

図 6 : 電流値 $300\ \mu\text{A}$ の Optical Imaging 結果

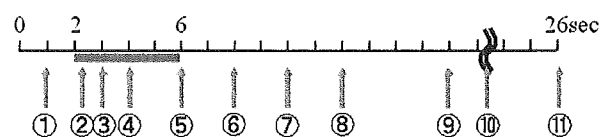


図 7 電流値 $300\ \mu\text{A}$ 刺激の経時変化

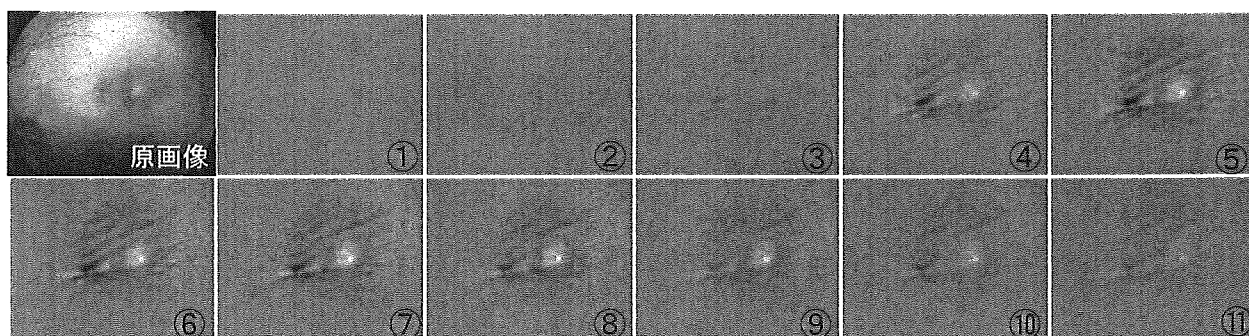


図 8 : 電流値 $100\ \mu\text{A}$ の Optical Imaging 結果

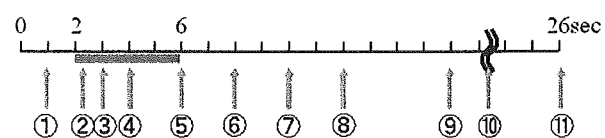
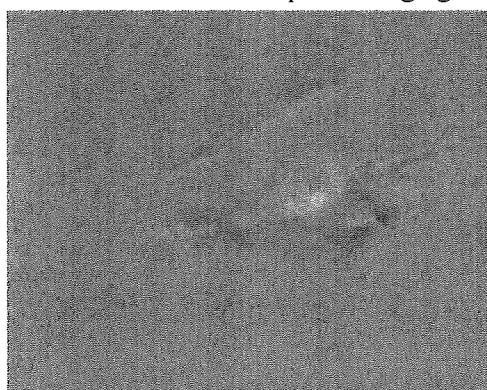
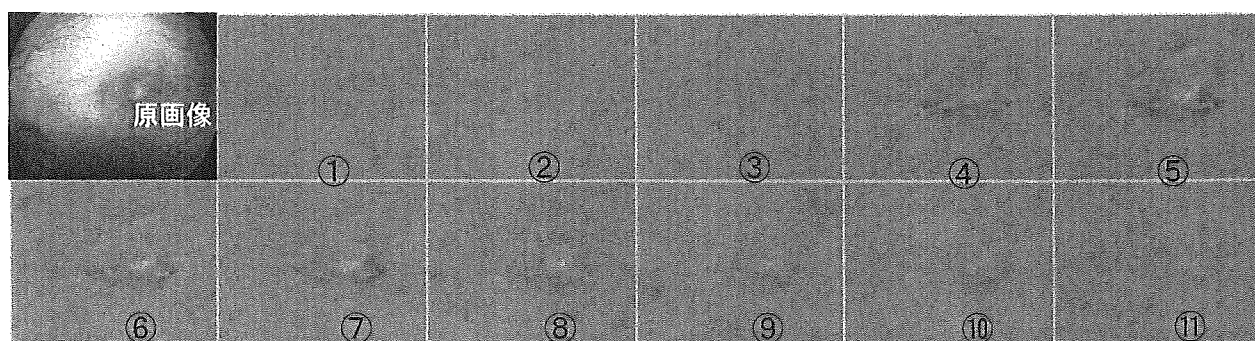


図 9 電流値 $100\ \mu\text{A}$ 刺激の経時変化



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 澤井 元 大阪大学医学系研究科システム生理学 助教授

研究協力者 三好智満 大阪大学医学系研究科システム生理学 助手

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

脈絡膜上一経網膜刺激(STS)の空間解像度を評価するため、強膜刺激電極直下の網膜近傍に受容野を持つネコ外側膝状体背側核中継細胞から、単発 STS に対する単一ユニット応答を記録した。刺激電極の中心から受容野までの距離と応答の出現率との関係を調べた結果、距離が小さいほど出現率が高くなる傾向が認められ、電流値を 150 μ A まで下げると応答率の空間分布は刺激電極を中心にして半値半幅 1.8° に限局した。この値はヒトの視力 0.01 程度に相当する。本研究の結果は、STS 方式の人工視覚システムにより指数弁以上の視力が得られる可能性を示唆している。

A. 研究目的

我々は、重度の網膜色素変性症患者に、指数弁以上の視力を回復させる得る人工視覚システムの開発を目指している。このシステムで用いる網膜刺激法として、我々は 2003 年に脈絡膜上一経網膜刺激 (STS) を開発した[1]。これは、刺激電極と不関電極をそれぞれ強膜半層切除部と硝子体内に設置することで、刺激電流が網膜を貫通するように通電する刺激方式である[1]-[3]。この方式には、網膜に刺激電極が直接接触しないため、他の刺激方式と比較して網膜への損傷の危険性が少ない利点がある一方で、刺激電極が網膜と離れているために刺激電流が拡散し、空間分解能で劣る可能性が指摘されている[4]。

そこで、我々は STS 方式の空間分解能の評価を行うことを目的に、STS で生じる網膜興奮の範囲を電気生理学的手法で計測してきた。具体的には、ネコの外側膝状体(dLGN)中継細胞の STS に対する反応を単一ユニット活動記録によって計測している。昨年度は刺激電極近傍のデータが少なかったため、刺激電流が低いところでの網膜興奮の広がりを正確に評価できなかった。そこで、本年度は特にその部分のデータを重点的に収集する

ことに努めた。

B. 方法

[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動物実験ガイドラインに従って行い、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。

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ユニット活動を記録

するために、動物の頭部を脳定位装置に固定し、記録電極を油圧式 3 次元マイクロマニピレータ(ナリシゲ)で脳定位的に左 dLGN の A1 層へ刺入した。記録電極には抵抗値 1 ~ 3 M Ω のガラス封入タングステン電極を使用した。

記録電極より単極誘導された信号は差動増幅器(Model 1800 Microelectrode AC Amplifier, A-M Systems, Inc)および直流増幅器(Model LPF-202, Warner Instrument Corp)を用いて 2,000~10,000 倍に増幅したのち 300-5k Hz のバンドパスフィルターを施した。その後シグナルプロセッサ(Power 1401, Cambridge Electronic Design Inc)、および神経活動解析ソフト(Spike 2, Cambridge Electronic Design Inc)を用いて記録と解析を行った。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、その後の解析に用いた。

記録したユニットそれぞれについて、眼前 114 cm に設置したスクリーン上で受容野を同定し、その生理学的特性と視交叉電気刺激に対する応答潜時に基づいて ON 中心型と OFF 中心型、Y 細胞と X 細胞に分類した。

なお、視交叉刺激には、視交叉の両側に設置した双極刺激電極(ϕ 0.2 mm ステンレス線、先端 1 mm 露出)の間に 50 μ s 単相矩形波を約 50-500 μ A の強度で通電し刺激を行った。

