

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 16 年度～18 年度 総合研究報告書

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 16 年度～18 年度 総合研究報告書

主任研究者 田野 保雄

平成 19 (2007) 年 4 月

目次

I. 総合研究報告	
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
	田野 保雄
(分担研究者：大路 正人、平形 明人、三宅 養三、近藤 峰生)	
II. 分担研究報告	
1. 網膜の精密評価システムの開発	12
	不二門 尚
2. 網膜刺激電極の視覚中枢における機能評価の研究	24
	福田 淳 澤井 元
3. 網膜刺激型電極のデバイスの開発	33
	太田 淳
4. 網膜刺激型電極のトータルシステムの開発	39
	小澤 素生
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	48
III. 研究成果の刊行物・別刷	50

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害事業）
総合研究報告書

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

主任研究者 田野 保雄 大阪大学大学院医学系研究科眼科学 教授

研究要旨

高齢化社会を迎え、加齢黄斑変性や、網膜色素変性などで社会的失明に到る患者の数が増加し、高齢者の QOL 維持に大きな問題になっているが、視細胞の機能が喪失した網膜色素変性および陳旧性の加齢黄斑変性の症例に対しては、これまで有効な治療法がなかった。このような場合でも、多くの場合網膜内層の細胞は残存しており、網膜を電気刺激すると、擬似視覚を感じ得ることはこれまでのわれわれの研究で明らかにされている。

本研究では、このような失明眼の眼内に網膜刺激電極を埋め込み、網膜神経節細胞を電氣的に刺激することで視覚機能再生を目指した、「網膜刺激型電極による人工視覚」の研究開発を行なった。本プロジェクトでは、2006 年に眼前指数弁程度の人工視覚を急性の動物実験で獲得することを目標とした。研究は、コンソーシアムを組み、眼鏡に取り付けられた撮像装置（CCD カメラ）、画像処理システム、送信装置、送電装置（1 次コイル）からなる体外装置と 2 次コイル、受信装置、パルス発生装置、脈絡膜上腔に置かれた刺激電極からなる体内装置の開発を工学側が行い、刺激電極の生体適合性、侵襲の少ない術式の開発、電極刺激により得られる視覚機能の評価、電気刺激による神経細胞の保護などの研究を医学側の研究者が、並行して緊密に連絡をとりながら行う方式をとった。動物実験は動物愛護の精神に基づき、片眼のみに手術操作を行い、臨床研究は患者様のプライバシーに十分配慮し、学内の倫理委員会の許可を得た上で行った。

先行する 3 年間（2001 年－2003 年）の人工網膜研究において、われわれは本邦独自の方式である脈絡膜上－経網膜刺激方式（STS 方式）を開発し、この方式による人工視覚システムで、盲目ラット（RCS ラット）、家兎、およびネコにおいて人工視覚が得られることを実証した。また、視神経に対する電気刺激が網膜神経節細胞に対して保護的な作用を持つことも明らかにしてきた。本研究機関（2004 年－2006 年）においては、この STS 方式による人工視覚システムを、慢性の動物実験において、臨床試験が開始できる直前の状態の、完成度が高いものになることを目指した。

1 年目（2004 年）には、Au-Pt バンプ方式によるフレキシブルな刺激電極を開発し、これを慢性的に家兎強膜に埋め込んで STS 方式による電気刺激した結果、有効性、安全性が保たれていることを示した。また、STS 方式によるネコを用いた空間分解能の研究では、本プロジェクトが目標とする指数弁程度の分解能が得られることが確認された。また、視細胞変性ラットに対して、経角膜的に網膜を電気刺激すると、視細胞に対しても神経保護

効果があることが示唆された。2年目（2005年）には、家兎に対して二週間の連日一時間刺激を行い、直径200 μ mの白金電極を使用した場合、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であることを確かめた。また、正常人に対して、STS法により同じ電荷量で擬似視覚を誘起する場合の、最適の刺激パラメータを求めた（2相性矩形波、パルス数 ≥ 10 、パルス幅0.5-1.0 msec 周波数20-50 Hz）。この刺激パラメータを用いて、失明した網膜色素変性患者2名に対して、STS方式による人工網膜を用いた急性臨床試験を行った（9極電極、 $\phi = 200\mu\text{m}$ 、電極間距離：1mm）。その結果、0.4-0.5mAの電流値で2点弁別が可能な人工視覚が得られることが確認された。3年目（2006年）には、STS方式による慢性埋め込み可能な、人工網膜のトータルシステムの開発を進めるとともに、臨床応用に向けて、最適の刺激パラメータの更なる検討を行い、内向き刺激相を先行させた0.2~0.6msec/phaseの二相性刺激が高効率で低消費電力であることが示唆された。残存する視細胞の画像診断法、および電極による網膜賦活部位の機能的画像診断法の確立、中型動物での網膜色素変性モデルの確立を行った。補償光学（Adaptive Optics）を用いた高精細眼底カメラでは、黄斑ジストロフィー一症例で視細胞の変性を直接示す所見が得られた。ネコ網膜における光学的機能画像では、STS法により2次元的な網膜賦活部位が示され、閾値電流値では賦活部位が視角約2度程度に限局していることが示された。ロドプシン遺伝子にPro347Leu変異を導入したトランスジェニックウサギ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おり、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が確認された。

