

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20245

研究課題名（和文）BMIデバイスの治療効果予測・評価のための光刺激－光記録神経活動撮像系の開発

研究課題名（英文）Development of an optical stimulation-optical recording imaging system for estimating and evaluating the therapeutic efficacy of BMI devices.

研究代表者

田代 洋行 (Tashiro, Hiroyuki)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：70380384

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：人工網膜のような空間的に高密度な刺激を加える Brain machine interface (BMI) の医療応用に向けた研究が取り組まれている。侵襲を伴うインプラント機器においては術前に治療後の効果、デバイスの有用性の評価が必要である。そのためには、非侵襲的に高密度に刺激を行い、時間的分解能が高い神経応答を画像として収集できると有用である。本研究では、遺伝子改変なしに既存のイオンチャンネルに光応答性を付与するPhotoswitchと毒性のない電位感受性色素としても使用できると近年になって報告されたIndocyanine greenを組み合わせ、臨床応用可能なBMI評価系の確立を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では臨床応用を視野に、毒性がない試薬を用い、Photoswitchによる高密度刺激と、Indocyanine greenを用いた時間分解能も電気記録に劣らない二次元神経応答画像記録の実現に取り組んだ。本研究で開発に取り組んだ評価系により、人工視覚システムのスクリーニング検査、治療後評価以外にも、正常眼圧緑内障の検査、脳外科手術の際の切除可能部位の特定、拡張型心筋症の変性部位の特定などにも応用可能であり、治療効果、術式の評価といった臨床（医療技術評価）領域への波及効果は大きい。また基礎的な神経科学の実験系としても利用できる。

研究成果の概要（英文）：Medical applications of brain-machine interface (BMI), which applies spatially dense stimulation such as artificial retinas, are being investigated. In invasive implantable devices, it is necessary to evaluate the post-treatment benefit and efficacy of the device before surgery. For this purpose, it would be helpful to noninvasively perform high-density stimulation and acquire images of neural responses with high temporal resolution. In this study, we established a clinically applicable BMI evaluation system by combining Photoswitch, which imparts photo-responsiveness to existing ion channels without genetic modification, and indocyanine green, recently reported as a non-toxic voltage-sensitive dye.

研究分野：生体医工学

キーワード：光神経刺激 光神経活動記録 Indocyanine green Photoswitch Brain Machine Interface 安全性評価

1. 研究開始当初の背景

人工内耳、人工視覚システム(人工網膜)といった、疾病により喪失した感覚を人工デバイスによって再生させる治療法が臨床応用されている。しかしながら、申請者らが開発に取り組んでいる人工視覚システムにおいては、健常者と同等な感覚を再生させるには未だいたっていない。健常者の視覚に近づけるため、高性能電極を用いたより高密度な刺激電極アレイの開発が広く取り組まれているが、高密度化が有効に働くには患者側にも相当する感受性が必要となる。申請者らが開発に取り組んでいる人工視覚システムは、光を神経信号に変換する受容体である視細胞が障害される疾患(網膜色素変性、加齢黄斑変性など)において、視神経以降の視覚神経路に残存する網膜神経節細胞などを電気刺激することにより、疑似光覚(フォスフェン)を誘発するデバイスである。しかしながら、これらの疾患において、視細胞からの入力がないと網膜神経節細胞などは、その残存数が減っていき、電気刺激に対する感受性も疾患の進行とともに減少する。申請者らの行った臨床研究においても、埋植前の疾患の進行度(網膜神経節細胞の残存数減少)に伴う、デバイスによる視覚再生効果の差を確認している。そのため、デバイス埋植前に残存する網膜神経機能の確認ができると非常に有用である。

