

人工視覚システム安全性評価のための長期記録系と
刺激電極の電気化学特性解析に関する研究

博士學位論文

桑原 真理子

2018年3月

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

目次

第1章 序論

1.1 研究の背景	1
1.2 目的	4
1.3 本論文の構成	5

第2章 人工視覚システム

2.1 原理	6
2.2 方式	8
2.3 安全性評価	12

第3章 人工視覚システム安全性評価のための誘発電位記録電極の開発

3.1 緒言	15
3.2 記録電極の作成	17
3.2.1 Platinum (Pt) ball-tip screw electrode	17
3.2.2 Platinum/iridium (Pt/Ir) ball-tip planar multi-electrode array (MEA)	19
3.3 電極の埋植	22
3.4 誘発電位・EIS 測定	23
3.4.1 視覚誘発電位の測定	23
3.4.2 電気刺激誘発電位の測定	25

3.4.3	電気化学インピーダンスの測定	27
3.4.4	誘発電位および EIS 測定結果	28
3.4.5	誘発電位・EIS 測定に関する考察	41
3.5	記録電極の電極界面特性と誘発電位の関連性	43
3.5.1	等価回路解析	44
3.5.2	VEP 波形の N_1 のエミュレーション	53
3.5.3	VEP 波形の N_1 のエミュレーションの考察	58
3.6	まとめ	60

第 4 章 人工視覚システム安全性評価のための安全安定な麻酔法の検討

4.1	緒言	61
4.2	方法	64
4.2.1	記録電極埋植	64
4.2.2	VEP 測定	67
4.2.3	EEP 測定	69
4.2.4	最小肺胞内濃度	71
4.2.5	VEP 波形解析	72
4.3	結果	73
4.4	考察	80
4.5	まとめ	82

第 5 章 刺激電極の慢性通電下における電気化学的特性解析

5.1	緒言	83
5.2	方法	85
5.2.1	刺激電極アレイおよび電極の埋植	85
5.2.2	電気刺激	87
5.2.3	EIS 測定	89
5.2.4	等価回路解析	90
5.2.5	組織標本観察	91
5.3	結果	92
5.4	考察	103
5.5	まとめ	105

第6章 結論	
6.1 本研究の成果	106
6.2 今後の展望	109
参考文献	111
研究発表目録	122
謝辞	126

第 1 章

序論

1.1 研究の背景

近年、外界の情報を直接、脳や神経を刺激することで伝え、感覚機能を喪失した患者に対し、人工的に感覚を再生させる研究開発が国内外で行われている [1]。Brain Machine Interface (BMI)、Brain Computer Interface (BCI)、Direct Neural Interface (DNI) は、脳の活動を非侵襲的または侵襲的に記録し、その記録した信号を処理することで機器を制御する、もしくは外界からの信号を脳で処理できる形式に符号化して脳に情報を送る技術である。現在、BMI や DNI の技術の一部は人工内耳などで実現されている [2]。人工内耳の成功により、喪失した感覚受容器の機能をデバイスで代行し、残存する感覚神経を電気刺激することにより、喪失した感覚を再生できることが示された。しかしながら、近年における目覚ましい医療技術の発展にもかかわらず、失われた視覚を回復させる有効な治療法はいまだなく、人工内耳と同様の原理を応用した視覚再生の研究開発が盛んに行われている [3]。

世界中で推定 2 億 5300 万人の視覚障害者が存在し、2 億 1700 万人が中程度から重度の視覚障害を有し、約 3600 万人が失明者である [4]。世界的な中程度以

上の視覚障害の主要原因は、未矯正の屈折異常 (53%)、未手術の白内障 (25%)、加齢黄斑変性 (4%)、緑内障 (2%)、糖尿病性網膜症 (1%) である [4]。

このような疾患の多くは手術や投薬による治療法が確立されており、全世界の視覚障害の 80 %以上が予防または治癒可能である [4]。過去 25 年間、国際的に様々な取り組みがされており、多くの国で視覚障害の予防と治療は大きく進歩し、オンコセルカ症およびトラコーマなどの感染症の有病率は、過去 25 年間で大幅に減少した [4]。社会経済的発展、公衆衛生活動、眼治療の技術向上などにより、世界の視覚障害者数は 1990 年代以降減少したが、中程度以上の視覚障害者または失明者の 81 %が 50 歳以上であり、人口増加と高齢化による、視覚障害者数の増加は今後も続くと考えられている [4]。失明者は 2020 年には 3850 万人、2050 年までに 1 億 1500 万人に増加すると推定される [4]。

日本における視覚障害の原因と割合を表 1.1 に示す [5]。日本においては視覚障害の原因として挙げられる疾患は加齢に伴うものが多い。

表 1.1 日本での視覚障害の原因順位と割合 (2007~2010 年)
(文献 [5] より引用)

順位	原因疾患	割合 (%)
1	緑内障	21.0
2	糖尿病網膜症	15.6
3	網膜色素変性	12.0
4	加齢黄斑変性	9.5
5	脈絡網膜萎縮	8.4
6	視神経萎縮	5.4
7	白内障	4.8
8	角膜疾患	3.5
9	脳卒中	2.8
10	強度近視	2.5

眼疾患の多くが治療可能であるが、萎縮型加齢黄斑変性、網膜色素変性については、医学的に有効な治療法が未だ確立されていない [6]。加齢黄斑変性は、加齢に伴い網膜の中心部分である黄斑に障害が生じる疾患であり、視野の中心部がゆがんで見える、視野中心が暗くなる・欠ける、色が分からなくなる、視力が低下するなどの症状を呈する [7]。網膜色素変性は、時間をかけて視細胞が変性する遺伝性の疾患であり、夜盲 (暗いところでものが見えにくい)、視野狭窄、視力低下などの症状を呈する [8]。これらの疾患は重篤化すると失明に至る。

高齢化社会の進展により、加齢に起因する疾患の増加による社会負担増が予想され、視覚障害に対する治療法の確立や補助装置の開発が望まれている。視覚障害者の生活補助装置としては、視覚情報を聴覚や触覚など残存する他の感覚に置き換える感覚代行装置が古くから実用されている [9]。音声読書器や点字ディスプレイ、色彩音声案内装置、広義には視覚障害者ナビゲーションシステムなどが視覚代行装置にあたり、視覚障害者の生活の質（Quality of life: QOL）の向上に役立っている [9]。しかしながら、日常生活のあらゆる場面でこのような設備・装置の利用はできず、健常者と同様の日常生活を行うことは困難である。そのため、直接視覚を再生する新たな治療技術の開発が望まれている。このような背景から、医工学の技術を用いて視覚を再生する人工視覚システムの研究開発が進められている [3, 10]。人工視覚システムとは、後天盲の患者に残存する視覚神経系を電気刺激し視覚情報を伝達する装置である [11]。

失明者の網膜や大脳皮質などの視覚神経系を刺激するとフォスフェンと呼ばれる光覚が得られることを 1755 年に Le Roy らが報告している [12]。その後、Tassiker（1954 年）が電気刺激による視覚再生の特許を出願している [13]。1960 年代から 1970 年代にかけて Brindley [14] や Dobelle ら [15] によって大脳刺激による視覚再生の研究が行われ、電光掲示板様の視覚情報の提示に成功した。Dobelle らによる視覚再生の実証は人工視覚研究の門戸を開くことになる。

1980 年代から 1990 年代にかけて、Santos らによって、視細胞の機能の大部分が失われた網膜色素変性や加齢黄斑変性の患者にも視細胞以外の網膜神経組織の機能が残存することが示される [16]。Humayun らによって加齢黄斑変性および網膜色素変性患者の網膜を電気刺激することにより光覚が得られることが示されると [17]、加齢黄斑変性および網膜色素変性の治療を目的とした網膜刺激型人工視覚の研究が盛んに行われるようになる。日本においては、2001 年より国家プロジェクトとして人工視覚システムの開発が進められた。その中で脈絡膜上経網膜刺激方式（sprachoroidal-transretinal stimulation: STS）が考案され、現在実用化に向けた研究開発、評価が進められている [18, 19]。

人工視覚システムの実用化に際しては、*in vivo*, *in vitro* における非臨床試験、臨床試験を行う必要がある。動物を用いた非臨床試験のコストは非常に高く、動物実験の倫理問題もある。動物実験に関する問題は人工視覚システムの開発のみならず、新規医療機器開発において社会的課題である。

1.2 目的

新規医療機器開発では、動物実験による、有効性・安全性の評価が必要である。しかしながら、動物実験の実施にはコスト、および倫理的な課題がある。そのため、最小限の動物実験数でより多くの知見が得られることが望まれる。本研究では、長期の動物実験をより安全・確実に行うための方法を検討し、加えて動物実験を介さない評価法の検討を行う。

人工視覚システムの実用化に際しては、電気刺激によって電氣的閃光（フォスフェン）が得られ、長期間に及ぶ慢性的な刺激が安全であるかの検証が必要である。電気刺激により光覚が得られるかの検証は、実験動物を用いた電気刺激誘発電位（Electrical evoked potential: EEP）測定で評価できる [11, 20]。EEP とは電気刺激を与えたときに得られる神経活動電位である。一般的に、実験動物における誘発電位の記録には頭蓋骨に埋め込まれた先端が鋭利な金属ネジが使用される [21]。しかしながら、短期間の記録には有用だが、脳組織を傷つけ長期間の記録は難しい [21]。また、実験動物の麻酔には、キシラジンやジエチルバルビタール酸などの注射麻酔が用いられるが、麻酔深度の制御が難しく、そのため再現性の良い誘発電位を得ることが難しい [22, 23]。長期間に及ぶ誘発電位によるシステムの耐久性や電気刺激の安全性評価には、長期記録が可能な記録電極と麻酔深度の制御が容易な麻酔法が必要である。本研究は、人工視覚システムの実用化に向けて必要最小限の動物実験数でより多くの知見が得られるよう、長期に及ぶ誘発電位記録が可能な埋植記録電極の開発、および吸入麻酔による誘発電位の長期記録系を利用した人工視覚システムの安全性評価系の開発を目的とする。また、刺激電極の *in vivo* の電気化学的特性を評価し、動物実験によらない安全指標の確立の検討を行った。

1.3 本論文の構成

以下に本論文の構成を示す。

第2章では、人工視覚システムの原理・方式について説明する。また、人工視覚システムの安全性評価について述べる。

第3章と第4章にて、人工視覚システムの安全性評価のための誘発電位記録電極と安全な麻酔法について解説する。

第3章では、人工視覚システムの安全性評価を行うために開発した記録電極について説明する。記録電極の作成方法と誘発電位の長期間記録結果を示す。また、記録電極の経時的な電極特性の変化を電気化学的に評価し、視覚誘発電位と電極特性の変化の関係性について言及する。

第4章では、誘発電位測定を繰り返し行う際の安全な麻酔法について検討する。イソフルラン麻酔下とセボフルラン麻酔下での視覚誘発電位を比較した結果を示す。

第5章では、刺激電極の電極界面に刺激電流が与える影響について、電気化学的に評価した結果を述べる。

最後に第6章において、本研究の成果と今後の展望について述べる。

第 2 章

人工視覚システム

2.1 原理

角膜から入った光は、硝子体を通過し網膜の最外層にあたる網膜色素上皮にまで達する。視細胞には感光性細胞膜があり、そこには光が当たることにより分子構造が変化する受容タンパク質が存在する [24]。光が受容タンパク質に当たると神経伝達物質が放出され、双極細胞を興奮させる。双極細胞の興奮は網膜神経節細胞に伝達される (図 2.1)。光の強さは神経パルスの発火頻度に変換され、外側膝状体を經由し一次視覚野に伝達される (図 2.2)。

視細胞の機能が喪失する疾患に罹患した患者においても、双極細胞や網膜神経節細胞が残存すれば電気刺激により光覚に類似した電氣的閃光を誘発できる。網膜色素変性や加齢黄斑変性は、視細胞が喪失し失明に至る疾患である。これらの疾患では、視細胞が喪失していても大脳へ神経信号を伝達する双極細胞や網膜神経節細胞が残存している [16]。人工視覚システムはカメラで取得した外界の画像情報に対応する電気刺激を、残存する双極細胞や網膜神経節細胞に与えることで喪失した視細胞の機能を人工物で代替する装置である。

自覚的に知覚されるフォスフェンを、他覚的に評価するには大脳誘発電位と

して記録される EEP で評価できる。網膜への電気刺激は双極細胞や網膜神経節細胞を興奮させ [25]、その興奮が大脑皮質に伝わると誘発電位として記録できる。

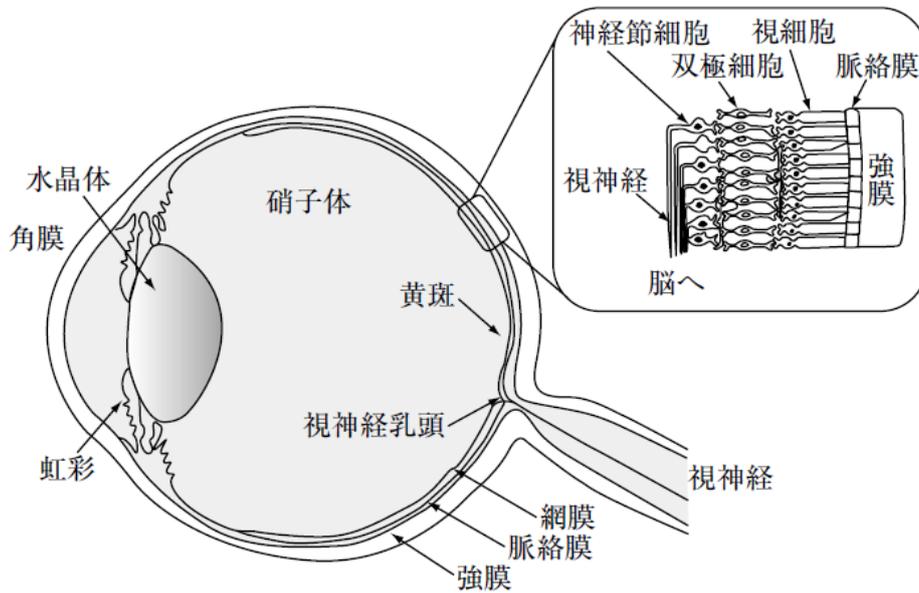


図 2.1 眼の構造
(文献 [26] より引用)

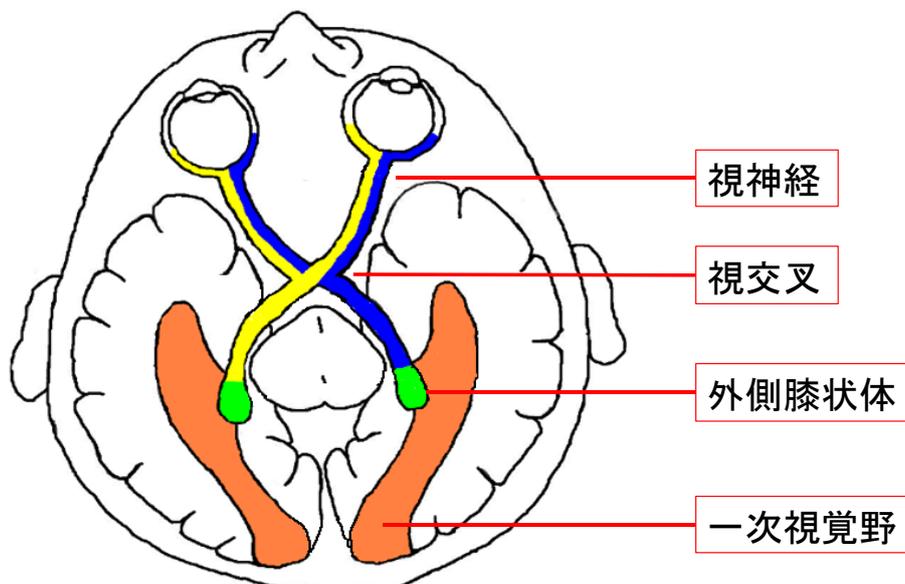


図 2.2 視覚神経系

2.2 方式

人工視覚システムは、外界情報をカメラで撮像し、体内に埋植された刺激電極により、視覚神経系を電気刺激することで視覚を再生する装置である。視覚神経系のどの部位を刺激するかにより、網膜上刺激方式、網膜下刺激方式、脈絡膜上経網膜刺激方式、視神経刺激方式、視覚野刺激方式などに大別できる [26] (図 2.3~2.5)。開発されている諸方式の優劣をまとめたものを表 2.1 に示す。

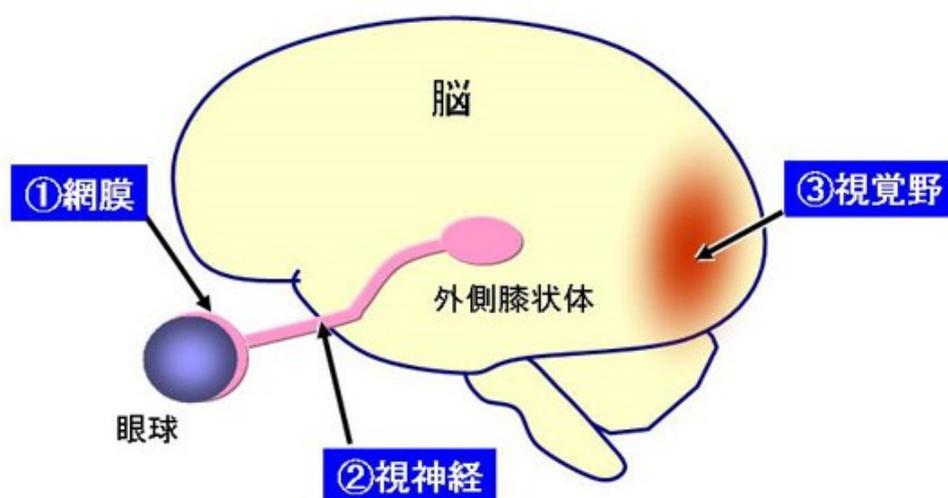


図 2.3 人工視覚システムの刺激方式
(文献 [26] より引用)

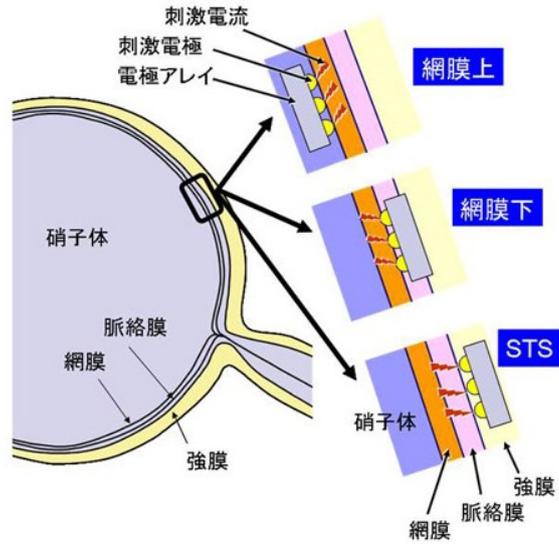


図 2.4 網膜刺激方式の種類
(文献 [26] より引用)

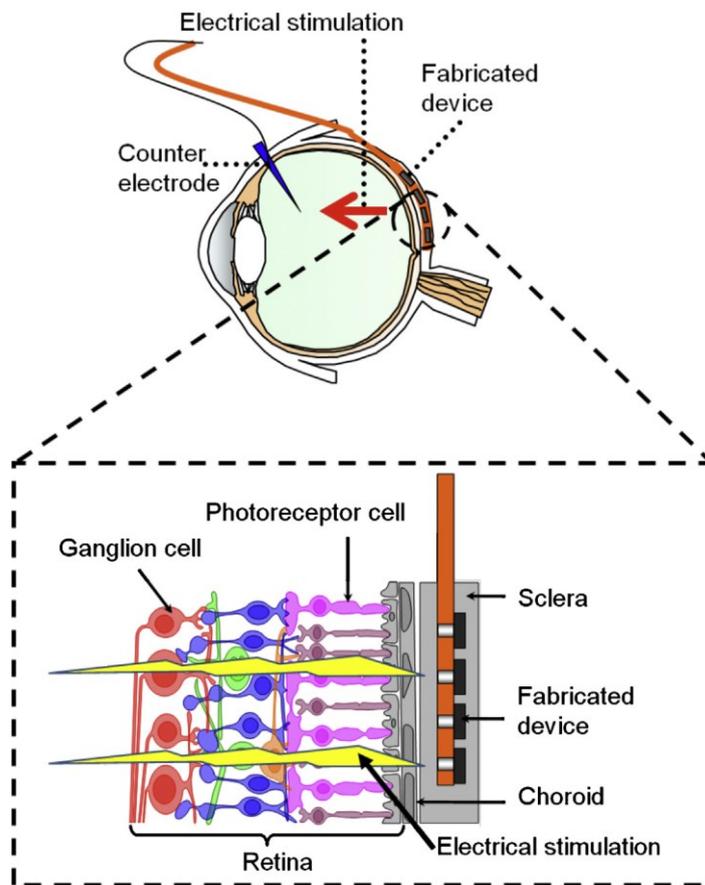


図 2.5 脈絡膜上経網膜刺激方式の人工視覚システムの概要図
(文献 [27] より引用)

表 2.1 人工視覚システムの各刺激方式の長所・短所

刺激型	長所	短所
網膜下刺激方式 (網膜下から刺激)	<ul style="list-style-type: none"> ・眼球運動に対応 (撮像素子が網膜にあるため) ・電極刺激部位と光覚認識の位置関係 (レチノトピー) の問題少ない ・刺激閾値低い 	<ul style="list-style-type: none"> ・対象疾患が網膜色素変性・加齢黄斑変性に限定 ・電極構造が複雑 ・他方式に比べ網膜剥離を起こしやすい
網膜上刺激方式 (双極 or 神経節細胞を刺激)	<ul style="list-style-type: none"> ・電極構造が簡単 ・比較的大きな電極が使用可能 ・レチノトピーの問題少ない 	<ul style="list-style-type: none"> ・対象疾患が網膜色素変性・加齢黄斑変性に限定 ・刺激電極の固定が困難 ・手術が比較的難しい ・眼球運動による情報と撮像素子からの画像情報が不一致
脈絡膜上-経網膜刺激方式 (網膜を非接触刺激)	<ul style="list-style-type: none"> ・電極を直接網膜に埋め込まないため、手術が容易 ・網膜上・下刺激方式より侵襲度が低い ・安定な固定が可能 ・広視野への刺激が可能 ・レチノトピーの問題少ない 	<ul style="list-style-type: none"> ・対象疾患が網膜色素変性・加齢黄斑変性に限定 ・刺激電流が大きい ・眼球運動による情報と撮像素子からの画像情報が不一致
視神経刺激方式 (視神経を刺激)	<ul style="list-style-type: none"> ・構造が簡単 (カフ電極) ・電極固定が容易 ・全視野刺激が可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・レチノトピーの問題あり ・眼球運動による情報と撮像素子からの画像情報が不一致
視覚野刺激方式 (大脳皮質の視覚野を刺激)	<ul style="list-style-type: none"> ・視覚神経系が機能していなくても良いため、失明の原因となるおおよその疾患へ適用が可能 ・レチノトピーの問題少ない 	<ul style="list-style-type: none"> ・刺激電極の設置困難 (視覚野が脳の溝の中の為) ・固定困難 ・眼球運動による情報と撮像素子からの画像情報が不一致

視覚野刺激方式や視神経刺激方式は、網膜神経節細胞や双極細胞が残存していなくとも電気刺激による視覚機能の回復が可能であり、適応疾患の範囲は広い。しかしながら、視覚野刺激方式や視神経刺激方式は、脳や神経系への埋植手術が必要なため難易度は高く、侵襲度も高い。視覚野刺激方式の研究開発は、Dobelle らの研究 [15] 以降途絶えていたが、現在の技術水準を利用したシステムの研究開発が進められている [28]。視神経刺激型の研究開発は過去にベルギーで行われ [29]、現在は日本 [30]、中国 [31]で行われている。

網膜刺激方式は、埋植した電極アレイにより残存する網膜細胞を刺激して、光覚を知覚させる方式である [32]。網膜刺激方式は手術も比較的容易であり、アレイ上の電極位置とフォスフェンの知覚位置との対応（レチノトピー）の問題がない。米国 Second sight 社の Argus II [33] は、網膜上刺激方式を採用しており、米国 FDA より医療機器認証、欧州の CE マークを取得している。独国 Retina Implant AG 社の Alpha-IMS [34] は網膜下刺激方式を採用しており、CE マークを取得している。そして日本 [32]、オーストラリア [35]、韓国 [36]では、脈絡膜上経網膜刺激方式の研究開発が精力的に進められている。

2.3 安全性評価

新規開発の医療デバイスは、非臨床試験 (*in vitro*, *in vivo*)、臨床試験 (治験) を経て、実用化される。これらの試験では、生体への安全性およびデバイスの耐久性が評価される。

米国 Food and Drug Administration (FDA) の人工視覚システム開発のガイドライン (Investigational Device Exemption Guidance for Retinal Prostheses) では、非臨床試験として、以下の項目の評価が挙げられている [37]。

a. Materials and Biocompatibility :

素材の生体適合性の評価、細菌の内毒素 (エンドトキシン) の評価
体内で外因性発熱物質として働く物質 (パイロジェン) の評価
溶出物の評価

b. Animal Tests :

急性試験 : 24 時間の通電試験、試験前後の組織評価
長期試験 : 6 ヶ月以上のデバイスの埋植、試験前後の組織評価

c. Electrode Stimulation Tests

想定する刺激を行った時の電荷注入能力評価
最大の電荷注入能力

d. Durability Tests

体内・体外装置の性能の耐久性の評価、装置寿命の推測
耐水性の評価、腐食可能性の評価、溶接・ボンド接合の評価 など

e. Electronics

無線通信の安全性の評価、眼球運動の評価、バッテリーの評価
Electro Magnetic Interference (EMI) などに対する安全性の評価

f. Software

フェイルセーフ機構、リセット、フィードバック等

g. Visible and Electromagnetic Radiation, and Magnetic Resonance Imaging (MRI) compatibility

可視光・赤外線に対する評価、電磁適合性の評価、MRI 適合性の評価

h. Sterilization and Packaging

滅菌やパッケージの評価

日本では、厚生労働省の神経機能修飾装置に関する評価指標が制定されている。この指針の中で非臨床試験としての動物を用いた *in vivo* 評価は以下の項目が挙げられている [38]。

『*In vivo* 評価 (ISO 14708-1, -3、ISO 10993-1 等)

動物試験においては、植込み装置、関連部品及び電極の神経組織に対する影響を評価することが望ましい。

- ・試験プロトコルと目的・動物種、系統、使用動物数も含めた試験計画・刺激レベルとレート・刺激効果確認試験・植込み対象部位の組織評価・植込み前後での神経機能評価・試験データ解析方法

当該装置による刺激が装置と直接接触する局所の脳神経系に与える影響を検討するため、装置を動作させた状態で以下の動物試験を行うこと。

①短期試験

- ・48時間以上にわたる電極テストを行うこと。
- ・テスト後には組織評価を行うこと。また、傷害を与えうる最小の刺激を明らかにするため、最小単位の動物数で種々の条件下での急性試験を行い、傷害を与える条件を明らかにするとともに刺激を受けた部位の組織評価を行う。

②長期試験

- ・植込み型装置の場合、装置を動物の神経組織に対して6か月は植え込み、取り出し後には植込み対象部位に加えて周辺組織の組織評価も行うこと。また装置が腐食や絶縁の悪化によって故障しないかどうかも評価すること。

<人工視覚特有の留意事項>

- ・網膜電図 (Electroretinogram: ERG)、視覚誘発電位 (Visual evoked potential: VEP)、又は、電気誘発電位 (Electrical evoked potential: EEP) のような視覚誘導反応試験の結果を示すことが望ましい
- ・有効性の指標として、動物での行動試験や大脳皮質での細胞興奮等から、視力・2点弁別の視角推測値を示すこと等が望ましい。
- ・特に装置の埋植部又は接触部を含む、眼球及び網膜の組織検討結果 (長期は6か月以上が望ましい。)』 (文献 [38] より引用)

人工視覚システムの開発において、残存する視覚神経路に加える電気刺激の *in vivo* や *in vitro* での安全性評価が必須である。電気刺激は埋植された金属電極により行われるが、刺激電流を通電した際、電極電位が水の電位窓を超えると電気分解が生じる。電気分解は、局所的な pH 変化や塩素ガス発生による化学熱傷といった生体組織への傷害を引き起こし、刺激電極自体の溶出といった耐久性に対する問題も生じさせる [39]。

in vivo 評価では、生体へ埋植されたシステムの長期に渡る機能保持の評価と刺激電極の耐久性の評価が行われる。FDA や厚生労働省の指針では、*in vivo* の長期試験において、実験系の構築の難しさから視覚誘発反応の測定、中長期の慢性通電は必須ではないが [37, 38]、通電を行いながらの中長期埋植試験はより厳密な安全試験、デバイスの動作確認に寄与する。

EPP の評価により、刺激電極直上の網膜神経節細胞以降の視覚伝導路や大脳一次視覚野に障害がなく、電気刺激によるフォスフェンが得られることを動物実験により客観的に検証できる。しかしながら、誘発電位は、麻酔の深度、記録電極の電極特性による影響を受ける。したがって、人工視覚システム安全性評価のための誘発電位測定には、誘発電位に影響を与えない麻酔法や記録電極が必要である。本研究では EPP による人工視覚安全性評価のために、外的因子（麻酔法や記録電極）による影響を受けないロバストな大脳誘発電位記録系の確立を目的とする。

また、刺激電流による電極表面特性変化を知ることは、電気刺激の生体への影響および電極耐久性評価に役立つ。*in vivo*, *in vitro* での電極特性を理解し、動物実験による安全性評価と対比させることにより、動物実験を用いない安全性指標の確立が期待できる。本研究では家兎に人工視覚システム用に開発した刺激電極を埋植し慢性通電による電気化学的な電極界面特性への影響を検討する。

第 3 章

人工視覚システム安全性評価の ための誘発電位記録電極の開発

3.1 緒言

人工視覚システムの実用化においては、電気刺激によるフォスフェンが長期間に渡り安全に得られるかの検証が必要である。*in vivo* 評価において、誘発電位は脳への視覚情報伝達の客観的な指標となる。しかしながら、FDA のガイドラインでは視覚誘発電位 (Visual evoked potential: VEP)、EEP などの視覚誘発反応試験は可能ならば行うこととされており、長期実験系の構築の難しさのためこのような誘発反応試験は必須とされていない [37]。VEP とはフラッシュ光による視覚刺激を全視野に与えたときに大脳皮質視覚野で記録できる神経活動電位である。家兎に対しフラッシュ光による全視野刺激を行うと、20~30 ms の潜時に明瞭な第一陰性波 (N_1) が確認できる [40]。VEP により、網膜機能、視覚伝

導路、大脳一次視覚野の機能保持を確認できる。大脳皮質における誘発反応は、光刺激だけでなく、電気刺激によっても得ることができる。EEP 計測における電気刺激は、刺激電極直上の網膜神経節細胞を刺激し、網膜神経節細胞から大脳皮質視覚野までの視覚伝導路の障害等が評価できる。EEP や VEP などの誘発電位を長期に渡り評価することで、デバイスの耐久性、生体への安全性が確認できる。

EEP の長期評価により、電気刺激による生体への影響やデバイスの劣化を評価できるが、誘発電位は麻酔法や記録電極などの外的因子による影響を受ける。そのため、長期間の EEP 測定による電気刺激による生体への影響を評価するには、外的要因に影響を受けないロバストな記録系の確立が必要となる。

動物を用いた誘発電位計測実験では、記録電極として金属ネジ電極が一般的に用いられている [40]。しかしながら、鋭利な電極先端により脳組織への損傷を起し長期間の誘発電位記録には適さない [41, 42, 43, 44]。よって、長期間の誘発電位記録には、脳組織に機械的負荷を与えない電極が必要である。

本研究では、長期間埋植下においても電極界面特性が変化しない記録電極を開発し、6ヶ月以上に渡る長期間誘発電位評価による人工視覚システムの安全性評価系の開発を目的とする。

EEP は刺激電極の電極特性や電気刺激による神経組織の性状変化にも影響を受ける可能性がある。記録系が与える影響のみを評価するため、記録電極特性が誘発電位に与える影響の評価は、EEP ではなく、VEP を用いた。また、電気化学インピーダンス計測 (Electrochemical impedance spectrogram: EIS) により、記録電極と生体界面、周辺組織の電気化学的特性を評価した。

全ての動物実験はニデック社の施設で行い、ニデック社の動物実験委員会の承認を受けて行った。動物実験の全てのプロセスは、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) の定める statement for the use of animals in ophthalmic and vision research, and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals を遵守して行った。

3.2 記録電極の作成

本研究では、Platinum (Pt) ball-tip screw electrode、Platinum/iridium (Pt/Ir) ball-tip planar multi-electrode array (MEA) の2種類の電極を開発した [45]。

3.2.1 Platinum (Pt) ball-tip screw electrode

白金製の球状の電極を、ポリメチルメタクリレート (polymethyl methacrylate: PMMA) やポリテトラフルオロエチレン (polytetrafluoroethylene: PTFE) 製のプラスチックネジの先端に接合した Pt ball-tip screw electrode を製作した(図 3.1)。電極全体の長さは、17.5 mm、幅は 2.6 mm であり、直径 0.7 mm の白金球電極は円滑な表面を有す(図 3.2)。電極本体をネジ構造としたのは、インサートナットを介して埋植深さの調整を可能とするためである。電極埋植は VEP 計測を行いながら行う。VEP の波形が明瞭かつ第一陰性波の振幅が最大になる電極位置で電極を固定する。Pt ball-tip screw electrode の製作手順を以下に示す。まず、PMMA (PTFE) 丸棒材から旋盤で 15 mm の M2.6 雄ネジ加工する。次に対面寸法 4 mm の六角頭部分をサイドカッターで加工し、突っ切バイトにて切断する。M2.6 雌ネジのついた治具に六角頭部分が完全に接触するように締結し、 $\phi 0.3$ mm ロングドリルにて貫通穴加工 (4 個) する。

白金球電極は、炎量を調整したミニトーチ (NT-PRO, Nippon Tansan Gas) の火炎中で、白金線 (0.2 mm diameter; 351265, Nilaco) を熔融させて作成する。熔融した白金線先端の白金は自然に球状になり、定期的に冷却水につけながら大きくしていく。DIGIMATIC CALIPER (CD-20CPX, Mitutoyo) で白金球の直径を計測し、直径 0.7 mm になるまで大きくしていく。このように作成された電極表面は非常に円滑で、生体内における安定した電極特性に寄与する。先端に白金球電極がついた白金線(図 3.3)をプラスチックネジの穴に挿入し、白金球とプラスチックネジの接触部、およびネジ頭から出る白金線とプラスチックネジの上部を瞬間接着剤で固定し、漏出した接着剤をエタノールで拭う。

