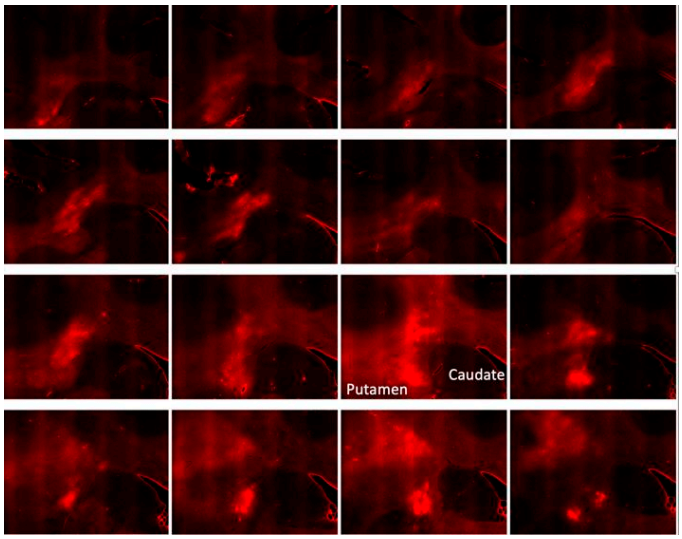
83　経頭蓋集束超音波による非侵襲的な脳深部刺激法の確立	関　和彦

【目的】生体への超音波刺激が神経組織の活動を変化させることは古くから知られている。しかしながら、超音波を頭蓋骨経由で行う tFUS についての試みは新しく、先行研究は少ない。例えば、齧歯類（ラットなど）を対象とした超音波による脳刺激の試みは世界数箇所で行われているが、再現性のある結果は出ていない。超音波を集束させる tFUS の技術は、頭蓋の小さい齧歯類では困難なことが一因である。また、頭蓋の大きいヒトやマカクサルにおける tFUS 研究も始まっているが、超音波の集束技術が確立していないため、刺激効果は小さく、再現性も低い。近年、サルをモデルにしてヒトを対象とした tFUS 技術を確立する試みが、中国において始まっているが、日本では少ない。国外で開発された MRI 一体型の tFUS 装置は超音波の集束が可能であり、同等な装置は日本にも数台導入されているが、その主目的は脳組織の熱凝固治療であり、ニューロモジュレーション目的の利用は基礎研究レベルでさえ行われていない。またその導入には高いコストがかかり、気軽に導入することができないのが現状である。そこで本研究では比較的簡便に用いることができる tFUS 装置を開発し、その効果を動物実験により検証する方法論を確立することを目的とする。

【方法】麻酔下のサルを専用のチェアに座らせ、チェアに安定的に tFUS 刺激装置を取り付け、その際、脳内標的焦点までの距離を調節できるよう、頭部上にウォータープールを作り、プール上に刺激装置を固定できるようにした。次に、サルを CT 装置（既存）に移動し、上腕静脈から CT 造影剤とマイクロバブルを投与し、同時に超音波刺激を行いながら、脳軟部組織の CT 撮像を行った。そして、CT によって脳内に造影剤の滞在が観察されるまで、超音波刺激方法やマイクロバブルの注入法・スピードなどの改善を行った。さらにこの方法によって、エバンスブルーを標的部位に導入することを行った。標的領域に造影剤が再現性高く認められるまで、刺激パラメタを調節した。一方、ラットに同様な実験を行い、tFUS による脳活動誘発を試みた。

【結果】従来開発してきた tFUS 制御システムをサル用にアレンジして、各種シミュレーションによってその機能確認を行ったのち、実際のトランスデューサを開発し、それらが充分な集束精度、焦点強度、頭蓋骨透過補正特性を持つことを確認した。その後、サル CT-MRI 画像の合成マップによる評価系の確立、アンギオグラフィーによる血管造影技術を麻酔下のサルを対象に確立した。また齧歯類を対象に、tFUS 照射パラメタとマイクロバブル投与量などの最適化を行い、tFUS によって脳活動が誘発できることを、四肢の動きを確認することによって証明した。

