

THE REPORT OF STUDY RESULT BY SUBSIDY

第31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31回

(研究期間：令和7年4月1日～令和8年3月31日)

目 次

巻頭言	1
	理事長 小谷 誠
I. 基礎研究	
I-1. 拡散強調画像による脂肪細胞微細構造の可視化	3
	東京科学大学リベラルアーツ研究教育院、東京科学大学大学院環境・社会理工学院、社会・人間科学系 准教授 小川 まどか
I-2. 経鼻投与と磁気を利用した脳部位選択的薬物デリバリーによる脳腫瘍治療システムの構築	10
	名古屋市立大学 大学院薬学研究科 講師 小川 昂輝
I-3. 行動停止のモニタ・調節を行う神経回路の解明: TMSとfMRIを用いたマルチモーダル研究	13
	順天堂大学 准教授 長田 貴宏
I-4. 交流コットン=ムートン効果による磁性リボソームのキャラクタリゼーション法の開発	16
	大阪大学 助教 諏訪 雅頼
II. 応用研究	
II-1. 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	19
	東海国立大学機構名古屋大学大学院医学系研究科/名古屋大学高等研究 特任講師 佐藤 和秀
II-2. 超偏極 ¹³ C-ピルビン酸を用いた磁気共鳴分光法による脳内エネルギー代謝の空間的可視化と応用	23
	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 研究員 小野 麻衣子
II-3. 経頭蓋磁気刺激による神経調節と脳磁図による脳活動計測の融合	26
	東京大学医学部附属病院 講師 代田 悠一郎
II-4. 磁性化間葉系幹細胞を利用した新規がん磁気温熱化学療法の開発	29
	神戸薬科大学 薬剤学研究室 准教授 河野 裕允
II-5. ディスク状ナノ粒子を利用した ¹⁹ F MRI造影剤の開発	31
	大阪大学大学院工学研究科附属フューチャーイノベーションセンター 助教 山本 智也
III. テーマ指定研究	
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	33
	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 先端技術医療応用学講座 ジョイントリサーチ講座助教 橋本 淳
III-2. 蝸牛内シスプラチンを磁気誘導技術により体外回収する革新的難聴治療	36
	北里大学 医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 講師 栗岡 隆臣
III-3. 拡散テンソル磁気共鳴画像を用いた統合失調症の病態研究	38
	東京大学医学部附属病院精神神経科 助教 越山 太輔
III-4. 交番磁界による慢性疼痛緩和の機序解明	40
	帝京大学 薬学部 臨床薬学講座 薬効解析学研究室 教授 大澤 匡弘
III-5. 経頭蓋静磁場刺激が脳卒中後半側空間無視症状に及ぼす影響	44
	広島大学大学院医系科学研究科 育成助教 松本 杏美莉
III-6. 末梢磁気刺激による運動機能改善と効果機序の解明	49
	山形県立保健医療大学 教授 仁藤 充洋

巻 頭 言

公益財団法人 渡邊財団

理事長 小 谷 誠

今から51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発生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、心臓に電流を流して、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6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。

拡散強調画像による脂肪細胞微細構造の可視化

The use of time-dependent diffusion-weighted imaging for adipocytes

小川 まどか*, 大城 日菜子**,***, 一ノ瀬 彩加****, 畑 純一**,***, 西尾 美和子****

Madoka Ogawa, Hinako Oshiro, Ayaka Ichinose, Hata Junichi, Miwako Nishio

*東京科学大学リベラルアーツ研究教育院, 環境・社会理工学院社会・人間科学系 (大学院),
〒152-8550 東京都目黒区大岡山 2 丁目 12-1

**理化学研究所脳神経科学研究センター, 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号

***東京都立大学大学院人間健康科学研究科, 〒116-8551 東京都荒川区東尾久 7-2-10

****東京科学大学大学院医歯学総合研究科, 〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

*Institute for Liberal Arts, School of Environment and Society and Society, Department of
Social and Human Sciences, Institute of Science Tokyo
2-12-1 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8550, Japan

**Laboratory for Neural Computation and Adaptability, RIKEN Center for Brain Science
2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan

***Graduate School of Human Health Sciences, Tokyo Metropolitan University
7-2-10 Higashiogu, Arakawa-ku, Tokyo 116-8551, Japan

****Graduate School of Medical and Dental Sciences, Institute of Science Tokyo
1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan

Abstract

The feasibility of time-dependent diffusion-weighted imaging (td-DWI) for fat phantoms and brown adipocytes (BA) derived from human induced pluripotent stem cells was investigated. Apparent diffusion coefficient (ADC) measurements at multiple diffusion times (DT16–DT676 ms) showed three distinct diffusion time-dependence patterns. In the absence of fat suppression, lipid proton signals from triglycerides influenced ADC measurements, plateauing at approximately 40% fat content. Cell viability was 1% in the BA after MR imaging. These findings demonstrate that td-DWI can detect diffusion time dependence in fat phantoms. However, maintaining cell viability will be necessary for future studies.

Keywords: induced pluripotent stem cells, brown adipocyte, apparent diffusion coefficient

1. 目的

ヒト褐色脂肪組織は、熱産生による体温調節やエネルギー代謝に重要な役割を担う(1)。ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPSCs) から褐色脂肪細胞を誘導する技術が確立されており(2-4)、肥満などの代謝疾患に対する治療法への応用が期待されている。一方、脂肪細胞

の生着や増殖を非侵襲的に観察する方法は確立されておらず、その方法が求められる。

拡散強調画像 (diffusion weighted image; DWI) は、生体組織内における水分子のブラウン運動を画像化し、見かけ上の拡散係数 (apparent diffusion coefficient; ADC) などの指標により組織の微細構造を非侵襲的に評価する。従来の DWI

では単一の拡散時間における拡散係数を測定するが、拡散時間依存性拡散強調画像 (time-dependent diffusion weighted image; td-DWI) では複数の拡散時間を設定して ADC を測定することで、微細構造に関するより詳細な情報の取得が可能である(5, 6). 本研究では、脂肪分率の異なるファントムおよびヒト iPSCs 由来褐色脂肪細胞 (以下, BA) における td-DWI シーケンス条件を検討し、脂肪細胞の評価の可能性を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

(1)MR 撮像用容器

MR 撮像用のホルダーとマイクロチューブは、東京科学大学コアファシリティセンター設計製作部門と共同で 3D プリンタ (KEYENCE AGILISTA-3100) を用いて作製した。ホルダーはマイクロチューブを遠沈管 (AGC テクノグラス株式会社, 2363-025-MYP) へ安定して保持し、MR 撮像時における位置再現性を確保できるように設計した。マイクロチューブは細胞懸濁液の充填や密封、取り外しが可能となるよう、スクリュー固定式かつ蓋を作製した。使用素材は透明樹脂 (KEYENCE AR-M2) であった。

(2) MR 撮像プロトコルの検討

先行研究(7)を参考に人体を想定した脂肪ファントムを作製し、脂肪細胞に特化した td-DWI の条件設定を事前に検討した。作製したファントムの成分は表 1 に示す。

表 1. 脂肪ファントム成分一覧

Fat content, %	Water, μL	Coconut oil, μL	Tween-80, μL	Gelatin (Sigma-Aldrich®), g
0	975	0	0	0.025
20	749	218	24	0.025
40	523	437	48	0.025
60	297	655	72	0.025

密度: Water 1.0 g/mL, Coconut oil (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 0.916 g/mL, Tween-80 (bioWORLD) 1.080 g/mL

MR 撮像は 9.4T 装置 (660 mT/m, Bruker Biospin) および内径 23 mm のソレノイドコイル (高島製作所) を用いて実施した。拡散強調パルス勾配刺激エコー (STEAM) 撮影時のパラメー

タは以下の通りであった。拡散時間 (Δ : 8/3), 16, 36, 64, 100, 144, 196, 256, 324, 400, 484, 576, 676 ms; 拡散方向: 1; b 値: 900 および 2225 s/mm², 勾配持続時間 (δ): 2.4 ms; TR: 5000 ms; TE: 15.8 ms; FOV: 24 × 24 mm²; マトリクスサイズ: 64 × 64; 解像度: 0.375 × 0.375 mm²; スライス厚: 0.5 mm; 平均回数: 1; 取得時間: 10 分 40 秒 × 12 (multi diffusion time) × 6term. なお, MR 室内は 22°C であった。

(3)ヒト iPSCs 由来褐色脂肪細胞(BA)の培養

東京科学大学および理化学研究所において、ヒト生命倫理審査非該当の確認を得て、予備実験を実施した。ヒト iPSCs を用いた BA への分化誘導は、確立されたプロトコルに基づき行った(4)。BA 分化誘導培地には、IMDM, Ham's F-12, 1/100 Chemically Defined Lipid Concentrate, 1/100 Insulin Transferrin Selenium、50 $\mu\text{g/mL}$ アスコルビン酸-2-リン酸, GlutaMAXTM Supplement を用いた。

ヒト iPS 細胞を TrypLE Express を用いて剥離し、Corning Elplasia マルチウェルプレートに 2000 cells/spheroid 程度の密度で播種した。分化誘導開始 8 日目に i-Matrix コーティングしたプレートに播種した。10 日目に細胞を回収した。

室温で BA のペレット形成後における細胞生存率およびその厚みを確認した (表 2)。細胞生存率はトリパンブルー染色により測定した。予備実験の結果から、10 時間後の細胞生存率 50% 以上と予測した、3 条件 (10 × 10⁵ cells, 20 × 10⁵ cells, 25 × 10⁵ cells) を撮像対象とした。

表 2. 室温 22°C における細胞生存率

Elapsed time	Cell viability (%)	
	10 × 10 ⁵ cells	60 × 10 ⁵ cells
0	100	100
12	56.9	18.0
18	37.7	14.9

(4)撮像前のファントムおよび BA

各脂肪分率の脂肪ファントムを 4°C で保存し、撮像前に室温へ戻した。また、BA は細胞数を 10 × 10⁵ cells (S1), 20 × 10⁵ cells (S2), 20 × 10⁵

cells (S3), 25×10^5 cells (S4) へ調整して培養液とともにチューブへ注入後、培養施設から撮像施設まで室温で移動した。

撮像施設へ到着後、室温にて遠心分離 (1,000 rpm $\times$ 3 分) を実施し、BA ペレットの存在を確認した。その後、マイクロチューブへ BA を移動し、培養液で満たして蓋をした。これらを市販マイクロチューブ (VIOLAMO) へ押し入れた状態で遠心分離 (室温, 300 rpm $\times$ 3 分, 700 rpm $\times$ 3 分) することで、ペレットを形成した (図 1C)。形成された BA ペレットの厚みは 0.3mm 程度であった。各脂肪ファントムおよび S1~S4 のマイクロチューブを撮像用ホルダーへ慎重に設置し、その後、フッ素系不活性液体 (Galden, ソルベイスペシャルティポリマーズジャパン) を充填させ、事前に検討した td-DWI シーケンスで撮像した。

(5) 細胞生存率および AQP7 発現

撮像後、マイクロチューブから速やかに BA を取り出し、細胞生存率の確認を実施した。また、後日、撮像に用いた BA (S1~S4) で蛍光組織化学染色にてアクアポリン 7 (AQP7) の発現を確認した。AQP7 は脂肪細胞膜における水およびグリセロールの膜透過性を担い(8, 9), その発現は細胞内外の水移動に影響することから、td-DWI の拡散時間依存性に関与すると考えられる。本研究では以下の手順を実施した。培養液を除去後、1 $\times$ PBS で 2 回洗浄後、4% PFA/PBS 溶液にて室温 15 分間、固定した。固定後、PBS で洗浄し、4 $^{\circ}$ C で保存した。ブロッキングは 1 $\times$ PBS, 5% BSA, 0.1% Tween 20 溶液を用いて 1 時間行い、PBS で洗浄後、抗 AQP7 抗体 (SC-376407 FITC, Santa Cruz Biotechnology, 1:100 希釈) を 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、DAPI にて核染色を行い、蛍光封入剤にて封入した。なお、蛍光組織化学染色の観察は東京科学大学バイオサイエンス統合支援施設にて行われた。

(6) 画像解析

撮像後、DICOM データを dcm2niix (version 1.0) により NIfTI 形式へ変換した。Fiji ImageJ (version 2.16) を用い、NIfTI 画像上でマイクロチューブの中央へ 9 つの関心領域 (ROI) を手動で設定し (図 2)、全条件へ適用した。各 ROI 内における Mean Intensity の値は、自動化マク

ロスクリプト処理により算出した。得られた値から、ADC を算出した。

なお、本研究は探索的検討であり、統計学的解析は行っていない。得られた値は単一測定値として示した。

3. 結果

図 3A~D に脂肪分率の異なる各ファントム、図 3E~I に各細胞数条件 (S1~S4) における 1st ~6th term の拡散時間 (DT16~DT676 ms) における ADC ($\times 10^{-3}$ mm²/s) を示す。

