

図 9

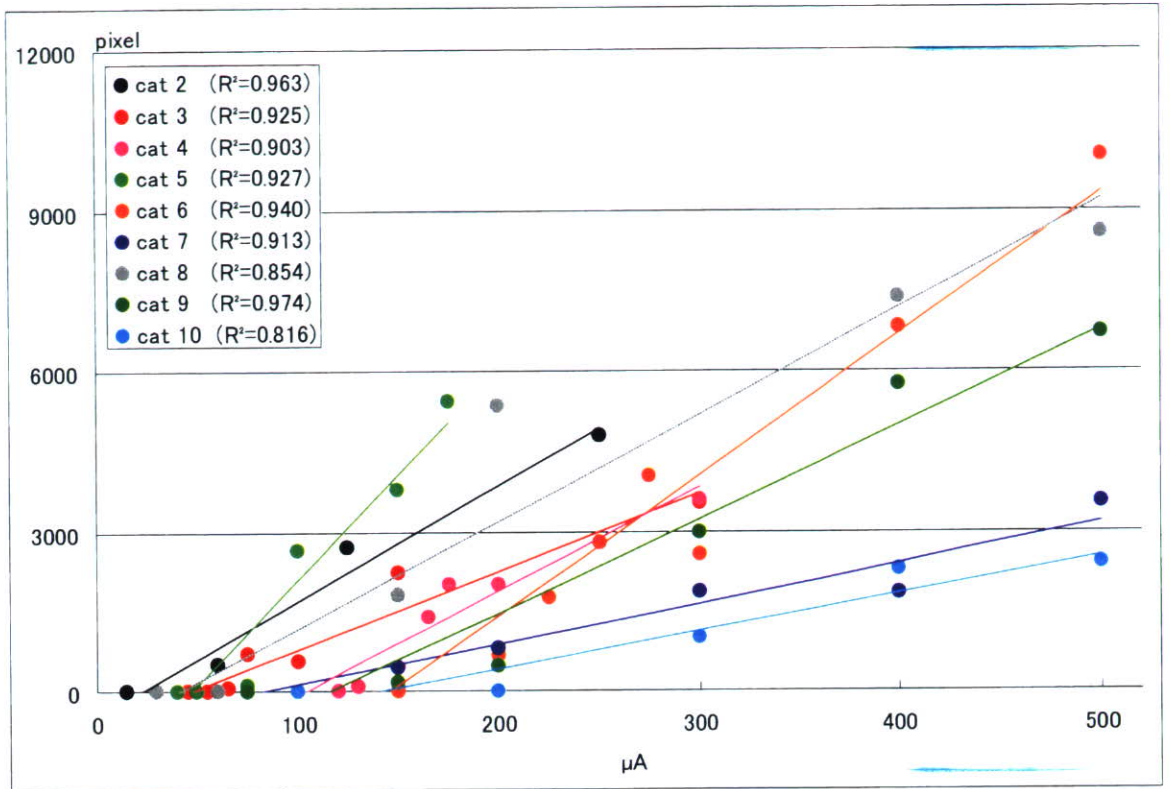
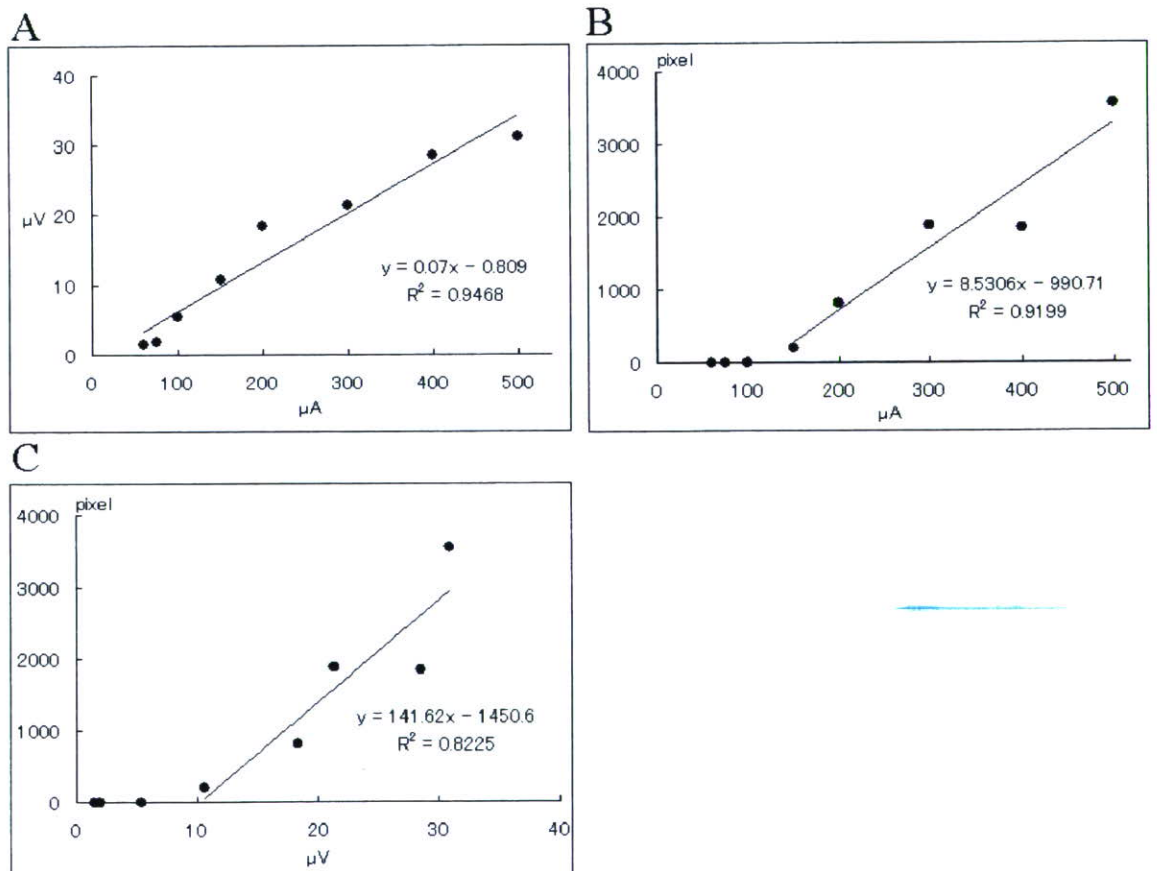


図 10



経強膜刺激による擬似光覚の評価

分担研究者 不二門 尚 大阪大学医学系研究科感覚機能形成学 教授
研究協力者 北口善之 大阪大学医学系研究科感覚機能形成学 大学院生
神田寛行 大阪大学医学系研究科感覚機能形成学 受託研究員

研究要旨

高分解能かつ低消費電力の人工視覚システムの開発には、パルスパラメータの最適化が必須である。今回、経強膜刺激法による網膜電気刺激実験を行いパルスパラメータと擬似光覚との関係について調べた。実験の結果、擬似光覚は電流値の増加にともない明るく自覚され、さらにパルス頻度が20~50 Hzの時に最も明るく自覚された。また明るい擬似光覚が得られる時のパルスパラメータと、電極個数と一致した擬似光覚が得られるときのパルスパラメータはほぼ一致していた。これらの知見は、本研究プロジェクトが開発を進める脈絡膜上-経網膜刺激(Suprachoroidal-Transretinal Stimulation: STS)方式の人工視覚システムに応用可能と考えられる。

A. 研究目的

本研究プロジェクトでは、脈絡膜上-経網膜刺激(Suprachoroidal-Transretinal Stimulation: STS)による人工視覚システムの研究開発を進めている。STSは、刺激電極が網膜と接触しないため、従来手法よりも網膜への侵襲が少ないと考えられている[1]-[3]。

これまでの研究から、STSは網膜色素変性に対しても有効に擬似光覚を誘発可能である明らかになった[4]。今後、更なる高分解能かつ低消費電力の人工視覚システムを目指すためには、刺激パルスパラメータの最適化が必要である。

擬似光覚とパルスパラメータの関係を検討する上で、臨床試験は有効な手段である。しかしSTSの臨床試験では、電極埋植手術のため被験者への負担が大きいため、同一被験者に対して繰り返し実験を行うことが難しい。そこで、臨床試験向けに被験者への侵襲が小さくSTSと類似した刺激手法（経強膜刺激法）を考案した。この手法では改造したコンタクトレンズ型を用いて眼外から網膜へ局所的に電気刺激を行う。この実験手法を用い刺激パラメータと擬似光覚との関係について基礎研究を行っている。