マカクサルを対象とした tFUS による BBB オープニングの証明



83. 経頭蓋集束超音波による非侵襲的な脳深部刺激法の確立

関　和彦

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 モデル動物開発研究部

Key words：経頭蓋超音波照射，霊長類，血液脳関門，神経活動操作，治療

緒　言

ニューロモジュレーションは、生体外から人工的な刺激を与えることにより神経活動を変化させる手法である。近年、この方法は精神・神経疾患や脳血管障害に対する治療にとても有効なツールとなっている。例えば疾患や損傷によって活動性が低下した脳領域やその代償領域を外部刺激によって賦活し、機能を再建する治療などである。従来は「電気」か「磁気」を媒介とした刺激方法が用いられてきた。頭蓋上に電気刺激を与えることによって神経軸索が興奮し、感覚や運動が引き起こされる（直流電気刺激法）。磁気刺激を用いると、痛みや熱損傷などのリスクなく、同様のことが実現できる（例：経頭蓋的磁気刺激）。しかしこのような従来法には空間解像度の低さ、空間選択性の低さ、侵襲度の高さなどの欠点がある。本研究では、このような磁気や電気刺激の有する上記の限界を補完できる方法として「経頭蓋的集束超音波刺激：Transcranial Focused Ultrasound Stimulation（tFUS）」に注目する。刺激プローブ内に多数の小型超音波素子を配置し、個々の素子へ与える刺激の位相と方向を調節することにより、各素子から発生する音波の集束点の大きさと位置を制御する技術である。この方法によって、サブミリオーダー領域に限定した刺激（高空間分解能）、プローブから遠い対象に限局した刺激（高空間選択性）、外科手術なしに脳深部などを刺激（非侵襲性）が実現できる可能性がある。生体への超音波刺激が神経組織の活動を変化させることは古くから知られている［1］。その細胞レベルでのメカニズムも研究されている［2］。しかしながら、超音波を頭蓋骨経由で行うtFUSについての　試みは新しく、先行研究は少ない。例えば、齧歯類（ラットなど）を対象とした超音波による脳刺激の試みは世界数箇所で行われているが、再現性のある結果は出ていない。超音波を集束させるtFUSの技術は、頭蓋の小さい齧歯類では困難なことが一因である。また、頭蓋の大きいヒトやマカクサルにおけるtFUS研究も始まっているが、超音波の集束技術が確立していないため、刺激効果は小さく、再現性も低い。近年、サルをモデルにしてヒトを対象としたtFUS技術を確立する試みが、中国において始まっているが、日本では少ない。国外で開発されたMRI一体型のtFUS装置は超音波の集束が可能である。同等な装置は日本にも数台導入されているが、その主目的は脳組織の熱凝固治療であり、ニューロモジュレーション目的の利用は基礎研究レベルでさえ行われていない。またその導入には高いコストがかかり、気軽に導入することができないのが現状である。そこで本研究では比較的簡便に用いることができるtFUS装置を開発し、その効果を動物実験により検証する方法論を確立することを目的とする。

方　法

本研究では、主として齧歯類を対象とした研究、およびサルを対象とした研究を行った。サルを対象とした研究では、麻酔下のサルを専用のチェアに座らせ、樹脂性のヘルメット型頭部固定装置で、サル頭部をチェアに固定した。さらにチェアに安定的にtFUS刺激装置を取り付け、その際、脳内標的焦点までの距離を調節できるよう、頭部上にウォータープールを作り、プール上に刺激装置を固定できるようにした。次に、サルをCT装置（既存）に移動し、上腕静脈からCT造影剤とマイクロバブルを投与し、同時に超音波刺激を行いながら、脳軟部組織のCT撮像を行った。超音波が照射された局部のマイクロバブルの振動によって、血液脳関門が一時的に開放され、上記造影剤が脳内に流入・滞在する。従って、造影剤導入部位を撮像することにより、超音波照射部位が正確に同定できるシステム開発を行った。そして、CTによって脳内に造影剤の滞在が観察されるまで、超音波刺激方法やマイクロバブルの注入法・スピード

などの改善を行った。この造影剤における、脳定位実験の精度をさらに検討するため、刺激効果を神経解剖学的に検討した。具体的には上記方法によって、エバンスブルーを標的部位に導入することを行った。エバンスブルーは分子量の大きな色素であり、通常の静脈注射では BBB を通過しないが、tFUS によって標的部位に導入することが可能になるはずであった。標的は、刺激効果を上肢運動の有無によって簡便に確認ができる脳深部領域、赤核（赤核脊髄路の起始核）、または臨床的に応用価値の高い大脳基底核であった。上記手法で当該領域に造影剤が再現性高く認められるまで、刺激パラメタを調節した。具体的には、サル超音波シミュレーターを用いて、上記標的への刺激に最適な刺激変数を計算して求める。その後、その変数を用いて実際に tFUS 刺激し、標的領域への造影剤の導入をあらかじめ別に撮像しておいた MRI 画像と CT 画像のハイブリッド画像により評価した。

