

20/0781

厚生科学研究費補助金

感覚器障害及び免疫アレルギー等研究事業

(感覚器障害研究分野)

網膜刺激型電極による人工視覚システムの開発に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田野 保雄

平成 14 (2002) 年 4 月

分冊 1

目次

I. 総括研究報告

- 網膜刺激型電極による人工視覚システムの開発に関する研究 ————— 1
(網膜刺激電極の眼内移植に関する術式開発、網膜刺激電極の生体適合性の研究、
遊離網膜片を用いた刺激電極の性能評価の研究)
田野 保雄

II. 分担研究報告

1. 網膜刺激電極の視覚中枢における機能評価の研究、 ————— 5
網膜神経節細胞の解剖学的、機能的評価の研究
不二門 尚
2. 網膜神経節細胞の神経保護 ————— 11
福田 淳
3. 網膜刺激電極の開発および機能評価に関する研究 ————— 16
三宅 養三
4. 網膜刺激電極の眼内移植に関する術式開発、 ————— 18
網膜刺激電極の生体適合性の研究
平形 明人
5. 網膜下刺激電極の開発 ————— 24
太田 淳
6. 網膜刺激電極の開発 ————— 25
八木 透、西村 茂

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 29

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫アレルギー等研究事業）
総括研究報告書

網膜刺激型電極による人工視覚システムの開発に関する研究

（・網膜刺激電極の眼内移植に関する術式開発・網膜刺激電極の生体適合性の研究
・遊離網膜片を用いた刺激電極の性能評価の研究）

主任研究者 田野 保雄 大阪大学大学院医学系研究科眼科学 教授

研究要旨

網膜刺激型電極の眼内移植に関する術式の開発として、家兎に対して電極素材であるポリイミド（幅2mm、長さ4mm、厚さ25 μ m）を硝子体手術を行って網膜上および網膜下に埋植した。術後網膜上タイプでは、網膜剥離が生じた例はなかったが、網膜下タイプでは半数以上の家兎で術後網膜剥離が見られた。長期間の埋植による網膜障害やチップの劣化を検討する上で、網膜下電極に関しては、minipigなど人間に近い血管系を持つ動物による検討が必要であると考えられた。

電極の生体適合性に関して、電極を埋植する網膜の環境を良くすることを目的として、新生血管の予防に関する研究を行った。糖尿病の治療薬であるチアゾリジンは、培養血管内皮細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、マウスの酸素網膜症モデルにおいても網膜血管新生を抑制した。血管新生が関与して網膜が障害され、人工網膜の手術が適応となる疾患（糖尿病網膜症など）に対しては、本薬剤併用の有用性が示唆された。

遊離網膜片を用いた刺激電極の性能評価の研究では、局所の網膜電気刺激に対する網膜神経節細胞の応答特性を、カエル遊離網膜を用いて行った。神経節細胞の活動電位には、2つのタイプのものが観測された。一つは刺激後数ミリ秒の遅れをもち、その遅れは刺激のパラメータによってほとんど変化しないタイプ、もう一つは数ミリ秒から数十ミリ秒の遅れを有し、その遅れが刺激パラメータによって変化するタイプであった。前者は、電気刺激により神経節細胞が直接は発火したもの、後者は電気刺激によりまず神経節細胞より末梢にある細胞が興奮し、その興奮がシナプスを介して神経節細胞に伝わったものと考えられた。これらの結果をもとに、今後網膜刺激電極の刺激パラメータを決定する予定である。

分担研究者

不二門 尚	大阪大学大学院医学系研究科 感覚機能形成学 教授	平形 明人	杏林大学医学部 眼科学 助教授
福田 淳	大阪大学大学院医学系研究科 情報生理学 教授	太田 淳	奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学 助教授
三宅 養三	名古屋大学大学院医学系研究科 眼科学 教授	八木 透	(株)二デック視覚研究所 所長

西村 茂 (株)ニデック東京研究センター
所長

A. 研究目的

網膜刺激電極による人工視覚研究において、医学サイドから見た場合、眼内移植に関する術式開発は大変重要である。網膜への侵襲を最小にし、長期に安定した電極を設置する術式を開発することにより初めて、臨床応用が可能となるわけである。初年度は、眼科領域の実験動物として扱い慣れている家兎を用いて、網膜上電極および網膜下電極に対して、埋め込みの術式を検討した。

網膜刺激電極の生体適合性の研究として、初年度は電極を埋植する網膜の環境を良くすることを研究目的として、新生血管の予防に関する研究を行った。新生血管は、人工網膜の適応疾患として頻度の高い糖尿病網膜症、加齢黄斑変性における失明の原因となっている。

人工網膜における眼内移植電極のデザインは、本プロジェクトの重要な課題である。移植電極の最適設計を知る目的で、電気刺激に対する網膜神経細胞応答の時空間特性を遊離網膜片を用いて解析した。

B. 研究方法

(1) 網膜刺激電極の眼内移植に関する術式開発

厚さ25マイクロメートルのポリイミド基盤に白金電極を蒸着し人工網膜用試験片を作成した。有色家兎(2.5-3.0キログラム)に全身麻酔を施した後、硝子体切除術を施行した。水晶体は保存した。39G針にて意図的網膜剥離を作成した後、網膜切開を加えて幅2mm、長さ4mmのポリイミド試験片を網膜下に鑷子で挿入した。意図的網膜切開を閉鎖するため術後空気によるタンポナーデを行った。一方網膜前タイプ

は網膜鉏で両端を網膜前面に固定し、特に眼内タンポナーデは行わなかった。手術は動物愛護の面から片眼のみに行い、もう片眼は健常に保存された。術後1ヶ月目までに毎週眼底検査を行い手術侵襲による合併症を検討した。網膜電位を測定し網膜障害の程度を電気生理学的に評価した。

(2) 網膜刺激電極の生体適合性の研究(血管新生抑制の研究)

糖尿病の治療薬であるチアゾリジンを、培養血管内皮細胞に対して濃度を変えて投与し、増殖能に対する影響を検討した。またマウスの酸素網膜症モデルに対して、網膜血管新生を抑制するか否かを検討した。

(3) 遊離網膜片を用いた刺激電極の性能評価の研究

麻酔下のカエルから眼球を摘出し、網膜を剥離した。剥離した網膜を、ガラス基板上に64個の金電極を蒸着した多点電極アレイ上に視細胞側を上置き、神経節細胞の活動電位を細胞外記録した。電気刺激は、視細胞側から挿入されたタングステン電極とその直下の基板電極のひとつを用いて行った。刺激は時間差をもった正負の電流をパルス状に与えた。電流刺激の振幅、パルスの持続時間、パルスの時間差を変化させ、これらのパラメータと神経節細胞応答の特性の関連を精査した。

