

# 助成研究成果 報告書

平成19年度

(研究期間：平成20年4月1日～平成21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. 磁場の抗腫瘍効果に及ぼす影響 .....	3
	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・食品廃棄物に残留する動物用抗菌剤の高勾配磁気分離 .....	6
	神戸大学 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 .....	9
	大阪市立大学大学院 医学研究科 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 .....	11
	横浜市立大学 医学研究科 黒 谷 玲 子
Ⅲ. 指定テーマ研究	
Ⅲ-1. 統合失調症の安静閉眼時における律動脳磁場活動変化の検討 —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を目指して— .....	14
	大阪大学大学院 医学系研究科 石 井 良 平

Ⅲ-2. 経頭蓋反復磁気刺激法による	
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 ……………	17
福島県立医科大学 医学部神経内科学講座	
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および作用メカニズムの解析 ……………	20
筑波大学大学院 システム情報工学研究科	
中川 秀紀	
平成20年度研究助成テーマ ……………	24

## 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

生物は、長い進化の歴史を地球の磁気に囲まれて過ごしてきた。生活環境には地磁気だけでなく、岩石の残留磁気や落雷時の電流による磁気もある。生物にとって避けられない磁気が、生きる上でどのように作用しているのかについては、古くから大勢の人が関心を持ち、研究がなされてきた。その作用は「こうすればこうなる」というように単純に記述できるものではないのだが、完全な理解に到達しないままに病気の治療や健康の増進を目的としてさまざまな応用が試みられ、多くの経験的な知識が集積されている。

実際、磁気を応用した健康と治療の機器、技術が、一部の国では盛んに試みられている。わが国においても、医療費の増加等の情勢の変化に伴って、その役割がしだいに重要になっていくものと予想される。さらに最近の医療技術においては、単に自然界と類似の磁界を加えるだけでなく、人工磁石や強力な磁界、あるいは交流磁界を利用することによって、体内のさまざまな現象を誘発し、加速・減速するなどの作用を与え、診断と治療に役立てることが研究されている。

本財団はこのような情勢に基づき、生体磁気現象を通して国民の医療と健康に貢献することを目的として、学術研究を助成し、講演会を開催するなど、社会に向けた活動をしている。しかし磁気的作用は、基礎的現象から始まり、体内の複雑な相互作用への関与を通して生じるものであり、短期間の実験試行ではなく、長期間腰を落ち着けて追求して初めて明らかにされることが多い。

一方昨今の学界においては、短期間に成果を挙げ、学位や業績に結びつけようとする雰囲気強く、原因結果の関係が明白な現象や、客観的に説明できる現象に関心が集中するよう見受けられる。これに対して本財団は、性急に成果を求めようとするよりも、長期間にわたる努力を覚悟して特定の問題に取り組む学究の徒を支援したいと考えている。

この報告書は、平成19年度に助成した研究の報告書を、原文のままにまとめたものである。基礎面から実際の応用にいたる広い範囲の研究が含まれているが、いずれもこの領域に新しい道を拓くことを目指している。この報告書が契機になって、志を同じくする研究者の間に連絡が始まり、磁気健康科学の発展に貢献することを期待している。

# 磁場の抗腫瘍効果に及ぼす影響

( Influence on antitumor effect of static magnetic field )

\* 東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座 鈴木 勇 司  
鉄道総合技術研究所 環境工学研究部 生物学 池 畑 政 輝

## 目的

我々はこれまでに、抗がん剤や放射線の染色体異常誘発性を静磁場が増強することを明らかにし、そのメカニズムの一つとしてフリーラジカルの関与を明らかにした<sup>1)~3)</sup>。

本研究では、これまでの知見を応用し、静磁場が抗がん剤の抗がん効果を増強できるかを検証し、得られた結果が将来臨床応用できるかを評価することを目的とした。

## 方法

### 1. 静磁場の制がん効果

DBA/2NCrCrIマウスにL1210細胞（リンパ球性白血病細胞（図1-1）；ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分与された）を継代維持した。制がんスクリーニングでは、Jcl:BDF1マウス

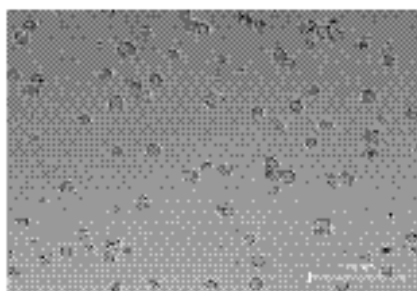


図 1 - 1 L1210 細胞

ス6-8匹にL1210細胞（ $10^6$ 個/マウス）を移植し、直ちに5テスラ（T）の超電導磁石（東芝製、図1-2）内に設置し、全マウスが死亡するまで均一磁場中で連続曝露を行った。

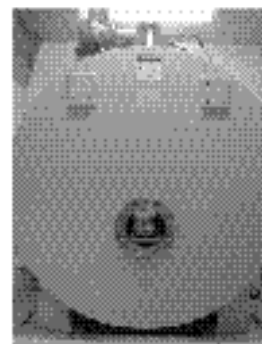


図 1 - 2 超伝導磁石

### 2. 抗がん剤と静磁場の複合曝露による制がん効果

BDF1マウス6-8匹にL1210細胞（ $5 \times 10^6$ 個/マウス）を移植し、1時間後にブレオマイシン（6mg/kg,日本化薬）を投与し直ちに5テスラ（T）の超電導磁石（東芝）内に設置し、全マウスが死亡するまで均一および勾配磁場中で連続曝露を行った。

### 3. 治療効果の判定

対照群に対する治療群の延命率を求めた。

延命率 =  $\{ (\text{治療群の総生存日数} \div \text{対照群の総生存日数}) - 1 \} \times 100 (\%)$

### 4. 静磁場による制がんメカニズム

10%牛胎児血清を添加したRPMI1640培養液を25ml入れた培養フラスコに、L1210細胞（ $10^7$ 個）を接種し、最終濃度が1.5または $3 \mu\text{g/ml}$ となるようにブレオマイシンを添加し、直ちに5Tの静磁場に曝露した。24時間曝露後の細胞を計数した後に、細胞のスミア標本の作製とDNA酸化損

傷の測定を行った。スミア標本は、May-Gr ü nwald Giemsa染色を施し、小核を有する細胞の割合を求めた。DNA酸化損傷は、細胞より全DNAを抽出し、加水分解後に8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG：活性酸素が誘発されると、遺伝子 DNA中のグアニン塩基が酸化損傷を受ける(図1-3)。8位の炭素が酸化されることにより、8-OHdG が生成される)を8-OHdG測定キット(JalCA)により定量した。

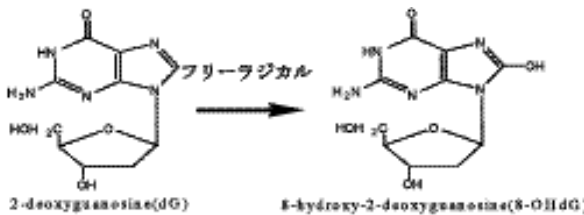


図1-3 8-OHdGの生成

## 結果

### 1. 磁場の制がん効果

図2に静磁場とプレオマイシンをそれぞれ曝露した時のL1210細胞に対する制がん効果を示した。また、図3に、静磁場とプレオマイシンそれぞれの延命率を示した。磁場単独で、16.5%の延命効果があった。プレオマイシン単独でも用量相

