

超音波ニューロモデュレーション法の研究開発

機械受容チャネルの関与と自由行動動物における経頭蓋超音波照射法

近畿大学 吉田 楓・Chan Michele・Yang Gangsheng
北海道大学 工藤 信樹
近畿大学 竹内 雄一

1. はじめに

てんかんやうつ病などの神経・精神疾患では、約1～3割の患者に薬物療法が奏効しない⁽¹⁾。近年、そのような患者には、電気や磁気など物理的な手法を用いて脳活動に介入する脳刺激法が用いられてきた。例えば脳深部刺激法（Deep Brain Stimulation；DBS）は、特定部位に電極を挿入し電気刺激を与える手法であり、適応患者の約50%に治療効果が認められる。しかし、DBSは侵襲的であり、脳出血や感染症等合併症のリスクを伴うため、より低侵襲な刺激法が求められている。また、非侵襲的脳刺激法として経頭蓋磁気刺激（Transcranial Magnetic Stimulation；TMS）がある。TMSは電磁誘導を利用して脳を刺激する方法であるが、標準的なコイルでは刺激範囲が広く標的部位周辺への影響を避けることができないため、空間分解能の高い刺激法が望ましい⁽²⁾。

そこで、近年我々は、経頭蓋超音波照射による脳刺激技術に注目している。超音波は生体透過性が高いため、非侵襲的に脳活動へ介入できる。また、球面状の振動子を用いる、または複数の振動子の出力を位相制御等により集束することで、ミリメートルまたはサブミリメートルの精度で脳深部を標的できる⁽³⁾⁽⁴⁾。我々は、超音波脳活動制御法の効果およびメカニズムについて、げっ歯類動物を用いて検討を進めている。本稿では、まず、哺乳類大脳神経細胞の超音波感受性におけるTRPC6チャネルの重要性を紹介する。

また、自由行動下動物の特定の脳部位に超音波照射を行うことで、てんかんをはじめとする神経疾患・精神疾患への介入も行っている。この際には、標的脳部位に対して正確に超音波を照射すること、

および自由行動動物の頭蓋上に超音波トランスデューサーを安定して慢性留置することが重要である。本稿では、自由行動動物に対する経頭蓋超音波照射法のためのトランスデューサーの作製法および慢性留置のための手術法を紹介する。

