

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田野 保雄

平成 17 (2005) 年 4 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

(分担研究者：大路 正人、研究協力者：瓶井資弘、生野恭司、中内一揚)

### II. 分担研究報告

1. 網膜刺激電極の視覚中枢および網膜における機能評価 ..... 8

不二門 尚

(i) ネコ視覚中枢における網膜刺激電極の機能評価

(研究協力者 神田寛行)

(ii) ネコ網膜における functional imaging

(研究協力者 大川 賀孝)

2. 経角膜電気刺激による視細胞の神経保護 ..... 19

福田 淳

(研究協力者 森本 壮、松田理、三好智満、澤井元)

3. 中型視細胞変性動物の作成 ..... 25

近藤峰生 三宅養三

4. 家兔眼における人工網膜チップの組織学的検討 ..... 28

平形 明人

5. 遊離網膜および視覚中枢における電気刺激の効果の検討 ..... 36

八木 哲也 (研究協力者 小山内実)

6. 網膜刺激型電極のデバイスの開発 ..... 43

太田 淳

7. 網膜刺激型電極のトータルシステムの開発 ..... 48

小澤 素生、西村 茂

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 59

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 60

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
総括研究報告書（H16年度）

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  
（分担研究者 大路 正人、研究協力者：瓶井資弘、生野恭司、坂口 裕和、中内一場）

研究要旨

わが国独自の人工網膜の方式である脈絡膜上—経網膜刺激法（Suprachoroidal-Transretinal Stimulation(STS))を用いて、家兎強膜内に慢性的に刺激電極を埋め込み、連日一定電流で刺激することで生じる生体の反応、電極の変化および埋め込みの安定性について検討した。ポリイミドフィルム上に金—白金バンプ電極をおいた、フレキシブルな刺激電極を用いて、電氣的誘発電位（EEP）が得られる閾値上の電流値である 100uA を毎日1時間、2週間与えたが、刺激後にEEPの振幅の低下はなかった。また組織学的にも網膜への影響はなく、電極周囲の強膜周辺に軽度の炎症細胞を認めるのみであった。電極の埋め込み安定性もよく、表面の変化も少なかった。従って、STS方式による人工網膜は、慢性的に刺激電極を埋植した場合でも有効に働き、生体適合性も良好で安全であることが示唆された。

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	近藤 峰生	名古屋大学大学院医学系研究科 眼科学 講師
福田 淳	大阪大学大学院医学系研究科 情報生理学 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
三宅 養三	名古屋大学大学院医学系研究科 眼科学 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
平形 明人	杏林大学医学部 眼科学 助教授	小澤 素生	(株)ニデック視覚研究所 所長
大路 正人	大阪大学大学院医学系研究科 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、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。眼組織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。われわれはこれまでの研究で、わが国独自の人工網膜の方式である脈絡膜上一経網膜刺激法

### (Suprachoroidal Transretinal Stimulation

(STS)) が、急性の動物実験で、人工網膜の方式として、有効で安全な方式であることを示した。本年(平成16年度)は、家兎強膜内に慢性的に刺激電極を埋め込み、連日一定電流で刺激することで生じる生体の反応、電極の変化および埋め込みの安定性について検討した。

## 研究方法

使用動物：有色家兎 (n = 4)

刺激電極；ポリイミド基板、白金—金スタッドバンプ、パリレンコート (図1、2)

参照電極；白金線 (100 $\mu$ m)

記録電極；頭蓋ネジ電極

方法：昨年度に開発した、慢性埋め込み方式を使用して、慢性刺激兎を作成する。(具体的には、昨年度報告書を参照) 連日1時間の、兎の皮質野から脳波が得られる程度の一定低電流刺激を行い、組織の安全性をみた。それに使用した固定刺激電流は、biphasic pulse, 100 $\mu$ A, 0.5ms duration, 20Hz, 1時間である。さらに、電極埋め込み性の評価として、オシロスコープを使用して、刺激—参照電極間の電圧を測定した。刺激開始直後と、終了時の電圧を記録した。この1時間刺激の前後に網膜反応性評価のための、脳波誘発電流；monophasic pulse, 300 $\mu$ A, 0.5ms duration, 1Hz, 50回加算を流して、電気

誘発電位 (EEP) を頭蓋電極から記録した。2週間連日この刺激と記録を繰り返した。

組織評価として、2週間の刺激後に眼底写真、蛍光眼底造影検査 (FAG) にて組織損傷の有無を確認した。さらに眼球摘出をしたのち電極ごと樹脂包埋し、HE染色にて光学的顕微鏡にて観察した。必要に応じて、電極を眼球摘出時にあらかじめ取り外し、電極は走査電顕にて、眼球は樹脂包埋にて観察した。

## 研究結果

図3に代表的な一匹からの脳波を示す。図3-aは、埋め込み4日目の覚醒した兎から得られたVEPおよびEEPであり、図3-bは、埋め込み14日目の同波形である。上から順番に、VEP波形、1時間刺激前のEEP波形、一番下が、1時間刺激後のEEP波形である。日数がたっても、再現性のよい波形が得られている。脳波形は、その日の兎のコンディションによって、多少変化するが、潜時はほぼ同じである。今回、2週間にわたり4匹の兎から再現性よく得ることができた、潜時30msあたりの陽性波と、それに引き続く潜時35msあたりの陰性波の振幅の幅を、すべての兎の脳波評価の数値とした。図4にそれぞれの兎から得られた刺激前後のEEPの大きさの時系列変化をグラフにして示す。(図4a, b, c, d)

2週間の傾向としては、刺激前後での振幅の大きさは、兎の個体によって反応に差はあるが、ほぼ減衰せずに最後まで保たれた。平均値刺激前14.7 $\pm$ 2.7  $\mu$ V、刺激後14.5 $\pm$ 4.2  $\mu$ Vであった。

次に、電極間の電圧測定結果の時系列変化を図5に示す。(図5a, b, c, d) この電圧は、電極間のイビ・ガスを反映していると考えられる。電極によって、多少の数値的な差異はあるが、2週間にわたりほぼ変化なく保たれている。平均値

刺激前 2.25±0.52 V、刺激後 2.29±0.50 V であった。

さらに組織の安全性評価であるが、4匹すべてにおいて、眼底検査および FAG 検査にて正常所見であった。樹脂包埋の結果を図 6 に示す。電極は強膜内にしっかりと埋め込まれており、炎症細胞の発生も少なかった。(図 6-a) 網膜は層構造がきちんと保たれており、埋め込み手技あるいは電流による障害は認められなかった。

(図 6-b)

最後に電極表面の電子顕微鏡写真 (SEM) を図 7 に示す。2 週間の通電による電極表面の変化は特に認められなかった。図 7a に弱拡大(x35)、図 7b に強拡大(x200)を示す。

#### 考察

人工網膜チップを兎に慢性的に埋め込むことが可能であることは以前報告したが、そのチップを刺激することで生じてくる生体側の変化、電極の変化につき調べたのが本年度の報告である。図 3、4 に示すとおり、埋め込み後毎日の通電にもかかわらず、安定した EEP が得られることは、網膜の反応性が生理学的に保たれていることを意味する。図 5 に示すとおり、電極間電圧が変化ないことは、埋め込み安定性、電極まわりの組織変化の少なさ、電極表面の変化の少なさを意味している。図 6 に示したとおり、実際の組織写真においても電極の埋め込み安定性はよかった。

また、強膜内における組織反応も少なかった。網膜に対する障害の少なさは、いままでの報告でも指摘していたが、今回さらにそれを裏打ちする結果となった。また図 7 は、電極表面の形状を示しているが、電極側からも通電に対する安定性が示された。

#### 結論

STS 方式による人工網膜は、慢性的に刺激電極を埋植し、電気刺激した場合でも有効に働き、生体適合性も良好で安全であることが示唆された。今後さらに長期間の刺激による安全性につき検討する必要がある。

#### 健康危険情報

特になし

#### 研究発表

##### 1. 論文発表

- [1] Nakauchi K, Fujikado T, Kanda H, Morimoto T, Choi JS, Ikuno Y, Sakaguchi H, Kamei M, Ohji M, Yagi T, Nishimura S, Sawai H, Fukuda Y, Tano Y.: Transretinal electrical stimulation by an intrascleral multichannel electrode array in rabbit eyes. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2004 Epub
- [2] 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. 45(2): 668-674, 2004.
- [3] Nakata K, Ohji M, Ikuno Y, Kusaka S, Gomi F, Kamei M, Ross DF 3rd, Tano YU: Wide-angle viewing lens for vitrectomy. Am J Ophthalmol. 137(4):760-762. 2004.
- [4] Ikuno Y, Sayanagi K, Ohji M, Kamei M, Gomi F, Harino S, Fujikado T, Tano YU: Vitrectomy and internal limiting membrane peeling for myopic foveoschisis. Am J Ophthalmol. 137(4):719-724, 2004.
- [5] Sawa M, Awazu K, Takahashi T, Sakaguchi H, Horiike H, Ohji M, Tano YU: Application of femtosecond ultrashort pulse laser to photodynamic therapy mediated by

indocyanine green. Br J Ophthalmol. 88(6):826-831, 2004.

