THE REPORT OF STUDY RESULT BY SUBSIDY

助 成 研 究 成 果 報 告 書

2010

平成22年度

Magnetic Health Science Foundation

公益財団法人 磁気健康科学研究振興財団

助　成　研　究　成　果

報　告　書

平成22年度

（研究期間：平成23年4月1日～平成24年3月31日）

公益財団法人 磁気健康科学研究振興財団

目　　次

巻頭言 …… 1
理事長　小谷　誠

Ⅰ. 基礎研究

Ⅰ-1. 綿維芽細胞の成長ならびに形態変化に対する磁場の影響とメカニズム解明 …… 3
埼玉大学　理工学研究科
若狭　雅信

Ⅰ-2. 磁性ナノ粒子を用いた腫瘍部位造影画像化への光音響技術の適用 …… 6
防衛医科大学校　医用工学講座
平沢　　壮

Ⅰ-3. エレクトロスピニングにより作製した磁性足場材料による局所磁場が細胞培養へ与える影響に関する研究 …… 10
大阪工業大学　工学部生命工学科
外波　弘之

Ⅰ-4. ハイパーサーミア応用のための強磁性体金属内包カーボンナノチューブ生成 …… 14
三重大学　大学院工学研究科
佐藤 英樹

Ⅰ-5. 磁気アルキメデス効果によるラベルフリー3次元生体組織再構築法の開発 …… 17
東京農工大学　大学院生物システム応用科学府
秋山　佳丈

Ⅱ　応用研究

Ⅱ-1. 低周波磁気刺激による視覚支援デバイスの開発 …… 19
東京大学大学院　情報理工学系研究科
正宗　　賢

Ⅲ. 指定テーマ研究

Ⅲ-1. ヒト運動野内在性リズムの生理的意義の反復磁気刺激による解明:反復磁気刺激のシナプス可塑性誘導の機序解明を目指して …… 23
東京大学医学部附属病院　神経内科
花島　律子

Ⅲ-2. 組織再生に対する磁場作用の研究 ～血液循環系に着目して～ …… 26
独立行政法人産業技術総合研究所　健康工学研究部門
川﨑　隆史

Ⅲ-3. 全頭型脳磁図を用いた統合失調症の感覚情報処理機能の縦断研究 …… 30
九州大学大学院医学研究院　臨床神経生理学講座
前川　敏彦

平成23年度研究助成テーマ …… 33

巻　頭　言

公益財団法人　磁気健康科学研究振興財団

理事長　小　谷　　誠

人間の身体はおよそ0.1ボルトの電圧で働いている。たとえば、私たちが右手の中指を動かすときには、左脳の中央部の表面にある運動野の中指を担当する脳細胞に0.1ボルトの電圧が発生し、その電圧に伴って発生する電流が脳から神経細胞を流れて、中指まで伝わり、中指を動かす神経細胞を刺激して中指を動かすのである。

電気理論によると、電流が流れると必ず磁気を発生する。このように電気と磁気は密接な関係がある。

一般に電気を流すためには、往きと帰りの2本の電線が必要であり、電気の流れるスピードも1秒間に30万Km、すなわち、1秒間に地球を7周半進む速さである。それに対して、人体の中では、往きだけの神経細胞で電気を流し、速度も最速の神経細胞でも1秒間に100メータと極端に遅い。このように人体内を流れる電流が、通常の電気の流れる方法とまったく異なるのは、多分、地磁気の影響があると考えられる。

人間がこの世に登場し、立って歩き、言葉を交わすようになったのは、今から数百万年前と云われている。この間に、地磁気の大きさと方向が何度も変わっている。

このように地磁気の大きさや方向が大きく変わる環境の中で人間は進化してきたので、地磁気の影響はあまり受けないように人体はできている。

ところが、人間が電気を使うようになったのは、200年ほど前からである。そのため、人体は電気に対しては防衛能力が進化しておらず、大変敏感に反応する。例えば、心臓の表面に数ボルトの電圧を加えると心臓は働かなくなる。ところが、外部から磁気を加えて心臓を止めることは大変困難である。

このような人体の特徴から電気治療器は即効性があるが、取り扱いを間違えると大変危険である。それに対して、磁気治療器は危険ではないが、時間をかけてじっくり治療する必要性があると思われる。

本財団は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。しかし磁気の作用は、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。

いっぽう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が強く、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に見受けられる。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22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。

線維芽細胞の成長ならびに形態変化に対する磁場の影響とメカニズム解明

(Influence of magnetic fields on the growth and morphological change of fibroblastic cell)

埼玉大学理工学研究科　若　狭　雅　信

【背景および目的】

生物に対する磁場の影響（例えば，高周波電磁波の人体におよぼす影響や渡り鳥の方向認識など）は，化学・生物・物理の研究分野にまたがる，人類にとって重要な研究課題である。特に，磁場の健康利用を考えるとき，メカニズムを含む完全な理解が必要不可欠である。磁場が生物に影響をおよぼすとき，原因としては磁気エネルギー，異方性磁気力，電子スピン多重度に対する量子効果などが考えられるが，残念ながらメカニズムは殆ど解明されていない。そこで，動物細胞のうち最も基本的かつ重要な，iPS細胞の材料にもなる線維芽細胞に対する磁場の影響を，静磁場（5 T）およびパルス強磁場（～20 T，2 ms）を用いて研究することを計画した。具体的には，マウス由来の線維芽細胞（NIH3T3）を用いて，増殖（速度）ならびに形態変化（密度，分岐，アスペクト比）を検討した。

【方法】

培地としてDMEM（GIBCO）にFBS（BIO WHITTAKER）を10%添加したものを用い，常法に従い細胞濃度を1.0×10^5 cells/mLおよび3×10^4 cells/mLに調整した溶液を準備した。この溶液を小型シャーレに1 mL 播種し，後述するガラス製インキュベーターを用いて，超電導磁石ボア内と地磁気下で細胞培養をおこなった。パルス磁場の場合は磁場印加時間が短いので，ガラス製インキュベーターは用いず，水分を飽和させたCO_2 5%，Air 95%混合気体雰囲気下，滅菌状態を保つための通気性シール（BM Bio Aera Seal）で小型シャーレを密封した。培養後の細胞数の評価は，以下の手順でおこなった。(1) 培地を取り除き，PBS（日水製薬）で洗浄後，PBS，0.25%トリプシン溶液，0.02% EDTA溶液を加え，しばらくインキュベーターに静置。(2) 新鮮な培地を5 mL加えてからピッペッティングし，遠心チューブ（STOCKWEEL）に採集。(3) 遠心分離後，上清を除去して新鮮な培地に細胞を分散。(4) 細胞が分散した溶液の細胞数を，血球計算盤（フックスローゼンタール型）を用いて計数。

【結果と考察】

1.超伝導磁石用の特殊インキュベーターの開発

超電導磁石ボア内で細胞培養が可能なシステムを開発した。超電導磁石のボア径は60 mmと狭く，さらに、内部では強磁場が発生している。したがって，市販されている細胞培養用のインキュ

ベーターを使用することができない。そのため，新たに小型インキュベーターを作製した。作製したインキュベーターの写真をFig. 1 に示す。このインキュベーターは磁場の影響がほとんどないガラス製である。また、インキュベーターは二重構造になっており，冷却水循環装置を用いることで内部温度を細胞培養に適切な37± 0.2℃に保つことができる。超電導磁石内部は断熱されているので，ボア表面は3℃と低温である。超電導磁石ボア内に設置した小型インキュベーターへの温度の影響を減らすために，熱伝導率が低く，非磁性であるアクリルパイプをインキュベーターの保温ジャケットとして利用し，小型インキュベーターの保温性を高めた。そして，水分を飽和させたCO_2 5%，Air 95%混合気体を小型インキュベーターに供給することで細胞培養を可能とした。

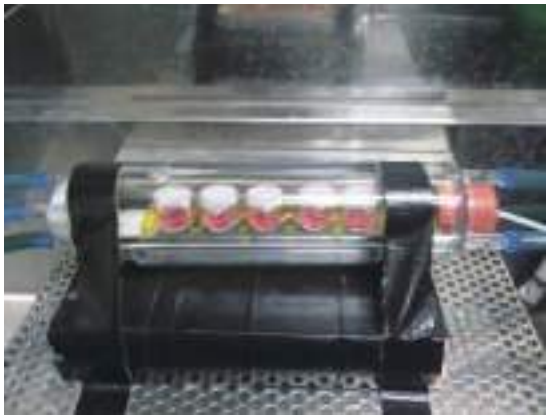


Fig. 1. ガラス製インキュベーター

小型シャーレの位置と磁束密度の分布をFig. 2 に示す。それぞれの小型シャーレ中央における磁束密度，磁場勾配，磁気力をTable 1に示す。次に超伝導磁石中と地磁気下での培養条件が同一であるかを評価するために，超電導磁石ボア内で磁場を印加せずに24 時間培養した細胞と地磁気下で24時間培養した細胞の細胞数（N）を比較した。細胞数の比較は相対細胞数（$R = N_{ボア内} / N_{地磁気下}$）でおこなった。結果をFig 3. に示す。どの位置でもRは1.00± 0.02であり，磁場を印加していないボア内と地磁気下は同一条件であると評価ができた。よって，本装置により磁場の影響を正しく評価できると結論した。

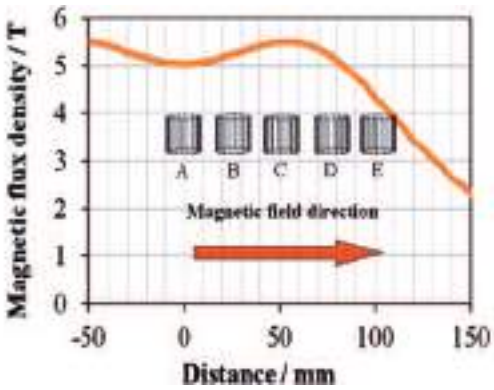


Fig. 2. 各位置における磁束密度

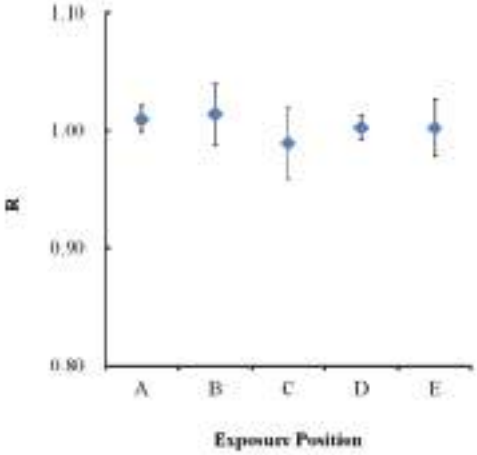


Fig. 3. 各位置における相対細胞数

Exposure position	Magnetic flux density (T)	Magnetic field gradient (T/m)	Field-gradient product (T^2/m)
A	5.0	0	0
B	5.2	12	62
C	5.5	0	0
D	5.2	26	135
E	4.4	42	184

Table 1. 各位置における磁束密度，磁場勾配，磁気力

2．強磁場による細胞数の変化

1.0× 10^5 cells / mL の細胞分散溶液を小型シャーレに1 mL 播種後，強磁場下および地磁気下で24時間培養した。この条件での結果をFig. 4 に示す。地磁気下条件をcontrolと表記した。ControlとEでは統計的に優位な差（P ＜0.01）があった。AからDの条件では統計的に有意な差は確認できなかったが，DではControlよりもわずかに減少していていた。また，磁場印加時間を変

化させて24時間培養を行うと，磁場の影響は播種直後に大きく現れることが解った。このことから，線維芽細胞が増殖するために培地底面に張り付くまで，もしくは張り付く初期段階に磁気力の影響が出たと解釈できる。一方，磁場による形態変化（密度，分岐，アスペクト比）は明確には観測されなかった。これは，培養後に形態観測を行っているので，細胞数に対する磁場の影響と矛盾しないと考える。