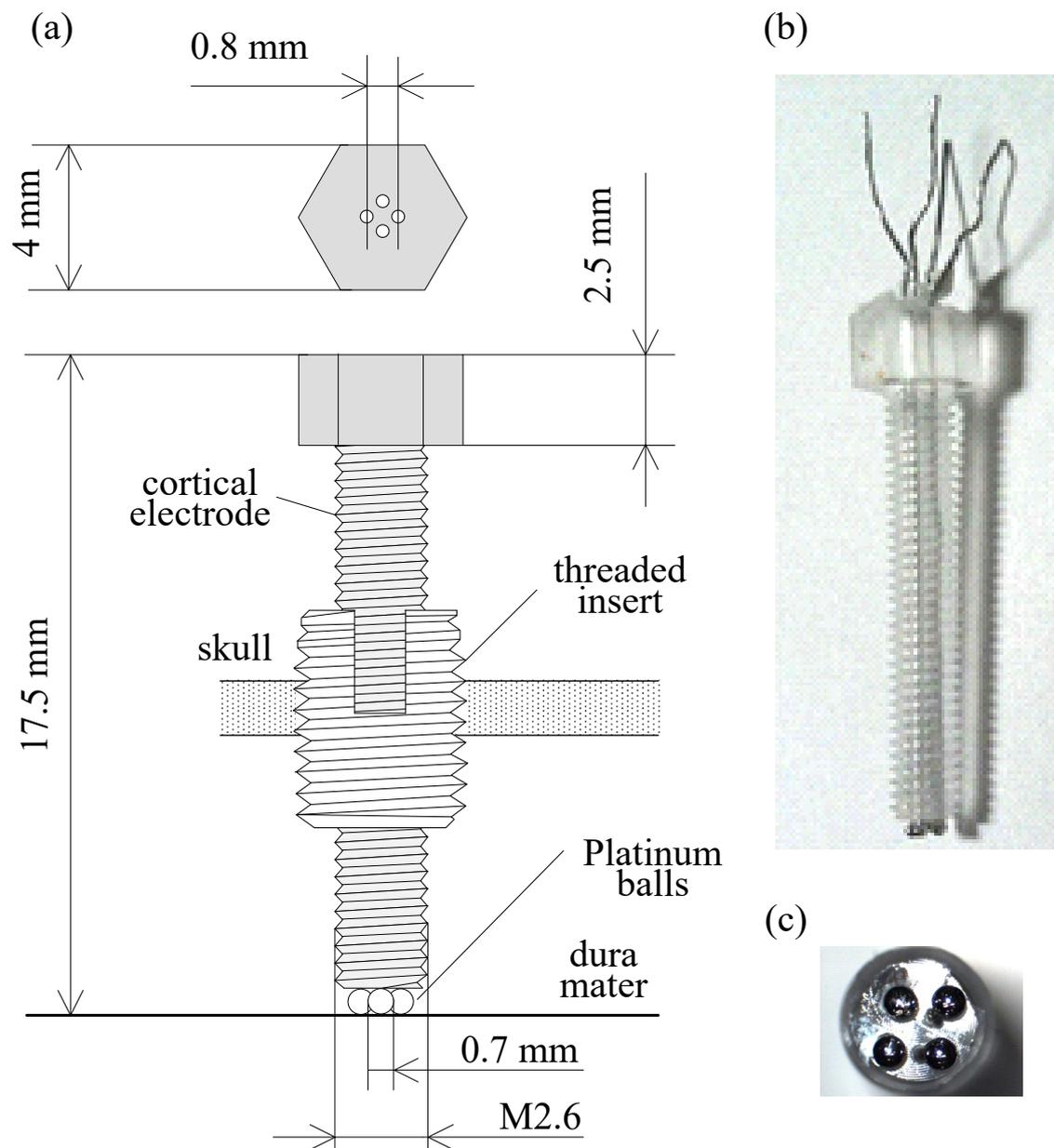


図 3.1 Platinum (Pt) ball-tip screw electrode

(a) 構造図

(b) 側面図

(c) 下からの図

(文献 [45] より引用)

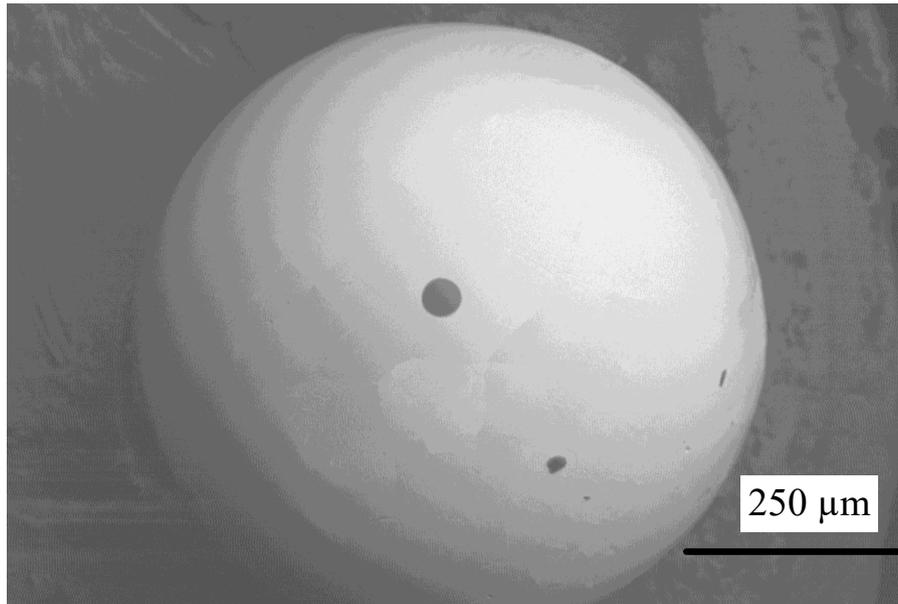


図 3.2 白金球電極の Scanning electron microscope (SEM) 写真
(文献 [45] より引用)



図 3.3 白金球電極の構造

3. 2. 2 Platinum/iridium (Pt/Ir) ball-tip planar multi-electrode array (MEA)

Pt/Ir ball-tip planar MEA は、シリコンシート上に白金イリジウム球電極が 3×3 の二次元格子状に配置されている電極である (図 3. 4)。シリコンシートの大きさは、約 8.3 mm × 約 12 mm であり、白金イリジウム球電極の直径は約 0.7

mm である。Pt/Ir ball-tip planar MEA の製作手順を以下に示す (図 3.5)。白金球電極は、炎量を調整したミニトーチ (NT-PRO, Nippon Tansan Gas) の火炎中で、白金イリジウム線 (9 twist lines ϕ 0.2 mm; 967223, Nilaco) を熔融させて作成する。熔融した白金イリジウムは自然に球状になり、定期的に冷却水につけながら大きくしていく。DIGIMATIC CALIPER (CD-20CPX, Mitutoyo) で白金球の直径を計測し、直径 0.7 mm になるまで大きくしていく。厚さ 0.1 mm のシリコンシート (0.1 t, Unique Medical) に、アクリル板の穴をガイドにし針で穿孔して電極配置用の穴を開ける。白金イリジウム球電極の導線部をシリコンシートの穴に通し、シートに沿って白金イリジウム線を湾曲させる。白金イリジウム線を、あらかじめ無水アルコール (321-D0025, Wako) に浸漬し膨張させておいたシリコンチューブ (外径 2 mm、内径 1 mm; 986902, Ason) に通し束ねる。厚さ 0.1mm シリコンシート上に厚さ 0.2 mm のシリコンシート (0.2 t, Unique Medical) を重ね、シリコン接着剤 (KE-41-T, Sinetsu Kagaku) にて接着する。最後に、シリコンチューブで覆った白金イリジウム線の先端にコネクタ (HR25-9TR-12P, Hirose) を装着する。Pt/Ir ball-tip planar MEA の電極表面は Pt ball-tip screw electrode と同様、円滑表面であり、硬膜外留置における電極特性の長期安定に寄与する。

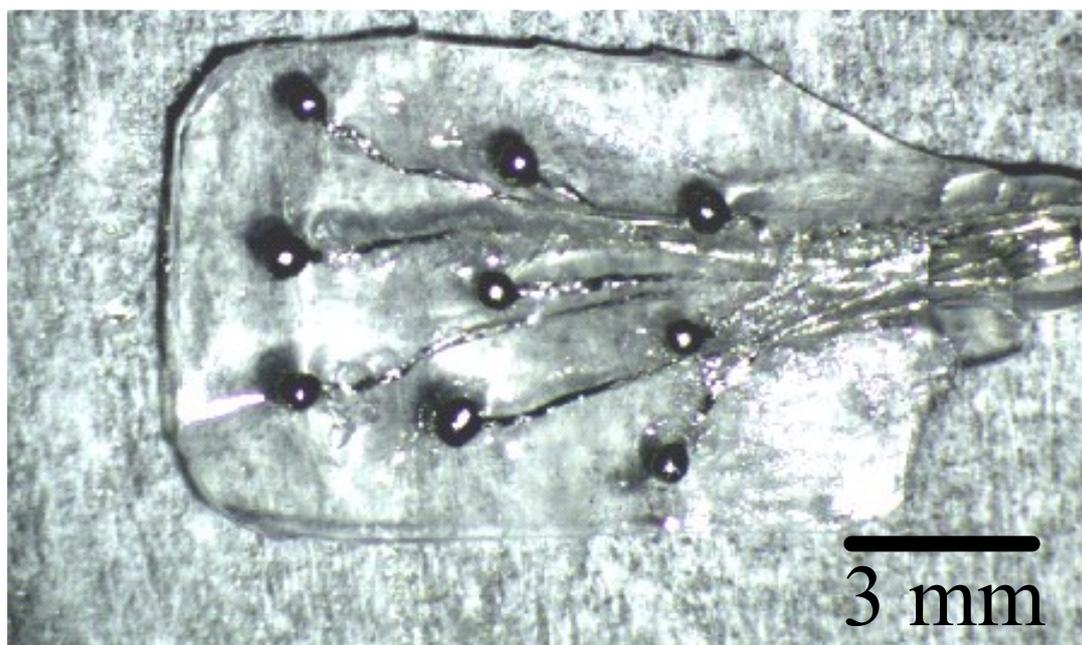


図 3.4 Platinum/iridium (Pt/Ir) ball-tip planar multi-electrode array (MEA) の光学顕微鏡写真 (文献 [45] より引用)

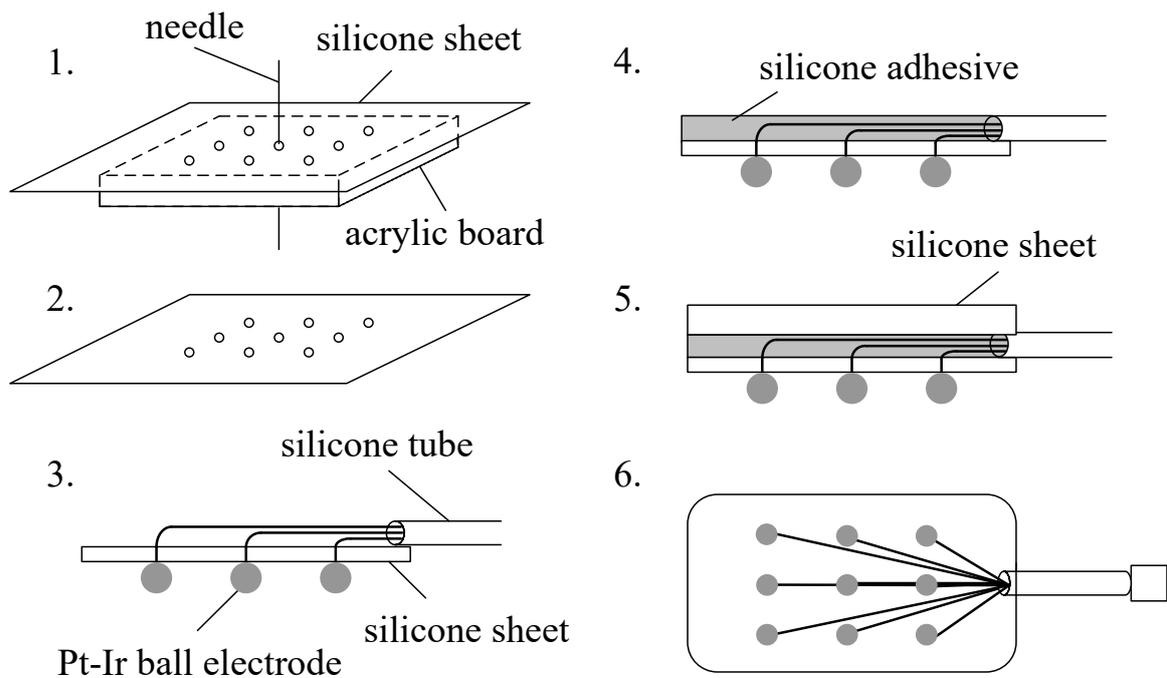


図 3.5 Platinum/iridium (Pt/Ir) ball-tip planar multi-electrode array (MEA) の製作方法 (文献 [45] より引用)

3.3 電極の埋植

4匹のダッチ種の家兔に、金属ネジ電極、開発した Pt ball-tip screw electrode、Pt/Ir ball-tip planar MEA を記録電極として埋植した。Pt ball-tip screw electrode は2匹の家兔に埋植し（以降 rabbit 1, rabbit 2 とする）、金属ネジ電極、Pt/Ir ball-tip planar MEA をそれぞれ1匹の家兔に埋植した（以降 Pt/Ir ball-tip planar MEA を埋植した家兔を rabbit 3 とする）。

金属ネジ電極と Pt ball-tip screw electrode の埋め込みは、ラムダ縫合から前方6 mm、側方6 mm の位置とした（図 3. 6）。Pt ball-tip screw electrode は記録電極埋植位置に立てたインサートナット（Ensaf 302000025.500, kkv）を介して挿入した。Pt ball-tip screw electrode の埋植の深さは光刺激を与えながら調整し、VEP 波形の第一陰性波（ N_1 ）の大きさが最も大きくなる深さでセメント（UNIFAST TRAD, GC）により固定した。最後に電極の周りを頭皮の切開創を縫合糸で縫合した。記録電極の埋植の深さが浅いと計測される波形が正負反転する [40]。

Pt/Ir ball-tip planar MEA は、右頭蓋下に埋植した。右頭蓋を電動のこぎりで開頭後、Pt/Ir ball-tip planar MEA を留置し、骨片を被せた後セメントで接着した。

基準電極（M2.5 ステンレスネジ）はラムダ縫合から正中14 mm 前方に埋植した。

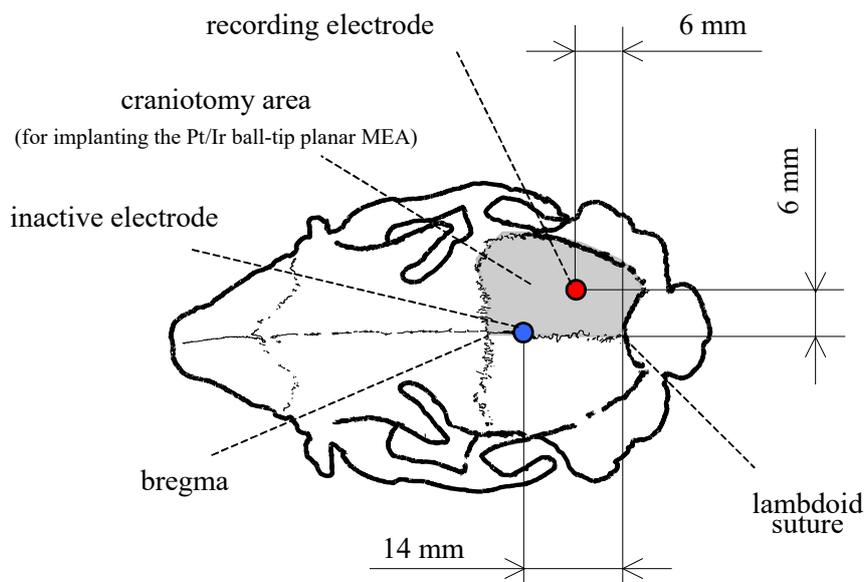


図 3. 6 記録電極埋植位置
(文献 [45] より引用)

3.4 誘発電位・EIS 測定

3.4.1 視覚誘発電位の測定

実験開始前、水のみを与え2時間絶食を行った。照明を消灯した後、暗幕で覆ったリカバリーボックス内に入れ、壁掛式麻酔器 (NS-3000, Acoma) から酸素を流量 4 l/min で流しながら、15 分間暗順応させた。

暗順応後、流入酸素にイソフルラン (Forane, AbbVie) を加え、リカバリーボックス内のガス濃度を生体情報モニター (BP-608EV, COLIN) により監視しながら、麻酔導入を行った。リカバリーボックス内のガス濃度が 2.4 % に達した後、リカバリーボックスを揺らし家兎の麻酔状態を確認した。覚醒反応がみられず、深麻酔状態を確認した後、酸素流量を 1 l/min に落とし、ガスマスクを装着し麻酔器に接続した。

刺激眼 (左眼) は、トロピカミド (Mydrin-P, Santen) により散瞳させ、塩酸オキシブプロカイン (oxybuprocaine hydrochloride; Benoxil, Santen) で局所麻酔を行った。角膜の白濁防止のためヒドロキシエチルセルロース (SCOPISOL, Senju) を滴下した後、開瞼器を装着した。非刺激眼 (右眼) はヒドロキシエチルセルロースを滴下した後、ガーゼで遮光した。

麻酔深度は生体情報モニターで測定される呼気終末イソフルラン濃度で調整し、実験期間中 2.4 % で一定に維持した。家兎を耳介に接続した耳朶用銀皿クリップ電極を介し接地し、光刺激装置 (SLS-3100, Nihon Kohden) の発光部を左眼前 30 cm におきフラッシュ刺激を行った。測定はバイオアンプ (ML135, ADInstrument)、生体シグナル記録解析システム (PowerLab/8SP, ADInstrument) を用い行った。VEP 実験系を図 3.7 に計測条件を表 3.1 に示す。測定時には照度計にて部屋の照度を計測し、照度に変化が無いことを確認し実験を行った (0.2 ~ 0.3 lx)。

48 週に渡り、VEP を計測し、VEP 波形、 N_1 の潜時・振幅の経時変化を観察した。 N_1 の振幅は peak-to-trough 法 [46] を用い算出した。

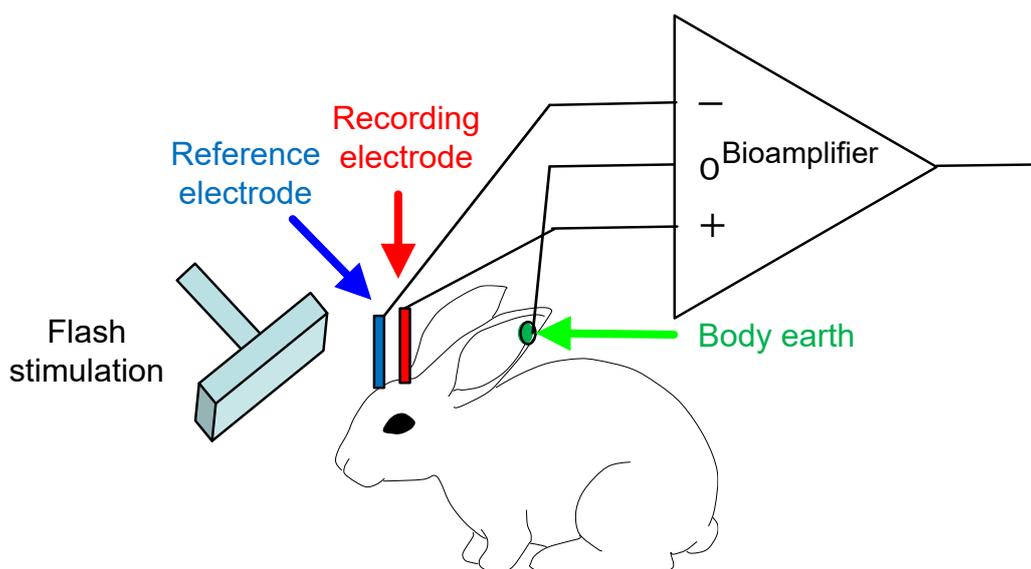


図 3.7 VEP 計測系

表 3.1 VEP 計測条件

光刺激条件	エネルギー	20 J (設定値) ※
	デュレーション	60 ms
	繰り返し周期	3 s
記録条件	高域遮断周波数	100 Hz
	低域遮断周波数	1 Hz
	加算平均回数	32 回
麻酔濃度	イソフルラン呼気ガス濃度	2.4 %

※ 光刺激のエネルギー（強度）に関して、輝度計を用いた実測値を図 3.8 に示す。
time-integrated luminance 3.74 cd·s/cm²,
peak luminance 29.5 cd/cm²,
half-value width with respect to the peak luminance 75 ms

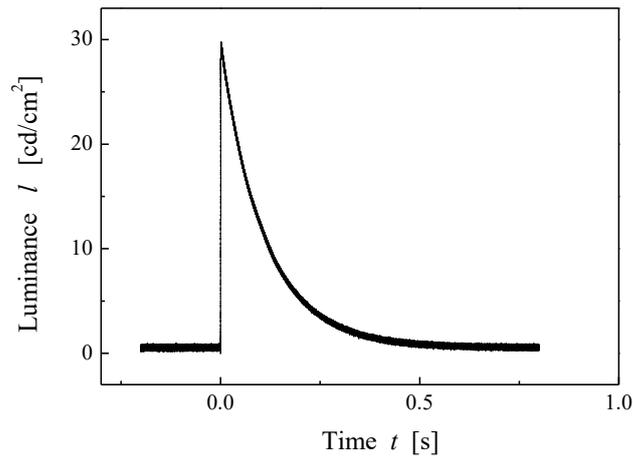


図 3.8 20 J 設定の光刺激装置で発光させた際の実測輝度
(文献 [45] より引用)

3.4.2 電気刺激誘発電位の測定

記録電極埋植 48 週後に EEP 測定を行った。刺激電極は、強膜ポケットに挿入された直径 200 μm の金製の電極を用いた。EEP の測定にはバイオアンプ (MEG-6116, Nihon Kohden) および生体シグナル記録解析システム (EplyzerII, Kissei Comtec) を用いた。EEP の計測系を図 3.9 に、計測条件を表 3.2 に示す。

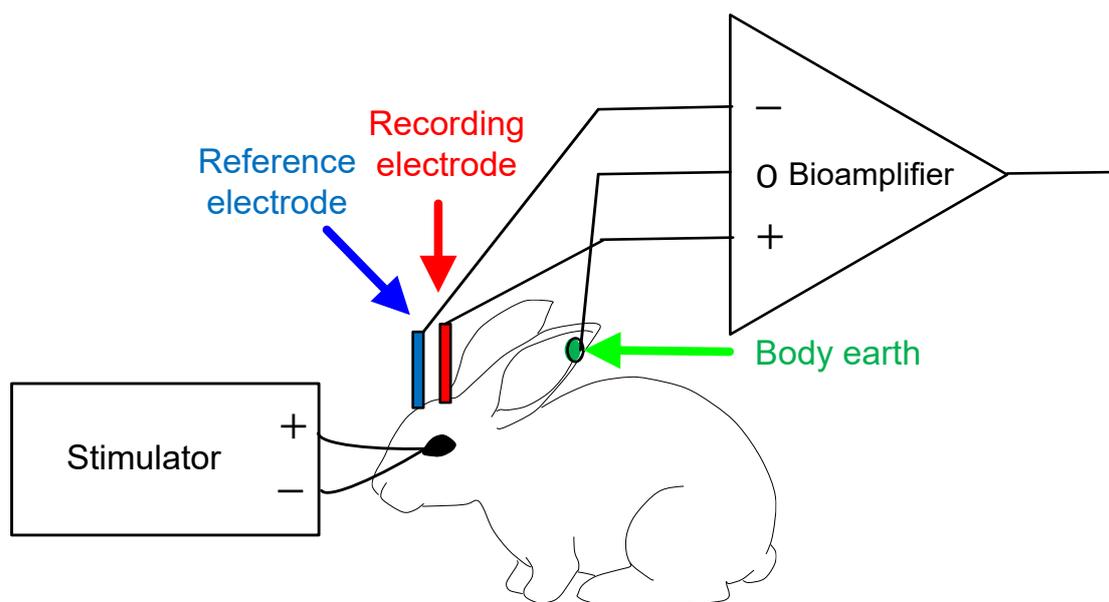


図 3.9 EEP 計測系

表 3.2 EEP 計測条件

電気刺激条件	刺激方式	cathodic first biphasic
	刺激電流	500 μ A
	デュレーション	500 μ s
記録条件	高域遮断周波数	1 kHz
	低域遮断周波数	1.5 Hz
	加算平均回数	1000 回
麻酔濃度	イソフルラン呼気ガス濃度	2.4 %

3.4.3 電気化学インピーダンスの測定

電気化学測定装置 (AutoLab PGSTAT32, Metrohm) を用い 3 電極法にて、開発した電極の交流インピーダンス法による電気化学インピーダンススペクトログラムを計測した。開発した記録電極をポテンシostatの作用極端子に、基準電極を対向極端子に、耳介に接続した銀皿電極を参照電極とし参照極端子に接続した。計測は定電圧 $1 \text{ mV}_{\text{rms}}$ の条件で行い、掃引周波数範囲は $1 \sim 1000 \text{ Hz}$ で行った (図 3.10)。交流インピーダンス法では、周波数応答解析器 (frequency response analyzer: FRA) を用い、電極に微弱電圧を印加した際の応答電流を調べる。広い周波数域の正弦波交流信号に対する電極の応答から電極反応機構を解析する方法であり、電極反応のパノラマ的知見が得られる [47]。FRA から出力された制御信号をもとに、ポテンシostatから出力される正弦波電位を作用極に印加し、その際の電流応答を測定する (図 3.11)。FRA は電位と電圧の交流成分を周波数領域のデータに変換し、その比をとることで各周波数のインピーダンスを算出する [48]。印加する正弦波信号の周波数を自動的に掃引することにより、インピーダンススペクトルを得ることができる [48]。

3 電極法では、作用極 (Working electrode: WE)、参照極 (Counter electrode: CE)、対向極 (Reference electrode: RE) の 3 種類の電極から構成され、電位制御は作用極と参照極との間で行い、電流は作用極と対向極との間に流す (図 3.11)。

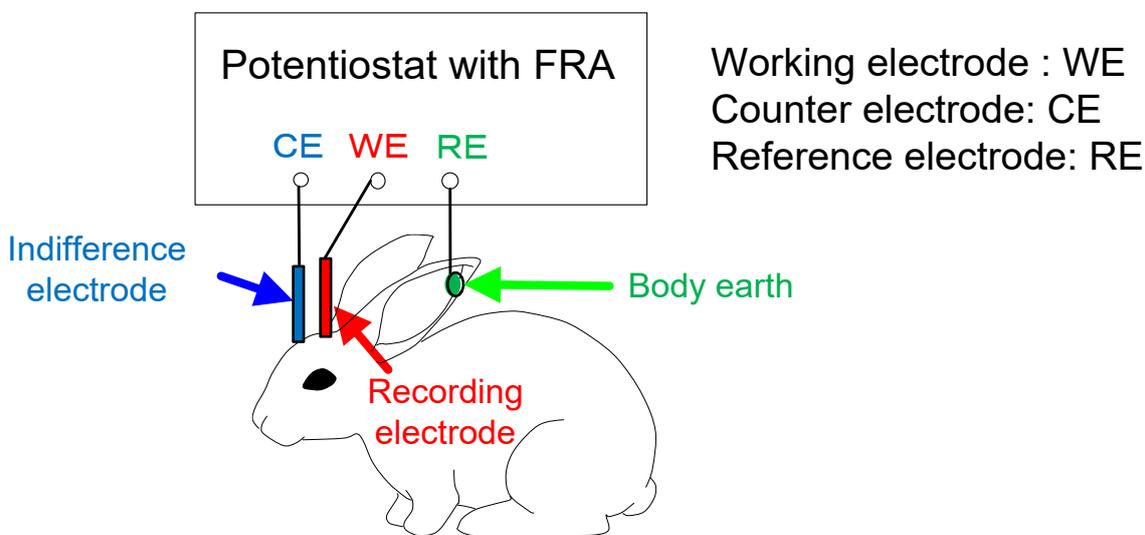


図 3.10 EIS 測定系

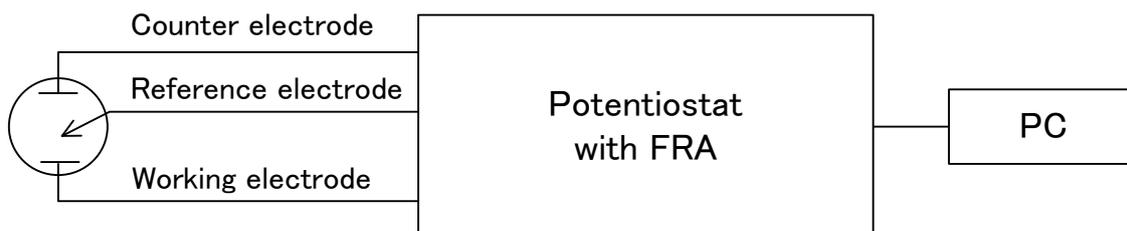


図 3.11 電気化学インピーダンス測定システム

3.4.4 誘発電位および EIS 測定結果

1) 誘発電位測定結果

計測された VEP 波形の典型例を図 3.12 に示す。Pt ball-tip screw electrode は rabbit 1、Pt/Ir ball-tip planar MEA はアレイ上の 1 電極分の結果である。金属ネジ電極では、電極埋植後から 2 週ほどしか N_1 振幅が一定ではなく、5 週以降で N_1 潜時が延長した。Pt ball-tip screw electrode と Pt/Ir ball-tip planar MEA では、明瞭な VEP 波形が 48 週に渡り観察できた。電極埋植後 6 週以降、Pt ball-tip screw electrode、Pt/Ir ball-tip planar MEA において、 N_1 潜時は約 28 ms から 23 ms へ経時的な短縮が観察された（時間との相関分析結果; rabbit 1: $r = -0.85, p < 0.01, t = 4.26$, rabbit 2: $r = -0.82, p < 0.01, t = 3.7$; rabbit 3: $r = -0.92, p < 0.01, t = 6.24$ ）。 N_1 振幅は Pt ball-tip screw electrode で約 700 μV 、Pt/Ir ball-tip planar MEA で約 600 μV で 48 週の間、ほぼ一定であった（時間との相関分析結果; rabbit 1: correlation coefficient $r = 0.01, p > 0.05, t = 0.02$; rabbit 2: $r = -0.26, p > 0.05, t = 0.54$; rabbit 3: $r = 0.28, p > 0.05, t = 0.57$ ）（図 3.13, 14）。

電極埋植 48 週間後に行った EEP 測定では、Pt ball-tip screw electrode と Pt/Ir ball-tip planar MEA で明瞭な EEP 波形の記録が行えた（図 3.15）。EEP と VEP 波形を比較すると、潜時は EEP の方が短く、振幅は VEP の方が大きい（図 3.15）。

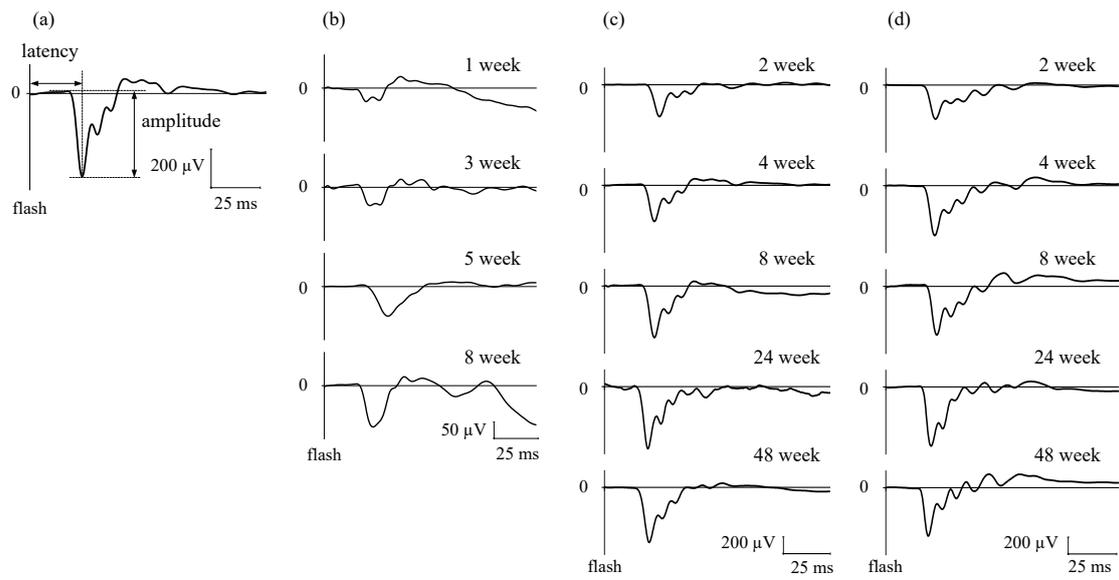


図 3.12 VEP 波形の経時変化の典型例 (文献 [45] より引用)

- (a) 典型的な VEP 波形
- (b) 金属ネジ電極
- (c) Platinum (Pt) ball-tip screw electrode (rabbit 1)
- (d) Platinum/iridium (Pt/Ir) ball-tip planar multi-electrode array (MEA)

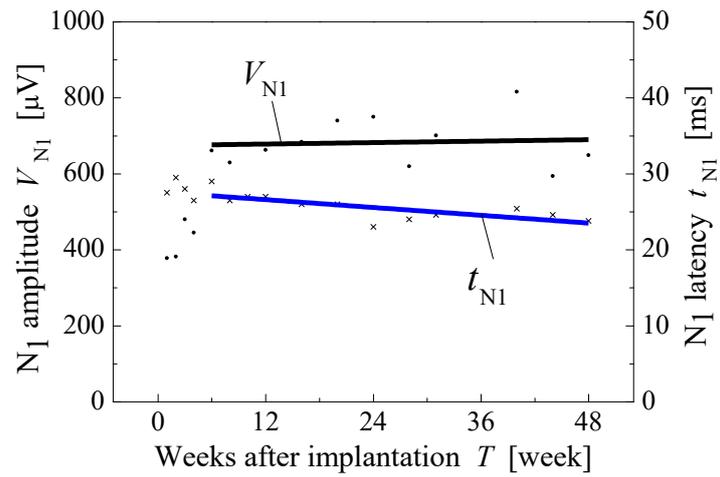


図 3.13 Platinum ball-tip screw electrode における VEP の第一陰性波の潜時と振幅の経時変化 (rabbit 1)
(文献 [45] より引用)

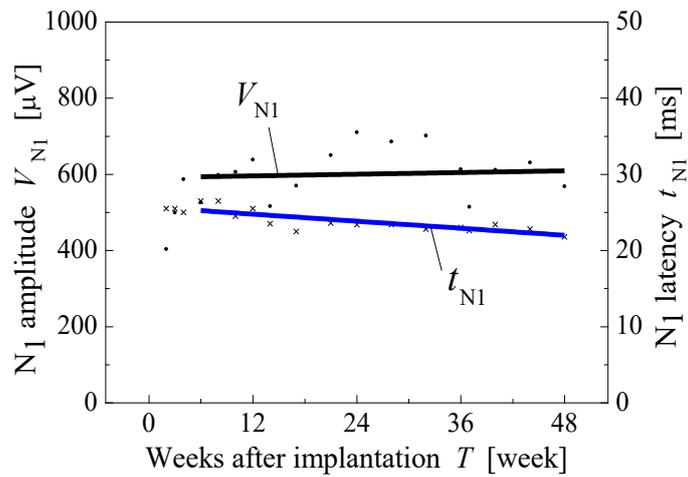


図 3.14 Platinum/iridium ball-tip planar multi-electrode array における VEP の第一陰性波の潜時と振幅の経時変化
(文献 [45] より引用)

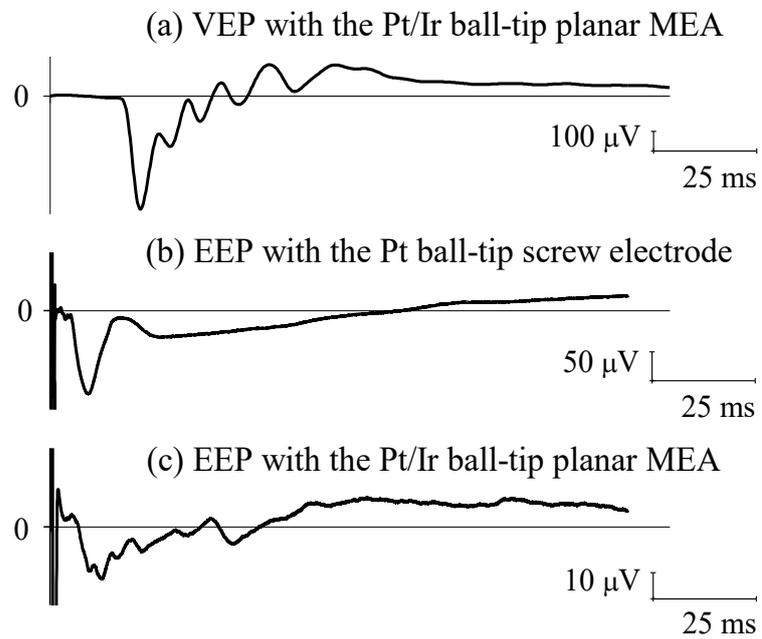


図 3.15 電極埋植 48 週後に記録した VEP 波形と EEP 波形 (rabbit 1, 3)
 (文献 [45] より引用)

2) 電気化学インピーダンス測定結果

Pt ball-tip screw electrode と Pt/Ir ball-tip planar MEA の EIS 計測結果を図 3. 16, 17 に示す。Pt ball-tip screw electrode 内の白金球電極インピーダンスは 4 極とも周波数 1 Hz で約 150 k Ω 、周波数 1 kHz で約 1 k Ω であった (図 3. 16)。また、Pt/Ir ball-tip planar MEA 内の白金イリジウム電極のインピーダンスは 9 極とも周波数 1 Hz で約 700 k Ω 、周波数 1 kHz で約 10 k Ω であった (図 3. 17)。全ての電極界面が容量性の性質を持つことが分かる (図 3. 16, 17)。電極埋植 6 週以降、1, 12.7, 112.9, 1000 Hz におけるインピーダンスは一定した値であった (図 3. 18)。

