

た。シリコンチューブを切り開き、その内腔面の相対する位置に、直径 1.5mm の銀製円盤電極を固定した。導線の露出部は細いチューブで被膜した。予備実験としてこの電極でどの程度の電流を流せば視神経が刺激できるかを知るため、RGC の集合電位と単一ニューロン活動を記録しながら、このカフ型双極電極で視神経を刺激したところ、300 μ sec の持続の場合におおよそ 1-3mA という電流量のオーダーで、逆行性の反応が見られた。

3) RGC の逆行性標識

形態学的に RGC の生存率を調べるため、逆行性に全ての RGC を標識した。視神経切断の 14 日以上前に麻酔下で、蛍光トレーサである DiI を、両側の外側膝状体および視索に注入した。脳内の注入部位の場所の同定は、電極に改造したハミルトンシリンジを用いて、脳アトラスによる定位的、かつ、フラッシュ光に対する誘発反応を用いた電気生理学的に行った。

4) 視神経切断と電気刺激 (図 1)

麻酔下で、左視神経を眼窩内で露出させ、眼球より 4mm の位置で完全に切断した。切断直後の視神経断端にカフ型双極電極を設置し、持続 300 μ sec の单相矩形波パルスで 20Hz で 2 時間与えた。電流値は 0.5, 1.0, 3.0mA の電流値を用いた群と電極を設置するが通電しない sham 刺激群を作成した。

5) 生存率の評価

切断 1 週間後に網膜を摘出し、網膜全伸展標本を作製した。網膜中心野 (Area Centralis; AC) を同定し、AC における 250 μ m 四方の生存している標識 RGC を計数した。また、網膜全体にわたって AC

から 1mm の格子点において、500 μ m 四方の領域における生存 RGC を計数し (実際の網膜の 25% の領域を調べたことになる)、全 RGC 数を算出した。そして、各々の動物で正常側網膜 (右) の値に対する切断側網膜 (左) の値の比を算出することによって、AC における RGC の生存率と、全 RGC の生存率の両方を求めた。

6) 細胞タイプ別の生存率の算出

細胞タイプ別の生存率を調べるために、AC から側頭側 3-4mm の一定領域において、生存している全ての RGC の樹状突起の形態を細胞内色素注入法を用いた可視化により同定した。そして、このようにして求めた α 細胞、 β 細胞、その他の細胞の存在比率と全 RGC の生存率から、各細胞タイプ別の生存率を求めた。ただし、 α 細胞については、もともとの存在比率が少ないことと、逆行性標識による蛍光像だけでも特徴的な細胞体の大きさと樹状突起形態から容易に同定可能であることから、全 RGC の計数と同様に網膜全体にわたって α 細胞のみを計数することによって生存率を求めた。

C. 結果

電気刺激 1 週間後における AC 部分の蛍光顕微鏡像を図 2 に示す。視神経切断によって、1 週間後には生存している細胞が大きく減少し、死に陥った細胞の残骸が多く観察されるが、電気刺激群 (3mA) では、細胞の減少が抑制され、正常網膜に近い像を示していた。

AC における細胞の生存率は、0.5mA の刺激では増加しなかったが、1mA で有意に増加し、3mA ではさらに増加した (図

3)。しかし、5mA の電気刺激では全く生存促進効果は見られなかった。5mA の時には、蛍光標識された軸索が途中で破裂しているなど、逆に電気刺激による何らかの傷害が生じていることを伺わせる現象が観察された。

この AC での生存率の増加に対して、全 RGC の生存率は、1mA の電気刺激では上昇しているものの有意差はなく、3mA の刺激でようやく有意差が得られた。また、AC と比較すると電気刺激による全 RGC の生存率を増加させる効果は現れにくかった。

さらに網膜の部位別に電気刺激の効果を検討するために、網膜中心部からの距離によって生存率にどのような違いが生じているのかを、上記の計測データから解析した。その結果、3mA の電気刺激の場合は、AC から 8mm 離れた場所まで有意な生存促進効果があったが、生存率そのものは周辺部に行くほど低下する傾向にあった。1mA の電気刺激の場合は、AC 付近においてのみ有意に生存率が上昇していたが、そこから離れると生存率が低下していき、sham 刺激群に対して有意差が現れなかった。

細胞タイプ別に生存率を調べた結果、 α 細胞に対する生存促進効果は認められなかったが、 β 細胞、および、その他の細胞に対しては、著明な生存促進効果が認められた。

D. 考察

本研究の結果、ラットと同様にネコにおいても視神経の電気刺激が軸索切断に対する神経保護作用を持つことが明らか

となった。また、細胞タイプ別に見ると、 β 細胞については生存促進効果が顕著であったが、我々の以前の研究では、ネコの視神経切断後に β 細胞は急激に細胞死に陥り、その時にはアポトーシスが起きていることから、この細胞死の過程を抑制しているものと考えられる。ただし、視神経断端への電気刺激がどのようなメカニズムを介して生存を促進しているかは、未だに不明である。いずれにせよ、網膜中心部の視力を担っている β 細胞の生存を促進するという事は、このような電気刺激が、ヒトの疾患に対する視力の回復のための治療として有望であることを示唆するものである。

網膜の中心部に最も強い電気刺激の効果が現れていることから、本実験で用いた電気刺激が、刺激部位の視神経の中央付近を走行する、網膜のより中心部からの軸索を効率的に刺激し、網膜の周辺部からの軸索はそれほど刺激していないのではないかと推測される。網膜の中心部からではなく視神経乳頭からの距離に対して図 5 と同様の生存率の解析を行ったところ、相関が現れなかった(図省略)ことも考え合わせると、本実験での視神経刺激は、視神経内の RGC 軸索への電気的効果を介している可能性が高いが、その過程そのものや、さらにその次に電気刺激が細胞の生存促進を引き起こすメカニズムについてさらなる検討が必要である。

E. 結論

ネコの切断視神経へカフ型双極電極を用いた電気刺激を加えることによって、

1週間後のRGCの生存を促進することができたことから、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RGCの生存に有効であることが明らかとなった。細胞タイプ別に見ると、中心視力を司る β 細胞にもこの電気刺激は有効であり、ヒトの疾患における視力の回復のためにも電気刺激が有効であると推測された。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kurimoto T, Miyoshi T, Suzuki A, Yakura T, Watanabe M, Mimura O. and Fukuda Y : Apoptotic death of beta cells after optic nerve transection in adult cats. *J Neurosci*, 23:4023-4028, 2003.

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

Kurimoto T, Miyoshi T, Yakura T, Watanabe

M, Mimura O and Fukuda Y : Difference in survival and axonal regeneration between alpha and beta types of cat retinal ganglion cells. In *The neural basis of early vision* (Edited by Kaneko A.) ,Springer-Verlag, 151-155, 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.

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.

福田淳：大脳皮質の感覚機能における可塑性 -視覚障害と機能回復を中心に- *新世紀の精神科治療 第6巻認知の科学と臨床*, pp. 271-283, 中山書店, 2003.

