

THE REPORT OF STUDY RESULT BY SUBSIDY

第29回 磁気健康科学研究助成
研究成果報告書

公益財団法人

渡邊財団

THE WATANABE FOUNDATION
SINCE 1994

助成研究成果 報告書

第29回

(研究期間：令和5年4月1日～令和6年3月31日)

30周年記念特別助成2020

(研究期間：令和3年4月1日～令和6年3月31日)

目 次

巻頭言	1
	理事長 小谷 誠
I. 基礎研究	
I-1. 磁場操作による培養基板の弾性率制御技術を用いた幹細胞ステムネス維持に関する研究	3
	熊本大学大学院 先端科学研究部 森田 康之
II. 応用研究	
II-1. コロナ後遺症に伴うメンタルヘルス障害に対する磁気刺激療法の開発	6
	慶應義塾大学 医学部 精神・神経科学教室 野田 賀大
II-2. T細胞の抗腫瘍活性を増強する磁性ナノ粒子の開発	9
	慶應義塾大学 医学部 先端医科学研究所 がん免疫研究部門 伊藤 雄介
III. テーマ指定研究	
III-1. 連合性ペア刺激と上下肢間神経相互作用の組み合わせによる脳の神経可塑的変化の信頼性向上	12
	ソニーコンピュータサイエンス研究所 加藤 辰弥
III-2. 交感神経様 PC 12 細胞における電位依存性カリウムイオンチャネルに対する中程度静磁場の影響	15
	大阪大学大学院 医学系研究科 心臓血管外科 金田 恵理
IV. 30周年記念特別助成2020	
IV-1. 磁場誘導加温による生体組織の凍結保存技術の開発	18
	名古屋大学大学院工学研究科化学システム工学専攻 井藤 彰
IV-2. 運動閾値未満の末梢磁気刺激を併用した上下肢リハビリテーション効果	20
	国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター リハビリテーション科部 加賀谷 斉

巻 頭 言

公益財団法人 渡邊財団

理事長 小 谷 誠

公益財団法人渡邊財団は本年で設立30周年記念を迎えることができました。2024年6月30日に新宿の京王プラザホテルで記念式典を開催しました。式典では、ノーベル賞受賞者である大隅良典先生（東京科学大学 荣誉教授）に講演していただきました。大隅先生は「オートファジー解明」の研究で2016年にノーベル生理学・医学賞を受賞されています。

オートファジーとはギリシャ語で「自分を食べる」という意味です。オートファジーの発見は古く、1950年代にベルギーのクリスチャン・ド・デューブ教授が飢餓状態にしたラットの肝臓細胞を電子顕微鏡で観察し、細胞は自己の成分を自分で食べて分解しているのではないかと考えて、これを「オートファジー」と命名しました。しかし、オートファジーの仕組みがわからず、デューブ教授は細胞内にある多くの「細胞小器官」の構造と機能の解明に研究の重点を置き、その研究成果によって1974年にノーベル生理学・医学賞を受賞されています。

その後、オートファジーは30年近く研究されませんでした。人のやらない研究をしたいという大隅先生の研究によって大きく発展しました。大隅先生はオートファジーの研究が社会にどれだけ役に立つかということを中心に考えず、真理の探究を目指して研究されてきましたが、酵母を使って一生懸命に研究した成果が人類のために大変役に立っています。

今から50年程前に私は米国のマサチューセッツ工科大学（MIT）に留学して、人間の身体から発生する微弱な磁気を計測して、病気の診断に役立てようとする研究を2年間行い、帰国後も生体磁気計測の研究を続けてきました。

人間の心臓や脳からは微弱な磁気が発生していることは以前から推定されていましたが、この微弱な磁気を計測できる磁束計がありませんでした。ところが、1970年代に超伝導技術を応用した超高感度のSQUID磁束計が米国立研究所とMITの共同研究で開発されました。

MITではこのSQUID磁束計を用いて、心臓から発生する磁気の計測に成功し、更に心臓磁気の千分の1程度の脳から発生する磁気計測に挑戦している頃、私はMITに留学しました。

私がMITに留学した頃、MITの研究所では大変なことが起っていました。それは、米国の著名な医師が、「MITのグループは心臓や脳の神経活動に伴って発生する磁気を計測していると言っているが、それは間違いである。彼らの計測している磁気は血液の中の鉄分が地磁気を乱している磁気を計測しているのにすぎない」と新聞で批判していました。その結果、MITの生体磁気計測の研究への米国の公的研究費は大幅に削減されていました。

私は、この医師の意見は理にかなっていると思って、10数名の健常者の血液を採取して

SQUID磁束計で計測しましたが、血液は全く磁性がないことがわかりました。

鉄自体は常に磁性を持っていますが、鉄が酸素と結合する仕方によって強い磁性を持ったり、全く磁性を持たなくなったりします。血液中の鉄は全く磁性を持たないように酸素と結合しています。

人間の祖先がこの世に登場し、立って歩き、言葉を交わすようになったのは、今から200万年程前と云われています。この間に、地磁気の大きさと方向は10回ほど変わっています。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ましたので、地磁気の影響はあまり受けないように人体はできています。

ところが、人間が電気を使うようになったのは、僅か200年ほど前からです。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、大変敏感に反応します。例えば、心臓の表面に数ボルトの電圧を加えると心臓は正常に働かなくなります。ところが、外部から心臓に磁気を加えて心臓を止めることは大変困難です。

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

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ます。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のです。

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ます。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ます。

この報告書は、令和4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す。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ますが、いずれもこの領域に新しい道を拓くことを目指しています。この報告書が契機となり、志を同じくする研究者へ情報が伝わり、磁気健康科学の発展に貢献することを期待しています。

磁場操作による培養基板の弾性率制御技術を用いた

幹細胞ステムネス維持に関する研究

Study on maintaining stem cell stemness using a technology to control the elasticity of culture substrates by magnetic field manipulation

森田康之*

Yasuyuki Morita*

*熊本大学大学院先端科学研究部, 〒860-8555 熊本県熊本市中央区黒髪 2-39-1

*Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University

2-39-1 Kurokami, Chuo-ku, Kumamoto 860-8555 Japan

Abstract

Regenerative and cell therapies of the future will require cell quantities 100 to 1,000 times greater than those currently used, along with demanding long-term cultivation under rigorous quality control. However, one of the main cell sources for these therapies, mesenchymal stem cells, tend to initiate differentiation into various somatic cells during culture, which diminishes their differentiation potential (stemness). This reduction in stemness leads to heterogeneity in the stemness state of individual mesenchymal stem cells, ultimately manifesting as variability in therapeutic effects and significantly undermining the reliability of regenerative and cell therapy products that utilize mesenchymal stem cells. Therefore, this research focuses on developing technologies to inhibit the reduction of mesenchymal stem cell stemness and to enable its long-term preservation. The approach involves using a magnetic field-responsive gel, dispersed with magnetic particles, as the culture substrate. By controlling the elasticity of the substrate through the application of a magnetic field, this technology aims to maintain the stemness of mesenchymal stem cells over extended periods. The realization of this technology could prevent the decline in reliability of mesenchymal stem cell-based products due to variability in therapeutic effects, which is a current issue in regenerative and cell therapies.

Keywords: stem cell, stemness, magnetic field-responsive gel, elasticity

1. 目的

本研究は、再生医療・細胞医療の主要な細胞ソースの一つである間葉系幹細胞のステムネスを長期保持する技術の開発に挑戦する。間葉系幹細胞のステムネスの質は、治療効果に直結する。再生医療・細胞医療の高度化に伴い、細胞利用製品となる間葉系幹細胞が大量に必要とされ、間葉系

幹細胞の長期培養およびステムネスを含めた品質管理の要求が高まってきている。しかし間葉系幹細胞の特性として、長期培養を行うとステムネスが減弱し、体細胞へと分化する。この原因は既に明らかになっており、間葉系幹細胞が培養基板の弾性率を能動的に検知し、その弾性率に応じた体細胞へ分化してしまうためである。間葉系幹細胞

胞のステムネス減弱の現象は 2014 年に発見されていたが (Yang et al, Nat Mater, 2014), 問題視され始めたのは臨床応用が拡大してきた最近のことである (Nature, 2019). したがって, 間葉系幹細胞のステムネス保持に関する研究は, 今まさに黎明を告げたばかりと言える. そしてこのステムネスの減弱を防ぐためには, 間葉系幹細胞を長期培養する基板の弾性率を意図的に変化させ, 一定の弾性率のみを経験させないことである. 本研究では, 上記の戦略の前段階として, 磁場印加装置の製作と磁性粒子を分散させた磁場応答性ゲルの作製およびその特性に取り組む.

2. 方法

目的とする弾性率制御の技術確立に向け, 図 1 に示すような, ゲル中の磁性体に磁力をかけ, 同時にその様子を観察できるような装置を開発した. 左右のコイルはスライド式にすることで, 様々な大きさの観察用容器に対応できるようにした. 観察体ステージにはスライドガラスの大きさに合わせたくぼみを作り, 観察用容器をはめ込めるように設計した.

試験流体には水, グリセリン 50%水溶液, グリセリン 75%水溶液, グリセリン 95%水溶液の 4 種を用いた. それぞれの流体中の磁性体粒子の速度から, 磁性体粒子の体積磁化率を求めた.

また, ゼラチンゲルを作製し, 磁場強度の違いによるゼラチンゲル内の磁性粒子の変位の違いを観察した. 観察には, ソフトウェア pylon Viewer を用いて磁場中の磁性体粒子の変位の様子を動画撮影した. その後, 粒子の変位が確認できたものは, 映像をフレームごとに切り取り, 画像解析ソフト ImageJ を用いて二値化を行い, 時間経過による変位量を測定した.

3. 結果と考察

3.1 磁性体粒子の体積磁化率測定

図 2 に, 各流体中の磁性体粒子の時間経過における変位を示す. このグラフの傾きから, 各流体中の磁性体粒子の速度を求め, 体積磁化率に変換したものを表 1 に示す. 水からグリセリン 95%水溶液にかけて, 粘度が大きくなるごとに流体中の磁性体粒子の速度が小さくなっていることが

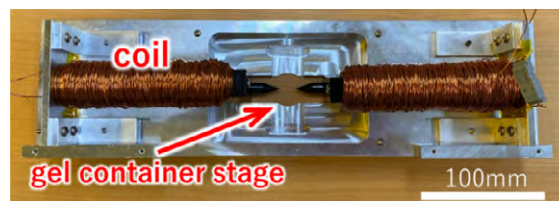


図 1 自作した磁場印加装置の写真

確認できる. また, 体積磁化率はほぼ一定の値を示しており, この磁性体粒子の体積磁化率は 0.35 程度であるとわかる.

磁性体粒子の体積磁化率については, 4 種の試験流体においてある程度近い値を得ることができた. グリセリン 95%水溶液における体積磁化率は他の実験結果と比べて少し小さくなっている. 高濃度のグリセリンは濃度や温度による粘度の変化が大きいため, 磁性体粒子を混合する際の濃度調整や実験時の室温の調整で誤差が生じた可能性が考えられる.

3.2 ゼラチンゲルの特性

図 3 に各磁場強度における磁性体粒子の経時的変位挙動の様子を示す. 100, 125, 150mT それぞれの磁場強度において, 観察領域内にあるゼラチンゲル中の数十個の磁性体粒子を選択し, それら磁性体粒子の変位挙動の平均値を算出し, プロットしたものである. なお, 変位量がマイナスであるのは, 座標の定義に起因するものであるが, 結果に影響を与えない. いずれの磁場強度においても多少のばらつきが存在するものの, ゼラチンゲル中の磁性体粒子は, 時間に対し, ほぼ線形的に変位したことを示している. ここで, 磁場強度 100mT と 125mT においては, その変位挙動に大きな差はみられず, かつその変位量はほぼゼロに等しかった. ここから, ゼラチンゲル中の磁性体

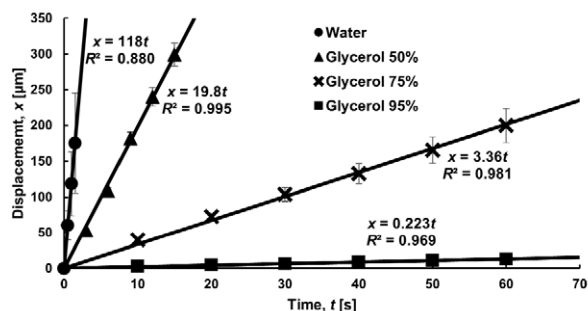


図 2 各種試料内の磁性体粒子の変位挙動

表 1 各種試料内の磁性粒子の速度と体積磁化率

	Water	Glycerol 50%	Glycerol 75%	Glycerol 95%
v [$\mu\text{m/s}$]	118	19.8	3.32	0.223
χ [-]	0.355	0.358	0.359	0.351

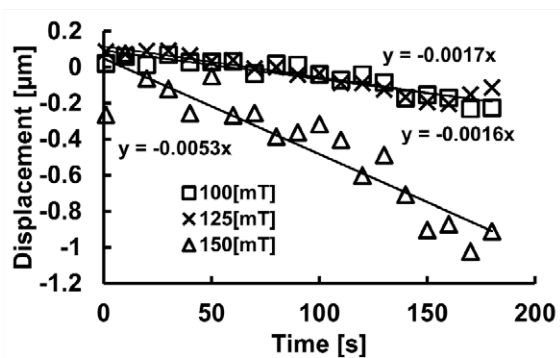


図 3 磁場強度と磁性粒子の変位の関係

粒子は、磁場強度に対して線形関係が成立しておらず、磁性体粒子を変位させるにはある程度の磁場強度が必要であることを示唆している。

4. まとめ

本研究では磁場を付加する二次元培養装置の開発を行った。ゼラチンゲルの弾性率はゲル濃度に比例して上昇していることがわかった。またゲル化が起きていると考えられるのはおよそゲル濃度 1.5% のときである。磁場強度が大きいほど変位量も大きいことがわかり、磁場強度 100 mT と 125 mT では、変位量の傾きにあまり変化がなく、磁場強度 150mT 以上が必要だと考えられる。

コロナ後遺症に伴うメンタルヘルス障害に対する

磁気刺激療法の開発

Development of transcranial magnetic stimulation treatment for mental health disorders associated with Long COVID

野田賀大*

Yoshihiro Noda*

*慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室, 〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35

*Department of Neuropsychiatry, Keio University School of Medicine

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582 Japan

Abstract

The present study aims to develop a treatment for Long COVID, a condition characterized by persistent cognitive dysfunction, chronic fatigue, insomnia, and depressive moods even after acute COVID-19 symptoms have subsided. The treatment protocol involves transcranial magnetic stimulation (TMS) therapy and is tested in a randomized controlled trial (RCT) involving 60 patients with Long COVID. The study is currently in progress with 25 subjects enrolled as of April 2024. The primary outcome measure is the MADRS score, and the study will also explore the relationship between clinical epidemiological data and treatment improvement rates. The study is expected to be completed by the end of FY2024, after which a statistical analysis of the clinical trial will be conducted. This research will contribute to the broader understanding and management of mental health issues associated with Long COVID.

