平成２４年度厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究推進事業
（身体・知的等障害分野）

報　告　書

厚生労働省

実施機関：日本障害者リハビリテーション協会

目　　次

＊日本人研究者派遣事業

「外肛門括約筋の機能維持に関連する病理学的背景の解明」

武田 貴裕(公益財団法人 東京都医学総合研究所)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5

＊若手研究者育成活用事業

「日常的コミュニケーション用途を主眼とした BMI 機器開発に向けた研究」

高野 弘二(国立障害者リハビリテーションセンター研究所)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14

日本人研究者派遣事業

外肛門括約筋の機能維持に関連する病理学的背景の解明

武田 貴裕
公益財団法人 東京都医学総合研究所

A. 研究目的

随意筋の萎縮と脱力が進行し、コミュニケーション手段が次第に制限される筋萎縮性側索硬化症（ALS）の進行期にも外肛門括約筋とそれを支配する Onuf 核（ON:Onuf's nuclei）が残存することに注目し[1]、それを通したコミュニケーション手法を確立することを本研究は目指している。この手法の確立と並行し、ON の神経細胞の変化が ALS で障害される他の下位運動ニューロンとどのように異なるかの比較を通して、ALS の細胞病理を特徴付け、その機能維持に関連する要素を見いだすことをめざす。同一個体の中にみられる変性部位と非変性部位の比較を通して見いだされた違いを診断や治療法の開発に反映させることを目指す。

B. 研究方法

ALS11 例（早期例 6 例（発症 1 年未満)、進行期例 5 例（発症から 5 年以上経過））および正常対照 5 例（表 1）の仙髄を含むホルマリン固定パラフィン標本を autoclave 処理し、抗リン酸化 TDP43 抗体(mouse monoclonal 1: 500/Alexa 488), 抗 TDP43 抗体(rabbit polyclonal 1:500/ Alexa 546), 抗 p62 抗体(hamster polyclonal, 1:500, Alexa647)で蛍光三重染色し DAPI(1:1000)で核染色した。なお背景のリポフスチンの自家蛍光を減弱させるために一次抗体に incubate 後、Sudan black B 1%に 10 分間処理した、蛍光色素-二次抗体と反応させた[2]。この四重蛍光染色標本全体を fluorescent scanning microscope (Pannoramic scan、3D-Histech、Hungary)を用いて高解像度(0.2325 micron/pixel)でデジタル画像化したのち、同標本を KB 染色した。KB 染色標本を light-fields scanning microscopy にてデジタル画像化した。観察用ソフトウェアにてモニター上でデジタル画像化された標本観察を行った (Pannoramic viewer, 3D-Histech, Hungary)。

							DL neurons								OAH neurons								ON neurons							
	No	Age (year)	Gender	Duration of illness in ALS (month)	side		mean perimeter (μm)	mean area (μm²)	mean CI	number of neurons	% of decreased neurons	with granular/ dot-like deposits	with skein/ rounded inclusion	% of neurons with inclusions	mean perimeter (μm)	mean area (μm²)	mean CI	number of neurons	% of decreased neurons	with granular/ dot-like deposits	with skein/ rounded inclusion	% of neurons with inclusions	mean perimeter (μm)	mean area (μm²)	mean CI	number of neurons	% of decreased neurons	with granular/ dot-like deposits	with skein/ rounded inclusion	% of neurons with inclusions
Control	1	76	M		Lt		168.7	1427.2	1.348	31					68.5	232.7	1.381	273					118.0	693.2	1.319	11				
					Rt		191.3	1685.6	1.362	33					82.4	323.7	1.405	278					95.5	378.5	1.466	9				
	2	73	F		Lt		190.9	1822.0	1.393	35					83.3	327.9	1.401	246					84.8	471.1	1.221	9				
					Rt		205.4	2038.1	1.334	33					77.3	309.4	1.369	225					76.3	509.2	1.129	8				
	3	69	M		Lt		189.9	1380.4	1.502	32					71.6	232.9	1.395	216					84.8	381.3	1.280	9				
					Rt		161.4	1169.7	1.373	22					61.7	176.3	1.391	267					75.1	251.7	1.373	7				
	4	66	M		Lt		185.8	1463.1	1.476	35					91.7	336.7	1.553	213					97.3	456.8	1.368	12				
					Rt		176.2	1096.0	1.502	23					86.9	283.8	1.564	205					128.1	599.5	1.539	19				
	5	73	M		Lt		135.1	987.2	1.271	20					73.8	261.9	1.347	231					94.9	526.5	1.236	13				
					Rt		125.8	699.6	1.393	9					66.4	213.3	1.342	251					106.5	595.1	1.295	11				
	mean	71.4					173.1	1376.9	1.395	27.3	-				76.4	270.9	1.415	240.5	-				96.1	486.3	1.323	10.8	-			
	SD	3.9					25.8	404.6	0.076	8.5					9.6	55.4	0.079	26.4					17.3	128.4	0.120	3.4				
Early ALS	1	51	M	10	Lt		43.0	138.6	1.164	19		0	0	0	65.0	263.9	1.202	44		1	4	11.6	76.6	379.0	1.150	7		1	0	14.3
					Rt		81.1	480.9	1.094	14		0	0	0	76.8	350.9	1.232	33		2	1	9.1	85.9	388.6	1.150	7		1	3	57.1
	2	73	M	10	Lt		131.6	1049.9	1.201	28		1	6	25.0	108.2	669.7	1.253	59		2	4	10.3	126.7	670.4	1.379	8		0	1	12.5
					Rt		178.9	1361.2	1.385	23		8	3	47.8	111.0	644.1	1.341	45		3	2	10.9	85.4	487.3	1.147	11		3	0	27.3
	3	69	F	10	Lt		93.6	482.4	1.268	16		1	1	12.5	73.2	199.3	1.507	39		1	0	2.1	59.9	221.3	1.231	2		0	0	0
					Rt		136.5	997.8	1.240	13		4	0	30.8	67.4	207.5	1.368	67		2	1	4.7	107.9	743.1	1.125	4		1	0	25.0
	4	61	M	9	Lt		125.0	696.1	1.435	24		0	1	4.2	76.3	310.6	1.305	100		0	0	0	100.6	605.6	1.207	12		3	0	25.0
					Rt		130.6	858.6	1.273	18		7	2	50.0	80.6	385.7	1.231	123		2	0	1.6	97.0	668.2	1.161	1		0	1	100
	5	80	M	7	Lt		120.1	838.4	1.315	19		1	0	5.3	72.2	286.2	1.369	45		0	0	0	140.5	1264.3	1.210	11		1	0	9.1
					Rt		158.2	1252.8	1.291	18		1	0	5.6	88.3	454.9	1.375	67		0	0	0	92.7	531.3	1.154	6		0	0	0
	6	52	M	11	Lt		89.2	426.4	1.279	25		0	3	12.0	61.3	227.3	1.228	56		2	0	3.6	88.2	481.7	1.162	5		0	0	0
					Rt		82.1	466.3	1.215	28		2	4	21.4	73.6	307.2	1.342	77		0	0	0	85.2	458.3	1.202	14		1	3	28.6
	mean	64.3		9.5			114.2	754.1	1.263	20.4	-25.3			17.9	79.5	358.9	1.313	62.9	-73.8			4.5	95.6	574.9	1.190	7.3	-32.1			24.9
	SD	11.7		1.4			37.6	369.7	0.092	5.1				17.5	15.7	157.5	0.088	26.5				4.7	21.7	261.5	0.068	4.1				28.7
Advanced ALS	1	59	F	60	Lt		73.9	492.9	1.091	5		1	0	20.0	63.7	223.9	1.263	23		4	0	17.4	129.2	1024.1	1.311	8		0	0	0
					Rt		45.6	141.6	1.081	1		0	0	0	67.6	253.5	1.307	24		1	1	8.3	109.6	647.0	1.242	4		0	0	0
	2	64	F	60	Lt		80.8	393.3	1.187	3		0	0	0	74.9	269.1	1.391	70		1	1	2.9	90.3	469.9	1.210	5		2	0	40.0
					Rt		124.9	551.6	1.610	7		3	0	42.9	83.5	325.8	1.439	78		0	0	0	123.2	755.8	1.296	6		1	0	16.7
	3	47	M	60	Lt		65.4	308.4	1.163	7		1	0	14.3	71.9	245.7	1.364	88		0	1	1.1	51.9	137.1	1.283	3		0	0	0
					Rt		53.5	167.9	1.220	6		0	0	0	66.2	223.1	1.304	88		0	1	1.2	85.8	396.8	1.288	9		0	0	0
	4	58	F	148	Lt		107.1	702.2	1.350	8		0	0	0	78.5	279.0	1.418	63		0	0	0	93.5	537.7	1.176	4		1	0	25.0
					Rt		84.4	497.5	1.239	7		0	0	0	66.9	217.1	1.360	50		1	0	2.0	92.1	433.3	1.300	8		0	0	0
	5	54	M	60	Lt		54.3	226.0	1.168	8		0	2	25.0	66.3	222.6	1.311	101		0	0	0	80.7	542.5	1.229	7		0	0	0
					Rt		117.4	745.1	1.360	8		1	1	25.0	69.2	244.1	1.347	106		2	0	1.9	58.5	178.9	1.232	3		0	0	0
	mean	56.4		77.6			80.7	422.7	1.247	6.0	-78.0			12.7	70.9	250.4	1.350	69.1	-71.3			3.5	91.5	512.3	1.257	5.7	-47.2			8.2
	SD	6.3		39.4			27.8	212.3	0.158	2.4				14.5	6.3	33.8	0.055	30.6				5.2	24.9	261.2	0.045	2.2				14.3

