

厚生科学研究費補助金（感覚器研究事業）  
分担研究報告書

経角膜電気刺激による視細胞の神経保護

分担研究者 福田 淳 大阪大学大学院医学系研究科 情報生理学講座  
(研究協力者 森本壮、松田理、三好智満、澤井元)

研究要旨

経角膜電気刺激が視細胞に対しても神経保護効果があるかどうか、遺伝的に視細胞が変性する RCS ラットを用いて検討した。まず、網膜電位図 (ERG) を用いて、電気生理学的に検討したところ、電気刺激を行った網膜は、電気刺激していない網膜に比べて、光に対する反応が大きく、網膜機能の低下が遅延していた。また、視細胞の核が存在する外顆粒層 (ONL) の厚みを電気刺激群と非電気刺激群で比較した結果、電気刺激群の網膜の ONL 厚は、有意に厚かった。以上の結果から、経角膜電気刺激は視細胞に対しても神経保護効果があることがわかった。

A. 研究目的

我々は、前年度までの分担研究で、コンタクトレンズ型電極を用いて、角膜側から網膜への電気刺激（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見出し、さらに、そのメカニズムは、神経栄養因子のひとつである Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) が、電気刺激によって網膜内で発現が上昇し、神経保護に働いていることを見出した。このように経角膜電気刺激によって、IGF-1 が上昇し、IGF-1 が RGC に対して、神経保護的に作用することがわかった。

このように、電気刺激は、RGC に対して、神経保護作用を有するが、一方、網膜刺激型人工網膜の移植の対象となる患者は、視細胞が変性する網膜色素変性症患者である。このため、電気刺激が視細

胞に対しても神経保護効果があるかどうか検討する必要がある。そこで、本年度は、この経角膜電気刺激が視細胞に対しても神経保護効果があるのか検討することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1) 実験動物

実験には、Royal college surgeons (RCS) ラットを用いた。RCS ラットは、生後 3 週頃から、視細胞が徐々に変性していくため、視細胞の変性がほとんどみられない、生後 20-23 日の RCS ラットを使用した。

2) 経角膜電気刺激

ネブタール麻酔下で、RCS 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 (図 1)。刺激条件は、50 または 100  $\mu$ A で、刺激頻度

40 Hz、1 ms/phase の両相矩形波パルスを用いた。刺激は、1 週間に 1 回行い 4 週間続けた。

### 3) 網膜電位図の検討

電気刺激治療前 (3 週齢)、治療開始から 4 週後 (7 週齢) に、ラットの網膜電位図 (ERG)

を測定した。方法は、半日以上暗順応させた後、ケタミン+キシラジン麻酔を行い、コンタクトレンズ電極を取り付け、暗所で ERG を測定した。刺激光については、 $2.1 \log \text{cd/m}^2$  の輝度光を ND フィルターを用いて弱め、最低  $-2.9 \log \text{cd/m}^2$  から、0.5 あるいは  $1 \log \text{unit}$  間隔で輝度を徐々に上げていき、それぞれの輝度で ERG を測定した。ERG で得られた反応について、電気刺激の効果を検討した。

### 4) 組織学的検討

3) の実験の後、ラットの眼を深部麻酔下で摘出し、取り出した眼球をエポキシ樹脂で包埋した。さらに、網膜切片を作製し、トルイジンブルー染色を行い、網膜標本を作製した。各網膜切片について、視細胞の核が存在する外顆粒層の厚みを測定し電気刺激の視細胞に対する効果について検討した。

## C. 結果

### 1) ERG による検討の結果

図 2A のように、3 週齢では、a 波、b 波ともに見られるが、7 週齢では、図 2B のように、a 波、b 波は見られず、強い光に対して、下向きの反応がわずかに見られるのみである。これに対して、電気刺激を行った網膜では、図 2B と同様に、a 波、b 波は見られないものの、電気刺激を

していない網膜よりも、より弱い強度の光で反応が出現し、下向きの反応の振幅も大きかった (図 2C)。

### 2) 組織学的検討の結果

図 3 のように、3 週齢では、外顆粒層 (ONL) にある視細胞の核は、9 から 11 層存在する (図 3A) が、7 週齢では、1 から 2 層に減少する (図 3B)。一方、電気刺激を行った網膜では、3 層から 4 層の核が ONL に残っていた (図 3C)。

7 週齢の RCS ラットの網膜の ONL の厚みを測定した結果、電気刺激なしあるいは、sham 刺激では、それぞれ、 $9.3 \pm 2.3 \mu\text{m}$ 、 $10.1 \pm 1.5 \mu\text{m}$  ( $\pm \text{SD}$ ) であり、それぞれ、3 週齢の平均 ONL 厚 ( $39.5 \pm 3.4 \mu\text{m}$ ) の 24%、26% に減少していた。一方、電気刺激を行った網膜では、電気刺激を行っていない網膜に比べて、ONL 厚は増加し、50  $\mu\text{A}$  では、平均 ONL 厚は、 $13 \pm 0.7 \mu\text{m}$  で、100  $\mu\text{A}$  では、 $15.5 \pm 2.2 \mu\text{m}$  ( $P < 0.05$ ) であり、それぞれ、3 週齢の ONL 厚の 33%、39% であった (図 4)。

## D. 考察

今回の視細胞変性モデル動物である、RCS ラットを用いた検討した。ERG の検討の結果、経角膜電気刺激を行った網膜の ERG の反応の低下の進行が、電気刺激を行っていない網膜に比べ、遅延していた。また、組織学的に検討した結果も、経角膜電気刺激は、視細胞に対しても神経保護効果があることがわかった。このように、網膜を電気刺激することで、網膜神経節細胞だけでなく視細胞に対しても神経保護効果があることが明らかになった。このことから、人工網膜による網膜への

電気刺激は、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、網膜に対して神経保護にも有効であると考えられる。

今後は、電気刺激の視細胞に対する神経保護効果が、RGCに対する神経保護効果と共通のメカニズムなのかあるいは、別のメカニズムなのか解明していく予定である。

#### E. 結論

視細胞が遺伝的に変性する RCS ラットを用いて、経角膜電気刺激の視細胞に対する神経保護効果について検討した。その結果、経角膜電気刺激は、視細胞に対しても神経保護効果があることが明らかになった。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Morimoto, T., Miyoshi, T., Matsuda, S., Tano, Y., Fujikado, T., Fukuda, Y.

Transcorneal Electrical Stimulation Rescues Axotomized Retinal Ganglion Cells by Activating Endogenous Retinal IGF-1 System. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, (in press).

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.

3) Fang, XY., 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*, 137: 1034-1041, 2004.

4) Cecki, C., Morimoto, T., Ohji M., Sawa, M., Hasegawa, T., Sakaguchi, H., Ikuno, Y., Gomi, F., Kamei, M., Tano, Y.

Nonaxoplasmic transfer of indocyanine green into the optic nerve after intravitreal application. *Retina*, 24:412-5, 2004.

5) 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.