[6] Sakaguchi H, Fujikado T, Fang X, Kanda H, Osanai M, Nakauchi K, Ikuno Y, Kamei M, Yagi T, Nishimura S, Ohji M, Yagi T, UTano YU: Transretinal electrical stimulation with a suprachoroidal multichannel electrode in rabbit eyes.

Jpn J Ophthalmol. 48(3):256-261, 2004.

[7] Fang X, Hayashi A, Morimoto T, Usui S, Cekic O, Fujioka S, Hayashi N, Fujikado T, Ohji M, UTano YU: Retinal changes after macular translocation with 360-Degree retinotomy in monkey eyes. Am J Ophthalmol. 137(6):1034-1041, 2004.

[8] Kamei M, UTano YU, Yasuhara T, Ohji M, Lewis H: Macular translocation with choriocleral outfolding: 2-year results. Am J Ophthalmol. 138(4):574-581, 2004.

#### 学会発表

1. Tano Y, The Japanese AMD Trial: Two-Year Results of Verteporfin Therapy in Japanese Age-related Macular Degeneration Patients: Association of Research in Vision and Ophthalmology, April 27, 2004.

2. K. Nakauchi, T. Fujikado, H. Kanda, J.S. Choi, Y. Ikuno, M. Kamei, M. Ohji, T. Yagi, S. Nishimura, Y. Tano Effectiveness of transretinal electrical stimulation using chronically implanted intrascleral electrodes in rabbits] ARVO, 2004. Full Macular Translocation for Subfoveal Choroidal Neovascularization: Southeast EURMEA REACT 2004, St. Petersburg, Russia, June 4-6, 2004.

4. Update in Internal Limiting Membrane Peeling Procedure: LXVII Annual Meeting of Canadian Ophthalmological Society, Vancouver, Canada, June 18, 2004.

5. Tano Y. The Japanese Artificial Retina Effort: III Curso de Oftalmologia de Clinica Alemana de Santiago, Centro de Eventos Club Manquehue, Santiago, Chile, August 20-21, 2004. The Japanese AMD Trial (JAT): Two-year results of verteporfin therapy and lesion morphology in Japanese AMD patients: XXIVth Meeting of the Club Jules Gonin. Athens, Greece, September 8-12, 2004.

7. 中内一揚、不二門尚、神田寛行、チョイジュンサブ、生野恭司、瓶井資弘、大路正人、八木透、西村茂、田野保雄 「家兎における網膜刺激型電極の慢性埋め込み実験:強膜側からの刺激による検討」、日本眼科学会、東京国際フォーラム、2004年4月15日 田野保雄

(organizer) 市民公開講座、実用化間近い人工視覚、大阪国際会議場、2005年2月1日

知的財産権の出願、登録状況  
特になし

「図の説明」

- 図 1 : 電極先端の断面拡大図
- 図 2 : 電極の全体図
- 図 3 a : 埋め込み 4 日目の兔脳波
- 図 3 b : 埋め込み 14 日目の兔脳波
- 図 4 a : 兔 no. 1 の EEP 変化のグラフ
- 図 4 b : 兔 no. 2 の EEP 変化のグラフ
- 図 4 c : 兔 no. 3 の EEP 変化のグラフ
- 図 4 d : 兔 no. 4 の EEP 変化のグラフ
- 図 5 a : 兔 no. 1 の電極間電圧変化のグラフ
- 図 5 b : 兔 no. 2 の電極間電圧変化のグラフ
- 図 5 c : 兔 no. 3 の電極間電圧変化のグラフ
- 図 5 d : 兔 no. 4 の電極間電圧変化のグラフ
- 図 6 a : 樹脂包埋写真 (弱拡大)
- 図 6 b : 樹脂包埋写真 (強拡大)
- 図 7 a : 電極表面の SEM 写真 (弱拡大)
- 図 7 b : 電極表面の SEM 写真 (強拡大)

