

200920001B

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）法による人工網膜の臨床応用

平成 19 年度～21 年度 総合研究報告書

主任研究者 不二門 尚

平成 22 年（2010）年 7 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）法による人工網膜の臨床応用

平成 19 年度～21 年度 総合研究報告書

主任研究者 不二門 尚

平成 22 年（2010）年 7 月

## 目次

I. 総合研究報告	
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 .....	1
	不二門 尚
	(分担研究者：大路正人、平形明人)
II. 分担研究報告	
1. 視細胞変性の中型モデル動物作成に関する研究 .....	1 3
	分担研究者 近藤 峰生
2. 膜電位イメージングを用いた解析法の確立 .....	2 1
(STS 型人工網膜の機能評価)	分担研究者 澤井 元
3. 網膜下刺激電極の開発 .....	2 7
	分担研究者 太田 淳
4. 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 .....	3 3
	分担研究者 小澤 素生
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	4 1
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	4 3

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
総合研究報告書

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

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

研究要旨

これまで網膜色素変性に代表される難治性の網膜疾患によって、視細胞が変性し重度視覚障害に至った場合、現在のところ有効な治療法は存在しなかった。このような場合でも、網膜内層の神経細胞は比較的残存しており、網膜への電気刺激により擬似的な光感覚が生じることは、これまでの我々の研究から明らかにされている。このような患者の網膜に刺激電極を埋植しカメラで取得した画像情報をもとに電気刺激することで視覚再建をめざす「網膜刺激型電極による人工視覚システム」の研究を行ってきた。

先行する6年間（2001年-2006年）の人工視覚研究において本邦独自の方式であるSTS法を考案し、この方式で眼前指数弁程度の人工視覚が得られることを急性動物実験で実証した。そしてSTS法による人工視覚システムを開発した。また、視神経に対する電気刺激が網膜神経節細胞に対して保護的な作用を持つことも明らかにしてきた。本研究期間では、そのSTS法による人工視覚の臨床応用を目指し研究開発を行った。

1年目(2007年)は、正常被験者の強膜に電極を設置し通電を行うことで電気刺激パラメータと擬似光覚の関係について検討を行った。また、人工視覚システムの適応および効果を調べるために新しい網膜評価法である補償光学眼底カメラおよびOptical Imaging眼底カメラの開発を行った。さらに、中型動物における光障害による網膜障害モデルを作成し、人工視覚システムが有効に機能するか検討した。2年目(2008年)は、臨床試験に用いる電極の安全性評価のため、家兎に対して長期間埋植し網膜への影響を調べた。また、同時に大電流通電による網膜障害についても検討した。これらの結果を踏まえ急性臨床試験を行い、開発した多極電極が網膜色素変性の患者で有効に機能することを確認した。3年目(2009年)は、患者への慢性埋植試験を目指し生体内へ長期埋植を目指した人工網膜システムを開発し、この生体安全性および耐久性を評価するべくビーグル犬への3ヶ月にわたる慢性埋植を実施し、有害事象が生じないことを確認した。献体への埋植を実施し効果的かつ安全に装置を埋植するための手術法について検討を行った。また、長期間の電気刺激による網膜神経保護効果についても検討した。

以上をまとめると、本邦独自の方式であるSTS法を採用した人工視覚システムを開発し、長期間の慢性生体埋植に対する安全性および有効性を確認することができた。このことは、我々が開発したSTS方式による人工視覚システムが臨床応用可能であることを示唆するものである。

主任研究者

田野保雄

大阪大学大学院医学系研究科  
眼科学 教授（2007-2008）

分担研究者

澤井元

大阪大学大学院医学系研究科  
統合生理学 准教授  
（2007-2009）

太田淳 奈良先端科学技術大学院大学  
物質創成科学研究科 教授  
(2007-2009)  
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  
(2007-2009)

平形明人 杏林大学医学部眼科学 教授  
(2007-2009)  
大路西正人 滋賀医科大学眼科学 教授  
(2007-2009)  
小澤素生 株式会社ニデック 社長  
(2007-2009)

## A.研究目的

網膜色素変性に代表される難治性の網膜疾患によって、視細胞が変性し重度視覚障害に至った場合、現在のところ有効な治療法は存在しない。このような場合でも、網膜内層の神経細胞は比較的残存しており、網膜への電気刺激により擬似的な光感覚が生じることが知られている。この現象を利用し、カメラで取得した画像を元に網膜近傍に埋植した多極電極で網膜を刺激することで視覚の再建を目指す網膜刺激型電気刺激による人工視覚システムの研究を行ってきた。

先行する6年間(2001年-2006年)の人工視覚研究において本邦独自の方式であるSTS法を考案し、この方式で眼前指数数程度の人工視覚が得られることを動物実験と急性臨床試験で実証した。さらに、網膜や視神経への電気刺激が神経保護効果を持つことを明らかにした。

本研究期間では、STS法による人工視覚システムの臨床応用に向けて、慢性臨床試験が開始できる直前の完成度が高いものになることを目指して研究開発を行った。

研究は、電極および体内装置の電子回路等の開発を工学側の研究者が行い、網膜刺激電極評価用の動物モデルや評価法の開発、人工視覚システムの適応を判断するための術前検査の開発、機能性および生体適合性、残存する網膜神経細胞の保護などの研究を医学側の研究者が平行して緊密に連絡をとりながら行うこととした。動物実験は、各研究者の所属施設での実験動物委員会の承認の下で、ARVOの動物実験取り扱い規約を遵守し動物の苦痛を最小限として行なった。臨床研究は患者様のプライバシーに十分配慮し、学内の倫理委員会の許可を得た上で行うことにした。

1年目は中型動物での視細胞障害モデルの確立、

残存する視細胞の画像診断法(~2008年度)および網膜刺激電極評価のための網膜賦活部位の機能的画像診断法(~2009年)を行った。刺激パラメータの最適化のために、健常人で経強膜刺激による擬似光覚の評価を行った。

2年目には、工学側で新型の網膜刺激電極が開発された。まず、電極の安全性を検証するため、有色家兎にこの電極を慢性的に埋植し網膜組織への影響を調べた。得られた結果を踏まえ、1年間埋植急性臨床試験を実施し、この多極電極で有効に擬似光覚を惹起可能検討した。術前に記録した経角膜刺激(TES)による擬似光覚の結果と急性臨床試験の結果を比較して、TESが人工網膜の術前検査に応用できないか検討した。

3年目には、工学側で試作された亜急性臨床試験用の体内装置を用い、ヒト頭部への埋植術式の検討や、犬(ビーグル種)に体内装置を慢性埋植し生体適合性および体内装置の耐久性を検証した。また、電気刺激による網膜神経細胞の保護効果を高めるため電気刺激の最適パラメータについて検討した。

