

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K12059

研究課題名(和文) 超多チャンネル刺激デバイスによる脳皮質内電流場刺激法の開発に向けた定量的実験解析

研究課題名(英文) Quantitative experimental analysis for the development of intracortical current field stimulation using a high-count multi-channel stimulator

研究代表者

林田 祐樹 (Hayashida, Yuki)

三重大学・工学研究科・教授

研究者番号：10381005

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)：難治性の神経機能障害に対する神経補綴の確立には、脳などの対象組織内の時空間的な神経活動を精密に駆動/制御する手法・技術が求められている。本研究では、1)先行開発の多チャンネル神経刺激モジュールを制御するハードウェアシステムと、このシステムによって生成される時空間パターン刺激の設計を行うためのGUIソフトウェアを開発した。2)脳切片試料を用いたミリ秒分解能の高速膜電位イメージング実験により、脳皮質内の単一微小電極刺激に誘発される時空間的な神経活動の特性とその生理学的メカニズムについて、さらに、複数微小電極からの刺激に対する神経応答の時空間的な独立性と非線形加法性について新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した神経組織内刺激システムは、先行開発した刺激デバイスの追加接続によって最大4096チャンネルの微小電極を介して、高精度の時空間パターン電流刺激を生成可能とし、特にチャンネル数変更の高い自由度、刺激パターンの一括設計・管理、刺激による神経駆動実証済み等の点において他に類が無く、次世代型神経補綴の実現に向けた臨床前研究において極めて有用なツールとなる。また本研究で見出した刺激印加後の数～数十ミリ秒以内に生じる刺激誘発性神経活動に関する新知見は、それが高時間分解能のイメージングデータから得られたことより、その確証性は非常に高く、また組織内での微小電極配置の定量設計等に不可欠となる。

研究成果の概要(英文)：In order to establish neural prostheses for patients suffering from intractable neural dysfunctions, methods and techniques for precisely driving/controlling the spatiotemporal neural activity in the target neural tissue such as the cerebral cortex are required. In the present study, 1) we developed a hardware system that controls our previously developed multi-channel neural stimulator, and also a GUI software that supports the designing of the spatiotemporal patterns of stimuli generated by this system, 2) through the experiments with the voltage-sensitive dye fast imaging at millisecond temporal resolution in the cerebral tissue slices, we obtained new findings on spatiotemporal properties and physiological mechanisms of the neural activity induced by stimulation with the intra-cortical single microelectrode, and also on independence and nonlinear additivity of the neural responses to stimulation with multiple microelectrodes.

研究分野：医用生体工学

キーワード：医用生体工学 神経工学 神経補綴 人工視覚 脳皮質内刺激 神経インタフェース 電子デバイスシステム 神経生理学実験

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの脳皮質に対して電気刺激を与えると、その刺激位置に応じた運動や感覚が誘発される。これを神経機能障害に対する補綴医療に利用する試みは 1960 年代には始まっている。その後、電子回路集積化の技術発展に伴う体内埋植型電子デバイスの開発と、生体神経系に対する科学的知見の蓄積とが進むにつれて、神経補綴は世界中の医工学分野で注目されるようになった。

これまで、人工内耳や脳深部刺激を代表とする神経補綴医療が一定の成功を収め、近年もそれらの改良等が進められている。将来、同様の方法論を、他の多様な神経系の機能不全を補償する一つの選択肢として確立させるには、より高度な神経活動の制御技術が求められる。しかし、そもそも脳皮質などの神経組織に与える電気刺激がどのような神経活動応答を誘発するのか、両者の間の定量的な関係に関する知見は未だ非常に乏しく、特に複数チャンネル刺激については殆ど明らかにされていないのが現状である。

こうした現状の背景には、刺激生成と神経応答計測の双方の難しさがある。前者については、刺激用の電極と組織との境界面および刺激通電経路となる神経組織の両方が電気化学的な非線形特性を示すため、刺激生成に用いる電子デバイスは、その実使用条件下でも、高い精度での動作が保証されなければならない。また後者については、複数の刺激電極から、かつ時間的に繰返して刺激通電が行われる場合でも、刺激通電時のいわゆる電氣的アーティファクトの影響を受けず、時空間的に連続して神経細胞群の電氣的活動応答を捉える必要がある。すなわち、それらの要求を満たしたうえで上述の定量的関係を明らかにし、その科学的根拠に基づいて刺激条件の最適設計を行うことが、次世代の神経補綴技術の発展に求められる。

