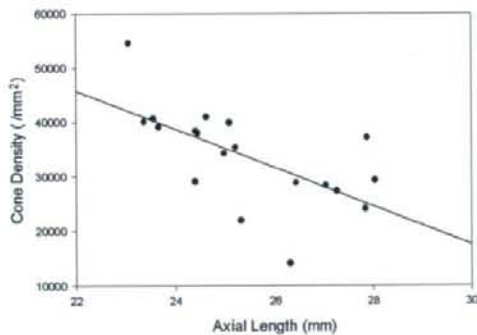


31歳女性（正常眼）、左眼黄斑部中央より2度耳側固視にて撮影。残存取差によるDeconvolution処理、8枚分の加算平均を行っている。個々の輝点が錐体視細胞を示す。線状影は網膜細血管である。

図4：眼軸長と錐体密度



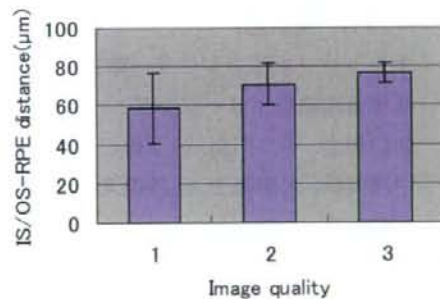
眼軸長が長い (=近視が強い) 症例ほど輝点の密度が低いことを示した。輝点の密度は 30000mm^2 程度で既報の錐体密度と一致した。

図5：眼底疾患眼の視細胞像



46歳男性（黄斑ジストロフィー）。両眼にいわゆる標的黃斑症を呈しており、弟が同様の黄斑症を持つ。画像は視標中央を固視にて撮影。上方には図4類似の輝点が多数見られるが、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）。

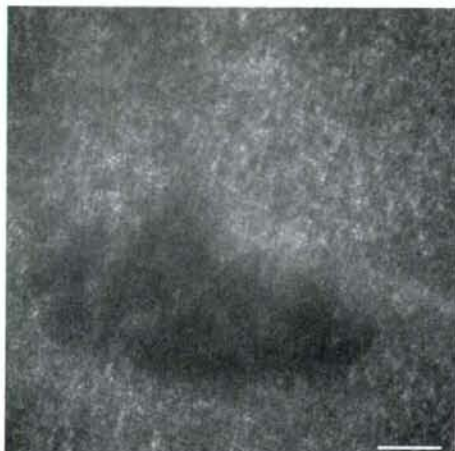
図6：視細胞外節の長さとの明瞭度



光干渉断層計を用いた視細胞外節の長さ、補償光学眼底カメラ画像の明瞭度との関係を示した。Image quality は高いほど画像が明瞭であることをしめしている。視細胞

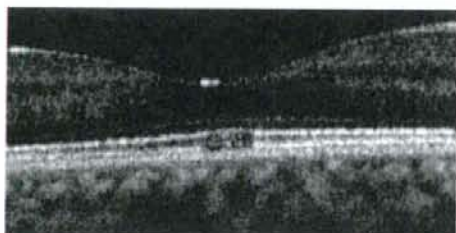
外節が長い症例ほど画像が明瞭に映ることが明らかになった。

図7：微小黄斑円孔症例の補償光学眼底所見



41歳男性(微小黄斑円孔)。黄斑部に $300 \times 180\mu\text{m}$ のモザイク欠損を認める。視力(0.3)。スケールバーは $50\mu\text{m}$ 。

図8：図7症例のフーリエドメイン光干渉断層計所見



補償光学眼底カメラ像と一致する大きさで視細胞外節部分の低反射を認める。

表1 撮影対象となった疾患

| | | | 有効な眼底撮像不能 |
|------------|--------------------------|---|-----------------|
| 網膜疾患 なし | | 5 | 3(白内障、眼内レンズによる) |
| 網膜疾患 あり | AZOOR | 6 | |
| | レーザー・光障害 | 9 | |
| | 微小黄斑円孔 | 3 | |
| | 黄斑円孔 | 3 | 2(眼内レンズ) |
| | MEWDS | 2 | 1(白内障) |
| | 自己免疫性網膜症 | 2 | 2(白内障、眼内レンズ) |
| | Supernormal ERG synd. | 2 | |
| | Occult macular dystrophy | 2 | |
| | leber病 | 2 | |
| | 眼球打撲 | 2 | |
| | 黄斑上膜 | 1 | 1(白内障) |
| | 黄斑牽引症候群 | 1 | 1(白内障) |
| | 不明 | 2 | |

白内障、眼内レンズ眼を除いた全ての症例で有効な画像が得られた。

脈絡膜上経網膜電気刺激 (STS) による人工視覚の実用機の開発

分担研究者 小澤素生 株式会社ニデック 社長

研究要旨

脈絡膜上一経網膜刺激方式の人工視覚システムの実用化を目的として開発を進めている。当面の目標である1ヶ月間の臨床試験実施に向け、本年度は臨床試験機製作のための技術開発および試作機の耐久性評価試験を実施した。体内装置を構成する各ユニットをデバイスの信頼性と生体への安全性を兼ね備えた状態で電氣的に接続するとともに、眼球と同等の曲率を有するフイティング形状刺激電極を開発した。これらの要素技術を用いて体内装置試作機を完成させた。

今年度の最重要テーマである長期間の生理食塩水を用いての耐久性評価試験ならびに in vivo 耐久性評価試験では、現時点で問題は発生していない。今後6ヶ月間継続し長期耐久性を実証する予定である。

A. 研究目的

(1) 体内装置および刺激電極の開発

体内ケースと体内コイル、ケーブル間の配線接続ならびに体内装置全体の樹脂包埋技術の確立に加え、眼球フイティング形状刺激電極部の開発をする。

(2) 電気刺激の安全性評価

臨床応用するためには、電気刺激の生体に対する安全性の確保が肝要であり、動物試験により評価する。

(3) 体内装置の電気回路開発

安全性を担保するシステム構成のキーデバイスとなるマルチプレクサ LSI を、試作・評価する。

(4) 体内装置耐久性評価試験

体内装置の重要な評価項目である耐久性を、第一に生理食塩水を用いての耐久性評価試験により、第二に動物を用いての試験により評価する。

(5) 臨床試験機の開発

長期埋植が可能な臨床試験機の開発を進める。

埋植後1ヶ月間の臨床試験を想定し、十分な安全性と耐久性を持ち、必要な臨床データを取得可能な仕様の体内装置を製作する。

B. 研究方法と成果

(1) 体内装置および刺激電極の開発

体内装置全体を製作し、体内システムとしての基本機能評価を行った。

体内装置は、体内ケース、体内ケーブルおよび体内コイル、刺激電極、硝子体電極で構成される。

刺激電極基板と体内ケーブルを連結する手法として、体内ケースまでの必要な長さの導線を刺激電極に接続し、体内ケーブルと刺激電極基板を分けずに一連の工程で製作する方法を選択した。これは慢性臨床試験用刺激電

