

図3 第一世代型 STS 方式人工網膜の体内装置 (スケールバー: 3 cm)

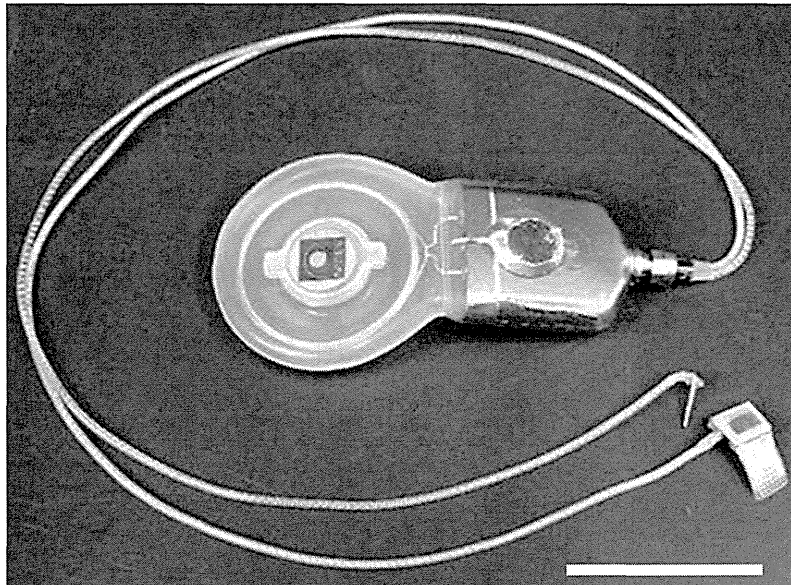


図4 第二世代型 STS 人工網膜の体内装置 (スケールバー: 3 cm)

大阪大学医学部倫理委員会の承認を得て、網膜色素変性の患者2名に対して最長1ヵ月半の慢性臨床試験が実施された¹⁰⁾。機能試験を実施したところ、埋植手術を受けた患者はこの人工網膜を使って眼前に提示した

太さの異なる二つの棒を識別できた。なお、デバイスの埋植手術、慢性埋植、そして摘出手術に伴う有害事象は発生しなかった。

V. 第二世代型 STS 方式人工網膜システム

その後も引き続きデバイス開発は進められた。そして完成したのが第二世代型 STS 人工網膜システムである。第一世代と第二世代の主な違いは電極数である。第二世代では 49 極型 (7 × 7 の配列) の多極電極が体内装置に搭載された。このほかにも、体内装置本体が第一世代よりも小型化された (図 4)。大阪大学医学部倫理委員会より埋植期間 1 年の臨床試験が承認され、現在、3 名の網膜色素変性の患者を対象に、同システムの臨床試験が行われている。

おわりに

従来は実現困難と考えられてきた人工網膜であるが、近年の急速な電子技術の進歩や医療材料の進歩により実用化への道が開けてきた。わが国においても STS 方式人工網膜の臨床試験が進行中で、その有効性と安全性が検証されつつある。近い将来、医療の現場で人工網膜が用いられるようになると思われる。今後は、人工網膜埋植後の患者の視機能リハビリテーションをどのように行っていくか、そして適応患者の選択に要する事前検査方法の確立などについての検討が必要となると考えられる。

参考文献

1) 中江公裕, 他: “わが国における視覚障害の現状. 厚生

労働省難治性疾患克服研究事業 網脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究”. 平成 17 年度研究報告書. pp263-267, 2006.

- 2) Santos A, et al : Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric analysis. Arch Ophthalmol 115 : 511-515, 1997.
- 3) Weiland JD, et al : Retinal prostheses: current clinical results and future needs. Ophthalmology 118 : 2227-2237, 2011.
- 4) Humayun MS, et al : Argus II Study Group, Interim Results from the International Trial of Second Sight's Visual Prosthesis. Ophthalmology 119 : 779-788, 2012
- 5) Zrenner E : Fighting Blindness with Microelectronics. Sci Transl Med 5 : 210ps16, 2013.
- 6) Kanda H, et al : Electrophysiological studies of the feasibility of suprachoroidal-transretinal stimulation for artificial vision in normal and RCS rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 45 : 560-566, 2004.
- 7) Nakauchi K, et al : Transretinal electrical stimulation by an intrascleral multichannel electrode array in rabbit eyes. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 243 : 169-174, 2005.
- 8) Sakaguchi H, et al : Transretinal electrical stimulation with a suprachoroidal multichannel electrode in rabbit eyes. Jpn J Ophthalmol 48 : 256-261, 2004.
- 9) Fujikado T, et al : Evaluation of phosphenes elicited by extraocular stimulation in normals and by suprachoroidal-transretinal stimulation in patients with retinitis pigmentosa. Graefes Arch ClinExp Ophthalmol 245 : 1411-1419, 2007.
- 10) Fujikado T, et al : Testing of semichronically implanted retinal prosthesis by suprachoroidal-transretinal stimulation in patients with retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 52 : 726-733, 2011.

人工網膜

Retinal Prosthesis

～よみがえる光感覚～

神田寛行 不二門 尚

Abstract

人工網膜とは、網膜への電気刺激で生じる光覚を用いて失われた視機能を再建する医療機器である。その仕組みは、目の代わりに小形カメラで外界の画像を撮影し、画像データを基に刺激電流を生成し、網膜近傍に設置した多極電極を介して網膜へ刺激電流を伝える。この刺激によって生じた神経活動が視神経を介して視覚中枢に伝わることで光覚が生まれる。既に臨床試験が各国で行われており、近い将来の実用化が期待されている。本稿では、人工網膜の原理から現在の開発状況について紹介する。

キーワード：人工網膜，人工視覚，神経インタフェース，視覚再建

1. はじめに

眼科における近年の医療技術の進歩には目を見張るものがある。例えば、一昔前まで主な失明原因だった白内障が、現在では人工レンズや白内障手術機器の進歩により日帰り手術で治療可能となった。このほかにも様々な目の病気が治療可能になっている。これを反映してか、急速な高齢化が進んでいるにもかかわらず、我が国の視覚障害者数はこの30年間増加していない（平成18（2006）年身体障害児・者実態調査結果，厚生労働省）。

