

200500607A

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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田野 保雄

平成 18 (2006) 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、坂口裕和 中内一揚)	1
II. 分担研究報告	
1. 網膜の精密評価システムの開発 10 不二門尚	10
(i) 補償光学眼底鏡による生体眼視細胞の評価 (研究協力者別所 建一郎)	
(ii) ネコ網膜における機能画像解析 (研究協力者 大川 賀孝)	
2. 網膜刺激電極の視覚中枢における機能評価の研究 20 澤井元 (研究協力者 三好智満、神田寛行)	20
3. 視細胞変性中型動物モデルの作成 28 近藤峰生	28
4. 動物眼における人工網膜チップの組織学的検討 31 平形明人	31
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 39 八木哲也	39
6. 網膜刺激型電極のデバイスの開発 44 太田淳	44
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	48
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 56	56
IV. 研究成果の刊行物・別刷 57	57

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（H17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、中内一揚）

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、家兔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。本年度は、網膜色素変性症眼に対して phosphene を誘起するために必要と思われる、直径 200 μm の金—白金電極バンプ電極を用いて、比較的大きな電流を流し影響をみた。(biphasic pulse 0.7mA, 1mA, 1時間/日、14日間、各 n=3)。0.7mA で刺激した兎では、網膜に特に変化は見られなかったが、1.0mA で刺激した兎においては、蛍光眼底検査にてわずかに変化が認められた。また電極表面形状には大きな変化はなかった。これらの結果から、直径 200 μm の金—白金電極の安全閾値電流値は 0.7mA から 1.0mA の間にあると考えられた。

次に、安全な電流値を用いて、網膜色素変性症例に対し急性臨床試験を行なった。大阪大学医学部倫理委員会の承認、および十分な説明と同意の上、視力光覚弁の網膜色素変性症例 2 例 2 眼に対して臨床試験を施行した。結膜切開を施した後、外直筋および下斜筋の一部を切離し眼球を内転させ耳側の強膜を露出した。強膜上から白金球電極で通電し、低い電流強度で phosphene が生じる部位を探索した。その部位に 5×5mm の強膜ポケットを作成し、9点電極(4×5mm)を挿入し、さらに硝子体内に白金線電極(ϕ 0.1 mm)を設置し、両電極間に刺激装置を用いて 2 相性パルス波(パルス幅 0.5 又は 1.0ms, 周波数 20 Hz, パルス数 20)を通電した。phosphene の有無、大きさなどについて被検者が口頭で表現したものを記録した。その結果：症例 1 では 0.3~0.5mA (0.5 ms)、症例 2 では 0.4mA (1.0 ms)程度の刺激強度で限局した phosphene が生じた。隣り合う 2 極の電極で同時に刺激すると二つの独立した phosphene 又は、ひょうたん型の phosphene が生じることがあった。2 極の組み合わせを変えて刺激した場合、症例 1 では方向の違いを感知した。以上の結果から、STS 方式による人工網膜は、重症の網膜色素変性症患者に対しても、2 点弁別可能な人工視覚を誘起しえ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

澤井 元 大阪大学大学院医学系研究科
生理学 助教授
太田 淳 奈良先端科学技術大学院大学

物質創成科学 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

平形 明人 杏林大学医学部 眼科学 教授
大路 正人 滋賀医科大学 眼科学 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

小澤 素生 (株)ニデック 副社長
西村 茂 (株)ニデック東京研究センター
所長

A. 研究目的

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—経網膜刺激法 (Suprachoroidal Transretinal Stimulation (STS))を開発し、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。本年度 (平成 17 年度) は、急性臨床試験を視野に入れ、網膜色素変性症眼に対して phosphen を誘起するために必要と思われる、直径 200 μ m の金・白金電極バンプ電極を家兎強膜内に慢性的に埋め込み、比較的大きな電流で連日刺激することで生じる生体の反応について検討した。また、この実験で確かめられた安全な電流値を用いて、進行した網膜色素変性症例に対して急性臨床試験を行い、STS方式による人工網膜が、実際の臨症例で人工視覚を誘起するのに有効か否かを検討した。

研究 1 : 家兎に対する組織損傷電流値の検討

B-1 研究方法

実験動物 : 有色家兎 (n=7)

刺激電極 : ポリイミド基板、白金—金スタッドバンプ (ϕ 200 μ m)、パリレンコート (図 1-a, b)

参照電極 : 白金線 (ϕ 100 μ m)

刺激波形作製装置 : SEN-7203、アイソレーター : WPI-A365、オシロスコープ : TPS-2014

方法 : 有色家兎の左眼腹側強膜内に半層切開を作製し、刺激電極を埋植した。

参照電極は、角膜輪部に 30G 針で開けた強膜

創から硝子体中に 2mm 挿入留置した。

電極のワイヤーは、眼瞼部皮下、頭部皮下を通して配線し、頭蓋上に固定した。麻酔下にて、連日 1 時間、14 日間の通電を行った。

使用電流値 : 0.7mA (n=3), 1mA (n=3) 対照 : 0mA (n=1) (すべて anodic first biphasic pulse, 0.5ms duration, 20Hz)

電極の通電性評価として、通電時電極間電圧をオシロスコープにて測定し、また電極の埋め込み前後の走査電顕写真を撮影し、比較した。

組織損傷を評価するために、最終日に眼底検査および蛍光造影検査 (FA) を行った。さらに眼球摘出して固定後、電極を外した後に、パラフィン包埋にて切片化して HE 染色し、組織学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

家兎を使用した実験においては、研究計画に関して大阪大学動物実験施設の許可を受け、ARVO の基準に従って、動物愛護の精神で行った。

C-1 研究結果

0.7mA の通電をした眼では、1 日目の平均電極間電圧は 7.0 ± 0.7 V であり、14 日目の平均電極間電圧は 10.4 ± 3.1 V であった (グラフ 1 a)。平均 50% の増加率であった。(10%~77%)

1 mA の通電をした眼では、1 日目の平均電極間電圧は 9.5 ± 1.1 V であり、14 日目の平均電極間電圧は 11.5 ± 0.1 V であった (グラフ 1 b)。

平均 20% の増加率であった。(7%~33%)

0.7mA 通電眼では、眼底および FA に変化はなかった (図 2-a)。1mA 通電眼では、眼底に変化は無かったが、FA にて 2 眼に RPE の変性が原因と思われる window defect が見られた (図 2-b)。

組織学検査では、6 眼ともに強膜内に異物反応が見られたが、その増殖の割合は、電流に比例していなかった。また対照の 0mA でも、強膜内に異物反応が見られた。(図 3-a,b,c,d)

HE 染色では、7 眼ともに網膜に異常を認めなかった。ただし、1mA にて刺激した兎のうち一眼には、強膜繊維に変性があり、接触部位に電極金属の debris とと思われる黒色物質の付着が認められた。(図 3-c,d)

走査電顕では電極の大きな形状変化は認めなかったが、0.7mA より 1mA 通電にて周辺部の侵食が強く見られた。(図 4-a,b,c,d)

D-1 考察

先行実験で、1 時間の複層波通電による組織損傷閾値電流を求める実験では、顕微鏡的眼底観察の結果、 $\phi 100\mu\text{m}$ では危険値が 1.5mA、安全値が 1mA、 $\phi 200\mu\text{m}$ では、危険値が 2mA、安全値が 1.5mA とおおよその安全閾が分かっていた (duration 0.5ms の場合)。よって、今回は、 $\phi 200\mu\text{m}$ の電極で 2 週間の通電を見込んで、0.7mA と 1mA の二つの電流値を採用した。また、角膜電極を用いた phosphon 誘発実験でも、色素変性の患者では 0.5~1mA を必要とすることが分かっており、この値にて組織損傷が起こるかどうかを見極めるのが重要であると考えられた。

