

神経制御工学の黎明

—— 適応的閉ループ型の電氣的神経制御技術の基盤構築 ——

Emerging a field of neural control engineering

—— Developing a foundation of applying electric control technology of adaptive loop type to nervous systems ——

2151021



研究代表者 北海道大学 教授 館野 高

[研究の目的]

本研究課題では、神経制御工学の基盤となる電磁気による神経活動の記録と刺激の方法の基礎技術の開発を目的としている。特に、本研究課題を通じて、神経工学、制御理論、電気生理学の3領域の融合を図った新たな学際領域として、神経制御工学の創成を目指している。

体内埋め込み型の電子医療機器として、現在、脊髄電気刺激器、脳深部刺激装置、心臓ペースメーカー、人工内耳等が利用されている。こうした電子機器の多くの特徴は、組織や臓器等に一方的に制御信号を送信するが、その結果として誘発される生体情報を取得できない。このために、制御信号の印加が適切であったか否かを推定するには、他の信号計測機器もしくは別の制御機構を通じて計測を行う必要がある。

また、近年、薬剤を用いずに生体内埋め込み電子装置により神経や分泌細胞を直接刺激し、神経伝達物質やホルモンの放出を促して病気を治療する「電気薬学治療」が特に注目されている。体内産出物質ではない「人工的」薬剤は、投与後に予期せぬ副作用が生じる可能性があるために、神経活動を電氣的に制御し、体内産出物質を必要な部位に必要な量を効果的に送ることが可能になれば、安全に治療効果を高めることができるかと予想される。

本研究課題では、神経制御工学が対象とする例として、代表的な耳疾患である「耳鳴り」を抑制制御するための閉ループ型システムの構築を通じて、その基盤となる技術と制御法を開発する。

[研究内容、成果]

A. 研究の方法

【実験系の概要】

本研究課題では、まず、脳活動の記録系(図1①)、および、誘発(刺激)系(図1②)を構築し、その後、それら2つを連結して、閉ループ型の制御システム(図1③)を構築する。そして、制御システムに必要な基礎的なハードウェアとソフトウェアの技術を開発する。本研究課題では、特に、聴覚中枢系を対象にして、

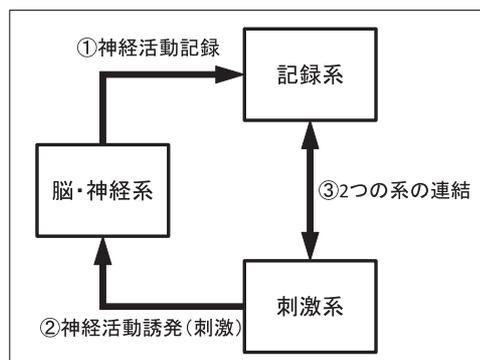


図1 記録系および刺激系の連結の概略

閉ループ型の制御システムのプロトタイプを構築する。

【記録系】

記録系の構築に当たって、音刺激および電気刺激により誘発された神経応答を記録するシステムを実験室内に構築し、モデル動物を使って2つの刺激方法による誘発応答の差異を明らかにする。モデル動物として、げっ歯類のラットおよびマウスを用いた。雄の成熟ラット (Wistar/ST, 6-9 週齢), もしくは, マウス (C57BL/6J, 10-14 週齢) にミダゾラム (10 mg/kg), キシラジン (12 mg/kg), 生理食塩水の混合液を腹腔内注射し, 麻酔を施した。実験中の麻酔の状態を安定に保つため, 以後1時間ごとにその半分の量を筋注射した。体温は, 温度コントローラーを使用して 37°C に保った。左脳聴覚皮質を露出させた後 (7 mm×5 mm), 硬膜を除去し, 膜電位感受性色素 (RH-1691, 1 mg/ml in ACSF: 135 NaCl, 5 KCl, 5 HEPES, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, in mM) を滴下し, 約 60 分間染色を行なった。残留した色素を十分に洗い流した後, 約 37°C に温めたアガロースゲルを流し込み, カバーガラスで押さえ, 脳表の不動化処置を行なった。また, 自家蛍光フラビンタンパク質のイメージングを行う場合には, 脳表に生理食塩水もしくは流動パラフィンで 30 分程度間隔で滴下し, 脳の表面の乾燥を防いだ。

音刺激には, 最も単純な純音刺激を用い, その周波数は 1, 2, 4, 8, 16, および, 32 kHz とした (50 ms; 5 ms rise and 5 ms fall, 50 or 70 dB)。また, 音刺激の作成には, Tucker-Davis Technologies (TDT) 社のハードウェア (System 3) とソフトウェア (RPvdsEX) を用いた。刺激のタイミングや回数は, 数値計算ソフト Matlab (MathWorks 社) の自作プログラムで制御した。音刺激は, 実験動物の外耳から約 20 cm 離れたスピーカー (MF-1, TDT) からオープンフィールドで呈示した。音刺激の音圧レベルについては, 動物の右耳の位置におい