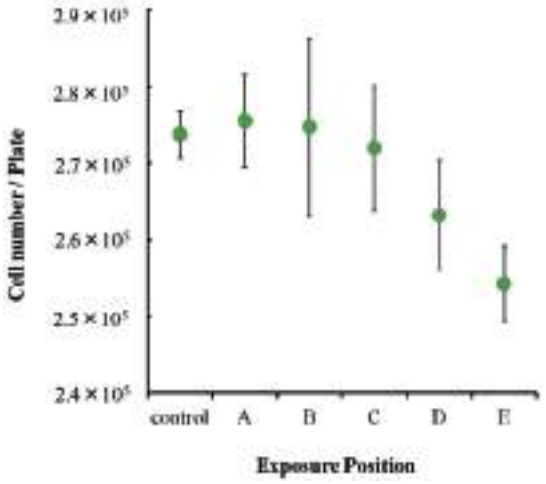


Fig. 4. 各位置における培養後の細胞（初期細胞数：1.0× 10^5 cells / plate，培養時間：強磁場下24時間）

パルス磁場については，印加回数ならびに試行回数が少なかったために，実験誤差が大きく明確な細胞数の変化は観測できなかった。そこで，パルス磁場下についても培養条件の制御を検討し，さらに磁場印加回数を増やして実験を試みる予定である。今回の研究で，線維芽細胞の増殖が磁場により抑制されることが明らかなになった。今後は，物理化学手法を駆使してメカニズム解明を目指したい。

【学会発表】

(1) 松井弘貴，坂井貴文，若狭雅信，マウス繊維芽細胞の成長に対する強磁場の影響，第6回磁気科学会年会（東京大学・山上会館，2011年9月26日～9月28日）

(2) 松井弘貴，坂井貴文，若狭雅信，マウス線維芽細胞NIH3T3の成長に対する強磁場の影響，第92回春季年会（慶応義塾大学・日吉キャンパス，2012年3月25日～3月28日）

磁性ナノ粒子を用いた腫瘍部位造影画像化への光音響技術の適用

（Application of photo-acoustic imaging for contrast enhanced imaging of tumor cell using magnetic nano particles）

防衛医科大学校　医用工学講座　　平　沢　　壮

目的

腫瘍部位の早期発見及び質的診断を目的とした，分子イメージング技術に関する研究が，様々な医用画像診断モダリティを用いて行われている．MRIにおいては，磁性酸化鉄粒子(SPIO)が肝腫瘍の局在用の造影剤として既に実用化されている．

一方，光音響画像化技術は，光を吸収する物質（光吸収体）にナノ秒パルスレーザー光を照射すると，レーザー光を吸収した光吸収体が発熱し，熱弾性過程を経て超音波（光音響信号）を発生する光音響現象を利用した画像診断技術である．本技術では多様な物質を造影剤として使用可能なため，新しい分子イメージング技術として注目を集めている．

本研究では，SPIOを光音響画像化技術で選択的に画像化する技術の開発を目的とする．光音響画像化技術と他のモダリティとの比較表をTable1に示す．本法は全身の撮像は困難であるが，小型な装置で高速に撮像が可能である．このため，全身を撮像可能なMRIと同じ造影剤を画像化することにより，術前に撮像したMRI画像との術中での比較など相補的に利用できる．本研究ではSPIOの磁気的特性を利用し，外部磁場に対する反応の周囲組織との差異を基に，SPIOを選択的に画像化する手法を提案し，その有効性について検討した．

方法

SPIOの外部磁場への感受性を光音響法で検出できることを検証するために，光音響信号計測実験を行った．実験用サンプルとして，Table 2のSPIOを用いた．これらのサンプルの光吸収スペクトルをFig. 1に示す．サンプルは，内径0.5 mm，外径0.6 mmのシリコンチューブに封入し，チューブの両端を固定して脱気水中に配置した．

光音響信号を発生するための励起光源として，波長可変チタンサファイアレーザーを用いた(LT2242, Lotis Tii)．励起光は，生体を対象とした深部イメージングに適する720 nmの近赤外光とした．光源が出力したレーザー光は，光ファイバを介して照射した。

Fig.2に本研究にて最適化した実験系を示す．サンプルが発生する光音響信号は，独自に設計したリング状のP(VDF-TrFE)製の圧電素子を有する超音波センサ（外径4 mm, 内径0.6 mm）にて計測した．本素子の中央に光ファイバを通して配置した．サンプルに印加する外部磁場は，外径30 mm，内径10 mm，長さ30 mm，表面磁束密度0.547 Tの円筒型ネオジム磁石で発生し，超音波

センサを磁石の中に通して配置した．この配置は，事前の基礎検討により，高磁場を撮像領域に印加するために最適化した配置である．超音波センサの検出面をサンプルから15 mm離して配置し，磁石のみをzステージに移動し，このときの信号強度の変化率及び信号到達時間の変化を観測した．信号到達時間は超音波の伝達時間に相当するため，音速を乗ずることにより撮像対象の深さに換算できる．

さらに磁石とセンサとを自動ステージにて同時に走査することにより，断層画像を取得した．色素とSPIOとを並べて配置したファントムを対象に，磁場印加前後にそれぞれ取得した断層画像に対して差分処理を施すことによりSPIOのみを強調画像化できることを検証した．実験用色素として，SPIO (Resovist)と同等の光吸収係数となるように希釈した黒インクを用いた。

結果

SPIOを対象に超音波センサの検出面から磁石表面までの距離を変化させて受信した光音響信号Fig. 3に示す．Fig. 3より，磁石をサンプルに近づけることにより，光音響信号の強度が増強され，信号の到達時間が短くなることが確認された．このことから，本法によりSPIOの外部磁場に対する反応を検出可能なことが確認された．

さらに，自動ステージでの走査により取得した画像をFig. 4に示す．本画像より，チューブに封入したSPIOを画像化できることが検証された．さらに，磁場印加前後に取得した光音響画像の差分を計算することより，SPIOのみを抽出する手法について検証した．Fig. 5に，Fig. 4に示す画像のラインごとの最大値のグラフを示す．本グラフより，差分処理によるSPIOの信号強度はほとんど減少しないが，黒インクの信号強度は抑制された．この結果より，差分画像と差分前の画像とを比較することにより，SPIOのみを画像化できることが確認された．

考察

Fig. 3に示す外部磁場の印加による光音響信号の変化のうち，光音響信号の強度増強はサンプルの光吸収係数の増加を示しており，外部磁場の影響でチューブ内においてSPIOの濃度勾配が生じ，撮像領域におけるSPIO濃度が高まったことに由来すると考えらえる．また，信号の到達時間の短縮は，外部磁場によるシリコンチューブの変位を反映していると考えられる．このうち後者は，本実験では周囲組織が水であるため機械的抵抗が少なく大きな変異が得られたが，生体を対象とする場合には変位は減少すると考えられる．一方で，前者は生体を対象とする場合にも等しく生じると考えられる．生体内での磁場の減衰は水中とほぼ同等と考えられるため，深さ30 mmの領域においても信号強度の増加は生じると考えられる．このため，Fig. 4に示す手法にて差分画像を算出することにより生体を対象とした場合にもSPIOを識別可能と考えられる．

本研究では，SPIOを特異的に画像化する手法を開発し，高感度にSPIOを抽出するために実験系を最適化し，SPIOと他の色素とを識別可能なことを実験的に示しており，本研究の目的を達成したと考える．

発表

1) T. Hirasawa, M. Ishihara, K. Tsujita, K. Hirota, K. Irisawa, M. Kitagaki, M. Fujita, and M. Kikuchi, *Continuous wavelet-transform analysis of photo-acoustic signal waveform to determine optical absorption coefficient*. Proc. of SPIE, 2011. 8223: p.822333-1-822333-7
2) T. Hirasawa, M. Ishihara, M. Fujita, M. Kitagaki, N. Otani, A. Horiguchi and M. Kikuchi, *Verification of selective imaging using photoacousic technique using animal model*. J. JSLSM, 2011,.32(3): p334

参考文献

1) Hu, S. and L.V. Wang, *Photoacoustic imaging and characterization of the microvasculature.* J Biomed Opt, 2010. 15(1): p. 011101.

図と表

Modality	MRI	x-ray CT	PET	Ultrasound	Photoacoustic
Depth (mm)	100 - 200	200	200	100 - 200	- 50
Resolution (μm)	1000	100	1000	500 - 1000	100 - 1000
Contrast agent	Iron oxide	Iodine	Positron	Microbubble	Optical absorber
Radiative		×	×		
Portability	×	×	×	○	○

Table 1 光音響画像化技術と既存の医用画像診断技術との比較[1]

Product	EMG607	EMG707	Resovist Inj.
Industry	Ferrotec		FUJIFILM RI Pharma
Particle diameter (nm)	10		57 (Carboxidextran coat)
Iron oxide	Mixture of γ-Fe_2O_3 and Fe_3O_4		γ-Fe_2O_3
Iron oxide concentration (g/l)	80.00	77.50	39.85
Molucular concentration of Iron (M)	0.65 - 1.00		0.50

Table2 本研究で使用した磁性酸化鉄粒子

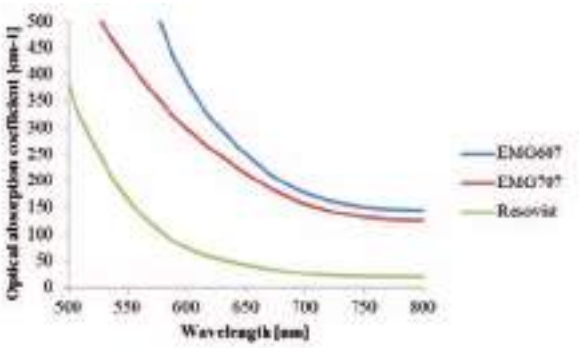


Fig.1 磁性酸化鉄粒子の光吸収スペクトル

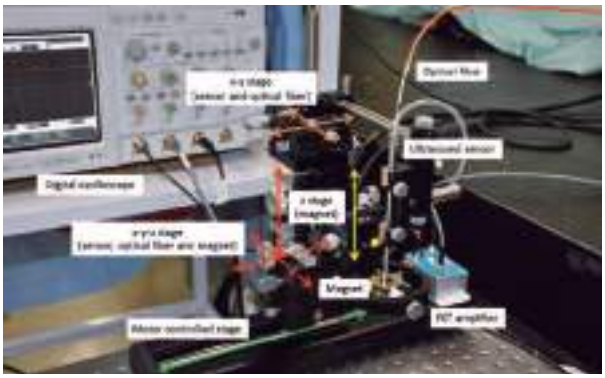


Fig. 2 本研究にて最適化した測定系

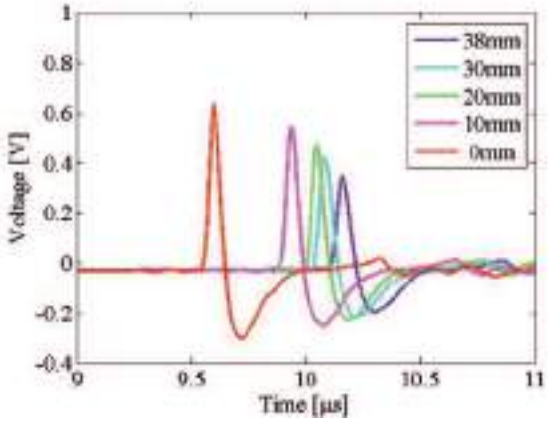


Fig.3 超音波センサの検出面と磁石平面との間の距離を変化させて取得した
磁性酸化鉄粒子(EMG707)が発生する光音響信号の時間波形.