極部の製作方法として、安定した品質確保に主眼をおいたからである。新規に開発した一体化プロセスは、ケーブル被覆材であるシリコーン樹脂上にパレン樹脂を形成するという信頼性に優れたもので、そのデバイス構造の概念図を図1. に示す。さらに、製作工程を最適化し接続部の故障リスクを著しく低減することができた。図2. に試作した体内ケーブル付刺激電極アレイを示す。

このケーブル付刺激電極アレイは、強膜ポケットに埋植する刺激電極アレイ基板と体内ケーブルとからなる。体内ケーブルは、眼球周りに縫合されるため、柔軟性と伸縮性を兼ね備えたものとなっている。

次に、このケーブル付刺激電極を兎眼球に埋植して、安定性を確認した。なお、試験では兎眼球の大きさや試験効率を考慮して 2ch の小型刺激電極を使用した。

さらに、刺激電極部を強膜ポケット内に留置するのを考慮して、反力を軽減させる形状とした。留置模擬実験を行い、問題点がないことを確認した(図3.)。臨床用刺激電極についても同様に、眼球強膜の曲率にフィットする形状の刺激電極基板とすべく、試作結果(図4)をもとに製造技術の開発と検証を進めている。

体内ケースは He リーク試験で 1×10^{-9} Pa \cdot mm³/sec 以下の気密性能を有し封止されている。その内部にある電気回路は気密端子を介してケース外と導通している。刺激電極ケーブルと体内コイルはこの気密端子へそれぞれ接続される。また、この芯線や体内コイル線を接続する工程には、作業性や生体安全性が確立された物質のみで接合部を構成する考えから、電気抵抗溶接とした。電気抵抗溶接は、導体間接触部の電気抵抗を利用して通電により材料を溶かして接合する技術である。体内コ

イルとケーブルの芯線を接続した端子部を生体適合性エポキシ樹脂で保護して体内ケースと一体化した後に、図5. に示すモールド型を用いて、体内装置全体をシリコーン樹脂包埋する。この方法にて完成した体内装置を図6. に示す。

この体内装置を37°Cの生理食塩水に浸し、電極間の絶縁抵抗変化を記録したのが図7. である。このグラフから、安定した絶縁性能が維持できていることがわかる。

(2) 電気刺激の安全性評価

人工視覚システムを臨床応用するためには、電気刺激の生体に対する安全性を確保することが極めて重要である。これに関しては内耳や脳に対する慢性刺激試験等多くの文献が存在するが、使用する電極や刺激部位、パルスパラメータによって結果は全く異なると考えられる。このため今後用いる刺激電極およびパルスパラメータにて網膜に電気刺激を行い損傷の有無を評価することが必要となる。そこで開発した白金弾丸電極および白金の硝子体電極を動物眼に埋め込み長期間刺激し損傷の有無を検討した。

家兎(Dutch 種)左眼の強膜内に上述の刺激電極を、角膜輪部に硝子体電極をそれぞれ埋植した。それぞれの電極には、白金イリジウム撚り線を螺旋状に巻いて耐久性を高めたケーブルが接続されており、皮下を通して頭蓋側に導かれている。このケーブルを介して定期的に電気刺激を行った。電気刺激にはパルス強度 500 μ A、パルス長さ 1ms、繰り返し周波数 20Hz のカソーディックファースト双極電流パルスを用いた。通電時間は3時間とし、これを週1回、1ヶ月にわたり実施した。また通電終了後は都度眼底カメラによる眼底撮影を行うとともに蛍光眼底観察を行い異常の有無を確認し

た。最終回の刺激試験終了後に眼球摘出を行い、電気刺激がなされた部位の網膜標本作製して組織損傷の有無を評価した。

その結果、眼底カメラによる観察では異常所見は認められなかった。刺激電極が眼底から明瞭に確認できる場合とできない場合があり、電極の埋植深さに対応した結果と推測された。蛍光眼底像の観察においてはとくに異常な所見は認められなかった。図8. は眼球摘出後に作成した組織標本である。*印部分が刺激電極の留置されていた部位であり、刺激電極が強膜内に一部陥没した状態になっていることが明らかになった。この電極直上の網膜を拡大したのが図9. である。網膜は正常な層構造を維持しており、従って電極留置および上記条件下での電気刺激による組織損傷は本試験では発生しなかった。また1ヶ月にわたる通電試験において電極やケーブルの破損、断線等の問題は発生しなかった。

今回の試験系により長期の慢性通電による安全性を評価できることが確認できた。この結果をもとに、現在我々は安全性評価試験の第2フェーズとしてより厳しい条件での試験を実施中である。本フェーズでは刺激強度 $500\mu\text{A}$ および $700\mu\text{A}$ の2群に分けて、第1フェーズの6倍に相当する週1回6時間3ヶ月の通電試験を各群それぞれ3羽の家兔に対して実施しており、より長期間の電気刺激が生体に及ぼす影響を評価してゆく予定である。

(3) 体内装置の電気回路開発

リスク分析と評価を実施した結果、防水故障が想定される体内ケーブルなどの樹脂包埋部に直流電圧が与えられると、生体組織損傷のリスク要因になることが明らかになった。この対策として体内ケース外の電氣的接続は全て交流結合とするシステムを考案し、これを実現す

る回路技術を開発した。さらに自己診断機能を追加し、体内装置の具体的なシステム構成のキーデバイスとなるマルチプレクサ(MUX) LSIを試作し(図10.)、機能評価を行った。

体内装置のシステム構成を図11. に示す。体内装置本体からMUXへの電力・制御信号の送受信は、上述の通り安全性を担保するために、どちらも交流を用いて行う。これらの間をつなぐ電線をできるだけ少なくするために、制御信号は電力供給信号に重畳されている。MUX側では、電力を整流して安定化された直流電源を作る必要があり、加えてMUXを制御するための制御信号を、重畳された電力波形からデコードする必要がある。これらの機能を有するMUX LSIを新規に試作した。

試作したMUX LSIは、これらの機能を1チップに集積しており、機能ブロックごとに評価・確認した。評価試験の一例として、直流安定化電源の負荷電流特性を図12. に示し、MUX LSI内のデコード回路や論理回路に与えられる3.3Vの安定な直流電源特性を明示する。図13. は、交流信号に重畳された制御信号をデコードする回路の動作を確認した例である。交流信号の周期に変調をかけた制御信号が、デコード回路の出力でシリアルなデータ列に変換されており、正常に機能していることがわかる。

