

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592040

研究課題名（和文） 視神経乳頭電気刺激による視機能再生の検討

研究課題名（英文） Reproduction of visual function by electrical stimulation through optic nerve electrode

研究代表者

坂口 裕和（SAKAGUCHI HIROKAZU）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80379172

研究成果の概要（和文）： 現在開発中の視神経刺激型人工視覚システムの臨床試験において、患者の中に、視神経を電気刺激した後、自覚的に視機能が改善する患者がみられた。今回の研究では、まず同様の効果が動物実験においても生じるか否か、を検討し、ラット網膜色素変性モデルにおける検討では、電気刺激後視機能改善効果、変性を抑制する効果、共に明白にはできなかった。その結果をうけ、より人に近い眼を有する中型、大型動物にて検討するための視神経慢性刺激用装置の開発をすすめた。

研究成果の概要（英文）： We have tried to develop an artificial vision by direct optic nerve electrode and in the clinical trial, some of the patients recognized the improvement of visual function after the electrical stimulation through optic nerve. We could not find the effect of the improvement of visual function with the electrical stimulation in this acute study using rats. We then tried to develop the materials and methods to examine the effect with larger animals in chronic study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：視神経刺激、刺激電極、網膜色素変性、人工視覚

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症、緑内障、網膜色素変性、黄斑変性は、視覚障害原因疾患の上位を占める疾患である。点眼薬の開発、手術加療にて緑内障の進行はある程度抑えられ、網膜光凝固術、硝子体手術にて糖尿病網膜症の進行、悪化はある程度抑制改善可能になってきた。しかしながら、緑内障の既に進行した例、重度の糖尿病網膜症においては、治療による視機能の回復は困難である。また、網膜色素変性に及んでは、有効な

治療方法は現時点ではない。周辺視野の障害に始まり、経過とともにその障害は進行し、強度の視野狭窄が生じ、最終的に病変が黄斑部に及び、失明に至る。また、黄斑変性の大部分を占める加齢黄斑変性に対しては、光線力学療法、抗 VEGF 療法など新たな治療法が開発されているが、治療には限界がある。当疾患人口が増加傾向にあることから、今後当疾患による視覚障害者は増加することが予想される。我々は、上記疾患による重度の視機能障害をもつ患者が、

物体形状の相違を識別し、また、既知の道であれば独歩できる程度の視野を構築する目的で、2つの人工視覚システムを開発中である。そのうちの一つは、視神経刺激型人工視覚と呼ばれるタイプである。実際に網膜色素変性患者に対して硝子体手術を施行し、顕微鏡下にて視神経乳頭に刺激電極を刺入設置し、電極を通じて視神経の電気刺激を行う臨床試験を行ない、擬似視覚（フォスフェン）を得ることに成功している。

我々は、この視神経刺激型人工視覚プロジェクトにおいて、経過観察期間中に以下の重要な結果を認めた。

電気刺激を施行した4人の患者の内3人（75%）において自覚的視機能改善を認めた。改善を自覚した時期は患者により異なり、電気刺激後2-6ヶ月後とさまざまであった。患者4人の内3人（75%）に、刺激をした眼と反対側の眼（僚眼）にも視力、色覚等の改善を認めている。電極は視神経に留置固定し、電気刺激を6ヶ月毎に施行しているが、複数回（2~3回）刺激された2人は刺激毎に同様の傾向を示している。我々が開発中のもう一つの人工視覚システムは網膜刺激型であるが、その急性臨床試験においては、同様の効果は今のところ確認できていない。

以上から、我々は、視神経乳頭刺激により視機能が改善する可能性があると考え、以下の目的で当該研究を行った。

2. 研究の目的

視神経（神経節細胞の軸索）を刺激することにより神経ネットワークの変化、あるいは再構築が起こり、視機能が改善する可能性があり、また、網膜の一部を刺激するよりも、視神経を刺激する方が、効率よく視機能改善を達成することができる可能性があると考え、本研究の目的を、視神経乳頭刺激による視機能改善効果のメカニズムの解明、とした。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルを用いた視神経電気刺激

対象動物としてラット（Wistar rat, n=9）を用い、ケタミンによる麻酔下にて、顕微鏡を用いて、ラット毛様体扁平部から極細刺激電極を眼内硝子体腔内に挿入し、視神経乳頭に刺入した。電極設置後、視神経線維を、電極を通じて電気刺激し、当術式の安全性について検討した。

