Optical Recording of Retinal and Visual Cortical Responses Evoked by Electrical Stimulation on the Retina

Makoto Osanai Member (Osaka University, osanai@eei.eng.osaka-u.ac.jp)

Haruko Sakaehara Non-member (Osaka University, sakaehara@eei.eng.osaka-u.ac.jp)

Hajime Sawai Non-member (Osaka University, h_sawai@phys2.med.osaka-u.ac.jp)

Wen-Jie Song Non-member (Kumamoto University, song@kumamoto-u.ac.jp)

Tetsuya Yagi Non-member (Osaka University, yagi@eei.eng.osaka-u.ac.jp)

Keywords : artificial vision, calcium imaging, membrane potential imaging, retina, visual cortex, electrical stimulation

To develop a retinal prosthesis for blind patients using an implanted multielectrode array, it is important to study the response properties of retinal ganglion cells and of the visual cortex to localized retinal electrical stimulation.

Optical imaging can reveal the spatio-temporal properties of neuronal activity. Therefore, we first conducted an in vitro calcium (Ca^{2+}) imaging study with Ca^{2+} -sensitive fluorophore to investigate the response properties of ganglion cells, which are retinal output neurons, to local current stimulation in isolated frog retinas. In order to know what kind of visual sensation was caused by a retinal stimulation, the response in the visual cortex should be revealed. Therefore, we also conducted an in vivo membrane potential imaging study with a voltage-sensitive dye to explore the visual cortical responses to retinal stimulation in guinea pigs.

In the retina, 100 Hz 10 times 100 μA current stimuli evoked localized transient responses of the ganglion cells (Fig. 1). The

responding area broadened during stimulus until about 200 ms after the stimulation. This response almost completely disappeared about 1 s after the stimulation. The diameter of the responding area was about 150 μm . The spatial pattern of the responding area was altered by changing the location of the stimulation.

In the visual cortex, 500 μs 100 μA STS (Suprachoroidal Transretinal Stimulation) caused localized responses in the primary visual cortex (Fig. 2). The responding area broadened until about 60 ms after the stimulation. This response almost completely disappeared about 120 ms after the stimulation. A spatially different cortical response was observed to stimulation of a different position on the retina.

These results suggest that the imaging study has great potential in revealing the spatio-temporal properties of the neuronal response for the retinal prosthesis.

Fig. 1. Time lapse images of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in retinal ganglion cells evoked by electrical stimuli on the retina

Fig. 2. Time lapse images of changes in the membrane potential elevation in the visual cortex evoked by STS using a single electrode

網膜電気刺激に対する網膜および視覚野応答の光学計測

正員 小山内 実* 非会員 榮原 晴子*
 非会員 澤井 元** 非会員 宋 文杰*,***
 非会員 八木 哲也*

Optical Recording of Retinal and Visual Cortical Responses Evoked by Electrical Stimulation on the Retina

Makoto Osanai*, Member, Haruko Sakaehara*, Non-member, Hajime Sawai**, Non-member,
 Wen-Jie Song*,***, Non-member, Tetsuya Yagi*, Non-member

To develop a retinal prosthesis for blind patients using an implanted multielectrode array, it is important to study the response properties of retinal ganglion cells and of the visual cortex to localized retinal electrical stimulation.

Optical imaging can reveal the spatio-temporal properties of neuronal activity. Therefore, we conducted a calcium imaging study to investigate response properties to local current stimulation in frog retinas, and a membrane potential imaging study to explore the visual cortical responses to retinal stimulation in guinea pigs.

In the retina, local current stimuli evoked transient responses in the ganglion cells located near the stimulus electrode. The spatial pattern of the responding area was altered by changing the location of the stimulation.

Local electrical stimulation to the retina also caused transient responses in the visual cortex. The responding cortical areas in the primary visual cortex were localized. A spatially different cortical response was observed to stimulation of a different position on the retina.

These results suggest that the imaging study has great potential in revealing the spatio-temporal properties of the neuronal response for the retinal prosthesis.

キーワード : 人工視覚, カルシウムイメージング, 膜電位イメージング, 網膜, 大脳皮質視覚野, 電気刺激

Keywords : artificial vision, calcium imaging, membrane potential imaging, retina, visual cortex, electrical stimulation

1. はじめに

人工網膜システムとは、視細胞変性による失明患者の網膜に刺激電極を埋植し、外界からの光情報に基づいて網膜を電気刺激することによって、視覚機能の再建を試みるものである。この人工網膜埋植の試みが初めて報告されたのは1956年のことであるが⁽¹⁾、近年の工学技術の進歩に加えて、ボランティア患者による臨床実験において、網膜埋植

電極からの電気刺激によって擬似光覚が誘発されることが分かり⁽²⁾、この分野の研究・開発が急速に進展している^{(2)~(4)}。

人工網膜実現のためには、網膜を電気刺激することにより、網膜の出力細胞である神経節細胞にどのような応答が引き起こされるのかを知る必要がある。また、網膜電気刺激が生体にどのような知覚を誘発するのかを知るためには、電気刺激により惹起された信号が、視神経を通して中枢にどのような応答を引き起こすのかを精査する必要がある。このような目的で、網膜電気刺激が神経節細胞や中枢にどのような応答を惹起するのかに関して、単一電極^{(5)~(9)}や多点電極基板⁽¹⁰⁾を用いた電気生理学的な方法による計測が行われている。これらの方法は、応答の時間特性を解析するには適しているが、刺激に対する応答の空間特性に関する解析には適さない。こうした空間特性の計測には、光学的な手法による画像計測が効果的である。