##### 2. 学会発表

1) 森本壮、三好智満、松田理、不二門尚、田野保雄、福田淳：経角膜電気刺激による IGF-1 の網膜内発現上昇。第 108 回日本眼科学会総会（東京）、2004 年 4 月。

2) Morimoto, T., Miyoshi T, Matsuda S., Tano, Y, Fujikado T, Fukuda Y: Transcorneal electrical stimulation increases IGF-1 mRNA in the retina in adult rats. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2004 年 5 月。

3) Morimoto, T, Miyoshi, T, Matsuda, S, Fujikado, T, Tano, Y , Fukuda, Y.: Endogenous IGF-1 mRNA was upregulated by transcorneal electrical stimulation in the

retina in adult rats. 第81回日本生理学会大会(札幌)、2004年6月。

4) 森本壮、三好智満、松田理、不二門尚、田野保雄、福田淳: 電気刺激によるIGF-1の網膜内発現上昇と変性網膜神経節細胞の神経保護。視覚科学フォーラム第8回研究会(鳥取)、2004年7月。

5) 森本壮、三好智満、松田理、不二門尚、田野保雄、福田淳: 経角膜電気刺激の変性網膜神経節細胞に対する生存促進効果。第28回日本神経科学大会シンポジウム(大阪)、2004年9月

6) Morimoto, T, Miyoshi, T, Matsuda, S, Fujikado, T, Tano, Y, Fukuda, Y.:

Neuroprotective effect of electrical stimulation on axotomized RGCs *in vivo*.

The second Asia Neuro-Ophthalmology Society (ASNOS) Congress (Nagoya), 2004年10月

7) 森本壮、三好智満、松田理、不二門尚、田野保雄、福田淳: 経角膜電気刺激の損傷網膜神経節細胞に対する神経保護効果。日本生理学会第97回近畿生理学談話会

(京都)、2004年11月。

8) 森本 壮、松下賢治、大川賀孝、細畠淳、福田 淳、不二門尚、田野保雄: 経角膜電気刺激を用いた視神経疾患に対する神経保護治療 第58回臨床眼科学会(東京)、2004年11月

9) Morimoto, T, Miyoshi, T, Matsuda, S, Fujikado, T, Tano, Y, Fukuda, Y.: Electrical stimulation promotes the survival of axotomized RGCs via activating endogenous IGF-1 system in adult rats. 4<sup>th</sup> Asia Pacific Symposium on Neuronal Regeneration (APSNR) (Osaka), 2004年12月

