



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	超音波刺激を用いた神経変調システムの開発と生体脳活動修飾への応用
Author(s)	古川, 凌
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第16510号
Issue Date	2025-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16510
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95165
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Furukawa.pdf



令和 6 年度 博士論文

超音波刺激を用いた神経変調システムの開発と
生体脳活動修飾への応用

**Development of Neuromodulation Systems Using Ultrasound
Stimulation and Their Applications in Modulating Brain Activity
In Vivo**

北海道大学 大学院情報科学院 生体情報工学コース
バイオエンジニアリング分野 神経制御工学研究室

古川 凌

目次

要旨.....	7
略語.....	10
第1章 序論.....	12
1.1. 本論文の概要.....	12
1.2. 研究背景.....	13
1.2.1. 神経変調と脳疾患治療.....	13
1.2.2. シナプス可塑性.....	13
1.2.3. 従来 of 脳刺激法.....	14
1.2.4. 超音波刺激法.....	16
1.2.5. 超音波刺激の神経活動誘発機序の仮説.....	21
1.2.6. 超音波刺激のパラメータ.....	23
1.2.7. 閉ループ型刺激.....	25
1.3. 本研究の構成.....	26
第2章 聴覚皮質における長期抑圧の動態解析.....	27
2.1. 背景と目的.....	27
2.2. 方法.....	29
2.2.1. 脳スライスの局所電場電位データ.....	29
2.2.2. シナプス可塑性モデル.....	30
2.2.3. 神経活動計測データへのモデルフィッティング.....	32
2.2.4. 時間変化パターンのクラスタリング.....	33
2.2.5. モデルの係数の推定法.....	33
2.3. 結果.....	35
2.3.1. モデルの係数.....	35
2.3.2. シナプスモデルの時間軌道.....	38
2.4. 考察.....	40
2.4.1. 長期抑圧における受容体の寄与.....	40
2.4.2. シナプスの状態遷移ポテンシャル.....	40

2.4.3.	聴覚皮質における長期抑圧の空間的特徴.....	41
2.4.4.	異なる物理モダリティの脳刺激に対する仮説	41
第3章	脳スライス用超音波刺激装置	42
3.1.	背景と目的	42
3.2.	方法.....	44
3.2.1.	デバイス設計.....	44
3.2.2.	微細加工.....	47
3.2.3.	物理特性の評価法.....	49
3.2.4.	超音波刺激による神経活動誘発効果の評価法	50
3.2.5.	脳スライスの活動をモニタリングする微小電極.....	52
3.2.6.	簡易フィードバックシステムの構築.....	52
3.3.	結果.....	54
3.3.1.	デバイス作製.....	54
3.3.2.	物理特性の評価	54
3.3.3.	超音波刺激による神経活動誘発効果の評価.....	55
3.3.4.	脳スライスの局所電場電位計測.....	59
3.3.5.	簡易的な閾値検出システム	61
3.4.	考察.....	65
3.4.1.	圧電型マイクロトランジューサの物理特性.....	65
3.4.2.	脳スライスの神経活動誘発	65
3.4.3.	脳スライスの局所電場電位計測とフィードバック	66
第4章	聴知覚を生じさせない効率的な経頭蓋超音波刺激.....	68
4.1.	背景と目的	68
4.2.	方法.....	70
4.2.1.	包絡線をかけた超音波刺激の時間パターン	70
4.2.2.	入力波形のスペクトル解析	71
4.2.3.	3次元モデルを用いた数値計算.....	72
4.2.4.	頭蓋骨から生じる音響圧放射の計測.....	72
4.2.5.	聴性脳幹応答計測.....	75

4.2.6.	大脳皮質の神経活動計測.....	75
4.2.7.	データ解析	76
4.3.	結果.....	77
4.3.1.	簡易 3 次元モデルを用いた数値計算.....	77
4.3.2.	頭蓋骨から生じる音響圧放射の計測.....	79
4.3.3.	聴性脳幹応答計測.....	79
4.3.4.	経頭蓋超音波刺激に誘発される局所電場電位応答	82
4.4.	考察.....	88
4.4.1.	包絡線適用区間率（窓長）と可聴周波数成分	88
4.4.2.	効果的な包絡線適用条件.....	88
第 5 章	閉ループ型経頭蓋超音波刺激を目指して	90
5.1.	背景と目的.....	90
5.2.	方法.....	91
5.2.1.	設計	91
5.2.2.	微細加工	93
5.2.3.	物理特性の評価法.....	93
5.2.4.	事象関連電位計測.....	94
5.2.5.	短期可塑性誘導	95
5.2.6.	データ解析	95
5.3.	結果.....	97
5.3.1.	数値計算.....	97
5.3.2.	頭部固定型マイクロトランスデューサの実装	98
5.3.3.	物理特性の評価	98
5.3.4.	事象関連電位.....	99
5.3.5.	短期可塑性誘導	101
5.4.	考察.....	103
5.4.1.	マイクロデバイスのマウス頭部固定.....	103
5.4.2.	超音波ビームフォーム	103
5.4.3.	脳波のモニタリング機能.....	104
5.4.4.	下丘における短期可塑性誘導.....	104

第6章	本論文の結論と展望	106
6.1.	結論.....	106
6.2.	展望.....	107
参考文献		108
謝辞		127
引用許諾		128
研究業績		129
学術論文（査読付き）		129
国際会議論文（査読付き）		130
受賞		130

要旨

本論文では、神経変調の方法とその機序について論じる。ここで、神経変調とは、電気的な神経活動の変調を意味する。神経変調は、神経系の機能障害の補綴（代替）器、新たな治療用装置、および、基礎的な神経科学の研究用ツールなどの幅広い用途で応用されている。神経活動の変調には、主に、神経系における活動電位の誘発と抑制を制御する方法を用いる。その方法の中で、電磁気的な刺激法は、臨床における脳疾患の治療と神経科学において古くから利用されている。これに対して、本論文で主に扱う方法は、超音波の機械的な振動を用いた脳刺激法（超音波刺激法）である。超音波刺激法は、比較的新しい手法であるため、神経変調の詳細な機序の理解や刺激装置の構成法に不明な点が多い。

従来の脳刺激法では、電磁気刺激（電気や磁気を使った刺激）が主に用いられてきた。しかし、それらの電磁気刺激には、臨床で応用する上で、空間分解能（局在性）と深部到達性、および、脳内への挿入を伴わない非侵襲性の3点に物理的な制約があった。これらの制約から、脳の深部にある領域を正確にかつ非侵襲的に刺激することは困難である。したがって、これらの難点を克服し、神経変調を通じて、正確に脳機能を調節する新たな代替手法の開発が求められている。

近年、頭蓋骨を開くことなく超音波を印加する経頭蓋超音波刺激法（transcranial ultrasound stimulation, TUS）が、従来の電磁気刺激法の限界を克服する可能性がある技術として注目されている。TUSは、経頭蓋により、1~5 mmの空間局在性で、脳の深部（10~15 cm）に刺激を到達させ、脳機能に局所的な変化を誘発できることが明らかになっている。TUSにより、特定の脳領域の機能をより詳細に制御および調査できる可能性がある。しかし、脳は、領域ごとに特徴的な神経回路網を形成しており、各領域でTUSがどのような効果をもたらすのか、不明な点が多い。また、所望の神経変調をTUSで実現するために、どのような装置構成が効率性に優れ、副作用を回避できるかなどの問いにも、未だ十分な知見が得られていない。

また、脳疾患の治療に神経変調を応用するためには、長期的な変調効果の持続が求められる。脳内の神経細胞間はシナプスと呼ばれる結合部を介して信号の伝達を行い、複雑な神経回路網を形成している。脳刺激によって、このシナプスの結合状態を増強、あるいは、抑圧できることが知られており、シナプスの可塑的な結合状態の変化をシナプス可塑性と呼ぶ。

現在、治療への応用に向けて、神経変調によるシナプス可塑性の誘導方法の開発が進めら

れている。また、神経変調を治療に応用するためには、刺激装置システムの構成と機能も重要である。例えば、てんかん発作や精神疾患などの疾患では、治療期間が長期間にわたる可能性があるため、近年、過度な脳刺激を回避する方法の開発が進められている。従来の脳刺激法は、脳の突発的な活動を刺激パターンに反映できず、予め決められたパターンや強度で刺激を続ける方法が用いられてきた。脳の活動状態をフィードバックしないことから、このような刺激系を「開ループ型」と呼ぶ。こうしたシステム構成では、刺激の過度な強度や時間的な特徴によっては、過剰な神経活動や意図しない可塑性を誘発するリスクが懸念されている。

これらの背景から、脳刺激法の新たな代替技術として超音波刺激が注目されている。本論文で、筆者は、その作用機序の理解とシステム構成の開発が現時点で不十分な課題に着目した。特に、特定の脳領域に応じた超音波刺激の効果や作用機序の解明、および、所望の用途に応じた刺激システムを開発することで、脳刺激法の実用性の向上が期待される。

本論文では、脳疾患治療法の一つである神経変調の技術的な発展を目指して、超音波刺激を用いた神経変調システムの一構成法を提案した。本論文は、次の6章で構成される。

第1章では、本研究の背景、目的、および、論文構成について述べる。

第2章では、特定の脳領域における、長期抑圧とよばれるシナプス可塑性について取り上げる。この章では、未解決の課題として、特に、聴覚皮質における可塑性の機序の解明に着目した。特に、マウス脳を切片状に成形した脳スライスを使った実験データと、シナプスの状態の変化を表現する数理モデルを組み合わせ、長期抑圧の仕組みの一部を解明した。

第3章では、上記の脳スライスを使った実験系に特化させて開発した小型超音波刺激装置の一構成法について述べる。既に提案されている超音波刺激装置は、脳スライスを用いた実験系に応用するのが困難であることが知られている。本章では、この問題の改善策を提案する。新規に開発した装置の、物理的特性の評価と脳スライスの神経変調を実際に行い、予め設定した目標を実現することでその有効性を実証した。

第4章では、対象とする神経経路にのみ、効率的に変調効果を及ぼす超音波の波形パターンの特徴について述べる。ここでは、神経経路として聴覚系以外を対象脳領域として選択しても、超音波刺激を印加した際に、実験動物に対して副次的に音の知覚を誘発する問題を取り上げた。特に、副次的に音の知覚を誘発する機序を基に、副次的な効果を最小限に抑えながら所望の脳領域のみに刺激効果を効率的に与える方法について述べる。

第5章では、脳活動をモニタリングする機能を有する、小型の経頭蓋超音波刺激装置の一

構成法を述べる。ここでは、従来の刺激装置が、実験動物の頭部に対して大型であること、および、脳活動のモニタリング機能と超音波刺激の印加機能とが相互に独立しており、過剰な活動の誘発を回避する仕組みが不足している問題に着目した。具体的には、従来の開ループ型とは異なる、「閉ループ型」の機能を有する小型デバイスの開発に取り組んだ。作製したデバイスの特性評価の結果から、超音波刺激と脳波のモニタリング機能の有用性が示された。これらの結果から、慢性的な脳疾患治療効果の検証を目的とした動物実験に応用できる可能性が示された。将来的には、過剰な神経活動の誘発を防ぎながら、より安全かつ効率的な脳疾患治療の実現が期待できる。

第6章では、本論文に示した成果をまとめ、今後の研究の展望について述べる。

以上のように、本論文では、超音波刺激を用いて神経変調を実施する装置システムの一構成法とその誘発応答の特徴を述べた。今後は、神経活動の誘発機序に関する知見や構築したシステムを応用して、慢性的な治療効果の検証実験に向けて、本研究で得た成果を展開していくことが期待される。

略語

AE	Acoustic emission
ACC	Anterior cingulate cortex
ACSF	Artificial cerebral spinal fluid
ABR	Auditory brainstem response
CMUT	Capacitive micromachined ultrasound transducer
CW	Continuous wave
CC	Correlation coefficient
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane transduction regulator
DBS	Deep brain stimulation
DC	Duty cycle
EEG	Electroencephalography
EIS	Electrical impedance spectroscopy
ERP	Event-related potential
FEM	Finite element method
FPC	Flexible printed circuit board
HIFU	High intensity focused ultrasound stimulation
ICP-RIE	Inductively coupled plasma reactive ion etching
LFP	Local field potential
LTD	Long-term depression
LTP	Long-term potentiation
LIFU	Low intensity focused ultrasound stimulation
MEMS	Microelectromechanical system
MUA	Multiunit activity
PZT	Lead zirconate titanate
PMUT	Piezoelectric micromachined ultrasound transducer
PCA	Principal component analysis
PCB	Printed circuit board
PRF	Pulse repetitive frequency

PRP	Pulse repetitive period
RI	Ratio index
SD	Standard deviation
Si	Silicon
SOI	Silicon on insulator
SPL	Sound pressure level
SPPA	Spatial peak pulse average
SPTA	Spatial peak temporal average
SEM	Standard error of the mean
SVM	Support vector machine
TBD	Tone burst duration
tbTUS	Theta burst transcranial ultrasound stimulation
TS	Tetanic stimulation
tDCS	Transcranial direct current stimulation
TMS	Transcranial magnetic stimulation
TUS	Transcranial ultrasound stimulation
US	Ultrasound

第1章 序論

1.1. 本論文の概要

本論文では、脳疾患治療法の一つである神経変調の技術的发展を目指した取り組みを示す。後述の背景を踏まえ、次の4つの目標を立てた。

1. 電気生理学の実験の結果と数理モデルを用いて、応答動態に基づき、可塑性に関する主要な受容体を探索する。
2. 閉ループで脳組織を記録および刺激するためのインターフェースの開発をし、それを脳スライスの細胞実験に適用する。
3. (1) 超音波刺激の包絡線パターン、(2) 頭蓋骨振動の周波数成分、(3) 聴覚末梢および中枢（皮質）における応答の関係を解明する。
4. マウス頭部に固定が可能な小型閉ループ型経頭蓋超音波刺激装置を開発する。

1.2. 研究背景

1.2.1. 神経変調と脳疾患治療

脳では神経細胞がネットワークを形成し、活動電位などの電気信号、および化学的な信号により情報伝達をしている。様々な情報が樹状突起へ入力されると膜のイオンチャネルのイオン透過性に変化が生じ、イオン濃度勾配による駆動力でイオンがイオンチャネルを透過するため、神経細胞は活動電位を生じる。ヒトの脳にはおよそ 1,000 億個もの神経細胞があるとされている。これらの神経細胞が、シナプス伝達と呼ばれる信号を伝達し、脳の機能が発現される (Bear et al., 2015)。

そこで、近年では脳疾患の治療として、薬剤治療法のような副作用を (Lutz & Helmstaedter, 2005; Sen et al., 2018), 根本的に回避できる利点を持つ脳神経刺激法が使われている (Bewernick et al., 2010; Luan et al., 2014)。脳神経刺激法とは、様々な物理的刺激を脳に印加し、神経活動を可逆的に変調する手法である。例えば、刺激の頻度に応じて神経活動を可塑的に増強、あるいは抑圧させることが可能である。

1.2.2. シナプス可塑性

神経変調を脳疾患の治療に応用するには、シナプス可塑性の誘導が必要である (Shamli

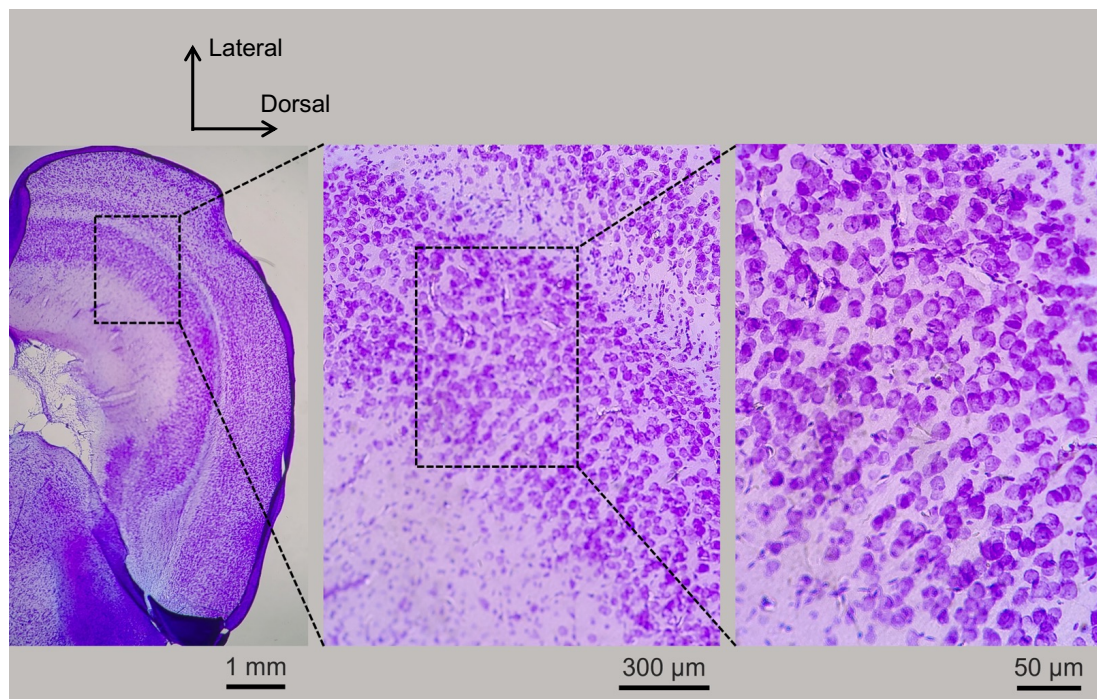


図 1-1. マウス聴覚皮質のニッスル染色。

Oghli et al., 2023). この可塑的変調にはシナプスにおけるカルシウムイオンが大きく関与しているとされている (Chindemi et al., 2022; Graupner & Brunel, 2012a). しかし, ある刺激パターンに対する可塑性誘導後の変調効果は, 対象とする脳領域で異なる結果が報告されている. 例えば, 齧歯類を使った研究では, テタヌス刺激 (tetanic stimulation, TS) と呼ばれる高頻度 (100 Hz 程度) の繰り返し電気刺激によって, 海馬で長期増強 (long-term potentiation, LTP) の誘発が知られている (Dunwiddie & Lynch, 1978). 一方, 近年, TS によって聴覚皮質では長期抑圧 (long-term depression, LTD) の誘発が報告されている. 大脳皮質は特徴的な 6 層構造を形成し (図 1-1), TS によって誘発される LTD は, 皮質特有の神経回路網構造を反映していると考えられる. しかし, その構造と LTD の詳細な関係性は, 現時点で明らかになっていない. 過去に報告された TS が誘発するシナプス可塑性の種類を比較すると, 脳領域や対象とする層に依存している傾向がみられる (表 1-1). シナプス可塑性は, 神経伝達物質受容体の構造や機能に密接に関係している. このため, 詳細な可塑性機序の解明には, 神経伝達物質の受容体を薬理的に阻害あるいは促進させた条件下で, その機能の変化を実験的に観察する方法が有用である. 特に, 組織培養実験系に比較して, 急性の *in vitro* 脳スライスを用いた実験では, 脳組織の局所神経回路の構造をある程度維持したまま, 組織外部条件を制御できるという利点がある. ここまで, 脳刺激法の中でも最も古くから利用されている電気刺激について述べてきたが, 同じく電磁気的な刺激である磁気刺激方も臨床応用に至っている手法である. 磁気刺激法では双方向性の変調効果が知られており, 5 Hz 以上の繰り返し周波数で大脳皮質を刺激した後にその誘発応答は増加するが, 1 Hz 以下の周波数で刺激すると応答は減少する特徴を示す (Chen et al., 1997; Pascual-Leone et al., 1994). 次節から様々な脳刺激法について説明する.

1.2.3. 従来の脳刺激法

電気刺激法

電気刺激法には, 開頭した後に脳へ直接電極を埋め込み電気刺激する, 脳深部刺激法 (deep brain stimulation, DBS) がある (Perlmutter & Mink, 2006). 治療にも応用されており, パーキンソン病の症状を緩和することが知られている (Benabid, 2003; Rizzone et al., 2014). この手法では, 電極付近への局所的な刺激が可能であるが, 電極を埋め込むための手術を伴うため, 侵襲性が課題として挙げられる (Martens et al., 2011). 刺激範囲は電流の分布, パルス

表 1-1. 脳領域とシナプス可塑性.

Reference	Preparation	Targeted region	Stimulation pattern	Plasticity
(Bliss & Gardner-Medwin, 1973)	Rabbit in vivo	Hippocampus	100 Hz for 3 – 4 s	LTP
(Alger & Teyler, 1976)	Rat slice	Hippocampus	0.1 – 15 Hz for 10 s	LTD
(Dunwiddie & Lynch, 1978)	Rat slice	Hippocampus	100 Hz for 1 s	LTP
(Kimura et al., 1989)	Rat slice	Visual cortex, white matter	5 Hz for 30 – 60 s	LTP
(Kudoh & Shibuki, 1994)	Rat slice	Auditory cortex, white matter	100 Hz for 1 s	LTP
(Tekkok & Krnjevic, 1996)	Rat slice	Hippocampus	100 Hz for 1 s	LTP
(Simon et al., 2001)	Mouse slice	Hippocampus	100 Hz for 1 s	LTP
(Shen et al., 2003)	Rat slice	Subthalamic nucleus	60 repetitive bursts consisting of 50 pulses delivered at 100 Hz	LTD
(Murakami et al., 2004)	Rat slice	Auditory cortex, layer 2/3	100 Hz for 1 s	LTD
(Murakami et al., 2004)	Rat slice	Auditory cortex, layers 4 & 6	100 Hz for 1 s	LTP
(Watanabe et al., 2007)	Rat slice	Auditory cortex, layer 2/3	100 Hz for 1 s	LTD
(Braz et al., 2017)	Mouse in vivo	Medial prefrontal cortex	100 Hz for 1 s	LTD

幅、刺激頻度に依存し、できる限り副反応がなく治療効果を最大化する上で、電極の位置は

重要な要素となる (Amon & Alesch, 2017). 侵襲性を伴う脳深部刺激法とは対照的な、非侵襲性の刺激法である経頭蓋電流刺激 (transcranial direct current stimulation, tDCS) がある. この刺激法は、頭皮に二つ以上の電極を貼り、電極間を流れる電流によって刺激する手法であるため、脳深部刺激法のように、電極を直接埋め込むことがなく、侵襲性を伴わない (Herrera-Melendez et al., 2020; Woods et al., 2016).

磁気刺激法

経頭蓋磁気刺激法 (transcranial magnetic stimulation, TMS) は、コイルへ電流を流すことで生成される電磁場によって刺激する、非侵襲的手法であり、耳鳴りや虚血性脳卒中などの治療効果が期待されている (Khedr et al., 2010; Lorenz et al., 2010; Müller et al., 2013). しかし、従来の脳刺激に用いるコイルは大型であるため、刺激の局所性は数センチメートルであり、(Cline et al., 2015; Luan et al., 2014), 脳の深部に刺激が到達しないという課題がある (Bystritsky et al., 2011). コイルが大型であると、マウスをはじめとする小さなモデル動物を用いた研究で扱いが困難であるという問題も生じる. 例えば、耳鳴りへの治療効果を調べる際に、マウスをモデル動物として使うとすると、聴覚皮質がおおよそ 1 mm^2 程度の範囲であるため、センチオーダーの局所性では特定の部位限定での刺激は難しい (Tsukano et al., 2016). このような問題に対処するため、小動物実験を対象とした、ミリサイズの小型コイルの使用も試みられている (Higuchi et al., 2021; Yoshikawa et al., 2022).

1.2.4. 超音波刺激法

概要と優位性

従来の脳神経刺激法では、電磁氣的刺激が用いられることが多く、それらは刺激領域の空間局所性と深部到達性に欠点があった (Ridding & Rothwell, 2007). さらに、空間局所性と深部到達性を補うと、非侵襲性を損なってしまうという課題もあった (Martens et al., 2011; Perlmutter & Mink, 2006). そこで、低侵襲的に刺激領域の空間局所性と深部到達性の両方を同時に改善する画期的な方法として経頭蓋超音波刺激法 (transcranial ultrasound stimulation, TUS) が注目されている (図 1-2A) (W. Lee, Kim, Jung, et al., 2015; Yu et al., 2021). 従来の脳刺激法は、医療機関で治療を受ける一時的な方法と、脳内に埋め込む移植型や携帯型の慢性治療が考案されている. しかし、超音波刺激法は比較的新しい手法で、いずれの方法でも臨床応用は実現されていない. その理由は、小型で効率的な超音波刺激装置 (トランスデューサ) が開発されておらず、検証実験や機序の解明が十分に進んでいない点にある. また、

超音波刺激にはその刺激強度によって、高強度集束超音波刺激（high intensity focused ultrasound, HIFU）と低強度集束超音波（low intensity focused ultrasound, LIFU）とに分類される。一般的に、HIFU は $100 \sim 1000 \text{ W/cm}^2$ の範囲の強度を扱い、脳組織の切除術などに用いられる（Klatte et al., 2014; Quadri et al., 2018）。本研究で述べる超音波刺激は、HIFU とは対照的に、比較的低強度の超音波で神経変調を起こす、LIFU を指す。従来の電磁氣的刺激と超音波刺激の特徴を表 1-2 に示す（Luan et al., 2014; Rezayat & Toostani, 2016）。その他の神経変調手法も含めた、時空間的分解能の比較を図 1-3 に示す（Luan et al., 2014）。

表 1-2. 脳神経刺激法の比較.

Parameter specify	DBS	TMS	TUS
Invasiveness	Invasive	Noninvasive	Noninvasive
Spatial resolution	$\sim 1 \text{ mm}$	3 – 5 cm	1 – 5 mm
Depth of stimulation	Unlimited	1 – 1.5 cm	10 – 15 cm
Cellular specificity	Stimulation waveform profile	Not clear	Not clear
Engineering challenges for miniaturization	Current control	Large devices	High power

マウスを対象とした *in vivo* 実験の経頭蓋超音波刺激において、超音波が神経活動を直接的に誘発していることが示唆されていた（Tufail et al., 2010, 2011）。経頭蓋超音波刺激をヒトに適用した例も報告されている。Legon らは、ヒトの一次体性感覚野（S1）を狙って経頭蓋から超音波刺激を印加し、その際の脳波を調べた。その結果、超音波刺激による、感覚誘発電位の有意な減少や、S1 から 1 cm 刺激位置をずらした際にその変化がみられなくなったことを示した（Legon et al., 2014）。他にも、超音波刺激によってヒトの機嫌や、前頭前皮質における感情の調節機能を変調することが可能であることが示唆された報告もある（Sanguinetti et al., 2020）。このように、経頭蓋から特定の脳部位への刺激が可能であることがわかる。さらに、超音波刺激はその深部到達性でも注目されている。例えば、マカクザルの比較的脳深部に位置する扁桃体および前側帯状皮質（anterior cingulate cortex, ACC）への超音波刺激を行った報告もある（Folloni et al., 2019）。

また、脳の深部には視床と呼ばれる領域がある。視床は、齧歯類のモデル動物であるラットでは脳表から 6.2 cm の深さに、ヒトでは数 cm 以上の深さに位置する。TMS の刺激は集

束型の強度分布を成さないため、脳の深部に十分な刺激強度を印加しようとする、他の領域にも強く影響を及ぼすリスクに注意が必要である。過去には、慢性的な認知障害患者に対して、視床へ刺激を印加することで行動的応答が増加したことや、視床下核への刺激がパーキンソン病モデル動物の治療効果を示した例が報告されている (J. A. Cain et al., 2021; Z. Wang et al., 2020)。したがって、パーキンソン病や認知障害などの、脳深部の変調が治療として必要な場合、TUS の物理的特徴が意義を持つと考えられる。そして、可塑性の誘発効果においても従来の電磁気的手法に比べて超音波刺激が、効果が高いという報告もされてい

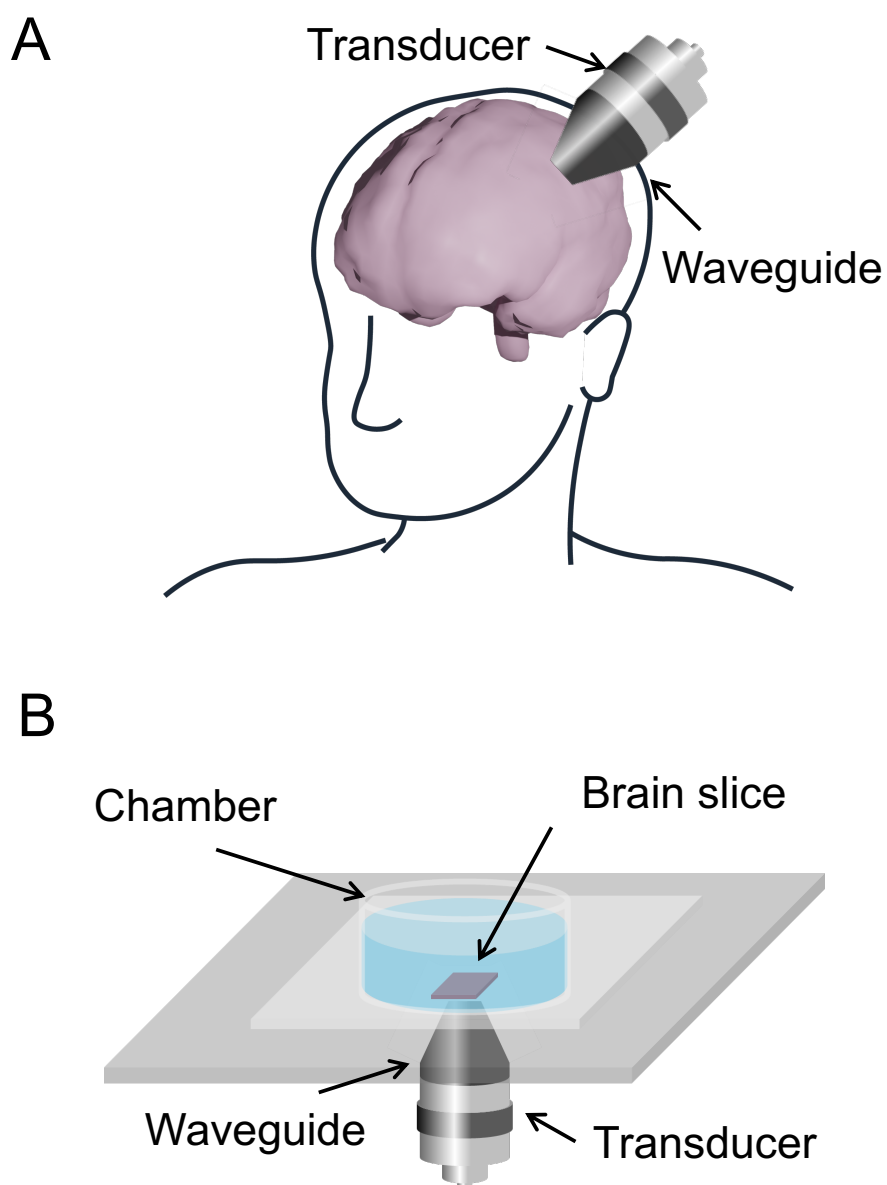


図 1-2. 超音波刺激の概略図. (A) 経頭蓋超音波刺激. (B) In vitro 超音波刺激系.

る (Zeng et al., 2022).

臨床研究での現状と問題

しかし、超音波刺激を治療へ応用する上でのガイドラインは現状確立されていない (Qin et al., 2024). 超音波刺激が、脳の興奮性や行動に影響を及ぼすことが系統的レビューにまとめられているが、既存の研究にはランダム化比較試験、被験者内試験、および、ケースレポートなど、多種のデザインが含まれていることから、臨床と研究との解釈を困難にしている (Sarica et al., 2022; P. Wang et al., 2019). また、被験者内試験では、前の治療条件が次の治療条件に影響を与える持ち越し効果の可能性が懸念される。1回のセッションのみでは、最大40分までの長期的な変調効果が報告されている (Gibson et al., 2018; Hameroff et al., 2013; Zeng et al., 2022). また、ヒトに応用した例では、数人の被験者から頭痛や吐き気の副作用が報告されている (Qin et al., 2024).

末梢系での応答特性

さらに、超音波刺激には直接的に神経活動を誘発する効果だけでなく、間接的に誘発する効果もあるという議論があった (Guo et al., 2018; T. Sato et al., 2018). In vivo で超音波刺激を

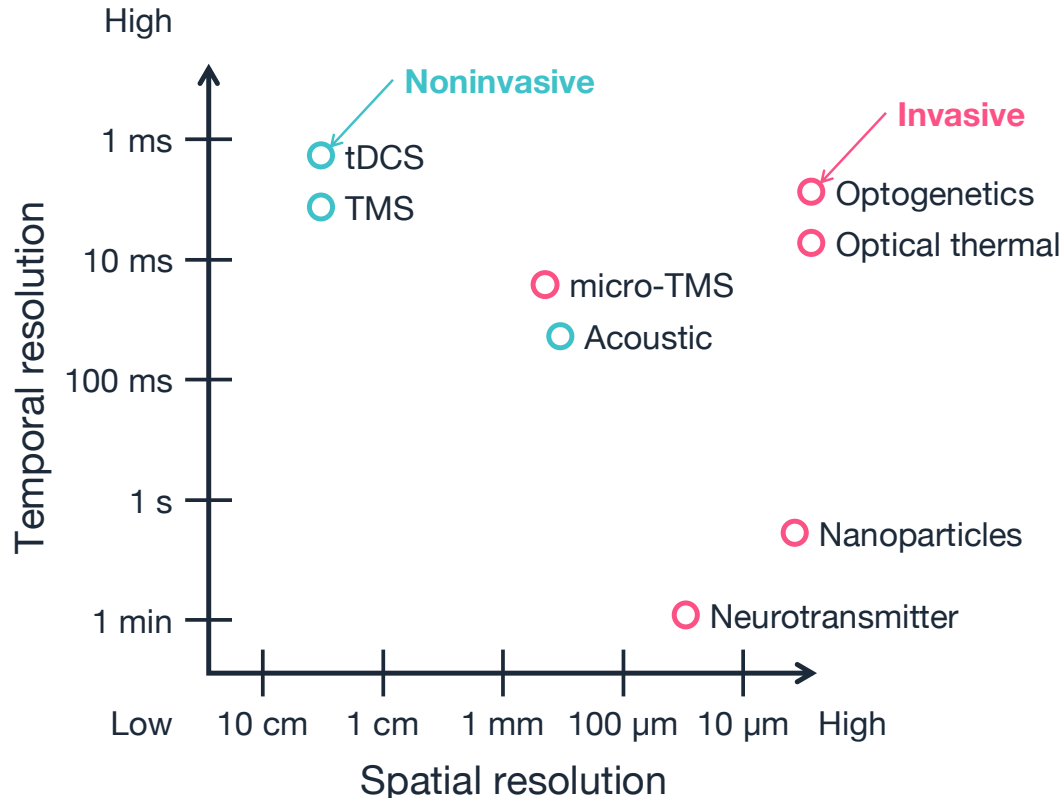


図 1-3. 神経変調の時空間的分解能の比較 (Luan et al., 2014).

印加した際に、内耳から蝸牛を刺激し、音の知覚が起きることで聴覚経路を介して間接的に応答を生じさせることがあることがわかった (Guo et al., 2018; T. Sato et al., 2018). したがって、in vivo での超音波刺激実験では超音波が直接刺激が可能かどうかについて注意が必要である。このような間接的な応答が生じてしまわないよう、超音波刺激波形のオンセットおよびオフセットに、滑らかな窓関数を用いて音の知覚を防ぐという工夫が報告されている (Mohammadjavadi et al., 2019). 現在は、超音波刺激が直接的に神経活動を誘発する場合においても、その誘発機序は十分には明らかとなっていない (誘発機序については 1.2.4 節を参照).

脳切片超音波刺激システム

そこで、超音波刺激の誘発メカニズム解明に向けて、外部環境を容易に制御することが可能となる in vitro 実験の研究も報告されている。例えば、in vitro での超音波刺激実験で、超音波が機械受容チャンネルに作用していることが示されている (Prieto et al., 2018; Qiu et al., 2019). さらに、この作用機序を利用して、分子遺伝学的に、ある閾値の圧力で開く機械受容チャンネルを細胞に導入し、超音波刺激によって細胞特異的に刺激できることを示した報告が存在する (Qiu et al., 2020; Xian et al., 2021). In vitro 実験の中でも、これまで齧歯類では海馬を含む脳スライス実験が多く報告されてきた (J. B. Choi et al., 2013; H. B. Kim et al., 2017; Tyler et al., 2008). また、in vivo 実験においては、齧歯類の脳皮質を対象とした超音波刺激実験が報告されているが (Bian et al., 2021; Liu et al., 2021; T. Sato et al., 2018), 超音波刺激が誘発する神経活動を齧歯類の皮質スライスで調べた in vitro 実験の報告は少ない (Furukawa et al., 2022). 脳皮質は6つの層から構成されており、その特有の層構造および神経回路網が知られているため (Muramatsu et al., 2019; Namikawa et al., 2017; Yamamura et al., 2017), 超音波刺激においても組織特有の応答特性を調べる価値がある。

生体脳超音波刺激システム

神経活動誘発の機序を解明する上で、細胞レベルの実験が有用であると考えられる (Oh et al., 2019; Qiu et al., 2019). しかし、従来のトランスデューサは、細胞レベルの局所刺激を印加するには、図 1-2B に示すようにその刺激印加部のサイズが大きい (> 10 mm) ため、マイクロスケールの実験系の開発が望まれる。より高い空間局所性を求め、光音響の技術でサブミリスケールの空間局所性を達成した報告もあるが、その手法では侵襲性が高いという問題があった (Jiang et al., 2020; S. Kim et al., 2021). In vivo においても、トランスデューサが大きいと慢性的な治療効果の検証実験において固定の難しさや、ストレスの問題が生じ

る。そのため、トランスデューサの小型化、およびウェアラブル化が望まれている (E. Kim et al., 2021)。

そこで、マイクロ磁気刺激にも応用される、マイクロ電気機械システム (microelectromechanical system, MEMS) の製作技術を利用し、近年では超音波刺激に向けたトランスデューサの開発が行われている (Le et al., 2021)。例えば、容量性マイクロ超音波トランスデューサ (capacitive micromachined ultrasound transducer, CMUT) を作製し、自由行動下のマウスへの *in vivo* 超音波刺激実験が報告されている (H. Kim et al., 2019)。さらに、圧電型マイクロ超音波トランスデューサ (piezoelectric micromachined ultrasound transducer, PMUT) を作製し、分散培養系を用いた *in vitro* 超音波刺激実験で、細胞実験への有用性を示した研究も報告されている (J. Lee et al., 2019; Oh et al., 2019)。しかし、Lee らの *in vitro* 実験で用いられた分散培養系の脳細胞では、神経細胞が分離されており、培養系で回路網のランダムな再構成が生じていると考えられる。細胞レベルで組織特異的な応答特性を調べる場合には、脳本来の特徴が失われている可能性のある培養細胞よりも、比較的組織本来の神経回路網の構造が保持されている脳スライスを用いることが必要である。また、エネルギー効率の観点では、PMUTの方がCMUTより優れているとされている (Manwar et al., 2020)。そこで、外部環境を容易に制御できる *in vitro* 実験系と脳スライス、さらに PMUT を組み合わせることで、超音波刺激の神経活動誘発機序の解明に向けた細胞実験が行えると考えた (Furukawa & Tateno, 2022)。

1.2.5. 超音波刺激の神経活動誘発機序の仮説

これまでの知見では、超音波刺激による神経活動誘発についての複数の機序仮説がある (Blackmore et al., 2019; Cardenas-rojas et al., 2021; Pasquinelli et al., 2019a)。(1) 機械受容チャネルの作用、(2) 細胞膜の変形、および、(3) グリア細胞の作用が知られている。これらのメカニズムが単独で作用する可能性も、複数の機序が組み合わさり誘発する可能性も考えられる。これらの内、どの機序が大きく関与するかや、組織特異性があるかなどの詳細な機序は明らかとなっていない。特に機械受容チャネルの作用に注目が高まっており、超音波刺激で TRP-4, Piezo1, DEG/ENAC/ASIC, TRPC1, MscL-G22S, TRPA1, および two-pore domain カリウムチャネル (TREK-1, TREK-2, TRAAK) が活性化することが知られている (Burks et al., 2019; Ibsen et al., 2015; Kubanek et al., 2016, 2018; Oh et al., 2019; Qiu et al., 2019, 2020; Sorum et al., 2021)。また、皮質ニューロンでは複数の機械受容チャネル (TRPV1, TRPV2, TRPV4,

Piezo1, TRPC1, TRPM7, および, TRPP1/2) の発現が報告されている (Christensen & Corey, 2007; Ranade et al., 2015). Piezo1 に関しては, 皮質よりも中心扁桃体での発現が多く, 発現量の差に対応して脳領域で超音波刺激への応答感度が異なることが知られている (Zhu et al., 2023). このような機械受容チャネルに起因するイオン膜電流は G タンパク質共役型受容体により間接的にも調節される (Xu et al., 2018). 従来の研究では機械受容チャネルの超音波刺激に対する応答について, 陽イオンを対象とした報告が一般的であったが, 近年では陰イオン電流を流すクロライドチャネル (cystic fibrosis transmembrane transduction regulator, CFTR) への作用も報告されている (Wen et al., 2024).