(2) 電気刺激による眼組織におけるインスリン様成長因子 IGF-1 のタンパクレベルにおける変化

(1)の方法を用いて、視神経乳頭から視神経線維を電気刺激し、刺激後1週間において、採集されたサンプル眼を、4%パラフォルムアルデ

ヒドにて固定した後、切片を作成し、抗 IGF-1 抗体による免疫染色を行い、網膜視神経組織におけるタンパク発現を、電気刺激をしていない個体の眼の同タンパクの発現と比較した。

(3) 刺激電極に使用する素材の安全性の検討

当該研究において、電気刺激を複数回行うことも念頭にいれ、慢性刺激にも通用する刺激電極のコーティング素材について検討した。従来臨床試験において、コーティング素材としてパリレンを用いていたが、より柔軟性の高い、テフロン素材について今回検討した。

具体的には、家兎眼硝子体内にテフロンコーティング白金イリジウム線を、実際に患者を対象とする視神経刺激型人工視覚臨床試験で硝子体内に留置する長さと同等の長さ（20mm）留置し、経時的に眼合併症が生じないか否かを眼底検査、フルオレセイン蛍光眼底検査、網膜電位図にて検討した。また、6ヶ月後、眼球を摘出し、切片を作成し、組織学的に障害がないか否か検討した。

(4) 網膜色素変性ラットを用いた視神経電気刺激における視機能改善効果の検討

網膜色素変性ラット（RCS ラット）（n=6）に対する視神経刺激の効果を組織学的に検討した。具体的には、RCS ラットを用い、結膜切開後、強膜側から可能な限り視神経に近い部分に電極を刺入し、1週間毎に4回電気刺激を施行（1ms, 100 μ A, 20Hz, 1時間）し、全通電終了1週間後、眼球を摘出し、4%パラフォルムアルデヒドにて固定した後、切片を作成し、電気刺激眼、sham 眼、それぞれについて比較検討した。

(5) 中型動物を用いた視神経電気刺激の検討

今回の研究を通じて、ラットを用いて複数回視神経を硝子体側から刺激することが困難であると考えられたため、より大きな動物を用いるための、埋植装置部分の安全性を検討した。具体的には、眼球内に埋植する電極線、接続装置、体内装置本体に続く配線、を一体化させた部分を結膜切開後、家兎（n=3）の強膜に縫合し、結膜で被覆し、生体埋植した場合の安全性を6ヶ月にわたり、観察した。また、埋植装置部分については、洗浄後に生理食塩水中で電圧を印加し、気泡の発生部位を観察することにより断線、短絡、リークの有無を確認した。その後 SEM にて形態観察を行った。

4. 研究成果

(1) 動物モデルを用いた視神経電気刺激

麻酔下で、顕微鏡を用いて、ラット毛様体扁平部から極細刺激電極を眼内硝子体腔内に挿入し、視神経乳頭に刺入することが可能であった。電極には、作成した先端が鋭の直径100 μ mの白金イリジウム電極を用いた。合併症として、

硝子体出血 (1 例)、水晶体損傷 (6 例) が生じ、また、電気刺激後、電極が視神経から、離れている例が 1 例あった。眼内炎は研究期間中認めなかった。合併症が多く、複数回の電気刺激、長期の経過観察は困難と考えられた。

(2) 刺激電極に使用する素材の安全性の検討

テフロンコーティング白金イリジウム線家兎眼硝子体内留置後、6 ヶ月間経時的に、前眼部検査、眼底検査、フルオレセイン蛍光眼底検査、網膜電位図を施行したが、すべての検討において、留置していない僚眼と著明な相違がないことを示した。また、6 ヶ月後の組織学的比較検討においても有意な相違がないことを確認した。

以上より、テフロンコーティング白金イリジウム線は、眼内において生体適合性が高く、毒性がない、と考えられ、長期埋植用のコーティング素材として、テフロンは有用であると考えられた。テフロンはパリレンと比較して、眼内における操作が容易であり、細工も容易であることから、今後の人工視覚用電極開発においても、当研究結果は大変重要と考えられた。

(3) 電気刺激による眼組織におけるインスリン様成長因子 IGF-1 のタンパクレベルにおける変化

今回の検討において、電気刺激を施行したサンプル、施行しなかったサンプル間で、抗 IGF-1 抗体による免疫染色における有意な差は認められなかった。患者では一回の電気刺激によっても視機能の改善がみられた患者がいたが、種の相違等にて、ラットでは複数回の刺激が必要かもしれないため、今後、複数回刺激による検討も考慮すべきであると考えられた。

