

メラノプシンを含む神経節細胞の瞳孔系への寄与：  
多原色光源による検討

辻村 誠一, 塗木 淳夫, 湯ノ口万友

鹿児島大学 工学部

Pupil Response to Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion  
Cells Studied with a Multi-Primary Illumination System

Sei-ichi Tsujimura, Atsuo Nuruki, Kazutomo Yunokuchi

Department of Bioengineering, Kagoshima University

## 要約

従来、人間の光受容器は赤緑青の3錐体と桿体だけであると考えられていたが、最近、新たに視物質メラノプシンを含む神経節細胞(melanopsin-expressing retinal ganglion cell; mRGC)が発見された。mRGCは生体リズムを調節していると考えられている視交叉上核や瞳孔反射をつかさどっている視蓋前域などに投射していることが知られている。本研究では、mRGCを他の光受容器と独立に刺激するための多原色光源装置を用いて、mRGC経路の信号が輝度経路や色経路の信号とともにどのように瞳孔反応経路に寄与しているかを調べた。実験の結果は、輝度信号とmRGC経路の信号は非線形に結合して瞳孔系に入力していることを示唆している。一方、色信号とmRGC経路の信号は、独立に瞳孔システムに入力していることを示唆していることがわかった。(神眼25 : 241 ~ 248, 2008)

## Abstract

A recent study has shown that retinal ganglion cells, which are intrinsically photosensitive in primates, contain the photopigment melanopsin and project to the pupillary control center in the pretectum. The aim of this study was to investigate how signals that are driven by the melanopsin-expressing retinal ganglion cells (mRGCs) and by the other visual photoreceptors are able to contribute to the pupillary control mechanism. To independently stimulate the mRGCs from the other photoreceptors, we designed and built a novel multi-primary stimulation system. With regard to the pupillary response, our results suggest that there is a weak interaction between the |M-L| color signals and the mRGC signals. However, we also found that there is a strong non-linear interaction between the |M+L| luminance signals and the mRGC signals.

(*Neuro-ophthalmol Jpn* 25: 241 ~ 248, 2008)

**Key Words:** melanopsin, pupil, luminance, color

## はじめに

従来、人間の光受容器は赤緑青の3種類の錐体と杆体だけであると考えられていたが、最近、新たな光受容器の存在が明らかとなった<sup>1,2)</sup>。その光受容器とは、視物質メラノプシンを含む特別な神経節細胞である。この神経節細胞は単体で光刺激に神経応答を示し、かつ、その信号は、生体リズムを調節していると考えられている視交叉上核や瞳孔反射をつかさどっている視蓋前域などに投射している。さらに驚くことには、その信号は、視覚情報を伝達している外側膝状体から視覚野への経路にも投射していることが報告されている<sup>2)</sup>。このことは、従来、視覚の研究は3錐体と杆体のみを対象としてきたので驚くべきことである。Daceyらは、メラノプシンを含む神経節細胞が、錐体や杆体からも入力を受けていることを報告しているが、これらの受容体の信号とメラノプシンを含む神経節細胞からの信号がどのように瞳孔反応に寄与しているかは明らかではない。本研究では、新たに開発した多原色光源を用いてメラノプシンを含む神経節細胞および他の光受容体を独立に刺激し、これらの細胞の瞳孔系への機能的な寄与を調べることを目的とする。

メラノプシンを含む神経節細胞の瞳孔系への影響を定量的に調べるためには、メラノプシンを含む神経節細胞の興奮度を推定することが必要であるが、従来の測色系では、メラノプシンを含む神経節細胞への物理刺激量を定義できない。従来、用いられている輝度や色度などの測光量は網膜の錐体、杆体細胞のみで定義されており、最近発見されたメラノプシンを含む神経節細胞を考慮していない。すなわち、従来の測色系はメラノプシンを含む神経節細胞の興奮度を反映していない。メラノプシンを含む神経節細胞の興奮度を定量

