

[参考文献]

- [1] Zrenner E. Will retinal implants restore vision? Science. 2002;295:1022-1025.
- [2] Hesse L, Schanze T, Wilms M, Eger M. Implantation of retina stimulation electrodes and recording of electrical stimulation responses in the visual cortex of the cat. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol. 2000;238:840-845.
- [3] Walter P, Heimann K. Evoked cortical potentials after electrical stimulation of the inner retina in rabbits. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol. 2000;238:315-318.
- [4] Schanze T, Wilms M, Eger M, Hesse L, Eckhorn R. Activation zones in cat visual cortex evoked by electrical retina stimulation. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol. 2002;240:947-954.
- [5] Chow AY, Chow VY. Subretinal electrical stimulation of the rabbit retina. Neurosci Lett. 1997;225:13-16.
- [6] 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; 45(2): 560-566.
- [7] Oyster CW. Ocular Geometry and Topography. The Human Eye: Structure and Function. Sunderland MA: Sinauer Associates, Inc., 1999:77-109.

図の説明

図 1

多点電極アレイの拡大図。9極の白金電極が格子状に並んでいる。写真の電極は電極間距離が 0.5mm のもの。電極径は 100 μ m。基盤はシリコン樹脂で作られている。スケールバー: 1 mm

図 2

(a) STS によって生じた LGN の中継細胞の活動電位。ES stim の位置で 500 μ A, 500 μ s の outward-first biphasic pulse を与えると、毎回 5-7 msec の潜時で活動電位 (▼) が発生した。(b) 刺激強度変化に対する活動電位の発火頻度の変化。刺激を 40 回繰り返し、活動電位が現れた位置をラスタとヒストグラムによって示した。刺激電流を下げていくと活動電位は潜時が一定のままで消失した。スケール: 10 ms。(c) 刺激電流に対するスパイク応答の出現率。電流値を下げると出現率が急激に下がった。刺激閾値を出現率 50 % に相当する刺激強度として内挿によって求めると、この例では 105 μ A であった。

図 3

刺激極性による反応性の違い。(a) Outward-first biphasic pulse と (b) Inward-first biphasic pulse に対する活動電位の生波形、ラスタ表示、ヒストグラム。同強度 (200 μ A) の刺激に対し Outward-first biphasic pulse では毎回同じ潜時 (5-7 ms) で反応が現れるが (a)、極性を反転させるとその反応は消失した。

図 4

各刺激部位におけるスパイク応答。網膜伸展標本中の網膜血管構造のスケッチ図、とスクリーン上に投影した中継細胞の受容野および網膜血管構造を重ね合わせることにより、網膜電気刺激部位 (図中の数字部分) と受容野位置 (○) の位置関係を表している。受容野に近い部位ある電極⑦で刺激した場合には高い出現率でスパイク活動が現れた。刺激部位が受容野から離れるにつれ、スパイク活動は消失した。刺激電流は 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を異なる4つの神経細胞についてまとめた。それぞれの神経細胞の細胞種は T7U1: On-Y cell, T12U1: On-X cell, T11U2: Off-Y cell, O113T2U1: On-Y cellであった。O113T2U1のみ電極間距離 0.5 mm の電極アレイを使用し、それ以外は 1 mm の電極間距離の電極アレイを使用した。刺激電極と受容野中心との距離が小さくなるにつれ閾値が下がっていきることがわかる。

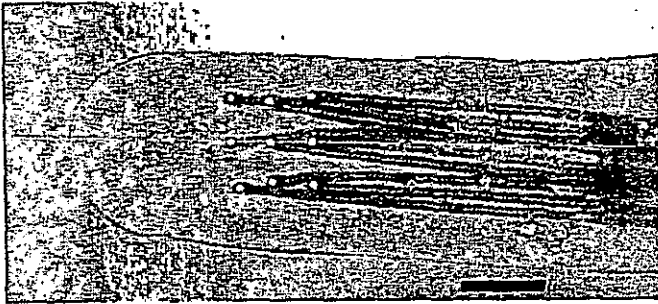


図 1

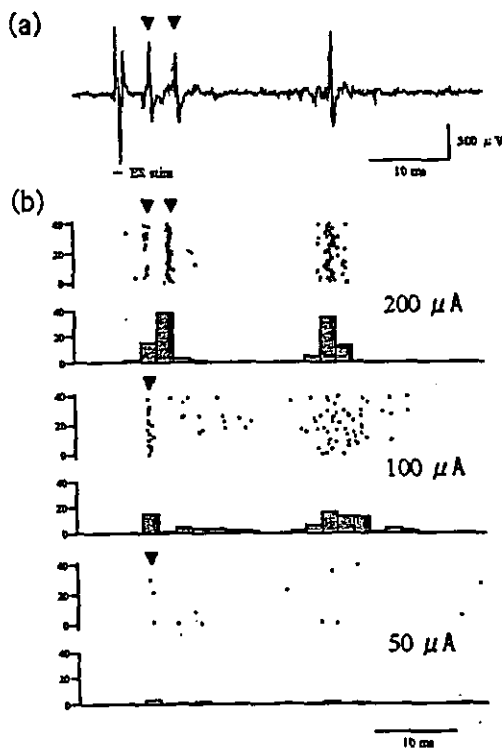
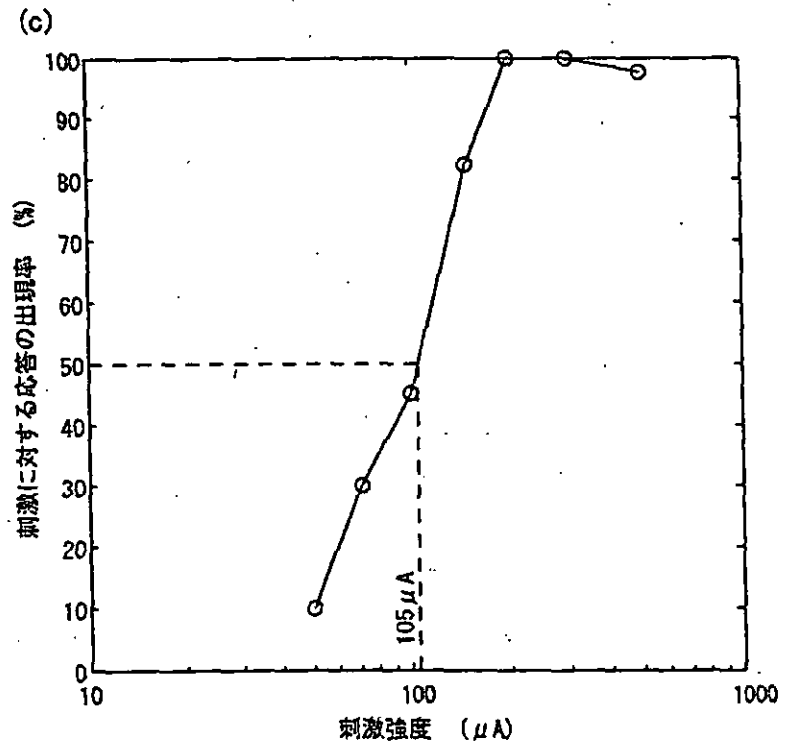