表 1. 対照 5 例および ALS 早期 6 例、進行期 5 例の臨床病理形態学的所見

ON および前角細胞群 2 領域（背外側α運動神経群（DL：dorsolateral

alpha-motoneuron group）とその他の前角細胞群（OAH：other anterior horn area））の 3 領域について、それぞれの神経細胞形態変化（神経細胞周径、神経細胞面積、円指数)、細胞数、封入体病理を観察した（円指数（CI）は、(周径/2π）/（(面積/π）^（1/2））で算出される形の凹凸の程度を表したもので、正円では 1 となり、凹凸が大きくまた多い形のものほど大きくなる[3])。神経細胞の大きさの分類は、それぞれの神経細胞を面積によって 3 群に分類した（大型（面積≧1500μm^2)、中型（500≦面積＜1500μm^2)、小型（面積＜500μm^2))。

C. 研究結果

①ON および前角細胞群の同定：蛍光染色のみでは境界の同定が困難であった細胞群の同定が KB 染色を加えることにより容易になった（図 1)。また細胞一つ一つの周囲長や面積の測定が簡便になった（図 2)。

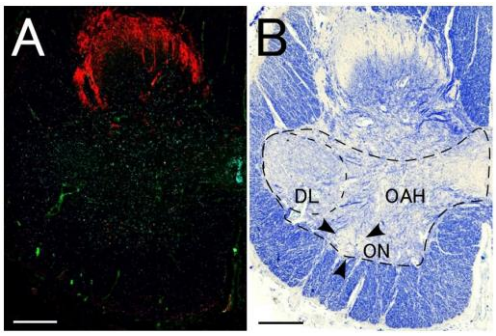


図 1. 第 2 仙髄（S2）レベルにおける免疫組織化学（A）および Klüver-Barrera(KB)染色像（B)。DL：dorsolateral alpha-motoneuron group（背外側α運動神経群)、OAH：other anterior horn area、ON：onuf's nuclei、Bars=500μm

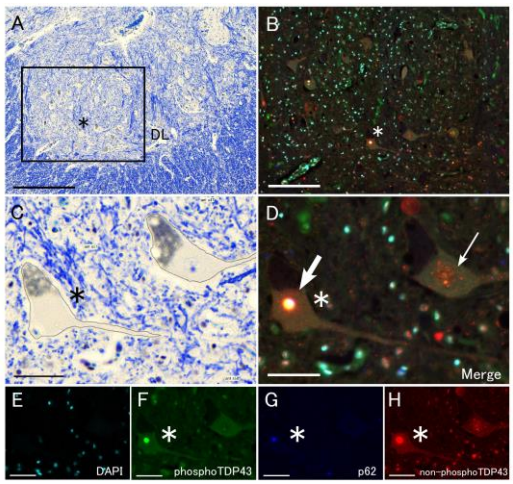


図 2. DL の免疫組織化学および KB 染色像。A は低倍率 KB 像（Bar=500μm)、B は A の四角で示した関心領域部の免疫組織化学像（Bar=200μm)。C および D は高倍率の KB、免疫組織化学 merge 像（Bars=50μm)。E（水色）：DAPI、F（緑）：リン酸化 TDP43、G（青）：p62、H（赤）：非リン酸化 TDP43（Bars=50μm)。＊はすべて同じ神経細胞を示す。円形封入体（太い矢印）（リン酸化・非リン酸化 TDP43 および p62 で陽性）および顆粒状/点状沈着（細い矢印）（非リン酸化 TDP43 のみ陽性）(D-H)。