(4) 体内装置耐久性評価試験

人工視覚システム開発において最も重要な評価項目のひとつは耐久性である。ここでの耐久性評価の基本は生理食塩水を用いての評価試験である。この評価法は実施が容易である反面、実際の生体内環境と試験条件が同一ではないという難点がある。このため実際に生体内にデバイスを長期埋植する評価が臨床応用前には欠かせない。そこで開発した体内

装置を生体内に留置し評価試験を実施した。

家兎3羽の背部皮下に体内装置を埋植した。ここでは、体内ケース部分を背中筋肉下に固定し(図14.)、電極部を皮下に留置する(図15.)術式を開発した。なお本試験は、体内装置の包埋技術の妥当性を確認することが目的である。このため妥当性確認可能な素子が体内ケースに格納され、最終製品同等の気密封止した体内装置を作製し試験に用いた。家兎背部皮下に留置された体内装置に対して、体外より検査装置を接近させ、刺激電極インピーダンスを無線にて計測することにより異常の有無を確認した。

試験の結果を図16. に示す。試験開始後より約4週間、刺激電極のインピーダンスはほぼ一定して1k Ω 程度の正常値であった。仮に断線が起こるとインピーダンスは上昇し、水密性の劣化が起こるとインピーダンスは低下する。従ってこれまでの観測期間の間、3個すべてのデバイスで異常は生じていないと考えられる。本試験は今後継続して6ヶ月間実施し、長期間の耐久性を実証してゆく予定である。

(5) 臨床試験機の開発

電子機器を実フィールドで使用する場合EMC(Electro-Magnetic Compatibility)を確保しなければならない。すなわち、他の機器からのノイズに対する耐性確保と他の機器へノイズを出さない構造とする必要がある。体内装置へ体外から無線で電力供給を行う本システムでは、特に後者の対策が重要である。このため電力伝送効率を犠牲にせずにノイズを出さないデバイス構造を考案した。具体的には、誘導コイルを金属でシールドする構造とした。このシールド形状を最適化することで、ノイズの発生を基準値以下にすることができた。シールド構造による違いと電力伝送

状態を比較したグラフを図17. に示す。シールドしない場合と同程度の電力伝送効率が得られる構造が可能であることがわかる。

現段階では、生理食塩水を人体ファントム、すなわち人体の電気的特性を模擬した試験用ダミーを用いて評価試験を行った。最終的なEMC特性を評価するには、より人体に近い特性と形状のファントムが必要となる。そのため、体内装置の埋植部位である側頭部近傍を模擬した人頭形状のファントムを、人体の電気的特性(誘電率と電気伝導率)に合わせ込んだ材料で製作した(図18.)。頭蓋の内部と頭皮部は異なる材料で構成されている。

人体近傍で使用される電子機器、体内に埋植して動作させる電子機器は、SAR(Specific Absorption Rate)を基準値以下にする必要がある。そのため、SARの評価系を構築した。

一方、SARの評価を求められる機器として、携帯電話がある。これにはGHz帯前後の周波数が用いられている。本システムが用いる16MHzの周波数帯とは2けた程度の違いがある。そのため一般的な評価方法が確立していない。そこで、評価系を構築するために、通常の液体ファントムとなる溶液を開発した。前述のEMC評価用の固体ファントムでは、体内部の電磁界を測定できないからである。人体組織の電気的特性は周波数によって大きく変わり、16MHz帯に使用可能な溶液レシピを開発した。

C. 考察および結論

(1) 体内装置および刺激電極の開発

体内ケーブル、体内ケース、体内コイル、刺激電極及び硝子体電極を接合し、全体をシリコン樹脂で包埋する人工視覚システム体内装置の製作技術を確立した。今後は、慢性臨

床試験実施を目指し、眼球にフィットする形状の刺激電極部の製作技術を確立してゆく。

(2) 電気刺激の安全性評価

現在実行中の試験では、これまで眼底カメラによる観察および蛍光眼底像の観察で異常所見は認められなかった。組織標本によれば、刺激電極が強膜内に一部陥没した状態になることが明らかになったが、網膜は正常な層構造を維持しており、組織損傷は本試験では発生しなかった。また1ヶ月にわたる通電試験において電極やケーブルの破損、断線等の問題は発生しなかった。

長期慢性通電による安全性を評価確認できたので、安全性評価試験も第2フェーズに入り、より厳しい条件下で実施中である。これにより、長期間の電気刺激が生体に及ぼす影響を評価してゆく予定である。

(3) 体内装置の電気回路開発

安全性を担保するシステムを構築するLSIの構成を考案し、キーデバイスとなるMUX LSIの試作を完了した。今後、LSI全体の機能評価を行う。また、システムを構成する他のLSI開発へと進めていく。

(4) 体内装置耐久性評価試験

これまでの観測期間の間、3個すべてのデバイスで異常は生じていない。本試験は今後継続して6ヶ月間実施し、長期間の耐久性を実証してゆく予定である。

(5) 臨床試験機の開発

EMC規格をクリアする体内装置の構造が確定した。また評価用のファントムの準備が整った。今後の術式開発により体内装置の留置位置が確定していくので、最終的なEMC評価にこのファントムを使用して評価を実施する。

SAR評価用の液体ファントムの準備が整った。今後は電磁界の測定用プローブを16MHz

帯に校正し、システム動作をさせながらSARを評価していく。

D. 健康危惧情報

特になし。

E. 研究発表

■ 発表論文(2008)

1)

Y. Terasawa, M. Ozawa, T. Tokuda, J. Ohta and Y. Tano

Large-Surface-Area Electrodes Based on Bulk Micromachining,

Investigative Ophthalmology and Visual Science, Vol.49(5), p. S3020, 2008

2)

Y. Terasawa, M. Ozawa, J. Ohta and Y. Tano, Bulk Micromachining-based Multielectrode Array for Retinal Prostheses,

The Eye and The Chip 2008 World Congress, Detroit, June 14, 2008

3)

寺澤靖雄, 小澤素生, 田代洋行, 太田 淳, 田野保雄,

人工視覚システムにおけるバルク材料を用いた高信頼性刺激電極の開発,

人工臓器, Vol.37, No.2, p. S-180, 2008

F. 知的財産権の出願登録状況

■ 特許権等知的財産権の取得および申請状況(2008. 1. 1~)

