

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、233series の実験を行った。代表例を示す。図 6 は同一眼に、刺激無し・電流値 125 μ A・電流値 250 μ A の刺激を与えた結果である。area centralis 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。赤矢印で示した電極直上部位(on-the-electrode、以下 OE)では反射光量が増加して白く、その周囲(around-the-electrode、以下 AE)では反射光量が減少して黒くなっている。図 7 左のグラフは反射光量変化強度の経時変化を示す。電極直上部位(図 6 で赤矢印、グラフでは OE)では反射光量増加、電極周囲(図 6 で黄矢印、AE)では反射光量減少していることが定量的に計測されており、変化強度は、刺激無し < 電流値 125 μ A < 電流値 250 μ A となっていることがわかる。図 7 右のグラフは反射光量変化部位面積の経時変化である。12bit グレースケール(4096 階調)において、40 以上の反射光量変化を起こした部位の pixel をカウントした。反射光量変化強度と同様に刺激無し < 電流値 125 μ A < 電流値 250 μ A になっている。図 8~10 は同様の実験を 65~300 μ A にて同一眼に施行した結果であ

る。結果は図 6 の眼と同様であった。また、刺激電流値と反射光量変化強度・反射光量変化部位面積は相関していた。全実験を通じて、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ないことはこれまでの実験と同様であった。

STS 方式による人工網膜において、不関電極をどこに設置するかは非常に重要である。当実験においては硝子体腔内に設置しているが、人工網膜に応用することを考えると、当方法は眼内に人工物を設置しないと言う STS 法の利点を減じている。一方で不関電極を眼外に設置する場合は無限遠方にある電極と同様の振る舞いをすると考えられ、STS 法では垂直に網膜を横切り硝子体電極に収束する電流が発散する(図 11)ことで、局所を強く刺激することによってえられる分解能を悪くすることが想像される。そこで preliminary な実験として、不関電極を硝子体内に設置した場合と、頭頂部皮下に設置した場合(monopolar 法)を比較してみた。図 11 に示すように、200 μ A、400 μ A とともに、monopolar 法では STS 法よりも広い範囲に神経活動が見られ、分解能と言う点で不利になる可能性が示唆された。

D. 考察・結論

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。以降の実験予定としては、テトロ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。

【学会発表】

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

Y. Okawa, T. Fujikado, T. Miyoshi, Y. Hirohara, T. Mihashi, Y. Tano [Evaluation of Suprachoroidal-Transretinal Stimulation (STS) by Optical Imaging] ARVO, 2006

図 1: 改造した眼底カメラ

図 2: STS・Optical Imaging シェーマ

図 3: 電気刺激条件

図 4: 1 session 測定

図 5: 測定～画像処理

図 6: STS の Optical Imaging 結果 1

図 7: 図 6 の経時変化(反射光量変化及び 反射光量変化部位面積)

図 8: STS の Optical Imaging 結果 2

図 9: 図 8 の経時変化(反射光量変化)

図 10: 図 8 の経時変化(反射光量変化部位面積)

図 11: STS 法と monopolar 法の比較

図 12: STS 法と monopolar 法の比較 (反射光量変化部位面積)