しかし、現代の医療技術でも治療できない目の病気が存在するのも事実である。その代表例が網膜色素変性である。この病気は日本の中途失明原因の第3位を占めるほど患者数が多いにもかかわらず⁽¹⁾、失われた視力を取り戻すことはおろか、病気の進行を食い止めることもできない。

網膜色素変性の治療法開発に向けて、再生医療、遺伝子治療など様々な研究が行われている。本稿で紹介する人工網膜もその一つである。人工網膜では電子機器を使って網膜の機能を代替する点が大きな特徴である。本稿では、まず視覚系の仕組みと視覚障害の原因について説明した上で、人工網膜の仕組みと現在の研究状況につ

いて紹介する。

2. 視覚の成り立ち

視覚をつかさどる感覚器官は、眼球とそれにつながる視神経・視路で構成される。

眼球（図1）は直径約24mmのほぼ球形の形をしており、外側は強膜という白くて弾力性のあるコラーゲン組織で覆われている。眼球の前側には角膜という透明の膜がありレンズの作用をしている。角膜の後ろ側には虹彩という膜があり、これが円周状に取り巻いて瞳孔ができる。その奥には透明で弾力性のある水晶体という組織がある。眼球の後ろ側で内側に薄く張っている膜が網膜である。網膜と強膜の間には脈絡膜という血管の豊富な膜があつて、網膜に酸素と栄養を供給する。眼球内は硝子体という透明なゼリー状の組織で満たされている。

外界からの光は、まず角膜で屈折し、瞳孔を通った後、水晶体で更に屈折して網膜に到達する。

網膜は解剖学的には10層から成る非常に美しい微細構造を形成している。この中には様々な神経細胞が存在する。最も外側に位置するのが視細胞である。網膜に到達した光は視細胞で吸収され細胞内と細胞外の電位差（膜電位）の変化を生む。デジタルカメラに例えると、視細胞はイメージセンサ内のフォトダイオードに相当する。

視細胞で取得した画像情報は、双極細胞、網膜神経節細胞へと順に伝達される。網膜神経節細胞から伸びる軸

神田寛行 不二門 尚 大阪大学大学院医学系研究科感覚機能形成学教室
Hiroyuki KANDA and Takashi FUJIKADO, Nonmembers (Graduate School of
Medicine, Osaka University, Suita-shi, 565-0871 Japan).
電子情報通信学会誌 Vol.98 No.4 pp.266-271 2015年4月
©電子情報通信学会 2015

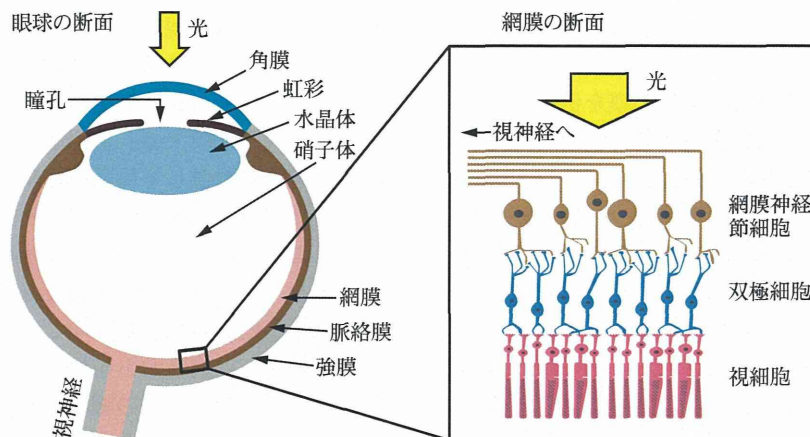


図1 眼球及び網膜の構造

索（神経細胞の電気ケーブル）は数 cm の長さを有し、網膜から視神経を經由して、脳内の外側膝状体の中継細胞まで到達する。網膜神経節細胞の軸索を經由して、画像情報は外側膝状体へと伝達される。これら全てが正常に機能することで正常な視覚が得られる。言い換えると、この中のどこか1か所でも機能不全を起こせば視覚障害が生じる。

3. 視 覚 障 害

3.1 視覚障害の現状

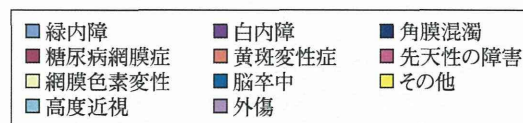
日常生活を営む上で視覚情報は重要な役割を担っている。失明による QOL（Quality of Life, 生活の質）の低下は、ほかの感覚器障害よりも重篤であると考えられる。実際、全ろうの場合は身体障害者福祉法に定める障害程度等級表では2級に分類されるのに対し、全盲の場合は1級に分類されている（級が小さいほど大きい障害とみなされる）。

視覚を失うことによる日常生活への影響は計り知れない。屋外移動、食事、スーパーでの買い物、公衆トイレの利用など、困難を感じる場面は例を挙げたらきりが無い。

現在、我が国における第一級視覚障害者（全盲）の方は約12万人（平成18（2006）年身体障害児・者実態調査結果、厚生労働省）に上る。失明原因疾患は様々で、時代によってその内訳は変化している。現在、我が国における主な失明原因疾患は1位が緑内障（25.5%）、2位が糖尿病網膜症（21.0%）、3位が網膜色素変性（8.8%）と推定されている（図2）⁽¹⁾。このうち、緑内障と糖尿病網膜症は病態の進行を遅らせることが可能である。しかし、網膜色素変性においては、前述のとおり治療法が皆無である。