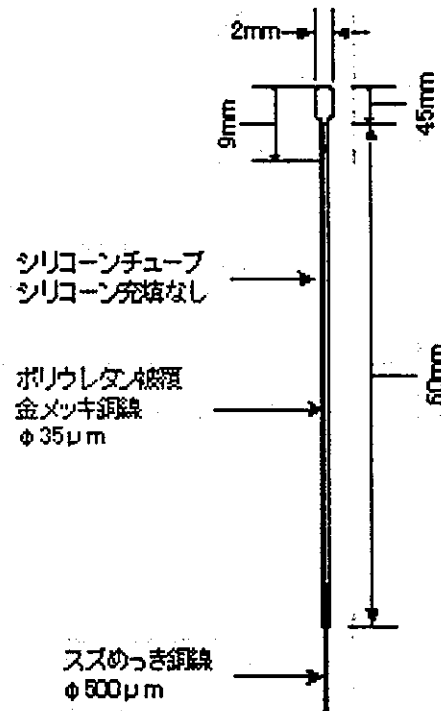


図 2

図 1

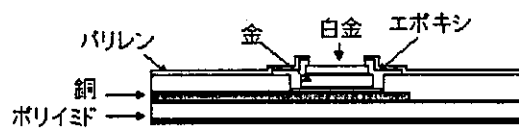


图 3 a

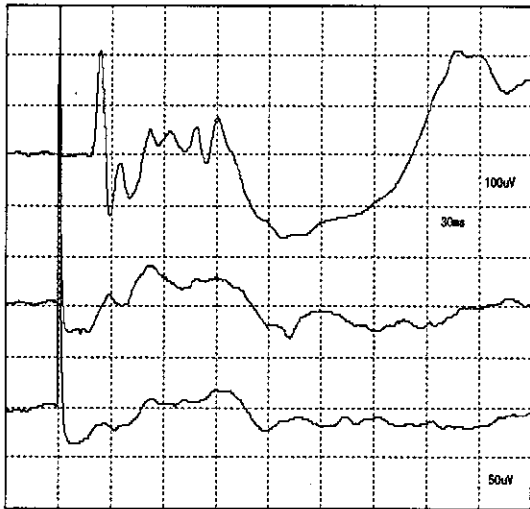


图 3 b

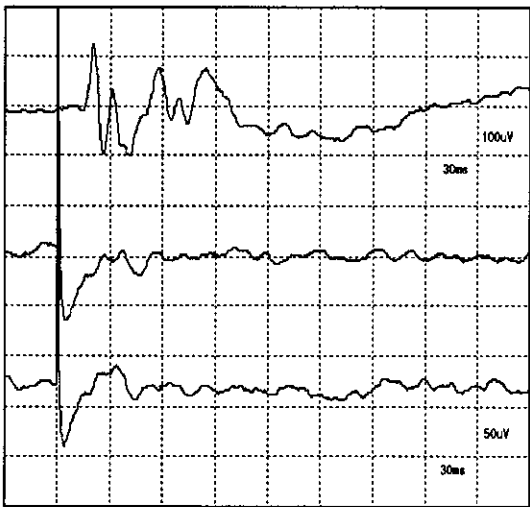


图 4 b

图 4 c

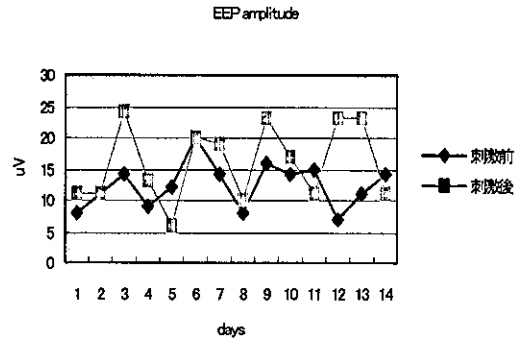


图 4 d

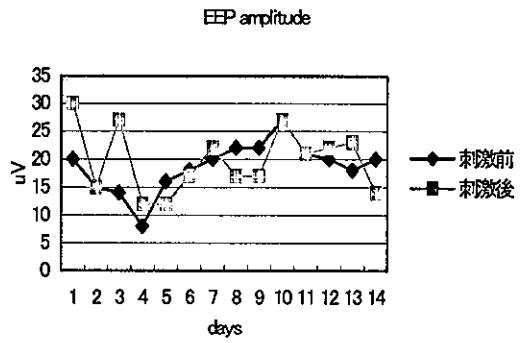


图 4 a

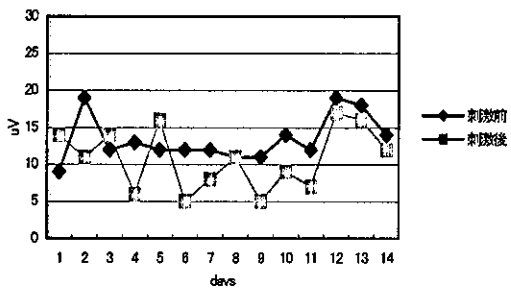
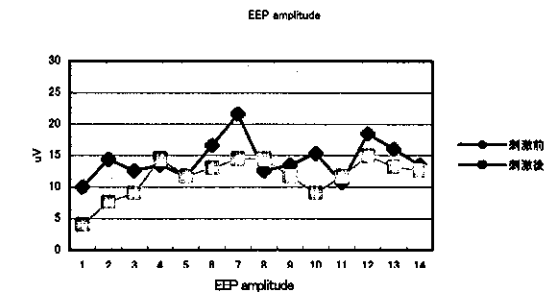




図 5a

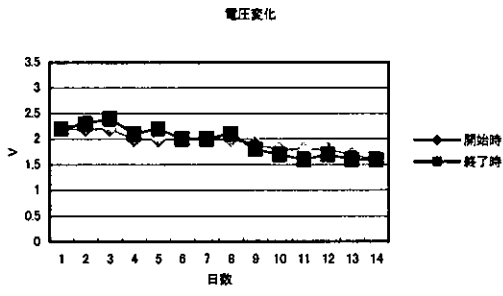


図 5b

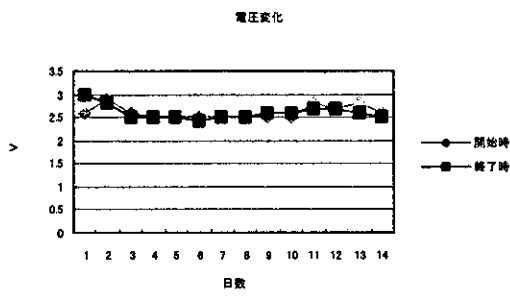


図 5c

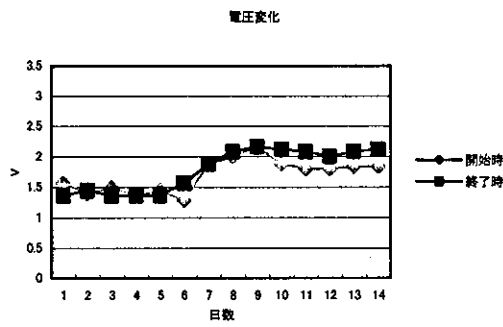


図 5d

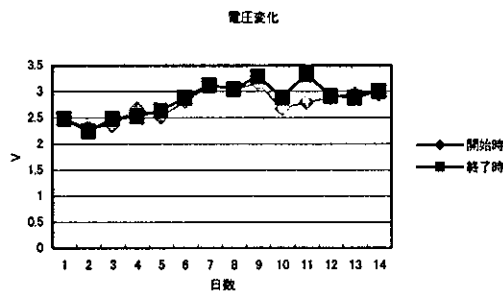


図 6a

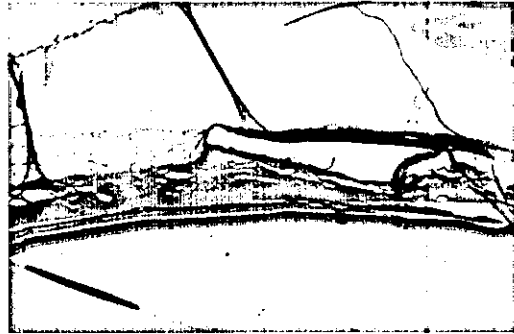


図 6b

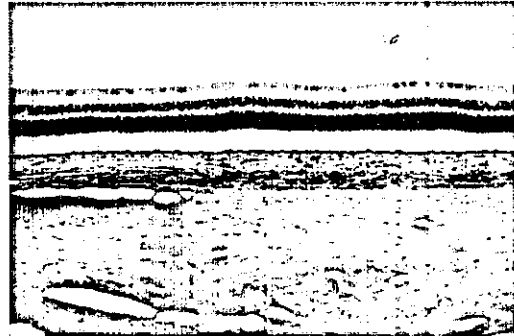


図 7a



図 7b



## 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

#### 網膜刺激電極の視覚中枢における機能評価の研究 —ネコ視覚中枢における網膜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

「脈絡膜上-経網膜刺激法 (STS)」によって惹起される視覚中枢での神経応答の特性についてネコ外側膝状体の中継細胞より単一神経応答レベルで解析した。その結果、STS に対するスパイク発火の潜時は 5-15ms でその出現率は刺激部位からの距離に依存して減少した。特に閾値レベルの弱い刺激強度ではさらにその興奮が限局した。これらの結果より、STS は刺激電極の直下の神経細胞を局所的に刺激していると考えられる。

#### A. 研究目的

本プロジェクトにおいて研究開発が進められている独自の網膜刺激方式（脈絡膜上-経網膜刺激：Suprachoroidal-transretinal stimulation: STS [1]-[3]）は刺激電極が網膜と直接接触しないという特徴を有し、海外の研究グループが採用している網膜上刺激(Epi-retinal stimulation)や網膜下刺激(Sub-retinal stimulation)といった直接網膜接触型の刺激方式に比べ網膜に対する侵襲を極力回避できるのではないかと期待されている。

しかし、非接触型の刺激方式では刺激閾値の上昇や局所刺激の困難さ等の問題が懸念される。局所的に刺激を行い限局した興奮を引き起こすことができなければ再生される画像の解像度が著しく低下し人工視覚として成り立たない。STS によって誘発される網膜の興奮がどの程度空間的に広がっているか明確にすることは STS が人工網膜の刺激方式として適しているかどうか判断する上で重要である。

そこで我々はネコの視覚系を用い STS によって誘発される神経活動を網膜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ユニットレベルで評価している。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で構成されており、ヒトの視覚系の生理実験のモデル系と

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、人工網膜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。

昨年度、多点電極を用い異なる刺激部位にて中継細胞の興奮を惹起するのに必要な電流の閾値を測定したところ、受容野の近い部位に刺激部位があるときほど閾値が低くなる傾向が見られたことを報告した。ただ、昨年度の段階では記録できたユニットが4個しかなく、さらに受容野近傍1~2度以内で刺激したデータがほとんど無かった。また閾値による評価だけでは、興奮の強さまで評価することが難しかった。そこで今年度はひきつづき実験を継続し電極近傍のデータを増やした上で、刺激部位からの距離と興奮の強さの関係について評価を行った。

#### B. 手法

##### [実験動物]

実験動物として成ネコ(米国短毛種)を使用した。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ツールナトリウム (1~2ml/kg, hr) と臭化パンクロニウム (0.2

ml/kg, hr) で動物を麻酔不動化し、笑気ガスと酸素ガスの混合気(1:1)で人工呼吸を行った。実験中は保温マットで体温を 37 度に維持し、心電図、呼気ガス分析装置およびスパイロメータで動物の生理的状态を持続的に監視しながら、人工呼吸器の換気回数や麻酔量をコントロールして動物の状態を維持した。

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(1%硫酸アトロピン、5%塩酸フェニレフリン)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 の中継細胞より単一神経活動を記録するために、抵抗値が 1~3 M $\Omega$  のガラス封入タングステン電極(ニューロサイエンスイデア社)を定位的に左 dLGN の A1 層へ刺入した。電極位置は油圧式 3 次元マイクロマニピレータ(ナリング)で制御した。