図 1

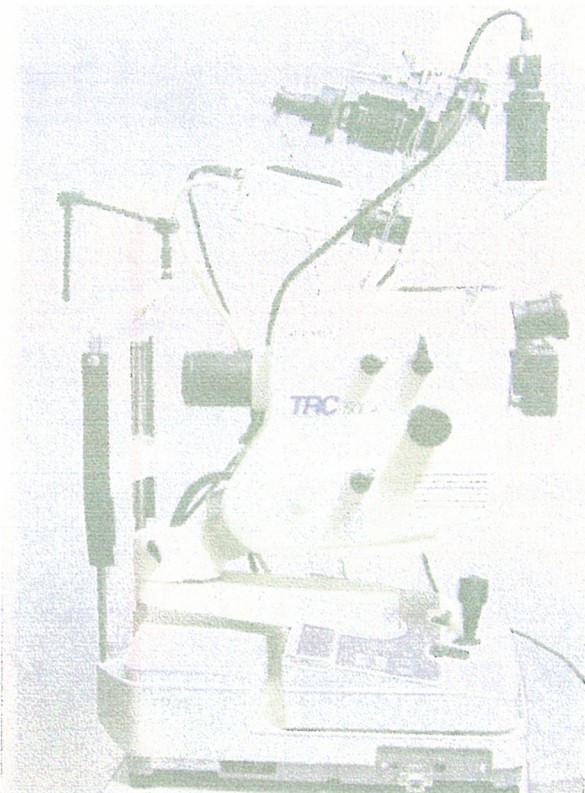


図 2

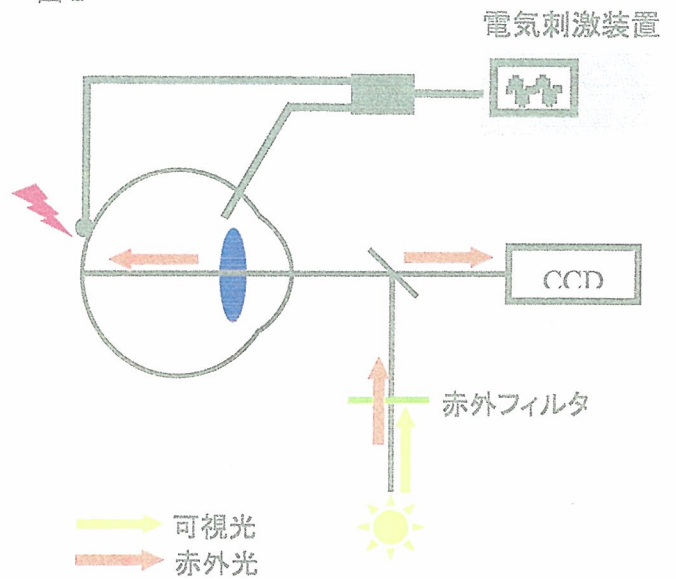


図 3

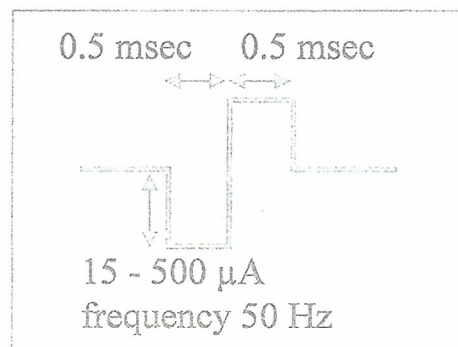


図 4

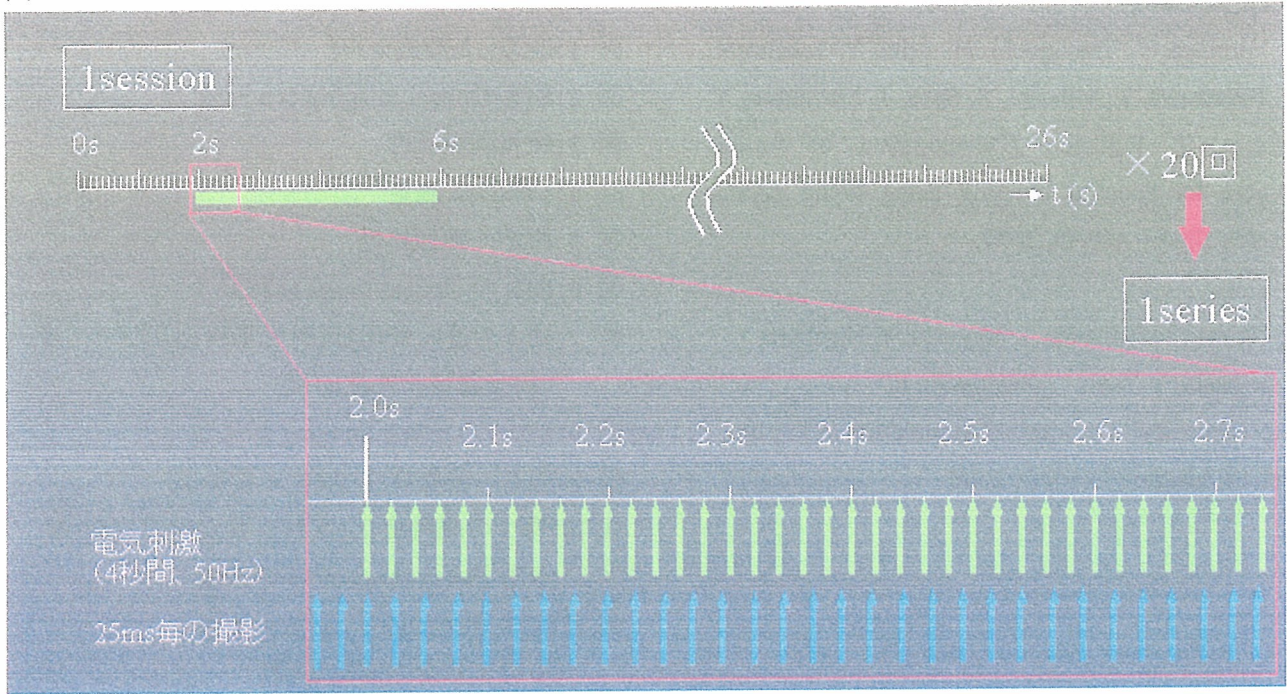


図 5

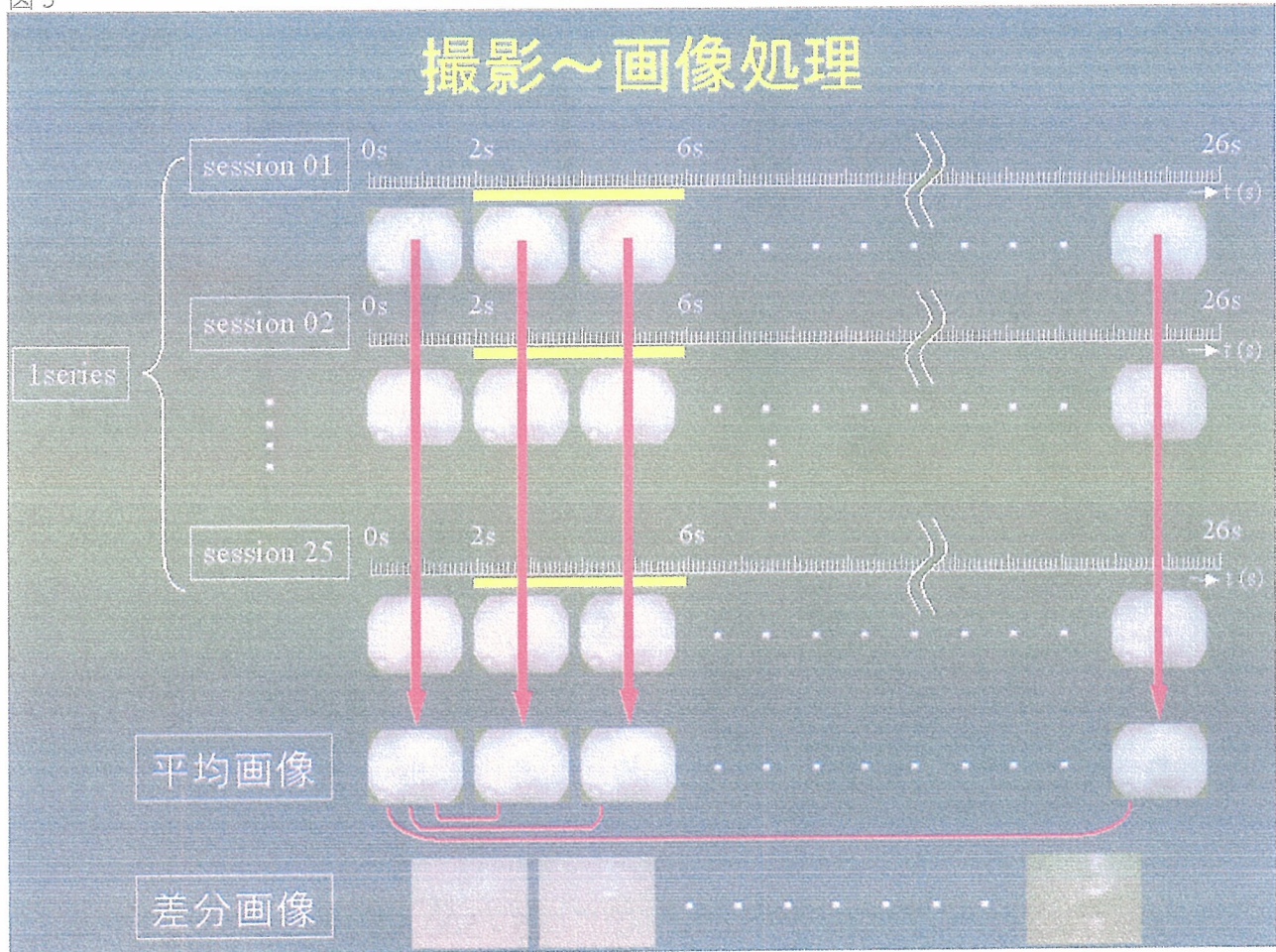


図 6

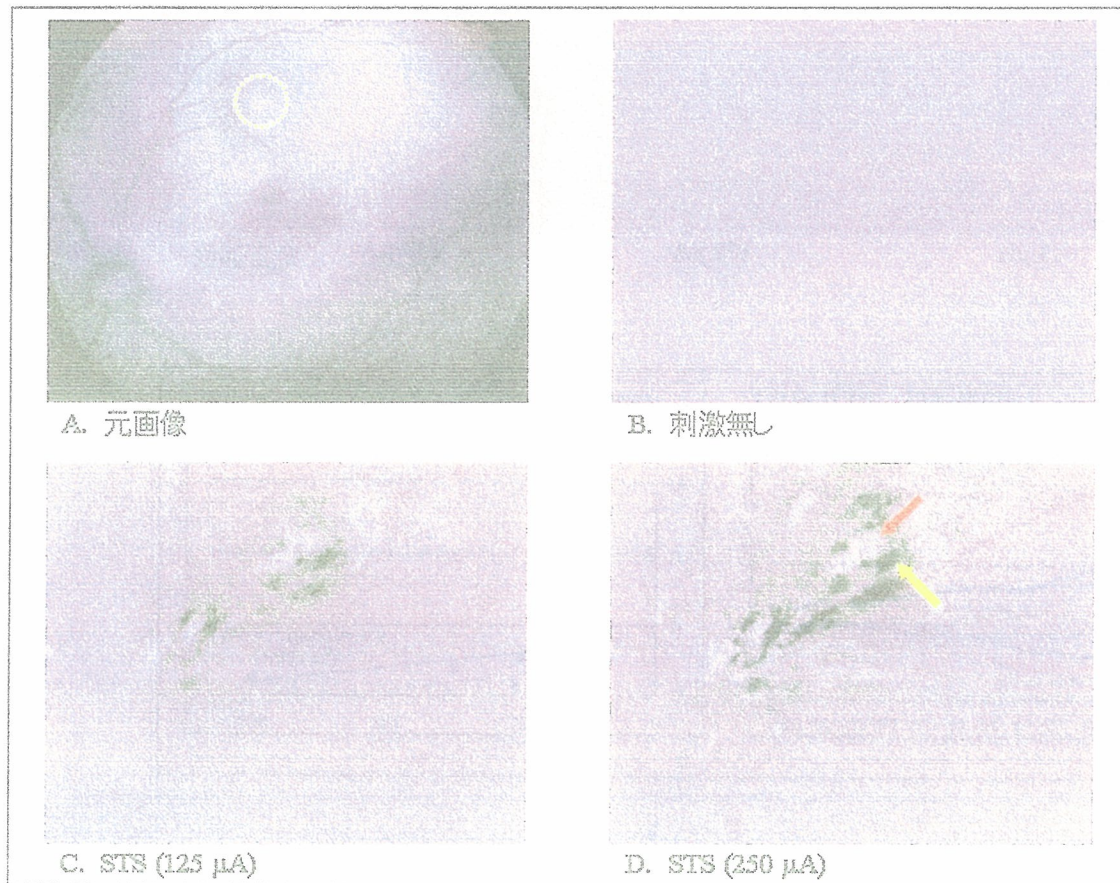


図 7

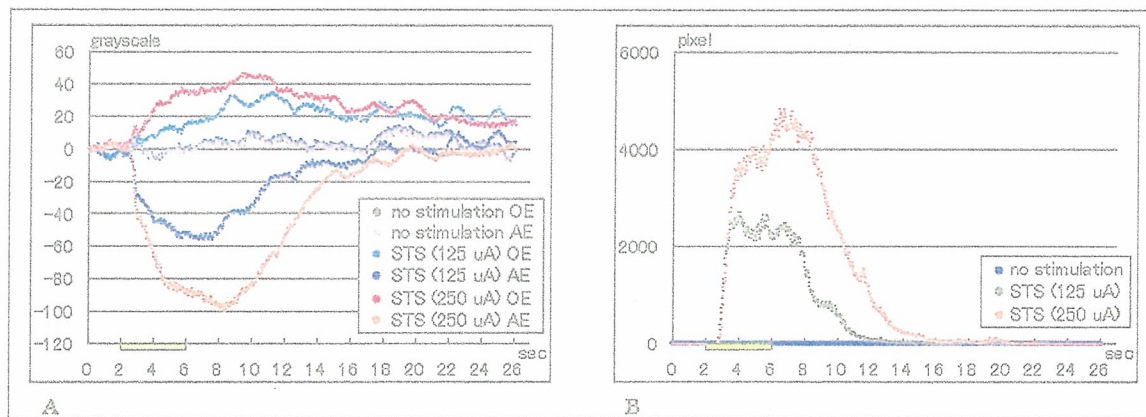


図 8

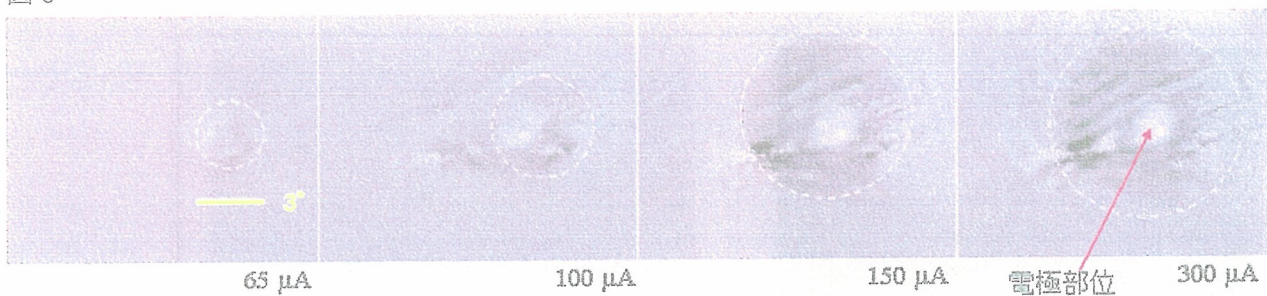


図 9

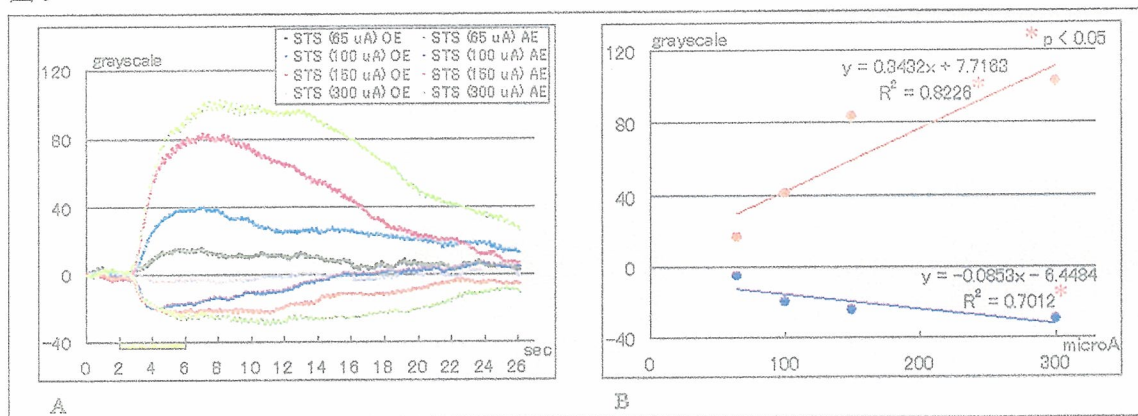


図 10

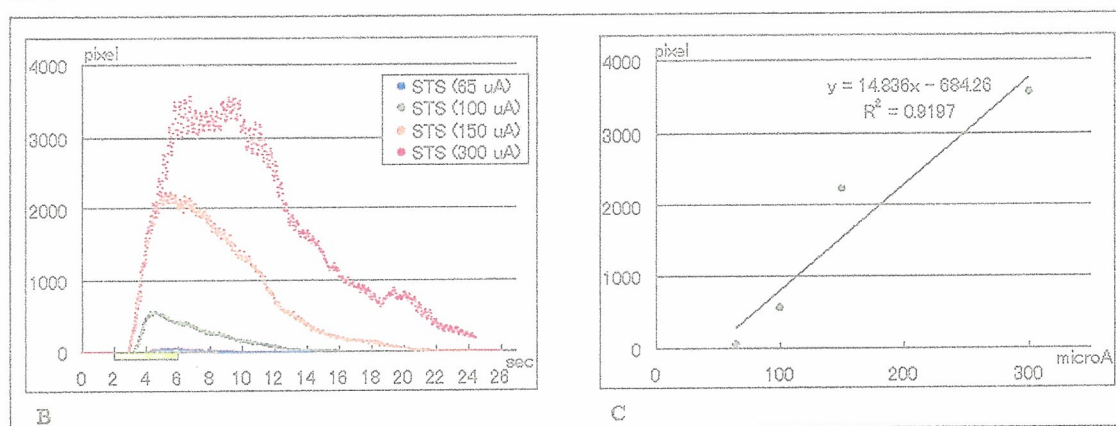
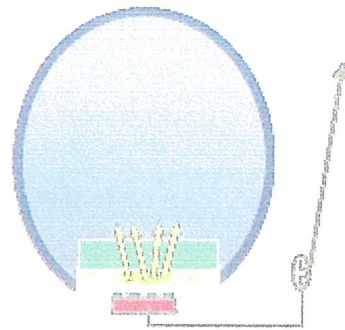
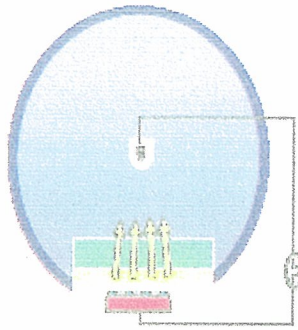


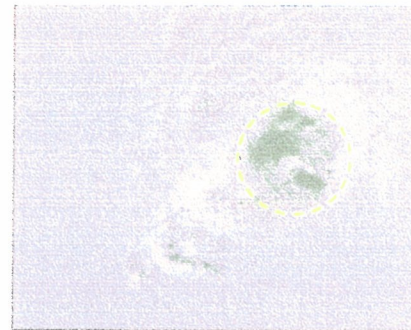
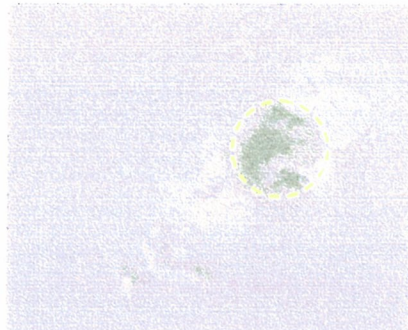
图 11

STS法

Monopolar法



200 μ A



400 μ A

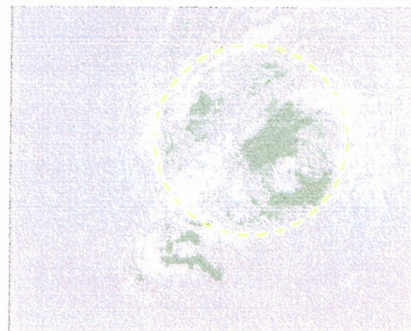
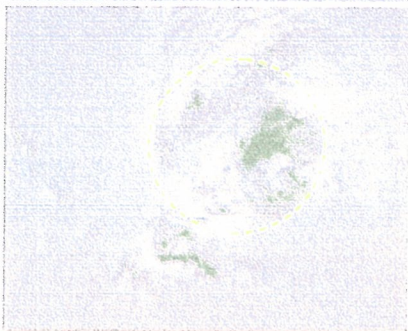
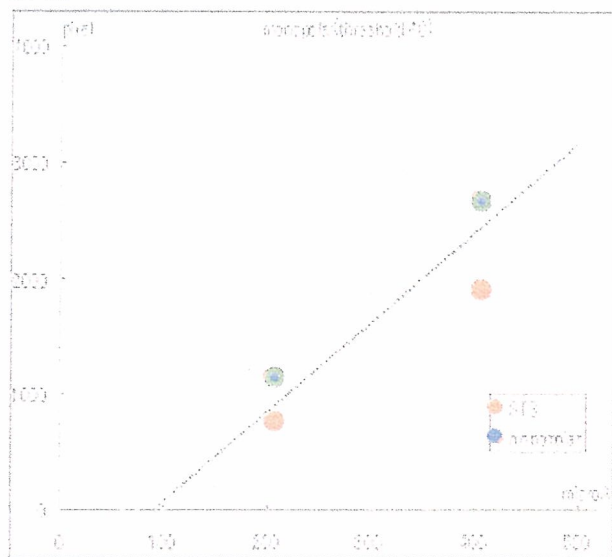


图 12



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

経強膜電気刺激によって誘発される擬似光覚の評価

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

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

強膜や脈絡膜を介して網膜刺激を行う際に疼痛を伴わずに擬似光覚が誘発できる刺激パラメータを探索することを目的に、健常被験者に対して経強膜電気刺激を行った。様々なパルス形状およびパルス幅における擬似光覚または疼痛の閾値を計測した結果、パルス幅の短縮に伴い、擬似光覚閾値よりも疼痛閾値が低くなる傾向が見られた。また対称型バイフェージックパルスに比べて非対称型バイフェージックパルスのほうが疼痛を生じさせにくかった。この結果から、疼痛を避け擬似光覚を誘発させるに長いパルス幅と非対称型バイフェージックパルスが有効であると考えられる。