図 2



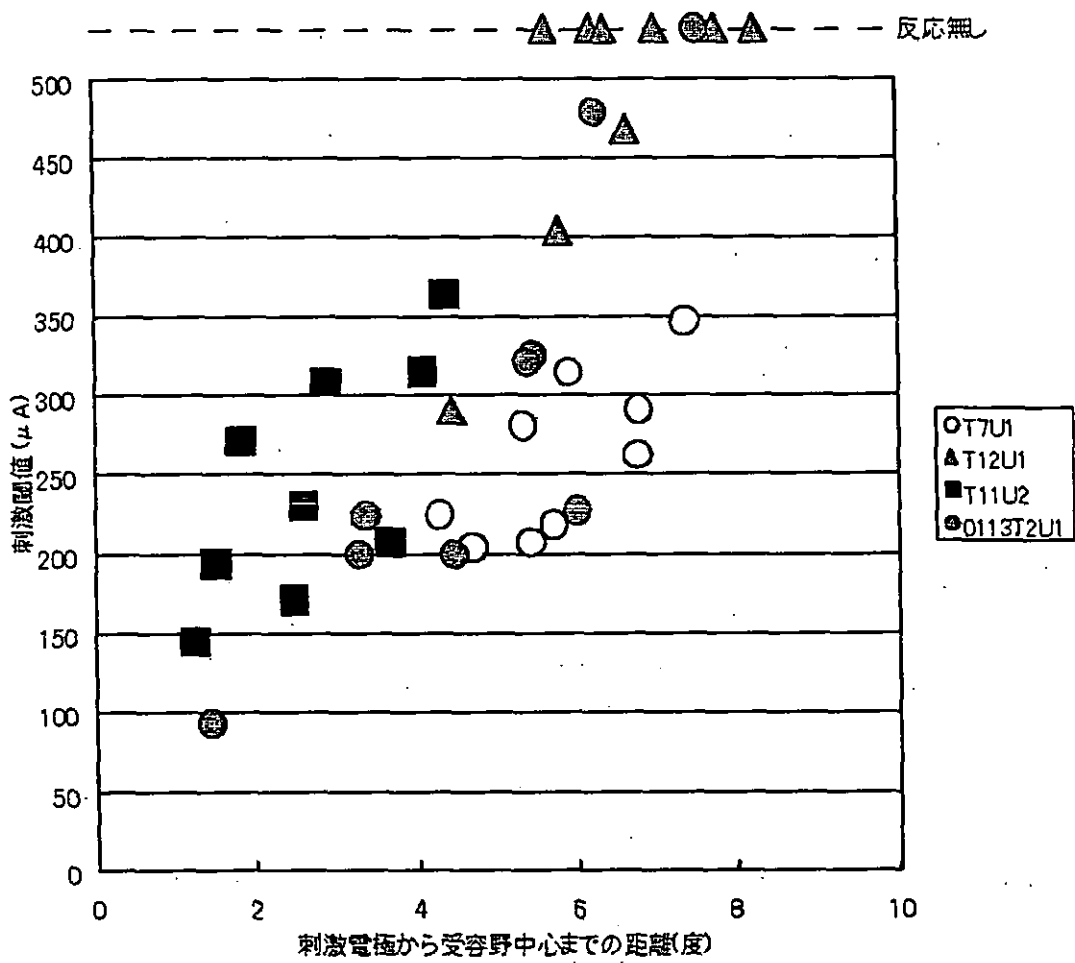


図 5

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）
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（3）

経角膜電気刺激を用いた遺伝性網膜変性症患者の残存網膜内層機能の評価方法の開発

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 森本 壮 大阪大学大学院医学系研究科感覚機能形成学 大学院生）

研究要旨

経角膜電気刺激を用いた遺伝性網膜変性症患者の網膜内層機能の評価方法を開発するため、健常者と遺伝性網膜変性症患者に経角膜電気刺激を行い、電気刺激によって起こる擬似光覚(ホスフェン)の特性と縮瞳反応について検討した。健常者では、弱い電流強度で周辺部視野にホスフェンを感じ、電流強度を上げていくと視野の周辺部から中央付近にまでホスフェンが広がりまた明るさも増した。さらに、電流強度を上げるとより明るく大きなホスフェンが感じられ、それとともに縮瞳反応が起こった。電気刺激による縮瞳反応は、電流強度に比例して大きくなる電流強度依存性、電気刺激のある周波数の範囲内で大きくなる周波数特性が見られた。ホスフェンも縮瞳率が大きくなる刺激条件でより明るく大きくなった。遺伝性網膜変性症患者では、最初に感じるホスフェンの電流閾値と中心部までホスフェンが広がる電流閾値の関係から2群に分かれた。この2群は、求心性に視野狭窄が進む患者群と黄斑部の変性から周辺に向かって変性が進行する患者群の2群とほぼ一致したことから、電気刺激検査によって、残存していた視野の付近の網膜内層機能が残存していることが示された。一方、患者の視力と電流閾値の間に有意な相関はみられなかった。同じ視力でも網膜内層機能の変性の程度が違うことが明らかになった。また、健常者、患者ともに電気刺激による縮瞳反応が起こるのは中心部ホスフェンの電流値よりも高かったことから、縮瞳現象は、視野の中央に光覚を感じる直接の指標ではないものの、間接的な指標になりうると考えられた。以上のように、電気刺激検査と縮瞳反応の測定は、これまでの眼科的検査では、評価ができない網膜内層機能を評価するために有用な検査である。

A. 研究目的

網膜刺激型の人工網膜チップが実際に開発され、臨床応用が可能になった場合、適応患者をどのように選択すべきかということが重要な問題となる。なぜなら、網膜刺激型人工網膜チップは、網膜内層

機能とくに脳の視覚中枢とつながっている網膜神経節細胞(RGC)を興奮させて、患者の視覚を起こすため、RGCが数多く生存し、また機能していないと人工網膜チップを移植しても、視覚を甦らせることができない。そのため、RGCが網膜の

どの辺りに生存し、機能しているのかを
検査する方法を確立する必要がある。し
かしながら、人工網膜電極の移植の対象
としているのは、ほぼ失明した遺伝性網
膜変性症患者であるため、従来の眼科検
査（視力、視野、網膜電位図など）では、
網膜内層機能を評価することができない。
これまでに、網膜色素変性症患者の角膜
表面にコンタクトレンズ電極をはめて、
電気刺激を行うとホスフェンを感じ、大
脳視覚野から誘発電位が発生することが
報告されている（三宅ら、日眼、1980）
また、縮瞳反応が起こることも報告され
ている（谷野ら、日眼、1981）。

そこで、本分担研究の目的は、この経
角膜電気刺激を用いて網膜色素変性症患
者がどのように光覚を感じ、また光覚と
電気刺激による縮瞳反応がどのような関
係にあるのかを明らかにし、網膜色素変
性症患者の網膜内層機能を評価する新た
な方法を開発することである。

B. 研究方法

1) 対象

本研究を行う前に、事前に研究につい
て説明し、同意の得られた、健常者 8
名と矯正視力 0.03 以下の遺伝性網膜変性
症患者 19 名を対象とした。

2) 経角膜電気刺激

被検者の片眼を点眼麻酔し、角膜保護
剤で角膜表面を覆った後、ピュリアンア
レン電極を眼表面に置いて、電気刺激を
行った。電気刺激の条件は、両相矩形
波パルス（10 mA/phase）20 発で、電流
強度は、50 μ A から 1.5 mA、刺激頻度は

