

40. 難治性てんかんをオンデマンドかつ非侵襲的に制御する臨床技術の開発

*Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Szeged
竹内 雄一

キーワード：側頭葉てんかん，内側中隔核，閉ループ制御，実時間シグナル処理，経頭蓋集束電気刺激法

Abstract

Temporal lobe epilepsy with distributed hippocampal seizure foci is often intractable and its secondary generalization might lead to sudden death. Early termination through spatially extensive hippocampal intervention is not feasible directly, due to its large size and irregular shape. In contrast, the medial septum (MS) is a promising target to govern hippocampal oscillations through its divergent connections to both hippocampi. Combining this ‘proxy intervention’ concept and precisely timed stimulation, we report here that closed-loop MS electrical stimulation can quickly terminate intrahippocampal seizures and suppress secondary generalization in a rat kindling model. Precise stimulus timing governed by internal seizure rhythms was essential. Cell-type-specific stimulation revealed that precisely timed activation of MS GABAergic neurons underlay the effects. Furthermore, to achieve non-invasive stimulation of an arbitrary brain region, we designed an ‘intersectional short pulse’ stimulation method: transcranial focused electrical stimulation. We verified the regional specificity of this novel method in rodents; in humans, we demonstrated how it affects ongoing EEG waves. Combined with the novel non-invasive brain stimulation method, time-targeted MS stimulation can be a novel therapeutic method to control intractable temporal lobe epilepsy.

背景および目的

世界 5000 万人のてんかん患者のうち、約 30%が薬剤抵抗性であり、特に側頭葉てんかんは難治性である割合が高い (Kwan P. et al, New Engl J Med 365: 919, 2011)。難治性側頭葉てんかんは、就学就労制限により社会に経済的損失を生じるのみならず、患者の日常生活に著しく支障をきたし、かつ二次性全般化 (大発作) に伴う突然死の原因にもなるので、適切に制御する必要がある (Bone B. et al, Epilepsia 53: 817, 2012)。ただしこの様な難治性症状に対して、現状発作焦点部位の外科的切除以外に有効な治療法が乏しい。側頭葉切除はしばしば認知機能障害など深刻な副作用を伴うため、低侵襲性で有効性の高い新たな治療法が社会的に望まれている。

前脳基底部の一部である内側中隔核が側頭葉 (海馬体や海馬傍回) における神経活動の同期性を強力に司るため、内側中隔核の神経活動へ介入することで側頭葉てんかんの発作を制御できると可能性があると考えるに至った。実際我々は側頭葉てんかんモデルラットを用いて、内側中隔核を電氣的または光遺伝学的に刺激することで発作症状を軽減可能であることを最近明らかにした¹⁾。この知見は難治性側頭葉てんかんの新規治療法開発に向けた重要なシーズである。ただしこのシーズの臨床応用に向け、以下の課題が残る。1. 認知機能障害：内側中

* 現所属：名古屋市立大学 大学院薬学研究科 神経薬理学分野

隔核の正常な神経活動リズムは記憶学習や空間認知などの認知機能に必須であるため、副作用を軽減するためには刺激を発作時に限る必要がある。2. 侵襲性：内側中隔核は脳深部に位置するため、介入のためには刺激電極や光ファイバーを頭蓋内に刺入する必要があり感染症や脳出血のリスクを伴う。そこで本研究では、これらの課題を発作時選択的な刺激のデリバリー法と経頭蓋集束電気刺激法の開発で、それぞれ克服できるか検証することを目的とした(図 1)。さらに内側中隔核刺激による抗てんかん作用の機序を明らかにするため、内側中隔核の細胞種特異的な刺激の検討も行った。

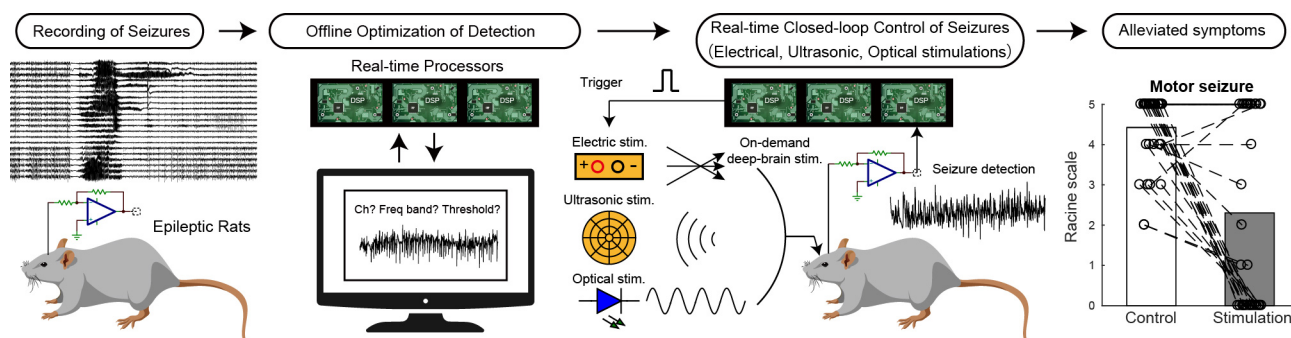


図 1. Development of on-demand of epileptic seizures of rats using transcranial deep-brain stimulation.

方法

1. 発作時選択的な刺激のデリバリー

<ラットモデル>

合計 50 匹の Long-Evans ラット（野生型 8 匹、遺伝子改変動物 42 匹、3–6 月齢、300–640 g、雌雄）を用いた²⁾。遺伝子改変動物は以下の通りである：VGAT-Cre rats (LE-Slc32a1tm1(cre)Sage; RGD Cat# 12905033; RRID:RGD_12905033), CaMKII α -Cre rats (LE-Camk2atm1(IRES-cre)Sage, RGD Cat# 12905032; RRID:RGD_12905032) and ChAT-Cre rats: LE-Tg(ChAT-Cre)5.1Deis, RGD Cat# 10401204; RRID:RGD_10401204)。すべての動物実験は、機関の動物実験倫理委員会の承認を受け、EU (2003/65/CE) および NIH のガイドラインに従った。

