

201419070B

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

補償光学適応走査型レーザー検眼鏡を用いた
糖尿病網膜症の病態解析と早期発見、
早期治療に関する研究
平成24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 宇治 彰人

平成 27 (2015) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告	
補償光学適応走査型レーザー検眼鏡を用いた糖尿病網膜症の病態解析と 早期発見、早期治療に関する研究	----- 3
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 13
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 15

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 総合研究報告

補償光学適応走査型レーザー検眼鏡を用いた糖尿病網膜症の病態解析と早期発見、早期治療
に関する研究

研究代表者 宇治彰人

京都大学大学院医学研究科感覚運動系外科学 眼科学 助教

【研究要旨】

糖尿病網膜症は、網膜微小循環の障害がその本体である。本研究は補償光学の技術を適用した共焦点走査型レーザー検眼鏡（AOSLO）を用いて非侵襲的に糖尿病における網膜循環動態をとらえることを目的とし、AOSLOを用いて1）SLO動画解析方法の確立、2）血流動態の解析、3）血管の形態変化の評価を行った。解析法の確立においては非線形レジストレーションを用いた動画に生じるフレーム間の歪みの解消、AOSLOで得た血球速度データと心拍動との同期処理の開発を行い、以後の解析に反映させた。循環動態の変化における観察では、正常群、糖尿病網膜症（DR）群、非糖尿病網膜症（NDR）群の3群の比較の結果、血球速度はDRが正常、NDRと比較し有意に早く、NDRと正常の間に差は認められず、また分岐のない毛細血管においてDRでは有意に速度変化する血管が多かった。赤血球列の伸び率はDRとNDRに差がない一方で、正常群と両群の間には有意な差があり、糖尿病網膜症の早期発見の手掛かりとなり得ると考えられた。形態の評価においては、NDRと正常被験者、高血圧患者のデータを取得し、解析することができた。動脈壁厚は高血圧患者で有意に高く、また血圧値と年齢との間に相関関係を認めた。一方、NDRにおいて、壁圧はHbA1c、総コレステロール値、LDL、頸動脈の内膜中膜複合体厚（IMT）と相関を示した。この結果は最小血管障害を壁厚として定量することが可能であり、また最小血管の変化が大血管における変化と関連することを示唆するものである。

A. 研究目的

糖尿病網膜症は、網膜微小循環の障害がその本体である。人眼における微小循環動態の解明が可能になれば、病気の早期発見やより良い治療法の確立に有用であり、その技術の確立は社会的失明予防の観点からも重要である。本研究は補償光学の技術を適用した共焦点走査型レーザー検眼鏡（AOSLO）を用いて非侵襲的に糖尿病網膜症における循環動態をとらえることを目的とする。非侵襲的な検査であるため、糖尿病網膜症がほとんど認められない患者に対してもスクリーニング的に施

行することが可能であり、病初期の循環障害を解明していく。

B. 研究方法

京都大学眼科外来に設置されたAOSLOを用いて1）SLO動画解析方法の確立、2）血流動態の解析、3）血管の形態変化の評価を行った。

1. SLO動画解析方法の確立

1-1. 非線形レジストレーションを用いた動画の補正方法の検討

A0-SLOは網膜毛細血管の血流動態を非侵襲的に観察することができるが、画像は撮影中に固視微動の影響を受けやすく、単純な位置合わせだけでは矯正不可能な位置ずれが生じる。今後の解析の基礎となる画像処理技術の結果に与える影響の検討は必須である。非線形レジストレーションを用いた補正方法を提案し、網膜毛細血管画像構築への有効性を検討した。

1-2. 血球速度データと心拍動との同期処理の開発

毛細血管においても、血球速度は心拍動の影響を受けるため、すべての対象について、パルスオキシメーターを用いた心拍動と撮影ビデオとの同期処理を行った。被験者の耳介にパルスオキシメーターを取り付け、A0SLO動画撮影開始をトリガーに、同時に記録した。撮影部位は耳側および鼻側の $1.4^{\circ} \times 2.8^{\circ}$ の範囲の傍中心窩網膜毛細血管網とし、保存した動画に対して、すでに開発済みの血流解析専用ソフトウェアを用いて、動画から血管造影を構築、時空間画像を用いた血球速度の算出、血球成分の配列の変化を測定した。その後、ソフトウェア上で、1心拍（収縮期～拡張期～収縮期）を5区間に分割し、各血球速度データを対応する記録された区間に振り分け、全速度データを1拍動に集約した。これにより、正確な平均速度、最大速度、最低速度の測定が可能となる。

2. 血流動態の解析

対象は健常者、糖尿病網膜症 (DR) 患者、2型非糖尿病網膜症 (NDR) 患者。A0-SLOを用いて対象の傍中心窩網膜毛細血管網を撮影、保存した。固視微動に伴う動画の位置ずれおよび歪みを補正した後、耳側および鼻側の $1.4^{\circ} \times 2.8^{\circ}$ の範囲に対して、動画から血管

造影を構築、時空間画像を用いた血球速度の算出、赤血球列の伸長率を測定した。すべての対象について、パルスオキシメーターを用いて心拍動を記録、すべての血球に対して脈波との同期処理を行った。

3. 血管の形態変化の評価

対象は健常者、2型非糖尿病網膜症 (NDR) 患者、高血圧患者 (HT)。A0SLOを用いて、視神経乳頭縁から0.5-1.0乳頭径離れたzone Bの領域内の網膜動脈を撮影、保存した。すでに開発済みの網膜血管壁解析専用ソフトウェアを用いて、固視微動に伴う動画の位置ずれおよび歪みを補正した後、半自動的に網膜血管壁の厚み (WT) を定量した。拍動に伴う血管径の変化が測定に与える影響を考慮し、パルスオキシメーターを用いて心拍動を記録、すべての血管径計測に対して脈波との同期処理を行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に従い、京都大学医学部医の倫理委員会の承認を得ている。被験者へ十分に説明を行い文章で同意を得てから行い、対象症例の個人のプライバシーは厳重に保護し、データは匿名化して保存する。個人が特定されるような形でのデータの公表は行わない。A0SLOは非侵襲的であり、有害事象の発生は予想されない。

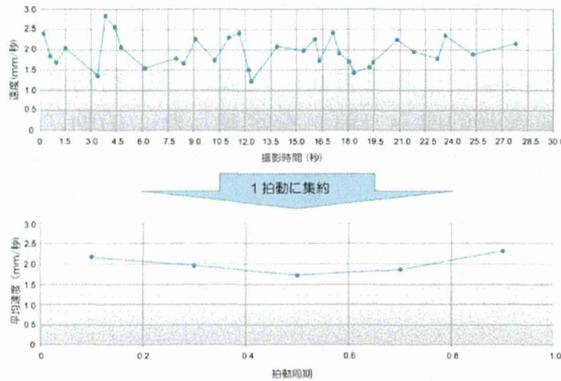
C. 研究成果

1. SLO動画解析方法の確立

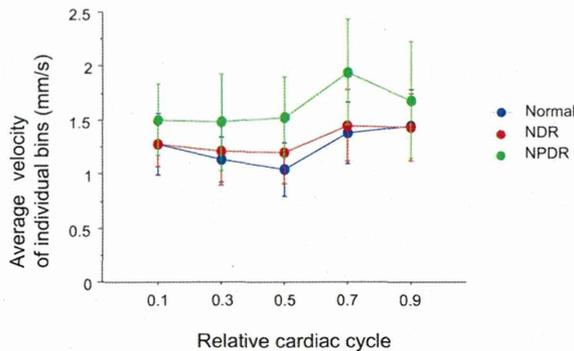
健常眼 24 眼、患眼 25 眼 (糖尿病網膜症 5 眼、傍中心窩網膜毛細血管拡張症 5 眼、黄斑