以上をまとめると、本研究で独自に開発された人工網膜の方式であるSTS法を用いて、進行した網膜色素変性患者に対して、安全な電流値である0.7mA未満の電流で2点弁別可能な擬似光覚を誘起可能であることが、急性の臨床試験で確認された。このことは、本方式による人工視覚システムが実用化可能であることを示唆するものである。今後は長期に埋植可能なSTS方式によるトータルな人工網膜システムを開発し、安全性および有効性を慢性の動物実験で確かめた上で、臨床的に用いることができるようにさらに研究を進める必要がある。

分担研究者

不二門尚	大阪大学大学院医学系研究科 感覚機能形成学教授（2004-2006）	太田 淳	奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学教授（2004-2006）
福田淳	大阪大学大学院医学系研究科 情報生理学 教授（2004）	三宅養三	名古屋大学大学院医学系研究科 眼科学 教授（2004）
澤井元	大阪大学大学院医学系研究科 情報生理学 助教授（2005-2006）	近藤峰生	名古屋大学大学院医学系研究科 眼科学 助教授（2004-2006）

平形 明人 杏林大学医学部 眼科学 教授
(2004-2006)

大路西人 滋賀医科大学 眼科学 教授
(2004-2006)

八木 哲也 大阪大学大学院工学研究科
電子工学専攻 教授 (2004-2006)

小沢 素生 (株)二デック副社長 (2004-2006)
西村 茂 (株)二デック東京研究センター
所長 (2004-2005)

A. 研究目的

高齢化社会を迎え、加齢黄斑変性や、網膜色素変性などで社会的失明に到る患者の数が増加し、高齢者の QOL 維持に大きな問題になっているが、視細胞の機能が喪失した網膜色素変性および陈旧性の加齢黄斑変性の症例に対しては、これまで有効な治療法がなかった。このような場合でも、多くの場合網膜内層の細胞は残存しており、網膜を電気刺激すると、擬似視覚を感じ得ることはこれまでのわれわれの研究で明らかにされている。

本研究では、このような失明眼の眼内に網膜刺激電極を埋め込み、網膜神経節細胞を電氣的に刺激することで視覚機能再生を目指した、「網膜刺激型電極による人工視覚」の研究開発を行なった。本プロジェクトでは、2006 年に眼前指数弁程度の人工視覚を急性の動物実験で獲得することを目標とした。

先行する 3 年間 (2001 年-2003 年) の人工網膜研究において、われわれは本邦独自の方式である脈絡膜上-経網膜刺激方式 (STS 方式) を開発し (図 1)、この方式による人工視覚システムで、盲目ラット (RCS ラット)、家兎、およびネコにおいて人工視覚が得られることを実証した。また、視神経に対する電気刺激が網膜神経節細胞に対して保護的な作用を持つことも明らかにしてきた。本研究機関 (2004 年-2006 年) においては、この STS 方式による人工視覚システムを、慢性の動物実験において、臨床試験が開始できる直前の状態の、完成度が高いものになることを目指した。

研究は、電極および信号処理回路の開発を工学側の研究者が行い、術式の開発、網膜刺激電極の

生体適合性、電極刺激により得られる視覚機能の評価、残存する網膜神経細胞の保護などの研究を医学側の研究者が、並行して緊密に連絡をとりながら行うこととした。動物実験は動物愛護の精神に基づき、片眼のみに手術操作を行い、臨床研究は患者様のプライバシーに十分配慮し、学内の倫理委員会の許可を得た上で行うこととした。

1 年目は、刺激電極を半慢性的に埋植し、STS 方式による電気刺激を行った場合の安全性、有効性を、家兎を用いて検討した。また、STS 方式で得られる空間分解能を、ネコを用いて検討した。さらに、網膜を電気刺激した場合の、視細胞に対する影響を視細胞変性ラットに対して経角膜電気刺激を行うことで検討した。

2 年目で、正常人に対して、STS 法により同じ電荷量で擬似視覚を誘起する場合の、最適の刺激パラメータを求め、この刺激パラメータを用いて、失明した網膜色素変性患者 2 名に対して、STS 方式による人工網膜を用いた急性臨床試験を行い、網膜変性が進行した場合でも STS 法が有効であるかを検討した。

3 年目 (2006 年) には、残存する視細胞の画像診断法および電極による網膜賦活部位の機能的画像診断法の確立、中型動物での網膜色素変性モデルの確立を行った。

B. 研究方法

2004 年度

1. 術式開発および生体適合性: 家兎に STS 方式で、十分な振幅の EEP が得られる電流値 (100 μ A) で、2 週間毎日 1 時間刺激した場合の EEP の振幅および電極インピーダンスを測定し、また組織学的検討も行った。

2. 視覚中枢における機能評価：1点電極で受容野近傍の網膜部位を刺激した場合の神経活動を、ネコ外側膝状体での単一細胞記録により測定し、電流の拡がりや発火頻度の関係を検討した。

3. 網膜神経節細胞の神経保護：経角膜的に網膜を電気刺激すると、視細胞に対しても神経保護効果があるかどうかを、遺伝的に視細胞が変性するRCSラットに対して、網膜電位図(ERG)を用いて電気生理学的に、また外顆粒層(ONL)の厚みで組織学的に検討した。

2005年度

1. 術式開発および生体適合性：家兎にSTS方式で、実際に臨床で用いる予定の直径200 μ mの電極を埋植し連日1時間、2週間の通電を行い、検眼鏡所見および蛍光眼底所見を検討した。

2. 視覚中枢における機能評価：1点電極で受容野近傍の網膜部位を刺激した場合の神経活動を、ネコ外側膝状体での単一細胞記録により測定し、電流の拡がりや発火頻度の関係を検討した。また、網膜を閾値電流値で刺激した場合の、モルモット視覚野における興奮部位を、電位感受性色素を用い検討した。