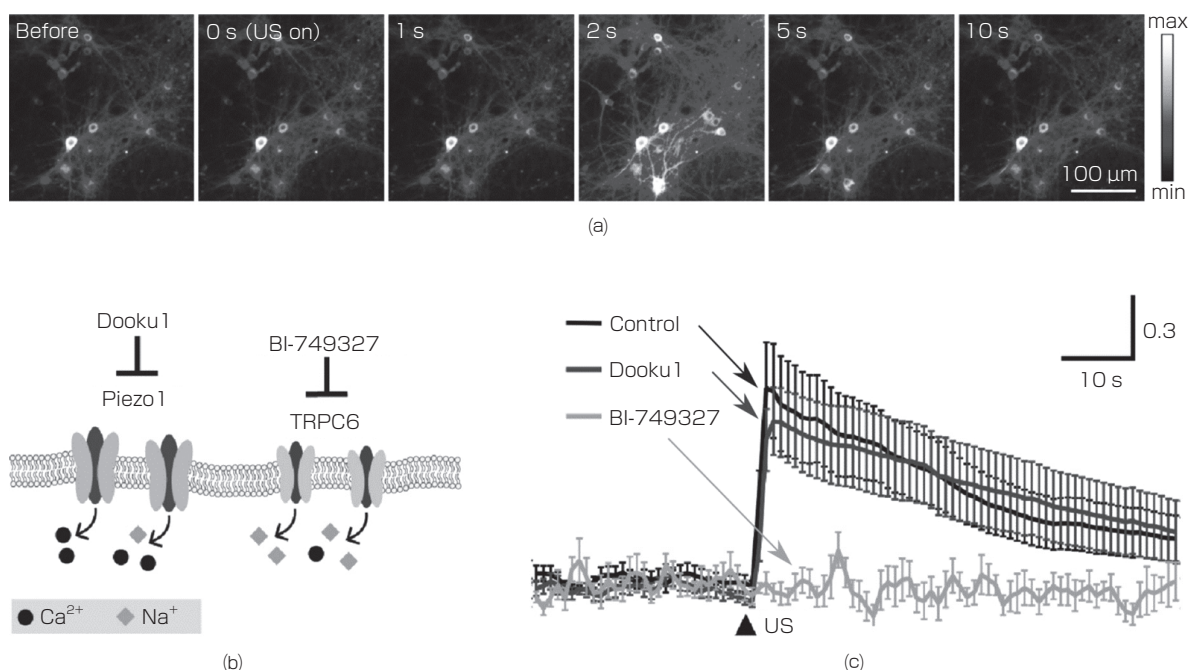
2. 神経細胞の超音波感受性メカニズム

超音波照射により神経活動が誘発される。この過程には神経細胞膜に発現し、膜の張力や細胞骨格の変化を感知する、“機械受容チャネル”が重要であることが示唆されてきた。しかし、数多く存在する機械受容チャネルのうち、どのチャネルが超音波感受性において特に重要な役割を果たすのかは未解明であった。そこで我々は、量子科学技術研究開発機構の脳機能イメージングセンターとの共同研究により、哺乳類神経細胞の超音波感受性に重要なチャネルの特定を行った⁽⁵⁾。

まず、マウスの初代培養神経細胞を用いた研究により、神経細胞が超音波応答性を示すことを確認した（第1図(a)）。様々な機械受容チャネルの機能を薬理的に阻害していくと、TRPC6チャネルの阻害時にのみ神経の超音波応答が消失することが明らかになった（第1図(b)、(c)）。

さらに、マウス個体においてもTRPC6が重要であるかを、麻酔下マウスにおける細胞外記録法により検討した（第2図(a)、(b)）。神経活動をタングステン電極により記録した状態で、経頭蓋超音波照射を行うと、神経の超音波応答性は強度依存的に増加した。一方、TRPC6チャネルを薬理的に阻害した際にはその応答性が減少した（第2図(c)、(d)）。

この結果は、神経の超音波応答性におけるTRPC6



第1図 培養神経細胞の超音波応答にはTRPC6が重要である

(a)細胞内カルシウムイオン濃度センサーであるGCaMP6sを発現した培養神経細胞の、超音波応答の時系列画像。スケールバーはGCaMP6sの蛍光強度を示す。(b)機械受容チャネルであるPiezo1またはTRPC6に対する選択的拮抗薬の効果をj示す模式図。Dooku1 (10 μM) およびBI-749327 (1 μM) は、それぞれPiezo1およびTRPC6の活性化を阻害するために使用された。(c)コントロール、Dooku1、BI-749327の条件下における、超音波照射に対する神経細胞のカルシウムイオン濃度変化 (平均±SEM)。n=14, 13, 12 experiments for control, Dooku1, and BI-749327, respectively.

チャネルの重要性を示すとともに、超音波を用いた神経活動制御の可能性を拓くものである。この発見を基にして、我々は現在、TRPC6チャネルなどの機械受容チャネルを目的の神経細胞に過剰発現させることで、より効果的な超音波神経活動制御を行う、“超音波遺伝学”⁽⁶⁾の研究開発を進めている。

