フリッカー光刺激に対するヒラメ *in situ* 網膜 S 電位の周波数応答特性

古瀬 正浩, 袋谷 賢吉

(1999年 3 月 3 日受付)

Frequency Response Properties of S-potential in the Retina *in situ* of the Japanese Flounder

Masahiro Furuse* and Kenkichi Fukurotani*

Frequency response properties of L-type S-potential in the retina *in situ* of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* were examined by flicker light stimulus. Three light intensities for the flicker were used. At the lowest intensity, response amplitude of the S-potential decreased monotonically as flicker frequency became higher. At the higher intensities, however, the response amplitude had a sub-peak around 20–30 Hz. We supposed that this phenomenon was some resonance caused by light adaptation of the retina as the light intensity of the flicker, therefore retinal mean illumination, increased. It is thought that S-potential can respond only to low frequencies. However, the obtained critical fusion frequency (CFF) in the experiments was 60 Hz or more, indicating that S-potential is able to respond over 60 Hz in the retina *in situ* of the Japanese flounder.

キーワード：ヒラメ, 視覚, 網膜, S 電位

フリッカー光による視覚研究は, 心理物理学をはじめ生理学や医学において古くから行われ, また, ヒトだけでなく実験動物についても多くの研究があることから, 実験方法の違いや対象種の違いを越えて, 得られた実験結果を総合的あるいは補完的に検討できる長所もっている。魚類の視覚研究においても, フリッカー光に対する網膜電図 (ERG) が調べられてきた。^{1,2,3)} しかしながら, ERG は多くの細胞からの集合電位であり, 近年, ERG の波形成分の由来細胞が明らかになりつつあるものの,⁴⁾ さらに踏み込んで各神経細胞レベルに還元して考えたいという要求に対し, ERG は十分でない。

この要求を満たすものとしてガラス微小電極法がある。^{1,3)} この方法は, 先端径が 0.1 μm 以下のガラス微小電極を網膜の単一神経細胞に刺入し, その細胞内電位を測定するものである。そこでは, 安定した記録を得るために特に振動を嫌うことから, 網膜試料として剥離網膜標本や眼杯標本が用いられる。眼杯標本とは, 魚体から摘出分離された眼球を赤道に沿って二分し, その後半部から硝子体液を除いて作られるものであり, 剥離網膜標本とは, 眼杯標本からさらに網膜組織だけを剥離したものである。それらの標本は不関電極上に固定して実験に

供される。

魚類の網膜水平細胞は特に細胞体が大きく, ガラス微小電極による細胞内電位計測が比較的容易なことから, 古くから多くの研究が行われてきた。水平細胞の細胞内電位は, その発見者 Svaetichin の頭文字を冠して, S 電位とも呼ばれる。S 電位は, その発見当初から, 時間的に持続性のある遅い応答が特徴とされ,⁵⁾ このローパスフィルターの機能は, その後の研究でも多く報告されて来た。すなわち, S 電位の周波数応答特性で振幅利得が 1/2 となるカットオフ周波数は, よく調べられているコイの場合, 剥離網膜標本で数 Hz,^{6,7,8)} 眼杯標本では 10 Hz 前後と言う。^{9,10)} また, ナマズの眼杯標本で数 Hz,^{11,12)} さらにカメの眼杯標本からの S 電位でも数 Hz と報告されている。¹³⁾ 一方, 血流を保った状態の網膜では S 電位の周波数応答は, ネコの場合, 60 Hz にもなるものがあることが報告されている。^{14,15)} これらの違いは種の違いによるものなのか, あるいは, 実験に用いた網膜標本の違いから来るものなのか明確でない。もし後者が原因であれば, 魚類の網膜 S 電位は, 実際の生体内では, 考えられている以上に高い周波数に応答可能ということになる。

* 富山大学工学部知能情報工学科 (Department of Intellectual and Information Systems, Faculty of Engineering, Toyama University, Gofuku, Toyama 930-8555, Japan).