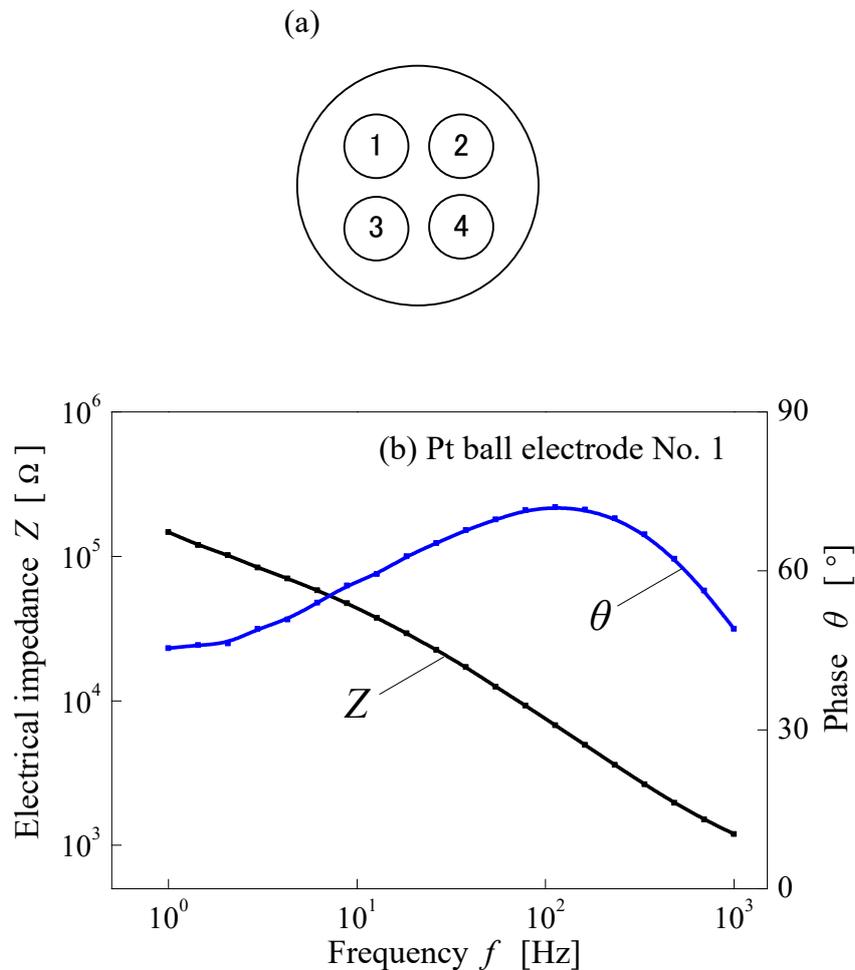


図 3. 16 電極インピーダンス計測結果 (Pt ball-tip screw electrode, rabbit 1)

(文献 [45] より引用)

次頁に続く

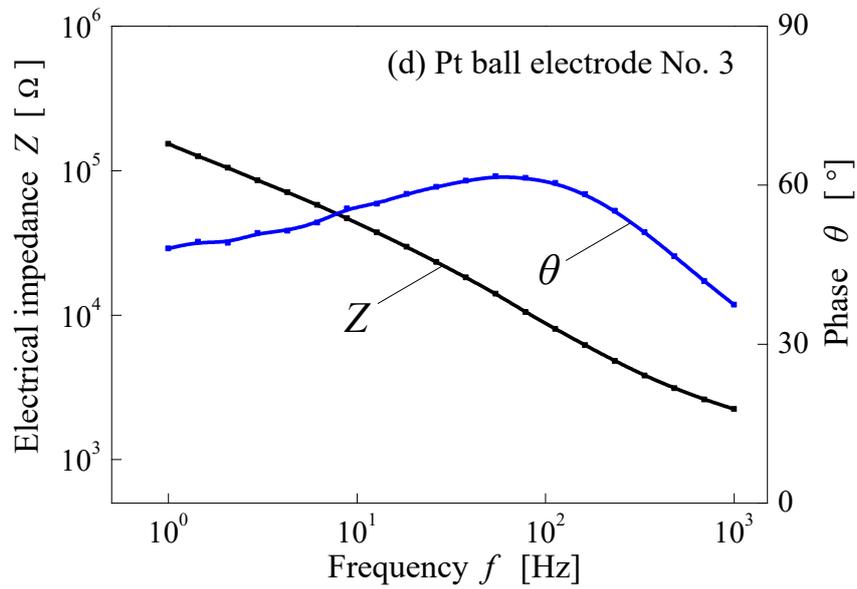
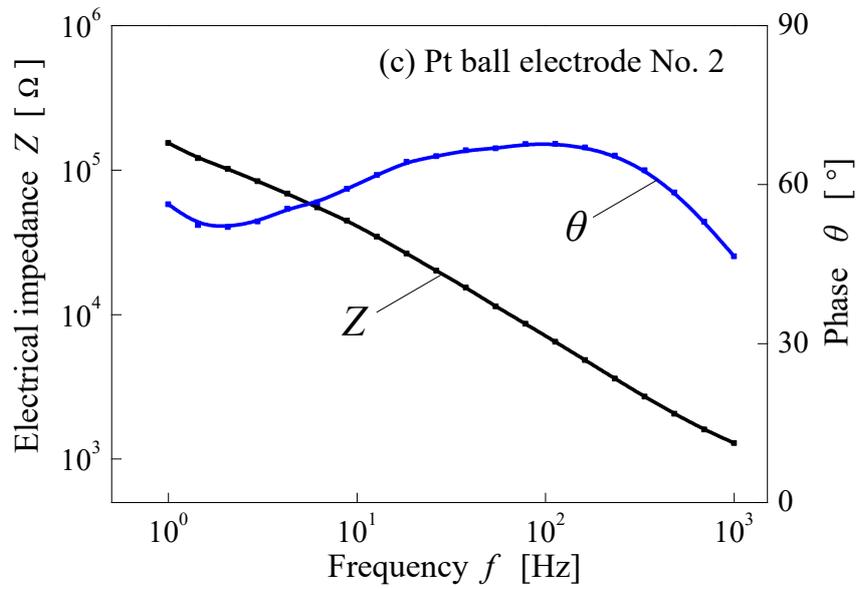


図 3.16 電極インピーダンス計測結果 (Pt ball-tip screw electrode, rabbit 1)
 (文献 [45] より引用)
 次頁に続く

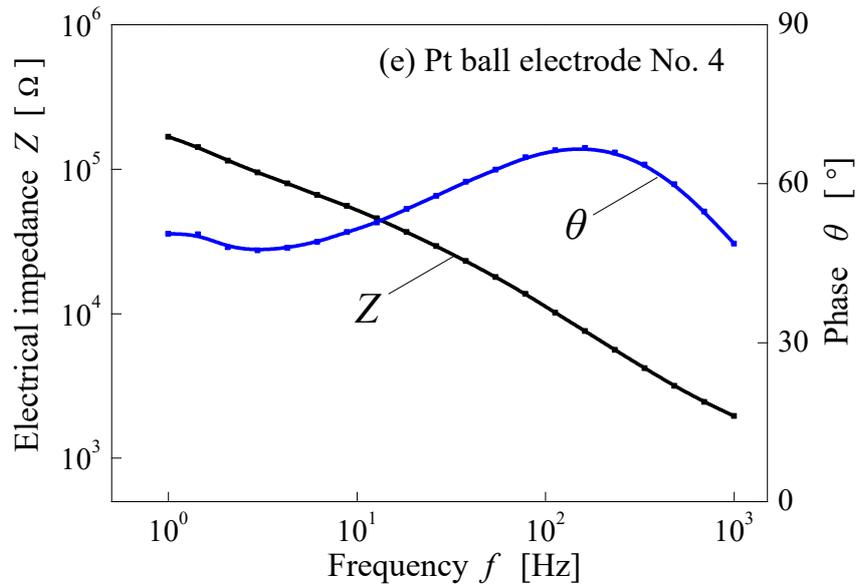


図 3.16 電極インピーダンス計測結果 (Pt ball-tip screw electrode, rabbit 1)
(文献 [45] より引用)

- (a) Pt ball-tip screw electrode 内の白金球電極の位置 (下からの図)
- (b) 白金球電極 No. 1
- (c) 白金球電極 No. 2
- (d) 白金球電極 No. 3
- (e) 白金球電極 No. 4

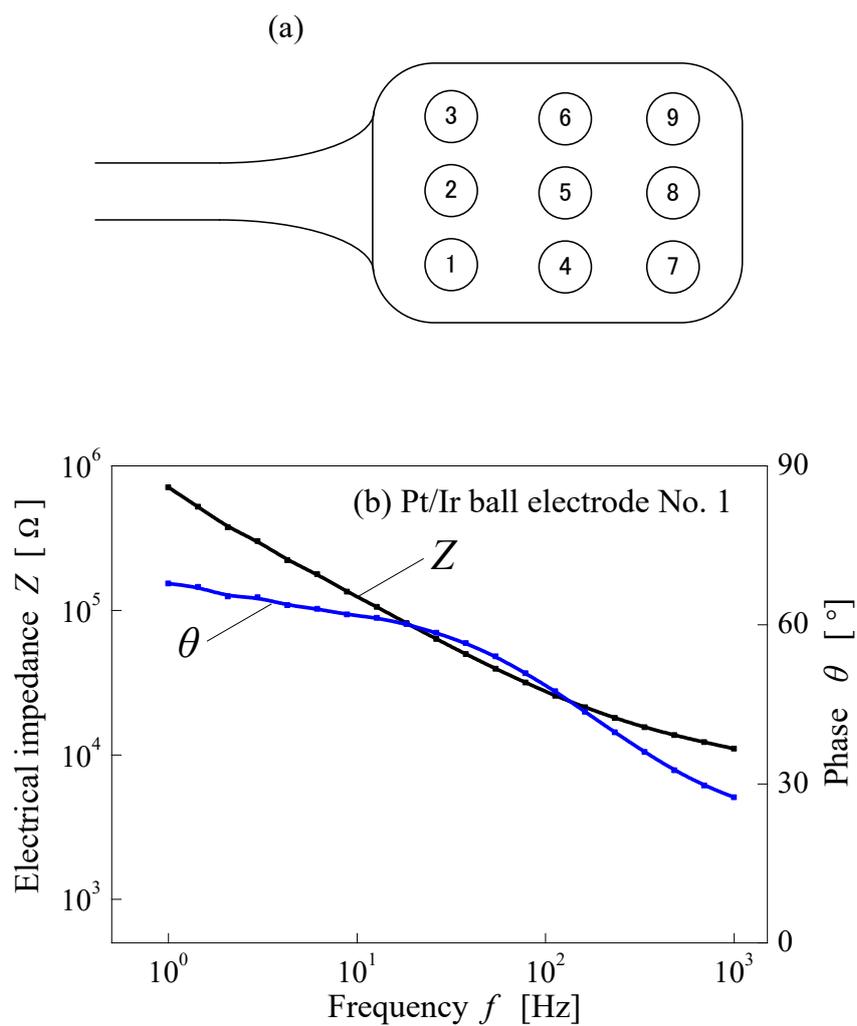


図 3.17 電極インピーダンス計測結果 (Pt/Ir ball-tip planar MEA, rabbit 3)
 (文献 [45] より引用)
 次頁へ続く

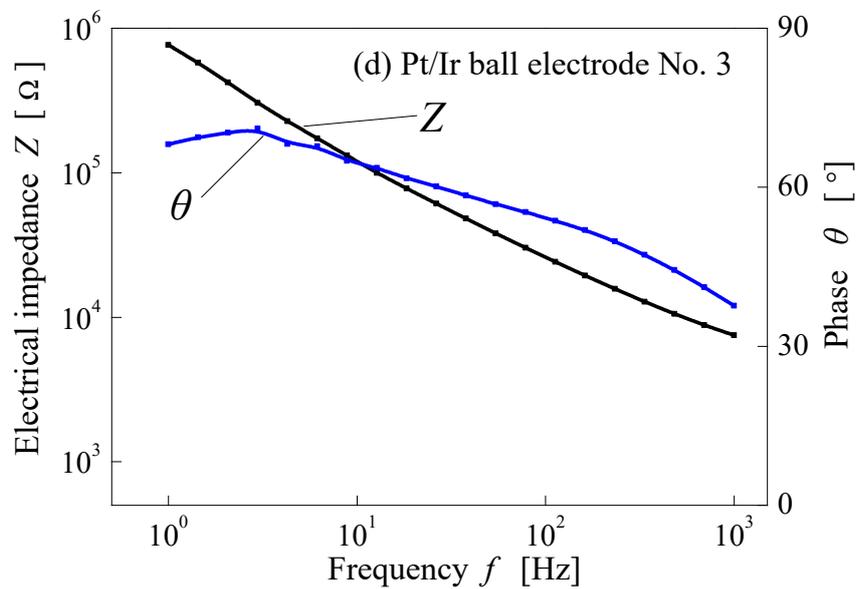
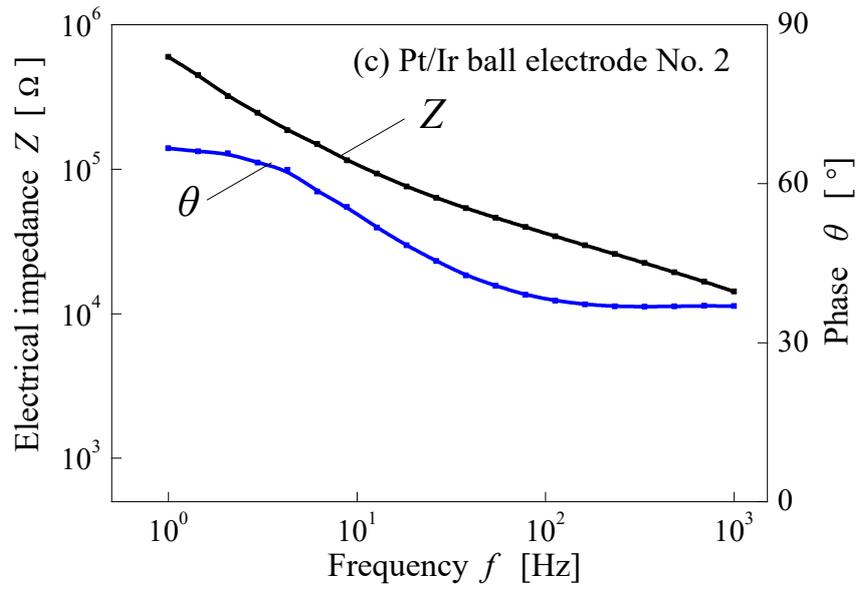


図 3.17 電極インピーダンス計測結果 (Pt/Ir ball-tip planar MEA, rabbit 3)

(文献 [45] より引用)

次頁へ続く

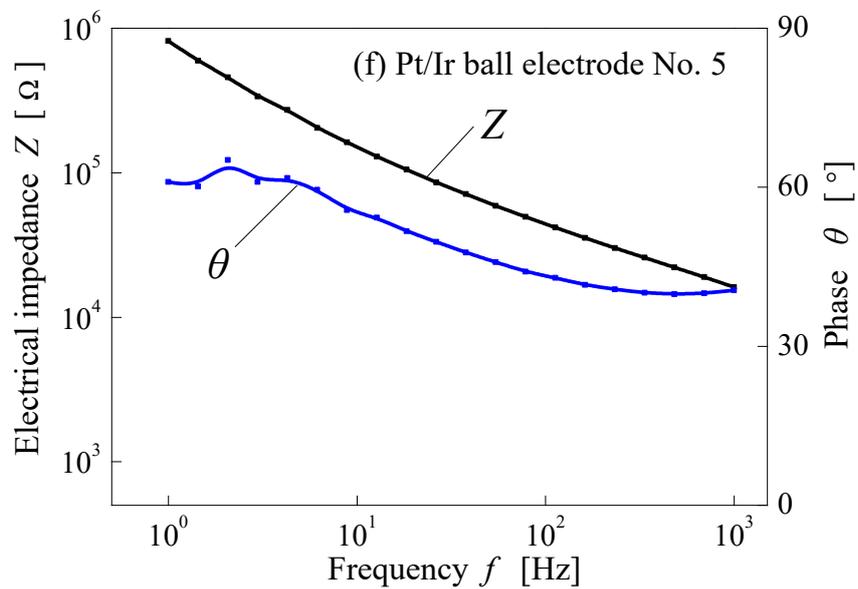
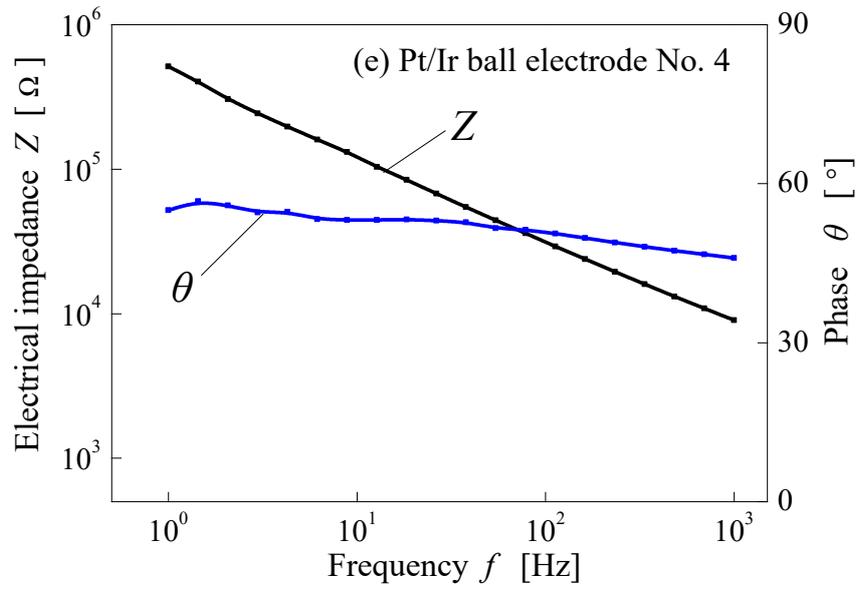


図 3.17 電極インピーダンス計測結果 (Pt/Ir ball-tip planar MEA, rabbit 3)

(文献 [45] より引用)

次頁へ続く

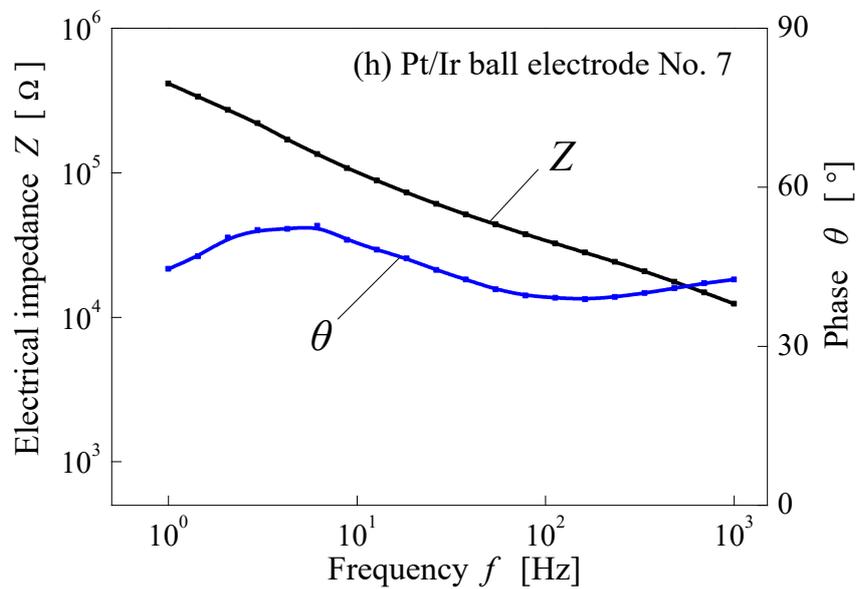
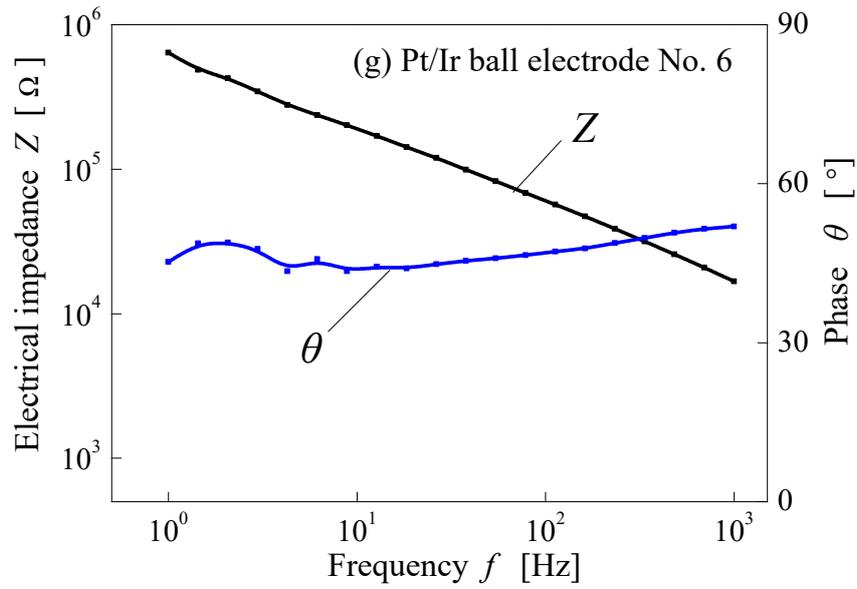


図 3.17 電極インピーダンス計測結果 (Pt/Ir ball-tip planar MEA, rabbit 3)

(文献 [45] より引用)

次頁へ続く

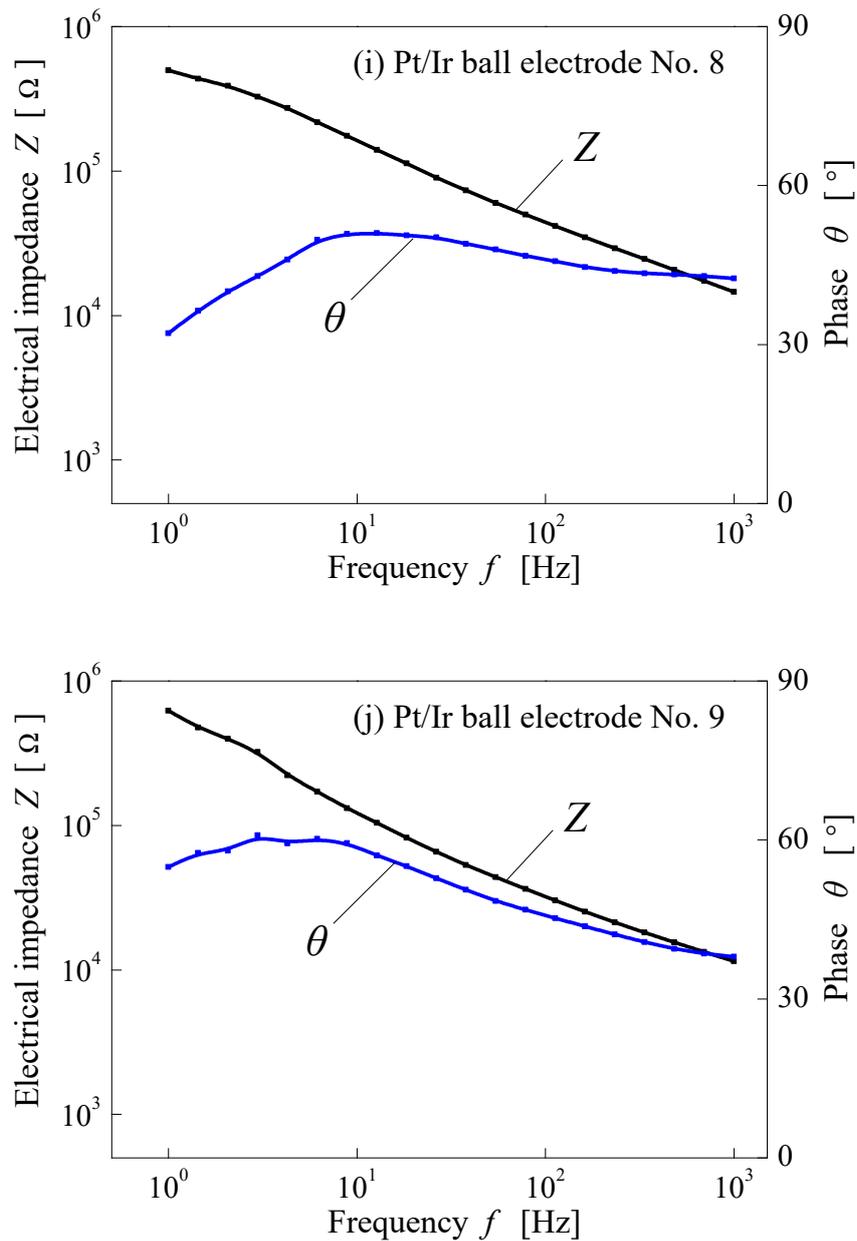


図 3.17 電極インピーダンス計測結果 (Pt/Ir ball-tip planar MEA, rabbit 3)
(文献 [45] より引用)

- | | |
|--|----------------------|
| (a) Pt/Ir ball-tip planar MEA 内の
白金イリジウム球電極の位置
(下からの図) | (e) 白金イリジウム球電極 No. 4 |
| (b) 白金イリジウム球電極 No. 1 | (f) 白金イリジウム球電極 No. 5 |
| (c) 白金イリジウム球電極 No. 2 | (g) 白金イリジウム球電極 No. 6 |
| (d) 白金イリジウム球電極 No. 3 | (h) 白金イリジウム球電極 No. 7 |
| | (i) 白金イリジウム球電極 No. 8 |
| | (j) 白金イリジウム球電極 No. 9 |

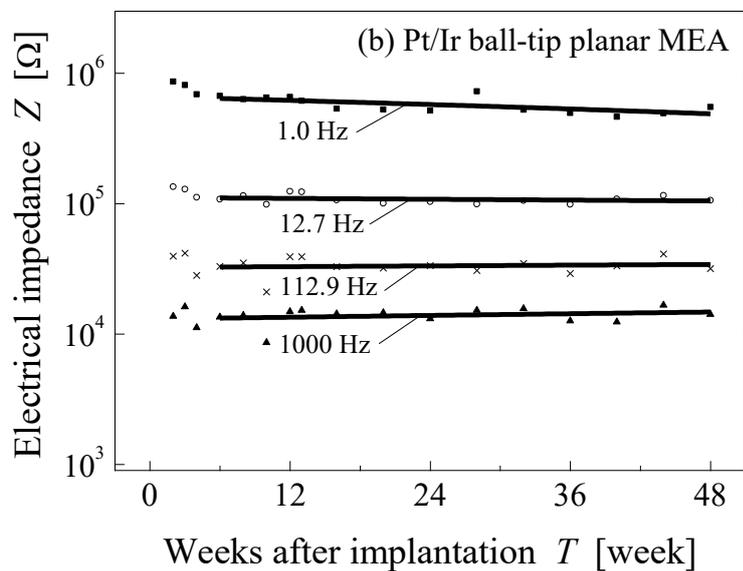
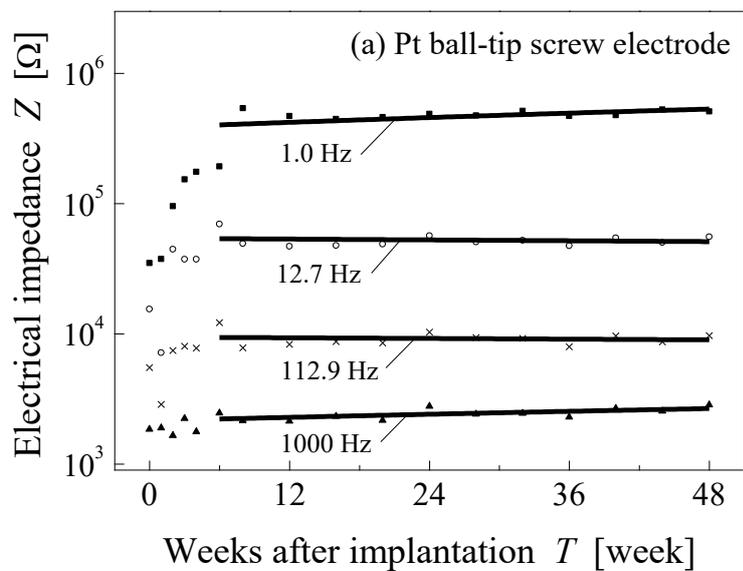


図 3.18 電極インピーダンスの経時変化 (rabbit 1, 3)
(文献 [45] より引用)

3.4.5 誘発電位・EIS 測定に関する考察

記録電極埋植後 2~4 週は全ての電極で、4 週以降の N_1 振幅の大きさに比べ小さく記録された。Pt ball-tip screw electrode と Pt/Ir ball-tip planar MEA では、記録電極埋植後 6 週以降、 N_1 振幅が一定であった。一方、金属ネジ電極では、 N_1 振幅が経時的に一定ではなく、長期に渡る誘発電位の安定な記録はできなかった。金属ネジ電極の先端による脳組織の傷害が原因と考えられる。

Pt ball-tip screw electrode、Pt/Ir ball-tip planar MEA では、 N_1 潜時が経時的に短くなっていったが、VEP 波形のみからは、その原因は特定できない。この N_1 潜時の短縮の原因については 3.5 章で述べる。

VEP 計測に用いたフラッシュ刺激では、視細胞が光を神経信号に変換し、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞による網膜内の神経ネットワークの一次処理を経て大脳に伝達される。一方、電気刺激は網膜神経節細胞を直接刺激し、大脳に伝達される。そのため EEP の潜時は VEP の潜時に比べ短い (図 3.15)。またフラッシュ刺激は全視野刺激であるのに対し、電気刺激は刺激電極直上の網膜神経節細胞のみが刺激されるため、EEP の振幅は VEP の振幅に比べ小さくなる (図 3.15)。また、EEP では網膜上の刺激電極と大脳皮質での記録電極の位置の関係によって振幅が変わる。

Pt ball-tip screw electrode、Pt/Ir ball-tip planar MEA とともに、電極インピーダンスは、高周波数ほど低く、容量性の界面特性を持つことが分かる (図 3.16, 17)。

Pt ball-tip screw electrode 内の白金球電極インピーダンスは 4 極とも周波数 1 Hz で約 150 k Ω 、周波数 1 kHz で約 1 k Ω であり、Pt ball-tip screw electrode 内の白金球電極 4 極のインピーダンススペクトルはほぼ同じであった (図 3.16)。Pt/Ir ball-tip planar MEA 内の白金イリジウム電極のインピーダンスは 9 極とも周波数 1 Hz で約 700 k Ω 、周波数 1 kHz で約 10 k Ω であり、Pt/Ir ball-tip planar MEA 内の白金イリジウム電極 9 極のインピーダンススペクトルもほぼ同じであった (図 3.17)。これらの結果は Pt ball-tip screw electrode、Pt/Ir ball-tip planar MEA 内での各電極界面状態はほぼ同じであることを示している。しかしながら、インピーダンスの値は Pt ball-tip screw electrode、Pt/Ir ball-tip planar MEA で異なった。インピーダンスは、電極の大きさや電極周辺環境の電解質組成に影響を受ける。両電極に用いた白金電極の径は同じであるため、Pt ball-tip screw electrode と Pt/Ir ball-tip planar MEA のインピーダンスの違いは電解質組成や組織抵抗などの電極周辺環境の違いによるものと考えられる。

48 週間にわたり振幅の一定の VEP が計測でき、その間の電極インピーダンス

は一定であった。また、48 週後の EEP 記録も成功した。したがって開発した電極は、長期間の安定した EEP 測定を可能にする電極である。

Pt ball-tip screw electrode のプラスチック部が実験中に破損するケースがあった。冗長に長い電極は、衝撃が加わり破損する恐れがある。より短いネジ長さ、電極カバー、強度のあるプラスチックネジ素材の使用などにより破損を防ぐことができると思う。実際の Pt ball-tip screw electrode の埋込深さから、電極の長さは 12 mm が適当であると思う。

記録電極としては、金属ネジ電極、多孔の電極がこれまでに報告されている [41, 49, 50]。金属ネジ電極は、鋭利な先端で電極周辺の組織を傷つける。多孔電極は、その実表面積が高性能な電極特性を実現するが、長期埋込を行うと孔の部分にタンパク質が詰まり電極性能が劣化する [49, 50]。本研究で開発した記録電極は、表面が円滑で脳組織に対する機械的負荷がない電極である。そのため、電極周辺組織の傷害が少なく、表面のタンパク質付着も少ない。これらの要因により、開発した記録電極による長期の誘発電位記録が実現できたと考える。

記録電極は頭蓋に固定したインサートナットを介して硬膜上に固定されている。記録電極を脳に直接固定するのは困難であり、侵襲度も高い。誘発電位は硬膜上で記録可能である。そのため、本研究における記録電極は頭蓋に固定し、硬膜上に留置した。

生体用電極は、不分極電極、分極電極に区分される。不分極電極は、電極界面での電荷の授受が可逆反応として行われるため、電極電位が安定している [51]。例として銀塩化銀電極があげられ、電位の基準を定める参照電極に用いられる。分極電極は可逆反応がなく、電解質溶液中で電位が安定せず、外部からの電流によって電極電位は大きく変化する [51]。分極電極は電極界面での反応がない、即ち、埋植による溶出がない。そのため、埋植用記録電極としては分極電極が用いられる [52]。また、生体へ埋植する金属材料は、生体適合性（界面的適合性、力学的適合性など）、生体安全性（非毒性、非発癌性など）、耐腐食性などの性質が求められる [53]。加えて記録電極の金属材料の性質は、分極電位が安定していること、電気化学的に誘発されるノイズが低いこと（電極面積が小さいと定常的な不規則雑音も大きくなる）、長期の生体内安定性が優れていること、電極界面のインピーダンスが小さいことが要求される [54, 55]。生体への埋植電極材料として、白金、白金イリジウム、チタン、ステンレス、金などが挙げられる [56]。この中では白金や白金イリジウム、チタンが耐食性と生体適合性に特に優れている [57]。分極電位の安定性 [58]、加工のしやすさも考慮し、本研究では白金、白金イリジウムを記録電極材料として採用した。生体埋植記録電極材料として白金の使用報告例は多い [58, 59, 60]。

3.5 記録電極の電極界面特性と誘発電位の関連性

誘発電位波形は、刺激条件の違い、刺激による生体反応、記録電極特性、麻酔深度、記録電極の周辺環境によって影響される [21]。そのため、長期間の EEP 測定により電気刺激が生体へ与える影響を検証するためには外的要因の影響を受けないロバストな記録系の確立が必要となる。

開発した記録電極を用いた VEP 計測において、経時的な N_1 潜時の短縮が観察された。この現象が記録電極自体の要因によるものなのか把握することが必要である。よって、記録電極界面や周辺組織の電気化学的特性の変化が誘発電位波形に及ぼす影響について、記録電極の電極界面の等価回路解析、VEP 波形のエミュレーションを組み合わせて検討した。

EIS 法は電極インピーダンスのスペクトル解析から電極と溶液界面の間の電気化学的な挙動を知る方法であり、その周波数応答は、ボードプロットあるいはコルーコループロットで表現される [61]。ボードプロットは各周波数におけるインピーダンスと位相を周波数の対数に対して描いたものであり、コルーコループロットは周波数の変化に伴う複素インピーダンスベクトルの軌跡を複素面上に描写したものである [62]。これらのプロットは電極界面で起こる電気化学的な反応の振舞いを表す。しかしながら、これらのプロットから直接的に電極や界面の電気化学的特性を言い表すのは難しく、得られた周波数特性からその特性を表す最小限の要素に単純化する等価回路解析が電極特性の解釈に有用な解析法である。

電極性能の指標として 1 kHz の正弦波電圧に対する電気化学インピーダンスが特に使用されるが [63]、この周波数におけるインピーダンスは電極界面の電気二重層容量が主たる成分となる [59]。しかしながら、実際の電極界面における電気化学的な挙動は、拡散や直接的な電荷移動も含まれるため複雑である。電極界面の特性を等価回路にて表す場合、電気二重層容量以外の回路素子も考慮に入れる必要がある [64]。このような電極特性の等価回路解析は *in vitro* や *in vivo* において多数の報告がある [65, 66, 67]。

記録電極、周辺組織の電気化学的特性と誘発電位の関連性を把握することにより、観察された誘発電位の潜時の短縮の要因が推測できる。大脳皮質電位の等価回路を用いたエミュレーション解析は、脳波・脳磁図の順・逆問題としてよく研究されている [68, 69]。このような等価回路を用いたエミュレーションは実測

の電位波形の形や大きさと同等のシミュレーションができると報告されている [70]。

3.5.1 等価回路解析

1) 等価回路および解析周波数の検討 [71]