前膜 5 眼、中心性漿液性網脈絡膜症 5 眼、緑内障 5 眼) で撮影が成功した。すべての疾患において構築された血管像の背景に対する CNR (コントラストノイズ比) は、非線形レジストレーションを行った方が、行わなかった方より有意に高く、平均 2.1 倍高かった。演算に必要とした時間は平均 626 秒 (Corei7, 2.80 GHz) と長かった。心拍動と血球速度データの同期処理はパルスオキシメーターを用いることで可能であり、技術的な問題は生じなかった。

(図) 血流速度の算出と脈波同期処理



(図) 健常者 (Normal)、非糖尿病網膜症患者 (NDR)、糖尿病網膜症患者 (NPDR) における血球速度と脈波の関係

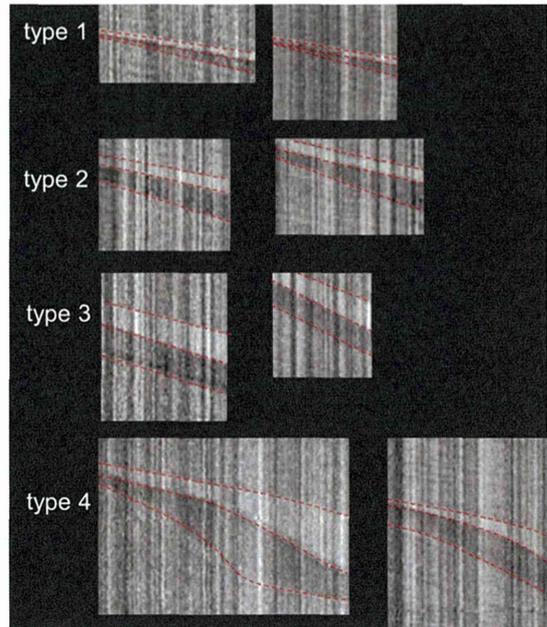


2. 血流動態の解析

2-1. 赤血球列の分岐のない毛細血管における速度変化

正常被検者 20 人 20 眼、NDR17 人 17 眼、DR (mild, moderate NPDR; nonproliferative DR) 8 人 8 眼が解析可能であった。赤血球列の分岐のない毛細血管における速度変化は正常が全体の 5%、NDR が 29.4%、DR が 50.0% で、DR で有意に多かった。

(図) 糖尿病における時空間画像の多様性。赤血球列の軌跡 (黒帯) は正常と比較して DR、NDR では type3, 4 の比率が多くなる。



2-2. 血球速度の解析

赤血球列の速度は DR (1.62 ± 0.37 mm) が正常 (1.26 ± 0.22 mm)、NDR (1.31 ± 0.21 mm) と比較し有意に早く、NDR と正常の間に差は認められなかった。拍動に伴う血球速度の変化の検討において、Pulsatility Index (PI) は $PI = (V_{max} - V_{min}) / V_{mean}$ で定義されるが、3 群間に有意差は認められなかった。

2-3. 赤血球列の伸長率

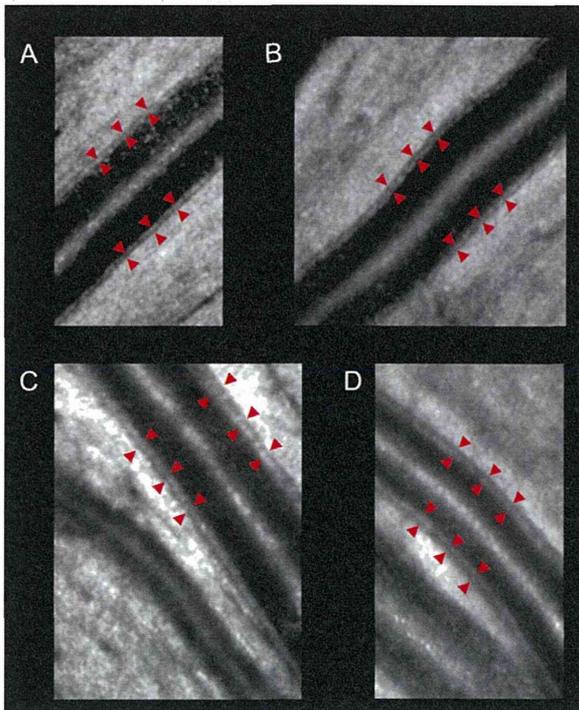
伸長率は DR (0.39 ± 0.19) と NDR (0.39 ± 0.19) に差がない一方で、正常群 (0.67 ± 0.20) と両群との間には有意な差を認めた。

3. 血管の形態変化の評価

3-1. 高血圧患者における血管壁厚の解析

AOSLO を用いることで明瞭な網膜血管の画像を得ることができた。また、検眼鏡的には可視化できない血管壁が可視化され、血管壁はおそらく内皮細胞、壁細胞と考えられる粒状の構造物を有していた。正常被検者 51 人 51 眼、HT22 人 22 眼が解析可能であった。検者間の級内相関は血管外径 (OD)、血管内径 (ID)、WT、wall to lumen ratio (WLR) がそれぞれ 0.980、0.970、0.889、0.882 で、繰り返しによる測定間の級内相関が 0.961、0.952、0.977、0.960 と高値であり、血管径の測定は再現性が高いものであった。OD、ID についてはカラー眼底を用いた従来の計測方法と高い相関を示した。WLR は HT (0.315 ± 0.066) が正常 (0.280 ± 0.040) に比べて有意に高く、また、WT、WLR は収縮期血圧、拡張期血圧、年齢、body mass index (BMI) と正の相関を示した。

(図) 正常 (A, B) よりも肥厚した HT (C, D) における網膜血管壁 (矢頭)



3-2. 糖尿病患者における血管壁厚の解析

NDR28 人 56 眼中、40 眼が解析可能であった。OD、ID、WT はそれぞれ $128.0 \pm 15.5 \mu\text{m}$ 、 $101.8 \pm 14.6 \mu\text{m}$ 、 $26.2 \pm 5.6 \mu\text{m}$ であり、WT は頸動脈エコーで測定した中膜内膜複合体 (IMT) と正の相関を示した。また、WT は HbA1c 値、総コレステロール値、LDL コレステロール値と正の相関を示した。一方で、OD、ID いずれの検査値とも相関を示さなかった。

