

THE REPORT OF STUDY RESULT BY SUBSIDY
助成研究成果報告書

2012
平成24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24年度

(研究期間：平成25年4月1日～平成26年3月31日)



目 次

巻頭言	1
理事長 小谷 誠	
I. 基礎研究	
I-1. 高機能性ナノ粒子プローブを用いたin vivo酵素活性のMRIによる可視化	3
大阪大学大学院 工学研究科 生命先端工学専攻 水上 進	
I-2. 分極ハイドロキシアパタイトによる骨形成促進効果の分子細胞レベルでの解明.....	5
慶応義塾大学 医学部 腎臓内分泌代謝内科 大庭 聖子	
I-3. 必要な時だけ体外から磁気駆動する超小型軽量右心補助人工心臓	8
東北大学 加齢医学研究所 山家 智之	
I-4. がん細胞選択性磁気ナノ微粒子の創生と磁気ハイパーサーミア効果の検証.....	10
横浜国立大学大学院 工学研究院 一柳 優子	
II 応用研究	
II-1.核磁気共鳴吸収法(MR)を用いた新規抗癌剤の開発	13
滋賀医科大学 MR医学総合研究センター 中谷 仁	

Ⅲ. 指定テーマ研究

Ⅲ-1. 低周波電磁波が細胞内のカルシウムイオン濃度の調節系を 乱す分子メカニズムの解明	16
埼玉医科大学 医学部 解剖学 駒崎 伸二	
Ⅲ-2. 小脳反復磁気刺激が大脑皮質に与える影響の研究	20
宮崎大学 医学部 内科学講座 望月 仁志	
Ⅲ-3. 感覚運動野への低頻度反復磁気刺激による触覚閾値の変化	23
名古屋大学大学院 医学系研究科 リハビリテーション療法学専攻 野瀧 一平	
Ⅲ-4. 交番磁気治療器の臨床評価と高性能磁気治療器の開発研究	25
北里大学 医学部 公衆衛生学 堤 明純	
Ⅲ-5. 運動誘発性筋損傷に対する磁気刺激の効果	28
日本体育大学 運動生理学研究室 中里 浩一	
平成25年度研究助成テーマ	31

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が発生する。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メートルと極端に遅い。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高く、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24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。

高機能性ナノ粒子プローブを用いた in vivo酵素活性のMRIによる可視化

(MRI Visualization of in vivo enzyme activities
with highly functional nanoparticle probe)

大阪大学大学院 工学研究科 生命先端工学専攻 水 上 進

目的

生体分子の真の機能を解明するには、生物が生きたままその機能を調べることが望ましい。それゆえ、生きた細胞・組織中における分子の挙動を調べる「分子イメージング技術」が着目されている。特に磁気共鳴イメージング (MRI) 法は、生体深部の撮像限界が存在しない為、MRIを用いた生体分子の挙動や活性の可視化が注目されている。我々は ^{19}F MRIに着目し、独自のシグナルOFF/ON原理に基づいて酵素活性を検出する ^{19}F MRIプローブを開発してきた¹⁻⁴。一方、これらの低分子プローブはシグナル強度が小さく、in vivoでMRIシグナルを検出することは困難であった。そこで、プローブシグナルの高感度化に取り組み、液体パーフルオロカーボン (PFC) をシリカゲルで被覆したコア-シェル型ナノ粒子PFCE@SiO₂ (PFCE: perfluoro crown ether)を開発した。そこで本研究では、この新規ナノ粒子を用いて、生きた動物体内での ^{19}F MRIシグナルの可視化、さらにケミカルシフトイメージングに基づくプローブのマルチカラー化、酵素活性検出が可能な新たなプローブの開発を目的とした。

方法

PFCE@SiO₂は次のように合成した。まず、PFCEを脂質と混合してエマルジョンを形成させた後、触媒となるピリジン誘導体の存在下、エマルジョン表面でのシリカ重合を行った。ナノ粒子の構造は、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察および動的光散乱測定 (DLS) を用いて確認した。作製したPFCE@SiO₂を生きたマウスの静脈内に投与し、 ^{19}F MRIを測定した。

次に、PFCEとは異なるパーフルオロカーボンを用いて、同様の形態のコア-シェル型ナノ粒子を作製した。ケミカルシフト選択的なラジオ波を照射することで、マルチカラー ^{19}F MRIへ応用かどうか検討した。ケミカルシフトが異なる幾つかのPFCをそれぞれシリカナノ粒子に内包させ、これらのナノ粒子を混合し、ケミカルシフト選択MRIによってマルチスペクトル画像による擬似マルチカラー化を検討した。

コア-シェル型ナノ粒子内のPFCに由来する ^{19}F MRIシグナルのOFF/ON制御技術の開発を検討した。ナノ粒子由来の ^{19}F MRIシグナルを制御する為に、低分子型の酵素活性検出プローブのシグナルOFF/ON原理¹で用いた常磁性緩和促進効果を利用した。常磁性種としては超常磁性酸化鉄 (SPIO) ナノ粒子とGd³⁺錯体について検討した。PFCE@SiO₂ナノ

粒子と常磁性種の間を酵素基質ペプチドで連結させたナノ粒子プローブを合成した。

結果

PFCE@SiO₂を投与した動物体内から強い¹⁹F MRIシグナルが観察された。ナノ粒子表面をポリエチレングリコール (PEG) 鎖で修飾することで、高い血管滞留性を示し、このナノ粒子プローブを癌移植マウスに投与すると、がん組織に集積することが¹⁹F MRIにより確認された。すなわち、PEG化したナノ粒子プローブにより、がん組織の¹⁹F MRIによる可視化に成功した⁵。

ケミカルシフト選択照射によるマルチスペクトルイメージングを行った結果、PFCE@SiO₂と同時にPFDCO (perfluorodichlorooctane) とPFTBA (perfluorotributylamine) を内包させたナノ粒子を用いることで、三色の異なるナノ粒子由来の¹⁹F MRIシグナルを別々の擬似カラーで画像化可能であった。

PFCE@SiO₂のMRIシグナルを制御する為に常磁性種をナノ粒子表面に修飾した。SPIOナノ粒子をPFCE@SiO₂ナノ粒子の表面に修飾すると、僅かな数の修飾でも完全にシグナルが消失した一方で、Gd³⁺錯体をナノ粒子表面に修飾した場合はGd³⁺錯体の分子数に依存して¹⁹F MRIシグナルが減少した。PFCE@SiO₂上に酵素基質ペプチドリンカーを介して大量のGd³⁺錯体を修飾し、完全にMRIシグナルを消失させた。ここに標的プロテアーゼを添加したところ、時間経過とともに基質ペプチドリンカーが切断され、¹⁹F MRIシグナルが増大した。

考察

PFC内包ナノ粒子は、内包させるPFCの種類を変えることで、異なるケミカルシフトを持たせることが可能である。これにより、ナノ粒子の生体適合性などの生化学物性を保ったまま、異なる種類のMRIシグナルとして検出できることから、複数の生体分子のin vivo検出も期待される。また、

ナノ粒子プローブを用いて酵素活性のMRI検出に成功したため、今後は生きた動物の体内深部の酵素活性の可視化が期待される。

参考文献

1. Shin Mizukami, Rika Takikawa, Fuminori Sugihara, Yuichiro Hori, Hidehito Tochio, Markus Wälchli, Masahiro Shirakawa, Kazuya Kikuchi
Paramagnetic Relaxation-Based ¹⁹F MRI Probe to Detect Protease Activity
J. Am. Chem. Soc. **2008**, 130, 794–795.
2. Shin Mizukami, Rika Takikawa, Fuminori Sugihara, Masahiro Shirakawa, Kazuya Kikuchi
Dual-Function Probe to Detect Protease Activity for Fluorescence Measurement and ¹⁹F MRI
Angew. Chem. Int. Ed. **2009**, 48, 3641–3643.
3. Shin Mizukami, Hisashi Matsushita, Rika Takikawa, Fuminori Sugihara, Masahiro Shirakawa, Kazuya Kikuchi
¹⁹F MRI Detection of β -Galactosidase Activity for Imaging of Gene Expression
Chem. Sci. **2011**, 2, 1151–1155.
4. Hisashi Matsushita, Shin Mizukami, Yuki Mori, Fuminori Sugihara, Masahiro Shirakawa, Yoshichika Yoshioka, Kazuya Kikuchi
¹⁹F MRI Monitoring of Gene Expression in Living Cells via Cell Surface β -Lactamase Activity
ChemBioChem **2012**, 13, 1579–1583.
5. Hisashi Matsushita, Shin Mizukami, Fuminori Sugihara, Yosuke Nakanishi, Yoshichika Yoshioka, Kazuya Kikuchi
Multifunctional Core-shell Silica Nanoparticles for Highly Sensitive ¹⁹F Magnetic Resonance Imaging
Angew. Chem. Int. Ed. **2014**, 53, 1008–1011.

分極ハイドロキシアパタイトによる 骨形成促進効果の分子細胞レベルでの解明

(Clarification of the mechanism for acceleration of
new bone formation by an electrically polarized hydroxyapatite
from the molecular biological point of view)

慶應義塾大学 医学部 腎臓内分泌代謝内科 大庭聖子

【目的】

骨手術による骨大欠損部の骨の再生は困難が多い。リン酸カルシウム化合物の中でも特にハイドロキシアパタイト (hydroxyapatite: HA) は優れた生体親和性と骨伝導性を持つため骨代替材料として広く臨床応用されているが、HAのブロック体は埋入後破損や変形をしたり、HAだけでは不十分で、自家骨と混和して使用する必要があることが欠点である。自家骨移植の必要がない、HAという生体材料でのみ骨補填ができるようになることは、より侵襲の少ない治療法を確立する上でますます重要である。

これまで申請者らは、HAに電界を加え電気分極を促し表面電荷を生じさせ、欠損部に補填することで、骨を形成する骨芽細胞を活性化し、効率よく骨再生が可能であることを明らかにしてきた。HAをこれまでのような単なる担体ではなく、周囲の細胞が移植部位へ侵入するための足場となり、栄養因子を供給すると同時に残存する自己細胞を活性化する組織再生促進型マトリックスとして機能させることを期待し研究を進めている。分極を硬組織再生のみならず、神経、血管をはじめとする軟組織再生の分野での臨床応用へも繋げていくために、本研究では未だ解明されていない、分極が骨芽細胞に及ぼす影響を個体レベルで分子

生物学的に解明することを目指す。

【方法】

①分極HAペレットの作製

ハイドロキシアパタイト粉体よりペレットを作製し、水蒸気下にて400℃、2000Vにて焼結、電気分極処理を行った。電気分極処理を行ったHAはXRD (X線回折) 測定、IR (赤外分光法) 測定により、アパタイト結晶であることの確認を行い、さらにTSDC (熱刺激脱分極電流) 測定により分極の確認を行った。

②分極HAの骨への影響、分極HAの骨形成に関わる遺伝子の同定

分極HA表面での骨芽細胞の挙動を分子細胞生物学的に解明する。

- 1、骨芽細胞：生後5日のマウスの頭蓋骨から未分化骨芽細胞を播種（未分極HA、分極HAのN面、分極HAのP面、Glass（プレート上へそのまま播く）の4群。各n=2）
- 2、2日おきにMedium changeとアスコルビン酸添加を行い、7日と14日でサンプルを採取し、RNAを抽出、Nano DropにてRNA濃度測定を行い（図D）、マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子解析を行った。