電気化学反応は、電極／溶液界面での電荷移動過程と溶液内での物質移動過程（拡散）からなる。一般に物質移動速度は電荷移動速度と比較して遅く、インピーダンススペクトルでは、高周波域で電荷移動抵抗と電気二重層容量に起因する特性が、低周波域で拡散に起因する特性が現れる [72]。電極界面特性の等価回路解析において、複雑な拡散項や表面状態を模擬したいくつかの回路が提案されている [73]。複雑な等価回路を用いれば、どんなに複雑なインピーダンス特性にも数学的には合致するが、電気化学的な挙動に対する各素子の持つ物理的、化学的意味合いの理解は難しくなる。

視覚誘発電位による生理学的な評価には最も明瞭に観察される N_1 が指標としてよく用いられる [40]。VEP の N_1 を構成する周波数域を調べることにより、電極界面を模擬する等価回路に考慮すべき要素を判断できる。開発した記録電極の電気化学的特性の等価回路解析に必要な回路構成要素の検討を行った。

VEP の周波数解析

データ分析ソフトウェア (Origin, Light Stone) を用い、VEP 波形をウェーブレット変換し、 N_1 ピークの構成周波数を検討した。ウェーブレット解析は時間領域情報を残しつつ、広周波数領域の特性を求めることが可能な解析法である [74]。VEP の N_1 ピークの潜時におけるパワースペクトルを高周波側から 99.9% を含む範囲を VEP の N_1 を構成する周波数帯域と定義した。波形全体をフーリエ変換し、前述の範囲外のスペクトルを除去したものを逆フーリエ変換し、低周波数域を除去した VEP 波形と元の VEP 波形の比較を行った。

Randles の等価回路

等価回路解析は、Pt ball-tip screw electrode の 32 週の EIS 測定結果を使用し電気化学解析ソフトウェア (NOVA, Metrohm) を用いて行った。電極/電解液界面を表す等価回路として、図 3. 19 の Randles の回路を用いた [75]。溶液抵抗 (Solution resistance: R_{sol}) は、バルク抵抗を表す [75]。電荷移動抵抗 (Charge transfer resistance: R_{ct}) は、電極表面での電荷移動のしやすさを表す [59]。一定位相要素 (Constant phase element: CPE) は、界面の電気二重層容量を近似する非線形要素である。この非線形性は表面荒さや陽イオン (タンパク質) の吸着などに起因する [76]。CPE のインピーダンス (Z_{CPE}) は、式 (3. 1) で表される。 n は非線形性を表す指数で、 $n=1$ のとき完全なキャパシタ、 $n=0$ のとき完全な抵抗を表す [59]。 ω は角周波数で、 Y_0 は $\omega = 1 \text{ rad/s}$ のときのアドミタンスである。

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Y_0(j\omega)^n} \quad (3. 1)$$

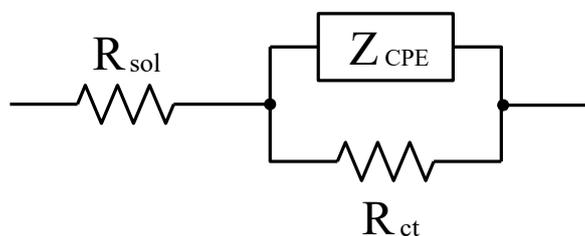
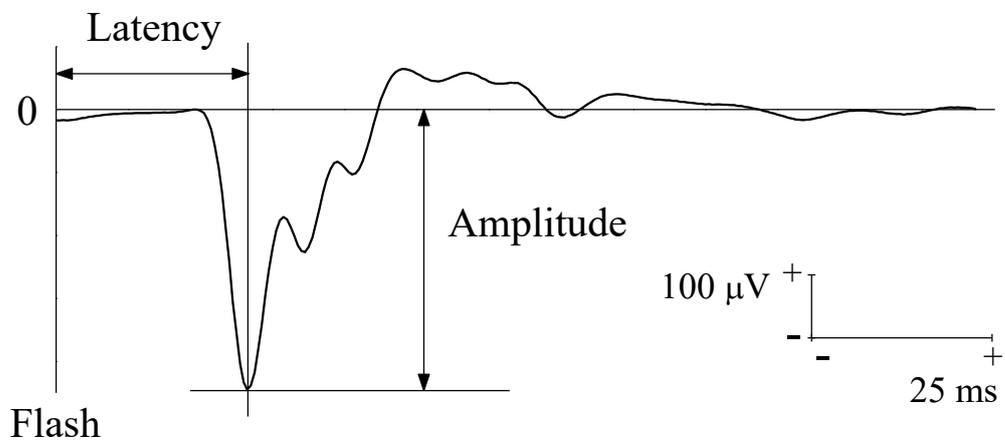


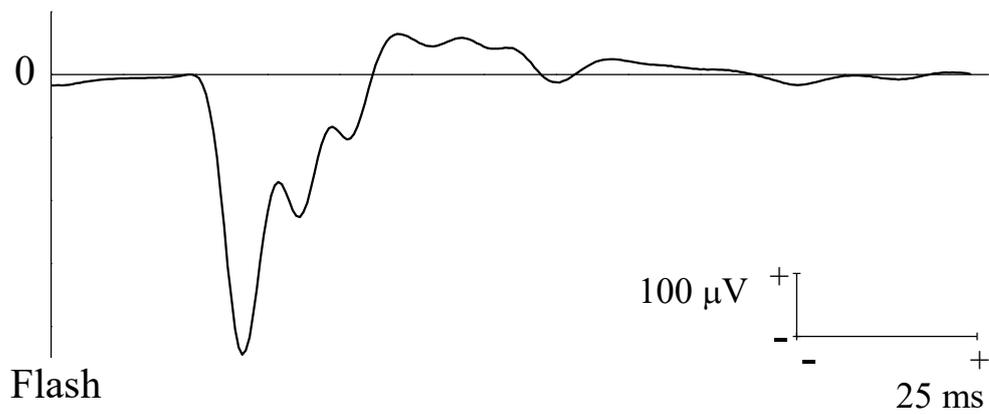
図 3. 19 Randles の等価回路
(文献 [71] より引用)

VEP の周波数解析の結果

電極埋込後 6 週後の VEP を図 3. 20 (a) に示す。VEP の N_1 ピークの振幅は $445 \mu\text{V}$ 、潜時は 26.5 ms であった。この波形をウェーブレット変換したものを図 3. 21 に示す。 N_1 潜時 26.5 ms におけるパワースペクトルを図 3. 22 (a) に示す。 N_1 潜時 26.5 ms におけるパワースペクトルが最大となる周波数は 37 Hz であった。VEP の N_1 構成周波数域を高周波側から積分したパワーが全パワーの 99.9% を含む周波数帯から求めたところ、 $5 \sim 1000 \text{ Hz}$ であった [図 3. 22 (b)]。図 3. 20 (a) の波形からフーリエ解析で 5 Hz 未満の低周波数域を除去した波形を図 3. 20 (b) に示す。 N_1 ピークの振幅は元の波形が $445 \mu\text{V}$ 、 5 Hz 以下の周波数を除去した波形の値も $445 \mu\text{V}$ であった。この VEP 波形を得たときの、EIS の測定結果から得た律速変化点の周波数は約 3 Hz であった (図 3. 23)。



(a) 典型的な VEP 波形



(b) 5 Hz 以下の周波数を除去した VEP 波形

図 3.20 周波数解析に用いた VEP 波形
(文献 [71] より引用)

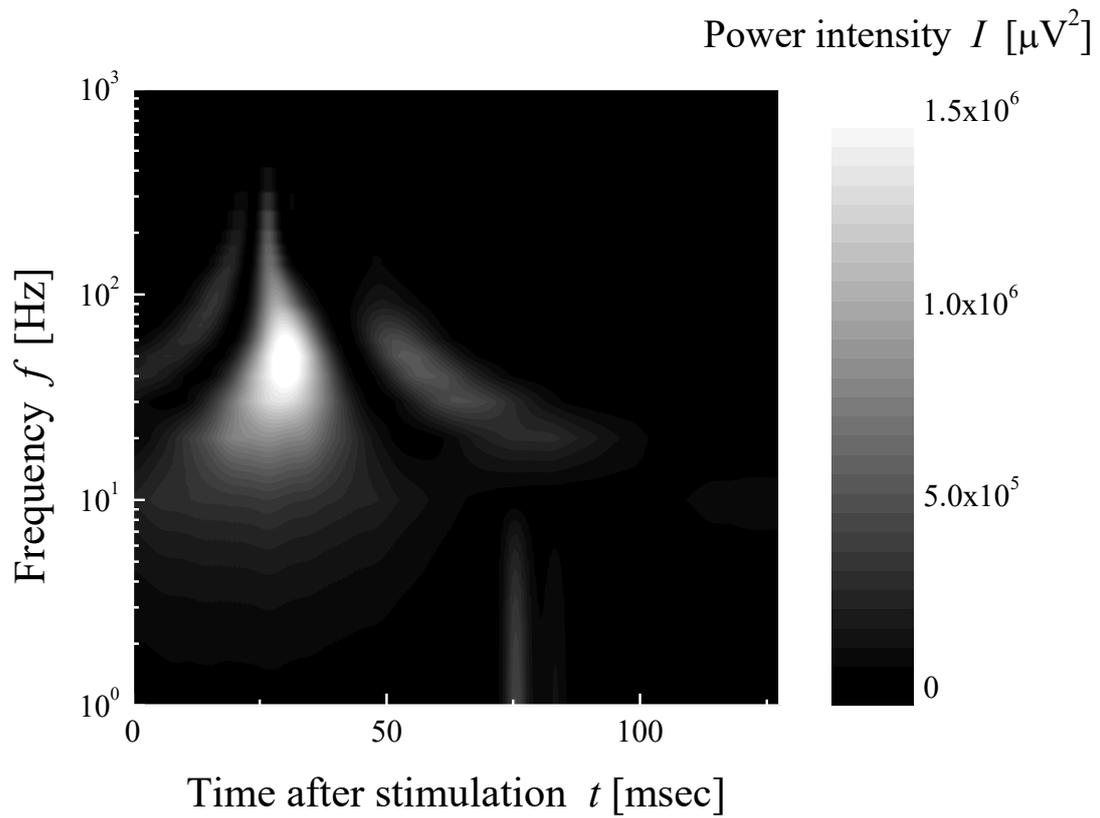
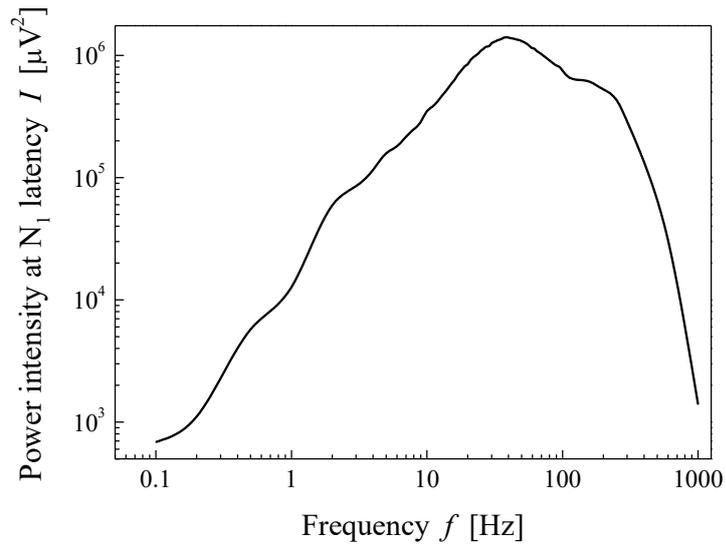
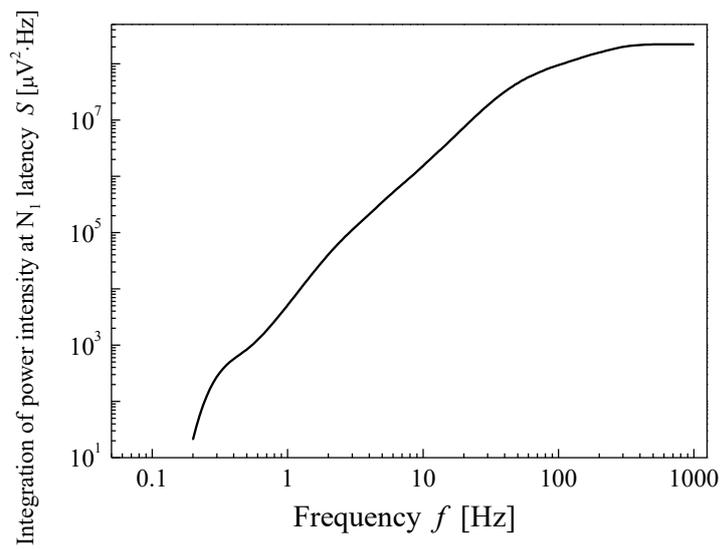


図 3.21 典型的な VEP 波形 [図 3.15 (a)] をウェーブレット変換したパワースペクトル (文献 [71] より引用)

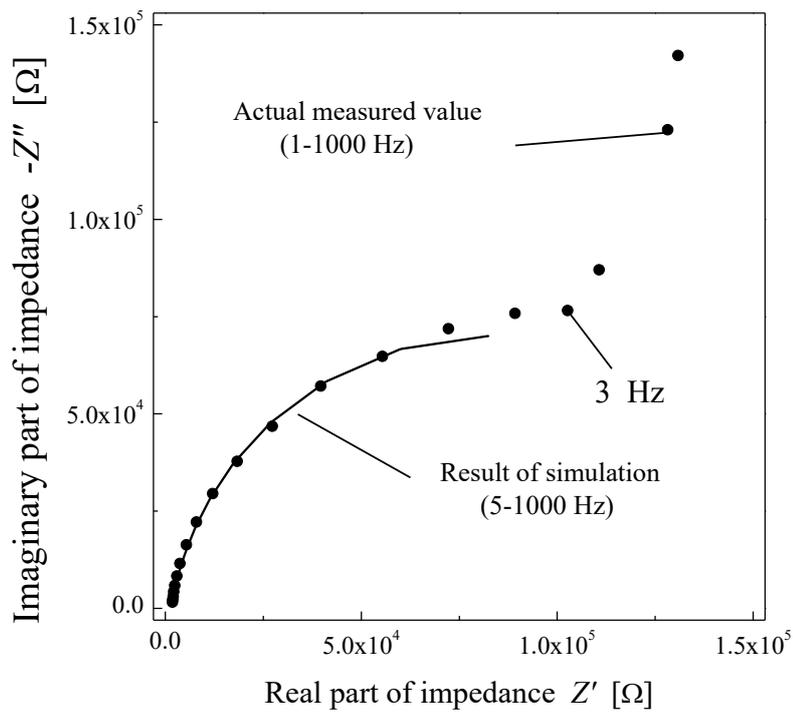


(a) N_1 潜時におけるパワースペクトル

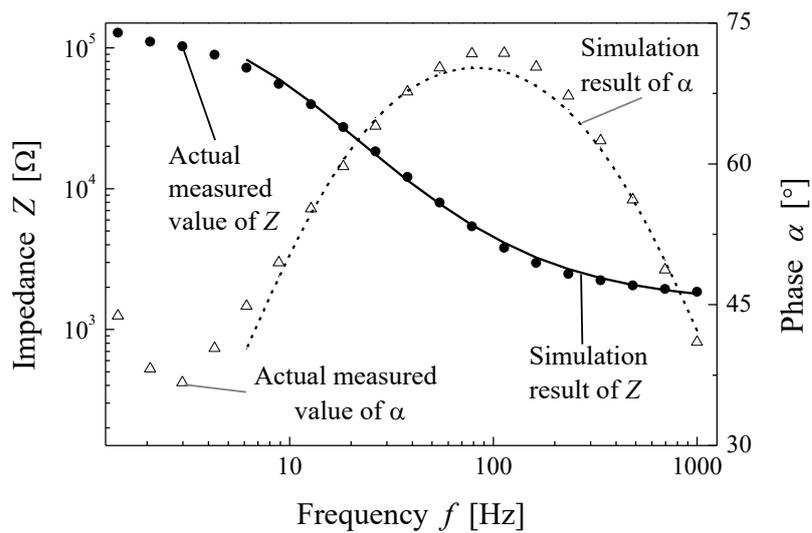


(b) N_1 潜時におけるパワースペクトル積分積算値

図 3.22 VEP の N_1 潜時におけるパワースペクトル
(文献 [71] より引用)



(a) コールーコールプロット



(b) ボードプロット

図 3.23 記録電極の電気化学インピーダンス測定結果
(文献 [71] より引用)

VEP の周波数解析の考察

結果より、VEP の N_1 を構成する周波数域は 5~1000 Hz であり、律速変化点の周波数は 3 Hz より大きく、それ以下の周波数成分は N_1 ピークにはほとんど含まれないことが確認できた。したがって、記録電極の長期間の等価回路解析を行う際は、拡散律速は考慮する必要がなく、図 3.19 の回路のような拡散を考慮しない比較的単純な回路で記録電極の界面特性を解釈できる。言い換えれば、記録電極界面の電気化学的特性は図 3.19 の Randles の等価回路で表現でき、エミュレーションで考慮すべき周波数帯域は VEP の N_1 構成周波数域である 5~1000 Hz の範囲で行えば良い。

2) 記録電極界面の等価回路解析結果

図 3.24~3.27 に等価回路解析結果を示す。溶液抵抗は 4~32 週の間で約 1300 Ω から 1750 Ω まで大きくなり、経時的に上昇した。(rabbit 1: correlation coefficient $r = 0.68$, $p < 0.05$, $t = 2.63$; rabbit 2: $r = 0.65$, $p < 0.05$, $t = 2.43$) (図 3.24)。

電荷移動抵抗の値は、電極埋植 6 週後以降は無限大となり (図 3.25)、CPE のアドミタンスはおよそ 500 nS、 n は 0.85 の一定の値で経時的な変化は見られなかった (図 3.26, 27)。

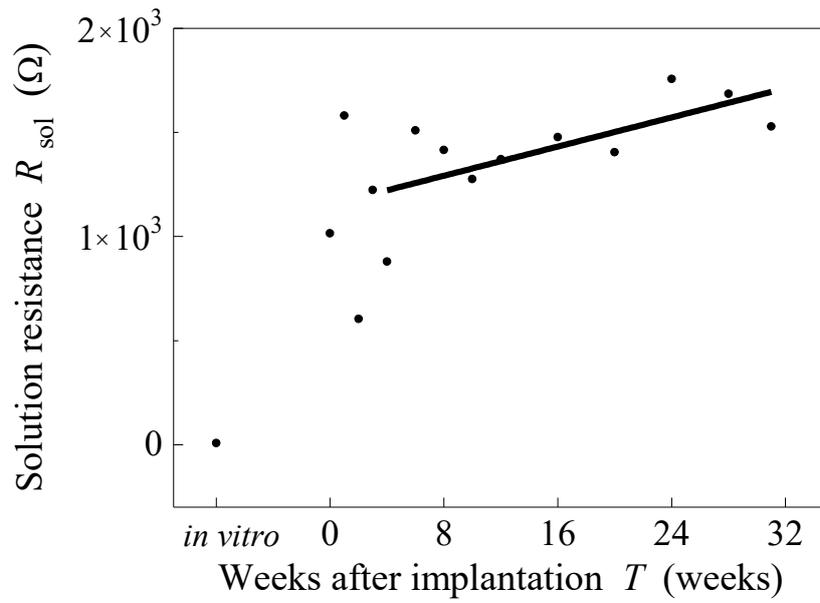


図 3.24 溶液抵抗の経時変化
(文献 [77] より引用)

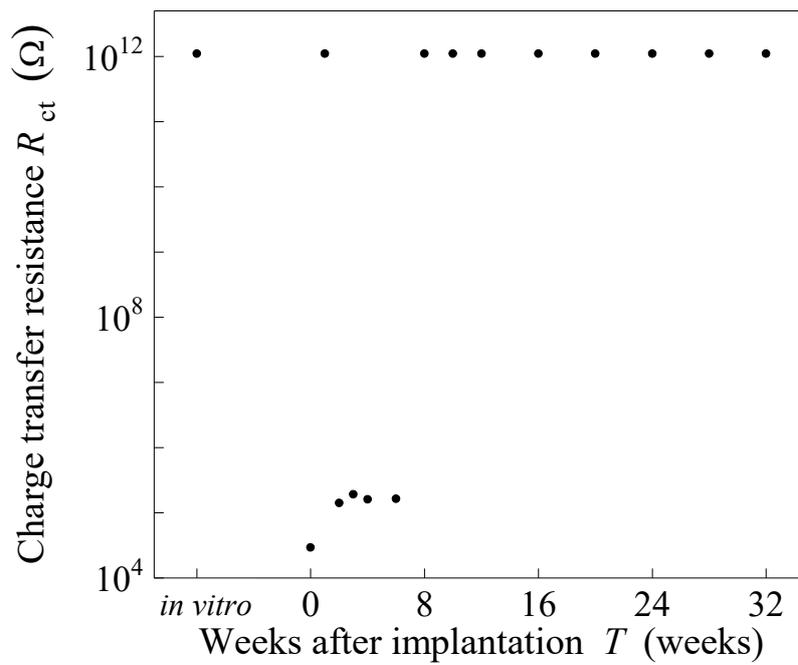


図 3.25 電荷移動抵抗の経時変化
(文献 [77] より引用)

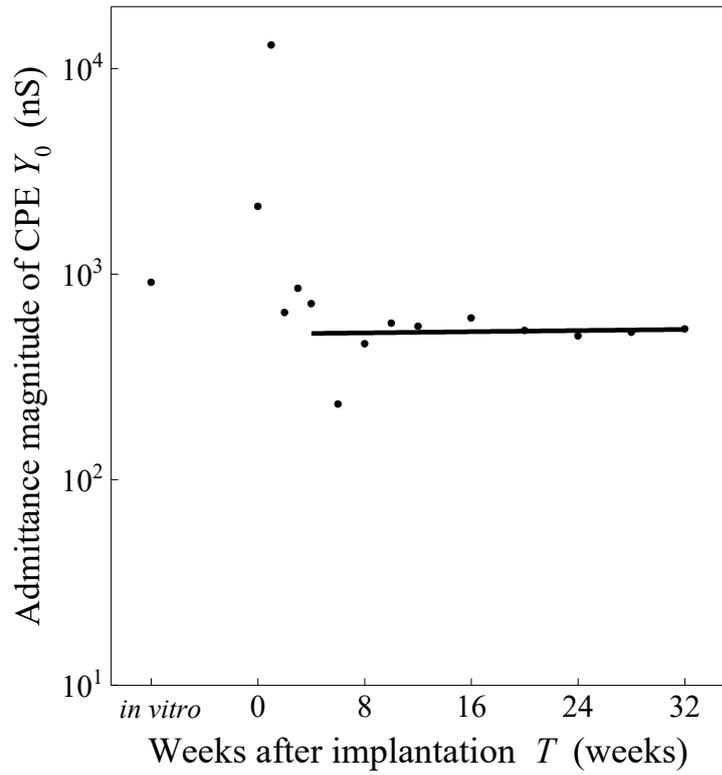


図 3.26 一定位相要素のアドミタンスの経時変化
(文献 [77] より引用)

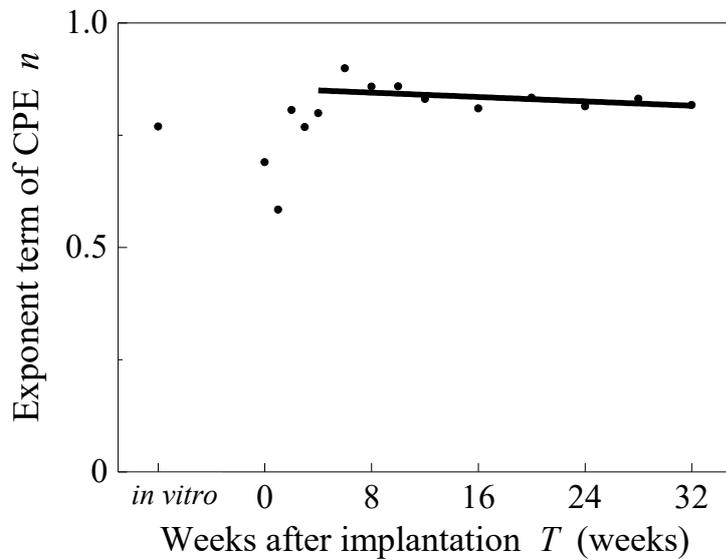


図 3.27 一定位相要素のべき乗数 n の経時変化
(文献 [77] より引用)

3.5.2 VEP 波形の N_1 のエミュレーション

記録電極界面の等価回路解析では、溶液抵抗は経時的に上昇し、電荷移動抵抗と電気二重層容量の近似である一定位相要素は経時的に変化しなかった。

VEP 波形の長期記録において、 N_1 振幅は経時的に一定であったが、 N_1 潜時は時間経過とともに短縮が見られた。この現象が記録電極自体の要因によるものなのか把握するため、 N_1 潜時の経時的な短縮と記録電極界面の関係性を VEP 波形の N_1 をエミュレーションにより検証を行った。

1) 方法

回路シミュレーションソフト (LTspice, LINEAR TECHNOLOGY) を使い、VEP 波形のエミュレーションを行った。使用したモデル回路を図 3.28 に示す。生体組織は細胞とその間を満たす細胞外液から構成され、さらに細胞は細胞内液と細胞膜から構成されている。電気的には、細胞内液・細胞外液は抵抗成分、細胞膜は容量成分からなる。約 10 kHz までの周波数帯域では、細胞外液抵抗、細胞膜容量を考慮すればよく、生体組織は抵抗とキャパシタンスの並列回路で模擬される [69]。脳組織は等価回路では細胞外液抵抗 R_{tissue} (1480 Ω) と細胞膜容量 C_{tissue} (2.99×10^{-7} F) の並列回路で表すことができる [69]。電極界面の等価回路は図 3.19 の Randles の等価回路で表し、CPE のべき乗数 n が 1 に近かったため、モデルの単純化のため電気二重層容量は純粋なキャパシタに置き換えた回路を用いた。バイオアンプ (ML135, AD Instrument) の入力インピーダンスはその仕様から R_{Bioamp} (200 M Ω) と C_{Bioamp} (200 pF) の並列回路で表した。神経応答を表す電流双極子電流は、式 (3.2) で表される [78]。

$$I(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left[-\frac{(t-t_c)^2}{2\sigma^2}\right] \quad (3.2)$$

t_c はニューロンの活性化の開始時間を表し、第一陰性波の潜時に相当する。 σ は活性の持続時間を表し、今回のエミュレーションでは第一陰性波の持続時間に相当する。 t_c および σ は rabbit 1 の記録電極埋植後 8 週後の VEP 波形から算出した値を用いた。したがって、エミュレーションにおける入力電流は式 (3.3) のよう表される。

$$I(t) = -4.34 \times 10^{-7} \times \exp\left[\frac{-(t-0.265)^2}{10^{-5}}\right] \quad (3.3)$$

図 3.28 の等価回路の各素子のエミュレーションに用いた値を表 3.3 に示す。電荷移動抵抗、電気二重層容量は、エミュレーションに使用する VEP 波形と同じ時点である電極埋め込み 8 週後の同じ家兎の値を使用した。溶液抵抗は電極埋め込み後 8 週後の値 (1415 Ω)、32 週間での最大値 (1757 Ω)、極めて大きな値 (10 M Ω) を用いた。溶液抵抗以外の素子の値は固定にし、溶液抵抗のみを変化させ、大脳皮質での応答が、記録電極の界面およびバイオアンプの入力インピーダンスによりどのように歪んで VEP として計測されるかを調べた。

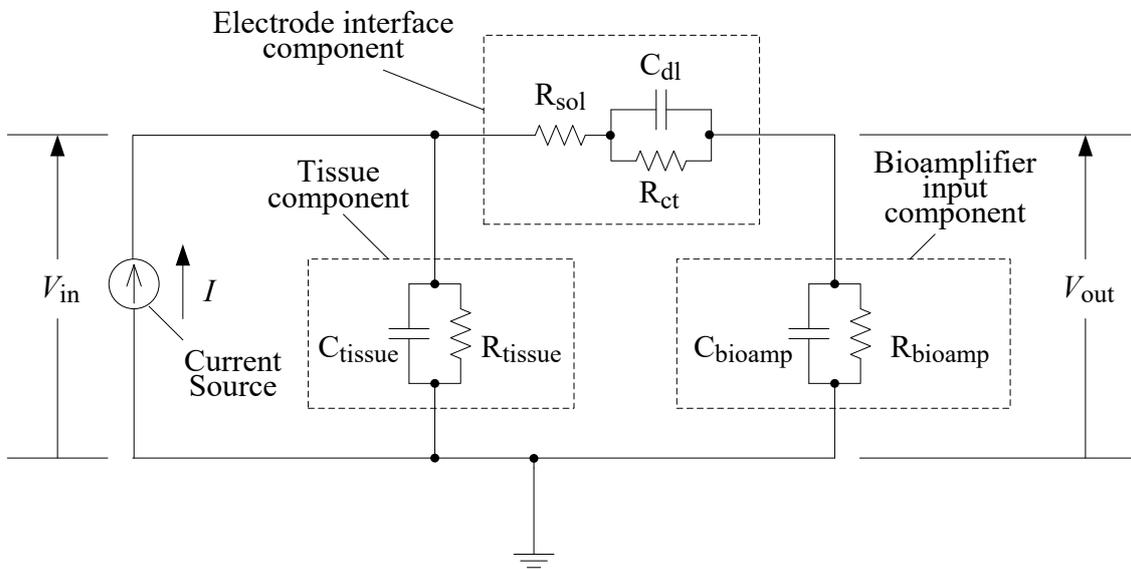


図 3.28 VEP、記録電極界面、バイオアンプを表すモデル等価回路
(文献 [77] より引用)

表 3.3 誘発電位波形のエミュレーションに用いた各構成要素の値

(文献 [77] より引用)

Parameter	Description	Simulation Value
R_{tissue}	Tissue resistance	1480 Ω
C_{tissue}	Tissue capacitance	299 nF
R_{sol} (8 weeks; maximum; extremely high value)	Solution resistance (8 weeks; maximum in 32 weeks; extremely high value)	1415 Ω ; 1757 Ω ; 10 M Ω
R_{ct}	Charge transfer resistance	1.1 T Ω
C_{dl} (approximated CPE*)	Double-layer capacitance	217 nF
R_{bioamp}	Input resistance of bioamplifier	200 M Ω
C_{bioamp}	Input capacitance of bioamplifier	200 pF

* CPE: constant phase element

2) エミュレーション結果

VEP の N_1 波形の、異なる溶液抵抗の値によるエミュレーション結果を図 3.29 ~ 3.31 に示す。溶液抵抗が電極埋植 8 週間後では、記録電極に入力される電圧とバイオアンプに入力される (output voltage) の N_1 潜時・振幅の差はなかった (図 3.29)。溶液抵抗が 32 週間での実測最大値 (1757 Ω) でも両者の間に差は見られなかった (図 3.30)。溶液抵抗が 10 M Ω の時、 N_1 潜時の延長及び N_1 振幅の低下が見られた (図 3.31)。

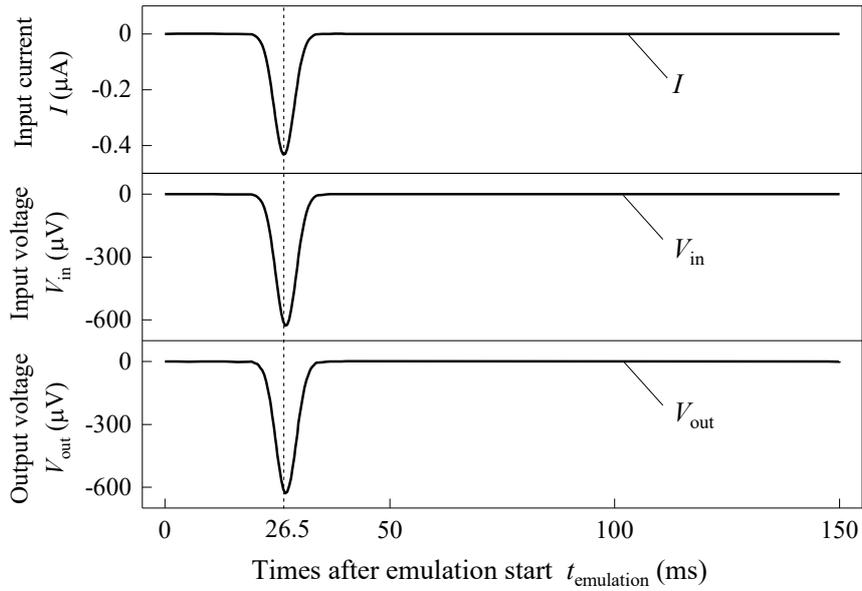


図 3.29 VEP 波形の N_1 のエミュレーション結果 (R_{sol} : 1415 Ω)
(文献 [77] より引用)

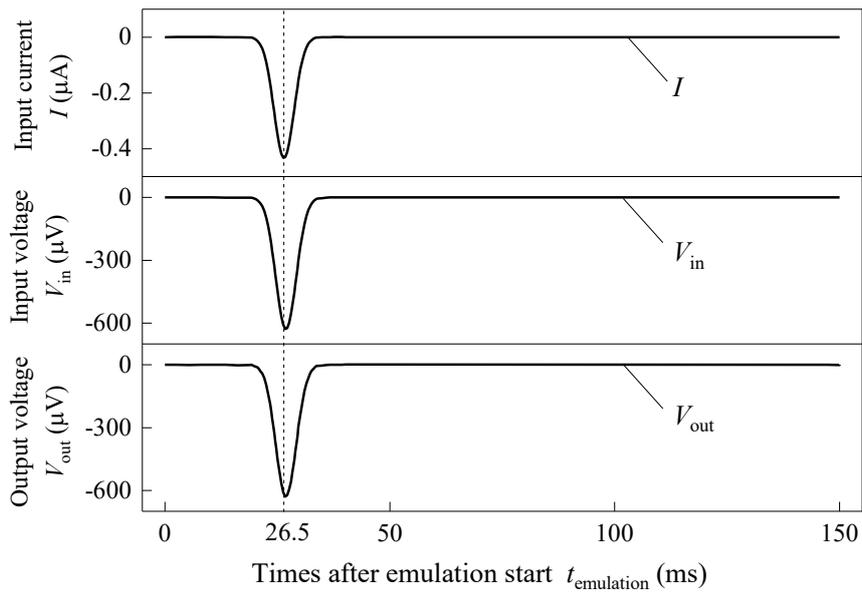


図 3.30 VEP 波形の N_1 のエミュレーション結果 (R_{sol} : 1757 Ω)
(文献 [77] より引用)

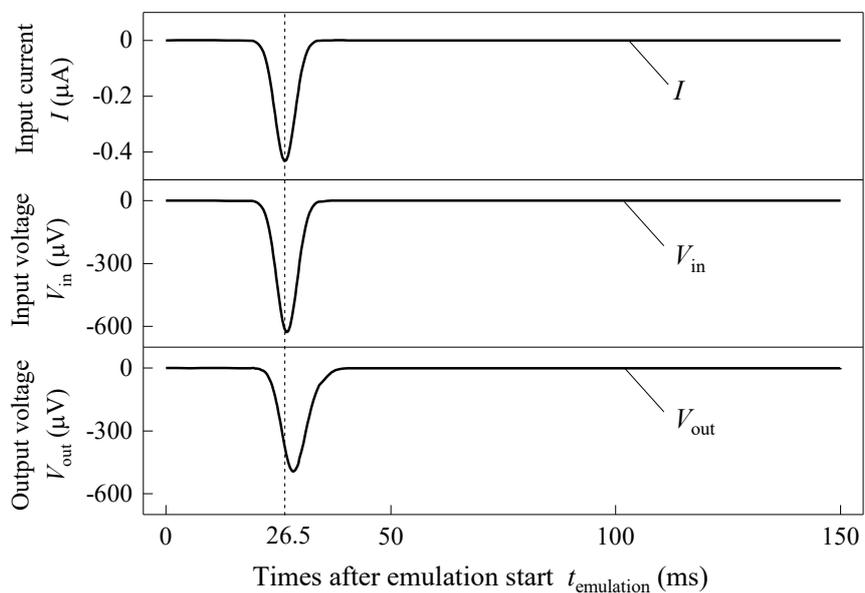


図 3.31 VEP 波形の N_1 のエミュレーション結果 ($R_{\text{sol}}: 10 \text{ M}\Omega$)
(文献 [77] より引用)

3.5.3 VEP 波形の N_1 エミュレーションの 考察

記録電極は生体にとって異物であり、生体に記録電極が埋植されると記録電極の周辺で異物反応が起こる。生体内に異物が侵入すると補体系が活性化され、アナフィラトキシンが生成される。アナフィラトキシンは肥満細胞の脱顆粒を促し、異物の周辺に炎症を引き起こす。異物の表面には貪食細胞が集積し、線維組織が形成され異物を生体から隔離する。これをカプセル化という。この時、異物表面にはマクロファージおよびこれが合一した異物巨細胞が見られる。マクロファージなどは単球系細胞であり、これらの細胞が TGF- β を産生し、線維芽細胞によるコラーゲンの産生を促す。このような異物に対する免疫反応は、異物の侵入後 2~4 週続き、埋植したデバイスの寿命に影響する [79]。

