

このN1の振幅(N1が得られた潜時における振幅)と皮質上での部位に対してプロットすると、その分布が釣鐘状の形となった(図3)。この広がりには500 $\mu$ Aの時よりも300 $\mu$ Aの時のほうがやや小さくなった。ガウス関数でこのプロットを近似して、その関数から半値幅を求めると、この個体では500 $\mu$ Aの強度のSTSでは0.81 mm、300 $\mu$ mでは0.63 mmだった。他の個体に対しても同様の解析を行いそれらの平均値を求めたところ、500 $\mu$ AのSTSでは0.85 mm (n=3)、300 $\mu$ Aでは0.71 mm (n=3)だった。

#### D. 考察

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に対する局所誘発電位を大脳皮質から記録し、応答の広がり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300 $\mu$ A程度の強度でSTSに対する応答は皮質上で半値幅0.71 mmまで限局することが分かった。皮質上の1 mmは、おおよそ視角の1度に相当すると報告されていることから[5]、STSは1度以上の空間分解能を有すると推測できる。

網膜上刺激の場合、その局所誘発電位の半値幅は約1 mmの範囲に限局すると報告されている[5]。我々の結果もそれに近い値であったため、皮質の応答から推測されるSTSの分解能は網膜上刺激とほぼ同程度であると示唆される。網膜上刺激に比べてSTSは非侵襲的であることも考慮すると、人工視覚の刺激方式としてSTSは有効であると考えられる。

ただし、さらに詳細に空間解像度を議論するためには、記録した大脳皮質の各部位の網膜上の対応場所を調べるのが望ましく、生理学的・形態学的手法を用いて引き続き検討する必要があると考えられる。

#### E. 結論

STSの空間分解能を評価するためにネコを用いてV1から局所誘発電位を記録した。その結果、STSでの興奮は、皮質上で約1 mm程度の範囲に限局していた。この値はすでに報告されている網膜上刺激の結果とほぼ同程度である。よって、STSの空間分解能は、ほかの刺激方式と比較して遜色ないと考えられる。

#### F. 健康危険情報

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

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] Wilms M, Eger M, Schanze T, Eckhorn R. Visual resolution with epi-retinal electrical stimulation estimated from activation profiles in cat visual cortex. *Vis Neurosci.* 2003; 20(5): 543-555.

[図および説明]



図 1

V1 の異なる深さにおける STS による局所誘発電位。深さは各々、A, 250  $\mu\text{m}$ 、B, 500  $\mu\text{m}$ 、C, 1000  $\mu\text{m}$  である。深さ 1000  $\mu\text{m}$  にて陰性の小波が複数記録された。そのうち最も潜時の早いものを N1 と定義した(三角矢印)。刺激電流は 500  $\mu\text{A}$ 。スケールは 100  $\mu\text{V}$ 、10 ms。拡大図内のスケールは 5 ms である。

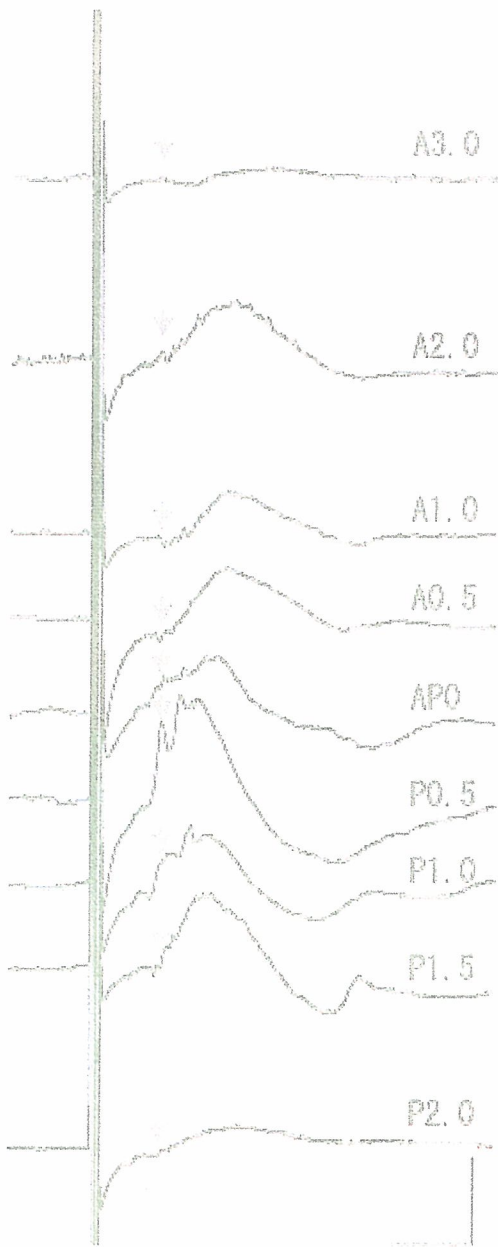


図 2

異なるトラックにおける STS の V1 の局所誘発電位。吻尾側方向に anterior 3.0 mm (A3.0) から posterior 2.0 mm (P2.0) まで電極の刺入トラックを変えた。posterior=0.5 mm (P0.5) のトラックにおいて N1 の振幅が最大となり、そこから離れるにつれ振幅が減少した。N1 の潜時(この場合は 8.9 ms)の箇所を矢印で示した。刺激電流は  $500 \mu\text{A}$  で記録電極の刺入深さは  $1000 \mu\text{m}$  である。スケールは  $100 \mu\text{V}$ 、 $10 \text{ms}$  である。

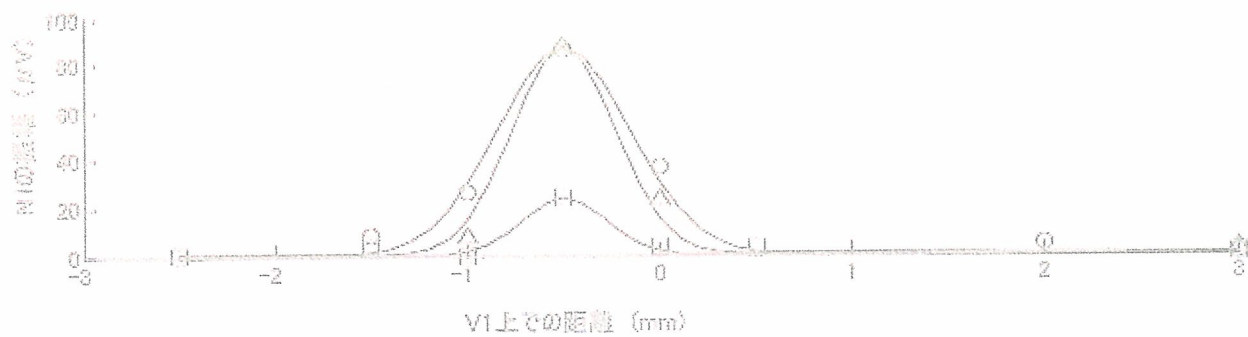


図3  
 V1の吻尾側方向におけるN1の振幅の強度分布。○は刺激電流が $500\mu\text{A}$ のとき、△は刺激電流が $300\mu\text{A}$ のとき、□は刺激電流が $150\mu\text{A}$ のときの結果である。実線はガウス関数を用いた近似を示す。

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系研究科細胞情報医学専攻頭頸部・感覚器外科学講座  
感覚器障害制御学