【結果】

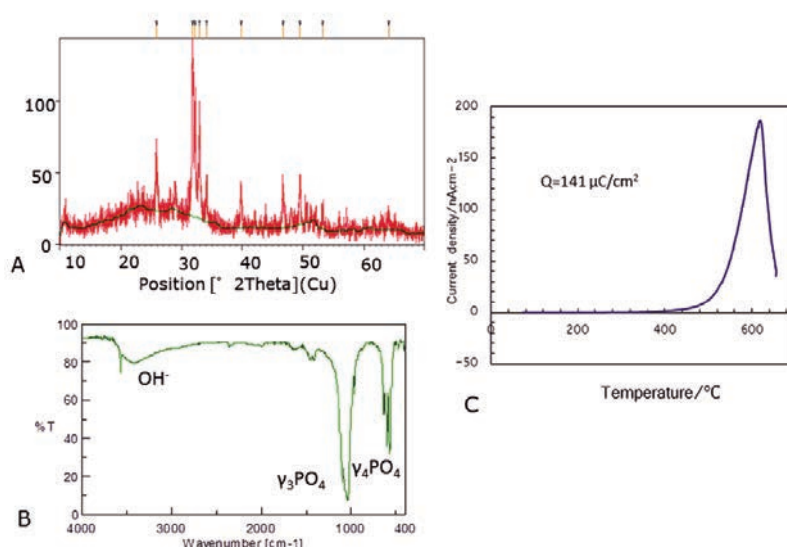
合成したHA微粒子のXRDパターンは類似したピークを示し、HA既定値と一致した（図A）。

FTIRも同様の結果だった（図B）。

分極したHA微粒子のTSDCスペクトルより計算した蓄積電荷量の平均値は $141 \pm 32.3 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ (average $\pm$ SD) だった（図C）。

以上より、分極処理を行ったHAはXRD（図A）、IR（図B）の結果より、アパタイト構造が保たれ、TSDC測定（図C）の結果よりきちんと分極が行われ、蓄積電荷も有することが示された。

分化のより進んだDay14のサンプルにてマイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子解析を行った。Excelによる解析ではデータの数値の高い遺伝子を選択した（図E）。



【考察】

高齢化社会を迎えたわが国では、インプラント治療の需要がますます高まっているが、こういった治療を行うためには元々の顎骨の量がある程度必要であり、顎骨吸収の著しい患者さんは今まで十分な治療を受けることができなかった。また、口唇口蓋裂の顎裂部への治療は腸骨からの骨移植が主流であるが、小児にとってこのような全身手術は非常に負担が大きい。このようなインプラントや顎裂部への大きな骨欠損に対する一般的な治療法は自家骨移植（自分の体の中の別の部分から採取した骨を移植すること）であるが、骨採取量に限界があること、採取手術自体の負担が大きいこと、移植骨が吸収されること等の問題があり、現在様々な骨補填材が開発されている。

リン酸カルシウム化合物の中でも特にHAは優れた生体親和性と骨伝導性を持つため骨代替材料として広く臨床応用されているが、HAのブロック体は埋入後破損や変形をしたり、HAだけでは不十分で、自家骨と混和して使用する必要があることが欠点である。

自家骨移植の必要がない、HAという生体材料でのみ骨補填ができるようになることは、より侵襲の少ない治療法を確立する上でますます重要である。我々は、HAの分極処理により蓄積された大きな電荷は、細胞や微生物を活性化する効果があることを発見し（Chem Mater 1996）、これまでの研究により、HA微粒子の電気分極処理とその評価法の確立、HA微粒子の分極処理が骨再生促進効果を持つことを明らかにしてきた（Actabiomaterialia 2012）。電気分極を行うことで、帯電したHA粒子は各種のイオンやタンパクを吸着することができるため、移植したHA自身が生体内で分泌されたサイトカインや細胞接着因子を吸着できると考えられる。HAの電気分極により、HAはこれまでのような単なる担体ではなく、周囲の細胞が移植部位へ侵入するための足場となり、栄養因子を供給すると同時に残存する自己細胞を活性化する組織再生促進型マトリックス

として機能することが期待できるが、分極によるHA表面の骨原生細胞の接着性に与える影響や骨形成促進効果の分子細胞レベルでの機構は未だ明らかとされていない。

分極バイオセラミックスの複合材料の研究は、安価で永続的効果を持つ再生医療に有用な医用材料の開発につながると考えられる。

マイクロアレイの結果、 $n=2$ の同一検体内で n 間に差が見られたため、Excel上で $n=1$ で検体間の違いを解析し直したものを結果にまとめた。マイクロアレイのデータは非常に膨大なため、専用の解析ソフトを用いた解析を行うこと、それにより、同一検体内で n 間での差が大きい遺伝子をピックアップし、それらを除去して再度、検体間の発現差を見て、発現の高い遺伝子を絞っていくことが今後の課題である。マイクロアレイによって網羅的に発現の高い遺伝子を絞り、それらを標的としてリアルタイムPCRやウェスタンブロットを行い、分極HAにおいて骨形成に関わる遺伝子を同定していきたい。

発表

特になし

文献

特になし

必要な時だけ体外から磁気駆動する 超小型軽量右心補助人工心臓

(Magnetic Forced Totally implantable Right ventricular assist device)

東北大学 加齢医学研究所 山 家 智 之

先天性心疾患に対するフォンタン手術などの根治手術の後には、右心室が存在しないので、右心不全の発生がしばしば報告される。本研究は、磁気の駆動力により、身体の外から、肺動脈部に埋め込まれたインペラを駆動し、必要な時に、必要な時間だけ右心補助ポンプを駆動させる全く新しい循環補助装置である。就寝時、安静時など、必要がないときには、インペラは受動的に受け流すので、体重性に優れ、血栓の心配もクリアされ、長期の耐久性が期待されるシステムである。



Fig.1 Impella in the Pulmonary artery

重症心不全患者の増加に伴い、心臓移植や、人工心臓、および補助循環の需要が本邦においても高まっている。現在まで、左心補助人工心臓は様々なシステムが開発されているが、右心補助に

関しては左右バランスの問題もあるので議論があり、治療ガイドラインは確定していない。左心補助だけで重症心不全を管理しようとしても、右心機能が不十分な場合は左心系に血液が還流せず、循環が維持できないことが知られている。また、先天性心疾患患者の手術成績が安定する時代になり、幼少時代に先天奇形の手術を受けた患者が、昨今では中高年の年齢層に入ってきたが、フォンタン手術後などの術後患者は、右心室がないので、右心不全を伴いやすい。すなわち右心補助循環の議論の必要性が高まっている。

完全埋め込み式の超小型補助人工心臓が、必要な時に必要なだけ駆動することができれば、重症両心不全患者や、先天奇形手術後の患者にとって大きな福音となる。

そこで我々は、肺動脈部に、磁石を伴ったインペラだけを埋め込み、磁気駆動力を大概から供給する、全く新しい右心補助循環システムを提案し、特許を申請した。

本研究ではかかる知的財産に則り、必要な時に必要なだけ、体外から磁気で駆動できるまったく新しい右心補助循環システムを提案する。

東北大学では磁気先端残量価格に関する長年の研究の蓄積が有り、かかる伝統に基づいて、体外から磁気駆動力を加え、体内の肺動脈の部位などに回転駆動力を与える全く新しい右心補助人工心

臓システムの開発研究を行い、既に特許も申請し、国際特許も申請した。そこで、安定したシステムとして、患者さんの助けになるには、慢性動物実験による基本性能確認と、駆動電力の設定などの実用化研究が不可欠になる。

本研究計画では、磁気インペラを使ったモデル循環回路による基本設計の検討を行い、安定したコマーシャル可能なシステム開発を勧めつつ、健康なヤギを使った右心補助人工心臓インペラの慢性耐久試験、抗血栓試験を行った。

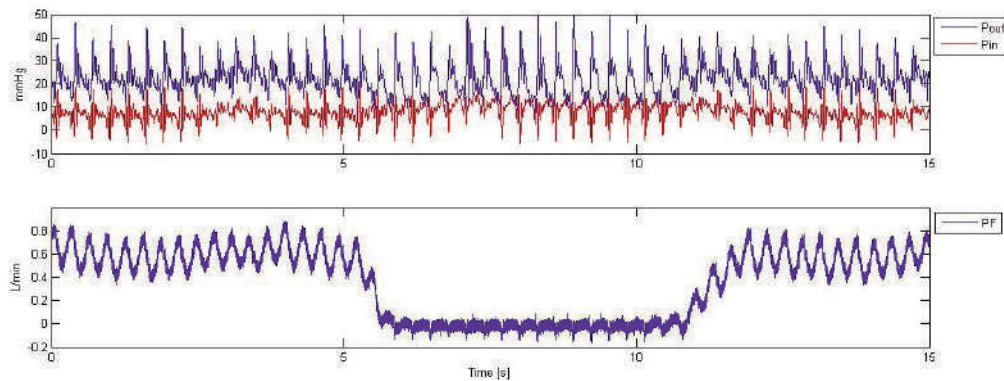


Fig.2 Effect of PA assistance on hemodynamics

この研究が具現化すれば、成人になりつつある先天性心疾患術後患者の福音になり得る。

体外からインペラを駆動する全く新しい補助人工心臓システムについて、基本コンセプトから、特許申請を行い、国際特許申請も行った。モデル循環回路で、必要とする有心循環に関する基本性能が得られたものと判断されたので、倫理委員会の審査を経て、麻酔下に健康なヤギを使った動物実験を遂行した。

その結果、体外から右心補助ポンプが稼働できることを確認している。

このシステムにより、患者が自分で、必要なときに必要なだけ駆動を行うことができる全く新しい右心補助人工心臓システムが具現化する予定である。これは例えば、大人の先天性心疾患手術後の患者にとって大きな福音となる。

これまでに重症の両心不全に対しては、心臓移植や全置換型人工心臓が提案されたが、移植はドナー心が少ないのが日本だけでなく世界的に問題であり、全人工心臓では日本では症例がない。そこで補助人工心臓が二つ用いられることもあるが左右バランスが難しい。

本研究では、肺動脈の本幹に、インペラを置き、体外から、磁力でインペラを回転させる、必要な

時に、必要なだけ、患者さんの個々の状態に応じて、右心補助を行う、新しい補助循環システムの提案を行っている。このようなシステムは国内的にも国際的にも例がないので先行知的財産の調査の後、国内特許と国際特許申請を行っている。磁性線を強くすることで、左心補助が可能な人工心臓も視野に入っており、この新しい方法論で、すべての循環補助が可能になるシステム開発が可能になる。ひいては、全置換型人工心臓と同等のシステムも可能になる。すなわち、肺動脈と大動脈のインペラが駆動できれば、血行動態力学的には全置換型人工心臓と同じである。インペラを埋め込むだけなので、本質的に小型軽量化が可能であり、末梢循環の補助も可能である他、臓器ごとの、超小型人工心臓の具現化も期待される。

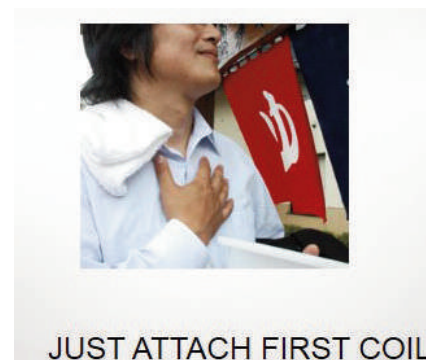


Fig.3 Just attach the 1st col, when you feel heart failure

がん細胞選択性磁気ナノ微粒子の創生と 磁気ハイパーサーミア効果の検証

(Preparation of cell-selective magnetic nanoparticles and hyperthermia effect)

