

## [研究助成 (A)]

## 経頭蓋集束超音波刺激によるてんかん発作のオンデマンド制御

## Closed-loop control of epilepsy with transcranial ultrasound irradiation

2221019



研究代表者	北海道大学 大学院薬学研究院	准教授	竹内 雄一
共同研究者	北海道大学 大学院情報科学研究院	学術研究員	工藤 信樹

## [研究の目的]

てんかん患者は性別人種に関わらず人口の約1%を占め、就学就労妊娠制限等社会にコストを生じるため、その適切な制御は社会的課題である<sup>[1]</sup>。てんかん患者の約7割は薬剤でその発作を制御可能であるが、約3割の患者は薬剤抵抗性である<sup>[2]</sup>。薬剤抵抗性患者に対して、発作の焦点が明らかで切除可能な場合は焦点の外科的切除が有効である。しかしながら外科的切除は高度に侵襲的で且つ不可逆的であるため、薬物治療と外科的切除の間に新しい治療選択肢が求められている。そのため研究代表者らは、時間特異的脳活動介入法および脳深部刺激法を組み合わせたてんかん発作の制御法を開発してきた<sup>[3-5]</sup>。当該法は時間特異的な介入法によって生理的な脳活動阻害による副作用を軽減しつつ、脳実質の切除を行わないため、不可逆性の課題を解決した。しかしながら脳実質への刺激電極を刺入するため侵襲性の課題は残った。非侵襲的脳刺激法によるてんかん制御法の開発が求められている。

そのため最近研究代表者らは、超音波による経頭蓋ニューロモデュレーション法の研究開発に取り組んでいる<sup>[6]</sup>。超音波は従来の経頭蓋脳刺激モダリティである電気刺激や磁気刺激に比べて刺激の空間解像度に優れ、脳深部刺激も可能である<sup>[7]</sup>。さらに超音波は既に脳部位特異

的な経頭蓋熱凝固やドラッグデリバリーシステム、または体外衝撃波結石破碎などで臨床応用されている安全なモダリティである。そこで本研究では、時間特異的刺激法と経頭蓋超音波ニューロモデュレーション法との組み合わせによる、てんかん発作の非侵襲的な閉ループ制御法の開発を目的とした。具体的には、1. 覚醒頭部固定てんかんモデルラット標本におけるてんかん発作の閉ループ制御法の開発、および2. 小型オンヘッド集束超音波照射装置の開発、を実施した。本研究は、北海道大学における動物実験審査委員会の承認(21-0109, 21-111)を得て実施した。

## [研究の内容, 成果]

## 1. 覚醒頭部固定てんかんモデルラット標本におけるてんかん発作の閉ループ制御

## 【序論】

新規てんかん制御法創出のため、てんかんモデルラットにおいて、閉ループ経頭蓋超音波照射法を開発した。

## 【材料, 方法】

- ① モデル動物：雄性 Long-Evans ラット (3-12ヶ月齢) を用いた。この系統は加齢に伴い、自発的な欠神発作を生じるようになる。
- ② 覚醒下頭部固定システム：1-2% イソフルラン麻酔下において、動物の頭蓋骨上に頭部

固定用 U 字型フレームを慢性留置し、左半球の大脳皮質 (S1, M1) および海馬 (HPC) にタングステン線記録電極 (CFW) を留置した (図 1)<sup>[3,8]</sup>。更に頸部の筋肉に筋電記録用ステンレススチール撚線電極 (793200, A-M Systems) を留置した。手術の回復後、動物を覚醒下に頭部および体部を固定される実験環境に順化した (図 1)。

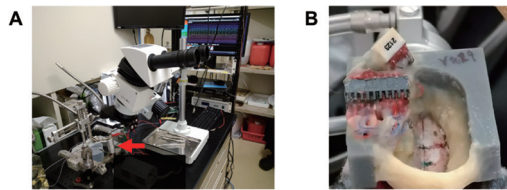


図 1 覚醒下頭部固定脳活動記録システム, (A) システムの外観。矢印は超音波トランスデューサーを示す。(B) 動物の頭部。左半球から脳活動を記録し、右半球に経頭蓋超音波照射を行った。

③ 神経および筋活動計測：上記のタングステン線電極およびステンレススチール電極より脳内局所電場電位および筋電記録を行った。各電位は増幅器 (C3335, Intan) で 192 倍に増幅し、データ収録装置 (C3004, Intan) を介して PC に記録および実時間シグナル分析装置に送達した。

④ 実時間シグナル分析：実時間シグナル分析装置 (RX8, TDT) を用いて信号を欠神発作の周波数帯 (5-15 Hz) でフィルターし、各動物およびチャンネルごとに適切な閾値を設定した。閾値を超えるシグナルの検出ごとに、下記の超音波照射装置をトリガーした。