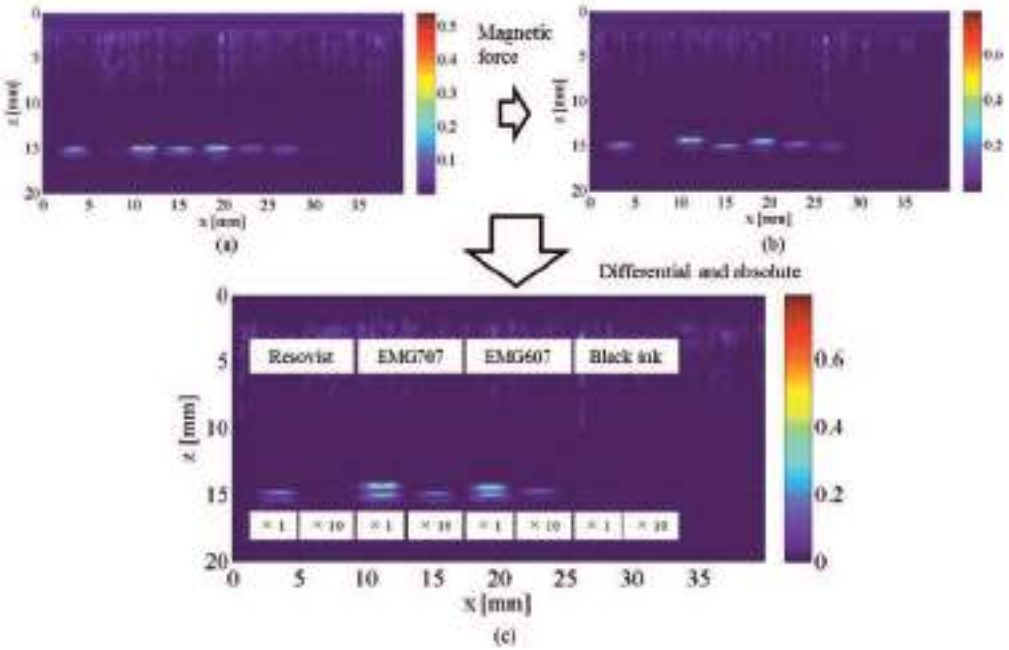


Fig.4 ファントムを対象に取得した光音響画像．(a)磁場印加前 (38 mm)，(b)磁場印加後(0 mm),
及び(a)と(b)との差分絶対値画像.

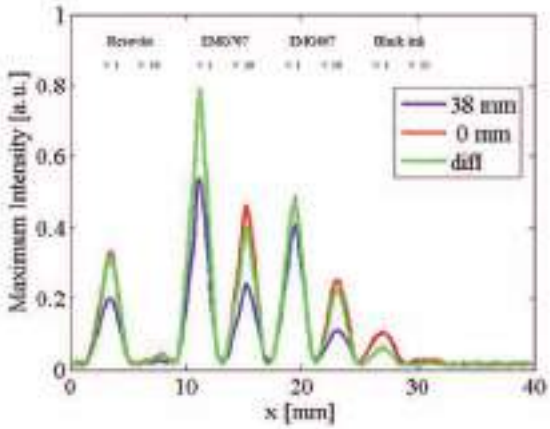


Fig.5 光音響画像のラインごとの最大値のプロット．差分処理により
黒インクが発生する信号が抑制されている.

エレクトロスピニングにより作製した磁性足場材料による局所磁場が細胞培養へ与える影響に関する研究

(Effect of local magnetic fields generated by electrospun magnetic scaffolds on cell culture)

大阪工業大学工学部生命工学科　外　波　弘　之

・目的

生体は一般に非磁性体であり，静磁場の生体への影響はあまり解明されていない．また細胞レベルにおいても，静磁場および変動磁場中で様々な条件下において細胞培養が行われているが，電流・電圧や熱に比して大きな影響は見られていない．しかしながら，静磁界により大きな影響が見られた研究として，Colettiらの筋肉細胞の分化促進を行ったものが挙げられ，筋肉細胞が静磁場に対して敏感に応答することが示唆された [1].

そこで本研究では，細胞足場形成に有用なエレクトロスピニング法を用い磁性を有する足場を作製し，細胞に近接した位置から複雑な局所磁場を与え，その影響を検討することとした．培養器外部からの静磁場だけではなく，細胞直近からの局所的静磁場により，より大きな応答を期待するものである．

・方法

エレクトロスピニング法を用いて2種類の磁性足場材料を作製した．一方は粒径6 μmの鉄粉を含有するポリウレタン（PU）の繊維が集積したシート（PUFe）であり，もう一方はコバルトニッケル（CoNi）からなる繊維が集積したシートである．PUFeについては，テトラヒドロフラン（THF）とジメチルホルムアミド（DMF）を体積分率が95:5になるように混合し，PU（日本ミラクトラン株式会社　P22SNAT，20wt%）と鉄粉（ φ6 m, 10wt%）を加えて調製した液を高電圧（5~20 kV）を印加しながらシリンジ先端から射出することで作製した．また，CoNiシートについてはNasserらの方法 [2] に従い，ポリビニルアルコールの水溶液に，酢酸コバルト(Ⅱ)四水和物と酢酸ニッケル(Ⅱ)四水和物を溶解させてエレクトロスピニングを行い，シートを乾燥，焼成（かしょう）することで，コバルト(Co)とニッケル(Ni)の合金繊維からなる足場材料を作製した．作製したシートは位相差顕微鏡および走査型電子顕微鏡（SEM）で観察し，繊維系等を見積もった．

こうして得られたシート上に，未分化マウス筋細胞株であるC2C12細胞を播種し，図１に示すように永久磁石（85 ± 15 mT）を配置した条件下で培養を行った．培養48 h後に分化培地に交換し，一定期間培養後のシートを核染色及びアクチン染色して，蛍光顕微鏡で観察した．

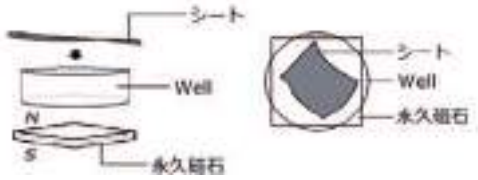


図１．細胞培養時の永久磁石の配置.

・結果と考察

作製したPUFeシートの位相差顕微鏡像とSEM像を図２に，250 ℃でか焼して作製したCoNiシートのSEM像を図３に示す．

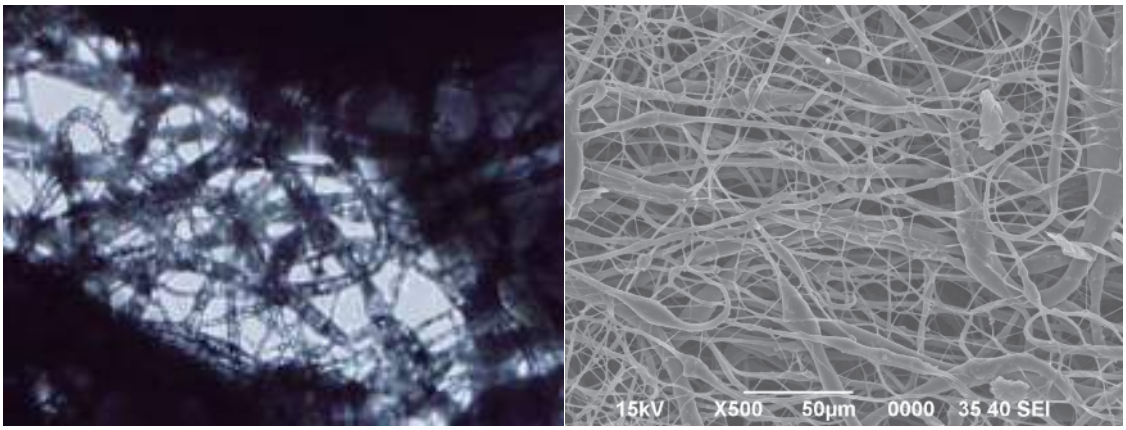


図２．PUFeシートの位相差顕微鏡像（左）とSEM像（右）．

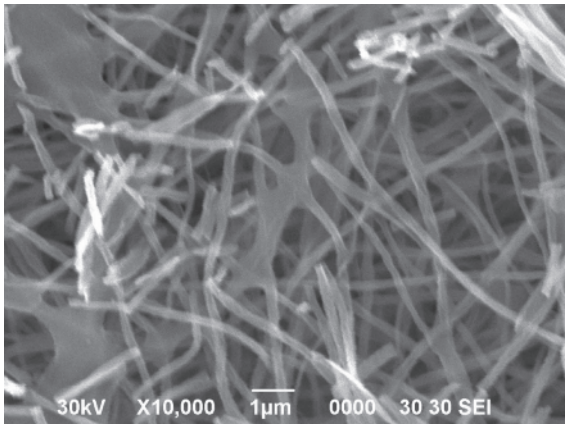


図３．250℃でか焼して作製したCoNiシートのSEM像．

図２の位相差像から鉄粉が繊維中に埋入していることを示された．また，CoNiシートをか焼する際の温度管理を適当に行うことにより，磁力応答と導電性を有するCoNi合金シートを得た．図３に示すように，部分的に繊維の断裂見られたものの，直径100 nm程度の繊維構造が残存していることが確認された．また250 ℃でか焼することで, 磁気応答と導電性を有することが分かった．

PUFeシート上に未分化マウス筋細胞株であるC2C12細胞を播種し，静磁場の有無が分化に及ぼす影響を観察するために，核染色及びアクチン染色して各日数で観察を行った（図４）．接着細胞数が十分でなく，いずれの場合も筋細胞の融合・分化は見られなかったが，静磁場が存在する条件下においてのみアクチンが染色され，静磁場が存在しない場合細胞死が疑われた．また鉄粉を含まないPUシートを用いた場合も細胞数が少なく，さらにアクチンが染色されず，PUFeシートで静磁場を与えた場合にのみ長期間の生着が確認された．このことからPUFeシートによる局所的な静磁場がC2C12細胞の生着に寄与したと考えられる．

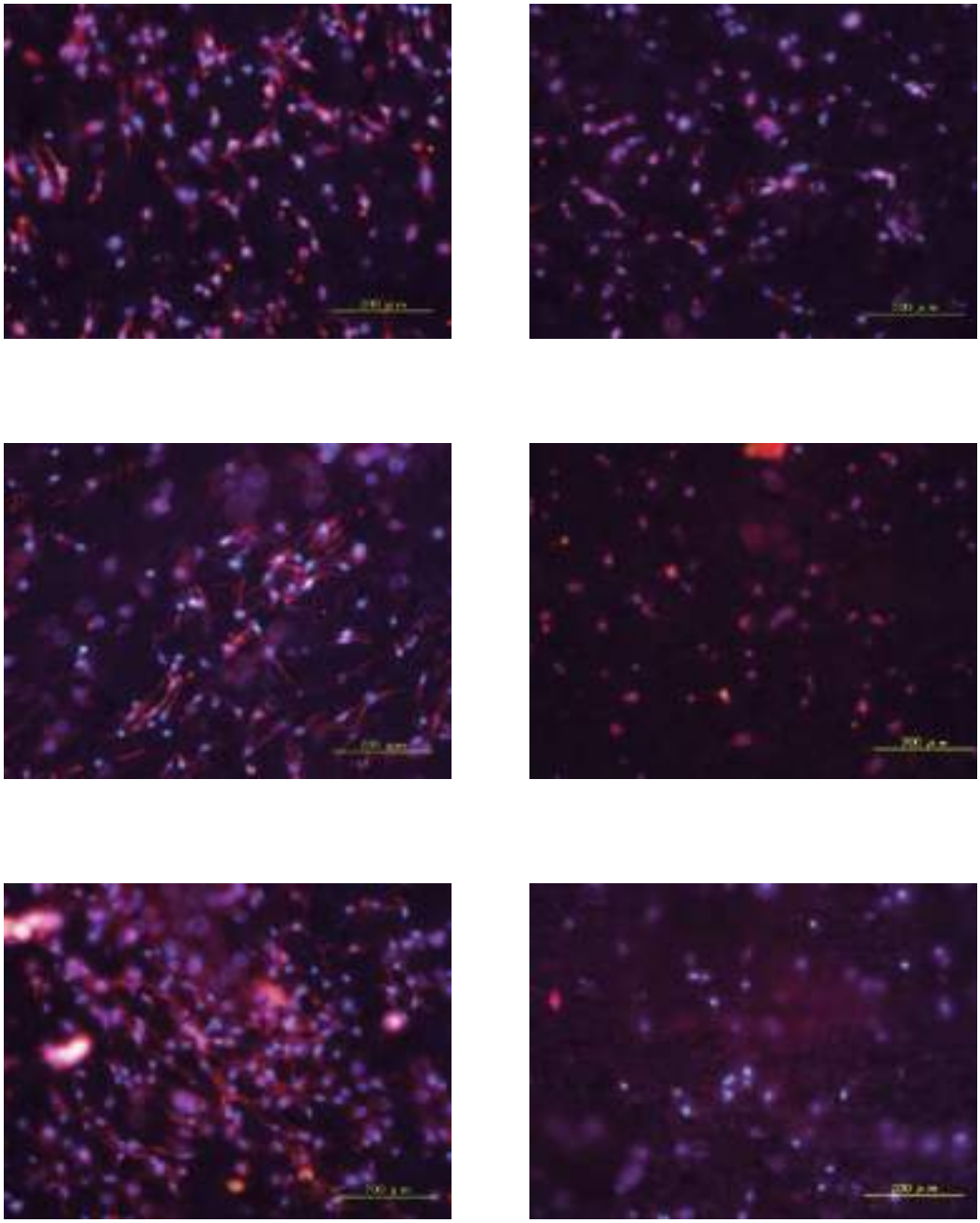


図４．PUFeシート上でのC2C12細胞の培養．青色は核染色，赤色はアクチン染色．

またCoNi合金シート上での培養を同様に試みたところ，溶出金属イオンの影響のためか短期間で細胞死が確認され，細胞培養に使用するためにはか焼条件の再検討が必要と思われる．

今後は，静磁場による筋細胞の分化促進を１つの目標として，接着した細胞の密度を上げるために，材料組成やスピニング条件，表面処理方法の改良を検討している．

・文献

[1] D. Coletti, L. Teodori, M. C. Albertini, M. Rocchi, Alessandro Pristera, M. Fini, M. Molinaro and S. Adamo, "Static Magnetic Fields Enhance Skeletal Muscle Differentiation In Vitro by Improving Myoblast Alignment." Cytometry Part A, 71A, pp. 846-856 (2007).