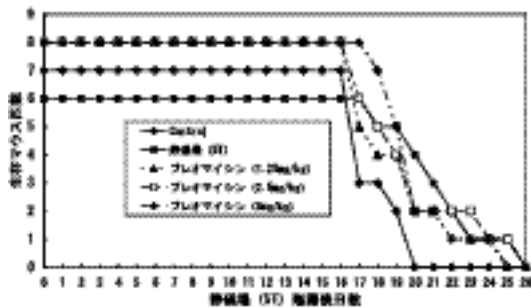


図2 静磁場とプレオマイシンの制癌効果

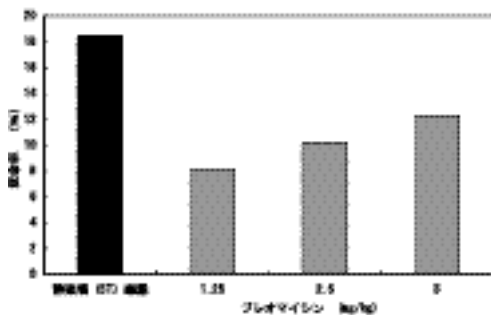


図3 静磁場とプレオマイシンの制癌効果

関性に制がん効果が認められた。

### 2. 抗がん剤と静磁場の複合曝露による制がん効果

図4に静磁場とプレオマイシンを複合曝露した時のL1210細胞に対する制がん効果を示した。また、図5に静磁場とプレオマイシンを複合曝露した時の延命率を示した。静磁場とプレオマイシンを複合曝露すると、27.9%の延命率が認められた。勾配磁場(34.6%)の方が、5Tの均一静磁場よりもさらに延命効果が認められた。

### 3. 静磁場による制がんメカニズム

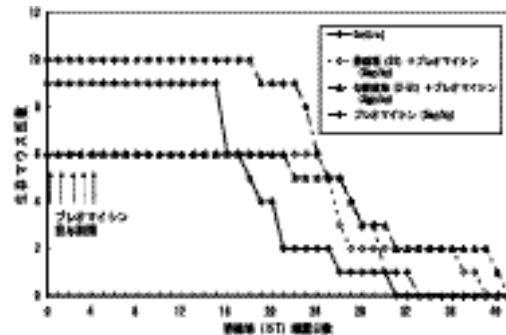


図4 静磁場とプレオマイシンを複合曝露したときの制癌効果

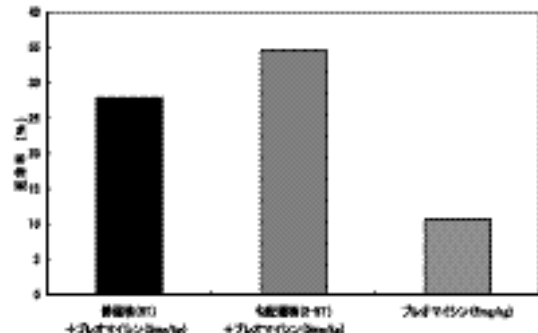


図5 静磁場とプレオマイシンを複合曝露したときの制癌効果

本研究では、in vitro実験による静磁場の制がんメカニズム解明を試みたが、小核および8-OHdGの誘発は認められなかった。

## 考察

本研究において、静磁場の抗がん修飾作用について検討した。その結果、静磁場自身に制がん効果が認められた。プレオマイシンと静磁場の複合曝露で、最大34.6%の制がん効果が認められ、これはNational Cancer Institute (USA)のDrug Research and Developmentに定められている薬剤の実験腫瘍に対する有効性の基準(延命率

25%)以上になっている。従って、静磁場はがん治療に有効な手段となりうる可能性がある。臨床診断にMRIが導入されており、今後静磁場をがん治療に応用していく上で有用と考えられる。今回用いた最も強い5Tよりも勾配磁場の方が強い制がん効果を示したことは、曝露条件に依存した効果である可能性があり、今後最適な静磁場曝露方法を検討していく必要がある。また、白血病由来細胞だけでなく、固形がんも含めた種々の腫瘍への効果を検討し、がんの種類に特異的な効果であるかどうか、また正常細胞に対する効果も検討する必要がある。さらに、抗がん剤についても、活性酸素を誘導するアドリアマイシンやX線など、複合曝露による治療効果が高いものを幅広く検討する必要がある。静磁場の制がんメカニズムについては、in vitro実験では証明できなかったことから、今後は、in vivo実験により検討を進めることが必要であるとともに、同様な効果を検出できるin vitro系の探索も進める必要がある。今後、これらの研究を推進することにより、抗がん剤の副作用を低減し、より強い制がん効果が期待できる手法を確立していきたいと考えている。

## 文献

- 1) Suzuki Y, Ikehata M, Nakamura K, Nishioka M, Asanuma K, Koana T, et al. Induction of micronuclei in mice exposed to static magnetic fields. *Mutagenesis* 2001; 427: 499~501.
- 2) Suzuki Y, Toyama Y, Miyakoshi Y, Ikehata M, Yoshioka H et al. Effects of static magnetic fields on the induction of micronuclei by some mutagens. *Environ. Health and Prev. Med.* 2006; 11: 119-121.
- 3) Asanuma K, Agata T, Nakamura Y, Naruse S, Suzuki Y, Shimizu H. A study of the health effects and electric magnetic fields. *Jikeidaishi* 2006; 121: 119~132.

# 畜産・食品廃棄物に残留する 動物用抗菌剤の高勾配磁気分離

( High Gradient Magnetic Separation of Veterinary Antibiotics in Agri-Food Wastes )

神戸大学 農学研究科 井原 一 高

## 目的：

畜産業において、疾病の治療そして成長促進を目的として動物用抗菌剤は広く利用されており、畜産物の安全性確保と生産性の向上に寄与している。我が国における抗菌剤（抗生物質および合成抗菌薬）の使用量は、2,000tを超えていると推定される（2001年）。畜産業で使用される抗生物質は動物用医薬品および飼料添加物としての利用を合計すると全体の6割を占め、医薬品として人に投与される量よりも多い実態がある。一方、一部の不適切な抗菌剤の使用は、薬剤耐性菌の発生の恐れがあることが指摘されている。畜産業における抗菌剤の使用と、家畜から人間へ移行する薬剤耐性菌との関係は複雑であり、解明されていない部分も多い。最近、我が国において家畜に使用されたと考えられる動物用抗菌剤が糞尿等を通じて排出され、河川等から検出された例が報告されている。一般に家畜に投与された動物用抗菌剤は、代謝によって一部分解されるものの大半は排泄されると考えられる。薬剤耐性菌の発生拡大を避けるためには、使用量の多い動物用抗菌剤の環境への拡散を防ぐことが重要であると考えられる。畜産業において畜産糞尿処理は極めて重大な課題であるが、その処理過程において、残留する動物用抗菌剤を分離・除去することが望ましい。磁気分

離法は、磁気シーディング法（磁性付与法）の応用により、対象物質を選択的に除去できる利点を持つ。動物用抗菌剤に磁気分離法を適用する場合、その磁化率は小さいことから、何らかの磁性シーディング法が求められる。本研究では、電気化学的手法による磁気シーディングを用いて、動物用抗菌剤を磁気力によって選択分離する方法について検討を行った。

## 方法：

実験対象の動物用抗菌剤として国内使用量が多いテトラサイクリン系抗生物質（オキシテトラサイクリン（OTC）、テトラサイクリン（TC）、ドキシサイクリン（DC）、クロルテトラサイクリン（CTC））を用いた。さらに比較のためにセファロsporin系抗生物質（セファゾリン、セフジニル）を対象とした。抗菌剤100mgと支持電解質として1.0gのNaClを100mlの蒸留水に溶かし、供試サンプルとした。pH調整には1MのNaOHもしくはHClを用いた。陽極は鉄もしくはアルミニウム、陰極は鉄とし、電解凝集を1.5Aの定電流で1分間実施した。サンプルを攪拌した後、強磁性粉であるマグネタイト（四酸化三鉄）を50mg加え、攪拌した。サンプルの入った100mlのガラスビーカーの下に、表面磁束密度4,400gaussのネオジ



ム磁石をセットし、静置した。5分後、上澄みを磁気分離サンプルとして採取した。抗菌剤はキャピラリー電気泳動システム (Agilent, G1600A) を用いて分析した。

