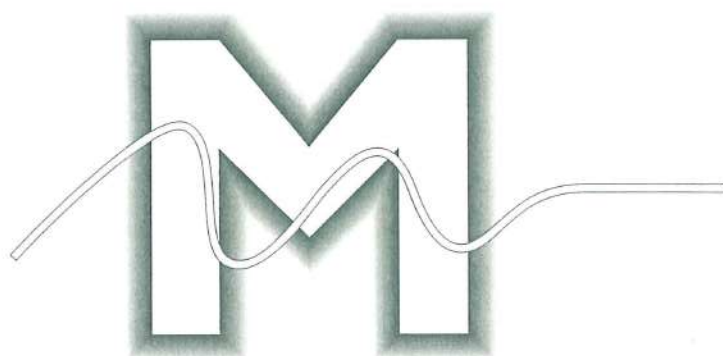


助 成 研 究 成 果 報 告 書

平成18年度

(研究期間：平成19年4月1日～平成20年3月31日)



目 次

巻頭言	1
-----------	---

理事長 齋 藤 正 男

研究論文

I. 基礎研究

I -1. 歯科精密鑄造磁性アタッチメントに関する研究 ー歯科用合金に対する接合性ー	3
---	---

テキサスA&M大学ヘルスサイエンスセンター・ペーラー歯科大学
渡 辺 郁 哉

I -2. インスリン分泌細胞の磁場応答に関する研究	6
----------------------------------	---

弘前大学大学院 保健学研究科
櫻 井 智 徳

II. テーマ指定研究

II -1. 交流磁界が動物細胞の細胞内Ca ²⁺ イオン濃度と 細胞運動に及ぼす影響の解析	9
--	---

埼玉医科大学 医学部解剖学
駒 崎 伸 二

II -2. 拡散強調磁気共鳴画像を用いた経頭蓋磁気刺激による脳活動変化の測定	13
---	----

国立精神・神経センター 神経研究所
花 川 隆

II -3. 磁気刺激による次世代ECT（電撃けいれん）療法のための基礎研究	16
--	----

金沢医科大学 生理機能制御学
加 藤 伸 郎

Ⅱ-4. 磁場印加によるP19細胞分化制御の基礎研究	19
----------------------------------	----

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

神 保 泰 彦

平成19年度研究助成テーマ	23
---------------------	----

巻 頭 言

財団法人 磁気健康科学研究振興財団

理事長 齋 藤 正 男

我々生物が地球の磁気の中で生活し、進化してきたこともあり、磁気の生体作用については非常に古くから関心が持たれ、研究がなされてきました。生物の種類によっては、磁界の影響を激しく受けるものもありますが、人間の場合には、磁気は穏やかに長期間にわたって作用します。磁気を使って病気を治療し、健康を増進する方法は、一部の国で盛んに行われています。

また磁気は生体に直接作用するだけでなく、生体内の様々な現象を加速し、あるいは抑えることによって、結果的に生体内の状態を示し、また状態に影響を与えることが知られています。最近の医学では、強い磁界、弱い磁界を効果的に利用することによって、診断・治療に役立てようとする研究が多数なされています。

しかし磁気的作用は、「こうしたらこうなる」というように短絡的に理解される場合が少ないために、性急に学術的成果を求める研究者達には興味の対象とならず、研究の歴史が長いのににもかかわらず、多くの未知の部分が残されています。この財団は、磁気の生体作用の中から、人間の健康に役立つと期待される現象を取り上げ、その解明と応用を通して社会に貢献しようとするものであります。学術的研究を助成するほかに、講演会など社会に向けた活動をしております。

この報告書は、平成18年度の助成研究報告書を原文のまままとめたものです。基礎的な研究から実際応用に近い研究まで様々なものが含まれていますが、いずれもこの分野に新しい道を拓くことを目指したものであります。この報告書を通して、似た問題に関心をお持ちの研究者相互の連絡が進み、磁気健康科学が発展することを期待しております。

歯科精密鑄造磁性アタッチメントに関する研究 - 歯科用合金に対する接合性 -

(Dental precision casting of magnetic attachments - Bonding characteristics to dental alloys -)

3302 Gaston Ave. Dallas, TX, 75246, USA

テキサスA&M大学ヘルスサイエンスセンター・ペーラー歯科大学 渡 辺 郁 哉

目的

我々はこれまでに様々な形態や大きさに歯科鑄造可能な白金鉄磁性アタッチメントの開発研究を行い^{1,2}、歯科への応用を検討してきた^{3,4}。本研究では本磁性システムの臨床応用を実施するための検討事項として、本磁性合金の接合に最適と思われるレーザー溶接を用い、代表的な歯科鑄造用合金（貴・非貴金属合金等）と溶接した場合の異種合金との接合性に関して溶接強度について評価することを目的とした。

方法

白金鉄磁性合金はFe-39.5at%Pt-0.75at%Nb（重量%：Fe-69.4wt%Pt-0.6wt%Nb）となるように合金化し、インゴットを製作した。強度測定用に板状（0.5x3x10mm）の鑄造用ワックスパターンを作製し、マグネシア系埋没材で鑄造リングに埋没後焼却し、遠心鑄造機（Eagle;Jelenko）を用いて鑄造を行った。鑄造後すべての試料は既報に準じて熱処理を施した。溶接面（0.5x3mm）は研磨後、同形に鑄造した歯科用合金（金合金、銀パラジウム金合金、コバルトクロム合金）とのレーザー

溶接に供した。レーザー溶接は歯科用Nd:YAGレーザー溶接機（NeoLaser;Girrbach）を用い、継手両側溶接により行った。溶接強度はパルス幅（10ms）とスポット径（1.0mm）を一定にし、レーザー溶接深さが試料厚さ（0.5mm）の1/2になるようにあらかじめ電圧を決定した。溶接回数は片側各5回とし、最初の3回の溶接で試験片幅（3mm）のすべてを覆い、後の2回は最初の溶接部の間隙に重複溶接（50%overlap）を行なった。磁性合金同士の溶接試験片および溶接しないコントロール試験片（0.5x3x20mm）も作製した。試験片は各合金につき10対ずつ作製した。溶接強度測定は引張り試験（クロスヘッドスピード:1.0mm/min）により行い、溶接強度は溶接試験片の破断荷重として測定し、破断時の延びの測定も同時に行った。得られた測定値は分散分析後、多重比較検定した。破断面の破壊様式を走査型電子顕微鏡（JMS5600LV;日本電子）を用いて観察し、溶接強度結果と比較検討した。

結果および考察

溶接強度と延性の結果をそれぞれFig. 1とFig. 2に示す。すべての合金において、同種

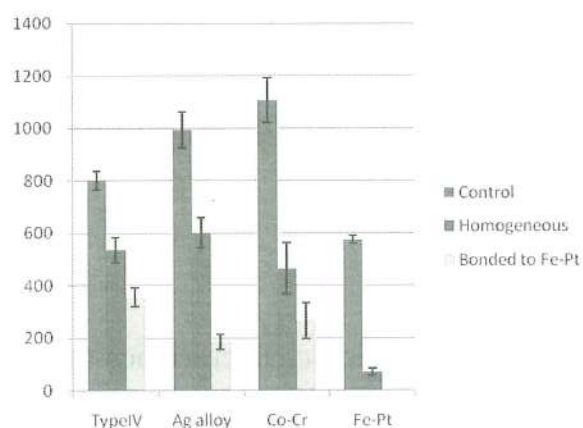


Fig. 1. 接合強度 (N)