近年, 麻酔下人工呼吸状態で, 魚類の血流を保った網膜から, 単一神経細胞内電位を計測する手法が開発された。¹⁶⁻¹⁹⁾ また, 同手法によるヒラメの明順応網膜からは L 型と C 型の 2 種の S 電位が記録された。²⁰⁾

以上の背景のもとに, 本研究では, 麻酔下人工呼吸状態でのヒラメの *in situ* 網膜において, フリッカー光に対する L 型 S 電位を計測し, その周波数応答特性を求めることを主目的とした。得られた結果は, ヒトの心理物理学的研究や生理学的研究なども参考に, 広い角度から考察した。また, 本実験手法の新規性に鑑み, それを詳述した。

方 法

供試魚 体色異常の認められない養殖ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の当歳魚を対象とした。実験魚を MS222 (三共) に薬浴後, えら呼吸の停止を待って筋弛緩剤 (Roche, Dialferin) を 0.01 ml/体重 10 g の割合で体内注射し, 元の飼育水槽に戻した。不動化を確認後, 速やかに実験水槽に移し, 魚体を眼から上が水面から出る形にアクリル製のベッドに固定した。十分にエアレーションされた海水を口からえらに通すことにより人工呼吸を行った。手術により角膜, 硝子体を切除したが, 虹彩は損傷により出血を招くため, そのまま残した。そのため, 前眼部に照射された刺激光パターンの外辺部は虹彩により阻止され, 網膜の光照射部位も中心部に制限される。しかし実験魚の瞳孔は筋弛緩により散大するため, ガラス微小電極の網膜刺入位置を網膜中心部付近にとることで, 水平細胞の受容野全体をカバーできた。

フリッカー光に対する ERG の周波数特性は温度に依存すると報告されているので,^{21,22)} 本実験での水温を, $18 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った。また, 供試魚は実験終了後直ちに断頭処理した。

光刺激系 直流点灯された 500 W キセノンランプ (ウシオ電機, UXL-500D) からの白色光を分光器 (Jobin yvon, H20UV) に通して半値幅約 5 nm の単色光を得, 集光レンズにより試供魚の前眼部にむらなく垂直に照射した。光の強さの調節は, 適切な ND フィルター (日本真空光学) を光路中に挿入することにより行った。

光の強さの測定には, 主としてシリコンフォトダイオード (浜松ホトニクス, S1337-1010BQ) を用いたが, 弱い光に対してはメーカー校正済のホトマル (浜松ホトニクス, R636) を使用した。また, 分光特性の定期的検査には, マルチチャンネル分光計 (浜松ホトニクス, PMA-11) も併用した。

刺激光波長スキャンにより L 型 S 電位を同定後,²⁰⁾ 光波長を L 型 S 電位の最大感度波長である 520 nm に

固定して実験を行った。

シャッターは, ステッピングモーターの回転軸にアルミホイールを切り抜いた矢羽根を取り付けて自作し, 分光器の入射スリットの約 1 mm 前に置いた。ステッピングモーターは自作のコンピュータからの信号で駆動した。本実験での駆動周波数帯域 (1~80 Hz) でシャッターの動作試験および調整を次のように行った。網膜の相当位置に置かれた PIN フォトダイオードの出力と, ステッピングモーター駆動信号とをデジタルオシロスコープ (横河, DL1200) に記録した。その結果, 自作ダンパーをステッピングモーターに取り付けることにより, 駆動周波数帯域全体 (1~80 Hz) で, 立ち上がり時間遅れ, 立ち下がり時間遅れ共に 2 ms 以下を実現できた。

シャッターは開閉を同時間ずつ繰り返した。つまり, フリッカー光刺激はデューティ比 50% の方形波であり, その時間平均は, シャッター開時の光の強さの半分となる。したがって, 刺激光はまた, その平均値を中心に, 方形波により変調度 100% に変調されたものとみなすことができる。このことは方形波のすべての繰り返し周波数について言える。Fig. 1 にフリッカー光刺激 $i(t)$ の時間波形を示す。Fig. 1 で, I_0 はフリッカー光刺激の強さの平均値, T は繰り返し周期を表す。繰り返し周波数を f とすれば, $f=1/T$ の関係がある。

この平均値 I_0 は網膜順応光の強さとみなされる。したがって, I_0 を変えることにより, 網膜の順応レベルを変えることができる。

本実験においては, 周波数 $f=1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 80$ Hz を採用した。一方, 平均の強さは, $I_0=0.41 \times 10^7, 0.40 \times 10^6, 0.82 \times 10^5$ 光子数/($\text{mm}^2 \cdot \text{s}$) の 3 段階を用いた。これらを常用対数の相対値で表し, 以後, それぞれ, 0 log, -1 log, -1.7 log の光の強さと呼ぶ。

記録系 パイレックスガラス管 (O.D.=10 mm, I.D.=6 mm) 内に, 細いパイレックスガラス管

Fig. 1. Time course of flicker light stimulus, $i(t)$. I_0 , mean intensity; T , iteration period.

