

## 経角膜網膜電気刺激の網膜血管閉塞性疾患に対する治療効果の検討

分担研究者 篠田啓 東京医療センター、臨床研究センター（感覚器センター）

### A. 研究目的

本研究で開発を目的とするFRGは、in vivoでの黄斑機能のマッピングを可能にせしめるもので、そのために、既存の評価法で得られたデータとの比較が必要と考える。また、主任研究者らは、FRG成分の起源の探索に当たり、既存のERGとの比較を行ってきた。同時に、光刺激ではなく電流刺激によって起きる網膜表面の色調変化をFRGを用いて記録し、FRG成分の変化や挙動を分析した。この網膜電流刺激は、1980年代に三宅らが精力的に臨床研究を行った経角膜電気刺激を再現したものである。眼球を電気パルスで刺激して得られる誘発反応を人の後頭部から記録したものはEER(electrically evoked response)と呼ばれ、網膜の視細胞ではなくそれより内層網膜を刺激して得られる反応であることが知られていたが、網膜機能検査法としての臨床での普及には至らなかった。しかし20年以上経過して近年、網膜色素変性症で視細胞機能を失った患者において、内層網膜の残存機能を他覚的に評価できるため、人工網膜開発に利用されている。さらに、近年網膜を電気刺激することにより、網膜神経節細胞のアポトーシス抑制効果、網膜賦活作用が報告され、網膜および視神経の変性疾患に対する治療法としても着目されている。網膜機能障害を有する患者に対する治療法としての可能性を探索した。これらの背景から昨年我々は、この電流刺激を網膜血管閉塞性疾患の治療への応用を開始したが、本年はさらに症例を増加した。

### B. 研究方法

EER刺激方法は三宅らの方法に準拠した。すなわち、点眼麻酔下にてビスコートを滴下し、Burian Allen型角膜刺激電極型コンタクトレンズ(BA-02)を装着し、刺激は電気刺激装置(BPG-1)にて発生させ、アイソレータ(BSI-2)を介して電流量を調節する。電気刺激は角膜コンタクトレンズ型電極を用いるため経角膜網膜電気刺激(TES: transcorneal electrical stimulation)と呼ぶ。刺激条件は二相性パルス刺激、パルス幅10ms、刺激強度20~1000uA、刺激頻度は20Hzとした。本プロトコールによる刺激を、原則として、1ヶ月に1度、3ヶ月目まで行い、臨床検査データによる評価も並行して行った。

### 治療効果の検討

上記方法を用いて30分間刺激を行い、この前後で、ルティーンの臨床検査(視力、視野)にて視機能評価を行った。

### (倫理面での配慮)

本研究は、患者に対して研究の趣旨、安全性についての十分な説明を行った後、インフォームド・コンセントを取得して実施した。

### C. 研究結果

2症例ともTESによりphospheneの自覚が得られた。また、TES前後での視機能のデータを以下に示す。

症例1 27歳男性 左高血圧性網膜症 網膜中心動脈閉塞症(CRAO) 発症からTESまでの期間:2ヶ月  
 治療前後の視力 Vs=光覚弁(-)→Vs=光覚弁(+)

眼底写真



TES治療前後の全視野網膜電図(mixed rod and cone ERG)

TES 施行前 Vs=SL(-)

TES 施行後 Vs=SL(+)

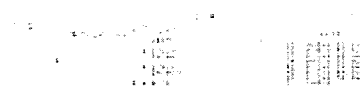
■OD b/a 1.39

b/a 1.37



■OS b/a 0.76

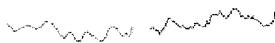
b/a 0.98



TES治療前後のVEP

TES 施行前 TES 施行後  
 SL(-) → SL(+)

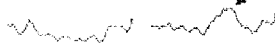
ND-3



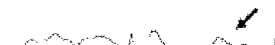
ND-2



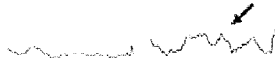
ND-1



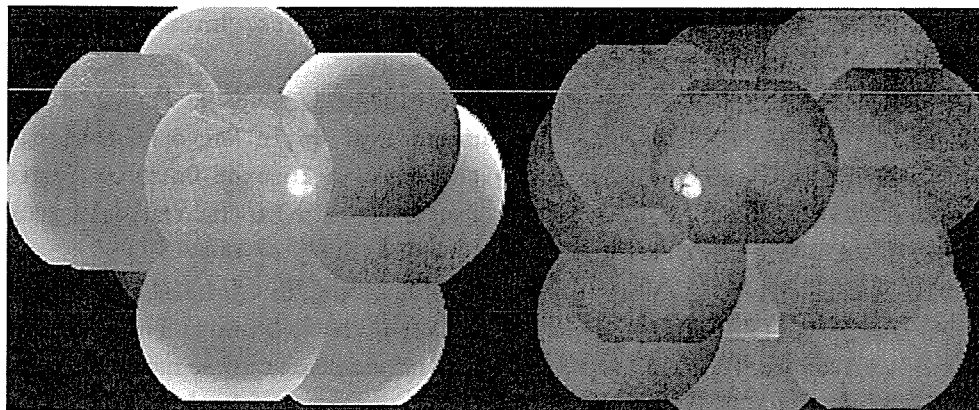
ND-0



ND-0  
 2.0J

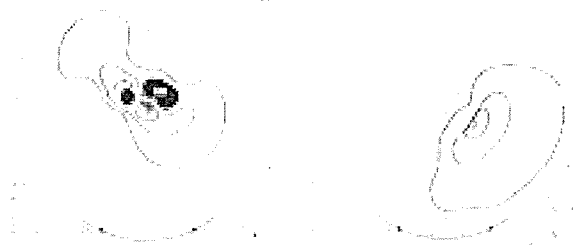


症例2 63歳男性 両多発性網膜動脈分枝閉塞症(BRAO) 発症からTESまでの期間:3年  
治療前後の視力 Vd=0.02(n.c.)→Vd=0.09(n.c) Vs=0.1(n.c.) →Vs=0.1(n.c.)  
眼底写真

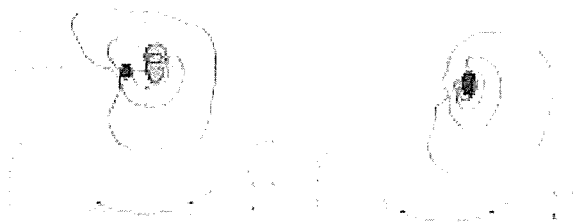


TES治療前後の視野所見

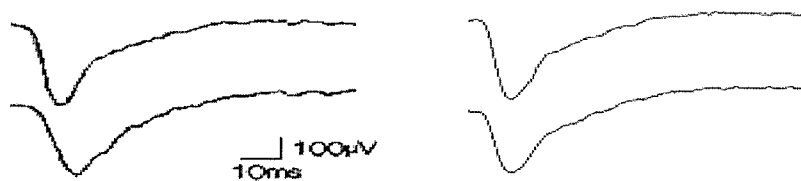
TES 施行前  
Vd=0.02(n.c.)  
Vs=0.1(n.c.)



TES 施行後  
Vd=0.09(n.c.)  
Vs=0.1(n.c.)



