

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791853

研究課題名(和文) 網膜刺激型及び視神経刺激型人工視覚が視覚中枢及び反対眼に及ぼす影響についての検討

研究課題名(英文) The effect of artificial vision for retina and optic nerve on brain and fellow eye.

研究代表者

西田 健太郎(Nishida, Kentaro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70624229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：網膜及び視神経刺激型人工視覚の中枢や反対眼への影響の評価のため、家兎及び視細胞障害ラットの眼球にそれぞれの刺激電極、視覚野に観測電極を埋植して慢性の刺激系、及び観測系を確立した。埋植後1～6ヶ月まで刺激に対する視覚野での誘発電位を安定して測定出来た。より中枢に影響が出やすいと思われる視神経刺激型に絞って研究を進め、6ヶ月の慢性通電後に大脳の切片を作成し、これらに対して神経栄養因子などの免疫染色を行った。一部の慢性通電後の固体では強く染色される固体があったことから、長期間の視神経電気刺激により脳に影響を与える可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established the chronic electrical stimulation system and measuring system of evoked potentials in visual cortex for surprachoroidal transretinal stimulation and artificial vision by direct optic nerve electrical stimulation in rabbits and RCS rats. We could measure the electrical evoked potentials from 1 to 6 months after implantation. Some rats' brain showed strong staining of GFAP after 6 month after implantation. Our result suggests the effect of optic nerve electrical stimulation on brain.

研究分野：人工視覚

キーワード：人工視覚

1. 研究開始当初の背景

現在、根本的な治療法のない網膜色素変性症で失明した患者に対して、網膜近傍や視神経に電極を埋植し視覚を回復しようという人工視覚が国内外で積極的に行われ、実際に臨床応用されている。これまでの人工視覚の治療において、網膜下への刺激電極の埋め込み及び電気刺激を行った症例で、刺激電極が埋め込まれていない部分の網膜細胞よりも、刺激電極近傍の網膜細胞が形態学的に温存していることが報告されている(American Academy of Ophthalmology Annual meeting2009)。このメカニズムについては、明らかになっていないが、角膜側からの電気刺激である経角膜電気刺激(Transcorneal electrical stimulation:以下TES)でも、視神経障害モデルにおける網膜神経節細胞の賦活化作用があると報告されている(Invest Ophthalmol Vis Sci.2005)。これらのことから、我々の人工視覚の電気刺激でも、網膜の神経系に対して賦活化作用がある可能性が高い。

我々のグループは、本邦独自の2種類の人工視覚を開発し、臨床応用に至っている。1つは、網膜を刺激するために刺激電極を脈絡膜上に設置する、脈絡膜上経網膜電気刺激方式(Suprachoroidal transretinal stimulation:以下STS)と、もう一つは、視神経に直接刺激電極を埋植する、視神経乳頭刺激方式(Artificial vision by direct optic nerve electrode:以下AV-DONE)である。

STS及びAV-DONEの電気刺激による、視覚中枢および反対眼への神経賦活化作用及びそのメカニズムについて、動物モデルを用いて評価し、視路の機能回復さらには人工視覚を用いた視路に対する治療法の可能性について検討を行う。

2. 研究の目的

STS及びAV-DONEの電気刺激による、視覚中枢および反対眼への神経賦活化作用及びそのメカニズムについて、動物を用いて評価する。

3. 研究の方法

1) 有色家兎に、STSの刺激電極(図1)を眼球(強膜ポケット内)に埋植(図2)し、ケーブルを結膜下から結膜円蓋部を通し、頬部の皮下から頭部に通し、頭部のコネクタに接続した。このコネクタはプラスチック製の保護カバーがついており、必要時に電気刺激が行えるようにした(図3)。また、視路の機能評価のために、視覚野での誘発電位を測定するために、視覚野にステンレス製のネジ電極を、また十字縫合に参照電極を埋植(図4)し、これも頭部のコネクタに接続し、必要時に脳波を測定できるように設置した。埋植直後から6ヶ月後まで、1カ月ごとにSTSの刺激電極からの電気刺激による脳での誘発電位(EEP)、光による脳での誘発電位(VEP)、光による網膜での誘発電位(ERG)の測定も同様に行った。