A. 研究目的

我々は、人工網膜における独自の網膜刺激法として脈絡膜上—経網膜刺激(Suprachoroidal-Transretinal Stimulation: STS)を考案しその機能評価を行っている。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]。STSは従来手法と異なり、刺激電極が網膜と接触しないため、網膜への損傷の危険性が少ない利点がある。

これまでの研究より STS で網膜色素変性の被験者に対し局所的な擬似光覚を惹起させることが可能であることが明らかになった[4]。しかしながら、刺激パルスパラメータを最適化するためには、さらに研究が必要である。

STSにおける最適なパラメータとは、①疼痛を伴わずに擬似光覚を惹起できること、②限局した擬似光覚を惹起できること、③より少ない電極で擬似光覚を惹起できること等の条件が要求される。強膜や脈絡膜には疼痛を生み出す神経が存在しそれらは短毛様体神経を介して三叉神経へとつながる。STSでは電気刺激によってそれらの神

経を賦活し疼痛を生み出してしまう可能性が考えられるので①の条件は重要である。しかしながら、これまでこれらの疼痛に関する知見は非常に少ない。Veraartらは眼瞼に電極を設置し、様々な刺激パラメータで電気刺激を行い、その際に生じる疼痛および擬似光覚の閾値を測定した[5]。しかし、この刺激方式はSTSと異なることから彼らの実験結果をそのままSTSに応用することは難しい。

そこで、本実験では、STSに類似の手法として、強膜刺激方法を考案し、強膜および脈絡膜へ刺激を与え、その際どのようなパラメータで擬似光覚や疼痛が生じるのか検討した。そして①の条件を満たすパルスパラメータを検討した。

B. 方法

[被験者]

20代から50代の健常被験者5例5眼に対し試験を行った。電極装着前にベノキシール点眼液(参天製薬)またはキシロカイン点眼液(アストラゼネカ)による点眼麻酔を行った。さらに角膜保護の目的でビスコート(日本アルコン)を角膜

上に塗布した。なお、すべての試験は被験者の同意の下で行った。試験終了後は、抗生物質の点眼（クラビット点眼液、参天製薬）を行った。また実験終了後の被験者の状況に応じてフルオロセイン染色による角結膜上皮の検査を行った。

[経強膜刺激]

強膜刺激用電極と帰還電極の間に刺激電流を通電し網膜刺激を行った。強膜刺激用電極は眼球に装着した。刺激試行中は眼球を内転させ、刺激部位を眼球赤道部付近の強膜に接触させた。一方、帰還電極には Ag-AgCl 電極を用い、刺激眼と同側の手の背に装着した。

強膜刺激用電極には本実験用に特注したコンタクトレンズ型の電極（メイヨー社製）を用いた。この電極は強膜側のエッジ付近に直線状に4つの刺激電極が配列されている（図1）。刺激電極の直径は 1.0 mm で中心間距離は 1.5 mm である。