て, メジャリングアンプ (2636 型, Bruel and Kjaer 社) と 1/4 インチマイクロフォン (4939-L-002, Bruel and Kjaer 社) を使用してキャリブレーションした後に実験を行なった。

膜電位感受性色素 (RH-1691) で染色された蛍光強度変化は, 高速 CMOS イメージングシステム (MiCAM02-CMOS, Brainvision 社) で計測した。励起光として 150 W のハロゲンランプを使用し, 励起フィルタ (632±11 nm) を通過させ, ダイクロックミラー (550-640 nm) で入射光に対して 90 度反射後, 脳表に照射させた。脳表から生じた蛍光はダイクロックミラーと蛍光フィルタ (665 nm 以上通過) を通過させ, 顕微鏡 (THT, Brainvision 社) の上部に取り付けられた CMOS カメラで記録した。また, フラビンタンパク質イメージングには, 同様のシステムでフラビンタンパク質の励起および蛍光の波長に適合したフィルタセットを用いた。

刺激前の蛍光量 (F_0) を基準として, 刺激後の蛍光量の変化量 ($\Delta F = F - F_0$) を F_0 で割って規格化した $\Delta F/F_0$ を算出した (脱分極における ΔF を正とした)。データ取得および解析ソフトウェア BV_Ana (Brainvision 社) を用いて, サンプリング間隔 4~6 ms, 脳表上の 5.8 mm×4.8 mm の領域を 188×160 ピクセルで計測し, 記録したデータを PC に保存した。呼吸や心拍の拍動ノイズを最小限に抑えるため, それぞれの刺激を 10-20 回ずつ呈示し, 平均加算の処理を行った。得られたデータは, 数値解析ソフト Matlab (MathWorks 社) で自作したプログラムを用いて解析した。閾値は, 各刺激に対する全ピクセル内での最大反応値を基準とし, その 40% 以上の誘発応答領域をカラーマップに応じて色付けした。

さらに, 神経細胞の集合電位および活動電位の細胞外記録には, 信号増幅システム (OmniPlex, Plexon 社, および, RHD2000, Intan Technology 社) を用いた。

【電気刺激系】

電氣的刺激を印加する実験系は、制御用ノートPC (図2A), トリガー信号の入力と電力供給に用いるトリガー基板 (図2B), 電源 (リチウムイオンポリマー電池, 図2C), および、刺激インターフェースを有するインプラント用基板 (図2D) から構成した。トリガー基板 (図2B) では、外部信号を入力、もしくは、神経活動の生起の事象を基に、電氣的刺激印加を開始できる。また、インプラント用基板には、報告者が既に試作した多電極配列基板 (チャンネル数, 16 もしくは 32) および制御回路用 CMOS chip を組み込んだシステムを利用した。電源は、3.7 V の電圧をインプラント基板に供給しており、通常、3 時間以上の刺激印加が可能である。本システムは、神経組織に対して、単独でも刺激印加システムとして利用できる。

【2つの実験系の連結】

上記の記録系と刺激系との間の信号伝達には、簡易的に、デジタルシグナルプロセッサ (sBOX2 DSP, MTT 社) を用いて、各機器への出力信号の変換を行った。記録系における活動電位の発生事象の検出には、多電極配列基板もしくはタングステン電極で計測した細胞外記録電位を利用した。光計測における神経活動発生検出には、高速 CMOS イメージングシステムの出力信号を一旦 PC に書き込んだ後に、神経活動の最大値がある一定の閾値を超えた時点

