

網膜電気刺激に対する網膜および視覚野応答の光学計測

正員 小山内 実* 非会員 榮原 晴子*
 非会員 澤井 元** 非会員 宋 文杰***
 非会員 八木 哲也*

Optical Recording of Retinal and Visual Cortical Responses Evoked by Electrical Stimulation on the Retina

Makoto Osanai*, Member, Haruko Sakaehara*, Non-member, Hajime Sawai**, Non-member,
 Wen-Jie Song***, Non-member, Tetsuya Yagi*, Non-member

To develop a retinal prosthesis for blind patients using an implanted multielectrode array, it is important to study the response properties of retinal ganglion cells and of the visual cortex to localized retinal electrical stimulation.

Optical imaging can reveal the spatio-temporal properties of neuronal activity. Therefore, we conducted a calcium imaging study to investigate response properties to local current stimulation in frog retinas, and a membrane potential imaging study to explore the visual cortical responses to retinal stimulation in guinea pigs.

In the retina, local current stimuli evoked transient responses in the ganglion cells located near the stimulus electrode. The spatial pattern of the responding area was altered by changing the location of the stimulation.

Local electrical stimulation to the retina also caused transient responses in the visual cortex. The responding cortical areas in the primary visual cortex were localized. A spatially different cortical response was observed to stimulation of a different position on the retina.

These results suggest that the imaging study has great potential in revealing the spatio-temporal properties of the neuronal response for the retinal prosthesis.

キーワード：人工視覚，カルシウムイメージング，膜電位イメージング，網膜，大脳皮質視覚野，電気刺激

Keywords : artificial vision, calcium imaging, membrane potential imaging, retina, visual cortex, electrical stimulation

1. はじめに

人工網膜システムとは、視細胞変性による失明患者の網膜に刺激電極を埋植し、外界からの光情報に基づいて網膜を電気刺激することによって、視覚機能の再建を試みるものである。この人工網膜埋植の試みが初めて報告されたのは1956年のことであるが⁽¹⁾、近年の工学技術の進歩に加えて、ボランティア患者による臨床実験において、網膜埋植

電極からの電気刺激によって擬似光覚が誘発されることが分かり⁽²⁾、この分野の研究・開発が急速に進展している^{(2)~(4)}。

人工網膜実現のためには、網膜を電気刺激することにより、網膜の出力細胞である神経節細胞にどのような応答が引き起こされるのかを知る必要がある。また、網膜電気刺激が生体にどのような知覚を誘発するのかを知るためには、電気刺激により惹起された信号が、視神経を通して中枢にどのような応答を引き起こすのかを精査する必要がある。このような目的で、網膜電気刺激が神経節細胞や中枢にどのような応答を惹起するののかに関して、単一電極^{(5)~(9)}や多点電極基板⁽¹⁰⁾を用いた電気生理学的な方法による計測が行われている。これらの方法は、応答の時間特性を解析するには適しているが、刺激に対する応答の空間特性に関する解析には適さない。こうした空間特性の計測には、光学的な手法による画像計測が効果的である。

光学的な神経信号計測法としては、膜電位感受性色素を用いた膜電位イメージング法と、細胞内カルシウム濃度

* 大阪大学大学院工学研究科
 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1
 Graduate School of Engineering, Osaka University,
 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

** 大阪大学大学院医学系研究科
 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2
 Graduate School of Medicine, Osaka University,
 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

*** 現所属：熊本大学大学院医学薬学研究部
 〒860-8556 熊本県熊本市本荘 1-1-1
 Present address: Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences,
 Kumamoto University,
 1-1-1 Honjo, Kumamoto, Kumamoto 860-8556

($[Ca^{2+}]_i$) の測定が可能なカルシウム (Ca^{2+}) イメージング法がある。膜電位イメージング法は、膜電位感受性色素を用いることにより、神経細胞における電位変化そのものの時空間特性を計測することが可能である⁽¹¹⁾。また Ca^{2+} イメージング法で測定される $[Ca^{2+}]_i$ は、活動電位により上昇することが知られており、膜電位変化（特に活動電位）の良い指標であると共に、細胞内の生化学的な状態を示す良い指標でもある⁽¹²⁾⁽¹³⁾。

人工視覚では空間的な光覚をもたらすために、多点刺激が必要とされている。多点刺激に対する神経応答の計測は最適な電極間距離などを決定するために必要なことであるが、多点刺激に対する応答の計測はほとんど報告がない。この多点刺激により応答する神経細胞の領域を明らかにするためにも、光学計測により応答領域を画像化し、その領域を計測することが有用であると思われる。

そこで本研究では、画像計測が網膜電気刺激の効果を客観的に評価する手段として有用であることを確認するために、以下の実験を行った。1) 摘出遊離網膜を用いた *in vitro* 実験により、電気刺激に対する神経節細胞の応答を Ca^{2+} イメージング法で計測した。また、複数の刺激電極を用いて、その配置により神経節細胞の応答領域がどのように変化し得るのかを計測した。2) モルモットを用いた *in vivo* 実験により、網膜電気刺激に対する一次視覚野の神経応答を膜電位イメージング法で計測した。また網膜の刺激位置の違いによる、視覚野の応答領域の違いを示した。

2. 方法

すべての実験動物の取り扱いは大阪大学動物実験委員会の規程に従った。

(2.1) 網膜応答測定用遊離網膜標本の作成および Ca^{2+} 感受性蛍光色素の逆行性負荷⁽¹⁴⁾ 実験動物にはウシガエル (*Rana Catesbeiana*, 体長約 10 cm) を用いた。ウシガエルを冷却麻酔したのち脊髄穿刺を行い、眼球を摘出し、眼球の前眼部を除去した。この前眼部を除去した眼球の視神経断端に、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 (Invitrogen, Oregon Green 488 BAPTA-1, $6K^+$ -salt) を溶解させた擬似細胞内液 (Oregon Green 488 BAPTA-1 25 mM, HEPES-Na (pH ~ 7.2) 10 mM) 0.5 μ l を滴下した後、この眼球をリンガー液を満たしたシャーレの中に入れ、95% O_2 -5% CO_2 を通気した湿潤なボックス中で 19 °C の環境下に 22-30 時間静置し、神経節細胞にのみ逆行性に色素を負荷した⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。その後、リンガー液中で網膜を強膜、色素上皮から遊離した。用いたリンガー液の組成は以下の通りである (単位: mM): NaCl 112, KCl 3.3, $NaHCO_3$ 17, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1, D-glucose 10。遊離した網膜を約 0.5 cm 角に切断し実験に用いた。

(2.2) Ca^{2+} イメージング法による電気刺激に対する網膜神経節細胞の応答計測⁽¹⁴⁾⁽¹⁷⁾ 蛍光色素を負荷し遊離した網膜を正立落射蛍光顕微鏡 (Olympus, BX51WI) 下のガラス基板平面多点電極 (MEA) 上に神経節細胞側を上にして静置し、蛍光変化を観察した。実験は室温下 (約 25 °C)

で、95% O_2 -5% CO_2 を通気したリンガー液を灌流しながら行った (約 1 ml/min)。Oregon Green 488 BAPTA-1 からの蛍光は、水浸対物レンズ (Olympus, 20 \times , NA 0.95) で集光され、中心波長 535 nm, バンド幅 45 nm の吸収フィルタ (XF1073, Omega Optical) を通して、解像度 256 \times 256 の冷却 CCD カメラ (Red Shirt Imaging, NeuroCCDsm256) により、フレームレート 50 Hz で画像化された。蛍光色素の励起光は、顕微鏡に取り付けられた Xenon 光源から中心波長 475 nm, バンド幅 40 nm (XF3084, Omega Optical) の励起フィルタを通過し、ダイクロイックミラー (XF2010, Omega Optical) で反射され、標本に照射された。本研究で用いた Oregon Green 488 BAPTA-1 は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇により蛍光強度を増加させるので、蛍光画像の各ピクセルにおける $\Delta F/F$ を算出することにより、相対的な $[Ca^{2+}]_i$ 変化 ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) を見積もった。ここで、F は各ピクセルにおける刺激前の蛍光強度の時間平均値、 ΔF は刺激後の蛍光変化量である。ノイズを低減するために、同じ試行を 5-10 回繰り返して、それぞれの試行で得られた $\Delta F/F$ を加算平均して、結果として用いた。

(2.3) 視覚野応答測定用モルモットの準備⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾ 実験動物には、体重約 350 g のハートレー系モルモット (guinea pig) を用いた。動物はケタミン (0.8 ml/kg; 三共、動物用ケタラール 50 筋注用) およびキシラジン (1.0 ml/kg; バイエル、セラクター 2% 注射液) の混合麻酔を筋肉注射し、麻酔を行った。手術中および計測中は、初回の半量を約 1 時間おきに投与し、麻酔を維持した。計測中は、臭化パンクロニウム (0.1 ml; 三共、ミオブロック注射液) により不動化し、人工呼吸器により呼吸を行わせた。動物の状態は、直腸温度と心拍数を計測することによりモニターした。大脳皮質視覚野直上の頭蓋骨および硬膜を除去し、皮質を電位感受性色素 RH-795 (0.7 mg/ml in saline; Invitrogen) で 1 時間染色した。

(2.4) 膜電位イメージング法による網膜電気刺激に対する視覚野応答計測⁽¹¹⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾ 本研究では高解像度 CMOS イメージングシステム (100 \times 100 画素; MiCAM Ultima, BrainVision) を用い、膜電位感受性色素の蛍光を、フレームレート 1 kHz で計測した。得られた蛍光画像から、 Ca^{2+} イメージング法と同様に $\Delta F/F$ を算出し、膜電位変化を見積もった。膜電位感受性色素の蛍光変化量は非常に微弱 (最大でも約 0.2 %) であるため、8-32 回同じ試行を繰り返して、加算平均することによりノイズを低減した。さらに、画像取り込み開始時期を心電図 QRS 波に同期させ、取り込み中は人工呼吸を停止し、かつ刺激試行と非刺激試行の差分をとることにより、体動や拍動により生じるノイズを抑制した。また、本研究で用いた RH-795 は膜電位上昇に伴い蛍光強度が減少するが膜電位上昇を分かりやすくするため、計算された $\Delta F/F$ に -1 を乗じて図示した。

