

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：19H04460

研究課題名（和文）極短音響パルスのエネルギー流束に着目したニューロモジュレーション

研究課題名（英文）Neuromodulation with ultrashort acoustic pulse

研究代表者

塚本 哲（Tsukamoto, Akira）

防衛大学校（総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群）・応用科学群・准教授

研究者番号：90511460

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：ニューロモジュレーションは、脳にある神経細胞を刺激して脳の神経活動を調整することにより、疼痛や不随意運動、重度なうつ病などを治療する。本研究を通じ、極短音響パルスを発生させる機構として安定性と多照射性を兼ね備えた黒インク流体作動流路を考案し、極短音響パルスのエネルギー流速を制御する方法としてパルスあたりのエネルギーに加えてパルス回数でも検証できるようにした。さらに極短音響パルスの照射と蛍光観察を両立できる機構も開発した。マウスの脳に極短音響パルスを照射すると細胞内Ca²⁺濃度が上昇するが副作用も生じた。この副作用はパルスあたりのエネルギーを制御するよりもパルス回数を制御する方が低減された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的な意義として、極短音響パルスを発生させる機構として安定性と多照射性を兼ね備えた黒インク流体作動流路を考案したこと、極短音響パルスの照射と蛍光観察を両立できる機構を開発したこと、それらにより極短音響パルスによって脳に生じる副作用を低減するにはパルスあたりのエネルギーよりもパルス回数で極短音響パルスのエネルギー流束を制御した方が有望であることを示唆した点が挙げられる。また社会的な意義として、極短音響パルスによる治療で想定される副作用とそれの回避法を初めて示した点が挙げられる。

研究成果の概要（英文）：Neuromodulation cures pain, involuntary movements and severe depression by stimulating nerve cells in the brain and regulating neural activity in the brain. Through this research, a black ink fluid working channel with stability and multi-irradiation properties was devised as a mechanism for generating ultrashort acoustic pulses, and a method for controlling the energy flow velocity of ultrashort acoustic pulses was developed that can be verified by pulse frequency as well as energy per pulse. We also developed a mechanism that enables both irradiation of ultrashort acoustic pulses and fluorescence observation. Irradiation of the mouse brain with ultrashort acoustic pulses increased the intracellular Ca²⁺ concentration, but also caused side-effects. This side-effect was reduced by controlling the number of pulses rather than by controlling the energy per pulse.

研究分野：生体医工学

キーワード：極短音響パルス 細胞内Ca²⁺濃度

1. 研究開始当初の背景

ニューロモジュレーションは、脳にある神経細胞を刺激して脳の神経活動を調整することにより、疼痛や不随意運動、重度なうつ病などを治療する。臨床応用されている技術として、電極を脳に挿入する脳深部刺激法や、外部から磁場を与える磁気刺激法などがある。しかしながら、前者は侵襲性が高く、後者は刺激領域が脳表層に限られる。そのため、脳深部まで刺激でき、かつ非侵襲的な音響刺激法の開発が期待されている。ヒトやマウスの脳を音響刺激すると、運動反応や感覚反応が誘発される。しかしながら、それら誘発に神経細胞の応答が関与していない事例が相次いで報告され、音響刺激が本当に脳にある神経細胞を応答させているのか、疑問視されている。

極短音響パルス(微弱衝撃波)は圧縮波で構成される圧力波である。極短音響パルスは虚血性心疾患の治療に使用され、細胞をメカノセンシングにより応答させることを申請者らは初めて見出した。さらに、細胞応答は極短音響パルスのエネルギー流束に依存し、圧力波形には依存しない。この知見を活かすならば、極短音響パルスはエネルギー流束に依存して脳にある神経細胞を応答させると期待される。仮に、極短音響パルスの圧力波形が頭蓋骨における散乱や屈折で乱れたとしても、それに影響されることはない。よって、音響刺激として極短音響パルスを用いれば、脳にある神経細胞を再現性良く応答させられると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、極短音響パルスのエネルギー流束に依存して脳にある神経細胞が応答するか問う。この細胞応答により運動反応が誘発されるのか、運動反応を誘発したエネルギー流束により副作用が生じないのか検証し、極短音響パルスによるニューロモジュレーションを実証することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス脳で細胞内 Ca^{2+} 濃度を計測する系を構築するため、キセノン光源にて発生させた励起光を、対物レンズを介して計測対象に照射した。計測対象から発せられた蛍光を高感度カメラで画像化し、蛍光強度を定量化した。対物レンズの直径は 30 mm 程度であって、後述する極短音響パルス照射系における反射鏡の直径が 20 mm 程度であるため、それらをマウス脳の上で併存させることは物理的に困難であった。そこで、それらを切り替える機構を設け、物理的干渉を避けた。切り替えに要する時間を 1 秒程度に抑えることを目標とした。なぜならば、極短音響パルスによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は 20 秒程度持続するため、切り替えに要する時間が 1 秒程度であれば、切り替え機構によって細胞内 Ca^{2+} 濃度の計測に生じる支障は少ないと予想されたからである。

