

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 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田野 保雄

平成 15 (2003) 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

網膜刺激電極の視覚中枢における機能評価	8
1. 強膜内多点電極による家兎の誘発電位の評価	
2. 網膜変性モデルラットに対する網膜刺激電極の評価	
3. ネコを用いた網膜刺激電極の機能評価	
不二門 尚	
網膜神経節細胞の神経保護	2 6
福田 淳	
網膜刺激電極の開発	3 5
1. 新しい電極および固定法の開発	
2. 動物モデル作成とその視機能評価	
三宅 養三	
網膜刺激電極の生体適合性の研究	4 4
平形 明人	
遊離網膜を用いた電極の評価	5 2
八木 哲也	
網膜下刺激電極システムの開発	5 6
太田 淳	
網膜上刺激電極の開発	6 4
八木 透、西村 茂	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	6 7
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	7 0
-----------------	-----

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）

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、家兎に対してダミー電極であるポリイミド片（幅大きさは2×6 mm厚さ50μm）を硝子体手術を行って網膜上および網膜下に埋植した。網膜上タイプでは、術後3ヶ月の時点で組織学的に大きな問題を生じなかったが、網膜下タイプでは網膜の層状構造が消失するという重篤な障害が見られた。これは家兎の網膜血管系が人間と異なることに起因すると考えられ、今後人間に近い網膜血管系を持つミニプタを用いて検討する予定である。

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。脈絡膜新生血管モデルマウスに対して、VEGFの選択的阻害剤であるVEGF-TRAP_{R1R2}を、全身投与および硝子体内投与することにより、血管新生を抑制することが示された。従って、今後脈絡膜新生血管により失明に到った眼に対して、網膜刺激電極を埋植する場合、このような新生血管抑制作用のある薬剤を併用して投与することが有効と考えられた。

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	八木 哲也	大阪大学大学院工学研究科 電子工学専攻 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)ニデック視覚研究所 所長
平形 明人	杏林大学医学部 眼科学 助教授	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の開発および電極の生体適合性の検討は大変重要である。網膜への侵襲を最小にし、電極を安定して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。また電極の生体適合性がよくなければ長期の埋植は困難である。平成14年度は、眼科領域でよく用いられている実験動物である家兎に対して、網膜上電極および網膜下電極を埋植し検討した。

また、網膜刺激電極の生体適合性の研究の一環として、本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、加齢黄斑変性における失明の原因となっており、電極を移植後に血管新生が再発すると、人工視覚が失われる可能性がある。また眼内増殖は網膜手術後にしばしば見られる反応であり、これを抑制することは、人工網膜チップ移植術を成功させる鍵となる。

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

有色家兎を筋肉注射で麻酔した後、右眼の網膜下もしくは網膜前にポリイミド製人工網膜擬似チップを埋植した。チップの厚さは50 μ m、大きさは2×6mmで、網膜鉏で固定できるように両端に孔を加工した(図1)。網膜下チップは埋植の際には硝子体を切除し、人工的剥離を作成してできるだけ網膜の障害が少なくなるように埋植した。一方網膜前タイプのチップは網膜鉏で網脈絡膜に固定した。術後1ヶ月および3

ヶ月後に網膜の電気生理学的検査を行い網膜機能を評価した。また、その後眼球を摘出し組織学的検査を行った。組織学的検査では網膜の形態、アポトーシスを評価する Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色、そして網膜のストレスを評価するために Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) に対して免疫組織化学を行った。動物愛護の考えから手術は片眼のみに行った。

(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)

血管新生モデルマウスとして VEGF を網膜に過剰発現させた遺伝子変異マウスとレーザー誘導脈絡膜血管新生マウスを使用した。レーザー誘導脈絡膜血管新生マウスは5~7週のマウスを麻酔下にて散瞳の上、ダイオードレーザーで網膜光凝固を行うことにより作成した。強い網膜光凝固によりブルッフ膜を破り、脈絡膜から新生血管が網膜下に生じさせ、網膜を光凝固する際にバブルが生じることをブルッフ膜が破れたことの指標とした。これらの血管新生モデルマウスに対し、VEGFの選択的阻害剤である VEGF-TRAP_{R1R2} (VEGF receptorの細胞外ドメインから抽出された Ligand binding element と結合した fusion protein) を腹腔内投与の他に硝子体内投与に投与方法を変更しその効果を検討した。レーザー誘導脈絡膜血管新生マウスに対しレーザー施行後より、VEGFを網膜に過剰発現させた遺伝子変異マウスに対しては生後7日目から14日間の間に処置を施した群と、経過観察のみしておいた群との間で網膜の変化を検討した。新生血管を評価するために麻酔下で可溶性蛍光物質を投与した後に、摘出した眼球から網膜だけを取り分け伸展標本を

作成し蛍光顕微鏡で新生血管を観察した。蛍光顕微鏡では焦点を変えることにより網膜表面の新生血管とそれ以外の網膜の正常血管とを区別した。また一定期間薬物の投与した後に組織封入剤にて低温下で眼球を封入した後、凍結切片を作成し網膜血管を組織免疫学的にも評価した。

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

いずれのタイプの網膜擬似チップにおいても重篤な副作用は電気生理学的に認めなかった。網膜前タイプでは網膜の障害は比較的軽度で(図2)、TUNEL染色およびGFAP陽性細胞はほとんど見受けられなかったが、網膜下タイプのチップを埋植した家兎眼では1ヶ月、3ヵ月後とも網膜が菲薄化している(図3)上にTUNEL陽性細胞およびGFAP陽性細胞も網膜全層にわたっておおくみられた。

(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)

レーザー誘導脈絡膜血管新生マウスの凍結切片について免疫組織染色を行ったところ、レーザーでブルッフ膜を破った部分に脈絡膜新生血管が認められ、レーザーを施さない部分は正常の網膜構造が保たれていた。レーザー施行後から14日間血管新生を抑制する薬物(VEGF-TRAP_{R1R2})を腹腔内投与行った群と薬物を投与していない対照群の伸展標本を比べると薬物投与をした群の方が新生血管が少なかった。硝子体内投与を行った研究でも同様の結果を得た。今回の研究に用いたVEGFを網膜に過剰発現させた遺伝子変異マウスでは生後7日より網膜にVEGFが発現し、生後21日までに網膜下に新生血管が拡大していくと報告されている。遺伝子変異マウスの生後21日目の網膜の伸展標本では新生血管の著明な発生がみられ