<光遺伝学のための遺伝子導入>

麻酔下動物を脳定位固定装置にマウントし、内側中隔核に Cre DNA リコンビナーゼ依存的にチャネルドプシン 2 を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを注入した(AAV5-EF1 α -DIO-hChR2(H134R)-mCherry, UNC Vector Core, Chapel Hill, NC, USA)²⁾。

<慢性記録・刺激電極の埋め込み手術>

麻酔下動物を脳定位固定装置にマウントし、両側海馬、右側運動野、右側感覚野、および右側嗅内野にタングステン線記録電極を慢性留置した。加えて電気刺激のために、海馬交連に双極刺激電極を慢性留置した。内側中隔核に電気刺激のための双極刺激電極または光遺伝学刺激のための光学カニューレを挿入した²⁾。

<電気生理記録>

自由行動動物から合計 30 チャンネルの局所電場電位を記録した。シグナルはアナログフィルターで 0.3-10 kHz 周波数成分に処理し、500 Hz でサンプリングを行った²⁾。

<海馬電気キンドリング>

海馬由来の側頭葉てんかん発作を誘起するため、海馬交連の電気刺激 ($\pm 20\text{--}200\ \mu\text{A}$, 62.5 Hz, 2 s) を 1 日 6 回、10 日間行った。全ての動物が海馬交連の電気刺激に対し、後発射を伴う典型的なてんかん発作症状を呈した²⁾。

<内側中隔核刺激>

電気刺激として、 $\pm 400\ \mu\text{A}$ 、1 ms 長の矩形波を用いた。光遺伝学刺激として、450 nm 波長のレーザーダイオード光による 30–40 mW、30 ms 長の矩形波を用いた。海馬交連刺激によるてんかん発作誘発後、開ループ刺激として、2 分間の内側中隔核刺激を固定周波数 (1, 8, 20 Hz) で行った。閉ループ刺激としては、海馬における各てんかん波検出をトリガーにして内側中隔核刺激を行った。その際、てんかん波検出と内側中隔核刺激の間に遅延時間 (0, 20, 40, 60 ms) を導入した²⁾。

<抗発作作用の評価>

海馬および大脳皮質におけるてんかん波の持続時間、および Racine スケールによる行動評点で評価した (1: 口の動き、2: 頭部の揺れ、3: 前肢のクロウンス、4: 立ち上がり、5: 転倒)²⁾。

2. 経頭蓋集束電気刺激法の開発

<刺激装置>

Intersectional Short Pulse (ISP) 刺激のため、刺激電流を複数の電極対に高速でスイッチする電気回路を実装した³⁾。

< In vivo 細胞外記録>

合計 19 匹の Long-Evans ラット (350–450 g, 10–16 週齢、雌雄) を用いた。動物を麻酔下で脳定位固定装置にマウントし、左右の海馬 CA1 領域にそれぞれユニット活動記録用シリコンプローブ (Buzsaki32-H32; NeuroNexus, Ann Arbor, MI, USA) を刺入した。左右の側頭骨に 3D プリントした刺激電極対を瞬間接着剤で固定し、左右の海馬体への刺激集束能を評価した³⁾。

< In vivo 細胞内記録>

合計 8 匹の Wistar ラット (250–450 g, 8–12 週齢、雄性) を用いた。動物を麻酔下で脳定位固定装置にマウントし、右側一次視覚野の神経細胞から常法に従ってブラインド全細胞パッチクランプ記録を行った。左右の側頭骨もしくは側頭部の皮膚に刺激電極を固定して $\pm 100\text{--}800\ \mu\text{A}$ の DC 刺激を行い、膜電位変化および活動電位の頻度変化を評価した。パッチクランプ記録後、2 次元的に記録部位が配置された細胞外記録電極 (Buzsaki32) を同座標に刺入し、電気刺激による細胞外電位勾配変化を記録した³⁾。

<ヒト献体における頭蓋内電位勾配の記録>

セゲド大学医学部病理学部門において、死後数日以内のヒト献体を用いた³⁾。ドリルを用いて頭蓋骨に 36 の窓を開け、頭蓋内に自作の 3 次元マトリックス電極を刺入した。経皮的、経頭蓋的、または直接脳実質に交流電気刺激を行い、頭蓋内電位勾配を評価した。

<健常ボランティアにおける経頭蓋電気刺激と脳波記録>

経皮的経頭蓋集束電気刺激法の脳波への影響を、健常ボランティア (22–66 年齢、雄性) において検討した³⁾。被験者が 1–8 mA の ISP 刺激に耐えられることを確認した後、目を閉じた状態の安静時脳波を常法に従って記録した。その後、同記録条件下において、1 Hz サイン波の ISP 刺激を側頭部に配置した 6 つの電極対を介して適応した。ISP 刺激が頭頂部 P3, P4 における α 帯活動に与える影響を評価した。

結果

1. 発作時選択的な刺激のデリバリー

<内側中隔核の開ループ、閉ループ電気刺激>

側頭葉てんかんモデルとして、ラット海馬キンドリングモデルを用いた（図 2A-C）。海馬交連の電気刺激により、1-2 分間持続するてんかん波が観察された。てんかん波は両側の海馬から始まり、その後大脳皮質に全般化した。発作は Racine スケールにおける 4 点の立ち上がり、5 点の転倒など典型的な行動表現型を伴った。これらの発作表現型に対し、固定周波数での内側中隔核刺激（開ループ刺激）または発作リズムに応答した内側中隔核刺激（閉ループ刺激）を行った。閉ループ刺激では、てんかん波検出と刺激の間に遅延時間（0, 20, 40, 60 ms）を導入した（図 2D, E）。

