

図3 2又刺激電極アレイ

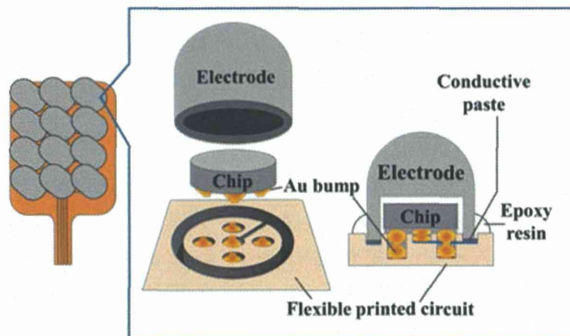


図4 半導体チップ内蔵スマート電極構造図

て、PBS中での電荷注入実験を行い正常の動作を確認した。更に、このスマート電極を2極実装した電極アレイデバイスを試作し(図2)、ネコによる*in vivo*での機能実証を行った。ネコ眼球に試作デバイスを埋植し、双極性パルスにより網膜を電気刺激した結果、視交叉に刺入した電極により神経応答を観測することができた。

これらの結果をもとに、図3に示すようなスマート電極を2式駆動するシステム(2又デバイス)を試作した。この場合、2×2のアレイを2分岐させて、計8極デバイスとしている。このデバイスを家兎眼内に埋植し術式の確認を行ったところ、眼底写真等より問題なく埋植できることを確認した。

電極内蔵型のスマート電極(図4)については、専用半導体チップを設計した。チップ試作サービスによってチップを作製し、シリコンエッチング加工により直径400 $\mu\text{m}$ の小型円形チップを切り出した。このチップを組み込む電極はチタン製とし、電極表面は白金コーティングした。電極の弾丸型の形状は、垂急性臨床試験に使用した電極とほぼ同一の直径550 $\mu\text{m}$ 、高さ500 $\mu\text{m}$ とし、内部にチップ組み込み用キャビティを形成した。作製したチップと電極をポリイミド製のフレキシブル基板上に実装した。まず半導体チップをフリップチップ実装し、続いて電極で覆って基部を樹脂シーリングした。試作した電極を図5に示す。

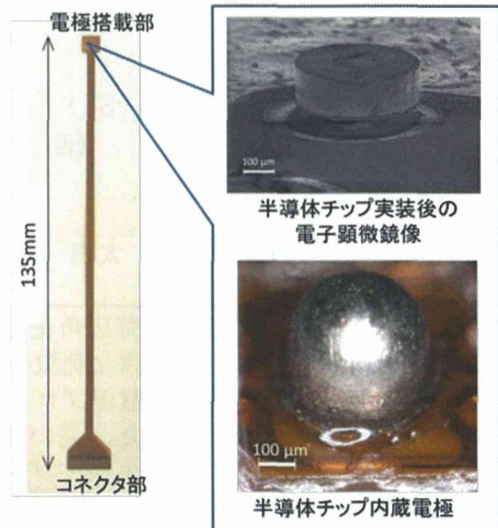


図5 試作した半導体チップ内蔵電極



図6 摘出豚眼を用いた機能評価

図6に示すように、試作した電極を摘出豚眼に埋植して、機能評価を実施した。電極は埋植した状態で正常に動作し、外部からの制御信号で設定した波形と強度で刺激電流を出力可能であることを確かめた。

#### D. 考察

試作したプロトタイプ電極が正常動作した事から、提案したスマート電極を用いた高機能人工網膜システムのコンセプトが実証された。今後は長期埋植時の耐久性についても評価する必要がある。また、より高性能な刺激電極とするために、電荷注入効率が高いフェムト秒レーザ加工Pt電極やIrOx、TiN等をコーティングした高性能電極を試作して特性を評価すると共に、長期安定性を確認する必要がある。

#### E. 結論

CMOSチップとPt弾丸電極から構成されるスマート電極の試作とその基本特性評価をPBS中およびネコ眼内埋植による網膜刺激実験で行い、正常な動作を確認した。またより広い視野を獲得する

ための二又デバイスを試作し、基本特性の評価と術式の確認を行い、良好な結果を得た。さらに半導体チップ内蔵型のスマート電極も提案した。専用チップと電極を設計試作して、チップ内蔵電極を完成させた。試作した電極を摘出豚眼に埋植して評価し、集積化した機能が正常動作する事を確かめた。

#### 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

- Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Hiroyuki Kanda, Yasuo Terasawa, Hiroyuki Tashiro, Takashi Fujikado and Jun Ohta, "Fabrication of Fork-Shaped Retinal Stimulator Integrated with CMOS Microchips for Extension of Viewing Angle," *Sensors and Materials*, Vol. 26, No. 8, pp. 637-648, 2014.
- Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Yasuo Terasawa, Hiroyuki Tashiro, Hiroyuki Kanda, Takashi Fujikado, Jun Ohta, "Performance improvement and functionalization of an electrode array for retinal prosthesis by iridium oxide coating and introduction of smart-wiring technology using CMOS microchips," *Sensors and Actuators A: Physical*, Vol. 211, pp.27-37, 2014.
- Yi-Li Pan, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Sputtering Condition Optimization of Sputtered IrOx and TiN Stimulus Electrodes for Retinal Prosthesis," *IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, Vol. 8, No. 3, pp.310-312, 2013.
- Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Yasuo Terasawa, Hiroyuki Tashiro, Hiroyuki Kanda, Takashi Fujikado, Jun Ohta, "Smart electrode array device with CMOS multi-chip architecture for neural interface," *Electronics Letters*, Vol. 48, No. 21, 1328-1329, 2012.
- Yi-Li Pan, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Hiroyuki Kanda, Takashi Fujikado, Jun Ohta, "Optimization of Sputtering Condition of IrOx Thin Film Stimulation Electrode for Retinal Prosthesis Application," *Journal of Physics: Conference Series*, 352, 012005-8, 2012.

##### 2. 学会発表

- Toshihiko Noda, Hiroaki Takehara, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, and Jun Ohta, "Smart electrode devices with CMOS microchips for retinal prosthesis," *International Conference on BioElectronics, BioSensors, Biomedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications 2014 (Bio4Apps 2014)*, Nov. 17-19, 2014, Shanghai, China. (Invited), (keynote)
- Takumi Fujisawa, Toshihiko Noda, Yasuo Terasawa,

Hiroaki Takehara, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Smart electrode devices with CMOS microchips for retinal prosthesis," *International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications 2014 (Bio4Apps 2014)*, Nov. 17-19, 2014, Shanghai, China.

- Toshihiko Noda, Takumi Fujisawa, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Hiroaki Takehara, Yasuo Terasawa, Hiroyuki Tashiro, Hiroyuki Kanda, Takashi Fujikado, Jun Ohta, "Fabrication of a smart electrode array with built-in CMOS microchips for STS retinal prosthesis," *The 8th Biennial World Congress on the Relationship between Neurobiology and Nano-Electronics Focusing on Artificial Vision (The Eye & the Chip)*, Sep. 29, 2014, Michigan, USA.
- 藤沢 匠, 野田 俊彦, 寺澤 靖雄, 田代 洋行, 竹原 宏明, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "人工視覚用 CMOS チップ内蔵型スマート電極デバイスの刺激機能実証," 平成 26 年応用物理学会秋季学術講演会, 2014/9/17.
- Jun Ohta, "Challenges for high performance stimulation in a retinal prosthesis," (invited), *Symposium on Grand Challenges in Neural Technology 2013*, Dec. 4, 2013, Centre for Life Sciences, National University of Singapore, SINGAPORE.
- Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Yasuo Terasawa, Hiroyuki Tashiro, Hiroyuki Kanda, Takashi Fujikado, Jun Ohta, "Intelligent Retinal Prosthetic Device Employs Smart Electrode Array Integrated with CMOS Microchips," *Bio4Apps 2013, O-1C-5*, Oct. 29, 2013, Tokyo Medical and Dental University, Japan.
- 藤本 裕介, 黒木 渉平, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 寺澤 靖雄, 太田 淳, "CMOS チップを電極内部に組込んだ人工視覚用スマート電極アレイの作製," 平成 25 年応用物理学会秋季学術講演会, 16a-C4-5, 同志社大学 京田辺キャンパス, 2013/9/16.
- Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "A Smart Electrode Array Devices with CMOS Microchip for Neural Interface," *International Conference on BioElectronics, BioSensors, Biomedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications 2012 (Bio4Apps 2012)*" Nov., 2012, Singapore.
- 平松 祐樹, 東丸 幸江, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 寺澤 靖雄, 神田 寛行, 不二門 尚, 太田 淳, "CMOS チップ搭載フォーク形人工視覚デバイスの作製と機能実証", 平成 24 年応用物理学会秋季学術講演会, 愛媛大学, 2012/9/12.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

野田俊彦, 笹川清隆, 徳田崇, 太田淳, “生体  
用高機能電極”, 特願 2013-028006, 平成 25  
(2013) 年 2 月 15 日

分担研究課題： STS 型人工網膜システムの開発に関する研究  
（体外装置の有効性・体内装置の耐久性について）

研究分担者 小澤 素生 株式会社ニデック 代表取締役社長

研究要旨：49ch 脈絡膜上経網膜刺激（STS: Suprachoroidal Transretinal Stimulation）方式の人工視覚システムの臨床研究を実施するにあたり、以下の研究を行った。

- ① 人工視覚で S/N の高い光覚を得るには刺激電極数を抑制しつつ識別のし易い変換処理が有効である。カメラの撮影画像から網膜を刺激する 7×7ch の電極アレイへ刺激信号を出力する二値化処理と輪郭抽出の変換処理の違いを人工視覚シミュレーターで比較した。カメラに写る対象物のサイズが大きくなると、輪郭抽出の方が二値化処理より刺激電極数が少なくなる傾向が確認された。但し、シミュレーターを装着した健常者の見え方と、人工視覚システムを埋植した患者の見え方は同じでなく、疾患の状態もシミュレーターに反映するアルゴリズムを追加する必要がある。
- ② 1 年間の臨床研究で使用する体内埋植装置の耐用期間を生理食塩水中での加速試験を行いアレニウスプロットにより 484 日と推定した。装置の主な故障原因はエポキシ樹脂封止部への浸水であり、アンカー効果から化学結合が期待されるシリコーン樹脂包埋及び金粒子の拡散接合技術に改善して、耐用期間の大幅な改善効果が得られた。
- ③ 単極電極での慢性通電試験から、長期慢性刺激の生体に対する安全性を示したのにつき、家兎眼に 49 極電極アレイを留置し、一日 8 時間の通電を 1 ヶ月間行い網膜に損傷が生じるか否かを調べた。試験を行った 5 眼すべてについて、蛍光眼底観察、組織標本観察等で電気刺激に伴う明らかな損傷は認められなかった。一方で残存強膜厚は通電に伴い増加する傾向のあることが示唆された。