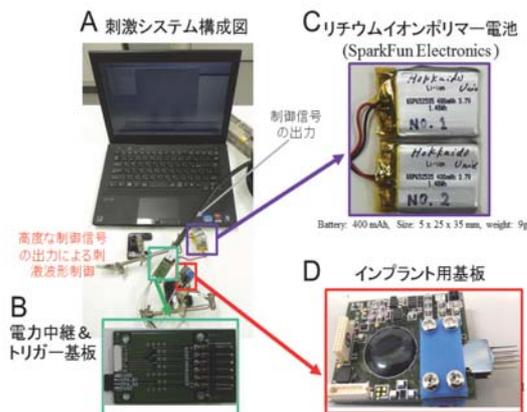


図2 記録系および刺激系の連結システムの概略

を神経活動が発生した時点とした。

B. 研究の結果

【純音刺激に対する誘発応答】

ラットの聴覚皮質 (図3A) に対して、2~32 kHz の純音刺激を呈示し、その結果として応答した神経活動の領域を図3Bに示す。図3B内の各色は、特定の周波数に対して、蛍光変化を示した中心部位とその活動領域を示している。各周波数の純音に応答する場所は、聴覚皮質上で少しずつ中心方向に遷移する。図3Aの中心からやや左上の位置に近づくに従って高周波数音に応答し、周波数の地図 (トノトピーマップ) を形成している (図3B)。特に、明瞭なトピーマップは、聴覚皮質上で、主に、2つの異なる部位に形成されることが既に先行研究から知られている。本研究でも2つの主要な応答領域が確認された (図3B)。次に、2つの応答領域を区別するために、先行研究に従って、聴覚野に位置するコア領域内の2つの領域である一次聴覚野 (primary auditory field, A1) と吻側聴覚野 (anterior auditory field, AAF) を定めた。時間的な活動の伝搬では、純音刺激に

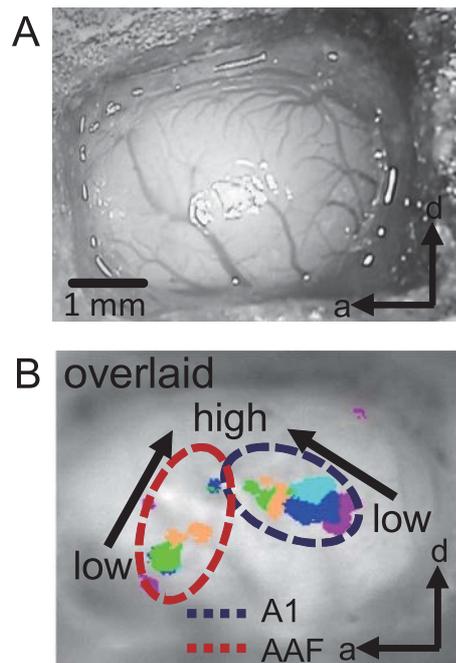


図3 A 聴覚皮質, B 周波数地図

誘発されて、A1 から開始された神経活動は、腹側後方と腹側方向へ活動が伝播した。また、AAF から始まった活動は、腹側前方に活動が伝播した。これらの結果は先行研究とほぼ一致した。膜電位感受性色素やフラビンタンパク質の光計測によってマウスにおいてもラットと同様に聴覚皮質の中心付近に2つの領域と各々にトノトピーマップの存在を確認できた。

【電気刺激の効果とその誘発応答】

次に、刺激系の動作を確認するために、電気的刺激によりマウス聴覚皮質の神経活動を誘発する実験を行った。聴覚皮質に多電極配列基板の先端部を 300 μm 程度刺入させ、フラビンタンパク質イメージングを用いて皮質表面の神経誘発活動を計測した (図 4A)。フラビンタンパク質は、細胞のミトコンドリアに内在する自家蛍光物質である。神経活動によってミトコンドリアの酸素代謝が促進し、フラビンタンパク質が酸化型に変化すると、青い照射光に対して緑色の自家蛍光を発する性質がある。また、自然還元により、還元型のフラビンタンパク質に戻ることから、退色の影響を受け難いことが知られている。また、電気的刺激後には、刺激電極の近隣で蛍光変化量が大きく一過性に増加す

るが、電極位置から離れた位置ではその変化量が小さくなる。この観察結果から、聴覚皮質における誘発刺激応答の記録が可能となった。

【2つの実験系の連結】

記録系における活動電位の発生事象の検出に、多電極配列基板もしくはタンゲステン電極で計測した細胞外記録電位を利用した場合には、信号検出に 1 ms 程度の遅れが生じた。一方、光計測の記録結果を用いた場合には、信号が一旦、光計測用の制御 PC を経由するために、検出には 3~5 ms 程度の遅れが生じた。何れの場合にも神経活動の発生に応じて、脳組織に刺激系から電圧の印加が可能となった。

【研究の方向と課題】

本研究では、脳活動の記録系、および、刺激系を構築し、その後、それら2つを連結して、脳活動の閉ループ型制御システムの構築を目的とした (図 1)。

その実現のために、研究課題期間の前半では、まず、音刺激に対する誘発応答の記録系を構築した。純音刺激に対するラットおよびマウスの聴覚皮質の神経応答を、膜電位感受性色素とフラビンタンパク質の蛍光強度の変化を計測することによって、聴覚皮質の領域を特定化した⁽¹⁾。特に、純音刺激に対する神経応答は、2つのコア領域 (A1 及び AAF) から始まり、それぞれ腹側後方、腹側、腹側前方へと活動が伝播した。純音刺激を呈示したときにみられた複数の活動伝播経路は、他の動物種でも報告されている。例えば、モルモットでは、コア領域から腹側、背側、後側の3方向に広がる活動伝播が見つかっている。モルモットの後側の領域が両耳の違いに敏感であることから、後側への活動伝播は場所特定に特化した機能経路を持っていることも推測されている。同様に、純音刺激に対するマウスの誘発応答も観察した。神経活動の伝搬経路は、ラットと類似していたが、詳細な違いを明らかにするためには、今後、引き続き