⑤ 超音波刺激：超音波振動子および駆動装置は NepaGene 社の ST-T1-3 および KTAC-4000CE を用いた。振動子を動物の大脳皮質一次体性感覚野 (S1) 直上の頭蓋骨上に留置し、臨床用超音波ゲルでカップリングした。各トリガーによって照射される超音波のパラメータは以下の通りである：0.894 MHz, Duty ratio: 50 %, Pulse repetition frequency: 100 Hz, Duration: 1 s, Intensity : 2-4 W/cm<sup>2</sup>。

## 【結果】

図 2 に覚醒 Long-Evans ラットから記録される頭蓋内局所電場電位 (Local Field Potential: LFP) および筋電 (electromyogram: EMG) の典型例を示す。LFP および EMG 記録により、容易に各脳状態 (覚醒, 睡眠, 欠神発作) をオンライン検出できた。

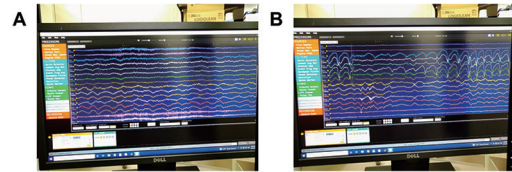


図 2 計測の典型例, (A) 覚醒時の頭蓋内局所電場電位および筋電図記録, (B) 典型的な欠神発作

オンライン検出した欠神発作エピソードに上記パラメータの超音波を即時経頭蓋照射したところ、欠神発作エピソードの即時終息を達成できた (図 3A)。5-15 Hz 帯の欠神発作エピソードが超音波照射後に終息していることが確認できる (図 3B)。

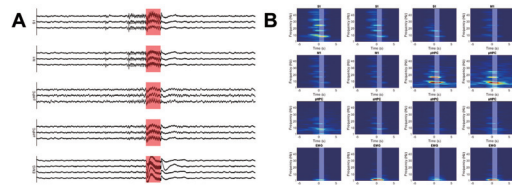


図 3 経頭蓋超音波照射によるてんかん発作の即時終息, (A) 局所電場電位および筋電図記録。赤部分は 1 秒間の超音波照射を示す。(B) 超音波照射前後の各脳部位における局所電場電位の時間周波数スペクトル。

## 【考察】

本研究により、オンデマンド経頭蓋超音波照射による欠神発作の制御をプレリミナリーに達成できた。発作の即時終息メカニズムの詳細は未だ不明であるが、超音波が欠神発作リズムを生じる脳内神経回路である大脳皮質一次体性感覚野-視床ループを発作エピソードの初期において断ち切った可能性がある。

## 2. 小型オンヘッド集束超音波照射装置の開発 【序論】

自由行動下動物における経頭蓋集束超音波ニューロモデュレーションおよびウェアラブル医療機器の実装を目指し、小型集束超音波照射装置の開発を行った。

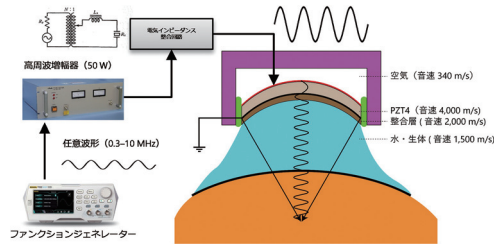


図4 経頭蓋集束超音波照射装置の作製

### 【材料, 方法】

① 小型超音波振動子の作製：中心周波数1, 5, 10 MHz, 直径10 mm, 焦点距離10 mmのチタン酸ジルコン酸鉛 (PZT) 振動子を特注作製した (富士セラミックス) (図5A)。当該振動子を収納するケースを光造形3Dプリンター (Form 3+, Formlabs) で作製し (図5B), エポキシ系接着剤で振動子をケースに固定した。振動子前面には音響整合層をつけず, 背面はエアバックとした。その後, 振動子の共振周波数におけるインピーダンスを測定し, パルストランスを用いて駆動用高周波増幅器 (T145-4726AA, Thamway) の出力インピーダンスと整合した。振動子の駆動波形生成には一般的なファンクションジェネレーター (DG992, Rigol) を用いた。