[2] Nasser A. M.Barakat, Khalil A. Khalil, Ibrahim H. Mahmoud, Muzafar A. Kanjwal, Faheem A. Sheikh, and Hak Yong Kim, "CoNi Bimetallic Nanofibers by Electrospinning: Nickel-Based Soft Magnetic Material with Improved Magnetic Properties." J. Phys. Chem. C, 114, pp. 15589-15593 (2010).

ハイパーサーミア応用のための
強磁性体金属内包カーボンナノチューブ生成

(Synthesis of carbon nanotubes filled with ferromagnetic metal and its application to hyperthermia)

三重大学　大学院工学研究科　　佐　藤　英　樹

【目的】

「癌」はここ30年、連続して日本における死因の第1位の座を占めており、安価で効果的な癌治療法の開発が急務となっている。癌治療法の一つとして、磁性ナノ微粒子を発熱体として組織内に注入し、外部からの高周波磁場印加によって癌組織のみを局所的に加温する磁気ハイパーサーミアが研究されている[1]。この方法では、非侵襲的であるため患者の負担が少ない、MRIなどの磁性を利用した粒子位置検出が可能、などの利点がある。しかしながら、従来の磁性ナノ微粒子では発熱量不足により加温効果が十分に得られておらず、少量で発熱効率が高く、かつ生体適合性が高い磁性ナノ粒子材料の開発が不可欠であった。そこで本研究では、磁気ハイパーサーミア用の磁性ナノ材料として、強磁性体内包カーボンナノチューブ(carbon nanotube : CNT)[2]に注目した。

CNTは直径が数nmから数10nmで、炭素でできた六角網面（グラフェンシート）が筒状になった中空構造を持つ（図1）。このCNTに内包された強磁性金属は、グラフェン層に包まれているため、これが保護層となり内包金属は高耐候性が期待できる（図2）[3]。本研究では、ハイパーサーミア応用に適した、強磁性体内包カーボンナノチューブ（CNT）合成方法の確立を目指し、(1) CNT内への強磁性金属（鉄：Fe）の内包方法の確立、(2) Fe内包CNTの磁気特性制御、(3) Fe内包CNTの合成量向上、(4) Fe内包CNTの発熱特性評価の4項目ついて評価を行った。

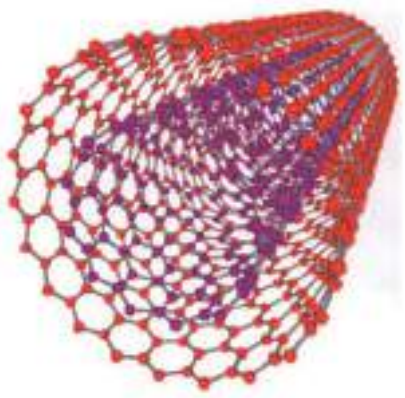


図1　カーボンナノチューブのグラフィクスイメージ.

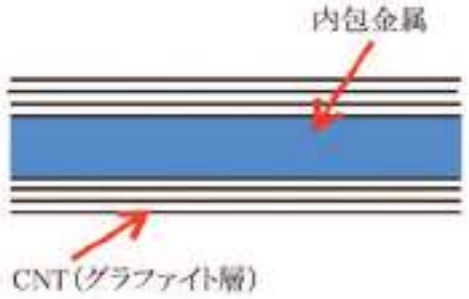


図2　強磁性を内包したカーボンナノチューブの模式図.

【方法】

Feナノワイヤ内包CNTの成長方法は以下の通りである。あらかじめ酸化膜を形成したSiウェハの表面に、真空蒸着法によりによりFe薄膜を2.0 nm成膜したものをCNT成長用基板とした。この基板をCVD装置（図3）に導入し、0.2 Pa程度まで真空排気を行ったのち管内をAr置換する。その後、所定の温度まで昇温後、原料ガスを導入してCVDを行った。

原料ガスとしてはAr雰囲気下で加熱・昇華させたフェロセン（$Fe(C_5H_5)_2$）ガスを用い、これをキャリアガスのアルゴンとともにリアクタ内に導入しながら785℃で10分間のCVDを行った。成長したCNTの評価は、走査型電子顕微鏡（SEM）観察、透過型電子顕微鏡（TEM）観察ならびに制限視野電子線回折(SAED)により行った。また、磁気特性の測定は試料振動型磁力計により行った。

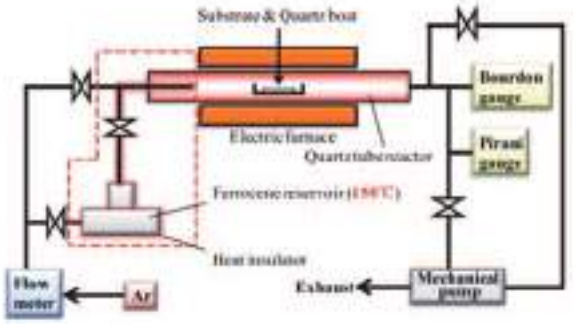


図3　本研究で用いたCVD装置の概略図.

【結果および考察】

図4に、CVD後の基板断面をSEMにより観察した写真を示す。基板に対し垂直に配向成長したCNTが確認される。これらのCNTをTEMおよびSAEDにより観察したところ、その直径は約10～100 nmに分布しており、その空洞内部はほぼFeもしくはその炭化物により満たされていた（図5(a),(b)）。CNTの全空洞体積に占めるFeの体積（Fe内包率）はおよそ56%で、内包されるFeナノワイヤのアスペクト比はおよそ32.4であった。

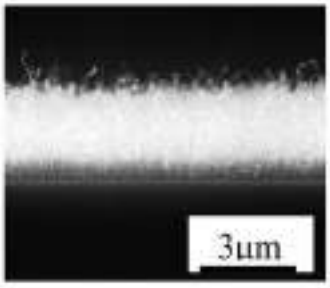


図4　成長したCNTのSEM観察像.

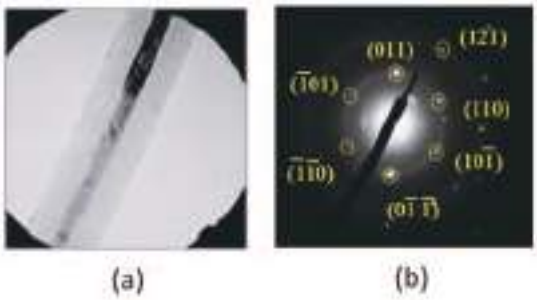


図5　CNTの (a) TEM観察像、(b) SAED像.

振動試料型磁力計により磁気特性を調べたところ、明瞭な磁気異方性が観られ、面直方向については最大で約1.8 kOe (143 kA/m)の保磁力が得られた(図6)。成長した複数のCNTについて制限視野電子線回折像の観察を行ったところ、高い割合（50%以上）でCNT内にFe単結晶が内包されていることが確認され(図5(b))、相対的に鉄炭化物の内包が少なかった。これが保磁力向上の原因であると推測され、磁気特性の制御において、CNTに内包されるFeの結晶状態が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

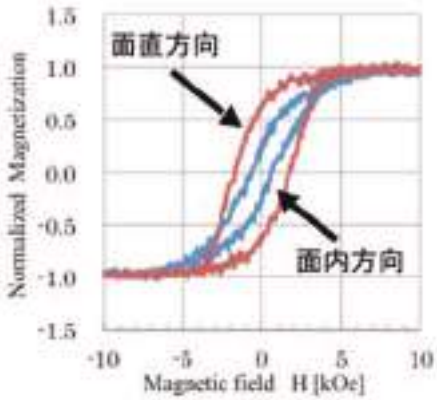


図6　強磁性内包カーボンナノチューブの磁化曲線.

成長量増加実験では、Si基板にあらかじめ形成するFe層を一度大気中で強制酸化させ酸化鉄の状態にすることにより、Fe内包CNTの収量は従来の約2倍まで増加させることができることを確認した。これは酸化によるFe薄膜の触媒活性向上によるものと考えられる。

以上の結果より、Feナノワイヤ内包CNTの合成方法を確立し、またその磁気特性制御が行えることを確認した。これにより、従来よりも広範囲の磁気特性制御が可能となった。しかしながら、これらのCNTからの発熱特性の評価は未実施の状況である。これについては現在評価準備並びに予備実験を行っているところであり、今後速やかに発熱特性評価を行い、ハイパーサーミア用発熱体としての特性評価を実施する予定である。

【発表】

(1) Atsushi Nagata, Hideki Sato, Yusuke Matsui, Tetsuya Kaneko, Yuji Fujiwara, "Magnetic properties of carbon nanotubes filled with ferromagnetic metals", The Eleventh International Symposium on Sputtering & Plasma Processes, Kyoto, Japan, (July, 2011)

(2) Atsushi Nagata, Hideki Sato, Shunsuke Nakamura, Tetsuya Kaneko, Yuji Fujiwara, "Magnetic properties of carbon nanotubes filled with iron", 4th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials, Aichi, Japan (March 7, 2012).

(3) 長田 篤、佐藤英樹、中村峻介、金子哲也、藤原裕司、「鉄内包カーボンナノチューブの磁気特性」2012年春季 第59回応用物理学関係連合講演会、東京都（2012.3.15）

(4) Atsushi Nagata, Hideki Sato, Yusuke Matsui, Tetsuya Kaneko, Yuji Fujiwara, "Magnetic properties of carbon nanotubes filled with ferromagnetic metals", Vacuum, 掲載決定.

【文献】

[1] I. Baker, Q. Zeng, W. Li and C.R. Sullivan, Heat deposition in iron oxide and iron nanoparticles for localized hyperthermia, J Appl Phys 99, 2006, 08H106-8.

[2] Ado Jorio, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus (Eds.), Carbon nanotubes: advanced topics in the synthesis, structure, properties and applications (Springer-Verlag, Berin Heidenberg, 2008).

[3] S. Groudeva-Zotova, R. Kozhuharova, D. Elefant, T. Muhl, C.M. Schneider and I. Monch, Phase composition and magnetic characteristics of Fe-filled multi-walled carbon nanotubes, J Magn Magn Mater 306, 2006, 40-50.

磁気アルキメデス効果による
ラベルフリー3次元生体組織再構築法の開発

(Novel Label-Free 3-Dimensional Tissue Reconstruction using Magneto-Archimedes Effect)

東京農工大学　大学院生物システム応用科学府　　秋　山　佳　丈

【目的】

ヒトにおいてもES細胞だけでなくiPS細胞が樹立され，各細胞への分化技術が確立されつつあるのに伴い，ティシューエンジニアリングの可能性が大きく広がっている．これまでに，ポリ乳酸等の生分解性ポリマーの足場に細胞を播種することで組織の再構築が行われてきているが，臨床応用が行われているのは，皮膚，骨，軟骨，膀胱などで，比較的単純な組織構造と生理機能を有しているもののみであり，また問題点として，足場内での代謝不良による細胞の壊死や分解物による炎症などが問題となっている[1].