昨年度は、電気刺激によって発生する擬似光覚や疼痛についての研究結果を報告した。研究の結果、疼痛を避け擬似光覚のみ誘発するには、非対称型バイフェージックパルスが有効であることが明らかになった。今回は、パルスパラメータと明るさの関係および多極刺激によって生み出される擬似光覚について研究を行った。

B. 方法

[被験者]

対象は、20代から50代の健常被験者3例3眼である。電極装着前にベノキシール点眼液（参天製薬）による点眼麻酔、必要に応じてキシロカイン点眼液（アストラゼネカ）による点眼麻酔を行った。さらに角膜保護の目的でビスコート（日本アルコン）を角膜上に塗布した。試験終了後は、抗生物質の点眼（クラビット点眼液、参天製薬）を行った。また実験終了後の被験者の状況に応じてフルオロセイン染色による角結膜上皮の検査を行った。すべての試験は被験者の同意の下で行った。

[経強膜刺激]

本実験では実験用に特注したコンタクトレンズ型の電極（メイヨー社製、図1参照）を強膜刺激電極として用いた。この電極は強膜側のエッジ付近に直線状に4つの刺激電極が配列されている。刺激電極の直径は1.0 mmで中心間距離は1.5 mmである。刺激試行中は眼球を内転させ、刺激部位を眼球赤道部付近の強膜に接触させるようにしてこの強膜刺激用電極を眼球に装着した。なお、電極装着において結膜切開等の手術操作は行わなかった。一方、帰還電極には心電図記録用の使い捨てAg-AgCl電極を用いた。帰還電極は、刺激眼と同側の手の背に装着した。強膜刺激電極と帰還電極のあいだに刺激パルスを通電し、網膜への刺激を行った。

目的の章にても述べたが、疼痛を避け擬似光覚のみを誘発させる目的で、非対称型バイフェージックパルスを用いた。具体的にはパルス幅は1.0 ms、一相目と二相目のパルス幅の比率は1:5、インターパルスインターバルは1.0 msに設定した。本実験では電流強度（5~700 μ A:一相目）、パルス頻度の2つのパラメータを変化させた。これらの刺激パルスはNIDEK人工視覚研究所で臨床試験用に開発した9ch刺激装置(NVI-3)を用いて生成された。

[擬似光覚の明るさとパルスパラメータの関係]

擬似光覚の明るさとパルスパラメータの関係について検討した。被験者には通電によって生じる擬似光覚の明るさを5段階で表してもらった。

パルスパラメータとして電流強度およびパルス頻度に着目した。電流強度を変化させるときには、パルス頻度を34 Hzに固定した。疼痛が発生した場合にはそれ以上電流強度を上げなかった。一方、刺激頻度を変化させるときには電流強度を疼痛が発生しない範囲での最大強度に設定した。刺激頻度は10, 20, 34, 50, 68 Hzの5つの種類について実験を行った。

[多極刺激によって生じる擬似光覚の評価]

多極刺激によって生じる擬似光覚を2つの手法を用いて評価した。

手法①

2箇所刺激電極から同時に通電し、それによってどのような擬似光覚が生じるか被験者に質問した。具体的には、「擬似光覚の有無」を質問し、さらに擬似光覚が現れた場合はその「形状」、「個数」について質問した。次にパルス頻度および電流値の組み合わせを変え、擬似光覚の「個数

を質問した。

手法②

パルスパラメータを固定し単極刺激と多極刺激をランダムに繰り返して両者をどの程度弁別できるか実験を行った。多極刺激では刺激電極の内、2つの電極を用いて同時に通電を行った。単極刺激ではこれらの電極の内どちらか一極を用いて通電を行った。その刺激が一極刺激によるものか多極刺激によるものか被験者に弁別させた。なお、実験中は被験者に刺激条件を伝えなかった。この試行を15回繰り返しその正答率を記録した。用いた電極を仮に電極Aと電極Bとすると、試行の内訳は電極Aのみの刺激が5回、電極Bのみの刺激が5回、AとBの同時刺激が5回だった。

なお、この手法②のみ、パルス幅を0.5 msに設定した。

C. 結果

一擬似光覚の明るさについて一

図2上図より、2例の被験者共にパルス頻度が20~50 Hzのときに擬似光覚が明るく感じられる傾向が認められた。次に電流強度を変化させると、電流強度の上昇に従い擬似光覚も明るく自覚された(図2下図)。ただし、電流強度を上げすぎると疼痛が発生したため、それ以上の電流強度では検査は行わなかった。

一多極刺激について一

2個の刺激電極から同時に通電すると、パルスパラメータによって2個の擬似光覚が自覚される場合と、1個の擬似光覚のみが自覚される場合があった。それぞれのパルスパラメータの組み合わせによる擬似光覚の数についてまとめた表が図3である。被験者1の場合は、パルス頻度が34 Hzまたは50 Hzで電流強度が200 μ Aの時に2個の擬似光覚が自覚された。電流強度を200 μ Aより上げると疼痛が生じた。被験者2の場合では、電流強度が100 μ Aあるいは150 μ Aの時に擬似光覚が2個自覚されることがあった。電流強度を200 μ Aよりも強くすると同様に疼痛が生じた。電流強度を弱めると、両被験者共に擬似光覚が1個に自覚された。このときの擬似光覚の形状を質問したところ、「楕円形に見える」、「ひょうたん型に見える」との返答が多く得られた。

次に、手法②により一極刺激と多極刺激の弁別実験を行った。3名の被験者に対する結果が図4である。刺激電極の組み合わせがCh1とCh4(電極間距離4.5 mm)で、パルス数が10 pulsesで刺激を行うと、被験者3名中2名が80%以上の高い

正答率で一極刺激と二極刺激を弁別できた(図4上段)。同刺激電極にて今回はパルス数を4 pulsesにて刺激を行った場合も、同様に被験者3名中2名が80%以上の高い正答率を示した(図4中段)。残りの被験者でも73%と比較的高い正答率を示した。パルス数を4 pulsesのまま刺激電極の組み合わせを変えて(Ch1とCh2)、電極間距離を1/3に短くして(1.5 mm)実験を行った場合でも、被験者3名中2名にて80%以上の高い正答率を示した(図4下段)。

D. 考察

今回の実験により、擬似光覚は電流値の増加にともない明るく自覚され、さらにパルス頻度が20~50 Hzの時に最も明るく自覚されることが明らかになった。

多極刺激を行うと、電流値が低い時は擬似光覚が一個しか知覚されなかったが、電流値を上げると刺激電極の個数と一致した個数の擬似光覚が知覚された。同刺激パラメータで電極個数の弁別試験を行うと、被験者は一点刺激と二点刺激を高い正答率で弁別した。被験者は二点の刺激を二個の擬似光覚として感じていることが確認できた。

明るい擬似光覚が得られる時のパルスパラメータと、電極個数と一致した擬似光覚が得られる時のパルスパラメータはほぼ一致していた。明るい擬似光覚が得られる刺激条件のとき、空間解像度が高くなるのではないかと推察される。なお、今回の実験では最小で1.5 mmの電極間距離を弁別できた。これは、視角5度に相当する。

経強膜刺激法は強膜側に電極を設置して刺激しているという点でSTSと条件が類似している。また経強膜刺激では手術操作が不要で被験者への負担がSTSの臨床試験に比べて少ないことから、長時間の試験、同一被験者への繰り返し試験、健常者に対する試験等が可能である。したがって、STSにおける刺激パラメータの最適化等の検討を行うには最適な実験手法の一つであると考えられる。一方、この経強膜刺激法がSTSと異なる点は①帰還電極の位置、②網膜刺激電極と網膜との距離である。このためSTSよりも刺激効率が劣ると考えられる。逆に考えると、今回の実験で得られた擬似光覚の刺激閾値よりもSTSにおける閾値のほうが低くなる可能性がある。また、刺激電極アレイ上のクロストークがSTSよりも経強膜刺激で起こりやすいため、同様の多極刺激実験をSTSで行った場合、今回の実験以下の正答率になることは考えにくい。したがって、STSで生じる擬似光覚の最小分離域は、経強膜刺激実験のもの

よりも小さくなると考えられる。

E. 結論

経強膜刺激を用い擬似光覚とパルスパラメータの関係を検討した。通電によって発生する擬似光覚は電流値の増加に伴って明るく知覚され、さらに刺激頻度が20~50 Hzの時に最も明るく知覚された。多極刺激を行うと電流値を増加させた時に刺激箇所と同数の擬似光覚が得られた。これらの結果から、明るい擬似光覚が得られるパルスパラメータのときに高い空間解像度が得られると推察される。これらの知見は、STSにも応用できると考えられる。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