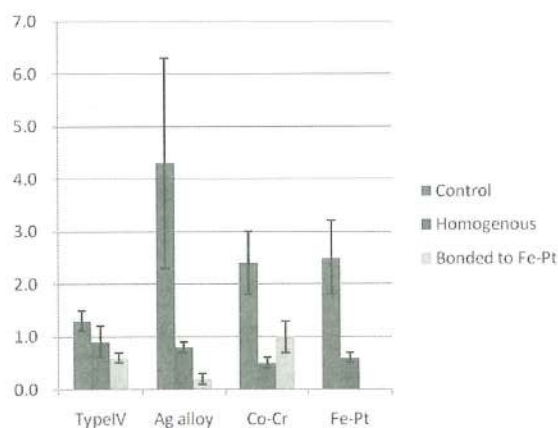
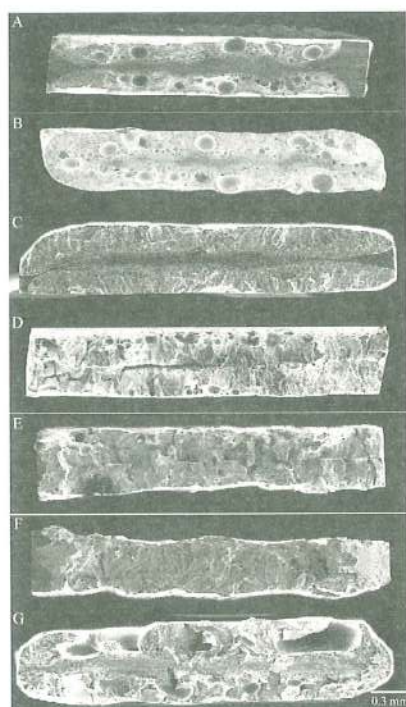


Fig. 2. 延性 (%)



A. Type IV vs. Type IV
B. Ag-Au vs. Ag-Au
C. Co-Cr vs. Co-Cr
D. Fe-Pt control
E. Type IV vs. Fe-Pt
F. Ag-Au vs. Fe-Pt
G. Co-Cr vs. Fe-Pt

Fig. 3 破断面観察 (SEM)

のレーザー溶接では溶接されていない母金よりも小さい溶接強度を示した。これはSEMの破断面の観察 (Fig. 3A-3C) からわかるように、中央部に溶接されていない部分があることから強度が十分に得られなかったものと考えられる。溶接していない白金鉄の破断面 (Fig. 3D) で中央部分に亀裂が認められたが、鑄造時の溶解・凝固の過程で形成されたものと考えられる。白金鉄同士の接合強度は非常に低かった。各合金を白金鉄にレーザー溶接した試験片ではほとんどの試験片 (Figs. 3E-3G) で完全に溶接されていたものの、その強度は各合金同士を溶接したものよりも低くなった。その中では、Type IV金合金が最も高い強度を示した。延性は銀パラジウム金合金が最も大きく、白金鉄とコバルトクロム合金に続き、Type IV金合金が最も低かった。Type IV金合金のほとんどの試験片で溶接していない白金鉄の破断面で観察された中央部の亀裂が観察された。このことは破壊が白金鉄の側で起こっていると考えられ、最も高い強度を示したType IV金合金が白金鉄のコントロールの破壊強度に近似していることを裏付けている。今回の実験結果より、白金鉄磁性アタッチメントにレーザー接合するに適した歯科用合金はType IV金合金であることが示唆された。

参考文献

1. Watanabe I, Tanaka Y, Fukunaga H, Hisatsune K, Atsuta M. Attractive force of castable iron-platinum magnetic alloys. Dent Mater 17:197-200, 2001.
2. Watanabe I, Hai K, Tanaka Y, Hisatsune K, Atsuta M. In vitro corrosion behavior of cast iron-platinum magnetic alloys. Dent Mater 17:217-220, 2001.
3. Watanabe I, Tanaka Y, Ohkubo C, Miller A. Application of cast magnetic attachments

to sectional complete dentures for a patient with microstomia: A clinical report. J Prosthet Dent 88:573-577, 2002.

4. Ohkubo C, Watanabe I, Tanaka Y, Hosoi T. Application of cast iron-platinum keeper to a collapsible denture for a patient with constricted oral opening: A clinical report. J Prosthet Dent 90:6-9, 2003.

発表

Watanabe I, Tanaka Y. Bonding characteristics of cast magnetic keeper to dental alloys The American Association for Dental Research, 37th Annual Meeting and Exhibition Dallas, TX, April, 2008.

インスリン分泌細胞の磁場応答に関する研究

(The effects of static magnetic field on insulin secreting cells)

〒036-8564 青森県弘前市本町66-1

弘前大学大学院保健学研究科 櫻井 智 徳

目的

磁界の向き一定である定常磁場は、診断装置のMRIに応用されている。MRIは核磁気共鳴(NMR)現象を利用しており、診断に際し外部から定常磁場を被験者に照射している。現在日本で使用されている多くのMRI装置の定常磁場は1.5テスラ(地磁気の30,000倍)であるが、3テスラのMRI装置も多く導入されるようになってきている。米国ではすでに6テスラのMRI装置が診断に使用されており、実験室レベルでは9テスラを超えるMRIも開発されている。MRIの磁束密度が高くなると、シグナル/ノイズ比の改善に伴うNMRシグナルの鮮明化、測定時間短縮に伴う新しい知見の可視化が可能になると思われ、MRIの磁束密度は高くなっていくことが予想される。ところが、磁束密度の高い定常磁場が、生体に及ぼす影響を細胞レベルで検討した研究は非常に少ない。本研究では、我々の研究室で開発した、最大10テスラの定常磁場ばく露環境下で細胞を培養できる装置を用いて、罹患率の高い糖尿病(2002年 厚生労働省糖尿病実態調査によると、糖尿病が強く疑われる人は約740万人、予備軍にあたる「可能性が否定できない人」を含めると国民6.3人に1人にあたる

1,620万にも達する)の発症に強く関連しているインスリン分泌細胞に対して強定常磁場が及ぼす影響を研究した。

方法

糖刺激に対するグルコース分泌作用が維持されているラット由来のインスリン分泌細胞INS-1を用いた。細胞を培養皿に播種後、定常磁場ばく露装置内の3, 6または10テスラ位置に培養皿を設置して30分または1時間培養した。各位置での磁場条件を表1に示す。同時に、定常磁場ばく露装置と同一形状で、強磁場ばく露発生部位のない装置(擬似ばく露)内で培養し、定常磁場ばく露装置内で培養した細胞との差異を比較した。定常磁場ばく露の影響は、磁場ばく露中に培養中に培地中に分泌されたインスリン量と培養直後の細胞内インスリン量をELISA法によって、細胞の活性をWST-1 cell proliferation assay kit、インスリンmRNAの発現量をリアルタイムRT-PCR法、糖刺激応答性をstatic incubation法によって評価した。

表1. 装置内のばく露位置と定常磁場条件

ばく露位置	磁束密度 (テスラ)	磁場勾配 (テスラ/メートル)	(磁束密度) × (磁場勾配) (テスラ ² /メートル)
3テスラ	3	27	81
6テスラ	6	42	251
10テスラ	10	0	0

結果

磁場ばく露中の培地へのインスリン分泌量は、6テスラ位置での1時間ばく露によって有意に増加した (図1)。インスリンmRNAも、6テスラ位置での1時間ばく露によって有意な上昇が見られた (図2)。細胞内インスリン含

量 (図3)、細胞の活性 (図4) には磁場ばく露の影響が見られなかったが、30分の磁場ばく露によって糖刺激応答性の増加が観察された (図5)。

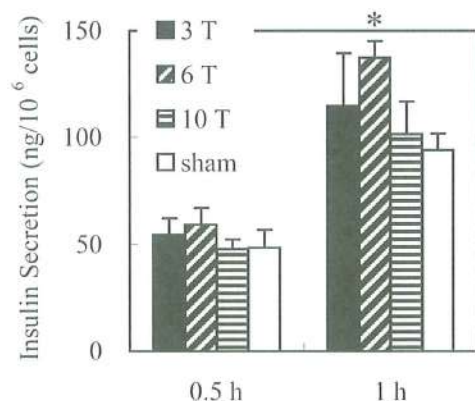


図1 培地へのインスリン分泌量に対する定常磁場の影響 (*p<0.05)

