

20093000/A

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21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 不二門 尚

平成22（2010）年5月

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21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 不二門 尚

平成22(2010)年5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

（体内装置埋め込み術式の犬および献体を用いた検討）

主任研究者 不二門尚

（分担研究者：大路正人，研究協力者：瓶井資弘、生野恭司、貴島晴彦、坂口裕和、森本壮、神田寛行、西田健太郎、）

II. 分担研究報告

1. 網膜刺激電極における生体適合性の研究 7

（動物眼における人工網膜チップの組織学的検討） 分担研究者 平形明人

2. 脈絡膜上経網膜電気刺激による人工視覚の実用機の開発 1 2

分担研究者 小澤素生

3. 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 2 1

（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

4. ベルテポルフィンと光照射を用いた視細胞障害モデルで残存する健常網膜が大腦皮質誘発電位に及ぼす影響についての検討 2 9

主任研究者 不二門 尚

（研究協力者：西田健太郎）

5. トランスジェニックウサギの網膜変性過程の層別解析 3 4

分担研究者 近藤 峰生

6. 経角膜電気刺激（TES）の神経保護効果に対する刺激条件 39

主任研究者 不二門 尚

（研究協力者：森本壮）

7. 網膜下刺激電極の開発 44

分担研究者 太田 淳

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 48

IV. 研究成果の刊行物・別刷 50

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

総括研究報告書

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

（体内装置埋め込み術式の犬および献体を用いた検討）

主任研究者 不二門 尚 大阪大学医学系研究科感覚機能形成学 教授
分担研究者 大路 正人 滋賀医科大学眼科学 教授
研究協力者 瓶井 資弘 大阪大学医学系研究科眼科学 准教授
生野 恭司 大阪大学医学系研究科眼科学 講師
貴島 晴彦 大阪大学医学系研究科脳神経外科学 助教
坂口 裕和 大阪大学医学系研究科眼科学 助教
森本 壮 大阪大学医学系研究科眼科学 助教
神田寛行 大阪大学医学系研究科感覚機能形成学 助教
西田 健太郎 大阪大学医学系研究科眼科学 大学院生

研究要旨

亜急性臨床試験に向けて、術式の開発および体内装置の安全性・信頼性の確認を事前に実施する必要がある。今回、本研究グループで開発した亜急性臨床試験用の体内装置を用い、献体に埋植し術式の検討を行った。さらに、犬（ビーグル種）3例に体内装置を慢性埋植し、最大3ヶ月経過観察を行った。犬の慢性埋植では、体内装置の動作確認のため、刺激パルスの出力を内部回路および ERG 電極を使って評価した。また、慢性埋植後の flash-ERG、眼底検査、蛍光眼底検査、そして組織学的解析から慢性埋植に対する安全性を評価した。実験の結果、体内装置がヒト頭部に埋植可能であることを確認した。また慢性埋植に対して、体内装置は生体に損傷を与えることなく長期間安定に動作することを確認した。

A. 研究目的

我々はヒトに長期埋植可能な人工視覚システム用体内装置の開発を進めてきた。完成した体内装置は、疑似生体液中と家兎の皮下での6ヶ月間におよぶ長期動作試験にて、すでにその耐久性が示されている。また、この体内装置はすべて医療グレードを満たす生体適合性シリコンおよびパリレンで被覆しており、生体に対する安全性も期待できる。

来年度、我々はこの体内装置を使って亜急性臨床試験実施することを予定している。そのためには、術式の開発と安全性・耐久性の確認を事前に行う必要がある。そこで、まず献体を使って体内装置の埋植術の開発を行った。さらに、その知見を元に実験動物に対する長期埋植を実施した。実

験動物として我々はビーグル犬を採用した。その理由は、頭部のサイズが体内装置本体を埋植するのに十分なサイズを有し、眼球のサイズもヒトに近いいためヒトと同様の方法で埋植することが可能だからである。この実験を通じて、デバイスの耐久性と生体に対する侵襲性を評価することが本研究の目的である。

B. 方法

実験 I：献体への体内装置埋植手術

耳介上方から後方へかけ頭皮を切開した（切開創 I）。次に眉の付近を上方から耳側にかけて切開した（切開創 II）。ケーブル設置用に、切開創 II 付近の眼窩縁の骨を骨ノミで削った。本体装置の埋植スペース確保のため、切開創 I 付近の皮膚

と筋膜を鈍的に剥離した。さらに、切開創Ⅰから切開創Ⅱまで鈍的に剥離し、ケーブル導入のためのトンネルを作成した。切開創Ⅰに本体装置を埋植し、スクリューで頭蓋骨に固定した。

結膜全周切開を行い、眼球側から切開創Ⅱまで鈍的に剥離した。次にトンネル作成し脳外科用イントロデューサー（ニューロシース）を使ってケーブルを眼球側へ導入した。

刺激電極およびケーブルを外直筋→下直筋→内直筋→上直筋の順に直筋の下をくぐらせ眼球周囲にケーブルを固定した。耳下側にクレセントナイフで強膜ポケットの作成を行い、刺激電極をポケット内に埋植した。硝子体電極とそのケーブルは刺激電極とは逆方向に導入し（耳上側→上側→鼻上側）、鼻上側に硝子体電極設置した。

実験Ⅱ：犬への長期慢性埋植

[実験動物]

実験には、成犬（ビーグル種、体重 10～12kg）3 匹を用いた。電極埋植手術は片眼のみに行った。すべての処置および飼育方法は大阪大学動物実験施設の規定に従い、苦痛を最小限にするよう心がけた。なお、本実験は大阪大学動物実験施設の動物実験委員会の許可を受けている。

[体内装置]

実験には、ニデック人工視覚研究所にて開発された体内装置（亜急性臨床試験モデル）を用いた。この体内装置は臨床試験に用いる装置と同じ構造と機能を有す。駆動電力およびは無線電力電送にて体外装置から体内装置に伝送される。体内装置と外部装置のからのデータに基づき、電波で無線伝送を行う。この装置には内部動作診断モードが備えられており、設定通りの電流が発生するか確認することができる。

[犬への埋植手術]

メデトミジン・ミタゾラム・ブトルフェノールの三種混合麻酔で導入麻酔を行い、その後、2.0%～2.5%のイソフルランの吸入麻酔で全身麻酔を行った。前肢より静脈ルートを確保し、抗生物質の投与を行った。

最初に頭部皮下への体内装置本体の埋植術から実施した。献体での手術同様に、頭部の二カ所に切開創を作成した。一つ目は、内眼角から 6 cm 尾側かつ正中から 2 cm 外側を起点に正中線と平行に 6 cm の皮膚切開を行った（切開創Ⅰ）。頭皮と側頭筋を鈍的に剥離し体内装置本体埋植に十分なスペースを作成した。二つ目は、上

眼瞼縁から 1 cm 上方にて瞼裂と平行に 2.5 cm 幅の皮膚切開を行った（切開創Ⅱ）。切開創Ⅰから切開創Ⅱまで頭皮を筋膜から鈍的に剥離しトンネルを作成し、脳外科用イントロデューサーを使って電極ケーブルを配線した。さらに角膜全周切開を施し、結膜下から切開創Ⅱまでトンネルを作成し、電極ケーブルを配線した。