3.2 網膜色素変性

網膜色素変性は遺伝子変異が原因で発症する網膜の病



第一級視覚障害者の定義（身体障害者福祉法）
両眼の視力の和が0.01以下のもの

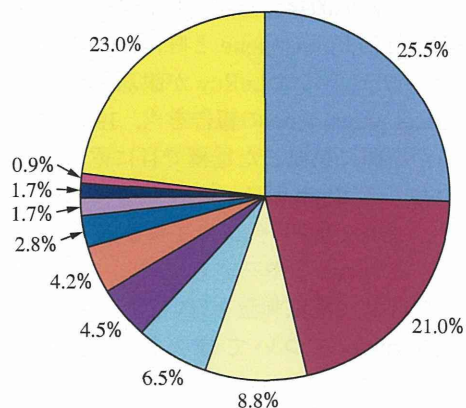


図2 第一級視覚障害の原因疾患の内訳

気である。網膜の視細胞が広範囲に変性するのが特徴である。発症率は3,000人から4,000人に一人と言われている。初期には夜盲（夜間視力の低下）を自覚し、視野狭さく（視野が狭くなること）と視力低下が徐々に進む。進行の程度には個人差が大きい。重度の場合には中途失明に至る場合がある。しかし病態が進行した場合でも網膜神経節細胞が残存するため⁽²⁾、人工網膜による視覚再建が可能である。

4. 人工網膜の仕組み

4.1 人工網膜の構成

人工網膜は、人工的な方法で光を受光し、光を電気信号に変換し、電気信号を網膜内の視細胞以外の神経細胞

に伝達して人工的に光感覚を生み出す装置と定義されている⁽³⁾。

我々のグループが開発を進める人工網膜を例にその構成と動作原理を説明する。人工網膜は体外装置と体内装置の二つの装置から構成される(図3)。

体外装置にはビデオカメラ、処理回路、一次コイルが搭載される。外界の映像は体外装置のビデオカメラで撮影され、得られた画像データを基に処理回路で最適な刺激パターンが計算される。このデータはコイルにより体内装置へ電波を使って無線で転送される。その際、体内装置の回路を駆動させるのに必要な電力も伝送される。

体内装置には、二次コイル、刺激回路、多極電極が搭載される。受信したデータを基に体内装置に搭載されている刺激回路で電流パルスが生成される。電気リードを経由して多極電極から網膜へ電流パルスが伝えられる。

4.2 Electrical phosphene

網膜に電気刺激を与えると網膜内の神経細胞の膜電位が変化する。これがトリガとなり神経活動が生じる。生じた神経活動は、網膜神経節細胞の軸索を経由して視覚中枢へと伝わり、擬似的な光感覚が生まれる。この光感覚のことを Electrical phosphene と呼ぶ。この現象は古くから知られ、1755年には LeRoy が眼球への電気刺激による Electrical phosphene の報告を⁽⁴⁾、1950年代には Motokawa らが眉間に設置した電極で目に電気刺激を与え、その際に生じる Electrical phosphene について報告がなされた⁽⁵⁾。また1960年代には主に網膜疾患の検査の目的で Potts & Inoue らや三宅らによってコンタクトレンズ型電極で眼球に電気刺激を行い、その際に生じる Electrical phosphene について様々な研究が行われた^{(6)~(10)}。

しかし、コンタクトレンズ型電極では、刺激電流が網

膜全体に拡散し、視野全体に Electrical phosphene が生じる。そのため、この方法では Electrical phosphene で意図した図形やパターンを描画できない。

そこで人工網膜では、直径数十から数百 μm の電極を網膜に近傍に設置して局所的に網膜を電気刺激する。更に、この電極を複数にしてパターン状に網膜を刺激することによって、ちょうど電光掲示板のように光の点の集合体として Electrical phosphene が知覚される。この複数の電極が搭載された基板のことを多極電極と呼ぶ。

人工網膜では網膜から中枢への情報伝達に網膜神経節細胞を用いるため、この細胞が正常に機能することが人工網膜適応の必要条件となる。

人工網膜では、カメラで得た画像情報に合わせて多極電極で複数の Electrical phosphene を生み出してパターンを作製することを意図する。

4.3 人工網膜の方式

現在までに考案されてきた人工網膜は多極電極の埋植位置によって、網膜上刺激方式、網膜下刺激方式、脈絡膜上刺激方式の三つに分類される(図4)。

4.3.1 網膜上刺激方式

多極電極を網膜の上側に設置して網膜を刺激する方式である。1980年代後半から1990年代前半にかけて Michelson や Humayun によって考案された^{(11), (12)}。網膜神経節細胞に近接して刺激できるため、刺激効率が高い点が利点である。一方、網膜上に多極電極を固定するために網膜タックという小形の押しピンで眼球壁に固定する必要がある。これは網膜が非常に柔らかく、網膜剥離が生じやすい組織であるため、接着剤や縫合糸で電極を網膜に直接固定することができないからである。網膜タックは網膜を貫き、その先端は強膜層まで達する。そのため網膜タック周囲に局所的ではあるが網膜損傷が発生してしまう。