5 から 50 Hz で変化させた。

3) 瞳孔径による瞳孔反応の記録

コンタクトレンズ電極を装着していな
い眼の瞳孔反応を浜松ホトニクス社製
瞳孔解析装置 IRISCODER を用いて、刺
激条件による縮瞳反応の変化を測定した。
得られた結果から以下の式にて、縮瞳率
を求め比較検討した。

$$\frac{\text{刺激前-最大縮瞳時の瞳孔径 (mm)} \times 100 (\%)}{\text{刺激前の瞳孔径 (mm)}}$$

4) 電気刺激によるホスフェンの広がり や大きさについての検討

電気刺激の条件によって、ホスフェン
の明るさや位置、広がりなどがどのよう
に変化するかを調べるため、
以下の項目について検討した。

a) ホスフェンの閾値；何らかのホスフェ
ンを感じる電流閾値、b) 中心ホスフェ
ンの閾値；ホスフェンが中心部まで及び
始める電流閾値、c) 縮瞳の閾値；縮瞳率
が 3% 以上になった最初の電流値とし 3
つの閾値について検討した。

C. 結果

1) 健常者の結果

a) 電流閾値と光覚の変化

すべての健常者が、最初、周辺部視野
にホスフェンを感じた、電流強度を上げ
ると、ホスフェンが視野の中央部まで広
がっていき、明るさも増していった。さ
らに電流強度を上げていくと縮瞳反応が
起こった。それぞれの電流閾値の平均値
は、最初のホスフェンの閾値；65.5 \pm 23
 μ A、ホスフェンが中央部におよび始める

閾値； $109 \pm 27 \mu\text{A}$ 、縮瞳反応が起こり始める閾値； $138 \pm 35 \mu\text{A}$ (mean \pm SD) であった (図1)。

b) 電気刺激の刺激条件による瞳孔反応の変化

刺激頻度を 20Hz にして、電流強度を変化させた場合、瞳孔反応は、電流強度に比例して大きくなった。また、ホスフェンも電流強度を上げていくと大きく明るくなった。

電流強度を一定にして、刺激頻度を変化させた結果を図2に示す。15Hz から 30Hz の刺激頻度では、縮瞳反応が大きくなった。同様にホスフェンの大きさや明るさも縮瞳率が大きくなる周波数帯で大きくなった。

c) 網膜変性症患者の結果

ホスフェンと中心部ホスフェンの電流閾値の関係を図3に示す。結果、図のように A、B 2つのグループに分かれた。A 群は、2例を除き、周辺部網膜から求心性に変性が進む患者群であり、B 群は、すべて黄斑部網膜から変性が始まり、周辺部網膜へ変性が進む患者群であり、電気刺激検査の結果と変性の進み方がほぼ一致した。一方、視力と電気刺激検査の結果は、相関がみられず、同じ視力でも変性の進み具合が異なっていることが示唆された。また、縮瞳反応を起こす閾値とホスフェンの閾値について、視野欠損の進行の違いによって分けたグラフを図4に示す。周辺部から視野の感度が低下し、中心視野が最後まで残るタイプを中心視野残存型とし、逆に黄斑部の変性から始

まり周辺視野が最後まで残るタイプを周辺視野残存型として 2 群に分類した。周辺視野型は、ホスフェンの閾値は低く、中心ホスフェンは高かった。一方中心視野型は、ホスフェンと中心部ホスフェンの閾値がほぼ等しかった。両群ともに縮瞳のホスフェンは、中心部ホスフェンの閾値よりも高く、値の大きさは違うものの健常者と同じ傾向を示した。

D. 考察

1) 健常者のホスフェンと瞳孔反応について

すべての健常者が弱い電流値で周辺部視野にホスフェンを感じ、電流値を上げていくとホスフェンが視野の中央部にまで及びまた明るさを増した。縮瞳反応は、中心ホスフェンの閾値よりも高い電流値で起こった。以上のことから、コンタクトレンズ電極では、周辺部網膜のほうが黄斑部網膜より刺激されやすく、電流値を上げていくことによって刺激される網膜部位が広がり、ホスフェンが広く、明るくなり、さらに電流強度が上がると、瞳孔反応に関係する RGC も刺激され、瞳孔反応が起こったと考えられる。

電気刺激による縮瞳反応は、電流強度に比例して大きくなる電流強度依存性、ある刺激周波数の範囲 (15-33Hz) で大きな縮瞳が起こる周波数特性がみられた。ホスフェンの大きさや明るさも、大きな縮瞳が起こる電気刺激では、大きく明るく感じた。これらの結果から、電流強度を上げる (電力量を上げる) とより広い範囲の網膜が刺激され、縮瞳反応が大きく、感じるホスフェンも広く明るくなる

と考えられる。一方、電流強度を一定にした場合（電力量も一定）では、周波数によって縮瞳率、ホスフェンが変化するという事実は、RGCを効率よく刺激するためには、刺激の周波数が重要であることを示している。このことは、限られた電力量で網膜の刺激を行わないといけないう網膜刺激型電極による人工網膜システムにおいて、どの周波数で刺激するかが重要となる。

2) 網膜変性症患者のホスフェン

今回の検討の結果、最初にホスフェンを感じ始める電流閾値と視野の中央部にホスフェンを感じる閾値の関係から、大きく2群に分かれた。この2群は、網膜変性症の2種の変性様式と一致していた。中心視野残存型は、周辺部網膜の変性が非常に進んでおり黄斑部網膜付近の網膜内層しか残っていないことが示唆される。

一方、周辺視野残存型では、周辺部の網膜内層はかなり残存しており、また黄斑部網膜も電流閾値から考えると中心残存型と同じ程度網膜内層の機能が残っていると考えられる。このように視野の低下が早い網膜の部位ほど網膜の内層の変性が進行していることが、電気刺激によるホスフェンの検査によって具体的に明らかになった。

また、視力とホスフェンの閾値とは、相関がなく、同じ視力でも患者それぞれで変性の程度や網膜の変性部位が異なることを、今回の検査によって具体的に見出すことができた。

3) ホスフェンと縮瞳反応の関係

健常者も網膜変性症患者も、視野の中央部に光覚を感じ始める電流強度よりもより高い電流値で縮瞳反応が起こった。また、ホスフェンも縮瞳率が大きくなる電気刺激の条件で大きくなる傾向があった。

縮瞳反応に関与するRGCと黄斑部網膜に分布しているRGCとは異なるため、縮瞳反応は、視野の中央部にホスフェンを感じているという直接の指標にはならない。しかしながら、今回対象とした、健常者および網膜変性症患者では、すべて同じ傾向を示したため、縮瞳反応は、視野の中央部にホスフェンを感じるよりも大きな電気刺激が網膜に行われていることを示す間接的な指標になると考えられる。また、縮瞳率が大きくなる刺激条件でホスフェンの大きさや明るさも増すことから、縮瞳率は、ホスフェンの程度を間接的に示す指標にもなると考えられる。

E. 結論

電気刺激によって起こるホスフェンを用いると、遺伝性網膜変性症患者の網膜内層がどの程度、変性しているのかをある程度評価することが可能である。また、電気刺激によって起こる縮瞳反応は、視野の中央にホスフェンを感じる以上の電流強度の刺激が網膜になされているということの意味し、中心部にホスフェンを感じていることを間接的に示すものである。このように、経角膜電気刺激は、変性が進行し、従来の眼科的検査では評価できない網膜変性症患者の網膜内層の変性の程度を評価するのに有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1.. Sayanagi K, Fujikado T, Onodera T, Tano Y. Chediak-Higashi syndrome with progressive visual loss. Jpn J Ophthalmol. 2003;47:304-306.

