

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

脈絡膜上経網膜電気刺激（STS）法による人工視覚システムの臨床応用

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田野 保雄

平成 20（2008）年 4 月

目次

I. 総括研究報告

脈絡膜上経網膜電気刺激 (S T S) 法による人工視覚システムの臨床応用	1
田野 保雄	

(分担研究者：大路 正人、平形 明人)

II. 分担研究報告

1. 網膜の精密評価システムの開発—補償光学眼底鏡による生体眼視細胞の評価—	6
不二門 尚	
2. 網膜刺激電極の機能評価方法—ネコ網膜における Optical Imaging—	13
不二門 尚	
3. 経強膜刺激による擬似光覚の評価	20
不二門 尚	
4. 網膜刺激電極の視覚中枢における機能評価の研究—ウサギ一次視覚野における網膜刺激電極の機能評価—	25
澤井 元	
5. 網膜下刺激電極の開発	34
太田 淳	
6. 視細胞変性の中型モデル動物の作成—トランスジェニックウサギの網膜変性の評価—	38
近藤 峰生	
7. 網膜刺激型電極による人工視覚システムの研究開発	42
小澤 素生	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	51
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	53
-----------------	----

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

I. 総括研究報告書（H19 年度）

脈絡膜上経網膜電気刺激（STS）法による人工視覚システムの臨床応用

主任研究者 田野 保雄 大阪大学医学系研究科眼科学 教授

分担研究者 大路 正人 滋賀医科大学眼科学 教授

平形 明人 杏林大学医学部眼科学 教授

研究協力者：瓶井 資弘、坂口 裕和、西田 健太郎（大阪大学医学系研究科眼科学）

研究要旨 有効な治療法のない網膜変性疾患に対して、本邦独自の人工網膜である、脈絡膜上経網膜電気刺激（STS）法を開発した。動物実験に引き続き、急性臨床試験を行い、失明した患者に擬似光覚が得られることを確認した。次に、最適な刺激パラメーターを決定するために、健常な動物ではなく、適応患者と類似した視細胞変性モデルが必要となってくる。これまで、マウス、イヌ、ブタなどの視細胞変性モデルは存在するものの、眼球が小さかったり、飼育施設の問題などがあり実験に適していない。そこで今回、有色家兎に対するベルテポルフィンと赤色 LED 光を用いた光障害モデルの作成を検討した。その結果、広範囲において視細胞を選択的に障害することに成功した。組織像は、ヒトの末期の色素変性患者やイヌの視細胞変性モデルの網膜の組織と同様の特徴を有していた。さらに、この障害部位に STS 法の刺激電極を埋植することにより、大脳皮質で電氣的誘発電位（EEP）を測定することにも成功した。この結果は、有色家兎に対してベルテポルフィンと赤色 LED を用いた光照射で作成される視細胞障害モデルが、人工視覚の実験のための貴重な疾患モデルとなりえる可能性があることを示すものである。

A. 研究目的

有効な治療法のない網膜変性疾患に対して、本邦独自の人工網膜である、脈絡膜上経網膜電気刺激（STS）法を開発した。動物実験に引き続き、急性臨床試験を行い、失明した患者に擬似光覚が得られることを確認した。今後の臨床応用にあたって、最適な刺激パラメーターを決定するために、健常な動物ではなく、適応患者と類似した視細胞変性モデルが必要となってくる。

る。

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

る。

今回、中型実験動物として扱いやすく、実験にも適していると考えられる有色家兎を用いて、ベルテポルフィンと赤色 LED を用いた光障害モデルの作成を検討した。もともと、ラットやマウスの光障害モデルの研究は多く、その障害のされ方が網膜色素変性症と類似していると報告されている。しかしながら、家兎の場合、ラットやマウスと比較すると非常に光に対する耐性が強靱であり、同じような条件では視細胞の障害は起こらないことが知られている。これまで、光感受性物質であるベルテポルフィンを用いたサルの実験で、視細胞を中心とした網膜外層が選択的に障害されることが報告されている¹⁾。そのため、今回は強力な光照射とベルテポルフィンを用いることにより、視細胞障害が出来ないか検討し、視細胞障害を生じること成功した。また、このモデルにおいて STS 方式の電極で、大脳皮質で誘発電位 (EEP) を誘導することにも成功したので報告する。

B. 対象と方法

対象：有色家兎 (n=5)

方法：有色家兎 (2.0-2.2kg) を 0.5% トロピカミド・5% フェニレフリンにて散瞳し、持続点滴 (2cc/h、ケタラール：キシラジン=2:1) を用いて麻酔を行ったうえで、ベルテポルフィンを経脈投与し (0.47mg/kg)、5分後より赤色 LED 光源 (MCEP-CR8 MORITEX 社製、 $1\text{cm} \times 9\text{cm}$ 、 $5\text{mW}/\text{cm}^2$ 図1) を眼前 (角膜頂点より 1mm 程度) に固定し、3方向に対して合計 90分間照射を行った。

照射前後に、眼底写真、蛍光眼底造影検査、網膜電図 (全視野 ERG と局所 ERG) を測定し、照射後 1か月の時点で照射部位に STS 方式の

刺激電極を埋植し、大脳皮質で EEP を測定した。その後、眼球摘出を行い、4% パラホルムアルデヒドにて 24時間固定し、凍結切片を作成し、HE 染色を行った。

(倫理面への配慮)

ARVO 動物実験の規定に準じて動物を取り扱い、最小限の苦痛で実験を行なった。

C. 研究結果

照射後 1カ月の時点で、眼底写真では Visual Streak を含む広範囲に網脈絡膜変性が認められ (図1)、蛍光眼底造影検査でも、その変性部位に一致した低蛍光な像が見られた (図2)。また、1ヶ月後の全視野 ERG では、a 波、b 波とも 30~35% 程度の振幅が減弱し (図3)、照射部位での局所 ERG ではフラットであった (図4)。局所 ERG が認められなかった照射部位に、STS 方式の刺激電極を埋植して電気刺激を行うことにより、EEP を誘発することに成功した (図5)。同部位での組織標本では、視細胞層を含む網膜外層が消失し、網膜内層が維持されていた (図6)。

