

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 9 日現在

機関番号：32690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591308

研究課題名(和文)カプセル内視鏡と慢性硬膜下電極埋め込みによる脳活動テレメータシステムの開発

研究課題名(英文)Chronic monitoring of cortical activity using telemetry systems of capsule endoscopy and subdural electrodes in freely moving animals

研究代表者

根本 正史(Masahito, Nemoto)

創価大学・公私立大学の部局等・研究員

研究者番号：80370980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、覚醒下、自由行動中の小動物において、カプセル内視鏡の技術を用い、何ら束縛することなく脳活動をイメージングする技術を開発することである。脳循環変化から脳活動領域を光学的に描出する為には、カプセル内視鏡の自動調光機能、色フィルター、LED波長特性、電池交換の問題を克服する必要があったが、企業から改造承諾が得られなかった。そこで、良好なS/Nで画像取得、軽量で身体に装着可能、外部通信可能、多様な撮像設定が可能な4条件を満たすウェアラブルカメラとしてGoPro Hero4を採用。さらに光学系を改造し脳活動が描出可能な高品位脳表画像を取得できた。今後、側視鏡付き内視鏡との組み合わせを行う。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is monitoring of cortical activity using telemetry systems of capsule endoscopy and subdural electrodes in freely moving animals. There are problems with capsule endoscopy which images local cortical activity by detecting changes in cerebral blood volume and oxygenation, such as image quality, color filter array for imaging sensor, wavelength of LED light source, automated control of illumination intensity, and replacing method of battery. To solve these problems, we employed a wearable camera, GoPro Hero 4 black edition, instead of capsule endoscopy. The wearable cameras are not implantable but can be mounted on the back of animal (rat) jacket. The camera can image cortical activity, which is joined to fiberscope with side view mirror on cranial window.

研究分野：神経生理学 脳循環代謝学 脳神経外科学

キーワード：神経活動・脳循環カップリング 内因性光学信号 脳機能マッピング 神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

近年、大脳の機能やその局在を非侵襲的に評価できる計測技術として機能的 MRI (fMRI)、機能的近赤外分光法 (fNIRS) の進歩がめざましい。しかし、これらの技術は、脳の神経活動を直接計測するのではない。大脳局所の神経活動と代謝、循環のカップリング(神経活動量に比例して局所の血流と代謝量が増える)という生理学的現象を前提として、活動局所で2次的に生じる脳循環代謝の変化を測定し、脳活動をイメージングする。しかし、このカップリング機構は、未だ不明な点が多く、その関係性に関しては、様々なアンカップリングが指摘されている (Nielsen, Lauritzen, 2001; Devor et al., 2003; 2008; Ureshi et al., 2004; Fukuda et al., 2006)。我々も、神経活動と血液量変化の線形性は、賦活法に依存する神経活動のパターンによって大きな相違がみられ、神経活動の異なるパターンが混在する複合的脳活動においては、単純な線形性は保証されないことを確認した (Nemoto et al., 2004, J Neurosci; 2012, NeuroImage)。今後、脳循環代謝計測から、神経活動、さらには脳の情報処理過程を解明する為には、カップリング機構への直截的アプローチと共に、脳活動の基礎状態が変動することを前提にした現実的な計測において、言い換えれば、興奮と抑制のバランス、カラムなど機能領野間での相互作用が変化する脳の基礎状態の変動の中で、目標志向型、課題達成型の神経活動とそれに伴う脳循環代謝反応がどのような影響を受け、両信号が、どこまで正確にカップリングするのか明らかにする必要がある。

しかし、脳活動の基礎状態が変動する自然な環境下での計測、具体的には、覚醒下・自由行動中、他の個体と交信中(社会的な活動に参加中)の状態や、睡眠中の小動物(ラット)において、何ら束縛することなく、脳循環代謝の変化に基づく脳活動の信号をイメージングすることは、困難を極める。これまで、覚醒下に、中吊り型の頭部固定装置を用いて頭部を固定し、電気生理学的に brain mapping した報告は 1981 年 Sapienza にはじまる。その後、Mayhew らが、類似した頭部固定装置と fiberscope を用いて、覚醒-拘束下において、脳循環代謝由来の信号に基づく脳活動をイメージングしている (Martin et al., 2002; 2006)。本邦では、菅野、正本ら、覚醒下のマウスにおいて、頭部を固定した上で回転するボール上を自由に歩行できるようにして脳活動を計測している (Takuwa et al., 2011)。一方、約 20 年前よりテレメトリー法が確立され、体温や心拍、活動量、心電図、脳波などの生理学的パラメーターが非拘束下で取得可能となり、現在では、脳内に埋め込んだ微小電極により、複数の神経細胞の活動もモニターリングできるようになった。これらの技術は、

