

# 1970年代の網膜研究

——水平細胞の生理学を中心にして——

高橋 恭一

(受付 2015年4月17日)

## 1. はじめに

Du Bois-Reymond (1849) は魚類 (テンチ [コイ科の魚類の一種]) 眼球を摘出し、眼球の角膜側と後極側 (角膜の反対側の強膜を指す。) に電極を接触させると、角膜側が正 (陽性あるいはプラス) そして後極側が負 (陰性あるいはマイナス) となる電位差が存在することを見出した。この後、Holmgren (1865) は摘出した両生類 (カエル) 眼球の角膜表面と後極表面に電極を置き、眼球を光照射すると、光照射時および終了時に一過性の電氣的变化が生じることを観察した。さらに、Holmgren (1870, 1880) は眼球の前眼部を取り除き、網膜表面に置いた電極と後極表面との間に光照射・終了に伴う電氣的变化が現れることを確認し、これらの電氣的变化発生に網膜<sup>1)</sup> が関係していることを示唆した。その後、Dewar & McKendrick (1873a, b, & c), Gotch (1903), v. Brücke & Garten (1907), Einthoven & Jolly (1908), Piper (1911), Chaffee *et al.* (1923), そして Granit (1933) などが測定法を改良し、電氣的变化の発生機序に関する本格的な研究が始まった。現在、網膜の電位変化を描記したものを網膜電図 (Electroretinogram: ERG) と呼び、角膜側が後極側に対して正となる変動を上向きの振れとして表すことが国際的な決まりとなっている。

網膜電図では、光を照射したとき眼球の角膜側が一過性に負となった後大きく正に振れ、その後正の振れが持続し、光を遮断したとき一過性の正の振れを示すことが知られている (例えば、Brown, 1968)。これらの電位変化は、それぞれ a 波 (光照射直後の角膜側が負の一過性電位変化)、b 波 (光照射後 a 波に続く角膜側が正の電位電位)、c 波 (光照射が持続したときに現れる角膜側が正の電位変化) そして d 波 (光遮断直後の角膜側が正の一過性電位変化) と名付けられている (例えば、Brown, 1968)。網膜電図の波形は動物種や明暗順応<sup>2)</sup> の状態によって相当異なるが、調査された総ての動物種で観察されている (例えば、Granit, 1962)。Dewar (1877) はヒト眼球においても光照射に伴い電氣的变化が生じることを報じた。Kahn & Löwenstein (1924) はヒトの網膜電図の記録に初めて成功し、その後 Riggs (1941) はコンタクトレンズ型電極を開発して臨床応用が開始された。

網膜における光受容と視覚情報処理を調べる生理学的方法として網膜電図以外に、網膜の

出力細胞である神経節細胞の電氣的応答を導出する方法がある。Adrian (1927a, b, 1928) は、視神経線維束<sup>3)</sup>の発する活動電流を細胞外記録する方法を網膜研究に導入した。クロアナゴ (*Conger vulgaris*) とヨーロッパアカガエル (*Rana temporaria*) 網膜の視神経線維束から活動電流を細胞外記録し、光照射に伴う活動電流の発射頻度への影響を調査した。Hartline (1938) は Adrian の研究を発展させ、ウシガエル (*Rana catesbiana*) 網膜から単一視神経線維標本を作製して活動電位を細胞外記録し、光照射に伴い活動電位を持続的に発射する ON 型視神経線維、光遮断に伴い活動電位を持続的に発射する OFF 型視神経線維に加え、これらの何れに対しても一過性の発射を示す ON-OFF 型視神経線維の存在を見出した。その後、Hartline (1940a, b, c) は視神経線維が活動電位を発射する領域を調査し、受容野<sup>4)</sup>が存在することも明らかにした。Granit & Svaetichin (1939) は金属製微小電極を作製し、Hartline (1938) の方法よりも簡単に視神経線維の電氣的活動をモニターする方法を開発した。Granit (1947) はこの金属電極を利用し、網膜の色受容に関する実験を始めた。

金属(後に、ガラス管電極が登場する。)で作製された微小電極は、視神経線維が発する活動電位の細胞外記録のみならず網膜電図の記録にも使用され、この結果網膜電図の発生機序の解明が急速に進んだ。a 波が光受容に伴う視細胞の電氣的変化、b 波が主に双極細胞の電氣的変化(ミュラー細胞も関与している可能性がある。)、c 波が網膜色素上皮細胞の電氣的活動、d 波が光遮断に伴う視細胞の電氣的変化によることなどが明らかとなった。とはいえ、今でも網膜電図の各波形の成因が完全に解明されているわけではない。

Ling & Gerard (1949) は尖端孔径 1  $\mu\text{m}$  程のガラス管微小電極を作製し、筋細胞から電氣的活動を細胞内記録することに成功した。このガラス管微小電極は比較的大きな細胞である筋肉細胞から小型の細胞(例えば、神経細胞や感覚細胞など)へと適用範囲を広げていった。ガラス管微小電極の開発から4年後、Svaetichin (1953, 1955) は魚類網膜の単一神経細胞から電氣的変化を細胞内記録し、光照射に伴う膜電位変化を記録することに成功した。網膜内での電極尖端の位置から、膜電位変化を惹起する細胞は錐体であると結論したが、後に水平細胞に訂正された。1960年代に入ると、網膜のみならず神経組織や筋肉組織において細胞内記録法による研究は益々盛んとなり、生理学的研究法の主流となっていった。

脊椎動物中枢神経系を構成する神経細胞は小さく、運よく細胞へのガラス管微小電極の刺入(ガラス管微小電極は、神経細胞で最も大きな細胞体に刺入されることが多かった。)が成功しても、長時間安定した膜電位記録を得ることは容易でない。このため、神経研究を行う場合、入手と飼育が容易であることに加え、大型の神経細胞を有する実験動物が好んで使われた。脊椎動物に比して無脊椎動物の神経細胞は大型であるため、神経細胞の興奮性の研究には無脊椎動物が使用されることが多かった。一方、脊椎動物の網膜研究では魚類よりも大型の神経細胞を有するマッドパピー<sup>5)</sup>(サンショウウオの一種) (*Necturus maculosus*) が用

いられた（例えば、Bortoff, 1964）。この動物は眼球が小さいものの、網膜を構成する神経細胞数は少なくそして細胞体が大きいため、電極刺入が容易であると同時に、膜電位変化を長時間安定して記録することができるという利点を有していた。1960年半ば以降、脊椎動物の代表として両生類（例えば、マッドパピー以外にトラフサンショウウオ [*Ambystoma tigrinum*] やオオヒキガエル [*Bufo marinus*] など）が網膜研究において多用された。実際、マッドパピーを用いて、網膜を構成する総ての神経細胞の光応答（光照射に対する網膜内神経細胞の惹起する膜電位変化）が明らかとなった（例えば、Dowling & Werblin, 1969; Werblin & Dowling, 1969）。

Ling & Gerard (1949) によるガラス管微小電極の開発によって、神経組織を構成する単一神経細胞から膜電位変化を導出・記録することが可能となったが、残念ながら得られた膜電位変化が神経組織内の何れの細胞に由来するのかを特定することができなかった。この問題を解決すべく、ガラス管微小電極内に色素あるいは染料を充填し、電気的変化を導出・記録後、これらを細胞内に注入・染色する細胞内染色法が開発された。しかし、細胞内染色に適した染料・色素が少なく、この方法を用いてさえ細胞特定を行うことは容易でなかった。こんな折、Stretton & Kravitz (1968) は、細胞内染色のための色素として Procion yellow を開発することに成功した。この色素は拡散性が高いため、記録細胞の全体像を光学顕微鏡で詳細に観察することができるようになった（例えば、Kaneko, 1970）。Procion yellow が報告されて以降、細胞内染色には専らこの色素が用いられ、細胞内記録と組み合わせた研究によって多くの成果が得られた。1970年後半、電子顕微鏡観察にも利用できる Lucifer yellow や Horseradish peroxidase (HRP)（ただし、HRP は分子量が大きいため、ギャップ結合を通過しない。）が開発され、Procion yellow の代わりに用いられた（Light & Durkovic, 1976; Maranto, 1982; Muller & McMahan, 1976; Stewart, 1978, 1981）。

Svaetichin (1953, 1956) がガラス管微小電極による細胞内記録法を網膜研究に導入して15年が経過し、漸く網膜を構成する総ての神経細胞に惹起される膜電位変化（暗時の膜電位や光応答）が突き止められた（Werblin & Dowling, 1969）。1970年代に入り、網膜内神経細胞が形作る神経回路<sup>6)</sup>ならびにこの回路内のシナプス<sup>7)</sup> 接続とその伝達のしくみを究明するための研究が始まった。しかし、細胞内記録法と細胞内染色法の併用ではこれらを全うすることができず、新たな研究の開発・導入が必至となった。本論文では、1970年から1980年代初頭までの網膜の機能解明に適用された研究法とその成果を、特に水平細胞の生理学研究に着目して調査した。

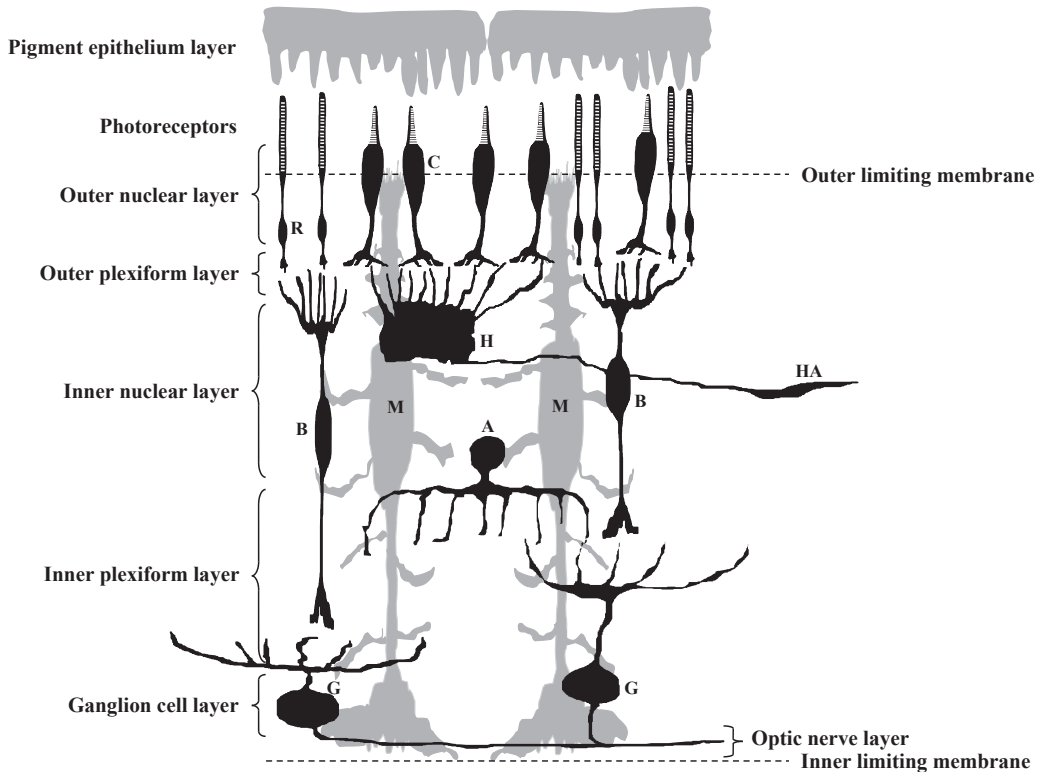
## 2. 網膜の構造と機能

脊椎動物の網膜構造は魚類から哺乳類までよく保存されている。特に、網膜を構成する神経細胞の種類（視細胞，双極細胞，水平細胞，アマクリン細胞と神経節細胞）とその配列は脊椎動物に共通している（第1図参照）。しかし、網膜研究が進むにつれ、昼行性動物と夜行性動物における視細胞の種類や配置の違い，中心窩<sup>8)</sup>と周辺網膜の神経細胞の構成と配置の違い，あるいは網膜内神経細胞のシナプス接続の動物種差などが報じられ，総ての脊椎動物で網膜構造が細部まで一致しているわけではないことが明らかになってきた。このような動物種による違いは，視覚情報処理（網膜機能）にも反映されていると推測された。

### 2.1 網膜の構造

Cajal<sup>9)</sup> (1892) そして Polyak (1941) は脊椎動物網膜の構造研究の先駆けであり，現在知られている網膜構造の大方を明らかにした。脊椎動物網膜は厚さが 100~300  $\mu\text{m}$  あり，組織学的に10層に分けられる（第1図参照）。強膜側から，色素上皮細胞層（Pigment epithelium layer），視細胞層（Photoreceptors），外境界膜（Outer limiting membrane），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），神経節細胞層（Ganglion cell layer），視神経線維層（Optic nerve layer），そして内境界膜（Inner limiting membrane）に分けられる。色素上皮細胞層を除く9層は，神経網膜と呼ばれる。このように，組織学的に網膜は神経網膜と色素上皮細胞層を合わせた膜状組織を指すが，生理学的に網膜は光受容ならびに視覚情報処理をする体内装置を指すため，視覚機能に直接関係ない色素上皮細胞層を除く傾向にある。つまり，生理学では網膜を神経網膜と同義で用いることが多い。本論文でも網膜は神経網膜を指し，色素上皮細胞層を含まない。

眼球内に入った光は角膜，房水や硝子体を通過し，内境界膜側から網膜各層を経て，最終的に視細胞（錐体と桿体）に到達する。視細胞で捉えられた光情報は，網膜（視細胞，双極細胞，水平細胞，アマクリン細胞と神経節細胞）で処理される（第1図参照）。外顆粒層には視細胞の細胞体，内顆粒層には双極細胞，水平細胞とアマクリン細胞の細胞体，そして神経節細胞層には神経節細胞の細胞体が存在する。また，外網状層では視細胞，双極細胞と水平細胞がシナプス接続，そして内網状層では双極細胞，アマクリン細胞と神経節細胞がシナプス接続している。神経網膜にはミュラー細胞と呼ばれる大型のグリア細胞が網膜を縦に貫いており，神経細胞の機能調節に関与していると考えられている。このミュラー細胞の両端が外境界膜と内境界膜を形成している。



第 1 図：脊椎動物網膜の構成（模式図）

脊椎動物には、球状の器官である眼球が一對備わっている。眼球の外壁は角膜あるいは強膜によって構成され、内部には房水、水晶体、硝子体、網膜、ブルッフ膜と脈絡膜などが存在している。

脊椎動物網膜は、5種類（錐体 [Cone [C]] と桿体 [Rod [R]]、水平細胞 [Horizontal cell [H]]、水平細胞の軸索終末 [Horizontal cell axon terminal [HA]]、双極細胞 [Bipolar cell [B]]、アマクリン細胞 [Amacrine cell [A]]、神経節細胞 [Ganglion cell [G]]）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、光感度の高い桿体（薄明視）と低い錐体（昼光視）に分類される。視細胞の外節部を視細胞層（Photoreceptors）、視細胞の細胞体が存在する部位を外顆粒層（Outer nuclear layer）、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）網膜からの出力細胞である神経節細胞がある層を神経節細胞層（Ganglion cell layer）そして神経節細胞からの軸索の走行する層を視神経軸層（Optic nerve layer）と呼ぶ。また、視細胞、双極細胞と水平細胞がシナプス接続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接続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）を経て脳に達する。網膜組織内にはグリア細胞の一種であるミュラー細胞（Müller cell [M]）そして視細胞の遠位側に色素上皮細胞層（Pigment epithelium layer）が存在する。ミュラー細胞は主に網膜内神経組織の物質代謝やイオン環境維持などを、また色素上皮細胞は明暗順応、視細胞外節の維持そして網膜運動現象に関わっている。このミュラー細胞の両端が内境界膜（Inner limiting membrane）と外境界膜（Outer limiting membrane）を形成している。



光は視細胞で電気的変化に変換後、双極細胞と水平細胞を経て、最終的にアマクリン細胞や神経節細胞に伝達される。そして、網膜内で処理された視覚情報は神経節細胞の神経軸索（視神経線維）を経て脳内の視覚中枢へと送られる。