2, Ninomiya S, Maeda N, Kuroda T, Fujikado T, Tano Y. Comparison of ocular higher-order aberrations and visual performance between photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis for myopia. Semin Ophthalmol. 2003;18:29-34.

3. 不二門 尚, 新しい人工網膜の可能性 (医学的立場から) 脳 21 2003 Vol.6 No.4 442-448.

4. 不二門 尚, 人工網膜の現況、眼科 2004;46:59-66

2. 学会発表

・第58回臨床眼科学会(名古屋)

2003年11月、福井健寛他

経角膜電気刺激を用いた網膜変性症患者の残存視機能の検査

・第41回日本神経眼科学会(京都)

2003年12月 松下 賢治、不二門 尚、他、経角膜的電気刺激による phosphene 計測の視神経症患者への応用

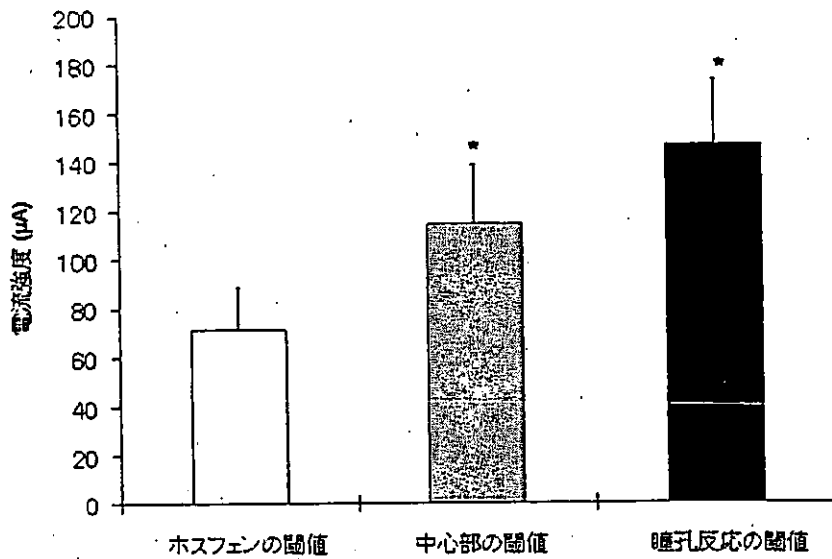
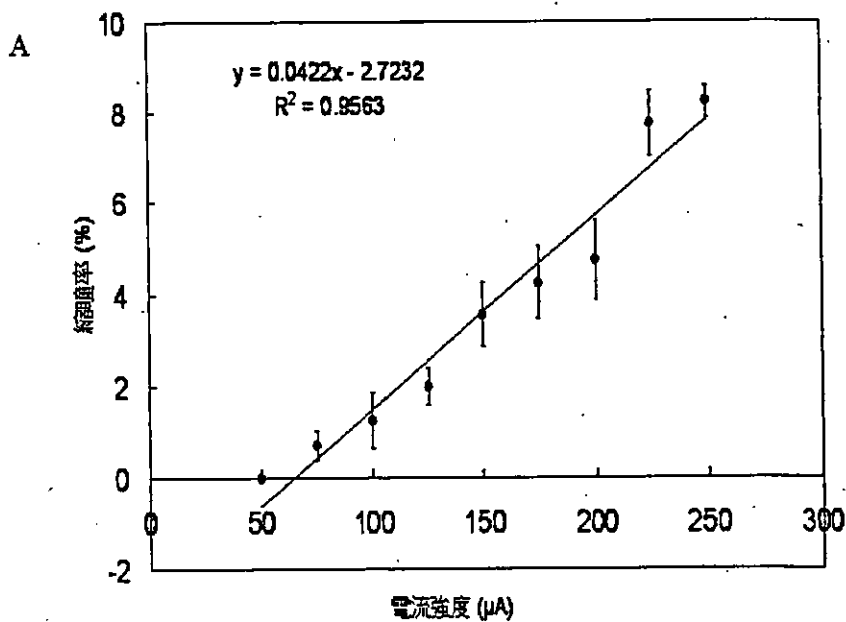


図 1. 健常者のホスフェンの閾値と縮瞳反応の閾値

最初のホスフェンの閾値；65.5 ± 23 μA、ホスフェンが中央部におよび始める閾値；109 ± 27 μA、縮瞳反応が起こり始める閾値；138 ± 35 μA (mean ± SD)、*p<0.05。