光学的な神経信号計測法としては、膜電位感受性色素を用いた膜電位イメージング法と、細胞内カルシウム濃度

* 大阪大学大学院工学研究科
 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1
 Graduate School of Engineering, Osaka University,
 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

** 大阪大学大学院医学系研究科
 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2
 Graduate School of Medicine, Osaka University,
 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

*** 現所属：熊本大学大学院医学薬学研究部
 〒860-8556 熊本県熊本市本荘 1-1-1
 Present address: Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences,
 Kumamoto University,
 1-1-1 Honjo, Kumamoto, Kumamoto 860-8556

($[Ca^{2+}]_i$) の測定が可能なカルシウム (Ca^{2+}) イメージング法がある。膜電位イメージング法は、膜電位感受性色素を用いることにより、神経細胞における電位変化そのものの時空間特性を計測することが可能である⁽¹¹⁾。また Ca^{2+} イメージング法で測定される $[Ca^{2+}]_i$ は、活動電位により上昇することが知られており、膜電位変化（特に活動電位）の良い指標であると共に、細胞内の生化学的な状態を示す良い指標でもある⁽¹²⁾⁽¹³⁾。

人工視覚では空間的な光覚をもたらすために、多点刺激が必要とされている。多点刺激に対する神経応答の計測は最適な電極間距離などを決定するために必要なことであるが、多点刺激に対する応答の計測はほとんど報告がない。この多点刺激により応答する神経細胞の領域を明らかにするためにも、光学計測により応答領域を画像化し、その領域を計測することが有用であると思われる。

そこで本研究では、画像計測が網膜電気刺激の効果を客観的に評価する手段として有用であることを確認するために、以下の実験を行った。1) 摘出遊離網膜を用いた *in vitro* 実験により、電気刺激に対する神経節細胞の応答を Ca^{2+} イメージング法で計測した。また、複数の刺激電極を用いて、その配置により神経節細胞の応答領域がどのように変化し得るのかを計測した。2) モルモットを用いた *in vivo* 実験により、網膜電気刺激に対する一次視覚野の神経応答を膜電位イメージング法で計測した。また網膜の刺激位置の違いによる、視覚野の応答領域の違いを示した。

2. 方 法

すべての実験動物の取り扱いは大阪大学動物実験委員会の規程に従った。

〈2・1〉 網膜応答測定用遊離網膜標本の作成および Ca^{2+} 感受性蛍光色素の逆行性負荷⁽¹⁴⁾ 実験動物にはウシガエル (*Rana Catesbeiana*, 体長約 10 cm) を用いた。ウシガエルを冷却麻酔したのち脊髄穿刺を行い、眼球を摘出し、眼球の前眼部を除去した。この前眼部を除去した眼球の視神経断端に、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 (Invitrogen, Oregon Green 488 BAPTA-1, $6K^+$ -salt) を溶解させた擬似細胞内液 (Oregon Green 488 BAPTA-1 25 mM, HEPES-Na (pH ~ 7.2) 10 mM) 0.5 μ l を滴下した後、この眼球をリンガー液を満したシャーレ中に入れ、95% O_2 -5% CO_2 を通気した湿潤なボックス中で 19 $^{\circ}C$ の環境下に 22-30 時間静置し、神経節細胞にのみ逆行性に色素を負荷した⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。その後、リンガー液中で網膜を強膜、色素上皮から遊離した。用いたリンガー液の組成は以下の通りである (単位: mM): NaCl 112, KCl 3.3, $NaHCO_3$ 17, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1, D-glucose 10。遊離した網膜を約 0.5 cm 角に切断し実験に用いた。

〈2・2〉 Ca^{2+} イメージング法による電気刺激に対する網膜神経節細胞の応答計測⁽¹⁴⁾⁽¹⁷⁾ 蛍光色素を負荷し遊離した網膜を正立落射蛍光顕微鏡 (Olympus, BX51WI) 下のガラス基板平面多点電極 (MEA) 上に神経節細胞側を上にして静置し、蛍光変化を観察した。実験は室温下 (約 25 $^{\circ}C$)

で、95% O_2 -5% CO_2 を通気したリンガー液を灌流しながら行った (約 1 ml/min)。Oregon Green 488 BAPTA-1 からの蛍光は、水浸対物レンズ (Olympus, 20 $\times$, NA 0.95) で集光され、中心波長 535 nm, バンド幅 45 nm の吸収フィルタ (XF1073, Omega Optical) を通して、解像度 256 $\times$ 256 の冷却 CCD カメラ (Red Shirt Imaging, NeuroCCDsm256) により、フレームレート 50 Hz で画像化された。蛍光色素の励起光は、顕微鏡に取り付けられた Xenon 光源から中心波長 475 nm, バンド幅 40 nm (XF3084, Omega Optical) の励起フィルタを通過し、ダイクロイックミラー (XF2010, Omega Optical) で反射され、標本に照射された。本研究で用いた Oregon Green 488 BAPTA-1 は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇により蛍光強度を増加させるので、蛍光画像の各ピクセルにおける $\Delta F/F$ を算出することにより、相対的な $[Ca^{2+}]_i$ 変化 ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) を見積もった。ここで、F は各ピクセルにおける刺激前の蛍光強度の時間平均値、 ΔF は刺激後の蛍光変化量である。ノイズを低減するために、同じ試行を 5-10 回繰り返し、それぞれの試行で得られた $\Delta F/F$ を加算平均して、結果として用いた。