D. 考察

ベルテポルフィンと赤色 LED を用いたモデルであるため、脈絡膜循環が障害されていると考えられる。家兎の場合は、網膜内層も脈絡膜循環で栄養されているために、照射後長期間経過を見た場合は、網膜内層まで障害される可能性がある。しかし照射後 1カ月の時点では、組織学的にも照射部位の視細胞が障害され、網膜内層は温存されていた。これは、ヒトの末期の網膜色素変性の網膜の組織 (図7)²⁾ や、イヌの視細胞障害モデルの組織切片 (図8)³⁾ と同様の特徴をもっていた。また、照射部位では局所 ERG では反応が見られず、網膜色素変性の特徴を有していた。同部位の STS 方式の刺激電極により EEP を誘発できている

ので、照射後1カ月で実験に用いれば、人工視覚実験に有用な動物モデルとなりうると考えられた。また、イヌの視細胞障害モデルで報告されているEEPの波形(図9)⁴⁾と、今回のモデルのEEPの波形の形状は異なっていたが、人工網膜の方式が異なること、刺激電流および刺激電極の数が異なることによるものに起因すると思われた。

E. 結論

今回我々は、ベルテポルフィンと赤色LEDを用いた光照射により、広範囲に有色家兎の視細胞を選択的に障害することができ、ヒトの網膜色素変性患者の網膜やイヌの視細胞障害モデルと同様な特徴を組織学的に有していた。また、このモデルにおいて、STS方式の刺激電極でEEPを誘発することに成功し、人工視覚実験に有用な動物モデルとなりうる可能性があることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

K. Nishida, M. Kamei, M. Suzuki,
K. Nakauchi, T. Yamamoto, H. Sakaguchi,
T. Fujikado, Y. Tano [Middle-Sized
Animal Model of Retinal Degeneration]
ARVO, 2007

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。

{参考文献}

- 1、 Reinke MH, et al. Verteporfin photodynamic therapy retreatment of normal retina and choroid in the cynomolgus monkey. *Ophthalmology* 1999; 106:1915-1923
- 2、 Santos, et al. Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric Analysis. *Arch Ophthalmol.* 1997; 115: 511-515
- 3、 Guven D et al, Long-term stimulation by active epiretinal implants in normal and RCD1 dogs. *J Neural Eng.* 2005:S65-73
- 4、 Chen SJ, et al. Neural responses elicited by electrical stimulation of the retina. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2006;104:252-9



図1. 照射後1か月の眼底写真。Visual Streakを含む広範囲に網脈絡膜変性を認める。

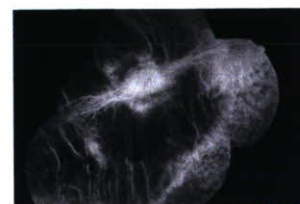


図2. 照射後1か月の蛍光眼底造影。図1の網脈絡膜変性に一致した範囲に低蛍光がみられる。

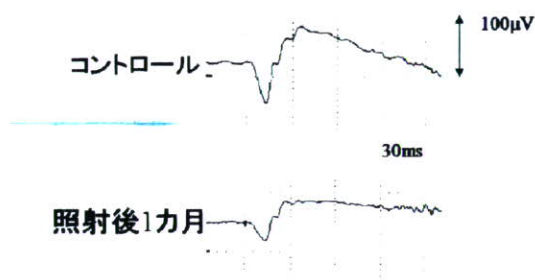


図3. 照射前と照射後1か月の全視野 ERG。a波、b波ともに3分の2程度に減弱した。

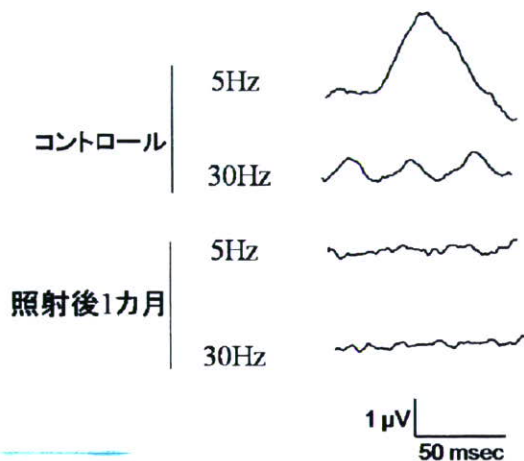


図4. 照射前と照射後1か月の局所 ERG。照射前では、5Hz 及び 30Hz の光刺激で振幅が得られたが、照射後1カ月ではフラットであった。

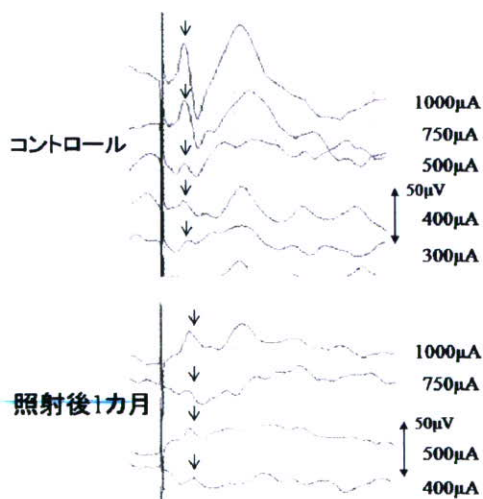


図5. 照射後1か月のコントロール眼と照

射部位それぞれに STS 方式の刺激電極を入れたときの EEP。刺激条件は、Biphasic cathodic first duration $500\mu s$ 。コントロール眼よりは小さいものの、照射眼でも EEP が誘発された。