TES治療前後の全視野網膜電図(mixed rod and cone ERG(左TES前、右TES後)



#### D. 考察

網膜微小電流刺激による網膜神経細胞への賦活効果、臨床的な治療効果の背景には、①米国で網膜色素変性症等の網膜変性疾患に対して人工網膜チップを埋植された患者において網膜電位図、視野等の臨床検査にて網膜機能の改善が認められ、微弱電流刺激による網膜機能の賦活作用が注目されている(Chow-A et al. Arch Ophthalmol. 2004;122:460-9)。

②成体ラットの網膜神経節細胞が変性するモデルで、経角膜電気刺激により網膜神経節細胞の生存が促進することが示されており、網膜視神経の変性疾患に対する治療法として着目されている(Morimoto-T, et al. IOVS. 2005;46:2147-55.)。というエビデンスがある。今回は従来治療法がないとされてきた慢性の網膜血管閉塞性疾患の機能改善の可能性を検討した。その結果症例数は少ないものの、網膜血管閉塞性疾患(RAO)でTESによりphospheneが惹起されること、さらには、TESが網膜機能の向上(障害に対する治療)効果を有することが、示唆された。RAOで最初に障害を受けるのは網膜内層であるが、同時に網膜神経節細胞の障害も生じるとされる。本症例においてどのレベルの障害がTESによって改善されたかを評価するには全視野刺激ERGのほかに黄斑部局所ERGが極めて有用である。

また、今回の研究では視野検査を黄斑部機能評価の指標として用いたが、他覚的検査法として、ERG、多局所ERG、黄斑部局所ERGやFRGが重要と考えられる。さらにFRGの臨床応用に向けて性能評価のためにも比較検討すべきと思われる。

#### E. 結論

網膜血管閉塞性疾患(RAO)でTESによりphospheneが惹起されること、さらには、TESが網膜機能の向上(障害に対する治療)効果を有することが示された。また、FRGの臨床応用にむけて、TESによる網膜内因性信号の評価も行う予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Terauchi N, Fujinami K, Shinoda K, Tsunoda K, Hanazono G, Inomata K, Miyake Y. Transient macular ischemia determined by focal macular electroretinogram. Br J Ophthalmol. in press.
2. Hanazono G, Tsunoda K, Shinoda K, Tanifuji

M, Miyake Y. Intrinsic Signal Imaging in Macaque's Retina Reveals Different Types of Flash-induced Light Reflectance Changes of Different Origins. Invest Ophthalmol Vis Sci. In press

3. Ban Y, Shinoda K, Ohde H, Kaneda E. Enlargement of Optic Nerve Resembling Orbital Mass in Case of Optic Neuritis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2007 Jan 17; [Epub ahead of print]
4. Sailer H, Shinoda K, Blatsios, Kohler K, Bondzio L, Zrenner E, Gekeler F. Investigation of thermal effects of infrared lasers on the rabbit retina: a study in the course of the development of an active subretinal prosthesis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2007 Jan 12; [Epub ahead of print]
5. Sato EA, Shinoda K, Kimura I, Ohtake Y, Inoue M. Microcirculation in Eyes after Rhegmatogenous Retinal Detachment Surgery. Curr Eye Res. In press.
6. Sato EA, Inoue M, Kimura I, Ohtake Y, Shinoda K. Reduced Choroidal Blood Flow can Induce Visual Field Defect in Open Angle Glaucoma Patients without Intraocular Pressure Elevation following Encircling Scleral Buckling. RETINA. In press
7. Watanabe K, Shinoda K, Kimura I, Mashima Y, Ohde H. Dissociation of Conventional Visual field Tests and Multifocal Visual Evoked Potentials in Patients with Hemianopsia. Am J Ophthalmol. 2006 Nov 29; [Epub ahead of print]
8. Chen CJ, Satofuka S, Inoue M, Ishida S, Shinoda K, Imamura Y, Tsubota K. Suprachoroidal hemorrhage caused by breakage of 25-gauge cannula. Ophthalmic Laser Surgery Imaging 2006 (in press)
9. Kimura I, Shinoda K, Eshita T, Inoue M, Mashima Y. Relaxation of encircling buckle improved choroidal blood flow in a patient with visual field defect following encircling procedure. Jpn J Ophthalmol. 2006 Nov-Dec;50(6):554-6. Epub 2006 Dec 18.
10. Kurihata T, Ozawa Y, Shinoda K, Nagai N, Inoue M, Oike Y, Tsubota K, Ishida S, Okano H. Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) blocker, telmisartan via modulating AT1R and AT2R signaling in retinal inflammation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 Dec;47(12):5545-52.
11. Gekeler F, Shinoda K, Jünger M, Bartz-Schmidt KU, Gelissen F. Three cases of familial Retinal Arterial Tortuosity (fRAT) associated with tortuosity of

capillaries in nailfold capillaroscopy as an indication for a systemic disease. Arch Ophthalmol. Arch Ophthalmol. 2006 Oct;124(10):1492-4.

12. Inoue M, Shinoda K, Ohde H, Tezuka K, Hida T. Phototoxic effects of commercial photographic flash lamp on rat eyes. Doc Ophthalmol. 2006 Nov;113(3):155-64.
  13. Imamura Y, Noda S, Hashizume K, Shinoda K, Yamaguchi M, Uchiyama S, Shimizu T, Mizushima Y, Shirasawa T, Tsubota K. Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: A model of age-related macular degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jul 25;103(30):11282-7. Epub 2006 Jul 14.
  14. Yokoyama S, Kimura I, Ohde H, Shinoda K, Mashima Y. Microcirculation at Optic Disc Rim is Correlated with Visual Field Defects in Cases of Anterior Ischemic Optic Neuropathy. Clin Exp Ophthalmol. 2006 Jul;34(5):491-3.
  15. Tatar O, Adam A, Shinoda K, Stalmans P, Eckardt C, Lüke M, Bartz-Schmidt KU, Grisanti S. Expression of VEGF and PEDF in Choroidal Neovascular Membranes Following Verteporfin Photodynamic Therapy. Am J Ophthalmol. 2006 Jul;142(1):95-104.e1.
  16. Sugisaka E, Shinoda K, Ishida S, Imamura Y, Ozawa Y, Nakajima T, Shinoda H, Suzuki K, Kawaguchi N, Inoue M. Visual Sensations during Pars Plana Vitrectomy under Retrobulbar Anesthesia. Ophthalmology. 2006 Oct;113(10):1886.e1-2.
  17. Eckhorn R, Wilms M, Schanze T, Eger M, Hesse L, Eysel UT, Kisvarday ZF, Zrenner E, Gekeler F, Schwahn H, Shinoda K, Sachs H, Walter P. Visual resolution with retinal implants estimated from recordings in cat visual cortex. Vision Res. 2006 Sep;46(17):2675-90. Epub 2006 Mar 29.
  18. Tatar O, Shinoda K, Adam A, Rohrbach JM, Lucke K, Henke-Fahle S, Bartz-Schmidt KU, Grisanti S. Expression of Endostatin in human choroidal neovascular membranes secondary to age-related macular degeneration. Exp Eye Res. 2006 Aug;83(2):329-38. Epub 2006 Apr 11.
  19. Tatar O, Kaiserling E, Adam A, Gelisken F, Shinoda K, Völker M, Lafaut BA, Bartz-Schmidt KU, Grisanti S. Consequences of verteporfin photodynamic therapy on choroidal neovascular membranes. Arch Ophthalmol. 2006 Jun;124(6):815-23.
1. 篠田啓. 人工網膜の開発-世界の現況. 日本の眼科 77:651-654, 2006. (総説 視覚再生 編者 田野保雄)
  2. 篠田啓. X連鎖若年網膜分離症. 眼科 48:1661-1668, 2006. (遺伝性網膜疾患のトピックス 編者 北原健二)
2. 学会発表
  1. Ohde H, Shinoda K, Tsunoda K, Oguchi Y, Kamoshita I, Kimura I, Morimoto T, Fujikado T, Miyake Y. Transcorneal electrical stimulation improved retinal function of retinal artery occlusion in chronic phase. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision, (44 th;2006;Fontevraud, France). 2006.6
  2. Tsunoda K, Inomata K, Hanazono G, Shinoda K, Miyake Y, Tanifuji M. Retinal propagation of transcorneal stimulation as observed by intrinsic signal imaging with infrared light. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision, (44 th;2006;Fontevraud, France). 2006.6
  3. Hanazono G, Tsunoda K, Shinoda K, Oguchi Y, Miyake Y, Tanifuji M. Retinal intrinsic signal image and ERG evaluated under the same stimulus conditions in macaques. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision, (44 th;2006;Fontevraud, France). 2006.6
  4. Kimura I, Nagai N, Shinoda K, Tsunoda K, Ohde H, Kita K, Oguchi Y. Analysis of binocular summation using multifocal VEPs for artificial aniseikonia. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision, (44 th;2006;Fontevraud, France). 2006.6
  5. Fujinami K, Hanazono G, Tsunoda K, Inomata K, Ohde H, Shinoda K, Miyake Y. Fundus autofluorescence and occult macular dystrophy. International HRA symposium. (5 th;2006;Kyoto, Japan). 2006.11
  6. Kurihata T, Ozawa Y, Nagai N, Shinoda K, Inoue M, Oike Y, Tsubota K, Ishida S, Okano H. Effects of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) blocker on retinal neuronal cells in inflammatory status. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, (39th; 2006; Fort Lauderdale, Florida). 2006.4.
  7. Hanazono G, Shinoda K, Miyake Y, Tanifuji M, Tsunoda K. Fast And Slow Light Scattering Changes