C. 研究結果

(1) 網膜刺激電極の眼内移植に関する術式開発

手術合併症として最も重篤である術後網膜剥離は、術後1ヶ月で網膜前タイプ0%、網膜下タイプ67%であった。感染症や大量出血などの併発症は特にみられなかった。網膜下タイプを埋植した家兎の25%で移植網膜チップに一致した部位の網膜の白色化

がみられ、チップ埋植による網膜障害の可能性が示唆された。術後網膜剥離のない家兎で網膜電位を測定すると、網膜前、網膜下いずれのタイプのチップにおいても著明な網膜電位の変化はみられなかった。

(2) 網膜刺激電極の生体適合性の研究(血管新生抑制の研究)

チアゾリジンは、培養血管内皮細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、マウスの酸素網膜症モデルにおいても網膜血管新生を抑制した。

(3) 遊離網膜片を用いた刺激電極の性能評価の研究

パルス間隔を100マイクロ秒に固定し、パルスの持続時間を200マイクロ秒から1ミリ秒、振幅を10マイクロ秒から500マイクロ秒に変化させた場合、30-50ナノCの閾値電荷で、神経節細胞の活動電位が惹起された。活動電位の発生には、2つのタイプのものが観測された。一つは刺激後数ミリ秒の遅れをもち、その遅れは刺激のパラメータによってほとんど変化しないタイプ、もう一つは数ミリ秒から数十ミリ秒の遅れを有し、その遅れが刺激パラメータによって変化するタイプであった。前者は、電気刺激により神経節細胞が直接は発火したもの、後者は電気刺激によりまず神経節細胞より抹消にある細胞が興奮し、その興奮がシナプスを介して神経節細胞に伝わったものを考えられる。

D. 考察

網膜刺激電極の眼内移植に関する術式開発において、網膜上タイプの電極片は手術併発症も少なく、手術手技は十分に確立されていると考えてよい。しかしながら、網膜下タイプは半数以上の家兎で術後網膜剥離が確認されており、光

凝固の使用による強固な裂孔閉鎖など、さらに洗練された安全な埋植手技を確立せねばならないと考えられる。一方網膜前、網膜下いずれのタイプのチップでも網膜電位の変化は見られず、少なくとも埋植による広範囲の網膜障害は生じていないものと思われた。今後組織学的検討を加えてさらに詳細な検討を行う予定である。

血管新生が関与して網膜が障害され、人工網膜の手術が適応となる疾患(糖尿病網膜症など)に対しては、チアゾリジン投与により網膜の環境を改善できる可能性が示唆された。

遊離網膜片を用いた刺激電極の性能評価の研究では、視細胞側から神経節細胞側へ与えた局所的電流刺激により惹起される神経節細胞の時間特性が分かった。今後は、神経節細胞の空間分布を調べる必要がある。また刺激のパラメータと閾値との関係は、動物種によってかなり異なることが報告されているので、よりヒトの網膜に近い構造をもった動物の網膜を用いて実験する必要がある。

E. 結論

網膜上チップの埋植に関する術式は確立された。網膜下タイプは術式の改良を要する。現在使用を検討している人工網膜チップはとりあえず1ヶ月の短期では広範な網膜障害を生じないことが生理学的にも検眼鏡的にも証明された。電極の生体適合性に関しては、埋植電極の網膜に与える影響を長期に観察する研究と、埋植される側の網膜の環境を改善する研究を進展させる必要がある。また刺激のパラメータと閾値との関係は、実際に埋めこむ電極に近いものを用いてさらに検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kubota A, Ohji M, Kusaka S, Hayashi A, Hosohata J, Fujikado T, Tano Y. Evaluation of the peripheral visual field afterfoveal translocation. *Am J Ophthalmol*, 132: 581-584, 2001.
 - 2) Ohji M, Fujikado T, Kusaka S, Hayashi A, Hosohata J, Ikuno Y, Sawa M, Kubota A, Hashida N, Tano Y. Comparison of three techniques of foveal translocation in patients with subfoveal choroidal neovascularization resulting from age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*, 132: 888-896, 2001.
 - 3) Ohji M, Futamura H, Sanger D, Nakata K, Hayashi A, Kusaka S, Tano Y. Magnifying prismatic lenses for vitrectomy. *Jpn J Ophthalmol*, 45:199-201, 2001.
 - 4) Cekik O, Ohji M, Hayashi A, Fang XY, Kusaka S, Tano Y. Humidified air effect on pupil size during fluid-air exchange, *Retina*, 21:529-531, 2001.
 - 5) Murata T, Hata Y, Ishibashi T, Kim S, Hsue WA, Law RE, Hinton DR. Response of experimental retinal neovascularization to thiazolidinediones. *Arch Ophthalmol*, 119:709-717, 2001.
 - 6) Kawano M, Fukushi J, Okamoto M, Nishie A, Goto H, Ishibashi T, Ono M. Angiogenesis Factors. *Internal Medicine*, 40:565-572, 2001
 - 7) 李麗明、八木哲也:人工網膜による視覚再生. *Molecular Vision*, 39 卷(別冊)、網膜・視神経の発生と再生, pp. 257-261, 2002.
 - 8) Ikuno Y, Ohji M, Kusaka S, Gomi F, Nakata K, Futamura H, and Tano Y. Sutureless Contact Lens Ring System during Vitrectomy. *Am J Ophthalmol*, in press 2002.
 - 9) Zheng Y, Ikuno Y, Ohji M, Kusaka S, Jiang R, Cekiç O, Sawa M, and Tano Y. Platelet-derived growth factor receptor kinase inhibitor AG1295 and inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy, *Grafe's Archive Clin Experim Ophthalmol*, submitted 2002.
 - 10) Ikuno Y, Hibino S, Bando H, Kawasaki Y, Nakamura T, and Tano Y. Retinal glial cells stimulate microvascular pericytes proliferation via fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in vitro. *Jpn J Ophthalmol*, in press 2002.
2. 学会発表
- 1) XXXII Annual Scientific Congress of Royal Australian College of Ophthalmologists Norman Gregg Lecture 2000 「Macular Surgery : From Minimum to Maximum」 2000 年 11 月 20 日 於 Sydney
 - 2) The 19th Annual Vitreous Society Meeting Gertrude D. Pyron Award Lecture 「Complications make me feel lonely...」 2001 年 11 月 29 日 於 Puerto Rico
 - 3) 第 25 回日本眼科手術学会総会、特別講演 「硝子体手術と合併症」、2002 年 1 月 27 日 於 広島
- H. 知的財産権の出願、登録状況**
- 「電気刺激による神経保護に関する発明」(申請中) 福田淳、田野保雄、森本 荘との共同申請。

