

図 7. 家兎背部再埋植 耐久性試験結果



図 11. ビーグル件眼球への電極埋植

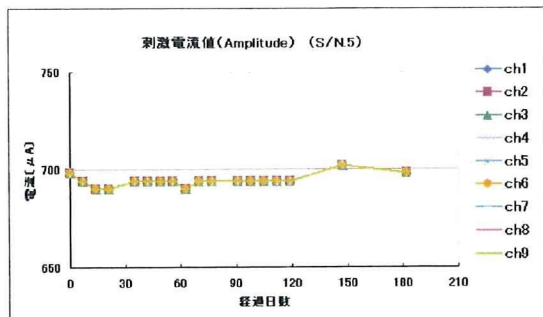


図 8. 生理食塩水中の刺激電流確認結果

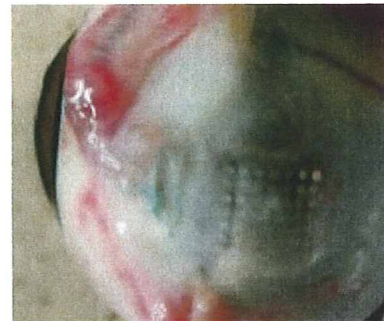


図 12. 摘出された眼球と刺激電極

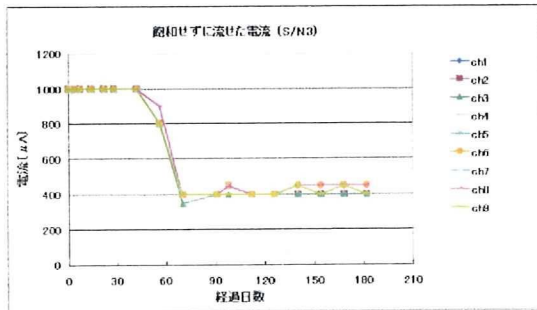


図 9. 家兎背部埋植 出力電流確認結果

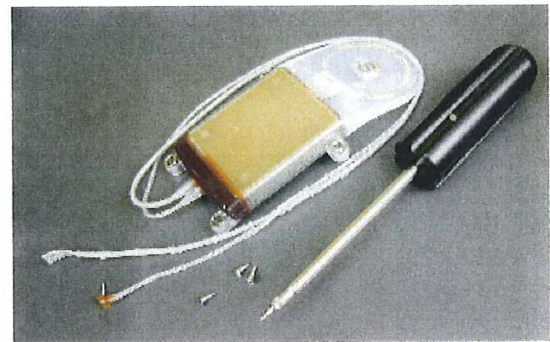


図 13. 亜急性臨床試験用体内装置

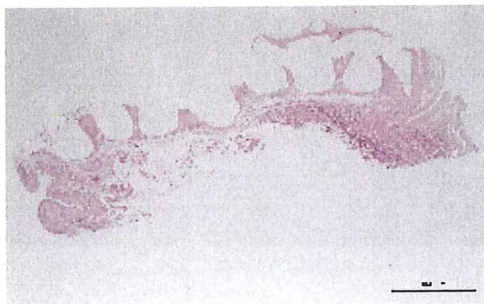


図 10. 埋植電極周りの組織切片

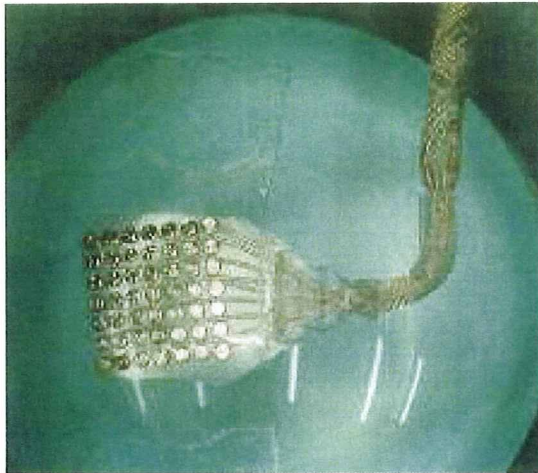


図 14. 刺激電極付根のケーブルの曲がり

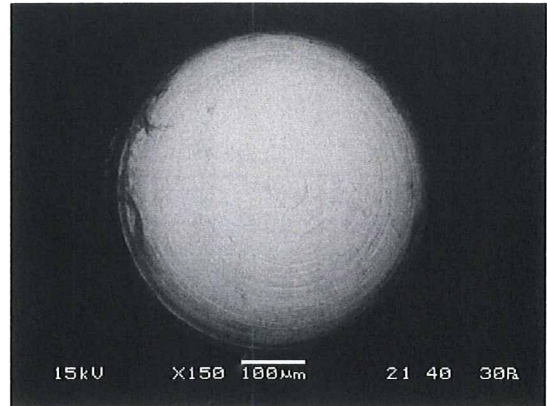


図 17. エッチング加工前の刺激電極



図 15. ガイドワイヤー付電極保護カバーとトロッカー

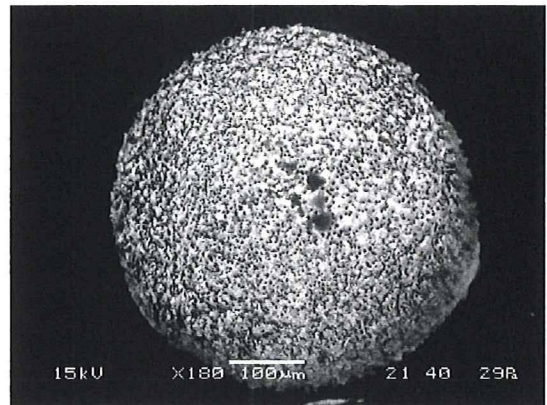


図 18. エッチング加工後の刺激電極



図 16. 直筋下へのケーブル巻き付け

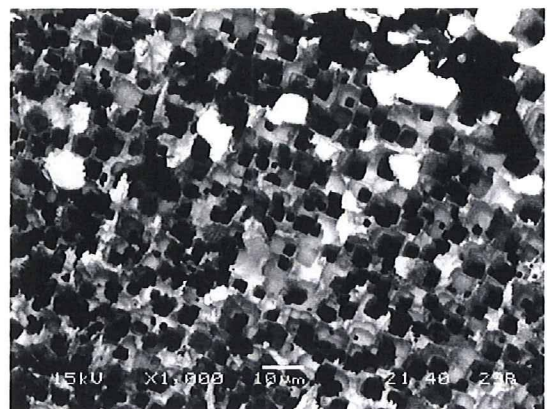


図 19. エッチングにより形成されたポラス表面

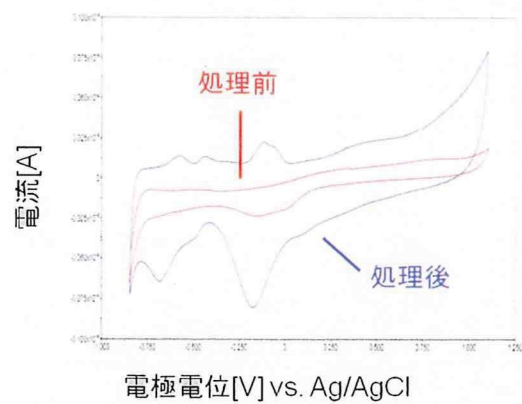


図 20. エッチング処理前後のサイクリックポ
ルタモグラム

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

STS 型人工網膜の機能評価：膜電位イメージングを用いた皮質視覚野応答の解析

分担研究者 澤井 元 大阪大学医学系研究科統合生理学 准教授

研究要旨

人工網膜システムが提供する視覚の質を動物実験において評価するには、視覚中枢において自然刺激に対する応答と多点電気刺激に対する応答との比較を行い、時空間特性がどこまで近似しているかを検証する必要がある。そこで、本研究で昨年度は、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を用いてイメージングする手法を確立したので、今回は直線に並んだ多点電極の刺激のコントロールとしてスリット光を用いて、視覚野応答の膜電位感受性色素イメージングを行って、その時空間パターンの解析を行った。