論文発表

- (1) Morimoto T, Fujikado T, Choi JS, Kanda H, Miyoshi T, Fukuda Y, Tano Y. Transcorneal Electrical Stimulation Promotes the Survival of Photoreceptors and Preserves Retinal Function in Royal College of Surgeons Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4725-4732
- (2) Nakauchi K, Fujikado T, Kanda H, Kusaka S, Ozawa M, Sakaguchi H, Ikuno Y, Kamei M, Tano Y. Threshold suprachoroidal-transretinal stimulation current resulting in retinal damage in rabbits. *J. Neural Eng.* 2007;4:S50-S57
- (3) Fujikado T, Morimoto T, Kanda H, Kusaka S, Nakauchi K, Ozawa M, Matsushita K, Sakaguchi H, Ikuno Y, Kamei M, Tano Y. Evaluation of Phosphenes Elicited by Extraocular Stimulation in Normals and by Suprachoroidal-Transretinal Stimulation in Patients with Retinitis Pigmentosa. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:1411-1419.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し

[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.*
- [3] Sakaguchi H, Fujikado T, Fang X, Kanda H, Osanai M, Nakauchi K, Ikuno Y, Kamei M, Yagi T,

Nishimura S, Ohji M, Yagi T, Tano Y. Transretinal electrical stimulation with a suprachoroidal multichannel electrode in rabbit eyes. *Jpn J Ophthalmol.* 2004; 48(3): 256-261.

- [4] M. Kamei, T. Fujikado, H. Kanda, T. Morimoto, K. Nakauchi, H. Sakaguchi, Y. Ikuno, M. Ozawa, S. Kusaka, and Y. Tano. Suprachoroidal-Transretinal Stimulation (STS) Artificial Vision System for Patients with Retinitis Pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006 47: E-Abstract 1537.



図1 経強膜刺激用コンタクトレンズ型電極。刺激電極数は4極。電極中心間距離は1.5mm。電極直径は1mm。

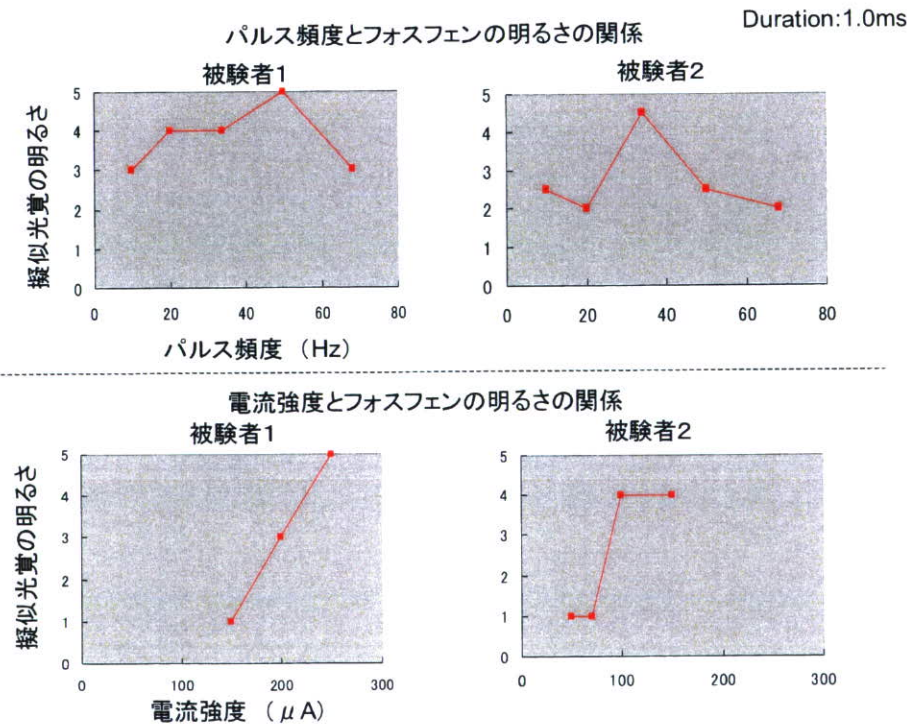


図2 擬似光覚の明るさとパルスパラメータの関係。

被験者1

	パルス頻度				
	10	20	34	50	68
50					
70					
100				0	
150	0	0	0	0	0
200	1	1	1	1	1
250	1	1	2	2	1
300					

被験者2

	パルス頻度				
	10	20	34	50	68
50		0	1		
70	0	1	1	1	0
100	2	1	2	2	1
150	1	2	1		
200					
250					
300					

図3 二点刺激によって生じる擬似光覚の個数。図中の数字は近くされた擬似光覚の個数を示す。空欄は疼痛発生などの原因により、データが得られなかった組み合わせである。

1-4ch	被験者①	被験者②	被験者③	Duration:0.5ms Frequency: 20Hz
1極刺激(Ch1)	80%	100%	60%	10 pulses
1極刺激(Ch4)	60%	100%	100%	
2極刺激(Ch1-4)	20%	100%	100%	
全体	53%	100%	87%	
1-4ch	被験者①	被験者②	被験者③	
1極刺激(Ch1)	80%	100%	60%	4pulses
1極刺激(Ch4)	100%	100%	100%	
2極刺激(Ch1-4)	80%	80%	60%	
全体	87%	93%	73%	
1-2ch	被験者①	被験者②	被験者③	
1極刺激(Ch1)	80%	80%	100%	4pulses
1極刺激(Ch2)	100%	100%	60%	
2極刺激(Ch1-2)	80%	60%	20%	
全体	87%	90%	60%	

図4 一極刺激と二極刺激の弁別を行わせた時の正答率。

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 —ウサギ一次視覚野における網膜刺激電極の機能評価—

分担研究者 澤井 元 大阪大学医学系研究科システム生理学 助教授

研究協力者 三好智満 大阪大学医学系研究科システム生理学 助手

西田健太郎 大阪大学医学系研究科眼科学 研究員

研究要旨

脈絡膜上—経網膜刺激(STS)の空間解像度を機能的に評価するため、ウサギの一次視覚野から単発 STS に対する局所誘発電位を記録した。得られた局所誘発電位の皮質上での分布を調べた結果、分布の半値幅は 0.5 mA 刺激電流に対し皮質上の 1 mm の範囲内に収まることがわかった。この結果から、STS の空間分解能は網膜上刺激と比べても遜色ないと考えられた。

A. 研究目的

本研究グループは脈絡膜上-経網膜刺激法 (Suprachoroidal-Transretinal Stimulation: 以下 STS) に基づく人工網膜の開発を積み重ねて来た[1]-[4]。これまでの動物実験で得られた基礎データから、網膜色素変性症患者の急性臨床試験で使用する脈絡膜上多点電極アレイが設計された。これは、バリレン被覆された厚さ 0.1 mm の白金配線基盤上に、直径 0.5 mm, 高さ 0.5 mm で先端部が半球状に加工された弾丸型白金製の電極 49 極を中心間距離 0.7 mm でハニカム状に配列したものである。この最新の刺激電極アレイを、実験動物の皮質視覚野での (1) 空間分解能 (二点弁別閾)、(2) 多点刺激に対する応答の点から機能評価し、最適な刺激パラメータを見いだすことが我々の研究班の課題である。その課題遂行には、電位感受性色素を用いた視覚野応答の光学計測が極めて有効と考えられる[4]。この方法は誘発電位や細胞外ユニット活動の記録などの電気生理学的計測に比べて、視覚野全体の電位応答を高い空間分解能で一度に観察することができる点で優れている。しかし、その一方で、電位感受性色素の感度は低く、時間分解能も低いという短所があり、特に閾値付近の刺激に対する応答を観察するに

は光学計測だけでは不十分である。

そこで本年度は、光学計測の予備段階として 1 点刺激に対する皮質視覚野の応答の時間的空間的特性、特に空間的な広がりを電気生理学的解析した。

B. 方法

実験動物： 実験動物として成雌ウサギ 4 匹 (Kbl Dutch 種, 日本 SLC) を使用した。実験は全て大阪大学医学部の動物実験ガイドラインに従って行い、実験動物に与える苦痛を最小限にするよう留意した。術中および電気生理学的記録中はハロセン (2-2.5%) の吸引により動物を麻酔し、必要に応じて人工呼吸を行った。実験中は保温マットで体温を 37 度に維持し、心電図、呼気ガス分析装置およびスパイロメータで動物の生理的状态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。

網膜電気刺激： 刺激電極には前述の急性臨床試験用最新の電極アレイを 6 極に縮小したものを使用した。即ち、白金製の弾丸型単極電極 (直径 0.5 mm, 高さ 0.5 mm) を中心間距離 0.7 mm で 2 行×3 列に配した多点電極アレイ (ニデック製)