Brain-Machine-Interface (BMI) 等の基盤技術 (Chapin et al., 1999; Talwar et al., 2002; Nicolelis, 2003; Xu et al., 2004 他多数) として、広く臨床に応用されるようになった。こうした背景の中で、当初、ミサイル誘導の為に小型カメラの開発で始まった Given Imaging 社のカプセル内視鏡 (PillCam® シリーズ) は、画像の高精度化、小型軽量化、テレメトリーシステムの構築に成功、臨床面での安全性も確立して、平成 19 年 10 月、日本においても、小腸内視鏡検査法として保険適用が認められた。現在、Olympus 社も、独自に国産のカプセル内視鏡を開発している。本研究は、このカプセル内視鏡を頭部に埋め込むことで、これまで不可能であった、自由行動中の小動物の脳機能イメージングを実現しようというアイデアから出発した。カプセル内視鏡は小型で軽量の為 (4g 以下)、ラットの頭部に装着してもストレスなく行動が可能であり、LED の波長を最適化することで、脳活動に伴う脳循環代謝の変化から、光学的脳機能イメージングが可能となる。カプセル内視鏡としてのテレメトリーシステムをそのまま生かし、非拘束下で脳表の画像を連続取得、脳循環代謝由来の信号に基づく cortical mapping が可能となる。さらに、神経活動の電気生理学的な信号と同時計測を行えば、時空の枠組みに囚われない確実な脳活動計測が可能であり、侵襲的な Brain-Machine-Interface (BMI) と非侵襲的な Brain-Computer-Interface (BCI) の両信号を統合する原理を提供する研究となる。本研究は、学習による脳の可塑的变化、末梢受容器・中枢神経系損傷後の脳の機能的再構築過程、様々な行動中の脳活動の姿を、電気生理学的信号と、脳循環代謝由来のイメージング信号によって、相補的、複眼的に明らかにするものと期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、覚醒下・自由行動中、あるいは睡眠中の小動物(ラット)において、何ら束縛することなく、脳循環代謝由来の信号によって、脳活動をイメージングする技術を開発することである。

3. 研究の方法

1) カプセル内視鏡選定と脳活動マッピング

高品位の脳機能イメージング信号取得を可能とするカプセル内視鏡を選定する。どのカプセル内視鏡で脳活動マッピングが可能か、RF System 社の開発した NORIKA-3、Sayaka と、Olympus 社製の Endo Capsule、Given Imaging 社製の PillCam SB の各特性と、改造が必要かどうか、可能かどうかなど各社と相談、交渉する。選定後に、購入したカプセル内視鏡を用いて、脳活動マッピングを行う。まず、Isoflurane の吸入麻酔下に、ラットの体性

感覚野上方の頭蓋頭頂部を薄く削り(頭窓作製),頭部を定位固定した状態で,カプセル内視鏡もマニピュレーターで固定。外部照射光源を用いてテレメトリー法によって脳表のイメージを取得し,脳循環代謝の変化に由来するヘモグロビンの内因性光学信号を検出する。次いで,内視鏡内臓の照射光源であるLEDを用いて,センサー側か光源側かにバンドパスフィルターを使用してイメージングが可能か,もし改造や工夫が必要な場合はどのような方法で実現が可能か検討を行う。

2) カプセル内視鏡埋め込みとテレメトリー法の確立

上記1)のステップが確実にできれば,カプセル内視鏡を実際に体内に植え込む。Isoflurane吸入麻酔下に,感覚野を中心に頭頂部あるいは後頭・側頭部の頭蓋を薄く削り(頭窓作製),カプセル内視鏡を頭蓋骨上に固定,体性感覚・光・音等の感覚刺激を与えて,内因性信号が取得できることを確認した上で閉創する。麻酔から覚醒後,自由行動下に,脳表のイメージがテレメトリー法によって取得できるか確認する。ラットを拘束せずに,画像取得と自然刺激との同期化を図る。自然刺激を繰り返し,内因性光学信号の加算平均によって,装置と生体由来のノイズ(特にラットの動き,振動によるもの)が除去できるか検討する。

