

## ラット網膜電図の概日リズム及び制御機構

大塚 博比古<sup>1,2)</sup>

1) 広島大学大学院医歯薬学総合研究科薬学専攻

2) 武田薬品工業 (株) 開発研究センター

受付：平成16年11月16日

受理：平成16年12月13日

網膜電図 (electroretinogram, ERG) 解析は、視機能評価の指標の一つとしてしばしば用いられる手法であるが、ERG の概日リズムの詳細については殆ど知られていない。本研究では、ERG の概日リズムが常暗条件 (DD) 下で自由継続するか否かを調べた。また、視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) を破壊したラットを用いて、自発行動リズムの制御機構である SCN と ERG の概日リズムの関連について検討した。

実験は、ERG 記録用電極を SCN を破壊した雄性 Jel:Wistar ラットあるいは無処置のラットの眼球内に埋め込み、ERG を解析した。ERG は12時間照明周期 (LD) 下で無麻酔・無拘束下に4時間毎に48時間記録し、その a 波及び b 波の振幅を計測した。その後、無処置ラットは DD 下で飼育し、DD 開始61, 85, 97及び117日後に各個体の ERG を無麻酔・無拘束下で4時間毎に48時間記録した。また、飼育ケージ内に取り付けた赤外線センサーを用いて自発運動量を記録し、ERG の概日リズムとの比較を行った。

その結果、無処置ラットでは、いずれの測定日にも ERG の a 波及び b 波の振幅の変化におよそ24時間周期の概日リズムが認められ、LD 下だけでなく DD 下で長期間飼育した場合でも ERG に概日リズムが存在することが確認された。a 波及び b 波の振幅のリズムは各 DD の記録日で頂点位相がシフトし、24.50時間周期の自由継続がみられた。自発運動量においても同様な概日リズム及び24.50時間周期の自由継続がみられ、自発運動リズムの位相は ERG リズムの位相と個体毎に一致していた。一方、SCN 破壊ラットでは、LD における ERG 及び自発運動リズムが消失していた。

以上より、ラット網膜の光に対する反応性は長期 DD 下においても LD 下と同様に概日リズムを示し、かつ自由継続することが判明した。このリズムは自発運動リズムと同期し、その周期は共に24.50時間であった。また、SCN 破壊ラットでは、これらのリズムが消失したことから、ERG の概日リズムは自発運動と同様に SCN による制御機構に関連していることが示された。

**Key words** : Electroretinogram (ERG), Suprachiasmatic nucleus (SCN), Circadian rhythm, Free-run, Rat

網膜電図 (electroretinogram, ERG) は、網膜における光刺激への総合的な反応電位を示すものである。光刺激によって最初に視細胞で生じた電位の変化が網膜組織内の双極細胞、ミュラー細胞、水平細胞、アマクリン細胞及び神経節細胞に伝達される。a 波及び b 波はそれぞれ視細胞及び双極細胞から起こる電位であり、これらが ERG の波形の一部を形成している<sup>4)</sup>。a 波及び b 波の振幅は網膜の光刺激に対する反応の大きさを反映しており、網膜機能評価のパラメータとなる。

動物における体内リズムの研究は近年盛んに行われており、様々な生体機能に概日リズムが存在し、常暗条件 (DD) 下ではそのリズムが24時間よりわずかにずれていけば、リズムの位相がシフト (自由継続) することが知られている。動物の視機能に関連する研究では、ラット網膜の視細胞の形態変化に概日リズムがあることが報告されている<sup>8,12,16,19)</sup>。また、ウサギにおいて、ERG の振幅が飼育照明サイクルにおける明期及び暗期で差があり、ERG の概日変化が報告され

ている<sup>2,22)</sup>。また、哺乳類の網膜を培養した実験では、melatonin 産生に概日リズムを示し、網膜自身が melatonin 産生を制御する時計遺伝子を持っており、それが網膜における様々な生体リズムに影響していると考えられている<sup>20)</sup>。我々は12時間照明周期 (LD) 下において、同一個体の網膜の光刺激に対する反応が暗期に亢進、明期に低下する規則的な変動を見出し、ERG に概日リズムが存在することを示した<sup>14)</sup>。本研究では、ERG の概日リズムが DD 下で自由継続するか否かを検討すると共に、自由継続周期を求めた。また、同時に自発行動量を記録し、ERG の概日リズムと比較した。さらに、視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) を破壊した動物での ERG 及び自発運動のリズムを無処置ラットのそれらと比較することにより、行動リズムの制御機構との関連性について検討した。

