

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293354

研究課題名(和文) 電気刺激による統合的視覚回復の研究

研究課題名(英文) Integrated approach to recover vision by electrical stimulation

研究代表者

不二門 尚 (Fujikado, Takashi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50243233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：2014-15年度に人工網膜の臨床研究を行った3名中2名で、術後6か月経過すると、残存する視力が術前よりも改善することが判明し、継続的な電気刺激が神経賦活に有効であることが示された。その機構解明のための基礎実験として、神経細胞死にいたる初期の変化をラマン顕微鏡を用いて検討し、細胞死に関係するミトコンドリアの動態が、生きた状態で観測できることを示した。網膜色素変性症では、視細胞が徐々に変性するが、これを定量化するために、補償光学(AO)眼底カメラを用いた錐体密度の自動計測システムを開発した。今後はラマン顕微鏡およびAO眼底カメラを用いて、電気刺激による神経賦活機構の解明をさらに進める予定である。

研究成果の概要(英文)：In 2 of 3 patients who underwent clinical trial on artificial retina in 2014 - 2015, the residual vision improved 6 months after surgery, suggesting that continuous electrical stimulation is effective to improve neural function. As a basic experiment to elucidate its mechanism, we investigated early changes of neuronal cell death using a Raman microscope and showed that kinetics of mitochondria-related to cell death can be observed in a living state. In retinitis pigmentosa, photoreceptors gradually degenerate. In order to quantify this, we developed an automatic measurement system for cone density using an adaptive optics (AO) fundus camera. We plan to further elucidate the neuronal activation mechanism by electrical stimulation using Raman microscope and AO fundus camera in the future.

研究分野：眼科学

キーワード：電気刺激 神経保護 ラマン分光 人工網膜 錐体密度 補償光学眼底カメラ 錐体密度

1. 研究開始当初の背景

われわれの研究室では、世界で初めて経角膜電気刺激 (TES) が網膜神経保護・賦活効果をもたらすことを、動物実験および臨床研究で示した。

2. 研究の目的

(1) 電気刺激による網膜神経・賦活効果の分子メカニズムを検討するための基礎研究。

(i) ラマン分光による神経細胞死に至る過程を非侵襲的検討。

(ii) 補償光学(AO)眼底カメラを用いた視細胞密度とコントラスト感度の関係、および光刺激による散乱光強度変化の検討

(2) 人工網膜移植後の視覚回復の評価。

3. 研究の方法

a) 網膜神経節細胞の不死化した細胞である RGC5 を用い、RGC5 に対してグルタミン酸を負荷し細胞死を誘導させ、投与から細胞死に至るまで、経時的にラマン顕微鏡で測定する。測定したラマン波から cyt c のラマン波に基づいたラマン画像を作成する。

b) ラマン画像が何を示すのか解明するため、cyt c の免疫組織染色や細胞の生死に関係するミトコンドリアを Mitotracker®を用いて染色し、ラマン画像と対比させる。また電子顕微鏡標本を作製し、細胞死に至る過程でのミトコンドリアや核の形態変化についても検討する。

c) 形態学的検討だけでなく、細胞内の cyt c のタンパク濃度とラマン画像の cyt c のシグナル強度の関連についても ELISA 法を用いて検討し、ラマン画像と比較する。

d) ラマン信号の定量法は現時点では、確立されていない。このため統計解析が可能なラマン信号の定量方法を確立し、定量を行い、ラマン信号の生物学的意味を解明する。

(1) (ii) 補償光学(AO)眼底カメラを用いた光刺激による散乱光強度変化の検討、および視細胞密度とコントラスト感度の関係

健康人被験者 8 名の右眼に散瞳薬(ミドリン P®) を点眼後、10 分間の暗順応を行った。補償光学レーザー走査検眼鏡を用いて視細胞を観察しながら、波長 630nm の赤色光を眼内に 5 分間照射し、錐体細胞の反射率変化を測定した。

健康人被験者 15 名、網膜変性疾患 11 例に対して、コントラスト感度の検査(CSV-1000HGT 使用)を実施した。補償光学レーザー走査検眼鏡を用いて、中心窩の錐体モザイクを撮影した。コントラスト感度検査の視標と重なる部分の錐体密度を算出し、コントラスト感度と錐体細胞密度の相関を統計解析した。