生体は微弱ながら反磁性を示し，非常に強力な磁場勾配によって浮上させることが可能である[2]．従って，生体を構成する細胞も同様に培養液に常磁性化合物を添加し，磁気アルキメデス効果[3]を用いることで，市販のネオジム磁石程度の磁場でも細胞の浮遊が可能になると考えられる．そこで，新たな3次元組織構築法として，磁気アルキメデス効果による反磁性を利用した細胞アセンブリ法の有用性の検証を行う．まず，細胞を円筒形状に凝集させるために必要な磁場を有限要素法による解析により求める．

【方法】

まず, 磁気アルキメデス効果を用いるためには, 強磁性化合物を培地に添加する必要があるための，その毒性試験を行った．細胞にはHepG2（理研セルバンク）を，強磁性化合物としては，Gd-DOTA（MRI造影剤マグネスコープ）を用いた．各濃度のGd-DOTAに暴露後，24, 48, 72時間後の細胞の活性をWST-1（タカラバイオ）を用いて評価した.

次に，中空円筒形状の組織の作製を行った．細胞にはC2C12（理研セルバンク）を用い，培地にはGd-DOTAを40 mM添加した．作製手順をFig. 1 に示す．まず，細胞を磁気アルキメデス効果により，心棒の回りに凝集させた．そして，細胞同士が接着するように，そのまま1日間培養を行った．次に，心棒を反転して，細胞が心棒全体を覆うまで培養した後に，心棒を取り除くことで中空円筒形状の組織を得た.

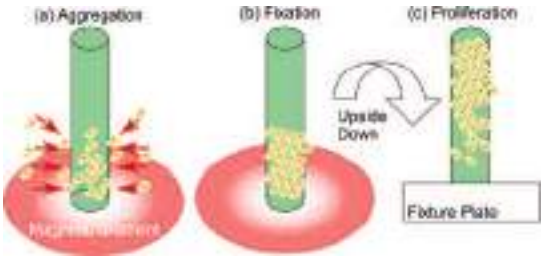


Fig. 1 中空円筒形状の組織の作製方法

【結果・考察】

細胞活性の評価結果をFig. 2に示す．80 mMへの暴露において，48時間以内では顕著な影響は見られなかったが，72時間においては対照実験と比較し50%以下となった．一方，40mMにおいては，72時間においても，対照実験と比較し80%以上の活性を保っており，20および40 mMの違いは小さかったため, 以下の実験においては, 終濃度40 mMとなるようにGd-DOTAを添加することとした．次に，得られた中空円筒形状の組織を，生細胞のみを染色するカルセインで染色し，観察した．その結果，ほとんどの細胞が生存していることが確認出来た(Fig. 3).

以上のように，磁気アルキメデス効果を用いることで，細胞を標識すること無く，3次元形状の組織を構築することが可能であることが示された．本研究で作製した組織は，単純な形状であったが，今後電磁石を用いるなどし，動的な磁場を用いることでより複雑な組織形成を行っていきたい．

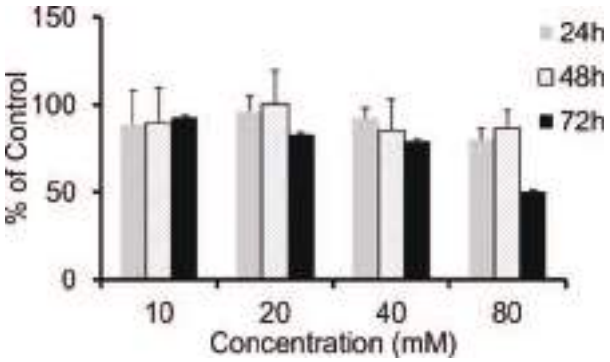


Fig. 2 Gd-DOTAのWST-1を使った細胞毒性アッセイの結果
（エラーバー: 標準偏差，試験回数：6回）
80 mMにて48時間の暴露は, 顕著な成長抑制効果が見られた.

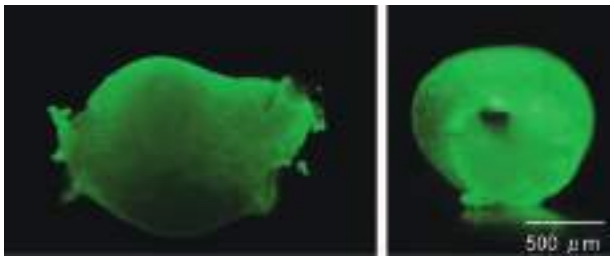


Fig. 3 カルセインにて生細胞のみを染色した中空円筒形状組織の蛍光画像（左：真横から，右：真上から）.

【発表】

1. Y. Akiyama and K. Morishima: "Label-free ultrarapid spheroid formation in microfluidic chip using magneto-Archimedes effect," *The 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2012)*, Paris (France), pp. 116 -119 (2012.1).
2. 秋山佳丈，森島圭祐，"マイクロ流体チップ内でのノンラベル高速スフェロイドアレイ形成" *第21回インテリジェント材料/システムシンポジウム*，東京女子医科大学（東京），B08 (2012.1.10)
3. Y. Akiyama and K. Morishima: "Hollow cylinder-shaped tissue formed by magneto-Archimedes cellular assembly," *Biofabrication 2011*, Toyama (Japan), p. 43 (2011.11).
4. Y. Akiyama and K. Morishima, "Spheroid array formation by non-label cell manipulation using magneto-Archimedes effect," *The 23th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2011)*, Nagoya (Japan), pp. 45-50 (2011.11).

【文献】

[1] K. Jakab et al., "Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells." *Biofabrication*. 2(2), 022001, 2010.

[2] M. V. Berry and A. K. Geim, "Of flying frogs and levitrons," *European Journal of Physics*, vol. 18, no. 4, pp. 307-313, 1997.

[3] Y. Ikezoe, et al., "Making water levitate," *Nature*, vol. 393, no. 6687, pp. 749-750, 1998.

低周波磁気刺激による視覚支援デバイスの開発

(Development of visual-assisting devices by ELF magnetic stimulations)

東京大学大学院　情報理工学系研究科　　正　宗　　賢

【目的】

近年、磁気刺激を広く高齢者・障害者の医療および生活支援に役立てることに期待が高まる一方、パルス磁界による脳や筋への刺激はコイルに大電流を流すリスクなどの問題点が指摘される。そこで低周波磁気刺激の利用が福祉機器への実用化において有望視されるが、現状でそれらの開発は殆どなされていない。

磁気環境問題における指標の一つとされる磁気閃光現象は、頭部を交流磁界内へ置いた際に認められ、誘導電流による網膜への刺激が閃光を知覚させると考えられている [1-7]。近年では電気刺激による閃光現象を視神経の再生治療に応用する例も見られ、この治療に低周波磁気刺激を代用すれば電気刺激による方法とは違って痛みを伴うことがない。即ちこの磁気閃光と同等レベルの低周波磁気刺激の利用は福祉機器開発のための重要な一手段となる上、頭部磁気刺激システムの改良が医療・福祉工学への更なる発展につながるものと期待される。また磁気閃光の発生機序に関しては未だ不明瞭な点が多く、そのメカニズムの完全解明は福祉機器開発のみならず、意識そのものの解明に重要な知見を与えうる可能性がある。そこで本研究では、磁気と干渉しない光ファイバを用いて脳機能の様子を画像化する光脳機能イメージング技術を利用し、磁気閃光メカニズムの解明および高齢者・視覚障害者を対象とした視覚支援デバイスの開発研究に役立てることを目的とした。

【方法】

実験に用いた装置および測定環境について述べる．視覚刺激用の光源として汎用の蛍光ランプを眼球から20 cmの距離に配置し、1計測セッションあたり各20秒の安定状態、刺激提示および休息を3回繰り返した。

低周波磁気刺激では被験者のこめかみ部に対し、眼を瞑った状態で明瞭に閃光を確認しうる位置へコイル先端を導入して磁気刺激 (網膜部で10 mT) を行った。その製作コイル [8] をFig. 1に示す。この間の後頭部の血流変化を0.16秒間隔でサンプリングし、酸素化ヘモグロビン (oxy-Hb)、脱酸素化ヘモグロビン (deoxy-Hb) および総ヘモグロビン (total-Hb) の動態について、paired-t検定 ($P < 0.05$) による評価をおこなった。

男性健常者の全7名 (20歳代5名、40歳代1名および70歳代1名、視覚障害等の既往症なし)。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）に不利益のないよう詳細に説明し、研究協力における同意を得た。また、研究協力はいつでも辞退できることを伝えた。

Fig. 1　Simplified coil system for magnetophosphenes.

測定条件として、室温23℃、湿度50%の暗室内における開眼座位を設定し、各被験者の頭部にホルダ間隔30 mmの全頭用ファイバホルダを装着した。次いで後頭葉をカバーする形で5× 4 (Fig. 2) に配置した直射型の送光および受光ファイバ各10本 (31 ch) を介し、島津製作所製近赤外光脳機能イメージング装置FOIRE-3000/16 (Fig. 3) と接続した。

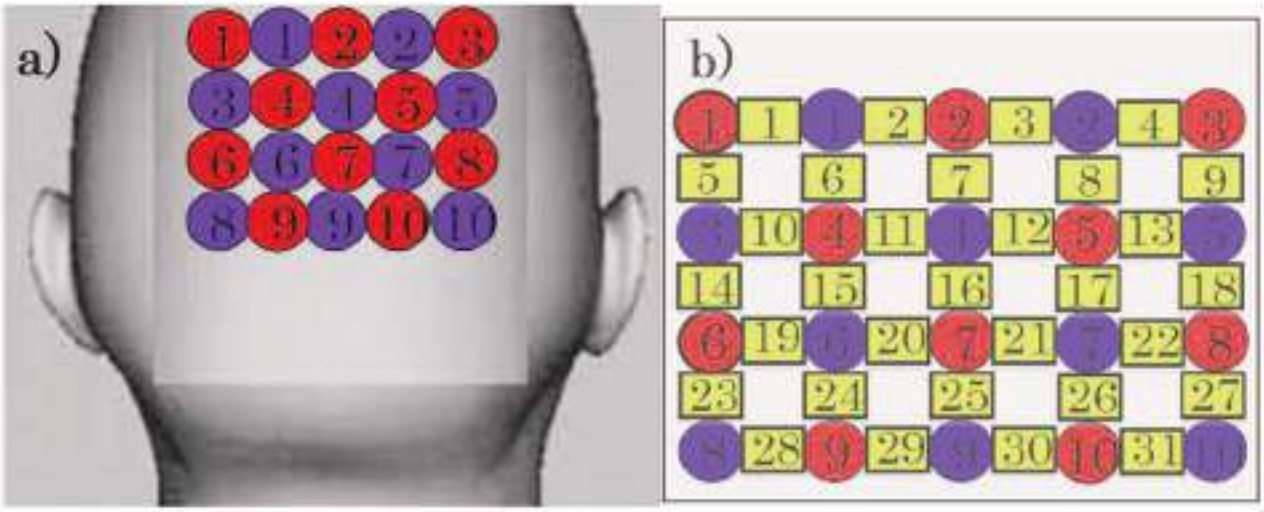


Fig. 2　a) Probe geometry schematic. Red filled circles = sources, blue filled circles = detectors.
b) Channel set up. Yellow filled squares = channel numbers.