上耳側または上鼻側に幅 7 mm の強膜ポケットを作成した。その後、刺激電極アレイとケーブルを直筋の下を通し、赤道部付近ではほぼ眼球 1 周させ配線を行い、アレイの先端を上耳側または上鼻側まで通した。そして電極を強膜ポケットに埋植して、電極の付け根および眼球周囲に配線したケーブルを強膜に縫着後、結膜縫合を行った。

本体デバイスは、切開創Ⅰにて筋膜に縫着して固定した。それぞれの頭皮創を閉創して手術を終了した。手術終了後は、手術創に抗生物質を塗布し、眼球には抗生物質の軟膏を点入した。

[デバイスの耐久性の評価]

・飽和電流チェック

この体内装置には、飽和電流チェック機能が備えられている。これは、断線や電極表面の変化等によるインピーダンス上昇が原因で設定値通りの電流が出力できなくなった電極を検出する機能である。本実験では、手術直後、一ヶ月後、二ヶ月後、三ヶ月後に飽和電流チェックを 9 極の電極すべてに対して実施した。なお、設定電流は 0.7 mA, 1.0 mA の 2 種類である。

・ERG 電極からの刺激パルス記録

電極からの電流出力の有無を確認するため、刺激パルス出力時に生じる電位変動（刺激アーチファクト）を角膜に設置した ERG 電極から検出した。記録は、Neuropack μ （日本光電）で行った。得られた波形からパルス数と電極数が一致するかどうか、また得られた波形の周波数が設定値と一致するかどうかを確認した（図 1）。なお、刺激パルスは全電極でそれぞれ 1 mA、20 Hz に設定した。

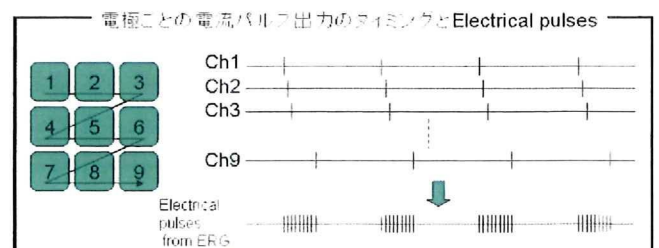


図1：電極ごとの電流パルス出力のタイミングと ERG 電極から得られる電位変動

[生体安全性の評価]

・Flash-ERG

電極埋植手術後から3ヶ月後のデバイス摘出直前に flash-ERG を記録し、網膜の機能検査を行った。ERG 電極には、LED 光源付きのコンタクトレンズ型電極（メイヨー）を用いた。LED の発光装置には WLS-20(メイヨー)を用いた。記録には Neuropack μ (日本光電)を用いた。バンドパスフィルタは 0.5 Hz から 1 kHz に設定した。

約1時間の暗順応の後、ERG 電極を左右両眼に装着し10秒間隔で5回のフラッシュ光刺激を行った。5回の波形を加算平均し ERG データを得た。

・眼底検査、蛍光眼底検査

電極埋植眼について眼底写真および蛍光眼底検査を実施した。眼底検査は、電極埋植後1ヶ月後、2ヶ月後、3ヶ月後に行った。蛍光眼底検査は、電極埋植後3ヶ月後に実施した。

・組織学的解析

電極埋植後3ヶ月経過時に、ネンブタールの大量投与による安楽死を行った。直後に両眼の眼球摘出を行った。4%パラフォルムアルデヒド：2.5%グルタルアルデヒド=1：1混合液にて摘出眼球を約1時間固定した。その後、成形してさらに10%中性緩衝ホルマリン溶液で24時間以上固定した。パラフィン包埋の後、電極と視神経が通る面にて3~4 μ m厚で薄切した。切片はHE法で染色した。これらのパラフィン包埋から染色までの標本作製作業は(株)組織科学研究所で行った。

光学顕微鏡を用いて電極埋植部付近の網膜における損傷の有無について評価した。

C. 結果

実験 I：献体への体内装置埋植

装置や埋植方法に改良が必要な箇所が一部見られたものの、概ね予定通りに体内装置を献体に埋植することができることを確認した。設計値では刺激電極のケーブル長は220mmだったのに対し、切開創 I から切開創 II までの距離は約80mmかつ切開創 II から刺激電極の先端までに要したケーブル長は105mmで合計185mmで、要したケーブル長は想定内に収まった。

当初、本体装置を水平にして埋植したが、本体

の曲率が頭部の曲率より小さく、先端部分が頭蓋骨から浮いてしまった。そこで装置の方向を斜めから垂直にして埋植したところ、先端部分の浮きの程度が小さくなった。本体装置の固定はスクリューで4箇所止める予定だったが、本体と頭蓋骨との曲率の違いにより2箇所のみ固定となった。しかし、固定箇所が2箇所でも十分に固定可能だった。

切開創 II におけるケーブルの固定では眼窩縁付近の骨に溝の作成に加え、チタンプレートを使うことでより安定したケーブル固定が可能となることが確認された(図2)。

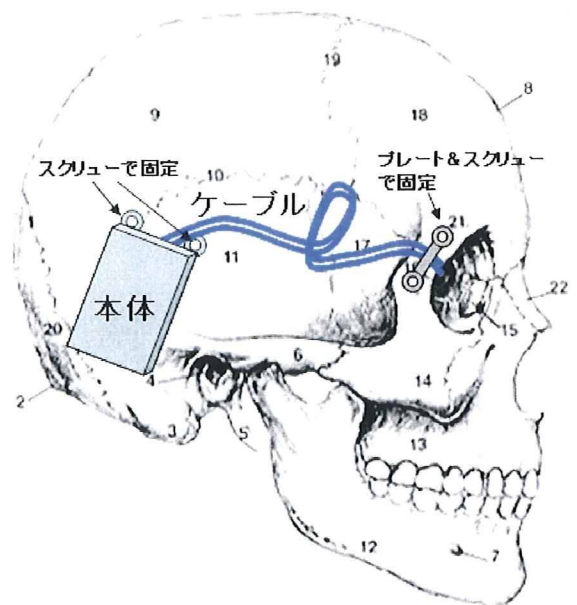
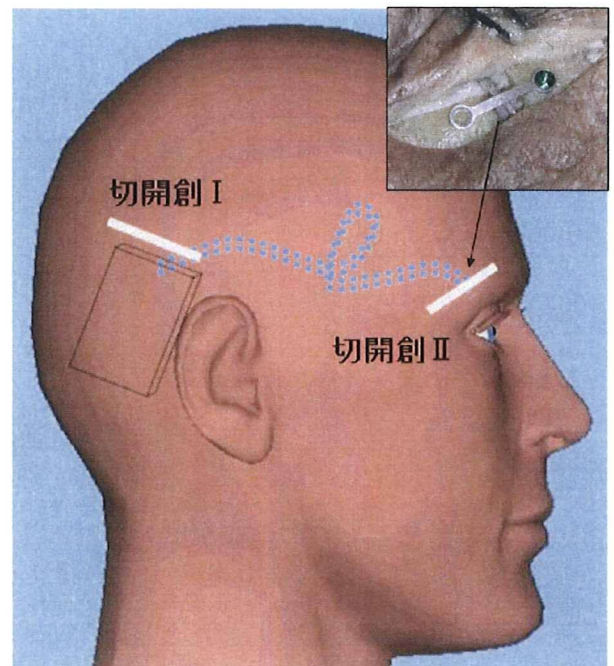