3. STS方式による刺激電極の急性臨床試験：進行した網膜色素変性の2例2眼(視力光覚弁)に対して、大阪大学医学部倫理委員会の承認を得た上で、十分な説明と同意の上、STS方式による刺激電極の急性臨床試験を施行した。白金球電極を用い、低い電流値でphospheneが生じる黄斑部耳側の強膜部位を探索し、その部位に5x5mmの強膜ポケットを作成し、9点電極(4x5mm)を挿入した。さらに硝子体内に白金線電極(ϕ 0.1mm)を設置し、両電極間に2相性矩形波(パルス幅0.5又は1.0ms, 周波数20Hz, パルス数20)を通電し、自覚的な見え方についてインタビューを行い、STS方式の人工視覚の有効性に関して検討した。

2006年度

1. 術式開発および生体適合性：STS方式を用

い、安全でより効率のよい刺激パラメータを見出す目的で、運動系のリハビリ(機能的電気刺激(FES))で用いられている、非対称性パルスを用い、網膜を刺激した場合の組織損傷閾値を検討した。また、分散型刺激電極アレイを1ヶ月間の埋植した眼の組織像を観察した。

2. 網膜神経細胞の機能的、解剖学的評価システムの開発：波長780nmより長波長の近赤外光を用い、反射光量の変化を計測する網膜の機能的イメージング法により、STS法による電極刺激で網膜が興奮する範囲(ネコ)を検討した。また、補償光学を用いた超高精度の眼底カメラを開発し、黄斑変性の症例の網膜の視細胞を計測した。

5. 網膜刺激電極および信号処理システムの開発：網膜下電極として、大面積化・大規模アレイ化が可能な分散型刺激電極方式を新たに考案し、その基本実証を行った。体外装置から体内装置へ無線で電力およびデータの送信を行い、体内装置から16極で電流刺激ができるシステムを開発した。

3. 中型動物による網膜変性モデルの作成

ヒトにおいて網膜色素変性の原因となる遺伝子変異の一つ(ロドプシンPro347Le変異)を導入したベクターを構築し、これを高純度に精製して、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した。

C. 研究結果

2004年度

1. 術式の開発および生体適合性：家兎にSTS方式で、100 μ Aの電流値で2週間毎日1時間刺激した場合、最終的なEEPの振幅および電極インピーダンスに大きな変化はなく、また組織学的検討においても変化はみとめられなかった。これらの結果は、STS方式による人工網膜で慢性的に刺激した場合の安全性を示唆する。

2. 視覚中枢における機能評価：1点電極で受容野近傍の網膜部位を刺激した場合の神経活動を、ネコ外側膝状体での単一細胞記録により測定し、電流の拡がりや発火頻度の関係を検討した。

低い電流値（100 μ A）で受容野近傍の網膜部位を刺激した場合、高頻度に神経が発火するのは、受容野の中心から視角2度以内程度に電極が設置された場合であった。これは、本プロジェクトが目標とする指数弁程度の分解能が、STS方式の人工網膜で得られることを示唆する。

3. 網膜神経節細胞の神経保護：網膜電位図（ERG）を用いた検討では、電気刺激を行った網膜は、電気刺激していない網膜に比べて、光に対する反応が大きく、網膜機能の低下が遅延していた。また、視細胞の核が存在する外顆粒層（ONL）の厚みを電気刺激群と非電気刺激群で比較した結果、電気刺激群の網膜のONL厚は、有意に厚かった。以上の結果から、網膜電気刺激は視細胞に対しても神経保護効果があることがわかった（図2）。

2005年度

1. 術式開発および生体適合性：検眼鏡所見および蛍光眼底所見に0.7mAの通電では変化はなかったが、1mAの通電では検眼鏡的に変化は無かったが、蛍光眼底所見でwindow defectが見られた。組織学的には、電極を埋植した強膜周囲に組織反応が見られた。網膜には、明らかな組織学的変化は認められなかった。走査型電子顕微鏡による電極の変化の検討では、1mAの刺激で電極周辺部が侵食されている像が見られた。これらの結果から、STS法による直径200 μ mの電極刺激においては、刺激電流の安全閾値は0.7mAと考えられた（図3）。

2. 視覚中枢における機能評価：発火頻度の中央値の半値半幅の電流値で刺激される網膜部位は、視角2度以内（半径）であった。また、網膜を閾値電流値で刺激した場合の、モルモット視覚野における興奮部位を、電位感受性色素を用い検討したところ、広がり視角2°以下であった。これらは、本プロジェクトが目標とする指数弁程度の分解能が、STS方式の人工網膜で得られることを示唆する（図1B）。

3. STS方式による刺激電極の急性臨床試験：症例1では0.3~0.5mA（0.5ms）、症例2では0.4

mA（1.0ms）程度の刺激強度で限局したphospheneが生じた。隣り合う2極の電極で同時に刺激すると二つの独立したphosphene又は、ひょうたん型のphospheneが生じることがあった。2極の組み合わせを変えて刺激した場合、症例1では方向の違いを感知した。以上の結果は、STS法による刺激電極で、重症の網膜色素変性症患者に対しても2点弁別が可能な人工視覚が得られることを示唆し、この方式による人工網膜臨床応用の可能性があることを推察された（図4）。

2006年度

1. 術式開発および生体適合性：非対称性パルスで網膜を刺激した場合、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。今回用いた刺激装置を詳細に検討すると、プラス側とマイナス側の電流で、わずかに電荷の不均衡が起こっていることが確認され、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。分散型刺激電極アレイの外側に多くの炎症細胞が観察されたが、網膜に明らかな病的所見は観察されなかった。強膜挿入が強膜浅層にあり、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、さらなる改良が必要と考えられた。