## B.研究方法

### 2007年度

1. 中型動物による視細胞障害モデル動物作成: 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検討した。照射前後に、眼底写真、蛍光眼底造影検査、網膜電図を測定した。その後、眼球摘出を行い、HE染色による組織学的評価を行った。

2. 網膜神経細胞の機能的、解剖学的評価システムの開発: 補償光学を用いた超高精度の眼底カメラを開発し、Occult macular dystrophyなどのジストロフィー症例の撮影を行った。また Optical



Imaging 眼底カメラにて STS 法による網膜神経活動を計測し、その強度及び広がりに関して検討した。

3. 経強膜刺激による擬似光覚の評価： STS の急性臨床試験では、電極埋植手術のため被験者への負担が大きいため、同一被験者に対して繰り返し実験を行うことが難しい。そこで、臨床試験向けに被験者への侵襲が小さく STS と類似した刺激手法（経強膜刺激法）を考案した。この手法では改造したコンタクトレンズ型を用いて眼外から網膜へ局所的に電気刺激を行う。この実験手法を用い刺激パラメータと擬似光覚との関係について調べた。

#### 2008 年度

1. STS 方式による刺激電極の急性臨床試験：新しく臨床試験用に開発された高耐久性の多極電極を用いて 2 名の RP 患者に対して STS の急性臨床試験を実施した。さらに術前検査として経角膜刺激(TES)による擬似光覚の広がりを記録した。この多極電極で擬似光覚を惹起可能かどうか検討した。また、TES の結果と STS の結果を比較して TES 検査の有用性について検討した。

2. 生体適合性評価：急性臨床試験で使用した多極電極の長期埋植における安全性を評価するため、有色家兎 6 眼に対してダミー 9 極電極の 1 年間埋植を行った。眼底写真及び蛍光眼底造影を行い、損傷の評価を行った。また眼球摘出後に電極接触部位の網膜組織標本を作製した。さらに、埋植後の電極形状を走査型電子顕微鏡で観察した。

3. 網膜神経の解剖学的評価方法の検討：2007 年度に引き続き開発した補償光学を用いた超高精度の眼底カメラを用いて微小黄斑円孔、工業用レーザー障害といった視細胞外節の変性が限局する複数の症例検討を行い、さらに光干渉断層計所見との比較を行った。

4. 中型動物における視細胞障害モデルの作成：2007 年度に行ったベルテポルフィンと赤色 LED 光を用いた光障害モデルの 1 年の長期経過をみるとともに、ヒト埋植用と同型の刺激電極を埋植し、STS の際の刺激パラメータを変化させて誘発電位を記録した。

#### 2009 年度

1. 体内装置の耐久性の検討および埋植手術の術式検討：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、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。

2. 中型動物における視細胞障害モデルの作成：2008 年度に引き続きベルテポルフィンと赤色 LED 光を用いた光障害モデルにて STS の電気誘発電位 (EEP) を記録した。今回は特にこのモデルで 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。

#### 3. 電気刺激による神経保護効果の検討

ラットの網膜神経節細胞 (RGC) を逆行性に標識するためにフルオゴールドを上丘に注入し、1 週間後に左眼の視神経を切断した。直後にコンタクトレンズ型電極を眼球の表面にのせて角膜から網膜、視神経に対して TES を行い、パルスパラメータを変え神経保護効果に変化が生じるか検討した。

### C. 研究結果

#### 2007 年度

1. 中型動物による視細胞障害モデル動物作成：ベルテポルフィンと赤色 LED を用いた光照射により広範囲において視細胞を選択的に障害することに成功した。組織像は、ヒトの末期の色素変性患者やイヌの視細胞変性モデルの網膜の組織と同様の特徴を有していた (図 1 上)。さらに、この障害部位に STS 法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) を測定することにも成功した (図 1 下)。この結果は、有色家兎に対してベルテポルフィンと赤色 LED を用いた光照射で作成される視細胞障害モデルが、人工視覚の実験のための貴重な疾患モデルとなりえることを示すものである。

2. 網膜神経細胞の機能的、解剖学的評価システムの開発：補償光学眼底カメラによる Occult macular dystrophy 症例の撮影では、視細胞の変性を直接示すと思われる所見の他、バックグラウンドの大きなモザイクの斑状変化を認めており、視細胞より外層の組織(網膜色素上皮、脈絡膜)の変性も示唆された。

また、Optical Imaging法でSTSに対する網膜の反射光量の分布を調べたところ、刺激電流値に応じて反射光量変化部位面積が増加した(図2)。さらに視交叉における誘発電位と反射光量変化部位面積を比較すると両者がよく相関することが分かった。この結果からoptical imagingで計測された反射光量変化部位面積は、与えた電気刺激によって起こった網膜神経節細胞の数と相関することが示唆される。

3. 経強膜刺激による擬似光覚の評価：経強膜刺激実験の結果、擬似光覚は電流値の増加にともない明るく自覚され、さらにパルス頻度が20~50 Hzの時に最も明るく自覚された(図3)。また明るい擬似光覚が得られる時のパルスパラメータと、電極個数と同じ数の擬似光覚が得られるときのパルスパラメータはほぼ一致していた。これらの知見は、STS法の人工視覚システムに応用可能と考えられる。

## 2008年度

### 1. STS方式による刺激電極の急性臨床試験

開発した多極電極によりSTSを行ったところ、2例ともで擬似光覚が得られた。一例目の症例では、9極のうち8極の電極で反応が得られた。最も低い閾値で400 $\mu$ Aだった。その周囲の電極の閾値も低く500 $\mu$ Aでそれらの電極の位置とフォスフェンが対応していた。2例目の症例では、1極では擬似光覚が得られず複数の電極を同時に1mAの電流で刺激したときに、擬似光覚が得られた(図4)。

TES検査とSTSの結果を比較するとTESで閾値が低いほどSTSで反応が得られた電極の数も多かった。このことから閾値が低いほどより広範囲に網膜内層機能が残存していると考えられTES

検査は人工視覚の埋植患者の適応を決めるための網膜内層機能の評価法として有用であると考えられる。

### 2. 生体適合性評価

一年間の長期埋植に対し約半数の電極接触部位において、軽度の網膜視細胞損傷を示唆する所見を得た(図5)。損傷の原因としては、強膜ポケットが深い症例においてのみ損傷所見を認めた事、走査型電子顕微鏡において電極自体の変化を認めなかった事から、電極の素材というより突出した形態による圧迫によるものが大きいと考えられる。