人工視覚システムのように、神経や脳を物理的に刺激することにより外界情報を直接脳に伝える技術は BMI, Brain computer interface (BCI), Direct neural interface (DNI) と呼ばれ、医療分野以外にも盛んに研究が行われているが、侵襲的なインターフェースは疾病の治療または欠損した機能の回復といった医療応用に関する研究開発が中心である。人工視覚システム以外でも、こういったインターフェースとなる部位の感受性評価の術前、術後の評価は非常に重要である。特に視覚においては感覚受容器である網膜が直接光学的に観測が可能であるため、光学的、非侵襲性に網膜神経系の機能が評価できれば、人工視覚システムの植え込み前に術後に見込める効果が評価できる。しかしながら、一般的に使用される膜電位感受性色素やカルシウムインジケーターといった試薬は毒性を有し、残存する数少ない神経細胞に障害を与えてしまう。臨床的にこういったスクリーニング検査や術後評価を可能にするには、毒性がない膜電位感受性色素を必要とする。近年になって、広く血管造影に臨床使用されている Indocyanine green (ICG) に膜電位感受性があることが報告された。また、このようなスクリーニングには非侵襲的に高密度刺激を行える方法が必要となる。遺伝子改変なしに Photoactive molecule の添加により既存のイオンチャンネルに光感受性を付与する Photoswitch という技術も開発されつつある。これらを応用すれば、人工視覚システムのような空間的に高密度な感受性を必要とする侵襲的 BMI 機器の埋め込み前に、効果の程度や術後の機能維持の評価が可能と考える。

2. 研究の目的

本研究では臨床応用を視野に、毒性がない試薬を用い、Photoswitch による高密度刺激と、ICG を用いた時間分解能も電気記録に劣らない二次元神経応答画像記録の実現を目指す。

本研究では Photoswitch を用いた Optical nerve stimulation が、光パルス刺激に対し安定した応答をするか評価を行う。また、これらの応答を電気記録と対比させて、安全性が確立している ICG を用い、電気刺激と同等な時間分解能が得られる高速 sCMOS カメラで ms オーダーの神経応答を画像として捉えられることを検証する。また、これらの試薬を添加後の神経毒性を見る。そのため、遊離網膜ではなく、比較的均質な性質を再現しやすく、長期評価が可能な培養神経細胞を用いて評価を行う。

このような評価系が確立できれば、人工視覚システムのスクリーニング検査、治療後評価以外にも、正常眼圧緑内障の検査、脳外科手術の際の切除可能部位の特定、拡張型心筋症の変性部位の特定などにも応用可能であり、治療効果、術式の評価といった臨床(医療技術評価)領域への波及効果は大きい。また基礎的な神経科学の実験系としても利用できる。

3. 研究の方法

神経系培養細胞を用いた Photoactive molecule の光応答性付与効果の in vitro 評価
神経薬理評価などに広く使用される培養神経細胞 NG108-15(マウス神経芽細胞)を用いる。MEA 上に培養した NG108-15 細胞に Photoactive molecule (BENAQ, DENAQ) を添加し、光応答性のない細胞に光応答を付与する。パルスレーザー刺激を加え、光刺激に対する細胞の誘発応答電位を MEA により記録する(図1)。誘発応答の潜時や振幅の変化を経時的に記録し、ユニットの線形応答をラスタプロットなどで評価する。また代謝により応答が消失する期間、その後の機能維持を、無添加の培養細胞と比較し安全性を評価する。

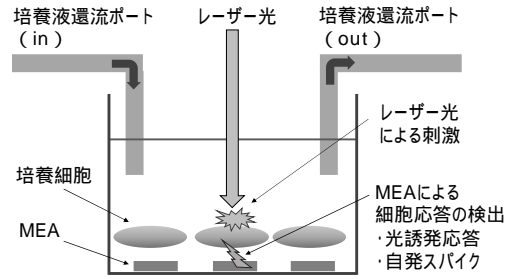


図1 還流培養系を用いた MEA による長期応答記録評価系

ICG を用いた神経活動の画像計測

MEA 上に培養した NG108-15 細胞に ICG を添加し、自発発火および電気刺激による電気応答を MEA より記録、ICG の蛍光変化を高速カメラで収集する。電位による蛍光変化が非常に微小なため、撮像には高 S/N 比が必要になる。そのため EM CCD または高速 sCMOS カメラによる撮像が必要になる。ICG の蛍光は時間とともに減少するのでバックグラウンドの補正や、S/N 比を稼ぐための加算平均処理などの画像処理プログラムの作成も併せて行う。光応答画像と MEA による神経電位計測を比較し、神経応答画像記録の検証を行う。

光刺激、光記録を用いた神経活動評価系の確立

の結果と、の結果を組み合わせ、光刺激を用いた高空間密度刺激、および ms オーダーの神経応答の収集を画像として記録が可能なシステムの開発を行う(図2)。

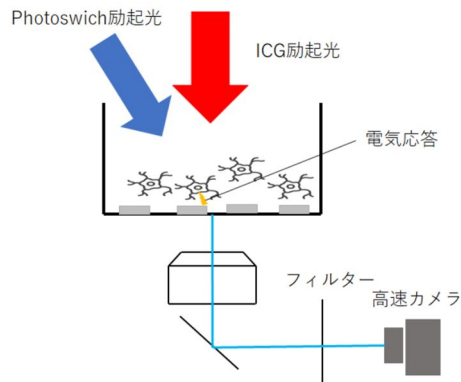


図2 光刺激・光計測システム

4. 研究成果

Photoactive molecule である BENAQ および DENAQ の有機合成に成功した。

図3のようなシングルモードファイバーから導光したレーザー光のビーム径をコリメーター、ビームエキスパンダーにより広げる落射照明系の光学開発を行った。また、図4のような LED を用いた落射照明系も開発した。

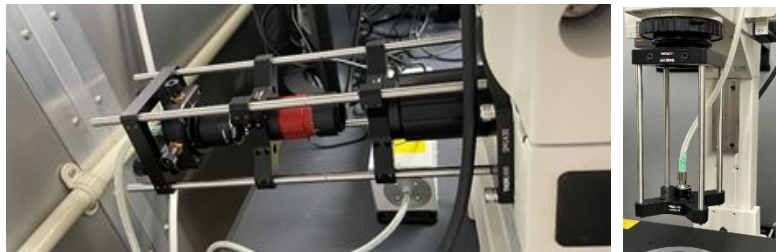


図3 レーザー光源を用いた落射照明・透過照明

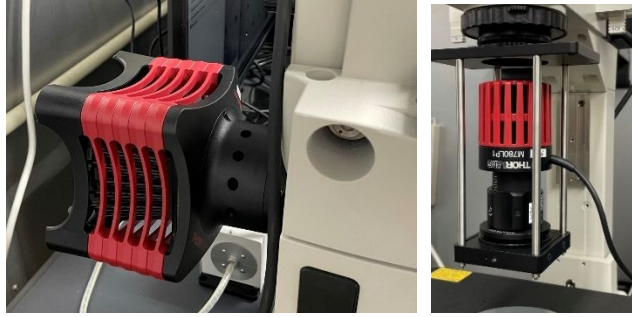


図4 レーザー光源を用いた落射照明・透過照明

ICGを用い膜電位観察するために必要な励起光パワーは明らかになっていない。過度に強い励起光はICGの退光を促進する。また、時間とともに漸減的な蛍光低下によりダイナミックレンジを損ない、蛍光変化の検出を難しくする。そのため、まずLEDおよびレーザーなど種々の光源を用意し、視野内の均一度およびパワー密度を求めた。