た。一方生後7日目から14日間血管新生を抑制する薬物を全身投与した群では血管新生が非投与群よりも少なかった。

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、初年度に、網膜上タイプの電極片は手術併発症が少ないが、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、安定した結果を得るためにさらなる検討が必要であることを報告した。本年度の組織学的検討においても、網膜前型人工網膜チップは少なくとも家兎においては組織障害を与えないのに対して、網膜下チップは重篤な網膜組織障害を引き起こすことを見いだした。網膜下電極による網膜障害は、家兎では網膜血管の分布が少なく、網膜下に電極を置いた場合、脈絡膜側からの栄養供給が障害されたことに起因すると推察される。現在人間と網膜血管の構造が類似しているミニプタを用いて、網膜下電極の網膜への影響に関して、組織学的検討を進行中である。

今回使用した血管新生モデル動物に対して、VEGFの選択的阻害剤であるVEGF-TRAP_{R1R2}は、全身投与および硝子体内投与により脈絡膜血管新生を抑制することが示された。従って、今後脈絡膜新生血管により失明に到った眼に対して、網膜刺激電極を埋植する場合、このような新生血管抑制作用のある薬剤を併用して投与することが必要と思われる。

E. 結論

網膜上チップの埋植に関する術式は確立され、長期の埋植に対しても組織学的に安全性が確かめられた。網膜下チップは、家兎に対しては重篤な組織障害を生じたが、これは家兎の網膜血管系が人間と異なることに起因すると考えられ、今後人間に近い網膜血管系を持つミニプタを用

いて検討する予定である。

脈絡膜新生血管の抑制は、加齢黄斑変性により失明した眼に対して網膜刺激電極を移植する際重要な課題となるが、今回有効性が動物実験レベルで確認された VEGF の選択的阻害剤を、臨床レベルで発展させることが望まれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tano, Y.: LIX Edward Jackson Memorial Lecture-Pathologic Myopia: Where are We Now?. *Am. J. Ophthalmol.*, 134(5):645-660, 2002.
- 2) Ikuno, Y., Ohji, M., Kusaka, S., Gomi, F., Nakata, K., Futamura, H., Tano, Y.: Sutureless Contact Lens Ring System During Vitrectomy, *Am. J. Ophthalmol.*, 133:847-848, 2002.
- 3) Cekic, O., Ohji, M., Hayashi, A., Fang, XY., Kusaka, S., Tano, Y.: Effects of Humidified and Dry Air on Corneal Endothelial Cells During Vitreal Fluid-air Exchange. *Am. J. Ophthalmol.*, 134(1):75-80, 2002.
- 4) Ikuno, Y., Hibino, S., Bando, H., Kawasaki, Y., Nakamura, T., Tano, Y.: Retinal Glial Cells Stimulate Microvascular Pericyte Proliferation Via Fibroblast Growth Factor and Platelet-derived Growth Factor In Vitro. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 46:413-418, 2002.
- 5) Sawa, M., Ohji, M., Gomi, F., Kusaka, S., Tano, Y., Bressler, N. M.,: Apparent Disappearance of Choroidal Neovascularization after Initial Photodynamic Therapy with Verteporfin. *Arch. Ophthalmol.*, 120:1588-1590, 2002.
- 6) Kubota, A., Harino, S., Ohji, M., Tano, Y.: Modified Technique to Create Retinal Detachment During Macular Translocation Surgery. *Am. J. Ophthalmol.*, 135(1): 105-106, 2002.
- 7) Yoshitsugu Saishin, Yumiko Saishin, Kyoichi Takahashi, Michele Melia, Stanley A. Vinore, Peter A. Campochiaro. Inhibition of protein kinase C decreases prostaglandin-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *J Cell Physiol.* 195:210-219, 2003.
- 8) Yoshitsugu Saishin, Yumiko Saishin, Kyoichi Takahashi, Raquel Lima Silva, Donna Hylton, John S. Rudge, Stanley J. Wiegand, Peter A. Campochiaro. VEGF-TRAPR1R2 suppresses choroidal neovascularization and VEGF-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *J. Cell Physiol.* 195:241-248, 2003.
- 9) Qiao H et al: Interferon- γ Affects Retinal Pigment Epithelial Cell Proliferation Via Protein Kinase C Pathways. *Ophthalmologica* 2001. Nov-Dec;215(6):401-407
- 10) Hisatomi T et al: Photocoagulation-induced retinal gliosis is inhibited by systemically expressed soluble TGF-beta receptor type II via adenovirus mediated gene transfer. *Lab Invest* 82:863-870, 2002
- 11) Oshima Y et al: Gene transfer of soluble TGF-beta type II receptor inhibits experimental proliferative vitreoretinopathy. *Gene Therapy* 9:1214-1220, 2002
- 12) Hisatomi T et al: Critical role of

photoreceptor apoptosis in functional damage after retinal detachment. *Curr Eye Research* 24:161-172,2002

5) Yasuo Tano: Macular Surgery, Past, Present and Future. China-Japan Medical Conference 2002. Beijing, China. 2002.10.4.

13) Sassa Y et al: Functional role of Egr-1 mediating VEGF-induced tissue factor expression in the retinal capillary endothelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2002 Dec; 240(12):1003-10.

H. 知的財産権の出願、登録状況

特許出願番号 2002-222360

出願日 平成14年7月31日

発明の名称 視覚再生補助装置

発明者 不二門尚、田野保雄、福田淳

出願国 日本

14) Ikeda Y et al. Recombinant Sendai Virus-mediated Gene Transfer into the Retinal Tissue of Adult Rats: efficient gene transfer by brief exposure. *Exp Eye Res* 75: 39-48, 2002

2. 学会発表

1) 田野保雄: 網膜硝子体手術と合併症. 第25回日本眼科手術学会総会特別講演. 広島. 2002.1.27.

2) Yasuo Tano: Macular Translocation. *Enfermedades de Retina y Vitreo 2002, Mexico.* 2002.2.15.

3) Yasuo Tano: Limited Translocation versus Full Retinotomy Translocation. 2nd International Conference on Vitreoretinal Diseases. Vienna, Austria. 2002.9.7.

4) Yasuo Tano: Pathological Myopia: Where are we Now?. Jackson Memorial Lecture. American Academy of Ophthalmology and Pan-American Association of Ophthalmology 2002 Joint Meeting. Orlando, U.S.A. 2002.9.20.