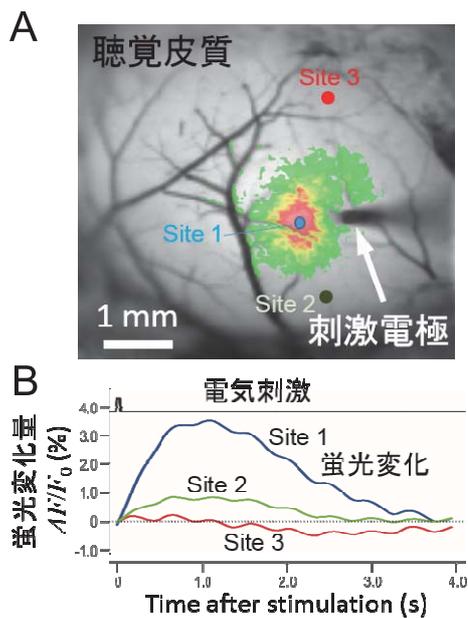


図4 電気的刺激の応答領域

実験が必要である。

次に、研究課題期間の後半では、聴覚皮質における電氣的刺激を行う実験系を構築した(図2)。そして、本課題で構築した実験系と齧歯類のモデル動物を用いて、実際に電氣的刺激が神経活動を誘発可能かについて、聴覚皮質を対象に実験を行った。その結果、本実験系で神経応答を十分に誘起できる結果を得た。AAFの刺激では、神経活動はA1に向かい伝搬していく様子が観察された。A1刺激では逆にAAF方向に活動が伝搬する傾向があることが判明した。今後はより微少な電氣的刺激に対して、神経活動がどの様に伝搬しているかを観察することにより、聴覚皮質の神経回路網の機能的な結合関係を詳細に明らかにしたい。

さらに、閉ループ型制御システムの構築を目指して、記録系と刺激系の連結を図った。記録系における神経活動検知の方法には、未だ開発の余地が十分にあり、単純な閾値による処理から複雑な検出機構を備えたシステムの構築が今後の課題である。特に、本システムでは、記録系から刺激系の遅延時間が長く、実時間処理に十分とは言えない点で更なる改良が必要である。しかし、本研究課題を通じて閉ループ型制御システムにおける問題点の多くが浮き彫りになった点は、課題実施における大きな収穫であった。

最後に、本報告書では、内容の詳細は報告できなかったが、本研究課題の期間中には、耳鳴りの発生機序に関する生理学実験を中心とする研究も行った。その結果から、聴覚皮質におけ

る神経回路網に依存して、耳鳴り関連活動が生じることを示唆する結果を得ている⁽²⁾。この現象は、聴覚皮質の可塑性とも深く関連しており⁽³⁾、更なる今後の研究が必要であると考えられる。今回の結果を基に、聴覚補償器の開発⁽⁴⁾と共に耳鳴り発生の機序の解明とその抑制法の研究を今後も継続して行っていく予定である。

[成果の発表・論文等]

- (1) M. Noto, J. Nishikawa, and T. Tateno, An analysis of nonlinear dynamics underlying neural activity related to auditory induction in the rat auditory cortex, *Neuroscience*, Vol. 318, No. 24 March 2016, pp 58-83 (2016).
- (2) A. Sano and T. Tateno, Sodium salicylate and muscimol differently regulate inhibitory synapses in the senescence-accelerated mouse auditory cortex, *Oral Sessions: Auditory System* (No. 20-10-2-3), 2015/07/29, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuroscience2015), July 28-31, 2015, Kobe, Japan.
- (3) T. Tateno and A. Sano, Spatial distribution patterns of short term potentiation induced by microelectrode stimulation in the mouse auditory cortex in vitro, Program#/Poster#: 596.09/J22, October 20, 2015; Abstracts of the 45st Annual Meeting of Society of Neuroscience, Chicago, IL, USA, October. 17-21, 2015.
- (4) 岩城遼, 村上修一, 佐藤和郎, 館野高, 齧歯類動物の聴覚中枢神経刺激に向けた周波数選択的音響センサの開発とその特性評価, *電子情報通信学会, ニューロコンピューティング研究会, 信学技報*, vol. 115, no. 514, NC2015-100, pp. 179-184, 2016年3月23日