[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 μ 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。

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 μ m の円形の白金電極が一極設置されている。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する際は単極電極を使用した。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]

左側眼球後部表面を露出し、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 mm² (3 $\times$ 3mm)の開窓部を作成した。この開窓部に網膜刺激の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 注射針で穴を開け、その穴から硝子体内へ不関電極を挿入した。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(Power 1401)によって出力コマンドを生成し、リニアアイソレータ(BSI950, Dagan 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小限に抑える目的で、二相性矩形波パルスを用いた。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 μ 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。

[刺激電極—受容野間の距離の測定]

記録した神経細胞の受容野から強膜側に設置した刺激電極までの距離を測定するために、以下の作業を行った。

実験中に眼内に拡散光を導入し眼底像をスクリーン上に投影し網膜血管のパターンをスケッチした。実験終了後、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 10%ホルムアルデヒド溶液中に浸漬固定した後、網膜全伸展標本作製し光学顕微鏡下で組織像を撮影した。血管パターンを手がかりに先に述べたスクリーン上の投影像と組織像を重ね合わせ、受容野から刺激部位までの距離を測定した。なお、この距離の単位は視野角(度)で表した。

C. 結果

[外側膝状体中継細胞の STS に対する応答]

—First burst と Late burst について—

記録したユニットは合計で 114 個であった。その内訳は、On-X 型が 28 個、On-Y 型が 11 個、Off-X 型が 40 個、Off-Y 型が 35 個であった。

単発の二相性矩形波を用いた STS に対する dLGN 中継細胞の応答の例を、図 1 に示した。STS によって、バースト状のスパイク発火が、刺激後約 200 ms に渡って約 70~100 ms の周期で複数回出

現した(図 1-a)。最初のバーストとそれ以降のバーストは性質が異なっていたため、最初のバーストを“First burst”、それ以降のバーストを“Late burst”と呼ぶことにした。

First burst は刺激後 3 ms から 15 ms の間に生じ、ほとんどの場合 5 つ以下のスパイク発火で構成されていた。これらのスパイク発火の個数や潜時は同じ刺激条件で繰り返し刺激しても常に一定であった(図 1-b)。

一方、Late burst は刺激後 20 ms 以降に出現し、First burst 同様 1~5 個のスパイク発火で構成されていた(図 1-a)。しかし Late burst 中のスパイク発火の個数や潜時は変動的であった。

刺激電極と受容野が離れている場合には Late burst のみ現れることが多く、一方距離が近い場合には First burst と Late burst の両方が出現することが多かった(図 1-a)。この性質から、First burst のほうが Late burst よりも網膜上の興奮の広がり直接的に反映しているのではないかと考えた。

そこで、今回の実験では First burst の期間に出現するスパイクの特性に着目して、STS に対する網膜上の興奮の広がり等の検討を行った。

—刺激強度によるスパイク発火の潜時の変化—

First burst 中のスパイク発火の潜時や出現率が刺激強度によってどのように変化したか以下に述べる。図 2 に示す例では、刺激電流が 500 μ A と閾値をはるかに越えた強度の場合、高い出現率かつ一定の潜時でスパイク発火が生じた(図 2-a, e)。刺激電流を 100~150 μ A まで下げると、それぞれのスパイクの潜時にばらつきが生じスパイク間隔が長くなる傾向にあった。それぞれのスパイクの潜時に着目すると、まず潜時が 5 ms のスパイクは刺激強度を弱めても潜時は一定だった。このスパイクは、スパイクの前に小さい波(図 2-b, 白抜の三角)が生じる特徴を持っており、刺激電流の低下によりスパイクが消失した際も同じ潜時で小さい波のみが出現した(図 2-c, 白抜の三角)。一方、それ以降のスパイクは刺激電流が弱まるにつれ、潜時が長くなった(図 2-b, c)。また、刺激電流の低下に伴って、徐々にスパイク出現率が低下した(図 2-b, f, c, g)。この例の場合、刺激電流を 50 μ A まで下げるとスパイク発火がほとんど出現しなくなった。(図 2-d, h)。

他のユニットにおいても、刺激電流を下げていくとスパイク間隔の延長およびスパイク出現率の低下が見られた。ただし、スパイクが消失する際の刺激電流値、すなわち閾値は、ユニット毎で異なっていた。特に、刺激電極から受容野までの

距離が遠いユニットほど閾値が高かった。

[刺激部位からの距離と First burst のスパイク出現率の関係]

First burst のスパイク出現率の空間的分布を評価するために、刺激電極からそれぞれの受容野の中心までの距離をスクリーン上で測定した。記録したユニット数は前節で述べたように 114 個であったが、一部のユニットに関しては多極電極を用いたため、一度に複数の距離について出現率を計算できた。従って、全体で最大 316 個(500 μ A の結果)からデータを取得することができた。

この実験では First burst のスパイク出現率を「40 回の試行のうち、刺激後 3 ms から 15 ms の間にスパイクが出現した試行数の割合」と定義した。ここで言う「試行」とは一発の刺激パルスによる刺激を指し、同じ刺激による試行を 40 回行なって 1 セットとした。まず 500 μ A で 40 回試行を繰り返し(1 セット)、その後 1 セット毎に 300, 200, 150, 100, 70, 50 μ A と段階的に刺激電流を下げ、それぞれのセット毎に first burst のスパイク出現率を計測した。

この出現率と距離の関係を刺激電流値毎に示したのが図 3 である。刺激強度 500 μ A の時(図 3-a)、刺激電極から遠く離れた場所でも高い出現率を示す細胞が多く見られた。例えば、80 %以上の出現率を有する細胞は刺激電極から約 10° 付近まで分布していた。刺激強度を徐々に下げていくと、その範囲は縮小し 100 μ A では 80 %以上の出現率を有する細胞は距離 2° 以内にしか見られなかった。これは電流値を下げることで興奮の範囲を局限できることを示している。

この距離ごとの出現率の分布にはばらつきがあるため、より定量的な解析に向けて区間ごとの出現率の中央値を算出した。また、今回中央値の算出に当たって区間を 1.5° に設定したのは、興奮の広がりを評価するのに重要になる電極近傍のデータの数が少なく、統計的に信頼できる中央値を算出するには少なくとも 1.5° まで区間を広げる必要があったためである。

算出した中央値のデータは灰色の丸で図 3 の分布図に重ねて示した。刺激電流が低下するにつれ、高い出現率の範囲が狭まっていくことが、この中央値のグラフからも読み取れる。この結果から半値半幅(最大出現率の半分になった時の距離)を線形補間にて計算し、興奮の広がり の尺度として用いた。その半値半幅と電流値との関係をグラフに示したのが図 4 である。ただし、70 μ A および 50 μ A については、電極近傍における出現率の中央

値が著しく低かったため、図4のグラフの対象としなかった。

興奮の広がりやを反映する半値半幅は、電流値が下がるにつれ縮小した。しかし、縮小傾向は150 μ Aまで電流値を下げると止まり、100 μ Aでは150 μ Aのときとほぼ同じ値(1.8°)となった。すなわち、STSにおいては150 μ A程度の刺激強度で最も興奮の範囲が狭まり、その値は半値半幅で1.8°程度であることが分かった。従って、STSでも電流値を制御することで、限局した興奮を引き起こすことが可能であることが分かった。

D. 考察

[STSの空間分解能]

人工視覚の機能を評価する上で空間分解能は重要な評価項目の一つである。今回我々は、*in vivo*にてSTSに対する神経応答を単一ユニットレベルで計測し、応答の広がりやを基に空間分解能について検討を行った。