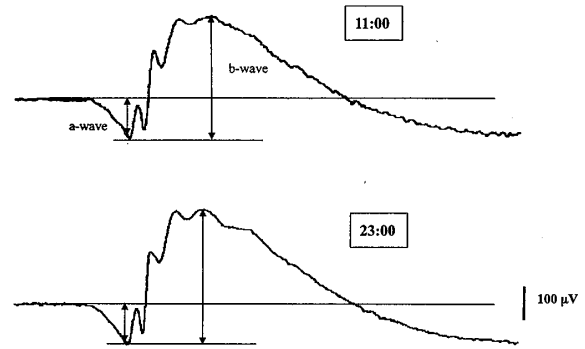
## 材料と方法

### 1. 使用動物及び飼育条件

雄性 Jcl:Wistar ラットを4週齢で日本クレアより入手後、スリットランプ (SL-14, コーワ)、双眼倒像検眼鏡 (OMEGA 200, HEINE OPTOTECHNIK) 及び非球面レンズ (28D, ニコン) を用いた眼科学的検査の結果、角膜、水晶体、硝子体あるいは眼底に異常がないことを確認し、4ヵ月齢時に実験に供した。動物は室温20~26℃、湿度40~70%、換気回数8~25回/時及び12時間照明周期 (LD) 下 (点灯時間7:00~19:00, 床上 150 lux 以上) に制御された飼育室の金属製ケージ内で個別に收容し、粉末飼料 (CE-2, 日本クレア) 及び水道水を自由摂取させて馴化飼育した。ERG 記録用電極の埋め込み手術後は、LD 下での ERG が問題なく記録されることを確認した後、飼育室内を消灯して常暗条件 (DD) 下で飼育した。なお、本研究は武田薬品工業 (株) 動物実験倫理委員会規則に準じて行った (許可番号 TEACUC-A1-136)。

### 2. SCN 破壊手術方法

SCN 破壊手術は、本間らの方法<sup>6)</sup> を一部改良して行った。即ち、ドロペリドール (ドロレプタン, 三共 (株), 2 mg/kg, i.m.) 及び塩酸ケタミン (ケタラルール 50, 三共 (株), 100 mg/kg, i.m.) 麻酔下で定位脳手術を行った。先端の 0.1 mm 以外を絶縁した直径約 0.5 mm のステンレススチール電極を脳の SCN に刺入し、約 1 分間 3 mA の直流電流を流し、両側の SCN を破壊した。手術後、ラットを約 1 ヶ月間飼育し、ERG 記録電極埋め込み手術を行った。



**Fig. 1.** These indicate ERG waveforms of a rat (No. 4) in LD. The upper waveform was recorded at 11:00 (light period) and the lower was recorded at 23:00 (dark period). The amplitudes of a-wave and b-wave at 23:00 were 125.7  $\mu$ V and 419.3  $\mu$ V, and these were 28.3% and 17.2% higher than those at 11:00, respectively.

### 3. ERG 記録電極埋め込み手術方法

SCN 破壊手術後に自発運動リズムの消失が確認された2例の動物及び5例の SCN 無処置動物について、ドロペリドール (ドロレプタン, 三共 (株), 2 mg/kg, i.m.) 及び塩酸ケタミン (ケタラルール 50, 三共 (株), 100 mg/kg, i.m.) 麻酔下で ERG 記録用電極の埋め込み手術を既報の方法<sup>14)</sup> を一部改良して行った。即ち、電極には2本のステンレス線 (直径 0.05 mm) を用い、左側眼球の強膜内 (角膜縁より約 0.3 mm の眼球周囲及び角膜縁より約 2.0 mm の眼球耳側, 幅約 1.0 mm) に埋め込んだ。埋め込んだ線はシリコンチューブで絶縁し、皮下を通して頭部より導出し、ミニチュアソケット (MM-8F, 本田工業) に接続した。ソケットは頭蓋骨にシアノアクリル系の接着剤 (アロンアルファスーパージェル, コニシポンド) で固定し、周囲の皮膚で覆った。

### 4. 測定方法

#### ERG 記録方法

ERG は LD 下は SCN 破壊動物 2 例, 無処置動物 5 例について, DD 下では無処置動物について, 開始後 61日 (5 例), 85日 (5 例), 97日 (4 例) 及び 117日 (3 例) (それぞれ DD 61, DD 85, DD 97 及び DD 117) に記録した。各測定日には、各動物について初日の 7:00, 11:00, 15:00, 19:00 及び 23:00, 2 日目の 3:00, 7:00, 11:00, 15:00, 19:00 及び 23:00, 3 日目の 3:00 及び 7:00 の計 13 回記録した。動物を専用のチャンバー内

**Table 1.** The absolute amplitudes of a- and b-waves in each animal on LD and DDs 61, 85, 95 and 117.

a-wave amplitude ( $\mu V$ )						b-wave amplitude ( $\mu V$ )							
Animal No.	LD	DD 61	DD 85	DD 95	DD 117	Animal No.	LD	DD 61	DD 85	DD 95	DD 117		
1	Maximum	192	189	178	173	169	1	Maximum	688	597	582	549	591
	Minimum	123	140	126	110	117		Minimum	482	468	475	456	436
	Mean	167	166	150	139	147		Mean	594	533	522	493	540
2	Maximum	117	108	138	132	142	2	Maximum	432	288	331	330	362
	Minimum	88	68	96	84	70		Minimum	296	196	232	234	231
	Mean	102	94	123	111	111		Mean	374	237	301	291	307
3	Maximum	102	108	109	106	106	3	Maximum	431	302	295	290	312
	Minimum	78	80	74	61	65		Minimum	255	250	219	224	236
	Mean	90	93	90	84	93		Mean	325	276	262	260	284
4	Maximum	154	155	149	133	ND	4	Maximum	413	362	357	343	ND
	Minimum	67	78	99	70	ND		Minimum	257	255	272	255	ND
	Mean	113	131	124	104	ND		Mean	341	324	321	303	ND
5	Maximum	137	155	122	ND	ND	5	Maximum	427	395	335	ND	ND
	Minimum	98	66	79	ND	ND		Minimum	358	283	243	ND	ND
	Mean	118	124	102	ND	ND		Mean	394	346	292	ND	ND
6	Maximum	143	—	—	—	—	6	Maximum	524	—	—	—	—
	Minimum	110	—	—	—	—		Minimum	445	—	—	—	—
	Mean	129	—	—	—	—		Mean	490	—	—	—	—
7	Maximum	79	—	—	—	—	7	Maximum	260	—	—	—	—
	Minimum	60	—	—	—	—		Minimum	223	—	—	—	—
	Mean	72	—	—	—	—		Mean	244	—	—	—	—
8	Maximum	186	—	—	—	—	8	Maximum	659	—	—	—	—
	Minimum	146	—	—	—	—		Minimum	560	—	—	—	—
	Mean	171	—	—	—	—		Mean	613	—	—	—	—