Of Macaque Retina Observed By Intrinsic Signal Imaging. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, (39th; 2006; Fort Lauderdale, Florida). 2006.4.

8. Tatar O, Shinoda K, Adam A, Lucke K, Eckerdt C, Stalmans P, Eckerdt T, Bopp S, Bartz-Schmidt K, Grisanti S. Impact of Verteporfin Photodynamic Therapy on Endostatin Expression and Angiogenesis in Human Choroidal Neovascular Membranes. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, (39th; 2006; Fort Lauderdale, Florida). 2006.4.
9. Partsch MC, Tatar O, Adam A, Voelker M, Shinoda K, Lucke K, Bartz-Schmidt K, Grisanti S. Immunohistopathologic Evaluation of Choroidal Neovascular Membranes Following Intravitreal Bevacizumab (Avastin®) Therapy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, (39th; 2006; Fort Lauderdale, Florida). 2006.4.

1. 井上 真、篠田啓、鈴木 浩太郎、中島 剛、篠田 肇、小沢 洋子、石田 晋. 二段階斜切開を用いた 25 ゲージ強膜創作成による低眼圧の予防. 第 60 回日本臨床眼科学会 2006 年 10 月 6 日、京都
2. 鈴木 浩太郎、中島 剛、篠田 肇、今村 裕、小沢 洋子、篠田啓、石田 晋、井上 真. 25 ゲージ網膜下注入針を用いた黄斑下手術. 第 60 回日本臨床眼科学会 2006 年 10 月 6 日、京都
3. 杉坂英子、篠田啓、鈴木 浩太郎、中島 剛、篠田 肇、小沢 洋子、石田 晋、井上 真. 硝子体手術中の視体験の描出. 第 60 回日本臨床眼科学会 2006 年 10 月 6 日、京都
4. 瓶井資弘、北岡隆、皆本敦、平形明人、野田 徹、篠田啓、二神創、山田浩喜、山本拓広. インストラクションコース、硝子体手術手技の ABC. 第 58 回日本臨床眼科学会、東京、2006 年 11 月
5. 佐藤エンリケアダン、篠田啓、木村至、大竹 雄一郎、井上真. 裂孔原性網膜剥離術後の網膜視神経血流の検討. 第 60 回日本臨床眼科学会 2006 年 10 月 6 日、京都
6. 猪俣公一、篠田啓、角田和繁、大出尚郎、花園元、木村至、鴨下泉、三宅養三. 陳旧性の網膜動脈閉塞症に対する経角膜網膜電気刺激の治療効果. 第 60 回日本臨床眼科学会 2006 年 10 月 6 日、京都
7. 藤波芳、猪俣公一、花園元、角田和繁、篠田啓、勝田智子、秦誠一郎、鈴木参郎助、三宅 養三. 第 60 回日本臨床眼科学会 2006 年 10 月

6 日、京都

8. 中島 剛、鈴木 浩太郎、篠田 肇、今村 裕、小沢 洋子、篠田啓、石田 晋、井上 真. 25 ゲージ硝子体手術のカニューラとカッターの固着. 第 60 回日本臨床眼科学会 2006 年 10 月 6 日、京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し

## 網膜内因性信号計測装置性能向上のための設計開発

分担研究者 楠城紹生

株式会社ニデック医療機器開発部網膜診断機器グループ網膜診断機器開発チームプロダクトリーダー

研究要旨：動物計測用実験装置（サル用）については FRG-M4（呼称）へと改良が続けられ、特に FRG 手法によるデータ抽出の経角膜電気刺激実験、フリッカー光を使用した刺激実験、ERG 装置による電気生理的な結果との比較実験、刺激エネルギーに分けての差分の確認、そしてブリーチング（褪色変化）を得るための基礎実験等々に使用され、FRG 計測手法の妥当性のバックアップと共に新たな知見に繋がっている。

ヒト計測用実験装置 FRG-H1 の方は、覚醒下における測定性能確認の継続、経角膜電気刺激による擬似光覚の確認（動物実験のフォロー）、様々のパターンによる局部（フォーカル）刺激実験などに使用され、最終的には固視微動や眼筋反応等による画像ブレ（ムービングアーチファクト）対策の必要性と共に、この部分の解決には一層のテクニカルな部分での研究開発が必要であることを明確にした。

尚、より早い実用化のためのブリーチング（褪色反応）に絞った実験と相応の計画など、新たな積極策への展開も図っている。

### A. 研究目的

網膜の画像診断技術は、新しいセンシング技術である SLO・OCT なども駆使され、細部までの形態観察が非常に進んでいる。しかし、これらは未だ網膜の機能を必ずしも明らかにするものでなく、また従来技術として ERG や視野計があるが、其々に機能をみる上で限界がある。よって、今後の診断面では客観的に十分な網膜機能の検査の出来るものこそ必要とされている。

角田らは、最近の脳研究分野における光学計測法という神経活動を捕らえる技術を網膜に応用することを提案し、先ずは眼底カメラの利用でその可能性を見出すことに成功。理化学研究所、国立東京医療センター、ニデック社の三者を中心とした研究チームで、全く新しい他覚的な網膜機能計測手段の確立を目指すとした。

以上の概要については、昨年度から引続き同様であり変更はない。

然るに本年度は、麻酔下の動物用実験装置の方では更なる理論的足場固めを基本として、機器計測性能のアップを含めた FRG 計測レ

ベルの探求、および生理的機序についての新事実の検証等々。そして、ヒト用実験装置の方については実用化の前段階である臨床検査に供せるレベルまで装置性能を高めること、覚醒下のヒト眼における各種検証とその対策改良等々、実用装置に向けての具体化について進めることを目的とした。

### B. 研究方法

ニデック社としては以下の項目（内容）に関わり、主として研究装置開発及び逐次の改良を施すことで研究協力、バックアップを実施する。

1. FRG-H1（ヒト用実験機）：性能確認、FRG-M4（サル用実験機）：経角膜電気刺激実験。
2. FRG-H1：局部刺激実験、FRG-M4：経角膜電気刺激とフリッカー光刺激実験。
3. 学会発表予定等の確認。
4. FRG-H1：ムービングアーチファクト対策、FRG-M4：ERG比較実験。
5. FRG-H1：フォーカル刺激の詳細実験、FRG-M4：刺激エネルギーによる差分の確認。