①カメラ画像の刺激信号への変換処理

A. 研究目的

STS方式の人工視覚システムで網膜への電気刺激を続けると、視野に霞がかかたり自己発火が生じて、S/Nの低下が起きることが2010年に実施した亜急性臨床研究で確認されている。これを低減する為に、単位時間あたりに刺激出力する電極数を減らすとともに、対象物の認識をし易くする効果的な刺激方法を探索する。

B. 研究方法

カメラ画像の処理工程を検討するために変換の中間工程の画像をリアルタイムで確認できるジグ（画像処理ソフトウェア）を開発して撮影画像から目的に叶う刺激電極出力をするアルゴリズムを探索して、実際に撮影画像で評価した。

図 1-1の操作画面で以下の各種設定を変更しながらその効果を確認できるジグを開発した。

- ①カメラで取得した画像(図 1-1 の①)に対し、
- ②画像処理（輪郭抽出(Sobel)・輪郭強調）の処理を加える。(処理無しも可能) (図 1-1 の②)
- ③ 7×7 の電極エリアに画像を分割した各電極

用画像の二値変換出力または多値出力（グレースケール化）する。(図 1-1 の③)

④ 7×7 の画像に対して画像処理（輪郭抽出(Sobel)・輪郭抽出(Canny)）の処理を加える。

(画像処理無しも可能) (図 1-1 の④)

⑤画像処理の結果を表示してカメラ入力画像と比較し評価する。(図 1-1 の①、⑤)

これらの条件を組み合わせると刺激電極数を減らしても対象物の認識がし易い画像処理工程について定性的に検討し、視認性と通電電極数を抑える効果について調査した。具体的にはヘッドマウントディスプレイ(HMD)にビデオカメラを接続した人工視覚シミュレーター(図 1-2)で液晶モニターに表示した視標を撮影して社内ボランティアの健常者の5名(24~42歳、中央値37歳)使って調査した。(図 1-2)初めに被験者5人が平均正答率50%で識別できる図形(三角)視標と文字(E)視標の二値化及び輪郭抽出処理の最小視角を測定し、(図 1-2)このサイズを1倍、1.5倍、2.5倍にして二値化処理と輪郭抽出処理の画素数を比較した。

(倫理面への配慮)輝度、使用時間に配慮し人工視角シミュレーターの使用による眼精疲労を

回避する。

### C. 研究結果

図1-3、図1-5に示す輪郭抽出後に二値化する処理が有効であると考えられた。

(A) 数字の0を入力画像にして、輪郭抽出のオフ(図1-2)/オン(図1-3)を比較した。輪郭抽出オンにすると白い背景は黒くなり文字の輪郭部分が白くなる。この結果、刺激する電極数を32%減らして(31ch→21ch)0と識別することができた。

(B) 黒い背景に比較的大きい面積で単純な形状の対象物(白いコーヒーカップ)を入力画像にして、輪郭抽出のオフ(図1-4)/オン(図1-5)を比較した。輪郭抽出をオンにすることで輪郭のみの刺激となり、刺激出力する電極数を10%低減して(20ch→18ch)形を認識することができた。

(C) 人工視覚シミュレーターによる調査で基準となる視標サイズ(認識出来る最小のサイズ)は、図形(三角)視標では、二値化、輪郭抽出ともに視角5.3度、文字(E)視標では、二値化が8.3度、輪郭抽出では16.7度になった。そしてこの最小サイズを基準に、1倍、1.5倍、2.5倍のサイズで認識した図形(三角)視標及び文字(E)視標視標の平均通電電極数をカウントした結果を

(図1-9)(図1-10)に示す。両方の視票で視標サイズが1倍では、二値化の方が通電電極数は少なくなり、2.5倍では、輪郭抽出の方が少なくなった。

### D. 考察

(A)文字については輪郭抽出を行う事で線の輪郭を検出するため、白地に黒い文字が書かれていても黒字に白い文字が書かれていても同じ画素で刺激する事が出来る。

(B)一方、視角に対して白い部分の面積比が大きくなる食器等では輪郭抽出を行う事で刺激画素数を減少させる効果が期待できる。

(C)二値化処理では黒地に白で表示される視標が大きくなると画面に占める高輝度の箇所が増え、通電電極数が増加するのに対し、輪郭抽出では、視標が大きくなると視標の一部が視角からはみ出すことで、輪郭線の本数が減り、通電電極数が減少する。(図1-11)但し、白黒が反転した視標では逆の状況となり二値化処理は見るものの明るさとサイズにより刺激電極数が大きく変化するのに対して、輪郭抽出では通電電極数の変化が少なくなる傾向がある事が推察される。

但し、手術を受けた患者が光覚を認識できる電極数は疾患の状態に依存(1例目:28/49、2

例目:47/49)し、視野内のPhospheneの位置と電極の配置も必ずしも一致しないため、実際に患者の見え方を反映したシミュレーターの表示アルゴリズムを検討する必要がある。

### E. 結論

カメラ画像から刺激電極の刺激信号への変換処理について、二値化と輪郭抽出処理の比較をして、輪郭抽出処理が刺激電極数を減らして形が認識できる処理技術としてより適している事を、健常者が人工視覚シミュレーターを装着した調査で確認したが、Phospheneを誘発しない電極があったり、電極配置とPhospheneを感じる位置が異なる電極があり、この様な事も含めてカメラ画像の刺激信号への変換処理方法について引き続き検討する。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

無し

#### 2. 学会発表

第50回日本眼光学学会総会、通電電極数の抑制を目指した人工視覚システム向け画像処理法の検討、伊藤邦彦(ニデック)

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

#### 1. 特許取得

特願2012-260735(出願日H24.11.29)

視機能評価プログラム及び視機能評価装置

発明者:不二門尚、神田寛行、杉浦基弘、

伊藤邦彦

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

## ②体内埋植装置の耐用期間(加速試験)

### A. 研究目的

(A)1年間の慢性臨床研究を実施するにあたり研究期間中装置が故障せずに動作することを加速試験によって予測する。

(B)また、治験装置として10年間以上の耐用期間を目指すして改良を加える。

### B. 研究方法

(A)体内へ埋植されるデバイスの耐用期間をア

レニウスプロット（工業評価）で予測するために、体内環境を模擬した加速試験系として 50℃と 80℃の PBS（リン酸緩衝生理食塩水）に工業試験用の体内装置（図 2-1）を浸し、49ch、Cathodic first・Biphasic Pulses、First pulse duration:500  $\mu$  sec、Inter pulse duration:50  $\mu$  sec、1st/2nd pulse ratio 1:1、Current Amplitude:1.2mA、Energization:24h/day の連続通試験を行い、故障するまでの時間を調べる。これらの異なる温度での装置寿命から 37℃（体温）での装置寿命を予測して 1 年間の臨床研究が遂行できる事を確認する。

(B) 上記試験での故障原因を調べて、対策を施し耐用期間の改善効果を確認する。

（倫理面への配慮）

使用材料の生体安全性を確保する。

### C. 研究結果

(A) 50℃と 80℃の耐久試験を 2 例ずつ実施した。80℃の試験では通電開始から 7 日目と 13 日目、50℃の試験では 121 日目と 156 日目にマルチプレクサ IC の動作異常が発生して装置が停止した。これらの故障データから、37℃での予測寿命は 484 日（約 1 年 4 ヶ月間）であった。（図 2-2）

(B) 故障原因はポキシ樹脂包埋部への浸水とマルチプレクサ IC 封止ガラス材料の腐食であった。

エポキシ樹脂とセラミックの接着は主にアンカー効果によると考えられ、これを酸素プラズマと生体適合性のあるカップリング剤を併用したシリコン樹脂との化学的な接合へ改善した。この効果を確認するために片面に楕円形金属配線を施したセラミック基板の配線面のみをエポキシ樹脂で覆った試料（界面有り）及び表裏面をエポキシ樹脂で覆った試料（界面無し）、そしてシリコン樹脂で配線面のみを覆った試料を 70℃の PBS（リン酸緩衝生理食塩水）に浸して（図 2-3）端子間のインピーダンスの経時変化を FRA インピーダンスアナライザー（AutoLab）で測定した結果が（図 2-4）である。エポキシ（界面有り）試料が 3 日目、エポキシ（界面無し）試料が 100～165 日目に線間インピーダンスが 100 k  $\Omega$  以下まで低下したが、シリコン樹脂で絶縁した試料は 340 日経過しても高いインピーダンスを保持している。

マルチプレクサ IC 封止ガラス材料は熱処理工程に配慮してアルミナセラミックス（熱膨張係数  $6.9 \times 10^{-6}$ ）と熱膨張係が極力近い光学ガラス材料（OHARA 製 S-BAL35、熱膨張係数  $6.7 \times 10^{-6}$ ）を使用していたが、耐食性を改善するために材

質を見直した。（SCHOTT 製 D263T、熱膨張係数  $7.2 \times 10^{-6}$ ）また、ガラスリッドとアルミナセラミックスの気密封止に金粒子の拡散接合（図 2-5）を導入して製作した評価用試料は 70℃の PBS（リン酸緩衝生理食塩水）中に連続 19 ヶ月浸漬しても浸水やヘリウムリーク試験で異常が認められない性能を得ており、改良した封止技術の効果が確認されている。