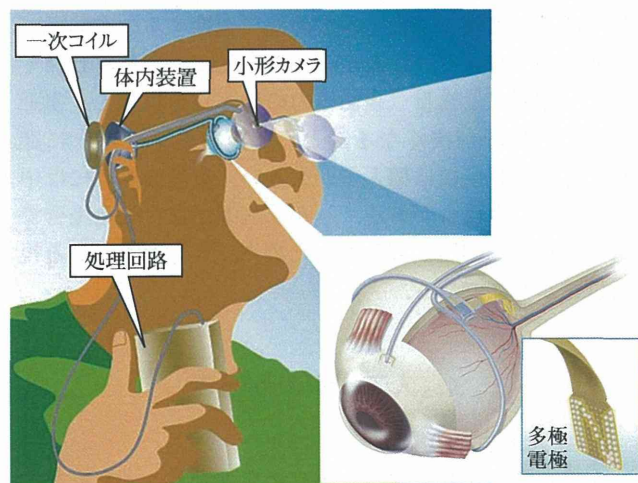


図3 人工網膜の全体システム

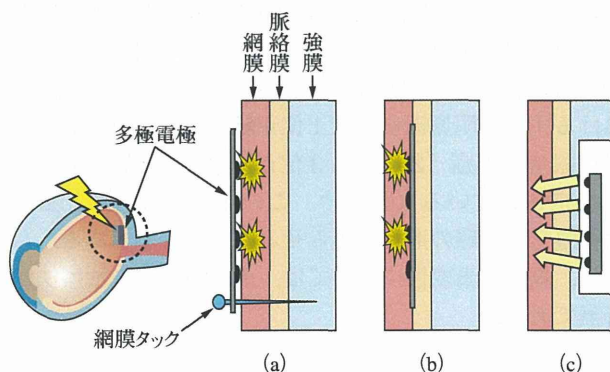


図4 人工網膜の三つの方式 (a)網膜上刺激方式, (b)網膜下刺激方式, (c)脈絡膜上刺激方式。

4.3.2 網膜下刺激方式

多極電極を網膜と脈絡膜の間に設置して網膜を刺激する方式である。多極電極は網膜と脈絡膜で挟み込まれて固定されるため、固定には網膜タックを必要としない。電極面が眼内に入ってくる光の入射方向を向くため、多極電極基板上に受光素子を組み込むことができる。これにより、体外装置にカメラが不要となるだけでなく、眼球運動に従った映像取得ができ、ほかの方式に比べてより自然な視覚再建が可能である。ただ、多極電極基板により脈絡膜から網膜への栄養や酸素の供給が遮断されること、電極埋植手術時に人工的に網膜剥離を作製しなければならないことなどの理由で、網膜への侵襲性が強く電極を広範囲に設置することが難しい。

4.3.3 脈絡膜上刺激方式

この方式は脈絡膜の外側に多極電極を設置して網膜を刺激する方式である。網膜上刺激方式と網膜下刺激方式はどちらも網膜と多極電極が接触するため、手術時の網膜損傷のリスクが高い。脈絡膜上刺激方式はこの問題を回避するために、我々のグループが考案した比較的新しい刺激方式である⁽¹³⁾。手術は、強膜にポケットを作製してその中に電極を挿入する方法⁽¹⁴⁾と部分的に脈絡膜を強膜から剥離してその間に多極電極を挿入する方法⁽¹⁵⁾の2種類が考案されている。

脈絡膜上刺激方式の一番の利点は網膜への侵襲性が低いことである。電極が網膜と接触しないため手術時の網膜損傷のリスクがほかの方式よりも低い。また、網膜タックを用いずとも安定に多極電極を固定することが可能である。更に、網膜への広い範囲に電極を埋植できる点や、再生医療との併用が可能な点が利点として挙げられる。

一方、電極と網膜との距離がほかの方式よりも離れているため、刺激効率や空間分解能の低下が危惧されている。我々は、その対策のために帰還電極を硝子体内に設置して刺激電極との間で通電を行う方式を採用している。脈絡膜上刺激方式の中でも、この方式のことを特に脈絡膜上一経網膜刺激方式 (STS: Suprachoroidal-Transretinal Stimulation) と呼んでいる (図5)。この

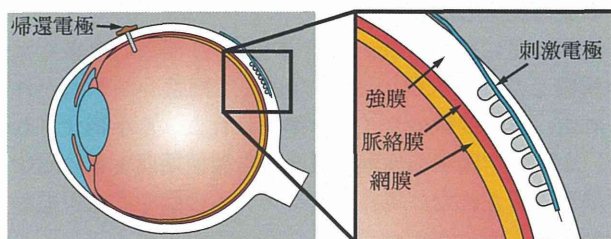


図5 STS方式の模式図

方式では、帰還電極を硝子体内に設置し、脈絡膜上の刺激電極の間で通電を行うことで、硝子体から脈絡膜までの電位差を大きくすることを意図している。網膜内の電界強度を強めて、網膜内の神経細胞への刺激効率を向上できると考えられる。

5. 主要グループの研究開発の状況

人工網膜の研究が本格的に始まったのは1990年代に入ってからである。当初は主にアメリカやドイツのグループが研究を進めていたが、2000年代に入り日本をはじめオーストラリアや韓国も参入するようになった。現在は、人工網膜や皮質刺激型も含めて、20以上の研究グループが人工視覚の研究に取り組んでいる (図6)。以下に主なグループの研究開発状況について紹介する。

5.1 網膜上刺激方式 (Argus II)

南カリフォルニア大学の Humayun が中心となり、1990年代から網膜上刺激方式の人工網膜の基礎研究が始まった。彼らのグループの成果を基に、1998年にベンチャー企業 Second Sight Medical Products (以下 SSMP 社、アメリカ) が設立された。同社が開発した最初の試作機は Argus I と名付けられた。これは人工内耳を改造して作製されたものである。この人工網膜には16極型の多極電極を搭載された。2002年から網膜色素変性で失明に至った患者に対して臨床試験が行われた。最良のケースで、対象物の個数や位置の特定などができるようになったと報告されている⁽¹⁶⁾。

その後60極型の多極電極を搭載した Argus II が開発され2006年から多施設臨床試験が開始された。合計30例の患者に埋植が行われた。最も良い成績の被験者で視力0.016が得られ、アルファベットの文字が識別できるようになったそうである⁽¹⁷⁾。ただ、一部で眼内炎や結膜障害の有害事象も報告されている。これらの臨床試験の結果を受けて、2011年に Argus II は CE マークを取得し EU 圏内での販売が認められた。更に2013年には米国食品医薬品局 (FDA) の認可を受けアメリカ国内での販売が認められた。

5.2 網膜下刺激方式 (The Alpha IMS)

チュービンゲン大学の Zreiner 教授が中心となり、1995年にドイツ南部地方のチュービンゲンやシュツトガルト近郊の複数の研究組織でコンソーシアム (SUBRET コンソーシアム) が組織され、網膜下刺激方式人工網膜の研究がスタートした。その研究成果を受け2003年にベンチャー企業の Retinal Implant 社 (ドイツ) が設立された。彼らが開発した人工網膜は Alpha IMS と名付けられた。この人工網膜には多極電極基板上に1,500もの素子が組み込まれ、各素子は受光素子と