(2) 人工網膜移植後の視覚回復の評価。

2014-15 年度に人工網膜の臨床研究を行った 3 名に対して、人工網膜 OFF 時の残存視力を経時的に 1 年間月 1 回計測した。

4. 研究成果

(1) (i) ラマン分光による神経細胞死の検討

研究 a の結果

図 1 のように正常な RGC5 のラマン像を示す。図 1B のように、核と細胞質でのラマンシフトが異なっており、細胞質内の cyt c のラマンシフトはピークは 4 つ見られ (図 1C a, b, c, d) それぞれのピークに基づいた画像が図 1D のように描出できた。

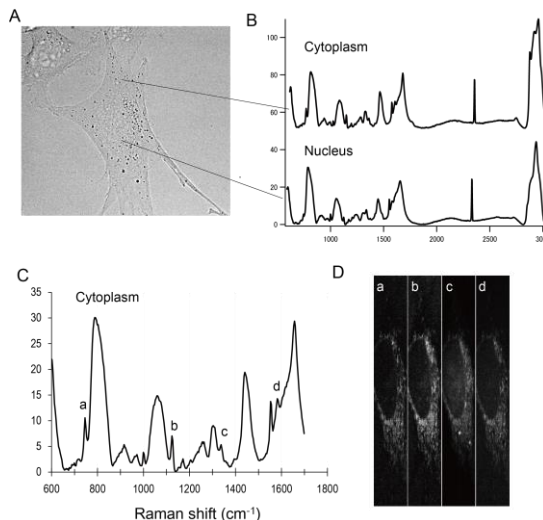


図 1. 正常 RGC5 細胞のラマン像

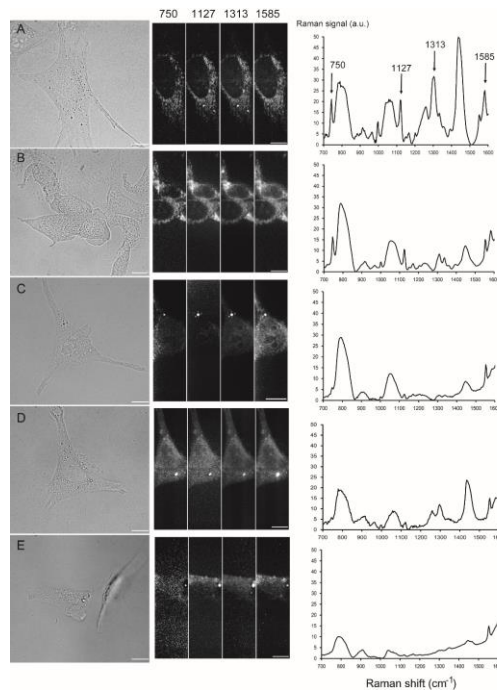


図 2. RGC5 細胞のグルタミン酸投与後の cyt c ラマン像とラマンシフト

グルタミン酸投与後に cyt c ラマン像が当初は粒子状にシグナルが出ていたのが徐々に

消失し、ラマンシフトの4つの cyt c シグナルのピークが消失した。

研究 b の結果

図3に高濃度のグルタミン酸投与によるRGC5細胞の細胞死の各段階のミトコンドリアの免疫染色 (Mito) と電顕像 (EM) を示す。

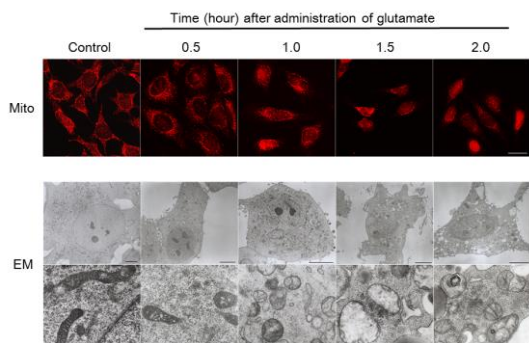


図3. RGC5細胞のミトコンドリア免疫染色と電顕像

細胞の変性過程で、ミトコンドリアの分布が変化し、徐々にミトコンドリアの粒子状のシグナルが融合している。電顕像では投与0.5時間後にミトコンドリアがすでに変性していることがわかった。

