

20030607

厚生労働科学研究費補助金

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田野 保雄

平成 16 (2004) 年 5 月

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
(網膜刺激型電極の術式開発、網膜刺激型電極の生体適合性の研究) 田野 保雄
(研究協力者 大路正人、瓶井資弘、生野恭司、Jun Sub Choi)

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 ————— 8
不二門 尚
- (i) 脈絡膜上一経網膜刺激による家兔の慢性実験による評価
(研究協力者 中内一揚)
- (ii) ネコ視覚中枢における網膜多点刺激電極の機能評価
(研究協力者 神田寛行)
- (iii) 経角膜電気刺激を用いた遺伝性網膜色素変性患者の残存網膜機能の評価方法
(研究協力者 森本 壮)
2. 網膜神経節細胞の神経保護 ————— 3 1
福田 淳
- (i) 経角膜電気刺激による網膜神経節細胞の神経保護のメカニズム
(研究協力者 森本 壮、松田理、三好智満)
- (ii) 切断視神経への電気刺激によるネコ網膜神経節細胞の生存促進
(研究協力者 三好智満、栗本拓治、澤井元)
3. 中・大動物における視細胞変性モデル作成とその機能評価 ————— 4 6
三宅養三 (研究協力者 近藤峰生)
4. 網膜刺激型電極の生体適合性の研究 ————— 4 9
平形 明人
5. 遊離網膜を用いた電気刺激の効果 ————— 5 8
八木 哲也 (研究協力者 小山内実)
5. 網膜下刺激電極の開発 ————— 6 3
太田 淳
6. 網膜上刺激電極システムの開発および画像処理システムの開発 ————— 6 8
八木 透、西村 茂
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 7 1
- IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 7 3
6. 研究成果の刊行に関する一覧表

厚生労働科学研究費補助金（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、ミニブタに対してダミー電極であるポリイミド片（幅大きさは2×6mm厚さ50μm）を硝子体手術を行って網膜下に埋植した。埋植後6ヶ月においても、網膜の神経細胞障害は視細胞層を除いて認められず、網膜下電極として、実用化可能と考えられた。また直径100μmのプラチナ電極をシリコン片に埋め込んだActive電極を使用し、パルス幅0.5msecの二相性パルスを脈絡膜上—経網膜電気刺激方式で家兎網膜に加えた場合、100Hzで1時間継続的に加えたと、電流値200μAまでは網膜障害がなく、この電流値が安全域と考えられた。

電極の術式開発に関して、電極を埋植する網膜の環境が臨床像に近いモデルを作成することを目的とする研究を行った。生後4週の子ブタ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、脈絡膜新生血管が生じることを確認した。この血管新生モデルに対し、従来全身投与により血管新生を抑制することが確かめられている薬剤を徐放剤として結膜下投与することにより、新生血管が抑制されることが見いだされた。このブタモデルは眼球の大きさが人間と類似しており、今後人工網膜を加齢黄斑変性眼に用いる場合により動物モデルになると考えられた。

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

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15年度は、人眼と血管支配が類似しているミニブタを用いて、眼網膜下電極を埋植し検討した。また、われわれが独自に開発した脈絡膜上-経網膜刺激方式を用いて、家兎網膜に対する刺激電流の安全域を検討した。

また、網膜刺激電極の術式開発、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人眼の臨床像と類似のモデルを作成することを研究目的として、ブタに対して脈絡膜新生血管モデルを作成する研究を行った。脈絡膜新生血管は、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。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。

研究方法

(1) ミニブタ網膜下に移植片を長期的に埋植した場合の組織学的変化

ポリイミド片(厚さ 50 μ m、大きさ 2 \times 6 mm)によるダミー電極をブタの網膜下に移植し、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月後の網膜組織を眼球摘出後、4% glutaraldehyde で固定し、0.1 M phosphate buffer で洗浄した。アルコールで脱水した後エポン包埋を行った(Epon 812, MNA, DDSA, DMP30)。サンプルは、60 $^{\circ}$ C で 48hrs 保温した後、マイクロトームで 1 μ m の厚さで切片を作成した。切片は 1% toluidine blue.

で染色し、Olympus microscope を用いて撮影を行った。

(2) 脈絡膜上-経網膜刺激を行った場合の家兎網膜組織の変化

家兎の強膜内に、シリコンで作成された1極の刺激電極(直径 100 μ m, Pt 電極、Unique Medical 社製)を埋植し、経網膜的に二相性の電気刺激を、電流値を変えて1時間加えた。眼球摘出後、4% glutaraldehyde で固定し、以後の操作はブタ網膜を用いた実験と同様にして行った。動物愛護の立場から手術は片眼のみに行った。

(3) ブタを用いた脈絡膜新生血管モデルの作成

生後4週のブタ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った。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るようにした。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。網膜光凝固を施行した20日後に組織封入剤にて低温下で眼球を組織封入剤で封入した後、凍結切片を作成し、網膜血管を組織免疫学的に評価した。観察は光学顕微鏡で行った。この血管新生モデルに対し、従来全身投与により血管新生を抑制することが確かめられているものの徐放剤を結膜下投与に投与方法を変更しその効果を検討した。薬物の投与し20日経過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評価した。また眼球の一部を用いて薬剤の網膜、脈絡膜、硝子体における濃度を測定した。

研究結果

(1) ミニブタ網膜下に移植片を長期的に埋植した場合の組織学的変化

網膜下電極周囲の網膜は埋植後1、3月において組織傷害はほとんど認められなかった

(Fig. 1 and 2)。移植片は、埋植後1、3月において網膜下に正常に配置されていた。網膜の神経細胞は、移植後6ヶ月において、視細胞層が軽度に変性していたが、網膜内層および神経節細胞層には変化は認められなかった。

(2) 脈絡膜上-経網膜刺激を行った場合の家兎網膜組織の変化

3種類の刺激条件で、網膜の組織変化を観察した。(i) 刺激電流値 300 μ A または 200 μ A、パルス幅 0.5 msec (biphasic)、周波数 20Hz、刺激時間 90分 (ii) 刺激電流値 300 μ A または 200 μ A、パルス幅 0.5 msec (biphasic)、周波数 20Hz、刺激時間 60分。(iii) 刺激電流値 100 μ A、パルス幅 0.5 msec (biphasic)、周波数 20Hz、刺激時間 60分。結果として、(i) の条件では、300 μ A では、網膜全層が、200 μ A では網膜の一部の層が障害を受けた。(ii), (iii)の条件では網膜障害は見られなかった (Fig3)。

(3) ブタを用いた脈絡膜新生血管モデルの作成

ブタにおけるレーザー誘導脈絡膜血管新生モデル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。レーザー施行直後に血管新生を抑制する薬物を結膜下投与を行った群と薬物を投与していない対照群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。