Fig. 3　Functional Near-Infrared Spectroscopy (fNIRS, Shimadzu FOIRE-3000/16)

【結果および考察】

各被験者につき3セッションの連続計測を行った結果、蛍光ランプによる視覚刺激では後頭部プローブ7番を中心とした周辺チャネル全般でoxy-Hb濃度の上昇が確認された (Fig. 4)。これらのチャネル領域は一次視覚野に相当する部位を網羅しており、よって視覚刺激により有意に賦活化したと容易に判断できる。特にoxy-Hb濃度上昇が顕著だったのはチャネル15、17、20、21、22、26であり、それらの殆どでdeoxy-Hb濃度の微増が観察された。一方、チャネル17と22においてはdeoxy-Hb濃度の減少が認められ、下半視野への刺激でdeoxy-Hb濃度が減少する報告 [9] と合わせて興味深い。

磁気閃光刺激においては、蛍光ランプによる視覚刺激で認められたチャネルでの有意な賦活化は一切認められなかった。これは今回用いたコイルが一次視覚野の賦活化を検出しうるレベルの磁場強度に達していないことに起因すると推測された。一方、有意性は無いがoxy-Hbの上昇が一部確認できるチャネルがプローブ配置上の幾つかで存在し、一次視覚野を介さない経路での賦活化を磁気閃光が誘導する可能性が示された。これらの賦活化が磁気閃光刺激特有のものであるとすれば、上丘を介す経路で起こる「盲視」を促進することで視覚機能の回復に利用できると期待される。今後、刺激コイルのさらなる改良と合わせ、低周波磁気刺激による側頭部および頭頂部における賦活化について詳細検討し、磁気閃光メカニズムの解明と視覚支援デバイスの開発に役立てていきたい。

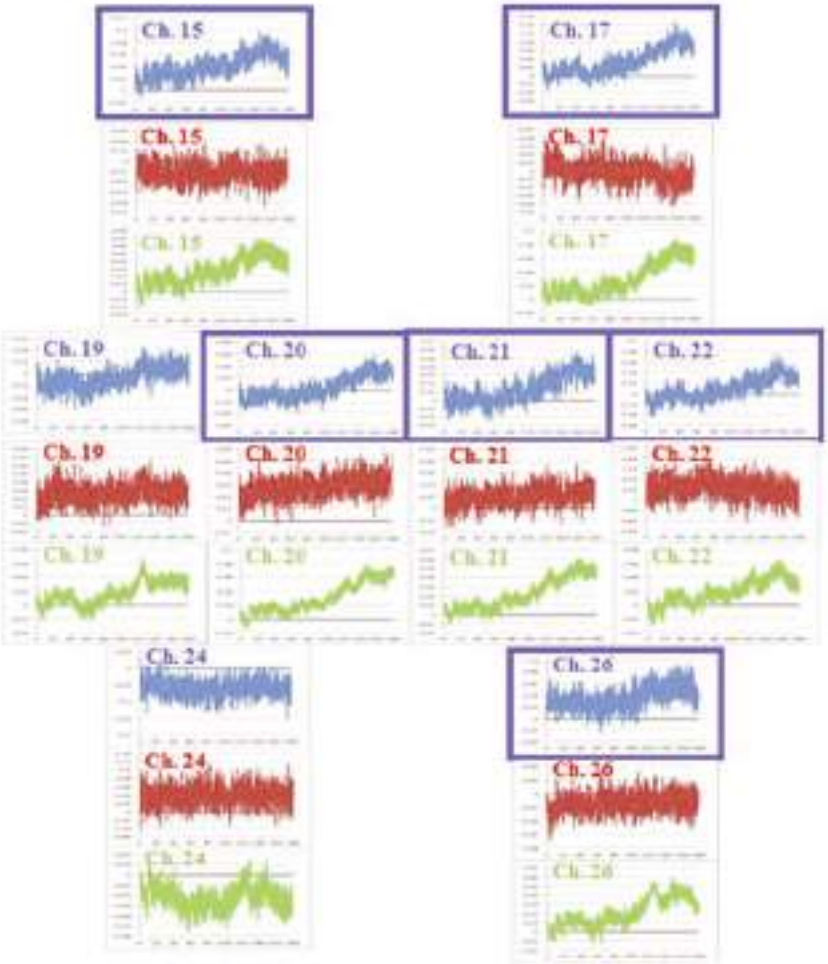


Fig. 4
Hb responses following visual stimulations. Top row = oxy-Hb concentration changes, center row = deoxy-Hb concentration changes, bottom row = total-Hb concentration changes.

【参考文献】

[1] M.A. d'Arsonval, Dispositifs pour la mesure descourants altenatifs des toutes frequences, C.R. Acad. Sci., 48, 450-451, 1896.

[2] M. Valentinuzzi, Theory of magnetophosphenes, Am. J. Med. Electronics, Apr-Jun, 112-121, 1962.

[3] P. Lovsund, P.Å. Oberg, Magnetophosphenes: a quantitative analysis, Med. Biol. Eng. Comput., 18, 326-334, 1980.

[4] K. Dunlap, Visual sensation from the alternating magnetic field, Science, 33, 68-71, 1911.

[5] C.E. Magnusson, H.C. Stevens, Visual sensations caused by changes in the strength of a magnetic field, Am. J. Physiol., 29, 124-136, 1911.

[6] P. Lovsund, P.Å. Oberg, Quantitative determination of threshold values of magnetophosphenes, International Symposium on the Biological Effects of Electromagnetic waves Air line, Va, Abstract K-2, 1977.

[7] 小倉 玄、多氣 昌生、雨宮 好文、相本 篤子、上村 佳嗣、磁気閃光の閾値に関する実験的検討、信学技報 EMCJ, 94, 13-18, 1994.

[8] 中川秀紀、森山真人、正宗賢、山下紘正、小谷誠、土肥健純、磁気閃光現象に基づく低周波磁界曝露の生体影響に関する検討、生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会2010講演論文集, 416-419, 2010.

[9] 田谷 修一郎、前原 吾朗、小島 治幸、刺激呈示視野に対応した後頭部の血行動態反応：24チャンネルNIRSによる測定、信学技報 HIP, 106, 49-52, 2006.

ヒト運動野内在性リズムの生理的意義の反復磁気刺激による解明：反復磁気刺激のシナプス可塑性誘導の機序解明を目指して

(Relationship between the stimulus frequencies of repetitive transcranial magnetic stimulation and the intrinsic rhythm of the human cortex in the cortical excitability changes)

東京大学医学部附属病院　神経内科　　花　島　律　子

目的

経頭蓋磁気刺激法は、ヒト大脳内の神経を非侵襲的に刺激し中枢神経の興奮調節機構の検討に広く用いられている。近年は反復磁気刺激法により、大脳の興奮性変化が持続することが注目を集めている。この長期興奮性変化は、学習などに関与するシナプス可塑性変化であると示唆され、神経疾患の治療法としても期待される。刺激後の効果は刺激周波数により変化するが、その関係性は未だ解明されていない。一方、神経の興奮性には部位ごとに固有の内在性リズムあることが近年注目されている。ヒト運動野では周波数13～30Hz（β帯域）および30～90Hz（γ帯域）であると知られているが、この生理学的意味は不明である。

今回、我々は、外的刺激の周波数が運動野の内在リズムと一致した場合どのような興奮性の変化を起こすか解明することを目的とした。4発の経頭蓋磁気刺激を外的刺激として与え、刺激周波数による大脳興奮性変化を検討し、促通を起こす特定の周波数を明らかにして、内在リス無との関係を解明するのが目的である。これを今後長期可塑性に最適な反復磁気刺激の周波数の解明につなげようとした。

方法

1. 4発の経頭蓋磁気刺激の周波数よる皮質興奮性の変化の検証

被検者は健常ボランティア15名。運動野の興奮性の指標は、単発磁気刺激に対する対側手指筋の反応（運動誘発電位）の振幅とした。4発の磁気刺激は5msから100m s の一定の刺激間隔で与えた（即ち10Hzから200Hz）。初めの3発の磁気刺激はその刺激のみでは運動誘発電位を出現させない運動閾値以下の刺激強度として（条件刺激）、最後の1発の刺激（試験刺激）は運動誘発電位を誘発する強度とした。試験刺激単発による運動誘発電位と、3発の条件刺激を先行させた場合の運動誘発電位の振幅の比率をとり、どの周波数で促通がみられるか検討した。

また、刺激のリズムに関わる変化であることを示すために、一発の強度の強い条件刺激の効果と比較した。

2.神経疾患への応用

大脳皮質のリズムに変化が生じていると示唆されている神経疾患において、促通効果がおきる周波数が変化しているか検討した。対象は皮質性ミオクローヌス6名、パーキンソン病10名。健常者の場合と同様の4発の経頭蓋的磁気刺激を行っ

た。

更に、促通が起きる周波数と皮質内抑制機構の関連を検討するために、磁気2発刺激法により運動野抑制機構の指標である短潜時抑制を併せて検査した。一発の運動野閾値以下の条件刺激を、1-5ms試験刺激に先行して与えて1-5msの刺激間隔の運動誘発電位の振幅減弱が誘発されるか分析した。

結果

1．4発の経頭蓋磁気刺激の周波数よる皮質興奮性の変化の検証

4発の磁気刺激の刺激間隔7-8msと25msで促通効果がみられた。刺激間隔7-8msの促通効果は1発の強度の強い条件刺激でも誘発されたが、刺激間隔25msの促通効果は条件刺激が3発の場合（即ち40Hzの刺激）でのみ誘発された。

2．神経疾患への応用

皮質性ミオクローヌスでは25 ms(40Hz)の4発の磁気刺激では促通がみられず、40m s 間隔の刺激(20Hz）により軽度の促通が生じた。2発刺激による皮質内短潜時抑制は減弱していた。

一方、パーキンソン病では、25 ms(40Hz)を含め、どの周波数でも4発の磁気刺激では促通効果はみられなかった。2発刺激による皮質内短潜時抑制は、前から後ろ向きの電流を誘発する方向に磁気刺激を行った場合には正常に誘発された。

考察

健常者では40Hzの4発の経頭蓋磁気刺激により促通効果を起こすことが示された。40Hzの外的刺激により、運動野の内在性リズムの40Hzのγ帯域の周波数と同期して促通が起こるのではないかと考えられた。

また、皮質性ミオクローヌスでは40Hzでは促通はなく、25Hz刺激で促通が見られることから、β帯域の刺激に同期しやすくなっていると考えられた。この結果は脳波などで皮質性ミオクローヌスではβ帯域のリズムが亢進していると報告されていることと合致する。皮質性ミオクローヌスは介在ニューロンの機能が障害されるとされるが、これにより皮質内の抑制機能が失われるとともに、運動野内ネットワークに変化を起こし優位な内在リズムがγ帯域からβ帯域に移行しているのではないかと考えられた。

一方、パーキンソン病では、基底核の機能異常により基底核内在リズムが変化しているとされている。今回の結果で外的刺激による促通効果が失われており、皮質でもリズムの変化が生じていると示唆された。皮質内抑制機構は保たれていることから、皮質内の変化ではなく基底核などからの間接的に生じた皮質リズムの変化であると推察される。

以上から外的刺激の周波数を内在リズムに合わせると促通が起きるのではないかと示唆され、内在リズムの変化の分析に用いることができると共に、今後促通を有効に誘導するための至適な周波数の解明に役立てられる可能性がある。

発表

1.花島律子ら　パーキンソン病における後ろ向き誘導電流による皮質内抑制　第52回日本神経学学術大会 名古屋

2.花島律子ら　皮質性ミオクローヌスにおける運動野興奮リズムの変化　第5回パーキンソン病・運動障害疾患コングレス　東京

3.堤涼介、花島律子ら　経頭蓋磁気刺激を用いた皮質抑制機能の相互作用に関する検討　第41回日本臨床神経生理学会学術大会　静岡

4.Hanajima R et al. Intrinsic rhythm within the primary motor cortex in cortical myoclonus 15th International Congress of Parkinson`s Disorders and Movement Disorders, 2011

Toronto

5.Shirota Y, Hanajima R et al. Transcranial magnetic stimulation over the cerebellum in ataxic and non-ataxic patients with progressive supranuclear palsy. The 4th International Symposium, Tokyo

文献

Hanajima R et al. Short-interval intracortical inhibition in Parkinson's disease using anterior-posterior directed currents. Exp Brain Res. 2011;214(2):317

組織再生に対する磁場作用の研究
～血液循環系に着目して～

(Analysis and molecular characterization of muscular regenetation in Medaka.)