D. 考察

非線形レジストレーションは AO-SLO 動画の歪みの補正に有効であり、明瞭な網膜毛細血管画像構築に有用であると考えられるが、処理時間が長く、処理速度の高速化が課題である。また、AOSLO で得た血球速度データを心拍動と同期させることで正確な速度の算出に成功した。AO-SLO で得た血球速度データを心拍動と同期させることで正確な速度の算出に成功した。

正常群、DR 群、NDR 群の 3 群の比較の結果、血球速度は DR が正常、NDR と比較し有意に早く、NDR と正常の間に差は認められなかった。これは心拍動同期前に得た前年の結果とは矛盾するものである。そこで、血球の流れやすさに注目し、赤血球列の分岐のない毛細血管における速度変化、赤血球列の伸長率を調べたところ、DR では有意に速度変化する血管が多く、これが前年度の結果との間に生じた矛盾を説明する因子と考えられた。DR で速度上昇が起こる理由としては以下の原因が挙げられる。傍中心窩毛細血管網には赤血球列が流れやすい毛細血管 (erythrocyte aggregate preferred path; EAPP) と流れにくい血管 (plasma gap capillary; PGC) が存在すると考えられ (Arichika S. PLoS One 2014)、PGC は血流の EAPP における急激な変化を緩和する役目 (relief valve) があると考えられる。NDR と NPDR の違いは血管の形態変化の有無と推察され、NPDR における PGC の閉塞は隣

接する EAPP における流速の上昇を、EAPP の閉塞は隣接する PGC における赤血球列の plugging を誘発すると考えられる。また赤血球列の伸び率は糖尿病では低下していたが、これは糖尿病では、恒常的に赤血球列の形成が起こっているために、相対的に1コずつ分離して流れる赤血球の数が少なくなっているためと想像される。伸長率は糖尿病網膜症の早期発見の手掛かりとなり得ると考えられた。

従来、網膜血管壁は直接可視化することができなかった。scanning laser Doppler flowmetry (SLDF) をもちいて、血管外径と血柱の差を壁厚とみなし、研究がおこなわれてきた経緯がある。AOSLO を用いることで、検眼鏡的には観察不可能な血管壁を可視化することができた。これは、補償光学を用いることで角膜や水晶体など眼球光学系に存在する収差による像の歪みを解消できたことが理由である。WRL は内皮細胞機能不全を表し、高血圧患者における早期のマーカーとして有用であることが報告されている。本研究においても WRL は収縮期血圧、拡張期血圧と高い相関を示しており、直接可視化、定量した血管壁厚が網膜細小血管異常の検出に有用であることが証明された。2型糖尿病患者においても、網膜動脈の血管壁の描出が可能であった。微小血管である網膜血管の壁厚は、動脈硬化の指標のひとつである内頸動脈の IMT と正の相関を認めた。これは従来、糖尿病においては細小血管障害と大血管障害を区別して評価してきたが、これらに実際にはある程度の関係があり、共通の血管障害のメカニズムを有することを示す初めての根拠である。また、定量化された壁厚は HbA1c、T-chol、LDL と正の相関を認め、これら数値の上昇が最小血管障害を起こす可能性を直接的に示すものである。つまり、網膜血管の破たん、出血、無灌流といった糖尿病網膜症の状態を呈する前に AOSLO を用いて定量的に最小血管障害を評価できる可能性が示唆された。今後、これまでに我々が評価系を確立した AOSLO を用いた微小循環動態の解析とあわせることで、形態変化と機能障害が関係を明らかにし、糖尿病

における微小循環障害発症のメカニズムの解明、早期診断、早期治療法の開発に貢献できると考えられる。

本研究を通して、網膜血管構造の細部を非侵襲的に観察し、また毛細血管レベルの血流動態を直接観察できる方法は、現在、AOSLO 以外には存在しない。本研究を通してその観察方法、解析技術の基礎が確立され、糖尿病による細小血管障害が機能的、形態的に定量評価できることが証明された。しかしながら、血流動態の解析には高画質の動画の取得が不可欠であるが、その成功率が低く、解析は可能であったものの予定症例数に達していない。動画を用いる評価方法に限界がある一方で、加算平均を行って得られる静止画像における形態の評価においては、十分な画質の画像の取得が比較的容易であった。研究期間中に正常被験者、NDRのみならず、高血圧患者からもデータを取得し解析可能であったが、DR群のデータ取得、解析までは行えなかった。また、治療への応用は着手できなかった。

E. 結論

AOSLOを用いることで非侵襲的に眼底を細胞レベルで観察することが可能であり、直接的な検眼では検出不可能な微細な糖尿病に伴う細小血管障害は定量的に評価できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arichika S, Uji A, Hangai M, Ooto S, Yoshimura N: Noninvasive and direct monitoring of erythrocyte aggregates in human retinal microvasculature using adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Jun 27;54(6):4394-402.
 - 2) Arichika S, Uji A, Ooto S, Miyamoto K, Yoshimura N: Adaptive optics-assisted identification of preferential erythrocyte aggregate pathways in the human retinal microvasculature. *PLoS One.* 2014 Feb 26;9(2):e89679.
 - 3) Uji A, Ooto S, Hangai M, Arichika S, Yoshimura N: Image quality improvement in adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy assisted capillary visualization using B-spline-based elastic image registration. *PLoS One.* 2013 Nov 12;8(11):e80106.
 - 4) Arichika S, Uji A, Yoshimura N. Adaptive optics assisted visualization of thickened retinal arterial wall in a patient with controlled malignant hypertension. *Clin Ophthalmol.* 8:2041-3. 2014.
 - 5) Arichika S, Uji A, Murakami T, Unoki N, Yoshitake S, Dodo Y, Ooto S, Miyamoto K, Yoshimura N. Retinal Hemorheological Characterization of Early-stage Diabetic Retinopathy Using Adaptive Optics Scanning Laser Ophthalmoscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 55:8513-22. 2014.
 - 6) Uji A, Murakami T, Unoki N, Ogino K, Horii T, Yoshitake S, Dodo Y, Yoshimura N. Parallelism for quantitative image analysis of photoreceptor-retinal pigment epithelium complex alterations in diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:3361-7. 2014.
 - 7) Arichika S, Uji A, Ooto S, Miyamoto K, Yoshimura N. Adaptive optics-assisted identification of preferential erythrocyte aggregate pathways in the human retinal microvasculature. *PLoS One.* 9(2):e89679. 2014.
 - 8) Uji A, Murakami T, Unoki N, Ogino K, Nishijima K, Yoshitake S, Dodo Y, Yoshimura N. Parallelism as a novel marker for structural integrity of retinal layers in optical coherence tomographic images in eyes with epiretinal membrane. *Am J Ophthalmol.* 157:227-236. 2014.
2. 学会発表
- 1) Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), FortLauderdale, USA, 2011. 5. 5-9
 Uji A, Hangai M, Ooto S, Murakami T, Yoshimura N, Imamura H, Nozato K: Measurement of retinal blood flow in diabetic retinopathy using adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy.
 Uji A: SIG on adaptive optics retinal imaging.
 - 2) 第47回日本眼光学学会総会, 秋葉原, 2012. 9. 1-2.
 宇治彰人、板谷正紀、大音壮太郎、有近重太、吉村長久: 補償光学適用走査型レーザー検眼鏡画像の非線形レジストレーションを用いた補正方法
 有近重太、宇治彰人、板谷正紀、大音壮太郎、吉村長久: 補償光学走査型レーザー検眼鏡による傍中心窩毛細血管での赤血球列の定量的画像解析
 - 3) 第66回日本臨床眼科学会, 京都, 2012. 10. 25-28.