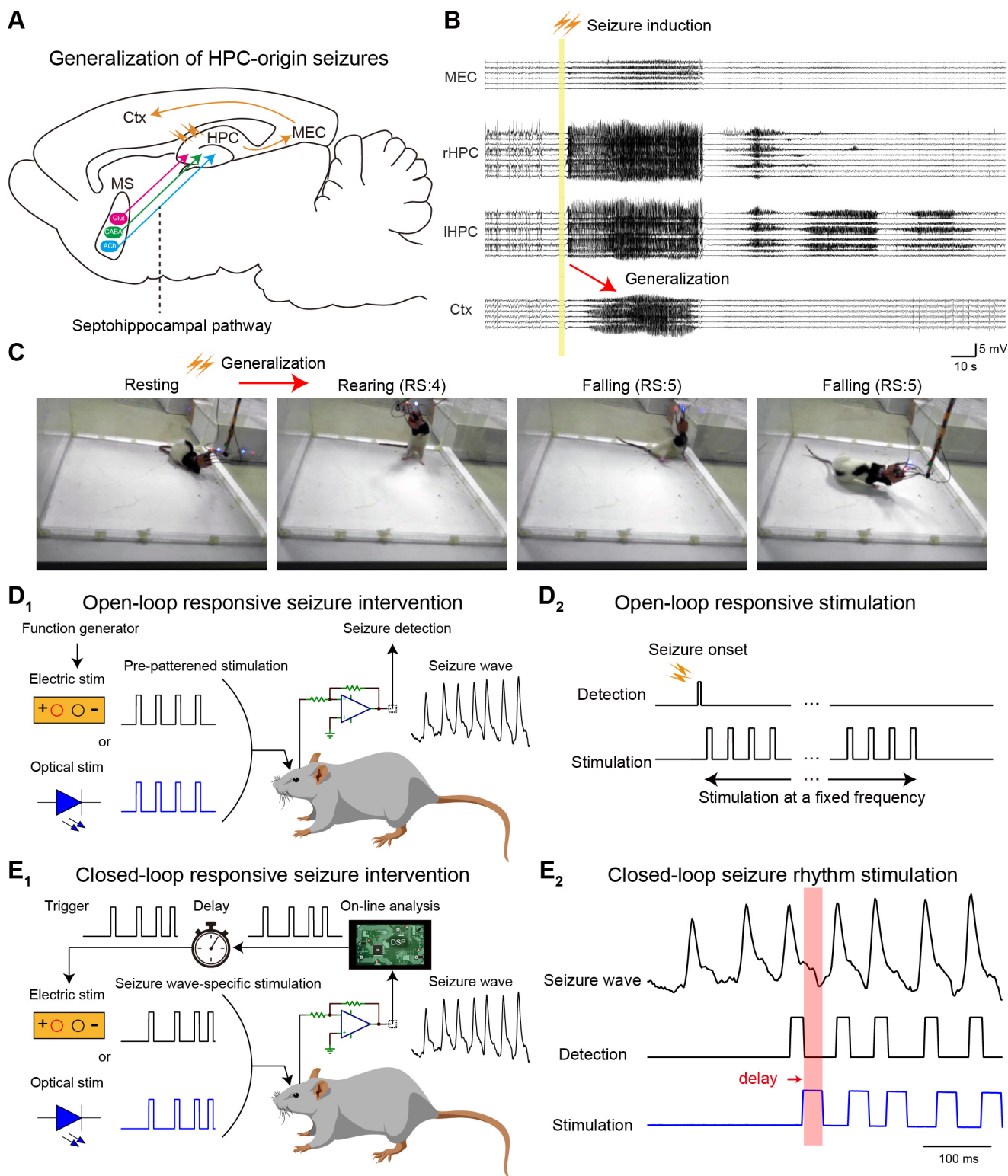


图 2. Responsive MS stimulation for intervening seizures of HPC-origin

(A) Schema of generalization of HPC seizures and septohippocampal pathway. MEC, medial entorhinal cortex. (B) Representative LFP traces of HPC seizures propagated to the Ctx. (C) E-stim of the HPC commissure induced motor seizures as well. RS: the Racine's scale. (D₁, D₂) The concept of open-loop responsive intervention. (E₁) The concept of closed-loop responsive intervention (seizure rhythm-driven stimulation). Seizure waves were detected in real-time and each detection triggers MS stimulation with a defined delay. (E₂) A representative HPC seizure, its detection, and MS stimulation. Red stripe indicates the targeted phase.

＜内側中隔核の開ループ刺激はてんかん発作症状を増悪する＞

内側中隔核の開ループ電気刺激（1, 8, 20 Hz）は、ラット海馬キンドリングモデルの発作症状を改善しなかった（図 3A-E）。小規模な焦点発作を模した弱い発作を誘導した際には、むしろ内側中隔核の開ループ電気刺激は発作症状を増悪した（図 3F-I）。