化するためには、神経節細胞の分光感度特性が必要である。我々は、生理学データ<sup>2)</sup>、および人間の水晶体の光学濃度などの眼光学系の特性を考慮し、メラノプシンを含む神経節細胞の分光感度特性を算出した<sup>3)</sup>。刺激光の放射量を、この分光感度特性で積分し、メラノプシンを含む神経節細胞の興奮度と定義して、実験をおこなった。

## 1. 方法

### (1) 4原色刺激装置

視覚刺激を提示するために、我々が開発した多原色積分球刺激提示装置を用いた(図1)。装置は、刺激表示部(display unit)および刺激制御部(stimulus control unit)から構成される。刺激制御部では、刺激提示プログラムによって、刺激の提示時間、強度、種類などの刺激提示条件から、各発光ダイオード(LED)の強度、提示タイミングなどを計算し、その値をもとにパルス幅変調ユニットを通して各発光ダイオードに時間的なパルス列を与える。それぞれのLEDはアナログPWMユニット(analog-pulse width modulation unit)からのパルス信号によって、各チャンネル独立に輝度が制御されている。アナログPWMユニットは、刺激制御部にインストールされているD/A変換器(DAQCard-6715, National Instruments, USA)からの電圧によって制御されている。D/A変換器からの電圧出力は、C++(Borland, USA)によって開発した刺激提示プログラムによって制御されている。刺激表示部は、積分球(integrating sphere)および刺激投影面(diffuser)から構成される。積分球内部には4色の異なる発光ダイオードがあり、各々のLEDの輝度はPWM装置によって独立に制御されている。各LEDから放射された光は積分球内部で光学的に積分され、積分球の開口部から放射される。各LEDのピーク波長は、600

nm, 520 nm, 500 nm, 470 nmである(Optosupply, Hong Kong). 開口部からの放射光はDiffuserを通して, 被験者の網膜に到達する. 光放射の分光放射輝度は, 分光放射輝度計(CS-1000A, コニカミノルタ)を用いて測定した. 被験者はDiffuserの手前に座り, 積分球からの光刺激を受ける. 積分球には色の異なるLEDが複数個配置されている. 被験者は実験者の指示に従い刺激中央に提示された固視点を注視する.

(2) 各受容体の分光感度

我々は, 先行研究によって同定された生理学データ, および水晶体の光学濃度特性, 黄斑色素による分光吸収特性などの眼光学系を

考慮してメラノプシンを含む神経節細胞の分光感度特性を推定した. この分光感度特性とすでに求められている他の光受容体の分光感度特性をもとに, 各受容体の刺激光に対する興奮度を計算する. メラノプシンを含む神経節細胞の網膜での分光感度特性は分光感度テンプレートにフィットすることで特定されているが<sup>2)</sup>, これは神経節細胞レベルであり, 人への影響を計測するためには, 人の水晶体の光学濃度特性, 黄斑色素による分光吸収特性など, 眼光学系の光学密度を考慮しなければならない. これらの特性はすでに錐体, 杆体では明らかにされており<sup>4,5,6)</sup>, 本プロジェクトでは, これら錐体, 杆体と同様の計算手順によりメラノプシンを含む神経節細胞の分光