超音波が機械受容チャネルに作用してから, 神経発火に至るまでの概略図を図 1-4 に示す (Yoo et al., 2022). 超音波は細胞膜にある特定のカルシウム透過生機械受容チャネルの開口を引き起こす. 開口したチャネルを通過して細胞外からカルシウムイオンが流入し蓄積される. カルシウムイオン電流は 2 種類の下流増幅因子により増幅される. 1 つ目は, カルシウム感受性カチオンチャネルの, TRPM4 の作用である. TRPM4 は皮質ニューロンで発現

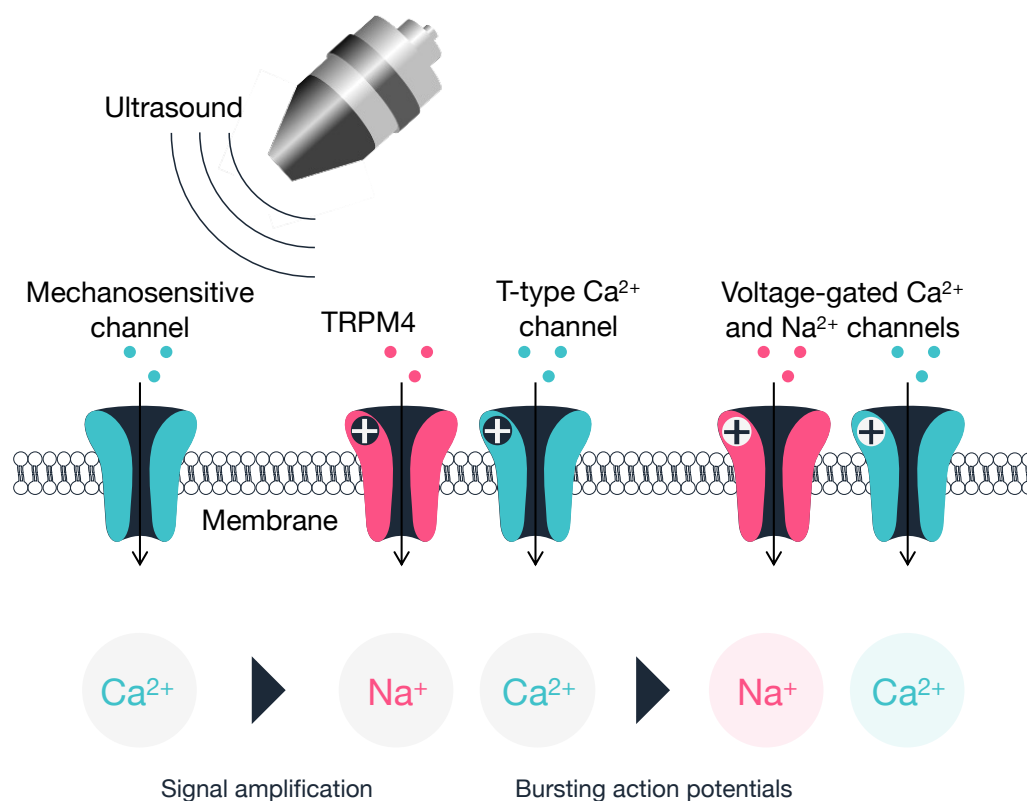


図 1-4. 超音波刺激が誘発する活動電位の機序の概略図.

し、3 μ M の細胞内カルシウムイオン濃度で活性化することで、小さなカルシウムイオン信号を脱分極電流へと増幅する (Launay et al., 2002; Prawitt et al., 2003). 2 つ目の増幅要素は、T 型の電位依存性カルシウムチャネルの開口である。T 型の電位依存性カルシウムチャネルは、低閾値の発火と活動電位を引き起こすことで知られている (S. M. Cain & Snutch, 2010).

1.2.6. 超音波刺激のパラメータ

超音波刺激では、正弦波状の音響圧力を連続波として印加する場合と、パルス波として印加する場合の 2 通りがある (J. B. Choi et al., 2013; H. B. Kim et al., 2017; Tyler et al., 2008). 連続波とは、刺激時間の間一貫して超音波を印加する波形である。一方で、パルス波とは、図 1-5A のように、刺激時間内にオンとオフが存在する。このオンとオフをそれぞれ、トーンバースト時間 (tone burst duration, TBD) およびパルス繰り返し時間 (pulse repetitive period, PRP) と呼ぶ。そして、これらの比、TBD/PRP をデューティ比 (duty cycle, DC) と呼ぶ (Pasquinelli et al., 2019b). また、PRP の逆数であるパルス繰り返し周波数 (pulse repetitive frequency, PRF) は、これまで様々な値が使われてきた。PRF を増加させた際に抑制性の fast-spiking ニューロンでは発火頻度に変化がみられなかった一方、興奮性の fast-spiking ニューロンでは有意な変化が生じたという報告がある (Yu et al., 2021). また、連続波とパルス波の刺激による応答について調べた結果、パルス波における刺激の方が応答率が高く、さらにその繰り返し周波数が 300 Hz と 1,500 Hz とでは 1,500 Hz のときの方が高かった (Manuel et al., 2020). これらのように、PRF はパルス波刺激において重要なパラメータであることがわかる。

超音波刺激の刺激強度は、図 1-5B に示される正弦波状の音響圧力 $p(t)$ から算出される (図 1-5C). 特に、刺激強度の指標として、式(1-1)より算出される繰り返し平均強度 (spatial peak temporal average intensity, I_{spta}) と式(1-2)より算出されるパルス平均強度 (spatial peak pulse average, I_{sppa}) の 2 種類が用いられる。

$$I_{\text{spta}} = \frac{1}{\text{PRP}} \int_0^{\text{PRP}} \frac{p^2(t)}{\rho c} dt. \quad (1-1)$$

$$I_{\text{sppa}} = \frac{1}{\text{TBD}} \int_0^{\text{TBD}} \frac{p^2(t)}{\rho c} dt. \quad (1-2)$$

$$I_{\text{spta}} / I_{\text{sppa}} = \text{DC}. \quad (1-3)$$

ここで、 ρ は媒質の密度、 c は音速を示す。

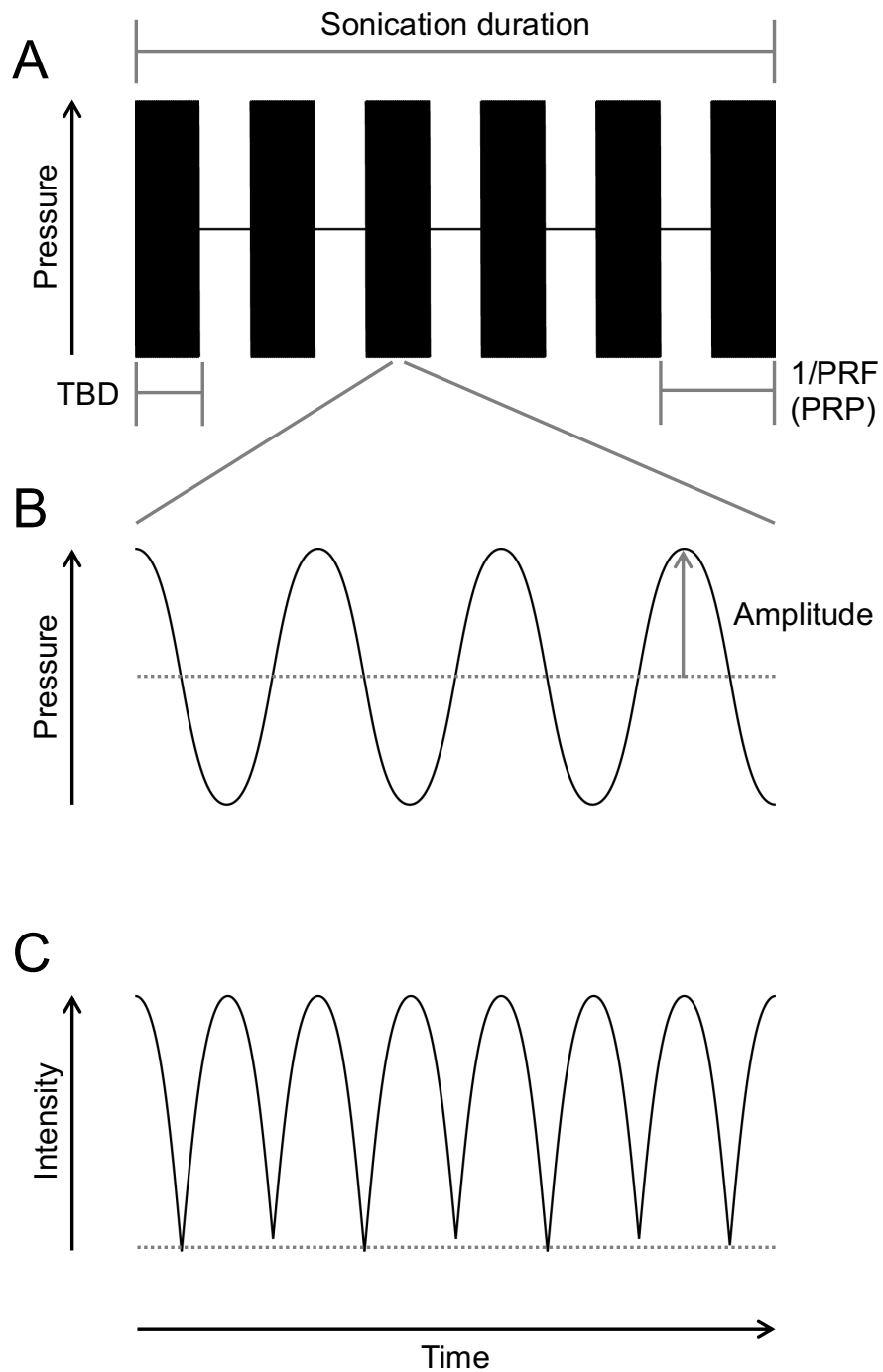


図 1-5. 超音波刺激パラメータの概略図. (A) パルス波. (B) 1パルスの拡大図. (C) パネル(B)の音響圧に対応する強度.

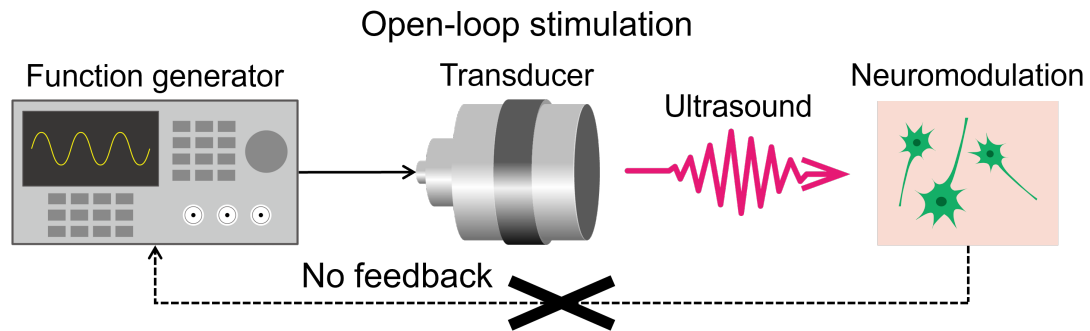


図 1-6. 従来の開ループ型超音刺激.

1.2.7. 閉ループ型刺激

脳刺激を治療に応用するためには、装置システムの構成と機能が重要である。例えば、てんかん発作や精神疾患などの疾患では治療期間が長期間にわたる可能性があるため、過度な脳刺激を回避する方法の開発が近年進められている。従来の開ループ型刺激では、刺激強度が適切であるか否かを判定するためのフィードバック信号がないため（図 1-6）、過剰な活動誘発による、副作用のリスクが懸念される。過度な刺激を避けるために、脳活動を持続的にモニタリングし、活動に応じて必要なタイミングで刺激を印加する、閉ループ型の脳刺激が望ましいと考えられる (Takeuchi et al., 2020; Takeuchi & Berényi, 2020)。特に、予測困難かつ突発的に生じる発作の治療には、閉ループ型の刺激系が必要となる (Hameed et al., 2018; Sudalaimani et al., 2015)。近年では、閉ループ型超音波刺激系の構築が試みられ始めている。例として、マウスの脳波から発作が検出されると、自動的に超音波刺激を印加するという技術の報告がある (Zhong et al., 2021)。

1.3. 本研究の構成

第1章では、本研究の背景および目的について記述した。第2章では、シナプス可塑性モデルを利用した、神経伝達物質受容体と長期抑圧の関係の解析について述べる。第3章では、微小トランスデューサの開発と、その *in vitro* 実験への応用性について述べる。第4章では、聴覚末梢系の活性化を防ぎながら、中枢系の活性化を誘発するための効率的な TUS パターンについて述べる。第5章では、閉ループ型 TUS 用の頭部固定型マイクロデバイスの開発とその実用性について述べる。第6章では、本研究のまとめと今後の展望について述べる。第2～5章の関係を図1-7に示す。

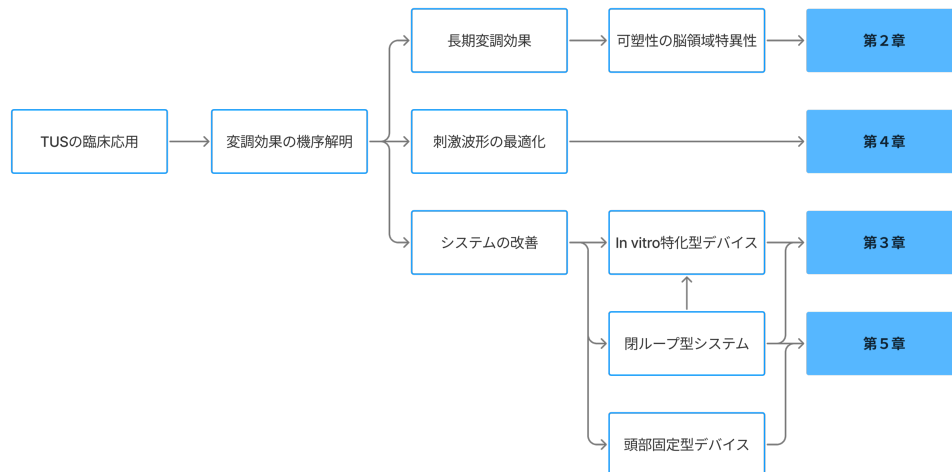


図 1-7. 本論文の構成.

第2章 聴覚皮質における長期抑圧の動態解析

2.1. 背景と目的

聴覚皮質において、神経細胞のシナプス可塑性は、音情報の選択的な処理や外部環境への適応に重要な役割を担っている。また、シナプス可塑性には、長期増強 (long-term potentiation, LTP) や長期抑圧 (long-term depression, LTD) などの増強と減弱の相反する機能がある。可塑的な脳機能変化の一例として、発達過程の齧歯類聴覚皮質では、経験に応じて、音響信号の周波数に対して脳部位特異的に、反応選択性が形成されていくことが知られている (Buonomano & Merzenich, 1998; Weinberger, 2004)。一般的に、海馬を含む脳切片 (スライス) では、約 100 Hz の高頻度電気刺激 (テタヌス刺激, tetanic stimulation, TS) を印加すると、その TS 後にテスト刺激の誘発応答が増強する LTP が知られている (Dunwiddie & Lynch, 1978)。一方、聴覚皮質を含む齧歯類の脳スライスでは、TS を印加した実験で、LTD が生じたという報告がある (Watanabe et al., 2007)。聴覚皮質は特徴的な 6 層構造を形成し (Budinger & Kanold, 2018)、TS によって誘発される LTD は、皮質特有の神経回路網構造を反映していると考えられるが、その構造と LTD の詳細な関係性は、現時点で明らかになっていない。シナプス可塑性は、神経伝達物質受容体の構造や機能の変化に関係している。このため、詳細な機序の解明には、神経伝達物質受容体の機能を薬理的に阻害あるいは促進させて可塑性の変化を実験的に観察する。特に、in vitro 脳スライスを用いた実験では、脳組織の局所神経回路網の構造をある程度維持したまま、スライス外部の条件を変更できる利点がある。

シナプス可塑性誘発後のテスト刺激に対する反応は、経過時間とともに動的に変化するため、反応動態をモデル化したシナプス可塑性モデルが提案されている (Pfister & Gerstner, 2006; Shouval et al., 2002)。特に、Graupner らの動態モデルは、規格化された反応の大きさを唯一の変数とする単純な常微分方程式であり、簡便に実験結果に応用が可能である (Graupner & Brunel, 2012a)。

本研究では、電気生理学的実験の結果と数理モデルを用いて、応答動態に基づき、可塑性に関係する主要な受容体を探索することを目的としている (図 2-1)。具体的には、脳スライスを用いて計測した、神経活動の可塑的な反応動態を、Graupner らのシナプスモデルに当てはめて、阻害 (促通) 実験条件に依存したモデル係数を推定した (Graupner & Brunel, 2012a)。推定したモデル係数を用いて、可塑性に関係する主要な受容体を探索し、反応動態への影響

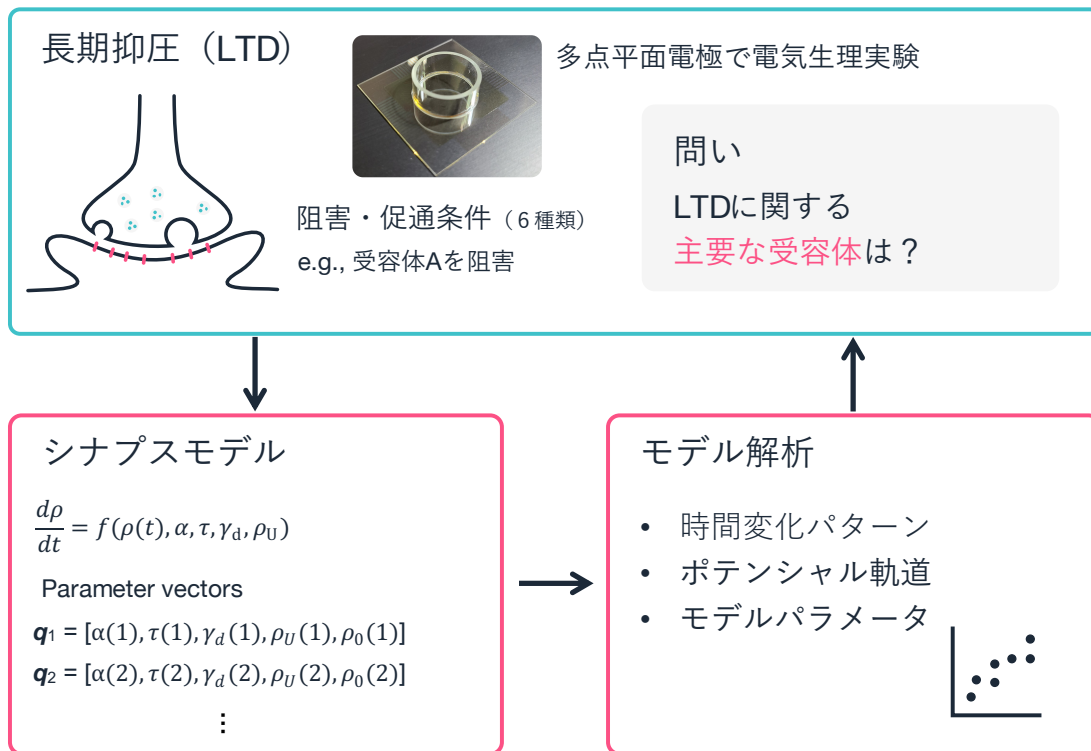


図 2-1. 聴覚皮質における長期抑圧の動態解析の概略図.

を定量的に明らかにする.

2.2. 方法

2.2.1. 脳スライスの局所電場電位データ

テスト刺激に対する局所電場電位 (local field potential, LFP) を、マウスの聴覚皮質を含む、厚さ 400 μm 脳スライスから計測した。脳スライスは 64-ch 多点電極アレイの基板 (MED-P515A, Alpha MED Scientific, Japan) の上に置かれ、短い電気パルスの応答を 30 s 間隔で印加し、誘発応答を計測した (図 2-2A)。聴覚皮質の第 4 層 (layer 4, L4) の位置にある電極から、可塑性を誘発するために TS (100 Hz, 1 s) を印加した。TS が印加される前の電流刺激に対する誘発応答の振幅 A_{pre} と印加から t min 後の誘発応答の振幅 $A_{\text{post}}(t)$ の比を Ratio index (RI) :

$$\text{RI}(t) = A_{\text{post}}(t) / A_{\text{pre}} \quad (2-1)$$

と定義した (図 2-2B)。また、LFP 計測は、対照実験 (control, 7 スライス) に加えて、シナプス伝達を阻害あるいは促進させる、次の 6 つの薬理条件下で行われた：(i) D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5), (ii) DNQX, (iii) metabotropic glutamate receptor 5 antagonist 6-methyl-2-(phenylethynyl)-pyridine hydrochloride (MPEP), (iv) bicuculline methiodide, (v) CGP

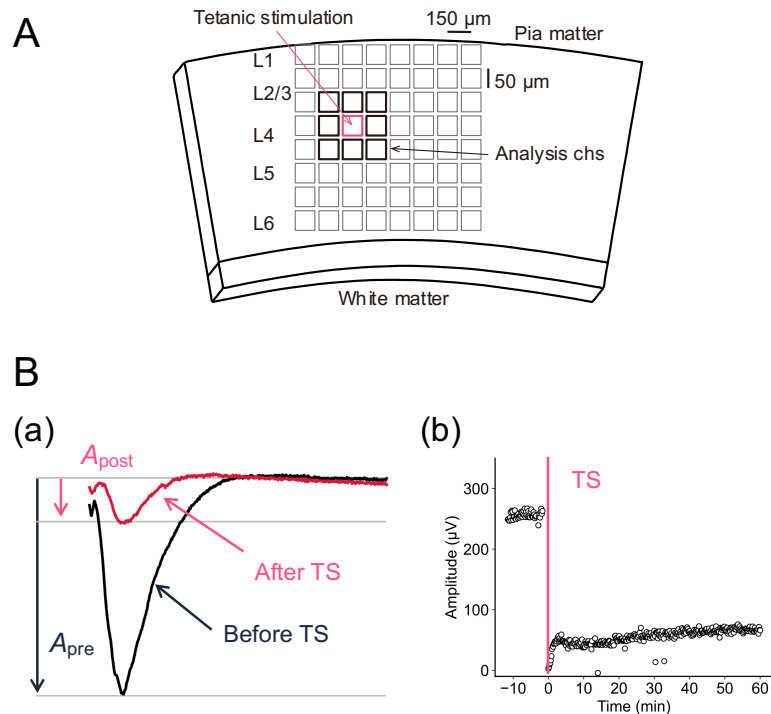


図 2-2. 電気生理学的実験の概要。 (A) 多点電極アレイ上の脳スライス。 (B) (a) TS 前後の誘発応答と (b) 応答振幅の時間変化。

54626 hydrochloride (vi) GABA_A receptor agonist muscimol (表 2-1). また、誘発応答の解析には、TS を印加したチャンネルの周辺にある 8 チャンネル (channels, chs) の応答を使用した (図 2-2A).

表 2-1. 電気生理学的実験に用いられた薬理条件. *Glu はグルタミン酸, **GABA は γ -アミノ酸を表す.

i	投与薬剤	伝達物質	受容体	効果	切片
1	D-AP5	Glu*	NMDA	阻害	6
2	DNQX	Glu	AMPA	阻害	7
3	MPEP	Glu	mGlu5	阻害	6
4	Bicuculline	GABA**	GABA _A	阻害	6
5	CGP	GABA	GABA _B	阻害	7
6	Muscimol	GABA	GABA _A	促通	8

2.2.2. シナプス可塑性モデル

Graupner らは、シナプス可塑性のモデルとして、テスト刺激に対する誘発応答を状態変数とする、1 変数 ρ のモデルを提案した (Graupner & Brunel, 2012b) :

$$\frac{d\rho}{dt} = \frac{1}{\tau} [-\rho(1-\rho)(\rho_* - \rho) + \gamma_p(1-\rho)\Theta\{c(t) - \theta_p\} - \gamma_d\rho\Theta\{c(t) - \theta_d\} + N(t)] \quad (2-2)$$

本研究では、この状態変数 $\rho(t)$ を実測データ $RI(t)$ に対応させる。ここで、 γ_p および γ_d は、増強率、抑圧率を各々示す。 $\Theta\{\cdot\}$ はヘビサイド関数、 θ_p と θ_d は、増強と抑圧の閾値を各々表す。 $c(t)$ は細胞内のカルシウムイオン濃度、 τ は時定数を表す。式(2-2)は、モデル係数の条件によって、2つの安定な平衡点をもつ場合がある。その場合に、 ρ_* は二つの平衡点に対応する状態の分水嶺である。本研究では、簡便のために、式(2-2)右辺のノイズ項 ($N(t)$) を除外した。さらに、LTD に着目するため、 γ_p を 0 とみなした。また、 $c(t)$ は時間に依存する変数であるが、時刻 $t = 0$ に TS を印加した後に、10 分後以降はモデル係数が固定され、式(2-2)のモデル係数は時不変であると仮定した。したがって、TS 印加の 10 分後以降では、 $\Theta\{c(t) - \theta_d\}$ は時間に依存しない定数項とみなした。以降の本研究では、次の簡易シナプスモデルを使用する。

$$\frac{d\rho}{dt} = -\frac{\rho - \alpha}{\tau} \{(\rho - \rho_U)(\rho - 2) + \gamma_d\}, \quad (2-3a)$$

$$0 < \alpha < \rho_U < 2, \quad (2-3b)$$

$$\rho_U = \rho_* + \alpha, \quad (2-3c)$$

$$\rho(t_0) = \rho_0. \quad (2-3d)$$

ここで、点 $\rho = \rho_U$ と ρ_U より小さな平衡点 ($\rho = \alpha$) は、式(2-3b), (2-3c) に従うものとする。さらに、 $t = t_0$ における微分方程式の初期条件を式(2-3d)とした。図 2-3A に本研究における簡易シナプス可塑性モデルの動態を示す。さらに、図 2-3B には対応するポテンシャル関数 V を示す。ポテンシャル関数 V は以下の関係式から求められる。

$$V(\rho) = -\int_0^\rho f(u) du, \quad (2-4a)$$

$$f(u) = -\frac{u - \alpha}{\tau} \{(u - \rho_U)(u - 2) + \gamma_d\}. \quad (2-4b)$$

本研究で扱うシナプスモデルの V は、 γ_d が大きいときには $\rho = \alpha$ (< 1) の 1 点で最小値 (安定平衡点) を取る (図 2-3Aa, Ba)。一方、 γ_d が小さいときに V は 2 点で極小値を取る (図 2-3Ab, Bb)。これら極小値の状態 ρ を LTP と LTD に関連付ける。すなわち、2 つの安定な平衡点に対して、大きい状態点 ($\rho = \rho_+ > 1$) を LTP に割り当て (TS 後に誘発応答の振幅が大きくなる)、小さい状態点 ($\rho = \alpha < 1$) を LTD とした (TS 後の誘発応答が小さくなる)。平衡点 $\rho = \rho_+$ は式(2-4b)中の 2 次関数の零点であり、以下で表される。

$$\rho_{\pm} = \frac{1}{2} \left\{ (2 + \rho_U) \pm \sqrt{(2 - \rho_U)^2 - 4\gamma_d} \right\} \quad (2-5)$$

そのため、

$$\rho^2 - (2 + \rho_U)\rho + 2\rho_U + \gamma_d = 0, \quad (2-6a)$$

ρ に関する 2 次方程式の平衡点の数に関する判別式 D :

$$D = (2 - \rho_U)^2 - 4\gamma_d, \quad (2-6b)$$

となり、 $D < 0$ は 1 つの安定平衡点 ($\rho = \alpha$)、 $D \geq 0$ は 2 つの安定平衡点に対応する ($\rho = \alpha, \rho = \rho_+$)。このように、モデル式(2-3a)は動変数に双安定性を持っており、これは生理学的実験に基づく生化学モデルと一致している (Zhabotinsky, 2000)。

2.2.3. 神経活動計測データへのモデルフィッティング

簡易シナプスモデル（式(2-3)）には、5つのモデル係数（ α , τ , γ_d , ρ_U および、 ρ_0 ）が存在し、シナプス可塑性の実測データ RI から、これらの係数を推定した。実測データ RI は、可塑性を誘発した TS 印加（ $t=0$ ）後の $t=10, 20, \dots, 60$ (min) の 6 点を用いた。ここで、RI(10) を ρ_0 とし（ $t_0 = 10$, $\rho(10) = \rho_0 = RI(10)$ ），その他の係数を表 2-2 の選択範囲にしたがって変化させた。全ての組み合わせの中から RI の誤差（式(2-7)）が最も小さくなる組み合わせをグリッドサーチにより選択した (Charnes et al., 1955).

$$E = \sum_{i=1}^6 |\rho(10i) - RI(10i)| \quad (2-7)$$

ここでは、各条件グループのスライス平均を 8 チャンネル分、合計 56 データに対して、最適なモデル係数を選択した。

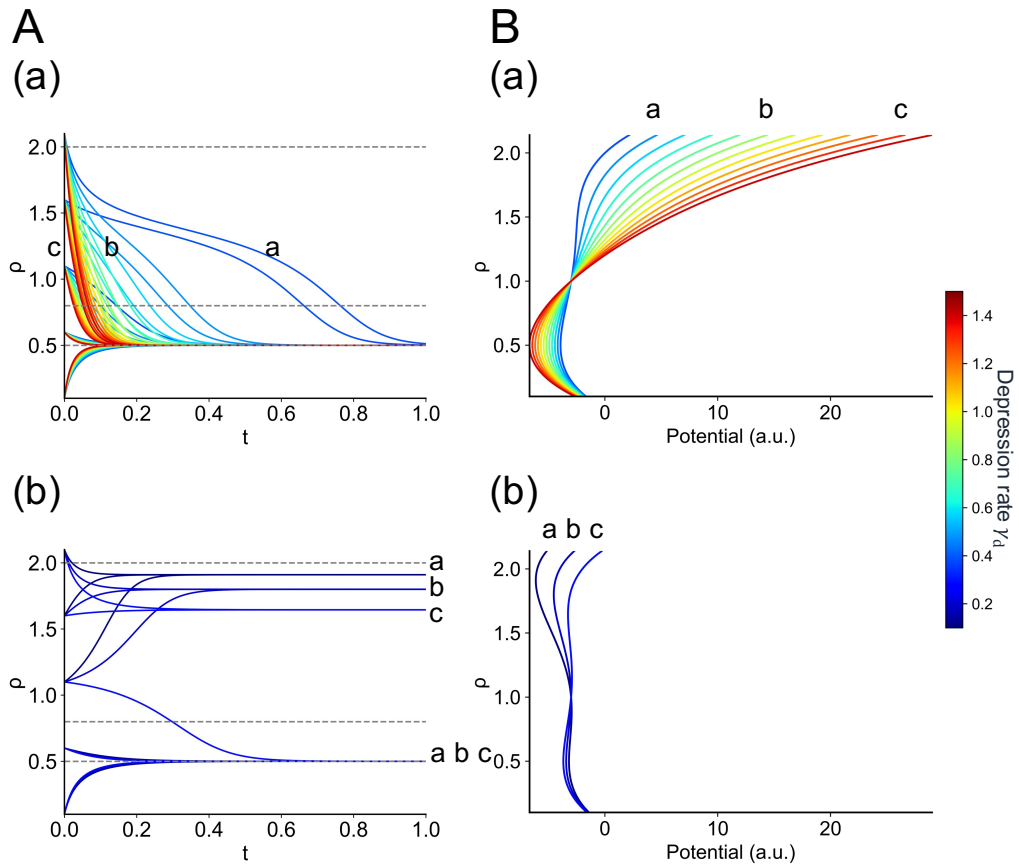


図 2-3. シナプスモデルの動態. (A) 時間変化. (B) ポテンシャル. $\rho_0 = 0.1$ to 2.1 (0.5 step), $\alpha = 0.5$, $\rho_U = 0.8$, $\gamma_d = 0.1$ to 0.5 (0.1 step), および, $\tau = 0.05$.

表 2-2. 推定に用いたモデル係数の範囲.

Parameter	Range	Step
α	0.1 – 0.6	0.05
τ	1 – 3600	300
γ_d	0.1 – 6.0	0.1
ρ_U	$\alpha - 2.0$	0.1

2.2.4. 時間変化パターンのクラスタリング

実測データヘシナプスモデル係数を最適化し、式(2-3)の微分方程式の数値解を計算し、各軌道データの主成分分析 (principal component analysis, PCA) を行った。そして、累積寄与率が 99% の 2 次元空間を構築した。PCA 空間において、各グループデータはクラスターを形成したため、各クラスターの重心ベクトル $\mathbf{c}$ を計算した。次に、control クラスターの重心 $\mathbf{c}_0$ に対する相対距離 d_i を次式で求めた。

$$d_i = \sqrt{(c_{i1} - c_{01})^2 + (c_{i2} - c_{02})^2} \quad (2-8)$$

ここで、 i は control 以外の薬理条件グループを表す (i.e., $i = 1, 2, \dots, 6$)。 c_{01} と c_{02} は control クラスターの 2 次元重心ベクトル $\mathbf{c}_0$ の第一成分および第二成分を示す。さらに、式(2-8)の 2 つの成分($c_{i1} - c_{01}$, $c_{i2} - c_{02}$)は、各薬理条件群の重心ベクトルを control クラスターの重心から引いて相対的に表したものである。一般的に、ゼロベクトルではない行ベクトル $\mathbf{x}$ と $\mathbf{y}$ に対して、 $\mathbf{x}$ と $\mathbf{y}$ の位相差 θ は次式で表される：

$$\theta = \cos^{-1} \left[\frac{\mathbf{x}\mathbf{y}^t}{\sqrt{(\mathbf{x}\mathbf{x}^t) \cdot (\mathbf{y}\mathbf{y}^t)}} \right]. \quad (2-9)$$

ここで、 $\mathbf{a}^t$ はベクトル $\mathbf{a}$ の転置を表す。

また、PCA 空間で大別すると 2 つのクラスター ((i) glutamatergic cluster, (ii) GABAergic cluster) が観察された。サポートベクターマシン (support vector machine, SVM) を用いて、2 つの領域の境界線を推定した (Li et al., 2023)。

2.2.5. モデルの係数の推定法

簡易シナプスモデル中の係数セットに関して、クラスタリングするため、以下の $\mathbf{q}_n$ を定義した。

$$\mathbf{q}_n = [\alpha(n), \gamma_d(n), \rho_U(n), \rho_0(n)] \quad (2-10)$$

ここで、 n はデータ番号を示す (i.e., $n = 1, \dots, 56$). 次元を削除するため、係数ベクトル q_n に対して主成分分析を行った。また、後に主成分と実際の係数とを比較するため、ここでは規格化をせずに、さらに次元が異なる τ を除外して、解析した。第 1 および第 2 主成分によって累積率が 98% に達した。

主要なモデル係数を探索した後、その係数の空間的ばらつきを定量化した。解析に 8 チャネルの電極から得られたデータを用いているため、ここでは 8 チャネル間における標準偏差を採用した。空間的ばらつきの解析には、式(2-7)で算出される誤差の大きさに基づき、外れ値を除外した。外れ値は DNQX から 1 チャネル分のデータが検出された。計測誤差をスライス間平均で除去しきれなかったデータであると判断した。

2.3. 結果

2.3.1. モデルの係数

シナプスモデル中の係数は、グリッドサーチにより最適化された。図 2-4A に例として RI と最適化されたシナプスモデルの時間軌道を示す。次に、モデル中の係数セットに関する主成分分析の結果を図 2-4B に示す。2D PCA 空間における分布は、 (γ_d, ρ_U) で構成される分布と類似していた (図 2-4C)。判別式 D の境界は黒色の破線で示されている。ここで、式(2-11A)が示す領域では平衡点が 1 つ、式(2-11B)が示す領域では平衡点が 2 つに対応している。

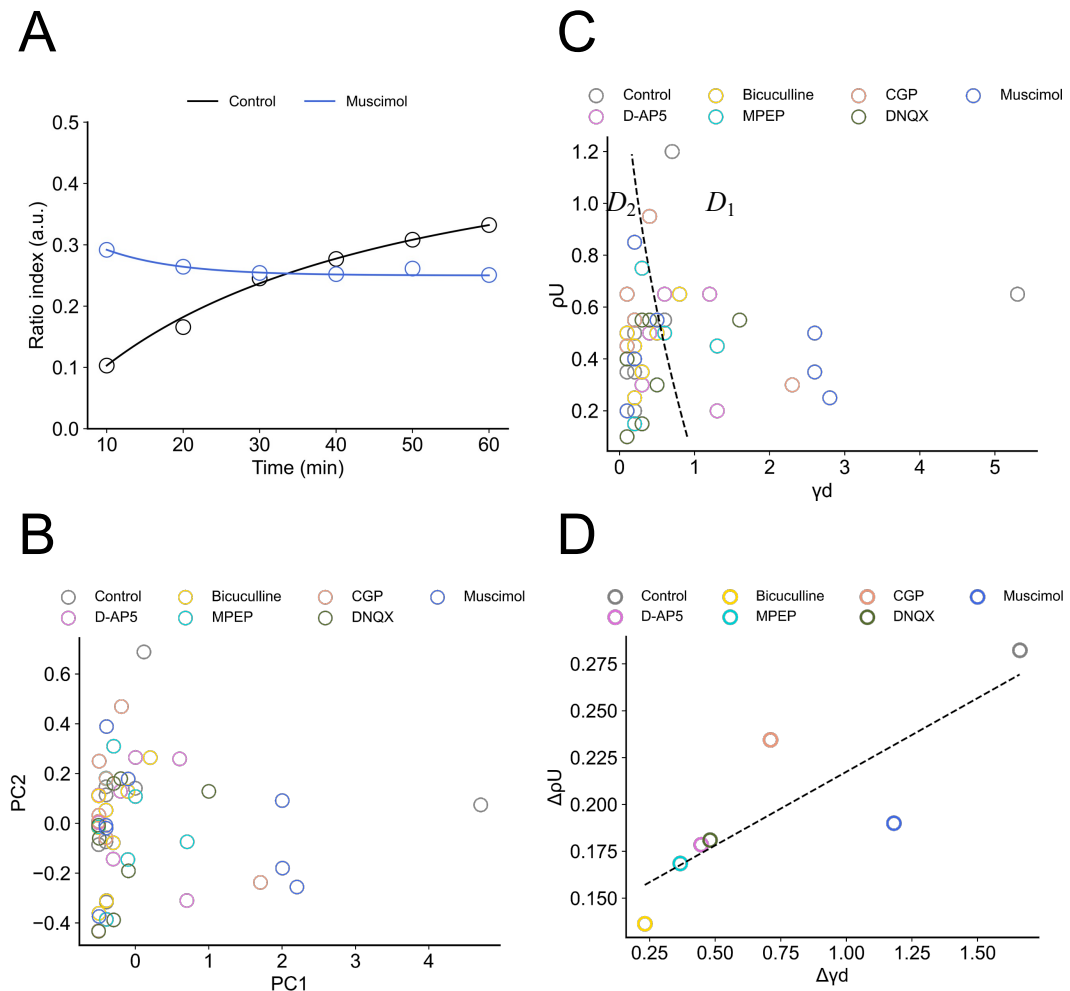


図 2-4. モデル係数の最適化結果. (A) RI (実験データ) と RI に最適化された簡易モデルの時間的な変化の例. (B) モデル係数の主成分分析. (C) 主要な 2 つのモデル係数. (D) 主要な係数の空間的ばらつき.

$$\text{領域}D_1 : \gamma_d > \frac{(2 - \rho_U)^2}{4} \quad (2-11a)$$

$$\text{領域}D_2 : \gamma_d \leq \frac{(2 - \rho_U)^2}{4} \quad (2-11b)$$

式(2-11a), (2-11b)の領域にあるデータ数を, 表 2-3 に示す. いずれのグループも, 両方の領

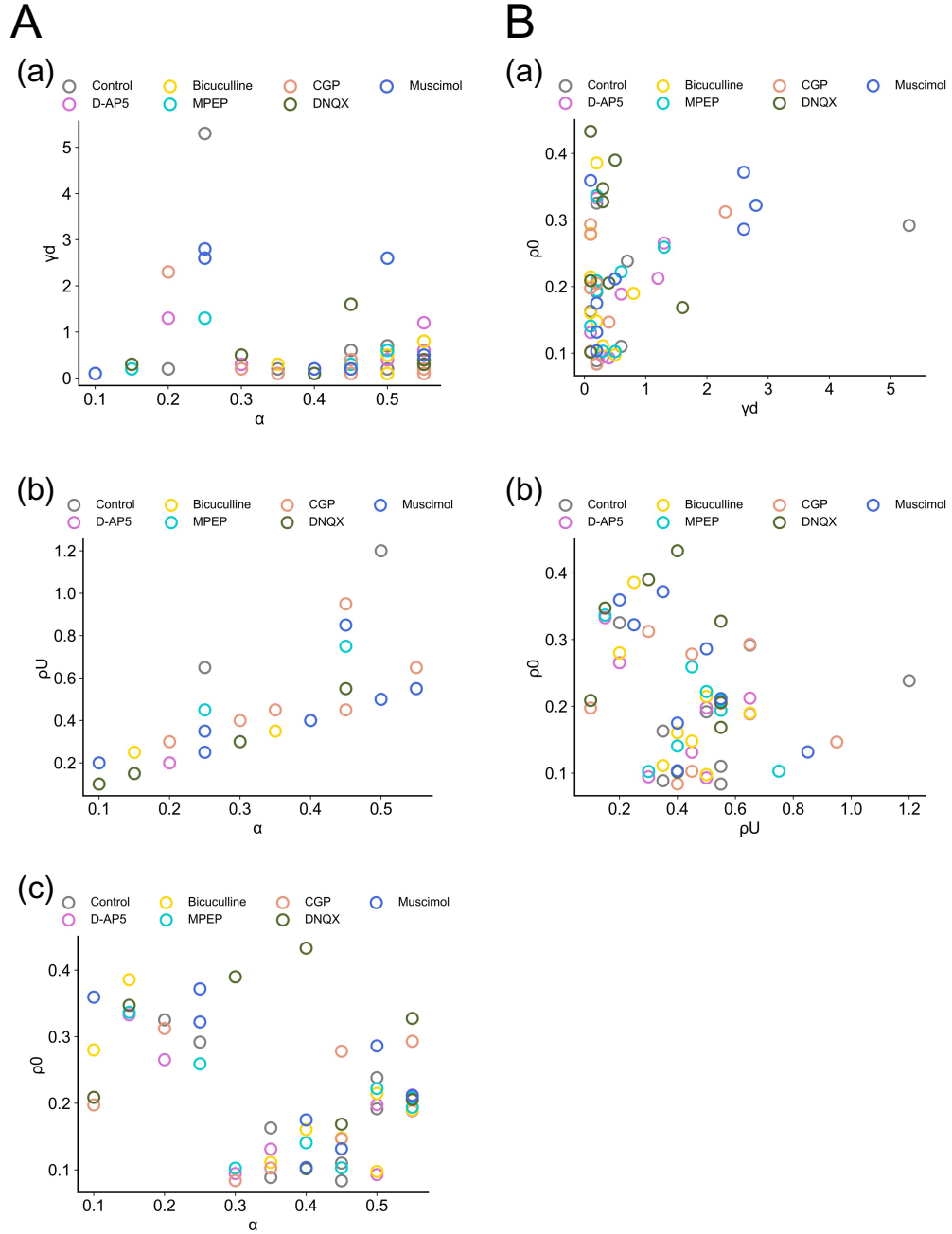


図 2-5. 2次元係数空間上の推定係数点. (A) α との関係. (a) (α vs. γ_d), (b) (α vs. ρ_U), および, (c) (α vs. ρ_0). (B) ρ_0 との関係. (a) (ρ_0 vs. γ_d), および, (b) (ρ_0 vs. α).