Keywords: Long COVID, brain fog, cognitive dysfunction, chronic fatigue, insomnia, depressed mood, transcranial magnetic stimulation (TMS)

1. 目的

2019年12月に新型コロナウイルス感染症(COVID-19)が出現して以降,世界中でパンデミックに発展し,現在まだ収束の目途は立っていない。新型コロナウイルスワクチンの普及および潜在的な集団免疫の獲得によりCOVID-19感染による呼吸器症状をはじめとした急性期症状は徐々に軽症化してきているが,現在急性期症状が軽快・治癒した後にもブレインフォグと呼ばれる認知機能障害や慢性的な疲労感,不眠や抑うつ気分などの精神的不調を持続的に訴えるケースが増えてきている。このような病態をコロナ後遺症

(Long COVID)と呼ぶ。しかし,Long COVIDに対して確立された治療法はまだ開発されておらず,持続する認知機能障害や慢性疲労によって止む無く仕事を休職あるいは離職せざるを得ないケースも増えてきている。よって,Long COVIDは社会的にも重大な問題となっている。

本研究では,Long COVIDに対する有効な治療法を確立することを目的に経頭蓋磁気刺激(transcranial magnetic stimulation: TMS)療法をLong COVIDに適用した治療プロトコルを開発し,ランダム化比較試験(RCT)デザインによる臨床研究を遂行することを目的とした。

2. 方法

本研究計画では、COVID-19 感染後に明らかなメンタルヘルス障害（うつ症状・不安症状・認知機能低下・易疲労感）が惹起された患者を対象とし、以下の適格基準を満たした患者を研究対象者とする。臨床研究審査委員会の承認を得次第、本研究を開始し、2024 年度末までに終了を目指している。選択基準：1) 2020 年 1 月以降 COVID-19 に感染し PCR 検査にて陽性の判定を受けた者で参加時点ではコロナ感染症は陰性になっている者、2) COVID-19 感染後にはじめて DSM-5 にてうつ病あるいは不安障害の診断基準を満たす病態を来した者、3) MADRS にて 15 点以上の重症度を示す者、4) 同意取得時の年齢が 20 歳から 70 歳までの者、5) TMS 療法期間中に精神科外来に定期的に通院することが可能な者とした。除外基準：1) 脳器質性疾患のある者、2) 原発性睡眠障害がある者、3) 双極性障害・統合失調症・精神病的うつ病・薬物乱用/依存症の診断を受けている者、4) アクティブな自己免疫疾患や内分泌代謝疾患の診断を受けている者、5) けいれん発作やてんかんの既往のある者、6) TMS 療法を受けることが困難な重篤または不安定な身体疾患を有する者、7) 過去 6 か月以内に ECT を受けている者、8) 妊娠中の者、9) 金属インプラントやペースメーカー等の TMS に対する禁忌のある者とした。研究デザイン：計 60 名の Long COVID 患者を対象に RCT デザイン（アクティブ TMS30 名 vs. シヤム TMS30 名）で TMS 療法を実施する。アクティブ刺激とシヤム刺激の割付は年齢・性別・ベースライン MADRS スコアを因子とした動的割付にて実施する。但し、倫理的配慮からシヤム TMS に割り付けられた研究対象者に対しては RCT 期間終了後にオープンラベルでアクティブ TMS を実施した。サンプルサイズの推定：本研究内容に類似した先行研究が存在しない為、シータバースト刺激の抗うつ効果の pooled effect size = 1⁹ を用いて算出した。具体的には α を 0.05, power (1- β) を 0.90 に設定し、各アームにおける必要サンプルサイズを 23 人（合計 46 人）とし、研究途中での脱落率を約 20%と想定し、本研究の必要参加人数を 60 名と推計した。検査バッテリー：組み入れ患者に

対して TMS 療法開始前と 30 回施行後、経過観察 3 か月後に以下の検査を実施した。1) MADRS、2) HAMD および 3) PHQ-9 によるうつ症状評価；4) TMT (trail making test)による認知機能・実行機能の評価。Long COVID 専用 TMS 療法プロトコル²⁾：①左背外側前頭前野(DLPFC)に対する間欠的シータバースト刺激(iTBS)(1200 発: 6 分): 刺激強度は 120%安静運動閾値(RMT)とし、痛みに耐えられない症例は 100%RMT まで低減可とした。DLPFC の同定方法は BeamF3 法で F3 電極部位を同定した。②右外側前頭眼窩野(LOFC)に対する低頻度 1Hz-rTMS (600 発: 10 分): 刺激強度は 100% RMT とし、痛みに耐えられない症例は 70%RMT まで低減可とした。脳波電極 AF8 電極部位を刺激した。③TMS 装置は MagPro R30 治療器を使用し、TMS コイルは Cool-B70 コイルを用いた。④シヤム刺激に関しては特殊なシヤム刺激コイルを使用した。統計解析：両アームの群間差について、各臨床評価項目をアウトカム（プライマリーアウトカムは MADRS スコア）として Mixed Model for Repeated Measure 解析を実施し、層別因子で調整した両群の治療効果の差異を統計学的に検定する。さらに性別や年齢をはじめとした臨床疫学データと治療改善率との関係についても探索的に調べる予定である。

3. 結果

2024 年 4 月現在、計 25 名の Long COVID 被験者が組み入れられており、本 RCT は現在も鋭意進行中であり、介入内容はキーオープンされていない。被験者の平均年齢は 33.6±8.7 歳、男性 14 名、女性 11 名であり、組み入れ時点における MADRS スコアは 22.4±4.6 点となっている。

4. 考察

2024 年度末までに last patient in を目指し、その後データ固定を行い、本臨床試験に関する統計解析を行っていく予定である。

謝辞

本研究の一部は渡邊財団研究助成を受けて実施した。本研究プロジェクトに協力してくださっている被験者の皆様、共同研究機関の新宿・代々

木こころのラボクリニックおよび東京横浜 TMS
クリニックの皆様, 慶應 MTR ラボの皆様にはこ
の場を借りて厚く御礼申し上げます.

参考文献

- 1) Mutz J, Vipulanathan V, Carter B, Hurlemann R, Fu CHY, Young AH. Comparative efficacy and acceptability of non-surgical brain stimulation for the acute treatment of major depressive episodes in adults: systematic review and network meta-analysis. *BMJ*. 2019; 364:11079
- 2) Noda Y, Sato A, Shichi M, Sato A, Fujii K, Iwasa M, Nagano Y, Kitahata R, Osawa R. Real world research on transcranial magnetic stimulation treatment strategies for neuropsychiatric symptoms with long-COVID in Japan. *Asian Journal of Psychiatry*. 2023; 103438

T 細胞の抗腫瘍活性を増強する磁性ナノ粒子の開発

Magnetic nanoparticles to potentiate T-cell anti-tumor function

伊藤 雄介

Yusuke Ito

慶應義塾大学医学部, 〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地

Keio University School of Medicine

35, Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582 Japan

Abstract

We aimed to develop a novel nanoparticle technology that can stimulate T cell functions and inhibit immunosuppressive signals simultaneously to induce the potent anti-tumor activity in endogenous T cells. We loaded multiple immunomodulators such as anti-CD3 antibody, antibodies against tumor antigens, co-stimulatory molecules, multiple cytokines, and blocking antibodies against immune checkpoint molecules on the surface of nanoparticles. The generated nanoparticles efficiently induced antigen-specific T-cell activation. Also, we extracted plasma membranes by magnetic isolation, which induced a similar anti-tumor immune response. We will use magnetic nanoparticles and apply an external magnetic field to further enhance their ability to migrate to solid tumors in future.

Keywords: nanoparticle, cancer immunology

1. 目的

近年、T細胞の抗腫瘍活性を応用したがん免疫療法の出現によって、造血器腫瘍の治療成績が向上してきたが、特に固形腫瘍においては未だ奏効率が低く、さらなる改良が喫緊の課題である¹⁾。T細胞の抗腫瘍活性を最大限に引き出すには、腫瘍抗原によるT細胞受容体の刺激、CD80や4-1BBLといった共刺激分子による刺激、サイトカイン刺激という3つのシグナルを同時に入れることが重要であり、加えて腫瘍やその周囲の免疫抑制性細胞が発現するPDL1, CTLA4といった免疫チェックポイント分子や、TGF- β , IL-10といった免疫抑制性サイトカインからの抑制性シグナルを解除することで、長期にわたる活性が増強される²⁾。従って、単一分子の修飾では限界があり、これら少なくとも4種類のシグナルを同時に改変させることが望ましい。しかしながら、現在のがん免疫

療法では、1種類ないし2種類のシグナルの改変に留まっており、またサイトカインなどの免疫制御因子を複数同時に全身投与すると副作用のリスクが極めて高くなる。従って、腫瘍局所で選択的に作用し、内在性T細胞に複数のシグナルを同時に与えて強力な抗腫瘍活性を誘導し、腫瘍細胞を特異的に認識して攻撃させるという新規の治療モダリティの開発が求められている。

粒径 50-250 nm のナノ粒子は腎排泄を受けないと同時に Enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) によって腫瘍組織に集積しやすく、腫瘍局所への薬剤送達システムとして注目されている。本研究では、細胞膜表面に腫瘍抗原を認識する抗体や複数の免疫制御分子を搭載して粒子表面にコートすることで、T細胞による腫瘍免疫応答を誘導する技術の開発を進めた。CD3 と腫瘍抗原に対する抗体、共刺激分子、T細胞に長期

のメモリー形質を賦与する IL-7 と IL-15, 免疫チェックポイント阻害剤 (PDL1 阻害抗体) などと同時に搭載したナノ粒子を作製し, 腫瘍非特異的な T 細胞に複合的にシグナルを与えて活性化させる研究に取り組んだ (図 1).

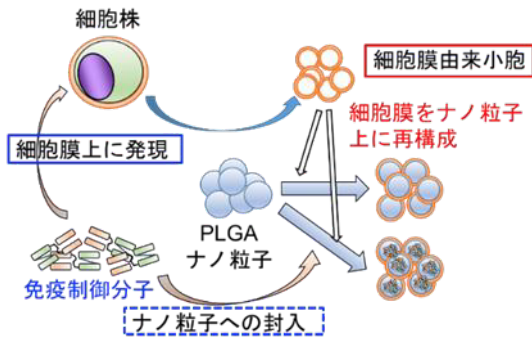


図 1 ナノ粒子作製の概念図

2. 方法

白血病細胞株 K562 に遺伝子導入を行い, 細胞表面上に様々な免疫制御因子を発現させた. 免疫制御因子として, 腫瘍抗原に対する抗体, T 細胞を活性化させる CD3 抗体, 共刺激分子 (CD80, 4-1BBL), サイトカイン (IL-7, IL-15) などを選択した. この細胞を機械的に破碎し, PLGA ナノ粒子表面にコートし, 免疫制御因子を搭載したナノ粒子を作製した. このようにしてできたナノ粒子を腫瘍細胞と T 細胞と共培養し, 抗腫瘍効果を検証した. また, 腫瘍モデルマウスにナノ粒子を投与し, *in vivo* での抗腫瘍効果を検証した.

また, PLGA ナノ粒子にコートする代わりに, 細胞を破碎した後に磁気ビーズによって CD45 陽性の細胞膜を精製して人工膜小胞を作成し, この機能を上記と同様に評価した.

3. 結果

(1) ナノ粒子の機能評価

上述した方法によって PLGA ナノ粒子表面に細胞膜をコートしたところ, 直径 100-150nm 程度のナノ粒子を作製できた (図 2).

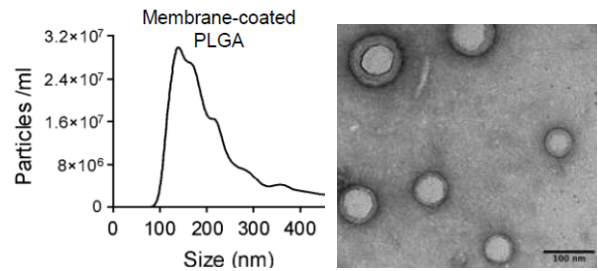


図 2 ナノ粒子の計測および電子顕微鏡写真

CD19 に対する抗体を搭載したナノ粒子と T 細胞と腫瘍細胞 (CD19 陽性白血病細胞株 NALM6) を共培養したところ, ナノ粒子の用量依存性に抗腫瘍効果を発揮した (図 3).

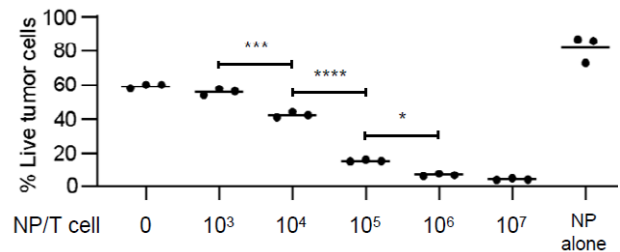


図 3 T 細胞, NALM6, ナノ粒子を共培養した後の NALM6 の生存率

続いて, 免疫不全マウスに NALM6 を静脈内投与後に, ナノ粒子を静脈内投与して治療したところ, 治療回数 (3 回, 6 回) に応じて有意な生存延長効果を認めた (図 4).

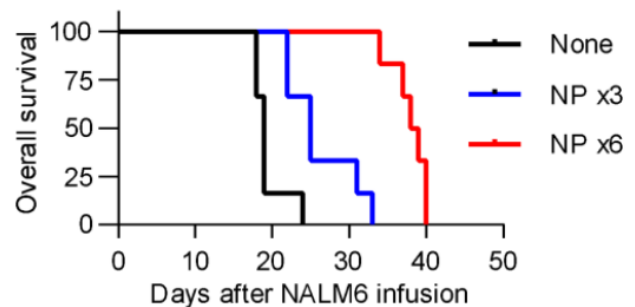


図 4 腫瘍モデルマウスの生存曲線

(2) 膜小胞の機能評価

細胞を機械的に破碎した後, CD45 に対する磁気ビーズを用いて, 細胞膜をソートした. この細胞膜を回収することで, 粒子状の膜小胞を単離することが出来た (図 5).

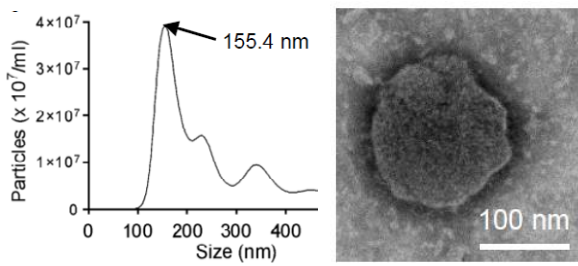


図5 膜小胞の計測および電子顕微鏡写真

免疫不全マウスに NALM6 を静脈内投与後に、膜小胞を静脈内投与して治療した。抗 CD3, 抗 CD19 抗体に加えて共刺激分子搭載膜小胞 (80/BB), さらに IL7/IL15 のサイトカインを搭載した膜小胞 (80/BB/7/15) による有意な生存延長効果を認めた (図6)。

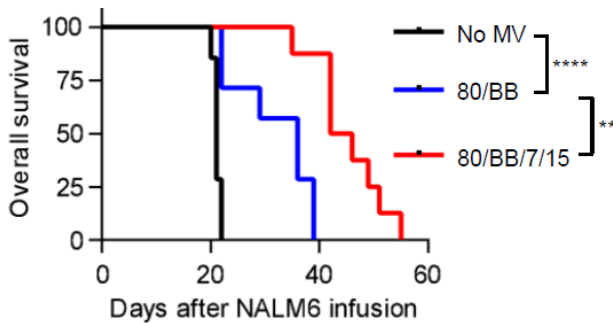


図6 腫瘍モデルマウスの生存曲線

4. 考察

T細胞を活性化するためには、腫瘍抗原によるT細胞受容体の刺激, CD80 や 4-1BBL といった共刺激分子による刺激, サイトカイン刺激という3つのシグナルが重要であるが、既存の手法ではこれらのシグナルを同時に入れることが困難であった。本研究によって、T細胞に最適なシグナルを入れることが可能となり、*in vitro*, *in vivo* 両方において抗腫瘍効果を惹起できることを示した。この手法は、任意の免疫制御因子を搭載することが可能であり、かつT細胞以外の免疫細胞を標的とすることもできるため、幅広く応用が可能となる。

謝辞

この研究は渡邊財団の補助を受けて実施したものである。本論文の内容は2023年9月21日~23日に横浜で開催された「第82回日本癌学会学術総会」、2023年10月13日~15日に東京で開催された『第85回日本血液学会学術集会』で報告したものである。

参考文献

- 1) Shah et al. Nat Rev Clin Oncol 2019
- 2) Bejarano et al. Cancer Discov 2021

連合性ペア刺激と上下肢間神経相互作用の組み合わせによる脳の 神経可塑的变化の信頼性向上

Robust enhancement of neuroplasticity by the combination of paired associative stimulation with interlimb network

加藤辰弥*,**,***, 金子直嗣***, 中澤公孝***

Tatsuya Kato*, **, ***, Naotsugu Kaneko***, Kimitaka Nakazawa***

*株式会社ソニーコンピュータサイエンス研究所, 〒141-0022 東京都品川区東五反田 3-14-13

**独立行政法人日本学術振興会, 〒103-0083 東京都千代田区麹町 5-3-1

***東京大学大学院総合文化研究科, 〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1

*Sony Computer Science Laboratories. Inc.,

3-14-13 Higashigotanda, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0022 Japan

**Japan Society for the Promotion of Science,

5-3-1 Kojimachi, Chiyoda-ku, Tokyo 103-0083 Japan

***Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902 Japan

Abstract

This study aimed to augment neuroplasticity induced by paired associative stimulation (PAS) through combining PAS with the interlimb network. The results revealed that the combination of lower-limb PAS and voluntary upper-limb muscle contraction (UMC) facilitated lower-limb corticospinal excitability more reliably than conventional PAS. Meanwhile, the correlation between intracortical inhibition and increased corticospinal excitability that occurred in conventional PAS was disrupted in PAS+UMC intervention, indicating that an excitation/inhibition imbalance limited increased corticospinal tract excitability in PAS+UMC intervention. Our findings suggest the usefulness of the interlimb network in neural interventions and the complexity of inducing neuroplasticity.