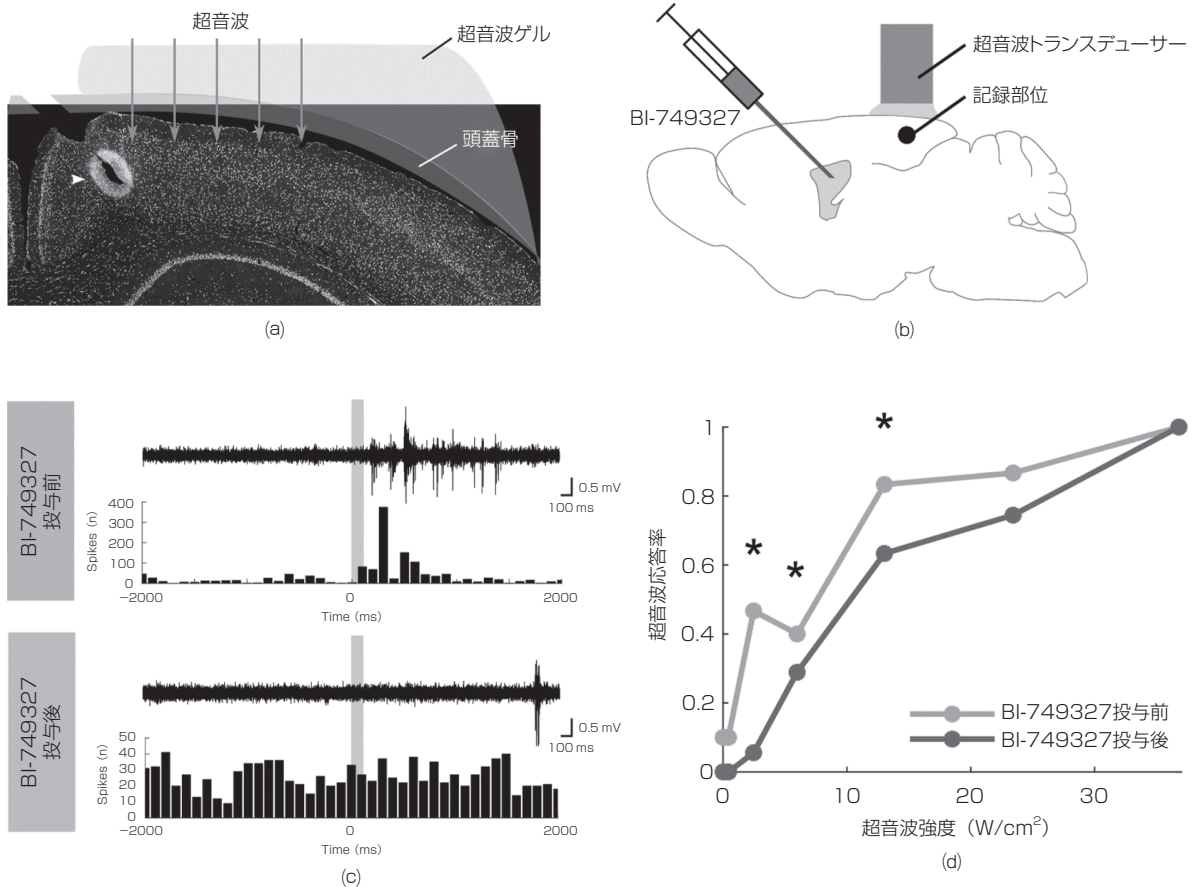
3. 自由行動動物における 経頭蓋超音波照射のための 超音波トランスデューサー設計および 慢性留置法

我々は、げっ歯類動物に対して経頭蓋的に超音波照射を行い、脳活動等の生体活動の制御法を検討している。マウス、ラット、ハムスターなどの小型げっ歯類の頭蓋骨は、幅が10 mm程度と小さく、超音波トランスデューサーの安定した設置や、慢性的な行動実験を可能にするための技術的課題が存在する。本節では、当核課題に対する我々の取り組みを紹介する⁽⁷⁾。

3-1 超音波トランスデューサーの設計

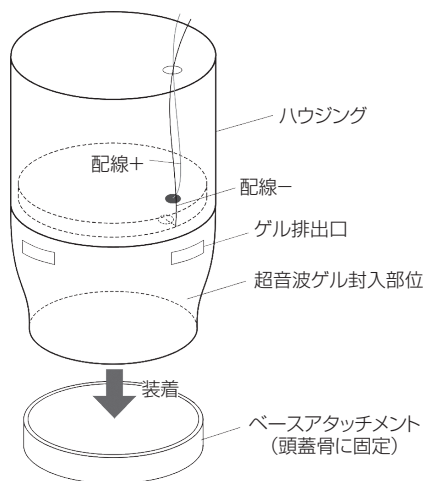
超音波の発生には、中心周波数1~10 MHz、口径10~20 mm、焦点距離10~30 mmの集束型ピエゾ素子を使用している。ピエゾ素子は3Dプリンターで作成した筒状のハウジングの先端部に取り付けられ、エポキシ系接着剤により素子の固定と水の浸入による電極間の絶縁低下防止を実現している(第3図)。これは、ピエゾ素子を衝撃による破損から守ることに役立つ。