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

### 電気刺激装置

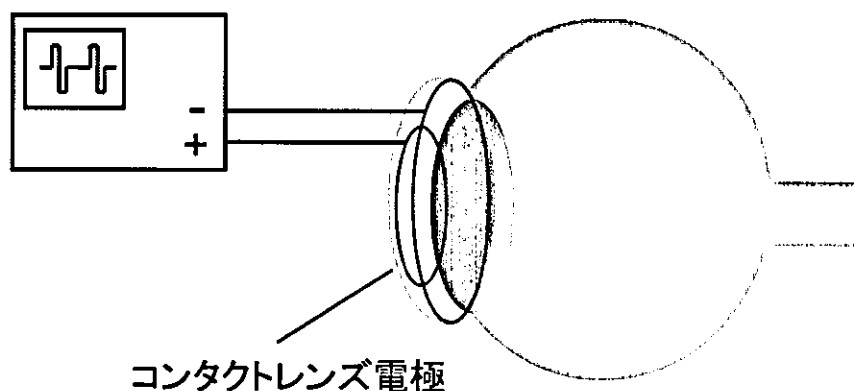


図1. 経角膜電気刺激

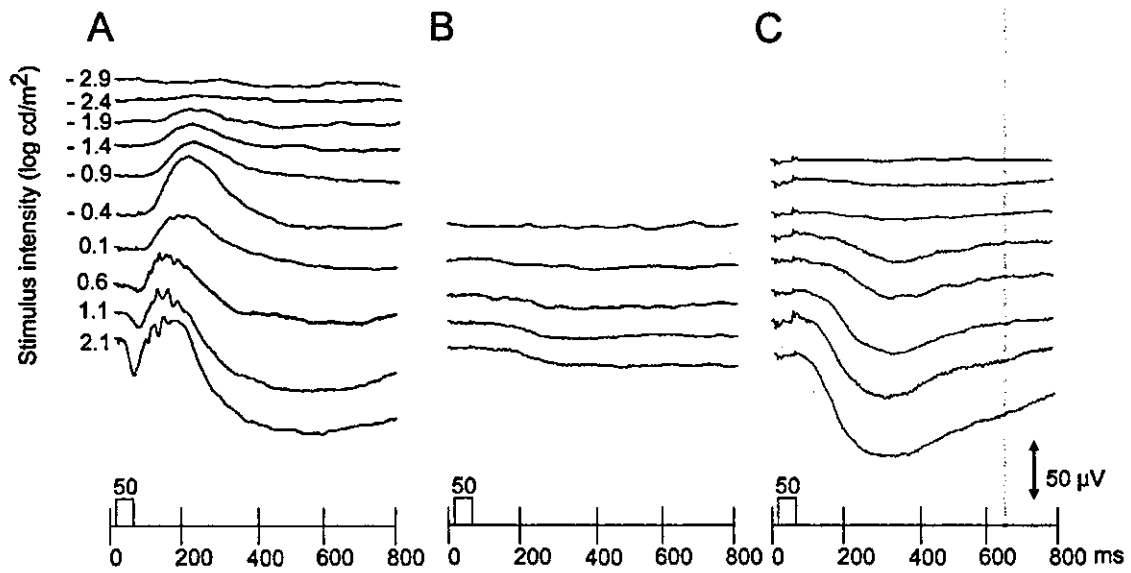


図2. RCS ラットの ERG

A、3週齢。 B、7週齢（電気刺激なし）、C、7週齢（電気刺激あり）  
 Bに比べ、Cの方が光に対する反応が大きい。

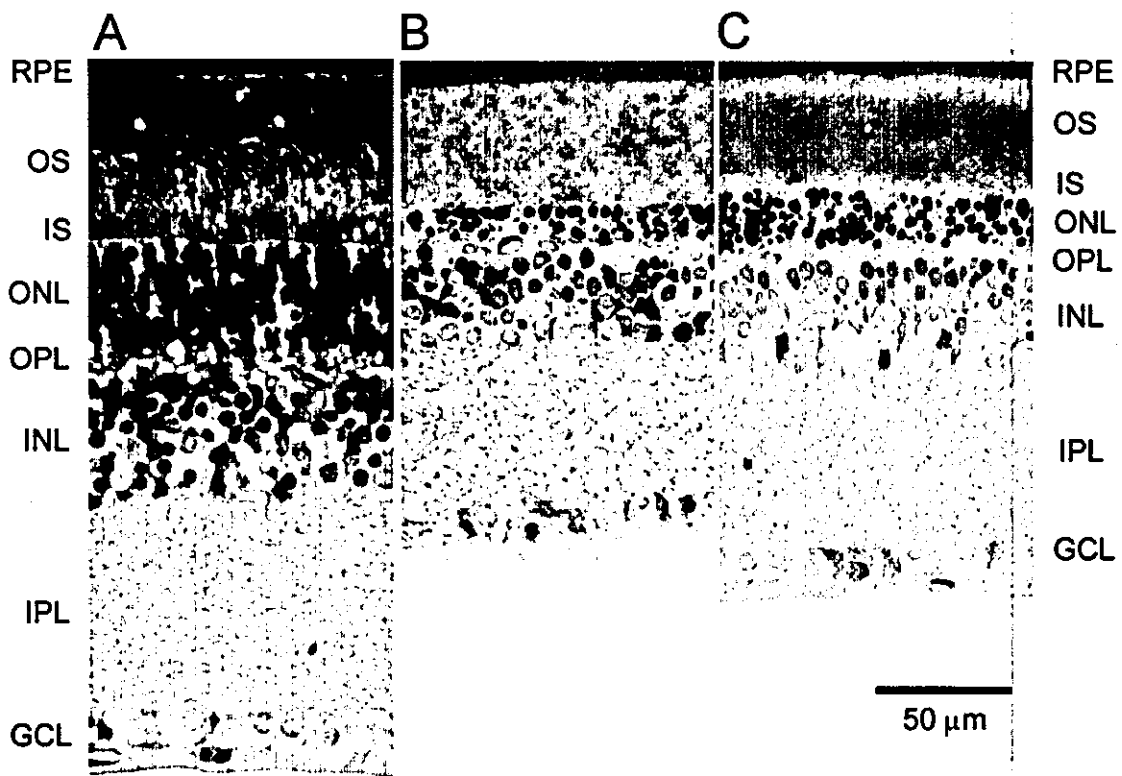


図3. RCS ラットの網膜組織像

A、3週齢、B、7週齢（電気刺激なし）、C、7週齢（電気刺激あり）。  
RPE；網膜色素上皮層、OS；視細胞外節、IS；視細胞内節、ONL；外顆粒層  
OPL；外網状層、INL；内顆粒層、IPL；内網状層、GCL；神経節細胞層。

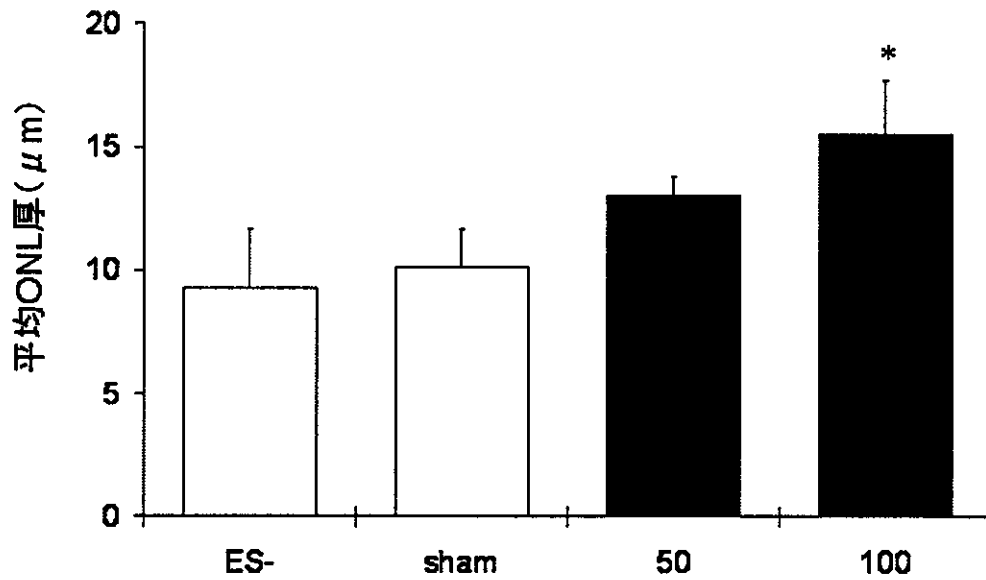


図4. 7週齢の RCS ラットの平均 ONL 厚。

ES-；電気刺激なし、Sham；電極を取り付けて、電気刺激なし、  
50、100；50  $\mu$ A、100  $\mu$ A で電気刺激。（\*one-way ANOVA,  $P < 0.05$ , Tukey  
test,  $P < 0.05$ ）。

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
分担研究報告書

中型視細胞変性モデル動物の作成

分担研究者：近藤峰生、三宅養三

所属：名古屋大学大学院医学研究科細胞情報医学専攻頭頸部感覚器外科学眼科

**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、ヒトに近い中型動物（ウサギ）における視細胞変性動物モデルを作出することを目的とした。ヒトにおいて網膜色素変性の原因となる遺伝子変異の一つ（ロドプシン Pro347Le 変異）を導入したベクターを構築し、これを高純度に精製してウサギ受精卵に注入した。合計 509 個の受精卵を移植し 76 匹の産子を得ることができたが、遺伝子解析の結果、この 76 匹の産子の中にロドプシン遺伝子変異を有するものは検出されなかった。現在は再度ベクターの構築と検定を行い、ベクターをラットとマウスに移植して確認を行っており、その後ウサギに移植する方法を計画している。本プロジェクトによりウサギのような眼球の大きな動物に網膜色素変性モデル動物を作出することに成功すれば、人工眼の動物実験に供与する貴重な疾患モデル動物となりうると考えられた。

**A. 研究目的**

人工眼を開発し、その臨床応用を推進していくには、動物実験が必要不可欠である。特に人工眼の動物実験では、眼球の大きさが比較的ヒトと類似している動物に人工眼を移植する実験が行われる。その際、単に人工眼の安全性のみを評価したいのであれば正常な動物に移植すればよい。しかし、実際に移植する患者は視細胞が広範囲に変性しているため、より患者に近い実験動物モデルとしては、眼球の視細胞が変性した動物であることが望ましい。

我々は昨年プロジェクトにおいて、薬物（例えば N-methyl-N-nitrosourea）を血行投与あるいは眼内投与する方法によって視細胞を変性させる試みを行った。しかしながら、このような方法では実際に患者で

みられるような視細胞変性とは異なった病態となることがわかり、人工眼を移植するためのモデルとしては適さないと結論した。

そこで本年は、実際にヒトにおいて網膜色素変性の原因となる遺伝子の一つであるロドプシン変異ウサギ（トランスジェニックウサギ: Tg ウサギ）を作出する試みを行った。網膜色素変性の遺伝子改変動物としては Tg ウサギは世界初の試みとなる。

**B. 研究方法**

(1) ゲノムクローン取得

ウサギロドプシン遺伝子の第五エキソン配列をクローニングして、プローブ DNA フラグメントを調製した。ハイブリダイゼーション法で、NZW 種ウサギの BAC ライブラリーをスクリーニングした。ウサギロドプシン遺伝子を含むウサギゲノム BAC クローンを取得した。

## (2) 変異型ロドプシンの発現ベクター構築

ウサギロドプシン遺伝子のゲノムクローンの変異を導入する遺伝子領域に、大腸菌のセレクションマーカを含むフラグメントを挿入した。Pro347Leu 変異を持つフラグメントを構築し、プラスミドベクターにサブクローニングした。大腸菌のセレクションマーカを、Pro347Leu 変異を持つフラグメントに置換した。シーケンス解析、サザン解析法により、構築した変異型ロドプシン遺伝子の発現ベクターのコンフィギュレーションを確認した。