Keywords: Noninvasive Brain Stimulation, Paired Associative Stimulation, Interlimb, Transcranial Magnetic Stimulation

1. 目的

非侵襲脳刺激 (Noninvasive brain stimulation: NBS) では、被験者間で頑健な神経可塑的变化を誘導することが重要な課題である¹⁾。特に下肢については、その機能低下が生活の質に大きく関与するにも関わらず、知見が乏しい。

NBS の代表的な手法として、連合性ペア刺激

(Paired associative stimulation: PAS) が挙げられる。PAS は、末梢感覚神経への電気刺激 (Peripheral nerve electrical stimulation: PNS) と続く皮質への経頭蓋磁気刺激 (Transcranial magnetic stimulation: TMS) のペア刺激を繰り返すことで、Hebb 則に基づいた皮質脊髄路興奮性の可塑的变化を誘導できる手法である^{2,3,4)}。しかし、下肢を対象とした

既存の PAS 研究では一貫した神経可塑的变化を誘導できていない⁵⁾.

Hebb 則ではシナプス後細胞の活動量がシナプスの可塑的变化を左右する^{3,6)}. 上肢筋の随意収縮は安静状態の下肢筋の皮質脊髄路興奮性を増大させることが知られている⁷⁾. したがって、下肢を対象とした PAS に上肢筋の随意収縮を組み合わせることで PAS の信頼性と効力を高められると仮説立てた.

2. 方法

被検者は重篤な中枢神経疾患の既往歴がない健康成人 13 名であった (女性 5 名, 男性 8 名, 26.1 ± 2.8 歳).

実験中, 被検者は膝関節 45° の状態で座位姿勢を保った. 単発単相性の TMS は, 右ヒラメ筋を対象として左一次運動野 (The primary motor cortex: M1) に PA 方向で双円錐型コイルを用いて与えられた (Magstim 200, Magstim Co., Whitland, UK). PNS は膝蓋の陽極 ($5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$) と膝窩の陰極 ($2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$) を通して右脛骨神経に与えられた. 介入中, TMS の刺激強度は安静時閾値 (Resting motor threshold: rMT) の 1.2 倍, PNS の刺激強度は運動閾値の 1.5 倍に設定した.

本研究では, 従来と同様の PAS のみの条件と PAS に上肢筋の随意収縮を組み合わせる PAS+UMC 条件を用意した. PAS による介入は, 0.2Hz の頻度による PNS と TMS のペア刺激の 200 回の繰り返しによって構成された. PNS と TMS の刺激間隔は, 各被検者の TMS による運動誘発電位 (Motor evoked potential: MEP) の潜時に 18 ms を加えた時間幅に設定した. PAS+UMC 条件では, ペア刺激のタイミングに合わせて手関節の屈曲を最大力の 30% で実行した.

右ヒラメ筋の皮質脊髄路興奮性と短潜時皮質内抑制 (Short-interval intracortical inhibition: SICI) を介入前 (ベースライン), 介入後 0, 15, 30 分後に評価した. 皮質脊髄路興奮性は単発 TMS をベースライン時に約 0.1 mV の MEP が誘発される強度で評価した. SICI は, 80% rMT の閾値下条件刺激と 120% rMT の閾値上テスト刺激を 3 ms の刺激間隔で与えた際, 120% rMT の閾値上テスト刺激のみで誘発される MEP に対する振幅の抑制の程度

で評価した. いずれも, ベースラインからの変調を評価するために, ベースラインの値で正規化して統計検定を行った.

3. 結果

ベースラインと比較して, PAS+UMC 条件の介入 30 分後にヒラメ筋の MEP が有意に増大したが (Wilcoxon の符号順位検定, $p < 0.001$), 介入 0 分後と 15 分後に有意な変調はなかった (Wilcoxon の符号順位検定, 0 分後: $p = 0.33$, 15 分後: $p = 0.14$) (図 1A). 反対に, PAS 条件では介入後いずれの時間においてもベースラインと比較して有意な MEP の変調はみられなかった (Wilcoxon の符号順位検定, 0 分後: $p = 1$, 15 分後: $p = 0.33$, 30 分後: $p = 0.10$) (図 1A).

ベースラインと比較して, PAS+UMC 条件の介入 30 分後にヒラメ筋の SICI が有意に増大したが (Wilcoxon の符号順位検定, $p = 0.04$), 介入 0 分後と 15 分後に有意な変調はなかった (Wilcoxon の

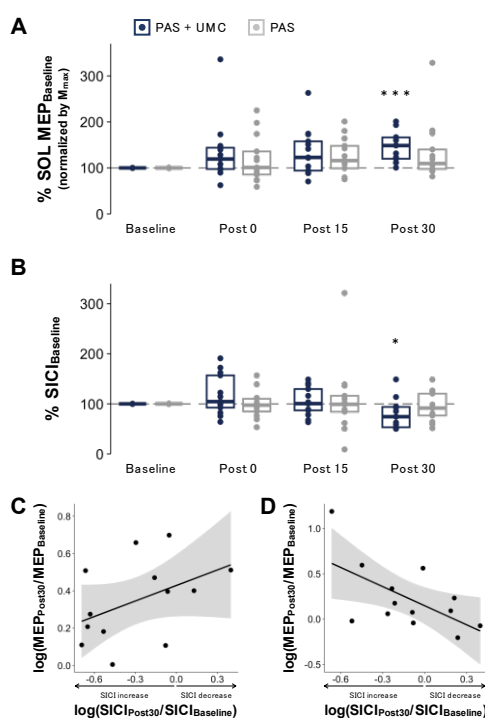


図 1 (A) ベースラインで正規化されたヒラメ筋 MEP の箱ひげ図. (B) ベースラインで正規化されたヒラメ筋 SICI の箱ひげ図. (C) and (D) PAS+UMC 介入 (C) または PAS 介入 (D) 30 分後の MEP と SICI の変調についての散布図. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

符号順位検定, 0 分後: $p = 0.24$, 15 分後: $p = 0.89$) (図 1B). PAS 条件では介入後いずれの時間においてもベースラインと比較して有意な MEP の変調はみられなかった (Wilcoxon の符号順位検定, 0 分後: $p = 0.64$, 15 分後: $p = 0.74$, 30 分後: $p = 0.22$) (図 1B).

MEP と SICI の変調の関係を評価するために, 介入 30 分後の MEP と SICI のベースラインに対する変調について相関解析を行った. PAS+UMC 条件では有意な相関はなかったが (Pearson 相関係数 $r = 0.44$, $p = 0.13$) (図 1C), PAS 条件では負の相関が有意であった (Pearson 相関係数 $r = -0.60$, $p = 0.03$) (図 1D). 即ち, PAS 介入後 SICI が増大していた被検者において MEP も増大していた.

4. 考察

下肢への PAS に上肢筋の随意収縮を組み合わせることで介入 30 分後にヒラメ筋 MEP が増大した. 一方で, 従来の PAS 介入のみでは MEP は増大しなかった. PAS+UMC 介入中は, 上肢筋収縮が下肢の皮質脊髄路興奮性を増大させたことで TMS によって誘発される M1 ニューロン (シナプス後細胞) の活動を増加させ⁷⁾, 頑健なシナプス可塑性を誘導したと考えられる.

しかし, 上下肢間のネットワークを組み込むことによって PAS の効力は増大しなかった. これには一次運動野の抑制性介在ニューロンが関わっていると考えられる. PAS+UMC 介入 30 分後に SICI は増大したが, PAS 介入後にみられた MEP 増大と SICI 増大の相関関係は PAS+UMC 介入後にはみられなかった. 先行研究では, 遠隔肢の収縮により SICI が減少することが報告されている⁸⁾. 即ち, 皮質脊髄路興奮性増大と反する方向の SICI の変調が上肢筋収縮によってもたらされたことで, 介入による皮質脊髄路興奮性増大が減弱させられた可能性がある. この結果は, 神経調節介入に関わる神経メカニズムの複雑さを示唆している.

謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団による第 29 回磁気研究助成の補助を受けて実施したものであり, 厚く御礼申し上げます.

参考文献

- 1) López-Alonso V, Cheeran B, Río-Rodríguez D, Fernández-del-Olmo M (2014) Inter-individual Variability in Response to Non-invasive Brain Stimulation Paradigms. *Brain Stimul* 7:372–380
- 2) Stefan K (2000) Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation. *Brain* 123:572–584
- 3) Thickbroom GW (2007) Transcranial magnetic stimulation and synaptic plasticity: experimental framework and human models. *Exp Brain Res* 180:583–593
- 4) Carson RG, Kennedy NC (2013) Modulation of human corticospinal excitability by paired associative stimulation. *Front Hum Neurosci* 7:1–28
- 5) Alder G, Signal N, Olsen S, Taylor D (2019) A Systematic Review of Paired Associative Stimulation (PAS) to Modulate Lower Limb Corticomotor Excitability: Implications for Stimulation Parameter Selection and Experimental Design. *Front Neurosci* 13
- 6) Feldman DE (2012) The Spike-Timing Dependence of Plasticity. *Neuron* 75:556–571
- 7) Kato T, Kaneko N, Sasaki A, Endo N, Yuasa A, Milosevic M, Watanabe K, Nakazawa K (2022) Corticospinal excitability and somatosensory information processing of the lower limb muscle during upper limb voluntary or electrically induced muscle contractions. *European Journal of Neuroscience* 55:1810–1824
- 8) Chiou S, Wang R, Liao K, Wu Y, Lu C, Yang Y (2013) Co-activation of primary motor cortex ipsilateral to muscles contracting in a unilateral motor task. *Clinical Neurophysiology* 124:1353–1363

交感神経様 PC 12 細胞における

電位依存性カリウムイオンチャネルに対する中程度静磁場の影響

Effects of moderate static magnetic fields on the voltage-gated potassium ion channels in sympathetic neuron-like PC12 cells

金田恵理

Eri Kaneda

大阪大学大学院医学系研究科, 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2

Department of Cardiovascular Surgery, Graduate of Medicine, Osaka University

2-2 Yamadaoka, Suita-city, Osaka 565-0871 Japan

Abstract

Previous studies reported the possibility that moderate static magnetic fields (moderate SMF) could alter the excitability of neurons by modulating ion channel activity. Our purpose of this study is to investigate the effects of moderate SMF on the electrophysiological properties of voltage-gated potassium channels which are expressed in sympathetic-like cell membranes of PC12 cells. We differentiated pheochromocytoma PC12 cells derived from rat adrenal medulla into sympathetic-like cells by adding nerve growth factor (NGF). Moderate SMF was applied to the cells after 6 ± 1 days of differentiation during overnight, we performed whole-cell patch clamp recording to observe the effects of SMF on voltage-gated potassium channels. The current density was significantly lower in the magnet group compared with the control. The results suggest that moderate SMF has the potential to alter the excitability of sympathetic neurons.

Keywords: sympathetic nerves, moderate static magnetic field (SMF), ion channels

1. 目的

近年, 経頭蓋静磁場刺激 (tSMS) が注目されている。ネオジム磁石を頭表に留置したとき, 直下の脳皮質の興奮性を抑制すると 2011 年に報告された。具体的には, ヒト一次運動野 (M1) の直上にネオジム磁石を 10 分間留置すると, 運動誘発電位 (MEP) が 25%減少することが確かめられている。^{1) 2) 3)} それだけでなく, 磁石を取り外したとしても 10~20 分間の tSMS では数分間, 30 分間の tSMS では 30 分間以上, 抑制効果が持続する。

神経細胞に対する静磁場の作用メカニズムとして有力な説では, 1~1000mT の中程度の磁力が, リン脂質分子の反磁性異方性に作用 (分子の再配

向)・イオンチャネルが変形 (ゆがみ)・力学的作用を受ける (回転) かのいずれかの影響を与え^{4) 5)}, 結果として神経細胞の活動に変化をもたらすと説明されている。

我々は高血圧や不整脈・ホットフラッシュなど一部自律神経系の異常が問題となる疾患への医療応用に着目し, 今回自律神経系である交感神経様培養細胞を用い, それに対する静磁場の影響を調べることにした。

2. 方法

細胞と分化: 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより購入した培養 PC 12 細胞 (IFO50278) を FBS 添加済みの

RPMI 培地で培養・継代 (P16~25) した. IFO50278 は遊走性細胞であったため, 細胞の播種時には毎回ディッシュにコラーゲンコーティングを施した. 10^5 cells を 35mm ディッシュに播種した翌日より, 培地交換と共に NGF 添加した. 培地交換・NGF 添加はともに 3 日に 1 回の頻度で行われ, パッチクランプ測定は分化開始 6 ± 1 日で実施された.

使用磁石と磁石感作: Overnight の感作時は $\phi 35 \times h5$ mm (Neomag 社, 東京, 日本) の円盤状磁石を 35mm ディッシュの下に静置した. 感作は実験開始 18 時間前より開始した. 実験当日, 培地を細胞外液で置換した後, Sham 群では通常の測定を Mag 群では円盤状磁石から取り外した直後より, 35mm dish の外側に $\phi 60 \times \phi 50 \times 10$ mm のリング状磁石を置き, 測定を行なった. 測定は Sham 群・Mag 群ともに, 1 枚の培地につき細胞外液置換から 180 分以内とした.

パッチクランプ法: Pipet サイズは外径 1.5mm, 内径 0.86mm のものを使用した. 細胞外液の組成は KCl 5mM, NaCl 145mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, HEPES 10mM, D-glucose 一水和物 10mM とし, 10N NaOH で pH7.3~7.5 に調製した. また, ガラスピペットに満たす細胞内液の組成は, KCl 135mM, MgCl₂ 1mM, EGTA 1mM, HEPES 10mM, D-スクロース 20mM とした.

3. 結果

Sham 群と 18 時間の Mag 感作群で比較すると, 細胞面積当たりの電流密度において, 有意な差がみられた (t-検定). 一方で, 最大電流値に対する割合や静止膜電位の項目におけるでは両群で有意な差は見られなかった. データは示していないが, 1 時間の磁石感作群, 6 時間の磁石感作群においても同様に調べたが, それぞれ Sham 群と細胞面積当たりの電流密度において有意な差は見られなかった.

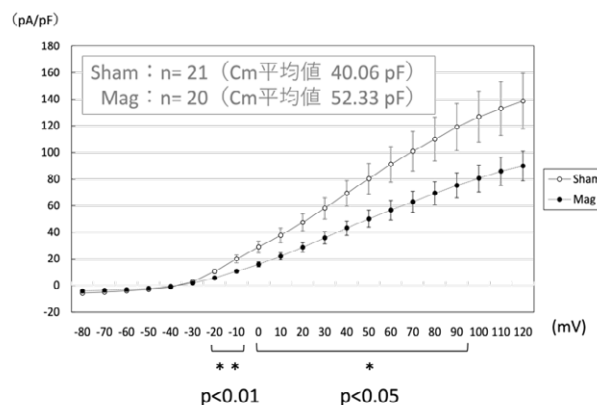


図 1. Sham 群 (磁石なし, n=21) と 18 時間の中程度静磁場感作の Mag 群 (磁石あり, n=20) における細胞表面積当たりの電流密度

4. 考察

本研究では, PC12 細胞においては 1 時間という短時間の感作では影響が見られなかったが, 6 時間より徐々に電流密度への影響が見え始め (データ示さず), 18 時間でははっきりとした差を生じたことが分かった. また, この影響は磁場感作から離脱させた後も少なくとも数時間は維持された (データ示さず).