脂肪分率 0% ファントムでは ADC が 0.178×10^{-3} mm²/s (DT16) から 0.291×10^{-3} mm²/s (DT676) へと増加し、term 間のばらつきは短い拡散時間域で小さく、DT484 以降で拡大した。40% ファントムでも同様に DT16 から DT676 で増加がみられ、term 間のばらつきは全条件中最小であった (DT16; CV 0.9%)。一方、脂肪分率 20% ファントムでは DT16 において 1.515×10^{-3} mm²/s を示し、DT324 (1.811×10^{-3} mm²/s) でピークに達した後低下した。脂肪分率 60% ファントムでも同様の挙動を示した。

BA 各条件の DT16 における ADC は S1; 1.534×10^{-3} mm²/s, S2; 1.213×10^{-3} mm²/s, S3; 1.522×10^{-3} mm²/s, S4; 1.531×10^{-3} mm²/s を示し、S2 のみ他条件と比較して低値を示した。DT16 と比較し、DT676 においては S1 および S4 で ADC の低下がみられたのに対し、CM, S2 および S3 はほとんど変化しなかった。

図 4a~l には、各拡散時間および各 term における全条件の ADC 値の比較を示す。ADC を拡散時間依存性パターンで分類すると、①拡散時間に伴い増加 (脂肪分率 0% および 40%), ②増加後に減少 (脂肪分率 20% および 60%), ③定常状態〜低下 (CM, S1~S4) の 3 パターンがみられた (図 4)。脂肪分率 0% のファントムは全条件内で最も低い ADC を示し、他条件と明確に区別された。脂肪分率 40%, 60%, CM, S1, S3, S4 は同程度の値を示し、S2 のみ他の BA 条件より低値を示した。また、いずれの条件も各 term 間で大きな差はみられなかった。

撮像直後の S1~S4 の細胞生存率は、いずれも 1% であった。後日、BA を対象に抗 AQP7 抗体に

よる蛍光免疫染色を実施したが、いずれのサンプルにおいても AQP7 の発現は認められなかった。

4. 考察

脂肪分率 0% のファントムにおける ADC は $0.178 \sim 0.291 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ であり (図 3A), 20°C の水における自己拡散係数 ($2.025 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) と比較して低値を示した(10)。これはゼラチンの 3 次元網目構造が水分子の拡散を物理的に制限したためと考えられる。

脂肪分率 20% および 60% ファントムでの term 間のばらつきは、本研究では脂肪抑制を使用していないため、水プロトンとトリグリセリド分子のプロトンの混合信号が ADC に影響を与えた可能性がある。また、トリグリセリド分子の各プロトンピークは異なる緩和時間を持つことから(11)、長い拡散時間域において T2 減衰の影響により水とトリグリセリドの信号比が変化し、term 間のばらつきが生じた可能性がある。

BA の ADC については、S1 および S4 において DT16 から DT676 にかけて ADC が低下する傾向がみられたが、細胞生存率が 1% であることから、死細胞や培養液の拡散特性を反映しているものと考えられる。細胞生存率の低下は、2 時間の移送、約 15 時間の静置、および複数回のペレット形成による物理的ストレスが影響したと考えられる。AQP7 の発現が検出されなかった要因として、細胞死による抗原性の消失、細胞数不足による検出限界以下のシグナル、BA における AQP7 発現量の低さが考えられた。

本研究により、td-DWI はファントムで拡散時間依存性を検出可能であり、脂肪分率の違いによる ADC の差異を捉えられることが示された。また、本撮像条件において脂質信号の混入が ADC に影響し、その影響は脂肪分率 40% 程度で頭打ちになることが確認された。今後は、十分な細胞数の確保、移送時間の短縮、撮像用容器の改善が課題である。また、細胞剥離を省略した浮遊培養 (スフィア) 状態での撮像により、細胞へのストレス軽減と細胞体積の確保が期待される。td-DWI で得られた ADC から表面積対体積比の推定を検討し、定量的評価が可能か否かを検証する予定である。

謝辞

公益財団法人渡邊財団の研究助成を受けて実施したものです。MR 装置の使用および実験環境をご提供いただいた理化学研究所ならびに技術支援をいただいた東京科学大学の担当者に心から感謝申し上げます。

参考文献

1. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature medicine*. 2013;19(10):1252-63.
2. Nishio M, Saeki K. Differentiation of human pluripotent stem cells into highly functional classical brown adipocytes. *Methods in enzymology*. 2014;537:177-97.
3. Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, Suzuki S, Saeki K, Hasegawa M, et al. Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer. *Cell metabolism*. 2012;16(3):394-406.
4. Oka M, Kobayashi N, Matsumura K, Nishio M, Saeki K. Exogenous Cytokine-Free Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Classical Brown Adipocytes. *Cells*. 2019;8(4).
5. Grussu F, Bernatowicz K, Casanova-Salas I, Castro N, Nuciforo P, Mateo J, et al. Diffusion MRI signal cumulants and hepatocyte microstructure at fixed diffusion time: Insights from simulations, 9.4T imaging, and histology. *Magnetic resonance in medicine*. 2022;88(1):365-79.
6. Maekawa T, Hori M, Murata K, Feiweier T, Kamiya K, Andica C, et al. Time-dependent Diffusion in Brain Abscesses Investigated with Oscillating-gradient Spin-echo. *Magn Reson Med Sci*. 2022;21(4):525-30.
7. Scholey JE, Chandramohan D, Naren T, Liu W, Larson PEZ, Sudhyadhom A. Technical Note: A methodology for improved accuracy in stopping power estimation using MRI and CT. *Med Phys*. 2021;48(1):342-53.
8. Madeira A, Camps M, Zorzano A, Moura TF, Soveral G. Biophysical assessment of human aquaporin-7 as a water and glycerol channel in

- 3T3-L1 adipocytes. PloS one. 2013;8(12):e83442.
9. Costa IP, Schiano G, Sacnun JM, Herzog R, Kerr A, Dahlman I, et al. AQP7 deficiency drives adipose tissue remodeling and disrupts homeostasis. NPJ Metab Health Dis. 2025;3(1):44.
10. Manfred Holz SRHaAS. Temperature-dependent self-diffusion coefficients of water and six selected molecular liquids for calibration in accurate ^1H NMRPFG measurements Physical Chemistry Chemical Physics. 2000;2(20):4740-2.
11. Peterson P, Trinh L, Månsson S. Quantitative (^1H) MRI and MRS of fatty acid composition. Magnetic resonance in medicine. 2021;85(1):49-67.

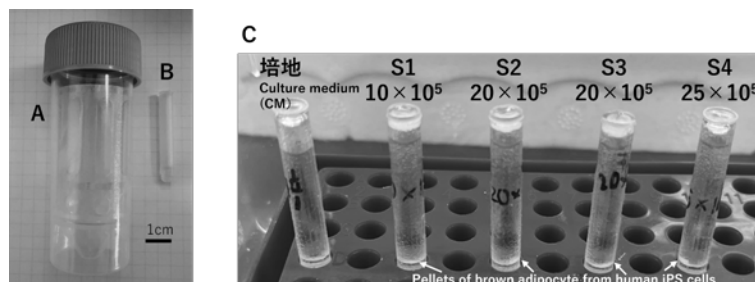


図 1.

A 撮像用ホルダーと遠沈管.

B 蓋付きマイクロチューブ.

C 培養液, 各細胞数におけるペレット形成後のヒト人工多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞 (S1~S4)

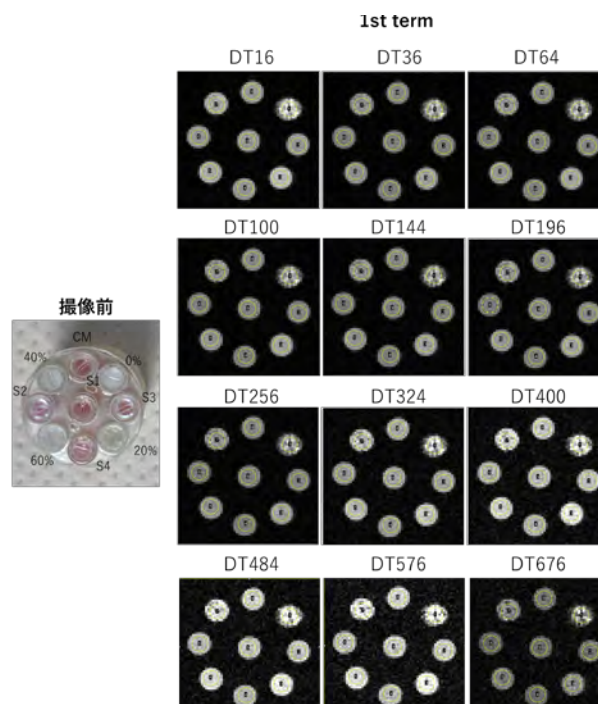


図 2. 拡散時間依存性拡散強調画像 (1st term, b-values: 2,225 s/mm^2) の例

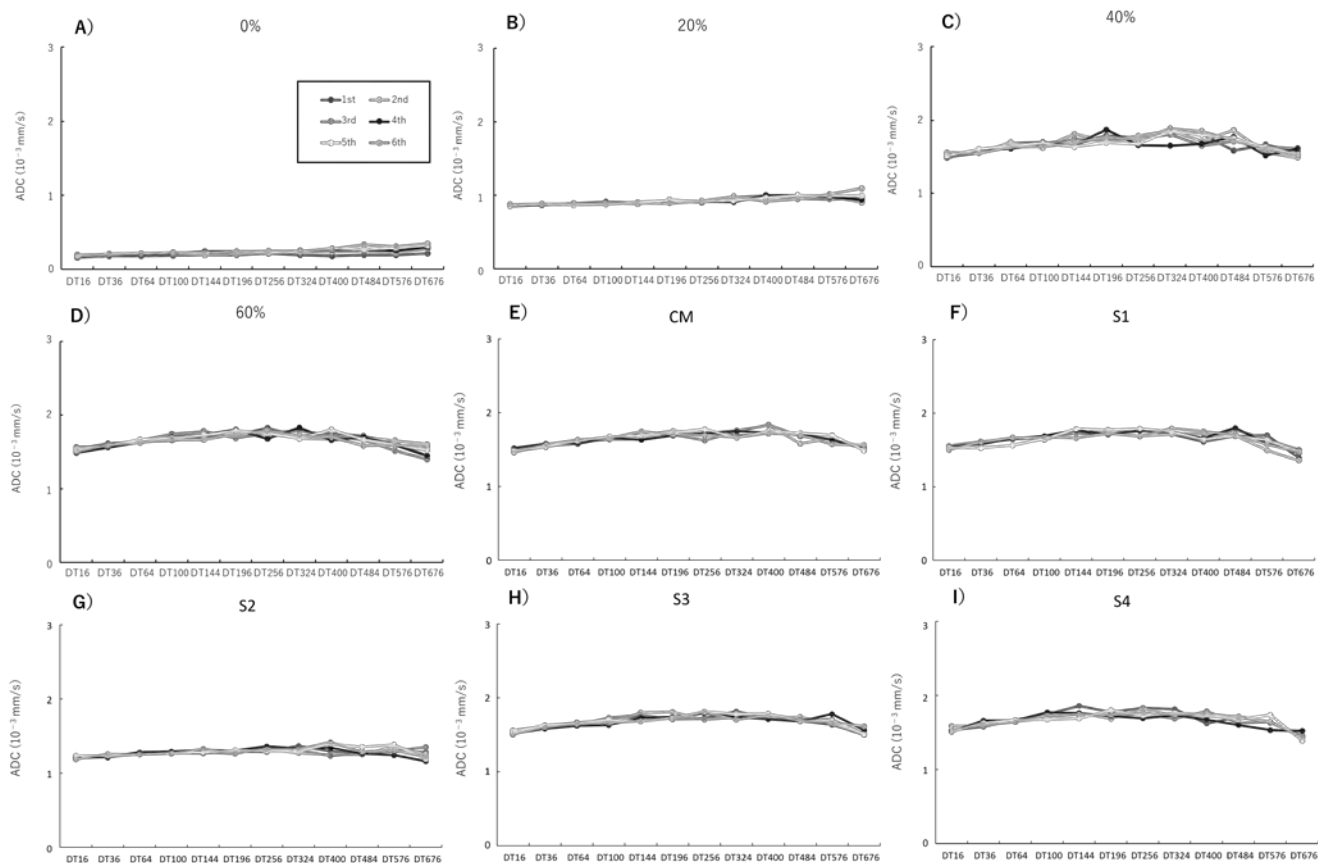


図 3. 1st~6th term の見かけ上の拡散係数 (ADC, $\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) と拡散時間 (DT16~DT676 ms).
 A) 脂肪分率 0%ファントム, B) 脂肪分率 20%ファントム, C) 脂肪分率 40%ファントム, D) 脂肪分率 60%ファントム, E) 培養液 (CM), F) S1 : ヒト人工多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞 (BA) 10×10^5 cells, G) S2 : BA 20×10^5 cells, H) BA 20×10^5 cells, I) 25×10^5 cells.

