

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10887

研究課題名（和文）神経組織活動の内因性蛍光反応を応用したヒト大脳皮質活動領域の術中可視法の確立

研究課題名（英文）Intraoperative visualization of human cortical activation using flavoprotein imaging

研究代表者

大石 誠（Makoto, Oishi）

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：00422593

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：今回我々は脳表刺激によるヒト大脳皮質での賦活活動のフラビン蛍光法による可視化をはじめて成し遂げた。大脳皮質の活動の可視化は今後の脳機能の研究に大きな発展を及ぼす可能性があると考えている。今後、てんかん性自発放電や、さらに小さな大脳誘発電位など、観察の難易度が高そうなものにさらに応用してゆき、手術支援法としての確立に努めたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳神経外科の手術においてさらなる安全性と確実性を追求するために、脳機能および脳解剖の新規イメージング法や神経生理学的手法を用いたモニタリング法にこだわった新しい手術支援法の確立に常に取り組んできた。その中でも、術中の「神経活動領域の可視化」は、脳神経外科医にとって究極の手術支援方法となりうるが、未だかつて実現した報告はない。本研究は、実験レベルで特別な薬剤を使用せずに神経組織の活動時に自然発現するフラビン蛋白を特殊波長で蛍光観察するフラビン蛍光法をヒト大脳に応用し、新たな手術支援法として確立できないかチャレンジしたものである。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we set out to detect neural activity using intraoperative flavoprotein fluorescence imaging (iFFI), which involves visualization of fluorescence changes derived from aerobic energy metabolism. In 7 brain tumor patients, neural activities were induced by direct electrical stimulation of surrounding cortex, and iFFI and intraoperative PDI (iPDI) were performed. Optical response of iFFI demonstrated a biphasic time course in which a short time increase in fluorescence was followed by a negative fluorescence change. By iPDI, only a relatively long-lasting negative signals were observed. The positive component of iFFI signals appeared the fastest and were most localized. These results suggest that detection of the positive component in iFFI enables earlier and more accurate detection of neural activity, potentially having profound influence on intraoperative detection of neural activity.

研究分野：脳神経外科

キーワード：optical imaging human brain monitoring

1. 研究開始当初の背景

我々は、脳神経外科の手術においてさらなる安全性と確実性を追求するために、脳機能および脳解剖の新規イメージング法や神経生理学的手法を用いたモニタリング法にこだわった新しい手術支援法の確立に常に取り組んできた。中でも術中「神経活動領域の可視化」は、究極の手術支援方法となりうるが、未だ実現した報告はない。脳神経外科手術中に 5-ALA や fluorescence といった外因性物質を用い、腫瘍や脳血管にて特殊波長で励起される蛍光反応を、特殊波長のフィルターを通して観察する蛍光イメージング法が手術支援法としてさかんに導入されている。一方で脳実質の活動も、神経細胞内における活動時の代謝産物を対象として同様の方法で可視化する蛍光イメージング法が、脳の組織切片や動物実験のレベルではいくつか確立されて来ている。その中で、フラビン蛍光イメージング法は、神経組織の活動を特殊波長で直接可視化できる内因性イメージング法であり、我々が所属する新潟大学脳研究所のシステム神経生理学教室（渋木克栄教授）により開発された手法である。最大の特徴は、神経細胞活動時の細胞内ミトコンドリアでの代謝産物である flavoprotein が特殊波長の光により励起される自然蛍光を特殊波長フィルターで観察できることであり、他のイメージング法と異なり外因性物質の投与は一切不要であり、対象組織への毒性を考慮する必要がない。すでに動物実験やヒトの切除組織切片への適用により、様々な脳皮質活動の可視化に成功している。我々も同手法を用い、てんかん原性皮質の持つ、易刺激性・易興奮性の可視化を実現し報告している。同方法をヒト大脳に術中に応用するには設備的な条件の不足もあり今まで実現していなかったが、実現すれば世界で初めての術中大脳神経活動の可視化・画像化につながり、新しい脳神経外科手術支援法として広く受け入れられるものと思われ、本研究を企画するきっかけとなった。

2. 研究の目的

脳神経外科手術中に、ヒト大脳を対象として賦活部の反応を直接可視化することに成功することが最大の目的である。次いで、その反応の特徴について明らかにすることをもう一つの目的とした。

これまで flavoprotein の蛍光反応を動物では獲得できていたのにヒトで行えなかった問題として、1つは光源の問題、もう1つは大脳皮質の構造の違いがあった。光源は、現在世界で使用可能な手術用光源として最も強力な選択的波長を実現できるレーザー照明装置(MML-01, ミズホ株式会社)を日本初の臨床利用機として導入したので、これを使用しているトライアルが可能な状況となった。また、大脳皮質の構造に関しては、術中の脳表の状態の安定化と対象とした活動を、「てんかん活動」を有する大脳皮質の電気刺激時の活動とすることで、十分観察が可能であろうと考えた。

3. 研究の方法

Flavoprotein を対象とした蛍光イメージング法(flavoprotein fluorescence imaging: FFI) は、動物実験では既に安定して行って来た手法につき、必要な方法論は確立していた。初年度から、レーザー光源を用いた手術顕微鏡による観察を行った。もっとも反応を惹起できる刺激条件、データの加算やフィルター条件の設定検討などを行い、特にてんかん併発の脳腫瘍症例の大脳皮質において、反応の可視化が安定して得られるかを検証、その至適条件を探索した。