中程度静磁場がニューロン膜に与える影響のメカニズムについては, あらゆる研究手法を用いて観察された複数の事象を通し, 解明が試みられている. 特に, 磁力がニューロンへ与えるバイオメカニクス (細胞内分子構造やイオンチャネルの回転など) や代謝・細胞間相互作用に至るまで多岐にわたって可能性が指摘されている. これらのいずれかが単独で影響を生み出すというよりも, 複数のメカニズムが存在すると考える方が自然である. 筆者は現在, メカニズム探求としての遺伝子や細胞代謝に関する観察, そして中程度静磁場の対象となる Kv チャネルの特定を目指し, ニューロンの興奮性変化への効果について検証中である.

また, プライマリ細胞は新生児動物より単離することが多く, 実際の生体に近い細胞の性質を保持しながら *in vitro* 研究が行える一方で, 動物の犠牲に対して収量が少なく, また一般的に培養までの手技体得に長期間かかることが知られる. 本研究で用いられたような培養細胞は細胞膜のイ

オンチャネル発現様式が生体とは異なるデメリットがあるが、一方で簡便に誰でも大量培養でき、網羅的な分子解析が可能であることは研究上の大きなメリットである。また本研究は既報と異なり、煩雑な磁石固定のセットアップが不要な実験系で実施した。

謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団の補助を受けて実施したものである。また、本内容は2024年5月の Ion Channel Modulation Symposium (ICMS) にて発表予定である。

参考文献

- 1) Antonio O, et al. J Physiol. 2011; 589: 4949–58.
- 2) Benjamin S, et al. Brain Stimul. 2013; 6: 817–20.
- 3) Michele D, et al. Brain Stimul. 2018; 11: 676–88.
- 4) Arthur R, et al. Cell Biochem Biophys. 2003; 39: 163–73.
- 5) Manuel F, et al. Electromagn Biol Med. 2020; 39: 310–5.

磁場誘導加温による生体組織の凍結保存技術の開発

Magnetic heating of nanoparticles for tissue/organ cryopreservation

井藤 彰

Akira Ito

名古屋大学大学院工学研究科化学システム工学専攻, 〒464-8603 名古屋市千種区不老町

Department of Chemical Systems Engineering, School of Engineering, Nagoya University,

Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8603 Japan

Abstract

The technology for cryopreservation of organs/tissues has not been established. If organs can be cryopreserved, the patients waiting for transplantation around the world will be saved. The technical problem is that ice crystals form during thawing, which destroys the tissue cells, and there is no technique for rapidly heating and thawing thick organs without forming the ice crystals. In this study, we have developed a uniform and rapid heating technology by heating magnetic nanoparticles with an alternating magnetic field as a novel cryopreservation technology for organs/tissues for transplantation.

Keywords: magnetic nanoparticle, alternating magnetic field, cryopreservation, islet, liver.

1. 目的

人体を自在に凍結・融解することができれば、医療技術の発展した未来に治療の望みを求めることができたり、宇宙における人類の活躍の場が飛躍的に広がるとされているが、依然として SF の話である。現在、人体はもちろん、臓器や組織も凍結保存することはできない。臓器移植における臓器の保存可能期間は、肝臓や膵臓で 8 時間であり、多くの場合は移植に間に合わずに廃棄されている。臓器や組織の凍結保存が技術的に可能になれば、世界的に年間数百万人もの患者の健康を改善することができると考えられる。

移植用組織を凍結保存することが困難であることは、解凍時に細胞が破壊されてしまうことに起因する。冷凍した際の水分の氷結による体積膨張で細胞が破壊されるといわれている。一方で、臓器・組織よりも下層レベルである細胞においては、細胞を生きた状態で冷凍保存するガラス化保存法がすでに開発されている。ガラス化保存法は、

凍結保護液で処理した細胞を液体窒素で素早く凍結させることで、細胞内に氷晶を形成させずに凍結する方法である。しかしながら、分厚い組織・臓器においては、溶液中および組織内を均一にかつ急速に解凍することができない。

本研究では、組織・臓器レベルの新しい冷凍保存技術として、無毒な酸化鉄から成る磁性ナノ粒子を凍結保護液に分散させて凍結し、交流磁場で磁性ナノ粒子を発熱させて解凍することで、従来の加温方法 (37°C の温浴による対流伝熱) では不可能だった臓器・組織を生存率よく、かつ機能を保ったままで解凍する技術を開発した。臓器/組織ターゲットとして、それぞれ血管網が発達して血管透過性に優れた肝臓と、糖尿病の治療に有用であるインスリンを分泌する直径 200 μm ほどの細胞凝集組織である膵島を使用した。

2. 方法

膵島の凍結保存については、マウスの膵臓か

ら膵島を単離した。磁性ナノ粒子として 10 nm のマグネタイトを懸濁した凍結保護液 20 mL 内に膵島を入れ、容器を液体窒素に浸漬して凍結した。凍結後に容器を取り出し、交流磁場を照射することで解凍した。膵島 400 個を糖尿病モデルマウスの腎臓皮膜に移植し、移植後の血糖値推移を記録した。

肝臓の凍結保存については、ラット肝臓を脱血し、磁性ナノ粒子として 10 nm のマグネタイトを懸濁した凍結保護液を肝臓内に灌流した。そして、液体窒素浸漬により凍結し、交流磁場装置で解凍した。

3. 結果

凍結・解凍後の膵島の *in vivo* における機能の評価するため、糖尿病モデルマウスを対象とした実験を行った。膵島移植後のマウスの血糖値推移を図 1 に示す。凍結なしの膵島を移植した群は、血糖値が正常血糖まで低下し、正常血糖が維持された。これに対して、対流式加温で解凍した膵島を移植した群は、糖尿病コントロール群と同様に、移植後も血糖値は下がらず、高血糖のままであった。一方、ナノウォーミングで解凍した膵島を移植した群では、移植翌日には血糖値が低下し、30 日間にわたって正常血糖を維持したり。

ラット肝臓に対して、10 nm のマグネタイトを懸濁した凍結保護液を灌流したところ、分散性良く肝臓全体に灌流することに成功した。さらに、液体窒素浸漬により凍結した肝臓を交流磁場装置で加温したところ、再結晶化を誘導することのない加温速度で肝臓を内部から急速に加温することに成功した (図 2)。

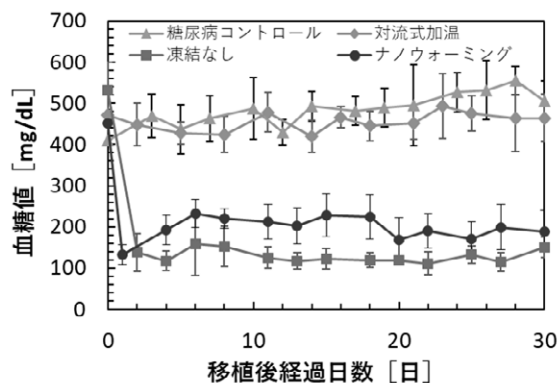


図 1 膵島移植後の血糖値変化

4. 考察

以上の結果から、膵島においては、対流式加温では解凍時に膵島組織が損傷して機能が損なわれた一方で、ナノウォーミングによる解凍では膵島の機能を保ったまま解凍されたと考えられる。これらのことから、ナノウォーミングを用いることで、従来の対流式加温では不可能であった大容量で膵島の機能を損なうことなく解凍することに成功した。今後、実用化の検討が必要となる。

肝臓においては、臓器内の血管にマグネタイトが入った凍結保護液を灌流する必要があり、そのためにナノ粒子の分散性が問題になったが、本研究で分散性の良い凍結保護液を開発することで、肝臓内に均一にマグネタイトを充填することに成功した。そのことによって、交流磁場照射で急速に肝臓を解凍する技術を確認した。今後は、解凍された肝臓の様々な機能を調べることで、ナノウォーミングが移植に資する臓器凍結技術となり得るかを検討していく必要がある。

謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団の補助を受けて実施したものである。

参考文献

- 1) Taisei Wakabayashi, Masahiro Kaneko, Tomoki Nakai, Masanobu Horie, Hiroyuki Fujimoto, Masazumi Takahashi, Shota Tanoue, Akira Ito, Nanowarming of vitrified pancreatic islets as a cryopreservation technology for transplantation. *Bioengineering & Translational Medicine*. 8, e10416 (2023).

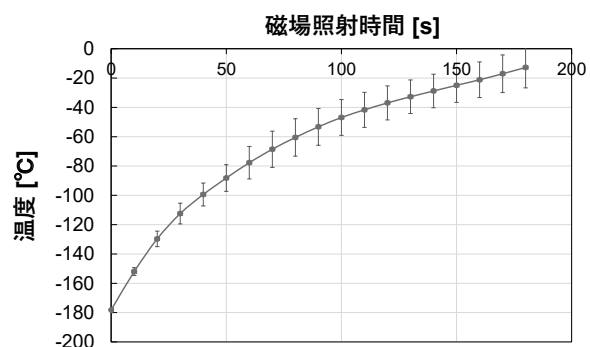


図 2 ナノウォーミングによる肝臓の昇温

運動閾値未満の末梢磁気刺激を併用した

上下肢リハビリテーションの効果

Effect of upper and lower limbs rehabilitation with peripheral magnetic stimulation below the motor threshold

加賀谷 斉

Hitoshi Kagaya

国立研究開発法人国立長寿医療研究センターリハビリテーション科部,

〒474-8511 愛知県大府市森岡町 7-430

Department of Rehabilitation Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology,

7-430 Morioka-cho, Obu, Aichi 474-8511 Japan

Abstract

We have developed a spinning permanent magnet (SPM) device that gives magnetic stimulation below the motor threshold. The purpose of this study was to examine the effect of upper and lower limbs rehabilitation with SPM. The changes in H_{max}/M_{max} in healthy individuals, spasticity reduction in patients with stroke, and rehabilitation with SPM device were investigated. Compared to the control group, H_{max}/M_{max} was significantly decreased by SPM stimulation. The SPM group showed a significant reduction in spasticity for patients with stroke, but the effect was not long-lasting. Both patients and therapists gave positive opinions about rehabilitation while wearing SPM. Therefore, rehabilitation under SPM is considered practical.

Keywords: peripheral magnetic stimulation, spinning permanent magnet, motor threshold, spasticity, rehabilitation

1. はじめに

脳卒中治療ガイドライン2021[改訂2023]¹⁾においても上下肢に対する電気刺激療法が有効であることが示されている。電気刺激の強度は運動閾値以上で最大上刺激または耐えられる最大強度に設定することが多いが、運動閾値未満で感覚閾値程度の電気刺激である経皮的電気神経刺激 (TENS) においても痙縮、慢性疼痛の軽減に有効である。人工膝関節置換術後4週間、通常のリハビリテーション治療に加えて電気刺激を行い、運動閾値以上、運動閾値未満のいずれの刺激強度においても通常のリハビリテーション治療群に比して大腿四頭筋筋力と2分間歩行テ

ストの有意な改善が得られたことが報告されている²⁾。

反復性末梢磁気刺激(rPMS)は皮膚に存在する侵害受容器を刺激しないため電気刺激に比して疼痛が少なく、電極貼付の必要がないため衣服の上からでも刺激可能であり使用しやすい。しかし、磁気刺激では刺激に用いるコイルが大きいために、四肢に装着しながら他のリハビリテーション手技と併用することはこれまで現実的ではなかった。われわれは、小型の磁気刺激機器 (spinning permanent magnet; SPM) を開発した (図1)。その刺激強度は運動閾値未満であるが、TENSと同様な効果が得られる可能性があり、さらに、運動閾値未満であれば筋運動が生

じないために他のリハビリテーション手技との併用が容易と考えられる。本研究の目的は、運動閾値未満の磁気刺激を用いた上下肢リハビリテーションの効果を検証することである。



バージョン1 バージョン2

図1. われわれの開発したSPM機器

バージョン1はバッテリーは外付けであるが、バージョン2ではバッテリーを内蔵している。いずれも永久磁石を回転させて磁場を発生させている。

2. 方法

本研究は臨床研究審査委員会の承認を受け、特定臨床研究として登録後に実施された (jRCTs042200013, jRCTs042180014)。

1) 健常人を対象とした H_{max}/M_{max} の変化

対象は平均年齢 34 歳の 11 名の成人男性であり、腹臥位でヒラメ筋筋腹に、a) SPM 刺激 15 分、b) SPM 刺激 30 分、c) rPMS 10,000 発、d) TENS 15 分、e) 15 分間刺激なし (コントロール群) を行った。陰極をヒラメ筋の腓腹筋-ヒラメ筋接合部に陽極をアキレス腱内側の陰極から 5cm 遠位に配置し、刺激前後に膝窩部で脛骨神経を刺激し H_{max} 値と M_{max} 値を記録し H_{max}/M_{max} を求めた。

2) 脳卒中患者に対する痙縮軽減効果

対象は前腕屈筋群に modified Ashworth Scale (MAS) 1+以上の痙縮を持つ平均年齢 68 歳の脳卒中患者 58 名であり、脳梗塞 33 名、脳出血 24 名、くも膜下出血 1 名であった。ランダムに SPM 刺激 15 分と sham 刺激 15 分の群に割り付けた。刺激直前 (T1)、刺激直後 (T2)、刺激終了 1 時間後 (T3)、刺激終了 24 時間後 (T4) に前腕屈筋群の MAS を評価した。

3) SPM 装着中のリハビリテーション治療

対象は上肢は脳梗塞 9 名、脳出血 1 名 (平均 72 歳) の患側総指伸筋、下肢は大腿骨近位部骨折術後 7 名、人工関節置換術後 2 名、腰部脊柱管狭窄症術後 1 名 (平均 80 歳) の大腿四頭筋とした。第 1 週目の連続する 3 日間、リハビリテーション治療中に SPM を装着させ、第 2 週は SPM を装着せずに、第 3 週に再び連続する 3 日間、SPM を装着し訓練を行い、SPM の有無による違いを 7 段階の Likert Scale (1 : 最悪, 7 最良) を用いて評価した。



図2. SPM を装着した上肢訓練

3. 結果

1) 健常人を対象とした H_{max}/M_{max} の変化

コントロール群と比較して、 H_{max}/M_{max} は SPM 15 分刺激、SPM 30 分刺激、rPMS、TENS で有意に減少した。15 分間の SPM 刺激における H_{max}/M_{max} の変化は、30 分間の SPM 刺激および rPMS よりも有意に小さかった (図 3)。

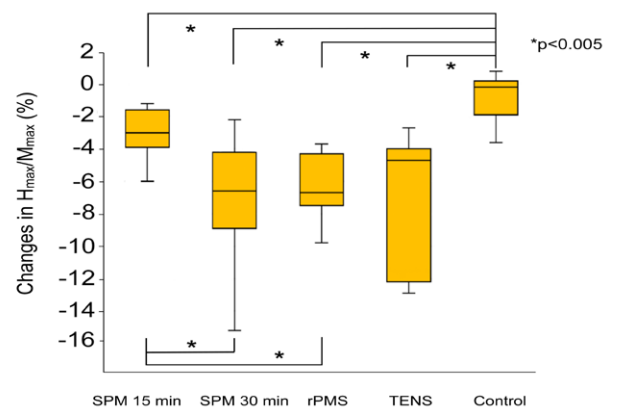


図3. H_{max}/M_{max} の変化

2) 脳卒中患者に対する痙縮軽減効果

SPM 群では T2 で MAS が有意に軽減したが, T3, T4 また, sham 群についてはいずれも MAS の有意な変化はみられなかった。

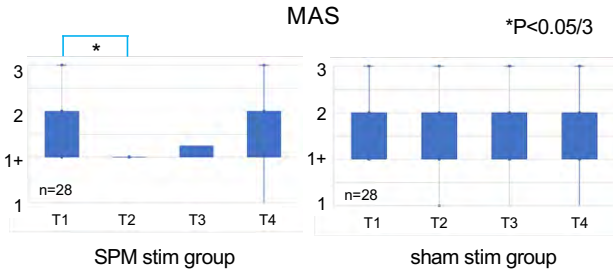


図4 MAS の変化

3) SPM 装着中のリハビリテーション治療

患者への質問では上肢患者では Likert Scale の中央値は使用感 : 5, 装着感 : 5, 疼痛の有無 : 7, 機器での訓練を続けたいか : 7, 機器なしの訓練と比べてどうか : 5 であり, 下肢患者では順に 5, 5, 7, 5, 7 であった。療法士には訓練の妨げとなったかどうかについて尋ね, Likert Scale の中央値は上肢では 6, 下肢では 7 であった。