図2：体内装置の献体への埋め込み模式図。(上図)切開創 II に

て眼窩縁の骨にケーブル用の溝を作り、その上からプレートで固定することでケーブルを安定して留置することができた。(下図) 本体とケーブルの設置模式図。スクリュー2本を使い本体を頭蓋骨に固定した。

側頭筋の筋膜の下には顔面神経が存在する。切開創Ⅰから切開創Ⅱまでのトンネル作成時に、この神経への損傷を避けるため、頭皮を筋膜より鈍的に剥離してトンネルを作成した。この手法にて顔面神経を損傷させることなくケーブル導入が可能だった。

実験Ⅱ：犬への慢性埋植試験

現時点では、埋植が行われた3例中、2例は所定の期間(3ヶ月間)を終了した。残りの1例は現在、埋植後2ヶ月を過ぎ現在も継続して埋植中である。3例とも、体内装置埋植に起因する死亡事故は生じていない。

なお、便宜上3例の動物の個体番号をそれぞれ#002, #003, #005とする。

[体内装置の耐久性評価]

飽和電流チェック機能による、体内装置の動作確認の結果が表1である。1mAに設定して通電を行ったところ、最大3ヶ月に渡り、常に全ての電極から設定値どおりの電流が出力されることが確認された。なお、設定電流を0.7mAにした試験でも、同様の結果が得られた。

動物番号	手術直後	1ヵ月後	2ヵ月後	3ヵ月後
#002	9/9	9/9	9/9	9/9
#003	9/9	9/9	9/9	9/9
#005	9/9	9/9	9/9	未実施

表1：設定電流通りの出力が確認された電極数の割合(合格した電極数/全電極)。全ての電極で設定値通りの電流が出力されていることが確認された。

埋植3ヵ月後、体内装置の動作確認のため、刺激パルス出力時に角膜に設置したERG電極から電位変動を記録した。その結果、複数のパルストレインが観測された(図3)。トレインの繰り返し周波数は20Hzで、人工視覚システムで設定した刺激周波数に一致し、またパルストレイン内のパルス数は、刺激出力を行った電極数と一致していた。

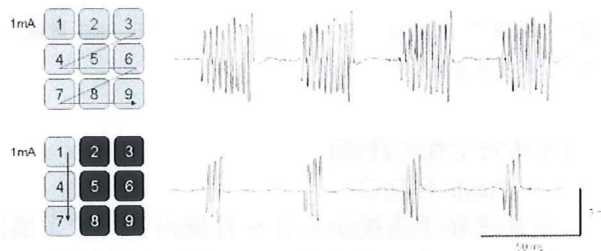


図3：ERG電極から記録した刺激パルス。(上段)9極すべて1mAに設定したとき。(下段)3極のみ1mA、他は0mAに設定したとき。

[体内装置の安全性評価]

埋植3ヶ月後のflash-ERG波形は、振幅および潜時間共に正常だった。コントロール眼で得られたERG波形と比べると、振幅および潜時はほぼ一致していた。

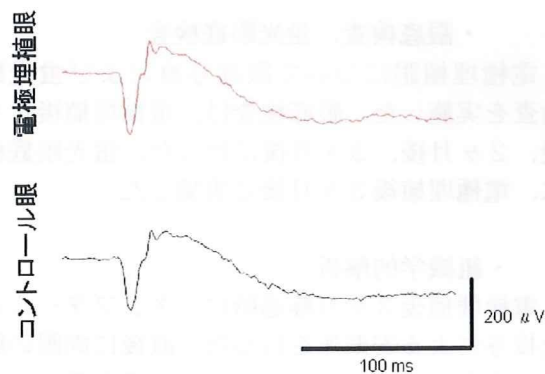


図4：電極埋植後3ヶ月経過時のflash-ERGの結果。上段が電極埋植眼の結果で下段がコントロール眼の結果を示す。

電極埋植3ヶ月経過後の眼底写真および蛍光眼底写真が図4である。眼底写真からは異常所見は見られなかった。また、蛍光眼底写真からも異常所見は認められなかった。

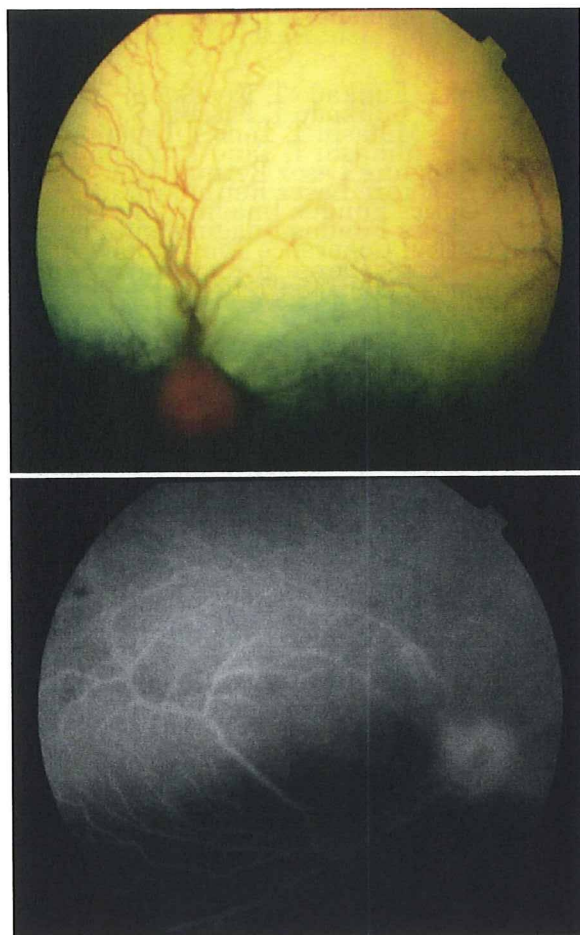


図4：電極埋植後3ヶ月経過時の眼底写真（上図）と蛍光眼底写真（下図）

網膜の組織標本の検鏡の結果、電極周囲の網膜内の細胞の欠損および層構造の乱れ等の網膜の変性や損傷を示す兆候は認められなかった。この人工視覚システムに搭載された電極は弾丸形状をしているが、電極は強膜や脈絡膜を貫通しておらず、強膜ポケット内に存在していた。電極先端部直上の残存強膜厚は約 0.1 mm 程度だった。また、電極基盤の跳ね上がりも認められなかった。

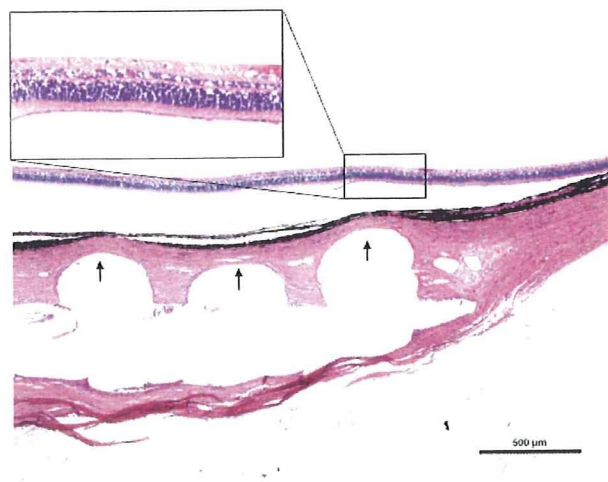


図5：電極埋植部付近の眼球組織標本。矢印は、電極先端が設置

してあった部位を示す。

D 考察

側頭部のケーブル導入に関する術式は、ドイツグループの先行研究[1]を参考に、耳介上方と眉付近にそれぞれ一箇所ずつ合計二箇所の皮膚切開を行い、脳外科用ニューロトランスデューサーを用いてケーブル導入を行った。この手法により、我々の体内装置でも問題なくケーブル導入ができることを確認した。