考察

家兎網膜下にポリイミド片を埋植した場合には、網膜血管支配の問題で、網膜障害が大きかった (H13 年度の報告) が、ミニブタの網膜下にダミーのポリイミド片を埋植した本研究においては、長期に埋植を行っても、網膜組織障害は軽度で、将来的に Active な人工網膜を設置した場合でも十分使用に耐えられると考え

られた。

脈絡膜上. 経網膜電気刺激を継続的に行った場合の網膜障害に関しては、200 μ A の電流値で1時間の連続刺激までは問題がないことが分かった。Active な電極を用いた場合を想定すると、視線 (頭部) を動かした場合、1つの電極に対して、連続的に1時間以上刺激が加えられる可能性は少なく、したがって直径 100 μ m のプラチナ電極を使用し、パルス幅 0.5msec の二相性パルスを 100Hz で用いた場合、許容される電流値は 200 μ A と考えられた。

後の検討で判明したこととして、本刺激に用いた Stimulator は、プラス側とマイナス側で Charge balance がわずかにとれておらず、微小な直流電流が連続的に網膜に加わった可能性がある。今後さらに検討する必要がある。

今回報告したブタの脈絡膜新生血管モデルは眼球の大きさや形態がヒトの眼球に似ており、マウスに比べよりヒトに近く、加齢黄斑変性に対する人工網膜埋植の研究に役立つと思われる。

結論

網膜下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。また脈絡膜上-経網膜電気刺激方式で網膜に電流を印加した場合、電流値 200 μ A までは網膜障害がなく、この電流値が安全域と考えられた。

ブタの脈絡膜新生血管モデルは眼球の大きさが人間と類似しており、今後人工網膜を加齢黄斑変性眼に用いる場合により動物モデルになると考えられた。

健康危険情報

特になし

研究発表

1. 論文発表

1) Cekic O, Ohji M, Keserci B, Sawa M,

- Zheng Y, Hayashi A, Ikuno Y, Nakata K, Gomi F, Tano Y. Evaluation of choroidal perfusion of the new central macular area by dilution analysis of indocyanine green angiography after macular translocation., *Retina*. 2004 Apr;24(2):210-4.
- 2) Cekic O, Keserci B, Ohji M, Sawa M, Ikuno Y, Gomi F, Hayashi A, Fujikado T, Tano Y. Macular translocation surgery and retinal circulation times., *Retina*. 2004 Feb;24(1):51-6.
- 3) Nakata K, Ohji M, Ikuno Y, Kusaka S, Gomi F, Kamei M, Ross DF 3rd, Tano Y. Wide-angle viewing lens for vitrectomy. *Am J Ophthalmol*. 2004 Apr;137(4):760-2.
- 4) Ikuno Y, Sayanagi K, Ohji M, Kamei M, Gomi F, Harino S, Fujikado T, Tano Y. Vitrectomy and internal limiting membrane peeling for myopic foveoschisis. *Am J Ophthalmol*. 2004 Apr;137(4):719-24.
- 5) Sou R, Oku N, Ohguro N, Hibino S, Fujikado T, Tano Y. The clinical role of N-isopropyl-p-[123I]-iodoamphetamine single photon emission computed tomography in the follow-up of choroidal melanoma after radiotherapy. *Jpn J Ophthalmol*. 2004 Jan-Feb;48(1):54-8.
- 6) Zheng Y, Bando H, Ikuno Y, Oshima Y, Sawa M, Ohji M, Tano Y. Involvement of rho-kinase pathway in contractile activity of rabbit RPE cells in vivo and in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Feb;45(2):668-74
- 7) Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I, Furukawa T. Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci*. 2003 Dec;6(12):1255-63.
- 8) Kusaka S, Oshita T, Ohji M, Tano Y. Reduction of the toxic effect of indocyanine green on retinal pigment epithelium during macular hole surgery. *Retina*. 2003 Oct;23(5):733-4.
- 9) Ikuno Y, Tano Y. Early macular holes with retinoschisis in highly myopic eyes. *Am J Ophthalmol*. 2003 Oct;136(4):741-4.
- 10) Sawa M, Chan WM, Ohji M, Imai K, Fujikado T, Tano Y, Schachat AP. Successful photodynamic therapy with verteporfin for recurrent choroidal neovascularization beneath the new fovea after macular translocation surgery with 360-degree retinotomy. *Am J Ophthalmol*. 2003 Sep;136(3):560-3.
- 11) Ikuno Y, Sayanagi K, Oshima T, Gomi F, Kusaka S, Kamei M, Ohji M, Fujikado T, Tano Y. Optical coherence tomographic findings of macular holes and retinal detachment after vitrectomy in highly myopic eyes. *Am J Ophthalmol*. 2003 Sep;136(3):477-81.
- 12) Nishimoto S, Kawane K, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Hashida N, Ohguro

N, Tano Y, Morimoto T, Fukuda Y, Nagata S. Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens. *Nature*. 2003 Aug 28;424(6952):1071-4.

13) Kusaka S, Hayashi N, Ohji M, Ikuno Y, Gomi F, Tano Y. Macular hole secondary to fungal endophthalmitis. *Arch Ophthalmol*. 2003 May;121(5):732-3.

14) Nakata K, Ohji M, Ikuno Y, Kusaka S, Gomi F, Tano Y. Sub-retinal hemorrhage during internal limiting membrane peeling for a macular hole. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2003 Jul;241(7):582-4

15) Zheng Y, Ikuno Y, Ohj M, Kusaka S, Jiang R, Cekic O, Sawa M, Tano Y. Platelet-derived growth factor receptor kinase inhibitor AG1295 and inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy. *Jpn J Ophthalmol*. 2003 Mar-Apr;47(2):158-65.

16) Cekic O, Ohji M, Zheng Y, Hayashi A, Kusaka S, Tano Y. Experimental study of viscoelastic in the prevention of corneal endothelial desiccation injury from vitreal fluid-air exchange. *Am J Ophthalmol*. 2003 May;135(5):641-7.

17) Oshima Y, Shukunami C, Honda J, Nishida K, Tashiro F, Miyazaki J, Hiraki Y, Tano Y. Expression and localization of

tenomodulin, a transmembrane type chondromodulin-I-related angiogenesis inhibitor, in mouse eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 May;44(5):1814-23.

18) Friberg TR, Ohji M, Scherer JJ, Tano Y. Frequency of epithelial debridement during diabetic vitrectomy. *Am J Ophthalmol*. 2003 Apr;135(4):553-4.

19) Sou R, Kusaka S, Ohji M, Gomi F, Ikuno Y, Tano Y. Optical coherence tomographic evaluation of a surgically treated traumatic macular hole secondary to Nd:YAG laser injury. *Am J Ophthalmol*. 2003 Apr;135(4):537-9.

2. 学会発表

1. Tano Y. Microtechnological Solutions for Ocular Disease, Doheny Vision Research Symposium. Jan 9-10, 2004, California.