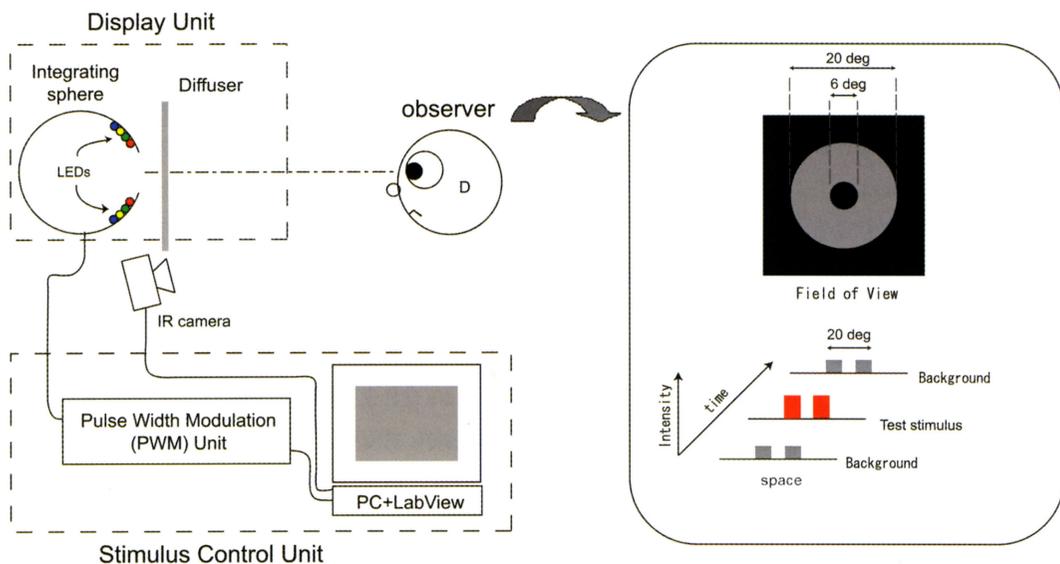


図1 多原色積分球刺激提示装置. 装置は, 刺激表示部(display unit)および刺激制御部(stimulus control unit)から構成される. 刺激制御部では, 刺激提示プログラムによって, 刺激の提示時間, 強度などを計算し, その値をもとにPWMユニットを通して各発光ダイオード(LED)に時間的なパルス列を与える. 刺激表示部は, 積分球および刺激投影面(diffuser)から構成される. 積分球内部には4色の異なる発光ダイオードがあり, 各LEDから放射された光は積分球内部で光学的に積分され, 積分球の開口部から放射される. 被験者は実験者の指示に従い刺激中央に提示された固視点を注視する.

感度を推定した。眼光学特性は、中心窩付近と周辺で異なるが、本研究では10度視野の特性を用いた。また、メラノプシンを含む神経節細胞の photopigment optical density は現時点で確認されていないので、0.5と仮定している。メラノプシンを含む神経節細胞の分光感度はピークが500 nmで半値幅が90 nmであった。photopigment optical densityはメラノプシンを含む神経節細胞の分光感度特性に影響を与えるが、photopigment optical densityを追加実験で妥当な範囲(0.1から0.8)で変化させても結果には大きな影響を与えないことを確認している。

### (3) 背景輝度および瞳孔測定

背景の輝度は230 cd/m<sup>2</sup>、色座標はCIE xy座標系で(0.40, 0.42)であった。背景の輝度は杆体の影響を少なくするために高輝度に設定している。網膜照度は瞳孔直径を2.0 mmとした場合に720 trolandであった。瞳孔の反応は赤外線カメラ(DragonFly2, Point Grey Research, Canada)によって60 Hzのサンプリングレートで測定し、LabView(National Instruments, USA)によって解析した。瞳孔の解析方法の詳細は辻村らの先行研究<sup>7,8)</sup>に記載されており、ここでは省略する。

## 2. 実験1：輝度刺激およびmRGC刺激に対する瞳孔反応

実験1では、(1)刺激の輝度のみが変化する刺激(輝度刺激)、および(2)mRGCの興奮度のみ変化させる刺激(mRGC刺激)の2種類の刺激に対する瞳孔反応を測定した。刺激の時間周波数は5 Hzである。測定には2名の被験者(DO, 23歳; SY, 22歳)が参加した。Gamlinら<sup>9)</sup>の先行研究によると、mRGCを刺激した場合の瞳孔反応は、錐体を刺激した場合の瞳孔反応に比較して、刺激のオフセットに対

して持続的な反応を示す。一方、錐体を刺激した場合には、刺激のオフセットに対して瞳孔反応は過渡的に散瞳する。輝度刺激のコントラストは、0.17、mRGC刺激のコントラストは0.11であった。予備実験においてこれらのコントラストではおおよそ0.4-0.5 mm程度の瞳孔反応が生じることを確認している。

