

4 9 ch 電極システムのパーツごとの安全性、有効性試験（分担研究課題）
(i) 表面を多孔化したプラチナ（Pt）電極の安全電流閾値を家兎で検討

研究分担者 不二門 尚 感覚機能形成学教室 教授
研究協力者 神田 寛行 感覚機能形成学教室 助教

研究要旨：表面を多孔化したプラチナ電極（多孔化電極）の安全性評価の目的で、家兎を対象に検討を行なった。有色家兎（Dutch種）14例16眼に対して電極埋植手術後、1～2週間の慢性埋植を経て通電試験を実施した。動物を無作為に5群に分け、それぞれ異なる通電強度（1.0から3.0 mA）で4～8時間の連続通電を行なった。通電強度の増加に伴い、最初に蛍光造影眼底検査にて電極周囲で過蛍光所見が認められた。この変化を網膜損傷のマーカーとして、網膜損傷の頻度と通電強度の関係についてプロビット解析を行った所、損傷の発生頻度の閾値は2.4mAと推測された。この値は臨床試験に用いられる最大電流の2倍であることから、臨床試験で用いる強度の範囲では多孔化電極の安全性に関しては問題ないと考えられた。

A．研究目的

網膜色素変性をはじめとする難治性の視細胞変性疾患の治療を目的とした医療機器「人工網膜」の開発が進められている。

この機器の臨床応用に向けて、刺激電極の安全性を確認する必要がある。人工網膜の安全性評価については、厚生労働省やFDAによって評価指針が示されている。指針では48時間以上にわたる通電安全性試験が求められ、通電後には刺激を受けた部位の組織評価を行い、通電障害を与える条件を明らかにしなければならない。

本研究では、将来の実用化および医療機器認可を見据え、今回の実験ではこれらの評価指針に準じた方式で急性動物試験にて刺激電極の安全性を評価した。具体的にはポーラス電極でSTSを行う際の安全性評価を行うことを目的に、家兎を対象に種々の通電条件下での急性試験を行い、ポーラス電極による通電傷害がどの程度の通電強度で損傷が生じるか調べた。

B．研究方法

・実験動物

有色家兎（Dutch種）14例16眼（体重2.0～2.5kg）を実験動物として使用した。

（倫理面への配慮）

ARVOの動物実験指針に従い、すべての処置において動物の苦痛が最小限になるよう心掛けた。本実験は大阪大学医学部の動物実験委員会の承認の下実施された。

<刺激電極>

1極型ポーラス電極（型番：99406-3470）
レーザー多孔化処理あり
電極高さ：0.3 mm,直径：0.5 mm

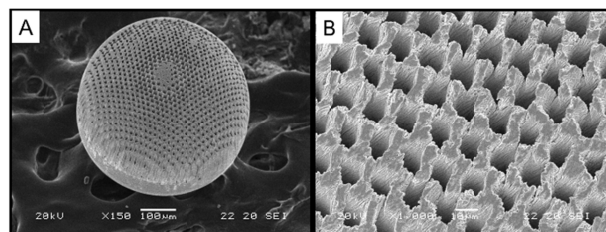


図2．フェムト秒レーザー照射により多孔化処理された白金電極の走査電子顕微鏡像。（A）電極全体像、（B）表面の拡大写真。

<電極埋植手術>

2～2.5%のイソフルレンの吸引麻酔による全身麻酔下で手術を実施した。主に左眼を対象に手術を施した。下方の結膜を輪部切開し、下直筋を筋附着部より切離した。さらに後極部の牽引筋を切除して後極部強膜を露出した。角膜輪部より9～11mm付近から強膜ポケット（幅6mm）作成した。強膜ポケットは、残存強膜厚2/3を目安に作成した。刺激電極を挿入し、強膜ポケットの入り口にて電極基盤を強膜に縫着した。