これまで我々は先行研究において、最大 4096 チャンネルまでの刺激出力に対応が可能なモジュール型の神経刺激用電子デバイスを独自に開発し、これが、実験動物の脳皮質内への微小電流刺激においても、極めて高い精度で動作可能なことを生理学実験によって実証した。また、そうした生理学実験には膜電位感受性色素(以下“VSD”)を用いた神経活動の光学的メーキング法を取り入れ、大脳視覚皮質の刺激誘発性神経応答に関して、定量的計測データに基づく幾つかの新たな科学的知見を報告してきた。我々はこれらの優位性を活かして、過去に前例のない、脳内神経細胞活動の 3 次元空間的制御を実現する手法・技術の開発を目指している。

## 2. 研究の目的

当初の研究目的は、実験動物の脳視覚皮質内に配置した多チャンネルの刺激電極から種々の電流場刺激を与え、これに対する時空間的な神経活動応答を、VSD イメージングによって計測し、両者の関係性を定量的に明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) 電流場刺激を高い自由度で設計・生成可能にするため、その刺激の設計および先行開発した神経刺激用電子デバイスの制御を効率的に行うための統合システムを開発する。

(2) 多チャンネル電流場刺激と、これに誘発される時空間的な神経活動応答との間の定量的関係を明らかにするうえで、必要不可欠となる基礎データとして、刺激と応答の間の入出力特性に関する次の 3 項目を、実験動物を用いた生理学実験を通じて計測・解析する：

時空間インパルス応答特性、時空間インパルス応答の空間的干渉特性、時空間インパルス応答の時間的干渉特性

## 4. 研究成果

### (1) 電流場刺激生成用統合システムの開発

開発した統合システムのブロックダイアグラムを図 1 に示す。先行開発の神経刺激用電子デバイス(図中右端)は、1 つで 64 の刺激出力チャンネルを有す。同じデバイスを、個別識別番号を変えて最大で計 64 個接続可能であるため、最大で 4096 チャンネルの刺激電極を用いた電流場刺激生成に対応する。本システムでは、Graphical User Interface (GUI) ソフトウェア(図中左上)を用いて、ユーザーが刺激の空間パターンおよび時間パターンの設計を行うと、それらに対応したハードウェア記述言語コードが自動生成される。その後、このコードに基づいて Field-Programmable Gate Array (FPGA; 図中左下) 内部に実装される論理回路モジュール群は、刺激デバイスの動作に必要な、レジストリ用デジタルデータおよび制御用デジタル信号を生成する。それらデジタル信号は、インターフェイス回路ボード(図中中央)を介して並列データバス(13-bit バス幅)で刺激デバイス群へ送られる。

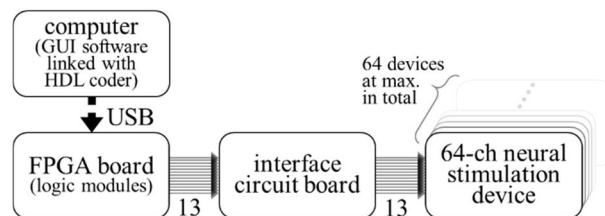


図 1: 開発した統合システムのブロックダイアグラム

## (2)- 時空間的インパルス応答特性

VSD 染色を施したマウス大脳切片試料において、その1次視覚皮質第 層又は第 / 層内部に刺入した先端開口径 5-6  $\mu\text{m}$  のガラス微小電極より、単発の電荷平衡双極性電流パルス(時間幅 0.2 ms/phase)を刺激として与え、これに対する神経活動応答の VSD 信号画像を取得頻度 2000 frame/s で計測した。ここでの刺激は、神経活動の誘発が可能という必要条件のもとでの時空間的なインパルス刺激と見なすことが出来る。解析は先ず、刺激に直接的に誘発される、いわゆる集合活動電位応答の成分を薬理的に分離抽出して行った(図 2B)。その結果、その空間分布はガウス関数で近似可能であり(図 2C)、またその有効範囲(図 2C 中 ' $2\sigma$ ')は刺激電流振幅の平方根に比例する事が示された。前者は、集合活動電位応答の連続的な空間分布をミリ秒分解能で捉え、その近似関数を示した世界初の結果である。後者については、過去の間接的実験から推定された結果を、イメージングによって直接的に証明したものである。続く解析は、集合活動電位応答により二次的に賦活される集合シナプス後電位応答の成分について行った。その結果、第 / 層内の正帰還的な相互興奮回路によって刺激後数ミリ秒で伝播し始める興奮性活動は、これに遅延して賦活される大域的な抑制性回路によって、刺激後数十ミリ秒で、刺激点から数百  $\mu\text{m}$  以内の範囲に限局されることが示された。この結果は、脳皮質内刺激による視覚補綴のヒト臨床試験で報告された、光覚認知の空間分解能に関する結果に対して、生理学的な説明根拠を与えるものとなった。