The data which were not recorded on DD 95 or 117 by problems with the electrodes in 2 animals (Nos. 4 and 5) were expressed as ND. The data which were not recorded in 3 SCN lesioned rats (Nos. 6, 7 and 8) on DDs.

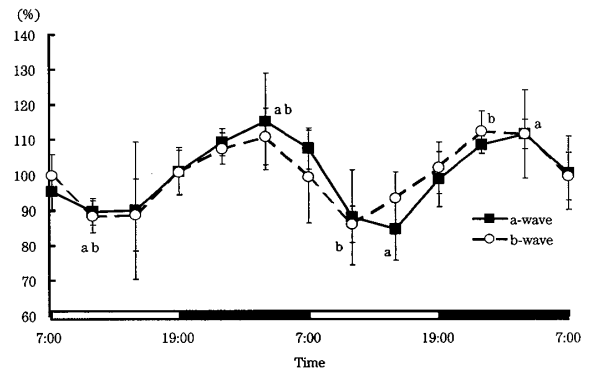
の暗黒下で15分間馴化させ、無麻酔、無拘束下で光刺激装置 (PHOTO STIMULATOR 3G22, 日本電気三栄) を用いて、約 30 cm 離れたキセノンランプより10秒間隔で 1J のフラッシュ刺激を行った。記録は誘発電位測定装置 (SYNAX ER1100, NEC) を用いて、感度 100  $\mu V/div$  及び記録速度 200 ms/div の条件で高周波 (1 kHz 以上) 及び低周波 (2 Hz 以下) を除外して行った。得られた30回の波形を加算平均し、ERG の a 波及び b 波の振幅を計測した。なお、上記以外の操作はすべて暗赤色光下で行った。

#### 自発運動量

赤外線センサーを左右に取り付けた金属製ケージ内で動物が赤外線を遮断した回数を自発運動量としてカウントし、1時間毎に集計した。データの収集には専用のプログラムをインストールしたパソコンを用いて集計した。

#### 自由継続周期

ERG 及び自発運動の概日リズムは、SCN 無処置動物から得られたデータを最小二乗法を用いて解析した。即ち、ERG の概日リズムでは DD 61 から DD 117 (56日間)、DD 61 から DD 97 (36日間) 及び DD 61 から DD 85 (24日間) において、個体毎に1日当た



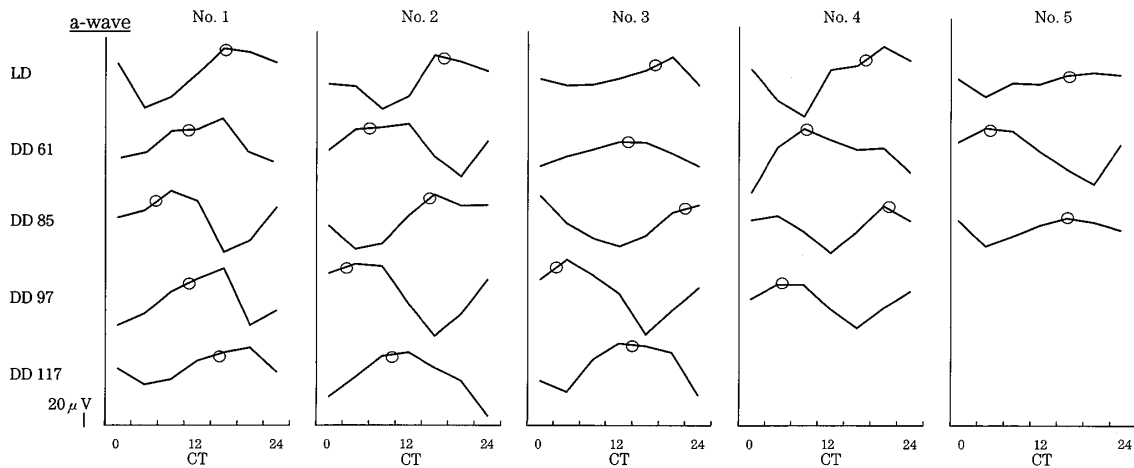
**Fig. 2.** Circadian changes of a- and b-wave amplitudes under the 12-hour light/dark cycle. ERGs were recorded every 4 hours for consecutive 48 hours. Data were expressed as percentages of the mean value of 13 consecutive measurements. Each point represents mean of 5 rats. Vertical line shows the standard deviation. The white bars and black bars indicate light periods and dark period, respectively. "a" and "b" indicate peaks or trough of the a- and b-waves, respectively.