2. 網膜神経節細胞の機能的、解剖学的評価：STS刺激により、反射光量に変化した網膜の面積は、外側膝状体での誘発電位と相関することから、反射光量の変化部位は、網膜の神経活動に関係することが示唆された。従って閾値電流値で反射光量に変化する、視角約2°程度の網膜部位は、STS刺激で賦活される網膜部位であることが示された。本法は、慢性埋め込み型の人工網膜トータルシステムの機能評価に有用と考えられた。また、黄斑変性の症例の網膜の視細胞を、補償光学を用いた超高精度の眼底カメラにより計測すると、変性部位において、視細胞の変性したが画像が得られ、人工網膜の移植部位を決定する上で有用と考

えられた。

3. 中型動物による網膜変性モデルの作成

得られたトランスジェニックウサギ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おり、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が確認された(図5)。

D. 考按

先行する3年間(2001年-2003年)の人工網膜研究において、われわれは本邦独自の方式である脈絡膜上-経網膜刺激方式(STS方式)を開発し、この方式による人工視覚システムで、盲目ラット(RCSラット)、家兎、およびネコにおいて人工視覚が得られることを実証した。また、視神経に対する電気刺激が網膜神経節細胞に対して保護的な作用を持つことも明らかにしてきた。本研究機関(2004年-2006年)においては、このSTS方式による人工視覚システムを、慢性の動物実験において、臨床試験が開始できる直前の状態の、完成度が高いものになることを目指した。

2004年度の研究では、ネコを用いた急性実験で、STS方式により、本プロジェクトが目標とする指数弁程度の分解能が得られることが確認された。また、視細胞変性ラットに対して、経角膜的に網膜を電気刺激すると、視細胞に対しても神経保護効果があることが示唆された。

2005年には、家兎に対して二週間の連日一時間刺激を行い、直径200 μ mの白金電極を使用した場合、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であることを確かめた。また、正常人に対して、STS法により同じ電荷量で疑似視覚を誘起する場合の、最適の刺激パラメータを求めた(2相性矩形波、パルス数 ≥ 10 、パルス幅0.5-1.0 msec 周波数20-50 Hz)。この刺激パラメータを用いて、失明した網膜色素変性患者2名に対して、STS方式による人工網膜を用いた急性臨床試験を行った(9極電極、 $\phi = 200\mu\text{m}$ 、電極間距離:1mm)。その結果、0.4-0.5mAの電流

値で2点弁別が可能な人工視覚が得られることが確認された。2006年には、STS方式による慢性埋め込み可能な、人工網膜のトータルシステムの開発を進めるとともに、臨床応用に向けて、最適の刺激パラメータの更なる検討を行い、内向き刺激相を先行させた0.2~0.6msec/phaseの二相性刺激が高効率で低消費電力であることが示唆された。残存する視細胞の画像診断法、および電極による網膜賦活部位の機能的画像診断法の確立、中型動物での網膜色素変性モデルの確立を行った。補償光学(Adaptive Optics)を用いた高精細眼底カメラでは、黄斑ジストロフィー症例で視細胞の変性を直接示す所見が得られた。ネコ網膜における光学的機能画像では、STS法により2次元的な網膜賦活部位が示され、閾値電流値では賦活部位が視角約2度程度に限局していることが示された。ロドプシン遺伝子にPro347Leu変異を導入したトランスジェニックウサギ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おり、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が確認された。

以上をまとめると、本研究で独自に開発された人工網膜の方式であるSTS法を用いて、進行した網膜色素変性患者に対して、安全な電流値である0.7mA未満の電流で2点弁別可能な疑似光覚を誘起可能であることが、急性の臨床試験で確認された。このことは、本方式による人工視覚システムが実用化可能であることを示唆するものである。今後は長期に埋植可能なSTS方式によるトータルな人工網膜システムを開発し、安全性および有効性を慢性の動物実験で確かめた上で、臨床的に用いることができるようにさらに研究を進める必要がある。

E. 結論

本研究(2004年-2006年)において、先行研究期間(2001年-2003年)に、独自に開発された人工網膜の方式である、脈絡膜上-経網膜電気

刺激方式（STS）の、有効性、安全性が確認された。空間分解能は、目標とした指数弁程度が得られることが確認され、また中期的な慢性埋込み実験において、0.7mA 程度の電流値であれば安全であることが実証された。急性の臨床試験では、重症の網膜色素変性患者において、STS方式で2点弁別が可能な人工視覚が得られることが示された。

今後は長期的に埋植可能なSTS方式によるトータルな人工網膜システムを、現行のシステムをさらに改良する形で作成し、安全性および有効性を本研究期間に作成した、網膜色素変性家兎を用いた慢性実験で確かめ、臨床的に用いることができるようにさらに研究を進める必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表（代表的なもの）

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;45:560-566.
2. 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;48:256-261.
3. 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.* 2005;243:169-174

4. Morimoto T, Miyoshi T, Matsuda S, Tano Y, Fujikado T, Fukuda Y.: Transcorneal electrical stimulation rescues axotomized retinal ganglion cells by activating endogenous retinal IGF-1 system. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.*2005;46:2147-2155.
5. Fujikado T, Kanda H, Kusaka S, Nakauchi K, Ozawa M, Matsushita K, Matsushita K, Sakaguchi H, Ikuno Y, Kamei M, Tano Y. Evaluation of phosphene by extraocular stimulation in normals and by suprachoroidal - transretinal stimulation in patients with retinitis pigmentosa. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, E-Pub,* 2007
6. 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.* 2007;4:S50-S57
7. 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
8. Fujikado T, Morimoto T, Matsushita K, Shimojo H, Okawa Y, Tano Y. Effect of Transcorneal Electrical Stimulation in Patients with Nonarteritic Ischemic Optic Neuropathy and Traumatic Optic Neuropathy *Jpn J Ophthalmol.* 2006;50: 266-273.
9. 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.
10. 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., in press.