研究要旨 人工視覚を移植する実験に供与する重要な動物モデルとして、我々はこれまで白色ウサギ（NZW 種）に網膜色素変性の原因となる遺伝子変異を導入したトランスジェニックウサギを作成する実験を行ってきた。ロドプシン遺伝子に Pro347Leu 変異を導入した BAC クローンを電気溶出法にて精製濃縮し、ウサギ受精卵に注入した。その結果、遺伝子検査によって 10 匹のトランスジェニックウサギのファウンダーを得ることに成功した。このうちの 1 匹（#8）のファウンダーの網膜電図を調べたところ、網膜電図の振幅が生後 6 か月で正常の約半分まで減少していることがわかった。今回の結果は、世界で初めてウサギで進行性の失明動物モデルを作成することに成功したことを示すものであり、この動物は人工視覚の実験のための貴重な疾患モデル動物として今後広く用いられる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

人工視覚の実現に向けた実験を推進していくためには動物実験は重要なプロセスである。しかしながら、現在日本において失明疾患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非常に小さいため大がかりな手術操作を行うことができず、もちろん人工網膜の移植実験をこのような小さな動物に行うことはできない。

一方で、欧米ではすでに網膜変性イヌ、ブタ、ネコの作成・繁殖と系統作成に成功しており、実際の人工視覚、遺伝子治療、再生医療の治療実験にもこのような動物が用いられている。日本で全くこのような動物が入手できない状況は人工視覚の関

発に向けて深刻な問題であるといつてよい。

これまで申請者は、中型実験動物として世界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」の作成を試みてきた。

我々は昨年までの段階で、ロドプシン Pro347Leu 変異を導入した BAC クローンを精製してウサギ受精卵に注入し、また精子ベクター法、卵管人工授精法も行ってきたが Tg ウサギは 1 匹も得られなかった。本年度は BAC の精製法を工夫した結果、Tg ウサギのファウンダー 10 匹を得ることができ、これらの 1 系統から網膜電図にて進行性の網膜変性を確認することができたので報告

する。

## B. 研究方法

### (1) ゲノムクローン取得

ウサギロドプシン遺伝子の第5エク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。今回は、BAC フラグメントの抽出を電気溶出法として、ゲルの不純物を最小限にして、これを受精卵にマイクロインジェクションした。その後受精卵を偽妊娠処理した雌ウサギの子宮に注入し、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。

### (3) 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しゲノム 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。全ての実験は大学の審査委員会の許可を得て行なった。

## C. 研究結果

合計で2回のマイクロインジェクションを行なった。4月に、偽妊娠処理をした9匹のウサギに受精卵を移植し、合計で31匹の産仔を得た。DNA 解析によってその中の3匹が変異遺伝子陽性であることが確認された。

第2回の実験では、6月に偽妊娠処理をした6匹のウサギに受精卵を移植し、合計で41匹の産仔を得た。DNA 解析によってその中の7匹が変異遺伝子陽性であることが確認された。

以上により、合計10匹のファウンダーを得ることに成功した。現在は、10匹のファウンダーを交配させてF1を得て、F1個体において進行性の網膜変性がみられるかどうかを網膜電図と組織学的検査で確認している段階である。

この10ラインの内、最も早く誕生した#8のラインのファウンダーの網膜電図を生後6か月の時点で調べたところ、視細胞の活動電位であるa波の振幅が50%程度に減弱しており、このウサギの網膜が変性していることが確認された。

しかしながら、ファウンダー個体は正常遺伝子の細胞と遺伝子変異の細胞がモザイク状になっている場合が多く、その表現型はF1以降でより強く安定してみられることが知られている。今後の目的は、10個のラインのF1以降の個体の網膜機能と組織を正確に調査し、変性の進行が早く、なおかつ神経節細胞の機能を残したラインを人工視覚の実験に適した動物モデルとして繁殖させていくことである。

#### D. 考察

ウサギは生殖サイクルが長いこと、Tg ウサギを作製するのにこれまで時間がかかったが、今回我々はウサギに遺伝子変異を導入して、網膜色素変性モデル動物を作成することに成功した。ウサギとしては世界で初めての失明モデル動物である。ウサギの眼球の大きさがヒトに比較的近いこと、また飼育しやすく世界で最も広く用いられている中型実験動物であることを考えると、今回の Tg ウサギは、今後人工視覚の移植実験に用いられる重要なモデル動物になりうると考えられる。

今後は、作製した 10 ラインの網膜変性の特徴を生理実験と組織実験によって確定し、必要なラインの系統を確保していく。その後は、実際に人工視覚をこのウサギに移植し、失明したウサギが人工視覚を移植することによって視覚を再獲得することが可能かどうかを確認する予定である。

#### E. 結論

今回我々は、人工視覚の動物実験に供与する目的で世界で初めてトランスジェニックによる網膜変性ウサギの作成に成功した。このウサギは、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と考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ueno S, Kondo M, Ueno M, Miyata K,

Terasaki H, Miyake Y. Contribution of retinal neurons to d-wave of primate photopic electroretinograms. *Vision Res.* 46:658-664, 2006.

2) Miyata K, Nakamura M, Kondo M, Lin J, Ueno S, Miyake Y, Terasaki H. Reduction of oscillatory potentials and photopic negative response in patients with dominant optic atrophy with OPA1 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48:820-824, 2007.

3) Ikenoya K, Kondo M, Piao CH, Kachi S, Ueno S, Miyake Y, Terasaki H. Preservation of macular oscillatory potentials in eyes of patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* in press.

##### 2. 学会発表

1) Kondo M, Miyata K, Nakamura M, Ueno S, Miyake Y, Terasaki H. Amplitude reduction of oscillatory potentials and photopic negative response in patients with ADOA with OPA1 mutations. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision, Western Hemisphere Division. Fort Lauderdale FL, USA. April 29, 2006.

2) Kondo M, Ueno S, Piao CH, Ikenya Y, Terasaki H, Miyake Y. Selective amplitude reduction of photopic negative response after macular hole surgery. 44<sup>th</sup> International Society of Clinical Electrophysiology of Vision. , Fontevraud, France, June 13, 2006

3) Kondo M, Ito Y, Kondo N, Miyata K, Ishikawa K, Terasaki H. Effect of axial length on laser spot size during photodynamic therapy: An experimental study in monkeys. Annual Meeting of the Association for

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.* 15:965-970, 1997
- 2) Li ZY et al. Rhodopsin transgenic pigs as a model for human retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39:808-819, 1998.
- 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.* 95:467- 479, 1997.

図表

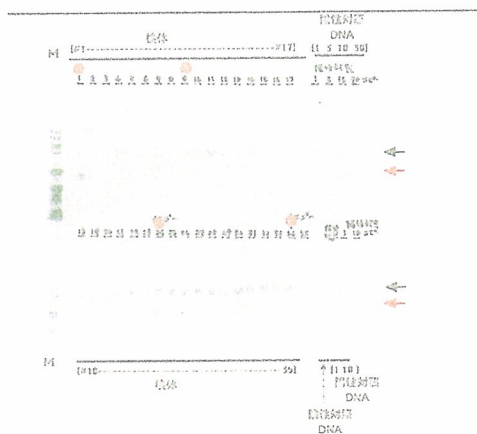


図 1:産仔の DNA 解析の結果。変異遺伝子の解析には Rhod EX プローブ (赤色矢印) を用いた。最終的に 10 匹の Tg ウサギを得ることに成功した。

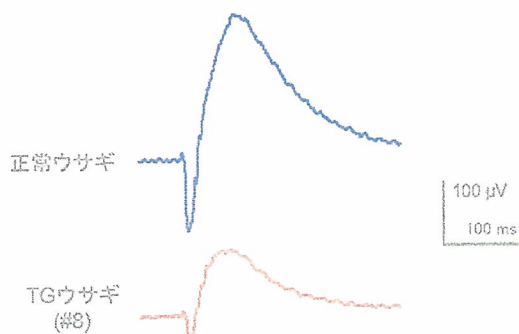


図 2: 正常および Tg ウサギ (ライン 8 のファウンダー、生後 6 か月) から記録した網膜電図の結果。20 分暗順応の後、10cd-s/m<sup>2</sup> の白色閃光刺激で記録している。Tg ウサギの網膜電図の振幅が正常よりも半分程度に減少していることがわかる。