3) カプセル内視鏡による内因性光学信号と電気生理学的信号との同時取得

複数の慢性硬膜下電極を植え込み,電気生理学的信号を多点で取得する。カプセル内視鏡より得られる脳循環代謝変化由来のヘモグロビンの2次元的な光学信号と比較して両者の動的カップリングを解明する。

4. 研究成果

1) カプセル内視鏡の選定

現在,国内で入手できる代表的なカプセル内視鏡は Given Imaging 社と Olympus 社による製品である。当初,RF System 社の内視鏡 Sayaka が,バッテリー内臓型でなく,無線による電力伝送で動力源を確保できる為,動作時間に制限がない点から実験に適すると考えられた(WEB 情報)が,製品は開発段階であり,市場に流通しておらず,取得は不可能であった。その為,Given Imaging 社と Olympus 社の内視鏡について,内視鏡学会で情報を取得し,各企業担当者と相談,交渉を行った。以下に,2社の内視鏡のそれぞれの特徴の概要を示す(表1)。光学的な脳活動計測には,高いS/Nと広いダイナミックレンジが求められ,画像の解像度,精細さも含めて Olympus 社製のものに適すると考えられた。

表1. カプセル内視鏡の2社製品比較

Company	Olympus	Given Imaging
Capsule	Endocapsule	PillCamSB2
Size (mm)	11×26	11×26
Weight (g)	3.5	2.8
FOV	145°	156°
Images/sec	2	2(-6)
Battery life	8 hours	8 (-12) hours
Sensor	CCD	CMOS
Resolution	512×512	256×256

しかし,これらのカプセル内視鏡の共通の特性として(1)取得画像はRGBフィルターを通して再構成されるカラー画像になる。(2)バッテリーの寿命は8(-12)時間であり,繰り返し計測には,電池交換が必要となる。(3)装置固有のレンズとsensorでは,視野,被写界深度,分解能(PillCamSB2は70μm)などが固定される。(4)照射光源は白色のLED光源であり,特にOlympus社製では,照明強度を対象の明るさに応じて自動調節する(自動調光)機能があり,刺激前後の時系列データで差分をとる脳活動計測には逆に不向きとなる。実際,光学的に脳活動領域を描出する為には,狭帯域光の照射光源としては,Hemoglobin(以下Hb)の酸素化-脱酸素化(oxy-deoxy)の等吸収波長(可視光領域では569nm,586nmなど)を利用した血液量変化のマッピングや,deoxy-Hb優位の波長(600-760nm)を利用したfMRI-BOLD信号に類似したdeoxy-Hb変化のマッピングが行われる(Nemoto et al., 1999, CBF & Metab; 2004, J Neurosci; 2012, NeuroImage)。さらに,3波長以上の照射光源からのイメージングデータが得られれば,下記の式よりピクセル毎にfittingを行い

$$\log \frac{I_o^\lambda}{I(t)^\lambda} = (\epsilon_{\text{Hbr}}^\lambda \Delta[\text{Hbr}](t) + \epsilon_{\text{HbO}_2}^\lambda \Delta[\text{HbO}_2](t))L^2 + \Delta S$$

oxy-Hb, deoxy-Hb, total-Hbのマッピングが可能である(Sheth, Nemoto et al., 2004, J Neurosci; 2004, Neuron; 2005, CBF & Metab)。

これらの問題を解決する為には,カプセル内視鏡の改造が必須となる。そこで,企業担当者を介して,研究部門の方と打ち合わせた。先進の医療装置であり,改造や共同開発の承諾は得ることができず,その後の大幅な計画変更が余儀なくされた。

2) ウェラブルカメラの選定

そこで,最近市場に出ている小型のカメラ(a)超小型ビデオカメラ (b)ウェラブルカメラの検討を行った。(a)については,低S/Nから,微弱な光強度変化検出が困難であった。

(b)については、SONY 社製 HDR-AS100 と GoPro 社製 Hero 4 Black Edition を比較した。両者とも良好な画質を取得できるスペックを持ち合わせていたが、小視野の脳表を映し出す光学系のセッティングの容易さ・撮像設定の豊富さ・自由度から、GoPro 社製 Hero 4 Black が実験に適していると判断された。カプセル内視鏡の場合、撮像部、LED 光源部、Wireless 発信部、バッテリー部と超小型化され、頭部にストレスなく装着可能だが、ウェアラブルカメラの場合は、その大きさと重量から(表 2)、本体は、ジャケットの背部に装着する方式が考えられる。頭部に設置した頭窓に側視鏡付の fiber-optic bundle を埋め込み、体外に導いてウェアラブルカメラに接続固定、脳表のイメージを取得する方法が最適であると考えられた。体外にカメラがある為、バッテリー交換は容易であり、データは本体の micro SD に記録され、本体の各種操作は、Wireless で、リモコンあるいはスマートフォンにより行われ得る。ウェアラブルカメラの撮像特性については、広く公表されている為、ここでは詳しく取り上げないが、カプセル内視鏡に比較すれば、はるかに良好な画質の取得が可能であり、多様な撮像設定の変更が容易にできる為、光学的な脳活動計測に適している。しかし、その大きさと重量から、ラット以上の中～大動物の計測は可能であるが、マウスの計測は不可能である。