電極間電圧の増加は、0.7mA の場合、約 50%、1mA の場合、約 20%となっている。この数値については、さらに長期の埋植実験にて、変化を明確にする必要がある。電極と組織の接触がよくなれば、抵抗が上がるということが分かっているが、

今回の電圧上昇の原因には主に三つの可能性が考えられる。ひとつは、電極周囲の組織間液が減少し、電極と強膜が密着したということ。もう一つは、強膜内の増殖性組織が通電抵抗を上げるということ。最後の一つは、硝子体電極側の通電抵抗が上がっていて、今回の結果に影響したということである。今後の実験では、三点法を用いて電極間電圧を計測し、刺激電極、硝子体電極個別の抵抗性の変化を記録する必要があると思われる。

また今回の通電では、0.7mA の場合、眼底検査や、FA、組織検査にても異常が認められなかったことより、少なくとも 2 週間は、この電流値が安全であったと考えられる。また、1mA では、眼底像や組織検査にては異常が無く、FA にのみ異常が出たことより、微細な変化ではあるが不可逆的な変化が起こったと考える。よって、さらに長時間の通電実験をして、この安全閾値が 0.7mA~1.0mA と同じものであるかを確かにする必要がある。臨床において、必要な最大刺激電流値は 0.5mA~1mA と予測されているので、今回の結果は、STS 法の最大刺激電流値に関して、安全性を示したものであると考えている。

E-1 結論

今回の実験により、2 週間の埋め込みで、連日 1 時間の STS 法における損傷電流閾値は兎においては、0.7mA から 1mA の間にあることが示唆された。

図の説明

図 1-a : 電極先端部

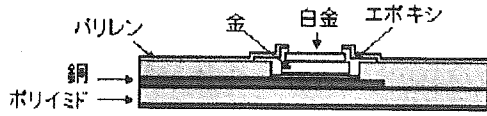


図 1-b : 埋め込み用の電極の全体像

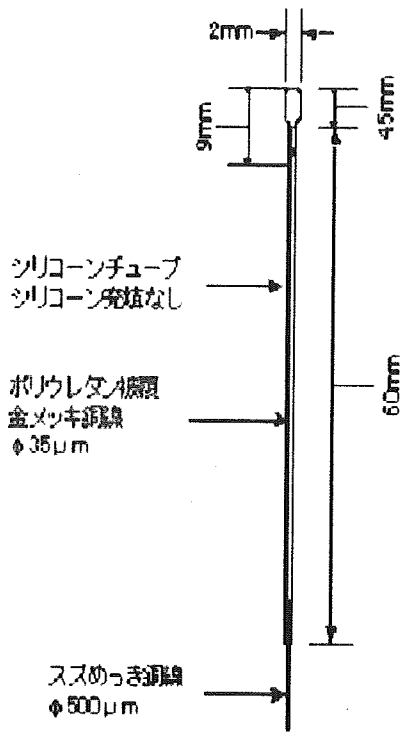


図 2-a : 0.7mA 刺激後の FA 像
特に変化は見られない。

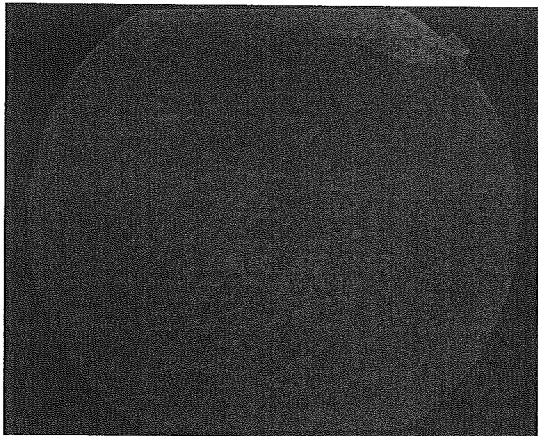


図 2-b : 1mA 刺激後の FA 像

電極接触部位に一致して window defect が見られる。

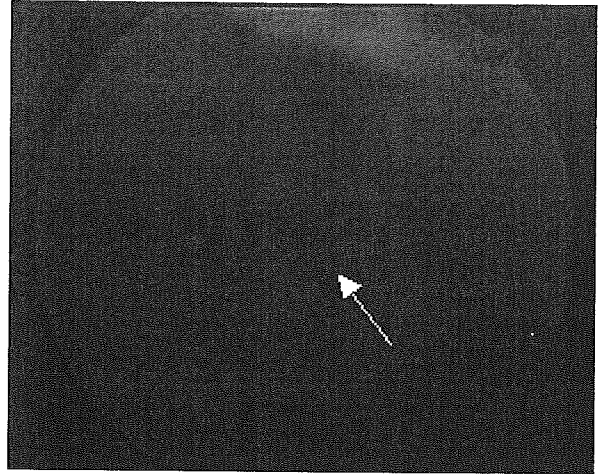


図 3-a: 0.7mA 刺激後の組織 x100

電極に接触していた部分には、炎症細胞が見られる。

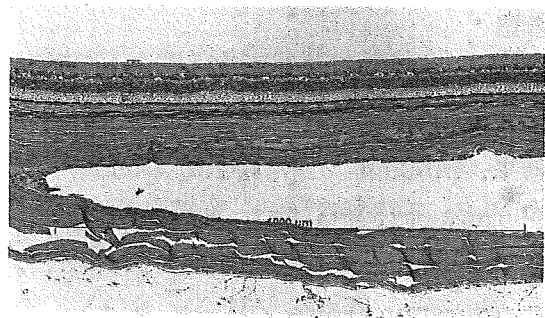


図 3-b: 電極接触部分の拡大 x400

凹み部位が電極の凸に一致

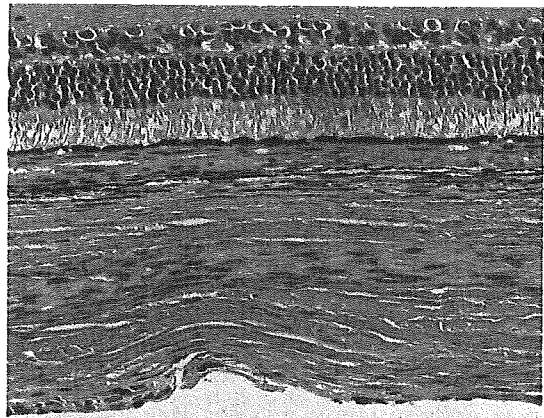


図 3-c : 1mA 刺激後の組織 x100
0.7mA 同様、電極接触部には炎症細胞が見られる。

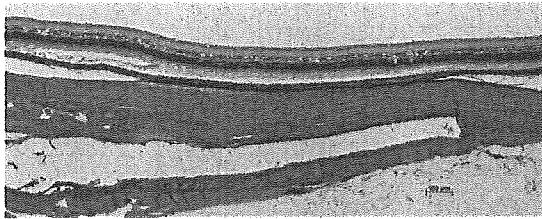


図 3-d : 電極接触部分の拡大 x400
黒色組織 (debris) がみられる。

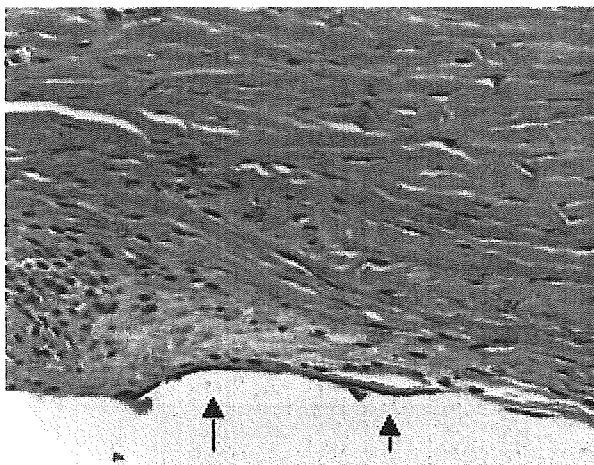


図 4-a : 0.7mA 刺激に使用前の電極形状
(SEM 検査はすべて倍率 500 倍)