(O.D.=1.5 mm) を入れ、ガラス引伸器 (成茂, PY-6) により、いわゆるファイバー入りガラス管を作った。それを modified Livingston タイプのプラー (高橋精機, EH-12) で引いてガラスマイクロピペットを作り、その中に 4M の酢酸カリウム水溶液を充填し、また銀線を挿入してガラス微小電極とした。ガラスマイクロピペットは、テーパ付き部分を長く (30 mm 以上) することで先を細くし、刺激光との接触部分を少なくした。ガラス微小電極の網膜刺入位置は網膜中心付近とした。実験魚の頭部にステンレス製の不関電極を密着させ、それを接地線に結んだ。ガラス微小電極からの電位は、ボルテージホロワ接続された FET 入力 OP アンプ (Burr-Brown, 3523L) によりインピーダンス変換の後、741 型 OP アンプにより主増幅し、パソコン (NEC, PC-9801EX) に増設した AD 変換ボード (マイクロサイエンス, ADM-1498BPC) へ入力した。AD 変換は 12-bit 精度で、サンプリング時間周期 2 ms とし、デジタル値に変換されたデータは、オンラインでモニター画面に表示し、あらかじめキー入力された実験条件等のコメントと共にパソコンに外付けのハードディスク装置に自動的に記録した。

周波数分析 S 電位の周波数分析は 2 つの方法で行った。1 つ目の方法は、光刺激-S 電位応答の伝達系の線形性、非線形性を問題にしないもので、単に S 電位の peak to peak 振幅値 V_{PP} の周波数特性を求めた。2 つ目の方法は、広く行われているように、^{6,7,8,10} 光刺激-S 電位応答の伝達系を線形とみなし、S 電位応答の振幅利得と位相シフトの周波数特性をボード線図の形に求めた。この際、以下の方法をとった。

Fig. 1 の刺激光 $i(t)$ をフーリエ展開すると次式で表される。

$$\begin{aligned} i(t) &= I_0 + (4I_0/\pi) [\sin(2\pi ft) + (1/3) \sin(6\pi ft) \\ &\quad + (1/5) \sin(10\pi ft) \\ &\quad + (1/7) \sin(14\pi ft) + \dots] \\ &= I_0 + (4I_0/\pi) \sum_k [(1/k) \sin(2\pi kft)] \\ &\quad (k=\text{奇数}) \end{aligned} \quad (1)$$

光刺激-S 電位伝達系が線形ならば、 $i(t)$ に対する S 電位応答 $v(t)$ は、フーリエ展開により次式で表される。

$$\begin{aligned} v(t) &= V_0 + (4V_0/\pi) [A_1 \sin(2\pi ft + \phi_1) \\ &\quad + (1/3) A_3 \sin(6\pi ft + \phi_3) \\ &\quad + (1/5) A_5 \sin(10\pi ft + \phi_5) \\ &\quad + (1/7) A_7 \sin(14\pi ft + \phi_7) + \dots] \\ &= V_0 + (4V_0/\pi) \sum_k [(A_k/k) \sin(2\pi kft + \phi_k)] \\ &\quad (k=\text{奇数}) \end{aligned} \quad (2)$$

ここで A_k と ϕ_k は、それぞれ k 次成分の振幅利得および位相シフトである。理論的には (1) 式と (2) 式における同次数成分同士の比較により、振幅利得並びに位相シ

フトの周波数特性を一度に求めることもできる。しかし、(1) 式から分かるように、フリッカー光刺激 $i(t)$ の 1 次成分すなわち基本波成分は、他の k 次成分 ($k=3, 5, 7, \dots$) の k 倍の大きさがある。ゆえにここでは測定精度を高めるため、基本波成分同士のみ比較することとし、代わって周波数 f を変えた。S 電位応答には、時間の経過につれて定常化の傾向が見られた。この S 電位応答 $v(t)$ の定常状態における時間平均から直流成分 V_0 を求めるとともに、基本波成分 ($k=1$) を抽出し、 A_1 と ϕ_1 を求めた。このことを、あらかじめ選定した周波数 f について繰り返した。さらに、これらの手順をフリッカー光刺激 $i(t)$ の平均の強さ I_0 を変えて繰り返した。

データ処理 ハードディスクに記録されたデータを後に読み出して、他のパソコンで市販ソフトウェア Matlab (Mathworks, ver.5) にて処理した。まず、S 電位応答データに対し、前処理として直流成分を除いた後、デジタルローパスフィルターにより高周波ノイズ成分を除去した。このデジタルローパスフィルターには、Matlab 標準のフィルタ関数の中から、通過域 0~90 Hz (± 2 dB)、遮断域 110 Hz 以上 (-40 dB)、次数 17 次の等リプル FIR フィルターを用いた。