### 3. 網膜神経の解剖学的評価方法の検討

黄斑ジストロフィーなど黄斑部全体が障害されている病変でモザイク構造が観察される頻度が減少した。微小黄斑円孔、工業用レーザー障害、Acute zonal occult outer retinopathyといった病変が黄斑部に限局する症例では、病変部周辺の視細胞モザイク構造は正常に近く、病変部のみモザイク構造の抜けが見られた(図6上)。補償光学眼底画像を光干渉断層計所見と照合し、網膜構造と画像の明瞭度との関係について検討したところ、視細胞外節に相当する部位が厚い症例ほど明瞭な画像が得られる傾向を認めた(図6下)。

### 4. 中型動物における視細胞障害モデルの作成

照射後1年を経過した視細胞障害モデルでも、神経節細胞は温存され、STSに対する誘発電位を誘発することができた。また、刺激パルスパラメータを変化させた場合、biphasic pulseの刺激電流では、anodic first、cathodic firstいずれを用いた場合でも閾値は大きく変わらなかった。

## 2009年度

1. 体内装置の耐久性の検討および埋植手術の術式検討：献体を用いた術式検討により、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、手術に要したケーブル長は合計185mmで想定内に収まった(図7)。

これらの知見を受け、ビーグル犬に対して最大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(表1)。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(図8)。

## 2. 中型動物による視細胞障害モデル動物作成:

ベルテポルフィンと赤色LED光を用いた光障害モデルへのSTSによるEEPを測定したところ、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。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検索などに有用なモデルであることが確認された。

## 3. 電気刺激による神経保護効果の検討

TESのRGCに対する神経保護効果は、刺激条件によって変化した(図9)。最適な刺激条件はパルス幅1-3ms、電流強度100-200 $\mu$ A、刺激周波数1-20Hz、刺激時間30分以上、刺激波形対称性両相矩形波、インターパルスなし、刺激回数4回だった。

## D. 考察

先行する6年間(2001-2006年)の人工網膜研究において、我々は本邦独自の方式である脈絡膜上経網膜電気刺激(STS方式)を開発し、様々な動物実験で人工視覚が得られることを確認した。また、急性臨床試験で2点弁別可能な擬似光覚を誘発可能であることを確認した。さらに、視神経や網膜への電気刺激が神経保護的な作用を持つことも明らかにしてきた。本研究機関(2007年-2009年)においてはこの技術を臨床応用へ発展させることを目的に、慢性臨床試験が開始できる程度の完成度の高いシステムの開発とその耐久性、安全性、有効性を評価すべく研究を行った。

2007年においては中型動物による視細胞障害モデル作成に着手し、ベルテポルフィンと赤色LEDを用いた光照射により視細胞を選択的に障害できることを確認した。同時に、患者の視細胞障害の程度を詳細に測定するために補償光学眼

底カメラを開発しOccult macular dystrophy症例の撮影にて、特徴的な変化を捉えることに成功した。また、人工網膜の有効性の検討のためOptical Imaging眼底カメラを開発し、網膜内の反射光量の変化部位面積が神経活動と関連することを確認した。さらに、新しく開発したコンタクトレンズ型の強膜刺激電極を用いて最適パルスパラメータの検討を行い、パルス頻度が20~50Hzのときに最も明るい擬似光覚が得られることを確認した。この刺激パラメータの知見を元に2008年には、新しく臨床試験用に開発した多極電極にて、急性の臨床試験を実施し有効に擬似光覚が得られることを確認した。このとき、事前の術前検査として角膜電気刺激(TES)を行ったが、TESで得られた擬似光覚の閾値および光覚の範囲がSTSで得られた結果と良く相関していることから、TESが人工網膜の適応症例を決めるための有効な術前検査となりうることが示唆された。さらに急性臨床試験で用いた多極電極を長期的に生体内で使用することを目的に生体適合性評価を行った。その結果、一部の電極において網膜圧迫による軽度の網膜視細胞損傷を示唆する所見を得たため、電極形状の設計変更を行うことで安全性を向上させた。また、補償光学眼底カメラの開発を引き続き進めた。微小黄斑円孔、レーザー障害、Acute zonal occult outer retinopathyといった従来の眼底カメラでは検出困難な視細胞障害の症例に対して、補償光学眼底カメラで病変を捕られることを確認した。視細胞障害モデルの作成については、照射後1年を経過した例でも、神経節細胞が温存されることを確認でき、人工網膜評価のための実験系になりうることを示唆された。2009年度は、引き続き中型動物による視細胞障害モデルに対してSTSを行い、そのときに生じる誘発電位を評価した。その結果、周辺部の健常網膜が誘発電位の結果に影響を与えていなかった。このことは、我々が作成した視細胞障害モデル動物は有用であることを示すものである。一方、慢性埋植臨床試験に向けて上記の多極電極を搭載した体内装置が開発され、これを用いての献体による術式検討を行った。この知見を元に犬に対し



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ことが確認された。また、電気刺激による神経保護効果の検討の結果、刺激周波数1-20Hzで網膜神経節細胞の神経保護効果が最も効果的であったことから、STSの臨床試験にて用いる周波数(20Hz)でも同様の神経保護効果が期待できる。

以上をまとめると本邦独自の方式であるSTS法を採用した人工視覚システムを開発し、長期間の生体埋植に対する安全性および耐久性そして多極電極の有効性を様々な動物実験を通じて確かめることができた。慢性臨床試験への直前の段階までたどり着くことできたといえる。同時に、人工網膜の適応診断のために、補償光学眼底カメラやTESによる擬似光覚の検査など様々な新しい評価手法を開発することができた。今後は、慢性臨床試験を実施し、人工網膜の効果や術後のリハビリテーションなど実用化に向けた研究をさらに進める必要がある。

## E. 結論

今回慢性試験に向けて多極電極開発を行いその安全性および有効性を評価した。さらにその電極を搭載した体内装置を開発し、その術式開発の検討および長期生体埋植を行うことで耐久性や安全性を示すことができた。臨床応用に向け大きく近づいたといえる。

今後はこの体内装置を用いて1~2ヶ月程度の慢性臨床試験を実施し、人工網膜の効果や術後のリハビリテーションなど、より実用化に向けた研究を進める必要がある。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表 (代表的なもの)