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。我々は、まず、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、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を確立した（平成 19 年度報告書）。

これらパルスパラメータの基本仕様がほぼ確立されたことから、次に連続刺激（トレイン刺激）や多点刺激に対する応答の時空間特性を解析するため、昨年度は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皮質視覚野の応答特性を解析する方法を確立した。

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、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疑似光覚が発生すると期待される。その疑似光覚が、本来の視覚刺激に対する光覚に近似していれば、より自然な視覚を提供できることになる。両者の光覚の近似性は最終的にはヒトによる臨床試験でなければ分からないが、臨床試験にいたるまでに可能な限り動物実験で事前検証する必要がある。

そこで、動物実験では、視覚中枢において自然刺激に対する応答と多点電気刺激に対する応答との比較を行い、時空間特性がどこまで近似しているかを検証する必要がある。但し、ラットの場合、ヒトより眼球が小さく視覚機能も劣っているため、複雑なパターン刺激を用いた応答の検証は不可能である。そこで、今回、直線に並んだ多点電極の刺激のコントロールとしてスリット光を用いて、視覚野応答の膜電位感受性色素イメージングを行って、その時空間パターンの解析を行った。

B. 方法

[実験動物と手術] 健常動物として Long Evans 系 hooded rat（雌、10～16 週齢、日本 SLC、以下 LE）17 匹を用いた。動物の飼育管理及び実験手続きは大阪大学動物実験委員会規定に従った。手術および実験中は保温パッドを用いて体温（直腸温）を 36-7℃に維持し、心電図をモニターした。

気道粘液の分泌を抑制するために硫酸アトロピン（0.005%、1mL/kg, i.m）を投与したのち、ウレタン（1.25 g/kg）を腹腔内投与して動物を麻酔した。実験中は麻酔状態を維持するため、ウレタンを適宜追加投与（初期投与量の 1/2-1/4）した。気管挿管して気道確保したのち、動物の頭部を脳定位固定装置（SR-15, ナリシゲ科学機器）に固定した。開頭し脳脊髄液を排出させた後、右頭頂骨の後部 2 / 3（Bregma より AP-5～-12mm/L3～10

mm) を切除し、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 2 - 3 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。

[皮質視覚野の染色] 遮光下の VC を膜電位感受性色素 (VSD) で染色した。ヘパリン入りの生理食塩水で 1 mg/ml に希釈した RH795 (Invitrogen) または RH1691 (Optical Imaging) 50~70 μ l を頭蓋の開口部に滴下し、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。再び 45 分間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。

[光刺激] 光刺激は上に表示した。7 inch サイズの有機 EL ディスプレイ (XEL-1, SONY) を動物の左眼球から 18 cm 前方に設置し、輝度 25 cd/mm² に設定した画面上に視野角 6° 幅の白色縦スリット光(輝度: 50 cd/mm²)を光刺激として 50 ms 表示した。

[光学計測] VC の蛍光強度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、VSD で染色された VC 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 100×100 画素の画像を 2 ms 毎に 256 または 512 フレーム分記録した。記録開始時点を動物の心電図の R 波の頂点時に同期させた。計測は 10 秒間隔で 32 回または 50 回行い、一回おきに画像記録開始 50 ms 後に光刺激を提示した。

[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。光刺激を加えた 16 ないし 25 回の記録画像データを平均化し、刺激を加えなかった記録の平均化データとの差分、すなわち光刺激による蛍光強度の変化比 ($\Delta F/F$) を求めた。変化比の時空間的変動の高周波成分を除去するため、空間的には 5×5 点、時間的には前後 3 点で重み付け平均を行った。

C. 結果

(1) 白色スリット光に対する VC 応答

図 1 は 50 ms の白色スリット光刺激に対する VC の VSD イメージングの典型例である。図 1 の上段は、正中から左視野の側頭側方向へ視野角 20° の位置に刺激光を提示したときの結果である。刺激提示後、数十ミリ秒後に一次視覚野 (V1) 内の外側部 (図の上中央) 付近で局所的興奮性応答を示す蛍光量の変化が観察された。その後、この応答の範囲と強度は次第に大きくなり、刺激後 100 ms 前後でピークに達した後、強さと範囲は減衰し潜時 170-200 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。

このスリット光刺激に対する興奮性応答の位置は、スリット光の提示位置を変えることにより移動した。図 1 の中段と下段はそれぞれスリット光を正中から左視野の側頭側方向へ視野角 30° と 50° の位置に刺激光を提示したときの結果である。刺激光の提示位置が側頭側方向に移動すると VC の興奮性応答の位置が内側尾側方向にシフトした。また、視野角 20° の位置への刺激光提示に対して、視野角 30° と 50° への刺激提示の方がより広く強い蛍光強度変化が観察された。

(2) V1 と V2 の応答

刺激に対する VC の興奮性応答は二カ所で観察されることがあった。図 2 にその一例を示す。左視野正中より 50° の位置に白色スリット光を提示したところ、V1 応答に加えて、その外側に興奮性応答領域が観察された (図 2 a 矢頭)。この領域は細胞構築学上 Oc2L と呼ばれ Broadmann の area 18a、いわゆる V2 に相当すると考えられる。図 2 b は V1 と V2 の応答中心における蛍光強度変化比の時間経過をグラフ化したものである。青線と赤線はそれぞれ V1 と V2 の応答中心の変化を示す。両者とも刺激光提示後、同時に興奮性応答が始まり、最大応答を迎える時点もほぼ一致している。これは両者の応答が皮質下からの共通な求心性入力により発生していることを反映しているものと考えられる。

(3) 二次応答

図 3 は正中より 50° の位置にスリット光を提示した時の VSD イメージを経時的に並べたものである。この図では 75 ms から V1 と V2 で興奮性応答が始まり、125-150 ms で最大応答を示した後、約 275 ms で応答は終了・消失した。その約 125 ms の後に再び興奮性応答が生じた。この二次応答は潜時約 400 ms で始まり 475-500 ms

で最大応答に達した。その後、二次応答は減衰し、650 ms 以降には消失した。

このような二次応答は 14 例中 11 例 (78.6%) で観察された。その中には二次応答の終了後、3 度目の興奮性応答が観察された例もあった。このような二次応答の範囲は一次応答の範囲と大部分重なっていたが完全に一致はしていなかった。特にそれぞれの応答の中心は一致していなかった。刺激提示開始を遅らせると一次応答・二次応答とも起こった。また、刺激の持続時間を延長しても二次応答の潜時が変わらなかった。以上のことより、二次応答は少なくともスリット光の消失に対する VC の OFF 応答でないと考えられた。

一次応答と二次応答の関係を調べるため、32 回の計測のうち前半 16 回と後半 16 回のそれぞれを加算平均し比較した (図 4)。すると、一次応答の大きさは前半と後半で差異が見られなかった。しかし、二次応答は前半ではあまり顕著ではないのに対して、後半では非常に大きくなっていった。このように、二次応答の大きさは一次応答の大きさに依存せず、また、時間とともに大きくなることが示唆された (11 例中 7 例、63.6%)。