図 3: 現在飼育中の Tg ウサギ。NZW 種のウサギのゲノムを用いてロドプシン P347L 変異を導入して、合計 10 匹のファウンダーを得ることに成功した。このファウンダーを正常ウサギとかけ合わせて、現在多くの F1 個体を繁殖・飼育している段階である。



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：共同研究者が開発した脈絡膜上一経網膜電気刺激（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、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。昨年度から、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てきた。臨床応用に向けて、電極数を増やしたり、電極サイズを小型化するためには、電極形状、基盤の種類、刺激電流などの改良が求められる。今回、共同研究者が開発する電極を使用して、各条件の違いによる、強膜内の安定や網膜を含む周囲組織の損傷程度について組織学的に検討した。IrOx 膜をスタッドバンブ上に形成して分散型刺激電極アレイは、広い面積で強膜の湾曲に沿って安定して固定できる可能性が示唆された。しかし、その形状によっては、強膜ポケットから脱出する危険性もあった。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昨年度までに観察したが、蛍光眼底造影検査で検出される網膜障害は光学顕微鏡組織所見が明らかでなくてもみられることがわかった。電極に基盤や形状で強膜内の安定性はかなり影響を受けることがわかった。刺激電流の非対称性刺激波形 (asymmetric pulse) と対称性刺激波形 (symmetric pulse) 刺激比較で、網膜と強膜への障害が異なった形で生じる可能性が蛍光眼底造影で示唆されたが、家兎眼の組織学的比較でその有意差はえられなかった。

#### A. 研究目的

共同研究者が開発した脈絡膜上一経網膜電気刺激（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、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てきた。昨年度、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。

さらに臨床応用に向けて検討するために

は、電極数を増やしたり、電極サイズを小型化するためには、電極形状、基盤の種類、刺激電流などの改良が求められる。今回、共同研究者が開発する電極を使用して、各条件の違いによる、強膜内の安定や網膜を含む周囲組織の損傷程度について組織学的に検討した。

## B. 研究方法

臨床応用に向けて共同研究者が開発、検討している電極埋め込み眼の組織学的検討を施行した。

それぞれの実験眼について、眼球を摘出し、ホルマリンと2.5%グルタルホルムアルデヒドの1:1混合液に浸透させ、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 $\mu$ 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・エオジン染色あるいは膠原線維観察のためにElastic van Gieson 染色を施行し、グリセリン封入して光学顕微鏡による観察を行った。

### （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

1. IrOx 電極のダミーを埋め込んだ眼球の組織検討

かなり幅広く強膜内に埋植されていたが、その形状は強膜の湾曲にしたがって滑らかに強膜内に存在した。電極部の組織は切片作成中のアーチファクトが生じやすかったが、電極周囲の異物反応や炎症反応はこれまでのものよりも強い所見は得られなかった。家兎眼ではチップ固定用の糸が網膜下に迷入する所見があり、幅広い電極の固定方法に工夫が必要と思われた。（図1）

2. 分散型刺激電極アレイ (distributed stimulus electrode array) を埋め込んだ眼球（先端に4箇所電極アレイ、基盤はポリイミド）

1ヶ月間の埋植眼の組織像を観察した。今回の分散型刺激電極アレイは1列に並んだタイプを用いた。

強膜挿入が強膜浅層にあり、埋植固定用の糸が電極部位に存在し、電極の外側に多くの炎症細胞が観察された。また棒状で長いため先端は、強膜の接線方向に跳ね上がり、安定性は不良に思われた。網膜に明らかな病的所見は観察されなかった。（図2 A, B）

3. 慢性埋植電極作成中に生じた高電圧による亜急性損傷網膜の観察

慢性埋植電極を眼球に埋め込み（径200 $\mu$ m）、兎頭蓋上ではんだ付けする際に、はんだ付けの熱が電極を伝わって網膜を損傷した疑いのある眼球を約4日後に眼球摘出して観察した。網膜は、網膜外層を中心とする変性と滲出性変化、色素上皮の遊走と変性、グリオシスが観察され、網膜ジアテルミー、冷凍凝固による過剰凝固所見に類似していた。（図3）

#### 4. 非対称性刺激波形 (asymmetric pulse) と対称性刺激波形 (symmetric pulse) 刺激実験

刺激電流の波形を symmetric にした場合、熱の影響が化学反応のより強く生じ (熱 > chemical)、強膜は傷害されなくても網膜に障害が生じ、asymmetric では化学反応が熱の影響より大きく (chemical > 熱)、網膜は無事でも強膜が損傷される可能性が考えられる。昨年度の実験などから蛍光造影検査などで障害を生じえる 1.5mA 刺激で、両者を比較した。

(1) Asymmetric pulse 1.5mA, 1 時間 20Hz 連続通電した。フルオレセイン蛍光眼底造影検査では蛍光の漏出が観察された。肉眼的観察では網膜に色調の変化などの異常は見られなかった。

電極埋植部位の強膜の層構造は崩れていたが、van Gieson 染色による強膜の明らかな変性や無構造化はみられなかった。網膜に異常な変性所見はみられなかった。(図 4 A)

(2) Symmetric pulse 1.5mA, 1 時間通電眼では、眼底に肉眼的な変化は見られなかったが、フルオレセイン蛍光眼底造影検査で明らかな変性所見が観察された。埋植した強膜に黒色斑が肉眼的に観察された。

組織検査にて、網膜周辺部の縫合部位が 1 箇所穿孔し網膜前出血が存在した。HE, van Gieson 染色にて、強膜、網膜に明らかな変性所見は観察されなかった。(図 4 B)

#### D. 考察

STS 方式の臨床応用に向けて、電極数を

増やしたり、電極サイズを小型化するためには、電極形状、基盤の種類、刺激電流などの改良が求められる。

今回、共同研究者が刺激実験に用いている数種類の電極あるいは実験条件の組織学的検討を行った。IrOx 電極は強膜の湾曲に沿って広い面積にわたって安定して固定しえる材質と考えられた。棒状に長い電極は接線方向に跳ね上がる可能性があり、埋植する強膜ポケットが浅い場合、脱出する可能性が示唆された。電極基盤の材質や形により、強膜内の安定性が家兎眼ではかなり影響されることがわかった。また、それぞれで固定するための糸がかなり炎症反応を誘発するために固定する手技や位置も慢性実験結果に影響する可能性が示唆された。

刺激電流の非対称性刺激波形 (asymmetric pulse) と対称性刺激波形 (symmetric pulse) 刺激比較においては、蛍光眼底造影検査で差は見られるものの、組織学的に明らかな差は得られなかった。強膜の固定部位や手術による合併症の方が家兎眼では組織所見に影響し、電流刺激波形の差を検討するためには、家兎眼は適当でない可能性が考えられた。一方、FA 蛍光造影検査で差が見られたことは、光学顕微鏡的組織変化がなくても FA で検出される網膜障害が生じることが確認された。

慢性埋植電極作成中に生じた高電圧によって著明な網膜変性像が生じ、組織学的にはジアテルミーや冷凍凝固による網膜変性像に類似していた。強膜に明瞭な変性所見はなく、高電圧による障害では強膜傷害が組織学的に観察されなくても網膜が組織学的に著明な変化が生じると考えられた。今後の電流障害の判定に有用な経験であった。

## 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昨年度までに観察したが、蛍光眼底造影検査で検出される網膜障害は光学顕微鏡組織所見が明らかでなくてもみられることがわかった。電極に基盤や形状で強膜内の安定性はかなり影響受けることがわかった。刺激電流の非対称性刺激波形 (asymmetric pulse) と対称性刺激波形 (symmetric pulse) 刺激比較で、網膜と強膜への障害が異なった形で生じる可能性が蛍光眼底造影で示唆されたが、家兎眼の組織学的比較でその有意差はえられなかった。