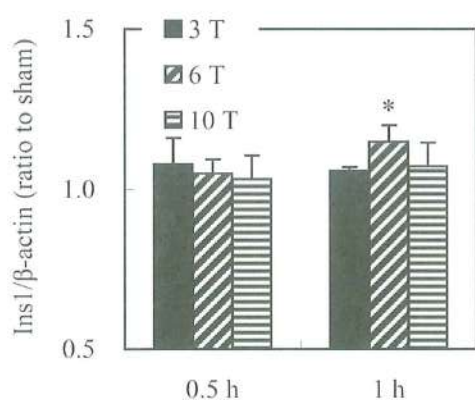


図2 インスリンmRNAに対する定常磁場の影響 (*p<0.05)

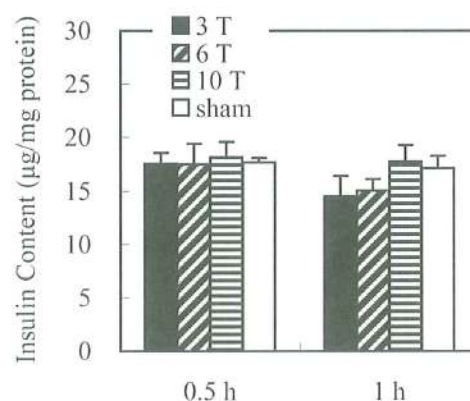


図3 インスリン含量に対する定常磁場の影響

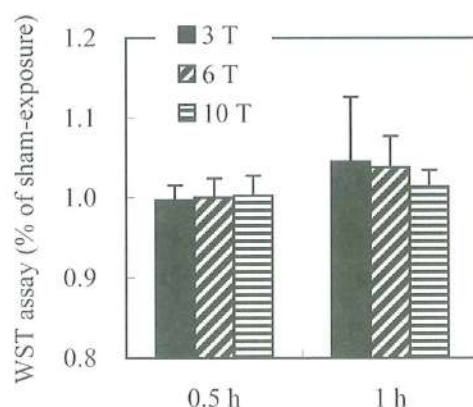


図4 細胞活性に対する定常磁場の影響

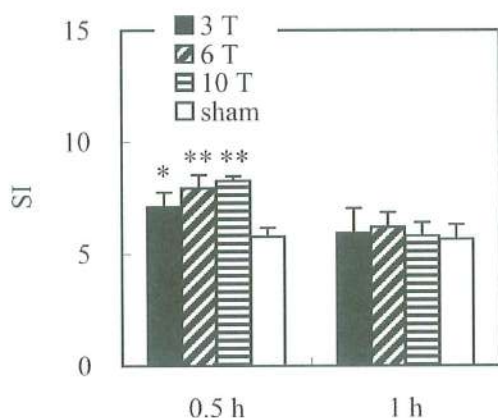


図5 糖刺激応答性(SI)に対する定常磁場の影響 (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

考察

本研究では、高磁束密度の磁場の短時間ばく露では、インスリン分泌細胞の数が減少したり、インスリン分泌細胞の主要な機能であるグルコース刺激応答性がなくなったりすることがなく、インスリン分泌細胞に対する障害は確認されなかった。

培地へのインスリン分泌量の増加は、本研究最高磁束密度の10テスラではなく、最大磁場勾配の6テスラで観察された。培地へのインスリン分泌量増加には、磁束密度よりも、磁場勾配または磁束密度と磁場勾配の積で表される、磁気力に比例した因子に影響されることが示唆される。インスリンmRNAの発現は、培地中のインスリン濃度自体も影響を及ぼすので、現在のところ、定常磁場が直接インスリンmRNAの発現を増加させているのか、インスリン分泌量が増加した結果、インスリンmRNAが増加しているのかは明らかになっていない。

30分の定常磁場ばく露後、インスリン分泌細胞の重要な機能である糖刺激応答性が増加していた。糖刺激応答性の増加は、磁束密度依存的に起きていることから、培地へのインスリン分泌量の増加とは異なったメカニズムで、定常磁場がインスリン分泌細胞に作用し

ていることが考えられるが、実際の作用メカニズムに関しては、今後の研究課題である。

発表・発表予定

- 1) Sakurai T, Terashima S and Miyakoshi J. Effects of strong static magnetic fields used in magnetic resonance imaging on insulin-secreting cells. (Bioelectromagnetics誌投稿中)
- 2) Sakurai T and Miyakoshi J. Effects of strong static magnetic fields on insulin-secreting cells. 3rd International Workshop on Material Analysis and Processing in Magnetic Fields, Tokyo, Japan, May 14-16, 2008.
- 3) Sakurai T and Miyakoshi J. Strong static magnetic fields affect insulin-secreting cells. Bioelectromagnetic Society 30th Annual Meeting, San Diego, California, June 8-12, 2008.

交流磁界が動物細胞の細胞内Ca²⁺イオン濃度と細胞運動に及ぼす影響の解析

(Effect of an alternating electromagnetic field (50 Hz) on cell movements of isolated embryonic cells)

〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38

埼玉医科大学・医学部・解剖学 駒 崎 伸 二

目的

磁界が動物細胞に及ぼす影響については依然として不明な点が多い。そのような中で、我々は、50Hzの交流磁界が両生類の初期胚発生に及ぼす影響を調べ、磁界が原腸胚形成の速度を促進することを明らかにした。そして、その原因の1つとして、磁界が胚細胞内のCa²⁺イオン濃度の上昇を引き起こすことを報告した (Komazaki & Takano, 2007)。今回の研究では、交流磁界が原腸胚形成期のどの領域の細胞運動に影響を及ぼして、その発生速度に

影響を及ぼしているのか明らかにするために、原腸胚から単離した胚細胞の運動性に及ぼす交流磁界の影響を解析した。

方法

両生類のイモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の原腸胚の時期 (Stage12) には、原腸の陥入と中胚葉の形成が行われる。そして、その中心的な役割を担っているのが3つの胚領域 (予定外胚葉、予定中胚葉、原口形成域) の細胞運動である (図1)。今回はそれらの領域を構成す

A



B



図1. イモリ原腸胚 (正中矢状断) を示す光学顕微鏡写真 (A) と、交流磁界の影響を調べた胚の各部域を示す図 (B)。太い矢印は原腸の陥入の方向を示す。

る胚細胞を取り出して、50Hzの交流磁界が胚細胞の運動性に及ぼす影響を調べた。胚細胞の単離と培養は、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -freeの培養液（1 mM GEDTAを含む培養液）を用いて行い、胚細胞への磁界の作用は図2に示した装置により行った。細胞の接着防止のため、培養チャンバーの底面のカバーガラスは血清アルブミンでコートした。加えた磁界の強度は胚細胞が置かれたチャンバーの中央部で20~30 mTであった。解離した胚細胞は、磁界を作用させない状態で30分間培養した後、磁界を作用させた状態で30分間培養して磁界の影響を調べた。コントロールは、磁界を作用させずに同じ条件下で60分間培養した。培養中の胚細胞の様子はタイムラプスビデオで記録して、それをもとに、磁界が胚細胞に及ぼす影響を画像解析ソフトのImage Jで解析した。

結果

予定外胚葉細胞

胚細胞のほとんど全てが硝子様の丸い突起（Hyaline bleb）を形成し、その突起を細胞周縁に沿って移動させる周転運動（Circus movement）を活発にくり返していた（図3a）。磁界を作用させた後でも、多くの細胞はその

運動を活発に続けていたが、一部の細胞が硝子様の突起形成を停止するのが観察された。それ以外には、磁界の作用による細胞の運動性（突起形成の頻度）や形態の顕著な変化は確認されなかった。

原口形成域の細胞

胚細胞は硝子様の突起を形成している細胞が少なく、その突起の運動も活発ではなかった（図3b）。一部の細胞は長く伸びた虫様の形（Vermiform）をして伸縮運動をくり返していた。磁界を作用させても、虫様の細胞には顕著な形態変化は見られなかったが、硝子様の突起形成をしている細胞の一部に、突起形成を停止する細胞が確認された。