## 2.2 網膜の機能

視神経線維に惹起される活動電位を細胞外記録し、光照射に伴う放電頻度（活動電位の発射頻度）の変化を調べる研究法は Adrian & Matthews (1927a, b, 1928) により開発・導入され、その後 Hartline (1938), Granit & Svaetichin (1939) そして Granit (1947) によって発展した。Granit (1947) は複数の動物種に金属製微小電極を適用し、網膜全体への単色光照射に対して惹起される視神経線維（神経節細胞の神経軸索を視神経線維という。）（注3参照）の電気的変化を細胞外記録し、狭い波長帯にしか応じない神経節細胞と幅広い波長帯の光刺激に応じる神経節細胞が存在することを見出し、それぞれを Modulator と Dominator と命名した。Modulator として青色、緑色そして赤色のそれぞれに最大感度を示す神経節細胞、そして Dominator として全波長に亘って応ずる神経節細胞（明暗を識別するための神経節細胞）が存在することを見出した。3つの Moduator が色覚そして Dominator が明暗に関係すると考え、これを Dominator-Modulator 学説として発表した。この学説は受容野が固定的且つ均一であることが前提となっているが、1950年以降、神経節細胞の受容野には光応答が拮抗する領域が存在すること、さらに神経節細胞の受容野には波長感受性が異なる領域が存在することなどが明らかにされ、その優位性は次第に薄れていった（例えば、Kuffler, 1953; Wagner *et al.*, 1960）。

Kuffler (1953) は金属製微小電極を用いてネコ (*Felis silvestris catus*) 網膜の神経節細胞から活動電位を細胞外記録し、この活動電位の放電頻度が受容野への光照射によってどのように変化するかを調べた。Hartline (1940a, b, c) の研究では興奮性を示す受容野のみが報じられたが、Kuffler (1953) は抑制領域が存在することを見出した。例えば、受容野の中心部を光照射すると、活動電位の放電頻度が増加し、また受容野の周辺部を光照射すると、活動電位の放電頻度が減少した。つまり、神経節細胞には全く逆の光応答を示す受容野が同心円状に配置していることを示している。このような受容野を、中心-周辺拮抗的受容野と呼ぶ。受容野中心部への光照射で放電頻度が増加し、周辺部照射で放電頻度が減少する神経節細胞を ON 型神経節細胞、逆の応答パターンを示す細胞を OFF 型神経節細胞と名付けた。さらに、ON 型神経節細胞の受容野中心部と周辺部の境界域において、ON-OFF 型応答が得られることも明らかにした (Kuffler, 1953)。Wagner *et al.* (1960) はキンギョ網膜の神経節細胞から活動電位を細胞外記録し、Kuffler (1953) の報じた中心-周辺拮抗的受容野の存在を確認した。さらに、刺激光として白色光ではなく単色光を用い、短波長光（青色光）照射に

に伴い ON 型応答を示す神経節細胞が長波長光（赤色光）照射に伴い OFF 型応答を示すこと、そして短波長光と長波長光照射で測定した受容野の大きさが異なることなども明らかにした。Wagner *et al.* (1960) の結果は、神経節細胞において反対色過程が成立していることを示唆していた。同様の実験は、コイ (*Cyprinus carpio*) 網膜でも報じられた (Motokawa *et al.*, 1960)。同時期、ON 型、OFF 型ならびに ON-OFF 型応答を示す神経節細胞がどのような膜電位変化を示すのかを調査すべく、神経節細胞へのガラス管微小電極の刺入が試みられた。この結果、㊶光照射開始に伴い脱分極が発生し、これに活動電位が重なる ON 型応答、㊷光照射開始に伴い過分極が発生するが、光照射終了に伴い過分極が脱分極に転じ、これに活動電位が重なる OFF 型応答、および㊸光照射開始のみならず終了に伴い脱分極が発生し、これに活動電位が重なる ON-OFF 型応答が細胞内記録された (Wiesel, 1959; Naka *et al.*, 1960; Tomita *et al.*, 1961)。

Svaetichin (1956) はブリーム（コイ科の魚種の一つ）あるいはパーチ（スズキ目パーチ科の魚種の一つ）網膜から S-potential を導出し、網膜を単色光照射したとき、過分極性応答のみを示す細胞、そして波長に依存して極性が変化する細胞が存在することを見出した。前者を Luminosity type (L 型) そして後者を Chromaticity type (C 型) と呼んだ。極性が反転する波長に違いがあることから、C 型には 2 種類存在することが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、Svaetichin (1956) は網膜内で Hering の反対色過程が成立していると考えられるようになった。Tomita (1963) も反対色過程を示す S-potential がコイ網膜から導出されることを報告した。数年後、Tomita *et al.* (1967) はコイ網膜の錐体から膜電位変化を導出することに成功し、網膜への単色光照射実験により、青色、緑色と赤色のそれぞれに最大過分極を示す 3 種の錐体が存在することを示した。この錐体での結果は、まさに Young-Helmholtz の三原色過程の証明であった。このように、網膜内で三原色過程（錐体）から反対色過程（S-potential を発生する細胞 [水平細胞]）への変換が行われることから、段階説（色を知覚する過程 [例えば、三原色過程と反対色過程] に階層性があるとする学説）が可能性が浮上してきた (Marriott, 1962; Tomita, 1965)。

1960年代の網膜研究に関するもう一つの大きな発見は、網膜内に動きを検出するしくみが備わっている可能性を示す実験結果が得られたことである。Miturana & Frenk (1963) はハト (*Columba livia*) 網膜の神経節細胞の活動電位を細胞外誘導し、光の動く方向や明暗の境界を検出する神経節細胞が存在することを明らかにした。Barlow & Hill (1963) もウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) 網膜を用い、ハトと同様の神経節細胞が存在することを報告した (Barlow *et al.*, 1964; Barlow & Levick, 1965)。

これらの網膜を構成する神経細胞の研究成果を踏まえ、1960年代末、網膜には形（神経節細胞で観察される中心-周辺拮抗的受容野の存在）、色（三原色 [青色、緑色と赤色] に最大

感度を示す錐体の存在および反対色応答を示す水平細胞や神経節細胞の存在)そして動き(光の動きを検出する神経節細胞の存在)といった特徴を抽出するしくみが備わっていると考えられていた。

### 3. 網膜研究の進歩 ——1970年頃から1980年代初頭まで——

動物(ヒトを含む。)の生きるしくみを明らかにすべく発達してきた生理学は、物理学・化学の進歩とともにその方法論を大きく発展させた。1940年後半、ガラス管微小電極を利用する細胞内記録法が開発され、動物の身体を構成する単一細胞の膜電位変化を直接測定することができるようになった。この手法を駆使して、筋肉細胞、神経細胞や感覚細胞などの興奮性細胞の研究が盛んに行われ、これらの成果は神経・筋・感覚生理学の礎を形成した。1960年代以降も、脳・脊髄そして各種の感覚器を解析するために細胞内記録法は積極的に活用され、単一細胞に惹起される膜電位変化に関する知見は相当蓄積した。しかし、神経組織や感覚器の機能を解明するには単一神経細胞や単一感覚細胞の解析だけでは不十分であり、神経組織や感覚器にある神経回路を明らかにし、この回路に含まれるシナプス(シナプスの微細構造とシナプス伝達のしくみ)や神経伝達物質(神経伝達物質の種類とその作用機序)などを解明する必要があった。このため、細胞内記録法に加え新たな研究法の開発が始まった。

#### 3.1 電気生理学的実験とその成果

##### 3.1.1 網膜標本と網膜灌流法

古くから、視細胞(桿体と錐体)と色素上皮細胞は網膜運動現象と呼ばれる生体反応を示すことが知られていた(Müller, 1856; Walls, 1942; Ali, 1975; Burnside & Nagel, 1983; Burnside, 2001)。暗順応時(暗所にて数十分以上飼育した動物の網膜の状態)、桿体の内節 Myoid<sup>10)</sup>は収縮、錐体の内節 Myoidは伸張、そして色素上皮細胞内に存在するメラニン顆粒(メラニン色素が細胞内のタンパク質を結合した状態)は強膜側へ移動する。これは、光感度の高い桿体を光の入射位置近く(角膜に近い位置)に、そして光感度の低い錐体を光の入射位置から遠く(角膜から遠い位置)に移動し、さらに桿体への光の進入を妨害しないよう色素上皮細胞内のメラニン顆粒を強膜側に集合させる生体反応である。反対に、明順応時(明所にて数十分以上飼育した動物の網膜の状態)、桿体の内節 Myoidは伸張、錐体の内節 Myoidは収縮、そして色素上皮細胞内のメラニン顆粒は神経網膜側へと移動する。この結果、桿体外節は色素上皮細胞層に覆われ、桿体は昼間の強光に曝されにくくなる。この網膜運動現象は魚類と両生類で顕著であり、爬虫類や鳥類でも観察されることが知られている。しかし、哺乳類では殆ど生じない。この網膜運動現象は明暗順応だけでなく、概日周期にも



応じることが知られている (Burnside & Nagel, 1983; Burnside, 2001)。

脊椎動物網膜を用いて実験を行うとき、一般的に実験動物を数十分～数時間暗所で飼育し、麻酔後頭部をギロチンで切断して眼球を摘出する。眼球前眼部(角膜、角膜に続く強膜と毛様体など)を剃刀にて切除し、ピンセットを用いて水晶体を摘出する、その後、硝子体を濾紙あるいは吸引により除去する。硝子体の粘性が高いとき、正常リンガー液に適量の *Collagenase* か *Hyaluronidase* あるいはこれらの両方を加え、数分から30分程放置し、濾紙あるいは吸引により除去する。これら一連の手術によって完成した標本は、眼盃網膜標本(あるいは眼盃標本)と呼ばれる。この標本は半球型であり、外側に強膜そして内部には色素上皮細胞層と神経網膜が存在する。半球型の眼盃網膜標本の開口部に濾紙を置き、天地を逆にして強膜を軽く押せば、神経網膜が色素上皮細胞層から離れて濾紙面に張り付く。ただし、視神経乳頭部で視神経線維束が強膜を貫いているため、眼球内の視神経乳頭部分を眼科用剪刀で切断すれば、神経網膜は強膜と色素上皮細胞層から剥がれ、視細胞が最上層そして神経節細胞が最下層の神経網膜のみの標本が完成する。この標本を剥離網膜標本と呼ぶ。多くの網膜実験では実験動物を少なくとも1時間以上暗所で飼育し、その後低照明下あるいは赤色照明下で上記の手術を行い眼盃網膜標本あるいは剥離網膜標本を作製し用いる。

*Svaetichin* (1953, 1956) が魚類網膜にガラス管微小電極を適用して膜電位変化を導出する実験を世界で初めて実施したとき、ブリーム(コイ科の魚種の一つ)あるいはパーチ(スズキ目パーチ科の魚種の一つ)を暗所ではなく、明所飼育して剥離網膜標本を作製し、光応答の導出・記録に挑んだ。当然、網膜運動現象により、桿体内節 *Myoid* は伸張し、桿体外節は色素上皮細胞層に入り込み、錐体内節 *Myoid* は収縮している。この状態で剥離網膜標本を作製すれば、色素上皮細胞層と一緒に桿体外節も神経網膜から剥がれ・除去される。結果として、錐体のみが残存する剥離網膜標本が完成する。実際、*Svaetichin* (1953) は論文の中に、錐体のみの剥離網膜標本の顕微鏡写真を掲載している。

作製直後の眼盃網膜標本あるいは剥離網膜標本はその表面が体液の薄層で覆われているに過ぎず、直ちに乾燥が始まる。さらに、標本作製の際に血管は切断されるため、血液循環はない。このため、網膜標本を構成する神経細胞は酸素ならびに栄養不足に曝され、さらに不要な代謝産物が増え続ける状況となる。このような網膜標本を、長時間の実験に使用することは難しい。従って、眼盃網膜標本のみならず剥離網膜標本を電気生理学的研究に用いる場合、網膜標本の劣化を防ぐため、標本を加湿し、酸素を供給することが一般的である。水平細胞から膜電位変化を導出し、波長依存性を調査する実験は数分から十数分以内に終了する。この程度の実験時間であれば、網膜内の水平細胞は概ね正常であり、得られた膜電位変化も正常であると見なすことができる。しかし、水平細胞から膜電位変化を導出し、波長依存性を調べた後、さらに通電実験を行うというような長きに亘る実験では、水平細胞が正常を維

持っていたのか否かを判断することは難しい。長時間の実験を行うために、成分（組成）、浸透圧や pH を細胞外液（血液）に近づけた人工的な生理的塩類溶液（リンガー液 [Ringer (1882a, b, 1883a, b) によって導入された生理的塩類溶液] ともいう。）を作製し、この溶液の中に網膜標本を置く方法が開発された（例えば、Furukawa & Hanawa, 1955）。リンガー液の使用は網膜標本の劣化を防ぐのみならず、網膜を一定のイオン環境に置くことができるという利点があった。1970年代に入ると、リンガー液の中に剥離網膜標本を置き、さらにこの溶液を灌流する方法が普及し、一つの網膜標本を用いて複数のイオンを交換する実験が行えるようになった。この灌流法は、網膜のイオン環境を変える実験のみならず、リンガー液に各種の薬剤（アゴニストやアンタゴニスト<sup>11)</sup>を含む。）を溶かし灌流投与することも可能なため、網膜電図のみならず網膜内の単一神経細胞に関する生理学的実験のみならず薬理学的実験にも貢献した。

### 3.1.2 電気生理学的実験に用いる機器・器具

1950年代、ガラス管微小電極を作製する際、先ず硬質の太いガラス管に熱を加えて伸ばし細いガラス管（例えば、外径 1 mm、内径 0.6 mm、長さ 10 cm）を作り、この細いガラス管の中央部分をマイクロバーナーで加熱して両端を手で引っ張るという方法を用いた。1950年代後半、U字に折り曲げた白金板（あるいは白金線）を加熱し、この白金線の内側に置いたガラス管の両端をバネで引っ張る電極作製機が登場した。この電極作製機の登場で、安定して良い電極を作製することができるようになった。1970年半ばを過ぎると、電極作製機の改良型が現れ、電極作製に多くの時間を割く必要がなくなった。

先端孔径が  $1\ \mu\text{m}$  かあるいはこれ以下のガラス管微小電極を使用して膜電位変化を導出・記録する際、ガラス管微小電極内に電解質溶液（例えば、3M-KCl）を充填する必要がある。ガラス管微小電極の先端にまで電解質溶液を充填するため、電極を溶液中で煮沸する方法が一般的であった（煮沸以外にも多くの方法があった。）。1960年の後半になると、二連式ガラス管微小電極が作製され、一方のガラス管微小電極で膜電位変化を測定し、他方のガラス管微小電極で通電刺激をする方法が普及した。結果として、細胞に惹起される膜電位変化の逆転電位の測定、ならびに膜電位変化時の膜抵抗の測定が可能となった（例えば、Toyoda *et al.*, 1969）。

ガラス管微小電極を神経細胞に刺入するには、電極を滑らかに且つ微動させることができる高精度マイクロマニピュレーターの開発が必要であった。ガラス管微小電極が使用され始めた1950年代には機械的マイクロマニピュレーター（顕微鏡で使用されている微動用機械的マニピュレータが使われた。）が主流であった。1970年代後半には、油圧式あるいは水圧式のマイクロマニピュレーターが開発され、 $1\ \mu\text{m}$  以下の移動さえ可能となった。

神経細胞から細胞内記録を得ようとする、神経細胞にガラス管微小電極を刺入し、その出力を前置増幅器と主増幅器を経由してオシロスコープへと導く必要がある。実験結果を保存するには、オシロスコープに現れる膜電位変化を写真撮影することが一般的であった。

1960年頃まで、細胞内記録に必要な機器・装置の殆どが手作りであり、電気に関する知識がなければ、この電気生理学的研究を行うことは困難であった。しかし、1970年代に入ると、実験用の機器・装置類を開発・製造するメーカーが現れ、1970年代後半には膜電位変化を磁気テープに保存することができるようになった。結果として、実験終了後磁気テープを再生して得られる膜電位変化を写真撮影あるいは周波数特性の優れたペンレコーダーを利用して記録紙上に描記すること、そして再生した膜電位変化を統計処理することも可能となった。

1990年以降、膜電位変化はデジタル化してハードディスクのような記憶媒体に保存し、またレーザープリンターなどに膜電位変化を印刷することも可能となった。

1970年代後半、実験機器・器具・装置などを手作りしなくともよい時代が到来したが、網膜標本を設置する実験箱（灌流槽）やリンガー液を一定の流速で灌流するための器具などについては、依然自作が一般的であった。

### 3.1.3 電気生理学的手法を駆使した視細胞の研究 ——光応答とイオン機序の解明——

Tomita *et al.* (1967) は、コイ網膜錐体が暗時に脱分極した状態にあり、光照射に伴い過分極することを報告した。その後、マッドパピーとトッケイヤモリ (*Gekko gecko*) 網膜を用い、錐体のみならず桿体でも光照射に伴って過分極することが明らかとなった (Toyoda *et al.*, 1969)。

