

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田野 保雄

平成 19 (2007) 年 4 月

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田野 保雄

平成 19 (2007) 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 西田健太郎)	

### II. 分担研究報告

1. 網膜の精密評価システムの開発	11
	不二門尚
(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 北口 善之)	
(ii) ネコ網膜における機能画像解析	
(研究協力者 大川 賀孝)	
(iii) 経強膜電気刺激によって誘発される擬似光覚の評価	
(研究協力者 神田 寛行)	
2. 網膜刺激電極の視覚中枢における機能評価の研究	29
	澤井元
(i) 効率的な網膜刺激パルスパラメータの探索	
(ii) ネコ一次視覚野における網膜刺激電極の機能評価	
(研究協力者 三好智満、神田寛行)	
3. 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	42
	近藤峰生
4. 動物眼における人工網膜チップの組織学的検討	46
	平形明人
5. 網膜刺激型電極のデバイスの開発	54
	太田淳
6. 網膜刺激型電極による人工視覚のトータルシステムの開発	58
	小澤素生
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	67
IV. 研究成果の刊行物・別刷	69

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

平成 18 年度総括研究報告書

網膜刺激型電極による人工視覚システムの開発に関する研究  
(網膜刺激電極の術式開発・網膜刺激電極の生体適合性の研究)

主任研究者 田野 保雄 大阪大学医学系研究科眼科学 教授

研究分担者 大路 正人

研究協力者 瓶井 資弘、中内 一揚、西田 健太郎

研究要旨 有効な治療法のない網膜変性疾患に対して、本邦独自の人工網膜である、脈絡膜上経網膜電気刺激 (STS) 法を開発した。これまでに、動物実験に引き続き、急性臨床試験を行い、失明した患者に擬似光覚が得られることを確認した。本年度は、動物実験で疑似光覚 (フォスフェン) を誘発するのに、対称性波形より有利であるとされる非対称性波形電流を用い、その波形の安全性について確かめてみた。その結果、網膜障害をきたさない電流閾値は 0.5mA で、対称パルスでの 0.7mA を下回る結果となった。陽極 - 陰極間にわずかな電荷の不均衡が確認され、このため損傷閾値が低下したと考えられた。従って、非対称性パルスを用いる場合には、電荷バランスを厳密にとる回路が必要であることが示唆された。次に、最適な刺激パラメーターを決定するために、健常な動物ではなく、適応患者と類似した視細胞変性モデルとして、有色家兎に対する LED 光を用いた光障害モデルの作成を検討した。網膜障害性が高いと考えられる青色 LED 光を用いた長時間の光照射により、網膜視細胞を選択的に障害することに成功した。しかし障害範囲が限局性であるため、今後、障害部位の拡大の必要がある。この結果は、有色家兎に対して青色 LED 照射を長時間連続照射することにより、人工視覚の実験のための貴重な疾患モデル動物ができる可能性があることを示すものである。

A. 研究目的

われわれは、有効な治療法のない網膜変性疾患に対して、本邦独自の人工網膜である、脈絡膜上経網膜電気刺激 (STS) 法を開発した。昨年度我々は、対称性パルスを使用して慢性刺激をした場合の安全性について報告した。2週間の連日 1 時間刺激で、組織学的に損傷を起こさず、また大きな電極表面形状の変形を起こさない電流値は 0.7mA であった。1mA では、電極および組織に変性が見られた。本年度は、動

物実験で疑似光覚 (フォスフェン) を誘発するのに、対称性波形より有利であるとされる非対称性波形電流を用い、その波形電流での安全性について確かめた。

動物実験に引き続き、急性臨床試験を行い、失明した患者に擬似光覚が得られることを確認したが、次のステップとして、最適な刺激パラメーターを決定が必要となってくる。そのため、健常な動物ではなく、適応患者と類似した視細胞変性モデル動物の作成を検討した。

これまで、マウス、イヌ、ブタなどの視

細胞変性モデルは存在し、我々もマウスを使用した研究を行ってきた。しかし、眼球が小さすぎため、臨床応用のための多極チャンネルを有する刺激電極を埋設する実験に適していない。網膜変性イヌやブタは海外の研究施設で開発系統維持されており、入手が困難であるうえに、飼育条件を満たした研究施設の問題が残る。

今回、中型実験動物として扱いやすく、実験にも適していると考えられる有色家兎を用いて、視細胞障害モデルの作成を検討した。もともと、ラットやマウスの光障害モデルの研究は多く、その障害のされ方が網膜色素変性症と類似していると報告されている。しかしながら、家兎の場合、ラットやマウスと比較すると非常に光に対しての耐性が強靱であり、同じような条件では視細胞の障害は起こらないことが知られている。そのため、今回は長時間の強力な光照射を行うことにより、視細胞障害が出来ないか検討し、視細胞障害を生じることができたので報告する。

## B. 対象と方法

### 研究 1

昨年度と同じ電極（スタッドバンプ形状、直径 200 $\mu$ m の白金電極、図 1）を使用した。硝子体電極には直径 100 $\mu$ m の白金線をシリコンチューブで補強したものを使用した。

有色家兎（n=4）眼球強膜に半層切開創を作製して電極を埋植し、引き続き慢性埋植用の手術を行った。頭部に誘導した刺激および硝子体電極の延長部（電線）を、アイソレーターとつなぐことでいつでも安定した刺激が可能ないように配線の材料および埋