予定中胚葉細胞胚

胚細胞は活発な硝子様の突起形成を行っていたが、その運動は周転運動のように規則的なものではなく、不規則な動きをしていた（図3c）。磁界を作用させると、予定外胚葉細胞と同じように硝子様の突起形成を停止する細胞が確認された（図3d）。

以上の結果から、磁界の影響による硝子様の突起形成の抑制が、調べた領域の細胞全てについて観察された。そこで、培養後30分か

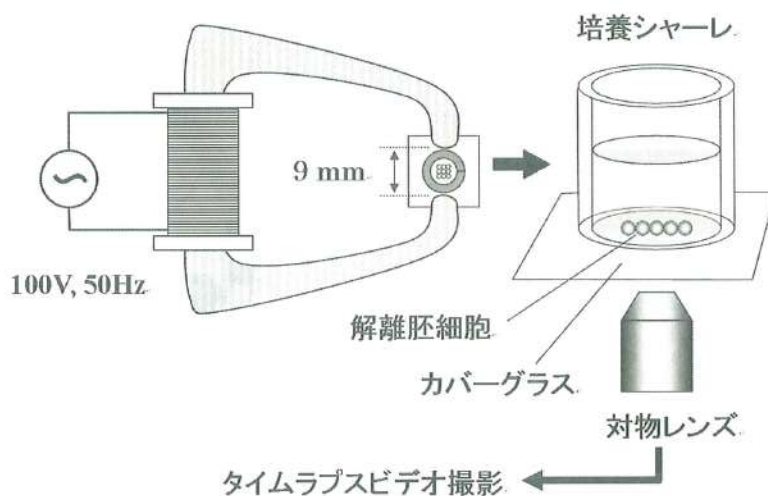


図2. 培養胚細胞に交流磁界を作用させた方法を示す模式図

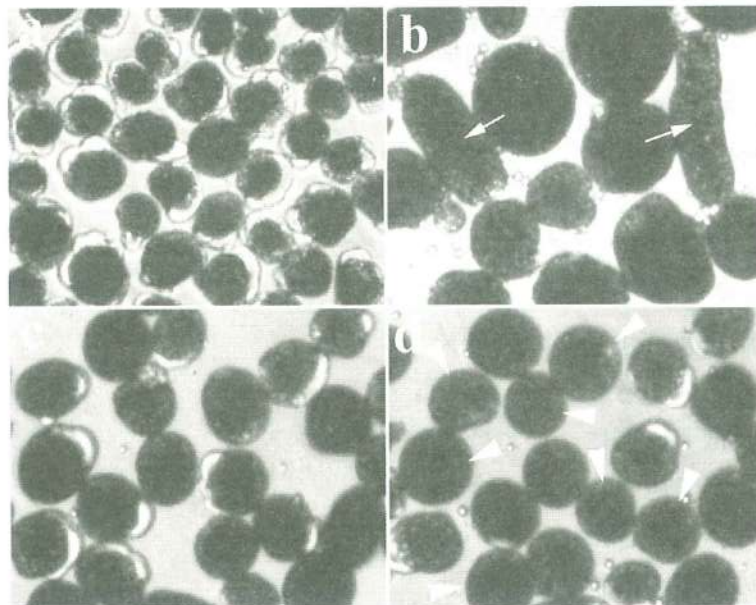


図3. 磁界の作用による細胞の変化
 a. 予定外胚葉細胞（磁界処理前）
 b. 原口形成領域の細胞（磁界処理前）矢印はVermiform細胞を示す。
 c. 予定中胚葉細胞（磁界処理前）
 d. 予定中胚葉細胞（磁界処理後）矢印は磁界の作用により硝子様突起形成を停止した細胞を示す。

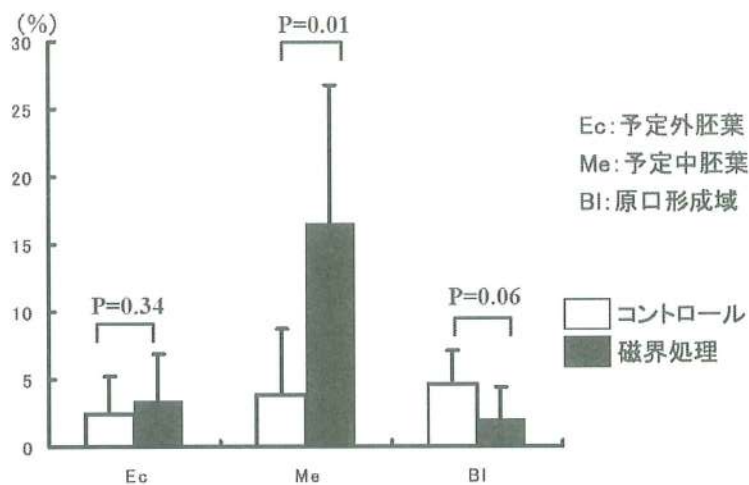


図4. 磁界の作用により硝子様の突起形成を停止した細胞の全細胞に対する割合の比較 (Mean±SD)

Student's t-testによる片側検定の結果、予定中胚葉のみに有意差あり（有意水準5%）。

ら60分にかけて、硝子様の突起形成を停止した細胞が現れた割合（全体の細胞に対する比率）を、Controlと磁界処理の場合で比較したのが図4である。その結果、予定中胚葉の細胞だけに、交流磁界の作用による硝子様突起形成の抑制作用が有意（ $p < 0.05$ ）に引き起こされることが確認された。

考察

今回の研究結果は、交流磁界が原腸胚の予定中胚葉細胞の運動性に影響を及ぼすことを明らかにした。おそらく、磁界の作用による細胞内の Ca^{2+} イオン濃度の上昇が原因となり、細胞骨格系の構築に変化を引き起こして、硝

子様の突起形成を停止させたと考えられる。今後の研究課題として、(1) 硝子様の突起形成の停止と、細胞内 Ca^{2+} イオン濃度の上昇との関連性、(2) 磁界の影響を受けた細胞と、そうでない細胞の間における細胞内構造（特に、細胞内 Ca^{2+} イオン濃度や運動性の制御系に関する構造）の違いなどを明らかにして、交流磁界が動物の細胞に及ぼす影響の分子メカニズムを解明することである。

交流磁界が生物に及ぼす影響については、その重要性（危険性）が考慮されてから今までに数多くの研究がなされてきたにもかかわらず、依然としてその影響の解釈については混乱がある。その原因の1つとして、今回の研究結果でも明らかにされたように、交流磁界の作用が一定の条件の備わった細胞に限って顕著に現れる可能性があることが指摘できる。このようなしくみを明らかにすることにより、交流磁界が人類に及ぼす影響を防止するとともに、その知識を医療技術や健康増進などに役立てる道が開けることが期待される。

参考文献

Komazaki S. and Takano K., Induction of increase in intracellular calcium concentration of embryonic cells and acceleration of morphogenetic cell movements during amphibian gastrulation by a 50-Hz magnetic field. *J Exp Zool*, 307:156–62, 2007.