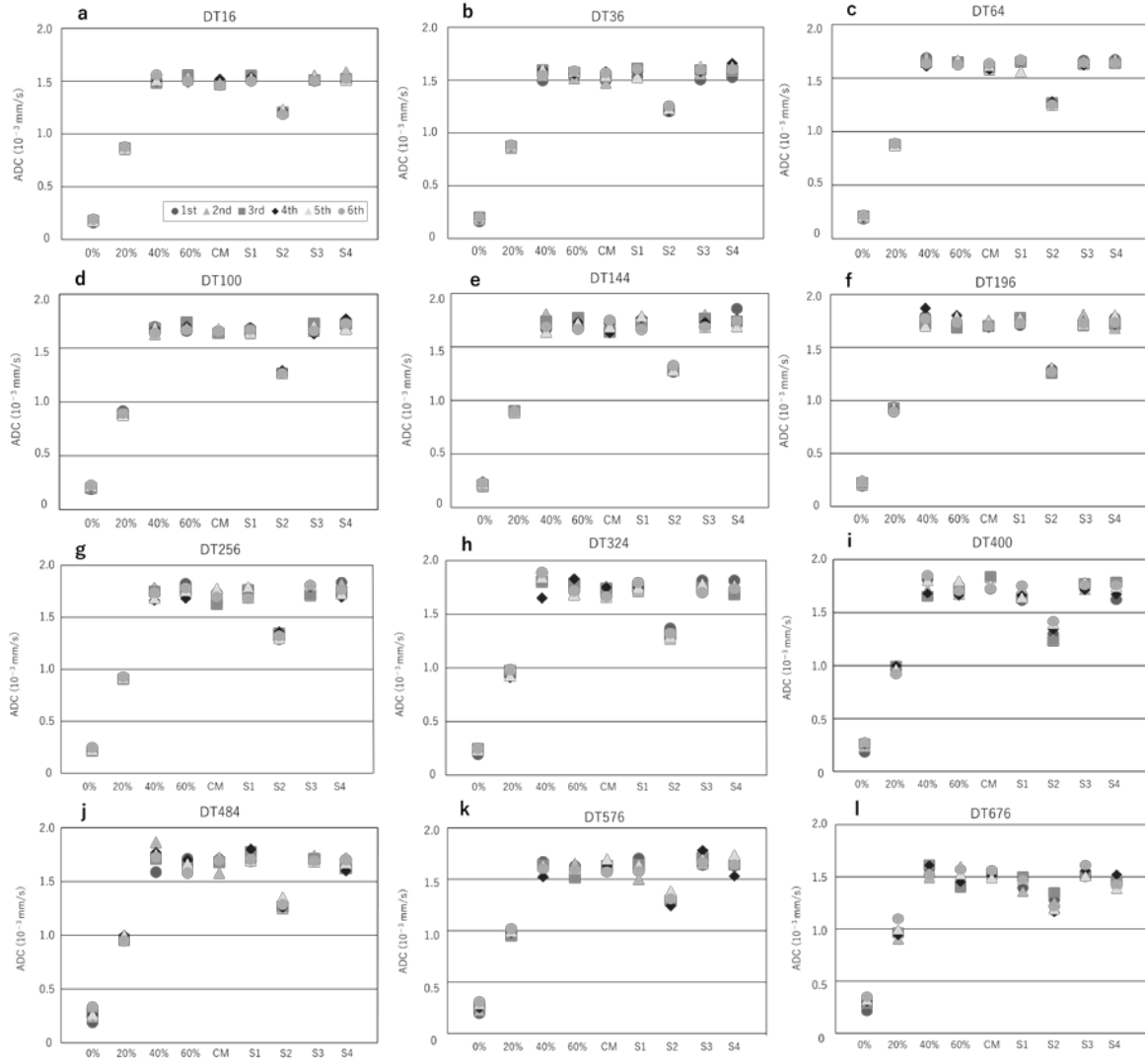


図 4. 各拡散時間 (DT) における 1st~6th term の見かけ上の拡散係数 (ADC, $\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)

経鼻投与と磁気を利用した脳部位選択的 薬物デリバリーによる 脳腫瘍治療システムの構築

小川 昂輝, Koki Ogawa

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

Abstract

This study aimed to construct a novel intracerebral drug delivery system combining nasal administration with magnetic targeting, and developed iron oxide nanoparticle-encapsulated PLGA nanoparticles (IONP@PLGA). Magnetic field application was confirmed to significantly enhance the uptake of IONP@PLGA by glioma cells. Furthermore, applying a magnetic field to the brain after nasal administration in rats significantly improved the brain translocation of IONP@PLGA. This approach improves brain translocation following nasal administration and demonstrates potential utility as a platform technology for future control of intracerebral drug distribution.

【研究経過および成果】

【序論】

脳には血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) が存在し、物質の移行が厳密に制限されている。そのため、脳へ薬物を効率的に送達するためには、ドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術の活用が不可欠である。一方、経鼻投与を介した鼻から脳への薬物移行経路 (鼻-脳経路) の存在が示唆されており、これを利用した脳デリバリー研究も精力的に進められている。しかし、鼻-脳デリバリーでは鼻腔近傍の脳領域への分布に偏りやすく、薬物が到達する脳部位が限定されるという課題がある。そのため、脳疾患治療へ幅広く応用するためには、脳内における薬物分布を精密に制御する新たな

方法論が求められている。

薬物の体内動態制御手法として、磁性材料と外部磁場を利用した「磁気ターゲティング」が盛んに研究されているものの、鼻-脳デリバリーへの応用例はこれまで報告されていない。そこで本研究では、鼻-脳デリバリーと磁気ターゲティングを併用することで、効率的かつ疾患部位選択的な脳内薬物デリバリーが可能になると考えた。本研究の目的は、経鼻投与に適した磁気誘導性 DDS キャリアを設計し、経鼻投与と磁気ターゲティングにより脳内の標的部位へ薬物を送達可能なシステムを開発することである。

【実験方法】

磁性材料と薬物を同時に搭載可能な DDS キャリ

アとして、ポリ乳酸-グリコール酸 (PLGA) ナノ粒子に酸化鉄ナノ粒子 (iron oxide nanoparticles; IONP) を封入した IONP@PLGA を作製した。電子顕微鏡観察および動的光散乱法による粒子径測定により、IONP@PLGA の基礎物性を評価した。次に、グリオーマ細胞株 C6 を用い、磁場照射下における IONP@PLGA の細胞内取り込み量を測定した。さらに、ラットに IONP@PLGA を経鼻投与し、脳に磁場を照射した際の脳移行性および脳内分布を評価した。

【結果・考察】

IONP@PLGA の調製

IONP は FeCl_3 および FeSO_4 を用いた一般的な共沈法により作製し、粒子径は 26 nm と標準的なサイズであった。PLGA ナノ粒子への封入効率を高めるため、IONP 表面を (3-アミノプロピル)トリエトキシシラン (APTES) によりカチオン修飾した。PLGA のアセトン溶液と IONP を含む水溶液を攪拌下で混合することで、IONP@PLGA を作製した。得られた粒子の平均粒子径は約 200 nm、ゼータ電位は約 13 mV であった。電子顕微鏡観察において、球状粒子内部に点状構造が確認されたことから、IONP が PLGA ナノ粒子内部に封入されていることが示唆された。

C6 グリオーマ細胞への取り込み

クマリン-6 により蛍光標識した IONP@PLGA を C6 細胞に添加し、マグネットプレートを用いて底面から磁場を照射した後、一定時間培養し細胞内の Fe 量を定量した。その結果、1~4 時間のいずれの時間点においても、磁場照射群では非照射群と比較して有意に高い細胞内取り込みが認められた。こ

の結果は、クマリン-6 の蛍光観察結果とも一致しており、磁場照射によって IONP@PLGA の細胞内取り込みが促進されることが示された。また、IONP@PLGA は薬物の同時封入が可能であることから、将来的には抗がん剤を搭載した IONP@PLGA を作製することで、薬物療法の治療効果向上が期待される。

In vivo における脳移行性評価

ラットに IONP@PLGA を経鼻投与後、ネオジム磁石を用いて脳に磁場を照射し、脳移行性および脳内分布を評価した。その結果、磁場照射により IONP@PLGA の脳移行量は約 3 倍に増加した。また、IONP 単独と比較して、IONP@PLGA の方が高い脳移行性を示した (Fig. 1)。

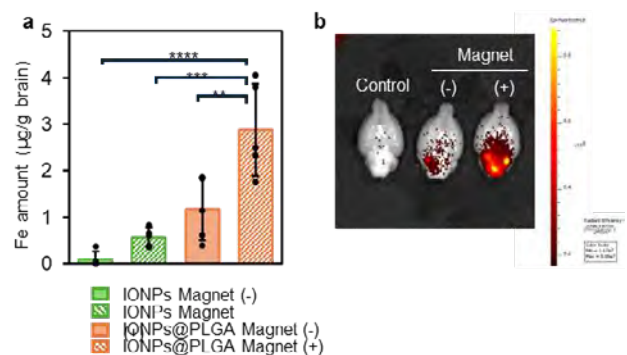


Fig. 1) Accumulation of iron in the brain after administration of IONPs or IONPs@PLGA with or without a magnetic field. Data represent mean $\pm$ S.D. ($n = 3$) and analyzed with one-way ANOVA with Tukey's test. Significant at ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. (b) Representative in vivo imaging system (IVIS) images of untreated rats (left), rats treated with DiR-IONPs@PLGA without a magnetic field (middle), and rats treated with IONPs@PLGA with a magnetic field (right). Copyright © 2025 Elsevier Ltd.

【結論】

本研究では、磁場応答性 DDS キャリアとして IONP@PLGA を開発し、磁場照射によるグリオーマ細胞への取り込み促進効果を確認した。さらに、ラットへの経鼻投与後に脳へ磁場を照射することで、脳移行性が向上することを実証した。一方で、脳内における薬物分布を精密に制御する段階には至っていない。今後、ピンポイントで磁場照射が可能な医療機器の開発と組み合わせることで、脳疾患治療への応用展開が期待される。

【謝辞】

この研究は渡邊財団 第 31 回磁気健康科学研究助成補助を受けて実施したものである。

【発表成果】

本論文の内容は以下の論文、シンポジウムにて報告したものである。

- K. Sato, K. Ogawa, S. Nabeshima, S. Suwabe, T. Ozeki. Fabrication and Application of Iron Oxide-Encapsulated PLGA Nanoparticles with Dual Responsiveness to Magnetic Fields and Light for Nose-to-Brain Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 107535 2025
- 小川昂輝, 諏訪部晋, 十時拓大, 鍋島彩羽希, 尾関哲也 Nose-to-Brain の効率を高める製剤技術とニューモダリティ医薬への応用 日本薬剤学会経肺経鼻 FG 2024 年度研究会 (招待講演)
- 小川昂輝, 尾関哲也 経鼻投与による脳移行

を促進する製剤設計と磁場応答性 DDS 令和年 7 年度・第 4 回超音波分子診断治療研究会 (招待講演)

行動停止のモニタ・調節を行う神経回路の解明：TMS と fMRI を 用いたマルチモーダル研究

Elucidating the neural circuits underlying the monitoring and adjustment of action
stopping: A multimodal study of TMS and fMRI

長田 貴宏
Takahiro Osada

順天堂大学医学部生理学第一講座，〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1
Department of Neurophysiology, Juntendo University School of Medicine
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421 Japan

Abstract

This study aimed to clarify neural circuits underlying the monitoring and adjustment of response inhibition. Using fMRI, resting-state network analysis, and TMS during a stop-signal task, we identified candidate fronto-parietal regions involved in post-error behavioral adjustment and found evidence suggesting that these regions contribute to subsequent stopping performance in a time-dependent manner.

