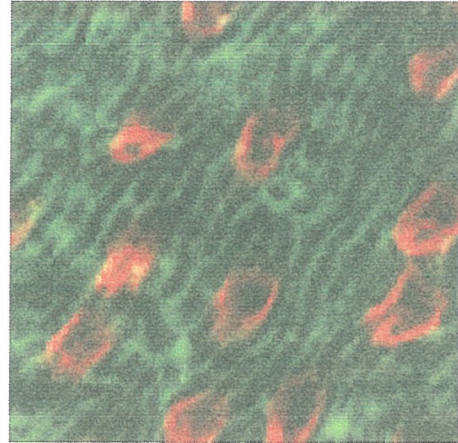
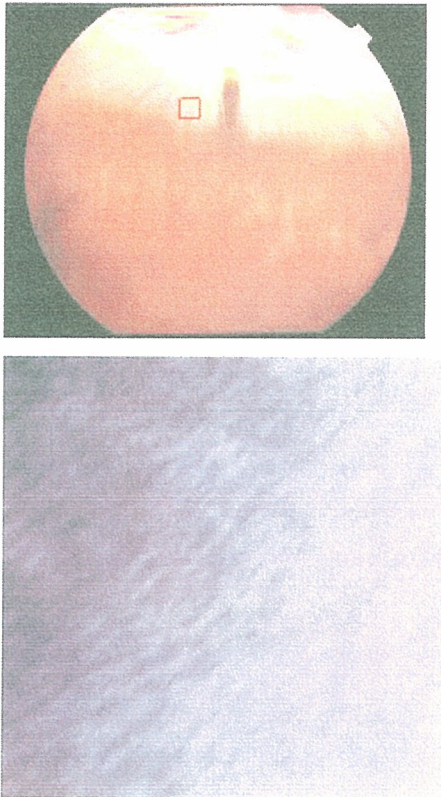


にて撮影。上方には図4類似の輝点が多
見られるが、輝点の大きさ、形状は正常
の場合に比べばらつきが大きく、また下
方はほぼ無構造である（眼底写真との比
較から、標的黃斑症の中央の部分と考
えられる）。