2. 田野保雄 (organizer)、シンポジウム：実用化間近い人工視覚、日本眼科手術学会、2004年2月1日、東京

3. 田野保雄 (organizer) 市民公開講座、実用化間近い人工視覚、2004年2月1日、東京

知的財産権の出願、登録状況

特になし

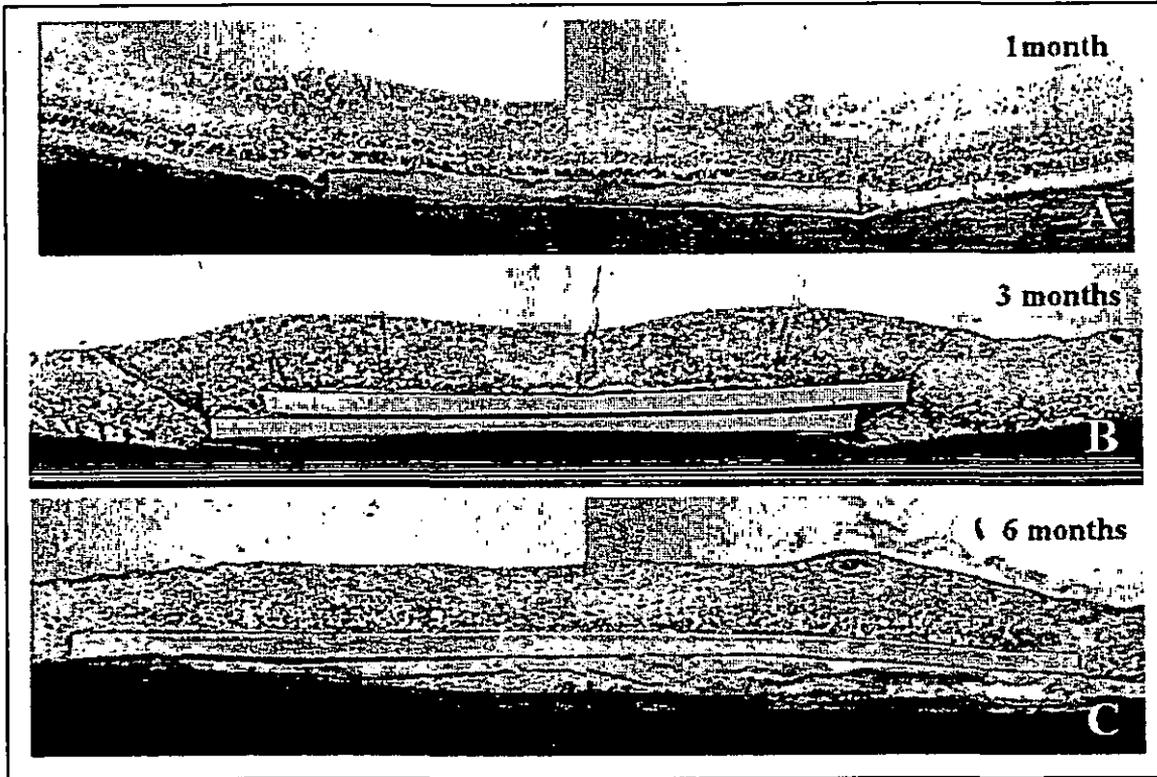


Figure 1. The microscopy of the retina after implant. A. One month after implant. B. Three months after implant. C. Six months after implant. The retinal prosthesis was well arranged in the sub-retinal space.

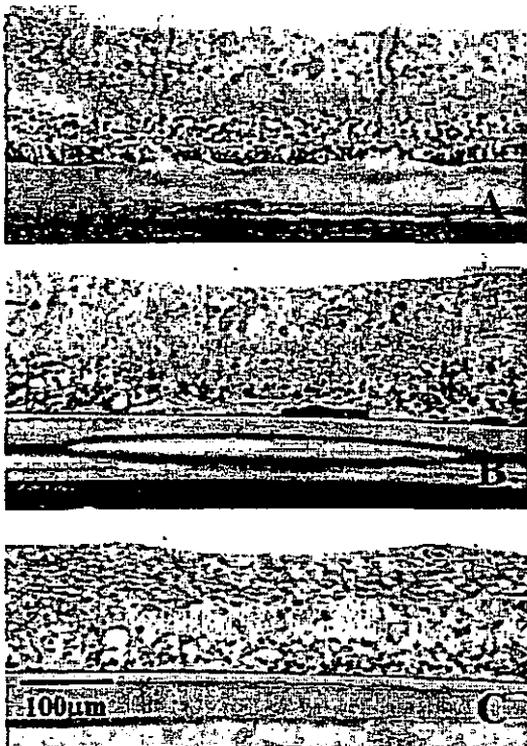


Figure 2. The microscopy of implanted regions. In A and B, The retinal neurons shown normal structure on the prosthesis. C. The photoreceptors were degenerated on the prosthesis in six months after implant but other regions were normal.