### D. 考察

図 2-2 の準用予測のプロットは 50℃、80℃各温度で N=2 の試験であったが各温度で大きいばらつきは無く品質が比較的安定している事が推測された。また、PBS 中は体内環境と比較して粘性の低い大量の水分が装置を取り囲んでおり、浸水に関しては過酷試験であると考えられる。なお、1 例目の臨床研究の装置埋植期間は 2014/1/30～2015/2/12 であり、1 年間の臨床研究が終了して装置は既に摘出されている。臨床研究期間中、安全機能が働いて一時的に運転の制約を受ける事はあったが概ね計画された期間装置は動作し、大きな問題はなかった。摘出した体内装置の状態を調査してその結果を治験装置に反映させていく。

### E. 結論

新しい医療技術を基礎研究から臨床研究、更に治験へと適切な段階で効率良く移行するためには新しいフェーズに向けての課題解決や研究成果のタイムリーなフィードバックが大切である。一年間の慢性臨床研究に必要な耐用期間は概ね確保しており、治験で使用する医療機器に求められる更に長期の耐用期間についても封止技術を根本的に改善した事で良好なデータが得られており、引き続き 10 年以上の信頼性確保のために検証をして行く。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

### 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

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

なし

### ③網膜への電気刺激の安全性検証（動物実験）

#### A. 研究目的

これまでに行ってきた単極電極での慢性通電試験から、長期慢性刺激の生体に対する安全性が示されてきた。また臨床研究に用いる49極電極アレイを長期間生体に通電することなく埋植しても、損傷は発生しないことを報告してきた。一方でこの49極電極アレイを用いて実際に通電を行う試験はこれまで行われていなかった。49極の電極すべてを用いた電気刺激は、単位時間当たり投入される電荷量は、全体としては単極電極刺激で投入される電荷量より著しく大きい。このような電気刺激が生体に及ぼす影響は明らかではない。本研究では、49極電極アレイを用いた電気刺激が生体に与える影響を明らかにすることを目的とする。

#### B. 研究方法

本研究では、家兔（日本白色種）5羽を使用した。

##### [埋植手術]

まず2.5%~3.0%のイソフルランによる吸引麻酔で全身麻酔を施し、頭蓋骨上の頭皮を切開し頭蓋骨を露出させ、頭蓋骨上にアンカーネジおよび骨セメントを用いて電子回路基板を内蔵した中継ボックスを固定した。その数日後に眼球手術を実施した。2.5%~3.0%のイソフルランによる吸引麻酔で全身麻酔を施し、片眼を対象に手術を施した。刺激電極は、下方の結膜を円蓋部切開し、後極部強膜を露出して、角膜輪部より10mm付近から強膜ポケットを作成した。強膜ポケットに刺激電極（図3-1）を挿入し、電極基盤を強膜に縫着した。硝子体電極は、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。

それぞれの電極から延びるケーブルを強膜に縫着し、固定した。眼窩から頭蓋に至る皮下トンネルを形成し、これを用いてケーブルを眼窩より頭蓋へと導いた。最後にケーブルの末端を頭蓋骨上に設置された電子回路基板の端子に接合した。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の点眼（1回/日）を行った。

##### [通電]

家兔にジャケットを装着させ、背部のポケットに設置された刺激装置を用いて通電を行っ

た。49極中40極の電極に対して、Cathodic-First、パルス高さ1.2mA、パルス長さ0.5ms (1st phase) + 0.5ms (2nd phase)、繰り返し周波数20Hzの通電を行った。49極全てに通電しなかった理由は、刺激装置が複数の電極に同時に通電できない仕様上、20Hzの繰り返し周波数を実現するために通電電極数を減らす必要があったためである。

##### [観察]

慢性通電開始前および通電後に、眼底写真撮影、蛍光眼底造影、前眼部観察、OCTによる断層撮影、およびデバイスの動作確認のための通電波形記録を行った。慢性通電終了後に動物を屠殺し眼球の組織標本を作成し、HE染色後に観察を行った。

##### （倫理面への配慮）

ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) 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(株)ニデック動物実験委員会承認の下実施された。

#### C. 研究結果

##### [前眼部観察]

1/5例においてMUX部分と硝子体電極埋植部周辺結膜における結膜裂傷の兆候が見られた(図3-2)。その他の4/5例については結膜裂傷に至るほどの兆候は認められなかったがMUXの角部分結膜にテンションがかかっていた。以上の結果からデバイスの形状の改良を行なった方が良いことが示唆された。

##### [眼底および蛍光眼底検査]

眼底観察にて、5例全てにおいて通電期間を通し眼内の出血や混濁眼等の異常所見は認められなかった。蛍光眼底検査では、一部MUX側の電極上に若干低蛍光箇所が見られたが(2/5例)、通電期間を通し、顕著な血管閉塞や損傷等の異常所見が認められたものはなかった。

##### [OCT検査]

4ch、25ch、46chを観察箇所として埋植期間を通して網膜断層像の観察を行った。残存強膜厚の変動は見られたものの5例全てにおいて、網膜の層構造に異常所見は認められなかった。

##### [残存強膜厚の経時変化]

5例全てにおいて4ch、25ch、46chの3カ所の残存強膜厚は通電前と比較し通電1週目に増加した。これは統計学的にも有意傾向にあると言える(4ch:  $p = 0.06$ , 25ch:  $p = 0.04$ , 46ch:  $p = 0.09$ , paired t-test)。同様に、通電期間中1ヵ月間の残存強膜厚の変動につ

いては個体差が見られるが、通電前と比較し1ヵ月間の通電後では、残存強膜厚は増加傾向にあると言える(4ch : p = 0.06, 25ch : p = 0.02, 46ch : p = 0.01, paired t-test)。また、1ヵ月間通電を行った本試験と、過去に行った非通電試験(本試験と同じ49ch多極電極を埋植)との残存強膜厚変化量平均値の比較を行った(図3-3)。本試験(通電有)では術後1週目から刺激1ヵ月後の変化量平均値(4ch, 25ch : n=4, 46ch : n=5)、非通電試験では術後1週目から術後1ヶ月目の変化量平均値(4ch, 25ch, 46ch : n=3)で評価を行った。図3-3より、4ch, 25ch, 46chの3カ所全てにおいて通電無では残存強膜厚が減少、通電有では肥厚していた。統計学的にも、4chについては通電の有無による残存強膜厚変化量に有意な差が認められた(4ch : p = 0.004, 25ch : p = 0.06, 46ch : p = 0.86, Unpaired t-test)。変化量を見るポイントが通電1ヵ月目、術後1ヵ月目と通電、非通電とで違いがあるため断定はできないが、これらの結果より、残存強膜厚の変化量に通電の有無の影響があると推測された。本試験にて、通電による残存強膜厚の肥厚傾向が示唆されたが、網膜機能に異常は認められていない。その他、電極周辺組織において炎症や損傷等の明らかな異常所見は認められていないため、慢性刺激による網膜への安全性は確認できたと示唆される。

#### [組織学的検査]

1ヶ月通電後の網膜の組織学的評価より、5例全てにおいて電極周辺強膜に線維芽細胞の発生が認められたが、特に目立った異常所見は見られなかった。

#### [刺激電流波形]

5例すべてについて電流波形および振幅は試験期間全体を通して正常であり、問題なく機能することが確認された。

#### [摘出後のデバイス動作確認]

摘出後のデバイスの動作を確認した。5例中4例に1ヶ月間埋植されたデバイスは摘出後も正常動作することが確認された。1例については、摘出後の検査で異常動作を示したが、一晚の乾燥処理後の再検査では正常動作した。

#### D. 考察

本試験で採用した刺激条件は40極から装置が出力可能な最大出力で刺激し続けるという過酷条件である。しかしながら電気刺激に起因する明らかな組織損傷は発生しなかった。従って49極電極を用いた1ヶ月間の電気刺激の安全性は確認されたと考えられる。一方で通電に伴い強膜は肥厚する傾向を示した。この現象は安全性に影響を及ぼすものではないが、機能性には影響する可能性があるため、より長期の試験を通じて傾向を把握する必要があるものと考えられる。

えられる。

#### E. 結論

過去に実施した単極電極を用いた慢性刺激試験、多極電極を非通電で長期埋植した試験、および多極電極を通電しながら1ヶ月埋植した本試験の結果を総合して、STS方式の49ch電極を用いた電気刺激は安全であると考えられる。