上記の方法で tFUS 刺激領域の評価系を確立した後、齧歯類を対象に、BBB オープニングの POC 及び、神経興奮誘発に必要なマイクロバブルの流量や濃度などの最適パラメタを確立し、将来的なサルを対象とした運動誘発実験の基礎資料を得た。

結果および考察

1. 超音波照射システム開発

まず、我々がこれまで開発してきたシステム［3］を応用し、サルを対象とした超音波照射システムを開発した。摘出頭蓋骨と生体組織を用いた照射評価システムを構築し、シミュレーションのバリデーションが行えることを確認した。いくつかの方法の中から、タイムリバーサル法を用いた頭蓋骨透過補正が可能であることを見出した。これにより照射制御方法を確立した。次に、サル実験に用いることが可能な tFUS トランスデューサの設計・試作を行った。上記の評価システムを用い、高低 2 種の tFUS トランスデューサを試作し、充分な集束精度、焦点強度、頭蓋骨透過補正が可能であることを確認した。また、個々のサルの頭蓋形状には個体差があり、開発された照射パラメタなどでは十分な BBB オープニングが実現できない可能性がある。そこで、CT データなどのサル頭蓋骨の実データを取り込み、頭蓋伝搬をシミュレーション可能な系を構築し、その妥当性を確認した。またこのシミュレーション結果に基づいた設計より、2 種類の tFUS トランスデューサの試作を行い、充分な集束精度、焦点強度、頭蓋骨透過補正が可能であることを確認した。

2. 血液脳関門オープニングの評価系 1：CT と MRI の合成マップ

次に、実験利用する動物数を最小限にするために、非侵襲的に BBB オープニングを評価する方法を段階的に開発した。図 1 はマカクサルの頭蓋骨（CT）と脳構造（MRI）の合成マップである。まず同一個体の MRI 構造画像と頭蓋部の CT 画像を取得した後、両 3 次元画像を耳腔と鼻腔位置を用いてアラインし、合成したマップの 1 断面を示している。この例に示されるように、本研究ではまず、マカクサルの MRI 及び CT 撮像環境を整え、撮像技術を確立した。その後、さらにそれらのアラインに必要なソフトウェア（Cicerone）を開発元のミネソタ大学から使用許可を受けてこの画像合成に使用した。同じソフトウェアを用いて、合成された画像の座標上に電極や超音波プローブの配置のシミュレーションをすることも可能であり、tFUS で赤核など脳深部を標的とする場合に必須の技術要素が確立した。

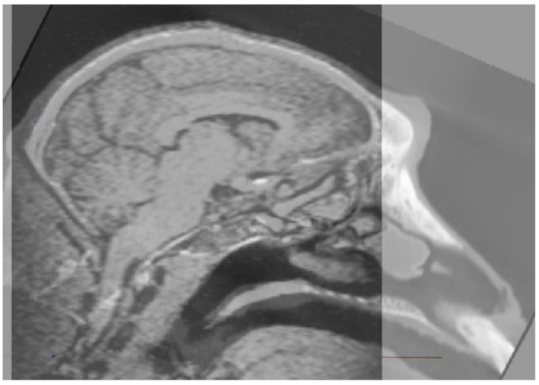


図 1. 頭蓋骨－脳構造融合マップ

3. 血液脳関門オープニングの評価系 2：アンギオグラフィー

次に、マカクサルの脳内 BBB オープニングを非侵襲的に評価するために、CT アンギオグラフィー技術の開発を行った。図 2 はコーンビーム型 CT で撮像した灌流固定後サル頭部の CT 画像から CT 値を基準に脳血管走行を再構築した例である。図左の脳底部に血管構造が明らかである。図右上は別アングルからの拡大図であり、ウィリス動脈輪が顕著である。この血管造影技術により、tFUS による DDS（造影剤の血管外への漏洩）が定量的に評価できる可能性が明らかになった。そこで、次に麻酔下のサルをモンキーチエアに座らせ、静脈ラインから造影剤を注入しながら血管造影を行った。図 3 は造影剤注入直後と 1 分後の上腕血管像である。注入直後は血管の構造が明瞭であるが、1 分後にはそれらが不明瞭になっていた。この結果は、造影剤を用いた脳内血管のアンギオグラフィーには critical timing があり、その時間幅で撮像を行うことができるようなプロトコルの確立が重要であることを示唆していた。次に、脳内血管のアンギオグラフィーを行った。図 3 は成功した一例である。造影剤投与開始後、1 分間の撮像において、中大脳動脈や全大脳動脈など主要な脳動脈だけでなく、比較的細い動脈も視覚化されていた。したがって、本方法を用いれば tFUS を用いた BBB オープニングを非侵襲的に評価することが可能になる。