国内出願

- ① 特願2008-060334(出願日H20. 3. 10)「通信回路及びこれを備えた視覚再生補助装置」 発明者: 米澤栄二

② 特願2008-24461(出願日H20. 2. 4)「視覚再生補助装置」 発明者:寺澤靖雄

③ 特願2008-4838(出願日20. 1. 11)「視覚再生補助装置」 発明者:鐘堂健三

④ 特願2008-124026(出願日20. 5. 9)「視覚再生補助装置」 発明者:寺澤靖雄

⑤ 特願2008-225345(出願日20. 9. 2)「視覚再生補助装置」 発明者:齊藤徹

⑥ 特願2008-255828(出願日20. 9. 30)「視覚再生補助装置」 発明者:大澤孝治

⑦ 特願2009-21914(出願日21. 2. 2)「電子素子のハーメチックシール方法、及び該方法を用いた生体埋植用機能デバイスユニット、視覚再生補助装置」 発明者:鐘堂健三、寺澤靖雄

⑧ 特願2009-32792(出願日21. 2. 16)「視覚再生補助装置」 発明者:鐘堂健三

国内登録

① 特許4188034(登録日H20. 9. 19)「眼内埋植装置」 発明者:寺澤靖雄・田代洋行

② 特許4176497(登録日H20. 8. 29)「視覚再生補助装置」 発明者:上原昭宏・香川景一郎・太田淳

③ 特許4171614(登録日H20. 8. 15)「視覚再生補助装置」 発明者:香川景一郎・太田淳・上原昭宏・八木透・鐘堂健三

④ 特許4162526(登録日H20. 8. 1)「視覚再生補助装置」 発明者:八木透

⑤ 特許4138407(登録日H20. 6. 13)「眼内埋植装置」 発明者:寺澤靖雄・田代洋行

⑥ 特許4118182(登録日H20. 5. 2)「視覚再生補助装置」 発明者:八木透・田代洋行・寺澤靖雄

⑦ 特許4118062(登録日H20. 5. 2)「眼内埋植装置」 発明者:八木透

⑧ 特許4063540(登録日H20. 1. 11)「実験動物を用いた電気刺激による光感覚の評価方法」 発明者:神田寛行・八木透

⑨ 特許4176497(登録日H20. 8. 29)「視覚再生補助装置」 発明者:太田淳、香川景一郎、上原昭宏

⑩ 特許4118182(登録日H20. 5. 2)「視覚再生補助装置」 発明者:八木透、田代洋行、寺澤靖雄

⑪ 特許4162526(登録日H20. 8. 1)「視覚再生補助装置」 発明者:八木透

海外出願

① US12/022374(出願日2008. 1. 30)「視覚再生補助装置」 発明者:鐘堂健三

② EP08001725. 4(出願日2008. 1. 30)「視覚再生補助装置」 発明者:鐘堂健三

海外登録

①USP7337008(登録日2008. 2. 26)「視覚再生補助装置」 発明者:寺澤靖雄・田代洋行・鐘堂健三・太田淳・徳田崇・香川景一郎

②USP7398124(登録日2008.7.8)

「視覚再生補助装置」 発明者: 田野保雄、不二門尚、福田淳

③USP7403822(登録日2008.7.22)

