

Fig. 5 EPs from the SC of normal (A, C) and RCS rats. (B, D) EPs in a normal hooded rat by flash stimuli. Averaged EPs (n=50) in a RCS rat by flashling light stimuli (A, B). Note that no response could be observed in the RCS rat (B). (C, D) Averaged EPs (n=50) to inward STS are superimposed. (C) ; the same illustration as the Fig. 1A. Stimulus intensities in (D) were 5, 10, 30, 40, 80 and 100 uA. *Arrows*; stimulus onset. *Calibration*; 100 uV and 100 ms (A, B), 50 uV and 20 ms (C, D).

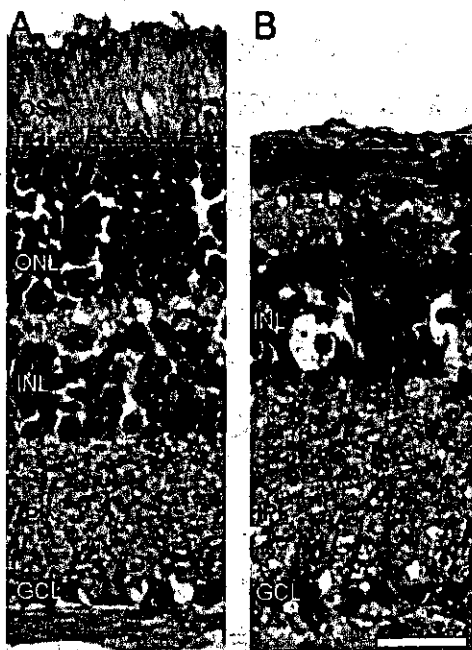


Fig. 6 Photomicrographs of vertical sections of the normal (A) and RCS (B) rat retinas, stained with hematoxylin and eosin. Note that photoreceptor layer was completely disappeared (B). OS, outer segments of photoreceptors; ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; RGC, ganglion cell layer; *scale bar*, 50 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での機能評価（3）

ネコを用いた網膜刺激電極の機能評価

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

研究要旨

視覚中枢レベルにおける網膜刺激電極の機能的評価法を確立するために、ネコの視覚中枢である外側膝状体背側核中継細胞の単一ニューロン活動の記録による網膜刺激電流の広がり の評価を試みた。epiretinal 式の刺激電極の場所を網膜上で移動させ、各部位の刺激によって中継細胞の活動電位を発生させる電流強度の閾値を調べた。その結果、用いた電極では刺激電流を弱くすると視角 0.5 度という狭い範囲にある網膜神経節細胞を興奮させることが可能であった。この外側膝状体背側核中継細胞の記録による評価法の精度は、網膜上の距離に換算して 115 μm 以下であるため、この方法を用いた網膜刺激型電極の空間分解能の評価が可能であることがわかった。

A. 研究目的

in vivo における網膜刺激電極の視覚中枢レベルでの機能評価法を確立するために、ネコの視覚系を用いて研究を行った。ネコの視覚系は、網膜から視覚中枢に至るまで機能的役割の異なった複数の並列情報処理系から構成されており、ヒトの視覚系の生理実験モデル系として有用である。人工網膜用の電極で網膜が有効に刺激され神経節細胞のスパイク発火活動が生じているかどうか、またその活動がどのような特性を持つのかを調べるため、神経節細胞の軸索投射先である外側膝状体背側核(dLGN)の中継細胞から単一活動を記録した。この実験を通して、網膜刺激電極の機能評価法の確立を試みた。

B. 研究方法

[全般] 成ネコ（米国短毛種）を用いた。動物実験は、大阪大学医学部の動物実験に関する規定に従い、動物福祉に配慮して行った。麻酔は、経静脈的にベントバルビタール(1-2 mg/kg.hr)とパンクロニウム(0.2 mg/kg.hr)を持続注入することによって行い、笑気と酸素の混合気(1:1)で人工呼吸を行った。実験中は動物の頭部を定位固定台に固定した。心電図、呼気ガス分析およびスパイロメータなどで動物の状態の監視を持続的に行った。

[電気生理学的記録] 単一ニューロン活動を記録したインピーダンス 12 M Ω の金属電極(A-M systems 社製, cat# 577400)は、右 dLGN の A 層に定位的に刺入した。記録した単一ニューロン活動が網膜神経節細胞からの入力を直接受け

る中継細胞かどうか、また細胞タイプはY型かX型かを決定するために、視神経交叉への電気刺激に対する応答潜時を測定し、動物の眼前に立てたスクリーンへ光刺激を与えて受容野を同定した。網膜神経節細胞から dLGN 中継細胞への投射は1対1であるため、この中継細胞の受容野は、その中継細胞へ入力している網膜神経節細胞の受容野と考えられる。

【網膜刺激】網膜刺激の方法として、epiretinal 刺激法を用いた。先端径 1-2 μm 、露出長さ 100 μm 、インピーダンス 0.1 M Ω の金属微小電極(WPI社製, cat# TM33B01KT)を刺激電極として用いた。強膜に 21 ゲージのガイドを刺入し、そのガイドを通して眼球内に金属電極をマニピュレータを用いて進め、眼底を観察しながら電極の先端を網膜に接触させた(図1)。これとは別に、先端 2 mm を露出させた直径 200 μm の絶縁コートステンレス線を硝子体内に刺入し基準電極に用いた。網膜上の刺激電極の位置は、眼底を観察しながら移動させることができ、しかも、眼内に光を導入すればスクリーン上に電極先端の位置を投影することが可能なため、同じスクリーン上に同定された中継細胞の受容野と、刺激電極の位置関係を自由に制御することができる。

コンピュータによって出力電圧コマンドを作成し、リニアアイソレータ(DAGAN 社製、BSI-950)によって定電流通電を行った。今回の刺激パラメータとしては、幅 500 μsec の陰性单相矩形波刺激を、電流量を様々に変化させながら加えた。

【網膜刺激効果の判定】

網膜刺激の各電流値に対して、約 1 秒間隔で 40 回の電気刺激を連続して加え、中継細胞か

ら活動電位が発生した回数を数え、それぞれの刺激強度に対する発火確率を求めた。そして 50% の確率で活動電位を発生させる電流値を求め、その刺激部位における閾値とした。そして、記録している中継細胞の受容野中心部から刺激電極までの距離と、各刺激部位での閾値との関係を調べた。

C. 結果

dLGN から記録した単一ニューロン活動の例を示す。この細胞の受容野は網膜中心部から視角にして 3.3 度の場所に存在した(図2)。この細胞は、視交叉刺激に対して 2.0-3.5 msec の間で変動する潜時を持って応答する、dLGN の中継細胞であった。この潜時と、光応答の特徴から、ON 中心型 X 細胞であると判断された。この受容野に対して、網膜上の周囲の 3 点に刺激用の電極を接触させて、それぞれの刺激部位における閾値を求めた。

図3に、3点の刺激部位のうち受容野に一番近い場所で、電流量 50 μA 、幅 500 μsec の单相矩形波刺激を加えた時の、この dLGN 中継細胞の電気活動の記録を示す。網膜の電気刺激から 5-7 msec 付近に、活動電位が記録された。これは潜時から、中継細胞が網膜神経節細胞からのシナプス入力を直接受けて発生した活動電位であると考えられる。

電気刺激によってこの活動電位が出現する頻度を調べた結果を図4に示した。E1, E2, E3 の3つの刺激部位間で比較すると、受容野に近い場所ほどより低い電流値で活動電位を発生させることが可能であった。活動電位の出現率 50% に対応する電流値をグラフの内挿から求め、それを、受容野の中心からの距離に対して