$\Delta F/F$ 画像は、左側を吻側、上側を外側として表示してある (図 3-5)。

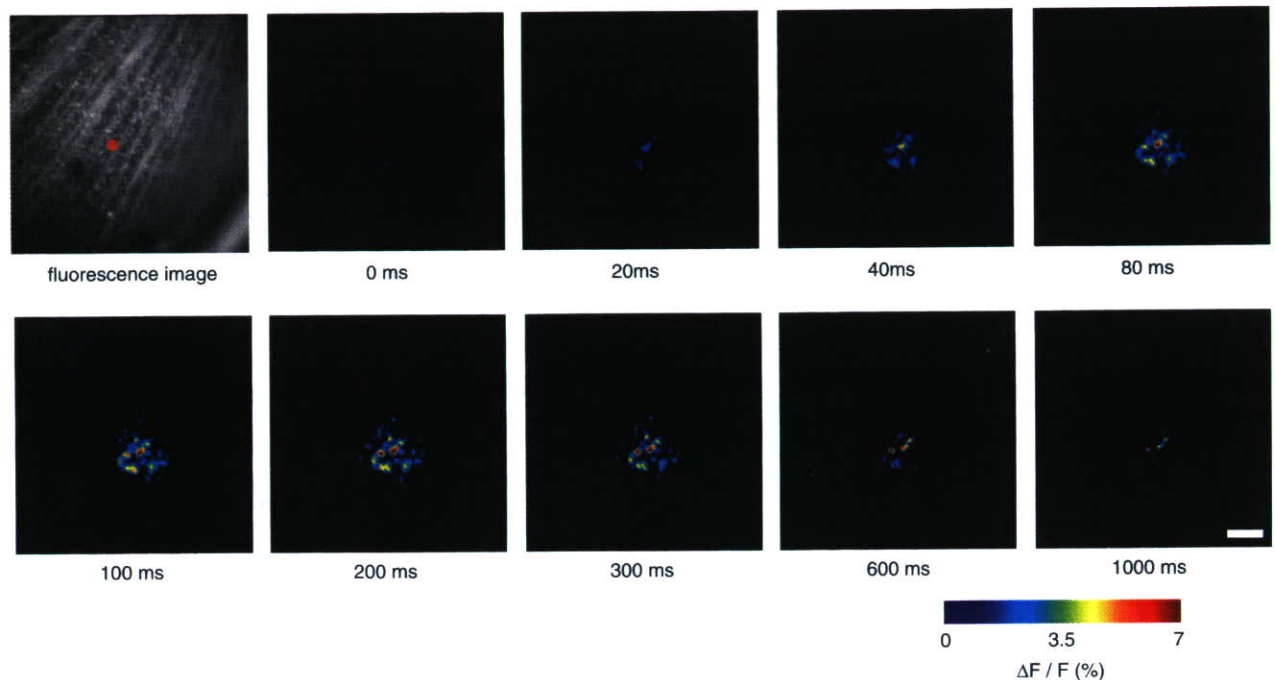
(2.5) 刺激電極及び刺激方法 遊離摘出網膜を用いた *in vitro* 実験 (図 1, 2) では、直径 30 あるいは 10 μ m の

Ti/TiN 電極が 100 あるいは 200 μm 間隔で 8×8 のマトリックス状に配列された平面多点電極基板 (Multi Channel Systems, MEA 100/10-Ti or MEA 200/30-Ti,) を用い、持続時間 200 μs の双極電流パルスを与え、電気刺激を行った。対極 (Ag/AgCl) は MEA 内のリンガー液中に設置した。

視覚野応答を計測するための *in vivo* 実験では、単一の刺激電極として直径約 300 μm の銀ボール電極を用い (図 4)、多点刺激電極として、厚さ 12 μm のポリイミド基板上に直径 200 μm の金メッキを施した銅電極が 500 μm 間隔で 2×4 のマトリックス状に配列された多点電極 (ニデック製 プロトタイプ) を用いた (図 5)。網膜電気刺激は、眼球背側部

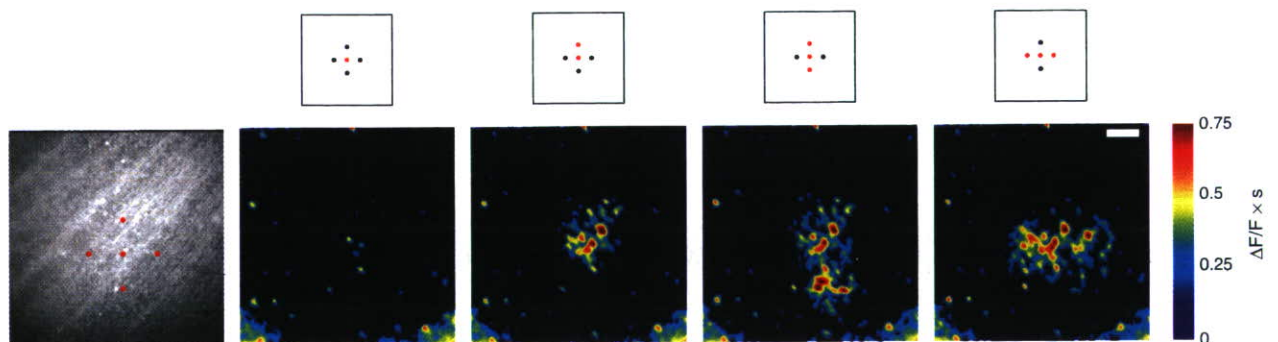
を露出させ、眼球と視神経の接合部より 1 mm 背側耳側の強膜を半層切開し、そこに銀ボール電極または多点電極を押し当てて、陰性矩形電流パルス (持続時間 500 μs) を与えることにより行った (脈絡膜上 - 経網膜刺激; Suprachoroidal Transretinal Stimulation, STS)⁽²⁾⁽⁹⁾⁽²⁰⁾。刺激電極の対極 (針電極) は眼球の硝子体内に設置した。

また、*in vivo* 実験では、通常の視覚入力により大脳皮質のどの領域に膜電位応答が惹起されるのかを同定するため、モルモットの眼前から白色発光ダイオードの拡散光を用いて視覚刺激を行い、大脳皮質における膜電位感受性色素の蛍光強度の変化を計測した (図 3)。網膜電気刺激の際



Upper left panel shows the fluorescence image of the retina. The stimulus electrode position is indicated by red circle. Time lapse images were obtained by application of 5×5 Gaussian kernel to $\Delta F/F$ images. At the bottom of each panel are the times in milliseconds after the application of 100 Hz 10 pulses 100 μA stimuli. As shown in the horizontal bar at the bottom right, warmer color indicates larger fluorescence change and colder color indicates smaller fluorescence change. The $\Delta F/F$ signal in each pixel less than a noise level is indicated by black color. Scale bar: 100 μm .

Fig. 1. Time lapse images of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in retinal ganglion cells evoked by electrical stimuli on the retina.



Leftmost panel shows the fluorescence image of the retina. The stimulus electrode positions are indicated by red circle. The intensity scale of this image is same as Fig. 1. Other bottom panel images were obtained by 20 frame integration of the $\Delta F/F$ images. Top panel illustrates electrode position for stimulation in the MEA (red circle). As shown in the vertical bar at the right, warmer color indicates larger fluorescence change and colder color indicates smaller fluorescence change. The $\Delta F/F$ signal in each pixel less than a noise level is indicated by black color. Scale bar: 100 μm .

Fig. 2. Spatial patterns of the ganglion cell responses in case of multielectrode stimulation.

には、この光刺激で応答が観測された領域を中心に計測を行った。

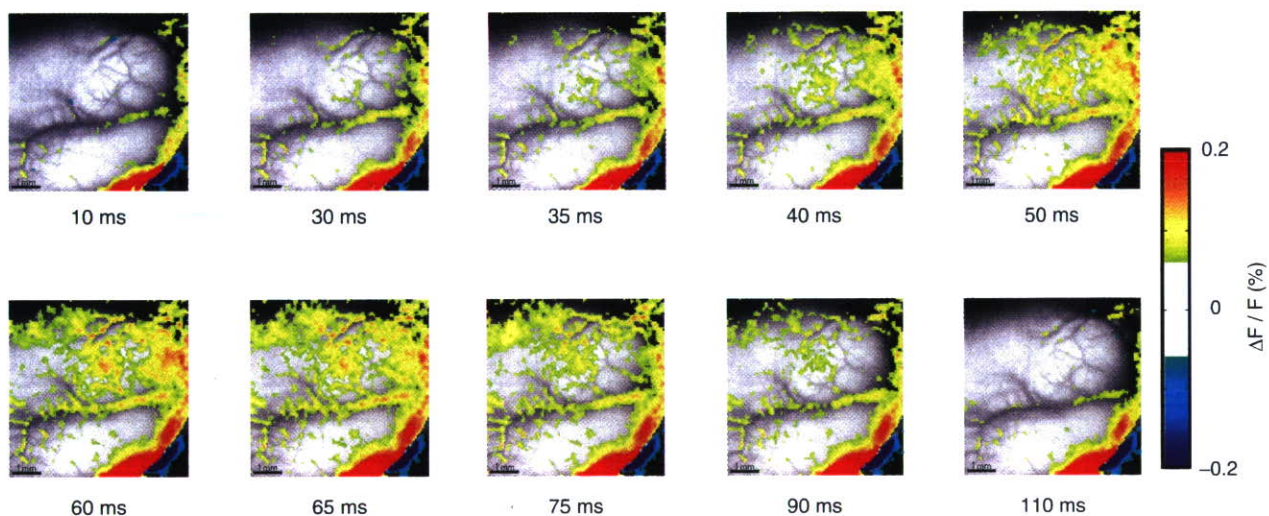
3. 結果

〈3・1〉 網膜電気刺激に対する網膜神経節細胞の応答

図 1 にガラス基板平面多点電極 (MEA 200/30) の一つを用いて、100 μ A 100 Hz 10 回の刺激を視細胞側から与えた際の、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化の時空間特性を示す。刺激開始直後から $[Ca^{2+}]_i$ は上昇し、応答する領域は時間と共に拡大した。応答する細胞は刺激電極を中心とした直径約 150 μ m の同心円状の領域内に局限していた。図 1 に示した蛍光画像から判断する限り、この同心円状に局限された応答は、各細胞における Ca^{2+} 感受性蛍光色素の負荷量の違いによるものでは