B

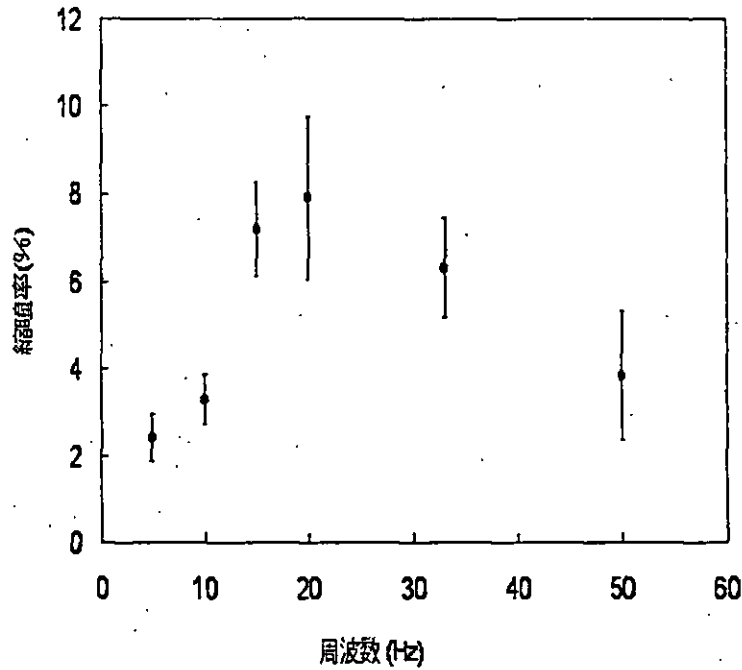


図 2. 電気刺激によって起こる縮腫反応

A. 電流強度依存性。電流強度に比例して縮腫率が大きくなっていった。B. 周波数特性。15Hz から 33Hz の間でのみ縮腫率が高くなっていった。

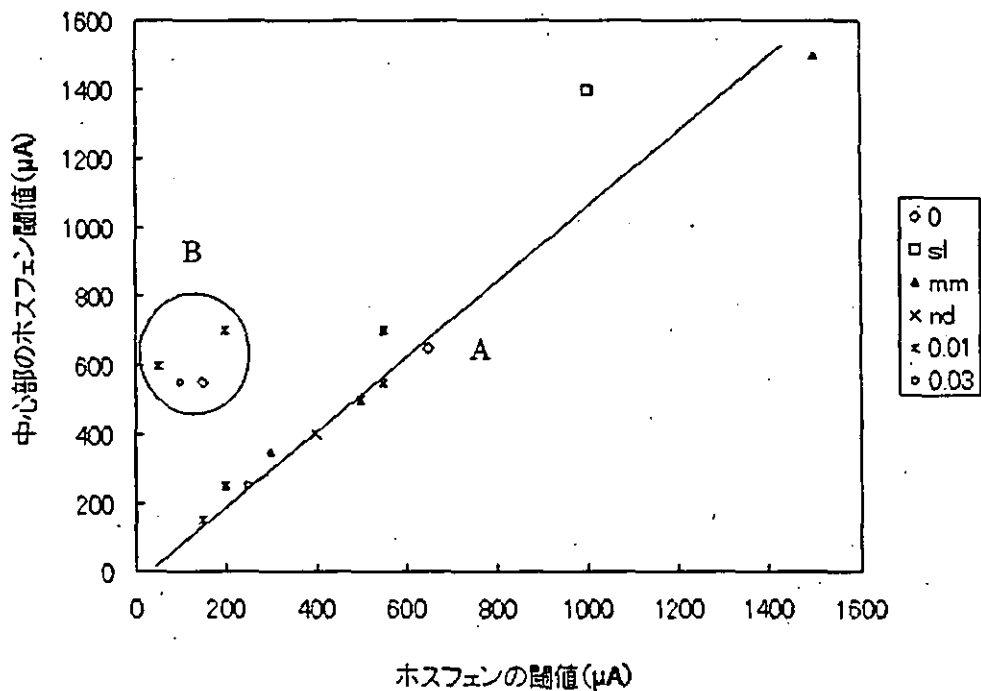


図 3. 網膜変性症患者の視力とホスフェンの閾値の関係

直線に沿って分布する A 群とそれ以外の B 群に分かれた。視力と閾値には相関がみられなかった。

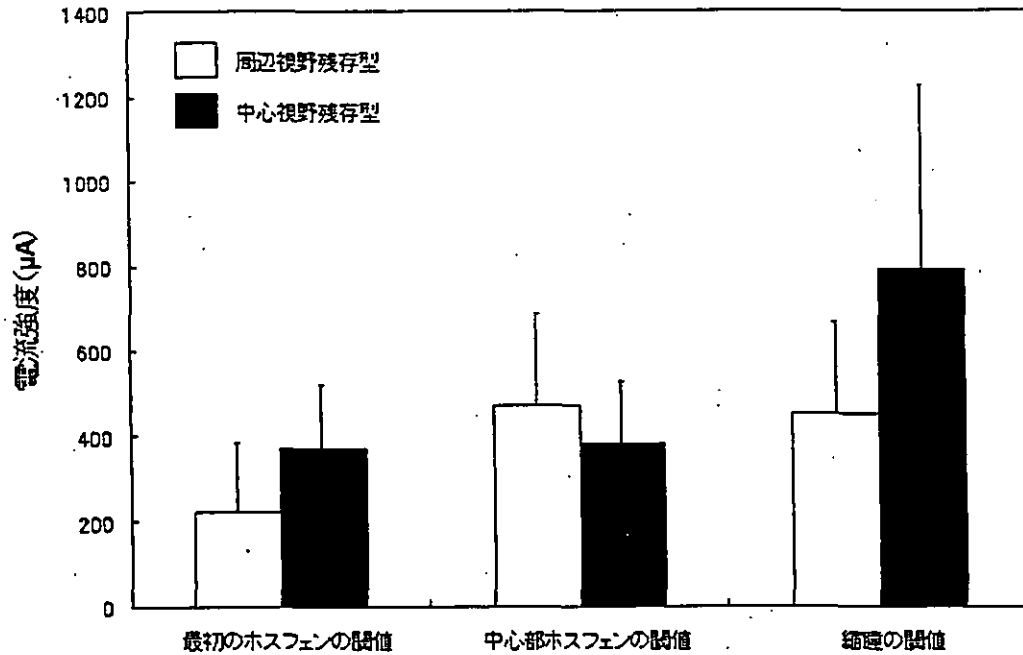


図4. 網膜変性症患者の残存視野とホスフェン、縮瞳の閾値

周辺視野残存型: ホスフェンの閾値; $221 \pm 160 \mu\text{A}$ 、中心部ホスフェンの閾値; $471 \pm 213 \mu\text{A}$ 、縮瞳の閾値; $450 \pm 214 \mu\text{A}$ 、中心視野残存型: ホスフェンの閾値; $370 \pm 148 \mu\text{A}$ 、中心部ホスフェンの閾値; $380 \pm 144 \mu\text{A}$ 、縮瞳の閾値; $790 \pm 436 \mu\text{A}$ (mean \pm SD)。

厚生労働科学研究費補助金(感覚器障害研究事業)

分担研究報告書

網膜神経節細胞の神経保護

1. 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

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講座 教授
(研究協力者 森本 壮、松田 理、三好智満)

研究要旨

経角膜電気刺激による網膜神経節細胞 (RGC) の神経保護のメカニズムを解明するため、RGC に対して神経保護効果を有する既知の主要な神経栄養因子や受容体に着目して検討を行った。その結果、IGF-1 の mRNA の発現のみが電気刺激後に網膜内で持続的に上昇し、IGF-1 のタンパク発現も同じように上昇した。IGF-1 タンパクの網膜内での局在を検討した結果、IGF-1 の発現は、健常の網膜内では内境界膜、特にミュラー細胞の end foot、に局所的に認められるだけであったが、電気刺激後には、特にミュラー細胞で強く認められ、時間とともに内境界膜から内網状層に広がっていった。さらに、IGF-1 受容体のアンタゴニストを用いて IGF-1 の作用を遮断したところ、電気刺激の RGC に対する神経保護効果は減弱した。以上の結果から、経角膜電気刺激による神経保護のメカニズムは、電気刺激によって増加した内因性の IGF-1 の RGC に対する神経保護的作用であることが明らかになった。

A. 研究目的

我々は、前年度の分担研究で、コンタクトレンズ型電極を用いて、角膜から電気刺激(経角膜電気刺激)を行うと、視神経切断後の網膜神経節細胞(RGC)の細胞死が抑制され、生存が促進することを証明し、経角膜電気刺激に神経保護効果があることを報告した(図1)。本年度は、この経角膜電気刺激による神経保護のメカニズムを解明することを目的として研究を行った。これまでに、神経組織に電気刺激を行うと、神経栄養因子の一つである BDNF の mRNA やその受容体である trkB の mRNA の発現が上昇すること

が報告されている。このような事実から、経角膜電気刺激によって網膜を電気刺激しても、同様に、網膜に神経栄養因子やその受容体の発現が上昇することが考えられる。そこで我々は、まず、電気刺激によってどのような種類の神経栄養因子やその受容体の mRNA が発現するのか検討し、次に発現が上昇した物質について、タンパク発現や網膜での局在について検討した。さらに、発現が上昇した物質が電気刺激による RGC の神経保護にどの程度関与しているのか検討した。

B. 研究方法

1) 経角膜電気刺激

ネンブタール麻酔下で、白色ラットの片眼にコンタクトレンズ電極を取り付けて、電気刺激を1時間行った。刺激条件は、昨年度の研究で最も神経保護効果の大きかった(図1)、100 μ A, 20 Hz, 1 ms/phase の両相矩形波パルスを用いた。

2) RT-PCR

電気刺激の後(1時間後、1日後、2日後、4日後、7日後)、それぞれの時点で、ラットの眼を麻酔下で摘出し、網膜を取り出した。取り出した網膜について、RGCに対して神経保護効果のある4つの主要な神経栄養因子とその受容体の mRNA (BDNF, trkB, bFGF, FGFR-1, CNTF, CNTF-R, IGF-1, IGF-1R) のうちどの mRNA の発現が変化するのか RT-PCR を用いて検討した。