6. 第 42 回日本眼光学学会発表(東京国際フォーラム、2007.9.16)。
7. FRG-H1による経角膜電気刺激実験。サルによるブリーチングの実験。
8. OPTICS & PHOTONICS JAPAN 2006 (学術総合センター/東京、2006.11.10)。
9. ブリーチングの実験。
10. イメージセンサの調査。
11. ブリーチング実用機の計画。

(倫理面への配慮)

装置の全般的安全性については、以下の国内及び国際安全規格に関わり、研究の実験の進捗段階で特にヒトへの適用に向けてこれらの遵守を前提とした。(JIS T 0601-1、JIS T 0601-1-1、JIS T 0601-1-2、ISO10940、ISO15004)

### C. 研究結果

前記、研究方法の手順に従った進捗状況は以下のとおりである。

#### 1. FRG-H1 (ヒト用実験機) : 性能確認、FRG-M4 (サル用実験機) : 経角膜電気刺激実験。

FRG-H1 : ソフト・ハードの改良変更の結果、未だクオリティは低いが発醒下の内因性信号が出せるようになった。FRG-M4 : 経角膜電気刺激による内因性信号実験装置の準備から開始。

#### 2. FRG-H1 : 局部刺激実験、FRG-M4 : 経角膜電気刺激とフリッカー光刺激実験。

FRG-H1 : 局部刺激用各種チャートを準備。びまん性刺激より内因性信号が出易い、しかし固視に関わる改良の必要性を確認。FRG-M4 : 経角膜電気刺激と共に各種フリッカー光刺激による比較実験を開始。

#### 3. 学会発表予定等の確認。

FRG-H1・FRG-M4共に改良が重ねられ一部成果も出ていることから、共同研究者間でARVO2006(済)・ISCEV2006・眼光学学会・臨床眼科学会・OPJ2006における各テーマ・発表の分担等について調整、合意。

#### 4. FRG-H1 : ムービングアーチファクト対策、FRG-M4 : ERG比較実験。

FRG-H1 : 局部刺激用各種チャートによる結果はムービングアーチファクトの影響が大き

く予定された目標に未達、画像ブレなどの対策が必要に。FRG-M4 : ERGとの比較実験では比較的順調に幾つかの新しい知見が得られ、FRGは優れて感度の高い計測法であることを再確認。

#### 5. FRG-H1 : フォーカル刺激の詳細実験、FRG-M4 : 刺激エネルギーによる差分の確認。

FRG-H1 : 局部刺激など、データの見直しから詳細実験に取り組む必要性があり、再実験の開始。FRG-M4 : 各刺激についてパルス幅・強度・刺激時間など其々の差分の出方詳細を確認。

#### 6. 第 42 回日本眼光学学会発表(東京国際フォーラム、2007.9.16)。

担当の発表 : FRG-H1・FRG-M4において一部研究成果を含める基本的内容からの報告を行い、同学会昨年までの内容にましてFRG手法による網膜機能解析への関心を引くことが出来た。

#### 7. FRG-H1 による経角膜電気刺激実験。サルによるブリーチングの実験。

ヒト角膜電気刺激の網膜反応について、動物実験のフォローとして擬似光覚が確実であること、また参照用光の改良の必要性など確認。サルではブリーチング実験を開始、まずは従来 FRG 手法にてその可能性を確認。

#### 8. OPTICS & PHOTONICS JAPAN 2006 (学術総合センター/東京、2006.11.10)。

担当の発表 : 日本光学会・日本分光学会のシンポジウムにおいて、網膜内因性信号計測の研究経過および現状動向について報告、FRG手法について眼科領域意外へのアピールを行った。

#### 9. ブリーチングの実験。

FRG-H1 にてブリーチングの時間変化を捉えることに成功、固視の視認性改良と高感度のイメージセンサにてその可能性を確認。FRGは近赤外光による網膜各層の混ざり合った反応より、可視光による視細胞に限定した反応の方が採りやすく、装置の改良で早期実用化の目処が立つと考えられた。

#### 10. イメージセンサの調査。

可視光を網膜に照射した場合、眼底反射率が低い上に被検眼への負担は大きい(増光すれば可視刺激がそれだけ増大してしまう)。よって、CCD 素子よりも高感度の冷却 CCD、イ



メージインテンシファイア、EM-CCD の検討を行った。

#### 11. ブリーチング実用機の計画。

FRG ヒト網膜各層反応の研究は、固視微動や眼筋反応等による画像ブレ対策について今後も尚技術課題として時間を要す。視細胞反応の方では、過去の研究で可視域においても定常光よりフラッシュ光の方が大きな反応の出ることも分かっており、実験機の仕様検討および新規部品手配などを推進中。

#### D. 考察

動物計測用実験装置（サル用）についてはFRG-M4 までの改良が進み、特に角膜知覚との関連で経角膜電気刺激による実験、またフリッカー光を使用した刺激実験の実験により、FRG 手法による網膜内因性信号検出法で十分に反応の捉えられることを確認した。特に後者においては、単発刺激で測定不可能な抵光量でも内因性信号の描出が可能であるなど、今後の臨床応用の有用性も考えられた。

具体的な ERG 装置による電気生理的な結果との比較においても、刺激エネルギーに分けての差分、各刺激についてパルス幅・強度・刺激時間など其々の差分の出方についての詳細確認で幾つかの新しい知見が得られたが、特にFRGは画像上からの網膜各部位別のデータ抽出に優れ、極めて感度の高い計測法であることを再確認した。

そしてブリーチングを得るための基礎実験では、高感度カメラを用いたの実験でノイズの重畳など多少の問題は出たものの、FRG 手法の妥当性をどこに求めるかの貴重な測定ノウハウおよびバックアップデータの入手に繋がっている。

ヒト計測用実験装置の方では、覚醒下における測定性能確認の継続では、確かにソフト・ハードの改良変更の結果で内因性信号が出せるようになったものの、未だクオリティが低い現状であり、特に眼筋反応（回旋）等による画像ブレ（ムービングアーチファクト）が原因と目されるFRG感度の低下が大きい。動物実験に引続いての各種刺激実験にて、様々のパターンによる局部（フォーカル）刺

激実験などを加味した結果では、瀰漫性刺激によるものより感度の改善がみられる場合もあった。しかし、いずれにしても画像ブレの影響を看過できるレベルには至らず、予定された目標に未達という結果となっている。

よって、ヒトへの適用では最終的には徹底した画像ブレ対策が必要になるのであるが、この部分の解決には一層のテクニカルな部分の研究開発で時間を要する恐れも出てきた。そこで、より早い実用化のためにFRGが提供する測定データのい中でも、比較的画像ブレの影響を受け難い、可視光によるブリーチングに絞った実験機の仕様検討およびの新規部品手配などを推進中。結果がよければ、先ずこの方向での臨床応用方法を図るのが得策であり、寧ろ新たな積極策として取上げるべきとされた。

その他、研究の進捗に合せ当方の担当として第42回日本眼光学学会（2007.9.16/東京）、OPJ2006（2006.11.10/東京）において発表を行ったが、其々にFRG手法そのものの今後の可能性について反響は得られアピールはできたものとする。

#### E. 結論

今回の網膜内因性信号計測装置（FRG 装置）性能向上については、特に測定理論の方では主にFRG-M系（麻酔下のサル用）実験装置において、継続した実験研究および装置改良の結果で、各種刺激仕様・画像キャプチャー・演算処理系など高い完成度と共にその実証はなされて来たと考ええる。

