

# 光機能イメージング：光および電気刺激に対する網膜応答の測定

広原陽子

## Functional Imaging: Measuring Intrinsic Signal by Light and Electrical Stimulations

Yoko HIROHARA

Optical imaging that measures intrinsic signal can be used not only for mapping functional activities of the cerebral cortex but also for identifying the activated areas of the retina. I introduce the studies in which changes of light reflectance evoked by light and by electrical stimulations of the retina were investigated. I also report our studies in which intrinsic signal by light, transcorneal electrical, and suprachoroidal-transretinal stimulation of the retina were investigated.

**Key words:** functional imaging, eye, retina, optical imaging, intrinsic signal, reflectance change

機能イメージングは、活動する部位を特定して画像化するものであり、従来の単なる形態的なイメージングを超える、臨床的に強力な診断手段となりうる。機能イメージングの代表的な例として、脳に対する機能イメージングが挙げられる。脳内の各部位の機能特定や、病気の診断などに利用されており、研究も進んでいる<sup>1)</sup>。機能イメージングの測定方法として、機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) や、ポジトロン断層法 (PET)、近赤外分光法 (NIRS) など、種々の方法がある。

従来の眼底カメラは、網膜の忠実な画像を得ることにより診断に使われてきた。機能イメージングでは、網膜内で起こっている神経活動を画像化し、診断に役立てることが考えられている。通常の画像化ではわからない神経活動の正常眼と病眼の間の違いが早期診断に役立つ、という想定が本研究開発の基本的な考え方になっている。

われわれが行っている眼に対する光機能イメージングの前身は、1986年にNatureに報告された、初の脳の内因性信号を測定した例である<sup>2)</sup>。それまでの光機能イメージングは電圧感受性色素を用いた侵襲の強い測定法であったが、この研究により内因性信号の検知が光機能イメージングで可能であることが明らかになった。つまり、可視光か

ら近赤外光を透過する眼球光学系を通して直接観察できる網膜については、光機能イメージングによる非侵襲の内因性信号測定の可能性がみえたといえる。

網膜の光機能イメージングに関する研究は、すでにいくつかなされている。Rivaらは古くから血流を測定しており<sup>3)</sup>、神経活動に対する血流変化の測定もさまざまな方法で行っている<sup>4)</sup>。Rivaらはレーザードップラー法などを利用して糖尿用などの病眼血流測定<sup>5)</sup>から、機能的な研究も行った<sup>6)</sup>。Ts'oらはネコ網膜の局所光刺激による内因性信号の観察を報告しており<sup>7,8)</sup>、これはわれわれの研究と最も関連の深い内容である。また、角田らは、カニクイザルにより、フラッシュ光を照射したときの網膜像を連続して観測し、視神経乳頭、中心窩、網膜周辺部それぞれでの刺激による変化の違いを捉えたことを報告している<sup>9)</sup>。さらに角田らは、網膜の光機能イメージングに低コヒーレンス断層撮影法 (OCT) を利用し、網膜の層別の活性状態を明確に示すという画期的な報告も行った<sup>10)</sup>。

ここでは、われわれが行った、既存の眼底カメラを用い、機能イメージング計測用の眼底カメラとその解析用プログラムを開発し、網膜応答の測定を行い、機能イメージングにおける眼底診断への可能性をネコ眼で検討した研究

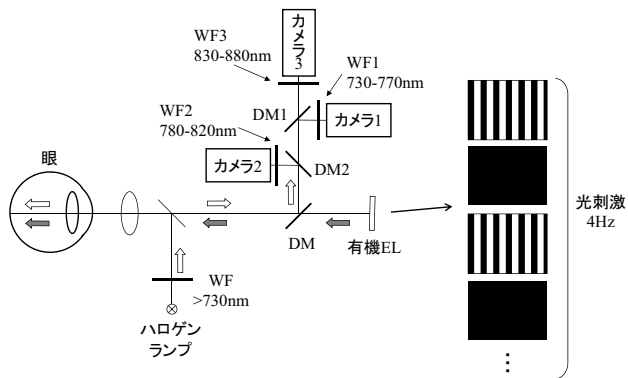


図1 機能イメージング用眼底カメラの模式図と光刺激. 光刺激中は有機ELにより、縞とブランク（何も表示されない状態）が交互に4 Hzで表示される. 刺激時以外は常にブランクである.