域に係数のデータ点を持っていた。図 2-4B,C より、2つの係数：(i) 抑圧率 γ_d 、状態遷移境界 ρ_U が、LTD の形成に特に寄与していることがわかった。その他の係数の組み合わせについては、図 2-5 にまとめた。そこで、この2つの主要な係数の、聴覚皮質神経回路網内にお

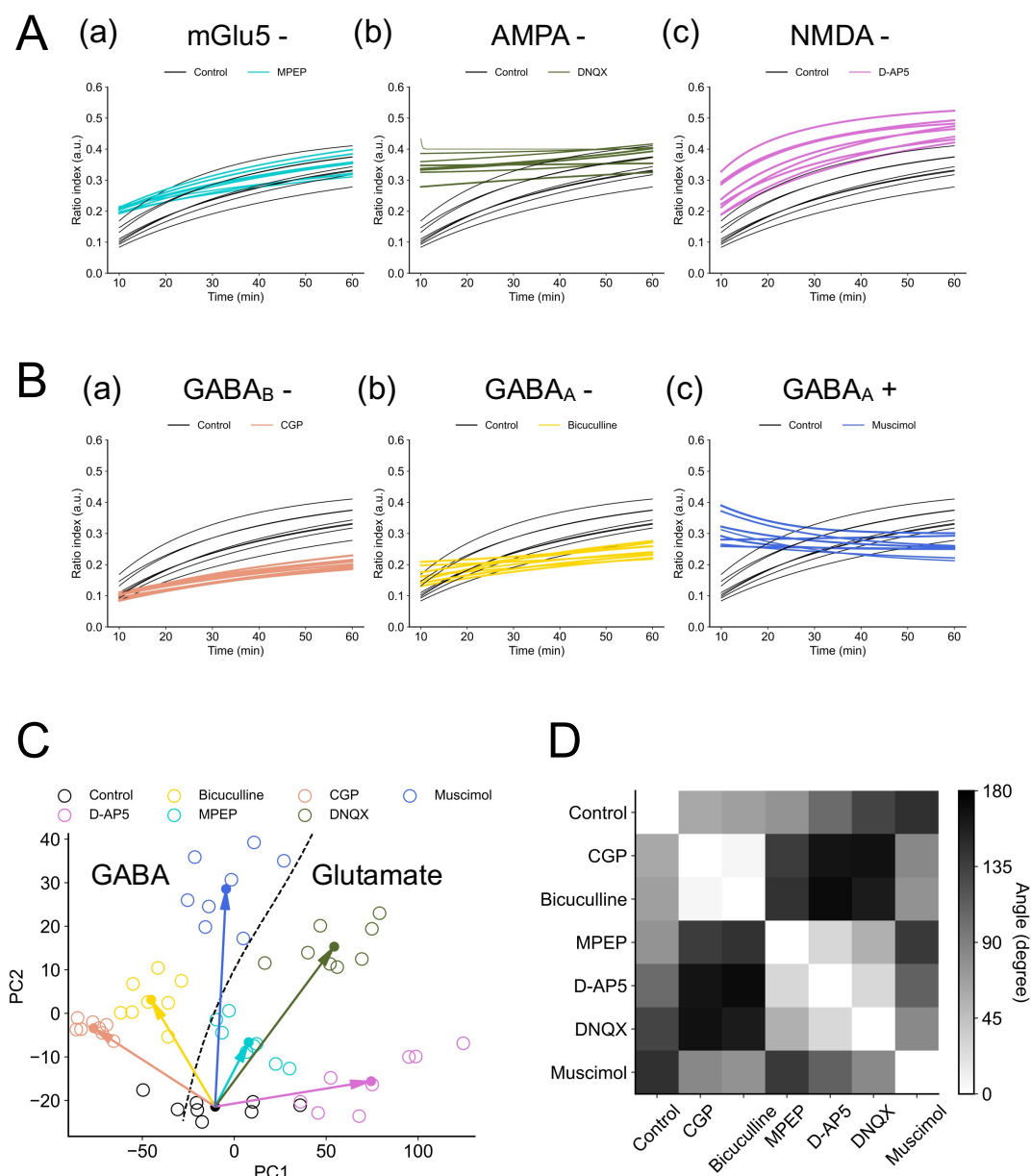


図 2-6. 実測データに最適化したシナプスモデルの過渡状態におけるダイナミクス解析。(A) Glutamatergic group. (B) GABAergic group. (C) 主成分分析. 第1および第2主成分における各データ分布. 各矢印各矢印は control の重心に対する相対重心位置ベクトルを示す. (D) 各重心ベクトルの位相差.

けるばらつき（標準偏差）を，解析に用いた 8 チャンネルから定量化した（図 2-4D）．その結果，control でいずれの係数も最も高いばらつきを示した．さらに， $\Delta\gamma_d$ と $\Delta\rho_U$ には有意な正の相関がみられた（ $r=0.845, p<0.05$ ）．すなわち，いずれの受容体阻害・促進条件で， γ_d と ρ_U の空間的なばらつきが減少したという結果になった．また，glutamatergic group の 3 つのグループは，類似するばらつきを成していた．

表 2-3. 各グループにおける平衡点.

Condition	Effect	領域 D_1	領域 D_2
Control	---	3	5
D-AP5	Glu (-)	3	5
DNQX	Glu (-)	1	7
MPEP	Glu (-)	2	6
Bicuculline	GABA _A (-)	1	7
CGP	GABA _B (-)	2	6
Muscimol	GABA _A (+)	3	5

2.3.2. シナプスモデルの時間軌道

図 2-7A, B に最適化されたシナプスモデルの時間軌道を示す．薬理条件下の可塑性動態は control に比べてチャンネル間でばらつきが小さい軌道を取る傾向がみられた．薬理条件下の中でも，大きく 2 種類でもグループ (i.e., glutamate or GABA) に注目すると，GABAergic group (i.e., Bicuculline, CGP, and Muscimol) は SVM で求めた境界線の左側に，glutamatergic group (i.e., D-AP5, MPEP, and DNQX) は右側に分離して位置する結果となった（図 2-4C）．

さらに，どの受容体が特に LTD の形成に寄与しているかを評価するために，control クラスタとの相対距離を定量化した．その結果，最も距離が大きいグループは D-AP5 であった．その他のグループの相対距離に関しては，次のような関係であった：D-AP5 ($d_1 = 85$) > DNQX ($d_2 = 74$) > CGP ($d_5 = 69$) > Muscimol ($d_6 = 50$) > Bicuculline ($d_4 = 43$) > MPEP ($d_3 = 23$)．ここで，各 d_i は相対距離（式(2-8)）を示す．さらに，各重心ベクトルの位相差（式(2-9)）を求めると，glutamatergic group が control に比べて大きく異なる重心ベクトルの位相をもつ傾向がみられた．

また，最適化されたモデルのポテンシャルを図 2-7 に示す．いずれのグループも単一井戸

型, 二重井戸型の両方のポテンシャルを持っていた. CGP, Bicuculline, そして DNQX の 3 つのグループは, LTP に対応する大きい方の平衡点 ($\rho = \rho_+$) で control よりも小さな極小値 (深い井戸) を形成する傾向にあった.

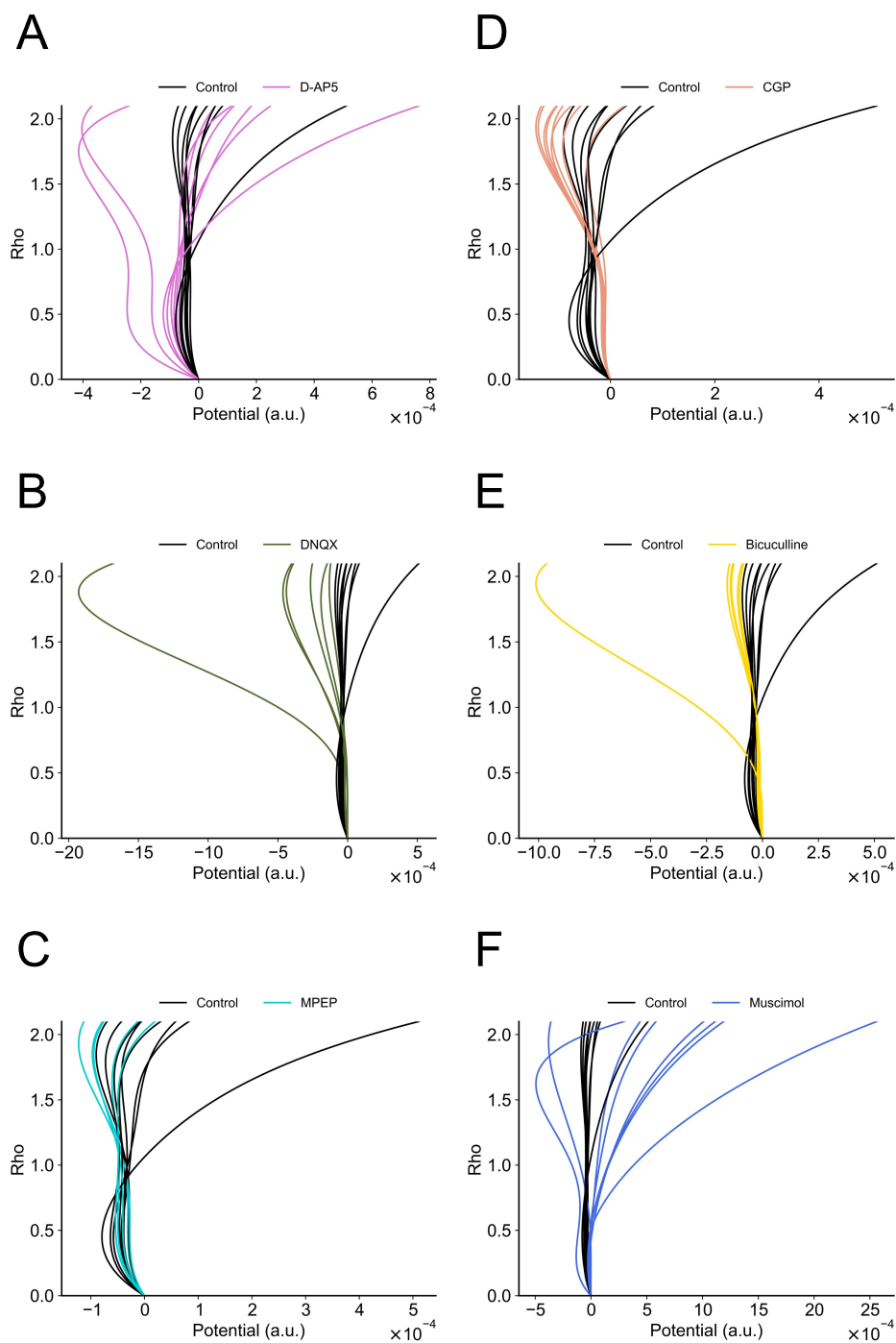


図 2-7. 実測データに最適化したシナプスモデルから算出したポテンシャル関数. (A) Control vs. D-AP5. (B) DNQX. (C) MPEP. (D) CGP. (E) Bicuculline. (F) Muscimol.

2.4. 考察

2.4.1. 長期抑圧における受容体の寄与

本研究では、実測したシナプス可塑性動態に簡易シナプスモデルを適用し、実測値と微分方程式モデルの軌道との誤差を最小化する方法で、各データに対応するモデル係数を最適化した。実測データをモデルの軌道に近似することで、計測ノイズ、個体差などの、計測上の不確定要素の平均化が可能となる。近似モデルの動態を主成分分析の低次元空間に投影することで、グループごとにクラスターが現れ、さらに glutamatergic group と GABAergic group の2種類での分離もみられた（図 2-6C）。この結果から、今回解析した受容体は、全て LTD の動態形成に寄与していたことが考えられる。さらに、D-AP5 のクラスターが control のクラスターから最も離れていたため、NMDA 受容体が特に主として LTD に関与していたことが示唆された。我々の知る限りでは、TS に誘発される LTD において NMDA 受容体が大きく関与することを、シナプスモデルを使って示した例は過去にない。今後の展望としては、図 2-6C で示した2次元 PCA 空間内で、D-AP5 群と DNQX 群の間の空白領域に位置する可能性のある他の重要な受容体を探索することが挙げられる。この領域はグルタミン酸受容体として分類された領域であるため、本研究で扱っていないグルタミン酸作動性受容体が位置する可能性が高い。

2.4.2. シナプスの状態遷移ポテンシャル

シナプスの状態遷移について、ポテンシャルの観点から解析した。DNQX, Bicuculline, および, CGP の3つのグループでは、LTP 側で control より深いポテンシャルを示していた（図 2-7）。対照的に、平衡点の数は薬理条件間で大きく異なる傾向はみられなかった。したがって、AMPA 受容体、GABA_A 受容体、および GABA_B 受容体は、聴覚皮質神経回路網のシナプス状態を、LTD へ引き付けるような作用をしていたことが考えられる。一般的に、GABA_A および GABA_B 受容体は抑制効果があると知られている。そのため、GABA 作動性の抑制効果が LTD のポテンシャル領域で機能していたと考えられる。また、小脳においては LTD がシナプスの AMPA 受容体発現の減少に特徴づけられることが知られている (Huganir & Nicoll, 2013)。本研究では、AMPA 受容体が阻害されたシナプスで、LTD よりも LTP の方が高いポテンシャルを示すことを実測データに基づくモデリング解析によって明らかとした。

2.4.3. 聴覚皮質における長期抑圧の空間的特徴

モデル中の係数推定値と、PCAにより得られた2つの主成分（累積寄与率：>98%）とを比較することで、 γ_d と ρ_U がLTDのモデル係数を縮約していることがわかった（図2-4B vs. 図2-4C）。そして、これら2つの係数はcontrolグループで、係数空間上で最も大きなばらつき（標準偏差）を示す結果が得られた（図2-4D）。式(2-3)では、 γ_d は右辺の第1項の3次関数に含まれており、これは主に時間的发展の速い動態を決定する。一方、 ρ_U は右辺の追加の線形項に含まれており、これは変数の持続状態への遅い動態を決定する。したがって、本研究で得られた結果は、時間スケールの観点からモデル動態を理解し解釈する上で合理的である。状態変数 ρ の動態を見ると、controlグループの時間的变化はその軌道の自由度が高い傾向にあるという整合性もみられた（図2-6A,B）。さらに、いずれの薬理条件下でも2つのモデル係数について、値のばらつき度合いが低下した結果から、多種の神経伝達物質受容体の均衡から時間発展軌道の空間的多様性が成立することが示唆された。

2.4.4. 異なる物理モダリティの脳刺激に対する仮説

本章では、従来の脳神経刺激として主流な電流刺激をTSに採用した。我々は過去に、本章と同じく皮質神経回路網を対象とし、電気刺激と超音波刺激の誘発応答特性を調べ、超音波刺激に誘発される応答も電気刺激誘発応答のように皮質の構造を反映するという可能性を報告した (Furukawa et al., 2022)。そのため、聴覚皮質では、超音波刺激でも高頻度刺激を印加することでLTDを誘発することが可能であるという仮説が立てられる。しかし、電磁気刺激と機序が異なるためシナプス可塑性誘発において本研究で得られた知見が当てはまらない可能性も考えられる。今後の課題としては、超音波刺激に誘発される聴覚皮質内のシナプス可塑性を調べる事が挙げられる。

第3章 脳スライス用超音波刺激装置

3.1. 背景と目的

神経変調は、脳疾患の治療において有望なツールとして考えられている (Bewernick et al., 2010). しかし、経頭蓋直流電気刺激や経頭蓋磁気刺激などの従来の手法では、電磁場強度が距離とともに減衰するため、脳深部領域での非侵襲的な神経活動の誘発に課題があった (Wagner et al., 2007). 近年、経頭蓋超音波刺激法は、非侵襲的かつ高空間分解能で脳の深部領域を対象とすることが可能である点で注目を浴びている (Tufail et al., 2010).

神経活動は従来電気信号であると見なされてきたが、神経細胞の興奮性の閾値を超えた脱分極が、電気生理学的メカニズムに加えて機械的メカニズムによっても影響を受けることが知られてきた (Blackmore et al., 2019). したがって、神経活動の誘発に対する機械的な寄与は、超音波による神経変調の物理的基盤となり得る. しかし、細胞レベルでの詳細なメカニズムは不明である. 詳細なメカニズムを解明するためには、神経細胞の局所外部環境を正確に制御できる *in vitro* 実験システムが有効である. しかし、従来の超音波刺激装置（トランスデューサ）は、10 mm を超えるサイズが一般的であり (Tyler et al., 2008), 神経細胞を対象としたの局所的な刺激位置の正確性に課題があった (Furukawa et al., 2022).

Lee らは圧電型マイクロ超音波トランスデューサ (piezoelectric micromachined ultrasound transducer, PMUT) を導入し、*in vitro* で分散培養した神経細胞に対して実験を行い、神経変調の細胞メカニズムを解明する上での有効性を示した (J. Lee et al., 2019). しかし、*in vitro* 培養のために神経細胞が再分離される過程で元の神経回路網の接続を失っているため、神経回路網はランダムな接続で構成されていることになる. そのため、急性脳スライスを使用することが、超音波を介した神経変調に関する詳細なメカニズムを理解するために必要であると言える.

また、従来の開ループ型刺激装置は、長時間の使用中に神経活動を過剰に誘発するリスクがあるのに対し、閉ループ型刺激は過剰な刺激の副作用を軽減することが期待されている (Takeuchi & Berényi, 2020). さらに、小動物向けのウェアラブル容量型マイクロ超音波トランスデューサ (capacitive micromachined ultrasound transducer, CMUT) デバイスに関する報告が幾つかある (Jo et al., 2022; H. Kim et al., 2019). しかし、PMUT と比較すると、駆動するために高いバイアス電圧 (e.g., 100 V) が必要であるため、生体への適用には懸念がある (He et al., 2022).

本研究では、閉ループで脳組織を記録および刺激するためのインターフェースを開発し、それを脳スライスの細胞実験に適用することを目指した。まず、円形のダイアフラムを用いたトランスデューサのサイズと共振周波数の関係など、望ましい物理的特性を実現する条件を特定するために数値計算を実施し、その後、PMUT デバイス構造を設計した。閉ループ型超音波刺激のために、PMUT 自体にモニタリング用の微小電極を併設した。次に、PMUT を微細加工し、その物理特性を計測して、当初の目標と比較した。第 3 に、神経変調の可能性を検証するために、急性マウス脳スライスにおける PMUT 駆動の細胞応答を計測した。最後に、このインターフェースの閉ループ型システムにおける適用性を評価するために、デバイス上に併設された微小電極を用いて脳スライスの神経活動を計測した。

3.2. 方法

3.2.1. デバイス設計

本研究では、脳スライスへ局所的な超音波刺激を印加して、神経活動を誘発することを目指し、PMUT に 3 つの数値目標を設定した：(1) 500 kHz の共振周波数，(2) 65 kPa 以上の音響圧，(3) 600 μm 以下の円形振動板半径 (J. Lee et al., 2019; Oh et al., 2019). PMUT の各円形振動板は圧電層 (lead zirconate titanate, PZT)，デバイス層 (silicon, Si)，絶縁層 (SiO_2) および、圧電層の上下に位置する電極 (Pt/Ti) で構成される (図 3-1A, B).

デバイスの作製に先駆けて、PMUT の振動板に関して数値計算を実施した (COMSOL

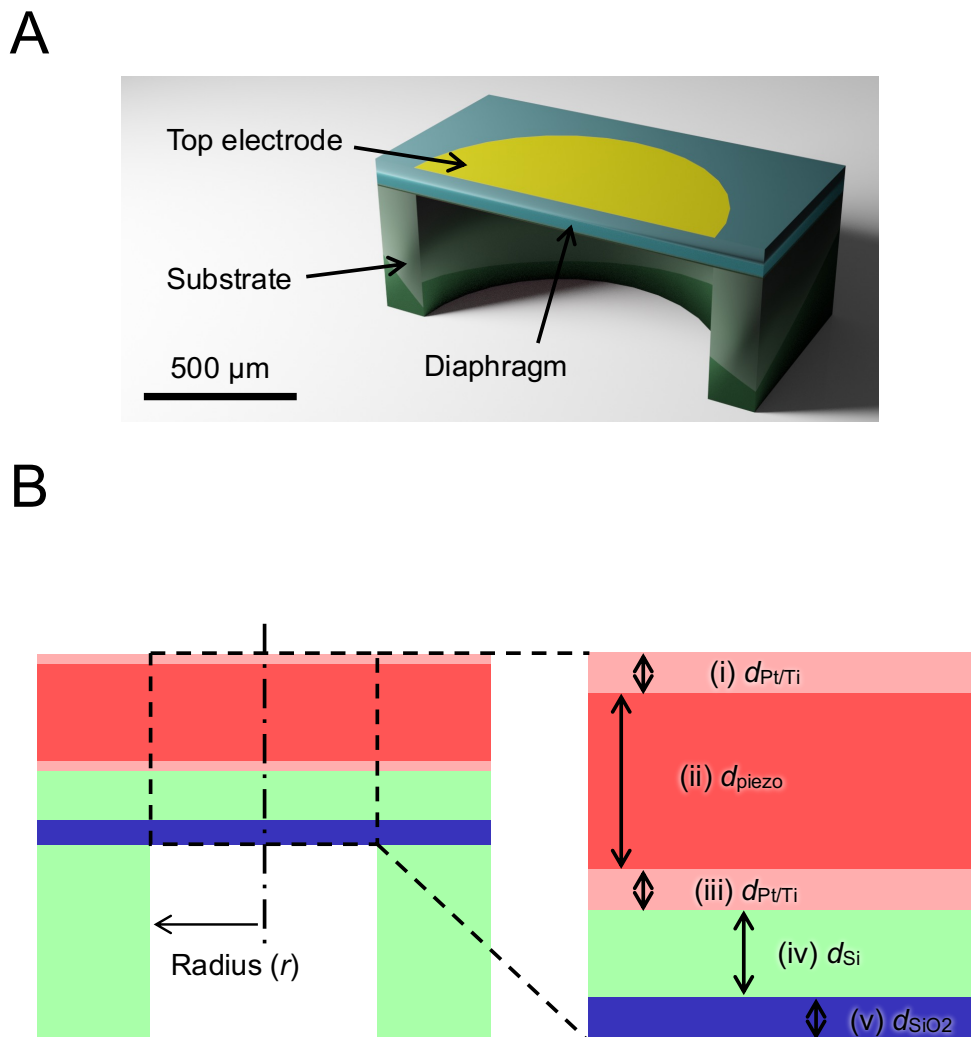


図 3-1. PMUT の設計概要図. (A) デバイスの円形振動板部分. (B) PMUT の断面層構造. 左パネルの拡大図を右パネルに示す.

Multiphysics, Ver. 5.5, COMSOL AB, Sweden). 数値計算は、北海道大学情報基盤センターのスーパーコンピュータシステム (PRIMERGY CX400/CX2550, FUJITSU, Japan) 上で実施した。有限要素法 (finite element method, FEM) を用いて、円形振動板が 500 kHz で共振する寸法：(1) 振動板の半径 (r)、(2) PZT 層の厚さ (d_{PZT})、(3) Si 層の厚さ (d_{Si}) を計算

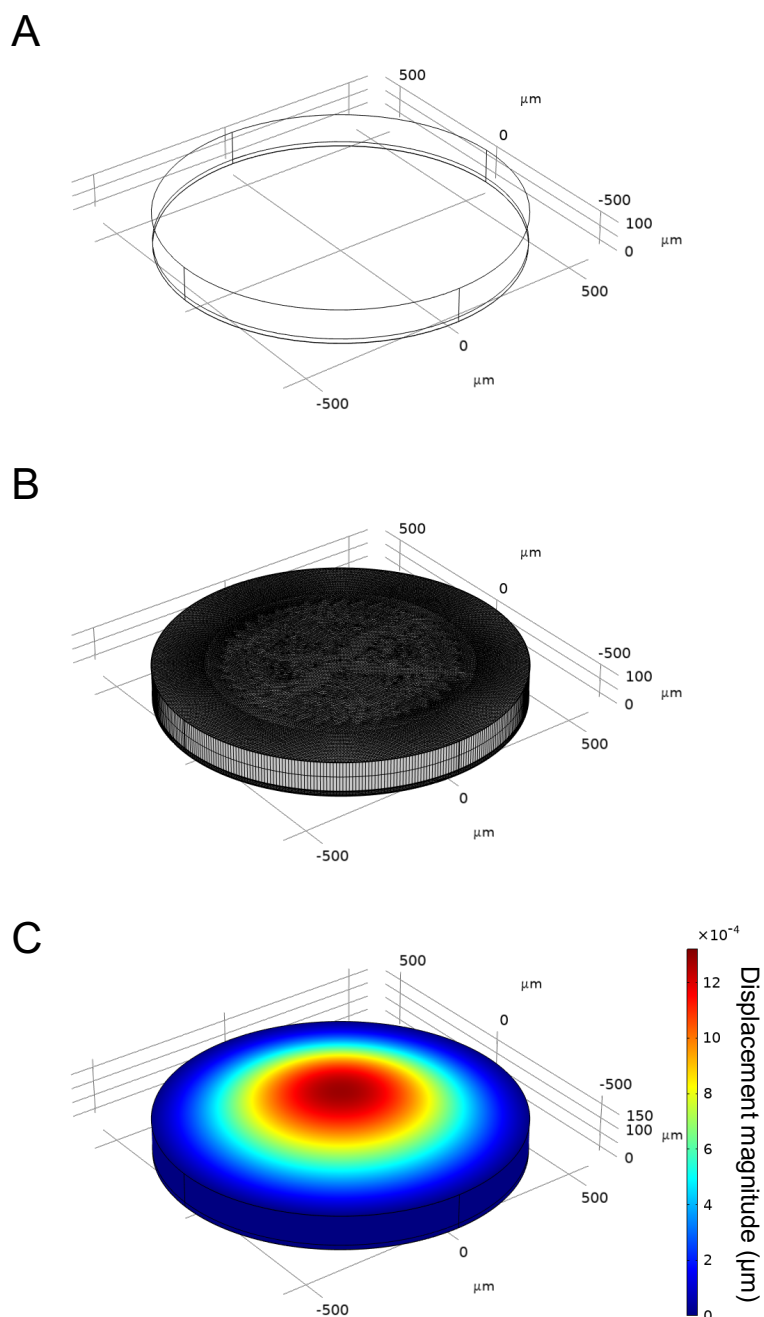


図 3-2. 円形振動板が 540 kHz で共振する際の 3D モデル. (A) 振動板のジオメトリ. (B) メッシュ. (C) 数値計算結果例.

した. ここでは, Pt/Ti 電極の材料を Pt 層として簡易化した. 数値計算モデルとして 5 層構造の円形振動板をモデリングした (図 3-2A). モデルのメッシュサイズは最小 12.6 μm , 最大 70.0 μm とした (図 3-2B). 数値計算に使用したパラメータを表 3-1 に示す.

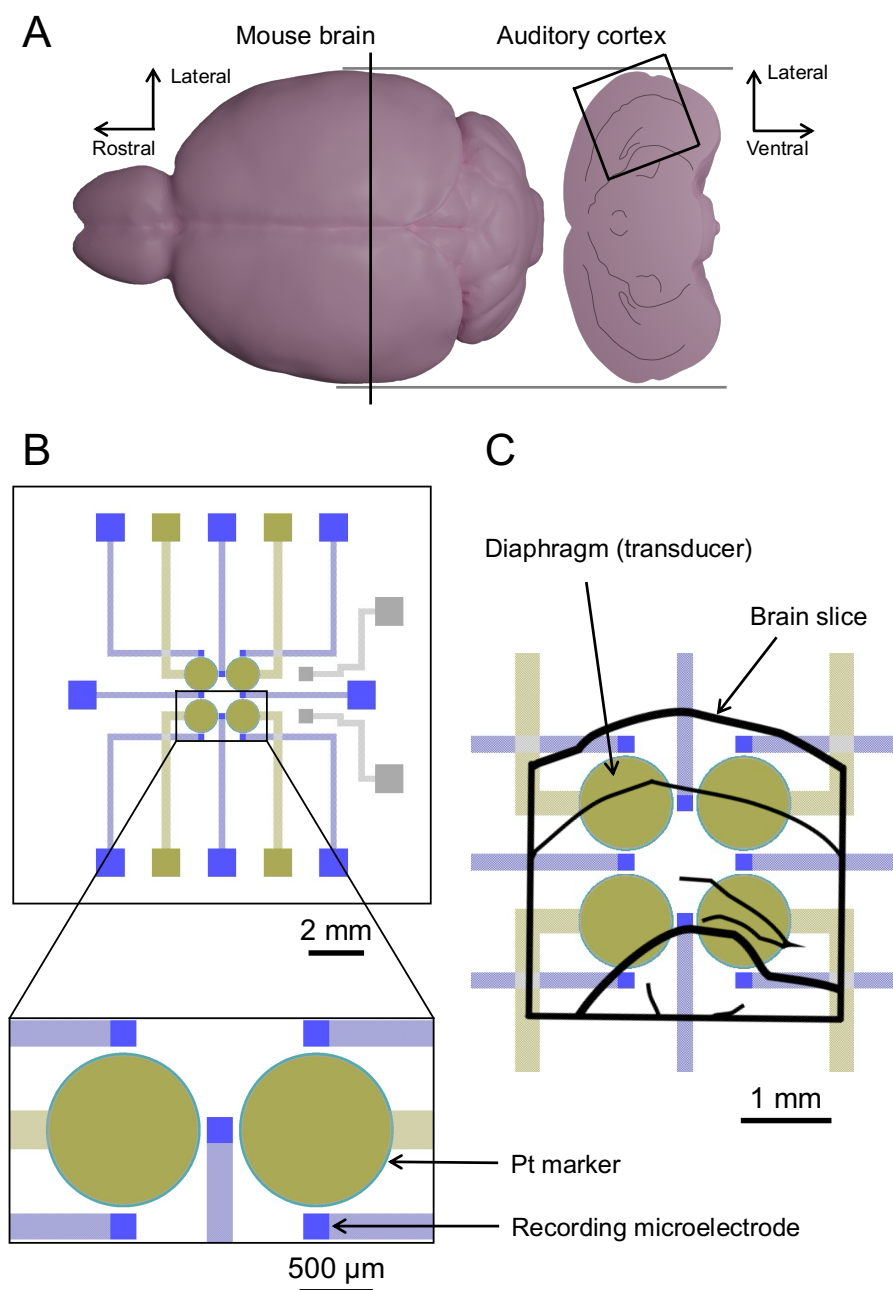


図 3-3. PMUT とモニタリング用電極の設計. (A) マウス全脳 (左) および聴覚皮質を含む脳スライス (右) の概略図. (B) PMUT 全体設計図および中心拡大図. (C) 脳スライス, トランスデューサ, および, 微小電極.

表 3-1. 数値計算に用いた各材料の物性値.

Material	Thickness in μm	Young's modulus in μm	Density in kg/m^3	Poisson's ratio
PZT	d_{PZT}	63	7500	0.34
Si	d_{Si}	170	2329	0.28
SiO ₂	d_{SiO_2}	70	2200	0.17
Pt	d_{Pt}	168	2145	0.38

3.2.2. 微細加工

正確に局所刺激を実現するために、PMUT は4つの振動板を含むアレイ構造で設計された (図 3-3B). PMUT のサイズは $15 \times 15 \text{ mm}^2$ の正方形とした (図 3-3B). 金色の領域はトランスデューサを駆動するために使用する上部電極およびそのパッドを示す. 青色の領域はモニタリング用電極とそのパッドを示す. 緑色の部分は明視野観察で脳スライス越しにトランスデューサのふちを見るためのマーカーである. 基板上には, 脳スライスの電気活動をモニタリングするための $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ の微小電極を設計した (図 3-3A, C).

デバイスの基板には, デバイス層 (Si), 絶縁層 (SiO₂), および, ハンドル層 (Si) の3層構造から成る silicon on insulator (SOI)基板を使用した. 円形振動板のサイズは数値計算の結果を基に決定された. 脳スライス実験の際に, 振動板の位置を特定しやすくするために, トランスデューサのふちには Pt をパターンニングした. 加工プロセスは過去に報告された微細加工技術を参考に, 以下の手順で進められた (Kuwano et al., 2020).

1. $500 \mu\text{m}$ の Si ハンドル層, $15 \mu\text{m}$ の Si デバイス層, および, $1 \mu\text{m}$ の絶縁層から成る SOI 基板を使用し, ハンドル層側に厚さ $1 \mu\text{m}$ の絶縁層を形成した (図 3-4A).
2. 電極を形成するため, スパッタ装置 (RSC-3ERD, Riken-sha, Co., Japan) を用いて厚さ 10 nm の Ti と厚さ 100 nm の Pt とを蒸着させた (図 3-4B).
3. Inductively coupled plasma reactive ion etching (ICP-RIE)装置 (RIE-101HU, SUMCO Co., Japan) にて, 電極と配線を形成した (図 3-4C).
4. 配線領域の保護膜 (TMMR 2000LV, TOKYO OHKA KOGYO Co., LTD.) を形成した (図 3-4D).
5. 厚さ $100 \mu\text{m}$ の PZT 板 (PI Japan) を SOI 基板の表面に, エポキシ (E205, Konishi Co., Ltd.) を使って貼り付けた (図 3-4E).
6. ICP-RIE 装置を用いて PZT の上部電極とその配線を形成した (図 3-4F).

7. 円形振動板を形成するため Deep-RIE 装置（MUG-21 ASE-SRE, SPP Technologies Co., Japan）を用いて，Si ハンドル層を取り除いた（図 3-4G）.

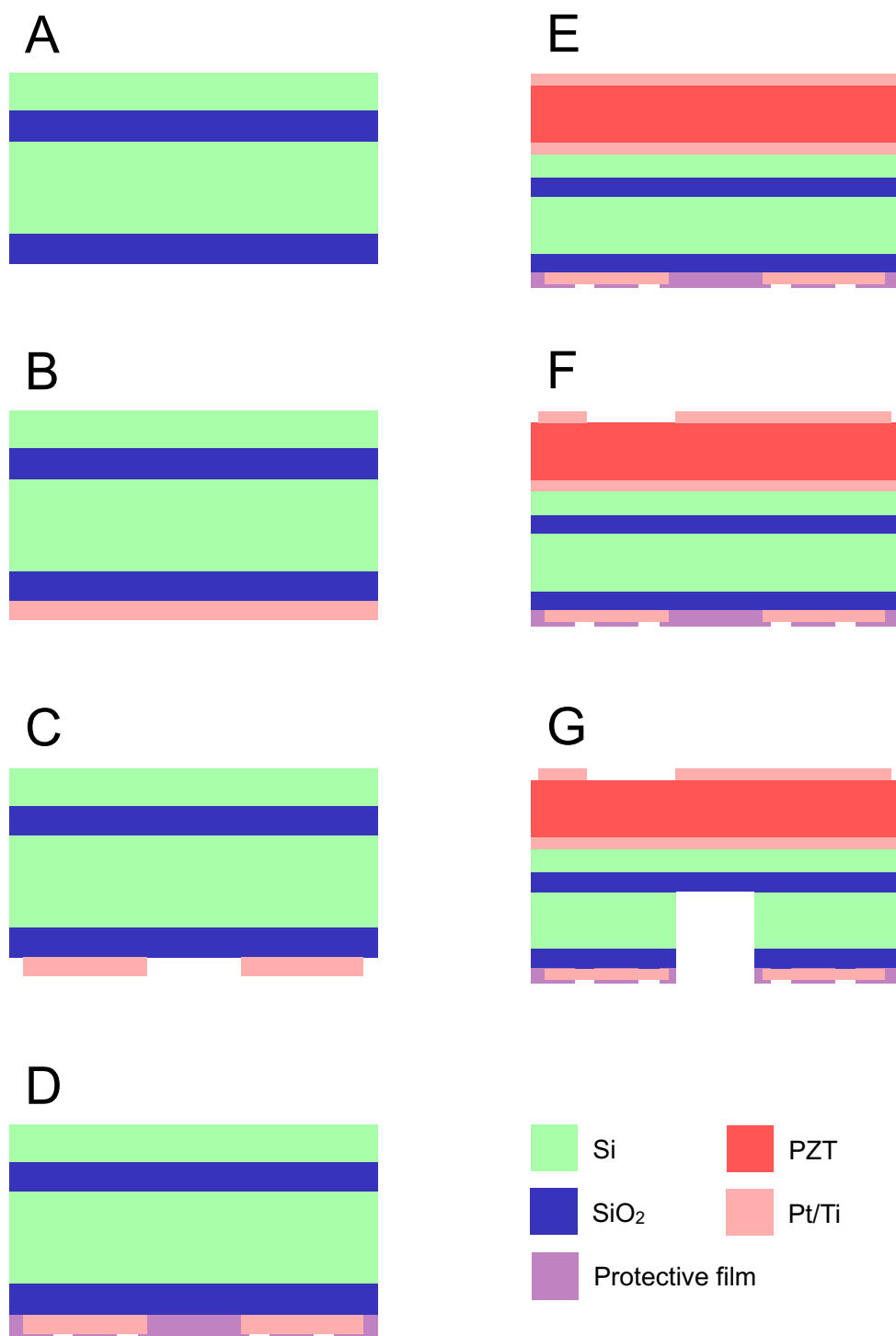


図 3-4. 微細加工プロセス. (A) SOI 基板と絶縁層. (B) Pt/Ti 層の蒸着. (C) 記録電極. (D) 配線の保護膜. (E) PZT 板の貼り付け. (F) 上部電極. (G) 振動板形成.