3) ノザンブロット、ウエスタンブロット、免疫組織染色による検討

次に、2) で上昇した IGF-1 の mRNA について、電気刺激後の経過時間変化(1時間後、1日後、2日後、7日後、10日後)についてノザンブロット法を用いて検討し、さらにタンパク発現についてもウエスタンブロットを用いて検討した。また、網膜での IGF-1 の局在について調べるため、抗 IGF-1 抗体および網膜のグリア細胞であるミューラー細胞を標識する抗 glutamine synthetase (GS) 抗体を用いて2重染色し、電気刺激後の IGF-1 の網膜内局在変化について検討した。

4) IGF-1 の受容体のアンタゴニストを用いた IGF-1 の抑制試験

IGF-1 の受容体のアンタゴニストである JB-3 を用いて検討した。ラットの視神経切断し、電気刺激を行った後、動物を JB-3 (100 μ g/kg)、JB-3 (10 μ g/kg)、PBS の3つの投与群に分け、直後から毎日6日間、腹腔内に投与し、7日目に眼球を取り出し、網膜伸展標本を作製し、生存している RGC の細胞密度を求め、比較検討した。

C. 結果

1) RT-PCR の結果

電気刺激後に IGF-1 mRNA のみ、発現が上昇し(図 3A)、その他の神経栄養因子や受容体の mRNA に変化はみられなかった。

2) ノザンブロット、ウエスタンブロットによる解析の結果

ノザンブロットによる IGF-1 の mRNA の解析の結果、電気刺激1日後から IGF-1 の mRNA が上昇し始め、10日後まで発現の上昇が持続した(図 3B)。ウエスタンブロットによる IGF-1 のタンパク発現の解析の結果についても、ノザンブロットによる解析の結果と同様に、電気刺激1日後から IGF-1 のタンパクの発現が上昇し始め、7日から10日後にピークに達し、その後減少するが、14日後でもコントロールに比べ、発現が上昇していた(図 3C)。

3) IGF-1 の免疫組織染色の結果

IGF-1 の免疫組織染色を行った結果、通常の網膜では、IGF-1 タンパクは、内

境界膜付近に強く発現しているが、電気刺激後に RGC 層、内網状層へと IGF-1 の発現の分布が拡大し、発現量も増え、14 日後まで発現が持続した (図 4 a-e)。さらに、IGF-1 と GS の 2 重染色を行ったところ、通常の網膜では IGF-1 は、ミュラー細胞のエンドフットに存在し、電気刺激後に、ミュラー細胞周囲とミュラー細胞の細胞体に強く発現することが確認された (図 4 f-l)。この結果から、ミュラー細胞が IGF-1 の合成分泌に関与していることが強く示唆された。

4) JB-3 による IGF-1 の抑制試験

図 5 のように、視神経を切断し、電気刺激を行った後、JB-3 (10 μ g/kg) を腹腔に投与した群では、PBS 投与群とほぼ同じ RGC の生存率であったが、JB-3 (100 μ g/kg) 投与群では、生存率が 60% にまで減少した。一方、視神経切断のみの群では、JB-3 (100 μ g/kg) を投与しても、視神経切断のみの群と生存率は変わらなかった。このように、JB-3 (100 μ g/kg) によって、電気刺激による神経保護効果が抑制されたことから、電気刺激の神経保護効果に、IGF-1 が重要な役割を持つことが証明された。

D. 考察

今回の検討の結果、電気刺激後に網膜内に神経栄養因子の一つである IGF-1 の発現が上昇することがわかった。さらに、免疫組織染色の結果、IGF-1 の合成、分泌に網膜のグリア細胞であるミュラー細胞が関与していることが示唆された。また、IGF-1 の抑制試験の結果、電気刺激

によって発現が上昇した IGF-1 が、神経保護に重要な役割を持つことが証明された。このように、網膜を電気刺激することは、網膜の神経細胞を興奮させて視覚を甦らせるだけではなく、グリア細胞の賦活による、神経栄養因子の産生を通して、神経保護にも有効であることが明らかになった。今後は、電気刺激によって、ミュラー細胞がどのように賦活され、IGF-1 の発現が上昇するのかそのメカニズムについて解明していく予定である。このメカニズムが解明されれば、グリア細胞からの神経栄養因子の発現を電気刺激によって促進することが可能になり、また、ミュラー細胞は IGF-1 のほかにさまざまな神経栄養因子を産生することができるためこれらの産生についても電気刺激によって制御することが可能になるかもしれない。

E. 結論

経角膜電気刺激の神経保護のメカニズムを解明した。そのメカニズムは、電気刺激によって、網膜内で IGF-1 の発現が上昇し、上昇した IGF-1 が RGC に対して神経保護的に働くと考えられる。また、IGF-1 の発現上昇には、網膜のグリア細胞であるミュラー細胞が関与していることがわかった。

F. 健康危険情報

なし

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*, 45:560-566, 2004.

三好智満、栗本拓治、森本壮:網膜神経節細胞の変性過程と電気刺激の神経保護効果 *神経眼科*,20(3):290-297,2003.

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 6(4), 420-426, 2003.

Miyoshi, T., Morimoto, T., Yakura, T., Okazaki, Y., Kurimoto, T., Inoue, T., Sawai, H., Fujikado, T., Tano, Y. and Fukuda, Y.: Survival promoting effect of electrical stimulation on axotomized retinal ganglion cells. In *The neural basis of early vision* (Edited by Kaneko, A.), Springer-Verlag, 156-159, 2003.

Miyoshi, T., Kurimoto, T. and Fukuda, Y.: Attempts to restore visual function after optic nerve damage in adult mammals. In *Brain Repair* (Edited by Baehr M.), Landes Bioscience, in press.

2. 学会発表

澤井元、三好智満、井上徹:網膜・視覚路障害からの視覚機能修復. 第26回日本医学会総会(福岡)、2003年4月.

森本壮、三好智満、澤井元、不二門尚、田野保雄、福田淳:経角膜電気刺激の網膜神経節細胞に対する神経保護効果. 第107回日本眼科学会総会(福岡)、2003年4月.

Morimoto T., Miyoshi T., Sawai H., Fujikado T., Tano Y., Fukuda Y.: Transcorneal electrical stimulation enhances survival of axotomized RGCs in vivo. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)*, Fort Lauderdale, Florida, USA, May, 2003.

森本壮、三好智満、澤井元、不二門尚、田野保雄、福田淳:網膜神経節細胞の変性に対する経角膜電気刺激の神経保護効果. *視覚科学フォーラム第7回研究会(大阪)*、2003年7月.

福田淳:網膜神経節細胞の定量的・定性的機能評価. 第39回日本眼科学会・第18回眼科ME学会合同学会セミナー(大阪)、2003年9月.