S 電位応答の定常部分に対し、高速フーリエ変換 (FFT) を用いて基本波成分の抽出を行った。具体的には、サンプリングしたデータ 2 s の内、後半 512 点を切り出し、直流分を除去後、ハニング窓をかけ、FFT 処理を施した。この FFT 計算結果から、基本周波数 f に対応した FFT 計算値を取り出した。

結 果

一般に、強さ I のフラッシュ光に対する S 電位の応答最大振幅 V は次式で近似されることが知られている。²³⁾

$$V/V_{\max} = I^n / (I^n + \sigma^n) \quad (3)$$

ここで $V_{\max}$ は V の最大飽和値、 σ は $V = V_{\max}/2$ を与える光の強さ、 n は定数である。

本実験において、S 電位の応答最大振幅はフリッカー光の照射直後に生じた。Fig. 2 は、このような S 電位の動作の概要を示すためのものである。Fig. 2 の下方には、光の強さ $0 \log$ のフリッカー光を示した。Fig. 2 の縦軸は S 電位応答を電圧で目盛ってある。一方、横軸はフリッカー光の平均の強さ I_0 を、最大のもの $I_0 = 0.41 \times 10^7$ 光子数/(mm²・s) を基準として常用対数で目盛ってある。Fig. 2 の中にはまた、それぞれ光の強さ $0 \log$, $-1 \log$, $-1.7 \log$ の 10 Hz フリッカーに対する S 電位応答例も示したが、その場合には、右から左方向が時間の経過を意味している。これら S 電位応答例から

Fig. 2. Outline of the input (flicker stimulus)-output (S-potential response) relationship.

The figure demonstrates sample records of 10 Hz flicker and responses for three different mean intensities (0 log, -1 log and -1.7 log). The relationship between the initial amplitude of response (V) and the intensity of the stimulus ($I=2I_0$) is approximated by the formulas, $V/V_{\max}=I^n/(I^n+\sigma^n)$, shown by a bold solid curve in the figure, where $V_{\max}=-24.2$ mV, $\log \sigma=-0.86$ and $n=0.82$.

も最大振幅はフリッカー光の照射直後に生じていることが分かる。この最大振幅値 V を、フリッカー光の ON 時の強さ $I=2I_0$ に対して●印でプロットした。また、Fig. 2 に太い実線で示したように、ここでの I と V の関係も(3)式で近似することができた。ただし、 $V_{\max}=-24.2$ mV, $\sigma=-0.86$ log, $n=0.82$ であった。また、この I - V 曲線は、横軸が 0 より大きくなるにつれ、しだいに飽和している。このことから、本実験で用いた光の強さ 0 log のフリッカー刺激は、ヒラメにとってかなり強い光であると思われる。

再び Fig. 2 中に示された S 電位応答波形をみると、フリッカー光の始まりでは S 電位応答の変動分の振幅が小さい。しかし、時間の経過とともに、S 電位応答の直流分が減少し、変動分が増大してくる。やがて、それらの変化は時間とともに定常値に向うが、刺激光の強さ

Fig. 3. S-potential responses for flicker of 0 log intensity.

The uppermost is the raw data of responses at all frequencies. In the lower figures, flicker and responses are plotted in two cycles at frequencies of 2, 5, 10, 20 and 40 Hz.

が弱いほど、速く定常値に達する傾向が見てとれる。

Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 の最上段は、それぞれ 0 log, -1 log, -1.7 log の光の強さの場合について、フリッカー光変調周波数を $f=1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 80$ Hz と次々変えながら測定した S 電位の概要を示すためのものである。そこでは、1 Hz および 2 Hz のフリッカー光に対し、S 電位は暗時に元の静止レベルまで戻っている。しかし、5 Hz 以上では戻ることができなくなる。このことは、S 電位の少なくとも一部の成分に、光の ON 時の時間遅れよりも OFF 時の時間遅れの方が長いものがあることを示唆している。Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 の最上段の各図ではまた、各周波数において、Fig. 2 の S 電位応答に見られたような、時間の経過につれての直流分の減少と変動分が増大、そして定常化の傾向が見られる。

Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 において、上から 2 段目以下は応答の拡大例で、それぞれ $f=2, 5, 10, 20, 40$ Hz における刺激光波形ならびに S 電位応答波形を 2 周期分だけ示している。周波数が高くなるにつれ、S 電位の応答波形は、概して方形波状からのこぎり波状、そしてサイン波状に変化している。

Fig. 4. S-potential responses for flicker of $-1 \log$ intensity.

Fig. 5. S-potential responses for flicker of $-1.7 \log$ intensity.