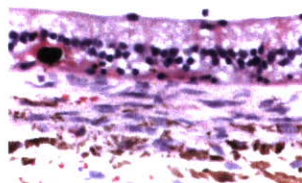


図6. 照射後1か月の400倍のHE染色。視細胞層、外顆粒層が完全に消失しているが、網膜内層は温存されている。

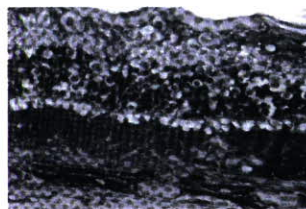


図7 重症の色素変性患者の網膜の組織標本。外顆粒層をはじめ視細胞層が完全に消失しているが、網膜内層は維持されている。



図8 イヌの視細胞障害モデルの網膜の組織標本。図6と同様に、外顆粒層、視細胞層が消失しているが、網膜内層は維持されている。

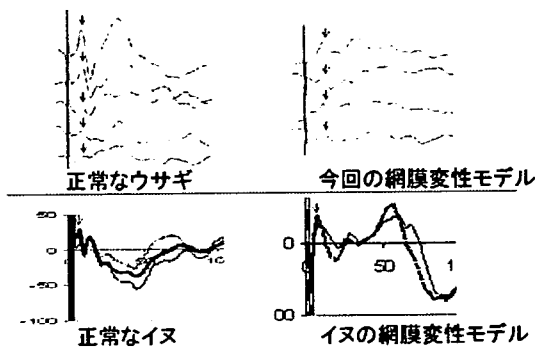


図9 今回の有色家兎の視細胞障害モデルとイヌの視細胞障害モデルでの EEP の比較

Ⅱ. 分担研究報告

網膜の精密評価システムの開発

—補償光学眼底鏡による生体眼視細胞の評価—

分担研究者 不二門尚 大阪大学医学系研究科感覚機能形成学 教授

研究協力者 北口善之 大阪大学医学系研究科感覚機能形成学 大学院生

研究要旨

人工網膜の適応を決める上で、残存する視細胞を評価することが必要である。これまで補償光学（Adaptive Optics）を用いた眼底カメラの開発を行ってきたが、本年度は昨年度に引き続き、眼底疾患眼での撮影及び所見の検討を行った。視細胞外節の変性が限局している複数の症例について光干渉断層計所見と比較する事により、視細胞外節が変性している部分で補償光学眼底写真でも視細胞変性の所見を認める事を示された。

また、Occult macular dystrophyなどの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の他、バックグラウンドの大きなモザイクの斑状変化を認めており、視細胞より外層の組織（網膜色素上皮、脈絡膜）の変性も示唆された。

視細胞以外の変性が補償光学眼底写真にどう反映されるか検討するため、昨年引き続き有色家兔に対する撮影と組織所見との対比を行い、焦点深度により各層の所見を得る事が出来る可能性が示された。

A. 研究目的

人工網膜の適応を決める上で、残存する視細胞を評価することが必要である。これまでわれわれは、補償光学（Adaptive Optics）を用いた眼底カメラの開発を行い、視細胞評価の可能性について検討してきた。補償光学は元来天文学で使われている技術で、これを眼底カメラなどの眼底撮影装置に応用すると、眼球の高次波面収差を補正することにより解像度を向上させることが可能で、従来の機器では不可能な視細胞レベルの生体内網膜観察が可能となる。

眼底疾患を観察した報告は黄斑ジストロフィーで数例あり、中心窩周辺の細胞密度低下や視細胞の脱落と思われる所見などが報告されている。画像の解釈法が確立されてくれば、錐体ジストロフィーなど診断が困難な網膜疾患に対する錐体密度など視細胞の情報による補助診断の可能性や、眼疾患による網膜障害・治療に対する回復度などに対する視細胞の形態学的側面からの評価など、臨床的に有用な検査となり得ると思われる。本年度は前年度に引き続き、補償光学眼底カメラにより得られた眼底像につ

いての検討を行った。

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

B. 対象と方法

I.

対象：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55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、位相変調素子を通過した後の波面がフラットになるように素子をコントロールする（約300ms毎）。補正された波面に対してさらにフィードバックがかかり、このループを周回することで波面収差はさらに低減される。設定した目標閾値に到達するとシャッターが開き撮影が行われる。撮像素子は 1000×1000 pixelのCCDを用い、露光2-3ms、30fpsにて撮影し、10-bit grayscaleのTiff画像約20フレー

ムを得た。

②撮影

大阪大学医学部倫理委員会の承認下で、説明を行い文書による同意を得た後、0.5%トロピカマイド・0.5%フェニレフリン（ミドリンP[®]）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5.4mmのとき）として、実際の補正状況に応じて増減した。視細胞の障害が限局している症例では、内部視標（図2）を用いて、0.5度あるいは0.25度ごとに撮影を行い、正常部分との境界がわかるようパノラマ画像を作成した。また、広範な視細胞障害が認められる症例では、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22眼

方法：

補償光学眼底カメラの光学系は上記と同様。ケタミン、キシラジ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、2.5%グルタルアルデヒド混合溶

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

C. 結果

正常眼では、ほとんどの例で個々の錐体視細胞を識別可能な画像の取得が可能であった(図3)。現時点まで対象となった眼底疾患症例は表1の通りである。眼底疾患眼では眼底像で正常眼とは異なった性状のモザイク構造が見られる事が多く、その構造は疾患により一定の傾向を認めた。

今年は高解像度光干渉断層計の所見と、補償光学眼底カメラ所見との対比を行った。結果、補償光学眼底カメラで輝点の脱落を認める領域が、光干渉断層計の視細胞外節層の乱れている領域に一致する事がわかった(図4)。また、Occult macular dystrophyの症例では、輝点の脱落が斑状に起こっている所見を認めた(図5)。

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、視細胞層、視細胞外節層の補償光学眼底像と組織像が一致する事が確認された。