## (3) 高純度 DNA 溶液調整

変異型ロドプシン遺伝子の発現ベクターでトランスフォームされた大腸菌を大量に培養した。アルカリ/SDS 法、および塩化セシウム密度勾配遠心法により変異型ロドプシン遺伝子の発現ベクターを精製した。限外ろ過膜を用いて、変異型ロドプシン遺伝子の発現ベクターのメディアウムをポリアミンを含むバッファーに置換、濃縮し、4°C で使用するまで保存した。

## (4) 受精卵に変異型遺伝子注入

過排卵処理で回収されるウサギ受精卵の雄性核期に、精製した変異型ロドプシン遺伝子の発現ベクターをマイクロインジェクションにより注入した。DNA を注入された受精卵を、偽妊娠処置を施した雌性ウサギの卵管に移植した DNA を注入された受精卵から産まれる児を、そのまま離乳に到るまで哺育させた。

## (5) Tg ウサギファウンダー選抜

得られた産子の組織サンプルを生検して、ゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA サンプルを制限酵素で完全消化させ、生成したフラグメントをアガロースゲル電気泳動で分離してナイロンメンブレンにトランスファーした。RI 標識されたロドプシンプローブとハイブリダイズさせ、遺伝子の Tg ウサギのファウンダーを選抜した。

### (倫理面への配慮)

ARVO 動物実験の規定に準じて動物を取り扱

い、最小限の苦痛で実験を行なった。

## C. 研究結果

以上の過程を経て、合計 509 個のベクター注入受精卵を偽妊娠処置を施した雌性ウサギの卵管に移植した。DNA を注入された受精卵から合計 76 匹の産子を得ることができた。これらの産子の全てをそのまま離乳に到るまで哺育させ、サザン解析で Tg ウサギファウンダーを選抜したが、遺伝子解析の結果、この 76 匹の産子の中にロドプシン遺伝子変異を有するものはなかった (図 1)。

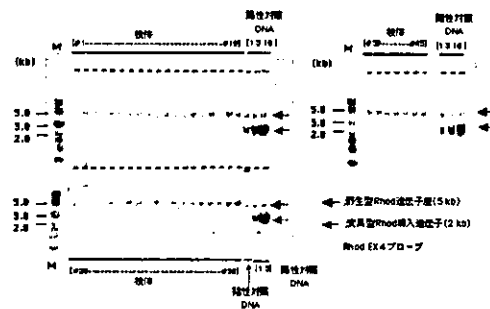


図 1: 受精卵に変異ベクターを注入して得られた産子の DNA 解析結果。赤の矢印が変異遺伝子のプローブ。Pro347Leu の点変異を有するものは 76 匹の産子の中には存在しなかった。

## D. 考察

今回 76 匹の産子の中に Tg ウサギは含まれていなかった。今回の技術では確率的には 4-5 匹の Tg が産出できるはずであり、今回の第一回目の試みではベクターそのものに問題があった可能性がある。あるいは今回のベクターがウサギ種に発現しにくいという可能性もある。そこで現在は、再度ベクターの再構築と検定を行い、次いでラットとマウスに移植して、まず Tg マウスと Tg ラットが産出できる確認を行い、その後ウサギに移植するという方向で行っている。



## E. 結論

我々は現在、人工眼の動物実験に供与する目的で、中型の視細胞変性動物モデルをウサギのロドプシン遺伝子改変法によって行っている。本プロジェクトが成功すれば、世界初の網膜色素変性ウサギモデルとなりうるため、人工眼の動物実験として貴重な疾患モデル動物となりうると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kondo M, Miyake Y, et al: Peripheral cone dystrophy: A variant of cone dystrophy with predominant dysfunction in the peripheral cone system. *Ophthalmology* 111, 732-739, 2004.
- 2) Ueno S, Kondo M, et al: Luminance dependence of neural components that underlies the primate photopic Electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 1033-1040, 2004.
- 3) Khan NW, Kondo M, et al: Primate retinal signaling pathways: suppressing ON-pathway activity in monkey with glutamate analogues mimics human CSNB1-NYX genetic night blindness. *J Neurophysiol* 93, 481-492, 2005.
- 4) Niwa Y, Kondo M, et al: Cone and rod dysfunction in fundus albipunctatus with RDH5 mutation: Electrophysiological study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. in press.

## 2. 学会発表

- 1) Kondo M: Use of ERG to understand the pathophysiology of congenital stationary night blindness. Symposium in Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Fort Lauderdale, Florida, 2004.
- 2) Kondo M: Multifocal pupillary response field in normal subjects and patients with visual field defects. Symposium in XVI International Congress of Eye Research. Sydney, 2004.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし。

### 2. 実用新案登録

なし。

### 3. その他

なし。

## II. 参考文献

1. Petters RM et al. Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. *Nat Biotechnol* 1997;15:965-970.
2. Li ZY et al. Rhodopsin transgenic pigs as a model for human retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:808-819.
3. Tso MO et al. A pathologic study of degeneration of the rod and cone populations of the rhodopsin Pro347Leu transgenic pigs. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1997;95:467-479.

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
分担研究報告書

網膜刺激型電極による人工視覚システムの開発  
網膜刺激電極における生体適合性の研究  
家兎眼における人工網膜チップの組織学的検討

分担研究者：平形明人

所属：杏林大学眼科

**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。共同研究者の実験で、プロトタイプの人工網膜チップをウサギ脈絡膜上腔に設置したところ、電氣的誘発電位（EEP）の記録が得られたことから、本年度は、この独自に開発した脈絡膜上一経網膜電気刺激（STS）方式による人工網膜で、実際に短期から慢性実験に使用した場合の人工チップの固定の安定性やその周囲組織学的変化を検討した。まず、有色家兎眼における人工チップの固定の安定性を確認するために、ポリイミド基板に白金一金スタッドバンプを形成しパリレンコートした電極を含有した組織標本作製のための条件を探った。樹脂包埋のテクノビット包埋法を改良することで、電極を含む眼球切片作成が可能であり、埋植電極の位置の安定性などの確認に有用であった。電極する基盤の種類や大きさにより、強膜ポケットから埋植人工チップの先端が接線方向に伸展脱出する可能性があり、人工チップの基盤には、柔軟で比較的短いものの方が組織固定に適していることが示された。また、強膜ポケット作成部位によっては、人工チップ基盤の圧迫による脈絡膜虚血を誘発する可能性も示唆され、その点からも柔軟な人工チップ基盤の利点が示唆された。次に STS 方式による 2 週刺激で EEP が誘発された人工チップ周辺の組織を観察したところ、人工チップ周辺に形質細胞や巨細胞の慢性炎症を示す所見が軽度で観察された。この炎症所見は、埋植しても通電しない人工チップ埋植眼より顕著な傾向が見られた。この炎症所見は、人工チップ固定用の糸と人工チップの周囲に顕著であるが、網膜・脈絡膜に影響するほどの重篤な炎症所見ではなく、網膜・脈絡膜に炎症細胞の浸潤や萎縮性変化、増殖性変化などの組織学的変化は観察されなかった。