宇治彰人、有近重太、板谷正紀、大音壮太郎、村上智明、今村 裕之、野里 宏治、吉村長久：補償光学適用走査レーザー検眼鏡を用いた糖尿病網膜症における dark tail の観察。

4) The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting, Seattle, USA, 2013. 5. 5-9.

Uji A, Hangai M, Ooto S, Arichika S, Murakami T, Yoshimura N: Detection of flow velocity fluctuations associated with erythrocyte aggregation in diabetic retinopathy by using adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy.

Arichika S, Uji A, Hangai M, Ooto S, Yoshimura N: Distribution of vessels with dark tails in the parafoveal capillary network monitored by adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy.

5) 第117回日本眼科学会、東京、2013. 4. 4-7.

有近重太、宇治彰人、大音壮太郎、板谷正紀、吉村長久：補償光学適応走査レーザー検眼鏡を用いた傍中心窩毛細血管網における dark tail の分布。

6) 第30回日本眼循環学会、東京、2013. 7. 19-20.

宇治彰人：シンポジウム、「眼循環評価のCutting Edge」 Adaptive Optics を応用した網膜微小循環評価。3) 第66回日本臨床眼科学会、京都、2012. 10. 25-28.

7) 第49回眼光学学会、京都、2013. 9. 7-8.

有近重太、宇治彰人、吉村長久：補償光学適応走査レーザー検眼鏡による網膜毛細血管の赤血球列の Preferential Pathway.

宇治彰人：「進化する網膜イメージング」補償光学走査型レーザー検眼鏡 (AO-SLO) を用いた細胞レベルの眼底観察。

8) Optics & Photonics Japan 2013, 奈良、2013. 11. 12-14.

宇治彰人：日韓生体医用光学シンポジウム、High-resolution retinal imaging using Adaptive Optics Scanning Laser Ophthalmoscopy.

9) The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting, Florida, USA, 201. 5. 4-8.

Uji A, Murakami T, Unoki N, Ogino K, Horii T, Yoshimura N: Parallelism for Quantitative Image Analysis of Photoreceptor-Retinal Pigment Epithelium Complex Alteration in Diabetic Macular Edema

Arichika S, Uji A, Murakami T, Unoki N, Yoshitake S, Dodo Y, Ooto S, Miyamoto K, Yoshimura N: Retinal Hemorheological Characterization of Early-Stages Diabetic Retinopathy Using Adaptive Optics Scanning Laser Ophthalmoscopy.

10) 第118回日本眼科学会、東京、2014. 4. 2-7.

宇治彰人、村上智昭、鵜木則之、吉武信、百々蓉子、吉村長久：光干渉断層計の網膜像における超解像技術の効果。

有近重太、宇治彰人、吉村長久：補償光学適応走査型レーザー検眼鏡を用いた血管壁の可視化。

11) 第4回 京都インフリキシマブセミナー、京都 2014. 6. 26.

宇治彰人：進化する網膜イメージングとぶどう膜炎治療。

12) 第5回京都糖尿病眼合併症フォーラム、京都 2014. 6. 27.

宇治彰人：糖尿病網膜症の数値化と診断への応用。

13) 眼光学チュートリアルセミナー，東京，2014. 8. 9-10.

宇治彰人：補償光学応用による眼底観察。

14) 公益社団法人 視能訓練士協会生涯教育制度 基礎教育プログラムⅠ、大阪，2014. 9. 15

宇治彰人：補償光学と眼底イメージング。

15) 第50回眼光学学会、金沢、2014. 6. 9-7.

宇治彰人、村上智明、有近重太、村岡勇貴、細田祥勝、吉村長久：OCT画像評価における補間アルゴリズムの影響

有近重太 宇治彰人 吉村長久：補償光学走査型レーザー検眼鏡を用いた網膜動脈血管壁厚の計測。

16) 第31回 日本眼循環学会、大阪、2014. 11. 28-11. 30.

有近重太 宇治彰人 村岡勇貴 大音壮太郎 吉村長久：補償光学走査型レーザー顕微鏡を用いた高血圧患者における血管壁の観察。

17) 第119回日本眼科学会、札幌、2015. 4. 16-19.

有近重太、宇治彰人、鈴間潔、村上智昭、後藤謙元、藤本雅大、吉武信、百々蓉子、吉村長久：糖尿病患者における眼と全身の血管の比較検討

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Roorda A, Williams DR. The arrangement of the three cone classes in the living human eye. *Nature* 1999;397 (6719) :520-522.

2. Roorda A, Romero-Borja F, Donnelly Iii W, Queener H, Hebert T, Campbell M. Adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. *Opt Express* 2002;10 (9) :405-412.

3. Uji A, Hangai M, Ooto S, et al. The source of moving particles in parafoveal capillaries detected by adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53 (1) :171-178.

4. Koch E, Rosenbaum D, Brolly A, et al. Morphometric analysis of small arteries in the human retina using adaptive optics imaging: relationship with blood pressure and focal vascular changes. *Journal of Hypertension* 2014;32 (4) :890-898.

5. Zhong Z, Petrig BL, Qi X, Burns SA. In vivo measurement of erythrocyte velocity and retinal blood flow using adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. *Opt Express* 2008;16 (17) :12746-12756.

6. Hirose F, Nozato K, Saito K, Numajiri Y. A compact adaptive optics scanning laser ophthalmoscope with high-efficiency wavefront correction using dual liquid crystal on silicon - spatial light modulator. *Proc. of SPIE*, 2011.

