

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20642

研究課題名（和文）超音波刺激による神経細胞活動誘発と運動誘発メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on the mechanism of neuron cell activity induction and motion induction by ultrasound stimulation

研究代表者

高木 周（Takagi, Shu）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授

研究者番号：30272371

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、基盤上に培養した神経細胞群に超音波照射を行い、神経細胞群からのカルシウム放出に関する知見を得た。特に、数密度の異なる神経細胞群に対し、超音波応答特性を観察し、超音波応答反応はシナプス伝達を伴う反応であることを確認した。さらに、興奮性のシナプス伝達を阻害した条件下で、一部の神経細胞のみで活動が誘発されることを確認し、超音波応答にはシナプス伝達を必要としないことがわかった。また、マイクロバブルの利用により力を局在化させ、より低強度でカルシウムイオン放出を達成することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られる知見は、脳神経系への超音波照射により運動を誘発する超音波ニューロモジュレーションへと繋がる知見を与える。超音波ニューロモジュレーションは、従来の電場・磁場を用いる手法に比べ、脳深部への局所的刺激を非侵襲で行える可能性を有するものであり、リハビリテーションへの利用など臨床応用への期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we obtained information on calcium release from neuronal cell populations cultured on a substrate by ultrasound irradiation. In particular, we observed ultrasound response characteristics in a group of neurons with different number densities and confirmed that the ultrasound response is a response involving synaptic transmission. Furthermore, under conditions in which excitatory synaptic transmission was inhibited, activity was induced in only some neurons, indicating that synaptic transmission is not required for ultrasound response. Furthermore, by using microbubbles, the force acting on neuron cells is localized to cell scales. This gives the calcium ion releasing with lower amplitude of irradiated pressure.

研究分野：生体力学

キーワード：ニューロモジュレーション 神経細胞 超音波 カルシウムイオン マウス 発火 運動誘発

### 1. 研究開始当初の背景

経頭蓋超音波を照射し四肢の運動を誘発する超音波ニューロモジュレーションは、電場・磁場を用いた他のニューロモジュレーションの方法に比べ、脳深部への局所的刺激を非侵襲に行える手法として大きな期待が寄せられている。研究代表者の高木らが、本研究の研究分担者の関和彦らと 2016 年に行った共同研究では、麻酔をかけたラットの頭部に集束超音波を照射し、下肢の運動を誘発するのに成功している。世界的にも麻酔をかけたマウスを用いた実験で、四肢の動きを誘発するのに成功した報告がなされているが、2018 年に発表された論文[1]では、マウスを用いた動物実験において脳への超音波刺激により運動誘発が起きているのは脳の運動野への刺激ではなく、聴覚野への刺激によるものだと報告されている。一方、超音波ニューロモジュレーションに関しては、臨床応用も含め、様々な可能性が検討されており、そのメカニズムがはっきりしないまま、応用展開が進められている状況にある。

### 2. 研究の目的

上記を背景に、本研究では、超音波照射により神経細胞群に生じる集団的発火とラットの経頭蓋超音波照射により誘発される運動の関係を結びつけることにより、超音波照射のもたらす力学的刺激が脳神経系の活動及び生体の運動を誘発するメカニズムについて知見を得ることを目的とする。この際、将来的にはリハビリや認知機能の改善などへの革新的技術へと展開していくことを期待して、脳神経系に損傷を与えない比較的低強度の超音波を、基盤上に培養した神経細胞群へ照射し、カルシウムイオンの放出よりその影響を解明することを目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、超音波照射により神経細胞群に生じる集団的発火のメカニズム解明のため、培養神経細胞を用いた実験を遂行した。メカニズム解明にあたり、神経細胞ネットワークの力学的な特性が超音波応答反応に関与していると考え、本研究では神経細胞のネットワークの特性および力学的刺激を局在化させることによる、超音波応答反応への影響を明らかにすることを目的とした。