以上のことから、STS 方式による人工視覚は、人工チップの挿入時の外科的侵襲予防、安定な固定において、昨年度まで検討した網膜上、網膜下人工チップ挿入より優れていることが判明し、今後の慢性実験実施の意義があると考えられた。

A. 研究目的

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。電極をどのような手術方法

でどの部位に設置するか、設置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。

昨年度まで、家兎眼および豚眼を使用して網膜上および網膜下への人工チップ埋植後の組織学的検討を施行してきた。その結果、動物眼におけるチップの生体適合性の判定には、網膜上チップ埋植時には網膜非接触の可能性、網膜下チップ埋植時には手術時の網膜障害が大きな課題となることが判明した。

共同研究者の実験で、プロトタイプの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ところ、短期挿入における人工網膜チップ付近の網膜に、光学・電子顕微鏡的な異物反応などの明らかな炎症所見は観察されなかった。本年度は、この独自に開発した脈絡膜上一経網膜電気刺激 (STS) 方式による人工網膜で、実際に短期から慢性実験に使用した場合の人工チップの固定の安定性やその周囲組織学的変化を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 人工チップ含有家兎眼の組織切片作成法の検討

大きさ 2mm x 3mm のポリイミド製人工網膜擬似チップを含んだまま兎眼組織切片を作成するための手技を検討するために、テクノビット包埋 (樹脂包埋)、凍結包埋法の切片作成を比較検討した。予備実験として人工チップ、家兎眼をそれぞれの方法で包埋し、組織を作成し、それぞれの組織所見の特徴を検討した。硬いチップの切片作成

のためにタングテンカーバイドプレート替え刃を、樹脂包埋用には全自動回転式マイクロトーム (ライカ (RM2265))、凍結包埋用には大型滑走式マイクロトーム (ヤマト ROM-380) に装着して使用した。

### 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。埋植して刺激しないで留置し、術後 1 から 3 ヶ月ヶ月後に眼球を摘出し、3.0%グルタル含有ダビットソン液に浸透させ、眼球を半割した。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、その後、脱水、テクノビット予備浸漬液に置換、包埋用テクノビット溶液で包埋、トリミングし、タングテンカーバイドプレート替え刃を装着させた全自動回転式マイクロトーム (ライカ RM2265) を用いて切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色による光学顕微鏡による観察を行った。

上記の組織標本作製を基本に STS 方式で EEP が得られた人工チップ埋植眼 (2 週間刺激、2 ヶ月間刺激) 組織学的検討を施行した。

### (倫理面への配慮)

ARVO 動物実験の規定に準じて動物を取り扱い、最小限の苦痛で実験を行なった。

## C. 研究結果

### 1. 人工チップ含有家兎眼の組織切片作成法の検討

#### i) テクノビット包埋標本

眼球全体という大きな切片の全体像を観察する上に有用であった(図1)。また、人工網膜チップ埋め込みの部位や固定状態を観察するためにも有用であった。その際、人工チップの基盤が薄切試料作成時に水中に収縮剥離することも多く、一切片作成ごとにフィルム添付する工夫が有用であった。人工チップ埋植部の周囲組織の形態も通常のパラフィン切片よりも変形なく、ヘマトキシリン染色性も優れていた(図2)。しかし、硬い電極と同一切片部位では、柔らかい眼組織との間に亀裂が生じるために、周囲組織の観察には、チップを組織固定後はずして包埋する方が切片作成時の組織障害(アーチファクト)は少なく、観察目的に準じて、人工チップ除去操作を検討することが必要であった。

凍結切片でも人工チップの基盤が薄切可能であることを確認した(図3)。しかし、凍結切片では網膜細胞の膨化、切片作成時の網膜剥離などが生じやすく、免疫組織学的検討が必要時に本手技が適応できることが確認された。

## 2. 家兎眼の刺激電極の脈絡膜上腔設置眼の観察

### (i) マクロ観察

家兎眼に埋植された人工チップは、約3ヶ月間強膜ポケットに固定され、周辺網膜などの周囲組織は比較的健常であった(図4)。ただし、強膜ポケットの深さは様々で、兎眼における手術の難易性が示唆された。一眼において、人工チップ対応部の網膜が白濁し、これが電気刺激による熱反応か化学反応か、あるいは埋没部位の機械的圧迫による虚血性変化なのか今後の課題となっ

た(図5)。

### (ii) 組織所見

電極する基盤の種類や大きさにより、強膜ポケットから埋植人工チップの先端が接線方向に伸展脱出する可能性があり、人工チップの基盤には、柔軟で比較的短いものの方が組織固定に適していることが示された(図7)。

人工網膜チップ付近の網膜・脈絡膜に炎症反応を含む組織学的な異常所見は上述の1眼以外、2週刺激眼、2ヶ月刺激眼においても観察されなかった(図6)。

人工チップ挿入部位周辺の強膜組織において、人工チップ固定用のダクロン糸周辺の形質細胞、巨細胞、リンパ球の浸潤は共通して観察された(図8)。また、眼数は少ないが、2週刺激眼において、人工チップ周辺に形質細胞、巨細胞の集積が観察され、刺激をしないで人工チップを2週間埋植留置した眼の同部位よりもその変化は明らかであった(図8)。両者において、その周囲の網膜・脈絡膜には、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

共同研究グループで、プロトタイプ的人工網膜チップを家兎眼の脈絡膜上腔に設置したところ、誘発電位(EEP)の記録が得られたことは、網膜上・網膜下に人工チップを挿入する手術による網膜侵襲が回避されることを考えると、人工視覚の臨床応用に向けて非常に期待される。今回の組織学的検討から、術後3ヶ月までの観察で、強膜ポケットに人工チップは比較的安定した留置されていたが、電極する基盤の種類や大き

さにより、強膜ポケットから埋植人工チップの先端が接線方向に伸展脱出する可能性があり、人工チップの基盤には、柔軟で比較的短いものの方が組織固定に適していることが示された。また、強膜ポケット作成部位によっては、人工チップ基盤の圧迫による脈絡膜虚血を誘発する可能性も一見であるが危惧され、その点からも柔軟な人工チップ基盤の利点が示唆された。

STS方式による2週刺激でEEPが誘発された人工チップ周辺の組織を観察したところ、人工チップ周辺に形質細胞や巨細胞の慢性炎症を示す所見が軽度に観察された。この炎症所見は、埋植しても通電しない人工チップ埋植眼より顕著な傾向が見られた。この炎症所見は、人工チップ固定用の糸と人工チップの周囲に顕著であるが、網膜・脈絡膜に影響するほどの重篤な炎症所見ではなく、網膜・脈絡膜に炎症細胞の浸潤や萎縮性変化、増殖性変化などの組織学的変化は観察されなかった。これは本研究開始時の海外派遣委員による電極シート移植の実験で、フルオレセイン蛍光造影検査(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を認めない結果と一致した。

以上のことから、STS方式による人工視覚は、人工チップの挿入時の外科的侵襲予防、安定な固定において、網膜上、網膜下人工チップ挿入より優れていることが判明し、今後の慢性実験実施の意義があると考えられた。