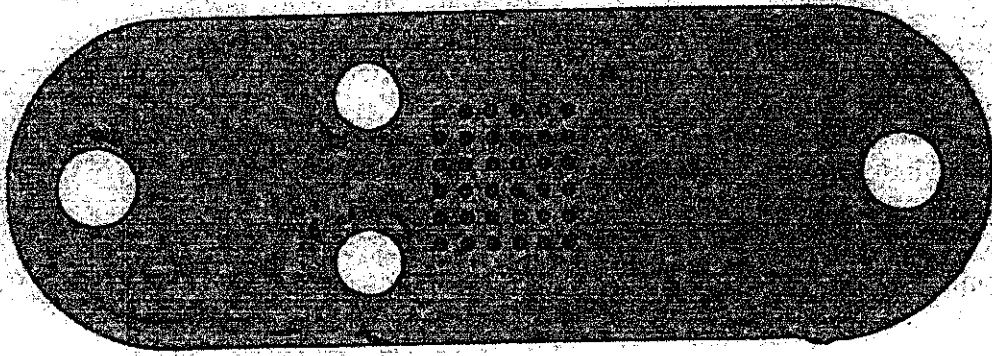


図1 埋植したポリイミド製人工網膜擬似チップ
長径の両端に網膜鉗で固定できるよう孔があいている。



図2 網膜前チップを埋植した家兎網膜
網膜前人工網膜擬似チップを埋植し、1ヵ月後に網膜の形態を組織学的に検討した。
正常網膜と比較して特に著明な形態変化は認めない。網膜神経細胞は全層にわたって
よく保存されている。

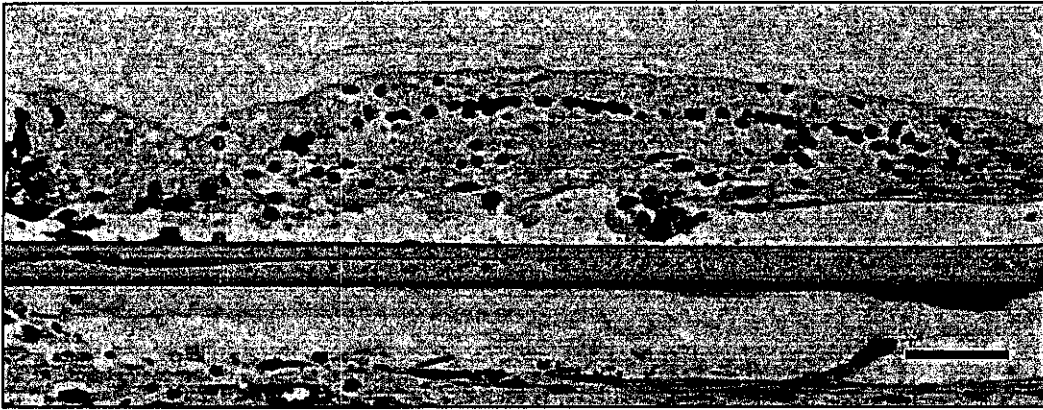


図3 網膜下チップを埋植した家兎網膜

網膜下に人工網膜擬似チップを埋植し、1ヵ月後に網膜の形態を組織学的に検討した。著明な網膜細胞死と萎縮性変化を認める。Bar = 100 μ m

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（1）
強膜内多点電極による家兎の誘発電位の評価

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
研究協力者 中内一揚 大阪大学大学院医学系研究科眼科学 研究生

研究要旨

前回我々是一对の刺激電極をそれぞれ強膜側と硝子体側に設置することで、網膜への侵襲を極力回避しながらも、網膜を電気刺激する方法「強膜インプラント刺激法」を考案し、昨年度ラットにつき実験し報告した。

さらなる臨床応用を目指すために、今回我々は強膜半層切開法を考案し、新しい刺激電極を用いて、この方法の有効性を有色家兎を用いて評価した。またこの手術法の安全性についても確認した。

この方法により、網膜の局所を刺激すると、視覚中枢である後頭葉上頭蓋においた電極より、誘発電位が記録された。また閾値は十分低いものであった。さらに組織に生ずる電流による変化は軽かった。強膜内のみ切開をおき、眼内に入らずにすむこの手術方式は簡便で、比較的安全に施行できることがわかった。この結果より、人工網膜の留置方法として、強膜半層切開法が有効であることが示された。

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・脈絡膜間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（Humayun, Survey of Ophthalmology '02）。短所としてはいずれの方法においても、刺激電極が網膜に直接接触ないし刺入される為、網膜への侵襲は少なくないと考えられる。また、手術手技が眼内へ入るために比較的困難であると予想される。

これまで我々のグループでは、一对の刺激電極をそれぞれ強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、網膜を電気刺激することが可能であることをラットを用いた実験で示してきた。（昨年報告書）今回、その手法を臨床応

用に発展させるために、電極アレイをいかに強膜内へ留置させるか、手術法の開発を行った。また、この方法で行った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、強膜半層切開層に刺激電極を埋め込んで網膜へ局所的に刺激を加えたとき、視覚中枢である後頭葉において誘発反応が惹起されるかを、有色家兎を用いて電気生理学的急性実験で検討した。

B. 研究方法

「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成熟有色家兎を使用した。

大阪大学動物施設のガイドラインにもとづき、実験動物に与える苦痛は最小限にとどめるように心がけた。全ての手術および電気生理学的記録は全身麻酔下(ケタミン 50 mg/kg i.m. +キシラジン 20 mg/kg i.m.)で行った。

また実験後は高容量のネブタール(ペントバルビタールナトリウム 100 mg/kg i.v.)を使用して安楽死処分した。

「刺激電極」

刺激電極はN I D E K社が今回新しく開発したポリイミド基板の電極アレイを用いた。その先端2 X 4 mmの部分に、金でコーティングされた8つの銅製凸型電極が、縦4列、横2列ついている。この凸の形状は、直径約250 μm で、高さは約130 μm 、電極間隔が500 μm 開いている。それぞれが、約15 cm離れた基盤根部の電線と電気的につながっており、電極個別の刺激が可能となっている。

本実験では便宜上、個別に電極に名前をつ

けた。凸面を上側にして、左側先端から後端にむかって、a~d、右側先端から後端にむかってe~hとした。(図1)

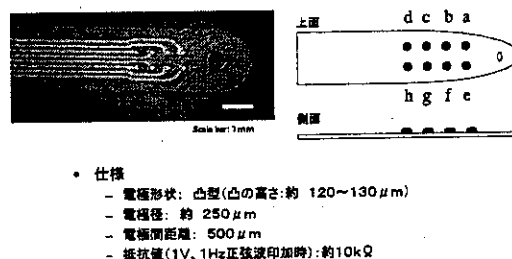


図1: 多点電極の仕様

「刺激電極埋め込み手術手技」

眼球には眼底観察が容易になるように、散瞳剤(ミドリンP)を点眼した。

次に、兎眼球を脱臼させ、ゴム製のドレーブをかけたのち、結膜を切開し、腹側輪部から約12mm後方の部位に強膜半層切開(2mm X 4mm)を作成した。凸型電極の先がウサギの visual streak にあたる部位を刺激する位置を選んだ。(図2)