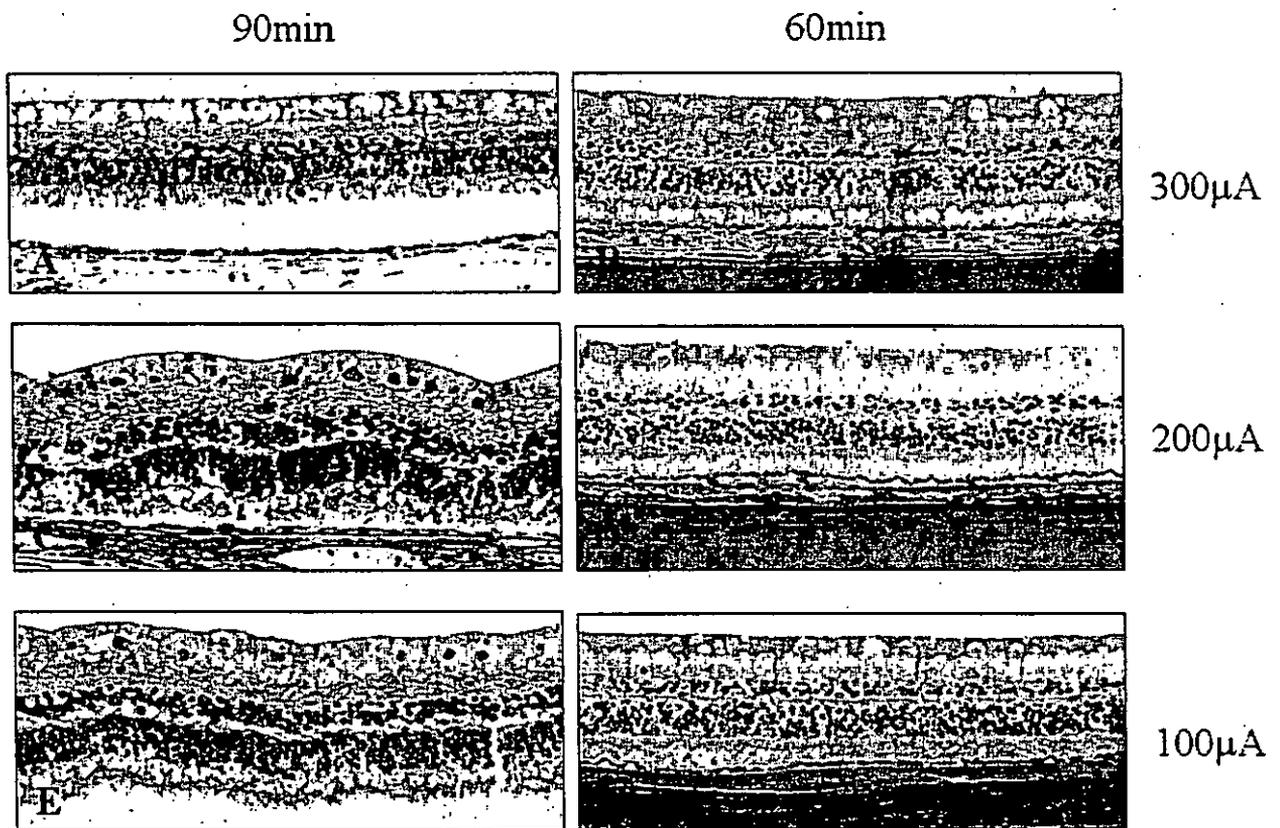


Figure 3. The right panels are the electric stimulated retinas in three different current, for 90min, 20Hz. The left panels differ in stimulation time only. The left panel's retinas are safer than right panel's retinas. And, in stimulation for 60 min, the retina was safe in 200µA and 100 µA.

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. 脈絡膜上一経網膜刺激による家兎の慢性実験による評価

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 大阪大学大阪大学大学院医学系研究科眼科学 大学院生

研究要旨

昨年度までに、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、網膜への侵襲を極力回避しながらも、網膜を電気刺激する方法「脈絡膜上一経網膜刺激法」を考案した。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、また閾低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経度であった。強膜内にのみ切開をおき、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は、昨年度有色家兎の急性実験にて報告した。本年度はさらなる臨床応用を目指すために、有色家兎を用いた慢性埋め込み実験にて、この方法の有効性を評価した。またこの手術法の安全性についても確認した。その結果、強膜内に慢性的に電極を埋め込んだ後、3週間までは誘発電位が維持され、本方式は、慢性実験においても有効性であることが確かめられた。

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。

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。さらに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、有色家兎を使用して手術法の開発

を行い、この方法で行った脈絡膜上一経網膜刺激法の有効性を検討してきた。

今回我々は慢性的に、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、また記録が減衰せずに得られるかを有色家兎を用いて検討した。

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。(n=5)
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。さらに長時間の麻酔が必要な場合はスタドール (0.1ml/kg i.m.) を追加して使用した。

また実験後は高容量のネンプタール (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」

刺激電極はユニークメディカル社製シリコーン包埋型白金線電極を用いた。(φ 100 μm) (図 1)

参照電極には直径 200 μm の白金線を直径 0.5 mm のシリコンチューブに通したものを使用した。

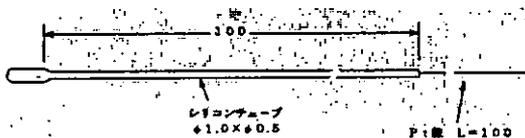


図 1: 刺激電極の仕様

「記録電極」

記録電極、参照電極にはステンレス製ねじ (φ 1.5 x 4 mm) を使用した。

「記録電極埋め込み手術手技」

家兎の頭頂部の毛をバリカンで刈り取り、感染防止のためイソジンにて消毒後、頭皮を正中線で約 5 cm 切開する。骨膜をむき、頭蓋縫合線が見えるようにして、ラムダとブレグマを確認する。ラムダより 8 mm 前方、7 mm 側方の視覚野上にねじ電極を埋め込み、記録電極とし、ブレグマに参照電

極を埋め込んだ。(図 2)

両電極ともに電線をはんだ付けしてあり、手術終了後に頭皮上に電線が誘導できるようにした。さらに漏電を防ぐために、レジンにて電極周囲を固定した。(図 3)

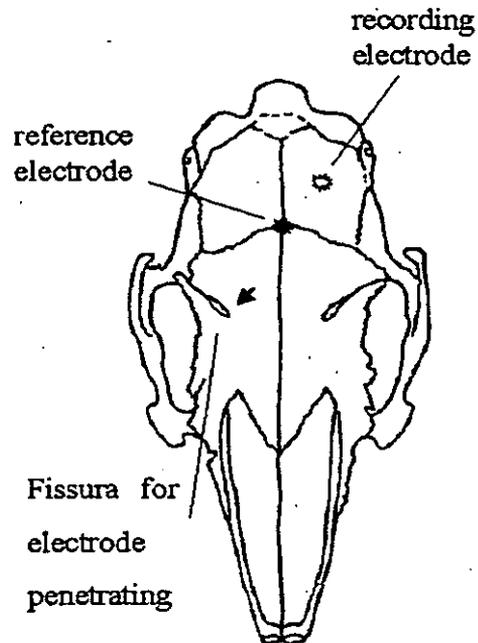


図 2: 解剖図

「刺激電極埋め込み手術手技」

まず兎眼球を脱臼させ、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。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。

電極を半層切開層に挿入し、埋め込みに際して外れないように、数箇所にて 5-0 ダクロン糸にて固定した。参照電極は白金線を先端 2 mm のみ露出したものを使用し、角膜実質内に挿入して、これも外れないように数箇所にて固定した。

これらの手技が終了したのちに、頭皮側から眼球後部結膜にむけてトンネルを掘り、その中を刺激電極、参照電極の対側を頭蓋上にむけて誘導した。さらに、両極とも電線とはんだ付けして頭皮上に誘導した。最後に記録電極と同じようにレジンにて固定した。(図3)

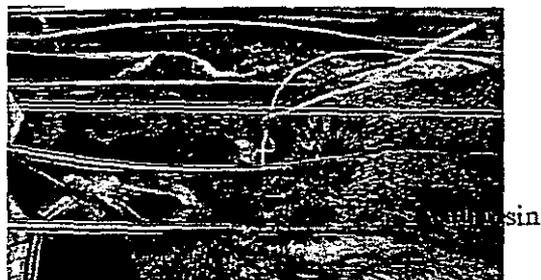


図 3：電線の設置位置

「電気生理学的記録方法」

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5 Hzから1 kHzのバンドパスフィルタを施した。得られた波形は3.4 kHz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」

毎回EEP実験前には、兎の脳皮質の状態が良いか、また記録の減衰が無いかを確認するために、視覚誘発電位(VEP)を測定した。眼球から15 cmの距離で、1.2 J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SEN7203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。

no.1兎には刺激幅0.5 msecの monophasic pulse を流し、no.2~5兎には biphasic pulse を使用した(1 Hz)。記録電極から 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最小の電流値(閾値)を求めた。