#### E. 結論

本研究グループが独自に開発した脈絡膜上—経網膜電気刺激(STS)方式による人工

網膜で、実際に2週から2ヶ月間に亘って実験に使用した場合の人工チップの強膜ポケット内の固定は比較的安定していた。STS方式による2週刺激でEEPが誘発された人工チップ周辺の組織を観察したところ、その炎症反応は人工チップ周辺強膜に軽度に存在するのみで、人工チップの挿入時の外科的侵襲予防、安定な固定において、網膜上、網膜下人工チップ挿入より優れていることが判明し、今後の慢性実験実施の意義があると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 報告(論文・総説)

- 1) Wakabayashi T, Okada AA, Morimura Y, Kojima E, Asano Y, Hirakata A, Hida T: Trans-Tenon's retrobulbar triamcinolone infusion for chronic macular edema in central and branch retinal vein occlusions. *Retina* 24:964-967 2004.
- 2) Hirakata A, Okada AA, Hida T: Longterm results of vitrectomy without laser treatment for macular detachment associated optic disc pit. *Ophthalmology* (in press) 2005
- 3) Hirakata A, Hida T, Ogasawara A, Iizuka N: Multi-layered retinoschisis associated with optic disc pit. *Jpn J Ophthalmol* (in press)

- 4) Hirakata A, Hida T, Fukuda M: Unusual posterior hyaloid strand in optic disc pit maculopathy in a young child: Intraoperative and histopathological findings. Jpn J Ophthalmol (in press)
- 5) Hirakata A, Hida T: Vitrectomy for myopic posterior retinoschisis and/or foveal detachment. Jpn J Ophthalmol (accepted in revision)
- 6) Takashima N, Okada AA, Morimura Y, Hirakata A, Hida T: Pulse intravenous corticosteroids without enucleation for sympathetic ophthalmia. Retina (accepted in revision)
- 7) 平形明人, 稲見達也, 斉藤真紀, 岡田アナベルあやめ, 樋田哲夫, 川野晃一, 甫守正史, 石田晋, 鈴木参郎助: 悪性リンパ腫に合併したぶどう膜炎における IL-10、IL-6 の診断的価値. 日眼会誌 108:359-367, 2004.
- 8) 平岡智之, 小田仁, 三木大二郎, 平形明人, 樋田哲夫: 下方弁状裂孔網膜剥離に対する強膜バックリング法と硝子体手術の比較. 眼紀 55:210-213, 2004.
- 9) 高島直子, 小田仁, 三木大二郎, 平形明人, 樋田哲夫: 特発性黄斑円孔の長期予後. 眼科手術 17:429-433, 2004.
- 10) 小幡博人, 森 樹郎, 平形明人: 眼内悪性リンパ腫の診断. 硝子体の寒天包埋と網膜生検. 眼科 46:1085-1092, 2004.
- 11) Morimura Y, Okada AA, et al.: Histology and protein expression in subthreshold transpupillary thermotherapy in rabbit eyes. Arch Ophthalmol 22:1510-1515, 2005

特許取得状況：なし

## 2. 学会発表

- 1) 平形明人: 術後眼内炎に対する硝子体手術. 第27回日本眼科手術学会総会, 東京国際フォーラム, 2004.1.30.
- 2) 平形明人, 沖坂重邦, 小幡博人, 吉川洋, 後藤 浩: 眼科手術に必要な病理検査の基礎知識. 第27回日本眼科手術学会総会, 東京国際フォーラム, 2004.1.31.
- 3) 高島直子, 平形明人, 忍足和浩, 飯原久仁子, 岡田アナベルあやめ, 樋田哲夫: 病理検査で診断した網膜剥離術後の交感性眼炎の1例. 第27回日本眼科手術学会総会 東京国際フォーラム 2004.1.30
- 4) 若林俊子, 岡田アナベルあやめ, 小島絵里, 浅野由香, 三木大二郎, 平形明人, 樋田哲夫: 硝子体混濁を伴うぶどう膜炎に対する硝子体手術の検討. 第27回日本眼科手術学会総会 東京国際フォーラム 2004.1.30
- 5) 今野公士, 平形明人, 若林俊子, 永本敏

- 之:内頸動脈海綿静脈洞瘻に合併した重篤な脈絡膜剥離の治療経験.第27回日本眼科手術学会総会 東京国際フォーラム 2004.1.30
- 6) 平形明人:情報開示時代の硝子体手術教育. 第27回日本眼科手術学会総会, 東京国際フォーラム, 2004.2.1.
- 7) 平形明人:糖尿病網膜症. 秋元ゼミナール, 吉祥寺第一ホテル, 2004.2.4.
- 8) 平形明人:硝子体手術基本的手技(1)ポット作成、硝子体切除、後部硝子体剥離作製. 網膜硝子体手術研究会, 東京, 2004.2.21.
- 9) Hirakata A: Vitrectomy and gas tamponade without laser treatment for optic disc pit maculopathy. Vail Vitrectomy, Vail Co.USA, 2004.3.8.
- 10) 平形明人: 網膜剥離手術の最前線. シンポジウム 硝子体手術の最前線. 第21回関東眼科学会, 東京, 2004.5.16.
- 11) 平形明人: 黄斑浮腫に対する硝子体手術の現状. 第27回独協医科大学・栃木県眼科医会合同講演会, 獨協医科大学, 2004.7.30.
- 12) 平形明人: 細隙灯顕微鏡による後眼部の観察. 第6回川崎眼病変談話会. 川崎武蔵小杉ホテルザエルシー. 2004.7.31.
- 13) 平形明人:高度近視眼の牽引性黄斑症. 第6回 Japan Macula Club 蒲郡プリンスホテル 2004.8.20-21
- 14) 平形明人: 循環器疾患に関連する眼科疾患. 三鷹市循環器病変談話会. 吉祥寺第一ホテル. 2004.10.13
- 15) 國田大輔、今野公士、三木大二郎、忍足 和浩、平形明人、樋田哲夫:マイラゲルを用いた強膜バックリングの術後合併症. 第58回日本臨床眼科学会 東京国際フォーラム 2004.11.11
- 16) 平形明人、杉谷篤彦、飯塚典子、川真田悦子、樋田哲夫:乳頭ピット黄斑症の光干渉断層計(OCT3)所見. 第58回日本臨床眼科学会 東京国際フォーラム 2004.11.11
- 17) 平形明人:網膜硝子体手術の標本. 第58回日本臨床眼科学会 東京国際フォーラム 2004.11.11
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

図1 樹脂包埋による全眼球組織

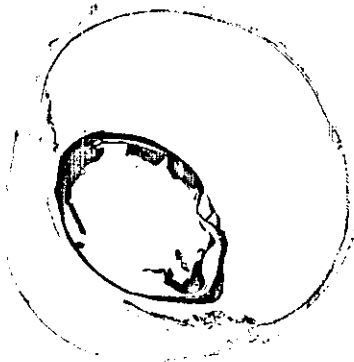


図2 樹脂包埋によるヘマトキシリンエオジン染色性 (網膜・脈絡膜組織)