D. 考察と結論

今回、我々は自然刺激の構成要素一つとしてスリット光刺激を用いて、その刺激に対する VC の応答の VSD イメージングを試みた。VC における一次応答の潜時は 70~80 ms で、誘発電位応答の潜時に比べて遅い。これは、VSD イメージングにおける興奮性応答の主成分が皮質ニューロンの発火よりも、樹状突起における膜電位変化、即ちシナプス後電位に有ることに起因しているものと考えられる。さらに、VSD イメージングで計測できるのは皮質表層の蛍光強度変化に限定される。ところが、皮質 2/3 層ニューロンは皮質下からの直接入力を受けず、4 層ニューロンを介して入力を受けることが知られている。このために、応答潜時が遅れたものと考えられる。

興奮性応答の VC 内位置はスリット光の提示位置 (正中から視野角で 20°、30°、50°) に応じて変化した。より側頭側視野に刺激を提示すると VC 内の応答位置はより内側尾側で観察された。VC には視野再現 visuotopic organization があることが知られており、今回の結果はそれを反映していた。また、50° への刺激提示による応答が 20° の応答よりも大きかったことも VC の視野再現では視野中心領域での再現範囲が大きい特徴を反映している。

今回、VC 内の Oc1 (rat での V1, area17 に相当する) 領域で興奮性の応答が観察されただけでなく、その外側に位置する Oc2L (rat の V2, area 18a に相当する) 領域からも興奮性応答が記録された。両者の応答の立ち上がりや持続時間はほぼ同じであったことは V2 の興奮が V1 経由というよりも、むしろ共通の興奮性入力によって惹起されたものということを示唆している。昨年度、我々は単発 STS 刺激に対する VC 応答の VSD イメージングを実施し、V1 内での興奮性応答を観察したが、V2 に相当する領域での明確な応答は観察していなかった。その理由は不明であるが、単発 STS では VC に十分な興奮を惹起出来ていない可能性がある。STS の繰り返し刺激によって V1 のみならず V2 にも興奮が誘発されるのか早急に検討する必要がある。

本研究で得られた最も興味深い知見は、スリット光刺激に対して二次応答が見られた事である。二次応答は一次応答が完全に終了した後、少なくとも 100 ms 経過してから始まった。そして、この非常に遅い応答は、同一刺激を繰り返すことによって増大する性質を持つことが、本研究から示唆された。この二次応答の成因は不明であるが、刺激提示開始から 400 ms 以上遅れて発生し、先行する一次応答の大きさに関わらず、刺激の反復により増大するという特徴からは、視床-皮質入力が繰り返されることにより二次応答が発生するよりも、高次中枢から皮質へのフィードバックによって発生している可能性が考えられる。そうであるならば、この二次応答は一次応答よりも高次元の情報処理過程を経た結果を反映しているものなのかもしれない。

これまで我々が実施してきた STS 刺激に対する VC 応答の VSD イメージングは、計測時間が刺激後 200 ms 以内に留まっていたため、STS 刺激に対する VC 応答に、このような二次応答が生じるか否かは不明である。今後は、計測時間を延長して、二次応答の有無を確認したい。なぜなら、STS 型人工網膜で発生する疑似光覚が、刺激パターンの元になる画像を健常者が見た時に生じる視覚と類似させる上で二次応答の発生は大きな影響を持つ可能性があると考えられるからである。

E. 健康危惧情報

特に無し

F. 研究発表

1. Optimal parameters of transcorneal electrical stimulation (TES) to be neuroprotective of axotomized RGCs in adult rats. Morimoto T, Miyoshi T, Sawai H, Fujikado T. Exp Eye Res. 2010 Feb;90(2):285-91. 2009 Nov 10. crushed optic nerve in adult rats. Tagami Y, Kurimoto T, Miyoshi T, Morimoto T, Sawai H, Mimura O. Jpn J Ophthalmol. 2009 May;53(3):257-66. 2009 May 31.
2. Axonal regeneration induced by repetitive electrical stimulation of

G. 知的財産権の出願・登録状況
[1] 特になし

[図および説明]

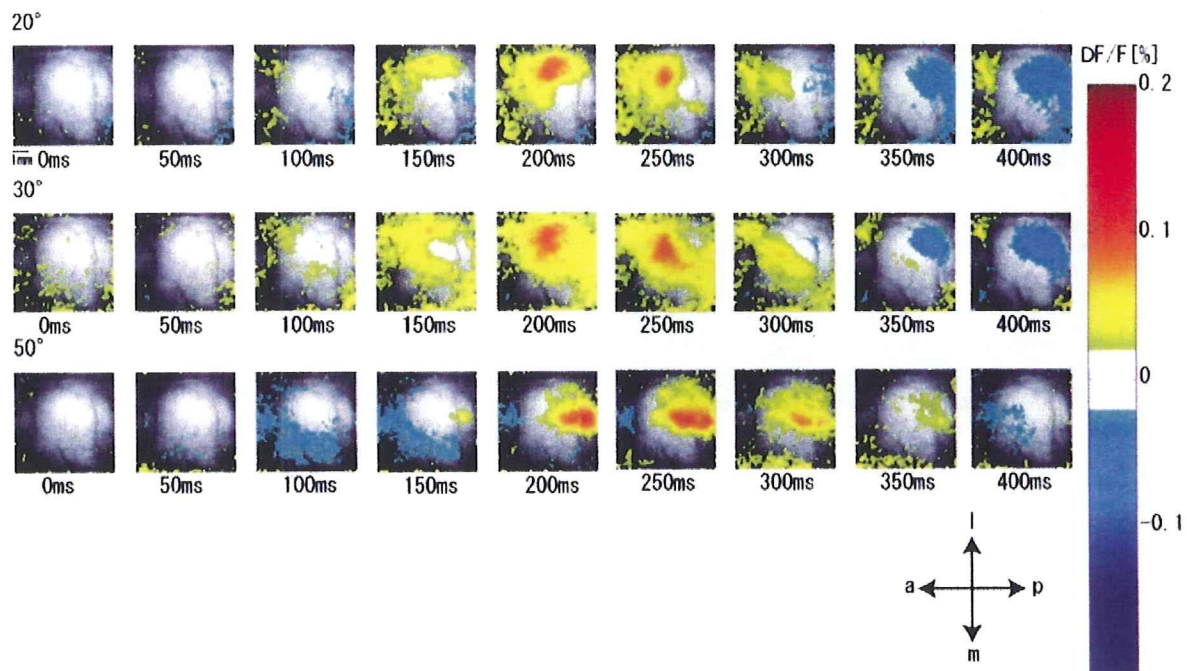


図 1. 白色スリット光に対する右皮質視覚野応答の膜電位イメージング
 上段、中段、下段はそれぞれ正中から左視野の側頭側方向へ視野角 20°, 30°, 50° の位置に刺激光を提示したときの蛍光強度変化比のマップ。左から右に、刺激開始後より 50 ms ごとのマップを並べた。
 a: anterior, p: posterior, m: medial, l: lateral