## 結果および考察：

鉄電極を用いた電解凝集によって、水酸化鉄フロックが生成した。1分間の電解凝集後にマグネタイトを添加するとフロックに対して比較的良好に吸着した。ピーカーの下に設置したネオジウム磁石によって、マグネタイトが絡んだ鉄電解フロックは急速に分離された。表1にテトラサイクリン系およびセファロsporin系抗生物質の磁気分離の結果を示す。4種類のテトラサイクリン系抗生物質およびセフジニルの除去率は78%以上を示した。鉄電極による電解凝集とマグネタイト添加による磁気シーディングは、オキシテトラサイクリン系抗生物質およびセフジニルの磁気分離に有効であることが示された。テトラサイクリン系抗生物質は、金属キレートを生じやすい性質を持つことが知られている。また、セフジニルも同様の性質が指摘されている。鉄電極を用いた電解凝集によって、鉄とのキレート物質（錯化合物）が生成されたと推定される。鉄電解は同時に吸着性に富んだ水酸化鉄コロイドを生成することから、両者が一体となって磁気分離に寄与したことが示唆された。対照的に、セファゾリンについては18.7%と低い除去率であった。これは、鉄との錯化合物の生成によるものではなく、電解生成された水酸化鉄に一部が吸着したためであると考えられる。鉄キレートおよび水酸化鉄コロイドは常磁

性であると考えられるため、永久磁石による磁気分離を実現するには磁化率が小さい。強磁性であるマグネタイトの添加は、分離に必要な磁気力の拡大に効果的であった。

実際の畜産廃水には、糞尿等の様々な成分が共存している。そこで、畜産業において排出量の多い搾乳施設（ミルクパーラ）排水に対し、3種類のテトラサイクリン系抗生物質を添加し、電解磁気シーディング法による磁気分離試験を行った（図1）。本実験で供試した搾乳施設排水には廃棄乳こそ混入していないものの、糞尿に加え洗浄剤が含まれている。初期濃度が100mg/Lになるよう抗生物質を添加し、pHを調整しない場合と塩酸を加えpH5.2に調整した場合で除去率を比較した。pH7.2の場合は、各抗生物質の除去率は約60%であったが、pH5.2の場合は、93%以上の高い除去率を示した。pHの影響を大きく受けた理由として、金属と抗生物質との錯化合物の安定性が挙げられる。実際の畜産廃水は中性を示すことが多いことから、電解磁気シーディング法を適用して抗生物質の分離を試みる場合は、適切なpHでの分離処理が重要である。なお、pH調整をしても畜産廃水には数mg/Lの抗生物質が溶存していることになり、食品等の残留基準から比較すると高い水準にある。しかし、排出量削減の観点から、排出源で分離・除去を行うことの意義は大きいと考えられる。

表1 電解磁気シーディングによる抗生物質の磁気分離

Class	Substance	Removal (%)	pH (-)	Iron-chelating
Tetracycline	Oxytetracycline	89.3	3.93	+
	Doxycycline	80.3	3.92	+
	Chlortetracycline	78.1	3.88	+
	Tetracycline	93.2	3.89	+
Cephalosporin	Cefdinir	88.0	6.42	+
	Cefazolin	18.7	7.75	

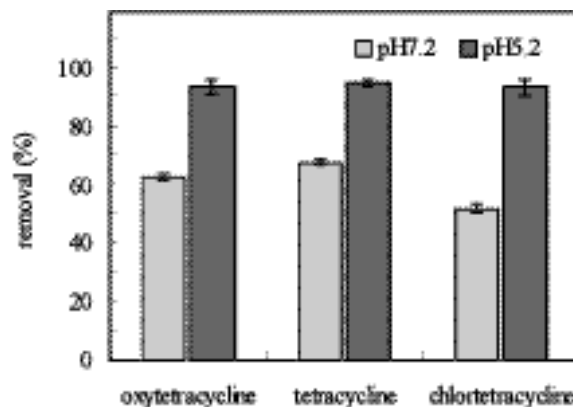


図1 搾乳施設排水に添加した抗生物質の磁気分離

## 発表・発表予定：

Ikko IHARA, Kiyohiko Toyoda, Kazutaka Umetsu, Magnetic separation of tetracycline antibiotics with electrocoagulation using iron electrodes, 3rd International Workshop on Materials and Analysis and Processing in Magnetic Fields, p.59 (2008) .

Ihara, K. Toyoda, N. Beneragama and K. Umetsu, Magnetic separation of antibiotics by electrochemical magnetic seeding, Journal of Physics: Conference Series 156 (2009) 012034

井原一高、豊田浄彦、北幹子、梅津一孝、畜産廃水浄化のためのテトラサイクリン系抗生物質の磁気分離 - 電解磁気シーディング法の検討 - 、農業機械学会関西支部報 第106号 (掲載予定)

井原一高、豊田浄彦、工藤幸会、梅津一孝、動物用抗菌剤の磁気分離を目的とした磁性ビーズの開発、農業機械学会関西支部報 第106号 (掲載予定)

# 特殊配列磁石による血流制御とその分子機構解明

( Study on The Mechanism of Vaso-relaxation by Specially Arranged Magnetic Device )

大阪市立大学大学院 医学研究科 分子病態学講座 井上正康

## 目的

磁場が生体に様々な影響を及ぼすことが予想されているが、その医学的効果に関しては不明な点が多い。申請者は、活性酸素や一酸化窒素（NO）による血流やエネルギー代謝の制御機構に関する研究に従事してきた。その中でスーパーオキシドラジカルとNOラジカルのバランスが動脈の収縮弛緩状態を制御し、正常時および異常時の血圧を左右している事を報告してきた。NOは血管平滑筋細胞のヘム含有酵素・グアニル酸シクラーゼを活性化してcGMP依存性にカルシウム濃度を低下させる事により血管を弛緩させる。強い磁場の近辺では磁性を有する鉄含有蛋白の機能構造が変化し、これにより様々な代謝が影響される可能性が考えられる。申請者は、「磁場による血流増加減少が、動脈壁の収縮弛緩に關与する鉄含有タンパク質のヘモグロビンやグアニル酸シクラーゼの機能的変化に起因する」との作業仮説を立て、その分子論的な解析を進めてきた。本研究は、鉄含有酵素の中でNOとの結合性が高く、両者の相互作用で酵素活性が修飾されるグアニル酸シクラーゼに着目し、その生理作用に対する特殊な磁場の影響を解析し、高齢者や生活習慣病患者の健康支援システムを構築することを目的とする。

## 方法

特殊磁石としては永久磁石のNS極を交互に配列したデバイス（15 x 15cmのプラスチック板に直径1cmの円盤状永久磁石を碁石状に36個配列したデバイス）を用いた。このデバイスの磁場を健常人の皮膚に接触させ、その前後で皮膚温度を測定して血流変化を解析した。体表温度は超高感度サーモトレーサTH7102MV（NEC）を用いた。ラットをペントバルビタール麻酔下で右側大腿動脈にカニューレを挿入し、全身血圧を経時的に測定した。血圧が安定した後、磁石デバイスを体表面に1cmまで近接させて血圧を測定した。その後、右側大腿静脈内にNO放出剤SNAPを0.1 mmol/kg投与し、血圧の変動を解析した。ラットの動脈を分離し、マグナス管中で酸素をバブリングしながら収縮弛緩動態を解析した。この際、動脈サンプルにNOガスを添加し、血管の弛緩動態を解析した。

## 結果

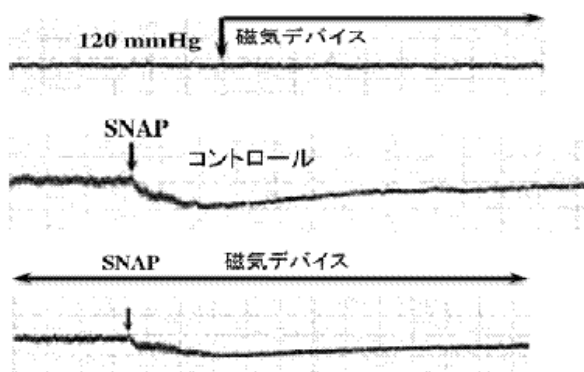
### 1) 健常ボランティアでの解析

室温（25度C）下で健常な男性ボランティアの皮膚表面にNS極交互配列デバイスを接触させ、その前後で皮膚の血流変化を超高感度サーモグラ

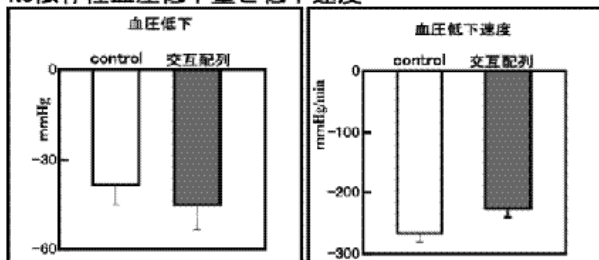
フィーで解析した。解析の結果、本デバイスを接触させた皮膚の部分の局所温度が優位に上昇する事が判明した。体表面に接触させたデバイスを取り去ると、体票温度は接触前の状態に回復した。この所見は、特殊配列デバイスの磁場により健康人の皮下血管が拡張して血流が増加した事を示唆する。