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫アレルギー等研究事業）
分担研究報告書

- ・網膜刺激電極の視覚中枢における機能評価の研究
- ・網膜神経節細胞の解剖学的、機能的評価の研究

分担研究者 不二門 尚 大阪大学大学院医学系研究科感覚機能形成学 教授

研究要旨

網膜刺激電極の、視覚中枢における機能評価法を確立することを目的として、初年度はラットの視覚中枢である、上丘での誘発電位の研究を行った。一对の刺激電極を、それぞれ脈絡膜側と硝子体側に設置することで、網膜への侵襲を回避することが可能な電極の設置法である「強膜インプラント刺激法」を考案し、その有効性を健常有色ラットおよび網膜色素変性疾患モデルである RCS ラットを用いて評価した。この方法により網膜の局所を電気刺激すると、健常ラット、RCS ラットともに上丘から誘発電位が記録された。また、刺激強度を下げることによって、上丘における誘発反応の広がりを見局させることができた。これらの結果から、ラット上丘での誘発電位は人工視覚の評価に有用であることが示されると共に、網膜色素変性における人工網膜の刺激方法として、強膜インプラント刺激法が有効であることが示された。

網膜変性眼において、残存する網膜神経節細胞の解剖学的評価のため、補償光学系を組み込んだ眼底カメラの開発を目指しているが、初年度は装置を最適化するための設計を行った。神経節細胞の機能評価に関しては、角膜刺激電極を biphasic pulse で刺激することが有効であることを確認された。

A. 研究目的

人工網膜は、外界の画像データを基に網膜を直接多点で電気刺激することにより視覚情報を中枢に伝えるシステムであり、重度の網膜疾患患者に対する視覚機能回復の手段として大きな注目を集めている。刺激方法としては、シート状の刺激電極を網膜下に挿入して網膜を刺激する subretinal stimulation (網膜下刺激) 法と、同様な電極を内側網膜に接触させて行う epiretinal stimulation (網膜上刺激) 法とが提案されており、ドイツ・米国を中心に研究開発が進んでいるが、どちらの方法にも一長一短がある (Zrenner, Science, 2002)。特に、い

ずれの方法においても、刺激電極が網膜に直接接触しないし刺入される為、網膜への侵襲は少ないと考えられる。我々は、一对の刺激電極をそれぞれ脈絡膜側と硝子体側に設置することで、網膜への侵襲を回避しながらも、網膜を電気刺激できるのではないかと考えた。この強膜インプラント刺激法の有効性を検討するのが、本研究の目的である。具体的には、強膜剥離部分へ局所的に刺激を加えたとき、視覚中枢である中脳上丘において誘発反応が惹起されるかを、健常有色ラットと網膜色素変性症モデルである RCS ラットを用いて電気生理学的急性実験で検討した。さらに、この刺激方法で得られ

る空間分解能を評価するため、上丘における誘発反応の局在を検討した。

網膜変性眼において、人工網膜が適応となるのは、網膜神経節細胞が残存している場合のみである。神経節細胞の解剖学的評価のため、補償光学系を組み込んだ眼底カメラの開発を、機能評価のために、角膜刺激電極による phosphene の定量化を目的とした装置のセットアップを行った。

B. 研究方法

(1) 網膜刺激電極の視覚中枢における機能評価

[実験動物]

実験動物には、有色素で健常網膜をもつ動物として Hooded rats (Long Evans, メス、8～12 週齢) 4 匹と、色素変性疾患モデルとして RCSrats (オス、25 週齢) 1 匹を用いた。大阪大学動物施設のガイドラインに基づき、実験動物に与える苦痛は最小限にとどめるよう心がけた。全ての手術および電気生理学的記録はウレタン麻酔 (1.75g/kg, i.p.) 下で行った。実験中は心電図を記録し、体温の低下を防ぐため、動物の腹部には使い捨てカイロをあてた。眼球には散瞳剤を滴下して瞳孔を散大させコンタクトレンズを装着した。

[電気生理学的記録]

切開した気管に挿管した後、頭部を定位固定した。開頭し、右側頭骨後部の頭蓋骨を除去した後、大脳皮質を吸引除去して右側上丘の背側表面を露出させた。上丘露出部分の表層に記録電極を置き電極の周囲はミネラルオイルで満たした。記録電極には銀ボール電極 (0.7φ) と金属製針電極 (0.3φ, ユニークメディカル社 UC-2007) を用い適宜使い分けた。基準電極としてステンレス製のねじ電極をラムダ縫合より約 1～2 mm 尾側の後頭骨に埋め込んだ。記録電極より単極誘導された電位変動を増幅 (増

幅率 1 万倍、バンドパスフィルター 3 Hz～3 kHz) し、シグナルプロセッサを用いて誘発反応の 20 回の平均加算を行った。また、コンタクトレンズ電極 (京都コンタクト製) を用いて増幅率 1 万倍、バンドパスフィルター 1 Hz～3 kHz で ERG も記録した。ERG は 20 分の暗順応後に記録した。

[光刺激]

網膜電図 (ERG) および視覚性誘発電位 (VEP) を記録するため、左目眼球に対して眼前 5cm の位置においた光源よりフラッシュ光を 3 秒間隔で呈示した。

[電気刺激]

視神経から 1.5～2.5mm の位置に約 1mm × 1mm の大きさで強膜開窓術を施した。開窓部に直径約 0.3mm の銀ボール刺激電極を接触させ、その周りをミネラルオイルで満たし絶縁した (強膜電極)。もう一方の刺激電極には 26 ゲージ注射針を用い、毛様体扁平部から硝子体内へ針入した (硝子体電極)。この二つの電極間に 0.5ms の単相矩形波で定電流刺激を加えた。また、この刺激応答との比較のために、視神経刺激もおこなった。虚血を起こさないように注意深く硬膜を切開して視神経を露出させた。露出させた視神経を 2 本の金属線で挟み、この二つの電極間に定電流刺激を加えた。

[組織学]

刺激部位と記録部位を組織学的に検討するため、電気生理学的実験の終了後、眼球と上丘にマーキングした。深麻酔下の動物を 10%ホルマリンで還流固定した。固定した動物より左眼球を摘出して、網膜全伸展標本を作製し、刺激電極位置を実態顕微鏡下で確認した。脳も摘出し右上丘の記録電極の部位を確認した。また、RCS ラットの網膜変性を組織学的に確認するため、固定した眼球の凍結切片標本 (厚さ 15 μm) を作成し HE 染色を施して光学顕微鏡的

による観察と顕微鏡写真の撮影を行った。コントロールとして1匹の Hooded rat 眼球についても同様に切片標本を作成し、検鏡観察した。

(2) 網膜神経節細胞の解剖学的、機能的評価
神経節細胞の解剖学的評価のため、補償光学系を組み込んだ眼底カメラの開発を目指しているが、初年度は装置を最適化するための設計を行った。神経節細胞の機能評価に関しては、三宅らの方法に従い、角膜刺激電極を用いて phospene を感じる閾値を正常者で検討した。