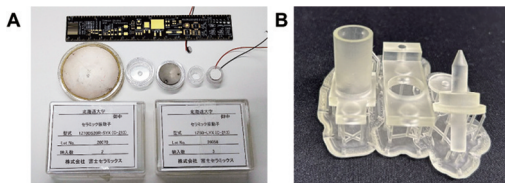


図5 小型超音波照射装置の開発, (A) 振動子の小型化, (B) 3Dプリンターによるケースの作製

### ② 小型超音波振動子の評価

振動子のインピーダンスは, 振動子と直列に接続した基準抵抗とのそれぞれに負荷される交

流電圧の振幅比により求めた。振動子の音響出力は音響放射法により計測した。吸収体には音響吸収タイル (EUA201A, Eastek) を用い, 放射力を分解能1 mgの電子天秤 (FX-300i, A&D Company) で計測した<sup>[9]</sup>。超音波振動子の音場分布はk-Waveソフトウェアを用いてシミュレーションするとともに<sup>[10]</sup>, Pulser/Receiver (1050 PRJ/ Accu-Tron) およびマイクロコンピュータ (David Kopf) を用いて3次元的に計測した。音圧の測定は, ニードル型ハイドロフォン (NH0500型, Precision Acoustics, U. K.) を用いて実施した。

### 【結果】

製作の一例として, 1 MHz振動子のインピーダンスを計測した結果, 実際の中心周波数は0.95 MHzであり, 当該周波数におけるインピーダンスは約200 Ωであった (図6A)。高周波増幅器の出力インピーダンスが50 Ωであるため, パルストランスにより電気インピーダンス整合を行った (図6B)。その結果, 超音波振動子の出力エネルギー (音響放射力) が著明に増加した (図6C)。

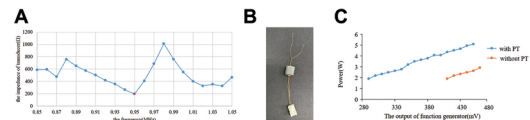


図6 超音波振動子駆動回路の電気インピーダンス整合, (A) 振動子のインピーダンス計測, (B) インピーダンス整合用パルストランス回路 (PT), (C) インピーダンス整合回路付加による出力 (音響放射力) の改善

次に, 球面状に成形した超音波振動子から生じる音場分布をシミュレーションおよび計測により求めた。k-Waveシミュレーター (MATLAB ツールボックス) により, 1, 5, 10 MHz振動子の音場分布を計算したところ, 設計通りの10 mm付近に焦点を得た (図7A)。次に超音波パルスレーバおよび3次元マイクロコンピュータを用いて, 音場分布を3次元的に実測した。5 MHz振動子の音場分布の一例を図7Bに示す。集束超音波ビームの方位方向 (XY平面) に0.5 mm程度および長軸方向

(Z 軸) に 1.0 mm 程度の焦点を得た。焦点の大きさは周波数依存であり、超音波の周波数が大きいほど焦点のサイズは小さかった。

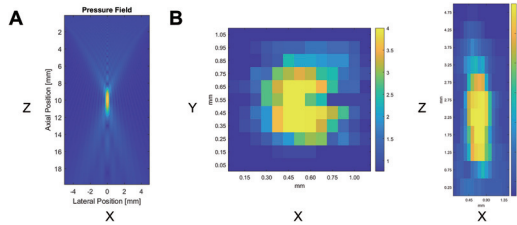


図7 集束超音波振動子からの出力の音場分布, (A) 5 MHz 振動子の音場分布のシミュレーション結果の一例, (B) パルサレーバを用いた音場分布の計測結果の一例

さらに超音波振動子の出力音圧レベルをハイドロフォンで実測した (図 8A, B)。その結果, 例えば 5 MHz 振動子の焦点付近で 0.5 MPa 以上の音圧を認めた (図 8C, D)。即ち超音波ニューロモデュレーションに十分な出力音圧を確認できた。

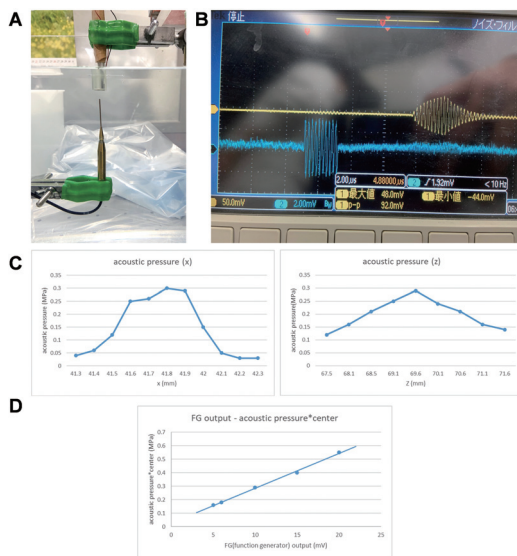


図8 超音波振動子からの出力音圧測定, (A) 水槽内で振動子下に設置したハイドロフォン, (B) 振動子駆動波形 (青) および焦点音圧波形 (黄), (C) 計測した音圧の分布, (D) 駆動波形電位と焦点における音圧の関係