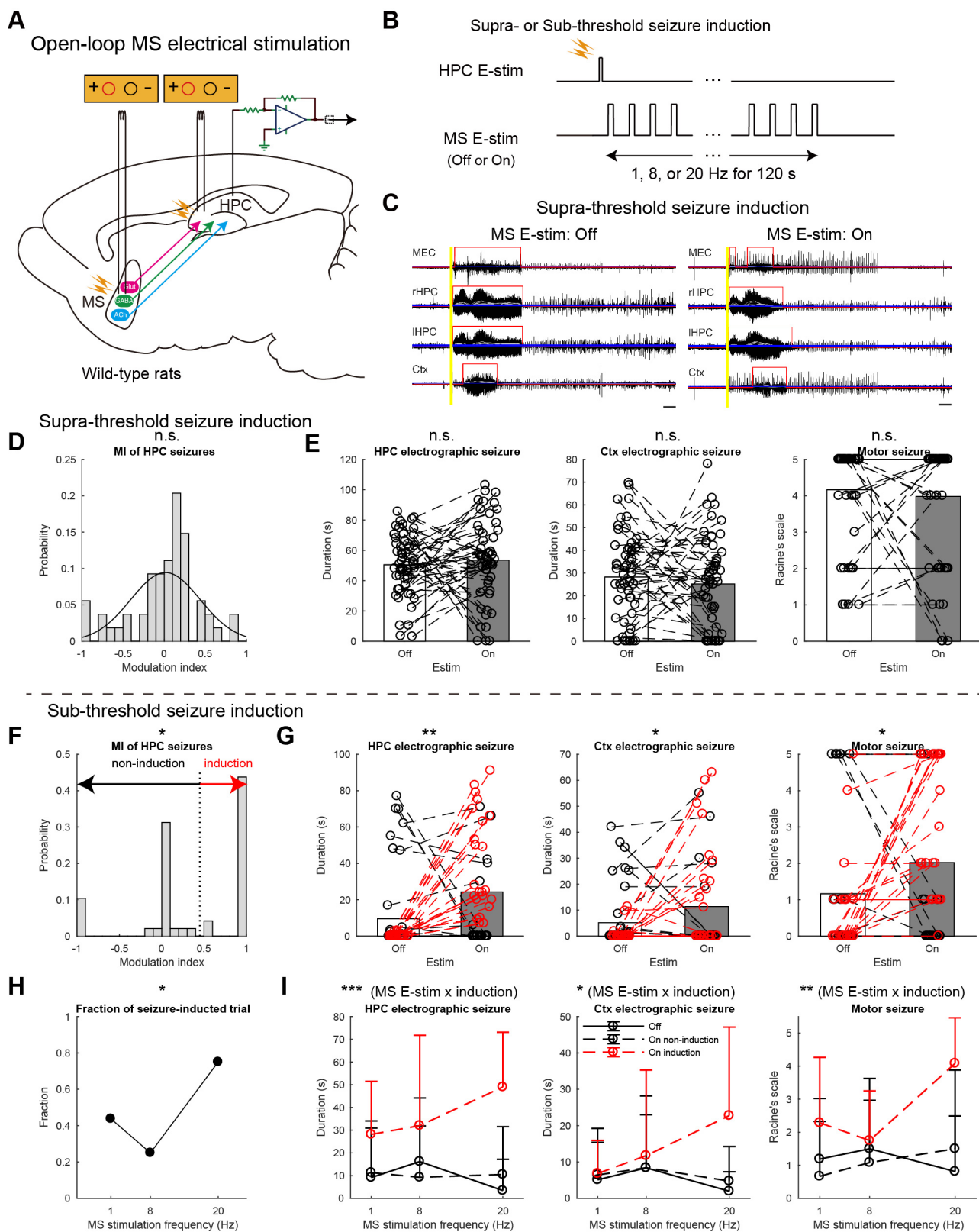
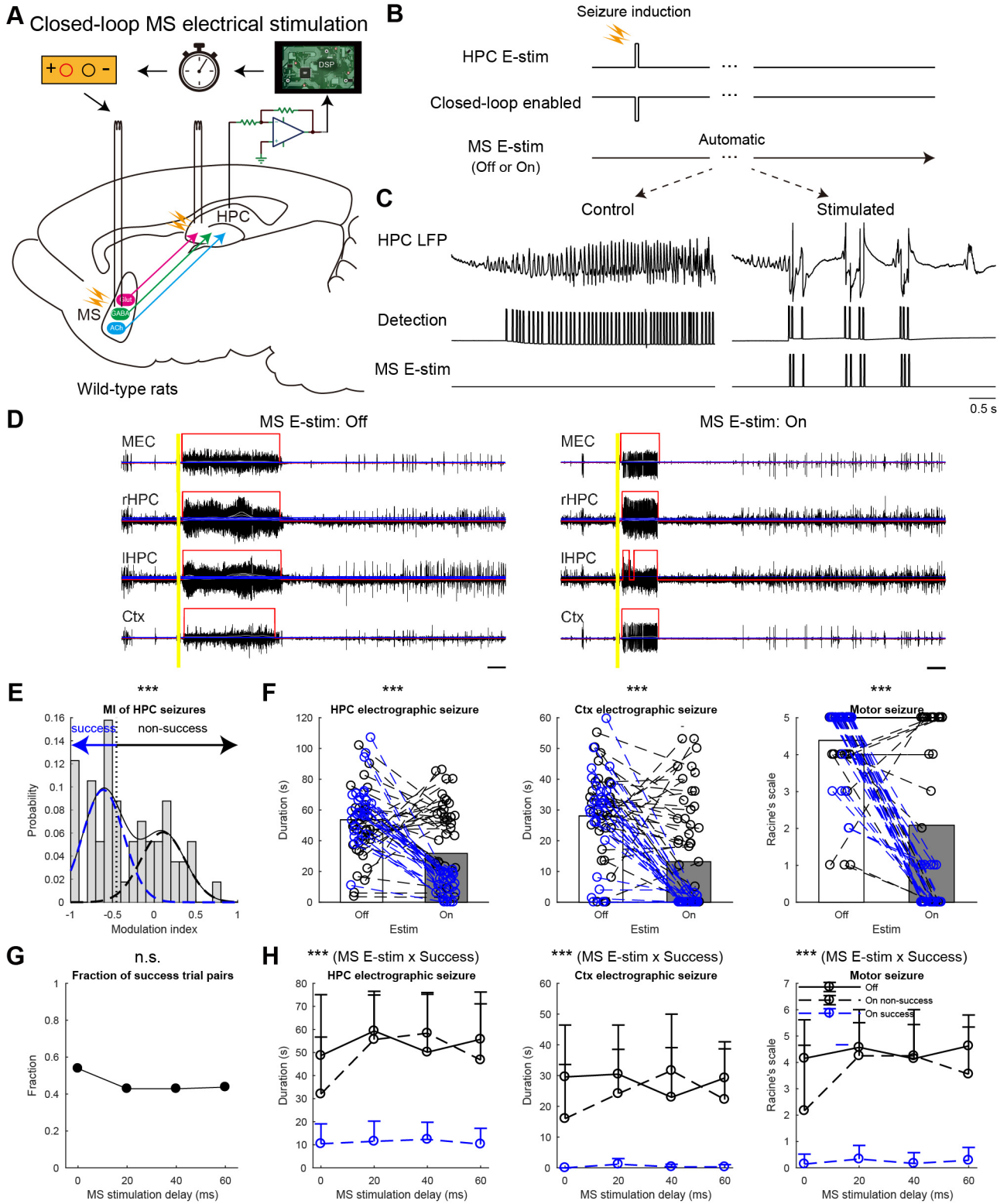


Fig. 3. Open-loop MS E-stim has no effects or promotes HPC seizures

(A) Schema of the experiment. (B) Open-loop responsive intervention. (C) Representative seizure waves induced by the supra-threshold stimulation w/o open-loop MS E-stim. Scale bars: 10 s. (D) Distribution of modulation indices (MIs) of duration of HPC seizures by MS E-stim. (E) Duration of HPC and Ctx seizures, and motor seizures. (F) Distribution of MIs. (G) The same conventions as (E) but with the clustered data. (H) Fractions of seizure-induced trials against MS E-stim frequencies. (I) MS E-stim frequency resolved representation of the data shown in (G).