一方、上鼻側の結膜を輪部切開し、網様体扁平部付近の強膜を露出して、25G針で強膜に穴をあけた。その穴に硝子体電極を挿入し、電極基盤を強膜に縫着した。

刺激電極および硝子体電極のリード線は眼球赤道部に沿って縫着し、そして外眼角付近より眼窩外へとリードを通した。その後、側頭部の皮下

を經由し頭頂部まで配線し、コネクタを頭頂部皮下に留置した。7-0バイクリルにて下直筋を復位した後、8-0バイクリルにて結膜を縫合し閉創した。術後にリンデロンA軟膏およびタリビット軟膏を点入した。術後感染症および術後炎症の予防の目的で、手術翌日より一週間クラビットおよびフルメトロンを点眼した（1回/日）。

刺激電極と網膜との距離が短すぎる場合は電極による圧迫で網膜を機械的に損傷する可能性がある。逆に、刺激電極が強膜ポケットから外れてしまう場合には有効な通電を行うことができない。そこで、手術後1週間経過後のOCTによる検査にて網膜電極間距離が200 μ m以下の場合、または電極がOCTで確認できない場合には、再手術を行って、新しく強膜ポケットを作り直して再度電極を埋植した。

< 48時間通電 >

手術後1週間から2週間の回復期間をおいた後、48時間通電試験を実施した。通電試験は全身麻酔下で行った。

刺激前の処置として、4%イソフルランの吸入麻酔で導入麻酔を行った後、動物用内視鏡(TESALA、AVS社)を用いて3mmの気管内チューブを気管へ挿管した。続いて、イソフルラン(2~3%)で維持麻酔を行いながら筋弛緩剤(ロクロニウム臭化物7 μ g/kg/分、i.v.)の持続注入および人工呼吸を行った。人工呼吸の一回換気量は45 mlに設定し、呼気終末CO₂分圧が40 \pm 5 mmHgとなるように喚起回数を15~25cycle/minの間で調整した。換気には空気/酸素の混合気(酸素濃度50%)を用いた。通電中は38の保温パッドを敷き、体温の保持に努めた。

通電中はバイタルモニターで心拍数、SpO₂、呼気終末CO₂分圧、酸素濃度、イソフルラン濃度、喚起回数を常時モニタリングした。

通電に用いた刺激パルスの各種パラメータは下記のとおりである。

パルス波形 : Cathodic-First Biphasic pulses
パルス幅 : 0.5 ms
Inter-pulse duration: 0.0 ms
パルス頻度 : 20 Hz
通電時間 : 48 hour

ファンクションジェネレータ(WAVE FACTORY, NF社)を用いてパルス波形を作製しリニアイソレータ(BSI-950, Dagan社)を介して刺激パルスを出力した。生体へ直流電流が流れることを防ぐため、硝子体電極側の出力線に1.0 μ Fのコンデンサを直列に接続してカップリングコンデンサと

して使用した(図3-B)。頭頂部に設置した刺激電極および硝子体電極のコネクタと、アイソレータの出力を接続し通電を行った。

動物はランダムに5群に分け、それぞれの群で異なる刺激強度の通電を行った。用いた通電強度と被検査眼は、それぞれ1.0mA (n=2)、1.5mA (n=3)、2.0mA (n=3)、2.5mA (n=5)、3.0mA (n=3)だった。

< 眼科検査 >

通電開始直前および通電終了直後に、眼底観察(Retcam) FA(F-10、ニデック) OCT(RS-3000、ニデック)で電極周囲の網膜に異常が発生していないか検査を行った。

なお、FAおよびOCT撮影の際は、角膜乱視の混入による画像の劣化を防止するため、撮影用に特注したハードコンタクトレンズ(dia13.5 mm, BC 7.6 mm, Power 0 D, メニコン社製)を用いた。さらに、眼球運動による画像の劣化を防止するため、撮影用に特注した頭部固定装置(SH-15 s、ナリシゲ社)で動物の頭部を固定し、筋弛緩剤投与下で撮影を行った。