その結果、図3に示されるように、電流値が100~200 μ A程度の強度でFirst burstのスパイク出現率が刺激電極近傍のみで高い値を示し、距離が離れるにつれ急激に出現率が下がる傾向が得られた。さらに、1.5°の区間毎に出現率の中央値を算出し、その広がりやを半値半幅で評価した。半値半幅は刺激電流の低下に伴い縮小していくものの、150 μ A以下で1.8°となりその後値が一定になった。以上の結果より、電流を制御することでSTSに対する応答は半値半幅1.8°程度まで限局することが分かった。

神経応答の出現率分布の広がりやと実際に知覚されるフォスフェンの大きさが一致する」という仮定にたつて、今回の動物実験の結果からヒトにおいてSTS式人工網膜にてどの程度の視力が得られるかを考察した。ネコの視角1.8°はネコ網膜上で0.40 mmに相当するので[5]、「STSに対してヒトの網膜上でネコの網膜上と同じ広がりやの興奮が生じる」ならば、ヒトの網膜においても0.40 mmの範囲でSTSに対する興奮が生じるはずである。その半値半幅はヒトの視角で約1.4°に相当する[6]。半値半幅だけ離れた網膜上の2点に加えたSTSに対して、それぞれの興奮の分布が空間的に弁別できると考えれば0.01程度となる。

図3に示した興奮の広がりやが、刺激電極を中心に等方に分布すると考えた場合、図4のシミュレーションに示したように、分布が二つに分かれて見えると考えたため「2点刺激の際、半値半幅だけ間隔を置けば、二つの興奮の広がりやを弁別でき

る」との仮定を立てた。ただし、お互いの興奮が重なりあう部分での相互作用は現在知見が得られていないため考慮に入れていない。もし、加重がかかるように相互作用が加算されるとしても、半値半幅の2倍、つまり全値半幅分の間隔があれば2点刺激の際興奮の分布が2つのピークを持った分布になるため、2点弁別可能であると考えられる。その場合の視力は先ほどの0.01の半分になるが、これは、30 cm指数弁程度と考えられる。

E. 結論

STSの空間分解能を評価するためにネコを用いて外側膝状体中継細胞から単一ユニット活動を記録した。その結果、STSでの興奮は刺激電極近傍で限局しており、その広がりやから、解像度を算出すると視力0.01程度の空間分解能を表現できると考えられる。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 総説

神田寛行、不二門尚、田野保雄「人工網膜(5) 脈絡膜上-経網膜刺激電極」臨床眼科 2005 Vol. 59 No. 11 pp130-135.

神田寛行、不二門尚「人工網膜の取り組み」加齢黄斑変性<NEW MOOK 眼科 No.9> 2005 pp 178-185.

2. 学会発表

H. Kanda, T. Miyoshi, T. Morimoto, T. Fujikado, Y. Tano, H. Sawai, Y. Fukuda “Evaluation of spatial resolution of Suprachoroidal-Transretinal Stimulation by single-unit recording” 2005 ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting, May 2nd, 2005, Fort Lauderdale, Florida, U.S.A

神田寛行、三好智満、森本壮、不二門尚、澤井元、福田淳、田野保雄 “Spatial properties of suprachoroidal-transretinal electrical stimulation for artificial retinas: an electrophysiological study of lateral geniculate neurons in cats” 第82回日本生理学会大会 5/18-20(発表日 5/19), 2005 仙台

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-経網膜刺激による

網膜興奮の空間的広がり of 生理学的評価」第 20 回 神経組織の成長・再生・移植研究会、2005 年 5 月 28 日、口演、豊中市

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-経網膜刺激で生じる網膜興奮の広がり of 評価」第 98 回近畿生理学談話会、2005 年 9 月 10 日、口演、大津市

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] Weiland JD, Liu W, Humayun MS. Retinal Prosthesis. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2005; 7:361-401.
- [5] Vakkur GJ, Bishop PO. The schematic eye in the cat. *Vision Res.* 1963; 3: 357-381.
- [6] Oyster CW. *Ocular Geometry and Topography. The Human Eye: Structure and Function.*

Sunderland MA. Sinauer Associates, Inc. 1999: 77-109.

[図および説明]

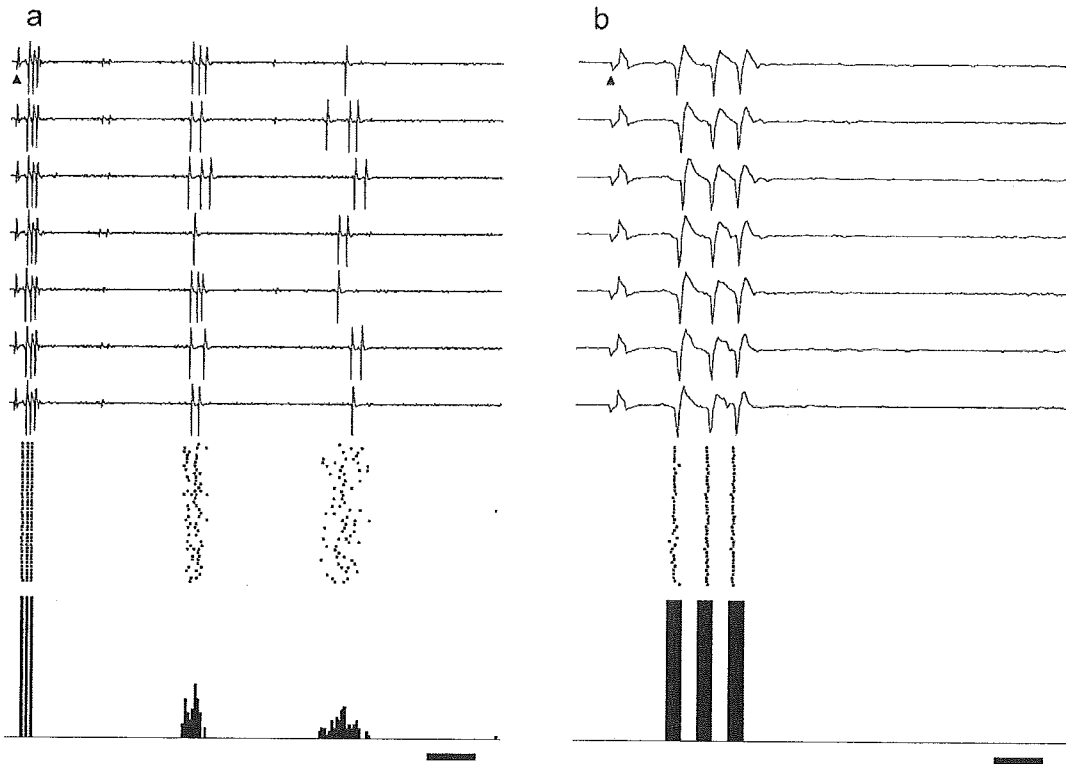


図 1

外側膝状体中継細胞の STS に対する応答の例。電流値は $300\ \mu\text{A}$ 。記録したユニットのタイプは Off-Y 型。a. First burst と Late burst を示した生波形(上)、ラスタプロット(中)、ヒストグラム(下)。スケールバーは $20\ \text{ms}$ 。b. First burst のみを示すために a の時間スケールを拡大したもの。スケールバーは $3\ \text{ms}$ 。