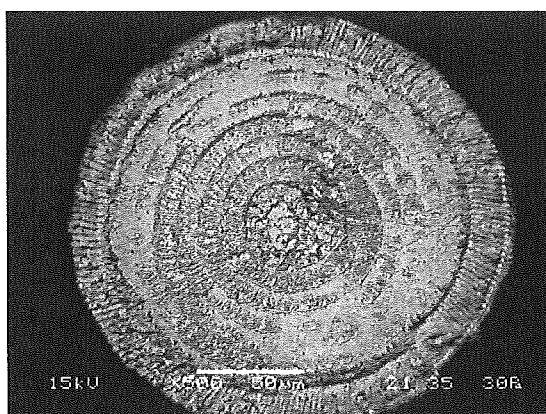


図 4-b : 0.7mA 刺激後の電極形状
付着物 (↑) があるが、電極表面の侵食は少ない。

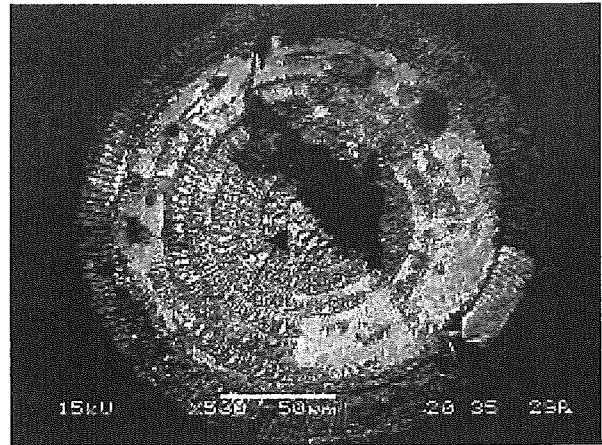


図 4-c : 1mA 刺激前の電極形状

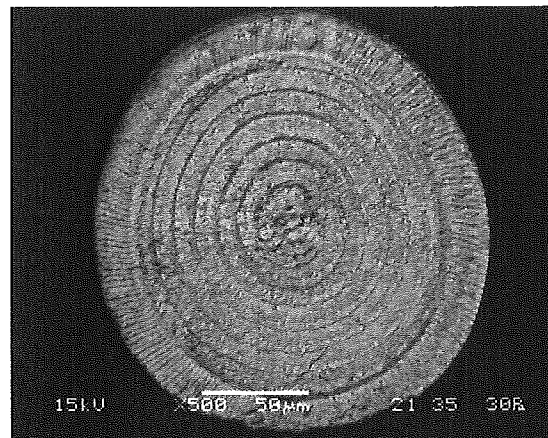
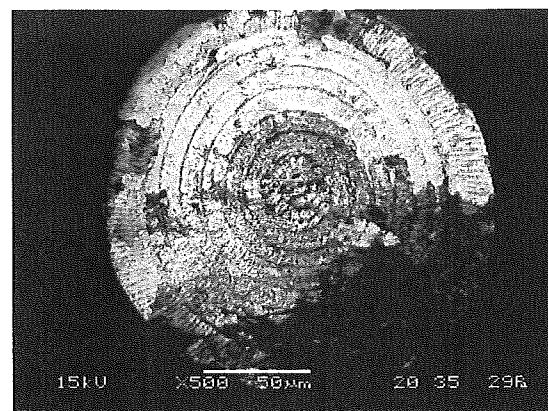
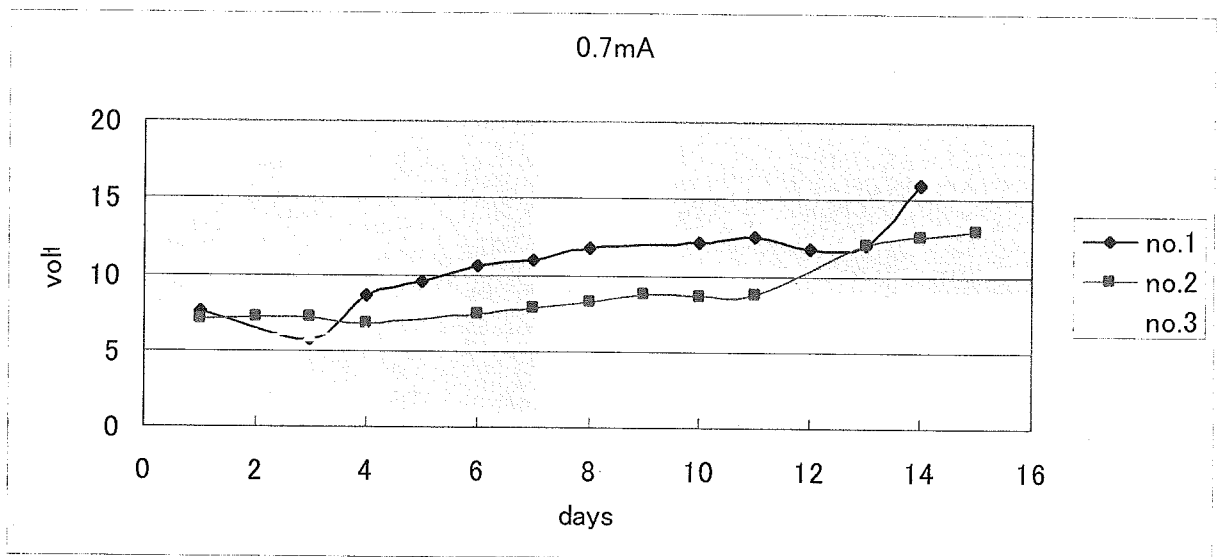


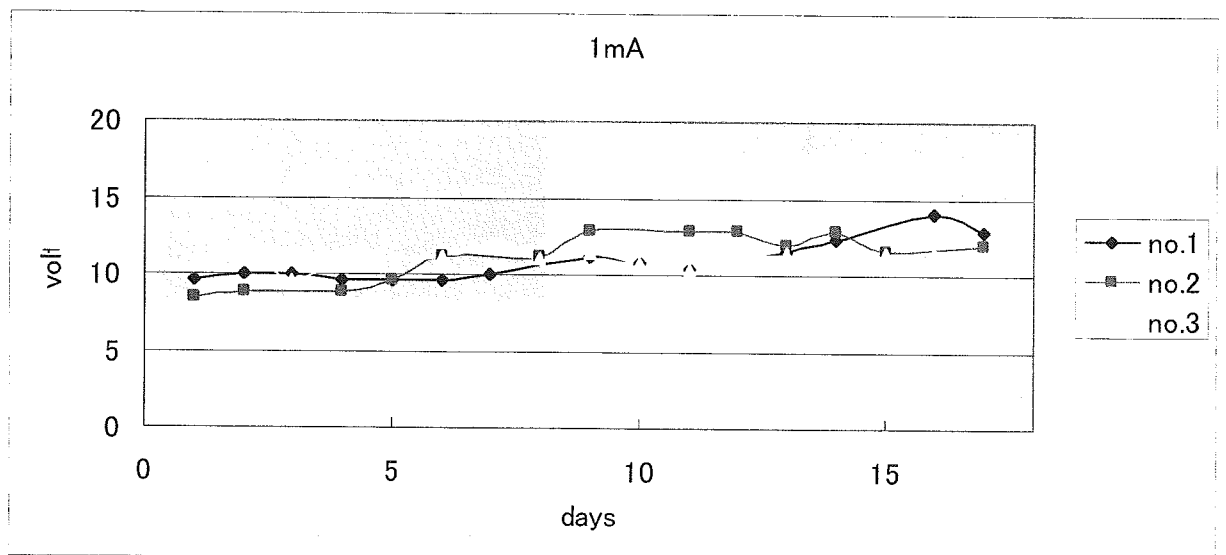
図 4-d : 1mA 刺激後の電極形状
全体的な変化は少ないが、周辺部には軽い侵食が見られる。