「視覚再生補助装置」 発明者: 田野保雄、不二門尚

【図表】

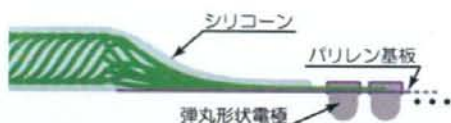


図1. 基板-ケーブル構造



図2. ケーブル付刺激電極アレイ



図3. 兎摘出眼へ縫合した試作実験



図4. 臨床用刺激電極



図5. 型による全体包埋処理



図6. 体内装置

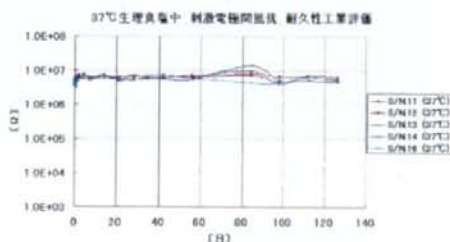


図7. 包埋性能評価資料

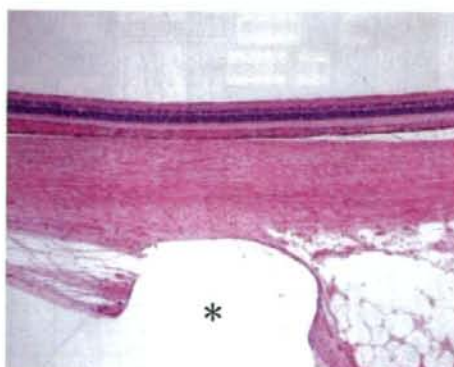


図8. 電極留置部の眼底組織標本

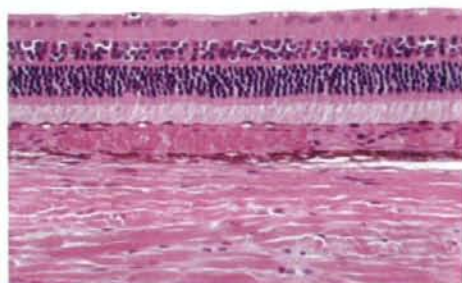


図 9. 電極留置箇所眼底組織標本拡大図

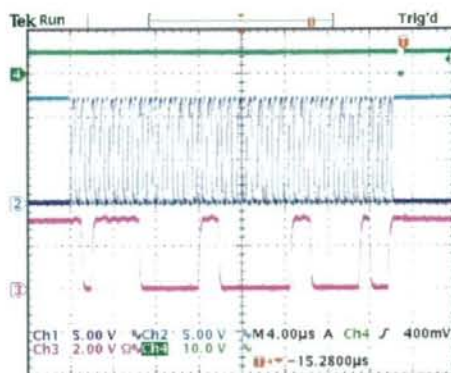


図13. デコーダ回路の入出力波形

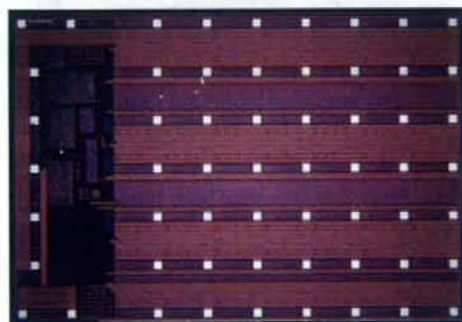


図10. マルチプレクサLSI

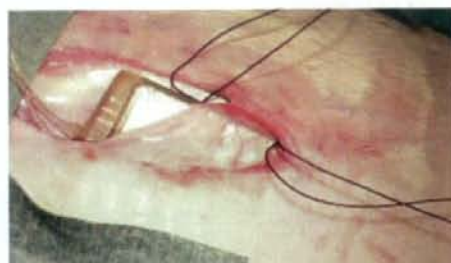


図14. 体内装置の固定

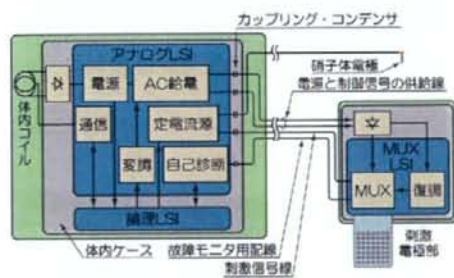


図11. 体内装置のシステム構成



図15. 電極部の留置

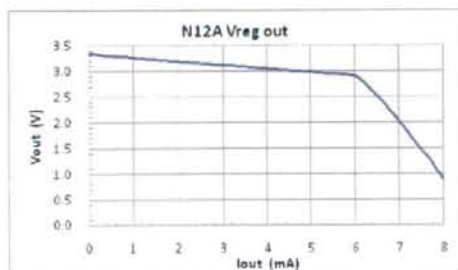


図12. 安定化電源回路の負荷電流特性

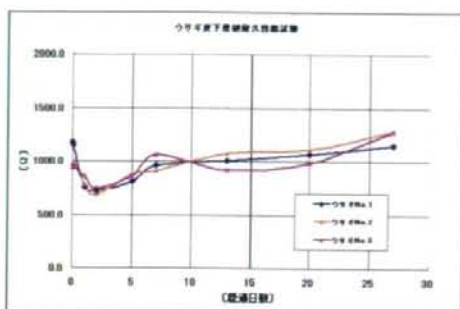


図16. ウサギ背皮下埋植 耐久性試験

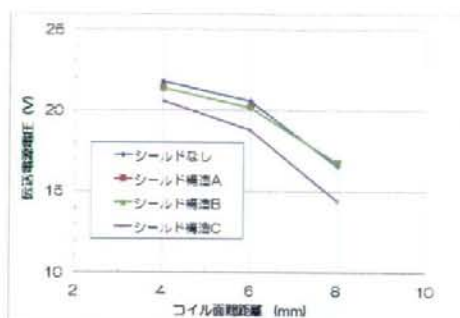


図17. シールド構造による電力伝送効率の比較



図18. EMC評価用固体ファントム

脈絡膜上-経網膜電気刺激に対する皮質視覚野応答の時空間特性の解析
—膜電位イメージングを用いた解析法の確立—

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 准教授

研究要旨

脈絡膜上-経網膜刺激(STS)型人工網膜システムを開発する上で、多点電極を通じて与えられた複数の刺激パルスが、時間的・空間的に近接している場合、それぞれの刺激に対する応答にどのような相互作用が働くのかを解析する必要がある。そこで、本研究では、齧歯類の視覚皮質の多点 STS 刺激に対する応答を膜電位感受性色素 RH1691,795 を用いてイメージングする手法を確立し、時空間的に近接した 2 つの STS パルス刺激に対する応答を検討した。

A. 研究目的

脈絡膜上-経網膜刺激(STS)型人工網膜システムでは、強膜上に設置する多点電極アレイ（強膜電極）と硝子体内に設置する参照電極（硝子体電極）間に矩形波電流パルスを通電し、残存する網膜回路を刺激することにより、擬似光覚を発生させる。従って、STS では両電極間に挟まれた様々な種類の網膜細胞が同時に刺激されることになる。我々はこれまで単発 STS 刺激に対してラット上丘で誘発される電位応答を電気生理学的手法を用いて解析してきた。その結果、STS 型人工網膜の実現に必要な刺激電流パルスの基本パラメータについて、以下の点が明らかになった。(1) 単相性矩形パルス電流を用いた単発の STS 刺激では、強膜電極を陽極とした内向き通電によって強膜電極直下の網膜神経節細胞（以下 RGC）を興奮させることが出来る。しかし、強膜電極を陰極にする外向き通電パルスでは RGC の興奮閾値が上昇する。(2) 同じ通電電荷量の刺激パルスであれば、電流値が大きく幅の短いパルス通電の方が効果的に RGC を興奮させる得る。(3) 二相性矩形パルス刺激を用いる場合、最初に強膜電極を陽極とした内向き通電パルスを先行させ、次に外向き通電パルスを伴う方（内向き先行刺激）が、その逆より効果的に RGC を興奮させることが可能である。(4) 内向き先行刺激に対する上丘誘発電位の閾値の強さ-時間曲線は直角双曲線に近似しており、閾値は、いわゆる、Weiss の式

$(y=RC/x+R)$ 、但し y : 刺激パルスの電流値 (μA)、刺激電流、 x : パルス幅 (μsec)、 R : 基電流、 C : 時値) に従い、時値は RCS ラットで 0.2~0.4msec、健常ラット (Long Evans) では 0.5~0.7msec であった。

これらのパルスパラメータの基本仕様がほぼ確定されたことから、次に連続刺激（トレイン刺激）や多点刺激に対する応答特性を解析する必要性が生じてきた。人工網膜ではカメラで捉えた視覚情報をもとに多点電極で網膜を刺激する為、視野内の任意の部位の明るさは、その部位に対応する電極を通じて網膜に与えられるパルス刺激の頻度に置き換える必要がある。刺激頻度が高くなれば、網膜興奮の時間的加重によってより強い光覚が発生すると期待されるが、刺激頻度と網膜興奮の強さとの間の比例関係は不明である。また、多点刺激によって電光掲示板のようにパターン化された光覚が発生すると期待されるが、隣接する 2 つの電極で網膜をほぼ同時に STS 刺激したとき、隣接する網膜部位の興奮が空間的に加重されるのか、あるいは逆に相互干渉によって興奮が減弱するのかが不明である。

電気刺激に対する応答の時間的加重や空間的加重を検討するには、応答の時空間的特徴を正確に捉える必要がある。誘発電位やユニット活動などの電気生理学的記録法は時間分解能に優れているが、電気刺激の場合は刺激のアーチファクトが混入するため、高頻度の連続刺激に対する電位

応答を解析することが困難である。また、電気生理学的記録法の空間分解能では、数百 μm の電極間距離の多点網膜刺激に対する応答の空間特性を調べるには不十分である。そこで、今回、膜電位感受性色素を用いたイメージング法を用いて連続刺激(トレイン刺激)や多点刺激に対する応答特性を解析可能かを検討した。

B. 方法

[実験動物と手術] 健常動物として成熟モルモット(Hartley系、雌、7-10週齢、日本SLC)6匹とLong Evans系 hooded rat (雌、10-16週齢、日本SLC、以下LE)4匹を用いた。手術および実験中は保温パッドを用いて体温(直腸温)を36-37 $^{\circ}\text{C}$ に維持した。心電図をモニターした。