〈2・3〉 視覚野応答測定用モルモットの準備⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾ 実験動物には、体重約 350 g のハートレー系モルモット (guinea pig) を用いた。動物はケタミン (0.8 ml/kg; 三共、動物用ケタラル 50 筋注用) およびキシラジン (1.0 ml/kg; バイエル、セラクター 2% 注射液) の混合麻酔を筋肉注射し、麻酔を行った。手術中および計測中は、初回の半量を約 1 時間おきに投与し、麻酔を維持した。計測中は、臭化パンクロニウム (0.1 ml; 三共、ミオブロック注射液) により不動化し、人工呼吸器により呼吸を行わせた。動物の状態は、直腸温度と心拍数を計測することによりモニターした。大脳皮質視覚野直上の頭蓋骨および硬膜を除去し、皮質を電位感受性色素 RH-795 (0.7 mg/ml in saline; Invitrogen) で 1 時間染色した。

〈2・4〉 膜電位イメージング法による網膜電気刺激に対する視覚野応答計測^{(11)(18),(19)} 本研究では高解像度 CMOS イメージングシステム (100 $\times$ 100 画素; MiCAM Ultima, BrainVision) を用い、膜電位感受性色素の蛍光を、フレームレート 1 kHz で計測した。得られた蛍光画像から、 Ca^{2+} イメージング法と同様に $\Delta F/F$ を算出し、膜電位変化を見積もった。膜電位感受性色素の蛍光変化量は非常に微弱 (最大でも約 0.2 %) であるため、8-32 回同じ試行を繰り返し、加算平均することによりノイズを低減した。さらに、画像取り込み開始時期を心電図 QRS 波に同期させ、取り込み中は人工呼吸を停止し、かつ刺激試行と非刺激試行の差分をとることにより、体動や拍動により生じるノイズを抑制した。また、本研究で用いた RH-795 は膜電位上昇に伴い蛍光強度が減少するが膜電位上昇を分かりやすくするため、計算された $\Delta F/F$ に -1 を乗じて図示した。

$\Delta F/F$ 画像は、左側を吻側、上側を外側として表示してある (図 3-5)。

〈2・5〉 刺激電極及び刺激方法 遊離摘出網膜を用いた *in vitro* 実験 (図 1, 2) では、直径 30 あるいは 10 μ m の

Ti/TiN 電極が 100 あるいは 200 μm 間隔で 8×8 のマトリクス状に配列された平面多点電極基板 (Multi Channel Systems, MEA 100/10-Ti or MEA 200/30-Ti,) を用い、持続時間 200 μs の双極電流パルスを与え、電気刺激を行った。対極 (Ag/AgCl) は MEA 内のリンガー液中に設置した。

視覚野応答を計測するための in vivo 実験では、単一の刺激電極として直径約 300 μm の銀ボール電極を用い (図 4)、多点刺激電極として、厚さ 12 μm のポリイミド基板上に直径 200 μm の金メッキを施した銅電極が 500 μm 間隔で 2×4 のマトリクス状に配列された多点電極 (ニデック製 プロトタイプ) を用いた (図 5)。網膜電気刺激は、眼球背側部

を露出させ、眼球と視神経の接合部より 1 mm 背側耳側の強膜を半層切開し、そこに銀ボール電極または多点電極を押し当てて、陰性矩形電流パルス (持続時間 500 μs) を与えることにより行った (脈絡膜上 - 経網膜刺激; Suprachoroidal Transretinal Stimulation, STS)⁽²⁾⁽⁹⁾⁽²⁰⁾。刺激電極の対極 (針電極) は眼球の硝子体内に設置した。

また、in vivo 実験では、通常の視覚入力により大脳皮質のどの領域に膜電位応答が惹起されるのかを同定するため、モルモットの眼前から白色発光ダイオードの拡散光を用いて視覚刺激を行い、大脳皮質における膜電位感受性色素の蛍光強度の変化を計測した (図 3)。網膜電気刺激の際

Upper left panel shows the fluorescence image of the retina. The stimulus electrode position is indicated by red circle. Time lapse images were obtained by application of 5×5 Gaussian kernel to $\Delta F/F$ images. At the bottom of each panel are the times in milliseconds after the application of 100 Hz 10 pulses 100 μA stimuli. As shown in the horizontal bar at the bottom right, warmer color indicates larger fluorescence change and colder color indicates smaller fluorescence change. The $\Delta F/F$ signal in each pixel less than a noise level is indicated by black color. Scale bar: 100 μm .

Fig. 1. Time lapse images of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in retinal ganglion cells evoked by electrical stimuli on the retina.