Toyoda *et al.* (1969) は二連式ガラス管微小電極を活用し、暗時と光照射時の視細胞の膜抵抗を測定した。光照射に伴い膜抵抗は増大し、しかもこの増大は光強度の上昇に伴いより顕著となった。また、細胞内通電によって視細胞を過分極させたとき、光応答の振幅は増加し、反対に脱分極させたとき、光応答の振幅は減少した。脱分極性通電によって視細胞の膜電位を 0~10 mV に保持すると、光応答の極性が反転することも明らかとなった。これらの結果は、視細胞の光応答発生にナトリウムイオン ( $\text{Na}^+$ ) が関与していることを強く示唆していた (Toyoda *et al.*, 1969)。

Sillman *et al.* (1969a, b) は視細胞の光応答の発生に関与するイオンを特定するため、ウシガエル網膜を L-アスパラギン酸処理 (4.4.2b 参照) して第二次神経細胞以下の活動を抑え、視細胞の電気的活動を細胞外記録し、視細胞周辺のイオン環境を変える実験を行った。この結果、 $\text{Na}^+$  が視細胞の光応答発生に必須であることが明らかとなった。Hagins *et al.* (1970) はラット (野生のドブネズミを改良して作られた実験用ネズミ) (*Rattus norvegicus*)

網膜の桿体外節に発生する膜電流変化を細胞外記録する方法を開発し、暗時に内節から外節方向に向かって流れる電流（暗電流と呼ぶ。）が存在することを発見した。そして、この電流は光照射によって減弱し、細胞外の  $\text{Na}^+$  に依存していることを見出した。また、Korenbrodt & Cone (1972) はヒョウガエル (*Rana pipiens*) とアルビノクマネズミ (*Rattus Rattus*) 網膜の桿体を用い、光照射に伴い  $\text{Na}^+$  の透過性が変化する部位は外節であることを明らかにした (Korenbrodt & Cone, 1972)。続いて、Cervetto (1973) はアカミミガメ (*Pseudemys scripta elegans*) の視細胞から膜電位変化を細胞内記録し、視細胞周辺の  $\text{Na}^+$  を他の一価陽イオンに置換すると、視細胞は過分極し、光応答が消失することを報じた。同様の結果は、オオヒキガエル網膜の視細胞でも得られた (Brown & Pinto, 1974)。最終的に、Yaw *et al.* (1977) はオオヒキガエル網膜の単一桿体外節全体をガラス管吸引電極で覆い、外節に惹起される膜電流を導出する方法を考案し、暗電流（暗時に視細胞外節に流れる膜電流）が  $\text{Na}^+$  によることを確定し、1 光子の吸収が 1 pA の電流発生をすることなどを明らかにした (Baylor *et al.*, 1979)。

以上の結果から、視細胞の暗時の膜電位ならびに光応答に  $\text{Na}^+$  が関与していることは明らかである。しかし、光照射に伴い視細胞外節内で生じる光化学変化ならびに外節膜に発現する光感受性イオンチャネルの開閉機構<sup>12)</sup> などについては十分な研究は行われておらず、これらが解明されるには今暫くの時間が必要であった。

### 3.1.4 細胞内記録法を利用した網膜研究

Svaetichin (1953, 1956) は網膜研究にガラス管微小電極を導入し、網膜を構成する単一神経細胞を対象とした細胞内記録を開始した。Svaetichin が記録した細胞の特定を巡って混乱が生じ、この解決に10年余を要した。この間、細胞内記録法に加え、新たに細胞内染色法が開発されたが、有効な染料・色素が見つからず、この染色法は十分に機能したとは言い難かった。しかし、Werblin & Dowling (1969) はマッドパピー網膜にガラス管微小電極を適用し、網膜を構成する神経細胞から光応答を導出・記録すると同時に、光応答を発生する細胞を Niagara sky blue によって細胞内染色し、網膜を構成する総ての神経細胞の電気的変化を明らかにした。この研究によって、視細胞、双極細胞、水平細胞とアマクリン細胞（一部）が緩電位応答を、そしてアマクリン細胞の一部と神経節細胞が活動電位を発生する神経細胞であることが明らかとなった。つまり、網膜内での視覚情報処理は基本的に緩電位で行われ、網膜から脳への出力に神経節細胞に惹起される活動電位が使われている。

Svaetichin (1953, 1956) から Werblin & Dowling (1969) までの網膜研究の成果を踏まえると、網膜における視覚情報処理のしくみを解明するには、㊦視細胞における光-電気変換機構、㊧水平細胞に見られる反対色応答の発生機序、㊨ON型双極細胞に発生する脱分極



性光応答の発生機序，㊦ ON-OFF 型アマクリン細胞および ON-OFF 型神経節細胞の光応答の発生機序，そして㊧網膜内神経細胞が形成する神経回路とこの回路内での神経細胞のシナプス接続とその伝達（神経伝達物質の種類とその作用を含む）などの解析が必須であった。幸いなことに，1970年以降，電気生理学的研究以外に，細胞内染色と組わせた電子顕微鏡による微細観察，オートラジオグラフィ法や免疫組織化学法などの新たな研究法が開発され，網膜研究は一層の発展を見せた。特に，上記㊧に関する研究の進展は顕著であった。

Baylor *et al.* (1971) によって，水平細胞から錐体に抑制性シナプスが存在することが報じられた。このシナプスの解析にオートラジオグラフィ法，免疫組織化学法や電子顕微鏡による微細観察などが導入され，結果としてこのシナプスは三原色過程から反対色過程への変換に関与している可能性が示された (Lam & Steiman, 1971; Lam, 1972; Fuortes & Simon, 1974; Stell *et al.*, 1975; Lam *et al.*, 1978)。また，Kaneko (1970) によって報告された双極細胞の中心-周辺拮抗的受容野の周辺部応答の形成に，水平細胞から錐体への抑制性シナプスが関与している可能性も示された (Toyoda & Tonosaki, 1978; Marchiafava, 1978)。このように，Svaetichin (1953, 1956) による細胞内記録が報じられて15年以上経過し，漸く水平細胞の機能解析が進展し始めた。

1970年代，網膜を構成する神経細胞がどのような神経回路を形成しているのか（神経回路の解明），そしてこの神経回路における情報伝達にどのようなしくみが備わっているのか（神経回路を形成する神経細胞のシナプス接続とその伝達のしくみの解明）に関する研究が主流であった。

### 3.2 電気生理学以外の研究法とその成果

#### 3.2.1 電子顕微鏡を利用した網膜研究

Cajal (1892) は Golgi (1873) の開発した Golgi 鍍銀染色法<sup>13)</sup> を活用し，脊椎動物網膜の神経構築を光学顕微鏡で解析し，網膜を構成する神経細胞の種類やその形態のみならずこれらの神経細胞の接続を予測した。この後も，網膜を構成する神経細胞の種類やこれらの細胞が形成する層状構造に関する形態学的研究は継続して行われた (Polyak, 1941)。しかし，光学顕微鏡では神経細胞ならびに神経細胞間シナプスの微細構造を観察することは困難であった。1930年代に電子顕微鏡<sup>14)</sup> が開発され，1950年代に網膜の微細構造の研究が開花した。

Sjöstrand (1953a, b) は電子顕微鏡を網膜研究に取り入れ，網膜を構成する神経細胞の微細構造の観察を開始した。この技術は次第に普及し，De Robertis (1956)，Ladman (1958)，Cohen (1960)，Villegas (1960)，Yamada (1960) そして Nilsson (1964) によって視細胞の微細構造の研究が行われた。その後，Golgi 鍍銀染色法と電子顕微鏡観察を組み合わせた手技が開発され，Evans (1966)，Stell (1967)，Dowling & Boycott (1966) と



Lasansky (1971) が網膜内のシナプス構造の解明に乗り出した。まず、視細胞終末部の構造が調査され、桿体には spherule そして錐体には pedicle と呼ばれる膨大部が存在することが明らかとなった (Dowling & Boycott, 1966; Kolb, 1970)。何れの視細胞の終末部の膨大でも、細胞膜が大きく陥入 (Invagination) する構造が認められ、双極細胞と水平細胞はこの陥入内部に神経突起を伸ばし、これら 3 細胞が三つ巴構造 (Triad) を形成してシナプス接続することが報じられた (Stell & Lightfoot, 1975; Stell *et al.*, 1975)。また、これらの視細胞のシナプス終末にはシナプスリボン (Synaptic ribbon) と呼ばれる構造が存在することも見つかった (Stell & Lightfoot, 1975; Stell *et al.*, 1975)。

外網状層のみならず内網状層も電子顕微鏡による研究が始まり、内網状層の層状構造が詳細に解明された。特に、双極細胞とアマクリン細胞および双極細胞と神経節細胞のシナプス接続に関する知見が数多く蓄積した (Kidd, 1962; Dubin, 1970; Kolb & Famiglietti, 1974, 1976; Famiglietti & Kolb, 1976; Kolb, 1979)。1970年代後半、Lucifer yellow や Horseradish peroxidase を充填したガラス管微小電極で膜電位応答を導出・記録し、これらを細胞内に注入後光学顕微鏡のみならず電子顕微鏡で観察する技法が開発され、神経細胞やシナプスの微細構造の形態観察のみならず神経回路を形成するシナプス接続とその方向を決定するためにも活用された。

### 3.2.2 オートラジオグラフィ法・免疫組織化学法を活用した網膜研究

1950年代、脳内に存在する  $\gamma$ -アミノ酪酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, 略して GABA と言う。) が重要な役割を演じられていることが明らかになって以降、神経系における化学物質の重要性が脚光を浴びるようになった。1970年代、化学シナプスではどのような物質が神経伝達物質<sup>15)</sup> として放出され、これらがどのように作用するのかを明らかにしようとする機運が高まった。

神経組織を放射性同位元素 (例えば,  $^3\text{H}$  [三重水素, トリチウム],  $^{14}\text{C}$  [炭素14],  $^{32}\text{p}$  [リン32],  $^{35}\text{S}$  [イオウ35] など) で標識した化学物質 (例えば, 代謝物質や神経伝達物質など) を含むリンガー液中に放置し、一定時間経過後に神経細胞に取り込まれた物質が発する放射線 ( $\beta$  線) を検出する方法が開発された。この方法はオートラジオグラフィ法と呼ばれ、特定の化学物質が神経組織内のどの神経細胞に取り込まれるのか (あるいは存在するのか) を明らかにするために用いられた。組織内に分布する物質の局在を解析できるため、1970年代以降の網膜研究で多用された。神経伝達物質候補である L-グルタミン酸, GABA やグリシンを  $^3\text{H}$  で標識後、これを含むリンガー液に網膜を一定時間放置し、この網膜の顕微鏡切片を作製する。この切片に感光乳剤を塗布し、 $^3\text{H}$  が発する放射線に露出させる。これを現像後実際の組織像と照合させることによって、神経伝達物質の局在が明らかとなる。光学顕微鏡のみ

ならず電子顕微鏡でもオートラジオグラフィ法が適用できるため、神経終末のシナプス部での化学物質の局在を観察することが可能であった。実際、 $^3\text{H}$ で標識したGABAを利用した実験において、GABAが水平細胞に取り込まれ、この細胞の神経伝達物質である可能性が高いことが示された (Lam & Steiman, 1971; Lam, 1972; Lam *et al.*, 1978)。また、同様の方法で、L-アスパラギン酸あるいはL-グルタミン酸が視細胞の神経伝達物質候補であることが報じられた (Marc & Lam, 1981b)。

1970年代に入ると、抗体を作製する技術が向上し、細胞内で代謝に関与する物質などの抗体を作製することができるようになった。これを利用して、神経組織における抗原の局在やこれに関連する細胞要素を可視化できるため、物質の局在を調査するために極めて有効な技術であった。この方法は、免疫組織化学法と呼ばれている。予め作製した当該タンパク質の一次抗体を組織切片に作用 (抗原抗体反応) させ、その後蛍光色素あるいは金属で標識した二次抗体を一次抗体に作用させて光学顕微鏡で観察する。金属で標識した二次抗体を用いれば、電子顕微鏡観察も可能である。この方法で、網膜内神経細胞に存在する各種物質 (主にタンパク質) の局在を明らかにすることができると同時に、細胞表面などに発現するレセプタータンパク質の局在を検索することも可能となった。1970年代末、細胞内でGABAを合成するグルタミン酸デカルボキシラーゼの抗体を用い、水平細胞とアマクリン細胞がGABAを神経伝達物質として放出している可能性を示した (Lam *et al.*, 1979; Vaughn *et al.*, 1981)。

これらの技術は光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡による形態観察であるが、実際には網膜での視覚情報処理における物質基盤を解明するための生理学的手法であり、1990年頃からこの免疫組織化学的技術は飛躍的な進歩を見せる。

### 3.3 電気生理学と電気生理学以外の研究法の連携

#### 3.3.1 網膜内の ON 経路, OFF 経路と ON-OFF 経路

視細胞 (錐体と桿体) は光照射に伴い過分極性応答を発生する。不思議なことに、第二次神経細胞である双極細胞<sup>16)</sup>には光照射に伴い過分極性応答を示すタイプ (OFF型双極細胞) と脱分極性応答を示すタイプ (ON型双極細胞) が存在する (Dowling & Werblin, 1969; Werblin & Dowling, 1969)。さらに、第3次神経細胞であるアマクリン細胞や神経節細胞にはON型とOFF型に加え、ON-OFF型が出現する (例えば、Werblin & Dowling, 1969)。

Kaneko (1970) はキンギョ (*Carassius auratus*) 網膜の双極細胞の膜電位変化を細胞内記録し、ガラス管微小電極の刺入部をスポット光 (100  $\mu\text{m}$  [0.1 mm] の円形の微小光) と環状光 (内径 0.5 mm, 外径 3.5 mm のドーナツ型光) で照射し、発生する光応答を調べた。ON型双極細胞ではスポット光照射に伴い脱分極性応答が、また環状光照射に伴い過分極性応答が惹起された。そして、OFF型双極細胞では、ON型と正反対の光応答がそれぞれの光

刺激で現れた。両双極細胞共に中心-周辺拮抗的受容野を有していることが判明した。Werblin & Dowling (1969) も、マッドバピー網膜で同様の結果を得ている。これらの報告は、中心-周辺拮抗的受容野は双極細胞で形成され、神経節細胞にシナプス伝達されることを示唆している（例えば、Kuffler, 1953; Wagner *et al.*, 1960）。

Raviola & Gilula (1975) はサル (*Macaca mulatta* と *Macaca arctoides*) とウサギ網膜の視細胞と双極細胞の間のシナプス接続を電子顕微鏡観察し、ON型双極細胞は *Invaginating type*, そしてOFF型双極細胞は *Flat type* のシナプスを形成することを発見した。その後、Stell *et al.* (1977) もキンギョ網膜において視細胞と双極細胞の間のシナプス接続を電子顕微鏡観察し、ON型双極細胞はシナプスリボンがある部分 (*Inverginating type*) で、OFF型双極細胞はリボンシナプスがない部分 (*Flat type*) で視細胞とシナプス接続していることを確認した。

Famiglietti *et al.* (1977) はコイ網膜のON型とOFF型双極細胞から光応答を導出・記録後、Procion yellow をこれらの細胞に注入し、光学顕微鏡を利用してこれらの細胞の終末部の形態を観察した。この結果、ON型双極細胞は内網状層のb層（内網状層のより近位側の部分）でON型神経節細胞と、そしてOFF型双極細胞は内網状層のa層（内網状層のより遠位側の部分）でOFF型神経節細胞とシナプス連絡していることを明らかにした。ネコ網膜でも同様の結果が得られ、さらにON-OFF型神経節細胞は内網状層のa層とb層の両方でシナプス結合していることも明らかとなった (Nelson *et al.*, 1978)。

以上の結果から、網膜内でON型双極細胞からON型神経節細胞、OFF型双極細胞からOFF型神経節細胞、そしてON型双極細胞とOFF型双極細胞からON-OFF型神経節細胞へのシナプス接続により、ON経路、OFF経路およびON-OFF経路が形成されることが考えられる。後年、哺乳動物網膜では錐体がON型およびOFF型双極細胞とシナプス接続するが、桿体はON型双極細胞としかシナプス接続しないことが報じられ、ON経路、OFF経路およびON-OFF経路の形成に動物種差が存在する可能性が浮上してきた（例えば、Dacheux & Raviola, 1986; Müller *et al.*, 1988; Wässle *et al.*, 1991）。