V_0 は一定の明るさ感に, V_{PP} はちらつき感に対応する。 V_0 と周波数との関係を Fig. 6 に示す。Fig. 6 において, V_0 の大きさは周波数が高くなるにつれしだいに増大し, やがて一定になる。Fig. 7 は V_{PP} の周波数特性である。そこでは, V_{PP} は光の強さ $0 \log$ の 1 Hz の場合を基準にとり, デシベル (dB) 相対値で表示した。Fig. 7 において, 光の強さ $-1.7 \log$ では, 周波数が高くなるにつれ V_{PP} はほぼ単調に減少しているのに対し, 光の強さが $-1 \log$ そして $0 \log$ と強くなるにつれ, $f=20 \sim 30 \text{ Hz}$ 付近にサブピークが生じている。また, $-1 \log$ そして $0 \log$ では, $5 \sim 20 \text{ Hz}$ の範囲に限って V_{PP} に大差がない。また, V_{PP} は $-1 \log$ と $-1.7 \log$ では, 60 Hz から 80 Hz にかけて増大している。このことは, この辺りがノイズレベルにあることを示しており, したがって臨界融合周波数 (CFF) は約 60 Hz と考えられる。

定常状態における S 電位応答の最大値を $V_{\max}$, 最小値を $V_{\min}$ とする。フリッカー光変調度に対応して ((6) 式参照), S 電位応答の変調度 η を次式で定義する。

$$\eta = (V_{\max} - V_{\min}) / (V_{\max} + V_{\min}) = V_{PP} / (V_{\max} + V_{\min}) \quad (4)$$

η の周波数特性を Fig. 8 に示す。方法の光刺激系で述べたように, フリッカー光の変調度はすべての周波数で 100% つまり 1 一定であった。一方, Fig. 8 で η の値が

Fig. 6. DC component (time-average) of S-potential responses at stable level.

1 より大きな所は, S 電位応答にオーバーシュートが見られる結果であり, 1 より小さな所は, フリッカー光に対し, 暗時に静止レベルまで戻れないためである。光の強さ $-1.7 \log$ では $1 \sim 6 \text{ Hz}$, 光の強さ $-1 \log$ では $1 \sim 4 \text{ Hz}$ の範囲で η の値が 1 を越えている。

方法で述べた 2 つ目の周波数分析方法により, フリ

Fig. 7. Peak-to-peak amplitude (V_{pp}) of S-potential responses at stable level.

V_{pp} is normalized by the largest value.

Fig. 8. Modulation depth of S-potential responses.

ッカー光に対する S 電位の周波数特性を, 振幅利得と位相シフトに分けて図示したのが Fig. 9 と Fig. 10 である。Fig. 9 では, Fig. 7 と同様, 0 log の 1 Hz の値で正規化し, デシベル (dB) 値で表示した。Fig. 9 における振幅利得の周波数特性は, Fig. 7 における V_{pp} の周波数特性に似ている。しかし, Fig. 9 の振幅利得は 60 Hz 以上の周波数でも低下を続けている。この場合, CFF は 80 Hz 以上と考えられる。この違いは, V_{pp} の場合, 単に処理時間内における peak to peak 振幅の最大値をとっているためノイズに敏感なのに対し, Fig. 9

Fig. 9. Bode plot of amplitude gain of responses.

All amplitude gains are normalized by the largest one, which is for an intensity of 0 log and a frequency of 1 Hz.

Fig. 10. Bode plot of the phase shift of S-potential responses.

の振幅利得は FFT を介して求めたので, FFT アルゴリズム内の平均処理によりノイズが低減されたためと考えられる。いずれにせよ田村らは,²⁴⁾ CFF を一意に決めることの難しさを指摘し, 代わって, ERG の振幅がその最大の 1/2 になる周波数 FHMA を用いることを提案している。Table 1 に本実験結果の CFF および FHMA をまとめて示した。また, Fig. 10 における位相シフトの周波数特性には, 光の強さによる違いがわずしか見られない。

Table 1. CFF and FHMA of S-potential which are estimated from Fig. 7 and Fig. 9

Light Intensity	CFF at Vpp [Hz]	CFF at Amp. [Hz]	FHMA at Vpp [Hz]	FHMA at Amp. [Hz]
0 log	≥80	≥80	7	7
-1 log	~60	≥80	24	24
-1.7 log	~60	≥80	13	9