である。この刺激電極アレイを設置するために、麻酔したウサギの左側眼球後部表面を露出させ、視細胞密度の最も高い visual streak 中央から腹側 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 (2×2mm) の強膜ポケットを作製した。このポケットに、2×3 点刺激電極アレイを挿入した。アレイとケーブルとの接合部に縫合糸をかけたのち、直下の強膜と縫合してアレイとケーブルを眼球に固定した。硝子体内におく参照電極には先端 5 mm を露出した直径 0.2 mm の絶縁コート白金線を用いた。毛様体扁平部の眼球壁に 30 G 注射針で穴を空け、そこから参照電極の先端を硝子体内へ挿入した。刺激電極アレイと参照電極を多チャンネル定電流刺激装置に接続し、単相あるいは二相性の矩形波定電流の STS を与えた (パルス幅 0.2, 0.5, 1.0 ms, 刺激強度 50-1000 mA)。

電気生理学的記録： 左眼球への STS に対して、反対側の脳皮質視覚野の局所誘発電位を記録するために、動物の頭部を脳定位装置 (ナリシゲ製) に固定したのち、右後頭骨を露出させ、bregma (冠状縫合矢状縫合交点) より尾側方向へ 2.0 mm から 13.0 mm、内外側方向に 2.0 mm から 10.0 mm の範囲で頭蓋骨を切除した。露出した皮質表面に記録電極を置き、STS に対する局所誘発電位 (10 Hz ~ 5k Hz 濾波器使用、加算平均 100 回) を記録した。記録電極には直径 0.3 mm、先端形状が半球状のタングステン電極 5-8 本を中心間距離 1 mm で一列に配した櫛型多連記録電極 (特注、ユニークメディカル製) を使用した。各電極の高さは脳表面の凸凹に沿うよう微調整できる。この多連電極を 3 次元マイクロマニピレータ (ナリシゲ製) に取り付け、電極が内外側方向に並ぶようセットした。そして電極セットを吻尾側方向に 1 mm 間隔で移動させながら記録することで、皮質視覚野表面における局所誘発電位の分布を計測した。

データ解析： STS に対する誘発電位は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) を用いて加算平均処理され、その波形のデジタルデータは txt フォーマットのファイルに保存された。このデータは Igor Pro (ver. 5 WaveMetrics, Inc.), Microsoft Excel 2004 (ver. 11, Microsoft), DeltaGraph 5 (日本ポラデジタル) を用いて波形の描画、潜時・頂点振幅の解析、振幅の空間分布 (マッピング) とその時間的变化を解析した。

C. 結果

STS に対する局所誘発電位の皮質視覚野分布は全 4 例に置いて限局しており、その位置は視野再現マップ [5] から visual streak 近傍の強膜電極設置位置に対応すると推定される領域にほぼ相当していた。図 1 はその典型例で、記録された誘発電位を記録領域の皮質視覚野のカメラ画像上に重ね書きしたものである。単発 STS (単相陰性矩形波、パルス幅 0.5 ms, 電流値 0.5 mA) に対して 4-5 行、6-7 列で大きな振幅の誘発電位が発生し、そこから周辺に遠ざかるにつれて振幅が急速に低下、消失していることがわかる。

図 2 は、全ての記録部位の誘発電位波形を重ねがきしたもので、単相陰性矩形波電流を用いた STS 刺激に対しては頂点潜時約 30 ms で陽性電位とそれ続く陰性電位からなる二相性の波形が限局して記録された (図 2 b)。各記録部位の誘発電位の振幅の標準偏差 (図 2 b、赤線) をみると、陰性波—陽性波の頂点潜時に一致して標準偏差が著明に大きくなっていることから、この二相性の誘発応答が視野内の限局した部位で発生していることが分かる。

一方、同じ電流値で極性を変えた (単相陽性矩形波電流) STS 刺激に対しては、約 40 ms 以降の潜時で陽性波が見られた。その頂点潜時は約 50 ms で、上述の単相陰性矩形波電流を用いた STS 刺激に対する応答より遅く、振幅も小さかった (図 2 a)。また、二相性矩形波電流刺激を用いた場合、陰性矩形波を先行させても (図 2 c)、陽性矩形波を先行させても (図 2 d)、明確な応答は観察されなかった。さらに、この単相陰性矩形波電流を用いた STS 刺激に対する二相性の誘発電位の潜時は、網膜への閃光刺激に対する誘発電位 (図 3 b、赤線) と近いが、視神経電気刺激に対する誘発電位 (図 3 c) の陽性頂点潜時が 14 ms であったことに比べると非常に遅いことから、この STS 刺激では網膜外層の神経回路が刺激されているもので、網膜神経節細胞の直接刺激の結果ではないと考えられた。

図 4 は単相陰性矩形波電流を用いた STS 刺激に対する皮質視覚野内の誘発波形の振幅を等高線でマップ化し、そのマップを刺激後 5 ms から 60 ms まで 5 ms 毎に順に並べたものである。潜時 35 ms のマップでは陽性の局所応答が生じ、その陽性電位分布は周辺にいくほど小さくなっていることがわかる (図 4 下の鳥瞰図参照)。以上のことから網膜局所に加えた単発の STS によって皮質視覚野において限局した場所に一過性の応答が発生していることが分かった。

次に、電極アレイ上の異なる電極を用いて刺激

し、その応答のマップがどのように変化するかを検討した。図5はその結果の一例である。中心間距離 0.7 mm で隣接する 1, 2, 3 の電極と 1 から 1.57 mm 離れた 4 の電極を用いて单相陰性矩形波電流による STS を与えた (図 5 a)。それぞれの刺激に対する潜時 35 ms における視覚野電位のマップ (図 5 b) を比較すると、いずれも限局した陽性の応答があり、その場所はほぼ一致していたが、応答の強さ、広がりは一貫していなかった。電極 1 での刺激に対する応答は他の 3 つの電極を用いた刺激に対する応答よりも弱かった。電極 3 を用いた刺激に対する応答は内外側に長く広がっていたが、電極 2 を用いた刺激に対する応答は内外側、吻尾側方向ともほぼ同じ範囲に広がっていた。図 6 は最大応答の 75% を超える電位の分布域を示したものである。いずれも 1.5 mm 四方の範囲に収まっていた。さらに、今回の電極アレイ上でもっとも離れた (1.57 mm) 1 と 4 の電極を用いた場合、それぞれの応答の分布を比較するとわずかなズレが見られた (図 6 c)。このことは、少なくとも網膜上 1.57 mm 離れた電極を通じて STS 刺激を与えると位置の異なる疑似光覚 phosphens として区別して知覚される可能性を示している。

D. 考察

これまで、ウサギでは後頭骨中央に取り付けられたネジ電極で STS 刺激に対する応答が記録されているが[2, 3]、網膜の刺激部位と皮質の記録部位とが必ずしも topographic に対応していたわけではなかった。今回、皮質表面から記録し、さらに視覚野全域をマッピングすることで、STS 刺激によって皮質視覚野において非常に限局した誘発電位が発生することが分かった。また、今回記録された誘発電位は、波形や潜時の点から見て先行のネジ電極で記録されていた応答と近似していた[2]。

刺激電極として臨床試験仕様の電極アレイの縮小版を用いた。0.7 mm で隣接する刺激電極同士では、誘発電位の空間分布に明瞭な差が認められず、電極アレイ上でもっとも離れた (1.57 mm) 電極間同士の電位応答マップで、わずかな差が観察された。これには 2 つの原因が考えられる。一つには STS 刺激の強度が閾値付近ではなく、かなり強い刺激を用いた結果、応答の範囲が広がってしまったことが考えられる。二つめには、記録部位間の距離が 1 mm 間隔と空間解像度が低いことによるものと考えられる。今後は、より空間解像能に優れた (0.06 mm 四方) 光学計測を用いて、

隣接する刺激電極に加えた STS 刺激がそれぞれ異なる応答マップを示すか否かを検討する必要がある。

今回、強い刺激と空間解像度が低い手法を用いたものの、少なくとも網膜上 1.57 mm 離れた電極を通じて STS 刺激を与えると位置の異なる疑似光覚 phosphens として区別して知覚される可能性を示すことが出来た。ヒト網膜上の 1.57 mm は視角約 5° に相当する。これは他の網膜刺激方式によって得られると推定されている視力に比べて数倍低い値である。しかし、各電極への刺激によって生じた応答の 75% を超える電位の分布域を見るといずれも 1.5 mm 四方の範囲に収まっていた。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[6]。我々の昨年度の研究でも電流値が 300 μ A 程度の強度で STS に対する応答は皮質上で半値幅 0.71 mm まで限局することが分かった。従って、今回の研究結果の 1.5 mm 四方は半値幅 0.71 mm に近い値であり、さらには網膜上刺激の値の 1.5 倍程度である点から考えると、網膜上刺激方式と比べて STS では得られる視力は少し劣るものが網膜に対して非侵襲的であることから、STS は人工視覚の刺激方式として有効と考えられる。