グラフ1a : 0.7mA 刺激の電極間電圧の推移



グラフ1b : 1.0mA 刺激の電極間電圧の推移



研究 2 :

網膜色素変性症例に対する STS 法による人工視覚の急性臨床試験

B-2 研究方法

臨床試験を行う準備として、正常者に対してプローブ型電極を用いて経強膜的に電気刺激を行ない、最適なパルスパラメータを検討した結果、パルス幅は 0.5-1.0 msec, 正負のパルス間隔は、0.5 msec, 周波数は 20-50 Hz、パルス数は 20 程度が、同一の電荷量を注入した場合に最も高輝度の Phosphene (擬似光覚) が得られることが分かった。以上の結果に基づき、視力光覚弁の網膜色素変性の 2 症例に対して、大阪大学医学部倫理委員会の承認を経て、急性の臨床試験を行った。

症例 1 は 65 歳男性で、眼底検査で網膜全周の萎縮と骨小体様色素沈着を認めること、および、網膜電図 (ERG) で電位変化を認めないことより網膜色素変性と診断した。視力は光覚弁であった。症例 2 は 65 歳女性で、同じく眼底検査と ERG で網膜色素変性と診断され、視力は光覚弁であった。この両者に、今回の試験の目的と方法、予想される結果、可能性のある合併症、および、結果の公表に関して説明し、文書による同意を得た。

術式は、2%キシロカインによる顔面神経ブロックと点眼麻酔のみを用い、症例 1 のみ試験終了直前にフェンタネスト 20mg の静脈注射を追加した。結膜を約 200°切開し、外直筋を切腱した後、下斜筋を露出した。プローブ型モノポーラー電極を下斜筋の後極側に挿入し、経強膜的に刺激して擬似光覚 (phosphene) の得られる電流閾値の小さい部位を探索した。参照電極は掌に設置した。低閾値領域を確認した後、その部位に強膜半層切開を加え、STS 電極を挿入するための 5 x 5mm 強膜ポケットを作成した。強膜ポケット前方縁に電極固定用の 5-0 ダクロ

ン糸を仮結紮した。角膜輪部の後方 4mm の位置に、白金線硝子体電極 (直径 0.1mm) を設置した。9 極電極 (4x5mm、ユニークメディカル、大阪) (図 1) を強膜ポケット内に挿入し、ケーブルを縫合固定した (図 2)。各白金電極は直径 200 μ m で、各電極の中心間距離は 1mm、シリコン基盤からの電極隆起は 50 μ m であった。

刺激装置は本試験用に開発したもので、各電極の刺激電流を独立して調節することが可能である (図 3)。2 相性双極波 (パルス幅 0.5 又は 1.0ms, 周波数 20 Hz, パルス数 20) を選択した電極に通電した。刺激電極を 1 極ずつ選択した後、隣接する 2 極、直行する 3 極ずつの組み合わせを選択した。

phosphene の有無、大きさなどについて被検者が口頭で表現したものを記録した。刺激直前に刺激開始の合図を口頭で行なったが、被検者に答えを誘導することのないように注意して対応した。

(倫理面への配慮)

本試験はヘルシンキ宣言の内容に即して遂行し、事前に大阪大学医学部倫理委員会の承認を得た。被検者は本研究の参加を表明した後も、自由に辞退できる旨伝え、結果の公表に関しては、個人情報の保護に努めた。

C-2 研究結果

プローブ型モノポーラー電極による経強膜刺激を行ない低閾値領域を探索したところ、症例 1 では、下斜筋の約 2 mm 後極側に 0.4mA 程度の低い閾値で phosphene を知覚する部位が検出できたので、その部位に強膜ポケットを作成し、9 極電極を埋植した。症例 2 では、症例 1 よりもさらに後極部よりの位置で電流値を 1 mA まで上げないと phosphene は得られなかった。症例 1 よりも更に約 1 mm 後方で黄斑部に向かう方向に強膜ポケットを作成した。STS で

は、9 極の電極のうち1 極を選択した場合、症例 1 は 0.3~0.5mA (0.5 ms)、症例 2 は 0.4mA (1.0 ms)程度の刺激強度で限局した phosphene が生じた。隣り合う 2 極の電極を同時に刺激すると、二つの独立した phosphene 又は、ひょうたん型の phosphene が生じることがあった。2 極の組み合わせを変えて刺激した場合、症例 1 では方向の違いを感知した。

D-2 考察

ヒトにおいて、脈絡膜上・経網膜電気刺激により人工的に視覚を誘導できることが、本試験で初めて示された。電極埋植部位の決定に当たっては、経強膜プローブ型電極による低閾値領域の探索が有用であった。2 例とも、黄斑に近づくほど感度がよくなり、閾値が低下していた。症例 2 において、経強膜刺激では 1 mA まで刺激電流値を上げなければ phosphene が得られなかったが、STS では 0.4mA で phosphene が得られた。その理由としては、強膜ポケット内に電極を埋植することにより刺激電極が網膜により近づいたことと、参照電極を硝子体腔に設置したので、電流の拡散が減少し、より高密度の電流束が網膜を貫いたことが挙げられる。

今回の被検者は 2 症例とも進行した網膜色素変性で、大部分の視細胞が萎縮変性に陥っていると考えられる。このような症例に対しても、STS 方式で残存神経節細胞を刺激すれば、限局した phosphene が得られることが判明した。さらに、2 点刺激で独立した phosphene が知覚されたことから、この STS 方式で 2 点弁別が得られることが実証されたと言える。また、刺激電極の組み合わせを変えることで、方向性の違いが知覚され、パターン認識も可能であることが示唆された。以上より、今後電極や周辺デバイスの改良により、STS 方式で指数弁の獲得が可能であると確認でき、今後の開発に方向性とモチベーションを与えることができた。

E-2 結論

STS 方式による 2 点弁別が可能であることを示唆し、この方式による人工網膜臨床応用の可能性があるかと推察できた。本研究は、現在治療方法がない網膜変性による視覚障害者に、復明の希望を与えるものであり、また、わが国より発信できる新技術となり、新たな医療産業の創出にも繋がるものと期待される。

F-2 健康危険情報

特になし

図 1 STS 9 極電極

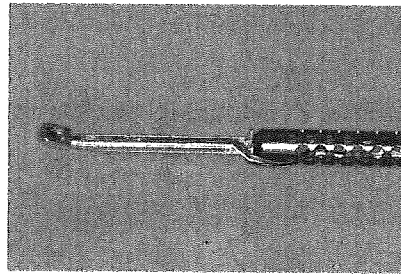


図 2 STS 電極埋植

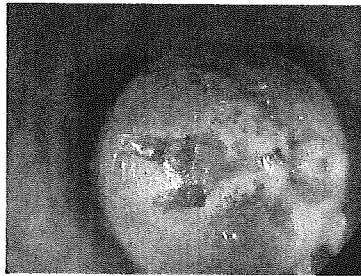
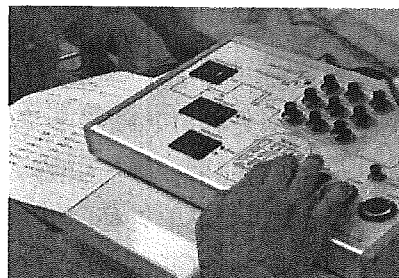


図 3 刺激装置



G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nakauchi K, et al.: Transretinal electrical stimulation by an intrascleral multichannel electrode array in rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243:169-174
- (2) Morimoto T, et al.: Transcorneal electrical stimulation rescues axotomized retinal ganglion cells by activating endogenous retinal IGF-1 system. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 2005;46:2147-2155.
- (3). Fang X, Sakaguchi H, Fujikado T, Osanai M, Kanda H, Ikuno Y, Kamei M, Ohji M, Gan D, Choi J, Yagi T, Tano Y: Direct stimulation of optic nerve by electrodes implanted in optic disc of rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 243(1):49-56, 2005.
- (4). Yi-Li Pan, T. Tokuda, A. Uehara, K. Kagawa, J. Ohta, M. Nunoshita, "A Flexible and Extendible Neural Stimulation Device with Distributed Multi-chip Architecture for Retinal Prosthesis," *Jpn. J. Appl. Phys.* Vol. 44, No. 4B, pp. 2099-2103, 2005.
- (5). Sakaguchi H, Ohji M, Gomi F, Sawa M, Oshima Y, Ikuno Y, Kamei M, Tano Y: New micro vertical scissors for the surgical ablation of retinal angiomatous proliferation. *Am J Ophthalmol.* 139:377-380, 2005.