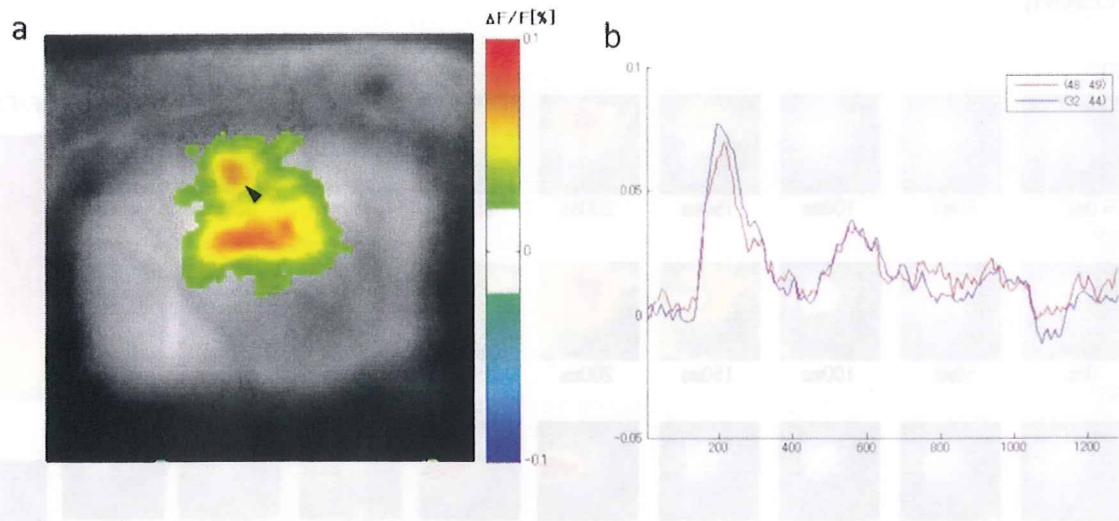


図2. 白色スリット光に対して生じたV1とV2の応答

a. 左視野の正中より 50° の位置に提示したスリット光に対して潜時 105 ms におけるVCでの蛍光強度変化比のマップ。矢頭はV2の応答領域を示す。マップの上、左はそれぞれ右VCの外側、吻側にあたる。V2の内側に前後に広がる応答領域はV1。b. V1(青)、V2(赤)の応答中心における蛍光強度変化比の時間経過。両者の応答が時間的に一致している点に注目。

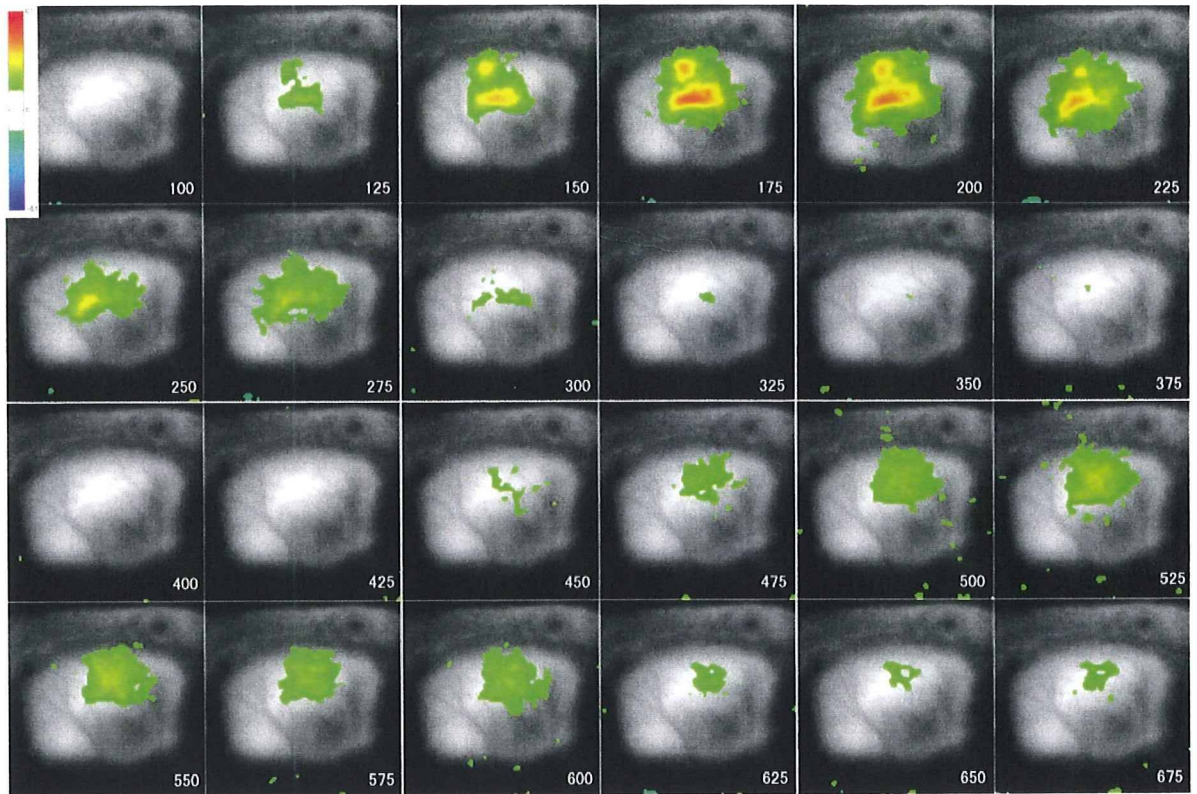


図3. 白色スリット光刺激で誘発されたVC 応答の時間経過。潜時 400～650 ms（上から3段目左から3つ目のマップ以降、最下段左から4つ目）間に二次応答が認められる。

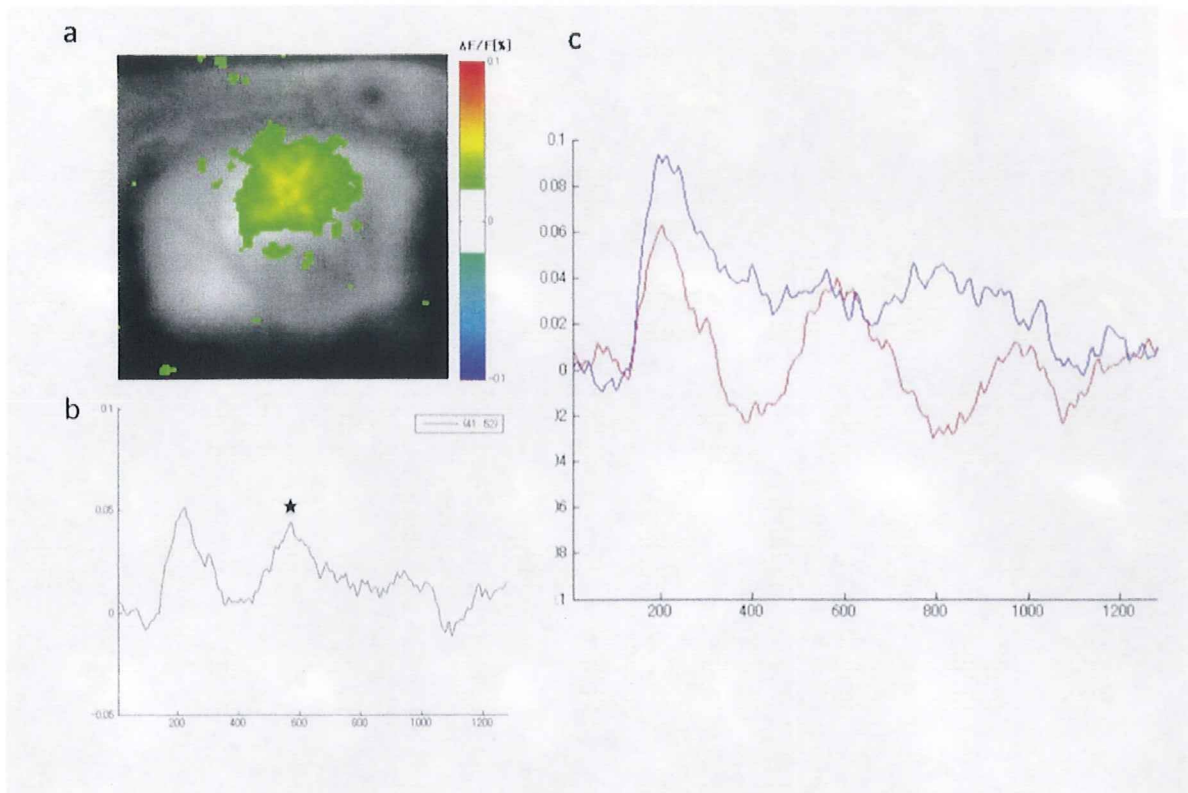


図4. 白色スリット光刺激に対するVCの二次応答

a. 二次応答が最大に達したときの蛍光強度変化比のマップ。潜時 495 ms. b. 二次応答の中心領域における蛍光強度変化比の時間経過。星印は二次応答のピークを示す。その約 400 ms 前に一次応答のピークが認められる。c. 二次応答の時間的変化。青線と赤線はそれぞれ 64 回の刺激提示のうちの最初と最後の 32 回の提示に対する応答の時間経過を示す。