考 察

網膜試料 剥離網膜標本では、視物質の再生に与る色素上皮層が除かれるため、視物質の再生が期待できない。眼杯標本では色素上皮層が残り、視物質の再生が望めるが、血流が無いため再生は部分的である。このように、剥離網膜標本と眼杯標本では、網膜は光の照射に連れて明順応が絶えず進行し、視物質の感光と再生が釣り合った一定の明順応状態に保たれない。つまり、従来の網膜試料をもっては、厳密に定常な明順応状態は達成できないものと考えられる。このことは研究者に広く知られており、したがって剥離網膜標本や眼杯標本の作成前に、実験動物を十分に暗順応させるのが普通である。その結果、これらの標本は、弱い刺激光のみ、あるいは短時間の強いフラッシュ刺激光を用いた暗順応網膜の実験には比較的長時間使用できる。過去に報告された S 電位の周波数特性の多くが、程度の差はあるにせよこのような暗順応網膜についてのものと思われ、これも周波数応答が遅くなった一因と思われる。

本実験結果の Fig. 7 および Fig. 9 のグラフや Table 1 の緒量から分かるように、CFF は 60 Hz 以上と考えられる。このことから、魚類においても、生体内で血流を保った明順応状態の網膜においては、S 電位は、従来考えられていた以上に高い周波数に応答することが示唆された。また、Table 1 にあるように、FHMA は刺激光の強さが弱い場合 (-1.7 log) よりも、強い場合 (-1 log) の方が高くなった。しかしながら、さらに高い平均の強さでは (0 log)、FHMA は大きく下がった。このことは Fig. 2 から分かるように、S 電位が動作の飽和域にかかるため、時間特性に影響したものと考えられる。

周波数特性におけるサブピーク Fig. 7 および Fig. 9 の周波数特性において、光の強さが 0 log と -1 log の場合に 20 Hz 付近にサブピークが現れた。同様の共鳴現象は、コイ¹⁰⁾やネコ¹⁵⁾の S 電位でも報告されている。さらには、フリッカー光に対するヒトの心理物理実験において、Kelly²⁵⁾と De Lange²⁶⁾が、ヒト ERG について

Heck²⁷⁾が同様の結果を得ている。したがって、これは、種の違いを越えて普遍的な現象と思われる。ヒトの場合、この現象は明順応に関連づけて次のように解釈されている。平均の強さが強くなると、網膜の明順応が進み、それによって低周波数の感度が低下するのに対し、高い周波数の感度はほとんど明順応の影響を受けないというものである。この考えに従えば、Fig. 7 および Fig. 9 において、-1.7 log から -1 log への光の強さの上昇に伴い、網膜の明順応が進むため、20~30 Hz 付近に共鳴ピークが現れたと解釈できる。また -1 log から 0 log への光の強さの上昇では、S 電位が飽和動作域にかかり、時間特性への影響を複合的に受けた結果、5~20 Hz の周波数帯域で感度低下が顕著になったものと思える。

このようなサブピークが生じるメカニズムの詳細は明らかでないが、視細胞の光電変換 (phototransduction) 系中には多くの負帰還作用があると言われ、²⁸⁾ また、水平細胞から視細胞への負帰還作用も知られていることから、²⁹⁾ それらを含め何らかの内部メカニズムが、明順応に伴って発現し、周波数選択的に作用していると思われる。

刺激光波形の影響 本実験では、フリッカー光波形として方形波を用いた。最近では、心理学実験をはじめ、生理学実験においても、フリッカー光波形に三角関数が用いられることが多い。^{30,31,32)} すなわち、

$$i(t) = I_0[1 + m \sin(2\pi ft)] \quad (5)$$

とすれば、平均の強さ I_0 と変調度 m を独立に変えることができる利点と、フーリエ変換法と直接結びつく利点がある。しかし、フリッカー光に三角関数波形が本格的に使用されるようになったのは、1950 年代後半になってからである。³¹⁾ それ以前の実験では、ほとんど方形波が用いられた。その理由は単に技術的簡便さからのもので、光路中に切れ込みを入れた回転円盤を置いて光を断続し、その回転数を変えるやり方が容易に実現できたからである。本実験のフリッカー光生成法もこれに類したものである。

得られた S 電位の周波数特性が、用いたフリッカー光の変調波形に依存するかどうかの問題がある。ヒトの心理学的実験では、様々な波形のフリッカー光を用いて周波数特性を比較した結果、低い周波数ではフリッカー光の時間平均すなわち平均の強さ、高い周波数では、その基本波成分のみで感度特性が決まることが知られている。^{26,33-35)} 実際に検証すべきことだが、仮にこれらのことが S 電位でも成り立つとすれば、フリッカー光の変調波形はあまり問題にならないことになる。実際、Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 の最下段の 40 Hz のフリッカー光に対する応答は基本サイン波に近いものとなっており、