C. 研究結果

(1) 網膜刺激電極の視覚中枢における機能評価

ノーマルラットに対して、強膜電極を陽極、硝子体電極を陰極として強膜インプラント刺激を行ったところ、対側上丘表面から誘発電位が記録された。図1-bはその典型である。この誘発電位は頂点潜時6~8msの陰性波と頂点潜時12~13msの陽極波からなっており、60 μ Aの電流刺激時の頂点間振幅は23 μ Vであった。刺激の極性を反転させて、強膜電極を陰極、硝子体電極を陽極として刺激すると、誘発電位は消失した(図1-c)。

一方、上丘から記録された VEP(図1-a)は潜時82~232msの多相性の波であった。また、視神経刺激に対しては、頂点潜時4msの陰性波とそれに続く頂点潜時9msの陽性波からなる二相性の波が記録された(図2-c)。従って、強膜インプラント刺激による誘発電位の波形は視神経刺激によるそれと近似していることが判った

以上の結果から、強膜インプラント刺激により、網膜神経節細胞に興奮が生じ、その興奮が視神経を通じて上丘に伝えられたことが示唆された。

次に色素変性疾患モデル動物である RCS ラ

ットにおいて、強膜インプラント刺激に対する誘発電位を対側上丘から記録した。記録された誘発電位の平均加算波形の典型例を図2-dに示した。ノーマルラットと同様に、誘発電位は陰性-陽性の二相性の波形からなり、それぞれの頂点潜時は7msと14msであった。この RCS ラットの網膜色素変性を確認するため、フラッシュ刺激に対する ERG および VEP を記録した。その結果を図2-a, bに示した。ERG および VEP ともほぼ完全に消失していた。さらに、この動物の切片標本を作製し、組織学的に検討した結果が、図3の B である。ここでは、正常ラットの標本(図3の A)では認められる視細胞層が、変性消失していた。

以上のことから、網膜色素変性症疾患において、視覚情報を強膜インプラント刺激によって視覚中枢に伝えうることが示唆された。

最後に、強膜インプラント刺激が誘発する上丘の興奮は、どのくらい広がっているのかをノーマルラットを用いて測定した。まず、強膜電極を視神経より上方2.5mmの位置に置き、電流強度を比較的閾値に近い100 μ Aに固定して刺激をおこなった。記録場所は0.1mm間隔ずつ上丘表面で移動させ、それぞれの記録部位で得られた誘発応答の振幅を円の大きさを表した(図4の A)。その結果、上丘の外側で最も大きい誘発電位が得られた。このときの振幅は48 μ Vであった。その地点より内側へ400 μ m離れると応答は消えて記録できなくなった。この実験によって強膜インプラント刺激でも、視野のある部位に局限した興奮を誘発することが可能であることが示唆された。

(3) 網膜神経節細胞の解剖学的、機能的評価
神経節細胞の解剖学的評価のため、補償光学系を組み込んだ眼底カメラの開発において、装置を最適化するための設計を行った。神経節細胞の機能評価に関しては、角膜刺激電極を

biphasic pulse で刺激することが、低閾値で phospene を誘起する上で有効であることが確認された。

D. 考察

ラット上丘での誘発電位の記録が、網膜刺激電極の機能評価に有効か否かを検討するために、強膜インプラント刺激による誘発電位をノーマルラットに対して調べたところ、この刺激方法においても十分に応答が得られた。得られた波形は視神経刺激による誘発電位と類似していることから、電気刺激による興奮は、視路を介して上丘まで伝わっていると推測された。

人工視覚システムの適応疾患の一つとして考えられているのが網膜色素変性である。これは視細胞が失われて失明にいたる疾患である。この疾患モデルとしての代表的なものとして RCS ラットがある。強膜インプラント刺激法が人工視覚システムに用いる刺激法として有効であるか評価するために、視細胞の変性を有する RCS ラットに対しても同様の実験を行った結果、上丘での誘発電位が確認された。硝子体電極側つまり網膜神経節側の電極が負極にあるとき誘発電位の振幅が増加し、視神経刺激と強膜インプラント刺激による誘発電位の波形がよく似ていたことを考慮すると、網膜神経節細胞が直接刺激され興奮したのではないかと推測される。

刺激電極一極で刺激した際、限局した刺激ができれば、より空間分解能の高い人工網膜が開発可能である。そこで現在、強膜インプラント刺激でどれほど限局した刺激ができるか研究を進めている。まだ例数は少ないが、図4にあるように電流値を小さくすることによって限局された興奮を得ることができた。興奮の起こった部位は上丘の外側であった。この部位は網膜の上方から神経投射を受けていることが一般に知

られている。今回の場合、強膜側の刺激電極が眼球上方に設置したことを考えると、網膜上の興奮は強膜電極付近で起こっているのではないかと考えられる。ただ、刺激によって網膜上の通過線維まで刺激したどうかについては、本実験の結果からでは判定が難しいため、これは今後例数を増やして深く検討していく必要がある。また、今後は電極等を改良することによってより限局させることが可能ではないかと考えている。

神経節細胞の解剖学的、機能的評価は実際に、人工視覚治療が適応となるか否かを定める重要な検査である。初年度は装置の設計および、刺激パラメーターの決定のための初歩的研究を行ったが、次年度以降これを発展させる所存である。

E. 結論

今回、視覚疾患モデル動物である RCS ラットを用いた *in vivo* 実験において、強膜インプラント刺激で網膜を興奮させ、その興奮が視覚中枢まで伝わることを確認した。これにより強膜インプラント刺激の網膜色素変性に対する有効性が示された。また、強膜インプラント刺激に対する刺激の興奮の広がりやを測定した結果、電流値を低くすることによってある程度限局させることができた。今後は、その広がりやをより限局させるために刺激電極の改良を試みる予定である。そして、どれほどの電極間距離で二点弁別が可能かについても調べる予定である。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuroda T, Fujikado T, Maeda N, Oshika T, Hirohara Y, Mihashi T. Wavefront analysis of higher

order aberrations in patients with cataracts. J Cat Ref Surg. 28;738-444, 2002.

2. Fujikado T, Shimojyo H, Hosohata J, Tsujikawa K, Fukui T, Ohji M, Tano Y. Effect of Simultaneous Oblique Muscle Surgery in Foveal Translocation by 360° Retinotomy. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 240;21-30, 2002

3. Fujikado T, Tsujikawa, K., Tamura, M., Hosohata, J., Kawasaki, Y., Tano, Y.: Effect of a Nitric Oxide Synthase Inhibitor on Lens-Induced Myopia. Ophthalmic Res. 33(2)75-79, 2001.