## 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) 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* 325: 101-109, 2006
- 2) Hirakata A, Hida T: Vitrectomy for myopic posterior retinoschisis or foveal detachment. *Jpn J Ophthalmol* 50: 53-61, 2006
- 3) 平形明人: 感染性眼内炎の対応. *東京都眼科医会報* 197:2-8, 2006
- 4) 小笠原亜希子、気賀沢一輝、平形明人、渡辺俊樹、高間直彦: 拍動性眼球陥凹を認めた2例. *神経眼科* (in press)
- 5) 平形明人: 前房水と硝子体-網膜生検と網膜下生検の手技-. 吉川洋, 石橋達朗 (編): *いますぐ役立つ眼病理, 眼科診療プラクティス* 8:178-179, 文光堂, 東京, 2006
- 6) 平形明人: 網膜・網膜前膜と網膜下組織-増殖組織の採取、固定、包埋-. 吉川洋, 石橋達朗 (編): *いますぐ役立つ眼病理, 眼科診療プラクティス* 8:210-211, 文光堂, 東京, 2006
- 7) 平形明人: 網膜・網膜前膜と網膜下組織-糖尿病網膜症 VS 未熟児網膜症. 吉川洋, 石橋達朗 (編): *いますぐ役立つ眼病理, 眼科診療プラクティス* 8:192-195, 文光堂, 東京, 2006
- 8) 平形明人: 網膜・網膜前膜と網膜下組織-増殖性硝子体網膜症の増殖膜. 吉川洋, 石橋達朗 (編): *いますぐ役立つ眼病理, 眼科診療プラクティス* 8:196-200, 文光堂, 東京, 2006
- 9) 平形明人: 網膜硝子体手術. *バトルロイヤル編集委員会 (編): Eye Surgery バトルロイヤル 2-網膜硝子体、斜視編* -:3-70, メジカルビュー社, 東京, 2006
- 10) 平形明人: 糖尿病網膜症-糖尿病とその合併症-. 石田均, 門脇孝 (編): *人体の*

- 構造と機能及び疾病の成り立ち各論 1: 24-29, 南江堂, 東京, 2006
- 11) 平形明人:眼循環疾患－Eales病－. 田野保雄(編):眼底アトラス 12, 眼科プラクティス:120-121, 文光堂, 東京, 2006
- 12) 平形明人:視神経－乳頭小窩黄斑症候群－. 田野保雄(編):眼底アトラス 12, 眼科プラクティス:120-121, 文光堂, 東京, 2006
- 5) 平形明人:硝子体手術採取検体の意義. 第41回眼科臨床病理組織研究会(第8回学術奨励賞), 大阪, 2006.4.18
- 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。

特許取得状況:なし

## 2. 学会発表

- 1) 杉谷篤彦, 平形明人, 福田稔(杏林大電顕室), 樋田哲夫:内境界膜皺襞を合併する糖尿病黄斑浮腫の一例. 第12回日本糖尿病眼学会, 2006.3.
- 2) 中内一揚, 不二門尚, 寺澤靖雄, 斉藤徹, 神田寛行, 太田敦, 平形明人, 田野保雄:家兎に対する人工網膜刺激による組織損傷電流閾値の検討. 第110回日本眼科学会総会, 大阪, 2006.4.14
- 3) Hirakata A: Diagnosing Neovascular Glaucoma and Understanding The Source of Ischemia. WOC 2006, Brazil, Feb 19-24, 2006
- 4) 平形明人:網膜上組織からの情報－網膜内境界膜、網膜上膜、糖尿病網膜症や増殖性硝子体網膜症の増殖膜－. 第45回日本網膜硝子体学会総会, 2006.12.1

図1. IrOx 電極のダミーを埋め込んだ眼球

強膜内に幅広い面積で強膜の湾曲に沿って存在した。先端の固定状態も良好で、電極部位も網膜下に位置した。固定用の糸が網膜下に存在した。

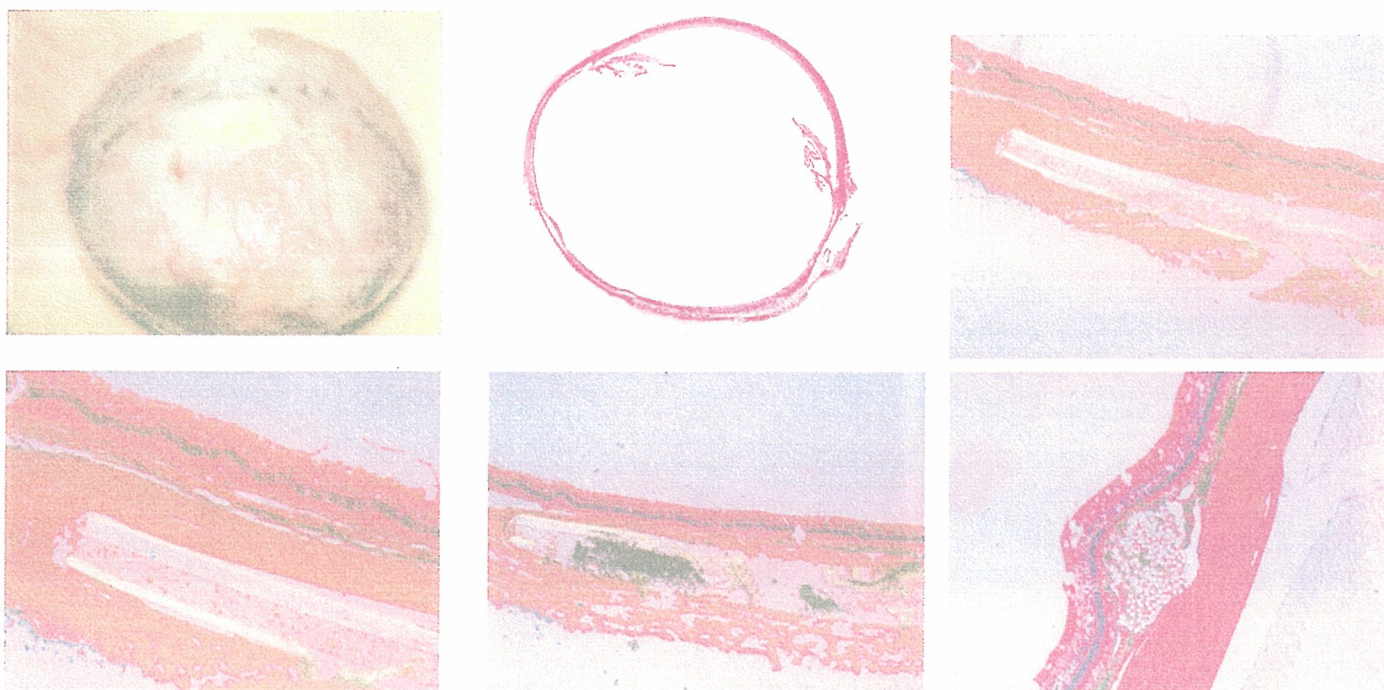


図2A. 分散型刺激電極アレイ (distributed stimulus electrode array) を埋植眼球 (電極1列タイプ) のマクロ写真

<埋植手術時>



<眼球摘出時>



図 2B. 分散型刺激電極アレイ (distributed stimulus electrode array) を埋植眼球 (電極 1 列タイプ)

