

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16579

研究課題名（和文）フラビン蛋白自家蛍光反応を用いた新たな術中イメージングの確立

研究課題名（英文）Establishment of new intraoperative imaging using flavoprotein autofluorescence

研究代表者

三橋 大樹 (Mitsubishi, Daiku)

新潟大学・脳研究所・非常勤講師

研究者番号：60807296

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,500,000円

研究成果の概要（和文）：脳神経外科手術中の革新的な脳機能マッピングと神経モニタリング法の開発を目的として、著者らはフラビン蛋白の自家蛍光反応によるイメージングにより手術中の脳の皮質活動を直接可視化する研究を行った。術中のフラビン蛋白自家蛍光イメージングの特徴は、従来行われてきた血流変化に基づいた灌流依存性イメージングと比較する事によって分析されました。フラビン蛋白イメージングでは早期陽性ピークとそれに続く陰性ピークの二相性の変化を認め、灌流依存性イメージングでは後期相で陰性波のみ認めた。本実験は術中で初めてフラビン蛋白イメージングを用いた皮質神経活動の可視化に成功し、灌流依存性反応より早期に明確な陽性ピークが記録された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

術中に神経活動を可視化する事ができれば手術の安全性や治療正確性の飛躍的な向上につながるため、正確な術中イメージングは有用な手術支援技術となり得る可能性を秘めている。これまでの手法は神経活動自体ではなく、付随して生じる血流変化を捉えて可視化するものであり、神経活動を過大評価するなどの問題点があり実用的な手術支援技術として確立するまでには至っていない。今回我々は既存の手法と全く異なるフラビン蛋白自家蛍光反応を用いることで、より神経活動自体に近い反応を可視化できることを証明した。

研究成果の概要（英文）：To develop an innovative brain mapping and neuromonitoring method during neurosurgery, the authors set out to establish intraoperative flavoprotein fluorescence imaging (iFFI) to directly visualize cortical activations in human brain. The significance of iFFI was analyzed by comparison with intraoperative perfusion-dependent imaging (iPDI), which is considered the conventional optical imaging. Signals acquired by iFFI exhibited biphasic spatiotemporal changes consisting of an early positive signal peak (F1) and a delayed negative signal peak (F2). In contrast, iPDI signals exhibited only 1 negative peak (P1) that was significantly delayed compared to F1. This is the first report in humans of successful intraoperative visualization of cortical activations using iFFI, which showed rapid evoked cortical activity prior to perfusion-dependent signal changes.

研究分野：神経活動イメージング

キーワード：フラビン蛋白 術中イメージング 神経活動イメージング

1. 研究開始当初の背景

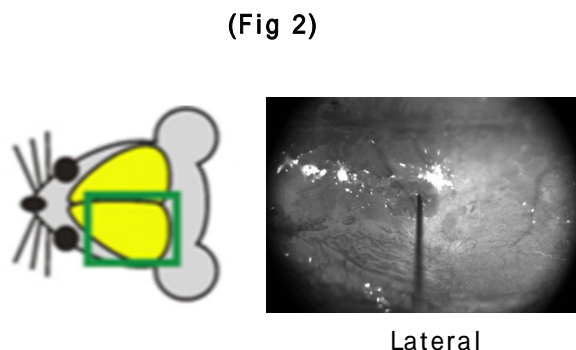
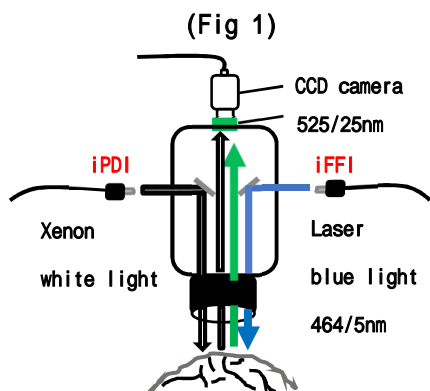
脳神経外科手術において体性感覚や運動機能、言語機能などの神経活動領域やてんかん焦点を正確に評価する事は手術の安全性や治療の確実性につながるため非常に重要であり様々な手術支援技術が発展してきた。内因性信号を用いた皮質神経活動の術中イメージング (intraoperative optical imaging; iOI) もその一つであり、体外から物質を投与せずに広範囲に神経活動を可視化できるため魅力的な手術支援技術であるが現状では日常的手法として定着していない。これまでの iOI の手法は全て神経活動の結果生じる局所脳血流及びヘモグロビン濃度の変化を信号として捉えたいわば血流変化に基づいた手法(perfusion dependent imaging; PDI) であるため、神経活動領域の過大評価が指摘されており正確性が充分で無い事が大きな要因の一つと言える。術中イメージングの手技を手術支援技術として確立していくためにはこれまでの手法と異なる取り組みが必要である。