刺激パルスとしてチャージバランスの取れた対称型バイフェージックパルスまたは非対称型バイフェージックパルスを用いた。いずれのパルスを用いた場合も、刺激時間は 0.5 sec、刺激周波数は 20 Hz、インターパルスインターバルは 1.0 ms で刺激を行った。なお、今回用いた非対称型バイフェージックパルスにおける一相目と二相目のパルス幅の比率は 1 : 5 だった。本実験では刺激電流（5~700 μ A : 一相目）、パルス幅（0.2~1.0 ms : 一相目）、刺激極性の三つのパラメータを変化させた。これらのパルス生成には NIDEK 人工視覚研究所で臨床試験用に開発した 9ch 刺激装置（NVI-3）を用いた。

動画パターン刺激の際は、同研究所で開発した 9ch 動画パターン刺激装置（NVI-5）を用いた。また、動画刺激には対称型バイフェージックパルス（パルス幅 1 ms）を用いた。

[擬似光覚および疼痛の評価方法]

パルスパラメータと刺激に伴って生じる感覚の関係を調べる目的で、パルス形状ごとに擬似光覚、触覚、疼痛の強さ時間曲線を作成した。

強さ時間曲線に記載した閾値は次のように求めた。刺激電流を段階的に上昇させ（30→50→70→100→150→200→250→300 μ A）、そのつど被験者に擬似光覚や触覚や疼痛の有無を口頭で返答させた。それぞれの感覚が生じる最小の電流値を閾値と定めた。なお、通電は4極全ての刺激電極で同時に行った。

C. 結果

—パルス幅と擬似光覚および疼痛閾値—

対称型バイフェージックパルスでは、パルス幅が短い時に擬似光覚閾値よりも疼痛閾値のほうが低くなる傾向が見られた。図2に疼痛、触覚、擬似光覚の強さ時間曲線の例を示した。この被験者の場合、パルス幅 1 ms の擬似光覚閾値は、触覚閾値と等しく疼痛閾値より低かった。しかし、パルス幅を 0.7 ms に短縮すると、擬似光覚閾値は疼痛閾値よりも高くなった。つまり、このパルス幅では擬似光覚発生の際、疼痛が伴うことを意味する。それより短いパルスでは疼痛より擬似光覚の閾値のほうが高くなり、擬似光覚閾値の測定が困難になった。このような傾向は被験者4名中3名で見られた。パルス幅の短縮に伴い疼痛閾値が擬似光覚閾値以上になったときのパルス幅を表1に示した。

表1

	パルス幅
被験者1	0.5 ms
被験者2	1.0 ms
被験者3	0.7 ms
被験者4	—

なお、No.4の被験者においては、0.4 ms 以上のパルス幅では疼痛は発生しなかったが、0.3 ms のパルス幅においては擬似光覚閾値が 600 μ A に対して、疼痛閾値は 700 μ A とお互い近接した値だった。被験者 No.1, 2, 3 における疼痛発生時のパルス幅の平均値は約 0.7 ms だった。

—パルス形状と擬似光覚および疼痛閾値—

非対称型バイフェージックに対しても同様の試験を行ったところ、対称型バイフェージックパルスに比べて疼痛が生じにくいことが分かった。図2に非対称型バイフェージックパルスの強さ時間曲線を示す。図2の結果は図1と同一被験者で行ったものである。試験に用いたいかなるパルス幅においても疼痛は発生しなかった。もう一名に対して非対称型バイフェージックパルスに対する強さ時間曲線を作成したが、この場合も 0.5ms 以上のパルス幅では疼痛閾値よりも擬似光覚閾値のほうが低く、パルス幅を 0.2 ms まで短縮させてようやく擬似光覚閾値と疼痛閾値が同一となった。このように、非対称型バイフェージックパルスではパルス幅を短縮しても、疼痛が生じにくかった。

—動画パターン刺激と擬似光覚—

新しく開発した動画パターン刺激装置を用い

て異なる2箇所の刺激部位から交互に通電をおこなったところ、それに追従して擬似光覚の位置が移動してあらわれることがあった。擬似光覚は鼻側下方の視野に出現した。刺激部位を1chと4chの間で交互に変えるとその視野の中でコイン大の擬似光覚が上下に移動して知覚された。

次にカメラ刺激モードにて刺激を行ったところ、カメラが指標を映し出すのと同時に被験者は擬似光覚を知覚した。しかしカメラで撮影した指標の形状を認知することはできなかった。指標は黒の背景の中に縦長の白い長方形で描かれたものをノートパソコンの液晶ディスプレイ上で表示した。

D. 考察

対称型バイフェージックパルスのパルス幅を短縮すると疼痛を生じやすくなることがわかった。疼痛を伴わず擬似光覚のみを発生させるには、パルス幅を長くすることが求められる。しかし、その場合パルスの発生時間が長くなりパルス頻度の増加が困難となる。特に、単一電流源で複数の刺激電極を駆動させる場合には、フレーム毎の時間がパルス幅によって大きく影響されてしまう。仮にパルスあたりに要する時間をパルス幅の2倍+1.0 ms (インターパルスインターバル)と仮定すると、刺激電極16極かつ20Hzのフレームレートを設定する場合は約1.0 msのパルス幅が上限となる。さらに、チャージバランス用の放電時間やマルチプレクサなどの回路に要する時間を考えるとパルス幅の上限はより低くなる。今回の実験では、パルス幅1.0 msにおいて疼痛閾値のほうが擬似光覚閾値よりも低くなった被験者は4名中1名のみだった。つまり、条件によっては、この最大パルス幅においても擬似光覚とともに疼痛を生じる場合があることを示唆している。

一方、非対称性バイフェージックパルスではパルス幅を短縮しても疼痛が生じにくかった。ただし、非対称性バイフェージックパルスの場合、二相目に要する時間が長くなるので全体としてパルスに要する時間が長くなる。今回の実験で用いたパルスは一相目と二層目との比率が1対5で、一つのパルスにかかる時間はパルス幅の6倍+1.0 ms (インターパルスインターバル)である。前節に述べた条件(刺激電極16極かつ20Hzのフレームレート)ではパルス幅約0.35 msが上限となる。本実験では0.5 msのパルス幅で疼痛閾値のほうが擬似光覚閾値よりも低くなった被験者は2名中0名、また0.2 msのパルス幅の場合は2名中1名だった。よって、非対称バイフェージックパルスにおいても擬似光覚とともに疼痛が生じる可

能性がある。

疼痛を避ける条件としては、パルス幅を長くする必要はある。しかし限られた条件の中でこの要求を満たすためには、一つのパルスあたりに要する時間を縮小させなければならない。現在使用しているパルスには1.0 msのインターパルスインターバルを設けてある。もし、このインターパルスインターバルをなくした場合でも強さ時間曲線の結果に影響がないのであれば、このインターパルスインターバルを削除することが可能となり、パルスにかかる時間を短縮させることができる。従って、今後はこのインターパルスインターバルの有無によって結果にどのように影響があるのかを調べていく予定である。

さらに、今回の実験結果をSTSに応用する場合には、①刺激方法の違い、②刺激部位の違い、③健常者と網膜色素変性症患者との違いを考慮していく必要がある。

E. 結論

強膜刺激実験の結果より、疼痛を伴わずに擬似光覚を誘発させるためにはパルス幅を長くすることが有効であることがわかった。また対称型バイフェージックパルスに比べ非対称型バイフェージックパルスのほうが疼痛を発生させにくいことがわかった。この結果から、疼痛を避け擬似光覚を誘発させるに長パルス幅および非対称型バイフェージックパルスが有効であると考えられる。

F. 健康危惧情報

特に無し

G. 研究発表

1. 総説

不二門尚「脈絡膜変性疾患の治療に向けて：人工網膜」あたらしい眼科 2006 Vol. 23 No. 9 pp1169-1174.

2. 学会発表

北口善之、森本壮、不二門尚、田野保雄「健常者に対する1極電極を用いた経強膜電気刺激の刺激条件とホスフェンの検討」第110回日本眼科学会総会、2006年4月13日、口演、大阪市

神田寛行、不二門尚、日下俊次、瓶井資弘、森本壮、坂口裕和、中内一揚、小澤素生、田野保雄「網膜色素変性に対する脈絡膜上-経網膜刺激法による人工視覚」第110回日本眼科学会総会、2006

年4月13日、口演、大阪市

Transscleral Electrical Stimulation in Normal Subjects” 2006 ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting, May 2nd, 2006, Fort Lauderdale, Florida, U.S.A

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.

H. Kanda, T. Morimoto, T. Fujikado, and Y. Tano. “Localized Phosphene Elicited by

Transretinal electrical stimulation by an intrascleral multichannel electrode array in rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*

- [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] M. Kamei, T. Fujikado, H. Kanda, T. Morimoto, K. Nakauchi, H. Sakaguchi, Y. Ikuno, M. Ozawa, S. Kusaka, and Y. Tano. Suprachoroidal-Transretinal Stimulation (STS) Artificial Vision System for Patients with Retinitis Pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006 47: E-Abstract 1537.
- [5] Jean Delbeke, Delphine Pins, Géraldine Michaux, Marie-Chantal Wanet-Defalque, Simone Parrini, and Claude Veraart. Electrical Stimulation of Anterior Visual Pathways in Retinitis Pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001 42: 291-297.