図5-1：有色家兎の組織的検討



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 μ m に揃
えている。

図1-2：改造した機能画像用眼底カメラ



図 2-2: STS・Optical Imaging シェーマ図

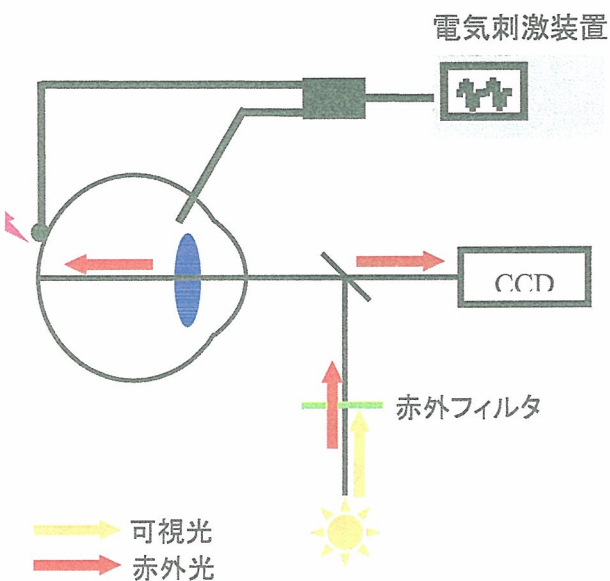


図 3-2: 電気刺激条件

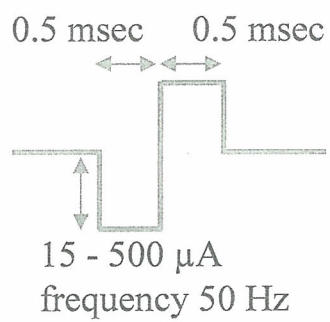


図 4-2:1 session 測定

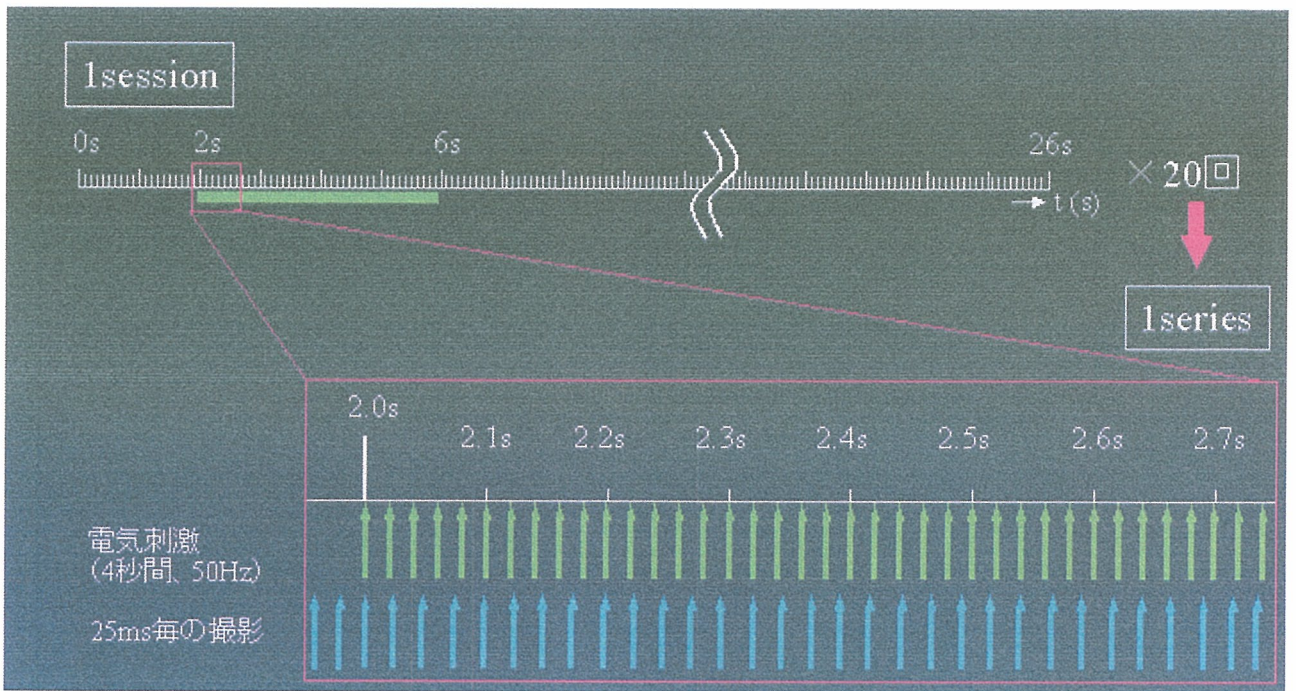


図 5:測定～画像処理

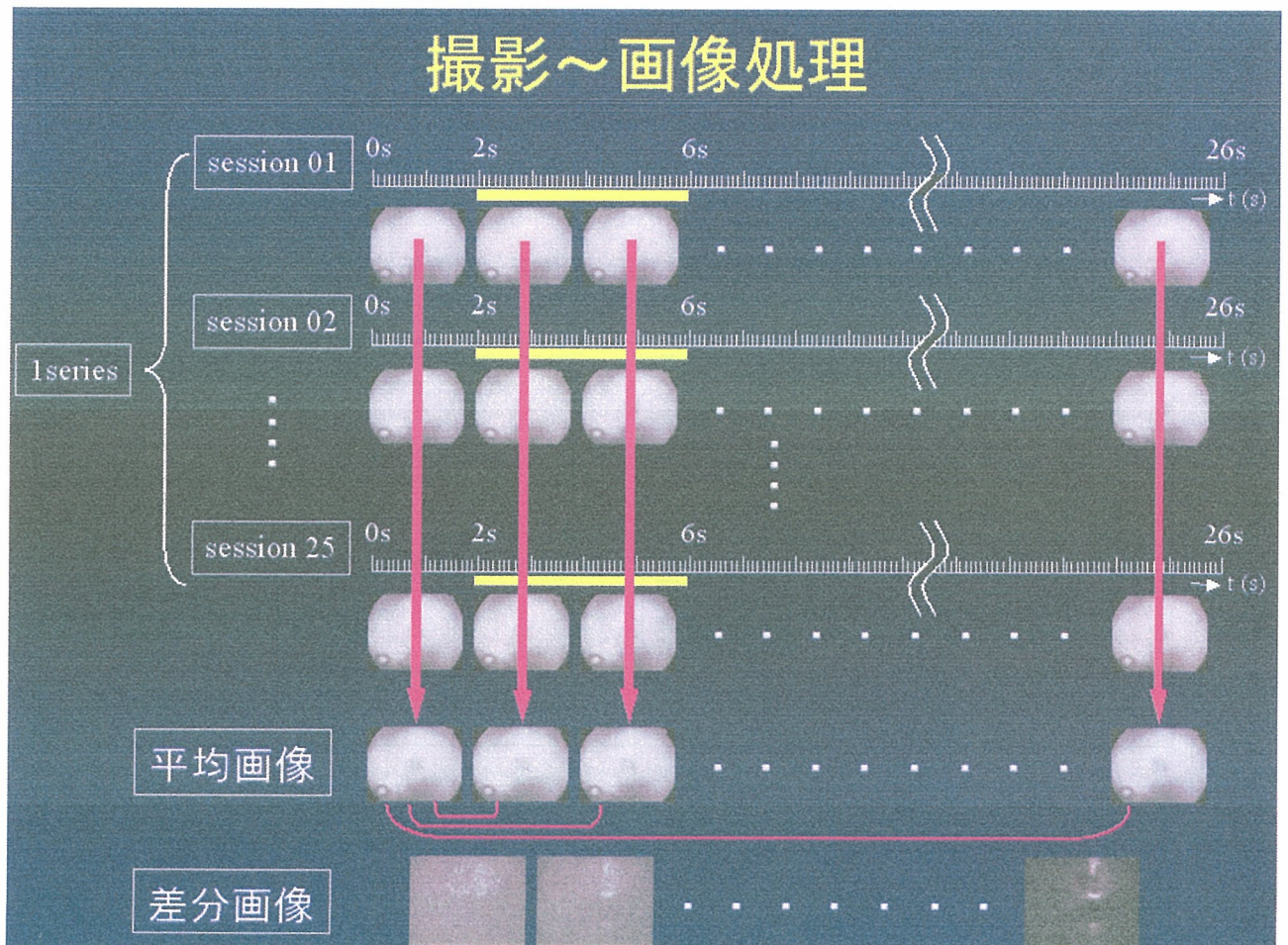


図 6: STS の Optical Imaging 結果 1

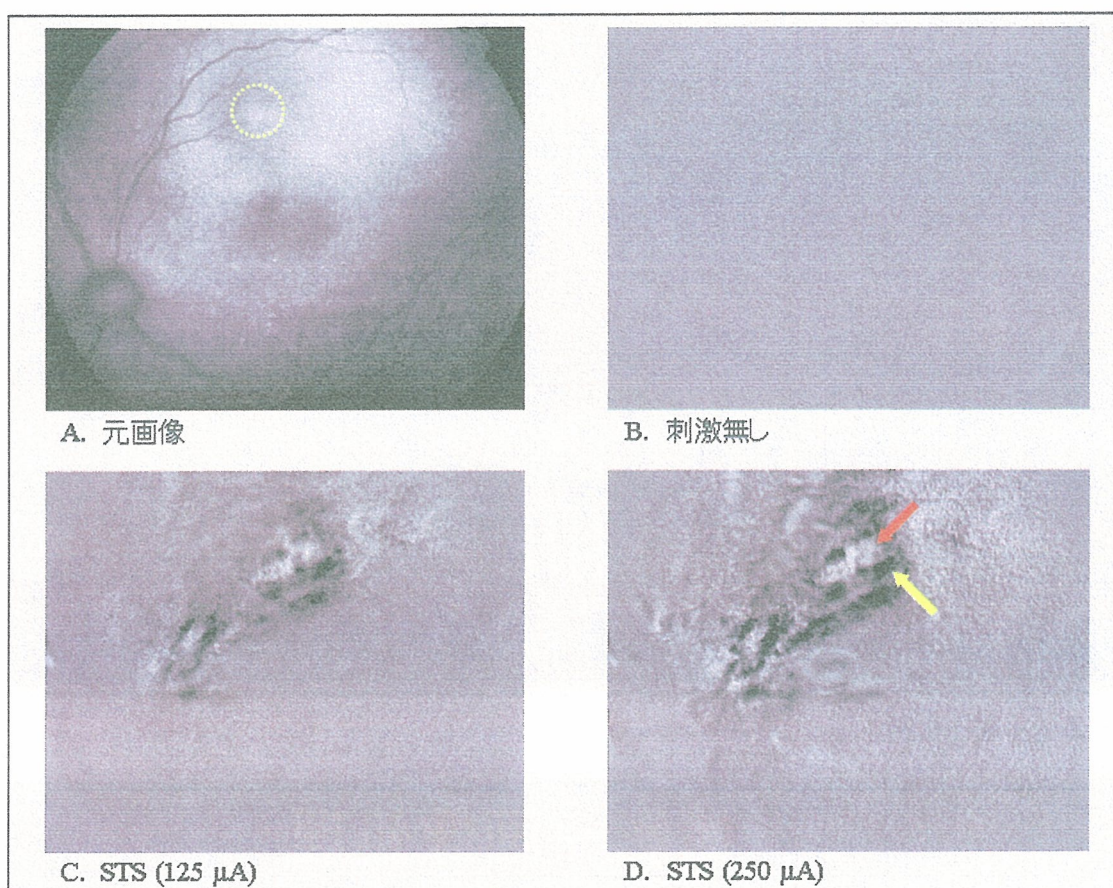


図 7: 図 6 の経時変化 (反射光量変化及び反射光量変化部位面積)

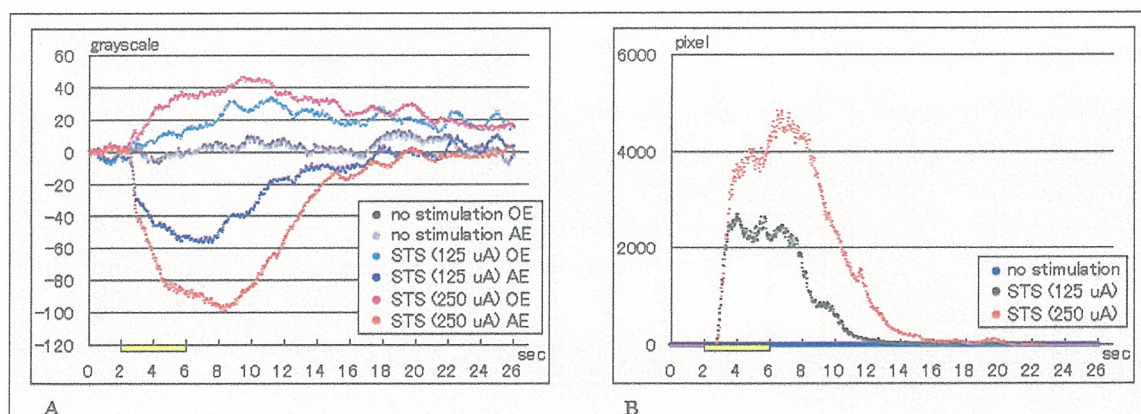


図 8: STS の Optical Imaging 結果 2

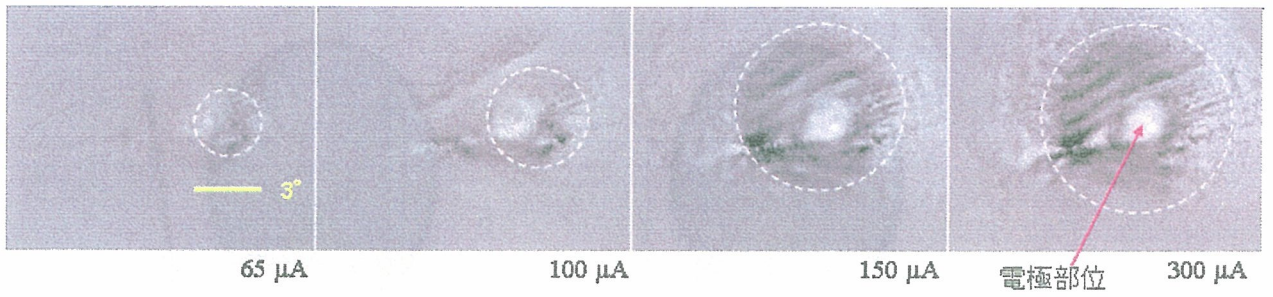


図 9: 図 8 の経時変化(反射光量変化)

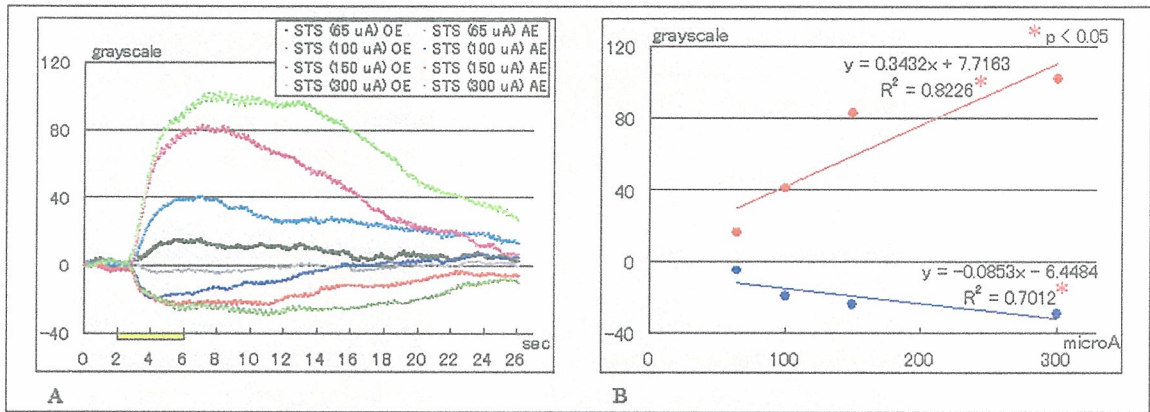


図 10: 図 8 の経時変化(反射光量変化部位面積)