本研究では、図 1 に示すような実験系を用いて、基板上に培養した神経細胞群に超音波を照射して実験を行う。ここでは、主として行った実験のうち、細胞密度の影響、およびシナプス伝達を阻害した実験（実験 1）と、超音波血管造影剤として用いられる直径 2 ミクロン程度のマイクロバブル(Sonazoid®)を用いて超音波による力学的刺激を細胞サイズに局在化した実験（実験 2）について説明する。

【実験 1】神経細胞群の培養にはアガロースゲルを用いたハイドロゲルキャスト法 [2]を用いた。直径 3 mm の神経細胞が接着できる領域を作成して播種を行い、播種する細胞数を数えることで、細胞密度の調整を行った。1 ヶ月以上培養してネットワークが形成されていることを確認した。超音波の周波数は 1.5 MHz の周波数を用い、音圧振幅 0.3 MPa、100 msec の連続波条件で超音波を照射した。細胞の活動は Cal-520AM の Ca<sup>2+</sup> 蛍光指示薬を用いて細胞内の Ca<sup>2+</sup> イオンを蛍光させた。神経細胞にレーザーを照射し、細胞内部の Ca<sup>2+</sup> イオン濃度の変化を神経細胞の蛍光輝度の様子から観察した。データの取得には高速度カメラを用いて 60 fps で撮影を行い、超音波照射前後で輝度変化を観察した。

【実験 2】基本的には、同様の実験系を用いているが、この実験においては、細胞は 19 日齢のマウス胎児大脳皮質を 3 週間程度培養したものを用いた。培養期間が 3 週間より短い細胞群を用いた場合には、超音波照射による影響が現れづらいことが確認されている。細胞は、1000 cells/mm<sup>2</sup> となるように直径 27mm のディッシュに培養した。超音波照射系に関しては、任意波形発生装置による生成された波形を、増幅器を通して増幅させたものをトランスデューサにより細胞に照射する。ここでは、トランスデューサと細胞の距離を 7 mm に設定した。レーザと顕微鏡をディッシュの下に置くことで、細胞の下から光を照射して観察を行った。実験中は細胞に負荷を与えないよう、インキュベータで常に細胞が適温である 37 度となるように設定した。本実験では超音波の周波数と音圧を変えて実験を行い、反応の閾値を調べてからマイクロバブルを用いた実験を行なった。ここでは、マイクロバブルを用いることで反応の閾値と反応率の変化を求める。

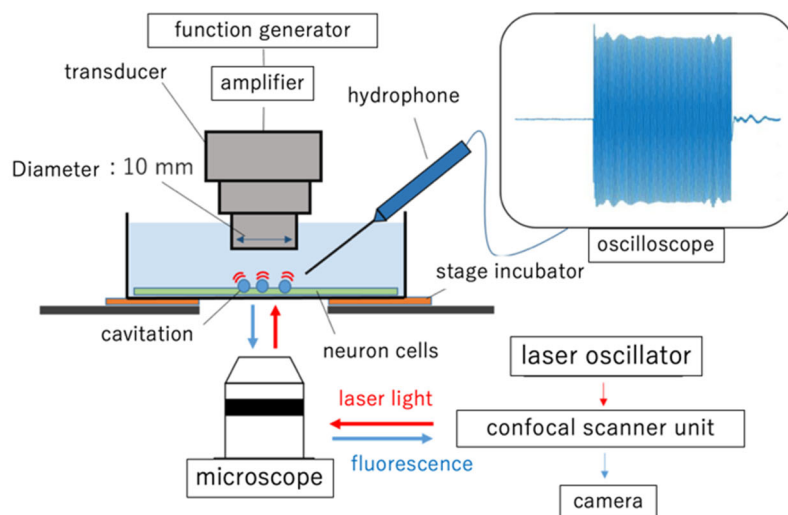


Fig.1 Ultrasound experiment system

実験条件は以下の表 1 の様に設定した。細胞培養の条件は一律であり，ここでは，超音波の照射条件のみを変更して実験を行った。周波数 2MHz の平面超音波と 8MHz の集束超音波を用いた。表中，超音波の圧力はハイドロフォンにより細胞近傍の測定した値である。