## 結果及び考察

図2に被験者2名の輝度刺激(上段のパネル)およびmRGC刺激(下段のパネル)に対する瞳孔反応の時間特性を示す。解析の際、瞬目が生じた試行のデータは省いているが、全ての条件において20回以上の試行データから平均を求めている。横軸は時間を示し、縦軸は瞳孔直径を示す。横軸のボックスはテスト刺激の提示時間(40秒間)を示している。輝度刺激、mRGC刺激のオンセットに対する振幅は、DOでは、0.62 mm, 0.45 mm, SYでは、0.41 mm, 0.33 mmであった。輝度刺激に対する瞳孔反応は、被験者DO, SYともに刺激のオフセットにより急激に散瞳していることがわかる。輝度刺激はM錐体とL錐体のみを興奮させており(M+L)、この結果は先行研究の錐体に対する反応と一致している。一方、mRGC刺激に対する瞳孔反応は刺激のオフセットに対して持続的に応答しており先行研究と一致している。以上の結果は、本システムがmRGCと錐体を独立に刺激していることを支持している。

## 3. 実験2：輝度刺激、色刺激、およびmRGC刺激の瞳孔反応への寄与

実験1では、輝度刺激、mRGC刺激に対する瞳孔反応を測定し、本装置がそれぞれの受容体を独立に刺激していることを示した。本実験では輝度刺激とmRGC刺激を様々な割合で足し合わせたテスト刺激(輝度条件)、およ

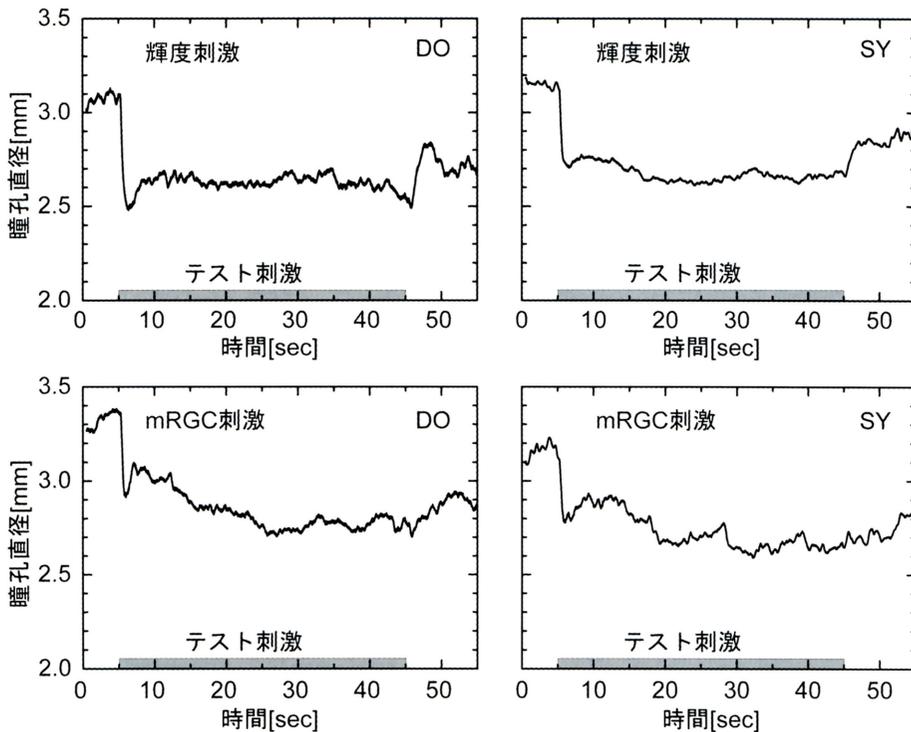


図2 輝度刺激(上段のパネル)およびmRGC刺激(下段のパネル)に対する瞳孔反応の時間特性。横軸は時間を示し、縦軸は瞳孔直径を示す。横軸のボックスはテスト刺激の提示時間(40秒間)を示している。