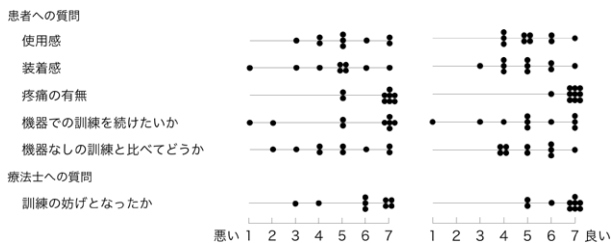


図5. 7段階のLikert Scale

4. 考察

健常者では SPM 刺激により H_{max}/M_{max} は減少し, 15 分間の SPM 刺激は 15 分間の TENS と同程度の効果があり, 30 分間の SPM 刺激によりその効果は増強した。痙縮に対する電気生理学的評価には H_{max}/M_{max} がしばしば用いられ, 健常者であっても TENS により H_{max}/M_{max} は減少する³⁾。したがって, SPM 刺激によっても痙縮軽減が期待できる。脳卒中患者においても実際に 15 分間の SPM 刺激により MAS の軽減が得られた。ただし, 刺激終了時に得られた効果は 1 時間後には消失していることから, SPM による痙縮軽減は短期効果と考えられる。しかし, SPM を装着しながらリハビリテーション治療を行うことについては患者, 療法

士双方から肯定的な意見が得られたことから, SPM 装着下でのリハビリテーション治療は実用的と考えられる。今後, SPM を用いた上下肢リハビリテーションをさらに追求していきたいと考えている。

謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団 30 周年記念特別助成金の補助を受けて実施したものである。

本論文の内容の一部は, 2023 年 6 月 12-14 日に横浜市で開催された IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023 で報告した。

参考文献

- 1) 脳卒中ガイドライン委員会. 脳卒中治療ガイドライン 2021[改訂 2023]. 協和企画, 東京, 2023.
- 2) Yoshida Y, Ikuno K, Shomoto K. Comparison of the effect of sensory-level and conventional motor-level neuromuscular electrical stimulations on quadriceps strength after total knee arthroplasty: A prospective randomized single-blind trial. Arch Phys Med Rehabil 98:2364-2370 (2017).
- 3) Karakoyun A, Boyraz İ, Gunduz R, Karamercan A, Ozgirgin N. Electrophysiological and clinical evaluation of the effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on the spasticity in the hemiplegic stroke patients. J Phys Ther Sci 27:3407-3411 (2015).

令和5年度 研究助成テーマ

令和5年度は、以下のように、第30回12名(基礎6名・応用3名・テーマ指定3名)の研究に対し助成が決定いたしました。

I.基礎研究

- I-1. 磁気により制御可能なタンパク質分解誘導剤の創出
国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部／横尾 英知
- I-2. 超低周波磁場による骨修復促進機構の解明
金沢大学理工研究域生命理工学系／小林 功
- I-3. 磁性ナノ粒子を用いた安全性に秀でた細胞免疫療法の開発
慶應義塾大学医学部先端医科学研究所がん免疫研究部門／井上 聡
- I-4. 定常状態誘発磁場による非侵襲的な言語機能マッピングの可能性
九州大学人文科学研究院 言語学講座／山田 絵美
- I-5. 永久磁石と磁場モジュレーターを組み合わせた再生筋組織構築技術の開発
福井工業大学環境学部環境食品応用化学科／古澤 和也
- I-6. 磁性ナノ粒子／生体物質凝集体の磁氣的性質の変化を利用したバイオ検出法の開発
東北大学大学院医工学研究科／藪上 信

II.応用研究

- II-1. 磁性ナノ粒子を用いた神経障害性疼痛の遠隔治療法の開拓
東京理科大学先進工学部機能デザイン工学科／上村 真生
<この研究は岡井治特別研究助成に選ばれました>
- II-2. トンネル磁気抵抗素子センサを用いたビデオ脳磁図モニタリングシステムの開発
東北大学大学院医学系研究科神経内科学分野てんかん学分野／此松 和俊
- II-3. 磁性イメージングと治療を同時達成する光温熱化学ナノセラノティクスの実現
東海国立大学機構名古屋大学大学院医学研究科／病態内科学講座呼吸器内科／佐藤 和秀

III.テーマ指定

- III-1. 脊磁図を用いた腰椎疾患患者における非侵襲的神経機能評価法の開発
東京医科歯科大学大学院先端技術医療応用学講座ジョイントリサーチ講座／橋本 淳
- III-2. 生物の磁力応答機構の解明
東京大学 先端科学技術研究センター／小林 和弘
- III-3. 脳脊髄同時磁気共鳴画像による随意運動能力の回復を支える脳脊髄連関の定量化法の確立
公益財団法人東京都医学総合研究所／白田 升

なお、所属は研究助成決定当時のものです。

THE REPORT OF STUDY RESULT BY SUBSIDY

29TH

(STUDY DURATION : April 1, 2023 – March 31, 2024)

Special Research Grant 2020

(STUDY DURATION : April 1, 2021 – March 31, 2024)

CONTENTS

Preface.....	1
	Director Makoto Kotani
I. Basic Research	
I-1. Study on maintaining stem cell stemness using a technology to control the elasticity of culture substrates by magnetic field manipulation	2
	Kumamoto University Yasuyuki Morita
II. Application Research	
II-1. Development of transcranial magnetic stimulation treatment for mental health disorders associated with long-COVID	5
	Keio University School of Medicine Yoshihiro Noda
II-2. Magnetic nanoparticles to potentiate T-cell anti-tumor function	7
	Keio University School of Medicine Yusuke Ito
III. Specific Research	
III-1. Robust enhancement of neuroplasticity by the combination of paired associative stimulation with interlimb network	10
	Sony Computer Science Laboratories, Inc. Tatsuya Kato
III-2. Effects of moderate static magnetic fields on the voltage-gated potassium ion channels in sympathetic neuron-like PC12 cells	14
	Department of Cardiovascular Surgery, School of Medicine, Osaka University Eri Kaneda
IV. Special Research Grant2020	
IV-1. Magnetic heating of nanoparticles for tissue/organ cryopreservation	17
	Department of Chemical Systems Engineering, School of Engineering, Nagoya University Akira Ito
IV-2. Effect of upper and lower limbs rehabilitation with peripheral magnetic stimulation below the motor threshold	19
	Department of Rehabilitation Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology Hitoshi Kagaya

Preface

Our foundation intends to contribute to the health and medical care of the nation, by subsidizing scientific research and appealing to the society through seminars. It should be noted, that the effect of the magnetic field is generated from some basic phenomena interacting with the complex mechanism of the body. The effect can only be clarified by a long-term persistent effort, not by short-sighted research.

It is a regrettable tendency in the present scientific sector that researchers are mostly interested in achieving successful results for acquiring a degree or achievement in a short period, focusing on obvious cause-effect relationship or phenomenon which invites quantitative descriptions. In view of such a tendency, our foundation prefers to support researchers who persistently attack a particular problem expecting long-term results rather than those who rush into short-term results.

This report is the summary of research which our foundation supported in the fiscal year 2022. It includes a wide range of topics from basic aspects to practical applications, intending to pave new ways in this area. It is our hope that the report will motivate researchers with similar interests to start communication and contribute to the development of magnetic health science.

The Watanabe Foundation

Study on maintaining stem cell stemness using a technology to control the elasticity of culture substrates by magnetic field manipulation

Yasuyuki Morita*

*Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University
2-39-1 Kurokami, Chuo-ku, Kumamoto 860-8555 Japan

Abstract

Regenerative and cell therapies of the future will require cell quantities 100 to 1,000 times greater than those currently used, along with demanding long-term cultivation under rigorous quality control. However, one of the main cell sources for these therapies, mesenchymal stem cells, tend to initiate differentiation into various somatic cells during culture, which diminishes their differentiation potential (stemness). This reduction in stemness leads to heterogeneity in the stemness state of individual mesenchymal stem cells, ultimately manifesting as variability in therapeutic effects and significantly undermining the reliability of regenerative and cell therapy products that utilize mesenchymal stem cells. Therefore, this research focuses on developing technologies to inhibit the reduction of mesenchymal stem cell stemness and to enable its long-term preservation. The approach involves using a magnetic field-responsive gel, dispersed with magnetic particles, as the culture substrate. By controlling the elasticity of the substrate through the application of a magnetic field, this technology aims to maintain the stemness of mesenchymal stem cells over extended periods. The realization of this technology could prevent the decline in reliability of mesenchymal stem cell-based products due to variability in therapeutic effects, which is a current issue in regenerative and cell therapies.

Keywords: stem cell, stemness, magnetic field-responsive gel, elasticity

1. PURPOSE

This research aims to develop technologies for the long-term preservation of stemness in mesenchymal stem cells, which are one of the primary cell sources for regenerative medicine and cell therapy. The quality of mesenchymal stem cell stemness is directly linked to therapeutic effects. As regenerative and cell therapies advance, there is a growing need for mesenchymal stem cells in large quantities as cell therapy products, and demands for quality control, including the maintenance of stemness during

long-term culture, are increasing. However, a characteristic of mesenchymal stem cells is that their stemness diminishes over long-term cultures, leading to differentiation into somatic cells. This phenomenon is due to mesenchymal stem cells actively sensing the elasticity of the culture substrate and differentiating according to this elasticity, a cause that has been identified (Yang et al, Nat Mater, 2014). Although the reduction in mesenchymal stem cell stemness was discovered in 2014, it has only recently become a significant concern with the expansion of clinical

applications (Nature, 2019). Therefore, research on the preservation of mesenchymal stem cell stemness can be said to be just dawning. To prevent this reduction in stemness, it is crucial not to expose mesenchymal stem cells to a constant elasticity by intentionally varying the elasticity of the substrate used for long-term cultures. As a preliminary step in this strategy, this study will focus on the fabrication of a magnetic field application device and the production and characterization of a magnetic particle-dispersed, magnetic field-responsive gel.

2. METHODS

To establish the technology for the targeted control of elasticity, we developed a device as shown in Fig. 1, which applies a magnetic force to the ferromagnetic particles in the gel and allows simultaneous observation of the process. The coils on the left and right are designed to slide so that they can accommodate observation dishes of various sizes. The observation stage includes a recess tailored to the size of a microscope slide to securely fit the observation dishes.

We used four types of test fluids: water, 50% glycerin aqueous solution, 75% glycerin aqueous solution, and 95% glycerin aqueous solution. From the velocity of the ferromagnetic particles in each fluid, we calculated the volumetric magnetization rate of the particles.

Additionally, we produced gelatin gels and observed the displacement of magnetic particles within the gelatin gels under different magnetic field strengths. For observation, we used the software pylonViewer to film the displacement of magnetic particles in the magnetic field. After confirming particle displacement, we captured the footage frame by frame, and used the

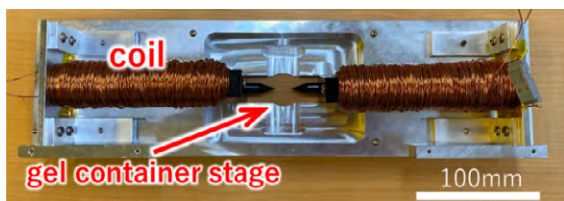


Fig. 1 Photo of the experimental apparatus made.

image analysis software ImageJ to perform binarization, measuring the displacement over time.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Measurement of the volumetric magnetization rate of the magnetic particles

Figure 2 shows the displacement of magnetic particles in each fluid over time. From the slope of this graph, we calculated the velocity of the magnetic particles in each fluid and converted it to the volumetric magnetization rate, which is shown in Table 1. It can be seen that as the viscosity increases from water to 95% glycerin solution, the velocity of the magnetic particles in the fluid decreases. Furthermore, the volumetric magnetization rate shows a nearly constant value, indicating that the volumetric magnetization rate of these magnetic particles is approximately 0.35.

Regarding the volumetric magnetization rate of magnetic particles, similar values were obtained in all four test fluids. The volumetric magnetization rate in the 95% glycerin solution is slightly lower compared to other experimental results. Since high concentrations of glycerin exhibit significant changes in viscosity depending on the concentration and temperature, errors may have occurred due to adjustments in the concentration of the magnetic particles mixed and the room temperature during the experiment.

3.2 Characteristics of the gelatin gel

Figure 3 illustrates the temporal displacement behavior of magnetic particles at various magnetic

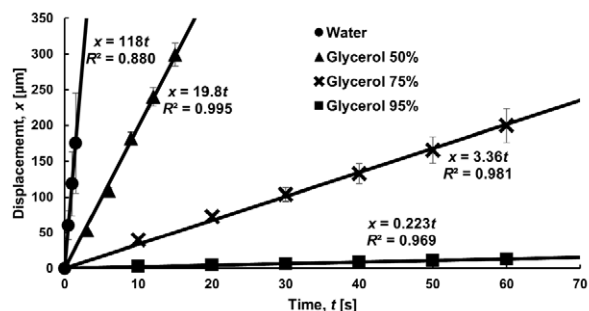


Fig. 2 Displacement behavior of the magnetic particles in the samples.

Table 1 The velocity and volumetric magnetization rate of the magnetic particles in the samples.

	Water	Glycerol 50%	Glycerol 75%	Glycerol 95%
v [$\mu\text{m/s}$]	118	19.8	3.32	0.223
χ [-]	0.355	0.358	0.359	0.351

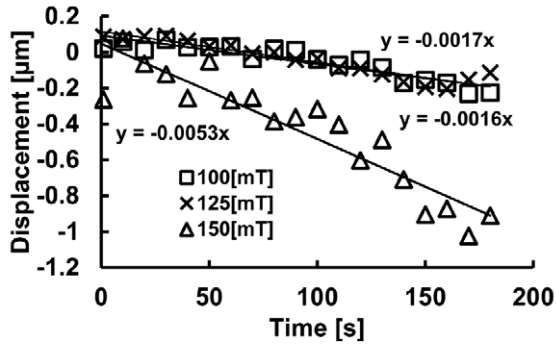


Fig. 3 Relationship between the magnetic field strength and the displacement of the magnetic particles.

field strengths. For magnetic field strengths of 100, 125, and 150 mT, dozens of magnetic particles within the gelatin gel in the observed area were selected, and the average displacement behavior of these particles was calculated and plotted. The displacement being negative is due to the definition of coordinates, but this does not affect the results. Although there is some

variation at all magnetic field strengths, it shows that the magnetic particles in the gelatin gel displaced almost linearly over time. At magnetic field strengths of 100mT and 125mT, there was no significant difference in their displacement behaviors, and the displacement amounts were nearly zero. This suggests that the relationship between the displacement of magnetic particles in the gelatin gel and the magnetic field strength is not linear, and a certain level of magnetic field strength is necessary to displace the magnetic particles.

4. Summary

In this study, we developed a two-dimensional culture device that applies a magnetic field. It was found that the elasticity of the gelatin gel increases in proportion to the gel concentration. Gelation is thought to occur at approximately 1.5% gel concentration. It was also observed that the greater the magnetic field strength, the larger the displacement. At magnetic field strengths of 100 mT and 125 mT, there was little change in the slope of the displacement, suggesting that a magnetic field strength of 150 mT or more is necessary.