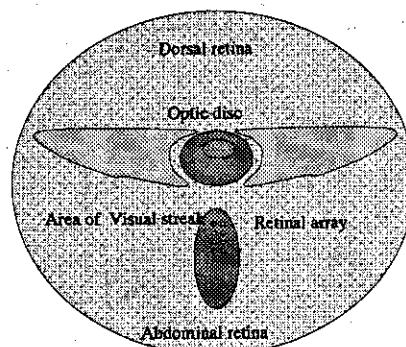


図2: 解剖図

凸型電極を半層切開層に挿入したあと、電

極が外れないように、輪部にて5-0ダクロン糸にてアンカーリングをした。また輪部より2mmの場所に21Gの注射針を使用して、硝子体側電極挿入口を作成した。硝子体側電極は白金線を先端2mmのみ露出したものを使用し、これを刺激時の参照電極として用いた。(図3)
 これらの手技が終了したのちに、ドレープを取り外し、脱臼を解除した。

電極の設置位置

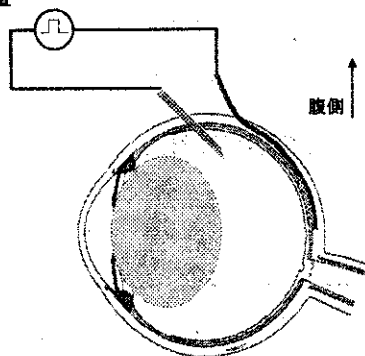


図 3: 電極の設置位置

「電気生理学的記録方法」

全身麻酔後、頭部正中線で皮切し、頭蓋骨を露出した。後頭葉視覚野上にあたる、ラムダ縫合より8mm前方で左右に7mmの頭蓋に、銀コーティングされたステンレス製の、ねじ電極(Φ=1.5mm、長さ4mm)を埋め込んで記録電極として用いた。(図4)

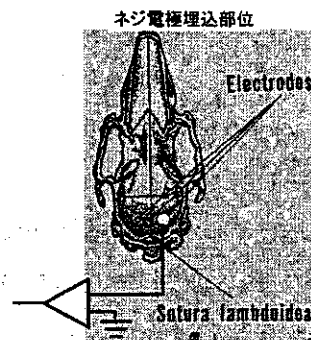


図 4: ねじ電極埋め込み部位

また針型電極を頭皮下に設置し参照電極として用いた。
 ねじ電極から導出された電位は日本光電製 Neuro Pac/μで記録、解析された。記録の際に5Hzから1kHzのバンドパスフィルターを施した。得られた波形は3.4kHzでサンプリングされた。なお、ノイズを除去するために、データは50回の加算平均を行った。

「光刺激」

頭蓋記録電極が視覚野上に設置されているかを確認するために、視覚誘発電位(VEP)を測定した。右目を光刺激する場合は左頭蓋電極より反応を記録した。眼球から15cmの距離で、1.2Jの光量でフラッシュ刺激を行った。フラッシュ刺激には日本光電製光刺激装置(SLS-3100)を用いた。

「電気刺激」

日本光電製SEN-7203を用いて刺激パルスを作成し、アイソレータ(WPI製リニアアイソレータA395)を介して電気刺激を行った。強膜電極アレイのうち1極を刺激電極として用いた。

まずは極性を刺激電極を+、参照電極を-として、刺激幅0.5 msec、電流値500 μ Aの monophasic pulse を流し、頭蓋電極および皮下電極から Electro evoked potential (EEP)を記録した。反応が得られると、次第に電流量を低くして、反応が得られなくなる細小の閾値を求めた。

また、極性を逆にして同様の閾値を求めた。次に、a~hの電極を、順番に300 μ Aの電流量で刺激を行い、電極による波形の変化をみた。

「組織学的検討」

電気刺激のあと、電流が強膜・網膜などの眼組織に与える影響をみるために、安楽死させた後に眼球を摘出した。グルタルアルデヒドにて固定した後に、アイカップを作成し、電気刺激した部位の組織をパラフィン包埋した切片標本を作製した。HE染色を施して、光学顕微鏡による観察と顕微鏡写真の撮影を行った。

C. 研究結果

有色家兎に対して、強膜電極を陽極、硝子体電極を陰極として、500 μ Aの強膜インプラント刺激を行ったところ、頭蓋電極より、誘発電位が記録された。この誘発電位は頂点潜時8~10msの陽性波と14~18msの陰性波、28~32msの陽性波、34~36msの陰性波さらに、42~46msの陽性波からなっていた。(図5)

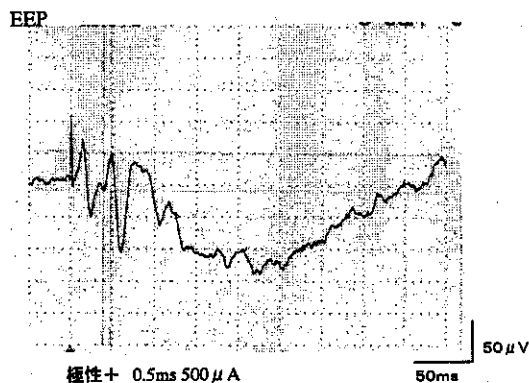


図5：極性+の誘導波

次に、刺激の極性を代えて強膜電極を陰極、硝子体電極を陽極として、強膜インプラント刺激を行ったところ、また異なる波形が得られた。この誘発電位は頂点潜時16~18msの陽性波と22~23msの陰性波さらに、30~32msの陽性波からなっていた。

(図6)

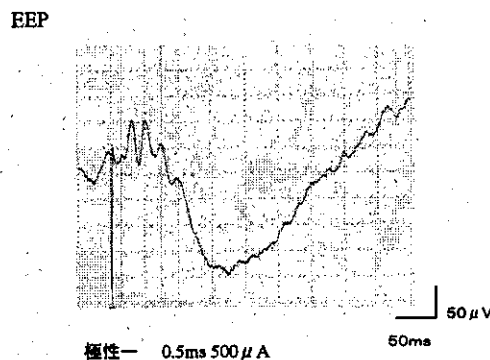


図6：極性-の誘導波

一方、頭蓋電極から得られたVEPは最初の潜時が25msの多相性の波であった。

(図7)

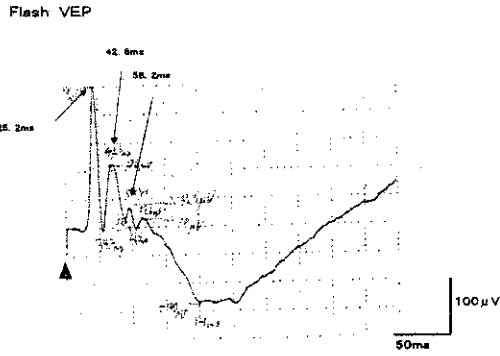


図 7: VEP

頭蓋電極から得られた EEP は VEP の潜伏時よりも早く、電流刺激は網膜神経節細胞に興奮を生じさせ、光刺激よりも早く後頭葉に到達することが分かった。

次に、電流値を下げて同様の刺激をして、EEP の波形を観察した。

その結果、50 μA 付近まではどの個体でも応答が得られた。さらに小さな電流値では、応答の有無に個体差があった。よって強膜内刺激における刺激閾値は約 50 μA としてよいと思われた。このときの電気量は 25 nC であった。(図 8)