りの a 波及び b 波の振幅の頂点位相のずれを算出した。自発運動では DD 45 から DD 82 (37日間) において ERG の場合と同様に算出した。

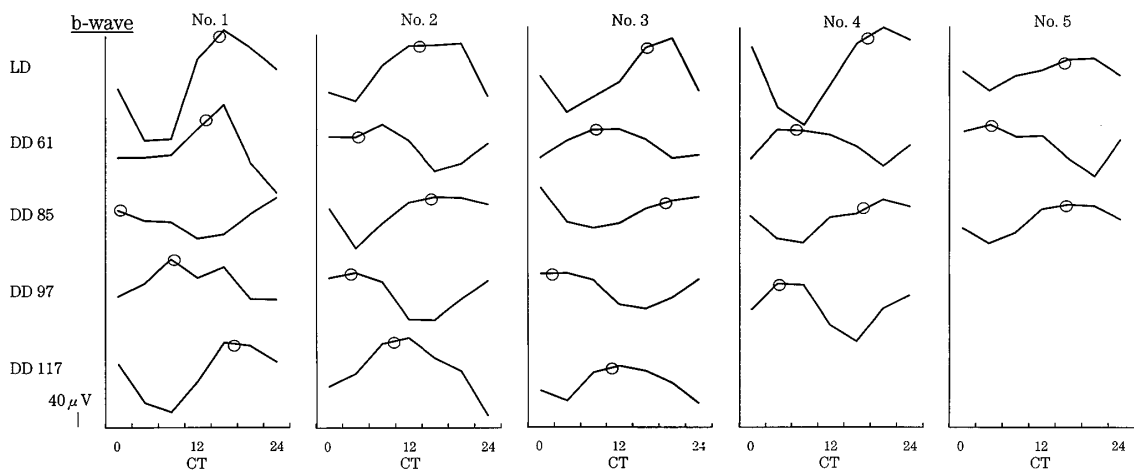
## 5. 病理組織学的検査

SCN の破壊状態を確認するため, SCN 破壊動物について, ジエチルエーテル麻酔下で腹部大動脈から放血後に脳を摘出した。摘出した脳は 10 vol% 中性緩

衝ホルマリン液で固定し, パラフィン包埋後, 50  $\mu$ m 間隔の連続切片に薄切し, ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して鏡検した。



**Fig. 3.** Circadian changes in a-wave amplitude in rats on LD and DDs 61, 85, 97 and 117. ERGs were recorded every 4 hours for a consecutive 48 hours. The values for same time point of the first and second days/the second and third days were averaged in this figure. White circles indicate peak time points calculated using the least squares method. ERGs were not recorded from 2 of 5 animals (Nos. 4 and 5) on DD 97 and/or 117 because of problems with the electrodes in the animals. The time in each figure indicates circadian time (CT) in DD. CT 0, CT 12 and CT 24 indicate extrapolated 7:00 (light onset), 19:00 (light off) and 7:00 (light onset) in LD, respectively.

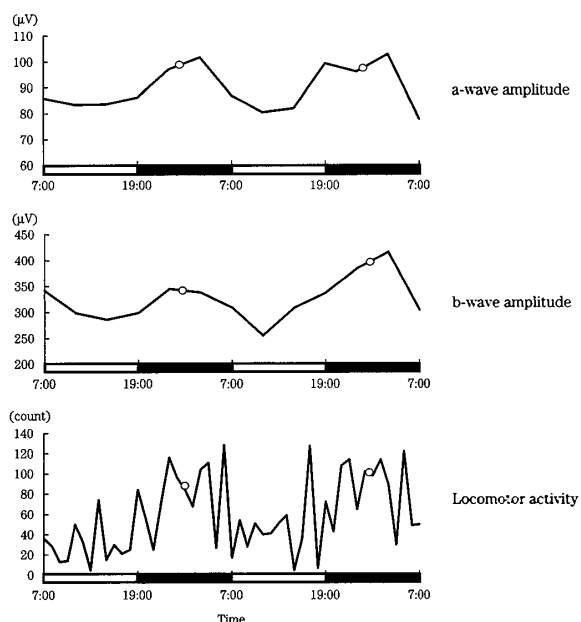


**Fig. 4.** Circadian changes in b-wave amplitude in rats on LD and DDs 61, 85, 97 and 117. ERGs were recorded every 4 hours for a consecutive 48 hours. The values for same time point of the first and second days/the second and third days were averaged in this figure. White circles indicate peak time points calculated using the least squares method. ERGs were not recorded from 2 of 5 animals (Nos. 4 and 5) on DD 97 and/or 117 because of problems with the electrodes in the animals. The time in each figure indicates circadian time (CT) in DD. CT 0, CT 12 and CT 24 indicate extrapolated 7:00 (light onset), 19:00 (light off) and 7:00 (light onset) in LD, respectively.

## 成 績

## 1. ERG

SCN 無処置動物における ERG は、いずれの測定日においても a 波及び b 波を特徴とする典型的な ERG が記録された。LD での ERG の波形を Fig. 1 に示す。記録された a 波及び b 波の振幅の絶対値はそれぞれ 61–192  $\mu\text{V}$  及び 196–688  $\mu\text{V}$  であった。頂点のレベルには個体差がみられたが、それらは LD, DD 61, 85, 97 及び 117 の各測定日において個体毎にほぼ同じレベルであった。a 波及び b 波の振幅はすべての動物でおよそ 24 時間の周期で規則的に変動し、個体内での最大値と最小値の差は、a 波で 87  $\mu\text{V}$  あるいは b 波で 206  $\mu\text{V}$  であった (Table 1)。LD における 48 時間の測定では、連続して記録した 13 回の平均値に対する各測定時点の変化率を個体毎に算出し、その平均値を各測定時点の値として表した (Fig. 2)。a 波の振幅の頂点は 3:00 に、同底点は 11:00 あるいは 15:00 にみられ、b 波の振幅の頂点は 23:00 あるいは 3:00 に、同底点は 11:00 にみられた。Fig. 3 (a 波) 及び Fig. 4 (b 波) に示したように、DD ではすべての動物で a 波及び b 波の頂点 (○印) となる時刻が記録日あるいは個体によって異なり、その位相は記録日毎にシフトした。個体毎の頂点位相は最小二乗法で算出し、a 波及び b 波