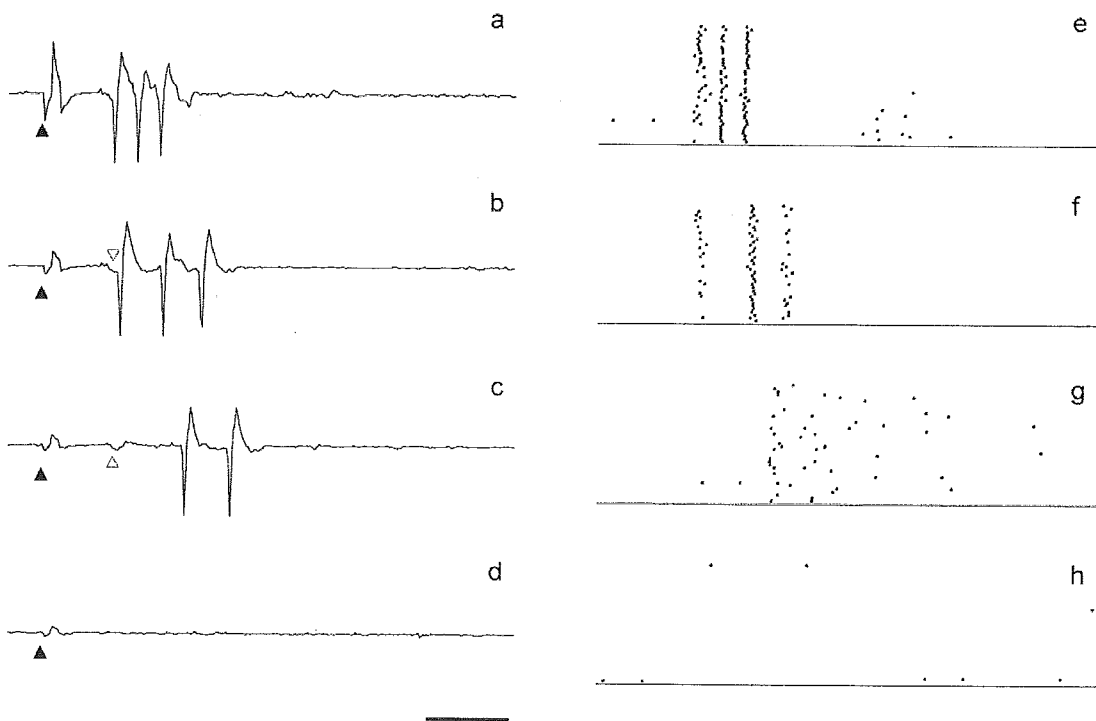


図 2

刺激の電流強度を変化させたときの First burst の変化。図 1 と同じユニットに対して記録を行った。a, b, c, d は生波形、e, f, g, h は 40 回の試行に対するラスタプロットである。電流値は a, e: $500\ \mu\text{A}$ 。b, f: $150\ \mu\text{A}$ 。c, g: $100\ \mu\text{A}$ 。d, h: $50\ \mu\text{A}$ 。スケールバーはそれぞれ $5\ \text{ms}$ 。

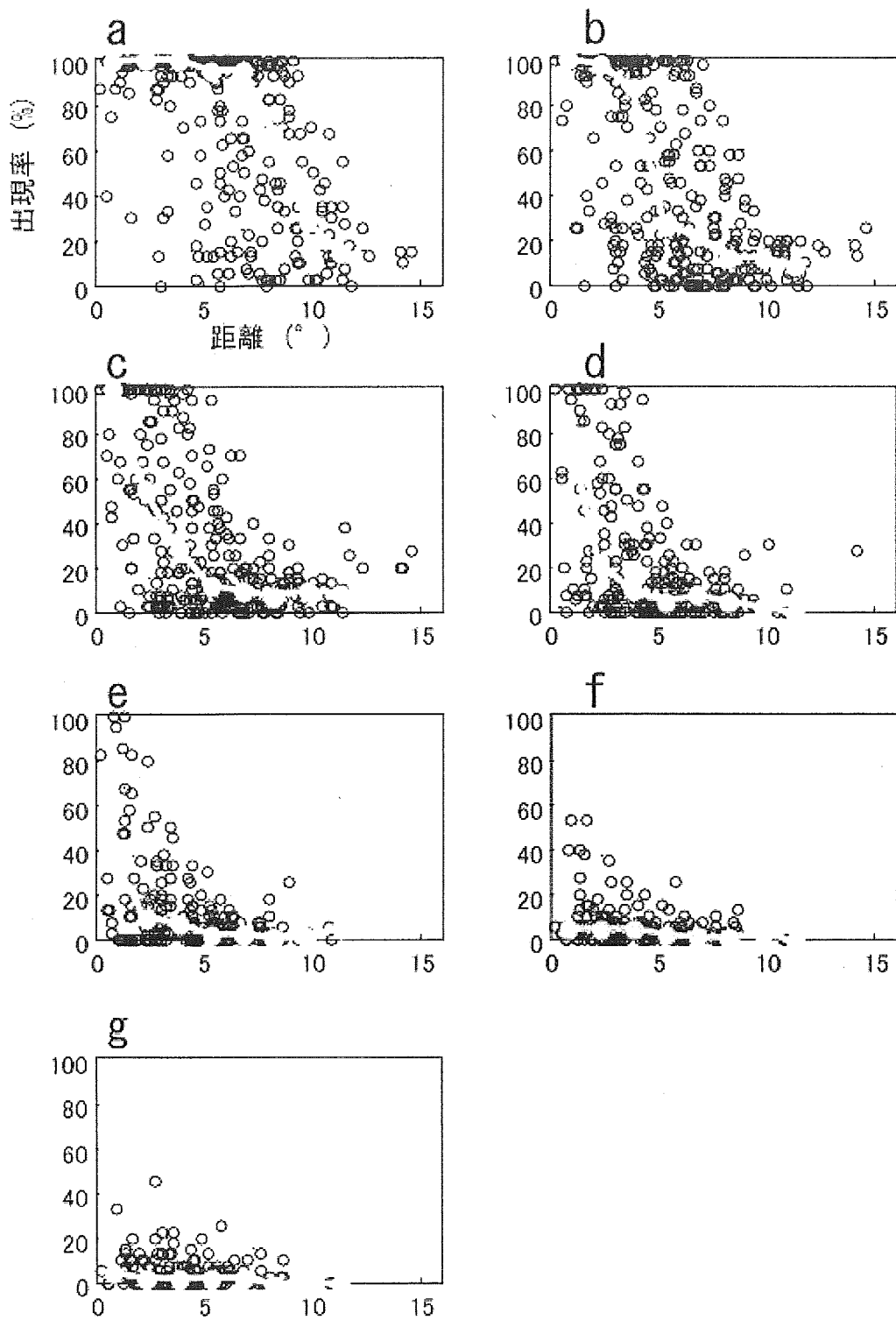


図 3

STS 電極からの受容野の距離による First burst のスパイク発火の出現率の分布及び中央値。図中白丸がそれぞれの細胞における出現率をプロットしたものである。一方、それらのプロットを区間 1.5° 毎に出現率の中央値を算出し灰色の丸で示した。それぞれの電流値は a: 500 μ A b: 300 μ A c: 200 μ A d: 150 μ A e: 100 μ A f: 70 μ A g: 50 μ A.