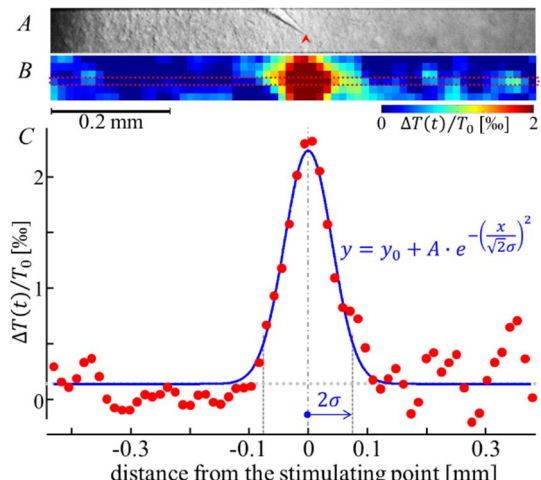


図 2: 時空間インパルス応答の空間分布特性の一例。A-B) 脳切片試料内観測領域の近赤外光透過像 A と刺激後 1.0-1.5 ms の VSD 信号疑似カラー画像 B。A 内の矢頭は刺激電極先端。C) 画像 B の中央ピクセル列(赤破線枠)についての VSD 信号ラインプロファイル。赤丸: データポイント、青線: ガウス関数近似曲線。

## (2)- 時空間インパルス応答の空間的干渉特性

マウス大脳切片試料の 1 次視覚皮質第 層内に刺入した 2 本のガラス微小電極から、2 本各々単独または 2 本同時に電流パルス刺激を与え(前者を“単独刺激条件”、後者を“同時刺激条件”と呼ぶ)、これらに対する神経活動応答の VSD イメージング計測を行った。同一試料で電極先端間の距離を 0.1-0.3 mm の範囲で変えた場合(図 3A-C)、同時刺激条件で誘発される集合活動電位応答の空間分布は(図 3D)、いずれの場合も単独刺激条件の空間分布を近似する 2 つのガウス関数の線形和によって説明可能であった(図 3E、刺激後 2.0 ms 以内を参照)。一方、集合シナプス後電位応答については、同時刺激条件での応答空間分布は、単独刺激条件での応答空間分布の線形和とは一致しないことが示された(図 3E、刺激後 2.5 ms 以降を参照)。但し、電極間距離を約 1 mm とした実験では、線形加法性が確認された。以上のような複数チャンネル電極刺激に対する神経活動応答ダイナミクスをミリ秒分解能で捉えた実験研究は前例が無く、本研究が先駆けとなった。またその結果は、皮質内の多チャンネル電極配置に対して定量的設計指針を与えるものと考えられた。今後、2 電極で時間差をもって刺激を与えた場合の干渉特性についても実験解析が必要である。

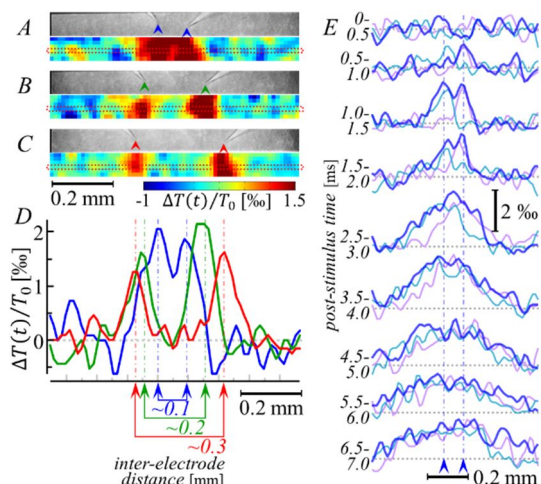


図 3: 時空間インパルス応答の空間的干渉特性の一例。A-C) 観測領域の近赤外光透過像(各上段)と刺激後 1.0-1.5 ms の VSD 信号疑似カラー画像(各下段)。各 A-C 上段内の矢頭は刺激電極先端。電極間距離およそ 100 (A)、300 (B)、 $\mu\text{m}$  (C)。D) 各 A-C 下段画像の中央ピクセル列(赤破線枠)についての VSD 信号ラインプロファイル。E) 電極間距離約 100  $\mu\text{m}$  の時の VSD 信号ラインプロファイルの時系列変化(左端: 刺激後の画像フレーム取得時刻)。水色線および紫線は片方の電極のみからの刺激印加、青線は両方の電極からの同時刺激印加の場合。