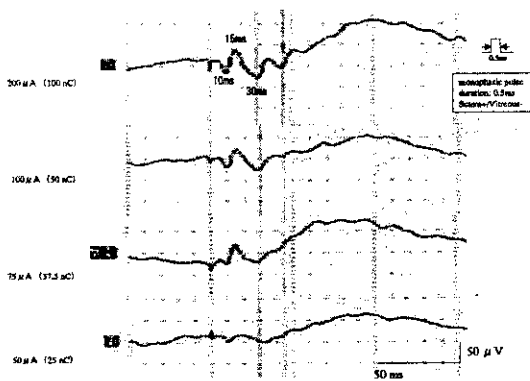


図 8: 閾値測定

さらに、電流値を 300 μA に固定して、

a~h の個別の電極から得られる EEP の波形を測定した。その結果、電極が違えば、波形もやや異なることが分かった。(図 9)

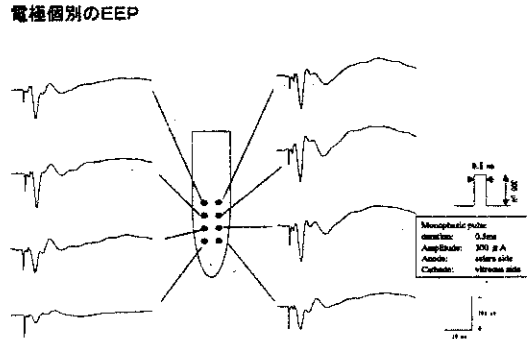


図 9: 電極個別の波形

これは対応した網膜の位置の違いによるものか、また強膜ポケット内での電極の接触具合の違いによるものかは判断できなかった。

組織学的検討

強膜内半層切開にて電極を設置し、刺激した部位の網膜組織損傷を調べた。

その結果、網膜損傷はほとんど見られず、刺激強度が 500 μA 以下であれば、生体に悪影響をおよぼすことは殆どないと考えられた。(図 10)

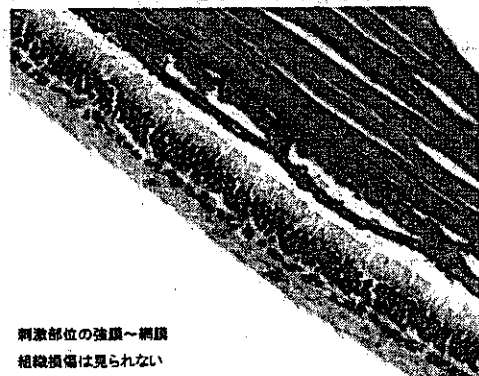


図 10: 組織図

D. 考察

まずは術式につき考察する。眼内に入る方法では、以前我々が研究していた兎眼に遊離チップを網膜前に移植する方法があった。その時の経験より述べると、網膜に出血を起こさせず、かつ眼球を虚脱させずに、手術を遂行することは熟練を要し、成功率も低かった。また組織検査より分かったことであるが、網膜上にチップをきちんと接触によって、手術手技的には刺激電極を眼外におくことが望ましいと考え、強膜内に埋め込む方法、強膜半層切開法を考案したのである。眼内に入らなければ術式は簡便になり、安全性も飛躍的に高くなる。その結果、広く一般に行える術式になると考えられる。しかし、眼外より刺激をしたときに、眼内刺激より必要な電流量が大きくなってしまふのではないか？という疑問があった。閾値が大きすぎると、実際の刺激には使えなくなるため、強膜刺激法が成功するためには、眼内刺激と比べても遜色ない刺激閾値が必要であった。今回の実験の結果より、 $50\mu A$ で作動することが分かったが、これは十分に実用化に期待が得られる値であった。

次に今回の実験において強膜側電極と硝子体側電極の極性を変えたときに、得られる波形が大きく異なったが、これについて考察する。

まず、最初に得られる極早期の波であるが、これは電極を網膜のどの位置に置くかによって、潜時が異なる。今回の実験では最短4 msecで、最長で12 msec程度まで伸びていた。これは刺激電極の真上にある軸索

させることは困難であった。ほとんどの眼でチップが網膜に埋もれていたり、また離れていたりした。

今回使用したチップはさらに電極刺激が可能なものであり、眼内に挿入すると、眼外との交通が必発する。兎眼においては、強膜創を作成したときに人眼よりもさらに虚脱を防ぐことが困難であり、今回の電極を眼内に留置することは、短時間であれ、非常に困難であると思われた。

が刺激されて、その信号が直接視神経に伝わっておきた波ではないかと示唆される。その理由として、極性を硝子体側を+にしたときに、この波形が大きくなり、これは硝子体側の網膜が-に帯電しているときにアクソンの興奮がより大きく伝わったものではないかと考えられるからである。

その後に見られる波形については強膜側陽性のほうが、大きな波が得られた。これは網膜内の細胞から得られる興奮であれば、網膜内が-に帯電しているほうが、より大きな興奮として見られることにそぐわない。

E. 結論

今回我々は、有色家兎を用いて、強膜インプラント法で刺激電極を使用し、網膜刺激を試みた。その結果、EEPを後頭部より得ることができ、網膜刺激が強膜内からの刺激でも的確に行えることがわかった。またその刺激閾値は十分に低いものであり、組織標本から得られた組織障害の少なさを考えると、手技的に眼内に入る他の方法より確実に安全でかつ容易に施行できる本方法は、今後さらに発展すべきタイプの刺激方法であると考えられた。

網膜刺激電極の視覚中枢における機能評価（2）

網膜変性モデルラットに対する網膜刺激電極の評価

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

（研究協力者 神田寛行 大阪大学大学院医学系研究科感覚機能形成学 研究生）

研究要旨

我々は一对の刺激電極をそれぞれ強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、網膜を電気刺激する方法「上脈絡膜-経網膜電気刺激（Suprachoroidal-transretinal stimulation: STS）」を考案し、その方法の有効性を健常有色ラットと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、網膜の局所を刺激すると、視覚中枢である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限局させることができた。強膜刺激電極直下の網膜部位から投射を受けている上丘部位から最も強い興奮が得られた。これらの結果より色素変性症による人工網膜の刺激方法として STS が有効であることが示された。

A. 研究目的

網膜色素変性症等により網膜が変性して失明に陥る患者に対して、人工視覚システムは有効な治療法として期待が集まっている。この人工視覚システムでは網膜に残存している神経細胞の一部に電気刺激を与えることによって視覚感覚を再生させる人工臓器である。網膜刺激法には刺激電極アレイを網膜の硝子体側に固定する Epi-retinal implant と網膜と色素上皮間に挿入する Sub-retinal implant の二つが検討されてきた[1]。しかし、両者とも、電極アレイが直接網膜に接触するため手術時の網膜への侵襲が大きく、また一旦埋め込んだ刺激電極アレイの除去や交換が困難であることが懸念される。