2. 学会発表

三好智満、栗本拓治、渡部眞三、福田淳：電気刺激による軸索切断ネコ網膜神経節細胞の生存促進。第17回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会（東京）、2003年6月。

Miyoshi T, Kurimoto T, Suzuki A, Yakura T, Mimura O, Watanabe M and Fukuda Y: Apoptotic death of beta cells but not alpha cells after optic nerve transection in adult cats. 6th IBRO congress, Prague, Czech Republic,

July, 2003.

三好智満、栗本拓治、楨英樹、渡部眞三、
福田淳：軸索切断されたネコ網膜神経節
細胞に対する電気刺激の生存促進効果。
第26回日本神経科学大会(名古屋)、2003
年7月。

栗本拓治、三好智満、渡部眞三、三村治、
福田淳：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。視覚科
学フォーラム第7回研究会(大阪)、2003
年7月。

栗本拓治、三好智満、渡部眞三、三村治、
福田淳：電気刺激による軸索切断された
ネコ網膜神経節細胞の生存促進。日本生
理学会第96回近畿生理学談話会(京都)、
2003年8月。

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

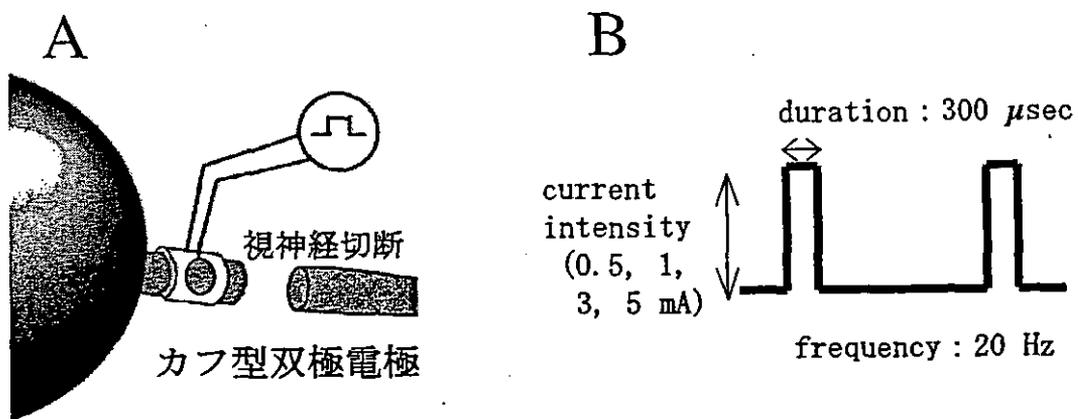


図1. A. 視神経切断端へのカップ型双極電極の設置の模式図。B. 電気刺激に用いた刺激パルス波形。

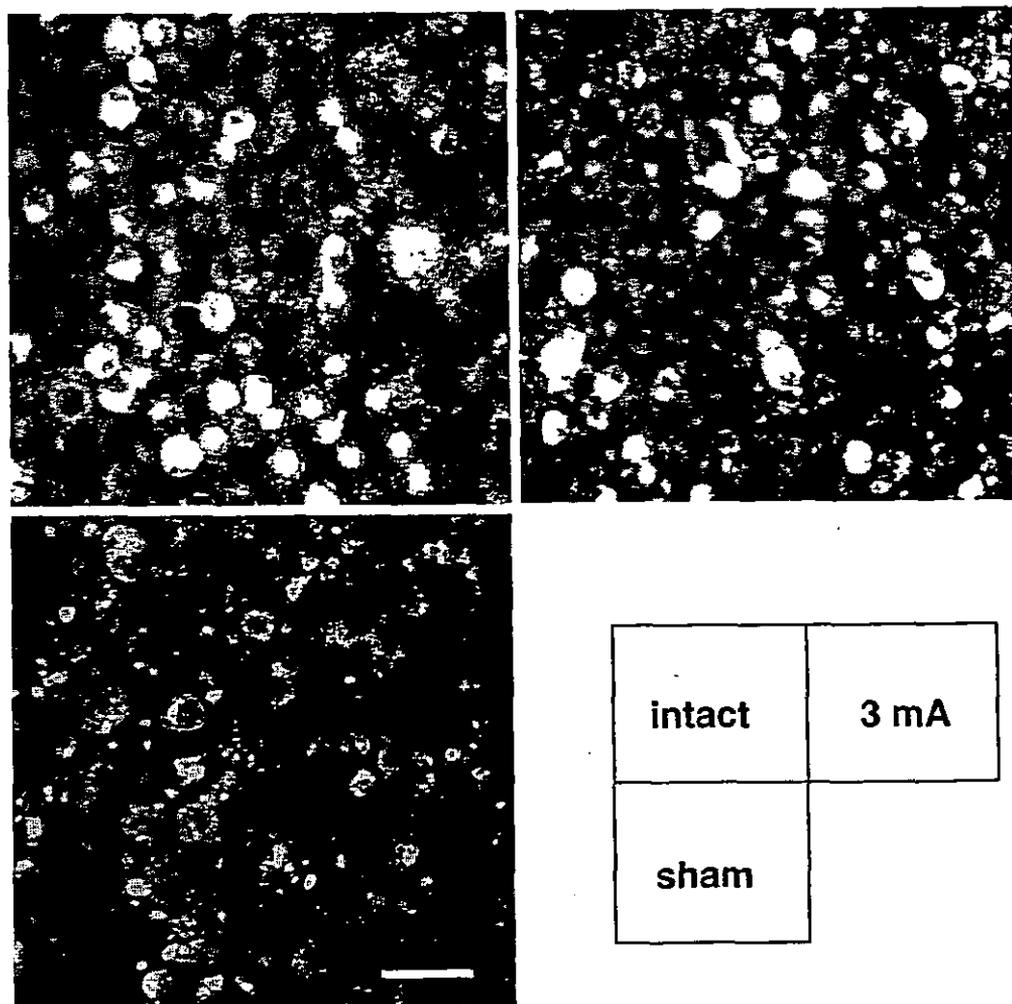


図2. 視神経切断1週間後の網膜伸展標本の網膜中心部の蛍光顕微鏡像。スケールは25μm。sham刺激群では丸く核を縁取る様に標識された網膜神経節細胞が減少し、代わりに細胞の残骸が多く現れたが、3 mAの刺激を与えた場合には、細胞が多く生存していた。

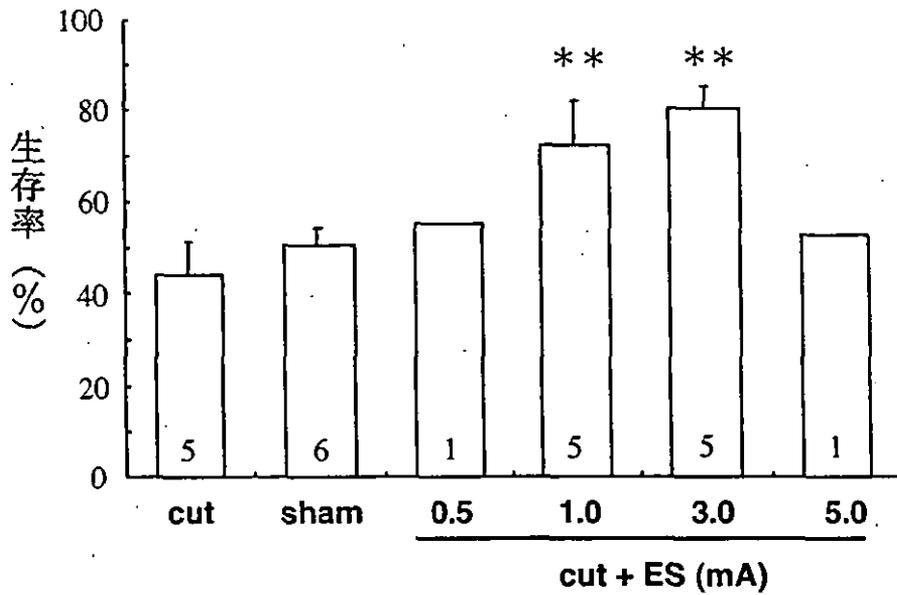


図3. 網膜中心野における網膜神経節細胞の切断1週間後の生存率。1.0 mA, 3.0 mAの電気刺激を行った群では、切断のみの群(cut)および切断して電極を設置したが電流を流さなかった群(sham)に比べて有意な生存率の増加を認めた。
 **: $p < 0.01$