プロットすると、閾値は受容野に近くなるほど小さくなった(図5)。逆に、この閾値の電流によって、受容野までの距離の範囲で有効に網膜神経節細胞に活動電位を生じさせることがわかった。このように、ネコ網膜を使用することで、網膜刺激電流の広がりを正確に評価することが可能であることがわかった。

D. 考察

今回の研究では、epiretinal型の網膜刺激のモデルとして、金属微小電極を用いた網膜刺激を用いて、その刺激の有効性を調べ、広がる範囲を計測した。この測定方法には、1) 受容野の中心に神経節細胞の細胞体が存在するという仮定をおいていること、2) 樹状突起野が興奮させられる可能性を考慮せず細胞体の位置のみを考慮していること、3) 受容野の大きさの決定に際して 0.05-0.1 度程度の測定誤差が存在しうること、などの検討すべき点がある。それらを考慮しても、現在のシステムで視角 0.5 度程度の評価は充分可能であると考えられる。

実験の結果、今回使用したタイプの電極の場合、12 μ A の電気刺激で 0.5 度程度のと限局した網膜上の範囲が有効に刺激されることが示された。ネコ網膜上の視角 1 度は、網膜上の距離においては約 230 μ m に相当するため、この評価法は約 115 μ m 以下の分解能を持ち、そのため直径が 50-100 μ m 程度の電極面を持つ刺激電極の生理学的評価は十分可能であると考えられた。今後は、細胞のタイプによる刺激効率の違いなどを考慮した上で、各種の網膜刺激電極の刺激特性の *in vivo* での評価を行う予定である。

E. 結論

ネコ dLGN 中継細胞からの単一ニューロン活動を記録して、網膜刺激電極による刺激電流の広がりを生理学的に評価することが可能であった。

図の説明

図1. 網膜電気刺激の眼底写真

金属電極を硝子体側から網膜に接触させているところ。接触場所付近に窪みが生じている像が観察された。

図2. 外統膝状体背側核中継細胞の受容野と電気刺激部位の例

スクリーン上に投影した、中継細胞の受容野(receptive field)、網膜電気刺激部位を示す電極の形(E1, E2, E3; それぞれ先端が刺激点)、および網膜中心野(area centralis; ×印)を示す。E1, E2, E3 の各刺激部位と中継細胞の受容野の中心の間の距離は、各々、2.4 度、1.4 度、0.5 度であった。

図3. 電気刺激によって生じた中継細胞の活動電位

E3 の位置で 50 μ A, 500 μ sec の電気刺激を 9 回与えると、毎回 5-7 msec の潜時で活動電位(▼)が発生した。

図4. 各刺激部位における刺激強度とスパイク応答の出現率

各刺激部位において、電気刺激の強度を変化させた時の、その刺激によって活動電位を発生させるのに成功した割合を示す。受容野に一番近い E3 の場所において最も刺激効率が良く、

その閾値を出現率50%に相当する刺激強度として内挿によって求めると、12 μ Aであった。同様にE1、E2ではそれぞれ60 μ Aと200 μ Aであった。

図5. 刺激電極から受容野中心までの距離と刺激閾値の関係

図4で求めた刺激閾値は、受容野中心までの距離が近くなるほど下がることが示された。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujikado T, Asonuma S, Ohji M, Kusaka S, Hayashi A, Kamei M, Oda K, Tano Y. Reading ability after foveal translocation surgery with 360° retinotomy. *Am. J. Ophthalmol.* 2002;134:849-856.
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. Kuroda T, Fujikado T, Maeda N, Oshika T, Hirohara Y, Mihashi T. Wavefront analysis in eyes with nuclear or cortical cataract. *Am J Ophthalmol.* 2002;134:1-9.
4. Kuroda T, Fujikado T, Ninomiya S, Maeda N, Hirohara Y, Mihashi T. Effect of aging on ocular light scatter and higher order aberrations. *J Refract Surg.* 2002 Sep-Oct;18(5):S598-602.
5. Fukui T, Yamamoto S, Nakano K,

Tsujikawa M, Morimura H, Nishida K, Ohguro N, Fujikado T, Irifune M, Kuniyoshi K, Okada AA, Hirakata A, Miyake Y, Tano Y. ABCA4 gene mutations in Japanese patients with Stargardt disease and retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Sep;43(9):2819-24.

2. 学会発表

- 不二門尚 (2002) 近視の基礎と臨床：第6回甲信セミナー、山梨、6月9日
- 不二門尚 (2002) 小児の近視：長崎眼科集談会、長崎、9月8日
- 不二門尚 (2003) 視覚障害と感覚代行：第2回高次統合感覚器医療研究会、山口、2月13日
- 不二門尚 (2003) 視機能回復と人工網膜：第242回熊本眼科集談会、熊本、3月1日
- 神田寛行、森本壮、福田淳、不二門尚、田野保雄、澤井元 (2003) 脈絡膜下？ 経網膜刺激法：人工視覚における網膜電気刺激の新技术。第80回日本生理学会大会、福岡、3月26日

H. 知的財産件の出願・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

图 1

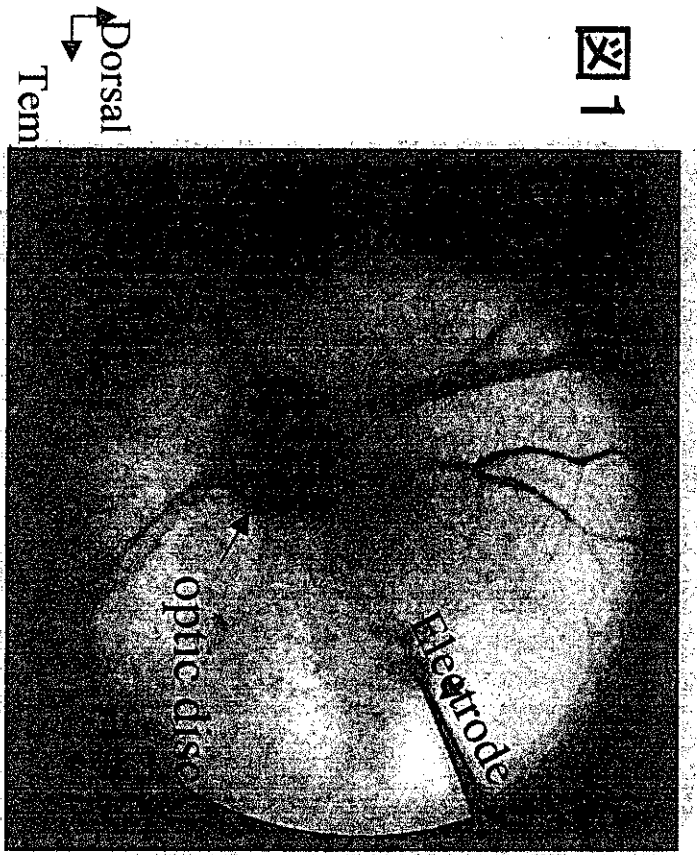
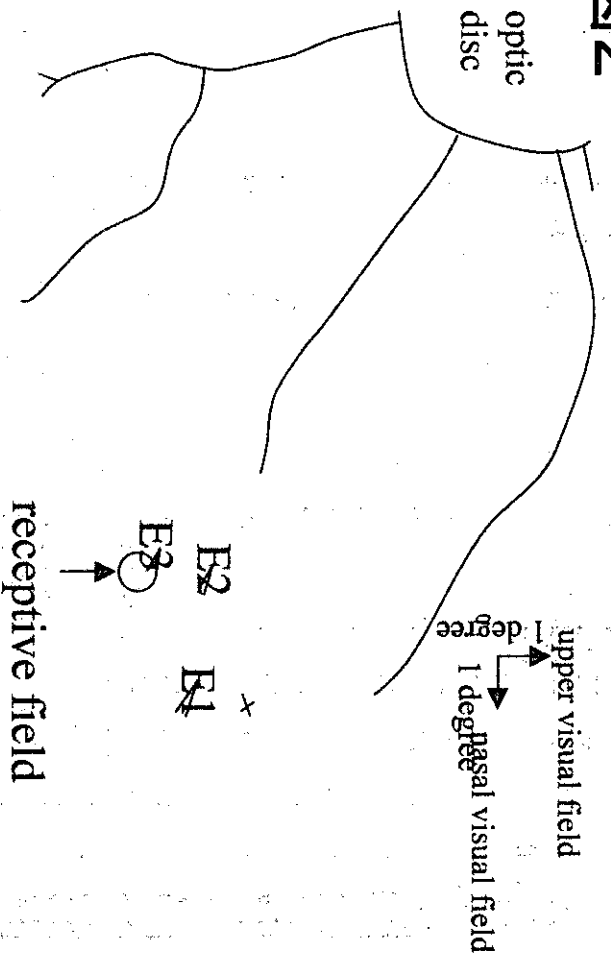