#### 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  
なし
2. 学会発表  
なし

#### 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
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



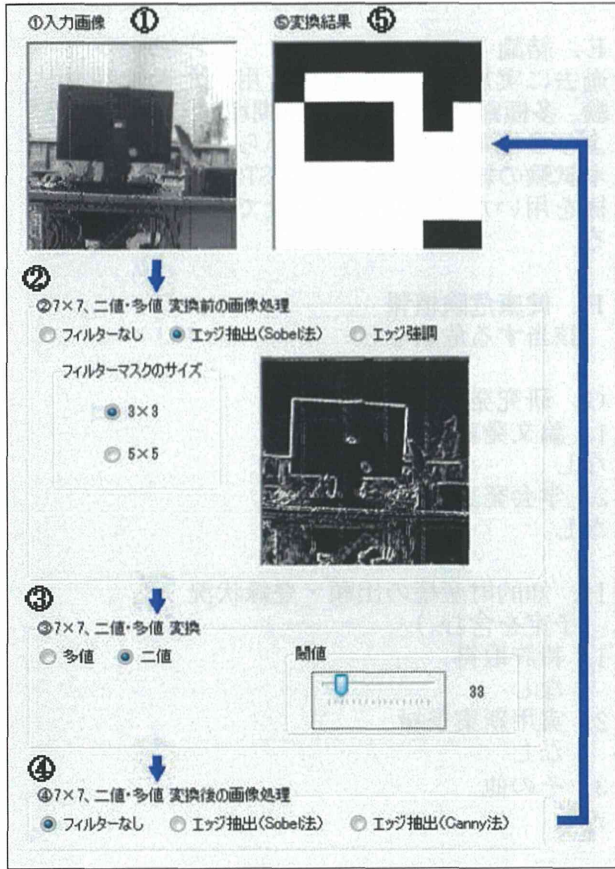


図 1-1. 評価用ソフトウェアの操作画面

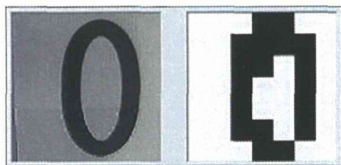


図 1-2. 数字の0を2値の7×7に変換

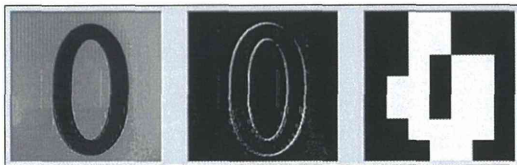


図 1-3. 数字の0を輪郭抽出(Sobel)し、2値の7×7に変換

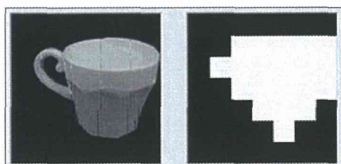


図 1-4. コーヒーカップを2値の7×7変換に変換



図 1-5. コーヒーカップを輪郭抽出(Sobel)し、2値の7×7に変換

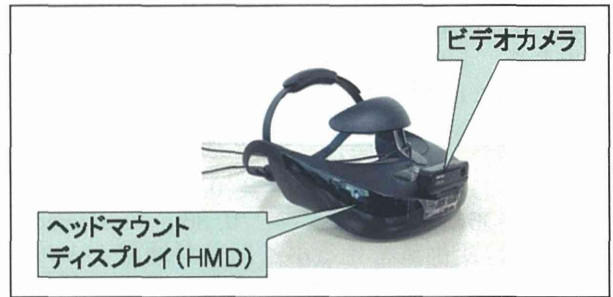


図 1-6. 人工視覚シミュレーター

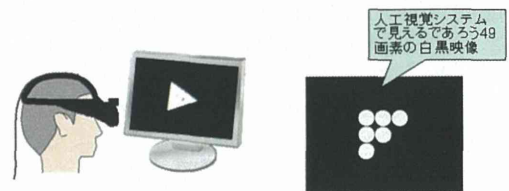


図 1-7. 検査の様子とHMD内の映像

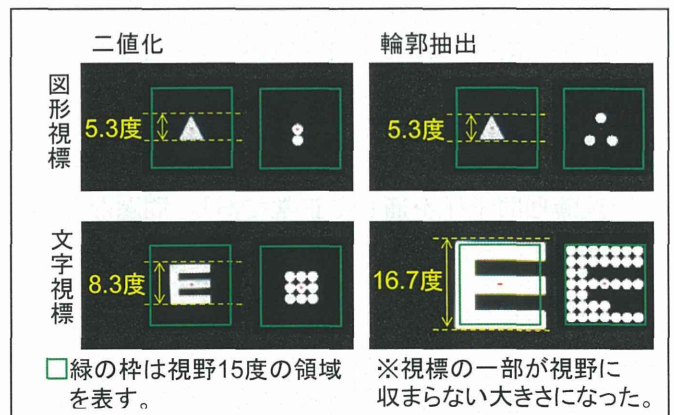


図 1-8. 識別可能な指標と処理の最小視角

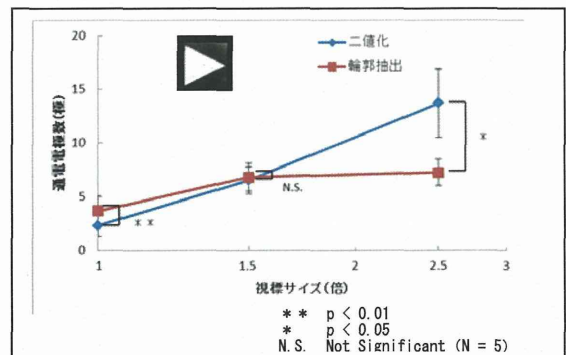


図 1-9. 図形視標

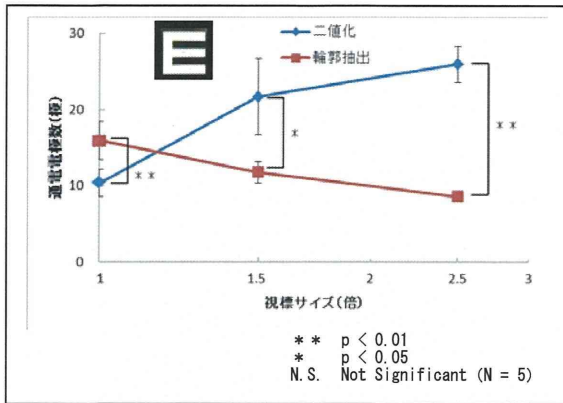


図 1-10. 文字視標のサイズと通電電極数

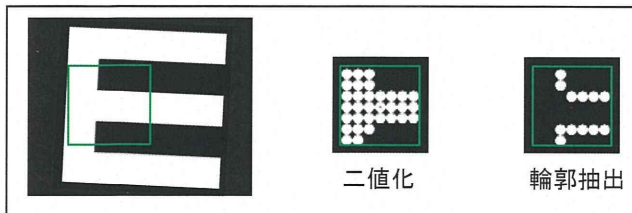


図 1-11. 視標が視角より大きい時の二値化と輪郭抽出の刺激電極数

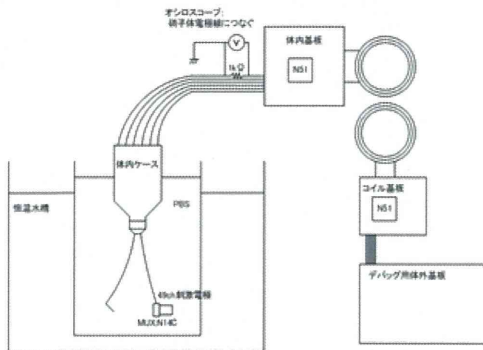


図 2-1. 耐久試験の装置環境

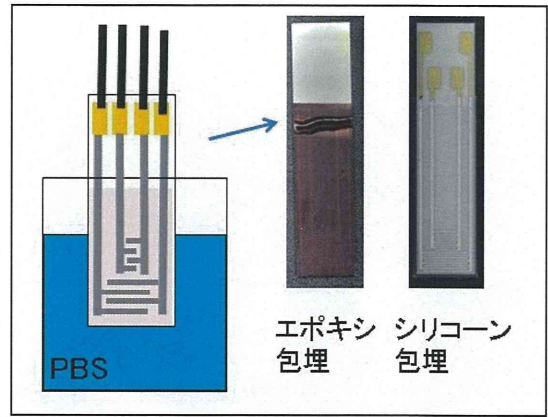


図 2-3. 楕形金属配線を施した試料

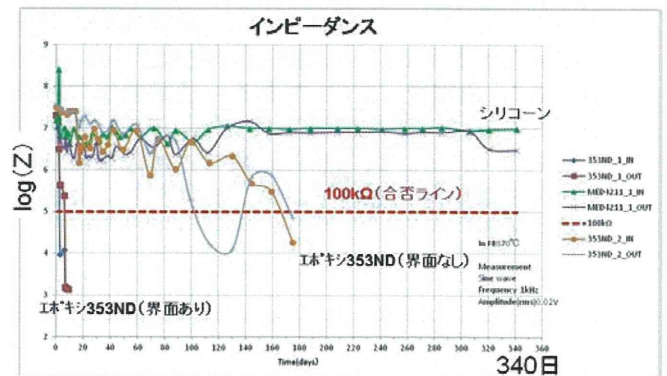


図 2-4. 樹脂被覆した楕型配線基板の 70°C PBS 中でのインピーダンス変化

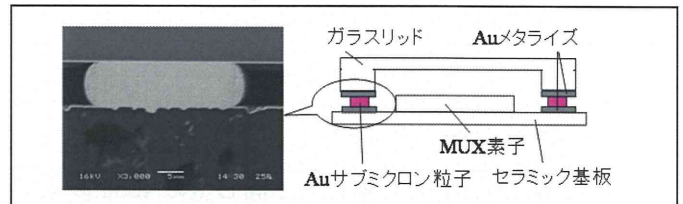


図 2-5. Au粒子の拡散接合

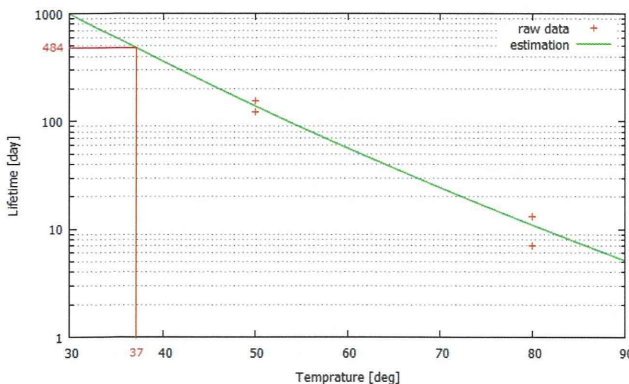


図 2-2. 50°Cと80°Cの試験結果より予測される37°Cでの装置寿命(484日)

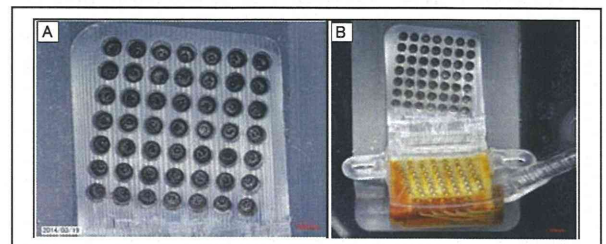


図 3-1. バルク電極49極アレイ写真 (A)、刺激電極ユニット全体写真 (B)