### 2) 動物モデルでのNO依存性血圧解析

正常血圧(120mmHg)を呈するラットにSNAPを0.1mmol/kg投与したところ、著明な血圧低下が観察された(図1)。磁石デバイスを体表面に近接させたのみでは血圧に有意な変化は認められなかったが、NOによる降圧効果はより顕著に観られた(図2)。



NO依存性血圧低下量と低下速度



### 3) 分離動脈標品での解析

ラットの腹部大動脈を分離し、マグヌス管内のリンゲル溶液に酸素をバブリングしながら動脈標品の収縮弛緩動態を経時的に解析した。動脈サンプルに微量のNOガスを添加すると、添加直後に著明な弛緩反応が誘起された。次にマグヌス管の側面に本デバイスを接近させた状態で同様の実験を行った。本デバイスを接近させたところ、血管のトーンに有意な変化は認められなかった。更に、NOガスを添加して血管の弛緩動態を解析

したが、この際に誘起される弛緩反応はコントロール群と有意な差が認められなかった。

## 考察

健康人に本デバイスを接触させると皮膚局所の温度が上昇する事から、本デバイスの磁場により皮下血管が拡張して血流が増加した事が示唆される。ラットでは本デバイスのみでは循環動態に変化が見られなかったが、ヒトでも全身血圧に対しては有意な変化は認められなかった。ラットでは本磁場環境下でNO依存性の降圧作用が増強されたことから、全身性にNOが作用する様な状況下では本デバイスによる循環動態を制御する事が可能と思われ、その可能性を検討する必要がある。

## 参考文献

- 1) M. Inoue, E. F. Sato, M. Nishikawa, K. Hiramoto, A. Kashiwagi, K. Utsumi. Redox Report 2004, 9, 237-247
- 2) Q. Li, E. F. Sato, Y. Kira, M. Nishikawa, K. Utsumi, M. Inoue. Free Radic Biol Med. 2006, 40, 173-181
- 3) M. Tsuchiya, E. Sato, M. Inoue, A. Asada. Anesthesia & Analgesia, 104, 301-307, 2008

# 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

( Development of a novel drug delivery system using an organ magnetic material and analysis of its anticancer effect. )

横浜市立大学 医学研究科 循環制御医学 黒谷 玲子

## 【目的】

同定した新規有機磁性体が抗がん作用を有することを明らかにし、磁場印加によって新規磁性体を腫瘍に送達させる抗がん剤の新たなドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発に取り組むことを目的とした。本研究で磁場印加による抗がん剤のDDSを確立し、将来的に大幅な副作用を軽減させるがん治療法として医療分野で貢献したい。

## 【方法】

### 新規有機磁性体による細胞傷害性の検討

有機磁性化合物による細胞増殖抑制効果の検討には、ラット前立腺癌細胞株R3327-G、ヒトメラノーマ細胞株MEL-24およびマウスリンパ腫細胞株AJ750細胞を利用した。細胞増殖抑制効果の評価は、MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)アッセイによる細胞数の計測によって評価した。24ウェルプレートの各ウェルに各細胞を $2 \times 10^4$ 個調整し、R3327-G細胞は、48時間、AJ750細胞は24時間培養した。続いて、有機磁性化合物を0-30 $\mu$ Mで培養液中に添加し、24時間後にMTT(同仁化学研究所、熊本)アッセイにより評価した。さらに、

R3327-G、MEL-24に対しTUNEL法(Promega, WI, USA)を用いてDNAのニックを検出した。8ウェルチャンバースライド(Nunc, 東京)の各ウェルに $1 \times 10^4$ 個の細胞を調整し、24時間培養後0-30 $\mu$ Mの有機磁性体で刺激をした。刺激後4%パラフォルムアルデヒドで20分固定し、PromegaのDeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometric TUNEL Systemのプロトコルに従ってTUNELを行った。最終的にDAPI(diamino-2-phenylindole)(1mg/ml)で核染色後、Nikon ECLIPSE TE2000-E(Nikon, 東京)で検出し、無作為に1選んだ10視野の細胞数を計測した。

### 腫瘍モデル動物作成の検討

吉田肉腫、LY-54細胞(ラット腹水肝細胞癌腫瘍)、R3327-Mat-Lu、R3327-AT2.1、R3327-G細胞(ラット前立腺癌)、MEL-24(ヒト悪性黒色腫)、AJ750(マウスリンパ腫)、CloneM3細胞(マウス悪性黒色腫)をDonryuラット、ヌードマウスの尾皮下に移植し、生着日数等を検討した。

## 【結果】

### 新規有機磁性体による細胞傷害性の検討

R3327-G細胞およびAJ750細胞は、有機磁性体の濃度依存的に細胞数が減少した。これに対し、TUNEL陽性細胞数は有機磁性体の濃度依存的に

増加した。一方、MEL-24細胞は、1.8-30  $\mu$ Mの有機磁性体で約15%程度の細胞数の減少しか認めず、TUNEL陽性細胞数も30  $\mu$ Mの有機磁性体刺激であっても約5%であった（図1）

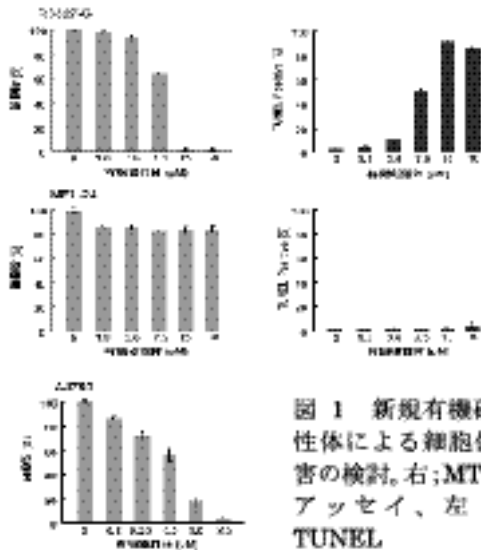


図1 新規有機磁性体による細胞傷害の検討。右;MTTアッセイ、左;TUNEL

### 腫瘍モデル動物作成の検討

LY-54細胞をDonryuラットの尾へ移植した結果、移植後4週間が経過しても尾に移植した腫瘍は小さく、腹腔内へ転移し、増殖していた。Copenhagenラットへの移植が報告されている前立腺細胞株R3327-AT2.1細胞、R3327-MAT-Lu細胞の腫瘍モデル作成を試みた。生着は非常に速くモデルとして利用価値が高いと考えた。最後にメラノーマの移植モデル作成を試みた。MEL-24細胞は、ラニン色素観察が非常に困難であり、メラニン産生が乏しいことが明らかになった。最後にCloneM3の移植を検討し、黒色腫が成長し、メラニン色素の観察により腫瘍の状態を観察できると考えられる結果が得られた。移植モデルマウスの検討については図2にまとめた。

癌細胞	移植細胞数(細胞)	移植動物	生着(日)	生着(種)	特徴
LY-54 ラット由来 骨肉腫	$2 \times 10^7$	Donryuラット	3	4	腹腔内へ転移
R3327-AT2.1 ラット由来 前立腺癌	$3.5 \times 10^7$	Copenhagenラット	3	2-3	早期転移 有腫瘍性(骨)付 着、増殖
R3327-MAT-Lu ラット由来 前立腺癌	$5 \times 10^7$	Copenhagenラット	3	2	早期転移 有腫瘍性(骨)付 着、増殖
Mel-24 ヒト由来 悪性黒色腫	$3 \times 10^6$	BALB/cマウス	-	2	増殖が鈍い メラニン産生なし
CloneM3 マウス由来 悪性黒色腫	$3.5 \times 10^6$	BALB/cマウス	3	3-4	有腫瘍性(骨)付 着、増殖 メラニン産生