2. 学会発表

- (1) 中内一揚、不二門尚、太田淳、徳田崇、神田寛行、寺澤靖雄、小澤素生、平形明人、田野保雄、脈絡膜上-経網膜電気刺激方式による人工網膜の長期連続電気刺激の効果 日本眼科学会総会 2005
- (2)Kazuaki Nakauchi, Takashi Fujikado, Jun Ohta, Takashi Tokuda, Hiroyuki Kanda, Yasuo Terasawa, Motoki Ozawa, Akito Hirakata, Yasuo Tano, Safety and effectiveness of suprachoroidal-transretinal stimulation by chronically implanted electrode with continuous electrical stimulation in rabbits, ARVO 2005
- (3) Kazuaki Nakauchi, Takashi Fujikado, Akito Hirakata, and Yasuo Tano, A tissue change after suprachoroidal-transretinal stimulation with high electrical current in rabbits, The 2nd DOE Symposium on Artificial Vision, 2005
- (4) Tano Y: Artificial vision: Vision of a newcomer, Keynote Lecture, The 2nd DOE Symposium on Artificial Vision, Ft Lauderdale, FL, U.S.A.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

特願 2005-222027(出願火 h17.7.29)「視覚再生装置」発明者 田野保雄、不二門尚 小澤素生

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

網膜の精密評価システムの開発
—補償光学眼底鏡による生体眼視細胞の評価—

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 別所建一郎 大阪大学医学系研究科感覚機能形成学 大学院生

研究要旨

人工網膜の適応を決める上で、残存する視細胞を評価することが必要である。これまで補償光学（Adaptive Optics）を用いた眼底カメラの開発を行ってきたが、本年度は得られた眼底像に対し眼底疾患、患者年齢、また屈折度数や視力などの眼科一般検査で得られる情報について比較検討を行った。眼底疾患のない正常眼ではほとんどの例で視細胞の 2 次元的配列のイメージを得ることが可能で、個々の視細胞が分離可能であった。眼底疾患眼では明瞭な細胞像の得られない例が少なくなかったが、その要因として視細胞自身の変性、脱落以外にも、網膜以外の要素（網膜浮腫、網膜下液、網膜色素上皮の変性など）が関与している可能性が考えられた。黄斑ジストロフィー症例では視細胞の変性を直接示すと思われる所見が得られた。網膜変性モデル動物を用いた病理学的検索が必要であるが、病眼においても本装置が有用となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

人工網膜の適応を決める上で、残存する視細胞を評価することが必要である。これまでわれわれは、補償光学（Adaptive Optics）を用いた眼底カメラの開発を行い、視細胞評価の可能性について検討してきた。補償光学は元来天文学で使われている技術で、これを眼底カメラなどの眼底撮影装置に応用すると、眼球の高次波面収差を補正することにより解像度を向上させることが可能で、従来の機器では不可能な視細胞レベルの生体内網膜観察が可能となる。一方眼底疾患を観察した報告は未だ少なく、これを用いることで、錐体ジストロフィーなど診

断が困難な網膜疾患に対する錐体密度など視細胞の情報による補助診断の可能性や、眼疾患による網膜障害・治療に対する回復度などに対する視細胞の形態学的側面からの評価など、臨床的にも有益な新しい知見を得られる可能性がある。本年度は補償光学眼底カメラの高精度化と、これにより得られた眼底像についての検討を行った。

B. 対象と方法

対象：正常眼ボランティア 60 眼、大阪大学附属病院眼科にて臨床的に診断された網膜疾患を有する 42 眼。

方法：①補償光学眼底カメラの光学系
試作機には波面収差測定用と照明用の 2 系

統の光源(波面測定用光源に波長 690nm の SLD光源、照明光として 638nm のLD光源)を設定した。光源の出力は角膜上で測定した場合、波面測定用光源が $0.5\mu\text{W}$ 、照明用光源が 1.5mW で、撮影(1-2秒)における安全係数は両光源とも 100 以上である。

これと Hartmann-Shack 波面センサー(28 × 28 lenslet)、液晶位相変調素子(Hamamatsu PAL X8287)を図1の如く組み込み、波面収差のフィードバックループを形成した。まず内部可動プリズムにて球面值の粗補正を行った後、被検眼からの波面に対して、Zernike 係数で 8 次までの収差測定を約 100ms 毎に行い、その情報からコンピュータで位相変調素子に発生させるべき逆位相の収差を計算し、位相変調素子を通じた後の波面がフラットになるように素子をコントロールする(約 300ms 毎)。補正された波面に対してさらにフィードバックがかかり、このループを周回することで波面収差はさらに低減される。設定した目標閾値に到達するとシャッターが開き撮影が行われる。撮像素子は $1000 \times 1000\text{pixel}$ の CCD を用い、露光 2-3ms、30fps にて撮影し、10-bit grayscale の Tiff 画像約 20 フレームを得た。

②撮影

大阪大学医学部倫理委員会の承認下で、説明を行い文書による同意を得た後、0.5%トロピカマイド・0.5%フェニレフリン(ミドリンP[®])による散瞳下で眼底撮影を行った。収差補正フィードバックの目標閾値は初期値を $0.15\mu\text{m}$ (Total RMS (総高次収差: 2 次の SC 面值を含む)、解析瞳孔径 5mm のとき)として、実際の補正状況に応

じて増減した。内部視標(図2)を用いて、中央固視、中央から耳側 2 度を固視させ、撮影を行った。黄斑疾患などの固視不良例については、Rodstock SLO または Nidek MP-1 を用いた Microperimetry により網膜上の固視点を確認した上で、結果画像のオリエンテーションを検討した。画像は可能であれば残収差による Deconvolution 処理、フレームの重ね合わせ処理を行い画質の向上を図った。

C. 結果

正常眼では、ほとんどの例で個々の錐体視細胞を識別可能な画像の取得が可能であった(図3)。現時点まで対象となった眼底疾患症例は表1の通りである。眼底疾患眼では収差の測定・補正が正常眼に比して困難な例が多く(表2)、眼底像でも識別可能な正常眼同様の構造物が観察される頻度が減少し、観察が可能であった症例では正常眼で見られる視細胞のモザイク構造以外の、視細胞の変性・脱落を示すと思われる所見を得た(図4)。

D. 考察

視細胞の2次元観察は、摘出標本での検討は詳細になされており(Curcio et al)、中心窩中央での錐体密度が最も高く、網膜周辺へ向かって杆体密度の増加とともに錐体密度は減少していくこと、錐体密度そのものには大きい個体差が存在することなどが報告されている。疾患眼での報告はあまり無く、例えば錐体ジストロフィーで錐体細胞が消滅しているという報告があるが、摘出眼であるため病期としては末期の例であるものがほとんどであり、初期の病態や進行様式など不明な点は依然多い。