しかしながら、FRG-H系（覚醒下のヒト用）実験装置においては、その生体反応である眼筋反応等をもたらす画像ブレ（ムービングアーチファクト）による感度低下について、固視灯の視認性改良、顎部バイトバー固定、それ以上の対策に及ぶことが出来なかった。通常の眼科検査装置では、座位姿勢により顔を固定する形式のものが多く、ERG などでは角膜コンタクト電極を用いる関係上、仰臥姿勢で上部から刺激光を用いる場合がある。よって、本装置においても新たに頭部固定の目的で、仰臥のみならず伏臥による検査姿勢

などを考えることも眼球安定に有効な手段として検討に値する。

又、測定時のリアルタイム対応では最近の高次低次周波数対応の画像トラッキング技術などの利用、角膜反射輝点の揺れを眼底画像のブレに置換えて量的補正を行うオプティカルセンサーの他、レーダーセンサー、超音波センサー、ひいてはジャイロセンサーなどといった運動系センサーに、メカ・電気・ソフトウェア的処理を含めた対策を用いることで何らかの打開策は見出せるのではないかとされる。

しかし、何れにしても今少し時間を必要とするのであれば、ブリーチング実用機を先立って検討するのも現時点での結果として一つの良い方向ではないかと考える。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

花園元、柴田尚久、楠城紹生、角田和繁、谷藤学；「膜内因性信号測定装置」、視覚の科学（日本眼光学学会誌）第 28 巻 最近のトピックス（印刷中）

##### 2. 学会発表

大島進、柴田尚久、楠城紹生、花園元、谷藤学、角田和繁；網膜内因性信号計測法（FRG）を用いた網膜局所応答の観察、第 42 回日本眼光学学会・第 21 回眼科 ME 学会・合同学会総会、東京国際フォーラム、2007.9.16

楠城紹生、角田和繁、柴田尚久、花園元、谷藤学；オプティカルイメージングによる網膜内因性信号計測、日本光学会年次学術講演会・日本分光学会秋季講演会（OPTICS & PHOTONICS JAPAN 2006）、学術総合センター（東京）、2006.11.10

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

出願済：「網膜機能測定装置」特願 2005-285539

「網膜機能測定装置」特願 2005-347289

「網膜機能測定装置」特願 2006-028303

「網膜機能測定装置」特願 2006-152569

公開中：「網膜機能測定装置」特開 2006-136379

「網膜機能測定装置」特開 2006-239100

#### 3. 実用新案登録

なし

#### 4. その他

なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Y Yamane, K Tsunoda, M Matsumoto, A Phillips, and M Tanifuji	Representation of the spatial relationship among object parts by neurons in macaque inferotemporal cortex	J. Neurophysiol	96	3147-3156	2006
G Hanazono, K Tsunoda, K Shinoda, K Tsubota, Y Miyake and M Tanifuji	Intrinsic Signal Imaging in Macaque's Retina Reveals Different Types of Flash-induced Light Reflectance Changes of Different Origins	Investigative Ophthalmology & Visual Science		In press	2007
N Terauchi, K Fujinami, K Shinoda, K Tsunoda, G Hanazono, K Inomata and Y Miyake	Transient Retinal Ischemia Determined by Focal Macular Electroretinography	British Journal of Ophthalmology		In press	2007
角田和繁	網膜神経活動のイメージング—網膜内因性信号計測法—	日本視能訓練士協会誌	35	47-51	2006
Yamane Y., Tsunoda K., Matsumoto M., Phillips A.N., and Tanifuji M	Representation of the spatial relationship among object parts by neurons in macaque inferotemporal cortex	J. Neurophysiol	96	3147-3156	2006
Rajagopalan U. M	深さ方向の内因性イメージング- 機能的オプティカルコヒーレンストモグラフィ—	脳 21	9	101-105	2006
Hanazono G, Tsunoda K., Shinoda K., Tsubota K., Miyake Y., and Tanifuji M	Intrinsic signal imaging in macaque's retina reveals different types of flash-induced light reflectance changes of different origins	Investigative Ophthalmology & Visual Science		In press	
Suzuki Y, Kawase E, Nishina S, Azuma N	Two patients with different features of congenital optic disc anomalies in the two eyes	Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol	244	259-261	2006
Azuma N, Ishikawa K, Hama Y, Hiraoka M, Suzuki Y, Nishina S	Early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity	Am J Ophthalmol	142	636-643	2006

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Goto K, Yamada M, Sugawara A, Itou T, Azuma N, * Itou M	Small eye phenotypes observed in a human tau gene transgenic rat	Current Eye Reseach	31	107-110	2006
Suzuki Y, Nishina S, Azuma N	Scleral window surgery and topical mitomycin C for nanophthalmic uveal effusion complicated by real failure	Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol		In press	
Yamaguchi Y, Watanabe T, Hirakata A, Hida T	Localization and ontogeny of aquaporin-1 and -4 expression in iris and ciliary epithelial cells in rats	Cell and Tissue Research	325	101-109	2006
Hirakata A, Hida T	Vitreotomy for myopic posterior retinoschisis or foveal detachment	Jpn J Ophthalmol	50	53-61	2006
平形明人	感染性眼内炎の対応	東京都眼科医会報	197	2-8	2006
小笠原亜希子、気賀沢一輝、平形明人、渡辺俊樹、高間直彦	拍動性眼球陥凹を認めた2例	神経眼科		In press	
平形明人	前房水と硝子体—網膜生検と網膜下生検の手技—	眼科診療プラクティス いますぐ役立つ眼病理 吉川洋, 石橋達朗(編)	8	178-179	2006
平形明人	網膜、網膜前膜と網膜下組織—増殖組織の採取、固定、包埋—	眼科診療プラクティス いますぐ役立つ眼病理 吉川洋, 石橋達朗(編)	8	210-211	2006
平形明人	網膜・網膜前膜と網膜下組織—糖尿病網膜症 VS 未熟児網膜症—	眼科診療プラクティス いますぐ役立つ眼病理 吉川洋, 石橋達朗(編)	8	192-195	2006
平形明人	網膜・網膜前膜と網膜下組織—増殖性硝子体網膜症の増殖膜—	眼科診療プラクティス いますぐ役立つ眼病理 吉川洋, 石橋達朗(編)	8	196-200	2006
平形明人	網膜硝子体手術	Eye Surgery バトルロイヤル2—網膜硝子体、斜視編 バトルロイヤル編集委員会(編)		3-70	2006
平形明人	糖尿病網膜症—糖尿病とその合併症—	人体の構造と機能及び疾病の成り立ち各論 石田均, 門脇孝(編)	1	24-29	2006
平形明人	眼循環疾患—Eales 病—	眼科プラクティス 眼底アトラス 田野保雄(編)	12	120-121	2006

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
平形明人	視神経－乳頭小窩黄斑症候群－	眼科プラクティス 眼底アトラス 田野保雄(編)	12	120-121	2006
Terauchi N, Fujinami K, Shinoda K, Tsunoda K, Hanazono G, Inomata K, Miyake Y	Transient macular ischemia determined by focal macular electroretinogram	Br J Ophthalmol.		In press	
Hanazono G, Tsunoda K, Shinoda K, Tanifuji M, Miyake Y	Intrinsic Signal Imaging in Macaque's Retina Reveals Different Types of Flash-induced Light Reflectance Changes of Different Origins	Invest Ophthalmol Vis Sci.		In press	
Ban Y, Shinoda K, Ohde H, Kaneda E	Enlargement of Optic Nerve Resembling Orbital Mass in Case of Optic Neuritis	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol		Epub ahead of print	2007
Sailer H, Shinoda K, Blatsios, Kohler K, Bondzio L, Zrenner E, Gekeler F	Investigation of thermal effects of infrared lasers on the rabbit retina: a study in the course of the development of an active subretinal prosthesis	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol		Epub ahead of print	2007
Sato EA, Shinoda K, Kimura I, Ohtake Y, Inoue M	Microcirculation in Eyes after Rhegmatogenous Retinal Detachment Surgery	Curr Eye Res		In press	
Sato EA, Inoue M, Kimura I, Ohtake Y, Shinoda K	Reduced Chroidal Blood Flow can Induce Visual Field Defect in Open Angle Glaucoma Patients without Intraocular Pressure Elevation following Encircling Scleral Buckling	RETINA		In press	
Watanabe K, Shinoda K, Kimura I, Mashima Y, Ohde H	Dissociation of Conventional Visual field Tests and Multifocal Visual Evoked Potentials in Patients with Hemianopsia	Am J Ophthalmol		Epub ahead of print	2006
Chen CJ, Satofuka S, Inoue M, Ishida S, Shinoda K, Imamura Y, Tsubota K	Suprachoroidal hemorrhage caused by breakage of 25-gauge cannula	Ophthalmic Laser Surgery Imaging 2006		In press	2006