2. 研究の目的

我々は本研究において、既存の手法と異なる新たな機序での術中神経活動イメージングの確立を目的とした。新たな iOI の指標としてミトコンドリアの電子伝達系に関わる内因性物質であるフラビン蛋白を用いる事に着目した。フラビン蛋白は青色光照射の元で神経活動が生じると緑色自家蛍光を発する特徴があり、外的物質の投与を必要としないため純粋な神経活動により近い反応を捉えることができる。ラットの体性感覚野において初めてフラビン蛋白蛍光イメージング(flavoprotein fluorescence imaging; FFI) が用いられ、それ以降も動物実験において様々な神経活動及びてんかん発作などの観察が行われた。またヒト脳切片でも FFI に成功しているが術中イメージングに用いられた報告は無い。我々はフラビン蛋白の自家蛍光反応に基づいたイメージングの術中応用を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

脳腫瘍患者 7 名で術中フラビン蛋白蛍光イメージング (intraoperative flavoprotein fluorescence imaging; iFFI) 及び血流変化に基づいたイメージング (intraoperative perfusion dependent imaging; iPDI) を行いそれぞれの信号を比較した。iFFI ではレーザー光源青色光 (464 ± 5nm) を照射し、血流イメージングではキセノン光源白色光を照射した (Fig 1)。皮質刺激は 4 極の硬膜下電極の中央 2 チャンネルを用いて 10mA, 50Hz, 1 秒で行い、iFFI の 3 症例では 3, 6, 10mA と異なる刺激強度を用いた。フィルター (525 ± 25nm) を通して手術用顕微鏡に装着した CCD カメラで 10 フレーム/秒 × 30 秒 (刺激前 5 秒、刺激 1 秒、刺激後 24 秒) 測定を行い 6~10 トライアル繰り返した。データ解析はオフラインで行い 3~6 トライアルを加算平均した。刺激電極中央点を中心とした円形関心領域を設定し、フラビン蛋白による蛍光変化 (F) 及び血流による吸光度変化 (R) を計測した。また刺激前測定を基準 (F₀, R₀) として (F/F₀)、(R/R₀) を計測し擬似カラーイメージを作成し測定野に重ね合わせた。基準測定の 3SD を超える反応を有意な反応と定義した。

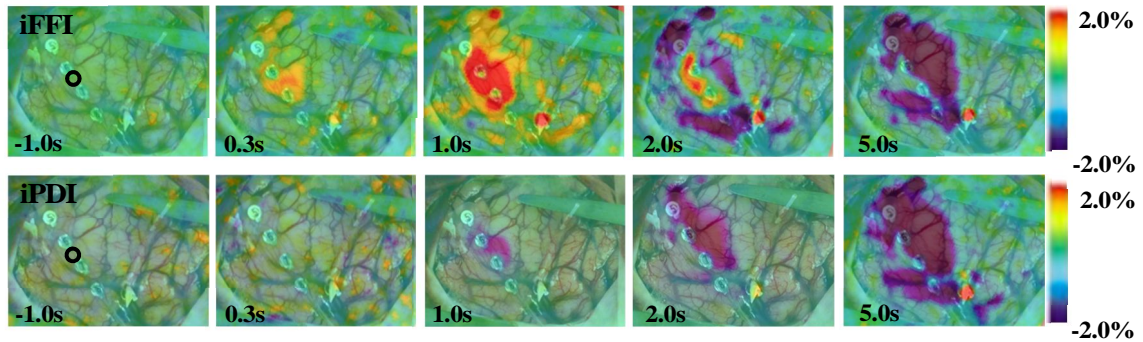


マウスを用いて FFI 及び PDI の測定も行なった。10 匹の 6~8 週の雄マウス (C57BL/6) を用いた。刺激針を脳表から 300 μm 穿刺し 100, 200, 300 μA, 10Hz, 1 秒間の刺激を与えた (Fig 2)。フラビン蛋白イメージングでは LED 青色光を用い、血流イメージングではハロゲン白色光を用いた。フィルター (525 ± 25nm) を通して CCD カメラを用いて 10 フレーム/秒 × 15 秒 (刺激前 5 秒、刺激 1 秒、刺激後 9 秒) の測定を行い 10 トライアル繰り返した。解析はヒトと同様に行なった。