め込みの工夫をした。

刺激は麻酔下で連日 1 時間、2 週間行った。刺激波形は図 2 に示すように、Anodic first で、前半の duration が 0.5ms、後半の duration が五倍の 2.5ms とした。電流値は前半の部分が 1mA, 0.7mA, 0.5mA, 0.3mA の四つ（それぞれ n=1）を使用した。（後半部分はそれぞれ 1/5 ずつ 0.2mA, 0.14mA, 0.1mA, 0.06mA となる）アイソレーターには BSI-950 (DAGAN, Minneapolis, USA) を使用し、刺激波形作成には SEN-7203 (日本光電、東京) を使用した。また刺激中の電極間電圧波形をモニターするのに、フローティングオシロスコープ TPS-2014 (Tektronics, Beaverton, USA) を使用した。この電圧測定により、電極と組織の界面での変化がわかるとされている。刺激開始時の電圧を記録して、変動をみた。

2 週間の刺激が終わると、眼底写真および FA（蛍光眼底検査）写真撮影を行い、組織ダメージをみた。また、屠殺後に眼球を摘出して、電極を取り出し、組織切片（H E 染色）を作製して詳細な変化を確認した。電極への電流の影響を見るために、使用前後の電極形状を SEM で比較観察した。

### 研究 2

対象：有色家兎（n=6）

方法：有色家兎（2.0-2.2kg）を 0.5% トロピカミド・5% フェニレフリンにて散瞳し、持続点滴（2cc/h、ケタラルール：キシラジン=2:1）を用いて麻酔を行ったうえで、青色 LED 光源（MCEP-CB8 MORITEX 社製、1cm:9.5mW/cm<sup>2</sup> 図 3）を眼前（角膜頂点より 2-7mm 程度）に固定し、青色 LED による光照射を連続 8 時間から 12 時間照射を行った。角膜表面が乾燥しないように、適時生理食塩水を角膜上に

滴下し、数時間ごとに散瞳剤の点眼を行い、散瞳状態を維持した。連続8時間照射したのみのものがn=3、その他は1週間の間隔をあげ、照射を繰り返し行い合計22-24時間の光照射を行った。

照射前後に、眼底写真、蛍光眼底造影検査、網膜電図を測定し、光照射後1週間以上あけてから眼球摘出を行い、4%パラホルムアルデヒドにて24時間固定し、凍結切片を作成し、HE染色を行った。

(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

### 研究1

1. 電圧変化：1mA の通電をした兎では、電極間電圧の上昇が見られた(図4-a)。一日目の電圧は 8.6V であったが、7日目より上昇し、14日目には24Vに達していた。0.7mA の通電をした兎では、一日目の電圧 4.0V が、同じように7日目頃から上昇し、14日目には40V に達していた(図4-b)。0.5mA の通電をした兎では、一日目の電圧 4.5V が、わずかずつ上昇し、14日目には10V に達していた(図4-c)。最後に0.3mA の通電をした兎では、一日目の電圧 4.5V が、やや下がったところで安定し、14日目にも3.3V で推移していた(図4-d)。
2. 電極変化：次に使用後の電極表面形状のSEM検査結果につき述べる。傾向としては電流の大きさに比例してダメージが強い。また同じ電流値でも昨年度の対称性パルス刺激後の電極よりも

ダメージが強かった。1mA では電極周囲がかなり削れているのがわかる(図5-a)。0.7mA も表面はかなり荒れている(図5-b)。0.5mA でも表面および周囲が削れている(図5-c)。0.3mA になると電極の荒れはほとんどみられなくなる(図5-d)。

3. 眼底および蛍光眼底(FA)変化：今回は眼底検査の結果は、蛍光眼底検査の結果と同じであったため、判断しやすいFA検査の結果について述べる。傾向としては、電流の大きさに比例して網膜ダメージが強く、1mA(図6-a)および0.7mA(図6-b)ではおよびRPEの欠損(window defect)および集簇(block)などの乱れがみられたが、0.5mA(図6-c)および0.3mA(図6-d)では変化が見られなかった。
4. 組織変化(HE染色)：1mA 刺激の組織(図7-a)には、多彩な影響が見られた。電極接触部の強膜変性、その部位に残る電極残渣(debris)、脈絡膜変性、RPEの乱れ、網膜損傷などである。これは昨年度報告した対称性パルスのダメージより大きなものであった。

また、ダメージのない組織として、0.5mA(図7-b)を示す。電極直上強膜(凹みの部分)および網膜にも特にダメージはなかった。

以上の結果について、Table.1にまとめて示す。

### 研究2

8時間照射後、Visual Streakを中心に網膜色素上皮障害と思われる過蛍光が造影検査で認められ、3日目まで拡大したものの、3日目をピークに減少していった(図8-10)。8時間照射後、1週間で眼球摘出し、

組織切片を作成した。しかし網膜色素上皮障害が見られた Visual Streak でも、視細胞障害は見られなかった。しかし、合計 22-24 時間照射したものでは、VisualStreak の網膜色素上皮に萎縮性変化が見られ (図 11)、同部位に視細胞障害がみられた。視細胞が障害された部分でも、網膜内層の形態は維持されていた (図 12)。しかし、それ以外の部分では視細胞の異常を認めず、網膜電図も変化が無かった。