研究 c の結果

図4のように cyt c タンパクのシグナルの分布は、グルタミン酸投与後に変化するが、シグナル強度はラマンシグナルと異なり、強いままであり、ELISA 法による cyt c タンパク量の変化も同様に2時間後でもそれほど低下しておらず、cyt c ラマンシグナルと乖離していた。

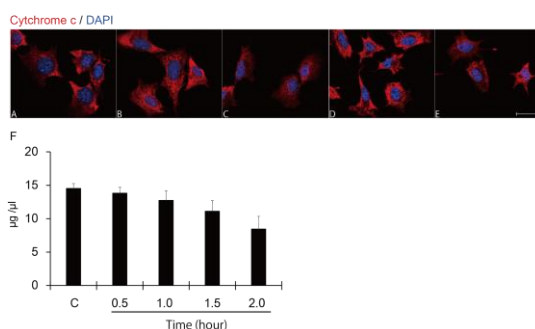


図4. RGC5細胞のCyt c免疫染色とELISA法による量的変化

研究 d の結果

図5のようにCyt c ラマンシグナルの4つのピークについてグルタミン酸投与後の経時変化について、シグナル強度を定量した結果どのピークも投与後に統計学的に有意に減少することがわかった (one way-ANOVA, $P < 0.05$)

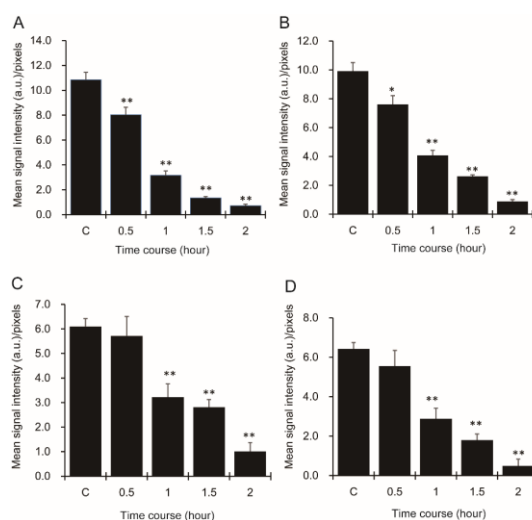


図5. RGC5細胞のCyt c ラマンシグナルの強度の変化

以上の実験結果よりグルタミン酸投与により還元型 cyt c が減少し、酸化型 cyt c が増加したと考えられ、ラマンシグナルによって酸化ストレスの程度やミトコンドリアのダメージを組織学的手法を用いずに光学的に評価できる可能性があることがわかった。

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13件)

1. Fujikado T, Kamei M, Sakaguchi H, Kanda H, Endo T, Hirota M, Morimoto T, Nishida K, Kishima H, Terasawa Y, Oosawa K, Ozawa M, Nishida K. One-Year Outcome of 49-Channel Suprachoroidal-Transretinal Stimulation Prosthesis in Patients With Advanced Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Nov 1;57(14):6147-6157.
2. Endo T, Kanda H, Hirota M, Morimoto T, Nishida K, Fujikado T. False reaching movements in localization test and effect of auditory feedback in simulated ultra-low vision subjects and patients with retinitis pigmentosa. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016 May;254(5):947-56. Epub 2016 Jan 7.
3. Lohmann TK, Kanda H, Morimoto T, Endo T, Miyoshi T, Nishida K, Kamei M, Walter P, Fujikado T. Surgical feasibility and biocompatibility of wide-field dual-array suprachoroidal-transretinal stimulation prosthesis in middle-sized animals. *Graefes Arch*