Development of transcranial magnetic stimulation treatment for mental health disorders associated with Long COVID

Yoshihiro Noda*

*Department of Neuropsychiatry, Keio University School of Medicine
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582 Japan

Abstract

The present study aims to develop a treatment for Long COVID, a condition characterized by persistent cognitive dysfunction, chronic fatigue, insomnia, and depressive moods even after acute COVID-19 symptoms have subsided. The treatment protocol involves transcranial magnetic stimulation (TMS) therapy and is tested in a randomized controlled trial (RCT) involving 60 patients with Long COVID. The study is currently in progress with 25 subjects enrolled as of April 2024. The primary outcome measure is the MADRS score, and the study will also explore the relationship between clinical epidemiological data and treatment improvement rates. The study is expected to be completed by the end of FY2024, after which a statistical analysis of the clinical trial will be conducted. This research will contribute to the broader understanding and management of mental health issues associated with Long COVID.

Keywords: Long COVID, brain fog, cognitive dysfunction, chronic fatigue, insomnia, depressed mood, transcranial magnetic stimulation (TMS)

1. PURPOSE

Since the emergence of COVID-19 in December 2019, the pandemic has developed globally and is yet to be resolved. While the spread of vaccines and potential herd immunity have gradually lessened the acute respiratory symptoms caused by COVID-19, there is an increasing number of cases reporting persistent cognitive dysfunction known as ‘brain fog,’ chronic fatigue, insomnia, and depressive moods even after acute symptoms have subsided. This condition is referred to as Long COVID. However, no established treatment for Long COVID has been developed, and the persistent cognitive impairment and chronic fatigue have forced some to take leave or resign from work, making Long COVID a significant social issue.

2. METHOD

This study aims to establish an effective transcranial

magnetic stimulation (TMS) treatment for Long COVID by developing a novel TMS protocol and conducting a randomized controlled trial (RCT). The study targets patients who have developed mental health disorders (depression, anxiety, cognitive decline, fatigue) after COVID-19 infection, meeting the following eligibility criteria. The study has started upon approval from the Clinical Research Review Board and aims to conclude by the end of the fiscal year 2024. The study will involve 60 participants with Long COVID in an RCT design (30 active TMS vs. 30 sham TMS) and will implement dynamic allocation based on age, sex, and baseline MADRS scores. Participants assigned to sham TMS can receive active TMS in an open-label manner after the RCT period. The sample size was estimated using the pooled effect size of theta burst stimulation’s antidepressant effect ¹⁾, setting α at 0.05 and power (1- β) at 0.90, requiring 23

participants per arm (46 in total), and accounting for an estimated dropout rate of about 20%, resulting in a total of 60 participants needed for the study. Participants undergo assessments before starting TMS intervention, after 30 sessions, and three months later, including MADRS, HAMD, PHQ-9 for depression; TMT for cognitive and executive functions. The specialized TMS protocol for Long COVID includes intermittent theta burst stimulation (iTBS) to the left dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) and low-frequency 1Hz-rTMS to the right lateral orbitofrontal cortex (LOFC), with adjustments for pain tolerance.²⁾ The study will analyze differences between the two arms for each clinical assessment outcome (primary outcome being MADRS score) using Mixed Model for Repeated Measure analysis, adjusting for stratification factors, and will also explore the relationship between clinical epidemiological data and treatment improvement rates. This summary provides an overview of the study's purpose, methodology, design, and planned analyses to establish an effective treatment for Long COVID through TMS treatment. The study's significance lies in addressing the persistent mental health issues following COVID-19 recovery and contributing to the broader understanding and management of Long COVID.

3. RESULTS

As of April 2024, a total of 25 subjects with Long COVID have been enrolled. The RCT is still ongoing and the intervention is not key open. The mean age of the participants is 33.6 ± 8.7 (mean \pm SD) years, 14 males and 11 females, and the MADRS score at the time of inclusion is 22.4 ± 4.6 points.

4. DISCUSSION

It is planned to complete the last patient in by the end of FY2024, after which the data will be fixed and statistical analysis of the trial will be conducted.

ACKNOWLEDGMENT

This study was partially supported by a research grant from the Watanabe Foundation. I would like to

take this opportunity to thank all the subjects who participated in this research project, the collaborators at the Shinjuku-Yoyogi Mental Lab Clinic and the Tokyo Yokohama TMS Clinic, and the MTR Lab at Keio University.

REFERENCES

- 1) Mutz J, Vipulanathan V, Carter B, Hurlemann R, Fu CHY, Young AH. Comparative efficacy and acceptability of non-surgical brain stimulation for the acute treatment of major depressive episodes in adults: systematic review and network meta-analysis. *BMJ*. 2019; 364:11079
- 2) Noda Y, Sato A, Shichi M, Sato A, Fujii K, Iwasa M, Nagano Y, Kitahata R, Osawa R. Real world research on transcranial magnetic stimulation treatment strategies for neuropsychiatric symptoms with long-COVID in Japan. *Asian Journal of Psychiatry*. 2023; 103438

Magnetic nanoparticles to potentiate T-cell anti-tumor function

Yusuke Ito

Keio University School of Medicine
35, Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582 Japan

Abstract

We aimed to develop a novel nanoparticle technology that can stimulate T cell functions and inhibit immunosuppressive signals simultaneously to induce the potent anti-tumor activity in endogenous T cells. We loaded multiple immunomodulators such as anti-CD3 antibody, antibodies against tumor antigens, co-stimulatory molecules, multiple cytokines, and blocking antibodies against immune checkpoint molecules on the surface of nanoparticles. We will use magnetic nanoparticles and apply an external magnetic field to further enhance their ability to migrate to solid tumors in future.

Keywords: nanoparticle, cancer immunology

1. Purpose

Cancer immunotherapy has dramatically improved the outcome of patients suffering from hematological malignancies, but the efficacy against solid tumors is insufficient.¹⁾ To stimulate T cells, three signals are important: 1) T cell receptor signal, 2) co-stimulatory signal, and 3) cytokine signal. In addition, immunosuppressive signals from the tumor microenvironment such as immune checkpoint molecules and cytokines (IL-10, TGF- β) should be blocked.²⁾ Therefore, simultaneous modulation of these signals is essential to induce optimal T-cell anti-tumor activity, but is not sufficient with current immunotherapeutics.

Nanoparticles with diameters of 50 - 250 nm accumulate in solid tumors due to enhanced permeability and retention (EPR) effect, and are applied to drug delivery system. In this study, we aimed to enhance antitumor immunity by incorporating multiple immunostimulatory molecules, including anti-CD3 mAb, costimulatory ligands, cytokines, and immune checkpoint blocking antibodies, into a

nanoparticle platform. Instead of conjugating molecules into inert particles, we used a novel strategy to generate cell lines that stably express immunomodulatory molecules on the surface and obtain membrane fractions by mechanical disruption. We coated these membranes onto nanoparticles.

2. Methods

We genetically engineered the leukemia cell line K562, to stably express multiple immunomodulatory factors on its cell surface. As immunomodulatory factors, we selected antibodies against tumor antigens, anti-CD3 antibody, co-stimulatory factors (CD80 and 4-1BBL), and cytokines (IL-7 and IL-15). We mechanically homogenized these cells and extracted membrane fractions by ultracentrifugation and coated them onto PLGA nanoparticles.

We co-cultured these nanoparticles, T cells, and tumor cells, and evaluated whether the nanoparticles could activate T cells and induce antigen-specific anti-tumor function. Also, we

inoculated tumors in immunodeficient mice followed by nanoparticle injection, and evaluated their function in vivo.

Next, we established the method to produce novel nano-sized membrane vesicles instead of PLGA nanoparticles. We mechanically disrupted these cells and sorted CD45-positive membrane fractions using magnetic beads. We evaluated the anti-tumor function of these membrane vesicles.

3. Results

(1) Nanoparticles

When membrane fractions were coated onto PLGA nanoparticles, the diameter of the nanoparticles was approximately 100 - 150 nm (Fig. 1).

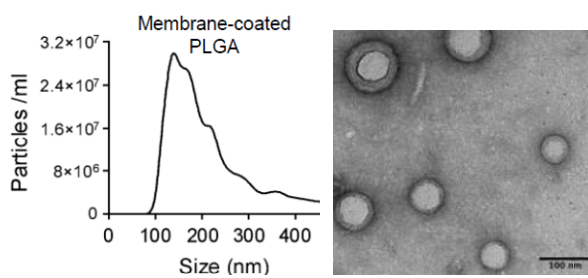


Fig.1 The size of nanoparticles

When nanoparticles targeting the tumor antigen CD19 were co-cultured with human T cells and the CD19-positive leukemia cell line NALM-6, the nanoparticles showed dose-dependent cytotoxicity (Fig. 2).

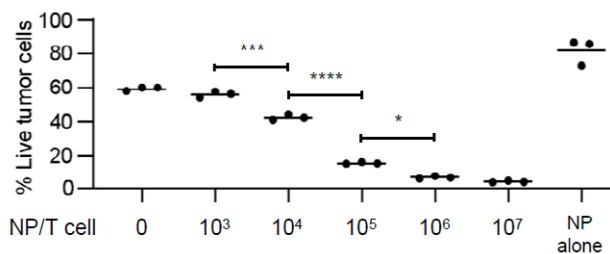


Fig.2 The proportion of live tumor cells when co-cultured with T cells and nanoparticles (NPs)

Then, NALM-6 was intravenously injected in immunodeficient NSG mice followed by nanoparticle injection. Nanoparticle treatment significantly

prolonged overall survival. Injecting nanoparticles 6 times was more effective than injecting them 3 times (Fig. 3).

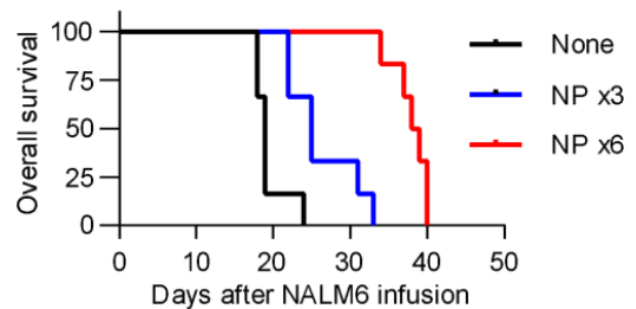


Fig.3 Survival curves of mice treated with nanoparticles

(2) Membrane vesicles

K562 was mechanically homogenized and CD45-positive cell membrane fractions were sorted by magnetic beads. Membrane vesicles were efficiently purified using these procedures (Fig. 4).

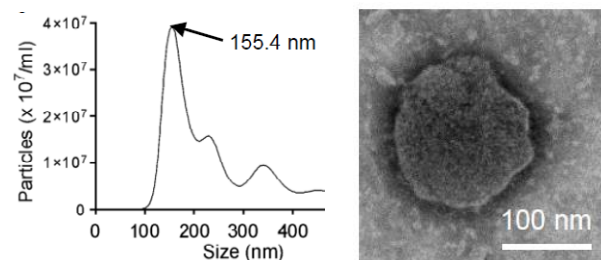


Fig.4 The size of membrane vesicles

NALM-6 was intravenously injected into immunodeficient NSG mice followed by injection of membrane vesicles (80/BB: membrane vesicles loaded with anti-CD3 and anti-CD19 antibodies, CD80, and 4-1BBL, 80/BB/7/15: membrane vesicles loaded with anti-CD3 and anti-CD19 antibodies, CD80, 4-1BBL, IL-7, and IL-15). 80/BB membrane vesicles elicited significant anti-tumor functions, which were further enhanced by the addition of IL-7 and IL-15 (Fig. 5).

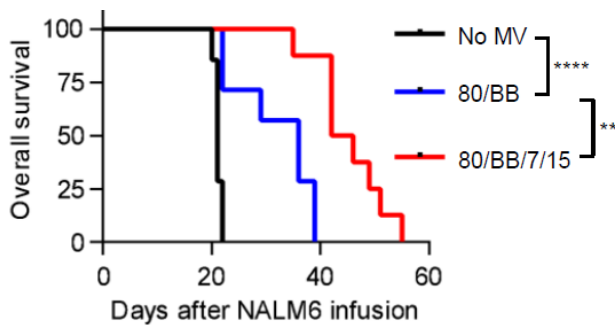


Fig.5 Survival curves of mice treated with membrane vesicles

4. Discussion

To activate T cells, T cell receptor (TCR) signaling, co-stimulatory signaling, and cytokine signaling are important, but it has been difficult to induce these signals simultaneously in the current strategy. Our novel platform can induce optimal signals in T cells, which showed anti-tumor efficacy in vitro and in vivo.

This method can be used to load any immunomodulatory factors, and also to stimulate other immune cells, such as NK cells, macrophages, and dendritic cells.

5. Acknowledgement

This study was supported by the 28th Research Grant from the Watanabe Foundation. This study was presented at the 82nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, held in Yokohama from September 21 to 23, and the 85th Congress of the Japanese Society of Hematology, held in Tokyo from October 13 to 15, 2023.

6. References

- 1) Shah et al. Nat Rev Clin Oncol. 2019
- 2) Bejarano et al. Cancer Discov. 2021

連合性ペア刺激と上下肢間神経相互作用の組み合わせによる脳の 神経可塑的变化の信頼性向上

Robust enhancement of neuroplasticity by the combination of paired associative stimulation with interlimb network

加藤辰弥*, **, ***, 金子直嗣***, 中澤公孝***

Tatsuya Kato*, **, ***, Naotsugu Kaneko***, Kimitaka Nakazawa***

*株式会社ソニーコンピュータサイエンス研究所, 〒141-0022 東京都品川区東五反田 3-14-13

**独立行政法人日本学術振興会, 〒103-0083 東京都千代田区麹町 5-3-1

***東京大学大学院総合文化研究科, 〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1

*Sony Computer Science Laboratories. Inc.,

3-14-13 Higashigotanda, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0022 Japan

**Japan Society for the Promotion of Science,

5-3-1 Kojimachi, Chiyoda-ku, Tokyo 103-0083 Japan

***Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902 Japan

Abstract

This study aimed to augment neuroplasticity induced by paired associative stimulation (PAS) through combining PAS with the interlimb network. The results revealed that the combination of lower-limb PAS and voluntary upper-limb muscle contraction (UMC) facilitated lower-limb corticospinal excitability more reliably than conventional PAS. Meanwhile, the correlation between intracortical inhibition and increased corticospinal excitability that occurred in conventional PAS was disrupted in PAS+UMC intervention, indicating that an excitation/inhibition imbalance limited increased corticospinal tract excitability in PAS+UMC intervention. Our findings suggest the usefulness of the interlimb network in neural interventions and the complexity of inducing neuroplasticity.

Keywords: Noninvasive Brain Stimulation, Paired Associative Stimulation, Interlimb, Transcranial Magnetic Stimulation

1. PURPOSE

A common issue of interventional noninvasive brain stimulation (NBS) methods is a lack of robust induction of neuroplastic changes in the motor system, especially in the lower limbs ¹⁾. A representative NBS method to induce neuroplastic changes in the motor system is paired associative stimulation (PAS), which

comprises repetitive pairs of peripheral nerve electrical stimulation (PNS) followed by transcranial magnetic stimulation (TMS) at a specific inter-stimulus interval (ISI) ²⁾. PAS is thought to modulate corticospinal excitability based on the Hebbian principle through multiple cellular mechanisms, including spike-timing dependent plasticity (STDP) ^{3,4)}. However, existing

studies on lower-limb PAS have not consistently demonstrated the facilitation of corticospinal excitability across participants⁵).

Postsynaptic activation plays a pivotal role in the Hebbian principles of synaptic plasticity^{3,6}. Voluntary contraction of upper-limb muscles has been reported to facilitate corticospinal excitability of the lower limbs in the resting state⁷. Hence, we hypothesized that the reliability and efficacy of lower-limb PAS could be enhanced by leveraging upper-limb muscle contraction.

2. METHODS

Thirteen right-handed, able-bodied volunteers (5 women and 8 men, aged 26.1 ± 2.8 years) took part in the experiment. The participants were seated with their knee joints at 45° using a footrest to allow effective stimulation of the tibial nerve.

Single-pulse monophasic TMS was applied over the left primary motor cortex (M1) with a posterior-anterior current direction to elicit motor evoked potentials (MEPs) from the right soleus (SOL) muscle using a double-cone coil connected to a Magstim 200 stimulator (Magstim 200, Magstim Co., Whitland, UK). PNS was applied to the tibial nerve by an anode ($5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$) placed over the patella and a cathode ($2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$) positioned at the popliteal fossa. During the intervention, TMS intensity was set at 1.2-fold resting motor threshold (rMT), and PNS intensity was set at 1.5-fold motor threshold.