4. Fujikado T, Ohji, M., Kusaka, S., Hayashi, A., Kamei, M., Okada, A.A., Oda, K., Tano, Y.: Visual function after foveal translocation with 360-degree retinotomy and simultaneous torsional muscle surgery in patients with myopic neovascular maculopathy. Am. J. Ophthalmol. 131(1):101-110, 2001

2. 学会発表

・ Fujikado T, Asonuma S, Ohji M, Hayashi A, Kusaka S, Tano Y, Oda K. Reading ability after foveal translocation surgery with 360° retinotomy. ARVO 2001 annual meeting (Fort Lauderdale, FL, USA, 2001.5.2)

・ Fujikado T, Tano Y. The relationship between postoperative vision and preoperative stability of fixation with SLO microperometry in patients treated with macular translocation surgery. Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft 2001 annual meeting (Berlin, Germany, 2001.9.29)

・ Kuroda T, Fujikado T, Maeda N, Hirohara Y, Mihashi T, Ninomiya S. The effect of aging on scattering and higher-order aberrations. 3rd International Conference of Wavefront Analysis (Interlaken, Switzerland, 2002.2.17)

H. 知的財産権の出願・登録状況

「電気刺激による神経保護に関する発明」(申請中) 福田淳、田野保雄、森本 荘との共同申請。

【図の説明】

図 1

正常ラット上丘の誘発応答。a: フラッシュ光刺激に対する応答、b: 強膜インプラント刺激に対する応答(強膜側正極)、c: 強膜インプラント刺激に対する応答(強膜側負極)。図中の矢印は刺激のタイミングを表す。

図 2

RCS ラットの結果。a, b: フラッシュ光刺激に対する ERG と VEP、c: 視神経刺激に対する上丘の応答、d: 強膜インプラント刺激に対する上丘の応答(強膜側正極)。

図 3

(A) ノーマルラットの網膜断面図、(B) RCS ラット (25 週齢) の網膜断面図。RCS ラットでは外顆粒層(ONL)や視細胞外節(OS)が消失していた。

RGC: 網膜神経節細胞、IPL: 内網状層、INL: 内顆粒層、ONL: 外顆粒層、OS: 視細胞外節。スケールバー = 100 μm。

図 4

(A) 上丘での応答マップ(測定点の間隔: 100 μm)。図中の円の大きさは誘発電位の振幅の大きさを表す。上丘の一部で応答が限局していることが分かる。尚、このときの刺激パルスはパルス幅 500 μs、電流強度 100 μA であった。

(B) 強膜電極の眼球上での位置。強膜電極は視神経(視神経乳頭)から上方 2.5mm の部位

に固定した (図中の点 α)。

正常ラット

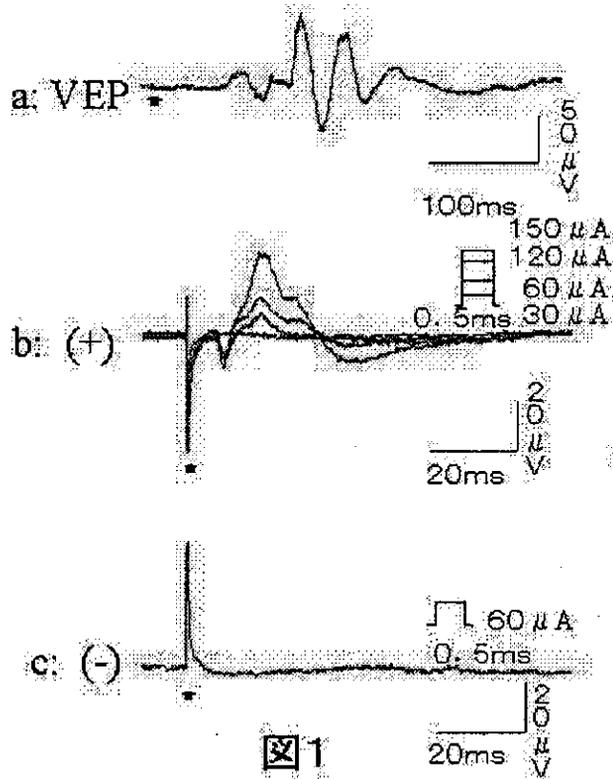


図1

RCSラット

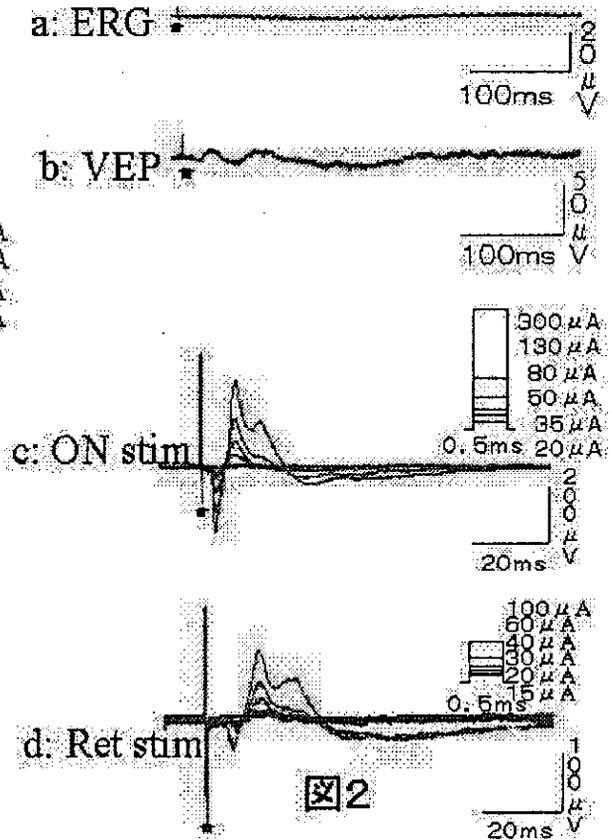
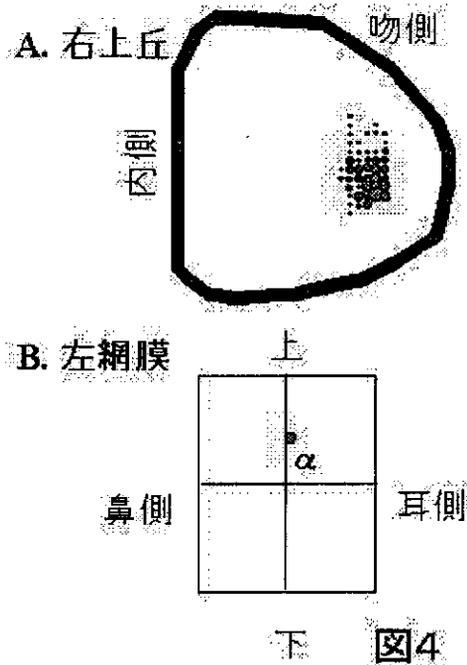
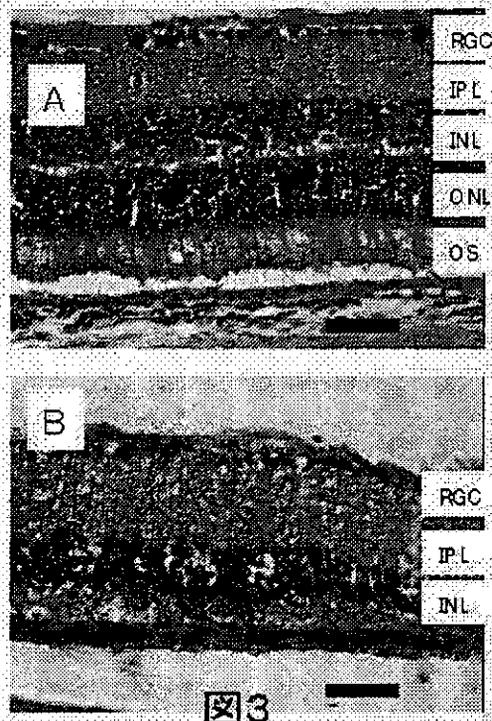