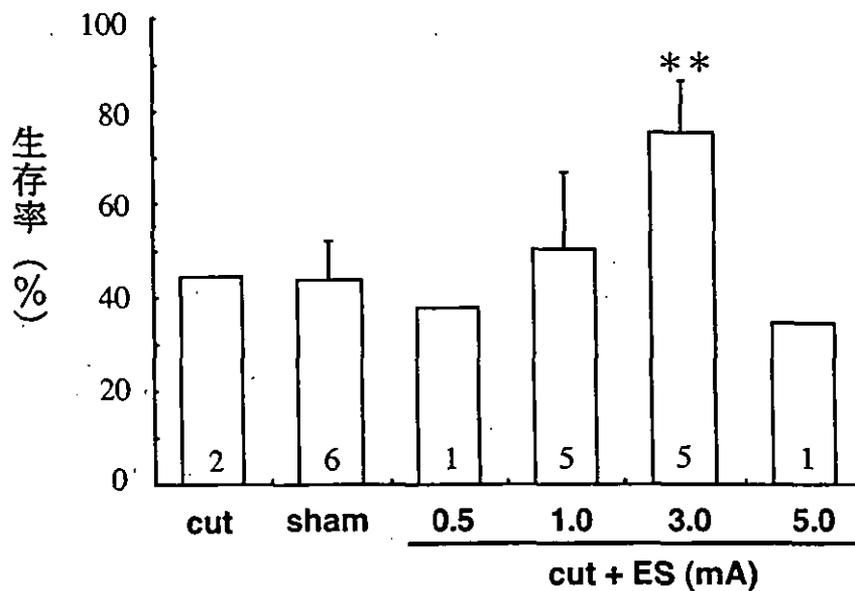


図4. 網膜全体にわたって調べた全網膜神経節細胞の切断1週間後の生存率。3.0 mAの電気刺激を行った群において有意な生存率の増加を認めた。
 **: $p < 0.01$

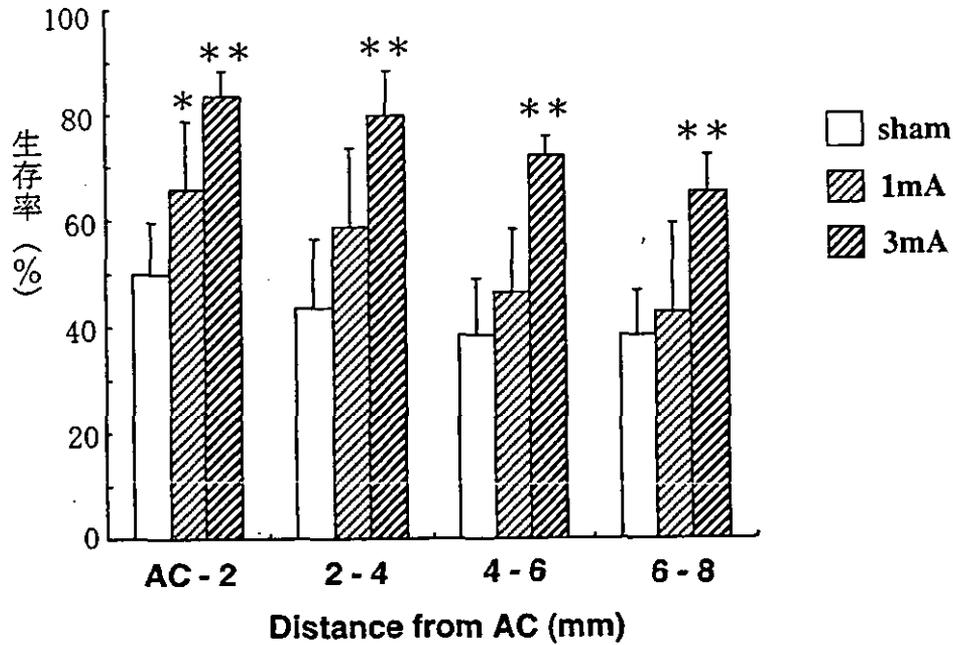


図5. 網膜中心部(AC)からの距離による、網膜神経節細胞の生存率の変化と電気刺激の効果。3mAの刺激の場合には、6-8mmにある細胞でも有意な生存率の増加を認めたが、1mAの刺激の場合には、ACの近くでしか有意に生存率が増加しなかった。

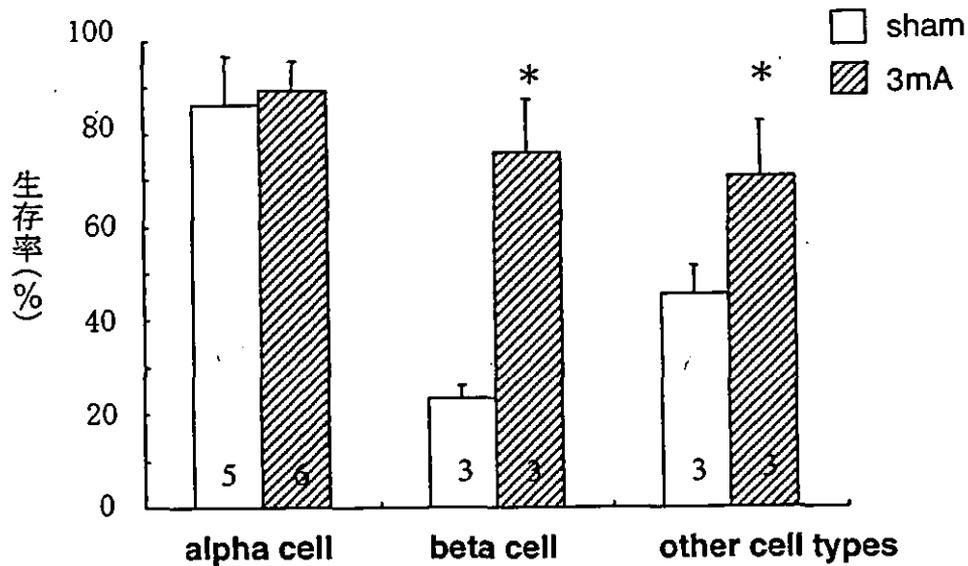


図6. 細胞タイプ別の生存率に対する電気刺激の効果。中心視力を担うβ細胞に対して有意な生存促進効果が見られた。また、α細胞・β細胞以外のその他のタイプの細胞に対しても効果が見られた。*: p<0.05