について紹介する<sup>11)</sup>.

### 1. 光刺激による機能イメージング

対象はネコ左眼 12 例 12 眼とした. 機能イメージングを行うにあたり、眼球が動くと、網膜像や網膜の刺激部位が動くため解析が困難になる. このため、眼球の固定が必要となる. われわれは麻酔、筋弛緩剤等を投与し、専用の固定台にて動物の眼球を固定した状態で測定を行った. イヤーバーにより、耳の穴の位置を固定することで、頭部のアライメントを行っている. ネコ眼は散瞳剤を点眼することで瞳孔を開いた状態とした. 乾燥を防ぎ、光学特性を保つために、直径 12 mm、角膜曲率半径に合わせたハードコンタクトレンズを装用した. 測定中は人工呼吸器をつけ、呼気中の二酸化炭素をモニターすることで酸素濃度を管理した. 暗順応を 1 時間行い、暗所で測定した.

装置は、散瞳型眼底カメラ（トプコン TRC-50LX）と、改良したカメラリレー部から構成される. 図 1 は本実験で使用した 3 波長機能イメージング用眼底カメラの模式図である. 観察光の波長域は、730~770 nm, 780~820 nm, 830~880 nm の 3 波長域で、すべて同じ機種の高感度カメラにより、3 波長ほぼ同時に画像取得が行える. 光源はハロゲンランプで、730 nm 以上の光が透過する波長フィルター WF を使って、近赤外光による眼底照明を実現している. 眼底からの反射光はレンズ系を通り、730~880 nm の光がダイクロミックミラー DM により反射される. まず第 2 波長域である 780~820 nm の光が DM2 により反射され、次に、第 1 波長域である 730~770 nm の光が DM1 により反射され、第 3 波長域である 830~880 nm が透過し、3 波長域に分けられる. 各カメラの前には取得したい波長域を透過する波長フィルターが設置され、WF1 は 730~770 nm, WF2 は 780~820 nm, WF3 は 830~880 nm を透過さ

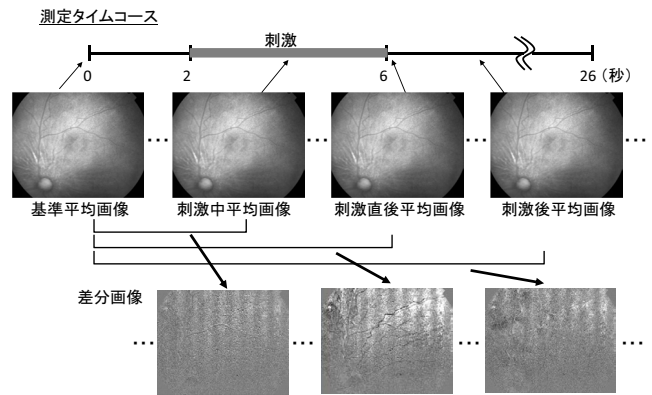


図2 測定のタイムコースと差分画像. 測定中は網膜像を連続的に取得する. 10 回繰り返した後、同じ時間の画像を足し合わせて平均画像をすべての時間で作成し、1 枚目の基準平均画像との差分画像を作成する. 変化が現れていれば、網膜の反応と考えられる.

せることで、他のノイズ光をカットするようになっている. それぞれの画像がサチュレーションを起こさないように、かつ最大強度ができるだけ大きくなるように、観察光の光量、カメラの露光時間を調整し、露光時間は 40~79 ms, 秒間 10 フレームの画像取得を行った. また、観察光の光量が多いと光刺激として刺激を与えることになってしまうため、できるだけ少なくなるようにした.