溶液抵抗の上昇は、電極周辺の結合組織に由来し、電極埋植直後 4 週間までに見られる溶液抵抗の急峻な上昇は、異物に対する炎症反応や電極埋植術後の創傷治癒が要因であると考えられる。さらに長期的な埋植は、脳組織に圧力や摩擦などの機械的ストレスを持続的に与える。この持続的な機械的ストレスは電極周辺に形成される線維やコラーゲンなどの肉芽組織をさらに肥厚させ、経時的な溶液抵抗の上昇を引き起こす [59]。

埋植手術直後、電極周辺は血液や浸潤液で満たされ、電荷移動抵抗は電解液に対する場合と同様に有限の値を示すが、治癒に伴いそれらが引くと電荷移動抵抗は急峻に上昇する。CPE のアドミタンスはリカバリー期間後一定であり、記録電極界面でのタンパク質の吸着の増加はないと考えられる。また、式 (3.1) の CPE の n はほぼ 1 に近く、CPE の大きさはほぼ電気二重層容量の静電容量の大きさとみなせる。

エミュレーションの結果より、電極埋植後 32 週間における溶液抵抗の上昇は、誘発電位の潜時や大きさには影響しないことが確認できた。溶液抵抗を極端に大きくしたときの VEP 波形のエミュレーションでは、 N_1 潜時は延長し、 N_1 振幅は低下した。金属ネジ電極のような脳組織に損傷が大きい記録電極の埋め込みは、極端な溶液抵抗の上昇を招く [41, 45]。金属ネジ電極による経時記録は短期間しか実現できなかったが、その際に観察された N_1 潜時の延長 (図 3.12) はエミュレーションの結果とよく一致する。したがって開発した長期記録用電極による経時記録で見られた潜時の短縮は、記録電極界面の特性の変化が要因ではないと考える。時間経過に伴う潜時の短縮の原因については、報告はない。潜時

に影響を及ぼす要因として、3つの要因を推測する。1つ目の要因として、神経細胞の信号伝達をサポートするグリア細胞による潜時への影響が挙げられる。脳へ電極を埋植した際、電極周辺にはグリア細胞が集結すると報告がある [80]。脳組織が損傷したとき、グリア細胞の一種であるアストロサイトが刺激を受け、 Ca^{2+} シグナルの放出により神経細胞保護作用を誘引し、創傷治癒を行う [81]。アストロサイト内の Ca^{2+} がシナプス機能調節に関与しているとの報告もある [81]。創傷治癒の過程で、アストロサイトの働きにより神経保護機構が機能し、シナプスの伝達速度が上昇したと考える。これにより、電極埋め込み後より徐々に反応が良くなり、潜時が短くなった可能性がある。2つ目の要因として、シグナル源への距離の短縮が挙げられる。電極の長期埋植によって機械的圧力負荷がかかり、シグナル源への距離が短縮した可能性が考えられる。シグナル源への距離の短縮は、潜時の短縮をもたらす [82]。また、3つ目の要因として、麻酔の影響が挙げられる。麻酔深度は誘発脳波へも影響を及ぼす [83]。本研究では、呼気ガス濃度で濃度を規定していたが、繰り返し麻酔への馴化によって、麻酔薬への感受性が段々と弱くなった可能性もある。Bispectral Index のような脳波解析による麻酔中の意識レベルモニターにより、麻酔深度を計測することが可能である。

3.6 まとめ

開発した記録電極を用い、長期間の VEP 記録を行った。N₁ 振幅が一定の VEP が 48 週間に渡り記録でき、48 週後の EEP 記録も可能であった。N₁ 振幅は経時的な短縮が見られた。

1, 12.7, 112.9, 1000 Hz における電極インピーダンスも期間中一定であった。溶液抵抗、電荷移動抵抗、一定位相要素で構成される Randles 回路 (図 3.19) を用いた等価回路解析では、電極界面の電気化学的特性を表す電荷移動抵抗および一定位相要素が期間中一定であり、電極周辺組織のバルク抵抗を表す溶液抵抗のみ経時的に上昇した。

N₁ 振幅は経時的な短縮の原因を明らかにするため、脳組織、生体/電極界面、バイオアンプの入力インピーダンスを総合したモデル等価回路による VEP 波形のエミュレーションを行った。溶液抵抗が 48 週間のうちに見せる上昇の範囲では、VEP の N₁ 潜時は変化しないことが確認できた。溶液抵抗が極端に大きい場合のエミュレーションでは、N₁ 潜時は延長し振幅は低下した。これはネジ電極などを用いた計測結果と一致するが (図 3.12) [41, 45]、開発した記録電極による結果とは矛盾する。したがって、観察された N₁ 潜時の短縮は記録電極自体の電気化学的特性変化が要因でないと考えられる。

開発した誘発電位記録電極は、界面の電気的特性が長期間変化せず、長期間の誘発電位測定においても、その電極特性が誘発電位に影響を与えないロバストな誘発電位測定を可能とする。

本研究で開発した記録電極を用いることで、長期間の誘発電位測定においても記録電極の特性変化によって測定継続不能となることは避けられ、動物実験を最小限に抑えることができると考える。

第4章

人工視覚システム安全性評価のための安全安定な麻酔法の検討

4.1 緒言

動物を用いた人工視覚システムの安全性評価では、VEPやEEPなどの誘発電位の計測が有用である。VEPとは全視野にフラッシュ光刺激を与えたときに大脳皮質視覚野で記録できる神経活動電位である。VEPによって、網膜機能、視覚伝導路、大脳一次視覚野の機能保持を確認できる。EEPとは網膜に電気刺激を与えた際に大脳皮質視覚野で記録できる神経活動電位である。EEPによって、網膜神経節細胞から大脳皮質視覚野までの視覚伝導路の障害等を評価できる。EEPやVEPなどの誘発電位を長期に渡り評価することで、デバイスの耐久性、生体への安全性などが確認できる。しかしながら、誘発電位は麻酔法や記録電極の特性変化などの外的因子による影響を受ける。そのため、長期間の誘発電位測定を

用いて電気刺激による生体への影響を評価するには、外的要因に影響を受けないロバストな記録系の確立が必要である。

記録電極として表面が円滑な白金球を用いた Pt ball-tip screw electrode, Pt/Ir ball-tip planar MEA 電極を開発し、48週に渡る視覚誘発電位記録に成功した [45]。

家兎を用いた実験における全身麻酔法として、注射麻酔法、吸入麻酔法が挙げられる (表 4. 1)。家兎は大きな耳を持ち耳静脈の確保が容易なことから、注射麻酔では一般的に静脈内投与が行われる。従来、注射麻酔としてケタミン/キシラジン、ペントバルビタール、フェンタニール/フルアニゾン、フェンタニール/メデトミジン、チオペンタール、プロポフォール等が用いられてきた [84]。しかしながら、家兎における注射麻酔は、他の動物に比べて、同じ薬剤でも個体によって投与量が著しく異なり麻酔深度の制御が難しく、再現性の良い誘発電位を得ることが難しい [22, 23]。注射麻酔の中でもペントバルビタールは、家兎の無呼吸を助長し麻酔死を引き起こすことがあるので、現在、推奨されていない。吸入麻酔として、イソフルラン、セボフルラン、ハロタンが挙げられる。吸入麻酔であるイソフルランは、麻酔濃度の調整が可能であり、再現性の良い誘発電位を得ることができる [45]。現在、動物実験で、吸入麻酔としてよく使用されるイソフルランは、悪性高熱や呼吸抑制の副作用があり、繰り返し麻酔により、最悪死亡することがある [85, 86]。動物実験の基本理念 3R の原則¹ [87] を考慮すると、長期試験の途中での動物の死亡は、試験の中止や延長をもたらす上、動物の使用数を増加させることにもつながるため、より安全な麻酔法がのぞまれる。セボフルラン麻酔は、血液/ガスの分配係数も低いため麻酔剤の移行が速く、麻酔の導入・覚醒も迅速に行うことがより安全な麻酔である [88, 89, 90]。家兎におけるセボフルラン麻酔での VEP や EEP 測定の報告はなく、家兎の視覚誘発電位による人工視覚システムの長期安全性評価でセボフルラン麻酔が実現できるか検証する必要があった。よって、より安全なセボフルラン麻酔が家兎を用いた視覚誘発電位評価においてイソフルラン麻酔の代替と成り得るか、セボフルラン麻酔下での VEP とイソフルラン麻酔下での VEP を比較検討した。

¹ イギリスの科学者 W.M.S. Russell と R. L. Burch が 1959 年に著書「人道的動物実験の原則」The principles of humane experimental technique で提唱した 3R の原則、Replacement：できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用すること、Reduction：できる限りその利用に供される動物の数を少なくすること、Refinement：できる限り動物に苦痛を与えないこと

表 4.1 家兎における全身麻酔 [91, 92, 93]

麻酔法	麻酔薬	備考
注射麻酔	解離性麻酔薬 (塩酸ケタミン)	高容量で外科手術が行える程度の十分な鎮痛・不動化が可能。 単独では筋弛緩が得られないためキシラジンと併用する。
	バルビツレート (ペントバルビタール チオペンタール)	睡眠作用が強力で循環器系・呼吸器系の抑制が強い。鎮痛作用や筋弛緩作用はない。 30-90分の浅中程度の外科麻酔が得られる。単独投与で過剰投与になり、死に至ることがある。
	ウレタン	長時間に渡る深麻酔が得られる。心血管系と呼吸器系の抑制は最小である。 従来は上記理由により良く使用されていたが、人に対する発癌性があるため、現在、使用は推奨されていない。
	麻薬性鎮痛薬 (フェンタニール)	ジアゼパムやミダゾラムと一緒に使用する。 30分程度の外科麻酔が得られる。
吸入麻酔	イソフルラン	中枢神経抑制薬。 筋弛緩得られる。 心筋抑制小さい。 臭いがあり、刺激性がある。 悪性高熱、呼吸抑制の副作用あり。
	ハロタン	中枢神経抑制薬。鎮痛効果なし。 心筋抑制あり。 低体温・呼吸抑制の副作用あり。
	セボフルラン	中枢神経抑制薬。 導入・覚醒時間短い。 臭いが強烈ではなく刺激性ない。

4.2 方法

4.2.1 記録電極埋植

記録電極を3匹の日本白色兎に埋植した（以降、rabbit A, rabbit B, rabbit Cとする）。記録電極は、ポリイミドネジ（長さ 12.0 mm）の先端に白金球（径 1.5 mm）を接合した Pt ball-tip screw electrode を使用した（図 4.1） [45]。図 4.1 (b) に示すインサートナット（Ensat 302000025.500, kkv）をラムダ縫合の前方 9 mm、右側方 6 mm に留置した後（図 4. 2）、VEP を記録しながら記録電極の埋植深さを調整し、VEP の N_1 振幅が最大になった位置で記録電極を固定した [45]。基準電極（AM2-8, Unique Medical）はラムダ縫合から前方 16 mm の正中に埋植した（図 4. 2）。2 週間のリハビリ期間をおいた後、VEP を測定した。同一個体に対し、イソフルラン麻酔下、セボフルラン麻酔下による VEP, EEP 測定を行った。同一個体での実験において、使用した記録電極・基準電極は同一のものである。

全ての動物実験はニデック社の施設で行い、ニデック社の動物実験委員会の承認を受けて行った。動物実験の全てのプロセスは、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) の定める statement for the use of animals in ophthalmic and vision research, and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals を遵守して行った。



(a) 記録電極



(b) 記録電極とインサートナット

図 4.1 実験に用いたポリイミド製の Pt ball-tip screw electrode

(文献 [94] より引用)

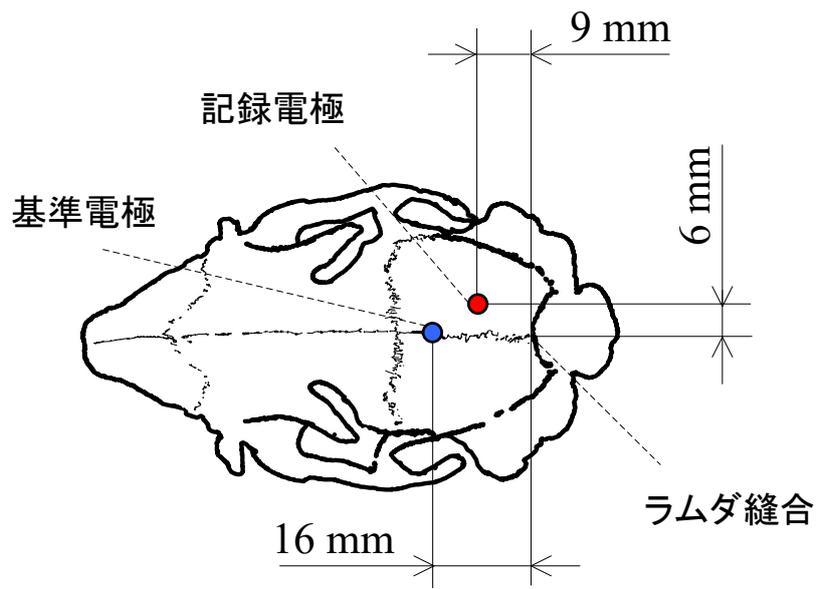


図 4.2 電極の埋植位置

4.2.2 VEP 測定

実験開始前2時間より、水のみを与え絶食を行った。実験室の電気を消灯し、家兎を暗幕で覆ったリカバリーボックスに入れ、壁掛式麻酔器(NS-3000, Acoma)から酸素を流量4 l/minで流しながら、15分間暗順応させた。

暗順応後、リカバリーボックスへイソフルランまたはセボフルランを流し、麻酔導入した。庫内のガス濃度は生体情報モニター(BP-608EV, COLIN)により監視した。イソフルランのガス濃度が2.4%、またはセボフルランのガス濃度が3.8%に達した後、リカバリーボックスを揺らし家兎が深麻酔状態であることを確認の後、麻酔用のマスクを装着しイソフルラン2.4%またはセボフルラン3.8%、酸素流量1 l/minで麻酔した。

刺激眼(左眼)は、トロピカミド(Mydrin-P, Santen)で散瞳し、塩酸オキシブプロカイン(oxybuprocaine hydrochloride; Benoxil, Santen)で局所麻酔を施した後、角膜の白濁防止のためヒドロキシエチルセルロース(SCOPISOL, Senju)を滴下し、開眼器で開眼させた。非刺激眼(右眼)はヒドロキシエチルセルロースを滴下した後、ガーゼで遮光した。

マスク麻酔下での呼気終末麻酔ガス濃度をイソフルラン麻酔: 2.4%, 2.0%, 1.5%, セボフルラン麻酔: 4.0%, 3.8%, 3.0%に達してから5分以上維持した後、VEP計測を行った。イソフルランとセボフルラン麻酔下でのVEP測定は連続する2日間で行った。バイオアンプ(AD-611J, Nihon Kohden)と生体シグナル記録解析システム(EplyzerII, Kissei Comtec)を使用して誘発電位を計測し、光刺激は、LED発光装置(LS-100, メイヨー)、Ganzfeld刺激型コンタクトレンズLED(LS-100, メイヨー)で行った。刺激条件は、発光輝度100 cd/m² 発光時間30 ms (ISCEV基準3 cd·s/m²に準拠 [95])、繰り返し周波数を1 Hzとした。照度計にて部屋の照度を計測し毎回測定時照度に変化が無いことを確認し実験を行った(0.2~0.3 lx)。VEPの測定系を図4.3に、測定条件を表4.2に示す。

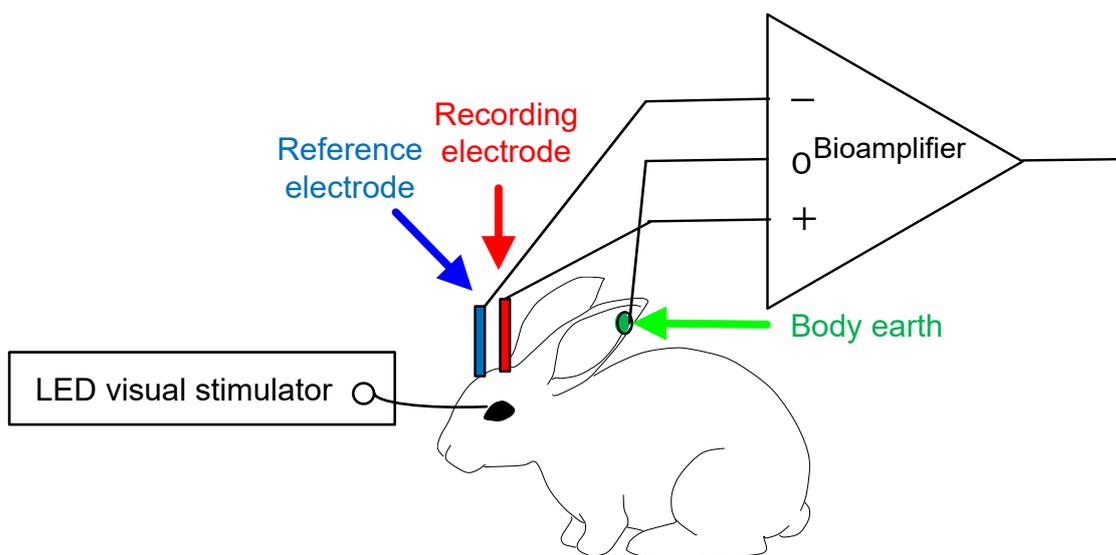


図 4.3 VEP 測定系

表 4.2 VEP 測定条件

光刺激条件	発光輝度	100 cd·s/m ²
	発光時間	30 ms
	Ganzfeld 刺激型コンタクトレンズ	
記録条件	高域遮断周波数	100 Hz
	低域遮断周波数	1.5 Hz
	加算平均回数	32 回
麻酔濃度	イソフルラン呼気ガス濃度	2.4 %、2.0 %、1.5 %
	セボフルラン呼気ガス濃度	4.0 %、3.8 %、3.0 %

4.2.3 EEP 測定

EEP 測定にはバイオアンプ (MEG-6116, AD-611J, Nihon Kohden)、生体シグナル記録解析システム (EplyzerII, Kissei Comtec) を用いた。EEP 計測は、マスク麻酔下で呼気終末麻酔ガス濃度がイソフルラン麻酔 2.4 % またはセボフルラン麻酔 3.8 % に達してから 15 分以上維持した後に行った。EEP の計測系を図 4.4 に、計測条件を表 4.3 に示す。刺激電極は、直径 2 mm の白金球電極を用いた (図 4.5)。結膜輪部にナイロン糸をかけ、眼球を上転させた状態で電気刺激を行った。マニピュレータ (MMN-2, NARISHIGE) で刺激電極位置を走査し、EEP が一番大きく記録される位置にポリエステル縫合糸で印をつけ、刺激の際のガイドとした (図 4.5)。刺激電流は刺激電極と家兎上腕部に刺入した 25 G の注射針との間に流した。イソフルランとセボフルラン麻酔での EEP 測定は連続した 2 日間で行った。

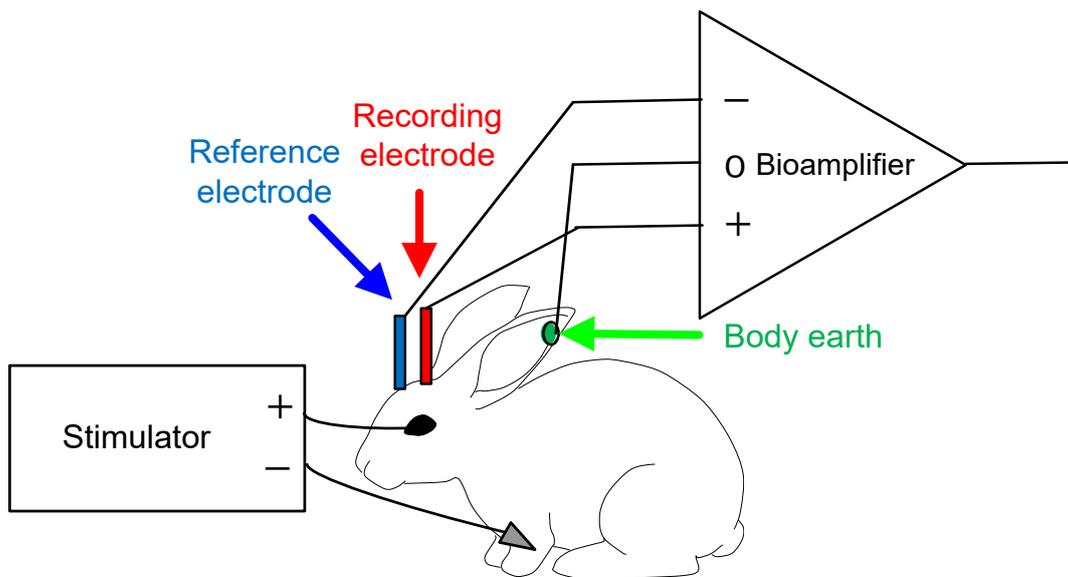


図 4.4 EEP 計測系

表 4.3 EEP 計測条件

電気刺激条件	刺激方式	cathodic first biphasic
	刺激電流	1200 μ A
	デュレーション	1 ms
記録条件	高域遮断周波数	1 kHz
	低域遮断周波数	1.5 Hz
	加算平均回数	1000 回
麻酔濃度	イソフルラン呼気ガス濃度	2.4 %
	セボフルラン呼気ガス濃度	3.8 %

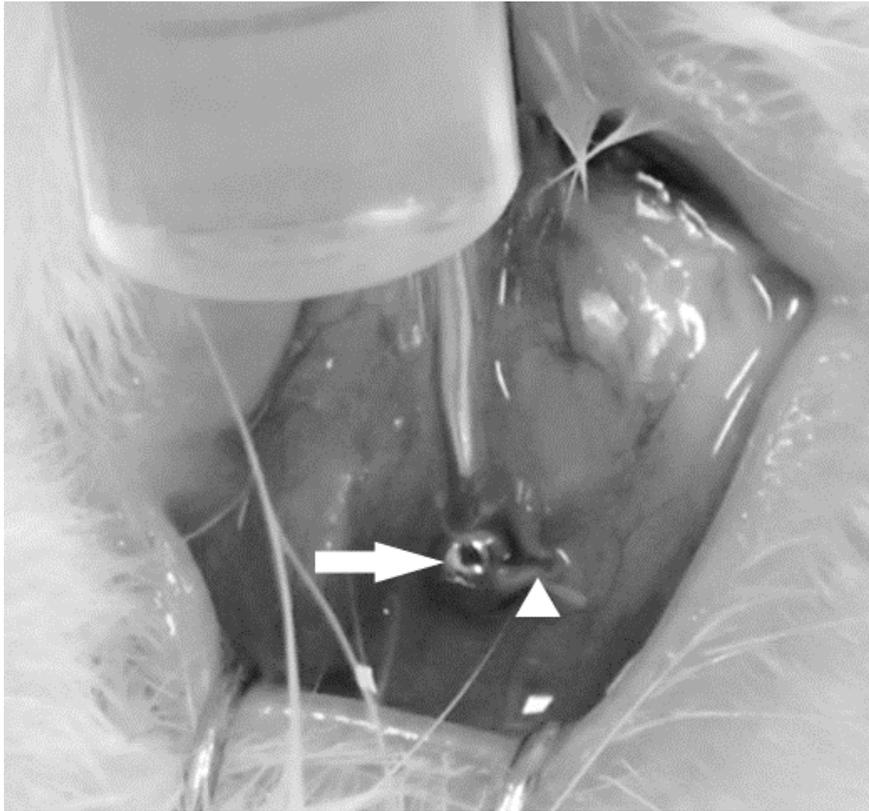


図 4.5 EEP の測定方法
(⇨ : 刺激電極、△ : 刺激場所ガイドのためのポリエステル縫合糸)
(文献 [94] より引用)

4.2.4 最小肺胞内濃度

1 気圧下において、吸入麻酔薬により半数の動物 (50%) を不動化させるのに必要な肺胞内における吸入麻酔薬の濃度を最小肺胞内濃度 (Minimum alveolar concentration: MAC) という。イソフルラン麻酔での家兎 (ニュージーランド白兎) では、 $2.05 \pm 0.18\%$ / 1 MAC であり [96]、本研究でを使用した麻酔濃度を MAC で表すと、呼気終末イソフルラン濃度、1.5%、2.0%、2.4% に対してそれぞれ、0.75 MAC, 1 MAC, 1.2 MAC となる。セボフルラン麻酔での家兎 (ニュージーランド白兎) では、 $3.70 \pm 0.16\%$ / 1 MAC であり [97]、本研究でを使用した麻酔濃度を MAC で表すと、呼気終末セボフルラン濃度、3.0%、3.8%、4.0% に対してそれぞれ 0.79 MAC, 1 MAC, 1.05 MAC となる。

4.2.5 VEP 波形解析

VEP 波形、 N_1 潜時、 N_1 振幅 (peak-to-trough 法 [46] を用いて計測) を統計解析により評価した。対応のある t 検定 (Paired t -test) により、イソフルランとセボフルラン麻酔 1 MAC における N_1 潜時、 N_1 振幅に有意差があるか評価した。イソフルラン麻酔下またはセボフルラン麻酔下の VEP において、麻酔濃度の違いによって、 N_1 潜時、 N_1 振幅に有意差があるか、繰り返しのある一元配置分散分析 (repeated measures analyses of variance: rANOVA) を行った。統計解析は、統計解析ソフト (JMP pro13, SAS) を用いた。

4.3 結果

VEP の計測結果を図 4.6 に示す。VEP 波形は明瞭な N₁、それに続く小さな波で構成される。明瞭な N₁ はイソフルラン麻酔、セボフルラン麻酔、どちらの麻酔下でも観察できた。N₁ 以降の波は個体や麻酔の種類により異なり、一様ではなかった。

1 MAC での N₁ 潜時においては、イソフルランとセボフルラン麻酔間に有意差はなかった ($t=0.97, p=0.435$) (表 4.4)。しかしながら、1 MAC におけるセボフルラン麻酔下での N₁ 振幅においては、イソフルラン麻酔下での N₁ 振幅より有意に大きかった ($t=5.18, p=0.0353$) (表 4.4)。

表 4.4 1 MAC における VEP の N₁ の計測結果 (文献 [94] より引用)

Anesthesia	N ₁ latency (ms) ^{NS}	N1 amplitude (μV) *
Isoflurane	29.3 ± 2.1	239.6 ± 89.4
Sevoflurane	30.4 ± 0.9	298.9 ± 93.1

n = 3. Values are mean ± standard deviation (SD).

* = significant ($p < 0.05$), NS = not significant ($p > 0.05$, paired t -test)

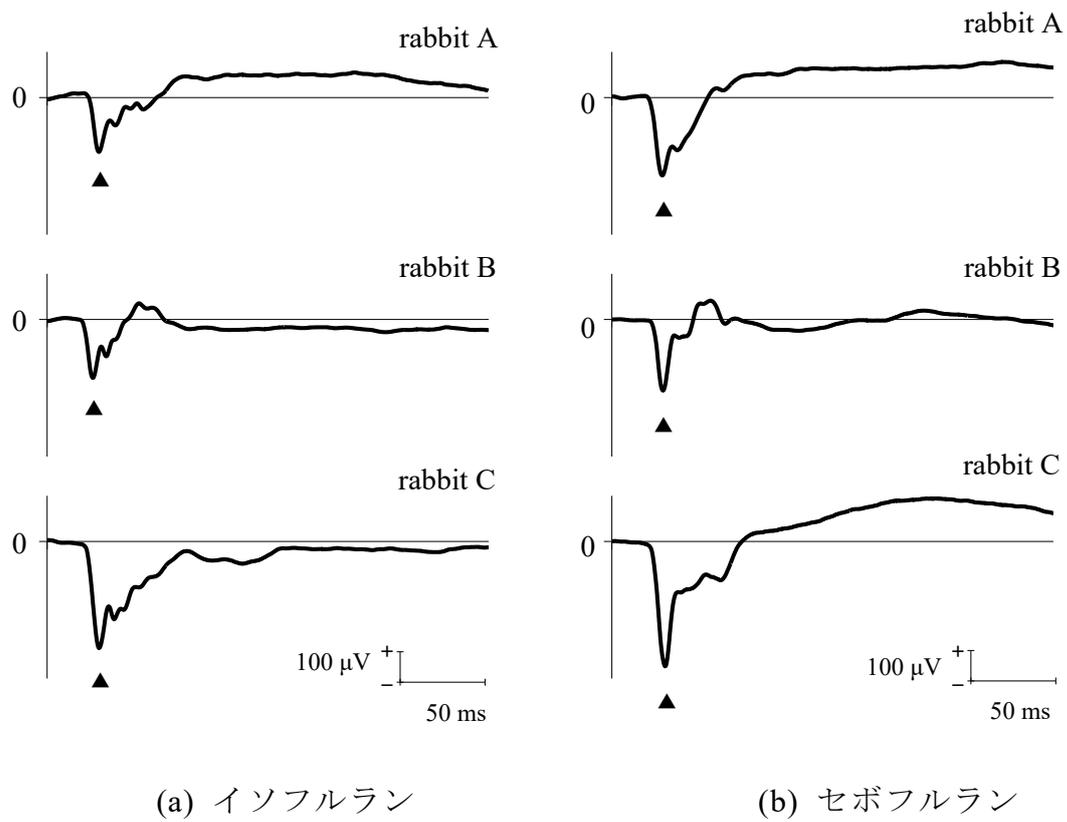
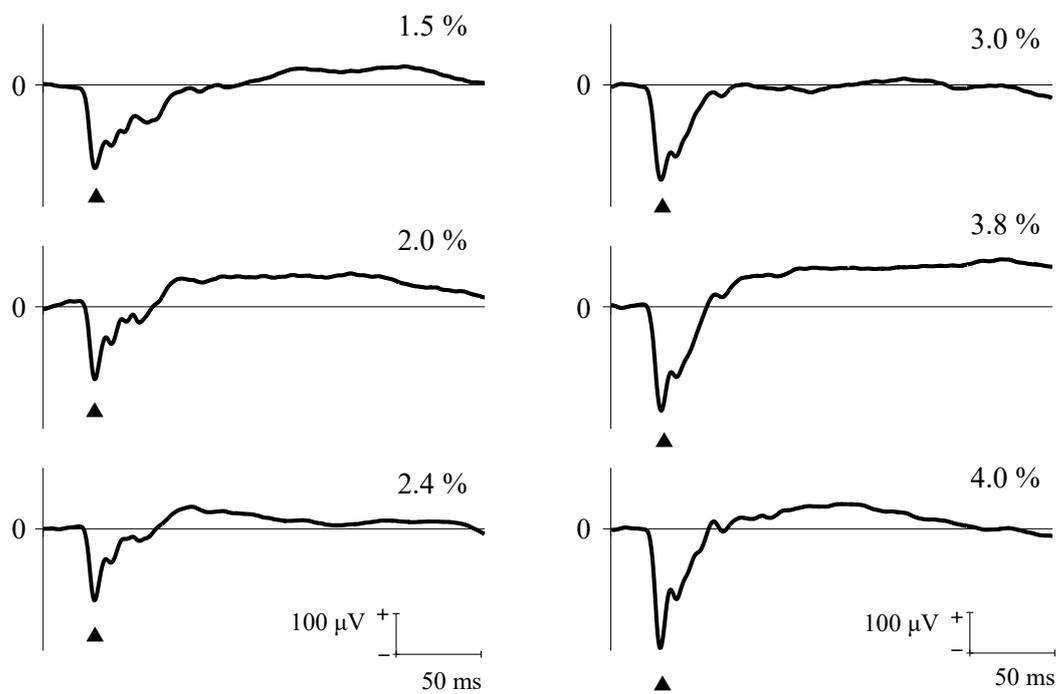


図 4.6 1 MAC におけるイソフルラン・セボフルラン麻酔下の VEP 波形
(文献 [94] より引用)

麻酔濃度の違いによる波形の変化の例を図 4.7 に示す。イソフルラン麻酔、セボフルラン麻酔において、異なる麻酔濃度でも明瞭な N_1 が観察できた。

イソフルラン麻酔下の VEP の N_1 潜時においては、異なる麻酔濃度間で有意差は見られず ($F=0.29, p=0.7558$) [図 4.8 (a)]、セボフルラン麻酔下の VEP の N_1 潜時においても、同様に有意差は見られなかった ($F=1.57, p=0.2823$) [図 4.8 (b)]。 N_1 振幅についても、イソフルラン麻酔下 ($F=0.21, p=0.8183$) [図 4.8 (c)]、セボフルラン麻酔下 ($F=0.30, p=0.7548$) [図 4.8 (d)]、いずれにおいても有意差は見られなかった。

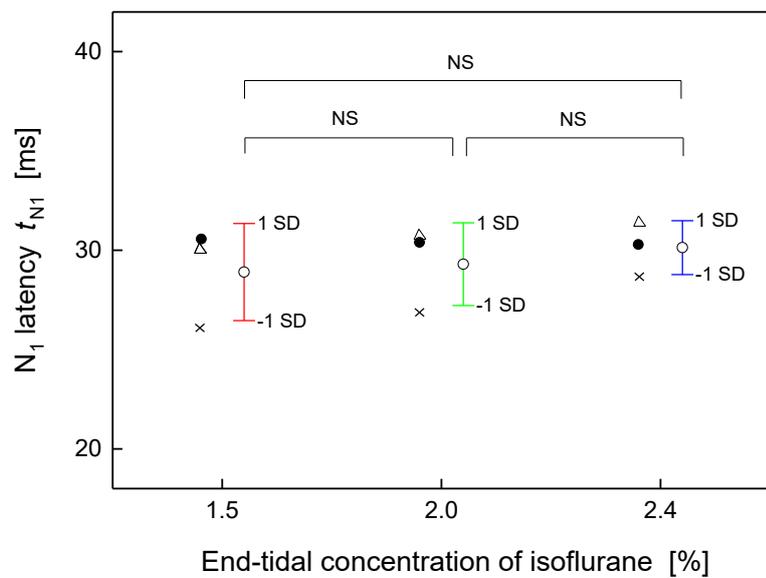
また、イソフルラン麻酔下、セボフルラン麻酔下の両方の条件で EEP の記録も可能であった (図 4.9)。



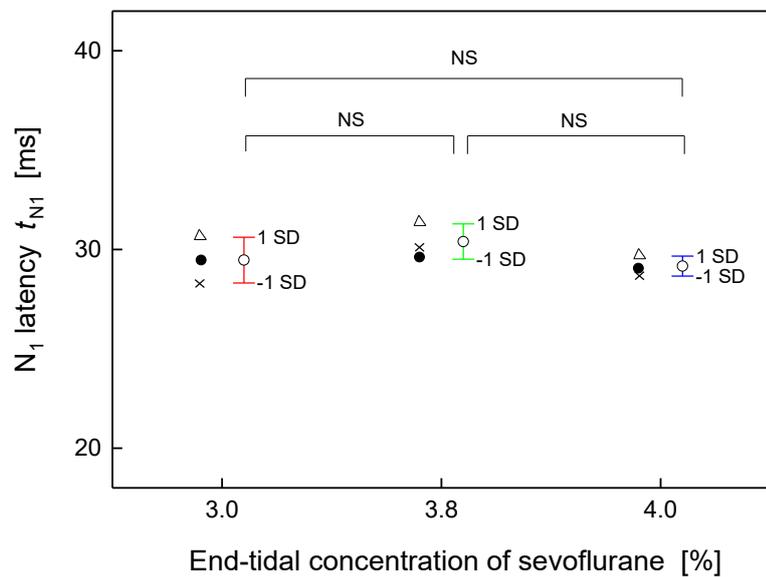
(a) イソフルラン

(b) セボフルラン

図 4.7 異なる麻酔濃度における VEP 波形の比較 (rabbit A)
(文献 [94] より引用)