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

中・大動物における視細胞変性モデル作成とその視機能評価

分担研究者 三宅養三、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

研究要旨

人工網膜の移植実験に必要な動物モデルとして、ヒトに近い中・大動物（家兎、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、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目的とした。本年度は、硝子体内に薬物を注入することで簡易に片眼性視細胞変性モデルを作成する方法として、Tunicamycin (TM) の効果を調べた。TM の硝子体内投与後約 2 週で家兎に広範囲な視細胞変性を惹起させることができた。しかし同時に視神経障害も合併するため、この方法は人工網膜の移植実験モデルとしては適さないことがわかった。

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。我々は昨年度の報告において、MNU (N-methyl-N-nitrosourea) の血行投与によって理想的な視細胞変性モデルが簡単に作成できることを報告した。しかし MNU では両眼性の失明となることから、長期の実験に用いるには倫理的に好ましい方法とはいえないと判断した。

そこで本年度は、片眼にのみ視細胞変性を惹起させる方法として Tunicamycin (TM) の硝子体内注入法を検討した。TM は 1984 年に Fliesler らによって網膜毒性があることが報告された抗生物質の一つである (Fliesler et al. Nature. 1984)。TM を硝子体内に約 1 μ g 注入すると、N-acetylglucosamine の生合成を抑制することによってラットに視細胞特異的な変性

をおこすことが知られている。今回、この TM を家兎の硝子体内に注入し、TM が視細胞特異的な変性を惹起させつつ視神経機能を温存させるかどうかを検討した。

B. 研究方法

実験動物としては有色家兎を用いた。Tunicamycin (TM) を種々の濃度 (0.5-10 mg) で硝子体内に投与し、その後 1 週から 2 か月後に眼底写真、網膜電図 (ERG)、視覚誘発電位 (VEP)、角膜電気刺激誘発脳波 (EER) を記録した。また最終的に眼球を摘出して網膜組織を調べた。

電気生理学的実験の全身麻酔にはケタミン (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。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。

EER は頭蓋骨にドリルで小孔を作成し、ネジ式電極を 2 点埋め込んで記録した。

C. 研究結果

TM を種々の濃度で硝子体内に注入して経時的に ERG で網膜変性の度合いをモニターしたところ、0.5-1 mg では ERG が残存することがわかった。また仮に non-recordable になったとしても、これらの濃度では約 2 か月後には機能回復を示すものがあつた。これに対して 2.5 mg 投与群ではほとんどの動物が ERG が non-recordable となり、この ERG はその後回復することがなかつた。また、これより高い濃度 (5-10mg) を注入した群では眼底検査にて著明な視神経乳頭周囲の出血や血管の蛇行がみられた。

以上の結果により TM の硝子体内注入により網膜変性モデルを作成する最適濃度は 2.5 mg 付近であると考え、この濃度を用いた動物の網膜組織を調べた。その結果、この濃度で既に明らかな視神経層の変性がみられた。また EER をこれらの家兎から測定したところ、EER は全て記録されなかつた (図 1)。

また、あらゆる濃度において、約 1 か月後に成熟白内障が発生し、眼底が透見困難となることもわかつた。

D. 考案

本年度の目標は、人工網膜の動物実験に必

要な中・大動物に対する片眼性の視細胞変性モデル作成として、TM の硝子体内投与法を検討することであつた。

ERG による変性のモニターでは TM2.5mg 投与にて ERG が記録されない最小の濃度であつたことから、この濃度を最適濃度と考え、この群より EER を記録し、また網膜組織を調べた。しかし、EER は記録されず、また網膜組織も視神経の強い障害を示唆する結果が得られた。視神経が強く障害されている状態では人工網膜を移植しても視覚回復は得られないことより、TM の硝子体内注入法は人工網膜を移植する大型動物モデル作成法として好ましい方法ではないことがわかつた。

今後は以下の方法を検討する予定である。

オルニチン硝子体内注入法

最新 LED による強い網膜光障害法

網膜特異的蛋白に対する抗体の硝子体内注入法

家兎トランスジェニック動物作成

D. 結論

大動物における視細胞変性モデルの作成法として Tunicamycin (TM) の硝子体内投与法はその視神経障害性により抵当ではないことがわかつた。視神経を障害せずに視細胞層を広範囲に障害を惹起させる新たな方法を検討する必用がある。

E. 健康危惧情報 特になし

F. 研究発表

論文発表

1) Kiuchi K, Kondo M, Ueno S, Moriguchi K, Yoshizawa K, Miyake Y, Matsumura M, Tsubura A. Functional rescue of N-methyl-N-nitrosourea-induced

retinopathy by nicotinamide in Sprague-Dawley rats. *Current Eye Research*. 2003;26:355-362.

2) Piao CH, Kondo M, Nakamura M, Terasaki H, Miyake Y. Multifocal electroretinograms in X-linked retinoschisis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003;44:4920-4930.

3) Ueno S, Kondo M, Niwa Y, Terasaki H, Miyake Y. Luminance dependence of neural components that underlies the primate photopic Electroretinogram. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2004;45:1033-1040.

4) Kondo M, Miyake Y, Kondo N, Ueno S, Takakuwa H, Terasaki H. Peripheral cone dystrophy: A variant of cone dystrophy with predominant dysfunction in the peripheral cone system. *Ophthalmology*, in press. 2004.

学会発表

1) Kondo M, Ueno S, Cnang-Hua Piao, Terasaki H, Miyake Y. Occult macular dystrophy in children. The Western Hemisphere of International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Florida, USA. May 3, 2003.

2) Niwa Y, Kondo M, Nakamura M, Chang-Hue Piao, Ueno S, Terasaki H, Miyake Y. Abnormalities in cone-mediated ERGs in patients with fundus albipunctatus with RDH5 mutations. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and

Ophthalmology. Florida, USA. May 5, 2003.

3) Ueno S, Kondo M, Niwa Y, Terasaki H, Miyake Y. "Push-pull" interplay between ON-, OFF-, and photoreceptor components in the primate photopic ERG contributes to the "photopic hill".

Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. Florida, USA. May 5, 2003.

Kiuchi K, Kondo M, Ueno S, Moriguchi K, Yoshizawa K, Matsumura M, Tsubura A.

Functional rescue of

N-Methyl-N-nitrosourea-induced retinopathy by nicotinamide in

Sprague-Dawley rats. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. Florida, USA. May 6, 2003.