Leftmost panel shows the fluorescence image of the retina. The stimulus electrode positions are indicated by red circle. The intensity scale of this image is same as Fig. 1. Other bottom panel images were obtained by 20 frame integration of the $\Delta F/F$ images. Top panel illustrates electrode position for stimulation in the MEA (red circle). As shown in the vertical bar at the right, warmer color indicates larger fluorescence change and colder color indicates smaller fluorescence change. The $\Delta F/F$ signal in each pixel less than a noise level is indicated by black color. Scale bar: 100 μm .

Fig. 2. Spatial patterns of the ganglion cell responses in case of multielectrode stimulation.

には、この光刺激で応答が観測された領域を中心に計測を行った。

3. 結 果

〈3・1〉 網膜電気刺激に対する網膜神経節細胞の応答

図 1 にガラス基板平面多点電極 (MEA 200/30) の一つを用いて、100 μ A 100 Hz 10 回の刺激を視細胞側から与えた際の、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化の時空間特性を示す。刺激開始直後から $[Ca^{2+}]_i$ は上昇し、応答する領域は時間と共に拡大した。応答する細胞は刺激電極を中心とした直径約 150 μ m の同心円状の領域内に局限していた。図 1 に示した蛍光画像から判断する限り、この同心円状に局限された応答は、各細胞における Ca^{2+} 感受性蛍光色素の負荷量の違いによるものでは

ない。応答した細胞における $[Ca^{2+}]_i$ は、刺激終了後約 100 ms 後 (刺激開始から 200 ms 後) まで上昇を続け、その後徐々に減少し、刺激開始後約 1 s 後に元のレベルに戻った。この結果は、網膜を視細胞側から電気刺激することにより、刺激電極を中心とした限られた領域内の神経細胞が興奮したことを示唆している (議論の章参照)。

次に、MEA 中の刺激に用いる電極数及び刺激位置を変化させることによってどのような応答が惹起されるのか、計測・解析した。図 2 は MEA (MEA 100/10; 電極間距離 100 μ m, 電極直径 10 μ m) を用いて、複数の異なる電極から 100 μ A 100 Hz 10 回刺激を行ったときの、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化を計測・解析した結果である。図 2 下段は、応答した領域を分かりやすくするために、刺激開始から $\Delta F/F$ を 20 フレーム (400 ms)

In each image, a photograph of the brain surface is overlapped with $\Delta F/F$ image. At the bottom of each panel are the times in milliseconds after the application of photo-stimulation. As shown in the vertical bar at the right, warmer colors indicate positive fluorescence changes and colder colors indicate negative fluorescence change. The $\Delta F/F$ signal in each pixel less than a noise level is indicated by no color. Left and upper side of each image is rostral and lateral side, respectively. Scale bar: 1 mm.

Fig. 3. Time lapse images of changes in membrane potential evoked by the photo-stimulation in the visual cortex.

Figure is illustrated in the same way as Fig. 3.

Fig. 4. Time lapse images of changes in the membrane potential elevation in the visual cortex evoked by STS using a single electrode.

A: The multi-electrode array used for stimulation. Scale bar: 1 mm. B: Spatial response pattern evoked by 500 μ s 300 μ A stimulation from the different stimulus position. C is a superimposed image of the spatial patterns of the responses in B. The color illustrating the responding area corresponds to the stimulus position in B.

Fig. 5. Electrical stimulation from different stimulus positions caused different patterns of the response in the visual cortex.

積分したものを表示してある。図 2 上段は刺激電極の模式図であり、実際に電流を流した電極を赤で示してある。単一電極から刺激を与えた場合は（図 2 左から二番目の図）、直径 30 μ m の電極から刺激を行った図 1 の結果と比べると、非常に少数の細胞から応答が観測された。これらの結果は、刺激電極の大きさと神経節細胞の応答領域の大きさに依存関係があることを示唆しているが、現段階でその確証は無い（議論の章参照）。2 電極を用いて刺激を与えた場合は（図 2 左から三番目の図）、応答する領域が拡大し、3 電極から刺激を与えた場合は（図 2 右側二つの図）、刺激電極の配列に沿った方向に応答する領域が広がることが分かった。図周辺部で $\Delta F/F$ が高いように見える領域があるが、これは、蛍光色素を励起させるための励起光の照明むらなどにより観測されるアーティファクトである。これらの結果は、網膜に与える電気刺激の箇所を変化させることにより、異なった領域の網膜神経節細胞に応答を引き起こすことができることを示している。

〈3・2〉 網膜電気刺激に対する大脳皮質視覚野の応答

まず、モルモットの大脳皮質の中で視覚野の領域を同定するために、左眼前に白色 LED を設置し、右脳の大脳皮質における膜電位感受性色素の蛍光量変化 ($\Delta F/F$) を計測した（図 3）。光刺激は 4 ms の持続時間で、眼球位置での光強度は 12 μ W/cm² であった。刺激後約 30 ms から大脳皮質で応答が確認され、約 60 ms 後まで応答する領域が広がっていった。この応答は徐々に減弱し、刺激後約 110 ms でほぼ消失した。この応答はその時間経過から、シナプス後電位を反映しているものと考えられる（議論の章参照）。電気生理学的な手法により一次視覚野の領域の同定を行った過去の文献と比較すると⁽²¹⁾、図 3 で応答が観測された領域は、モルモットの一次視覚野に相当すると考えられる。