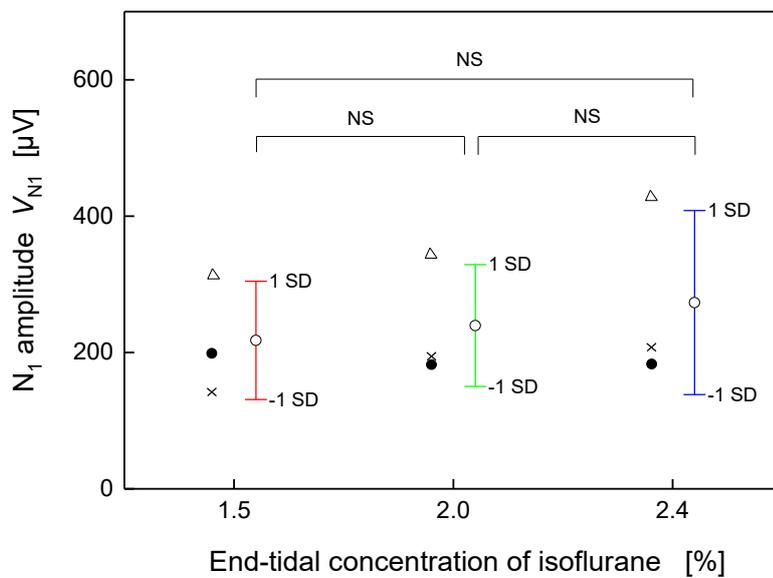


(a) イソフルラン麻酔下での N_1 潜時

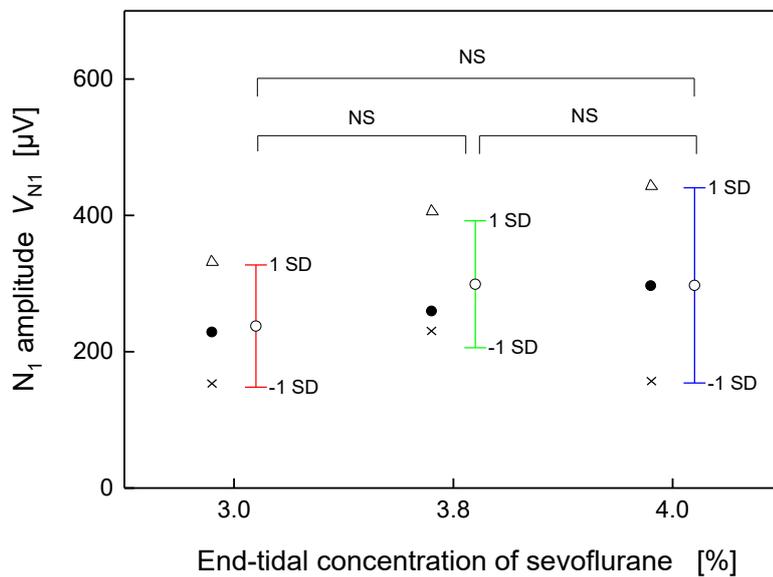


(b) セボフルラン麻酔下での N_1 潜時

図 4.8 異なる麻酔濃度における VEP の N_1 潜時・振幅の比較
(文献 [94] より引用) 次頁に続く



(c) イソフルラン麻酔下での N_1 振幅



(d) セボフルラン麻酔下での N_1 振幅

図 4.8 異なる麻酔濃度における VEP の N_1 潜時・振幅の比較
(文献 [94] より引用)

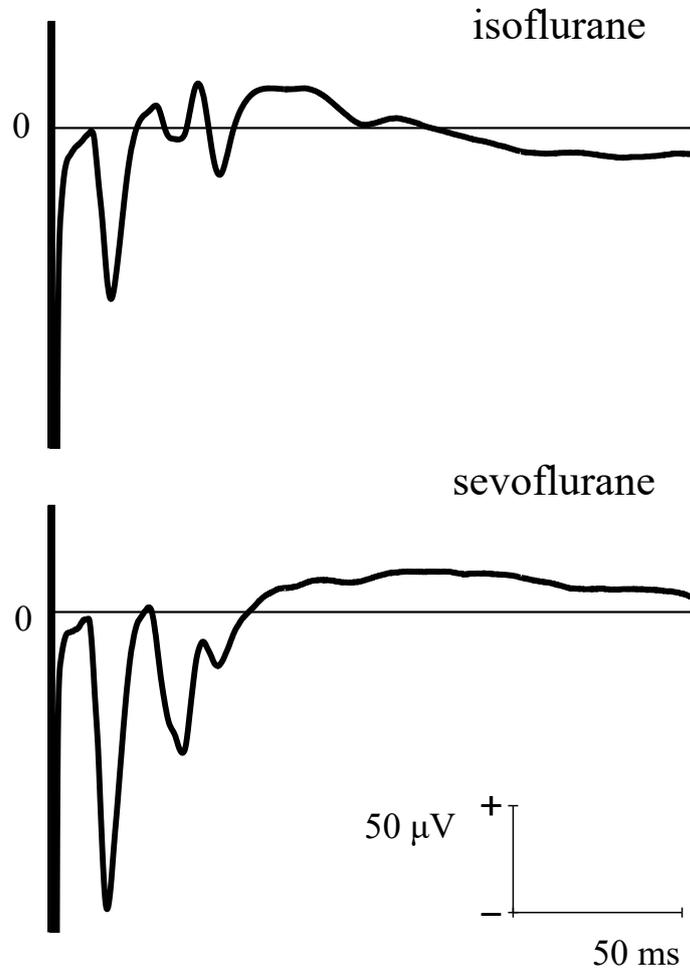


図 4.9 麻酔の違いによる EEP 波形の比較 (rabbit C)
 (文献 [94] より引用)

4.4 考察

イソフルラン、セボフルランの両麻酔において、いずれの麻酔濃度においても明瞭な N_1 が確認できた。 N_1 は大脳皮質の layer IVからの初期応答である [98]。 N_1 以降の波は layer IV以降の反応と考えられており、大脳皮質内の複雑な反応の結果であり、バリエーションが大きい [99]。個体差や麻酔条件等も影響すると考えられ、誘発電位を安全性評価に利用するには N_1 以降の波形は信頼性にかける。

VEP 測定を行うことにより、光信号が視細胞から、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞を経て大脳に伝達されることが評価できる。EEP 測定では、電気刺激が網膜神経節細胞から大脳に伝達されることが評価できる。VEP 計測に用いるフラッシュ光刺激は全視野刺激であるため、VEP 測定では刺激位置と記録位置の一対一の対応（レチノトピー）は大きな問題にならない。一方、EEP では網膜刺激位置と大脳皮質記録位置の一対一の対応があるために、刺激電極の位置のわずかなズレも EEP の振幅に影響すると考えられる。今回の実験では、セボフルラン麻酔下における EEP 記録の可否を調べるのが目的であったために、刺激電極は固定せずに糸による目印を刺激位置とした。EEP 測定において、予めつけた目印を刺激位置として電気刺激したが、両麻酔下での刺激位置は完全に一致しない。本実験におけるイソフルラン麻酔下、セボフルラン麻酔下での EEP の振幅の差は、刺激位置のズレが原因と考える。長期的に繰り返す EEP 測定をする場合は、刺激電極を埋植し刺激電極位置を固定した状態で長期計測する必要がある。

セボフルラン麻酔におけるラットの VEP 測定では、麻酔深度の上昇とともに潜時が延長することが報告されているが [100]、本研究では、イソフルラン、セボフルラン両麻酔下での N_1 潜時や N_1 振幅は異なる麻酔濃度間でも有意差は見られなかった。大脳への麻酔効果が動物種により異なる可能性が考えられる。

1 MAC の同一麻酔濃度において、 N_1 潜時はセボフルラン、イソフルランの間で有意差はなく、 N_1 振幅は、セボフルラン麻酔下の VEP のほうが有意に大きかった。イソフルランとセボフルランの神経系に与える効果（作用機序）が、麻酔薬により異なることが要因として考えられる。吸入麻酔薬の作用機序は中脳網様体や大脳皮質などの上行性網様体賦活系の抑制が考えられているが詳細は明らかになっていない。 N_1 振幅がイソフルラン麻酔下とセボフルラン麻酔下において異なることから、同一の長期試験内では、同一の麻酔薬を用いる必要がある。

イソフルランは特有の臭い、刺激性がある。一方、セボフルランは強烈な臭いがなく刺激性もない [91]。そのため、麻酔導入においても、セボフルラン麻酔はイソフルラン麻酔より家兎の苦痛を軽減することができる。

動物実験における深麻酔は、通常 1.2~1.5 MAC で管理される。セボフルラン麻酔では 1.05 MAC を超えると呼吸数低下が見られるが、イソフルラン麻酔では 1.2 MAC でも呼吸数低下は見られない。最小肺胞内濃度 1 MAC は 1 気圧下における、半数の動物を不動化させるのに必要な肺胞内における吸入麻酔薬濃度である。MAC 値は視覚神経系や大脳一次視覚野への麻酔の効果を表す指標ではなく、1 MAC 以外の濃度は 1 MAC のガス濃度を基準にした一次関数で決められるため、1 MAC 以外の麻酔効果は麻酔薬によって異なる。

家兎を用いた視覚誘発反応による人工視覚システムの安全評価において、セボフルラン麻酔はイソフルラン麻酔の代替と成り得ることが確認できた。セボフルランの繰り返し麻酔による死亡例は報告されておらず [101, 102]、セボフルランは人工視覚システム安全性評価における繰り返し麻酔でも安全に使用できる。

セボフルラン麻酔を用いて長期の動物実験を行うことで、麻酔の副作用による動物の死亡や試験の中断を防ぐことができ、実験動物数も最小限に留めることができる。

また、VEP 測定は眼科治療薬開発での非臨床試験でも行われており、セボフルランを用いた安全な VEP や EEP などの視覚誘発反応試験は人工視覚システム安全性評価のみならず、眼科系薬剤の開発などにも役立つと考える。

4.5 まとめ

本研究では、家兎を用いた視覚誘発反応による人工視覚システムの安全評価において、セボフルラン麻酔がイソフルラン麻酔の代替となるか、セボフルラン・イソフルラン麻酔下の VEP を比較することにより検証した。セボフルラン麻酔下においても明瞭な VEP が観察でき、 N_1 潜時は両麻酔間で有意差はなく、 N_1 振幅はセボフルラン麻酔下のほうがイソフルラン麻酔下よりも有意に大きかった。

人工視覚システムの安全性評価において誘発電位の長期記録を行う際、セボフルランはイソフルランの代替に成り得るが、誘発電位の振幅の大きさはイソフルラン・セボフルランで異なるため、同一の安全評価試験内では、同じ麻酔薬を用いる必要がある。

誘発電位の長期記録において、セボフルラン吸入麻酔を使用することにより安全な繰り返し麻酔が行える。開発した記録電極とセボフルラン麻酔を用いることにより、外的因子の影響を受けないロバストな誘発電位による安全性評価系が確立できた。

セボフルラン麻酔を用いて長期の動物実験を行うことで、麻酔の副作用による動物の死亡や試験の中断を防ぐことができる。VEP 測定は眼科治療薬での非臨床試験でも行われており、セボフルランを用いた安全な VEP や EEP などの視覚誘発反応試験は人工視覚システム安全性評価のみならず、眼科系薬剤の開発などにも役立つと考える。

第 5 章

刺激電極の慢性通電下における 電気化学的特性解析

5.1 緒言

新規医療機器の開発には非臨床試験が必須である。非臨床試験には *in vivo* 評価、*in vitro* 評価がある。*in vivo* 評価（動物実験）には、経済的・時間的なコストがかかる。また動物実験は、動物愛護の倫理問題がある。これら倫理およびコストに関する問題は、動物実験全般における課題である。

現在、加齢黄斑変性や網膜色素変性の失明患者を対象とした人工視覚システムの開発を行っている。人工視覚システムは、残存する視覚神経経路を電気刺激し、視覚の再生を行う装置である [11]。人工視覚システムの開発においても、非臨床試験が必要である。刺激電流を通電した際、電極電位が水の電位窓を超えると電気分解を生じる。電気分解は、局所的な pH 変化や塩素ガス発生による化学熱傷といった生体組織への傷害だけでなく、電極自体の溶出といった耐久性に関する問題も生じさせる [39]。そのため、人工視覚システムの開発には、*in vivo*

や *in vitro* での電流刺激に対する安全性の確認が必要である。米国 FDA のガイドラインでは実験動物を用いた安全性、耐久性評価において、24 時間の短期埋植試験については実際に電気刺激を加えた評価が必要としているが、実験系の構築の難しさから中長期試験での通電は必須でないとしている [37]。しかしながら、通電を行いながらの中長期埋植試験はより厳密な安全性・耐久性の確認に寄与する。

人工視覚システムの安全性評価において、刺激電流による刺激電極界面の電気化学的特性の理解は、電気刺激の生体への影響の理解および電極耐久性の評価に役立つ。電極の界面の電気化学的特性を評価する方法として、EIS などが挙げられる [59]。*in vivo, in vitro* での刺激電極の電気化学的特性を理解し、動物実験による安全性評価と対比させることにより、動物実験を用いない人工視覚システムの安全性指標の確立が期待できる。

本研究では、家兔に人工視覚システム用に開発した刺激電極を埋植し慢性的な刺激電流の通電が電極界面に与える影響について電気化学的な検討を行う。

5.2 方法

5.2.1 刺激電極アレイおよび電極の埋植

刺激電極アレイ

開発中の人工視覚システムの刺激電極アレイは白金製の弾丸形状刺激電極が厚さ $30\ \mu\text{m}$ のポリレン基板上に 49 極配置され、白金イリジウム製の導線によりマルチプレクサに接続される [103]。白金製の刺激電極の直径は $0.5\ \text{mm}$ 、高さは $0.3\ \text{mm}$ である。試験用に製作した刺激電極アレイは実際に使用される 2 個の白金電極の周りにポリレンで作成されたダミー電極で囲まれた構造をし (図 5.1)、2 極のうちの 1 極に刺激電流パルスを通電し (Active 電極)、もう一方は通電は行わず EIS 測定のみを使用した (Inactive 電極)。

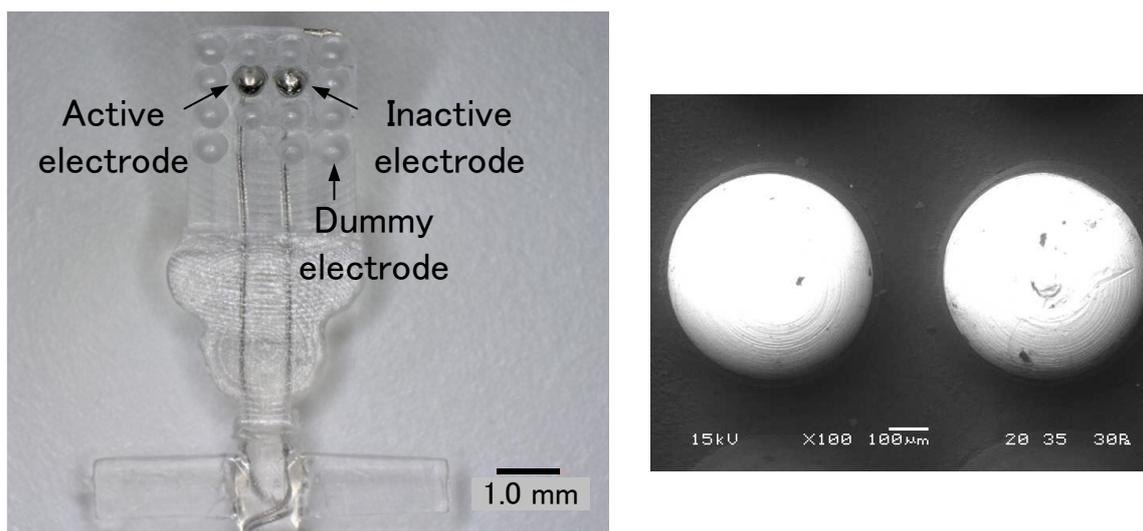


図 5.1 刺激電極の構造 (左 : 刺激電極アレイ、右 : 白金製弾丸刺激電極)
(文献 [104] より引用)

対向電極

EIS 測定の対象電極は直径 0.4 mm の白金線 100 mm をコイル状に巻いたものを使用した (図 5.2)。



図 5.2 EIS 測定用の対向電極

電極埋植

刺激電極埋植手術 (左眼) は、吸引麻酔による全身麻酔下で実施した。下方の結膜を輪部切開し、下直筋を筋付着部より切断した。さらに後極部の牽引筋を切除して後極部強膜を露出した。角膜輪部より 9~11 mm 付近から 5×5 mm の強膜ポケットを作成し、刺激電極を挿入した。次に上鼻側の結膜を輪部切開し、網様体扁平部付近の強膜を露出して、25 G 針で強膜に穴をあけた。その穴に直径 0.5 mm、長さ 3 mm の白金棒からなる硝子体電極を挿入し、電極基板を強膜に縫着した。刺激電極および硝子体電極のリード線は眼球赤道部に沿って縫着し、外眼角付近より眼窩外へとリード線を通した。リード線は側頭部の皮下を經由し頭頂部まで配線した。刺激電極アレイの埋植位置を図 5.3 に示す。

電極インピーダンス測定時に使用する対向電極は右側の側頭部皮下に埋植した。

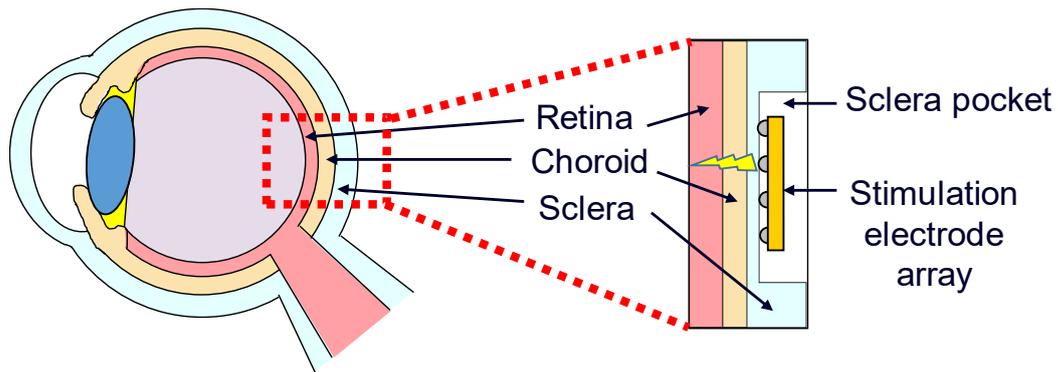


図 5.3 刺激電極の埋植位置
(文献 [104] より引用)

全ての動物実験はニデック社の施設で行い、ニデック社の動物実験委員会の承認を受けて行った。動物実験の全てのプロセスは、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) の定める statement for the use of animals in ophthalmic and vision research, and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals を遵守して行った。

5.2.2 電気刺激

電極埋植術後 2 週間の回復期間の後、埋植された刺激電極は外部の刺激電極装置と接続された。慢性通電評価システムを図 5.4 に示す。家兎のゲージの天井にはスリップリングを設置しており、家兎が回転等の運動をしても刺激電極と刺激装置の接続が保たれる構造になっている。刺激条件を表 5.1 に示す。

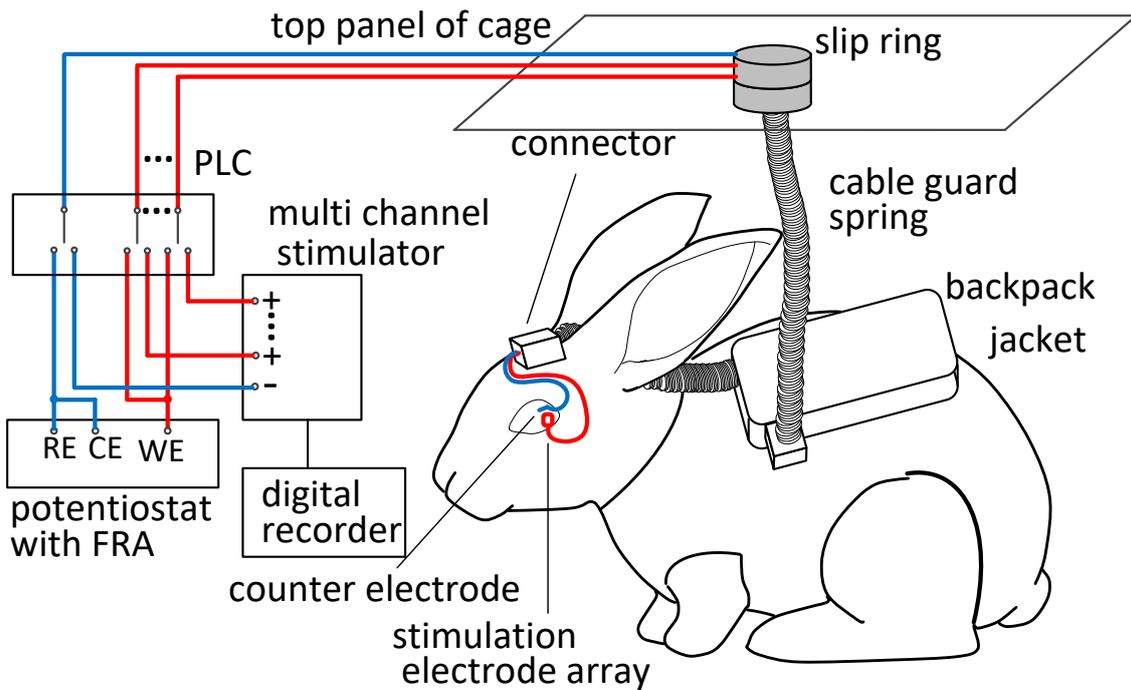


図 5.4 慢性通電評価システム
(文献 [105] より引用)

表 5.1 電気刺激条件 (文献 [104] より引用)

電気刺激条件	刺激方式	cathodic first biphasic
	電流	1500 μ A
	デュレーション	0.5 ms
	インターパルス	0.05 ms
	繰り返し周波数	50 Hz
	刺激時間	8 時間/日
	通電期間	1 ヶ月

5.2.3 EIS 測定

電極反応の非定常測定では、電極に電位信号を印加し定常からずらし、その緩和過程における応答を解析することで素過程に関する情報を得ることができる。正弦波入力と応答を比べることで電極反応の伝導関数を求める方法を電気化学的インピーダンス分光法 (EIS) という。EIS 法は電極インピーダンスのスペクトル解析から電極と溶液界面の間の電気化学的な挙動を知る方法である。その周波数応答は、コールーコールプロットあるいはボードプロットで表現される [61]。コールーコールプロットは周波数の変化に伴う複素インピーダンススペクトルの軌跡を複素面上に描写したものであり、全体の形が直感的に分かりやすい。ボードプロットは各周波数におけるインピーダンスと位相を周波数の対数に対して描いたものであり、インピーダンスの周波数依存性を説明するのに役立つ [62]。

EIS の計測系を図 5.5 に示す。周波数特性解析装置 (FRA) 付きのポテンシostat (Autolab PGSTAT12, Metrohm) を用い、2 電極法で電極インピーダンスを計測した。作用極端子を刺激電極に、対極端子を対向電極に接続し、作用極と対極間のインピーダンスを計測した。印加電圧は $20 \text{ mV}_{\text{rms}}$ 一定とし、掃引周波数範囲は $10 \text{ Hz} \sim 10 \text{ kHz}$ で行った。10 Hz, 100 Hz, 1 kHz, 10 kHz におけるインピーダンスの経時変化を記録した。無通電期間および通電期間におけるインピーダンスが Active 電極/Inactive 電極間で有意に異なるかを、対応のある t 検定を用いて統計解析を行った。有意水準は 0.05 とした。

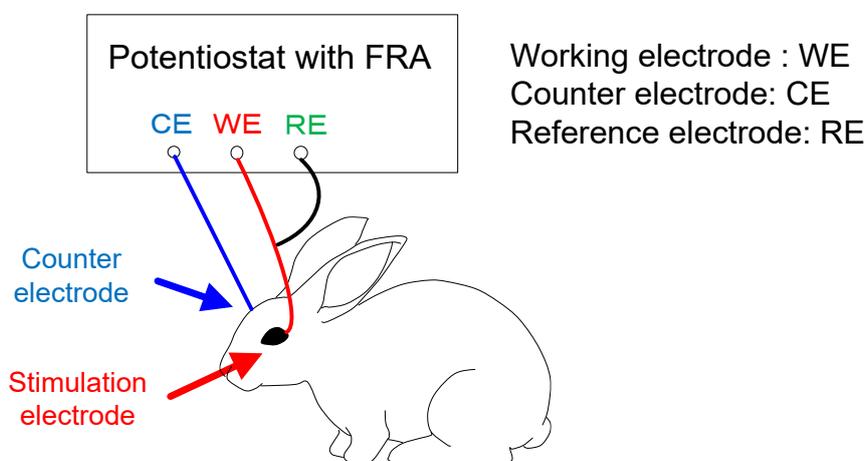


図 5.5 EIS 計測系

5.2.4 等価回路解析

等価回路とは電気化学反応系を電気回路に置き換えて表したモデルである。等価回路解析によって電極界面の電気化学的特性を理解することができる。そのため、等価回路解析は EIS の解釈に役立つ。電気化学反応は、電極/溶液界面での電荷移動過程と溶液内の物質移動過程（拡散）からなる。一般に物質移動速度は電荷移動速度と比較して遅く、インピーダンススペクトルでは、高周波域で電荷移動抵抗と電気二重層容量に起因する特性が、低周波域で拡散に起因する特性が現れる [72]。電極界面特性の等価回路解析において、複雑な拡散項や表面状態を模擬したいくつかの回路が提案されている [73]。複雑な等価回路を用いれば、どんなに複雑なインピーダンス特性にも数学的には合致するが、電気化学的な挙動と各素子の持つ物理的、化学的意味合いの理解は難しくなる。

生体に埋植された電極と生体組織の異相界面を模擬した図を図 5.6 (a), (b) に示す。電極界面の等価回路は、図 5.6 (c) に示す Randles の等価回路が良く用いられる。

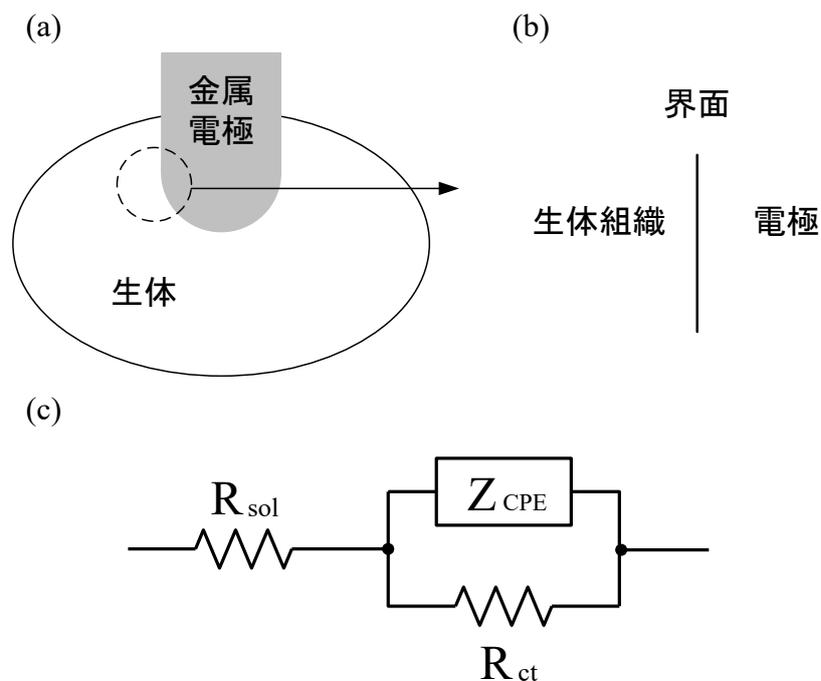


図 5.6 金属電極界面と等価回路の関係

(a) 生体埋植の金属電極 (b) 電極/生体組織界面 (c) Randles の等価回路

異相界面には、各相の内部電位の差から界面電位差が生じる。界面には電気二重層が存在するため大きな電気容量を持つ [48]。この界面電気容量を電気二重層容量という。図 5.6(c) に示す Randles の等価回路では、一定位相要素 (CPE) により、界面の電気二重層容量を近似している。CPE は非線形要素であり、この非線形性は表面荒さや陽イオン (タンパク質) の吸着などに起因する [76]。CPE のインピーダンス (Z_{CPE}) は、式 (5.1) で表される。 n は非線形性を表す指数で、 $n=1$ のとき完全なキャパシタ、 $n=0$ のとき完全な抵抗と等価である [59]。 ω は角周波数で、 Y は $\omega = 1 \text{ rad/s}$ のときのアドミタンスである。

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Y(j\omega)^n} \quad (5.1)$$

EIS 測定で電極に微弱電位を印加した際、電極・生体界面において、電極電位に依存して電気二重層容量に界面電位差が生じ、それが電荷移動の駆動力となる [48]。界面電位差と電流の比を電荷移動抵抗 (R_{ct}) といい、電極表面での電荷移動のしやすさを表す [59]。溶液抵抗 (R_{sol}) は、生体組織におけるバルク抵抗を表す [75]。

EIS の結果に対し、電気化学解析ソフトウェア (NOVA, Metrohm) を用い Randles の等価回路 [図 5.6(c)] による等価回路解析を行った。無通電期間および通電期間における等価回路パラメータ (R_{sol} , R_{ct} , CPE) が Active 電極/Inactive 電極間で有意に異なるかを、対応のある t 検定を用いて統計解析を行った。有意水準は 0.05 とした。

5.2.5 組織標本観察

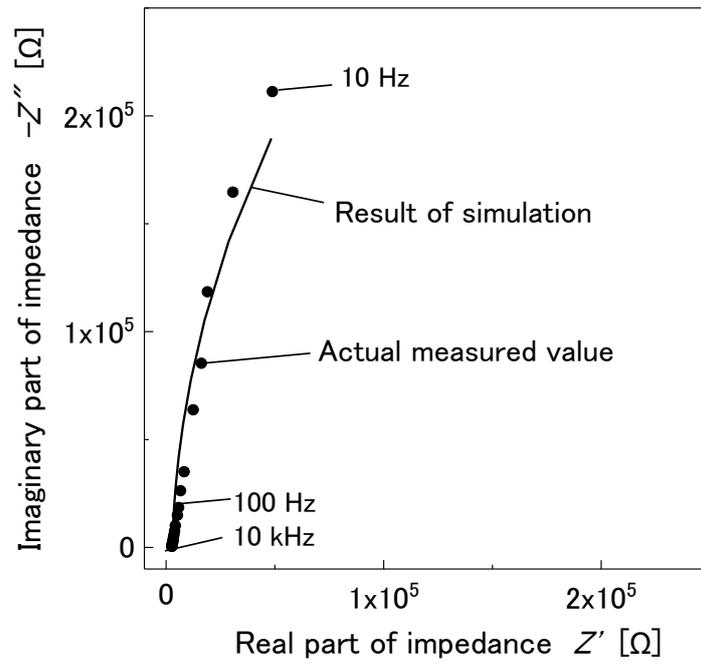
通電・埋植による電極近傍の強膜組織の変化を、組織標本を作製し観察した。1 ヶ月の電気刺激終了後に摘出した眼球をパラフィン包埋後に 50 μm 間隔で薄切し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。

5.3 結果

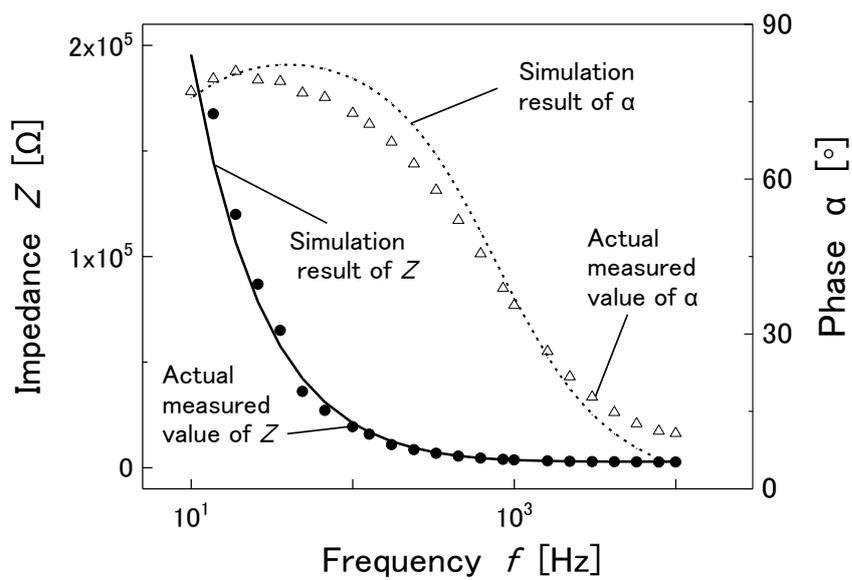
EIS 計測結果および等価回路シミュレーション結果を図 5.7 に示す。シミュレーション結果はよく実測値に一致していることがわかる。コラー-コラープロットにおいて、Active 電極では真円に近い円弧状の軌跡を示し、Inactive 電極では直線状の軌跡を示した。

周波数 10 Hz, 100 Hz, 1 kHz, 10 kHz におけるインピーダンスの経時変化を図 5.8 に、無通電期間・通電期間で通電の有無によるインピーダンスの差を統計解析した結果を表 5.2 に示す。無通電期間では、周波数 10 Hz, 100 Hz, 1 kHz, 10 kHz において、両電極に有意差はなかった。通電期間では、周波数 100 Hz, 1 kHz, 10 kHz において Active 電極のインピーダンスが Inactive 電極のインピーダンスに比べ、有意に低かった。10 Hz では両電極間に有意差は見られなかった。電極のインピーダンスは 10 Hz で $10^5 \Omega$ 程度、100 Hz で $10^4 \Omega$ 程度、1 kHz で $10^3 \Omega$ 程度、10 kHz で $10^3 \Omega$ 程度であった (図 5.8)。

R_{sol} , R_{ct} , $CPE(Y, n)$ の経時変化を図 5.9 に、無通電期間・通電期間で通電の有無による R_{sol} , R_{ct} , $CPE(Y, n)$ の差を統計解析した結果を表 5.3 に示す。無通電期間は両電極間に有意差はなかったが、通電期間は CPE の Y, n で両電極間に有意差が見られた。通電終了後の組織観察では、両電極ともに電極周辺に結合組織が見られた (図 5.10)。

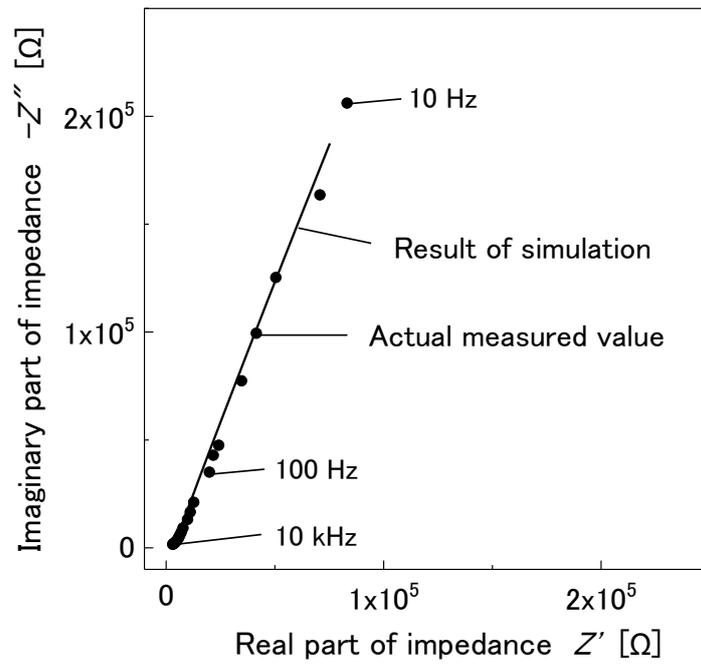


(a) Active 電極 (コールーコールプロット)

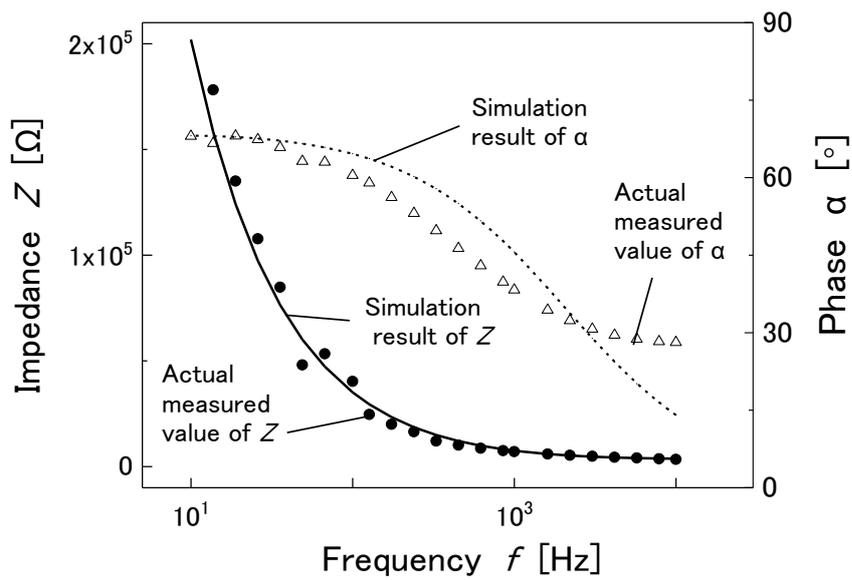


(b) Active 電極 (ボードプロット)