#### D. 考察

今回の結果をみると、安全に使える電流値は組織学的には 0.5mA、電極的には 0.3mA と、どちらも前回の 0.7mA を下回るものとなった。

ただし、この結果より非対称性パルスの安全性が低いと結論づけるのは早い。なぜならば、筋肉刺激を主な目的に埋め込まれる FES(Functional Electrical Stimulation) の BION(AMF, California, USA)では、非対称な刺激波形を使用しているからである。工学サイドとの検討により、非対称パルス作製時の電荷の不均衡が主原因ではないかと考えられたため、追加実験として、刺激回路に直列にコンデンサをつないで、その両端の電圧を計測した。結果、刺激を重ねるごとに電圧が上昇し、電荷の不均衡が起こっていることが確認された。

ただし、この電荷不均衡はダイヤル目盛り変更式の SEN-7203 を使用する時点であらかじめ想定されたため、刺激回路に直列に小抵抗をつないで、その両端の電圧を測り、回路を流れる電流波形についても計測していた。その結果、図 2 に示すように、電流値はダイヤルどおりほぼ 5 : 1 で流れているという確認は取れていたため実験を継続

した。

以上の事柄より今回は、みかけの電荷バランスは取れた波形であったが、わずかに電荷不均衡がある刺激波形で刺激を行った結果であると判断される。

このような電荷不均衡を起こさないようにするためには主に二つが考えられる。一つは、刺激波形作成装置の指令を厳密にすること。それが出来ない場合はアイソレーター自体で厳密な刺激電流値が設定できるものを選択すること。もう一つは、指示通りの電流波形を作れない場合には、カップリングコンデンサを組み込んだアイソレーターを使用して、電荷バランスをとってやるという方法である。

現在、このカップリングコンデンサを組み込んだアイソレーターを工学サイドより自作、提供していただき刺激実験を追加しており、その結果により非対称性パルスが対称性パルスと比べて安全でないのかどうか判断しているところである。

青色 LED8 時間の連続照射では視細胞障害を起こすことはできなかったが、合計 22-24 時間照射することにより、Visual Streak の視細胞を障害することができた。このことから、有色家兎でも青色 LED 照射により時間依存性に視細胞が障害されていると考えられ、今後、照射時間を延長させることにより、広範な視細胞障害モデルができる可能性があることを示唆している。今回は、長時間の持続点滴麻酔を用いたため家兎にストレスが大きい方法となったが、例えば、青色 LED が四方から照射されるような小屋を作成し、そこで有色家兎を飼育し、長時間青色 LED 光照射を行うことで、より安全かつ確実な視細胞変性モデルがで

きる可能性があると考えられた。

#### E. 結論

今回の結果から分かることは、チャージバランスが取れていない刺激波形を使用して刺激を行った場合、その電荷不均衡が小さくても、直流成分による電極および組織に与えるダメージは大きいということである。また、青色LEDによる長時間光照射により、有色家兎の視細胞を障害することができ、今後より長時間照射を行うことなどによって広範な視細胞障害を生じさせることができれば、人工視覚実験に有用な動物モデルとなりうる可能性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

- 1) Morimoto T, Fukui T, Matsushita K, Okawa Y, Shimojyo H, Kusaka S, 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*, 2006;244:1283-1292
- 2) Nakauchi K, Fujikado T, Kanda H, Kusaka S, Ozawa M, T, Sakaguchi H, Ikuno Y, Kamei M, Tano Y. Threshold suprachoroidal-transretinal stimulation current resulting in retinal damage in rabbit *J Neural Eng*. 2006;3:1-8
- 3) Nakauchi K, Fujikado T, Hirakata A

and Tano Y. A tissue change after suprachoroidal-transretinal stimulation with high electrical current in rabbits. 2<sup>nd</sup> DOE International Symposium of the book *Artificial Sight in press*.

(総説)

- 1) 田野保雄 視覚再生、日本の眼科 2006 ; 77 ; 641-646
- 2) 瓶井資弘、田野保雄 失われた視機能の回復、老年医学 2006 ; 44: 1273-1277

##### 4) 学会発表

###### 1) 国内 (主なもの)

- 1) 田野保雄：網膜刺激型電極による人工視覚の開発 感覚器障害研究発表会 2006年2月16日、都市センター、東京
- 2) 中内一揚、不二門尚、寺澤靖雄、斉藤徹、神田寛行、太田淳、平形明人、田野保雄「家兎に対する人工網膜慢性刺激組織損傷電流閾値の検討」第110回日本眼科学会総会 2006年4月14日、大阪国際会議場、大阪
- 3) 瓶井資弘、不二門尚、神田寛行、森本壮、坂口裕和、中内一揚、生野恭司、小澤素生、大田淳、田野保雄：脈絡膜上-経網膜刺激 (STS) を用いた人工視覚の網膜色素変性への急性臨床試験 第44回日本人工臓器学会大会 2006年11月1日、パシフィコ横浜、横浜
- 4) 中内一揚、不二門尚、寺澤靖雄、斉藤徹、神田寛行、小澤素生、太田淳、瓶井資弘、田野保雄「脈絡膜上-経網膜刺激法による人工網膜の慢性電気刺激による機能的・組織学



的变化」第44回日本人工臓器学会大会 2006年11月2日、パシフィコ横浜、横浜

2) 海外 (主なもの)