図1
強膜刺激用コンタクト型電極。スケールバーは5mm。

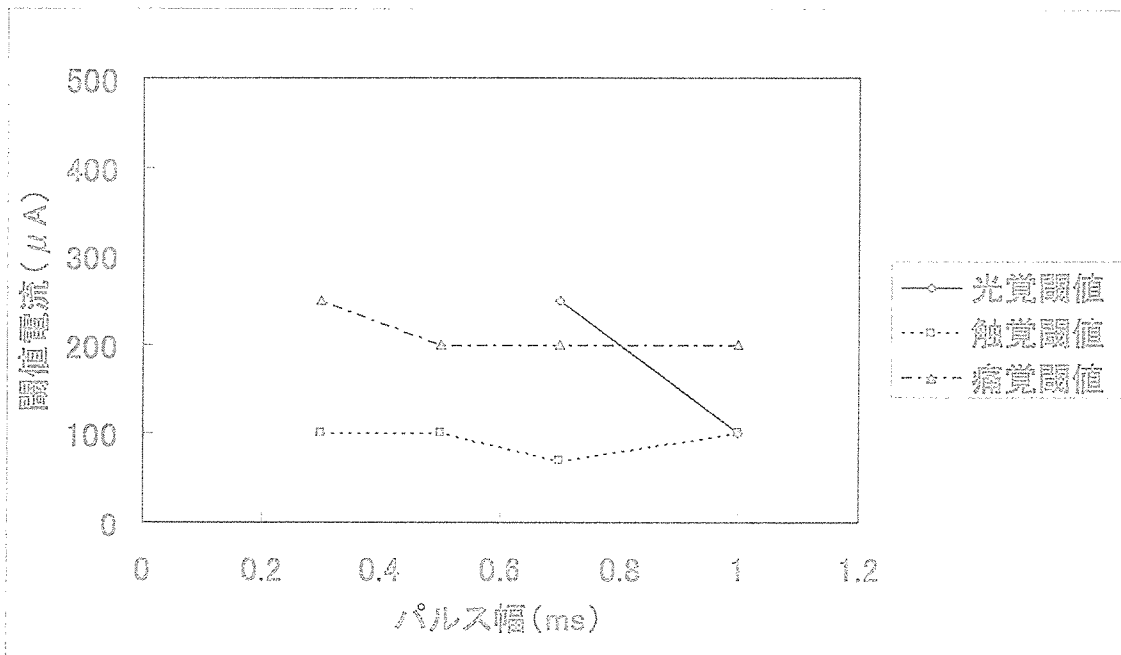


図 2

対称型バイフェーシックパルスにおける擬似光覚閾値、触覚閾値、および疼痛閾値の強さ時間曲線。パルス極性はアノードファーストでインターパルスインターバルは 1.0 ms だった。

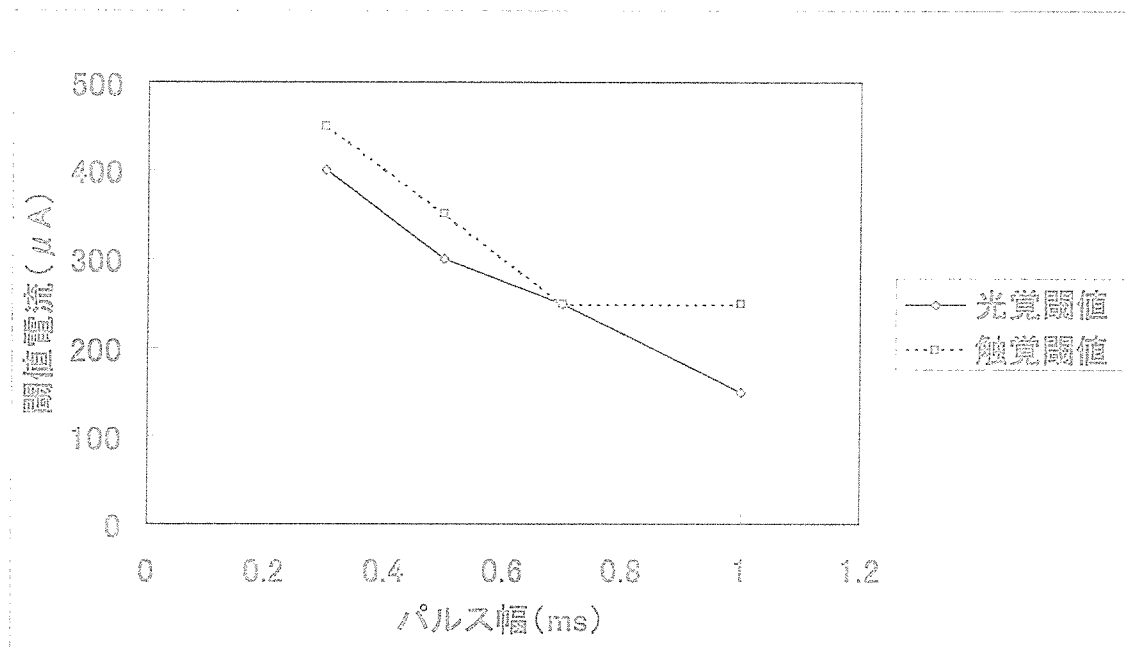


図 3

非対称型バイフェーシックパルスにおける擬似光覚閾値、触覚閾値、および疼痛閾値の強さ時間曲線。パルス極性はアノードファーストでインターパルスインターバルは 1.0 ms だった。

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 I
—効率的な網膜刺激パルスパラメータの探索—

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

研究要旨

脈絡膜上-経網膜刺激(STS)型人工網膜システムにおいて疑似視覚を効率良く発生させる刺激パルスパラメータを検討するため、ラットの眼球に様々なパルス幅と電流値からなる単発の単相および二相性矩形パルス刺激を加えて、その刺激に対する誘発電位を上丘から記録した。その結果、高効率と低消費電力の面からは、内向き刺激相を先行させた 0.2~0.6msec/phase の二相性刺激が望ましいことが示唆された。

A. 研究目的

脈絡膜上-経網膜刺激(STS)型人工網膜システムでは、強膜上に設置する多点電極アレイ（強膜電極）と硝子体内に設置する参照電極（硝子体電極）間に矩形波電流パルスを通電し、残存する網膜回路を刺激することにより、疑似光覚を発生させる。従って、STS では両電極間に挟まれた様々な種類の網膜細胞が同時に刺激されることになる。

しかし、両電極間の各種類の細胞は同時に刺激されるが、刺激効率は等価ではない。一般に、刺激電極の陰極近傍の細胞では脱分極が、陽極近傍の細胞では過分極が生じるため、単相矩形波刺激を用いた STS の場合、直接興奮する網膜細胞の種類は刺激電極の極性に依りて大きく異なると予想され、その結果、疑似視覚の発生効率（閾値）や知覚されるイメージも極性に依りて変化することが予想される。

実際のシステムでは、刺激によって生じる電極面と生体との界面で生じる電荷の不均衡を解消するために、極性が異なり通電電荷量が等しい2つの矩形波電流パルスを組み合わせた二相性刺激を用いる必要がある。この場合、数百 μ sec から数 msec までの短かい時間に刺激電極の極性が陰極から陽極あるいはその逆に切り替わることになるので、両電極間に残存する細胞への刺激効果は単相矩形波刺激の場合よりも更に複雑になると考えられる。

つまり、STS 型人工網膜システムでは、パルス

幅や電流値や極性などの刺激パラメータのデザインによって刺激効率が大きく変わる可能性があり、これらのパラメータを最適化する必要がある。そこで本研究では、ラット眼球の局所に加えた単発の単相性および二相性 STS に対する誘発電位を上丘より記録し、パルス幅や電流値や極性が誘発電位の振幅や潜時にどのような影響を及ぼすかを検討した。

B. 方法

[実験動物と手術] 健常動物として成熟 Long Evans 系 hooded rat（雌、10~16 週齢、日本 SLC、以下 LE）36 匹、視細胞変性動物として RCS rat（雄雌、25~35 週齢、日本クレア、以下 RCS）21 匹を用いた。手術および実験中は保温パッドを用いて体温（直腸温）を 36~37°C に維持した。心電図をモニターした。

ウレタン腹腔内投与（12.5 g/kg）により麻酔した動物に気管挿管して気道確保したのち、その頭部を固定装置により固定した。開頭して門を切開し脳脊髄液を排出させた後、右頭頂骨の後ろ半分をドリルで切除し、直下の皮質を吸引除去して右上丘背側表面全体を露出させた。後頭骨中央にスクルーネジを取り付け、記録用基準電極とした。左眼球背側表面を露出させたのち、眼球と視神経との境界部から 1 mm 背側耳側部の強膜を半層切開し、その表面に強膜刺激電極として白金製刺激

電極(直径 150 μm , テフロン被覆)を設置した。鼻側背側部の網膜扁平部に 30G 注射針で穿孔し、ステンレス製針電極(ユニークメディカル製)を硝子体内に挿入して参照電極(硝子体内刺激電極)とした。

[眼球刺激] STS 刺激として、強膜刺激電極と硝子体内電極との間に単発の単相性および二相性矩形パルス電流をパルス幅 0.06~3 msec, 電流値 4~800 μA で与えた。極性については、参照電極に対して強膜刺激電極の極性を陽極または陰極とし、電流が網膜を流れる向きから前者を内向き STS (以下 inSTS)、後者を外向き STS (以下 outSTS) と定義した。二相性 STS の場合、通電電荷量が等しく極性の異なる単発矩形パルスの間隔を置かずに与えた。inSTS に続いて outSTS を与える刺激を内向き先行 STS (以下 i-oSTS)、逆を外向き先行 STS (以下 o-iSTS) と定義した。

[電気生理学的記録] タングステン製針電極(約 0.1M Ω)を右上丘の浅灰白層(表面より 200-250 μm 下)に刺入し、集合電位を記録した。集合電位は増幅(ゲイン: 10,000、バンドパスフィルター: 5 Hz~3k Hz)し AD 変換した後、シグナルプロセッサ(PowerLab+Scope, AD Instruments)により光または電気刺激をトリガーにした平均加算処理(加算回数 25~64 回)を行った。

まず、1 時間暗順応した後、左眼前に設置した LED ランプより全視野閃光刺激(10 または 500 msec)を与えて、LE では視覚誘発電位が得られ、視細胞変性した RCS では得られないことを確認した。次に、強膜刺激電極を陽極、硝子体内電極を陰極とした inSTS(0.2 msec, 100-150 μA)に対する上丘誘発電位を、250 μm 間隔で内外側および吻尾側方向に記録部位を変えて記録し、誘発電位の振幅の最も大きい場所を見つけ出した(図 1 参照)。そして、その場所で刺激のパルス幅や電流値や極性を変えて、誘発電位の波形がどのように変化するかを調べた。