图 2



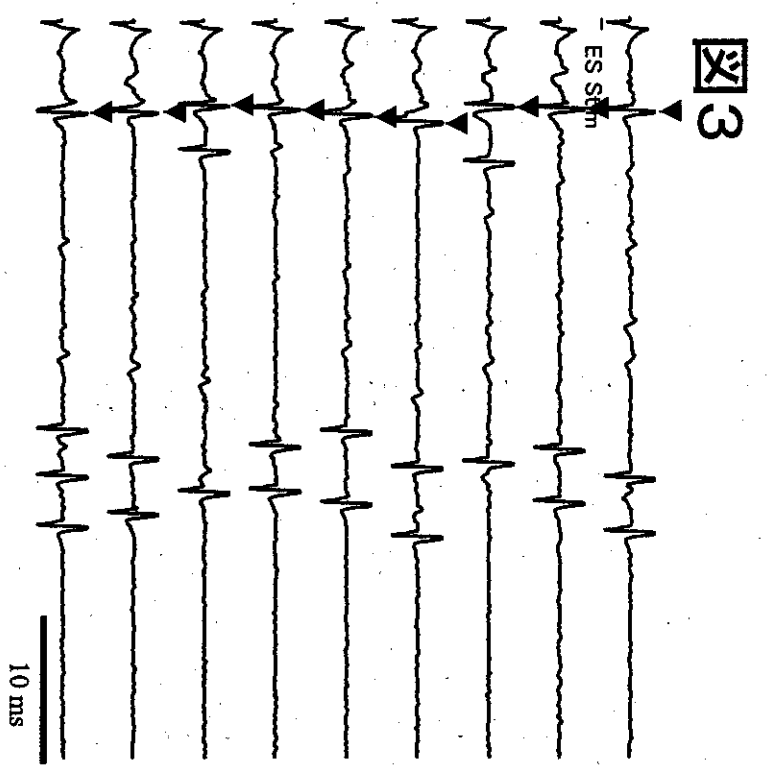


図3

刺激に対する応答の出現率 ()

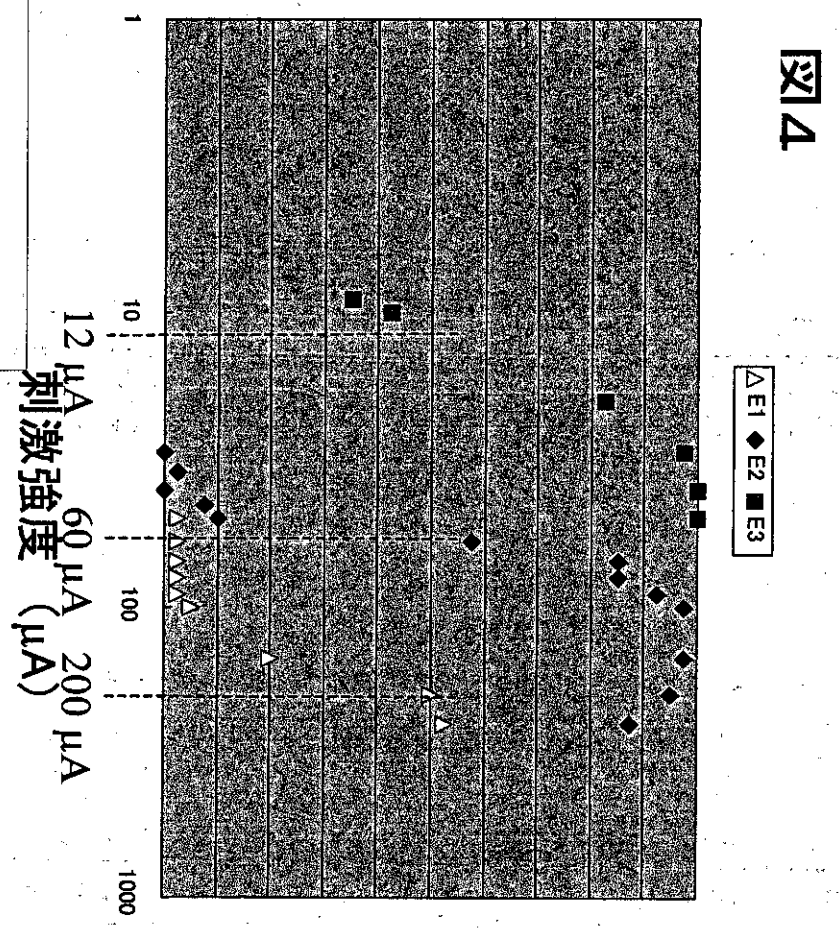


図4

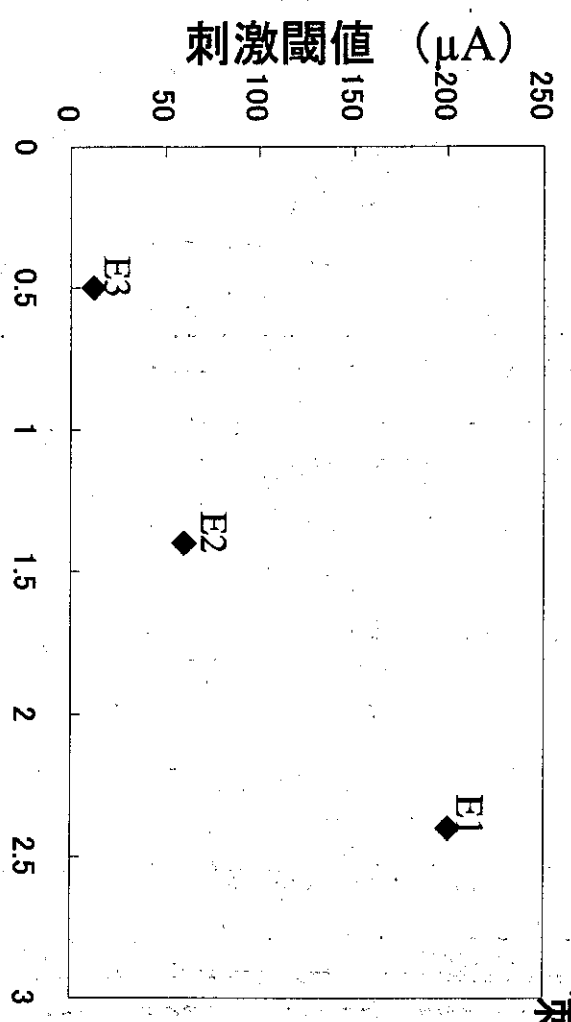


図5

受容野中心から刺激電極までの距離 (度)