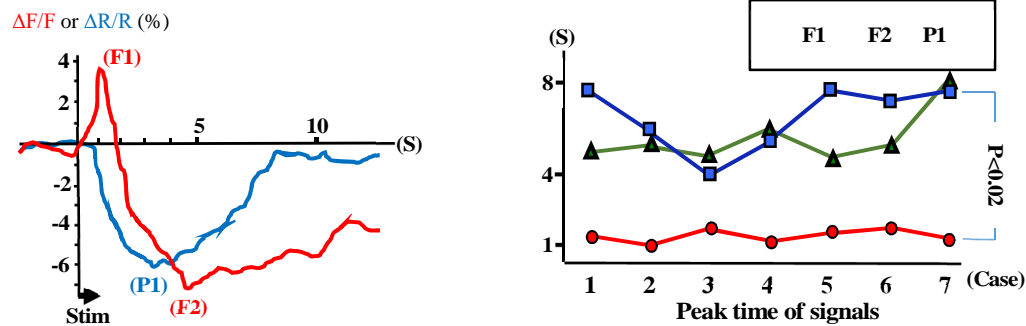
4. 研究成果

iFFI 全例で刺激後早期にピークを持つ陽性信号(F1)及びそれに続く陰性信号(F2)の2相性の反応を認めた。iPDI では全例で陰性信号(P1)のみ認めた(Fig 3,4)。信号の平均潜時はF1 1490 ± 230ms、P1 5490 ± 1120ms と全例で F1 は早期にピークを形成した(P<0.02, Wilcoxon signed rank test)。

(Fig 3)

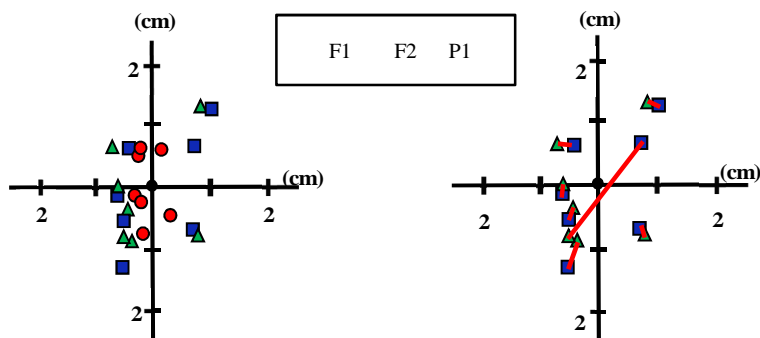


(Fig 4)



F1, F2, P1 の平均信号強度はそれぞれ $2.08\% \pm 0.71\%$ 、 $5.34\% \pm 2.39\%$ 、 $3.60\% \pm 1.79\%$ であり F1 は F2, P1 いずれよりも小さい反応であった(P<0.02)。信号の広がり F1 $3.18 \pm 1.56 \text{ cm}^2$ 、F2 $5.39 \pm 2.06 \text{ cm}^2$ と F1 は局限していた(P<0.02)。それぞれの信号の最大反応点と刺激電極中央点との平均距離は F1 $0.61 \pm 0.18 \text{ cm}$ 、F2 $1.08 \pm 0.35 \text{ cm}$ 、P1 $1.04 \pm 0.39 \text{ cm}$ と F1 はより刺激点近くに最大反応点が存在した。また F2 及び P1 の最大反応点は互いに同様の分布を示した(Fig 5)。

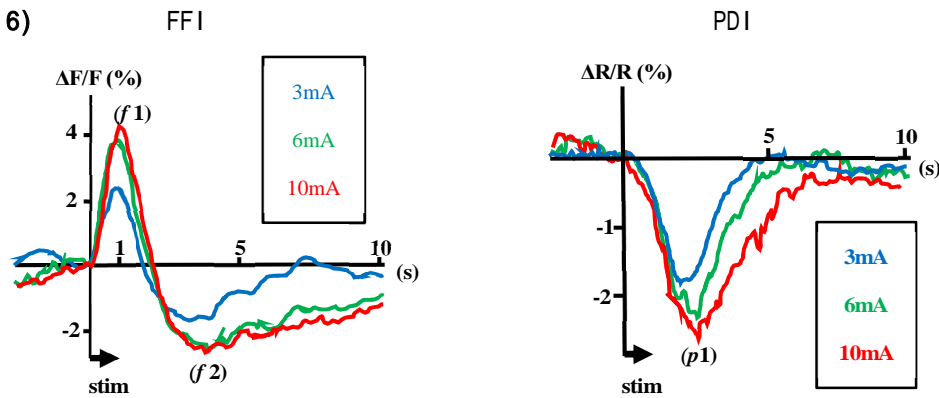
(Fig 5) maximum signal points of individual peaks



