

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500581

研究課題名(和文) ゆらぎ刺激を導入した人工視覚システムの開発

研究課題名(英文) Effect of irregular patterns of electrical stimulation pulses for retinal prosthesis

研究代表者

澤井 元 (Sawai, Hajime)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20202103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：人工網膜において網膜に加えられる刺激パルス列が長く続くと次第に応答が減弱することが知られている。本研究は、パルス列の間隔をランダムに変動させることにより、この減弱を防ぐことができるかを検討した。健常および視細胞変性ラットを用いた電気生理学的実験・光学計測実験より、我々が開発した脈絡膜上-経網膜刺激型人工網膜でも、パルス間隔の固定が網膜応答の減弱をもたらすが、間隔を変動させれば減弱効果を抑制することが可能であることを示すことができた。他のさまざまな刺激方式の人工網膜においても、応答の経時的減弱にはパルス間隔が大きな影響を持っていることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：It was previously shown that a retinal prosthesis-based on suprachoroidal/transretinal stimulation (STS) is feasible for restoring visual function to blind patients with outer retinal degeneration. However, it has been shown that long-lasting train of stimulation pulses can reduce electrically evoked responses in many animal experiments and clinical trials. In the present study, we examined if such reduction can be somewhat compensated by variable inter-pulse interval of train pulse for STS-based retinal prosthesis. In acute experiments with both intact and retinal degenerated rats, variable inter-pulse interval of train pulse increase multiunit neuronal activities of the superior colliculus, comparing with fixed inter-pulse interval, suggesting that pulse intervals of stimulus were critical to counteract diminishing electrically evoked phosphens during long lasting stimulation in various types of retinal prosthesis.

研究分野：感覚生理学

キーワード：人工視覚 電気刺激 網膜 電位感受性色素 細胞外ユニット活動 視覚皮質 上丘

1. 研究開始当初の背景

視細胞変性による失明者は国内で数万人、全世界で数百万人いるが、その治療法は未だない。これらの失明者に新たな視機能を提供するための人工感覚器が人工視覚システムである。このシステムでは、眼鏡に備えた小型ビデオカメラで眼前の画像情報をとらえ、その情報を元に、眼球に埋め込んだ多点刺激電極アレイを通じて残存する網膜神経回路に直接電気刺激を与えるもので、利用者には眼前のイメージが疑似光覚の集合体として与えられる。申請者は安全性の高い独自の刺激方式(脈絡膜上経網膜刺激方式, STS)を考案し、2005年より動物実験での基礎研究と改良を続け、2012年には共同研究者の大阪大学医学系研究科・不二門尚教授のグループが、このシステムで世界初の亜急性臨床試験(2名)を成功させている。

視野上の光を知覚させるためには、その位置に対応する電極を通じて一定間隔(通常、20 Hz)の電流パルス列が与えられる。しかし、刺激パルス列が長く続けると次第に応答が減弱する。メモリ効果とも脱感作とも似たこの効果は、動物実験・ヒト臨床試験を問わず海外の様々なタイプの人工視覚システムでも広く報告されている。連続刺激による応答の減弱に対して、光覚のレベルを保つために刺激強度を上げれば、組織への安全性と刺激装置の耐久性が損なわれる危険性が生じる。

よって、このメモリ効果を抑えることが、人工視覚開発の喫緊の課題の一つである。メモリ効果の背景には、生理学的には「順応」、行動学的には「慣れ」と呼ばれる現象があると考えられる。生体は多様で大量の外界情報を効率的に収集・処理し、迅速に環境変化に適応するために、単調で変化に乏しい入力信号に対してすぐに応答しなくなる。そこで、刺激パルス列の間隔を絶えず変動させれば、メモリ効果を抑えられるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

上述の仮説をもとにして、本研究は以下の目的で行われた。刺激パルス間隔に不規則な変動、すなわち「揺らぎ」を持たせることによって、反復電気刺激中の視覚応答の漸減現象を回避できるかを検討することである。