一方で、我々の体内装置は、ドイツグループのデバイスと異なり、本体装置を完全に埋植する。そのため、本体デバイスの埋植術式に関してはデバイスの形状および固定方法に関して本実験を通して新たに知見が得られた。

一つ目は、スクリューによる固定である。当初4つのスクリューが必要になると予想していたが、実際は2つのスクリューのほうが頭蓋骨の曲率と本体の曲率が異なる場合でも対応可能であることが分かった。また2つのスクリューでも本体の固定が可能であることから、固定には2個のスクリューが適切であると考えられる。

二つ目は本体デバイスの形状である。頭部の形状には個人差があるため、本体デバイスの形状と被験者の頭蓋骨の形状に完全に一致しないことがある。今回の実験でも水平方向に本体を設置すると頭蓋骨からの浮き上がりが大きくなり、埋植の方向を垂直に変更することで対応した。従って、実際の臨床試験の場合も被験者に合わせて本体の埋植方向を最適な方向に変更することが必要であろう。また、本体装置の形状についても、事前に被験者の頭部形状を調査した上で最適な形状の装置を作成するべきだと考える。今回の結果を受け、臨床試験に向け曲率を変えた数種類の本体装置作成型を準備することとなった。

三つ目は眼窩縁の急な曲面に沿って直接骨の上にケーブルを留置すると、ケーブルの屈曲が大きくなりすぎることが分かった。対策として眼窩縁周辺の骨を削って溝を作りケーブルを通し、その上にプレートを設置した。これにより、安定してケーブルが留置されることが分かった。

これらの知見を受け、犬に対して最大3ヶ月の慢性埋植を実施した。全ての例において装置の故障や断線は発生せず、設定値どおりの電流が出力されることが確認された。また、埋植後に重篤な有害事象は現在までに発生していない。眼所見に関しても電極埋植眼の網膜機能は正常で、電極留置付近の網膜内の細胞構造も正常であった。これらの結果から、開発した臨床試験用モデルは今

後実施する1ヶ月の亜急性臨床試験を行う上で十分な耐久性、信頼性そして安全性を有するといえる。

E. 結論

献体に対する埋植試験の結果、一部の改良は要するものの、概ね予定通りに体内装置を献体に埋植することができることを確認した。さらに、犬への長期埋植の結果、体内装置が長期慢性埋植に対して信頼性、耐久性そして安全性を有することが分かった。

[参考文献]

[1] Besch D, Sachs H, Szurman P, Gülicher D, Wilke R, Reinert S, Zrenner E, Bartz-Schmidt KU, Gekeler F. "Extraocular surgery for implantation of an active subretinal visual prosthesis with external connections: feasibility and outcome in seven patients." *Br J Ophthalmol.* 92 (10) p1361-1368. 2008

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Nishida K, Kamei M, Kondo M, Sakaguchi H, Suzuki M, Fujikado T, Tano Y. Efficacy of suprachoroidal-transretinal stimulation in a rabbit model of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Apr;51(4):2263-8.

・ T. Tokuda, K. Hiyama, S. Sawamura, K. Sasagawa, Y. Terasawa, K. Nishida, Y. Kitaguchi, T. Fujikado, Y. Tano, J. Ohta, "CMOS-based multichip networked flexible retinal stimulator designed for image-based retinal prosthesis," *IEEE Trans. Electron Devices*, 56 (11), 2577-2585, 2009.

・ Morimoto T, Miyoshi T, Sawai H, Fujikado T. Optimal parameters of transcorneal electrical stimulation (TES) to be neuroprotective of axotomized RGCs in adult rats. *Exp Eye Res.* 2010;90:285-91

・ Sakaguchi H, Kamei M, Fujikado T, Yonezawa E, Ozawa M, Cecilia-Gonzalez C, Ustariz-Gonzalez O, Quiroz-Mercado H, Tano Y. Artificial vision by direct optic nerve electrode (AV-DONE) implantation in a blind patient

with retinitis pigmentosa. *J Artif Organs.* 2009;12(3):206-9.

・ Kitaguchi Y, Fujikado T, Kusaka S, Yamaguchi T, Mihashi T, Tano Y. Imaging of Titanium:Sapphire Laser Retinal Injury by Adaptive Optics Fundus Imaging and Fourier-Domain Optical Coherence Tomography. *Am J Ophthalmol.* 2009;148:97-104.

2. 学会発表

・ Takashi Fujikado, Transcorneal electrical stimulation, for diagnosis and treatment of retina or optic nerve diseases. 50th Taiwan ophthalmological Society, Taipei, November 17, 2009 (Invited)

・ Takashi Fujikado, Visual prosthesis with suprachoroidal transretinal stimulation, Human Vision and Electronic Imaging XV, Jan 18, San Jose 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

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

網膜刺激電極における生体適合性の研究
動物眼における人工網膜チップの組織学的検討

分担研究者：平形明人（研究協力者 神田寛行）
所属：杏林大学眼科学教室

研究要旨：脈絡膜上一経網膜電気刺激（STS）方式による人工視覚の臨床応用に向けて、電極数を増やしたり、電極サイズを小型化するために、電極形状、基盤の種類、刺激電流などの生体適合性や安全性が求められる。これまで、その形状によっては、強膜ポケットから脱出する危険性もあることを組織学的にも確認してきた。また、STS方式による強い電流刺激で網膜は傷害され得る事も組織学的に観察した。臨床応用に向けて改良されてきた電極の組織適合性を検討する目的で、ネコ眼とイヌ眼に埋め込み実験された電極付近の手術侵襲あるいは通電による網膜障害を組織学的に評価した。電極埋没の強膜ポケット底は眼球後方に行くほど脈絡膜に近づく可能性が考えられた。強膜ポケット内やその周囲に強い炎症所見や増殖性変化はみられなかった。通電による網脈絡膜の損傷は観察されなかった。しかし、毛様体扁平部に固定させる硝子体電極の設置によって、毛様体扁平部剥離を来す危険性があり、注意する必要があると示唆された。

A. 研究目的

脈絡膜上一経網膜電気刺激（STS）方式による人工視覚は、動物眼（有色家兎）の人工チップの挿入時の外科的侵襲予防、安定な固定において、網膜上、網膜下人工チップ挿入より優れていることを組織学的に観察してきた。昨年度までに、電極の堅さや形状で強膜ポケット付近の損傷や炎症所見が異なること、STS方式による強い電流刺激で網膜は傷害され得る事、いいかえれば網膜がSTS方式で刺激を受けていることを組織学的に観察した。そして、安全域の検討に、STS刺激で生じる蛍光造影検査によるRPEレベルの変化と網膜浮腫状変化に注目する必要があることが示唆された。