光刺激は 7 種類の縞視標を有機 EL に表示することで行った. 4 Hz の白色光でのフリッカー刺激である. 刺激は白黒交互の縦縞光刺激で、縞の幅は 0.05, 0.11, 0.22, 0.43, 0.86, 1.73, 3.46 cycles/deg (cpd) の 7 種類とした. 測定開始 2 秒後から 4 秒間 4 Hz の光刺激を与え、刺激後 20 秒間測定を継続した. 測定は 75 秒ごとに 10 回繰り返した. 10 回の各時間での平均画像を算出し、測定開始時との時系列差分画像を作成し、解析対象とした (図 2). 差分画像をみると、刺激部位に光刺激に応じた縞状の変化が現れていることがわかる.

解析は、当初、光を当てた領域と当てない領域での差分画像の強度変化を検討したが、網膜上の各部位での反応強度の違いなどの影響により、空間周波数に対する傾向がみられず、反応強度の検討が難しかった. そこで、フーリエ解析での検討を行った. 時系列差分画像の二次元高速フーリエ変換 (2D FFT) を行い、縦縞の空間周波数付近に現れたピーク値を通るように断面を取得することで選択し、ピーク値の時間特性を検討した (図 3).

また、網膜刺激の空間周波数による反応と、眼の光学特性を比較するために、ネコ眼の波面収差測定を小型波面センサーにより行った<sup>12, 13)</sup>. この装置は、シャック・ハルトマン波面センサーを搭載し、眼の光学系の収差量を算出できる. 解析する瞳孔径は眼底カメラの刺激用光路の光束に

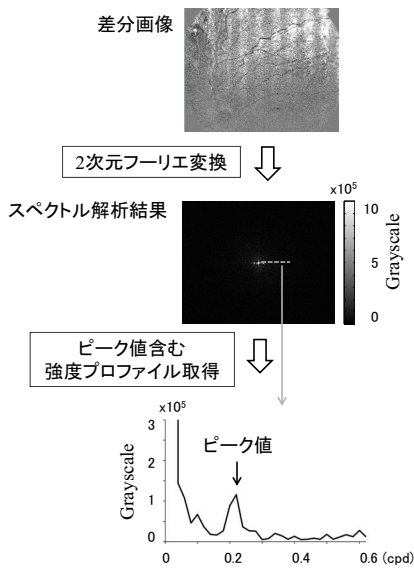


図3 光縞視標による網膜変化の解析方法. 差分画像を2D FFTにより解析し, スペクトル解析結果を算出し, 投影した縞に対応する周波数近辺で得られるピーク値を算出した.

合わせて直径2 mmである. 測定された波面収差をフーリエ変換して点像強度分布 (PSF) を算出した後, さらにフーリエ変換を行い, 変調伝達関数 (MTF) を算出した. さらにこれを2乗することにより, 入射と射出両方を加味した MTF を算出した. 光刺激による網膜の応答が, 眼の光学系の影響のみを受けると考えると, 眼の光学系による MTF と, 光縞刺激によるピーク値の変化は一致するはずである. 眼の光学系がどの程度網膜の応答に影響を与えるのかを調べるために, この MTF と, 光縞刺激のピーク値の結果との比較を行った.

2D FFTにより得られた0.11 cpd, 0.86 cpdでのピーク値の時間特性の1例を図4に示す. 波長が短いほど, ピーク値が低くなる傾向にあった. また, ピーク値は刺激が終わった後も約0.4秒まで増加し, そこから徐々に減少した. また, 反応の時間特性は波長間で差がなかった. ほぼ

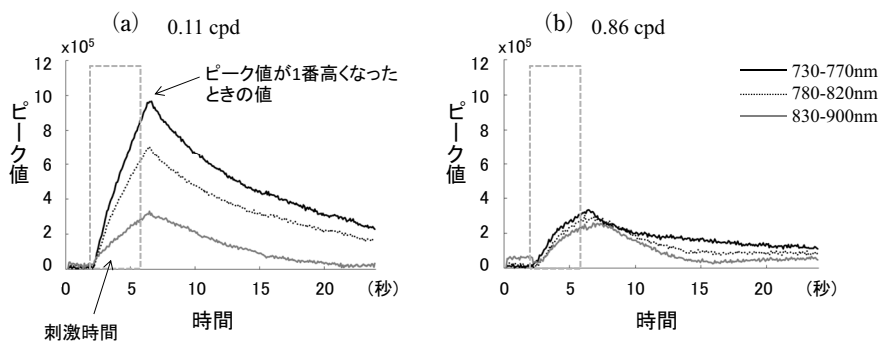


図4 ピーク値の時間特性の1例. 12眼のうち1例の, 0.11 cpd (a), 0.86 cpd (b)の結果. 横軸が時間, 縦軸がピーク値で, 3波長分の結果が示してある. 点線の領域が刺激中の結果である.