1. Y.Tano : Macular Surgery: From Here towards Artificial Vision. World Congress of Ophthalmology 2006.2.21. Sao Paulo, Brazil
2. Y.Tano: Artificial vision: A Vision to Come. Annual Meeting of Spanish Vitreo-Retinal Society 2006.3.17. Barcelona, Spain
3. Y.Tano: Artificial vision: New ways. 15<sup>th</sup> Duke Advanced Vitrectomy Course 2006.4.29 Durham, N.C, U.S.A.
4. M.Kamei, T.Fujikado, H.Kanda, T.Morimoto, K.Nakauchi, H.Sakaguchi, M.Ozawa, S.Kusaka, Y.Tano. Suprachoroidal-Transretinal Stimulation (STS) Artificial Vision System for Patients with Retinitis Pigmentosa. Assoc Res Vis Ophthalmol, 2006.5.1, Fort Lauderdale, Florida, USA.
5. K.Nakauchi, T.Fujikado, Y.Terasawa, T.Saito, H.Kanda, J.Ohta, A.Hirakata, Y.Tano. Threshold Current for Retinal Damage by an Artificial Retina with Chronic Suprachoroidal-Transretinal Stimulation. ARVO 2006.5.2, Fort Lauderdale, Florida, USA.
6. K.Nakauchi, T.Fujikado, H.Kanda, S.Kusaka, M.Ozawa, H.Sakaguchi, Y.Ikuno, M.Kamei, Y.Tano. Threshold Suprachoroidal-transretinal Stimulation Current Resulting in Retinal Damage in Rabbits. The Eye and The Chip 2006.

6.15, Detroit

7. Y.Tano: Artificial vision: A vision to come. Invited Lecture at the University Eye Hospital 2006.7.3. Zurich, Switzerland
8. Y.Tano: New approaches on artificial vision. New Therapies in Retinal Diseases 2006 2006.9.7 Rome, Italy
9. Y.Tano: Surgery for Suprachoroidal and Intrasceral Implants. The Japanese Retinal Implant Project. International Congress on Visual Prosthesis 2006.9.9. Bonn, Germany

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。

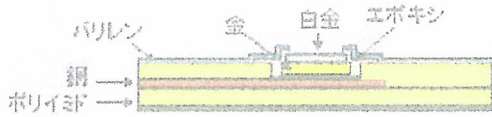


図 1-a : 刺激電極先端の形状  
スタッドバンプ形状の白金電極(200um)

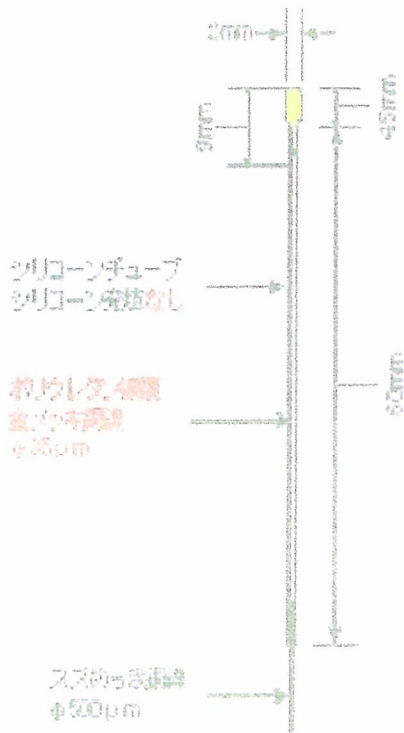


図 1-b : 刺激電極全体像  
眼球から結膜をへて、体部を皮下トンネルを通して頭部へと引き抜く。



図 2 : 刺激回路に直列に小抵抗をつないだときの電圧波形。Anodic と cathodic の電圧が 5 : 1 になっていることに注目。



図3. 今回用いた青色 LED 光源(1mm の距離でおよそ 11600LUX の照度)