今回我々は、網膜への侵襲を最小限に抑えるために網膜へ電極を接触させずに電気刺激を行う方法、上脈絡膜-経網膜電気刺激（suprachoroidal-transretinal stimulation: STS）を考案した。この STS では強膜内（脈絡膜上方）と硝子体内に設置した一对の刺激電極間に通電することにより電極間に挟まれた網膜を局所的に興奮させられるものと期待される。これを実験的に確認するのが本研究の目的である。具体的には、強膜開窓部分へ局所的に刺激を加えた時、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。

B. 研究方法

【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)17 匹と、色素変性疾患モデルとして RCS rats (オス、25~30 週齢)6 匹を用いた。大阪大学医学部の動物実験に関する規定に従い、実験動物に与える苦痛は最小限に留めるように心がけた。

【電気生理学的記録】

すべての手術および電気生理学的記録はウレタン麻酔 (1.75 g/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 (ミドリリン P) 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。気管挿管を施した後、頭部を定位固定した。

上丘からの集合電位を記録するために、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。記録電極(銀ボール、直径 0.2~0.3 mm)を上丘表面に接触させ周りをミネラルオイルで満たした。基準電極としてステンレス製のネジ電極をラムダ縫合よりも 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集合電位を増幅(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 50 回平均加算を行った。

[光刺激および電気刺激]

視覚性誘発電位(VEP)を記録するため、左側眼球に対して眼前 5 cm の位置においた光源よりフラッシュ光を 3 秒間隔で提示した。

一方、網膜電気刺激用に左側眼球後部の眼窩付近を開き、視神経乳頭から背側 1.5-2.5 mm 付近の強膜を 25 ゲージ針で削り取ることによって、約 1mm² の開窓部を作成した。開窓部に直径約 0.2-0.3 mm 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先端 2 mm 部分を除いて絶縁コートしたステンレス線(0.2)を用い、毛様体扁平部から硝子体内へ刺入した(硝子体電極)。

視神経刺激の際は、露出させた視神経を 2 本の金属線ではさみ、この 2 つの電極間に定電流刺激を与えた。

[組織学]

記録部位の上丘上での位置を組織学的に確認するため、電気生理学的実験の終了後、応答が最も顕著に得られた記録部位(center of the responsive area: CRA)に注射針で穴を開け、マーキングを行った。深麻酔下の動物を 4%パラホルムアルデヒドで還流固定した。固定された脳を摘出し残存している大脳皮質を除去し上丘全体を露出した。上丘の輪郭とマーキング位置を実体顕微鏡下で確認した。一方、強膜電極の視神経乳頭から距離と位置を調べるため、固定された左眼球を摘出後、強膜全伸標本作製し、強膜開窓部位を実体顕微鏡下で確認することによって、強膜電極の設置部位を同定した。

また RCS ラットの網膜変性を組織学的に検討するため、実験に使用したものと同週齢の RCS ラットを上記の手法で還流固定し、固定した眼球の凍結切片標本(厚さ 15. μm)を作成しヘマトキシリンとエオジンで染色し、光学顕微鏡写真の撮影を行った。コントロールとして一匹の健常ラット眼球についても同様に切片標本作製し、顕微鏡下で観察を行った。

C. 研究結果

[健常ラットでの誘発電位]

健常ラットの眼球に対して、強膜電極を陽極、

硝子体電極を陰極として STS を与えると対側上丘表面から誘発電位が記録された。CRA に記録電極を移動させ、STS の通電量を段階的に変化させた時に得られた誘発電位を示したのが Fig.1 である。誘発電位は頂点潜時 6~7 ms の陽性波(P1)とそれに続く 12~14 ms の陰性波(N1)、そして 40~60 ms の陽性波(P2)から構成されていた。さらに、中程度の刺激(30-80. A, 500. s)の際、小さな陽性波(P0)が P1 の前に現れた(潜時 4~5 ms)。この P0 は頻回刺激(100 Hz)の電気刺激に対しても振幅を変化させなかった。一方、他の波は頻回刺激に対して、振幅の低下がみられた。このことから P0 は上丘に投射する視神経終末の応答であると考えられる。これらの誘発電位は視神経刺激に対する誘発電位の波形と近似していることが判った(Fig. 1c)。

電流強度を下げていくとそれぞれの波は減少していき P1 のみが最後まで残った。どの個体でも約 10~20. A (500. s, 5~10 nC)以下の電流強度では P1 を含む全ての波が消失した。また、刺激極性を反転させると振幅は顕著に減少し、閾値も 5 倍に上がった。

[刺激電極位置と興奮部位の対応関係]

我々は上丘上の CRA の位置と眼球上の強膜電極の位置とにどのような関係があるのか調べるために、強膜電極設置部位の視神経乳頭からの距離と眼球上での位置と、CRA の上丘表面内での位置を確認した。それらを点であらわしたのが Fig.2 である。毎回、刺激電極の位置は、1.5~2.5 mm 視神経乳頭の位置から背側に設置された。これに対して、CRA は毎回、上丘の外側に位置していた。この部位は網膜の背側のニューロンから投射を受けていることが知られている[2]。よって、強膜電極の直下の網膜が最も強く興奮していることが示唆された。

さらに、強膜電極を異なる二箇所(0.7 mm の間隔)に設置してそれぞれの電極で STS を与えた時の誘発電位を記録した。その結果、刺激に用いた強膜電極の位置が変わると、誘発電位のピークが得られる部位が 0.5~0.6 mm 移動した(Fig.3)。このことから、STS による網膜の興奮部位は強膜電極の位置に依存していることがわかった。

[限局性]

次に、STS が誘発する上丘の興奮は、どのくらい限局しているのかを健常ラットを用いて測定した。まず電流強度を CRA で記録した際の閾値付近の強度に固定して刺激を行った。記録場所は 0.1 mm 又は 0.2 mm ずつ上丘表面で前後方向、内外側方向に移動させそれぞれの記録部位での誘

発応答の有無を調べた(Fig. 4)。その結果、応答は100. μ mから700. μ mの範囲に局限していた。この実験によって STS によって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。

[RCS ラットの誘発電位]

次に色素変性疾患モデル動物である RCS ラットにおいて、STS 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典型例を Fig.5D に示した。ノーマルラットと同様に、誘発電位は陽性(P1)–陰性(N1)の二相性の波から構成され、それぞれの頂点潜時は7 ms (P1)と14 ms (N1)であった。この RCS ラットの網膜変性を確認するため、フラッシュに対する VEP を記録したところ、VEP は完全に消失していた(Fig. 5B)。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、健常ラットでは認められる視細胞層が変性消失していた(Fig. 6B)