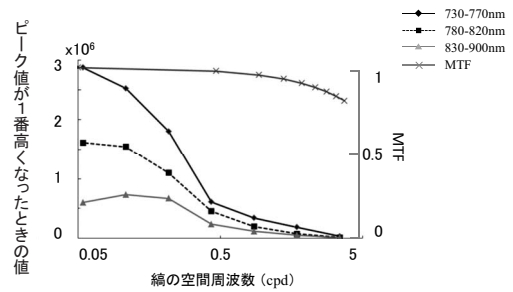


図5 ピーク値が一番高くなったときの値と空間周波数, 光学的 MTF と空間周波数の関係の1例. 横軸が光縞視標の空間周波数, 縦軸が2D FFTにより得られたピーク値が一番高くなったときの値と, MTF.

すべての個体, 周波数で, 同様の結果が得られた.

眼の波面収差から算出された MTF と, フーリエ解析のピーク値が一番高くなった値の結果を比較した. 図5は, 各波長のピーク値が一番高くなったときの値, 空間周波数のグラフと, MTF と空間周波数のグラフの1例である. MTF はピーク値の最大値で規格化した. 刺激による反応は, 低空間周波数のほうがほぼすべての個体で大きい結果となり, 特に1 cpd までに急激に減少していた. また, 波面収差による MTF のほうが空間周波数が増加しても光学特性の減少が少ない結果となった. この傾向もほぼすべての眼 (12 眼中 11 眼) で同様であった.

縞視標の反応解析では, フーリエ解析を行った結果は, ほとんどの場合で, 短波長側と比較して長波長で観察された反応強度が低かった. これは, 可視域に近い短波長側の反応が強く出たと考えられた. また, 光学系による MTF と比較して網膜の反応のほうが, 高周波に行くに従って大きく減衰した. このことから, 機能イメージングにより得られた反射の変化は眼の光学系の影響からだけではないことがわかった. この原因として, 血流変化, 視細胞, 神経節細胞などの吸収・散乱変化などが考えられる. 上記のことから, 網膜刺激の空間周波数による反応の変化は, 眼の光