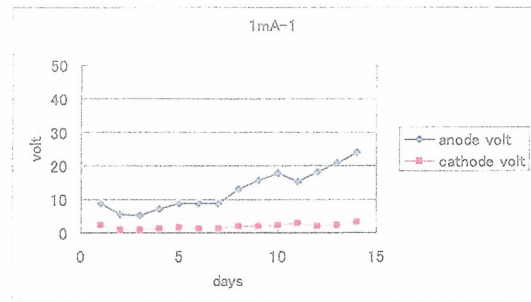


図 4-a : 1mA 通電の電圧変化  
前半は安定しているが、後半は電圧が上昇する。

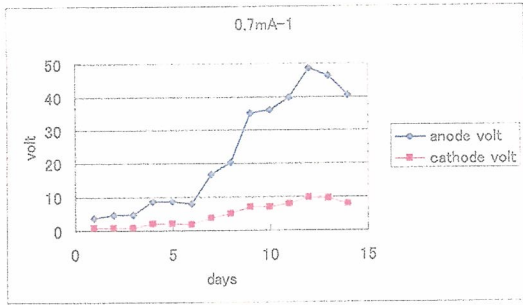


図 4-b : 0.7mA 通電の電圧変化  
後半の電圧上昇は激しい。

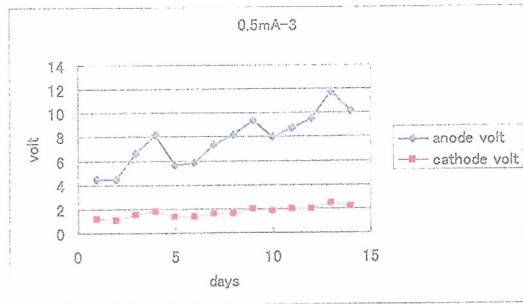


図 4-c : 0.5mA 通電の電圧変化  
数値上は小さいが、電圧上昇がみられる。

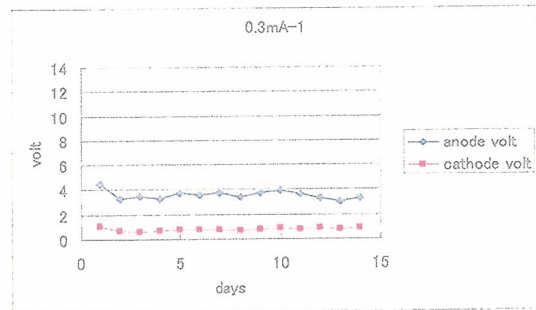


図 4-d : 0.3mA 通電の電圧変化  
ほぼ安定している。

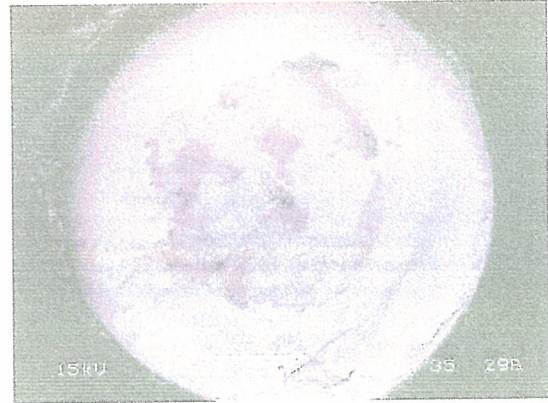


図 5-a : 1mA 通電後の電極形状  
電極の変形が激しい。

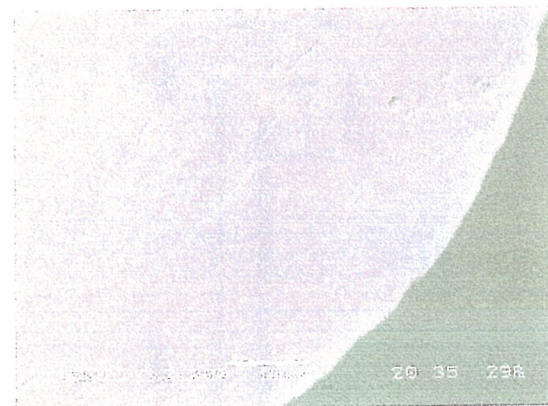


図 5-b : 0.7mA 通電後の電極形状  
電極表面は荒れている。



図 5-c : 0.5mA 通電後の電極形状  
表面表面および周囲の溶出。

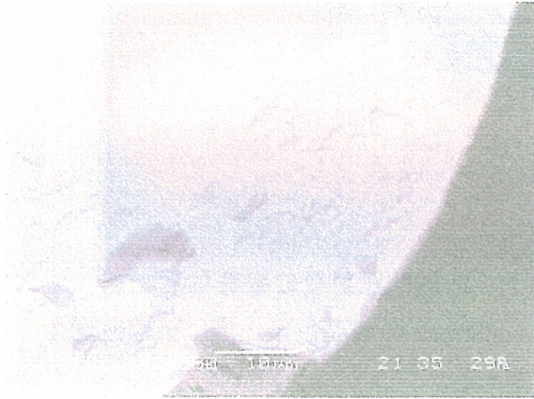


図5-d : 0.3mA 通電後の電極形状  
他の電流値と比べほとんど変化ない。

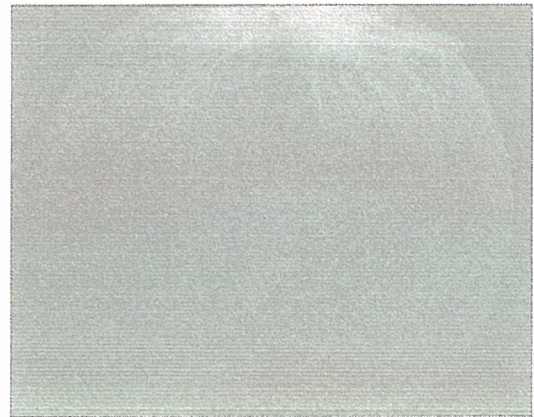


図6-c : 0.5mA 刺激後のFA写真  
特に変化は無い。



図6-a : 1mA 刺激後のFA写真  
写真中央部分にRPE配列乱れが見られる。



図6-d : 0.3mA 刺激後のFA写真  
特に変化は無い。

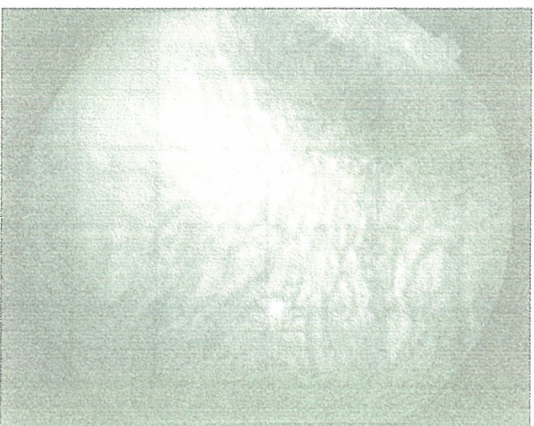


図6-b : 0.7mA 刺激後のFA写真  
写真中央に白いRPE欠損部位、その周囲にRPE集簇部位が見られる。

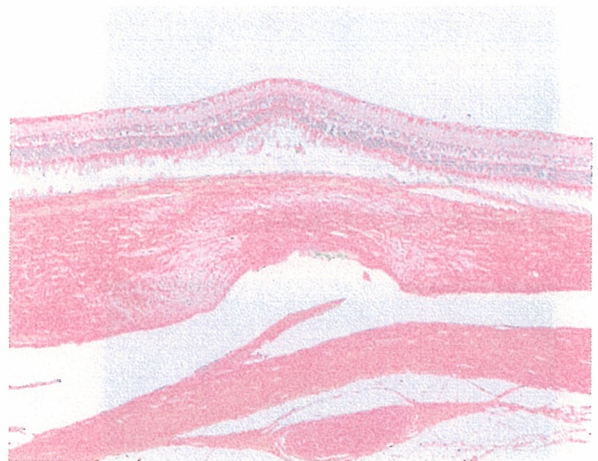


図7-a : 1mA 刺激後の組織  
強膜、脈絡膜、RPE、網膜にダメージが見られる。



図7-b : 0.5mA 刺激後の組織  
電極直上（凹み）強膜にも変性はない。

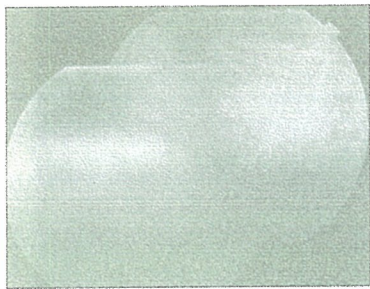


図8. 8時間照射直後の蛍光眼底造影。  
Visual streak に沿って、過蛍光を認める。



図9. 8時間照射3日後の蛍光眼底造影。過  
蛍光領域の拡大を認める。



図10. 8時間照射5日後の蛍光眼底造影。過  
蛍光領域の縮小を認める。

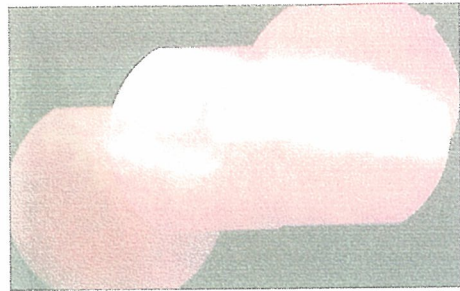


図11. 24時間照射後の眼底写真。  
VisualStreak の網膜色素上皮に萎縮性変化  
を認める。

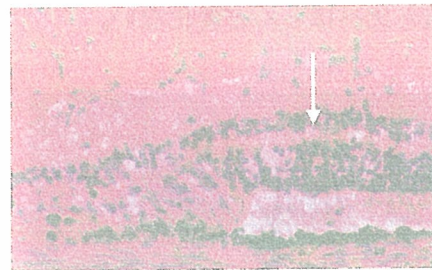


図12. 合計24時間照射後の400倍のHE染  
色。上が硝子体腔側、下が強膜側。左が後極  
側、右が周辺部側。矢印を境にして、左側の  
視細胞層及び外顆粒層が障害されているが、  
右側では網膜内層が保存されているのが分  
かる。

Table.1

電流値 (mA)	電圧 上昇	SEM damage	FA damage	組 織 変化	電極安全性 組織安全性
1.0	+	++	+	++	× ×
0.7	+	+	++	+	× ×
0.5	+	+	-	-	× ○