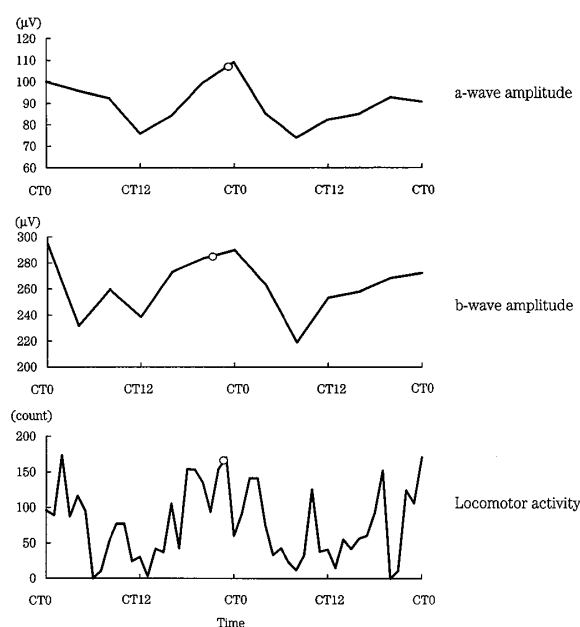
**Fig. 5.** The upper 2 figures show circadian changes of ERG amplitudes and another shows that of locomotor activity in LD for 1 animal (No. 3). White circles indicate peak time points calculated using the least squares method.

の振幅の概日リズムは統計学的に有意 ( $p < 0.01$ ) であった。代表的な 1 例の LD での a 波及び b 波の頂点時刻の計算値は、それぞれ 23:56 及び 0:42 であったのに対し、DD 85 ではそれぞれ 6:13 及び 4:10 であった (Fig. 5 及び Fig. 6)。a 波及び b 波の間の位相変位の一致は他の 4 例の動物でも同様にみられた。

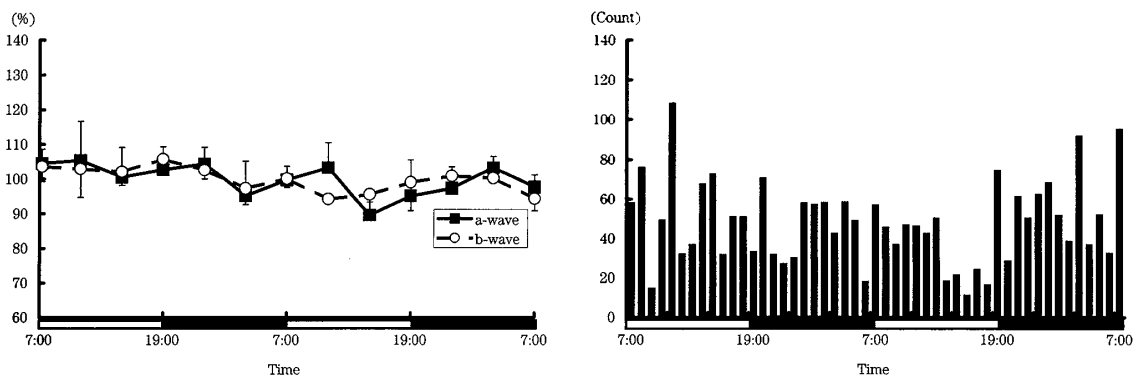
SCN 破壊動物における LD で記録された a 波及び b 波の振幅の絶対値は、それぞれ 60–186  $\mu\text{V}$  及び 224–659  $\mu\text{V}$  であった。しかし、個体内での最大値と最小値の差は、a 波で 40  $\mu\text{V}$  あるいは b 波で 99  $\mu\text{V}$  と SCN 無処置動物に比べて小さく (Table 1), a 波及び b 波の振幅に無処置動物でみられた概日リズムは認められなかった (Fig. 7)。

## 2. 自発運動量

SCN 無処置動物における自発運動量はおよそ 24 時間の周期で規則的に変動し、その位相は自由継続を示した。頂点位相は最小二乗法を用いて解析し、LD, DD 45 及び DD 82 のいずれにおいても有意なリズム ( $p < 0.01$  あるいは  $p < 0.05$ ) を示した。一方、SCN 破壊動物では、ERG の場合と同様に LD での有意なリズムは認められなかった (Fig. 7)。



**Fig. 6.** The upper 2 figures show circadian changes of ERG amplitudes in DD 85 and another shows that of locomotor activity in DD 83 for 1 animal (No. 3). White circles indicate peak time points calculated using the least squares method.