7. Tam J, Roorda A. Speed quantification and tracking of moving objects in adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. *J Biomed Opt* 2011;16 (3) :036002.
8. Martin JA, Roorda A. Pulsatility of parafoveal capillary leukocytes. *Exp Eye Res* 2009;88 (3) :356-360.
9. Martin JA, Roorda A. Direct and noninvasive assessment of parafoveal capillary leukocyte velocity. *Ophthalmology* 2005;112 (12) :2219-2224.
10. Schmid-Schonbein GW, Usami S, Skalak R, Chien S. The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. *Microvasc Res* 1980;19 (1) :45-70.
11. Bedggood P, Metha A. Direct visualization and characterization of erythrocyte flow in human retinal capillaries. *Biomed Opt Express* 2012;3 (12) :3264-3277.
12. Tam J, Roorda A. Enhanced detection of cell paths in spatiotemporal plots for noninvasive microscopy of the human retina. *ISBI'10 Proceedings of the 2010 IEEE international conference on Biomedical imaging: from nano to Macro 2010*.
13. Spengler MI, Svetaz MJ, Leroux MB, et al. Erythrocyte aggregation in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011;47 (4) :279-285.
14. Tsukada K, Sekizuka E, Oshio C, Minamitani H. Direct measurement of erythrocyte deformability in diabetes mellitus with a transparent microchannel capillary model and high-speed video camera system. *Microvasc Res* 2001;61 (3) :231-239.
15. Ricart JM, Vaya A, Todoli J, Santaolalia ML, Calvo J, Aznar J. Erythrocyte aggregation in Behcet's disease determined with the Sefam and Myrenne aggregometer. Lack of association with thrombosis and uveitis. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005;33 (4) :389-396.
16. Tam J, Dhamdhare KP, Tiruveedhula P, et al. Subclinical capillary changes in non-proliferative diabetic retinopathy. *Optom Vis Sci* 2012;89 (5) :E692-703.
17. Tam J, Dhamdhare KP, Tiruveedhula P, et al. Disruption of the retinal parafoveal capillary network in type 2 diabetes before the onset of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52 (12) :9257-9266.
18. Nishiwaki H, Ogura Y, Kimura H, Kiryu J, Honda Y. Quantitative evaluation of leukocyte dynamics in retinal microcirculation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36 (1) :123-130.
19. Tam J, Martin JA, Roorda A. Noninvasive visualization and analysis of parafoveal capillaries in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51 (3) :1691-1698.
20. Tam J, Tiruveedhula P, Roorda A. Characterization of single-file flow through human retinal parafoveal capillaries using an adaptive optics scanning laser ophthalmoscope. *Biomed Opt Express* 2011;2 (4) :781-793.

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
宇治彰人、大音壮太郎、板谷正紀、有近重太、吉村長久	Image Quality Improvement in Adaptive Optics Scanning Laser Ophthalmoscopy Assisted Capillary Visualization Using B-spline-based Elastic Image Registration.	PLoS One	8(11)	e80106	2013
有近重太、宇治彰人、板谷正紀、大音壮太郎、吉村長久	Noninvasive and direct monitoring of erythrocyte aggregates in human retinal microvasculature using adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy.	Invest Ophthalmol Vis Sci	54(6)	4394-4402	2013
有近重太、宇治彰人、大音壮太郎、宮本和明、吉村長久	Adaptive optics-assisted identification of preferential erythrocyte aggregate pathways in the human retinal microvasculature.	PLoS One	9(2)	e89679	2014
有近重太、宇治彰人、吉村長久	Adaptive optics assisted visualization of thickened retinal arterial wall in a patient with controlled malignant hypertension	Clin Ophthalmol	8	2041-2043	2014
有近重太、宇治彰人、村上智昭、鵜木則之、吉武信、百々蓉子、大音壮太郎、宮本和明、吉村長久	Retinal Hemorheological Characterization of Early-stage Diabetic Retinopathy Using Adaptive Optics Scanning Laser Ophthalmoscopy.	Invest Ophthalmol Vis Sci	55	8513-8522	2014
宇治彰人、村上智昭、鵜木則之、荻野顕、堀井崇弘、吉武信、百々蓉子、吉村長久	Parallelism for quantitative image analysis of photoreceptor-retinal pigment epithelium complex alterations in diabetic macular edema.	Invest Ophthalmol Vis Sci	55	3361-3367	2014
宇治彰人、村上智昭、鵜木則之、荻野顕、西嶋一晃、吉武信、百々蓉子、吉村長久	Parallelism as a novel marker for structural integrity of retinal layers in optical coherence tomographic images in eyes with epiretinal membrane	Am J Ophthalmol	157	227-236	2014

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

Image Quality Improvement in Adaptive Optics Scanning Laser Ophthalmoscopy Assisted Capillary Visualization Using B-spline-based Elastic Image Registration

Akihito Uji*, Sotaro Ooto, Masanori Hangai, Shigeta Arichika, Nagahisa Yoshimura

Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

Abstract

Purpose: To investigate the effect of B-spline-based elastic image registration on adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy (AO-SLO)-assisted capillary visualization.

Methods: AO-SLO videos were acquired from parafoveal areas in the eyes of healthy subjects and patients with various diseases. After nonlinear image registration, the image quality of capillary images constructed from AO-SLO videos using motion contrast enhancement was compared before and after B-spline-based elastic (nonlinear) image registration performed using ImageJ. For objective comparison of image quality, contrast-to-noise ratios (CNRS) for vessel images were calculated. For subjective comparison, experienced ophthalmologists ranked images on a 5-point scale.

Results: All AO-SLO videos were successfully stabilized by elastic image registration. CNR was significantly higher in capillary images stabilized by elastic image registration than in those stabilized without registration. The average ratio of CNR in images with elastic image registration to CNR in images without elastic image registration was 2.10 ± 1.73 , with no significant difference in the ratio between patients and healthy subjects. Improvement of image quality was also supported by expert comparison.

Conclusions: Use of B-spline-based elastic image registration in AO-SLO-assisted capillary visualization was effective for enhancing image quality both objectively and subjectively.

Citation: Uji A, Ooto S, Hangai M, Arichika S, Yoshimura N (2013) Image Quality Improvement in Adaptive Optics Scanning Laser Ophthalmoscopy Assisted Capillary Visualization Using B-spline-based Elastic Image Registration. PLoS ONE 8(11): e80106. doi:10.1371/journal.pone.0080106

Editor: Jonathan A Coles, Glasgow University, United Kingdom

Received: August 3, 2013; **Accepted:** October 6, 2013; **Published:** November 12, 2013

Copyright: © 2013 Uji et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported in part by the Innovative Techno-Hub for Integrated Medical Bio-imaging of the Project for Developing Innovation Systems, from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan, and Canon Inc. No additional external funding received for this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: This study was supported in part by Canon Inc.. Canon Inc. has provided a prototype of AO-SLO system to the authors' institution. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: akihito1@kuhp.kyoto-u.ac.jp

Introduction

Imaging technology in optical coherence tomography (OCT) has advanced rapidly and contributed greatly to progress in ophthalmology during this decade[1,2]. Improvement of OCT image quality has been achieved not only by increased retinal scan speed, as represented by the advancement of OCT generations from time-domain OCT to spectral-domain OCT (SD-OCT)[3–7], but also by image processing techniques to reduce speckle noise using multiple-aligned OCT scans[8,9]. Although multiple B-scan averaging can visualize microstructure in OCT more clearly than single B-scans, this technique is based on high-speed SD-OCT scanning, by which B-scans are generated with minimal scanning distortion variation from one scan to another.

More recently, confocal adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy (AO-SLO) has enabled imaging of retinal cells such as photoreceptors and blood cells[10–12]. Adaptive optics (AO) can compensate for aberrations in ocular optics, allowing clear visualization of individual cone photoreceptors in the living eye. As in OCT, multiple scan averaging has been reported as useful in AO-SLO imaging, with averaged AO-SLO images demonstrating photoreceptor microstructure more clearly than single scans[13–15]. However, unlike SD-OCT, averaging of AO-SLO images is challenged by the relatively narrow and magnified scanning area. An interframe position gap produced by eye motion exists between scan frames, and intraframe eye motion produces distortions in frames[16]. Thus, averaging often results in blurry images. To overcome these issues, hardware and software for eye tracking have been

developed that can stabilize the frames, such as cross-correlation methods[17] and the KLT (Kanade-Lucas-Tomasi)-SIFT (Scale-invariant feature transform) algorithm[14], and excellent photoreceptor imaging results have been reported using these systems[18].