網膜神経節細胞の神経保護

分担研究者 福田 淳 大阪大学大学院医学系研究科情報生理学 教授

研究要旨

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の特性について調べた。電気刺激の開始時期を視神経切断の前後に変化させて、視神経切断1週間後の網膜神経節細胞の生存率を調べた結果、電気刺激の効果は、視神経切断から刺激開始が遅れると、その効果も減弱し、また事前の電気刺激は神経保護効果を持たないことがわかった。この結果から、電気刺激は、視神経切断によって早期に一過性に活性化される細胞死シグナルに影響を与えていることが推測された。また、視神経への直接刺激の代わりに、より非侵襲的な電気刺激の方法として経角膜電気刺激を行い、同様の神経保護効果があるかどうかを調べた。その結果、経角膜電気刺激も、視神経への直接刺激と同程度に、視神経切断1週間後の網膜神経節細胞の生存を促進させることが明らかになった。

A. 研究目的

人工網膜は網膜に直接電気刺激を与えて外界の視覚情報を視覚中枢に伝えるシステムである。一方、我々は、軸索損傷を受けた網膜神経節細胞に電気刺激を与えることで、その生存の促進が可能であること見いだした(Morimoto et al., Neuroreport, 13:227-230, 2002)。本年度は、この電気刺激による神経保護効果をさらに詳細に調べるため、以下の2種類の研究を行った。1) 電気刺激の開始時期を軸索切断の時間よりも前後に移動させた時の生存率の変化を調べることによって、至適な電気刺激の開始時期を調べた(至適刺激開始時期の研究)。2) 視神経刺激よりも非侵襲的で臨床的に応用しやす

い電気刺激法として、角膜上から電気刺激を加えることによって視神経刺激と同様の神経保護効果が得られるかを調べた(経角膜電気刺激法の研究)。

B. 研究方法

実験動物には成熟 Wistar ラットを用いた。動物実験は大阪大学医学部の動物実験に関する規定に従い、動物福祉に配慮して行った。手術操作はすべて抱水クロラル 0.1 ml/kg の腹腔内注射またはペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内注射による麻酔下で行った。いずれの研究でも、生存している網膜神経節細胞を同定するため、視神経切断よりも1週間以上前に予

め、蛍光色素 Fluorogold を用いて上丘から逆行性に網膜神経節細胞を標識した。

1) 至適刺激開始時期の研究

電気刺激の至適開始時期の検討は、図 1 に示すように、以下の 4 条件の電気刺激の開始時期に対して行った。(1) 視神経切断直後 (直後刺激)、(2) 視神経切断 3 時間後 (3 時間遅延刺激)、(3) 視神経切断の 3 時間前 (3 時間先行刺激)、(4) 視神経切断の 1 時間前 (直前刺激)。どの条件においても電気刺激の持続時間は 1 時間であった。直後刺激と 3 時間遅延刺激の場合、左視神経を球後 3 mm の位置で切断した後、切断端を双極の円板状電極で挟み、50 μ A, 50 μ sec の单相矩形波刺激を 20 Hz で 1 時間与えた。3 時間先行刺激と直前刺激の場合は、ステンレス製の双極スティック状電極を用いて、電流量を 150 μ A に変えた以外は上記と同じ条件で電気刺激を加えた。この 150 μ A という値は、円板状電極を用いて上記の電気刺激を行った場合と同じ程度の誘発電位を、スティック状電極を用いて上丘に発生させることのできる電流量を根拠に決定した。また各々の刺激方法において、電極を設置するが電流を流さない sham 手術群を作成して対照とした。どの実験動物群も視神経切断 1 週間後に灌流固定し、網膜伸展標本を作製し、視神経乳頭から背側・腹側・鼻側・耳側の 4 方向に 1 mm おきの計 12 点において、各々 0.25 mm² のエリア内に生存している網膜神経節細胞を計数し、その平均密度を計算し、切断側である左網膜と健常側である右網膜の値から生存率を算出した。

2) 経角膜電気刺激法の研究

視神経切断直後に、角膜表面にコンタクトレンズ型電極を設置し、電気刺激を行った (図 4)。

刺激条件は、両相矩形波で電流強度は、100 μ A、刺激頻度 20Hz で 1 時間電気刺激を行った。一発の刺激時間が 0.5 msec/phase、1 msec/phase、3 msec/phase の群を作成し、視神経切断 1 週間後の各群における網膜神経節細胞の生存率を比較した。生存率の算出には、至適刺激開始時期の研究の場合と同じ方法を用いた。

C. 研究結果

1) 至適刺激開始時期の研究

直後刺激と 3 時間遅延刺激の網膜神経節細胞の蛍光像の例を図 2 (a)-(d) に示した。sham 手術群では、楕円形の形態を持つ網膜神経節細胞以外に、細胞の残骸や、それを取り込んだグリア細胞の細かな標識も見られたが、電気刺激を行った群では、生存している網膜神経節細胞が多く観察された。生存率を検討すると (図 2 (e))、直後刺激では、sham 手術群の生存率 59.4 \pm 5.3% (n=4) に対して、74.1 \pm 6.6% (n=7, p<0.01) と生存率が有意に増加しており、昨年の研究結果を再確認できた。3 時間遅延刺激の場合は、sham 群の生存率 56.7 \pm 3.6% (n=4) に対して、62.8 \pm 4.1% (n=7, p<0.05) と有意水準は直後刺激よりも低くなったものの、生存率が増加することがわかった。直後刺激群と 3 時間遅延刺激群の間にも p<0.01 の有意差が認められ、3 時間遅延刺激は、生存率を増加させるものの、直後刺激の方がさらに生存率を増加させることがわかった。

3 時間先行刺激と直前刺激については、どちらの場合も、sham 群と電気刺激群との間に有意な生存率の差は認められなかった。(図 3)

2) 経角膜電気刺激法の研究

経角膜電気刺激を行った網膜の神経節細胞像

の例を図5 a? dに示す。視神経切断1週間後では網膜神経節細胞の数は、急速に減少し、異形な細胞や死んだ細胞の残骸が増加していたが、電気刺激を行った網膜では、視神経切断のみの網膜に比べ、より多くの網膜神経節細胞が生存していた。各群における生存率を調べると(図5 e)、視神経切断1週間後の網膜神経節細胞の生存率は54.5%であるのに対し、経角膜電気刺激を行った網膜では、刺激幅0.5 msec/phaseでは、生存率が66.9%、1 msec/phaseでは86.8%に達し、3 msec/phaseの刺激幅でも1 msec/phaseの刺激と同様の生存率(84.8%)を示した。一方、sham刺激群では、生存率は58.4%で、切断のみの群の生存率と有意な差はなかった。これらのことから経角膜電気刺激法は、視神経断端を直接刺激する従来の方法と同等の生存促進効果を有することが明らかになった。

D. 考察

1) 電気刺激の至適開始時期について

直後刺激と3時間遅延刺激の結果から、電気刺激は、視神経切断後できるだけ早くに与えればより効果を発揮できると考えられる。また、3時間先行刺激と直前刺激の結果から、電気刺激の効果に蓄積効果はないと考えられる。ただし、視神経切断前の電気刺激は原理的に切断後の刺激と同じ手法を用いることができないため、刺激強度などを変えてさらに検討する必要があるだろう。いずれにせよ、本研究の結果から、視神経切断によって早期に一過性に活性化される細胞死のシグナルに影響を与えることが、電気刺激の神経節細胞保護効果のメカニズムであると考えられた。