今回、ネコ眼、イヌ眼において、臨床応用に向けて改良されやや大型になった電極の手術侵襲や通電による網膜障害の有無について検討した。

B. 研究方法

臨床応用に向けて共同研究者が開発、検討している電極をネコ眼に埋め込み通電を繰り返した。電極埋植部付近の網膜障害の有無について、組織学的に検討した。

また、さらにヒト臨床応用に向けて大型になる電極の埋植手術操作における侵襲を検討するために、埋植したビーグル犬眼を組織学的に検討した。

それぞれの実験眼について、眼球を摘出

し、ホルマリンと2.5%グルタルホルムアルデヒドの1:1混合液に浸透させ、眼球を半割した。実体顕微鏡によるマクロ的な組織観察で、チップの固定状態、網膜剥離の有無などを観察し、その後、10%シュクロース、20%シュクロース、CMCによる凍結包埋し、タンゲステンカーバイドプレート替え刃を装着させた全自動回転式マイクローム（ライカ CM3050S）を用いて、面だしし、粘着フィルムを貼り付けて、5~10 μ の薄切切片を作成した。純エタノールで固定し水洗して、ヘマトキシリン・エオジン染色を施行し、グリセリン封入して光学顕微鏡による観察を行った。

（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

1. ネコ眼における通電眼の組織学的検討（図1）

検体数： 1眼（電極埋植眼、左眼）

摘出日： 11月20日未明

固定液： 2.5%グルタルアルデヒドと10%中性緩衝ホルムアルデヒド液の1:1混合液

使用した電極：PtとIrOxの8極型混合電極（奈良先端大学院大学製）

通電履歴：一回の試行で4秒間通電を10回繰り返した。それぞれの試行における電流強度の履歴を下記に示す。

第一回目：電極⑦で0.5 mA

第二回目：電極⑦で0.3 mA

第三回目：電極②で0.5 mA

第四回目：電極②と⑦でそれぞれ 0.5

mA

第五回目：電極⑧で0.5 mA

第六回目：電極⑧で0.3 mA

第七回目：電極②で0.3 mA

第八回目：電極②と⑧でそれぞれ 0.3 mA

電極の埋植部位の強膜にマーキュロクロム液で赤くマーキングした。電極埋植部は視神経より約3 mm離れたところで、その付近の網膜障害を観察した。

光学顕微鏡的に、通電付近の網膜の層構造は他の部位と変化なく、炎症細胞などの明らかな病的変化や熱による変性などの所見はみられなかった。強膜ポケットの位置は、強膜の外層1/3の深さであった。脈絡膜までの距離は一定であった。強膜ポケット内にわずかな赤血球は存在したが、線維性増殖変化や強い炎症所見は明らかでなかった。

2. ビーグル犬における電極埋植手術侵襲の組織学的検討（図2）

検体数： 1眼（電極埋植眼、左眼）

摘出日： 11月21日夕方

固定液： 2.5%グルタルアルデヒドと4%パラホルムアルデヒドの1:1混合液

使用した電極：49極型の弾丸型白金電極（ニデック製）

通電履歴：通電は行っていない。

電極の埋植部位の強膜にマーキュロクロム液で赤くマーキングした。電極埋植部は角膜輪部から約12 mmのところであった。硝子体電極埋植部は角膜輪部から約3 mmに位置した。

埋植強膜ポケットの深さは、おおむね強

膜の中央の深さであるが、眼球の深部に向かうほど深層になる傾向があり、強膜底が薄くなっていた。ポケット周辺の出血塊や増殖性変化や炎症所見は少なかった。ポケット付近の網脈絡膜組織に異常はみられない。

硝子体電極埋植部位の毛様体剥離が疑われ、手術手技による可能性が示唆された。強膜のコラーゲン層に乱れが存在するが、炎症所見は少なかった。

D. 考察

STS方式の臨床応用に向けて、電極設置のための手術侵襲や電極の設置部位や組織適合性を検討することは大切である。

今回の結果は、ネコ眼、ビーグル犬眼の強膜ポケットの設置で、網脈絡膜への侵襲は見られないが、強膜内の深さが一定しない可能性を示唆した。強膜底の厚みが、電流に影響しないことを確認する必要があるかもしれない。電極設置部位の深さが、脈絡膜に近い部位もあり、今後、光干渉断層計（OCT）などでも脈絡膜厚を検討する条件で電極設置部位が同定できる可能性があると思われた。

一方で、通電実験に使用したネコ眼において、網脈絡膜に異常が見られなかったことを確認できた。

しかし、ビーグル犬眼の硝子体電極設置付近で、網膜色素上皮剥離所見が見られた。これが、手術操作によるものか組織作成によるアーチファクトか区別することは難しかったが、設置による医原性網膜剥離を予防するために硝子体電極の設置は注意を要すると考えられた。

今後、臨床応用に向けて、動物眼の慢性

埋植実験を施行するにあたり、臨床応用に適応される電極を用いた設置部位の確認や手術侵襲を検討することは大切であると確認された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

報告（論文・総説）

- 1) Miyazawa A, Inoue M, Hirakata A, Okada AA, Iihara K, Fujioka Y: Expression of inhibin α by stromal cells of retinal angiomas excised from a patient with von Hippel-Lindau disease. *Jpn J Ophthalmol.* 53: 501-505, 2009
- 2) Inoue M, Shinoda K, Hirakata A: Twenty-three Gauge Cannula System with Microvitreal Blade Trocar. *Br J Ophthalmol.* 2009 [Epub ahead of print]
- 3) Hirakata A, Inoue M, Oshitari K, Okada AA, Nagamoto T, Tano Y: Histopathological examination of internal limiting membrane surface after scraping with diamond-dusted membrane scraper. *Acta Ophthalmol.* 2009 [Epub ahead of print]

特許取得状況：なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

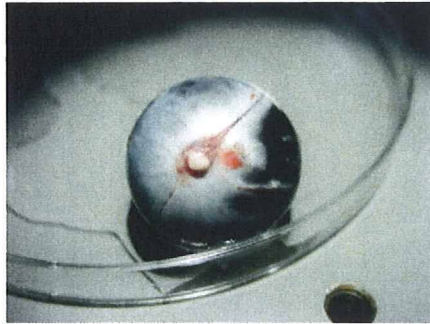
2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