図 5.7 通電期間の電気化学インピーダンス測定結果 (文献 [104] より引用)
次頁に続く

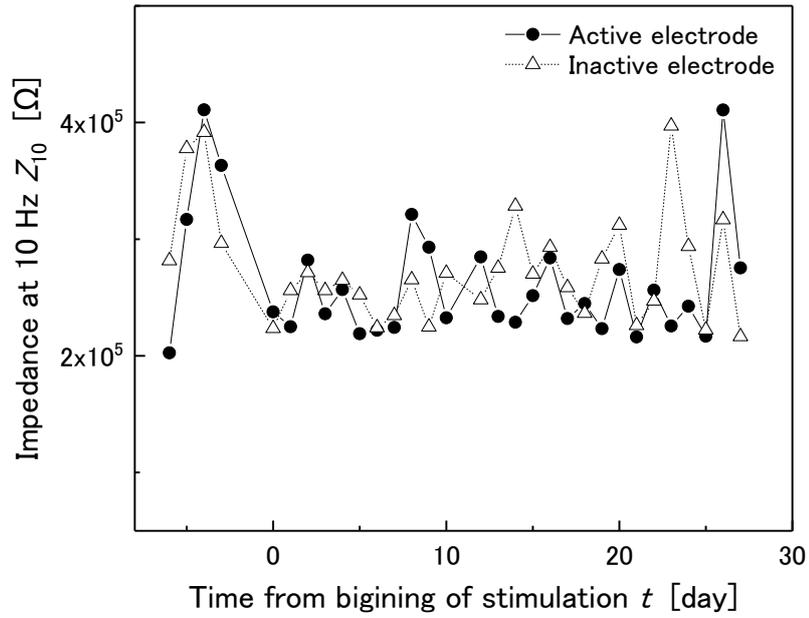


(c) Inactive 電極 (コールーコールプロット)

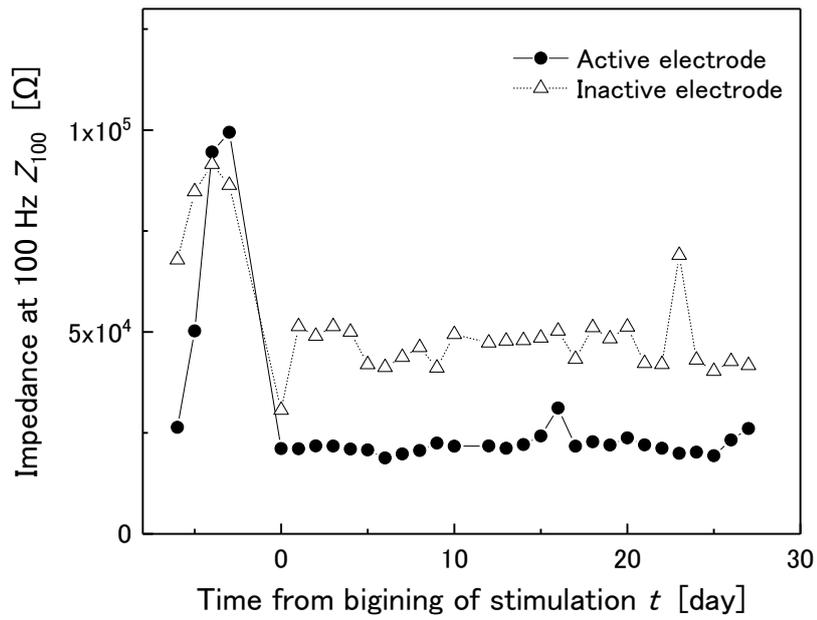


(d) Inactive 電極 (ボードプロット)

図 5.7 通電期間の電気化学インピーダンス測定結果 (文献 [104] より引用)

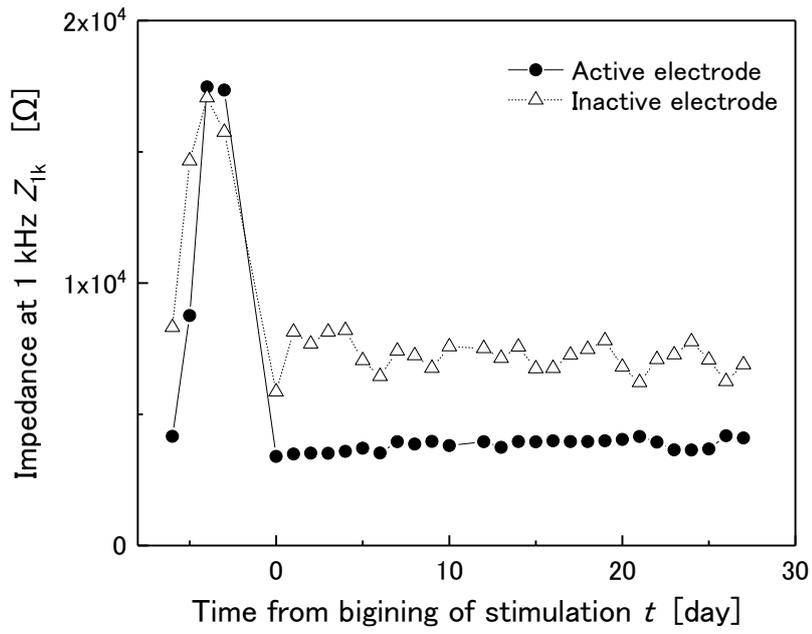


(a) 10 Hz

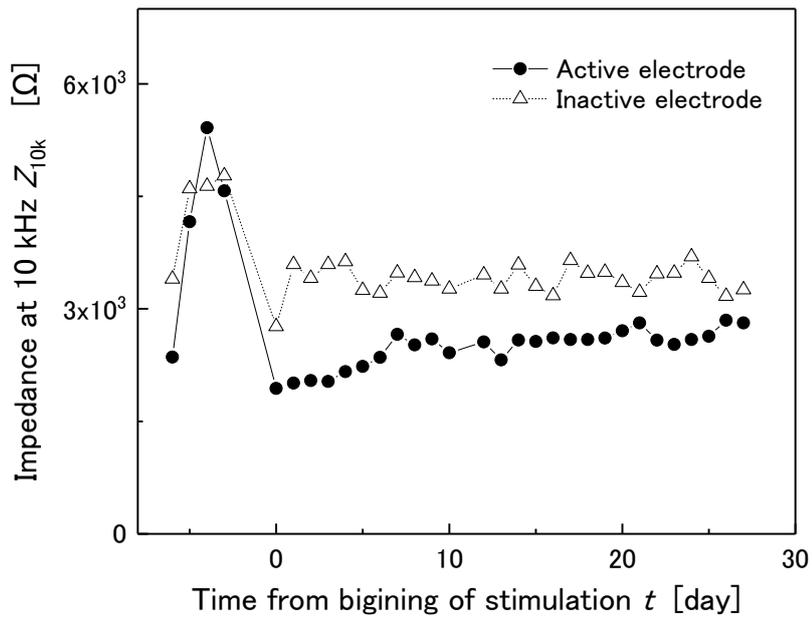


(b) 100 Hz

図 5.8 インピーダンスの経時変化
次頁に続く

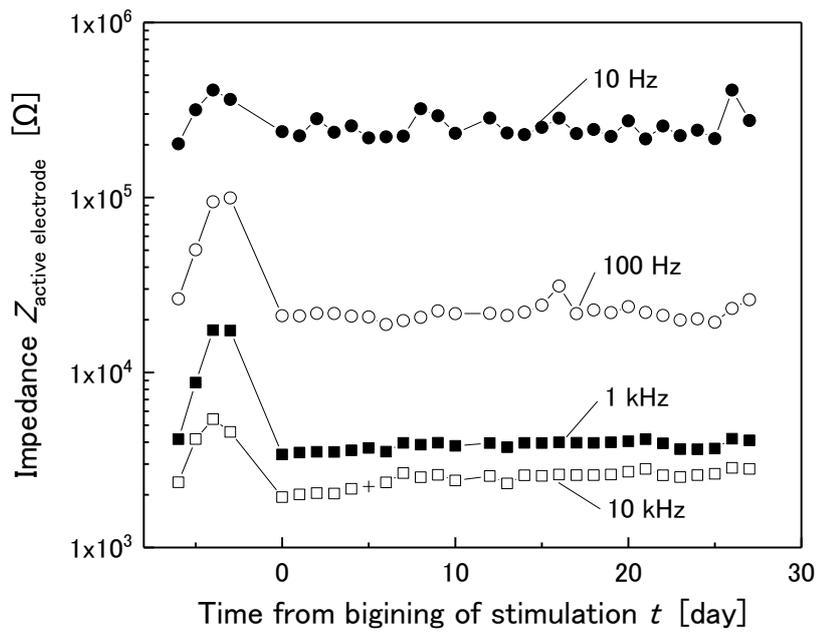


(c) 1 kHz

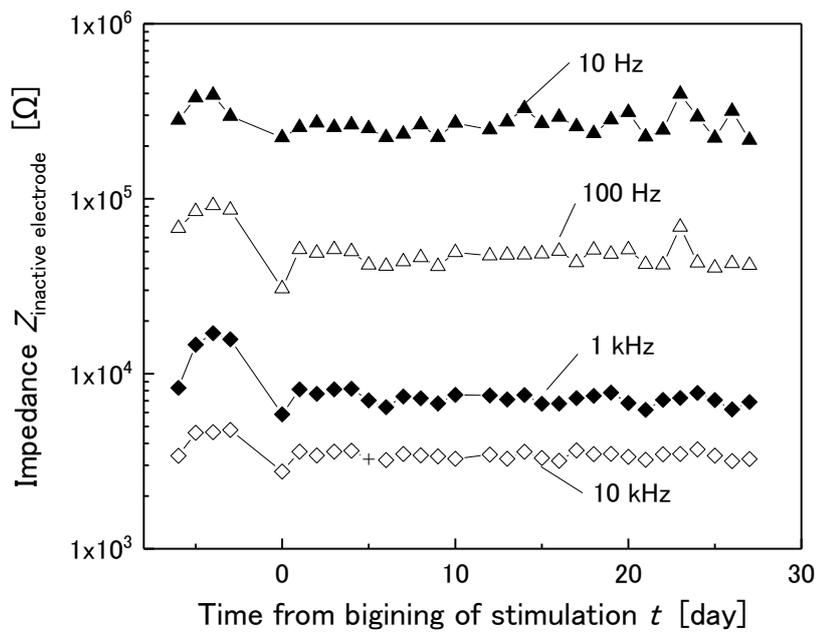


(d) 10 kHz

図 5.8 インピーダンスの経時変化
次頁に続く



(e) Active electrode



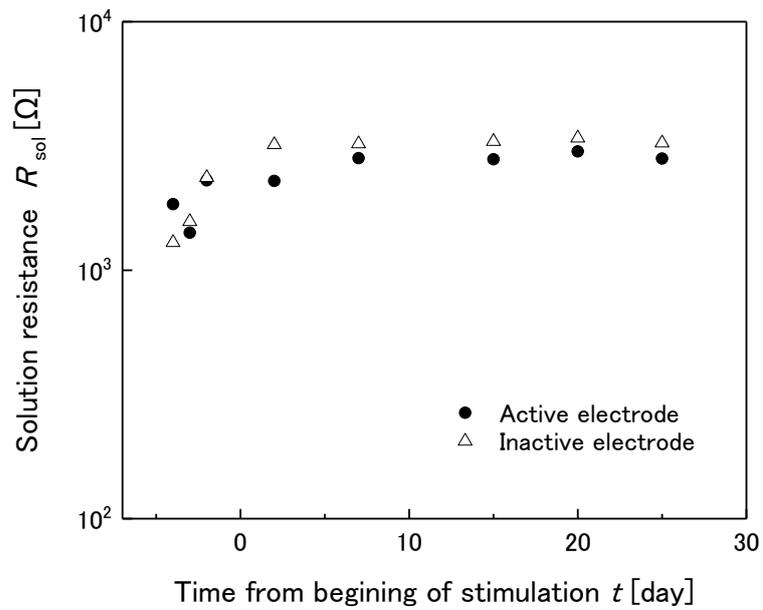
(f) Inactive electrode

図 5.8 インピーダンスの経時変化

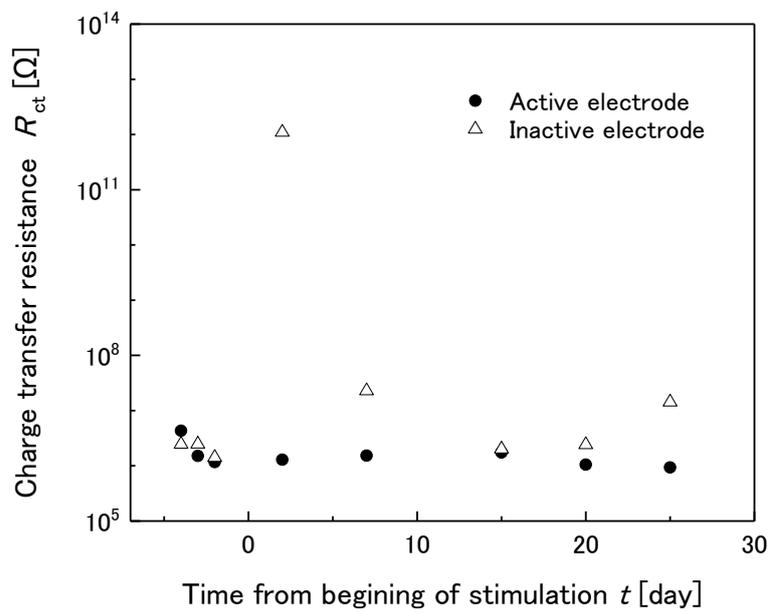
表 5.2 通電の有無に対するインピーダンスの対応のある t 検定の結果

Frequency	Before stimulation (Active/Inactive)		During stimulation (Active/Inactive)	
	t value	p value	t value	p value
10 Hz	0.394	0.720 ^{NS}	1.165	0.254 ^{NS}
100 Hz	1.105	0.346 ^{NS}	18.68	< 0.0001 ^{**}
1 kHz	1.121	0.344 ^{NS}	24.98	< 0.0001 ^{**}
10 kHz	0.598	0.592 ^{NS}	15.01	< 0.0001 ^{**}

** = highly significant ($p < 0.01$), NS = not significant ($p > 0.05$, paired t -test)

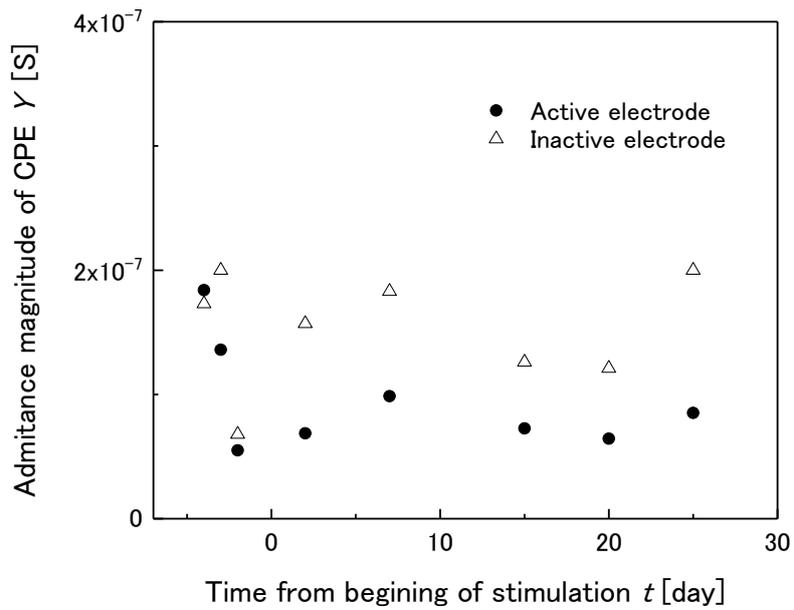


(a) 溶液抵抗

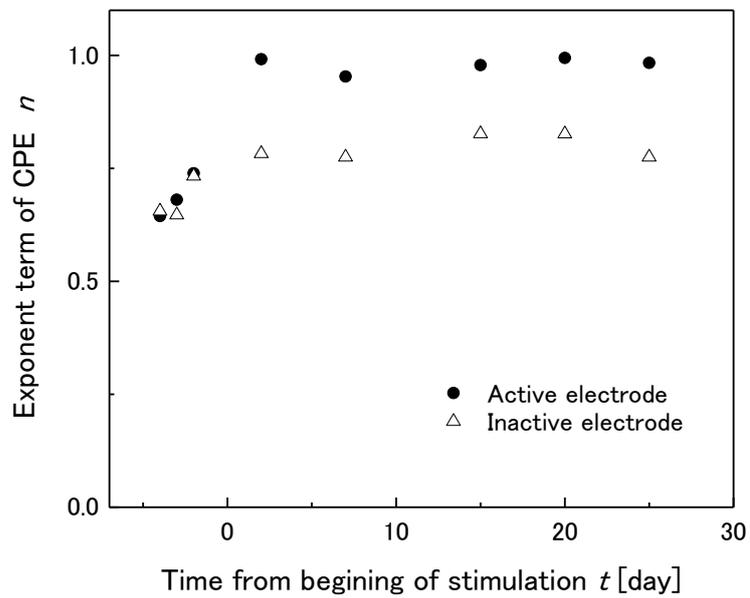


(b) 電荷移動抵抗

図 5.9 通電期間の等価回路要素の経時変化 (文献 [104] より引用)
次頁に続く



(c) 一定位相要素のアドミタンス



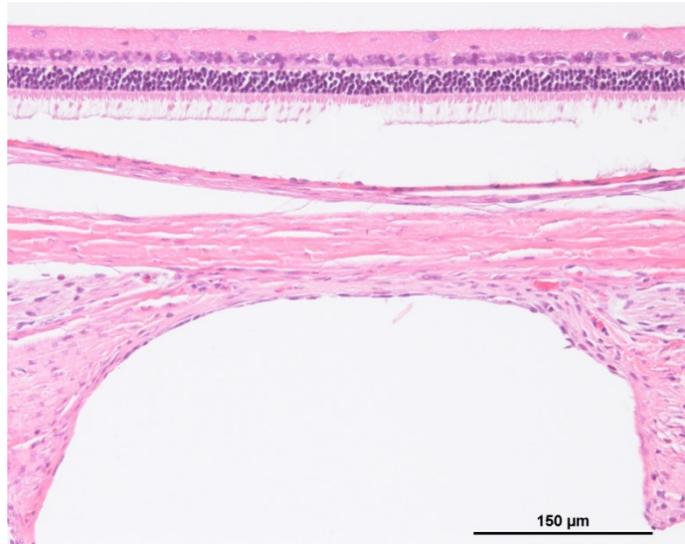
(d) 一定位相要素のべき乗数

図 5.9 通電期間の等価回路要素の経時変化 (文献 [104] より引用)

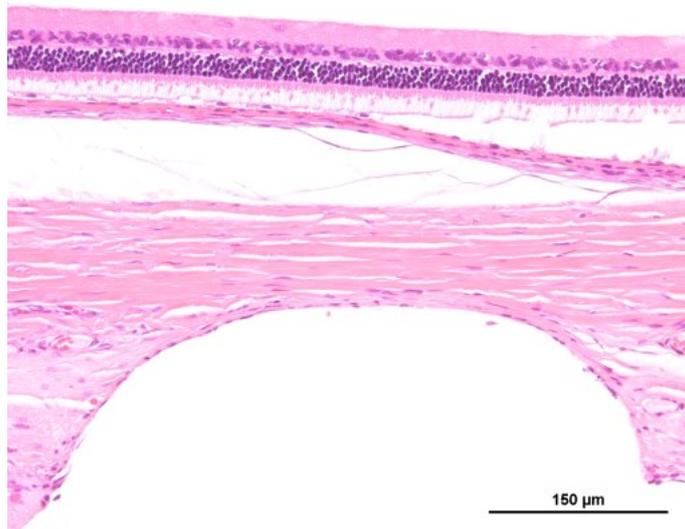
表 5.3 通電の有無に対する等価回路要素の対応のある t 検定の結果
(文献[104]より引用)

	Before stimulation (Active/Inactive)		During stimulation (Active/Inactive)	
	t value	p value	t value	p value
R_{sol}	0.551	0.660 ^{NS}	0.792	0.463 ^{NS}
R_{ct}	0.256	0.822 ^{NS}	1.000	0.363 ^{NS}
Y of CPE	0.993	0.425 ^{NS}	7.05	0.0009 ^{**}
n of CPE	0.739	0.537 ^{NS}	19.7	< 0.0001 ^{**}

** = highly significant ($p < 0.01$), NS = not significant ($p > 0.05$, paired t -test)



(a) Active 電極



(b) Inactive 電極

図 5.10 電極埋植周辺組織の組織標本の比較
(文献 [104] より引用)

5.4 考察

生体内に埋植された刺激電極は、人体にとって異物である。電極埋植に伴い、刺激電極の周辺では異物反応が起こる [53]。埋植された電極が血液と接触すると、電極表面上に血小板系・凝固系・補体系によって急性反応である血液凝固反応が生じる [56]。創傷部位（刺激電極周囲）からヒスタミンやアナフィラトキシンなどの化学伝達物質が放出され、白血球が創傷部に集結し、亜急性反応である炎症反応が開始される。マクロファージや単球は細胞の死滅片などを貪食する [106]。炎症反応が落ち着くと創傷の修復反応が始まり、未分化の間葉細胞が血管の新生と同時に線維芽細胞に分化していく [56]。線維芽細胞はコラーゲンや糖蛋白質などを産生する。細胞外へ分泌されたコラーゲンと糖蛋白質等が結合して線維を形成し肉芽組織となる。コラーゲン線維による架橋によって創傷部の強度が増大していく。数週後に蛋白質の産生は活発になる。また、電極表面への細胞の接着は、細胞外マトリックスが重要な役割を果たす。電極表面に細胞外マトリックスが吸着し、細胞膜に存在する蛋白質であるインテグリンが結合して接着斑を形成し、細胞骨格に連結する [56]。このように刺激電極埋植数週間間に様々な反応が起こる。電極埋植部位周辺には線維芽細胞が集まり、刺激電極には線維芽細胞が産生した蛋白質が吸着する。また、蛋白質は荷電体であるため吸着の際の分子構造の変化は金属材料表面の静電引力に依存する。吸着の静電引力の強さは、金属の比誘電率によって決まる。本実験では、刺激電極埋植 2 週間後から電気刺激を開始した。よって電気刺激を開始した時点で、刺激電極には蛋白質が吸着していたと考えられる。また、刺激電極を埋植した強膜は主にコラーゲン線維と弾性線維で構成されるために、刺激電極はより蛋白質が吸着しやすいと考える。

周波数 10 Hz, 100 Hz, 1 kHz, 10 kHz におけるインピーダンスは無通電期間では、両電極に有意差はなかった。これは Active 電極と Inactive 電極の界面特性に違いがないことを示す。通電期間では、100 Hz, 1 kHz, 10 kHz において Active 電極のインピーダンスが Inactive 電極のインピーダンスに比べ、有意に低かった。通電によるインピーダンスの低下は人工内耳の研究でも報告がある [107]。電気刺激開始日 (day 0) では、Inactive 電極も一過性にインピーダンスが低下したが、その原因は不明である。

電気刺激を行う前は、 R_{sol} , R_{ct} , CPE の Y_n は Active 電極、Inactive 電極間に有意差は見られず、試験に使用した電極の特性は両条件間で違いはなかった。電気刺激を行うと、CPE のアドミタンス Y は Inactive 電極で有意に大きく [図 5.9

(c)、 n の値は有意に小さかった [図 5.9 (d)]。これらの結果より、通電していない電極では、コラーゲンなどの蛋白質が電極表面に吸着しているが [108]、刺激電流の通電により吸着タンパクが脱離すると考えられる。

電極埋植後 3 週間程まで R_{sol} の経時的に上昇し (Active 電極: 1840~2300 Ω , Inactive 電極: 1230~3000 Ω)、その後はほぼ一定であった (Active 電極: 約 2800 Ω , Inactive 電極: 約 3000 Ω) [図 5.9 (a)]。通電終了後の組織観察では、両電極ともに線維芽細胞等で形成される結合組織が電極周辺に見られ (図 5.10)、 R_{sol} の上昇は電極の被包化によるものと考えられる [59]。

人工視覚システムの刺激電極はフェムト秒レーザー加工の多孔の刺激電極も開発されている [109]。フェムト秒レーザー加工の多孔刺激電極も表面円滑な刺激電極同様に生体にとって異物のため、埋植により、表面への蛋白質の付着が生じる。孔の大きさは直径約 10 μm 、深さ 100 μm であり [109]、蛋白質に比べ明らかに大きいため、孔内部にも蛋白質の吸着がおこると考える。どちらの刺激電極も材質は白金であるため、表面への蛋白質の吸着度合いは同じであるが、孔内部の面積も含めた電極の表面積は、フェムト秒レーザー加工の多孔刺激電極の方が広いため、蛋白質の吸着量も多いと推測する。フェムト秒レーザー加工の多孔刺激電極は孔径が大きいため、蛋白質のみならず結合組織や細胞自体も孔内部に入り込む。これらはフェムト秒レーザー加工の多孔刺激電極界面の電気化学的特性へ影響を及ぼすと考えられる。

本実験で、*in vivo* における慢性通電下の電極界面の電気化学的特性変化を知ることができた。今後、*in vivo* における EIS、組織観察、電荷注入能力、生理学的な評価などと *in vitro* における EIS、組織観察、電荷注入能力の評価などを対比することにより、動物実験を介さない安全性評価指標の確立ができれば、刺激電極の開発の際に動物実験を減らすことができる。これらは、人工視覚システムの開発だけでなく、刺激電極を用いた神経インターフェース開発全般において大いに役立つと考える。

5.5 まとめ

本研究では、白金製の弾丸形状刺激電極の慢性的な刺激電流の通電による電極界面の電気化学的特性への影響について検討した。通電・無通電の刺激電極に対し、インピーダンスの経時変化を記録し、EISの結果をRandlesの等価回路にて解析した。

刺激電極は生体にとって異物である。刺激電極を生体に埋植することで刺激電極周辺には異物反応が生じ、埋植後数週間で刺激電極は線維芽細胞に包まれる。刺激電極表面には線維芽細胞により産生されるコラーゲン等の蛋白質が吸着する。

EISの結果より、通電中、100 Hz, 1 kHz, 10 kHzにおけるインピーダンスはActive電極の方がInactive電極に比べ、有意に低かった。CPEにおいて、通電中、Active, Inactive電極間に有意差が見られたことから、刺激電流によって電極表面に吸着した蛋白質が脱離すると考えられる。さらに長期の刺激電流の通電による刺激電極特性や界面性状の変化の把握に、電極の電気化学特性評価が有用であることが確認できた。

今後、*in vivo*におけるEIS、組織観察、電荷注入能力、生理学的な評価などと*in vitro*におけるEIS、組織観察、電荷注入能力の評価などを対比することにより、動物実験を介さない安全性評価指標ができれば、刺激電極を用いた神経インターフェース開発全般に役立つと考えられる。

第 6 章

結論

6.1 本研究の成果

新規医療機器開発には動物実験が必須である。しかしながら、動物実験には経済的、倫理的な課題がある。そのため、最小限の動物実験数でより多くの知見や成果が得られることが望まれる。本研究では、長期の動物実験をより安全・確実に行うための方法を検討し、加えて動物実験を介さない評価法の検討を行った。

人工視覚システムの実用化においては、電気刺激によるフォスフェンが長期間に渡り安全に得られるかの確認が必要である。動物実験においては、電気刺激により光覚が得られるているかの確認は、EEP により評価できる。EEP により、視覚伝導路や大脳皮質などの障害といった電気刺激による生体への影響を評価でき、人工視覚システムの安全性が検証できる。しかしながら、埋植電極による大脳誘発電位は、麻酔法や記録電極といった外的因子による影響を受ける。そのため、長期間の安全性を EEP 測定にて評価する場合、電気刺激による生体への影響を検討するには外的要因による影響を受けないロバストな記録系の確立が必要となる。

本研究では、人工視覚システムの安全性評価のための視覚誘発電位測定におけるロバストな記録系の確立を目的とし、記録電極の開発および麻酔法の検討を行った。

動物を用いた大脳誘発電位計測では、記録電極として金属ネジ電極が一般的に用いられる [40]。しかしながら、鋭利な電極先端が脳組織の損傷をきたし、長期間の誘発電位記録は困難である [41–44]。長期間の誘発電位記録のための埋植電極には、脳組織に機械的負荷を与えないことが求められる。そこで、表面が円滑で周辺組織を傷つけにくい白金球の電極を開発した。開発した記録電極を用い、長期間の VEP の記録を行った結果、 N_1 振幅が 48 週間に渡り一定の VEP 記録を実現し、48 週後の EEP 記録も可能であった。電極インピーダンスおよび、等価回路解析による電極界面特性も一定であり、電気化学的にも安定した特性が確認できた。大脳に埋植する記録電極は BMI や BCI の領域においても使用され [110–112]、本研究にて開発した記録電極は、人工視覚システムの安全性評価のみならず、BMI や BCI の領域にも応用できるものと考えられる。

実験動物の麻酔には、キシラジンやジエチルバルビタール酸などの注射麻酔が一般に用いられるが、麻酔深度の制御が難しいため、再現性の良い誘発電位を得ることができない [22, 23]。誘発電位の長期間記録による電気刺激の安全性評価には、麻酔深度の制御が容易な麻酔法が必要である。イソフルラン吸入麻酔は、麻酔濃度の調整が容易であり、再現性の良い誘発電位が取得できる [45]。しかしながらイソフルランは、悪性高熱や呼吸抑制といった副作用があり、繰り返し麻酔による死亡も報告されている [85, 86]。そのため、長期試験ではより安全な麻酔法が求められる。セボフルランはイソフルラン比べると、血液/ガスの分配係数も低く麻酔剤の移行が速く、麻酔の導入・覚醒も迅速に行うことができるより安全な麻酔薬である [88–90]。より安全なセボフルラン麻酔が人工視覚システムの視覚誘発電位による安全性評価においてイソフルラン麻酔の代替と成り得るか、両麻酔下での VEP を比較した。その結果、誘発電位の長期記録において、セボフルラン吸入麻酔の使用で安全に繰り返し麻酔が実施でき、セボフルランはイソフルランの代替に成り得ることが確認できた。誘発電位の振幅の大きさはイソフルラン麻酔下とセボフルラン麻酔下で異なるため、長期試験を行う際は、同一の試験期間中は同じ麻酔薬を用いる必要がある。開発した記録電極とセボフルラン麻酔を用いることにより、より安全かつ確実な人工視覚システムの長期安全性評価系を確立した。

家兎は眼球の大きさが人間と同程度のため、人工視覚システムの研究だけでなく、眼の研究や医薬品の開発にもよく用いられる [40]。VEP は視覚神経系から脳までの視覚伝導路の評価ができるため、神経保護薬などの眼用薬の評価（網膜神経節細胞や視神経の機能的評価） [40] や視覚情報を利用する BMI 領域の長

期間評価等においても用いられている [55, 112]。セボフルラン麻酔下の視覚誘発電位による評価は、人工視覚システムの安全性評価だけでなく、眼や BMI の研究開発においても役立つ。

本研究で開発検討したロバストな長期試験評価系を用いることで、BMI 研究での長期の動物実験評価をより有効的に行える。使用動物数も最小限にでき、倫理面、経済面も配慮した上で、多くの知見の取得・評価が可能である。

人工視覚システムの安全性評価では、電気刺激が刺激電極の性能や耐久性へ与える影響を把握することが最も重要である。本研究では、電気刺激が刺激電極界面特性へ及ぼす影響について電気化学的側面から検討した。1 ヶ月の慢性通電を行い、通電した電極と無通電の電極の電極界面の電気化学的特性を解析し、刺激電流によって電極界面の蛋白質が脱離することが確認できた [104]。このような刺激電極の *in vivo, in vitro* における慢性刺激下における電気化学的な電極特性と組織学的、生理学的評価などを対比させることにより、動物実験によらない安全性の指標の確立が期待できる。

6.2 今後の展望

開発した記録電極、および麻酔深度が安全に制御できるセボフルラン麻酔を用いることで、人工視覚システムの長期安全性評価のための視覚誘発電位記録系が確立できた [45, 77]。

現時点では、FDA や厚生労働省の指針において、誘発電位の長期測定評価系の構築の難しさから、誘発電位の長期記録は必須とされていない。開発した記録電極、安全なセボフルラン麻酔を用いれば、外的因子に影響を受けないロバストな長期の誘発電位測定も可能となる。長期の誘発電位の測定は、より厳密な安全性評価ができるため、可能ならば行うべきである。本研究にて開発した記録電極、安全なセボフルラン麻酔を組み合わせた誘発電位評価系は、人工視覚システムの安全性評価のみならず、眼科薬等の眼の研究、また BMI や BCI の領域にも応用できその波及効果は大きい。

刺激電極に関して、本研究では慢性通電した電極と無通電の電極での電極界面の電気化学的特性の比較を行った [104]。刺激電極の安全性を電気化学的な指標のみから判断できるようにするためには、さらに 6 ヶ月以上の刺激期間における生理学的評価および組織学的な評価と対比させる必要がある。また、電気化学的な指標としては電極インピーダンスの他、電荷注入能力やサイクリックボルタンメトリーなどの結果との対比も有用と考える。刺激電極の生体内での性能や安全性が *in vitro* での電気化学的な指標から予測できれば、人工視覚システムだけでなく神経インターフェースを使用する全ての機器の刺激電極開発に大きく寄与し、サイバネティクス技術を利用した医療機器開発が更に進むことが期待される。

現在開発を進めている人工視覚システムは、網膜刺激型が主流であり、加齢黄斑変性や網膜色素変性を対象疾患としている。加齢に伴う眼疾患は、米国では白内障、糖尿病性網膜症、緑内障、加齢黄斑変性の順であり、日本では緑内障、糖尿病性網膜症、網膜色素変性、加齢黄斑変性の順である。今後、患者数が多い緑内障や糖尿病性網膜症への適応を視野に入れた大脳刺激型の人工視覚システムの開発も進められると考える [28]。

電気刺激による人工視覚システムは、患者の QOL 向上に寄与するが、電極数の関係から、現在、解像度の面で健常者並みの視力は得られていない。そのため、刺激電極の高性能化や刺激電極の小型化などの研究が進められているが、電気刺激では電極の微細化において物理的限界がある。このような問題を解決するために今後は、遺伝子操作・化学物質導入による神経組織の光応答機能の付加

[113]、超音波刺激 [114]、化学刺激 [115]など、電気刺激によらないアプローチによる新たな人工視覚システムの研究も発展すると考える。これらの新しい刺激原理による人工視覚システムの開発を評価する際も *in vivo* 実験は欠かせない。*in vivo* 実験における各種刺激による神経応答の確認には誘発電位による評価が最も重要であり、今回開発した実験系が役立つと考える。

参考文献

- [1] M. A. Lebedev and M. A. L. Nicolelis, “Brain-machine interfaces: past, present and future,” *Trends in Neurosciences*, vol. 29, no. 9, pp. 536–546, 2006.
- [2] O. Macherey and R. P. Carlyon, “Cochlear implants,” *Current Biology*, vol. 24, no. 18, pp. R878–R884, 2014.
- [3] E. Zrenner, “Will Retinal Implants Restore Vision?,” *Science*, vol. 295, no. February, pp. 1022–1025, 2002.
- [4] R. R. A. Bourne, S. R. Flaxman, T. Braithwaite, M. V. Cicinelli, A. Das, J. B. Jonas, J. Keeffe, J. Kempen, J. Leasher, H. Limburg, K. Naidoo, K. Pesudovs, S. Resnikoff, A. Silvester, G. A. Stevens, N. Tahhan, T. Wong, and H. R. Taylor, “Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis,” *The Lancet Global Health*, vol. 5, no. 9, pp. e888–e897, 2017.
- [5] R. Wako, T. Yasukawa, A. Kato, T. Omori, S. Ishida, T. Ishibashi, and Y. Ogura, “Causes and prevalence of visual impairment in Japan,” *Nippon Ganka Gakkai zasshi*, vol. 118, no. 6, pp. 495–501, 2014.
- [6] 高橋寛二, 小椋祐一郎, 石橋達郎, 湯澤美都子, 史雄白神, “加齢黄斑変性の治療指針,” *日本眼科学会誌*, vol. 116, no. 12, pp. 1150–1155, 2012.
- [7] J. Ambati and B. Fowler, “Mechanisms of age-related macular degeneration,” *Neuron*, vol. 75, no. 1, pp. 26–39, 2012.
- [8] C. Hamel, “Retinitis pigmentosa,” *Orphanet Journal of Rare Diseases*, vol. 1, no. 1, pp. 1–12, 2006.