**Fig. 7.** The left figure shows circadian changes in the a- and b-wave amplitudes over a 12-hour light/dark cycle in SCN lesioned rats. ERGs were recorded every 4 hours for a consecutive 48 hours. Data were expressed as percentages of the mean values of 13 consecutive measurements. The vertical line shows the standard deviation. The white bars and black bars indicate the light and dark periods, respectively. The right figure shows the circadian rhythm of locomotor activity under the 12-hour light/dark cycle in SCN lesioned rats. Locomotor activity was recorded every hour. No circadian rhythm was observed in the ERGs or locomotor activity in SCN lesioned animals.

### 3. 自由継続周期

ERGの個体毎の自由継続周期は、a波では24.52, 24.50, 24.45, 24.50及び24.50時間, b波では24.50, 24.53, 24.48, 24.55及び24.45時間であった。これらより平均した自由継続周期は24.50時間であった。自発運動量の個体毎の自由継続周期は、個体毎に24.57, 24.38, 24.54, 24.47及び24.55時間, 平均で24.50時間であり、概ねERGの自由継続周期と一致していた。自発運動量及びa波及びb波の振幅のリズムの頂点位相は実験期間を通して個体毎にも一致していた (Fig. 5及びFig. 6)。

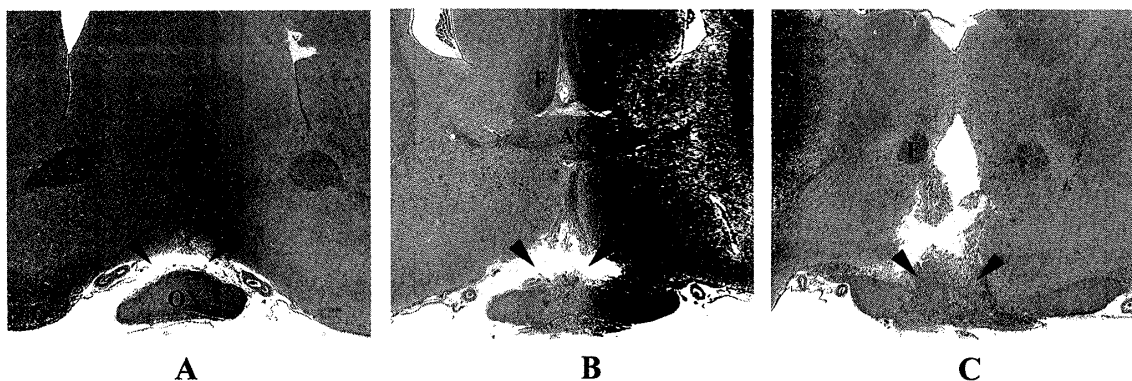
### 4. 病理組織学的検査 (脳)

全てのSCN破壊動物では、視交叉上核のほぼ完全な破壊が確認された。代表的な病理組織像をFig. 8に

示す。破壊は視交叉の背側中心付近から内側視索前核あるいは視床下部前核の一部までに及び、視交叉上核の組織は確認されなかった。

## 考 察

SCN無処置ラットのa波及びb波の振幅は、12時間照明周期 (LD) 下及び常暗条件 (DD) 下において約24時間の周期で規則的に増加・減少し、DDでの自由継続周期は24.50時間であった。また、ERGの概日リズムは117日間の長期DD下において自発運動リズムと同期して自由継続を維持していた。これまでに、LD下、LD翌日のDD下及び常明条件下でERGの概日リズムがみられることを報告した<sup>14)</sup>。本研究では、ERGの概日リズムがDDを長期継続した状態でも保たれ、それが自由継続することを示した。また、SCN



**Fig. 8.** Series of photograph of the SCN in one of the SCN lesioned rats. The figures show the lesion of the SCN (allows) at anterior (A,  $\times 20$ ), middle (B,  $\times 20$ ) and posterior (C,  $\times 20$ ) portions of the SCN. ACA: anterior part of anterior commissure, AC: anterior commissure, F: fornix, OX: optic chiasm.

を破壊したラットでは、上記 LD での ERG のリズムが消失したことから、ERG における概日リズムが照明の明暗の直接の影響により起こるのではなく、本来生体がつ主要な概日リズム、即ち、SCN によって制御される可能性を、初めて明らかにした。

哺乳動物の網膜には、melatonin の産生を司る遺伝的にプログラムされた概日発振器が含まれており、それが網膜における様々な機能に影響していると考えられている<sup>20)</sup>。melatonin あるいは dopamine は、日本うずらにおいて dopamine D<sub>2</sub> 受容体を遮断することにより b 波の反応を変化させることから、これらは網膜における概日リズムの発生に直接あるいは間接的な役割を持っていると考えられている<sup>10)</sup>。一方、N-methyl-D-aspartate はアマクリン細胞から特異的に  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) の放出を誘発するが、dopamine はその GABA の放出を抑制することから、GABA の放出は dopamine によって調節されていると考えられている<sup>3)</sup>。GABA は中枢神経系における主な抑制性の神経伝達物質であり、アマクリン細胞の中に存在する。dopamine の網膜への暴露は、アマクリン細胞からの GABA の放出を阻害し、結果的に b 波を増加させるようなアマクリン細胞から双極細胞への神経伝達の活性化を起こすと考えられる。従って、dopamine 暴露による b 波の増加は視細胞における本来の概日リズムを反映していない可能性がある。しかし、一方では D<sub>2</sub> ファミリーの dopamine 受容体はラット網膜の視細胞外節にも存在すると報告されている<sup>21)</sup>。従って、dopamine は視細胞における網膜機能の概日リズムに何らかの影響を及ぼしている可能性もあるが、人工的な条件を付加しない場合には、SCN による網膜の反応電位の制御の方が dopamine による制御よりも優位に作用しているのかも知れない。また、SCN 破壊動物では ERG の概日リズムが消失したことから、内因性の dopamine のレベルの変化では網膜の反応電位に明確な影響を与えないと考えられた。