図1. ネコ眼における通電眼の組織学的検討



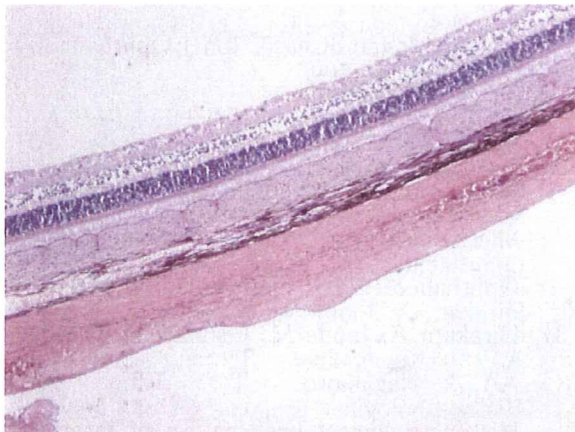
摘出眼球



強膜ポケット電極縫着部位



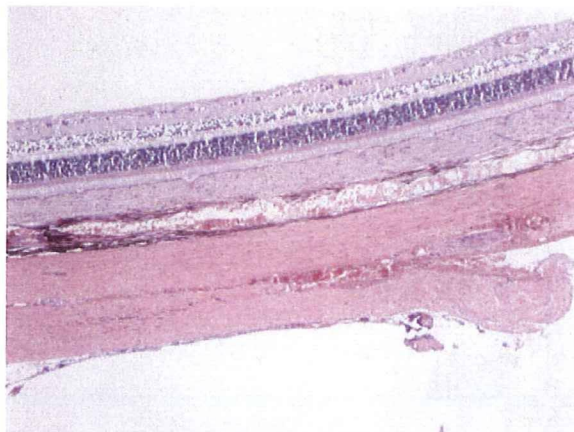
全眼球断面
網膜剥離はアーチファクト



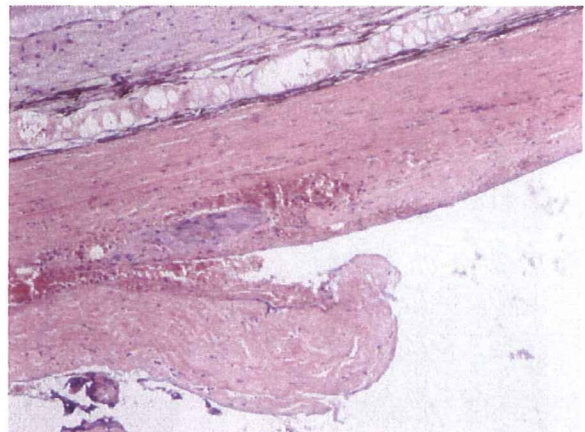
埋植強膜ポケットに隣接する網膜脈絡膜所見



毛様体扁平部付近



埋植強膜ポケット先端部付近



埋植強膜ポケット部位の拡大

図2. ビーグル犬における電極埋植手術侵襲の組織学的検討



摘出眼球

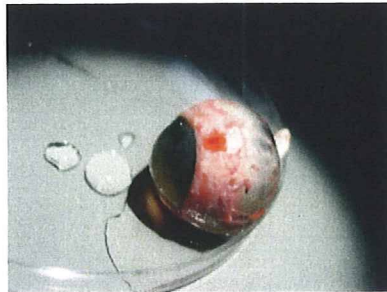
電極埋植強膜ポケット部位



強膜ポケット部位



全眼球断面

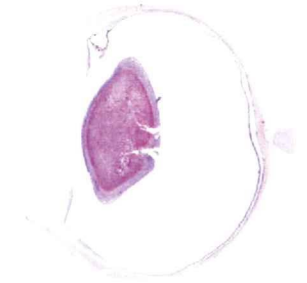


摘出眼球

硝子体電極埋植部位

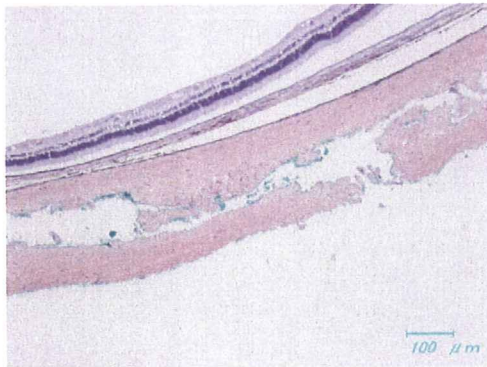


硝子体電極付近?



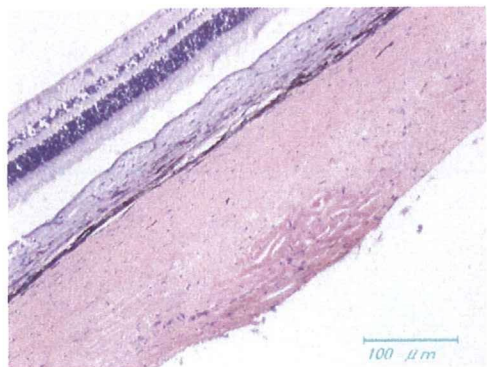
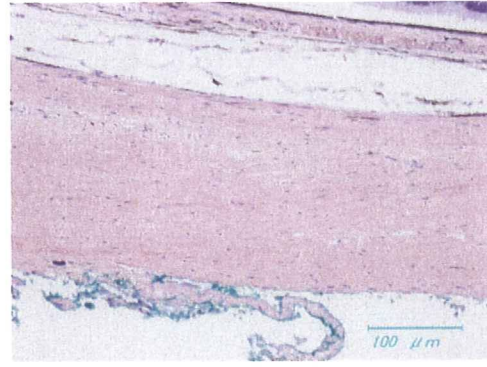
全眼球断面

硝子体電極埋植部位の毛様体剥離が疑われる



埋植強膜ポケット部位

強膜ポケットは深部に向かうほど強膜底が薄くなる。周辺の炎症所見は少ない。網脈絡膜組織に異常はみられない。



硝子体電極埋植部位は強膜のコラーゲン層に乱れが存在するが、炎症所見は少ない。

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

脈絡膜上経網膜電気刺激(STS)方式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

2008 年度からの信頼性試験で判明した技術課題を解決した要素技術を用いて亜急性臨床試験モデルを製作し、生理食塩水中での長期電気機能評価と動物体内での耐久性評価を行い、その適合性を実証した。その結果として、実用化を目指した脈絡膜上経網膜刺激(STS: Suprachoroidal Transretinal Stimulation)方式人工視覚システムの亜急性臨床試験モデルを完成した。

加えて、医学側と協働にて亜急性臨床試験を実施する為の埋植手術で必要となる器具を製作し、亜急性臨床試験に適用する実用化技術も開発した。

A. 研究目的

STS方式の人工視覚システムを1~2ヶ月間ヒトに埋植して効果を検証する亜急性臨床試験モデルの完成と、埋植手術で必要となる技術を開発する。さらに、多極化に向け刺激電極を高性能化するための技術を開発する。

(1) 体内装置の要素技術開発

人工視覚システムを長期間体内に埋植する上で、不可欠となる体内装置の包埋技術と機械機能の信頼性を担保する技術を開発する。

(2) 亜急性臨床試験モデルの生理食塩水中評価

亜急性臨床試験モデルを50℃の生理食塩水中で6ヶ月間通電し、気密封止性能と電気機能の信頼性を検証する。

(3) 亜急性臨床試験モデルの生体内評価

亜急性臨床試験モデルを家兎の背中に6ヶ月間埋植して実際の使用環境下での総合

的なシステムの信頼性を検証する。

(4) 埋植手術に関する技術開発

亜急性臨床試験において、患者への侵襲が少なく、手術中に微細な電極の損傷を防止すると共に短時間の手術を可能とする埋植手術の実用化技術を開発する。

(5) 刺激電極高性能化

白金のバルク材料を機械加工により実現した刺激電極の単位表面積あたりの注入電荷量を改善するため、この弾丸様3次元形状の電極表面をエッチングによって表面積を増大させることで、刺激電極の高性能化を図る。

B. 研究方法と成果

(1) 体内装置の要素技術開発

体内ケースはHeリーク試験で 1.0×10^{-9} Pa・m³/sec以下の気密性能を有し、ケース内の電気回路に気密貫通端子を介して電極ケーブルと体内コイルが繋がっている。体内

装置はシリコーン樹脂で全体包埋した。この包埋性能を評価するために、無線で電極間のインピーダンスを測定することができる回路をケース内に収めた(図1)。この体内装置5台を37°Cの生理食塩水に浸し、測定時のみ取り出して刺激電極間の絶縁抵抗を6ヶ月間記録したのが図2である。グラフから、ケース内への浸水などがなく、安定した包埋性能が得られていることが確認された。