Table.1 Experimental conditions

Frequency	Type	Time/s	Pressure/MPa
2 MHz	Plain	0.1	0.48, 0.66, 0.84, 0.96
8 MHz	Focus	0.1	1.1, 1.3, 1.5, 1.8, 2.0, 2.2

#### 4. 研究成果

##### 【実験 1】

細胞密度の異なる 2 つの神経細胞群を用いて，自発活動を 30 秒程度観察し，神経細胞の輝度変化の様子を調べた。細胞密度の違いにより自発活動の特性に差異が生じ，低密度の神経細胞群では，反応が生じてから定常状態に戻るのに要する時間が長く，また活動頻度は低くなることが多くのサンプルに共通して確認された。

自発活動の解析から，細胞密度の違いは自発活動の活動頻度と活動の緩和時間の特性に影響を与えることが分かった。次に，細胞密度の違いによる超音波応答反応の違いを調べた。超音波刺激前後のカルシウムイメージングの様子を Fig.2 に示した。応答は自発活動と同様に低密度の細胞群ほど，1 回の活動の緩和時間が長くなる傾向がわかった。また，活動の強度と緩和時間に関して自発活動との比較を行うと，Fig.3 で示すように超音波応答反応は，細胞密度が高い方がより強いことがわかった。これより，超音波応答の反応は自発活動と類似した細胞ネットワーク依存性がある可能性が示唆された。そこで，次に，超音波応答におけるシナプス伝達の役割を調べるため，AP5 と CNQX を緩衝液に溶存させて神経細胞群の興奮性のシナプス伝達を阻害した。この細胞群に対し超音波刺激を行い，観察された神経細胞の輝度の変化の様子を Fig.3 に示す。計 8 回の超音波刺激のうち，6 回で応答が確認できた。また，超音波への反応は神経細胞ネットワークの一部の神経細胞のみで確認された。この結果から，超音波に対する反応はシナプス伝達を必要とせず，超音波応答は細胞群の一部の神経細胞を起点として生じていることが示唆された。

##### 【実験 2】

2 MHz の平面超音波を用いて圧力振幅の違いの影響を調べた結果を表 2 に 8 MHz の集束超音波を用いた場合の結果を表 3 に示す。表中の分数は，カルシウムイオンの放出がみられた割合 [(カルシウムイオン放出が見られたサンプル数) / (全サンプル数)] に対応する。サンプル数が少ないため，統計的に意味のある結論までの議論はできないが，マイクロバブルありの条件の方がより低強度でカルシウムイオン放出へと繋がっている傾向は見てとれる。これは，マイクロバブルの注入により，超音波照射下で局所的な圧力が増加したためと考えられる。

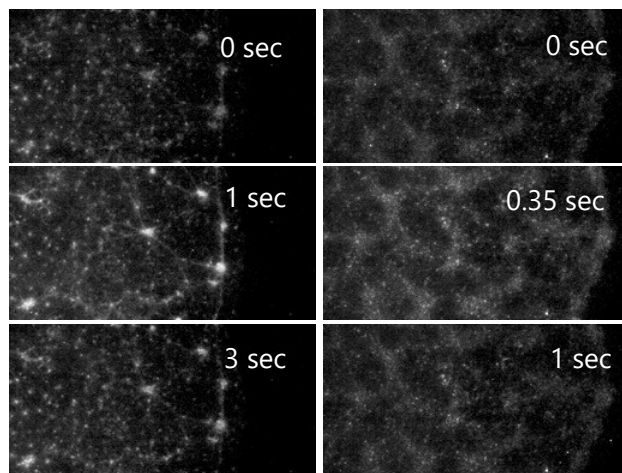


Fig.2 Response of neuron after US stimulation.  
Low density (left) High density (right).