少なくとも高い周波数では S 電位でもこのことの成り立つことが期待される。

水産養殖との関連 小池³⁶⁾によれば, 一定光に対し顕著な走光性を示す魚種でも, 時間周期の遅い断続光に対しては, 忌避行動やある種の混乱行動を示すという。

(5)式において, 刺激光の最大値を $I_{\max}$, 最小値を $I_{\min}$ とすれば, 変調度 m は,

$$m = (I_{\max} - I_{\min}) / (I_{\max} + I_{\min}) \quad (6)$$

で表される。

本実験では, 変調波はサイン波に代えて方形波で, 変調度は $m=1$ 一定であった。このフリッカー光の変調度 m に対応するものとして, 応答にも同様の量 η を(4)式で定義した。得られた結果を Fig. 8 に示した。Fig. 8 のグラフから, フリッカー光刺激は, その強度が適度であれば, 低い周波数での S 電位応答に大きなオーバーシュートを伴うことが分かった。これは強烈的な光刺激として魚類に作用することが考えられる。

より高い周波数が魚類の行動に与える影響は, 必ずしも明確ではないが, 多少のちらつき感でも長時間にわたれば, 何らかのストレスを生じる可能性は否定できない。養殖水槽の人工照明に広く用いられている蛍光灯の光は, 商用電源周波数の 2 倍の周波数を基本波とするフリッカー光である。ゆえに, その基本周波数は東日本で 100 Hz, 西日本で 120 Hz になる。これらの周波数は, 今回調べたヒラメの S 電位の CFF から判断する限り, 問題ないように思える。しかし, ERG の研究によれば, 魚種により CFF には違いが見られ, 一般に, ヒラメのような底魚よりも浮き魚の方が CFF は高いといわれる。³⁷⁾ 魚種によっては, 注意する必要があるかもしれない。

本実験結果にみられたように, S 電位の周波数特性には $f=20\sim30$ Hz 付近にサブピークが生じる。フリッカー光によるヒトの心理実験でも, より明るく感じられる周波数帯のあることが知られている。^{38,39)} フリッカー光のこのようなサブピーク周波数における魚類の行動は興味のある所で, 今後の課題としたい。

文 献

- 1) 田村 保: 視覚, 「魚類生理(改定増補版)」(川本信之編), 恒星社厚生閣, 東京, 1977, pp. 451-479.
- 2) 小林 博: ERG と魚眼の機能, 「魚類生理(改定増補版)」(川本信之編), 恒星社厚生閣, 東京, 1977, pp. 480-490.
- 3) 田村 保: 魚の眼の機能の研究, 日本誌, **29**, 75-89, (1963).
- 4) 村上元彦: 網膜電図 (ERG), 「新生理学大系 第 9 巻 感覚の生理学」(田崎京二, 小川哲朗編), 医学書院, 東京, 1989, pp. 109-115.
- 5) G. Svaetichin: The cone action potential. *Acta Physiol. Scand.*, **29** Suppl., **106**, 565-600 (1953).
- 6) H. Spekrijse and A.L. Norton: The dynamic characteristics of color-coded S-potentials. *J. Gen. Physiol.*, **56**, 1-15 (1970).
- 7) J. Toyoda: Frequency characteristics of retinal neurons in the carp. *J. Gen. Physiol.*, **63**, 214-234 (1974).
- 8) M. Yamada, Y. Shigematsu, and M. Fuwa: Latency of horizontal cell response in the carp retina. *Vision Res.*, **25**, 767-774 (1985).
- 9) K. Fukurotani, K.-I. Hara, and Y. Oomura: Dynamic characteristics of the receptive field of L-cells in the carp retina. *Vision Res.*, **15**, 1403-1405 (1975).
- 10) K. Fukurotani and K.-I. Hara: Dynamic characteristics of the receptive field of L-cells for monochromatic lights. *Biol. Cybernetics*, **23**, 149-156 (1976).
- 11) Z. Marmarelis and K.-I. Naka: Nonlinear analysis and synthesis of receptive-field responses in the catfish retina. II. One-input white-noise analysis. *J. Neurophysiol.*, **36**, 619-633 (1973).
- 12) M. Sakuranaga and K.-I. Naka: Signal transmission in the catfish retina. III. Transmission to type-N cell. *J. Neurophysiol.*, **53**, 390-410 (1985).
- 13) D. Tranchina, J. Gordon, and R. Shapley: Spatial and temporal properties of luminosity horizontal cells in the turtle retina. *J. Gen. Physiol.*, **83**, 573-598 (1983).
- 14) O.-J. Grüsser: Cat ganglion-cell receptive fields and the role of horizontal cells in their generation, in "The Neurosciences. The fourth study program" (ed. by F. W. Schmitt and F. G. Worden), MIT Press, Cambridge, 1979, pp. 247-273.
- 15) W. A. van de Grid and O.-J. Grüsser: Frequency transfer properties of cat retina horizontal cells. *Vision Res.*, **21**, 1565-1572 (1981).
- 16) K. Watanabe: Electrically evoked responses (E-responses) of the carp horizontal cells, in "The S-potential" (ed. by B. D. Drujan and M. Laufer), Alan R. Liss, Inc., New York, 1982, pp. 123-136.
- 17) X.-L. Yang, M. Tauchi, and A. Kaneko: Convergence of signals from red-sensitive cones onto L-type external horizontal cells of the goldfish retina. *Vision Res.*, **23**, 371-380 (1983).
- 18) M. Tauchi, X.-L. Yang, and A. Kaneko: Depolarizing responses of L-type external horizontal cells in the goldfish retina under intense chromatic background. *Vision Res.*, **24**, 867-870 (1984).
- 19) X.-L. Yang, T.-X. Fan, and W. Shen: Effects of prolonged darkness on light responsiveness and spectral sensitivity of cone horizontal cells in carp retina, *in vivo*. *J. Neuroscience*, **14**, 326-334 (1994).
- 20) 古瀬正浩, 五味正揮, 沼田智幸, 袋谷賢吉: ヒラメの網膜 S 電位のスペクトル応答特性, 日本誌, **65**, 901-902 (1999).
- 21) M. A. Ali and H. Kobayashi: Temperature: influence on the electroretinogram flicker fusion frequency of the sunfish *Lepomis gibbosus*. *Rev. Can. Biol.*, **26**, 341-345 (1967).
- 22) I. Hanyu and M. A. Ali: Electroretinogram and its flicker frequency at different temperatures in light adapted salmon *salmo salar*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **63**, 309-322 (1964).
- 23) J. E. Dowling: The retina: an approachable part of the brain, Harvard Univ. Press, Cambridge, 1987, pp. 93-94.
- 24) T. Tamura and I. Hanyu: The flicker electroretinogram of the carp eye. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **25**, 624-631 (1959).
- 25) D. H. Kelly: Visual responses to time-dependent stimuli. Amplitude sensitivity measurements. *J. Opt. Soc. Amer.*,