②形態・細胞病理観察：KB 染色による形態観察、免疫組織化学蛍光像による細胞病理観察が、同じ細胞で施行可能となった（図 2)。

③Sudan-black の前処理：自家蛍光を有するリポフスチンの除去は、脊髄運動神経細胞内の細胞質内封入体の観察に有用であった。

④**ON の神経細胞病変**：ALS 進行期では細胞数が正常の約半数に減少、封入体も散見されたが、神経細胞周径の変化や面積縮小化はなかった（図 3-C、I、L)。ただし早期において有意な CI の低下がみられ、突起が早期から消失傾向を示すことが示唆された（図 3-O)。

⑤**前角の神経細胞病変**：DL では早期では神経細胞脱落はさほど強くはないものの進行期では 70%以上の脱落がみられた（図 3-A)。封入体が形成されない神経細胞ではその小型化（周径および面積の低下）が目立ち、突起も消失傾向を示した（図 3-G、J、M)。小型の運動神経細胞が多い OAH では早期から小型の神経細胞が顕著に減少し（図 3-B、E)、残存した神経細胞は大型のものが多かった（図 3-H、K）が、同様に突起の消失傾向がみられた（図 3-N)。

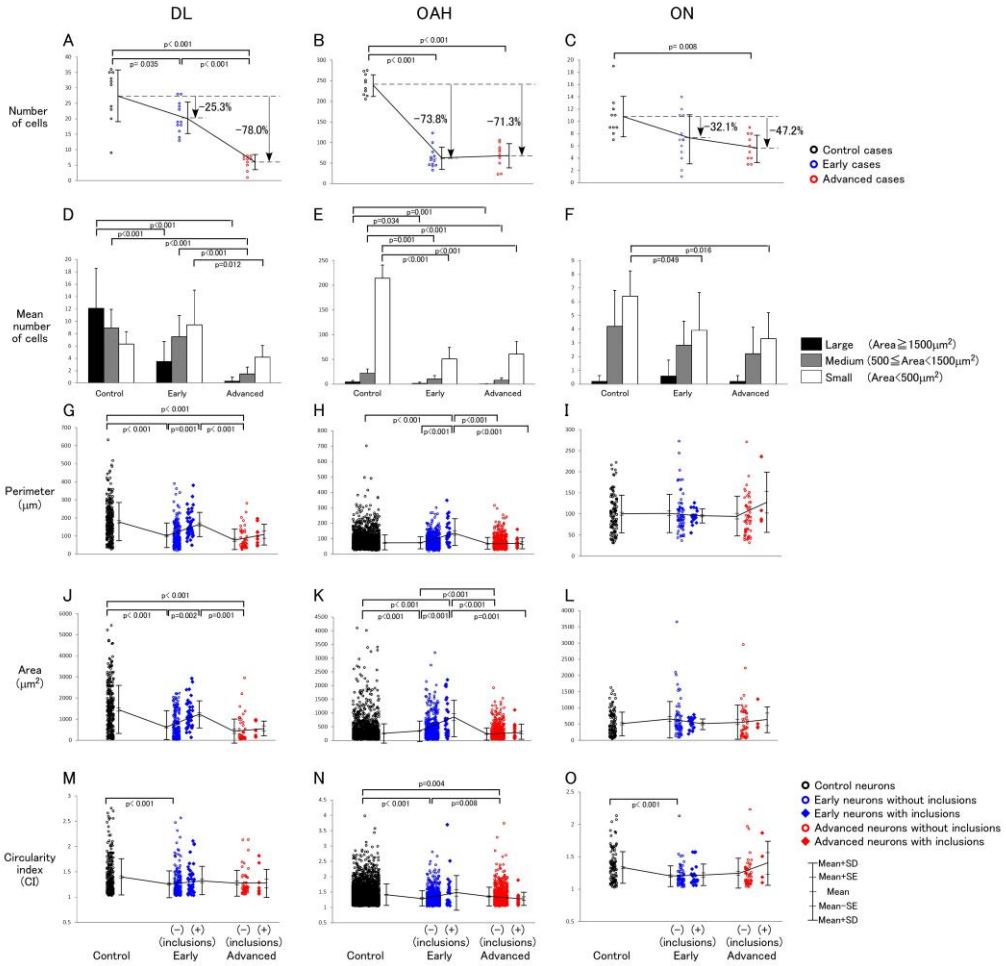


図 3. それぞれの領域における神経細胞数および神経単位ごとの周径、面積、CI のプロッティンググラフ。全領域で細胞数減少は DL や OAH で高度、ON で軽度から中等度に留まる。経時的な周径および面積の減少は DL で目立ち、OAH の早期では小型神経細胞の高度脱落を反映すると思われる残存神経細胞平均面積の有意な増大あり。ON では神経細胞の周径および面積の経時的有意変化なし。CI はすべての領域の早期おいてコントロールに比し有意に低下。封入体を有する神経細胞の周径、面積および CI は早期のすべての領域において有さない細胞より大きい。

⑥**封入体・細胞病理**：封入体について、非リン酸化 TDP43 が主体の顆粒状/点状沈着とリン酸化 TDP43 も陽性を示す糸くず様/円形封入体の 2 種に大別可能であった。糸くず様/円形封入体を有する神経細胞においては正常の核 TDP43 染色像はほぼ失われていたが、顆粒状/点状沈着を呈する細胞では核内にも顆粒状の TDP43 の沈着を残す例が多か

った（図 4)。封入体を有する神経細胞は、有さない細胞よりも特に初期において DL、OAH で周径、面積が大きく、またいずれの領域において CI が大きかった（図 3-G-O)。