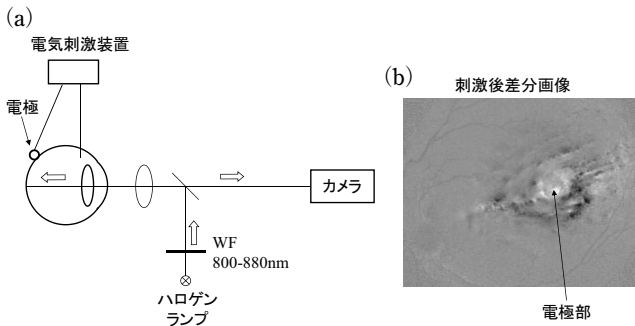


図6 脈絡膜上経網膜電気刺激時の機能イメージング測定装置模式図 (a) と、刺激後の差分画像 (b)。網膜に反応が出ていることがわかる。

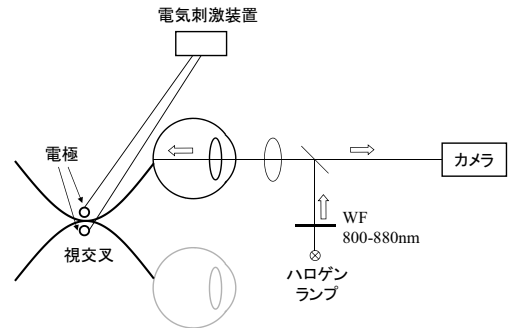


図8 逆行性電気刺激時の機能イメージング測定装置模式図。

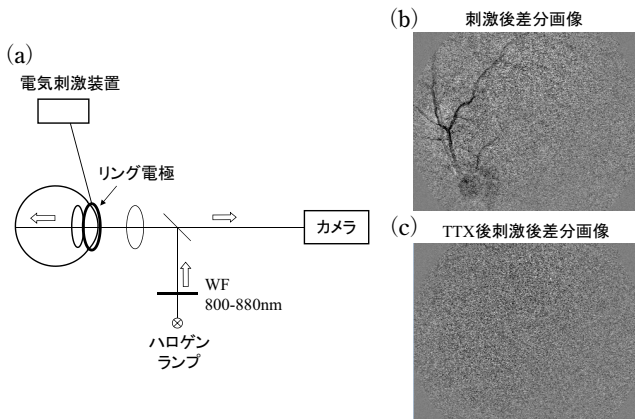


図7 経角膜電気刺激時の機能イメージング測定装置模式図 (a)、刺激後の差分画像 (b)、TTX 注入後に電気刺激したときの差分画像 (c)。

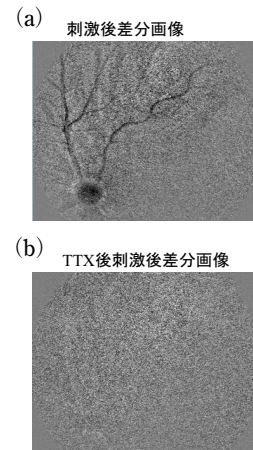


図9 逆行性電気刺激後の差分画像 (a) と、TTX 注入後に電気刺激したときの差分画像 (b)。

学特性だけでは説明できず、網膜構造・活性の影響も入っている可能性が示唆された。

この結果により、本方法を使って、網膜内における神経系の活性を調べられる可能性がある。縞そのものの強度を測定するのではなく、周波数特性を調べることで神経系の機能を調べることができれば、ノイズに強い測定法が確立され、人への応用の可能性も高まると考えられる。

## 2. 電気刺激による機能イメージング

光刺激以外に、われわれは、電気刺激を使った機能イメージングも行っている。人工網膜で利用されているような、強膜のある場所から電気刺激（脈絡膜上経網膜電気刺激）を行ったときの変化を観察した場合（図6 (a)）<sup>14</sup>、電流値を上げるにつれ、網膜の反射強度が変化するエリアが増え、しかし刺激部位では反射が上がるのに、その周辺部では反射が下がるという特性となっていた（図6 (b)）。また、角膜の周りにリング状の電極を取り付け、そこから電気刺激（経角膜電気刺激）をした場合（図7 (a)）、血管に強度変化が表れていた（図7 (b)）<sup>15</sup>。さらに、電流値、刺

激時間、電気周波数、1パルスあたりの時間を変化させると、血管強度に変化が生じていた。加えて、反応部位を特定するために、ナトリウムチャンネルを阻害する、フグ毒として知られるテトロドトキシン（TTX）を硝子体に注射にて注入後、同じ測定を行うと、血管に反応は起きなかった（図7 (c)）<sup>13</sup>。また、右眼と左眼の視神経が交差する、視交叉の部位から電気刺激（逆行性電気刺激）をすると（図8）、血管や視神経乳頭に反射強度変化の反応が起こるが（図9 (a)）、TTX を硝子体内に注入後は反応が起きなかった（図9 (b)）<sup>16</sup>。これらのことから、経角膜電気刺激により起こる刺激反応は、神経節細胞やアマクリン細胞起因と考えられる。経角膜電気刺激を使った光機能イメージングにより視神経の診断、緑内障診断への応用の可能性がある。

機能イメージングにより、網膜の活動部位特定や血管の活動特性診断、視神経診断等の可能性があるが、網膜像の動的な測定が必要なことから、眼の動きによる影響、光照明むら等の影響を受け、人眼での測定がまだ不十分である。今後、測定法が改良され、人眼での測定が精密に行わ