拡散強調磁気共鳴画像を用いた 経頭蓋磁気刺激による脳活動変化の測定

(Effects of transcranial magnetic stimulation on brain activity measured by
diffusion-weighted functional magnetic resonance imaging)

〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1

国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第七部 花 川 隆

目的

経頭蓋磁気刺激（TMS）は、頭表上に置いたコイルに強い変動磁場を発生させ、直下の脳を刺激することで、脳機能を修飾するユニークな非侵襲的脳機能計測法である。しかし、強度、頻度や反復間隔などの刺激パラメーターの組み合わせにより、促進から抑制まで複雑に変化する作用機序の理解はまだ十分ではなく、このため検査や実験結果の解釈が恣意的になる可能性が指摘されている。最近、TMSでネコの一次視覚野を刺激し、神経細胞記録と脳酸素代謝を組み合わせる脳活動を測定した研究により（Allen et al. 2007）、TMS刺激による神経活動の促進あるいは抑制性変化を、脳酸素代謝・血流変化を測定するBOLD型磁気共鳴機能画像（fMRI）により正確にモニターできる可能性が浮上してきた。本研究では当初、TMSが脳活動に与える影響を、信号検出原理に血流を介さないfMRI手法として提唱されている（Le Bihan et al. 2006）拡散強調fMRI法（DfMRI）を用いて測定する実験を計画したが、その後の研究の進展によりDfMRI信号がBOLDあるいは血管容積変化の影響を受けている可能性が完全には否定できなくなったため、DfMRIとBOLD-fMRIを用

いた実験を並行して行った。花川（国立精神・神経セ）は、BOLD-fMRIを用いて一次運動野に対する単発刺激TMSの影響を誘発筋電図（MEP）の変化と合わせて詳細に検討し（実験1）、共同研究者の阿部、浦山、美馬ら（京都大学）はDfMRIを用いて一次運動野に対する反復刺激TMSの影響を検討した（実験2）。

方法

実験1：8名の健常被験者において、単発TMS刺激を10-15秒の時間間隔で左一次運動野に与えた（Magstim Rapid, Magstim Company Ltd, Wales, UK）。刺激強度として、安静時運動閾値（rMT）の120%、活動時運動閾値（aMT）の90%、脳活動への影響のない機械出力の30%の3条件を用い、30%機械刺激条件ではTMS刺激にタイミングに合わせた手指の自発運動を行わせた。MRI撮像は3T装置（Trio, Siemens, Erlangen, Germany）と標準の頭部コイルを用いて行った。MRI同時計測用の8の字TMSコイルは、専用装置で強固に固定した。BOLD-fMRI撮像は、グラディエントエコー・エコープラナー法の変法であるstepping stone sequence法（Anami et al. 2003）を用いて、TR=998 ms、TE=25 ms、撮 像 単 位

3x3x4-mm³ボクセルの条件で行った。Stepping stone sampling法を応用して、MRI撮像中の筋電図 (EMG) を連続記録し、MATLABによる信号処理によりEMG潜時と積分値を自動計測した。FSL (Oxford大学) を用いてMRI画像の歪みとアーチファクト補正を行い、統計解析はstatistical parametric mapping (London大学) で行った。

実験2: 健常被験者12名の左一次運動野に対し、頻度1Hz、持続10分間の反復刺激TMS (rTMS) をrMTの90%の強度で与え (Magstim Rapid)、rTMS前後にDfMRIとMEPの測定を行った。MRI撮像は3T装置 (Trio) と標準の頭部コイルを用いて行い、8の字TMSコイルを専用装置で強固に固定した。DfMRI (撮像単位2x2x2-mm³ボクセル) は、300と1200 s/mm²の2種類のb値を用いて行った。DfMRI信号の変化は、statistical parametric mapping法と関心領域法を用いて検出した。

結果

実験1: Stepping stone sampling法を応用した記録と信号処理により (図1)、120%rMT刺激によるMEP並びに自発EMGの潜時と大きさ (EMG積分値) の半自動的定量化が可能に

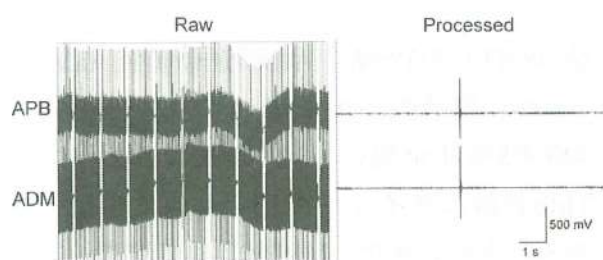


図1. fMRI計測中の120% rMT強度TMS刺激による誘発筋電図。拇指外転筋 (APB) と小指外転筋 (ADM) からの記録。生データ (Raw) ではfMRI撮像に伴うイメージングアーチファクトが著明だがアーチファクト除去後 (Processed) にはMEPの同定が可能。

なった。90%aMT刺激ではMEPを認めなかった。fMRIの解析では、30%刺激+自発運動条件において、一次運動野、一次・二次体性感覚野、補足運動野、運動前野など、運動計画・実行と運動に伴う固有知覚入力 of 解析に関わる領域の活動上昇を確認した。120%rMT刺激では、程度は弱いもののほぼ同様の領域に脳活動の上昇を検出した。一方、90%aMT刺激では、補足運動野と二次体性感覚野を中心に脳活動の上昇を認めたが、一次運動野や一次体性感覚野には目立った脳活動の変化を認めなかった。筋電図積分値に正の相関を示す領域として、120%rMT刺激では一次体性感覚野後方部、30%刺激+自発運動条件では運動前野から一次運動野にかけての部位が検出された (図2)。

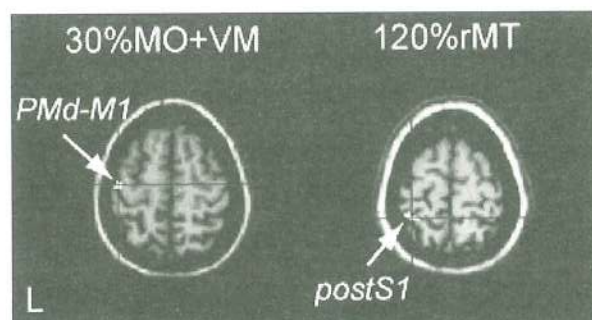


図2. 自発運動による筋電図の大きさは背側運動前野から一次運動野にかけての領域の活動と相関していたが、運動閾値上TMS刺激による誘発筋電図の大きさは、一次対性感覚野後方の脳活動と相関していた。

実験2: MEPは、rTMS刺激直後にはrTMS前の80%程度に抑制されたが、この抑制効果は刺激終了10分後には消失していた。刺激終了直後のDfMRI信号は、刺激直下の一次運動野を含め、補足運動野や刺激反対側の運動前野に相当する領域など複数の運動関連領域で変化していたが、この変化は刺激終了10分後にはほぼ消失していた。

考察

BOLD型fMRIとTMSの同時計測下に、一次運動野に運動閾値上と閾値下の強度でTMS刺激を与えると、補足運動野などの直接刺激を与えていない遠隔領域の活動が閾値下刺激でも検出されるのに対し、直接刺激される一次運動野の活動は閾値上刺激でないと検出できない(花川と美馬)。本研究はこの結果を再現し、さらに自発運動とTMSによる誘発運動では、筋電図の大きさと相関する脳活動を示す領域が乖離することを示した。このことは、自発運動とTMSによる誘発運動では、運動生成と運動に伴う固有知覚評価のメカニズムのいずれかあるいは双方に相違点があることを示唆する。この相違点の少なくとも一部は、自発運動では運動生成に伴い運動指令のコピーが発生するのに対し、TMS刺激ではそれが生まれないことと関係する可能性がある。また、DfMRIを用いた測定では、TMSによる脳活動の抑制がDMRI信号の変化として検出できることが明らかになった。TMSとfMRIの同時測定は、TMSによる脳活動修飾のメカニズムを明らかにし、TMSをより確実な脳機能探究のツールとして用いるために、今後ますます重要になると考えられる。

発表

経頭蓋磁気刺激と磁気共鳴機能画像同時計測による誘発領域間連関画像法の基礎的検討. 第1回運動制御研究会, 岡崎, 6.28, 2007
fMRIと脳波・筋電図または経頭蓋磁気刺激・筋電図の同時計測に関する基礎的検討. 第37回日本臨床神経生理学会・学術大会, 宇都宮, 11.22, 2007
Hunan Brain Mapping 2008 (発表予定)

文献

Allen EA, Pasley BN, Duong TD, Freeman RD: Transcranial magnetic stimulation elicits coupled neural and hemodynamic consequences. *Science* 317: 1918-1921, 2007
Anami K, Mori T, Tanaka F, Kawagoe Y, Okamoto J, Yarita M, Ohnishi T, Yumoto M, Matsuda H, Saitoh O. Stepping stone sampling for retrieving artifact-free electroencephalogram during functional magnetic resonance imaging. *NeuroImage* 19:281-295, 2003
Le Bihan D, Urayama S, Aso T, Hanakawa T, Fukuyama H: Direct and fast detection of neuronal activation in the human brain with diffusion MRI. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8263-8268, 2006
花川隆、美馬達哉: 経頭蓋磁気刺激と脳機能画像の同時計測. *臨床脳波* 48: 665-670, 2006

磁気刺激による次世代ECT（電撃けいれん）療法の ための基礎研究

(Preparatory investigation in quest of magnetic application for electroconvulsive therapy.)