網膜の視細胞は、外節を turnover することによって自身の機能を維持している。即ち、視細胞外節は絶えず再生され、古いディスクは脱落し、色素上皮細胞によって貪食される<sup>8)</sup>。視細胞外節ディスクの脱落には貪食によって示される概日リズムがみられ、それが網膜の光の感受性の変化に関連していることが報告されている<sup>15-17)</sup>。視細胞における脱落のリズムの位相は、DD 下において後退し、リズムの周期は24時間よりも長い<sup>9)</sup>とされている。網膜の光に対する感受性の変化は視細胞の turnover に関連すると考えられ、ERG の概日リズム周期が24.50時間であることから、本実験

でみられた ERG リズムの位相の後退は網膜視細胞外節ディスクにおける turnover のリズムに起因したものと考えられた。DD の各測定時で ERG の振幅の絶対値が変化しなかったことは、ラットの網膜機能が117日間もの長期 DD 下でも維持されるということを示しており、視細胞外節ディスクの turnover が長期 DD 下でも LD 下と同様に起こっていることを示唆している。

自発運動の概日リズムは SCN に存在するペースメーカーによって制御されている<sup>5,7,11,18)</sup>。SCN に存在する推測上の概日リズムのペースメーカーは、視覚信号を網膜-視床下部神経路を介して受ける<sup>21)</sup>。そして、眼球は哺乳類がつ複数の発振システムの中に含まれる SCN のペースメーカーと連結した自律神経系の発振器であるかもしれない<sup>16)</sup>。網膜機能及び自発運動の概日リズムは本実験下で非常に良く一致したことから、自発運動の活動期及び休息期の周期が網膜におけるディスク脱落による視細胞外節の再生周期と一致していることを示唆している。動物にとって、視細胞が機能的に完全な状態を維持することは、活動期に十分な視覚を維持するために重要なことである。視細胞の機能は視細胞外節の turnover によって維持される。それゆえ、網膜機能の概日リズムは視機能維持のための重要な細胞活動を反映していると言える。ヒトにおいては網膜視細胞外節ディスクの脱落のリズムは明確には捉えられていないが、ERG を発生させる光刺激強度の閾値の平均は、明暗照明周期下における点灯1.5時間後で他の時間よりも有意に高いことが報告されている<sup>1)</sup>。ラットにおける視細胞外節のディスクの脱落は、明暗照明周期下における点灯約2時間後に最も活発になる<sup>8)</sup>ことから、おそらくヒトにおける網膜視細胞外節の再生システムもラットのそれと同様であると考えられる。しかし、ヒトにおける b 波の振幅は6:00、18:00及び24:00よりも12:00が最も大きくなる<sup>13)</sup>ことから、ヒトのような昼行性動物における網膜機能のリズムは、ERG の振幅が深夜に最大となるラットのような夜行性動物とは異なるのかもしれない。

本実験では、ERG を記録するために非常に明るい光を動物に当てたが、これによる ERG の概日リズムへの影響は不明である。しかし、光刺激は48時間の間4時間毎に行っているため、位相は一定の方向に変位しないと考えられる。もし、ERG の概日リズム位相がこの光刺激によって前進あるいは後退するならば、ERG 概日リズムの頂点位相は ERG 測定日の前後の自発行動量の頂点位相とは一致しないと考えられるが、実際には両者は一致していた。Witting らの報

告<sup>23)</sup>では、自発運動の概日リズムの自由継続周期はおよそ24.3~24.4時間であるとされており、本実験での計算値とほぼ一致している。従って、本実験は概日リズムの同調因子に影響しない条件下で実施され、ERGの概日リズムの評価に影響はなかったと考えられた。

以上、ERGの概日リズムは長期DD下で維持され、自発行動の概日リズムと同じ周期で自由継続した。また、SCNを破壊したラットでは、LDでの概日リズムが消失したことから、ERGの概日リズムは自発行動のそれと同様にSCNの概日ペースメーカーによって制御されていることが示された。このことは、夜行性であるラットが夜間において光への高い感受性を保つために重要であると考えられた。

### 謝 辞

本研究におけるリズム解析にご協力いただきました北海道大学大学院医学研究科統合生理学講座の本間さんと先生に、また、ERG測定及び自発行動量測定に協力して下さった武田薬品工業(株)開発研究センターの松田佳昭君、繁田真樹君、古川初江さん及び山住美由紀さんに深く感謝致します。