Keywords: response inhibition, stop-signal task, functional MRI, transcranial magnetic stimulation, fronto-parietal network

1. 目的

反応抑制とは、不適切な行動を抑制し、状況変化に応じて適切な行動を選択する認知機能であり、ヒトの適応行動を支える重要な実行機能の一つである。例えば、歩き始めた直後に危険を察知して急停止する行動などに代表されるように、外界の変化に応じて行動を柔軟に制御するために不可欠である。また、その障害は注意欠如・多動症(ADHD)、強迫症、依存症など多様な精神・神経疾患と関連することが知られている。

これまでの研究により、反応抑制には下前頭皮質後部(posterior inferior frontal cortex: pIFC)、前補足運動野(presupplementary motor area: preSMA)、頭頂間溝(intraparietal sulcus: IPS)、大脳基底核などが関与することが示されてきた。我々はこれまで、機能的磁気共鳴画像法(functional magnetic resonance imaging: fMRI)と経頭蓋磁気刺激(transcranial magnetic stimulation: TMS)を組み合わ

せた研究により、右 pIFC 内に「行動停止」を担う腹側領域(ventral pIFC: vpIFC)と、「行動停止のモニタ・調節」に関与する背側領域(dorsal pIFC: dpIFC)が存在することを報告してきた^{1), 2)}。さらに近年、我々は fMRI, TMS, 経頭蓋超音波刺激(transcranial ultrasound stimulation: TUS)を組み合わせることで、視覚情報の処理から行動停止の実行に至る反応抑制の大規模脳回路を明らかにした³⁾。

一方で、行動停止後のモニタリングや次試行への行動調節を担う神経回路については、依然として不明な点が多い。特に、停止失敗後に脳内でどのような情報処理が行われ、その情報がどのように次の行動制御へ反映されるのかについては十分に解明されていない。

そこで本研究では、反応抑制における「行動停止のモニタ・調節」を担う神経回路の構成要素と、その時間的ダイナミクスを明らかにすることを

目的とした。特に、反応抑制失敗時に活動する脳領域の同定と、それらの領域に対する TMS 介入による因果的検証を行うことで、停止失敗後の行動調節過程の神経基盤解明を目指した。

2. 方法

健常成人を対象に、反応抑制課題であるストップシグナル課題(stop-signal task)⁴⁾を用いた fMRI 実験を実施した。本課題では、被験者は画面に提示される矢印刺激に応じて左右のいずれかのボタン押し反応を行う(ゴー試行)一方、一部の試行では停止信号(ストップシグナル)が提示され、その際には進行中の運動反応を抑制することが求められる(ストップ試行)。本研究では、特に反応抑制失敗時の脳活動に着目し、停止失敗後のモニタリングや行動調節に関与する脳領域の探索を行った。

fMRI データ解析では、反応抑制成功試行および失敗試行に関連する脳活動を比較し、失敗時に特徴的な活動を示す領域を抽出した。さらに、安静時 fMRI データを用いて、同定された候補領域間の機能的結合性を解析し、各脳領域がどのような大規模脳ネットワーク内に位置づけられるかを検討した。

加えて、fMRI および安静時ネットワーク解析に基づいて抽出された候補領域に対し、TMS による因果的介入実験を行った。被験者がストップシグナル課題を遂行している最中に、単発 TMS を用いて候補領域へ瞬時的な介入を行い、その後の反応抑制成績への影響を評価した。特に、試行中の異なるタイミングで刺激を行うことで、各脳領域が停止失敗後の行動調節に関与する時間帯について検討した。

3. 結果

fMRI 解析の結果、反応抑制失敗時に活動を示す領域として、過去に報告した dpIFC および IPS に加え、中前頭皮質(middle frontal cortex: MFC)および前補足運動野前部(anterior preSMA)が候補領域として抽出された。

dpIFC および IPS は、我々の過去の研究^{1),2)}において、反応抑制後の行動モニタリングや調節に関与する候補領域として示されていたが、本研究で

はさらに MFC および anterior preSMA の関与が示唆された。これらの領域は、停止失敗時に活動増加を示し、その後の行動修正に関わる可能性が考えられた。

また、安静時 fMRI に基づく機能的ネットワーク解析では、これらの領域が前頭—頭頂ネットワーク(fronto-parietal network)を中心とした広域ネットワーク内に位置づけられることが示唆された。この結果は、反応抑制失敗後のモニタリングや行動調節が、単一脳領域ではなく、複数の前頭・頭頂領域から構成されるネットワークにより支えられている可能性を示している。

さらに、単発 TMS による介入実験では、反応抑制失敗時の特定の時間帯に候補領域へ刺激を行った場合に、次のストップ試行の成績に影響が認められた(図 1)。刺激タイミングによって影響の現れ方が異なることから、停止失敗後には時間依存的な神経処理過程が存在し、その処理が次試行の行動制御へ反映されている可能性が示唆された。

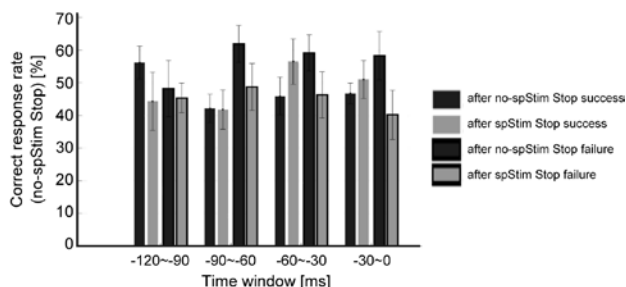


図 1：候補領域への単発 TMS 実験により、停止失敗時の特定の時間帯における神経処理が、次のストップ試行の成績に影響を及ぼす可能性が示された。

4. 考察

本研究では、反応抑制における「行動停止のモニタ・調節」を担う神経回路について、fMRI による活動解析、安静時 fMRI によるネットワーク解析、および TMS による因果的介入を組み合わせで検討した。

その結果、従来から候補領域として考えられていた dpIFC および IPS に加え、MFC および anterior preSMA が停止失敗後の行動調節に関与する可能

性が示された。特に、これらの領域が前頭—頭頂ネットワーク内に位置づけられたことは、反応抑制後のモニタリングおよび調節が、複数領域からなるネットワークダイナミクスにより支えられている可能性を支持する。

また、TMS による時間特異的介入実験では、停止失敗時の特定時間帯における神経活動が、次試行の反応抑制成績に影響を及ぼす可能性が示唆された。この結果は、反応抑制を単なる「止められたか/止められなかったか」という二値的過程として捉えるだけでは不十分であり、停止失敗後のモニタリング、行動評価、次試行への方略更新を含む動的制御過程として理解する必要性を示している。

さらに、本研究で得られた知見は、反応抑制障害を呈する精神・神経疾患における病態理解にも寄与する可能性がある。例えば、ADHD や強迫症などでは、単純な停止能力の低下だけでなく、停止失敗後の行動調節異常が存在する可能性が考えられる。本研究で示唆された神経回路は、そのような病態メカニズムを理解するための基盤となることが期待される。

謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団による第 31 回磁気健康科学研究助成の補助を受けて実施したものである。

参考文献

- 1) Osada T, Ohta S, Ogawa A, Tanaka M, Suda A, Kamagata K, Hori M, Aoki S, Shimo Y, Hattori N, Enomoto H, Shimizu T, Hanajima R, Ugawa Y, Konishi S. An essential role of the intraparietal sulcus in response inhibition predicted by parcellation-based network. *Journal of Neuroscience* 39: 2509–2521 (2019).
- 2) Osada T, Ogawa A, Suda A, Nakajima K, Tanaka M, Oka S, Kamagata K, Aoki S, Oshima Y, Tanaka S, Hattori N, Konishi S. Parallel cognitive processing streams in human prefrontal cortex: Parsing areal-level brain network for response inhibition. *Cell Reports* 36: 109732 (2021).
- 3) Osada T, Nakajima K, Shirokoshi T, Ogawa A, Oka S, Kamagata K, Aoki S, Oshima Y, Tanaka S, Konishi S. Multiple insular-prefrontal pathways underlie perception to execution during response inhibition in humans. *Nature Communications* 15: 10380 (2024).
- 4) Verbruggen F, Logan GD. Response inhibition in the stop-signal paradigm. *Trends in Cognitive Sciences* 12: 418–424 (2008).

交流コットン＝ムートン効果による 磁性リポソームのキャラクタリゼーション法の開発 Development of a characterization method for magneto-liposome by alternating current Cotton-Mouton effect

諏訪雅頼*
Masayori Suwa*

*大阪大学 大学院理学研究科, 〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1

*Graduate School of Science, The University of Osaka

1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043 Japan

Abstract

Magneto-liposomes, functionalized lipid bilayer vesicles containing magnetic nanoparticles (MNPs), are expected to serve as nanosized carriers for drug delivery systems. It is suggested that the magnetic response of magneto-liposomes strongly depends on the spatial distribution of MNPs in the vesicle. In this study, we have developed a characterization method for magneto-liposomes using the Cotton-Mouton effect under an alternating magnetic field.

Keywords: magneto-liposome, magnetic nanoparticles, Cotton-Mouton effect

1. 目的

磁性リポソームは、磁性ナノ粒子（MNP）を組み込むことで機能化した脂質二分子膜小胞であり、ドラッグデリバリーシステムのキャリアとして期待されている。磁場で磁性リポソームを標的部位に集積させ、さらに交流磁場の印加によるMNPの発熱や回転運動により膜の流動性を高めると、局所選択的な薬剤の放出が可能となる。また、MNPは磁気共鳴イメージングの造影剤となるため、標的組織への集積が確認できる。さらに、がん細胞をターゲットとした場合、磁気温熱療法と組み合わせた効率的な治療も期待できる。

磁性リポソーム中のMNPの空間分布の違いはその機能に強く影響する。例えば、膜に吸着しているか、内水相に浮遊しているかで薬剤放出の効率に変化する。脂質分子の組成や水相のイオン強度およびpH、MNPの表面修飾などによりこの空間分布は変化することが報告されており¹⁾、調製条件を変える度に確認が必要である。慣例的に透過型電子顕微鏡（TEM）で確認されているが、時

間と労力が必要、試料の乾燥により形状が変化、統計的処理が困難、といった問題がある。磁性リポソームのキャラクタリゼーションは、その分散液を直接測定可能な手法で行うのが望ましい。

MNPの分散液は大きなコットン＝ムートン効果(Cotton-Mouton Effect, CME)を示す²⁾。CMEは、MNPの磁場配向に起因する光学異方性(直線二色性と直線複屈折)の総称である。交流磁場下でCME(交流CME)を測定すればMNPの配向ダイナミクスを観測できる。本研究課題ではMNPの空間分布による交流CMEの違いを明らかにし、磁性リポソームのキャラクタリゼーション法として応用することを目的とする。

2. 方法

交流CME測定

交流CME測定には既存³⁾の装置を用いた(図1)。脂質二分子膜の相転移を精密に観測するため、コイル冷却のための循環水の設定温度と試料の温度の間の関係を詳細に調査し、20-60℃の範囲

で、目標温度 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ の精度で CME 測定を行った。交流磁場の強度は最大 15 mT, 周波数は 0.3 Hz - 40 kHz の範囲で掃引した。

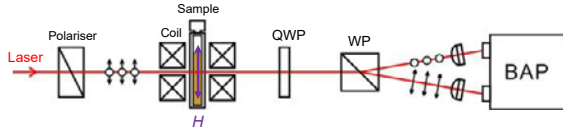


図1 交流 CME 測定装置. QWP: $\lambda/4$ 波長板, WP: ウォラストンプリズム, BAP: 差分増幅検出器. 光源として波長 785 nm の半導体レーザーを用いた。

MNP 分散液に誘起する CME は周波数 f の交流磁場 $H = H_0 \cos(2\pi ft)$ に対して $2f$ で振動し、光学遅延量は以下の式で表すことができる。

$$R_{2f} = R'_{2f} \cos(4\pi ft) + R''_{2f} \sin(4\pi ft)$$

R'_{2f} , R''_{2f} は光学遅延量の同位相成分（実部）と直交成分（虚部）にあたる。ロックインアンプを用いて R'_{2f} , R''_{2f} を精確に測定し、 f に対してプロットすることで、CME 周波数スペクトルを得た。MNP 分散液の CME 周波数スペクトルには、以下の Cole-Cole 式が良く当てはまる⁴⁾。

$$R_{2f} = \frac{R_0}{1 + (i4\pi f\tau_0)^\beta}$$

ここで、 R_0 は低周波数領域における振幅、 τ_0 は時定数で本研究の場合は配向緩和時間を反映する、 β は τ_0 の広がりを出すパラメータである。

磁性ナノ粒子

共沈法で合成したマグヘマイト ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) MNP を使用した。透過型電子顕微鏡像より、平均直径は 9 nm であった。表面修飾は施しておらず、 ζ 電位は +45 mV であった。

磁性リポソームの調製

広く用いられるリポソーム調製法であるバンガム法により調製した。エバポレーターを用いて丸底フラスコの壁に形成したジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) の薄膜に、MNP の分散液を添加して水和させることで磁性リポソーム分散液を調製した。さらにエクストルーダーにより、磁性リポソームの平均直径を揃えた。エクストルーダーに用いたフィルターは、ポア径 100 nm, 200 nm, 400

nm の三種を用いた。グリセロールの添加により外水相の粘度 η を調節した。

3. 結果

磁性リポソーム分散液の交流 CME は磁場の周波数 f に対して $2f$ で振動した。CME は MNP の磁場配向に起因するため、周波数依存性から MNP の配向緩和時間 τ_0 を見積もることができる。図 2a は磁性リポソーム分散液の CME 周波数スペクトルである。ここでは、直交成分（虚部）のみを示す。外水相の粘度が増加するに従って、ピークが低周波数側にシフトした。ピーク周波数の逆数から τ_0 を求めると、外水相の粘性率との比例関係が得られた（図 2b）。さらに、動的光散乱で得られたリポソーム直径から算出した回転緩和時間と τ_0 はよく一致した。この結果は、MNP が脂質膜に吸着し、リポソームとともに回転していることを示唆する。サイズの異なる磁性リポソームに対しても同様の結果が得られた。