マウス脳へ極短音響パルスを照射する系を構築するため、極短音響パルス照射装置(J Biomed Sci Eng 2013)を援用し、回転楕円体の反射面をもつ反射鏡の 1 次焦点で極短音響パルスを発生させ、その 2 次焦点で集束させることを当初は予定していた。しかしながら反射鏡の 1 次焦点で極短音響パルスを発生させるのに困難が多かったため、平面で極短音響パルスを発生させることとした。ガラス板に黒インクを塗布し、黒インク上に油膜を介して高分子膜を貼り付け、ガラス板の反対面からレーザーを入射させることで極短音響パルスを発生させた。しかしながら単発しか極短音響パルスを発生させることができず、実験に支障が生じた。そのため、黒インクの流体を作動させる流路を作製し、ガラス板を介してレーザーを入射させることで極短音響パルスを発生させた。

マウスとしてアストロサイトに蛍光タンパク質 G-CaMP7 が発現した遺伝子改変マウス(理研 BRC, RBRC09650)ならびに野生型マウス(C57BL/6)を使用した。前者については頭蓋骨を歯科用ドリルで薄膜になるまで削った。後者については頭蓋骨ならびに硬膜を除去し蛍光色素 Fluo4AM でアストロサイトを染色した。

4. 研究成果

対物レンズと極短音響パルス照射系における反射鏡とをマウス脳の上で併存させることは物理的に困難であったため、それらを切り替える機構を設けた。切り替えに要する時間の目標であった 1 秒程度に対して、それを下回る切り替え時間を実現することができた。この切り替え前後で観察視野がずれることはなく、切り替えによって蛍光観察への影響はなかった。

極短音響パルスを発生させる機構として黒インクの塗布を採用した場合と、機構として黒インク流体を作動させる流路を採用した場合とで、圧力の時系列に違いがあるのかを検討した。その結果、いずれの機構であっても時間幅が 100 ns 程度の一過性の圧力上昇が認められ、レーザーのパルスエネルギーに応じた極短音響パルスのピーク圧力は 10-50 MPa の範囲で差異がなかった。以上のことから、極短音響パルス発生させる機構を黒インク流体の作動流路にしたとしても基本的な性能を維持しつつ、複数回を照射できるという性能を付加できることが確かめられた。

2 つあるマウスモデルのうち、実験に必要な侵襲性が比較的低い遺伝子改変マウスに対して極短音響パルスを照射して細胞内 Ca^{2+} 濃度を計測した。その結果、直径 1 mm 以下の領域で脳内の細胞が細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた様子が観察された。極短音響パルス発生させるためにレーザーを照射した範囲が直径 1 mm 程度であったことから、極短音響パルスを照射した領域で細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したと考えられる。極短音響パルスのエネルギー流束を徐々に上げたところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したエネルギー流束よりも 2 倍程度大きいエネルギー流束で出血といった副作用が観察されるようになった。極短音響パルスを照射するときに可聴音が発生することから、この可聴音が細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた可能性が懸念された。そこで極短音響パルス発生させる流路とマウス脳との間にある生理食塩水を排除することで可聴音のみを発生させて極短音響パルスを脳に照射しないようにした。その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇しなかった。この結果より、極短音響パルスを照射するときに発生する可聴音は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に関与しないことがわかった。極短音響パルスのエネルギー流束を極短音響パルスの照射回数で制御したところ、照射回数を 1 回から 1000 回まで増やしたとしても出血といった副作用は観察されなかった。このことから、極短音響パルスのエネルギー流束を制御する方法としてパルスあたりのエネルギーよりもパルス回数の方が副作用の懸念が抑えられることがわかった。

野生型マウスを使うことで細胞内 Ca^{2+} 濃度に関わる経路を探った。予備実験の結果として神経細胞の関与を探り、その結果、神経細胞の関与は低いことが示唆された。しかしながら野生型マウスで手術する手技に困難が大きく、手技を安定させるのに相当の時間を要する。具体的には、頭蓋骨を除去したのちの硬膜除去の過程に困難が大きい。硬膜の下にあるくも膜が損傷すると染色状態が大きく変化し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の観察に多大な影響が出る。これら困難を排除して実験を安定させて細胞内 Ca^{2+} 濃度に関わる経路を詳細に見い出すことが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塚本 哲, 川内聡子, 中川桂一, 佐藤俊一
2. 発表標題 経頭蓋骨衝撃波刺激による脳内アストロサイトの活性化
3. 学会等名 2022年度衝撃波シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塚本 哲, 川内聡子, 中川桂一, 佐藤俊一
2. 発表標題 光ファイバ先端で衝撃波とともに発生する気泡の高分子薄膜による抑制
3. 学会等名 日本機械学会2022年度年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚本 哲, 川内聡子, 中川桂一, 佐藤俊一
2. 発表標題 衝撃波照射による細胞内Ca ²⁺ 濃度上昇のin vivo観察
3. 学会等名 2021年度衝撃波シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚本 哲, クルメナハー マルコ, シュタインハウザー マーティン
2. 発表標題 衝撃波による高分子変形に対する静水圧の影響
3. 学会等名 日本機械学会2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中川 桂一 (Nakagawa Keiichi) (00737926)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師 (12601)	
研究 分担者	川内 聡子 (Kawauchi Satoko) (20506505)	防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、 動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学 研究センター 生体情報・治療システム研究部門・准教授 (82406)	
研究 分担者	佐藤 俊一 (Sato Shunichi) (90502906)	防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、 動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学 研究センター 生体情報・治療システム研究部門・教授 (82406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------