なお今回の実験ではすべて兎で覚醒下にて記録が行われた。

「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。グルター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エポキシ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

「VEPの記録」

no.5より得られたVEP波形を図4に示す。日数経過による記録の減衰はみられない。また潜時、振幅も安定していた。

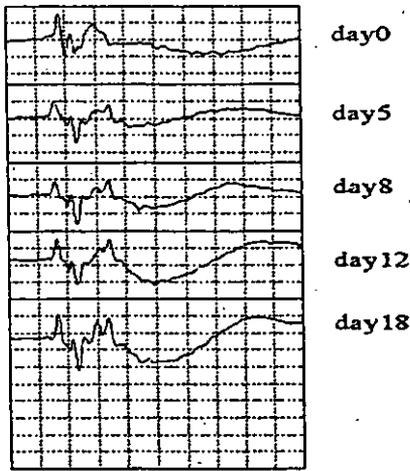
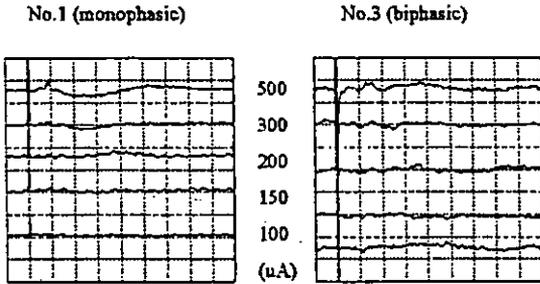


図 4: VEPの記録

(一目盛り; 横軸30ms、縦軸100 μ V)

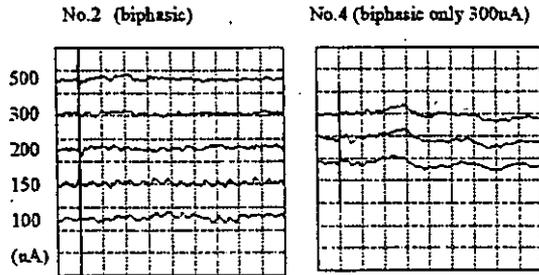
「EEPの記録」

1. 1週目の記録 (no.1 VS no.3)



(一目盛り; 横軸30ms、縦軸50 μ V)
monophasic, biphasicともに記録が可能であった。

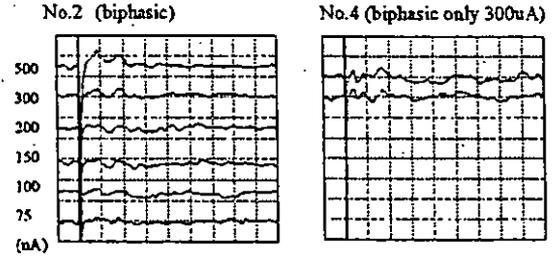
2. 2週目の記録 (no.2 VS no.4)



(一目盛り; 横軸30ms、縦軸50 μ V)
biphasic pulse によって得られる覚醒時の

EEP波形は小さいが、確かに得られた。

3. 3週目の記録 (no.2 VS no.4)

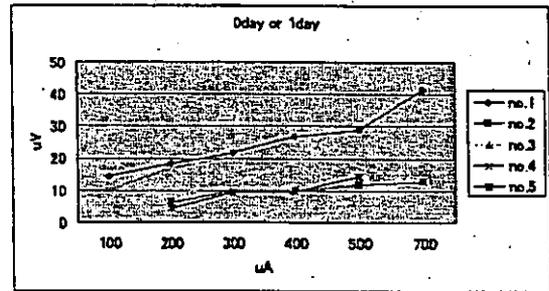


(一目盛り; 横軸30ms、縦軸50 μ V)

3週間を越えると、逆に記録が安定する。今回はno.4においては2ヶ月間の長期記録を達成することができた。

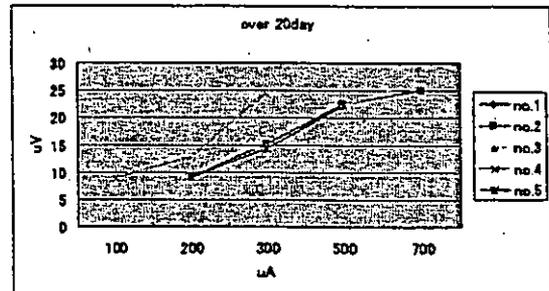
4. 結果のグラフ

①埋め込み当日または翌日のEEP反応



monophasic pulse におけるEEP反応の大きさは電流値に比例した。biphasic pulse においても緩やかに比例していた。

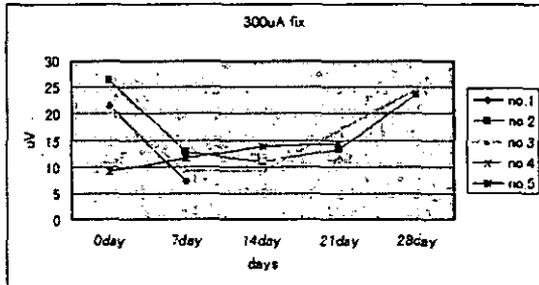
②20日以上経過時のEEP反応



no.2-5のすべての兎で、20日以上たって

いても EEP 反応の大きさは電流値に比例した。

③ 300 μ A 固定 EEP 反応の経時変化



3週間以上たつと埋め込み当時の反応の大きさに戻り、安定する個体が多かった。

「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、monophasic pulse は網膜構造に変化を及ぼしたが、biphasic pulse においては網膜損傷はほとんど見られず、千回単位の刺激回数であれば、刺激強度が 500 μ A 以下では、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5)

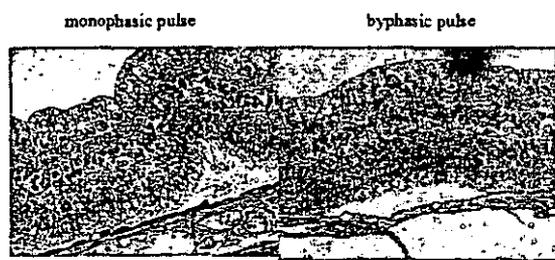


図 5：組織図

D. 考察

昨年我々が報告した通り、強膜側からの刺激は、眼内刺激より必要な電流量が大きくなってしまわないか？という問いに

対して、やや眼内型よりは高いものの、組織安全性を考えると、より有利であるという回答ができる。よって我々は、今回その技術をさらに発展させて、慢性埋め込み実験を行い、刺激側：有効刺激投与の可否、反応側：網膜反応性の変化および組織障害の有無、記録側：記録電極の劣化の有無、について調べてみた。