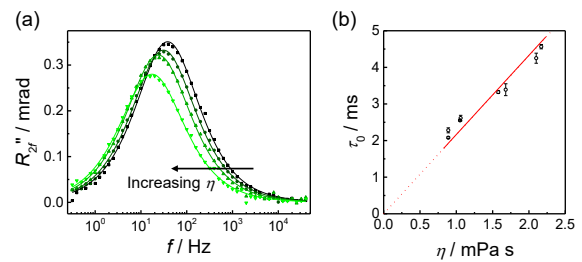


図2 (a) 交流 CME (虚部) の周波数依存性と (b) 回転緩和時間 τ_0 の外水相粘性率依存性。磁性リポソームの平均直径：200 nm。

図 3a に、磁性リポソーム分散液の分散液の交流 CME 周波数スペクトルの温度変化を示す。温度上昇に伴い外水相の粘度が低下するため、スペクトルのピーク位置は高周波数側に移動し、特に 40°C 付近で顕著なシフトが観測された。周波数スペクトルから見積もった τ_0 においても急激な減少が確認された（図 3b）。この温度は、DPPC 二分子膜のゲルー液晶相転移温度 ($T_m = 41^\circ\text{C}$) と一致する。高温側の液晶相では膜流動性が高くなることが知られている⁵⁾。ゲル相では、膜流動性が低く、リポソームの回転のみが MNP の配向緩和を担う。一方、液晶相では膜が流動性を持つため、膜内での MNP の回転とリポソームの回転の両方が配向緩和に寄与する。この相転移に伴う膜流動性の増

加により，スペクトルの急激な高周波シフトが生じたと考えられる．

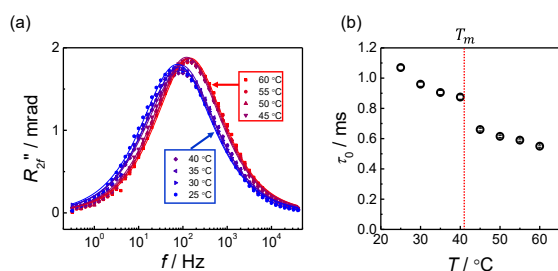


図3 (a)磁性リポソームの交流 CME 周波数スペクトル（虚部）と(b)緩和時間の温度変化

4. 考察

周波数スペクトルの外水相粘度依存性から MNP はリポソーム膜とともに回転していることが示された．また，温度依存性から MNP は膜に吸着していることが分かった．さらに， τ_0 から見積もられた磁性リポソームのサイズはエクストルーダーで使用したフィルターの孔径とほぼ等しく，磁性リポソームの会合していないことから，MNP は内水相側に吸着していることも示唆された．

このように，磁性リポソームの CME 周波数ス

ペクトルから，MNP の小胞内での空間分布に関する有用な知見が得られる．今後は，負に帯電した MNP や，異なる形状（例えばロッド状）の MNP を用いた磁性リポソームの CME 周波数スペクトルの測定を行い，本法の有効性を検証する．

謝辞

この研究は渡邊財団第 31 回磁気研究助成の補助を受けて実施したものである．透過型電子顕微鏡観察と動的光散乱測定は，大阪大学 大学院理学研究科 技術部 分析機器測定室の機器を使用した．

参考文献

- 1) M. E. F. Brollo, et al.: Phys. Chem. Chem. Phys. 20, 17829-17838 (2018)
- 2) J. Peterson, E. L. Bominaar: Anal. Chem. 74, 527A-533A (2002)
- 3) M. Suwa, et al.: Anal. Chem. 97, 9239-9247 (2025)
- 4) M. Suwa, et al.: J. Appl. Phys. 134, 233902 (2023)
- 5) R. Biltonen, D. Lichtenberg: Chem. Phys. Lipids, 64, 129-142 (1993)

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
Photothermal chemical nanotherapeutics that simultaneously achieve magnetic
imaging and treatment

佐藤和秀*, **

Kazuhide Sato*, **

*名古屋大学大学院医学系研究科, 〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65

**名古屋大学高等研究院医工連携ユニット, 〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65

*, **Nagoya University, School of Medicine

65Tsuruma-cho, Showa-ku, Nagoya city, AICHI, 466-8550, Japan

Abstract

Conjugation of mAb-IRDye700DX (mAb-IR700) to dextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (nanomag-D-spio) yielded nanomag-D-spio-mAb-IR700, enabling dual imaging (IR700 fluorescence/MRI) and targeted cytotoxicity upon 690-nm irradiation. The conjugate retained antigen selectivity, exhibited activatable NIR fluorescence after cellular uptake, generated negative T1- and T2-weighted MRI contrast, and demonstrated robust, cycle-enhanced photothermal performance.

Keywords: iron nanoparticle, near infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT), theranostics imaging, magnetic resonance imaging (MRI), photothermal therapy (PTT)

1. 緒言

抗体製剤、近年特に抗体薬物複合体（ADC； antibody drug conjugates）ががん治療や感染症治療のキードラッグとなりつつある。このような中で、申請者は ADC として、抗体に光感受物質を付加した近赤外光線免疫療法（Near Infrared Photoimmunotherapy; NIR-PIT）の研究を遂行してきた¹。本治療は、抗体・ひかり感受物質が腫瘍標的的部位に結合した後に近赤外光を照射することで、光化学反応がおきて細胞破碎する、これまでの抗癌モダリティとは完全に異なる機序を用いた治療で、筆者らがその光化学反応細胞死を 2018 年に証明している²。この細胞死の特異性によって、NIR-PIT は「第5のがん治療」として注目されて期待されている（図1）。さらに筆者らはその詳細な分子メカニズムを明らかにして新規細胞死“Photochemosis”と名付けた³。

ADC の問題点として、患者さんごとに効果がばらつき、その原因として患者さんごとに標的の抗原発現がばらついている、ADC の代謝が患者さんごとに違うことが挙げられる。ADC の投与に対し

てどの程度標的に結合しているか分かれば、ADC の最適化を図ることができると考えられる。さらに NIR-PIT に関しては、光照射前の標的結合が定量できれば、柔軟に光照射の量を変化させ最適化することで患者さんへの治療効果を最大化することが可能となりうる。これらの問題点を解決するために、抗体製剤、ADC を投与した際に実際にどの程度患者さんの標的病変部位に集積しているかを既存の画像イメージングで評価できれば画期的である。本研究により、いまだ完治に至らないがんへの、次世代型光複合がん治療基盤を確立し、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を目的とした。

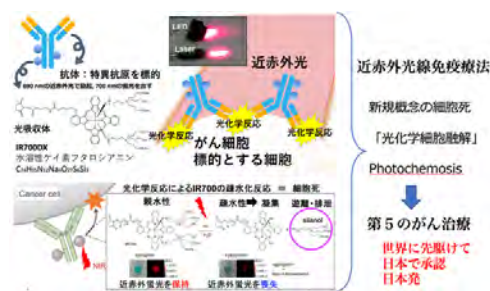


図1. NIR-PIT の概要

2. 方法

2.1 抗体付加

カルボジイミド化合物によるカルボン酸の架橋を介して panitumumab-IR700 と結合した (Antibody Fe-nano conjugates; AFC, pan-IR700-AFC)。作成薬剤の透過型電子顕微鏡写真は JEM-F200 顕微鏡を用いて撮影された。薬剤の吸光度は UV-1900i Plus (島津社) にて測定した。

2.2 薬剤性質評価方法

磁気特性は振動試料磁気計 (リケン電子) を用いて検出された。MR 画像は MR イメージャー (MR VivoLVA) を用いて取得された。リアルタイム温度付き熱画像は FLIR C2 IR サーマルカメラ (FLIR Systems, Inc.) を用いて記録した。690nm レーザー照射は MLL-III-690 (長春新産業光電技術有限公司) を用いて照射した。フェントン反応は、1 mM GSH 溶液と薬剤混合物を 10 μ g/mL メタクロロベンゼン (MB) および 20 mM 過酸化水素 (H_2O_2) と共に、異なる pH 値 (5.4、6.4、または 7.4) および異なる温度条件下で試験した。NIR 光照射下での強化された $\cdot OH$ 生成を調査するため、pH 5.4 の条件下で 10 μ g/mL の MB と 20 mM の H_2O_2 を添加した後、レーザー照射 (200 mW/cm²) を行った。対照群として、同じ濃度の各サンプルに 10 μ g/mL の MB を混合した。 $\cdot OH$ 生成は MB 分解に基づき評価され、分光光度法による吸光度減少で測定した。

2.3 in vitro 細胞評価方法

EGFR を過剰発現する A431、MDA-MB-468 細胞、EGFR 低発現の H661 への結合をフローサイトメトリで測定して評価した。細胞 (1×10^5) を pan-IR700-AFC と共に RPMI-1640 完全培地中で 37°C、6 時間インキュベートした。新規結合体の結合特異性を確認するため、過剰量のパニツムマブ (1 μ g) を添加した競合アッセイを実施した。細胞はフローサイトメーター (DxFLEX; Beckman Coulter) で解析し、結果は FlowJo v10 (Beckman Coulter) を用いて解析した。

蛍光顕微鏡観察は A1Rsi; Nikon Instech にて実施した。A431 細胞 (2×10^4) をガラス底ディッシュに播種し、24 時間培養した。その後、培養液に 10 μ g/mL の pan-IR700-AFC を添加し、37°C で 6 時間培養した。続いて細胞を PBS で 2

回洗浄した。細胞死を検出するプロピジウムイオダイド (最終濃度 2 μ g/mL)、SYTOX blue (最終濃度: 2 μ g/mL) を顕微鏡観察の 20 分前に添加した。細胞を NIR 光 (16 J/cm²) に照射し、連続的な顕微鏡画像を取得した。

2.4 in vivo イメージング評価

すべての *in vivo* 処置は、名古屋大学動物実験委員会の方針に準拠して実施された。マウスはすべて SLC ジャパン株式会社より購入した。実験処置中は、イソフルランを用いてマウスを麻酔した。生後 8~12 週齢の Balb/C-Slc-nu/nu マウスに対し、右側の背部に A431-luc-GFP 細胞 (2×10^6 個) を接種した。腫瘍が 1 cm を超えたものを使用した。IR700 蛍光イメージングは、PEARL (LICOR 社) を用いて、MRI イメージングは MR VivoLVA を用いて撮像した。

3. 結果

3.1 鉄ナノ粒子への抗体付加

鉄ナノ粒子と抗体 (抗 EGFR 抗体 panitumumab) ・ IR700 を COOH 官能基の縮合反応により鉄ナノ粒子・抗体複合体 (Antibody Fe-nano conjugates; AFC) を作成した (pan-IR700-AFC/以下 AFC)。鉄ナノ粒子のサイズは 20nm のものを用いた (図 2a)。抗体は抗 EGFR の panitumumab を使用した。条件を複数検討した後に反応を行い、薬剤を作成した。吸光度での評価では、抗体 IR700 の吸光度は鉄ナノ粒子の付加で消失し、クエンチした (図 2b)。

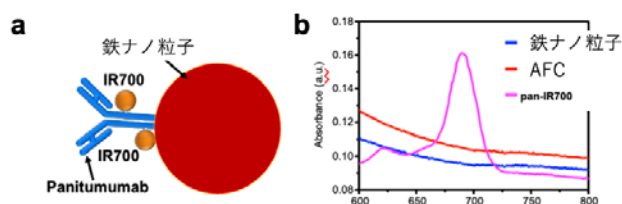


図 2. 鉄ナノ粒子・抗体複合体 (Antibody Fe-nano conjugates; AFC) の性質

- AFC の構成: panitumumab-IR700 と鉄ナノ粒子の結合模式図
- AFC、鉄ナノ粒子、pan-IR700 の吸光波形

3.2 AFC の磁性イメージング評価と光温熱高価、フェントン反応

- 2.1 で作成した AFC の MRI の T1 強調、T2 強調

条件での陰性造影効果を検討して評価した。濃度依存的な陰性造影効果が得られた(図 3a)。また、690nm の近赤外光照射による光温熱効果を検討し、良好な温度上昇を得た(図 3b)。また、メチレンブルーを用いたフェントン反応の検討では、光照射量依存的な促進が見られ、光温熱効果に加えて、Chemodynamic Therapy (CDT) の効果が得られることが判明した(図 3c)。本材料の熱変換効率(PCE)は 29.21%であり、十分な光温熱効果が得られると判明した。

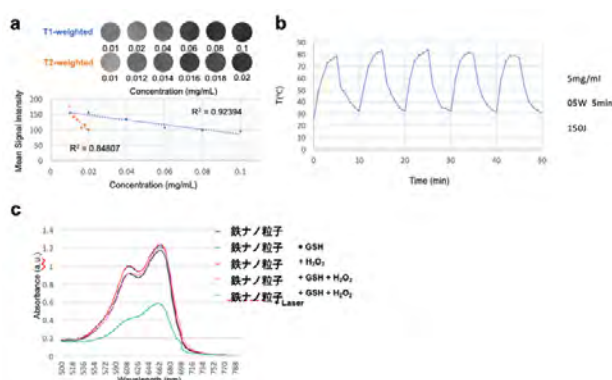


図 3. 鉄ナノ粒子の MRI 造影能、光温熱能、フェントン反応

- 鉄ナノ粒子の MRI 陰性造影能
- 鉄ナノ粒子の光温熱効果
- 鉄ナノ粒子のフェントン反応

3.3 AFC の activatable 蛍光プローブと磁性イメージングの *in vitro* 評価

図 2b の結果から、フェルカルボトランナノ粒子によって、pan-IR700 の蛍光がクエンチし、AFC は蛍光を保持していないと考えられた。細胞内での代謝によるデクエンチ (再発光) の可能性を検討するために、10%SDS を添加してデクエンチングを検討した。SDS 添加にて、クエンチしていた蛍光が出現し、2-3 倍となった(図 4a)。このことから、AFC は細胞に結合し、エンドサイトーシスして細胞内に入った後に蛍光を発するアクチベータブルプローブであることが判明した。さらに血中での安定性を検討するために、マウス血清で評価したところ、血中ではデクエンチングが起きずに安定していることが判明した(図 4b)。