横浜国立大学大学院 工学研究院 一 柳 優 子

【目的】

本研究は独自の製法でナノサイズの磁気微粒子を生成し、量子スケールにおける磁氣的性質を明らかにするとともに、がん細胞に特異的な官能基や抗体その他の化学物質を修飾し、磁気ハイパーサーミアへ応用することを目的とする。本研究期間には、各種の遷移金属を含むナノ微粒子を生成し、特に交流磁化率に注目してそれらの磁氣的性質を分析し、発熱が期待される微粒子を選定する。さらに外部磁場による温度上昇を実際に測定した上でハイパーサーミアに適応する組成、粒径、周波数、磁場等の条件について最適化をはかる。最適微粒子をがん細胞へ導入し、最終的にはがん細胞をアポトーシスへ導くために条件を自在にコントロール可能な機能性磁気ナノ微粒子を開発する。

【方法】

細胞に導入可能なナノメートルオーダーの新しい強磁性微粒子を開発するとともに、それらの磁気パラメータを詳細に探求する。磁気微粒子に含まれる金属イオンや粒径サイズを制御し、磁化測定からハイパーサーミアに適合する微粒子の最適化をはかる。医療への応用を考慮に入れて、これ

らの強磁性微粒子に各種官能基や他の化学分子を修飾することを目指す。磁化率の測定結果をふまえて、コイルを巻き交流磁場発生装置を構築し、試料の実際の温度上昇を測定する装置を構築する。がん細胞を培養したディッシュが測定可能なように改良を重ねる。

【結果】

磁化の値が大きく超常磁性を示す試料として、Co-Fe系およびMn-Zn系ferriteを選び粒子径や組成を制御して磁気パラメータの最適化を行った。このうちCo-Fe系についてはもっとも磁化の値が大きくなった $\text{Fe}_{2.7}\text{Co}_{0.3}\text{O}_4$ の組成で粒径を6nmから18 nmに変化させた。周波数100 Hz、磁場1 Oeの交流磁化率の測定結果からは8 nmのものが高い発熱効率を持つと期待され、昇温測定による熱散逸量からも8 nmの粒径にピークが見られた(図1)。この試料を用いて前立腺がんを培養したディッシュに交流磁場を印加したところ、劇的なハイパーサーミア効果を確認できた(図2)。官能基はアミノ基のほか、カルボキシル基、チオール基、ニトロ基の修飾方法を確立し、さらに分散性を向上させるためのPEIの修飾も可能にした。

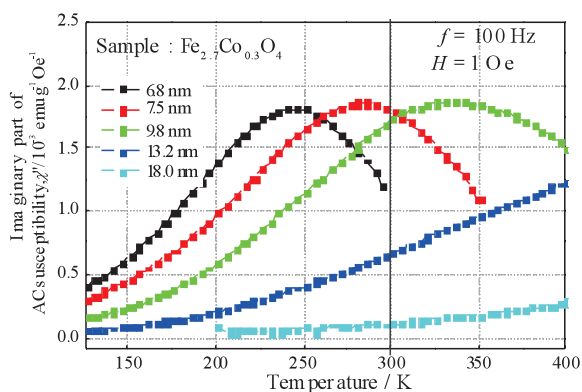


図1 交流磁化率の虚数部 χ'' の温度依存性

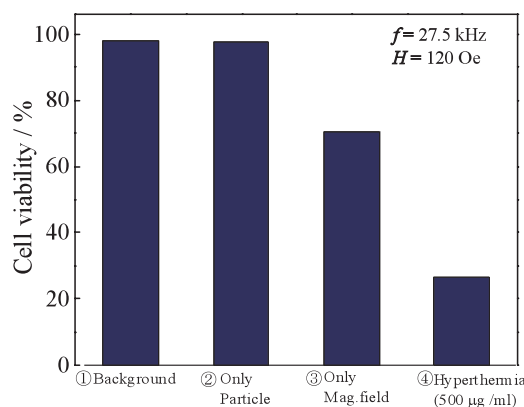


図2 前立腺がんの磁気ハイパーサーミア効果

【考察】

ナノサイズの磁性体であっても、組成や粒子径を制御することで、交流磁化率虚数部 χ'' のピークを室温付近に維持することができる。この χ'' が発熱に寄与すると考えられるため、温度上昇と熱散逸量とも整合性がある。目的に応じた条件のコントロールが可能であるといえる。In vitroの実験では温熱効果が明瞭であったが、細胞死のメカニズムについても明らかにする必要がある。さらにはin vivoの実験へと発展させたい。

【発表】

- (1) 「磁気ハイパーサーミアに向けたフェライトナノ微粒子の磁気特性と発熱特性」
近藤貴哉、竹内宏賢、三池和成、宮坂俊樹、蜂巢正也、森 一将、一柳優子、ナノ学会第11回大会（東工大・100年記念館）6/6-8
- (2) 「スピネル型Mn 酸化物ナノ微粒子のSiO₂ 包含効果と局所構造解析」
宮坂俊樹、近藤貴哉、三池和成、蜂巢将也、森 一将、一柳優子、ナノ学会第11回大会（東工大・100年記念館）6/6-8
- (3) 「薬剤輸送を目指した磁性ナノ微粒子の機能化」
森 一将、小沼一紀、近藤貴哉、三池和成、宮

坂俊樹、蜂巢将也、一柳優子、ナノ学会第11回大会（東工大・100年記念館）6/6-8

- (4) “Production of Fe_{3-x}Zn_xO₄ Nanoparticles for Agents in Hyperthermia Treatment”
H. Takeuchi, A. Kurokawa, T. Yanoh, S. Yano and Y. Ichiyanagi, Intl.Conf.Fine Particle Magn, (Perpignan 6/24-27)
- (5) 「磁気ハイパーサーミアに向けたMn-Zn ferriteナノ微粒子の磁気特性及び発熱評価」
近藤貴哉、小沼一紀、三池和成、宮坂俊樹、蜂巢将也、森一将、一柳優子、日本物理学会秋季大会9/25-28
- (6) 「Mn及びCo系フェライトナノ微粒子のMRI造影効果と発熱特性」
三池和成、近藤貴哉、一柳優子、他、日本物理学会秋季大会9/25-28
- (7) “TG-DTA ANALYSIS OF PEI COATED COBALT FERRITE NANOPARTICLES FOR MAGNETIC HYPERTHERMIA”, K MORI, Y KIKUCHI, T KONDO, K MIIKE, K ONUMA, T MIYASAKA, M HACHISU and Y ICHIYANAGI The Fifth International Symposium on the New Frontiers of Thermal Studies of Materials, Yokohama, 10/28
- (8) “Optimization of Self-Heating Properties of Multifunctional Magnetic Nanoparticles”,

Yuko Ichiyanagi, 招待講演, 7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM) 11/7 Kitakyushu

- (9) “Synthesis of the PEI coated cobalt ferrite nanoparticles for magnetic hyperthermia” , K. Mori, K. Onuma, T. Kondo, K. Miike, T. Miyasaka, M. Hachisu, Y. Kikuchi, Y. Ichiyanagi, 7th ISNM Kitakyushu 11/8
- (10) “Self-heating properties and MRI contrast of multifunctional magnetic nanoparticles” Yuko Ichiyanagi, 招待講演 EMN Fall meeting Orlando, 12/9

【文献】

1. H. Takeuchi, A. Kurokawa, T. Yanoh, S. Yano, K. Onuma, T. Kondo, K. Miike, T. Miyasaka, M. Hachisu, K. Mori and Y. Ichiyanagi, “Production of $\text{Fe}_{3-x}\text{Zn}_x\text{O}_4$ nanoparticles for agents in hyperthermia treatment” , Journal of Basic and Applied Physics, **2** 201-204 (2013)
2. T. Kondo, A. Kurokawa, H. Takeuchi, T. Yanoh, S. Yano, K. Onuma, K. Miike, T. Miyasaka and Y. Ichiyanagi, “Magnetic Properties of MgFe_2O_4 Nanoparticles and Zn Doping Effect” , *Trans. Mat. Res. Soc. Japan* **38** 513-516 (2013)

核磁気共鳴吸収法（MR）を用いた 新規抗癌剤の開発

(Novel method to evaluate the effectiveness of anti-cancer drug by using MR.)

滋賀医科大学 MR医学総合研究センター 中 谷 仁

目的

癌は、主として遺伝子の研究が行われてきた。それらの研究は、癌と遺伝子変異の因果関係を明らかにした。しかし、遺伝子研究から得られた知見は、必ずしも癌患者の治療に繋がっていない。癌の遺伝子変異は多岐に渡り、そのシグナル経路は複雑に絡み合う。従って、限られた作用点しか持たない分子標的薬ではカバー出来ないからである。また、抗癌剤の化学療法は、正常細胞にも障害を与え、強い副作用がある。

その様な手詰まりの中、近年、癌に対する新たなアプローチとして、癌の代謝が注目されている。癌の代謝は正常細胞とは異なる。正常細胞では、グルコースは、解糖経路でピルビン酸を経てTCAサイクルに入り、好氣的代謝でエネルギーを産生する。一方、癌細胞では、TCAサイクルに入らず、代わりに乳酸に代謝される。この乳酸産生は癌を特徴付けるもので、ワールブルグ効果として知られている。この癌細胞内に蓄積された乳酸は、モノカルボン酸トランスポーター (MCT) を介して細胞外に排出される。この排出で、癌細胞は細胞内が酸性に傾く事を防ぐ。これでアシドーシスを回避する。

本研究では、この乳酸を蓄積させ、乳酸アシドーシスを癌に引き起こし、抗癌性を持つ新規薬

剤に対する乳酸の測定系を開発する。目的とする薬剤は、乳酸蓄積で癌細胞内pHの低下を引き起こし、障害を与える事が期待される。

この様な乳酸測定系は、in vivoの動物個体で、長期に渡って癌細胞の乳酸を調べる計測系が必要である。そこで本研究では、核磁気共鳴吸収法 (MR) を用いた非侵襲の測定法を採用する。得られたデータは二種類の解析方法を試みる。一つは乳酸の時間変化 (癌の乳酸代謝) を調べる。二つ目は乳酸イメージングを行い、癌組織に於ける乳酸の空間分布を調べる。

方法

MR測定はアジレント社、7テスラMRスキャナー、Unity Inovaを用い、自作の ^1H - ^{13}C 二重共鳴コイルを使用した。担癌モデルマウスは2週齢C57BL/6雌マウスにLLC細胞 (Lewis Lung Carcinoma cell) を注入し作製した。2週間後、癌組織の成長を確認後、 ^{13}C 標識グルコース (1.449 g/kg body weight) で腹腔内に投与した。これらの代謝物である ^{13}C 標識乳酸を検出する為、HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) パルスシーケンスを用いた。まず、 ^1H -90度パルス照射し、続いて ^{13}C -90度パルス照射し、一量子を二量子コヒーレンスにする。

引き続き二回目の ^{13}C -90度パルスで一量子コヒーレンスに戻す。傾斜磁場は $G1:G2:G3=2:2:1$ でコヒーレンスセクションを行う。測定は5 min毎に行い (256 scans)、それを引き続き39回測定した (195 min)。最初の3回目の測定後に ^{13}C 標識グルコースを投与した。

乳酸イメージングは、化学シフトイメージング法 (CSI) で行った。8X8 の位相エンコーディングステップをHMQCパルスシーケンスに導入した。CSIデータは $\text{FOV}=10\text{X}10\text{mm}$ 、厚さ 2mmで取得し、30 min間の測定を平均して行った。