- (1) Morimoto T, Fujikado T, Choi JS, Kanda H, Miyoshi T, Fukuda Y, Tano Y. Transcorneal Electrical Stimulation Promotes the Survival of Photoreceptors and Preserves Retinal Function in Royal College of Surgeons Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:4725-4732.
- (2) Nakauchi K, Fujikado T, Kanda H, Kusaka S, Ozawa M, Sakaguchi H, Ikuno Y, Kamei M, Tano Y. Threshold suprachoroidal-transretinal stimulation current resulting in retinal damage in rabbits. *J. Neural Eng.* 2007;4:S50-S57.
- (3) Fujikado T, Morimoto T, Kanda H, Kusaka S, Nakauchi K, Ozawa M, Matsushita K, Sakaguchi H, Ikuno Y, Kamei M, Tano Y. Evaluation of Phosphenes Elicited by Extraocular Stimulation in Normals and by Suprachoroidal-Transretinal Stimulation in Patients with Retinitis Pigmentosa. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:1411-1419.
- (4) 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. *IOVS* 2007.
- (5) Sato T, Fujikado T, Lee TS, Tano Y. Direct Effect of Electrical Stimulation on Induction of Brain-derived Neurotrophic Factor from Cultured Retinal Mueller Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:4641-4646.
- (6) Kitaguchi Y, Fujikado T, Bessho K, Sakaguchi H, Gomi F, Yamaguchi T, Nakazawa N, Mihashi T, Tano Y. Adaptive Optics Fundus Camera to Examine Localized Changes in Photoreceptor Layer of Fovea. *Ophthalmology.* 2008;115:1771-1777.
- (7) 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;12:206-209.
- (8) 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.
- (9) 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;51:2263-2268.
- (10) 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;90:285-291.
- (11) Kondo M, et al. Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:1371-1377.
- (12) Tokuda T, Asano R, Sugitani S, Taniyama M, Terasawa Y, Nunoshita M, Nakauchi K, Fujikado T, Tano Y, Ohta J. Retinal stimulation on rabbit using CMOS-based multi-chip flexible stimulator toward retinal prosthesis. *Jpn J Appl Phys*. 2008;47(4):3220-3225.
- (13) Tokuda T, Hiyama K, Sawamura S, Sasagawa K, Terasawa Y, Nishida K, Kitaguchi Y, Fujikado T, Tano Y, Ohta J. CMOS-based multichip networked flexible retinal stimulator designed for image-based retinal prosthesis. *IEEE Trans. Electron Devices*. 2009;56(11):2577-2585.
- (14) Ohta J, Tokuda T, Sasagawa K, Noda T. Implantable CMOS biomedical devices. *Sensors*. 2009;9:9073-9093.
- (15) Terasawa Y, Uehara A, Yonezawa E, Saitoh T, Shodo K, Ozawa M, Tano Y, Ohta J. A Visual Prosthesis with 100 Electrodes Featuring Wireless Signals and Wireless Power Transmission. *IEICE Electronics Express(ELEX)*. 2008;5(15):574-580.
2. 学会発表 (代表的なもの)
- (1) T. Fujikado, Y. Okawa, T. Morimoto, K. Matsushita, T Miyoshi, Y. Hirohara, T. Mihashi [Optical Imaging and Pupil Reflex by Trans-corneal Electrical Stimulation to Evaluate Inner-Retinal Function] *IEEE・ICME*, 2007
- (2) T. Fujikado, Y. Okawa, T. Miyoshi, Y. Hirohara, T. Mihashi, Y. Tano [Optical imaging of the retina in response to the electrical stimulation] *SPIE*, 2008
- (3) T. Fujikado, Y. Okawa, T. Miyoshi, Y. Hirohara, T. Mihashi, Y. Tano [Contribution of Retinal Ganglion Cells to Intrinsic Signals in Retinal Optical Imaging by Trans-Corneal Electrical Stimulation or by Light Stimulation] *ARVO*, 2008
- (4) T.Fujikado, Y.Tano [Suprachoroidal-Transretinal Stimulation (STS) Generates EEP In a Middle-Sized Animal Model of Retinal Degeneration] *ARVO*, 2008
- (5) Takashi Fujikado, Transcorneal electrical stimulation, for diagnosis and treatment of retina or optic nerve diseases.50th Taiwan ophthalmological Society, Taipei, November 17, 2009 (Invited)
- (6) 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. 特願2008-060334 「通信回路及びこれを備えた視覚再生補助装置」
  2. 特願2008-24461 「視覚再生補助装置」
  3. 特願2008-4838 「視覚再生補助装置」
  4. 特願2008-124026 「視覚再生補助装置」
  5. 特願2008-225345 「視覚再生補助装置」
  6. 特願2008-255828 「視覚再生補助装置」

7. 特願2009-21914「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」
8. 特願2009-32792「視覚再生補助装置」
9. 特願2009-8804「電力伝送回路及びこれを備えた視覚再生補助装置」
10. 特願2009-135167「視覚再生補助装置」
11. 特願2009-135207「視覚再生補助装置」
12. 特願2009-179331「視覚再生補助装置及び視覚再生補助装置の製造方法」
13. 特願2009-257141「視覚再生補助装置」
14. 特願2009-273850「視覚再生補助装置」

[図および説明]

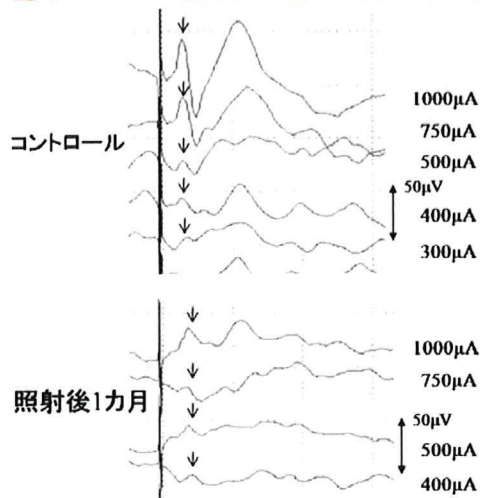
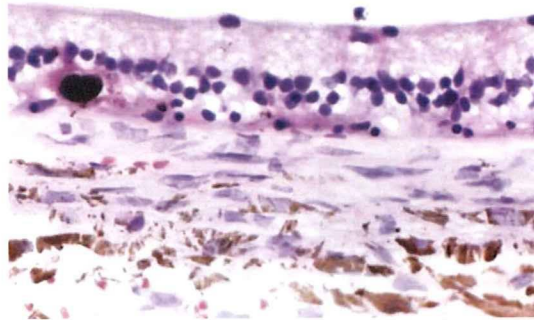


図 1 : (上) 照射後 1 カ月の 400 倍の HE 染色。視細胞層、外顆粒層が完全に消失しているが、網膜内層は温存されている。  
(下) 照射後 1 か月のコントロール眼と照射部位それぞれに STS 方式の刺激電極を入れたときの EEP。コントロール眼よりは小さいものの、照射眼でも EEP が誘発された。