標的性を検討するために、EGFR 高発現がん細胞 (乳癌; MDAMB-468, 皮膚がん; A431) と EGFR 低/無発現がん細胞 (肺がん; H661, マウス細胞; 3T3)

をもちいた AFC の結合をフルーサイトメーターを用いて検討した。EGFR 高発現細胞では pan-AFC の蛍光が観察され、また panitumumab 過剰添加によってその蛍光が阻害されることから、特異的に結合していると考えられた。一方、EGFR 低・無発現細胞では蛍光を測定できず、結合していないことが判明した(図 4c)。また、細胞塊に結合した状態でチューブにて画像化したところ、AFC が結合している場合は MRI で陰性造影剤、IR700 がある場合は蛍光でも評価できた(図 4d)。

次に、*in vitro* での細胞死効果の検討では、photochemosis の効果で 690nm の光照射によって pan-IR700, AFC とともに細胞死が誘導されるが、AFC のほうが細胞死が優位に誘導されており、これは、AFC のフェントン反応による効果や温熱効果の加算が考えられた(図 4e)。

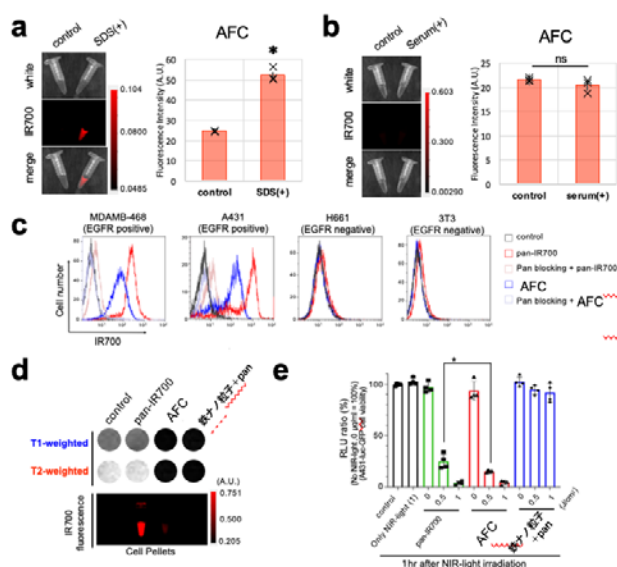


図 4. AFC の性質と標的細胞死効果

- AFC のデクエンチング能評価
- AFC の血中安定性の評価
- AFC の標的細胞結合性の蛍光評価
- AFC 結合細胞塊の MRI 造影能と蛍光評価
- AFC の標的細胞結合と 690nm 光照射による細胞死誘導の定量評価

3.4 AFC の activatable 蛍光プローブと磁性イメージングの *in vivo* 評価

In vivo での磁性イメージング評価と IR700 蛍光の評価をするために、マウスヒト腫瘍異種移植モデルを用いた AFC の静脈投与による体内動態評

価を行った(図 5a)。もともと T1,T2 強調の MRI にて高 intensity に撮像される腫瘍部分が、1 時間～9 時間にかけて徐々に陰性化していく画像経過がわかる。12 時間から 1 日にピークに達した後、2 日目から再度薬剤が抜けていき、7 日後には投与前に戻るような動態が MRI 分子標的陰性造影剤として検出された(図 5b)。IR700 蛍光は投与直後から徐々に増加し 9～12 時間でピークに達したのち 2 日目まで保たれ、3 日目から徐々に蛍光が低下していくことがわかった(図 5b)。このことから、AFC は分子標的造影薬として IR700 の蛍光と磁性粒子の MRI 陰性造影剤としてデュアルイメージング剤として使用できることがわかった。

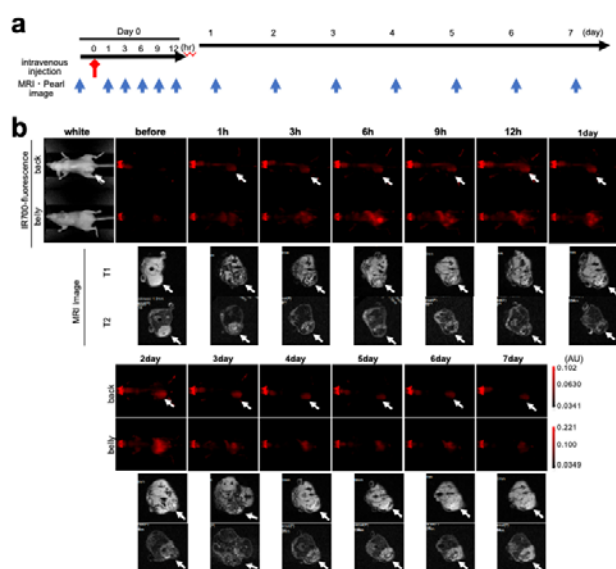


図 5. AFC の in vivo 薬物動態と標的腫瘍への効果

- MRI と IR700 蛍光 in vivo 評価のイメージング手順
- マウス腫瘍モデルの IR700 蛍光画像と MRI 画像の時間経過

4. 考察

我々は、パニツムマブ-IR700 と鉄ナノ粒子(デキストラン被覆超常磁性酸化鉄)を統合することで、AFC を作成し、磁気追跡可能な EGFR 標的 NIR-PIT プラットフォームを開発した。これにより MRI 可視性があり、かつ近赤外照射下で細胞毒性を示す単一の診断剤が得られた。*in vitro* では、この複合体は EGFR 選択性を保持し、単体のパニツ

ムマブ-IR700 よりも強い細胞死を誘導した。これは、NIR-PIT の光化学的細胞死メカニズム(Photochemosis)が相乗的に増強され、さらに PTT (光熱療法)、CDT (光化学的細胞死) が加わることを示唆している。これらの複数の細胞死メカニズムが抗腫瘍効果の増強につながると考えられた。NIR-PIT の薬剤がどの程度結合しているかを評価できる新しいプラットフォームとして機能すると期待できる。

今後、マウスモデルを用いた検討を行い、前臨床試験としての効果を検証していきたい。効果が確認できれば、NIR-PIT, CDT, PTT を複合的に同時発出できる薬剤となりうる。無機粒子の薬剤は認可されておらず、今後の研究を継続したい。

5. 文献

1. Mitsunaga M, et al., Nat Med. 2011 Nov 6;17(12):1685-91.
2. Sato K, et al., ACS Cent Sci. 2018 Nov 28;4(11):1559-1569.
3. Sato K, et al., ACS Nano. 2025 Mar 4;19(8):8338-8356.

超偏極 ^{13}C -ピルビン酸を用いた磁気共鳴分光法による

脳内エネルギー代謝の空間的可視化と応用

Spatial visualization of brain energy metabolism by magnetic resonance spectroscopy using hyperpolarized ^{13}C -pyruvate and its application

小野麻衣子

Maiko Ono

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構量子生命科学研究所,

〒263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1

Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum Science and Technology

4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba 263-8555 Japan

Abstract

Abnormalities and alterations in the glycolytic pathway in the pathology of neurodegenerative diseases and brain aging have recently received much attention. Hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate magnetic resonance spectroscopy (MRS) holds great promise for neurological applications because it enables real-time detection of glycolytic and oxidative phosphorylation fluxes in vivo. In this study, we compared hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate metabolism in the brains of awake mice and isoflurane-anesthetized mice using a custom-built awake mouse restraint device with MR spectroscopic imaging (MRSI), which enables spatial mapping of metabolism. Furthermore, we compared hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate metabolism in the brains of young and aged mice using awake MRSI. The results demonstrated that hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate MRSI under awake conditions is useful for the spatial detection of abnormalities and alterations in glycolysis and oxidative phosphorylation flux in the brains of mice. Thus, the use of hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate MRSI has potential in pathological and mechanistic studies of brain diseases and brain aging.

Keywords: hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate, chemical shift imaging, mouse brain, awake condition, aging

1. 目的

超高齢社会の進展に伴いアルツハイマー病の罹患数が増加しているにも関わらず、その発症メカニズムは未だ明らかではない。近年、アルツハイマー病の病像として、代謝異常との関連が注目されている。ピルビン酸は解糖系代謝と好氣的代謝の交差点であり、脳のエネルギー代謝においては、アストロサイトでピルビン酸から産生された

乳酸が神経細胞に供給され利用される、アストロサイト-ニューロン乳酸シャトルが仮定されている(図1)。著者らはこれまでに、アルツハイマー病患者脳の後部帯状回における反応性アストロサイトと乳酸濃度の上昇が、疾患の重症度と関連することをプロトン核(^1H)磁気共鳴分光法(MRS)の臨床応用にて明らかにしている¹⁾。また、ヒト脳では加齢に伴いグルコース代謝が低下

することが、陽電子放出断層撮影法を用いた臨床研究により示唆されている²⁾。本研究では、アルツハイマー病態や加齢に伴うエネルギー代謝変調の詳細を生体脳で明らかにすることを目的として、生体内のピルビン酸代謝の高感度リアルタイム計測を可能にする超偏極 MRS 技術の神経学的応用を実施する。超偏極 $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸を造影剤としてマウス脳内のエネルギー代謝を空間的に可視化するために、覚醒下安静時のマウス脳における超偏極 MRS 評価を可能にする測定系を構築する。さらに、この測定系により老齢マウスの生体脳イメージングを実現し、生体脳内のエネルギー代謝変化という新規性の高い生体情報を脳の発達や老化のメカニズム解明に挑む基礎神経科学研究や脳疾患病態研究にもたらし得る応用例を提示することを目的とする。

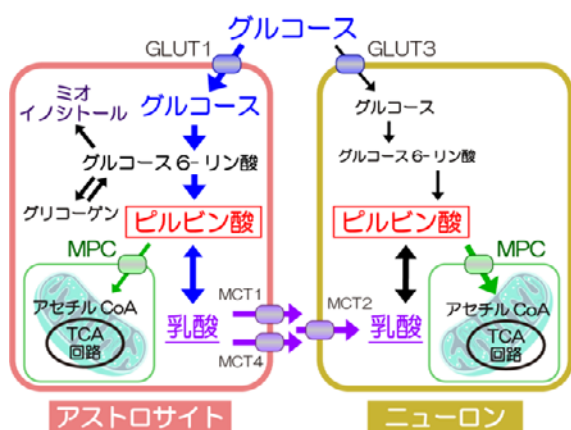


図1. 脳のエネルギー代謝（アストロサイト-ニューロン乳酸シャトル）

2. 方法

覚醒下とイソフルラン麻酔下マウスでの超偏極 $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸の脳内代謝を比較するため、MRI で使用可能な覚醒マウス固定装置と、マウスを装置上に固定するためのヘッドプレートを作成し、測定システムを開発した（図2）³⁾。実験には、2 か月齢の C57BL/6N マウス、および、2.5 か月齢（若齢）ないしは 19 か月齢（高齢）の C57BL/6J マウスが用いられ、イソフルラン麻酔下でマウス頭蓋骨にヘッドプレートが装着された。超偏極 MRS 計測は BioSpec 3T preclinical MR scanner（Bruker Biospin 社製）を用いて実施された。覚醒マウス固定装置に固定されたマウスを MR

scanner 内に配置した後、T2 強調画像を取得した。その後、尾静脈から超偏極 $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸溶液（ $10\mu\text{L/g}$ body weight）を投与し、その 4 秒後から ^{13}C FID chemical shift 画像を取得した。各代謝物のピーク値を測定し、それを T2 強調画像に重ね合わせることで、超偏極 ^{13}C 代謝物マップを作成した。

