

博士学位論文要約（令和4年3月）

げっ歯類視覚野網膜地図のモデルベース推定法の開発と応用に関する研究

外川 龍之介

指導教員：中尾 光之

Study of development and application of model-based estimation method of the rodent cortical retinotopic map

Ryunosuke TOGAWA

Supervisor: Mitsuyuki NAKAO

To evaluate the visual ability in vision-restored animals, it is desirable to use minimally invasive method, unanesthetized, short in time, and allows for long-term repeated follow-up. For this purpose, transcranial intrinsic optical signal (IOS) imaging is a promising candidate. I have developed a new method for estimating retinotopic maps under unanesthetized conditions using the partitioned grating method and a retino-cortical map model (planar and spherical space models of the retina). In this study, I applied the conventional method and our proposed model-based methods to the data obtained from the IOS response experiments, and compared the results of the retinotopic map estimation. In the retinotopic maps estimated by the model-based methods, retinal areas were mapped to the cortical areas while maintaining topological relationships, which was neurophysiologically plausible. Using the retinotopic map estimation method developed in this study, I succeeded in evaluating the visual ability of visually reconstructed animals.

第1章 序論

大脳皮質一次視覚野には網膜地図と呼ばれる網膜からのトポグラフィックな神経投射がある¹⁾²⁾。網膜地図は視覚反応の評価や視野欠損範囲の推定に有用なので、動物を用いた視覚再建研究において重要な役割を果たしうる。従来の網膜地図推定法は計測中の眼位変動に対して脆弱であったため、眼球運動を抑制する麻酔など、動物に負担を強いる必要があった。本研究では、動物への負担が少ない、無麻酔・安静状態の動物に適用可能な、眼位変動に対してロバストな網膜地図推定法を開発した。さらにその方法を視覚再建されたラットに適用する事により、従来は眼球摘出など侵襲的な方法でしか行えなかった視野範囲の推定などの視覚能力の評価を低侵襲に行うことに成功した。本論文はこれらの成果を取りまとめたものである。

第2章 研究の背景と目的

現在、様々な先端的視覚再建技術の研究・開発が行われている。その技術開発の過程では実験動物を用いた評価実験が必要である。特にマウスとラットは遺伝子導入が容易であり、侵襲的な実験が比較的容易であるため、この研究によく用いられている。しかしながら、げっ歯類の視力検査は人と同じように行うことができないため、生理学的計測によって評価する手法の開発が必要である。既存の視覚能力評価手法の例として視覚誘発電位の計測と視機性運動班反応の計測が

ある³⁾。

視覚誘発電位とは、網膜で光が受容されると大脳皮質視覚野で生じる誘発電位のことである。視覚誘発電位の有無や応答の大きさから視覚能力の回復の程度を評価する。この手法では、侵襲性を低く抑えるために大脳皮質視覚野の少数点でのみ応答計測にとどまっているため、どの程度の視野範囲が回復したかを詳細に評価することができないことが問題となっている。

健全な視覚を持つマウスやラットに移動する縞模様を見せると、その縞模様を追跡するように首を振る運動が見られる。この現象は視機性運動反応(OKM)と呼ばれる。提示する縞模様の間隔や回転速度、コントラストを変えた時のOKMの有無を計測することによって、コントラスト特性や波長特性を評価する。この手法では、運動反応由来の行動か自発的に生じた行動なのかの判断がつけるのが困難であるという問題がある。また、動物が視覚刺激に反応するかどうかについては評価できるものの、どれくらいの範囲の視野が回復したのか、また、どれくらい細かいものを判別可能かについて精密に評価することは容易でない。そこで、我々はげっ歯類の視覚能力を大脳皮質視覚野の網膜地図を用いて評価する方法を提案してきた。網膜地図には網膜から大脳皮質視覚野に形成されるトポグラフィックな投射構造が反映されているので、その構造や欠損から視野の回復範囲を評価することができるからである。

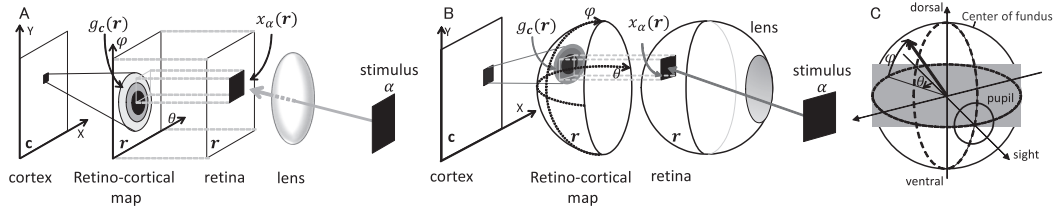


図1 網膜-皮質マップモデル⁶⁾. A 平面網膜モデル, B 球面網膜モデル, C 網膜極座標系.