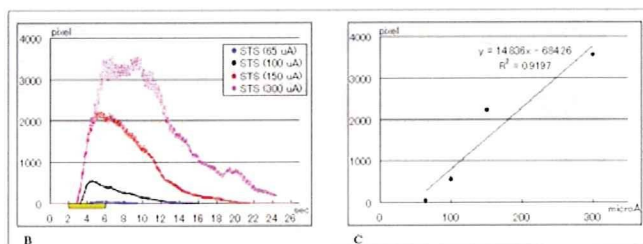
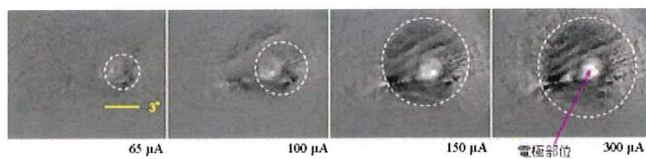


図 2: STS の Optical Imaging 結果(上)と、反射光量変化部位面積の経時変化(左下)及び刺激電流値との相関(右下)

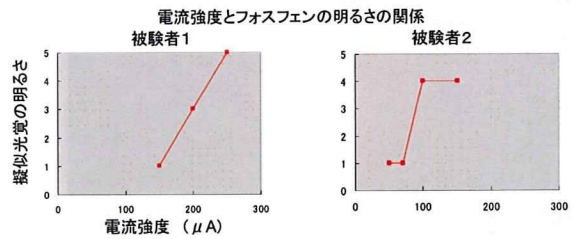
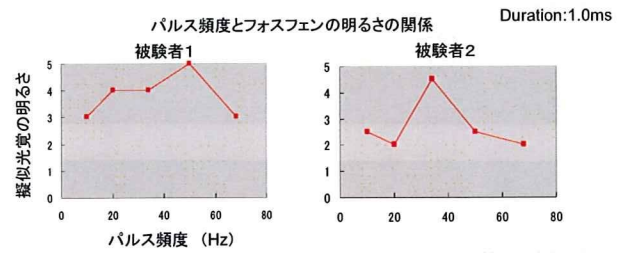


図 3 : 擬似光覚の明るさとパルスパラメータの関係。

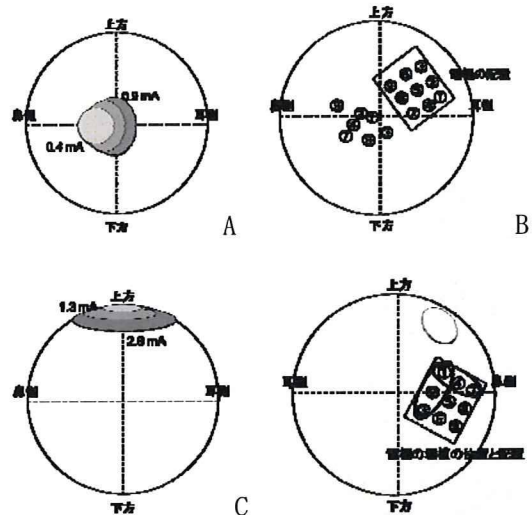


図 4 : 症例 1 ; TES のフォスフェン発生部位と刺激電流値 (A) と STS の刺激電極位置とフォスフェン発生部位 (B)、症例 2 ; フォスフェン発生部位と刺激電流値 (C)、STS の刺激電極位置のフォスフェン発生部位 (D)。





図5：埋植した電極(上)と電極挿入部の眼底写真。電極が透見される。透見の程度は電極により異なる。

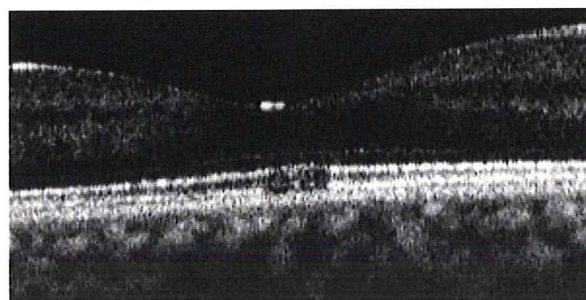
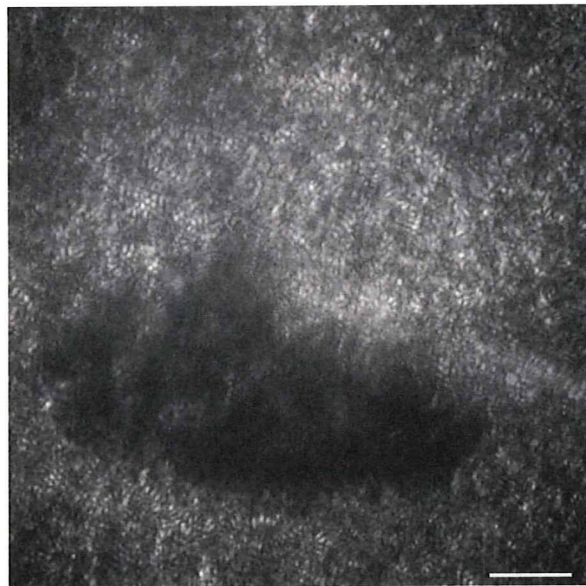


図6：微小黄斑円孔症例の補償光学眼底所見(上)とフーリエドメイン光干渉断層計所見(下)

41歳男性(微小黄斑円孔)。補償光学眼底所見にて黄斑部に $300 \times 180 \mu\text{m}$ のモザイク欠損を認める。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ 。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。

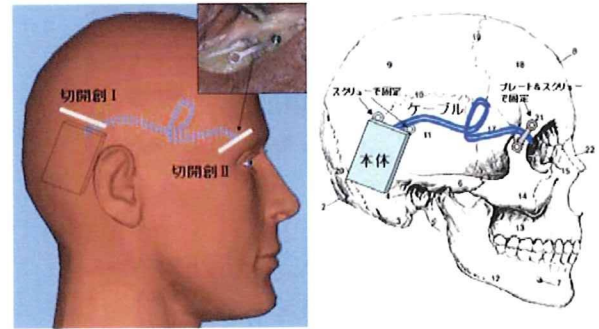


図7：体内装置の献体への埋め込み模式図。(上図)切開創IIにて眼窩縁の骨にケーブル用の溝を作り、その上からプレートで固定することでケーブルを安定して留置することができた。(下図)本体とケーブルの設置模式図。スクリュー2本を使い本体を頭蓋骨に固定した。