図2



網膜神経節細胞の神経保護

分担研究者 福田 淳 大阪大学医学系研究科教授

研究要旨

網膜の神経細胞の細胞死を防ぐための新しい方法として、電気刺激が神経保護効果を有するか否かを検討した。成ラットの視神経を切断し、その直後に2時間の電気刺激を切断端に加え、1週間後の網膜神経節細胞の生存率を調べた。その結果、刺激なしの対照群では54%の平均生存率だったのに対し電気刺激では83%の細胞が生存しており、*in vivo*での電気刺激が網膜神経節細胞に対して神経保護効果を有することが明らかとなった。人工網膜における網膜電気刺激が神経細胞保護にも有用であることが示唆された。

A. 研究目的

網膜刺激型人工網膜の実現のためには、網膜に加える電気刺激そのものが細胞の変性・生存にどのように影響を与えるかについても検討する必要がある。電気刺激の対象である網膜神経節細胞に対する神経保護を調べるためには、視神経切断によって網膜神経節細胞に軸索損傷を与えることで生じる細胞数の減少が指標としてこれまで多く用いられている。そのため、この視神経切断モデルを用いて、電気刺激が網膜神経節細胞の生存にどのように影響を与えるかを検討した。

B. 研究方法

成ウイスターラットを用い、両側上丘への蛍光色素 Fluorogold 投与によって逆行性に網膜神経節細胞を標識した。実験動物は、視神経切断を行った群、視神経切断直後に電気刺激を行った群、および、視神経切断後に刺

激電極を設置するが通電しない群（対照手術群）の3群に分けた。網膜に虚血が生じないように注意しながら、球後3mmの位置で視神経を切断した。切断直後に眼底鏡にて血流の維持を確認した。直径各1mmの双極の銀ボール電極で視神経断端を挟み、極間に持続50 μ secの矩形波パルスを20Hzの頻度で2時間加えた。また、一発のパルスの電流値には20 μ A, 30 μ A, 50 μ A, または70 μ Aを用いた。手術の1週間後に動物を灌流固定して網膜伸展標本作製し、蛍光顕微鏡下で生存している網膜神経節細胞を計数した。具体的には、視神経乳頭から耳側、鼻側、背側、腹側の4方向に1,2,3mmの場所、計12カ所にて500 μ m四方内の神経節細胞の数を求め、各網膜毎に網膜神経節細胞の平均密度を算出し、3群間で比較した。本研究の手術操作は全てペントバルビタール(50mg/kg, i.p.)の麻酔下で行っており、それ以外にも動物に無用な苦痛を与え

ないように最大限配慮して行った。また大阪大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

図1に正常網膜(A)、視神経切断7日後の網膜(B)、視神経切断後に電気刺激を与えて7日後の網膜(C)の蛍光顕微鏡像を示す。切断7日後では蛍光標識された網膜神経節細胞の数が大きく減少しており、死滅した細胞の残骸を示す小さな光点が多く出現していたのに対し、50 μ Aの電気刺激を与えた網膜では、多くの網膜神経節細胞が生存していた。

網膜神経節細胞の密度(平均 \pm 標準偏差)は、正常網膜では $2,401\pm 150/\text{mm}^2$ ($n=8$)、切断7日後では $1,298\pm 103/\text{mm}^2$ ($n=4$) (生存率54%)であるのに対し、50 μ Aの電気刺激を加えた群では、 $2,000\pm 66/\text{mm}^2$ ($n=4$)と、83%もの網膜神経節細胞が生存していた(図2)。電気刺激のための電極を視神経切断後2時間設置しておくが通電だけを行わなかった対照手術群の生存率は53%($n=4$)と視神経切断のみの群と変わりなかった。

電流量を変化させた場合、20 μ A, 30 μ A, 50 μ Aと電流量が増すに従って生存率は上昇し、生存促進効果における電流量依存性が認められた(図2)。70 μ Aの電気刺激の場合は50 μ Aの場合と比べて生存促進効果の増加は認められなかった。また、80 μ A, 100 μ Aの刺激の場合には、網膜そのものが剥離していたため、電気刺激の網膜神経節細胞への保護効果の検討はできなかった。

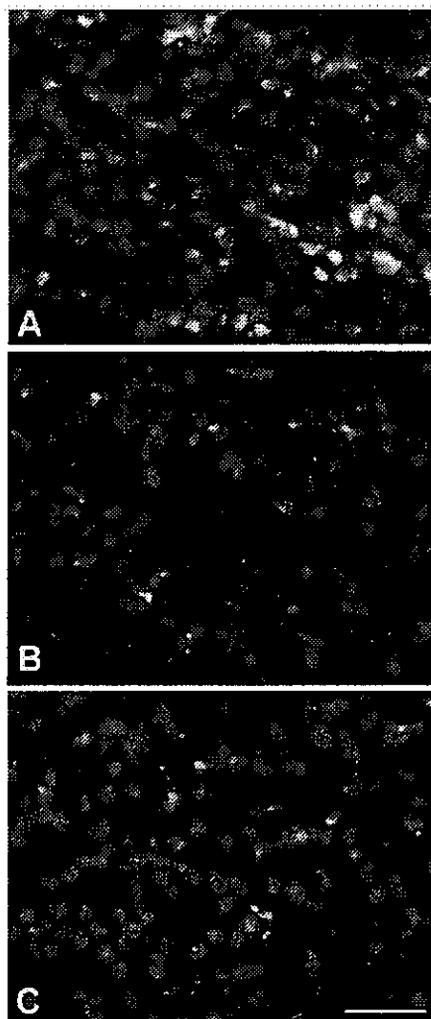
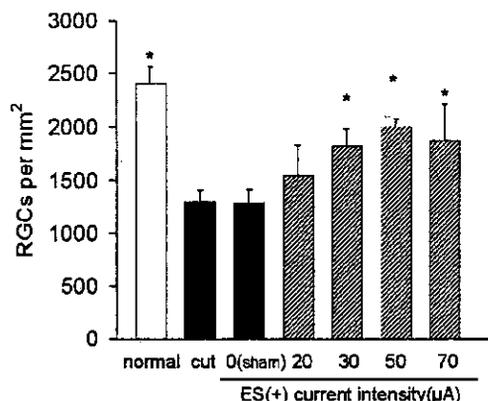