### 3.3.2 網膜内の第6番目の神経細胞 —— Interplexiform 細胞の発見 ——

脊椎動物網膜には、5種類の神経細胞が存在する（例えば、Cajal, 1892; Polyak, 1941）（第1図参照）。1970年代半ば、細胞体が内顆粒層（アマクリン細胞の細胞体の付近）に存在し、この樹状突起が外網状層内および内網状層内でシナプスを形成する第6番目の神経細胞が発見され、Interplexiform細胞（IP細胞あるいは間網状細胞とも呼ばれることがある。）と名付けられた (Boycott *et al.*, 1975; Dowling & Ehinger, 1975, 1978)。Interplexiform細胞は魚類から哺乳類までの多くの脊椎動物種（コイ、キンギョ、トラフサンショウウオ、トカゲ、

カメ、ラット、サルそしてヒトなど）で確認されている（例えば、Gallego, 1971; Dowling & Ehinger, 1975; Hashimoto & Inokuchi, 1980）。キンギョ網膜に免疫組織化学法を適用し、Interplexiform 細胞にドーパミンを放出するタイプとグリシンを放出するタイプの2種類が存在することを明らかにした（Marc & Liu, 1984; Kalloniatis & Marc, 1990）。ドーパミンを放出する Interplexiform 細胞は内顆粒層内で脳（嗅球）が発する遠心性神経細胞からシナプス入力を受け取り、少なくとも水平細胞にシナプス出力していることが明らかとなっている（Boycott *et al.*, 1975; Dowling & Ehinger, 1975; Dowling *et al.*, 1976; Zucker & Dowling, 1987）。

1970年代後半には水平細胞に対する Dopamine の作用が詳細に調べられ、この細胞の受容野サイズに大きく影響することが報告された（Hedden & Dowling, 1978; Negishi & Drujan, 1979a, b, c）。その後、Dopamine は水平細胞間の電気シナプス<sup>17)</sup>（ギャップ結合）を修飾することが明らかとなった（Teranishi *et al.*, 1983）。Interplexiform 細胞は網膜内に細胞体を持つ網膜内神経細胞であるが、脳からの遠心性神経細胞によって機能するため、網膜内で視覚情報処理に当たる5種類の神経細胞（視細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞と神経節細胞）とは区別される。このため、網膜を構成する神経細胞に Interplexiform 細胞を含めないことが多い。

#### 4. 水平細胞の研究 ——1970年頃から1980年代初頭まで——

1960年半ば以降、ガラス管微小電極を用いた細胞内記録法と細胞内染色法が普及し、網膜を構成する神経細胞の形態と電氣的応答（暗時の膜電位、光応答と受容野）の対応付けが進んだ（Werblin & Dowling, 1969）。結果として、ガラス管微小電極を用いて網膜細胞から膜電位変化を導出したとき、暗時の膜電位、光応答波形、波長感受性や受容野サイズと受容野内の光刺激に対する応答性を調べれば、細胞内染色を行わなくとも、細胞を特定することが可能となった。1970年代に入り、網膜を構成する神経細胞に惹起される膜電位変化の発生機序を究明しようとする機運が高まった。しかし、視細胞や双極細胞などのような小型の神経細胞への電極刺入し、そして細胞内に刺入した電極を長時間保持することは依然難しい時代であった。

水平細胞は大型の神経細胞であり、ガラス管微小電極の刺入ならびに長時間保持が比較的容易であるため、1970年以降も網膜生理学では好個の細胞であった。この時代に、視細胞から水平細胞への興奮性シナプス、水平細胞から錐体へ抑制性シナプス、水平細胞間の電気シナプスなどの研究が始まり、水平細胞から錐体への抑制性シナプスが双極細胞（や神経節細胞）の中心-周辺拮抗的受容野ならびに水平細胞の反対色応答の形成に関与していることが

明らかとなった（4.4の項参照）。

#### 4.1 水平細胞の形態と網膜内での位置

脊椎動物網膜は5種類の神経細胞（視細胞，双極細胞，水平細胞，アマクリン細胞と神経節細胞）が層状構造を成している（第1図参照）。水平細胞は細胞体が比較的大きく，多くの樹状突起を伸展している。水平細胞の細胞体は内顆粒層に位置し，この細胞の樹状突起は外網状層内で視細胞（あるいは双極細胞）とシナプス接続している。哺乳動物では，細胞体に短い神経軸索を有する水平細胞と，比較的に長い神経軸索と広範な樹状突起を拡げる軸索終末を有する水平細胞の2種類が知られている（例えば，Kolb, 1974; Nelson *et al.*, 1975）。魚類網膜の水平細胞の種類は色覚の有無と密接に関係しており，色覚を有しない魚種では2種類（例えば アメリカナマズ [*Ictalurus punctatus*]），色覚を有する魚種では3種類以上（キンギョやコイ）が一般的である。下等脊椎動物網膜（魚類，両生類と爬虫類）の水平細胞では，軸索終末の発達が哺乳類ほど顕著ではないことが知られている（例えば，Stell, 1975 [魚類]; Leeper, 1978 [両生類]; Stephen & Weiler, 1981 [爬虫類]）。

魚類は入手と飼育が容易であることに加え，魚類網膜水平細胞にはガラス管微小電極の刺入が容易で，そして細胞内記録を長時間保持できるため，1970年以降も水平細胞研究ではマッドパピーのような両生類よりも多用された。キンギョ，コイそしてアメリカナマズは実験動物の代表であった。色覚に関する電気生理学的研究ではコイとキンギョが良く用いられた。コイ網膜には1種類の桿体水平細胞と3種類の錐体水平細胞が存在する（例えば，Mitarai *et al.*, 1974; Hashimoto *et al.*, 1976）。内顆粒層内で水平細胞は三層構造を形成し，煉瓦を重ねたように配置されている。第一層（最外層）にはL型水平細胞が，第二層（外層）にはC型水平細胞が，そして第三層（内層）にはL型とC型水平細胞が混在している。第三層には第一層と第二層から延びた神経軸索と終末も存在する。またL型水平細胞の中で桿体から入力を受け取る水平細胞は第二層と第三層の間に存在している。色覚を有しないアメリカナマズや紫外線を視覚として利用しているウグイなどでは，水平細胞の種類や内網状層内での存在様式はそれぞれ異なっている（例えば，Naka & Carraway, 1975; Fukurotani & Hashimoto, 1984; Hashimoto *et al.*, 1988）。

#### 4.2 水平細胞の機能

Maksimova (1969) はキタカワカマス (*Esox lucius*) 網膜のL型 S-potential<sup>18)</sup> から膜電位変化を細胞内記録すると同時に，神経節細胞の発する活動電位を細胞外記録し，S-potentialを発生する細胞（水平細胞）に与えた細胞内通電刺激が神経節細胞に与える影響について調べた。例えば，赤色光（波長 700 nm の光）照射には反応せず，青色光（波長 470 nm の光）



照射に対して活動電位を発生する神経節細胞から細胞外記録を行い、S-potential を発生する細胞（水平細胞）に脱分極性通電を行うと、この神経節細胞の発する活動電位の頻度は減少した。反対に、この水平細胞に過分極性通電を行うと、活動電位の頻度は増加した。この実験はS-potential を発生する細胞（水平細胞）が神経節細胞の光応答形成に関与していることを強く示唆している。本研究は水平細胞の機能解析を試みた最初の実験であったが、水平細胞の機能を解明するまでには至らなかった。

Baylor *et al.* (1971) はアカミミガメ網膜の錐体から膜電位変化を細胞内記録し、光照射する網膜の領域（光照射面積）を増大させると、過分極性の光応答の最大値からの暗時の膜電位までの回復時間が光照射面積が大きいと速いことを見出した。この原因を探るべく、錐体と水平細胞の同時記録を行い、水平細胞に過分極性通電を実施すると、錐体に脱分極性の膜電位変化が惹起されることを観察した。これは、水平細胞から錐体に対して抑制性シナプス（負のフィードバックシナプスとも呼ばれる。）が存在していることを示唆している。この研究に続いて、Fuortes & Simon (1974) はアカミミガメ網膜を用い、3種類の錐体と3種類の水平細胞（1種類のL型水平細胞と2種類のC型水平細胞）のシナプス接続を詳細に調査し、水平細胞から錐体への抑制性シナプスが三原色過程から反対色過程への変換に関与している可能性を示した。この報告を踏まえ、Stell *et al.* (1975) はキンギョ網膜外網状層の電子顕微鏡観察を実施し、水平細胞から錐体への抑制性シナプスが三原色過程から反対色過程への変換に関与するモデル（仮説）を発表した。

Toyoda & Tonosaki (1978) はコイ網膜のL型水平細胞と近隣（50  $\mu\text{m}$  以内）のON型双極細胞から同時に膜電位変化を導出し、水平細胞に脱分極性通電を行うと双極細胞には脱分極が、そして水平細胞に過分極通電を行うと双極細胞には過分極が発生することを明らかにした。また、通電によって双極細胞に惹起される膜電位変化の膜抵抗を測定し、通電による膜電位変化がシナプスを介していることを示唆した。同様の結果は、カメ網膜でも報告された (Marchiafava, 1978)。これらの実験は、双極細胞の受容野中心部応答は視細胞によって、そして受容野周辺部応答は水平細胞によって形成されることを示唆しており、周辺部応答のメカニズムとして水平細胞から錐体への抑制性シナプスが有力であった (Toyoda & Tonosaki, 1978)。

以上の結果から、下等脊椎動物網膜の外網状層内で水平細胞は錐体に対してシナプス出力しており、このシナプスは抑制性であることが明らかとなった (4.4.3参照)。この抑制性シナプスは、錐体の三原色過程から水平細胞の反対色過程への変換に寄与すると同時に、双極細胞の中心-周辺拮抗的受容野の周辺部応答の形成にも寄与している可能性が示された。これらを踏まえ、水平細胞は色と形に関する網膜内視覚情報処理に重要な役割を演じていることが予想された。

### 4.3 水平細胞の膜電位変化とそのイオン機序

1960年代半ば、化学シナプスにおいて神経細胞の終末に蓄えられた神経伝達物質が放出されるには、終末が脱分極することに加え、終末内部のカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 濃度上昇が必要であることが明らかとなった (Katz & Miledi, 1965, 1967; Miledi & Slater, 1966)。 $\text{Ca}^{2+}$  以外に二価イオンであるマグネシウムイオン ( $\text{Mg}^{2+}$ )、マンガンイオン ( $\text{Mn}^{2+}$ ) やコバルトイオン ( $\text{Co}^{2+}$ ) などは、シナプスを修飾することが報じられた (del Castillo & Katz, 1954a, b; Katz & Miledi, 1965, 1967; Miledi & Slater, 1966; Meiri & Rahamimoff, 1971; Weakly, 1973)。これらの知見は、網膜研究にも活用された。Dowling & Ripps (1973) は、 $\text{Mg}^{2+}$  が水平細胞を過分極させ、光応答を消失させることを明らかにした。さらに、Keneko & Shimazaki (1975) は二価イオンのシナプス遮断効果を巧みに利用し、水平細胞の膜電位変化のイオン機序を調べる実験を行った。まず、 $\text{Ca}^{2+}$  を除去し、20 mM の  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した修飾リンガー液でコイ剥離網膜を灌流すると、暗時の膜電位 ( $-20 \sim -40$  mV) が  $-70$  mV 付近にまで過分極し、これに伴って光応答は徐々に減弱し、やがて消失することを確認した。この修飾リンガー液で網膜を灌流中、 $\text{Na}^+$  や塩化物イオン ( $\text{Cl}^-$ ) の濃度を変化させても、水平細胞の膜電位に顕著な影響は認められなかった。ところが、カリウムイオン ( $\text{K}^+$ ) 濃度を変化させると、水平細胞の膜電位は細胞外の  $\text{K}^+$  濃度に依存して変化することを見出した。10 mM 以上の  $\text{K}^+$  濃度では、水平細胞の膜電位は Nernst の式から予想される変化を示すことが明らかとなった。次に、 $\text{Na}^+$  を完全に除去したリンガー液で網膜を灌流すると、 $\text{Mg}^{2+}$  を添加したときのように、暗時の膜電位は  $-70$  mV 付近まで過分極し、水平細胞の光応答は完全に消失した。この後、正常リンガー液に戻すと、水平細胞の膜電位は脱分極し、一時的に細胞膜内外の電位が逆転することを発見した。この電位の逆転に基づき、Kaneko & Shimazaki (1975) は水平細胞の暗時の膜電位 (脱分極した状態) に  $\text{Na}^+$  が関与していると推測した。

以上の結果から、水平細胞は暗時に  $\text{Na}^+$  に対する透過性が高いため脱分極した状態にあるが、明時 (光照射時) に  $\text{Na}^+$  の透過性が減弱あるいは消失し、 $\text{K}^+$  の平衡電位 ( $-70$  mV 付近かあるいはさらに負の膜電位) に近づくため過分極すると推測された。また、C型水平細胞に惹起される脱分極性光応答については、水平細胞から錐体への抑制性シナプスが動作することにより、結果として水平細胞の  $\text{Na}^+$  透過性が暗時よりも増加するためと推測された。

### 4.4 水平細胞のシナプス接続

#### 4.4.1 水平細胞間に存在する電気シナプス

1960年代初頭、S-potential の発生機序を解明するため、ガラス管微小電極を利用して魚類網膜から S-potential を細胞内記録し、この電極を通じて細胞内通電を行い S-potential を発

生する細胞の膜電位を強制的に変化させる実験が行われた。残念ながら、細胞内通電を実施しても、光応答への顕著な影響は認められなかった (Gouras, 1960; Tasaki, 1960; Watanabe, 1960)。さらに、S-potential を発生する細胞の膜抵抗を測定するために、暗時ならびに光照射時にガラス管微小電極を通じてパルス状の細胞内通電を行ったが、不思議なことに膜抵抗変化は認められなかった (Watanabe, 1960; Tomita & Kaneko, 1965)。Tomita & Kaneko (1965) は長時間の光照射を行うと、徐々に膜抵抗が増加し、また光照射終了時に膜抵抗が徐々に減少する細胞が存在することを報じている。これらの報告は S-potential の発生にイオンが関与せず、このため逆転電位も存在しないことを示唆していた (S-potential が細胞内記録であることさえ疑わしいことを意味している)。しかし、細胞内通電の強度を上げ、S-potential を発生する細胞の膜電位を 100~200 mV 変化させると、過分極性通電では S-potential が大きく、また脱分極性通電では小さくなることが判明した (Tomita, 1965)。また、Toyoda *et al.* (1969) はマッドバピー網膜から S-potential を導出して暗時と光照射時の膜抵抗を測定し、光照射時に膜抵抗が増大することを明らかにした。ちょうどこの頃、Werblin & Dowling (1969) ならびに Kaneko (1970) によって、S-potential が水平細胞に惹起される膜電位変化であることが明らかにされた。

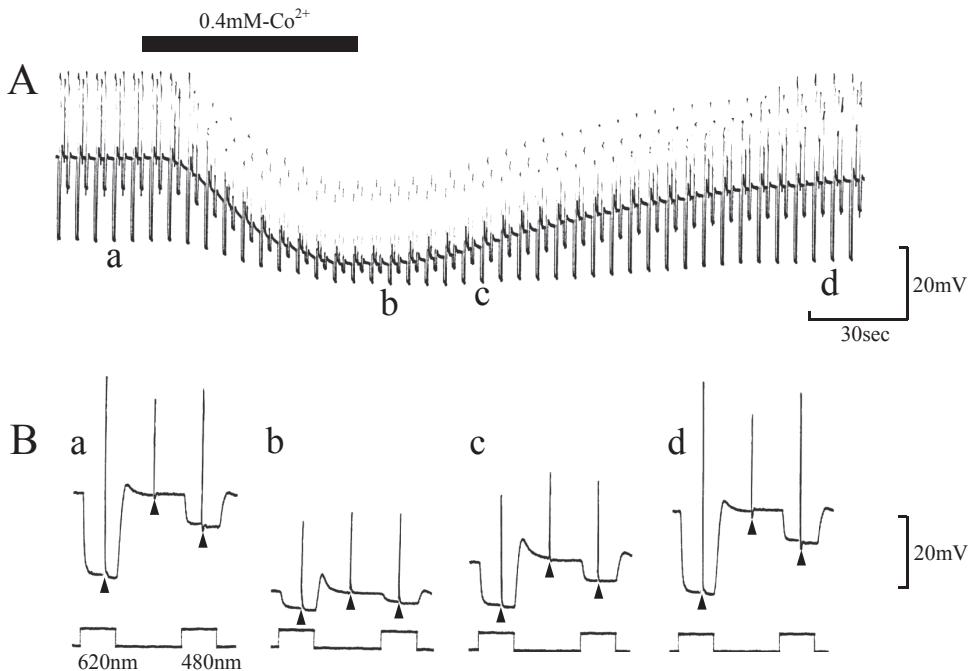
Kaneko (1971) はイヌホシザメ (*Mustelus canis*) 網膜水平細胞にガラス管微小電極を刺入し、光応答を記録した後、電極に充填した Procion yellow を細胞内に注入した。光学顕微鏡による組織検索の結果、Procion yellow が周辺の水平細胞に漏れ出ていることを観察し、同種の水平細胞が電気シナプスを介して接続していることが明らかになった。これは、Naka & Rushton (1967) によって提唱された水平細胞間の電氣的結合、そして水平細胞間に Tight junction が存在するという電子顕微鏡観察とも一致していた (O'Daly, 1967; Stell, 1967; Yamada & Ishikawa, 1965; Witkovsky & Dowling, 1969)。内顆粒層に煉瓦状に並んだ水平細胞間にガラス管微小電極を通じて細胞内通電を行うと、通電電流は電気シナプス (ギャップ結合) を介して周囲の水平細胞に漏れるため、単一水平細胞の膜電位を充分に且つ均一に変化させることは難しい。このため、Tasaki (1960) や Watanabe *et al.* (1960) が実施した通電実験では水平細胞に顕著な変化を観察することができなかったと考えられる。また、パルス状通電実験においても、暗時と光照射時の膜抵抗変化を測定することができなかったと考えられる (Watanabe *et al.*, 1960)。