### 【考察】

本研究により, げっ歯類の頭蓋上にも慢性留置可能なほど小型な集束超音波照射装置を作出できた。

### 【今後の研究の方向, 課題】

本研究により, 超音波ニューロモデュレーション法によるてんかん発作の閉ループ制御を達成できた。今後は, 今回作出した小型集束超音波照射装置を用いて自由行動ラットにおけるてんかん発作の閉ループ制御に挑む予定である。また今回は欠神発作をモデルに主に大脳皮質を超音波ニューロモデュレーションの標的にしたが, 新たに作出した集束超音波照射装置を用いて, 深部脳領域を標的にしたてんかん発作の閉ループ制御を行いたい。また深部脳領域が標的可能になったことで, 梨状皮質等大脳辺縁系のニューロモデュレーションを介したうつ病等精神疾患の制御にも挑むことが可能になった<sup>[1]</sup>。今回は自由行動ラットを対象にした集束超音波照射装置 (1-10 MHz, 直径 10 mm) を作製した。今後, より小型のげっ歯類であるマウスを対象にした装置を開発する。その際, 例えば直径 5 mm の円盤状振動子に小型のアコースティックレンズを組み合わせることを予定している。

### 【成果の発表, 論文など】

1. 三村聡優, チャン ミシェル, 南雅文, 竹内雄一, 経頭蓋ソノポレーションによる大脳神経細胞を標的とした新規遺伝子導入法, 日本薬学会第 143 年会, 札幌, 3月 25-28日, 2023.
  2. 三村聡優, チャン ミシェル, 南雅文, 小俣大樹, 鈴木亮, 竹内雄一, 経頭蓋ソノポレーションによる非侵襲的遺伝子導入法の開発, 日本薬学会北海道支部第 150 回支部例会, 札幌, 5月 21日, 2023.
- その他, 以下の演題を第 46 回日本神経科学大会 8月 1-4日, 2023, 仙台にて発表予定である。

Yoshida K, Minami M, Takeuchi Y, A closed-loop transcranial ultrasound irradiation system for an awake rat model of absence epilepsy.

### 【参考文献】

- [1] Kwan P, Schachter SC, Brodie MJ: Drug-resistant epilepsy. *N Engl J Med* 365 (10): 919-26, 2011.
- [2] Chen Z, Brodie MJ, Liew D, Kwan P: Treatment

- outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs: a 30-year longitudinal cohort study. *JAMA Neurol* 75 (3): 279-86, 2018.
- [ 3 ] Takeuchi Y and Berényi A: Oscillotherapeutics – Time-Targeted Interventions in Epilepsy and Beyond. *Neurosci Res* 152: 87-107, 2020
- [ 4 ] Takeuchi Y, Harangozó M, Pedraza L, Földi T, Kozák G, Li Q, and Berényi A: Closed-Loop Stimulation of the Medial Septum Terminates Epileptic Seizures. *Brain* 144 (3): 885-908, 2021.
- [ 5 ] Takeuchi Y, Nagy AJ, Barcsai L, Li Q, Ohsawa M, Mizuseki K, and Berényi A: The Medial Septum as a Potential Target for Treating Brain Disorders Associated with Oscillopathies. *Front Neural Circuits* 15: 701080, 2021.
- [ 6 ] 竹内雄一, 関和彦: 超音波ニューロモデレーション. *Clin Neurosci* 40 (2): 249-253, 2022.
- [ 7 ] Vöröslakos M, Takeuchi Y, Brinyiczki K, Zombori T, Oliva A, Fernández-Ruiz A, Kozák G *et al.*: Direct Effects of Transcranial Electric Stimulation on Brain Circuits in Rats and Humans. *Nat Commun* 9: 483, 2018.
- [ 8 ] Takeuchi Y: RatHeadFixRestraintSystem. figshare. Dataset. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5466355.v1>, 2018
- [ 9 ] 工藤信樹: 超音波測定法の原理と実際. *超音波医学* 43 (6): 719-721, 2016.
- [10] Treeby BE and Cox BT: K-Wave: MATLAB Toolbox for the Simulation and Reconstruction of Photoacoustic Wave Fields. *J Biomed Opt* 15 (2): 021314, 2010.
- [11] Li Q, Takeuchi Y, Wang J, Gellért L, Barcsai L, Pedraza LK, Nagy AJ *et al.*: Reinstating Olfactory Bulb-Derived Limbic Gamma Oscillations Alleviates Depression-like Behavioral Deficits in Rodents. *Neuron* 111, Available online, May 9, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.04.013>