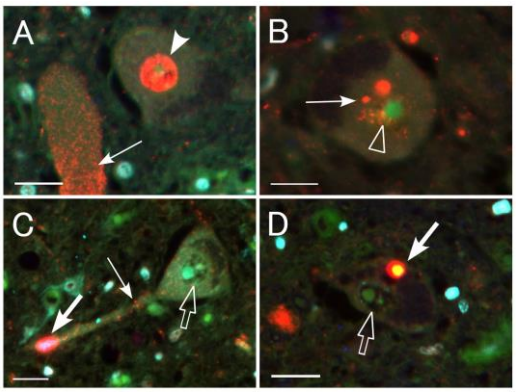


図 4.顆粒状/点状沈着および円形封入体像。び漫性の生理的核内 TDP43 沈着像(矢頭）（A)、細胞質内（細い矢印)・核内（空の矢頭）の顆粒状/点状沈着（A、B、C)、円形封入体（太い矢印）および TDP43 沈着が完全に消失した核（空の矢印)。Bars=20μm

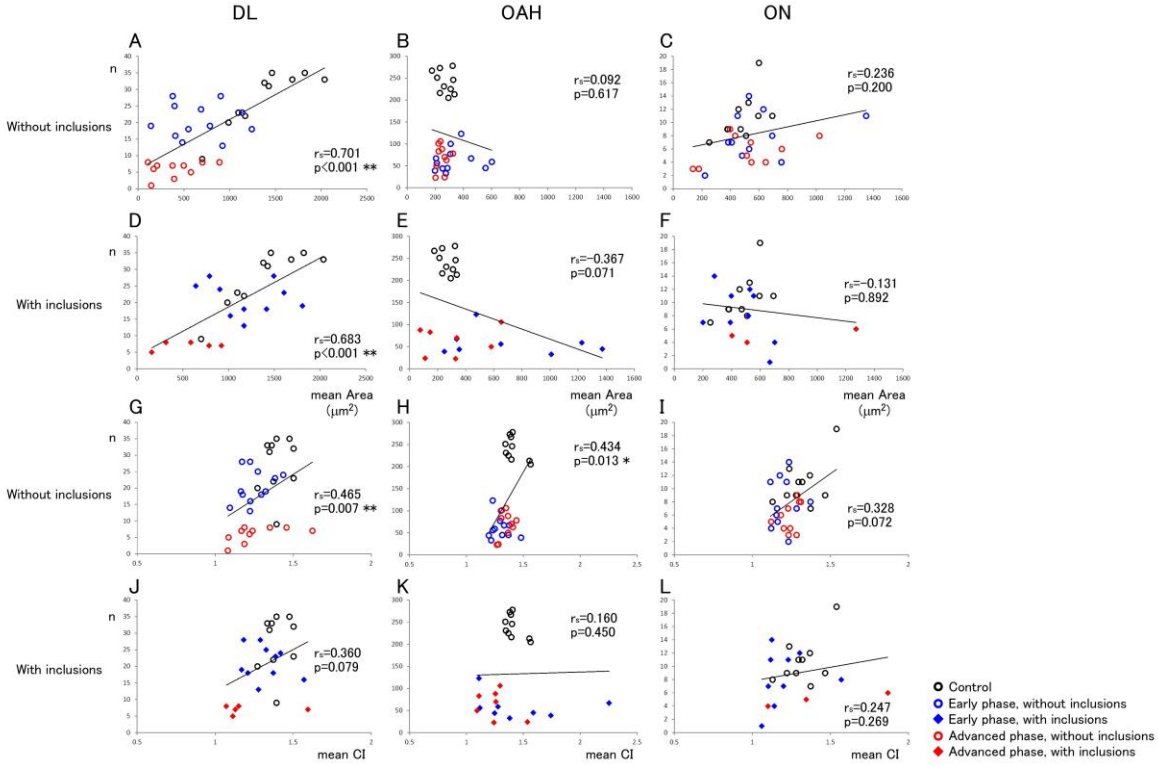


図 5. 残存神経細胞形態（面積および CI）と残存神経細胞数との比較。神経細胞面積と神経細胞数は DL において封入体の有無を問わずパラレルな相関あり（p<0.001)。CI と神経細胞数は DL（p=0.007）および OAH（p=0.013）で有意相関あり、ON では有意ではないものの相関傾向あり。

⑦**残存神経形態と残存神経細胞数との関係**：いずれの領域でも神経細胞脱落と神経細胞面積低下は並行して進行すると思われた当初の予想を覆し、この関係は DL では封入体の有無を問わずあてはまったものの（図 5-A、D)（p<0.001)、OAH と ON ではその関係は明らかでなく、OAH においては、神経細胞面積は早期でむしろ大きくなる例が（特に封入体のある群で）目立ち（図 5-E)、ON では封入体の有無を問わず神経細胞数と神経細胞面積の分布にばらつきが目立っていた（図 5-F)。一方で残存神経細胞数と CI

の関係は、DL（p=0.007）および OAH（p=0.013）で封入体を有さない神経細胞群においてその相関が明瞭で（図 5-G、H)、また ON においても有意差はなかったものの、関連する傾向がみられた（図 5-I)。しかし封入体のある群ではその分布が大きく異なり、いずれの領域においても神経細胞脱落が進む中、CI の低下がない例、あるいはコントロール群よりもむしろ CI の大きな例が存在し､それは特に OAH で目立っていた(図 5-K)。

D. 考察

①神経細胞群の同定および細胞観察法の向上：これまでの課題であった免疫組織化学組織標本における解剖学的構造物の同定や形態計測について、免疫組織化学の標本のデジタル保存後に KB 染色を加えることにより、これらの同定や形態測定が容易になった。また ALS では運動神経細胞に含まれる自家蛍光を有する豊富なリポフスチンに封入体が埋没する形で存在することが多く、封入体の観察においてリポフスチンの自家蛍光を減弱させることにより、封入体の観察が容易になった。これまでの ALS の定量的研究は一つのパラメータを解析したものが殆どだが、運動神経細胞一つ一つの形態と封入体病理を対比して部位や時期の違いを観察する我々の新しいアプローチで、ALS 神経細胞において経時的に進行する“変性”の形態学的特徴とそれにかかわる封入体病理の意義を明らかにすることがはじめて可能になった。