〒920-0293 石川県河北郡内灘町大学1-1

金沢医科大学・生理機能制御学 加藤伸郎

目的

電撃けいれん療法（ECT）は、うつ病や統合失調症の治療において絶大な効果を発揮する。ECTにおいて発現が高まる分子群については、分子生物学的研究が進められ、(1) 神経栄養因子BDNFに関連した分子群、(2) アラキドン酸代謝に関連した分子群、(3) 足場タンパク質であるHomer1a、の3つの分子群が強く発現してくることがコンセンサスとなっている。ところが、これらの分子群が、実際の脳内でどのように働き、個々のニューロンにどのように作用するか、という生理学的側面についてはほとんど知られてこなかった。我々はここ数年来、上記(3)で挙げたHomer1aにターゲットを絞って、生理学的解析を実行してきた。これまでに、大脳皮質視覚野から作製した脳スライス上にてこのタンパク質を錐体細胞に注入すると、①新皮質錐体細胞を過分極させること [1]、および②カルシウムスパイク発射が促進されること [2] を見出した。このうち、①の過分極作用はベンゾジアゼピンのGABA受容体促進作用と類似しており、ECTの抗不安作用を良く説明する。また、これら①過分極と②カルシウムスパイク促進の両者が同時に起こるとシナプス

効率抑圧に至ることが、これまでのシナプス可塑性の実験的・理論的研究から強く予測される。この予測を実証するため、これまで使用してきたラット大脳皮質視覚野の脳スライスを用いて、シナプス抑圧の誘導性についてパッチクランプ法にて調べた。

これと平行する第二の課題として、マイルドに電撃を代替できることが期待される磁場刺激を使用するための準備を意図し、これまでのサイン波電流刺激に代えて矩形パルス波による電撃パターンの効果を調べた。磁場刺激の反復では、脳内に惹起される電流波形はサイン波よりも反復矩形パルスに近いと考えたためである。

方法

すでに報告している方法 [3] にて脳スライスを作製し、パッチクランプ法を使って、ラット視覚皮質錐体細胞より電位固定記録下でシナプス電流を計測した。標準的プロトコルを使ってシナプス抑圧を引き起こし、これをコントロール対照群とした。ECTを施したラットからスライスを作製し、同様にシナプス抑圧を引き起こして、これをテスト例とした。

反復矩形パルスの効果は、マウスを使った行動実験によって調べた。これまで使用していたECTと同様に両耳間に電流を流した。これを一日一回、連続して3日間賦課した。マウスは毎日10分間の強制水泳試験に供せられた。強制水泳試験は、うつ状態の程度を反映すると考えられているテストである。強制水泳による総移動距離を、うつ状態の指標として採用した。

結果

ECT施行後のラットから脳スライスを作製すると、シナプス抑圧が縮小していた。この縮小は、細胞内への抗Homer1a抗体の注入によって阻止された。また、Homer1aの細胞内注入だけでも、ECTを施行することなくシナプス抑圧を縮小させたので、Homer1aがECT効果のメディエーターとなっていることがわかった。

ECTを施さないコントロール例では、水泳試験を連日課することにより、総水泳距離が短縮していった。これは強制水泳モデルにおける抑うつ状態が深化していったことを意味する。矩形波パルスを2日目連日賦課し、その上で強制水泳させた。ECTを施さないコントロール群 (N=4; $41.0 \pm 10.2\text{m}$) と比べ、施行群 (N=5; $69.3 \pm 10.0\text{m}$; $P < 0.05$) では2日目に総水泳距離が有意に延長していた (Fig.1)。これは、抑うつ状態の進展が、今回用いた反復矩形パルス電流によるECTによって抑止されたことを意味する。

考察

本研究により、(1) ECTがシナプス可塑性のひとつであるシナプス抑圧に影響を与えること、および (2) 反復パルス波によるECTでも抑うつ行動への改善効果が実現できることが明らかとなった。ECTのもたらす種々の神

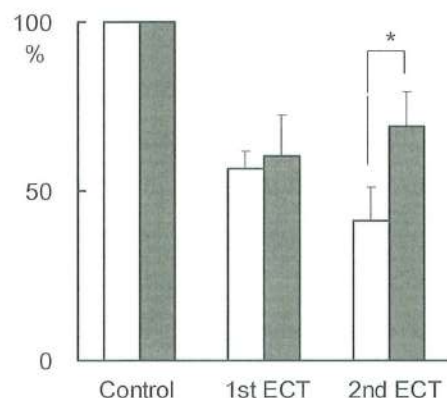


Fig.1 : ECTによる水泳距離延長。コントロール群 (空白バー) とECT施行群 (濃色) において3日連続で強制水泳試験を行った。2日目 (1st ECT) と3日目 (2nd ECT) にはECTを施行して4~5時間後にテストした。水泳距離は、個体ごとの1日目 (Control) の結果を基準としてパーセント表示した後に、平均した。3日目では、ECTの有意な効果が確認された。

経生理学的変化を明らかにすべく、我々は研究すすめてきた。(1) は、この研究の一環として得られた結果であり、ECTにおけるHomer1aの働きをさらに明確化し、ECTの神経生物学的理解を深めた。

一方我々は、ECT手技の侵襲性を低めて同等の効果を得るための研究もすすめている。そのために磁場刺激の応用を展望している。本研究をその応用をめざすための基礎研究と位置づけて、まずは単純なサイン波の交流電流によるECTに代えて、矩形波電流によるECTを施行し、(2) の結果を得た。すなわち、このタイプのECTでもモデルうつ病動物への行動改善効果のあることを見出した。磁界を反復してオン・オフすることによる刺激がECTを代替する可能性が示唆された。この基礎実験の結果を踏まえて、実際の磁場刺激の利用をすみやかに試行したい。

文献

- [1] . Sakagami ,Y., Yamamoto, K., Sugiura, S., Inokuchi, K., Hayashi, T., Kato, N.: Roles of Homer-1a in homeostatic regulation of pyramidal cell excitability: a possible link to clinical benefits of electroconvulsive shock. *Eur. J. Neurosci.*, 21, 3229-3239 (2005) .
- [2] . Yamamoto, K., Sakagami, Y., Sugiura,S., Inokuchi, K., Shimohama, S., Kato, N.: Homer 1a enhances spike-induced calcium influx via L-type calcium channels in neocortex pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.*, 22, 1338-1348 (2005) .
- [3] . Ueta, Y., Yamamoto, R., Sugiura, S., Inokuchi, K., Kato, N.: Homer 1a suppresses neocortex long-term depression in a cortical layer specific manner. *J. Neurophysiol*, 99, 950-957 (2008) .