### 参 考 文 献

1. **Birch, D.G., Sandberg, M.A. and Berson, E.L.** 1986. Diurnal rhythm in the human rod ERG. Relationship to cyclic lighting. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27 : 268-270.
2. **Brandenburg, J., Bobbert, A.C. and Eggelmeyer, F.** 1983. Circadian changes in the response of the rabbit's retina to flashes. *Behav. Brain. Res.* 7 : 113-123.
3. **Calaza, K.C., de Mello, F.G. and Gardino, P.F.** 2001. GABA release induced by aspartate-mediated activation of NMDA receptors is modulated by dopamine in a selective subpopulation of amacrine cells. *J. Neurocytol.* 30 : 181-193.
4. **Dong, C.J. and Hare, W.A.** 2002. GABA<sub>A</sub> feedback pathway modulates the amplitude and kinetics of ERG b-wave in a mammalian retina in vivo. *Vision Res.* 42 : 1081-1087.
5. **Erhardt, C., Galani, R., Jeltsch, H., Cassel, J.C., Klosen, P., Menet, J.S., Pevet, P. and Challet, E.** 2004. Modulation of photic resetting in rats by lesions of projections to the suprachiasmatic nuclei expressing p75 neurotrophin receptor. *Eur. J. Neurosci.* 19 : 1773-1788.
6. **Honma, S., Honma, K., Shirakawa, T. and Hiroshige, T.** 1984. Maternal phase setting of fetal circadian oscillation underlying the plasma corticosterone rhythm in rats. *Endocrinology* 1984; 114 : 1791-1796.
7. **Inouye, S.T. and Kawamura, H.** 1982. Characteristic of a circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Physiol.* 146 : 153-160.
8. **La Vail, M.M.** 1976. Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* 194 : 1071-1074.
9. **La Vail, M.M.** 1980. Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19 : 407-411.
10. **Manglapus, M.K., Iuvone, P.M., Underwood, H., Pierce, M.E. and Barlow, R.B.** 1999. Dopamine mediates circadian rhythms of rod-cone dominance in the Japanese quail retina. *J. Neurosci.* 19 : 4132-4141.
11. **Moore, R.Y.** 1973. Retino-hypothalamic projections in mammals: A comparative study. *Brain Res.* 49 : 403-409.
12. **Nguyen-Legros, J. and Hicks, D.** 2000. Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Int. Rev. Cytol.* 196 : 245-313.
13. **Nozaki, S., Wakakura, M. and Ishikawa, S.** 1983. Circadian rhythm of human electroretinogram. *Jpn. J. Ophthalmol.* 27 : 346-352.
14. **Ohtsuka, H., Matsuda, Y. and Nishida, N.** 1998. Circadian rhythm of the electroretinogram in rats. *Anim Eye Res.* 17 : 105-109.
15. **Remé, C., Aeberhard, B. and Schoch, M.** 1985. Circadian rhythm of autophagy and light response of autophagy and disk-shedding in the rat retina. *J. Comp. Physiol. A* 156 : 669-677.
16. **Remé, C., Wirz-Justice, A., Rhyner, A. and Hofmann, S.** 1986. Circadian rhythm in the light response of rat retinal disc-shedding and autophagy. *Brain Res.* 369 : 356-360.
17. **Sandberg, M.A., Pawlyk, B.S., Crane, W.G. and Berson, E.L.** 1988. Diurnal rhythm in the electroretinogram of the Royal College of Surgeons (RCS) pigmented rat. *Exp. Eye Res.*



- 46 : 929-936.
18. **Stephan, F.K. and Zucker, I.** 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69** : 1583-1586.
  19. **Tamai, M., Teirstein, P., Goldman, A., O'Brien, P. and Chader, G.** 1978. The pineal gland does not control rod outer segment shedding and phagocytosis in the rat retina and pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Visual. Sci.* **17** : 558-562.
  20. **Tosini, G. and Fukuhara, C.** 2003. Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. *J. Neuroendocrinol.* **15** : 364-369.
  21. **Vuvan, T., Geffard, M., Denis, P., Simon, A. and Nguyen-Legros, J.** 1993. Radioimmunoassay characterization and immunohistochemical localization of dopamine D2 receptors on rods in the rat retina. *Brain Res.* **614** : 57-64.
  22. **White, M.P. and Hock, P.A.** 1992. Effects of continuous darkness on ERG correlates of disc shedding in rabbit retina. *Exp. Eye Res.* **54** : 173-180.
  23. **Witting, W., Mirmiran, M., Bos, N.P.A. and Swaab, D.F.** 1994. The effect of old age on the free-running period of circadian rhythms in rat. *Chronobiol. Int.* **11** : 113-118.

## Circadian Rhythm of the Electroretinogram and the Control System in Rats

Hirohiko OHTSUKA<sup>1,2)</sup>

- 1) Department of Pharmacology, Division of Clinical Pharmaceutical Science, Programs of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University
- 2) Development Research Center, Pharmaceutical Research Division, Takeda Pharmaceutical Company Limited

Circadian rhythm in the electroretinogram (ERG) in continuous darkness (DD) over a long period were examined to find whether a free-running rhythm in retinal function exists in rats and if the rhythm is related to the circadian control system in the suprachiasmatic nucleus (SCN) in SCN lesioned rats. ERGs were recorded every 4 hours over 48 hours under a 12-hour light/dark cycle (LD) in SCN non-lesioned or lesioned rats, and on days 61, 85, 97 and 117 in DD in SCN non-lesioned rats. Locomotor activities were examined concurrently to compare the rhythms in the ERG.

The amplitudes of the a- and b-waves changed in a circadian fashion in both LD and DD in the SCN non-lesioned rats. The acrophases shifted for every measurement in DD. The mean free-running period in the ERG and locomotor activity rhythms were 24.50 hours. However, no circadian rhythm was observed in the ERG or locomotor activity in the SCN lesioned rats.

These results indicated that a circadian rhythm exists in the rat retinal function, in which the rhythm free-runs with the same periodicity as that for locomotor activity, and a circadian rhythm for retinal function was confirmed to be associated with the SCN.