②神経細胞脱落は、OAH の小型神経細胞で早期から強く、ON では進行期でも中等度にとどまる：OAH では早期からより小型の神経細胞脱落が高度で（図 3-B、E)、DL では、早期から有意差があるものの脱落はそれほど強くなく、進行すると高度になった（図 3-A)。一方 ON では神経細胞脱落が進行期でも中等度にとどまる点、他の 2 領域と明らかに異なっていた（図 3-C)。この ON の神経細胞の脱落は、臨床的に針筋電図で脱神経所見が検出されうる程度ではあるものの[4]、症状が顕在化しうる 63～87%以上の脱落は観察されず、ALS において ON の神経脱落に伴う外肛門括約筋症状がでにくいことを裏付けると思われる[5]。

③ON の神経細胞周径および面積は経時的に変わらない:さらに ON では神経細胞の周径および面積に有意な変化はなく（図 3-I、J)、一方で DL では大型神経細胞の経時的減少（図 3-D）を反映する残存神経細胞の周径や面積の低下（図 3-G、J）が観察された。OAH においては早期では残存神経細胞の周径や面積はコントロールに比較して大きいものが多かったが（図 3-H、K)、これは同領域に存在する小型の神経細胞の顕著な脱落を反映する可能性、あるいは加齢や変性過程[6]においてみられることがある神経細胞の一過性大型化を反映する可能性がある。また OAH の早期で封入体を有する神経細胞は大型である傾向がみられたが(図 3-H､K)､封入体は VII 層の小型～中型の介在　神経細胞にはできにくく、大型の神経細胞にできやすいとされ[7]、OAH に含まれる　一部の大型の運動神経細胞にできた封入体をみている可能性がある。

④封入体は形態変化を軽減する：封入体はいずれの領域においても観察されたが、DL では面積、周径について封入体を有する神経細胞のほうが有しない細胞より大きく、コントロールにより近い形態を示した。また突起を反映する CI については、特に早期のいずれの領域において封入体を有する神経細胞では有しない細胞より CI がコントロールに近い傾向を示した（図 3-M、N、O)。TDP43 は突起の発達に関与するとの報告もあり[8]、TDP43 代謝異常により突起の消失が助長される可能性があるが、封入体の形成によりその形態変化が軽減される可能性が示唆された。

封入体が神経細胞の形態変化を軽減させる可能性について[9]、これまで我々が、二次元的解析でマシャドジョセフ病[3]や核内封入体病[10]において核内封入体の存在が核の変形を軽減する可能性があることや、また多系統萎縮症において GCI（glial cytoplasmic inclusions）が核体積の低下を軽減させうることを、より精度を上げた三次元解析で報告したように[11]､ALS においても封入体の存在により変性を受けつつある神経細胞の形態変化が軽減される可能性がある。今回の我々の検討は二次元的解

析であり、三次元構造を持つ神経細胞内で封入体が偏在した場合、封入体がないと判断される封入体偽陰性の神経細胞も観察されていた可能性がある。OAH 早期で封入体が無いとされた神経細胞でも正常より有意に大きいことを示したが、この面積の増大が封入体と無関係に起こったのか、二次元観察面に含まれなかった封入体が神経細胞内にあるのかは今後検討を要する。また突起の観察について、今回の検討では脊髄水平断の切片を用いており、突起が脊髄長軸方向へ発達している可能性のある領域では突起の評価が不十分である可能性もあり[12]、二次元的解析による形態計測、封入体との関連を議論するにはこれらの点に十分注意する必要がある。

⑤**突起の退縮が神経細胞脱落に関連する**：前述のようにいずれの領域でも早期において突起の消失する傾向にあることが示したが、突起の消失と神経細胞数減少は、DL（図 5-G）と OAH（図 5-H）の封入体のない群で相関が明らかであった。また ON でも有意差はないもののこれらは関連する傾向があり（図 5-I)、変性早期に見られやすい突起の消失が神経細胞脱落と強く関連する形態変化である可能性が示唆された。

神経細胞脱落と神経細胞面積の低下は、封入体の有無を問わず DL では並行して進行したが（図 5-A、D)、OAH や ON など小型の神経細胞を主体に構成される領域では、一定の関係が示されず（図 5-B、C、E、F)、ALS の変性神経細胞の脱落は、かならずしも神経細胞面積の低下を伴う現象ではない可能性が示唆された。これら DL、OAH、ON の 3 つの領域の形態、残存神経細胞数、封入体との関係について、DL では封入体の有無を問わず形態と残存神経細胞数とに相関する傾向があり（図 5-A、D、G、J)、OAH では封入体のある群で一部神経細胞面積や突起がコントロールに比して大きくなる例がみられ（図 5-B、 E、H、K)、そして ON では封入体の有無を問わずこれらの分布そのもののばらつきが強いことが特徴であった（図 5-C、F、I、L)。

いずれの領域の神経細胞においても出現が確認された TDP43 陽性封入体は、神経細胞どうしの形態対比を通して神経細胞の形態変化を軽減する可能性があることをすでに示したが（図 3-G-O)、神経細胞群としてみると、ON でみられるように封入体を有する神経細胞、有さない神経細胞の間での形態変化が乏しく、また形態変化と神経細胞脱落との関係が一定しない領域もあり、封入体のみが神経細胞の変性あるいはその進行（あるいはそれらの抑制）を規定するものではないと思われる。逆にこの封入体の有無にかかわらず形態変化およびその神経細胞脱落との関係が乏しかったことが ON の特徴といえるかもしれない。

D. 結論

TDP43 の異常凝集に関連する突起の退縮が、神経細胞脱落に関連する。封入体形成により神経形態変化は軽減される可能性があるが、ON では封入体の有無を問わず形態変化が軽かった点で他の領域と大きく異なっていた。

今回の我々の二次元的神経細胞形態評価は、多彩な立体構造を有する神経細胞の一断面のみをみているに過ぎず、特に観察対象神経細胞数が少なく、また神経細胞に極性がある領域では、データのばらつき、偏りが生じる可能性がある。観察対象の全体をみる三次元的形態による評価が今後の課題である。

F. 参考文献

1 Mannen T, Iwata M, Toyokura Y, Nagashima K. Preservation of a certain motoneurone group of the sacral cord in amyotrophic lateral sclerosis: its clinical significance. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1977 May; **40**: 464-9

2 Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem* 1999 Jun; **47**: 719-30