モルモットには5%ケタミンと2%キシラジンをそれぞれ0.8 ml/kgと1.0 ml/kg、ラットには25%ウレタンを5 ml/kg腹腔内投与して麻酔した後、気管挿管して気道確保した。頭部を固定装置により固定した。開頭し脳脊髄液を排出させた後、右頭頂骨の後部2/3半をドリルで切除し、直下の硬膜を切開して皮質視覚野(VC)を含む右後頭皮質表面を露出させた。露出部の周囲には歯科用セメントで高さ数mm程度の土手を作成し、土手の内側に液体を満たせるようにした。

左眼球背側表面を外科的に露出させたのち、眼球と視神経との境界部から1mm背側耳側部の強膜を半層切開し、その表面に強膜刺激電極として白金製刺激電極(直径500 μm 、先端より500 μm を除いてエポキシ塗料により絶縁被覆されたもの、ユニークメディカル社製)を設置した。鼻側背側部の網膜扁平部に30G注射針で穿孔し、ステンレス製単針電極(ユニークメディカル製)を硝子体内に挿入して参照電極(硝子体内刺激電極)とした。

[眼球刺激] STS刺激として、強膜刺激電極と硝子体内電極との間に単発の単相性または二相性矩形パルス電流をパルス幅0.2~1 msec、電流値100~800 μA で与えた。極性については、参照電極に対して強膜刺激電極の極性を陽極または陰極とし、電流が網膜を流れる向きから前者を内向きSTS(以下in-STS)、後者を外向きSTS(以下out-STS)と定義した。二相性STSの場合、通電電荷量が等しく極性の異なる単発矩形パルスを間隔を置かず与えた。in-STSに続いてout-STSを与える刺激を内向き先行STS(以下io-STS)、逆を外向き先行STS(以下oi-STS)と

定義した。

[視覚野の染色] 遮光下のVCを膜電位感受性色素RH795またはRH1691(Invitrogen)で染色した。ヘパリン入りの生理食塩水で2 mg/mlに希釈した色素を頭蓋の開口部に50~70 μl 滴下し、45分間放置した。放置中は液の蒸発を防ぐ目的で開口部をパラフィルムで覆った。再度染色を繰り返した後、皮質表面に残った染色液を除去するために表面に生理食塩水を滴下しては吸引することを数度繰り返した。

[光学計測] 筋弛緩剤(ミオブロック、0.1 ml)の筋注により動物を不動化した。呼吸は人工呼吸により維持した。計測には高速イメージングシステム(MiCAM ULTIMA, BrainVision社製)を用いた。図1に示すように、染色された皮質に向けて励起光を照射し、発生した蛍光を1.6倍の対物レンズを介して開口部の上方に設置したCMOSセンサー搭載のカメラで100 \times 100画素の画像を1 ms毎に256フレーム分記録した。記録開始は動物の心電図のR波の頂点に同期させ、記録中は人工呼吸器を停止することによって、血管の拍動および呼吸運動によるノイズ発生を抑えた。記録は10秒間隔で32回または50回行い、一回おきに記録開始25 ms後にSTSを与えた。

[画像データ処理] カメラから画像処理ユニットに送られ保存された記録画像のデジタルデータを解析ソフトMATLAB上に取り込んだ。STS刺激を加えた16ないし25回の記録画像データを平均化した。このデータと、刺激を加えなかった記録を平均化したデータとの差分($\Delta F/F$)を求めた。

C. 結果

(1) RH795を用いたイメージング

単発の矩形電流パルスを用いたSTSにより、RH795で染色したVCの局所に一過性の応答を確認した。図2はモルモットのVCで得られたSTS誘発応答の典型例である。in-STSに対して十数ミリ秒後にVCの局所で脱分極応答を示す蛍光量の変化が観察された。この応答は楕円広がりながら大きくなり、刺激後25 ms前後でピークに達した後、強さと範囲は減衰し潜時40-50 msには終息した。一方、フラッシュ光に対する応答の開始、ピークはそれぞれ約50 ms、約150 ms、持続時間は数百 msに及んだ。

このSTSに対する最初の一過性の応答が終息

したのち、しばしば応答領域を含む広汎な領域で緩慢な蛍光量の変化が生じた。図2Cでは、潜時45 ms以降、 $\Delta F/F$ が漸増していることが分かる。この増加は血管上やその周囲で顕著であった。

(2) RH1691を用いたイメージング

次に、RH795に比べて励起波長が高いRH1691を指示薬としたイメージングを行った。図3はin-STS刺激パルスに対するVC応答の典型例で、健常ラットで得られたものである。RH795の場合と同様に、一過性の局所的脱分極応答を示す蛍光量の変化 $\Delta F/F$ が見られた。立ち上がり潜時やピーク潜時はRH795と同等か若干短かった。また、 $\Delta F/F$ はRH795での記録よりも非常に大きく、0.2-0.3%に及んだ。さらに、RH1691を用いた計測では、脱分極応答に引き続いて過分極を示す蛍光量の変化が観察された。この過分極応答は潜時約70 ms以降に観察され、しばしば100-150 ms続いたのち、終息して刺激前の蛍光量に戻った。

(3) イメージングによる刺激強-反応関係

以上の結果から、RH1691がRH795に比べて膜電位変化の検出感度の点で優れていることが分かった為、RH1691を用いてin-STSの刺激強度と応答との関係を検討した。図4はその一例である。パルス幅0.3 ms、電流値800 μA のin-STSに対して潜時16 msでの応答は吻尾側方向に細長く広がっており、その長さは長軸方向で約4 mm、短軸方向で2 mm前後に及んでいた(図4a)。刺激電流値を500、350、200 μA と下げていくと脱分極応答の強さと範囲は小さくなった(図4b-d, f)。図4eはパルス幅0.5 ms、電流値800 μA のin-STSに対してRH795で染色されたVCから得られた応答である。刺激電流量、電荷量が高いにもかかわらず、脱分極応答の強さと範囲は非常に小さく、RH795の感度がRH1691に比べて低い事を示している(図4f)。

(4) 多点刺激に対する応答の解析

今回、RH1691がRH795に比べて膜電位変化の検出感度の点で優れていることが判明しただけでなく、単発STS刺激によってVCに発生した一過性の脱分極性応答には長い過分極応答が伴われることが明らかになった。この観察結果は、先行パルスに対する過分極応答と後続するパルスに対する脱分極応答が干渉しあって、後続パルスによるVC興奮が減弱あるいは消失する可能性を示唆している。この可能性が事実なら、人工網

膜にとって大きな障害となる。人工網膜では連続したパルス刺激によって光覚の強弱を作り出すことを想定しているからである。過分極応答が終息するまでパルス間隔を広げる必要があるなら、人工網膜で提供できる視覚の時間分解能は著しく低くなり、動体を視認することが困難となる。頭部や眼球が動く際にも物体の視認が困難となるであろう。さらには、多点刺激の場合には空間分解能が低下する可能性も考えられる。