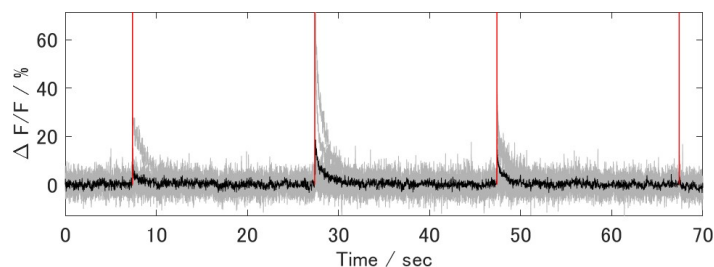


Fig.3  $Ca^{2+}$  fluorescence intensity in response to US stimulation under inhibition of synaptic transmission. Red indicates duration of US exposure.

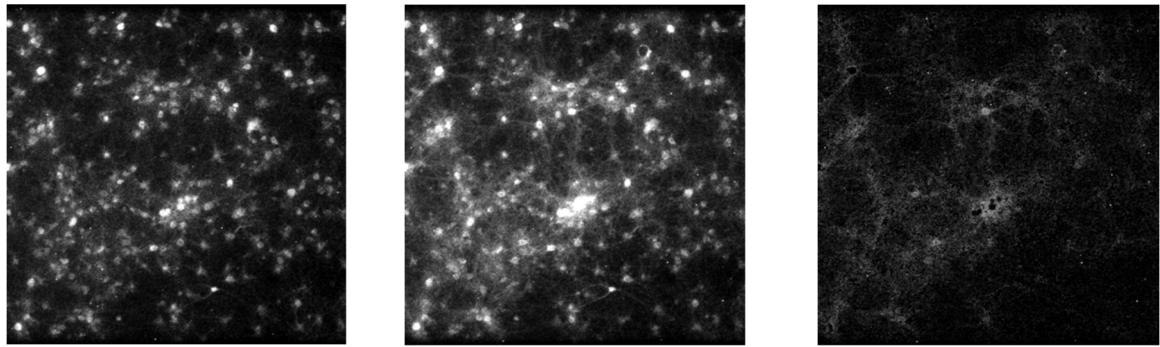
Table.2 Difference in reaction rate depending on the presence or absence of bubbles with 2 MHz plain ultrasound. (The values in the table corresponding to the ratio of (Calcium Ion Release Observed Cases vs. All samples))

Pressure/MPa	0.48	0.66	0.84	0.96
No bubble	0/1	1/2	2/2	0/1
Bubble	2/3	3/3	1/1	

Table.3 Difference in reaction rate depending on the presence or absence of bubbles with 8MHz focus ultrasound. (The values in the table corresponding to the ratio of (Calcium Ion Release Observed Cases vs. All samples))

Pressure/MPa	1.1	1.3	1.5	1.8	2.0	2.2
No bubble	0/2	0/5	2/11	1/6	0/3	3/5
Bubble	1/7	3/9	3/5	1/1		

マイクロバブルを入れた状態で 8 MHz で 1.8 MPa の集束超音波照射実験における細胞の反応の様子を以下の図 4 に示す。それぞれ順に超音波照射前、照射後(0.8 s)およびその差分処理を示している。また、図 5 より、試行回数の多い 8 MHz 集束超音波の反応率をグラフで示す。マイクロバブルを入れることによって反応率が向上することが確認できる。



(a) Before stimulation (b) After stimulation (c) difference processing  
 Fig. 4 Cell reaction when 8 MHz 1.8 MPa focused ultrasound irradiation experiment in the presence of microbubbles