微細加工プロセスの後、作製された PMUT はプリント基板（printed circuit board, PCB）に実装された（図 3-5）。後述するカルシウムイメージングに利用するために、PCB に円柱型のアクリルチャンバーを接着した。細胞内カルシウムイオンの濃度は長期シナプス可塑性と密接に関係するため (Chindemi et al., 2022), カルシウムイオン濃度の観察を可能とするインターフェースは意義を持つと考えられる。

3.2.3. 物理特性の評価法

音響圧特性

作製した PMUT の物理特性を評価するため、共振周波数を調べた。各円形振動板に AC 10 V の正弦波交流電圧を任意波形生成器（WF1947, NF Electronic Instruments, Japan）から印加した。チャンバー内を水で満たし、PMUT から出力された音響圧をニードル型ハイドロフォン（HY05N, Toray Engineering Co., Japan）で計測し、オシロスコープ（SDS1104X-E, SIGLENT, USA）を用いてデータを取得した。このとき、入力電圧の周波数を 260 ~ 900 kHz の範囲で

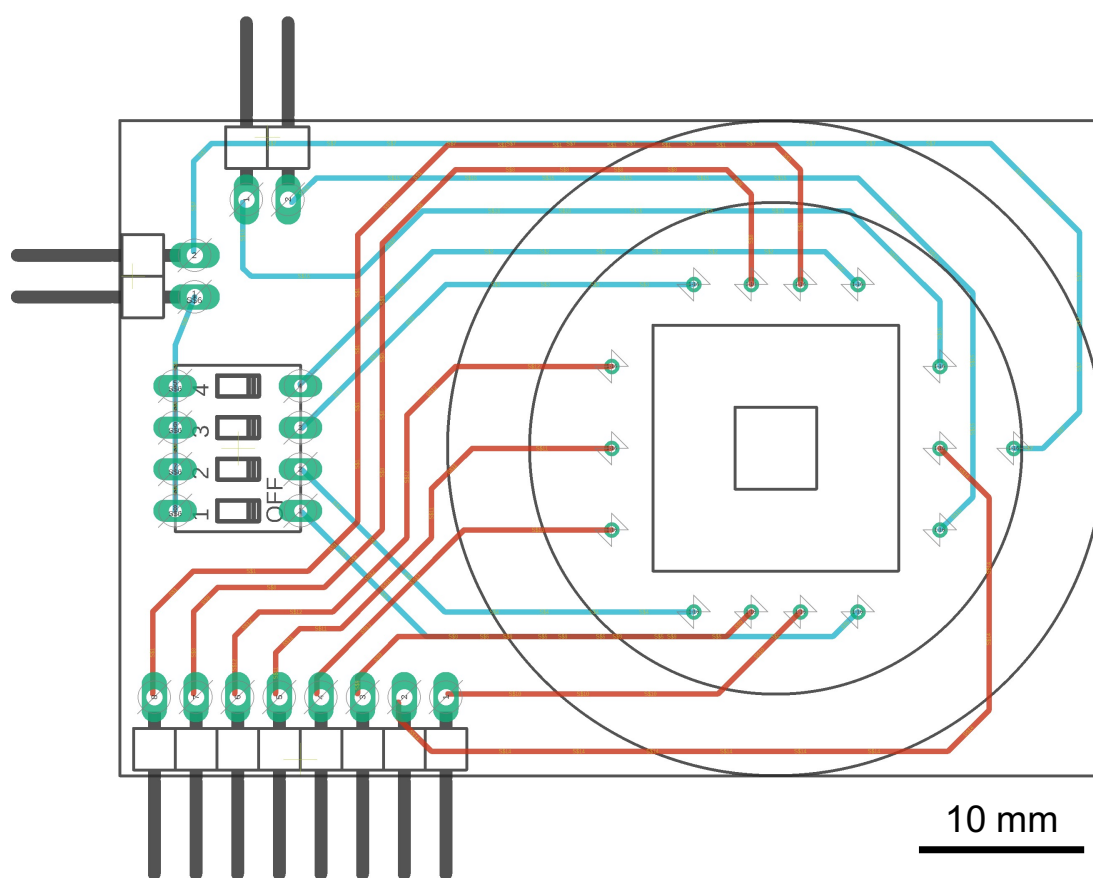


図 3-5. PMUT を実装するプリント基板の設計図。

変化させた。各条件で5回ずつ計測した。次に、各チャンネルで最も大きい音圧を出力したときの周波数条件下で、入力電圧を変化させて音響圧を取得した。このとき、任意波形生成器から出力された電圧をパワーアンプ（ZSA5064, RAD Co., Fuji, Japan）で増幅して、PMUTへ印加した。

温度計測

脳スライスに超音波刺激を印加する際に生じる温度変化を調べた。温度計測にはニードル型熱電対（330- μ m diameter, 5-cm length, MT-29/5HT, Physitemp Instruments LLC, USA）を使用した。計測時チャンバー内は水で満たされた。計測は同一条件下で合計10回行われた。

電気化学計測

微小電極の特性を評価するため、交流インピーダンス計測（electrical impedance spectroscopy, EIS）を実施した。計測には電気化学アナライザー（ALS720E, BAS Inc., Japan）を使用した。飽和カロメル電極（RE-2BP, BAS Inc., Japan）を参照電極として、白金線（PT-351265, Nilaco, Japan）を対電極として使用した。チャンバーの中は実験液で満たした。各微小電極に25 mVの正弦波交流電圧を印加し、周波数を0.01～1000 kHzの範囲で変化させて応答電流を計測した。

3.2.4. 超音波刺激による神経活動誘発効果の評価法

脳スライス作製

動物実験を行うにあたり、北海道大学における動物実験に関する教育訓練を受け、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に定められた指針に従い実験を行った。動物実験にはC57BL/6J系統、5～10週齢のオスマウスを2個体、メスマウスを5個体使用した（Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan）。容器にイソフルラン吸入麻酔を少量入れ充満させた後にマウスを容器に入れて麻酔をかけた。その後脳を取り出して冷えた人工脳脊髄液（artificial cerebral spinal fluid, ACSF）に浸した。ACSFの組成は、NaCl: 119 mM, KCl: 2.5 mM, NaH_2PO_4 : 1.0 mM, NaH_2CO_3 : 6.2 mM, MgSO_4 : 1.3 mM, CaCl_2 : 2.5 mM, および、D-(+)-glucose: 11.0 mMとなっている。取り出した脳から聴覚皮質を含む $4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$ の範囲で脳ブロックを作製した。スライサー（VT1200S, Leica, Germany）を用いて厚さ400 μ mの厚さで脳スライスを作製した。脳スライスは28°CのACSF内で、2 h以上回復させた。

カルシウムイメージング

本研究では、PMUTに活性化される細胞の活動をカルシウム指示薬で定量化した。カルシ

ウム指示薬の選択では、(i) 比較的高い Ca^{2+} 親和性（解離定数, $K_d < 400 \text{ nM}$ ）および (ii) スペクトル特性に着目した。そのため、一波長計測指示薬には Fluo-4 AM (K_d : $\sim 345 \text{ nM}$) を選択した (Paredes et al., 2008)。Fluo-4 AM は比較的 SN 比が高いことで知られているが (Grienberger & Konnerth, 2012), 超音波刺激で生じる、機械的なアーチファクトの影響を受ける可能性がある。二波長計測では超音波刺激のアーチファクトの影響を受けにくいことが知られているため (Qiu et al., 2019), Fluo-4 AM に加えて Fura-2 AM を用いた計測も実施した (Tateno, 2010)。しかし、強い紫外線光は細胞に対して光毒性を持つため、Fura-2 AM を使用したイメージングでは強度の弱い励起光を利用する必要がある。これにより Fura-2 AM を用いたイメージングでは Fluo-4 AM によるものと比べてノイズの多い蛍光信号が得られた。Fura-2 AM の K_d はおよそ 145 nM であり、高親和性 Ca^{2+} 指示薬として分類される (Paredes et al., 2008)。この K_d は内因性の静止 Ca^{2+} レベルに相当し、Fura-2 AM は光退色に対して比較的耐性があると考えられる。Fura-2 AM は 340 nm 波長光および 380 nm 波長光の 2 種類の波長光で励起され、 510 nm 波長光で蛍光を発する。本研究では、 340 nm 波長励起光の蛍光信号 (F_{340}) と 380 nm 励起波長光の蛍光信号 (F_{380}) を 50 Hz で交互に計測した (Tateno, 2010)。励起光は high-speed filter changer LAMBDA DG-4 (CA 94949, Sutter Co., USA) 内のフィルターを経て出力された。多機能電気刺激装置 (ESTM-9, Brainvision, Japan) と BV Workbench (Brainvision, Japan) を用いて CMOS カメラ (acA1920-155 μm , Basler, Germany) のフレームタイミングと各励起フィルターの切り替えを同期させた。各蛍光信号は移動平均フィルタを数点のウィンドウで処理した後に解析された。その後、 F_{340}/F_{380} 比を計算して細胞内カルシウムイオン濃度の変動を定量化した。脳スライスは蛍光指示薬溶液内で 45 min 染色された。

超音波刺激プロトコル

脳スライス内の細胞に対して、PMUT から超音波刺激を印加した。まず Ca^{2+} のベースラインを 1 s 間モニタリングし、この区間を Pre-US とした。次に、超音波刺激 (880 kHz , 連続波) を 1 s 間印加して、その後 1 s 間を回復期間とした (1 回の試行あたり合計 3 s)。各計測は同一条件下で 10 試行ずつ行われた。超音波刺激の対照として、刺激を印加しない (入力電圧 0 V) Sham 刺激中の Ca^{2+} 変動も計測した。さらに、超音波刺激によって細胞死を引き起こさないことを示すため、刺激への適応から回復する時間を計測中に設け、回復時間後に数回計測を行った。

カルシウムイメージングの計測中は、ACSF を $1.26 \pm 0.01 \text{ ml/min}$ ($n = 5$) の流速で灌流させた。また、ナイロンメッシュとステンレスアンカーによって PMUT 上に脳スライスを保持

し、室温 ($23.6 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$) で計測を行った。

3.2.5. 脳スライスの活動をモニタリングする微小電極

PMUT に併設した微小電極で神経活動を計測できることを検証するため、 Mg^{2+} を含まない条件下で誘発された細胞外電位変化の計測でその実用性を評価した。局所電場電位 (local field potential, LFP) 計測によって、標準および Mg^{2+} free の ACSF によって誘発された自発的および発作様の神経活動をそれぞれ計測した (Anderson et al., 1986)。まず標準の ACSF 内で自発的活動を 5 min 間計測した。次に、 Mg^{2+} -free ACSF を灌流して 30 ~ 40 min 間計測した。信号は 20 kHz のサンプリングレートで取得され、1 Hz から 10 kHz の範囲でフィルター処理された。標準条件と Mg^{2+} free 条件とでの時間的特徴を比較するため、LFP のパワースペクトルを解析した。さらに、8 個の電極で得られた LFP の任意の対から得られるチャンネル間の相関係数 (correlation coefficient, CC) を計算し、相関行列を生成した。細胞外 Mg^{2+} 濃度の低下前後の同期活動を特徴付けるために、相関行列の差 ($\text{CC}_{\text{post}} - \text{CC}_{\text{pre}}$) を計算した。

3.2.6. 簡易フィードバックシステムの構築

モニタリング用の微小電極が併設されたデバイスで、神経活動のフィードバックが可能であるかを検証した。イベント検出とフィードバック機能の検証には、図 3-6A に示す簡易的なシステムを使用した。ここでは、PMUT に併設された電極アレイのうち、ch 6 に 100 μV の閾値を設定した。イベント (100 μV 以上の電圧値) の検出後、イベント検出器 (USB-6343, National Instruments, USA) から PMUT の駆動信号を生成する任意波形生成器 (WF1947, NF Electronic Instruments, Japan) にトリガー信号が送られる。また、自発的な活動の信号のみ検出し、刺激直後の大きな信号をイベントと区別するために、イベント検出後は一定時間検出をしない時間 (silent period) を設けた (Furukawa et al., 2024)。

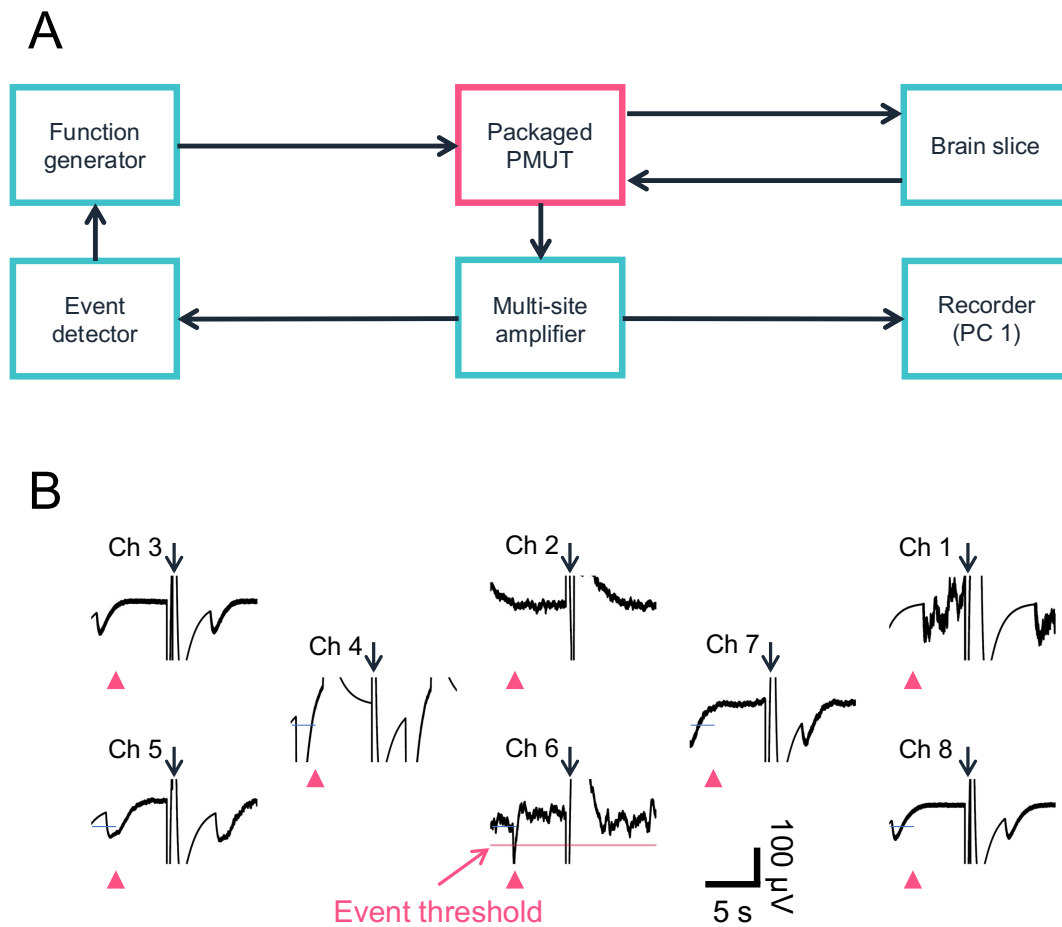


図 3-6. 簡易フィードバックシステムのデモンストレーション. (A) 閉ループ型超音波刺激システムのブロックダイアグラム. (B) イベントフィードバックの代表例. 黒色の矢印は超音波を出力したタイミングで生じるアーチファクトを示す.

3.3. 結果

3.3.1. デバイス作製

PMUT モデルの数値計算の結果に基づいて、共振周波数が 540 kHz、半径 580 μm 、PZT 層の厚さ 100 μm 、および、Si 層の厚さ 15 μm の振動板が選択された（図 3-2C）。数値計算による共振周波数 ($f_c = 540 \text{ kHz}$) は、目標としていた共振周波数と完全に一致はしていないが、超音波刺激の効果的な周波数範囲内にあるため、ここでは 540 kHz を選択した (Li et al., 2023)。PCB に実装した製作デバイスの概要を図 3-7A, B に示す。振動板の上に脳スライスを配置し、脳スライスの下から超音波刺激を印加し、上方から対物レンズを配置して細胞内カルシウムイメージングで神経活動を計測する構成となっている（図 3-7C）。

3.3.2. 物理特性の評価

音響圧特性

作製した PMUT の応答を評価するために、まず個々の振動板によって生成された音響圧の測定を行った。AC 10 V の入力電圧で駆動した際の周波数応答の例を図 3-8A に示す。音響圧のピークはいずれのチャンネルにおいても、数値計算で推定された共振周波数 ($f_c = 540 \text{ kHz}$) よりも高い周波数 (f_{peak}) で取得された。例として、同一デバイス内の振動板の誤差率 ($|f_{\text{peak}} - f_c| / f_c$) は $55 \pm 3\%$ であった (mean $\pm$ standard error of the mean (SEM); 図 3-8A)。特性評価に使用したデバイス全体の誤差率は $40 \pm 10\%$ であった ($n = 6$)。

次に、PMUT の入力電圧依存性を調べた。入力電圧を増加させると、実測共振周波数 (f_{peak}) での出力音響圧が単調に増加した（図 3-8B）。また、超音波刺激の音響圧が刺激プロトコル中に持続することを確認した（図 3-8C）。

温度計測

PMUT の熱効果を評価するために、in vitro 実験と同じ刺激条件で温度計測を行った。その結果、1 s 間の連続駆動期間中に振動板上の温度は 0.15°C 上昇した（図 3-9）。

電気化学計測

PMUT には脳スライスの電気活動をモニタリングするための微小電極が併設されている。微小電極のインピーダンスを計測した結果、 $23.4 \pm 3.7 \text{ kHz}$ (1 kHz, 8 channels) であった（図 3-8D）。

3.3.3. 超音波刺激による神経活動誘発効果の評価

作製した PMUT が脳スライスの細胞を活性化できるかどうかを調べるため、脳スライスに対してカルシウムイメージングを実施した。PMUT は周波数 880 kHz、振幅 70 V の正弦

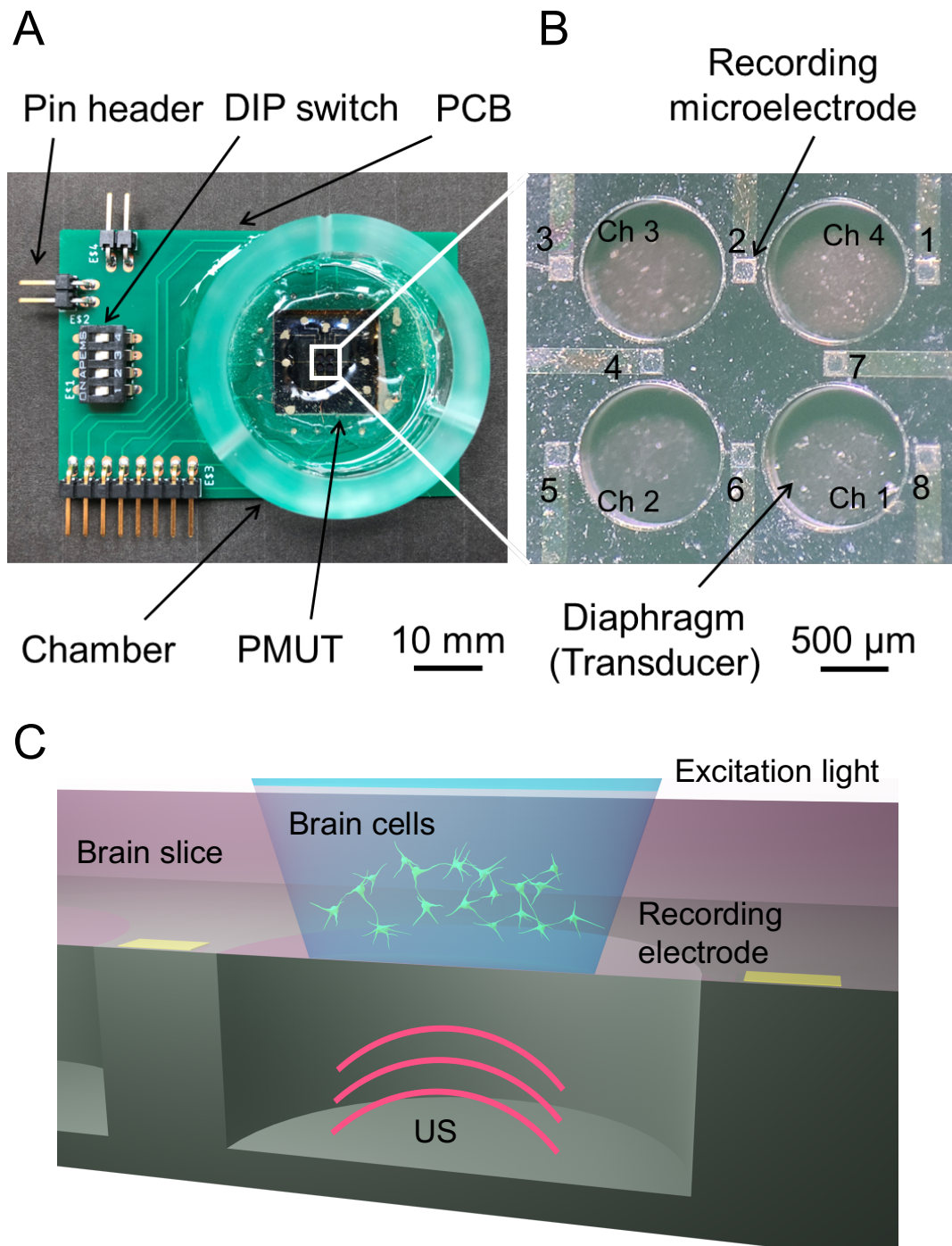


図 3-7. In vitro 超音波神経変調用デバイスの概要図. (A) 作製したデバイスの全体画像と (B) 振動板周辺の拡大図. (C) カルシウムイメージング使用時の概略断面図.

波交流電圧で駆動された。まず、Fluo-4AMを使用した結果例を図 3-10A に示す。蛍光信号の空間マップでは、超音波刺激のオンセット後に多くの細胞の活性化がみられた(図 3-10A)。刺激のオンセット後、細胞の蛍光信号が徐々に増加し、刺激のオフセット後少なくとも 1 s 間持続した(図 3-10B)。活性化された細胞は変動に違いがみられ、中でも cell #2~4 は振動成分を示した。対照実験(Sham 条件)として 0 V の入力電圧で駆動した場合、蛍光信号の増加はみられなかった(図 3-10C)。

2 つの条件(70 V vs. 0 V)の違いを検証するため、刺激期間中の最大強度として定義される応答振幅を統計的に解析した。超音波刺激下で正の方向の応答振幅は Sham 刺激下の応答振幅よりも有意に大きかった(図 3-10D, $p = 0.012$, $n = 14$, three slices)。細胞内 Ca^{2+} 濃度の変

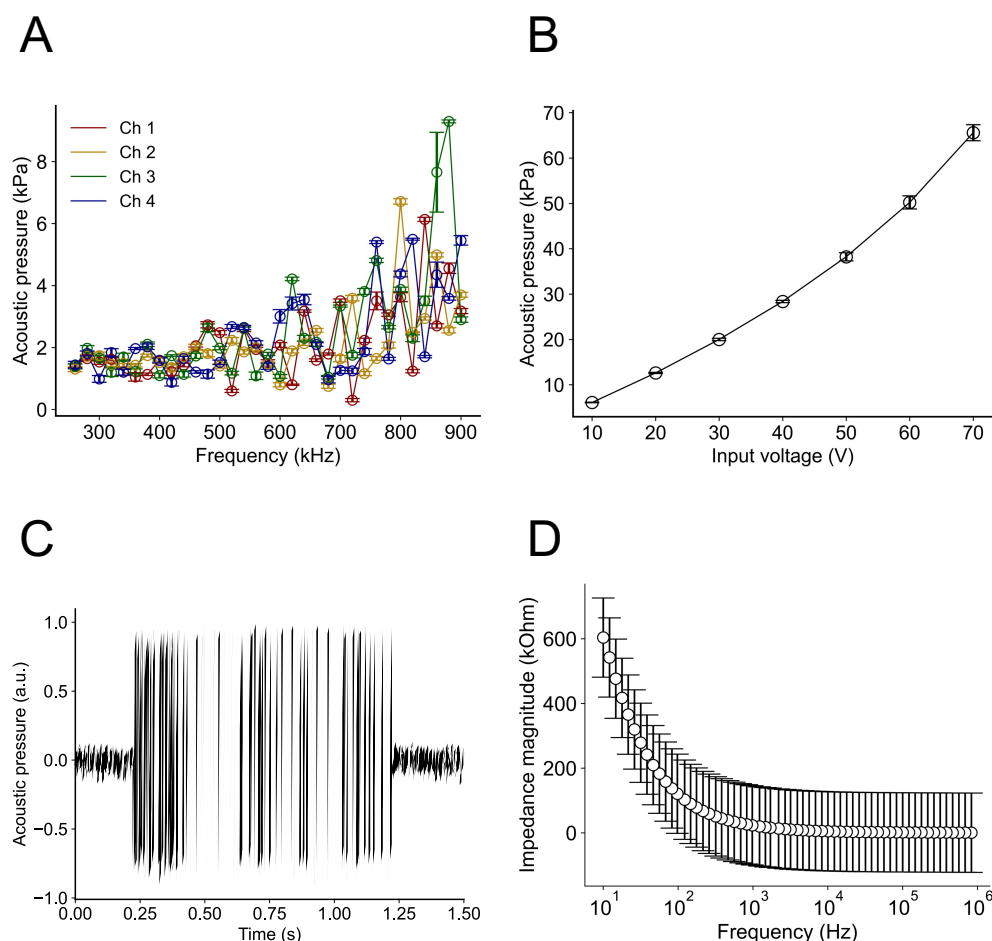


図 3-8. PMUT の物理特性評価。(A) 音響圧の周波数特性。(B) 音響圧の入力電圧特性。(C) 1 s 間の出力超音波波形。(D) PMUT に併設された微小電極のインピーダンス周波数特性 (mean $\pm$ SEM, $n = 8$)。

化は膜電位変化と同期するため、この結果から作製した PMUT が出力する超音波刺激によって脳スライス内の細胞を活性化させるポテンシャルを持つことが示された。反復超音波刺激に対する細胞の応答例を図 3-11A に示す。刺激開始前の 5 s 間の蛍光信号 ($\Delta F/F_0$) はわずかに変動していたが、応答振幅と比べると小さかった (図 3-11B, 破線)。連続試行間の時間間隔は約 30 s であった。さらに、7 min 間に渡る反復刺激に対して再現性のある応答が観測されたため、各刺激試行に対する、蛍光信号の持続的な増加は神経活動の持続的な活性化や細胞死によるものではないと考えられる (図 3-10)。一方、幾つかの細胞は超音波刺激に対して負の方向の応答を示した (図 3-11, $p = 2.9 \times 10^{-8}$, $n = 28$, three slices)。

Fura-2 AM を使ったカルシウムイメージングの結果に関して、340 nm 波長励起光の蛍光信号 (F_{340}) と 380 nm 励起波長光の蛍光信号 (F_{380}) を図 3-13A の上パネルおよび中央パネルにそれぞれ示す。また、それらの比をとった値 (F_{340}/F_{380} 比) を図 3-13A の下パネルに示す。この比は細胞内 Ca^{2+} 濃度に対応する。したがって、図 3-13A から超音波刺激に対して細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加していることがみられる。個々の蛍光信号では刺激のオンセット後に退色している様子がみられる一方で、それらの比に関してはオンセット後に増加していることがわかる (図 3-13A)。図 3-13B に計測対象とした細胞から得られた全ての信号をトレースした結果を示す。全体として、刺激中に細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加がみられた。さらに、刺激の効果を明らかにするために刺激前 ($R_{\text{Pre-US}}$) と刺激中 (R_{US}) とで比を比較した結果、 $R_{\text{Pre-US}}$ と R_{US} の間に有意な差がみられた (Wilcoxon signed-rank test, $p = 0.049$, $n = 19$, five slices; 図 3-13C)。これらの結果から、本開発デバイスでは、神経活動の誘発が可能であり脳スラ

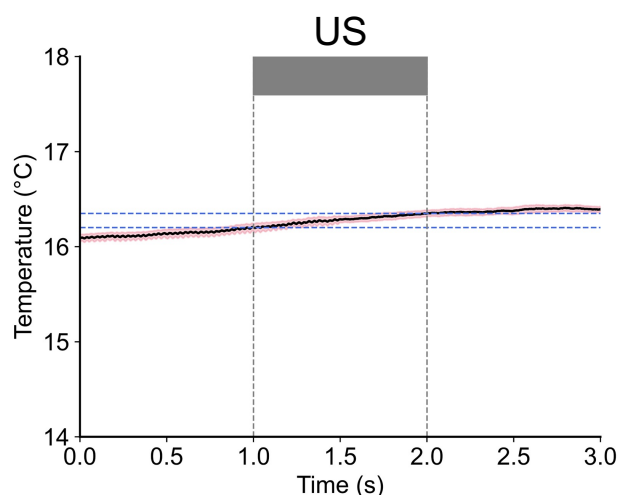


図 3-9. 超音波刺激による温度上昇 (mean $\pm$ SEM, $n = 10$)。

イス実験に有用であることが示唆された。

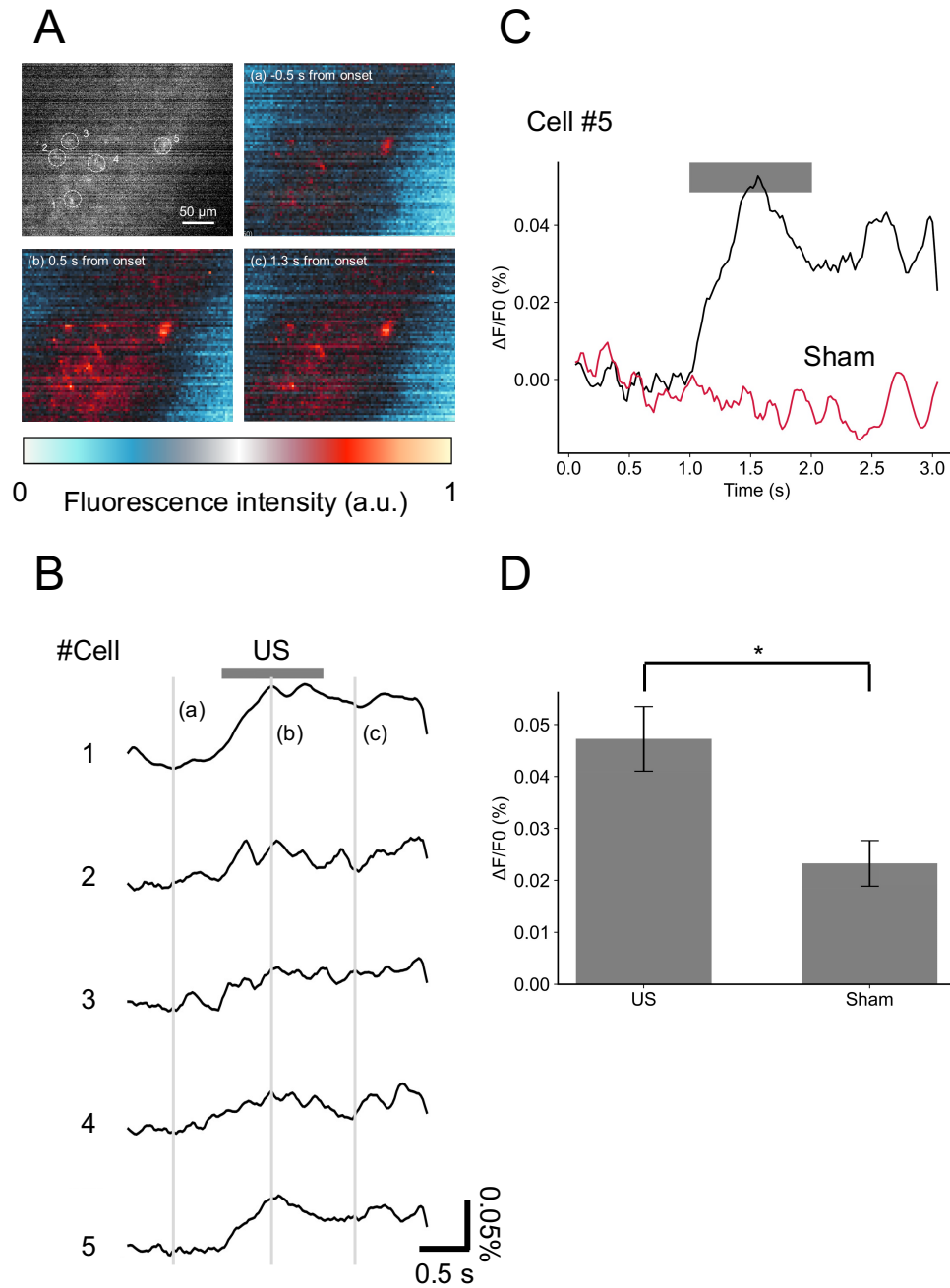


図 3-10. 超音波刺激に対する細胞のカルシウム指示薬の応答. (A) 5 つの細胞の蛍光画像. (B) 各細胞のカルシウム指示薬強度の変動. (C) Sham 刺激 (赤色) との応答比較. (D) ピーク値における Sham 刺激との統計解析 (* $p < 0.05$, $n = 14$).

3.3.4. 脳スライスの局所電場電位計測

閉ループ型システムの構築を目指すため、併設した微小電極によって脳組織の細胞外電位の計測が可能かを検証した。典型的な自発活動の LFP を図 3-14A,B に示す。標準の ACSF

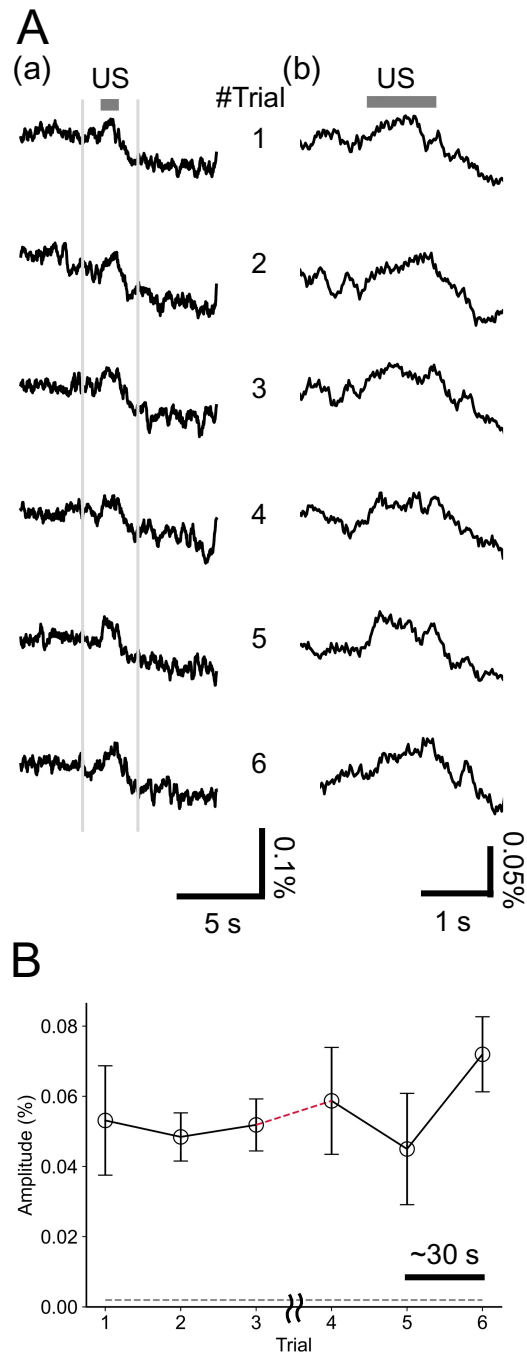


図 3-11. 各刺激試行における蛍光信号. (A) 6 試行分の各刺激応答波形(a)とその拡大図 (b). (B) 試行数と誘発応答の振幅との関係. 灰色の破線はベースラインの変動レベルを示す.

条件下での自発活動では急速な負のピークがみられた。標準の ACSF 条件下で、負のピークのインターバルは 15.5 ± 1.1 s であった。

一般的に、脳内の細胞外 Mg^{2+} 濃度 ($[Mg^{2+}]_o$) は 0.7–1.3 mM で維持されている (Sun et al., 2009)。皮質脳領域の $[Mg^{2+}]_o$ は NMDA 受容体の電位依存性ブロックに関与している。したがって、低 $[Mg^{2+}]_o$ 条件下で作製したデバイスの性能を検証するため、脳スライスを 0 mM $[Mg^{2+}]_o$ の ACSF で灌流した。 Mg^{2+} を除去する (0 mM $[Mg^{2+}]_o$) ことで異常な活動が誘発され、バースト活動のイベントがより頻繁に発生した (図 3-14A, B)。

さらに、4つの脳スライス全ての8チャンネル分における LFP の時間周波数解析をした。その結果、 Mg^{2+} free 条件では 40~60 Hz の高周波帯のパワーが増加する傾向がみられた (図 3-14C)。また、 Mg^{2+} -free ACSF における平均高周波パワー (40~60 Hz) は標準の ACSF における平均高周波パワーよりも大きい傾向がみられたが、有意な差は得られなかった ($p > 0.05$, $n = 32$, four slices, eight electrodes ; 図 3-14D)。

先行研究では、細胞外 Mg^{2+} 濃度を低下させることで NMDA 受容体依存性の同期発作が齧歯類の in vitro 脳スライスで誘発されることが報告されている (Flint & Connors, 1996; Kawaguchi, 2001)。このような同期活動を調べるために、対象条件と Mg^{2+} free 条件とで同期の程度を比較した (図 3-15A, B)。結果として、 Mg^{2+} free 条件によって誘発された活動は、過去に海馬脳スライスで報告された鋭いリップル様のでんかん発作に類似していた (Karlócai et al., 2014)。電極ペアの解析では、全ての解析された脳スライスで電極ペア間の

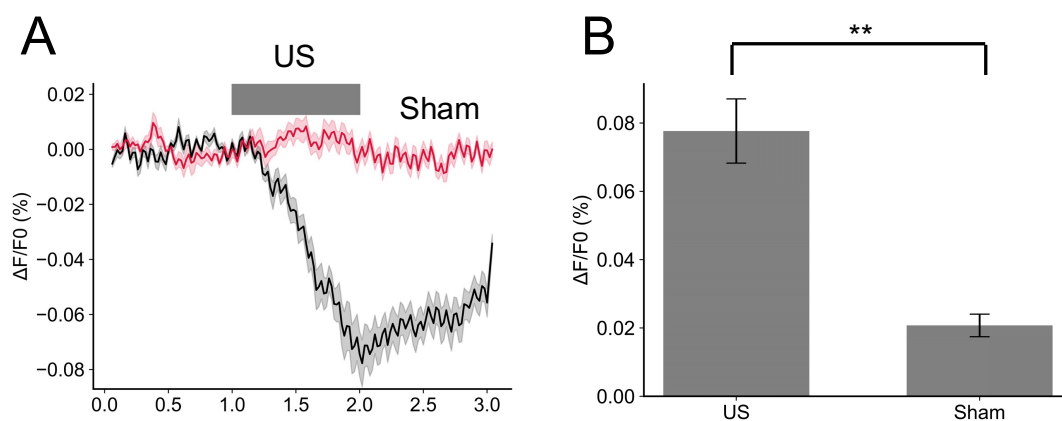


図 3-12. 超音波刺激に対する細胞の負の応答. (A) 負の応答を示した細胞の平均応答波形 (mean $\pm$ SEM, $n = 28$). (B) ピーク値における Sham 刺激との統計解析 (** $p < 0.01$, $n = 28$).

LFP 信号の相関が増加している結果が得られた (図 3-15C). したがって, Mg^{2+} free の条件で複数部位における同期活動が増加していることが示唆された.

3.3.5. 簡易的な閾値検出システム

脳スライスの自発的な活動を利用して, イベントフィードバック機能のデモンストレーションを行った結果, 計測電圧が閾値を超えるイベントを検知した後に, PMUT が駆動された (図 3-6B). 各波形の中央に描画されているアーチファクトの位置が PMUT の駆動タイミングに対応している. この結果から, 本研究で開発した超音波刺激と神経活動のモニタリング電極を一つの素子に併設したインターフェースの実用性が示された. 一方, 記録と刺激の機能が同一素子に併設されているため, 刺激直後に大きなアーチファクトが発生して神経信号が検出できない難点も確認された (図 3-6B). そのため, 併設した電極は, 自発活動のモニタリングに用途が限られ, 刺激直後に生じる誘発応答の, 詳細な記録には不向きであると言える.

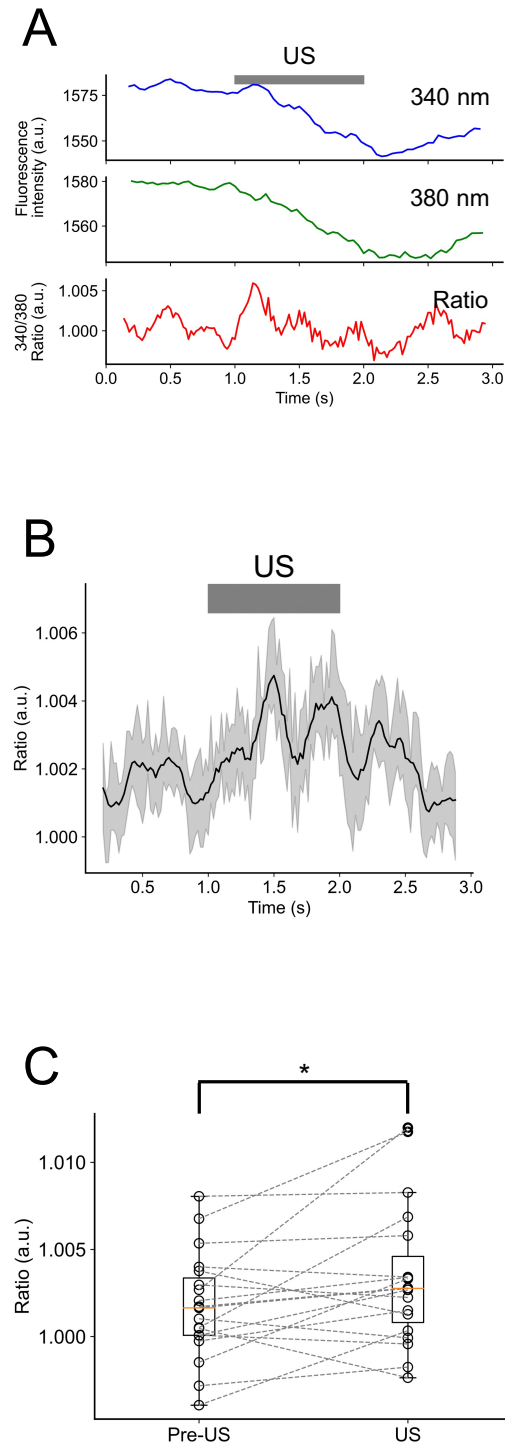


図 3-13. Fura-2AM を使った際のカルシウム信号. (A) 応答波形の代表例. (B) 全細胞の平均波形 (mean $\pm$ SEM, $n = 19$). (C) 刺激前と刺激中との細胞内 Ca^{2+} 濃度の比較 ($*p < 0.05$, $n = 19$).

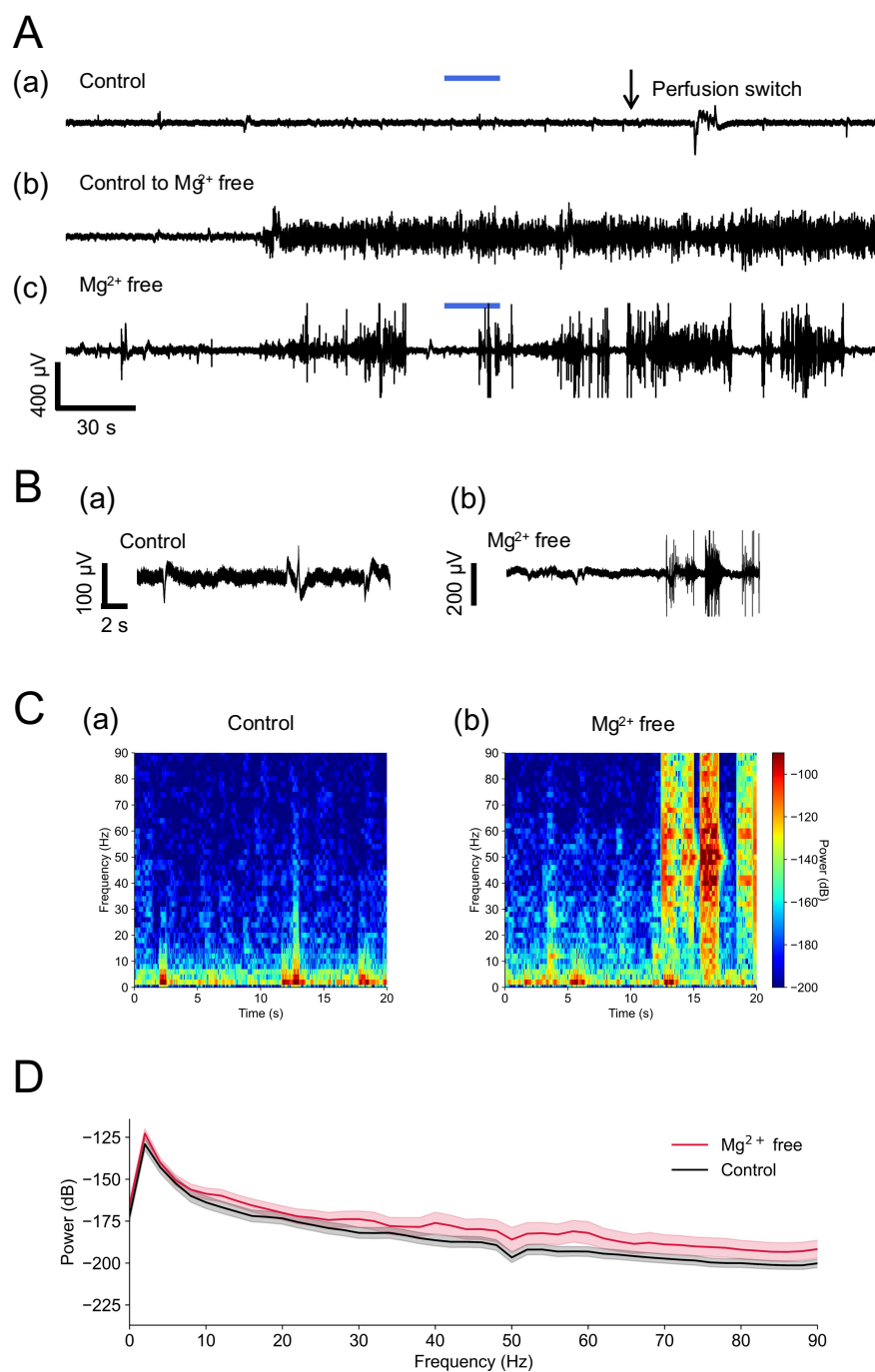


図 3-14. PMUT に併設された微小電極で計測した脳スライスの自発活動. (A) 標準の ACSF および Mg^{2+} -free ACSF での LFP. (a) Control, (b) Mg^{2+} free 条件に切り替えた直後, (c) Mg^{2+} free 条件に切り替えた後の定常状態. (B) パネル(A)中に青い線で示した領域の拡大図. (C) パネル(B)に示した LFP 波形の時間周波数解析. (D) LFP のパワースペクトル (mean $\pm$ SEM, $n = 32$).