ない。応答した細胞における $[Ca^{2+}]_i$ は、刺激終了後約 100 ms 後 (刺激開始から 200 ms 後) まで上昇を続け、その後徐々に減少し、刺激開始後約 1 s 後に元のレベルに戻った。この結果は、網膜を視細胞側から電気刺激することにより、刺激電極を中心とした限られた領域内の神経細胞が興奮したことを示唆している (議論の章参照)。

次に、MEA 中の刺激に用いる電極数及び刺激位置を変化させることによってどのような応答が惹起されるのか、計測・解析した。図 2 は MEA (MEA 100/10; 電極間距離 100 μ m, 電極直径 10 μ m) を用いて、複数の異なる電極から 100 μ A 100 Hz 10 回刺激を行ったときの、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化を計測・解析した結果である。図 2 下段は、応答した領域を分かりやすくするために、刺激開始から $\Delta F/F$ を 20 フレーム (400 ms)



In each image, a photograph of the brain surface is overlapped with $\Delta F/F$ image. At the bottom of each panel are the times in milliseconds after the application of photo-stimulation. As shown in the vertical bar at the right, warmer colors indicate positive fluorescence changes and colder colors indicate negative fluorescence change. The $\Delta F/F$ signal in each pixel less than a noise level is indicated by no color. Left and upper side of each image is rostral and lateral side, respectively. Scale bar: 1 mm.

Fig. 3. Time lapse images of changes in membrane potential evoked by the photo-stimulation in the visual cortex.

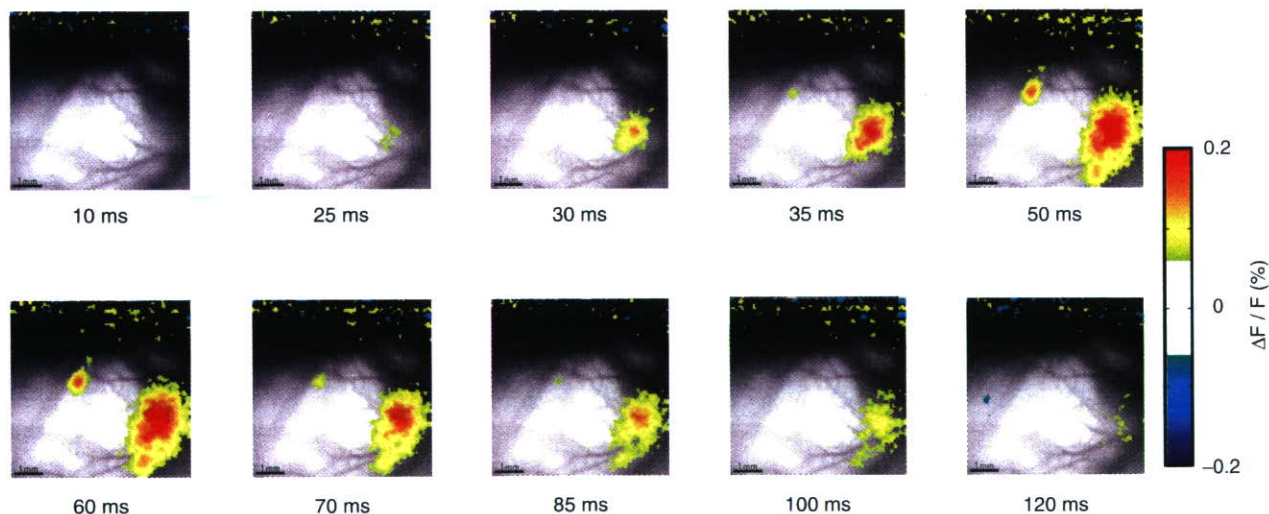
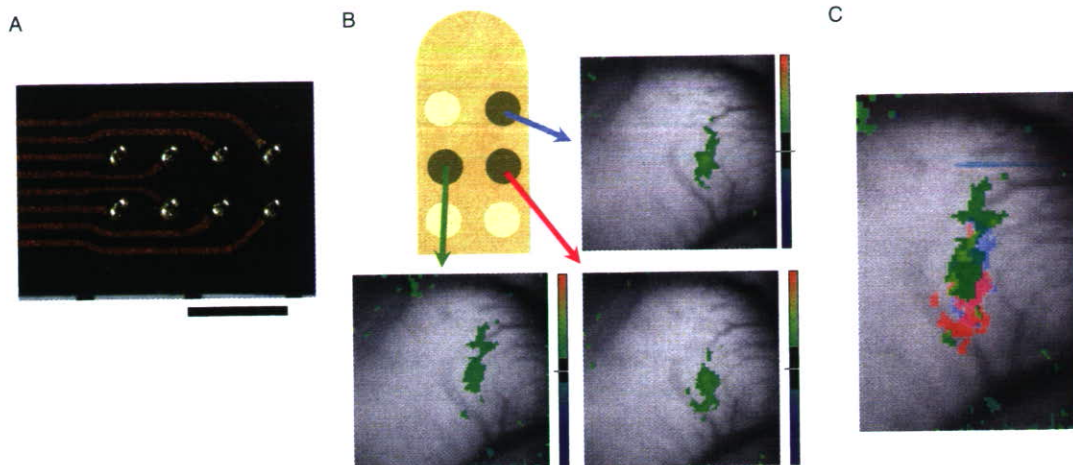


Figure is illustrated in the same way as Fig. 3.

Fig. 4. Time lapse images of changes in the membrane potential elevation in the visual cortex evoked by STS using a single electrode.



A: The multi-electrode array used for stimulation. Scale bar: 1 mm. B: Spatial response pattern evoked by 500 μ s 300 μ A stimulation from the different stimulus position. C is a superimposed image of the spatial patterns of the responses in B. The color illustrating the responding area corresponds to the stimulus position in B.

Fig. 5. Electrical stimulation from different stimulus positions caused different patterns of the response in the visual cortex.

積分したものを表示してある。図 2 上段は刺激電極の模式図であり、実際に電流を流した電極を赤で示してある。単一電極から刺激を与えた場合は (図 2 左から二番目の図)、直径 30 μ m の電極から刺激を行った図 1 の結果と比べると、非常に少数の細胞から応答が観測された。これらの結果は、刺激電極の大きさと神経節細胞の応答領域の大きさに依存関係があることを示唆しているが、現段階でその確証は無い (議論の章参照)。2 電極を用いて刺激を与えた場合は (図 2 左から三番目の図)、応答する領域が拡大し、3 電極から刺激を与えた場合は (図 2 右側二つの図)、刺激電極の配列に沿った方向に応答する領域が広がるのが分かった。図周辺部で $\Delta F/F$ が高いように見える領域があるが、これは、蛍光色素を励起させるための励起光の照明むらなどにより観測されるアーティファクトである。これらの結果は、網膜に与える電気刺激の箇所を変化させることにより、異なった領域の網膜神経節細胞に応答を引き起こすことができることを示している。

(3・2) 網膜電気刺激に対する大脳皮質視覚野の応答

まず、モルモットの脳皮質の中で視覚野の領域を同定するために、左眼前に白色 LED を設置し、右脳の大脳皮質における膜電位感受性色素の蛍光量変化 ($\Delta F/F$) を計測した (図 3)。光刺激は 4 ms の持続時間で、眼球位置での光強度は 12 μ W/cm² であった。刺激後約 30 ms から大脳皮質で応答が確認され、約 60 ms 後まで応答する領域が広がっていった。この応答は徐々に減弱し、刺激後約 110 ms でほぼ消失した。この応答はその時間経過から、シナプス後電位を反映しているものと考えられる (議論の章参照)。電気生理学的な手法により一次視覚野の領域の同定を行った過去の文献と比較すると⁽²¹⁾、図 3 で応答が観測された領域は、モルモットの一次視覚野に相当すると考えられる。

網膜電気刺激が大脳皮質視覚野にどのような応答を惹起するのか調べるために、STS 方式によりモルモットの網膜に 500 μ s 100 μ A の単発刺激を与え、視覚野における膜電位

応答を計測した (図 4)。その結果、約 25 ms 前後の潜時を持った応答が視覚野で観測された。刺激後約 60 ms まで応答の振幅、領域は共に大きくなり、約 120 ms 後にほぼ消失した。図 3 の全視野光刺激に比べ、応答領域の大きさは、限局していた。この結果は、視覚野の限局した領域にシナプス後電位が発生したと考えられる (議論の章参照)。またこの例では、刺激後約 35–85 ms の間に左上 (吻外側) にも小さな応答を示した領域が現れたが、必ずしも 2 箇所の応答が得られるわけではなかった (8 例中 3 例)。

前節図 2 の実験で、網膜に電気刺激を与える場所及び箇所を変化させることにより、応答する神経節細胞の領域が変化することを示した。このような応答領域の変化が、空間情報の変化として生体に知覚されるかどうかを明らかにするためには、異なる位置の網膜刺激が視覚野内の異なる位置に応答を引き起こすことができるのか確かめる必要がある。そこでニデック社製多点電極を用い、同一標本で刺激位置を変えた場合に視覚野で惹起される応答について調べた。その結果を図 5 に示す。図 5 B, C に示すように、異なる位置に刺激を与えた場合、応答する領域に重なりはあるものの、視覚野内の異なる領域に応答が現れることが分かった。

4. 議 論

本論文では、人工視覚実現に向けた基礎研究として、網膜電気刺激に対する網膜神経節細胞及び視覚野における応答の時空間特性を、イメージング法により計測可能であることを示した。

遊離網膜を用いた実験では、Ca²⁺イメージング法により、神経節細胞の応答の計測を行った。この方法は、現時点では、細胞を同定できる空間分解能を持ち、多数の細胞から同時に神経活動を計測できる最も良い方法である⁽²²⁾。本研究では、Ca²⁺感受性蛍光色素の負荷法として、軸索輸送による逆行性染色法を用いた。従来から多細胞に Ca²⁺感受性