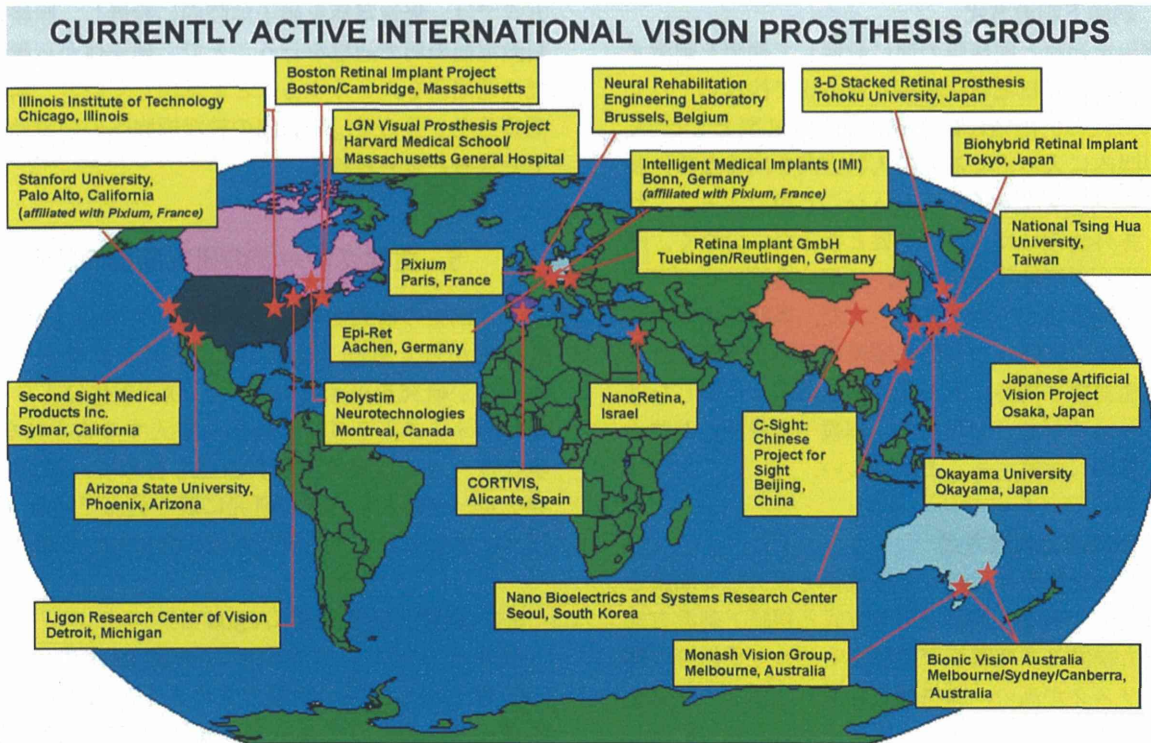


図6 世界の人工視覚システムの開発グループのマップ (出典：www.artificialvision.org. Lauren Ayton と Joseph F. Rizzo の好意による.)

増幅器と刺激電極で構成されている。これにより多極電極で撮像と電気刺激を同時に行うことができる。

これまでの臨床試験で約 20 例の手術が実施された。患者によって治療効果は様々ではあるが、最良のケースでは視力 0.037 まで回復できたとのことである。また一部のアルファベットを識別できたとも報告している⁽¹⁸⁾。更なる臨床試験が、ドイツ、英国、香港などで実施されている。

既に CE マークを取得しており、EU 圏内での販売が認められた。また、米国における販売に向け現在 FDA にて審査が行われている。

5.3 日本における人工網膜研究開発

日本独自の人工網膜を開発することを目的に、大阪大学の故田野教授（当時）をグループリーダーとして大阪大学、奈良先端科学技術大学院大学、(株)ニデックなど複数の研究機関が参加して 2001 年度から人工網膜の開発プロジェクトが進められている。当初は網膜上刺激方式あるいは網膜下刺激方式の人工網膜の検討が進められていたが、網膜への侵襲性が高いことを理由に新しい刺激方式の模索が行われた。その中で考案されたのが前述の STS 方式である。

様々な基礎実験を通じて STS 方式の実現可能性が確認された。そして 2004 年から 2008 年にわたり、合計 4 名の網膜色素変性患者に対して急性臨床試験（手術室内

での試験、多極電極は試験後速やかに抜去）が実施された。この試験で進行した網膜色素変性症例に対しても STS 方式により限局した Electrical phosphene が得られることを確認した⁽¹⁹⁾。

次に、慢性埋植可能な人工網膜システムの開発が進められた。国内にはペースメーカや人工内耳など電子機器の体内インプラントのメーカーはなく、ゼロからのスタートだった。開発には多くの時間と労力を要したが、2010 年に体内埋植可能な人工網膜システムの試作に成功した。この人工網膜システムには 9 極型の多極電極が搭載された。大阪大学医学部倫理委員会の承認を得て、網膜色素変性の患者 2 名に対して臨床試験が実施された⁽²⁰⁾。事前の倫理委員会の指示により埋植期間が限定されたため、最長 1 か月半で同システムの摘出手術が行われた。機能試験を実施したところ、2 名とも phosphene を知覚した。また、2 名とも眼前に提示した太さの異なる二つの棒を識別できた⁽²⁰⁾。埋植手術及び摘出手術に伴う有害事象は発生しなかった。

開発は更に続けられ、2013 年には 49 極型の多極電極を搭載した第二世代の STS 方式人工網膜システムが作られた。体内装置のサイズは第一世代よりも小形化された。大阪大学医学部倫理委員会から埋植期間 1 年の臨床試験が承認された。現在、同システムの臨床試験が進められている。

6. お わ り に

従来は実現困難と考えられてきた人工網膜であるが、近年の急速な電子技術の進歩や医療材料の進歩により実用化への道が開けてきた。医療の現場で人工網膜が用いられる日もそう遠くないと思われる。今後は、人工網膜埋植後の患者の視機能リハビリテーションをどのように行っていくか、そして適応患者の選択に要する事前検査方法の確立などについての検討が必要となると考えられる。