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kimura I, Shinoda K, Eshita T, Inoue M, Mashima Y	Relaxation of encircling buckle improved choroidal blood flow in a patient with visual field defect following encircling procedure	Jpn J Ophthalmol	50 (6)	554-556	2006
Kurihata T, Ozawa Y, Shinoda K, Nagai N, Inoue M, Oike Y, Tsubota K, Ishida S, Okano H	Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) blocker, telmisartan via modulating AT1R and AT2R signaling in retinal inflammation	Invest Ophthalmol Vis Sci.	47 (12)	5545-5552	2006
Gekeler F, Shinoda K, Jünger M, Bartz-Schmidt KU, Gelissen F	Three cases of familial Retinal Arterial//Tortuosity//fRAT) associated with tortuosity of capillaries in nailfold capillaroscopy as an indication for a systemic disease	Arch Ophthalmol	124 (10)	1492-1494	2006
Inoue M, Shinoda K, Ohde H, Tezuka K, Hida T	Phototoxic effects of commercial photographic flash lamp on rat eyes	Doc Ophthalmol	113 (3)	155-164	2006
Imamura Y, Noda S, Hashizume K, Shinoda K, Yamaguchi M, Uchiyama S, Shimizu T, Mizushima Y, Shirasawa T, Tsubota K	Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: A model of//age-related macular degeneration	Proc Natl Acad Sci U S A	103 (30)	11282-11287	2006
Yokoyama S, Kimura I, Ohde H, Shinoda K, Mashima Y	Microcirculation at Optic Disc Rim is Correlated with Visual Field Defects in Cases of Anterior Ischemic Optic Neuropathy	Clin Exp Ophthalmol	34 (5)	491-493	2006
Tatar O, Adam A, Shinoda K, Stalmans P, Eckardt C, Lüke M, Bartz-Schmidt KU, Grisanti S	Expression of VEGF and PEDF in Choroidal Neovascular Membranes Following Verteporfin Photodynamic Therapy	Am J Ophthalmol.	142 (1)	95-104	2006

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugisaka E, Shinoda K, Ishida S, Imamura Y, Ozawa Y, Nakajima T, Shinoda H, Suzuki//K, Kawaguchi N, Inoue M	Visual Sensations during Pars Plana Vitrectomy under Retrobulbar Anesthesia	Ophthalmology.	113 (10)	1886	2006
Eckhorn R, Wilms M, Schanze T, Eger M, Hesse L, Eysel UT, Kisvarday ZF, Zrenner E, Gekeler F, Schwahn H, Shinoda K, Sachs H, Walter P	Visual resolution with retinal implants estimated from recordings in cat visual cortex	Vision Res	46 (17)	2675-2690	2006
Tatar O, Shinoda K, Adam A, Rohrbach JM, Lucke K, Henke-Fahle S, Bartz-Schmidt KU, Grisanti S	Expression of Endostatin in human choroidal neovascular membranes secondary to age-related macular degeneration	Exp Eye Res	83 (2)	329-338	2006
Tatar O, Kaiserling E, Adam A, Gelisken F, Shinoda K, Völker M, Lafaut BA, Bartz-Schmidt KU, Grisanti S	Consequences of verteporfin photodynamic therapy on choroidal neovascular membranes	Arch Ophthalmol	124 (6)	815-823	2006
篠田啓	人工網膜の開発-世界の現況	日本の眼科	77	651-654	2006
篠田啓	X連鎖若年網膜分離症	眼科	48	1661-1668	2006
花園元、柴田尚久、楠城紹生、角田和繁、谷藤学	「膜内因性信号測定装置」	視覚の科学 (日本眼光学学会誌)	28		



#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# Representation of the Spatial Relationship Among Object Parts by Neurons in Macaque Inferotemporal Cortex

Yukako Yamane,<sup>1,2</sup> Kazushige Tsunoda,<sup>1,3</sup> Madoka Matsumoto,<sup>1</sup> Adam N. Phillips,<sup>1</sup> and Manabu Tanifuji<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Integrative Neural Systems, RIKEN Brain Science Institute, Saitama; <sup>2</sup>Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo; <sup>3</sup>Laboratory of Visual Physiology, National Institute of Sensory Organs, Tokyo, Japan

Submitted 21 November 2005; accepted in final form 27 August 2006

Yamane, Yukako, Kazushige Tsunoda, Madoka Matsumoto, Adam N. Phillips, and Manabu Tanifuji. Representation of the spatial relationship among object parts by neurons in macaque inferotemporal cortex. *J Neurophysiol* 96: 3147–3156, 2006. First published August 30, 2006; doi:10.1152/jn.01224.2005. We investigated object representation in area TE, the anterior part of monkey inferotemporal (IT) cortex, with a combination of optical and extracellular recordings in anesthetized monkeys. We found neurons that respond to visual stimuli composed of naturally distinguishable parts. These neurons were sensitive to a particular spatial arrangement of parts but less sensitive to differences in local features within individual parts. Thus these neurons were activated when arbitrary local features were arranged in a particular spatial configuration, suggesting that they may be responsible for representing the spatial configuration of object images. Previously it has been reported that many neurons in area TE respond to visual features less complex than natural objects, but it has remained unclear whether these features are related to local features of object images or to more global features. These results indicate that TE neurons represent not only local features but also global features such as the spatial relationship among object parts.

## INTRODUCTION

Visual information about object images is conveyed from early visual area V1 to inferior temporal (IT) cortex through areas V2 and V4 in macaque monkeys (for review, see Logothetis and Sheinberg 1996). Area TE is a ventral part of IT cortex and is the site that represents object images necessary for visual recognition (Gross 1994; Logothetis and Sheinberg 1996).

Early studies on visual responses of TE neurons showed that these neurons respond to various visual stimuli including natural object images (Bruce et al. 1981; Desimone et al. 1984; Gross et al. 1979; Perrett et al. 1982; Schwartz et al. 1983). More recently, a number of studies have attempted to identify the simplest visual features that activate individual neurons in area TE (Kobatake and Tanaka 1994; Tanaka et al. 1991). These studies have revealed that essential stimuli for TE neurons are visual features that are geometrically less complex than natural objects. Thus combinations of visual features are necessary for neural representation unique to individual object images in area TE.

As in the primary visual cortex, neurons in area TE with similar response properties are reported to be clustered into columns (Fujita et al. 1992; Gochin et al. 1991). The columns responding to visual stimuli have been visualized with intrinsic signal imaging as darkened spots scattered across the cortical

surface (Tsunoda et al. 2001; Wang et al. 1996, 1998). In particular, Tsunoda and colleagues used this technique together with conventional extracellular recordings and showed that an object image activates multiple spots, each of which represents a particular visual feature of the object image (Tsunoda et al. 2001). They reported that some of the visual features represented by activated spots were local features of object images, that is, features that appear in a spatially localized part of the object image. Thus it remains unknown how spatial arrangements of these local features in an object image are specified. Neurons in area TE may represent global features, such as spatial configuration of local features, in addition to spatially localized features. In this paper, we address this question by combining data from intrinsic signal imaging and extracellular recordings.