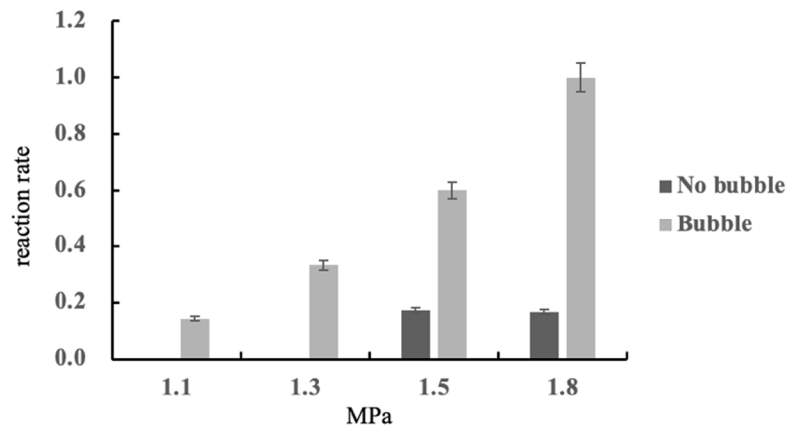


Fig.5 Difference in reaction rate with and without bubbles at 8 MHz

本研究では、超音波ニューロモジュレーションのメカニズム解明に向けて、基板上に培養した神経細胞群に超音波照射を行い、カルシウムイオンの放出について調べた。細胞レベルに局在化された力の影響を見るため、直径数ミクロン程度のマイクロバブルを用い、マイクロバブルの有無の影響について調べた。結果として、マイクロバブル存在下の方が、より低強度の超音波照射で、カルシウムイオンの放出が生じることがわかった。以上より、カルシウムイオンの放出は細胞レベルで局在化された力でも生じることが示唆され、これまでマイクロバブル無しの条件下で波長数百ミクロン程度の超音波によりカルシウムイオンの放出が見られた現象に対しても、細胞同士がネットワーク構造をなすことにより物理的に繋がっていることにより、数百ミクロン程度の波長スケールの圧力勾配が、数十ミクロン程度の個々の細胞に力を伝えている可能性が示された。

紙面の都合で割愛したが、文献[3]には、周波数依存性について調べた成果を報告している。

参考文献

[1] Sato, T., Shapiro, M. G., & Tsao, D. Y. (2018). Ultrasonic neuromodulation causes widespread cortical activation via an indirect auditory mechanism. *Neuron*, **98**(5), 1031-1041.),  
 [2] Tanaka, N., Moriguchi, H., Sato, A., Kawai, T., Shimba, K., Jimbo, Y., & Tanaka, Y. (2016). Microcasting with agarose gel via degassed polydimethylsiloxane molds for repellency-guided cell patterning. *RSC advances*, **6**(60), 54754-54762.  
 [3] Fan, H., Shimba, K., Ishijima, A., Sasaoka, K., Takahashi, T., Saka, E., ... & Takagi, S. (2022). Acoustic frequency-dependent physical mechanism of sub-MHz ultrasound neurostimulation. *Japanese Journal of Applied Physics*, **61**(12), 127001.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fan Haixiao, Shimba Kenta, Ishijima Ayumu, Sasaoka Kenya, Takahashi Tsuyoshi, Saka Eigo, Chang Chih-Hsiang, Jimbo Yasuhiko, Azuma Takashi, Takagi Shu	4. 巻 61
2. 論文標題 Acoustic frequency-dependent physical mechanism of sub-MHz ultrasound neurostimulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 127001 ~ 127001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ac9faf	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Mingzhen, Narumi Ryuta, Azuma Takashi, Okita Kohei, Takagi Shu	4. 巻 69
2. 論文標題 Numerical Study on a Focus-Control Method Using Breast Model With Intentionally Assigned High-Absorbing Layer Near Skin for High-Intensity Focused Ultrasound Treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control	6. 最初と最後の頁 3155 ~ 3164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/TUFFC.2022.3205620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石島 歩, 範 海嘯, 榛葉 健太, 東 隆, 神保 泰彦, 高木 周
2. 発表標題 サブMHz超音波による神経細胞刺激の物理作用機序
3. 学会等名 キャピテーションに関するシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宅間 諒, 阪 英語, 北川 悠梧, 椎葉 健太, 神保 泰彦, 渡村 友昭, 高木 周
2. 発表標題 超音波ニューロモデュレーションのメカニズム解明に向けた局所力学的刺激手法の開発
3. 学会等名 第21回キャピテーションに関するシンポジウム
4. 発表年 2023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	関 和彦  (Sekiz Kazuhiko)  (00226630)	国立研究開発法人国立精神・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・部長   (82611)	
研究 分担者	神保 泰彦  (Jimbo Yasuhiko)  (20372401)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授   (12601)	
研究 分担者	榛葉 健太  (Simba Kenta)  (80792655)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教   (12601)	

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
---------	---------