文 献

- (1) 中江公裕, 増田寛次郎, 妹尾 正, 小暮文雄, 澤 充, 金井 淳, 石橋達明, “わが国における視覚障害の現状. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 網脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究,” 平成 17 年度研究報告書, pp. 263-267, 2006.
- (2) A. Santos, M.S. Humayun, E. de Juan Jr, R.J. Greenburg, M.J. Marsh, I.B. Klock, and A.H. Milam, “Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric analysis,” Arch Ophthalmol., vol. 115, no. 4, pp. 511-515, 1997.
- (3) J.D. Weiland, A.K. Cho, and M.S. Humayun, “Retinal prostheses: Current clinical results and future needs,” Ophthalmology, vol. 118, no. 11, pp. 2227-2237, 2011.
- (4) E. Marg, “Magnetostimulation of vision: Direct noninvasive stimulation of the retina and the visual brain,” Optom. Vis. Sci., vol. 68, no. 6, pp. 427-440, June 1991.
- (5) K. Motokawa and K. Iwama, “Resonance in electrical stimulation of the eye,” The Tohoku J. Exp. Med., vol. 53, no. 1-2, pp. 201-206, 1950.
- (6) A.M. Potts, J. Inoue, and D. Buffum, “The electrically evoked response of the visual system (EER),” Invest Ophthalmol., vol. 7, no. 3, pp. 269-278, 1968.
- (7) A.M. Potts, J. Inoue, and D. Buffum, “The electrically evoked response (EER) of the visual system, II. Effect of adaptation and retinitis pigmentosa,” Invest Ophthalmol., vol. 8, no. 6, pp. 605-612, 1969.
- (8) A.M. Potts and J. Inoue, “The electrically evoked response of the visual system (EER). III. Further contribution to the origin of the EER,” Invest Ophthalmol., vol. 9, no. 10, pp. 814-819, 1970.
- (9) 三宅養三, 柳田和夫, 矢ヶ崎克哉, “EER (Electrical Evoked Response)の臨床応用. I. 正常者の EER 分析,” 日眼会誌, vol. 84, no. 5, pp. 354-360, 1980.
- (10) 三宅養三, 柳田和夫, 矢ヶ崎克哉, “EER (Electrical Evoked Response)の臨床応用. II. 杆体系, 錐体系視路障害疾患の EER,” 日眼会誌, vol. 84, no. 6, pp. 502-509, 1980.
- (11) R.P. Michelson, US Patent: 4628933, “Method and apparatus for visual prosthesis,” 1986.
- (12) E. de Juan, M.S. Humayun, and D.H. Phillips, US Patent: 5109844, “Retinal microstimulation,” 1992.
- (13) H. Kanda, T. Morimoto, T. Fujikado, Y. Tano, Y. Fukuda, and H. Sawai, “Electrophysiological studies of the feasibility of suprachoroidal-transretinal stimulation for artificial vision in normal and RCS rats,” Invest Ophthalmol. Vis. Sci., vol. 45, no. 2, pp. 560-566, Feb.

- 2004.
- (14) K. Nakauchi, T. Fujikado, H. Kanda, T. Morimoto, J.S. Choi, Y. Ikuno, H. Sakaguchi, M. Kamei, M. Ohji, T. Yagi, S. Nishimura, H. Sawai, Y. Fukuda, and Y. Tano, “Transretinal electrical stimulation by an intrascleral multichannel electrode array in rabbit eyes,” Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., vol. 243, no. 2, pp. 169-174, 2005.
- (15) H. Sakaguchi, T. Fujikado, X. Fang, H. Kanda, M. Osanai, K. Nakauchi, Y. Ikuno, M. Kamei, T. Yagi, S. Nishimura, M. Ohji, T. Yagi, and Y. Tano, “Transretinal electrical stimulation with a suprachoroidal multichannel electrode in rabbit eyes,” Jpn J. Ophthalmol., vol. 48, no. 3, pp. 256-261, 2004.
- (16) M.S. Humayun, J.D. Weiland, G.Y. Fujii, R. Greenberg, R. Williamson, J. Little, B. Mech, V. Cimmarusti, G. Van Boemel, G. Dagnelie, and E. de Juan, “Visual perception in a blind subject with a chronic microelectronic retinal prosthesis,” Vis. Res., vol. 43, no. 24, pp. 2573-2581, 2003.
- (17) M.S. Humayun, J.D. Dorn, L. da Cruz, G. Dagnelie, J.A. Sahel, P.E. Stanga, A.V. Cideciyan, J.L. Duncan, D. Elliott, E. Filley, A.C. Ho, A. Santos, A.B. Safran, A. Arditi, L.V. Del Priore, R.J. Greenberg, and Argus II Study Group, “Interim results from the international trial of second sight’s visual prosthesis,” Ophthalmology, vol. 119, no. 4, pp. 779-788, 2012.
- (18) E. Zrenner, “Fighting blindness with microelectronics,” Sci. Transl. Med., vol. 5, no. 210, pp. 210-ps16, 2013.
- (19) T. Fujikado, T. Morimoto, H. Kanda, S. Kusaka, K. Nakauchi, M. Ozawa, K. Matsushita, H. Sakaguchi, Y. Ikuno, M. Kamei, and Y. Tano, “Evaluation of phosphenes elicited by extraocular stimulation in normals and by suprachoroidal-transretinal stimulation in patients with retinitis pigmentosa,” Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., vol. 245, no. 10, pp. 1411-1419, 2007.
- (20) T. Fujikado, M. Kamei, H. Sakaguchi, H. Kanda, T. Morimoto, Y. Ikuno, K. Nishida, H. Kishima, T. Maruo, K. Konoma, M. Ozawa, and K. Nishida, “Testing of semichronically implanted retinal prosthesis by suprachoroidal-transretinal stimulation in patients with retinitis pigmentosa,” Invest Ophthalmol. Vis. Sci., vol. 52, no. 7, pp. 4726-4733, 2011.