3 Uchihara T, Iwabuchi K, Funata N, Yagishita S. Attenuated nuclear shrinkage in neurons with nuclear aggregates--a morphometric study on pontine neurons of Machado-Joseph disease brains. *Exp Neurol* 2002 Nov; **178**: 124-8

4 Carvalho M, Schwartz MS, Swash M. Involvement of the external anal sphincter in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 1995 Aug; **18**: 848-53

5 Iwata M. Onuf-Mannen's nucleus. *Japan Medical Association Journal* 2011; **54**: 45-50

6 Iacono D, O'Brien R, Resnick SM, Zonderman AB, Pletnikova O, Rudow G, An Y, West MJ, Crain B, Troncoso JC. Neuronal hypertrophy in asymptomatic Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008 Jun; **67**: 578-89

7 Stephens B, Navarrete R, Guiloff RJ. Ubiquitin immunoreactivity in presumed spinal interneurones in motor neurone disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001 Oct; **27**: 352-61

8 Lu Y, Ferris J, Gao FB. Frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis-associated disease protein TDP-43 promotes dendritic branching. *Mol Brain* 2009; **2**: 30

9 Ross CA, Poirier MA. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005 Nov; **6**: 891-8

10 Uchihara T, Tanaka J, Funata N, Arai K, Hattori T. Influences of intranuclear inclusion on nuclear size - morphometric study on pontine neurons of neuronal intranuclear inclusion disease cases. *Acta Neuropathol* 2003 Feb; **105**: 103-8

11 Uyama N, Uchihara T, Mochizuki Y, Nakamura A, Takahashi R, Mizutani T. Selective nuclear shrinkage of oligodendrocytes lacking glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy: a 3-dimensional volumetric study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009 Oct; **68**: 1084-91

12 Roppolo JR, Nadelhaft I, de Groat WC. The organization of pudendal motoneurons and primary afferent projections in the spinal cord of the rhesus monkey revealed by horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 1985 Apr 22; **234**: 475-88

若手研究者育成活用事業

日常的コミュニケーション用途を主眼とした

BMI 機器開発に向けた研究

高野 弘二
国立障害者リハビリテーションセンター研究所

１．はじめに

病気や事故により、認知機能に障害が無いにも関わらず発話によるコミュニケーションに困難が生じた場合のコミュニケーションの方法として、書字、透明文字盤、口文字盤や意思伝達装置などを用いたコミュニケーションがある。これらは患者・障害者毎の残存機能に合わせて適切なものを用いることが必要となるが、完全に運動機能を失なった完全閉じこめ症候群(Complete Locked in State: CLIS)の患者・障害者とのコミュニケーションは困難である。そのような患者・障害者が使用可能な機器として脳機能を利用する脳-機械インターフェイス(Brain Machine Interface: BMI)を用いることが考えられる。

BMI は脳からの各種生体信号を用いてコンピューターや各種機器を操作する手法である(Birbaumer 2006, Birbaumer and Cohen 2007)。刺激提示の有無やどのような刺激を用いるか等により、細分化されるが、大きな枠組みとしては脳活動の計測のために手術を必要とする侵襲型と必要としない非侵襲型に分けることが可能である。

非侵襲型では、脳波(Electroencephalography: EEG)や機能的核磁気共鳴画像法(functional magnetic resonance imaging: fMRI)、脳磁図(Magnetoencephalography: MEG)、近赤外分光法(Near infrared spectroscopy: NIRS)などを用いる。中でも脳波は計測機器の小型化が進み、日常的な使用が可能な BMI 機器の開発が可能な段階に来ている。従来脳波は、脳からの信号が脳脊髄液、頭蓋、頭皮を経由することで拡散し、弱まることから、複雑な情報の抽出には適していないとされたが、近年の研究ではコンピューター上で 2 次元のカーソル操作を行うなどの操作が可能であること(Wolpaw and McFarland 2004)が示され、脳波を利用した BMI の可能性が示された。

得に提示刺激で誘引される脳波を利用する方法は非侵襲型の BMI では多く用いられており、最も有名なものの一つとして、P300 スペラーと呼ばれるものがある(Farwell and Donchin 1988)。これはランダムな順序で提示される刺激によって誘引される脳波を解析し、どの刺激に注意を向けていたかを推測する手法である。

ALS などの進行性の疾患では、残存機能の変化に伴って入力方法が変化し、使用するコミュニケーション機器の変更を余儀なくされる。従来の機器においては、入力方法が変化するのに伴って、機器の機能や使用者に提示されるインターフェイスが変化するため、使用法のみならず、その機器で何ができるか、その機能がどこにあるかなどを覚える必要があった。これが負担となり機器の乗り換えが消極的となることが考えられる。これらの問題に対し国立障害者リハビリテーションセンター研究所脳機能系障害研究部脳神経科学研究室では、筋電等スイッチ、視線、脳波に対応した環境制御装置の開発を行っている

(Komatsu et al., 2012)。このシステムでは同じパネルを用いながら、その中のアイコンの選択方法として複数の入力方法に対応している。一つは右から左、上から下などの決まった順で 1 秒から 2 秒程度毎にアイコンを強調する方法(スキャン方式)で、これは筋電等によるスイッチを用いて操作を行うことに適している。次はアイコンの強調を行わない方式で、これは視線入力に適している。最後はランダムな順序で 1 秒間に 6 から 7 回程度の早さでアイコンを強調する方法で、これは P300 様脳波を利用した BMI に適している。

アイコンの提示方法こそ異なるものの同じシステムであるため、同じパネルを用いた入力が可能であり、機器の移行時におけるパネルの覚え直しによる使用者への負担を低減することが可能となると考えられる。また病態の進行に伴って残存機能が変化するにあたって、次に必要となる入力方法の練習が容易となり円滑な機器の移行が可能となる。これにより、患者自身のみならず家族や介助者の負担が低減されるものと推測される。

また国立障害者リハビリテーションセンター研究所脳機能系障害研究部脳神経科学研究室では、これまで BMI を用いた環境制御システム(BMI based Environmental Control System: BMI-ECS)の開発を進めている(Komatsu et al., 2008; Takano et al., 2009; Kansaku, 2011)。これらについて実際に麻痺を持つ障害者が BMI-ECS を使用可能であることを確認した(Ikegami et al., 2011; 2012)。しかしながら、このシステムは研究を目的として設計されていたため、病院のスタッフや、家族、介助者などが使用することが困難であった。本研究ではこれらの問題についてより簡単に使用可能な実用的 BMI 機器の開発について、研究開発を行った(Takano et al., 2012)。