全研究期間中、以下の手順で研究を進めた。

(1)観測用システム整備：2016年4月には新潟大学手術部に備え付けの既存のライカ社製 OH-4 システムに、レーザー照明装置(ミズホ社製 MML-01)を搭載。これに、同時に備え付けられた高感度 CCD カメラユニットシステムを使用。光源側に flavoprotein 反応の励起波長を、カメラ側に反応の捕捉波長用のフィルター調整を行い、反応の可視化が可能な状態とした。

(2)記録用システム整備と支援システムとしてのプラットフォーム作成：術中に得たデータをオフラインにて解析。加算条件を検討の上、得られた反応のスケール画像を術野写真と合成し、実際に脳表画像上にて神経活動域を可視化できるようにした。

(3)刺激条件などの確立：解析データをもとに初年度はさらに良好な反応の観察を得られるよう、術中の脳表刺激に関する条件の検討、また観察のための脳表の固定状況(アクリル板圧着による脳の拍動状態の制御)などの条件確立を行った。

(4)反応そのものの解析：波長の時系列での変化そのものを解析し、flavoprotein 反応の蛍光イメージング上の特徴を導き出した。

(5)動物実験での確認：とりわけ反応の鑑別が問題となる血流変化に影響を受ける蛍光反応との違いを知るため、動物でも同様の条件下に実験を行い、得られた反応の意味を検証した。

4. 研究成果

(1) ヒト脳皮質における FFI 観測の成功

初期のトライアル症例にて、術中のヒト大脳皮質での FFI が観察可能であることを明らかにし、至適観測条件を決定したのち、計7例で同条件下に安定した FFI 観測を行うことに成功し、それぞれの皮質刺激に応じて電極周囲に緑色蛍光反応の増強が測定された。蛍光変化は、刺激後早期に短時間の陽性信号を呈し、次いで大きな陰性信号が出現する二相性変化となった。陽性信号は刺激開始後 $114 \pm 35\text{ms}$ で出現、 $1200\sim 1800\text{ms}$ でピークに達した。陰性信号は刺激後4~8秒程度でピークとなりその後ゆっくりと減衰した。異なる刺激強度で FFI 観測を行うと、刺激強度を強めていくに従い、蛍光変化も増強し、反応面積も広がった。

比較対照として、従来から報告があった術中灌流依存性イメージングも行ったが、これは刺激開始後 $429 \pm 128\text{ms}$ で出現し4~6秒程度でピークに達する陰性信号のみの単相性変化であり、従来の報告通りであり、これは FFI の後方信号に相当するものと考えて矛盾がなかった。

(2) FFI 反応の空間的広がりに関する結果

FFI, 術中灌流依存性イメージング両者の反応領域の空間的な広がりについて比較を行った。FFI 陽性信号は電極近傍より出現し外側に向けて拡大, その後中央に向けて収束した。FFI 陰性反応領域はそれに続いて外側から出現し, 徐々に電極近傍やさらに外側に向けて拡大した。その最大面積は前者が $3.18 \pm 1.56 \text{ cm}^2$, 後者が $5.39 \pm 2.06 \text{ cm}^2$ であり, 陽性反応領域は陰性反応領域に比べ有意に限局していた ($p < 0.02$)。術中灌流依存性イメージングでは電極近傍から反応領域が出現, 電極を囲むように徐々に外側へ拡大し, その最大面積は $4.90 \pm 2.23 \text{ cm}^2$ であった。それぞれの反応領域と刺激部位との位置関係を評価する目的で, 刺激電極チャンネル同士の中点からそれぞれの信号の最大反応点までの距離を調べたが, FFI 陽性信号では $0.61 \pm 0.18 \text{ cm}$, FFI 陰性信号では $1.08 \pm 0.35 \text{ cm}$, 術中灌流依存性イメージング信号では $1.04 \pm 0.39 \text{ cm}$ であった。以上の結果から, FFI 陽性反応は, 現存で可視化される蛍光反応の中で, 最も神経活動を直接示している可能性が示唆された。

(3) 動物実験での再現性の検討

条件を揃えやすいマウスを用いた動物実験において今回の検討内容の再実験を行ったが, FFI 陽性信号は実験を行った 10 検体全てに認め, 続いて陰性信号が認められる二相性パターンも同様であった。陽性信号は刺激後 200ms 以内に出現し 1 秒前後でピークに達し, 陰性信号は陽性信号に続いて出現し 2~4 秒程度でピークに達した。また FFI 陽性信号及び陰性信号は刺激強度上昇に応じて増大した。ヒトと異なったのは, FFI 陽性信号ピークは陰性信号ピークより大きいことであった。灌流依存性イメージングでは刺激針周囲に再現性ある陰性反応のみが認められ, 単峰性パターンであった。FFI 陽性信号は灌流依存性イメージングの信号より早期に認め, いずれの刺激強度においても FFI 陽性反応領域は灌流依存性イメージングの反応領域に比較して限局していた ($p < 0.02$)。以上, 動物実験では相対的にフラビン蛋白の蛍光増強応答が強く見られたが, それ以外の結果については, 今回ヒトで得られたデータと同様の傾向を示した。

(4) 本研究の意義と今後の展望

今回我々は脳表刺激によるヒト大脳皮質での賦活活動のフラビン蛍光法による可視化をはじめて成し遂げた。大脳皮質の活動の可視化は今後の脳機能の研究に大きな発展を及ぼす可能性があると考えている。今後, てんかん性自発放電や, さらに小さな大脳誘発電位など, 観察の難易度が高そうなものにさらに応用してゆき, 手術支援法としての確立に努めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----