網膜電気刺激が大脳皮質視覚野にどのような応答を惹起するのか調べるために、STS 方式によりモルモットの網膜に 500 μ s 100 μ A の単発刺激を与え、視覚野における膜電位

応答を計測した（図 4）。その結果、約 25 ms 前後の潜時を持った応答が視覚野で観測された。刺激後約 60 ms まで応答の振幅、領域は共に大きくなり、約 120 ms 後にほぼ消失した。図 3 の全視野光刺激に比べ、応答領域の大きさは、限局していた。この結果は、視覚野の限局した領域にシナプス後電位が発生したと考えられる（議論の章参照）。またこの例では、刺激後約 35–85 ms の間に左上（吻外側）にも小さな応答を示した領域が現れたが、必ずしも 2 箇所の応答が得られるわけではなかった（8 例中 3 例）。

前節図 2 の実験で、網膜に電気刺激を与える場所及び箇所を変化させることにより、応答する神経節細胞の領域が変化することを示した。このような応答領域の変化が、空間情報の変化として生体に知覚されるかどうかを明らかにするためには、異なる位置の網膜刺激が視覚野内の異なる位置に応答を引き起こすことができるのか確かめる必要がある。そこでニデック社製多点電極を用い、同一標本で刺激位置を変えた場合に視覚野で惹起される応答について調べた。その結果を図 5 に示す。図 5 B, C に示すように、異なる位置に刺激を与えた場合、応答する領域に重なりはあるものの、視覚野内の異なる領域に応答が現れることが分かった。

4. 議 論

本論文では、人工視覚実現に向けた基礎研究として、網膜電気刺激に対する網膜神経節細胞及び視覚野における応答の時空間特性を、イメージング法により計測可能であることを示した。

遊離網膜を用いた実験では、Ca²⁺イメージング法により、神経節細胞の応答の計測を行った。この方法は、現時点では、細胞を同定できる空間分解能を持ち、多数の細胞から同時に神経活動を計測できる最も良い方法である⁽²²⁾。本研究では、Ca²⁺感受性蛍光色素の負荷法として、軸索輸送による逆行性染色法を用いた。従来から多細胞に Ca²⁺感受性

蛍光色素を導入する方法として用いられている、膜透過性のアセトキシメチルエステル体を用いた色素負荷法では、応答を示した細胞の種類を同定することが困難である。逆行性色素負荷法を用いることにより、選択的に神経節細胞にのみ Ca^{2+} 感受性蛍光色素を負荷させることが可能であり、その結果イメージングで計測された $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化は全て神経節細胞由来であると言える。

網膜視細胞側から電気刺激を与えると、刺激電極近傍を中心とした同心円状の応答が観測された。図 1 に示した実験と同条件で実験を行った 6 例中 6 例で同様の同心円状の応答が観測されている。また、図 1 左上の蛍光画像に示したように、刺激電極近傍に局在したような蛍光色素の負荷量の偏りは見られていない。これらの結果は刺激により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇した細胞は刺激電極近傍に局在していることを示している。

一般に神経細胞において刺激により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する原因として、主に以下の 3 つの要因が考えられる⁽¹³⁾。1) 活動電位により電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開閉し Ca^{2+} が流入。2) シナプス伝達により、神経伝達物質の受容体から Ca^{2+} が流入。3) 細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出。これまでの研究により、脳の神経細胞の細胞体における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は活動電位が発生することにより観測されることが報告されている⁽¹²⁾⁽²³⁾。神経伝達物質受容体からの Ca^{2+} 流入は、樹状突起上で起こる。樹状突起は空間的に非常に密に存在しているため、もし樹状突起に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が起こっているのであれば、空間的に連続した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観測されるはずである。しかし図 1 に示したように、本研究では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観測された領域は斑点状であり、その形状から細胞体のものである可能性が高い。図 1 で示したように、電気刺激に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化は刺激に同期して上昇し、ほぼ 1 s 前後で元のレベルに戻っている。細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出が起こった場合、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇及び減少の時間経過はもっと遅いはずである⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾。これらの点を合わせて考えると、本研究で計測された神経節細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は活動電位が起こった結果であると考えられる。しかし、網膜神経節細胞において、活動電位と細胞体の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の関係を調べた報告はないので、今後検討する必要がある。

図 2 に示した結果のうち、単一電極で刺激を行った場合、図 1 の結果に比べ非常に少数の細胞でしか $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は観測されなかった。図 2 左端に示した蛍光画像を見る限り、図 1 の実験と比べて蛍光色素の負荷量に大きな差異は認められない。また、図には示していないが、刺激強度を 200 μA にした場合は、単一電極刺激においても、図 1 と同様の大きさの領域に神経節細胞の応答が観測されている。これらの点から、図 2 で示した単一電極刺激で応答が観測された細胞が少なかった原因には次の可能性が考えられる。1) 刺激電極の直径が図 1 の実験では 30 μm であったが、図 2 の実験では 10 μm であった。刺激電極の直径が小さかったため、刺激が及ぶ領域の大きさが小さかった。2) 電極と組織の接触に問題があった。1) に関しては、電極直径によらず