以上のことから、視細胞が完全に変性した網膜色素変性症モデルにおいても、視覚情報を STS によって視覚中枢へ伝えうることが示唆された。

D. 考察

STS の有効性を検討するために、まずは STS による興奮が視覚中枢へ伝わるのか否かについて検討した。最初健常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興奮が上丘まで伝わった。得られた神経興奮は視神経切断後には消失した(データ非掲載)ことから、確かに刺激による興奮は視神経を介して上丘まで伝わっていると推測される。同様に色素変性モデルである RCS ラットについても健常ラットと同程度の刺激強度で網膜を興奮させることができたことから、色素変性症患者に対しても STS を適用可能であると期待できる。

人工視覚に用いる刺激法を評価する際の重要な要素として、刺激閾値と局限性の二つが挙げられる。前者は、システム全体の消費電力と密接に関与している。人工視覚システムでは内部デバイスへ電力を無線で伝送するため、刺激に用いることができる電力はおのずと限られてしまう。そのため、刺激時の消費電力を抑えなければ刺激電極アレイの本数を増加することが困難になってしまうため、高解像度の画像を再生することが困難になる。今回の実験では STS の刺激閾値は5~10 nC (10~20. A, 500. s)であった。Epi-retinal implant での実験結果(例: 14 nC [3], 0.1~0.3 nC [4], 0.5~0.6 nC

[5])や Sub-retinal implant (例:1-36 nC [6])に比べ、必ずしも STS の成績が良いとは言えないが、刺激電極が網膜から離れていながら網膜を刺激したことを考慮すると、この値は十分低いものである。

次に局限性について考察する。人工視覚システムで外界の画像を再生する場合、一極の刺激電極でより局限した部位を刺激できなければ画像が荒くなり高解像度の画像を再生することが困難になる。今回の刺激による興奮部位は上丘表面全体の約2%に過ぎなかった。上丘上での magnification factor を無視して計算すると、この刺激によって網膜上の1mm² (ラット網膜の面積は57 mm²、2%は約1 mm²)の範囲で局限して興奮したことになる。人間の網膜上1 mm は、おおよそ視野角3.5度に対応することを考えると、STS を臨床応用した場合、約3.5度の分解能を有すると推測できる。局限性について報告した論文は少ないが、その中で Schanze ら[5]はネコ眼球への Epi-retinal 刺激では、視野角1度の分解能を有したとの報告をしている。この報告と比較すると、STS の局限性は決して良いとは言えないが、今後電極刺激部の面積を小さくするなどの改良によって局限性を改善できると考えている。

E. 結論

今回、ラットを用いた in vivo 実験において、STS による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。その刺激閾値は十分小さく、刺激電流値を低くすることによって刺激興奮を局限させることができた。また、視覚疾患モデルである RCS ラットに対しても STS で網膜を興奮させることができた。これにより STS の網膜色素変性症に対する有効性が示された。よって、この刺激法は人工視覚システムにおいて有効であると考えられる。

今後は、ネコやウサギ等の中型動物に多点電極アレイを埋植し STS 刺激の機能評価を電気生理学的に行う予定である。また、STS 用に多点電極を長期埋植した場合の組織損傷に対しても評価していく予定である。

F. 健康危険情報 特に無し

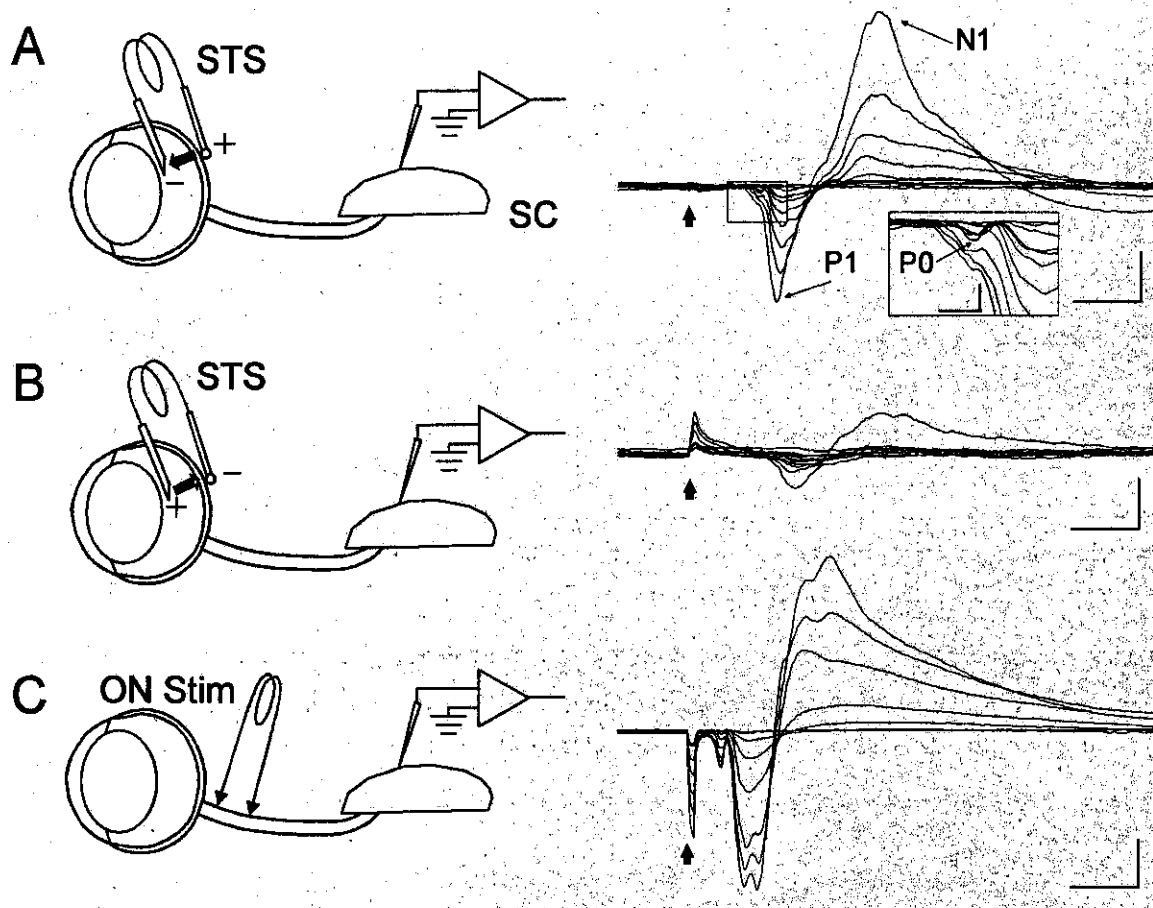


Fig. 1 EPs recorded from the SC to inward STS (A), outward STS (B), and ON stimulation (C) in normal hooded rats. The right schemas represent the methods for stimulation and recording. Fifty-time averaged EPs to various stimulus intensity are overlaid in the left. Arrows; stimulus onset. The stimulus intensities are from 10 to 100 μA with 10 μA step in (A), 40, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 and 250 μA in (B), 70, 100, 150, 200, 250 and 300 μA in (C). Calibration; 50 μV , 5 ms (A,B), and 100 μV , 5 ms (C).