## METHODS

### *Anesthesia and the general recording condition*

Four rhesus monkeys were artificially ventilated with a mixture of N<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub>, and isoflurane for anesthesia and paralyzed with pancuronium bromide or vecuronium bromide (Tsunoda et al. 2001). The visual stimuli were presented on a 20-in CRT display placed 57 cm from the eye contralateral to the recording hemisphere. The pupil of the eye was dilated by local application of 0.5% tropicamide 0.5% phenylephrine, and the cornea was covered with a contact lens of appropriate power to focus the visual stimuli onto the retina. The fovea was identified with a custom-made ophthalmoscope, and the position of the fovea was back-projected onto the center of the CRT screen. Except for three-dimensional (3D) objects for manual presentations, the visual stimuli were presented at the center of the CRT display. Electroencephalography (EEG), electrocardiography (ECG), expired CO<sub>2</sub> concentration, and rectal temperature were monitored throughout the experiments. The experimental protocol was approved by the Experimental Animal Committee of the RIKEN Institute. All experimental procedures were done in accordance with the guidelines of the RIKEN Institute and the National Institute of Health.

### *Intrinsic signal imaging*

The dorsal part of area TE was exposed and illuminated by light with a wavelength of 605 nm through a glass cover slip window attached to a titanium chamber centered 15.0–17.5 mm anterior to the ear bar position (Tsunoda et al. 2001). Reflected light from the cortex was detected by a low-noise video camera (frame rate, 1/30 frames/s; S/N ratio, 60 dB; CS8310, Teli, Japan) and digitized by a 10-bit video capture board (Pulsar, Matrox). The light was focused to a depth of 500 μm below the cortical surface. The imaged area was 6.5 × 4.9

Address for reprint requests and other correspondence: M. Tanifuji, Laboratory for Integrative Neural Systems, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan (E-mail: tanifuji@riken.jp).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

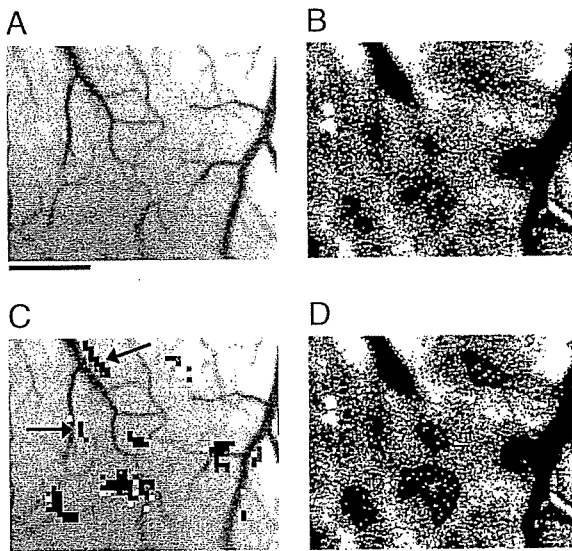


FIG. 1. Intrinsic signal imaging detected local modulation of light absorption changes in area TE. *A*: surface view of the exposed portion of the cortex. *B*: differential image showing local increase in light absorption. *C*: regions that showed statistically significant darkening after presentation of a visual stimulus are indicated in red ( $P < 0.05$ ). Apparent artifacts that appeared along the thick vessels (arrows) were eliminated from the analysis. *D*: extracted active spots outlined by connecting pixels with half the peak absorption value. Scale bar = 1 mm.

mm and contained  $320 \times 240$  pixels. We presented a visual stimulus to the monkey for 2.0 s, and sequential images were acquired for 4.0 s (starting from 1.0 s before the stimulus onset). During the 2-s stimulus presentation period, a stimulus image appeared and moved in a circular path (with a radius of  $0.4^\circ$  at the rate of 1 cycle/s). The imaging experiments consisted of two sessions. In the first session, the visual stimuli were 10–20 object images together with two blank images as control. Then on the basis on these results, we selected several stimuli that activated a large number of spots in the imaged region. In the second session, the selected stimuli (“the original”), their modifications and two controls were used as visual stimuli. Each stimulus was randomly presented 15–30 times in one session. The same imaging session as the second session was repeated at least twice on different days to confirm the consistency of the observed spots.

#### Identification of the active spots

The active spots were extracted as follows (Tsunoda et al. 2001): 1) images acquired during the 0.5- to 3.0-s period after the onset of stimulus presentation were divided by an average of images during the 1-s period just before the stimulus onset. 2) Gaussian spatial filtering was used to eliminate the global (stimulus nonspecific) darkening and high-frequency noise (cut-off frequencies:  $\sigma = 0.04 \text{ mm}^{-1}$  for high cut and  $\sigma = 2.1 \text{ mm}^{-1}$  for low cut). 3) The  $t$ -values were calculated by pixel-by-pixel comparison of signal intensity between the filtered images for the trials with a particular stimulus and those for the control trials. The filtered images with a stimulus were averaged for all the trials and a differential image was created by subtracting the averaged image for control trials. Localized dark regions of the differential image, which showed significant darkening ( $t$ -test,  $P < 0.05$ ), were defined as active spots. 4) The contour of active spots was demarcated at the half-value of the peak absorption value. Representative images for each step are shown in Fig. 1.

#### Extracellular recording

The exposed cortex used for intrinsic signal imaging was covered with a transparent artificial dura made of silicon rubber (Arieli et al.

2002). Tungsten microelectrodes were inserted into the spots through the artificial dura. The surface blood vessel pattern was used as a mapping reference to identify the position of the spots. Extracellular action potentials were recorded for 3 s in each trial. Visual stimulus presentation started 1 s after the onset of a trial and lasted for 1 s. During the 1-s stimulus-presentation period, a stimulus image appeared and moved in a circular path (with a radius of  $0.4^\circ$  at the rate of 1 cycle/s). No intertrial interval was inserted, so that a blank period between two stimuli was 2 s. The different stimuli were presented in pseudo-random order, and the number of trials for each stimulus was between 10 and 20. For each stimulus, we applied the Wilcoxon test to the difference in the mean firing rate during and before the stimulus presentation. The amplitude of evoked responses for each stimulus was calculated by subtracting the mean firing rate during the 1-s period before the stimulus onset from the mean firing rate during the 1-s stimulus-presentation period, and by averaging for all the trials.

To characterize individual cells, we determined visual features critical for the cells according to previous studies (Fujita 1993; Fujita et al. 1992; Tanaka et al. 1991) (Fig. 2): 1) we manually searched for the most effective visual stimulus among 96 hand-held 3D objects (Fig. 3), 2) we simplified the best stimulus by removing or modifying a particular visual feature of the stimulus, and 3) if the simplified image elicited significant responses (Wilcoxon test,  $P < 0.05$ ) and also if the response amplitude for the simplified image exceeded a certain threshold, we used this image as the best stimulus in the next step. This procedure was repeated until further simplification failed to produce any response that exceeded the threshold. The threshold was set to 70% of the response elicited by the stimulus before simplification because there was no significant difference in evoked responses at this threshold. Typically, we started with the examination of a