び等輝度刺激(色刺激)とmRGC刺激を様々な割合で足し合わせたテスト刺激(等輝度条件)を用いて、mRGCが輝度および色信号とともに、どのように瞳孔経路に寄与しているのかを検討する。瞳孔の等反応曲線を用いることにより、輝度、色刺激とmRGC刺激が線形に加算されて瞳孔経路に寄与しているのか、もしくは非線形に加算されているのかを調べることができる<sup>3,7,8)</sup>。

図3にテスト刺激を受容体コントラスト空間で表した模式図を示す。上段のパネルは、輝度条件によるテスト刺激を表し、下段のパネルは等輝度条件におけるテスト刺激を表している。上段のパネルの横軸は輝度のみを変調させた輝度コントラストを表し、縦軸はmRGCの興奮度のみを変調させたmRGCコン

トラストを表している。すなわち横軸上の刺激は、輝度のみを変化させ、刺激の色、mRGC興奮度は変化させない。同様に縦軸上の刺激は、mRGC興奮度のみ変化させ、刺激の輝度および色は変化させない。横軸上の刺激は実験1での輝度刺激に対応し、縦軸上の刺激はmRGC刺激に対応する。原点はコントラストが零、すなわち背景刺激を表している。パネル右は、輝度とmRGCを変調させたテスト刺激の一例である。輝度刺激はL錐体の興奮度とM錐体の興奮度を同時に変調させる。一方、mRGC刺激はmRGCの興奮度のみを変調させる。テスト刺激はこれら2つの刺激から構成されている。下段のパネルの横軸は色のみを変調させたM-Lコントラスト、縦軸はmRGCの興奮度のみを変調させたmRGCコン

トラストである。パネルの右は、色とmRGCを変調させたテスト刺激の一例を表している。M-L刺激はL錐体の興奮度とM錐体の興奮度の加算が一定になるように変調されている。すなわち、刺激の輝度が一定である。一方、mRGC刺激はmRGCの興奮度のみを変調する。全てのテスト刺激は原点からのベクトルで表すことができる。ベクトルの角度は、輝度刺激(等輝度刺激)とmRGC刺激の加算する割合を示し、ベクトルの長さは、コントラストの大きさを示している。マイナスのコントラストは、位相が180度異なることを示し

ている。したがって、原点を中心に点対称な刺激は本質的に同一な刺激である。ベクトル角度が、0度から150度まで30度ステップの6種類のテスト刺激を用いた。輝度条件における、それぞれのテスト刺激のコントラストは、全てのベクトル方向の刺激について0.090であった。等輝度条件でのテスト刺激のコントラストは、0度から、0.040, 0.048, 0.120, 0.088, 0.044, 0.036であった。各刺激のコントラストは予備実験により振幅が概ね0.3 mmのコントラストを選んでい。本実験では背景刺激を変化させていないので、各受容体の興奮度