3. 研究の方法

まず、固定間隔の規則的な刺激パルス列に対して、揺らぎを導入し不規則化させた刺激パルス列の方が、強い応答を誘発することを動物実験で調べた。次に、同じ実験系で $1/f_0$ 、 $1/f_1$ 、 $1/f_2$ の揺らぎのうち、どれが最も強い応答を誘発できるかを検討した。

実験 : 電気生理学的実験

実験動物と手術 : 健康動物として成熟 Long Evans 系 hooded rat (雌、10~16 週齢、

日本 SLC、以下 LE) 36 匹、視細胞変性動物として RCS rat (雄雌、25~35 週齢、日本クレア、以下 RCS) 21 匹を用いた。手術および実験中は保温パッドを用いて体温(直腸温)を 36-7 に維持した。心電図をモニターした。

ウレタン腹腔内投与(12.5 g/kg)により麻酔した動物に気管挿管して気道確保したのち、その頭部を固定装置により固定した。開頭して門を切開し脳脊髄液を排出させた後、右頭頂骨の後ろ半分をドリルで切除し、直下の皮質を吸引除去して右上丘背側表面全体を露出させた。後頭骨中央にスクリューネジを取り付け、記録用基準電極とした。左眼球背側表面を露出させたのち、眼球と視神経との境界部から 1 mm 背側耳側部の強膜を半層切開し、その表面に強膜刺激電極として白金製刺激電極(直径 150 μm 、テフロン被覆)を設置した。鼻側背側部の網膜扁平部に 30G 注射針で穿孔し、ステンレス製針電極(ユニークメディカル製)を硝子体内に挿入して参照電極(硝子体内刺激電極)とした。

眼球刺激 : STS 刺激として、強膜刺激電極と硝子体内電極との間に単相または二相性矩形パルス電流(パルス幅 0.5 ms、電流値 0.1-0.5 mA)を単発で与えた。極性については、参照電極に対して強膜刺激電極の極性を陽極とし、電流が網膜を内向き流れる STS(以下 inSTS)、後者を外向き STS(以下 outSTS)と定義した。二相性 STS の場合、通電電荷量が等しく極性の異なる単発矩形パルスを間隔を置かずに与えた。inSTS に続いて outSTS を与える刺激を内向き先行 STS(以下 i-oSTS)、逆を外向き先行 STS(以下 o-iSTS)と定義した。さらに固定間隔 50 ms で二相性矩形パルス電流を 11 発のトレインとして網膜に与えた(周波数 $f=20$ Hz、刺激時間 0.5 sec、以下固定間隔刺激)。変動間隔のパルス列刺激としては、3-11 発目の刺激パルスを 25 msec, 50 msec, 75 msec の間隔で各 3 回ずつランダムに配した刺激系列(平均 $f=20$ Hz、 $1/f_0$ 揺らぎ刺激)と、パルス間隔に比例して出現確率が変動するパルス列($1/f$ 揺らぎ刺激)、またはその 2 乗に比例して出現確率が変動するパルス列($1/f_2$ 揺らぎ)を用いた。

電気生理学的記録 : タングステン製針電極(約 0.1M)を右上丘の浅灰白層(表面より 200-250 μm 下)に刺入し、集合電位を記録した。集合電位は増幅(ゲイン : 10,000、バンドパスフィルター : 5 Hz~3k Hz)し AD 変換した後、シグナルプロセッサ(PowerLab+Scope, AD Instruments)により光または電気刺激をトリガーにした平均加算処理(加算回数 25-64 回)を行った。

まず、1 時間暗順応した後、左眼前に設置した LED ランプより全視野閃光刺激(10 または 500 msec、)を与えて、LE では視覚誘発電位が得られ、視細胞変性した RCS では得られないことを確認した。次に、強膜刺激電極を