[組織学的解析] 電気生理学的実験終了後、致死量のネプタールを腹腔内投与して動物を安楽死させた。直ちに心臓を通じて 10% formaldehyde を全身灌流させて組織固定した。固定された眼球を摘出し、2 日以上後固定した後、水洗、脱水してから樹脂(テクノビット TM)で包埋した。この包埋標本からマイクロトームで 5 μm 厚の薄切網膜標本を作りヘマトキシリンエ

オジン染色を施した。切片標本を顕微鏡観察して、RCS では視細胞層が完全に変性していたことを確認した。

C. 結果

(1) STS 誘発応答のマップ

図 1 は RCS の STS 誘発応答のマップの典型例である(060816)。inSTS (0.2 msec, 100 μA)に対して、250 μm 間隔を置いた 001 から 011 までの記録部位における誘発電位は頂点潜時約 4 msec の陽性波(P1)とそれに続く頂点潜時約 10msec の陰性波(N1)から構成されていた。その頂点間振幅は記録部位 007 で最大を示し、記録部位がそこから内外側・吻尾側に遠ざかると振幅は著明に減少した。このことは、既に報告したように STS によって強膜電極直下の網膜局所に興奮が生じ、その興奮が上丘に伝達されたことを示している。

(2) LE の強さ- 反応関係

前述のマッピングで最大振幅を示した部位において、刺激パルスの時間幅や電流値や極性を変化させると誘発電位の波形がどのように変化するかを調べた。図 2 は LE で得られた結果の一例(060305)である。inSTS の場合(図 2-A)、その誘発電位には短潜時の P1, N1 成分に加えて潜時 30~40 msec 付近に陰性成分(以後、N30)が認められた。刺激強度(パルス幅と電流値の積、即ち電荷量)を上げるとそれぞれの成分の振幅は増大し、さらに N1 の直後に陰性波 N2 が出現した。電荷量を 20, 30, 40, あるいは 48 nC に固定して場合、パルス幅を 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 msec と変化させると、P1-N1 成分はパルス幅が短い(逆に電流値が大きい)ほど大きくなったが、N30 成分はパルス幅を変えてもほとんど変化しない傾向が認められた。

一方、極性を反転させ outSTS で調べると、inSTS で見られた P1-N1 成分に相当する 10 msec 以前の短潜時成分は見られず、潜時約 20msec 以降に緩徐な 3-4 相性の波が出現した(図 2-B)。この波の振幅は電荷量の増大に従って大きくなったが、電荷量が同じ場合、パルス幅が変わっても波形には変化が認められなかった。眼球直後の視神経を直接電気刺激(50 μsec , 150)したところ、潜時 3.5 msec と 6 msec にそれぞれ頂点を持つ陽性波と陰性波からなる誘発電位が得られた(図 2-C)。刺激強度を 300 μA に増大させても 10 msec 以後には明瞭な反応は認められなかった。

二相性 STS の場合、短潜時成分 P1-N1/N2 が観察されたが、潜時 20 msec 以降の成分は認められなかった。

(3) RCS の強さ- 反応関係

LE と同様に RCS においても、マッピングで最大振幅を示した部位において、刺激パルスの時間幅や電流値や極性を変化させると誘発電位の波形がどのように変化するかを調べた。図 3 は inSTS の結果の典型例である。その誘発応答は短潜時成分 P1-N1/N2 で構成されており、LE で観察された N30 のような長潜時成分は見られなかった。P1-N1/N2 振幅はパルス幅 0.1 msec では電荷量 20nC の刺激で観察され、刺激強度に依存して増大する傾向があり、また、同じ電荷量の刺激ではパルス幅が短く電流値の大きい刺激の方が振幅が大きくなった。

一方、この動物の outSTS では、パルス幅 0.1 msec で電荷量 20nC の刺激では、応答が認められず、刺激強度を 48nC に上げてようやく N1 成分が観察された (図 4)。しかも、LE の場合と異なり、潜時 20 msec 以降の成分は全く認められなかった。この N1 成分の振幅も inSTS の場合と同様、同じ電荷量の刺激ではパルス幅が短く電流値の大きい刺激の方が振幅が大きくなった。

図 5 は、二相性 STS に対する誘発応答の結果の例である。短潜時成分 P1-N1/N2 のみが観察され、その振幅は刺激強度に依存して大きくなり、同じ電荷量の刺激ではパルス幅が短く電流値の大きい刺激の方が振幅が大きくなることが分かった。単相性の inSTS と比較すると (図 5 黒線)、charge-balance をとるためのパルスを組み合わせることで、振幅が顕著に低下することが分かった。また、i-oSTS (図 5 赤線) の応答が o-iSTS (図 5 青線) の応答よりも大きかった。

(4) i-oSTS の強さ- 期間曲線

二相性 STS によって短潜時成分 P1-N1/N2 成分が視細胞変性した RCS でも LE 同様に観察されたことから、二相性 STS での P1-N1/N2 成分の閾値に関する強さ-時間曲線を求めた (LE 3 匹、RCS 3 匹)。図 6 はその結果である。曲線は、直角双曲線に近似しており、閾値は、いわゆる Weiss の式 ($y=RC/x+R$, 但し y : 刺激電流、 x : 刺激時間、 R : 基電流、 C : 時値) に従っていると考えられた。このグラフから刺激時間と電荷量 (刺激電流×刺激時間) の関係が少なくとも刺激時間 0.1msec-1.5msec の範囲で直線近似できることが確認されたので、近似直線の傾きと y 切片から基電流と時値を算出した。i-oSTS の RCS にお

ける時値は 0.2~0.4msec、LE では 0.5~0.7msec であった。

D. 考察

本研究により、内向き単相矩形パルスを用いた inSTS に対して、短潜時成分 P1-N1/N2 と長潜時成分 N30 から構成される応答が上丘において誘発され、前者は視細胞変性した RCS でもほぼ同じ閾値で記録されるが、後者は RCS では記録できない事が分かった。さらに、前者の振幅は刺激パルスの電荷量よりも電流値に比例して増大するのに対して、後者の振幅は刺激電流値あるいはパルス幅よりもむしろ電荷量に依存することが分かった。

これらの実験結果は、inSTS に対する P1-N1/N2 成分が、陰極側となる網膜内層に存在し悉無律に従って活動電位を発生するタイプの神経細胞の直接興奮に由来していることを強く示唆している。このタイプに当てはまるのは網膜神経節細胞と一部のアマクリン細胞しかない。さらに、神経節細胞の軸索束である視神経刺激によって、P1-N1/N2 と酷似した波形で、より短潜時の上丘誘発電位が観察されたことから、inSTS では網膜神経節細胞に直接興奮が引き起こさせているものと考えられる。

一方、N30 は陽極に近い網膜外層に位置し、過分極することにより情報伝達するタイプの細胞、すなわち視細胞に由来すると考えられる。この推察の妥当性を裏付けものとして、N30 の潜時が閃光刺激による誘発電位の潜時並に遅いことに加え、N30 が視細胞変性した RCS では観察されなかったことが挙げられる。

outSTS では、LE において潜時 20msec 以降に持続的で、かつ振幅が電荷量に依存する成分のみが観察されたが、この応答は RCS では記録できなかった。従って、この成分は、outSTS において陰極側となる網膜外層の神経細胞が脱分極することによって発生したものと考えられる。潜時の遅さと RCS で記録されなかったことから視細胞もしくは双極細胞がその候補として考えられる。

実際の刺激システムでは単相矩形パルス刺激は使用できない。ある刺激電極が陽極または陰極として持続的に使用されると、電極面で水の電気分解が進行し酸素または水素が発生して組織障害を引き起こすからである。このため、電荷量の等しく極性の異なる 2 つのパルスを組み合わせ、いわゆる二相性刺激を用いる必要がある。この場合、STS では上記の inSTS の効果と outSTS

の効果が時間差を置いて重なり合い、網膜では複雑な興奮が誘発されると想定される。

しかし、少なくとも RCS では網膜神経節細胞の直接興奮に由来すると考えられる P1-N1/N2 が観察された。その振幅は i-oSTS の方が o-iSTS よりも大きかった。このことから、実際の STS 型人工網膜システムでは i-oSTS での二相性刺激を採用すべきと考えられる。

そして、同じ電荷注入量であれば、短いパルス幅で構成された刺激の方が興奮閾値は低くなることから、出来る限り短いパルス幅の刺激パターンを採用すべきであろう。パルス幅が短かいほど、単位時間に高頻度な刺激を与えることが出来る。これは、人工網膜システムが高い時間分解能をもち、知覚される疑似視覚の大きさを変えずに明るさだけを変えるシステムであるために必要なことである。

ただし、パルス幅に反比例して電流値は高くなるので、無闇に短いパルスでは消費電力が高く装置への負荷が大きくなる。今回、強さ- 期間曲線から時値が 0.2~0.6msec になった。時値は消費電力が最低になるパルス時間に相当することから、今後は、0.5msec 前後のパルス幅で構成された i-oSTS を用いて、組織に対する安全性、すなわち刺激によって痛みや炎症などの障害が発生しない事を検討することが必要である。同時に、電極や電源などシステムへの負荷が設計可能で高い

耐久性が保たれる範囲に収まるのか確かめる必要がある。

E. 結論

SSTS 型人工網膜システムにおいて疑似視覚を効率良く発生させる刺激パルスパラメータを検討するため、ラットの眼球に様々なパルス幅と電流値からなる単発の单相および二相性矩形パルス刺激を加えて、その刺激に対する誘発電位を上丘から記録した。その結果、(1) 短いパルス幅の大きな電流値を内向きに与える inSTS が網膜神経節細胞を効果的に直接興奮させられる事、(2) 短いパルス幅の二相性刺激では内向き刺激相を先行させる (i-oSTS) 方が外向き刺激相を先行させる (o-iSTS) より効率が良いこと、(3) i-oSTS 誘発電位の閾値の強さ- 期間曲線から消費電力の最も少ないのは 0.2~0.6msec/phase となることが分かった。