今回の実験では、電極アレイ上の電極ごとに誘発電位の大きさや広がり大きな違いが見られた。これは、電極と強膜との密着の程度や電極下の残存強膜組織の厚さが異なることによるものと考えられる。密着性が低い、あるいは電極下の組織が厚いほど刺激効率が低下し、強い刺激が必要となり、その結果、応答の範囲が広がって空間解像度を低下させる可能性がある。今後は、各電極が均等にかつ確実に眼球に密着させる埋め込み術を開発する必要がある。また、強膜ポケット内も、出来る限り均一に強膜切開する必要がある。

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. 健康危惧情報

特に無し

G. 研究発表

特に無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

D. 考察

[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] Osanai M, Sakaehara H, Sawai H, Song W-J, Yagi T. Optical recording of retinal and visual cortical responses evoked by electrical stimulation. *IEEJ Trans. EIS.* 127: 1595-1602, 2007.
- [5] Choudhury BP. Visual field representation in the newborn rabbit's cortex. *Brain Res* 153(1):27-37, 1978
- [6] Weiland JD, Liu W, Humayun MS. Retinal Prosthesis. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2005: 7:361-401.

[図および説明]

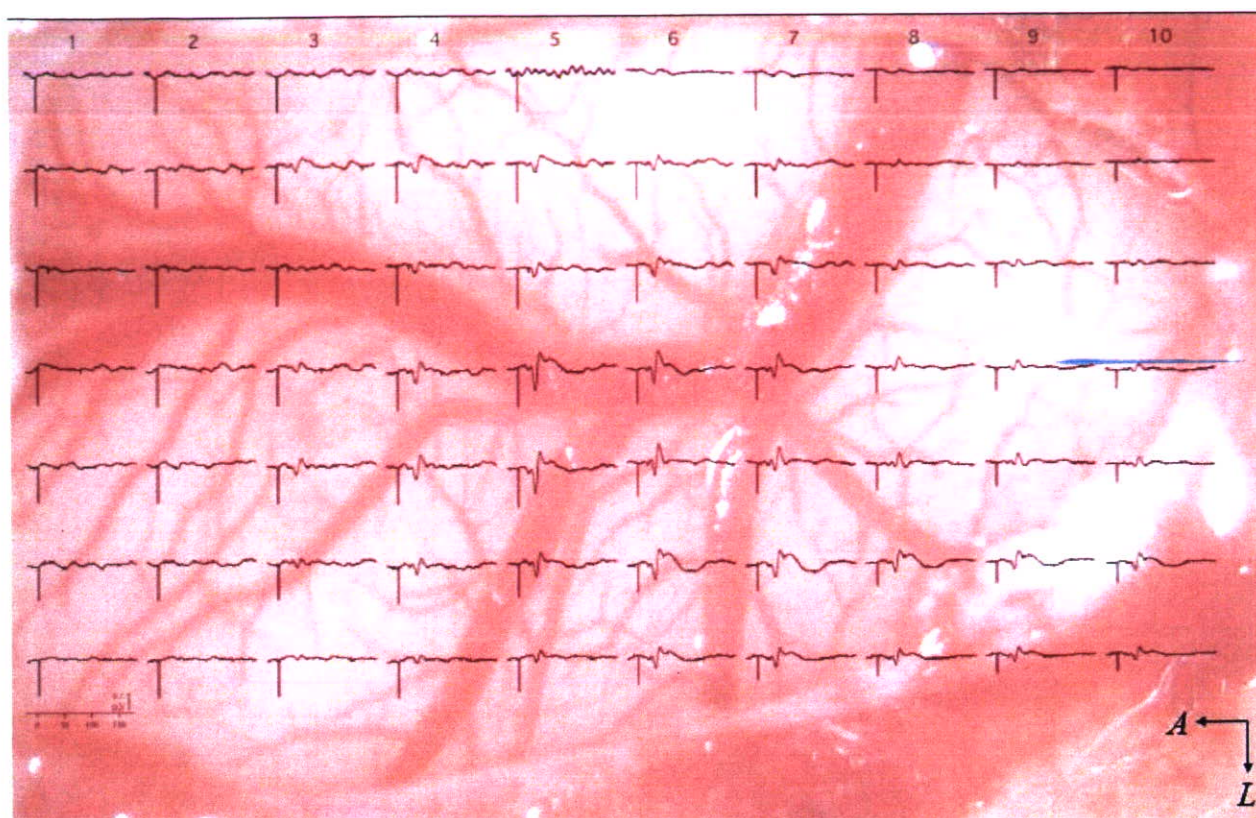


図 1. 単発 STS に対する皮質視覚野の局所誘発電位

内外側、吻尾側方向に 1 mm ステップで皮質表面から記録された誘発電位を記録領域の皮質視覚野のカメラ画像上に重ね書きした。刺激は单相陰性矩形波、パルス幅 0.5 ms, 電流値 0.5 mA で、100 回加算平均。各トレースの下向き線は刺激の artifact である。

A: anterior, L: latral

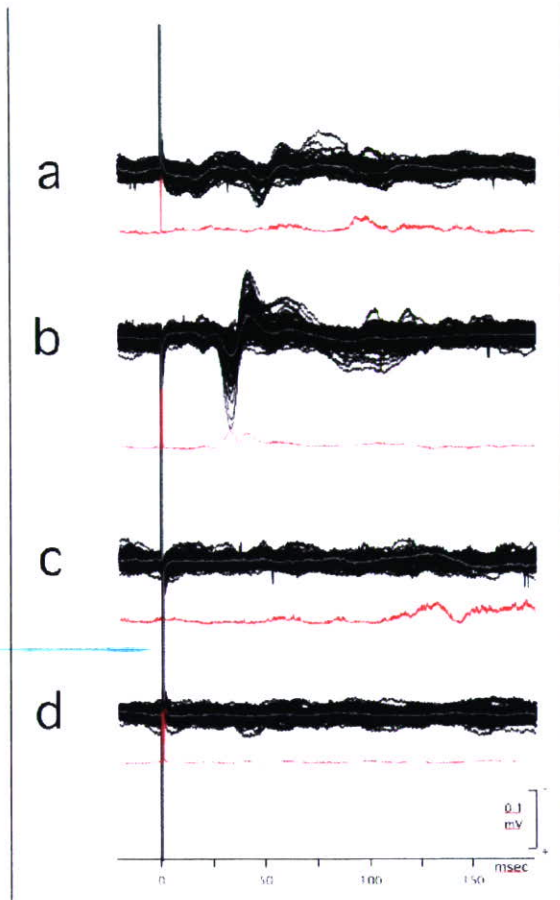


図2. 単発 STS に対する皮質視覚野の局所誘発電位

単発 STS に対して内外側、吻尾側方向に 1 mm ステップで皮質表面から記録された誘発電位（黒線）を重ね書きしたもの。a：単相陽性矩形波（パルス幅 0.5 ms, 電流値 0.5 mA）、b：単相陰性矩形波刺激（同 a）c：陰極先行型二相性矩形波刺激（パルス幅 0.5 ms/phase, 電流値 0.5 mA, no interphase interval）、d：陽極先行型二相性矩形波刺激（同 c）。各トレースの灰線は平均値、赤線は標準偏差を示す。

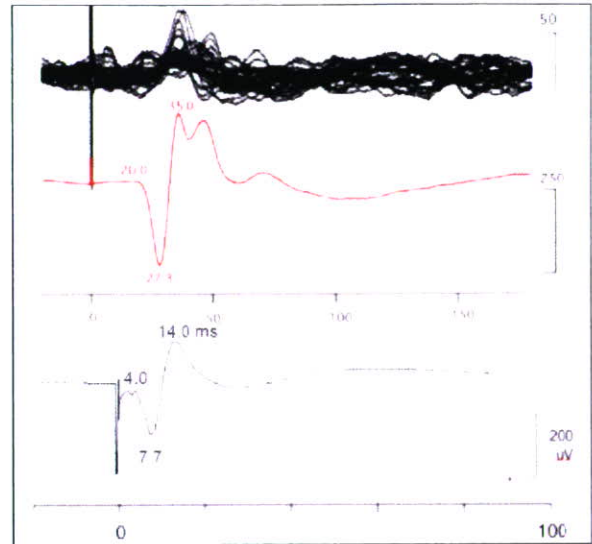


図3. 単発 STS に対する皮質視覚野の局所誘発電位と視覚誘発電位の比較

a) 単発 STS に対して内外側、吻尾側方向に 1 mm ステップで皮質表面から記録された誘発電位を重ね書きしたもの。単相陽性矩形波（パルス幅 0.5 ms, 電流値 0.5 mA）。b) 視覚誘発電位。眼前においた LED から 50 ms の白色閃光を与えた。c) 視神経電気刺激に対する皮質視覚野の局所誘発電位の例。