0.3	±	±	-	-	○ ○

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 北口善之 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い、昨年度に続き本年度も、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。昨年度までは正常眼でほとんどの例で視細胞の2次元配列のイメージを得ることが可能であったにも関わらず、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。本年度は装置の改良もあり眼底疾患眼でも正常部分は視細胞の2次元配列のイメージを得ることができる症例が増加した。

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。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るため、モデル動物を用いた病理学的検索が必要であると考えられる。本年度は有色家兎の正常眼に対し眼底カメラ所見と組織所見との対比を行い、眼底カメラ所見と組織所見がほぼ一致している事が確認できた。

今後網膜変性モデル動物に対する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。

眼底疾患を観察した報告は黄斑ジストロフィーで数例あり、中心窩周辺の細胞密度低下や視細胞の脱落と思われる所見などが報告されている。画像の解釈法が確立されてくれば、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、臨床的に有用な検査となり得ると思われる。本年度は前年度に引き続き、補償光学眼底カメラにより得られた眼底像についての検討を行った。

病眼の所見解釈については、網膜変性モデル動物を用いた検討が必要である。本年度は、健常な有色家兎に対し補償光学眼底撮影を行い、組織学的所見との比較を行った。

### B. 対象と方法

#### I.

対象：正常眼ボランティア52眼、大阪大学付属病院眼科にて臨床的に診断された網膜疾患を有する33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 $1.5\text{mW}$ 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（ $28\times 28$  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値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、位相変調素子を通過し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<sup>®</sup>）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、Rodestock 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。

#### II.

対象：正常眼有色家兎18眼

方法：

補償光学眼底カメラの光学系は上記と同様。キシラジン、ケタミンを用いて有色家兎に全身麻酔を行った後、ハードコンタクトを装着して固定器具に固定、0.5%トロピカマイド・0.5%フェニレフリン（ミドリンP<sup>®</sup>）による散瞳下で眼底撮影を行った。