図1. Fluorogoldで標識された網膜神経節細胞の蛍光顕微鏡像。A.正常網膜、B.視神経切断7日後の網膜、C.視神経切断直後に50 μ Aの電気刺激を加えて7日後の網膜。スケールは50 μ m。

D. 考察

本研究での電気刺激の神経保護効果は、対照手術群では切断のみの群と全く同じで生存率の向上が見られなかったこと、および、神経保護効果には電流量依存性が見られることから、電気刺激そのものの効果であることが明らかとなった。本研究で用いた電気刺激の



頻度は網膜神経節細胞の活動電位の頻度の生

図2. 軸索切断後の網膜神経節細胞に対する電気刺激の生存促進効果。One-way ANOVA ($p < 0.001$) followed by Tukey test ($p < 0.05$, 切断群に対して)。

理的な範囲内にあるものである。人工網膜による網膜神経節細胞への電気刺激は単に視覚情報を直接神経細胞において発生させるのみならず、傷害された網膜神経節細胞を保護することにも役立つ可能性を示唆している。

電気刺激の神経保護メカニズムについては現状では全く不明であるが、電気刺激が網膜神経節細胞に活動電位を発生させ、その活動電位が細胞内において何らかの生存シグナルを活性化させているものと考えられる。

80μA, 100μA という強さの電気刺激を与えた時には網膜全体が剥離したが、この傷害は、単相性波形を用いて刺激を行ったことによるものと考えられる。一般的に生体へ電気刺激を与える場合には、単相性よりも二相性の刺激波形を用いた方が組織へのダメージが少ない。網膜に傷害を与えた電流値は、最も大き

な神経保護効果のあった 50μA に比較的近いが、二相性の刺激を用いれば、有効な刺激電流値と傷害を与える刺激電流値の間にもっと大きな安全間隔を取ることが可能であると考えられる。

以上より、電気刺激は網膜神経節細胞の神経保護に有用であることが示された。今後さらに刺激パラメータや電気刺激を与える方法、神経保護作用のメカニズムなどを研究する予定である。

E. 結論

電気刺激は視神経切断による網膜神経節細胞の細胞死を抑制し、神経保護効果をもたらすことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Watanabe M, Inukai N and Fukuda Y: Survival of retinal ganglion cells after transection of the optic nerve in adult cats: a quantitative study within two weeks. *Visual Neurosci.* 18:137-145, 2001.

2) Morimoto T, Miyoshi T, Fujikado T, Tano Y and Fukuda Y: Electrical stimulation enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells *in vivo*. *Neuroreport* 13:227-230, 2002.

3) Yakura T, Fukuda Y and Sawai H: Effect of bcl-2 overexpression on establishment of

ipsilateral retinocollicular projection. Neuroscience, *in press*.

4) Inoue T, Hosokawa M, Morigiwa K, Ohashi Y and Fukuda Y: *Bcl-2* overexpression does not enhance *in vivo* axonal regeneration of retinal ganglion cells after peripheral nerve transplantation in adult mice. J. Neurosci., *in press*.

5) 矢倉徹, 澤井元, 福田淳 : 哺乳類の視交叉? 同側性視神経投射形成のメカニズムを中心に? 脳 21,5(1), 14-18, 2002.

6) 栗本拓治, 渡部眞三, 福田淳 : 視神経の再生? 網膜神経節細胞の生存促進効果から視覚機能回復へ. .実験医学増刊,20(5),185-191, 2002.

7) 福田淳 (編): 網膜・視神経の発生と再生. Molecular Medicine 別冊, 中山書店, 2002.

8) 福田淳, 佐藤宏道: 脳と視覚. 共立出版, 2002.

2. 学会発表

1) Miyoshi T, Takao M, Watanabe M and Fukuda Y: Intraocular injections of neurotrophic factors rescue retinal ganglion cells from receptive field shrinkage after axotomy in adult cats. ARVO 2001 annual meeting (Fort Lauderdale, FL, USA, 2001.5.2.).

2) 三好智満, 森本壮, 井上徹, 澤井元, 不二門尚, 田野保雄, 福田淳: 電気刺激を用いた神経賦活による網膜神経節細胞の細胞死抑制。視覚科学フォーラム第5回研究会(北九州,2001.7.24.)。

3) 栗本拓治, 三好智満, 渡部眞三, 三村治, 福田淳: ネコ網膜神経節細胞の細胞死におけ

るアポトーシスの関与。第16回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会(大阪, 2001.6.9)。

4) 森本壮, 三好智満, 不二門尚, 田野保雄, 福田淳: 電気刺激による網膜神経節細胞の細胞死抑制効果。第16回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会(大阪, 2001.6.9.)。

5) 栗本拓治, 三好智満, 渡部眞三, 福田淳: ネコ網膜神経節細胞の軸索切断後のアポトーシス? 細胞タイプによる違い?。第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会(京都,2001.9.27)。

6) 森本壮, 三好智満, 井上徹, 澤井元, 不二門尚, 田野保雄, 福田淳: 電気刺激による網膜神経節細胞生存促進効果。第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会(京都,2001.9.27)。

7) 栗本拓治, 三好智満, 渡部眞三, 三村治, 福田淳: ネコ網膜神経節細胞の軸索切断後のアポトーシス細胞死。第39回神経眼科学会総会(倉敷, 2001.10.27)。

8) Fukuda Y: Survival and axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells. 第79回日本生理学会大会(広島,2002.3.28.)。

9) 矢倉徹, 森本壮, 三好智満, 澤井元, 福田淳: 電気刺激による網膜神経節細胞の生存促進と網膜内リン酸化 Akt 量の変化。第79回日本生理学会大会(広島,2002.3.28.)。

10) 栗本拓治, 三好智満, 渡部眞三, 福田淳: ネコ網膜神経節細胞の軸索切断による細胞死? タイプによるアポトーシス関与の違い?。第79回日本生理学会大会(広島,2002.3.28)。