通電電荷量が同じであれば、同様の刺激が行われるはずである。しかし、これは実際に電気刺激が神経興奮を惹起している場所により違いが出ると考えられる。もし、刺激電極に近接した領域（今回の場合視細胞に近い領域）に細胞興奮が起こっているとするならば、刺激電極の直径が小さいほど刺激が影響を及ぼす範囲は小さくなると思われる。逆に、刺激電極から離れた部位（今回の場合神経節細胞に近い領域）に興奮を惹起させているとするならば、刺激電極の直径はあまり影響しないと思われる。2) に関しては、組織と電極の接触をコントロールするのは、*in vitro* 実験においても、実際に生体に電極を埋め込む際にも非常に困難な問題である。いずれにせよ、電極直径が異なる実験の例数を重ね、電極直径と神経節細胞の応答領域との関係を精査する必要があると思われる。

in vivo 実験では、大脳皮質視覚野における応答を計測するために、膜電位感受性色素を用い、神経活動のイメージングを行った。この方法は、細胞の膜電位変化を広範囲で ms 以下の時間分解能で高速に可視化することが可能である。しかし、この方法には以下のような欠点がある。1) 細胞体と樹状突起などを区別することができない。2) 膜電位変化の要因を特定することが困難である。3) 膜電位変化が起こった細胞の種類の同定が困難である。細胞外電位記録法と異なり、膜電位感受性色素を用いた計測では、実際に膜電位上昇が起こった場所を同定することが可能である⁽²⁶⁾。この点を考慮に入れると、網膜を刺激した際に興奮する視覚野の領域を同定することを目的とした本論文では、欠点 1) は問題にならない。本論文で示した蛍光強度変化計測の結果から、膜電位変化の時間経過は数十 ms 程度であった。この結果と過去の報告を合わせて考えると⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾、2) の問題に関して、膜電位感受性色素で計測される膜電位変化は、活動電位とシナプス後電位の合成されたものを捉えているが、シナプス後電位に由来するものが支配的であると考えられる。3) の問題から、膜電位感受性色素で計測される応答は、脳に存在する神経細胞以外（例えばグリア細胞）の膜電位変化も合わせて計測している可能性が高い。この問題は、細胞内記録を行う以外解決策は無いが、図 3 で示した応答の時間経過を考えると、神経細胞の応答と考えるのが妥当であると思われる。これらの点を考え合わせると、図 3、4 で示した応答は、主に神経細胞のシナプス後電位由来のものであると考えられる。

in vivo イメージングでは、呼吸や心拍に伴う体動によるアーティファクトが発生する恐れがある。本論文では、この問題を回避するために、画像取り込み開始時期を心電の QRS 波に同期させ、取り込み中は人工呼吸を停止し、かつ刺激試行と非刺激試行の差分をとっている。しかし図 3 では、視覚野全体に応答が観測される前に、血管に沿ったような蛍光強度の変化が観測されている。血管あるいはグリア細胞の応答が神経細胞の応答より先に発生するとは考えにくい、この応答が、体動などによるアーティファクトであるのか、血管及びその周囲の細胞が先に興奮したのか

は、今後実験を重ね検討する必要がある。

図 1 の実験では、遊離網膜を単一電極で刺激した場合、その応答領域が刺激電極を中心とした同心円状になることを示したが、その直径を視角に換算すると 2°以下になることを以前報告した⁽¹⁴⁾。このような網膜電気刺激により、視覚野でも限局した領域に応答が惹起されることが本研究により確認された (図 4)。この応答領域のうち右下の領域の大きさは、光刺激を行い電気生理学的手法により retinotopy マッピングを行った報告⁽²¹⁾と比較すると、視角にして約 6°に相当していた。しかし、本論文で行った網膜神経節細胞の応答計測と視覚野応答の計測では、実験動物、刺激方法、刺激電極に違いがあり、その応答特性を単純に比較することはできない。単一細胞に電流注入を行って刺激を与えるような実験と異なり、組織を用いた実験や in vivo 実験では、電極と組織の接触を制御することは困難であるが、今後できる限り条件を合わせて実験を重ね、統計的処理を行うことにより、実験ごとのばらつきをキャンセルした結果を導出し、検討する必要があると思われる。

図 2, 4 では複数の電極を用い刺激を行うことにより、応答領域に差異が出ることが分かった。この結果は、網膜上の刺激位置を変化させることにより、異なる空間座標に光覚が知覚される可能性を示している。しかし、その応答領域がどの程度異なるのか、どの程度の空間分解能が得られる可能性があるのかについては、今後更なる実験・解析を行い検討することが必要である。

図 3 に示した実験では、ほぼ全視野をカバーする光刺激を行い、大脳皮質一次視覚野の応答が膜電位イメージングで計測可能なことを確認すると共に、一次視覚野の領域を確認した。今後、空間的に限局した様々なパターンの光刺激を与え、視覚野における応答を計測することにより、視覚野における retinotopy マッピングや、刺激形状と応答領域との対応付けが可能であると思われる。これらの結果と網膜電気刺激の結果とを比較することにより、網膜電気刺激がどのような光覚を知覚させ得るのかを調べることが可能であると思われる。