陽極、硝子体内電極を陰極とした inSTS (0.2 msec, 100-150 μ A) に対する上丘誘発電位を、250 μ m 間隔で内外側および吻尾側方向に記録部位を変えて記録し、誘発電位の振幅の最も大きい場所を見つけ出した。そして、その場所にミンガンプローブ製多点電極アレイ (8 極, 極間距離 250 μ m) を刺入し、上丘ニューロンの multi-unit activities (MUA) を記録した。

組織学的解析：電気生理学的実験終了後、致死量のネプタールを腹腔内投与して動物を安楽死させた。直ちに心臓を通じて 10% formaldehyde を全身灌流させて組織固定した。固定された眼球を摘出し、2 日以上後固定した後、水洗、脱水してから樹脂 (テクノピット™) で包埋した。この包埋標本からミクロトームで 5 μ m 厚の薄切網膜標本を作りヘマトキシリンエオジン染色を施した。切片標本を顕微鏡観察して、RCS では視細胞層が完全に変性していたことを確認した。

実験：膜電位感受性色素を用いた視覚野活動の光学計測

実験動物と手術：LE rat (雌、10~16 週齢、17 匹) と RCS rat (雄雌、25~35 週齢、日本クレア) 8 匹を用いた。動物の飼育管理及び実験手続きは大阪大学動物実験委員会規定に従った。手術および実験中は保温パッドを用いて体温 (直腸温) を 36-7 に維持し、心電図をモニターした。

気道粘液の分泌を抑制するために硫酸アトロピン (0.005%, 1mL/kg, i.m) を投与したのち、ウレタン (1.25 g/kg) を腹腔内投与して動物を麻酔した。実験中は麻酔状態を維持するため、ウレタンを適宜追加投与 (初期投与量の 1/2-1/4) した。気管挿管して気道確保したのち、動物の頭部を脳定位固定装置 (SR-15, ナリシゲ科学機器) に固定した。開頭し脳脊髄液を排出させた後、右頭頂骨の後部 2 / 3 (Bregma より AP-5~-12mm/L3~10 mm) を切除し、直下の硬膜を切開して皮質視覚野 (VC) を含む右後頭皮質表面を露出させた。露出部の周囲には歯科用セメントで高さ 2-3 mm 程度の土手を作成し、土手の内側に液体を満たせるようにした。

皮質視覚野の染色：遮光下の VC を膜電位感受性色素 (VSD) で染色した。ヘパリン入りの生理食塩水で 1 mg/ml に希釈した RH795 (Invitrogen) または RH1691 (Optical Imaging) 50~70 μ l を頭蓋の開口部に滴下し、45 分間放置した。放置中は液の蒸発を防ぐ目的で開口部をパラフィルムで覆った。再び 45 分間染色を繰り返した後、皮質表面に残った染色液を除去するために表面に生理食塩水を滴下しては吸引することを数度繰り返した。

光学計測：VC の蛍光強度計測には高速イメージングシステム (MiCAM ULTIMA, BrainVision 社製) を用いた。VSD で染色さ

れた VC に向けて励起光を照射し、発生した蛍光を 1.6 倍の対物レンズを介して開口部の上方に設置した CMOS センサー搭載のカメラで 100 \times 100 画素の画像を 2 ms 毎に 256 または 512 フレーム分記録した。記録開始時点は動物の心電図の R 波の頂点時に同期させた。計測は 10 秒間隔で 32 回または 50 回行い、一回おきに画像記録開始 50 ms 後に光刺激を提示した。

画像データ処理：カメラから画像処理ユニットに送られ保存された記録画像のデジタルデータを解析ソフト MATLAB 上に取り込んだ。光刺激を加えた 16 ないし 25 回の記録画像データを平均化し、刺激を加えなかった記録の平均化データとの差分、すなわち光刺激による蛍光強度の変化比 (F/F_0) を求めた。変化比の時空間的変動の高周波成分を除去するため、空間的には 5 \times 5 点、時間的には前後 3 点で重み付け平均を行った。

4. 研究成果

概要：以下の研究結果より、STS 型人工網膜でも、パルス間隔の固定が網膜応答の減弱をもたらすが、間隔を変動させれば減弱効果を抑制することが可能であることを示すことができた。