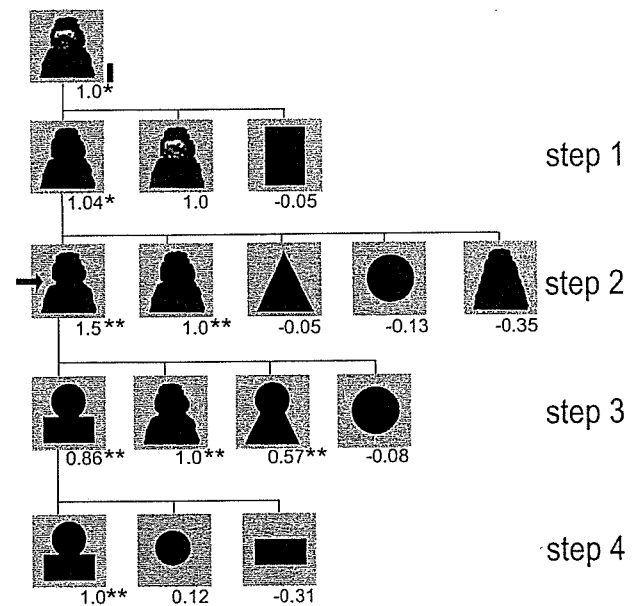


FIG. 2. Systematic simplification of an object image. The stimulus was simplified step by step. The stimulus that evoked the strongest response in one step was examined in the next step as the reference stimulus. The numbers below each picture indicate the response amplitudes normalized to the response to the reference stimulus together with statistical significance (Wilcoxon test,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ). Step 1 showed that neuronal activities elicited by the best object and the silhouette were the same. Step 2 examined the effect of the ‘sharpness’ of the corner at the junction of upper and lower parts (arrow) and showed that the silhouette with the sharpest corners (leftmost picture) was the most effective stimulus. Step 3 showed that activities elicited by the leftmost two stimuli were not significantly different. Step 4 showed that neither the upper nor lower part activated the cell. In this case, the critical feature was determined as a combination of a circle and a rectangle (leftmost picture at step 4). Scale bar,  $5^\circ$ .

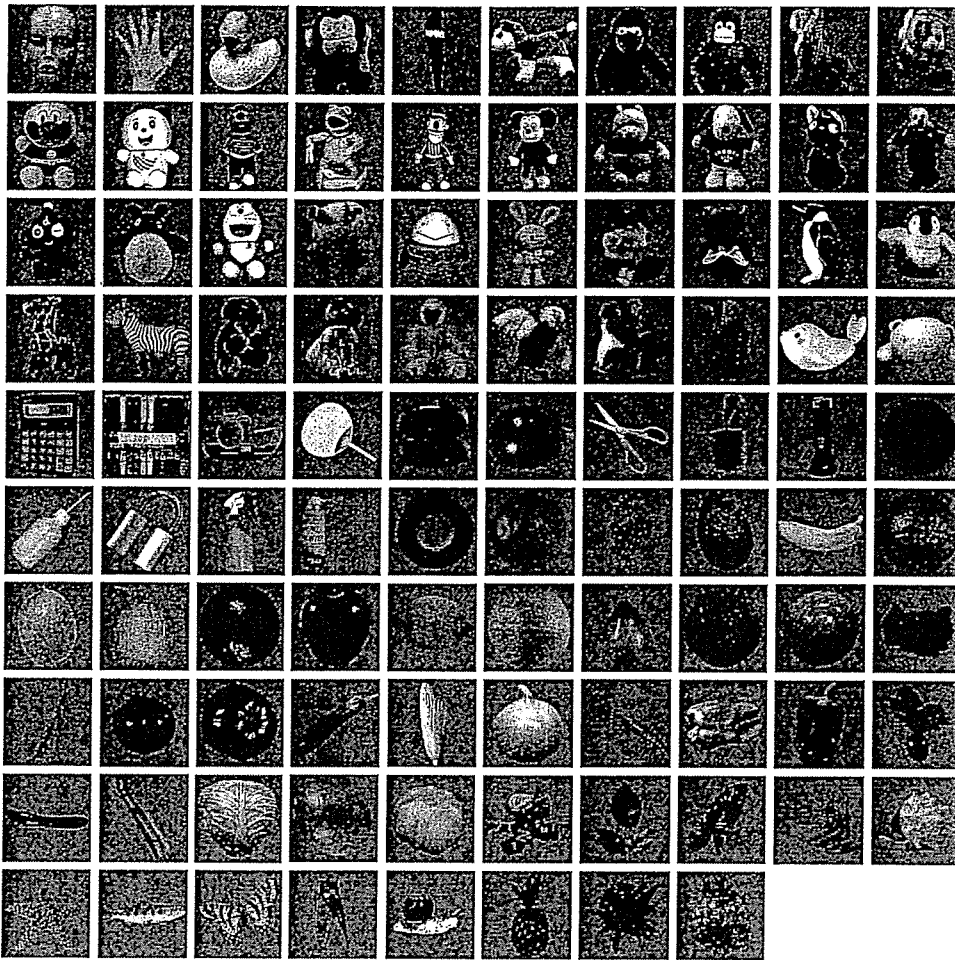


FIG. 3. The 3-dimensional (3D) objects used as visual stimuli to search for effective objects for individual cells. These objects were presented to the animals from various perspectives, as shown in the last three pineapple images in the *bottom row*.

monochrome image and silhouette of the original as in Fig. 2. However, image simplifications in the intermediate levels were different from case to case even if the original object was the same. The average numbers of simplification steps before reaching the simplest visual feature was  $4.8 \pm 2.0$  (mean  $\pm$  SD).

We examined receptive field size of each cell manually with the most effective 3D objects. We presented these objects not through the CRT display but directly to the animals because the size of receptive fields was larger than the size of the CRT display in most of the cells. On average, edges of receptive fields were  $18.82 \pm 8.17^\circ$  above,  $23.14 \pm 5.30^\circ$  below,  $23.86 \pm 8.41^\circ$  contralateral, and  $22.60 \pm 8.62^\circ$  ipsilateral to the recording hemisphere (means  $\pm$  SD,  $n = 35$ ). These values were measured from the center of the fovea. These values represent distances between the center of the CRT screen and the center of objects at the edges of receptive fields. Two exceptional cell having smaller receptive field size was eliminated from the analysis. The size of the object images used for quantitative analyses was on average  $13.30 \pm 3.08^\circ$  along the vertical axis and was  $10.88 \pm 4.02^\circ$  along the horizontal axis.

#### Definition of object parts

Throughout this manuscript, we took the simplest definition of object parts as the ones naturally distinguishable by discontinuities at minima of negative curvature of the object shape. For example, the minimum of negative curvature of stimulus 1 in Fig. 4A is the joint connecting head and body, and accordingly the stimulus is segmented into "head" (stimulus 3) and "body" (stimulus 2). Although this definition of parts is conventionally used in the field of object vision, there is no a priori reason to define object parts according to this

definition for TE neurons. Our intention, however, was not to explore the optimal segmentation for TE neurons, but rather to search for a possible mechanism for representing the spatial relationship among local features.

## RESULTS

### Intrinsic signal imaging

First, using intrinsic signal imaging, we identified one or two visual stimuli that activated a large number of spots in an imaged region of area TE. Each of these "original" visual stimuli was segmented into parts containing local features. We then conducted another intrinsic signal imaging session with a stimulus set consisting of the original (stimulus 1), two individual parts of the original (stimuli 2 and 3), and the original with a gap between the two parts (stimulus 4; Fig. 4). The results revealed that each spot was activated differently by these four stimuli. For example, one spot (indicated by an arrowhead in Fig. 4A) was activated by stimuli 1, 3, and 4 but not by stimulus 2. We interpret activity in this spot as being related to local features in the upper part of the original image (Fig. 4A). Because we were interested in identifying spots related to the spatial arrangement of local features in parts, we restricted our analysis to spots that were activated by combinations of the two parts but not by individual parts. Among four examined hemispheres, we found three spots, A–C, that satisfied this criterion: these spots were activated by the original image (stimulus 1) and the original with a gap (stimulus 4)