5. むすび

本研究では、人工網膜移植実現を目指した基礎研究として、網膜電気刺激が網膜の出力細胞である神経節細胞、および視覚中枢である大脳皮質視覚野にどのような応答を惹起するのかを計測・解析した。

in vitro 実験により、網膜局所電気刺激が神経節細胞に局所的な応答を引き起こすことが分かった。また、刺激を与える電極の配列を変化させることにより、応答する神経節細胞の分布を変化させることができた。

in vivo 実験では、モルモットの網膜に STS 方式で刺激を与えることにより、大脳皮質一次視覚野に局所的な応答を惹起できることが分かった。網膜の刺激位置を変化させることにより、視覚野においても応答する神経細胞の分布が変化することが明らかになった。

これらの結果は、網膜電気刺激が限局された光覚を生じさせることを示している。また、刺激位置を変えて計測した結果より、刺激電極を適切にマッピングすることにより、光覚だけでなく形をも認識させることが可能であることを示唆している。

今後の課題としては、主に以下の点が挙げられる。1) 刺激電極の大きさ、刺激強度などの刺激条件と、網膜神経節細胞及び視覚野における応答との関係を精査する必要がある。2) in vivo 実験の例数を重ね、アーティファクトと真の応答を明確に区別する必要がある。3) in vitro, in vivo 両者の実験条件をできるだけ揃え、それぞれの実験結果から、網膜電気刺激により得られる光覚の時空間分解能を推定する必要がある。4) in vivo 実験において、光刺激と電気刺激の対応関係を精査することにより、網膜電気刺激が惹起し得る光覚を予測する必要がある。

上記の点を踏まえて、今後様々な条件で実験を重ね、統計的検討も含めた詳細な解析をすることにより、人工視覚実現のための礎ができると考えられる。

謝 辞

本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) プロジェクト「人工視覚システム」および厚生労働科学研究費補助金 (H16-X-01; プロジェクトリーダー: 田野保雄 大阪大学教授) の予算補助により行われた。田野教授、株式会社ニデックを始めプロジェクトメンバーのご協力に深く感謝いたします。

(平成 19 年 1 月 25 日受付, 平成 19 年 6 月 6 日再受付)

文 献

- (1) G. E. Tassicker: "Retinal Stimulator", US Patent, No.2760483 (1956)
- (2) J. Dowling: "Artificial human vision", *Expert Rev. Med. Devices*, Vol.2, pp.73-85 (2005)
- (3) 田野保雄・不二門尚・八木哲也・澤井 元・神田寛行・森本 壮・三好智満・福田 淳・八木 透・三宅義三・太田 淳: 「人工網膜の展望」(不二門尚, 田野保雄 企画), 脳 21, Vol.6, No.4, pp.413-447 (2003)
- (4) I. Wickelgren: "Biomedical engineering. A vision for the blind", *Science*, Vol.312, pp.1124-1126 (2006)
- (5) V. Chowdhury, J. W. Morley, and M. T. Coroneo: "Feasibility of extraocular stimulation for a retinal prosthesis", *Can. J. Ophthalmol.*, Vol.40, pp.563-572 (2005)
- (6) H. A. Shah, S. R. Montezuma, and J. F. Rizzo III: "In vivo electrical stimulation of rabbit retina: effect of stimulus duration and electrical field orientation", *Exp. Eye Res.*, Vol.83, pp.247-254 (2006)
- (7) R. J. Jensen and J. F. Rizzo III: "Threshold for activation of rabbit ganglion cells with a subretinal electrode", *Exp. Eye Res.*, Vol.83, pp.367-373 (2006)
- (8) T. M. O'Hearn, S. R. Sadda, J. D. Weiland, M. Maia, E. Margalit, and M. S. Humayun: "Electrical stimulation in normal and retinal degeneration (rd1) isolated mouse retina", *Vision Res.*, Vol.46, pp.3198-3204 (2006)
- (9) H. Kanda, T. Morimoto, T. Fujikado, Y. Tano, Y. Fukuda, and H. Sawai: "Electrophysiological studies of the feasibility of suprachoroidal-transretinal stimulation for artificial vision in normal and RCS rats", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, Vol.45, pp.560-566 (2004)
- (10) L. Li, Y. Hayashida, and T. Yagi: "Temporal properties of retinal ganglion cell response to local transretinal current stimuli in the frog retina", *Vision Res.*, Vol.45, pp.263-273 (2005)
- (11) L. B. Cohen, B. M. Salzberg, and A. Grinvald: "Optical methods for