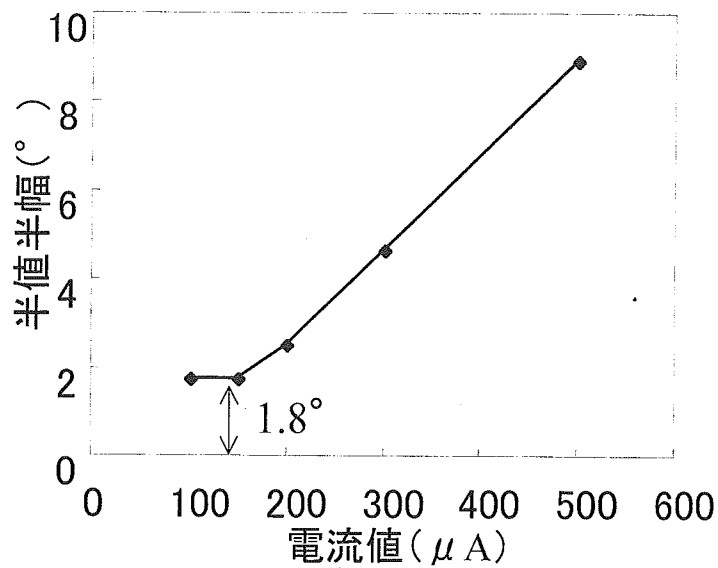


図4：出現率分布の半値半幅の電流値による変化。図3で示した中央値のグラフより半値半幅を計算し、それぞれの電流値ごとにその値をプロットした。

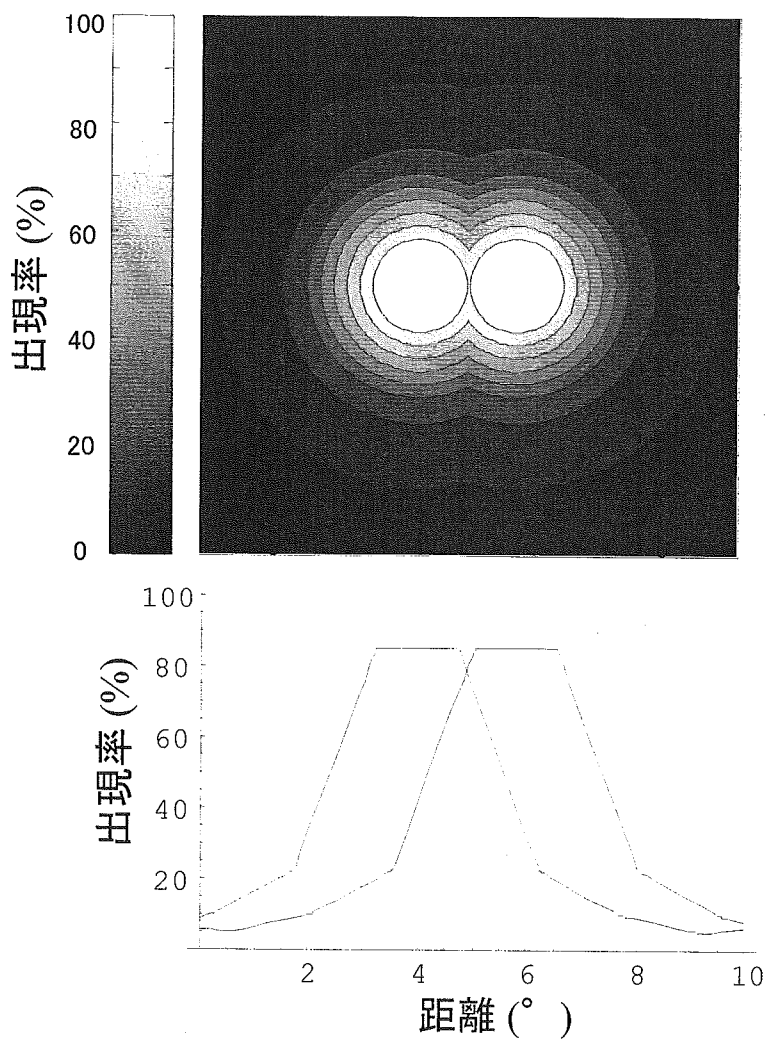


図5：半値半幅（1.8度）だけずらして2点刺激した場合の興奮の分布シミュレーション。刺激電極を中心に興奮が等方に広がるものと仮定して、図3-dの中央値のグラフを基に2点刺激に対する出現率分布のシミュレーションを作成した。上が等高線で示した分布、下が2点の刺激電極を通る線上でのスパイク出現率の分布を示す。

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

人工視覚移植実験に用いる視細胞変性中型動物モデルの作成

分担研究者：近藤峰生

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 人工視覚を移植する動物実験に有用な動物モデルとして、大きな眼球を有する中型動物（ウサギ）の遺伝子を改変し、ヒトにおける網膜色素変性と同じ遺伝子変異を有するトランスジェニックウサギを作出する実験を行なった。昨年までは、ロドプシン Pro347Le 変異を導入した BAC クローンをベクターを精製してウサギ受精卵に注入してきたが、76 匹の産子の中に遺伝子変異を有するものは検出されなかった。そこで今回は精子ベクター法、特に卵管人工授精法（AI）によって Pro347Le 変異をウサギに導入する実験を行ってきた。第 1 回の試みでは 3 匹のウサギ卵管に移植し 10 匹の産子を得たが、この中に遺伝子変異ウサギはいなかった。現在は第 2 回のトライアルを行ない、6 匹のウサギ卵管に移植し合計 30 匹の産子を得ており、この産子の遺伝子を解析している段階である。本プロジェクトによりウサギ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る。

A. 研究目的

人工視覚の実験を推進していくためには、動物実験は必要不可欠なプロセスである。しかしながら、現在日本において網膜色素変性のモデル動物として用いられているのは、全てマウスあるいはラットなどの小動物である。このような小動物の眼球は小さいため大がかりな手術を行うことができず、もちろん人工網膜の移植実験を行うことができない。

欧米ではすでに網膜変性イヌ、ブタ、ネコの作成・繁殖に成功しており、実際の人工視覚、遺伝子治療、再生医療の治療実験に用いられている環境があり、日本で全くこのような動物が入手できない状況は深刻な問題であるといつてよい。

そこで今回申請者は、中型実験動物とし

て本邦で広く用いられている白色ウサギにおいて、網膜色素変性の原因となる遺伝子変異を導入した、「ロドプシントランスジェニック（Tg）ウサギ」の作成を世界で初めて試みる。

我々は、昨年までの段階でロドプシン Pro347Le 変異を導入した BAC クローンをベクターを精製してウサギ受精卵に注入してきたが、76 匹の産子の中に遺伝子変異を有するものは検出されなかった。そこで今回は精子ベクター法、特に卵管人工授精法（AI）によって Pro347Le 変異をウサギに導入する実験を行なったのでその結果について報告する。

B. 研究方法

基本的な遺伝子組み込み BAC クローン精製までは昨年と同様である。

(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) 変異遺伝子の発現ベクター構築と精製

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ー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。

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。

(3) 卵管に精子注入により人工受精

ウサギの射出精子をリポフェクチンと混合させて DNA と結合させ、そのまま偽妊娠処置を施した雌ウサギの卵管に注入した。その雌ウサギから産出された産子を離乳にいたるまで生育させた。

(4) Tg ウサギファウンダー選抜

得られた産子の血液サンプルからゲノム 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 (Rhod EX プローブ) とハイブリダイズさせ、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

第 1 回の実験では、以上の過程によって 3 匹のウサギが着床し、それから 10 匹の産子を得たが、DNA 解析ではその中に遺伝子変異ウサギは存在しなかった (図 1)。

現在は、第 2 回目の実験を行っており、合計 6 匹のウサギが妊娠し、そこから合計 30 匹の産子を得て、現在離乳に至るまで生育させている段階である。

D. 考察

これまで、BAC クローンを受精卵に打ち込む方法でトランスジェニックウサギが得られなかったため、今回から変異 DNA をリポフェクチンに結合させて卵管に移植する卵管人工授精法 (AI 法) を用いた。最近の報告によれば、ウサギにおける AI 法の成功率は 10-20%といわれており、第 2 回目の実験で 30 匹の産子が得られていることにより、この中に最低 2-3 匹の変異ウサギがいることを予想している。

ファウンダーが発見された場合、繁殖によってその数を増やし、その後に網膜変性の有無を確認する予定である。

E. 結論

現在我々は、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。特に本年は卵管人工授精法を行なって、その効果を確認している段階である。本プロジェクトが成功した場合、人工視覚実験に有用な動物モデルとして国際的にも有用なモデルとなりうる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chen GY, Muramatsu H, Kondo M et al.
Abnormalities caused by carbohydrate alterations in
Ibeta6-N-acetylglucosaminyltransferase-deficient Mice. Mol Cell Biol 25, 7828-7838, 2005.
- 2) Ueno S, Kondo M, et al. Physiological function of S-cone system is not enhanced in rd7 mice. Exp Eye Res 81, 751-758, 2005.
- 3) Ueno S, Kondo M et al. Contribution of retinal neurons to d-wave of primate photopic electroretinograms. Vision Res 46, 658-664, 2006.