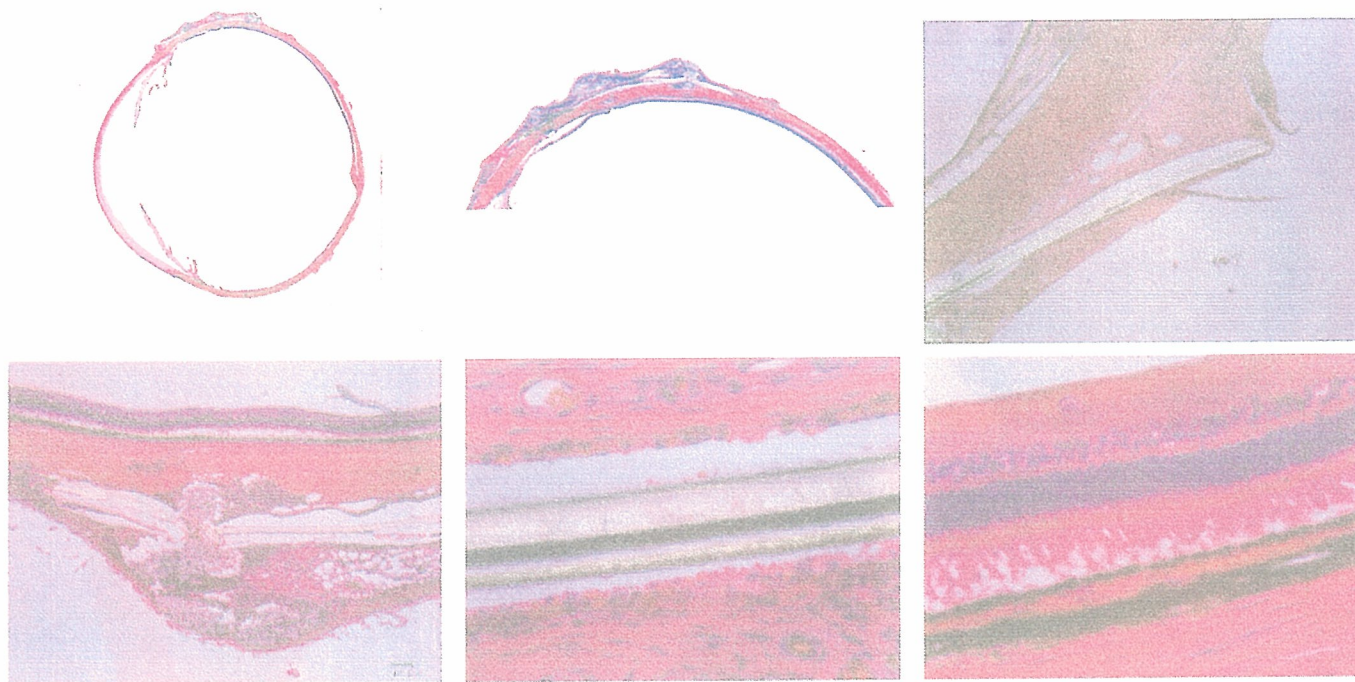


図 3. 慢性埋植電極作成中に生じた高電圧による亜急性損傷網膜

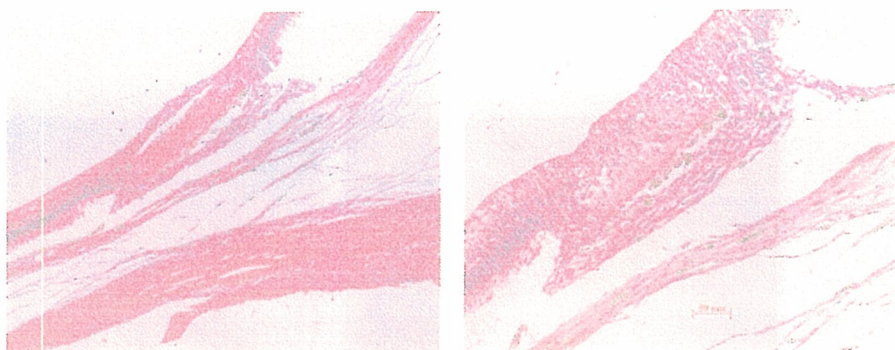


図4. Asymmetric pulse 1.5mA, 1時間 20Hz 連続通電眼

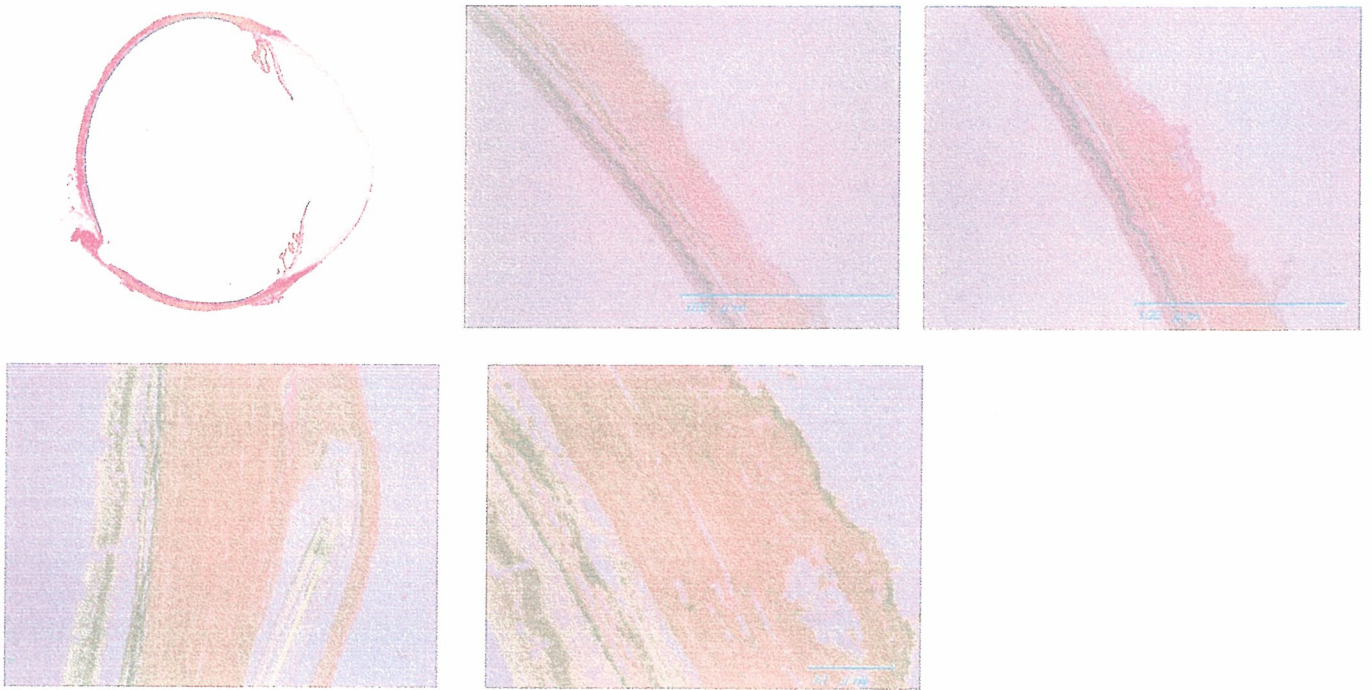
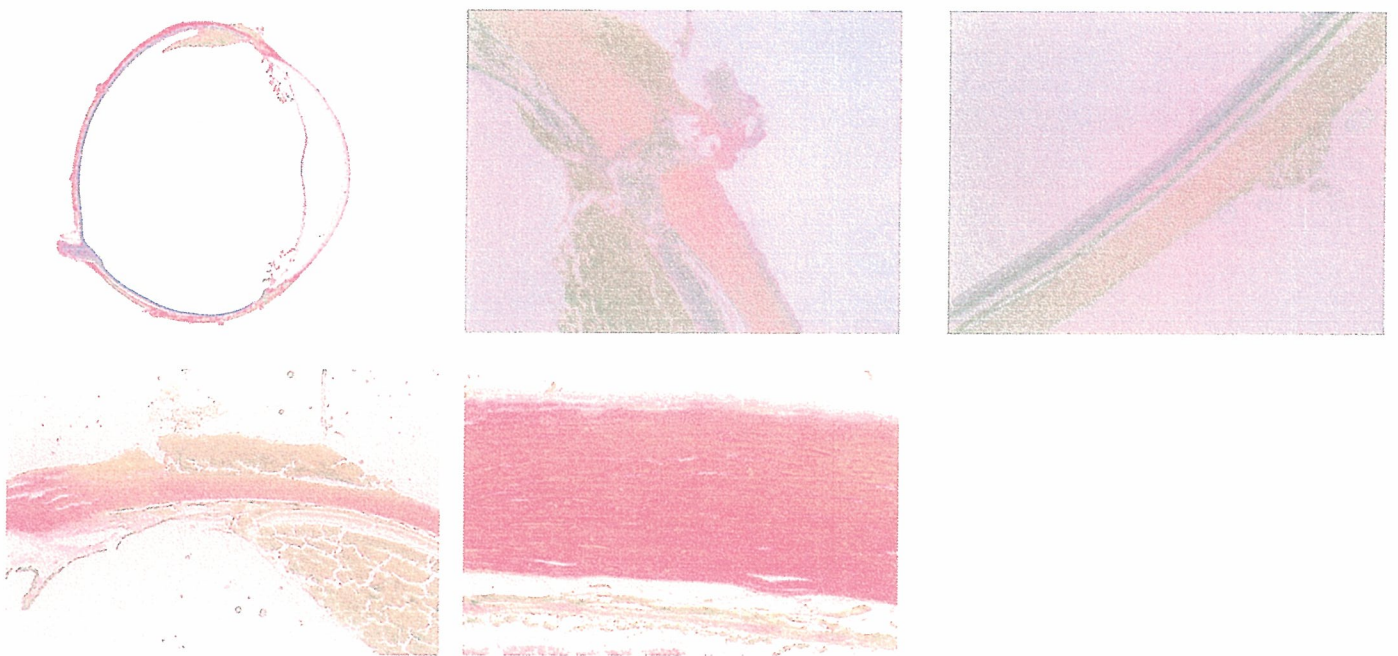