水平細胞間に存在する電気シナプスのため、細胞内通電によって水平細胞の膜電位を正確且つ均一に変化させることが難しく、1980年代後半になるまで水平細胞の光応答の逆転電位を正確に測定することはできなかった。

#### 4.4.2 視細胞から水平細胞への化学シナプス

Trifonov & Byzov (1965) はガラス管微小電極を用いてヨーロッパヌマガメ (*Emys orbicularis*) 網膜から S-potential を導出し、視細胞側から神経節細胞側に向けて細胞外通電刺激 (視細胞終末が脱分極する通電刺激) を行うと、S-potential に脱分極性応答が重なって現れることを見つけた (第2図参照)。ヨーロッパヌマガメのみならずコイ網膜でも同様の結果を得た (Byzov & Trifonov, 1968)。これらの結果を踏まえ、Trifonov (1968) は暗時に視細胞は神経伝達物質を放出し、また網膜が光照射されて視細胞が過分極すると神経伝達物質の放出は減少あるいは停止すると推測した。また、S-potential を発生する細胞 (水平細胞) では光照射に伴う過分極時に膜抵抗が増大するが、この結果も暗時に視細胞から神経伝達物質が放出されていることを示唆していた (Toyoda *et al.*, 1969)。1970年代に入ると、カメあるいはエイ網膜を用いた実験において、化学シナプス伝達を阻害することが知られている  $\text{Co}^{2+}$  や  $\text{Mg}^{2+}$  を細胞外 (リンガー液) に添加し、さらに細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を低下させることによってシナプス伝達を減弱あるいは遮断すると、水平細胞に過分極が生じ、光応答が消失することが明らかとなった (Cervetto & Piccoline, 1974; Dowling & Ripps, 1972)。これらの結果を総合すると、暗時に視細胞は興奮性の神経伝達物質を放出していると推測された。

Furukawa & Hanawa (1955) は網膜電図の成因を調べる目的で、細胞外液のイオン環境の変化が網膜電図に及ぼす効果について調べた。この研究において、 $\text{Cl}^-$  の代わりに用いた



**第2図：コイ網膜L型水平細胞の膜電位応答ならびに細胞外パルス通電刺激に伴い惹起される脱分極性応答に対するコバルトイオンの影響**

コイ網膜には、3種類の錐体（赤色錐体、緑色錐体および青色錐体）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。これら3種類の錐体水平細胞は光応答の特徴に基づき、L型水平細胞（あるいはPhotopic L型水平細胞）（単相性水平細胞；総ての可視光波長に対して過分極性光応答を示し、赤色で最大の応答を示す水平細胞であり、主に赤錐体からシナプス入力を受け取る。）、RG型水平細胞（あるいは二相性水平細胞；赤色で脱分極性光応答そして青色と緑色で過分極性光応答を示す水平細胞であり、主に緑錐体からシナプス入力を受け取る。）およびRYB型水平細胞（あるいは三相性水平細胞；黄色で脱分極性光応答そして青色と赤色で過分極性光応答を示す水平細胞であり、主に青錐体からシナプス入力を受け取る。）に分類される。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（Scotopic L型水平細胞）とシナプス結合していることが知られている。

A：L型水平細胞にガラス管微小電極を刺入し、膜電位を測定した。暗時の膜電位は $-37$  mVであった。620 nmと480 nmの単色光を交互に照射すると、約22 mVと約8 mVの過分極性応答が現れた。また、暗時そして光照射中、視細胞側から神経節細胞側に向けて細胞外パルス通電刺激（視細胞終末を脱分極させる刺激）を与えると、一過性の脱分極性応答が現れた（Bを参照）。リンガー液中に0.4 mMのコバルトイオン（ $0.4$  mM- $\text{Co}^{2+}$ ）を添加して網膜を灌流すると、暗時の膜電位は徐々に過分極方向に移動し、そして光応答の振幅のみならずパルス通電刺激に対する脱分極性応答の振幅も減少した。これを洗い流すと、ゆっくりと元の膜電位に回復した。同時に、光応答もパルス通電刺激により惹起された脱分極性応答も元の振幅へと回復した。本実験では低濃度（0.4 mM）の $\text{Co}^{2+}$ を用いたため、暗時の膜電位、光応答そして通電刺激に伴う脱分極性応答を完全に抑制することはできなかった。B：Aの連続記録の中のa, b, cとdの時間軸を拡大して表示した。細胞外パルス通電刺激をした時点を矢頭で表した。

**【実験材料と方法】**

実験には、体長約30 cmのコイ（*Cyprinus carpio*）を用いた。コイを約2時間暗順応させた後、冷凍麻酔し、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、その後視細胞側を上にして濾紙上に附着させ、剥離網膜標本を作製し実験に用いた。以上の手術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（ $\text{NaHCO}_3$ ）、2.6 mM 塩化カリウム（KCl）、1.0 mM 塩化カルシウム（ $\text{CaCl}_2$ ）、1.0 mM 塩化マグネシウム（ $\text{MgCl}_2$ ）、10.0 mM ブドウ糖（Glucose）、5.0 mM Tris-hydroxymethyl-aminomethane（Tris）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、網膜を灌流した。

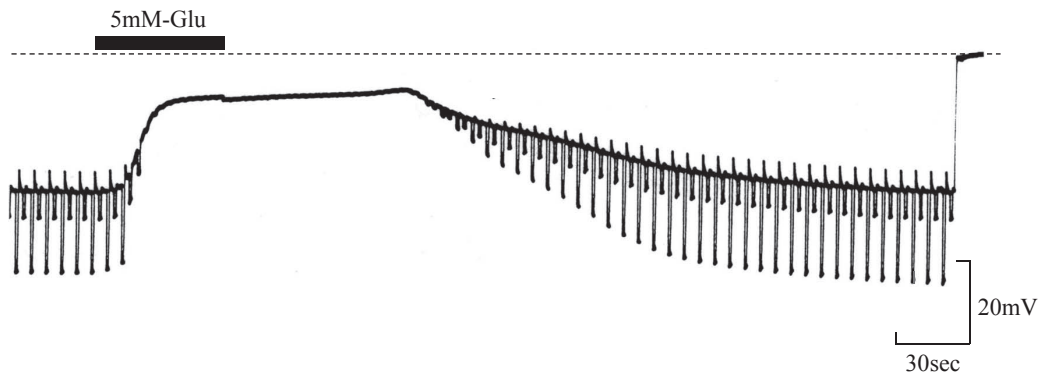
膜電位応答の細胞内記録には、ガラス管微小電極を用いた。ガラス管微小電極は電極作製機（PN-3、成茂科学）を使って、Omega dotタイプのborosilicate性ガラス管から作製した。電極内には4M-酢酸カリウム（ $\text{CH}_3\text{COOK}$ ）を充填し用いた。電極抵抗は40~80 M $\Omega$ であった。記録槽の底部に銀-塩化銀板を置き、これを不関電極とした。膜電位応答は、微小電極用前置増幅器（MEZ-8201、日本光電）を介してオシロスコープ（VC-10、日本光電）で観察し、FMデータレコーダー（A-45、Sony-Magnescape）を利用して磁気テープに記録した。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）から容易に識別できた。細胞外パルス通電をする際、パルス通電用の電極は剥離網膜標本上に置いた直径2.6 mmの輪状の銀-塩化銀線から不関電極に向けて通電（視細胞側から神経節細胞側への通電）した。パルス通電刺激の通電時間は1 msecそして通電強度は1.5 mAであった。

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）の単色光を等光量子化（ $8.2 \times 10^5$  photons/ $\mu\text{m}^2$ /秒）して網膜に照射した。光照射時間は、何れも800ミリ秒であった。



L-アスパラギン酸がb波以降を抑制し、網膜電図をa波（視細胞電位）のみにすることをみた。その後、L-アスパラギン酸のみならずL-グルタミン酸も同様な効果を有することが明らかとなった（Sillman *et al.*, 1969; Hanawa & Tateishi, 1970）。これらの報告は両アミノ酸が視細胞から第二次神経細胞へのシナプス伝達を遮断したことを物語っており、視細胞の放出する神経伝達物質の可能性を示していた。もしこれらのアミノ酸が視細胞の神経伝達物質であるならば、第二次神経細胞である水平細胞や双極細胞はこれらのアミノ酸による影響を受けるに違いない。早速、Murakami *et al.* (1972) はガラス管微小電極を利用してコイ網膜の水平細胞から膜電位変化を導出し、L-グルタミン酸やL-アスパラギン酸を噴霧投与する実験を行った。予想通り、これらのアミノ酸は水平細胞を脱分極させ、光照射に伴う膜電位変化を減少もしくは消失させた（第3図参照）。コイ網膜以外に、カメや他の魚種でも両アミノ酸は同様の効果を有していた（Cervetto & MacNichol, 1972; Dowling & Ripps, 1972; Sugawara & Negishi, 1973）。さらに、第二次神経細胞である双極細胞においても、L-グルタミン酸やL-アスパラギン酸が視細胞の神経伝達物質と同様の作用を示すことが明らかとなった（Murakami *et al.*, 1975）。これらの結果を踏まえると、両アミノ酸が視細胞から放出される神経伝達物質である可能性は極めて高い。しかし、両アミノ酸の何れが視細胞の神経伝達物質であるのか、あるいは錐体と桿体とで神経伝達物質が異なるのかなどについては不明であった。

神経伝達物質であることを確定するには、



第3図：コイ網膜L型水平細胞の膜電位応答に対するL-グルタミン酸の影響

L型水平細胞にガラス管微小電極を刺入し、膜電位を測定した。暗時の膜電位は $-34$  mVであった。620 nmと480 nmの単色光を交互に照射すると、約20 mVと約7 mVの過分極応答が現れた。リンガー液中に5 mMのL-グルタミン酸(5 mM-Glu)を添加し網膜を灌流すると、暗時の膜電位は徐々に脱分極方向に移動し、そして光応答は徐々に減弱し、やがて消失した。5 mM-Gluを洗い流すと、膜電位および光応答は徐々に元のレベルへと回復を始めた。暗時の膜電位と光応答が充分に回復した後、マイクロマニピュレーターを操作して電極を細胞から引き抜いた。

【実験材料と方法】は第2図と同じである。

- ㉞ シナプス前神経細胞に当該物質の合成系が存在する。
- ㉟ シナプス前神経細胞の終末部に当該物質が充分量存在する。
- ㊱ シナプス前神経細胞の刺激により当該物質が放出される。
- ㊲ 当該物質を投与したとき、シナプス後神経細胞にはシナプス前神経細胞の刺激により惹起された応答と同じ応答が誘発され、両応答の発生機序（イオンチャンネルやセカンドメッセンジャーの経路<sup>19)</sup>）が一致する。
- ㊳ シナプス間隙から当該物質を除去するメカニズム（当該物質の不活性化機構を含む。）が存在する。

の基準を充足する必要がある。L-グルタミン酸やL-アスパラギン酸投与に伴う水平細胞の脱分極と光応答の消失は、上記㉞の一部を証明したに過ぎず、両アミノ酸の何れかを確定するには不十分である。Marc & Lam (1981) は、<sup>3</sup>H（トリチウム）で標識したL-グルタミン酸とL-アスパラギン酸が視細胞（視細胞による取り込みの程度に差があった。）に取り込まれることを明らかにした。この報告は視細胞には両アミノ酸を細胞外から除去するしくみが備わっていることを示しており、上記㉞を証明したと同時に、取り込まれたアミノ酸が再放出される可能性があるため㉟も間接的そして部分的に証明したことになる。また、L-グルタミン酸やL-アスパラギン酸の合成系については、総ての細胞に存在することが知られているため、上記㉞の条件も充足していると考えられる。しかし、上記㉞～㉟の中で最も重要且つ直接的な基準である㊱は全く手つかずの状態であり、また㊲についても応答の発生機序は不明のままである。

1970年代後半にも、視細胞の神経伝達物質を確定すべく研究は継続した。しかし、この間の研究は水平細胞や双極細胞に対するL-グルタミン酸とL-アスパラギン酸のアゴニストやアンタゴニストの影響を調べる神経薬理学的実験が主流となり、両アミノ酸の何れが真の神経伝達物質であるのかを解明するには至らなかった（Wu & Dowling, 1978; Shiells *et al.*, 1981; Ishida & Fain, 1981; Rowe & Ruddok, 1982a, b）。幸運なことに、アゴニストの一つとして投与した2-Amino-4-phosphonobutyric acid (APB) が、ON型双極細胞を過分極させることを見出した（Shiells *et al.*, 1981; Slaughter & Miller, 1981）。これらの報告は、ON型双極細胞にはOFF型双極細胞や水平細胞と全く異なるしくみが働いていることを示唆していた。

両アミノ酸の何れが視細胞から放出されているのかを確定するには上記㊱と㊲の証明が必要であり、このために長い道のりが待っていた。

#### 4.4.3 水平細胞から視細胞への化学シナプス

水平細胞は視細胞からシナプス入力を受け取ると同時に、視細胞（錐体）や双極細胞にシ

ナプス出力していることが明らかとなった (Baylor *et al.*, 1971; Naka, 1972; Marmarelis & Naka, 1973; Naka, 1977; Burkhardt, 1977)。Baylor & Fourtes (1971) の実験によって、水平細胞から錐体 (視細胞) へのシナプスは抑制性であることが報じられたが、この抑制性シナプスの詳細については不明であった。

Lam & Steiman (1971) は網膜研究にオートラジオグラフィ法を適用し、 $^3\text{H}$  で標識した GABA がキンギョ網膜の水平細胞に取り込まれることを明らかにした。翌年、Lam (1972) は網膜研究に免疫組織化学法を適用し、水平細胞において GABA が L-グルタミン酸デカルボキシラーゼを利用して L-グルタミン酸から合成されることを明らかにした。その後、キンギョ網膜に存在する 4 種類の水平細胞の中で、L 型水平細胞 (あるいは単相性水平細胞) のみが GABA を取り込むことを明らかにし、GABA がこの L 型水平細胞の神経伝達物質である可能性の高いことを報じた (Marc *et al.*, 1978)。同時期、Lam *et al.* (1978) はアメリカナマズ網膜にオートラジオグラフ法と細胞内記録法を併用し、GABA が錐体水平細胞の神経伝達物質の有力候補であることを明らかにした。

Murakami *et al.* (1978) はコイ網膜の赤色錐体から膜電位変化を細胞内記録し、GABA の影響を調べた。細胞外通電刺激に伴って錐体に惹起される抑制性シナプス後電位が、GABA の灌流投与によって消失することを見つけた。さらに、Murakami *et al.* (1982a, b) は水平細胞の膜電位と光応答に対する GABA アンタゴニストの影響を調べ、L 型水平細胞が GABA を放出している可能性が高いことを報じた (Wu & Dowling, 1980; Murakami *et al.*, 1982a, b)。

GABA が水平細胞の神経伝達物質であることを確定するには、上述の神経伝達物質の基準を充足する必要がある。このための実験は1980年代以降も継続された。1983年、水平細胞からの GABA 放出に GABA トランスポーターが関与していることが明らかとなった (Yazulla & Kleinschmidt, 1983)。GABA のみならずグリシンも水平細胞から放出される神経伝達物質である可能性が報じられた (Wu & Dowling, 1980; Marc & Lam, 1981a)。これら両物質は現在も水平細胞の神経伝達物質候補であり、研究が継続している。