2. 学会発表

- 1) Kondo M et al. Physiological function of S-cone system is not enhanced in rd7 mice. 43rd International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Glasgow, 2005.
- 2) Kondo M. Basics and current topics of multifocal ERG. Symposium of the Korean Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Seoul, Korea, November 5, 2005.
- 3) Kondo M. Effect of photodynamic therapy on normal retinal function. Symposium of the Korean Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Seoul, Korea, November 5, 2005.

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。

I. 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.

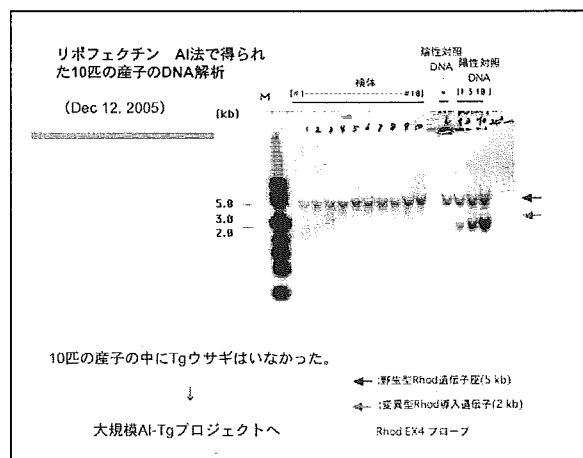


図 1: 卵管人工授精法で得られた産子 10 匹の DNA 解析の結果。変異遺伝子の解析には Rhod EX プローブ (赤色矢印) を用いた。第 1 回の実験で産出された 10 匹の産子にはロドプシン遺伝子に変異を有する者はなかった。現在はさらに第 2 回目の実験を行なって 30 匹の産子解析を進めている。

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

網膜刺激電極における生体適合性の研究
動物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：杏林大学眼科学教室
(研究協力者：中内一揚)

研究要旨：網膜刺激型電極を開発する上で、その生体適合性の変化を検討することは重要な課題である。これまで、共同研究者の開発した脈絡膜上—経網膜電気刺激（STS）方式による人工視覚は、動物眼（有色家兎）の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、一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を組織学的に観察した。本年度、STS 慢性実験や臨床応用に向けて、STS 方式による電流の安全域や人工チップ基盤の変化に対する生体適合性を検討することを目的に、電流変化による組織変化および電極基盤変化によるチップの安定性について、粘着フィルム法による凍結標本法で検討した。有色家兎眼の強膜内に $\phi 200 \mu\text{m}$ の刺激電流を埋植し、硝子体中に参照電極を挿入した。急性電流刺激実験では、2mA で網膜の組織障害が確認された。続いて、使用電流値：0.25mA、0.7mA、1mA、0mA で、連日 1 時間、2 週間の通電を行った。最終日に検眼鏡的眼底検査、および蛍光眼底検査を行い、さらに摘出眼球の組織学的検討を行った。0.7mA の通電では、検眼鏡所見および蛍光眼底所見に変化はなかった。1mA の通電では、蛍光眼底所見で window defect が見られた。組織学的検査では、全眼ともに強膜内に組織反応が見られたが、電流に比例する所見ではなく、むしろ手術操作や人工チップ固定用の糸による異物反応が主体であった。網膜の層構造に明らかな異常は観察されなかったが、0.5mA 刺激で、網膜外層の細胞あるいは細胞間の拡大が存在し浮腫状で、1mA で網膜がやや皺壁を形成した。蛍光眼底所見から STS 法における損傷電流閾値は家兎においては、0.7mA から 1mA の間にあることが示唆されたが、本切片法による組織検査で、その変化に対応する所見が網膜皺や浮腫なのか明らかではなかった。ヒトへの臨床応用に向けて開発されている柔らかい基盤に 100 極電極を埋植した家兎眼の組織所見は、人工チップの強膜内の安定性は良好で、網脈絡膜や強膜における変性や強い炎症反応は見られなかった。サル眼を利用した短期埋触眼においても、明らかな異物反応や炎症所見を本組織検査では観察されなかった。以上のことから、STS 方式による強い電流刺激で網膜は傷害され得る事、いいかえれば網膜が STS 方式で刺激を受けていることを組織学的にも観察し、その電流値の安全域を検討する重要性が確認された。そして、安全域の検討に、STS 刺激で生じる蛍光造影検査による RPE レベルの変化と網膜浮腫状変化に注目する必要があることが示唆された。

A. 研究目的

網膜刺激型電極を開発する上で、その生体適合性の変化を検討することは重要な課題である。昨年度、共同研究者の開発した脈絡膜上—経網膜電気刺激 (STS) 方式による人工視覚は、動物眼 (有色家兎) の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、一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を組織学的に観察した。その過程で、人工チップを含む組織切片の作製法が容易でないことも経験し、人工チップの位置や固定状況、組織全像を把握するために、樹脂包埋のテクノビット包埋法や粘着フィルムを使用した凍結標本法が有用であることが判明した。本年度は、STS 慢性実験や臨床応用に向けて、STS 方式による電流の安全域や人工チップ基盤の変化について、粘着フィルム法による凍結標本法で検討した。

B. 研究方法

1. 家兎眼における人工網膜慢性刺激による電流変化による組織学的検討

有色家兎眼の強膜内に $\phi 200 \mu\text{m}$ の刺激電流を埋植し、硝子体中に参照電極を挿入した。連日 1 時間、2 週間の通電を行った。使用電流値: 0.25mA、0.7mA、1mA、0mA (すべて biphasic pulse、0.5ms duration、20Hz) を採用した。最終日に検眼鏡的眼底検査、および蛍光眼底検査を行い、さらに摘出眼球の組織学的検討を行った。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、10%シュクロース、20%シュクロー

ス、CMCによる凍結包埋し、タングス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 CM3050S) を用いて、面だしし、粘着フィルムを貼り付けて、5~10 μ の薄切切片を作成した。純エタノールで固定し水洗して、ヘマトキシリン・エオジン染色、グリセリン封入して光学顕微鏡による観察を行った。

2. 臨床応用に向けた 100 極電極チップの組織内安定性の検討

ヒトへの臨床応用に向けて、柔らかい基盤に 100 極電極が埋植された人工チップの組織安定性を、前述の方法で組織学的に観察した。

(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. 家兎眼における人工網膜慢性刺激による電流変化による組織学的検討

0.7mA の通電では、平均電極間電圧は $8.6 \pm 2.1\text{V}$ であり、検眼鏡所見および蛍光眼底所見に変化はなかった。1mA の通電では、同電圧は $11.0 \pm 0.3\text{V}$ であり、検眼鏡的に変化は無かったが、蛍光眼底所見で 2 眼に RPE の変性と思われる window defect が見られた。組織学的検査では、全眼ともに強膜内に組織反応が見られたが、電流に比例する所見ではなく、むしろ手術操作や人工チップ固定用の糸による異物反応が主体であった。網膜の層構造に明らかな異常は観察されなかったが、0.5mA 刺激で、網膜外層の細胞あるいは細胞間の拡大が存在し、浮腫状で、1mA で網膜がやや皺壁を

形成した。蛍光眼底所見から STS 法における損傷電流閾値は家兎においては、0.7mA から 1 mA の間にあることが示唆されたが、本切片法による組織検査で、その変化に対応する所見が網膜皺や浮腫なのか明らかではなかった。