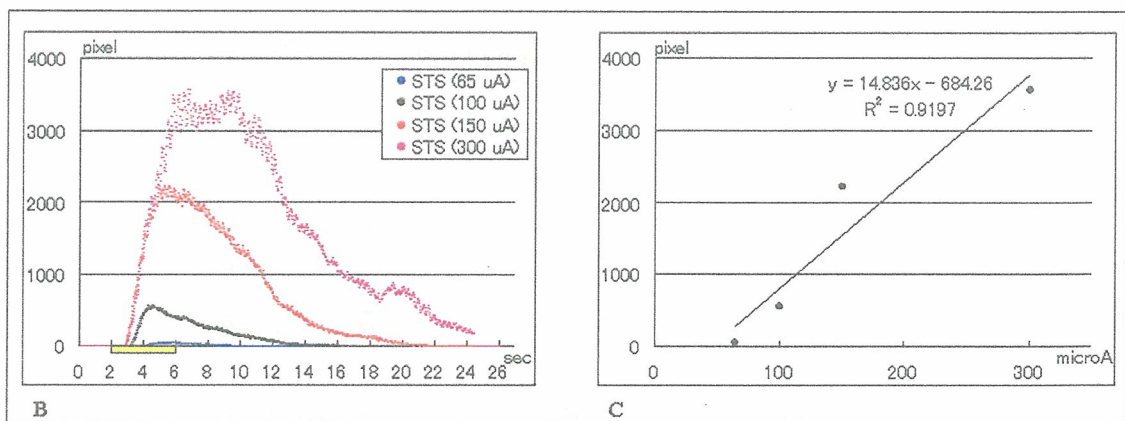


図 11: STS 法と monopolar 法の比較

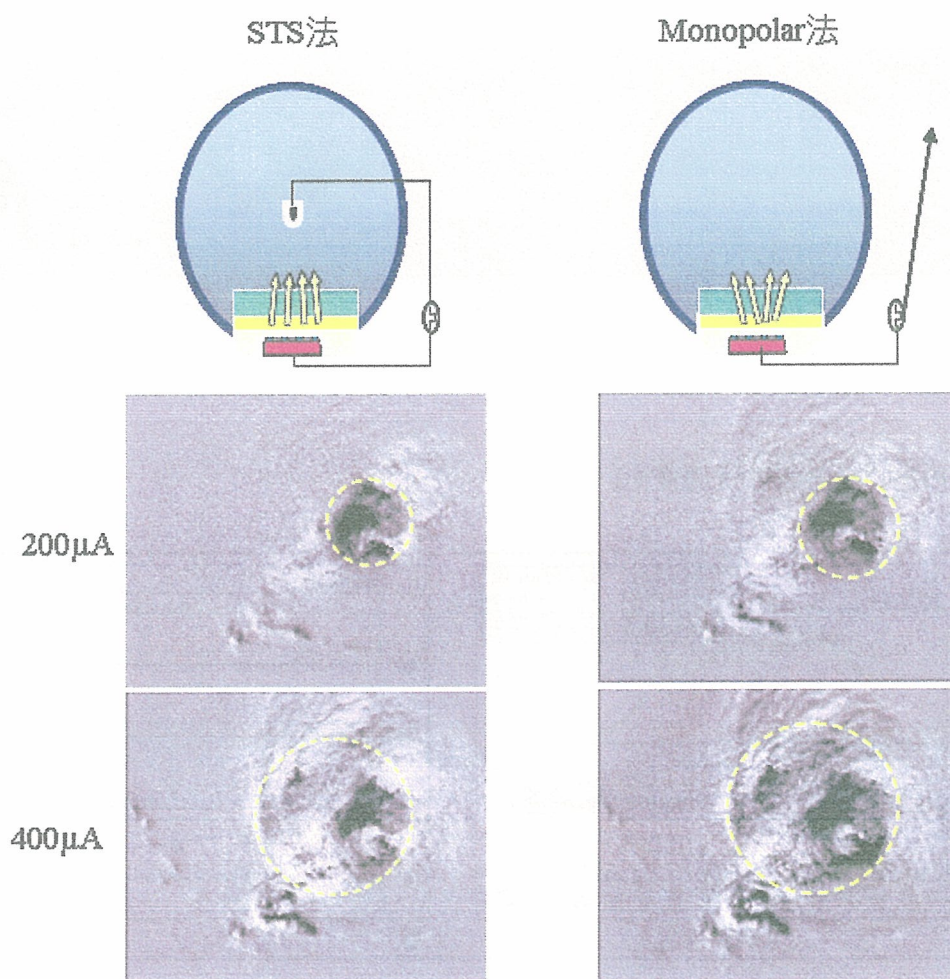
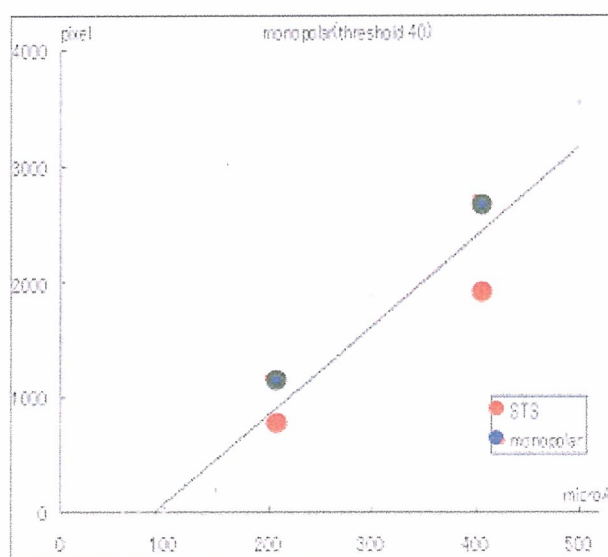


図 12: STS 法と monopolar 法の比較 (反射光量変化部位面積)



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

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)の空間解像度を評価するため、ネコの一次視覚野および外側膝状体背側核(dLGN)中継細胞から単発 STS に対する神経応答を記録した。dLGN の中継細胞の STS に対する応答率と刺激電極から受容野までの距離の関係を調べた結果、距離が小さいほど出現率が高くなる傾向が認められ、電流値を 150 μ A まで下げると応答率の空間分布は刺激電極を中心にして半値半幅 1.8°に局限した。一方、局所誘発電位の視覚野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 の空間分解能は他の網膜上刺激と比べても遜色ないと考えられる。さらに他の刺激方式に比べて非侵襲的であることも考慮すると、STS は人工視覚の刺激方式として有効であると考えられる。

A. 研究目的

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

そこで我々はネコの視覚系を用い STS に対する誘発応答の空間特性を評価した。ネコの視覚系は網膜から視覚中枢に至るまで機能的役割の異

なった複数の並列情報処理系で構成されており、ヒトの視覚系の生理実験のモデル系として有用である。さらに視覚中枢の解析がネコにおいて最も進んでいることから、人工網膜における視覚中枢の反応解析には最適な動物の一つであると考えられる。具体的には STS に対する応答を外側膝状体背側核(dLGN)の中継細胞から単一ユニットレベルで評価した。加えてさらに高次の領域での評価として V1 における STS の局所誘発電位の空間特性も評価した。

主に刺激部位からの距離と応答の強さの関係について評価を行い STS の空間分解能を考察した。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考察した。

B. 方法

[実験動物]

実験動物として成ネコ(米国短毛種)を使用した。

実験は全て大阪大学医学部動物実験ガイドラインに従って行い、実験動物に与える苦痛を最小限に留めるように留意した。術中および電気生理学的記録中ペントバルビツールナトリウム (1~2ml/kg, hr) と臭化パンクロニウム (0.2 ml/kg, hr) で動物を麻酔不動化し、笑気ガスと酸素ガスの混合気(1:1)で人工呼吸を行った。実験中は保温マットで体温を 37 度に維持し、心電図、呼気ガス分析装置およびスパイロメータで動物の生理学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。

眼球には散瞳剤(1%硫酸アトロピン、5%塩酸フェニレフリン)を滴下して瞳孔を散大させコンタクトレンズを装着した。

[電気生理学的記録]

dLGN や V1 へ記録電極を脳定位的にアプローチするために、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 次元マイクロマニピレータ(ナリシゲ)で制御した。記録電極には抵抗値 1 ~ 3 M Ω のガラス封入タンダステン電極を使用した。記録電極より単極誘導された信号は差動増幅器(Model 1800 Microelectrode AC Amplifier, A-M Systems, Inc) および直流増幅器(Model LPF-202, Warner Instrument Corp) を用いて 2,000~10,000 倍に増幅し、バンドパスフィルターを施した(dLGN からの記録の際は 10 Hz ~ 5k Hz、V1 からの記録の際は 300 Hz ~ 5k Hz)。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。なお、視交叉刺激には、視交叉の両側に設置した双極刺激電極(ϕ 0.2 mm ステンレス線、先端 1 mm 露出)の間に 50 μ s 単相矩形波を約 50-500 μ A の強度で通電し刺激を行った。