本研究では補償光学を用いた生体内観察に

より、非侵襲的に視細胞の2次元構造の観察が可能であった。眼底疾患を有する眼では明瞭な細胞像の得られない例が少なくなかったが、その要因として①視細胞自身の変性、脱落を反映している、②網膜の浮腫、網膜下液、網膜色素上皮の変性など、視細胞描写のために必要と思われる網膜色素上皮とのコントラストを低下させる要素、③網膜の浮腫、網膜下液などによる波面測定光の吸収や、白内障など中間透光体の混濁のための散乱によると思われる波面測定・補正が困難な例、④病眼に特に多く見られる装置の補正限界を超える屈折異常（高次収差）の存在、⑤散瞳不良例、などが考えられた。現状では構造物が何も写っていないときに、それが視細胞自身の変化を表すのかアーチファクトであるのかを明確に判別するのは難しく、このためには①②についてモデル動物を用いた実験による検証、③については画質と散乱との関係の検討、④については位相変調素子と、そのコントロールプログラムの改良を要する。病眼では、黄斑ジストロフィー症例で構造物が明瞭に写っており、しかも正常と異なる様相を呈する、視細胞の変性を直接示すと思われる所見が得られた（図5）。やはりモデルを用いた病理学的検索が所見の解釈には必要であるが、病眼においても本装置が有用となる可能性が示唆された。

E. 結論

補償光学（Adaptive Optics）を用いた眼底カメラは、網膜変性のある眼において、残存細胞する視細胞の評価に役立つ可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1). Fujikado T, Shimojyo H, Hosohata J, Yoko Hirohara Y, Mihashi T, Maeda N, Tano Y, Wavefront Analysis of Eye with Monocular Diplopia and Cortical Cataract, Am J Ophthalmol, in press
- (2). Mihashi T, Hirohara Y, Watanabe H, Maeda N, Koh S, Ninomiya S, Kuroda T, Tano Y, Fujikado T. Tear Film Break-Up Evaluated by Real Time Hartmann-Shack Wavefront Sensing. Jpn J Ophthalmol. 2006 Mar-Apr;50(2):85-9.
- (3). Kim A, Bessho K, Okawa Y, Maeda N, Tano Y, Hirohara Y, Mihashi T, Fujikado T. Wavefront analysis of eyes with cataracts in patients with monocular triplopia. Ophthalmic Physiol Opt. 2006 Jan;26(1):65-70.

2. 学会発表

- (1) Bessho K, Yamaguchi T, Nakazawa N, Mihashi T, Okawa Y, Maeda N, Fujikado T. Live photoreceptor imaging using a prototype adaptive optics fundus camera: a preliminary result ARVO meeting, Fort Lauderdale 2005, May 1-5.
- (2) Fujikado T, Kim A, Bessho K, Okawa Y, Maeda N, Tano Y, Hirohara Y, Mihashi T. Efficacy of Wavefront Analysis in Identifying the Cause of Monocular Triplopia of Lens Origin. AAO meeting, Chicago, 2005, Oct 16-18.

図とその解説

図 1 : 補償光学眼底カメラの模式図

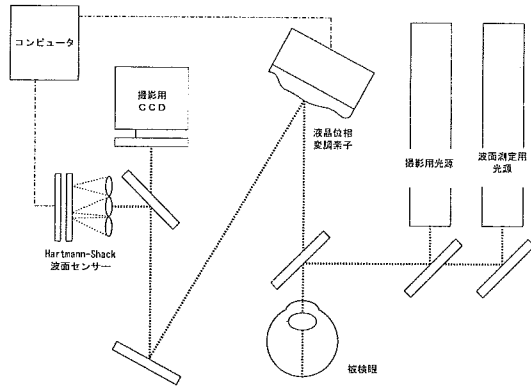


図 2 : 内部視標

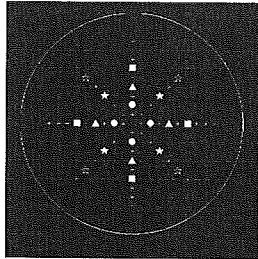
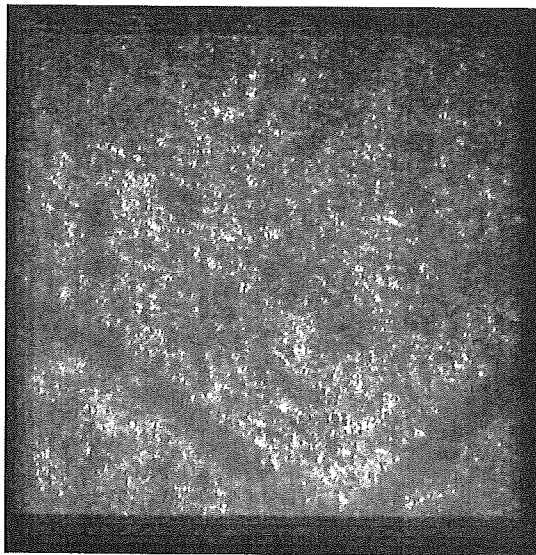
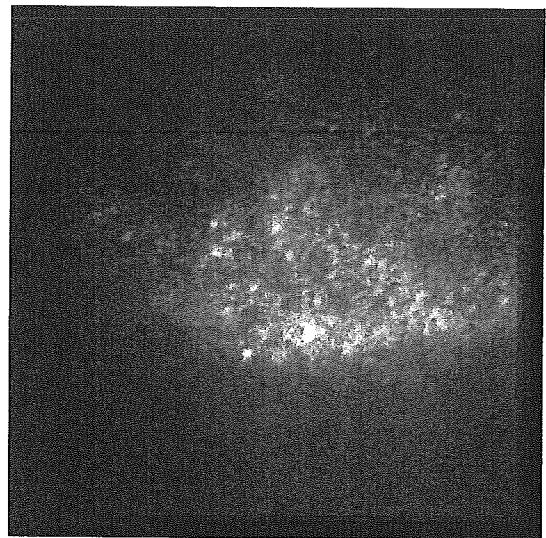


図 3 : 正常眼の視細胞像



31歳女性（正常眼）、左眼黄斑部中央より2度耳側固視にて撮影。残存収差によるDeconvolution処理、8枚分の加算平均を行っている。個々の輝点が錐体視細胞を示す。線状影は網膜細血管である。

図 4 : 眼底疾患眼の視細胞像



46歳男性（黄斑ジストロフィー）。両眼にいわゆる標的黃斑症を呈しており、弟が同様の黄斑症を持つ。画像は視標中央を固視にて撮影。上方には図4類似の輝点が多数見られるが、輝点の大きさ、形状は正常の場合に比べばらつきが大きく、また下方はほぼ無構造である（眼底写真との比較から、標的黃斑症の中央の部分と考えられる）。

表1 撮影対象となった疾患

		有効な眼底像撮影不能	
網膜疾患なし	屈折異常なし	55	
網膜疾患なし	近視(-8D以上)	4	
網膜疾患なし	円錐角膜疑い	1	
網膜疾患あり	網膜ジストロフィー	8	
	錐体ジストロフィー	2	
	錐体杆体ジストロフィー	2	
	Occult ジストロフィー	2	
	網膜色素変性症	2	
	加齢黄斑変性	7	1
	変性近視	11	4
	近視性新生血管黄斑症	3	
	中心性網脈絡膜症	3	2
	光網膜症	1	
	後天色覚異常	1	
	ぶどう膜炎	1	1
	視神経症疑い	1	

表2 収差補正の状況[#]

補正パラメータ	Total RMS
眼底疾患なし	0.108±0.029*
眼底疾患あり	0.138±0.052

収差測定不能例（眼底疾患群の6例）を除外。（P=0.03 student t）

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

網膜の精密評価システムの開発

—ネコ網膜における機能画像解析—

分担研究者 大阪大学感覚機能形成学 教授：不二門 尚

研究協力者 大阪大学感覚機能形成学 大学院生：大川 賀孝

研究要旨

脳研究における optical imaging をネコ網膜に応用し、光刺激による網膜神経活動を観察できることを前回報告した。今回、人工網膜に使用されている suprachoroidal-transretinal stimulation (STS 法) による電気刺激をネコ眼球に与えたところ、網膜神経活動を計測し、時間的・空間的局在を可視化することができたので報告する。この技術を人における急性臨床研究に用いれば、客観的・定量的かつ経時的な網膜神経活動計測を非侵襲的に行える可能性がある。