## (2)- 時空間インパルス応答の時間的干渉特性

上記(2)- と同じ実験条件で、繰返し周波数 50-200 Hz で与えた刺激電流パルス列に対する神経活動応答の VSD イメージング計測データについて詳細な解析を行った。集合活動電位応答と 2 種の興奮性回路を介した集団シナプス後応答の各々で、即時のおよび蓄積的な成分が存在し、刺激の持続時間が数百ミリ秒以上の場合では、それら両成分の時間経過が、2 種の興奮性回路で異なることが示唆された。これは視覚補綴のヒト臨床試験で報告された、持続的な電流パルス列刺激で見られた光覚認知の減衰効果を説明すると考えられた。今後、ここで用いた刺激と上記(2)- の複数チャンネル刺激とを組み合わせた場合についても実験解析が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryosuke Okada, Shinnosuke Ishikawa, Tetsufumi Tasaki, Tetsuya Yagi, Yuki Hayashida	4. 巻 -
2. 論文標題 A bench-test system of the visual prostheses utilizing retino-morphic spikes as the driver signals of intracortical microstimulation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PROCEEDINGS OF THE 2022 INTERNATIONAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL LIFE AND ROBOTICS	6. 最初と最後の頁 524-528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Takanori Yotsumoto, Yuki Hayashida, Shinsuke Yasukawa	4. 巻 -
2. 論文標題 A Robotic vision system emulating fixational eye movements and retinal sampling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PROCEEDINGS OF THE 2022 INTERNATIONAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL LIFE AND ROBOTICS	6. 最初と最後の頁 519-523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Alejandro Barriga-Rivera, Tianruo Guo, Yuki Hayashida, Gregg J. Suaning	4. 巻 14
2. 論文標題 Editorial: A Conversation With the Brain: Can We Speak Its Language?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -(article794)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2020.00794	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 S. Hayashi, K. Yoshida, T. Nomoto, Y. Tanaka, T. Yagi, Y. Hayashida	4. 巻 -
2. 論文標題 Millisecond Imaging of Neural Responses to Micro-stimuli in the Visual Cortex Layer II/III In Vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 2020 IEEE 2nd Global Conference on Life Sciences and Technologies (LifeTech 2020)	6. 最初と最後の頁 391-392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/LifeTech48969.2020.1570619123	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 -

1. 著者名 Y. Tanaka, T. Nomoto, T. Shiki, Y. Sakata, Y. Shimada, Y. Hayashida and T. Yagi	4. 巻 16(3)
2. 論文標題 Focal activation of neuronal circuits induced by microstimulation in the visual cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neural Engineering	6. 最初と最後の頁 -(036007,17pp.)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1741-2552/ab0b80	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 -