11. Terasawa Y, Tashiro H, Uehara A, Saitoh T, Ozawa M, Tokuda T, Ohta J. "The development of a multichannel electrode array for retinal prostheses" J. of Art. Org., vol.9, No.4, pp.263-266, 2006.
12. Fujikado T, Sawai H, Tano Y, Artificial Vision: Vision of a Newcomer. In Artificial Sight, M. S. Humayun, J. D. Weiland, G. Chader and E. Greenbaum (Editors), Springer-New York, in press.
13. 田野保雄 視覚再生、日本の眼科 2006;77; 641-646

2. 学会発表 (代表的なもの)

1. 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, May 1, 2006, Fort Lauderdale, Florida, USA.
2. Y.Tano : Macular Surgery: From Here towards Artificial Vision. World Congress of Ophthalmology 2006.2.21. Sao Paulo, Brazil
3. Y.Tano: Artificial vision: A Vision to Come. Annual Meeting of Spanish Vitreo-Retinal Society 2006.3.17. Barcelona, Spain
- 4.Y.Tano: "George Theodossiadis Lecture" Artificial Vision: Vision of a Newcomer. 4th Hippocrates Meeting 2006.4.7. Thessaloniki, Greece
- 5.Y.Tano: Artificial vision: New ways. Frankfurt Retina Meeting 2006.4.22 Frankfurt, Germany
- 6.Y.Tano: Artificial vision: New ways. 15th Duke Advanced Vitrectomy Course 2006.4.29 Durham, N.C, U.S.A.
- 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 Intrasclearal Implants. The Japanese Retinal Implant Project. International Congress on Visual Prosthesis 2006.9.9. Bonn, Germany
- 10.Y.Tano: Artificial vision: Vision of a newcomer. Karlsruhe Retina Summit 2006.12.2. Karlsruhe, Germany

H. 知的財産権の出願・登録状況

- ①特願 2005-222027 「視覚再生装置」発明者 田野保雄、不二門尚、小澤素生
- ②特願2005-232878 「視覚再生補助装置」発明者：鐘堂健三，上原昭宏，太田淳，徳田崇
- ③特開 2004-229998 視覚再生補助装置.
- ④特開 2004-195206 生体組織刺激用電極の製造方法及び該方法にて得られる生体組織刺激用電極
- ⑤特願 2004-227491 整流回路及びこれを備えた視覚再生補助装置
- ⑥ 特願 2004-348154 視覚再生補助装置
- ⑦ 特開 2004-298298 視覚再生補助装置
- ⑧ 特開 2004-298299 視覚再生補助装置