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 optical 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変化を起こすことを利用した計測であり、光学的な手段であることから大がかりな装置は不要である。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。さらに、網膜は光学的に外界から観察可能であることから、生体で非侵襲的にこの技術を応用できる。2004 年の Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) にて我々はヒト網膜における optical imaging 結果について発表したが、固視の維持が難しく、再現性がある結果を得ることが困難であった。そこで、ネコを用いた動物実験を行い、光刺激による網膜神経活動が計測できることを確認した（前回の報告）。今回、われわれが人工網膜の新しい方法として開発した suprachoroidal-transretinal stimulation (STS) 法による電気刺激をネコ網膜

に与え、神経活動を計測したので報告する。

B. 方法

生後 1~2 年のネコ 6 匹を全身麻酔し、頭部及び眼球を固定、0.5% トロピカミド・5% フェニレフリン・1% アトロピン点眼液にて散瞳、コンタクトレンズを装着した状態で眼底を観察した。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 1)。改造内容は、前回同様であるが (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、記録用には赤外光 CCD を使用した)、今回は光刺激を与えず、STS 法による電気刺激を与えた。STS 法は、眼球後極部強膜を半層切除し、そこに押し当てた閏電極と毛様体扁平部から硝子体腔内に挿入した不閏電極の間に通電することにより施行した (図 2)。刺激条件は電流値以外を統一し、duration 500 μ sec の biphasic 矩形パルス波 (inward \rightarrow outward) を 50Hz で 4 秒間与えた (図 3)。

1 session の撮影時間は 26 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秒間は様々な条件で電気刺激を与え、6秒から26秒までは刺激無しとした。26秒間の撮影時間中は25m秒毎に撮影を繰り返し(図4)、刺激前・刺激中・刺激後、計1,040枚の画像(320×256 pixel、12bit グレースケール)を得た。20sessionを全く同じ条件で計測し、得られた画像計20,800枚を1seriesとして解析に使用した。なお、sessionとsessionの間隔は34秒とし、刺激開始から次の刺激開始までが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)やCCDノイズの影響を抑え、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20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1,040枚を使用し、測定開始時の画像とそれぞれのタイミングの画像を比較して反射光量の変化を計算(各pixel座標で階調を減算)した(図5)。

C. 結果

今回、84seriesの実験を行った。代表例を示す。図6は電流値300 μ Aで刺激を与えた結果である。中心窩の耳上側にある電極設置部位を中心にして反射光量の変化が起こっている。前回報告の光刺激時には主に反射光量低下であったが、今回の電気刺激時には低下だけでなく、反射光量増加している部分も見られた。また、下方のtapetumの存在しない部位では反射光量の変化は見られず、これは光刺激時と同様であった。時系列に並べたものを図7に示す(左→右、上→下)。刺激開始後約1秒で反射光量変化が起こり始め、約2秒でピークに達し、その後徐々に反射光量変化が小さくなって、刺激開始前と同レベル近くまで戻る様子がわかる。同様に電流値100 μ Aで刺激を与えた結果を図8、図9に示す。電流値300 μ A刺激時と同様であるが、

反射光量変化が小さく、また、変化部位の面積も小さかった。時間的な変化は同様であった。

D. 考察

ネコ網膜において、STS法による電気刺激部位すなわち神経活動部位の反射光量変化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。

今回の実験は刺激開始から24秒後までの観察であったが、前回報告時(刺激開始から10秒まで)よりも14秒間延長したにもかかわらず、刺激条件によっては撮影終了時でも反射光量変化が残っているものがあった。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。次回の実験ではさらに長時間の撮影を施行し、蓄積の影響を極力排除する予定である。

これ以降の実験予定としては、テトロドトキシンによる電位依存性ナトリウムチャンネル阻害による変化測定、chiasmaからのリアルタイム集合電位モニタ、多点刺激電極による実験を予定している。

神経活動部位に反射光量の変化が起こる理由は、血行力学的な変化、酸素化ヘモグロビン割合の変化、蛋白・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、未だに確定しておらず、精力的な研究がなされている。我々はこれにも注目しつつ、optical imagingの臨床応用を目指して研究を進める予定である。

E. 結論

ネコ網膜において、STS法による人工網膜で、電気刺激部位において、反射光量変化を観察することが可能であった。この技術を人における急性臨床研究に用いれば、客観的・定量的かつ経時的な網膜神経活動計測を非侵襲的にできる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Fukui T, Fujikado T, Tsujikawa M, Okada M, Yamamoto S, Tano Y. Null *ABCA4* Gene Mutations Found in Japanese Patients with Panretinal Degeneration, *Jpn J Ophthalmol.* 2006 Mar-Apr;50(2):179-81.

(2) Morimoto, T, Fukui T, Matsushita K, Okawa Y, Shimojyo H, Syunji K; Tano Y, Fujikado, T. Evaluation of Residual Retinal Function by Pupillary Constrictions and Phosphenes using Transcorneal Electrical Stimulation in Patients with Retinal Degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, in press

(3). Fujikado T, Morimoto T, Matsushita K, Shimojo H, Okawa Y, Tano Y. Effect of Transcorneal Electrical Stimulation in Patients with Nonarteritic Ischemic Optic Neuropathy and Traumatic Optic Neuropathy *Jpn J Ophthalmol.* in press

(4). Kim A, Bessho K, Okawa Y, Maeda N, Tano Y, Hirohara Y, Mihashi T, Fujikado T. Wavefront analysis of eyes with cataracts in patients with monocular triplopia. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2006 Jan;26(1):65-70.

(5). 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.* 2005 Jun;46(6):2147-55.

2. 学会発表

(1) Okawa Y, Fujikado T, Miyoshi T, Hirohara Y, Mihashi T, Tano Y, Evaluation of Suprachoroidal-Transretinal Stimulation (STS) by Optical Imaging, ARVO meeting FL, 2006, May