一方、実際に生体内へ埋植したときの信頼性を評価するため、別に同じ装置3台を家兎の背中へ埋植し、刺激電極と硝子体電極間のインピーダンス変化を評価した。ヒトへの埋植では体内ケースは側頭骨へ固定され、電極部は眼球強膜に縫合されるため筋肉の動きによる大きな負荷は生じない。しかし、ケーブル螺旋ピッチを2mmから1mmとし(図3)、体内コイルの端子接続部付近での変形を吸収する線材形状として(図4)耐久性を向上させた。さらに、体内に埋植される状態を想定し、頭蓋骨を模したアクリル板に体内ケースと電極を縫合固定し(図5)、ウサギ背部に埋植した(図6)。

この実際に近い体内環境下での試験で、6ヶ月間安定した1k Ω 程度の正常値が得られ(図7)、装置の信頼性が検証された。

(2) 亜急性臨床試験モデルの生理食塩水中評価

前項で検証した包埋技術を用いて7×7個のうち特定の3×3個で電気刺激をする亜急性臨床試験モデルを製作した。生理食塩水を用いての電気機能試験は実際の体内環境よりも高い苛酷な温度条件を設定でき、性能や機能の変化を詳細にトレースすることができるため、加速試験の難しい動物の体内への埋植試験を補完できる利点をここで

は活用した。50°Cの生理食塩水中での6ヶ月間の試験結果からは、刺激電流値、刺激パルス幅、刺激周波数について測定誤差範囲内の微小な変化しか観測されなかった。図8は最も変動の大きかった電流値のグラフであるが実用上問題の無い範囲であり、体内よりも苛酷な温度でも電気機能及び包埋性能に支障が生じないことが検証された。

(3) 亜急性臨床試験モデルの生体内評価

動物体内への埋植試験は、生理食塩水を用いての試験では予測や確認が困難な故障モードの検証をすると同時に、ヒトへの適用の可否を判断する最終検査となる。

この試験では、まず、亜急性臨床試験モデルの体内装置を同様にアクリル板に固定し、家兎の背部筋肉下に埋植して出力電流を測定する機能信頼性試験を行った。つぎに、ビーグル犬の頭部及び眼球に体内装置と電極を埋植して眼底像を観察し、あわせて眼球運動を伴うデバイスの構造信頼性試験を行った。これらの試験により、亜急性臨床試験モデルの信頼性を実証した。

[家兎背部への埋植試験]

プロトコールで決められた経過時間ごとに家兎背部に埋植した体内装置を動作させ、体外装置との通信が可能であることと1mAを上限に出力可能な最大電流値を記録した。1.5ヶ月経過後に出力電流1mAから低下しはじめ、最終的に400 μ Aで安定する現象が観測された(図9)。6ヶ月間の試験終了後、同様の現象が見られた2羽の家兎から体内装置を摘出し、一方については生体組織を取り除いて生理食塩水中でのインピーダンスを測定して、埋植前の測定値と比較して装置性能に劣化が無いことを確認した。もう一方については電極周りの組織切片(図10)を

製作して刺激電極が良性の膜状結合組織で覆われていることを確認した。また、電流値が低下する時期と切開部が治癒して毛が生え始める時期がほぼ同じであることから、電極周囲の組織成長に伴いインピーダンスが上昇することが推察された。

なお、電極を眼球に埋植した試験でこのような著しい電流値の低下は今までに確認されていない。

[ビーグル犬眼球への埋植試験]

ビーグル犬 3 頭にヒトへの埋植を想定した手術手技にて体内装置は頭部固定、電極部は頭部皮下を通して眼に埋植した(図 11)。埋植後は 1 ヶ月ごとに眼底撮影と体内装置の動作を確認して、全ての試験において3ヶ月間正常に機能することを確認した。また、網膜の組織切片作成のために3ヶ月後に摘出した眼球と眼球に埋植された電極双方に外観的な異常は見られなかった(図 12)。

(4) 埋植手術に関する技術開発

側頭骨に埋植する体内装置とそこから眼窩に導かれる体内ケーブルについては主に献体で、眼球に埋植する刺激電極及び硝子体電極と眼球まわりの体内ケーブルの引き回しについては主にビーグル犬で、手術方法や埋植機器の形態について検証した。

また、合わせて手術に必要な治具やゲージ類について検討した。

[体内装置]

今回の亜急性臨床試験では、短期間でデバイスを摘出することを考慮し、耳の後ろ側の頭蓋骨にチタン製ネジで体内装置を固定することにした(図 13)。また、体内装置と同等寸法のゲージにより切開範囲を確認する手法で、短時間の手術の可能性を確認した。

[刺激電極部]

ケーブル直径1mmに対し繰り返し曲げ半径を3倍以上にすることで、眼球運動による繰り返し変形に対する耐久性が確保できる。一方、強膜ポケットに電極を挿入する部分では狭い領域に埋植できるように、ケーブルを半径1mm以下で急に曲げられる特性が重視される。さらに、この部分は手術時に左右眼、耳側鼻側の任意の場所へ電極を埋植することが要求される。これらを解決するため、自由な角度に曲げることのできる細首構造とした。この部分は、所望の角度に決定後に用いる保護カバーを設けた。図 14 が、開発した刺激電極部である。曲げ半径0.5 mmで維持できるようにした。

刺激電極を埋植する強膜ポケットの幅と深さを切開中にゲージで確認することにより効率よく手術ができるようにした。

[電極保護カバー]

体内ケースから眼球部に電極を導く手術は皮下にトロッカーを通して行われる。この際に電極を保護すると同時にガイドワイヤーを引っ掛けられる電極保護カバーを、術式とあわせて開発した(図 15)。眼球の周りにケーブルを巻き付ける際にも電極を保護する役割も果たす(図 16)。

(5) 刺激電極高性能化

弾丸形状の白金電極(図 17)を室温下の燐酸緩衝生理食塩水中に浸漬した。そこで、白金電極の電位を銀/塩化銀参照電極に対して1秒間+2.5V に保持し、続いて1秒間-2.5V に保持した。この電位走査の繰り返しの15時間連続で行った。処理後の電極について形態観察を行うとともに通電時の電位波形を測定することで電気的特性を評価した。

電子顕微鏡で表面を観察したところ、電極表面が非等方的にエッチングされポーラスな表面となっていることが明らかになった(図 18-図 19)。また電気刺激に用いる双極パルス電極に印加して電極電位波形を観察したところ、電圧振幅が顕著に低下することを確認した。電荷注入能力が2から3倍増加した(図 20)。これらの観察結果は、エッチング加工によって電極の表面積が増大し、刺激電極の性能が向上したことを示している。

C. 考察および結論

(1) 体内装置の要素技術開発

生理食塩水を用いた包埋性能試験と動物体内にデバイスを埋植する総合的な信頼性試験にて、1~2ヶ月間体内に埋植する亜急性臨床試験モデルの製作に必要な要素技術を検証した。

また、家兎背部への埋植試験で、実際の使用状態を模した実験系を開発した。

(2) 亜急性臨床試験モデルの生理食塩水中評価

亜急性臨床試験モデルを製作して 50℃の生理食塩水中で6ヶ月間の通電試験を実施し、包埋性能と電気機能について亜急性臨床試験が実施できるレベルにあることを実証した。加速試験にも関わらず、6ヶ月の試験期間での性能低下は全く見られなかった。