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

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脳皮質誘発電位に及ぼす影響についての検討

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

研究協力者 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

これまでに有色家兎に対するベルテポルフィンと赤色 LED 光を用いた光障害モデルの作成を試み、広範囲に視細胞を選択的に障害することに成功した。また、この障害部位に STS 方式の刺激電極を埋植することにより、大脳皮質で電氣的誘発電位（EEP）を測定することに成功し、中型動物の視細胞障害モデルを作成した。またこのモデルが光照射後 1 年を経過しても、モデルとして使用しうることを示し、このモデルを用いて適正刺激パルスパラメーターの検索も行ってきた。

ただ、このモデルでは、変性部位が限局しているため、このモデルで得られる大脳皮質誘発電位（EEP）が周辺部の健常網膜から誘発されている可能性があった。そこで今回、我々は STS 方式を用いて、このモデルで EEP を誘発した際の周辺部健常網膜が EEP に及ぼす影響を検討した。その結果、周辺部の健常網膜が、EEP の潜時、振幅、及び閾値に影響を与えていないことが示された。以上のことから、我々が作成した視細胞障害モデル家兎は、適正刺激パルスパラメーター検索などに有用なモデルであることが確認された。

A. 研究目的

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

これまで、マウス、イヌ、ブタなどの視細胞変性モデルが報告されている。我々も網膜変性マウスを使用した研究を行ってきたが、眼球が小さすぎるため、臨床応用

のための多極チャンネルを有する刺激電極を埋設する実験に適していない。中型動物の網膜変性イヌやブタは海外の研究施設で開発、系統維持されており、入手が困難であるうえに、飼育条件を満たした研究施設の問題が残る。

そこで、これまで中型実験動物として扱いやすく、実験にも適していると考えられる有色家兎を用いて、ベルテポルフィンと赤色 LED を用いた光障害モデルの作成を試みってきた。もともと、ラットやマウスの光障害モデルの研究は多く、その障害のされ方が網膜色素変性症と類似していると報告されている。しかしながら、家兎の場合、ラットやマウスと比較すると非常に光に対し

ての耐性が強靱であり、同じような条件では視細胞の障害は起こらないことが知られている。一方で、光感受性物質であるベルテポルフィンを用いたサルの実験で、視細胞を中心とした網膜外層が選択的に障害されることが報告されている¹⁾。そこで照射とベルテポルフィンを用いることにより、視細胞障害が出来ないか検討し、末期の網膜色素変性患者の網膜組織で見られるような視細胞障害²⁾を生じること成功した。また、このモデルにおいて STS 方式の電極で、大脳皮質で誘発電位 (EEP) を誘導することにも成功し、このモデルが中型動物の視細胞障害モデルとして有用であるとこれまで報告してきた。また、このモデルでは脈絡膜循環が障害されており、脈絡膜循環により網膜の大部分が栄養されている家兎の場合は、長期的には障害は網膜外層にとどまらず、網膜内層まで障害される可能性があったため、このモデルの照射後 1 年の長期経過を観察した。その結果、1 年後も内顆粒層の細胞数は有意に減少したものの、神経節細胞は温存され、EEP を誘発することにも成功し、少なくとも照射後 1 年は、視細胞障害モデルとして使用しうることも報告してきた。

実験動物の視覚誘発の評価として EEP が一般的に用いられ、これまで EEP を用いて強化してきた。ただこのモデルでは、変性部位が局限し、周辺部に健全な網膜が残っているため、このモデルで得られる EEP が、STS 方式の電極から迷走した電流によって周辺部の健全網膜から誘発されている可能性があった。そこで今回、STS 方式を用いて、このモデルで EEP を誘発した際、周辺部健全網膜が EEP に及ぼす影響を検討し

た。

B. 対象と方法

対象：有色家兎 (n=3)

方法：有色家兎 (2.0-2.2kg) を 0.5% トロピカミド・5% フェニレフリンにて散瞳し、持続点滴 (2cc/h、ケタラール：キシラジン=2:1) を用いて麻酔を行ったうえで、ベルテポルフィンを静脈投与し (0.47mg/kg)、5 分後より赤色 LED 光源 (MCEP-CR8 MORITEX 社製、1cm:9.5mW/cm² 図 1) を眼前 (角膜頂点より 1mm 程度) に固定し、3 方向に対して合計 90 分間照射を行った。

照射後 1 カ月に、0.5~2% のイソフルレンによる吸入麻酔下で、照射部位に STS 方式の刺激電極を埋植し、大脳皮質で EEP を測定し、その直後に、周辺部の健全網膜を切除したのち、再度 EEP を測定し、切除前後で、EEP に変化がないか検討した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

照射後 1 カ月の眼底写真では Visual Streak を含む広範囲に網脈絡膜変性が認められたが、周辺に健全網膜が残存した (図 1)。また、これまで報告してきたように、照射部位の変性網膜に埋植した STS 電極 (図 2) により、大脳皮質で EEP を観測することに成功した。さらに、周辺部の網膜を切除した後 (図 3, 4) も、EEP を測定することに成功した (図 5)。網膜切除前後で、EEP の潜時と振幅は有意な変化を認めなかった (表 1, 2) また、EEP の閾値は、網膜切除前後とも、すべての個体において 400uA で、変化しなかった。

D. 考察

これまで、Optical Imaging の手法を用いて、STS 方式の機能評価を網膜上で行われ

てきた³⁾。その結果、STS 方式による電気刺激による網膜上での内因性信号の広がり局限していることが分かってきたことから、STS による電気刺激で誘発される EEP も、この局限した網膜から誘発されることが類推でき、これまで作成してきた視細胞障害モデルでは、広範な変性巣が得られたため、STS の適性刺激パラメーターに適切なモデルと考えてきた。

しかし、刺激電流が可視化できず、STS の刺激電流が周辺の健常網膜まで迷走して、健常網膜を刺激し、EEP を誘発している恐れは拭いきれなかった。

今回の結果から、周辺の健常網膜の有無で、EEP の潜時、振幅や閾値などの主要なパラメーターが有意に変化しなかったことから、周辺の健常網膜の EEP に与える影響は無視できると考えられた。

このことから、我々がこれまで作成してきた視細胞障害モデルが、STS の適性刺激パラメーターの検索などに有用なモデルであることが確認された。

また、視覚誘発の指標として用いている EEP は、キシラジンなどの麻酔薬の影響を受けやすく、これまでは、キシラジンの投与量を極力抑え、ケタラールによる静脈注射を用いて、EEP が安定して測定できるように努めてきた。しかし、この方法でもせいぜい3～4時間程度しか安定した麻酔が維持出来なかった。しかし、今回は、イソフルレンの吸入麻酔を用いることによって、8時間を超えるような実験でも、安定した麻酔を維持することができ、安定したデータを取ることに成功した。