G.知的財産権の出願・登録状況: なし

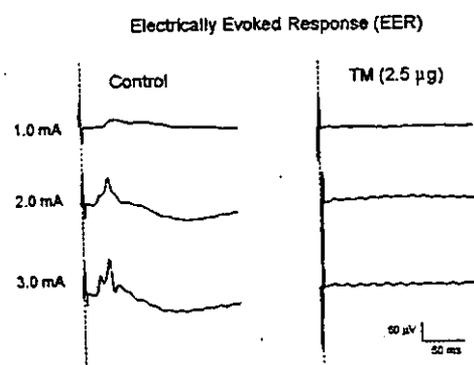


図 1: Tunicamycin を 2.5 mg 硝子体内に投与した家兎から記録した EER。EER が記録不能であり、強い視神経障害が存在することが推定される。

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)

分担研究者 平形 明人 杏林大学医学部眼科 助教授

研究要旨

網膜を電気刺激することにより得られる人工視覚(人工網膜)の開発において、人工視覚チップを網膜上あるいは網膜下に挿入することで生じる人工チップの生体適合性の変化を検討することは、網膜刺激型電極を開発する上で重要な課題である。

昨年度までの検討で、家兎眼は比較的容易に多数の手術を施行することが可能であるため、人工チップ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を確認した。その障害をトリパンプルーによる生体染色である程度把握できることを報告した。

また、人工チップを網膜上に留置することで、家兎眼でどのような異物反応や組織修復反応が生じるかを観察した。チップ挿入時に発生したと推測される網膜裂孔、網膜欠損は存在し、それに続発した網膜色素上皮の遊走が見られたが、6ヶ月までの留置では、炎症細胞、グリア細胞、網膜色素上皮細胞、線維芽細胞の明らかな浸潤や増殖性変化はみられなかった。しかし、電子顕微鏡の観察で、チップと網膜の間に空隙があり、硝子体コラーゲンが残存していることから、チップが網膜上に安定して固定されていなかった可能性が示唆された。これは家兎眼において、ヒト網膜で可能である後部硝子体剥離を作成することが非常に困難なこと、チップを網膜上に固定する網膜鉸(タッグ)が家兎眼では強膜が硬いため穿刺が難しく、網膜上のチップの固定が不安定で、時間経過とともに硝子体コラーゲンの収縮とともに網膜上のチップが硝子体腔中に浮上してくることが示唆された。硝子体コラーゲンにも炎症細胞などの集積は見られなかったが、家兎網膜におけるチップの生体適合成性の判定にはチップの網膜非接触の可能性を考慮する必要性が判明した。

今年度は、これらの手術手技を考慮に入れて、家兎眼よりヒト網膜に近似する豚眼を利用して、人工チップの生体適合性を検討した。その際、人工チップの挿入部位の安定性を考慮して、網膜下に挿入し、その周囲網膜に与える組織学的変化を観察した。網膜下に人

エチップを挿入して3ヶ月後、6ヶ月後に検討した。人工チップ挿入箇所は網膜の重層化などの病的変化が見られたが、網膜剥離はなく、網膜下チップの固定状態は良好であった。挿入部の網膜は、視細胞外節の欠損、外顆粒層の変性が見られ、チップ上に色素上皮の遊走、増殖が観察され、これがチップ挿入時に付着した細胞の残存かチップ挿入後の続発性変化か、今後の検討を必要とした。内層は正常な構造が維持されていた。炎症細胞、線維芽細胞、グリア細胞の増殖はみられなかった。

さらに、共同研究者の実験で、プロトタイプ的人工網膜チップをウサギ脈絡膜上腔に設置したところ、誘発電位の記録が得られたことから、その網膜刺激の影響の有無を組織学的に検討した。人工網膜チップ付近の網膜は電子顕微鏡的な異常は観察されなかった。ただし、送電装置となる角膜周辺に設置したアレイ付近の網膜は、マクロ的な観察においも全層にわたって萎縮変性していた。これが、設置手技によるものか、熱凝固斑か不明であった。

以上のことから、人工チップによる生態適合性は、家兎眼、豚眼において、6ヶ月までの留置では、明らかな異物反応、拒絶反応は組織学的には観察されなかった。しかし、網膜上チップではその設置の安定性が大きな問題であることが示唆された。網膜下チップの安定性は良好であるが、網膜上に比較してチップ前面の色素上皮細胞を主体とする細胞増殖、網膜外層の変性などの二次的な反応が見られた。網膜剥離や出血などの術中、術後の合併症を考えると、縫硝子体に網膜下に挿入するよりも脈絡膜上腔設置の意義をさらに検討することが重要であると考えられた。

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どの部位に移植するか、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と欠点を有しており、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高いこと、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、活性化に伴う増殖反応、それらによって引き起こされる増殖網膜硝子体症等の合併症の可能性も考えられる。

本研究の2年間は、術式開発や生体適合性を検討するための動物眼モデルを開発するために、家兎眼や豚眼が電極移植のための硝子体手術手技の侵襲にどのように反応するか検討した。本年度は、豚眼の網膜下に埋植された人工網膜がどの程度生体眼に適合性するのかを擬似チップを用いて組織学的に観察し、異物反応や手術手技の問題点を追究した。さらに、脈絡膜上腔に刺激電極を設置した場合の周囲網膜の異常の有無を検討した。

B. 研究方法

1. 豚眼の人工チップ網膜下固定の組織学的検討

大きさ2mm x 3mmのポリイミド製人工網膜擬似チップをminipigの片眼に移植した。局所麻酔薬筋注（ケタラル）の後、笑気にて全身麻酔、移植方法は経硝子体的(ab interno)に行った。すなわち、毛様体扁平部に強膜切開創を作成し、強膜創と眼底後極部の間の硝子体を切除した後（水晶体保存）、後部硝子体剥離を可及的に作成し、39G針にて網膜下にBSSを注入し、意図的網膜剥離を4～5乳頭径大に作成した。網膜切開しチップを網膜下挿入し、液空気置換で網膜を復位させた。空気のみ硝子体内タ

ンポナーデでレーザー凝固は施行しなかった。

術後3ヶ月、6ヶ月後に眼球摘出し、組織検査を行った。

2. 兎眼の人工チップ脈絡膜上腔設置の組織学的検討

有色家兎片眼を用い、麻酔した後、右眼の脈絡膜上腔に刺激電極を埋植した。また送電装置アレイを角膜周囲の強膜に設置した。術1ヶ月後に眼球を摘出し、2.0%グルタールに浸透させ、眼球を半割し、ふたたびグルタールで固定した。実体顕微鏡によるマクロ的な組織観察で、チップの固定状態、網膜剥離の有無などを観察し、電子顕微鏡的な検討のための標本作成施行し、トルイジンブルー染色による光学顕微鏡観察、さらに電子顕微鏡学的な検討を行った。

C. 研究結果

1. 豚眼のチップ網膜下固定の代表写真を図1に示す。

(i) マクロ観察

術後3ヶ月、術後6ヶ月の眼では、人工チップは網膜下に安定して固定していた。網膜剥離もみられなかった。

(ii) 組織所見

人工網膜チップは手術時に網膜に挿入した位置と移動していないことが網膜創との関係から確認された。網膜剥離などの所見もみられなかった。これによって人工網膜チップは一定の位置に固定されていたと考えられた。

人工的に後部硝子体剥離を完成させて、意図的網膜剥離を作成したはずであるが、電子顕微鏡では後部硝子体は未剥離であることが観察された。

- ・人工網膜チップの部位(人工網膜チップ上の部位、図1)の網膜はその周囲(図1)より肥厚、浮腫が存在したが、視細胞の消失以外は著明な変化を認めなかった。網膜内層は比較的健常に維持されていた。
- ・人工網膜チップ上に大きな色素顆粒を含む細胞が存在し(図1)、これが手術時に沈着した網膜色素上皮なのか、術後に網膜色素上皮が遊走したのか、今後の検討が必要と思われた。しかし、網膜内にグリア細胞、色素上皮細胞の増殖所見は認められなかった。
- ・術後6ヶ月の網膜においても術後3ヶ月時点と比較して大きな変化はみられなかった。