2. 臨床応用に向けた 100 極電極チップの組織内安定性の検討

ヒトへの臨床応用に向けて開発されている柔らかい基盤に 100 極電極を埋植した家兎眼の組織所見は、人工チップの強膜内の安定性は良好で、網脈絡膜や強膜における変性や強い炎症反応は見られなかった。サル眼を利用した短期埋触眼においても、明らかな異物反応や炎症所見を本組織検査では観察されなかった。

D. 考察

STS 方式の生体適合性研究において、粘着フィルム法による凍結標本法は、人工チップの固定部位やその周囲組織の炎症所見や変性組織を確認するには有用であることが確認された。ただし、チップの種類によっては、組織切片作成中に浮き出てしまいやすく、目的によっては、樹脂標本の有利な場合があると思われた。また、凍結標本であるため、細胞全体の浮腫は樹脂標本より生じやすく、STS 刺激で生じる蛍光造影検査による window defect 程度の微細所見を凍結標本組織検査で確認するには限界があることも判明した。

しかし、凍結組織は免疫組織学的検査などに有用であり、生体観察の異常を反映する glia の活性化、RPE の変性、apoptosis や necrosis の検討するために、免疫学的検査

に応用できると考えられた。また、今回の検討で、網膜に層構造の異常が生じる前に網膜内浮腫状の変化を生じることがわかり細胞内変化を判定する電子顕微鏡的検査も意義があることが示唆された。

今回の刺激電流変更実験を通じて STS 方式による強い電流刺激で網膜は傷害され得る事、いいかえれば網膜が STS 方式で刺激を受けていることを組織学的にも観察できた。したがって、その電流値の安全域を検討する重要性が確認された。その際に、FA などの蛍光造影検査の window defect、すなわち RPE レベルの異常と網膜浮腫が関係する可能性が示唆された。

E. 結論

STS 方式による強い電流刺激で網膜は傷害され得る事、いいかえれば網膜が STS 方式で刺激を受けていることを組織学的にも観察し、その電流値の安全域を検討する重要性が確認された。そして、安全域の検討に、STS 刺激で生じる蛍光造影検査による RPE レベルの変化と網膜浮腫状変化に注目する必要があることが示唆された。

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) Hirakata A, Okada AA, Hida T: Longterm results of vitrectomy without laser treatment for macular detachment associated optic disc pit. Ophthalmology 112:1430-1435, 2005

- 2) Hirakata A, Hida T, Ogasawara A, Iizuka N: Multi-layered retinoschisis associated with optic disc pit. Jpn J Ophthalmol 49:414-416, 2005
- 3) 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 49 : 264-266, 2005
- 4) 西脇友紀, 田中恵津子, 平形明人, 小田浩一, 気賀澤一輝, 樋田哲夫: 読書評価が診断と治療に有効であった心因性視覚障害の1例. 日本眼科学会雑誌 109:761-765, 2005
- 5) 小幡博人, 平形明人, Alan D. Proia, 青木真祐: 前衛と後衛—未熟児網膜症の病理—. 眼科 48:1233-1239, 2005
- 6) Yamaguchi Y, Watanabe T, Hirakata A, Hida T: Localization and ontogeny of aquaporin-1 and -4 expression in iris and ciliary epithelial cells in rats. Cell and Tissue Research, (in press)
- 7) Hirakata A, Hida T: Vitrectomy for myopic posterior retinoschisis and/or foveal detachment. Jpn J Ophthalmol 50: 53-61

特許取得状況：なし

2. 学会発表

- 1) Hirakata A: Diagnosing Neovascular Glaucoma and Understanding The Source of Ischemia. WOC 2006, Brazil, Feb 19-24, 2006
- 2) 平形明人: 網膜剥離. 神経眼底コース 2005. 10.22
- 3) 平形明人: 明日からはじめよう「手術をしたら病理検査」症例検討編. 第29回日本眼科手術学会総会, 2006.1.27-29
- 4) 中内一揚, 不二門尚, 太田 淳, 徳田 崇, 寺澤靖雄, 神田寛行, 小澤素生, 平形明人, 田野保雄: 脈絡膜—経網膜電気刺激方式による人工網膜の長期連続刺激の効果, 第109回日本眼科学会総会 国立京都国際会館 2005.3.24
- 5) 平岡智之, 篠崎尚史, 平形明人, 樋田哲夫, 佐藤康彦, 福田 稔: イモリ網膜再生過程におけるN-cadherin, R-cadherinの発現 第109回日本眼科学会総会 国立京都国際会館 2005.3.24~3.27
- 6) Nakauchi K, Fujikada T, Hirakata A, Tano Y: A tissue change after suprachoroidal-transretinal stimulation with high electrical current in rabbits. The 2nd DOE International Symposium on Artificial Sight. 2005.4.29.
- 7) Nakauchi K, Fujikada T, Ohta J, Tokuda T, Kanda H, Tearasawa Y, Ozawa M, Hirakata A, Tano Y: Safety and

effectiveness of suprachoroidal-transretinal stimulation by chronically implanted electrode with continuous electrical stimulation in rabbits. 2005 Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida 2005.5. 2.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

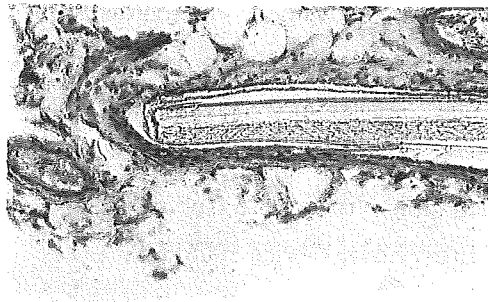
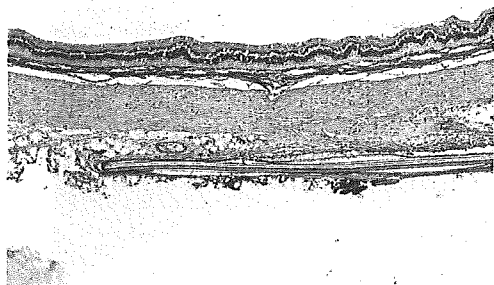
2. 実用新案登録

なし。

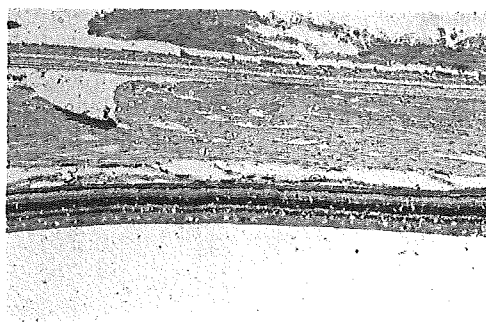
3. その他

なし。

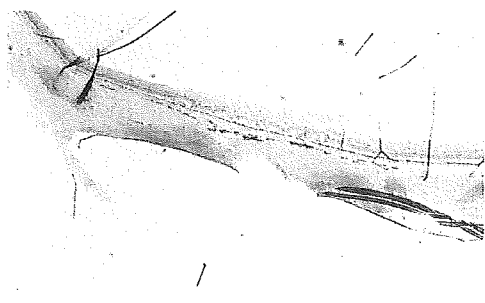
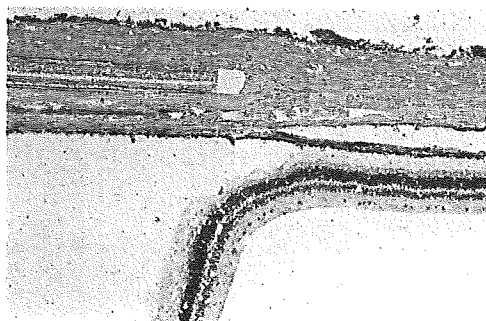
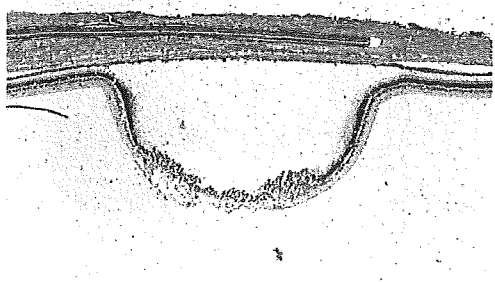
ウサギ眼 1.0mA x 14 時間刺激を 2 週間連続刺激