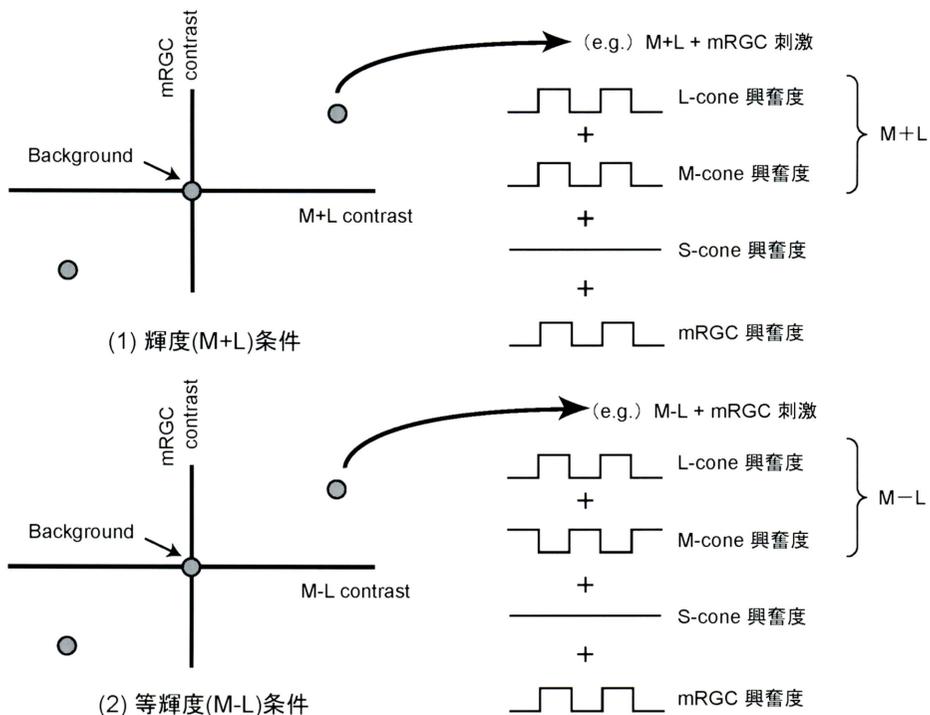


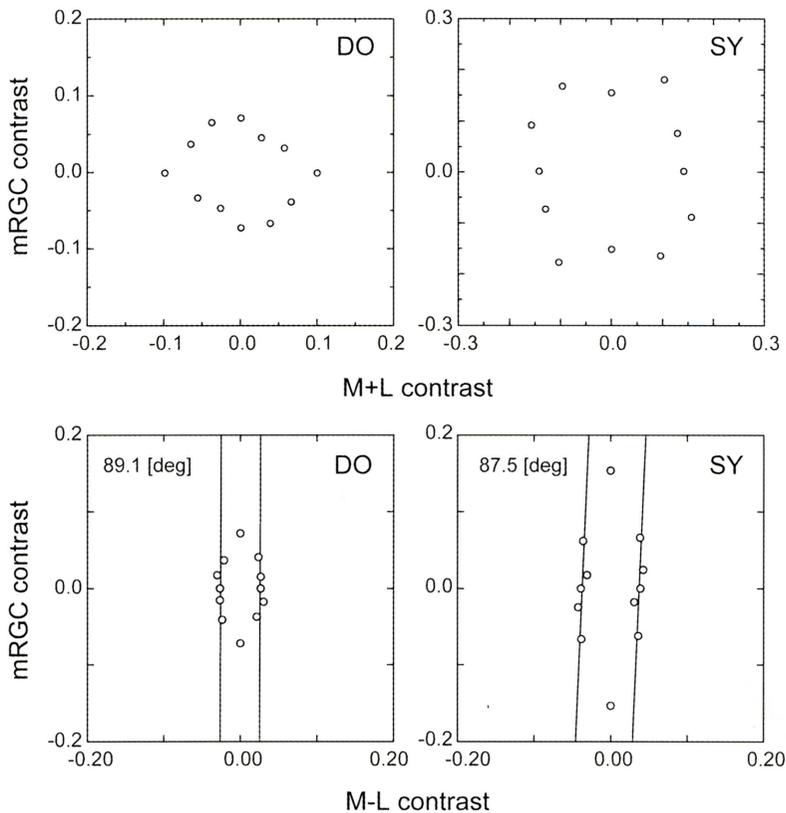
図3 テスト刺激を受容体コントラスト空間で表した模式図。上段のパネルは、輝度条件によるテスト刺激を表し、下段のパネルは等輝度条件におけるテスト刺激を表している。上段のパネルの横軸は輝度のみを変調させた輝度コントラストを表し、縦軸はmRGCの興奮度のみを変調させたmRGCコントラストを表している。下段のパネルの横軸は色のみを変調させたM-Lコントラスト、縦軸はmRGCの興奮度のみを変調させたmRGCコントラストである。詳細は本文を参照。