2. 家兎眼の刺激電極の脈絡膜上腔設置眼の観察(図2、図3)

(i) マクロ観察

刺激電極設置周囲の網膜構造は比較的健常であった。一方、送電装置となるアレイ付近の網膜は、白色癥痕化していた。網膜剥離などは観察されなかった。

(iv) 組織所見

人工網膜チップ付近の網膜は電子顕微鏡的な異常は観察されなかった。送電装置となる角膜周辺に設置したアレイ付近の網膜は、マクロ的な観察においても全層にわたって萎縮変性していた。しかし、その周囲網

膜には、炎症細胞や線維芽細胞、グリア細胞の増殖性変化は観察されなかった。

D. 考察

豚眼における人工チップの網膜下固定は6ヶ月までの期間で比較的安定した設置が得られることが判明した。しかも異物反応や増殖性変化などの二次的変化が少なく、これは一昨年度の海外派遣委員による電極シート移植の実験で、FAと組織所見から、網膜下に移植された人工網膜チップに起因する網膜下液の貯留や増殖反応は認めた結果と一致した。後部硝子体は未剥離で、豚眼の実験モデルにこのことの配慮の必要性が示唆された。グリア細胞の増殖の所見は認められず、シグナル伝達を強く阻害する事を示す所見はないと考えられた。しかし、人工チップ挿入部位の網膜の重層化など手術侵襲の影響は大きく、手術的に安定した結果が得られるかが今後の課題と考えられた。

その点、共同研究者の実験で、プロトタイプ的人工網膜チップをウサギ脈絡膜上腔に設置したところ、誘発電位の記録が得られたことは、手術による網膜侵襲が回避されることを考えると、今後の検討の意義があると考えられた。組織学的にも、その付近の網膜に病的変化は見られなかった。ただし、送電装置付近の網膜傷害が観察され、今後更に生体内での人工網膜チップの固定状態、長期に渡る電氣的刺激後の生体側の反応、組織形態、チップ自体の頑強性等についての検討が必要である。

E. 結論

人工チップによる生態適合性は、家兎眼、豚眼において、6ヶ月までの留置では、明らかな異物反応、拒絶反応は組織学的には観察されなかった。しかし、網膜上チップではその設置の安定性が大きな問題であることが示唆された。網膜下チップの安定性は良好であるが、網膜上に比較してチップ前面の色素上皮細胞を主体とする細胞増殖、網膜外層の変性などの二次的な反応が見られた。網膜剥離や出血などの術中、術後の合併症を考えると、硝子体に網膜下に挿入するよりも脈絡膜上腔設置の意義をさらに検討することが重要であると考えられた。

G. 研究発表

報告 (論文・総説)

Oshitari K, Hida T, MD, Okada AA, Hirakata A: Long term complications of hydrogel Buckles. *Retina*. 23:257-261, 2003

忍足和浩、平形明人、岡田アナベルあやめ、樋田哲夫、小田仁、三木大二郎、永本敏之、藤原隆明: 白内障術後感染性眼内炎の硝子体手術成績. *日眼会誌* 107:590-596, 2003

今野公士 平形明人 三木大二郎 樋田哲夫: 増殖糖尿病網膜症における牽引性網膜剥離に対する手術成績: 予後不良例の検討. *眼紀* 54: 211-216, 2003

三浦克洋 平形明人 田中恵津子 西脇友紀 樋田哲夫: シリコンオイル注入眼の近用屈

折矯正. *眼臨* 97:786-790, 2003

Wakabayashi T, Okada AA, Morimura Y, Kojima E, Asano Y, Hirakata A, Hida T: Trans-Tenon's retrobulbar triamcinolone infusion for macular edema in central and branch retinal vein occlusions. *Retina* (in press)

田村智則、平形明人、杉本敬、高島直子、川真田悦子、小田仁、三木大二郎、樋田哲夫: 糖尿病黄斑浮腫に対する内境界膜剥離を併用した硝子体手術成績. *眼臨*

Morimura Y, Okada AA, Hayashi A, Fujioka S, Hashida N, Kawahara S, Hida T: Histology and protein expression in subthreshold transpupillary thermotherapy in rabbit eyes. *Arch Ophthalmol* (in press)

平形明人: 糖尿病網膜症をどう管理するか. *Medicina* 40:481-485, 2003

平形明人: 病変の理解に役立つ硝子体手術. *日本の眼科* 74:203-206, 2003

小田仁、平形明人: 網膜剥離、眼内充填質の使い方—増殖性硝子体網膜症— *プラティカルオプサルモロジー* 70-73, 2002

平形明人、田中靖彦、井上真: 硝子体・網膜病変 *小児眼科の ABC* p107-124, 2003 日本医事新報社

堀田一樹・平形明人・樋田哲夫:PDR 術後強膜創における線維血管増殖の UBM 所見.三宅養三・玉井信・白井正彦・安藤文隆編,21 世紀アラカルト,p85-90,アジア地域眼科医研修基金の会,2003

平形明人:液体パーフルオロカーボンの使用法. 田野保雄他(編), 樋田哲夫(特集編集):スタンダード眼科顕微鏡手術, 眼科診療プラクティス 6, p260-264, 文光堂, 東京, 2003

平形明人:ガス・シリコンオイルタンポナーデ. 田野保雄他(編), 樋田哲夫(特集編集):スタンダード眼科顕微鏡手術, 眼科診療プラクティス 6, p265-272, 文光堂, 東京, 2003

平形明人:同時手術(水晶体硝子体同時手術). 田野保雄他(編), 樋田哲夫(特集編集):スタンダード眼科顕微鏡手術, 眼科診療プラクティス 6, p273-285, 文光堂, 東京, 2003