ピエゾ素子の両面には電極が付加されており、電極間に電圧を印加することにより超音波を発生する。動物に対する電撃を防ぎ、電氣的ノイズを低減するために動物側の電極を接地側としている。刺激に用いる数MHz帯の超音波は空気中をほとんど伝搬しないため、ピエゾ素子の前面と頭蓋骨の間を超音波ゲルで満たしている(超音波ゲル封入部位)。この際、ゲル内への気泡の混入を防ぐためにゲル排出口を設置している。素子背面には特別な構造は付加せず、エアバック型jの構造とすることで素子



第2図 マウス生体内での神経超音波応答にはTRPC6が重要である

(a)(b)TRPC6遮断薬BI-749327を用いた生体内神経活動記録の模式図。麻酔下マウスにおいて、記録用のタングステン微小電極は頭蓋に穴を開けた小さな穴から大脳皮質に挿入され、超音波は、記録部位に経頭蓋的に照射された(a)。TRPC6選択的拮抗薬であるBI-749327は、記録開始30分前に脳室内に投与された。(c)(d)BI-749327投与前(c)と投与後(d)の、超音波照射時の生体内神経活動記録の代表例。上：ハイパスフィルター後の細胞外電位のトレース。下：刺激周辺時間ヒストグラム(Peri-Stimulus Time Histogram: PSTHs)。(e)異なる強度の超音波照射に対して、応答を示した神経集団の割合。各刺激強度における有意性は、 2×2 (有意性×コントロールまたはBI-749327) 度数表におけるカイニ乗検定により決定した。 $n=73$, 80 sessions from three mice for pre- and postrecordings, respectively. * $P<0.05$.



第3図 超音波トランスデューサーの模式図

の出力増加を図っている。

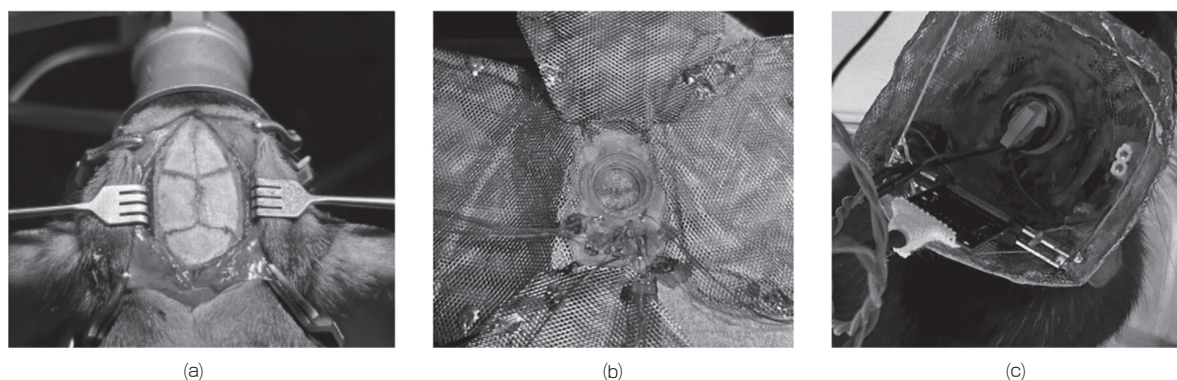
さらに、ピエゾ素子には固有の焦点距離があり、ピエゾ素子と標的脳部位との距離をこの焦点距離と一致させる必要がある。そのため、ゲル封入部の高さを調整することで、適切な焦点距離を確保する設計としている。一方でベースアタッチメントを頭蓋骨にセメントで固定し、ここにゲルを封入した超音波トランスデューサーを装着することで、自由行動下での安定した超音波照射を可能にしている。

3-2 慢性留置法

ここでは成獣ラットでの手術法を紹介する⁽⁷⁾。

(1) 前処理

手術は、イソフルラン (1~2%) 麻酔下で脳定位



第4図 自由行動下超音波刺激のための手術手順

(a)洗浄後のラット頭蓋骨。血や皮下組織が残らないように綺麗に洗浄する。(b)ベースアタッチメントおよび銅メッシュ設置後。手前には、脳波記録用の線電極およびねじ電極が埋め込まれている。(c)組み立て後の銅メッシュと、実際の超音波トランスデューサー配置の様子（銅メッシュ内奥）。銅メッシュ内手前には脳波記録システムが配置されている。