磁場印加によるP19細胞分化制御の基礎研究

(Fundamental study of differentiation control on P19 embryonal carcinoma cells by magnetic field exposure)

〒277-8563 千葉県柏市柏の葉5-1-5

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 神 保 泰 彦

目的

マウスの胚性癌腫細胞であるP19細胞は、多能性幹細胞のモデル細胞として、特に神経細胞、心筋細胞の発生・分化研究に広く利用される細胞株である。本研究では、このP19細胞を用いて、①未分化時、②分化誘導時、③神経分化時の各培養条件下における磁場印加がP19細胞の増殖能および神経分化能に及ぼす影響を形態的な変化から調べる。また、ここで得られた結果をもとに、磁場印加の多能性幹細胞の分化制御への応用、および中枢神経再生の可能性について検討する。

方法

細胞試料および分化誘導法

未分化時のP19細胞（図1）の培養は、基本培地として α MEM（Gibco社）に10%（v/v）牛胎児血清（FBS）（Gibco社）、1%（v/v）penicillin-streptomycin solution（Gibco社）を加えたものを使用し、5 mlの培地に 2×10^5 cellの細胞密度で2日おきに継代しながら行った。なお、培養は37℃、5%CO₂のインキュベータ内で行った。また、神経細胞への分化誘導法は、McBurneyの方法〔1〕をもとに行った。

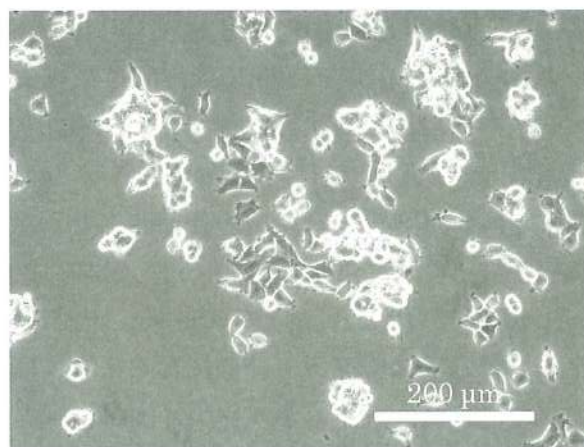


図1

方法は以下のとおりである。まず、未分化P19細胞を培養2日目にtrypsin-EDTA処理にて回収し、回収した細胞（ $\approx 2 \times 10^5$ cell）を直径100 mmのバクテリアディッシュ（Fisherbrand社）へ10 mlの培地に 10×10^5 cellの細胞密度で再播種した。この際、 $1 \mu\text{M}$ のall-trans retinoic acid（Sigma社）を培地に加え、4日間浮遊培養を行うことで胚様体（Embryoid Body: EB）を形成させた（図2）。4日後にこの胚様体を回収し、あらかじめPolyethyleneimine（PEI）をコートしておいた直径35 mmのPolystyrene製のディッシュ（Corning社）へ再播種し、胚様体から分化し生じる神経細胞の形態的な変化を観察した。

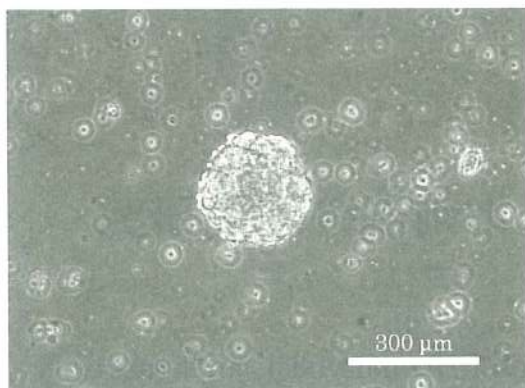


図 2

磁場印加方法

本研究では、静磁場 (Static Magnetic Field: SMF) および極低周波変動磁場 (Extremely Low Frequency Magnetic Field: ELFMF) を使用した。なお、SMFは永久磁石、ELFMFはヘルムホルツコイルを使用し、共にインキュベータ内に設置した状態で行った。磁場印加期間は、未分化時 (3日間)、分化誘導時 (4日間)、神経分化時 (3日間) の各期間中とした。磁場強度 (磁束密度) については、SMFは20 mT, ELFMFは2 mT_{rms} (周波数50 Hz, 正弦波) とし、細胞培養環境下で一様になるように印加した。また、ヘルムホルツコイルは、通常培養時に使用するインキュベータとは別のインキュベータに設置し、環境温度を2対のコイル間 (ディッシュの配置位置) にて 37 ± 0.5 °C となるように恒温水循環によって調整した (図3)。

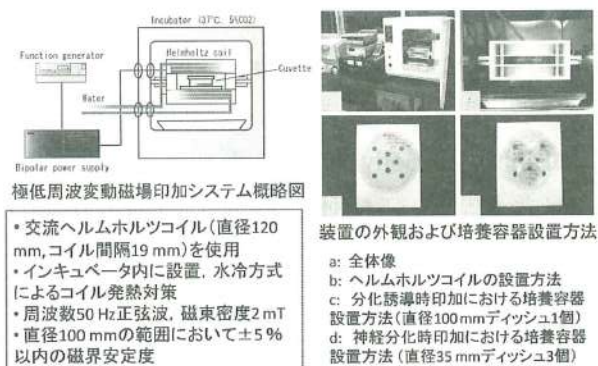


図 3

増殖速度および細胞形態変化の評価方法

細胞の増殖速度は、培養24時間、48時間、72時間の各時点での血球計算盤を用いた細胞数カウントによって算出した。形態変化については、分化の指標として神経分化時に胚様体から伸長する神経突起の長さを24時間ごとに72時間まで位相差顕微鏡像より測定し、神経突起の長さが胚様体の半径の1/2以上のもので、かつ、突起の先端部において初期の成長円錐様の構造が確認できるものについて分化有効と判断し、分化効率を算出した。また、同様の試料について、胚様体をtrypsin-EDTA処理により単一細胞へと分散させた後、分散培養下における神経突起伸長速度を算出した。なお、各磁場印加試料との比較試料として、非磁場印加 (Control) 試料を用意し、SMF群と同じインキュベータ内で培養した。

結果

未分化時の増殖速度への磁場の影響

未分化P19細胞への磁場印加による細胞増殖速度を培養24時間から72時間まで細胞数を測定することにより求めた結果 ($n=4$) (図4)、培養72時間の試料について、Control群と比較して増殖速度がSMF群はわずかに低下、ELFMF群はわずかに上昇する傾向がみられた。しかし、Control群と磁場印加群の間に有意的な差はみられなかった。また、未分化

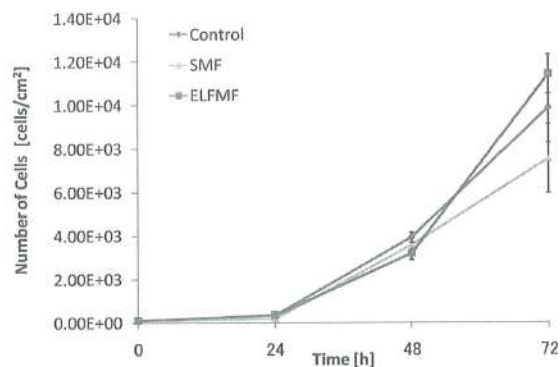


図 4

P19細胞の各試料間での細胞形態の違いを観察した結果、形体的な違いは確認できなかった（図5）。

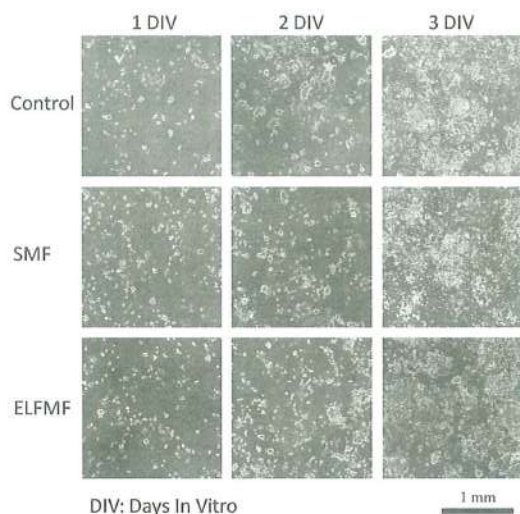


図 5

分化誘導時の胚様体形成への磁場の影響

分化誘導時における磁場の影響を調べた結果、形成される胚様体の大きさについて、ELFMF系がControl系と比較して平均で約1/2ほどの大きさとなることを確認した（n=4）（図6）。