撮影後眼球摘出を行い、4%パラホルムアルデヒド及び2.5%グルタルアルデヒドに

て24時間固定。網膜組織をフラットマウントし、反射式光学顕微鏡で観察を行った。また、錐体・杆体の形状把握のため、PNA、WGAを用いた免疫染色を行い補償光学眼底カメラの画像と比較した。

### 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。眼底疾患の有無に関わらず同様に収差補正を行う事が可能であったが(表2)、近視眼や眼底疾患を有する眼では眼底像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)。有色家兎を用いた観察では、有髄線維の部位において表層と視細胞外節層の補償光学眼底像と組織像がほぼ一致する事が確認された(図5)。

### D. 考察

視細胞の2次元的観察は、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次元的構造の観

察が可能であった事は昨年度示したが、本年度も症例を増やし検討を行った。眼底疾患を有する眼で明瞭な細胞像の得られない傾向は同様であり、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、などが考えられる。①②の検討のため、本年度は、有色家兎に対し生体内補償光学眼底撮影を施行、眼球摘出後の組織所見との対比を行い、正常眼においては視細胞外節の所見を反映している事が推察された。今後は眼底疾患モデルを用いた撮影を行い、組織所見との対比を行っていく必要がある。また、③については画質と散乱との関係の検討を要する。

### 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. 学会発表

(1). 別所建一郎、不二門尚、山口達夫、中澤直樹、広原陽子、三橋俊文、前田直之、田野保雄

「正常眼における生体内視細胞密度測定」  
110回日本眼科学会総会(2006/4/16)

(2). 別所建一郎、不二門尚、北口善之、山



山口達夫、中澤直樹、三橋俊文、前田直之、  
 田野保雄

「補償光学眼底カメラにおける生体内視細胞像に  
 影響する因子についての検討」

42 回日本眼光学学会 (2006/9/16)

(3). 北口善之、不二門尚、別所建一郎、山口  
 達夫、中澤直樹、広原陽子、三橋俊文、  
 前田直之、田野保雄、

「錐体障害が疑われた症例に対する、補償光  
 学眼底カメラを用いた視細胞の観察」

第 60 回臨床眼科学会(2006/10/5~8)

(4). 三橋俊文、山口達夫、中澤直樹、別所建  
 一郎、北口善之、不二門尚

「補償光学の眼底検査への応用」

Optics & Photonics Japan 2006

(2006/11/8)

(5). Yamaguchi T, Nakazawa N, Minashi T,  
 Bessho K, Kitaguchi Y, Maeda N, Fujikado  
 T.

Inter-Photoreceptor Distance Calibrated  
 by Axial Length in Adaptive Optics  
 Fundus Camera. Frontiers in Optics  
 2006/Laser Science XXII conferences,  
 2006/10/09

図とその解説

図 1 : 補償光学眼底カメラの模式図

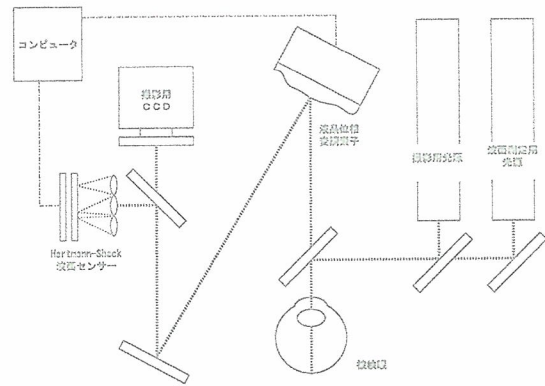


図 2 : 内部視標

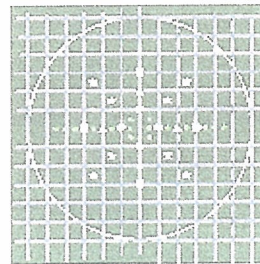
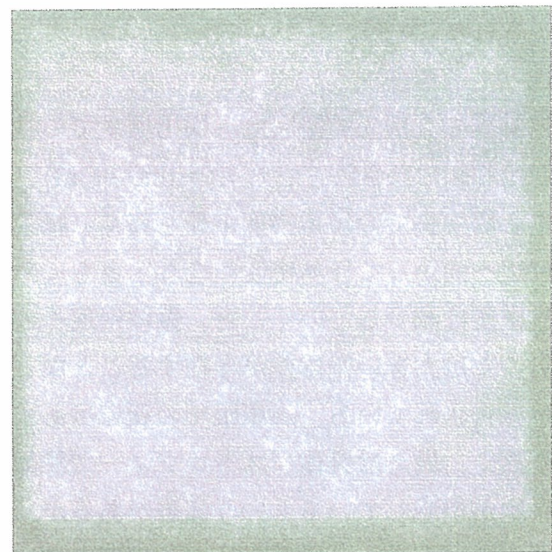