## 5. 最 後 に

網膜は、5 種類の神経細胞がシナプス接続する複雑な神経組織である。網膜における視覚情報処理を理解するには、(1) 網膜内の神経回路を明らかにすること、(2) 神経回路を形成するシナプスのしくみを明らかにすること、そして (3) 神経回路を構成する単一神経細胞の電気的性質を明らかにすることが最低限必要である。このため、眼盃網膜標本あるいは剝離網膜標本にガラス管微小電極を用いた細胞内記録法が1950年代に始まった。この研究法は

1960年代に積極的に活用され、網膜内の単一神経細胞の膜電位変化に関する多くの成果を生んだ。1970年代に入ると、電気生理学的手法に加え、電子顕微鏡観察（Golgi 鍍銀法で染色した神経細胞の電子顕微鏡観察や HRP などの細胞内染色した神経細胞の電子顕微鏡観察）、オートラジオグラフィー法や免疫組織化学法などの新たな研究方法が加わり、網膜研究は一層盛んとなった。特に、1970年代もガラス管微小電鏡の刺入が容易な水平細胞の電気生理学的研究が盛んに行われ、また新たに開発された研究法も先ず水平細胞に適用され、網膜を構成する細胞の中で水平細胞の機能解析が最も進んだ状況となった。

1980年代に入ると、網膜研究に新しい標本が2つ登場する。一つ目は、網膜を酵素処理して単離した神経細胞<sup>20)</sup>をそのままあるいは培養して電気生理学の実験に用いる方法である（例えば、Tachibana, 1981）。この方法では、単一神経細胞の電気的性質の詳細な解析が可能であるのと同時に、単一神経細胞に発現するイオンチャネルやレセプターの解析も可能である。二つ目は、網膜を縦方向（視細胞から神経節細胞方向）に薄く切断（厚さ 100~200  $\mu\text{m}$ ）し、スライス網膜標本作製して電気生理学の実験に用いる方法である（例えば、Werblin, 1978）。この標本では網膜組織の断面にある層状構造を暗視カメラで観察しながら、対象とする神経細胞から細胞内記録を得ること、また近接する2種類以上の神経細胞から同時に電気的変化を記録することが可能である。従って、シナプス機構の解析に非常に有利である。1980年代半ば、これら2種類の標本が次第に普及し、従来不可能と考えられた実験を行うことができるようになった。

Neher & Sakmann (1976) は全く新しい発想で、神経細胞の電気的応答（膜電位や膜電流）を測定する技術を開発した。これはパッチクランプ法<sup>21)</sup>と呼ばれ、神経細胞にガラス管微小電極を刺入するのではなく、先端孔径の比較的大きなパッチ電極（パッチ電極とは、ガラス管で作製された先端孔径の大きな電極を指す。）を作製し、これを神経細胞に接着（あるいは密着）させて電気的応答を導出する方法である。この方法は、ガラス管微小電極が刺入できないような小型の神経細胞からも電気的応答を得ることができるという利点がある。Hamill *et al.* (1981) はパッチクランプ法を改良し、誰もがこの方法を使用できるようにした。このため、1980年代初めには新しい網膜標本（単離網膜細胞やスライス網膜標本）に細胞内電極法（ガラス管微小電極を神経細胞に刺入する方法）を適用して電気的応答を導出していたが、1980年代半ばにはパッチクランプ法（パッチ電極を神経細胞に密着させる方法）による電気的応答の導出が始まった。これ以降、網膜から単離した神経細胞に発現するイオンチャネルやレセプターに関する詳細な解析が可能となり、またスライス網膜標本を利用して複数の神経細胞の電気的応答を同時に記録し、記録細胞間のシナプス伝達に関する詳細な解析が可能となった。結果として、電気生理学的研究法は再び脚光を浴びることになった。

## 引用文献

- Adrian, E. D. and Matthews, R. (1927a), The action of light on 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 on 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. (1975), Retinomotor responses, In M. A. Ali (Ed.), *Vision in fishes*, pp. 315–355, New York, Plenum.
- Barlow, H. B. and Hill, R. M. (1963), Selective sensitivity to direction of movement in ganglion cells of the rabbit retina, *Science*, **139**: 412.
- Barlow, H. B. and Levick, W. R. (1965), The mechanism of directionally selective units in rabbit's retina, *J. Physiol.*, **178**: 477–504.
- Barlow, H. B., Hill, R. M., and Levick, W. R. (1964), Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit, *J. Physiol.*, **173**: 377–407.
- Baylor, D. A. and Fuortes, M. G. F. and O'Bryan, P. M. (1971), Receptive fields of cones in the retina of the turtle, *J. Physiol.*, **214**: 205–294.
- Baylor, D. A., Lamb, T. D. and Yau, K.-W. (1979), The membrane current of single rod outer segments, *J. Physiol.*, **288**: 589–611.
- Bortoff, A. (1964), Localization of slow potential responses in the *Necturus* retina, *Vision Res.*, **4**: 627–635.
- Boycott, B. B., Dowling, J. E., Fisher, S. K., Kolb, H. and Laties, A. M. (1975), Interplexiform cells of the mammalian retina and their comparison with catecholamine-containing retinal cells, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **191**: 353–368.
- Brown, K. T. (1968), The electroretinogram: Its components and their origins, *Vision Res.*, **8**: 663–677.
- Brown, J. E. and Pinto, L. H. (1974), Ionic mechanism for the photoreceptor potential of the retina of *Bufo Marinus*, *J. Physiol.*, **236**: 575–591.
- v. Brücke, E. T. and Garten, S. (1907), Zur vergleichenden Physiologie der Netzhautströme, *Pflügers Arch. Physiol.*, **120**: 290–348 (1907).
- Burkhardt, D. A. (1977), Responses and receptive-field organization of cones in perch retinas, *J. Neurophysiol.*, **40**: 53–62.
- Burnside, B. (2001), Light and circadian regulation of retinomotor movement, In H. Kolb, H. Ripps and S. Wu (Eds.), *Concepts and challenge in retinal biology*, pp 477–486, Amsterdam, Elsevier.
- Burnside, B. and Nagel, B. (1983), Retinomotor movements of photoreceptors and retinal pigment epithelium: mechanisms and regulation, In N. N. Osborne and G. J. Chader (Eds.), *Progress in retinal research*, pp 67–109, Oxford, Pergamon Press.
- 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.
- Cajal, S. R. (1892), *La rétine des vertébrés*, *La Cellule*, **9**: 119–257. (S. A. Thorpe & M. Glickstein (1973), trans., “The structure of the retina”, Springfield, Charles C. Thomas publisher.)
- Chaffee, E. L., Bovie, W. T. and Hampson, A. (1923), The electrical response of the retina under stimulation by light, *J. opt. Soc. Amer.*, **7**: 1–44.
- Cervetto, L. (1973), Influence of sodium, potassium and chloride ions in the intracellular responses of turtle retina, *Nature*, **241**: 401–403.
- Cervetto, L. and MacNichol, E. F. Jr. (1972), Inactivation of horizontal cells in turtle retina by glutamate and aspartate, *Science*, **178**: 767–769.
- Cervetto, L. and Piccolino, M. (1973), Synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells in the turtle retina, *Science*, **183**: 417–419.
- Cohen, A. I. (1960), The ultrastructure of the rods of the mouse retina, *Amer. J. Anat.*, **107**: 23–48.



- Dacheux, R. F. and Raviola, E. (1986), The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell, *J. Neurosci.*, **6**: 331–345.
- De Robertis, E. (1956), Electron microscope observations on the submicroscopic organization of the retina rods, *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **2**: 319–329.
- Del Castillo, J. and Katz, B. (1954a), The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings, *J. Physiol.*, **124**: 553–559.
- Del Castillo, J. and Katz, B. (1954b), Quantal components of the end-plate potential, *J. Physiol.*, **124**: 560–573.
- Dewar, J. (1877), The physiologic action of light. *Nature*, **15**: 433–435.
- Dewar, J. and McKendrick, J. G. (1873a), On the physiological action of light, No. I, *J. Anat. Physiol.*, **7**: 275–278.
- Dewar, J. and McKendrick, J. G. (1873b), On the physiological action of light, No. II, *J. Anat. Physiol.*, **7**: 278–282.
- Dewar, J. and McKendrick, J. G. (1873c), On the physiological action of light, *Trans. Roy. Soc. of Edinb.*, **27**: 141–166.
- Dowling, J. E. and Boycott, B. B. (1966), Organization of the primate retina: Electron microscopy, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **166**: 80–111.
- Dowling, J. E. and Ehinger, B. (1975), Synaptic organization of the amine-containing interplexiform cells of the goldfish and *Cebus* monkey retina, *Science*, **188**: 270–273.
- Dowling, J. E. and Ehinger, B. (1978), The interplexiform cell system. I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **201**: 7–26.
- Dowling J. E. and Ripps H. (1972), Adaptation in skate photoreceptors, *J. Gen. Physiol.*, **60**: 698–719.
- Dowling J. E. and Ripps H. (1973), Effect of magnesium on horizontal cell activity in the skate retina, *Nature*, **242**: 101–103.
- Dowling, J. E. and Werblin, F. S. (1969), Organization of the retina the the mudpuppy, *Necturus Maculosus*. I Synaptic structure, *J. Neurophysiol.*, **32**: 315–338.
- Dowling, J. E., Ehinger, B. and Hedden, W. L. (1976), The interplexiform cell: A new type of retinal Neuron, *Invest. Ophthalmol.*, **15**: 916–926.
- Du Bois-Reymond, E. (1849), *Untersuchungen über thierische Elektrizität*, Berlin, Verlag von G. Reimer, Vol. 2, pp. 256–257.
- Dubin, M. W. (1970), The inner plexiform layer of the vertebrate retina: a quantitative and comparative electron microscopical analysis, *J. Comp. Neurol.*, **140**: 479–506.
- Einhoven, W. and Jolly, W. A. (1908), The form and magnitude of the electrical response of the eye to stimulation by light at various intensities, *Q. J. Exp. Physiol.*, **1**: 373–416.
- Evans, E. M. (1966), n the ultrastructure of the synaptic region of visual receptors in certain vertebrates, *Z. Zellforsch.*, **71**: 499–516.
- Famiglietti, E. V. Jr. and Kolb, H. (1976), Structural basis for ‘ON’- and ‘OFF’-center responses in retinal ganglion cells, *Science*, **194**: 193–195.
- Famiglietti, E. V. Jr., Kaneko, A. and Tachibana, M. (1977), Neuronal architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp, *Science*, **198**: 1267–1269.
- Fesenko, E. E., Koloensnikov, S. S. and Lyubarsky, A. L. (1985), Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment, *Nature*, **313**: 310–313.
- 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.
- Fuortes, M. G. F. and Simon, E. J. (1974), Interactions leading to horizontal cell responses in the turtle retina, *J. Physiol.*, **240**: 177–198.
- Furukawa, T. and Hanawa, I. (1955), Effects of some common cations on electroretinogram of the toad, *Jpn. J. Physiol.*, **5**: 289–300.
- Gallego, A. (1971), Horizontal and amacrine cells in the mammal’s retina, *Vision Res.*, **Suppl 3**: 33–50.
- Golgi, C. (1873), Sulla struttura della sostanza grigiadela ervello, *Gazetta Medica Lomberda* **33**: 244–246.
- Gotch, F. (1903), The time relations of the photoelectric changes on the eyeball of the frog, *J. Physiol.*, **29**:

- 388–416.
- Gouras, P. (1960), Graded potentials of bream retina, *J. Physiol.*, **152**: 487–505.
- Granit, R. (1933), The components of the retinal action potential in mammals and their relation to discharge of optic nerve, *J. Physiol.*, **77**: 207–240.
- Granit, R. (1947), *Sensory mechanisms of the retina*, London, Oxford University Press.
- Granit, R. (1962), Neurophysiology of the retina, In *The eye Vol. 2 The visual process* (ed. H. Davson), pp. 575–692, Academic Press, New York and London.
- Granit, R. and Svætichin, G. (1939), Principles and technique of the electrophysiological analysis of colour reception with the aid of micro-electrode, *Upsala Läkaref. Förh.*, **65**: 161–171.
- Hagins, W. A. (1972), The visual process: Excitatory mechanisms in the primary receptor cells, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1**: 131–158.
- Hagins, W. A. and Yoshikami, S. (1974), A role for  $\text{Ca}^{2+}$  in excitation of retinal rods and cones, *Exp. Eye Res.*, **18**: 299–305.
- Hagins, W. A., Penn, R. D. and Yoshikami, S. (1970), Dark current and photocurrent in retinal rod, *Biophysical J.*, **10**: 380–412.
- 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.
- Hanawa, I. and Tateishi, T. (1970), The effect of aspartate on the electroretinogram of the vertebrate retina, *Experientia*, **26**: 1311–1312.
- 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. (1940a), The receptive fields of optic nerve fibers, *Am. J. Physiol.*, **130**: 690–699.
- Hartline, H. K. (1940b), The effects of spatial summation in the retina on the excitation of the fibers of the optic nerve, *Am. J. Physiol.*, **130**: 700–711.
- Hartline, H. K. (1940c), The nerve messages in the fibers of the visual pathway, *J. Opt. Soc. Am.*, **30**: 239–247.
- Hashimoto, Y. and Inokuchi, M. (1980), Identification of the interplexiform cell in the dace retina by dye injection method, *Brain Res.*, **197**: 331–340.
- Hashimoto, Y., Hároshi, 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.
- Hashimoto, Y., Kato, A., Inokuchi, M. and Watanabe, K. (1976), Re-examination of horizontal cells in the carp retina with procion yellow electrode, *Vision Res.*, **16**: 25–29.
- Hedden, W. L. and Dowling, J. E. (1978), The interplexiform cell system. II. Effects of dopamine on goldfish retinal neurons, *Proc. Roy. Soc Lond. B*, **201**: 27–55.
- Holmgren, F. (1865), Method att objectivera effecten av ljusinttryck på retina, *Upsala Läkaref. Förh.*, **1**: 184–198.
- Holmgren, F. (1870), Om Retinaströmmen, *Upsala Läkaref. Förh.*, **4**: 419–455.
- Holmgren, F. (1880), Über die Retinaströme, *Untersuch. Physiol. Inst. Der Univ. Heidelberg*, **3**: 278–326.
- Ishida, A. T. and Fain, G. L. (1981), D-Aspartate potentiates the effects of L-glutamate on horizontal cells in goldfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**: 5890–5894.
- Kahn, R. H. and Löwenstein, A. (1924), Das Elektroretinogramm, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalm.*, **114**, 304–325.
- Kalloniatis, M. and Marc, R. E. (1990), Interplexiform cells of the goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **297**: 340–358.
- Kaneko, A. (1970), Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina, *J. Physiol.*, **207**: 623–633.
- Kaneko, A. (1971), Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina, *J. Physiol.*, **213**: 95–105.
- Kaneko, A. and Shimazaki, H. (1975), Effects of external ions on the synaptic transmission from photoreceptors to horizontal cells in the carp retina, *J. Physiol.*, **252**: 509–522.