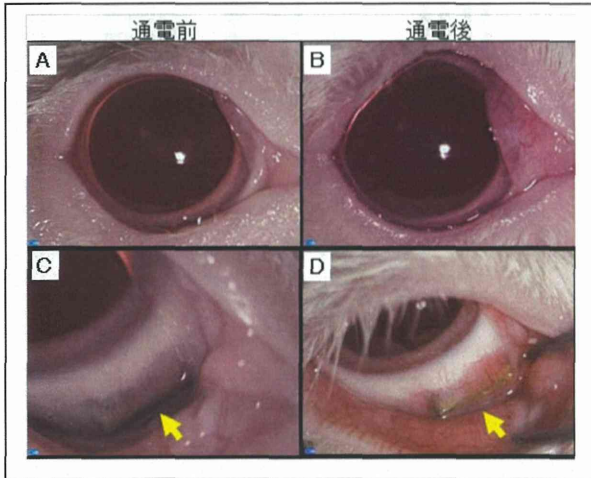


図 3-2. MUX 部分の結膜において、結膜裂創の兆候が認められた V503 の通電前後の前眼部写真 (通電前: A, C、通電後: B, C) である。通電前後の前眼部写真 C, D は MUX 埋植箇所 (黄矢印部分) を観察したものである。通電前と比較し、通電後は MUX 箇所の結膜が薄くなっており、結膜裂傷の兆候が認められた。

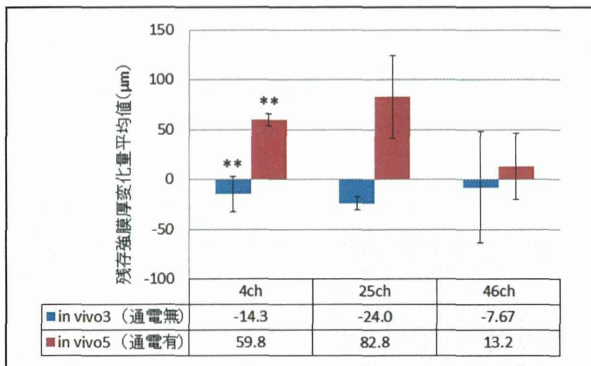


図 3-3. 本試験と、本試験と同じ型の 49ch 多極電極を埋植し通電を実施していない試験 (in vivo3) との残存強膜厚変化量平均値の比較。縦軸が残存強膜厚変化量、エラーバーは標準偏差である。有意差がある場合に\*としている。in vivo5 (通電有) は術後 1 週目から刺激 1 カ月後の変化量平均値 (4ch, 25ch: n=4, 46ch: n=5)、in vivo3 (通電無) は術後 1 週目から術後 1 ヶ月目の変化量平均値 (4ch, 25ch, 46ch: n=3) である。4ch, 25ch については、グラフより通電無では、残存強膜厚が減少、通電有では肥厚している。統計学的にも、4ch については通電の有無による残存強膜厚変化量に有意な差が見られた (4ch:  $p = 0.004$ , 25ch:  $p = 0.06$ , 46ch:  $p = 0.86$ , Unpaired t-test)。

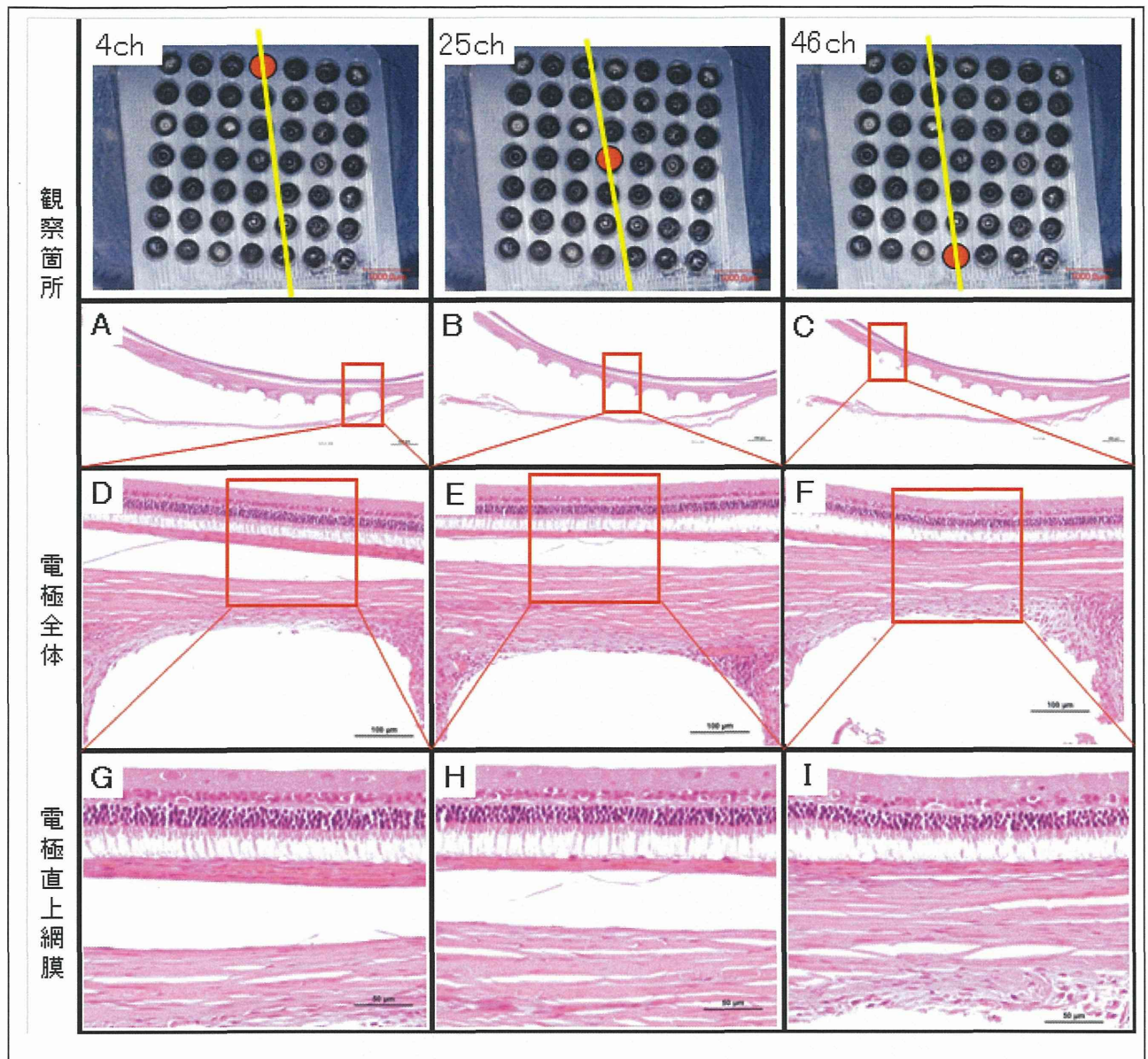


図3-4. 代表例としてV503の1ヶ月通電後の電極埋植部付近網膜切片のHE染色を示す。観察箇所は、4ch：通電 (A, D, G)、25ch：非通電 (B, E, H)、46ch：通電 (C, F, I) であり、全ての組織において脈絡膜または色素上皮細胞層より網膜が剥離しているが、OCT観察では網膜剥離がみられないことから、組織標本作製時に剥離したものと推察される。電極直上および電極周辺部の組織に一部線維芽細胞の発生が認められるが (青矢印部分)、特に目立った異常所見は見られなかった。

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 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
2. Miyagawa S, Mihashi T, Kanda H, Hirohara Y, Endo T, Morimoto T, Miyoshi T, and Fujikado T. Asymmetric Wavefront Aberrations and Pupillary Shapes Induced by Electrical Stimulation of Ciliary Nerve in Cats Measured with Compact Wavefront Aberrometer. PLoS One. 2014 Aug 21;9(8):e105615. doi: 10.1371/journal.pone.0105615. eCollection 2014
3. 神田 寛行、不二門 尚 : 電気信号を用いた神経機能再検 人工網膜 (Suprachoroidal-transretinal stimulation STS) 脳 21, 18 巻 1 号 pp.84-88、2015
4. Morimoto T, Kanda H, Miyoshi T, Hirohara Y, Mihashi T, Kitaguchi Y, Nishida K, Fujikado T.: Characteristics of Retinal Reflectance Changes Induced by Transcorneal Electrical Stimulation in Cat Eyes. PLOS ONE 9(3) Mar. 2014
5. Ito Y, Saishin Y, Sawada O, Kakinoki M, Miyake T, Sawada T, Kawamura H, Ohji M.; Comparison of single injection and three monthly injections of intravitreal bevacizumab for macular edema associated with branch retinal vein occlusion. Clin Ophthalmol. 2015 Jan 23;9:175-80. doi: 10.2147/OPHTH.S76261. eCollection 2015.
6. Kakinoki M, Sawada O, Sawada T, Saishin Y, Kawamura H, Ohji M; Effect of vitrectomy on aqueous VEGF concentration and pharmacokinetics of bevacizumab in macaque monkeys. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Aug 24;53(9):5877-80. doi: 10.1167/iovs.12-10164.
7. Tojo N, Nakamura T, Ozaki H, Oka M, Oiwake T, Hayashi A. Analysis of macular cone photoreceptors in a case of occult macular dystrophy. Clin Ophthalmol.2013 May 8 ;7:859-64

8. Hirakata A, Inoue M, Hiraoka T, McCuen BW 2nd 1 (1Department Ophthalmology, Duke Univ, Durham, NC): Vitrectomy without Laser Treatment or Gas Tamponade for Macular Detachment Associated with an Optic Disc Pit. *Ophthalmology*119:810-818,2012
9. Khoo HM, Kishima H, Hosomi K, Maruo T, Tani N, Oshino S, Shimokawa T, Yokoe M, Mochizuki H, Saitoh Y, Yoshimine T. Low-Frequency Subthalamic Nucleus Stimulation in Parkinson' s Disease: A Randomized, Clinical Trial. *Mov Disord.* 29 (2) : 270-4, 2014.
10. Uchimura M & Kitazawa S. Cancelling prism adaptation by a shift of background: a novel utility of allocentric coordinates for extracting motor errors. *The Journal of Neuroscience* 33:7595-7602, 2013.
11. Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Yasuo Terasawa, Hiroyuki Tashiro, Hiroyuki Kanda, Takashi Fujikado, Jun Ohta, "Performance improvement and functionalization of an electrode array for retinal prosthesis by iridium oxide coating and introduction of smart-wiring technology using CMOS microchips," *Sensors and Actuators A: Physical*, Vol. 211, pp.27-37, 2014.