まずは術式につき考察する。埋め込み用に、フレキシブルな刺激電極および角膜電極を開発し、それを外れないように眼球に固定した。これは 5-0 ダクロンを使用した縫合本数を増やすのみで、昨年と同じ手技にて問題なかった。

次に今回の実験において一番問題となったのが、眼球後部結膜から頭蓋上に電極線を引き抜く手技であるが、これは兎の頭蓋骨にちょうど血管や神経のあまり豊富でない間隙があり、そこにセッシを挿入して、頭蓋側から電極線を迎えに行くことで解決した。

次に、頭蓋上に引き抜いた電極線と電線をはんだ付けすることで、記録時にいちいち麻酔せずとも、固定器の中に兎を入れ、電線を記録クリップで挟みこむのみで、覚醒時の兎から VEP または EEP を取ることに成功した。

さらに、このはんだ付け部分をレジンにて法埋し、頭蓋上に固定することで、連結部が頭皮で覆われたときに漏電を防ぎ、刺激および記録の減衰を防ぐことができた。

次に刺激側の有効性であるが、3週間を超える刺激をした場合にも、②のグラフに示すように、電流に比例して反応も大きくなっていることより、問題ないを考える。ただし、③の結果に示すように、3週間を超

えると記録が安定することが多いことは、電極の組織への接着性が日数が立って良くなっていることが十分に考えられる。最後に網膜反応性の変化であるが、monophasic pulse にて刺激したときは途中で記録が減衰し、取れなくなったが、これは組織の変化に一致していると考えられる。相補する電流にて刺激を行なう biphasic pulse にて強い電流を流し過ぎなければ、組織ダメージを与えることも少なく、電極の接着さえ問題なければ、的確な刺激に対する反応がえられるものと考えている。

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に刺激電極を使用し、慢性的埋め込み実験を試みた。その結果、20日間を超えても、E E Pを後頭部視覚野上より得ることができた。組織標本から得られた組織障害の少なさを考えると (biphasic pulse 使用時)、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、今後臨床応用においても、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。今後さらに刺激回数を増やして、組織に対する電流の毒性を調べていきたいと考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujikado T, Kuroda T, Maeda N, Ninomiya S, Goto H, Tano Y, Oshika T, Hirohara Y,

Mihashi T. Light Scattering and Optical Aberrations as Objective Parameters to Predict Visual Deterioration in Eyes with Cataracts. J Cat Ref Surg in press

2. Fujikado T, Kuroda T, Maeda N, Kim A, Tano Y, Oshika T, Hirohara Y, Mihashi T.

Wavefront analysis of monocular triptopia in the eye of nuclear cataract. Am J Ophthalmol 2004;137:361-363.

3. Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Arai K, Misaki K, Fukui T, Kobayashi K, Tachikawa M, Imamura M, Nakamura Y, Shimizu T, Murakami T, Sunada Y, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T. Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histogenesis and normal eye development. Hum Mol Genet. 2003;12:1449-1459.

2. 学会発表

1.平成15年4月17-20日

日本眼科学会(福岡)

中内一揚、神田寛行、不二門 尚 他
家兎における網膜刺激型電極による人工視覚：強膜側からの刺激による検討

2. 平成15年5月8日 ARVO (Florida)

Nakauchi K, Kanda H, Fujikado T, et al. Trans-choroidal electrical stimulation in the rabbit eye with multi-channel electrodes.

3. 平成15年5月2日 DOE meeting (Florida) Fujikado T.

Suprachoroidal-Transretinal Stimulation Effectively Elicits Localized Evoked Potential in RCS Rats.

4. 平成15年11月14日 AAO meeting Retinal Subspeciality day (Anaheim)

Fujikado T

Artificial Vision Update - The Japan Experience

5. 平成15年10月5日 JRPS (日本網膜色素変性協会) 講演会 (大阪)

不二門 尚;

6. 平成16年2月1日、日本眼科手術学会 (東京)

不二門尚、人工視覚研究-日本人の現状

7. 平成16年2月1日 市民公開講座
実用化間近い人工視覚 (東京) 不二門尚
・医学サイドからみた人工網膜の展望・

G. 知的所有権の取得状況

特になし

網膜刺激電極の視覚中枢における機能評価の研究（2）

—ネコ視覚中枢における網膜多点刺激電極の機能評価

分担研究者 不二門尚 大阪大学医学系研究科感覚機能形成学 教授

研究協力者 神田寛行 大阪大学医学系研究科感覚機能形成学 受託研究員

研究要旨

我々がこれまで報告してきた「上脈絡膜—経網膜電気刺激（Suprachoroidal-transretinal stimulation: STS）」について、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神経細胞活動を用いて機能評価を行った。STSにより強膜刺激電極直下の網膜部位から投射を受けている細胞から、最も強い興奮が得られた。刺激閾値の分布から、STSによる網膜興奮の広がりには電流値が低いほど狭くなり、150 μ Aの強度でネコの視野角1~2.5度の範囲に局限した。このことから、STSは「30 cm 指数弁程度の視力」実現に必要な程度の空間分解能を有することが示唆された。

A. 研究目的

人工視覚システム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失明患者の視覚を人工的に蘇らせることを目的とした人工臓器である。現在有効な治療法のない網膜色素変性症患者または加齢黄斑変性症患者に対して有効な治療法になるものと期待されており、各国で精力的に研究開発が進められている[1]-[5]。

人工視覚システムにおける網膜刺激法としては、直接網膜に電極を接触させる Epi-retinal implant[2]-[4]と Sub-retinal implant[5]がこれまで主に検討されてきた。それに対し我々は、一対の刺激電極を強膜側と硝子体側にそれぞれ設置することで、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—経網膜電気刺激法（Suprachoroidal-transretinal stimulation: STS）」を考案し、ラット視覚系を用いて機能評価を行い、その有効性を報告した[6]。

この刺激方法では、刺激電極が網膜に直接接触していないため、網膜に対し局限した興奮を惹起できるかどうか懸念される。この STS 法をネコの視覚系を用いた電気生理学的実験で機能評価を行うのが本研究の目的である。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。さらに視覚中枢の解析がネコにおいて最も進んでいることから、人工視覚システムにおける視覚中枢の反応解析には最適な動物の一つである

と考えられる。今回は神経節細胞の軸索投射先である外側膝状体背側核(dLGN)の中継細胞の単一神経活動を記録し、特に網膜上において、視覚皮質へ情報を伝える近接した刺激個所の弁別が可能かどうか評価した。

B. 研究方法

[全般]