独立行政法人産業技術総合研究所　健康工学研究部門　　川　﨑　隆　史

＜目的＞

磁場が生体に与える影響に関しては、これまでに多くの研究がなされてきたが、明確な作用を報告した例はほとんどない。この中で、血流を主とする循環系に対する作用が強く示唆されてきたが、これに関してさえも作用を決定付ける研究はない。これまでの研究で、マウス、ラット等の生物個体を用いた実験（in vivo）では、血管（血流）等、生体内を直接観察することができず、実験方法が限られるのが現状である。また、培養細胞を用いた実験（in vitro）では、実際の生体内(in vivo)の生理条件とはかけ離れた環境での実験となる。そこで、本研究では、生きた状態で生体内での経過観察が可能である利点を有する小型魚類メダカを用いたアプローチにより、健常時の生命活動や損傷治癒過程等に及ぼす静磁場の影響を探索する。

＜方法＞

・メダカの静磁場曝露

血球速度・心拍数に及ぼす影響を評価する実験に関しては、受精後20～25日の稚魚を、その他の実験に関しては、受精後50～60日のメダカ成魚を用いた。メダカを静磁場下で保持するためにネオジウム磁石を固定した磁場曝露装置（Fig.1）およびその中に挿入するメダカ保持用のセルを作製した。静磁場の強度はおよそ200mT とした。また、水温は26.5℃で、14時間明条件／10時間暗条件の周期的明暗条件の中で飼育し、1日2度の粉餌給餌を行った。

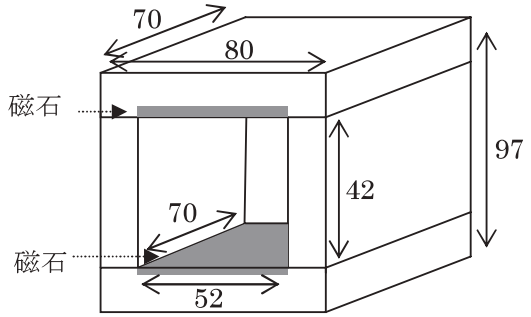


Fig. 1 静磁場曝露装置

・静磁場が血球速度・心拍数に及ぼす影響

赤血球を可視化した遺伝子導入（Tg）メダカ系統pGlobin:YFP(pGb:YFP)（文献1）の稚魚を用いた。受精後から実験で使用するまで、静磁場曝露下の条件でメダカ胚を保持した。メダカをガラスボトム皿に横たえ、顕微鏡ステージに乗せ、2分後に血流に従い移動する赤血球の画像の撮影を開始した。ガラスボトム皿上でも磁場に曝露できるよう、約200mTの磁石を固定したリングを作製し、必要に応じて撮影用のメダカの横に置いた。血流画像は、高速カメラ（CoolSNAP HQ，日本ローパ）により取得し、

Fig.3に従って解析し、赤血球の最高速度を計算した。また、心拍数は、目視により30秒間カウントした。

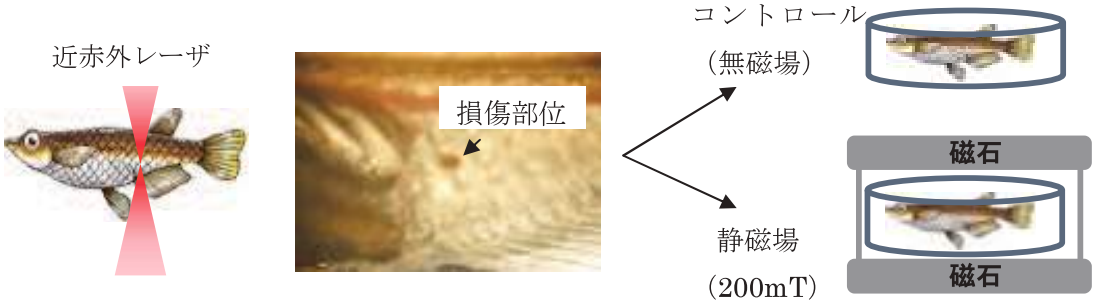


Fig. 2 メダカの損傷とその後の保持

・静磁場が血管の再生に及ぼす影響

Tgメダカ系統pGb:YFPを用いた。近赤外レーザ（550mT、67msec）を照射することにより、筋組織に損傷を起こした(Fig.2)。損傷後、共焦点レーザ顕微鏡を用い、損傷部の蛍光画像を、定期的に取得し、Fig.4に従って解析し、血管の再生過程を評価した。画像は、ｚ軸方向に10um毎に100umの深さまで撮影し、ｚ軸方向に重ね合わせたものを解析に用いた。

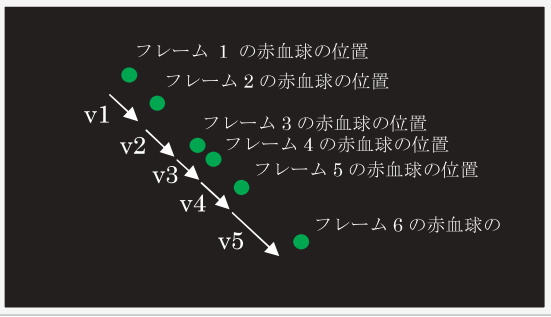


Fig.3 血流速度の評価

Tgメダカ：pGb:YFPの血流に伴う赤血球の移動を尾部筋組織において蛍光動画撮影し、フレーム毎の特定の赤血球の位置から、各フレーム間での赤血球の平均移動速度(v)を計算し、測定時間内での最大速度を算出し、各条件での血球速度とした。

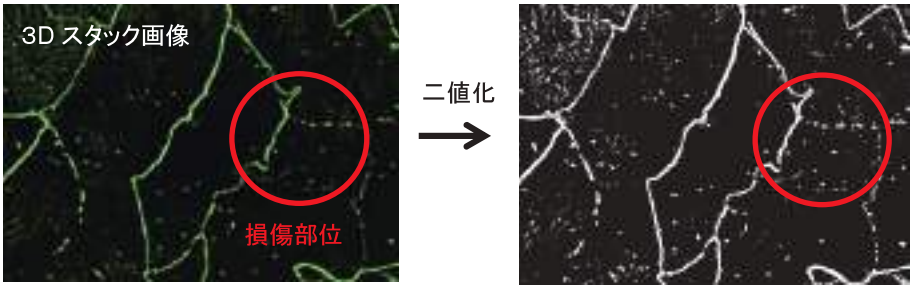


Fig.4 血管再生の評価

Gb:YFP損傷後の損傷部付近の蛍光画像を共焦点レーザ顕微鏡を用いて撮影した。ｚ軸方向に重ね合わせた蛍光画像を無償解析ソフトImageJにより二値化した。損傷部を中心とした半径250umの範囲内の領域での血管の面積を算出し、血管面積を定量化した。

・イメージングMS解析

メダカSeeThrough系統を用い、上記と同様の損傷を起こした。損傷後4日目、損傷メダカを凍結後、損傷部の横断切片を作製し、導電性コートを施したスライドガラス上に載せた。乾燥後、イメージングMS解析に用いた。イメージングMS解析は、ブルカー・ダルトニクス株式会社で行った。

＜結果＞

・静磁場が血球速度・心拍数に及ぼす影響

損傷後、静磁場無もしくは有環境下で保持したそれぞれのメダカに対し、静磁場無もしくは有環境下で画像取得を行い、それぞれの群に対する血流解析を方法に示したように行ったところ、静磁場環境下で保持し無磁場で撮影したもののみ有意な血流の上昇がみられたが、他の条件に関しては、有意差がみられなかった。心拍数については、すべての群に関して有意差は見られなかった。(Fig.5)

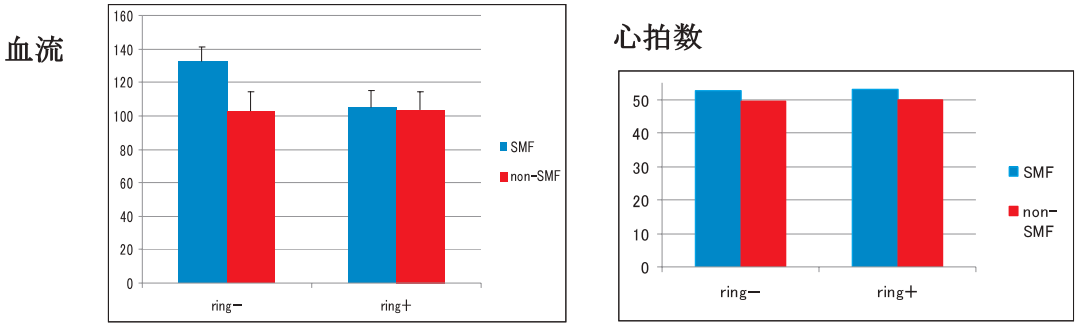


Fig.5 血球速度・心拍数に及ぼす影響

・静磁場が血管の再生に及ぼす影響

方法に示したように、損傷後の血管の再生過程を画像処理により評価した結果、本実験の条件では、損傷後2週間程度で再生の速度（血流のある血管の増加速度）が減少するため、主に再生速度が速い期間である損傷後2週間の再生過程に関する磁場の効果を検討した。その結果、損傷後の静磁場環境の有無は、損傷部付近の血管再生過程に対し、特に影響を与えなかった。(Fig.6)

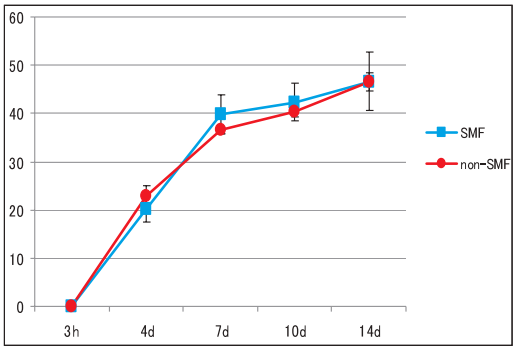
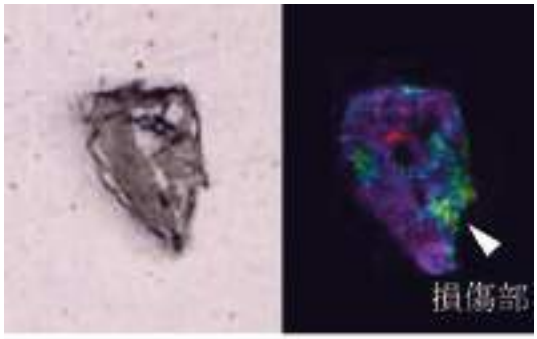


Fig.6 血管の再生に及ぼす影響

・イメージングMS解析

損傷後4日目のメダカの損傷部の横断切片に対し、イメージングMS解析を行った。有意に検出された蛋白質の分布を分子量毎にイメージングにより表示した結果、分子量6276付近の蛋白質に関して、損傷部に特異的な発現が見られた。しかし、磁場環境の有無による変化は見られなかった。(Fig.7)

無磁場飼育魚の切片像（左）とイメージング像（右）



磁場下飼育魚の切片像（左）とイメージング像（右）

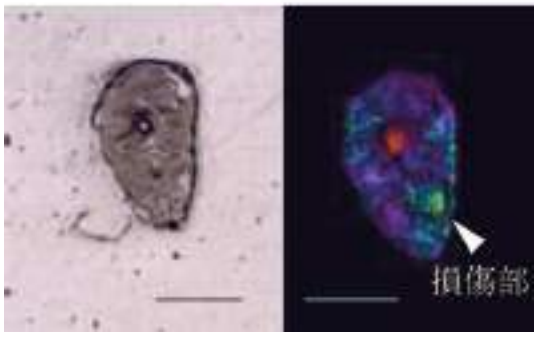


Fig.7 損傷部切片に対するイメージングMS解析

損傷後４日成魚の損傷部連続横断切片を作成し、イメージングＭＳ解析を行った。有意に検出された分子量の蛋白質に関し、それぞれイメージを作成した。無磁場下（上図）もしくは磁場下（下図）で飼育した各損傷成魚に関して、明視野像（左図）とイメージング像（右）を示した。イメージング像は、損傷部において発現する蛋白質（分子量約6276；緑）、背骨で発現する蛋白質（分子量約7825；赤）、全体的に発現する蛋白質（分子量約4734；青）の各分布をマージして示した。損傷部において発現する蛋白質の発現量は、見かけ上、磁場の有無によって変化しなかった。スケールバー：2 mm

＜考察＞

本研究では、個体が生きたまま生体内を観測できるメダカを用いることにより、高等動物では容易に実現できない実験系による細胞・組織レベルの解析を可能にすることにより、新たな知見を得られる可能性に期待した。しかし、血管、血流に関する実験および損傷部における発現蛋白質解析における殆どの場合について、静磁場の有意な影響がみられなかった。唯一、血流速度に関して、静磁場環境下保持後、無磁場で撮影した場合、他条件と比較して、有意な変化が見られた。静磁場における長時間保持後の磁場除去の影響も考えられるが、原因を特定するためには更なる研究が必要である。

本実験では、実験に用いる磁場を静磁場（200mT）に設定して実験を行った。実験的に、静磁場の強度を変動させたり、変動磁場を用いることが、安易に行いにくい問題点が存在するが、今後の課題として、静磁場強度（磁束密度）を変動パラメーターとしたり、変動磁場を用いることが必要であると考える。

＜発表＞

特になし。

＜文献＞

1. Maruyama K, Wang B, Ishikawa Y, Yasumasu S, Iuchi I. 1kbp 5' upstream sequence enables developmental stage-specific expressions of globin genes in the fish, medaka Oryzias latipes. Gene. 2012;492(1):212-9.