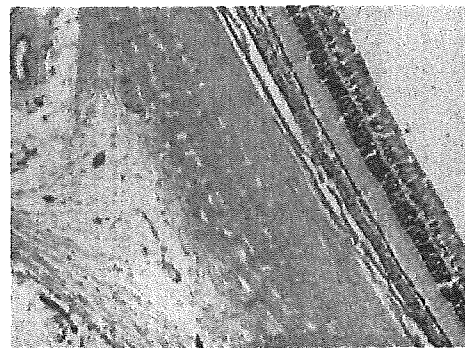
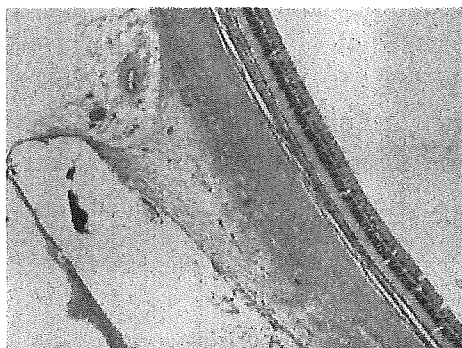
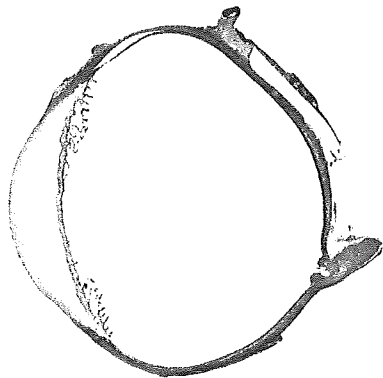
ウサギ眼 1.5mA x 1 時間刺激



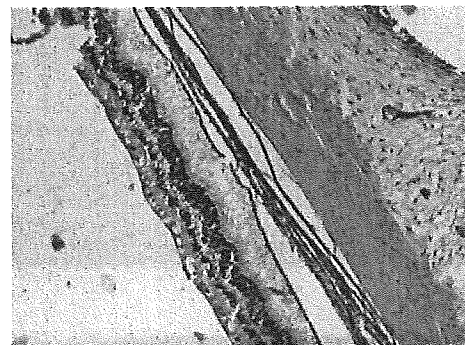
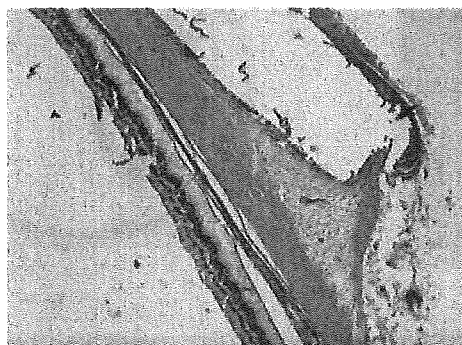
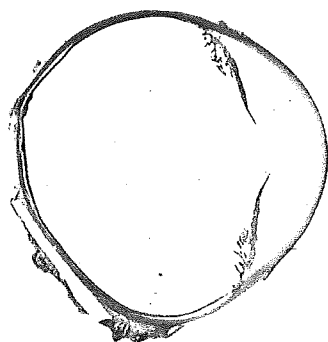
ウサギ眼 2mA x 1 時間 2 週刺激



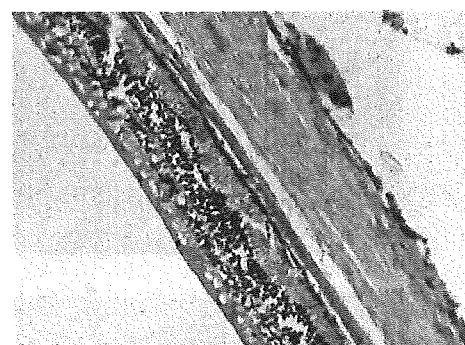
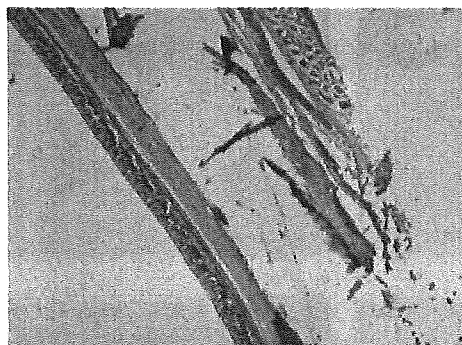
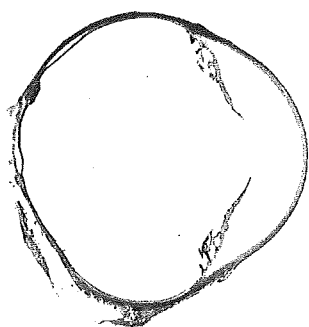
0mA x 1 時間刺激 (20Hz) 0.5ms biphasic pulse



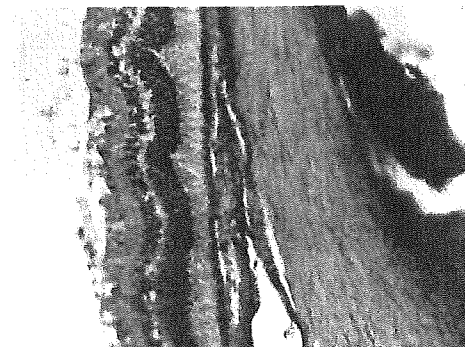
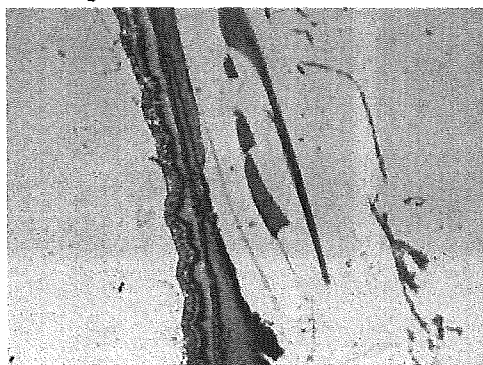
0.25mA x 1 時間刺激 (20Hz) 0.5ms biphasic pulse



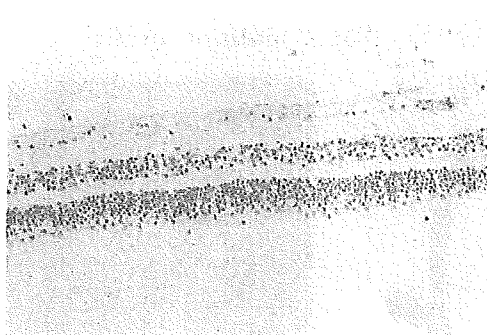
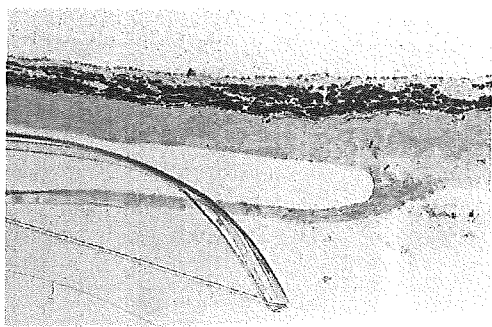
0.5mA x 1 時間刺激 (20Hz) 0.5ms biphasic pulse



1mA x 1 時間刺激 (20Hz) 0.5ms biphasic



サル眼における電極安定性



臨床応用に向けた100極電極のダミーchipの強膜内安定性