- Clin Exp Ophthalmol. 2016 Apr;254(4):661-73. Epub 2015 Jul 21.
4. Hirota M, Morimoto T, Kanda H, Lohmann TK, Miyagawa S, Endo T, Miyoshi T, Fujikado T. Relationships Between Spatial Contrast Sensitivity and Parafoveal Cone Density in Normal Subjects and Patients With Retinal Degeneration. Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina. 2017 Feb 1;48(2):106-113.
 5. Hirota M, Kanda H, Endo T, Lohmann TK, Miyoshi T, Morimoto T, Fujikado T. Relationship between reading performance and saccadic disconjugacy in patients with convergence insufficiency type intermittent exotropia. Jpn J Ophthalmol. 2016 Jul;60(4):326-32. Epub 2016 Apr 25.
 6. 神田 寛行, 不二門 尚. 人工網膜による視覚再生. 再生医療 (1347-7919)15 巻1号 Page22-32(2016. 02)
 7. 神田 寛行, 不二門 尚. 【ブレインマシンインターフェース】感覚のBMI 人工視覚システム. Clinical Neuroscience (0289-0585)34 巻 2 号 Page230-234(2016. 02)
 8. Endo T, Kanda H, Hirota M, Morimoto T, Nishida K, Fujikado T. False reaching movements in localization test and effect of auditory feedback in simulated ultra-low vision subjects and patients with retinitis pigmentosa. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2016 May;254(5):947-56. Epub 2016 Jan 7.
 9. 神田 寛行, 不二門 尚. 人工網膜-最近の動向. 光技術コンタクト 625 (53) ,2015
 10. Lohmann TK, Kanda H, Morimoto T, Endo T, Miyoshi T, Nishida K, Kamei M, Walter P, Fujikado T. Surgical feasibility and biocompatibility of wide-field dual-array suprachoroidal - transretinal stimulation prosthesis in middle-sized animals. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2016 Apr;254(4):661-73. Epub 2015 Jul 21.
 11. 神田 寛行, 不二門 尚. 【身体補助具の今-クオリティオブライフの維持に向けて-】人工網膜 よみがえる光感覚. 電子情報通信学会誌 (0913-5693)98 巻 4 号 Page266-271(2015. 04)
 12. 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;2013:3119-21.
 13. 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. 2014 Mar 20;9(3):e92186.
- [学会発表] (計 28 件)
1. Fujikado Takashi, Kamei M, Kishima H, Morimoto T, Kanda H, Sakaguchi H, Nishida K, Endo T, Lohmann TK, Maruo T, Hirota M, Oosawa K, Ozawa M. Artificial Vision. The 3rd International Symposium on Cognitive Neuroscience Robotics, 大阪, 2016 年 12 月 11 日
 2. Kanda H, Kamei M, Sakaguchi H, Endo T, Hirota M, Morimoto T, Nishida K, Kishima H, Miyoshi T, Fujikado T. Development of a second-generation suprachoroidal-transretinal stimulation retinal prosthesis. Australia, 2016 年 11 月 22 日
 3. Kanda Hiroyuki. Relationship between retinal damage and current intensity in Suprachoroidal - Transretinal Stimulation. 2016 Taiwan - Japan Joint Symposium, 奈良, 2016 年 10 月 28 日
 4. Fujikado Takashi, Kamei M, Sakaguchi H, Kanda H, Morimoto T, Endo Takao, Nishida Ke, Kishima H, Hirota M, Oosawa K, Ozawa M, Nishida Ko. Clinical Trial of 49-Channel STS Retinal Prosthesis for Advanced RP Patients. Dearborn(USA), 2016 年 9 月 20 日
 5. Morimoto Takeshi, Kanda Hiroyuki, Endo Takao, Lohmann Tibor Karl, Miyoshi Tomomitsu, Nishida Kohji, Fujikado Takashi. Surgical Feasibility of a Wide-Field Dual-Array Suprachoroidal-Transretinal Stimulation(STS) Prosthesis in Middle-Sized Animals. 9th Biennial World Research Congress on the Relationship between Neurobiology and Nano-Electronics Focusing on Artificial Vision, Dearborn(USA) , 2016 年 9 月 19 日