(平成 26 年 11 月 10 日受付)



かんだ ひろあき
神田 寛行

平 10 静岡大・理・物理卒。平 12 名大大学院工学研究科博士前期了。平 13 (株)ニデック入社。平 21 から阪大・医・助教。現在に至る。研究分野は人工網膜開発プロジェクトにて人工網膜の安全性及び有効性の評価。視能訓練士。医博。



ふじの たかし
不二門 尚

昭 51 東大・理卒。昭 53 同大学院工学系研究科修士課程了。昭 57 阪大・医卒, 平 4 同大学助手, 講師を経て, 平 10 同大学教授。現在に至る。研究分野は視機能の評価, 医用画像処理と工学機器への応用, 視機能回復の基礎研究。人工網膜開発プロジェクトリーダーを務める。医博。

Characteristics of Retinal Reflectance Changes Induced by Transcorneal Electrical Stimulation in Cat Eyes

Takeshi Morimoto^{1*}, Hiroyuki Kanda¹, Tomomitsu Miyoshi², Yoko Hirohara³, Toshifumi Mihashi⁴, Yoshiyuki Kitaguchi¹, Kohji Nishida⁵, Takashi Fujikado¹

1 Department of Applied Visual Science, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan, **2** Department of Integrative Physiology, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan, **3** Research Institute, Topcon Corporation, Itabashi-ku, Tokyo, Japan, **4** Innovative Research Initiatives, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Kanagawa, Japan, **5** Department of Ophthalmology, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan

Abstract

Transcorneal electrical stimulation (TES) activates retinal neurons leading to visual sensations. How the retinal cells are activated by TES has not been definitively determined. Investigating the reflectance changes of the retina is an established technique and has been used to determine the mechanism of retinal activation. The purpose of this study was to evaluate the reflectance changes elicited by TES in cat eyes. Eight eyes of Eight cats were studied under general anesthesia. Biphasic electrical pulses were delivered transcorneally. The fundus images observed with near-infrared light (800–880 nm) were recorded every 25 ms for 26 s. To improve the signal-to-noise ratio, the images of 10 consecutive recordings were averaged. Two-dimensional topographic maps of the reflective changes were constructed by subtracting images before from those after the TES. The effects of different stimulus parameters, e.g., current intensity, pulse duration, frequency, and stimulus duration, on the reflective changes were studied. Our results showed that after TES, the reflective changes appeared on the retinal vessels and optic disc. The intensity of reflectance changes increased as the current intensity, pulse duration, and stimulation duration increased ($P < 0.05$ for all). The maximum intensity of the reflective change was obtained when the stimulus frequency was 20 Hz. The time course of the reflectance changes was also altered by the stimulation parameters. The response started earlier and returned to the baseline later with higher current intensities, longer pulse durations, but the time of the peak of the response was not changed. These results showed that the reflective changes were due to the activation of retinal neurons by TES and might involve the vascular changes induced by an activation of the retinal neurons.

Citation: Morimoto T, Kanda H, Miyoshi T, Hirohara Y, Mihashi T, et al. (2014) Characteristics of Retinal Reflectance Changes Induced by Transcorneal Electrical Stimulation in Cat Eyes. PLoS ONE 9(3): e92186. doi:10.1371/journal.pone.0092186

Editor: Friedemann Paul, Charité University Medicine Berlin, Germany

Received: August 20, 2013; **Accepted:** February 20, 2014; **Published:** March 20, 2014

Copyright: © 2014 Morimoto et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by Charitable Trust Fund for Ophthalmic Research in Commemoration of Santen Pharmaceutical's Founder. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have the following interests: This research was supported by Charitable Trust Fund for Ophthalmic Research in Commemoration of Santen Pharmaceutical's Founder. Yoko Hirohara is the employee of Topcon Corporation. Toshifumi Mihashi was the employee of Topcon Corporation until 2012. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

* E-mail: takeshi.morimoto@ophthal.med.osaka-u.ac.jp

Introduction

Transcorneal electrical stimulation (TES) activates retinal neurons and evokes electrical potential changes in the visual cortex. These changes lead to visual sensations in humans [1–3]. TES is used clinically for the treatment of optic neuropathy and retinal diseases [4–7] and for the determination of residual retinal function in patients with advanced retinitis pigmentosa (RP) [8–11]. Although electrophysiological studies have been performed to try to determine how TES activates retinal neurons [12,13], it has not been determined definitively because it is difficult to record electrically evoked retinal responses because of the artifacts induced by the electrical stimuli [14].

In situ optical imaging of the intrinsic signals is a well-established method of studying brain physiology and mapping the functional architecture of the cerebral cortex [15–17]. The intrinsic signals are represented by the optical reflectance changes associated with the activity of neural tissues [15–17]. The reflectance changes of neural tissues have been attributed to the physiological oximetric changes [16,17], blood flow changes [16,18], and light-scattering changes [19].

Optical imaging of the intrinsic signals of the retina has also been extensively studied [20–31], and it has become an established technique to investigate how the retina is activated by electrical currents [22,24,27,30]. However, the details of how the electrical stimuli affect the reflectance changes have not been determined.

Thus, the purpose of this study was to evaluate the retinal reflectance changes elicited by different stimulation parameters of the TES in cat eyes. We shall show that the reflectance changes appeared on the blood vessels and the optic disc, and the intensity of the reflectance changes was dependent on the parameters of the electrical stimuli. These reflective changes were due to the activation of retinal neurons by TES and might involve the vascular changes induced by an activation of the retinal neurons.