E. 結論

今回我々は、ベルテポルフィンと赤色LED

を用いた有色家兎の視細胞障害モデルを作成し、周辺部の健常網膜の切除前後で STS 方式の刺激電極で EEP を誘発することに成功し、切除前後で EEP が有意に変化していないことを示した。このことから、我々が作成した視細胞障害モデルが、STS の適性刺激パラメーター検索などに有用なモデルであることが確認された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1, Nishida K, Kamei M, Kondo M, Sakaguchi H, Suzuki M, Fujikado T, Tano Y. Efficacy of suprachoroidal-transretinal stimulation in rabbit model of retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010, in press

2. 学会発表

1, 西田健太郎、瓶井資弘、坂口裕和、北口善之、不二門尚、田野保雄 [脈絡膜上経網膜電気刺激において大脳皮質誘発電位に影響を与える因子] 第113回日本眼科学会総会 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

{参考文献}

1, Reinke MH, et al. Verteporfin photodynamic therapy retreatment of normal retina and choroid in the

cynomolgus monkey. Ophthalmology 1999; 106:1915-1923

2、Santos, et al. Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric Analysis. Arch Ophthalmol. 1997; 115: 511-515

3、Okawa Y, et al. Optical imaging to evaluate retinal activation by electrical currents using suprachoroidal-transretinal stimulation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007;48:4777-4784

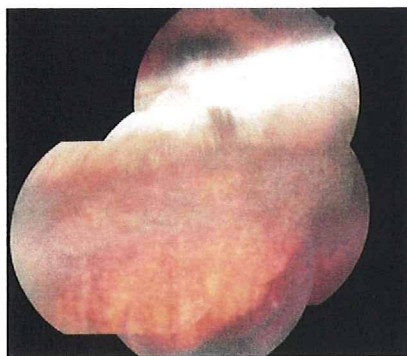
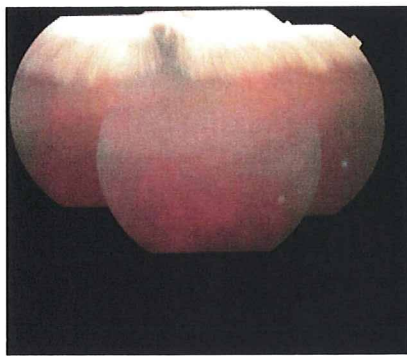


図1. 上から照射前と照射後1か月の眼底写真。Visual Streak を含む広範囲に網脈絡膜変性を認めるが、周辺部に健常網膜が残っている。

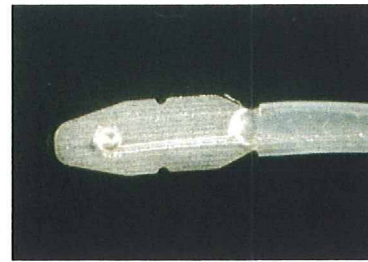


図2. 今回用いた STS 方式の刺激電極。直径は 500um で 500um 突出した弾丸状の形状をしている。

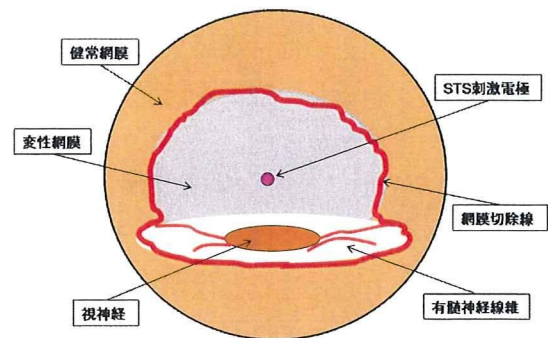


図3. 網膜変性鼠に STS 方式の刺激電極を埋植して EEP を測定したのち、赤線より周辺部の健常網膜を切除してから、再度 EEP を測定した。

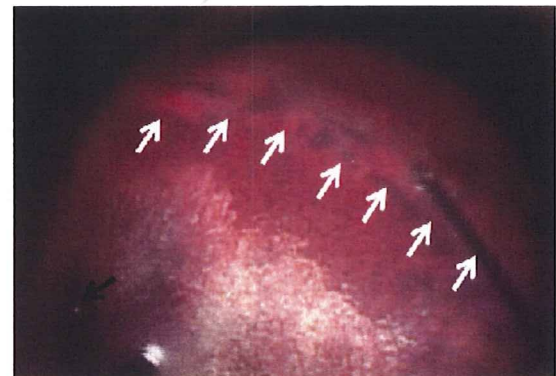


図4. 網膜切除を行っているところ。黒の矢印が STS 方式の刺激電極埋植位置で、その周りの白い部分や、黒い色素沈着が見られる部分が網膜変性巣。白い矢印が周辺部健常網膜と網膜変性巣の境界で、ここから周辺部の網膜切除を行った。

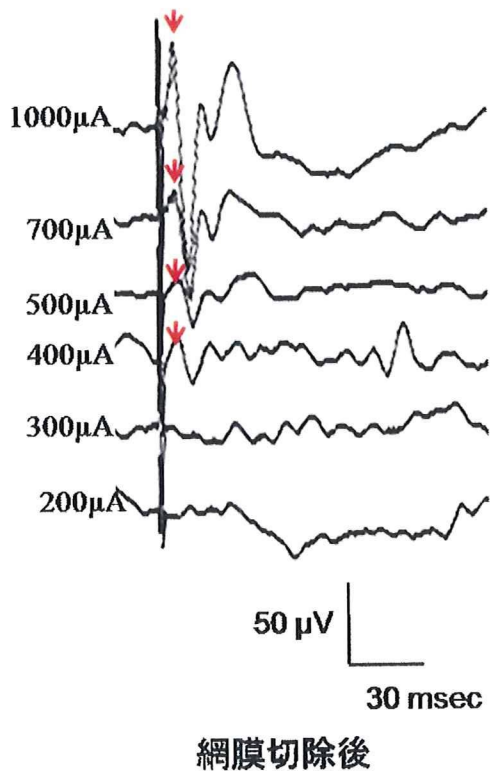
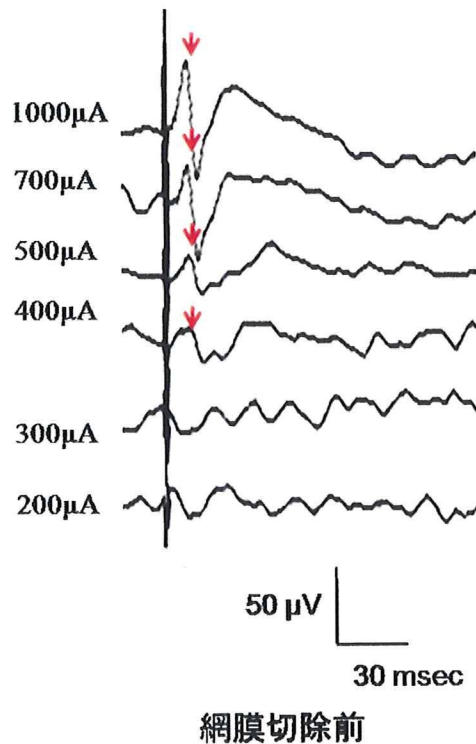


図5. 網膜切除前後の EEP の代表波形。網膜切除前後でも、矢印で示すような潜時や振幅がほぼ同じの EEP が得ることができた。

Current (μA)	Amplitude (μV) (網膜切除前)	Amplitude (μV) (網膜切除後)	P Value
1000	61.5±41.4	51.5±53.8	$P^t=0.700$
750	25.4±21.2	22.7±11.1	$P^t=0.694$
500	17.4±14.4	15.2±10.3	$P^t=0.456$
400	8.3±4.7	10.3±6.6	$P^t=0.508$