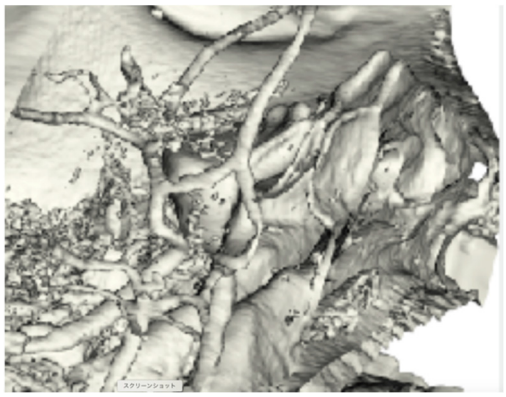


図 2. サル CT アンギオグラフィー

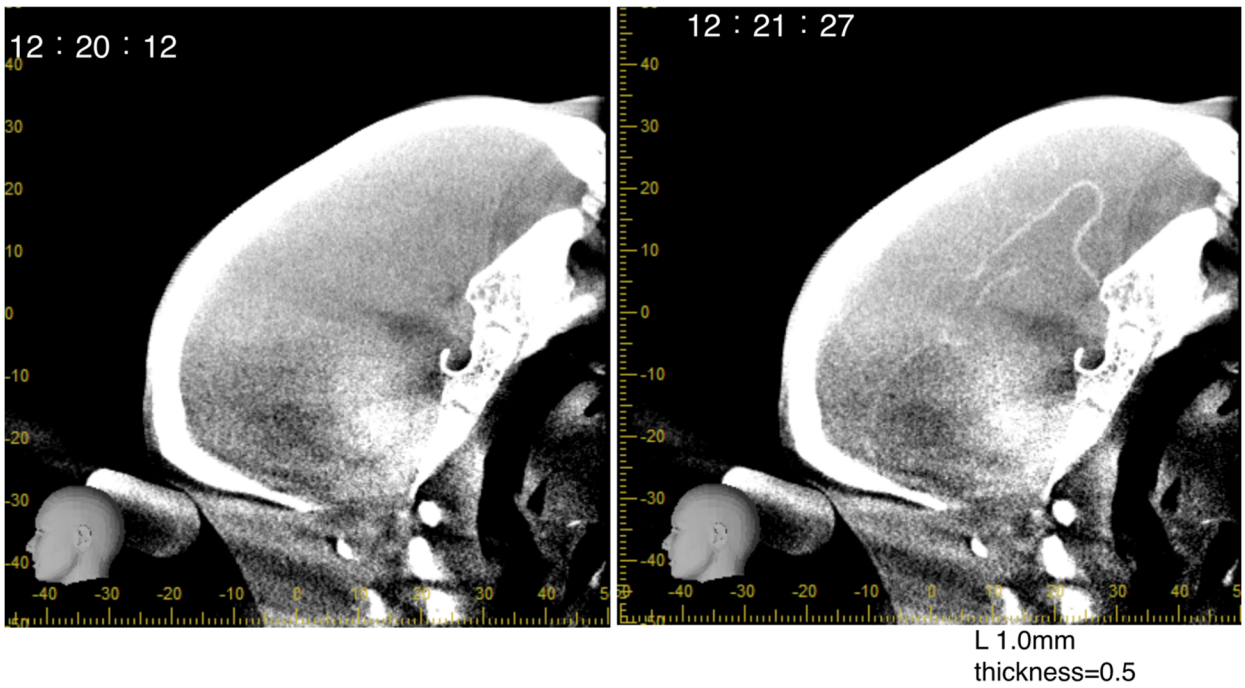


図 3. 造影剤を用いたアンギオグラフィーの例

4. tFUS を用いた BBB オープニング実験結果

次に、麻酔下のサルを対象にマイクロバブル投与下での tFUS によって、BBB オープニングを試みる実験を行った。標的は臨床的に応用価値が高い大脳基底核であった。図 4 にその一例を示す。この実験ではマイクロバブルと tFUS によって BBB オープニングを行い、エバンスブルーの脳内送達を試みた。図に示されている結果は蛍光免疫組織化学解析の結果である。赤で示されている部位に有意なエバンスブルーの送達が認められる。大脳基底核のうち特に被殻（putamen）や尾状核（audate）細胞のラベルが顕著であった。このことは、tFUS による大脳基底核付近に選択性のある BBB オープニングができる可能性を示していた。今後、同様の実験をアンギオグラフィー撮像下で行い、BBB オープニングの非侵襲的評価が可能であることを証明する予定である。