＜内側中隔核の閉ループ刺激はてんかん発作を終息する＞

次に、内側中隔核の閉ループ電気刺激を検討したところ、約半数のトライアルにおいて発作が速やかに終息した（海馬および大脳皮質におけるてんかん波の持続時間が短縮）（図 4A-H）。この結果は、図 3 の検討のように内側中隔核を固定周波数で刺激するのみでは発作の終息に十分ではなく、海馬における発作（てんかん波）のリズムに合わせて刺激することが、発作終息作用の発現に必要であることを示唆する。各てんかん波の検出と刺激との遅延時間（0–60 ms）は、発作終息作用に影響しなかった。



4. Closed-loop seizure rhythm-driven MS E-stim terminates seizures of HPC-origin

(A) Schema of the experiment. (B) Close-loop seizure rhythm intervention. (C) HPC seizure waves w/o the MS E-stim. (D) Representative seizure waves w/o the MS E-stim. (E) Distribution of MIs. (F) Duration of HPC and Ctx seizures, and motor seizures with the clusters defined in (E). (G) Fractions of success trial pairs as a function of delays. (H) Delay time resolved representation of the data shown in (F).

＜内側中隔核 GABA 作動性ニューロンの閉ループ刺激は内側てんかん発作を終息する＞

内側中隔核には GABA 作動性ニューロン、コリン作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロンの 3 種類の神経細胞種が存在する。閉ループ刺激による抗てんかん作用の機序を解明する目的で、光遺伝学を利用してそれぞれの神経細胞種を特異的に刺激した。その結果、主に GABA 作動性ニューロンが内側中隔核の閉ループ刺激による発作終息作用を仲介することが明らかになった(図 5)。コリン作動性ニューロンおよびグルタミン酸作動性ニューロンの寄与はマイナーであった。

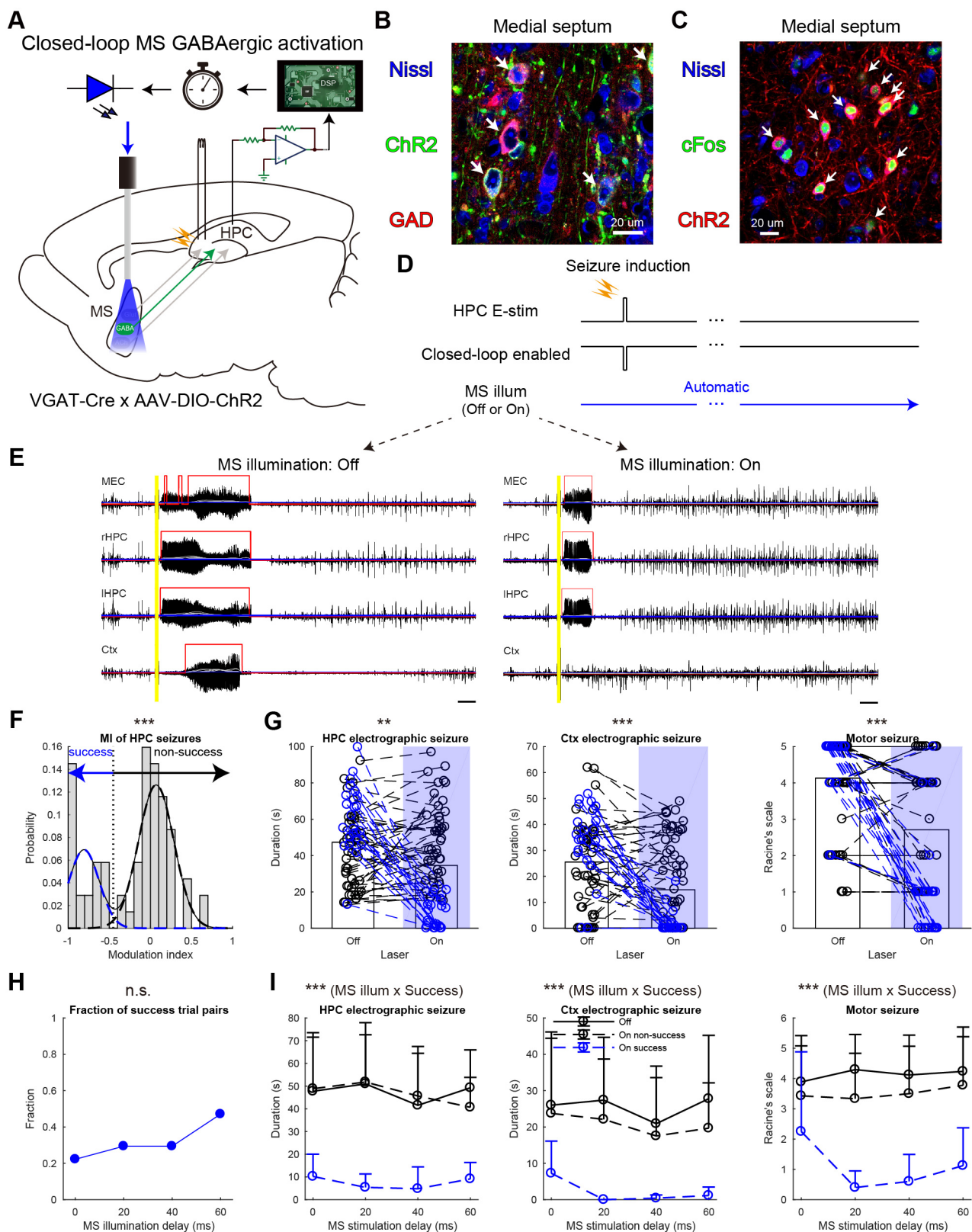


Fig. 5. Closed-loop seizure rhythm-driven activation of MS GABAergic neurons terminates seizures of HPC-origin

(A) Schema of the experiment. (B) ChR2 signals were colocalized with GABAergic neurons. (C) cFos expression was colocalized with ChR2 expressing neurons after illumination. (D) Closed-loop seizure rhythm intervention. (E) Representative seizures w/o the MS illumination. (F) Distribution of MI with the MS illumination. (G) Duration of HPC and Ctx seizures, and motor seizures with the clusters defined in (F). (H) Fractions of success trial pairs as a function of delays. (I) MS illumination delay resolved representation of the data shown in (G).