網膜地図の推定には、視覚刺激に対する視覚野の応答を計測する必要がある。ラベルフリーで長期にわたって大脳皮質活動を測定可能な経頭蓋内因性光信号 (IOS) イメージング法がこの目的に適していると考えられる⁴⁾。しかし、IOS は信号対雑音比が小さいため、同期平均法を用いたノイズ抑制の前処理が必要となる。しかし、視覚刺激の際に眼位が変化すると、同一の視覚刺激であっても網膜像が変化するため、同期平均法の前提条件が満たされなくなる、網膜像が変化しないようにするには眼球を固定した条件で計測する必要があるが、その際に必要な麻酔処置は、動物にとって負担が大きい。視覚再建過程の評価のためには長期にわたって計測を繰り返す必要があるため、より負担の小さい無麻酔・安静状態で計測を行うことが望ましい。しかし、この条件では眼位変動が生じることは避けられない。

以上から、本研究の目的を次のように設定した。まず、眼位変動に対し頑健で高い空間分解能を持つ網膜地図推定法を開発する。次に、この手法を用いて無麻酔・覚醒状態のマウスの網膜地図を推定し、従来法で推定されたものと比較することにより、提案法の有用性を評価する。最後に、この手法を視覚再建動物に適応することにより、回復した視覚能力の定量評価を試みる。以上から、提案法が視覚再建動物の視覚能力評価に有用であること示す。

第3章 網膜-視覚野マップモデルに基づく網膜地図推定法の提案⁵⁾⁶⁾

従来のげっ歯類の網膜地図推定法には Schuett らが提案した手法と Kalatsky らが提案した手法がある。

Schuett 法¹⁾は視覚刺激として分割 Grating 刺激を用いて二次元の網膜地図が推定する手法である。この網膜地図推定法では各刺激に対する応答を求める際に同期平均を用いるため、実験中は眼位の変動が生じないということが前提としている。また、網膜地図の分解能は視野の分割数に制限されるため、視野の欠損範囲をこの方法から推定された網膜地図から評価することは難しい。

Kalatsky 法²⁾は視覚刺激として Moving bar 刺激を用いて一次元の連続した構造を有する網膜地図を

推定する手法である。この手法でもノイズ抑制法として同期平均を用いるため、実験中は眼位の変動が生じないということが前提としている。

そこで我々は同期平均法を用いないノイズ抑制法を導入し、眼位変動に対しロバストに網膜地図を推定できる新しい手法(モデルベース網膜地図推定法)の開発を行った。この網膜地図推定法では、視覚刺激が提示されてから大脳皮質一次視覚野で反応が生じるまでの経路をモデル化した(図1)。視覚野上の関心領域(Region of interested, ROI)における反応の大きさは、その場所が網膜上に持つ受容野と網膜像との積和で表せると仮定した。計算の簡略化のために、網膜を平面で近似し、皮質の受容野の形状が Gauss 関数であるとした(平面モデルベース法、図1A)。モデルの反応の大きさと計測された反応の大きさと計測された応答との二乗誤差が最小になるように受容野関数のパラメータを推定する。推定されたパラメータのうち、受容野の中心座標を表すパラメータのヒートマップを用いることで網膜地図を描画した。

この方法は測定中の視覚刺激提示箇所と眼位から推定される網膜像と実際の反応の大きさをを用いて網膜地図を推定するため眼位変動によって対しロバストである。本提案法では、単一刺激の応答を計測する必要があるため、同期平均によるノイズ抑制が行えない。そこで、同期平均に代わるノイズ抑制法として Global signal regression 法を導入した。

平面モデルベース法では網膜が平面であると仮定しているため、網膜周辺部で誤差が増大することが懸念された。そこで本研究では、網膜を球面モデル化し、受容野関数を球面上の Von Mises-Fisher 関数で置き換えた網膜地図推定法(球面モデルベース法、図1B)を提案した。球面モデルベース法では反応の大きさを算出する際にはモンテカルロ法を用いた。

第4章 視覚野の応答と眼球運動の計測方法

まず、本研究で提案した網膜地図推定法の有用性を検証するために行った動物実験の方法について説明した。従来法と提案法の性能を比較するために C57BL/6N マウスを実験に用いた。視覚再建動物のとした視覚能力の定量評価のためには網膜色素

変性症モデル動物であるRCSラットを使用した。ホモ型のRCSラット(RCS-rdy/rdy)は出生時には正常な視細胞をもっているが、生後4週を過ぎると視細胞が徐々に減少していき、生後3カ月頃にはほとんどの視細胞が消失するという特徴がある。一方、野生型のRCSラット(RCS+/+)は視覚刺激誘発応答を示すなど健全な視覚が維持されることが報告されている。