全頭型脳磁図を用いた統合失調症の感覚情報処理機能の縦断研究

(Longitudinal study of sensory information processing in schizophrenia using whole head 306-ch magentoencephalography)

九州大学大学院医学研究院　臨床神経生理学講座　　前　川　敏　彦

【目的】

統合失調症（SZ）は思考と知覚の独特で根本的な歪曲と不適切なあるいは鈍麻した感情で特徴づけられる原因不明で以前は早発痴呆と呼ばれた予後不良の精神疾患であるが，その病態は未だに十分には解明されていない。しかし，これまでの精力的な研究からSZは進行性の脳疾患であり，早期介入によって疾病の進行を食い止められる可能性が見いだされており，この領域のトピックスのひとつは早期発見のためのバイオマーカーの同定である。

ところで，N-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体拮抗薬であるフェンシクリジン（PCP）乱用者はSZとよく似た精神症状を示すことから，SZの病態仮説として「グルタミン酸作動性神経系機能低下説」が提唱されているが，脳波を用いた事象関連電位（ERP）の一成分である聴覚ミスマッチ陰性電位（aMMN）はグルタミン酸NMDA型受容体機能を反映していることが知られており，aMMNとMRI構造画像解析を組み合わせた研究によって，慢性期SZではaMMNの減衰と側頭葉の体積減少に相関があることが発見されている。また，aMMNを用いたSZの縦断研究では，罹病期間と陰性症状がaMMNの振幅と関連していることが報告されている。これまでSZの聴覚情報処理異常はaMMNを指標としてよく調べられてきたが，SZの感覚情報処理異常は聴覚に限定的なものではなく，視覚情報処理異常も繰り返し報告されており，SZの脳機能異常を解明する上で感覚情報処理のマルチモダリティー研究は必要である。我々は先行研究において，視覚MMN（vMMN）が視覚情報自動処理（Visual Information Automatic Processing, VIAP）の指標となること（文献1），慢性期SZではvMMNが減衰しており，vMMNが服薬量や年齢に相関していることを発見した（文献2）。先行研究から慢性期SZではvMMNが減衰しており，SZのVIAPは服薬量や年齢に相関していることが見いだされているが，どの時期から異常が出現するのかはわかっていない。発症早期SZを対象とすることでSZのVIAPを縦断的に解明できる。

本研究では，頭蓋骨などの構造物の影響を受けずに，脳波と同等の高時間分解能とMRI同等の高空間分解能で大脳皮質の神経活動を磁場変化として直接検知できる全頭型脳磁図（306ch-MEG）を用いてvMMNの磁場相当成分であるvMMFを指標にして，発症早期SZと慢性期SZのVIAPを解析する。

【方法】

1．対象

対象は初発統合失調症（初回入院後6か月以内の患者；FES）群と慢性期統合失調症群（初回入院後1年以上で完全寛解には至っていない患者；ChS））群と年齢，性別，利き手を一致させた各対照（NC）群，各群15名（計60名）程度を対象とする。

図1

2．視覚実験条件

被験者にはシールドルーム中の安楽椅子に座り，イヤホンからの物語に注意集中しながら前方のスクリーン中心を固視するように指示する。正面のスクリーンには2種類のウインドミルパタン{標準刺激（S），逸脱刺激（D）}と同じ大きさの白色円形刺激{標的刺激（T）}を呈示時間200 ms，刺激間隔800 ms，8：1：1の割合でランダムに呈示し，Tでボタンを押すように指示する（図1）。行動指標として，ボタン押しの正答率，反応時間を計測し，実験終了時に物語の内容に関する質問紙により被験者の注意が物語の内容とTの同定に向いていたことを確認する。実験中は306ch MEGを用いて持続して脳磁場を記録する。

3．記録と解析

得られたMEGデータはオフライン処理し，刺激ごとに加算平均を行い，Dに対する反応からSに対する反応を引算してvMMFを抽出した。先行研究からChS群ではvMMFが減衰することが予想される。あらかじめ撮像しておいた3T-MRI画像上にMEGデータを重ねてvMMFの電流源推定を行う。

【結果】

H24年3月時点で実験に参加した者は17人（ChS：10人，全員右利き，女性5人，男性5人，平均年齢41.6（25~47）歳，NC：7人，全員右利き，女性2人，男性5人，平均年齢36.4（26~47）歳）であった。行動指標とした質問紙の正答率は，ChS群：79.0%，NC群：93.6%，ボタン押しの正答率と反応時間はそれぞれ，ChS群：93.7%，478.2ms，NC群：97.3%，466.8msといずれもNC群の方がChS群よりも優れている傾向であった。MEG解析では，両群とも後頭部に限局して誘発反応を認めたが（図2），N1m反応，vMMF反応ともにChS群では減衰傾向であった（図3）。

図2

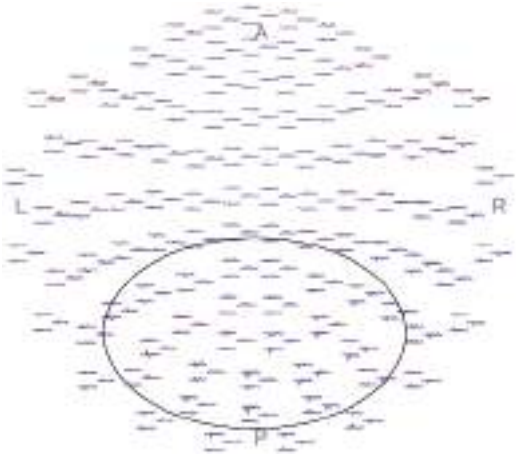
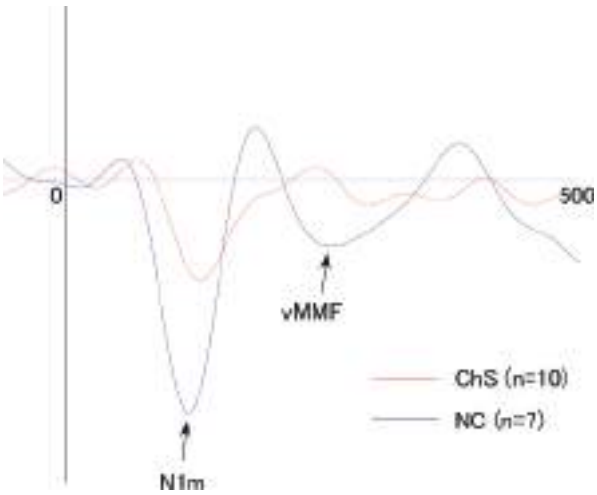


図3　最大の反応を示したチャンネル



【考察】

先行研究（文献2）から予想された通り，ChS群はNC群よりも行動パフォーマンスが劣り，vMMFも減衰していた。本研究によってChS，NC両群において，vMMFは後頭部に安定して記録されたので，今後はさらにFESを対象に研究を進めていく予定である。

【発表】

1. 前川敏彦，Margaret A. Niznikiewicz，Robert W. McCarley：初発統合失調症の多モダリティーERPs: Boston CIDAR Projectの中間報告．第41回日本臨床神経生理学会，2011年11月12日，静岡市．（優秀ポスター賞受賞）
2. Toshihiko Maekawa, Toshiaki Onitsuka, Shozo Tobimatsu: Auditory and visual mismatch negativity in psychiatric disorders: A review. Current Psychiatry Reviews, 2012, 8, *in press*.

【文献】

1. T. Maekawa, Y. Goto, N. Kinukawa, T. Taniwaki, S. Kanba, S. Tobimatsu: Functional characterization of mismatch negativity to a visual stimulus. Clin Neurophysiol 116(10): 2392-2402, 2005.
2. 前川敏彦，平野昭吾，大林長二，平野羊嗣，鬼塚俊明，飛松省三，神庭重信: ミスマッチ陰性電位を用いた統合失調症の視覚情報自動処理過程の検討．臨床脳波 50:202-208, 2008.
3. T. Maekawa, S. Tobimatsu, N. Inada, N. Oribe, T. Onitsuka, S. Kanba, Y. Kamio: Top-down and bottom-up attention in high functioning autism spectrum disorder. Res Autism Spectrum Disord 5:201-209, 2011.

平成23年度　研究助成テーマ

平成23年度は、以下のように、基礎5名・応用2名・テーマ指定4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. 磁界測定法を用いた石綿代替品の安全性評価
北里大学　医学部　衛生学／工藤　雄一朗

Ⅰ-2. 低頻度・短期経頭蓋磁気刺激が脳神経活動に与える効果と可塑性に関する研究
純真学園大学　保健医療学部　医療工学科／鳥居　徹也

Ⅰ-3. 磁性ナノ粒子による磁場誘導組織内加温法とがん免疫治療の融合による前立腺癌に対する新しい治療法の開発
名古屋市立大学大学院　医学研究科　腎・泌尿器科学分野／河合　憲康

Ⅰ-4. 磁性体ナノ粒子を利用した前立腺癌の集学的治療法の基礎的研究
横浜国立大学大学院　工学研究院／渡邉　昌俊

Ⅰ-5. 卵巣摘出ラットに対する局所的磁場が骨微細構造に与える影響
畿央大学　健康科学部／峯松　亮

Ⅱ　応用研究

Ⅱ-1. 脳磁計用リアルタイム頭部位置観測システムの高精度化に関する研究
金沢工業大学　先端電子技術応用研究所／小山　大介

Ⅱ-2. 耳鳴に対する経頭蓋磁気刺激による治療効果の評価
慶應義塾大学　医学部耳鼻咽喉科学教室／渡部　高久

Ⅲ. 指定テーマ研究

Ⅲ-1. 脳磁図、機能的核磁気共鳴画像、磁気刺激、深部電極刺激を用いた時間的情報処理に関わる脳内機構の総合的研究
東京大学　医学部附属病院　神経内科／寺尾　安生

Ⅲ-2. 高感度生体磁場計測装置を用いた肺静脈興奮の非侵襲的評価
東京医科歯科大学　医学部附属病院　循環器内科／笹野　哲郎

Ⅲ-3. 慢性極低周波変動電磁界暴露によるマウス副腎皮質への直接刺激作用の検討
徳島大学大学院　ヘルスバイオサイエンス研究部　生理機能学分野／北岡　和義

Ⅲ-4. 体表面心磁図を用いたブルガダ症候群における突然死リスクの非侵襲的評価方法の確立
独立行政法人　国立循環器病研究センター　心臓血管内科・不整脈科／相庭　武司

なお、所属は研究助成決定当時のものです。

助 成 研 究 成 果 報 告 書

平成22年度

発　行　日　　平成24年8月8日

発　行　所　　公益財団法人 磁気健康科学研究振興財団

福岡県福岡市中央区天神1-13-17
TEL 092-724-3605
FAX 092-724-3605

印　　刷　　三栄印刷株式会社

より明瞭なカラーデータの図表をご希望の方はサイト(http://www.maghealth.or.jp/)に掲載しておりますのでご覧下さい。