[STS 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ズパルスを用いた。刺激電流を 50~500 μ A の範囲で変化させ、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 50-100 回繰り返した。

[データ解析]

記録する対象ごとに以下の解析を行った。

—dLGN からの記録—

左 dLGN の A1 層から記録されたユニットのデータのみを解析に用いた。記録した波形より Spike 2 付属の主成分分析機能を用いて記録波形中から単一ユニット活動を抽出した。これら記録したユニットそれぞれについて、眼前 114 cm に設置したスクリーン上で受容野を同定し、その生理学的特性と視交叉電気刺激に対する応答潜時に基づいて ON 中心型と OFF 中心型、Y 細胞と X 細胞に分類した。

実験中に眼内に拡散光を導入し眼底像をスクリーン上に投影しスケッチして、その投影像と網膜全伸展標本を網膜血管のパターンを手がかりに重ね合わせ、受容野から刺激部位までの距離を測定した。なお、この距離の単位は視野角(度)で表した。

これらのデータを元に、STS で誘発されるスパイク発火頻度と受容野-刺激部位間の距離との関係の評価した。さらにその関係が電流値や細胞種によってどのように変化するか評価した。

—V1 からの記録—

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。各々の記録部位における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

[STS に対する dLGN 中継細胞の応答]

記録したユニットは合計で 114 個であった。その内訳は、On-X 型が 28 個、On-Y 型が 11 個、Off-X 型が 40 個、Off-Y 型が 35 個であった。単発の二相性矩形波を用いた STS に対する dLGN 中継細胞の応答の例を、図 1 に示した。STS によって、バースト状のスパイク発火が、刺激後約 200 ms に渡って約 70~100 ms の周期で複数回出現した(図 1-a)。最初のバーストとそれ以降のバーストは性質が異なっていたため、最初のバーストを“First burst”、それ以降のバーストを“Late burst”と呼ぶことにした。

First burst は刺激後 3 ms から 15 ms の間に生じ、ほとんどの場合 5 つ以下のスパイク発火で構成されていた。これらのスパイク発火の個数や潜時は同じ刺激条件で繰り返し刺激しても常に一定であった(図 1-b)。一方、Late burst は刺激後 20 ms 以降に出現し、First burst 同様 1~5 個のスパイク発火で構成されていた(図 1-a)。しかし Late burst 中のスパイク発火の個数や潜時は変動的であった。刺激電極と受容野が離れている場合には Late burst のみ現れることが多く、一方距離が近い場合には First burst と Late burst の両方が出現することが多かった(図 1-a)。この性質から、First burst のほうが Late burst よりも網膜上の興奮の広がりを直接的に反映しているのではないかと考えた。そこで、今回の実験では First burst の期間に出現するスパイクの特性に着目して、STS に対する網膜上の興奮の広がり等の検討を行った。

First burst のスパイク出現率の空間的分布を評価するために、刺激電極からそれぞれの受容野の中心までの距離をスクリーン上で測定した。この実験では First burst のスパイク出現率を「40 回の試行のうち、刺激後 3 ms から 15 ms の間にスパイクが出現した試行数の割合」と定義した。ここで言う「試行」とは一発の刺激パルスによる刺激を

指し、同じ刺激による試行を 40 回行なって 1 セットとした。まず 500 μ A で 40 回試行を繰り返す(1 セット)、その後 1 セット毎に 300, 200, 150, 100, 70, 50 μ A と段階的に刺激電流を下げ、それぞれのセット毎に first burst のスパイク出現率を計測した。この出現率と距離の関係を刺激電流値毎に示したのが図 2 である。刺激強度 500 μ A の時(図 2 -a)、刺激電極から遠く離れた場所でも高い出現率を示す細胞が多く見られた。例えば、80 %以上の出現率を有する細胞は刺激電極から約 10° 付近まで分布していた。刺激強度を徐々に下げていくと、その範囲は縮小し 100 μ A では 80 %以上の出現率を有する細胞は距離 2° 以内にしか見られなかった。これは電流値を下げることで興奮の範囲を限局できることを示している。この距離ごとの出現率の分布にはばらつきがあるため、より定量的な解析に向けて区間ごとの出現率の中央値を算出した。また、今回中央値の算出に当たって区間を 1.5° に設定したのは、興奮の広がりや評価するのに重要になる電極近傍のデータの数が少なく、統計的に信頼できる中央値を算出するには少なくとも 1.5° まで区間を広げる必要があったためである。算出した中央値のデータは灰色の丸で図 2 の分布図に重ねて示した。刺激電流が低下するにつれ、高い出現率の範囲が狭まっていくことが、この中央値のグラフからも読み取れる。この結果から半値半幅(最大出現率の半分になった時の距離)を線形補間にて計算し、興奮の広がりやの尺度として用いた。その半値半幅と電流値との関係をグラフに示したのが図 3 である。ただし、70 μ A および 50 μ A については、電極近傍における出現率の中央値が著しく低かったため、図 3 のグラフの対象としなかった。

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

[STS に対する V1 の応答]

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 4-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 4-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 4 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。

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 5 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。

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 6)。この広がり は 500 μ A の時よりも 300 μ 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 μ A の強度の STS では 0.81 mm、300 μ 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 μ A の STS では 0.85 mm (n=3)、300 μ 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 に対する神経応答の広がりを基に空間分解能について検討を行った。

まず、STS によって誘発される神経活動を dLGN の中継細胞から単一ユニットレベルで評価した。その結果、図 2 に示されるように、電流値が 100~200 μ A 程度の強度で First burst のスパイク出現率が刺激電極近傍のみで高い値を示し、距

離が離れるにつれ急激に出現率が下がる傾向が得られた。さらに、1.5° の区間毎に出現率の中央値を算出し、その広がりを半値半幅で評価した。その結果、電流を制御することで STS に対する応答は半値半幅 1.8° 程度まで限局することが分かった。仮に応答の強度分布が刺激部位を中心に対称に分布すると仮定すると、半値全幅では 1.8° \times 2=3.6° となる。

一方、STS に対する応答の広がりを V1 の局所誘発電位から評価した結果、電流値が 300 μ A 程度の強度で STS に対する応答は皮質上で半値幅 0.71mm まで限局することが分かった。ネコの皮質上の 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]、応答の広がりの半値幅は視角で約 0.7° に相当すると推測される。

異なる二種類の評価法で空間分解能の評価を行った結果、両者に多少の差がでたものの、STS による興奮の範囲はネコの視角で 10⁻¹~10⁰ 度のオーダーで限局する事がわかった。網膜上刺激の場合、ネコの V1 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]。これは、ネコの視角で 1° に相当し、STS と同じオーダーであることから 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。ただし、さらに詳細に空間分解能を議論するためには、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 による興奮は刺激電極直下で限局し、他の刺激手法とほぼ同程度の空間特性を有すると考えられることから STS は人工視覚の刺激方式として適していると考えられる。さらに STS は電極が網膜に非接触の状態でも刺激できることから、手術の簡便化、安全性等の面で他の刺激方式よりも有利である。

今回は電流値を変えて限局度が変わることを示したが、ほかの刺激パラメータについても検討が必要になってくると思われる。それは、STS の刺激メカニズムが他の網膜刺激方式とは異なる可能性があり、他の方式と同じパラメータを模倣したところで STS の刺激としては適さない可能性が考えられるからである。今後は特に刺激パルスの時間パラメータを変えることでより限局した興奮を誘発できないか検討していく予定である。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文

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 Vol.45 No.2 pp560-566.

2. 総説

神田寛行、不二門尚、田野保雄「人工網膜(5) 脈絡膜上一経網膜刺激電極」*臨床眼科* 2005 Vol. 59 No. 11 pp130-135.