11)岡崎祐香、森本壮、澤井元、福田淳：電気刺激の遅延が網膜神経節細胞の生存促進効果に及ぼす影響。第 79 回日本生理学会大会（広島,2002.3.29）。

12)森本壮、三好智満、澤井元、井上徹、不二門尚、田野保雄、福田淳：軸索切断された網膜神経節細胞に対する電気刺激の神経保護効果。第 79 回日本生理学会大会（広島,2002.3.29）。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

「電気刺激による神経保護に関する発明」

（出願中）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

人工網膜電極の開発および機能評価に関する研究

分担研究者 三宅養三 名古屋大学医学部眼科学教室教授

研究要旨

網膜色素変性症により失明した患者に対して残存網膜を電気刺激することにより形態覚を得させる目的で人工網膜開発が始まっている。今回我々は網膜電極の形状、電気刺激送信方法に対して考察し、国際特許を出願した。また、網膜変性症に対し電気生理学的検査を施行し患者網膜の残存機能を考察した。

A.研究目的

厚生労働省により特定疾患に指定されている網膜色素変性症は失明状態に陥っても人工網膜により形態覚の再取得が生理的に可能である。現在人工網膜開発のために研究が行われており、電極の材質、手術方法、外部から電極への信号送信方法など様々な分野で研究が進んでいる。

今回我々は網膜に機械的障害の起こりにくい電極の形状、網膜を効率よく刺激する電気刺激方法に対して研究を開始した。

B.研究方法

動物（ウサギ）網膜を網膜厚を光干渉断層形（OCT）にて計測し、網膜に障害を与えない形状を考察した。また、従来の網膜の電気刺激方法は認識させたい形のみを刺激していたが、我々は電気刺激を行う対象の網膜双極細胞は過分極型と脱分極型と2種類あることを利用し、その背景も逆位相で刺激することによりコントラストを高めることを予想した。その研究の一環として脱分極型網膜双極細胞が機能低下を起こす完全型先天性停止性夜盲患者（cCSNB）

の多局所網膜電図（mfERG）を記録しその網膜生理を考察した。

倫理面への配慮 今回の研究では形状に関してはウサギを使用することで問題ないと思われる。網膜電図に関しては記録波形を研究に使用することは患者のインフォームドコンセントを得られており問題ないと思われる。

C.研究結果

1) 網膜電極の形状について

光干渉断層形（OCT）によりウサギ網膜厚は計測することができ、その厚みのスペーサを備えた電極を設計することができた。これはスペーサ部は網膜を潰してしまうが、肝心の刺激部は網膜に障害を与えない構造を呈している。

2) 刺激方法について

cCSNB の mfERG を記録することができ、記録波形の振幅、潜時から脱分極型網膜双極細胞機能低下時の網膜電気生理反応情報が得られた。

D.考察

網膜電極の形状により解剖学的に網膜形態を維持することは可能であり必要なことである。従来の網膜電極は板状であり、網膜にかかる圧力が均一である。網膜タックにより固定するが圧力がかかりすぎると刺激する残存網膜を押しつぶしてしまう。スペーサを設けることにより網膜の障害をスペーサ部のみに留めることができ、安全に電極移植ができる

電気刺激については高電荷で刺激すれば網膜は興奮しやすいが当然網膜に対する侵襲が大きい。いかに低電荷で刺激するかが重要である。従来は送信図形部だけを刺激していたが背景を逆位相にて刺激することは研究がされておらず今後比較検討する価値があると思われる。

E. 結論

網膜の障害を防ぐため、網膜厚のスペーサを備えることが電極の形状として必要である。

網膜電気刺激の方法として送信図形部と逆位相の刺激を背景に行うことは総電荷の減少に寄与する可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

雑誌

Kondo M, Miyake Y, Kondo N, Tanikawa A, Suzuki S, Horiguchi M, Terasaki H.:

Multifocal erg findings in complete type congenital stationary night blindness.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001

May;42:1342-8.

鈴木 聡：視覚代行の現状と研究. あたらしい眼科 18: 163-69, 2001

鈴木 聡：人工眼の現状. 臨床眼科 55: 1367-71, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

「網膜刺激用電極部材、およびその電極部材を用いた人工網膜装置等」

国際特許出願中

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫アレルギー等研究事業研究事業）
分担研究報告書

網膜刺激電極の眼内移植に関する術式開発、網膜刺激電極の生体適合性の研究
分担研究者 分担研究者 平形 明人 杏林大学・助教授

研究要旨

人工視覚のための電極を網膜上あるいは網膜下に挿入するためには安全な手術手技の開発と電極の生体適合性を検討することは重要な課題である。

家兎眼が硝子体手術手技の施行および網膜障害の程度を観察するための動物眼モデルに成りえるか検討した。家兎眼は人工電極挿入のための硝子体手術手技の開発研究のためには有用であるが、組織障害を検討するためには硝子体手術手技自体による網膜障害もヒト網膜に比較して容易に生じることが確認された。その障害をトリバンブルーによる生体染色である程度把握できることが示された。

また、家兎眼よりヒト網膜に近似する豚眼を利用して人工網膜シートを挿入し、生体適合性を検討した。2mm x 3mm の人工網膜チップを移植された minipig について、最長 14 ヶ月に渡る検討を行った。フルオレセイン蛍光眼底撮影(FA)と組織所見から、明らかな異物反応や増殖反応は認めず、非移植眼の形態維持が長期に渡って可能であることが示され、網膜下に移植された人工網膜チップ移植の生体適合性が部分的ながら確認された。

A. 研究目的

網膜刺激型電極を網膜に設置するためには、電極をどのような手術方法で移植するか、移植後どのような合併症が問題となるか検討する必要がある。つまり、網膜損傷や網膜剥離、多量の出血、術後の重篤な炎症、増殖性変化などの手術侵襲を減らし、術後の人工視覚誘発電極の生体適合性を良好にする検討が重要な課題である。

現在、欧米のいくつかのグループで行われている人工網膜研究は大別して網膜上電極と網膜下電極の 2 つの移植部位をターゲットとして行われている。いずれのアプローチもそれぞれいくつかの利点欠点を持っており未だ実用性の決着はついていない。

主な点を挙げると、前者の利点は外部からの刺激波形の制御が可能であること、ごくわずかの網膜損傷で移植可能と考えられることで、欠点は情報や電力を転送するための外部装置を要すること、網膜上への電極の固定法等である。後者の利点は未だ変性に陥っていない網膜内層を利用できる可能性があること、生体内への固定が容易であると予想されることで、欠点は外部からの制御が困難なこと、網膜下に異物を移植することに伴う合併症の可能性が否定できないことである。特に網膜剥離に加え、異物存在下での生体の反応は未知の部分が多く、炎症反応、色素上皮の遊走、化生に伴う増殖反応、それらによって引き起こされる増