記録電極より単極誘導された神経細胞の電気活動を初段増幅器(Model 1800 Microelectrode AC Amplifier, A-M Systems, Inc, 増幅率 1000 倍、バンドパスフィルター: 300Hz-20 k Hz)で増幅し、さらに直流増幅器(Model LPF-202, Warner Instrument Corp, 増幅率 2~10 倍、ローパスフィルター: 5 kHz)で増幅した。増幅後の波形をシグナルプロセッサ(1401 plus, Cambridge Electronic Design Inc)で記録した。その記録した神経活動をオフラインで神経活動解析ソフト(Spike 2, Cambridge Electronic Design Inc)を用いて解析した。Spike 2 付属の主成分分析機能を用いて記録波形中から単一ユニット活動を抽出し、解析に用いた。

視交叉刺激のために双極刺激電極( $\phi$  0.2 mm ステンレス線, 先端 1 mm 露出)を外耳道より吻側約 15 mm、正中線より約 1 mm 外側で左右それぞれ一本ずつ刺入し、脳表からへ 22-24 mm 付近で最も視覚刺激に強く反応する部位で歯科用アクリルレジンをを用いて電極を頭蓋骨に固定した。

記録したユニットそれぞれについて、眼前 114cm に設置したスクリーン上で受容野の同定を行った。この視交叉刺激に対する応答潜時と光刺激に対する光応答特性より、記録している dLGN 中継細胞の cell type (ON 中心型と OFF 中心型: Y 細胞と X 細胞)の判定を行った。

#### [網膜刺激電極]

網膜刺激電極として多極電極と単極電極の 2 種類の刺激電極を用いた。多極電極(ユニークメディ

カル製)では幅 3 mm のシリコン樹脂基盤平面に直径 100  $\mu$  m の円形の白金電極部が 0.5 mm 間隔の格子状に 3 $\times$ 3 の計 9 個配置されている(図 1a)。

一方、単極電極(ユニークメディカル製)では直径 0.8 mm のシリコン樹脂基盤中央に直径 100  $\mu$  m の円形の白金電極が一極設置されている(図 1b)。単極電極の白金電極部は多極電極と同じ仕様を持つ。

多極電極では実験中に白金電極部の位置を網膜側から把握しづらいが、単極電極では電極全体を強膜に押し付けることによって白金電極部の位置を容易に把握できる。そのため特に電極から 1~2 度の近傍に受容野を持つユニットを集中的にサンプリングをするときには単極電極を使用し、一個のユニットにおいて広範囲の距離からサンプリングをする場合には多極電極を用いた。それぞれの白金電極部の特性は同じであると考えてデータを扱った。

#### [STS 法による網膜電気刺激]

網膜刺激用電極設置のため左側眼球後部の眼窩を露出し、網膜中心野から耳側 1~2 mm に相当する部位に強膜半層切除を施し約 9 mm<sup>2</sup> (3 $\times$ 3mm)の開窓部を作成した。開窓部に刺激電極を密着させた。

一方、毛様体扁平部の眼球壁に 30 G 針で穴を空け、不関電極を硝子体内へ挿入した。不関電極には先端 2 mm を露出した直径 0.2 mm の絶縁コート白金線を用いた。

強膜側の刺激電極と不関電極の間で電流パルスを与えることで網膜を刺激した。シグナルプロセッサ(1401 plus)によって出力コマンドを生成し、リニアアイソレータ(A395R, WPI 社製)より出力した電流を両電極間へ流した。

本実験では組織損傷を最低限に抑える目的で、バイフェージックパルスを用いた。具体的には、硝子体内の不関電極から強膜上の刺激電極への外向電流(パルス幅 0.5 ms)を先に、続いて 0.5 ms の内向電流を通電した。電流値は 50、70、100、150、200、250、300、500  $\mu$  A と 7 段階変化させた。同じ刺激パラメータの試行をそれぞれ約一秒の周期で 40 回繰り返した。

多点電極を用いた際は、刺激電極とアイソレータとの間に自作の切り替え装置を接続し、9 極ある刺激電極のうち 1 極の電極を選択して刺激を行った。

#### [組織学的検索]

強膜側に設置した刺激電極の部位が網膜のどこに対応しているのかを調べるため、組織学的に白金電極の設置部位を調べた。実験終了時に 1 mA の直流電流を刺激電極に約 15 秒間流し電極直下の網膜にマーキングした。眼球を摘出し 30 分間 4%ホルムアルデヒド溶液中で固定した後、網膜全伸展標本を作製し電極部位を示すマーキング跡と網膜血管の走行を光学顕微鏡下で記録した。

#### [刺激電極—網膜神経節細胞間の距離について]

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できるため、先に述べた組織像とスクリーン上の投影像とを血管パターンを基準に重ね合わせ、受容野と刺激部位との位置関係を決定した。

記録した dLGN 中継細胞への投射元の網膜神経節細胞が受容野の中心に存在すると仮定し、刺激電極と受容野中心との距離を刺激電極—網膜神経節細胞間の距離(D)として扱った。D の単位は視野角(度)で表した。

### C. 結果

#### [STS による dLGN 中継細胞の反応]

今回の実験では全 79 ユニット(On 中心型 27 個, Off 中心型 52 個: X 細胞 28 個, Y 細胞 39 個, 不明 13 個)から STS に対する反応を記録した。記録電極が dLGN に到達していたことを組織学的に確認したこと、いずれのユニットも同側の光刺激に反応していたことから、これらは dLGN の A1 層に存在する中継細胞の神経活動であると考えられる。

これらのユニットは STS 後 5-15 ms にスパイクを発生した。図 2 にその典型例を表す。このユニットでは約 5 ms からスパイクが現われ 15ms にかけて 2~4 発のスパイクを生じ、それに続いて 30 ms 以降にも約 70 ms の周期で繰り返しスパイクが現われた。15 ms 以内に現われたスパイクは D が小さいときに限って出現していたことから、解析の対象を 15 ms 以内に限った。

各刺激条件にて 40 回試行を繰り返したが、それぞれのスパイクはほぼ同じ潜時をもって現われ、そのばらつきは、ほぼ 1 ms 以内に収まっていた。中には電流が弱くなるに従って潜時が遅くなっていく反応も見られた。このような潜時が遅くなる反応は刺激後 6~7 ms 以降に現われるスパイクに多く見られた。(例、図 3)

刺激後 5~15ms の範囲で一回以上スパイク発火が生じた場合、その試行を「スパイクが生じた試

行」として、40 回の試行中のスパイクが生じた試行の割合を百分率で表したものをスパイク出現率と定義し、STS に対する興奮の強さの指標として用いた。刺激電流強度を段階的に弱めていくとスパイク出現率は減少した。

#### [スパイク出現率の分布と刺激強度の関係]

まず、刺激強度の 100  $\mu$ A の結果(図 4e)に着目すると D が小さい時ほどユニットのスパイク出現率が高くなる傾向にあった。例えば、90%以上のスパイク出現率で毎回の応答に反応するユニットは D が 2 度以内の範囲にしか存在しなかったが、D が大きくなるに従いスパイク出現率は減少した。さらに、D が 6 度以上になるとほぼ全てのユニットで出現率が 10%を下回った。STS に対する網膜の興奮が刺激部位周辺に限局していることが示唆される。

次にスパイク出現率の分布が刺激強度によってどのように変化するか評価するために他の電流値の結果にも着目した。電流値を 500  $\mu$ A にして刺激を行った時(図 4a) D が 10 度以上の部位でも 80%以上のスパイク出現率を持つユニットが存在した。電流値を徐々に下げると、D が小さい範囲に限ってスパイク出現率が高い値を示すようになった。さらに電流を下げていき 50  $\mu$ A まで下げるといかなる場所においてもスパイク出現率はほぼ 10%以下となった。これらの結果から、STS の興奮の分布は刺激強度に影響される事がわかった。限局した興奮を惹起させるためには刺激強度を弱める必要があることが示唆される。

### D. 考察

#### [STS による興奮の広がり]

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。図 4e に示されるようにスパイク出現率は電極から離れるに従って急激に減少していることから、電極近傍で興奮が限局している事がわかる。この結果は STS でも他の網膜刺激方法同様に限局した刺激を行うことが可能であることを示している。

電流密度は刺激電極に近いほど高くなるはずである。スパイク出現率の分布が刺激部位周辺で高い値を示し、さらに電流強度を下げることによってその分布が限局したことを考えると、おそらく電流の分布と興奮の分布がほぼ同一ではないかと考えられる。特に STS では強膜側に設置された刺激電極から硝子体内の不関電極へ電流が貫通して流れることを考えると、STS の電気力線が

