Nippon Suisan Gakkaishi

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 *Paralichths 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をもって 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。^{12,3)}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 スフィルター的機能は、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) さらには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 ものぼるものの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).

古瀬, 袋谷

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±1℃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 ybon, 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1mm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ーからの信号で駆動 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ィジタルオシロス 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2ms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イ比 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、 $I_0=0.41 \times 10^7$, 0.40×10^6 , 0.82×10^5 光子数/ (mm²·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,テーパー付き部分を長く(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 12bit 精度で、サンプリング時間周期2msとし、ディジ 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。

$$\begin{split} i(t) &= I_0 + (4I_0/\pi) [\sin (2\pi ft) + (1/3) \sin (6\pi ft) \\ &+ (1/5) \sin (10\pi ft) \\ &+ (1/7) \sin (14\pi ft) + \cdots] \\ &= I_0 + (4I_0/\pi) \Sigma_k [(1/k) \sin (2\pi kft)] \\ &(k = 奇数) \quad (1) \\ &| \partial t - S \ \ensuremath{\mathbb{R}} \ \ensuremath{\mathbb{A}} \ \ensuremath{\mathbb{R}} \ \e$$

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。 $v(t) = V_0 + (4V_0/\pi)[A_1 \sin (2\pi ft + \phi_1)]$

+ (1/3)
$$A_3 \sin (6\pi ft + \phi_3)$$

+ (1/5) $A_5 \sin (10\pi ft + \phi_5)$
+ (1/7) $A_7 \sin (14\pi ft + \phi_7) + \cdots$]
= $V_0 + (4V_0/\pi) \Sigma_k [(A_k/k) \sin (2\pi k ft + \phi_k)]$
(k=奇数) (2)

ここで $A_k \ge \phi_k$ 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,……)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、 $A_1 と \phi_1$ 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 ィ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。このディ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2s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⁾

$$V/V_{max} = I^n/(I^n + \sigma^n)$$
 (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0log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 = 0.41×10^7 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、-1log、-1.7logの10Hz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

NII-Electronic Library Service

1072



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, $-1 \log \text{ and } -1.7 \log \text{)}$. The relationship between the initial amplitude of response (V) and the intensity of the stimulus ($I=2I_0$) is approximated by the formulas, $V/V_{\text{max}}=I^n/(I^n+\sigma^n)$, shown by a bold solid curve in the figure, where $V_{\text{max}}=-24.2 \text{ mV}$, 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 $V \varepsilon$,フリッカー光の ON 時の強さ $I=2I_0$ に対して \bullet 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 $I \ge V$ の 関係も(3)式で近似することができた。ただし, V_{max} = $-24.2 \text{ mV}, \sigma$ = $-0.86 \log, n$ = 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の増大, 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。 ヒラメの網膜S電位のフリッカー光応答



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

V₀は一定の明るさ感に、V_{PP}はちらつき感に対応す る。 Vo と周波数との関係を Fig. 6 に示す。 Fig. 6 にお いて、 Vo 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 Vppの周波数特 性である。そこでは、 V_{PP}は光の強さ0logの1Hz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 Vpp はほぼ単調に減少しているのに対し, 光の強さが-1log そして0log と強くなるにつれ, $f=20\sim30$ 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, 5~20 Hz の範囲に限って $V_{\rm PP}$ に大差がない。また、 $V_{\rm PP}$ 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60Hz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。

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



1073

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



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 1~6 Hz、光の強さ-1 log では 1~ 4 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,0logの1Hz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か 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
$-1 \log$	${\sim}60$	≫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 和城にかかるため,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 付近にサブビークが現れた。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,この現象は明順応と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、

 $i(t) = I_0 [1+m \sin(2\pi ft)]$ (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, 古瀬,袋谷

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,

$$m = (I_{\max} - I_{\min}) / (I_{\max} + I_{\min})$$
(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 n 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=20~30 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

- 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.
- 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.
- 田村 保:魚の眼の機能の研究方法、日水誌、29,75-89, (1963).
- 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.
- G. Svaetichin: The cone action potential. Acta Physiol. Scand., 29 Suppl., 106, 565-600 (1953).
- 6) H. Spekreijse and A.L. Norton: The dynamic characteris-

tics 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).
- M. Yamada, Y. Shigematsu, and M. Fuwa: Latency of horizontal cell response in the carp retina. *Vision Res.*, 25, 767-774 (1985).
- 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).
- K. Fukurotani and K.-I. Hara: Dynamic characteristics of the receptive field of L-cells for monochromatic lights. *Biol. Cybernetics*, 23, 149-156 (1976).
- 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).
- 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 (Eresponses) 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.
- 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).
- 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).
- 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,日水誌,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).
- 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).
- S. M. Wu: Feedback connections and operation of the outer plexiform layer of the retina. *Current Opi. Neurobiol.*, 2, 462-468 (1992).
- 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.
- 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, Cen-

tral Processing of Visual Information Pt. A" (ed. by R. Jung), Springer, Berlin, 1973, pp. 431-573.

- H. De Lange: Experiments on flicker and some calculations on an electrical analogue of the foveal systems. *Pysica*, 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 ophtal., 18, 16-35 (1964).
- 36) 小池 隆:断続光に対する魚類の反応. 日水誌, 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).