図2 腫瘍移植モデル。尾皮下に移植。

### 【考察】

本研究では、複数同定した新規磁性体の候補物質に対し、電子スピン共鳴装置で磁性体であることが明らかになった有機磁性体に注目した。同定した有機磁性体が生物学的効果を有するならば、この有機磁性体自身が薬剤として効果を発揮するばかりか、磁場印加によるDDSに利用できると期待した。初めに、数種の腫瘍細胞株に対する有機磁性体の細胞傷害性を検討し、R3327-GとAJ750では濃度依存的に細胞数が減少し、DNAニックを呈した細胞数が増加したが、MEL-24では認められなかった。これは、腫瘍細胞株の増殖速度や細胞の付着性に依存する可能性がある。そこで、MEL-24細胞のような有機磁性体による細胞傷害性の効果の低い細胞に対しては、長期刺激を検討したいと考えている。

一方、動物での磁場印加による有機磁性体を利用したDDSを可能にするために、腫瘍モデル動物の検討を行った。LY-54細胞をHoltzmanラットの尾に移植したモデルを用いたDDSの研究が報告されているが<sup>1)</sup>、Holtzmanラットは入手不可能であった。そこで、LY-54の生着が確認されているDonryuラットの尾への移植を試みたが、腫瘍は主に腹腔内へ転移することが明らかになった。腹腔などの深部への薬剤送達には強力な磁場を発生する超電導磁石の開発が必要であると考えられたため、表皮への移植モデルの作成を試みた。R3327-AT2.1細胞、R3327-MAT-Lu細胞の移植には、Copenhagenラットの使用が多く報告されているが<sup>2)3)</sup>、Copenhagenラットの入手も困難であった。最終的に悪性黒色種の移植モデル作成を試み、CloneM3は、黒色腫の成長を認めたため、メラニン色素の観察による腫瘍の状態を観察可能であると考えられた。現在、Clone M3を尾静脈より移植し、肺での腫瘍の生着と成長が認められたため、左右どちらかの胸部からの磁場印加によって有機磁性体の効果を検討していきたいと考えている（図3）

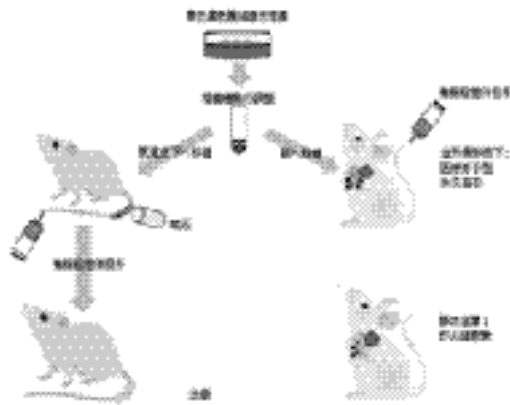


図3 マウス尾および肺への腫瘍移植モデルを利用した有機磁性化合物による DDS の作成と抗がん効果。

本研究で、新規有機磁性体が抗がん作用を有することが明らかになり、腫瘍モデル動物の条件が明らかになった。動物生体内で、磁場印加により目的の場所に有機磁性体の集積を可能にすることで、少量の抗がん剤をがん細胞に効率良く送達でき、将来的に投薬量と副作用が大幅に軽減される新たなDDSを確立できると期待している。

## 【文献】

- [ 1 ] K J Widder, R M Morris, G Poore, D P Howard, Jr, and A E Senyei Tumor remission in Yoshida sarcoma-bearing rats by selective targeting of magnetic albumin microspheres containing doxorubicin. Proc Natl Acad Sci U S A. 78 ( 1 ) : 579 - 581 1981.
- [ 2 ] Lubaroff DM, Culp DA. Experience with an animal model for the study of prostatic carcinoma. Trans Am Assoc Genitourin Surg 69:72-77 1977.
- [ 3 ] Vincent A. Bourke, Ph.D., Dawen Zhao, MD, Ph.D., Joseph Gilio, Ph.D., Cheng-Hui Chang, Ph.D., Lan Jiang, Ph.D., Eric W. Hahn, Ph.D., and Ralph P. Mason, Ph.D. Correlation of Radiation Response with Tumor Oxygenation in the Dunning Prostate R3327-AT1 Tumor Int J Radiat Oncol Biol Phys. 67 ( 4 ) : 1179 - 1186 2007.

# 統合失調症の安静開閉眼時における 律動脳磁場活動変化の検討

- 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を目指して -

( MEG differences between eyes-open and eyes-closed resting conditions in schizophrenia )

大阪大学大学院 医学系研究科 精神医学教室 石井良平

## 目的

統合失調症 (SCZ) に対する治療方法として薬物療法や精神療法などが挙げられるが、その一つに磁気刺激 (TMS) 治療法がある。このTMSを日常の臨床的治療に導入するにあたり、その有効性を確認するためにTMS治療前後の脳機能や臨床症状の評価が不可欠となる。これらの評価には従来からfMRIやPETなどの神経画像法が用いられているが、これらよりも時間分解能、空間分解能にすぐれた脳磁図 (MEG) も汎用されてきた。よって、TMS治療前後の脳機能を測定し、その治療の効果判定を行う際にMEGを用いることは有用であると考えられる。SCZへのTMS治療の導入にあたり、我々はまずMEGを用いたSCZの脳機能評価の確立を目指すため本研究を行った。

このSCZに対する脳機能研究において、近年fMRIやPETなどの神経画像法を用いた安静時の脳機能障害に関する研究が活発に行われており、HypofrontalityやDefault mode networkの障害が報告されている [1,2]。従来から脳波 (EEG) を用いた研究も報告されているが、基礎律動に関する研究が多く、波や波など徐波が前頭部で増加すると言う点では一致しているが、波や波に関する見解は一致していない [3]。その原因としてはSCHという病態の不均一性が考えられ

るが、覚醒度が維持されているかなどの理由も挙げられる。一方、Synchronous oscillation (SO) が脳内神経ネットワークに重要な関連があると近年報告がされており、例えば帯域のSOは作業記憶、帯域のSOは注意や長期記憶に関連していると言われている [4]。

そこで我々はSOを調べることがSCZの病態解明の一翼を担えようと考え、安静開閉眼時におけるSOを脳磁図 (MEG) を用いて検討した。この安静開閉眼のパラダイムは非常に簡単かつ短時間で行えるため、ある程度精神症状の重い患者でも検査を施行することが可能であり、かつ覚醒度を維持することが可能となる。また現在EEGを用いた研究の多くは、画像解析が2次元的なマッピングにとどまっているが [5] MEGを用いれば3次元的なマッピングを行うことが可能で、より事象に関連した脳内の活動部位のネットワークや局在を正確に知ることができ、群間比較統計を行うことも可能となる [6]。SCZにおいて安静開閉眼時のSOの変化を調べた研究は、EEGでは散見されるものの [7]、MEGでは我々の知る限りでは未だない。

今回我々はSCZ群と健常被験者 (HC) 群に対し、安静開閉眼時の律動脳磁場活動の変化を調べ、空間フィルター法による解析を用い群間比較統計を行った。閉眼に伴う律動脳磁場活動の変化につ



いて、SCZ群はHC群に比べ 帯域 (8-13Hz) における事象関連同期 (Event-Related Synchronization: ERS) の減弱を仮説とした。