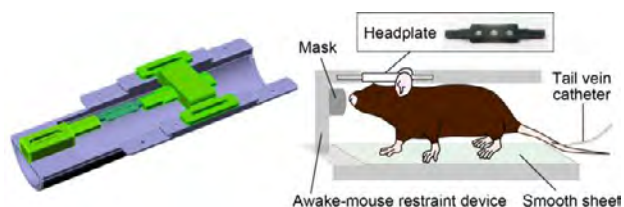


図2. 覚醒マウス固定装置の設計図（左）と模式図（右）

3. 結果

覚醒下安静時のマウス脳における超偏極 MRS 評価を可能にする測定系の構築

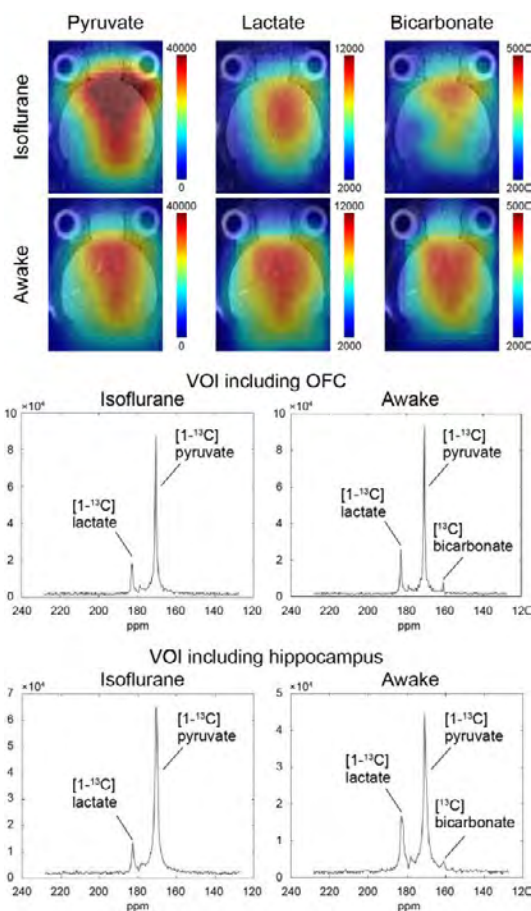


図3. イソフルラン麻酔下（isoflurane）および覚醒下（awake）C57BL/6N マウスの眼窩前頭皮質

(OFC) および海馬における超偏極 $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸代謝の MRS イメージング (MRSI) を用いた評価

開発した覚醒マウス固定装置と代謝を空間的に可視化する MRSI 手法を用いて、イソフルラン麻酔下と覚醒下マウスでの超偏極 $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸の脳内代謝を比較した。解糖系フラックスの指標となる $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸から代謝された乳酸のシグナルは、OFC および海馬を含む複数の領域で検出された (図 3)³⁾。酸化リン酸化フラックスの指標となる $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸から代謝された重炭酸塩のシグナルは、イソフルラン麻酔下の OFC および海馬では検出限界以下であったが、覚醒下では検出可能であった。

覚醒下超偏極 $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸 MRSI を用いた加齢に伴う脳内エネルギー代謝変化の解析

覚醒下 MRSI を用いて、若齢および高齢マウス脳の超偏極 $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸代謝を比較した。乳酸/ピルビン酸比には若齢・高齢マウス間で有意な差がみられなかった (図 4)³⁾。また、OFC における重炭酸塩/ピルビン酸比には若齢・高齢マウス間で有意な差がみられなかったが、海馬の重炭酸塩/ピルビン酸比は若齢マウス脳と比較して高齢マウス脳の海馬で有意に低下していた。

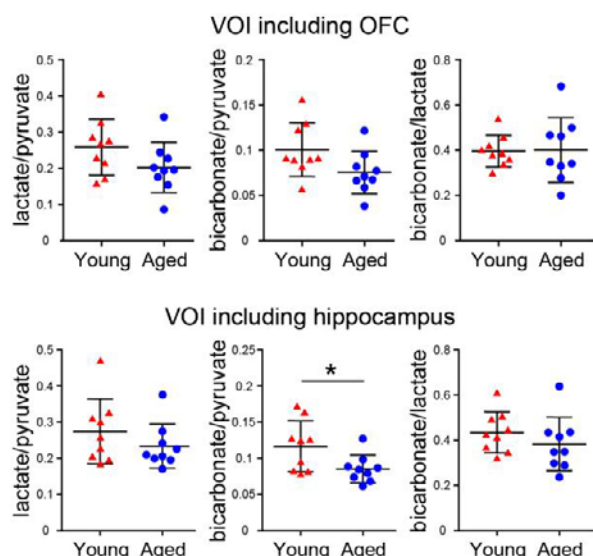


図 4. 覚醒下 MRSI を用いた若齢 (young) および高齢 (aged) C57BL/6J マウス間での眼窩前頭皮質および海馬における超偏極 $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸代謝

の比較

4. 考察

本研究結果は、覚醒マウス脳における超偏極 $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸から乳酸および重炭酸塩への代謝の空間マッピングの実現可能性を示している。さらに、構築した覚醒下マウス脳における超偏極 MRSI 評価系は、マウスの海馬を含む脳領域における加齢に伴う酸化的リン酸化フラックスの減少を描出し、これらの変化の程度は脳領域間で異なることを明らかにした。本研究は、覚醒条件下での超偏極 $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸 MRSI が、現在疾患モデル動物として広く用いられているマウスの脳における解糖系および酸化的リン酸化フラックスの異常および変化の空間的検出に有用であることを実証した。今後、脳疾患の病態研究や疾患修飾薬の評価、ならびに脳の発達や老化のメカニズム解明に挑む基礎神経科学研究における、超偏極 $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸 MRSI の活用が期待される。

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。また、本内容は 2025 年 8 月 30 日に兵庫で開催された『第 10 回国際磁気共鳴医学会・日本支部学術集会』で報告したものである。

参考文献

- 1) Hirata K, et al. Altered brain energy metabolism related to astrocytes in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 95(1):104-115 (2024).
- 2) Subtirelu RC, et al. Aging and cerebral glucose metabolism: ^{18}F -FDG-PET/CT reveals distinct global and regional metabolic changes in healthy patients. *Life (Basel)* 13(10):2044 (2023).
- 3) Ono M, et al. Awake brain MRSI reveals anesthetic sensitivity and regional aging effects on $[^{13}\text{C}]$ bicarbonate metabolism in mice. *Front Neuroimaging* 4:1506126 (2025).

経頭蓋磁気刺激による神経調節と

脳磁図による脳活動計測の融合

Combining Transcranial Magnetic Stimulation and Magnetoencephalography

代田悠一郎*

Yuichiro Shiota*

*東京大学医学部附属病院検査部, 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

*Department of Clinical Laboratory, the University of Tokyo Hospital

7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033 Japan

Abstract

This study aimed to bridge transcranial magnetic stimulation (TMS) and magnetoencephalography (MEG) by integrating experimental and computational approaches. First, motor evoked potentials (MEPs) were successfully recorded from trunk muscles, identifying optimal stimulation parameters. Second, the precision and accuracy of resting motor threshold (RMT) estimation were quantitatively evaluated, demonstrating early convergence of precision and later achievement of accuracy. Finally, simulation studies based on the Lorentz reciprocity theorem were initiated to estimate TMS-induced electric fields. These findings contribute to improving the reliability and interpretability of TMS-based neuromodulation.

Keywords: transcranial magnetic stimulation (TMS), magnetoencephalography (MEG)

1. 目的 PURPOSE

非侵襲的脳刺激法のうち経頭蓋磁気刺激 (transcranial magnetic stimulation; TMS) は, ヒトの脳を非侵襲的に刺激して活動電位を生じさせることのできる唯一の方法である. 一方で脳磁図 (magnetoencephalography; MEG) は脳波よりも優れた空間分解能を有し, 磁気共鳴画像 (MRI) にはない高い時間分解能で神経活動の源を推定できる手法である. 両者を有機的に組み合わせた研究は少なく, 本研究ではこれら二つの手法の橋渡しを目指した.

TMSにおいては, 一定のリズムで刺激を繰り返す反復 TMS (rTMS) により神経精神疾患の治療効果が得られることに大きな注目が集まっている. 一方で rTMS により設定しうるパラメータ空間は広大であるため, はじめから治療研究を計画

することは合理的でも効率的でもない. TMS・rTMS の効果を推定するためのパラメータとして, 一次運動野に対する TMS により得られる運動誘発電位 (motor evoked potential; MEP) が現在も広く用いられている. そこで本研究では, まず TMS-MEP による新たな被検筋の開拓を目指して「2-1 体幹筋での MEP 導出」に, また TMS-MEP における重要な指標である安静時運動閾値 (RMT) 計測の検査性能を評価するために「2-2 TMS-MEP の精密度と正確さ」に取り組んだ. この両者は既に論文としてその成果を報告している^{1,2)}. さらに MEG の接続という点では, Lorentz の相反性定理 (Lorentz's reciprocity formula)に着目して「2-3 TMS 効果推定シミュレーション」を手掛けている.

2. 方法 METHOD

2-1 体幹筋での MEP 導出

本研究では健常成人を対象として、経頭蓋磁気刺激 (TMS) により体幹筋、特に外腹斜筋からの運動誘発電位 (MEP) 導出を試みた。若年群および高齢群を対象とし、TMS 禁忌のない被験者から文書同意を取得した。刺激にはダブルコーンコイルを用い、国際 10-20 法に基づく Cz 周辺を基準として刺激部位を探索し、最大振幅の MEP が得られる刺激点を同定した。さらに若年群では同一部位においてコイル方向を 45 度刻みで 8 方向に変化させ、導出に適した刺激方法を探索した。筋電図は右外腹斜筋より表面電極で記録し、被験者には最大随意収縮の 30% 程度の軽度収縮を維持させた状態で測定を行った。随意収縮時運動閾値 (AMT) を各条件で決定し、その 120% 強度で反応を記録した。刺激は左右半球それぞれに対して行い、対側および同側刺激の差異を検討した。得られた MEP については潜時および閾値を指標として解析した。

2-2 TMS-MEP の精密度と正確さ

臨床検査医学においては、検査精度を精密度 (precision) と正確さ (accuracy) の二つの側面から評価する。本研究では、TMS による RMT の検査性能を評価するため、精密度 (同一条件下での測定値のばらつきの小ささ) および正確さ (測定値が真の値にどれだけ近いか) の観点から検討を行った。対象は健常成人 53 名とし、右第一背側骨間筋から MEP を記録した。刺激には 8 の字コイルを用い、MEP 振幅 0.05 mV および 0.2 mV を基準とする 2 条件 (RMT0.05, RMT0.2) を設定した。閾値推定には最尤推定を応用した逐次アルゴリズムであるいわゆる threshold hunting 法を用い、各条件につき 30 試行を取得した。精密度は直近 3 試行の推定値が $\pm 2\%$ MSO 以内に収まるかにより判定し、正確さは各試行の推定値が最終 6 試行の平均値に対して $\pm 5\%$ 以内に入るかにより評価した。さらに、これらの基準を満たし以降も維持される最初の試行を収束点として定義し、全セッションを統合して解析した。

2-3 TMS 効果推定シミュレーション

近年 MEP のほか脳波 (electroencephalography; EEG) を用いて TMS 効果を推定する試みも行わ

れている。本研究では、Lorentz の相反性定理に基づき MEG の逆問題と TMS の刺激効果予測順問題の対応関係を考察した報告³⁾に着目し、頭部モデルを用いた数値シミュレーションにより TMS による誘導電場の推定法改善を試みた。具体的には SimNIBS を用いて組織パラメータを変化させ、脳内電場分布への影響を検討した。

3. 結果 RESULTS

2-1 体幹筋での MEP 導出

外腹斜筋における MEP は、対側刺激では全被験者から安定して記録された一方、同側刺激では若年群・高齢群ともに一部の被験者でのみ導出可能であった。コイル方向の検討では、脳内に前内側 (antero-medial) 方向の電流を誘導する条件において、対側・同側いずれの刺激でも最短の潜時と最も低い AMT が得られた (図 1, 文献 1 より引用)。さらに同一条件下で比較すると、対側刺激は同側刺激に比して有意に短い潜時および低い AMT を示した。以上より、体幹筋に対する TMS においては前内側方向の電流誘導が最適な刺激条件であり、皮質脊髄路の効率的な賦活に寄与することが示唆された。

2-2 TMS-MEP の精密度と正確さ

本研究では、RMT の推定における精密度および正確さの時間的推移を、全 185 セッションのデータを統合して評価した。結果、精密度 (precision) は比較的早期に達成され、約 11 試行以内に 95% 以上のセッションで基準を満たした (図 2, 文献 2 より引用)。一方、真の閾値への近接性を示す正確さ (accuracy) については、より多くの試行を要し、RMT0.05 および RMT0.2 のいずれの条件においても、おおむね 18 試行程度で 95% のセッションが基準に到達した。すなわち、閾値推定においては初期段階で安定した推定 (精密度) は得られるものの、その値が真の閾値を適切に反映するためには、追加の試行を重ねる必要があることが示された。

2-3 TMS 効果推定シミュレーション

本パートは未だ完成に至っていないが、個人の MRI 画像を用いて生体組織ごとのパラメータを変化させることで誘導電場の大きさや分布に変化が生じることが示唆されている。