H. 知的財産権の出願・登録状況
眼科用治療装置 特願 2002-14777

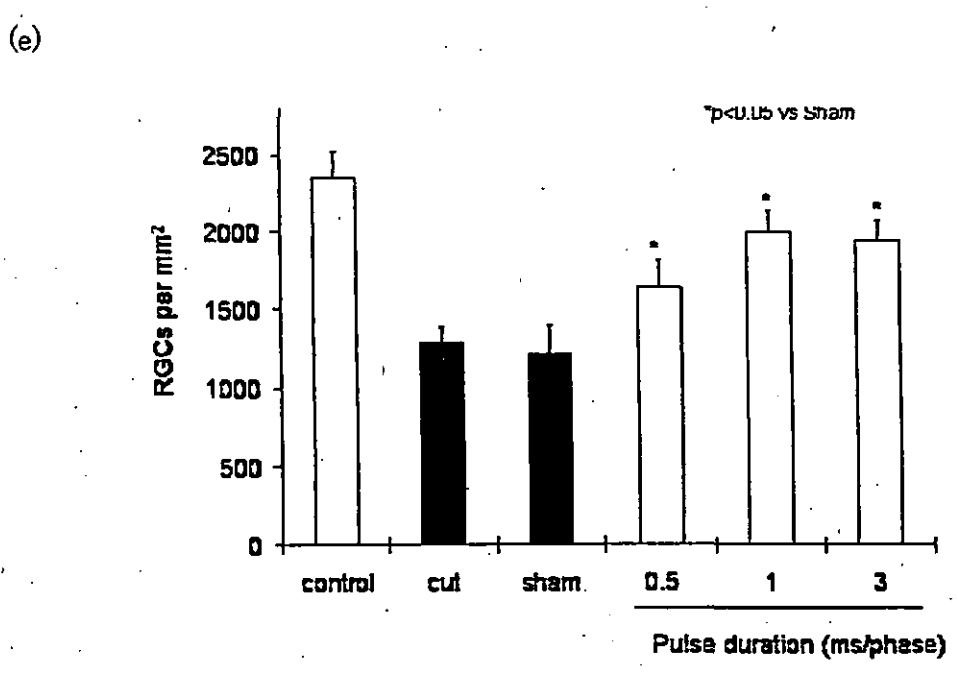
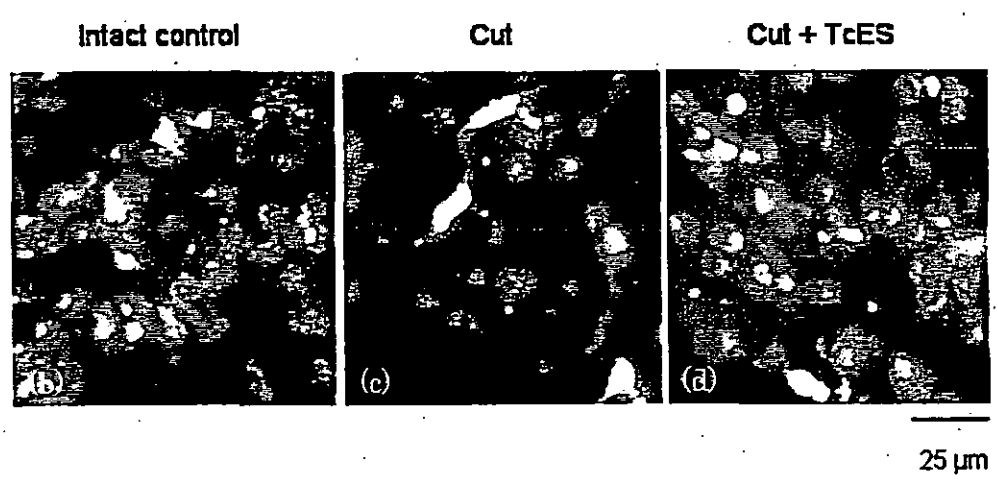
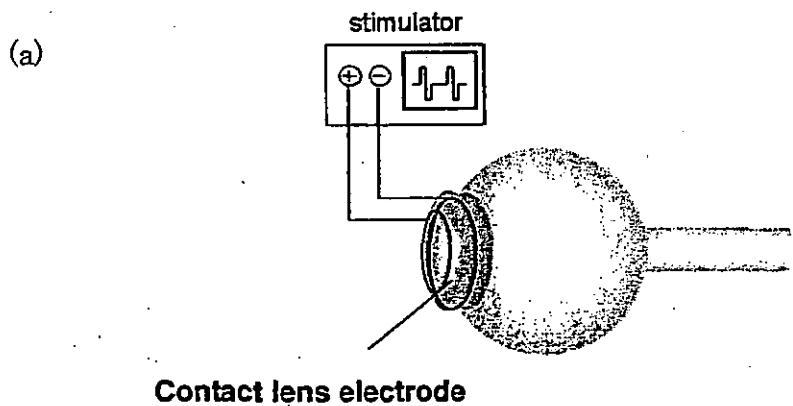


図1. 経角膜電気刺激に RGC に対する神経保護効果

(a) 経角膜電気刺激法。 (b)-(d) 視神経切断 7 日後における網膜標本の蛍光顕微鏡像。 (b) 健常網膜、 (c) 視神経切断 7 日後の網膜、 (d) 経角膜電気刺激を行った視神経切断 7 日後の網膜、 (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。

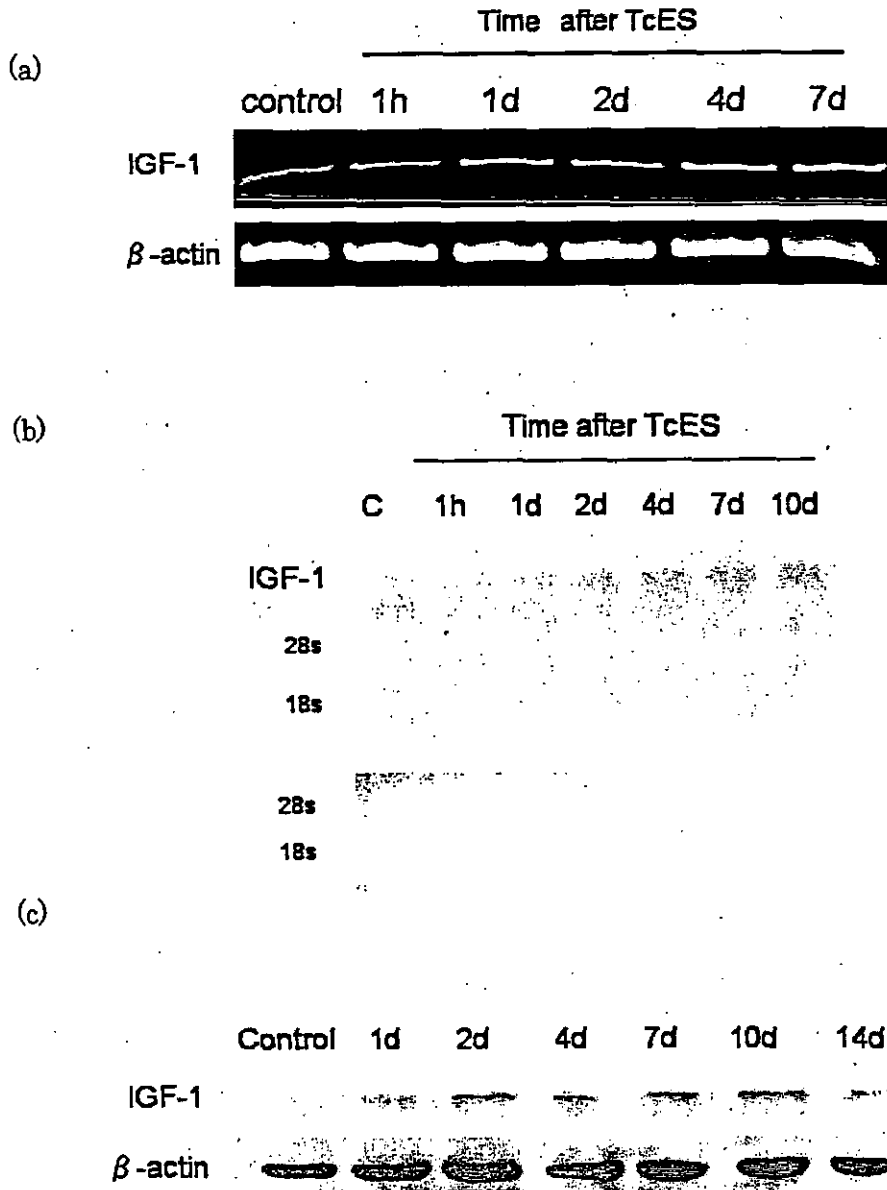


図2. 電気刺激による IGF-1 の網膜内発現の上昇

(a) IGF-1 の RT-PCR。電気刺激 1 日後から発現が徐々に上昇し始めている。(b) ノザンプロットによる IGF-1 mRNA の解析。(a) の RT-PCR と同じく、IGF-1 の mRNA が電気刺激 1 日後から上昇している。(c) ウェスタンブロットによる IGF-1 のタンパク発現の変化。電気刺激 1 日後から、IGF-1 タンパクの発現が上昇している。