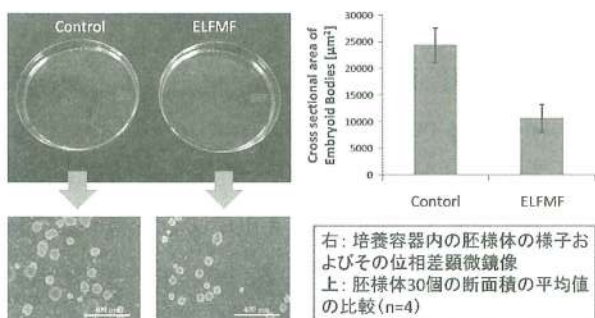


図 6

神経分化への磁場の影響

分化誘導後に胚様体をPEIコートディッシュに播種し、Control群、SMF群、ELFMF-S（分化誘導時磁界印加）群、ELFMF-D（分化時磁界印加）群の4つの試料について神経分化効率を求め、比較した（n=4）（図7）。その結果、Control群と比較して、ELFMF-S群につ

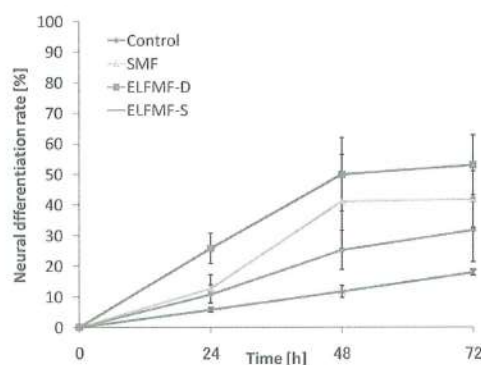


図 7

いては分化効率が低下し、ELFMF-D群については分化効率が上昇する傾向がみられた。さらに、Control群とELFMF-S群の胚様体をトリプシン処理により単一細胞に分散させて比較した結果（図8）についても同様に

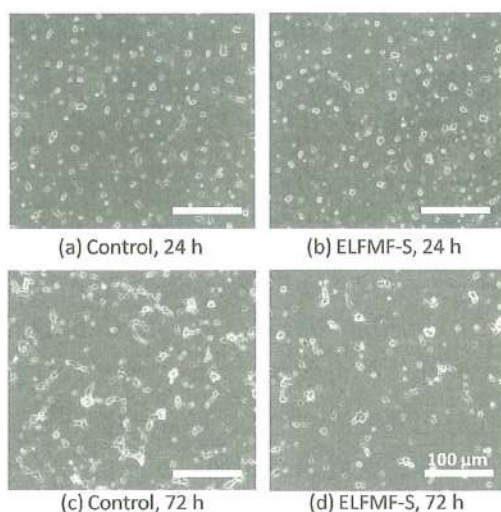


図 8

ELFMF-S群の分化効率が低下する傾向がみられた。また、SMF群については、Control群よりわずかに高い傾向を示したが、有意的な差はみられなかった。さらに、同様の4つの試料について、神経突起伸長速度を調べた結果（n=4）（図9）、ELFMF-D群のみについては、Control群よりも突起伸長速度が速くなる傾向がみられ、SMF群、ELFMF-S群についてはControl群との差はみられなかった。

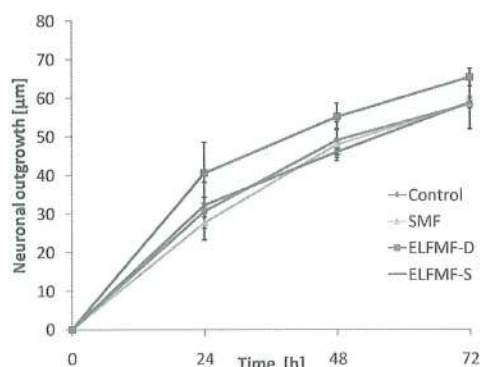


図 9

考察

今回、P19細胞を使用し、静磁場および極低周波変動磁場が①増殖速度、②胚様体形成、③神経分化に及ぼす影響を形態的な変化を指標として調べた。その結果、静磁場については、増殖速度、神経分化（分化効率、神経突起伸長速度）への影響はみられなかった。極低周波変動磁場については、増殖速度には影響はみられないものの、胚様体形成および神経分化にいくつか有意な影響がみられることを確認した。各々の影響について以下にまとめる。（i）胚様体形成について、Control群に比べて胚様体の大きさについて差がみられた。（ii）分化効率について、Control群と比較して分化誘導時に磁界を印加した系については分化効率が低下し、分化誘導後の神経分化の際に磁界を印加した系については分化効率が上昇する傾向がみられた。（iii）神経突起伸長速度について、神経分化時に磁界を印加した系についてのみControl群に比べて神経突起伸長速度が促進された。上記の結果より、極低周波変動磁場は分化誘導時の胚様体形成時の運命づけの段階において、胚様体、もしくは誘導剤を介して神経分化に関わる細胞内シグナル伝達を抑制する可能性が示唆された。また、神経分化時においては、神経細胞が成熟していく段階において突起伸長を促進させる作用をもつ可能性が示唆された。

本研究で用いたP19細胞から分化した神経細胞は、形態的・機能的にもES細胞のような多能性幹細胞より分化した神経細胞と極めて似ていることが知られている。そのため、本研究で示唆された極低周波変動磁場印加によるP19細胞の神経分化の抑制・促進は、多能性幹細胞の細胞分化制御機構においても有効な効果をもたらすことが考えられる。また、本研究で得られた知見により、これまでのいくつかの報告 [2] [3] にあった磁場印加による末梢神経再生に加え、中枢神経再生についても同様の効果が期待できることが示唆された。

発表

斎藤 淳史, 高山 祐三, 森口 裕之, 神保 泰彦, “静磁界およびELF磁界が胚性癌腫細胞P19の細胞分化に及ぼす影響”, 電気学会医用・生体工学研究会, MBE-08-40, 東京, 2008.

文献等

- [1] M. W. McBurney, “P19 embryonal carcinoma cells”, *Int. J. Dev. Biol.*, Vol. 37, pp. 135-140, 1993
- [2] E. H. McFarlane, et al., “Changes in neurite outgrowth but not in cell division induced by low EMF exposure: influence of field strength & culture conditions on responses in rat PC12 pheochromocytoma cells”, *Bioelectrochemistry*, Vol. 52, pp. 23-28, 2000
- [3] A. A. Al-Majed, et al., “Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration”, *J. Neurosci.*, Vol. 20, pp. 2602-2608, 2000

平成19年度 研究助成テーマ

平成19年度は、以下のように、基礎3名・応用1名・テーマ指定3名の研究に対し助成が決定いたしました。

I. 基礎研究

I-1. 磁場の抗腫瘍効果に及ぼす影響

東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座／鈴木 勇司

I-2. 畜産・食品廃棄物に含有する動物用抗菌剤の磁気分離

神戸大学大学院 農学研究科／井原 一高

I-3. 特殊配列磁石による血流制御とその分子機構解明

大阪市立大学大学院 医学研究科 分子病態学／井上 正康

II. 応用研究

II-1. 有機磁性体を利用した新規ドラッグデリバリーシステムの開発と抗がん作用について

横浜市立大学 医学部 循環制御医学／黒谷 玲子

III. テーマ指定研究

III-1. 反復的経頭蓋磁気刺激法を用いた統合失調症の認知機能改善に対する治療法の開発

大阪大学大学院 医学系研究科 精神医学教室／石井 良平

III-2. 反復経頭蓋磁気刺激法によるヒト大脳皮質可塑性の機序の解明と治療応用に関する基礎的研究

福島県立医科大学 医学部 神経内科／宇川 義一

III-3. 強磁場を用いた精子アクロソーム反応の制御及び作用メカニズムの解析

筑波大学大学院 システム情報工学研究科／中川 秀紀

なお、所属は研究助成決定当時のものです。