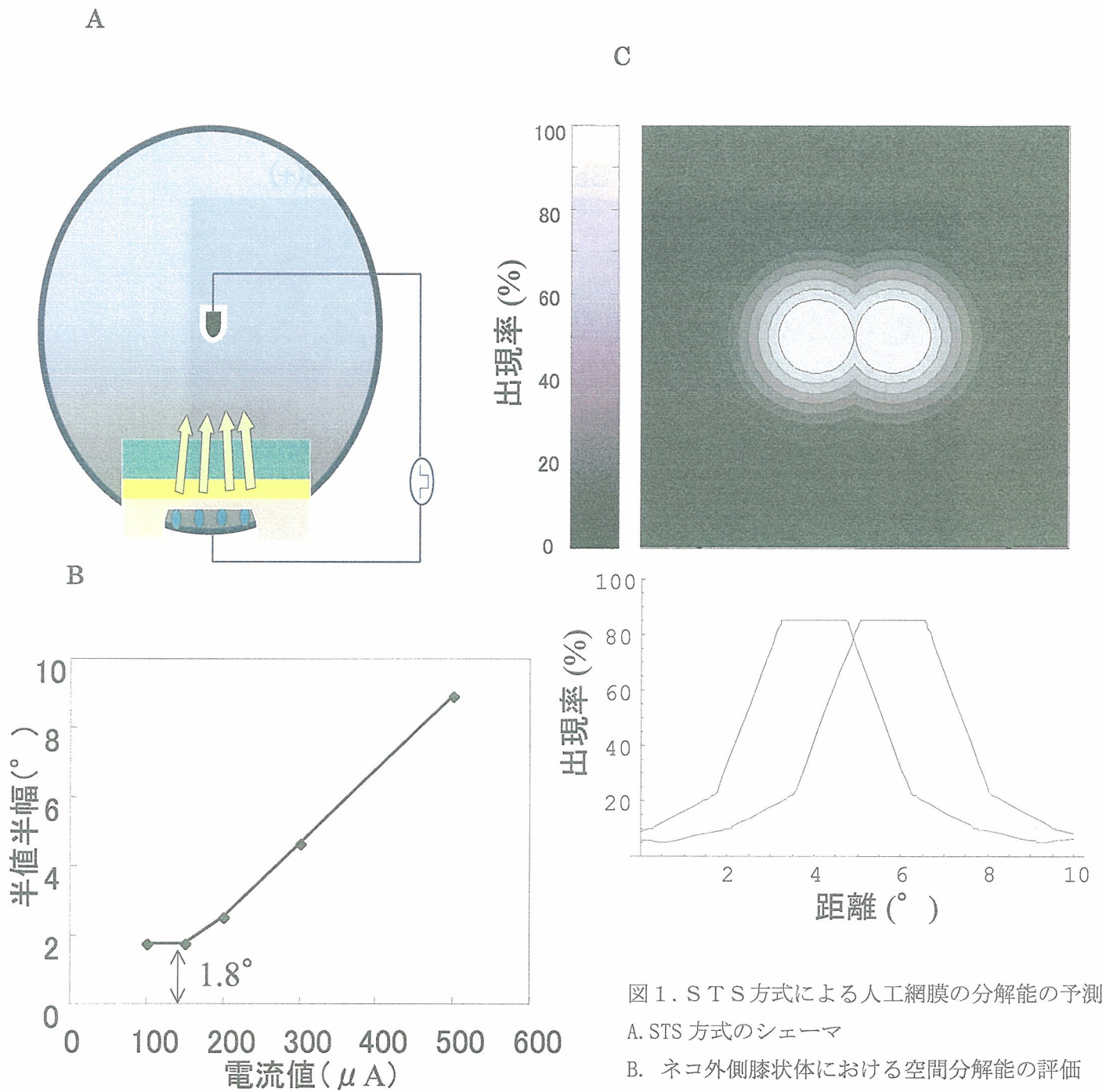


図1. STS方式による人工網膜の分解能の予測
 A. STS方式のシェーマ
 B. ネコ外側膝状体における空間分解能の評価
 C. 2点弁別のシェーマ

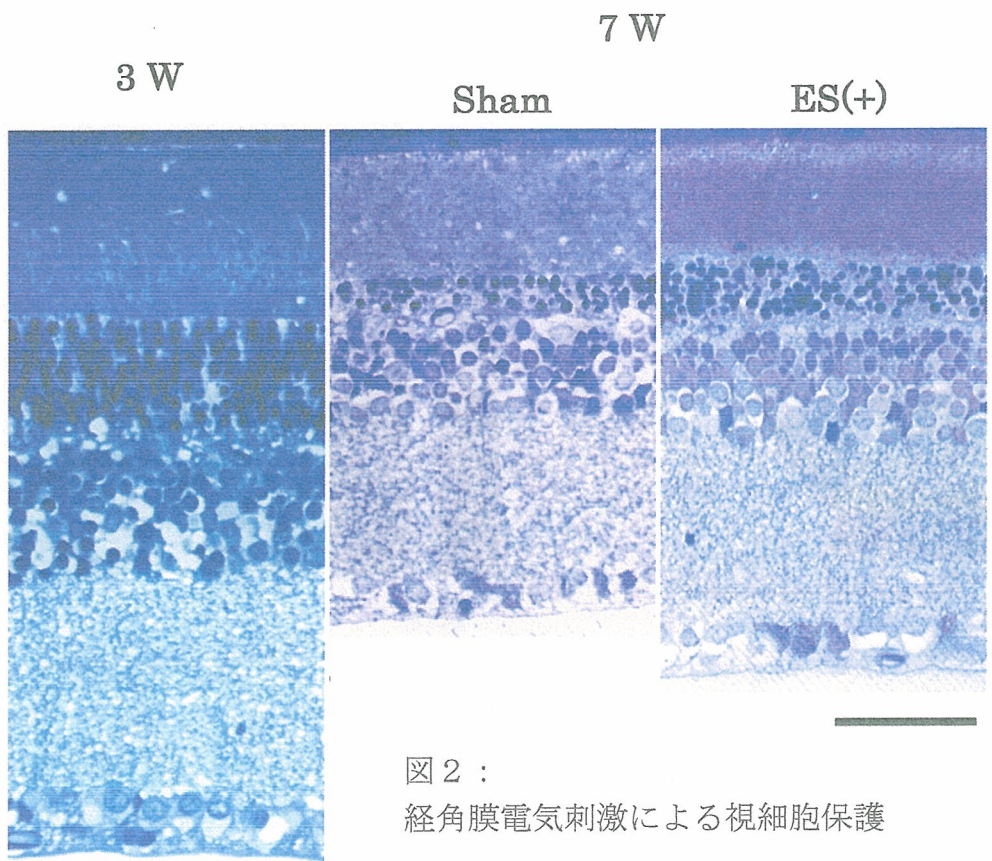


図 2 :
経角膜電気刺激による視細胞保護

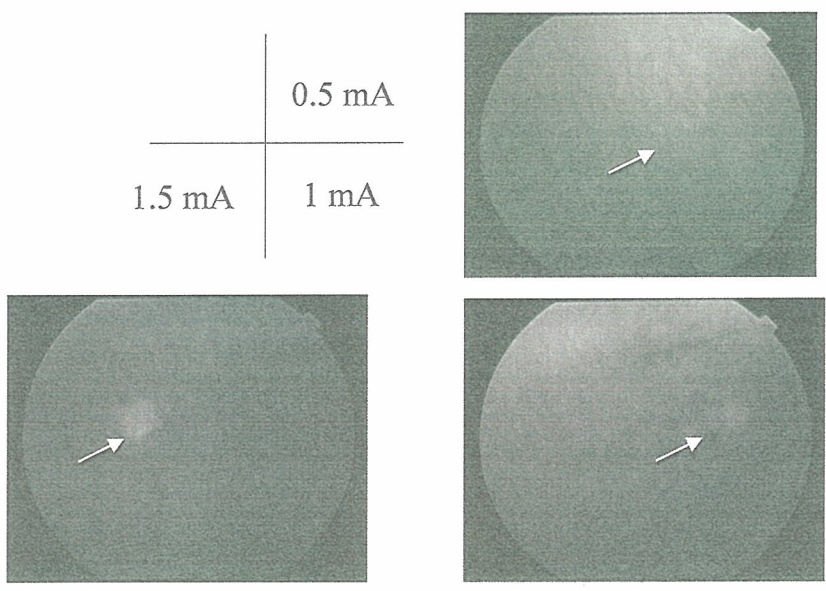


図 3 STS 法による、網膜損傷の電流閾値

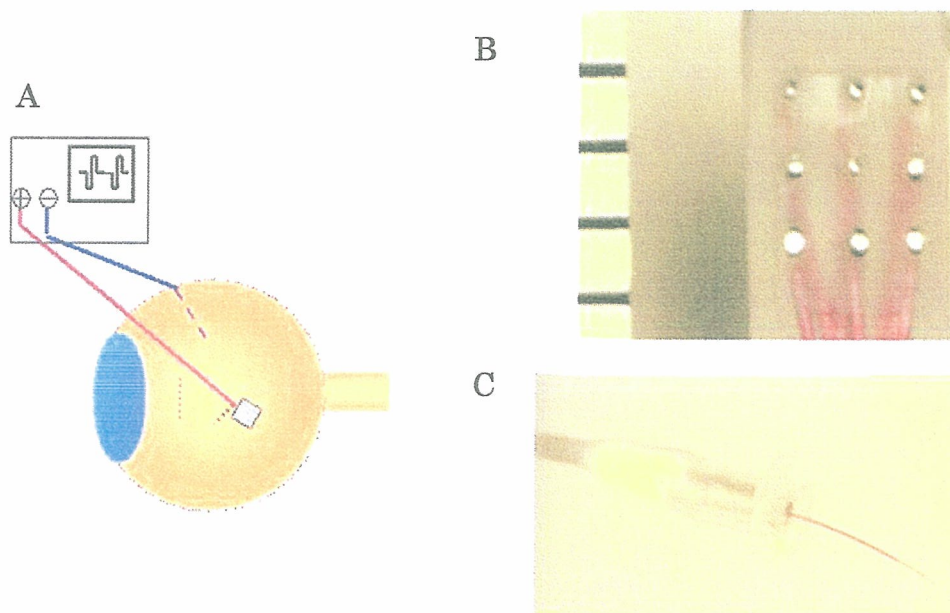


図4. 重症網膜色素変性患者に対する STS 法による人工網膜の臨床研究
 A: 刺激法の Scheme, B: 刺激電極, C: 参照電極

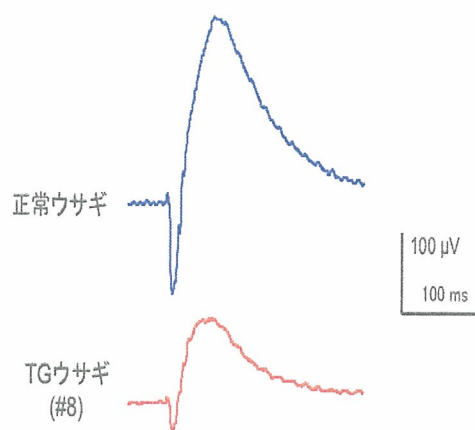


図5. トランスジェニック兎の網膜電図

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

分担研究者 不二門尚

研究協力者 別所建一郎、北口善之

研究要旨

人工網膜の設置部位を決める上で、残存する視細胞を直接画像として評価できれば有用である。また、電極刺激による網膜興奮部位を網膜上で機能画像で評価できれば、電磁誘導を用いたハムノイズの多い、慢性埋め込み型人工網膜システムの分解能評価に有用である。本研究では、視細胞の評価として、補償光学（Adaptive Optics）を用いた眼底カメラの開発を行った。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。また、臨床例として、黄斑ジストロフィー症例では、視細胞の変性を直接示すと思われる所見が得られた。網膜の機能画像システムを開発し、suprachoroidal-transretinal stimulation (STS 法)による電気刺激による網膜の興奮部位を求めることが可能になった。電流による網膜興奮部位の拡がり、視角にして 2° 程度で、これは指数弁程度の視力と考えられた。

A. 研究目的

1. 補償光学眼底鏡による生体眼視細胞の評価：

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。画像の解釈が確立されてくれば、黄斑疾患に対する錐体密度が計測でき、人工網膜の適応、および設置部位の決定に有用と考えられる。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健全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。また、補償光学眼底カメラにより得られた黄斑疾患の眼底像についての検討を行った。

2. 網膜における機能画像解析

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。本研究では、suprachoroidal-transretinal stimulation (STS法)による電気刺激で、賦活される網膜部位を反射光量の変化で評価し、その強度及び広がりについて検討した。

B. 対象と方法

1. 補償光学眼底鏡による生体眼視細胞の評価:

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 1.5mW で、撮影(1-2秒)における安全係数は両光源とも100以上である。これとHartmann-Shack波面センサー(28×28 lenslet)、液晶位相変調素子(Hamamatsu PAL X8287)を図1-1の如く組み込み、波面収差のフィードバック