実験動物には、成ネコ（米国短毛種）を用いた。実験は全て大阪大学医学部の動物実験に関する規定に従って行い、実験動物に与える苦痛を最小限に留めるように留意した。術中および電気生理学的記録中、ペントバルビタール（1-2mg/kg, hr）とバンクロニウム（0.2 mg/kg, hr）を経静脈的に持続注入して麻酔を行い、笑気と酸素の混合気（1:1）で人工呼吸を行った。動物の体温は保温マットにより 37 度に保った。心電図、呼気ガス分析装置およびスピロメータなどで動物の状態を持続的に監視した。実験中は動物の頭部を定位固定台に固定した。眼球には、散瞳剤（ミドリン P、ネオシネジン、硫酸アトロピン 0.5%）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]

dLGN の中継細胞から単一ニューロン活動の記録するために、インピーダンス 1-3 M Ω のガラス封入タングステン電極（ニューロサイエンス社）を、左 dLGN の A1 層に定位的に刺入した。

記録電極より単極誘導された神経活動を増幅し (Model 1800 Microelectrode AC Amplifier, A-M Systems, Inc.) で増幅し(増幅率1万倍、バンドパスフィルター300Hz-5kHz)、シグナルプロセッサ(1401 plus, Cambridge Electronic Design社)を用いて記録解析を行った。視神経交叉に刺激電極を設置し、その刺激に対する順行性応答潜時から、記録したニューロンのタイプがY型かX型かを決定した。また、眼前114 cmの位置に建てたスクリーン上に、記録された各々のニューロンの光刺激に対する受容野を決定した。

[網膜刺激]

網膜電気刺激用に左側眼球後部の後極付近を露出し、網膜中心野から耳側に1~2 mm付近に相当する強膜を半層切除することによって、約9 mm² (3mm×3mm)の開窓部を作成した。開窓部に9極型白金多点電極アレイ(図1参照、ユニークメディカル製)を密着させた。この多点電極は直径100 μmの電極9つで構成されている。今回は極間距離が0.3 mmのものと0.5 mmの二種類を用いた。基準電極として先端2 mmを露出させた直径200 μmの絶縁コート白金線を硝子体内に刺入した。電極アレイから一極の電極を選択し基準電極との間に刺激パルスを通電することによって網膜を局所的に刺激した。

シグナルプロセッサ(1401 plus, Cambridge Electronic Design社)によって出力電圧コマンドを作成して刺激パルスを生成し、リニアアイソレータ(Isolator A395R, WPI社)介して定電流通電を行った。今回の実験においては、パルス幅各500 μsの両極性パルス刺激を使用した。

眼内に光を導入すれば受容野を記録したスクリーン上に網膜血管像を投影することが可能である。さらに実験後、網膜を顕微鏡下で組織学的に観察することによって、網膜血管と電極アレイ設置部位との位置関係を同定した。組織像とスクリーン上の投影像を重ね合わせることにより、電極位置と受容野との位置関係を把握した。

[データ解析]

神経活動解析ソフト(Spike2, Cambridge Electronic Design社)を使用しデータ解析を行った。Spike2付属の主成分分析機能を用いて記録波形中から特定の神経細胞の活動を選択して抽出した。網膜刺激の各電流値に対して、約一秒間隔で40回の電気刺激を連続して加えた時の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

発火確率を発生させる電流値を刺激閾値として算出した(結果の項で後述)。

[組織学]

多点電極アレイの設置されていた部位が網膜上のどこに対応しているのかを調べるため、組織学的に強膜電極の設置部位を調べた。実験終了後、電極アレイの4個の電極にそれぞれ1 mAの直流電流を15秒間ずつ流すことによって強膜の電極設置部位に跡をつけた。眼球を摘出後、電極跡の部分から垂直に針を刺入し網膜に小さな傷を作成した。眼球ごとホルマリン中で2時間固定した後、網膜全伸展標本を作製し電極部位を示す傷跡と網膜血管を光学顕微鏡下でスケッチした。

C. 結果

[STSによるdLGN中継細胞の活動電位]

今回の実験では組織損傷を最低限に抑える目的で刺激として、極性の異なる2つのパルスで構成された両極性パルス(biphasic pulse)を使用した。硝子体内の基準電極から強膜上の電極アレイへの電流パルス(outward current)を先に、それに続いて電極アレイから基準電極への電流パルス(inward current)で構成されたbiphasic pulseを便宜上outward-first biphasic pulseと呼ぶこととする(逆の順番の極性のものをinward-first biphasic pulseとする)。

まずoutward-first biphasic pulseを網膜に与えて同側dLGNのA1層の中継細胞から活動電位を測定した(図2-a)。この例では、記録していた細胞が持つ受容野の位置と電極アレイの投影部位が近接している、即ち、刺激部位が記録部位と神経的に対応があったと考えられる。網膜刺激後5-7 msecに活動電位が現れ(図2-a、▼で示した部位)、30 ms以降にも周期的な活動電位応答が得られた。この30 ms以降の周期応答は起こる場合と起こらない場合とがあり、受容野から離れても発生するため、刺激部位直下の神経回路を直接興奮させたことに由来する応答ではないと考えられる。これに対し、5-7 msec付近の活動電位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ため、この活動電位に着目して評価を行った。図2-bの▼が指し示すこの活動電位は、刺激電流値を下げていくと潜時はほぼ一定のまま消失した。この活動電位の刺激閾値を測定するために、同じ刺激を40回繰り返して、活動電位の出現回数を数えて発火確率を算出した。これを電流強度ごとにプロットしたのが図2-cである。刺激強度を下げていくと出現確率はある強度付近で急激

に下がった。前述したように本実験においては、出現確率が 50% を切った時の刺激強度を刺激閾値として定義した。この例の場合、刺激閾値は 105 μA となる。この様にして、各々の単一ニューロン活動に対して刺激場所毎に刺激閾値を測定した。

さらに、outward-first と inward-first とでどちらの刺激極性が効果的か、各々の刺激によって生じる活動電位の比較を行った (図 3 参照 a: outward-first, b: inward-first)。図 3-a に示されるように outward-first biphasic pulse では潜時の揃った活動電位がほぼ毎回の刺激に対して現れた。outward-first の極性の方が刺激に対する発火確率は高く、刺激閾値も低い傾向にあった。そのため、以降の実験においては outward-first biphasic pulse を用いて実験を行った。

[刺激電極位置と興奮部位の対応関係]

強膜上の刺激電極の位置と網膜上で最も興奮する部位にどのような関係があるのかを調べるために、組織学的に調べた刺激電極部位に、スクリーン上の各細胞の受容野の位置を重ね合わせた。記録した神経細胞の中で、最も電極アレイから近い位置に受容野を持っていた一例について、その神経応答の結果を図 4 に示す。

記録した中継細胞の受容野の網膜上での位置を○印で示した。それに対し 9 極の電極それぞれの網膜上での位置を番号にて示した。それぞれの刺激電極で別々に 200 μA の強度で網膜を刺激し、電極ごとの神経応答のヒストグラムを図 4 に示した。7 番の電極が受容野と最も近接しており、受容野中心から約 1.5 度の距離にあった。この 7 番の電極で刺激したとき最も発火頻度が高かった。7 番の電極から 0.5mm だけ離れた 4 番や 8 番の電極で刺激すると発火頻度が減少した。さらに 2 番や 3 番などの受容野からはなれた電極で刺激するとスパイク応答が消失した。このことから、STS による興奮部位は強膜電極の直下に限局して存在していることがわかる。刺激部位が 0.5mm 変わるだけで発火率が減少したことを考えるとこの神経細胞に対して 200 μA の刺激を行った場合、少なくとも網膜上の 0.5 mm の電極間隔を弁別可能であることが分かった。