Two conditions were set: PAS condition and PAS with voluntary upper-limb muscle contraction (PAS+UMC) condition. PAS consisted of a pair of PNS and TMS at a rate of 0.2 Hz for a total of 200 pairs (about 17 min). An ISI between PNS and TMS was set at each individual's MEP latency plus 18 ms. In the PAS+UMC condition, wrist flexion at 30% of maximum voluntary contraction was executed according to the timing of the paired stimulation.

Corticospinal excitability and short-interval intracortical inhibition (SICI) of the SOL muscle were assessed before (baseline), at 0, 15, and 30 min after the intervention. Corticospinal excitability was

assessed by a single-pulse TMS at an intensity evoking SOL MEPs of approximately 0.1 mV at baseline, which corresponds to about half of the maximum MEP amplitude. SICI was assessed using a paired-pulse paradigm that consists of a subthreshold conditioning stimulus (80% rMT) followed by a suprathreshold test stimulus (120% rMT) with an ISI of 3 ms. Each index was normalized by baseline values for statistical tests.

3. RESULTS

In the PAS+UMC condition, the Wilcoxon signed-rank test revealed that SOL MEP amplitudes increased at 30 min post-intervention, compared with that at baseline ($p < 0.001$), but not at 0 or 15 min post-intervention (post 0: $p = 0.33$; post 15: $p = 0.14$) (Fig. 1A). In the PAS condition, however, SOL MEP amplitudes did not significantly increase after the intervention (post 0: $p = 1$; post 15: $p = 0.33$; post 30: $p = 0.10$) (Fig. 1A).

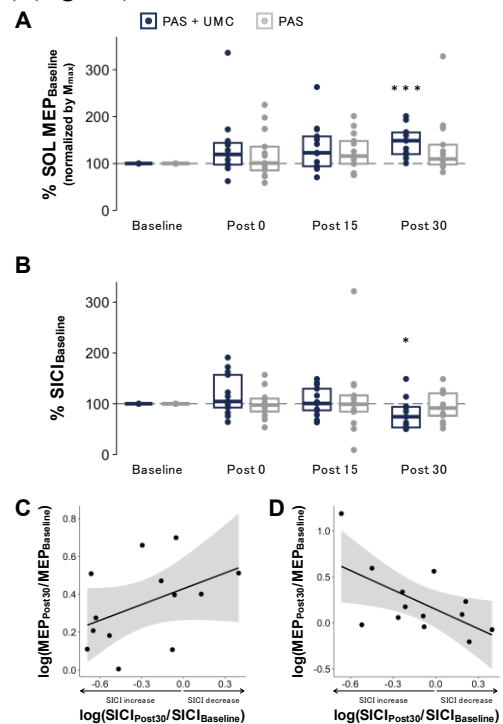


Figure 1 (A) Boxplot of SOL MEP amplitudes normalized by the baseline value. (B) Boxplot of SOL SICI normalized by the baseline value. (C), (D) Scatter plot between the modulation of SOL SICI and MEP 30 min after PAS+UMC intervention (C) and 30 min after PAS intervention (D). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

In the PAS+UMC condition, the Wilcoxon

signed-rank test revealed that SOL SICI amplified at 30 min post-intervention, compared to that at baseline ($p = 0.04$), but not at 0 or 15 min post-intervention (post 0: $p = 0.24$; post 15: $p = 0.89$) (Fig. 1B). In the PAS condition, however, no significant changes were observed in SOL SICI after the intervention at any assessment time point (post 0: $p = 0.64$; post 15: $p = 0.74$; post 30: $p = 0.22$) (Fig. 1B). To evaluate the relationship between MEP and SICI modulations, Pearson correlation analysis between SOL MEPs and SOL SICI at 30 min post-intervention was performed in both the PAS+UMC and PAS conditions. While no significant correlation was identified in the PAS+UMC condition (Pearson's $r = 0.44$, $p = 0.13$) (Fig. 1C), a significant negative correlation was observed in the PAS condition (Pearson's $r = -0.60$, $p = 0.03$) (Fig. 1D), indicating that MEP amplitudes increased more in those with amplified SICI after conventional PAS intervention.

4. DISCUSSION

Our findings demonstrated that combining voluntary upper-limb muscle contraction increased SOL MEP amplitudes at 30 min post-intervention. Conversely, conventional PAS did not yield a significant increase in SOL MEP amplitudes owing to considerable inter-individual variability. During PAS+UMC intervention, TMS-induced activity of M1 neurons likely increased, compared with that of conventional PAS⁷⁾, leading to more reliable synaptic plasticity changes.

However, the efficacy of PAS was not enhanced by incorporating the interlimb network. It might be associated with inhibitory interneurons in the M1. Although SICI increased 30 min after PAS+UMC intervention, the correlation between MEP and SICI observed in PAS intervention was absent in PAS+UMC intervention. Previous studies suggested that muscle contractions in distant limbs decrease SICI⁸⁾. This could imply that disinhibition of inhibitory interneurons by upper limb muscle contraction attenuated the MEP increase of PAS+UMC intervention. This finding highlights the complexity of

neural mechanisms involved in neuromodulatory interventions, particularly when combining PAS with the interlimb network.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the 29th Magnetic Research Grand from the Watanabe Foundation.

REFERENCES

- 1) López-Alonso V, Cheeran B, Río-Rodríguez D, Fernández-del-Olmo M (2014) Inter-individual Variability in Response to Non-invasive Brain Stimulation Paradigms. *Brain Stimul* 7:372–380
- 2) Stefan K (2000) Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation. *Brain* 123:572–584
- 3) Thickbroom GW (2007) Transcranial magnetic stimulation and synaptic plasticity: experimental framework and human models. *Exp Brain Res* 180:583–593
- 4) Carson RG, Kennedy NC (2013) Modulation of human corticospinal excitability by paired associative stimulation. *Front Hum Neurosci* 7:1–28
- 5) Alder G, Signal N, Olsen S, Taylor D (2019) A Systematic Review of Paired Associative Stimulation (PAS) to Modulate Lower Limb Corticomotor Excitability: Implications for Stimulation Parameter Selection and Experimental Design. *Front Neurosci* 13
- 6) Feldman DE (2012) The Spike-Timing Dependence of Plasticity. *Neuron* 75:556–571
- 7) Kato T, Kaneko N, Sasaki A, Endo N, Yuasa A, Milosevic M, Watanabe K, Nakazawa K (2022) Corticospinal excitability and somatosensory information processing of the lower limb muscle during upper limb voluntary or electrically induced muscle contractions. *European Journal of Neuroscience* 55:1810–1824
- 8) Chiou S, Wang R, Liao K, Wu Y, Lu C, Yang Y (2013) Co-activation of primary motor cortex

ipsilateral to muscles contracting in a unilateral motor task. *Clinical Neurophysiology* 124:1353–1363

Effects of moderate static magnetic fields on the voltage-gated potassium ion channels in sympathetic neuron-like PC12 cells

Eri Kaneda

Department of Cardiovascular Surgery, Graduate of Medicine, Osaka University
2-2 Yamadaoka, Suita-city, Osaka 565-0871 Japan

Abstract

Previous studies reported the possibility that moderate static magnetic fields (moderate SMF) could alter the excitability of neurons by modulating ion channel activity. Our purpose of this study is to investigate the effects of moderate SMF on the electrophysiological properties of voltage-gated potassium channels which are expressed in sympathetic-like cell membranes of PC12 cells. We differentiated pheochromocytoma PC12 cells derived from rat adrenal medulla into sympathetic-like cells by adding nerve growth factor (NGF). Moderate SMF was applied to the cells after 6 ± 1 days of differentiation during overnight, we performed whole-cell patch clamp recording to observe the effects of SMF on voltage-gated potassium channels. The current density was significantly lower in the magnet group compared with the control. The results suggest that moderate SMF has the potential to alter the excitability of sympathetic neurons.

Keywords: sympathetic nerves, moderate static magnetic field (SMF), ion channels

1. PURPOSE

Recently, transcranial static magnetic field stimulation (tSMS) has attracted much attention. It was reported in 2011 that a neodymium magnet implanted on the head surface suppresses the excitability of the cortex immediately below. Specifically, it was confirmed that the motor evoked potentials (MEPs) were reduced by 25% when a NdFeB magnet was implanted just above the human primary motor cortex (M1) for 10 minutes. 1) Not only that, even after the magnet is removed, the suppressive effect persists for several minutes in the tSMS of 10 to 20 minutes, and for more than 30 minutes in the tSMS of 30 minutes. 1) 2) 3)

The most popular explanation for the mechanism of the action of static magnetic fields on neurons is that a moderate magnetic force of 1-1000 mT affects either the antimagnetic anisotropy of phospholipid molecules (molecular reorientation), deformation of ion

channels (distortion), or mechanical action (rotation),⁴⁾⁵⁾ and results in a change in neuronal activity, resulting in changes in neuronal activity.

We have focused on the medical application to diseases such as hypertension, arrhythmia, and hot flashes, in which abnormalities in the autonomic nervous system are problematic and have decided to investigate the effects of static magnetic fields on the autonomic nervous system using cultured sympathetic-like cells.

2. METHODS

Cells and differentiation: Cultured PC 12 cells (IFO50278) purchased from the JCRB cell bank of the National Institute of Biomedical Innovation and Nutrition were cultured and passaged (P16-25) in RPMI medium with FBS. Since IFO50278 is a migratory cell, the dishes were coated with collagen each time the cells were seeded. The day after 105

cells were seeded into 35 mm dishes, the medium was changed and NGF was added. Both medium exchange and NGF addition were performed once every 3 days, and patch clamp measurement was performed at 6±1 days after differentiation.

Magnets used and magnet sensitization: A 35 mm diameter x 5 mm height (Neomag, Tokyo, Japan) disk-shaped magnet was placed under a 35 mm dish during Overnight sensitization. Sensitization was started 18 hours before the start of the experiment. On the day of the experiment, after replacing the medium with extracellular fluid, measurements were performed as usual in the Sham group. In the Mag group, measurements were performed by placing a ring-shaped magnet ($\phi 60 \times \phi 50 \times 10$ mm) outside the 35-mm dish immediately after removing it from the disk-shaped magnet. Measurements were made within 180 minutes after the replacement of extracellular fluid per dish for both the Sham and Mag groups.

Patch clamp method: Pipet size was 1.5 mm outer diameter and 0.86 mm inner diameter. The composition of extracellular fluid was KCl 5mM, NaCl 145mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, HEPES 10mM, D-glucose monohydrate 10mM, and was prepared at pH 7.3-7.5 with 10N NaOH. The composition of the intracellular fluid in the glass pipette was KCl 135mM, MgCl₂ 1mM, EGTA 1mM, HEPES 10mM, and D-sucrose 20mM.

3. RESULTS

Comparing the Sham group with the 18-hour Mag sensitization group, there was a significant difference in the current density per cell area (t-test). On the other hand, there was no significant difference between the two groups in terms of percentage of maximum current or resting membrane potential. Although data are not shown, the 1-hr and 6-hr magnet groups were similarly examined, and no significant differences were found between the Sham group and the Sham group in current density per cell surface area, respectively.

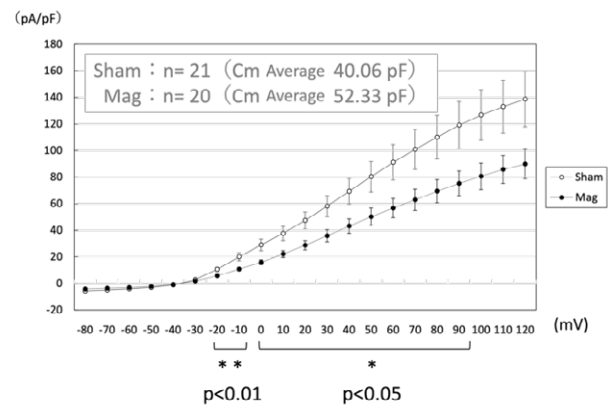


Figure 1. Current density per cell surface area in the Sham group (without magnet, n=21) and in the Mag group (with magnet, n=20) after 18 hours of moderate static magnetic field sensitization

4. DISCUSSION

In the present study, we found that no effect was observed in PC12 cells after a short time of sensitization (1 hour), but the effect on current density gradually became visible from 6 hours (data not shown), and a clear difference was observed at 18 hours (data not shown). This effect was maintained for at least a few hours after the withdrawal from magnetic field sensitization (data not shown).

The mechanism of the effects of moderate static magnetic fields on neuronal membranes has been attempted to be elucidated through several events observed using a variety of research techniques. In particular, a wide range of possibilities have been pointed out, from the biomechanics of magnetic forces on neurons (e.g., intracellular molecular structure and rotation of ion channels) to metabolic and cell-cell interactions. It is more natural to assume that multiple mechanisms exist rather than that any one of these mechanisms alone produces an effect. The author is currently investigating the effects on excitability of neurons by observing genes and cellular metabolism as a mechanism, and by identifying Kv channels subject to moderate static magnetic fields. Primary cells are often isolated from neonatal animals, and while they can be used for in vitro studies while maintaining cell characteristics similar to those of actual living

organisms, their yield is low compared to animal sacrifices, and it generally takes a long time to master the techniques for culturing them. Although cultured cells such as those used in this study have the disadvantage that the expression pattern of ion channels in the cell membrane differs from that of living cells, the fact that they can be easily cultured in large quantities by anyone and that comprehensive molecular analysis is possible is a great advantage in research. In addition, unlike previous reports, this study was conducted in an experimental system that does not require complicated setups for magnet fixation.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Watanabe Foundation. This work will be presented at the Ion Channel Modulation Symposium (ICMS) in May 2024.

REFERENCES

- 1) Antonio O, et al. *J Physiol.* 2011; 589: 4949–58.
- 2) Benjamin S, et al. *Brain Stimul.* 2013; 6: 817–20.
- 3) Michele D, et al. *Brain Stimul.* 2018; 11: 676–88.
- 4) Arthur R, et al. *Cell Biochem Biophys.* 2003; 39: 163–73.
- 5) Manuel F, et al. *Electromagn Biol Med.* 2020; 39: 310–5.

Magnetic heating of nanoparticles for tissue/organ cryopreservation

Akira Ito

Department of Chemical Systems Engineering, School of Engineering, Nagoya University,
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8603 Japan

Abstract

The technology for cryopreservation of organs/tissues has not been established. If organs can be cryopreserved, the patients waiting for transplantation around the world will be saved. The technical problem is that ice crystals form during thawing, which destroys the tissue cells, and there is no technique for rapidly heating and thawing thick organs without forming the ice crystals. In this research, we developed a uniform and rapid heating technology by heating magnetic nanoparticles with an alternating magnetic field as a novel cryopreservation technology for organs/tissues for transplantation.

Keywords: magnetic nanoparticle, alternating magnetic field, cryopreservation, islet, liver

1. PURPOSE

Currently, it is not possible to cryopreserve not only the human body but also organs and tissues. Cool storage of organs for transplantation is limited for 8 hours for the liver and pancreas, and in many cases they are discarded before being ready for transplantation. If cryopreservation of organs and tissues become technically possible, it will be possible to improve the health of millions of patients worldwide each year. The difficulty in cryopreserving tissues for transplantation is due to the fact that cells are destroyed during thawing. Cells are destroyed by ice crystals due to freezing of water during freezing. On the other hand, for cells, which are at a lower level than organs and tissues, a vitrification method has already been developed. Vitrification is a method of freezing cells that have been treated with a cryoprotectant solution and quickly freezing them in liquid nitrogen without forming ice crystals inside the cells. However, thick tissues/organs cannot be thawed uniformly and rapidly in the solution and inside the tissue. In this study, as a new cryopreservation technology at the tissue and organ levels, magnetic

nanoparticles of non-toxic iron oxide are dispersed in a cryoprotectant solution, frozen, and then thawed by generating heat in an alternating magnetic field. We have developed a technology to thaw organs and tissues with a high survival rate and while preserving their functionality, which was impossible with conventional heating methods (convection heat transfer using a 37°C water bath). As organ and tissue targets, we used the liver, which has a well-developed vascular network and excellent vascular permeability, and the pancreatic islet, which is a cell aggregate tissue with a diameter of approximately 200 μm that secretes insulin, which is useful for the treatment of diabetes.