## Feasibility of 2nd Generation STS Retinal Prosthesis in dogs

Fujikado T, Kamei M, Sakaguchi H, Kanda H, Morimoto T, Nishida K,  
Kishima H, Maruo T, Oosawa K, Ozawa M, and Nishida K

**Abstract**— We developed a 2<sup>nd</sup> generation suprachoroidal transretinal stimulation (STS) system with a 49 channel electrode array and implanted in 2 dogs. One month after surgery, all electrodes were functioning and the ocular fundus was normal in both dogs. The results indicate the 2<sup>nd</sup> generation STS retinal prosthesis is feasible and can be considered for clinical use.

### I. INTRODUCTION

Retinitis pigmentosa (RP) is one of the leading causes of blindness in developed countries and is characterized by a progressive degeneration of the photoreceptors.<sup>1,2</sup> To restore some vision to these patients, stimulating the residual functional retinal neurons by electrical currents delivered through a retinal prosthesis is being extensively studied.<sup>3-5</sup> We have developed our original method of retinal prosthesis named suprachoroidal transretinal stimulation (STS) and demonstrated that STS system with 9 channel platinum electrode array allowed 2 patients with advanced RP resolve to white bar targets.<sup>6</sup> In STS retinal prosthesis, electrode array is placed in a scleral pocket, which allows the stability of electrode<sup>7</sup>, so STS may be a safer approach compared with epi- or subretinal approaches. In order to attain the reading vision, we have developed a 2<sup>nd</sup> generation STS system with 49 channel electrodes, in which the surface of electrodes is processed by a femtosecond laser to increase the capability of charge injection. A multiplexer was attached to the electrode array and distributes electric pulses to each electrode, which allowed the internal system to reduce the number of lead wires. The purpose of this study was to determine the feasibility of the new STS retinal prosthesis using dogs.

### II. METHODS

#### A. Implant

The internal device consisted of a secondary coil which receives signals from the external coil and a decoder which generates biphasic pulses. (Fig.1) The electrode array (size, 5.8 × 5.8 mm; Nidek, Gamabori, Japan) consisted of 49 electrodes made of 0.5 mm diameter platinum bulk with a surface processed by femtosecond laser. The center-to-center separation of a pair of electrode was 0.7 mm. Each electrode

protruded from the silicon base by 0.3 mm. A multiplexer was attached to the electrode array and distributes electric pulses to individual electrode. The return electrode was a 0.5 mm diameter, 6 mm long platinum wire that was insulated except for 3 mm of the tip.

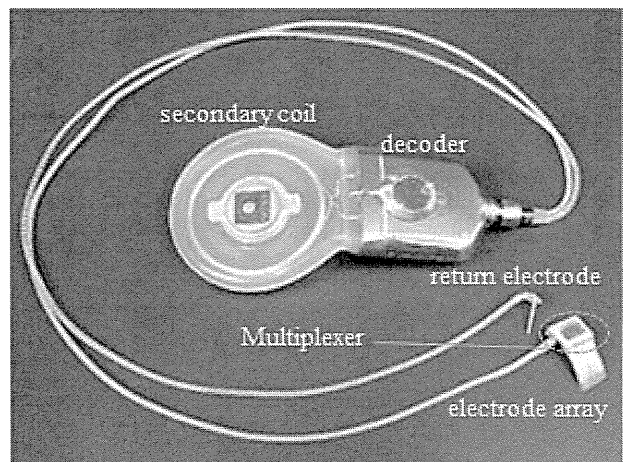


Figure 1. Photograph of the internal device

#### B. Surgical procedure

Two healthy adult male beagle dogs in weight from 10 to 12 kg were used. All procedures conformed to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, and the procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Osaka University. Implantation was made to the left eye of each dog. The surgical procedures included insertion of the microelectrode array into a deep lamellar scleral pocket created 11.5mm from the corneal limbus, and placing the return needle electrode into the vitreous body. The microelectrode array and the return electrode were combined into one bundle and the cables were passed under the skin of the forehead and through the brow. The Internal coil and the decoder were set on the surface of the left temporal muscle and cables from electrode array and return electrode were connected to the decoder. (Fig. 1)

#### C. Examination of Ocular fundus

Color fundus photographs were taken under general anesthesia before surgery and monthly after surgery. Fluorescein angiography (FA) was performed at 1 month after surgery. For both procedures, the eyes were dilated with topical 2.5% phenylephrine hydrochloride and 0.5% tropicamide (Midrine P; Santen Co., Ltd., Osaka, Japan), and fundus photographs were taken with a fundus camera

\*Resrach supported by Japan and by Strategic Research Program for Brain Sciences and Grant-in -Aid for Scientific Research (A,22249058) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology and by Health Sciences Research Grants (H24-medical device-004) from the Ministry of Health, Labor and Welfare Japan..

T. Fujikado is with the Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, 565-0871 Japan (corresponding author to provide phone: 81-6-6879-3941; fax: 81-6-6879-3948; e-mail: fujikado@ophthal.med.osaka-u.ac.jp).

(TRC-50IX; Topcon Corporation, Tokyo, Japan). For FA, photographs were taken after the injection of 0.075 mL/kg of 10% sodium fluorescein solution (Fluorescein; Alcon Japan Ltd., Tokyo, Japan) into a vein.

#### D. Electroretinography

Bright-light flash electroretinograms (ERG) were recorded 1 month after the implantation of the STS electrode array. Under general anesthesia with pupil dilation, corneal contact lens electrode/LED mini-Ganzfeld stimulator (WLS-20; Mayo Corporation, Nagoya, Japan) was used for ERG recording. The animal was dark-adapted for 30 minutes before the ERG recordings. Responses elicited by bright flash stimuli were amplified, band pass filtered from 0.5 to 1000 Hz, and digitized at 3.3 kHz. Five responses were averaged.

#### E. Functional Testing of STS System

The voltage in the microelectronic circuit of the decoder was monitored by an external circuit. The maximum voltage of this circuit was 10.0 V, and we set 9.5 V as a saturation voltage. Just after and at 1 month after implantation, we checked to be sure that the voltage did not exceed the saturation voltage of 9.5 V. Each of the 49 electrodes was activated with balanced, cathodic-first biphasic pulses of up to 1000  $\mu$ A, with a duration of 0.5 ms/phase and pulse duration of 0.5 ms. The frequency of the pulses was 20 Hz for 0.5 seconds that was controlled by the extraocular stimulator driven by the external transmitter. If the voltage in the electric circuit in the microstimulator was less than the saturation voltage, the device set the current as pass, but if the voltage exceeded the saturation voltage, the device set the current as failure. Next the artifacts evoked by electrical stimulation were recorded with a contact lens corneal electrode/LED mini-Ganzfeld stimulator (WLS-20; Mayo Corporation).

### III. RESULTS

#### A. Implantation Surgery

All prostheses were safely implanted and no intraoperative complications occurred. The electrode array was inserted in the scleral pocket without bleeding (Fig. 2) and the multiplexer attached with electrode array was kept stably under the conjunctiva. The cable was flexible and encircled the globe. No sign of infections or wound dehiscence was observed.



Figure 2. Photograph taken during implantation surgery. An electrode array was inserted into the scleral pocket, and the multiplexer was sutured (\*) to the sclera. Asterisk mark indicates the multiplexer.

#### B. Postoperative ocular fundus

Fundus photographs of the two dogs showed that the implanted electrode array was not detectable, and there was no obvious indication of surgical damage or side effects. FA showed intact vasculature without signs of inflammation, leakage, obstruction, or formation of new vessels in the area overlying and surrounding the implant in all dogs.

#### C. Electroretinography

The electroretinograms had normal a-wave and b-waves, and the shapes did not differ from those of electroretinograms recorded from the unoperated fellow eye 1 month after implantation in all two animals. (Fig. 3)

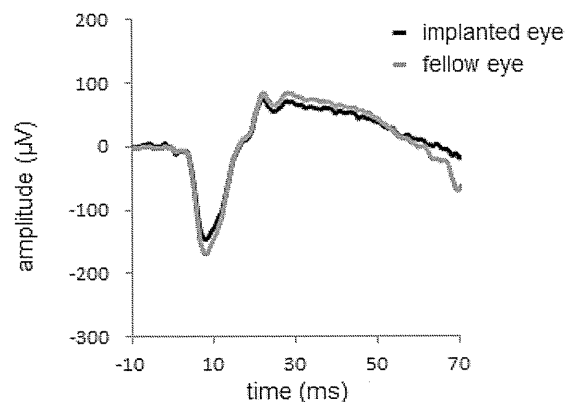


Figure 3. Representative electroretinograms recorded of the implanted eye and fellow eye of dog 1 after one month implantation.



#### D. Functional Testing of STS System

The voltage in the microelectronic circuit of the decoder was less than the saturation voltage in all electrodes and in all cases throughout the observation period. Representative stimulus artifact waveforms recorded with a contact lens electrode are shown in Figure 4. All the electrodes could deliver the electric currents.

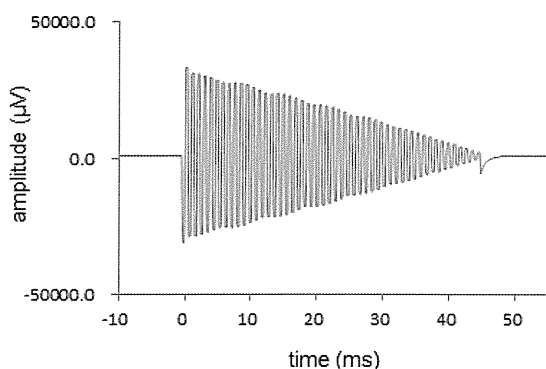


Figure 4. Representative waveforms of the stimulus artifacts of dog 1. Drawing of the waveforms of artifacts derived from each of 49 electrodes sequentially. Amplitudes of artifacts increase with increasing current intensity.

#### IV. DISCUSSION

Our results showed that it is possible to implant our 2<sup>nd</sup> generation STS device into the scleral pocket of beagle dogs without intraoperative or postoperative complications.

The device consisted of 49 channel electrode array with multiplexer and a decoder with internal coil. The device was different from that of 1<sup>st</sup> generation in that multiplexer was added to deliver electrical pulses to each 49 channel electrodes without increasing the number of lead wires.