In addition to photoreceptor observation, AO-SLO video allows noninvasive monitoring of the movement of blood components without contrast dyes[11,19]. Noninvasive visualization of retinal capillaries using stabilized AO-SLO videos was very effective in analyzing the parafoveal capillary network of diabetic patients[20–22]. Because the technique requires no contrast dyes, angiogram can be safely obtained even in patients with minimal changes of that retina, which would be helpful in the early detection of retinal diseases and may also be a powerful tool for researching the pathogenic mechanisms of retinal diseases. Although the effect of video stabilization on vessel visualization was not analyzed in these studies, it was thought to be profound because the capillary image was constructed as a trajectory of small blood cells using multiple frames.

In this study, we applied B-spline-based elastic image registration on AO-SLO videos to interpolate the images for AO-SLO video stabilization using public domain software ImageJ. B-splines have proven very useful in modeling deformations in many biomedical imaging problems and ensure high-quality interpolation[23–27]. The effect of elastic image registration on AO-SLO-assisted capillary visualization in normal eyes and various retinal diseases was then evaluated objectively and subjectively.

Methods

This study was approved by the Institutional Review Board and the Ethics Committee at Kyoto University Graduate School of Medicine and performed in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each participant after a detailed explanation of the nature and possible consequences of the study procedures.

Subjects

Twenty-four healthy subjects with no history of ocular or systemic diseases (mean \pm standard deviation [SD] age, 35.2 ± 8.1 y) and 25 patients (mean age \pm SD, 56.7 ± 13.1 y) diagnosed with various eye diseases at Kyoto University Hospital (5 patients each with diabetic retinopathy [DR], idiopathic macular telangiectasia [MacTel], epiretinal membrane [ERM], central serous chorioretinopathy [CSC], and glaucoma) were recruited in this prospective cross-sectional study.

Adaptive Optics Scanning Laser Ophthalmoscopy Imaging

The AO-SLO system developed by Canon Inc. was employed for this study[28], with 840-nm imaging light wavelength and 32-Hz frame rate. The imaging light exposure level was set to less than the maximum permissible exposure indicated by the American National Standards Institute[29]. The scan area at the retina was $2.8 \times 2.8^\circ$ and sampled at $400 \times$

400 pixels. AO-SLO videos were acquired randomly from 1 eye of each subject after pupil dilation with one combined application of tropicamide (0.5%) and phenylephrine hydrochloride (0.5%) and recorded for 2 s per scan area; 6–12 scan areas were collected per subject to cover the parafoveal area. AO-SLO imaging was focused on the photoreceptor layer to enable detection of moving bright objects in the capillaries, which may correspond to leukocytes or plasma gaps as described previously[30].

Video Processing

Prior to linear and nonlinear registrations, all images were desinusoided in preprocessing to cancel the difference in reflective values between the center and near edge of each image caused by sinusoidal movement of the resonant scanner.

Video Stabilization. For each subject, a 2-s video was randomly chosen for analysis. All videos were first stabilized by linear image registration to align frames, followed by nonlinear image registration to correct image distortion produced by intraframe eye motion. The image quality of constructed capillary images was compared before and after nonlinear image registration. All digital images were processed by a single operator (A.U.) using ImageJ (developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Grayscale ranged from 0 (black) to 255 (white).

Linear Image Registration. To align position gaps induced by eye motion across sequential frames, the Stackreg plug-in for ImageJ was used[31]. Stackreg is based on an automatic sub-pixel registration algorithm that minimizes the mean square difference of intensities between a reference image and source images. Rigid-body transformation, by which source images are transformed with translation and rotation to match a reference image while maintaining the distance between any pair of landmark points in the images, was applied to all videos. After registration, videos were cropped to eliminate the margin lacking a retinal image, which was a by-product of registration.

Elastic (Nonlinear) Image Registration. After linear image registration, videos were corrected for scanning distortions that were uncorrectable by linear registration and stabilized using the ImageJ plug-in bUnwarpJ, an algorithm for elastic and consistent image registration (Figure 1 and the text of Digital Content S1, which describes the development of the bUnwarpJ algorithm as an ImageJ Plug-in in detail)[32,33]. Deformation of bUnwarpJ was based on B-spline models, and the source image was elastically deformed in order to look as similar as possible to the target (reference) image. Because the bUnwarpJ plug-in was designed for registration between just 2 images and does not perform consecutive processing for registration between the reference image and other remaining frames, bUnwarpJ was run 63 times to analyze each 64-frame (2-s) video. We then created a macro that automates a series of ImageJ commands, and videos were registered automatically (Digital Content S2). Our macro was programmed to use the first frame as a fixed reference frame for image warping by bUnwarpJ.