さらに、OCTにおいては、撮影ソフトウェアに改造を施し加算回数を200回に増加して撮影を行った。ウサギはヒトに比べて網膜厚が薄いためスペックルノイズの影響を受けやすく、明瞭なOCT像を得ることが困難であるが、この改造により明瞭なOCT像を得ることが可能となった。

通電終了後の眼科検査を完了後、ペントバルビタールの過剰投与(i.v.)で安楽死処置を施し、直後に眼球を摘出した。2.5%グルタルアルデヒドと4%パラフォルムアルデヒドの1:1混合溶液で48時間固定した後、5~7日間中性緩衝ホルマリン液で固定した。パラフィン包埋の後、7 μ m厚で薄切してHE染色を行った。顕鏡下にて組織学的に網膜障害の有無を検討した。

< 統計学的解析 >

通電強度と損傷発生率の関係を求めるため、各検査所見における損傷の発生率と通電強度について、用量(刺激量) 反応曲線による予想曲線を求めた。この曲線からLD₅₀値(50% lethal dose: 異常の発生率が50%となる刺激量)を算出した。用量 反応曲線は、プロビット分析で推定し、この曲線からLD₅₀値を求めた。これらの解析にはIBM社のSPSS ver 21を用いた。

C. 研究結果

動物を4群に分け、それぞれ異なる通電強度で48時間連続通電を行った。網膜(網膜色素上皮を含む)、脈絡膜、強膜それぞれが通電によってどの

ような影響を受けるか各電流値で評価した。以下に、その結果を示す。

網膜への影響

網膜への影響は眼底写真、FA、OCT、病理組織検査から評価した。

OCTの検査結果を通電前後で比較すると(図5 - C、G、K)、網膜剥離の肥厚などの網膜の形態学的変化は本試験の全例で認められなかった。

一方、FAの検査結果を通電前後で比較すると、通電前にはFAの所見は全例で正常だったが、通電後に蛍光漏出が一部の個体で確認された。この蛍光漏出は刺激部位周辺に点状に分布していた(図5 - F、J)。さらに、眼底写真で同部位に点状の色素沈着が認められた(図5 - E、I)。

このような変化は、2.0mA通電群で3例中1例、2.5mA通電群で5例中2例、3.0mA通電群で2例中2例、確認された(表3)。

通電後の網膜に対して実施した病理組織検査(図5 - D、H、L)からは、網膜の異常を示す所見は認められなかった。

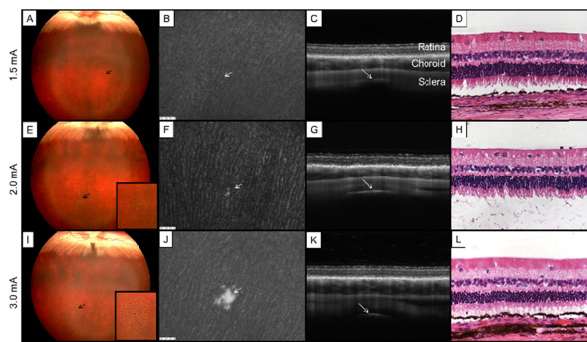


図5. 48時間連続通電後の眼底写真(A, E, I)、電極周囲の蛍光眼底写真(B, F, J)、電極周囲のOCT(C, G, K)、電極埋植部付近の網膜切片のHE染色(D, H, L)、それぞれの代表例を示した。矢印は電極埋植部位を示す。特にOCT像における矢印は電極表面を示す。

通電で生じた網膜の変化

電流強度	発生頻度	主な変化
1.0mA	0/3	無
1.5mA	0/3	無
2.0mA	1/3	蛍光漏出(FA)、点状色素沈着(眼底写真)
2.5mA	2/5	蛍光漏出(FA)、点状色素沈着(眼底写真)
3.0mA	3/3	蛍光漏出(FA)、点状色素沈着(眼底写真)