表 2. ウェラブルカメラ 2 社製品

Company	Sony	GoPro
Capsule	HDR-AS100	Hero4 black
Size (mm)	81.5×46.5×22.4	59×40.5×30
Weight (g)	92	88
Sensor	CMOS	CMOS
Resolution (max)	4896×2752	4000×3000

3) GoPro Hero4 black による脳表画像の取得

これらのウェアラブルカメラ固有の光学系では、脳表の画像を撮ることは不可能である為、まずレンズの変更が必要となる。Optical fiber との接続の前段階として、通常的光学系を用いて、ラット脳表の撮像を試みた。

- GoPro カメラを CS-C Mount レンズが装着できるよう Ribcage による変更を加えた。
- Computar 社製の 2/3 3.3× Macro Zoom レンズを装着。
- このレンズの最適撮像距離は 90 mm。
- 照射光源として、586 nm (Hb 等吸収点) と 620 nm (deoxy-Hb 優位) の狭帯域光を用いて脳表からの反射光の画像を取得。
- 頭窓を通して得られた脳表のカラー画像を図 1. に示す。
- Hb の等吸収点で撮像されている為、動脈と静脈が同じコントラストで描出されて

いるが、図 2. は、deoxy-Hb 優位の波長の為、ほぼ静脈のみが描出されているのがわかる。

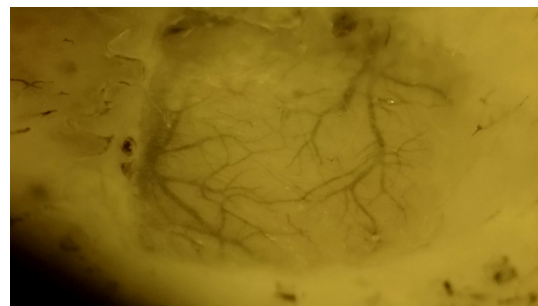


図 1. 照射光源 586 nm による RGB 脳表画像

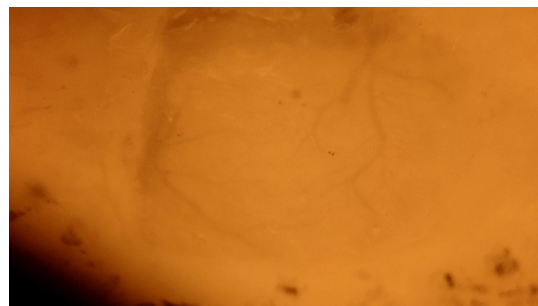


図 2. 照射光源 620 nm による RGB 脳表画像

これらの画像を Matlab 上の Matrix に取り込み RGB データに分離し、時空間で down sizing した後 Gray Scale 化した画像を以下に示す。



図 3. 586 nm 画像の Green Channel を抽出



図 4. 620 nm 画像の Red Channel を抽出

これらの画像を賦活前後で取得し、組織総 Hb 濃度と deoxy-Hb 濃度の経時的な変化に強く相関する脳活動画像を得る。

4) 実験のプロトコールと実際のマッピング

実験のプロトコールを以下 ~ に示す。

雄の Sprague Dawley Rat を用い Isoflurane の吸入麻酔下に頭蓋骨を薄くドリリング、シ

リコンオイルで透明化させる。

586 nm と 620 nm の狭帯域光を用いて、脳表を照明する。

GoPro の撮像モードとして Protune™ Control の状態にして White Balance: Native/ Color: Flat/ ISO400 /Sharpness: Low/ Exposure: +2.0 に設定し MPEG-4 AVC/H.264 のカラー動画を 1920 × 1080/60p で取得。この際、上下肢の電気刺激や頬ひげへの触覚刺激を与える。

取得されたカラー動画を Matlab の “ VideoReader ” のプログラムを用いて多次元 matrix data に変換。RGB チャンネルのうち、G/R チャンネルのみを使用。時空間ノイズを減少させる為に、“ Imresize ” のプログラムを用いてイメージサイズを減らし、時間方向に 12-15 枚の動画像を画素毎に平均化、200-250 ms 毎の動画像へダウンサイズする。直前 1 秒間の画像に対する刺激開始後の吸収(反射光)変化を、組織総 Hb 濃度と酸素化状態の変化によると考えてこれを算出する。光学的ノイズ・装置由来のノイズに加えて、生体の動きと血流のゆらぎによるノイズを減らす為に、10 回の試行を繰り返し、これを平均化する。

上記のような手法により GoPro カメラで取り込まれた画像から、脳活動マッピングを行った実験例を示す。結果として、良好に活動領域の描出が可能であった。

実験: 右 hind paw に対して 5 秒間 8 Hz-1 ms パルスの電気刺激を与えた際の左頭頂葉での脳活動イメージングを示す。図 5-6 は Hb の等吸収点である 586 nm、図 7-8 は deoxy-Hb 優位の 620 nm によるイメージングである。図 5 は RGB(586 nm)の Raw 画像、図 6 は組織総 Hb 濃度変化(血液量、血流量変化に密接に相関)由来する反射光変化を疑似カラーで示したものである。Bregma より 2 mm 後方、3 mm 左側方の部位を中心に、刺激 4 - 5 秒後に総 Hb 濃度増大のピークをもつ脳活動領域がマッピングされている。図 7 は RGB(620 nm)の Raw 画像、図 8 は 2 秒後に deoxy-Hb が同領域で増大するが(反射光減少 / 酸素代謝亢進と血液量増大による)、5 秒後には血流の増大により deoxy-Hb が還流静脈を中心に wash out されて減少し、結果として反射光が増大していることを示す。この二相性の変化は、高磁場で取得された fMRI-BOLD 信号に類似する。



図 5. 照射光源 586 nm による RGB 脳表画像

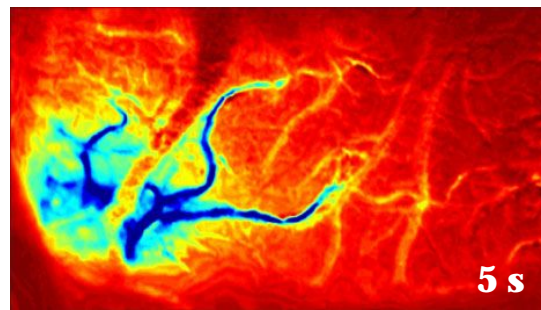


図 6. 照射光源 586 nm による脳活動マップ

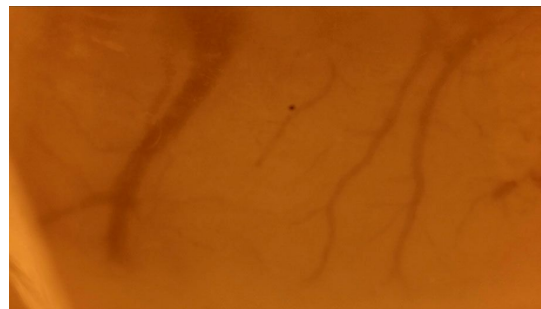


図 7. 照射光源 620 nm による RGB 脳表画像

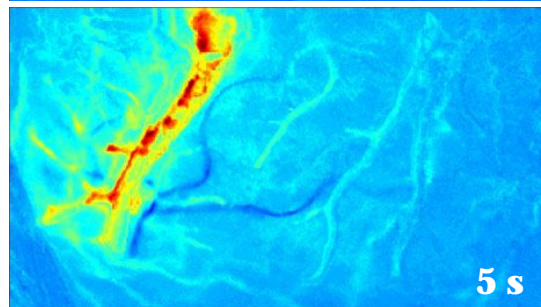
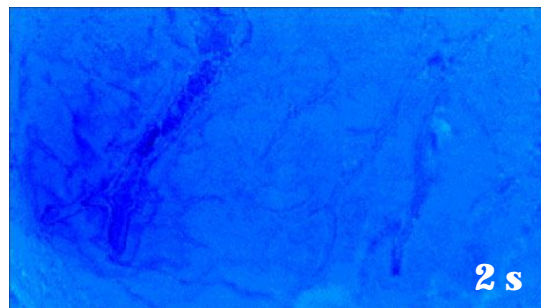


図 8. 照射光源 620 nm による脳活動マップ

5) 本法の問題点と有効性

本法の問題点としては、光の吸収変化の計算画像には非線形成分が混入することである。すなわち、CMOS sensor は Bayer Color Filter Array を通して RGB データを取得し、動画の YUV の色空間に翻訳、補間圧縮される。そのデータから Matlab で G/R チャンネルのみを取り出すという操作を行う為、RGB チャンネル間のクロストークが生じるからである。しかし、狭帯域光を用いることで、RGB 線形和としてある程度の線形性が確保される為、実

験の結果に示されたように、必ずしも大きく重い高額な冷却 CCD カメラを用いずとも活動領域の描出は可能である。特に、自由行動中の小動物の光学的脳活動マッピングにおいては、技術革新の著しいウェアブルカメラの適用は、現実的な段階に入ってきていると考えられる。

6) 結語

本方法は、カプセル内視鏡のようにラット頭部に装着可能というわけではないが、ウェアブルカメラ本体と LED 光源部をジャケットの背部に装着し、頭窓に接続した光 fiber bundle によって光の入出力を行うことで、光学的な脳活動計測が可能な画像を取得できる。これらの装置は Wi-Fi で操作が可能であり、覚醒下、自由行動中の小動物の脳活動イメージングが可能となる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. 532 nm Low-Power Laser Irradiation Facilitates the Migration of GABAergic Neural Stem/Progenitor Cells in Mouse Neocortex. Fukuzaki Y, Shin H, Kawai HD, Yamanoha B, Kogure S. PLoS One 10(4):e0123833, 2015

2. Layer-specific modulation of neuronal excitability by 660-nm laser irradiation in mouse neocortex. Kumazaki K, Mieda T, Kogure S, Kawai H. Lasers Med Sci 29(3):1117-24, 2014

3. Convergence of nicotine-induced and auditory-evoked neural activity activates ERK in auditory cortex. Kawai HD, La M, Kang HA, Hashimoto Y, Liang K, Lazar R, Metherate R. Synapse 67(8):455-68, 2013

4. 532 nm low-power laser irradiation recovers -secretase inhibitor-mediated cell growth suppression and promotes cell proliferation via Akt signaling. Fukuzaki Y, Sugawara H, Yamanoha B, Kogure S. PLoS One 8(8):e70737, 2013

5. The effect of low-level laser irradiation on muscle tension and hardness compared among three wavelengths. Yonezu T, Kogure S. Laser Ther 22(3):201-7, 2013

6. 脳の可塑性を活かす. 根本正史 J Oriental Studies 52(2): 300, 2013.

7. Diversity of neural - hemodynamic relationships associated with different cortical processing during bilateral somatosensory activation in rats. Nemoto M, Hoshi Y, Sato C, Iguchi Y, Hashimoto I, Kohno E, Hirano T, Terakawa S. NeuroImage 59: 3325-3338, 2012

8. Nicotinic acetylcholine receptors in rat

forebrain that bind ¹⁸F-nifene: relating PET imaging, autoradiography, and behavior. Bieszczad KM, Kant R, Constantinescu CC, Pandey SK, Kawai HD, Metherate R, Weinberger NM, Mukherjee J. Synapse 66(5):418-34, 2012

9. Spectral analysis of bilateral or alternate-site kindling-induced afterdischarges in the rabbit hippocampi. Tsuchiya K, Kogure S. Epilepsy Res 101(3):228-36, 2012

10. Nicotinic filtering of sensory processing in auditory cortex. Metherate R, Intskirveli I, Kawai HD. Front Behav Neurosci 6:44, 2012

〔雑誌論文〕(計 10 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 1 件)

ミトコンドリアはミドリがお好き! -究極のヒューマン・パワー・プラント 木暮信一
東京図書出版 2015

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根本 正史 (NEMOTO MASAHIITO)
創価大学・公私立大学の部局等・研究員
研究者番号: 80370980

(2) 研究分担者

木暮 信一 (KOGURE SHINICHI)
創価大学・理工学部・教授
研究者番号: 10133448

川井 秀樹 (KAWAI HIDEKI)
創価大学・理工学部・教授
研究者番号: 90546243

(3) 連携研究者

星 詳子 (HOSHI YOKO)
浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授
研究者番号: 50332383

精山 明敏 (SEIYAMA AKITOSHI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号: 70206605

(4) 研究協力者

播磨 勇希 (HARIMA YUKI)
創価大学理工学部