大脳皮質視覚野応答の計測法として、緑色散乱光(波長約530nm)を用いた脳血液量イメージング法を用いた。脳血液量イメージング法は神経血管カップリング現象を利用した脳活動の画像化法であり、比較的低侵襲な経頭蓋的計測が可能であるため、長期の計測に適している。

視覚刺激中、脳血液量イメージングと同時に眼位・瞳孔計測を行った。眼位計測にはCMOSカメラ、レンズおよびホットミラーを用いた。RCSラットはアルビノ系で虹彩が薄いため、この方法では鮮明な画像が得られない。そこでinfrared back-illumination pupillometry (iBip)法を用いた。これは頭蓋骨前頭部に設置したLEDから赤外線を照射し、脳と眼球硬膜越しに瞳孔を背面から照射して像を得る方法である。

第5章 網膜・視覚野系モデルモデルに基づく網膜地図推定⁶⁾

提案した球面網膜モデルベース網膜地図推定法の有用性を示すために、安静・覚醒状態のマウスを対象に、従来手法及び我々が過去に提案した平面網膜モデルベース法を用いて推定した網膜地図との比較を行った。

従来法であるKalatsky法では、水平または垂直方向に移動するMoving bar刺激に対する視覚野応答を解析し、一次元の連続した網膜地図を推定する。Kalatskyらは、Moving bar刺激を用いることにより、覚醒状態でも視覚刺激中の眼位変動は無視できる程度に抑制されると主張していた。しかし、実験の結果、我々の方法で利用している分割Grating刺激と同程度の眼位変動が生じていた(図2B)。また、Kalatsky法により推定された網膜地図(図2Aa)には、網膜との結合構造の乱れが観察された。これは、無麻酔状態であるために生じた自発眼位変動の影響によると考えられた。また網膜地図の水平方向の視野の範囲が $\pm 40^\circ$ で、従来の知見($\pm 90^\circ$)に比べ狭かった。

平面網膜モデルベース法では、視覚刺激中の眼位補正を行った結果、仰角及び水平方向に関して血管のない連続した二次元網膜地図が推定することができた(図3A)。網膜地図の視野の範囲は $\pm 60^\circ$ とKalatsky法より広がった。

提案法である球面網膜モデルベース法で、平面モデルベース法と同様に眼位変動の影響を補正

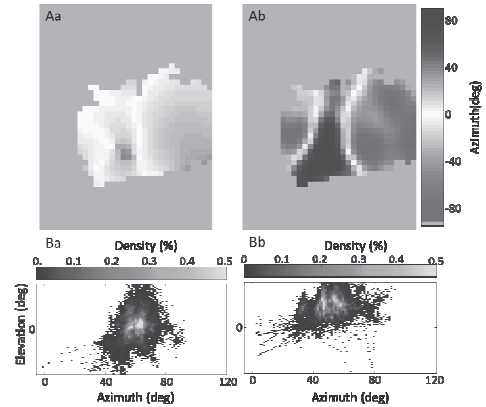


図2 網膜地図の推定結果(方位角)と眼位の滞在比率(マウス1-2)⁶⁾。Moving bar法による結果Aaと眼位の滞在比率Ba, 提案法(球面モデル)による結果Abと眼位の滞在比率Bb。

した二次元網膜地図を推定できた(図3B)。網膜地図の視野の範囲は $\pm 90^\circ$ であり、Kalatsky法や平面モデルベース法に比べ広く、また、マウスの視野に関する知見に最も近かった。

以上の結果から、覚醒・安静状態のマウスの視野網膜地図を推定する手法として、本研究で提案した球面網膜モデルベース推定法が最も優れた性能を有することが明らかになった。

第6章 網膜地図推定法の視覚再建動物への適用

本研究で開発した網膜地図推定法を用いて、視覚再建治療を施したRCSラットの視覚能力の評価実験を行った。実験は岩手大学の富田浩史教授らとの共同研究により実施した。視細胞が失われたRCSラットの網膜神経節細胞に光感受性イオンチャンネルタンパク質であるComV1を発現させたRCS-rdy/rdyラット(処置群)と処置を行わなかったRCS-rdy/rdyラット(非処置群)、及び健全な視覚を持つRCS+/+ラット(対照群)を使用した。解析の結果、対照群の大脳皮質視覚野では健全マウスで推定されたものと同様にトポグラフィックな構造を持つ網膜地図が推定された。一方、非処置群の視覚野では視覚誘発性応答が観測されなかった。処置群においては、左視野への視覚刺激に対して右大脳皮質視覚野に、対照群に比べやや小さいものの視覚誘発応答が観察された。網膜地図を推定した結果、網膜と視覚野の間に対照群と類似したトポグラフィックな構造が確認された。しかしながら、対照群に比べ視覚野の反応する領域が狭く、また網膜の選好角度の偏りが大きかった。この結果は網膜神経節細胞におけるComV1の発現密度の偏りを示唆するものである。