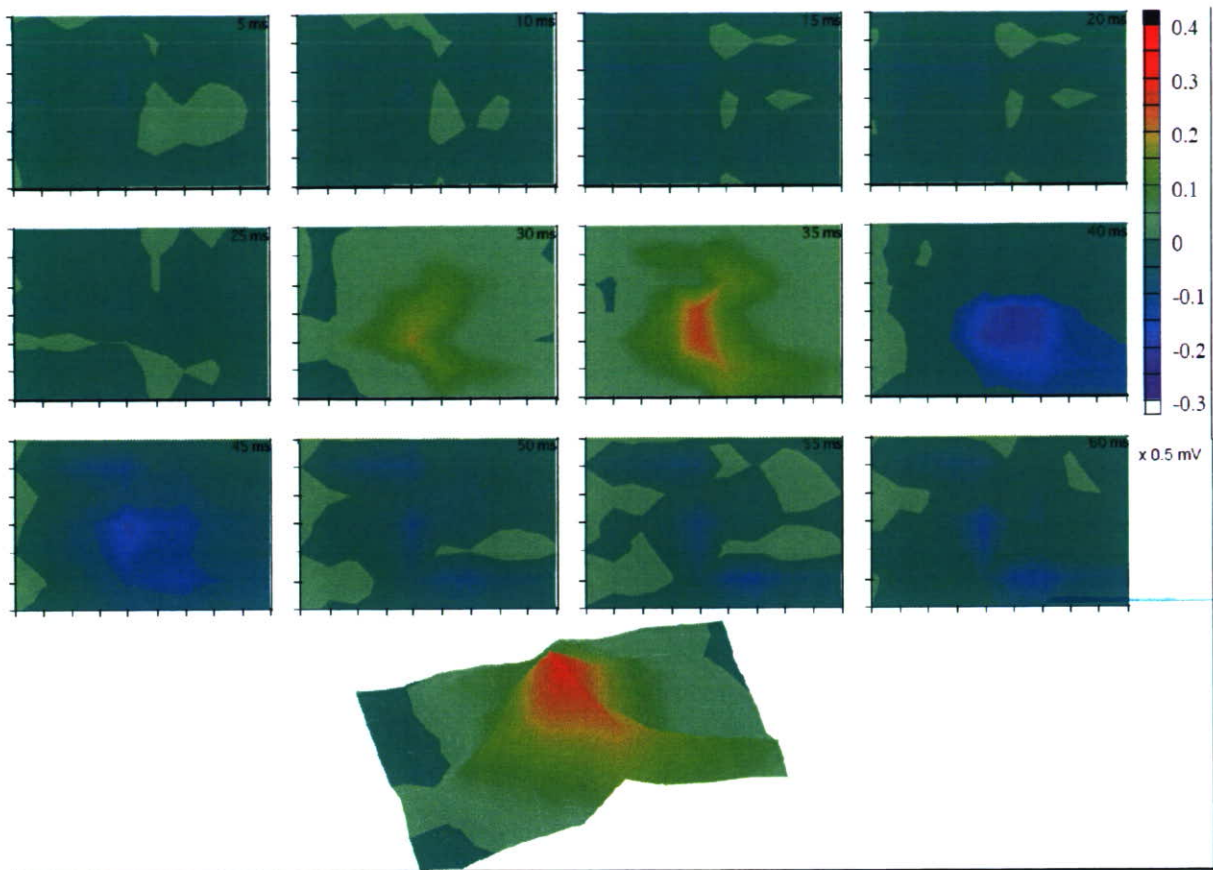


図4. 単発 STS に対する皮質視覚野の局所誘発電位の空間分布

单相陰性矩形波電流を用いた STS 刺激に対する皮質視覚野内の誘発波形の振幅を等高線でマップ化し、そのマップを刺激後 5 ms から 60 ms まで 5 ms 毎に左上から右下に順に並べたもの。各マップの目盛の間隔は 1 mm で縦軸は内外側軸（上が内側）、横軸が吻尾側軸（右が尾側）を示す。マップ下の鳥瞰図は潜時 35 ms におけるマップを 3D 表示したもの。

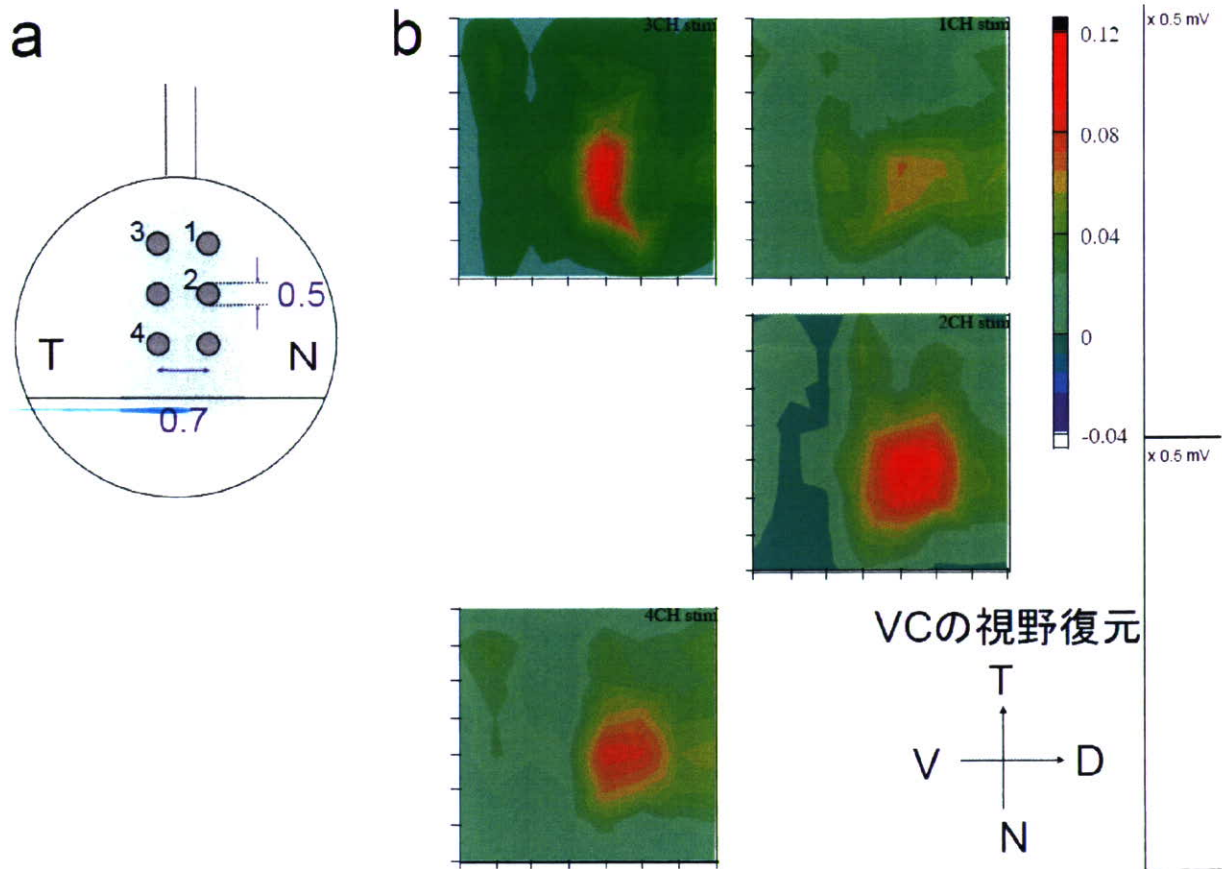


図5. 刺激部位とその誘発電位の皮質視覚野内空間分布との関係

a) 2×3点電極アレイの設置を示した模式図、左眼球腹側面図で上は視神経、下は角膜を示す。
 b) アレイの1～4の電極に対して単発 STS 刺激を加えた際に得られた潜時 35 ms における皮質視覚野の電位の空間分布。单相陽性矩形波（パルス幅 0.5 ms, 電流値 0.5 mA）による刺激。T：耳側、N：鼻側、V：腹側、D：背