図3 凍結標本における人工チップ組織切片

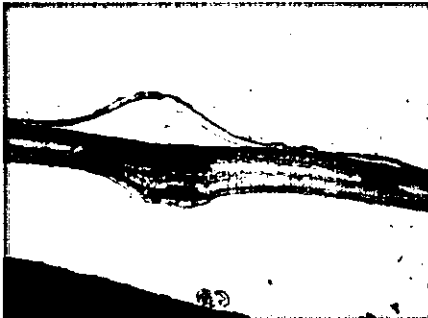


図4 人工チップ強膜ポケット挿入  
マクロ写真



図5

2週刺激眼の一眼に生じた網膜白濁

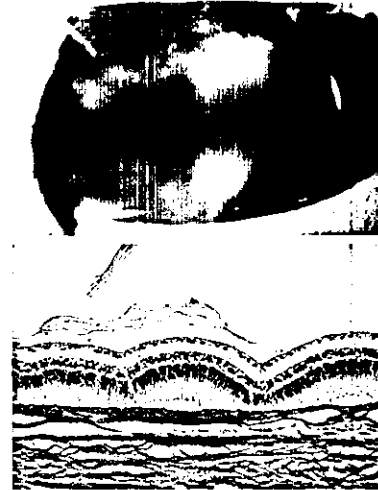




図6  
2ヶ月刺激眼の人工チップ固定部位とその  
周囲組織

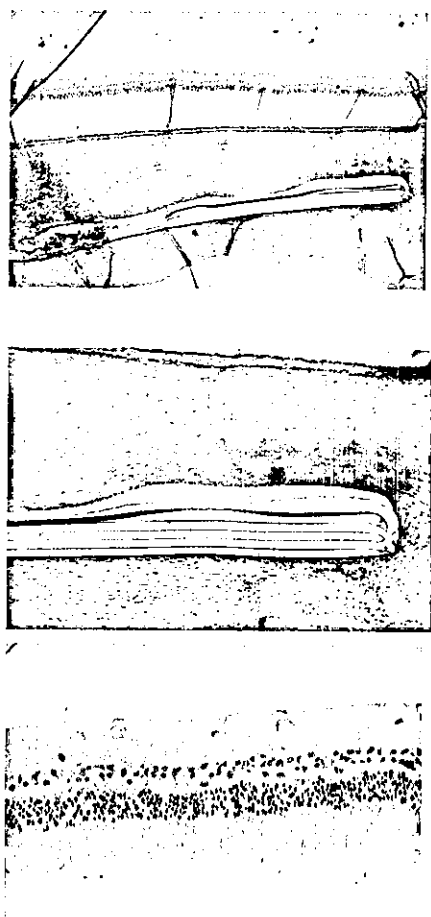


図7 硬い人工チップの2ヶ月埋植留置。  
先端が強膜ポケットから外側に伸展

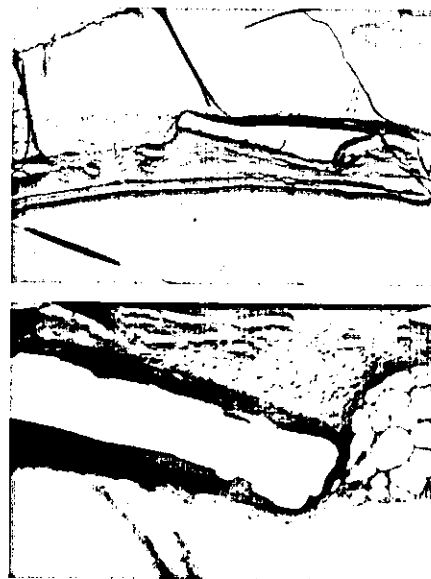
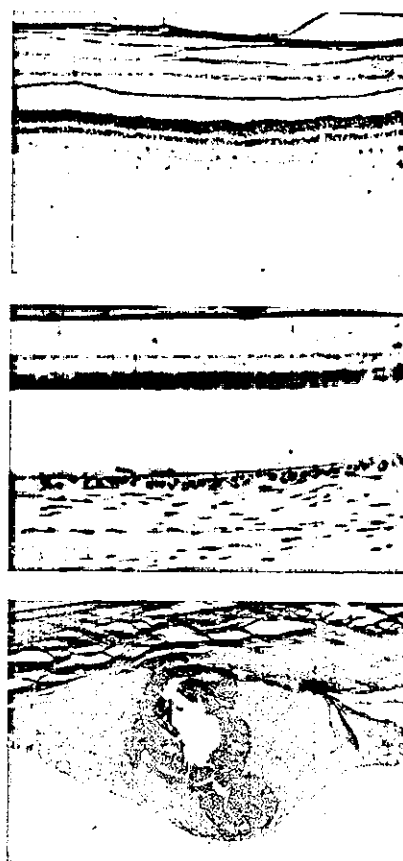


図8 2週間刺激眼。  
網膜・脈絡膜に異常所見は見られないが、  
チップ周辺および固定糸周辺に軽度な炎症  
細胞の浸潤が観察された。



厚生労働科学研究費 (感覚器障害研究事業)

分担研究報告書

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

分担研究者 八木 哲也 大阪大学大学院工学研究科電子工学専攻 教授

(研究協力者 小山内 実 大阪大学大学院工学研究科電子工学専攻 助手)

### 研究要旨

刺激電極による電気刺激の有効性及び安全性を精査するために、*in vitro* 及び *in vivo* 実験を行った。カエル剥離網膜を用いた *in vitro* 実験では、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、をカルシウムイメージング法により精査し、本プロジェクトにて採用予定の経脈絡膜刺激(STS方式)の有効性を示した。モルモットを使った *in vivo* 実験では、網膜電気刺激が視覚を惹起するかどうかを明らかにするために、大脳皮質一次視覚野において膜電位感受性色素を用いた光計測システムを構築し、実験を行った。その結果、網膜電気刺激により、視覚野において応答を確認することができた。

#### 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氣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増減する、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。

また、網膜電気刺激により、網膜神経節細胞が活動したとしても、その信号が大脳皮質視覚野まで到達しなければ、視覚を惹起したとは言えない。そこで、網膜を電気刺激した際の大脳皮質視覚野での応答を光計測法により測定するための装置を確立し、測定を行った。