6. 神田寛行, 三好 智満, 森本 壮, 不二門 尚. ネコ外側膝状体ニューロン単一ユニット記録による人工網膜用刺激電極の評価. 視覚科学フォーラム第20回研究会, 大阪, 2016年8月25日
7. Fujikado Takashi, Kamei M, Kishima H, Morimoto T, Kanda H, Sakaguchi H, Nishida K, Endo T, Lohmann T.K., Maruo T, Hirota M, Oosawa K, Ozawa M. Clinical Trial of 49-Channel STS Retinal Prosthesis for Advanced RP Patients. Retina Conservation and Regeneration Taipei(Taiwan), 2016年7月9日
8. Fujikado Takashi, Kamei M, Kishima H, Morimoto T, Kanda Hiroyuki, Sakaguchi Hi, Nishida K, Endo T, Osawa K, Ozawa M. One-Year Outcomes of 49-Channel Suprachoroidal-Transretinal Stimulation(STS) Retinal Prosthesis in Patients with Advanced Retinitis Pigmentosa. ARVO2016, Seattle(USA), 2016年5月4日
9. Morimoto Takeshi, Kanda Hiroyuki, Endo Takao, Lohmann TK, Miyoshi Tomomitsu, Kishima Haruhiko, Nishida Kohji, Fujikado Takashi. Surgical feasibility of wide-field dual-array suprachoroidal-transretinal stimulation (STS) prosthesis in middle-sized animals. ARVO2016, Seattle(USA), 2016年5月3日
10. Kanda Hiroyuki, Miyoshi Tomomitsu, Morimoto Takeshi, Fujikado Takashi. Evaluation of the spatial resolution of electrode arrays for suprachoroidal retinal prosthesis by recording single-unit activities in the lateral geniculate nucleus. ARVO2016, Seattle(USA), 2016年5月3日
11. 神田寛行, 森本 壮, 三好 智満, 不二門 尚. 外側膝状体単一ユニット活動による人工網膜多極電極の機能評価. 第120回日本眼科学会総会, 仙台, 2016年4月7日
12. 不二門 尚, 瓶井 資弘, 貴島 晴彦, 森本 壮, 神田 寛行, 広田 雅和, 坂口 裕和, 西田 健太郎, 遠藤 高生, 圓尾 知之, 小澤 素生, 大澤 孝治, 西田 幸二. 49極 STS 型人工網膜の慢性臨床研究の結果. 第120回日本眼科学会総会, 仙台, 2016年4月7日
13. 森本壮, 神田 寛行, 三好 智満, 遠藤 高生, Tibor K Lohmann, 西田 幸二, 不二門 尚. 2枚電極脈絡膜上-経網膜電気刺激(STS)型人工網膜の中型動物への埋植術と生体適合性. 第120回日本眼科学会総会, 仙台, 2016年4月7日
14. Morimoto Takeshi, Chiu Liang-da, Fujita Katsumasa, Kanda Hiroyuki, Fujikado Takashi. Watching dying retinal ganglion cells induced by high concentration of glutamate by using Raman microscopy. Nanophotonics in Asia 2015, 大阪, 2015年12月10日
15. Morimoto Takeshi, Kanda Hiroyuki, Miyoshi Tomomitsu, Lohmann T.K., Fujikado Takashi. Surgical feasibility of wide-field dual-array suprachoroidal-transretinal stimulation(STS) prosthesis in middle-sized animals. Artificial Vision 2015, ドイツ, 2015年11月28日
16. Lohmann T.K., Kanda Hiroyuki, Morimoto Takeshi, Miyoshi Tomomitsu, Mokwa W, Walter P, Fujikado T. Suprachoroidal-transretinal stimulation with the VLARS(very large array retina stimulator) device in a cat. Artificial Vision 2015, ドイツ, 2015年11月28日
17. Fujikado Takashi, Kamei Motohiro, Kishima Haruhiko, Morimoto Takeshi, Kanda Hiroyuki, Sakaguchi H, Nishida K, Endo T, Lohmann T.K., Maruo T, Hirota M, Oosawa K, Ozawa M. Clinical Study of Retinal Prosthesis by 49 Channel Suprachoroidal-Transretinal Stimulation (STS) in Patients with Advanced Retinitis Pigmentosa. Artificial Vision 2015, ドイツ, 2015年11月28日
18. Kanda Hiroyuki, Miyoshi Tomomitsu, Morimoto Takeshi, Fujikado Takashi. Spatial extent of neural responses evaluated by single-unit activities of the lateral geniculate nucleus elicited by suprachoroidal electrical stimulation. Artificial Vision 2015, ドイツ, 2015年11月28日
19. 神田 寛行, 不二門 尚, STS方式人工網膜の開発. 第58回自動制御連合講演会, 神戸, 2015年11月15日
20. 森本壮, 遠藤 高生, 神田 寛行, 西田 幸二, 不二門 尚. 人工網膜埋植患者に対する術前経角膜電気刺激検査を用いた網膜残存機能の評価. 第53回日本神経眼科学会総会, 埼玉, 2015年11月6日
21. Kanda Hiroyuki, Takaomi Kanda, Yuki