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

3. 学会発表

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

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

神田寛行、三好智満、森本壮、不二門尚、田野保雄、澤井元、福田淳「脈絡膜上-経網膜刺激による網膜興奮の空間的広がり」第20回神経組織の成長・再生・移植研究会、2005年5月28日、口演、豊中市

神田寛行、三好智満、森本壮、不二門尚、田野保雄、澤井元、福田淳「脈絡膜上-経網膜刺激で生じる網膜興奮の広がり」第98回近畿生理学談話会、2005年9月10日、口演、大津市

神田寛行、三好智満、森本壮、不二門尚、田野保雄、澤井元、福田淳「脈絡膜上-経網膜刺激法を用いた人工視覚の空間分解能評価」第97回近畿生理学談話会、2004年11月6日、口演、京都市

三好智満、神田寛行、森本壮、不二門尚、田野保雄、澤井元、福田淳「上脈絡膜-経網膜電気刺激法による人工視覚：ネコを用いた空間分解能の評価の試み」*視覚科学フォーラム*第8回研究会、2004年7月31日、口演、米子市

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

[参考文献]

- [1] Kanda H, Morimoto T, Fujikado T, Tano Y, Fukuda Y, Sawai H. Electrophysiological studies of the feasibility of suprachoroidal-transretinal stimulation for artificial vision in normal and RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45(2): 560-566.
- [2] Nakauchi K, Fujikado T, Kanda H, Morimoto T, Choi JS, Ikuno Y, Sakaguchi H, Kamei M, Ohji M, Yagi T, Nishimura S, Sawai H, Fukuda Y, Tano Y. Transretinal electrical stimulation by an intrascleral multichannel electrode array in rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* (in press)
- [3] Sakaguchi H, Fujikado T, Fang X, Kanda H, Osanai M, Nakauchi K, Ikuno Y, Kamei M, Yagi T, Nishimura S, Ohji M, Yagi T, Tano Y. Transretinal electrical stimulation with a suprachoroidal multichannel electrode in rabbit eyes. *Jpn J Ophthalmol.* 2004; 48(3): 256-261.
- [4] Weiland JD, Liu W, Humayun MS. Retinal Prosthesis. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2005; 7:361-401.
- [5] 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]

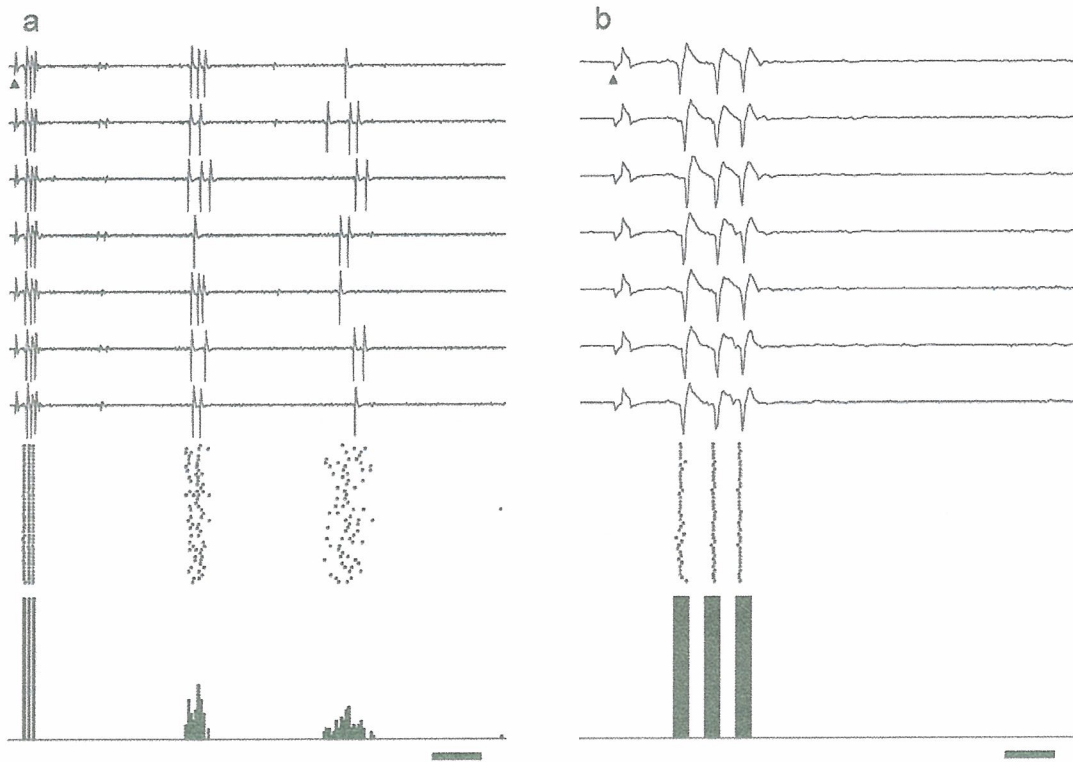


図 1

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

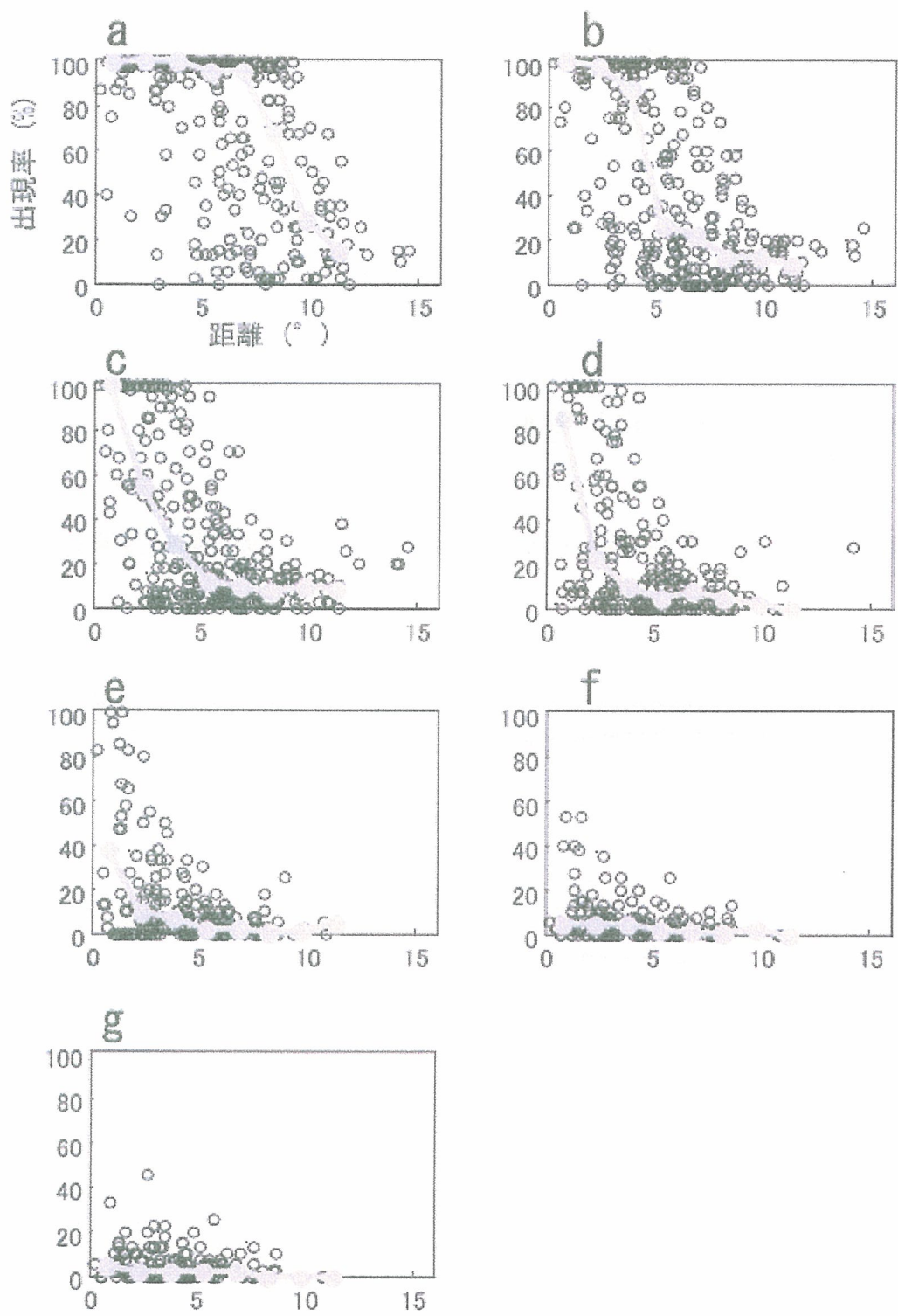


図2 STS電極からの受容野の距離による First burst のスパイク発火の出現率の分布及び中央値。図中白丸がそれぞれの細胞における出現率をプロットしたものである。一方、それらのプロットを区間 1.5° 毎に出現率の中央値を算出し灰色の丸で示した。それぞれの電流値は a: 500 μ A b: 300 μ A c: 200 μ A d: 150 μ A e: 100 μ A f: 70 μ A g: 50 μ A.