D. 考察

視細胞の2次元的観察は、摘出標本での検討は詳細になされており(Curcio et al)、中心窩中央での錐体密度が最も高く、網膜周辺へ向かって杆体密度の増加とともに錐体密度は減少していくこと、錐体密度そのものには大きい個体差が存在することなどが報告されている。疾患眼での報告はあまり無く、例えば錐体ジストロフィーで錐体細胞が消滅しているという報告があるが、摘出眼であるため病期としては末期の例で

あるものがほとんどであり、初期の病態や進行様式など不明な点は依然多い。

本研究では補償光学を用いた生体内観察により、非侵襲的に視細胞の2次元的構造の観察が可能であった事は昨年度示したが、今年は光干渉断層計の解像度が格段に改善した事により、臨床症例においても光干渉断層計所見との比較で深さ方向の情報についても考察する事が可能となった。

補償光学眼底カメラで輝点の脱落を認める領域が、光干渉断層計の視細胞外節層の乱れている領域に一致する事が判明した事で、補償光学眼底カメラでの輝点の脱落が視細胞の障害を意味する事が裏付けられた。

補償光学眼底カメラの長所は、水平方向の解像度が約 $2\mu\text{m}$ と高い事であり、光干渉断層計で微小な異常を認めるものの解像度が不十分な症例の精査に適していると考えられる。前述のOccult macular dystrophyはその典型例であり、眼底疾患の進行様式の解明や、眼底疾患の詳細な経過観察に有用な検査となり得ると思われる。

有色家兎での組織所見との対比では、正常眼においては、焦点深度をずらす事で、網膜表層、視細胞、視細胞外節、網膜色素上皮の情報を得られる事がわかった(図6)。ヒトでは視細胞外節からの反射が強いためか他層の解析は現時点では困難であるが、波長や測定方法の改善により他層の解析も可能になる可能性が示唆された。

残存視神経節細胞の評価、網膜色素上皮細胞の評価は、人工網膜に限らず広範な網膜疾患に対して有用であり、今後の発展が望まれる。

E. 結論

補償光学(Adaptive Optics)を用いた眼底カ

メラは、網膜変性のある眼において、残存細胞する視細胞の評価に役立つ可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kitaguchi Y, Bessho K, Yamaguchi T, Nakazawa N, Mihashi T, Fujikado T.

In vivo measurements of cone photoreceptor spacing in myopic eyes from images obtained by an adaptive optics fundus camera.

Jpn J Ophthalmol. 2007 Nov-Dec;51(6):456-61

2. 学会発表

(1) 日本眼科学会 (2007/04/21)

有色家兔を用いた、補償光学眼底カメラの機能解析

北口善之、不二門尚、別所健一郎、山口達夫、中澤直樹、広原陽子、三橋俊文、前田直之、田野保雄

(2) 第43回日本眼光学学会 (2007年9月8日～9日 旭川)

IS/OS が欠損する症例における、補償光学眼底カメラ撮影

北口善之、不二門尚、別所健一郎、山口達夫、中澤直樹、広原陽子、三橋俊文、前田直之、田野保雄

(3) 第61回臨床眼科学会 (2007年10月11日～14日 京都)

Occult macular dystrophy の補償光学眼底

撮影所見

北口善之、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

(4) 第61回日本臨床眼科学会総会 (2007年10月11日～14日 京都)

シンポジウム OCT 最前線

題目：補償光学

発表者：三橋俊文

(5)

第55回日本臨床視覚電気生理学学会 (2007年11月3日～4日 名古屋市)

多局所網膜電図で振幅低下を認めた脈絡膜循環不全に対する高解像度網膜イメージング

北口善之、不二門尚、山口達夫、中澤直樹、広原陽子、三橋俊文、五味文、田野保雄

図1：補償光学眼底カメラの模式図

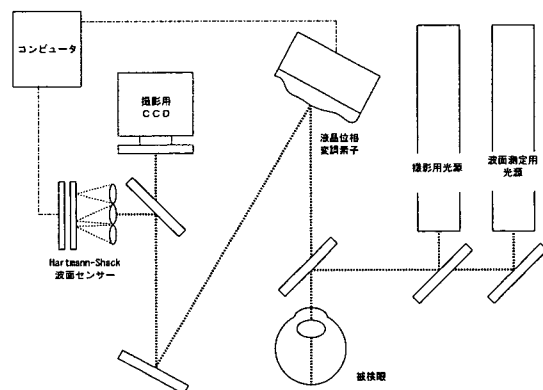


図2：内部視標

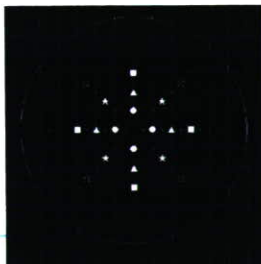
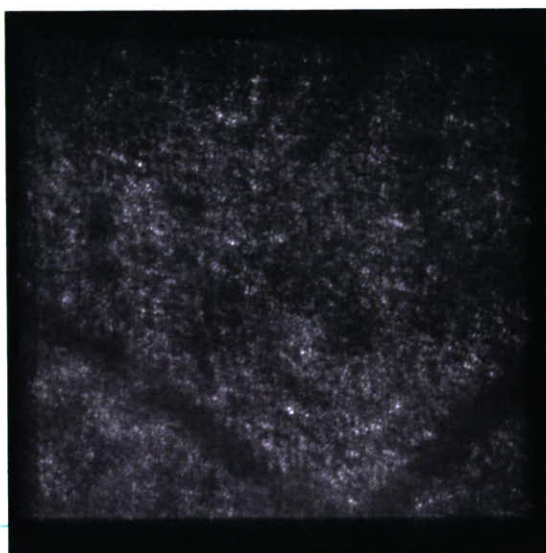


図3：正常眼の視細胞像



31歳女性（正常眼）、左眼黄斑部中央より2度耳側固視にて撮影。残存収差による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：補償光学眼底所見と光干渉断層計所見の対比