- Nagai, Takashi Fujikado. Image processing using a saliency map for a 49-channel retinal prosthesis. ARVO2015, Denver(USA), 2015年5月6日
22. Morimoto Takeshi, Endo Takao, Nishida Kohji, Fujikado Takashi. Current intensity-dependent neuroprotection in eyes with traumatic optic neuropathy by transcorneal electrical stimulation. ARVO2015, Denver(USA), 2015年5月3日
23. Fujiakdo Takashi, Kamei Motohiro, Kishima Haruhiko, Morimoto Takeshi, Kanda Hiroyuki, Sakaguchi Hirokazu, Nishida Kentaro, Endo Takao, Ozawa Motoki, Nishida Kohji. Testing of Chronically Implanted 49-Channel Retinal Prosthesis by Suprachoroidal-Transretinal Stimulation(STS) in Patients with Advanced Retinitis Pigmentosa. ARVO2015, Denver(USA), 2015年5月3日
24. 森本壮, 遠藤 高生, 西田 幸二, 不二門 尚. 網膜色素変性に対する経角膜電気刺激の治療効果. 第119回日本眼科学会総会 札幌, 2015年4月17日
25. 不二門 尚, 瓶井 資弘, 貴島 晴彦, 森本 壮, 神田 寛行, 広田 雅和, 坂口 裕和, 西田 健太郎, 遠藤 高生, 圓尾 知之, 小澤 素生, 大澤 孝治, 西田 幸二. 第2世代49極STS型人工網膜の臨床研究. 第119回日本眼科学会総会, 札幌, 2015年4月16日
26. Fujiakdo Takashi, Kamei M, Sakaguchi H, Kanda H, Morimoto T, Nishida K, Kishima H, Maruo T, Oosawa K, Ozawa M. Feasibility of 2nd Generation STS Retinal Prosthesis in dogs. Artificial Vision 2013: The International Symposium on Visual Prosthetics, Aachen(ドイツ), 2013年11月9日
27. Fujikado Takashi, Kamei Motohiro, Sakaguchi Hirokazu, Kanda Hiroyuki, Morimoto Takeshi, Nishida Kentaro, Kishima Haruhiko, Maruo Tomoyuki, Oosawa Kouji, Ozawa Motoki, Nishida Kohji. Feasibility of 2nd Generation STS Retinal Prosthesis in Dogs. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Osaka, 2013年7月5日
28. Fujikado Takashi, Kamei Motohiro,

Kishima Haruhiko, Maruo Tomoyuki, Osawa Koji, Ozawa Motoki. Feasibility of 2nd Generation STS Retinal Prosthesis with 49 Channel Electrode Array in Dogs. ARVO2013, Seattle(USA), 2013年5月8日

〔図書〕(計2件)

1. Kasai Masashi, Ishiguro Hiroshi, Asada Minoru, Osaka Mariko, Fujikado Takashi. Cognitive Neuroscience Robotics B - Analytic Approaches to Human Understanding - 10. Brain Machine - Interfaces for Sensory Systems. Springer, 2016, 275pages
2. Viet Peter Gabel, Fujikado Takashi, et al. Artificial Vision - A Clinical Guide - Part II Retinal Approaches 11. Retinal Prosthesis by Suprachoroidal - Transretinal Stimulation(STS), Japanese Approach, Springer International Publishing, 2017, 232pages

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

なし

○取得状況(計 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/sensory/www/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

不二門 尚 (FUJIKADO, Takashi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 50243233

(2)研究分担者

森本 壮 (MORIMOTO, Takeshi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 00530198

松下 賢治 (MATSUSHITA, Kenji)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号: 40437405

神田 寛行 (KANDA, Hiroyuki)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 50570248

三好 智満 (MIYOSHI, Tomomitsu)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 70314309

辻川 元一 (TSUJIKAWA, Motokazu)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号: 70419472