結果、考察

^{13}C 標識グルコース投与直後に乳酸シグナルの強度は上昇した。またこの時、乳酸一位の ^{13}C と、それに共有結合するメチル基の ^1H との間で起こるj-couplingに特徴的なダブルットのシグナルが観察された (図1)。次に、これら時間ごとのシグナル強度を調べ、平均化したものを時系列で示す (図2)。これによると、グルコース投与後、約一時間で乳酸量はピークに達し、その後は減退して行った。そして、測定を行った195 min後でも、ピーク時の約半分量の乳酸が存在する事が分かった。これらの結果は、本研究のHMQC法が、乳酸を特異的に捉えており、その時間的な変化も経時的に追跡出来る事を示している。

乳酸イメージングでは、固形癌断面上の乳酸の空間分布を示す (図3)。一般的に癌は、ワークブルグ効果と呼ばれる特異的なエネルギー代謝を行う事で知られており、多くの癌細胞に於いて乳酸への代謝が亢進していると考えられている。他方、本研究の結果は、乳酸は確かに産生、蓄積されているが、その領域は非常に限局されている事が分かった (全体の約10%)。この事実は、従来から行われている生化学的な手法では、組織破壊を伴い、解析が極めて困難であり、本研究によって明らかになった新しい知見である。

結論

本研究で用いたMRのHMQC法は、 ^{13}C 標識グルコース投与により、その癌細胞の代謝産物である乳酸を特異的に検出する事に成功した。この測定は5minごとに行う事が可能で、乳酸代謝の時間的な変化を非侵襲で行う事が出来た。また、位相エンコーディングステップを導入する事で、その空間的な分布を明らかにする事に成功した。この方法論は、癌に乳酸蓄積でアシドーシスをおこさせる新規抗癌剤のスクリーニングに有用だけでなく、癌の代謝研究にも有益であると考えられる。

学会発表

- ① 中谷仁、加藤智子、藤本栄、王欣、大西民男、堤香代子、椎野顯彦、森川茂廣、犬伏俊郎
多量子
コヒーレンスMR法を用いたがんの乳酸解析、マイクロイメージング学会、(2013.7) 東京
- ② 中谷仁、加藤智子、藤本栄、王欣、大西民男、堤香代子、椎野顯彦、森川茂廣、犬伏俊郎
多量子
コヒーレンスMR法を用いたがんの乳酸解析、日本磁気共鳴医学会、(2013.9) 徳島
- ③ 中谷仁、加藤智子、小嶋洋子、藤本栄、森川茂廣、杉原洋行、犬伏俊郎
MRを用いた癌の病理学解析、生体医用画像研究会、(2014.3) 大阪

参考文献

無し

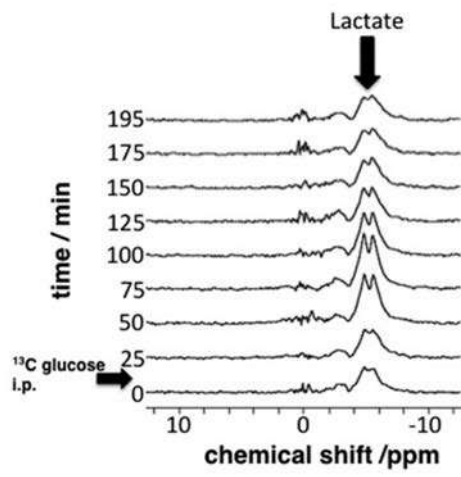


图 1

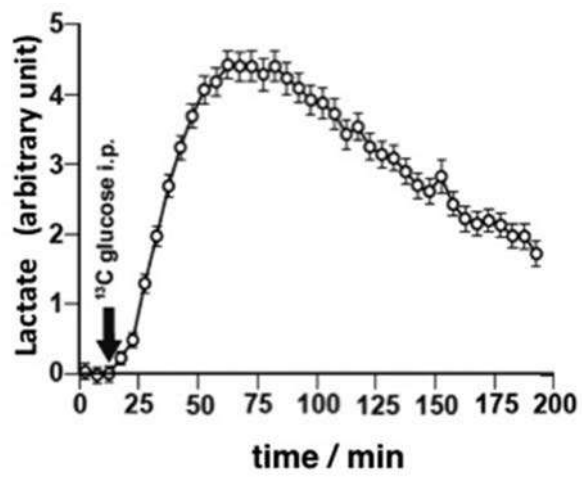


图 2

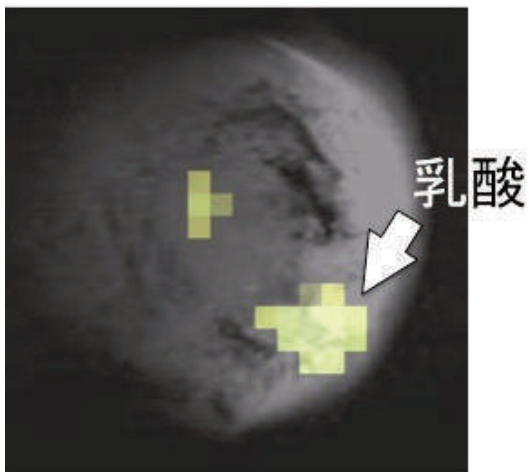


图 3

低周波電磁波が細胞内カルシウムイオン濃度の調節系を乱す分子メカニズムの解明

(Clarifications of molecular mechanisms that low frequency electromagnetic wave disrupt the regulatory system of intracellular calcium ion concentration.)

埼玉医科大学 医学部 解剖学 駒 崎 伸 二

目的

我々が行った以前の研究において、50 Hzの交流磁界が両生類の原腸胚の発生速度や、原腸胚から単離された胚細胞の運動性を顕著に促進することを明らかにした（文献1、2）。今回の研究では、磁界が動物に及ぼす影響を簡便に調べるための経済的な実験装置を考案し、その装置を用いて、動物の細胞内Caイオン濃度調節機構に磁界が及ぼす影響のメカニズムをさらに詳細に解明することを目指した。

方法

コイルに電流を流して強力な磁界を安定的に発生させるためには、大掛かりで高価な装置が必要である。そのことが、磁界の影響を調べる実験を抑制する原因の1つになっていると思われる。そこで、今回の研究では、誰もが簡単に作製できて、しかも、再現性の良い結果が得られる経済的な交流磁界発生装置の作製を試みた。そして、その装置を用いて磁界が動物に及ぼす作用の解析を試みた。

今回、我々が考案したのは、強力な磁界を発生するネオジム磁石（マグファイン株式会社）をモーターに取り付けて回転し、交流磁界のように変化する磁界を発生させる装置である（図1、図4A）。そして、その装置を用いて磁界が動物の胚や胚細胞に及ぼす影響を解析した。実験材料として両生類の胚を用いたのは、それが研究材料として扱いやすく、しかも、磁界の影響を受けやすい材料だからである。胚や細胞に及ぼされる磁界強度や磁界の変化は、ホールセンサー素子（Model; A1324、Allegro Microsystems）とUSBオシロスコープ（SwordFish、EasySYNC Ltd.）を用いて測定された（図2）。

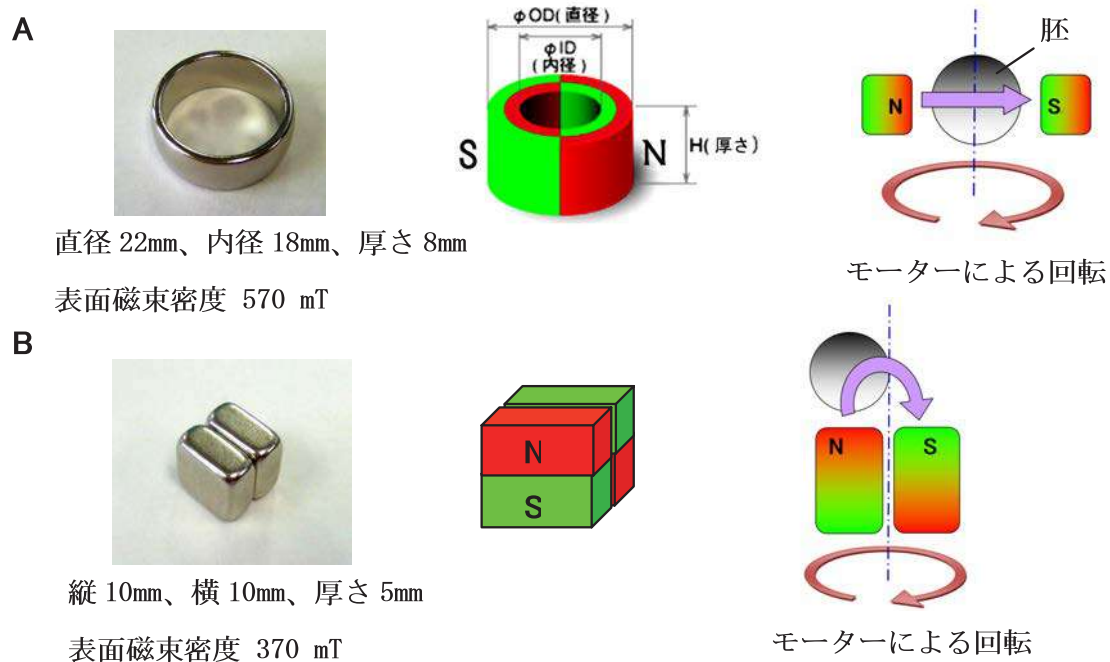


図1. ネオジム磁石を胚に作用させる方法

A. 内径部分にN極（赤色）とS極（緑色）が対向しているリング状のネオジム磁石の中心部に胚を置いて、そのリングをモーターで一定の速度で回転することにより、変化する磁界を胚の背腹軸方向に作用させた。胚に及ぼされた磁界強度は60-65 mTで、磁界の周波数は95 Hzであった。

B. 極性を逆にして配置した2つのネオジム磁石を回転させて変化する磁界を発生させ、その磁界を胚の植物極側から胚の背腹軸方向と直角に作用させた。胚に及ぼされた磁界強度は80-85 mTで、磁界の周波数は103 Hzであった。

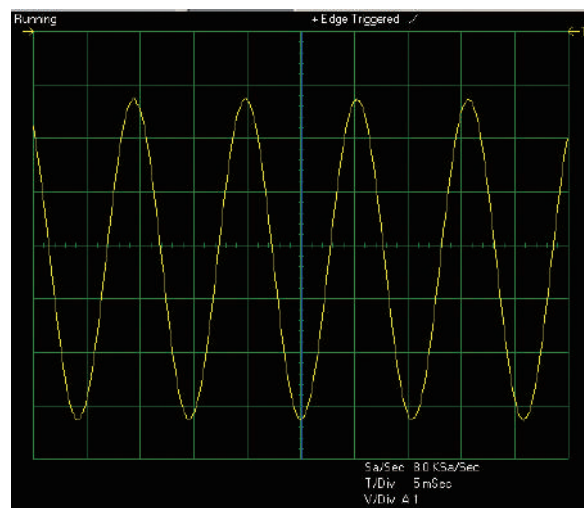
結果

(1) 実験装置の性能

実験装置内に置かれた胚に及ぼされる磁界の強度とその変化を磁気センサーとオシロスコープで測定した。図2に示すように、モーターの回転に伴い、交流磁界と同じようにN極とS極が交互に変化する磁界が胚に及ぼされた。

図2. ネオジム磁石から胚細胞に及ぼされる磁界強度と磁界の変化の例

胚に及ぼされる磁界の強さとその変化は磁気センサーとオシロスコープで測定された。示されたデータは図1 Aの装置の場合である。他の装置でも同じような交流磁界が得られた。



