

## 【助成 39-45】

収束超音波のニューロモデュレーション効果の作用機序の解明とこれを用いた神経ネットワーク活動の制御

代表研究者 杏林大学 医学部 講師 三嶋竜弥

### 〔研究の概要〕

低強度の収束超音波 (focused ultrasound: FUS) が非侵襲的に神経機能を亢進あるいは抑制する効果 (ニューロモデュレーション効果) を示すことが報告された。FUS で経頭蓋的に特定の脳領域を刺激すると、運動機能や知覚機能に影響を及ぼす他に、細胞間隙に存在する GABA やドパミンの濃度を可塑的に調整する作用が観察されている。しかし、FUS 刺激による機械的・熱的作用がどのような分子機序により神経機能に作用しているのかは不明である。FUS によるニューロモデュレーション効果を難治性神経疾患の治療に応用するために、本研究では超音波が神経の興奮性やシナプス伝達機能に及ぼす作用を解明することを目的とする。そこで、超音波刺激に対する初代培養神経細胞の電気的応答を顕微鏡下で解析する実験系を構築し、超音波がシナプス伝達機能に及ぼす影響を解析した。

### 〔研究経過および成果〕

#### 1. 生体脳組織に似た動的粘弾性を持つコラーゲンゲルの作製

生体脳組織に吸収された超音波は機械的・熱的作用を及ぼす。その受容には神経細胞膜上の機械受容イオンチャネルや熱感受性イオンチャネル等が関与していると考えられる。通常、神経細胞はプラスチックやガラス等の硬い素材上で培養するが、脳組織の変形により生じる機械刺激の受容を解析には生体脳組織の物理特性を考慮する必要がある。そこで、細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲンと架橋剤の濃度を調整して種々の硬さのコラーゲンハイドロゲルを作製し、動的粘弾性を計測した。コラーゲンは I 型コラーゲン、末端のテロペプチドを除去したアテロコラーゲンを 3.0-4.5 mg/ml の濃度で使用し、コラーゲン繊維の架橋剤として細胞毒性の低い genipin を 0.25-1.00 mM で用いた。作製したコラーゲンハイドロ

ゲルの弾性貯蔵係数 ( $G'$ ) と粘性損失係数 ( $G''$ ) をレオメーター (ONRH-1, Ohnatech) を用いて計測した (図 1)。脳組織の機械的特性は、ヤング率では

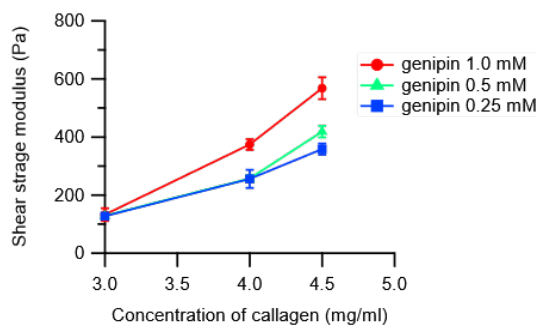


図 1 コラーゲン濃度と弾性貯蔵係数との関係  
500-1500 Pa 程度、レオメーターによる計測では 100-350 Pa 程度の弾性貯蔵係数を示すことが報告されている。

#### 2. 超音波トランスデューサーの性能解析

先行研究では、経頭蓋脳刺激には頭蓋骨の透過性と刺激領域のサイズとの兼ね合いから 500kHz 付近の超音波周波数が用いられている。しかし、この範

圏の周波数用のトランスデューサーの外形は 20~30 mmと大きく、また焦点距離も長いためコリメーターの使用が必要となる。さらに、ガラス電極を用いるホールセル記録時には、振動によりギガオームシールの安定性を著しく損なうことが報告されている。これらの欠点を踏まえ、本研究では小型(外形 2mm)でより高い周波数(5~10MHz)の超音波トランスデューサーを用いることとした。ハイドロホンを用い、トランスデューサーの駆動電圧、周波数を変えて水中超音波の受信電圧を測定すると共に、ハイドロホンを移動させ上下 5mm、左右 5mm、距離 6mm~12mm の範囲にわたって音圧の空間分布を求めた。入力周波数 10MHz、入力電圧 40V 時の最大音圧は約 100kPa であった。トランスデューサーとの距離が 6mm の時、半径 0.5mm 程度の円状に音圧の高い狭いエリアを示すことが判った(図 2)。

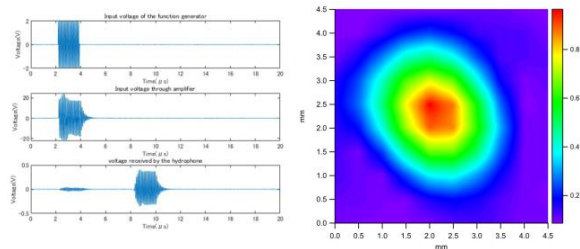


図 2 超音波トランスデューサーの音圧分布

### 3. シナプス伝達機能に対する超音波刺激の解析

カバーガラス上に弾性貯蔵係数 100-200 Pa のコーゲンハイドロゲル層を作製した。ハイドロゲル上にグリア細胞を播種し10日間程度培養してシート状のフィーダー層を形成させた。フィーダー上で新生仔マウスから採取した海馬神経細胞の分散培養を行い、培養 14-21 日に実験を行った。カバーガラスをチャンバーに移動し、音圧の高いエリアに培養神経細胞が位置するようにセットした。分散培養した神経細胞か

らホールセル記録を行っている間に超音波刺激を加えてもギガオームシールが維持されるかを確認した。その結果、5~10MHz の超音波周波数では、アンプからの出力電圧が 80V(約 150kPa)程度までであれば、刺激後も安定してギガオームシールを維持したまままで記録が可能ことが判った。そこで、超音波刺激がシナプス伝達機能に及ぼす影響を明らかにするために、分散培養した神経細胞の間に形成されたシナプスに生じる自発性微小シナプス後電流を計測し、刺激前後で自発性微小シナプス後電流の発生頻度に変化が生じるかを解析した。

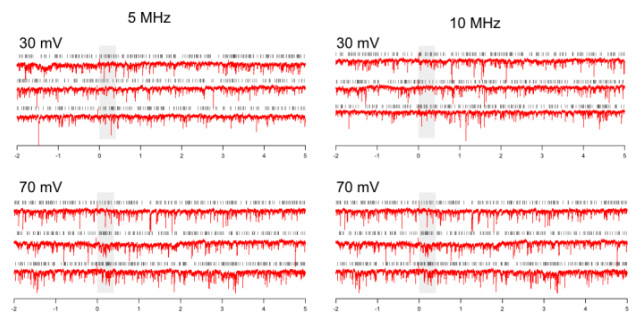


図 3 自発性微小シナプス電流に対する超音波刺激の影響

灌流液にテトロドトキシン (1  $\mu\text{M}$ )、CNQX (10  $\mu\text{M}$ )、D-AP5 (50  $\mu\text{M}$ )を加え、抑制性の自発性微小シナプス後電流を記録した。記録している神経細胞を含む領域に 5MHz もしくは 10MHz の超音波刺激を 400 ミリ秒間の連続波として種々の強度で加え、抑制性の自発性微小シナプス後電流の発生頻度を解析した。その結果、自発性の抑制性伝達物質放出頻度の超音波刺激による影響は見られなかった(図 3)。

本研究では、神経細胞の種々の情報伝達機能の中でも自発性のシナプス小胞放出機構に対する超音波刺激の影響を解析した。引き続きシナプス伝達機能、神経ネットワーク活動に対する効果を明らかにしていきたい。