特許取得状況:なし

図1 豚眼における人工チップ網膜下設置例

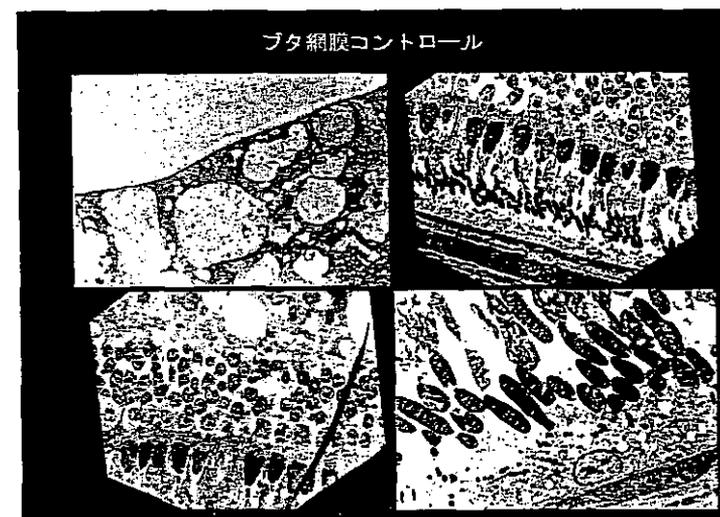
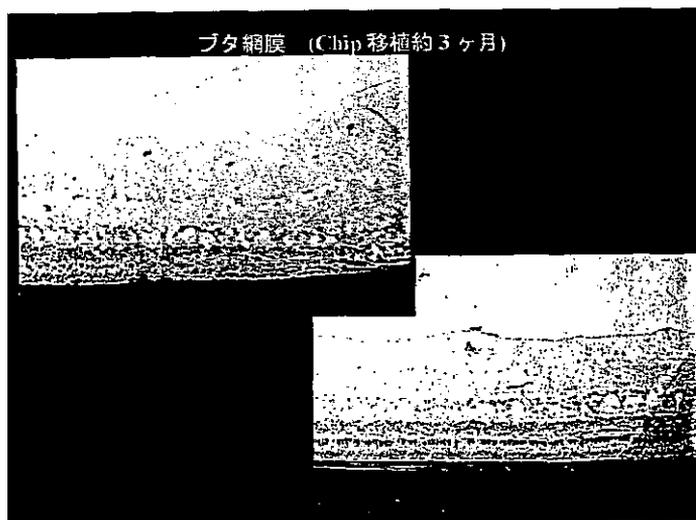
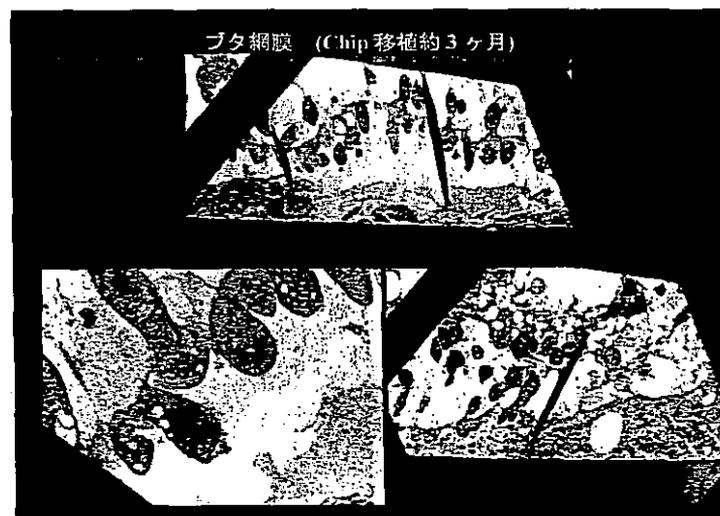
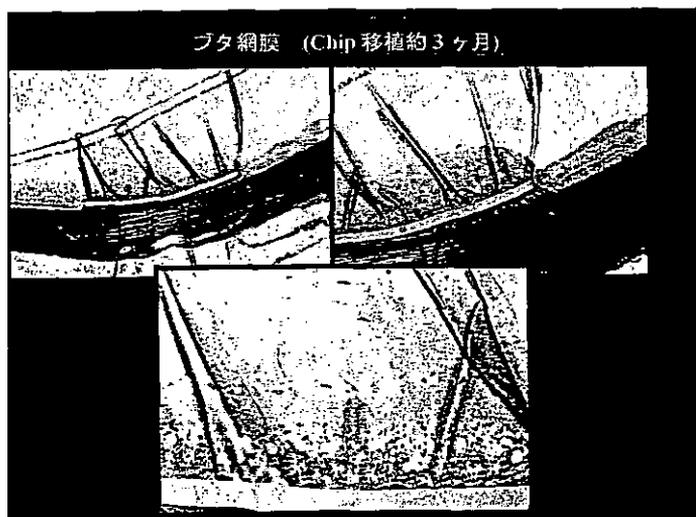
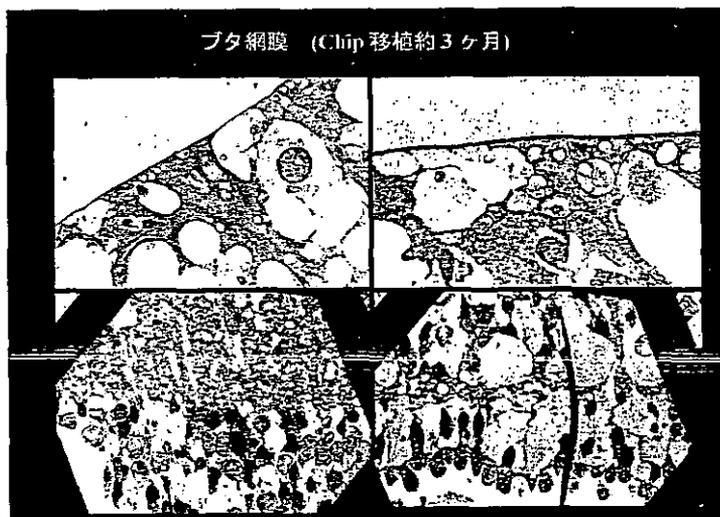
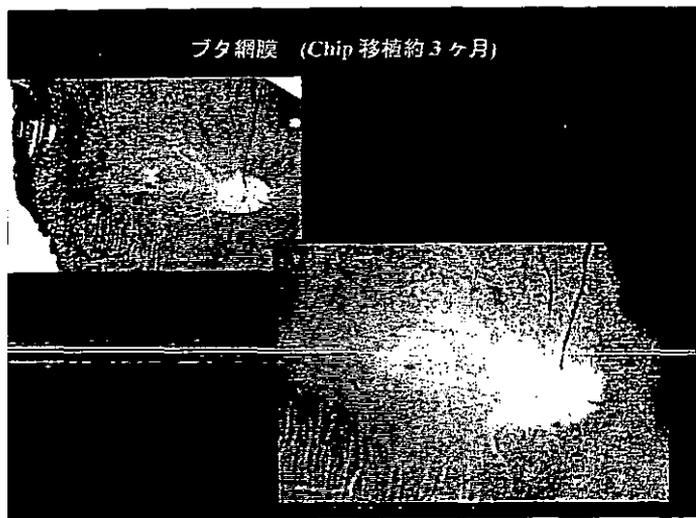