38歳男性。微小黄斑円孔の症例。

補償光学眼底写真における低反射部位と、光干渉断層計における視細胞内節/外節障害部位を比較した所、範囲の一致をみた。

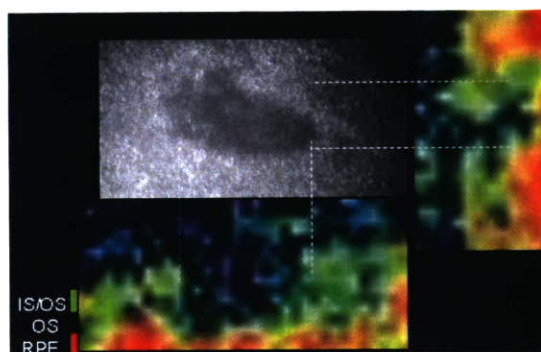
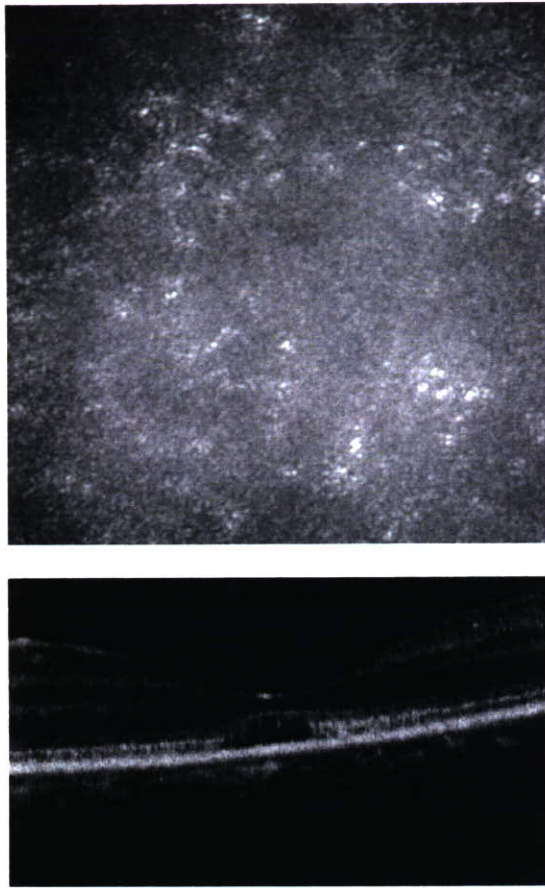


図5：眼底疾患眼の視細胞像

48歳男性（Occult macular dystrophy）。両眼の視力低下があり、局所網膜電図にて中心部の振幅低下を認める。画像は視標中央を固視にて撮影。斑状のモザイク低反射部位を認め、視細胞の障害が示唆される。低反射部位の配列が網膜色素上皮あるいは脈絡膜の配列と類似しており、これらの部位の障害も合併している可能性が示唆される。下は同部位の光干渉断層計所見。視細胞外節の脱落所見を認める。



左列が補償光学眼底写真、右列が同じ深さの組織所見。上から順に表層、視細胞層、視細胞外節層。

それぞれの深さにおいて、補償光学眼底像は組織所見と一致している。

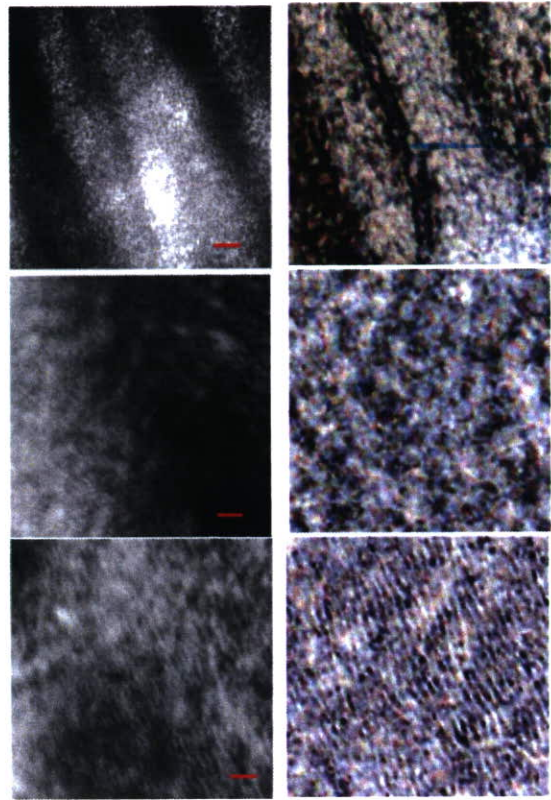


図6：有色家兎における補償光学眼底写真と組織所見の対比

表1 撮影対象となった疾患

網膜疾患なし	屈折異常なし		9
	近視 (-8D 以上)		2
網膜疾患あり	網膜ジストロフィー	錐体ジストロフィー	4
		錐体杆体ジストロフィー	2
		Occult ジストロフィー	6
		網膜色素変性症	1
	AZOOR		10
	micro macular hole		6
	近視性網脈絡膜変性症		4
	レーザー障害		2
	黄斑低形成		2
	先天性停止性夜盲		2
	黄斑部血管新生症		1
	視神経症疑い		1
	不明		3

厚生労働科学研究費補助金(感覚器障害研究事業)
分担研究報告書

網膜刺激電極の機能評価方法

—ネコ網膜における Optical Imaging—

分担研究者 大阪大学感覚機能形成学:不二門 尚

研究協力者 大阪大学感覚機能形成学:大川 賀孝

研究要旨

脳研究における optical imaging をネコ網膜に応用することで、網膜神経活動を客観的・定量的に観察することが可能である。これまでに光刺激による結果及び、人工網膜に使用されている suprachoroidal-transretinal stimulation (STS 法) による電気刺激の結果を報告し、網膜神経活動の時間的・空間的局在を可視化する事に成功した。今回は STS 法による網膜神経活動を計測し、その強度及び広がりに関して検討し、同時に視交叉部における誘発電位を同時に計測し、その結果を検討したので報告する。この技術を人における急性実験に用いれば、客観的・定量的かつ経時的な網膜神経活動計測を非侵襲的に行える可能性がある。