平均値±標準偏差 t Paired t tests

表1 網膜切除前後の各電流値での EEP の振幅の変化。それぞれの電流値で振幅に有意な変化を認めなかった。

Current (μA)	Implicit time(ms) (網膜切除前)	Implicit time (ms) (網膜切除後)	P Value
1000	10.5±3.0	8.4±2.1	$P^t=0.546$
750	11.7±4.7	12.9±4.8	$P^t=0.716$
500	12.2±5.1	11.0±5.8	$P^t=0.339$
400	14.0±5.8	11.4±6.0	$P^t=0.058$

平均値±標準偏差 t Paired t tests

表2 網膜切除前後の各電流値での EEP の潜時の変化。それぞれの電流値で振幅に有意な変化を認めなかった。

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作成に関する研究
-トランスジェニックラビットの局所網膜機能解析および人工視覚移植-

研究分担者 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

我々は人工視覚の移植および評価実験に有用な中型動物の視細胞変性モデルとして、ロドプシン P347L トランスジェニック (Tg) ラビットの作成に世界で初めて成功した (Kondo et al. IOVS, 2009)。この Tg ラビットの網膜の組織学的検査では、視細胞の変性は網膜中心部 (visual streak) で最も強く、生後 1 年の段階では網膜中心部から局所網膜電図が記録できないことがわかった。さらに今回、この生後 1 年の Tg ラビットの網膜中心部に 1 極の STS 型人工網膜を移植して電気刺激を行った結果、EER を誘発することに成功した。以上の結果により、我々の作成した Tg ラビットは人工視覚の移植実験に有用な動物モデルであることが示された。

A. 研究目的

我々のグループは、人工視覚の移植実験に有用な中型動物として、ラビットの視細胞変性モデルの作製を試みてきた。その結果、ロドプシン遺伝子変異 (Pro347Lau) をラビット遺伝子に導入してトランスジェニックラビット (Tg ラビット) を作成することに世界で初めて成功した (Kondo et al. IOVS, 2009)。

昨年までの研究によって、我々はこの Tg ラビットの視細胞変性メカニズムを解明し、また Tg ラビットの網膜電図 (ERG) の解析から、視細胞層が重度に障害されていても中層や内層の機能が保たれた状態であることを証明した。しかしながら、実際に人工視覚を移植する部位 (網膜の中心部) の視細胞の機能がある時期に完全に消失していることまでは証明していなかった。また、実際にそのような時期に網膜の中心部に

我々の研究班が開発した STS (脈絡膜上-経網膜電気刺激) 方式の人工視覚を移植して、実際に脳内誘発電位 (Electrical Evoked Potential: EEP) が記録できるかどうかは試していなかった。

そこで本年度は、(1) 生後 12 か月の Tg ラビットから黄斑部局所網膜電図を記録して、網膜中心部の視細胞機能が完全に消失していることを証明すること、(2) その時点の Tg ラビットの網膜中心部に STS 型人工視覚の刺激装置を移植して電気刺激を行い、EEP の記録が可能であるかどうかを確認すること、の 2 つを目的とした。本年度の研究の成果は、第 113 回日本眼科学会総会の評議員会指名講演 (平成 21 年 4 月 18 日、東京) でも報告した。

B. 研究方法

人工視覚の移植には、白色の NZW 種の家兎

よりも網膜における神経節細胞の密度が高い有色の Dutch 種家兎の方が有用であると考え、まず我々が作製した NZW 種の白色 Tg ラビットを Dutch 種のラビットと交配して、有色の Tg ラビットを作製した。これには、雄の NZW 種の Tg ウサギの精子を用いて、偽妊娠処理をした数匹の雌の Dutch 種ウサギに人工授精し、得られた仔ウサギを NZW 種の仮親に授乳させる方法で飼育した。

有色 Tg ラビットから網膜中心部の ERG を記録するために、我々は黄斑部局所 ERG を用いた。この装置では、赤外線眼底カメラで眼底を観察しながら、確実に目的部位（網膜中心部の visual streak）を光刺激することができる。我々は、刺激の強さに 30 cd/m^2 、背景光に 3 cd/m^2 の白色光（刺激時間は 100 ms 、刺激頻度は 5 Hz ）を用い、刺激スポットの大きさとして、視角 15 度の直径を有する円形のスポット刺激を使用した。

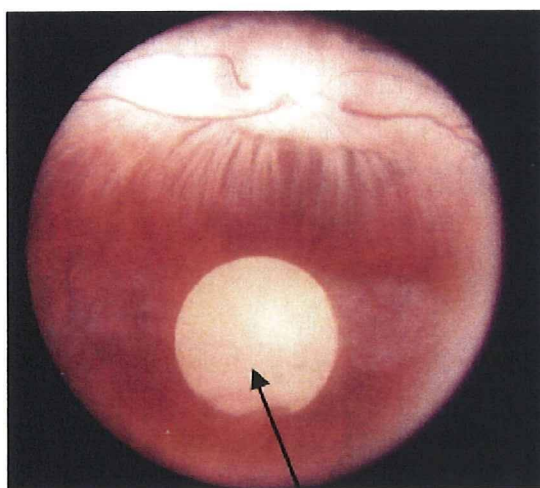


図 1: 有色の Tg ウサギの眼底の中心部に白色の円形刺激スポット(矢印)を照射して、黄斑部局所 ERG を記録している様子。

EPP の記録方法は、まず有色家兎をケタミンとキシラジンの筋肉注射で麻酔させた。その後、STS 型刺激電極（1 極、白金、直径

0.5 mm ）を強膜ポケット間に挿入して、縫合固定した。その後眼底を観察して、刺激電極が網膜中心部の visual streak 付近にあることを確認した。電気刺激装置（SEN-7203, 日本光電）はアイソレーション装置を経て STS 電極に接続された。刺激電流を $50 \mu\text{A}$ から $1000 \mu\text{A}$ に変化させて、biphasic パルス（ともに 0.5 ms ）で刺激を行った。

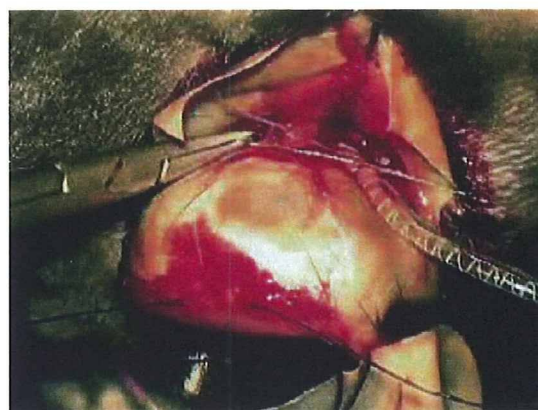


図 2: 有色の Tg ウサギの後極部に強膜ポケットを作製し、その間に刺激電極を挿入して、5-0 ダクロン糸で固定している様子。

EPP は、家兎の頭皮を切開して頭蓋骨を露出させたのちに、ネジ型電極を埋め込んで記録電極とした。

（倫理面への配慮）

今回の研究は、名古屋大学医学部の実験動物委員会の承認の下で行なった。動物の苦痛は最小限とし、ARVO の動物実験取り扱い規約を遵守した。

C. 研究結果

まず、刺激電極を埋め込む部位である visual streak（網膜中心部）の視細胞変性が周辺部よりも重症であることを、光学顕微鏡による組織検査で確認した。

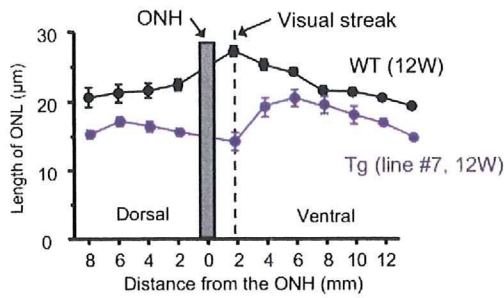


図 3: 生後 3M の Tg ラビットにおける、視神経乳頭を通る垂直断面の様々な部位における外顆粒層 (outer nuclear length: ONL) の長さのプロット。黒が野生型 (WT) で、青が Tg である。