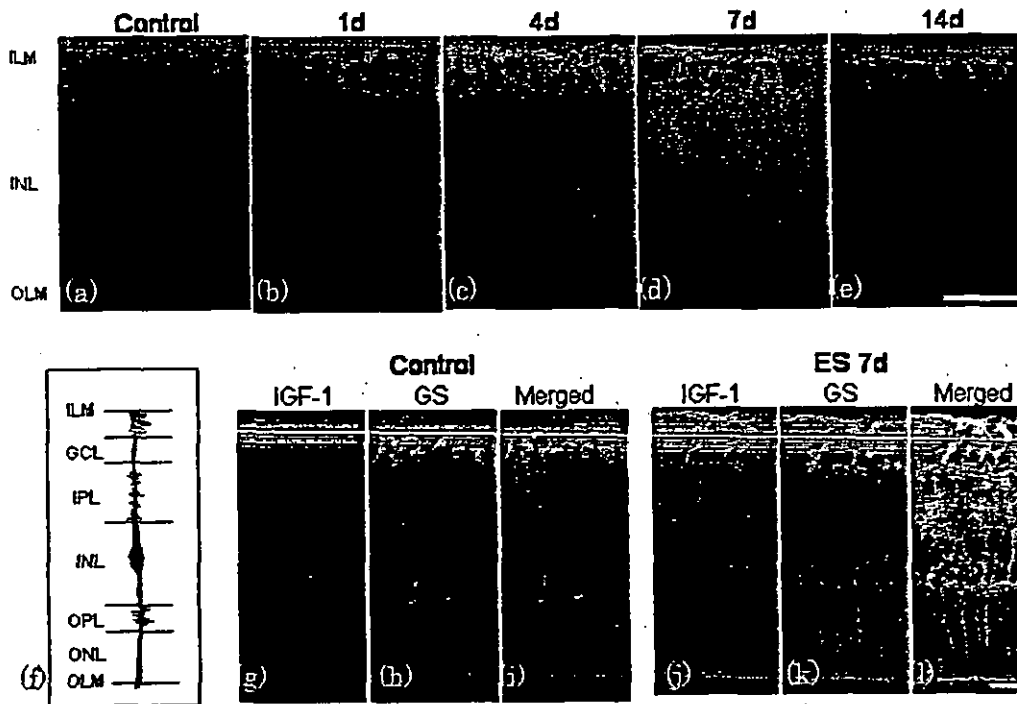


図3. 電気刺激によるIGF-1の網膜内局在変化

(a)-(e) IGF-1の免疫組織染色像。

(f) ミュラー細胞の模式図。(g)-(l) IGF-1とglutamine synthetase(GS)の2重染色像。

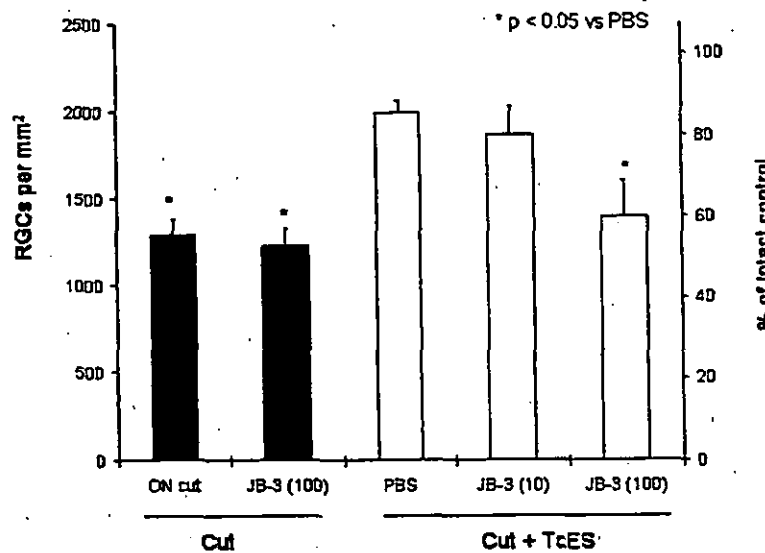


図4. JB-3による電気刺激の神経保護効果の抑制

各群における視神経切断7日後のRGCの生存密度。

Cut: 視神経切断のみ、Cut+TcES: 視神経切断後に電気刺激(100 μ A, 1ms/phase, 20Hz, 1時間)。JB-3(10); 10 μ g/kg, JB-3(100); 100 μ g/kg、カッコ内は、体重あたりのJB-3の投与量を表す。

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

網膜神経節細胞の神経保護

2. 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

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講座 教授
(研究協力者 三好智満、栗本拓治、澤井元)

研究要旨

ネコの切断視神経へカフ型双極電極を用いて切断直後に電気刺激を加え、1週間後の網膜神経節細胞の生存が促進されるかどうか、また、中でも中心視力を司る β 細胞に有効かどうかを調べた。その結果、視神経への3mA-300 μ sec, 20Hzの電気刺激によって、網膜全体にわたって生存が促進され、また、網膜中心部においても生存が促進されていた。細胞タイプ別の検討により β 細胞の生存も促進されていることも明らかになった。以上のことから、ラットよりも大型の実験動物であり機能分化した視覚系を持つネコにおいても、視神経への電気刺激が軸索切断された網膜神経節細胞の生存に有効であることがわかり、また β 細胞に対しても有効であったことから、ヒトの疾患に際しても視力の回復に有効であることが推測された。

A. 研究目的

我々は、切断視神経の断端に電気刺激を与えると、軸索切断された網膜神経節細胞(RGC)の生存が促進できることを、ラットを用いて明らかにした。本研究では、RGCがラットよりも形態学的・生理学的に明確に機能分化していて、よりヒトに近い視覚系を持つネコを用いて、電気刺激がラットと同様にRGCの生存を促進するかどうか、また、RGCの中でも、網膜の中心部に多く中心視を司る β 細胞に対してこの電気刺激が有効かどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 全般

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低限に留めるように注意した。手術の際には、塩酸ケタミン(57mg/kg)の筋注によって麻酔を導入し、挿管後、ハロセン(1-2%)および笑気と酸素(1:1)の混合気の人工換気によって麻酔を維持した。心電図、呼気ガス分析装置で動物の状態をリアルタイムにモニターし、体温の維持に保温マットを用いた。

2) 刺激電極

将来的に慢性埋め込み型の実験を行うことも想定して、ネコの視神経の刺激に適した大きさのカフ型双極電極を作成し