2) また、従来から確立された視細胞変性モデルとして使用されているRCSラットにおいても、AV-DONEの刺激電極(図5)を用いて、同様の刺激系、観測系を埋植し、埋植から1ヶ月まで脳波の計測を行った(図6, 7)。

3) RCSラットに、AV-DONEの刺激電極を視神経に埋植し、頭部のコネクタに接続して1週間ごとに2時間の連続通電を行った。通電の条件は、臨床試験で用いているBiphasic pulseのcathodic first、duration $250\mu\text{s}$ 、インターパルス $0\mu\text{s}$ 、電流値 $50\mu\text{A}$ 、周波数 160Hz を用いた(図8)。

6か月の慢性通電後のRCSラットを4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、後固定を行った後、30%シュクロース液で脱水洗し、包埋後、上丘を含む凍結切片を作成し、型どおりにGFAP、FGF、BDNFの免疫染色を行い、電気刺激による神経賦活化作用を評価する。

4. 研究成果

1) 有色家兎に、STS の刺激電極、視覚野での誘発電位を測定するため観測電極を埋植し、また十字縫合に参照電極を埋植し、これも頭部のコネクタに接続し、必要時に脳波を測定できるように設置した。この結果、EEP、VEP、ERG のいずれもの波形も観測期間を通して安定して測定することができ、大きな変動もみられなかった(図9)。この結果から、家兎に対する長期間にわたり STS により通電できる刺激系、及び、視路のそれぞれの機能評価を行うための観測系を確立することができた。

2) 従来から確立された視細胞変性モデルとして使用されている RCS ラットにおいても、AV-DONE の刺激電極を用いて、同様の刺激系、観測系を埋植し、埋植から1ヶ月まで脳波を計測することが出来た(図10)。

3) 6 か月の慢性通電後の RCS ラットを4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、大脳を摘出し(図11)、30%シュクロース液で脱水し、包埋後、上丘を含む凍結切片を作成した。その後、型どおりに GFAP、FGF、BDNF の免疫染色を行ったが、通電後と Sham の間で明らかな差は認めなかった(図12、13)。

また、埋植眼球に対する侵襲が大きくなったため、通電を行った眼とその反対眼での比較は困難であった。

しかし、通電後の一部の個体の中に GFAP で強く染色される個体(図13)がいたことから、長期間の視神経電気刺激により脳に影響を与える可能性があることが示唆された。



図1. 高さが0.3mmのSTS方式の刺激電

極(直径は500um)