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

②撮影

大阪大学医学部倫理委員会の承認下で、説明を行い文書による同意を得た後、0.5%トロピカマイド・0.5%フェニレフリン(ミドリリンP©)による散瞳下で眼底撮影を行った。収差補正フィードバックの目標閾値は初期値を $0.15\mu\text{m}$ (Total RMS(総高次収差:2次のSC面值を含む)、解析瞳孔径5mmのとき)として、実際の補正状況に応じて増減した。内部視標(図2-1)を用いて、中央固視、中央から耳側2度を固視させ、撮影を行った。黄斑疾患などの固視不良例については、Rodstock SLOまたはNidek MP-1を用いたMicroperimetryにより網膜上の固視点を確認した上で、結果画像のオリエンテーションを検討した。画像は可能であれば残収差によるDeconvolution処理、フレームの重ね合わせ処理を行い画質の向上を図った。

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[®])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。

2. 網膜における機能画像解析

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%トロピカマイド・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1-2)。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、そこに押し当てた閏電極と毛様体扁平部から硝子体腔内に挿入した不閏電極の間に通電することにより施行した(図2-2)。刺激条件は電流値以外を統一し、duration500 μ secのbiphasic矩形パルス波(inward \rightarrow outward)を50Hzで4秒間与えた(図3-2)。

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す(図4-2)、刺激前・刺激中・刺激後、計1,040枚の画像(320 \times 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5-2)。

C. 結果

1. 補償光学眼底鏡による生体眼視細胞の評価：

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3-1)。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、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4-1)。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5-1)。

2. 網膜における機能画像解析

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11-2)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11-2に示すように、200 μ A、400 μ A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。STS法による閾値電流値での網膜興奮部位の拡がり、視角にして2°程度で、これは指数弁程度の視力と考えられた。

D. 考察

1. 補償光学眼底鏡による生体眼視細胞の評価:

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、有色家兔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。

2. 網膜における機能画像解析

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。

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)を比較すると、200 μ A、400 μ Aともに、STS法ではmonopolar法よりも限局した範囲に神経活動が見られ、分解能で有利になる可能性が示唆された。また、STS法による閾値電流値での網膜興奮部位の拡がりは、視角にして2°程度で、これは指数弁程度の視力と考えられ、これは外側膝状体での単一神経活動の記録による実験と同等であった。

E. 結論

補償光学(Adaptive Optics)を用いた眼底カメラは、網膜変性のある眼において、残存

細胞する視細胞の評価に役立つ可能性が示唆された。網膜の機能的画像では、STS法により、効率よく網膜が刺激可能で、指数弁程度の分解能が得られることが示された。

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

(6) 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.

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

図とその解説

図 1-1 : 補償光学眼底カメラの模式図

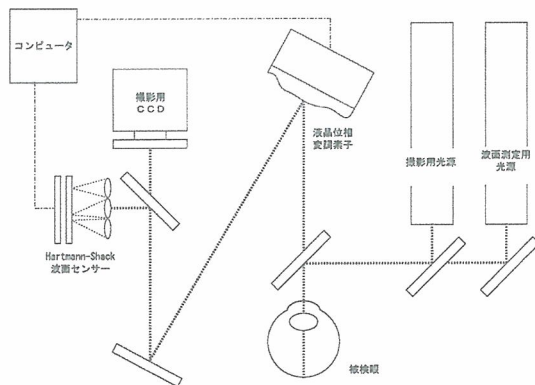


図 2-1 : 内部視標

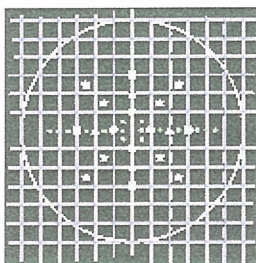
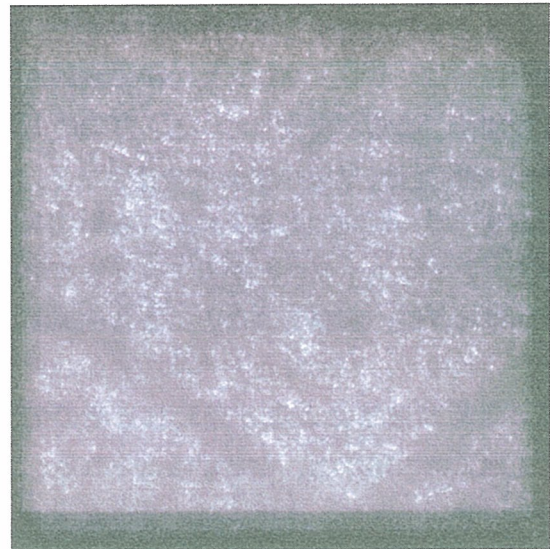
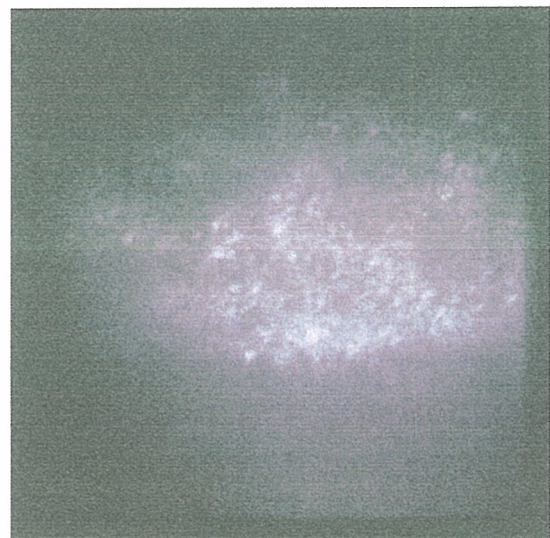


図 3-1 : 正常眼の視細胞像



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

図 4-1 : 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