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

特願 2005-222027(出願日 h17.7.29)「視覚再生装置」発明者 田野保雄、不二門尚 小澤素生

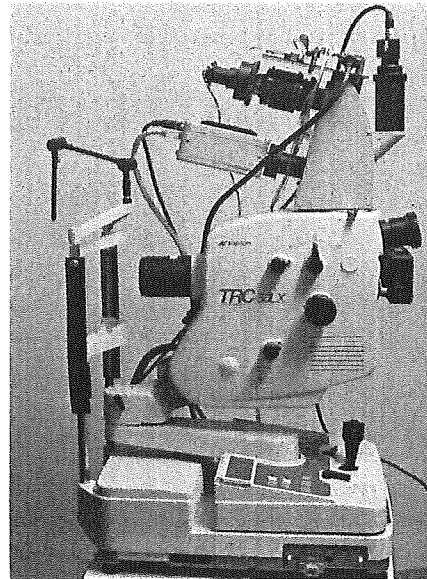


図 1：改造した眼底カメラ

電気刺激装置

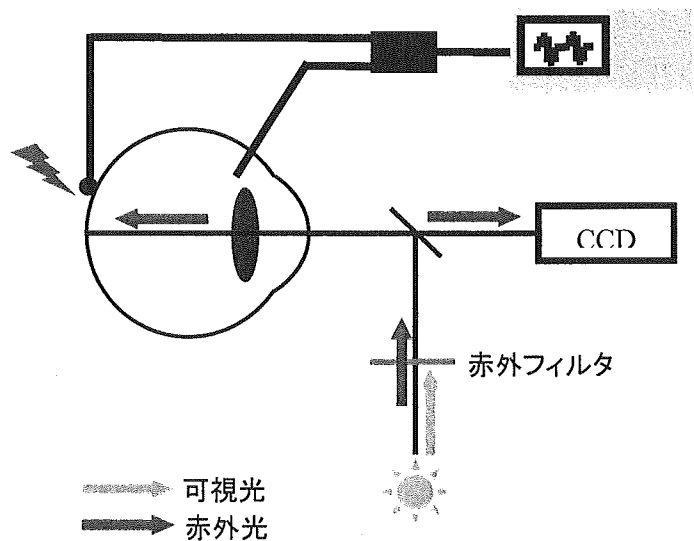


図 2：電気刺激 (STS 法) による・Optical Imaging のシエーマ

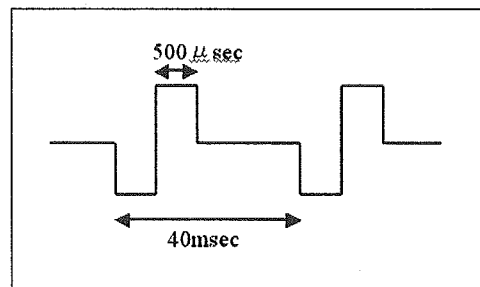


図 3：電気刺激の条件

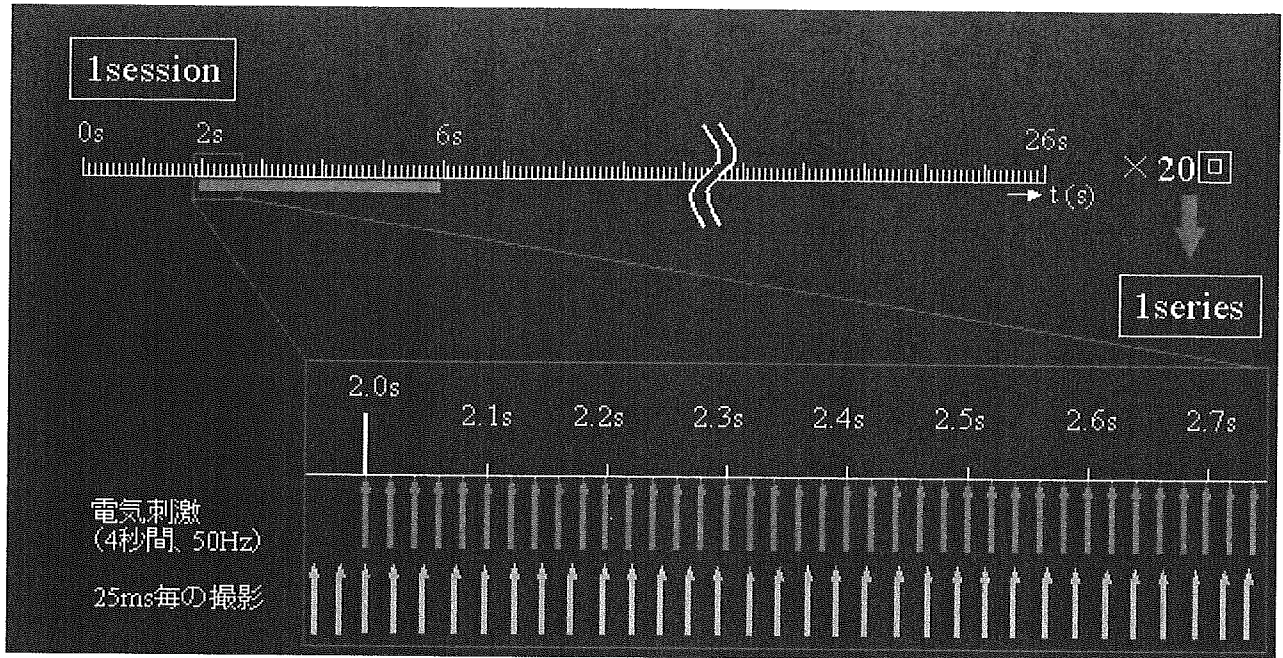


図 4 : 1 session 測定 の Time Sequence

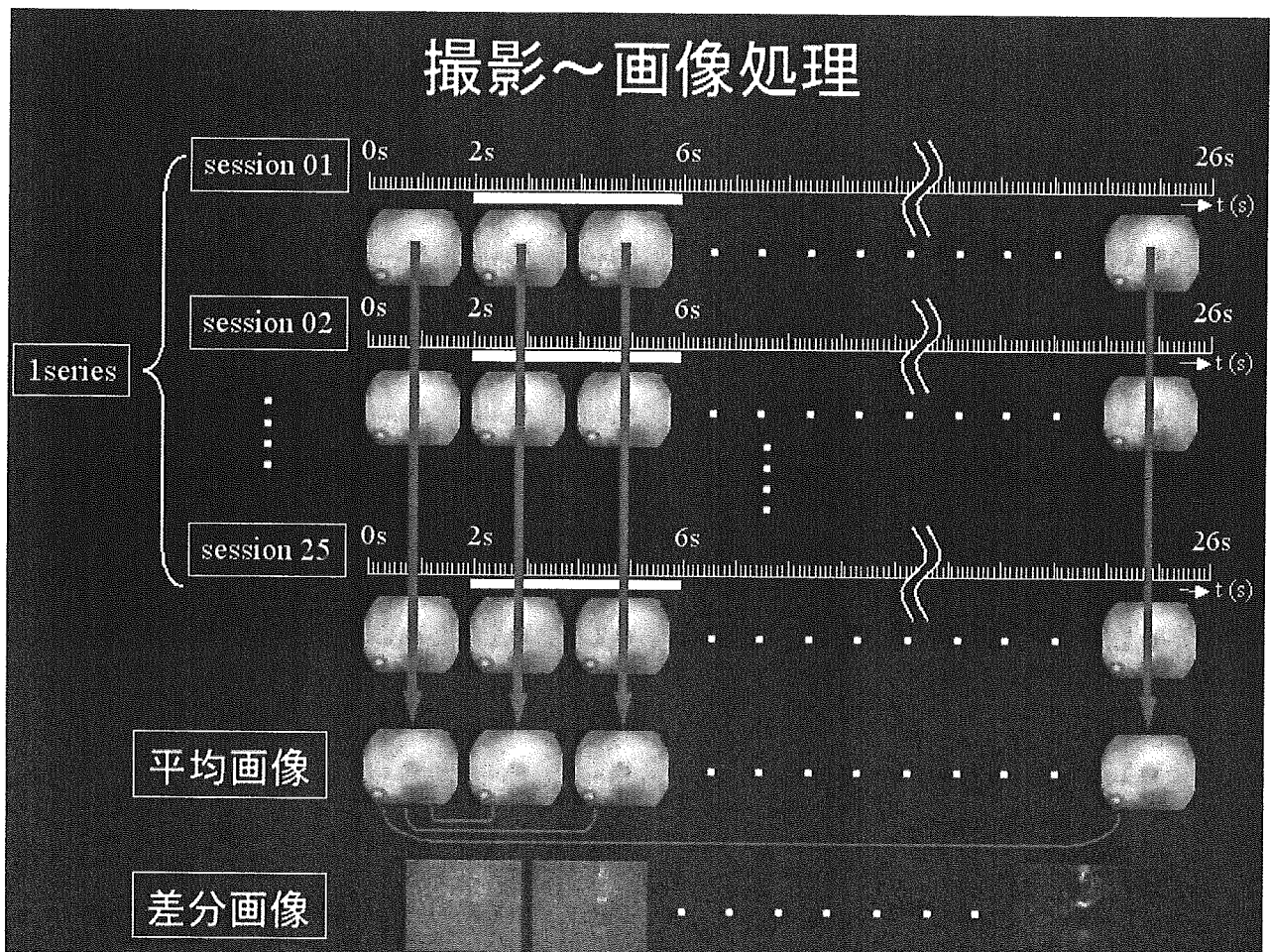


図 5. 画像処理法のシェーマ