蛍光色素を導入する方法として用いられている、膜透過性のアセトキシメチルエステル体を用いた色素負荷法では、応答を示した細胞の種類を同定することが困難である。逆行性色素負荷法を用いることにより、選択的に神経節細胞にのみ Ca^{2+} 感受性蛍光色素を負荷させることが可能であり、その結果イメージングで計測された $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化は全て神経節細胞由来であると言える。

網膜視細胞側から電気刺激を与えると、刺激電極近傍を中心とした同心円状の応答が観測された。図 1 に示した実験と同条件で実験を行った 6 例中 6 例で同様の同心円状の応答が観測されている。また、図 1 左上の蛍光画像に示したように、刺激電極近傍に局在したような蛍光色素の負荷量の偏りは見られていない。これらの結果は刺激により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇した細胞は刺激電極近傍に局在していることを示している。

一般に神経細胞において刺激により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する原因として、主に以下の 3 つの要因が考えられる⁽¹³⁾。1) 活動電位により電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開口し Ca^{2+} が流入。2) シナプス伝達により、神経伝達物質の受容体から Ca^{2+} が流入。3) 細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出。これまでの研究により、脳の神経細胞の細胞体における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は活動電位が発生することにより観測されることが報告されている⁽¹²⁾⁽²³⁾。神経伝達物質受容体からの Ca^{2+} 流入は、樹状突起上で起こる。樹状突起は空間的に非常に密に存在しているため、もし樹状突起に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が起こっているのであれば、空間的に連続した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観測されるはずである。しかし図 1 に示したように、本研究では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観測された領域は斑点状であり、その形状から細胞体のものである可能性が高い。図 1 で示したように、電気刺激に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化は刺激に同期して上昇し、ほぼ 1 s 前後で元のレベルに戻っている。細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出が起こった場合、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇及び減少の時間経過はもっと遅いはずである⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾。これらの点を合わせて考えると、本研究で計測された神経節細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は活動電位が起こった結果であると考えられる。しかし、網膜神経節細胞において、活動電位と細胞体の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の関係を調べた報告はないので、今後検討する必要がある。

図 2 に示した結果のうち、単一電極で刺激を行った場合、図 1 の結果に比べ非常に少数の細胞でしか $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は観測されなかった。図 2 左端に示した蛍光画像を見る限り、図 1 の実験と比べて蛍光色素の負荷量に大きな差異は認められない。また、図には示していないが、刺激強度を 200 μA にした場合は、単一電極刺激においても、図 1 と同様の大きさの領域に神経節細胞の応答が観測されている。これらの点から、図 2 で示した単一電極刺激で応答が観測された細胞が少なかった原因には次の可能性が考えられる。1) 刺激電極の直径が図 1 の実験では 30 μm であったが、図 2 の実験では 10 μm であった。刺激電極の直径が小さかったため、刺激が及ぶ領域の大きさが小さかった。2) 電極と組織の接触に問題があった。1) に関しては、電極直径によらず

通電電荷量が同じであれば、同様の刺激が行われるはずである。しかし、これは実際に電気刺激が神経興奮を惹起している場所により違いが出ると考えられる。もし、刺激電極に近接した領域（今回の場合視細胞に近い領域）に細胞興奮が起こっているとすれば、刺激電極の直径が小さいほど刺激が影響を及ぼす範囲は小さくなると思われる。逆に、刺激電極から離れた部位（今回の場合神経節細胞に近い領域）に興奮を惹起させているとすれば、刺激電極の直径はあまり影響しないと思われる。2) に関しては、組織と電極の接触をコントロールするのは、*in vitro* 実験においても、実際に生体に電極を埋め込む際にも非常に困難な問題である。いずれにせよ、電極直径が異なる実験の例数を重ね、電極直径と神経節細胞の応答領域との関係を精査する必要があると思われる。

in vivo 実験では、大脳皮質視覚野における応答を計測するために、膜電位感受性色素を用い、神経活動のイメージングを行った。この方法は、細胞の膜電位変化を広範囲で ms 以下の時間分解能で高速に可視化することが可能である。しかし、この方法には以下のような欠点がある。1) 細胞体と樹状突起などを区別することができない。2) 膜電位変化の要因を特定することが困難である。3) 膜電位変化が起こった細胞の種類の同定が困難である。細胞外電位記録法と異なり、膜電位感受性色素を用いた計測では、実際に膜電位上昇が起こった場所を同定することが可能である⁽²⁶⁾。この点を考慮に入れると、網膜を刺激した際に興奮する視覚野の領域を同定することを目的とした本論文では、欠点 1) は問題にならない。本論文で示した蛍光強度変化計測の結果から、膜電位変化の時間経過は数十 ms 程度であった。この結果と過去の報告を合わせて考えると⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾、2) の問題に関して、膜電位感受性色素で計測される膜電位変化は、活動電位とシナプス後電位の合成されたものを捉えているが、シナプス後電位に由来するものが支配的であると考えられる。3) の問題から、膜電位感受性色素で計測される応答は、脳に存在する神経細胞以外（例えばグリア細胞）の膜電位変化も合わせて計測している可能性が高い。この問題は、細胞内記録を行う以外解決策は無いが、図 3 で示した応答の時間経過を考えると、神経細胞の応答と考えるのが妥当であると思われる。これらの点を考え合わせると、図 3、4 で示した応答は、主に神経細胞のシナプス後電位由来のものであると考えられる。

in vivo イメージングでは、呼吸や心拍に伴う体動によるアーティファクトが発生する恐れがある。本論文では、この問題を回避するために、画像取り込み開始時期を心電の QRS 波に同期させ、取り込み中は人工呼吸を停止し、かつ刺激試行と非刺激試行の差分をとっている。しかし図 3 では、視覚野全体に応答が観測される前に、血管に沿ったような蛍光強度の変化が観測されている。血管あるいはグリア細胞の応答が神経細胞の応答より先に発生するとは考えにくい。この応答が、体動などによるアーティファクトであるのか、血管及びその周囲の細胞が先に興奮したのか

は、今後実験を重ね検討する必要がある。

図 1 の実験では、遊離網膜を単一電極で刺激した場合、その応答領域が刺激電極を中心とした同心円状になることを示したが、その直径を視角に換算すると 2°以下なることを以前報告した⁽¹⁴⁾。このような網膜電気刺激により、視覚野でも限局した領域に応答が惹起されることが本研究により確認された (図 4)。この応答領域のうち右下の領域の大きさは、光刺激を行い電気生理学的手法により retinotopy マッピングを行った報告⁽²¹⁾と比較すると、視角にして約 6°に相当していた。しかし、本論文で行った網膜神経節細胞の応答計測と視覚野応答の計測では、実験動物、刺激方法、刺激電極に違いがあり、その応答特性を単純に比較することはできない。単一細胞に電流注入を行って刺激を与えるような実験と異なり、組織を用いた実験や in vivo 実験では、電極と組織の接触を制御することは困難であるが、今後できる限り条件を合わせて実験を重ね、統計的処理を行うことにより、実験ごとのばらつきをキャンセルした結果を導出し、検討する必要があると思われる。

図 2, 4 では複数の電極を用い刺激を行うことにより、応答領域に差異が出ることが分かった。この結果は、網膜上の刺激位置を変化させることにより、異なる空間座標に光覚が知覚される可能性を示している。しかし、その応答領域がどの程度異なるのか、どの程度の空間分解能が得られる可能性があるのかについては、今後更なる実験・解析を行い検討することが必要である。

図 3 に示した実験では、ほぼ全視野をカバーする光刺激を行い、大脳皮質一次視覚野の応答が膜電位イメージングで計測可能なことを確認すると共に、一次視覚野の領域を確認した。今後、空間的に限局した様々なパターンの光刺激を与え、視覚野における応答を計測することにより、視覚野における retinotopy マッピングや、刺激形状と応答領域との対応付けが可能であると思われる。これらの結果と網膜電気刺激の結果とを比較することにより、網膜電気刺激がどのような光覚を知覚させ得るのかを調べることが可能であると思われる。

5. むすび

本研究では、人工網膜移植実現を目指した基礎研究として、網膜電気刺激が網膜の出力細胞である神経節細胞、および視覚中枢である大脳皮質視覚野にどのような応答を惹起するのかを計測・解析した。

in vitro 実験により、網膜局所電気刺激が神経節細胞に局所的な応答を引き起こすことが分かった。また、刺激を与える電極の配列を変化させることにより、応答する神経節細胞の分布を変化させることができた。

in vivo 実験では、モルモットの網膜に STS 方式で刺激を与えることにより、大脳皮質一次視覚野に局所的な応答を惹起できることが分かった。網膜の刺激位置を変化させることにより、視覚野においても応答する神経細胞の分布が変化することが明らかになった。

これらの結果は、網膜電気刺激が限局された光覚を生じさせることを示している。また、刺激位置を変えて計測した結果より、刺激電極を適切にマッピングすることにより、光覚だけでなく形をも認識させることが可能であることを示唆している。

今後の課題としては、主に以下の点が挙げられる。1) 刺激電極の大きさ、刺激強度などの刺激条件と、網膜神経節細胞及び視覚野における応答との関係を精査する必要がある。2) in vivo 実験の例数を重ね、アーティファクトと真の応答を明確に区別する必要がある。3) in vitro, in vivo 両者の実験条件をできるだけ揃え、それぞれの実験結果から、網膜電気刺激により得られる光覚の時空間分解能を推定する必要がある。4) in vivo 実験において、光刺激と電気刺激の対応関係を精査することにより、網膜電気刺激が惹起し得る光覚を予測する必要がある。

上記の点を踏まえて、今後様々な条件で実験を重ね、統計的検討も含めた詳細な解析をすることにより、人工視覚実現のための礎ができると思われる。

謝 辞

本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) プロジェクト「人工視覚システム」および厚生労働科学研究費補助金 (H16-X-01; プロジェクトリーダー: 田野保雄 大阪大学教授) の予算補助により行われた。田野教授、株式会社ニデックを始めプロジェクトメンバーのご協力に深く感謝いたします。