収束した状態で刺激電極直下に存在する網膜神経節細胞層を貫いたのではないかと思われる。そのため、非接触の状態で網膜を刺激しても限局した興奮が得られたと考えられる。

#### [通過線維刺激の可能性]

人工網膜の場合、網膜神経節細胞の軸索を刺激してしまう可能性が不安要素として挙げられている。もし刺激部位直下を通過する網膜神経節細胞の軸索を刺激したならば、刺激電極から離れた部位に細胞体が存在する網膜神経節細胞が興奮してしまうため、網膜空間対応が保存されないまま中枢へ視覚情報が伝わってしまい、本来意図した画像を再生することが困難になってしまうからである。特に通過線維の付近に電極を置く網膜上刺激においてこの事象が起こりやすいのではないかとされており、実際いくつかの論文でその現象が報告されている[4]-[6]。これは STS に関しても発生する可能性は考えられるため検証を行う必要がある。

通過線維を同時に刺激しているならば電極から離れた部位でもスパイク出現率の高いユニットが現われるはずだが、図 4e を見ると STS による興奮は刺激部位近傍のみで限局している。ここから STS では通過線維を直接刺激した可能性が低いのではないかと考えられる。しかし、今回は通過線維の方向に沿ったサンプリングをするなどして、積極的に通過線維の影響を調べたわけではなく、本実験の結果だけでは STS の通過線維への影響を結論付けることは難しい。今後より詳細な評価が求められる。

#### [STS の人工網膜への適性と今後の展望]

STS による興奮は刺激電極直下で限局していたことから STS は人工視覚の刺激方式として適していると考えられる。さらに電極が網膜に非接触の状態で刺激できることから、手術の簡便化、安全性等の面で他の刺激方式よりも有利である。

今回は電流値を変えて限局度が変化することを示したが、ほかの刺激パラメータについても検討が必要になってくると思われる。それは、STS の刺激メカニズムが他の網膜刺激方式とは異なる可能性があり、他の方式と同じパラメータを模倣したところで STS の刺激としては適さない可能性が考えられるからである。今後は特に刺激パルスの時間パラメータを変えることでより限局した興奮を誘発できないか検討していく予定である。

#### E. 結論

今回、ネコを用いた *in vivo* 実験において、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限局することがわかった。今後は特に刺激の時間パラメータに着目し STS による反応の時空間的特性を評価していくことが必要である。

#### F. 健康危惧情報

特に無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

1. 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 Vol.45 No.2 pp560-566.

2. Oyagi T, Fujikado T, Hosohata J, Ohji M, Kamei M, Bessho K, Tano Y.: Foveal sensitivity and fixation stability before and after macular translocation with 360-degree retinotomy. *Retina.*;24(4):548-55, 2004.

3. Fang X, Hayashi A, Morimoto T, Usui S, Cekic O, Fujioka S, Hayashi N, Fujikado T, Ohji M, Tano Y. Retinal changes after macular translocation with 360-degree retinotomy in monkey eyes. *Am J Ophthalmol.* 2004 Jun;137(6):1034-41.

4. . Fujikado T, Kuroda T, Ninomiya S, Maeda N, Tano Y, Oshika T, Hirohara Y, Mihashi T. Age-related changes in ocular and corneal aberrations. *Am J Ophthalmol.* 2004 Jul;138(1):143-6.

5. Sato T, Fujikado T, Hosohata J, Ohji M, Tano Y. Development of bilateral, nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy in an eye with diabetic papillopathy.

*Jpn J Ophthalmol.* 2004 Mar-Apr;48(2):158-62.

##### 2. 学会発表

神田寛行、三好智満、森本壮、不二門尚、田野保雄、澤井元、福田淳「脈絡膜上・経網膜刺激法を用いた人工視覚の空間分解能評価」第 97 回近畿生理学談話会、2004 年 11 月 6 日、口演、京都市

三好智満、神田寛行、森本壮、不二門尚、田野保

雄、澤井元、福田淳 「上脈絡膜-経網膜電気刺激法による人工視覚：ネコを用いた空間分解能の評価の試み」 視覚科学フォーラム第 8 回研究会、2004 年 7 月 31 日、口演、米子市

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] Nakauchi K, Fujikado T, Kanda H, Morimoto T, Choi JS, Ikuno Y, Sakaguchi H, Kamei M, Ohji M, Yagi T, Nishimura S, Sawai H, Fukuda Y, Tano Y. Transretinal electrical stimulation by an intrascleral multichannel electrode array in rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* (in press)
- [3] Sakaguchi H, Fujikado T, Fang X, Kanda H, Osanai M, Nakauchi K, Ikuno Y, Kamei M, Yagi T, Nishimura S, Ohji M, Yagi T, Tano Y. Transretinal electrical stimulation with a suprachoroidal multichannel electrode in rabbit eyes. *Jpn J Ophthalmol.* 2004; 48(3): 256-261.
- [4] Li L, Hayashida Y, Yagi T. Temporal properties of retinal ganglion cell responses to local transretinal current stimuli in the frog retina. *Vision Res.* 2005 Jan;45(2):263-73.
- [5] Rizzo JF 3rd, Wyatt J, Loewenstein J, Kelly S, Shire D. Perceptual efficacy of electrical stimulation of human retina with a microelectrode array during short-term surgical trials. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Dec;44(12):5362-9.
- [6] Weiland JD, Humayun MS, Dagnelie G, de Juan E Jr, Greenberg RJ, Iliff NT. Understanding the origin of visual percepts elicited by electrical stimulation of the human retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1999 Dec;237(12):1007-13.

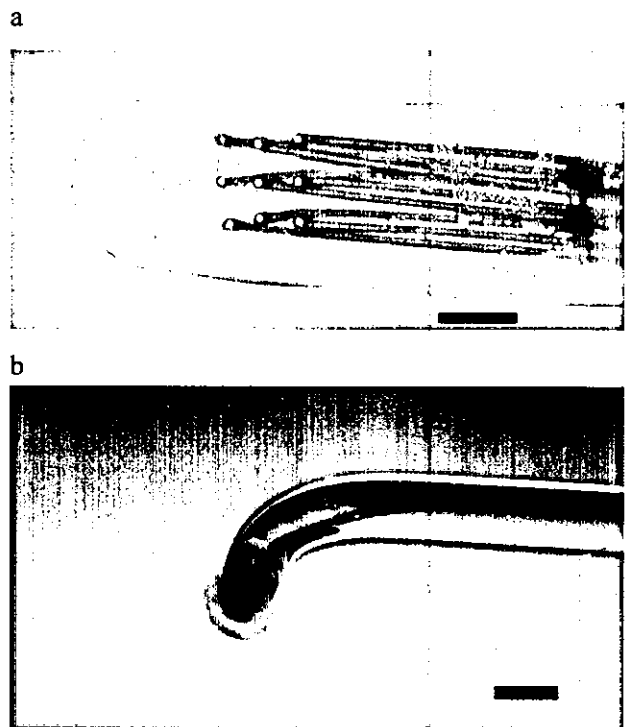


図 1. (a) 多点電極 (スケールバー: 1 mm)  
(b) 単極電極 (スケールバー: 1 mm)

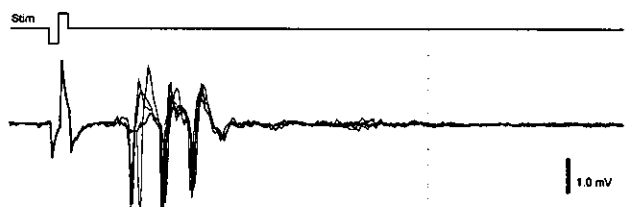


図 2. STS によって生じた LGN 中継細胞の反応。刺激強度 500  $\mu$ A。Off-Ycell。上から順に、刺激パルス、記録波形の重ね合わせ。

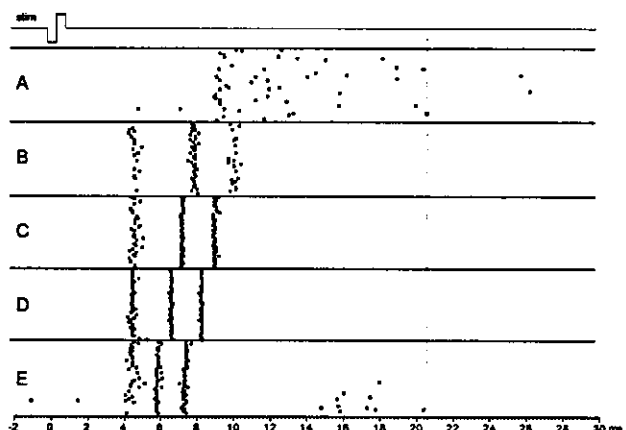


図 3. 刺激電流強度を変化させた時のラスタープロット。A: 100  $\mu$ A, B: 150  $\mu$ A, C: 200  $\mu$ A, D: 300  $\mu$ A, E: 500  $\mu$ A