(2) 磁界が胚の発生過程に及ぼす影響

交流磁界のように変化する磁界を発生させる装置を用いて磁界が胚に及ぼす影響を調べた。ここでは、他の時期の胚と比べて磁界の影響をより受けやすい原腸胚の時期の胚について調べた。その結果、磁界の影響により胚の発生速度が顕著に促進された(図3)。その際の胚の外見からは奇形などの異常はまったく見られなかった。そして、その後、磁界の影響のない環境に移して幼生になるまで成長させても明らかな異常は見られなかった。

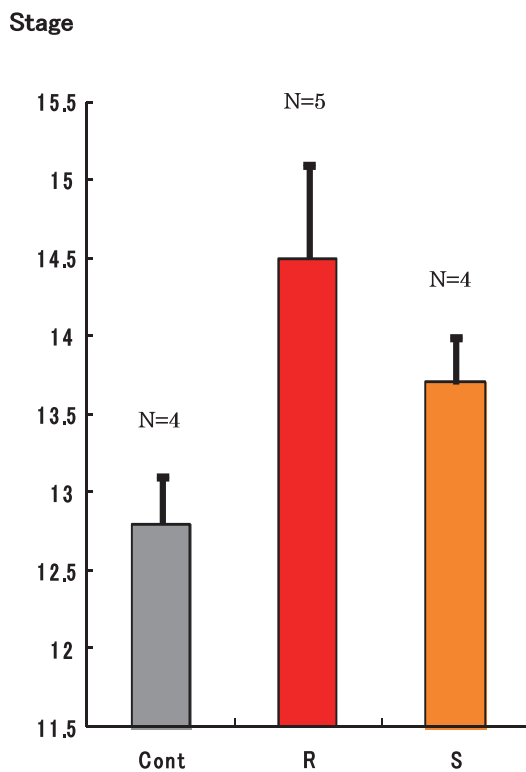


図3. 原腸胚の発生速度に及ぼす磁界の影響

原腸胚の時期が開始されるStage 11~11.5の胚を原腸胚形成が完了するまでの間(18~19時間)、 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ にて磁界の影響下で培養した。Contは磁界を作用させないで培養したコントロールの胚を示す。RとSはそれぞれ図1Aと1Bの装置で磁界を作用させながら培養した胚を示す。磁界を作用させて培養したRとSには顕著な発生速度の促進作用が見られた。ContとR、ContとS、そして、RとSの間には有意差があった(それぞれとも、 $p < 0.0001$)

(3) 胚から解離した胚細胞に磁界が及ぼす作用

胚から解離させた胚細胞を図4に示した装置で磁界を作用させながら培養し、それらの細胞に対する磁界の影響を観察した。ここでは、原腸胚形成の過程で活発な形態形成運動を行い、磁界の影響を受けやすいと考えられる中胚葉細胞について調べた。磁界を作用させてから30分後の細胞を見ると、磁界を作用させないコントロールの細胞と比べて、より多くの細胞突起が細胞に形成されていた(図5)。

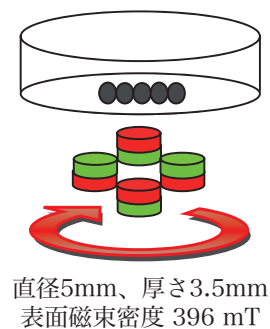


図4. 胚から取り出した細胞に磁界を作用させる方法

N極(赤色)とS極(緑色)が交互になるように並べた4つのネオジウム磁石を胚細胞が存在するシャーレの下で回転させて細胞に磁界を作用させた(A)。胚細胞の位置の磁界強度は80-85 mTで、磁界の周波数は185Hzであった。

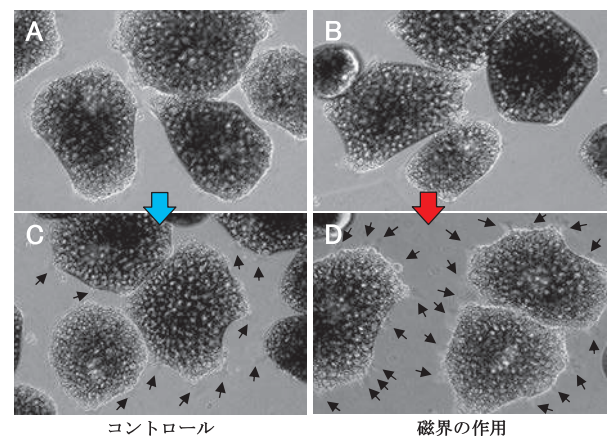


図5. 原腸胚(Stage 12a)から取り出した予定中胚葉細胞に及ぼす磁界の影響

胚から取り出して30分培養した細胞(A、B)。その後、磁界を作用させないで30分間培養したControlの細胞(C)と、図3の方法で磁界を作用させて30分間培養した細胞(D)を示す。矢印は細胞から形成された葉状突起を示す。

考察

ネオジム磁石を用いることで、強力な磁界を作
用させる交流磁界の発生装置が作製できた。しか
も、その装置を用いた今回の実験でも、電磁石に
よる50 Hzの交流磁界を用いた実験（1）と同じ
結果が得られた。このことは、交流磁界が動物に
及ぼす影響を調べるための経済的で簡便な装置と
して、今回の実験装置が磁界の研究に役立つであ
ろうこと示している。さらに、ネオジム磁石を用
いた実験による研究成果は、磁界を用いたさまざ
まな利用法（医療や健康など）の簡便化にも貢献
することが期待される。

磁界が人を含めた生物に少なからぬ影響を及ぼ
していることは、今までに行われた数多くの研究
から疑いのない事実として証明されている。しか
しながら、その一方で、それらの実験結果の再現
性の低さや、弱い磁界による長期的な暴露が引き
起こす影響の解明の難しさ、そして、磁界が動物
の細胞に及ぼす影響の分子レベルでの解明の遅れ
など、依然として大きな課題が未解決のまま残さ
れている。このような状況の中で、今回のように
経済的で簡便な装置を用いた実験が普及すれば、
人を含めた生物に及ぼされる磁界の影響のさらな
る解明に向けた研究の発展が期待される。現在、
我々はこれらの装置を用いて、以上に述べたいく
つかの重要な課題を解明するためにさらなる研究
を進めている。

引用文献

1. 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, 156-162, 2007.
2. 駒崎伸二、猪股玲子、交流磁界が細胞内Caイオン濃度の調整機能に及ぼす影響の解析。埼玉医学会雑誌、第38巻、第1号、24－28、2011年。

謝辞

今回の研究に助成をしていただいた磁気健康科学
研究振興財団に深く感謝いたします。

小脳反復磁気刺激が大腦皮質に与える影響の研究

(The effect of repetitive transcranial magnetic stimulation over cerebellum)

宮崎大学 医学部 内科学講座 望 月 仁 志

目的

小脳が大腦皮質の広範な部位に線維連絡していることは、動物実験により明らかにされており、ヒトにおいても近年の神経画像もしくは神経生理学的手法により証明されている。小脳プルキンエ細胞は抑制性連絡線維を介して、対側大腦皮質全体に強く作用していると予測 (1) されているが、詳細な機序は解明されていない。小脳に対する反復磁気刺激法の研究は最近行われており、小脳を 1 Hz で単調に刺激した際に、対側大腦皮質一次運動野における活動性が低下したと報告されている (2)。小脳を刺激する場合は、頭蓋骨が厚く、限局した領域のみを刺激することは難しい。そのため磁気刺激が小脳と同時に運動を司る錐体路も同時に刺激してしまい、実際には純粋に小脳刺激による効果なのか判断が難しい。そこで今回は、下行する錐体路とは逆に末梢から脳に上行する体性感覚路の評価を行い脊髄から大腦皮質に至る経路に対しての反復磁気刺激の効果を定量する。

当研究の目的は、刺激部位とは別の部位に対する遠隔部位に対する効果を解明することである。この効果を検討する際には、磁気刺激による音が遠隔部位に対してなんらかの影響を与える可能性が示唆されている。その影響を調べるために、まず磁気刺激の刺激音 (クリック音) が、大腦一次

運動野周辺に何らかの影響を与えるかどうかについて、近赤外線トポグラフィー (near infrared spectroscopy; NIRS) (3) を使用して検証した。

今回の研究は、準備実験として磁気刺激の音が評価対象部位である大腦皮質運動感覚野に影響を与えるかについて、NIRSを用いて評価した。次に、小脳に対する反復磁気刺激が対側大腦皮質感覚野における体性感覚誘発電位にどのような影響を与えるかを評価する。

対象と方法

対象者

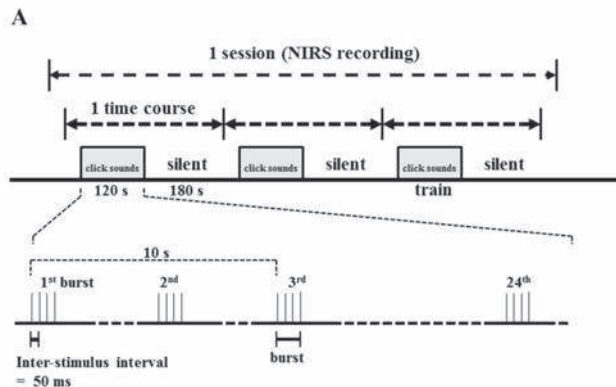
健康成人 9 名 (男 7 名、女 2 名) で、全員 Edinburg 利き手テスト (4) にて右利きと判断された。内訳は、研究 1 : 7 名 (男 5 名、女 2 名)、研究 2 : 2 名 (男 2 名) で、全員インフォームド Consent を書面にて確認した。今回の研究はヘルシンキ宣言にのっとり当大学の倫理委員会の承認を得て実施された。被験者は、リクライニング椅子に座った状態で研究は行われた。

研究1

音刺激：図1Aのように、刺激間隔が50msの4連発が0.2Hzにてクリック音が生じ、これが120秒続いたのち、180秒の無音のサイクルが3回の繰り返しを2セット実施された。音の大きさは、無音、50 dB、90dBの3種類で実施された。

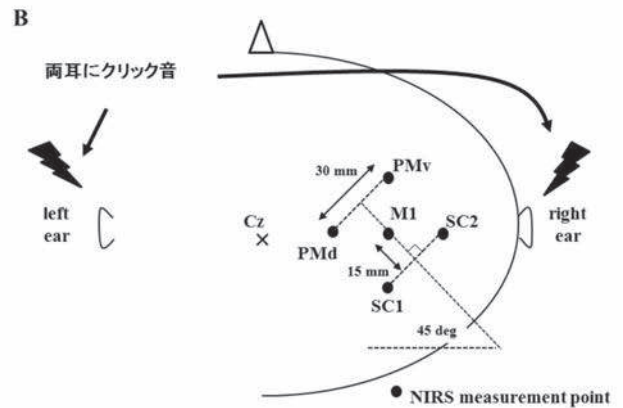
NIRS：機器はETG-4000 (Hitachi Medical Corporation, Tokyo, Japan) を使用して、図1Bのように一次運動野 (M1)、運動前野 (PMd、PMv)、感覚野 (SC1、2) の5チャンネルにてNIRS記録を行った。近赤外線は 692nmと830nmを利用し、出力と入力3 cmの距離に調節した。

図1



研究2

磁気刺激：1 Hzで、強度は左側の一次運動野に対する90%RMT (resting motor threshold) で、600発小脳刺激した。部位はinionの1cm下方で、3cm右側方の小脳を対象とした。被験者は研究1の結果を考慮して、耳栓をして研究が行われた。体性感覚誘発電位 (somatosensory evoked potential; SEP)：刺激は右正中神経刺激で、強度は運動閾値の1.2倍、3 Hzで行った。記録は右 Erb点にてN9、C3' -FzにてN20、N20-P25、P25-N33の振幅を分析した (C3' はC3の2 cm後方。International 10-20 system)。記録は、反復小脳磁気刺激前後で経時的に実施した。