(平成 19 年 1 月 25 日受付, 平成 19 年 6 月 6 日再受付)

文 献

- (1) G. E. Tassicker: "Retinal Stimulator", US Patent, No.2760483 (1956)
- (2) J. Dowling: "Artificial human vision", *Expert Rev. Med. Devices*, Vol.2, pp.73-85 (2005)
- (3) 田野保雄・不二門尚・八木哲也・澤井 元・神田寛行・森本 壮・三好智満・福田 淳・八木 透・三宅養三・太田 淳: 「人工網膜の展望」(不二門尚, 田野保雄 企画), 脳 21, Vol.6, No.4, pp.413-447 (2003)
- (4) I. Wickelgren: "Biomedical engineering. A vision for the blind", *Science*, Vol.312, pp.1124-1126 (2006)
- (5) V. Chowdhury, J. W. Morley, and M. T. Coroneo: "Feasibility of extraocular stimulation for a retinal prosthesis", *Can. J. Ophthalmol.*, Vol.40, pp.563-572 (2005)
- (6) H. A. Shah, S. R. Montezuma, and J. F. Rizzo III: "In vivo electrical stimulation of rabbit retina: effect of stimulus duration and electrical field orientation", *Exp. Eye Res.*, Vol.83, pp.247-254 (2006)
- (7) R. J. Jensen and J. F. Rizzo III: "Threshold for activation of rabbit ganglion cells with a subretinal electrode", *Exp. Eye Res.*, Vol.83, pp.367-373 (2006)
- (8) T. M. O'Hearn, S. R. Sadda, J. D. Weiland, M. Maia, E. Margalit, and M. S. Humayun: "Electrical stimulation in normal and retinal degeneration (rd1) isolated mouse retina", *Vision Res.*, Vol.46, pp.3198-3204 (2006)
- (9) H. Kanda, T. Morimoto, T. Fujikado, Y. Tano, Y. Fukuda, and H. Sawai: "Electrophysiological studies of the feasibility of suprachoroidal-transretinal stimulation for artificial vision in normal and RCS rats", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, Vol.45, pp.560-566 (2004)
- (10) L. Li, Y. Hayashida, and T. Yagi: "Temporal properties of retinal ganglion cell response to local transretinal current stimuli in the frog retina", *Vision Res.*, Vol.45, pp.263-273 (2005)
- (11) L. B. Cohen, B. M. Salzberg, and A. Grinvald: "Optical methods for

- monitoring neuron activity”, *Annu. Rev. Neurosci.*, Vol.1, pp.171-182 (1978)
- (12) D. Smetters, A. Majewska, and R. Yuste : “Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging”, *Methods*, Vol.18, pp.215-221 (1999)
- (13) M. J. Berridge, P. Lipp, and M. D. Bootman : “The versatility and universality of calcium signalling”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Vol.1, pp.11-21 (2000)
- (14) M. Osanai, T. Kitagawa, and T. Yagi : “Evaluation of effects of electrical stimulation on the retinal ganglion cells for the retinal prosthesis”, *Trans. Jpn. Soc. Med. Biol. Eng.*, Vol.45, No.1, *in press* (2007) (in Japanese)
 小山内実・北川豊啓・八木哲也：「人工視覚システム実現に向けた網膜電気刺激に対する神経節細胞応答の検証」, *生体医工学*, **45**, 1, 印刷中 (2006)
- (15) 小山内実・鈴木慎一・鈴木直哉・木島博正・久場健司：「シナプス前末端内のカルシウム濃度の可視化とその時間変化測定」, *生物物理*, Vol.213, pp.223-224 (1997)
- (16) S. Suzuki, M. Osanai, M. Murase, N. Suzuki, K. Ito, T. Shirasaki, K. Narita, K. Ohnuma, K. Kuba, and H. Kijima : “Ca²⁺ dynamics at the frog motor nerve terminal”, *Pflügers Arch.*, Vol.440, pp.351-365 (2000)
- (17) G. Grynkiewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien : “A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties”, *J. Biol. Chem.*, Vol.260, pp.3440-3450 (1985)
- (18) W. -J. Song, H. Kawaguchi, S. Totoki, Y. Inoue, T. Katura, S. Maeda, S. Inagaki, H. Shirasawa, and M. Nishimura : “Cortical intrinsic circuits can support activity propagation through an isofrequency strip of the guinea pig primary auditory cortex”, *Cereb. Cortex*, Vol.16, pp.718-729 (2006)
- (19) M. Nishimura, H. Shirasawa, H. Kaizo, and W. -J. Song : “New field with tonotopic organization in guinea pig auditory cortex”, *J. Neurophysiol.*, Vol.97, pp.927-932 (2007)
- (20) H. Sakaguchi, T. Fujikado, X. Fang, H. Kanda, M. Osanai, K. Nakauchi, Y. Ikuno, M. Kamei, T. Yagi, S. Nishimura, M. Ohji, T. Yagi, and Y. Tano : “Transretinal electrical stimulation with a suprachoroidal multichannel electrode in rabbit eyes”, *Jpn. J. Ophthalmol.*, Vol.48, pp.256-261 (2004)
- (21) B. P. Choudhury : “Retinotopic organization of the guinea pig’s visual cortex”, *Brain. Res.*, Vol.144, pp.19-29 (1978)
- (22) Y. Ikegaya, M. Le Bon-Jego, and R. Yuste : “Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators”, *Neurosci. Res.*, Vol.52, pp.132-138 (2005)
- (23) M. Murayama, K. Miyazaki, Y. Kudo, H. Miyakawa, and M. Inoue : “Optical monitoring of progressive synchronization in dentate granule cells during population burst activities”, *Eur. J. Neurosci.*, Vol.21, pp.3349-3360 (2005)
- (24) M. J. Berridge : “Neuronal calcium signaling”, *Neuron*, Vol.21, pp.13-26 (1998)
- (25) A. Verkhratsky : “The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signaling”, *Cell Calcium*, Vol.32, pp.393-404 (2002)
- (26) A. Grinvald, E. E. Lieke, R. D. Frostig, and R. Hildesheim : “Cortical point-spread function and long-range lateral interactions revealed by real-time optical imaging of macaque monkey primary visual cortex”, *J. Neurosci.*, Vol.14, pp.2545-2568 (1994)
- (27) R. Yuste, D. W. Tank, and D. Kleinfeld : “Functional study of the rat cortical microcircuitry with voltage-sensitive dye imaging of neocortical slices”, *Cereb. Cortex*, Vol.7, pp.546-558 (1997)

小山内 実



(正員) 1969年3月27日生。1991年名古屋大学理学部物理学科卒業。1996年同大学院理学研究科にて学位を取得。杏林大学、東京医科歯科大学などを経て、2001年より大阪大学大学院工学研究科に赴任。カルシウムイメージング、電気生理学等の手法による神経科学の研究、および医用生体工学の研究に従事。現在、同講師。理学博士。

榮原 晴子



(非会員) 1978年2月8日生。2000年3月長崎大学水産学部卒業。2002年同大学院生産科学研究科博士前期課程修了。2004年7月より大阪大学大学院工学研究科技術補佐員。現在カルシウムイメージング法による、カエル網膜標本および心筋細胞の活動計測に従事。水産学修士。

澤井 元



(非会員) 1957年9月28日生。1988年9月大阪大学大学院医学系研究科博士課程退学後、弘前大学助手、大阪大学助手、岡山県立大学助教授を経て、2000年4月より大阪大学大学院医学系研究科助教授。網膜神経節細胞の変性・再生の研究と人工視覚の研究に従事。医学博士。

宋 文 杰



(非会員) 1961年8月28日生。1983年中国海洋大学水産学部卒業、1990年大阪大学基礎工学部生物工学科にて学位を取得。大阪大学基礎工学部助手、大阪大学大学院工学研究科助教授を経て、2006年熊本大学医学部教授。細胞生理学、聴覚生理学および医用生体工学の研究に従事。工学博士。

八木 哲 也

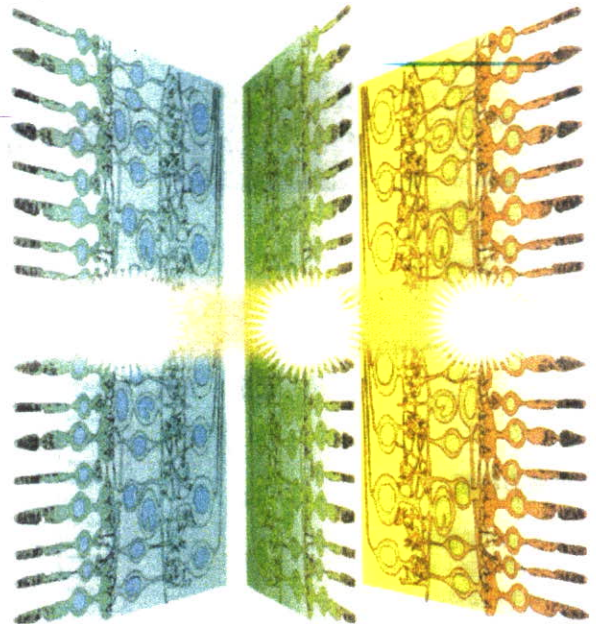


(非会員) 1955年12月5日生。1979年名古屋大学理学部物理学科卒、同大学大学院医学研究科博士課程満了。生理学研究所、名古屋工業大学、ロックフェラー大学、九州工業大学を経て、2001年4月より大阪大学大学院工学研究科教授。この間、神経生理学、視覚生理学、生体エレクトロニクスに関する研究に従事。医学博士。

新しい刺激法を用いた人工網膜の開発

● 澤井 元 大阪大学大学院医学系研究科 システム生理学講座

失明者の視機能を回復させる治療戦略として、人工網膜に関心が集まっている。これは、外界の視覚情報にもとづき適切な刺激パターンを視覚神経回路に加えて、疑似光覚の集合体としての視知覚を与える人工視覚システム⁽¹⁾の一種であり、網膜に刺激を与えるものである。これまでに、網膜の上から刺激を与える方式と網膜の下から刺激を与える方法の二つが考案されているが、それぞれ問題があった。これを克服するため新たな刺激法「脈絡膜上-経網膜刺激法」を用いた人工網膜を開発した。