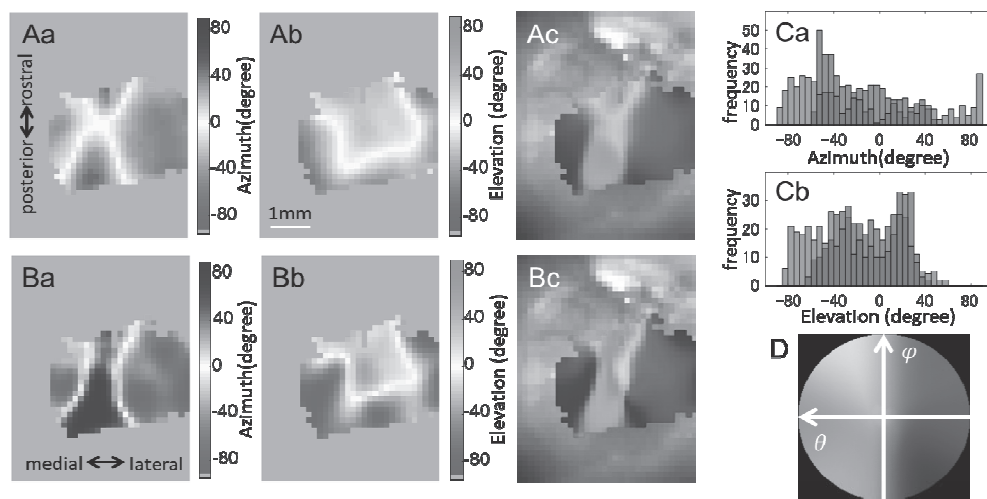


図3 提案法で推定された網膜-皮質マップの比較（マウス1-2, 平均眼位：方位角56度, 仰角6.2度）⁶⁾。平面モデルによる推定結果(A), 球面モデルの推定結果(B)。a 方位角, b 仰角, c 二次元網膜地図。C 推定された選好角度の分布（橙：球面モデル, 青：平面モデル）。D 網膜座標系のカラーマップ。

以上, 視覚再建動物の網膜地図を低侵襲な方法で推定することにより, その視覚能力を評価することに初めて成功した。

第7章 結論

本研究では, 視覚野網膜地図に基づいて視覚再建動物の視覚能力を解析するために, 眼位変動に対しロバストで高精度な推定が可能な球面網膜モデルベース網膜地図推定法を提案した。健全な視覚を持つマウスを対象に従来法と提案法で推定した網膜地図を比較することにより, 提案法が最も優れた性能を有することを明らかにした。提案法を用いることにより, 視覚再建術を施したラットの網膜地図を推定することに初めて成功し, 視野の欠損や偏りを推定した。従来, このような解析は網膜を摘出して遺伝子発現領域を免疫染色しなければ行えなかった。本手法を用いることにより視覚能力の経時変化を調べることも可能になった。以上により, 本提案手法が視覚再建技術の研究・開発に有用であることが示された。

文献

- 1) S. Schuett, T. Bonhoeffer, and M. H. Bener, “Mapping Retinotopic Structure in Mouse Visual Cortex with Optical Imaging,” *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 15, pp. 6549–6559, 2002.
- 2) V. A. Kalatsky and M. P. Stryker, “New paradigm for optical imaging: Temporally encoded maps of intrinsic signal,” *Neuron*, vol. 38, no. 4, pp. 529–545, 2003.

- 3) Y. Watanabe *et al.*, “Development of an optogenetic gene sensitive to daylight and its implications in vision restoration,” *npj Regen. Med.*, vol. 6, no. 1, 2021.
- 4) Y. Yoshida, M. Nakao, and N. Katayama, “Resting-state functional connectivity analysis of the mouse brain using intrinsic optical signal imaging of cerebral blood volume dynamics,” *Physiol. Meas.*, vol. 39, no. 054003, pp. 1–20, 2018.
- 5) 外川 龍之介, 奥畑 大悟, 吉田 侑冬, 中尾光之, 片山統裕, “眼位・瞳孔径変動を考慮した内因性光信号イメージングに基づく覚醒時マウス脳視野地図の推定”, 生体医工学, 56(4), 157–163, 2018.
- 6) 外川龍之介, 中尾光之, 虫明元, 片山統裕, “網膜極座標系を用いた大脳皮質網膜地図のモデルベース推定法”, 生体医工学, 印刷中