- 脈絡膜への影響

脈絡膜への影響はIAの造影後期とOCT検査とから評価した。なお、通電前のIA検査で電極周囲の脈絡膜で虚血が認められた個体は、通電の対象から除外した。

IAの造影早期の画像からは通電前後で虚血あるいは漏出を示す所見は全例で認められなかった(図6)。

またOCT検査から通電前後で刺激電極直上の脈絡厚を比較したが、通電後に脈絡膜の肥厚あるいは菲薄化を示す所見は全例で認められなかった。

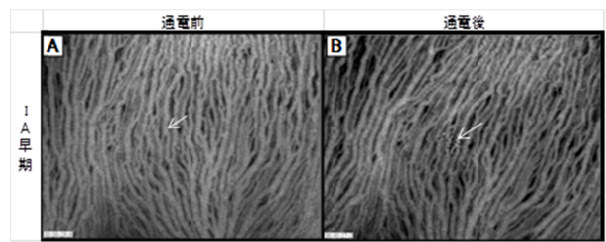


図. 48時間連続通電前後のIA。矢印は電極埋植部位を示す。ここに示した例は@@mA通電群の一例(動物No.@@)で、FAでは蛍光漏出が認められた個体である。

- 強膜への影響 -

強膜への影響は、OCTと病理組織検査から評価した。

OCT検査で測定した電極直上の強膜厚を通電前後で比較をしたところ、一部の個体で電極直上の強膜が通電後に肥厚していることが確認された(図7 - A)。強膜厚の増加量と通電強度の関係について、Pearsonの相関検定を行ったが両者に有意な相関関係は認められなかった。

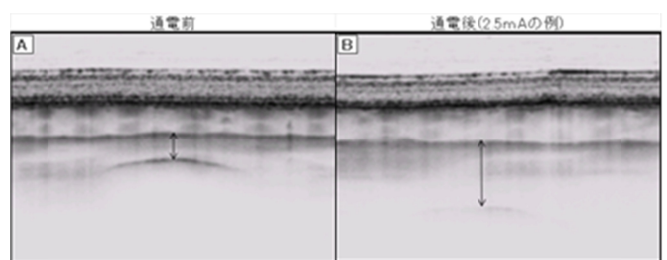


図7. 48時間連続通電前後のOCT像である。矢印は電極先端から脈絡膜までの距離(残存強膜厚)を示す。

D. 考察

今回初めて48時間もの長時間にわたる連続通電から網膜損傷が生じる閾値を測定した。なお、通電損傷の評価にあたり、電極直上の残存強膜厚の大きさによって結果に影響があると考えたため、その影響を排除するために、刺激前にOCTを測定してポケットが厚い場合や薄い場合は再手

術を行った。具体的には電極直上から網膜までの距離が0.2 mm以下の場合や、OCTで電極が確認できない場合は、再手術を実施した。この0.2 mmというのはヒトの脈絡膜厚を参考に算出した値である。

通電強度の上昇に伴って最初に変化が現れたのがFAの蛍光漏出と眼底の点状の色素沈着である。特に蛍光漏出については、発生の有無の判定が容易であったことから、網膜損傷の視標として利用した。網膜損傷の発生頻度（蛍光漏出の発生頻度）と通電強度の関係を図1にプロットした。さらに、毒性試験の評価によく用いられているプロビット関数でフィッティングした。この損傷発生に関するLD50の値は2.4mAと推測された（図1）。さらに、LD10の値は1.9 mA、LD1.0の値は1.4mAと推測された。つまり、当社が臨床研究向けに作製している人工視覚システムの試作機の最大刺激電流の1.2 mAではパルス幅0.5 msの条件下で網膜損傷の発生する確率は1%以下と推測することができる。従って、臨床研究で用いる強度の範囲内では安全性に問題ないと考えられる。