図4B. Symmetric pulse 1.5mA, 1時間通電眼





厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
分担研究報告書

網膜刺激型電極のデバイス開発

分担研究者 太田 淳 奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 教授

研究要旨

網膜刺激型電極システムへの適用を目的として、分散型刺激電極方式について研究を行った。昨年度考案したフリップチップ実装方式の研究を更に進め、生理食塩水中での電荷注入実験およびダミーチップによる動物実験を実施し、その有効性を実証した。また高密度刺激を旨し電極材料の研究を実施した。スパッタ成膜により、Pt, IrO<sub>x</sub> および TiN に関して電荷注入能力および耐久性(数時間の電荷注入)の観点から比較検討を行い、TiN が Pt 以上の電荷注入能力を有しかつ耐久性があることが明らかになった。

A. 研究目的

本研究の目的は、脈絡膜上経網膜刺激 (STS: Suprachoroidal Transretinal Stimulation) に適した実装方式の開発と高効率電極材料の探索である。

今年度は、昨年度提案しその基本実証を行った分散型電極のフリップチップ実装方式について、実際に試作を行い、*in vitro* および *in vivo* 実験を実施しその有効性を実証する。また電極材料については昨年度 IrO<sub>x</sub> の LSI 上への形成を試みたが、今年度は TiN も含めてより電荷注入能力と耐久性が高い電極材料の探索を行う。

B. 研究方法と結果

(1) フリップチップ実装型 LSI マイクロチップベース分散型刺激電極アレイの動作実証

昨年度再現性と信頼性が高いフリップチップ実装方式を考案した。今年度は作製プロセスの確立を行い、試作デバイスの生理食塩水中での連続電流注入動作および家兎埋植による動作実証を行った。

本デバイスは多数の Si-LSI マイクロチップをフレキシブル基板上に分散配置することで、機械的に柔軟でかつ 100 点以上の刺激が可能な方式である。図 1 はマイクロチップのブロックダイアグラムである。マイクロチップへは電源 (Vdd と GND) 以外に 2 本の入力線 CTRL と STIM のみである。STIM は刺激電流を受取る端子である。CTRL はデータ線であり、10 ビットのアドレス信号が送られる。各マイクロチップには 10 ビットのアドレスバッファが内蔵されており、上位 6 ビットでチップの指定を下位 4 ビットでチップ内の 9 個の電極の内 1 個が活性化するように指定される。この活性化電極が STIM ラインに接続され外部からの刺激電流を出力することになる。なお本システムでは合計で 2<sup>6</sup> チップ×9 個/チップ=576 個の電極を制御可能である。チップは 0.35μm 標準 CMOS プロセスで試作を行い、図 2 に示すようにマイクロチップを 16 個搭載したマザーチップとして設計を行った。マイクロチップのサイズは 600μm 角とした。

刺激デバイス上にはマイクロチップを図 3 に示すような

分散配置した形状とした。4 本の配線 (VDD, GND, STIM, CTRL) は垂直方向に配線されている。水平方向には配線がないため、縦方向に分離することも可能である。

試作デバイスプロセスフローを図 4 に示す。まずマイクロチップが形成された Si-LSI マザーチップのマイクロチップの拾遺に溝を形成し(a)、マイクロチップパッドに Au バンプを形成する(b)。別途ポリイミドフレキシブル基板に Pt 刺激電極を形成し、その反対側に開口を形成する(c)。開口はポリイミド基板内部の配線部分へのパイアホールとなる。次にマザーチップとこのポリイミド基板をフリップチップボンディングする(d)。これによりマイクロチップとポリイミド基板内配線とが電気的に接続される。次に裏面研磨によりマイクロチップに分離する(e)。マイクロチップ裏面を樹脂により包埋裏打ちフィルムを貼りデバイスを完成させる(f)。

試作デバイスの外観写真を図 5 に示す。分散配置することで屈曲可能な柔軟性を確保できている。

試作デバイスを生理食塩水中で動作させその有効性を確認した。図 6 は動作結果をまとめたものである。繰返し周期は 1kHz で cathodic-first biphasic pulse で cathodic-, anodic-, inter-pulse の幅は同一とした。報告されている Pt の注入電荷量とほぼ同程度の値であった。また生理食塩水中で 2 週間ほどの動作を確認し、本実装方式での水密性を確認できた。

本フリップチップ方式の有効性を確認するためにマイクロチップと同一サイズの Si ダミーチップを用いて動物埋植実験を行った。Si ダミーチップを用いて上述と同じ実装プロセスを行い、刺激デバイスを試作した。Si ダミーチップ上には IrO<sub>x</sub> 刺激電極を形成した。試作デバイスを家兎眼球強膜ポケットに埋植し STS 方式で刺激を行い、BEP (Electrical Evoked Potential) 取得実験を実施した。図 7 は測定した BEP 信号である。100μA 程度のしきい値で BEP が取得できた。

更に高密度実装の可能性を示すモックアップを試作した。図 8 は最大電極数である 576 個の電極を搭載した分散型刺激デバイスである、また垂直方向にスリットを

入れることで、このような大面積デバイスの場合の屈曲性を確保した。図9は垂直方向にスリットをいれたデバイスを人の眼球と同程度の大きさを持つ球に密着させた写真であり、スリットを入れたことで1方向だけでなく2方向への曲げが可能となっていることがわかる。