#### B. 研究方法

#### (1) *in vitro* カルシウムイメージング装置 および計測法の確立

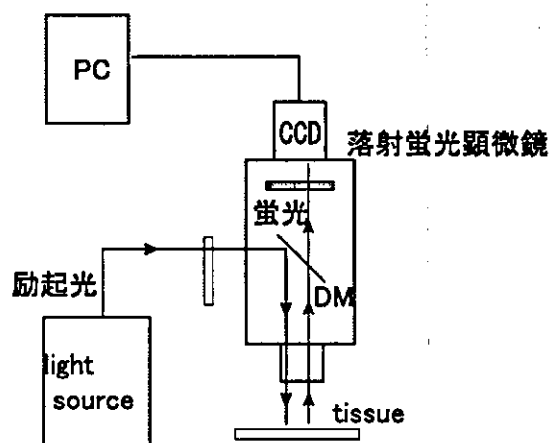


図1. カルシウムイメージングシステムの概略図

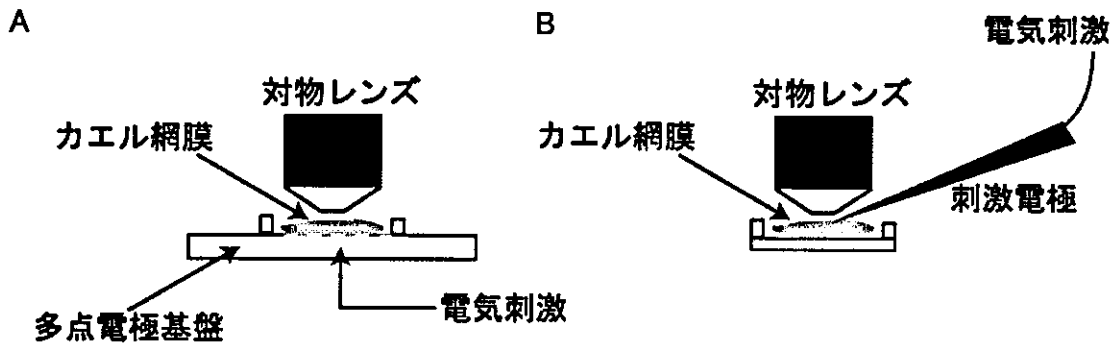


図 2. 電気刺激方法の概略図。A. 視細胞側刺激の方法。B. 神経節細胞側刺激の方法。

**[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。

**[カルシウムイメージング]**

本研究では、細胞外からカルシウム蛍光指示薬を導入し、その蛍光を測定することで、カルシウム濃度変化を測定する方法を適用した。測定のためのイメージング装置には、顕微鏡 (BX-51WI, Olympus) に高速冷却 CCD (NeuroCCD256sm, Red Shirts Imaging) を取り付けたものを用いた。得られたデータは専用ソフトウェア (NeuroPlex, Red Shirts Imaging) を使い PC により処理した。イメージングシステムの概略図を図 1 に示す。

また、カルシウム蛍光指示薬には、Oregon Green 488 BAPTA-1 (Molecular Probes) を使い、視神経断端より逆行性に

神経節細胞を染色した。この逆行性染色法を確立したことにより、昨年度まで行っていた AM 体による染色法に比べ、測定の S/N 比が格段に上昇した。

**[電気刺激]**

刺激方法による網膜神経節細胞の応答の違いを評価するために、網膜の神経節細胞側と視細胞側からの刺激を行い、その違いを検証した。神経節細胞のイメージングを行うためには、顕微鏡の対物レンズ側に神経節細胞が向くようにしなければならない。そのため、視細胞側の刺激には、ガラス基盤多点電極 (Multi Electrode Array, Multichannel Systems) を使い、神経節細胞側の刺激には、タングステン金属電極を用いて刺激した (図 2)。また、刺激には持続時間 200  $\mu$ sec の双極電流刺激を用いた。

**(2) *in vivo* 光計測装置の確立及び測定**

**[実験動物]**

実験動物には、ハートレイ系モルモット (体重 300-350g) を用いた。麻酔下で、モルモットの視覚野に相当する部分の頭蓋骨を取り除き、膜電位感受性色素 RH795 (Molecular Probes) で染色した。

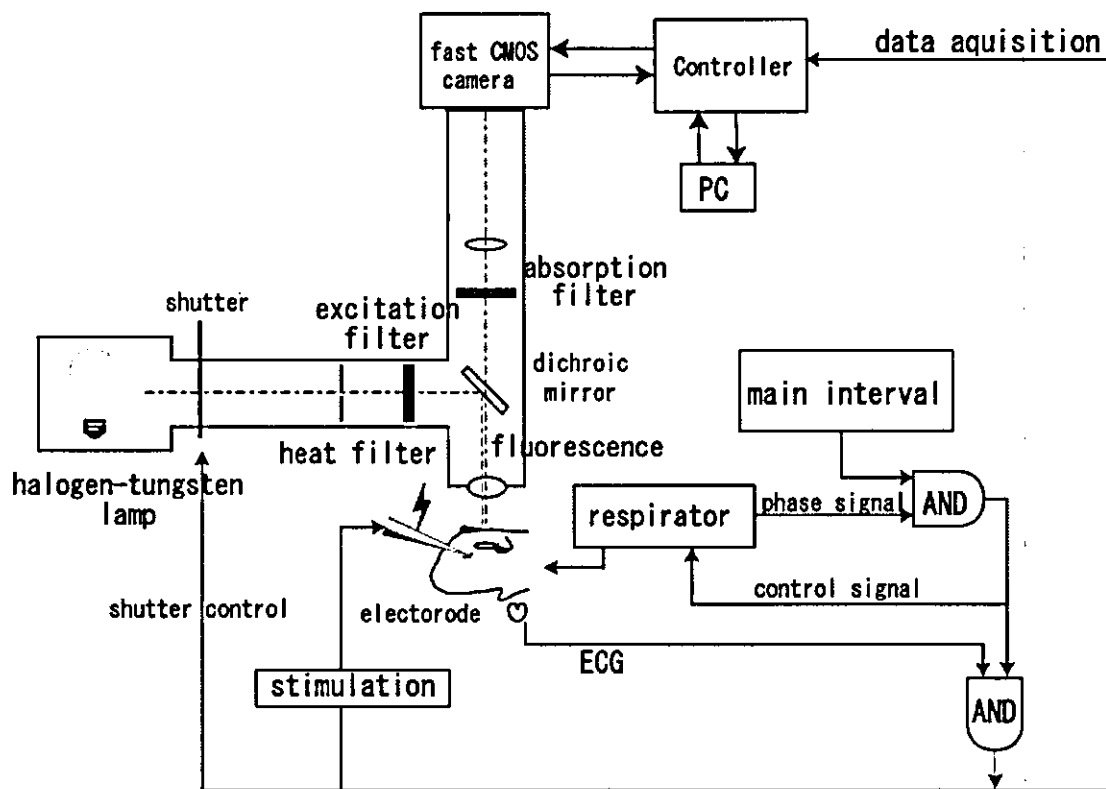


図3 *in vivo* 光計測システムの構成

【光計測法】

図3に示すシステムにより、光計測を行った。膜電位感受性色素は、細胞の膜電位変化により、蛍光強度が変化する。その蛍光変化を高速 CMOS image sensor (MiCAM Ultima, Brain Vision)を用いて計測した。また、呼吸及び心拍の影響を抑えるために、計測中は人工呼吸器を停止させ、心電の決まったタイミングで計測を行った。

C. 研究結果

【カルシウムイメージングによる細胞応答の評価】

図4に神経節細胞側から電気刺激を行い、神経節細胞のカルシウム濃度変化の測定結果を、図5に視細胞側から電気刺激を

行った結果を示す。図4より、刺激強度が  $50 \mu\text{A}$  から神経節細胞の応答が出ているものの、刺激電極より帯状にカルシウム濃度上昇が大きい部分が拡がっている。これは、視神経束のカルシウム濃度上昇であると考えられる。

図5より、視細胞側より刺激した場合は、より強い刺激強度が必要となるものの、視神経束のカルシウム濃度上昇は見られない。また、図には示していないが、刺激強度に依存して、応答する細胞の範囲が変化することが分かった。