実験で「ゆらぎ」導入効果を確認するため、固定間隔のパルス列刺激と変動間隔のパルス列刺激のどちらが、上丘の視覚ニューロンでより強い神経応答を誘発できるのかを電気生理学的に検討した。

固定間隔刺激に対する 50 回の応答から刺激パルスのアーチファクトを除去したのち、加算平均を行い peri-stimulus time histogram (PSTH) を作成した。最初~3 発目までのパルスに対しては 8 割以上の発火確率で応答するが、それ以降の応答以降は 3 割以下に減弱し、とくに後 1/3 のパルス列に対する発火確率は 1 割以下まで低下した。

次に、2-10 番目のパルス間隔を 25, 50, 75 msec の各 3 回ずつランダムに配した刺激系列 (平均間隔 50 msec, $f=20$ Hz, 以降 $1/f_0$ ゆらぎ刺激) をゆらぎ刺激として網膜刺激を行った結果、固定間隔刺激に対する応答に比べて後半パルス列に対する平均発火確率が 17% 高かった。

次に、パルス間隔の不規則配列を最適化するために、高い周波数ほど出現確率が低くなる $1/f$ ゆらぎや $1/f^2$ ゆらぎ (ブラウン運動様の変動) を持つパルス列をラット網膜に与え、その刺激に対する視覚中枢の応答を電気生理学的に記録して固定間隔刺激と $1/f_0$ ゆらぎ刺激、 $1/f$ ゆらぎ刺激、 $1/f^2$ ゆらぎ刺激に対する平均発火確率を比較した。その結果、 $1/f_0$ ゆらぎ刺激、 $1/f$ ゆらぎ刺激、 $1/f^2$ ゆらぎ刺激で応答の強さに違いが認められなかった。

実験：実験で認められた「ゆらぎ」導入

効果を確認するため、固定間隔のパルス列刺激と変動間隔のパルス列刺激のどちらが、皮質視覚野ニューロンでより強い神経応答を誘発できるのかをVSDを用いた光学計測法により検討した。

固定間隔刺激提示後、数十ミリ秒後に一次視覚野(V1)内の外側部(図の上中央)付近で局所的興奮性応答を示す蛍光量の変化が観察された。その後、この応答の範囲と強度は次第に大きくなり、刺激後100ms前後でピークに達した後、強さと範囲は減衰したが、パルス列終了後の170-200msまで興奮性応答が持続した。

次に、 $1/f_0$ ゆらぎ刺激を与え、V1の興奮性応答の光学計測結果を、固定間隔刺激の結果と比較したが、最大応答時の蛍光強度変化比、その1/2以上の強度を示した領域の広さ、刺激提示間の蛍光強度変化比の積分値のいずれにおいても、固定間隔刺激と不規則間隔刺激の間に有意な差が認められなかった。

光学計測(実験)と電気生理学実験(実験)の結果と一致していないが、その理由としては、光学計測の感度が低いことが考えられ、追加実験および実験方法の改良が必要である。

この結果より、STS型人工網膜でも、パルス間隔の固定が網膜応答の減弱をもたらすが、間隔を変動させれば減弱効果を抑制することが可能であり、以上の動物実験の結果を踏まえて、今後は最も効果的な揺らぎを導入した刺激パルス列を作製し、ヒトでの心理物理学の実験でその有効性を確認する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

Nishitani Y, Hosokawa C, Mizuno-Matsumoto Y, Miyoshi T, Sawai H, Tamura S. Detection of m-sequences from spike sequence in neuronal networks.

Comput Intell Neurosci. Article ID 2012:862579, 2012.