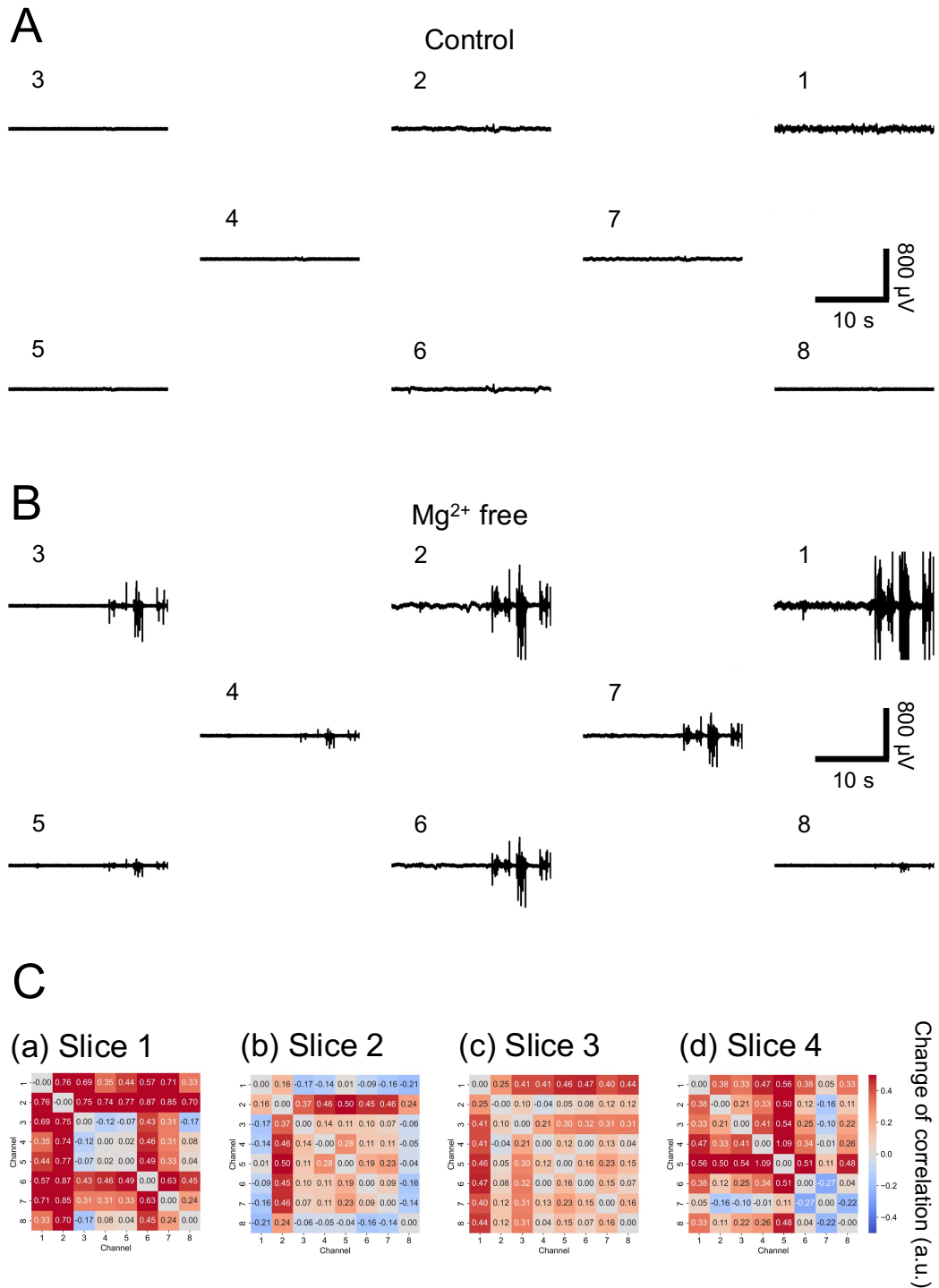


図 3-15. 2つの条件における多チャンネル LFP 解析. (A) 標準の ACSF 条件における自発活動. (B) Mg^{2+} -free ACSF 条件における自発活動. (C) 8 チャンネルでの電極ペア相関係数 (CC) から成る相関行列の変化 ($CC_{\text{post}} - CC_{\text{pre}}$).

3.4. 考察

3.4.1. 圧電型マイクロランデューサの物理特性

計測された共振周波数 (i.e., $f_{\text{peak}} = 835 \pm 17$ kHz) は数値計算によって推定された共振周波数 (540 kHz) と異なっていた. 高周波数側へのシフトの要因として, 数値計算におけるモジュール選択の違いが考えられる. 本研究では設計において機械的な要素を含めたモジュールのみ使用した. しかし, PMUT を駆動する PZT は圧電材料であることから, 電気的な要素を含めたモジュールを追加した混成モデルで再計算した結果, 540 kHz から 590 kHz へと共振周波数の高周波数側へのシフトがみられた. モジュールの違いで高周波数側へシフトしている点は, 実測した際に 540 kHz を上回る周波数で共振する傾向があったことと類似している. 以上により, 設計の際に機械的な現象のみ考慮したことから, 実際の振動現象との差異が生じたのではないかと考察できる.

1つの PMUT デバイス内の, 個々の振動板間で周波数応答特性は完全に一致していなかったが, 誤差率のばらつきは小さかった ($\text{SEM} = 3\%$). 評価に使用した合計2つの PMUT デバイスにおける, 6つの振動板の誤差率は $40 \pm 10\%$ であり, 過去に報告された例 (14~40%) と比べて比較的大きかった (Cheng et al., 2019; Dangi et al., 2018, 2020; Tipsawat et al., 2022). こうした理由から, 個々の振動板の作製された層の厚さと設計した層の厚さとに差異があった可能性が考えられる.

また, 超音波刺激による温度変化は 0.15°C であった. したがって, この程度のわずかな温度上昇は脳スライスの神経活動の変化に影響を与える可能性は低いと考えられる (Lin et al., 2018).

3.4.2. 脳スライスの神経活動誘発

PMUT を用いた超音波刺激によって, 有意な細胞内 Ca^{2+} 流入がみられた. この結果から作製した PMUT が脳スライスの神経変調に有用であることが示唆された. 私たちの知る限り, 齧歯類の皮質脳スライスに対して超音波刺激を可能とする *in vitro* マイクロデバイスであり, 皮質の層構造と固有の神経回路網を保持するもの (分散培養細胞とは対照的) は過去に報告されていない. また, 過去に比較的高い超音波周波数 (27.38 MHz) を脳スライスに使用した例があるが (Lin et al., 2018), 本研究では, 多くの *in vivo* 応用で用いられている周波数 (~ 500 kHz) に近い周波数 (< 1 MHz) を使用している. したがって, 本研究のマイクロデバイスは皮質脳スライスの神経変調メカニズムの解明に役立つと考えられる.

本研究では Ca^{2+} の蛍光指示薬を脳スライスに適用しており、神経細胞だけでなくグリア細胞も含まれていた。そのため、実験で計測した蛍光信号は神経細胞の Ca^{2+} 応答とグリア細胞の Ca^{2+} 応答とが混在したものであったと考えられる。すなわち、今回用いた条件では2種類の信号の区別が困難であった。しかし、本研究では主に2種類の細胞応答が観察された：

(i) 素早い応答 (図 3-13A), および, (ii) 遅い応答 (図 3-13B)。一般的に、神経細胞の応答は Ca^{2+} 応答が素早く数百 ms の範囲内で減少し、グリア細胞は遅い応答を示す (Ikegaya et al., 2005)。したがって、これらの Ca^{2+} 信号の時間的違いは、脳スライス内の細胞種の違いに由来することが考えられる。細胞種の分類方法としては、例えば神経細胞とアストロサイトとでは、アストロサイトマーカー (sulforhodamine 101) と Ca^{2+} 感受性色素 (Oregon Green 488 BAPTA-1) の重ね合わせによって区別することができる (Komiyama et al., 2010)。近年では、特定の種類の細胞における Ca^{2+} 信号を取得するために遺伝子ツールが使用されている (Madisen et al., 2015)。したがって、今後本デバイスを超音波刺激の細胞メカニズム解明に利用するためには、細胞特異的な色素や遺伝子ツールと組み合わせる必要がある。

3.4.3. 脳スライスの局所電場電位計測とフィードバック

本研究で開発した PMUT は微小電極が併設されており、脳スライスにおける電気活動のスペクトル変化を検出でき、異常活動をリアルタイムで検出する閉ループ型システムに応用できることが示唆された。ここでは in vitro 応用として実証したが、開発した小型のインターフェースは将来的に in vivo 応用にも期待ができる。先行研究では、閉ループ型の超音波刺激システムの実験を報告した例はあるが、いずれも刺激装置と計測機器が独立した、分離型システムであった (Dong et al., 2023; Xie et al., 2022)。一方で、本研究で示した集約パッケージ化されたインターフェースはコンパクトな閉ループ型システムに適している。今後は慢性的な閉ループ型超音波刺激に応用していく。

脳スライスを対象とした超音波神経変調に関する、これまでの研究の多くは、比較的大きなサイズを持つ圧電セラミックで製造された市販の超音波トランスデューサに基づいていた (Tyler et al., 2008)。近年では、微細加工技術を使用して小型トランスデューサが開発され、ソフト光音響パッドによる集束超音波や (Li et al., 2022)、記録チャンバーの外側に配置された、インターデジタルトランスデューサのペアによる表面音波の利用が報告されている (Lin et al., 2018)。ソフト音響パッドを用いた研究では、ラットの分散培養神経細胞を対象としており、脳スライスに関する in vitro 研究は報告されていない。さらに、インターデ

デジタルトランスデューサは脳スライスの表面に進行波を生成できるが、集束超音波によって生成される定在波よりも効果が低いと考えられる (Doinikov, 2003). 小型化および十分な出力音響圧力の観点から、本研究で開発したデバイスは超音波神経変調の細胞メカニズムを解明するための、よりシンプルで有用なツールであると考えられる.

第4章 聴知覚を生じさせない効率的な経頭蓋超音波刺激

4.1. 背景と目的

経頭蓋超音波刺激 (transcranial ultrasound stimulation, TUS) は、低侵襲あるいは非侵襲性、高い空間分解能、および、深部到達性を備えた有望な技術として注目されている (Tufail et al., 2010). しかし、末梢から高次脳領域への多シナプス経路を通じた間接的な神経活動が神経変調に影響を与える可能性があり、脳内における TUS の作用メカニズムの解明を複雑化している (Guo et al., 2018; T. Sato et al., 2018). さらに、この聴覚複合効果は、高次脳領域を対象とするヒトへの応用でも懸念されている (Braun et al., 2020; Butler et al., 2022). 小動物における、聴覚知覚の潜在的なメカニズムの一つは、TUS によって誘発される頭蓋骨内の骨伝導を介した伝搬が関与している可能性がある (Chhan et al., 2017).

予期せぬ聴覚効果を防ぐために、超音波 (US) 刺激のオンセットとオフセットの両方にテーパー包絡線を適用することが、末梢神経の活性化を回避するための効果的な解決策の一つとして知られている (Mohammadjavadi et al., 2019). しかし、US 刺激パターンのより詳細な条件は十分に検討されていない. 特に、US 刺激に適用されるテーパー窓の時間が過度に長いと、平均超音波強度が低下する可能性がある. これは、刺激時間内での平均強度が、刺激時間内の音響圧の自乗の積分に比例するためである (Fomenko et al., 2018). したがって、聴覚末梢系を活性化させずに、高次脳領域に US 刺激を効果的に適用するためには、適切な窓長を決定する必要がある.

本研究では、(1) US 刺激の包絡線パターン、(2) 頭蓋骨振動の周波数成分、(3) 聴覚末梢および中枢 (皮質) における応答の関係を解明することを目的とした. 特に US 刺激パターンに関しては、刺激全体にわたるテーパー窓の時間長に注目した. これは、US 刺激のオンセットとオフセットの傾斜率にも関連する. この目的のために、まず US 刺激のオンセットとオフセットにテーパー窓を有する包絡線を設計した. 次に、US 刺激条件の一貫性を確保するために、US 刺激に誘発されるマウスの頭蓋骨の音響圧に対し、マウスの頭部と US トランスデューサを含む 3 次元構造モデルの数値計算を実施した. その後、得られた数値計算結果と実測データを解析し、マウスの可聴周波数範囲での音響圧の過渡現象と周波数成分に焦点を当てた. 最後に、US 刺激に誘発されるマウスの神経活動を、聴性脳幹応答計測と聴覚皮質の細胞外記録により評価した. 高次脳領域において聴覚末梢を活性化させずに中枢応答を誘発するための効果的な US 刺激条件について、時間的包絡線に焦点を当てて議

論する。

4.2. 方法

4.2.1. 包絡線をかけた超音波刺激の時間パターン

超音波波形パターンとして、ここでは連続波（continuous wave, CW）を扱う。超音波刺激のオンセットとオフセットには包絡線を適用する。そのため、刺激波形は正弦波にオンセットとオフセットとでテーパー（窓）関数を掛けることで生成される（図 4-1A）。刺激時間を d 、窓関数を適用する区間を hd （window rate, $h \leq 0.5$ ）、および時間を t とすると、包絡線は次式で表される：

$$E(t; d, h) = W_{\text{on}}(t; d, h) + W_{\text{in}}(t; d, h) + W_{\text{off}}(t; d, h). \quad (4-1)$$

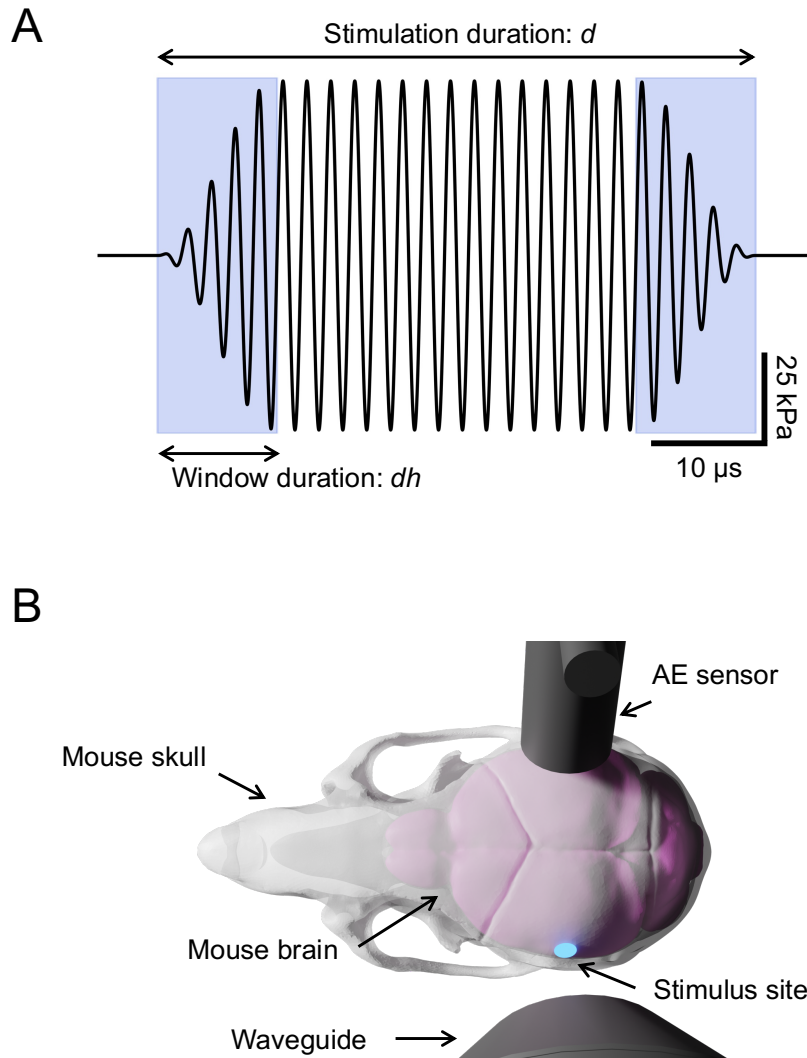


図 4-1. 超音波刺激波形と音響放射圧計測の概略図. (A) 超音波刺激波形の時間パターン. (B) 音響放射圧計測の概略図. 青色の円で示す部分は、超音波刺激の印加部分を示す.

ここで W_{on} , W_{off} , および, W_{in} はそれぞれ, 包絡線が適用されているオンセットとオフセットの区間 (合計 $2dh$), および, それらの間の区間 ($d - 2dh$) を示す. 窓関数が余弦関数テーパー窓を成すとする, W_{on} , W_{off} , および, W_{in} はそれぞれ次式で示される.

$$W_{\text{on}}(t; d, h) = u_{s+}(t) + \frac{1}{2}u_{s-}(t - dh)\left\{1 - \cos\left(\frac{\pi t}{dh}\right)\right\}, \quad (4-2a)$$

$$W_{\text{in}}(t) = u_{s+}(t - dh)u_{s-}(t - d + dh), \quad (4-2b)$$

$$W_{\text{off}}(t; d, h) = \frac{1}{2}u_{s+}(t - d + dh)u_{s-}(t - d)\left[1 - \cos\left\{\frac{\pi(t - d)}{dh}\right\}\right], \quad (4-2c)$$

ここで,

$$u_{s+}(t) = \begin{cases} 1 & (t \geq 0) \\ 0 & (t < 0) \end{cases}, \quad (4-3a)$$

$$u_{s-}(t) = \begin{cases} 0 & (t \geq 0) \\ 1 & (t < 0) \end{cases}, \quad (4-3b)$$

とする. $h = 0.5$ のとき, 包絡線はハン関数となる. 刺激波形の信号は次式で表される:

$$f(t; d, h) = E(t; d, h) \sin(\omega_c t). \quad (4-4)$$

ω_c は刺激波形の中心角周波数を示す.

4.2.2. 入力波形のスペクトル解析

入力される US 波形の周波数特性を明らかにするために, 刺激波形 $f(t; d, h)$ のフーリエ変換 $F(\omega; d, h)$ を求めた:

$$F(\omega; d, h) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t; d, h) e^{-i\omega t} dt. \quad (4-5)$$

関数 $|F(\omega; d, h)|^2$ は刺激波形 $f(t; d, h)$ のエネルギースペクトルである (Percival & Walden, 1993). マウスの可聴周波数帯域における窓率とエネルギースペクトルとの関係に注目するために, 可聴周波数帯域でエネルギースペクトル関数を積分して, 平均エネルギー E_{audi} を考慮した:

$$E_{\text{audi}}(d, h) = \frac{1}{\omega_2 - \omega_1} \int_{\omega_1}^{\omega_2} |F(\omega; d, h)|^2 d\omega. \quad (4-6)$$

ここで, $\omega_i = 2\pi f_i$ ($i = 1$ and 2 ; $f_1 = 20$ kHz and $f_2 = 60$ kHz) とする. 刺激時間は 0.05 ms で固定した.

4.2.3. 3次元モデルを用いた数値計算

印加する超音波の特性を実験動物の頭蓋骨や脳組織内で計測することは、センサーの仕様上困難である。そのため、包絡線が掛けられた超音波刺激によって生じるマウス頭蓋骨での音響圧の特徴を数値計算によって調べる。数値計算では、マウス脳、頭蓋骨、超音波用ゲル、導波路、および、トランスデューサを含む3Dモデルを対象とした（図4-2A）。モデルのメッシュサイズは最小0.0123 mm、最大1.23 mmとした（図4-2B）。数値計算に使用したパラメータを表4-1に示す。

表4-1. 数値計算に使用したパラメータ。

Material	Density (kg/m ³)	Speed of sound (m/s)
Skull	1908	4080
Brain	1040	1540
Water/gel	998	1480

本研究では、マウス脳を長半径9.4 mm、短半径4.4 mmの楕円体で定義し、頭蓋骨の厚さは0.3 mmとした（Soleimanzad et al., 2017）。

音響圧 p_t に関して次式を数値的に計算した：

$$\frac{1}{\rho c^2} \frac{\partial^2 p_t}{\partial t^2} + \nabla \cdot \left\{ -\frac{1}{\rho} (\nabla p_t - \mathbf{q}_d) \right\} = Q_m. \quad (4-7)$$

ここで、 ρ は媒質の密度、 c は音速、 $\mathbf{q}_d$ は容積力ドメインを示すダイポールドメインソース、および、 Q_m は各方向へ均一な力を示すモノポールドメインソースを表す。物理モデルはFEMによって計算された（COMSOL Multiphysics, Ver. 6.1, COMSOL AB, Sweden）。トランスデューサからの出力音響圧は50 kPaに設定した。トランスデューサおよび導波路は45度に傾けた。

テーパー窓の相対的な長さの効果を調べるため、式(4-1)中の窓率 h を0～0.45 (0.05 step)の範囲で変化させた。刺激時間 d は比較的短い0.05 msと、in vivo 研究で一般的に使用される1 msに設定した（Ai et al., 2016; Kubanek et al., 2020; W. Lee, Kim, Lee, et al., 2015）。

4.2.4. 頭蓋骨から生じる音響圧放射の計測

実験動物

音響放射圧の計測には、C57BL/6J 系統、13 週齢のメスを 2 個体使用した。手術を行う前に三種混合麻酔薬を腹腔内へ投与した。三種混合麻酔薬は、 $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬であるメデトミジン (0.3 mg/kg)、GABA_A 受容体作動薬であるミダゾラム (4.0 mg/kg)、および、 κ オピオイド受容体作動薬であるブトルファノール (5.0 mg/kg) を混合した。その後

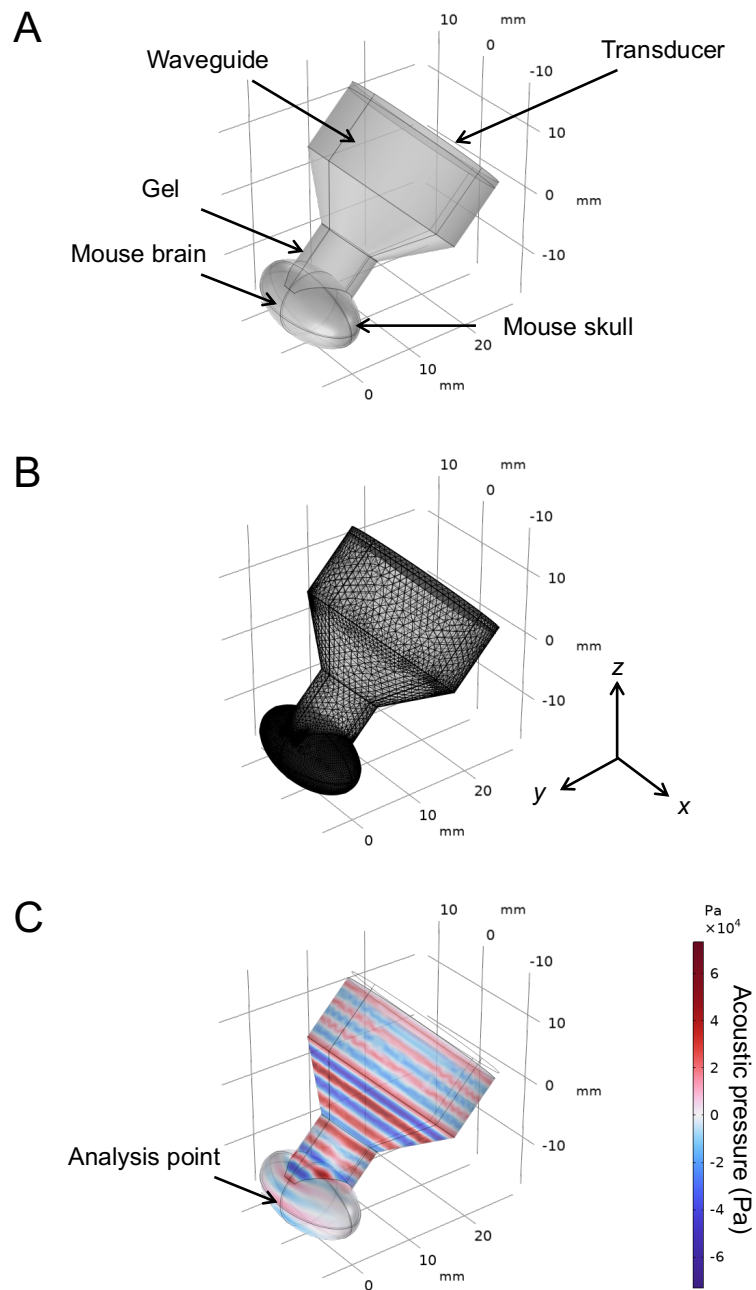


図 4-2. In vivo 超音波刺激の 3D モデル. (A) マウス頭部とトランスデューサのジオメトリ. (B) メッシュ. (C) 数値計算結果例.

頭皮を切開して頭蓋骨を露出した (Yoshikawa et al., 2023).

音響圧放射計測プロトコル

超音波刺激によって生じるマウス頭蓋骨での機械的な振動を調べるため、マウス頭蓋骨から発生する音響放射圧 (acoustic emission, AE) を計測した。AE センサ (AE-901, NF corp., Yokohama, Japan) をマウス頭蓋骨の右側に向けて設置した (図 4-1B)。AE センサからの出力信号はプリアンプ (SA-440F5, NF corp.; gain, 50 dB) を使って増幅した。プリアンプからの出力信号はハイパスフィルタ (multifunction filter 3611, NF corp.; cutoff frequency, 20 kHz) で処理された。フィルタ処理された信号はオシロスコープ (SDS1104X-E, SIGLENT, USA, sampling rate, 500 MHz) で取得された。

超音波トランスデューサ (V301-SU, Olympus, USA) の先端に導波路を装着し、マウス頭蓋骨の右側の表面に対して 45° に傾けて設置した。導波路から出力される超音波のビームフォームを図 4-3 に示す。導波路の先端と頭蓋骨との距離はおよそ 8 mm にマニピュレータ (SM 15, NARISHIGE, Kanagawa, Japan) を用いて調整された。導波路の中は脱気水で満たし、パラフィルム (Parafilm M, Amcor, Zurich, Switzerland) を用いて密閉した。導波路/AE センサと頭蓋骨との間は超音波用ゲル (SONO JELLY, CANON MEDTECH SUPPLY corp., Kanagawa, Japan) で満たした。刺激時間 d は数値計算と同様に 0.05 および 1 ms の 2 種類を用いた。

計測は同一条件下で 5 回ずつ行われた。周波数解析では、数値計算結果および AE 計測結

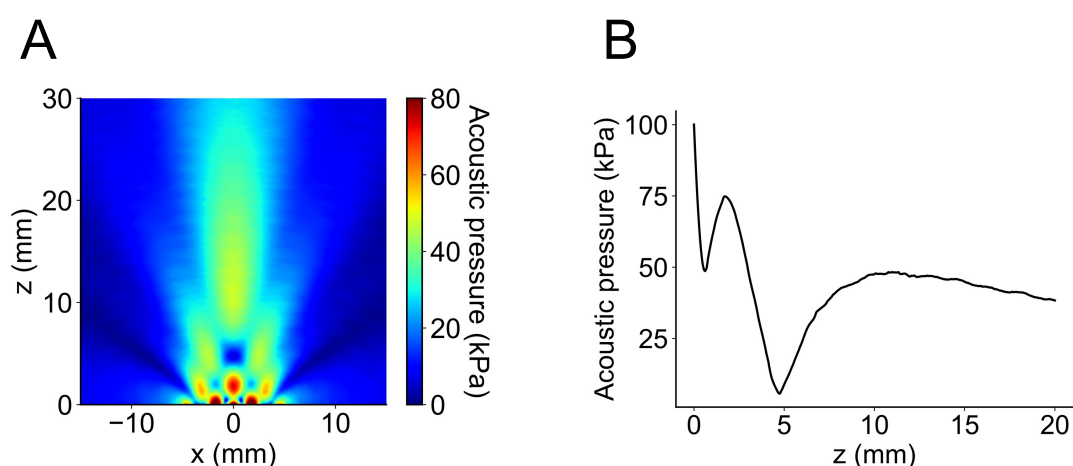


図 4-3. 超音波トランスデューサに導波路を装着した際の音響圧分布. (A) 照射方向 (z) とその垂直方向 (x) における分布. (B) 照射方向における音響圧分布.

果のどちらも可聴域成分（20～60 kHz の周波数帯）を定義した。

4.2.5. 聴性脳幹応答計測

TUS 中にマウスの聴性脳幹応答 (auditory brainstem response, ABR) を計測した。実験には、C57BL/6J 系統、8～9 週齢のメスを 3 個体、オスを 3 個体使用した。ABR の記録は、防音および電磁シールドされた部屋で行われた (Noto et al., 2016)。3 本の電極を使用し、アクティブ電極は右耳後方から右目にかけて、リファレンス電極は首から後頭部にかけて、グラウンド電極は尾の付け根から背骨に沿うように刺入した (Ingham et al., 2011)。

各超音波刺激実験の前には音刺激を提示した。音刺激にはクリックパルス（音圧：80 dB sound pressure level, SPL, 持続時間：100 μ s, 単相性）を使用し、スピーカー（MF1, Tucker-Davis, USA）を介して提示した。ABR 信号は TDT システム（RA4PA/RA16 Medusa, Tucker-Davis Technology, USA）と BioSigRP ソフトウェア（Tucker-Davis Technologies, USA）を用いて増幅および取得した。ABR 計測のサンプリングレートは 25 kHz とし、同じ条件下で 500 試行ずつ実施した。取得した信号は 0.5～3 kHz のバンドパスフィルタで処理してから解析した。ABR の平均波形を求めた後、刺激前の区間 20 ms 間における標準偏差を計算した。さらにその標準偏差の 4 倍を応答閾値とした。

4.2.6. 大脳皮質の神経活動計測

テーパー窓をかけた条件でも神経変調に有用な刺激波形であることを検証するために、TUS によって誘発された皮質内の LFP の電気生理学的記録を行った。実験には、C57BL/6J 系統、8～10 週齢のオスを 3 個体使用した。対照実験として、0 V の入力電圧でトランスデューサから生成された Sham 刺激による誘発応答も記録した。LFP 計測に伴う手術と刺激プロトコルは 4.2.5 節と同じである。LFP 計測は 16-ch 多点電極アレイ（0.98 – 2.03 M Ω at 1 kHz; A1 $\times$ 16-5 mm-50-177-A16; NeuroNexus Technologies）を用いて行った。電極間距離は 50 μ m である。LFP 信号は 0.1～300 Hz の範囲でフィルタリングされた。さらに、0.30～8.0 kHz の範囲のマルチユニット活動（multiunit activity, MUA）信号は、元のデータの広帯域信号をフィルタリングすることで取得され、フィルタリングされた信号の標準偏差 σ が各データセットに対して計算された。MUA を分類するために、 $4.0 \times \sigma$ の閾値処理によってスパイクが検出された。また、測定試行は同一条件下で 30 回繰り返された。

4.2.7. データ解析

全ての統計解析は、特定の分布を仮定せずに順序統計を使用してノンパラメトリック統計手法を用いて行われた。AE 計測で得られたデータは、平均値±標準偏差 (standard deviation, SD) として示した。ABR および LFP のピーク振幅は、平均値±標準誤差 (standard error of the mean) として示した。複数のグループを含む比較の統計解析は、Python 3.12.1 を用いて Nemenyi の事後検定で行われた。 $p < 0.05$ の場合、統計的に有意と見なされた。

4.3. 結果

4.3.1. 簡易 3 次元モデルを用いた数値計算

まず、理想化された頭蓋骨を含む 3D モデルをシミュレーションし、式(4-4)の US 波形によって駆動され、モデル化された頭蓋骨の反対側部分における音響圧の過渡現象を調べた。モデル化された頭蓋骨に伝達される入力音響圧は、窓率 h が増加するにつれて可聴周波数帯域でエネルギーが単調に減少した (図 4-4A)。また、超音波によって駆動されるモデル化された頭蓋骨上の音響圧の振動は、窓率 (h) が増加するにつれて入力音響圧と同様のエネルギー特性を示し (図 4-4B)，入力 US 信号と出力頭蓋骨圧のエネルギースペクトル間の高い相関係数 (相関係数, $r = 0.991$, $p = 4.01 \times 10^{-8}$) が示された。例えば、図 4-5A は同じ刺激時間 $d = 0.05$ ms で、異なる窓率 ($h = 0$ to 45% with a 5% step) 条件下で数値的に得られた反対側の頭蓋骨上の音響圧過渡減少を示している。図 4-5B は、2 つの刺激時間: 0.05 ms (図 4-5Ba) および 1 ms (図 4-5Bb) の下で計算された窓率のエネルギースペクトルを示す。各 US 刺激の中心周波数 (i.e., 500 kHz) でのエネルギースペクトルは、全ての窓率にわたって一定のままであった。対照的に、中心周波数以下のサイドバンド周波数でのエネルギースペクトルは、窓率に大きく依存していた。さらに、可聴周波数帯域では、図 4-5C は窓率 (h ; 図 4-5Ca) および窓長 (dh ; 図 4-5Cb) に関するスペクトル特性をまとめている。可聴周波

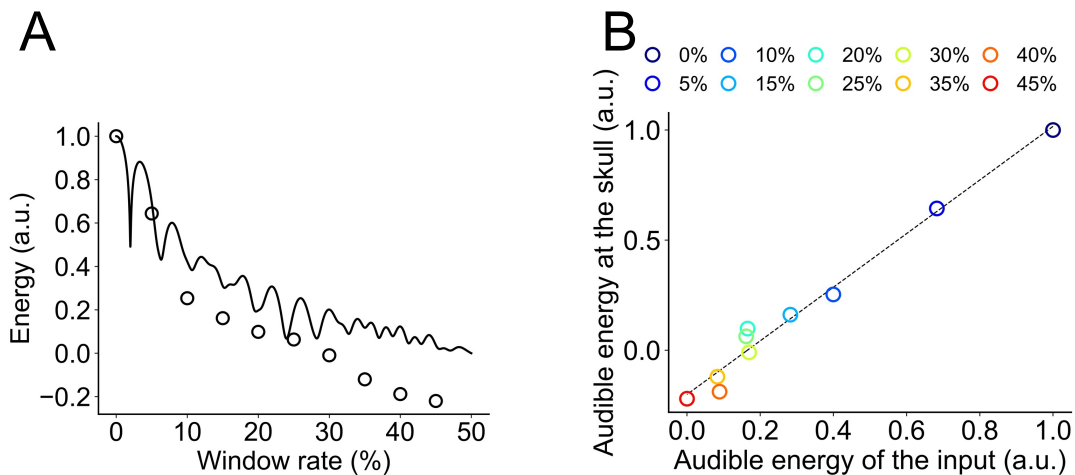


図 4-4. 入力波形のスペクトル特性. (A) 可聴周波数帯域の平均エネルギーと窓率の関係. 円形のマーカーは数値計算によって得られた頭蓋骨上での平均エネルギーを示す. (B) 入力波形と頭蓋骨上から取得した、可聴周波数帯域の平均エネルギーの比較. 破線は回帰直線を示す.

数帯域でのエネルギースペクトルは、窓率の増加に伴い単調減少した。

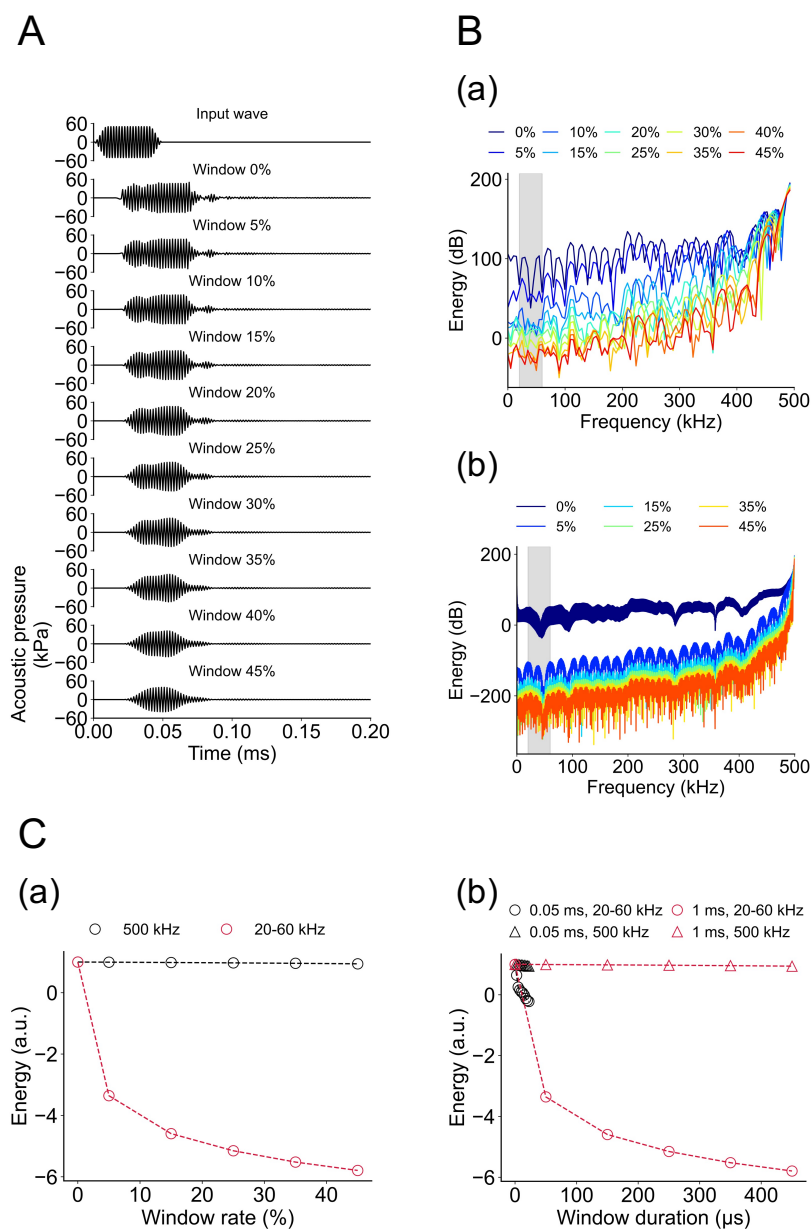


図 4-5. 図 4-2C に示した解析点 (analysis point) から抽出された数値計算結果. (A) 異なる窓率 (h) での頭蓋骨における音響圧過渡現象. (B) 音響圧のエネルギースペクトル. (a) 0.05 ms および (b) 1 ms の刺激時間. 灰色の背景は 20~60 kHz のマウス可聴域を含む周波数帯を示す. (C) 可聴周波数帯域における異なる (a) 窓率および (b) 窓時間での平均エネルギースペクトル. エネルギーは 0%条件でのエネルギーで正規化されている.