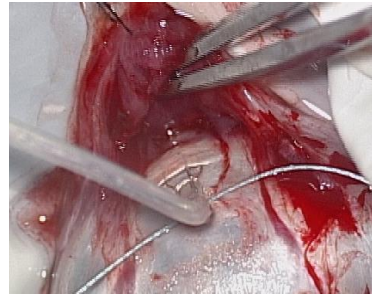


図2. STS 刺激電極の強膜ポケットへの埋植

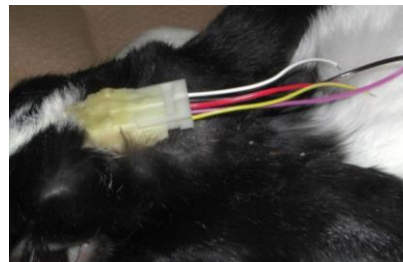


図3. STS の慢性の刺激のセッティング

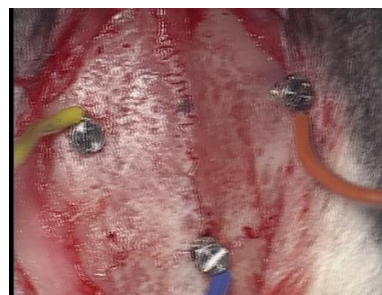


図4. 脳波の観測電極



図5. 直径50μmのAV-DONE方式の刺激電極



図6. AV-DONE 刺激電極の視神経への埋植



図 7. AV-DONE の慢性の刺激のセッティング

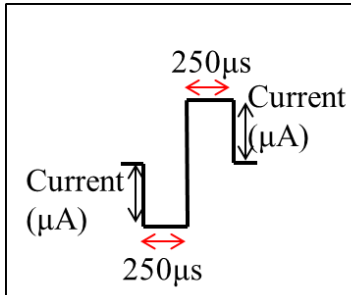


図 8. AV-DONE で用いた電流波形

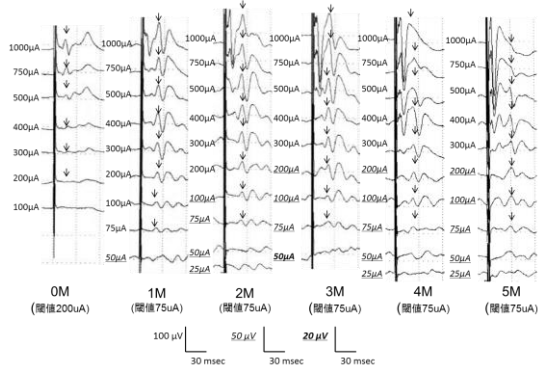


図 9. STS における長期の EEP の測定

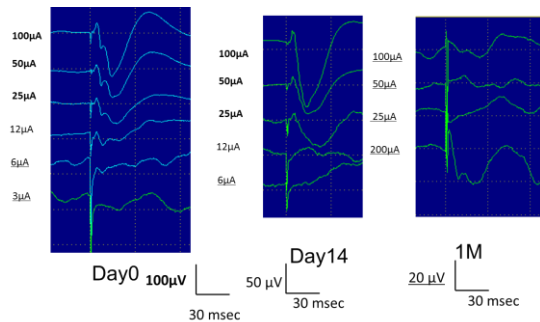


図 10. AV-DONE における EEP の測定



図 11. 慢性通電後の摘出脳

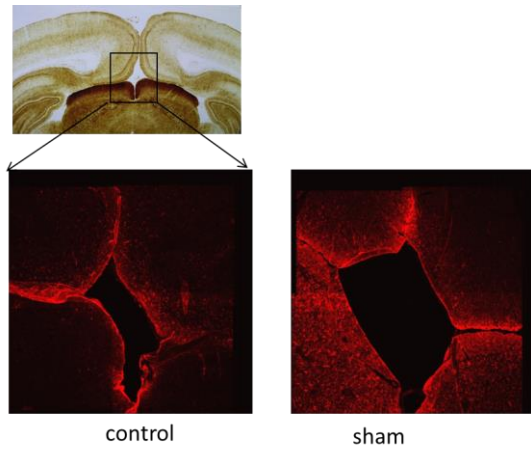


図 12. 慢性通電後のラットの脳切片の GFAP による免疫染色の結果 1

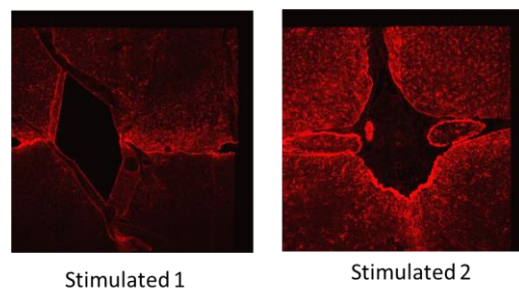


図 13. 慢性通電後のラットの脳切片の GFAP による免疫染色の結果 2

Stimulated2 のように、一部の個体で GFAP で強く染色されるものがあった。

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 3 件)

1. Surgical feasibility and biocompatibility of wide-field dual-array suprachoroidal-transretinal stimulation prosthesis in middle-sized animals

Lohmann TK, Kanda H, Morimoto T, Endo T, Miyoshi T, Nishida K, Kamei M, Walter P, Fujikado T

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2016 Apr;254:661-73

doi:10.1007/s00417-015-3104-1.