1. 著者名 R. Ota, S. Suga and Y. Hayashida	4. 巻 -
2. 論文標題 Neural Excitations by the Current Injected Through the Carbon Nanotube Surface of an Intracortical Electrode in Vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of 2018 IEEE Life Sciences Conference	6. 最初と最後の頁 215-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/LSC.2018.8572216	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12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 福田燦太, 野本知宏, 吉田 航, 林田祐樹, 八木哲也
2. 発表標題 大脳皮質への連続パルス微小刺激に対する蓄積的興奮応答のメカニズムに関する解析.
3. 学会等名 2021年度 ME とバイオサネティックス研究会 (信学技報, vol. 121, no. 222, MBE2021-21, pp. 20-25)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Santa Fukuda, Tomohiro Nomoto, Kou Yoshida, Yuki Hayashida, Tetsuya Yagi
2. 発表標題 Accumulation of non-synaptic and synaptic excitations induced by microstimulation pulses in the mouse visual cortex layer II/III
3. 学会等名 2021 43rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (Proceedings, p.5164) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橘 和佳・井本篤貴・森定慶祐・石川直裕・Celine Vergne・Tamas David Fehervari・林田祐樹・八木哲也
2. 発表標題 In-vivoマウスを用いた頻回電気刺激に対する視覚野応答の解析
3. 学会等名 2020年度 ME とバイオサネティックス研究会（信学技報, vol. 120, no. 301, MBE2020-22, pp. 12-17）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 祥太郎, 林田祐樹, 野本知宏, 八木哲也
2. 発表標題 マウス大脳皮質スライスにおける多チャンネル刺激に対する神経応答の膜電位イメージング解析
3. 学会等名 2019年度 ME とバイオサネティックス研究会（信学技報, vol. 119, no. 327, MBE2019-66, pp. 119-124）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Hayashida, Y. Umehira, N. Satoshiro, K. Takayama, S. Ishikawa, T. Yagi
2. 発表標題 Animal Experiment Platform with Wireless Multi-Channel Microstimulation System Usable for Cortical Vision Prosthesis
3. 学会等名 The 15th Asia-Pacific Conference on Vision (I-PERCEPTION, vol.10. pp.84-85) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 C. A. Vergne, L. de L. Oliviera, T. D. Fehervari, K. Morisada, N. Suematsu, Y. Hayashida, T. Yagi
2. 発表標題 Quantitative Analyses of Cortical Responses to Prosthetic Microstimulations Using Voltage-Sensitive Dye Imaging on Mice
3. 学会等名 The 15th Asia-Pacific Conference on Vision (I-PERCEPTION, vol.10. pp.118) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Hayashida, R. Ota, and S. Suga
2. 発表標題 A possibility of intracortical neural prostheses with carbon-nanotube-based electrodes
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Hayashida
2. 発表標題 Voltage-Sensitive Dye Neural Imaging for Testing and Designing Stimuli in Visual Prostheses
3. 学会等名 40th International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林田 祐樹, 梅比良 裕一, 里城 直希, 高山 浩輔, 石川 慎之祐, 八木 哲也
2. 発表標題 皮膚型視覚補綴に向けた無線式多チャンネル刺激システムと無拘束動物実験プラットフォーム
3. 学会等名 第58回 日本生体医工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 里城 直希, 清水 理優, 崔 軫煥, 八木 哲也, 林田 祐樹
2. 発表標題 in-vitro細胞組織の制御・育成のための多チャンネル刺激・計測システムの開発
3. 学会等名 第58回 日本生体医工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水 理優, 里城 直希, 崔 軫煥, 八木 哲也, 林田 祐樹
2. 発表標題 細胞組織活動の閉ループ制御に向けた多チャンネル刺激計測システム
3. 学会等名 2018年度 ME とバイオサネティクス研究会 (信学技報, vol. 118, no. 366, MBE2018-54, pp. 21-24)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林田 祐樹
2. 発表標題 脳神経微小電気刺激のためのCNTバンドル電極について
3. 学会等名 電気学会C部門 光・量子デバイス技術委員会 「量子ビームによるナノ構造形成とその医療・バイオ応用技術調査専門委員会」 第5回講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018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	田中 雄太  (Tanaka Yuta)	大阪大学・大学院工学研究科電気電子情報工学専攻・博士前期課程大学院生  (14401)	
研究協力者	野本 知宏  (Nomoto Tomohiro)	大阪大学・大学院工学研究科電気電子情報工学専攻・博士前期課程大学院生  (14401)	
研究協力者	林 祥太郎  (Hayashi Shotaro)	大阪大学・大学院工学研究科電気電子情報工学専攻・博士前期課程大学院生  (14401)	



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
研究協力者	清水 理優  (Shimizu Toshihiro)	大阪大学・大学院工学研究科電気電子情報工学専攻・博士前期課程大学院生  (14401)	
研究協力者	里城 直希  (Satoshiro Naoki)	大阪大学・大学院工学研究科電気電子情報工学専攻・博士前期課程大学院生  (14401)	
研究協力者	吉田 航  (Yoshida Kou)	大阪大学・大学院工学研究科電気電子情報工学専攻・博士前期課程大学院生  (14401)	
研究協力者	福田 燦太  (Fukuda Santa)	三重大学・大学院工学研究科情報工学専攻・博士前期課程大学院生  (14101)	
連携研究者	末松 尚史  (Suematsu Naofumi)  (30779517)	大阪大学・大学院工学研究科電気電子情報工学専攻・助教  (14401)	
連携研究者	八木 哲也  (Yagi Tetsuya)  (50183976)	大阪大学・大学院工学研究科電気電子情報工学専攻・教授  (14401)	

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