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。

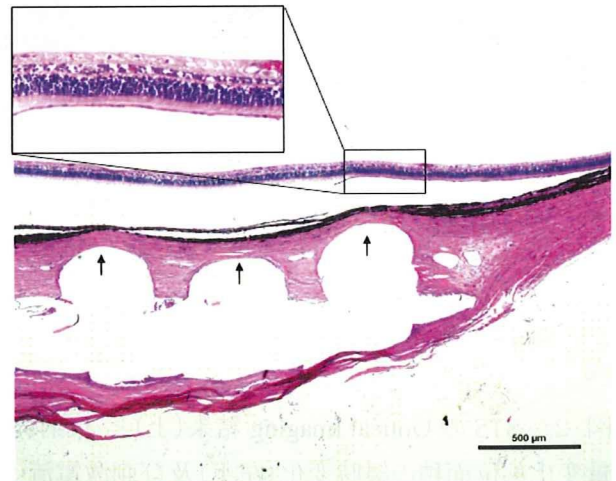


図8：電極埋植部付近の眼球組織標本。矢印は、

電極先端が設置してあった部位を示す。埋植による網膜損傷は発生しなかった。

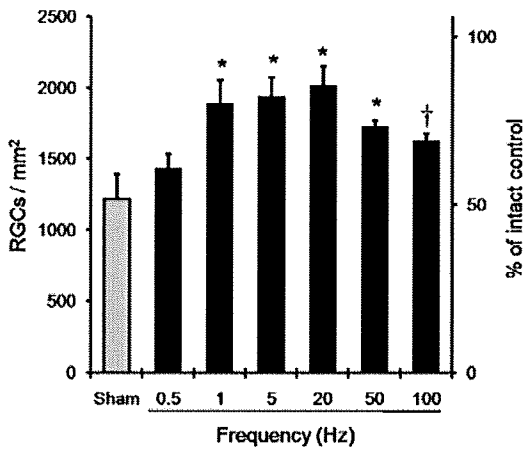


図9：刺激周波数による TES の神経保護効果の変化



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

分担研究者 近藤 峰生 名古屋大学大学院医学系研究科感覚器障害制御学 准教授

研究要旨

我々は、これまでに人工視覚の移植実験に有用な本邦オリジナルの中型動物の網膜色素変性モデルの作成を試みてきた。先行する6年間の研究(2001-2006年)までの段階で、ロドプシン遺伝子の347番目のProをLeuに置換したトランスジェニックウサギ(Tgウサギ)を作成することに世界で初めて成功した。本研究期間は、このTgウサギの網膜変性過程を、変異遺伝子の発現量の定量、組織学的検査、および網膜機能検査(網膜電図)によってTgウサギの網膜各層の障害の程度を明らかにすることを目的に研究を行った。網膜電図の結果により、このTgウサギは早期に杆体機能が消失するものの、錐体機能は比較的保存されているという特徴を有していることがわかった。また組織学的検査により、Tgウサギは進行性に網膜の外顆粒層(視細胞層)の減少を示すが、その程度は網膜中心部にあたるvisual streak付近で最も強いことがわかった。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

これまでに我々は、先行研究期間(2001-2006年度)の成果として、人工視覚の移植実験に適した中型動物の視細胞変性モデルとして、ロドプシン遺伝子変異(Pro347Leu)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)。本研究期間の研究の一つ目の目的は、安定して視細胞変性がおこるラインを樹立することファウンダーの次の世代(F1)の系統を完全に樹立させることである。二つ目の目的は、作成したTgラビットの網膜変性の様式を、眼底検査、変異遺伝子の発現定量、網膜組織切片、電子顕微鏡所見、および網膜電図(ERG)によって、進行性に視細胞が変性していくメカニズムを明らかにし、視細胞障害後の網膜中層や内層の機能の状態を調べ人工視覚の移植実験に適した動物モデルであることを証明することを目的に研究を行った。さらに、生後12か

月の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、EERの記録が可能であるかどうかを検証した。

B. 研究方法

(1) 変異遺伝子の発現量の定量

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

(2) 網膜の形態変化の研究

光学顕微鏡切片は、生後1M、3M、6M、12Mに標本を作成してHE染色で評価した。網膜の全層および各層の厚さの計測に加え、外顆粒層、内顆粒層、神経節細胞層の細胞数のカウントも行なった。この評価はウサギ網膜の中心部であるvisual

streak だけでなく周辺までの全部位で行ない、垂直断面の 1mm 毎の値をプロットした。

また視細胞の電子顕微鏡による観察を行った。この観察では、生後 6 週のウサギの網膜を用いた。2.5%のグルタルアルデヒドで 2 時間固定後にさらに 1%オスミウム溶液で 2 時間固定した。エタノールで段階的に脱水し、エポキシ包埋後に ultramicrotome にて超薄切片を作製し、電子顕微鏡で観察した

### (3) 網膜機能の変化の研究

Tgウサギの網膜機能の評価には網膜電図 (ERG) を用いた。ERGの記録のための光刺激には全視野刺激の Ganzfeld ドームを用い、最高で 200 cd-s/m<sup>2</sup> 以上の強いキセノンフラッシュを 7 log 幅で変化させて ERG を記録した。視細胞の機能評価は、視細胞電位 (a-wave) のフィッティング曲線により解析した。この解析方法は、視細胞の single cell 電位解析に用いられた数式を ERG の a-wave の波形の解析に利用した方法であり (Hood et al, IOVS, 1996)、視細胞の外節から内節にかけて発生する電位変化を 2 つのパラメーター、R<sub>m</sub> (最大振幅値) と S (増幅率、つまり感度) に分類して解析することができる。双極細胞の機能評価には b 波の intensity-response カーブを sigmoid 曲線にフィットさせて最大振幅と感度を得る方法を用いた。内網状層の機能評価には律動様小波を用いた。律動様小波の解析は、a 波を差し引きしたあとの成分 (P2) をフーリエ解析で周波数分析し、85-300 Hz の成分のみを抽出した。錐体機能の評価は、40cd/m<sup>2</sup> の定常白色光の背景光下に錐体 ERG を記録し、また 30Hz フリッカー反応も使用した。

### (4) 有色の Tg ラビット作成と人工網膜電極による電気誘発電位 (EEP) の解析

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<sup>2</sup>、背景光に 3 cd/m<sup>2</sup> 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。

EEP 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  $\mu$ A から 1000  $\mu$ A に変化させて、biphasic パルス (ともに 0.5 ms) で刺激を行った。

### (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

### (1) 変異遺伝子の発現量の定量

6 つのラインの変異遺伝子の発現量を RT-PCR で定量した結果、発現量は 6 つのラインで大きく異なり、ライン 7 で 82%、ライン 8 で 47%、ライン 10 で 13%、ライン 11 で 6%、ライン 14 で 6% であることがわかった。またライン 16 は二重挿入によって値は様々であった。この数値は、サザン解析によって調べた変異遺伝子の推定コピー数によく比例していることがわかった (ライン 7 は 30 コピー、ライン 11 および 14 は 1 コピー)。眼底検査および蛍光眼底検査では生後 10 か月の段階でも Tg ウサギに異常はみられなかった (図