- 51, 422-429 (1961).
- 26) H. De Lange: Research into the dynamic nature of the human fovea-cortex systems with intermittent and modulated light. I. Attenuation characteristics with white and colored light. *J. Opt. Soc. Amer.*, **48**, 777-784 (1958).
- 27) J. Heck: The flicker electroretinogram of the human eye. *Acta Physiol. Scand.*, **39**, 158-166 (1957).
- 28) D. Baylor: How photons start vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 560-565 (1996).
- 29) S. M. Wu: Feedback connections and operation of the outer plexiform layer of the retina. *Current Opin. Neurobiol.*, **2**, 462-468 (1992).
- 30) 三田俊定: フリッカー, 「生理学大系 第6巻 感覚の生理学」(勝木保次編), 医学書院, 東京, 1967, pp. 127-142.
- 31) D. H. Kelly: Flicker, in "Handbook of Sensory Physiology, vol.7/4, Visual Psychophysics" (ed. by D. Jameson and L. M. Hurvich), Springer, Berlin, 1972, pp. 273-302.
- 32) W. A. van de Grind, O.-J. Grüsser, and H.-U. Lunkenheimer: Temporal transfer properties of the afferent visual system, in "Handbook of Sensory Physiology, vol.7/3, Central Processing of Visual Information Pt. A" (ed. by R. Jung), Springer, Berlin, 1973, pp. 431-573.
- 33) H. De Lange: Experiments on flicker and some calculations on an electrical analogue of the foveal systems. *Physica*, **18**, 935-950 (1952).
- 34) H. De Lange: Relationship between critical flicker frequency and a set of low-frequency characteristics of the eye. *J. Opt. Soc. Amer.*, **44**, 380-389 (1954).
- 35) D.H. Kelly: Sine waves and flicker fusion. *Documenta ophthalmol.*, **18**, 16-35 (1964).
- 36) 小池 隆: 断続光に対する魚類の反応. 日本誌, **51**, 1097-1102 (1985).
- 37) H. Kobayashi: A comparative study on electroretinogram in fish, with special reference to ecological aspects. *J. Shimonoseki Coll. Fish.*, **11**, 407-538 (1962).
- 38) G. J. C. v. Horst and W. Muis: Hue shift and brightness enhancement of flickering light. *Vision Res.*, **9**, 953-963 (1969).
- 39) S. Wu, S. A. Burns, A. Reeves, and A. E. Elsner: Flicker brightness enhancement and visual nonlinearity. *Vision Res.*, **36**, 1573-1583 (1996).