## (2) 高効率電極材料の探索

Pt, IrO<sub>x</sub> と TiN の評価用薄膜電極アレイをスパッタリングにより作製した。電極形状を図10に示す。Au配線ポリイミド基板上に300μmφ Pt薄膜電極を8個形成し、その上にIrO<sub>x</sub>あるいはTiNをスパッタ成膜した。電気的性能評価と、電位窓を超えない範囲で双極電流パルスを入力できる安全な電流域を見積もることを目的とし、サイクリックボルタンメトリー(CV)測定と、双極電流パルス注入実験を行った。また、1時間通電した前後で電極表面の形態観察をSEMにより行った。

電荷注入能力を測る指標をCV測定結果の電流密度(@0.6V)とすると、薄膜電極における最大電流密度の関係として、Pt(0.226mA/cm<sup>2</sup>) < TiN(0.623mA/cm<sup>2</sup>) < IrO<sub>x</sub>(11.7mA/cm<sup>2</sup>)を得た。ただし形態観察において、図11(a)のTiNは通電前後で表面形態に変化がなかったのに対し、最も電荷注入能力の高かった図11(b)のIrO<sub>x</sub>は通電後に表面が剥離しており、耐久性が劣ることがわかった。IrO<sub>x</sub>では電荷注入能力と耐久性に相関があり、スパッタ条件の最適化が必要であることがわかった。TiNでは、電荷注入能力はIrO<sub>x</sub>に及ばなかったが優れた耐久性を示すことが明らかになった。これらの結果より、Pt電極に代わる刺激電極としてIrO<sub>x</sub>, TiN薄膜電極が有力であることを確認した。

## C. 考察

フリップチップ実装方式の有効性を*in vitro*および*in vivo*で実証することができた。今後はより再現性・信頼性ともに高い実装方式を目指していく必要がある。また動物実験でのEEP取得に成功したがダミーチップを用いた実験であり、分散型の特徴である任意電極の刺激は実現できていない。今後はSi-LSIマイクロチップ実装によるデバイスによる動物埋植実験を行う必要がある。電極材料に関してはTiNが有望であることを実証できたが、電荷注入能力が高いIrO<sub>x</sub>もまだ完全にスパッタ条件を詰めきっていないと言いがたく、最適化を更に検討し、最終的な判断を下す必要がある。またTiNもまだ最適な成膜条件には至っておらず今後引き続き検討をする必要があることと、Si-LSI上への形成方法を考案する必要がある。

## D. 結論

高密度刺激電極アレイを再現性良く実現できる分散型刺激電極デバイスの実装方式であるフリップチップ実装方式に基づき刺激デバイスを試作し、生理食塩水中での動作を確認した。またダミーチップを用いた本実装方式に基づくデバイスを家兎眼球強膜ポケットに埋植し、EEP信号を取得することに成功し、その有効性を実証した。Pt, IrO<sub>x</sub>, TiN電極材料について検討を行い、TiNが耐久性と電荷注入能力の観点から有望であることを確認した。

## E. 健康危険情報

なし。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- [1] 山本 真也, 香川 景一郎, 古宮 哲夫, 徳田 崇, 布下 正宏, 太田 淳, “32×32 画素キャパシティブフィードバックリセット型パルス周波数変調方式低電圧ビジョンチップの試作と評価”, 映像学会誌 60(4), 621-626, 2006
- [2] T. Furumiya, S. Yamamoto, K. Kagawa, T. Tokuda, M. Nunoshita, J. Ohta, “Optimization of electrical stimulus pulse parameter for low-power operation of a retinal prosthetic device,” Jpn. J. Appl. Phys. 45(19), L505 - L507, 2006.
- [3] D. C. Ng, T. Furumiya, K. Yasuoka, A. Uehara, K. Kagawa, T. Tokuda, M. Nunoshita, J. Ohta, “Pulse Frequency Modulation-based CMOS Image Sensor for Subretinal Stimulation,” IEEE Trans. Circuits and Systems II 53(6), 487-491, 2006.
- [4] J. Ohta, T. Tokuda, K. Kagawa, T. Furumiya, A. Uehara, Y. Terasawa, M. Ozawa, T. Fujikado, Y. Tano, “Silicon LSI-Based Smart Stimulators for Retinal Prosthesis,” IEEE Eng. Medicine & Biology Magazine 25(5), 47-59, 2006.
- [5] T. Tokuda, S. Sugitani, M. Taniyama, A. Uehara, Y. Terasawa, K. Kagawa, M. Nunoshita, J. Ohta, “A CMOS LSI-based multi-chip flexible neural stimulation device with embedded bulk Pt electrodes,” Electron. Lett., accepted.
- [6] J. Ohta, T. Tokuda, K. Kagawa, S. Sugitani, M. Taniyama, A. Uehara, Y. Terasawa, K. Nakauchi, T. Fujikado, Y. Tano, “Laboratory Investigation of Microelectronics-Based Stimulators for Large-Scale Suprachoroidal Transretinal Stimulation (STS),” J. Neural Eng., accepted.
- [7] T. Tokuda, S. Sugitani, M. Taniyama, A. Uehara, Y. Terasawa, K. Kagawa, M. Nunoshita, Y. Tano, J. Ohta, “Fabrication and validation of a multi-chip neural stimulator for in vivo experiments toward retinal prosthesis,” Jpn. J. Appl. Phys., accepted.

### 2. 総説・著書

- [1] 太田 淳, 「人工視覚チップの最前線」光アライアンス 17(11), 7-11, 2006.
- [2] 太田 淳(分担執筆)「超五感センサの最前線」2.1.4 人工視覚デバイス, pp. 45-55, エヌ・ティイー・エス, 2005.

### 3. 学会発表

- [1] J. Ohta, T. Tokuda, K. Kagawa, A. Uehara, Y. Terasawa, K. Shodo, T. Fujikado, Y. Tano, “Toward 1000-ch electrode array based on distributed microchip architecture for retinal prosthesis,” IEEE Int'l Symposium on Circuits and Systems (ISCAS), 2006.
- [2] J. Ohta, T. Tokuda, K. Kagawa, A. Uehara, Y. Terasawa, K. Shodo, T. Fujikado, Y. Tano, “Large-scale Electrode Array Based On Distributed Microchip Architecture For Suprachoroidal Transretinal Stimulation,” ARVO Annual Meeting,

2006.

- [3] J. Ohta, "Microelectronics-based Stimulators for STS," *The Eye and The Chip*, 2006.
- [4] J. Ohta, T. Tokuda, S. Sugitani, M. Taniyama, M. Nunoshita, A. Uehara, Y. Terasawa, Y. Tano, "Large scale electrode array based on distributed microchip architecture for retinal prosthesis," *Int'l Conf. Solid State Devices & Materials (SSDM2006)*, 896, 2006.
- [5] J. Ohta, "Nanotechnology -Impact on Electronics, Photonics, and Biology-," *Int'l Conf. Solid State Devices & Materials (SSDM2006)*, 2006.
- [6] J. Ohta, T. Tokuda, K. Kagawa, A. Uehara, Y. Terasawa, K. nakauchi, T. Fujikado, Y. Tano, "A large scale electrode array of microchip-based stimulator for suprachoroidal transretinal stimulation," *Shanghai Int'l Conf. Physiological Biophysics (SICPB)*, 146, 2006.
- [7] T. Tokuda, M. Kawada, S. Sugitani, M. Taniyama, A. Uehara, K. Kagawa, M. Nunoshita, J. Ohta, "A Multi-Chip-Architecture Based Flexible Stimulation Device for Retinal Prosthesis with a Flip-Chip Packaging Technique," *EMBC*, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

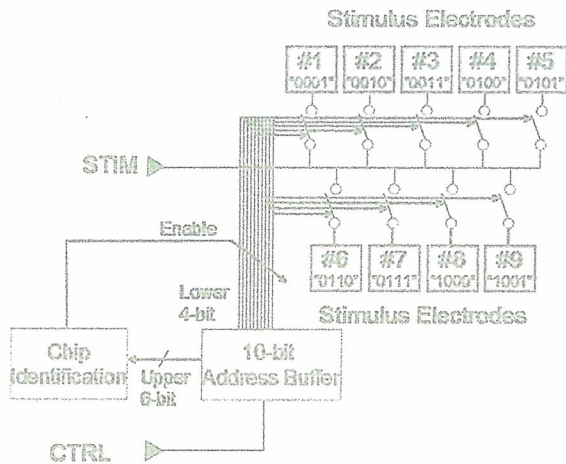


図1: マイクロチップブロックダイアグラム.