- [9] 齊藤正男, 生体工学, pp. 167–168, 東京: コロナ社, 1985.
- [10] J. D. Weiland, A. K. Cho, and M. S. Humayun, “Retinal prostheses: Current clinical results and future needs,” *Ophthalmology*, vol. 118, no. 11, pp. 2227–2237, 2011.
- [11] L. Yue, J. D. Weiland, B. Roska, and M. S. Humayun, “Retinal stimulation strategies to restore vision: Fundamentals and systems,” *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 53, pp. 21–47, 2016.
- [12] Le Roy Ch, “Où l’on rend compte de quelques tentatives que lon a faites pour guérir plusieurs maladies par l’ectricité. Mémoires de Mathématique et de Physique tirés des registres de cette Académie,” *Histoire de l’Académie royale des Science avec les mémoires de mathématique et de Phyfique tirés des registres de cette Académie*, vol. 2, pp. 60–98, 1755.
- [13] G. E. Tassicker, “retinal stimulator,” US Patent No.2760483, 1954.
- [14] G. S. Brindley and W. S. Lewin, “The sensations produced by electrical stimulation of the visual cortex,” *The Journal of Physiology*, vol. 196, no. 2, pp. 479–493, 1968.
- [15] W. H. Dobelle and M. G. Mladejovsky, “Phosphenes produced by electrical stimulation of human occipital cortex, and their application to the development of a prosthesis for the blind,” *The Journal of Physiology*, vol. 243, no. 2, pp. 553–576, 1974.
- [16] A. Santos, M. S. Humayun, E. De Juan, M. J. Marsh, I. B. Klock, and A. H. Milam, “Preservation of the Inner Retina in Retinitis Pigmentosa,” *Archieve of ophthalmology*, vol. 115, no. 4, pp. 511–515, 1997.
- [17] M. S. Humayun, E. De Juan, G. Dagnelie, R. J. Greenberg, R. H. Propst, and D. H. Phillips, “Visual perception elicited by electrical stimulation of retina in blind humans,” *Archieve of ophthalmology*, vol. 114, no. 1, pp. 40–46, 1996.
- [18] 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,” *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 45, no. 2, pp. 560–566, 2004.
- [19] T. Fujikado, M. Kamei, H. Sakaguchi, H. Kanda, T. Endo, M. Hirota, T. Morimoto, K. Nishida, H. Kishima, Y. Terasawa, K. Oosawa, M. Ozawa, and K. Nishida, “One-year outcome of 49-channel suprachoroidal–transretinal stimulation prosthesis in patients with advanced retinitis pigmentosa,” *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 57, no. 14, pp. 6147–6157, 2016.
- [20] D. A. X. Nayagam, R. A. Williams, P. J. Allen, M. N. Shivdasani, C. D. Luu, C.

- M. Salinas-LaRosa, S. Finch, L. N. Ayton, A. L. Saunders, M. McPhedran, C. McGowan, J. Villalobos, J. B. Fallon, A. K. Wise, J. Yeoh, J. Xu, H. Feng, R. Millard, M. McWade, P. C. Thien, C. E. Williams, and R. K. Shepherd, “Chronic electrical stimulation with a suprachoroidal retinal prosthesis: A preclinical safety and efficacy study,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 5, e97182, 2014.
- [21] K. Makowiecki, A. Garrett, V. Clark, S. L. Graham, and J. Rodger, “Reliability of VEP Recordings Using Chronically Implanted Screw Electrodes in Mice,” *Translational vision science & technology*, vol. 4, no. 2, pp. 1–13, 2015.
- [22] W. R. Woodward, D. Choi, J. Grose, B. Malmin, S. Hurst, J. Pang, R. G. Weleber, and D. A. M. Pillers, “Isoflurane is an effective alternative to ketamine/xylazine/acepromazine as an anesthetic agent for the mouse electroretinogram,” *Documenta Ophthalmologica*, vol. 115, no. 3, pp. 187–201, 2007.
- [23] G. H. Rose, S. P. Gruenau, and J. W. Spencer, “MATURATION OF VISUAL ELECTROCORTICAL RESPONSES UNANESTHETIZED KITTENS: EFFECTS OF BARBITURATE ANESTHESIA,” *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, vol. 33, no. 2, pp. 141–158, 1972.
- [24] G. J. Tortora and S. Reynolds, トートラ人体の構造と機能, pp. 534–546, 東京: 丸善, 2004.
- [25] 柳田和夫, “家兎を用いた Electrically Evoked Response (EER) の基礎的研究,” *日本眼科学会雑誌*, vol. 88, pp. 997–1006, 1984.
- [26] 太田淳, “人工視覚デバイス,” *映像情報メディア学会誌*, vol. 62, no. 6, pp. 827–831, 2008.
- [27] T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, Y. Terasawa, H. Tashiro, H. Kanda, T. Fujikado, and J. Ohta, “Performance improvement and functionalization of an electrode array for retinal prosthesis by iridium oxide coating and introduction of smart-wiring technology using CMOS microchips,” *Sensors and Actuators, A: Physical*, vol. 211, pp. 27–37, 2014.
- [28] P. M. Lewis, L. N. Ayton, R. H. Guymer, A. J. Lowery, P. J. Blamey, P. J. Allen, C. D. Luu, and J. V. Rosenfeld, “Advances in implantable bionic devices for blindness: a review,” *ANZ Journal of Surgery*, vol. 86, no. 9, pp. 654–659, 2016.
- [29] C. Veraart, M. C. Wanet-Defalque, B. Gérard, A. Vanlierde, and J. Delbeke, “Pattern Recognition with the Optic Nerve Visual Prosthesis,” *Artificial Organs*, vol. 27, no. 11, pp. 996–1004, 2003.
- [30] H. Sakaguchi, M. Kamei, T. Fujikado, E. Yonezawa, M. Ozawa, C. Cecilia-Gonzalez, O. Ustariz-Gonzalez, H. Quiroz-Mercado, and Y. Tano, “Artificial

- vision by direct optic nerve electrode (AV-DONE) implantation in a blind patient with retinitis pigmentosa,” *Journal of Artificial Organs*, vol. 12, no. 3, pp. 206–209, 2009.
- [31] X. Chai, L. Li, K. Wu, C. Zhou, P. Cao, and Q. Ren, “C-Sight Visual Prostheses for the Blind,” *IEEE engineering in medicine and biology magazine*, pp. 20–28, 2008.
- [32] H. Kanda, Y. Nakano, Y. Terasawa, T. Morimoto, and T. Fujikado, “The relationship between retinal damage and current intensity in a pre-clinical suprachoroidal-transretinal stimulation model using a laser-formed microporous electrode,” *Journal of Neural Engineering*, vol. 14, no. 5, 056013, 31p, 2017.
- [33] M. S. Humayun, J. D. Dorn, L. Da Cruz, G. Dagnelie, J. A. Sahel, P. E. Stanga, A. V. Cideciyan, J. L. Duncan, D. Elliott, E. Filley, A. C. Ho, A. Santos, A. B. Safran, A. Ardit, L. V. Del Priore, and R. J. Greenberg, “Interim results from the international trial of second sight’s visual prosthesis,” *Ophthalmology*, vol. 119, no. 4, pp. 779–788, 2012.
- [34] K. Stingl, K. U. Bartz-Schmidt, D. Besch, C. K. Chee, C. L. Cottrill, F. Gekeler, M. Groppe, T. L. Jackson, R. E. MacLaren, A. Koitschev, A. Kusnyerik, J. Neffendorf, J. Nemeth, M. A. N. Naeem, T. Peters, J. D. Ramsden, H. Sachs, A. Simpson, M. S. Singh, B. Wilhelm, D. Wong, and E. Zrenner, “Subretinal Visual Implant Alpha IMS - Clinical trial interim report,” *Vision Research*, vol. 111, pp. 149–160, 2015.
- [35] V. Chowdhury, J. W. Morley, and M. T. Coroneo, “Development of an extraocular retinal prosthesis: Evaluation of stimulation parameters in the cat,” *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 15, no. 8, pp. 900–906, 2008.
- [36] J. A. Zhou, S. J. Woo, S. I. Park, E. T. Kim, J. M. Seo, H. Chung, and S. J. Kim, “A suprachoroidal electrical retinal stimulator design for long-term animal experiments and in vivo assessment of its feasibility and biocompatibility in rabbits,” *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2008, no. 1, pp. 1–10, 2008.
- [37] Food and Drug Administration, *Investigational Device Exemption (IDE) Guidance for Retinal Prostheses: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff*, 2013.
- [38] 厚生労働省医薬食品局審査管理課, “次世代医療機器評価指標の公表について,” *薬食機発1215第1号*, 2013.
- [39] S. F. Cogan, “Neural Stimulation and Recording Electrodes,” *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 10, no. 1, pp. 275–309, 2008.

- [40] T. Okuno, H. Oku, and T. Ikeda, "The reproducibility and sensitivity of visual evoked potential testing in rabbits," *Neuro-Ophthalmology*, vol. 26, no. 1, pp. 59–66, 2002.
- [41] K. Makowiecki, A. Garrett, V. Clark, S. L. Graham, and J. Rodger, "Reliability of VEP Recordings Using Chronically Implanted Screw Electrodes in Mice," *Translational vision science & technology*, vol. 4, no. 2, pp. 1–13, 2015.
- [42] B. Gunasekera, T. Saxena, R. Bellamkonda, and L. Karumbaiah, "Intracortical recording interfaces: Current challenges to chronic recording function," *ACS Chemical Neuroscience*, vol. 6, no. 1, pp. 68–83, 2015.
- [43] J. C. Williams, R. L. Rennaker, and D. R. Kipke, "Long-term neural recording characteristics of wire microelectrode arrays implanted in cerebral cortex," *Brain Research Protocols*, vol. 4, no. 3, pp. 303–313, 1999.
- [44] L. Karumbaiah, T. Saxena, D. Carlson, K. Patil, R. Patkar, E. A. Gaupp, M. Betancur, G. B. Stanley, L. Carin, and R. V. Bellamkonda, "Relationship between intracortical electrode design and chronic recording function," *Biomaterials*, vol. 34, no. 33, pp. 8061–8074, 2013.
- [45] M. Kuwabara, H. Tashiro, Y. Terasawa, K. Osawa, T. Takashi, J. Ohta, and T. Fujikado, "Development of Chronic Implantable Electrodes for Long-term Visual Evoked Potential Recording in Rabbits," *Advanced Biomedical Engineering*, vol. 6, pp. 59–67, 2017.
- [46] H. A. Shah, S. R. Montezuma, and J. F. Rizzo, "In vivo electrical stimulation of rabbit retina: Effect of stimulus duration and electrical field orientation," *Experimental Eye Research*, vol. 83, no. 2, pp. 247–254, 2006.
- [47] 電気化学会, 電気化学測定マニュアル基礎編, pp. 95–101, 東京: 丸善, 2005.
- [48] 板垣昌幸, 電気化学インピーダンス法 第2版 原理・測定・解析, pp. 24–47, 東京: 丸善, 2012.
- [49] T. D. Y. Kozai, K. Catt, Z. Du, K. Na, O. Srivannavit, R. M. Haque, F. John Seymour, Kensall D. Wise, IEEE, E. Yoon, and X. T. Cui, "Chronic In Vivo Evaluation of PEDOT/CNT for Stable Neural Recordings," *IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING*, vol. 63, no. 1, pp. 111–119, 2016.
- [50] C. Henle, M. Raab, J. G. Cordeiro, S. Doostkam, A. Schulze-Bonhage, T. Stieglitz, and J. Rickert, "First long term in vivo study on subdurally implanted Micro-ECoG electrodes, manufactured with a novel laser technology," *Biomedical Microdevices*, vol. 13, no. 1, pp. 59–68, 2011.
- [51] 田頭功, 清水芳雄, 医用工学概論, pp. 38–41, 東京: 医学書院, 2002.

- [52] 神保泰彦, “生体電気計測の基礎,” 精密工学会誌, vol. 73, no. 11, pp. 1204–1207, 2007.
- [53] 埴隆夫, 米山隆之, 金属バイオマテリアル, pp. 53–75, 東京: コロナ社, 2007.
- [54] S. Thomas, NEUROPROSTHETICS Theory and Practice, pp. 475–511, Hackensack: World Scientific Publishing, 2007.
- [55] K. Wang, X. Q. Li, X. X. Li, W. H. Pei, H. Da Chen, and J. Q. Dong, “Efficacy and reliability of long-term implantation of multi-channel microelectrode arrays in the optical nerve sheath of rabbit eyes,” Vision Research, vol. 51, no. 17, pp. 1897–1906, 2011.
- [56] 田中順三, 角田方衛, 立石哲也, バイオマテリアル 材料と生体の相互作用, pp. 11–19, 34–35, 東京: 内田老鶴圃, 2008.
- [57] 岡崎義光, “金属系生体材料の開発動向,” 溶接学会誌, vol. 73, no. 2, pp. 13–16, 2004.
- [58] 星宮望, 生体情報計測, pp. 17–22, 東京: 森北出版, 2002.
- [59] A. Mercanzini, P. Colin, J. C. Bensadoun, A. Bertsch, and P. Renaud, “In vivo electrical impedance spectroscopy of tissue reaction to microelectrode arrays,” IEEE transactions on bio-medical engineering, vol. 56, no. 7, pp. 1909–18, 2009.
- [60] G. Márton, I. Bakos, Z. Fekete, I. Ulbert, and A. Pongrácz, “Durability of high surface area platinum deposits on microelectrode arrays for acute neural recordings,” Journal of Materials Science: Materials in Medicine, vol. 25, no. 3, pp. 931–940, 2014.
- [61] R. de Levie, “On the impedance of electrodes with rough interfaces,” Journal of Electroanalytical Chemistry, vol. 261, no. 1, pp. 1–9, 1989.
- [62] B. E. Conway, Impedance Spectroscopy, pp. 494–495, New Jersey: Wiley, 2005.
- [63] A. Prasad and J. C. Sanchez, “Quantifying long-term microelectrode array functionality using chronic in vivo impedance testing,” Journal of Neural Engineering, vol. 9, no. 2, pp. 1–12, 2012.
- [64] M. E. Orazem and B. Tribollet, Electrochemical Impedance Spectroscopy, pp. 155–162, New Jersey: Wiley, 2008.
- [65] X. F. Wei and W. M. Grill, “Impedance characteristics of deep brain stimulation electrodes in vitro and in vivo,” Journal of neural engineering, vol. 6, no. 4, pp. 1–20, 2009.
- [66] V. Sankar, E. Patrick, R. Dieme, J. C. Sanchez, A. Prasad, and T. Nishida, “Electrode impedance analysis of chronic tungsten microwire neural implants: understanding abiotic vs. biotic contributions,” Frontiers in Neuroengineering, vol.

- 7, no. May, pp. 1–12, 2014.
- [67] G. Rondelli, P. Torricelli, M. Fini, and R. Giardino, “In vitro corrosion study by EIS of a nickel-free stainless steel for orthopaedic applications,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 7, pp. 739–744, 2005.
- [68] D. De Venuto, P. Ledochowitsch, M. Maharabitz, and J. Rabaey, “Impedance modeling of the intracortical microelectrode for a reliable design of a brain activity recording system,” *Proceedings - International Symposium on Quality Electronic Design, ISQED*, pp. 380–385, 2014.
- [69] N. Yousifa, R. Bayfordb, and X. Liu, “The influence of reactivity of the electrode-brain interface on the crossing electric current in therapeutic deep brain stimulation,” *Neuroscience*, vol. 156, no. 3, pp. 597–606, 2008.
- [70] M. A. Moffitt and C. C. McIntyre, “Model-based analysis of cortical recording with silicon microelectrodes,” *Clinical Neurophysiology*, vol. 116, no. 9, pp. 2240–2250, 2005.
- [71] M. Kuwabara, H. Tashiro, Y. Terasawa, Y. Nakano, Y. Yoshimura, K. Osawa, T. Noda, T. Tokuda, and J. Ohta, “In vivo analysis of electrode-surface characteristic for evoked potential recording using electrochemical impedance spectroscopy to evaluate the safety of visual prostheses,” *IEICE Research Technical Report*, vol. 116, pp. 25–29, 2017.
- [72] 板垣昌幸, 電気化学インピーダンス法 第2版 原理・測定・解析, pp. 137–142, 東京: 丸善, 2012.
- [73] M. E. Orazem and B. Tribollet, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, pp. 155–162, Hoboken: Wiley, 2008.
- [74] 山田道夫, “ウェーブレット解析とその応用,” *電子情報通信学会誌*, vol. 76, no. 5, pp. 518–528, 1993.
- [75] W. Franks, I. Schenker, P. Schmutz, and A. Hierlemann, “Impedance characterization and modeling of electrodes for biomedical applications,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 52, no. 7, pp. 1295–1302, 2005.
- [76] B. E. Conway, *Impedance Spectroscopy*, pp. 492–496, New Jersey: Wiley, 2005.
- [77] M. Kuwabara, H. Tashiro, Y. Terasawa, Y. Nakano, Y. Yoshimura, K. Osawa, T. Noda, T. Tokuda, and J. Ohta, “Long-Term Analysis of In Vivo Characteristics of Recording Electrode Using Electrochemical Impedance Spectroscopy,” *Sensors and Materials*, vol. 29, no. 12, pp. 1689–1702, 2017.
- [78] C. H. Im, C. Lee, H. K. Jung, and S. Y. Lee, “A new neuronal electrical source model considering electrophysiology to simulate realistic electroencephalography (EEG) forward signals,” *IEEE Transactions on Magnetics*, vol. 44, no. 6, pp. 1434–

- 1437, 2008.
- [79] J. M. Anderson, A. Rodriguez, and D. T. Chang, "FOREIGN BODY REACTION TO BIOMATERIALS," *Seminars in Immunology*, vol. 20, no. 2, pp. 86–100, 2008.
- [80] J. W. Salatino, K. A. Ludwig, T. D. Y. Kozai, and E. K. Purcell, "Glial responses to implanted electrodes in the brain," *Nature Biomedical Engineering*, vol. 1, pp. 862–877, 2017.
- [81] K. Kanemaru, J. Kubota, H. Sekiya, K. Hirose, Y. Okubo, and M. Iino, "Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, no. 28, pp. 11612–11617, 2013.
- [82] G. Buzsáki, C. A. Anastassiou, and C. Koch, "The origin of extracellular fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 13, no. 6, pp. 407–420, 2012.
- [83] P. S. Sebel, A. Ingram, D. P. J. Flynn, C. F. Rutherford, and H. Rogers, "Evoked potentials during isoflurane anaesthesia," *British Journal of Anaesthesia*, vol. 58, pp. 580–585, 1986.
- [84] K. Nakauchi, T. Fujikado, H. Kanda, T. Morimoto, J. S. Choi, Y. Ikuno, H. Sakaguchi, M. Kamei, M. Ohji, T. Yagi, S. Nishimura, H. Sawai, Y. Fukuda, and Y. Tano, "Transretinal electrical stimulation by an intrascleral multichannel electrode array in rabbit eyes," *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 243, no. 2, pp. 169–174, 2005.
- [85] W. Wade, JG; Stevens, "Isoflurane: An Anesthetic for the Eighties?," *Anesthesia and Analgesia*, vol. 60, no. 9, pp. 666–682, 1981.
- [86] H. R. Kusuma, N. K. Venkataramana, S. A. Rao, A. L. Naik, D. Gangadhara, and K. H. Venkatesh, "Fulminant hepatic failure after repeated exposure to isoflurane," *Indian journal of anaesthesia*, vol. 55, no. 3, pp. 290–292, 2011.
- [87] W. M. S. Russell and R. L. Burch, "The Principles of Humane Experimental Technique," Chapter 5–7, London: JOHNS HOPKINS, 1959.
- [88] T. Kazama and K. Ikeda, "Comparison of MAC and the Rate of Rise of Alveolar Concentration of Sevoflurane with Halothane and Isoflurane in the Dog," *Anesthesiology*, vol. 68, pp. 435–437, 1988.
- [89] E. Eger and B. H. Johnson, "Rates of Awakening from Anesthesia with I-653, Halothane, Isoflurane, and Sevoflurane: A Test of the Effect of Anesthetic Concentration and Duration in Rats," *Anesthesia and Analgesia*, vol. 66, pp. 977–982, 1987.
- [90] A. Bergadano, R. Lauber, A. Zbinden, U. Schatzmann, and Y. Moens, "Blood/gas

- partition coefficients of halothane, isoflurane and sevoflurane in horse blood,” *British Journal of Anaesthesia*, vol. 91, no. 2, pp. 276–278, 2003.
- [91] R. R. Paddleford, 多川政弘, 小動物臨床麻酔マニュアル, pp. 37–85, 東京: メディカルサイエンス社, 2002.
- [92] 獣医麻酔外科学会, 獣医麻酔の基礎と実際, pp. 345–348, 東京: 学窓社, 1997.
- [93] P. Flecknell, 倉林譲, ラボラトリーアニマルの麻酔, pp. 152–158, 東京: 学窓社, 1998.
- [94] M. Kuwabara, H. Tashiro, Y. Nakano, Y. Terasawa, H. Sawai, and J. Ohta, “Comparative Study of Sevoflurane and Isoflurane Anesthesia for the Long-Term Safety Evaluation of Visual Prosthesis with Rabbits,” *Sensors and Materials*, vol. 30, no. 2, pp. 287–297, 2017.
- [95] J. V. Odom, M. Bach, M. Brigell, G. E. Holder, D. L. McCulloch, A. Mizota, and A. P. Tormene, “ISCEV standard for clinical visual evoked potentials: (2016 update),” *Documenta Ophthalmologica*, vol. 133, no. 1, pp. 1–9, 2016.
- [96] J. C. Drummond, “MAC for Halothane, Enflurane, and Isoflurane in the New Zealand White Rabbit: And a Test for the Validity of MAC Determinations,” *Anesthesiology*, vol. 62, pp. 336–338, 1985.
- [97] M. S. Scheller, L. J. Saidman, and B. L. Partridge, “MAC of sevoflurane in humans and the New Zealand white rabbit,” *Canadian journal of anaesthesia*, vol. 35, no. 2, pp. 153–156, 1988.
- [98] L. B. Padnick and R. A. Linsenmeier, “Properties of the flash visual evoked potential recorded in the cat primary visual cortex,” *Vision Research*, vol. 39, pp. 2833–2840, 1999.
- [99] C. E. Schroeder, C. E. Tenke, S. J. Givre, J. C. Arezzo, and H. G. Vaughan, “Striate Cortical Contribution To the Surface-Recorded Pattern-Reversal VEP in the Alert Monkey,” *Vision Research*, vol. 31, no. 7/8, pp. 1143–1157, 1991.
- [100] A. M. Ghita, D. Parvu, R. Sava, L. Georgescu, and L. Zagrean, “Analysis of the visual evoked potential in anesthesia with sevoflurane and chloral hydrate,” *Journal of medicine and life*, vol. 6, no. 2, pp. 214–225, 2013.
- [101] C. Kaymak, E. Kadioglu, H. Basar, and S. Sardas, “Genoprotective role of vitamin E and selenium in rabbits anaesthetized with sevoflurane,” *Human and Experimental Toxicology*, vol. 23, no. 8, pp. 413–419, 2004.
- [102] A. Kilicaslan, M. Belviranli, N. Okudan, and E. Nurullahoglu Atalik, “Single and repeated sevoflurane or desflurane exposure does not impair spatial memory performance of young adult mice,” *Fundamental & Clinical Pharmacology*, vol.

- 27, no. 6, pp. 641–649, 2013.
- [103] Y. Terasawa, H. Tashiro, Y. Nakano, T. Tokuda, and J. Ohta, “Mechanical Machining-based Three-Dimensional Electrode Array for Chronic Neural Stimulation,” *Advanced Biomedical Engineering*, vol. 5, pp. 137–141, 2016.
- [104] M. Kuwabara, H. Tashiro, Y. Terasawa, Y. Nakano, and J. Ohta, “Analysis of Electrochemical Properties of Stimulation Electrode for Visual Prostheses in Chronic Stimulation,” *INSTITUTE OF ELECTRONICS, INFORMATION AND COMMUNICATION ENGINEERS (IEICE) Technical Report*, vol. MEB2017-51, pp. 23–28, 2017.
- [105] H. Tashiro, Y. Terasawa, M. Kuwabara, K. Osawa, T. Tokuda, and J. Ohta, “Initial Evaluation of the Safety and Durability of Retinal Prostheses Based on Suprachoroidal transretinal Stimulation using Bullet-shaped Platinum Electrodes,” *Advanced Biomedical Engineering*, vol. 6, pp. 8–14, 2017.
- [106] 筏義人, バイオマテリアル—人工臓器へのアプローチ—, pp. 168–181, 東京: 日刊工業新聞社, 2007.
- [107] F. G. Zeng, S. J. Rebscher, Q. J. Fu, H. Chen, X. Sun, L. Yin, L. Ping, H. Feng, S. Yang, S. Gong, B. Yang, H. Y. Kang, N. Gao, and F. Chi, “Development and evaluation of the Nurotron 26-electrode cochlear implant system,” *Hearing Research*, vol. 322, pp. 188–199, 2014.
- [108] N. Lewis, C. Lahuec, S. Renaud, E. McAdams, P. Bogonez-Franco, C. Lethias, S. Kellouche, F. Carreiras, A. Pinna, A. Histace, M. Boissiere, E. Pauthe, I. Lagroye, F. Soulier, S. Bernard, S. Binczak, B. Granado, P. Garda, M. Terosiet, A. Goguin, and O. Romain, “Relevance of impedance spectroscopy for the monitoring of implant-induced fibrosis: A preliminary study,” *Proceedings of IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference: Engineering for Healthy Minds and Able Bodies, BioCAS 2015, Atlanta, 2015*.
- [109] Y. Terasawa, H. Tashiro, Y. Nakano, and J. Ohta, “Safety and Efficacy of Semichronic Suprachoroidal Transretinal Stimulation with Femtosecond Laser-induced Porosity and Smooth-surface Electrodes,” *Sensors and Materials*, vol. 30, no. 2, pp. 235–249, 2018.
- [110] P. K. Campbell, K. E. Jones, R. J. Huber, K. W. Horch, and R. A. Normann, “A Silicon-Based, Three-Dimensional Neural Interface: Manufacturing Processes for an Intracortical Electrode Array,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 38, no. 8, pp. 758–768, 1991.
- [111] J. D. Rose and D. J. Weishaar, “Tapered tungsten fine-wire microelectrode for chronic single unit recording,” *Brain Research Bulletin*, vol. 4, no. 3, pp. 435–437,

1979.

- [112] I. Guarino, S. Loizzo, L. Lopez, A. Fadda, and A. Loizzo, "A chronic implant to record electroretinogram, visual evoked potentials and oscillatory potentials in awake, freely moving rats for pharmacological studies," *Neural Plasticity*, vol. 11, no. 3–4, pp. 241–250, 2004.
- [113] A. C. Thompson, P. R. Stoddart, and E. D. Jansen, "Optical Stimulation of Neurons," *Current molecular imaging*, vol. 3, no. 2, pp. 162–177, 2014.
- [114] M. D. Menz, O. Oralkan, P. T. Khuri-Yakub, and S. A. Baccus, "Precise Neural Stimulation in the Retina Using Focused Ultrasound," *Journal of Neuroscience*, vol. 33, no. 10, pp. 4550–4560, 2013.
- [115] S. Inayat, C. M. Routree, J. B. Troy, and L. Saqqere, "Chemical stimulation of rat retinal neurons: feasibility of an epiretinal neurotransmitter-based prosthesis," *Journal of neural engineering*, vol. 12, no. 1, 06010, 19p, 2015.

研究発表目録

発表論文

1. **Mariko Kuwabara**, Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, Koji Osawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, and Takashi Fujikado, “Development of Chronic Implantable Electrodes for Long-term Visual Evoked Potential Recording in Rabbits” *Advanced Biomedical Engineering*, vol. 6, pp. 59–67, 2017.
2. **Mariko Kuwabara**, Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, Yukari Nakano, Yurina Yoshimura, Koji Osawa, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, and Jun Ohta, “Long-Term Analysis of the *In Vivo* Characteristics of a Recording Electrode Using Electrochemical Impedance Spectroscopy” *Sensors and Materials*, vol. 29, no. 12, pp. 1689–1702, 2017.
3. **Mariko Kuwabara**, Hiroyuki Tashiro, Yukari Nakano, Yasuo Terasawa, Hajime Sawai, and Jun Ohta, “Comparative Study of Sevoflurane and Isoflurane Anesthesia for the Long-Term Safety Evaluation of Visual Prosthesis with Rabbits” *Sensors and Materials*, vol. 30, no. 2, pp. 287–297, 2018.

参考論文

1. Hiroyuki Tashiro, **Mariko Kuwabara**, Yukari Nakano, Yasuo Terasawa, Koji Osawa, Yurina Yoshimura, Haruna Doi, and Jun Ohta, “*In Vitro* and *In Vivo* Long-Term Electrochemical Properties of Electrodes with Femtosecond-Laser-Induced Porosity for Suprachoroidal Transretinal Stimulation-Type Visual Prostheses” *Sensors and Materials*, vol. 30, no. 2, pp. 251–268, 2018.
2. **桑原 真理子**, 田代 洋行, 寺澤 靖雄, 中野 由香梨, 太田 淳, 「人工視覚システム用刺激電極の慢性通電下における電気化学的特性解析」電子情報通信学会技術研究報告, vol. IEICE-117, no. 324, IEICE-MBE2017-51, pp. 23–28, 2017. <査読無し>
3. Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, **Mariko Kuwabara**, Koji Osawa, Takashi Tokuda, and Takashi Fujikado, “Initial Evaluation of the Safety and Durability of Retinal Prostheses Based on Suprachoroidal– transretinal Stimulation using Bullet-shaped Platinum Electrodes” *Advanced Biomedical Engineering*, vol. 6, pp. 8–14, 2017.
4. **桑原 真理子**, 田代 洋行, 寺澤 靖雄, 中野 由香梨, 吉村 優里奈, 大澤 孝治, 野田 俊彦, 徳田 崇, 太田 淳, 「人工視覚システム安全性評価のための EIS を用いた *in vivo* における誘発電位記録電極の界面特性解析」電子情報通信学会技術研究報告, vol. IEICE-116, no. 435, IEICE-MBE2016-74, pp. 25–29, 2017. <査読無し>
5. 田代 洋行, 寺澤 靖雄, **桑原 真理子**, 吉村 優里奈, 中野 由香梨, 大澤 孝治, 野田 俊彦, 徳田 崇, 太田 淳, 「析出反応による埋植用金属電極の性能向上法」電気学会研究会資料, CHS-16-34, BMS-16-56, pp. 11–15 2016. <査読無し>

国際会議における発表

1. **Mariko Kuwabara**, Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, Yukari Nakano, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, and Jun Ohta, “Analysis of the Porous Stimulation Electrode Characteristic Using Electrochemical Impedance Spectroscopy in Visual Prostheses” 39th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC 2017), Jeju, Korea, 2017. 7.
2. **Mariko Kuwabara**, Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, Yukari Nakano, Yurina Yoshimura, Koji Osawa, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, and Jun Ohta, “Long-term Analysis of the In Vivo Characteristics of a Recording Electrode with Electrochemical Impedance Spectroscopy, International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices” BioMEMS/NEMS & Applications (Bio4Apps 2016), Gold Coast, Australia, 2016. 12.

国内会議における発表

1. **桑原 真理子**, 田代 洋行, 寺澤 靖雄, 中野 由香梨, 太田 淳, 「人工視覚システム用刺激電極の慢性通電下における電気化学的特性解析」電子情報通信学会 ME とバイオサイバネティクス研究会, 仙台, 2017. 11.
2. **桑原 真理子**, 田代 洋行, 中野 由香梨, 寺澤 靖雄, 澤井 元, 太田 淳, 「家兔の視覚誘発電位計測におけるセボフルラン麻酔の検討」視覚科学フォーラム 2017 第 21 回研究会, 豊橋, 2017. 9.
3. **桑原 真理子**, 田代 洋行, 寺澤 靖雄, 中野 由香梨, 太田 淳, 「人工視覚システムにおける EIS 解析を用いた刺激電極の電極界面分析」第 78 回応用物理学会秋期学術講演会, 福岡, 2017. 9.

4. 桑原 真理子, 田代 洋行, 寺澤 靖雄, 中野 由香梨, 太田 淳, 「家兎におけるセボフルラン吸入麻酔を用いた視覚誘発反応の計測」2017 年 日本生体医工学学会九州支部学術講演会, 福岡, 2017. 3.
5. 桑原 真理子, 田代 洋行, 寺澤 靖雄, 中野 由香梨, 吉村 優里奈, 大澤 孝治, 野田 俊彦, 徳田 崇, 太田 淳, 「人工視覚システム安全性評価のための EIS を用いた *in vivo* における誘発電位記録電極の界面特性解析」電子情報通信学会 ME とバイオサイバネティクス研究会, 福岡, 2017. 1.
6. Mariko Kuwabara, Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, Koji Osawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, and Takashi Fujikado, “Development of Chronic Implantable Electrodes for Long-term Visual Evoked Potential Recording to Evaluate the Safety of Visual Prostheses in Rabbits” 生体医工学シンポジウム 2016, 旭川, 2016. 9.
7. Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, Mariko Kuwabara, Koji Osawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, and Takashi Fujikado, “Development of an Evaluation System for Chronic Safety of Retinal Prostheses” 生体医工学シンポジウム 2016, 旭川, 2016. 9.
8. 桑原 真理子, 田代 洋行, 寺澤 靖雄, 大澤 孝治, 「人工視覚システム安全性評価のための長期間視覚誘発電位記録電極の経時的特性変化の解析」2016 年 電子情報通信学会総合大会, 福岡, 2016. 3.

謝辞

本研究は太田淳教授の暖かいご指導のもとに遂行されました。社会人学生として論文執筆がなかなか進まない中、博士論文を完成させることができましたのは、ひとえに太田淳教授の叱咤激励のおかげです。ここに深く感謝の意を表します。

スーパーバイザーの浦岡行治教授には、審査を通して豊富な知識に基づく有益なご指導、ご助言を頂きました。ここに深く感謝いたします。

スーパーバイザーの上久保裕生教授には、専門的な知識に基づく有益なご指導、ご助言をいただきました。研究での考え方やご指摘事項はその後の研究に大いに役立ちました。ここに感謝の意を表します。

スーパーバイザーの徳田崇准教授には、審査を通してのご指導、ご助言賜れましたこと、御礼申し上げます。

大阪大学大学院医学系研究科 不二門尚教授には、人工視覚システムの研究に関しまして、ご指導ご助言を賜れましたこと、ここに深く感謝の意を表します。神田寛行助教には、人工視覚研究におけるご助言賜れましたこと、感謝いたします。大阪府立大学学術研究院看護学類 澤井元教授には、誘発電位評価に関するご指導ご助言を賜りました。ここに感謝の意を表します。九州大学大学院医学研究院 田代洋行講師には、学部生時代より研究をはじめ多方面にわたり終始懇篤なご指導ご助言を賜りました。また叱咤激励いただきながらも精神的にもいつも暖かく支えてくださりました。ここに深く感謝の意を表します。奈良先端科学技術大学院大学 野田俊彦助教、笹川清隆助教、春田牧人特任助教には、人工視覚の研究に関するご助言を賜り、中間発表や公聴会に向けてご指導いただけま

したことを深く感謝いたします。光機能素子科学研究室 福澤亨子女史には、研究活動が円滑に進むよう手続き等サポートして頂きましたこと、ここに深く感謝いたします。

(株)ニデック 小澤素生社長には、研究に対するご支援とご協力頂きましたことを心より感謝致します。(株)ニデックアイケア事業部 大澤孝治氏には、記録電極の作成に関しまして、ご協力頂きましたこと、ここに深く感謝いたします。同人工視覚研究所 寺澤靖雄氏には、学部生時代より人工視覚システム研究に関してたくさんのご助言ご指導、実験のご協力賜れましたこと、ここに深く感謝いたします。中野由香梨女史には、研究に対するご助言ご指導、実験のご協力賜れましただけでなく、社会人学生の同期として切磋琢磨させていただきました。ここに深く感謝いたします。同生物工学研究所 中谷正義氏、すでにニデックを退職されておられます瀧千里女史には動物実験に関して大変お世話になりました。ここに深く感謝いたします。

九州大学大学院医学系学府保健学専攻 吉村優里奈女史には、研究の解析などのご助力を頂きました。ここに深く感謝いたします。

本研究は実験動物を使用しております。研究の遂行に際しては、動物実験に関する指針を遵守し、使用数を必要最低限に抑え、可能な限り苦痛を与えることのないよう細心の注意を払って行いました。本研究は実験動物の犠牲により成り立っており、科学技術・医療技術の発展のために犠牲になりました兔たちの冥福を心よりお祈りさせていただきます。

このほかにも多方面における多くの方々に暖かいご指導ご協力頂きました。ここに全ての皆様へ謹んで感謝の意を表します。