２．方法

将来的な機器の実用化のために、機器の安定性の向上や病態の変化によらず使用可能なインターフェイス、リモートでのサポート 環境や介助者が機器を容易に設置できるようにするための周辺機器の開発および改善およびそのためマニュアルの作成などを進めた。

周辺機器について図 1 に示す。まず簡単な操作を行うための外部キーパッドを作成した。ボタンの数は 7 個とし、キーにアイコンを供し一目で機能がわかるように考慮した。キーパッドの操作で機器の動作開始、脳波波形の確認や BMI のテンプレート作成等が可能である。また、このキーパッドには外部入力端子があり、この端子に外部入力機器を接続することでボタンや筋電スイッチを利用することが出来る。次に本機器を脳波で使用する際の脳波電極設置のために、簡易なインピーダンスチェッカーを用いた。インピーダンスチェッカーが無い場合、計測されている脳波を確認することで、電極の設置を確認する必要があったが、それには十分な熟練が必要であった。本機器はバー型の LED の色を見ることで十分な電極の設置が出来ているかが一目でわかるように作られている。脳波電極については昨年度同様、開発を進め、本年度も改良を進めている固形ゲル電極(Toyama et al.,2012)を用いた。この電極は設置および使用後の除去が容易かつ、長時間の使用が可能であり、日常的な BMI 機器の使用に適している。

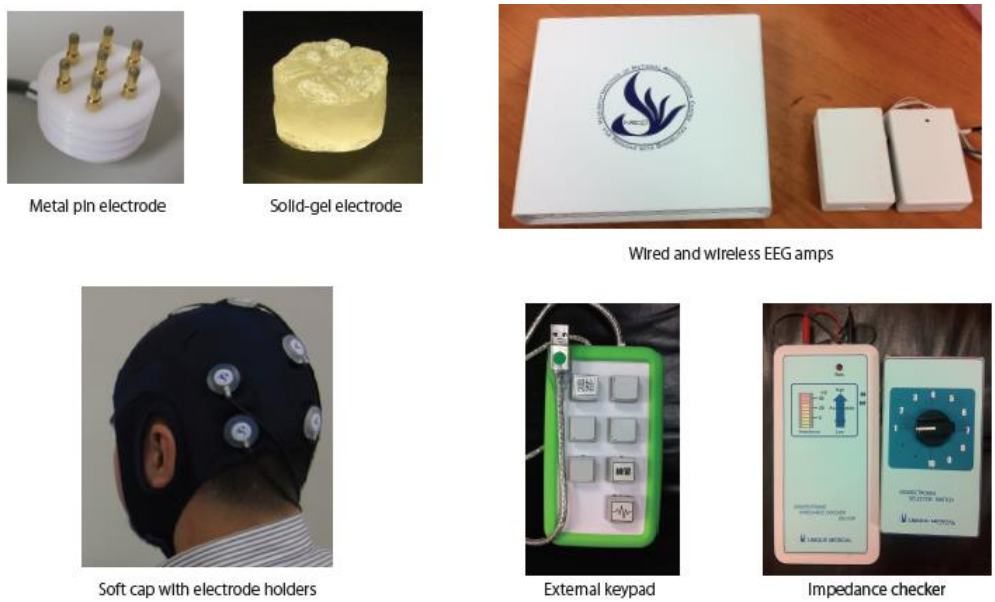


図 1. 開発品

マニュアルについては、機器設置マニュアルと電極設置マニュアルを作成した(図 2)。マニュアルは写真を多く用いて手順毎に写真を見ながら設置が進められるように考慮し作成した。また、マニュアルのみでは対応が困難な問題への対応や、遠隔地からのプログラムの修正やシステムのアップグレードなどを行うために、遠隔地サポート環境を用いた。

中長期評価を行うにあたり脳波のみならず他の入力方法での動作について意見を得るため、本システムについて脳波およびスイッチ入力での試用を行い意見を得た。

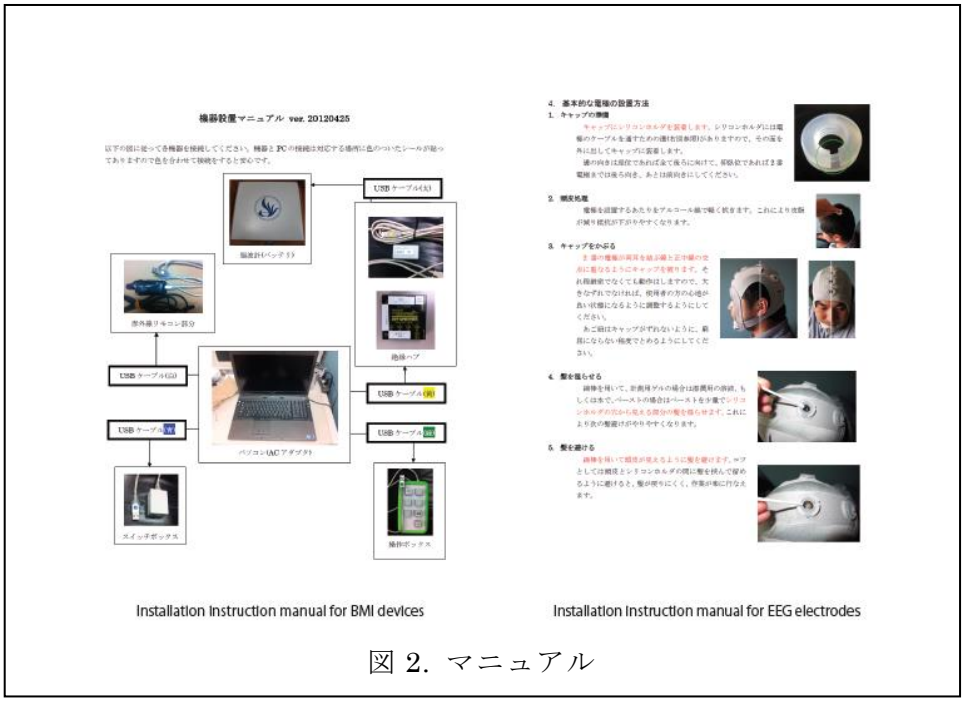


図 2. マニュアル

これらのシステムを用いて公立八鹿病院にて ALS の患者を対象とした実験を行った。実験は介助者のみでの機器の使用実験(実験 1)と、複数の入力方法での機器使用の実験(実験 2)を行った。被験者は 2 名(62 歳男性、76 歳女性、ともに ALSFRS-R=0)でうち 1 名(男性)には両方の実験に参加いただき、もう 1 名(女性には)複数の入力方法での機器使用の実験にのみ参加いただいた。