1)。

## (2) 網膜の形態変化の研究

Tg ウサギの網膜電図 (ERG) による機能評価の結果、Tg ウサギの網膜電図では生後 12 か月以内に杆体機能がほぼ消失するものの、錐体機能はこの時点でまだ正常の 40%程度に保存されているという特徴があることがわかった(図 2)。さらに我々は、詳細な ERG 解析によって、Tg ウサギの網膜の外層、中層、内層の機能が週齢とともにどのように変化していくのかを調べた。生後 48 週の時点では、杆体 a 波は  $10\mu\text{V}$  以下にまで減弱しておりフィッティングが不可能な状態であった。その振幅は野生型ウサギより 1 log 以上低下している。杆体 b 波もおよそ 1 log の低下である。一方で錐体 a 波はこの時点で 0.5 log の低下、錐体 b 波は 0.3 log の低下にとどまっている。錐体系の内層電位である律動様小波は、生後 12 週と 24 週ではむしろ正常よりも電位が大きいという興味深い現象もみられた (図 3)

## (3) 網膜機能の変化の研究

組織学的検査の結果、Tg ウサギの網膜は進行性に網膜変性、特に視細胞変性をおこしていることが明らかとなった。網膜中心部にあたる visual streak 付近でみると、正常ではこの部分は 6-7 層の視細胞の核が存在するのに対し、Tg ウサギでは生後 12 か月でこの部分の視細胞核はほぼ 1 層にまで減少していた (図 4 上)。さらに、TUNEL 染色により、この進行性の視細胞変性がアポトーシスによるものであることが示された(図 4 下)。さらに、網膜の部位における変性様式の違いについて調べた。生後 3 か月の Tg ウサギの網膜の垂直断面を正常ウサギのそれと比較した結果、Tg ウサギの網膜変性が最も強い場所は網膜中心部にあたる visual streal 付近であることがわかった (図 5)。

Tg ウサギの視細胞の電子顕微鏡での観察では生後 6 週の時点では、視細胞の外節はまだよく保たれていた(図 6)。興味深い所見は、Tg の視細胞の間に多数の小嚢 (vesicle) の沈着がみられたことであった。この沈着物はすべて 1 層の膜に

包まれており、大きさは、直径 50-300 nm 程度のものであった。さらに高倍率で観察すると、この vesicle は視細胞の内節からちぎれるように産生されていることがわかった。内節から産生されて視細胞の間隙を埋め尽くしているこの物質の存在が Tg ウサギの視細胞死に関与している可能性が考えられた。

## (4) 有色の Tg ラビット作成と人工網膜電極による電気誘発電位 (EEP) の解析

白色 Tg ラビットを Dutch 種のラビットと交配して、有色の Tg ラビットを作製することができた。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。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、 $50\mu\text{A}$  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。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  $\mu\text{A}$ 、Tg 400-500  $\mu\text{A}$ )、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 7)。

## D. 考察

今回の Tg ウサギの作成にあたって、我々はウサギゲノム (rabbit BAC) を用いている。BAC を用いた Tg 動物の表現系の特徴として、挿入部位に比較的左右されず、単純にコピー数 (導入された変異遺伝子数) に依存した表現系を示す傾向が

あることが知られている。今回の mRNA の結果もそれを裏付ける結果となった。

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。さらに、電子顕微鏡による観察から Tg ウサギの視細胞間隙には多数の小嚢が存在することがわかった。この小嚢は内節からちぎられるようにして次々と産生され、やがて視細胞同士の間隙を埋め尽くしていくようであった。今回の Tg ウサギの遺伝子変異はロドプシン遺伝子の C 末端付近にある。この部位は産生されたロドプシンが視細胞の外節に輸送される際に重要な役割を果たしているとしてされており、実際に同じ部位に遺伝子異常がある Tg マウスでも同様の所見が報告されている (Li et al. PNAS, 1996)。彼らは免疫組織電顕も行っており、この小嚢の中に実際に変異ロドプシンが詰まっていることを証明している。我々の今回の Tg では小嚢の中味が実際に変異ロドプシンであるかどうかは証明していないが、変異部位が同じであることと、電子顕微鏡所見の類似により、我々の Tg ウサギの視細胞の変性メカニズムとして変異ロドプシンが正常に外説に輸送されずに内節に蓄積してそこからちぎれて細胞間に蓄積し、その蓄積物質の毒性によって視細胞死がおこるという可能性が示唆された。

網膜電図の結果については、進行性の ERG 振幅の低下に加え、杆体優位の変性という、実際の RP 患者によく似た変性様式を示した。実際にヒトの P347L 患者では、杆体機能は小児期にほぼ消失するものの、錐体機能は比較的中-後期まで残存する。我々の Tg ウサギの変性様式もこれによく似ており、生後 1 年の段階で杆体反応はほぼ消失しても錐体反応は正常の 40%程度残存していることが

わかった。さらなる詳細な ERG の層別解析によって、Tg ウサギの各層が各週齢でどの程度障害されているかがわかった。予想通り杆体系の細胞群は錐体系細胞群よりも速く変性し、重度に障害され、また視細胞応答が最も障害され、内層電位である律動様小波 (OPs) は最もよく保存されていることがわかった。この結果は、この Tg ウサギの視細胞が全て変性して失明したとしても網膜内層機能はまだ十分に保存されている可能性を示しており、今回我々が作製した Tg ウサギが人工視覚の移植実験に理想的な動物モデルであることが証明された。

最後に、生後 12 か月の Tg ラビットに 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できることを確認した。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

今回の研究によって、我々の作製した Tg ウサギが進行性の網膜変性をおこし、その細胞死の原因として変異ロドプシンの外節への輸送障害が関与している可能性が示唆された。また詳細な ERG 解析によって、視細胞の機能が著しく障害された時点でも、網膜の中層や内層の機能は 50%程度残存していることがわかった。この結果により、我々の Tg ウサギは人工視覚の移植に用いる中型動物モデルとして理想的なものであることが証明された。

実際に、STS 電極を移植して EEP が記録できたことから、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ことができたといえる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Ishikawa K. Kondo M, et al. Correlation between