A. 研究目的

現在、脳研究において生体での神経活動の計測は fMRI や MEG、NIRS 等が臨床応用され、大きな成果を得ている。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、光学的手法であることから非介入的な観察が可能である。網膜は脳と同様に神経組織であり、この技術の応用が可能である。脳研究では神経を外界に露出する必要があるが、網膜は光学的に外界に露出していることから、生体においても非侵襲的にこの技術を応用できる。2004 年の *Association for Research in Vision and Ophthalmology* にて我々はヒト網膜における optical imaging 結果について発表したが、実験結果には再現性がなく artifact である可能性が否定できなかった。そこで、ネコを用いた動物実験を行い、これまでに光刺激及び suprachoroidal-transretinal stimulation (STS 法) による電気刺激による網膜神経活動が計測できることを報告した。今回、STS 法による網膜神経活動を計測し、その強度及び広がりについて検討し、また視交叉部における誘発電位を同時に計測し、その結果を検討したので報告する。

B. 方法

生後 1~2 年のネコ 16 匹を全身麻酔し、頭部及び眼球を固定、0.5%トロピカミド・5%フェニレフリン・1%アトロピン点眼液にて散瞳、コンタクトレンズを装着した状態で眼底を観察した。記録には眼科にて一般臨床応用されている眼底カメラ (TRC-50LX、TOPCON 社製) に改造を加えたものを使用した (図 1)。改造内容は、これまでと同様である (刺激光以外の光を無くすため、観察系の照明用ハロゲンランプには赤外フィルタを使用し、記録用には赤外光 CCD を使用した)。STS 法は、眼球後極部強膜を半層切除し、そこに押し当てた関電極と毛様体扁平部から硝子体腔内に挿入した不関電極の間に通電することにより施行した (図 2)。刺激条件は電流値以外を統一し、duration 500 μ sec の biphasic 矩形パルス波 (inward \rightarrow outward) を 50Hz で 4 秒間与えた (図 3)。1 session の撮影時間は 26 秒間で、開始から 2 秒まで刺激無し、2 秒から 6 秒までの 4 秒間は様々な条件で電気刺激を与え、6 秒から 26 秒までは刺激無しとした。26 秒間の撮影時間中は 25m 秒毎に撮影を繰り返し (図 4)、刺激前・刺激中・刺激後、計 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、刺激前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求めた (各 pixel 座標で階調を減算) (図 5)。

C. 結果

これまでに合計 476series の実験を行った。代表例を示す。図 6 は同一眼に、電流値 65~300 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 左のグラフに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 で白円、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、電流値と相関した (図 7 右グラフ)。図 8 左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 (刺激無し条件における同部位の反射光量変化の 8SD に相当) 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電流値に相関した (図 8 右グラフ)。同様の方法を用いて、個体数 N=9 の結果をまとめた結果を図 9 に示す。個体をまたぐと残存強膜厚や STS 電極の圧迫加減が変化するために閾値や相関直線の傾きが変化するが、各個体においては電流値と極めて高い相関を示すことがわかる。全実験を通じて、下方の tapetum 非存在部位では反射光量の変化は見られない、もしくは著しく小さいことはこれまでの実験と同様であった。視交叉にて計測した

誘発電位の結果を図 10 に示す。図 10A は刺激電流値と誘発電位の相関を見ており、電流値に関わらず刺激が視交叉部位まで有効に到達していることがわかり、また刺激電流値を大きくすると誘発電位すなわち活動した網膜神経節細胞の数が多くなると言うことがわかる。図 10B は図 9 と同様に刺激電流値と反射光量変化部位面積の相関である。図 10C はこの二つのグラフをあわせたもので、視交叉における誘発電位と反射光量変化部位面積の相関を見ている。この結果から網膜 optical imaging で計測された反射光量変化部位面積は、与えた電気刺激によって起こった網膜神経節細胞の数と相関することがわかる。

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。これまでの実験により、STS による網膜電気刺激では方法論が確立できたと考え、以降の実験予定として、STS 方式の人工網膜実験における客観的・定量的な網膜神経活動の計測等の人眼実験への応用を考えている。また STS 方式以外の電気刺激 (経角膜電気刺激等) による網膜神経活動の計測と言った方向への応用も考えている。

【学会発表】

大川 賀孝、不二門 尚、三好 智満、広原 陽子、三橋 俊文、田野 保雄 [網膜神経節細胞に起因する内因性信号] 2007 年日本眼科学会総会

Y.Okawa, T.Fujikado, T.Miyoshi, T.Mihashi, Y.Hirohara, Y.Tano [Contribution of Retinal Ganglion Cell Activity to Intrinsic Signals] ARVO, 2007

T. Fujikado, Y. Okawa, T. Morimoto, K. Matsushita, T Miyoshi, Y. Hirohara, T. Mihashi [Optical Imaging and Pupil Reflex by Trans-corneal Electrical Stimulation to Evaluate Inner-Retinal Function] IEEE·ICME, 2007

大川 賀孝、不二門 尚、三好 智満、広原 陽子、三橋 俊文、田野 保雄 [電気刺激による網膜内因性信号] 2007 年日本眼光学学会総会

T. Fujikado, Y. Okawa, T. Miyoshi, Y. Hirohara, T. Mihashi, Y. Tano [Optical imaging of the retina in response to the electrical stimulation] SPIE, 2008

T. Fujikado, Y. Okawa, T. Miyoshi, Y. Hirohara, T. Mihashi, Y. Tano [Contribution of Retinal Ganglion Cells to Intrinsic Signals in Retinal Optical Imaging by Trans-Corneal Electrical Stimulation or by Light Stimulation] ARVO, 2008