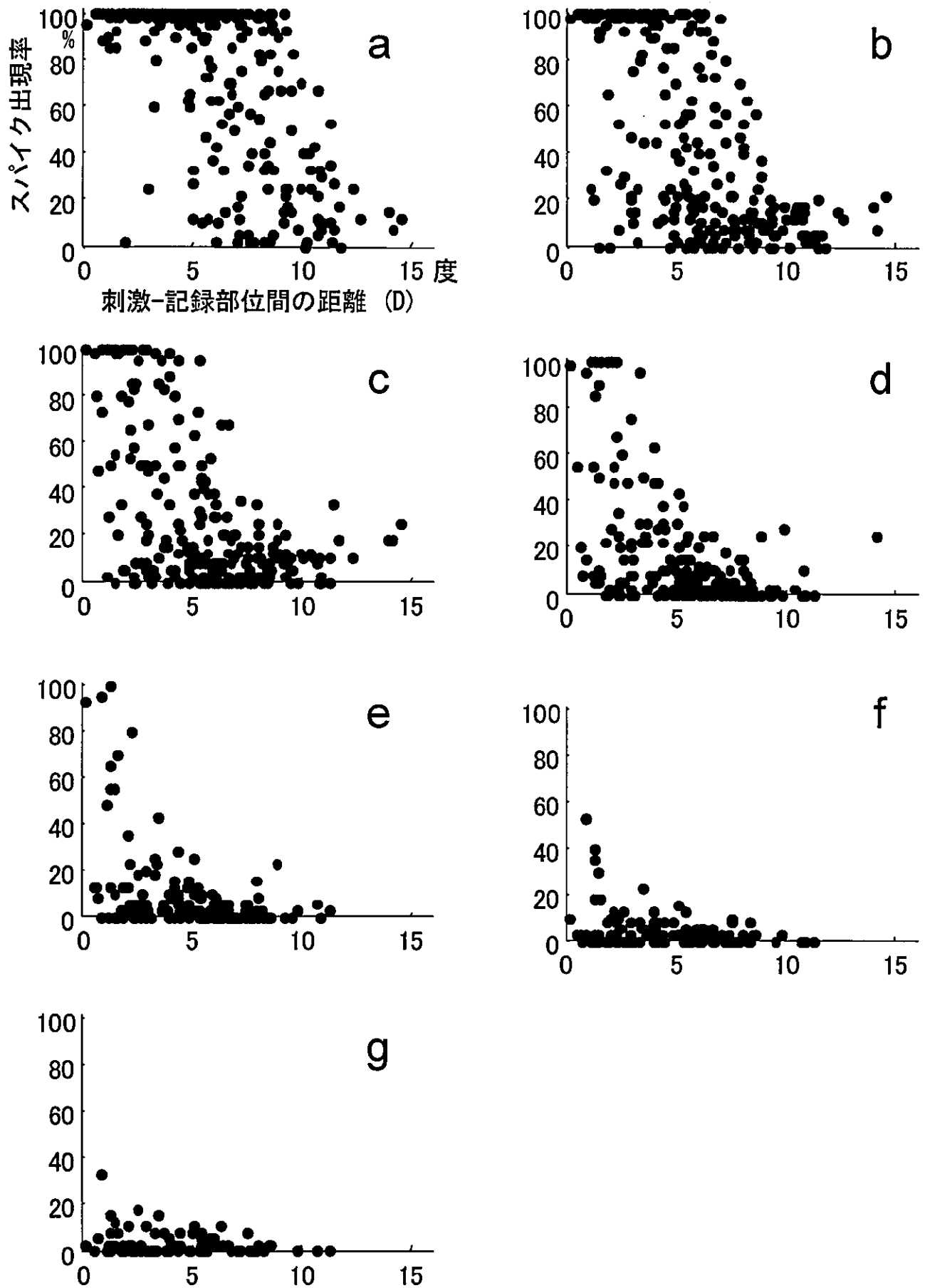


図4. 電流強度別のスパイク出現率の分布 a:  $500\ \mu\text{A}$  (250 nC), b:  $300\ \mu\text{A}$  (150 nC), c:  $200\ \mu\text{A}$  (100 nC), d:  $150\ \mu\text{A}$  (75 nC), e:  $100\ \mu\text{A}$  (50 nC), f:  $70\ \mu\text{A}$  (35 nC), g:  $50\ \mu\text{A}$  (25 nC),

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

網膜刺激電極の機能評価の研究

—ネコ網膜における functional imaging—

分担研究者 大阪大学感覚機能形成学：不二門 尚

研究協力者 大阪大学感覚機能形成学：大川 賀孝

研究要旨

脳研究において近年、注目を浴びている光学的な技術に応用した functional imaging を利用してネコ網膜における神経活動を計測した。眼球を固定した状態で光照射による網膜刺激及び光学的測定を行い、得られた画像をコンピュータ処理することによって神経活動の時間的偏位、空間的分布・局在を観察することができた。

A. 研究目的

現在、脳研究において生体での神経活動の計測は PET や fMRI、MEG が臨床応用されている。近年、光学的な技術を用いた functional imaging が注目されている。神経組織に光を当てると活動のある部位では反射光量低下を起こすことを利用した計測であるが、網膜は脳と同様に神経組織であり、この技術の応用が可能である。また、網膜は光学的に外界に露出していることから、生体においても非侵襲的に技術に応用できる。2004 年の Association for Research in Vision and Ophthalmology にて我々はヒト網膜における functional imaging 結果について発表したが、実験結果には再現性がなく artifact である可能性が否定できなかつた。そこで我々はネコを使用して実験を行い、神経活動観測の可否を確かめ、若干の知見が得られたので報告する。

B. 方法

生後 1 年 8 ヶ月のネコを全身麻酔し、頭部及び眼球を固定、5%フェニレフリンにて散瞳、コンタクトレンズを装着した状態で眼底を観察した（図 1）。記録には眼科にて一般臨床応用されている眼底カメラ（TRC-50LX、TOPCON 社製）

に改造を加えたものを使用した（図 2）。改造内容は、網膜に照射する刺激用光源として白色 LED を装着し、その光路上に様々な画角・位置のスリットを置き刺激部位を変化させられるようにした。刺激光以外の光を無くすため、観察系の照明用ハロゲンランプには赤外フィルタを使用し、記録用 CCD には赤外光 CCD を使用し、白色 LED の影響を避けるために CCD 前に赤外フィルタを使用した（図 3）。

1 session の撮影時間は 16 秒間で、開始から 2 秒まで刺激無し、2 秒から 6 秒までの 4 秒間は 8Hz のフリッカー刺激を与え、6 秒から 16 秒までは刺激無しとした。16 秒間の撮影時間中は 20m 秒毎に撮影を繰り返す（図 4）、刺激前・刺激中・刺激後、計 657 枚の画像（320×256 pixel、10bit グレースケール）を得た。25session を全く同じ条件で計測して 1series とし、得られた画像計 16,425 枚を解析に使用した。なお、session と session の間隔は約 45 秒とし、刺激開始から次の刺激開始までが約 1 分となるようにした。

画像解析は各 series ごとに以下のように行った。各位置・時間における光源の光子分布ムラによるノイズ（shot noise）の影響を抑え、S/N



比を向上させるため、同一 series 内の各 session で同じタイミングの画像を計 25 枚重ね合わせた (各 pixel 座標で階調を加算平均)。こうして得られた各タイミングでの画像 657 枚を使用し、刺激開始前 1 秒の画像と異なるタイミングの画像を比較して反射光量の変化を計算した (各 pixel 座標で階調を減算)。