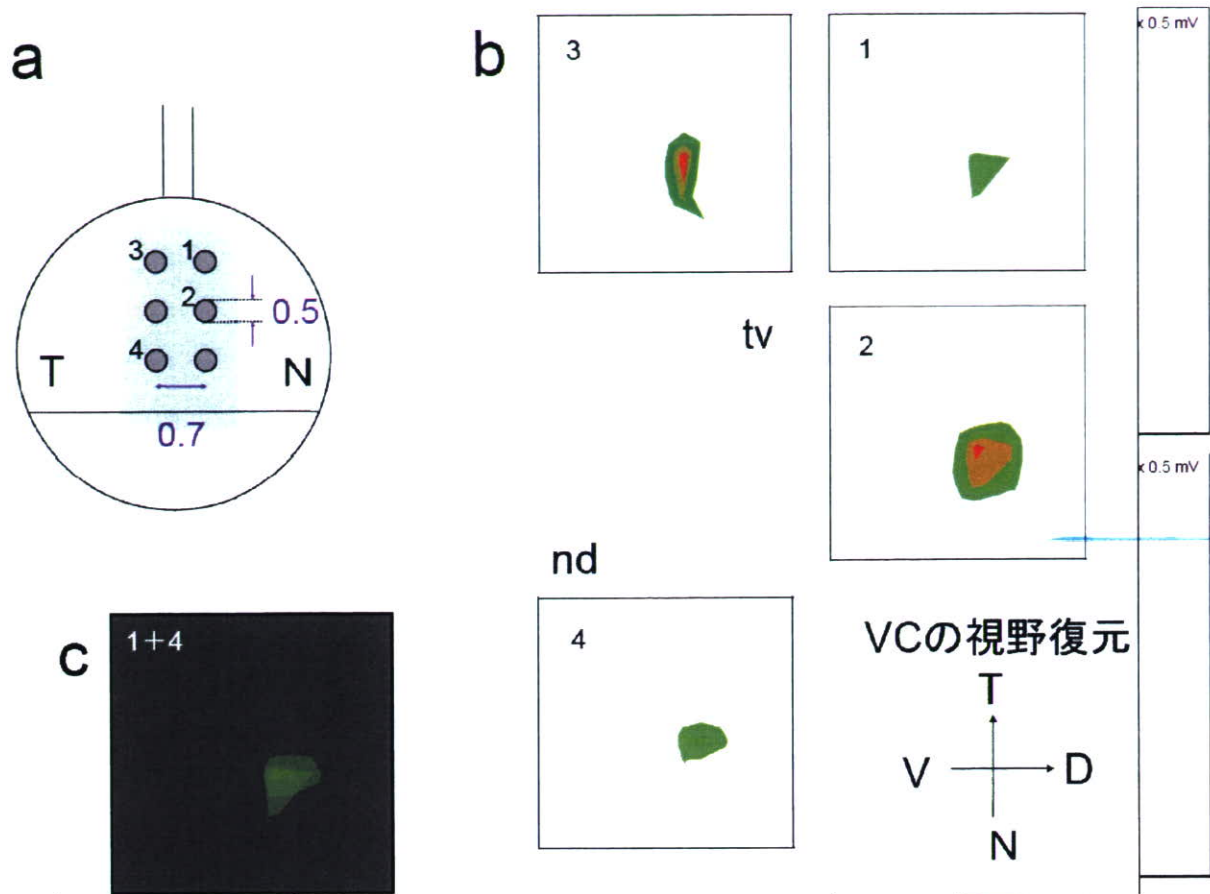


図6. 刺激部位とその誘発電位の皮質視覚野内空間分布との関係
 a) 2×3点電極アレイの設置を示した模式図、左眼球腹側面図で上は視神経、下は角膜を示す。
 b) 図6の分布で最大振幅の75%を超える電位を表示したもの。单相陽性矩形波（パルス幅0.5 ms, 電流値0.5 mA）による刺激。
 c) アレイの1と4の電極を用いた刺激の結果を重ねたもの。T, t: 耳側、N, n: 鼻側、V, v: 腹側、D, d: 背側

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

網膜下刺激電極の開発

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、分散型刺激電極方式について研究を行った。昨年度試作した Pt 刺激電極デバイスをさらに高機能化したデバイスとして、電荷注入能力の優れた TiN 薄膜電極を搭載する埋植デバイスの開発、また広範囲に多電極を埋植することが可能なマルチフィンガーデバイスの開発を行った。さらにウサギ *in vivo* 電気刺激実験において試作したデバイスの機能実証を行った。

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) や網膜下刺激に適した高密度実装を目指した分散型電極アレイの実装方式の開発である。今年度は、これまで基本動作実証を行った分散型電極アレイの動物実験による動作実証と多極化方式の検討を目的とした。

B. 研究方法と結果

実績：本研究では、昨年度試作した Pt 刺激電極デバイスをさらに高機能化したデバイスとして、電荷注入能力の優れた TiN 薄膜電極を搭載する埋植デバイスの開発、また広範囲に多電極を埋植することが可能なマルチフィンガーデバイスの開発を行った。さらにウサギ *in vivo* 電気刺激実験において試作したデバイスの機能実証を行った。

[デバイスの実装]

本研究でのデバイスは全て、分散型人工視覚デバイス向けに開発された刺激チップ AR36 を用いている。このチップは4本の制御配線(VDD, GND, CONT, STIM)から入力された信号によって制御され、任意の刺激箇所から電流を出力することができる。

まず、初めに動物実験向け Pt 刺激電極デバイスの試作を行った。小型なウサギ眼球に埋植することを想定し、フレキシブル基板

上に縦に4チップを分散配置させ、それぞれのチップに9つの刺激電極を搭載した。

次に TiN 薄膜電極を搭載するデバイスの開発を行った。TiN 薄膜をスパッタリングにより Pt 刺激電極上に形成した。成膜条件には電荷注入能力、表面安定性において最も優れた条件(N₂ 5sccm, Ar 8.3sccm, 1 Pa, DC 500W, 280 min, TiN 1000nm/Pt 200nm)を用いた。図1に試作した TiN および Pt 刺激電極デバイスを示す。

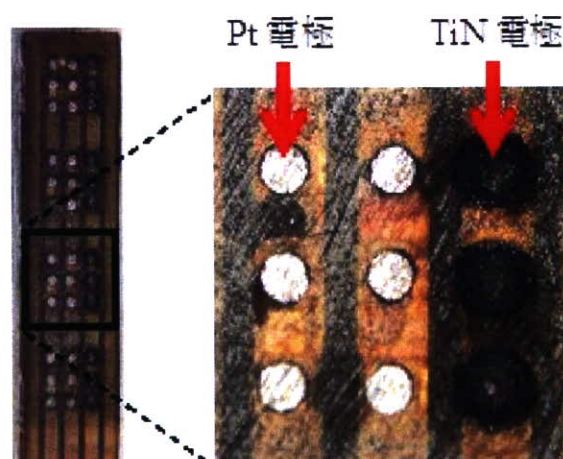


図1：TiN および Pt 刺激電極デバイス

更にデバイスのマルチフィンガー化を行った。フレキシブル両面基板を使用することにより、従来の4本という配線数を維持したままフィンガー数を増やすことに成功した。また実装においては、電極形成の工程

で 2 段階開口方式を新たに提案することによって、歩留まりの向上に成功した。図 2 に試作したツーフインガーデバイスの外観を示す。

[動物実験による機能評価]

大阪大学医学部の協力のもとに、試作したデバイスをウサギ眼球に埋植し、網膜の電気刺激実験を行った。Pt 刺激電極デバイスを用いた実験では、複数のチップから期待する電流出力が可能であることを確認し、更に有効的な網膜刺激が行われていること

を調べるために脳に埋め込んだ観測用電極からの脳波を計測したところ、網膜を電気刺激したことにより脳内に誘発される電位 (EEP; Electrical Evoked Potential) の検出に成功した。図 3 の EEP 波形は、デバイスの中央列の 12 個の電極からの電気刺激に対応しており、一番上がデバイス先端チップの中央列の刺激電極、一番下がデバイス下端中央列の刺激電極に対応している。この結果は分散配置した 4 つの異なるチップの全てから有効的な電気刺激が行われたことを示している。さらに、EEP 波形が検出可能な閾値の検証、刺激パタンの検討、双極パルス電流による実験を行った。また、高機能化した 2 つのデバイスを用いた実験では、TiN 薄膜電極からの電気刺激による EEP 波形の検出に成功し、さらに眼球の離れた 2 ヶ所にデバイスを埋植し、各フィンガーからの電気刺激による EEP 波形の検出にも成功した。