[限局性]

次に、記録した 4 個の神経細胞について刺激閾値と刺激電極—受容野中心間の距離との関係を求めた(図 5)。その結果、刺激電極と受容野中心との距離が小さくなるにつれ刺激閾値が下がっていくことがわかった。刺激強度が 400 μA の時

は刺激電極から 5~7 度の範囲の網膜神経節細胞が興奮するが、電流値を下げるるとともに興奮の範囲は急激に狭まり、刺激強度を 150 μA に設定した場合、およそ視野角 1 度か 2 度程度の範囲に興奮が限局する傾向にあった。

D. 考察

空間分解能を評価する項目の一つとして刺激による網膜興奮の限局度が挙げられる。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限局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、ネコの視覚系を用いて興奮の広がりを検討した。前年度の報告書中でも述べたが、興奮の広がりを調べるために今回の測定には受容野の中心と刺激電極の距離の計測を行うという方法を用いた。この手法には、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 4)受容野と刺激電極との位置関係を組織的に把握する際に測定誤差が生じること、などのマイナス面はあるものの、それらを考慮しても視野角 0.5 度程度の評価が充分可能であり、技術的に最も精度の高い方法の一つであると考えられる。

網膜刺激には今回の実験より biphasic pulse を使用した。電気生理学的に刺激メカニズムをする際には monophasic pulse の方が考察をしやすいのであるものの、biphasic pulse のほうが組織損傷を最小限に抑えることができるというメリットがあるため、STS の臨床応用を考えた場合には biphasic pulse が網膜刺激方法として適していると考えられる。

実験にあたり、刺激極性を決める必要があった。結果に示すように outward-first biphasic pulse のほうが inward-first biphasic pulse よりも刺激効率が高かった。以前、ラットにおいて monophasic pulse を用いて STS の機能評価をした際、inward current のほうが outward current に比べて著しく興奮性が高かった[6]。このことから、おそらく biphasic pulse においてもそのなかの inward current によって興奮が生じたのではないかと考えられる。また outward-first biphasic pulse の刺激効率が高くなったのは、inward current の前に outward current をもってくることにより outward current の抑制効果を少なくなったからではないかと推測できる。しかしこれら刺激メカニズムについてはまだ不明な点

も多いため今後の検証が必要となる。現段階で得られているデータから、outward-firstの極性のほうで刺激効率が高い傾向にあるため、今回はoutward-first biphasic pulseを用いて空間分解能の評価実験を行うことにした。

まず、0.5 mmの電極間距離で9極の電極が配置されている電極アレイを用いて、異なる個所を200 μ Aの強度で別々に刺激しそれに対する応答を一つの中継細胞から記録をした。その結果、図4に示す通り、受容野に対応する部位をSTSで局所刺激すると他の部位の刺激よりも低い閾値で神経細胞の活動電位が出現することがわかった(図4)。このことから、STSによる刺激はretinotopyが保たれた状態で光覚が知覚されるものと推測できる。また、刺激場所が0.5mm異なるだけで反応が異なった(図4電極7と電極4)ことから、この例の神経細胞に関しては刺激電流を200 μ Aに設定した場合、少なくとも網膜上の0.5mm(ネコの視野角で約2~2.5度に相当、ヒトでは約1.7度に相当)電極間隔を弁別可能であると言える。

さらに、詳細に網膜の興奮の限局度を調べるために、現段階で得られている4個の神経細胞について、刺激電極・受容野間距離と刺激閾値の関係についてグラフをまとめた(図5)。まだデータ数が少ないが、このグラフからは、電流強度を下げていくことにより網膜上の興奮は限局していき150 μ Aの刺激ではネコの視野角で1~2.5度の範囲(ネコの網膜上で0.2~0.5 mmに相当:本実験データから算出)に限局する傾向にあることが読みとれる。

人工視覚における限局性について報告した論文は少ないが、その中でSchanzeら[4]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。一方STSではまだデータ数は少ないものの、STSの限局性が、Epi-retinal刺激の限局度に遜色のない程度まで近づくことが期待できる。

本プロジェクトにおいては「30 cm指数弁程度の視力を回復させること」が一つの目標となっている。指数弁検査における検者の指の間隔を約2 cm(視野角3.8度に相当、網膜上1.1mmの距離に相当[7])と仮定すると、ヒトの網膜上では1.1mm離れた二点弁別と置き換えることができる。動物種の違いを考慮したとしても、今回の実験では少なくともネコ網膜で0.2~0.5 mmの範囲に興奮が限局すると考えられるため、1.1mm間隔の二点弁別は可能と考えられる。このことからおそらくSTSは「30 cm指数弁程度の視力」を実現するのに必要な分解能を有することが期待できる。

E. 結論

今回、ネコを用いたin vivo実験において、多点電極を用いたSTSの機能評価を行った。その結果STSにより刺激電極直下の細胞が興奮し、刺激電流値を低くすることによって刺激興奮が視野角1~2.5度まで限局することがわかった。よってSTSではある程度の空間分解能が期待できる。

現段階ではまだデータ数が少ないため、今後も引き続き同様の実験を継続する予定である。さらに、多点電極から同時に複数箇所を刺激した際の時空間的特性も評価していくことが必要である。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanda H, Morimoto T, Fujikado T, Tano Y, Fukuda Y, Sawai H. "Electrophysiological studies of the feasibility of suprachoroidal-transretinal stimulation for artificial vision in normal and RCS rats" Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004 Feb Vol.45 No.2 pp560-566.

澤井元、神田寛行、森本壮、三好智満、不二門尚、福田淳「人工視覚システムによる視覚機能の再生:網膜・皮質埋植装置の現状と課題」脳21 2003 Vol.6 No.4 pp74-80.

2. 学会発表

Kanda, H., Sawai, H., Morimoto, T., Fujikado, T., Tano, Y. and Fukuda, Y. "Study of Suprachoroidal-Transretinal Stimulation for artificial vision in normal and RCS rats" 41st ISCEV (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision) symposium, April 4th, 2003, Nagoya, Japan

H. Kanda, H. Sawai, T. Morimoto, T. Fujikado, Y. Tano, Y. Fukuda "Suprachoroidal-Transretinal Stimulation (STS) Can Elicit Localized Evoked Responses From the Superior Colliculus in Normal and RCS Rats" 2003 ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting, May 8th, 2003, Fort Lauderdale, Florida, U.S.A

H. 知的財産権の出願・登録状況