2. Visual Sensation by Electrical

Stimulation Using a New Direct Optic Nerve Electrode Device

Nishida K, Sakaguchi H, Kamei M, Gonzalez C, Terasawa Y, Montoya R, Fujikado T, Fontan R, Ozawa M, Mercardo H, Nishida K
Brain Stimul. 2015; 8:678-681 doi: 10.1016/j.brs.2015.03.001.

3. Direct photocoagulation to leakage points to treat chronic macular edema associated with branch retinal vein occlusion: a pilot study

Sakimoto S, Kamei M, Sakaguchi H, Suzuki M, Matsumura N, **Nishida K**, Nishida K
Clinical Ophthalmol. 8 : 2055-2060.2014

[学会発表] (計 9 件)

1. **Nishida K**, Sakaguchi H, Fujikado T, Kamei M, Nishida K

The effect of the locations of return electrodes on the electrical evoked potentials elicited by suprachoroidal-transretinal stimulation. Poster presentation at Neuroscience 2015, October 17-21, 2015, Chicago, IL, USA

2. **Nishida K**, Kamei M, Sakaguchi H, Ikuno Y, Fukuda M, Nishida K
Simulation of panretinal laser photocoagulation using geometric methods

Poster presentation at EURETINA2015 (European Society of Retina SpecialiSTS) Annual Meeting, September17-20, 2015, Nice, Nice, France

3. **Nishida K**, Sakaguchi H, Kamei M, Cecilia-Gonzalez C, Terasawa V, Velez-Montoya R, Fujikado T, Sanchez-Fontan R, Ozawa M, Quiroz-Mercado H, Nishida K
Visual Sensation by Electrical Stimulation Using a New Direct Optic Nerve Electrode Device
Poster presentation at American Society of Retina SpecialiSTS 33rd Annual Meeting, July10-14, 2015, Vienna, Austria, Austria

4. **Nishida K**
Suprachoroidal Stimulation Approach to Visual Prosthetics
Oral Presentation at The 30th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress, April1-4, 2015, South of Bai Yun Da Dao, Guangzhou, China

5. **Nishida K**
The statue of retinal prosthesis
Oral Presentation at APAO Grand Rounds Around the World, December4, 2014, Suita, Osaka, Japan

6. **Nishida K**, Sakaguchi H, Kamei M, Fujikado T, Nishida K
The effect of electrical stimulation of optic nerve on rat brain
Poster presentation at Neuroscience 2014 Annual Meeting, November15-19, 2014, Washington, DC, USA

7. **Nishida K**, Sakaguchi H, Fujikado T, Kamei M, Nishida K
The effect of the locations of return electrodes on the electrical evoked potentials elicited by

suprachoroidal-transretinal stimulation
in rabbit eye.

Poster presentation at The 8th Biennial
World Congress, September 28-30, 2014,
Detroit, MI, USA

8. **Nishida K**, Sakaguchi H, Kamei M,
Fujikado T, Nishida K.

Optimal electrode conditions for
surprachoroidal-transretinal stimulation
system to elicit electrically-evoked
potentials

Poster presentation at annual meeting of
the Association for Research in Vision
and Ophthalmology (ARVO), May5-9,
2013, Seattle, WA, USA

9. 脈絡膜上経網膜電気刺激での帰還電極
の位置が大脳皮質誘発電位に与える影響の
検討 (ポスター)

西田健太郎、坂口裕和、瓶井資弘、不二門
尚、西田幸二

第 119 回日本眼科学会総会

2015 年 4 月 16 日～19 日 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田健太郎 (Kentaro Nishida)

大阪大学医学系研究科 助教

研究者番号 : 70624229