図 2：ツーフインガーデバイス外観

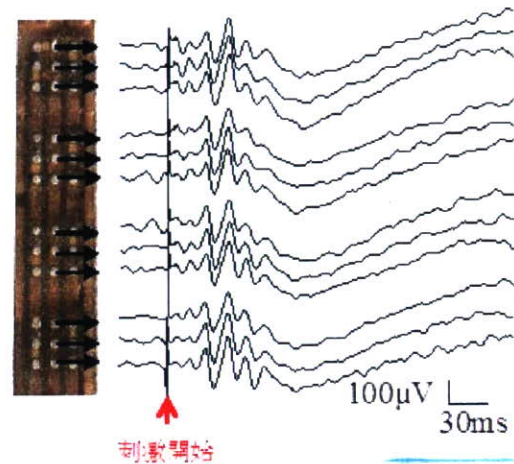


図 3：複数のチップからの刺激による

C. 考察

Pt 刺激電極デバイスを用いた実験では、生体内で複数のチップからの電気刺激を行い、EEP 波形の取得に始めて成功した。この結果により、分散型アーキテクチャを用いたデバイスの有効性を実証した。刺激パタンの検討では、電荷注入量一定のもとパルスの加算数を変化させて刺を行い、EEP 波形の取得を行った。今回の結果では、パルス加算数の EEP 波形への影響に規則性は見られなかった。また双極パルス電流刺激に

よる実験では、明確な EEP 波形の取得が出来なかった。動物実験は個体差、麻酔の深度、埋め込みの状態にもよるため、何度も電気刺激実験を行う必要がある。

TiN 刺激電極デバイスを用いた実験では、生体内において TiN 刺激電極からの電気刺激が可能であることを確認し、さらに明確な EEP 波形の取得に成功した。

TiN 薄膜電極と Pt バルク電極からの刺激電流を比較すると、同じ電圧において TiN の方が多くの電流を流すことができた。昨年度の研究成果によると、本デバイスの TiN 薄膜電極の電荷注入能力は 0.425 mC/cm^2 であり、Pt の電荷注入能力の文献値は $0.09 \sim 0.35 \text{ mC/cm}^2$ を考慮すると、この電流の大きさの違いは電荷注入能力の違いではなく、電極面積によるものと考えられる。TiN の電荷注入能力の

文献値は、 $0.87 \sim 23 \text{ mC/cm}^2$ であり、今後成膜条件や電極形成方法などを検討することで高密度刺激が可能な TiN 刺激電極デバイスの開発が可能となると考えられる。

ツーフインターデバイスを用いたウサギ *in vivo* 電気刺激実験では、2ヶ所の網膜埋植部位にデバイスを埋植し、電気刺激によって EEP 波形の取得に成功した。今回の結果では、刺激部位によって EEP 波形の振幅に差が見られなかった。今後はより大面積をカバーできる構造を考案していく必要がある。

D. 結論

LSI による分散型人工視覚デバイスとして Pt 刺激電極デバイス、TiN 薄膜電極デバイス、ツーフインターデバイスの開発を行った。さらに試作したデバイスを用いてウサ

ギ *in vivo* 電気刺激実験を行い、各デバイスにおいて EEP 波形の検出により有効的な刺激が行われたことを実証した。今後、種々の動物実験を行うと共に、実装の信頼性向上を図る必要がある。

E. 健康危険情報なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.* **46** (4B), 2792-2798, 2007.

徳田 崇, 杉谷 幸愛, 浅野 良介, 谷山 真理, 寺澤 靖雄, 上原 昭宏, 香川 景一郎, 布下 正宏, 田野 保雄, 太田 淳, 「人工視覚を目指した CMOS LSI 搭載フレキシブル網膜刺激デバイス」, 電気学会論文誌 C, **127** (10), 1588-1594.

2. 総説・著書

太田 淳, 「バイオ医療応用 CMOS イメージセンサの最新動向—高性能化, 高機能化から応用展開まで—」, シーエムシー, 2007.

J. Ohta, T. Tokuda, K. Kagawa, Y. Terasawa, M. Ozawa, T. Fujikado, Y. Tano, "Chapter 8. Large-scale Integration-Based Stimulus Electrodes for Retinal Prosthesis," *Artificial Sight*, by M.S. Humayun, J.D. Weiland, G. Chader, E. Greenbaum (Eds.), pp.151-168, 2007, New York, NY, Springer.

3. 学会発表

J. Ohta, "LSI-based retinal prosthesis device for STS," Int'l Federation Artificial Organs (IFAO), 2007/10/31, Osaka.

T. Tokuda, R. Asano, Y. Terasawa, M. Nunoshita, K. Nakauchi, T. Fujikado, Y. Tano, J. Ohta, "Development of a multi-chip retinal stimulator for in vivo experiments toward retinal prosthesis," Ext. Abst. SSDM (Solid State Devices and Materials) , pp. 974-975, 2007/9/20, Tsukuba.

J. Ohta, "Implantable CMOS sensors for biomedical applications," Int'l Sympo Photoelectronic Detection and Imaging: 2007/9/11, Beijing, RPC.

J. Ohta, T. Tokuda, K. Keiichiro, A. Uehara, Y. Terasawa, K. Nakauchi, T. Fujikado, Y. Tan, "Si-LSI Based Stimulators for Retinal

Prosthesis," Int'l Joint Conf. Neural Networks, 2007/8/14, Orlando, FL.

J. Ohta, "CMOS Technologies for Retinal Prosthesis," CMOS Emerging Technologies Workshop, 2007/7/12, Whistler, Canada

J. Ohta, T. Tokuda, K. Kagawa, A. Uehara, Y. Terasawa , K. Nakauchi, T. Fujikado, Y. Tano, "A Multi-Microchip Retinal Stimulator for in vitro / in vivo Experiments," IEEE Int'l Symposium on Circuits and Systems (ISCAS), 2007/5/29, New Orleans, LA.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

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

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—

分担研究者 近藤峰生 名古屋大学大学院医学系研究科感覚器障害制御学 准教授

研究要旨

我々は、これまでに人工視覚の移植実験に有用な本邦オリジナルの中型動物の網膜色素変性モデルの作成を試みてきた。昨年度までの段階で、ロドプシン遺伝子の 347 番目の Pro を Leu に置換したトランスジェニックウサギ (Tg ウサギ) の 6 つのファウンダーを作成することに成功した。本年度は、この Tg ウサギの網膜変性過程を、変異遺伝子の発現量の定量、組織学的検査、および網膜機能検査（網膜電図）によって研究した。6 つのラインの変性スピードは transgene の発現量（6-82%）によく相関していた。網膜電図の結果により、この Tg ウサギは早期に杆体機能が消失するものの、錐体機能は比較的保存されているという特徴を有していることがわかった。また組織学的検査により、Tg ウサギは進行性に網膜の外顆粒層（視細胞層）の減少を示すが、その程度は網膜中心部にあたる visual streak 付近で最も強いことがわかった。今回の結果により、Tg ウサギは人工視覚の実験に用いる動物モデルとして、また RP の病態生理の研究に役立つと考えられた。

A. 研究目的

これまで我々は、人工視覚の実験に使用するための動物モデルとして、国際的に中型動物として眼科実験に広く用いられているウサギにロドプシン遺伝子変異を導入したトランスジェニックウサギの作成とその系統樹立を試みてきた。昨年度までの成果として、ロドプシン遺伝子の347番のプロリンをロイシンに置換したP347Lトランスジェニックウサギのファウンダー10匹（うち6匹に系統維持）を得ることに成功した。今年度の研究の目的は、ファウンダーの次の世代 (F1) の系統を完全に樹立させて、各ラインの網膜変性の様式を、mRNAによる遺伝子発現、網膜電図、組織学的検査によ

って研究することである。

B. 方法

(1) 変異遺伝子の発現量の定量

Tg ウサギの主要なラインである 3 つのラインにおいて、生直後、生後 1M、生後 3M に網膜を摘出して mRNA を分離し、変異遺伝子の mRNA を認識するプライマーを設定して RT-PCR を行ない mRNA を定量してロドプシン全体に対する変異ロドプシンの相対%値を計算した。

(2) 網膜の形態変化の研究

光学顕微鏡切片は、生後 1M、3M、6M、12M に標本を作成して HE 染色で評価した。網膜の全層および各層の厚さの計測に加え、外顆粒層、内顆粒層、神経節細胞層の細胞