F. 健康危惧情報

特に無し

G. 研究発表

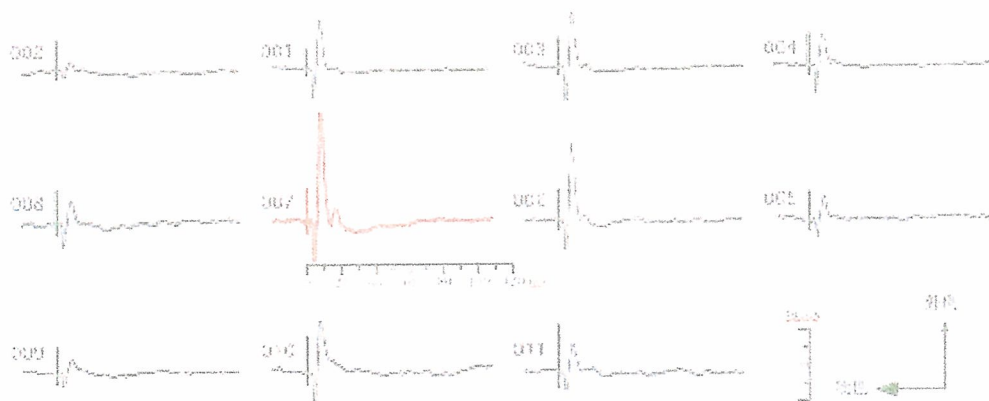
特に無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

[1] 特になし

[図および説明]

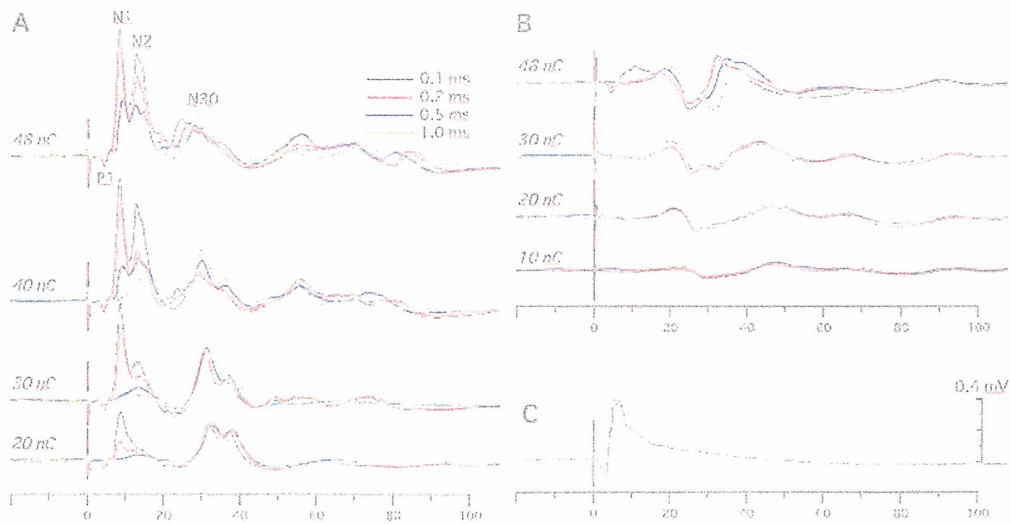
図 1



RCS における inSTS に対する上丘誘発電位の空間分布

nSTS (0.2 msec, 100 μ A) に対して、250 μ m 間隔を置いた 001 から 011 までの記録部位における誘発電位を並べたマップ。部位 007 で最も高振幅の波形が得られた。

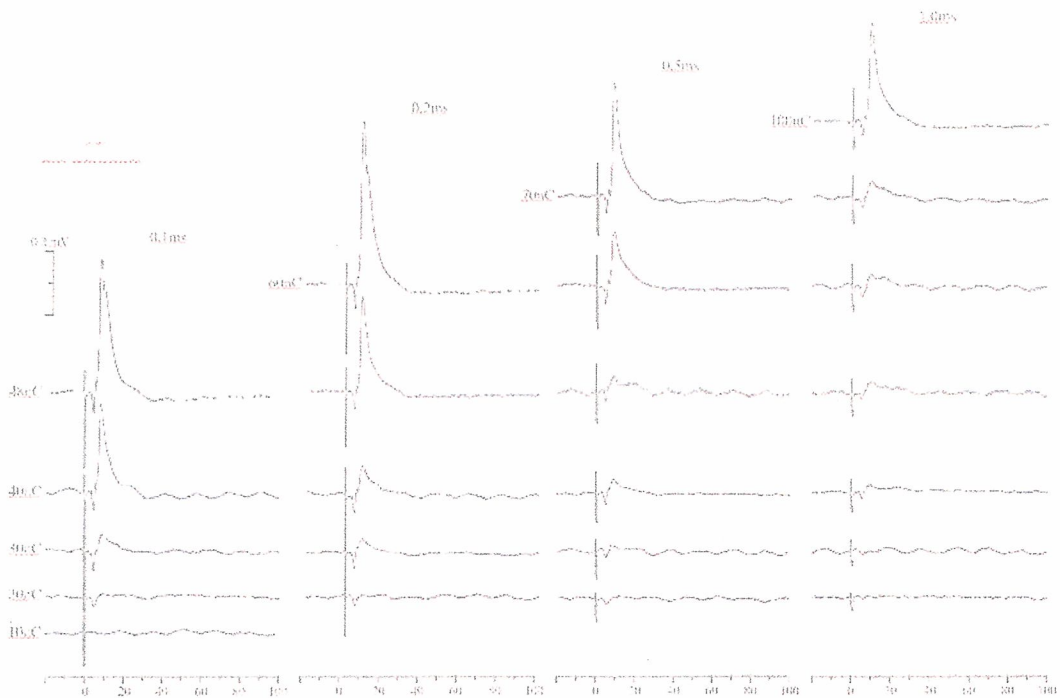
図 2



LE における刺激の強さと誘発電位の関係

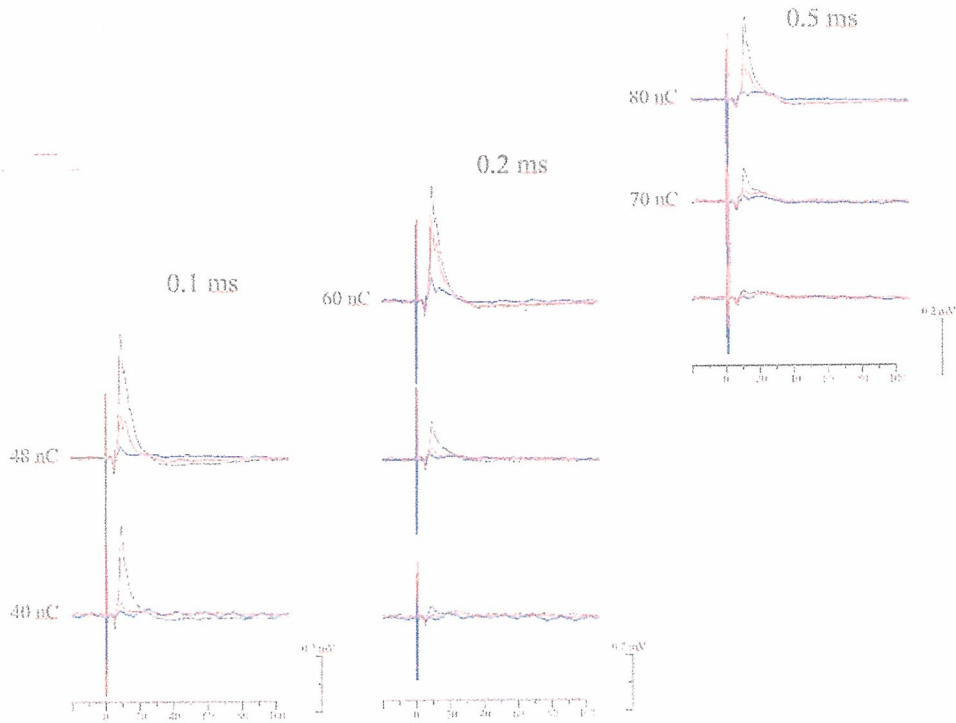
A) 内向き単相矩形パルス刺激(inSTS)、 B)外向き単相矩形パルス刺激(outSTS)で、パルス幅と電流値を変化させて、同一電荷量の反応を重ね書きた。 C)視神経刺激 (50 μ sec, 300 μ A) に対する誘発電位。