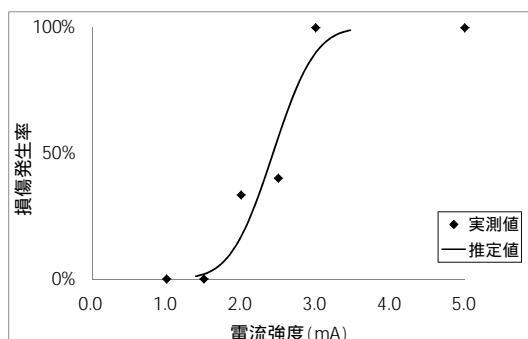


図1. 過蛍光の発生頻度（通電損傷発生頻度）と電流強度の関係

今回得られたLD50の電流値（2.4 mA）は、電極表面における電荷密度に換算すると $290 \mu\text{C} / \text{cm}^2$ に相当する。それに対して、ポラス電極の生体内におけるCharge injection capacityは平均 $143 \mu\text{C} / \text{cm}^2$ （95%信頼区間110 - $180 \mu\text{C} / \text{cm}^2$ ）と有意に低い（Terasawa IEEE 2013）。従来、Charge Injection capacityが安全に通電できる最大強度に関する指標の1つとして用いられてきたが、STS法で生じる網膜損傷はCharge Injection capacityとは別の評価基準を用いる必要性を今回の結果は示している。

そもそもCharge Injection Capacityは通電時に生じる不可逆的な化学変化が起きない最大の通電量のことを示す。もしその値を超えると、電気分解等の化学変化が電極表面で生じ、周辺のpHの変化が生じ組織損傷へと繋がることが予想される。

今回の結果では、電流強度を上げると最初に蛍光漏出が見られた。ウサギの網膜は大部分で網膜血管が無い領域があり、今回刺激電極を留置した部位もその網膜血管が存在しない領域である。従って、蛍光漏出はブルッフ膜による関門を超えて脈絡膜から網膜下へと漏出した蛍光色素がFAで撮影されたのだと考えられる。つまり、蛍光漏出が認められた部分では網膜色素上皮やブルッフ膜が通電により損傷を受けた。もし、この損傷がCharge Injection Capacityを超えたことに起因する化学変化が原因だと仮定すると、電極表面から網膜色素上皮までの強膜や脈絡膜も同様に損傷を受けるはずである。しかし、実際は脈絡膜には異常が認められなかった。また強膜については一部で肥厚が認められたものの、必ずしも蛍光漏出を認めた全ての個体で、強膜肥厚は生じたわけではない。従って、網膜色素上皮の損傷はCharge Injection Capacityを超えたことに起因する化学変化が原因である可能性は低いと考えられる。

一方、Zhou と Greenberg,が編集した“Implantable Neural Prostheses”という教科書には、網膜色素上皮が網膜の各層において最もインピーダンスが高いと記述されている。つまり、同じ電流が通った場合インピーダンスが高いところほどジュール熱が大きくなるため、他の層に比べて網膜色素上皮で高い温度上昇が発生した可能性がある。中内らはSTS通電を網膜に与えて発生する網膜損傷の閾値を、異なるパルス幅で測定して報告している（J. Neural Eng. 200）。それによると、網膜損傷の電流閾値とパルス幅の間には高い線形関係が認められた。これは、STSの損傷が電荷量よりも消費電力量に依存していることを示している。ジュール熱は消費電力量と比例関係にあることから、中内らの結果もSTS通電によって生じる網膜損傷はジュール熱が原因である可能性を支持している。

この仮説を検証するためには、形状は同じでCharge Injection Capacityだけが異なる電極間で通電閾値を比較する必要がある。

今回、複数の検査で網膜損傷の評価を行ったが、最も低い電流で変化を捉えられたのがSLOによるFA検査だった。さらに、この評価系は通電に伴う変化が明瞭に現われるため、網膜損傷の有無の判断が明確に行うことができる。今後、STSの安全性試験において最も有効な検査方法の1つであると考えられる。

一方、STS通電に伴う強膜への影響であるが、通電に伴い強膜が肥厚する事例が一部で見られた。この強膜肥厚が認められた例では、何らかの細胞が電極周囲に浸潤していることが組織学的に確認された。おそらく、通電に伴い強膜が損傷しそ