The multiplexer has  $5.7 \times 4.4$  mm in area and set close (10.5 mm) to the corneal limbus, so a possibility exists that the device is exposed from the conjunctiva if the friction between the lid and conjunctiva is increased. However the multiplexer was covered by the conjunctiva stably for 1 month, suggesting that the new device is able to be implanted stably in human trial.

The new device equipped a junction between the decoder and the lead wires, so a possibility exists to disconnection between the device and wires. However, the device was functional 1 month after the implantation, suggesting that the new device is kept functional at least 1 month.

Further observation is necessary to confirm the long-time safety and efficacy of our 2<sup>nd</sup> generation STS retinal prosthesis.

#### V. CONCLUSION

The 2<sup>nd</sup> generation STS system with a 49 channel electrode array is implanted successfully in 2 dogs. One month after surgery, all electrodes were functioning and the ocular fundus was normal in both dogs, suggesting that the 2<sup>nd</sup> generation STS retinal prosthesis is feasible and can be considered for clinical use.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors thank their project partners Kouji Oosawa, Eiji Yonezawa, Yasuo Terasawa, and Tohru Saitoh (Vision Institution, Nidek Co., Ltd.) for the development of new devices.

#### REFERENCES

- [1] M.F. Marmor, G. Aguirre, G. Arden, et al., "Retinitis pigmentosa: a symposium on terminology and methods of examination," *Ophthalmology*, vol. 90, pp. 126-131, 1983.
- [2] R.A. Pagon, "Retinitis Pigmentosa," *Surv Ophthalmol*, vol. 33, pp. 137-177, 1988.
- [3] Margalit E, Maia M, Weiland JD, Greenberg RJ, Fujii GY, Torres G, Piyathaisere DV, O'Hearn TM, Liu W, Lazzi G, Dagnelie G, Scribner DA, de Juan E Jr, and Humayun MS, "Retinal prosthesis for the blind," *Surv Ophthalmol*, vol. 47, pp. 335-356, 2002.
- [4] Zrenner E, "Will retinal implants restore vision?" *Science*, vol. 295, pp. 1022-1025, 2002.
- [5] Chader GJ, Weiland J, and Humayun MS, "Artificial vision: needs, functioning, testing of a retinal electronic prosthesis," Verhaagen et al (Eds.), *Progress in Brain Research*, vol. 175, pp. 317-332, 2009.
- [6] Fujikado T, Kamei M, Sakaguchi H, Kanda H, Morimoto T, Ikuno Y, Nishida K, Kishima H, Maruo T, Konoma K, Ozawa M, and Nishida K, "Testing of Semi-chronically Implanted Retinal Prosthesis by Suprachoroidal-Transretinal Stimulation in Patients with Retinitis Pigmentosa," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 52, pp. 4726-33, 2011.
- [7] Morimoto T, Kamei M, Nishida K, Sakaguchi H, Kanda H, Ikuno Y, Kishima H, Maruo T, Konoma K, Ozawa M, Nishida K, and Fujikado T, "Chronic implantation of newly developed suprachoroidal-transretinal stimulation (STS) prosthesis in dogs," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 52, pp. 6785-92, 2011.



# Asymmetric Wavefront Aberrations and Pupillary Shapes Induced by Electrical Stimulation of Ciliary Nerve in Cats Measured with Compact Wavefront Aberrometer

Suguru Miyagawa<sup>1,2</sup>, Toshifumi Mihashi<sup>3</sup>, Hiroyuki Kanda<sup>1</sup>, Yoko Hirohara<sup>1,2</sup>, Takao Endo<sup>4</sup>, Takeshi Morimoto<sup>4</sup>, Tomomitsu Miyoshi<sup>5</sup>, Takashi Fujikado<sup>1\*</sup>

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

## Abstract

To investigate the changes in the wavefront aberrations and pupillary shape in response to electrical stimulation of the branches of the ciliary nerves in cats. Seven eyes of seven cats were studied under general anesthesia. Trains of monophasic pulses (current, 0.1 to 1.0 mA; duration, 0.5 ms/phase; frequency, 5 to 40 Hz) were applied to the lateral or medial branch of the short ciliary nerve near the posterior pole of the eye. A pair of electrodes was hooked onto one or both branch of the short ciliary nerve. The electrodes were placed about 5 mm from the scleral surface. The wavefront aberrations were recorded continuously for 2 seconds before, 8 seconds during, and for 20 seconds after the electrical stimulation. The pupillary images were simultaneously recorded during the stimulation period. Both the wavefront aberrations and the pupillary images were obtained 10 times/sec with a custom-built wavefront aberrometer. The maximum accommodative amplitude was 1.19 diopters (D) produced by electrical stimulation of the short ciliary nerves. The latency of the accommodative changes was very short, and the accommodative level gradually increased up to 4 seconds and reached a plateau. When only one branch of the ciliary nerve was stimulated, the pupil dilated asymmetrically, and the oblique astigmatism and one of the asymmetrical wavefront terms was also altered. Our results showed that the wavefront aberrations and pupillary dilations can be measured simultaneously and serially with a compact wavefront aberrometer. The asymmetric pupil dilation and asymmetric changes of the wavefront aberrations suggest that each branch of the ciliary nerve innervates specific segments of the ciliary muscle and dilator muscle of the pupil.

**Citation:** Miyagawa S, Mihashi T, Kanda H, Hirohara Y, Endo T, et al. (2014) Asymmetric Wavefront Aberrations and Pupillary Shapes Induced by Electrical Stimulation of Ciliary Nerve in Cats Measured with Compact Wavefront Aberrometer. *PLoS ONE* 9(8): e105615. doi:10.1371/journal.pone.0105615

**Editor:** Friedemann Paul, Charité University Medicine Berlin, Germany

**Received:** February 5, 2014; **Accepted:** July 25, 2014; **Published:** August 21, 2014

**Copyright:** © 2014 Miyagawa 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 study was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (25670730) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan and by Health Sciences Research Grants (H24-medical device-004) from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors Suguru Miyagawa and Yoko Hirohara are employees of TOPCON company, however, this does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

\* Email: fujikado@ophthal.med.osaka-u.ac.jp

## Introduction

Lens accommodation and pupillary dilation or constriction elicited by electrical stimulation of the peripheral nerves or the brain have been extensively studied. The changes in the refractive power of the eye, i.e., accommodation, to electrical stimulation of the ciliary ganglion have been studied in cats and other animals [1–3]. The amplitude of accommodation was dependent on the frequency and voltage of the electrical stimulus. The maximum amplitude of accommodation was about 2 diopters. The accommodative responses elicited by microstimulation of the midbrain or cerebellum have also been studied in cats [4–6]. Glasser et al. demonstrated the accommodative responses elicited by stimulation of the preganglionic Edinger-Westphal nucleus in rhesus monkeys [7,8]. In monkeys, the maximum amplitude of accommodation was 10 to 20 diopters.

The changes in the accommodation not only affected the refractive power but also the ocular aberrations. An ideal monochromatic ray of light from a point source has a perfect

spherical wave-front surface. If the eye has an ocular aberration, the wavefront of light reflected from the ocular fundus deviate from an ideal spherical surface, and the deviation in the wavefront is called the wavefront aberrations [9]. Many studies have demonstrated changes in the wavefront aberrations induced by lens accommodation using different techniques in humans. Atchison et al. studied the aberrations with the Howland aberroscope technique [10], and He et al. applied psychophysical ray tracing methods [11]. Recently, Shack-Hartmann wavefront aberrometer (SHWA) techniques allowed the rapid and accurate measurements of the wavefront aberrations [12–14]. With a SHWA, changes of the Zernike terms, e.g., astigmatism, coma, and spherical aberration, can be evaluated during and after accommodative changes. Some studies have demonstrated a significant increase of negative spherical aberration during accommodation using SHWA [15,16]. Animal models have also been used to evaluate changes in the wavefront aberrations with SHWA. For example, Huxlin et al. measured up to sixth order

wavefront aberrations in wake cats [17]. Ramamirtham et al. also measured the wavefront aberrations in young monkeys [18].

The dynamic pupillary dilation and constriction evoked by light stimulation or by electrical stimulation of the ciliary nerve have also been studied in cats [19,20]. In addition, the dynamic pupillary dilations and eye movements in response to micro-stimulation of the superior colliculus or the optic tectum have been studied in monkeys and birds [21,22]. Dearworth et al. studied the pupillary constriction evoked in vitro by stimulating the ciliary nerve in turtles [23].

Clinically, patients with Adie's syndrome have tonically dilated pupils and accommodative palsy. In addition, the pupillary reactions in these patients are usually segmental due to sector iridoplegia. Bell and Thompson reported that astigmatism was induced with accommodation in one-third of Adie's patients, and they suggested that this may be related to the segmental paralysis of the ciliary muscle [24].

Because both lens accommodation and pupillary constriction and dilation are controlled by postganglionic nerve fibers travelling in the short ciliary nerves, measurements of pupillary diameter and circularity, as well as lens accommodation and wavefront aberrations should be effected by electrical stimulation of the short ciliary nerves. In cats, the short ciliary nerve is made up of a lateral and a medial branch, so segmental stimulation is possible.

The purpose of this study was to determine the dynamic changes in the accommodation, wavefront aberrations, and pupillary size and shape evoked by electrical stimulation of one or both branches of the short ciliary nerve near the posterior pole of the eye in cats. The responses were measured with a custom-made, compact SHWA (Topcon Corporation and Aston University) which allowed us to determine the dynamic changes of accommodation, wavefront aberrations, pupillary size and shape simultaneously [25].

## Materials and Methods

### Experimental Animals

Seven healthy adult cats between 10- to 14 months-of-age 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 injected with atropine sulfate (0.1 mg/kg) intraperitoneally and after 30 minutes they were anesthetized with an intramuscular injection of ketamine hydrochloride (25 mg/kg). The anesthesia was maintained by a continuous intravenous infusion of pentobarbital sodium (1 mg/kg/hr). The cats were paralyzed by an infusion of pancuronium bromide (0.2 mg/kg/hr) mixed with Ringer's solution and glucose (0.1 g/kg/hr), and artificially ventilated with equivalent mixture of nitrous oxide (N<sup>2</sup>O) and oxygen (O<sup>2</sup>) for auxiliary anesthesia and alleviation of pain.