- focal macular electroretinograms and angiographic findings after photodynamic therapy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2007;48:2254-2259.
- (2) Ikenoya K, Kondo M, et al. Preservation of Macular Oscillatory Potentials in Eyes of Patients with Retinitis Pigmentosa and Normal Visual Acuity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2007;48:3312-3317.
- (3) Kondo M, Ueno S, Piao CH, Miyake Y, Terasaki H. Focal Macular Cone ERG in complete type CSNB: A comparison with APB-treated monkeys. *Vision Research*. 2008;48:273-280.
- (4) Sugita S, Kondo M, et al. Correlation between macular volume and focal macular electroretinogram in patients with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:3551-3558.
- (5) Kondo M, Kurimoto Y, et al. Recording focal macular photopic negative response (PhNR) from monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:3544-50.
- (6) Kondo M, et al. Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:1371- 1377.
- (7) Sakai, et al. Supernormal ERG oscillatory potentials in transgenic rabbit with rhodopsin P347L mutation and retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:4402-4409.
- (8) Kurimoto Y, et al. Asymmetry of focal macular photopic negative responses (PhNRs) in monkeys. *Exp Eye Res*. 2009;88:92-8.
- (9) Koike C, et al. TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:332-337.
- (10) Nishida et al. Efficacy of suprachoroidal-transretinal stimulation in rabbit model of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 51: 2263-2268.
- Macular Oscillatory Potentials in Eyes of Patients with Retinitis Pigmentosa and Normal Visual Acuity. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. Florida, USA. May 9, 2007.
- (2) Kondo M, Ikenoya K, et al. Preservation of macular oscillatory potentials in eyes with retinitis pigmentosa with normal visual acuity. *Visual Neuroscience Symposium*. 18th International Congress for Eye Research. Beijing, China, September 28, 2008.
- (3) 近藤峰生: 網膜・視神経疾患動物モデルの ERG 解析. 日本眼科学会評議員会指名講演. 第 113 回日本眼科学会総会. 東京、2009.
- (4) Kondo M, Kondo M, Sakai T, Komeima K, Ueno S, Terasaki H. Assessment of retinal function in genetically-engineered animal model of retinal degeneration. *Korea-Japan Joint Symposium of Clinical electro-physiology of Vision*. Oct 31, Urayasu, Japan.
- (5) Kondo M, et al. Assessment of macular function of retinitis pigmentosa using focal macular ERG. *The 24th Congress of the Asia-Pacific Academy of Ophthalmology*, 2009 May 18, Bali, Indonesia.
- (6) Kondo et al. Supernormal ERG oscillatory potentials in transgenic rabbit with rhodopsin P347L mutation and retinal degeneration. *42th International Society of Clinical Electro- physiology of Vision*, July 24, Padova, Italy.

## 2. 学会発表

- (1) Kondo M, Ikenoya K et al. Preservation of

[図および説明]

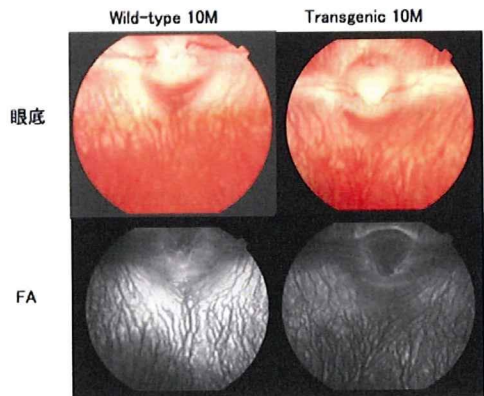


図 1 : 正常ウサギと Tg ウサギの眼底および蛍光眼底造影の結果

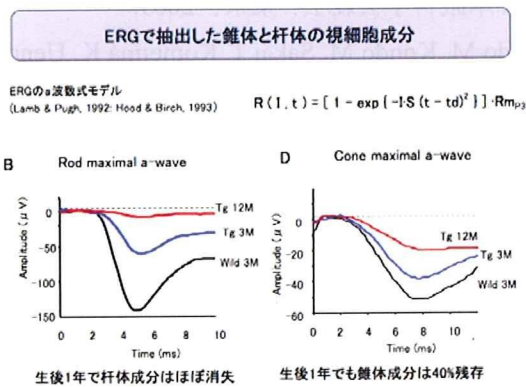


図 2 : 正常ウサギと Tg ウサギの網膜電図 (ERG) による、視細胞応答 (a-wave) の結果

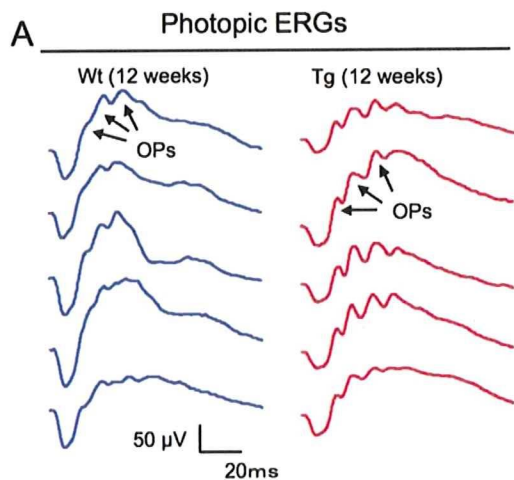


図 3. 野生型 (WT) と Tg ウサギの生後 12 週における律動様小波 (OPs、矢印)。この時点では明らかに Tg の方が野生型よりも OPs の振幅が大き

い。

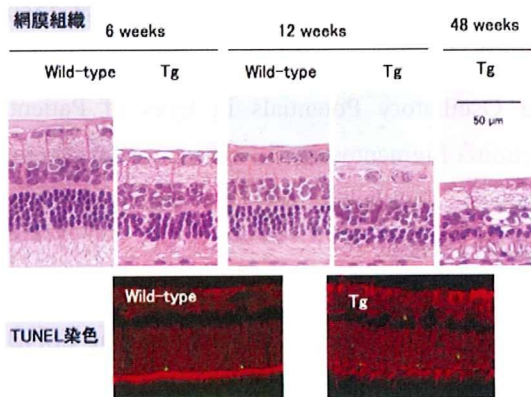


図 4: Tg ウサギの網膜組織の経時的変化  
下段は TUNEL 染色の結果

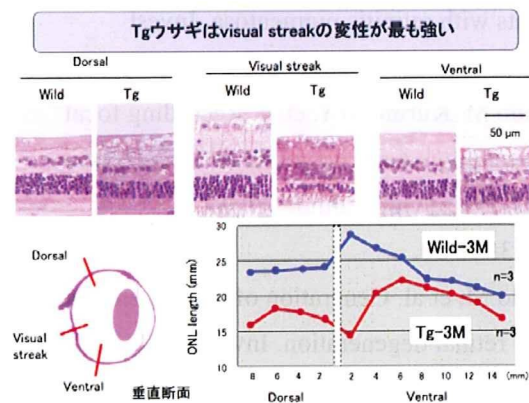


図 5 : Tg ウサギの網膜組織の部位による変性スピードの違い。下段では、外顆粒層の厚みの計測値をプロットしてある。