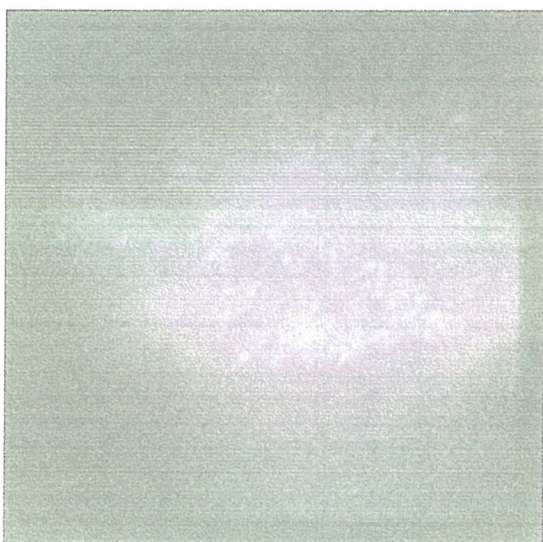
図 3 : 正常眼の視細胞像



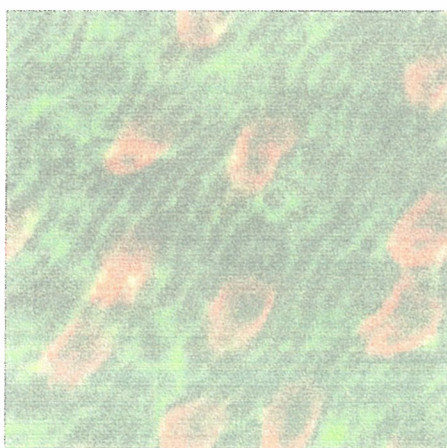
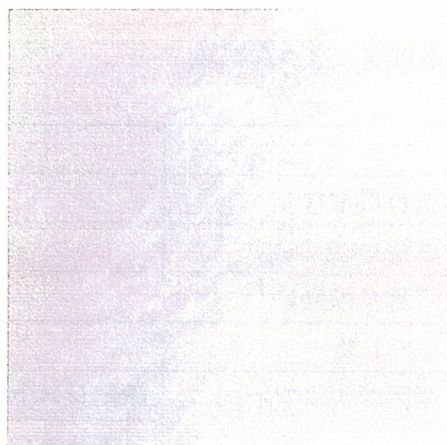
31 歳女性 (正常眼)、左眼黄斑部中央より  
 2 度耳側固視にて撮影。残収収差による  
 Deconvolution 処理、8 枚分の加算平  
 均を行っている。個々の輝点が錐体視細胞

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）。



有色家兎の正常眼の眼底写真を示す(上)。赤い四角で示した部位について、Adaptive Optics 眼底カメラで撮影を行った(中)後、眼球を摘出して同じ部位の免疫染色を行い、構造を比較した所、非常に似た構造が確認された。Adaptive Optics 眼底写真、免疫染色画像のスケールは一辺 50  $\mu\text{m}$  に揃えている

図5：有色家兎の組織的検討

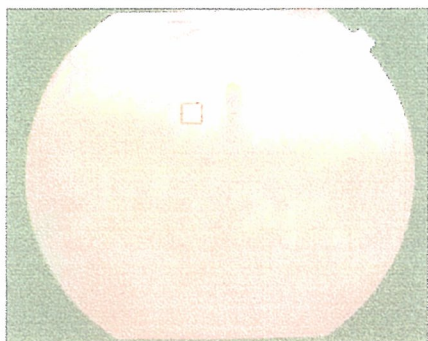


表 1 撮影対象となった疾患

			眼数	有効眼底像撮影不能
眼底疾患なし	屈折異常なし		34	2
	近視(-8D以上)		22	5
	円錐角膜疑い		1	1
	LASIK後		1	
眼底疾患あり	網膜ジストロフィー	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	4	
		網膜色素変性症	4	
	近視(-8D以上)	近視性網脈絡膜変性	4	1
		近視性新生血管黄斑症	7	1
	クリスタリン網膜症		2	
	Stargardt症候群		3	1
	視神経萎縮		5	1
	網膜分離症		2	
	黄斑円孔		2	
	網膜剥離術後		1	
	中心性漿液性網膜症		1	

表 2 収差補正の状況<sup>#</sup>

補正パラメータ	Total RMS
眼底疾患なし	0.115±0.033
眼底疾患あり	0.111±0.031

収差測定不能例（眼底疾患群の6例）を除外。

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: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

脳研究における optical imaging をネコ網膜に応用し、網膜神経活動を観察することができる。前々回は光刺激による結果を、前回は人工網膜に使用されている suprachoroidal-transretinal stimulation (STS 法) による電気刺激の結果を報告し、網膜神経活動の時間的・空間的局在を可視化した。今回は STS 法による網膜神経活動を計測し、その強度及び広がりに関して検討したので報告する。この技術を人における急性実験に用いれば、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 fMRI や MEG、NIRS 等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、光学的手段であることから非介入的な観察が可能である。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。脳研究では神経を外界に露出する必要があるが、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この技術を応用できる。2004 年の Association for Research in Vision and Ophthalmology にて我々はヒト網膜における optical 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った。そこで、ネコを用いた動物実験を行い、光刺激(前々回の報告)及び suprachoroidal-transretinal stimulation (STS 法) による電気刺激(前回の報告)による網膜神経活動が計測できることを確認した。今回、STS 法による網膜神経活動を計測し、その強度及び広がりについて検討したので報告する。

B. 方法

生後 1~2 年のネコ 12 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、これまでと同様である(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)。STS 法は、眼球後極部強膜を半層切除し、そこに押し当てた閥電極と毛様体扁平部から硝子体腔内に挿入した不閥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  $\mu$  sec の biphasic 矩形パルス波 (inward→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