ヒトの感覚情報の8割は視覚よりもたらされるとされる。そのため、視覚障害は生活の質(QOL)をいちじるしく低下させることになる。2002年WHOの調査によると、全世界の視覚障害者人口は1億6100万人で、そのうち盲人は3100万人。日本の視覚障害者は2001年(平成13年)厚生労働省の発表では30万1000人となっている。

失明者の総数は世界的に減少傾向、国内ではほぼ横ばい状態にあるが、高齢化にともなって視力を失う人は増加しているといわれる。失明の原因疾患の約3分の1を占めるのが、加齢黄斑変性、網膜色素変性症など視細胞の変性疾患である。とくに、加齢黄斑変性は欧米先進国での失明疾患原因の第一位になっており、高齢化の進む日本でも増加傾向にある。

これらの視細胞変性疾患に対して、診断技術の開発・改良や病態の解剖学的研究・生理学的研究・分子生物学的研究が進む一方で、有効な治療法はまだ見つかっていない。現在、遺伝子治療、細胞移植などさまざまな治療法の開発・研

究がおこなわれているが、ヒトにおいて視細胞の変性を阻止するだけでなく死滅した網膜の神経細胞を再生させ、視覚を回復させることは至難の業である。

最近期待を寄せられている治療戦略の一つに人工網膜^{*1}がある。その基本コンセプトは、視細胞の光電変換機能をデバイスに置き換え、そのデバイスで得られた光情報をもとに神経回路を直接電気刺激して疑似的光覚(phosphen)を発生させるものである⁽²⁾。このアイデアが提示された1956年にはまだ実現性に乏しかったが、近年のマイクロデバイス作製技術、生体埋め込み材料、眼科手術法の急速な進歩を背景にして、この10年で急速に現実味を帯びてきた⁽³⁾。内耳有毛細胞の変性による聴覚障害に対して同様の基本コンセプトに沿った人工内耳(蝸牛インプラント)が治療法として確立したことも期待を高めた。

アメリカでは1990年よりハーバード大学、MIT(マサチューセッツ工科大学)、シカゴ大学、ジョンズ・ホプキンス大学(のちUCLAに移る)

*1 網膜補綴、網膜インプラントともよばれる。

図1

人工網膜の構成

ビデオカメラ(a)でとらえた画像データをもとに処理装置(b)で刺激パターンのデータを作成し、そのデータを電気刺激装置(c)に無線伝送する。多点電極アレイ(d)を通じて残存する網膜神経回路に電気刺激を与える。

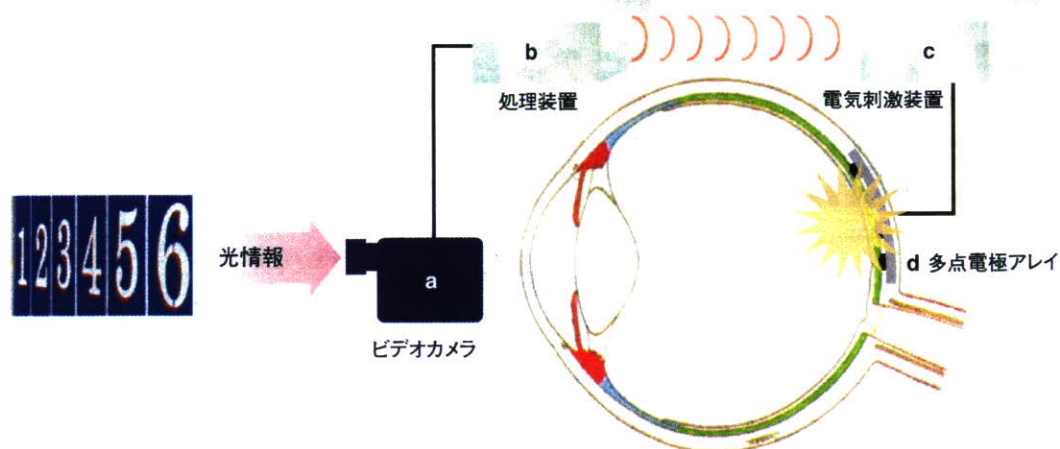
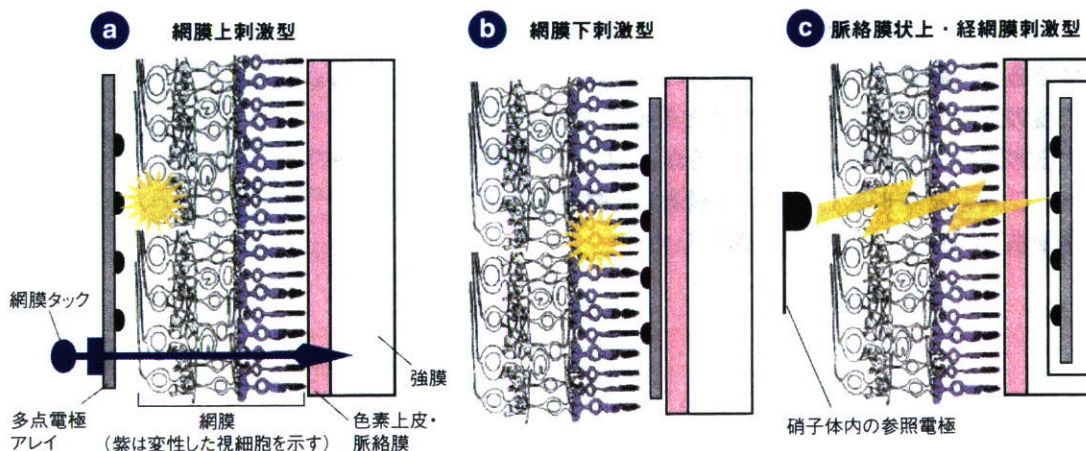


図2

人工網膜の種類

多点電極アレイの設置位置にもとづいて、網膜上刺激型(a)と網膜下刺激型(b)に分かれる。(c)は筆者のグループが開発した脈絡膜上・経網膜刺激型。



の研究グループが、ドイツでは国家プロジェクトとして複数の大学チームと企業との共同研究体制が組織されて研究を積み重ね、最近ではそれぞれ臨床試験にまで進んでいる⁽⁴⁾。

2000年に入ると日本でも産学官連携の人工視覚システムの研究開発コンソーシアム^{*2}が立ち上げられ、韓国、中国、オーストラリア、スイスでも産学連携の研究チームが組織されている。アメリカ視覚・眼科学会年会における人工網膜に関する発表演題数も、2003年に50題だったものが2006年には114題にまで急増しており、この分野への関心の急速な高まりを反映している。

人工網膜の構成

人工網膜は、図1のように(a)外界の画像を撮り込むデジタルビデオカメラ、(b)その画像情報を処理し、刺激パターンに変換する装置、(c)その刺激信号にもとづいて刺激電流を各刺激電極

に通電する刺激装置、(d)刺激電極を2次元配置した多点電極アレイから構成される。このうち、(a)と(b)を装着可能な形で体外に置き、(c)と(d)を体内に埋植し、(b)と(c)間を無線でつなぐ方式がもっとも一般的である。なお、体内装置の電源は電磁誘導で供給される。

体内に設置される刺激装置と電極アレイには高い信頼性と安全性が要求される。とりわけ眼球組織と接触する電極材料には、耐腐食性と高い電荷注入能力をもち、加工が容易で細胞毒性のない金属^{*3}が求められる。さらに電極間や回路を被覆する絶縁材料も単に高い絶縁特性に加えて、十分な生体適合性・耐久性、高い塑性が必要である。

網膜上刺激型と網膜下刺激型

これまで研究されている人工網膜は、電極アレイをどこに設置するかによって、網膜上型と

*2 独立行政法人新エネルギー・産業開発機構(NEDO)、厚生労働省、大阪大学、奈良先端科学技術大学院大学、名古屋大学、九州大学、杏林大学、株式会社ニデックが参加。
プロジェクトリーダー：
田野保雄(大阪大・医・眼科)

*3 たとえば白金イリジウムや窒素チタンなど。

網膜下型の2種類に大別される(図2)。

網膜上刺激型(図2a)は、アレイを網膜の硝子体側表面に密着固定し、網膜内層側に位置する神経節細胞や視神経を直接電気刺激するものである。この方法はUCLAのHumayunら⁽⁴⁾、ハーバード大学のRizzoら⁽⁵⁾、ドイツのEckmillerら⁽⁶⁾によって研究が進められてきた。

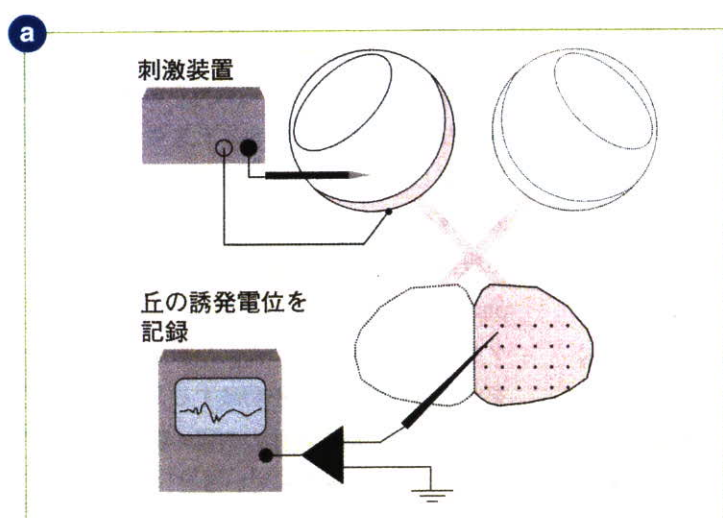
網膜上刺激法の最大の利点は、視細胞だけでなく双極細胞などの網膜内層の神経回路が障害された失明患者でも、神経節細胞や視神経線維が生き残っていれば光覚の発生を可能にする点である。また、硝子体腔に機器を埋植できるので、機器の大きさや発熱量に関する制限が低い。さらに、カメラと画像処理装置を体外に置くので、画像情報の時空間的变化を神経インパルス(活動電位)に符号化する処理を埋植後も調整することが容易である。