れに伴い局所的に炎症が発生したのではないかと考えられる。しかし、現時点では強膜肥厚は電流強度とは有意な相関関係が認められない。おそらく、通電以外に電極の強膜への圧迫の程度など、複数の要因が関与していると推測される。ただ、もしも、この変化が患者の眼で発生したとしても、刺激効率の低下が生じるかもしれないが、網膜内の神経細胞を不可逆的に損傷する可能性はほとんどない。従って、重篤な有害事象に繋がる可能性は低いと考えられる。

E . 結論

変化の有無の判定が容易であった、FAの過蛍光の有無を通電損傷のマーカーとし、損傷発生頻度を統計学的に分析した結果、損傷発生頻度が50%を示す通電強度(LD50)は2.4mAと推測された。臨床試験で用いる最大電流(1.2mA)であり、この電流値では通電に伴う影響は発生していない。よって、臨床試験で用いる強度の範囲では安全性に関しては問題ないと考えられる。

F . 健康危険情報

該当する危険なし

G . 研究発表

1. 論文発表

原著論文

Fujikado T, Kamei M, Sakaguchi H, Kanda H, Morimoto T, Nishida K, Kishima H, Maruo T, Oosawa K, Ozawa M, Nishida K: Feasibility of 2nd generation STS retinal prosthesis in dogs. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.2013 Jul pp.3119-3121, Jul 2013

Hiroyuki Kanda, Toshifumi Mihashi, Tomomitsu Miyoshi, Yoko Hirohara, Takeshi Morimoto, Yasuo Terasawa, Takashi Fujikado: Evaluation of electrochemically treated bulk electrodes for a retinal prosthesis by examination of retinal intrinsic signals in cats. Jpn J Ophthalmol Feb 2014

総説

神田寛行、不二門尚：【Brain Machine Interface (BMI)の現状と展望】10.視覚 BMI、医学のあゆみ 246(4) pp.324-330、2013年7月

2. 学会発表

Kanda Hiroyuki, Morimoto Takeshi, Fujikado Takashi, Nakano Yukari, Terasawa Yasuo: Evaluating the

Relationship between Retinal Damage and Electrical Stimulation Intensity with Suprachoroidal-Transretinal Stimulation. 3rd International Conference on medicalbionics Engineering Solutinos for Neural Disorders, Silverwater Resort, Phillip Island, Australia, Nov 2013

Kanda Hiroyuki, Morimoto Takeshi, Terasawa Yasuo, Nakano Yukari, Nishida Kohji, Fujikado Takashi: Evaluation of safety of porous surface electrodes for STS Retinal prosthesis. ARVO2013 Seattle, USA, May 2013

Fujikado Takashi, Kamei M, Sakaguchi H, Kanda H, Morimoto T, Nishida K, Kishima H, Maruo T, Oosawa K, Ozawa M, Nishida K: Feasibility of 2nd Generation STS Retinal Prosthesis in dogs. Artificial Vision 2013: The International Symposium on Visual Prosthetics, Aachen,Germany, Nov 2013

Morimoto Takeshi, Endo T, Kanda H, Nishida K, Fujikado T: Evaluation of residual retinal preservation by using transcorneal electrical stimulation and optical coherence tomography in patients with advanced retinitis pigmentosa, candidates for retinal prosthesis. Artificial Vision 2013: The International Symposium on Visual Prosthetics, Aachen,Germany, Nov 2013

Endo Takao, Fujikado Takashi, Kanda Hiroyuki, Morimoto Takeshi, Kitazawa Shigeru, Nishida Koji: Evaluation of localization test under simulated very low vision conditions. ARVO2013 Seattle, USA, May 2013

神田寛行、森本壮、寺澤靖雄、中野由香梨、西田幸二、不二門尚：多孔化処理を施した人工網膜用刺激電極の安全性評価、第117回日本眼科学会東京、2013年4月

遠

藤高生、不二門尚、神田寛行、森本壮、北澤茂、西田幸二：超低視力者における到達運動のLocalization testによる評価、第117回日本眼科学会東京、2013年4月

H . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし