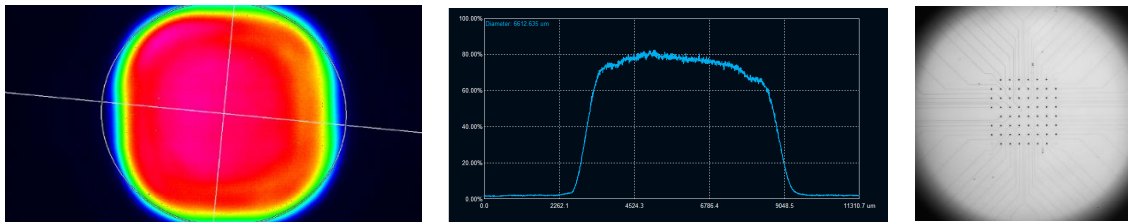


図3 LED 落射照明・対物レンズ4倍のビームプロファイルおよび視野画像

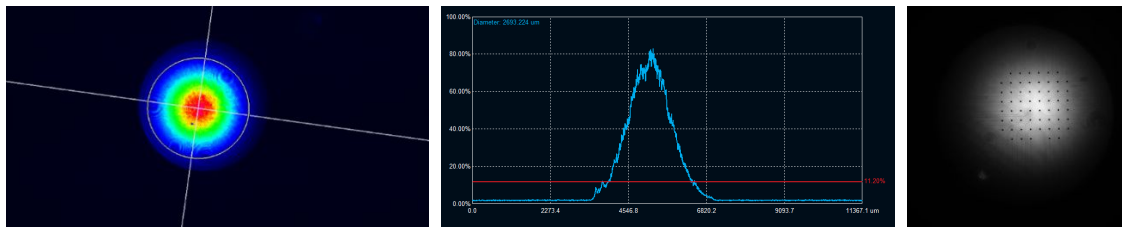


図4 レーザー落射照明・対物レンズ4倍のビームプロファイルおよび視野画像

LEDの方が均一な照明が得られるが、その分、パワー密度に劣る。4倍で 48 mW/cm^2 、10倍で 58 mW/cm^2 、20倍で 240 mW/cm^2 であった(図3)。レーザーは照度がガウシアン分布になるが、光パワー密度が得られる。4倍で 500 mW/cm^2 、10倍で 4000 mW/cm^2 、20倍で 20000 mW/cm^2 であった(図4)。レーザーはコリメーターで3mm程にビーム径を広げ、透過照明で行っても視野、 500 mW/cm^2 パワー密度が得られたが、観察視野は透過照明と大きく変わらなかった。透過照明の場合、対物レンズを経ないため、観察倍率によってパワー密度は変化しない利点がある。

低倍率レンズで広視野を得る場合はレーザー光源の方が向く。高倍率レンズで比較的狭い視野を観察する場合は、集光される分、LED照明でも高いパワー密度が得られた。

ICGと退避させるため、カルシウムインジケーターで逆行染色したラット遊離網膜を作成し観察を行った(図5)。網膜神経節細胞を明瞭に染めることができた。

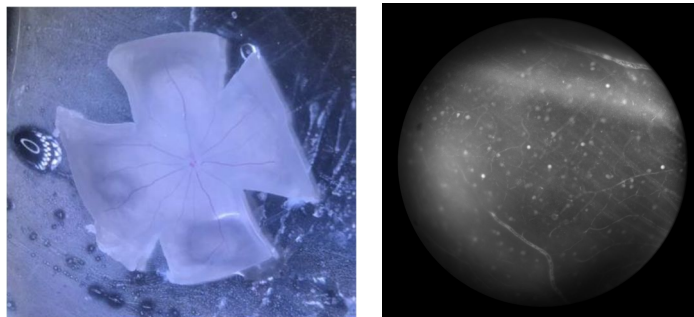


図5 ラット遊離網膜の作成と蛍光染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木海吏, 田代 洋行, 野村 修平
2. 発表標題 神経細胞に光応答性を付与するPhotoactive molecule (BENAQ) の精製純度の検討
3. 学会等名 日本生体医工学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Teixeira Barbara Sais, Ronnakorn Siwadamrongpong, Joshua Olorocisimo, Taisuke Saigo, Mark ChristianGuinto, Makito Haruta, Hironari Takehara, Hiroyuki Tashiro, Kiyotaka Sasagawa, Jun Ohta
2. 発表標題 Compact Fluorescent Cell Imaging System for Real Time Acquisition
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

〔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
研究協力者	野村 修平 (Nomura Shuhei) (00825432)	帝京大学・福岡医療技術学部・講師 (32643)	
連携研究者	太田 淳 (Ohta Jun) (80304161)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学研究科・教授 (14603)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	寺澤 靖雄 (Terasawa Yasuo) (20815849)	奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・教授 (14603)	

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