<内側中隔核コリン作動性ニューロンの刺激は発作感受性を低下する>

てんかん発作の前兆を検出した場合、内側中隔核刺激等を介して発作の発生や二次性全般化を防止できるかもしれない。そこで内側中隔核を予め1分間20 Hzで刺激することで、海馬における発作感受性を低下することが可能か検討した(図6)。その結果、20 Hzの電気刺激やGABA作動性ニューロンの刺激は発作感受性を亢進した。グルタミン酸作動性ニューロンの刺激は効果がなかった。一方、コリン作動性ニューロンの刺激は発作感受性を低下した。このため細胞種特異的に内側中隔核を刺激すれば、てんかん発作の発生を予防することは可能かもしれない。ただし20 Hz周波数(海馬由来てんかん発作の主要周波数)で単純に内側中隔核を電気刺激するとてんかん症状を増悪してしまうため、電気刺激の場合てんかんのリズムに合わせた閉ループ刺激が適当であることが示唆された。

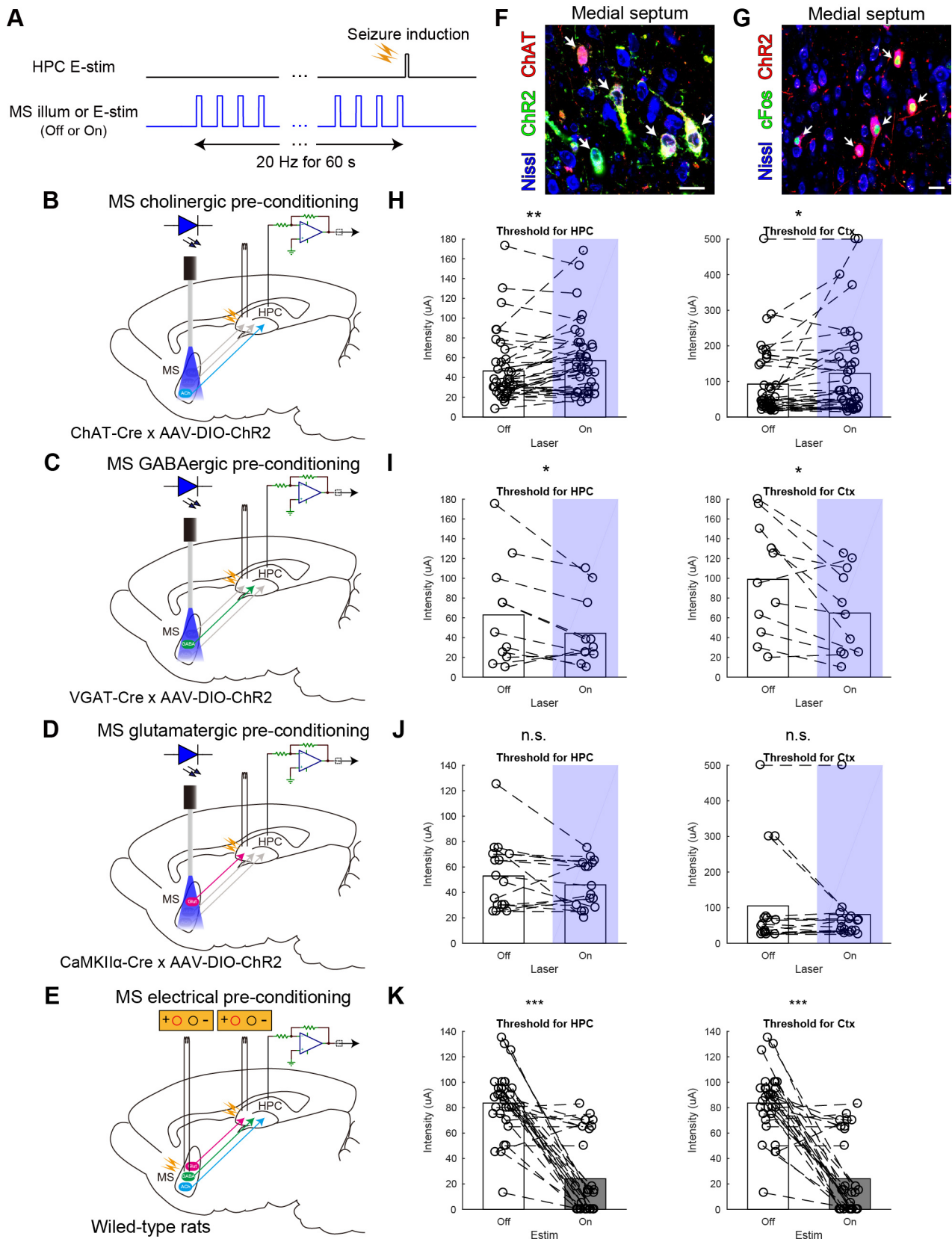


Fig. 6. MS cholinergic pre-conditioning decreases seizure susceptibility whereas MS E-stim pre-conditioning at seizure-like-frequency increases it

(A) Pre-conditioning procedure. (B–E) Schemata of the MS optogenetic pre-conditioning. (E) Schema of the MS electrical pre-conditioning. (F) ChR2 signals were colocalized with cholinergic neurons. (G) cFos expression was colocalized with ChR2 expressing neurons. (H–J) Stimulus intensity thresholds for inducing HPC and Ctx seizures w/o pre-conditioning. (K) Stimulus intensity thresholds for inducing HPC and Ctx seizures w/o electrical pre-conditioning.

2. 経頭蓋集束電気刺激法の開発

<経皮的および経頭蓋的電気刺激>

伝統的に臨床で用いられてきた経頭蓋電気刺激法に関して、どの程度の刺激が頭蓋内に到達し、それにより神経細胞の活動がどの程度修飾されているかは不明だった。そのため我々は、まずラットおよび死後数日以内のヒト献体を用い、経皮的および経頭蓋的に付加した電気刺激が頭蓋内にどの程度の電位勾配を生じ、その電位勾配がどの程度神経細胞の膜電位および活動電位に影響するか、細胞内記録および細胞外記録で検討した。その結果、頭皮により 50–80% の刺激電流がシャントされ、頭蓋内に到達しないことが明らかになった。特に神経細胞の発火頻度を修飾するためには、1 mV/mm 以上の頭蓋内電位勾配が必要であり、伝統的な経頭蓋電気刺激（～2 mA）では 1 mV/mm の電位勾配を生じ無いことが明らかになった。