反面、この方法では神経節細胞を刺激するので、刺激電極に電送される情報は網膜に投影された視覚情報そのものを単純にドットパターン化したものではなく、神経節細胞に至る網膜内回路の光情報処理を考慮して符号化された刺激信号を作る必要がある。よって得られる視知覚の質はその符号化の質に依存する。また、この方法では電極直近の神経節細胞だけでなく通過走行する視神経線維束も同時刺激される可能性があり、その場合、空間解像度が低下するおそれもある。さらに、アレイは網膜タックによって固定されるが、球面である網膜に全電極面が接触するように固定するのがむずかしい。

一方、網膜下刺激型(図2b)は、変性した視細胞層の受光および電気信号変換機能を網膜と色素上皮との間に挿入した多点式光電素子の人工網膜チップで代替し、残りの網膜神経回路を

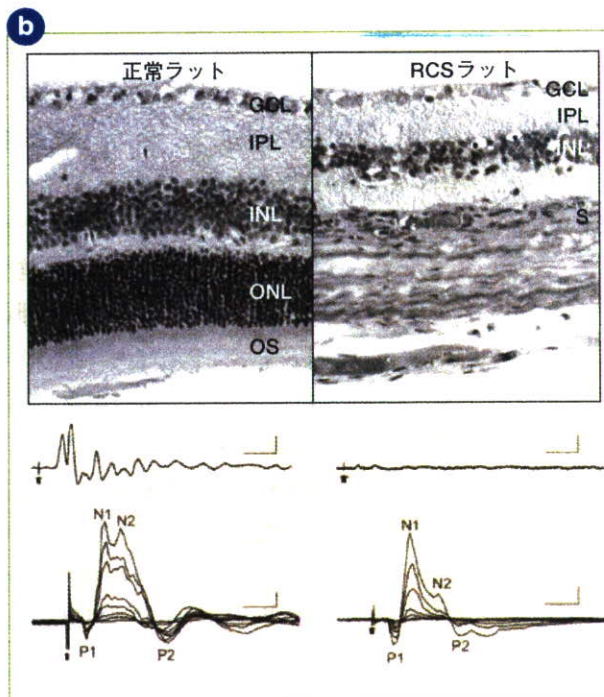
図3

STS 刺激に対する上丘の反応



実験のセットアップの模式図

強膜上においた銀ボール電極を陽極、硝子体内に刺入した参照電極を陰極として定電流パルス刺激を眼球に与え、反対側の上丘から誘発電位を記録する。

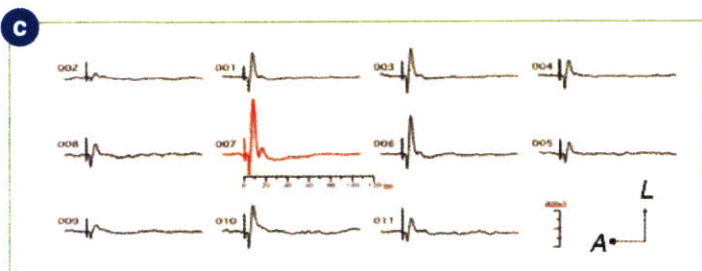


正常ラット(左側)とRCSラットの記録の典型例

上段: HE染色した網膜切片の顕微鏡写真。RCSラットでは外顆粒層(ONL)が完全に消失しており、視細胞が脱落変性しているのがわかる。しかし、内顆粒層(INL)~神経節細胞層(GCL)は比較的良好に保持されている。

中段: 閃光刺激に対する誘発電位(校正50 m秒, 50 μ V)。RCSラットでは応答が認められない。矢印: 刺激開始時点

下段: STS刺激に対する誘発電位(校正10 m秒, 50 μ V)。正常ラットは10, 30, 50, 80, 100, 150, 200, 300 μ A, RCSラットは30, 50, 80, 100, 150, 200, 300 μ Aに対する応答を重ね合わせた。矢印: 刺激開始時点

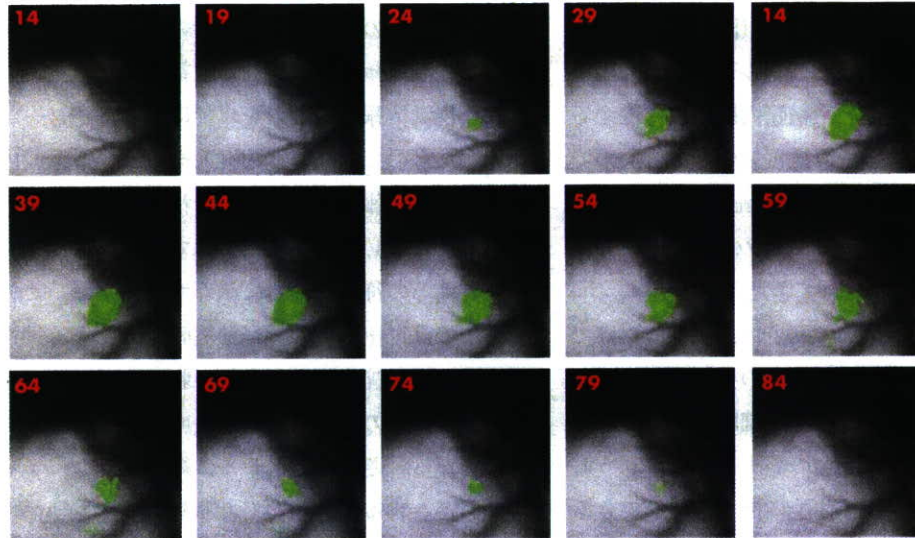


上丘の記録部位を前後軸・内外側軸に沿って0.25mm間隔で記録した一例。最大振幅の電位反応が記録された007を中心にして、記録部位を周辺に移動すると反応が低下した。

図4

単発 STS 刺激に対するモルモット大脳皮質一次視覚野の応答のイメージング

STS (0.5 m秒, 100 μ A) 刺激後 14~84m 秒間までの応答画像を 5 m 秒ごとに並べたもの。各画像左上の赤字は刺激後の時間 (m 秒) を示す。自発的電位変動の 3 倍を超える電位変動についてその大きさをカラー (黄~赤) 表示した。各画像は 6 mm 四方。



興奮させる方法で、シカゴ大学のChowやドイツのZrennerらのグループによって開発が進んでいる^(7,8)。

微小な薄いフォトダイオードに電極を貼り合わせて2次元配置したもの(マルチフォトダイオードアレイ, MPA)を、局所的に網膜剥離をおこして作った網膜下のスペースに滑り込ませて設置する。MPAが網膜越しに受光すると、発生する電圧によって直下の残存神経回路が刺激される。視細胞の機能を光電素子に代替させるだけなので、カメラと画像処理のための装置が不要になり、装置全体が単純で軽量小型化され、すべてを眼球内に埋植することさえ可能になる。また、装置は網膜と色素上皮とに挟まれることで確実に固定される。さらに網膜外層側の残存回路を刺激するので、通過線維を刺激する可能性は低く、また複雑な符号化も不要である。

Chowらは、ネコの網膜下に挿入したMPAに赤外光を照射すると刺激電流が流れることを最長12か月にわたって確認しており⁽⁹⁾、さらに最近では、この方法をヒトに応用して、一定の視覚機能の回復を報告している⁽¹⁰⁾。

しかしMPAが、脈絡膜と網膜との間の物質交換を阻害する可能性や、デバイスの発熱による網膜の損傷、網膜剥離の危険性を抱えている。また、角膜から網膜までの通光性が保たれている必要がある。さらに、現時点でのフォトダイ

オード光電変換効率では残存網膜神経細胞を興奮させるのに必要な刺激電流を発生できないことが明らかになり、外部からの電力供給が不可欠と考えられるようになってきている。

この二つの方式以外に、眼窩内で視神経を直接刺激する方法も検討されている。ベルギーのVeraartらは、四つの平面電極が視神経表面を包み込むように配置したカフを失明患者の視神経に装着して電気パルスを与えると、通電する刺激電極の位置や刺激パルスの幅・電流値に応じて視野のさまざまな場所にさまざまな大きさのphosphenが生じることを見いだした。このデータをもとに、カメラで捉えた画像情報の符号化をおこなって視神経を刺激するように調整すると、患者は眼前の物体の空間的位置を弁別することができたと報告している⁽¹¹⁾。

新しい刺激法:脈絡膜上- 経網膜刺激(STS)法

網膜上刺激法と網膜下刺激法はいずれも、電極が直接網膜に接しているために、電極アレイの埋植時に網膜を損傷する危険性がある。さらに、経年変化にともなって電極を交換したり新たに追加したりする際の外科的侵襲が大きい。したがって、臨床的にみて、刺激電極が網膜に直接に接触することなく、光覚を生じさせる刺激方法が望まれる。そこで、筆者は前述のコン

ソーシアムのメンバーとともに脈絡膜上-経網膜刺激法 (Supracholoidal transretinal stimulation, 以下STS) を考案した⁽¹²⁾。この方式では、強膜の一部を切除して多点刺激電極アレイを設置し、硝子体内に挿入した参照電極との間に通電して残存する神経細胞を刺激する (図2c)。