Okuno H, Yagi T. Image sensor system with bio-inspired sufficient coding and adaptation. IEEE Transactions on biomedical circuits and systems 6: 375-384, 2012

Tamura S, Miyoshi T, Sawai H, Yuko Mizuno-Matsumoto. Random Bin for Analyzing Neuron Spike Trains. Comput Intell Neurosci. Article ID 2012:153496. 2012

Fujikado T, Kamei M, Sakaguchi H, Kanda H, Morimoto T, Ikuno Y, Nishida K, Kishima H, Maruo T, Sawai H, Miyoshi T, Osawa K, Ozawa M. Clinical trial of chronic implantation of suprachoroidal-transretinal stimulation system for retinal prosthesis. Sensors and Materials. 24(4) 181-187, 2012

Hirohara Y, Mihashi T, Kanda H, Morimoto T, Miyoshi T, Wolffson JS, Fujikado T. Optical imaging of retina in response to grating stimuli in cats. Exp Eye Res. 109:1-7, 2013

Suematsu N, Naito T, Miyoshi T, Sawai H, Sato H. Spatiotemporal receptive field structures in retinogeniculate connections of cat. Frontiers in Systems Neuroscience. 2013 7:103. doi: 10.3389/fnsys.2013.00103

〔学会発表〕(計11件)

小津野将, 林田祐樹, 島田義規, 八木哲也 「マウス第一次視覚皮質回路における信号伝搬のダイナミクスについて」第35回日本神経科学大会(2012.9.19-21, 名古屋市)

奥野弘嗣, 松岡優, Tamas Fehervart, 亀田成司, 八木哲也 「視覚野刺激型人工視覚の評価のための実時間光覚シミュレータ」第35回日本神経科学大会(2012.9.19-21, 名古屋市)

末松尚史, 内藤智之, 三好智満, 澤井元, 佐藤宏道 「ネコ外側膝状体ニューロンの楕円形受容野を形成する網膜-外側膝状体の機能的結合」第35回日本神経科学大会(2012.9.19-21, 名古屋市)

Sawai H. Voltage sensitive dye imaging of visual cortical response to suprachoroidal-transretinal electrical stimulation in the retinal degenerated rat」第90回日本生理学会大会(2013.3.27-29, 東京)

Miyoshi T, Kanda H, Morimoto T, Hirohara Y, Mihashi T, Fujikado T. The retinal intrinsic response of suprachoroidal-transretinal stimulation (STS) for retinal prosthesis: relationship between threshold current and features of implantation surgery. 第90回日本生理学会大会(2013.3.27-29, 東京)

Naito T, Suematsu N, Miyoshi T, Sawai H, Sato H. Neurons in the cat primary visual cortex is selective for skewed-statistics-related surface properties of visual images. 第36回日本

神経科学大会 (2013.6.20-23, 京都市)

Kameda S, Hayashida Y, Tanaka H, Atika D, Iwata A, Yagi T. A multi-channel current stimulator chip intended for a visual cortical implant. The 35th annual international conference of the IEEE engineering in medicine and biology society (2013.7.3-7, 大阪市)

Kameda S, Hayashida Y, Tanaka H, Atika D, Yagi T. A multi-channel current-pulse generator chip used for high impedance stimulating electrodes. Life Engineering Symposium 2013 (2013.9.12-14, 横浜市)

末松尚史、内藤智之、三好智満、澤井元、佐藤宏道「ネコ外側膝状体-一次視覚野間結合における受容特性の類似生」第37回日本神経科学大会 (2014.9.11-13, 横浜市)

青木亮三、北村多平、三好智満、澤井元「脳幹近傍の電極から記録された脳波の周波数スペクトラムの周期的パターン」第120回日本解剖学会総会・全国学術集会&第92回日本生理学会大会合同大会 (2015.3.21-23, 神戸市)

末松尚史、内藤智之、三好智満、澤井元、佐藤宏道「ネコ外側膝状体-一次視覚野間結合における受容特性の類似生」第120回日本解剖学会総会・全国学術集会&第92回日本生理学会大会合同大会 (2015.3.21-23, 神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤井元 (Sawai Hajime)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：20202103

(2) 研究分担者

八木哲也 (Yagi Tetsuya)
大阪大学・工学系研究科・教授
研究者番号：50183976

三好智満 (Miyoshi Tomomitsu)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70314309