そこで、1 mmの間隔を置いて設置した2つの強膜電極を通じて2発刺激を行って、それぞれの刺激に対する応答のイメージングを行った。その結果を図5に示す。図5Aは第1刺激電極を通じて与えた単発in-STS(0.3 msec, 350 μA)に対する応答のイメージを刺激直後から165 msまで15 ms毎に並べたものである。図5Bは第2刺激電極によるイメージである。第2電極は第1電極から1 mm背側に設置した。A,Bとも潜時15 msで局所性脱分極性応答が生じており、それぞれの発生部位は部分的に重なってはいるが応答の中心は明らかに異なっている。この脱分極応答のあと60 ms-165 msまで過分極性の応答が広範囲に生じていた。次に第1電極で刺激した50 ms後に第2電極での刺激を行った。その結果が図5Cである。それを見ると、潜時15-30 msのイメージは図5Aと近似しているが、60 ms-165 msでは図5Aで見られた広範囲の過分極性応答が見られず、むしろ、弱い脱分極性応答が生じており、第2電極の刺激に対する応答の発生を示唆している。そこで、図5Cと図5Aの差分を求めた。その結果が図5Dである。潜時75 msで強い脱分極性応答が起きており、その中心はほぼ第二電極単独の刺激に対する応答部位に近似している(図5Bの15msのイメージ参照)。その潜時の差は第1刺激と第2刺激との遅延時間に近似していた。また、図5Dの潜時75 ms以降の脱分極性応答は図5Bの脱分極性応答より強く持続していた。このことは、先行する第1刺激に対する応答と後続の第2刺激に対する応答が加重していることを示唆している。

D. 考察と結論

我々はこれまで毒性の低い膜電位感受性色素RH795を用いて光学計測を行っていたが、今年度は、さらに最近開発された新しい色素RH1691(通称 blue dye)を用いてSTSに対するVCの応答のイメージングを試みた。その結果、RH1691によるイメージング法を用いて連続刺激(トレイ

ン刺激)や多点刺激に対する応答特性を解析する手法が確立出来た。両方の色素では単発の STS 刺激に対して脱分極を示す一過性の局所応答が得られる。その潜時は、我々が以前に記録した STS 刺激に対する上丘誘発電位より大きい、皮質誘発電位の潜時とほぼ同様である。この2つの色素を比較すると RH1691 の方が感度が高い。このため、弱い STS 刺激でも明瞭な VC 応答を記録することが出来た。また最初の脱分極性の応答に続いて過分極を示す応答が記録された。

これまで、RH795 でのイメージングではこのような過分極性応答は余り記録されていなかった。それには2つの理由が考えられる。まず、RH795 は膜の脱分極の大きさに応じて蛍光量が減少する性質を持つ。このため、励起光によって蛍光色素が経時的に退色して蛍光量が減少していくと見かけの脱分極応答として記録される可能性がある。刺激試行と非刺激試行を交互に繰り返す、その差分を記録しているが、常に非刺激試行が先行するため、退色に伴う見かけの脱分極応答が生じる可能性を完全に排除することは出来ない。両試行をランダムにする必要が有るだろう。

もう一つは刺激後ゆっくりとした代謝活動の増大や局所血流量の増大が起こり、そのため蛍光強度が変化する可能性である。RH795 の励起波長は 530 nm であり、これは、酸化ヘモグロビンの吸収極大値 (540 nm, 580 nm) に近似している。したがって、刺激による組織興奮に伴って代謝が上昇し局所血流量が増大すると励起光の酸化ヘモグロビンによる吸収が増大し、その結果、RH795 の励起が減少するためにその蛍光強度変化比が減少する可能性がつかまとう。このような代謝や血流変化は内因性信号として脳機能イメージングに利用されているものである。しかし、このような内因性信号の変化は緩徐であるため、単発刺激に対する短潜時の応答だけを記録する場合には問題にならないが、長潜時の成分や連続刺激や持続光刺激など持続時間の長い刺激に対する応答を解析する場合には問題となる。

これに対して RH1691 の励起波長は 630 nm であり、ヘモグロビンの吸光度の変化に依存しない。さらに、感度が非常に高く電位変化に対する蛍光強度の変化が RH795 より大きい。今回の研究により、RH1691 を用いて上丘誘発電位の閾値に近い刺激強度で VC に局所応答が生じていることが判った。人工網膜用多点電極の空間分解能を評価する上で、感度が高いことは非常に重要であり、その点で RH1691 によるイメージングはパターン刺激と視覚刺激との比較を行う上で有効な手

法の一つと期待される。

RH1691 は、RH795 とは反対に、染色された興奮性膜の脱分極に対して蛍光強度が増加する性質をもつため、計測中の色素退色を脱分極応答として評価することがない。その反面、この性質は計測中の色素退色に伴う蛍光強度の減少を過分極応答分として評価する危険性を持つ。今回の研究で、最初の脱分極性の応答に続いて長い過分極を示す応答が記録された。この応答は 256 ms の計測中に終息し、蛍光強度の変化比は記録開始時の基準レベルに戻っている事から、この過分極応答は見かけの応答ではないと考えられる。

最後に、隣接した2つの刺激電極を通じて 50 ms 間隔で組み刺激を与えた。この場合、先行刺激に対する過分極応答の発生期間に2番目の STS 刺激が加えられる。この2番目の刺激に対しては、単独の STS に対する応答よりも大きな応答が発生していることが判った。この促進現象は人工網膜の時間分解能・空間分解能によってどのような影響をもたらすのであろうか。今後、さまざまな間隔の組刺激を加えて、その応答の大きさを解析していかなければならない。また、網膜色素変性モデルである RCS ラットを用いても、検討を加える必要がある。

E. 健康危惧情報

特に無し

F. 研究発表

1. Okazaki Y, Morimoto T, Sawai H. Parameters of optic nerve electrical stimulation affecting neuroprotection of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *Neurosci Res.* 61(2):129-35, 2008.
2. Okawa Y, Fujikado T, Miyoshi T, Sawai H, Kusaka S, Mihashi T, Hirohara Y, Tano Y. Optical imaging to evaluate retinal activation by electrical currents using suprachoroidal-transretinal stimulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48(10):4777-84, 2007.
3. Tanida M, Shen J, Horii Y, Matsuda M, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I,

- Sawai H, Fukuda Y, Matsuzawa Y, Nagai K. Effects of adiponectin on the renal sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. *Exp Biol Med* (Maywood). 232(3):390-7, 2007.
4. Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K, Funabiki K, Koyasu T, Kajimura N, Miyoshi T, Sawai H, Kobayashi K, Tani A, Toda T, Usukura J, Tano Y, Fujikado T, Furukawa T. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat Neurosci*. 11(8):923-31, 2008.
5. 澤井元、三好智満、不二門尚、田野保雄
「人工感覚器—最近の進歩」人工臓器
37(3) : 163-167, 2008.