れるようになれば、病眼の網膜診断や、人工網膜の検査等、応用される分野が広がっていくことが予測されるため、今後の発展に期待したい。

## 文 献

- 1) I. Pelletier, H. C. Sauerwein, F. Lepore, D. Saint-Amour and M. Lassonde: "Non-invasive alternatives to the Wada test in the presurgical evaluation of language and memory functions in epilepsy patients," *Epileptic disord.*, **9** (2007) 111-126.
- 2) A. Grinvald, E. Lieke, R. D. Frostig, C. D. Gilbert and T. N. Wiesel: "Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals," *Nature*, **324** (1986) 361-364.
- 3) C. E. Riva, B. Ross and G. B. Benedek: "Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **11** (1972) 936-944.
- 4) C. E. Riva, E. Logean and B. Falsini: "Visually evoked hemodynamical response and assessment of neurovascular coupling in the optic nerve and retina," *Prog. Retin. Eye Res.*, **24** (2005) 183-215.
- 5) J. E. Grunwald, C. E. Riva, S. H. Sinclair, A. J. Brucker and B. L. Petrig: "Laser Doppler velocimetry study of retinal circulation in diabetes mellitus," *Arch. Ophthalmol.*, **104** (1986) 991-996.
- 6) C. E. Riva, E. Logean and B. Falsini: "Visually evoked hemodynamical response and assessment of neurovascular coupling in the optic nerve and retina," *Prog. Retin. Eye Res.*, **24** (2005) 183-215.
- 7) J. B. Schallek, H. Li, R. Kardon, Y. Kwon, M. Abramoff, P. Soliz and D. Y. Ts'o: "Stimulus-evoked intrinsic optical signals in the retina: Spatial and temporal characteristics," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50** (2009) 4865-4872.
- 8) J. B. Schallek, R. Kardon, Y. Kwon, M. Abramoff, P. Soliz and D. Y. Ts'o: "Stimulus-evoked intrinsic optical signals in the retina: pharmacologic dissection reveals outer retinal origins," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50** (2009) 4873-4880.
- 9) K. Tsunoda, Y. Oguchi, G. Hanazono and M. Tanifuji: "Mapping cone- and rod-induced retinal responsiveness in macaque retina by optical imaging," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45** (2004) 3820-3826.
- 10) W. Suzuki, K. Tsunoda, G. Hanazono and M. Tanifuji: "Stimulus-induced changes of reflectivity detected by optical coherence tomography in macaque retina," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **54** (2013) 6345-6354.
- 11) Y. Hirohara, T. Mihashi, H. Kanda, T. Morimoto, T. Miyoshi, J. S. Wolffsohn and T. Fujikado: "Optical imaging of retina in response to grating stimuli in cats," *Exp. Eye Res.*, **109** (2013) 1-7.
- 12) 広原陽子, 中澤直樹, 高橋義嗣, 三橋俊文, 黒田輝仁, 前田直之, 不二門尚: "人眼の波面収差測定", *Vision*, **13** (2001) 99-105.
- 13) U. K. Bhatt, A. L. Sheppard, S. Shah, H. S. Dua, T. Mihashi, T. Yamaguchi and J. S. Wolffsohn: "Design and validity of a miniaturized open-field aberrometer," *J. Cataract Refract. Surg.*, **39** (2013) 36-40.
- 14) Y. Okawa, T. Fujikado, T. Miyoshi, H. Sawai, S. Kusaka, T. Mihashi, Y. Hirohara and Y. Tano: "Optical imaging to evaluate retinal activation by electrical currents using suprachoroidal-transretinal stimulation," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48** (2007) 4777-4784.
- 15) T. Morimoto, H. Kanda, T. Miyoshi, Y. Hirohara, T. Mihashi, Y. Kitaguchi, K. Nishida and T. Fujikado: "Characteristics of retinal reflectance changes induced by transcorneal electrical stimulation in cat eyes," *PLoS One*, **9** (2014) e92186.
- 16) T. Mihashi, Y. Okawa, T. Miyoshi, Y. Kitaguchi, Y. Hirohara and T. Fujikado: "Comparing retinal reflectance changes elicited by transcorneal electrical retinal stimulation with those of optic chiasma stimulation in cats," *Jpn. J. Ophthalmol.*, **55** (2011) 49-56.

(2014年9月19日受理)