## 方法

SCZ群22名と年齢・性別のマッチしたHC群20名を対象とした。全例教育歴を聴取し、病前知能としてJART50 (Japanese Adult Reading Test 50) を施行した。SCZ群に対しては、発症年齢、罹病期間、抗精神病薬の種類・分量と抗精神病薬による治療歴を聴取し、臨床評価はPANSS (Positive and Negative Syndrome Scale) 抗精神病薬による副作用の評価はDIEPSS (Drug-Induced EPS Scale) を施行した。HC群に対しては、いずれの精神疾患や神経疾患に罹患していないこと、EEG・MEGに影響を与える薬物を常用していないことを確認した。本研究は大阪大学倫理委員会において承認を受け、全例から文書による説明と同意を得て行った。CTF社製全頭型64チャンネル脳磁計を用いサンプリング周波数625Hz・ローパスフィルター200Hzにて、測定者が被験者の開閉眼を目視で確認しながら安静開眼10秒間、閉眼10秒間の計20秒間のMEG測定をそれぞれ8回施行した。解析は、まずBV (Brain Voyager QX) を用いて標準化 (Talairach変換) した各被験者の頭部MRIをBESA (Brain Electrical Source Analysis) 上にco-registrationした。次にオフラインでBESAを用い、瞬目によるartifactの影響を除くため開眼時 -10000 ~ -1000msをbaselineとして (図1-1) 閉眼時1000 ~ 10000msのtime frequency spectrumのpower値を1-30Hzの帯域で求めた (図1-2)。その後各帯域におけるERSの分布を空間フィルター法の一つであるMultiple Source Beamformerにより求め、こうして得られたERS分布を各被験者の3Dマップに表示した (図1-3)。最後にSCZ群とHC群の各帯域のERS分布をBVで頭部標準MRI上に重ね合わせ比較検討した (un-paired t検定,  $p < 0.001$ ; uncorrected)。

## 結果

基礎律動のピーク周波数は、SCZ群 ( $9.6 \pm 0.7\text{Hz}$ ) はHC群 ( $10.5 \pm 0.7\text{Hz}$ ) に比し有意に低下していた。閉眼後の 帯域 (8-13Hz) におけるERS分布に関して、両群とも後頭葉を中心に強く認められたが群間比較で有意差は認められなかった。同様に、 帯域でも有意差は認められなかった。また全帯域において閉眼後のERDは認められなかった。しかしながら、upper-帯域 (10-13Hz) におけるERS分布に関して、両群とも後頭葉を中心に強く認められ、特にleft posterior middle temporal gyrus (PMTG) においてはSCZ群はHC群に比べERS分布の有意な低下が認められた (図2)。Lower-帯域 (8-10Hz) で有意差は認められなかった。Lt. PMTGは文字言語や視覚情報の記憶に関連する部位とされている [8]。Lt. PMTGの中で最も有意差のあったERSのpeak pointを求め (Talairach coordinates (-44, -50, 1); d.f. =40,  $t = 3.822$ ,  $p = 0.000453$ )、その部位におけるSCZ群のERS値と代表的な言語・視覚記憶検査であるWechsler Memory Scale-Revised (WMS-R) 下位検査 (粗点) との相関をピアソンの積率相関を用いて調べた。結果、視覚性再生 ( $r = 0.48$ ,  $p < 0.05$ ) 視覚性対連合 ( $r = 0.56$ ,  $p < 0.01$ ) の視覚性記憶で正の相関を認め、言語性記憶など他の項目とは有意な相関を認めなかった。

## 考察

Upper-帯域のERSは、その出現領域における皮質活動の抑制に関連するといわれており [9]、ERSの低下はその領域における皮質活動の抑制の低下を意味していると考えられる。SCZ群ではlt. PMTGにおいてERSの低下が認められたことにより、この部位における安静閉眼時における皮質活動の抑制が効果的に行われていない可能性が示唆された。また、lt. PMTGの機能の一つである視覚性記憶について、特に視覚性再生はSCZ群でそ

の病状 (state) と関連することが報告されており [ 10 ] SCZ群では閉眼に伴うERSと視覚性再生を含む視覚性記憶に正の相関が認められたことより、It. PMTGにおける閉眼に伴うERSはSCZ群のstateと関連する可能性が示唆された。すなわち、単純な開閉眼のパラダイムを用いることによって、It. PMTGにおいて視覚情報からの高次脳機能活動、特に視覚性再生において効果的な活動が行われず、その機能障害の関連性を示唆することができ、この部位のERSがSCZ群のstateとの関連、すなわち生理学的state markerとなりうる可能性を示唆することができた。

## 参考文献

- [ 1 ] Andreasen NC, O'Leary DS, Flaum M, Nopoulos P, Watkins GL, Boles Ponto LL, et al. (1997) : Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naïve patients. *Lancet* 349: 1730-1734.
- [ 2 ] Calhoun VD, Maciejewski PK, Pearlson GD, Kiehl KA (2008) : Temporal lobe and "default" hemodynamic brain modes discriminate between schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Brain Mapp* 29 :1265-1275.
- [ 3 ] Hughes JR, John ER (1999) : Conventional and quantitative electroencephalography in psychiatry. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*11: 190-208.
- [ 4 ] Klimesch W (1999) : EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Brain Res Rev* 29: 169-195.
- [ 5 ] Knyazeva MG, Jalili M, Meuli R, Hasler M, De Feo O, Do KQ (2008) : Alpha rhythm and hypofrontality in schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand* 118: 188-199.
- [ 6 ] Kurimoto R, Ishii R, Canuet L, Ikezawa K, Azechi M, Iwase M, et al. (2008) : Event-related synchronization of alpha activity in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: An MEG study combining beam-former and group comparison. *Neurosci Lett* 443: 86-89.
- [ 7 ] Colombo C, Gambini O, Macciardi F, Bellodi L, Sacchetti E, Vita A, et al. (1989) : Alpha reactivity in schizophrenia and in schizophrenic spectrum disorders: demographic, clinical and hemispheric assessment. *Int J Psychophysiol* 7: 47-54.
- [ 8 ] Assaf M, Rivkin PR, Kuzu CH, Calhoun VD, Kraut MA, Groth KM, et al. (2006) : Abnormal object recall and anterior cingulate overactivation correlate with formal thought disorder in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 59: 452-459.
- [ 9 ] Klimesch W, Sauseng P, Hanslmayr S. (2007) EEG alpha oscillations: the inhibition-timing hypothesis. *Brain Res Rev.* 53: 63-88.
- [ 10 ] Skelley SL, Goldberg TE, Egan MF, Weinberger DR, Gold JM. (2008) Verbal and visual memory: characterizing the clinical and intermediate phenotype in schizophrenia. *Schizophr Res.* 105: 78-85.

# 経頭蓋反復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

( Mechanism underlying plasticity induction of the human cerebral cortex by repetitive transcranial magnetic stimulation )

福島県立医科大学 医学部 神経内科学講座 宇川 義一

## 【目的】

単発経頭蓋磁気刺激が臨床応用された後、反復磁気刺激が登場し、動物で証明されていた長期可塑性 (LTP/LTD) に類似した効果をヒトでも誘発できるようになり、これらの神経疾患の治療への応用が期待されている。本研究の目的は、経頭蓋反復磁気刺激法 (rTMS) の長期効果の発生機序を明らかにし、神経難病の治療をより効率的に行うための刺激方法を開発することである。すでに申請者は従来用いられてきた均一な刺激ではない4発の軽頭蓋反復磁気刺激 (Quadri-Pulse Stimulation: QPS) という不均一な刺激法により、安定した持続時間の長い効果が得られることを報告した (文献1)。本研究では、この長期効果の作用機序の解明と、ヒト運動野におけるシナプス恒常性制御を解明するための研究を行った。すなわち、Bienenstockらによって提唱された学習則 (BCM理論) に基づいて刺激間隔などの刺激条件の特性を詳細に検討し、それによって得られる長期の可塑的变化がシナプスの可塑性の特性と合致する特色を有するか、これと整合性をもつか否かを検討した (文献2)。

また一旦LTPやLTDを起こしたシナプスに対して適切な刺激を与えると、そのLTPやLTDが消失する事も知られており、それぞれ脱増強

(Depotential)、脱抑圧 (Dedepression) などと呼ばれている。従ってQPSによるLTP様可塑性が、その後のQPSにより脱増強様変化を起こすかについても検討した。

## 【方法】

対象は正常ボランティア10名。単発の運動野磁気刺激により対側手内筋に生じる運動誘発筋電図 (MEP) の振幅を運動野興奮性の指標に用いた。QPS前と、刺激後5分毎の振幅の変化を分析した。QPSは、運動閾値以下の単相性磁気刺激を1.5~1250msの間隔で4連発運動野刺激し、5秒毎に30分間繰り返した。