2) 経角膜電気刺激法について

今回の研究の結果、視神経刺激による網膜神経節細胞の神経保護効果(視神経切断1週間後の生存率84%、Morimoto T et al. 2002)と同様に、角膜側からの電気刺激によっても同様の神経保護効果が得られることが証明された。この経角膜電気刺激法は、簡便で侵襲が少なく臨床応用が可能であると考えられる。また、経角膜電気刺激法は、網膜神経節細胞以外の網膜細胞に対しても電気刺激を与えることが可能なため、視細胞の変性疾患など、神経節細胞以外の細胞に対する生存促進・変性阻止にも応用できる可能性がある。この電気刺激法の網膜に対する安全性や、角膜や水晶体などその他の眼組織に対する影響についても今後検討する必要があると考えられる。

3) 電気刺激の神経保護メカニズムについて

電気刺激による神経保護のメカニズムについては未だ明らかではないが、従来より神経保護のメカニズムとして報告されている、リン酸化・脱リン酸化による細胞内シグナルの調節や各種の神経栄養因子群の変化に加えて、視神経切断後早期に生じている何らかの細胞内シグナルを明らかにすることが重要と考えられた。また、視神経電気刺激と経角膜電気刺激による神経保護作用に、共通の神経保護のメカニズムが働いているのかあるいはそれぞれ別のメカニズムが働いているのかも検討する必要がある。今後、これらの点についても研究を進めていく予定である。

E. 結論

視神経への電気刺激によって網膜神経節細胞の神経保護作用を得るためには、視神経切断の

直後に電気刺激を与え始める必要があることがわかった。また、経角膜電気刺激法も、視神経刺激と同様に、視神経切断後の網膜神経節細胞の細胞死を抑制し、生存を促進させることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yakura, T., Fukuda, Y. and Sawai, H. (2002) Effect of Bcl-2 overexpression on establishment of ipsilateral retinocollicular projection in mice. *Neurosci.* 110(4) : 667-673.

Inoue, T., Hosokawa, M., Morigiwa, K., Ohashi, Y. and Fukuda, Y. (2002) Bcl-2 overexpression does not enhance in vivo axonal regeneration of retinal ganglion cells after peripheral nerve transplantation in adult mice. *J. Neurosci.* 22(11) : 4468-4477.

Takao, M., Miyoshi, T., Watanabe, M. and Fukuda, Y. (2002) Changes in visual response properties of cat retinal ganglion cells within two weeks after axotomy. *Exp. Neurol.* 177 : 171-182.

Watanabe, M. and Fukuda, Y. (2002) Survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells in adult cats. *Prog. Retin. Eye Res.* 21 : 529-553.

Watanabe, M., Tokita, Y., Katoh, M., and Fukuda, Y. (2003) Intravitreal injections of neurotrophic factors and forskolin enhance survival and axonal regeneration of axotomized beta ganglion cells in cat retina. *Neurosci.* 116 : 733-742.

Kurimoto, T., Miyoshi, T., Yakura, T., Watanabe, M.

Mimura, O. and Fukuda, Y. (2003) Apoptotic death of beta cells after optic nerve transection in adult cats. *J. Neurosci.* in press.

三好 智満 (2002) 実験動物の視覚? 視神経の再生と視覚伝導路の再構築? . 比較眼科研究 21 : 115-121.

栗本 拓治、渡部 眞三、福田 淳 (2002) 視神経の再生? 網膜神経節細胞の生存促進から視覚機能回復へ? . 実験医学増刊 Vol.20 : 185-191 羊土社.

福田 淳 (2003) 中枢神経系の再生と機能修復をめざして. 脳の科学 25 巻 (増刊) 3-9 星和書店.

2. 学会発表

Morimoto, T., Miyoshi, T., Sawai, H., Inoue, T., Fujikado, T., Tano, Y. and Fukuda, Y. (2002) Neuroprotective effects of electrical stimulation on the axotomized retinal ganglion cells in vivo. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, U.S.A., May.

Kurimoto, T., Miyoshi, T., Watanabe, M., Mimura, O. and Fukuda, Y. (2002) Apoptotic cell death of beta cells after optic nerve transection in adult cat retinas. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, U.S.A., May.

Miyoshi, T., Morimoto, T., Okazaki, Y., Yakura, T., Kurimoto, T., Inoue, T., Sawai, H., Fujikado, T., Tano, Y. and Fukuda, Y. (2002) Survival-promoting effect of electrical stimulation on axotomized retinal ganglion cells. The 12th Keio University International Symposium for Life Sciences and Medicine "The Neural Basis of Early

Vision" (The 6th Vision Forum), Tokyo, Japan, Sept.

Kurimoto, T., Miyoshi, T., Yakura, T., Watanabe, M. and Fukuda, Y. (2002) Apoptotic death of beta cells induced by optic nerve transection on adult cat retinas. The 12th Keio University International Symposium for Life Sciences and Medicine "The Neural Basis of Early Vision" (The 6th Vision Forum), Tokyo, Japan, Sept.

Kurimoto, T., Miyoshi, T., Yakura, T., Watanabe, M., Mimura, O. and Fukuda, Y. (2002) Apoptotic death of axotomized beta cells in adult cat retinas. The 1st Asian Neuro-Ophthalmology Society (ASNOS) Congress, Tokyo, Japan, Oct.

福田 淳、渡部 眞三 (2002) 哺乳動物における視神経再生と視覚機能回復—その現状と課題—。日本電子顕微鏡学会第58回学術講演会シンポジウム (大阪) 5月。

森本 壮、三好 智満、澤井 元、井上 徹、不二門 尚、田野 保雄、福田 淳 (2002) 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作用。第106回日本眼科学会総会 (仙台) 5月。

澤井 元、森本 壮、矢倉 徹、岡崎 祐香、澤井 元、福田 淳 (2002) 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17回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会 (東京) 6月。

森本 壮、三好 智満、矢倉 徹、岡崎 祐香、井上 徹、澤井 元、不二門 尚、田野 保雄、福田 淳 (2002) 電気刺激による網膜神経節細胞の生存促進における刺激時間の関与。第25回日本神経科学大会 (東京) 7月。

岡崎祐香、森本壮、澤井元、福田淳 (2002) 電

気刺激による軸索損傷網膜神経節細胞の生存促進効果発現の条件。日本生理学会第95回近畿生理談話会 (和歌山) 8月。

岡崎祐香、森本壮、矢倉徹、澤井元、福田淳 (2003) 視神経断端への電気刺激による網膜神経節細胞の生存促進；刺激の至適時期の解析。第80回日本生理学会大会 (福岡) 3月。

森本壮、三好智満、澤井元、不二門尚、田野保雄、福田淳 (2003) 経角膜電気刺激による網膜神経節細胞に対する神経保護効果。第80回日本生理学会大会 (福岡) 3月。

三好智満、栗本拓治、渡部眞三、横英樹、福田淳 (2003) 電気刺激は軸索切断されたネコ網膜神経節細胞の生存を促進する。第80回日本生理学会大会 (福岡) 3月。

福田淳 (2003) 生理研連シンポジウム「再生医学, 医療と生理学の接点を探る」中枢神経系の機能再生? 網膜・視覚伝導路を中心に?。第80回日本生理学会大会 (福岡) 3月。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) なし。