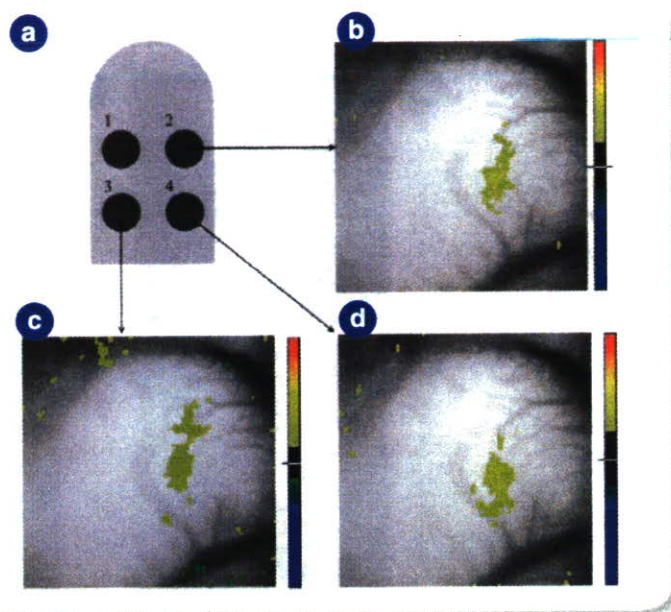
STS方式の有効性を評価するため、図3aに示すように正常ラットと網膜色素変性症モデルラット (RCSラット) を用いて、網膜の一点に単発定電流パルスのSTSを加え、視覚中枢の一つである上丘から誘発電位を記録したところ、光刺激に対する誘発電位が消失していたRCSラットにおいても正常ラットと同様、潜時約4.5 m秒で小さな陽性波 (P1) とそれに続く大きな陰性波 (N1-N2) が記録された (図2b 下段グラフ)。P1の閾値は両ラットとも6~10 $\mu\text{A} \cdot 0.5\text{m秒}$ (3~5nC) で、これまで報告された網膜上刺激、網膜下刺激の場合とほぼ同等であった。

このP1-N1の振幅は刺激の電流値に依存し、電荷量には依存しない。また、誘発電位の波形は視神経刺激に対するものと非常によく似ている。さらに、硝子体内の参照電極の極性を陽極に切り替えて刺激すると、正常ラットではP1-N1が現れず潜時約20m秒に刺激電荷量に比例して振幅が変化する応答が現れたのに対し、RCSラットではP1-N1が記録されたが閾値が増大していた。

以上の結果から、STS法は網膜内層に位置する神経節細胞に直接興奮を引き起こすと考えられた。

STS型人工網膜の空間分解能

図2cに示すように、上丘での誘発電位の最大振幅が得られた部位を調べた結果、正常ラットでもRCSラットでも最大振幅記録部位は強膜に置いた刺激電極直下の網膜部位と空間的に対応していることがわかった。また、誘発電位の記録範囲は刺激強度に依存し、閾値をわずかに上回る刺激では100 $\mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$ 四方にまで限局していた。



つぎに、モルモットの眼球に単発STSを加え、反対側視覚皮質の応答を膜電位感受性色素による光学計測によってイメージングしたところ、刺激に対して皮質の局所で一過性の興奮 (脱分極) 応答が生じた (図4)。さらに、強膜上に2×2極の電極アレイを置いて、そのうち三つの電極を使って単発STSを加え、それぞれの応答部位を検討した結果、それぞれ電極の位置に対応して皮質の応答領域がシフトすることが判明した (図5)。

この結果は各電極を通じて網膜に加えられたSTS刺激に対して、空間的に異なった位置に疑似光覚が発生し、空間弁別される可能性を示している。その場合、この電極アレイで隣接する電極同士の中心間距離 (500 μm) から、ヒトの網膜内では視角3°程度離れた2点の刺激が空間的に弁別可能ということになる。これは視力にして0.03程度になる。

人工網膜で得られる視知覚像

われわれのコンソーシアムは、当面の目標を指数弁^{*4}の達成に置いている。それでは、現時点の技術レベルの人工網膜によって得られる視知覚像とはどのようなものになるのであろうか？

これまでの研究結果を総合し、5 mm四方に8×8極を配した電極アレイで得られるイメージをシミュレートしてみた (図6)。この場合、視

図5

多点STS刺激に対するモルモット大脳皮質一次視覚野の応答のイメージング

(a) 2×2極の多点電極アレイ。1~4は平面型刺激電極 (Pt, 直径100 μm) を表す。

(b, c, d) それぞれ、電極2, 3, 4を用いて単発STS (300 μA , 0.5 m秒) を与えて45 m秒後の視覚野の応答画像。刺激位置を変えることにより、応答する視覚野の領域が変化している。

*4

指の本数を答えてもらい、正答できる距離によって視力を表す。

図6

人工網膜によってえられる疑似光覚像のシミュレーション

(a) 指数弁の視力検査を想定して、眼前30 cmに示された手を視覚対象とした。CCDカメラで捉えた画像(原画) 320 x 320ピクセル、グレースケール8ビット(256階調)。

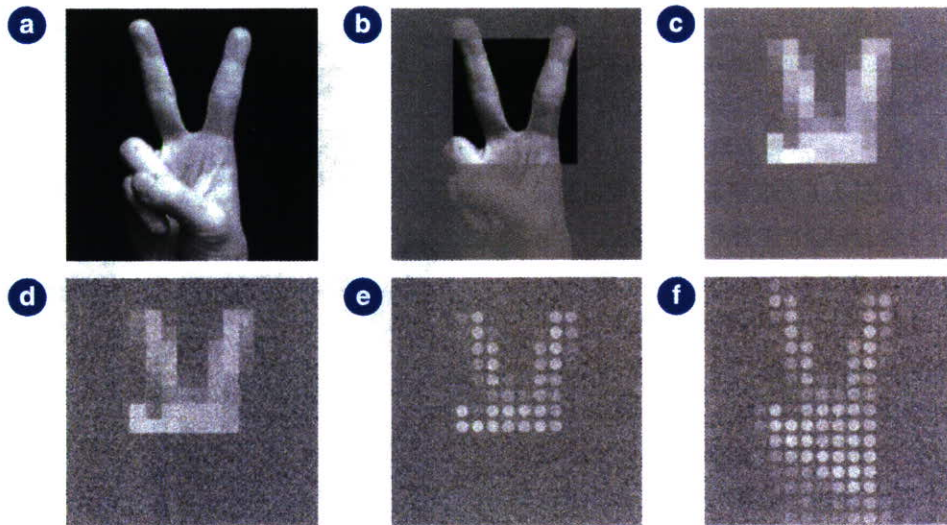
(b) 原画のうち、埋植される8x8電極アレイの大きさ(5 mm四方)に相当する網膜エリアに投影される部分

(c) Photoshop (Adobe)を用いて画像bを8x8ピクセルにピニングし、各ピクセルの明暗を3ビット(8階調)で表現したものの。

(d) 残存網膜回路や視覚系の自発発火を考慮してブラックバランスをおこなったのち、ノイズ(ガウス分布15%)を加えたものの。

(e) 各ピクセルを電極の形状と大きさに変形したものの。

(f) 装着したビデオカメラを動かして眼前をスキヤニングすることで最終的に知覚されるであろうイメージ。



視野角20° 四方の視空間が64点の疑似光覚の集合として再現される(図6b, c)。さらに、視細胞変性患者では残存網膜回路の自発活動が背景ノイズとして常時混入するため、ランダムなちらつきをとともなう低解像度の電光掲示板のようなものではないかと予想される(図6d, e)。しかも、視野角20° 程度の窓枠を通して覗いていることになり、全体像をつかむためにはカメラを上下左右に動かして視野を広くスキャンする必要がある(図6f)。

このシミュレーション結果が正しければ、人工網膜を用いて弁別課題としての指数弁を遂行することは十分に可能であろう。もちろん、それは失明患者に指数弁程度の視覚を提供することではない。しかし、失明患者の日常のモビリティを支援し、QOLを大きく向上させることは、十分期待できると思われる。

実用化にむけて

2005年秋、大阪大学眼科で2名の網膜色素変性症患者の協力を得て急性臨床試験がおこなわれた。強膜上に置かれた3x3極のアレイを通じてSTS刺激をおこなったところ、被験者からはパチンコ玉~500円硬貨サイズの疑似光覚が生じたとの報告を得られたそうである。また、隣接した2極を同時に刺激した際にはひょうたん型の疑似光覚や二つの円形の疑似光覚が見えた

そうである。

人工網膜が実用化されるには、もたらされる視覚の質をさらに向上させるだけではなく、体内に埋植されるデバイスの長期耐久性・安全性や交換・除去時の安全性を確保しなければならない。

Profile

さわい・はじめ

1957年9月28日生。1988年9月大阪大学大学院医学系研究科博士課程退学、弘前大学医学部、岡山県立大学保健福祉学部などを経て、2000年4月より大阪大学大学院医学系研究科准教授。主に電気生理学的・形態学的方法を用いて網膜神経節細胞の変性・軸索再生の研究ならびに人工視覚の研究に従事。学術博士(医学)。

参考文献

- [1] Maynard EM: "Visual prostheses" Annu Rev Biomed Eng 3(2001)145-168
- [2] Tassicker GE: "Retinal Stimulator" U S Patent No.2, 760, 483 (1956)
- [3] Zrenner E: "Will retinal implants restore vision?" Science 295 (2002) 1022-1025
- [4] Weiland JD, Liu W & Humayun MS: "Retinal prosthesis" Annu Rev Biomed Eng 7 (2005) 361-401
- [5] Rizzo JF et al: "Retinal prosthesis: an encouraging first decade with major challenges ahead" Ophthalmology 108 (2001) 13-14
- [6] Eckmiller R: "Learning retinal implants with epiretinal contacts" Ophthalmic Res 29 (1997) 281-289
- [7] Chow AY & Chow VY: "Subretinal electrical stimulation of the rabbit retina" Neurosci Lett 225 (1997) 13-16
- [8] Chow AY, Pardue MT, Perlman JI, Ball SL, Chow VY, Hettling JR, Peyman GA, Liang C, Stubbs EB Jr & Peachey NS: "The development of retinal microphotodiodes for replacement of degenerated photoreceptors" Ophthalmic Res 29 (1997) 269-280
- [9] Chow AY, Pardue MT, Perlman JI, Ball SL, Chow VY, Hettling JR, Peyman GA, Liang C, Stubbs EB Jr & Peachey NS: "Subretinal implantation of semiconductor-based photodiodes: durability of novel implant designs" J Rehabil Res Dev 39 (2002) 313-321
- [10] Chow AY, Chow VY, Packo KH, Pollack JS, Peyman GA & Schuchard R: "The artificial silicon retina microchip for the treatment of vision loss from retinitis pigmentosa" Arch Ophthalmol 122 (2004) 460-469
- [11] Veraart C, Wanet-Defalque MC, Gerard B, Vanlierde A & Delbeke J: "Pattern recognition with the optic nerve visual prosthesis" Artif Organs 27 (2003) 996-1004
- [12] 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 45 (2004) 560-566