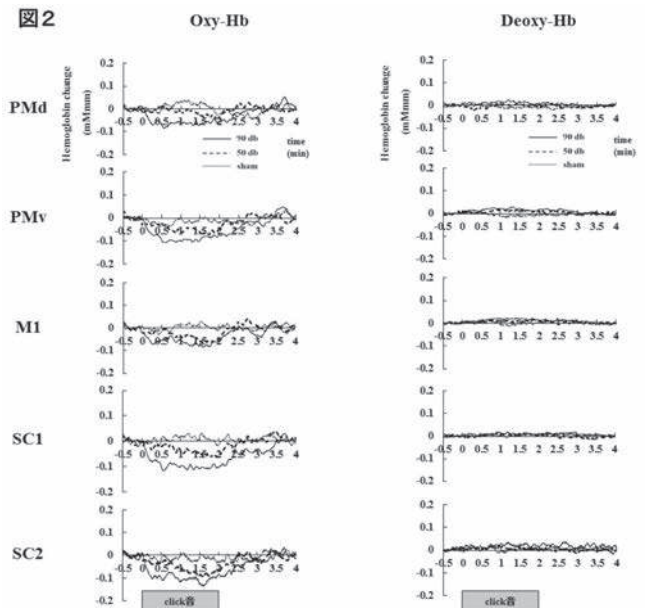


結果

研究1

oxy-Hbとdeoxy-Hbの変化を図2に示した。無音ではoxy-Hbもdeoxy-Hbも大きな変化を示さなかった。しかしながら、50と90 dBでは全てのチャンネルでoxy-Hbは減少し、deoxy-Hbは増加した。刺激開始から2分間の変化量についての統計解析では、無音に比較して90 dBでM1とSC1においてoxy-Hbが有意に減少し、PMvにおいてdeoxy-Hbが増加した ($p < 0.05$) (図2)。

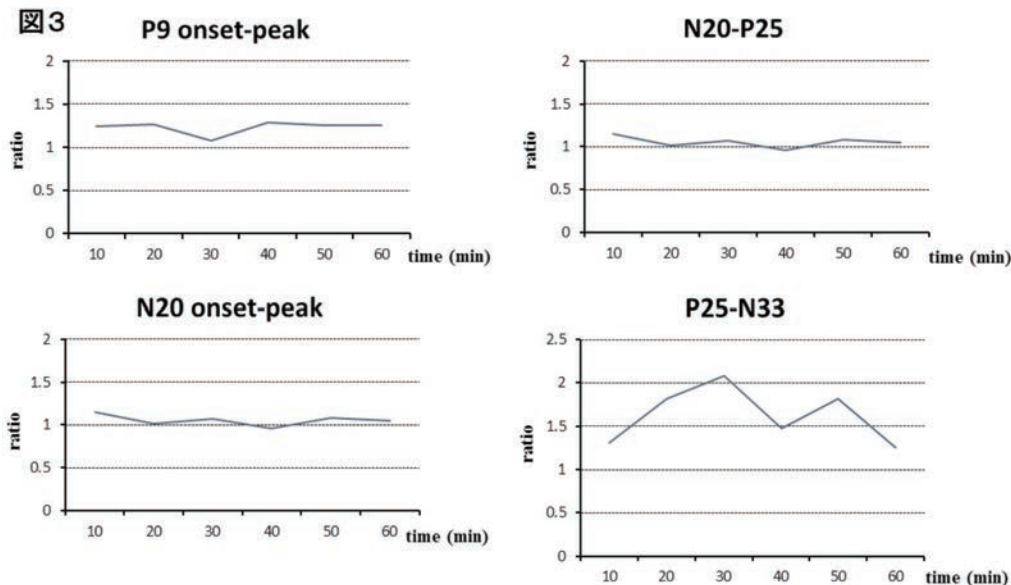
図2



研究2

反復小脳磁気刺激後には、末梢神経成分であるN9、皮質成分であるN20、N20-P25は、刺激前

と大きな変化を認めなかった。P25-N33に関しては、刺激後20-50分において150%以上の増大を認めた（図3）。



考察

Oxy-Hbの減少とdeoxy-Hbの増加のNIRSパターンは、脳活動性の低下を示している（5）。つまり大きな音は運動感覚野を抑制している。これは大きな音が大腦皮質一次運動野を抑制するという過去のわれわれの報告（6）と一致している。今回の結果により、磁気刺激研究においては、音の効果に十分に配慮する必要があることを示している。

小脳反復磁気刺激後に視床—皮質経路を反映するN20は大きな変化を示さず、P25-N33が大きく増大する傾向を示した。小脳に1 Hzの刺激を与えることにより、対側大腦感覚野を促通する効果があると考えられた。被験者数が少数であるため統計処理は実施していないが、今後の積み重ねにより証明されると思われる。小脳を対側大腦感覚野との線維連絡を生理学的手法により初めて示すことが可能となる。

文献

1. Ito M, Yoshida M, Obata K. Monosynaptic

inhibition of the intracerebellar nuclei induced from the cerebellar cortex. *Experientia* 1964; 20: 575-576.

2. Fierro B, Giglia G, Palermo A, et al. Modulatory effects of 1 Hz rTMS over the cerebellum on motor cortex excitability. *Exp Brain Res* 2007; 176: 440-447.

3. Mochizuki H, Ugawa Y, Terao Y, Sakai KL. Cortical hemoglobin-concentration changes under the coil induced by single-pulse TMS in humans: a simultaneous recording with near-infrared spectroscopy. *Exp Brain Res* 2006; 169: 302-310.

4. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: The Edinburgh inventory. *Neuropsychologia* 1971; 9: 97-113.

5. Wenzel R, Wobst P, Heekeren HH, et al. Saccadic suppression induces focal hypooxygenation in the occipital cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 1103-1110.

6. Furubayashi T, Ugawa Y, Terao Y, et al. The human hand motor area is transiently suppressed by an unexpected auditory stimulus. *Clin Neurophysiol.* 2000; 111: 178-183.

感覚運動野への低頻度反復磁気刺激による 触覚閾値の変化

(The change of tactile perception by repetitive Transcranial Magnetic Stimulation over the sensorimotor cortex)

名古屋大学大学院 医学系研究科 リハビリテーション療法学専攻 野 嶋 一 平

【目的】

我々は先行研究において、運動錯覚を伴う視覚刺激を利用する新しいリハビリテーション介入による効果を検討した。その結果、実際の運動を行わなくても運動錯覚を伴う視覚刺激を与えることで、対象となる手の対側一次運動野の可塑的变化が起こることにより運動機能も向上する可能性を報告した [1]。また脳梗塞患者における検討においても、運動錯覚を伴う視覚刺激により運動機能の短期的な機能改善を報告した [2]。これらの結果は、外部からの視覚刺激により脳機能に可塑的な変化を誘発することができる可能性を示唆している。

一方、外的な刺激により大脳皮質に可塑的な変化を誘発する方法として、経頭蓋磁気刺激 (TMS) と末梢神経電気刺激をペアとする連合性対刺激 (Paired associative stimulation : PAS) の効果が数多く報告されている [3]。大脳皮質を外的に調整することができれば、運動麻痺などの障害を有する患者に対するリハビリテーション介入の一助となり得る可能性がある。しかしPASで用いる電気刺激は一般的に感覚閾値の3倍程度と高強度であり、対象者の不快感や火傷などをリスクとして含んでいるため、より効率的な刺激方法の開発が必要である。一方Thabitら [4] は、末梢神経

刺激の代わりに運動とTMSを組み合わせることでも一次運動野の興奮性を調整できる可能性を報告している。しかし運動麻痺が重度な患者や切断患者などでは運動や電気刺激が困難となり適応ができない。そこで今回、末梢への電気刺激の代わりに先行研究で大脳皮質の可塑的变化を誘発することができた視覚刺激を用いて、大脳皮質の可塑的变化の効果について検討する。

【方法】

対象は神経疾患の既往を有しない右利き健常成人13名とする。被検筋は左短母指外転筋と左小指外転筋とする。視覚刺激は、事前に左母指の外転運動をビデオカメラに記録したものを、動画開始1秒後に運動開始予告の音刺激を出し、その1秒後に母指外転運動を行うよう編集を行った。そして運動開始時点を基準として、開始50ms、開始後100msおよび200msにTMSを一次運動野に与えた。TMS介入時間は7秒で1セットとし、240セット実施した。刺激強度は安静時閾値 (rMT) の120%とした。安静時および運動時閾値 (aMT)、皮質内抑制／促進 (SICI/ICF)、Silent Period (SP)、運動機能評価として母指選択運動反応課題とピンチ力、感覚評価として触圧覚刺激をそれぞれ介入前、0分後、15分後、30分後に実施した。

【結果】

TMSの刺激タイミングの比較から、運動開始50ms前の刺激入力により、介入後0分で母趾外転運動の主動作筋である短母指外転筋で記録されるMEPが増大する傾向が見られた。一方、運動開始200ms後の刺激入力では、逆に興奮性が低下する傾向が見られた。このような変化は、母指外転運動に関係のない小指外転筋で見られなかった。運動機能に関しては、ピンチ力で50ms前条件の介入後0分で向上し、感覚機能においても50ms前条件の介入後0分で閾値の低下を示した。

【考察】

本研究の結果は、運動錯覚を伴う視覚入力とTMSを組み合わせることで、一次運動野に可塑的变化を誘発できる可能性を示唆した。特に刺激としての運動の開始50ms前にTMSを与えることで、介入直後に運動の主動作筋である短母指外転筋領域を支配する一次運動野の興奮性が増大すると共に、ピンチ力が増大した。更に感覚閾値も低下する傾向が示された。一方運動開始200ms後にTMSを与えることでMEPの抑制が見られた。

運動錯覚により一次運動野の興奮性が高まることはすでに知られており、今回の結果は一次運動野の興奮性増大に対し特定のタイミングで外的刺激を与えることで大脳皮質に可塑的变化を誘発することができるというThabitら[3]の方法と類似した方法であると考え。シナプス前およびシナプス後のスパイク発生タイミングが、シナプスの可塑的变化にとって重要であることは、スパイクタイミング依存可塑性（STDP）として知られている。本研究では予告刺激を与える刺激プログラムとしたことでタイミングがロックされ、実際の運動を用いた検討と同様、時間依存的シナプス可塑性が誘発されたものと考え。更に、運動開始50ms前のTMS入力により、ピンチ力の向上と感覚閾値の低下も見られたことは、大脳皮質の可塑的变化が機能レベルの変化をもたらす可能性を示

しており、臨床への応用が期待される。

しかし今回、SICIやICFといった大脳皮質内の興奮性変化を反映していることが報告されている指標に変化が見られなかった。これは、今回誘発された一次運動野の可塑的变化にGABA系の神経活動が直接的に関わっていない可能性を示唆している。一方、本法の効果は介入直後にしか見られておらず、効果持続時間が非常に短い可能性がある。そのような中、評価項目が多くなることによって介入効果がマスクされてしまった可能性も考えられる。今後評価順序をランダムにする、また被験者を増やして詳細を検討する必要がある。

【発表】

1. 野嶋一平：運動錯覚を利用した運動学習における神経可塑的变化の検討，第3回基礎理学療法学術大会
2. 野嶋一平、美馬達哉、他：大脳皮質の興奮性を調整する新しい試み，第21回日本物理療法学会