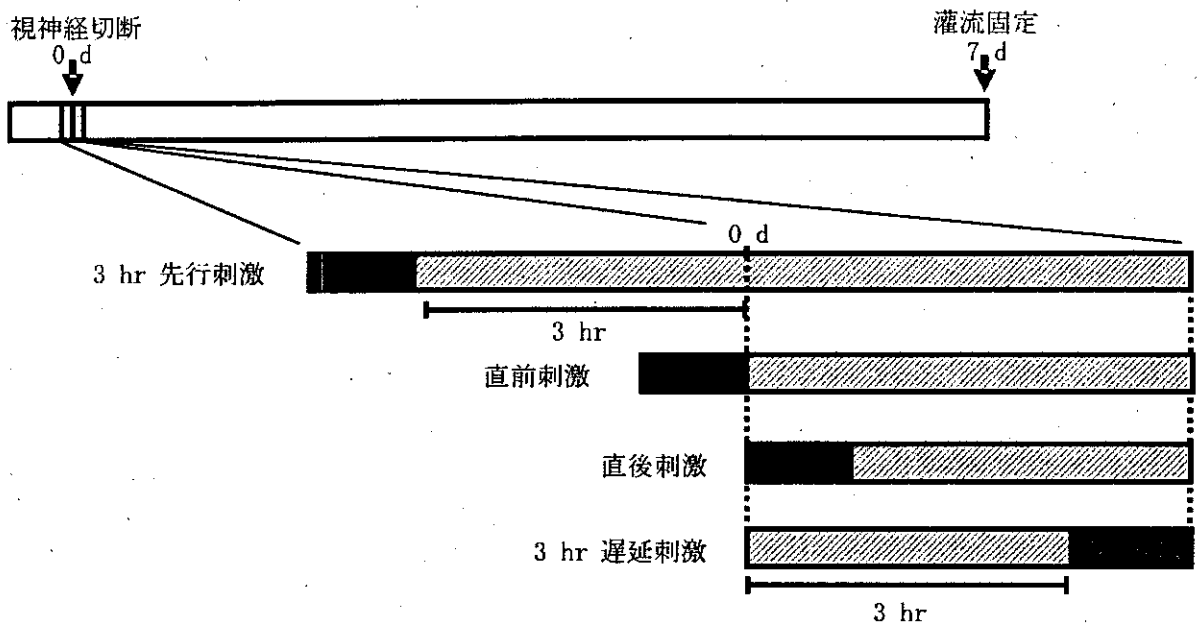


図1. 各群における電気刺激の開始時期

電気刺激至適開始時期の検討に用いた4つの群の実験デザインを示す。どの群も電気刺激は1時間加えた(黒色)。

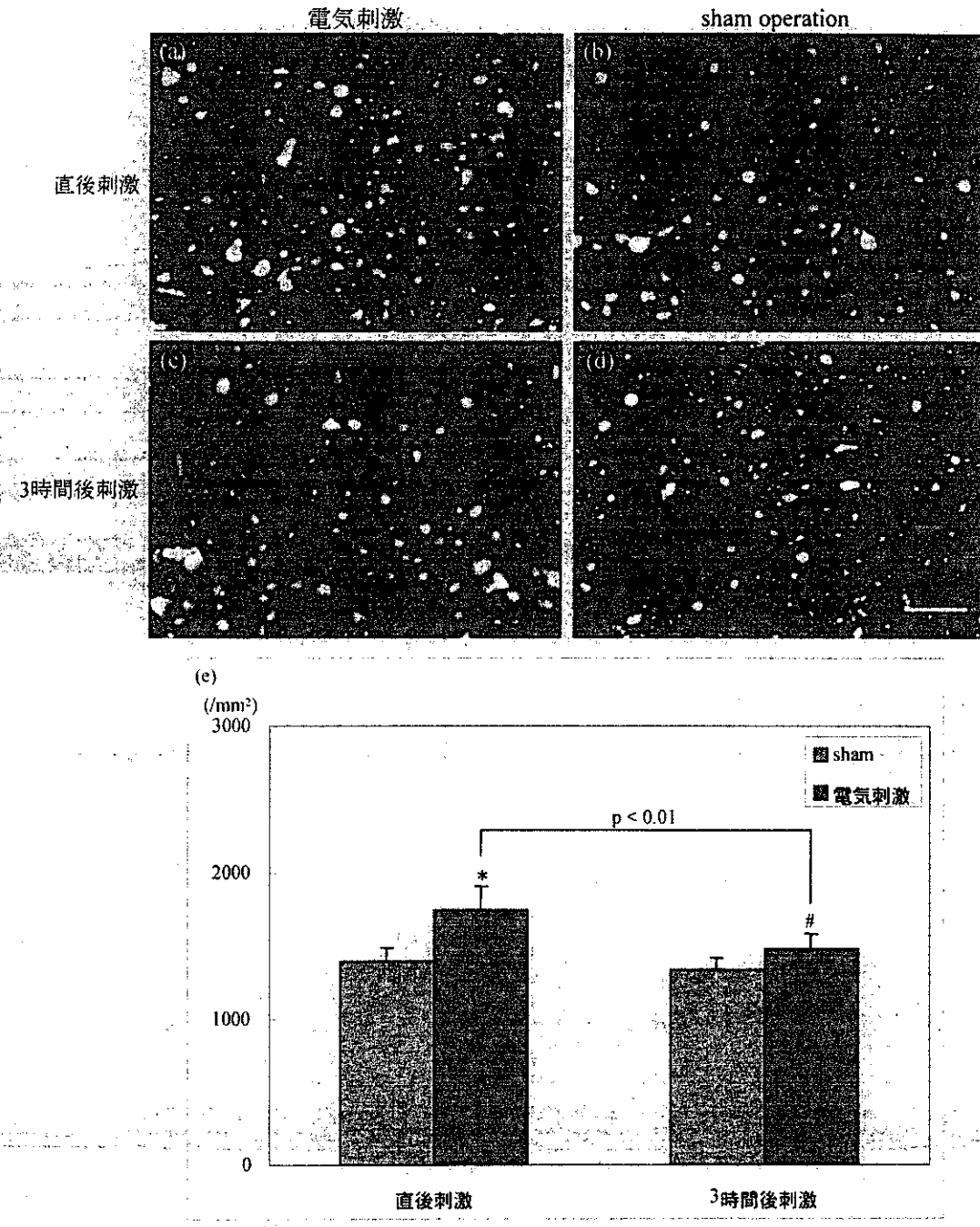


図 2. 直後刺激および3時間遅延刺激による神経保護効果

(a)-(d) 視神経切断7日後における網膜標本の蛍光顕微鏡像。(a) 直後刺激動物、(b) 直後刺激の sham 手術動物、(c) 3時間遅延刺激動物、(d) 3時間遅延刺激の sham 手術動物。bar: 50 μ m。

(e) 視神経切断7日後における各群の網膜神経節細胞の生存密度。直後刺激と3時間遅延刺激は共に生存を促進していた(各々、 $p < 0.01$, $p < 0.05$)。しかも、直後刺激は3時間遅延刺激よりも生存を促進した($p < 0.01$)。