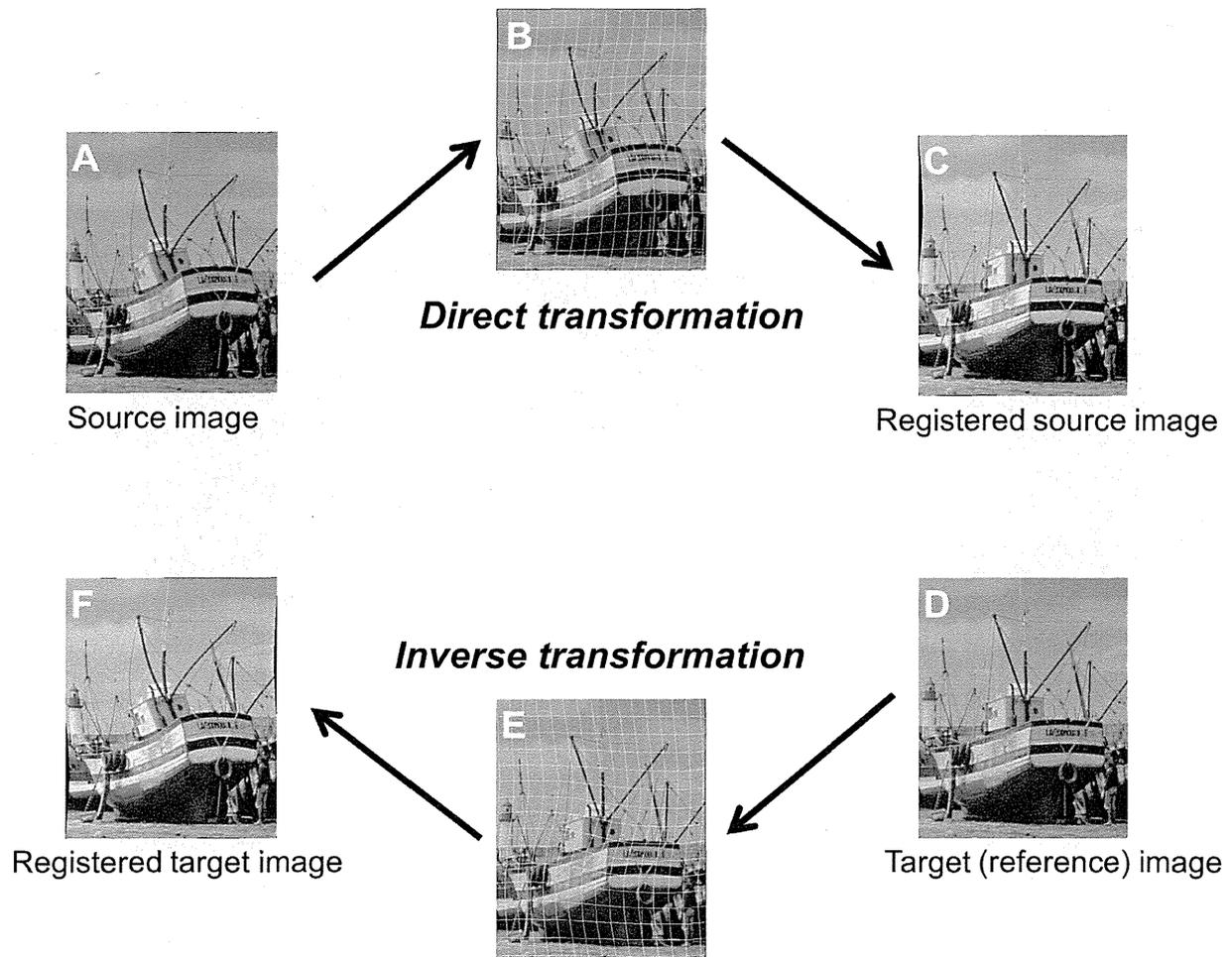


Figure 1. Elastic and Consistent Image Registration. (A) Source image. (B) Deformation grids on (A). Deformation of bUnwarpJ is based on B-spline models. Source image is elastically deformed in order to look as similar as possible to target (reference) image (D). (C) Registered source image. (D) Target (reference) image. (E) Deformation grids on (D). Simultaneously, target image (D) is elastically deformed in order to look as similar as possible to source image (A) to reduce registration error and obtain better correspondence compared to registration without the consistency factor.

doi: 10.1371/journal.pone.0080106.g001

Capillary Visualization. The capillary images were constructed as projections of the moving objects in sequential frames using the motion contrast-enhancement technique reported by Tam et al.[20] Pixels were divided between sequential frames, and the variance of pixels among all division images in each x-y position was calculated to visualize contrast-enhanced capillary images. For each video processed by linear image registration, capillary visualization was performed both before and after elastic image registration, classified as the E(-) and E(+) groups, respectively, for comparison. A macro was also created to facilitate capillary visualization (Digital Content S3).

Assessment of the Effect of Elastic Registration on Capillary Visualization

The effect of elastic image registration on capillary visualization was assessed by comparing the quality of visualized capillary images between the E(-) and E(+) groups objectively and subjectively.

Contrast-to-Noise Ratio Comparison. To objectively compare image quality, contrast-to-noise ratio (CNR) was calculated for regions of interest (ROI) and compared between pairs of E(-) and E(+)-group images[8,34]. ROIs examined in this study consisted of a line selected on the vessel and areas selected in space surrounding the vessel. To match the position of ROIs between E(-) and E(+) images, we established ROIs on the first frame of the registered videos and copied

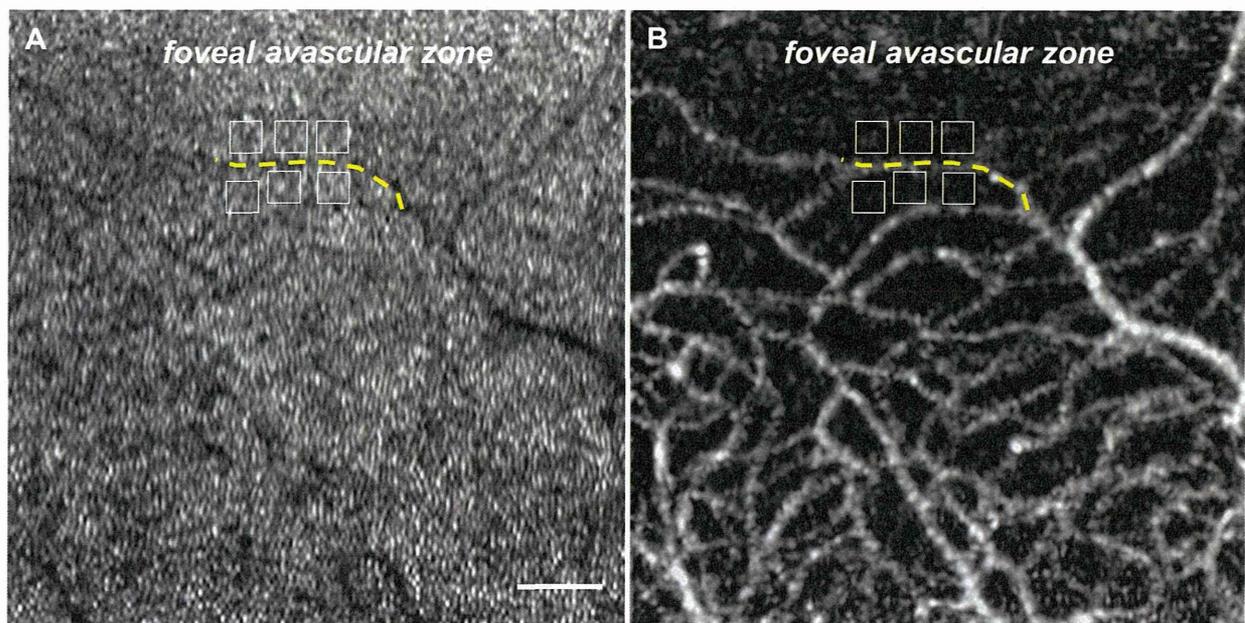


Figure 2. Calculation of Contrast-to-noise Ratio. (A) First frame of video obtained using adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy (AO-SLO). Regions of interests (ROI) were set on the first frame of the video. ROIs examined in this study were a line selected on the vessel shadow (yellow dotted line) and areas selected on space surrounding the vessel (white squares) for each subject. Scale bar, 100 μm . (B) Capillary image constructed from the video in (A) after elastic registration. ROIs on (A) were copied to the image with capillary visualization.

doi: 10.1371/journal.pone.0080106.g002

them to the images with capillary visualization (Figure 2). Briefly, the line was established along a vessel shadow. Six 20×20 -pixel areas were selected adjacent to the selected capillary shadow on the cone mosaic pattern and then copied to the brightly visualized capillary image using ROI Manager, a built-in function of ImageJ that records the exact location of the ROIs, and the mean gray values of the selected capillary and vessel free space were calculated. CNR was calculated as follows:

$$CNR = (f - b) / \sqrt{\delta_f^2 + \delta_b^2} \quad (1),$$

where f and b are the mean gray values of the ROI set on visualized capillary (foreground) and the 6 ROIs set on vessel free space (background), respectively, and δ_f and δ_b are the standard deviation from the foreground and background mean values, respectively.