【参考文献】

1. Nojima I, et al. Human motor plasticity induced mirror visual feedback. J Neurosci 32: 1293-1300, 2012
2. Nojima I, et al. Mirror visual feedback can induce motor learning in patients with callosal disconnection. Exp Brain Res 227: 79-83, 2013
3. Stefan K, et al. Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation. Brain 123: 572-584, 2000
4. Thabit MN, et al. Movement-related cortical stimulation can induce human motor plasticity. J Neurosci 30: 11529-11536, 2010

交番磁気治療器の臨床評価と 高性能磁気治療器の開発研究

(Development approaches and clinical evaluation of an improved frequency-modulated electromagnetic therapy devices)

北里大学 医学部 公衆衛生学 堤 明 純

【目的】

交番磁気治療器による血流促進効果への要因の一つとして、電流周波数の違いが考えられるが、これまでその検討は行われていない。そこで本研究では、周波数の違いが血流改善効果に影響するか検討することを目的として基礎的・臨床的研究を行った。

【方法】

1. 基礎的研究；コイル制作および流体曝磁装置、周波数変換電源装置の開発

1.1 コイル製作および流体曝磁装置

流体曝磁用コイルは、硬質プラスチック製のコア (ø20 mm) にポリエステル銅線 (古河電工, PEW 1.2, $S = 1.1 \text{ mm}^2$) を 2800回 (40回/50 mm x 70層) 巻いて製作した。任意波形ファンクションジェネレータ (LEADER, LG 1301) で発生させた正弦波および矩形波信号を出力最大 4000Wのパワーアンプ (BEHRINGER, EP 4000) で増幅し、モノブリッジモードにてコイルに電流を流した。磁束密度 (実効値) はガウスメータ (東陽テクニカ, LakeShore 421) で測定し、磁場波形測定

用の二次コイルにオシロスコープ (Agilent Technologies, DSO3202A) を接続した。

1.2 擬似流体循環システム

流体に用いる代替血液として今回は生理食塩水 (0.9% NaCl) を使用し、内径11.5 mmのシリコンチューブ内をポンプ (Nisso, PP-51) で循環させた (Fig. 1)。電極からの起電力信号をデュアルオペアンプ (STMicroelectronics, TL072CN) 内蔵型差動アンプで増幅し、オシロスコープおよびマルチメータ (Iwatsu, VOAC 7411) で測定した。また、本測定環境への商用周波数ノイズを除去するため、チューブ上の起電力測定電極から差動アンプまでを連結する電線をアースケーブル (Interwired, TBC5.5) で遮蔽した。

1.3 交流磁気治療器対応の周波数簡易可変スイッチ付電源装置の開発

市販の交番磁気治療器 (NIKEN, BIOBEAM®α1) の周波数を変換可能な電源装置のモデルを開発した。商用周波数を極低周波に変換するため、電源トランス (Noguchi, PM-241W)、リレーコイル (Panasonic, HTM-DC12V-F) およびオリジナルのマルチバイブレータで構成した。それ

ぞれのコイルに電流を流すための電源分配器は磁気治療器に付属のものを流用した。

2. 臨床的研究；磁気治療器を用いた周波数の違いによる下肢深部静脈血流増加、浮腫改善効果についての無作為化比較試験

下肢疾患を持たない健康成人ボランティア10名を対象とした。基礎的研究1.3において作成した周波数簡易可変スイッチ付電源装置を接続して家庭用電気交流磁気治療器実器を被験者の腓腹部に巻き、「50Hz群」「0.5Hz群」「安静群（機器介入なし）」の各処置を1日1回ずつ計3日行った（処置順はランダム割付システムを封筒法対応可能にカスタマイズした上で実施した）。各処置前後に携帯型超音波診断装置（M-Turbo SonoSite, INC.）を用いて下肢深部静脈血流（血流速度、血流量、血管径）を測定し、下肢部浮腫の評価（脛脛周囲径、下肢部ボリューム測定）およびアンケート調査（主観的評価としての「ふくらはぎに感じる重さ・つっぱり感・張り、満足度」を行った。

【結果】

1. 基礎的研究

1.1 コイル製作および流体曝磁装置

コイル電流2.3 Aおよび磁界周波数20 Hzの条件下、コイル表面において20 mT（理論値27.6 mT）の磁束密度を得た。コイルの自己インダクタンスは0.22 H（理論値0.38 H）となった。実験に使用したコイルの表面における磁束密度および中心からの距離との関係をFig. 2に示す。中心から水平方向の半径4センチ範囲ではその磁束が一定であることが分かった。また、垂直方向の測定では磁場の減衰が1センチ距離内で15%程度に抑えられたことから、本コイルが実験条件を十分に満たすものと判断した。

1.2 擬似血液循環システムの概要

流速7.5 L/minおよび磁束密度20 mTに

おいて2.8 mVの起電力を得た。

1.3 交流磁気治療器対応の周波数簡易可変スイッチ付電源装置の開発

磁界周波数（50 Hz）を極低周波（0.5 Hz）に変換した改変型磁気治療器の磁束密度分布をFig. 3に示す。商用周波数で得られる交流磁場を効率よく極低周波で利用することが可能となった。

2. 臨床的研究

介入前後の血流速度、血流量、血管径の変化率、アンケート調査結果は各介入間の有意差が認められなかった。下肢部ボリューム変化率を検討したところ「50Hz群 vs 0.5Hz群」「0.5Hz群 vs 安静群」において、0.5Hz群は50Hz群および安静群に比べボリュームは有意な減少を認めた（ $P<0.05$ ）。脛脛周囲径変化率を検討した結果、「50Hz群 vs 安静群」において、50Hz群は安静群に比べ周囲径は有意な減少を認めた（ $P<0.05$ ）。

【考察】

1. 基礎的研究

磁界を横切る流体からの誘導起電力 E は、

$$E = kBlv$$

Faradayの電磁誘導の法則を基に次式で求めることができる。

（ K ：比例定数、 B ：流路の起電力測定部における磁束密度、 l ：流路の半径、 v ：流速）

ゆえに流体による誘導起電力は磁界強度に依存し、既存の電磁流量計では磁界周波数を変更した際の起電力の挙動を反映しない。しかしながら実際の血液中の分子挙動は、血液の粘性、共存する不溶性化合物、および他の未知要因の支配下であり、その起電力の変化から有効な血行改善および治療域の最適周波数を見出せる可能性がある。現在、幾つかの

流体成分を候補として利用し、3つの電極部における起電力の差を解析することで良好な結果を得てきている。今後、最良な血液マッサージ効果の条件導出に期待がもたれる。

2. 臨床的研究

下肢深部静脈血流は、50Hz群、0.5Hz群、安静群の各群間に差は認められなかったことから、交番磁場治療器の血流改善効果は周波数の違いによって影響を受けないと考えられた。下肢部ボリューム変化率および脛脛周囲径変化率については相反する結果が出たことにより、浮腫改善効果には周波数の影響があるか結論は得られていない。被験者による主観的評価においても周波数の違いによる影響は認められなかった。

【発表】

1. Hidenori Nakagawa, Mikio Ohuchi, Hiromi Kawase, Makoto Kotani, Masafumi Tsunoda, Guogin Wang, Yasutoshi Sakamoto, Keika Hoshi, Akizumi Tsutsumi: ELF Electromagnetic Control of Bloodstream on Imitative Blood-Circulation System. IEEE International Magnetism Conference 2014, Dresden, Germany, May, 2014. (oral presentation)
2. Hidenori Nakagawa, Mikio Ohuchi, Hiromi Kawase, Makoto Kotani, Masafumi Tsunoda, Guogin Wang, Yasutoshi Sakamoto, Keika Hoshi, Akizumi Tsutsumi: Extremely Low Frequency Electromagnetic control of blood-stream on imitative blood-circulation system. IEEE Trans. Magn., 2014, submitted for publication. (submitted)

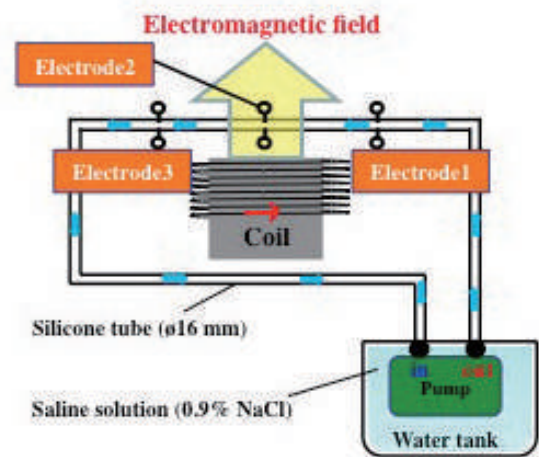


Fig. 1 Schematic design of imitative blood-circulation system.

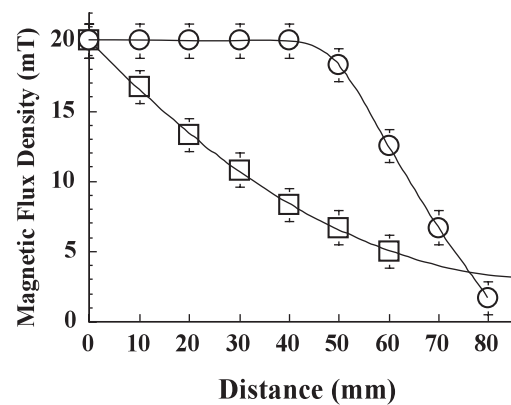


Fig. 2 Electromagnetic field strengths in horizontal (○) and vertical (□) directions from the tip of exposure coil.

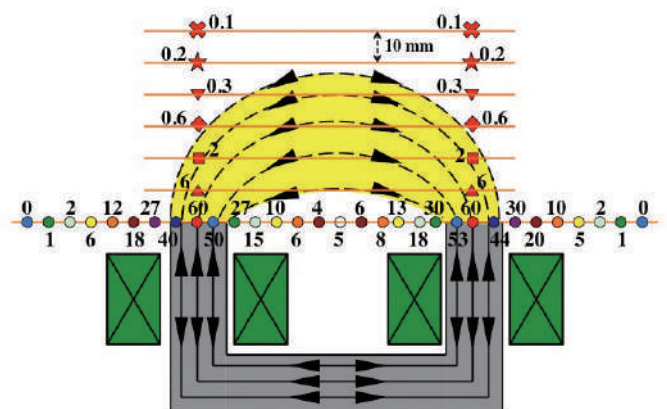


Fig. 3 Distribution of magnetic flux density from internal coil cores in the modified BIOBEAM® α I (unit: mT).