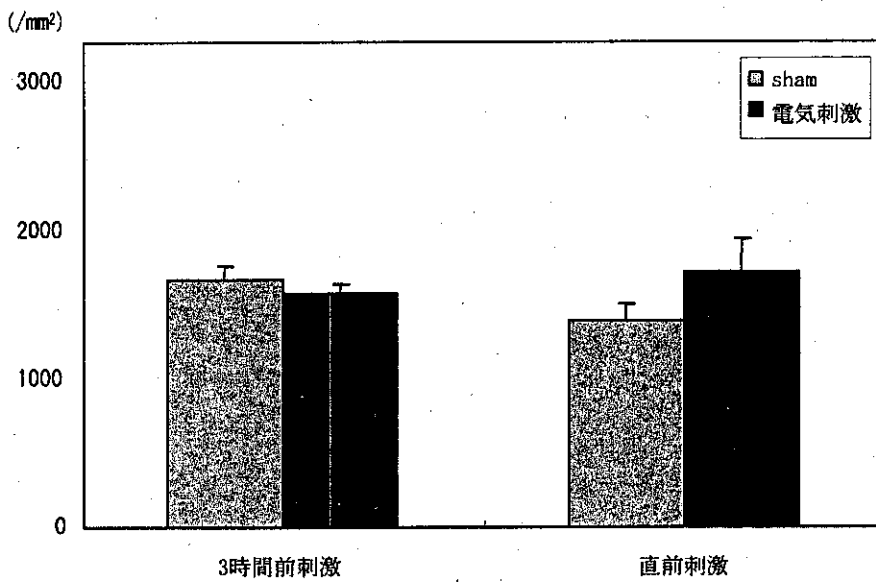


図3. 3時間先行刺激および直前刺激を行った場合の視神経切断7日後における網膜神経節細胞の生存密度

3時間先行刺激群、直前刺激群、のどちらも、それぞれの sham 手術群に比べて生存が促進されていなかった。

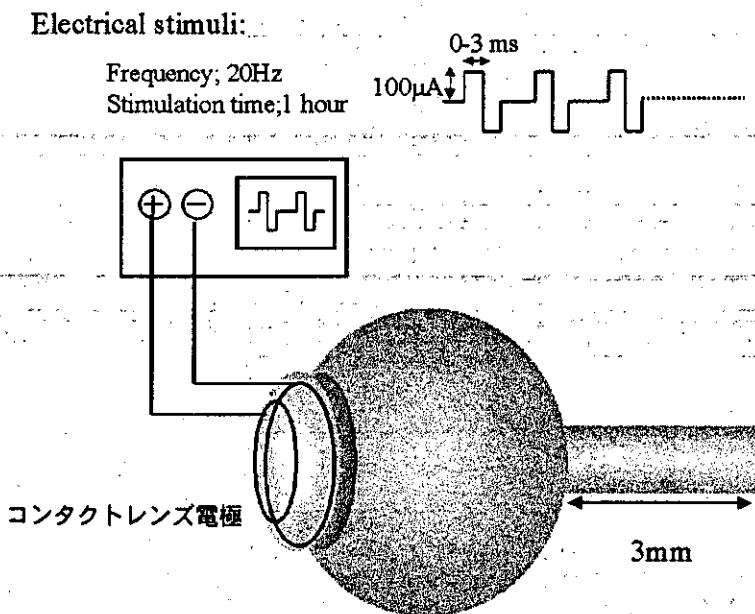


図4. 経角膜電気刺激法の概要

コンタクトレンズ電極を介して、 $100 \mu\text{A}$, $0-3 \text{ msec/phase}$ の両相矩形波による電気刺激を角膜に加えた。

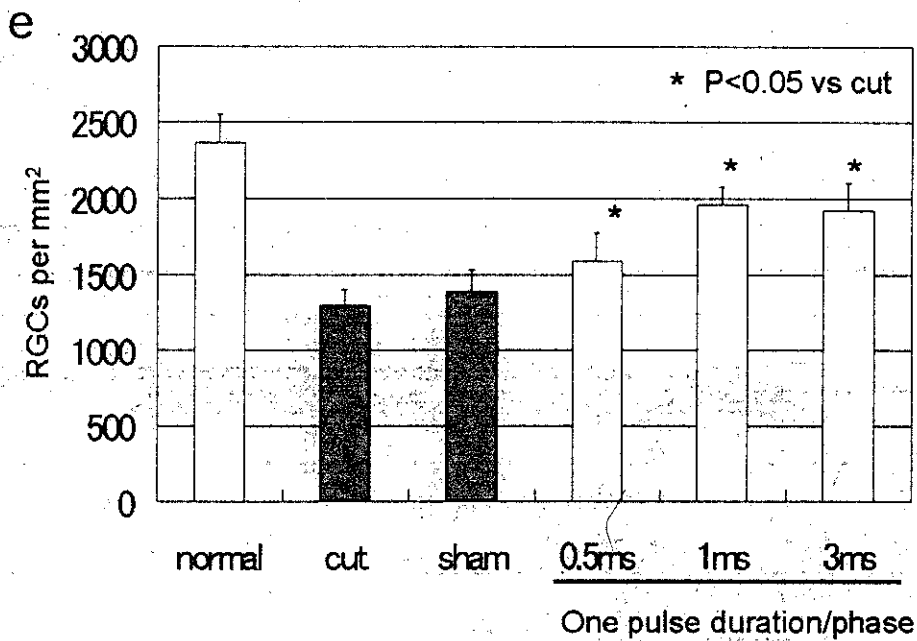
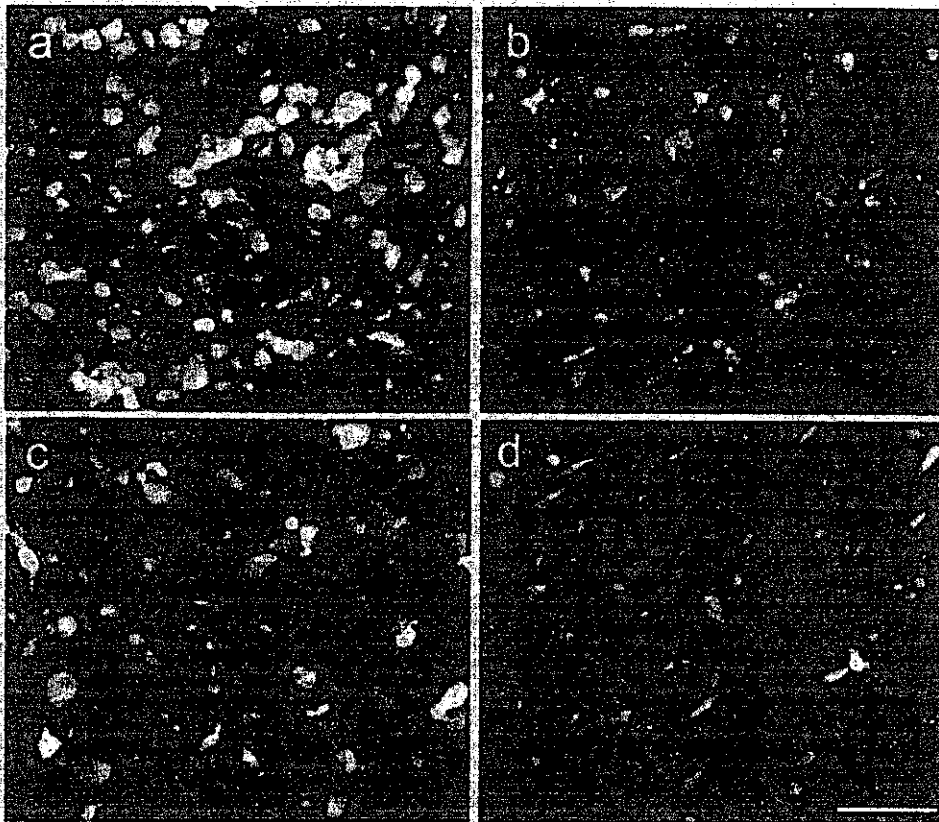


図5. 経角膜電気刺激法の神経保護効果

a - d. 網膜伸展標本の蛍光顕微鏡像。a. 正常網膜、b. 視神経切断7日後の網膜、c. 経角膜電気刺激を行った視神経切断7日後の網膜 (duration: 1 msec/phase)、d. 同 (0.5 msec/phase)。

bar: 100 μ m. e. 視神経切断7日後における各群の網膜神経節細胞の生存密度。

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

分担研究報告書

新しい電極および固定法の開発

分担研究者 三宅 養三 名古屋大学大学院医学研究科感覚器障害制御学 教授
（研究協力者 鈴木 聡 名古屋大学大学院医学研究科感覚器障害制御学 助手）

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。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、国際特許を出願している。動物実験において形状に関してさらなる改良を考察した。