Expert Comparison. For subjective comparison, 6 experienced ophthalmologists masked to image information performed independent expert comparisons of pairs of E(-) and E(+) images [8,35]. A comparative image quality score for clarity of capillary images was assigned to each image pair as follows: 5 = markedly better capillary image in E(+); 4 = slightly better capillary image in E(+); 3 = equal capillary images in E(+) and E(-); 2 = slightly better capillary image in E(-); and 1 = markedly better capillary image in E(-).

Measurement of Processing Time Required for Elastic Image Registration

The processing time required for elastic image registration using bUnwarpJ was measured to assess its ease of use and future applicability. Image processing was performed using a Microsoft Windows 7 64-bit operating system with 64-bit central processing unit (Corei7, 2.80 GHz).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using StatView version 5.0 (SAS Inc., Cary, NC). All values are presented as the mean \pm standard deviation. Paired t tests were used to determine CNR differences between the E(-) and E(+) groups. Comparison of the ratio of CNR values in the E(+) and E(-) groups and the mean score assigned by experts between patients and normal subjects was performed using one-way analysis of variance, with post-hoc comparisons tested by the Scheffe procedure. P values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Effect of Elastic Registration on Capillary Visualization

All AO-SLO videos tested in this study were successfully stabilized by elastic image registration with ImageJ, and distortion that was wavy and uncorrectable by linear image

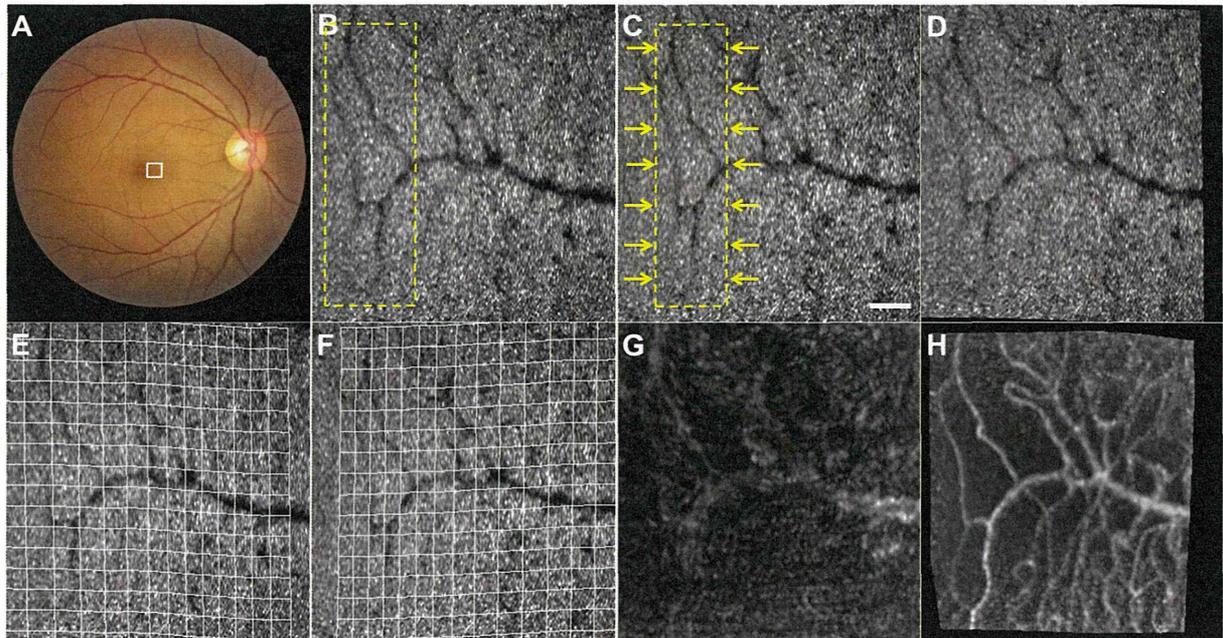


Figure 3. Effect of B-spline-based Elastic Registration on Capillary Visualization. (A) Color fundus photograph of the right eye of a 34-year-old woman with no history of ocular or systemic diseases. (B, C) Two consecutive frames obtained by adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy (AO-SLO), which correspond to the area outlined in white in (A) showing scanning distortions that were uncorrectable by linear registration. High-intensity dots representing the cone mosaic pattern and dark shadow of the vessels are observed. Although the squares outlined by a dashed line in (B) and (C) indicate an identical area of the retina, the area in (B) appears to be wider than the area in (C). Scale bar, 100 μm . (D) Registered image of (C), which was elastically deformed to appear as similar as possible to (B). (E, F) Deformation grids on (B) and (C), respectively. (G) Capillary image constructed from unregistered AO-SLO video recorded for 2 s. (H) Capillary image constructed from AO-SLO video after B-spline-based elastic registration. The capillary is more brilliant than that of (G) constructed without registration.

doi: 10.1371/journal.pone.0080106.g003

registration was considerably diminished (Figure 3 and Digital Content S4). Bright moving objects in the shadows of capillaries on the cone mosaic pattern, considered to be leukocytes or plasma gaps, were easier to observe in stabilized videos than in videos only subjected to linear image registration.

Table 1 shows CNRs for ROIs set on pairs of E(-) and E(+) capillary visualized images in normal subjects and patients with various disease. CNR was significantly higher ($P < 0.0001$) in the E(+) group than the E(-) group (1.92 ± 0.57 vs. 1.24 ± 0.59 , respectively) overall. CNR was also significantly higher in the E(+) group than in the E(-) group in normal subjects and each disease group. In no pair of ROIs was the CNR lower in the E(+) group than in the E(-) group. The average ratio of CNR in the E(+) group to CNR in the E(-) group was 2.10 ± 1.73 overall, and no significant difference in this ratio was observed between patients or normal subjects ($P = 0.379$).

The mean score assigned by experts was 3.99 ± 0.69 overall, 4.21 ± 0.69 in normal subjects, 3.92 ± 0.58 in DR patients, 3.88 ± 0.87 in MacTel patients, 3.40 ± 0.59 in ERM patients, 3.72 ± 0.42 in CSC patients, and 3.96 ± 0.79 in glaucoma patients, and the mean score did not significantly

differ between patients and normal subjects ($P = 0.306$) (Table 1).

Processing Time Required for Elastic Image Registration

Mean processing time required for elastic image registration was 626 ± 190 s in total, with no significant difference between patients and normal subjects ($P = 0.258$). Mean processing time was correlated with the area ($R = 0.385$; $P = 0.006$) and width ($R = 0.399$; $P = 0.004$) of cropped videos, but not their vertical length ($R = 0.169$; $P = 0.248$).

Case 1

The parafoveal area of the left eye of a 53-year-old man with no history of ocular or systemic diseases was examined by AO-SLO, and capillary image was constructed from video recorded for 2 s (Figure 4). Capillaries were brilliantly visualized using elastic image registration (Figure 4F), comparably to early-phase fluorescein angiography (FA) images obtained using Heidelberg Retinal Angiography 2 (Heidelberg Engineering)