固定装置を用いて実施している。イヤバーで頭蓋骨を固定し、頭部を剃毛・消毒後、皮下に鎮痛薬（1%リドカイン塩酸塩、約0.1 mL）を注射する。5分後、メスで頭皮を正中線に沿って切開して頭蓋骨を露出し、頭皮の筋膜4か所をクランプで固定し、術野を確保する。鏡匙で側頭骨周りの側頭筋を剥離し、開創器で側頭筋を固定する。頭蓋骨からの出血を止めた後、0.3% (w/v) 過酸化水素水を使用し頭蓋骨を洗浄する（第4図(a)）。続いて、のちに使用する歯科用重合レジンと頭蓋骨の接合材として、歯科接着用レジンセメント（ESTEC EM II、トクヤマデンタル）を、超音波照射領域を除いた頭蓋骨全体に塗布する。ESTEC EM IIのペーストA/Bを順に薄く塗布したのち、多方向からUV照射を行う。（この時点ではレジンセメントは固まらないが、のちに歯科用重合レジンを塗布し真空状態になると固定される。）

(2) ベースおよび銅メッシュの設置

さらに、ベースアタッチメントを標的部位に設置し、歯科用重合レジン（ユニファストトラッド、GC）で固定する。この際、超音波照射領域（ベース内領域）への塗布は避ける。また、側頭骨上に「壁」（高さ約2 mm、幅約1 mm）を歯科用重合レジンで形成し、当核壁に銅メッシュをセメントで固定する（第4図(b)）。この銅メッシュは、電気的なノイズの除去に加え、動物が露出された頭蓋骨に触れないようにしている（第4図(c)）。

上記に加えて、タングステン線電極の頭蓋内慢性留置やねじ電極の頭蓋骨への固定などを行い、脳活動をモニタリングしながらの超音波照射も可能である（第4図(b)、(c)）。

4. おわりに

本稿では、超音波による神経活動制御の基盤メカニズムとして、TRPC6チャネルが神経の超音波感受性において重要な役割を果たすことを明らかにした。また、自由行動下のげっ歯類に安定して超音波を照射するための装置設計と手術手技を紹介した。

今後は、より精密な超音波による神経活動制御技術の確立を目指す。さらに当核技術は、脳機能の解明や新たな疾患治療法の開発に貢献すると期待される⁽⁸⁾。

<参考文献>

- (1) Kwan P, Schachter SC and Brodie MJ. Drug-resistant epilepsy. *New Engl J Med* ; 365 : 919-926 (2011)
- (2) Pascual-Leone A, Rubio B, Pallardó F, *et al.* : Rapid-rate transcranial magnetic stimulation of left dorsolateral prefrontal cortex in drug-resistant depression. *The Lancet* ; 348 : 233-237 (1996)
- (3) Rabut C, Yoo S, Hurt R C, *et al.* : Ultrasound technologies for imaging and modulating neural activity. *Neuron* ; 108 : 93-110 (2020)
- (4) Meng Y, Hynynen K, & Lipsman N. Applications of focused ultrasound in the brain : from thermoablation to drug delivery. *Nat Rev Neural* ; 17 : 7-22 (2021)
- (5) Matsushita Y, Yoshida K, Yoshiya M, *et al.* : TRPC6 is a mechanosensitive channel essential for ultrasound neuromodulation in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 121 : e2404877121 (2024)

- (6) Ibsen S, Tong A, Schutt C, *et al.* : Sonogenetics is a non-invasive approach to activating neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* ; 6 : 8264 (2015)
- (7) Chan M, Yoshida K, Yang G, *et al.* : Time-targeted intervention of brain oscillations with transcranial ultrasound irradiation. *Neuromethods*, Springer Nature, London, in press
- (8) Takeuchi Y and Berényi A. Oscillotherapeutics-Time-targeted interventions in epilepsy and beyond. *Neurosci Res* ; 152 : 87-107 (2020)

【筆者紹介】

吉田 楓

近畿大学 薬学部 薬物治療学研究室 研究員

Lab-link : <https://ytake.org/>

Chan Michele

近畿大学 薬学部 医療薬学科 薬物治療学研究室
助教

Yang Gangsheng

近畿大学 大学院薬学研究科 薬物治療学研究室
博士課程

工藤 信樹

北海道大学 大学院情報科学研究院
生命人間情報科学部門 人間情報工学研究室
学術研究員

竹内 雄一

近畿大学 薬学部 医療薬学科 薬物治療学研究室
教授