4.3.2. 頭蓋骨から生じる音響圧放射の計測

次に、US 刺激を印加した側に対して反対側の位置に配置された AE センサから測定された信号を調べた。刺激時間 0.05 ms の代表的な入力波形を図 4-6A の最上段に、異なる窓率 ($h=0, 10, 15, 20, 30, 40\%$) 下で測定された AE 信号を図 4-6A の 2 から 7 段目に示す。窓率が増加するにつれて、AE 応答のピークタイミングが遅れる傾向にあった。

全ての測定された窓率に対するエネルギースペクトルを図 4-6B に示す。数値計算の結果と同様に、中心周波数 (i.e., 500 kHz) でのエネルギースペクトルは、異なる窓率間でほぼ一定であった。対照的に、可聴周波数帯域 (i.e., 20 ~ 60 kHz) では、どちらの刺激時間 : 0.05 ms (図 4-6Ba) と 1 ms (図 4-6Bb) の条件下でも、窓率間に顕著な違いがあった。可聴周波数帯域では、図 4-6C が窓率 (h ; 図 4-6Ca) および窓長 (dh ; 図 4-6Cb) に関するスペクトル特性を要約して示している。図 4-6Ca では、0.05 ms の刺激時間において、窓率が 10% から 20% の条件下での可聴周波数帯域における平均エネルギースペクトルは、0% 窓率条件よりも大きくなった。さらに、40% 窓率の条件下では、平均エネルギースペクトルは大幅に減少した。また、1 ms の刺激時間では、2% および 3% の窓率での可聴周波数帯域における平均エネルギースペクトルは、0% 窓率条件と比較して増加したが、1% および 10% 窓率の条件下では減少した。

窓長と可聴周波数帯域における平均エネルギースペクトルの関係を図 4-6Cb に示す。これは、時間スケールに関して図 4-6Ca を x 軸で変換したものである。図 4-6Cb では、可聴周波数帯域における平均エネルギースペクトルが刺激時間に依存していた。例えば、同じ 10 μ s の窓長条件では、0.05 ms と 1 ms の 2 つの刺激時間条件は、それぞれ非窓条件と比較してより大きなエネルギーとより小さなエネルギーを示した。短時間と長時間の条件に応じてエネルギースペクトルの逆の傾向が観察された。

4.3.3. 聴性脳幹応答計測

2 種類の刺激時間と異なるテーパー窓率での US 刺激に対する ABR をマウス脳から記録した。1 ms および 0.05 ms の刺激時間条件下での代表的な ABR をそれぞれ図 4-7Aa および 4-7Ab に示す。1 ms の刺激時間と様々な窓率の条件下では、閾値 (点線) を超える Wave I, II, III を含む正のピークが 0% 窓率での刺激にも応答して観察された (図 4-7Aa の上部パネル)。他の窓率ではピークの検出がされなかった (図 4-7Aa の中部および下部パネル)。同様に、0.05 ms の刺激時間条件下 (図 4-7Ab) でも、閾値を超える正のピークは、0% 窓率で

の刺激にのみ応答して現れた。

短時間および長時間の全ての窓率に対する応答率を図 4-7B に示す。テーパー窓がない条件では、閾値を超えるピークを含む ABR が常に観察された ($n = 6$)。テーパー窓がある条件では、クリック刺激に対する応答と比較して、ピーク振幅が有意に小さくなった (図 4-

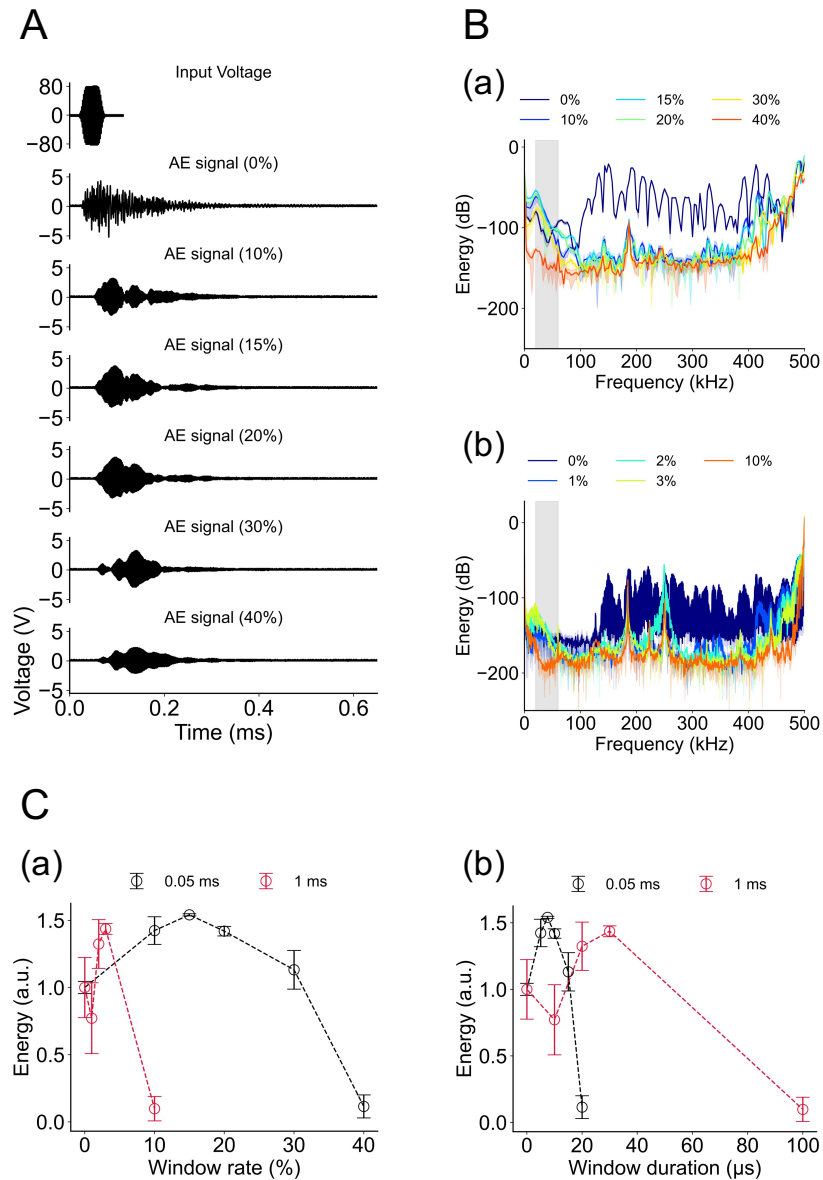


図 4-6. AE 計測の結果. (A) 20%窓率および刺激時間 0.05 ms の入力電圧波形（最上段）と、異なる窓率（0 ~ 40%）条件下における AE 信号. (B) 測定された AE 信号のエネルギースペクトル：(a) 0.05 ms および (b) 1 ms の刺激時間. (C) 異なる (a) 窓率および (b) 窓長での可聴周波数帯域における平均エネルギー。エネルギーは 0%条件のエネルギーで正規化されている。データは平均値±標準偏差として示す ($n = 5$)。

7C, $n=6$). しかし, 各刺激時間 (1 ms あるいは 0.05 ms) の窓率間で, ピーク振幅に有意な差はみられなかった (図 4-7C, $n=6$). この結果は, 短いテーパー窓でも, これらの条件下で ABR ピーク振幅を低減するのに効果的であることを示唆しているが, 応答率を評価するには閾値の決定が重要であることがわかる.

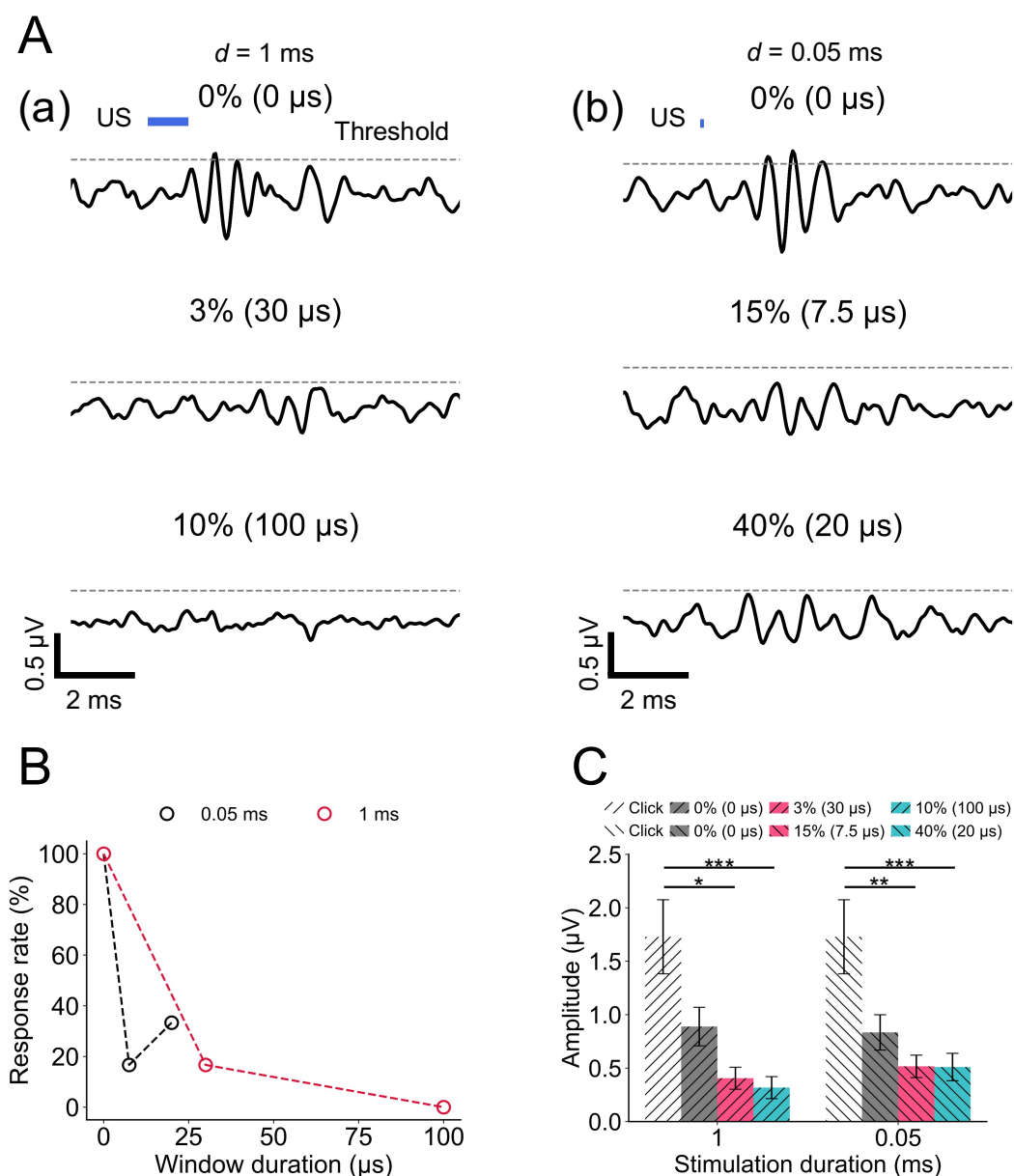


図 4-7. 異なる窓率および刺激時間で ABR 特性. (A) TUS によって誘発された典型的な ABR 波形: (a) 1 ms および (b) 0.05 ms の刺激時間. 刺激のタイミングと時間は水平の青色の棒で示される. 点線は閾値を示す. (B) 応答率と窓長の関係. (C) クリックおよび異なる窓率での TUS に対する ABR 振幅の比較. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.005$, $n = 6$.

さらに、AE 計測の結果では、短い窓率 (e.g., 図 4-6Ca の 3%および 15%) の範囲で可聴周波数帯域のエネルギースペクトルが単調に増加することを示したが、ABR の観察における結果では、短い窓率が必ずしも聴覚末梢部を活性化させるわけではないことを示唆している (図 4-7B)。

4.3.4. 経頭蓋超音波刺激に誘発される局所電場電位応答

最後に、異なる窓率 (0, 3, 10%または 0, 15, 40%) での US 刺激に対するマウス皮質の LFP を記録した。皮質層での US 刺激による LFP 応答は、3 匹のマウスから記録された。図 4-8Aa は 1 ms の刺激時間での US 刺激に対する典型的な LFP 応答の例を示す。対応する 1 ms 刺激による MUA を図 4-9A に示す。図 4-8Ba は脳表面から 400 μm の深さに位置する第 4 層で記録された、異なる窓率での平均 LFP 応答を示す。ピーク振幅は窓率が増加するにつれてわずかに減少した。特に、US による皮質 LFP 応答は、ABR が検出されない条件に対応する 3%および 10%のテーパー窓条件でも観察された。さらに、US 刺激によるピーク振幅は、Sham 刺激 (音響圧, 0 kPa) と比較して、全ての窓率で統計的に有意に大きかった (図 4-8C; $p < 0.05$, $n = 18$ from 3 animals)。この結果は、検出可能な聴覚末梢応答がない場合でも、TUS が皮質 LFP 応答を誘発するのに十分であることを示している。さらに、ピーク振幅は窓率によって遅延する傾向があったが、それらの間に有意な差はなかった (図 4-8C; $p > 0.05$, $n = 18$ from 3 animals)。同様に、図 4-8Ab は短い刺激時間 ($d = 0.05$ ms) での US 刺激に対する典型的な皮質 LFP 応答を示す。対応する 0.05 ms の刺激による MUA を図 4-9B に示す。脳表面から 400 μm の位置で記録された、異なる窓率での平均 LFP 応答は、全てのテーパー窓条件で検出可能な応答を示した (図 4-8Bb)。さらに、US 刺激によって誘発された皮質 LFP 応答は、全ての窓率で Sham 刺激によって誘発された皮質応答よりも有意に大きかった (図 4-8C; $p < 0.05$, $n = 18$ from 3 animals)。異なる窓率間の潜時に有意な差はみられなかった (図 4-8D; $p > 0.05$, $n = 18$ from 3 animals)。さらに、他の窓率条件の皮質 LFP 応答の例は図 4-10 に示す。

また、クリック刺激に誘発された LFP 応答と TUS に誘発された LFP 応答との比較結果を図 4-11A に示す。刺激のオンセット後、2 種類の刺激間で負のピーク潜時はほぼ同じであった。しかし、遅いフェーズ (> 50 ms after stimulation onset) における、TUS に誘発された LFP 応答の、20 kHz のオーバーシュートはクリック刺激に誘発されたものと比べて大きく、TUS がより長い皮質応答に影響を与えることが示唆された (図 4-11B)。

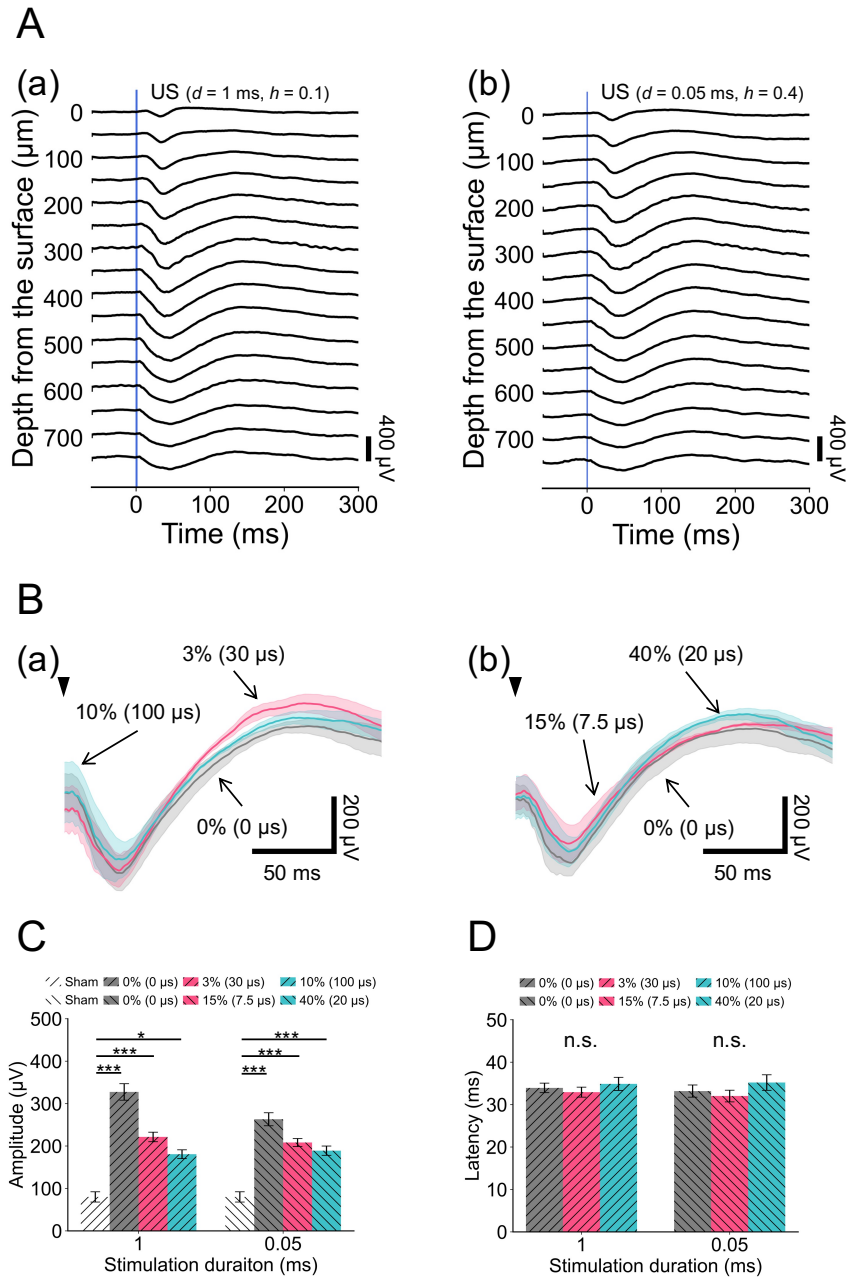
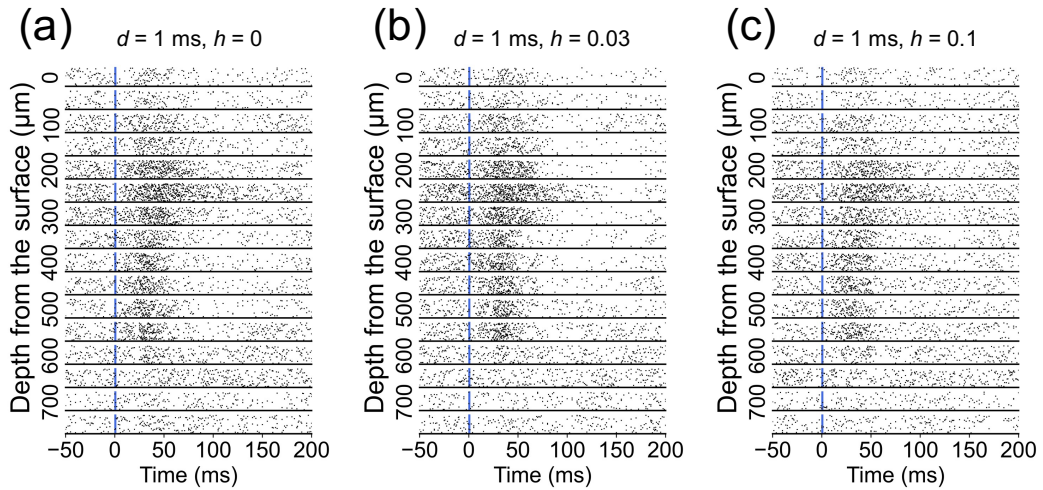


図 4-8. TUS によって誘発された皮質層状 LFP 応答. (A) 刺激時間 (a) 1 ms および (b) 0.05 ms における典型的な応答. 青い線は刺激のタイミングと持続時間を示す. (B) 刺激時間が (a) 1 ms および (b) 0.05 ms の際に表面から 400 μm の深さで記録された平均波形. データは平均値 $\pm$ SEM で示されている ($n = 3$). 刺激開始のタイミングは黒い三角形で示されている. (C) 異なる窓率でのピーク振幅と刺激時間の関係 ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.005$, $n = 18$ from 3 animals). (D) 異なる窓率でのピーク潜時と刺激時間の関係 (n.s., $p > 0.05$, $n = 18$ from 3 animals).

A



B

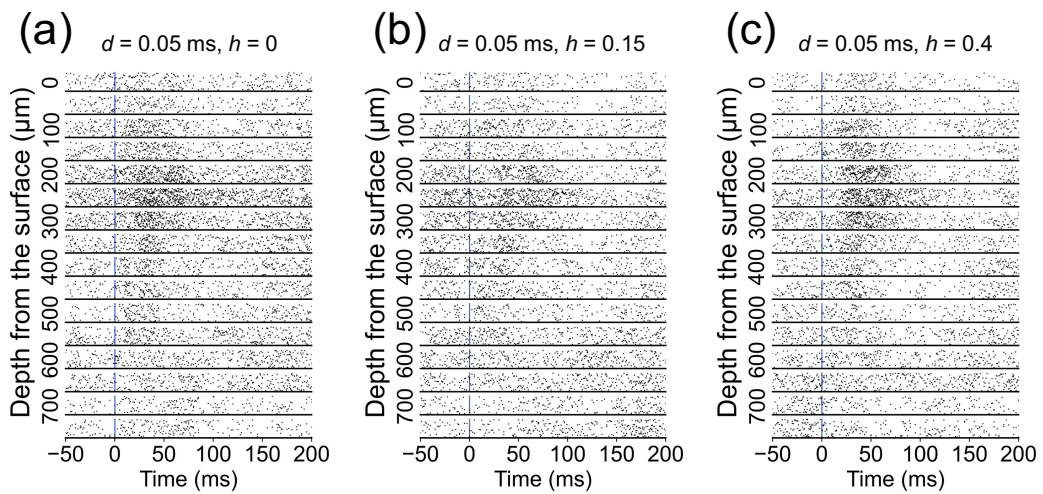
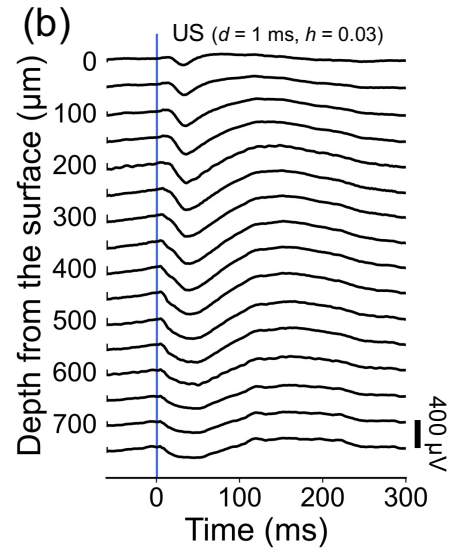
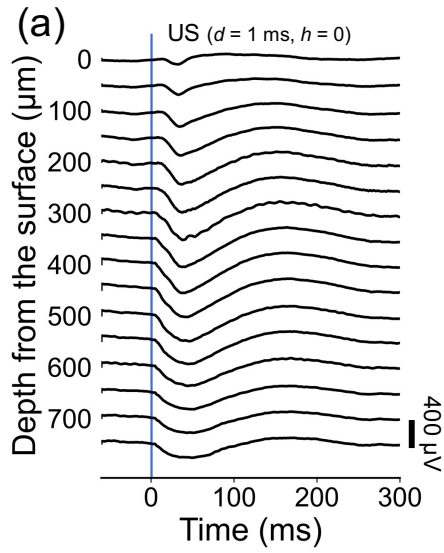


図 4-9. TUS によって誘発された皮質層状 MUA 応答を示すラスタープロット. (A) 刺激時間 1 ms, 窓率 (a) 0%, (b) 3% および (c) 10% における典型的な応答. (A) 刺激時間 0.05 ms, 窓率 (a) 0%, (b) 15% および (c) 40% における典型的な応答. 青い線は刺激のタイミングと持続時間を示す.

A



B

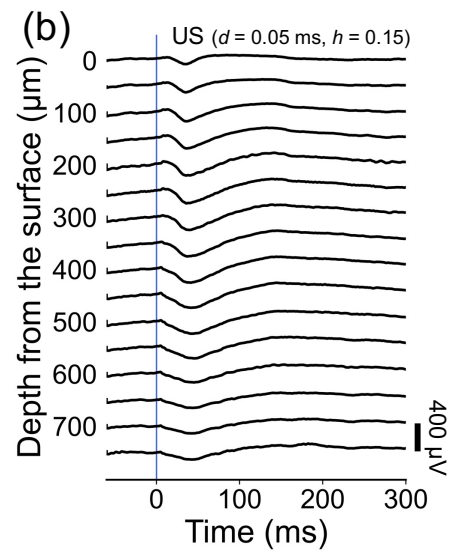
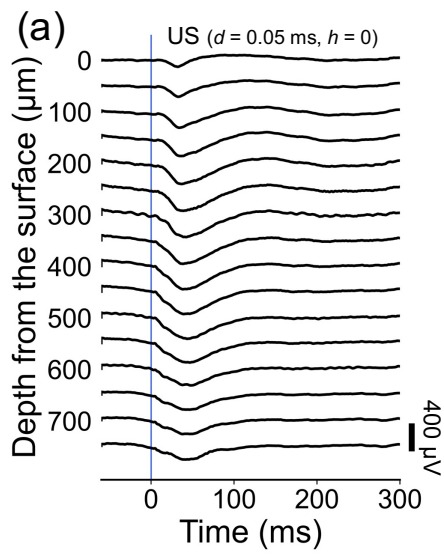


図 4-10. TUS によって誘発された皮質層状 LFP 応答. (A) 刺激時間 1 ms, 窓率 (a) 0%および (b) 3%における典型的な応答. (A) 刺激時間 0.05 ms, 窓率 (a) 0%および (b) 15%における典型的な応答. 青い線は刺激のタイミングと持続時間を示す.

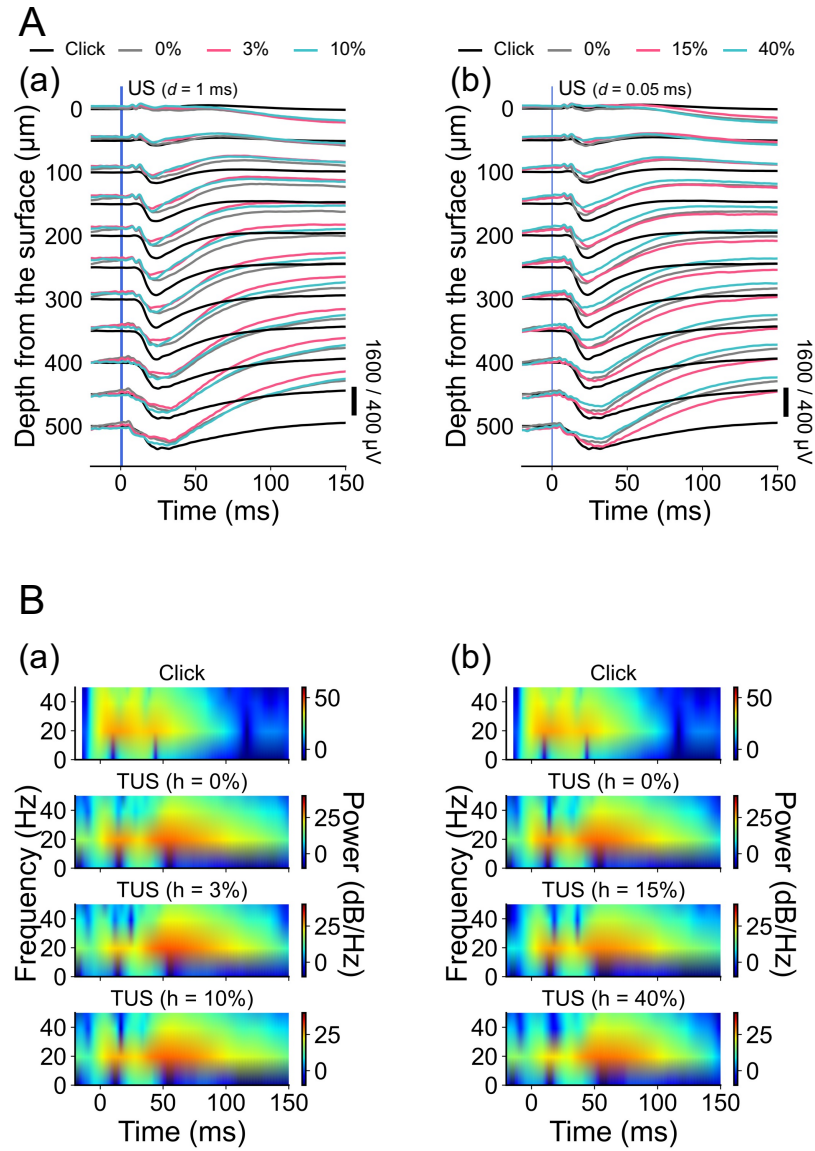


図 4-11. クリック刺激誘発応答と異なる窓率における TUS 誘発応答の比較. (A) LFP 波形. 1600 μV と 400 μV のスケールバーはそれぞれクリック刺激誘発応答と TUS 誘発応答に対応する. (B) 時間周波数解析の結果. (a) TUS の刺激時間: 1 ms. (b) TUS の刺激時間: 0.05 ms.

4.4. 考察

4.4.1. 包絡線適用区間率（窓長）と可聴周波数成分

数値計算の結果から、テーパー窓率を増加させると、入力波形と頭蓋骨に到達した超音波振動の両方において、可聴周波数帯域のエネルギースペクトルが減少した（図 4-4B）。このシミュレーション結果は、US 刺激波形のテーパー窓率を増加させることで、マウスの頭蓋骨での音響圧の、中心周波数周辺のサイドバンド成分を単調減少させることを示している。一方で、AE 計測の結果は、窓率を増加させた際に、可聴域のエネルギー成分が異なる傾向を示した。すなわち、テーパー窓率を増加させた際に、初めは可聴周波数帯域のエネルギースペクトルが増加して、刺激時間に依存した最大値に達するとその後減少していく（図 4-6C）。したがって、本研究で示した AE 計測の結果から、窓長が十分に短い際、可聴周波数帯域のエネルギースペクトルが、たとえテーパー窓を US 刺激のオンセットと、オフセットにかけたとしても増加するということが示唆された。マウスの頭蓋骨に達した音響圧の変動そのものと、音響圧によって生じる振動から発生する弾性波との間に生じたスペクトルの差異は、頭蓋骨の振動特性が関係していると考えられる。詳細な骨伝導特性を調べるために、数値計算で使用する物理モデルを細部まで再現していくことを今後に検討する。

4.4.2. 効果的な包絡線適用条件

本研究では、聴知覚を生じさせない TUS の効率的なテーパー窓率を解明した。ABR 計測の結果から、短い窓率、および、窓長（ $\geq 30 \mu\text{s}$ ）でも聴知覚を生じさせずに皮質の応答を誘発することが示された（表 4-2）。

表 4-2. 聴知覚と皮質応答。+は応答検出を示す。-は 40%未満の応答率を示す。

	$d = 1 \text{ ms}$			$d = 0.05 \text{ ms}$		
h (%)	0	3	10	0	15	40
dh (μs)	0	30	100	0	7.5	20
ABR	+	-	-	+	-	-
LFP	+	+	+	+	+	+

さらに、US 刺激にテーパーをかけることで、LFP 応答のピーク潜時にやや影響を及ぼす傾向がみられた（図 4-8D）。窓率を増加させると遅れ時間が増加する傾向は、音響圧の数値計

算と AE 計測の結果と類似していた (図 4-5A, 6A). この結果から, 過剰なテーパー窓長は TUS による神経変調の時間分解能を損なう可能性が示唆された. 特に, 長期的な変調効果を得るには繰り返し TUS が使用される (Zeng et al., 2022). したがって, 過剰なテーパー窓の適用による時間分解能の低下は繰り返し TUS をする際には注意が必要である. 今後は連続波だけでなく, 繰り返しパルス波におけるテーパー条件についても調べていく.

先行研究では, TUS に 15%以上の窓率を適用していた (M. H. Choi et al., 2023; H.-J. Kim et al., 2024; Mohammadjavadi et al., 2019; Salahshoor et al., 2022). 本研究では, 10%以下の窓率をかけた US 印加時にも, 聴覚応答が生じないことを ABR 計測で示した. 本研究で示した ABR と LFP の計測から得られた結果は, 効率的な TUS パラメータの選択に有効であると考えられる.

一般的に, 電気刺激に対する LFP 応答は, US 刺激や音刺激に対する応答と比べて早いピーク潜時を示すため区別が容易である (Furukawa et al., 2022; Muramatsu et al., 2019). しかし, 聴覚皮質における US 刺激誘発応答と音刺激誘発応答とを区別することは, それらの時間変動が類似しているため困難である (図 4-8D, 4-11A). すなわち, 聴覚の複合効果を LFP の応答波形から検出することは難しい. したがって, TUS による直接的な変調と聴覚の複合効果による変調とを, LFP の応答波形から区別できる技術が今後の研究で求められる.

第5章 閉ループ型経頭蓋超音波刺激を目指して

5.1. 背景と目的

脳刺激を治療に応用するためには、装置システムの構成と機能が重要である。例えば、てんかん発作や精神疾患などの疾患では治療期間が長期間にわたる可能性があるため、近年、過度な脳刺激を回避する方法の開発が進められている。従来の開ループ型刺激では、刺激強度が適切であるか否かを判定するために、フィードバック信号が無いため、過剰な活動誘発による副作用のリスクが懸念される。過度な刺激を避けるために、脳活動を持続的にモニタリングし、活動に応じて必要なタイミングで刺激を印加する、閉ループ型の脳刺激が望ましいと考えられる (Takeuchi & Berényi, 2020)。こうした閉ループ型の制御を TUS と組み合わせることで、低侵襲的に必要に応じて脳刺激が可能となると期待できる。さらに、配列型の PMUT では、複数の振動板の駆動信号に時間（位相）差を与えることで、超音波ビームの焦点位置の制御が可能となると期待される (Tipsawat et al., 2022)。こうした phased-array PMUT を閉ループ型の TUS として利用することで、脳活動に応じて刺激のタイミングと対象領域を自動で制御可能なシステムへと応用できると期待される。

閉ループ型の超音波刺激システムの実現に向けて、刺激デバイスのインターフェースに着目した。先行研究では、閉ループ型の超音波刺激システムの実験を報告した例はあるが、いずれも刺激装置と計測機器が独立した、分離型システムであった (Jo et al., 2022; Xie et al., 2022)。

そこで、本研究では、超音波刺激の装置と神経活動の記録用電極を小型に集約パッケージ化する着想を得た。これにより、将来的にウェアラブルで脳活動依存的な脳刺激装置の応用開発が期待される。

本章では、マウス頭部に固定が可能な小型閉ループ型 TUS 装置の開発を目指した。特に、(1) 閉ループ型 TUS の設計、(2) 一体化されたモニタリング用電極の実用性、および、(3) TUS としての神経変調効果の3点を中心に述べる。まず、超音波刺激とモニタリング用の微小電極を組み合わせた PMUT の設計について述べる。次に、神経活動をモニタリングするために、試作した頭部固定型刺激装置に併設された微小電極で、音響刺激によって誘発された応答の脳波が取得できるかについて検証した。最後に、開発したデバイスの電極とトランスデューサの両方を利用して、可塑性の誘導に取り組んだ。これらの内容を踏まえて、開発したデバイスの優位性と今後の改善点について議論する。

5.2. 方法

5.2.1. 設計

マウスの脳で TUS を達成するために、複数の振動板を備えた PMUT の開発を目指した。振動板の構造は過去の報告に基づいて設計した (Furukawa, et al., 2024)。PMUT には以下の 3 つの数値目標を設けた：(1) 500 kHz の共振周波数、(2) 100 kPa 以上の音響圧、(3) 5 mm 以上の焦点距離 (Franklin & Paxinos, 2007; Yuan et al., 2021)。さらに、マウス脳から脳波 (electroencephalography, EEG) 信号をモニタリングするために、PMUT の裏側に微小電極 ($200 \times 200 \mu\text{m}^2$) を設計した。微小電極のサイズは、同じサイズと材料で低インピーダンスを示した過去の報告に基づいて決定した (Furukawa et al., 2024)。PMUT の各円形振動板は PZT 層, Si 層, 絶縁層 (SiO_2) および、PZT 層の上下に位置する電極 (Pt/Ti) で構成される。

デバイスを作製する前に、数値計算によって PMUT の円形振動板の共振振動をシミュレーションした (COMSOL Multiphysics, Ver. 6.2, COMSOL AB, Sweden)。ソフトウェアの FEM を使用して、目標共振周波数 (i.e., 500 kHz) を満たすサイズを決定した。

次に、限られた領域 ($10 \times 10 \text{ mm}^2$) で TUS 用の効果的な超音波アレイのパターンを探るために、目標とする音響圧と焦点距離の達成を目指し、設定条件として 2 つのパラメータを用いてビームフォーミングの計算を実施した：(1) 円形振動板の中心間距離 (d , 1 ~ 2, 0.5-mm step, 図 5-1A)、(2) 励起遅れ時間 (Δt , 0 ~ 1.8 μs , 0.2- μs step)。シミュレーションされた設計概要を表 5-1 に示す。

表 5-1. ビームフォーミングのシミュレーションで用いられた PMUT アレイの概要。

d (mm)	振動板の数
1.0	25
1.5	17
2.0	17

さらに、シミュレーションでは音響圧 p_t に関する下記の方程式を計算した：

$$\nabla \cdot \left\{ -\frac{1}{\rho} (\nabla p_t - \mathbf{q}_d) \right\} - \frac{k^2 p_t}{\rho} = Q_m, \quad (5-1a)$$

$$k^2 = \left(\frac{2\pi f}{c} \right)^2, \quad (5-1b)$$

ここで, ρ は媒質の密度, c は音速, f は周波数, $\mathbf{q}_d$ は容積力ドメインを示すダイポールドメインソース, および, Q_m は各方向へ均一な力を示すモノポールドメインソースを表す.

近年, 神経変調に PMUT を使用した例が幾つか報告されている. 各ダイアフラムの半径が $275\ \mu\text{m}$ の 1 次元 (1D) アレイ PMUT では, 単一のトランスデューサが $66\ \text{V}$ の印加電圧で $67.3\ \text{kPa}$ の音響圧を生成したと報告されている (J. Lee et al., 2019; Oh et al., 2019). 各ダイアフラムの半径が $580\ \mu\text{m}$ の 2 次元 (2D) アレイ PMUT では, 単一のトランスデューサが $70\ \text{V}$ の印加電圧で $65 \pm 1.8\ \text{kPa}$ の音響圧を生成したと報告されている (Furukawa et al., 2024).

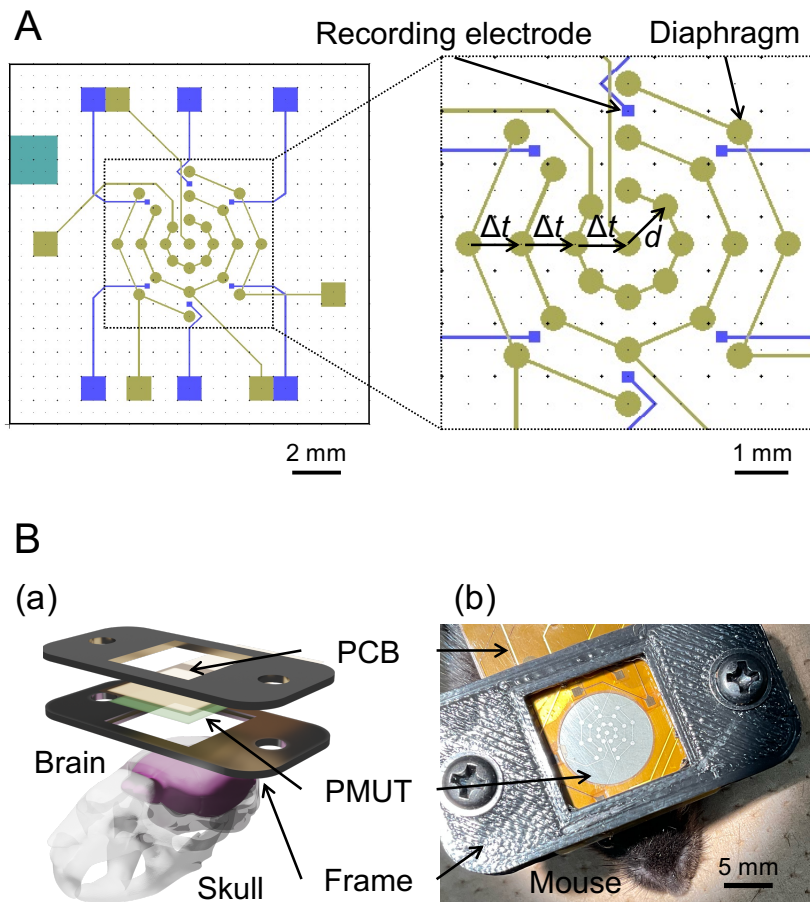


図 5-1. 閉ループ型 TUS 用の頭部固定 PMUT アレイの設計. (A) PMUT 設計図の全体パターン (左) および中央部分の拡大図 (右). 金色の線, 四角形, および, 円はトランスデューサを駆動するために使用される上部電極とそのパッドを示す. 緑色の四角形は下部電極を示す. 青色の四角形はマウスの EEG 信号を取得するための微小電極とそのパッドを示す. (B)(a) 頭部固定 PMUT の概略図. 手術で固定される下部フレームと取り外し可能な上部フレームにより, PMUT を保持する. (b) 実装された PMUT の画像.