またQPS前後で、錐体細胞の膜興奮性の指標である運動閾値・2発刺激法で示されるGABA機能を示すshort-interval intracortical inhibition (SICI)・グルタミン酸機能を示すintracortical inhibition (ICF)・皮質内興奮性介在ニューロンのexcitatory postsynaptic potential (EPSP)の時間的空間的重合により引き起こされるshort interval intracortical facilitation (SICF)に関して検討した。更に動物実験で得られているメタ可塑性の知見に基づき、QPSで誘導されたLTP/LTD様可塑性がQPS前のプライミング刺激によりどのように変化するかについても検討し

た。脱増強については促進性QPSによるLTP様可塑性誘導後、抑制性QPSを行いMEPの変化を経時的に測定した。

## 【結果】

4発の刺激間隔が1.5, 5, 10msと短い場合 (short-interval QPS, S-QPS) にはMEP振幅が増大する刺激後の効果が見られ、50, 100msと長い場合 (long-interval QPS, L-QPS) ではMEP振幅が減少する効果が誘導された。促進効果は刺激間隔5msで抑制効果は50msで最も強かった。刺激後の効果は60分以上続いた。また運動閾値・SICIは変化せず、ICF・SICFIはS-QPSでは増強され、L-QPSでは抑制された。促進性プライミング刺激後にはS-QPSによる促進効果は見られなくなり、抑制性プライミング後にはS-QPSによる促進効果は増強されL-QPSによる抑制効果は認めなくなった。またS-QPSによるLTP様可塑性誘導後、L-QPSで刺激するとMEPはS-QPS刺激前と同等の振幅に回復した (depotentiation の証明)

## 【考察】

QPSによる効果は動物実験で認められる刺激頻度とシナプス可塑性の非線形の関係性に類似した特徴を備えていると考えた。QPSにより興奮性シナプスによるEPSPが変化していることも、シナプス可塑性と類似の効果を誘導していることと矛盾しないと考えた。プライミング実験により、QPS誘導効果が可変したことはメタ可塑的变化であると推測した。即ちメタ可塑性はLTP・LTDを誘導する前にプライミング刺激を行うと後に誘導される可塑性が変化するという現象である。この実験的現象はBCM理論におけるsliding modification thresholdにより説明可能である。即ち先行する後シナプス活動によりシナプス可塑性は規定されており、後シナプス活動が高い場合、通常であればLTPを誘導する刺激であってもLTDが誘導されうるというものである。これによりシナプス

可塑性の不安定性が回避でき、シナプス可塑性の恒常的制御が行われていると推察される。

今回の結果から、QPS誘導可塑性はBCM理論の予測通りに可変することを示した。ヒト運動野ではBCM理論で推定される恒常性維持機構の存在が示唆された。さらにS-QPSによるLTP様可塑性はL-QPSにより脱増強されることが示され、2発刺激法の結果と合わせ、QPSによる可塑性はシナプス可塑性に基づいていることが推測された。また治療応用に際しQPSは一つの有力な手段となり得ると期待される。

## 【発表】

1. Ugawa Y. Plasticity induced by quadripulse rTMS. 3rd International Conference on Transcranial Magnetic and Direct Current Stimulation. Goettingen, Germany. October 1-4, 2008.
2. Hamada M, Terao Y, Hanajima R, Furubayashi T, Ugawa Y. Quadripulse stimulation of the human motor cortex. 3rd International Conference on Transcranial Magnetic and Direct Current Stimulation. Goettingen, Germany. October 1-4, 2008.
3. 濱田雅, 宇川義一. 反復4連発磁気刺激のヒト大脳運動野への効果. 第38回日本臨床神経生理学会 (シンポジウム) (神戸) 2008年11月
4. 濱田雅, 寺尾安生, 花島律子, 宇川義一. 反復4連発磁気刺激 (QPS) の運動皮質可塑性の誘導効果. 第50回日本神経学会総会 (仙台) 2009年5月
5. 濱田雅, 宇川義一. 反復単相性4連発経頭蓋磁気刺激 (QPS) による運動皮質可塑性の誘導. 第24回日本生体磁気学会大会. (シンポジウム) (金沢) 2009年5月

## 【文献】

1. Hamada M, Hanajima R, Terao Y, Arai N, Furubayashi T, Inomata-Terada S, Yugeta A,

Matsumoto H, Shirota Y, Ugawa Y. Quadropulse stimulation is more effective than paired-pulse stimulation for plasticity induction of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol.* 2007. 118 ( 12 ) :2672-82.

2. Hamada M, Terao Y, Hanajima R, Shirota Y, Nakatani-Enomoto S, Furubayashi T, Matsumoto H, Ugawa Y. Bidirectional long-term motor cortical plasticity and metaplasticity induced by quadripulse transcranial stimulation. *J Physiol.* 2008 586 ( 16 ) :3927-47.

# 強磁場を用いた精子アクロソーム反応の制御 および作用メカニズムの解析

( Analysis and control of sperm acrosome reactions by high-field NMR spectroscopy )

筑波大学大学院 システム情報工学研究科 コンピュータサイエンス専攻 中川 秀 紀  
( 現・東京大学大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系 )

## 目的

食生活および環境変化による精子運動率の低下は、不妊症を誘起する重要因子と考えられており、我が国の少子化傾向は深刻さを増してきている。従って高度な治療法である「体外受精」、「顕微授精」の需要が今後さらに高まっていくものと予想される。

近年、家畜精子の受胎率向上に静磁場を利用した研究が増えつつあり、精子凍結時に磁場を曝露することで融解後の精子生存率を改善する試み [ 1,2 ] や、静磁場を利用した精子の行動制御 [ 3 ] などの研究が進められている。一方、体外受精の成立には精子のキャパシテーション ( 受精能獲得 ) およびアクロソーム反応 ( 先体反応 ) の誘起が必要となるが、これらの制御に静磁場を利用した報告はあまり知られていない。磁場は物質透過性の遠達力であり、先体反応の効率化や、未だ厳密に明らかとなっていない受精能獲得についてのメカニズム解明に重要な知見をもたらすものと思われる。

高磁場発生源である核磁気共鳴 ( NMR ) 装置は、そのボア内部で細胞を曝磁すると同時にスペクトル解析を可能とするため、磁場影響を受けた細胞の動態追跡には有用な手段と成りうる。本研究では、高磁場NMRを利用した精子運動性の簡

易評価および運動精子における先体反応の制御について検討した。

## 被験者

健全成人男子 ( 27 ~ 36歳、精囊炎・前立腺炎などの副性器障害の既往症なし ) 研究実施前に「ヒト生命倫理に関わる説明書」を用意し、被験者 ( 研究協力者 ) に不利益にならないよう詳細に説明し、研究協力における同意を得た。

## 方法

精漿の主要NMRピークを同定するため、得られた精液サンプルを密封ガラス管内で2時間、37 °C で加温した。十分に先体反応を誘起させた後、1000g、4 分、5分間の遠心で得た精漿をNMRチューブに移した。高分解能強磁場FT-NMR装置にはJEOL製JNM-ECA600を使用し、精液と等量のD<sub>2</sub>Oにて重水素ロックおよびシム調整を行った。濃度基準としてDSS ( 2,2-dimethylsilapentane-5-sulfonic acid ) を終濃度0.1 Mで精液サンプルに添加し、測定はすべて37 °Cで行った。