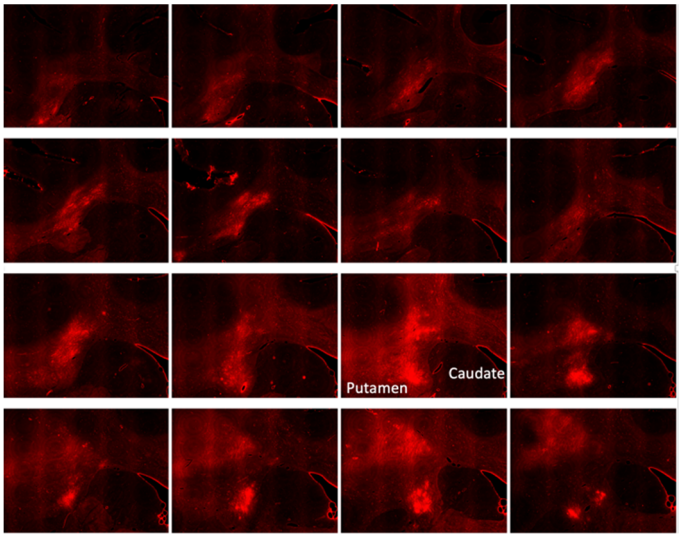


図 4. マカクサル大脳基底核を標的にした tFUS による BBB オープニング

5. tFUS を用いた脳細胞活動の誘発

次に、マイクロバブルと tFUS による刺激反応について検討した。イソフルラン麻酔下でラットを固定台にのせ、頭部の皮膚を切開した。ステージに tFUS を設置し、tFUS に付属するレーザーで焦点をブレグマに合わせた。その後、トランスデューサを下げ、ラット脳に対して設置した。ステージを利用し tFUS の焦点をずらしながら、超音波を照射し、ラットの反射反応を観察した。その結果、ブレグマからおよそ後方に 10 mm、横方向に 5 mm の位置に焦点を合わせた際に、ラットの四肢の反射反応が得られる傾向が認められた。また、tFUS の音圧を下げると四肢の反射反応は観察されなくなった。次に、この四肢の反射反応が観察されない tFUS の条件において、マイクロバブルを投与し反射反応への影響を検討した。その結果、低い音圧の tFUS とマイクロバブルを併用することで、四肢の反射反応が観察された。これは、tFUS によりマイクロバブルがオシレーションやキャビテーションを起こし、機械的な刺激を脳に対して与えられ、それによって運動関連の脳細胞の活動が誘発されたためだと考えられる。

本研究によって、tFUS によるニューロモジュレーションが齧歯類において実現し、さらに霊長類においてもその適用を開始する準備が整った。今後は、構築したシステムを用いて、霊長類を対象とした本方法の機能性・安全性などの検討を進めたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院工学研究科流体工学研究室の高木周教授、東京大学大学院医学研究科疾患生命工学センターの東隆教授、帝京大学薬学部薬物送達学研究室の丸山一雄教授、鈴木亮教授である。ご支援いただいた上原記念生命科学財団に感謝いたします。

文　献

1) Fry FJ, Ades HW, Fry WJ. (1958) Production of reversible changes in the central nervous system by ultrasound. Science 127(3289):83-4. DOI: 10.1126/science.127.3289.83

2) Tyler WJ, Tufail Y, Finsterwald M, Tauchmann ML, Olson EJ, Majestic C (2008): Remote excitation of neuronal circuits using low-intensity, low-frequency ultrasound. PLoS One 3(10): e3511. DOI: 10.1371/journal.pone. 0003511.

3) Kobayashi Y, Azuma T, Shimizu K, Koizumi M, Oya T, Suzuki R, Maruyama K, Seki K, Takagi S (2018) : Development of focus controlling method with tFUS aided by numerical simulation for non-invasive brain therapy, Jpn. J. Appl. Phys., 57(7S1):07LF22. DOI: 10.7567/JJAP.57.07LF22