【学術論文】

Y. Okawa, T. Fujikado, T. Miyoshi, H. Sawai, S. Kusaka, T. Mihashi, Y. Hirohara, Y. Tano [Optical Imaging to Evaluate Retinal Activation by Electrical Currents using Suprachoroidal- Transretinal Stimulation] IOVS, 2007

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(反射光量強度変化及び

刺激電流値との相関)

図 8:図 6 の揭示変化(反射光量変化部位面積及び刺激電流値との相関)

図 9:反射光量変化部位面積(個体数 N=9)

図 10:STS 時の刺激電流値と視交叉で計測された誘発電位との相関

図 1



図 2

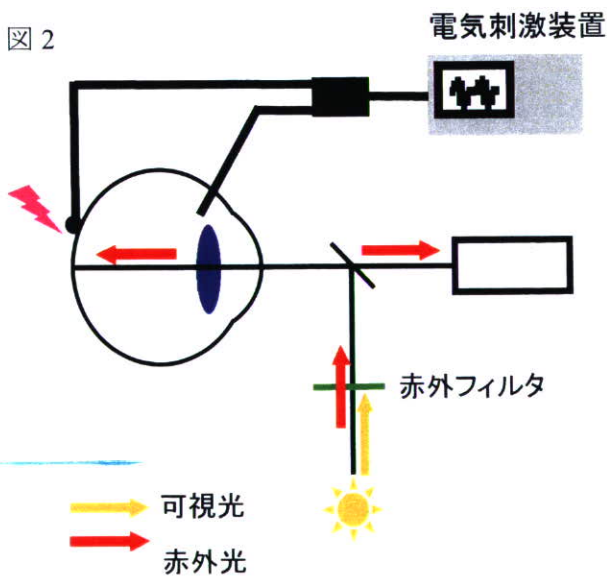


図 3

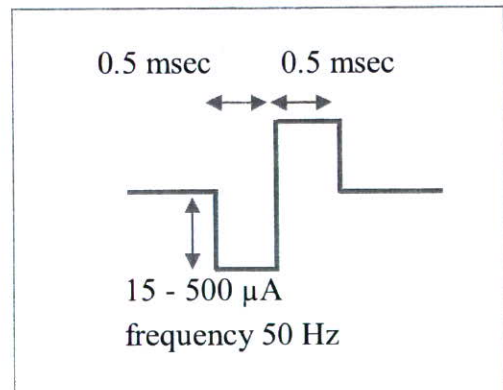


図 4

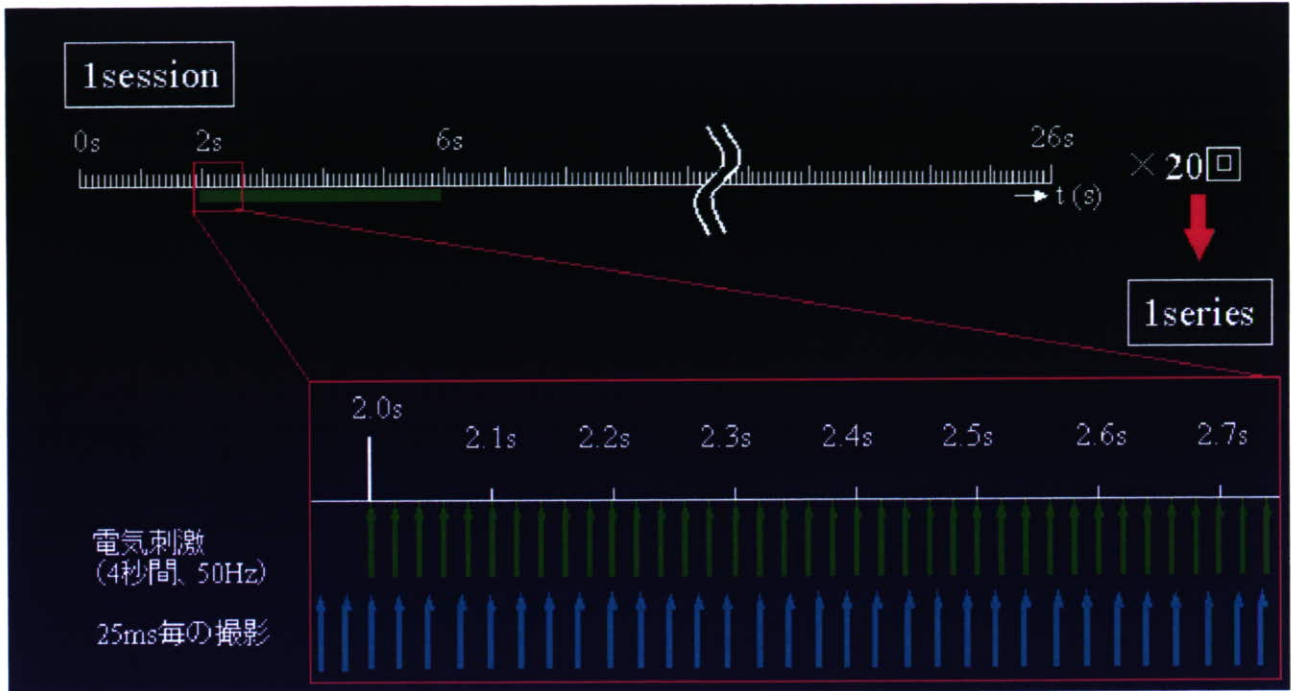


図 5

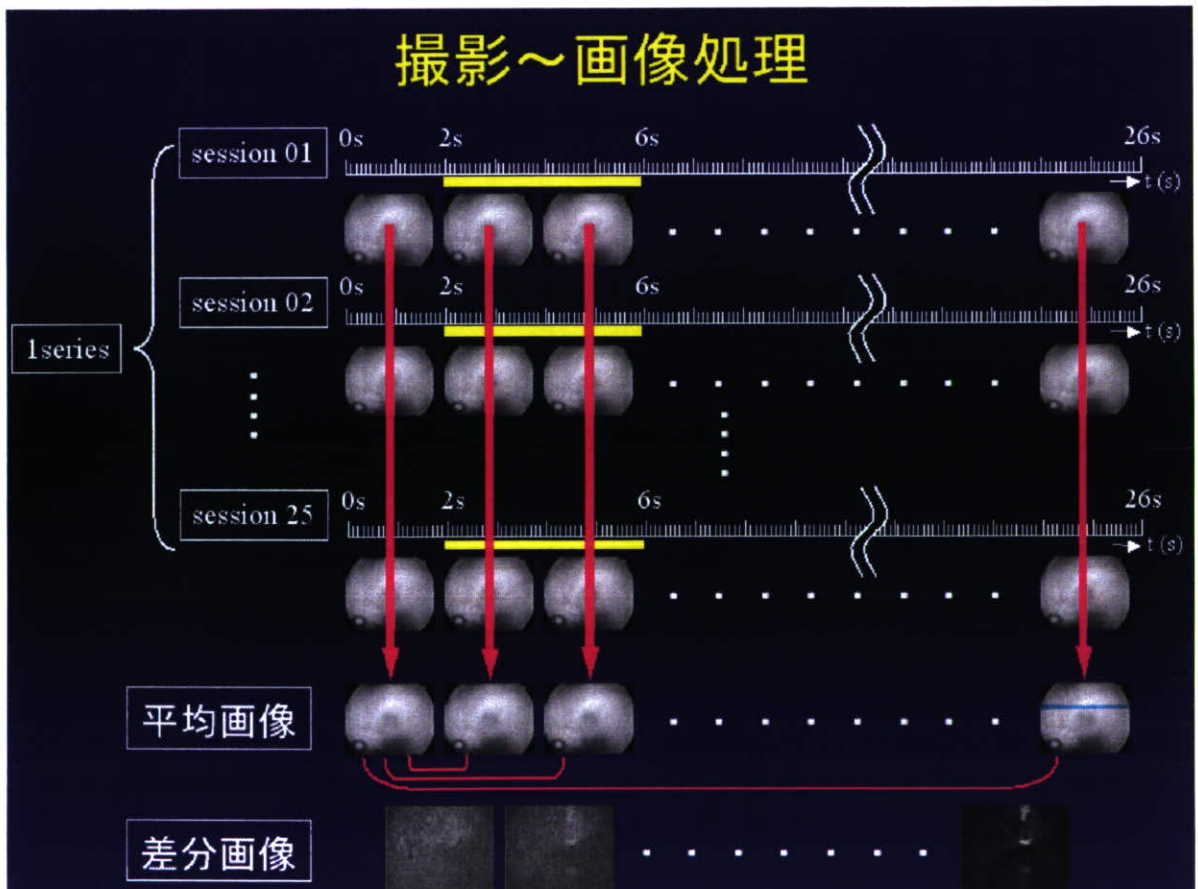


図 6

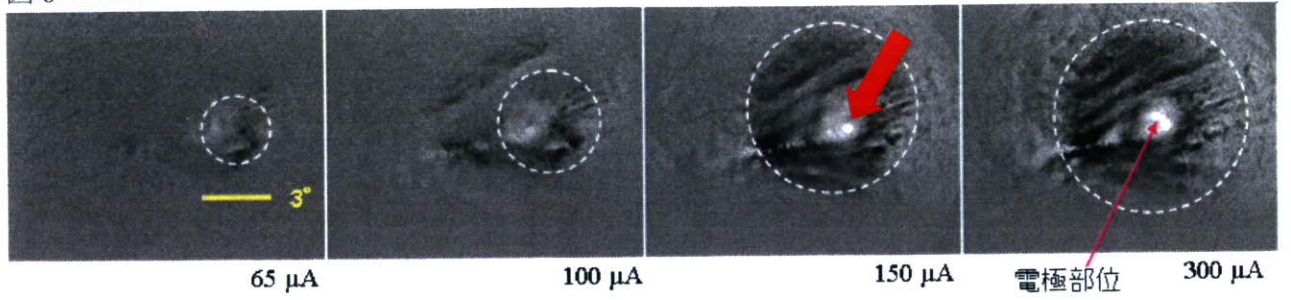


図 7

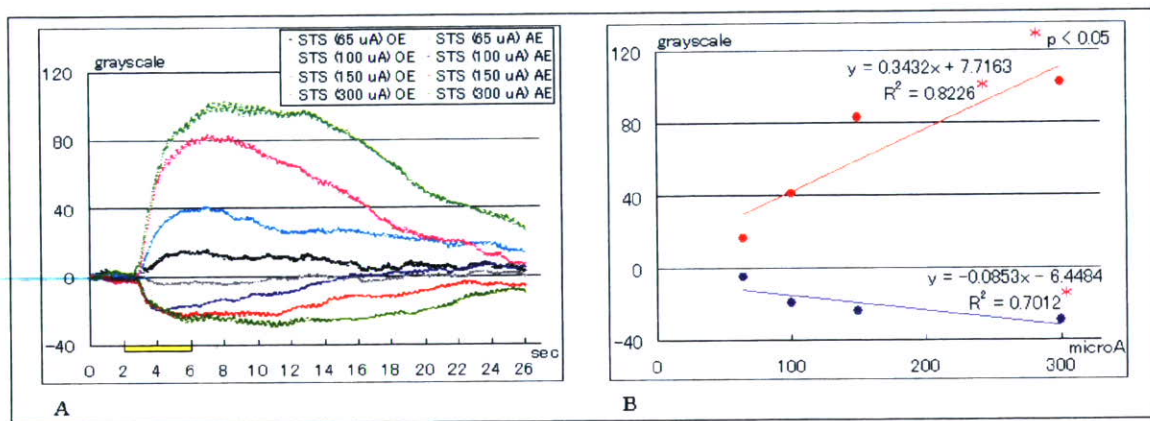


図 8