2. METHOD

For cryopreservation of pancreatic islets, islets were isolated from mouse pancreas. Pancreatic islets were placed in 20 mL of cryoprotectant solution containing 10 nm magnetite suspended as magnetic nanoparticles, and the container was immersed in liquid nitrogen to freeze. After freezing, the container was removed and thawed by exposure of an alternating magnetic field. We transplanted 400 pancreatic islets into the kidney

capsule of a diabetic model mouse, and monitored changes in blood glucose levels after transplantation.

For liver cryopreservation, a cryoprotectant solution containing 10 nm magnetite as magnetic nanoparticles was perfused into the rat liver. Then, it was frozen by immersion in liquid nitrogen and thawed by exposure of an alternating magnetic field.

3. RESULTS

To evaluate the *in vivo* function of pancreatic islets after freezing and thawing, we conducted experiments using diabetic model mice. Figure 1 shows the changes in blood glucose levels in mice after islet transplantation. In the group that received fresh pancreatic islets, blood glucose levels decreased to normoglycemia. In contrast, in the group that received pancreatic islets thawed using convection heating, blood glucose levels did not decrease and remained hyperglycemic after transplantation, similar to the diabetic control group. On the other hand, in the group transplanted with pancreatic islets thawed by nanowarming, blood glucose levels decreased after transplantation and maintained normoglycemia for 30 days¹⁾.

When the rat liver was perfused with a cryoprotectant solution containing 10 nm of magnetite, we succeeded in perfusing the entire liver with dispersion. Furthermore, when a liver frozen by immersion in liquid nitrogen was heated with an alternating magnetic field, we succeeded in rapidly warming the liver from the inside at a heating rate that did not induce recrystallization (Figure 2).

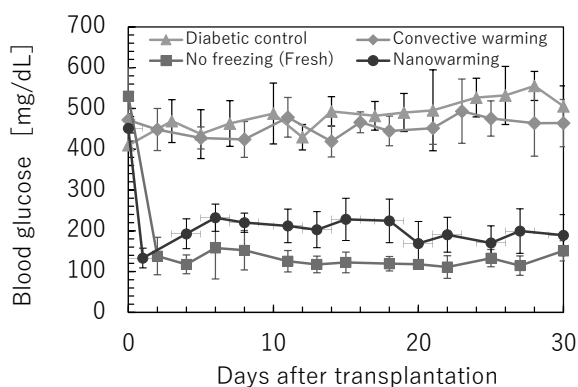


Figure 1 Blood glucose levels after transplantation

4. DISCUSSION

For the islets, convective heating damaged the islet tissue and impaired its function during thawing, whereas nanowarming thawed the islet while preserving the functions. Based on these findings, we have succeeded in thawing pancreatic islets in a large volume without impairing their function, which was impossible with convection heating. Preclinical study will be necessary for practical application.

For the liver, it is necessary to perfuse blood vessels within the organ with a cryoprotectant solution containing magnetite, which poses a problem with the dispersibility of nanoparticles, but we have developed a cryoprotectant solution with good dispersibility in this study. As a result, we succeeded in uniformly filling the liver with magnetite, and we have established a technology to rapidly thaw the liver by exposure of an alternating magnetic field. In the future, it will be necessary to investigate whether nanowarming can be an organ freezing technique that contributes to liver transplantation by investigating various functions of the thawed liver.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Watanabe Foundation.

REFERENCES

- 1) Taisei Wakabayashi, et. al. *Bioeng. Transl. Med.* **8**, e10416 (2023).

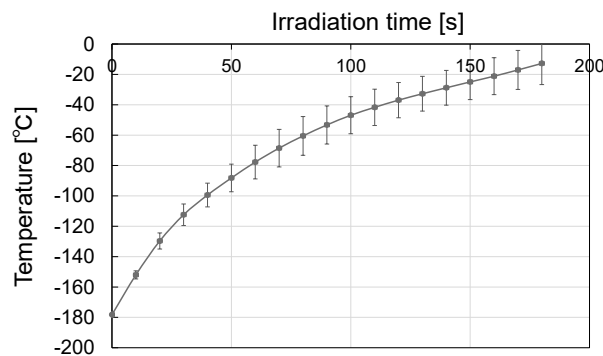


Figure 2 Temperature increase with nanowarming

Effect of upper and lower limbs rehabilitation with peripheral magnetic stimulation below the motor threshold

Hitoshi Kagaya

Department of Rehabilitation Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology,
7-430 Morioka-cho, Obu, Aichi 474-8511 Japan

Abstract

We have developed a spinning permanent magnet (SPM) device that gives magnetic stimulation below the motor threshold. The purpose of this study was to examine the effect of upper and lower limbs rehabilitation with SPM. The changes in H_{\max}/M_{\max} in healthy individuals, spasticity reduction in patients with stroke, and rehabilitation with SPM device were investigated. Compared to the control group, H_{\max}/M_{\max} was significantly decreased by SPM stimulation. The SPM group showed a significant reduction in spasticity for patients with stroke, but the effect was not long-lasting. Both patients and therapists gave positive opinions about rehabilitation while wearing SPM. Therefore, rehabilitation under SPM is considered practical.

Keywords: peripheral magnetic stimulation, spinning permanent magnet, motor threshold, spasticity, rehabilitation

1. PURPOSE

Japan Stroke Society Guideline 2021 for the Treatment of Stroke [Revised version 2023]¹⁾ indicates that electrical stimulation for the upper and lower limbs is effective. The intensity of electrical stimulation is often set to the supramaximal or maximum tolerable intensity above the motor threshold, but transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS), in which the intensity of stimulation is below the motor threshold and at the level of the sensory threshold, is also effective in reducing spasticity and chronic pain. In a study of electrical stimulation in addition to conventional rehabilitation for 4 weeks after knee joint arthroplasty surgery, significant improvements in quadriceps muscle strength and 2-minute walk test were reported in both above and below the motor threshold compared to the conventional rehabilitation only²⁾.

Repetitive Peripheral magnetic stimulation (rPMS) does not stimulate skin nociceptors, so it gives less pain than electrical stimulation. Moreover, rPMS is easy to use, because it does not need to adhere electrodes to the skin. However, it is not practical to combine rehabilitation techniques while wearing bulky rPMS devices on the limbs. We have developed a compact rPMS device (spinning permanent magnet; SPM) (Figure 1). Although the stimulation intensity is below the motor threshold, it may produce similar effects to TENS, and can be easily combined with other rehabilitation techniques because no muscle movements occur during stimulation. The purpose of this study was to examine the effect of upper and lower limbs rehabilitation with rPMS below the motor threshold.



Version 1



Version 2

Figure 1. SPM device we have developed

Version 1 has an external battery, while version 2 has a built-in battery. Both versions generate a magnetic field by rotating a permanent magnet.

2. METHOD

This study was approved by the Certified Clinical Research Review Board and was registered with the Japan Registry of Clinical Trials (jRCTs042200013, jRCTs042180014).

1) Changes in H_{max}/M_{max} in healthy individuals

The subjects were 11 adult men with a mean age of 34 years. The following conditions were evaluated: a) SPM stimulation for 15 minutes, b) SPM stimulation for 30 minutes, c) 10,000 pulses for rPMS, d) TENS for 15 minutes, and e) no stimulation for 15 minutes (control group). The active electrode was placed on the soleus muscle at the gastrocnemius–soleus muscle junction. The reference electrode was placed at 5 cm distal from the active electrode on the medial side of the Achilles tendon. The tibial nerve was stimulated at the popliteal fossa before and after stimulation, and H_{max} and M_{max} values were recorded to obtain H_{max}/M_{max} .

2) Spasticity reduction in patients with stroke

The subjects were 58 stroke patients with a mean age of 68 years who had spasticity of modified Ashworth Scale (MAS) 1+ or higher in the forearm flexor muscles. They were 33 cerebral infarctions, 24 cerebral hemorrhages, and 1 subarachnoid hemorrhage. The patients were randomly assigned to 15 minutes of SPM stimulation and sham stimulation. MAS of the forearm flexor muscles was evaluated just before (T1), just after

(T2), 1 hour after (T3), and 24 hours after (T4) the stimulation.

3) Rehabilitation with SPM device

The subjects for the upper limb include 9 cerebral infarctions and 1 cerebral hemorrhage (mean age: 72 years), while 7 had hip fractures, 2 total knee arthroplasties, and 1 underwent surgery for lumbar canal stenosis for the lower limb (mean age: 80 years). The target muscles for upper and lower limbs were extensor digitorum communis and the quadriceps muscles, respectively. The SPM was worn during rehabilitation for 3 consecutive days in the first week, without SPM in the second week, and again for 3 consecutive days in the third week. The differences with and without SPM were evaluated using a 7-point Likert Scale (1: worst, 7 best).



Figure 2. Upper limb rehabilitation with SPM device

3. RESULTS

1) Changes in H_{max}/M_{max} in healthy individuals

Compared to the control group, H_{max}/M_{max} was significantly decreased by 15 min SPM stimulation, 30 min SPM stimulation, rPMS, and TENS. The changes in H_{max}/M_{max} for 15 min SPM stimulation was significantly smaller than for 30 min SPM stimulation and rPMS (Figure 3).

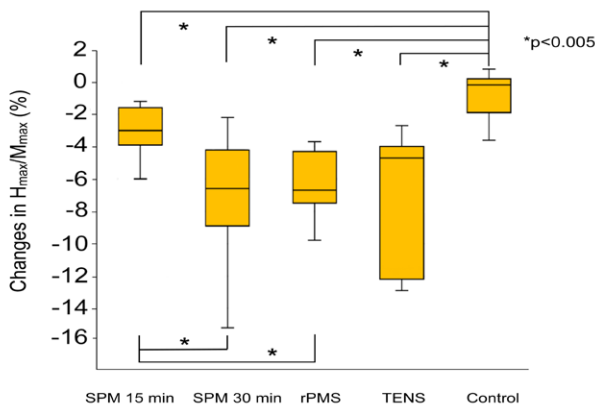


Figure 3. Changes in H_{max}/M_{max}

2) Spasticity reduction in patients with stroke

The SPM group showed a significant reduction in MAS at T2, but there was no significant changes in MAS at T3, T4, or in the sham group.

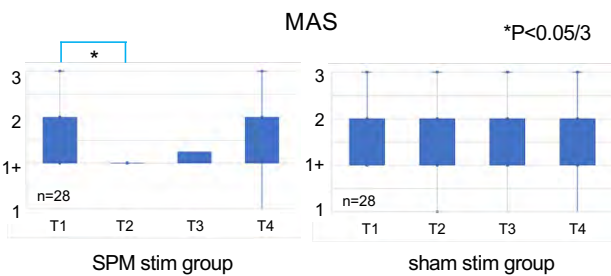


Figure 4. Changes in MAS

3) Rehabilitation with SPM device

The median Likert Scale for upper limb patients was 5 for feel of use, 5 for wear, 7 for pain, 7 for desire to continue rehabilitation with the device, and 5 for comparison to rehabilitation without the device, whilst 5, 5, 7, 5, 7 for lower limb patients, respectively. The therapists were asked if it interfered with rehabilitation, with a median Likert Scale of 6 for the upper limb and 7 for the lower limb.

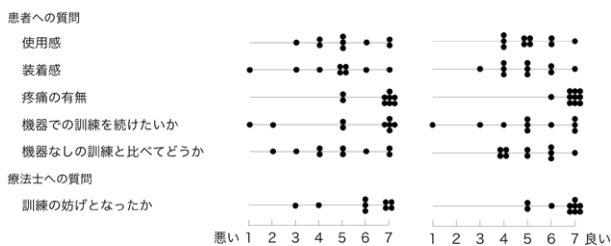


Figure 5. 7-point Likert Scale

4. DISCUSSION

H_{max}/M_{max} was decreased by SPM stimulation in healthy individuals; 15 minutes of SPM stimulation was as effective as 15 minutes of TENS, and the effect was enhanced by 30 minutes of SPM stimulation. H_{max}/M_{max} is often used for electrophysiological evaluation of spasticity, and H_{max}/M_{max} decreases with TENS even in healthy subjects³. Therefore, SPM stimulation can be expected to reduce spasticity. Actually, SPM stimulation for 15 minutes reduced MAS in patients with stroke. However, the effect disappeared after 1 hour, suggesting that it was not long-lasting. Nevertheless, both patients and therapists gave positive opinions about rehabilitation while wearing SPM. Therefore, rehabilitation under SPM is considered practical. We intend to continue the research on rehabilitation of upper and lower limbs using the SPM device.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Watanabe Foundation (30th Anniversary Special Grant 2020).

A part of this study was presented at the IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023 held in Yokohama, Japan on June 12-14, 2023.

REFERENCES

- 1) Japan Stroke Society Guideline 2021 for the Treatment of Stroke [Revised version 2023]. Kyowa Kikaku, Tokyo, 2023.
- 2) Yoshida Y, Ikuno K, Shomoto K. Comparison of the effect of sensory-level and conventional motor-level neuromuscular electrical stimulations on quadriceps strength after total knee arthroplasty: A prospective randomized single-blind trial. Arch Phys Med Rehabil 98:2364-2370 (2017).
- 3) Karakoyun A, Boyraz İ, Gunduz R, Karamercan A, Ozigirgin N. Electrophysiological and clinical evaluation of the effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on the spasticity in the hemiplegic stroke patients. J Phys Ther Sci 27:3407-3411 (2015).

The Subjects for the 2023 Research Grants

Here are the subjects (6 Basic Researches, 3 Application Researches, 3 Specific Researches) that the 2023 Research Grants are subsidized.

I. Basic Research

- I-1. Development of magnetically controllable protein degrader
Division of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences/Hidetomo Yokoo
- I-2. Mechanisms of bone repair enhancement by extremely low-frequency electromagnetic fields
Kanazawa University/Isao Kobayashi
- I-3. Achievement of a safer CAR-T cell therapy by incorporating substances into magnetic lipid nanoparticles
Keio University/Satoshi Inoue
- I-4. Possibility for non-invasive mapping of language function using steady-state evoked magnetic fields
Department Linguistic, Faculty of Humanities, Kyushu University/Emi Yamada
- I-5. Development of construction method of engineered muscle tissues by combining permanent magnets and magnetic field modulators
Fukui University of Technology/Kazuya Furusawa
- I-6. Development of detection method using changes in magnetic properties of magnetic nanoparticles and biological material aggregates
Tohoku University/Shin Yabukami

II. Application Research

- II-1. Development of Remote Treatment Method of Neuropathic Pain Based on Magnetic Nanoparticle
Faculty of Advanced Engineering, Tokyo University of Science/Masao Kamimura
- II-2. Development of a video magnetoencephalography monitoring system with a tunnel magneto-resistive sensors
Department of Neurology and Epileptology Tohoku University School of medicine/Kazutoshi Konomatsu
- II-3. Realization of photo-thermo-chemical nano-theranotics to achieve simultaneous magnetic imaging and therapy.
Nagoya University/Sato Kazuhide

III. Specific Research

- III-1. Development of a noninvasive method to assess neurophysiological function in lumbar spine diseases using magnetospinography
Dept. of Advanced Technology in Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University/Jun Hashimoto
- III-2. Elucidating how living organisms respond to magnetic fields
RCAST, The University of Tokyo/Kazuhiro Kobayashi
- III-3. Establishment of a method for quantification of brain-spinal cord connectivity supporting recovery of voluntary motor control ability by simultaneous brain-spinal cord magnetic resonance imaging
Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science/Noboru Usuda

Note: Affiliations above are at the time of the grants were subsidized.

THE REPORT OF STUDY RESULT BY SUBSIDY
助成研究成果報告書
第29回

発行日 令和6年10月1日
発行所 公益財団法人 渡邊財団
福岡県福岡市中央区天神1-13-17
TEL 092-724-3605
FAX 092-724-3690
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(<https://watanabe-zaidan.or.jp/>)に掲載しておりますのでご覧下さい。



この印刷物は、環境に配慮した
ベジタブルインクを使用しています。