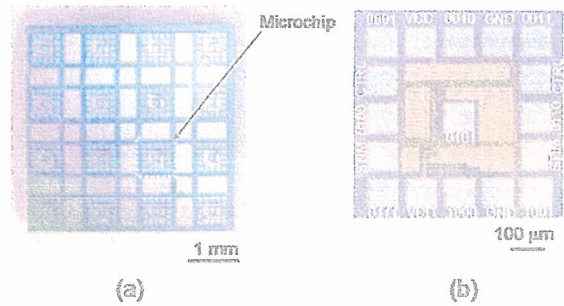


図 2: 試作マザーチップ(a)とダイシングしたマイクロチップ(b)の表面写真.

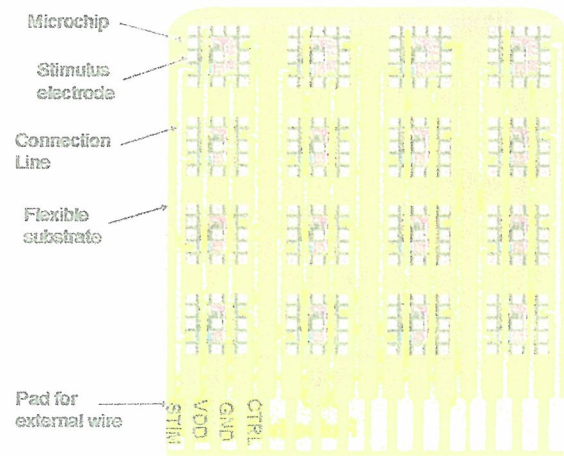


図 3: 4×4 マイクロチップ配置刺激電極.

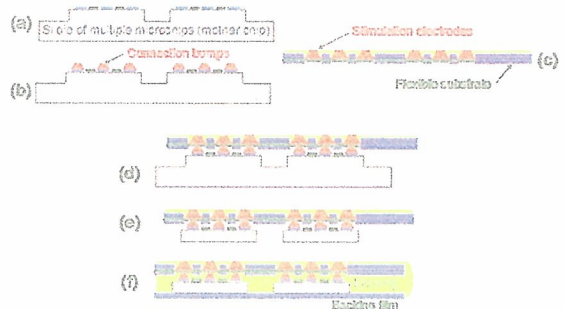


図 4: フリップチップ方式刺激デバイスの実装プロセスフロー.

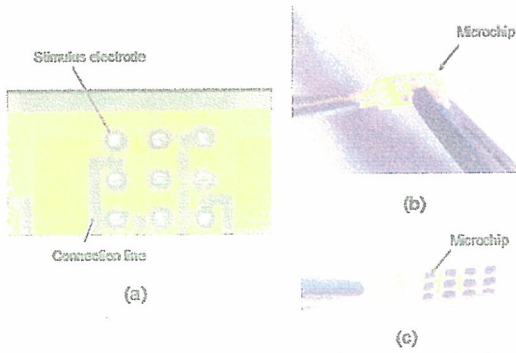


図 5: 試作刺激デバイス写真. (a) 電極部拡大写真, (b) 表面. 屈曲性があることを示す. (c) 裏面.

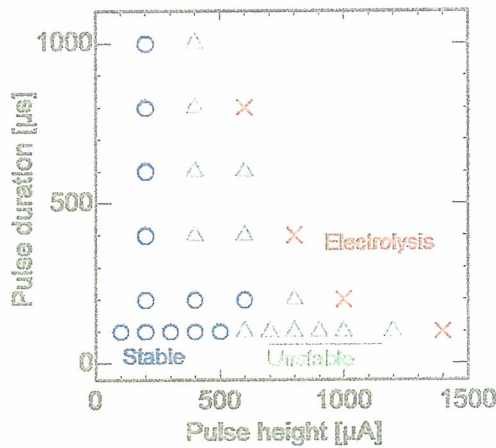


図 6: 生理食塩水中での刺激デバイス動作.

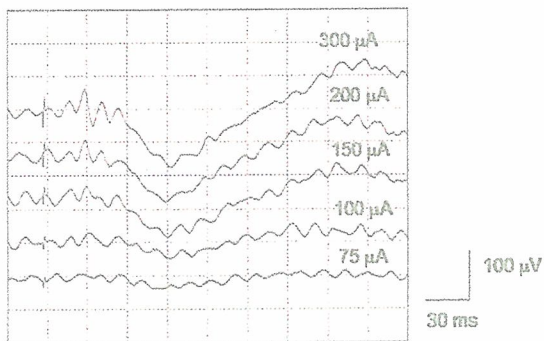


図 7: EEP 実験結果.

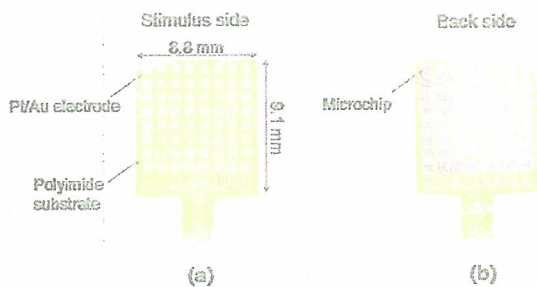


図 8: 576 電極搭載モックアップ写真. (a) 刺激電極面, (b) 裏面 (マイクロチップ搭載面).

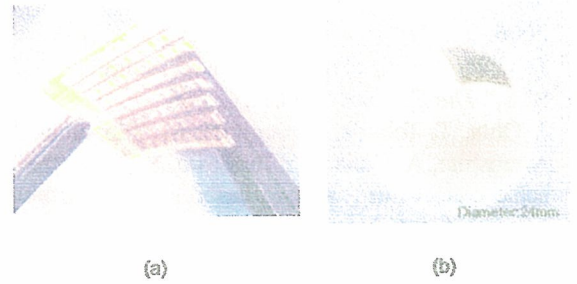


図 9: 576 モックアップ写真. (a) 垂直スリットにより 3 次元的な屈曲性確保. (b) 人眼球に沿う柔軟性.

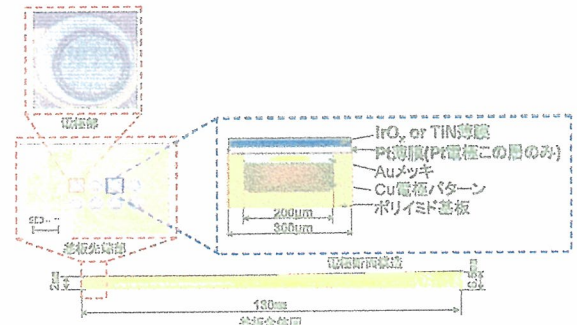


図 10: 電極材料評価用デバイス外観.

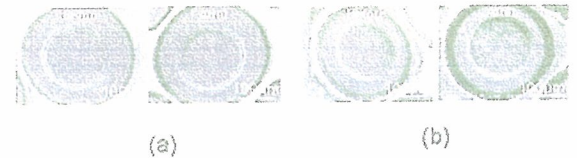


図 11: TiN 薄膜電極と IrOx 薄膜電極の通電前後の表面形態.