精子運動性の評価においては、精液の一部を検鏡して精子数が10<sup>7</sup>/mL以上、運動精子率50%以

上を確認した。測定開始までの少時間は、精子の運動を抑えるため4 で一時保存した。

先体反応の有無については、ダブルステイン法 [4] による顕微鏡観察において先体反応精子を判別した。

## 結果および考察

精子は一般に鞭毛による遊泳運動を行う。そして、その運動は先体反応を誘起すべき受精能を獲得するまで維持される。この運動性が強磁場下でどのような影響を受けるかを調べる目的で、まず始めに磁場内外におけるエネルギー代謝の違いをNMRスペクトルの変化から比較、検討した。Figure 1にヒト精漿の $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSYスペクトル (600MHz) を示す。この $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSYに加え、HMBC、HMQCなどの各種2D NMRスペクトルデータを解析した結果、全ての $^1\text{H}$ ピークが同定され (Fig. 2) 文献値 [5] とほぼ完全に一致した。次いで、得られたスペクトルの経時変化から精子の運動性を定量化するため、精液 (精子および精漿) サンプルのアレイ測定を試みた。乳酸生成量は解糖による精子の運動をリアルタイムに反映し、精子運動率と乳酸ピーク強度は正の相関を示した。磁場外で37 に維持したものととの比較では、磁場内外の両者ともに乳酸生成速度に大きな違いは無く、14 Tの強磁場下における精子の動態への影響は認められなかった。つまり本条件下においては運動精子の磁場影響を無視することができ、精子運動性のリアルタイム検出がNMRで簡便に行えることが示された。鞭毛運動の必須エネルギーATPの産生経路は主に解糖系と呼吸系の2系統が知られるが、近年、解糖系がエネルギー供給の主役であるとの報告もなされ [6]、解糖の代謝産物である乳酸のピークを追跡した本結果を重ね合わせると興味深い。

一方、不動化した精子の磁場配向については既に報告がある [7,8] このことは精子頭部の細胞膜やDNA、および鞭毛を構成する骨格タンパクなどが、明らかに、磁場に対して反磁性異方性を

もつことを示している。精子が自由に運動できる上記の条件下では、運動障害による先体反応の進行が、スペクトル解析的および顕微鏡観察的にも見いだされなかった。しかしながら精子の先体反応の進行がストレス様の物理化学的条件下で早められる傾向があり、磁場によってストレス惹起しうる条件を設定すれば、先体反応の制御が可能になると考えられる。特に精子の頭部は偏平なため、その細胞膜リン脂質への磁性イオンの関与は、磁場内において配向ストレスを誘導するものと推測される (Fig. 3)。そこで磁場に対して垂直方向への常磁性配向を付与した精子の運動性について検討した。

Figure 4に精子の常磁性配向時における乳酸ピーク強度の経時変化を示す。常磁性配向時には解糖によるエネルギー代謝が活発化すると同時に、先体反応の進行が早まる傾向がみられた。一方、配向を誘導しない磁場外の条件下において、 $\text{Pr}^{3+}$ 単独では先体反応を誘起しなかった。 $\text{Pr}^{3+}$ を始めとするランタノイドイオンはむしろ膜の安定化に働く報告があり [9]、磁場による配向が精子の細胞膜を不安定化して先体反応を誘起したとは考えにくい。よって常磁性配向時には精子の運動に要するエネルギー負荷が増大し、ATPの枯渇が先体反応を早める傾向にあることが示された。

以上のことから、本手法は精子運動性をリアルタイムに評価しうる簡便かつ有用な手段となることが分かった。特に強磁場を利用した先体反応誘起の追跡において、その磁場強度、磁場曝露時間、精子の磁場配向度などを詳細に検討すれば、先体反応自体をより高度に制御可能となり、これは今後の課題となっている。

## 参考文献

- [1] 菅大助、新城明久、牛精子の凍結に及ぼす600G定常磁場の影響、日本応用磁気学会誌、Vol.21(9) p.1134-1137 1997年
- [2] 菅大助、西川周一、新城明久、千葉好夫、牛凍結精液の融解後の精子生存率に対する静

磁場の影響、日本畜産学会報、66、p.86、1995年

- [ 3 ] 菅大助、新城明久、西川周一、千葉好夫、牛精子の生存率と運動性に及ぼす弱い定常磁場の影響、日本応用磁気学会誌、Vol.19( 5 ) p.872-874 1995年
- [ 4 ] Cross, N.L. and Meizel, S.: Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. Biol. Reprod. 1989;41:635-641.
- [ 5 ] Averna, T.A., Kline, E.E., Smith, A.Y., and Sillerud, L.O.: A decrease in <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopically determined citrate in human seminal fluid accompanies the development of prostate adenocarcinoma. J.Urol. 2005;173:433-438.
- [ 6 ] 菅大助、新城明久、稲嶺一樹、仲田正、荷川取秀樹、5400G定常磁場における除膜および核膨潤化ウシ精子の磁場配向の高低、日本応用磁気学会誌、Vol.22( 6 ) p.1080-1084、1998年
- [ 7 ] 芦田信之、東照正、竹内徹也、ウシ精子の定常磁場配向、日本生体磁気学会誌、Vol.9( 2 ) p.29-34 1996年
- [ 8 ] Mukai, C. and Okuno, M.: Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. Biol.Reprod. 2004;71:540-547.
- [ 9 ] Hill, W.G., Rivers, R.L., and Zeidel, M.L.: Roll of leaflet asymmetry in the permeability of model biological membranes to protons, solutes, and gases. J.Gen.Physiol. 1999;114:405-414.

## 口演発表

< 国際学会 >

Hidenori Nakagawa, Shoogo Ueno, Tsuyoshi Shiina, Makoto Kotani, Shunichiro Kubota: Application of Radical Chain Reactions to Drug

Release Controlling of Liposomal Carriers Under High Magnetic Fields. 53<sup>rd</sup> Annual Conference on Magnetism & Magnetic Materials, Austin, USA, November, 2008.

Hidenori Nakagawa, Tsuyoshi Shiina, Wakako Taira, Makoto Kotani, Shoogo Ueno: Effect of Paramagnetic Alignment on the Sperm Motility under High Magnetic Fields. 16<sup>th</sup> International Conference on Biomagnetism, Sapporo, Japan, August, 2008.

Hidenori Nakagawa, Tsuyoshi Shiina, Makoto Kotani, Shoogo Ueno: Destabilization Effect of Liposomal Nanocarriers Modified with Radical Initiators Studied by Nuclear Magnetic Resonance. 3<sup>rd</sup> International Workshop on Materials Analysis and Processing in Magnetic Fields, Tokyo, Japan, May, 2008.

< 国内学会 >

中川秀紀、平和香子、椎名毅、小谷誠、上野照剛、高磁場下における哺乳類精子の動態追跡手法の検討、第47回日本生体医工学会大会、神戸、2008年5月

## 論文発表

< 学術論文 >

Hidenori Nakagawa, Shoogo Ueno, Tsuyoshi Shiina, Makoto Kotani, Shunichiro Kubota: Application of Radical Chain Reactions to Drug Release Controlling of Liposomal Carriers Under High Magnetic Fields. J. Appl. Phys., 105, 07B323, 2009.

## Figure Captions

Fig. 1 Two-dimensional NMR spectrum of seminal plasma ( 600MHz ) .



Fig. 2 Identification of the  $^1\text{H}$ -NMR peaks with main seminal components.

Fig. 3 Scheme for paramagnetic stress induction to sperm cells.

Fig. 4 Time course of changes in NMR peak intensity of seminal lactate under high magnetic field.

## 平成20年度 研究助成テーマ

平成20年度は、以下のように、基礎3名・基礎2名・テーマ指定2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. 磁力を用いた再生医療技術の開発

九州大学大学院 工学研究院／井藤 彰

#### I-2. がん温熱治療に適した強磁性セラミックマイクロカプセルの調製と評価

九州工業大学大学院 生命体工学研究科／宮崎 敏樹

#### I-3. 磁場が概日リズム制御機構に与える影響に関する研究

東京医科歯科大学 難治疾患研究所／平山 順

### II. 応用研究

#### II-1. 超磁歪素子を用いた埋め込み型補聴器の開発研究

慶応義塾大学 医学部 耳鼻咽喉科学／神崎 晶

#### II-2. MRI酸化鉄造影剤の質的向上を目指した腫瘍標的化磁性ナノ粒子の開発研究

大阪大学大学院 薬学研究科／向 洋平

### III. 指定テーマ研究

#### III-1. 表面筋電図によるPSTHを用いた、小脳刺激の脊髄前角細胞に対する影響評価

九州大学大学院 臨床神経生理／緒方 勝也

#### III-2. 経頭蓋磁気刺激法を用いた運動イメージ・運動観察の中脳メカニズムの解明とリハビリテーション科学への応用

広島大学大学院 保健学研究科／梁 楠

なお、所属は研究助成決定当時のものです。