<集束電気刺激装置の開発>

この問題を克服するため、我々は新しい経頭蓋集束電気刺激法（Intersectional Short Pulse：ISP 法）を開発した。ISP 法の原理は、2.5–10 μ s 幅の短い電気刺激ビームを複数の電極対間でタイミングをずらして適応し、刺激を焦点に集束するものである。さらに刺激焦点間の位相をずらすことで、脳内情報フローを自在に制御することも可能である（図 7）^{3,4)}。

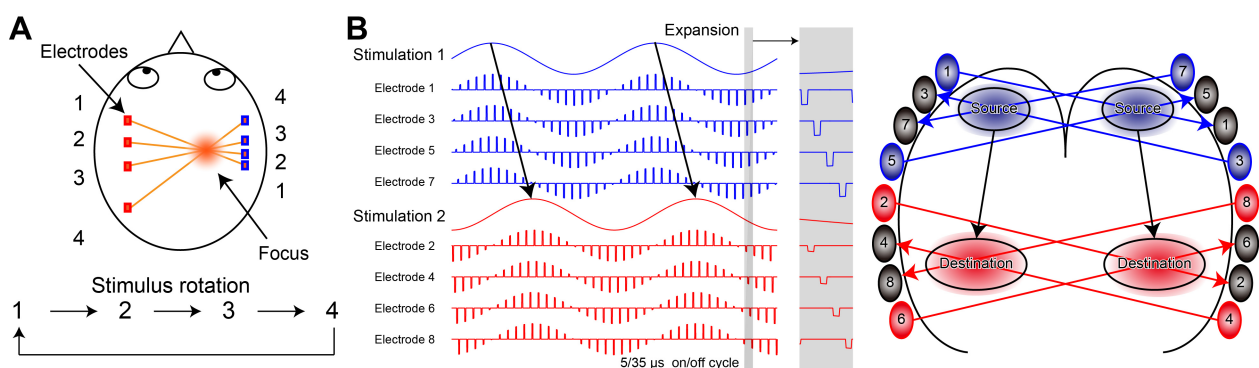


図 7. Intersectional Short Pulse stimulation: a focused transcranial electrical stimulation technology

pairs are located on the skull or scalp. Electrical stimulation was temporally interleaved at 5–25 μ s and rotated within the electrode pairs. The electrical field generated by the stimulation is focused to an arbitrary region of the brain. (B) Expansion of ISP technology for multiple focusing points with two distinct stimulus waveforms (left). Depending on electrode alignment and stimulus polarity, multiple brain regions can be stimulated using distinct stimulus waveforms causing the same effect (excitatory or inhibitory) on both hemispheres (right). Black arrows indicate information flows with phase differences. After Takeuchi Y. and Berényi A.⁴⁾

<ISP 法の刺激集束能の検証>

麻酔下ラットを用い、ISP 法の空間的に刺激集束能を検討した。すなわち麻酔下ラットで左右の海馬を刺激し分けることができるか検討したところ、右半球に集束した刺激は左側海馬の神経活動（神経発火）に影響を与えず、右側海馬における神経活動を優位に修飾することに成功した³⁾。

<ISP 法によるヒト脳活動の修飾>

健常ボランティアにおいて安静時脳波を測定し、ISP 法が脳活動を効果的に変調できるか検証した³⁾。脳波測定に加え、6 の刺激電極対を頭皮上に配置し、1 Hz（～9 mA）のサイン波 ISP 刺激を付加した。その結果、ISP 刺激は頭頂部（P3, P4）において、左右の大脳半球および刺激の位相選択的に α 帯活動を増強した。この脳活動修

飾作用は刺激後速やかに現れ、刺激後速やかに消失した。すなわち脳活動の長期間に渡る可塑的变化は認められなかった。ISP 法では、刺激強度を複数の電極対間で時間的に分配するため、従来法の 8 倍にあたる 16 mA まで刺激強度を上げることができた。副作用としては、8 mA 以上の強度で若干の平衡感覚異常、味覚異常、および体性感覚（刺激電極下の痛み）が認められた。

考察

本研究により、難治性側頭葉てんかんの新しい治療標的脳部位として、内側中隔核を見いだすことができた²⁾。内側中隔核を介するてんかん発作終息作用は主に GABA 作動性ニューロンを介しており、特に閉ループ刺激によりてんかん波のリズムに従って内側中隔核を刺激することが必要であった(図 8)。さらに新しい経頭蓋集束電気刺激法 (ISP 法) の開発に成功した³⁾。これらの成果を組み合わせることで、今後難治性てんかんの発作をオンデマンドかつ非侵襲的に制御することが可能になる可能性がある。