- Katz, B. and Miledi, R. (1965), The Effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **161**: 496–503.
- Katz, B. and Miledi, R. (1967), A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses, *J. Physiol.*, **192**: 407–436.
- Kidd, M. (1962), Electron microscopy of the inner plexiform layer of the retina in the cat and the pigeon, *J. Anat.*, **96**: 179–188.
- Kolb, H. (1970), Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **B258**: 261–283.
- Kolb, H. (1974), The connections between horizontal cells and photoreceptors in the retina of the cat: electron microscopy of Golgi preparations, *J. Comp. Neurol.*, **155**: 1–14.
- Kolb, H. (1979), The inner plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observation, *J. Neurocytol.*, **8**: 295–329.
- Kolb, H. and Famiglietti, E. V. Jr. (1974), Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of the cat retina, *Science*, **186**: 47–49.
- Kolb, H. and Famiglietti, E. V. Jr. (1976), Rod and cone pathways in the retina of the cat retina, *Invest. Ophthalmol.*, **15**: 935–946.
- Korenbrodt, J. I. and Cone, R. A. (1972), Dark ionic flux and the effects of light in isolated rod outer segments, *J. Gen. Physiol.*, **60**: 20–45.
- Kuffler, S. W. (1953), Discharge patterns and functional organization of mammal retina, *J. Neurophysiol.*, **16**: 37–68.
- Ladman, A. J. (1958), The fine structure of the rod bipolar synapse in the retina of the albino rat, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**: 459–466.
- Lam, D. M.-K. (1972), The biosynthesis and content of gamma-aminobutyric acid in the goldfish retina, *J. cell Biol.*, **54**: 225–231.
- Lam, D. M.-K. and Steinman, L. (1971), The uptake of [ $\gamma$ - $^3\text{H}$ ] aminobutyric acid in the goldfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**: 2777–2781.
- Lam, D. M.-K., Lasater, E. M. and Naka, K.-I. (1978),  $\gamma$ -Aminobutyric acid: A neurotransmitter candidate for cone horizontal cells of the catfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**: 6310–6315.
- Lam, D. M.-K., Su, T., Swain, L., Marc, R. E., Brandon, C. and Wu, J.-Y. (1979), Immunocytochemical localization of L-glutamic acid decarboxylase in the goldfish retina, *Nature*, **278**: 565–567.
- Lasansky, A. (1971), Synaptic organization of cone cells in the turtle retina, *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B*, **262**: 365–381.
- Leeper, H.F. (1978), Horizontal cells of the turtle retina I. Light microscopy of Golgi preparations, *J. Comp. Neurol.*, **182**: 777–793.
- Light, A. R. and Durkovic, R. C. (1976), Horseradish peroxidase: an improvement in intracellular staining of single, electrophysiologically characterized neurons, *Exp. Neurol.*, **53**: 847–853.
- Ling, G. and Gerard, R. W. (1949), The normal membrane potential of frog sartorius fibers, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **34**: 383–396.
- López-Colomé, A. M., Salceda, R. and Pasantes-Morales, H. (1978), Potassium-stimulated release of GABA, Glycine, and taurine from the chick retina, *Neurochem. Res.*, **3**: 431–441.
- Maksimova, E. M. (1969), Effect of intracellular polarization of horizontal cells on ganglion cell activity in the fish retina, *Biofizika*, **14**: 537–544.
- Marc, R. E. and Lam, D. M.-K. (1981a), Glycinergic pathways in the goldfish retina, *J. Neurosci.*, **1**: 152–165.
- Marc, R. E. and Lam, D. M.-K. (1981b), Uptake of aspartic and glutamic acid by photoreceptors in goldfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**: 7185–7189.
- Marc, R. E. and Liu, W.-L. S. (1981), Horizontal cell synapses onto glycine-accumulating interplexiform cells, *Nature*, **311**: 266–269.
- Marc, R. E., Stell, W. K., Bok, D. and Lam, D. M. K. (1978), GABAergic pathways in the goldfish Retina, *J. Comp. Neurol.*, **182**: 221–246.
- Marchiafava, P. L. (1978), Horizontal cells influence membrane potential of bipolar cells in the retina of the

- turtle, *Nature*, **275**: 141–142.
- Marriott, F. H. (1962), Colour vision: Theories, In *The eye Vol. 2 The visual process* (ed. H. Davson), pp. 299–320, Academic Press, New York and London.
- Marmarelis, P. Z. and Naka, K.-I. (1973), Nonlinear analysis and synthesis of receptive field responses in the catfish retina. II. One-input white-noise analysis, *J. Neurophysiol.*, **36**: 619–633.
- Maranto, A. R. (1982), Neunonal mapping: a photooxidation reaction makes Lucifer yellow useful for electron microscopy, *Science*, **217**: 953–955.
- Maturana, H. R. and Frenk, S. (1963), Directional movement and horizontal edge detectors in the pigeon retina, *Science*, **142**: 977–979.
- Meiri, U. and Rahamimoff, R. (1971), Neuromuscular transmission: Inhibition by manganese ions, *Science*, **176**: 308–309.
- Miledi, R. and Slater, C. R. (1966), The action of calcium on neuronal synapses in the squid, *J. Physiol.*, **184**: 473–498.
- Miller, W. H. and Nicol, G. D. (1979), Evidence that cyclic GMP regulates membrane potential in rod photoreceptors, *Nature*, **280**: 64–66.
- Mitarai, G., Asano, T. and Miyake, Y. (1974), Identification of five types of S-potential and their corresponding generating sites in the horizontal cells of the carp retina, *Jap. J. Ophthalmol.*, **18**: 161–176.
- Motokawa, K., Yamashita, E. and Ogawa, T. (1960), Studies on receptive fields of single units with colored lights, *Tohoku J. Exp. Med.*, **71**: 261–272.
- Müller, H. (1856), Anatomisch-physiologische Untersuchungen über die Retina bei des Menschen und der Wirbeltieren, *Z. Wissensch. Zool.*, **8**: 1–122.
- Muller, K. J. and McMahan, U. J. (1976), The shapes of sensory and motor neurons and the distribution of their synapses in ganglia of the leech: a study using intracellular injection of horseradish peroxidase, *Proc. Roy. Soc. Lond.*, **194**: 481–499.
- Müller, F., Wässle, H. and Voigt, T. (1988), Pharmacological modulation of the rod pathway in the cat retina, *J. Neurophysiol.*, **59**: 1657–1672.
- Murakami, M., Otsu, K. and Otsuka, T. (1972), Effects of chemicals on receptors and horizontal cells in the retina, *J. Physiol.*, **227**: 899–913.
- Murakami, M., Ohtsuka, T. and Shimazaki, H. (1975), Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cells in the carp retina, *Vision Res.*, **15**: 456–458.
- Murakami, M., Shimoda, Y. and Nakatani, K. (1978), Effects of GABA on neuronal activities in the distal retina of the carp, *Sensory Proc.*, **2**: 334–338.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982a), GABA-mediated negative feedback from horizontal cells to cones in carp retina, *Jpn. J. Physiol.*, **32**: 911–926.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982b), GABA-mediated negative feedback and color opponency in carp retina, *Jpn. J. Physiol.*, **32**: 927–935.
- Naka, K.-I. (1972), The cells horizontal cells talk to, *Vision Res.*, **22**: 653–660.
- Naka, K.-I. (1977), Functional organization of catfish retina, *J. Neurophysiol.*, **40**: 26–43.
- Naka, K.-I. and Carraway, N. R. G. (1975), Morphological and functional identifications of catfish retinal neurons. I. Classical morphology, *J. Neurophysiol.*, **38**: 53–71.
- Naka, K.-I. and Rushton, W. A. H. (1967), The generation and spread of S-potentials in fish (*Cyprinidae*), *J. Physiol.*, **192**: 437–461.
- Naka, K.-I., Inoma, S., Kosugi, Y. and Tong, C.-W. (1960), Recording of action potentials from single cells in the frog retina, *Jpn. J. Physiol.*, **10**: 436–442.
- Negishi, K. and Drujan, B. (1979a), Reciprocal changes in center and surrounding S potentials of fish retina in response to dopamine, *Neurochem. Res.*, **4**: 313–318.
- Negishi, K. and Drujan, B. (1979b), Effects of catecholamines and related compounds on horizontal cells in the fish retina, *J. Neurosci. Res.*, **4**: 311–334.
- Negishi, K. and Drujan, B. (1979c), Similarities in effects of catecholamine and dopamine on horizontal cells in the fish retina, *J. Neurosci. Res.*, **4**: 335–349.

- Neher, E. and Sakmann, B. (1976), Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers, *Nature*, **260**: 799–802.
- Nelson, R., Famiglietti, E. V. Jr. and Kolb, H. (1978), Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina, *J. Neurophysiol.*, **41**: 472–483.
- Nelson, R., Lützwow, A. V., Kolb, H. and Gouras, P. (1975), Horizontal cells in cat retina with independent dendritic systems, *Science*, **189**: 137–139.
- Nicol, G. D. and Miller, W. H. (1978), Cyclic GMP injected into retinal rod outer segments Increases latency and amplitude of response to illumination, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**: 5217–5220.
- Nilsson, S. E. G. (1964), An electron microscopic classification of the retinal receptors of the leopard frog (*Rana pipiens*), *J. Ultrastruct. Res.*, **10**: 390–416.
- O'Daly, J. A. (1967), ATPase activity at the functional contacts between retinal cells which produce S-potential, *Nature*, **216**: 1329–1331.
- Piper, H. (1911), Über die Netzhautströme, *Arch. Anat. Physiol. (Abt. Physiol.)*, Suppl.: 85–132.
- Polyak, S. (1941), *The retina*, Chicago, The University of Chicago Press.
- Raviola, E. and Gilula, N. B. (1975), Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer of the retina: A freeze-fracture study in monkeys and rabbits, *J. Cell Bio.*, **65**: 192–222.
- Riggs, L. A. (1941), Continuous and reproducible records of the electrical activity of the human Retina, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **48**: 204–207.
- Ringer, S. (1882a), Regarding the action of hydrate of soda, hydrate of ammonia, and hydrate of potash on the ventricle of the frog's heart, *J. Physiol.*, **3**: 195–202.
- Ringer, S. (1882b), Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle, *J. Physiol.*, **3**: 380–393.
- Ringer, S. (1883a), A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart, *J. Physiol.*, **4**: 29–42.
- Ringer, S. (1883b), A third contribution regarding the influence of the inorganic constituents of the blood on the ventricle contraction, *J. Physiol.*, **4**: 222–225.
- Rowe, J. S. and Ruddock, K. H. (1982a), Hyperpolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter antagonists, *Neurosci. Lett.*, **30**: 251–256.
- Rowe, J. S. and Ruddock, K. H. (1982b), Depolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter agonists, *Neurosci. Lett.*, **30**: 257–262.
- Shiells, R. A., Falk, G. and Naghshineh, S. (1981), Action of glutamate and aspartate analogues on rod horizontal and bipolar cells, *Nature*, **294**: 592–594.
- Sillman, A. J., Ito, H. and Tomita, T. (1969a), Studies on the mass receptor potential of the isolated frog retina. I. General properties of the response, *Vision Res.*, **9**: 1435–1442.
- Sillman, A. J., Ito, H. and Tomita, T. (1969b), Studies on the mass receptor potential of the isolated frog retina. II. On the basis of the ionic mechanisms, *Vision Res.*, **9**: 1443–1451.
- Sjöstrand, F. S. (1953a), 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.
- Sjöstrand, F. S. (1953b), The ultrastructure of the inner segments of the retinal rods of the guinea pig eye as revealed by electron microscopy, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **42**: 45–70.
- Slaughter, M. M. and Miller R. F. (1981), 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retinal research, *Science*, **211**: 182–185.
- Stephan, P. and Weiler, R. (1981), Morphology of horizontal cells in the frog retina, *Cell Tiss. Res.*, **221**: 443–449.
- Stretton, A. O. and Kravitz, E. A. (1968), Neuronal geometry: determination with a technique of intracellular dye injection. *Science*, **162**: 132–134.
- 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. (1975), Horizontal cell axons and axon terminals in goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **159**: 503–519.



- 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., Ishida, A. T. and Lightfoot, D. O. (1977), Structure basis for On and Off-center response in retinal bipolar cells, *Science*, **198**: 1269–1271.
- 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.
- Stewart, W. W. (1978), Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer, *Cell*, **14**: 741–759.
- Stewart, W. W. (1981), Lucifer dyes: Highly fluorescent dyes for biological tracing, *Nature*, **292**: 17–21.
- Sugawara, K. and Negishi, K. (1973), Effects of some amino acids on light-induced responses in the isolated carp retina, *Vision Res.*, **13**: 2479–2489.
- 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.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol.*, **321**: 141–161.
- Tasaki, K. (1960), Some observations on the retinal potentials of the fish, *Arch. Ital. Biol.*, **98**: 81–91.
- Teranishi, T. and Negishi, K. and Kato, S. (1983), Dopamine modulates S-potential amplitude and dye-coupling between external horizontal cells in carp retina, *Nature*, **301**: 243–246.
- Tomita, T. (1963), Electrical activity in the vertebrate retina, *J. Opt. Soc. Amer.*, **53**: 49–57.
- 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. and Kaneko, A. (1965), An intracellular coaxial microelectrode. Its construction and application, *Med. Electron. Biol. Engng.*, **3**: 367–376.
- 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.
- 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.
- Toyoda, J.-I. and Tonosaki, K. (1978), Effect of polarization of horizontal cells on the on-center bipolar cell of carp retina, *Nature*, **276**: 399–401.
- Toyoda, J.-I., Nosaki, H. and Tomita, T. (1969), Light-induced resistance changes in single photoreceptors of *Necturus* and *Gekko*, *Vision Res.*, **9**: 453–463.
- Trifonov, Yu. A. (1968), Study of synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells by means of electrical stimulation of the retina, *Biofizika*, **13**: 809–817.
- 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).
- Villegas, G. M. (1960), Electron microscopic study of the vertebrate retina, *J. Gen. Physiol.*, **43**(Suppl.): 15–48.
- Vaughn, J. E., Famiglietti, E. V. Jr., Barber, R. P. Jr., Saito, K., Roberts, E. and Ribak, C. E. (1981), GABAergic amacrine cells in rat retina: Immunocytochemical identification and synaptic connectivity, *J. Comp. Neurol.*, **197**: 113–127.
- Wagner, H. G., MacNichol, E. F. Jr. and Wolbarsht, M. L. (1960), The response properties of single ganglion cells in the goldfish retina, *J. Gen. Physiol.*, **43**: 45–62.
- Walls, G. L. (1942), *The vertebrate eye*, New York, Hafner.
- 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.
- Weakly, J. N. (1973), The action of cobalt ions on neuromuscular transmission in the frog, *J. Physiol.*, **234**: 597–612.
- Werblin, F. S. (1978), Transmission along and between rods in the tiger salamander retina, *J. Physiol.*, **280**:

- 449–470.
- Werblin, F. S. and Dowling, J. E. (1969), Organization of the retina the the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording, *J. Neurophysiol.*, **32**: 339–355.
- Wiesel, T. N. (1959), Rewcording inhibition and excitation in the cat's retinal ganglion cells with intracellular electrodes, *Nature*, **183**: 264–265.
- Witkovsky, P. and Dowling, J. E. (1969), Synaptic relationships in the plexiform layers of carp retina. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, **100**: 60–82.
- Wu, S. M. and Dowling, J. E. (1978), L-Aspartate: Evidence for a role in cone photoreceptor synaptic transmission in the carp retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**: 5205–5209.
- Wu, S. M. and Dowling, J. E. (1980), Effects of GABA and glycine in the distal cells of the cyprinid retina, *Brain Res.*, **199**: 401–414.
- Yamada, E. (1960), Observations on the Fine Structure of Photoreceptive Elements in the Vertebrate Eye, *J. Electron Microsc.*, **9**: 1–14.
- 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.
- Yau, K.-W., Lamb, T. D. and Baylor, D. A. (1977), Light-induced fluctuations in membrane current of single toad rod outer segments, *Nature*, **269**: 78–80.
- Yazulla, S. and Kleinschmidt, J. (1983), Carrier-mediated release of GABA from retinal horizontal cells, *Brain Res.*, **263**: 63–75.
- Zucker, C. L. and Dowling, J. E. (1987), Centrifugal fibers synapse on dopaminergic interplexiform cells in the teleost retina, *Nature*, **330**: 166–168.