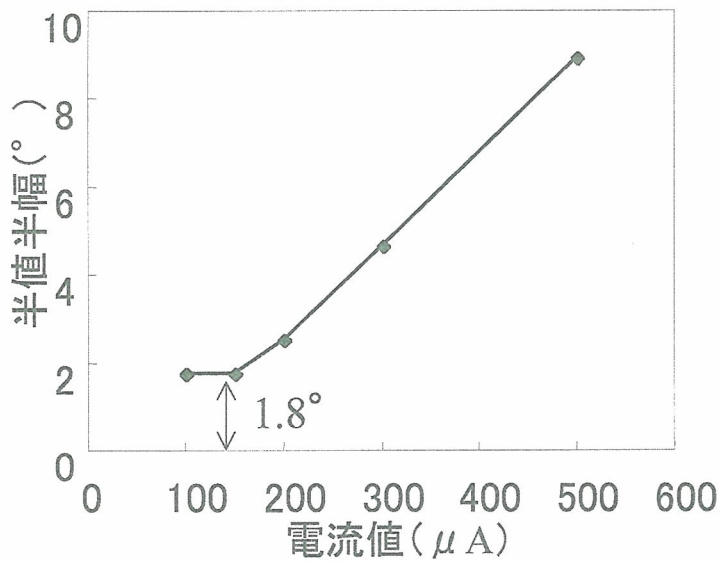


図 3

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

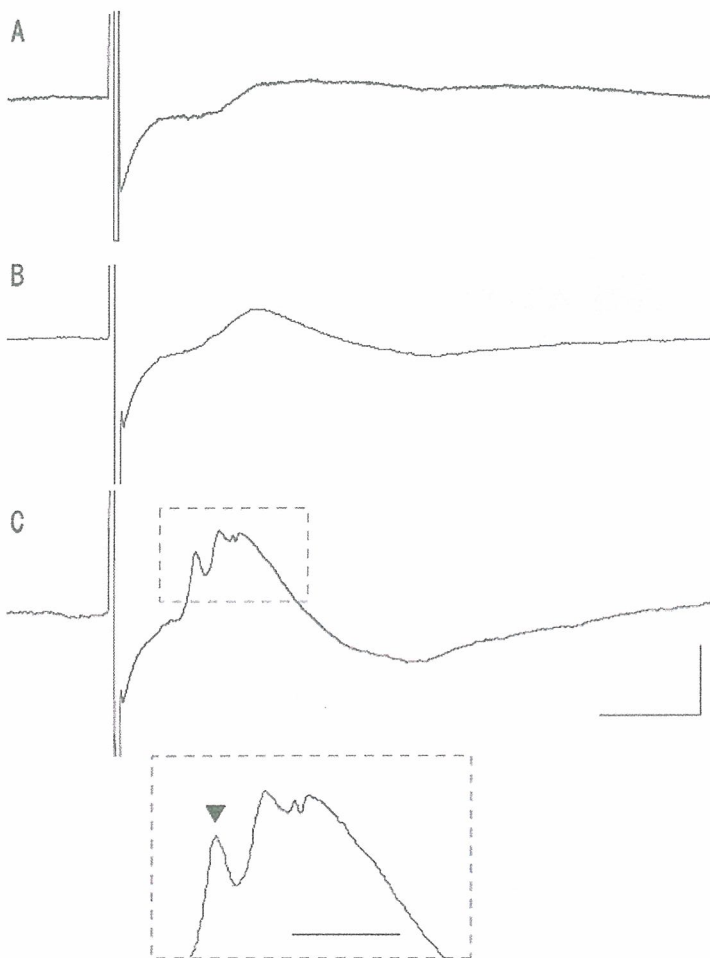


図 4

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 μm 、B, 500 μm 、C, 1000 μm である。深さ 1000 μm 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 μA 。スケールは 100 μV 、10 ms。拡大図内のスケールは 5 ms

である。

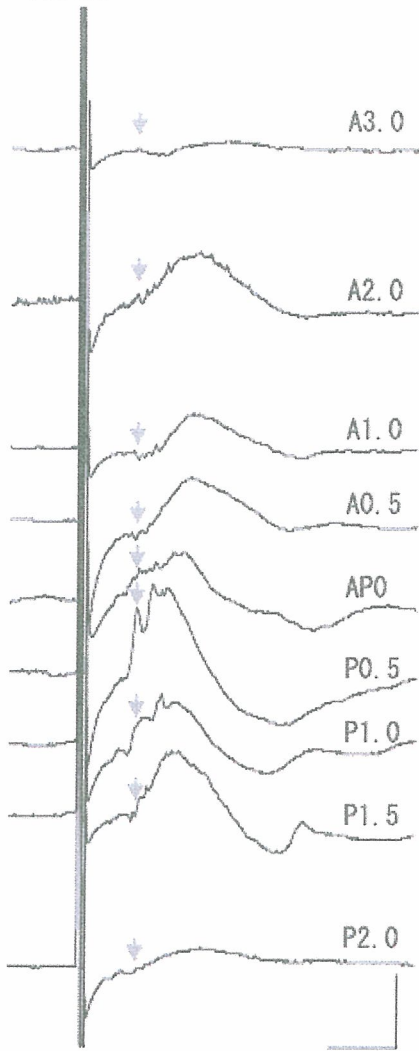


図 5

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 $100 \mu\text{V}$ 、 10ms である。

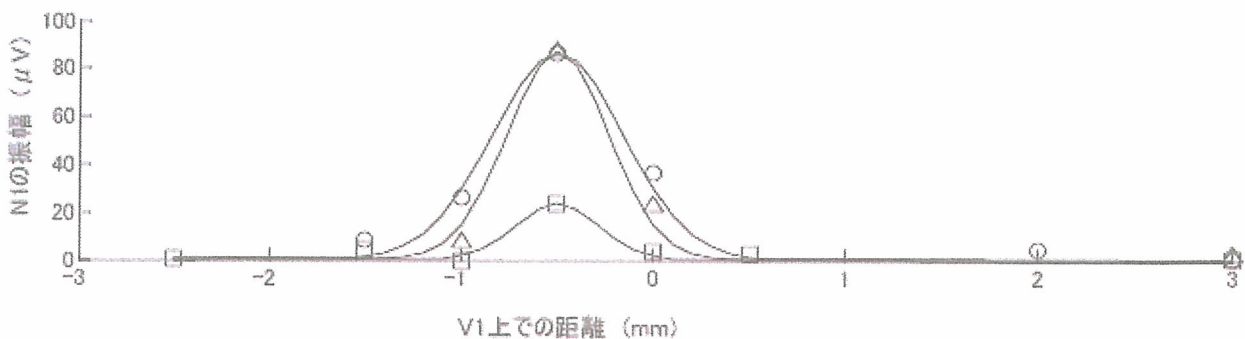


図 6

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。

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
（総合）分担研究報告書

網膜刺激型電極による人工視覚システムの開発

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、パルス周波数変調(Pulse Frequency Modulation; PFM)方式に基づく刺激チップ及びチップ実装方式に関する研究を行った。まず PFM 方式では、蛙遊離網膜を用いた刺激実験によりその有効性を実証するとともに、低消費電力で 4 近傍演算を可能とする 32×32 画素 PFM 方式イメージセンサの設計およびその動作実証を行い、網膜刺激電極システムへの適用可能性を実証した。チップ実装では高密度刺激が可能な分散型電極の実装方式を Si-LSI に適用できる実装プロセスを確立した。5 個の Pt/Au バンプ電極及び制御回路を実装した 500 μm 角サイズの Si-CMOS マイクロチップの設計・試作を行い、このマイクロチップを 3×4=12 個ポリイミド基板の上に実装した電極アレイを試作した。8-bit アドレスを指定することで任意チップの任電極からの刺激電流出力が可能であることを実証した。更に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。また高密度刺激を目指し電極材料の研究を実施した。スパッタ成膜により、Pt, IrO_x 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を明らかにした。

A. 研究目的

本研究の目的は、網膜刺激型電極による人工視覚システムの開発として、パルス周波数変調(Pulse Frequency Modulation; PFM)方式に基づく刺激チップの開発と脈絡膜上経網膜刺激(STS: Suprachoroidal Transretinal Stimulation)に適した実装方式の開発である。具体的には、PFM 方式の刺激電極への適用可能性の検証と LSI を用いた刺激電極方式である分散型刺激電極の *in vitro*, *in vivo* での実証である。

B. 研究方法と結果

(1) PFM 方式に基づく刺激チップの開発

(a) 蛙遊離網膜を用いた *in vitro* 刺激実験による PFM 方式刺激チップ動作実証

後述する Pt/Au スタッドバンプ電極を形成した PFM 方式刺激チップにより蛙から摘出した網膜の刺激実験を行った。使用したチップは 16×16 画素 PFM フォトセンサ内蔵刺激チップである。図 1 にそのチップ写真を、図 2 に *in vitro* 実験配置を示す。チップに近赤外(NIR)光を入射し PFM フォトンセンサにより刺激電流パルスを生じさせる。このパルスにより網膜細胞を刺激し、その応答を銀電極によりセンサする。

図 3 は刺激実験結果である。神経節細胞応答波形の一例を挿入図に示している。図 3 の結果より入射 NIR 光の強度により網膜応答頻度が変化することを示すことができ、本実装方式の有効性を確認できた。

(b) PFM 方式の低電圧駆動化と画像前処理機能強化
PFM フォトセンサは広いダイナミックレンジを持ち、低電圧動作も可能である。しかし、電源電圧を低電圧化した場合、遅延を大きくしないと安定にパルスを生じさせる

ことができず、ダイナミックレンジが狭くなるという問題がある。また、画素面積を縮小するためにインバータチェーンを短くすると、更に低電圧化が困難になる。これらの課題を解決する PFM 方式として容量帰還リセット型 PFM(C-PFM)を提案し、試作回路により、電源電圧 1.2V という低電圧で通常のイメージセンサと同等の 70dB のダイナミックレンジを実証した。