これらの音響圧はデバイスから約 1 mm 離れた位置で測定されたため、本研究のシミュレーションのモデルにおいても、ダイアフラムから 1 mm の位置で 60 kPa の音響圧に達する入力音響圧 (i.e., 1.25 MPa) を設定した。

5.2.2. 微細加工

デバイスの基板には、デバイス層 (Si, 15 μm)、絶縁層 (SiO_2 , 1 μm)、ハンドル層 (Si, 500 μm)、および、熱酸化膜絶縁層 (SiO_2 , 1 μm) の 4 層構造から成る silicon on insulator (SOI) 基板を使用した。円形振動板のサイズは数値計算の結果を基に決定された。加工プロセスは過去に報告された微細加工技術を参考に以下の手順で進められた (Kuwano et al., 2020)。

1. 電極を形成するため、スパッタ装置 (RSC-3ERD, Riken-sha, Co., Japan) を用いて厚さ 10 nm の Ti と厚さ 100 nm の Pt とを蒸着させた。
2. Inductively coupled plasma reactive ion etching (ICP-RIE) 装置 (RIE-101HU, SUMCO Co., Japan) にて、電極と配線を形成した。
3. 配線領域の保護膜 (TMMR 2000SV, TOKYO OHKA KOGYO Co., LTD.) を形成した。
4. Deep-RIE 装置 (MUC-21 ASE-SRE, SPP Technologies Co., Japan) を用いて、PMUT の下部電極を露出させるためのコンタクトホールを形成した。
5. エポキシ (E205, Konishi Co., Ltd.) を使って、厚さ 100 μm の PZT 板 (PI Japan) を SOI 基板の表面に貼り付けた。
6. 研磨プロセスにより、PZT 板の厚さを 40 μm に削減した。
7. 上部電極を形成するため、スパッタ装置 (RSC-3ERD, Riken-sha, Co., Japan) を用いて厚さ 10 nm の Ti と厚さ 100 nm の Pt とを蒸着させた。
8. 円形振動板を形成するため Deep-RIE 装置 (MUC-21 ASE-SRE, SPP Technologies Co., Japan) を用いて、Si ハンドル層を取り除いた。

微細加工プロセスの後、作製された PMUT はフレキシブルプリント基板 (flexible printed circuit board, FPC) に実装された (図 5-1B)。

5.2.3. 物理特性の評価法

インピーダンス特性

作製した PMUT の共振周波数を評価するため、インピーダンス計測を行った。LCR メータ (ZM2376, NF Electronic Instruments, Japan) を使って、260 ~ 940 kHz のインピーダンスを

計測した。この時、中心の振動板 1 つだけを使った場合と、全ての振動板を使った場合との、2 種類の条件で計測を行った。

音響圧特性

作製した PMUT から出力される音響圧を評価するため、まずは周波数特性を調べた。各円形振動板に AC 10 V の正弦波交流電圧を任意波形生成器（WF1947, NF Electronic Instruments, Japan）から印加した。水槽に水を入れ、PMUT から出力された音響圧をニードル型ハイドロフォン（HY05N, Toray Engineering Co., Japan）で計測し、オシロスコープ（SDS1104X-E, SIGLENT, USA）を用いてデータを取得した。この時、入力電圧の周波数を 300 ~ 700 kHz の範囲で変化させた。各条件で 5 回ずつ計測した。次に、500 kHz の周波数条件下で、入力電圧を変化させて音響圧を計測した。この時、任意波形生成器から出力された電圧をパワーアンプ（ZSA5064, RAD Co., Fuji, Japan）で増幅して、PMUT に印加した。

次に、音響圧の分布を調べた。各円形振動板に AC 10 V の正弦波交流電圧を任意波形生成器（WF1947, NF Electronic Instruments, Japan）から印加した。この時、デバイスの中心からの水平方向の距離 x とデバイスからの垂直方向の距離 z を表 5-2 に示す範囲内として、各位置における音響圧を計測した。計測は同一条件下で合計 3 回行われた。

表 5-2. 音響圧分布の計測範囲。

Parameter	Range in mm	Step in mm
x	-5 to 5	0.5
z	2 to 12	0.5

5.2.4. 事象関連電位計測

動物実験には C57BL/6J 系統 7 ~ 8 週齢のメスを 2 個体、オスを 1 個体使用した。麻酔をかけた後に頭蓋骨を露出させ、下部固定具（20 × 40 mm²）を固定した（図 5-1B）。固定具の中心を頭蓋骨のラムダの位置に合わせて配置した。FPC に実装した PMUT を、上部固定具と下部固定具とで挟み込むように固定した。PMUT と頭蓋骨との間は超音波用ゲルで満たした。

PMUT に併設した微小電極で脳波を計測できることを検証するため、音の呈示により誘発された事象関連電位（event-related potential, ERP）の計測でその実用性を評価した。

音の呈示には、純音（周波数：2, 4, 8, 16, and 32 kHz, 音圧：80 dB SPL, 持続時間：100

ms)を使用した。脳波計測のサンプリングレートは1 kHzとし、同じ条件下で50 試行ずつ実施した。

5.2.5. 短期可塑性誘導

PMUT から出力される超音波刺激で神経変調ができることを検証するため、短期可塑性の誘導でその実用性を評価した。可塑性の誘導には、シータバースト経頭蓋超音波刺激(theta burst transcranial ultrasound stimulation, tbTUS)を用いた (Zeng et al., 2022)。使用した超音波波形を図 5-2A に示す。PMUT に併設した微小電極で音刺激に誘発される事象関連電位 (Sound-ERP) を計測し、tbTUS の前と tbTUS の 5 min 後とで Sound-ERP が変わるかどうかを調べた (図 5-2B)。音の提示には、純音 (周波数: 4 kHz, 音圧: 80 dB SPL, 持続時間: 100 ms) を使用した。脳波計測のサンプリングレートは1 kHzとし、同じ条件下で50 試行ずつ実施した。tbTUS が印加される前の音刺激に対する ERP の振幅 A_{pre} と可塑性誘導から 5 min 後の振幅 A_{post} の比を以下の式で定義した:

$$\text{Ratio} = \frac{A_{\text{post}}}{A_{\text{pre}}}. \quad (5-2)$$

また、tbTUS の対照として、刺激を印加しない Sham 刺激前後の音刺激に対する ERP も計測した。

5.2.6. データ解析

ERP 計測で得られた加算平均波形を刺激の印加時刻の Pre 区間と Post 区間に分けた。Pre 区間は音刺激のオンセットから 200 ms 前までの区間とし、Post 区間はオンセットから 500 ms 後までの区間と定義した。各区間で生じたピークの最大振幅を比較して、音刺激に対する応答が生じたかを検証した。有意差検定には Wilcoxon の符号順位検定を使用した。

可塑性の誘導における ERP 計測では、音刺激のオンセットから 100 ms 間の区間で生じた負のピークの振幅を解析に用いた。Sham 刺激を与えた条件と、tbTUS を与えた条件との差を検証した。

解析には Python (Ver. 3.12.1)を使用し、有意水準を 5%に設定した。

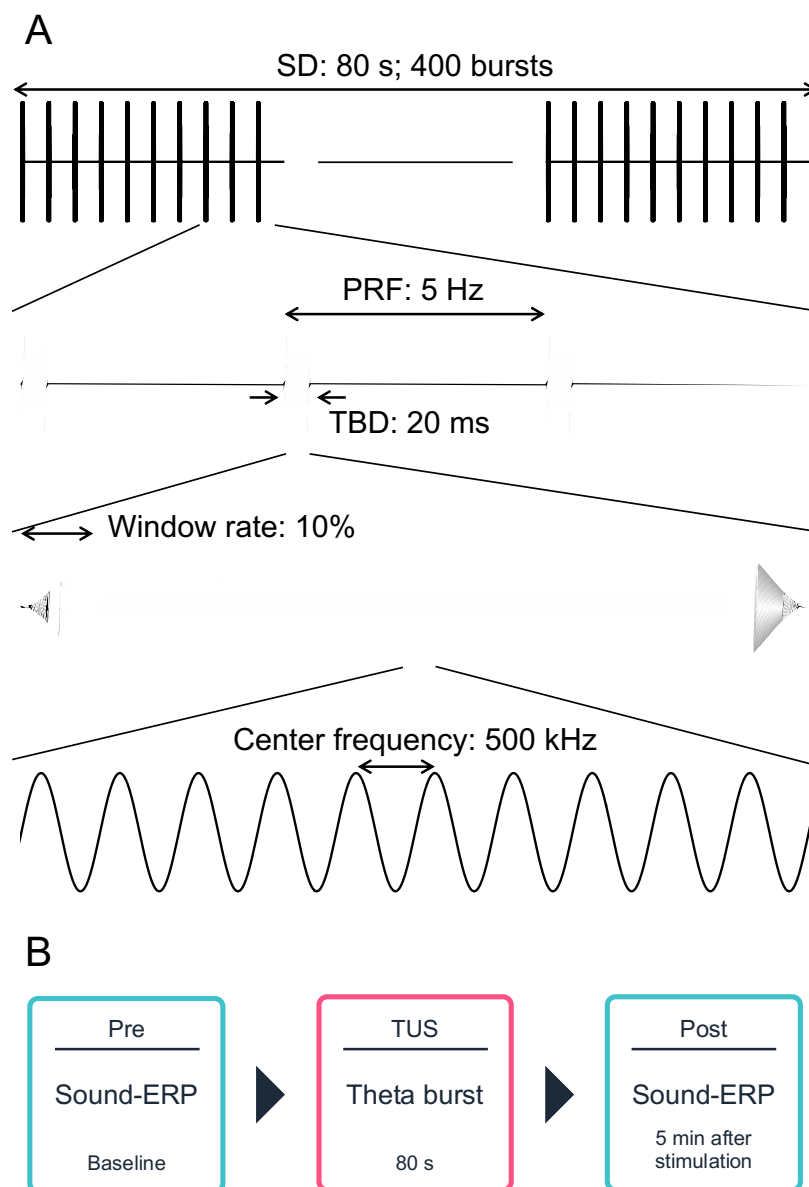


図 5-2. 可塑性誘導プロトコル. (A) 可塑性の誘導に使用した tbTUS 波形の概要図. (B) 音刺激と tbTUS の実験プロトコル概要図.

5.3. 結果

5.3.1. 数値計算

PMUT モデルの数値計算の結果に基づいて、共振周波数が 500 kHz、半径 235 μm 、PZT 層の厚さ 40 μm 、および、Si 層の厚さ 15 μm の振動板が選択された。次に、これらのサイズの振動板を、複数有するアレイパターン（図 5-1A）から生成される超音波の音響圧分布シミュレーションを実施した。同心円状に並べられた振動板の中心間距離が $d = 1\text{ mm}$ の場合におけるシミュレーション結果（2D; x - z field）を図 5-3A に示す。5 mm 以上の遠距離場ビ

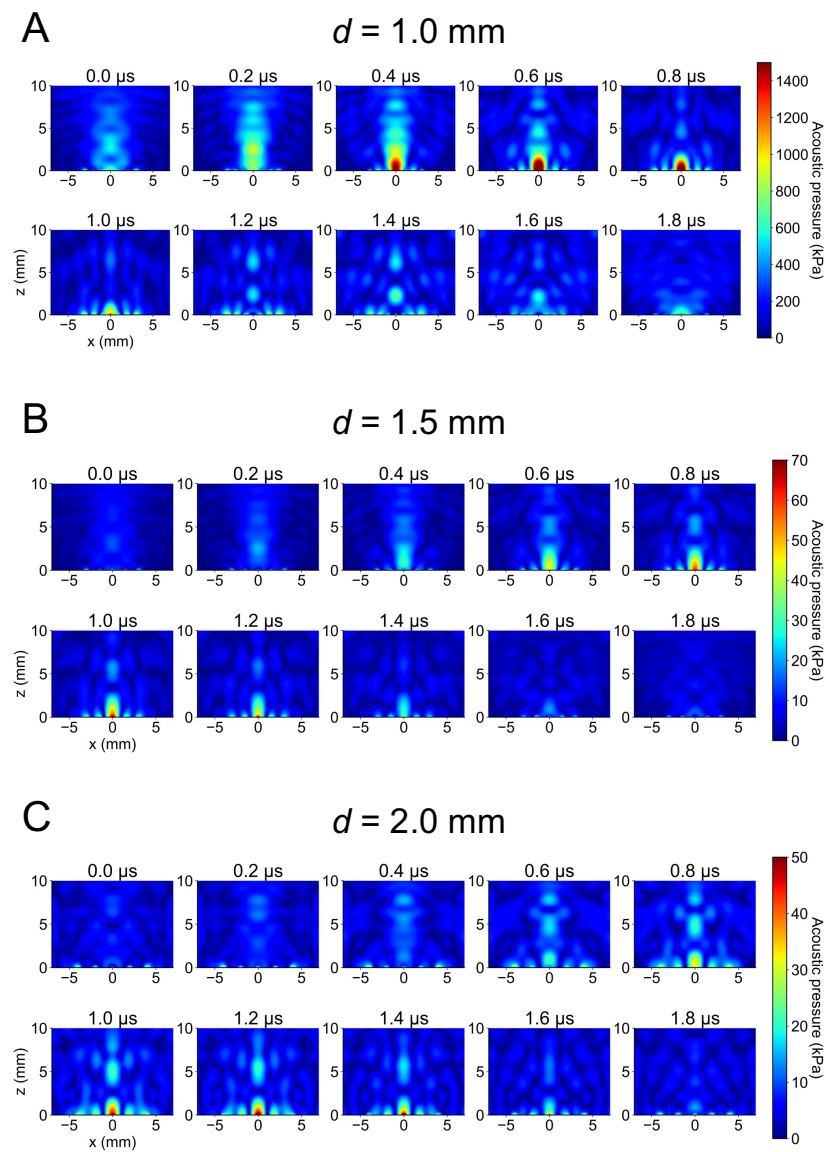


図 5-3. US 音響圧分布のシミュレーション結果. (A) 中心間距離 $d = 1.0\text{ mm}$. (B) 中心間距離 $d = 1.5\text{ mm}$. (C) 中心間距離 $d = 2.0\text{ mm}$.

ークでは数百 kPa を超える大きさの音響圧が分布する結果となった。さらに、 $d = 1.5$ mm (or 2 mm) のアレイパターンでは、およそ 5 mm の位置に遠距離場ピークが生じているが、数十 kPa 以下の音響圧になっていた (図 5-3B, C)。中心間距離 $d = 1$ mm の場合における、照射方向 (i.e., z direction) の音響圧分布を図 5-4A に示す。逆三角のマーカは第一、または、第二ピーク (極大値) を示す。駆動遅れ時間 (Δt) と焦点距離の関係を図 5-4B に示す。 $\Delta t = 1.0$ μ s の条件では、第一ピークが最も遠方に位置する結果となった。これらの結果から、駆動遅れ時間を選択することで、刺激を集中させる部位の選択が、マウスの脳表から中心部分の範囲で選択可能であることが示唆された。

5.3.2. 頭部固定型マイクロトランスデューサの実装

微細加工プロセスを経て作製された PMUT を FPC に実装した。FPC には、駆動信号の供給、および、脳波信号取得のためのコネクタ部品を実装した。パッケージ化された PMUT デバイスの重さは合計 1.40 g であった。

5.3.3. 物理特性の評価

インピーダンス特性

作製した PMUT のインピーダンスを計測した結果を図 5-5 に示す。図 5-5A は中心に位置

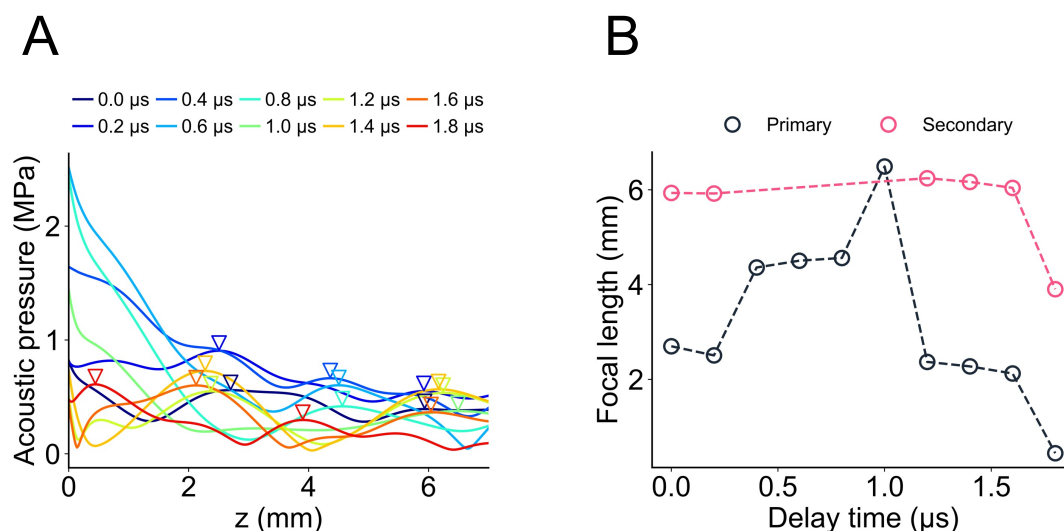


図 5-4. 超音波照射方向における音響圧分布特性. (A) 中心間距離 $d = 1$ mm における、異なる駆動遅れ時間と音響圧分布の関係. 各逆三角形のマーカは極大値を示す. (B) 焦点距離と駆動遅れ時間の関係. 幾つかの条件では第一ピークのみ検出された。

する振動板 1 つだけを使った場合の結果を示す。496 kHz で位相が極大値を示した。図 5-5B は 25 個全ての振動板を駆動した場合のインピーダンスを示す。全ての振動板を駆動した際は、インピーダンスの位相が 549 kHz でピークを示した。

音響圧特性

作製した PMUT の応答を評価するために、PMUT から出力された音響圧を計測した。図 5-6A に、AC 10 V の入力電圧で駆動した際の周波数応答の例を示す。音響圧のピークが数値計算で推定された共振周波数（500 kHz）で取得された。

次に、500 kHz の周波数条件下における PMUT の入力電圧依存性を調べた。入力電圧を増加させると、出力音響圧が単調に増加した（図 5-6B）。

さらに、PMUT から出力される音響圧の分布を計測した結果を図 5-4 に示す。図 5-4A は 10 V の入力電圧を印加した際に推定される、同じ範囲の音響圧を示す。図 5-4B は同様の範囲で音響圧計測をした結果である。数値計算と実測の結果を比較すると、最大音響圧が両方で 80 kPa 程度を示しており、数値計算と同じ音響圧振幅が観察された。一方、音響圧の空間的な広がりには違いが観られた。数値計算の結果では、 $z=2\text{ mm}$ における x 方向の半値幅がおおよそ 4 mm 程度であるのに対して、実測の結果では、10 mm 以上の広がり形成されていた。すなわち、音響圧の最大振幅は数値計算と一致し、空間的な分布は相違が観られたという結果が得られた。

5.3.4. 事象関連電位

PMUT に併設した微小電極を用いて神経活動の検出が可能か検証するために、音刺激に

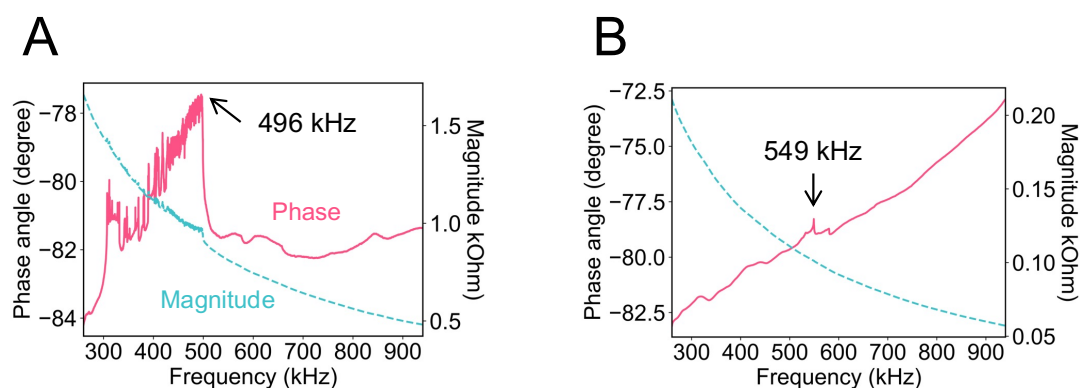


図 5-5. PMUT のインピーダンス測定結果。(A) 中心に位置する振動板 1 つだけを使った場合の結果。(B) 25 個全ての振動板を使った場合の結果。

誘発される ERP 計測を行った。6 個のモニタリング用電極 (Chs 1 to 6) を使用した ERP 計測の概要図と、音刺激 (4-kHz pure-tone burst, 80 dB SPL, 100 ms) に対する典型的な ERP 応答の例を図 5-7A, B に示す。下丘付近に位置するチャンネル (i.e., Chs 4 and 6; 図 5-7B) の波形が、音刺激のオンセットに続いて負のピークと正のピークを示した ($-4.9 \mu\text{V}$ and $6.6 \mu\text{V}$ at Ch 4; 図 5-7B)。さらに、Ch 4 から取得された、異なる周波数の音刺激により誘発された ERP 波形の例を図 5-7Ca に示す。4 kHz や 8 kHz の音刺激に対して特に大きく応答していることがわかる。Pre 区間と Post 区間のピーク振幅の比較を図 5-7Cb に示す。ベースラインの振幅に対して有意に大きな応答振幅が、4 kHz と 8 kHz の音刺激誘発応答から得られた ($*p < 0.05$, $n = 6$ from 3 animals)。

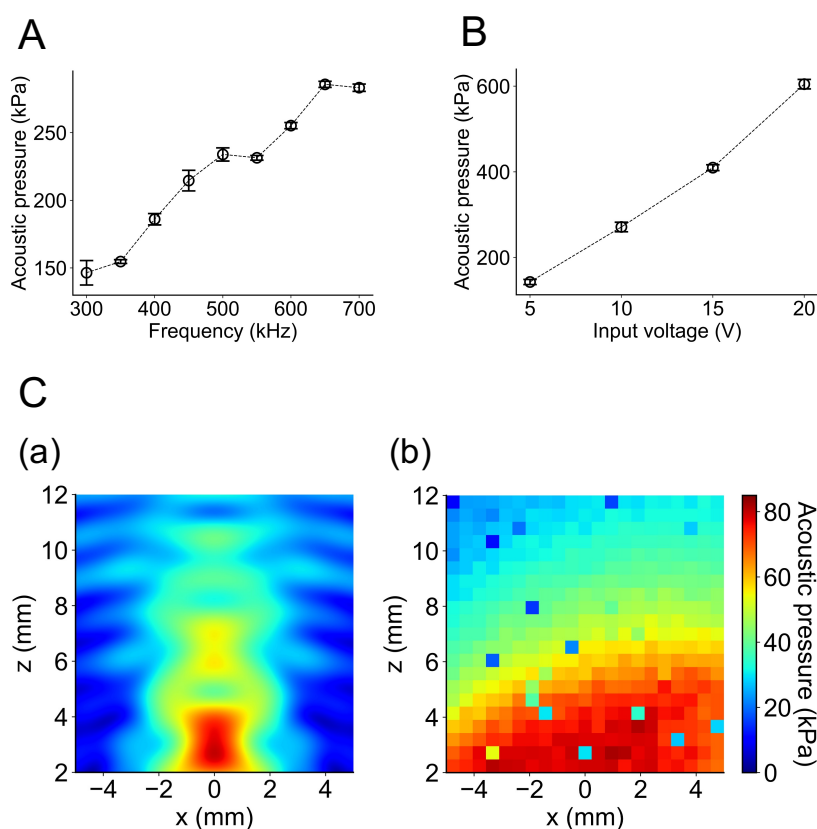


図 5-6. PMUT の音響圧特性評価. (A) 音響圧の周波数特性. (B) 音響圧の入力電圧特性. (C) 音響圧分布の数値計算と実測の結果. (A) 音響圧分布の数値計算結果. (B) 音響圧分布の実測結果.

5.3.5. 短期可塑性誘導

作製した PMUT が神経活動の変調をできるかどうかを調べるため、マウスに対して tbTUS を印加し、その前後の音刺激に対する ERP を比較した。PMUT は振幅 20 V の正弦波交流電圧で駆動された。図 5-8A に tbTUS 前後で計測した ERP の例を示す。音刺激の提示からおよそ 100 ms 以内に負のピークが生じた。tbTUS を印加してから 5 min 後に計測した ERP では、音刺激後に生じる負のピークの振幅が大きくなった (図 5-8A)。対照実験 (Sham 刺激) として超音波を照射しなかった場合、Sham 刺激後でやや振幅が小さくなった (図 5-8B)。

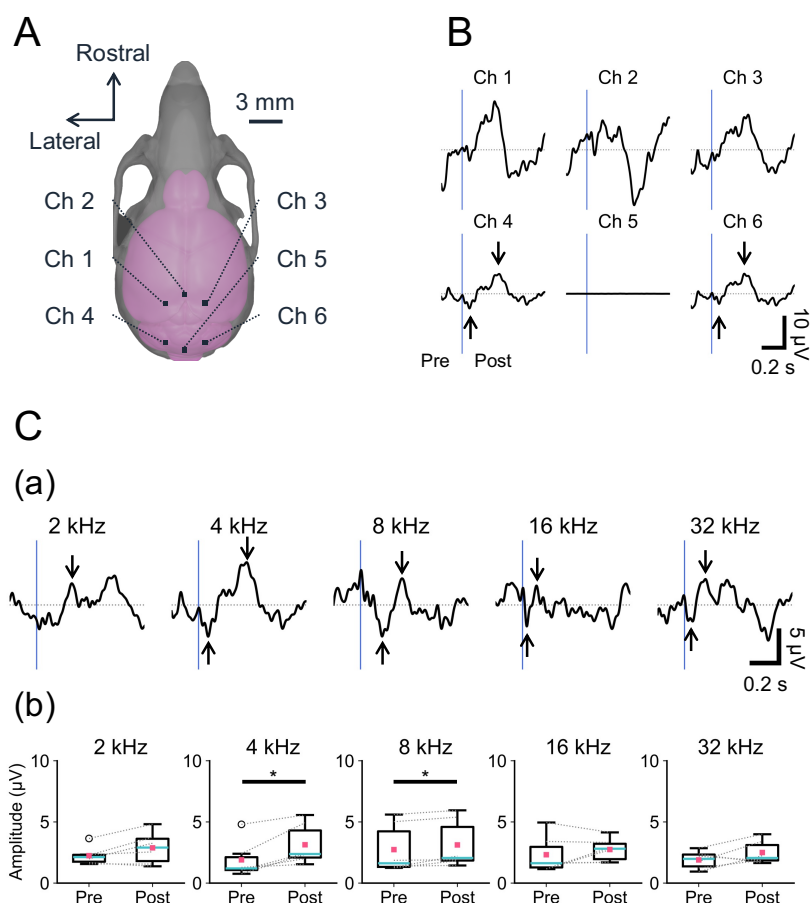


図 5-7. マウスの頭蓋骨上に位置する 6 個の電極から取得された、音刺激に対する ERP 波形. (A) 6 個のモニタリング用微小電極とマウスの脳、および、頭蓋骨. (B) 音刺激 (pure-tone burst, 4 kHz, 80 dB SPL, duration 100 ms) に対する ERP 波形. (C) ERP の音刺激周波数特性. (a) Ch 4 における応答波形. 音刺激のオンセットのタイミングを、青い縦線で示す. (b) ベースラインと応答振幅の比較 (* $p < 0.05$, $n = 6$ from 3 animals).

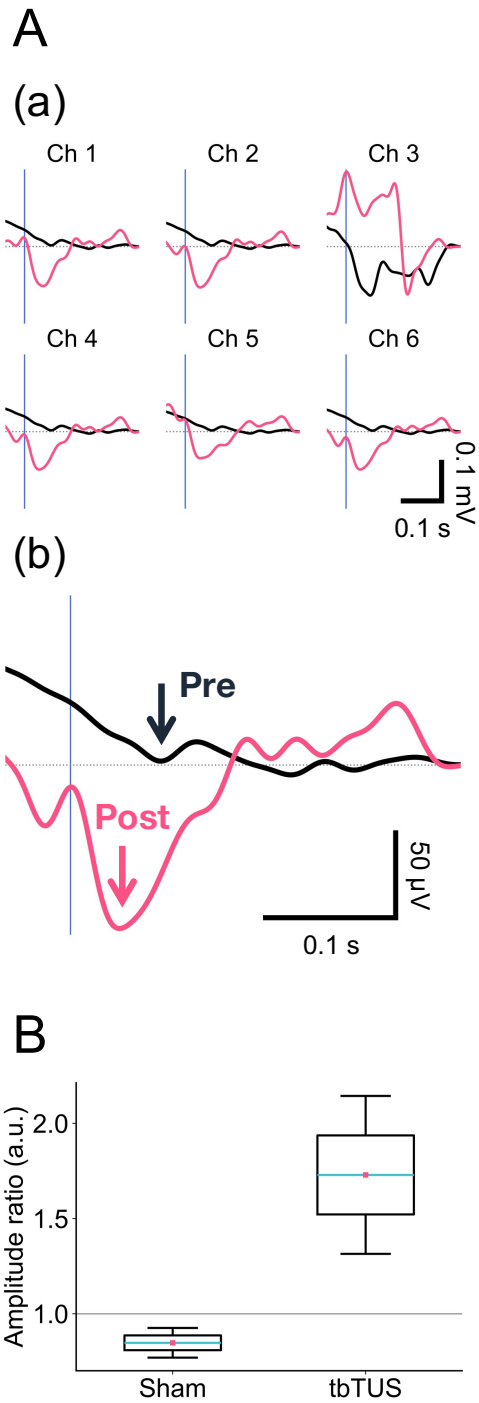


図 5-8. tbTUS 印加前後の ERP. (A) 代表的な ERP 波形. (a) 全チャンネル. (b) Ch 6 の拡大図. 音刺激のオンセットのタイミングを青い縦線で示す. 黒い線は tbTUS 前, 赤い線は tbTUS から 5 min 後の ERP を示す. (B) ERP のピーク振幅比における Sham 刺激との比較. 灰色の線は振幅比 1 を示す. $n=2$ from 1 animal for Sham. $n=2$ from 1 animal for tbTUS.

5.4. 考察

5.4.1. マイクロデバイスのマウス頭部固定

本研究で開発したデバイスの重さは 1.4 g であった。過去に齧歯類用のウェアラブルデバイスとして報告された超音波トランスデューサは、ラット用で 0.765 g および 20 g、マウス用で 2 g であった (E. Kim et al., 2021; H. Kim et al., 2019; Zhou et al., 2019)。したがって、開発したデバイスは、マウスの頭部に固定する装置として十分な軽量化に成功したと言える。しかし、急性的な実験から慢性的な実験へと実用的な発展を目指すには、その他の装置を含めたシステム全体のワイヤレス化なども求められる (Topalovic et al., 2023)。

5.4.2. 超音波ビームフォーム

PMUT アレイから出力される超音波に対する音響圧分布のシミュレーション結果より、駆動遅れ時間を制御することで、超音波の目標音響圧を満たしながら、焦点距離を選択的に制御可能であることが示唆された。例えば、 $\Delta t = 0.6 \mu\text{s}$ で形成される $\sim 1 \text{ mm}$ の焦点距離では下丘を刺激対象に、 $\Delta t = 1.4 \mu\text{s}$ で形成される $\sim 6 \text{ mm}$ の焦点距離では、視床下部を刺激対象とすることが可能であると推定される。これにより、耳鳴りやパーキンソン病を例とする脳疾患治療に応用できると考えられる (Berger & Coomber, 2015; Z. Wang et al., 2020)。

次に、作製した PMUT を対象にして物理特性を調べた結果、共振周波数 (500 kHz) と最大音響圧 (80 kPa for 10-V input voltage) が数値計算による推定値と類似していた (図 5-6A, B, 5-7A, C)。さらに、目標としていた音響圧 (100 kPa) を超える音響圧が、5~20 V の入力電圧で実現された。しかし、音響圧の空間的な分布は数値計算で推定された分布と大きく異なった (図 5-7C)。PMUT の中心では、半径およそ 3 mm の範囲に合計 25 個の振動板が配置されている。 $z = 2 \text{ mm}$ において、 $-4 < x < 4 \text{ mm}$ の範囲で特に大きな音響圧が分布していることから、振動板が配置されている、半径およそ 3 mm の範囲が一つの円形振動板のように振動したことでこのような分布が観察された可能性が考えられる。25 個の振動板が個別の振動板として振る舞うために、振動板の中心間距離を大きくするという再設計の改善点が考えられる。しかし、数値計算による推定では、中心間距離を大きくすると出力音響圧が低下する傾向にあるため (図 5-3A vs. 5-3C)、同心円状に並べる振動板の、一周あたりの個数を増やすなど、基板上での干渉が避けられる範囲で工夫が必要となる可能性が考えられる。

5.4.3. 脳波のモニタリング機能

マウスの頭部に固定した、閉ループ型 TUS のインターフェースを有する本開発デバイスが、脳波を計測可能であるかを検証した。予備的実験として音刺激に対する事象関連電位を計測したところ、音刺激の後に下丘付近の電極で応答がみられた。特に、4,8 kHz の音刺激に対する応答で、脳波のベースラインと比較して有意に大きなピーク値の結果となった(図 5-4Cb)。これは、脳表付近で音刺激応答生じる、下丘の周波数選択性(トノトピー特性)を表していると考えられる。過去の報告から、下丘では脳表からの距離が 450 μm 以下の表層では 4 kHz の音に、400 ~ 700 μm の中層では 8 kHz の音に、600 μm 以上の深層では 16 kHz の音に応答がみられることが知られている (Portfors et al., 2011; H. Sato et al., 2024; Stiebler & Ehret, 1985)。すなわち、脳領域特有の神経活動を検出可能であることが示唆された。こうした脳領域に応じた神経活動の検出が可能であることは、自発的な脳活動や刺激誘発の脳波を利用して、特定の脳疾患に閉ループ型刺激を応用する上で有用と考えられる。

5.4.4. 下丘における短期可塑性誘導

マウスの頭部に固定した、電極併設型の TUS 装置で神経変調が可能であるかを検証した。tbTUS を印加すると、5 min 後に、音刺激に対する ERP の振幅が大きくなった。さらに、この効果は Sham 条件と比べて大きかった(図 5-8A,B)。これは、下丘で短期可塑性が誘発されたことを示唆している。我々の知る限りでは、TUS による可塑性の誘発を下丘で示した例は過去にない。

脳疾患の 1 つである耳鳴りの原因の 1 つに、下丘の関連が知られている。耳鳴りの状態下で生じる、下丘における自発活動の増加が、GABA 作動性の神経活動の抑制効果の低下に起因している可能性が報告されている (Ma et al., 2006; Szczepaniak & Møller, 1995)。したがって、本論文では tbTUS を印加し、下丘での音刺激誘発応答の増加を示したが、抑制性の可塑性誘発に成功することで、治療効果としての実用性を示すことができると考えられる。ここでは、開発した装置で神経変調が可能であることを示すために、運動野で長期増強の誘発が可能であることが過去に報告されている tbTUS を選択した (Zeng et al., 2022)。長期抑圧の誘発効果が報告されている刺激波形を選択しなかった理由として、長期抑圧様の現象が他の要因からも誘発されてしまう可能性があり：(1) 神経細胞のエネルギーの枯渇、(2) カルシウムの過剰流入、(3) 神経伝達物質の枯渇 (Kovac et al., 2013; D. G. Lee et al., 2016; von Gersdorff & Borst, 2002)、抑圧に成功したとしても TUS による変調効果と解釈すること

が難しいためである。tbTUS が誘発する長期増強の機序としては、GABA 作動性の抑制効果を低下させることで全体としての興奮性を高めている可能性が示唆されている (Yaakub et al., 2023)。反対に、運動野で長期抑圧を誘発することが報告されている TUS の刺激波形で (Zadeh et al., 2024)、同様に下丘においても抑圧効果が実証できれば、耳鳴りへの治療効果が期待される。

第 6 章 本論文の結論と展望

6.1. 結論

本研究では、脳疾患治療法の一つである神経変調の技術的发展を目指し、以下の 4 つの成果を得た。

1. 電気生理学的実験の計測データと数理モデルを用いて、応答動態に基づき、可塑性の動態形成に NMDA 受容体が大きく関与している可能性を発見した。
2. In vitro の局所神経回路網を対象とした実験に特化した小型超音波刺激装置を開発し、その有用性を示した。
3. 経頭蓋超音波刺激の効果的な刺激波形パターンを、(1) 数理モデル、(2) 頭蓋骨の振動計測、(3) 電気生理学的計測データの 3 点から導いた。
4. マウス頭部に固定が可能な小型閉ループ型経頭蓋超音波刺激装置を開発した。

6.2. 展望

今後は、第3章で示した脳スライスに特化した小型装置を応用し、第2章の内容のように長期的な神経変調効果の機序解明を目指す。例えば、第4章で示した、音刺激が誘発する LFP 応答と超音波刺激が誘発する LFP 応答とでは、応答後に生じるオーバーシュートで違いがみられたが、その原因は不明なままである。近年、機械感受性カリウムチャンネルや、機械感受性の陰イオンチャンネルに対する超音波刺激の作用が報告されている (Prieto et al., 2020; Wen et al., 2024)。これらのチャンネルによる作用か、あるいは、さらに他のチャンネルの作用と混合して生じた過分極成分なのか、神経回路網の構造を保ったまま外部環境の制御が可能な脳スライス実験により、詳細に解明できることが期待される。また、第4章で示した効果的な経頭蓋超音波刺激の波形パターンを、第5章で示した閉ループ型経頭蓋超音波刺激装置の、慢性型の治療効果検証実験へ導入する。今後、開発したデバイスが神経疾患治療に応用できるかを検証するためには、特定の疾患モデル動物を対象とした検証が必要である。本研究では、開発したデバイスを用いて、聴覚応答の変調が可能であることが示唆されたため、耳鳴りの治療へ応用することが期待できる。しかし、本研究では超音波刺激による増強効果のみを示しているため、耳鳴りの治療へ応用するためには、聴覚応答を抑圧する効果を及ぼす刺激パラメータの特定が必要である。以上により、経頭蓋超音波刺激が新たな脳疾患治療法として実用的になることを目指す。

参考文献

- Ai, L., Mueller, J. K., Grant, A., Eryaman, Y., & Legon, W. (2016). Transcranial focused ultrasound for BOLD fMRI signal modulation in humans. *2016 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, 1758–1761. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2016.7591057>
- Amon, A., & Alesch, F. (2017). Systems for deep brain stimulation: Review of technical features. *Journal of Neural Transmission*, 124(9), 1083–1091. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1751-6>
- Anderson, W. W., Anderson, W. W., Lewis, D. V., Swartzwelder, H. S., & Wilson, W. A. (1986). Magnesium-free medium activates seizure-like events in the rat hippocampal slice. *Brain Research*, 398(1), 215–219. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91274-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91274-6)
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2015). カラー版ベアー コノーズ パラディーン 神経科学 脳の探求. 西村書店.
- Benabid, A. L. (2003). Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(6), 696–706. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.11.001>
- Berger, J. I., & Coomber, B. (2015). Tinnitus-Related Changes in the Inferior Colliculus. *Frontiers in Neurology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00061>
- Bewernick, B. H., Hurlmann, R., Matusch, A., Kayser, S., Grubert, C., Hadrysiewicz, B., Axmacher, N., Lemke, M., Cooper-Mahkorn, D., Cohen, M. X., Brockmann, H., Lenartz, D., Sturm, V., & Schlaepfer, T. E. (2010). Nucleus Accumbens Deep Brain Stimulation Decreases Ratings of Depression and Anxiety in Treatment-Resistant Depression. *Biological Psychiatry*, 67(2), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.013>
- Bian, T., Meng, W., Qiu, M., Zhong, Z., Lin, Z., Zou, J., Wang, Y., Huang, X., Xu, L., Yuan, T., Huang, Z., Niu, L., Meng, L., & Zheng, H. (2021). Noninvasive Ultrasound Stimulation of Ventral Tegmental Area Induces Reanimation from General Anaesthesia in Mice. *Research*, 2021, 1–13. <https://doi.org/10.34133/2021/2674692>
- Blackmore, J., Shrivastava, S., Sallet, J., Butler, C. R., & Cleveland, R. O. (2019). Ultrasound Neuromodulation: A Review of Results, Mechanisms and Safety. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 45(7), 1509–1536. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2018.12.015>

- Braun, V., Blackmore, J., Cleveland, R. O., & Butler, C. R. (2020). Transcranial ultrasound stimulation in humans is associated with an auditory confound that can be effectively masked. *Brain Stimulation*, 13(6), 1527–1534. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2020.08.014>
- Budinger, E., & Kanold, P. O. (2018). *Auditory Cortex Circuits*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71798-2_8
- Buonomano, D. V., & Merzenich, M. M. (1998). CORTICAL PLASTICITY: From Synapses to Maps. *Annual Review of Neuroscience*, 21(1), 149–186. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.149>
- Burks, S. R., Lorsung, R. M., Nagle, M. E., Tu, T.-W., & Frank, J. A. (2019). Focused ultrasound activates voltage-gated calcium channels through depolarizing TRPC1 sodium currents in kidney and skeletal muscle. *Theranostics*, 9(19), 5517–5531. <https://doi.org/10.7150/thno.33876>
- Butler, C. R., Rhodes, E., Blackmore, J., Cheng, X., Peach, R. L., Veldsman, M., Sheerin, F., & Cleveland, R. O. (2022). Transcranial ultrasound stimulation to human middle temporal complex improves visual motion detection and modulates electrophysiological responses. *Brain Stimulation*, 15(5), 1236–1245. <https://doi.org/10.1016/J.BRS.2022.08.022>
- Bystritsky, A., Korb, A. S., Douglas, P. K., Cohen, M. S., Melega, W. P., Mulgaonkar, A. P., Desalles, A., Min, B. K., & Yoo, S. S. (2011). A review of low-intensity focused ultrasound pulsation. *Brain Stimulation*, 4(3), 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2011.03.007>
- Cain, J. A., Spivak, N. M., Coetzee, J. P., Crone, J. S., Johnson, M. A., Lutkenhoff, E. S., Real, C., Buitrago-Blanco, M., Vespa, P. M., Schnakers, C., & Monti, M. M. (2021). Ultrasonic thalamic stimulation in chronic disorders of consciousness. *Brain Stimulation*, 14(2), 301–303. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2021.01.008>
- Cain, S. M., & Snutch, T. P. (2010). Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing. *Channels*, 4(6), 475–482. <https://doi.org/10.4161/chan.4.6.14106>
- Cardenas-rojas, A., Pacheco-barrios, K., Giannoni-luza, S., Fregni, F., Rehabilitation, S., Hospital, M. G., Loyola, S. I. D., & Health, M. (2021). *HHS Public Access*. 20(4), 401–412. <https://doi.org/10.1080/14737175.2020.1738927>.Non-invasive
- Charnes, A., Cooper, W. W., & Ferguson, R. O. (1955). Optimal Estimation of Executive Compensation by Linear Programming. *Management Science*, 1(2), 138–151.