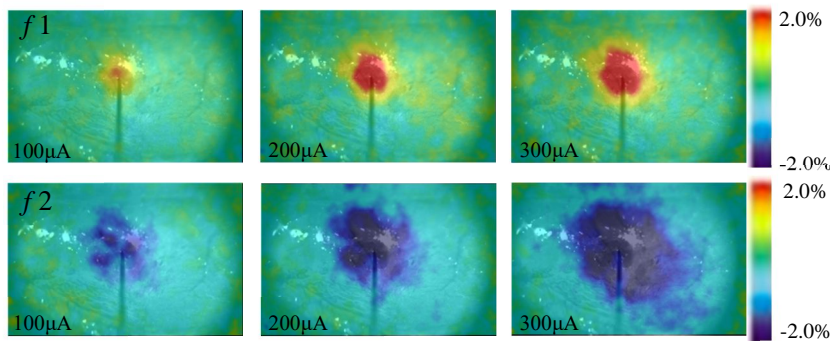
刺激強度を増強する事で F1 及び F2 は増大した。3mA 6mA と 6mA 10mA での F1 の増大率を比較すると前者の方が大きく F1 の反応は刺激増強に応じて飽和していく傾向を認めた。

動物実験ではマウスでもヒトと同様に FFI で早期陽性信号(f1)及びそれに続く陰性信号(f2)を認め、PDI では陰性信号(p1)のみ認めた(Fig 6)。刺激強度の増強に応じて f1, f2, p1 の信号強度は増強し、また信号の広がりも拡大していった(Fig 7)。一方でヒトと異なりマウスでは f1 は全例で f2 より大きい信号であり、他の2つの信号に対する F1 の相対値は f1 よりも小さかった。

(Fig 6)



(Fig 7)



本研究では手術中に誘発されたヒトの皮質神経活動をフラビン蛋白を用いて可視化する事に初めて成功した。フラビン蛋白は初期には嫌気性条件下での脳代謝の研究に用いられていたが、信号強度は通常の神経活動を評価するには小さいという欠点があった。CCDカメラや光源、画像解析ソフトの進歩に伴い動物実験や切片でのフラビン蛋白の信号測定に成功してきた。しかしFFIには励起光フィルターとして450-490nm、放出フィルターとして500-590nmという2つのフィルターを要することなどが術中イメージングに応用することの障壁となっていた。今回我々は手術用レーザー光源のフィルターを要せずに狭波長青色光を照射できる特徴を利用することで測定設備の簡略化を達成できた。これはフラビン蛋白の微細な蛍光反応を手術室というイメージングに適さない環境で測定できた要因の一つと考えている。

術中フラビン蛋白イメージングの早期陽性信号(F1)は後期陰性信号(F2)及び血流イメージング陰性信号(P1)と比較してより早期に明確なピークを形成し、刺激強度の上昇に伴い反応の増強を認め、最大反応点は刺激点により近い分布を示した。またF2及びP1の最大反応点の分布は近似しており、F1より潜時が遅く、また不規則にF1より広く拡大する分布などの特徴を認めた。このことからP1だけでなくF2も血流変化を反映した信号と考えられた。以上の事からF1は根本的に血流と無関係な反応でありF2,P1と比較して神経活動自体により近い反応と考えた。動物実験結果と比較するとF1の早期に明確なピークを形成する特徴はf1でも同様に認められた。一方でF1の相対的信号強度はf1より小さいという違いを認めた。その原因としてはヒトとマウスで皮質の厚さや構造が違い、加えて血流応答がヒトにおいてより大きいためF1の相対的信号強度が低いと考えた。我々はフラビン蛋白の蛍光信号が術中に捉えられる事を立証できたものの、術中イメージングとして確立していくためには解析装置及びソフトの工夫でリアルタイムモニタリングを達成する必要がある。また神経生理学的手法など他の手術支援技術で評価された神経活動領域と比較する事でフラビン蛋白イメージングの正確性などを立証していく必要がある。我々はこれらの課題を解決していく事で、血流反応に影響されず早期に明確なピークを形成する術中フラビン蛋白イメージングの特徴を用いて、リアルタイムな機能局在評価を達成し手術の安全性の向上と神経ネットワークの解明につなげることができると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mitsuhashi Daiju, Hishida Ryuichi, Oishi Makoto, Hiraishi Tetsuya, Natsumeda Manabu, Shibuki Katsuei, Fujii Yukihiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Visualization of cortical activation in human brain by flavoprotein fluorescence imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2022.1.JNS212542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------