## 【注】

- 1) 網膜は9層の神経網膜と1層の色素上皮細胞層からなる厚さ 100~300  $\mu\text{m}$  の組織である (第1図参照)。眼球内では、網膜と強膜の間にブルッフ膜 (コラーゲン線維を主体とする無細胞性の膜構造であり、網膜と脈絡膜の境界の役割を担う。) と脈絡膜 (眼球の後極側に存在する色素細胞と血管でできた黒い膜状構造物であり、光の透過と乱反射を防ぐと同時に、桿体と錐体に栄養を与えそして老廃物を眼球から運び出す役割を担う。) が存在している。神経網膜では光受容と視覚情報処理が行われる。色素上皮細胞層の役割として、⑦脈絡膜と神経網膜間で血管-網膜関門を形成し、血管を透過する物質を制限し、不要な物質が網膜に接することがないようにしている、④視細胞外節の先端を貪食・消化し、古い外節を除去している、②視物質であるレチナールのリサイクルに関与している、⑤色素上皮細胞内のメラニン顆粒により、眼球内へ入ってきた光の散乱を防ぐ、④下等脊椎動物網膜では、色素上皮細胞内のメラニン顆粒が網膜運動現象を引き起こす、などが知られている。生理学的研究では、網膜を神経網膜と同義で用いることが多い。
- 2) 順応とは、生態系の変化 (環境の変化) に対して生物が生存するために生体反応 (性質や行動など) を変化させる過程を指す。感覚器の順応とは、外界の刺激に対して感覚器官が慣れて行く過程を言う。例えば、明所から暗所に移動したとき、ヒトの場合殆ど何も見ることができない状態となるが、時間と共に徐々に周囲を見ることができるようになる。この過程を暗順応と言う。明所では、桿体外節に存在するロドプシンが殆ど分解し、また錐体外節に存在する錐体視物質は部分的に分解している。従って、明所から暗所に移動すれば、桿体は殆ど働かず、そして錐体も充分には機能しないため、外界を察知することが難しい。暗所で数分が経過すると、錐体の光感度が上昇し、その後約20分で桿体の光感度が上昇する。これは、暗時における錐体視物質の急速な再生とロドプシンの緩徐な再生のためである。このように、暗順応では時間差はあるものの、錐体と桿体の両視細胞の光感度が上昇する。また、明順応はこの反対の過程であり、両視細胞の視物質 (ロドプシンと錐体視物質) の分解に伴う光感度の顕著な低下を指す。視物質の分解は一瞬で終了するが、再生には分単位の時間を要するため、明暗順応の時間に大きな差異が生じる。
- 3) 外界の光環境の変化は網膜 (神経網膜) の最外層にある視細胞で受容され、網膜内の神経細胞を経由する間に情報処理が進行し、神経節細胞へと伝達される。多くの動物では神経節細胞の神経軸索は視神経

乳頭に集まり、神経軸索の束となり強膜から脳へと向かう。神経節細胞の神経軸索の束を視神経（あるいは視神経線維束）と言う。

- 4) 感覚細胞において適当刺激が与えられたとき、反応を示す領域（空間領域）を受容野という。網膜を構成する神経細胞も、光刺激を与えたときに膜電位変化を示す空間領域が存在する。網膜内の神経細胞の示す受容野は概ね円型である。不思議なことに、双極細胞と神経節細胞は受容野中心部と周辺部とで膜電位変化が逆転することが知られている、これを中心-周辺拮抗的受容野と呼ぶ。
- 5) マッドバビー (*Necturus maculosus*) はサンショウウオの一種であり、生息域はカナダ中南部、米国中西部から米国東部の大西洋側とメキシコ湾に流れ込む河川に至る。体長は 30 cm 以上にもなる大型サンショウウオである。眼は小さく、4 mm 程度である。しかし、網膜を構成する細胞が大きく、30  $\mu\text{m}$  程もある (Dowling & Werblin, 1969; Werblin & Dowling, 1969)。他の脊椎動物網膜の神経細胞が 5~10  $\mu\text{m}$  であることを踏まえると、マッドバビー網膜の神経細胞は極めて大きく、このためカラス管微小電極の刺入を容易で、さらに細胞内記録を長時間保持することが可能である。マッドバビーのみならず、トラフサンショウウオやオオヒキガエルなどの両生類網膜は神経細胞が大きく、これらは網膜研究において好個の実験動物である。
- 6) 神経細胞はシナプスを介して接続し、神経回路を形成する。近年、神経回路が脳の機能単位であると考えられるようになってきた。最近の研究では、遺伝的プログラムにより脳内に形成された神経回路が成長や環境変化（学習や経験など）で変化することも明らかになっている。しかし、脳内で神経回路が形成されるしくみについては十分に解明されていない。
- 7) 細胞は小さな生命単位であり、それぞれは独立した存在であり、基本的に細胞同士の物理的な接触はない。神経細胞や感覚細胞などでは生体電気信号を発生し、これを他の神経細胞や筋肉細胞などに伝達する役割を担っている。例えば、脳内では神経細胞が繋がり神経回路を形成し、運動や感覚のみならず内臓などの機能を統括・制御している。生体電気信号伝播のために、神経細胞と神経細胞、感覚細胞と神経細胞、神経細胞と腺細胞あるいは神経細胞と筋肉細胞の間に形成される接続構造をシナプスと言う（ただし、神経細胞-筋肉細胞間はシナプスとは呼ばず、神経筋接合部と呼ぶ）。通常、シナプス部にある2つの神経細胞の間にはシナプス間隙（約 20 nm）と呼ばれる隙間が存在し、シナプス前神経細胞の生体電気信号をシナプス後神経細胞に伝達するために神経伝達物質が放出される。例えば、シナプス前神経細胞に発生した活動電位が神経終末に達すると、神経伝達物質が放出され、これがシナプス間隙を拡散で拡がり、シナプス後神経細胞に発現するレセプターに結合して膜電位変化を生む。このように、神経細胞間の生体電気信号の伝達に神経伝達物質が使われる場合、このシナプスを化学シナプスと言う。また、神経細胞間にシナプス間隙がなく、両細胞がギャップ結合を介して接続しているとき、生体電気信号はそのまま伝達される。このシナプスを電気シナプスと言う（注17参照）。動物の神経系では両シナプスが混在している。
- 8) 脊椎動物は概ね球体の眼球を持ち、その内側に網膜が張り付いている。網膜の中央部に窩みがあり、この部分を中心窩と言う。網膜中心窩の厚みは、網膜周辺の約半分程度である。ヒト網膜中心窩には錐体が密集し、網膜の中で最も高い視力を提供している。ヒトが何かを見るとき、その像は中心窩に投影される。哺乳類の中で中心窩が存在するのは、霊長類のみである。霊長類以外に、鳥類、爬虫類そして魚類にも中心窩を持つ種が存在する。
- 9) Santiago Ramón y Cajal (1852~1934) はスペイン生まれの神経解剖学者であり、1906年 Camillo Golgi (1843~1926) と共に神経系の構造研究の業績により1906年にノーベル生理学・医学賞を受賞した。Golgi は神経細胞の形態観察の手法である Golgi 鍍銀染色法（注13参照）の開発者であり、この方法を駆使して Golgi と Cajal は共に中枢神経系の神経構築を研究し、脳内の神経細胞の繋がりに関して異なる説を提唱した。Golgi は網状説そして Cajal はニューロン説を主張し、激しい論争を繰り広げた。両者がノーベル賞を受賞する時点で、何れの説が正しいのかは明らかではなかった。その後、電子顕微鏡が開発され、神経繊維が連続して網状構造を形成するという網状説は否定された。Cajal は脳以外に網膜の神経構築に関する研究も行い、今の網膜の形態学的基盤を構築した。
- 10) 脊椎動物網膜視細胞（錐体と桿体）は外節、内節とシナプス終末の3部位に分けられる。視細胞の外節には視物質が存在し、光受容ならびに光-電位変換の役割を果たしている。内節には各種のイオンチャネルやイオン交換ポンプが発現し、光応答を形成している。シナプス終末には神経伝達物質の分泌装置が備わっており、明暗に伴う膜電位変化に応じて神経伝達物質の放出を制御している。

視細胞の内節遠位側には、ミトコンドリアが密集する Elipsoid と呼ばれる構造がある。この Elipsoid

と細胞核に挟まれた部分にはゴルジ体、粗面小胞体やリボゾームが存在し、Myoid（筋様部）と呼ばれる。Myoidは脊椎動物網膜の桿体と錐体共に存在する。魚類や両生類を明所あるいは暗所で長時間飼育すると、視細胞内節 Myoid に伸縮が認められる。この Myoid の伸縮と連動して色素上皮細胞内のメラニン顆粒も凝集・拡散を引き起こす。これらを網膜運動現象という。

- 11) 化学シナプスではシナプス前神経細胞が放出する神経伝達物質が拡散で拡がり、シナプス後神経細胞に発現するレセプターに作用して膜電位変化を生む。神経伝達物質とレセプターの関係は鍵と鍵穴に例えられ、まさに1対1の関係である。不思議なことに、レセプターに作用する化学物質が複数見つかることがある。アゴニストとはレセプターに作用し、神経伝達物質（やホルモンなど）と同じ生体応答を引き起こす化学物質（作動薬）を指す。一方、アンタゴニストはアゴニストと同様にレセプターに作用するが、神経伝達物質（やホルモンなど）の作用を抑制する化学物質（作動薬）を指す。
- 12) 脊椎動物網膜視細胞は錐体と桿体の2種に分類される。錐体は光感度が低く昼間の視覚に、また桿体は光感度が高く薄明（夕方及び夜間）の視覚に役立っている。錐体では、外節の形質膜が内側に折り畳まれ層状構造を形成し、この層状構造に錐体視物質が存在している。一方、桿体では、外節内に二重膜円盤が数百枚以上重なり層状構造を形成し、この円盤膜（形質膜との物理的な繋がりはない）上にロドプシン（桿体視物質）が存在している。視物質が光を受容するメカニズムに関しては、桿体でよく調べられている。光量子が桿体外節内の円盤膜に存在するロドプシンに衝突すると、ロドプシンは褪色する。この結果、桿体外節に発現するイオンチャンネルにまでロドプシン褪色の影響が伝播する必要がある。Hagins (1972) および Hagins & Yoshikami (1974) は暗時に桿体内の円盤に  $\text{Ca}^{2+}$  が蓄えられており、ロドプシン褪色に伴い円盤から  $\text{Ca}^{2+}$  が外節内に放出され、ナトリウムチャンネルが開くという仮説を提唱した。これは  $\text{Ca}^{2+}$  仮説と呼ばれている。一方、Nicol & Miller (1978) と Miller & Nicol (1979) はロドプシン褪色に伴い細胞内の 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) が減少し、ナトリウムチャンネルが開くという仮説を提唱した。これは cGMP 説と呼ばれている。両仮説を証明するために、幾多の実験が行われたが決着がつかなかった。Fesenko *et al.* (1985) が、桿体外節内に cGMP によって開く陽イオンチャンネルが存在することを見出し、10年以上にも及ぶ論争に決着がついた。
- 13) Golgi 鍍銀染色法は硝酸銀を重クロム酸カリウムと反応させ、クロム酸銀の粒子を神経細胞の表面に沈着させる染色法である。神経組織の中の少数の神経細胞全体が黒色に染まるため、細胞体のみならず樹状突起、軸索やシナプス終末まで神経細胞の全体を顕微鏡観察することができる。1873年、Golgi 鍍銀染色法は Golgi (Camillo Golgi, 1843–1926) によって開発され、以降中枢神経系の構造研究に中心的役割を果たした。また、Cajal (Santiago Ramón y Cajal, 1952–1934) はこの鍍銀法を利用して、中枢神経系（網膜を含む）の神経構築を明らかにした。
- 14) 光学顕微鏡は虫眼鏡の原理を発展させた拡大鏡であり、光と光学レンズを利用する。光を利用した拡大には限界があり、可視光の波長よりも小さいものを見ることはできない。実際には、 $0.2\ \mu\text{m}$  ( $2 \times 10^{-7}\ \text{m}$ ) まで見ることが可能である。一方、電子顕微鏡では光よりも波長が短い電子線を利用するため、光学顕微鏡よりも遥かに解像度が高い。電子線と電子レンズ（電磁石を利用したしくみ）を利用する。電子顕微鏡での限界は、 $0.2\ \text{nm}$  ( $2 \times 10^{-10}\ \text{m}$ ) ほどである。細胞全体を観察するのであれば、光学顕微鏡で充分である。しかし、細胞の一部を拡大するのであれば、電子顕微鏡が必要である。シナプスの微細観察に、電子顕微鏡は欠かせない。
- 15) 現在、約40種の神経伝達物質が知られている。神経伝達物質がシナプス後神経細胞に発現するレセプターに作用することによって、脱分極性応答を惹起する興奮性シナプスと、反対に過分極性応答を惹起する抑制性シナプスが存在する。興奮性シナプスの神経伝達物質として L-グルタミン酸、アセチルコリンやアドレナリンなどが知られている。一方、抑制性シナプスの神経伝達物質として GABA やグリシンなどが知られている。神経伝達物質のレセプターはその作用のメカニズムの違いから、イオンチャンネル直結型レセプターと代謝調節型レセプターに分類される。L-グルタミン酸や GABA のレセプターにはイオンチャンネル直結型と代謝調節型が知られており、それぞれは特異なシナプス伝達に関与している。
- 16) ON 型双極細胞も OFF 型双極細胞も第二次神経細胞であり、両細胞共に視細胞から直接シナプス入力を受け取っている。両細胞が逆の膜電位変化を示すのは、それぞれに発現するレセプターが異なるためである。OFF 型双極細胞には Kainic acid (KA)/(RS)- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸レセプター（イオンチャンネル直結型グルタミン酸レセプター）、そして ON 型双極細胞には 2-Amino-4-phosphonobutyric acid (APB) 感受性グルタミン酸レセプター（代謝調節型グルタミン酸レセプター）が発現している。このため、視細胞から放出される神経伝達物質が同一



- であっても、両双極細胞は異なるレセプターを有しているため、極性の異なる膜電位変化が惹起される。
- 17) 電気シナプスでは神経細胞同士がギャップ結合を介して接続している。このギャップ結合はコネクソンと呼ばれるタンパクが6分子環状に集まり、直径1~2 nmの孔(通路)を形成している。この孔をイオンや分子が通過することができる。従って、2つの神経細胞が電気シナプスを介して接続しているとき、一方の神経細胞に発生した活動電位は遅延することなく他の神経細胞に伝達される。Kaneko (1970) はサメ網膜の水平細胞に Procion yellow を注入すると、他の水平細胞にもこの色素が拡散することを発見したが、この現象はギャップ結合を介した色素の移動を観察した結果である。
  - 18) Svaetichin (1953, 1956) は魚類網膜にガラス管微小電極を適用し、膜電位変化を細胞内記録した。網膜内に刺入した電極先端の位置を考慮し、膜電位変化を錐体から導出したと結論した。そして、錐体電位と命名した。その後、この膜電位変化が錐体由来ではないことが判明したものの、その細胞が確定しないため、Motokawa は S-potential と呼ぶことを提案した。S-potential を発生する細胞の検索は10年余も続き、1970年に水平細胞の膜電位変化であることが確定した。その後も S-potential は水平細胞の膜電位変化という意味で使われ、今でも生きている。総ての波長の可視光刺激に対して過分極性応答を示すとき、L型(Luminosity type) S-potential、また波長に依存して光応答の極性が変化するとき、C型(Chromaticity type) S-potential と言う。S-potential が水平細胞由来であることが明らかになった後、L型水平細胞そしてC型水平細胞と呼ばれている。コイ網膜ではL型水平細胞は Photopic L型水平細胞(赤色錐体から主にシナプス入力を受け取る水平細胞)と Scotopic L型水平細胞(桿体からシナプス入力を受け取る水平細胞)の二種類に、そしてC型水平細胞はRG型水平細胞(赤色で脱分極性光応答そして青色と緑色で過分極性光応答を示し、主に緑錐体からシナプス入力を受け取る水平細胞)とRYB型水平細胞(黄色で脱分極性光応答そして青色と赤色で過分極性光応答を示し、主に青錐体からシナプス入力を受け取る水平細胞)の二種類に分類されている。
  - 19) 化学シナプスにおいて、放出された神経伝達物質はイオンチャネル直結型レセプターあるいは代謝調節型レセプターに作用する。代謝調節型レセプターに神経伝達物質が作用すると、細胞内の3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cGMP, Inositol 1,4,5-trisphosphate (イノシトール三リン酸あるいはIP<sub>3</sub>)やCa<sup>2+</sup>などを介して複数の化学反応が連続して進行し、最終的にイオンチャネルの開閉に至る。cAMP, cGMP, イノシトール三リン酸やCa<sup>2+</sup>などのように、レセプターからの情報を細胞内に伝達する際の最初の化学物質をセカンドメッセンジャーと呼ぶ。
  - 20) 多細胞生物を構成する同種の細胞は、細胞接着分子(コラーゲン、フィブロネクチンなど)によって接着している。従って、中枢神経系の神経組織から単一神経細胞を単離する場合、神経組織間にある細胞接着分子を分解する必要がある。このためタンパク質分解酵素による化学的処理が行われる。網膜において単一神経細胞を単離する場合、網膜をPapainやCollagenaseなどの酵素で処理し、その後ガラスピペットを出し入れするような機械的な操作を加える。この結果、単離神経細胞を得ることができる。当然、網膜に機械処理を施すため、神経細胞の微細な樹状突起や細い神経軸索などは消失する。しかし、単離後生存している神経細胞にはイオンチャネルやリガンドレセプターが残存し、これらの解析にこの細胞は非常に便利である。
  - 21) パッチクランプ法(Patch clamp technique)はErwin Neher (1944~)とBert Sakmann (1942~)により開発された電気生理学の実験手法である。パッチ電極を神経細胞などに圧着して1 GΩ以上の強固なシールを達成し、単一イオンチャネルの電気的活動を記録するために利用した。この業績により、両者は1991年ノーベル生理学・医学賞を受賞した。パッチクランプ法は単一イオンチャネルのみならず細胞全体の電気的現象を記録するためにも利用されるようになり、その適用範囲は著しく拡大した。単一イオンチャネルの電気的活動を記録するための方法として、パッチ電極の先端が取り囲んだ細胞膜のイオンチャネルを解析する方法として、セルアタッチ法(Cell attached patch recording)、インサイドアウト法(Inside-out patch recording)とアウトサイドアウト法(Outside-out patch recording)が開発された。また、細胞全体の電気現象(膜電流あるいは膜電位)を記録するための方法として、ホールセル法(Whole-cell patch recording)とパーフォレイテッド法(Perforated whole-cell patch recording)が開発された。近年、何れの方法も一般的な電気生理学的手法となっている。