(4) 網膜色素変性ラットを用いた視神経電気刺激における視機能改善効果の検討

RCS ラット眼 (n=6) の 1 週間毎、4 回の電気刺激終了 1 週間後、眼球を摘出し、通電眼 (図 1A)、sham 眼 (図 1B)、それぞれの網膜視細胞の層 (個数: 視機能を反映すると考えられる) を比較検討した。結果、通電眼に網膜視細胞核数が sham

眼よりも多く保たれている傾向にあったが、有意差は認めなかった。今後対象ラット数を増やし、さらに検討する必要があると

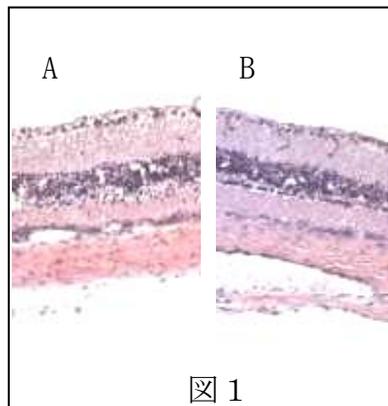


図 1

と考えられた。また、刺激前と比較し、

網膜層が薄くなっており、視神経の電気刺激によって、網膜細胞が再生、あるいは、細胞死が抑制される、ということは、今回の結果からは否定的と考えられた。

(5) 中型動物を用いた視神経電気刺激の検討

慢性刺激用、埋植装置部分 (図 2) を家兎強膜に逢着、6 ヶ月間、前眼部、後眼部に眼内炎等の炎症を認めなかった。埋植装置部分については、洗浄後に生理食塩水中で電圧を印加し、気泡の発生部位を観察することにより断線、短絡、リークの有無を確認した。その後 SEM にて形態観察を行った。埋植装置部分に、断線および短絡は見られなかった。リークは 3 個すべての試験片の単線部で発生した。また接続部のリークは試験片 3 のみで発生した。単線部のリーク箇所ではテフロン被覆が破れており、破れの大きさは 10-30um 程度であった。リーク箇所近傍ではテフロン被覆に、撮子等の圧迫で生じたと思われる変形が見られた。

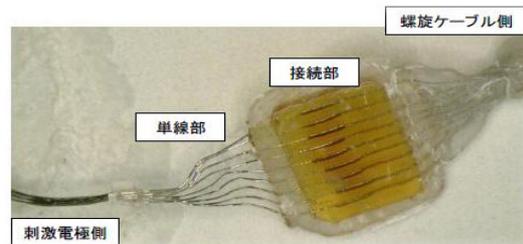


図 2

新たな埋植装置部分として、リークを防止するため、シリコンによる単線部の被覆を要すると考えられた。また、シリコン被覆された撮子を埋植時使用する方法も検討必要と考えられた。改良された埋植装置部分を用いて、今後中型動物において、慢性的な視神経電気刺激をもちいた研究が施行できると考えられた。

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 14 件)

雑誌論文

- ① Sasamoto Y, Gomi F, Sawa M, Sakaguchi H, Tsujikawa M, Nishida K, Effect of cataract in evaluation of macular pigment optical density by autofluorescence spectrometry, Invest Ophthalmol Vis Sci, 52, 927-932, 2011、有
- ② Wakabayashi T, Fujiwara M, Sakaguchi H, Kusaka S, Oshima Y, Foveal microstructure and visual acuity in surgically closed macular holes: spectral-domain optical coherence

tomographic analysis, *Ophthalmology*, 117, 1815-1824, 2010、有

③ Suzuki M, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Sakaguchi H, Bevacizumab treatment for choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration in Japanese patients, *Jpn J Ophthalmol*, 54, 124-128, 2010、有

④ Tominaga A, Oshima Y, Wakabayashi T, Sakaguchi H, Horii Y, Maeda N, Bacterial contamination of the vitreous cavity associated with transconjunctival 25-gauge microincision vitrectomy surgery, *Ophthalmology*, 117, 811-817, 2010、有

⑤ Nishida K, Kamei M, Kondo M, Sakaguchi H, Suzuki M, Fujikado T, Tano Y, Efficacy of Suprachoroidal-Transretinal Stimulation in Rabbit Model of Retinal Degeneration, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 2263-2268, 2010、有

⑥ Sakaguchi H, Kamei M, Fujikado T, Yonezawa E, Ozawa M, Cecilia-Gonzalez C, Ustariz-Gonzalez O, Quiroz-Mercado H, Tano Y, Artificial vision by direct optic nerve electrode (AV-DONE) implantation in a blind patient with retinitis pigmentosa, *J Artif Organs*, 12, 206-209, 2009、有