製品レベルの性能をどこまで確保しているか更に検証を進めていく。

(3) 亜急性臨床試験モデルの生体内評価

家兎背部筋肉下6ヶ月埋植試験とビーグル犬頭部及び眼球への3ヶ月埋植試験のいずれにおいても、機械的な損傷や浸水、デバイスの劣化による性能低下は認められず、

1~2ヶ月の亜急性臨床試験を行うための体内装置の信頼性、耐久性が実証された。

但し、家兎背部への長期埋植試験では生体組織が原因で最大電流値が半分以下に低下することが確認された。さらなる長期臨床試験を想定して、眼球への埋植試験との違いについて今後詳しく調査する必要がある。

(4) 埋植手術に関する技術開発

亜急性臨床試験に向けて必要となる術式開発を献体とビーグル犬で実施し、実際の手術を想定した検証によりデバイスの見直しや手術に必要なゲージ、治具類について確認した。手術での執刀は術者の経験に基づいて行われるが、強膜ポケットと網膜との間の寸法管理が難しく、この間隔を安定的に確保する支援システムについて検討の余地がある。

(5) 刺激電極の高性能化

白金電極の表面積増加方法としてはいわゆる白金黒が知られているが、機械的特性や毒性に難があり、生体内で長期間利用可能な刺激電極としては用いられていない。本研究で提案したエッチング手法では、加工に際し有毒な物質を使用することがなく、かつ電極製造プロセスの最終段階すなわち電極アレイ形成後にエッチング加工することが可能であるという点で優れている。

本研究で提案したエッチング加工により、刺激電極の性能が向上することが示された。今後はエッチング条件の最適化、およびエッチング加工した電極の耐久性について評価を行ってゆく。

D. 健康危険情報

なし.

E. 研究発表

■ 論文発表

なし.

■ 総説・著書

なし.

■ 学会発表(以下記載)

1)

Y. Terasawa, M. Ozawa, J. Ohta, Y. Tano, "A visual prosthesis based on suprachoroidal-transretinal stimulation," The 2nd Bonn Dialogue. The International Symposium on Visual Prosthesis, 2009/9/19, Wissenschaftszentrum, Bonn.

2)

Y. Terasawa, A. Uehara, H. Kanda, H. Tashiro, M. Ozawa, "A method of surface-area enhancement of platinum bulk electrode with electrochemical etching," Society for Neuroscience Meeting Planner, Program No. 181.18, 2009/9/18, Chicago.

3)

寺澤靖雄, 上原昭宏, 神田寛行, 阿部志保, 田代洋行, 小澤素生, 太田淳, "エッチング加工に基づく白金バルク電極の高性能化," 人工臓器 Vol.38, No.2, pp.S-41, 2009

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(2009. 3. 1~)

国内出願

- ① 特願2009-8804(出願日H21. 3. 31)「電力伝送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2009-135167(出願日H21. 6. 4)「視覚再生補助装置」発明者:寺澤靖雄

- ③ 特願2009-135207(出願日H21. 6. 4)「視覚再生補助装置」発明者:上原昭宏

- ④ 特願2009-179331(出願日H21. 7. 31)「視覚再生補助装置及び視覚再生補助装置の製造方法」発明者:寺澤靖雄、上原昭宏

- ⑤ 特願2009-257141(出願日H21. 11. 10)「視覚再生補助装置」発明者:大澤孝治

- ⑥ 特願2009-273850(出願日H21. 12. 1)「視覚再生補助装置」発明者:鐘堂健三

国内登録

- ① 特許4264320(登録日H21. 2. 20)「視覚再生補助装置」発明者:田代洋行、寺澤靖雄

- ② 特許4359567(登録日H21. 8. 14)「視覚再生補助装置およびその作製方法」発明者:鐘堂健三

海外出願

なし

海外登録

なし

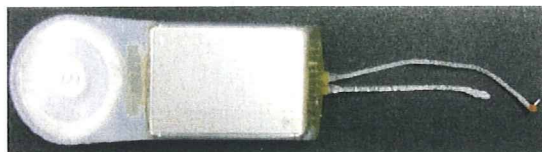


図 1. 包埋性能評価用体内装置

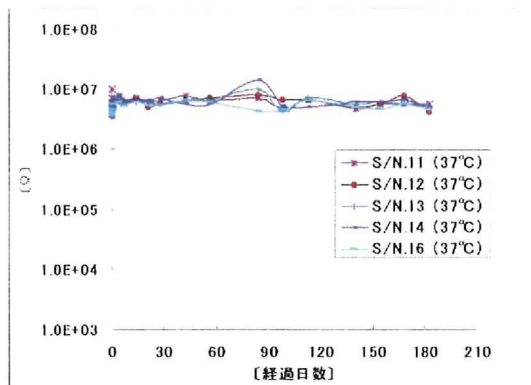


図 2. 包埋絶縁性能評価結果

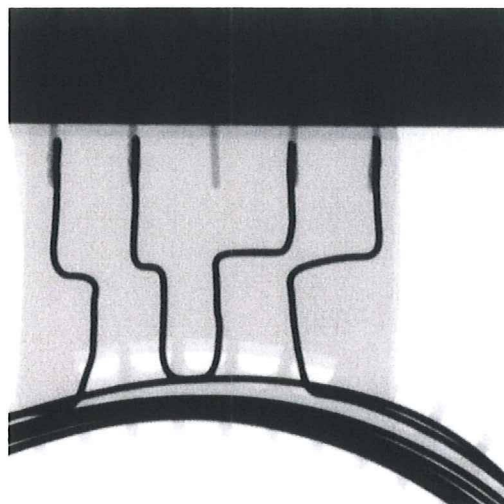


図 4. 改良コイル接続部

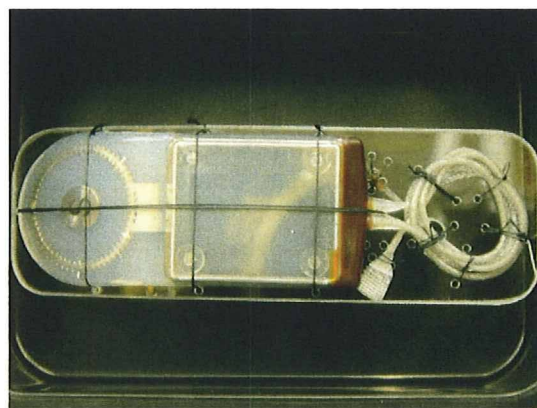


図 5. アクリル板への体内装置固定

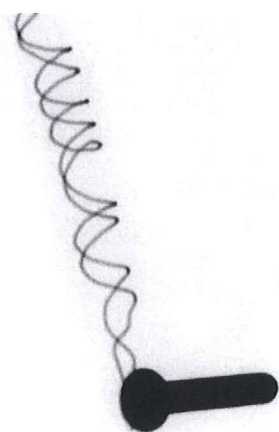


図 3. 改良硝子体螺旋ケーブル

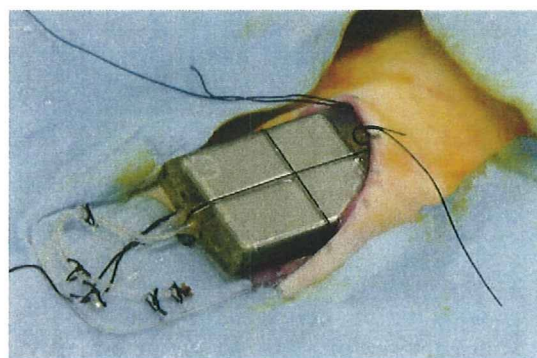


図 6. 体内装置の再埋植手術