運動誘発性筋損傷に対する磁気刺激の効果

(Pulsed electromagnetic fields attenuate human musculocutaneous nerve damage induced by biceps eccentric contractions)

日本体育大学 健康科学 運動生理学研究室 中 里 浩 一

目的

パルス磁気刺激 (pulsed electromagnetic field: PEMF) は骨、皮膚、関節、神経などの損傷において一定の治療効果を挙げている。神経組織に対するPEMFの効果として、in vivo (1) あるいはin vitro (2) での実験においてPEMFは神経損傷の軽減あるいは神経細胞の活性化や増殖促進などの効果が報告されている。

運動誘発性筋損傷は不慣れた運動を行った場合に発生する。実験的には筋が力を発揮しながらその筋長が伸張する伸張性収縮を行うことで筋損傷が誘発される。我々のグループは伸張性収縮後の筋損傷が支配神経機能低下を併発することを報告した (3)。

本研究の目的は運動誘発性筋損傷時に併発する神経機能低下に対するPEMFの効果を検討することである。我々はPEMFが運動誘発性の神経機能低下に対して軽減効果があることを仮定し、上腕二頭筋および支配神経である筋皮神経に伸張性収縮により誘発された損傷がPEMFにどのような影響を与えるかを検討した。

方法

16人の健康な成人男女 (男性10名、女性10名) を対象とした。対象者は無作為にコントロール (CNT) 群 (男性4名、女性4名、平均年齢 22.6 ± 3.2 歳) と磁気刺激 (MS) 群 (男性6名、女性4名、平均年齢 24.0 ± 3.5 歳) に分けた。なお本実験は日本体育大学倫理審査委員会の承認を得て行われた (承認番号012-H0)。

全被験者の非利き手を対象として肘屈筋群にて伸張性収縮 (ECC) を行わせた。肘関節可動域は完全伸展から 90° 屈曲までとした。屈曲時の角速度は 90deg/sec とした。伸張性収縮運動は6回を1セットとして10セット行わせた。

伸張性収縮後、肘関節 90° での等尺性随意最大屈曲トルク、筋痛の程度 (visual analogue scale : VAS) および神経機能検査としてErb点の電気刺激から上腕二頭筋での誘発性M波発生までの時間 (潜時) を4日間測定した。CNT群はECC後特に処理は行わなかったが、MS群はMagstim200 (The Magstim Company) により腋下部より筋皮神経走行部に対して図1のように磁気刺激 (1.5 Tesla、1Hz、6分間) を施した。磁気刺激はECC直後および24時間ごとに一回、上記測定前に行った。

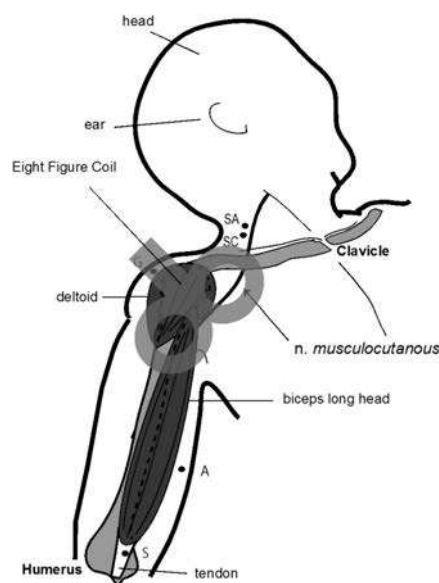


図1 実験のセットアップ

SA、SCはM波誘発のための電気刺激の位置。AはM波導出部。Sはアース。図のような位置に八の字コイルをセットして筋皮神経を刺激した。

結果

誘発性M波の潜時

M波の潜時の変化を図2に示す。CNT群において潜時の有意な遅延が確認された。一方MS群では潜時の有意な遅延は確認されなかった。

筋痛

筋痛を示すVASスコアの変化を図3に示す。CNT群においてECC2日後をピークとして筋痛を示すVASスコアの有意な増加が1-4日後に観察された。PEMF群でも同様な傾向が観察されたが、VASスコアは4日後にはベースラインに戻った。

等尺性随意最大発揮トルク

等尺性随意最大発揮トルクの変化を図4に示す。CNT群においてECC実施前に対してECC実施1, 2日後に有意なトルクの低下が観察された。PEMF群でも同様な傾向が観察されたがECC2日後にはベースラインに戻った。

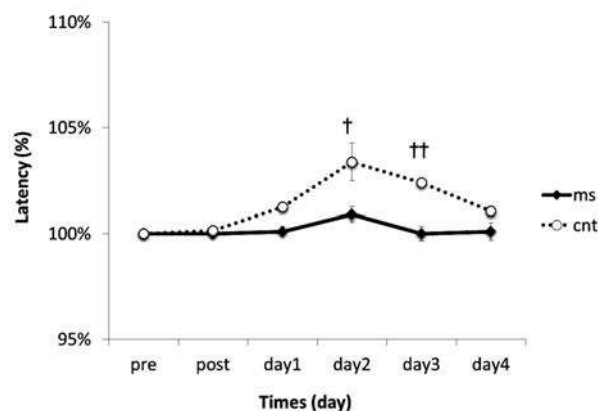


図2 伸張性収縮後のM波潜時の変化

† : CNT群内において伸張性収縮前の値に対して $P < 0.01$

† † : CNT群内において伸張性収縮前の値に対して $P < 0.05$

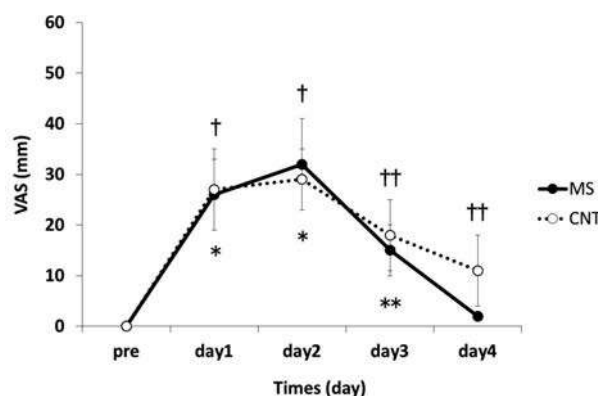


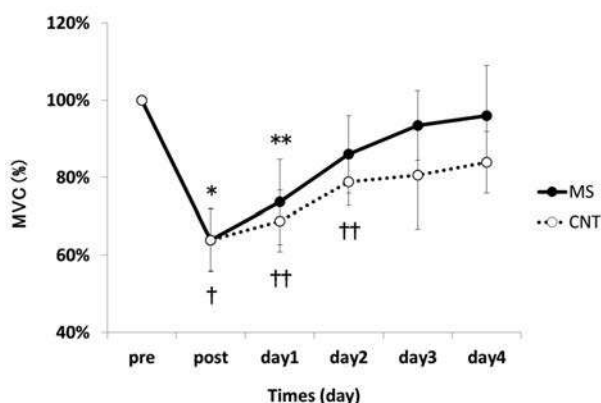
図3 伸張性収縮後のVASスコアの変化

† : CNT群内において伸張性収縮前の値に対して $P < 0.01$

† † : CNT群内において伸張性収縮前の値に対して $P < 0.05$

* : MS群内において伸張性収縮前の値に対して $P < 0.01$

** : MS群内において伸張性収縮前の値に対して $P < 0.05$



† : CNT群内において伸張性収縮前の値に対して $P < 0.01$

† † : CNT群内において伸張性収縮前の値に対して $P < 0.05$

* : MS群内において伸張性収縮前の値に対して $P < 0.01$

** : MS群内において伸張性収縮前の値に対して $P < 0.05$

考察

今回我々は上腕二頭筋の伸張性収縮運動後に筋皮神経の有意な潜時の延長を観察した。潜時は筋放電であるM波を誘発するために電気刺激を施してからM波が検出されるまでの時間である。M波潜時の延長は神経伝導速度の遅延を示しており、本研究の結果は上腕二頭筋の伸張性収縮は筋皮神経の伝導速度の低下を示唆している。この結果は以前に我々がラットにおいて観察した結果 (3) と同様であり、伸張性収縮は神経の機能低下をもたらすことを支持している。

PEMF群においてM波潜時の有意な増加は観察されなかった。この結果は神経損傷や疾患に対してPEMF処理が有効であるとの先行研究 (1,4) と同様、伸張性収縮により誘発される神経機能低下がPEMF処理によって軽減することを示唆している。ただし今回の磁場刺激強度 (1.5 Tesla) は先行研究 (1-10 mTesla) と比較して高値であり、誘導電位による影響は無視できない。今回使用したmagstim200における最低磁場である0.1TeslaであってもM波が誘発されることを観察しており、今後電気刺激が神経機能に与える影響を検討する必要がある。

今回の伸張性収縮により有意な遅発性筋痛の発生および発揮トルクの低下が観察された。ただしそれらはPEMF処理により早期に回復する傾向が観察された。一般に筋損傷および修復の過程は大きく急性期、炎症期、修復期に分けられる。PEMF処理により神経機能低下の軽減が観察されるとともに筋痛およびトルクの早期回復が見られたため、伸張性収縮後の神経損傷は筋損傷修復期において何らかの影響を与えている可能性が示唆される。

本研究によりPEMF処理が伸張性収縮誘発性の神経損傷を軽減し、筋機能の早期回復を促すことが示唆された。スポーツ現場では伸張性収縮により誘発される損傷として肉離れ損傷が知られており、今後はPEMF処理を肉離れ損傷に応用していくことを考えている。

参考文献

- (1) Lei T, Jing D, Xie K, Jiang M, Li F, Cai J, Wu X, Tang C, Xu Q, Liu J and others. 2013. Therapeutic effects of 15 Hz pulsed electromagnetic field on diabetic peripheral neuropathy in streptozotocin-treated rats. PLoS One 8:e61414.
- (2) Kudo TA, Kanetaka H, Shimizu Y, Abe T, Mori H, Mori K, Suzuki E, Takagi T, Izumi S. 2013. Induction of neuritogenesis in PC12 cells by a pulsed electromagnetic field via MEK-ERK1/2 signaling. Cell Struct Funct 38:15-20.
- (3) Lee K, Kouzaki K, Ochi E, Kobayashi K, Tsutaki A, Hiranuma K, Kami K, Nakazato K. 2014. Eccentric contractions of gastrocnemius muscle-induced nerve damage in rats. Muscle Nerve. Jul;50 (1) :87-94.
- (4) Szymborska-Kajanek A, Strzelczyk JK, Karasek D, Rawwash HA, Biniszkiewicz T, Cieslar G, Hajdrowska B, Sieron-Stoltny K, Sieron A, Wiczowski A and others. 2010. Impact of low-frequency pulsed magnetic fields on defensin and CRP concentrations in patients with painful diabetic polyneuropathy and in healthy subjects. Electromagn Biol Med 29:19-25.

平成25年度 研究助成テーマ

平成25年度は、以下のように、基礎4名・応用4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. 体液環境下でアパタイトを形成する磁性ナノ粒子含有チタニア微粒子の開発
東北大学 大学院医工学研究科／川下 将一
- I -2. 磁気温熱療法に適した磁性バイオミネラル粒子の迅速製造技術
独立行政法人産業技術総合研究所／中村 真紀
- I -3. 高い発熱性を有する磁気ハイパーサーミア用自己温度制御性発熱体の開発
大阪大学 大学院工学研究科／中川 貴
- I -4. 細胞内鉄計測を目指した高感度顕微ファラデー回転測定法の開発
大阪大学 大学院理学研究科／諏訪 雅頼

II 応用研究

- II -1. 治療抵抗性平衡障害に対する経頭蓋磁気刺激による新規治療法の開発
独立行政法人国立病院機構 東京医療センター 耳鼻咽喉科／五島 史行
- II -2. 嚥下障害に対する機能的磁気刺激の臨床応用
東京慈恵会医科大学 リハビリテーション医学講座／百崎 良
- II -3. 経頭蓋磁気刺激装置による生理学的基盤に基づく新たなニューロ・フィードバック法の開発と応用
京都大学 医学研究科／小金丸 聡子
- II -4. 磁気ハイパーサーミア治療普及のための小型交流磁場発生システム開発
奈良工業高等専門学校 機械工学科／児玉 謙司

III. 指定テーマ研究

- III -1. 経頭蓋磁気刺激を用いた一次運動野の運動変数記号化についての研究
東京大学 医学部附属病院／濱田 雅
- III -2. 超低周波電磁界の神経幹細胞の及ぼす影響評価に関する研究
独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター／石堂 正美

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24年度

発 行 日 平成26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。