⑦ Yamamoto T, Kamei M, Sakaguchi H, Oshima Y, Ikuno Y, Gomi F, Ohji M, Tano Y, Comparison of surgical treatments for central retinal vein occlusion; RON vs. cannulation of tissue plasminogen activator into the retinal vein, *Retina*, 29, 1167-1174, 2009、有

⑧ Sawa M, Gomi F, Tsujikawa M, Sakaguchi H, Tano Y, Long-term results of intravitreal bevacizumab injection for choroidal neovascularization secondary to angioid streaks, *Am J Ophthalmol*, 148, 584-590, 2009、有

⑨ Shima C, Gomi F, Sawa M, Sakaguchi H, Tsujikawa M, Tano Y, One-year results of combined photodynamic therapy and intravitreal bevacizumab injection for retinal pigment epithelial detachment secondary to age-related macular degeneration, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 247, 899-906, 2009、有

⑩ Wakabayashi T, Oshima Y, Fujimoto H, Murakami Y, Sakaguchi H, Kusaka S, Tano Y, Foveal Microstructure and Visual Acuity after Retinal Detachment Repair Imaging Analysis by Fourier-Domain Optical Coherence Tomography, *Ophthalmology*, 116, 519-528, 2009、有

⑪ Sawa M, Gomi F, Tsujikawa M, Ikuno Y, Sakaguchi H, Sayanagi K, Tano Y, Abnormal fundus autofluorescence patterns in myopic choroidal neovascularisation, *Br J*

Ophthalmol, 92, 1236-40, 2008、有

⑫ Fang X, Sakaguchi H, Kamei M, Kusaka S, Tano Y, Efficacy and safety of one intravitreal injection of bevacizumab in diabetic macular oedema, *Acta Ophthalmol*, 86, 800-805, 2008、有

⑬ Kitaguchi Y, Fujikado T, Bessho K, Sakaguchi H, Gomi F, Yamaguchi T, Nakazawa N, Mihashi T, Tano Y, Adaptive optics fundus camera to examine localized changes in the photoreceptor layer of the fovea, *Ophthalmology*, 115, 1771-7, 2008、有

⑭ Wakabayashi T, Oshima Y, Sakaguchi H, Kamei M, Kusaka S, Tano Y, Intravitreal bevacizumab to treat iris neovascularization and neovascular glaucoma secondary to ischemic retinal diseases in 41 consecutive cases, *Ophthalmology*, 115, 1571-80, 2008、有

〔学会発表〕(計6件)

①坂口裕和、瓶井資弘、西田健太郎、生野恭司、森本壮、貴島晴彦、圓尾知之、小澤素生、古野間邦彦、神田寛行、不二門尚、西田幸二、脈絡膜上経網膜電気刺激型人工視覚システム体内装置埋植手術、第64回日本臨床眼科学会、2010/11/11-14、神戸

②K. Nishida, H. Sakaguchi, T. Fujikado, M. Kamei, Electrophysiological Evaluation of Rabbit Eyes Chronically Implanted With Electrode for Suprachoroidal Transretinal Stimulation, ARVO annual meeting 2010, 2010/5/2-6, Fort Lauderdale, USA

③H. Sakaguchi, K. Nishida, C. Cecilia-Gonzalez, Y. Terasawa, R. Velez-Montoya, T. Fujikado, R. Sanchez-Fontan, M. Ozawa, H. Quiroz-Mercado, M. Kamei, A New Electrode Device for Artificial Vision by Direct Optic Nerve Electrode (AV-DONE), ARVO annual meeting 2010, 2010/5/2-6, Fort Lauderdale, USA

④坂口裕和、脈絡膜上経網膜電気刺激型人工視覚および視神経刺激型人工視覚の現状、第114回日本眼科学会総会、2010/4/15-18、名古屋

⑤西田健太郎、坂口裕和、瓶井資弘、田野保雄、脈絡膜上経網膜電気刺激において大脳皮質誘発電位に影響を与える因子、第113回日本眼科学会総会、2009/4/17、東京

⑥H. Sakaguchi, Artificial Vision with Direct Optic Nerve Electrode (AV-DONE), 2008 World Ophthalmology Congress, 2008/6/30, Hong Kong

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂口 裕和 (SAKAGUCHI HIROKAZU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80379172

(2) 研究分担者

瓶井 資弘 (KAMEI MOTOHIRO)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40281125

田野 保雄 (TANO YASUO)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80093433

(平成 21 年 1 月 31 日逝去のため研究分担者から外れる)