- monitoring neuron activity”, *Annu. Rev. Neurosci.*, Vol.1, pp.171-182 (1978)
- (12) D. Smetters, A. Majewska, and R. Yuste : “Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging”, *Methods*, Vol.18, pp.215-221 (1999)
- (13) M. J. Berridge, P. Lipp, and M. D. Bootman : “The versatility and universality of calcium signalling”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Vol.1, pp.11-21 (2000)
- (14) M. Osanai, T. Kitagawa, and T. Yagi : “Evaluation of effects of electrical stimulation on the retinal ganglion cells for the retinal prosthesis”, *Trans. Jpn. Soc. Med. Biol. Eng.*, Vol.45, No.1, in press (2007) (in Japanese)
 小山内実・北川豊啓・八木哲也 : 「人工視覚システム実現に向けた網膜電気刺激に対する神経節細胞応答の検証」, 生体医工学, **45**, 1, 印刷中 (2006)
- (15) 小山内実・鈴木慎一・鈴木直哉・木島博正・久場健司 : 「シナプス前末端内のカルシウム濃度の可視化とその時間変化測定」, 生物物理, Vol.213, pp.223-224 (1997)
- (16) S. Suzuki, M. Osanai, M. Murase, N. Suzuki, K. Ito, T. Shirasaki, K. Narita, K. Ohnuma, K. Kuba, and H. Kijima : “Ca²⁺ dynamics at the frog motor nerve terminal”, *Pflügers Arch.*, Vol.440, pp.351-365 (2000)
- (17) G. Grynkiewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien : “A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties”, *J. Biol. Chem.*, Vol.260, pp.3440-3450 (1985)
- (18) W. -J. Song, H. Kawaguchi, S. Totoki, Y. Inoue, T. Katura, S. Maeda, S. Inagaki, H. Shirasawa, and M. Nishimura : “Cortical intrinsic circuits can support activity propagation through an isofrequency strip of the guinea pig primary auditory cortex”, *Cereb. Cortex*, Vol.16, pp.718-729 (2006)
- (19) M. Nishimura, H. Shirasawa, H. Kaizo, and W. -J. Song : “New field with tonotopic organization in guinea pig auditory cortex”, *J. Neurophysiol.*, Vol.97, pp.927-932 (2007)
- (20) H. Sakaguchi, T. Fujikado, X. Fang, H. Kanda, M. Osanai, K. Nakauchi, Y. Ikuno, M. Kamei, T. Yagi, S. Nishimura, M. Ohji, T. Yagi, and Y. Tano : “Transretinal electrical stimulation with a suprachoroidal multichannel electrode in rabbit eyes”, *Jpn. J. Ophthalmol.*, Vol.48, pp.256-261 (2004)
- (21) B. P. Choudhury : “Retinotopic organization of the guinea pig’s visual cortex”, *Brain. Res.*, Vol.144, pp.19-29 (1978)
- (22) Y. Ikegaya, M. Le Bon-Jego, and R. Yuste : “Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators”, *Neurosci. Res.*, Vol.52, pp.132-138 (2005)
- (23) M. Murayama, K. Miyazaki, Y. Kudo, H. Miyakawa, and M. Inoue : “Optical monitoring of progressive synchronization in dentate granule cells during population burst activities”, *Eur. J. Neurosci.*, Vol.21, pp.3349-3360 (2005)
- (24) M. J. Berridge : “Neuronal calcium signaling”, *Neuron*, Vol.21, pp.13-26 (1998)
- (25) A. Verkhratsky : “The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signaling”, *Cell Calcium*, Vol.32, pp.393-404 (2002)
- (26) A. Grinvald, E. E. Lieke, R. D. Frostig, and R. Hildesheim : “Cortical point-spread function and long-range lateral interactions revealed by real-time optical imaging of macaque monkey primary visual cortex”, *J. Neurosci.*, Vol.14, pp.2545-2568 (1994)
- (27) R. Yuste, D. W. Tank, and D. Kleinfeld : “Functional study of the rat cortical microcircuitry with voltage-sensitive dye imaging of neocortical slices”, *Cereb. Cortex*, Vol.7, pp.546-558 (1997)

小山内 実

(正員) 1969年3月27日生。1991年名古屋大学理学部物理学科卒業。1996年同大学院理学研究科にて学位を取得。杏林大学, 東京医科歯科大学などを経て, 2001年より大阪大学大学院工学研究科に赴任。カルシウムイメージング, 電気生理学等の手法による神経科学の研究, および医用生体工学の研究に従事。現在, 同講師。理学博士。

榮原 晴子

(非会員) 1978年2月8日生。2000年3月長崎大学水産学部卒業。2002年同大学院生産科学研究科博士前期課程修了。2004年7月より大阪大学大学院工学研究科技術補佐員。現在カルシウムイメージング法による, カエル網膜標本および心筋細胞の活動計測に従事。水産学修士。

澤井 元

(非会員) 1957年9月28日生。1988年9月大阪大学大学院医学系研究科博士課程退学後, 弘前大学助手, 大阪大学助手, 岡山県立大学助教授を経て, 2000年4月より大阪大学大学院医学系研究科助教授。網膜神経節細胞の変性・再生の研究と人工視覚の研究に従事。医学博士。

宋 文 杰

(非会員) 1961年8月28日生。1983年中国海洋大学水産学部卒業, 1990年大阪大学基礎工学部生物工学科にて学位を取得。大阪大学基礎工学部助手, 大阪大学大学院工学研究科助教授を経て, 2006年熊本大学医学部教授。細胞生理学, 聴覚生理学および医用生体工学の研究に従事。工学博士。

八木 哲也

(非会員) 1955年12月5日生。1979年名古屋大学理学部物理学科卒, 同大学大学院医学研究科博士課程満了。生理学研究所, 名古屋工業大学, ロックフェラー大学, 九州工業大学を経て, 2001年4月より大阪大学大学院工学研究科教授。この間, 神経生理学, 視覚生理学, 生体エレクトロニクスに関する研究に従事。医学博士。