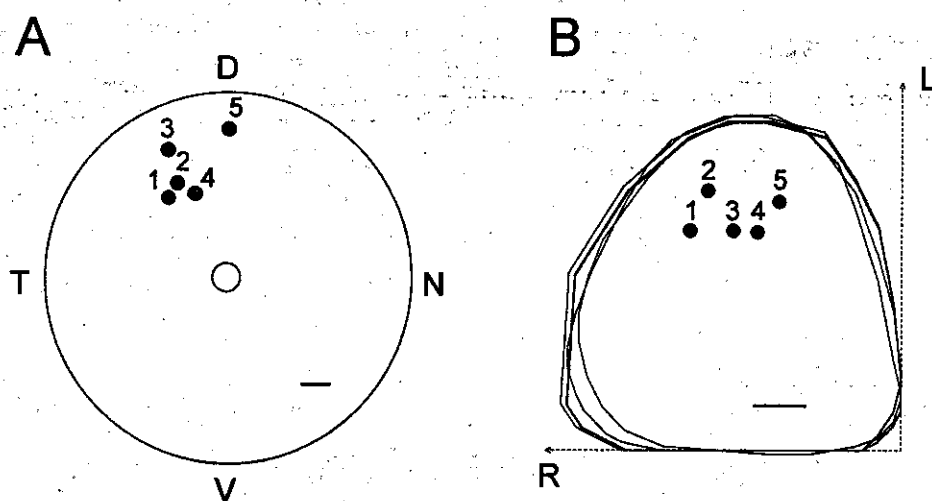


Fig. 2 Topographic correspondence between the positions of the anodic s-electrodes (A) and the collicular sites from which the maximal EPs were recorded (B) in 5 representative experiments. (A) A drawing of the posterior view of the eyes. A center circle is the ON. D, dorsal; N, nasal; T, temporal; V, ventral; Scale bar, 1 mm. (B) A drawing of dorsal surface of the SC. R, rostral; L, lateral; Scale bar, 0.5 mm.

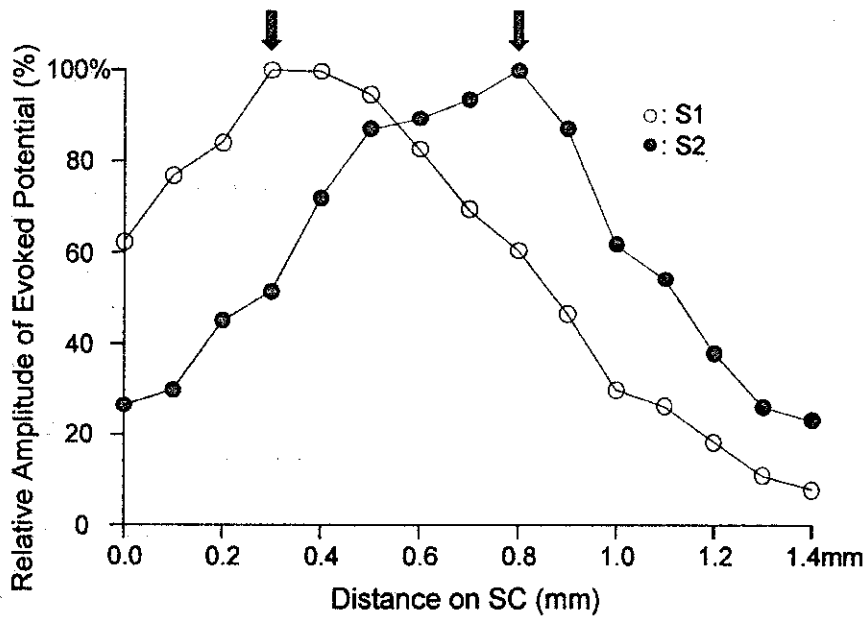


Fig. 3 Spatial separation of amplitude profiles of EPs to inward STS between two different anodic electrodes, S1 (open circles) and S2 (filled circles). Relative amplitudes of EPs are plotted on ordinates while positions of recording electrode on abscissas. *Arrows*, peak response sites to S1 and S2.

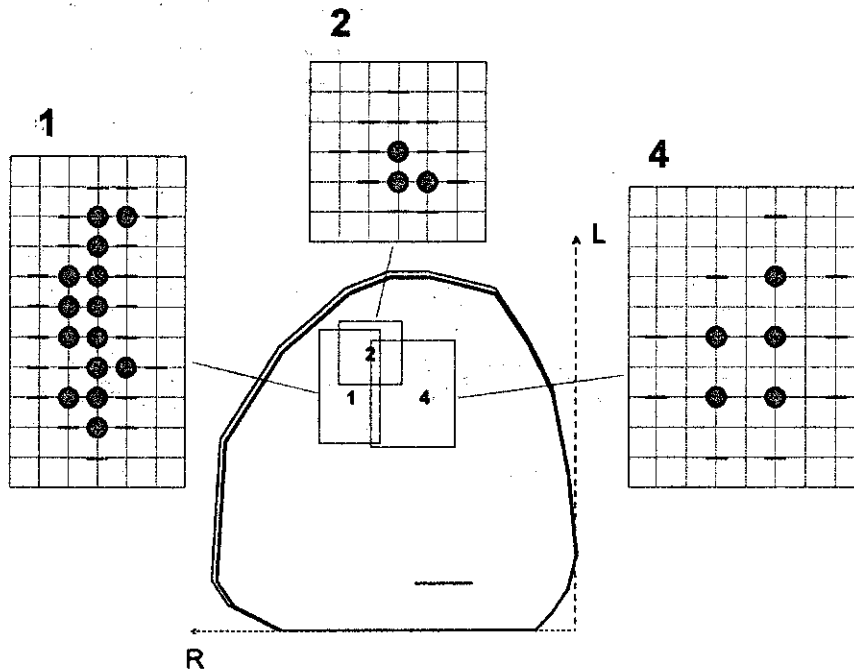


Fig. 4 Three examples out of five in Fig. 2 indicate localization of collicular responsive area to inward STS. In the numbered squares on the dorsal surface of SC, filled circles represent the sites where EPs were recorded, whereas bars were unresponsive sites. The stimulation intensities were just above the threshold (5-8 nC). R, rostral; L, lateral; *Scale bar*, 0.5 mm; An interval of the grid in the squares, 100 μ m.