は受容体コントラスト空間より一意に求められる。

**結果及び考察**

図4に瞳孔の等反応特性を示す。上段のパネルは輝度条件を示し、下段のパネルは等輝度条件を示している。横軸はそれぞれ輝度コントラスト、色コントラストを示し、縦軸はmRGCコントラストを示す。各コントラストは、瞳孔が0.3 mm収縮するコントラストを表している。これらのコントラストは、コントラスト-振幅特性が線形であることを仮定して算出している<sup>7,8)</sup>。線形性の確認につい

ては、予備実験においてコントラスト-振幅特性を測定し、相関係数が0.89以上、平均が0.93であった。輝度条件では、被験者DO、SYともに非線形な等反応特性を示した。一方、等輝度条件ではmRGC刺激に対する瞳孔反応を除き、縦軸に平行な直線で近似できる。実線は近似直線である。パネル内左上の値は近似直線の傾きを示す。等反応曲線が縦軸と平行な直線で近似できることは、これらの振幅が横軸の刺激条件のみによって決定されていることを示している。すなわち、これらの瞳孔反応は、M-Lコントラストの値のみで決



**図4** 瞳孔の等反応特性。上段のパネルは輝度条件の等反応特性を示し、下段のパネルは等輝度条件の等反応特性を示している。横軸はそれぞれ輝度コントラスト、色コントラストを示し、縦軸はmRGCコントラストを示す。各コントラストは、瞳孔が0.3 mm収縮するコントラストを表している。

定されている。一方、輝度条件では、近似曲線は非線形な形となっており、等輝度条件とは大きく異なっている。輝度条件において、等反応曲線が非線形な形を示していることは、輝度信号とmRGC信号が非線形に結合し、瞳孔システムに入力していることを示唆している。一方、等輝度条件では、等反応曲線がmRGC軸と平行であることから、色信号とmRGC信号は、独立に瞳孔システムに入力していることを示唆している。

#### 4. まとめ

新たに作成した多原色光源によって、輝度刺激およびmRGCのみを変調させる刺激を用いて瞳孔反応を測定した。各刺激に対する瞳孔反応の結果は、本実験装置が各メカニズムを刺激していることを示している。輝度刺激、等輝度刺激、mRGC刺激を様々な割合で足し合わせたテスト刺激を用いて、瞳孔の等反応特性を測定した。その結果、mRGC経路の信号と等輝度信号は互いに独立に瞳孔系に入力されていることが示唆された。一方、mRGC経路の信号と輝度経路の信号には非線形な結合があることが示唆された。

#### 謝辞

この研究の一部は、医科学応用研究財団、御器谷科学技術振興財団、積水化学からの助成を受け実施されました。感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Lucas RJ, Hattar S, et al: Diminished Pupillary Light Reflex at High Irradiances in Melanopsin-Knockout Mice. *Science* 299: 245–247, 2003
- 2) Dacey DM, Liao HW, et al: Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature* 433: 749–54, 2005
- 3) Tsujimura S, Nuruki A, et al: Pupil response to melanopsin-containing retinal ganglion cells studied with a multi-primary illumination system. The 27th Pupil Colloquium, Hamamatsu, Japan, 2007
- 4) Smith VC, Pokorny J: Spectral sensitivity of the foveal cone photopigments between 400 and 500 nm. *Vision Res* 15: 161–171, 1975
- 5) Stockman A, Sharpe LT, et al: The spectral sensitivity of the human short-wavelength sensitive cones derived from thresholds and color matches. *Vision Res* 39: 2901–27, 1999
- 6) Stockman A, Sharpe LT: Tritanopic color matches and the middle- and long-wavelength-sensitive cone spectral sensitivities. *Vision Res* 40: 1739–50, 2000
- 7) Tsujimura S, Wolffsohn JS, et al: A linear chromatic mechanism drives the pupillary response. *P Roy Soc Lond B* 268: 2203–2209, 2000
- 8) Tsujimura S, Wolffsohn JS, et al: Pupil responses associated with colored afterimages are mediated by the magno-cellular pathway. *Vision Res* 43: 1423–1432, 2003
- 9) Gamlin PD, McDougal DH, et al: Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Vision Res* 47: 946–54, 2007