- Chen, R., Classen, J., Gerloff, C., Celnik, P., Wassermann, E. M., Hallett, M., & Cohen, L. G. (1997). Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation. *Neurology*, 48(5), 1398–1403. <https://doi.org/10.1212/wnl.48.5.1398>
- Cheng, C. Y., Dangi, A., Ren, L., Tiwari, S., Benoit, R. R., Qiu, Y., Lay, H. S., Agrawal, S., Pratap, R., Kothapalli, S. R., Mallouk, T. E., Cochran, S., & Trolier-Mckinsty, S. (2019). Thin Film PZT-Based PMUT Arrays for Deterministic Particle Manipulation. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 66(10), 1605–1615. <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2019.2926211>
- Chhan, D., McKinnon, M. L., & Rosowski, J. J. (2017). Identification of induced and naturally occurring conductive hearing loss in mice using bone conduction. *Hearing Research*, 346, 45–54. <https://doi.org/10.1016/J.HEARES.2017.02.001>
- Chindemi, G., Abdellah, M., Amsalem, O., Benavides-Piccione, R., Delattre, V., Doron, M., Ecker, A., Jaquier, A. T., King, J., Kumbhar, P., Monney, C., Perin, R., Rössert, C., Tuncel, A. M., Van Geit, W., DeFelipe, J., Graupner, M., Segev, I., Markram, H., & Muller, E. B. (2022). A calcium-based plasticity model for predicting long-term potentiation and depression in the neocortex. *Nature Communications*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30214-w>
- Choi, J. B., Lim, S. H., Cho, K. W., Kim, D. H., Jang, D. P., & Kim, I. Y. (2013). The effect of focused ultrasonic stimulation on the activity of hippocampal neurons in multi-channel electrode. *International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering, NER*, 731–734. <https://doi.org/10.1109/NER.2013.6696038>
- Choi, M. H., Li, N., Popelka, G., & Butts Pauly, K. (2023). Development and validation of a computational method to predict unintended auditory brainstem response during transcranial ultrasound neuromodulation in mice. *Brain Stimulation*, 16(5), 1362–1370. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2023.09.004>
- Christensen, A. P., & Corey, D. P. (2007). TRP channels in mechanosensation: Direct or indirect activation? *Nature Reviews Neuroscience*, 8(7), 510–521. <https://doi.org/10.1038/nrn2149>
- Cline, C. C., Johnson, N. N., & He, B. (2015). Subject-specific optimization of channel currents for multichannel transcranial magnetic stimulation. *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS, 2015-Novem*,

- 2083–2086. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2015.7318798>
- Dangi, A., Agrawal, S., Tiwari, S., Jadhav, S., Cheng, C., Trolhier-McKinstry, S., Pratap, R., & Kothapalli, S.-R. (2018). Evaluation of High Frequency Piezoelectric Micromachined Ultrasound Transducers for Photoacoustic Imaging. *2018 IEEE SENSORS*, 1–4. <https://doi.org/10.1109/ICSENS.2018.8589733>
- Dangi, A., Cheng, C. Y., Agrawal, S., Tiwari, S., Datta, G. R., Benoit, R. R., Pratap, R., Trolhier-Mckinstry, S., & Kothapalli, S. R. (2020). A Photoacoustic Imaging Device Using Piezoelectric Micromachined Ultrasound Transducers (PMUTs). *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 67(4), 801–809. <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2019.2956463>
- Doinikov, A. (2003). *Acoustic radiation forces: Classical theory and recent advances* (Vol. 1, pp. 39–67).
- Dong, S., Xie, Z., & Yuan, Y. (2023). Transcranial ultrasound stimulation modulates neural activities during NREM and REM depending on the stimulation phase of slow oscillations and theta waves in the hippocampus. *Cerebral Cortex*. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHAD174>
- Dunwiddie, T., & Lynch, G. (1978). Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: Localization and frequency dependency. *The Journal of Physiology*, 276(1), 353–367. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1978.sp012239>
- Flint, A. C., & Connors, B. W. (1996). Two types of network oscillations in neocortex mediated by distinct glutamate receptor subtypes and neuronal populations. *Journal of Neurophysiology*, 75(2), 951–957. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.75.2.951>
- Folloni, D., Verhagen, L., Mars, R. B., Fouragnan, E., Constans, C., Aubry, J. F., Rushworth, M. F. S., & Sallet, J. (2019). Manipulation of Subcortical and Deep Cortical Activity in the Primate Brain Using Transcranial Focused Ultrasound Stimulation. *Neuron*, 101(6), 1109–1116.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.019>
- Fomenko, A., Neudorfer, C., Dallapiazza, R. F., Kalia, S. K., & Lozano, A. M. (2018). Low-intensity ultrasound neuromodulation: An overview of mechanisms and emerging human applications. *Brain Stimulation*, 11(6), 1209–1217. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.08.013>
- Franklin, K., & Paxinos, G. (2007). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. In *NY: Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374247-6.50004-3>

- Furukawa, R., Kaneta, H., & Tateno, T. (2022). A Multielectrode Array-Based Recording System for Analyzing Ultrasound-Driven Neural Responses in Brain Slices in vitro. *Frontiers in Neuroscience*, 16(February), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.824142>
- Furukawa, R., Murakami, S., & Tateno, T. (2024). *An Event-Driven Closed-Loop Ultrasound Stimulator Composed of a Micro-Transducer and Multi-Site Electrodes in Vitro*. 95–102. <https://www.scitepress.org/PublicationsDetail.aspx?ID=0dNNikhoqNs%3d&t=1>
- Furukawa, R., & Tateno, T. (2022). Development of a Piezoelectric Micromachined Ultrasound Transducer using Microfabrication Technology for in Vitro Neuromodulation. *In Proceedings of International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies (BIOSTEC 2022)*, 1(BIODEVICES), 196–203. <https://doi.org/10.5220/0010938500003123>
- Furukawa, R., Yoshikawa, T., Murakami, S., & Tateno, T. (2024). A piezoelectric micromachined ultrasound transducer combined with recording electrodes for acute brain preparations in vitro. *Journal of Neuroscience Methods*, 403, 110048. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2023.110048>
- Gibson, B. C., Sanguinetti, J. L., Badran, B. W., Yu, A. B., Klein, E. P., Abbott, C. C., Hansberger, J. T., & Clark, V. P. (2018). Increased Excitability Induced in the Primary Motor Cortex by Transcranial Ultrasound Stimulation. *Frontiers in Neurology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.01007>
- Graupner, M., & Brunel, N. (2012a). Calcium-based plasticity model explains sensitivity of synaptic changes to spike pattern, rate, and dendritic location. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), 3991–3996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109359109>
- Graupner, M., & Brunel, N. (2012b). Calcium-based plasticity model explains sensitivity of synaptic changes to spike pattern, rate, and dendritic location. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), 3991–3996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109359109>
- Grienberger, C., & Konnerth, A. (2012). Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*, 73(5), 862–885. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011>
- Guo, H., Hamilton, M., Offutt, S. J., Gloeckner, C. D., Li, T., Kim, Y., Legon, W., Alford, J. K., & Lim, H. H. (2018). Ultrasound Produces Extensive Brain Activation via a Cochlear Pathway.

- Neuron*, 98(5), 1020–1030.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.036>
- Hameed, Z., Saleem, S., Mirza, J., Mustafa, M. S., & Qamar-ul-Islam. (2018). Characterisation of ictal and interictal states of epilepsy: A system dynamic approach of principal dynamic modes analysis. *PLOS ONE*, 13(1), e0191392. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0191392>
- Hameroff, S., Trakas, M., Duffield, C., Annabi, E., Gerace, M. B., Boyle, P., Lucas, A., Amos, Q., Buadu, A., & Badal, J. J. (2013). Transcranial Ultrasound (TUS) Effects on Mental States: A Pilot Study. *Brain Stimulation*, 6(3), 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2012.05.002>
- He, Y., Wan, H., Jiang, X., & Peng, C. (2022). Piezoelectric Micromachined Ultrasound Transducer Technology: Recent Advances and Applications. *Biosensors*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/BIOS13010055>
- Herrera-Melendez, A. L., Bajbouj, M., & Aust, S. (2020). Application of Transcranial Direct Current Stimulation in Psychiatry. *Neuropsychobiology*, 79(6), 372–383. <https://doi.org/10.1159/000501227>
- Higuchi, H., Furukawa, R., & Tateno, T. (2021). Characterizing Millimeter-Sized Coils for Transcranial Magnetic Stimulation of Small Animals: Comparison of Magnetic Cores. *IEEE Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, 16(7), 1035–1037. <https://doi.org/10.1002/tee.23387>
- Huganir, R. L., & Nicoll, R. A. (2013). AMPARs and Synaptic Plasticity: The Last 25 Years. *Neuron*, 80(3), 704–717. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.025>
- Ibsen, S., Tong, A., Schutt, C., Esener, S., & Chalasani, S. H. (2015). Sonogenetics is a non-invasive approach to activating neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications*, 6(1), 8264. <https://doi.org/10.1038/ncomms9264>
- Ikegaya, Y., Bon-Jego, M. L., & Yuste, R. (2005). Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neuroscience Research*, 52(2), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.02.004>
- Ingham, N. J., Pearson, S., & Steel, K. P. (2011). Using the Auditory Brainstem Response (ABR) to Determine Sensitivity of Hearing in Mutant Mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, 1(2), 279–287. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo110059>
- Jiang, Y., Lee, H. J., Lan, L., Tseng, H. an, Yang, C., Man, H. Y., Han, X., & Cheng, J. X. (2020). Optoacoustic brain stimulation at submillimeter spatial precision. *Nature Communications*,

- 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14706-1>
- Jo, Y., Lee, S. M., Jung, T., Park, G., Lee, C., Im, G. H., Lee, S., Park, J. S., Oh, C., Kook, G., Kim, H., Kim, S., Lee, B. C., Suh, G. S. B., Kim, S. G., Kim, J., & Lee, H. J. (2022). General-Purpose Ultrasound Neuromodulation System for Chronic, Closed-Loop Preclinical Studies in Freely Behaving Rodents. *Advanced Science*, 9(34). <https://doi.org/10.1002/ADVS.202202345>
- Karlócai, M. R., Kohus, Z., Káli, S., Ulbert, I., Szabó, G., Máté, Z., Freund, T. F., & Gulyás, A. I. (2014). Physiological sharp wave-ripples and interictal events in vitro: What's the difference? *Brain*, 137(2), 463–485. <https://doi.org/10.1093/brain/awt348>
- Kawaguchi, Y. (2001). Distinct Firing Patterns of Neuronal Subtypes in Cortical Synchronized Activities. *Journal of Neuroscience*, 21(18), 7261–7272. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07261.2001>
- Khedr, E. M., Etraby, A. E., Hemeda, M., Nasef, A. M., & Razek, A. A. E. (2010). Long-term effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on motor function recovery after acute ischemic stroke. *Acta Neurologica Scandinavica*, 121(1), 30–37. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2009.01195.x>
- Kim, E., Anguluan, E., Kum, J., Sanchez-Casanova, J., Park, T. Y., Kim, J. G., & Kim, H. (2021). Wearable transcranial ultrasound system for remote stimulation of freely moving animal. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 68(7), 2195–2202. <https://doi.org/10.1109/TBME.2020.3038018>
- Kim, H. B., Swanberg, K. M., Han, H. S., Kim, J. C., Kim, J. W., Lee, S., Lee, C. J., Maeng, S., Kim, T. S., & Park, J. H. (2017). Prolonged stimulation with low-intensity ultrasound induces delayed increases in spontaneous hippocampal culture spiking activity. *Journal of Neuroscience Research*, 95(3), 885–896. <https://doi.org/10.1002/jnr.23845>
- Kim, H., Kim, S., Sim, N. S., Pasquinelli, C., Thielscher, A., Lee, J. H., & Lee, H. J. (2019). Miniature ultrasound ring array transducers for transcranial ultrasound neuromodulation of freely-moving small animals. *Brain Stimulation*, 12(2), 251–255. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.11.007>
- Kim, H.-J., Phan, T. T., Lee, K., Kim, J. S., Lee, S.-Y., Lee, J. M., Do, J., Lee, D., Kim, S.-P., Lee, K. P., Park, J., Lee, C. J., & Park, J. M. (2024). Long-lasting forms of plasticity through patterned

- ultrasound-induced brainwave entrainment. *Science Advances*, 10(8), eadk3198. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adk3198>
- Kim, S., Jo, Y., Kook, G., Pasquinelli, C., Kim, H., Kim, K., Hoe, H. S., Choe, Y., Rhim, H., Thielscher, A., Kim, J., & Lee, H. J. (2021). Transcranial focused ultrasound stimulation with high spatial resolution. *Brain Stimulation*, 14(2), 290–300. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2021.01.002>
- Klatte, T., Kroeger, N., Zimmermann, U., Burchardt, M., Belldegrun, A. S., & Pantuck, A. J. (2014). The contemporary role of ablative treatment approaches in the management of renal cell carcinoma (RCC): Focus on radiofrequency ablation (RFA), high-intensity focused ultrasound (HIFU), and cryoablation. *World Journal of Urology*, 32(3), 597–605. <https://doi.org/10.1007/S00345-014-1284-7/TABLES/2>
- Komiyama, T., Sato, T. R., O’connor, D. H., Zhang, Y.-X., Huber, D., Hooks, B. M., Gabitto, M., & Svoboda, K. (2010). Learning-related fine-scale specificity imaged in motor cortex circuits of behaving mice. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature08897>
- Kovac, S., Abramov, A. Y., & Walker, M. C. (2013). Energy depletion in seizures: Anaplerosis as a strategy for future therapies. *Neuropharmacology*, 69, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.05.012>
- Kubanek, J., Brown, J., Ye, P., Pauly, K. B., Moore, T., & Newsome, W. (2020). Remote, brain region–specific control of choice behavior with ultrasonic waves. *Science Advances*, 6(21), eaaz4193. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz4193>
- Kubanek, J., Shi, J., Marsh, J., Chen, D., Deng, C., & Cui, J. (2016). Ultrasound modulates ion channel currents. *Scientific Reports*, 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep24170>
- Kubanek, J., Shukla, P., Das, A., Baccus, S. A., & Goodman, M. B. (2018). Ultrasound elicits behavioral responses through mechanical effects on neurons and ion channels in a simple nervous system. *Journal of Neuroscience*, 38(12), 3081–3091. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1458-17.2018>
- Kuwano, T., Kaneta, H., Nishikawa, J., Satoh, K., Murakami, S., & Tateno, T. (2020). Developing a Frequency-selective Piezoelectric Acoustic Sensor Sensitive to the Audible Frequency Range of Rodents. *IEEE Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, 15(12), 1816–1823. <https://doi.org/10.1002/tee.23260>
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A.-L., Scharenberg, A. M., Penner, R., & Kinet, J.-P. (2002). TRPM4 Is

- a Ca^{2+} -Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization. *Cell*, 109(3), 397–407. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00719-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00719-5)
- Le, H. T., Haque, R. I., Ouyang, Z., Lee, S. W., Fried, S. I., Zhao, D., Qiu, M., & Han, A. (2021). MEMS inductor fabrication and emerging applications in power electronics and neurotechnologies. *Microsystems and Nanoengineering*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41378-021-00275-w>
- Lee, D. G., Park, J., Lee, H.-S., Lee, S.-R., & Lee, D.-S. (2016). Iron overload-induced calcium signals modulate mitochondrial fragmentation in HT-22 hippocampal neuron cells. *Toxicology*, 365, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.07.022>
- Lee, J., Ko, K., Shin, H., Oh, S.-J., Lee, C. J., Chou, N., Choi, N., Tack Oh, M., Chul Lee, B., Chan Jun, S., & Cho, I.-J. (2019). A MEMS ultrasound stimulation system for modulation of neural circuits with high spatial resolution in vitro. *Microsystems & Nanoengineering*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41378-019-0070-5>
- Lee, W., Kim, H., Jung, Y., Song, I. U., Chung, Y. A., & Yoo, S. S. (2015). Image-guided transcranial focused ultrasound stimulates human primary somatosensory cortex. *Scientific Reports*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep08743>
- Lee, W., Kim, H., Lee, S. D., Park, M. Y., & Yoo, S.-S. (2015). FUS-mediated functional neuromodulation for neurophysiologic assessment in a large animal model. *Journal of Therapeutic Ultrasound*, 3(1), O23. <https://doi.org/10.1186/2050-5736-3-S1-O23>
- Legon, W., Sato, T. F., Opitz, A., Mueller, J., Barbour, A., Williams, A., & Tyler, W. J. (2014). Transcranial focused ultrasound modulates the activity of primary somatosensory cortex in humans. *Nature Neuroscience*, 17(2), 322–329. <https://doi.org/10.1038/nn.3620>
- Li, Y., Jiang, Y., Lan, L., Ge, X., Cheng, R., Zhan, Y., Chen, G., Shi, L., Wang, R., Zheng, N., Yang, C., & Cheng, J.-X. (2022). Optically-generated focused ultrasound for noninvasive brain stimulation with ultrahigh precision. *Light: Science & Applications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41377-022-01004-2>
- Li, Y., Wang, Z., & Dai, H. (2023). Improved Parkinsonian tremor quantification based on automatic label modification and SVM with RBF kernel. *Physiological Measurement*, 44(2), 025003. <https://doi.org/10.1088/1361-6579/acb8fe>
- Lin, Z., Zhou, W., Huang, X., Wang, K., Tang, J., Niu, L., Meng, L., & Zheng, H. (2018). On-Chip

- Ultrasound Modulation of Pyramidal Neuronal Activity in Hippocampal Slices. *Advanced Biosystems*, 2(8), 1800041. <https://doi.org/10.1002/adbi.201800041>
- Liu, Y., Wang, G., Cao, C., Zhang, G., Tanzi, E. B., Zhang, Y., Zhou, W., & Li, Y. (2021). Neuromodulation Effect of Very Low Intensity Transcranial Ultrasound Stimulation on Multiple Nuclei in Rat Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.656430>
- Lorenz, I., Müller, N., Schlee, W., Langguth, B., & Weisz, N. (2010). Short-term effects of single repetitive TMS sessions on auditory evoked activity in patients with chronic tinnitus. *Journal of Neurophysiology*, 104(3), 1497–1505. <https://doi.org/10.1152/jn.00370.2010>
- Luan, S., Williams, I., Nikolic, K., & Constandinou, T. G. (2014). Neuromodulation: Present and emerging methods. *Frontiers in Neuroengineering*, 7(JUL), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fneng.2014.00027>
- Lutz, M. T., & Helmstaedter, C. (2005). EpiTrack: Tracking cognitive side effects of medication on attention and executive functions in patients with epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, 7(4), 708–714. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2005.08.015>
- Ma, W.-L. D., Hidaka, H., & May, B. J. (2006). Spontaneous activity in the inferior colliculus of CBA/J mice after manipulations that induce tinnitus. *Hearing Research*, 212(1), 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2005.10.003>
- Madisen, L., Garner, A. R., Shimaoka, D., Chuong, A. S., Klapoetke, N. C., Li, L., van der Bourg, A., Niino, Y., Egolf, L., Monetti, C., Gu, H., Mills, M., Cheng, A., Tasic, B., Nguyen, T. N., Sunkin, S. M., Benucci, A., Nagy, A., Miyawaki, A., ... Zeng, H. (2015). Transgenic Mice for Intersectional Targeting of Neural Sensors and Effectors with High Specificity and Performance. *Neuron*, 85(5), 942–958. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.022>
- Manuel, T. J., Kusunose, J., Zhan, X., Lv, X., Kang, E., Yang, A., Xiang, Z., & Caskey, C. F. (2020). Ultrasound neuromodulation depends on pulse repetition frequency and can modulate inhibitory effects of TTX. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72189-y>
- Manwar, R., Kratkiewicz, K., & Avnani, K. (2020). Overview of ultrasound detection technologies for photoacoustic imaging. *Micromachines*, 11(7), 1–24. <https://doi.org/10.3390/mi11070692>
- Martens, H. C. F., Toader, E., Decré, M. M. J., Anderson, D. J., Vetter, R., Kipke, D. R., Baker, K. B.,

- Johnson, M. D., & Vitek, J. L. (2011). Spatial steering of deep brain stimulation volumes using a novel lead design. *Clinical Neurophysiology*, 122(3), 558–566. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2010.07.026>
- Mohammadjavadi, M., Ye, P. P., Xia, A., Brown, J., Popelka, G., & Pauly, K. B. (2019). Elimination of peripheral auditory pathway activation does not affect motor responses from ultrasound neuromodulation. *Brain Stimulation*, 12(4), 901–910. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2019.03.005>
- Müller, N., Lorenz, I., Langguth, B., & Weisz, N. (2013). rTMS Induced Tinnitus Relief Is Related to an Increase in Auditory Cortical Alpha Activity. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055557>
- Muramatsu, S., Toda, M., Nishikawa, J., & Tateno, T. (2019). Sound- and current-driven laminar profiles and their application method mimicking acoustic responses in the mouse auditory cortex in vivo. *Brain Research*, 1721(March), 146312. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146312>
- Namikawa, M., Sano, A., & Tateno, T. (2017). Salicylate-Induced Suppression of Electrically Driven Activity in Brain Slices from the Auditory Cortex of Aging Mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00395>
- Noto, M., Nishikawa, J., & Tateno, T. (2016). An analysis of nonlinear dynamics underlying neural activity related to auditory induction in the rat auditory cortex. *Neuroscience*, 318, 58–83. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.060>
- Oh, S.-J., Lee, J. M., Kim, H.-B., Lee, J., Han, S., Bae, J. Y., Hong, G.-S., Koh, W., Kwon, J., Hwang, E.-S., Woo, D. H., Youn, I., Cho, I.-J., Bae, Y. C., Lee, S., Shim, J. W., Park, J.-H., & Lee, C. J. (2019). Ultrasonic Neuromodulation via Astrocytic TRPA1. *Current Biology*, 29(20), 3386–3401.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.021>
- Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W., & Lechleiter, J. D. (2008). Chemical calcium indicators. *Methods*, 46(3), 143–151. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2008.09.025>
- Pascual-Leone, A., Valls-Solé, J., Wassermann, E. M., & Hallett, M. (1994). Responses to rapid-rate transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex. *Brain*, 117(4), 847–858. <https://doi.org/10.1093/brain/117.4.847>
- Pasquinelli, C., Hanson, L. G., Siebner, H. R., Lee, H. J., & Thielscher, A. (2019a). Safety of

- transcranial focused ultrasound stimulation: A systematic review of the state of knowledge from both human and animal studies. *Brain Stimulation*, 12(6), 1367–1380. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2019.07.024>
- Pasquinelli, C., Hanson, L. G., Siebner, H. R., Lee, H. J., & Thielscher, A. (2019b). Safety of transcranial focused ultrasound stimulation: A systematic review of the state of knowledge from both human and animal studies. *Brain Stimulation*, 12(6), 1367–1380. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2019.07.024>
- Percival, D. B., & Walden, A. T. (1993). *Spectral Analysis for Physical Applications*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511622762>
- Perlmutter, J. S., & Mink, J. W. (2006). Deep brain stimulation. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 229–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112824>
- Pfister, J.-P., & Gerstner, W. (2006). Triplets of Spikes in a Model of Spike Timing-Dependent Plasticity. *Journal of Neuroscience*, 26(38), 9673–9682. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1425-06.2006>
- Portfors, C. V., Mayko, Z. M., Jonson, K., Cha, G. F., & Roberts, P. D. (2011). Spatial organization of receptive fields in the auditory midbrain of awake mouse. *Neuroscience*, 193, 429–439. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.025>
- Prawitt, D., Monteilh-Zoller, M. K., Brixel, L., Spangenberg, C., Zabel, B., Fleig, A., & Penner, R. (2003). TRPM5 is a transient Ca²⁺-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca²⁺]_i. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 15166–15171. <https://doi.org/10.1073/pnas.2334624100>
- Prieto, M. L., Firouzi, K., Khuri-Yakub, B. T., Madison, D. V., & Maduke, M. (2020). Spike frequency-dependent inhibition and excitation of neural activity by high-frequency ultrasound. *Journal of General Physiology*, 152(11), e202012672. <https://doi.org/10.1085/jgp.202012672>
- Prieto, M. L., Firouzi, K., Khuri-Yakub, B. T., & Maduke, M. (2018). Activation of Piezo1 but Not NaV1.2 Channels by Ultrasound at 43 MHz. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 44(6), 1217–1232. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2017.12.020>
- Qin, P. P., Jin, M., Xia, A. W., Li, A. S., Lin, T. T., Liu, Y., Kan, R. L., Zhang, B. B., & Kranz, G. S. (2024). The effectiveness and safety of low-intensity transcranial ultrasound stimulation: A

- systematic review of human and animal studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 156, 105501. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105501>
- Qiu, Z., Guo, J., Kala, S., Zhu, J., Xian, Q., Qiu, W., Li, G., Zhu, T., Meng, L., Zhang, R., Chan, H. C., Zheng, H., & Sun, L. (2019). The Mechanosensitive Ion Channel Piezo1 Significantly Mediates In Vitro Ultrasonic Stimulation of Neurons. *iScience*, 21, 448–457. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.10.037>
- Qiu, Z., Kala, S., Guo, J., Xian, Q., Zhu, J., Zhu, T., Hou, X., Wong, K. F., Yang, M., Wang, H., & Sun, L. (2020). Targeted Neurostimulation in Mouse Brains with Non-invasive Ultrasound. *Cell Reports*, 32(7), 108033. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108033>
- Quadri, S. A., Waqas, M., Khan, I., Khan, M. A., Suriya, S. S., Farooqui, M., & Fiani, B. (2018). High-intensity focused ultrasound: Past, present, and future in neurosurgery. *Neurosurgical Focus*, 44(2), E16. <https://doi.org/10.3171/2017.11.FOCUS17610>
- Ranade, S. S., Syeda, R., & Patapoutian, A. (2015). Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron*, 87(6), 1162–1179. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.032>
- Rezayat, E., & Toostani, I. G. (2016). A review on brain stimulation using low intensity focused ultrasound. *Basic and Clinical Neuroscience*, 7(3), 187–194. <https://doi.org/10.15412/J.BCN.03070303>
- Ridding, M. C., & Rothwell, J. C. (2007). *Ridding (2007) Is there a future for use of TMS*. 8(July), 559–567.
- Rizzone, M. G., Fasano, A., Daniele, A., Zibetti, M., Merola, A., Rizzi, L., Piano, C., Piccininni, C., Romito, L. M., Lopiano, L., & Albanese, A. (2014). Long-term outcome of subthalamic nucleus DBS in Parkinson's disease: From the advanced phase towards the late stage of the disease? *Parkinsonism and Related Disorders*, 20(4), 376–381. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.01.012>
- Salahshoor, H., Guo, H., Shapiro, M. G., & Ortiz, M. (2022). Mechanics of ultrasonic neuromodulation in a mouse subject. *Extreme Mechanics Letters*, 50, 101539. <https://doi.org/10.1016/j.eml.2021.101539>
- Sanguinetti, J. L., Hameroff, S., Smith, E. E., Sato, T., Daft, C. M. W., Tyler, W. J., & Allen, J. J. B. (2020). Transcranial Focused Ultrasound to the Right Prefrontal Cortex Improves Mood and Alters Functional Connectivity in Humans. *Frontiers in Human Neuroscience*, 14(February),

- 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2020.00052>
- Sarica, C., Nankoo, J.-F., Fomenko, A., Grippe, T. C., Yamamoto, K., Samuel, N., Milano, V., Vetkas, A., Darmani, G., Cizmeci, M. N., Lozano, A. M., & Chen, R. (2022). Human Studies of Transcranial Ultrasound neuromodulation: A systematic review of effectiveness and safety. *Brain Stimulation*, *15*(3), 737–746. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2022.05.002>
- Sato, H., Sugimoto, F., Furukawa, R., & Tateno, T. (2024). Modulatory Effects on Laminar Neural Activity Induced by Near-Infrared Light Stimulation with a Continuous Waveform to the Mouse Inferior Colliculus In Vivo. *eNeuro*, *11*(5). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0521-23.2024>
- 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.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.009>
- Sen, A., Capelli, V., & Husain, M. (2018). Cognition and dementia in older patients with epilepsy. *Brain*, *141*(6), 1592–1608. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWY022>
- Shamli Oghli, Y., Grippe, T., Arora, T., Hoque, T., Darmani, G., & Chen, R. (2023). Mechanisms of theta burst transcranial ultrasound induced plasticity in the human motor cortex. *Brain Stimulation*, *16*(4), 1135–1143. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2023.07.056>
- Shouval, H. Z., Bear, M. F., & Cooper, L. N. (2002). A unified model of NMDA receptor-dependent bidirectional synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(16), 10831–10836. <https://doi.org/10.1073/pnas.152343099>
- Soleimanzad, H., Gurden, H., & Pain, F. (2017). Optical properties of mice skull bone in the 455- to 705-nm range. *https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.1.010503*, *22*(1), 010503. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.1.010503>
- Sorum, B., Rietmeijer, R. A., Gopakumar, K., Adesnik, H., & Brohawn, S. G. (2021). Ultrasound activates mechanosensitive TRAAK K⁺ channels through the lipid membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(6), e2006980118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006980118>
- Stiebler, I., & Ehret, G. (1985). Inferior colliculus of the house mouse. I. A quantitative study of tonotopic organization, frequency representation, and tone-threshold distribution. *Journal of Comparative Neurology*, *238*(1), 65–76. <https://doi.org/10.1002/cne.902380106>

- Sudalaimani, C., A. A. S., Thomas, E. T., Menon, R. N., & Thomas, S. V. (2015). *Use of electrographic seizures and interictal epileptiform discharges for improving performance in seizure prediction; Use of electrographic seizures and interictal epileptiform discharges for improving performance in seizure prediction*. <https://doi.org/10.1109/RAICS.2015.7488419>
- Sun, L., Kosugi, Y., Kawakami, E., Piao, Y. S., Hashimoto, T., & Oyanagi, K. (2009). Magnesium concentration in the cerebrospinal fluid of mice and its response to changes in serum magnesium concentration. *Magnesium Research*, 22(4), 266–272. <https://doi.org/10.1684/MRH.2009.0186>
- Szczepaniak, W. S., & Møller, A. R. (1995). Evidence of decreased GABAergic influence on temporal integration in the inferior colliculus following acute noise exposure: A study of evoked potentials in the rat. *Neuroscience Letters*, 196(1), 77–80. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11851-M](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11851-M)
- Takeuchi, Y., & Berényi, A. (2020). Oscillotherapeutics – Time-targeted interventions in epilepsy and beyond. *Neuroscience Research*, 152, 87–107. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.01.002>
- Takeuchi, Y., Harangozo, M., & Pedraza, L. (2020). *Closed-loop stimulation of the medial septum terminates epileptic seizures*.
- Tateno, T. (2010). A small-conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} current regulates dopamine neuron activity: A combined approach of dynamic current clamping and intracellular imaging of calcium signals. *NeuroReport*, 21(10), 667–674. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32833add56>
- Tipsawat, P., Ilham, S. J., Yang, J. I., Kashani, Z., Kiani, M., & Trolier-Mckinstry, S. (2022). 32 Element Piezoelectric Micromachined Ultrasound Transducer (PMUT) Phased Array for Neuromodulation. *IEEE Open Journal of Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 2, 184–193. <https://doi.org/10.1109/OJUFFC.2022.3196823>
- Topalovic, U., Barclay, S., Ling, C., Alzuhair, A., Yu, W., Hoxhikyan, V., Chandrakumar, H., Rozgic, D., Jiang, W., Basir-Kazeruni, S., Maoz, S. L., Inman, C. S., Stangl, M., Gill, J., Bari, A., Fallah, A., Eliashiv, D., Pouratian, N., Fried, I., ... Markovic, D. (2023). A wearable platform for closed-loop stimulation and recording of single-neuron and local field potential activity in freely moving humans. *Nature Neuroscience*, 26(3), Article 3.

<https://doi.org/10.1038/s41593-023-01260-4>

- Tsukano, H., Horie, M., Hishida, R., Takahashi, K., Takebayashi, H., & Shibuki, K. (2016). Quantitative map of multiple auditory cortical regions with a stereotaxic fine-scale atlas of the mouse brain. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep22315>
- Tufail, Y., Matyushov, A., Baldwin, N., Tauchmann, M. L., Georges, J., Yoshihiro, A., Tillery, S. I. H., & Tyler, W. J. (2010). Transcranial Pulsed Ultrasound Stimulates Intact Brain Circuits. *Neuron*, 66(5), 681–694. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.05.008>
- Tufail, Y., Yoshihiro, A., Pati, S., Li, M. M., & Tyler, W. J. (2011). Ultrasonic neuromodulation by brain stimulation with transcranial ultrasound. *Nature Protocols*, 6(9), 1453–1470. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.371>
- Tyler, W. J., Tufail, Y., Finsterwald, M., Tauchmann, M. L., Olson, E. J., & Majestic, C. (2008). Remote excitation of neuronal circuits using low-intensity, low-frequency ultrasound. *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003511>
- von Gersdorff, H., & Borst, J. G. G. (2002). Short-term plasticity at the calyx of held. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(1), 53–64. <https://doi.org/10.1038/nrn705>
- Wagner, T., Valero-Cabre, A., & Pascual-Leone, A. (2007). Noninvasive human brain stimulation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9, 527–565. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.061206.133100>
- Wang, P., Zhang, J., Yu, J., Smith, C., & Feng, W. (2019). Brain Modulatory Effects by Low-Intensity Transcranial Ultrasound Stimulation (TUS): A Systematic Review on Both Animal and Human Studies. *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00696>
- Wang, Z., Yan, J., Wang, X., Yuan, Y., & Li, X. (2020). Transcranial Ultrasound Stimulation Directly Influences the Cortical Excitability of the Motor Cortex in Parkinsonian Mice. *Movement Disorders*, 35(4), 693–698. <https://doi.org/10.1002/mds.27952>
- Watanabe, K., Kamatani, D., Hishida, R., Kudoh, M., & Shibuki, K. (2007). Long-term depression induced by local tetanic stimulation in the rat auditory cortex. *Brain Research*, 1166(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2007.06.049>
- Weinberger, N. M. (2004). Specific long-term memory traces in primary auditory cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrn1366>

- Wen, Y., Lin, M., Liu, J., Tang, J., & Qi, X. (2024). Low-intensity ultrasound activates transmembrane chloride flow through CFTR. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 37, 101604. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101604>
- Woods, A. J., Antal, A., Bikson, M., Boggio, P. S., Brunoni, A. R., Celnik, P., Cohen, L. G., Fregni, F., Herrmann, C. S., Kappenman, E. S., Knotkova, H., Liebetanz, D., Miniussi, C., Miranda, P. C., Paulus, W., Priori, A., Reato, D., Stagg, C., Wenderoth, N., & Nitsche, M. A. (2016). A technical guide to tDCS, and related non-invasive brain stimulation tools. *Clinical Neurophysiology*, 127(2), 1031–1048. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2015.11.012>
- Xian, Q., Qiu, Z., Kala, S., Guo, J., Zhu, J., Wong, K. F., Guo, S. S. Y., Zhu, T., Hou, X., & Sun, L. (2021). Protocol for the sonogenetic stimulation of mouse brain by non-invasive ultrasound. *STAR Protocols*, 2(2), 100393. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100393>
- Xie, Z., Yan, J., Dong, S., Ji, H., & Yuan, Y. (2022). Phase-locked closed-loop ultrasound stimulation modulates theta and gamma rhythms in the mouse hippocampus. *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2022.994570>
- Xu, J., Mathur, J., Vessi res, E., Hammack, S., Nonomura, K., Favre, J., Grimaud, L., Petrus, M., Francisco, A., Li, J., Lee, V., Xiang, F., Mainquist, J. K., Cahalan, S. M., Orth, A. P., Walker, J. R., Ma, S., Lukacs, V., Bordone, L., ... Patapoutian, A. (2018). GPR68 Senses Flow and Is Essential for Vascular Physiology. *Cell*, 173(3), 762-775.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.076>
- Yaakub, S. N., White, T. A., Roberts, J., Martin, E., Verhagen, L., Stagg, C. J., Hall, S., & Fouragnan, E. F. (2023). Transcranial focused ultrasound-mediated neurochemical and functional connectivity changes in deep cortical regions in humans. *Nature Communications*, 14(1), 5318. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40998-0>
- Yamamura, D., Sano, A., & Tateno, T. (2017). An analysis of current source density profiles activated by local stimulation in the mouse auditory cortex in vitro. *Brain Research*, 1659, 96–112. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.01.021>
- Yoo, S., Mittelstein, D. R., Hurt, R. C., Lacroix, J., & Shapiro, M. G. (2022). Focused ultrasound excites cortical neurons via mechanosensitive calcium accumulation and ion channel amplification. *Nature Communications*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28040-1>

- Yoshikawa, T., Higuchi, H., Furukawa, R., & Tateno, T. (2022). Temporal and spatial profiles of evoked activity induced by magnetic stimulation using millimeter-sized coils in the mouse auditory cortex in vivo. *Brain Research*, 1796, 148092. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.148092>
- Yoshikawa, T., Sato, H., Kawakatsu, K., & Tateno, T. (2023). Low-Cost Electroencephalographic Recording System Combined with a Millimeter-Sized Coil to Transcranially Stimulate the Mouse Brain In Vivo. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 195, e65302. <https://doi.org/10.3791/65302>
- Yu, K., Niu, X., Krook-Magnuson, E., & He, B. (2021). Intrinsic functional neuron-type selectivity of transcranial focused ultrasound neuromodulation. *Nature Communications*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22743-7>
- Yuan, Y., Zhang, K., Zhang, Y., Yan, J., Wang, Z., Wang, X., Liu, M., & Li, X. (2021). The Effect of Low-Intensity Transcranial Ultrasound Stimulation on Neural Oscillation and Hemodynamics in the Mouse Visual Cortex Depends on Anesthesia Level and Ultrasound Intensity. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 68(5), 1619–1626. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. <https://doi.org/10.1109/TBME.2021.3050797>
- Zadeh, A. K., Raghuram, H., Shrestha, S., Kibreab, M., Kathol, I., Martino, D., Pike, G. B., Pichardo, S., & Monchi, O. (2024). The effect of transcranial ultrasound pulse repetition frequency on sustained inhibition in the human primary motor cortex: A double-blind, sham-controlled study. *Brain Stimulation: Basic, Translational, and Clinical Research in Neuromodulation*, 17(2), 476–484. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2024.04.005>
- Zeng, K., Darmani, G., Fomenko, A., Xia, X., Tran, S., Nankoo, J.-F., Shamli Oghli, Y., Wang, Y., Lozano, A. M., & Chen, R. (2022). Induction of Human Motor Cortex Plasticity by Theta Burst Transcranial Ultrasound Stimulation. *Annals of Neurology*, 91(2), 238–252. <https://doi.org/10.1002/ana.26294>
- Zhabotinsky, A. M. (2000). Bistability in the Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase-Phosphatase System. *Biophysical Journal*, 79(5), 2211–2221. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76469-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76469-1)
- Zhong, Y., Wang, Y., He, Z., Lin, Z., Pang, N., Niu, L., Guo, Y., Pan, M., & Meng, L. (2021). Closed-loop wearable ultrasound deep brain stimulation system based on EEG in mice. *Journal of*

Neural Engineering, 18(4). <https://doi.org/10.1088/1741-2552/ac1d5c>

- Zhou, H., Niu, L., Xia, X., Lin, Z., Liu, X., Su, M., Guo, R., Meng, L., & Zheng, H. (2019). Wearable Ultrasound Improves Motor Function in an MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 66(11), 3006–3013. IEEE Transactions on Biomedical Engineering. <https://doi.org/10.1109/TBME.2019.2899631>
- Zhu, J., Xian, Q., Hou, X., Wong, K. F., Zhu, T., Chen, Z., He, D., Kala, S., Murugappan, S., Jing, J., Wu, Y., Zhao, X., Li, D., Guo, J., Qiu, Z., & Sun, L. (2023). The mechanosensitive ion channel Piezo1 contributes to ultrasound neuromodulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(18), e2300291120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2300291120>

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くのご指導・ご助言を賜りました北海道大学大学院情報科学研究科生命人間情報科学専攻神経制御工学研究室の舘野高教授，西川淳准教授，また副査としてご指導をいただきました磁気共鳴工学研究室の平田拓教授，人間情報工学研究室の橋本守教授に深く感謝申し上げます。さらに，様々な装置のご提供，並びに使用法や加工技術の知識をご教授くださった大阪府立産業技術研究所の村上修一博士に深く感謝します。また，電気化学計測を行うための装置をご提供してくださった，本学理学院分析化学研究室の上野貢生教授に深く感謝申し上げます。皆様のお力添えのおかげで本研究に組み込むことができました。神経制御工学研究室の佐藤広務氏には研究発表に関して，吉川隆洋氏には計測系の改善に関して，川勝孝基氏，および，柴公晟氏には関連する研究テーマとして実験手技の指導や補助等のご協力を頂きました。また，その他の先輩方や同期，および，後輩の皆様には研究や生活の面でご支援いただきました。ご協力いただいた皆様へ，そしてここまで支えてくれた家族へ，心から感謝の意を表し，謝辞に代えさせていただきます。

引用許諾

第2章において、表2-1～2-3、図2-3～2-7は筆者がFrontiers社の学術雑誌（Frontiers in Neuroscience）に筆頭著者として投稿したものを引用した。Frontiers社の方針により、出版された論文の著作権を所持しないため、学位論文への引用において引用許諾を必要としない。

第3章において、表3-1、図3-1～3-15は筆者がElsevier社の学術論文（Journal of Neuroscience Methods）に筆頭著者として投稿したものを引用した。Elsevier社の方針により、投稿論文の著者が非営利目的の学位論文に内容を引用する際には引用許諾を必要としない。

また、本論文中のマウス脳と頭蓋骨を示す図は、以下のデータを編集して作図した。

<https://www.thingiverse.com/thing:3079327>

研究業績

学術論文（査読付き）

- **Ryo Furukawa**, Kosei Shiba, and Takashi Tateno, “Effective Temporal Envelopes for Transcranial Ultrasound Stimulation in the Absence of Auditory Peripheral Responses”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, in review.
- **Ryo Furukawa**, Kouta Kume, and Takashi Tateno, “Analyzing the transient response dynamics of long-term depression in the mouse auditory cortex in vitro through multielectrode-array-based spatiotemporal recordings”, *Frontiers in Neuroscience*, vol. 18, 2024.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1448365>
- Hiromu Sato, Futoshi Sugimoto, **Ryo Furukawa**, and Takashi Tateno, "Modulatory effects on laminar neural activity induced by near-infrared light stimulation with a continuous waveform to the mouse inferior colliculus in vivo", *eNeuro*, vol. 11, 2024.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0521-23.2024>
- **Ryo Furukawa**, Takahiro Yoshikawa, Shuichi Murakami, and Takashi Tateno, “A piezoelectric micromachined ultrasound transducer combined with recording electrodes for acute brain preparations in vitro”, *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 403, 2024.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2023.110048>
- Takahiro Yoshikawa, Hisaya Higuchi, **Ryo Furukawa**, and Takashi Tateno, “Temporal and spatial profiles of evoked activity induced by magnetic stimulation using millimeter-sized coils in the mouse auditory cortex in vivo”, *Brain Research*, vol. 1796, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.148092>
- **Ryo Furukawa**, Hiroki Kaneta, and Takashi Tateno, “A Multielectrode Array-based Recording System for Analyzing Ultrasound-Driven Neural Responses in Brain Slices in vitro”, *Frontiers in Neuroscience*, vol. 16, 2022.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.824142>
- Hisaya Higuchi, **Ryo Furukawa**, and Takashi Tateno, “Characterizing Millimeter-Sized Coils for Transcranial Magnetic Stimulation of Small Animals: Comparison of Magnetic Cores”, *IEEE Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, vol. 15, no. 7, pp. 1035-1037, 2021.
<https://doi.org/10.1002/tee.23387>

国際会議論文（査読付き）

- **Ryo Furukawa**, Shuichi Murakami, and Takashi Tateno, “Developing a Head-Attached Interface Device for Closed-Loop Transcranial Ultrasound Stimulation in the Mouse Brain”, *In Proceedings of International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies (BIOSTEC 2025)*, accepted on 4 December 2024.
- **Ryo Furukawa**, Shuichi Murakami, and Takashi Tateno, "An Event-driven Closed-loop Ultrasound Stimulator Composed of a Micro-transducer and Multi-site Electrodes In Vitro", *In Proceedings of International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies (BIOSTEC 2024)* – Volume 1, pp. 95-102, Rome, Italy, February 2024. (Oral Presentation)
<https://doi.org/10.5220/0012307900003657>
- **Ryo Furukawa** and Takashi Tateno, “Development of a Piezoelectric Micromachined Ultrasound Transducer using Microfabrication Technology for in Vitro Neuromodulation”, *In Proceedings of the International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies (BIOSTEC 2022)* – Volume 1: BIODEVICES, pp. 196-203, Online, February 2022 (Poster presentation).
<https://doi.org/10.5220/0010938500003123>

受賞

- Outstanding Student Presentation Award
電気学会電子・情報・システム部門大会, Student Competition Session, 2022 年 9 月 1 日.
- Best Poster Award
15th International Conference on Biomedical Electronics and Devices (BIODEVICES 2022), February 11, 2022.
- 若手優秀論文発表賞
令和 3 年度電気・情報関係学会北海道支部連合大会, 2021 年 11 月 30 日.
- 優秀ポスター賞
電気学会電子・情報・システム部門大会, 学生ポスターセッション, 2021 年 9 月 16 日.
- 優秀発表賞

令和2年度電子情報通信学会北海道支部学生会インターネットシンポジウム，2021年
3月11日．