### C. 結果

今回、33series の実験を行った。代表例を示す。図 5 は画角 5 度の縦スリット (基準画像にて赤の四角) 部位に刺激光を照射した例であるが、対応する位置に反射光量の低下が起きている (画像では白い部分)。基準画像で上部から右にかけて暗い部分は tapetum の無い部位であるが、この部分では変化がない。図 6 は縦スリット位置を視神経乳頭側に動かしたものであるが、同様の結果が得られている。図 7 は耳側半視野刺激、図 8 は鼻側半視野刺激したものであるが、刺激部位に反射光量低下が起こり、tapetum の無い部分では変化がないのは同様である。また、網膜の大血管にも反射光量低下が起きている。図 9 は図 5 と同じ例の経時的変化である。最初に血管の反射光量が低下し、のちに刺激部位の網膜反射光量の低下部位が浮き上がってきており、刺激開始から 14 秒後でもはっきりと残っていることがわかる。なお、刺激光を与えず、その他の条件は全く同じにした実験 (図 10) や sacrifice し、血流の途絶えた直後での全く同じ条件の実験では反射光量の変化は見られなかった。

### D. 考察・結論

ネコ網膜において光刺激部位、すなわち神経活動部位の反射光量低下を観察することは可能であり、脳における研究と同様の結果が得ることができた。

神経活動部位に反射光量の低下が起こる理由は、血行力学的な変化、酸素化ヘモグロビン割

合の変化、蛋白構造・膜構造変化による散乱光変化、細胞膨化による変化等が言われているが未だに決定的な理由は判明していない。今回の実験では刺激網膜部位の反射光量低下とともに血管部位の反射光低下も起こっていた。使用した観察光は 780nm をピークとする近赤外光であり、この領域での血管反射光量低下は酸素化ヘモグロビン割合の低下を示唆している。一方で光刺激部位は比較的鮮明な境界を持ち、経時的にもそれを保持していることを考えると血行動態やヘモグロビンの変化よりも網膜細胞そのもの変化を思わせる。これについてはさらなる研究が望まれるところである。

そもそも functional imaging は 1949 年発表の Hill らの論文に端を発するものであるが、反射光量変化は 0.01%~5% と非常に小さいものであり、また S/N 比向上のために多数の画像を重ね合わせるといった複雑な処理が必要であることから実用化されたのは 80 年代になってからである。近年コンピュータの著しい発達により、これらの処理が比較的簡単にできるようになって functional imaging は脳研究分野で盛んに用いられるようになった。当実験では、それをネコ網膜に応用したわけであるが、興味深い知見を得ることができた。今回の実験では刺激開始から 10 秒後までの観察であり、その時点で刺激部位の反射率低下が十分に観察されており、次の session での刺激までその影響が残っていた、すなわち、session を重ねるにつれ、前 session の影響が蓄積した可能性が否定できない。次回の追加実験では刺激後観察時間を延長し反射率低下が無くなるまで撮影を続け、蓄積の影響を極力排除する予定である。また、刺激範囲を小さくして、網膜各部位における局所における刺激の効果の違いや血管支配域内外刺激による血管部位反射光量変化等についても調査する予定である。

学会発表

Y. Hirohara, T. Yamaguchi, H. Aoki, Y. Takahashi, N. Nakazawa, T. Mihashi, S. Sato, T. Morimoto, Y. Okawa, T. Fujikado [Development of fundus camera for spectral imaging using liquid crystal tunable filter.] ARVO, 2004.

「図の説明」

- 図 1 : ネコの頭部及び眼球を固定した状態
- 図 2 : 改造した眼底カメラ
- 図 3 : 眼底カメラ光学系シエーマ
- 図 4 : 1session 測定シエーマ
- 図 5 : 画角 5 度の縦方向刺激結果 (耳側)
- 図 6 : 画角 5 度の縦方向刺激結果 (鼻側)
- 図 7 : 半視野刺激結果 (耳側)
- 図 8 : 半視野刺激結果 (鼻側)
- 図 9 : 図 5 の経時変化
- 図 10 : 図 5 と同条件、ただし刺激無し