図 2A 家兔眼における人工チップ脈絡膜上腔設置例

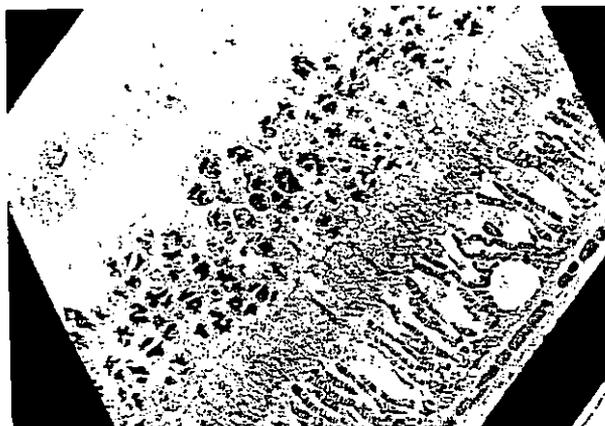
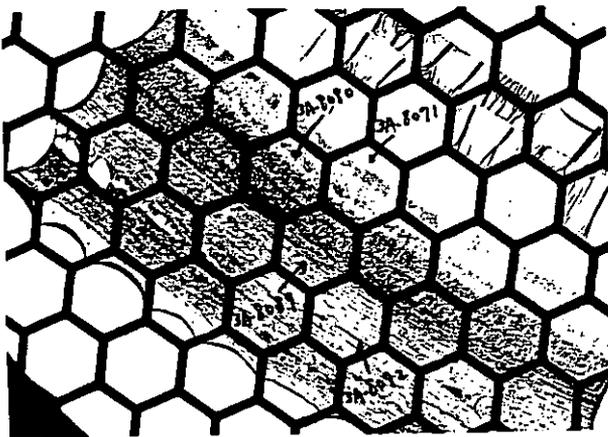
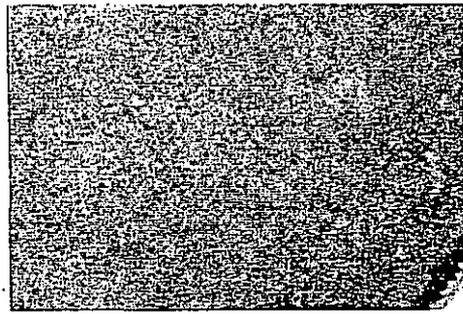
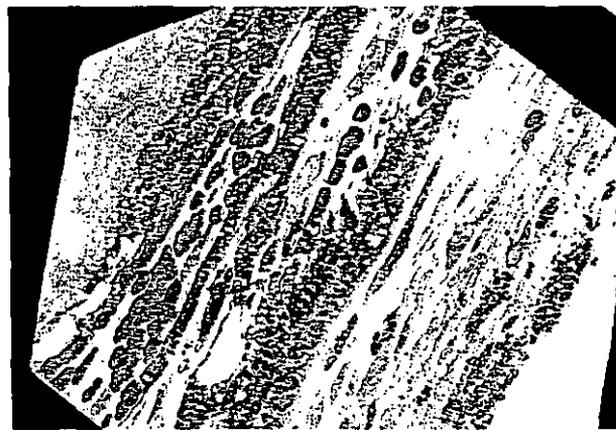
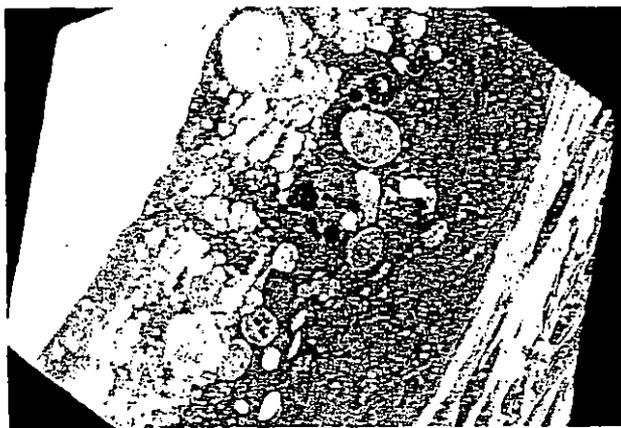
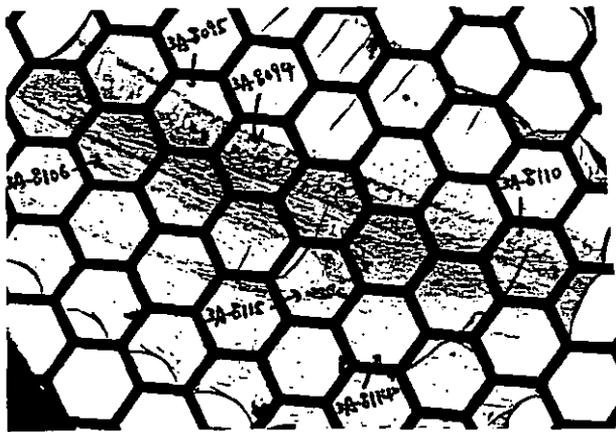
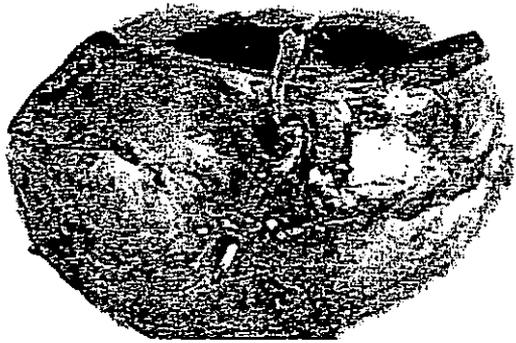


図 2B 家兎眼人工チップ脈絡膜上腔設置例における送電装置部位の検討



研究要旨

刺激電極による電気刺激の有効性および安全性を精査するためには、*in vivo* 実験のみでは不可能である。そこで比較的实验がコントロールしやすい剥離網膜を用いた実験により、これを調べなければならない。具体的な課題は、どのような電気刺激(強度、刺激パターンなど)で、どの範囲の、どの種類の細胞が、どう応答するか、を精査することである。平成14年度までの研究により、電気刺激に対する網膜神経節細胞の電気的応答について多点電極記録装置を用い、刺激閾値及び応答様式を明らかにした。平成15年度においては、電気刺激が神経節細胞に与える生物学的影響をより細かな細胞レベルで精査するために、細胞内カルシウム濃度を指標とし、電気刺激が神経節細胞に与える影響を、単一細胞レベルで測定した。

A. 研究目的

人工網膜システムを現実のものとするためには、刺激電極を評価し、刺激条件を適切に定める必要がある。しかし、多点電極装置を用いた電気的応答の測定のみでは、電気刺激に対する細胞レベルの生物学的応答を測定することはできない。そこで、細胞内での重要な情報伝達物質であり、細胞の活動により濃度が変化する、細胞内カルシウムイオン濃度を指標とし、その測定システムを構築するとともに、電気刺激によるカルシウム濃度変化の測定を行った。

B. 研究方法

(1) カルシウムイメージング装置および計測法の確立

[実験動物]

実験動物には、無尾目アカガエル科ウシガエル (*Rana catesbeiana*: 体長 10~15 cm) を用いた。ウシガエルは一年を通して

入手が可能で飼育が容易であり、変温動物であるため、試料としての取り扱いが容易で、長時間にわたっての実験が行える。実験動物の取扱いは、大阪大学大学院工学研究科動物実験委員会の方針に基づいて行った。網膜は、脊髄穿刺後眼球を取り出し、剥離した。

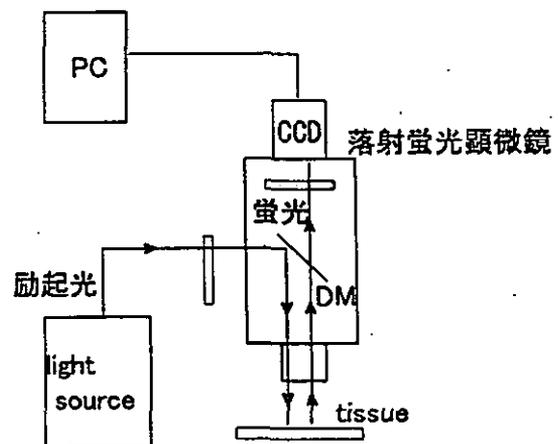


図1. イメージングシステムの概略図