G. 知的財産権の出願・登録状況

[1] 特になし

[図および説明]

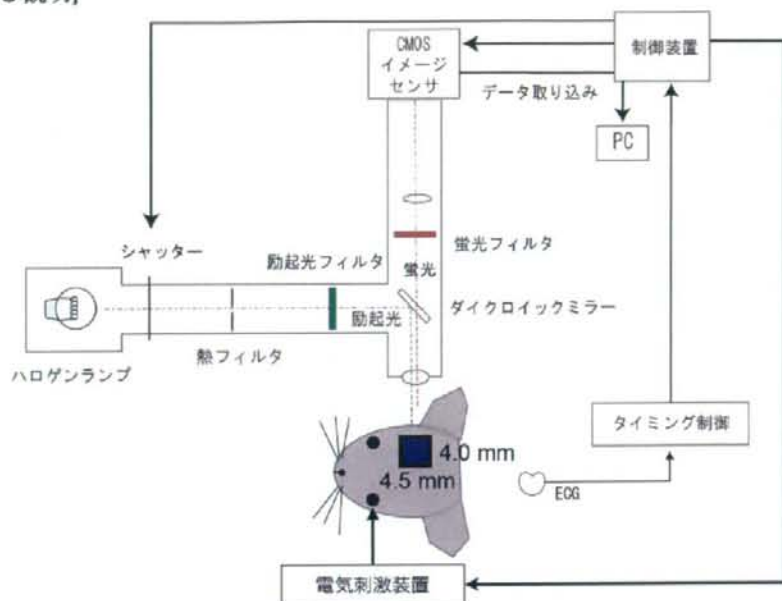


図1. イメージングシステムの構成図

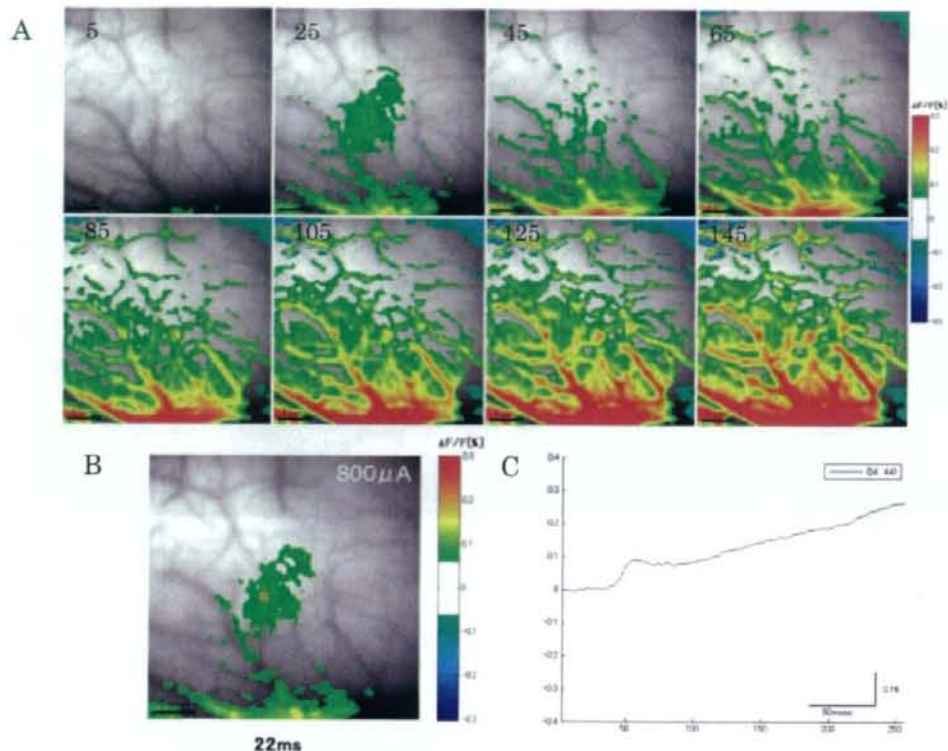


図2. 内向き单相矩形パルス刺激で誘発された応答のイメージ。刺激強度 $0.5 \text{ ms} \times 800 \mu\text{A}$ 。
 A) RH795 で染色された VC における応答の時間経過 (各画像左上角の数値は刺激後の経過時間 ms を示す)。 B) 刺激 22 ms 後の応答のイメージ。応答の中心 (赤色の□) における蛍光強度変化比の時間経過を C) に示す。イメージの左は皮質吻側、上は外側にあたる。下縁に見える黒い部分は正中静脈である。

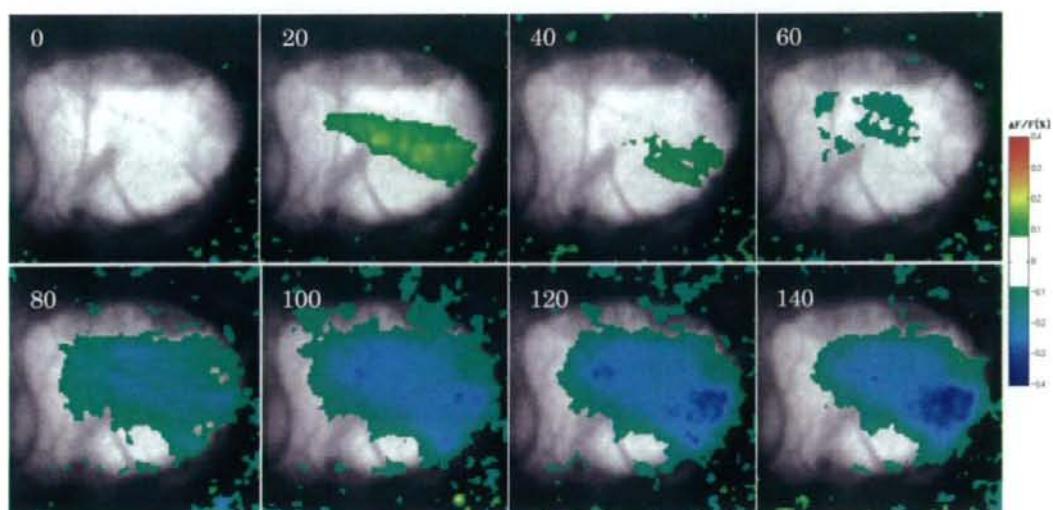


図3. 内向き单相矩形パルス刺激で誘発された応答のイメージ例。刺激強度 $0.3 \text{ ms} \times 800 \mu\text{A}$ 。RH1691 で染色された VC における応答の時間経過（各画像左上角の数値は刺激後の経過時間 ms を示す）。イメージの左は皮質吻側、上は外側にあたる。