図 3

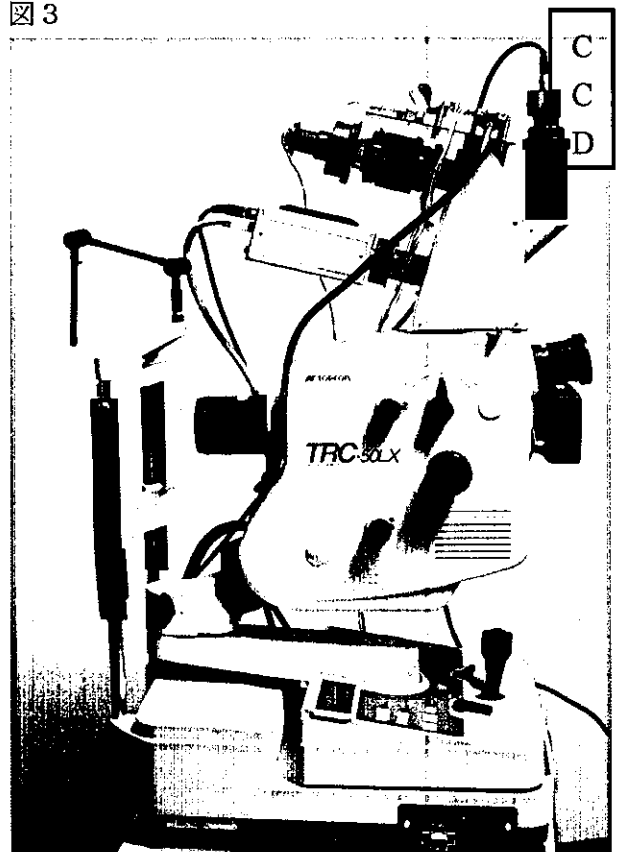


図 1



図 2

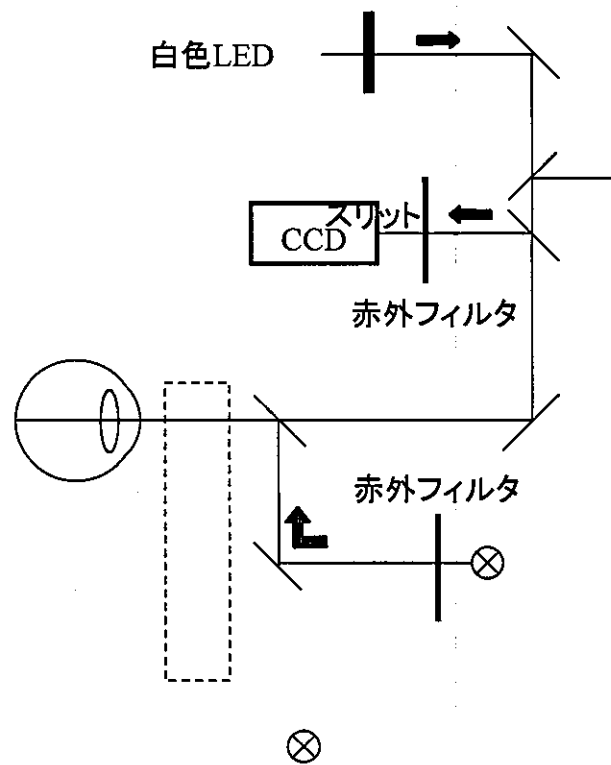


図 4

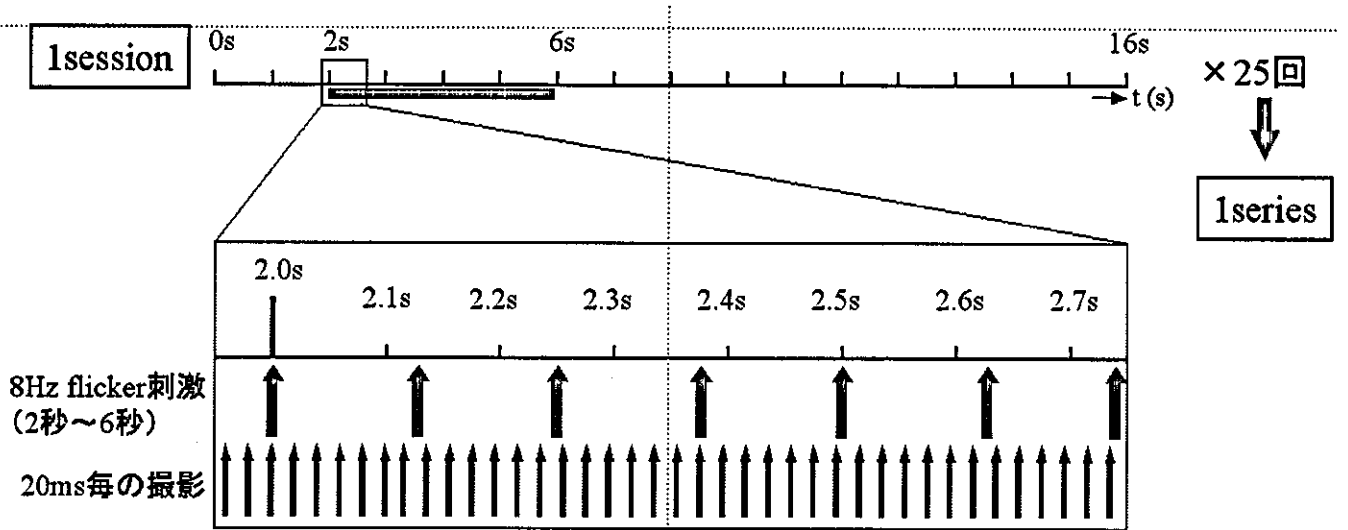


図 5

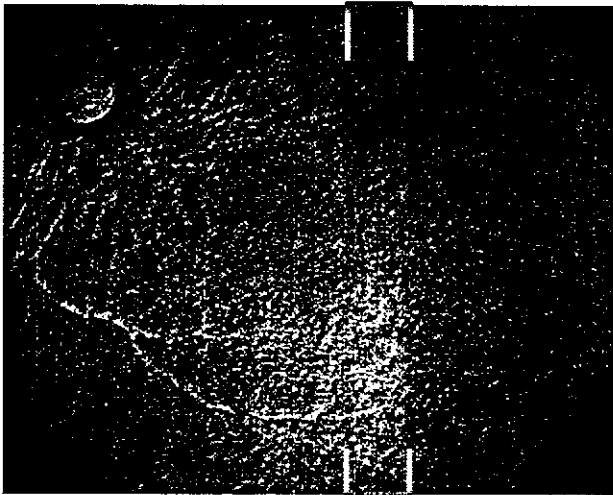


図 7

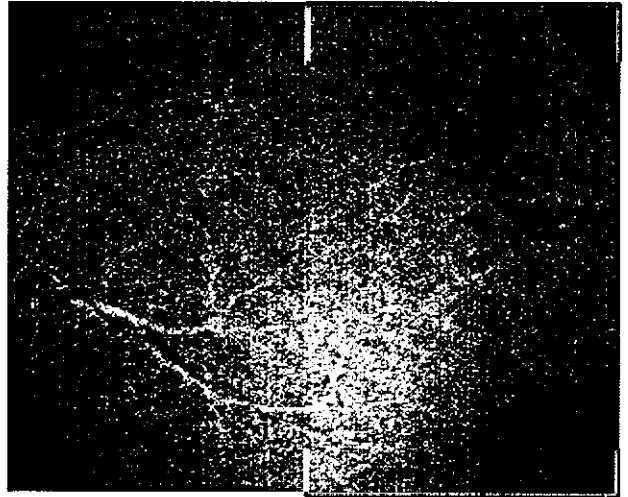


図 6

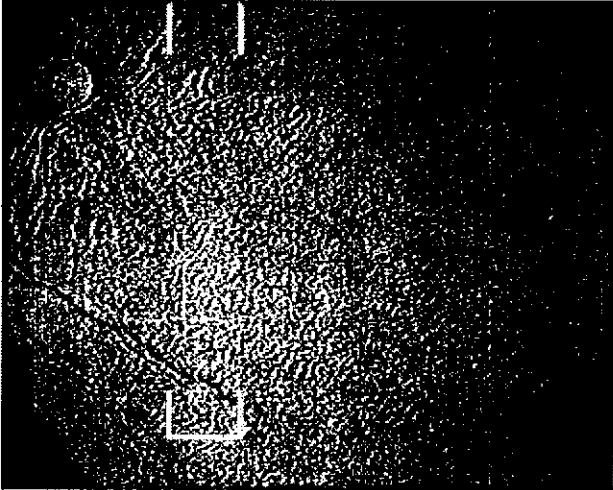


図 8

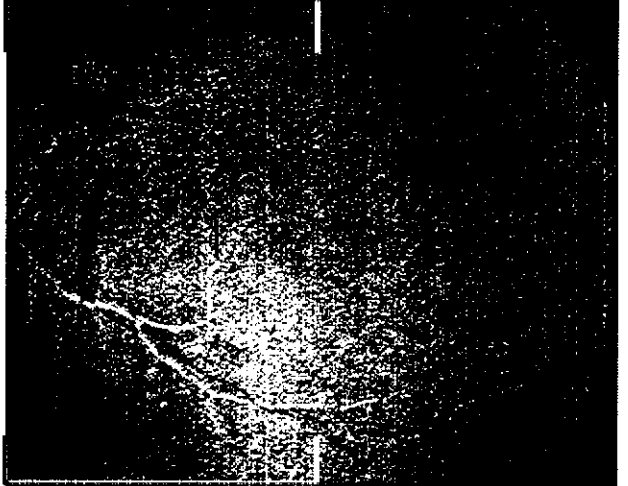


図 9 右上の青い矢印は撮影のタイミング、

赤いバーは刺激タイミング

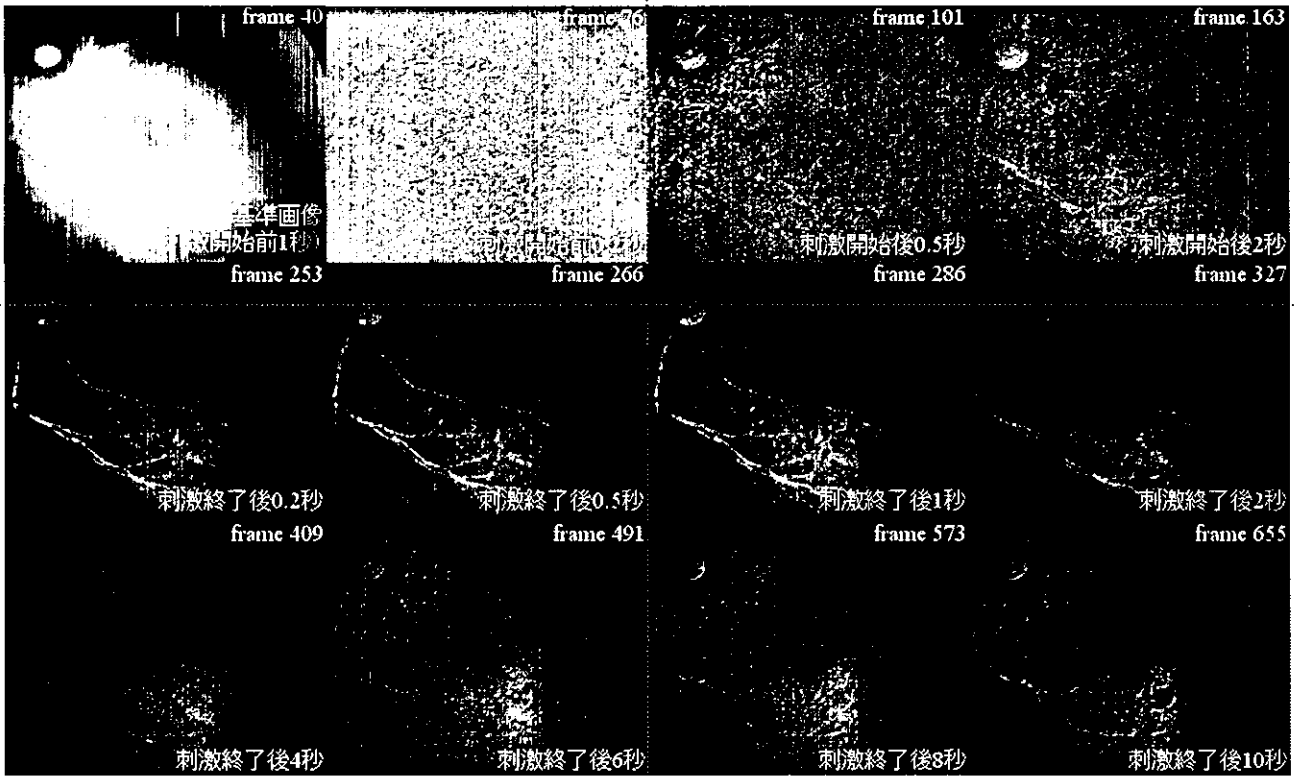
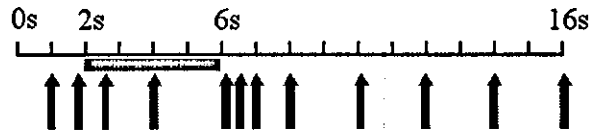


図 10 右上の青い矢印は撮影のタイミング