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に対して研究を行った。

B.研究方法

昨年から引き続き動物（ウサギ）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開発したが、さらに改良を加える必要があるか考察した。

C.研究結果

1) 板形網膜電極の形状について

昨年、光干渉断層形（OCT）によりウサギ網膜厚は計測し、その厚みのスペースを備えた電極を設計した。このスペース部は

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。材質にシリコンを使用し、その硬度は3種類とした。実際にウサギに対して移植を行うと硬度の最も柔らかいものでも電極の端により球面形の網膜を傷害することがわかった。

2) 円柱型網膜電極について

従来は板形電極が考えられていたが、これは毛様体扁平部からの挿入を前提にしているため器材を薄くする必要があった。しかし、薄く作るとより高度な技術が必要であり、完成までに期間がかかる。発想を転換し、未熟児網膜症に対するオープンスカイピトクトミーの手技を利用する。角膜を角膜移植のように一時的にくり貫き、水晶体、硝子体を切除する。角膜創から器械を挿入すれば角膜創径の直径、眼球長の高さを持つ円柱状電極を移植することができる。ウサギにて実験し、この手技が可能であることを確認した。

材を用いた人工網膜装置等」
国際特許出願中

D. 考察

網膜は侵襲を受けやすい軟弱な組織であり、電極はより柔らかい硬度とするか、球面に合わせた形状に改良するべきことがわかった。

円柱型電極は板形電極に比べ、容積が10倍以上あり器械の作成はよりしやすいと思われる。早期の臨床応用が見込まれ、板形電極完成までの対応に適することは確実である。

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が、電極の材質も考慮しなくてはならない。

円柱型電極はウサギ眼に移植可能であることがわかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

雑誌、著書

鈴木 聡：人工眼。玉井信ほか編。NEW MOOK 眼科 「眼組織移植と免疫」，金原出版，東京，95-102，2002

鈴木 聡：視覚障害—電気刺激による視覚代行。総合リハビリテーション 30，1337-40，2002

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

厚生科学研究費補助金（感覚器障害および免疫アレルギー等研究事業）

分担研究報告書

動物モデル作成とその視機能評価

分担研究者 三宅 養三 名古屋大学大学院医学研究科感覚器障害制御学・教授
（研究協力者 近藤 峰生 名古屋大学大学院医学研究科感覚器障害制御学・助手）

研究要旨

人工網膜の動物実験に重要な動物モデルとして、ヒトに近い中-大動物（ブタあるいはサル）における視細胞変性モデルの作成方法を確立させること、およびそのような動物から正確な視機能を測定する実験系を確立することを本年度の目的とした。簡易かつ確実に視細胞変性モデルを作成する手段としてMNU（N-methyl-N-nitrosourea）を用い、ラットに60mg/kgの全身投与で完全な視細胞変性が一週間で作成できることを確認した。次にMNUを硝子体内に投与して片眼のみの視細胞変性モデル作成を試みたが、MNUの硝子体内投与では変性は全く惹起できず、血行投与でのみMNUで視細胞変性がおこることことがわかった。また、大動物における視機能評価としてアカゲザルを用い、全身麻酔の状態にて眼底直視下にて目的とする部位のみを光刺激して、局所刺激による網膜電位図（ERG）および視覚誘発電位（VEP）が測定できる実験システムを確立した。

A. 研究目的

人工網膜を実際に臨床応用する前段階として、比較的ヒトに近い網膜を有する中-大動物における移植および視機能評価実験が重要である。この場合、正常な網膜に対する移植実験だけでは十分とはいえず、実際に網膜変性、特に人工網膜が適応となるような重度の網膜外層変性を有する動物モデルに対する実験が鍵となる。使用する動物としてはイヌ、ネコ、ミニブタなどが考えられるが、最終的にはヒトとほぼ同じ網膜構造および機能をもつサルを使用することが必要になる。マウスやラットなどのげっ歯類ではこの

ような網膜変性モデルの作成は既に確立されている。光障害モデルはその最も簡易なものであるし、またげっ歯類では既に遺伝子操作によってヒトと網膜色素変性症と同じ遺伝背景をもつ網膜変性を作成することも可能である。しかしブタやサルではまだ網膜変性モデル作成は十分確立されているとはいえない。遺伝操作も困難である。本分担研究の目的は、人工網膜移植実験に使用できるような中-大動物視細胞変性モデルの簡単な作成方法を確立すること、またそのような動物の視機能を他覚的に評価する方法を確立す

ることである。

B. 研究方法

(i) 血行性薬物投与による視細胞変性モデルの作成

まず初めに、血行性薬物投与による視細胞変性モデルの作成を試みた。全身投与により視細胞変性を惹起させる薬物としてMNU (N-methyl-N-nitrosourea) を選択した。アルキル化剤の一つであるMNUはを単回腹腔内投与するのみでマウス、ラット、ハムスターでは約一週間後に視細胞アポトーシスに起因する網膜変性が惹起されることが知られている (Herrold et al, 1976; Nakajima, et al, 1996. Nambu H, et al. Pathol Int. 1998.). 白色ラットに完全な視細胞を惹起させるMNUの投与量を調べる目的で、白色ラット (SDラット、8w) に種々の濃度のMNUを0.05% 酢酸を滴下した生理食塩水に溶解させて腹腔内投与し、1週後に網膜機能を網膜電図 (ERG) を用いて測定し、また網膜組織をメタカルンで固定後パラフィンで固定して4 μ m切片を作成した。

(ii) 硝子体内薬物投与による視細胞変性モデルの作成

上記の方法にてほぼ完全な視細胞変性モデルが作成できたとしても、この方法では両眼性視細胞変性となる。ブタやサルに両眼性の完全視細胞変性を作成すると、少なくとも実験期間中は動物は両眼完全失明となり、実験動物に対する倫理面を配慮するとこの方法は好ましい方法とはいえない。そこでMNUを

片眼の硝子体内に直接投与し、網膜変性がおこるかどうかを観察した。(i) と同様に1週後に網膜機能を網膜電図 (ERG) を用いて測定し、また網膜組織をメタカルンで固定後パラフィンで固定して4 μ m切片を作成した。

(iii) 大動物における視機能を他覚的に評価するシステムの確立

3歳と4歳の雄アカゲザル (*macaca mutata*) を使用した。麻酔にはケタミン (7 mg/kg) とキシラジン *xylazine* (0.6 mg/kg) の筋注を用いた。網膜全視野刺激 ERG には強いキセノンフラッシュを用い、その刺激強度を neutral density filter を使って 0.4 log ステップで変化させて ERG を記録した。錐体 ERG の記録には背景光として 40cd/m² の白色光を使用した。網膜局所刺激に対する ERG としては、赤外線眼底カメラに 15 度径のスポット刺激を組み込み、直接眼底を観察しながら任意の網膜部位を刺激して 512 回加算で局所 ERG を記録した。また視覚誘発電位記録 (VEP) は上記の網膜全視野刺激もしくは局所スポット刺激を用い、inion から 1 cm 上の頭皮に置いた針電極により 256 回加算で VEP を記録した。

C. 研究結果

(i) 全身性薬物投与による視細胞変性モデルの作成

白色ラットにMNUを腹腔内投与し、1週後に網膜電図 (ERG) と網膜組織切片で網膜を調べたところ、60 mg/kgの投与でほぼ完全な視細胞変性がおこることが確認された (図1B)。