Materials and Methods

Ethics Statement

All experiments were performed in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, and all procedures were approved by the Animal

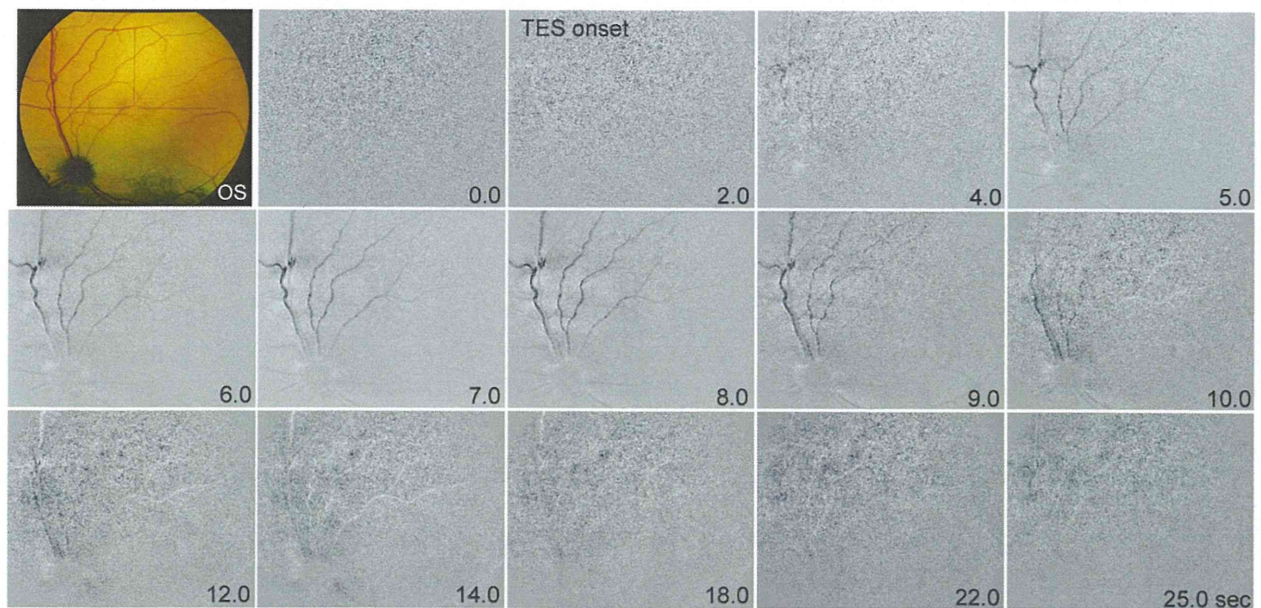


Figure 1. Images of the fundus of the eye of a cat showing reflectance changes in response to transcorneal electrical stimulation (TES). The reflectance changes appeared on the optic disc (OD) and over the retinal blood vessels after the TES. The reflectance changes began about 2.0 s after the onset of stimulation (4.0 s after the onset of recording), and the intensity of the reflectance change increased for 7.0 s after the onset of the recording. It then gradually decreased for 12.0 s. The top left is a fundus photograph of the left eye.
doi:10.1371/journal.pone.0092186.g001

Research Committee of Osaka University graduate school of medicine.

All efforts were made to minimize suffering.

Animals and Preparation

Eight healthy adult cats between 7 months and 1-year-of-age of both sexes and weighing 2.5–3.0 kg were studied. These cats were raised in a breeding colony in the Institute of Laboratory Animals, Osaka University, Graduate School of Medicine. The cats were initially anesthetized with an intramuscular injection of ketamine HCl (25 mg/kg) followed by an intraperitoneal injection of atropine sulfate (0.1 mg/kg). The anesthesia and paralysis were maintained with a continuous intravenous infusion of sodium pentobarbital (1.0 mg/kg/hr), pancuronium bromide (0.2 mg/kg/hr), glucose (0.1 g/kg/hr) in Ringer's solution at a rate of 5 ml/hr. The cats were artificially ventilated with a mixture of N₂O/O₂ (1:1), and the end-tidal CO₂ concentration was kept at 3.5 to 5.0% by altering the frequency and tidal volume of the ventilation. The intratracheal pressure and electrocardiogram were also monitored. The body temperature was maintained at 38°C with a heating pad.

Only the left eyes of the cats were studied due to equipment and space limitations. The pupil was dilated with a solution of 0.5% tropicamide and 0.5% phenylephrine hydrochloride, and 1% atropine. A closed ring shaped eyebar made of stainless steel was used to stimulate the eye. The ring (diameter, 16.5 mm) of the eyebar was sutured to the limbus of cornea, and the end of the bar of the ring was attached to the stereotaxic headholder to minimize eye movements. To protect the corneal surface, a hard contact lens (polymethylmethacrylate; base curve, 8.50 mm; diameter, 13.5 mm; power, +1.5 diopters) was placed on the cornea. The corneas were kept moist with drops of a 0.9% NaCl solution during the experiment.

Optical Imaging of Reflectance Changes of Retina

The ocular fundus was viewed with a fundus camera (TRC-50LX, Topcon, Tokyo, Japan) equipped with a digital CCD camera (C8484, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) [22,31]. The resolution of the camera was 1280×1024 pixels, but the use of the binning mode of the camera to obtain maximum light sensitivity reduced the resolution to 320×256 pixels (12-bit gray scale). A 12-bit digitizer was used, and 4096 grayscale values (GSVs) were obtained for each pixel. The exposure time of the CCD imaging was 20 ms.

A halogen lamp was used to illuminate the posterior fundus, and a band-pass filter was inserted into the optical path to limit the wavelength of the fundus monitoring light to 800–880 nm [22,31]. The power of the monitor light was 250 nW, which was much lower than the safe exposure limit of the American National Standards Institute.

Fundus images were obtained every 25 ms for 26 s. The images were recorded 2 s before, 4 s during, and 20 s after the electrical stimulation. To improve the signal-to-noise ratio, ten images of ten consecutive measurements were averaged [22,31]. The interval between sessions was 1 min. A two-dimensional image of the reflectance changes was obtained by subtracting the images recorded before the stimulation from those recorded after the stimulation. A stabilized power supply (PS-150UE-DC, Hayashi Watch Works, Tateyama, Japan) was used to reduce background fluctuations of the illuminating light. All experiments were performed in a dark room after 30 min of dark-adaptation.

Transcorneal Electrical Stimulation

The left eyes were stimulated transcorneally by the sutured stainless eyebar shaped electrode at the sclerocorneal limbus as one of the electrodes. The return electrode was placed under the skin of the head. The TES consisted of rectangular anodic first (cornea positive) biphasic current pulses obtained from an