そこで我々は、生後 12 週の Tg ウサギと野生型ウサギの垂直断面の網膜組織切片を作製し、2 mm おきに外顆粒層の厚みを計測した。その結果、Tg ウサギの視細胞変性は visual streak で最も強く、網膜周辺部では変性が比較的軽いことがわかった (図 3)。ウサギでは杆体の密度が中心部の visual streak で最も高く、そのために変異ロドプシンの発現もこの部位で高いために中心部の変性が最も重度になったと考えられた。

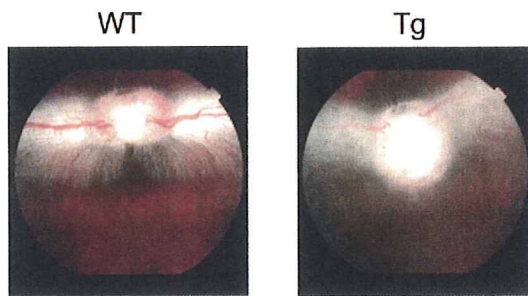


図 2. 生後 48 週の有色の野生型 (WT) とトランスジェニック (Tg) ラビットの眼底写真。Tg ラビットでは眼底の色調が暗く、網膜血管も WT よりも細いことがわかる。

次に我々は、生後 12 か月の有色の野生型と Tg ラビットの網膜中心部 (visual streak) から黄斑部局所 ERG を記録した。

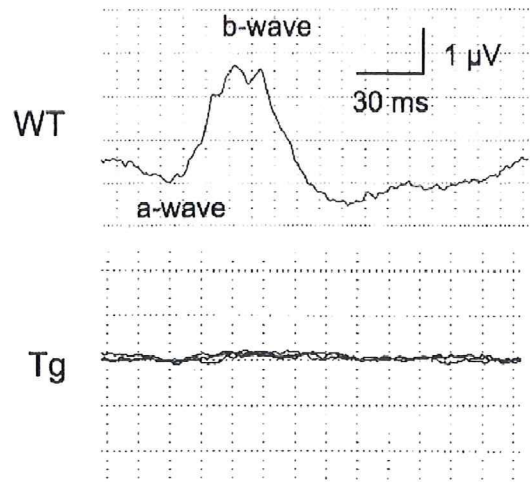


図 5: 生後 12 か月の有色の野生型 (WT) と Tg ラビットの網膜中心部 (visual streak) から記録した黄斑部局所 ERG

その結果、野生型ラビットの visual streak からは 2-3 microV 程度の局所 ERG が記録され、a 波や b 波に加えて網膜内層電位である律動様小波もきれいに記録されたが、生後 12 か月の Tg ラビットからは、全く局所 ERG が記録されなかった。この結果により、Tg ラビットの網膜においては視細胞の変性は網膜中心の visual streak で最も強く、生後 12 か月ではこの部位における視覚機能はほぼ消失していることがわかった。

そこで、我々はこの生後 12 か月の Tg ラビットの visual streak 付近の強膜ポケット内に刺激電極を移植して電気刺激し、脳内に誘発された電位 (EEP) を記録した。刺激電流は、50 μ A から 1000 μ A に変化させて、biphasic パルス (ともに 0.5 ms) で刺激を行った。

その結果、野生型ラビットと比較して Tg ラビットでは閾値は低いものの (WT 200-250 μ A, Tg 400-500 μ A)、Tg ラビットで全く視機能のない visual streak 部位の

電気刺激で EEP を誘発することができた (図 5)。

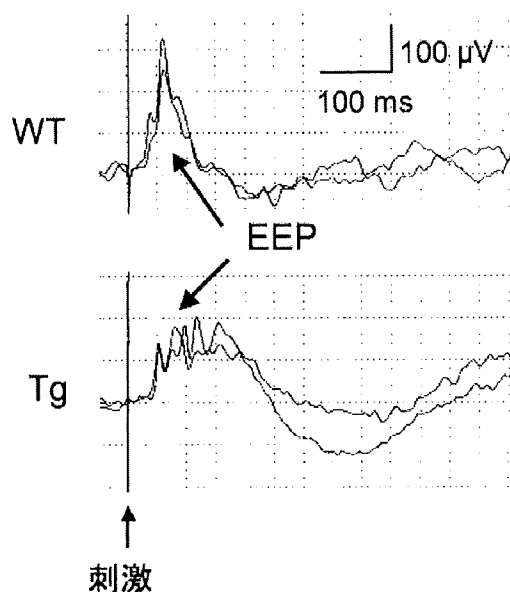


図 5: 生後 12 か月の野生型ラビット(WT)と Tg ラビットに対して STS による電気刺激で記録された EEP。刺激の条件は、biphasic cathodic first, duration 0.5ms で 750μA。Tg ラビットからも EEP が記録されていることがわかる。

D. 考察

今回の研究では、我々の作製した Tg ラビットが STS 型人工視覚を移植してその効果を評価するのに適切な動物モデルであるかどうかを研究した。

我々はまず、通常の光学顕微鏡所見で Tg ラビットの網膜断面を観察し、部位による変性の程度の違いを調べた。その結果、Tg ラビットでは網膜中心部 (visual streak) の障害が最も強く、周辺部に向かうにつれて変性の程度が軽くなることがわかった。興味深いことに、ロドプシン遺伝子に変異を有するイヌやブタにおいても我々の Tg ウサギと同様に網膜中心部において視細胞変性が最も強いことが報告されており、

我々の結果もこれらに一致する所見であると考えられた。

Tg ラビットでは、生後 12 か月で網膜の色調には明らかな変化がみられる。そこでこの時期における網膜中心部の機能を黄斑部局所 ERG を用いて調べた。その結果、生後 12 か月では黄斑部局所 ERG は平坦になっており、この次期において Tg ラビットの網膜中心部の機能は重度に障害されていることがわかった。そこで、この時期に visual streak 付近に STS 電極を移植して EEP が記録されれば、失明している Tg ラビットの網膜中心部位が人工視覚によって光覚を再獲得しうることを証明できると考えた。実際に STS 電極を Tg ラビットに移植して電気刺激することによって、頭蓋表面より誘発反応を記録することに成功した。この結果により、我々の作製した Tg ラビットは人工視覚の移植実験に有用な RP 中型モデル動物であることがわかった。

E. 結論

今回の結果により、我々の作製した Tg ラビットは網膜の中心部において視細胞変性が最も強く、生後約 1 年で網膜中心部からは ERG 反応が記録できないことがわかった。この時期に中心部に STS 電極を移植して EEP を記録できたことによって、我々の研究班が開発した STS 電極が視機能を再獲得できる装置であることを証明するとともに、この Tg ラビットが人工視覚の実験に有用な RP の中型モデル動物であることを証明することができたといえる。

今後は STS 型電極の長期移植の成績と多極電極の移植の結果についてもさらに検討していく予定である。