図 3



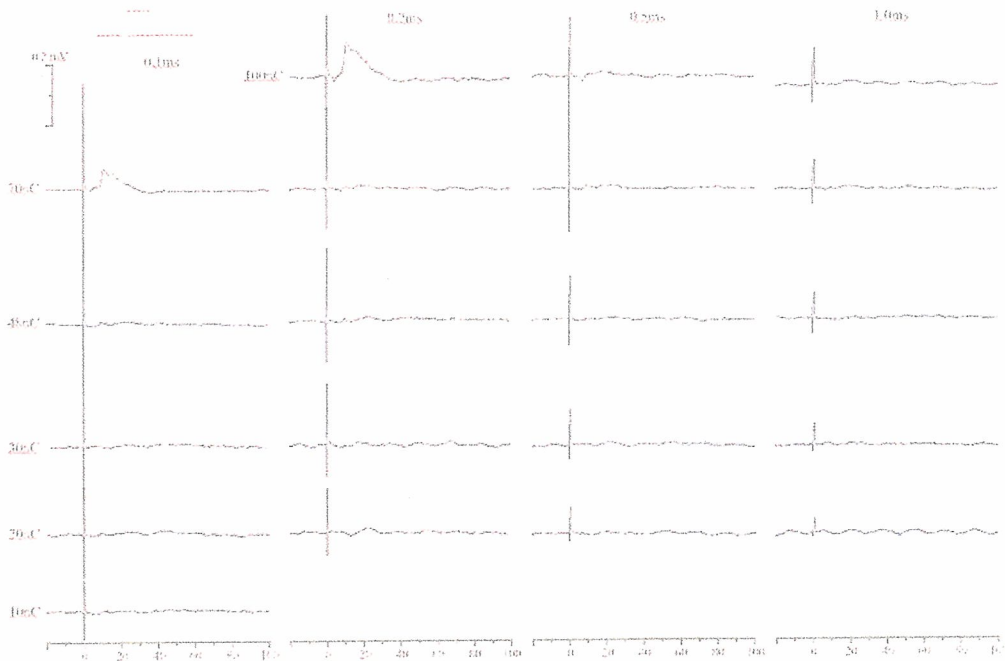
RCS における inSTS の刺激の強さと誘発電位の関係

図 4



RCS における outSTS の刺激の強さと誘発電位の関係

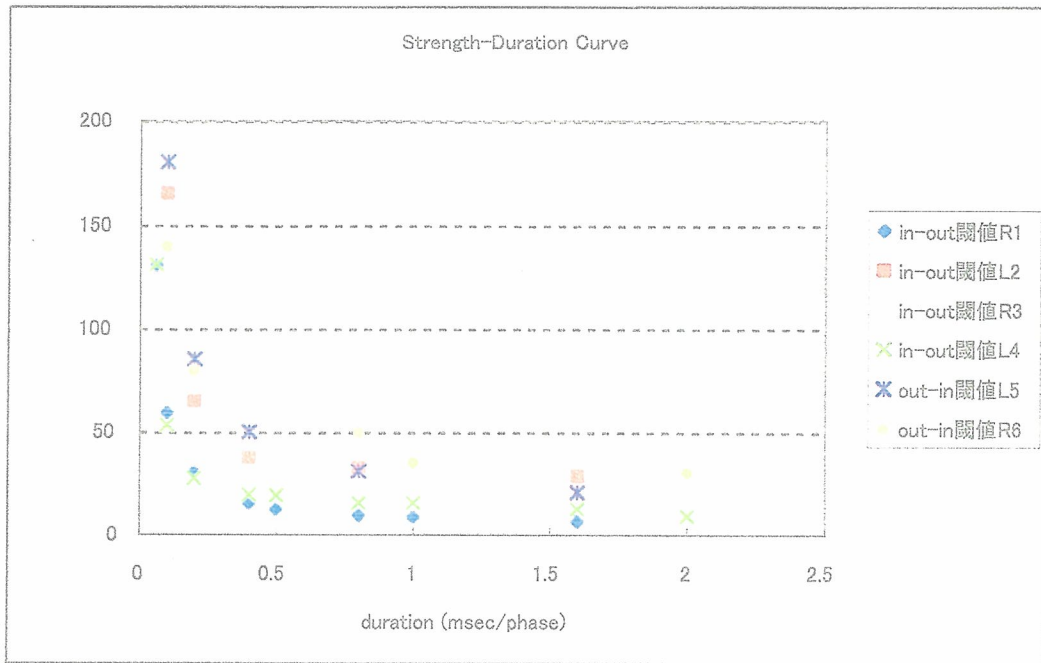
図 5



RCS における二相性 STS の刺激の強さと誘発電位の関係

黒線 : inSTS、赤線 : i-oSTS、青線 : o-iSTS

図 6



二相性 STS 刺激に対する P1-N1 成分の閾値の強さ- 期間曲線

RCS 3 例と LE 3 例の結果。曲線が反比例様であることに注意。RCS と LE との閾値に明瞭な差は認められなかったが、内向き相先行刺激(in-out)の方が外向き相先行刺激(out-in)より閾値が低かった。

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
—ネコ一次視覚野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—経網膜刺激(STS)の空間解像度を機能的に評価するため、ネコの一次視覚野から単発 STS に対する局所誘発電位を記録した。得られた局所誘発電位の皮質上での分布を調べた結果、分布の半値幅は 300 μ A 刺激電流に対し皮質上の 1mm の範囲内に収まることがわかった。この結果から、STS の空間分解能は網膜上刺激と比べても遜色ないと考えられた。

A. 研究目的

人工網膜のための独自の網膜刺激法として、我々は脈絡膜上—経網膜刺激(Suprachoroidal-Transretinal Stimulation: STS)を考案しその機能評価を行っている。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]。STS は従来手法と異なり、刺激電極が網膜と接触しないため、網膜への損傷の危険性が少ないのが特徴である。その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が低くなる可能性が指摘されている[4]。しかし、従来手法と比較して空間分解能の面でどれほどの差があるかわかっていない。

海外のグループによって研究が行われている網膜上刺激については、ネコの一次視覚野(V1)の興奮の広がりや評価し空間分解能の検討を行った報告がある[5]。それによると、網膜上刺激で網膜の局所刺激を行うと、V1 上で 1 mm 程度の範囲に誘発反応が生じた。これは皮質上の網膜空間対応から考えて、視角の 1 度程度に相当すると報告している。

一方、我々は、STS に関してネコ外側膝状体の

単一ユニット活動を記録することによって、その興奮の広がりや評価し STS の空間分解能を検討してきた。しかし、V1 における空間特性については未検討のままである。そこで今回、V1 での STS に対する応答の空間特性を評価することを目的に実験を行った。さらに、STS とすでに報告されている網膜上刺激との応答の分布を比較することで両者の空間分解能の差についても評価を行った。

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の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するよう留意した。術中および電気生理学的記録中ペントバルビタールナトリウム (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態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。

[電気生理学的記録]

STS に対する局所誘発電位を V1 から記録するために、動物の頭部を脳定位装置に固定し、記録電極の位置を油圧式 3 次元マイクロマンピレータ(ナリシゲ)で制御して、脳定位的に目的の記録部位へアプローチした。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。

記録部位を吻尾側方向に 0.2-0.3 mm 間隔で移動し様々な部位から記録することで局所誘発電位の分布を評価した。その範囲は、通常背腹側方向へ anterior 2.0 mm から posterior 3.0 mm、皮質表面からの深さは 200-1500 μ m であった。

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 10 Hz ~ 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(Signal, Cambridge Electronic Design Inc)を用いて記録と解析を行った。

[STS 法による網膜電気刺激]

刺激電極の設置のために以下の手術を行った。左側眼球後部表面を露出させ、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術によって約 4 mm² (2 \times 2mm)の開窓部を作成した。この開窓部に、刺激電極の刺激部位を密着させた。刺激電極には直径 0.1 mm の白金電極を使用した。次に、毛様体扁平部の眼球壁に 30 G 注射針で穴を空け、不関電極を硝子体内へ挿入した。不関電極には先端 2 mm を露出した直径 0.2 mm の絶縁コート白金線を用いた。

シグナルプロセッサ(Power 1401)によって電圧波形を生成し、リニアアイソレータ(BSI950, Dagan 社製)を介して刺激パルスを出力した。刺激パルスとして 0.5 ms のカソーディックファーストバイフェーシックパルスを用いた。刺激強度は 150, 300, 500 μ A の三種類を用い、電流強度に対して誘発電位の分布がどのように変化するか調べた。それぞれの刺激パラメータによる刺激試行を約一秒周期で 100 回ずつ繰り返し、誘発電位の加算平均を行った。

[データ解析]

局所の誘発電位の強度を評価するために、潜時 7~10 ms に出現した陰性の小波 (N1; 結果の項参

照)振幅に着目した。データの解析はオフラインで行った。記録した誘発電位を神経活動解析ソフトの Signal を用いて前述のとおり 100 回の加算平均を行いノイズを除去した。その後の解析は、科学計算用ソフト Matlab (MathWorks)を用いて行った。

本実験では、基線から陰性波の頂点までの差を振幅と定義した。基線は刺激直前 10 ms 間に得られた電位を平均して求めた。

得られた振幅の値を皮質表面の吻尾側方向の座標ごとにプロットし、ガウス関数で近似した。そして近似曲線より分布の半値幅を求めた。なお、これらの解析方法は、Wilms らの方法を参考にした[5]。

C. 結果

—記録電極の深さと局所誘発電位の波形—

STS に対する V1 の局所誘発電位は、刺激後 7 から 20 ms に渡って生じる陰性波と 20 から 60 ms に渡って生じる陽性波から構成されており、その陰性波には 2~5 個の陰性の小波が現れていた。この陰性の小波の中で最も潜時が早いものを N1 と名付け、以降、この最も初めに現れる陰性波である N1 について解析を行った。図 1-c に、記録された局所誘発電位の例を示す。この例では、N1 は 8.9 ms の潜時で出現した(拡大図中の三角印で示された部分)。この記録場所近傍の神経細胞の受容野は、網膜上の刺激部位とほぼ一致していた。このときの刺激強度は 500 μ A、皮質表面から記録電極先端までの深さは 1000 μ m だった。

記録電極の深さを変えると、主に N1 の振幅に変化があった。図 1-a, b に c と同じトラック内で異なる深さから記録した局所誘発電位を示す。深さ 500 μ m では N1 は消失し、250 μ m では他の波もなくなった。図 1 に示した例では 1000 μ m の深さで N1 の振幅が最大となったが、他の個体でも 1000 μ m のときに N1 の振幅が最大になったわけではない。しかし、個体差はあるものの、大抵 750 μ m から 1250 μ m の深さで N1 の振幅が最大値を示した。

—誘発電位の強度分布—

電流強度および記録電極の深さが一定の条件で、吻尾側方向へ記録部位を移動させると、受容野と刺激部位が対応した部位から離れるに従って、N1 の振幅が小さくなった。図 3 に示す例では N1 の振幅は P=0.5 mm のトラックにて最大値を示し、そこから離れるにつれ振幅が減少した。1.5 mm 離れた A=1.0 mm のトラックでは N1 の検出はされなかった。なお、このときの記録電極の深さは 1000 μ m、刺激強度は 500 μ A だった。