さらにこの C-PFM 方式を用いて 4 近傍画像処理機能を有する 32×32 画素アレイを 0.35 μm CMOS プロセスを用いて試作し良好な画像処理を実現した。埋込下での限られた電力供給状態での画像処理機能を実証した

(2) LSI マイクロチップベース分散型刺激電極アレイの開発

(a) LSI に適した Pt/Au スタッドバンプ刺激電極の開発
刺激電極として Pt/Au スタッドバンプ電極を新たに開発し、動作実証を行った。図 4(a)にそのプロセスフローを示す。昨年度開発した形成プロセスをもとにし、さらに Si-LSI に適したプロセスへと改良を行った。図 4(b)は Si-LSI マイクロチップへ実装後の SEM 写真である。

この実装チップを用いて生理食塩水中での電流注入実験を行い、チップの電源電圧内で十分な刺激電流を注入できていることが実証できた。

(b)分散型刺激電極アレイの開発

LSI チップを適用しかつ眼球に沿う柔軟性を確保するために 0.5mm 角程度のマイクロチップ LSI を図 5 に示すように複数個フレキシブル基板に分散配置した構造を有する分散型刺激電極アレイの開発を行った。LSI チップを用いる事で 1000 点以上の刺激電極を実現可能である。作製プロセスとして高い再現性と信頼

性が高いフリップチップ実装方式開発し、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。

マイクロチップへは電源(VddとGND)以外に2本の入力線CTRL(データ入力)とSTIM(刺激電流供給)のみである。CTRLは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 2^6 チップ \times 9個/チップ=576個の電極を制御可能である。チップは0.35 μ m標準CMOSプロセスで試作を行い、図6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600 μ m角とした。

刺激デバイス上にはマイクロチップを図7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8に、試作デバイスの外観写真を図9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10は動作結果をまとめたものである。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_x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、EEP(Electrical Evoked Potential)取得実験を実施した。図11は測定したEEP信号である。100 μ A程度のしきい値でEEP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12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。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12に示すようにスリットを入れたことで2方向への曲げが可能となりデバイスを人の眼球と同程度の大きさを持つ球に密着可能である。

(c) 高効率電極材料の探索

高密度刺激のためにはPtを上回る電荷注入能力を有する刺激電極材料が必要となるため、IrO_xとTiNの評価を行った。評価用の電極形状を図13に示す。Au配線ポリイミド基板上に300 μ m ϕ Pt薄膜電極を8個形成し、その上にIrO_xあるいはTiNをスパッタ成膜し、CV、SEMによる表面形態評価などを行った。表面形態の例を図14に示す。薄膜電極における最大電流密度の関係として、Pt(0.226mA/cm²) < TiN(0.623mA/cm²) < IrO_x(11.7mA/cm²)を得た。IrO_x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_x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_x、TiN薄膜電極が有力であることを確認した。

C. 考察

PFM方式の刺激電極適用性を実証した。今後は分散型実装への適用を検討していく必要がある。分散型刺激電極方式はより再現性・信頼性ともに高い実装方式を目指し、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_xもまだ完全にスパッタ条件を詰めきっているとは言いがたく、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。Si-LSI上への形成方法を考案する必要がある。

D. 結論

PFM方式に基づく刺激チップを試作し、基本動作の確認ならびに蛙遊離網膜を用いた*in vitro*刺激実証を行い、本方式の有効性を確認した。また眼球に沿う柔軟性を確保しつつ高密度刺激電極アレイを実現できる分散型刺激電極デバイスの開発を行い、生理食塩水中での動作を確認した。更に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_x、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] A. Uehara, K. Kagawa, T. Tokuda, J. Ohta, M. Nunoshita, "A CMOS retinal prosthesis with on-chip electrode impedance measurement," *Electron. Lett.* Vol. 40, No. 10, pp.582-583, 2004.
- [2] K. Kagawa, N. Yoshida, T. Tokuda, J. Ohta, M. Nunoshita, "Building a Simple Model of A Pulse-Frequency-Modulation Photosensor and Demonstration of a 128x128-pixel Pulse-Frequency-Modulation Image Sensor Fabricated in a Standard 0.35- μ m Complementary Metal-Oxide Semiconductor Technology," *Opt. Rev.*, Vol. 11, No.3, pp.176-181, 2004.
- [3] K. Kagawa, K. Yasuoka, D. C. Ng, T. Furumiya, T. Tokuda, J. Ohta, M. Nunoshita, "Pulse-domain digital image processing for vision chips employing low-voltage operation in deep-submicron technologies," *IEEE Selected Topics Quantum Electron.*, Vol. 10, No. 4, pp.816-828, 2004.
- [4] A. Uehara, Yi-Li Pan, K. Kagawa, T. Tokuda, J. Ohta, M. Nunoshita, "Micro-sized photo detecting stimulator array for retinal prosthesis by distributed sensor network approach," *Sensors &*

- Actuators A, Available online 24 December 2004.
- [5] A. Uehara, K. Kagawa, T. Tokuda, J. Ohta, M. Nunoshita, "A high-sensitive digital photosensor using MOS interface-trap charge pumping," *IEICE Electronics Express*, Vol. 1, No. 18, pp. 556-561, 2004.
- [6] Yi-Li Pan, T. Tokuda, A. Uehara, K. Kagawa, J. Ohta, M. Nunoshita, "A Flexible and Extendible Neural Stimulation Device with Distributed Multi-chip Architecture for Retinal Prosthesis," *Jpn. J. Appl. Phys.*, 44 (4B), 2099-2103, 2005.
- [7] A. Uehara, Yi-Li Pan, K. Kagawa, T. Tokuda, J. Ohta, M. Nunoshita, "Micro-sized photo detecting stimulator array for retinal prosthesis by distributed sensor network approach," *Sensors & Actuators: A*, 120 (1), 78-87, 2005.
- [8] T. Tokuda, Yi-Li Pan, A. Uehara, K. Kagawa, M. Nunoshita, J. Ohta, "Flexible and extendible neural interface device based on cooperative multi-chip CMOS LSI architecture," *Sensors & Actuators: A*, 122 (1), 88-98, 2005.
- [9] T. Furumiya, D. C. Ng, K. Yasuoka, K. Kagawa, T. Tokuda, M. Nunoshita, J. Ohta, "Functional verification of pulse frequency modulation-based image sensor for retinal prosthesis by in vitro electrophysiological experiments using frog retina," *Biosensors & Bioelectronics*, 21 (7), 1059-1068, 2006.
- [10] 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
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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 Suprachroidal Transretinal Stimulation (STS)," *J. Neural Eng.*, accepted.
- [16] T. Tokud, 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, 香川 景一郎, "画像前処理機能を内蔵した人工視覚チップ," *画像ラボ*, Vol.15, No.9, pp.22-26, 2004.
- [2] 太田 淳, "網膜下人工視覚", *臨床眼科*, 59 (11), 112-117, 2005.
- [3] 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.
- [4] 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・ティール・エス, 2005.
3. 学会発表
- [1] Y.-L. Pan, T. Tokuda, A. Uehara, K. Kagawa, J. Ohta, M. Nunoshita, "A Flexible and Extendible Neural Stimulation Device with Distributed Multi-chip Architecture for Retinal Prosthesis," *Ext. Abst. SSDM (Solid State Devices and Materials)*, pp.352-353, 2004.
- [2] T. Tokuda, Y.-L. Pan, A. Uehara, K. Kagawa, J. Ohta, M. Nunoshita, "Flexible and extendible neural stimulation/recording device based on cooperative multi-chip CMOS LSI architecture," *Proc. 26th Annual Int'l Conf. IEEE Eng. Medicine & Biology Soc. (EMBS)*, pp.4322-4325, 2004.
- [3] K. Yasuoka, T. Furumiya, D.C. Ng, A. Uehara, K. Kagawa, T. Tokuda, J. Ohta, M. Nunoshita, "A Pulsed vision chip with image processing functions for retinal prosthesis," *Int'l Conf. Optics & Photonics in Technology Frontier (ICO)*, pp.89-90, 2004.
- [4] A. Uehara, Y.-L. Pan, K. Kagawa, T. Tokuda, J. Ohta, M. Nunoshita, "A Micro-Sized Photo Detectable Stimulator Array for Retinal Prosthesis by Distributed Sensor Network Approach," *VLSI Symposium*, 2004.
- [5] C. Ng, T. Furumiya, A. Uehara, K. Kagawa, T. Tokuda, J. Ohta, M. Nunoshita, "Pulsed Frequency Modulation-based Retinal Implant Chip with 1-bit Pulse Image Processing," *EOS Topical Meeting Optics in Computing*, 2004.
- [6] T. Furumiya, David C. Ng, K. Yasuoka, F. Shiraishi, K. Kagawa, T. Tokuda, J. Ohta, M. Nunoshita, "A 16x16 Pixel Pulse-Frequency-Modulation Based Image Sensor for Retinal Prosthesis," *IEEE Sensors*, 2004.
- [7] K. Yasuoka, K. Kagawa, J. Ohta, M. Nunoshita, "A 0.9-V pulse frequency modulation photosensor based on capacitive feedback reset," *Proc. SPIE*, 5667, 1-8, 2005.
- [8] J. Ohta, T. Tokuda, K. Kagawa, Y. Terasawa, M. Ozawa, T. Fujikado, Y. Tano, "LSI-Based Stimulus Electrodes for Retinal Prosthesis," *The 2nd U.S. Department of Energy (DOE) International Symposium on Artificial Sight*, 2005 (Invite).
- [9] J. Ohta, T. Tokuda, K. Kagawa, M. Nunoshita, "Retinal prosthesis device based on pulse-frequency-modulation vision chip," *IEEE Int'l Symposium on Circuits and Systems (ISCAS)*, pp. 2923-2926, 2005.

- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] J. Ohta, "Microelectronics-based Stimulators for STS," *The Eye and The Chip*, 2006 (Invite).
- [13] 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.
- [14] J. Ohta, "Nanotechnology -Impact on Electronics, Photonics, and Biology-," *Int'l Conf. Solid State Devices & Materials (SSDM2006)*, 2006 (Invite).
- [15] 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 (Invite).
- [16] 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.

4. 受賞

- [1] 第7回 LSI IP デザイン・アワード 開発奨励賞「分散型アーキテクチャによるフレキシブル生体刺激・計測デバイス」
- [2] 第8回 LSI IP デザイン・アワード, IP 賞「人工視覚デバイス用並列パルス領域画像処理機能をもつビジョンチップ IP」

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- [1] 特開 2004-229998 H16.8.19 視覚再生補助装置.
- [2] 特開 2004-195206 H16.7.15 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

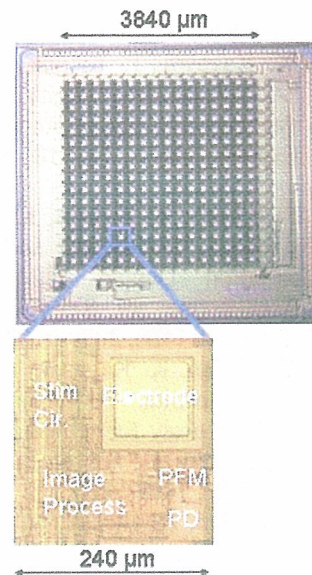


図 1: PFM フォトセンサ刺激チップと画素部拡大写真

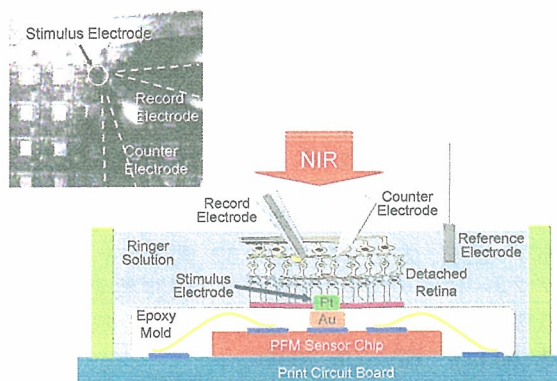


図 2: 蛙遊離網膜の電気刺激実験セットアップ。挿入図は実験配置を上面より見た写真。

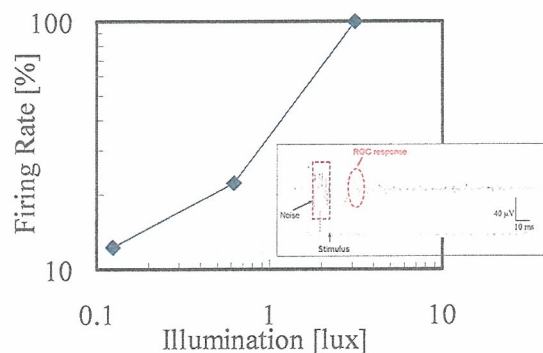


図 3: NIR 光強度に対する刺激応答特性. 挿入図は刺激波形例。

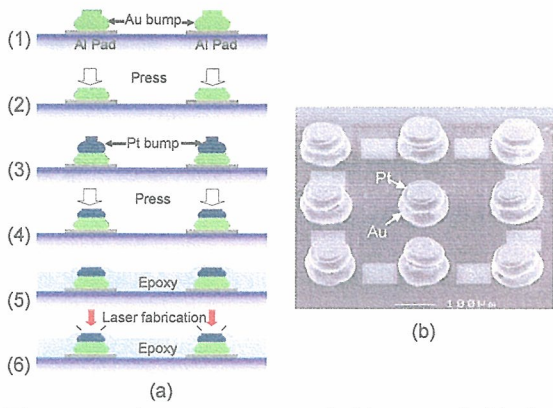


図 4: LSI 上の Pt/Au バンプ電極. (a) 作製プロセスフロー; (1) Au バンプ形成, (2) Au バンププレス, (3) Pt バンプ形成, (4) Pt バンププレス, (5) エポキシモールドディング, (6) Pt 部開口. (b) SEM 写真.

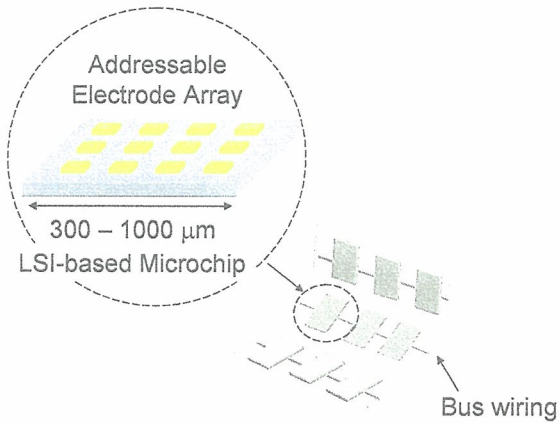


図 5: 分散型電極アレイの概念.

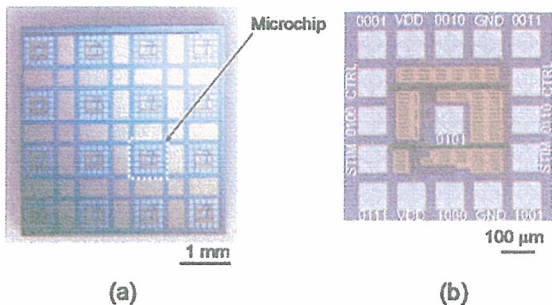


図 6: 試作マザーチップ(a)とダイシングしたマイクロチップ(b)の表面写真.

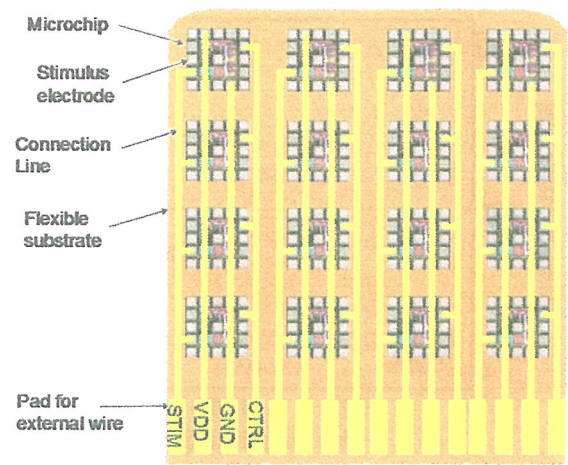


図 7: 4×4 マイクロチップ配置刺激電極.

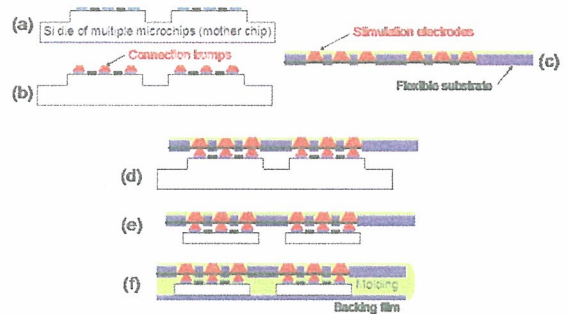


図 8: フリップチップ方式刺激デバイスの実装プロセスフロー.

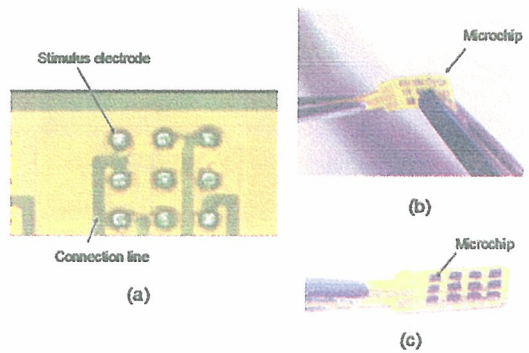


図 9: 試作刺激デバイス写真. (a) 電極部拡大写真, (b) 表面. 屈曲性があることを示す. (c) 裏面.