The end-tidal CO<sub>2</sub> concentration was controlled at 3.5 to 5.0% by altering the frequency and tidal volume of ventilation. The intratracheal pressure and electrocardiogram were also monitored, and the body temperature was maintained at 38°C with a heating pad. The cornea of cats was kept moist using custom made contact lenses during the experiments.

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Animals of the National Institutes of Health. The procedures were approved by the Animal Research Committee of the Osaka University Medical School, document number 20-145. All surgery was performed under pentobarbital sodium anesthesia, and all efforts were made to minimize pain. All animals were sacrificed by a

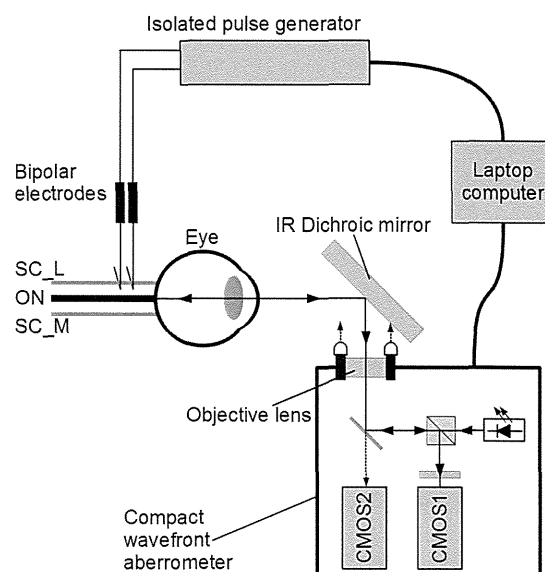
rapid intravenous infusion of pentobarbital sodium (64.8 mg/ml) after a completion of all experimental procedures.

### Electric Stimulation of Ciliary Nerve

In cats, the ciliary ganglion gives rise to a lateral and a medial branch of the short ciliary nerve. Additionally, one or two fine communicating branches from the long ciliary nerve are fused with the short ciliary nerve. Electrical currents were applied to either the lateral or medial branch or to both branches of the short ciliary nerves to study the changes in the accommodation, pupillary size and shape, and wavefront aberrations. A schematic diagram of the experimental setup is shown in Figure 1. The stimulating electrodes were bipolar hook-shaped electrodes made of 0.3 mm diameter stainless steel wire (OK212-069, Unique Medical, Tokyo, Japan). The wire was coated with insulating resin with a small region of the tip bared where the electrode contacted the ciliary nerve. The electrodes were hooked onto the branch of the short ciliary nerve about 5 mm from sclera. Trains of monophasic square wave electrical pulses were applied to either the lateral or the medial or to both branches of the short ciliary nerve. All pulses were generated by an isolated pulse generator (STG2008, Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen Germany). The pulse parameters were: current intensities of 0.1, 0.3, 0.5, and 1.0 mA; frequencies of 5, 10, 20, and 40 Hz; pulse duration of 0.5 ms/phase; and the duration of the pulse trains was 8 s. Changes in the accommodation, wavefront aberrations and pupillary shape evoked by electrical stimulation of short ciliary nerve were simultaneously recorded with a compact wavefront aberrometer.

### Dynamic Measurements of Wavefront Aberrations Using Compact Wavefront Aberrometer

The wavefront aberrations were measured with a compact wavefront aberrometer. This device consisted of an open-field dichroic mirror and a cuboid shaped body (12×12×4.5 cm), which can be attached to a standard flex holder (Figure 1). Because of the flexibility and compactness of this aberrometer, it



**Figure 1. Photograph of the compact wavefront aberrometer attached to a flex holder arm.**

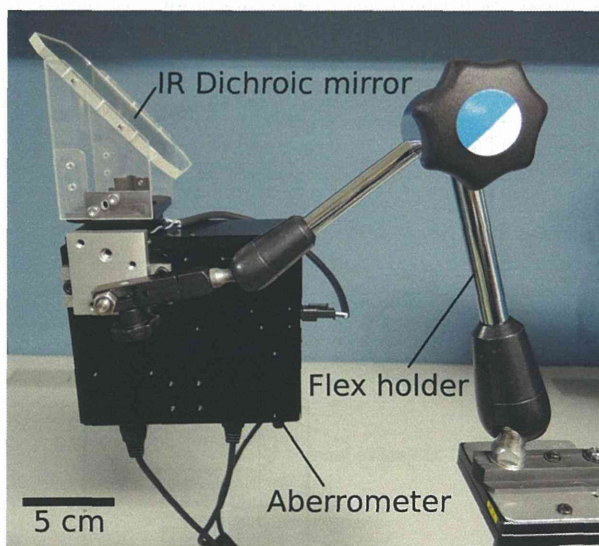
doi:10.1371/journal.pone.0105615.g001

can be easily used for *in vivo* animal studies or clinical studies. The experimental setup and optical arrangement are shown in Figure 2. The aberrometer contained two complementary metal-oxide semiconductor (CMOS) image sensors. The wavefront aberrations were measured with the first CMOS sensor (CMOS1). A lenslet array plate located in front of CMOS1 focused the Shack-Hartmann spot images. The digitized Shack-Hartmann spot images were recorded sequentially at 10 frames/sec. Therefore, we were able to measure the changes of accommodation and aberrations every 100 ms. The digitized Shack-Hartmann spot images were analyzed quantitatively for up to the 6th order by expanding the set of Zernike polynomials with custom written software.

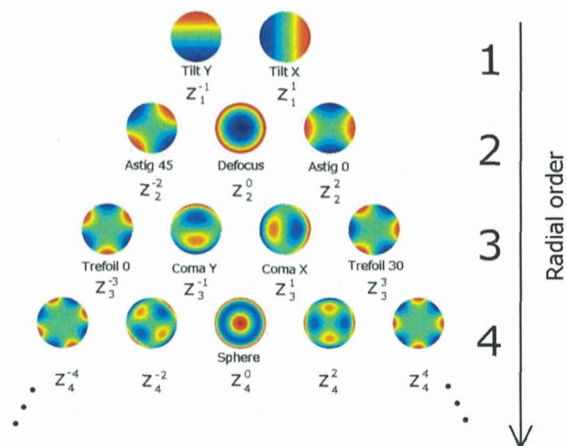
The second CMOS sensor (CMOS2) obtained the images of the anterior segment of the eye to evaluate the pupillary shape. Both the aberrometer and the isolated pulse generator were synchronously controlled by a commercially available laptop computer.

The accommodative responses were assessed by the changes of the refractive power (spherical equivalents). The wavefront aberrations were evaluated by the changes of the Zernike coefficients, and the wavefront aberrations were specified using the standard nomenclature defined with reference to the standard coordinate system recommended by the Optical Society of America [26]. A color map diagram of Zernike polynomials of up to 4th order is shown in Figure 3. The with- and against-the-rule astigmatism ( $Z_2^{-2}$ ), the oblique astigmatism ( $Z_2^{-2}$ ), the trefoil terms ( $Z_3^{-3}$  and  $Z_3^3$ ), the x coma ( $Z_3^1$ ), the y coma ( $Z_3^{-1}$ ), and spherical aberration term ( $Z_4^0$ ) were determined.

To study the dynamic changes of accommodation, we determined the velocity of the accommodative responses where the velocity was defined in diopters/sec and we assessed the maximum amplitude of accommodation and the time required to reach 80% of the maximum amplitude. Then the velocity ratio was calculated as 80% of maximum amplitude divided by the time to reach this level, i.e., 0.8 amplitude of accommodation in diopters/time in msec. In cases where the wavefront aberration



**Figure 2. Schematic diagram of experimental setup.** ON, optic nerve; SC\_L, lateral branch of the short ciliary nerve; SC\_M, medial branch of the short ciliary nerve. CMOS1, complementary metal-oxide semiconductor (CMOS) image sensor for Shack-Hartmann spot image; CMOS2, CMOS image sensor for anterior eye (pupil) image. doi:10.1371/journal.pone.0105615.g002



**Figure 3. Color map diagram of Zernike polynomials up to the 4th order.** Astig 45, oblique astigmatism (45 deg); Astig 0, with-the-rule astigmatism (0 deg); Trefoil 0, vertical trefoil aberration (0 deg); Trefoil 30, oblique trefoil aberration (30 deg); Sphere, spherical aberration. doi:10.1371/journal.pone.0105615.g003

was not measurable due to pupillary constriction, the pupil was dilated by 5% phenylephrine HCl (Neosynsin). Earlier studies showed that 10% neosynephrine eye drops did not alter the accommodation in cats [27].

### Measurements of Pupillary Shape

To study pupillary dilation and constriction, the pupil was photographed by CMOS image sensor incorporated into the wavefront aberrometer. The images were analyzed with a custom written software. The contour of the pupil was first outlined to calculate the area of the pupil ( $\text{mm}^2$ ) and to evaluate the pupil shape. The coordinates of the center of gravity of the pupil were also calculated to determine whether there was an asymmetrical change in the pupillary shape. This program can determine both the size and shape of the pupil. To study the relationship between the changes in the wavefront aberrations and pupillary shape, both were recorded simultaneously and sequentially at 10 frames/sec for 2 seconds before, 8 seconds during, and for 20 seconds after the stimulation. The ambient illumination of light was kept steadily during measurements to avoid changing pupil size due to pupillary reaction to light.

### Statistical Analyses

Data were statistically analyzed using commercial software (SigmaPlot, version 12.0; HULINKS, Inc.). Comparisons between two groups were made by Student's *t* tests. The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ . To analyze the degree of association between velocity and maximum amplitude of accommodation, Pearson's correlation coefficient was calculated.

## Results

### Amplitude of Accommodation

The average amplitude of accommodation due to stimulation of the medial or the lateral ciliary nerves was  $0.64 \pm 0.34$  D (mean  $\pm$  standard deviations) by a stimulation of the medial or lateral branch of ciliary nerve with a range of 0.25 to 1.19 D (Table 1). The amplitude of accommodation increased with increasing currents and frequencies of stimulation (Figure 4). However,