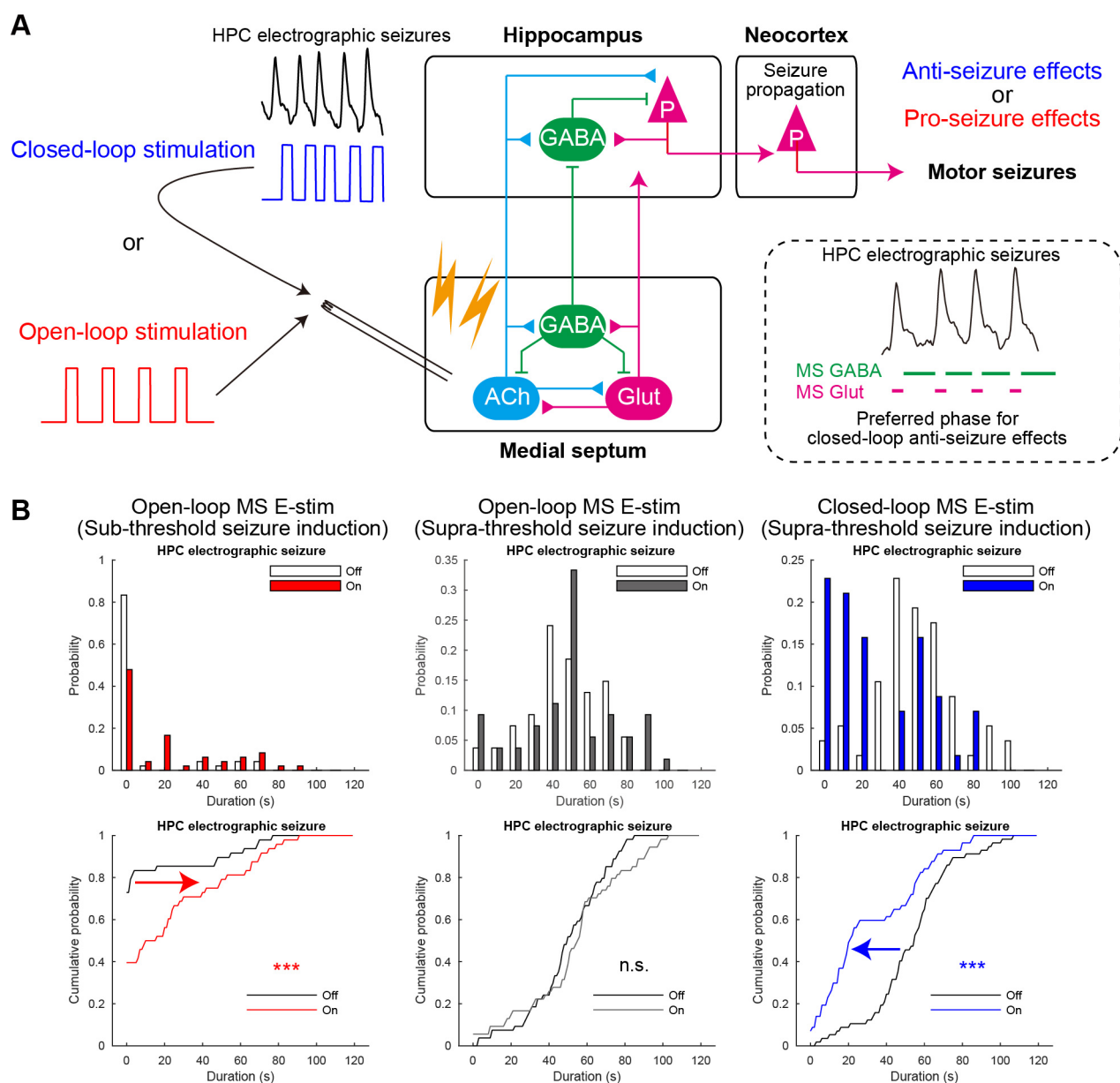


図 8. Summary

(A) Closed-loop seizure rhythm-driven MS E-stim is effective to terminate seizures of HPC-origin and successfully suppresses secondary generalization. Alternating activation of MS GABAergic and Glut neurons may underlie the seizure terminating effect. In contrast, open-loop responsive MS E-stim does not alter or rather promotes HPC seizures. (B) Distributions and cumulative probabilities of HPC seizure duration w/o MS E-stims. Data are from Figs. 3 and 4. The red and blue arrows indicate significant pro- and anti-seizure effects. Statistical significance was tested by two-sample Kolmogorov-Smirnov test. n.s., not significant; *** $P < 0.001$.

<内側中隔核刺激の臨床応用>

経頭蓋集束電気刺激法のさらなる技術開発により、将来非侵襲的に内側中隔核を刺激可能になるかもしれない。ただし現状では電極挿入による直接電気刺激（Deep Brain Stimulation：DBS）が現実的と考えられる。難治性てんかんの制御を目的とした DBS の標的脳部位としては、これまで視床前核、視床正中中心核、海馬体、小

脳皮質等が知られているが、それらの治療成績は報告により様々である。今後これらに加えて内側中隔核刺激が新たな治療のオプションとなる可能性がある。

内側中隔核刺激の応用について注意すべきは、実時間シグナル処理による閉ループ刺激が必要という点である。単純な開ループによる固定頻度刺激は、てんかんの症状を悪化させる可能性がある（図3、図6）。実時間シグナル処理には一定の計算力を備えた計算機が必要であるが、近年の計算機技術の発達により、計算速度の問題は解決可能であると考えられる4）。閉ループ制御の安定性、安全性は十分に検討する必要がある。

<経頭蓋集束電気刺激法の臨床応用>

動物実験に関して、今後ヒツジなどより人間の脳の大きさに近い動物で実験を進め、刺激効率や集束能に関して改良を積み重ねる予定である。ヒトへの応用に関して、既に本研究において健常者での効果を確認することができた。現在病態時における概念実証を目的として、難治性てんかん患者を対象にした臨床研究を計画している。装置実装に関して、刺激素子として電気刺激を採用しているため、ISP法の装置の小型化は超音波刺激や磁気刺激に比較して易しいと考えられる4,5）。実際セゲド大学のBerényi博士が中心となり、ISP法を用いた刺激装置（ウェアラブル装置）の実装に取り組んでいる（<https://neunos.com/>）。

<その他の刺激モダリティについて>

ヒト内側中隔核の非侵襲的刺激に関して、経頭蓋集束電気刺激法の他に、集束超音波刺激法やラジオ波を利用した脳活動介入法がある（第43回日本神経科学大会、シンポジウム1S06a：神経・精神疾患のリアルタイム制御に向けて：閉ループ制御技術と非侵襲的脳活動介入法の最前線）。特に超音波刺激は、近年ナノポリマーを利用した刺激素子の利用により刺激効率や小型化技術を格段に改善できる可能性があり、我々も研究開発を進めている（<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-18KK0236/>）。

発表論文・参考文献

- 1) Takeuchi Y., Harangozó M., Pedraza L., et al.: Automated, closed-loop stimulation of the medial septum alleviates temporal lobe epilepsy in rats. J Physiol Sci. 2019; 69: S144.
- 2) Takeuchi Y., Harangozó M., Pedraza L., et al.: Closed-loop stimulation of the medial septum terminates epileptic seizures. bioRxiv. 2020; <https://doi.org/10.1101/2020.03.09.982827>
- 3) Vöröslakos M., Takeuchi Y., Brinyiczki K., et al.: Direct effects of transcranial electric stimulation on brain circuits in rats and humans. Nat Commun. 2018; 9: 483.
- 4) Takeuchi Y. and Berényi A.: Oscillotherapeutics – Time-targeted interventions in epilepsy and beyond. Neurosci Res. 2020; 152: 87-107.
- 5) Takeuchi Y.: Development of on-demand interventions of epileptic seizures and a quantitative method of seizure susceptibility. Medical Science Digest. 2020; 46: 118-121.