

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09384

研究課題名（和文）神経組織内因性蛍光反応を基盤とした大脳皮質活動領域の術中直接可視法の確立

研究課題名（英文）Intraoperative visualization of human cortical activation using intrinsic fluorescence signal imaging

研究代表者

大石 誠（Makoto, Oishi）

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：00422593

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は脳表刺激によるヒト大脳皮質での賦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。現在、小さな大脳誘発電位の観察にトライしており、いまだ難しい点が多いが、あと一息のところにある。目先を変えれば、てんかん性自発放電などにも応用してゆき、脳神経外科手術の安全性に貢献できる手術支援法としての確立に努めたい。

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 flavoprotein brain function

## 1. 研究開始当初の背景

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、我々は今まで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手術支援法の確立に取り組んできた。術中「神経活動領域の直接可視化」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確立されて来ており、それぞれ手術支援法として導入されて来たが、脳実質の活動そのものの可視化にはまだいたっていない。

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(渋谷克栄教授)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。同方法をいよいよヒト大脳に応用し、実際の開頭手術中に脳表刺激により誘発される大脳皮質活動をプレリミナリーに可視化できたところから、本研究へと展開した。

## 2. 研究の目的

最終目標は脳神経外科手術中に、ヒト大脳を対象として機能の賦活部を直接可視化することである。flavoprotein の蛍光反応を動物では獲得できており、感覚野や聴覚野の反応を可視化し、その特徴を示した研究論文は多数報告された。ヒトでは大脳皮質の構造の問題、術中の脳の拍動などのアーチファクトの問題、手術中という限られた時間内という制限の問題などがあった。本研究ではこれらの問題を一つずつクリアするところから始めた。

## 3. 研究の方法

先行研究で行って来た Flavoprotein を対象とした蛍光観察イメージング法 (flavoprotein fluorescence imaging: FFI) を基本に、方法をブラッシュアップした。手術顕微鏡にレーザー光源を組み込み、もっとも反応を惹起できる Blue light の波長で脳表を照射、フラビン蛍光反応の自家発光は Green light の波長にあるため、可視フィルターを組み込んだ。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、脳腫瘍症例の大脳皮質において、反応の可視化

を行った。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。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト脳皮質における FFI 観測の成功

すでに先行研究で決めていた刺激条件、観察条件において、術中のヒト大脳皮質での FFI 観測を計 20 例で行い、全例で皮質刺激に応じた刺激電極周囲の緑色蛍光反応の増強を観測した。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 120ms で出現、1200~1800ms でピークに達し、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。先行研究と大きく異なるものではなかった。今回は手術室の暗転化、脳表のアクリル板による軽度圧迫固定、顕微鏡をより脳表に近づけた観測など、実験中の細かな条件を修正し、まず安定した記録が可能であった。先行研究同様に、従来から報告があった術中灌流依存性イメージングもセットで行っているが、やはり単相性変化であり、FFI で見られた二相性反応の後方成分に全例で相当し、血流イメージングとしての広がりには明らかにフラビン反応よりも面積が広く、時に他の脳回に及ぶものであった。フラビン反応では、基本的に一脳回の局所に反応は止まったが、2 例ほど遠隔に引き続く反応が見られた例があった。フラビン反応と血流反応の中心が合致していない例が 3 例ほどあった。

##### (2) リアルタイム観察方法の確立

CCD カメラを介して撮像された映像は、ハイスペック PC のソフトウェアで数回分のデータの加算処理を施しカラースケールの動画データとしてアウトプットする。このデータ解析は今までは手術中に何か問題のないように、という配慮からも術中にはデータ収集に徹し、後日研究室で解析、画像化していた。しかし、脳神経外科手術の支援技術として導入するには、リアルタイム観察をする技術が必要となり、今回はそのトライアルも行って来た。PC 上ですぐに解析を行い、

結果画像をパワーポイント上で脳表写真に位置合わせ合成を行い、モニター表示することは可能であった。まだ手間が多く、これを手術顕微鏡のモニター映像にリアルタイムに重畳して見せるには、独自のプログラム作成が必要であるが、理論的には十分可能である。

### (3) 誘発反応の観察検討

他覚的な大脳皮質の誘発反応として、最も簡便で再現性の高いものに体性感覚誘発反応がある。もっとも単純なものとして、正中神経刺激体性感覚誘発電位 SEP があり、やはり SEP に準じた反応が最もよく観察されるのではないかと考えた。動物実験では、ラットの母指球を擦ることで反応が観察された、動物のように行くかはわからないが同じ刺激条件も試してみた。これまで10例ほどでプレリミナリーにさまざまな刺激方法のトライアルを重ねたが、結果的には現段階では明確で再現性のある反応の観察までに至れていない。原理的に必ず観察できるはずであり、刺激条件や、あるいは体性感覚にこだわらずにさらに聴覚などの反応も試行錯誤してゆく。

### (4) 本研究の意義と今後の展望

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。現在、小さな大脳誘発電位の観察にトライしており、いまだ難しい点が多いが、あと一息のところにある。目先を変えれば、てんかん性自発放電などにも応用してゆき、脳神経外科手術の安全性に貢献できる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 Daiju Mitsuhashi MD1, Ryuichi Hishida PhD2, Makoto Oishi MD1, Tetsuya Hiraishi MD1, Manabu Natsumeda MD1, Katsuei Shibuki PhD2, and Yukihiko Fujii MD1	4. 巻 134
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 1105-1113
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
---------	---------