(倫理面への配慮)

ヒトを対象とする本研究は、全てヘルシンキ宣言に基づき、また、申請者の所属研究機関の倫理委員会の承認のもと行った。さらに、本研究の非侵襲脳機能計測法を用いた実験は、日本神経科学学会研究倫理委員会「ヒト脳機能の非侵襲的研究」に関する倫理小委員会による「ヒト脳機能の非侵襲的研究」の倫理問題などに関する指針に基づき実施した。

被験者及び保護者・関係者から、口頭ならびに文書にてのインフォームドコンセントを徹底し、自発的な同意を得た上で実験を行った。実験中は無用な苦痛を与えないように配慮した。

本研究で実施したすべての実験について、被験者の個人情報などに係るプライバシーの保護に配慮し、被験者が如何なる不利益を受けないように配慮した。結果の公表に関しては検査・実験の受諾と同様に被験者及び保護者・関係者から、口頭ならびに文書にてのインフォームドコンセントを徹底し、承諾を得た。また、個人が特定されないように格別の注意を払った。

３．結果と考察

実験１は研究者が同席せず作業療法士のみで行い、実用的とされる精度である 70%を越える精度(92%)での動作を確認した。また、遠隔地サポート環境にて脳波波形の確認および記録したデータの取得、プログラムの更新が可能であることを確認した。この結果から、本システムが病院等の環境において、運用可能であることが示された。

中長期の試験を実施するにあたり試験を行う対象となる患者についてより詳細な検討を行った。今回の実験に参加していただいた 2 名について、1 名(被験者 A)はこれまでに長期間コンピューターを利用したコミュニケーション支援機器を使用しており、BMI 機器としての操作精度は高く 90%を越えていた。統一インターフェイスを用いた試用においては、これまで使用しているコミュニケーション支援機器と同じ機能と配列を望む傾向があった。

もう 1 名(被験者 B)については、コンピューターを用いたコミュニケーション支援機器の導入段階にあり、従来使用していた機器からタッチセンサによる機器の操作の練習時期に本機器を用いた実験を行った。BMI 機器としては実用可能な精度での動作をしていたが、統一インターフェイスを用いた試用においてはタッチセンサによる機器の操作に慣れていないため、十分に操作を行うことができなかった。感想における聞き取りでもコンピューターへの忌避感があることを挙げ、機器の導入自体に否定的な意見であった。また、機器の導入により身の回りのことが出来るようになることについても、それによって家族等の介助者との関係が減少することを危惧する意見があった。

中長期の臨床試験に向けた検討では機能性の拡充や使用の容易化だけでは不十分であり、被験者の好みや使用機器の履歴によって機器への印象や求める機能が異なることも明らかとなった。機器の機能についても自分自身で多くのことが出来ることが最優先ではないことが推測される意見が得られ、機器開発において他者とのコミュニケーションのための機能を重視する必要があることが明確になった。

これらのことから今後、実証評価を進めていくにあたり、本人のみならず家族、介助者や病院のスタッフとの綿密な協力体勢を構築する必要があると考えられる。

４．結論

本研究では、容易に使用可能な BMI システムのために、周辺機器や、各種マニュアル、遠隔地サポート環境の研究開発とそれらが実際に使用可能であるかについて、調査検討を行った。その結果、研究者が同席せずとも本システムが使用可能であることが示された。今後より改良を進め、より使いやすく精度の高いシステムの構築を進めていく。

参考文献

Birbaumer, N., 2006. Breaking the silence: Brain?computer interfaces (BCI) for communication and motor control. *Psychophysiology*, 43(6), pp.517–532.

Birbaumer, N. & Cohen, L.G., 2007. Brain-computer interfaces: communication and restoration of movement in paralysis. *The Journal of Physiology*, 579(3), pp.621–636.

Farwell, L.A. & Donchin, E., 1988. Talking off the top of your head: toward a mental prosthesis utilizing event-related brain potentials. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 70(6), pp.510–523.

Kansaku, K., 2011. Brain-machine interface for environmental control. In K. Kansaku & L. G. Cohen, eds. *Systems Neuroscience and Rehabilitation*. Springer, pp. 19–33.

Komatsu, T., Tajabi, K., Nakajima, Y., Kansaku, K., 2012. Development of unified user interface ready for EEG and other signals for ALS patients. Abstract Viewer/Itenerary Planner. New Orleans: Society for Neuroscience 2012, Program No. 792.18, Online

Komatsu, T., Hata, N., Nakajima, Y., Kansaku, K., 2008. A non-training EEG-based BMI system for environmental control. *Neuroscience research*, 61(Suppl 1), p.S251.

Takano, K. et al., 2009. Visual stimuli for the P300 brain-computer interface: a comparison of white/gray and green/blue flicker matrices. *Clinical Neurophysiology*, 120(8), pp.1562–1566.

Takano, K., Komatsu, T., Kondo, K., Nakajima, Y., Kansaku, K., 2012. Development of an easy-to-use BMI system for ALS patients. JNS Meeting Planner. Nagoya, Japan: The Japan Neuroscience Society, Japan. Program No. P1-k02. Online.

Toyama, S., Takano, K. & Kansaku, K., 2012. A non-adhesive solid-gel electrode for a non-invasive brain-machine interface. *Frontiers in neurology*, 3, p.114.

Wolpaw, J.R. & McFarland, D.J., 2004. Control of a two-dimensional movement signal by a noninvasive brain-computer interface in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(51), pp.17849–17854.

平成２４年度　障害者対策総合研究推進事業
（身体・知的等障害分野）

平成２５年３月　発行

発　行　　公益財団法人　日本障害者リハビリテーション協会
〒162-0052　東京都新宿区戸山１丁目 22 番１号
（戸山サンライズ内）
電　話　　(03) 5273-0601
ＦＡＸ　　(03) 5273-1523

印　刷　　株式会社　教文堂