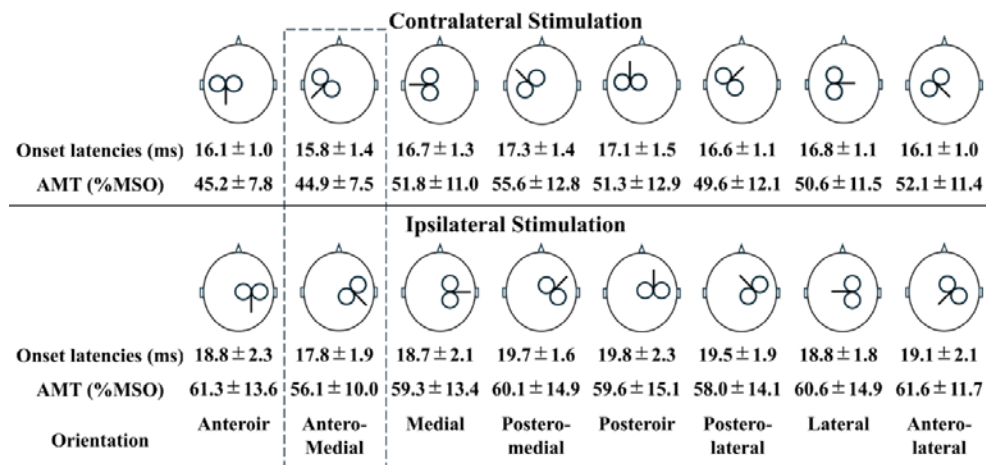


図 1：対側・同側刺激における外腹斜筋からの MEP 潜時および AMT

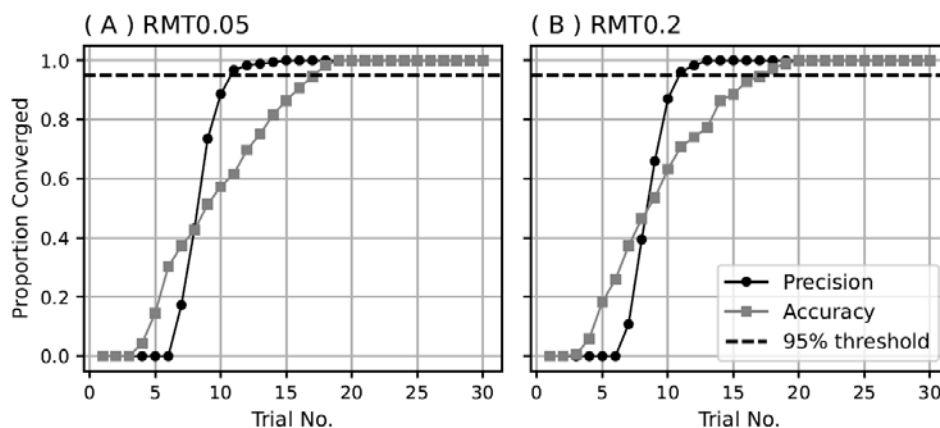


図 2：Threshold hunting 法による RMT 推定の精密度と正確さ

参考文献

4. 考察 DISCUSSION

本研究においては、TMS を用いたヒトでの実計測を先行させ、これを裏付けるための MEG や逆問題を用いた推定法改善に取り組むことで両者の融合を目指した。その結果として、TMS-MEP に関する論文発表を行うことができた。MEG との橋渡し部分に関しては残念ながら論文報告に足る結果が未だ得られていないが、今後の(r)TMS の効果予測精度向上に向け有意義なデータが得られている。

謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団第 31 回磁気健康科学研究助成の補助を受けて実施したものである。

- 1) Miyano R, Shirota Y, Kodama S, et al. Ipsilateral and contralateral cortical control of the external oblique muscles revealed by TMS. *Clinical Neurophysiology*. 181: 2111400, 2026.
- 2) Shirota Y, Otsuka J, Hamada M. Precision, accuracy, and reliability of a threshold hunting method for transcranial magnetic stimulation. *Clinical Neurophysiology Practice*. 11:24–31, 2026.
- 3) Núñez Ponasso G, Drumm DA, Wang A, et al. High-definition MEG source estimation using the reciprocal boundary element fast multipole method. *NeuroImage*. 320:121452, 2025.

磁性化間葉系幹細胞を利用した新規がん磁気温熱化学療法の開発

Development of a novel cancer magnetothermal chemotherapy using magnetized mesenchymal stem cells

河野 裕允

Yusuke Kono

神戸薬科大学, 〒658-8558 兵庫県神戸市東灘区本山北町 4-19-1

Kobe Pharmaceutical University

4-19-1 Motoyamakita-machi, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo 658-8558 Japan

Abstract

In this study, we aimed to develop an effective cancer magnetothermal chemotherapy using liposome-modified mesenchymal stem cells (MSCs) in combination with an alternating magnetic field (AMF). Gemcitabine-loaded liposome-modified MSCs significantly inhibited tumor growth, and its effect was further enhanced in combination with hyperthermia. On the other hand, the anti-tumor efficacy of liposome-modified MSCs was not enhanced by the presence of AMF exposure. This may be attributed to the insufficient magnetic flux density of the AMF generator used in this study. Currently, we are investigating the optimization of parameters, such as the particle size of iron oxide magnetic nanoparticles and their loading amount into MSCs to achieve efficient heat generation under an AMF.

Keywords: cancer magnetothermal chemotherapy, liposome, mesenchymal stem cell

1. 目的

がん細胞は、正常細胞と比較して熱感受性が高く、また熱刺激を受けたがん細胞は抗がん剤感受性が高くなることが知られている。この性質に着目して、酸化鉄磁性ナノ粒子と交流磁場の併用による腫瘍局所の加温と抗がん剤を組み合わせた「がん磁気温熱化学療法」が、効果的な新規がん治療法となることが期待されている。本治療法を構築する上では、磁性ナノ粒子と抗がん剤を腫瘍組織へいかに選択的にかつ同時に送達するかが、有効性・安全性を決定する重要な要因となる。

我々はこれまでに、抗がん剤および酸化鉄磁性ナノ粒子を内封したリポソームを間葉系幹細胞(MSC)表面に修飾したリポソーム修飾 MSC を開発し、リポソーム修飾 MSC が抗がん剤および酸化鉄磁性ナノ粒子を安定に搭載した状態で腫瘍

組織へ集積することを明らかにしている。¹⁾

そこで本研究では、リポソーム修飾 MSC と交流磁場を用いた効果的ながん磁気温熱化学療法の開発に取り組んだ。

2. 方法

ゲムシタビン内封リポソーム修飾 MSC の作製：

我々が開発した酸化鉄磁性ナノ粒子内封負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体に抗がん剤ゲムシタビンを封入した。その後、マウス骨髄由来 MSC に対して複合体を添加し、30 分間磁場存在下で培養することでリポソーム修飾 MSC を作製した。

ゲムシタビン内封リポソーム修飾 MSC と加温による抗腫瘍効果の評価：B16/BL6 マウスメラノーマ細胞株を皮下に移植することにより作製した

固形がんモデルマウスに対して、リポソーム修飾 MSC を静脈内投与した。24 時間経過後、腫瘍組織を 42℃ の温浴に 30 分間浸漬した。その後、経日的に腫瘍体積を測定した。

ゲムシタビン内封リポソーム修飾 MSC と交流磁場の併用による腫瘍組織の温度上昇の評価：固形がんモデルマウスにリポソーム修飾 MSC を静脈内投与した 24 時間後に腫瘍組織に対して交流磁場を 30 分間付加した。磁場付加中、経時的に腫瘍組織の温度をサーモグラフィーカメラにより測定した。

3. 結果

ゲムシタビン内封リポソーム修飾 MSC を固形がんモデルマウスに静脈内投与することにより、高い腫瘍増殖抑制効果が認められ、その効果は腫瘍組織への加温を併用することで有意に増大した。なお、加温のみによる腫瘍増殖抑制効果はほとんど認められなかった。また、ゲムシタビン内封リポソーム修飾 MSC と加温による抗腫瘍効果は、ゲムシタビンと酸化鉄磁性ナノ粒子の共投与と加温を併用した場合と比較して顕著に高いものであった。

一方、ゲムシタビン内封リポソーム修飾 MSC の投与と腫瘍組織に対する交流磁場の付加を併用した際、腫瘍組織の温度が若干上昇したものの、40℃ を超える加温効果は得られなかった。また、ゲムシタビン内封リポソーム修飾 MSC による抗腫瘍効果も、交流磁場の付加の有無による有意な差は認められなかった。交流磁場の付加時間を 30 分から 1 時間へ延長して再検討を行ったが、同様の結果であった。

4. 考察

固形がんモデルマウスにおいて、加温のみでは腫瘍増殖抑制効果が認められなかったことから、

加温によるゲムシタビン内封リポソーム修飾 MSC の腫瘍増殖抑制効果の増大は、がん細胞の抗がん剤感受性の亢進によるものであると推察される。また、ゲムシタビンと酸化鉄磁性ナノ粒子の共投与と比較してゲムシタビン内封リポソーム修飾 MSC が顕著に高い抗腫瘍効果を示したのは、酸化鉄磁性ナノ粒子とゲムシタビンが MSC により腫瘍組織へ同時に送達され、抗がん剤感受性が亢進したがん細胞に効率よくゲムシタビンを曝露することができたためであると考えられる。

一方、ゲムシタビン内封リポソーム修飾 MSC と交流磁場の併用により十分な加温効果が得られなかった原因の 1 つとして、磁束密度が挙げられる。本研究で使用した交流磁場発生装置の磁束密度は 20 mT であり、この量では酸化鉄磁性ナノ粒子を発熱させるには不十分であったと推察される。現在、交流磁場により効率的に発熱するための酸化鉄磁性ナノ粒子の粒子径やリポソーム修飾 MSC への搭載量などの最適化に関する検討を進めている。また、磁場を収束させることで局所的に磁束密度を高めることが可能なデバイス開発にも今後着手する予定である。

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) Yusuke Kono, Himi Kanbara, Saki Danjo, Aiga Yoshikawa, Yoshihiro Iwayama, Ken-ichi Ogawara. Liposome-loaded mesenchymal stem cells enhance tumor accumulation and anti-tumor efficacy of doxorubicin in mouse tumor models of melanoma. *Pharmaceutics*, 17(8), 947 (2025).

ディスク状ナノ粒子を利用した ^{19}F MRI 造影剤の開発

Discoidal Nanoparticle-Based ^{19}F MRI Contrast Agent

山本智也*

Tomoya Yamamoto*

*大阪大学大学院工学研究科, 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

*Department of Engineering, The University of Osaka

2-1 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871 Japan

Abstract

^{19}F magnetic resonance imaging (^{19}F MRI) enables the visualization of the in vivo localization of fluorine-containing probes and has attracted significant attention for tumor imaging applications. In this study, we report the development of a nanoscale ^{19}F MRI contrast agent by employing lipid nanodiscs, achieving a particle size of approximately 10 nm. By leveraging the unique structural features of nanodiscs—namely their small size and the high mobility of constituent lipid molecules—we incorporated ^{19}F -labeled phospholipids into the nanodisc structure to function as an effective contrast agent. The resulting probe exhibited reduced hepatic uptake and rapid renal clearance in vivo. Furthermore, surface PEGylation of the nanodiscs successfully enhanced their blood circulation time.

Keywords: ^{19}F MRI, nanodisc, lipid, probe

1. 目的

磁気共鳴画像法 (Magnetic Resonance Imaging; MRI) は、生体内を非侵襲的に画像化できるため、広く医療応用されている。一般的な MRI では ^1H 核を観測するが、 ^{19}F MRI は ^{19}F 核を含む造影剤から MRI シグナルを得ることで、 ^1H MRI とは独立に造影剤の分布を可視化する。 ^{19}F MRI は内因性シグナルが小さく、高コントラストで造影剤の分布を可視化する手法として注目されている。

^{19}F MRI 造影剤の設計ではシグナル感度と局所濃度を高めるために、造影剤内に運動性の高い ^{19}F 核を多く含有させる必要がある。この特有のナノ粒子の設計指針をもとに、運動性の高い ^{19}F 化液体を界面活性剤で可溶化したエマルジョンナノ粒子やエマルジョン表面をシリカや金属で被覆したナノ粒子も開発された。しかし、100 nm 以上の粒子径と表面の硬さが原因で肝臓に捕捉

され、長期的に蓄積することが課題であった。

これらの条件を満たす ^{19}F MRI 造影剤を開発するにあたり、申請者は脂質ナノディスクに着目した。脂質ナノディスクは細胞膜構造に代表されるリン脂質膜構造を両親媒性のポリマーやタンパク質によって円盤状に可溶化したナノ粒子で、近年は薬物送達にも応用されている。脂質ナノディスク中の脂質分子は並進・回転運動をするため運動性が高い。そこで、 ^{19}F 標識化リン脂質をナノディスクに導入すれば、 ^{19}F 核の運動性が高いナノ粒子を開発できる。ナノディスクはサイズ安定性が高く、無機材料を使用せず、粒子径も 10~20 nm であるため、腫瘍組織に送達するための理想的な条件を備えている。このことから、 ^{19}F 標識化リン脂質を用いたナノディスクは腫瘍組織を選択的に可視化する ^{19}F MRI 造影剤として利用できると考えた。

2. 方法

化学合成した ^{19}F 標識化リン脂質を用いてリボソームを作成した後、両親媒性ポリマーであるスチレン-マレイン酸コポリマーによって可溶化し、ディスク状の ^{19}F MRI 造影剤を調製した。また、粒子表面をポリマー修飾する際は、リボソーム作成の際に 20mol% の PEG 修飾リン脂質を混合した。ナノ粒子の粒子サイズは動的光散乱法、透過型電子顕微鏡によって測定した。また、 ^{19}F 核の MR シグナル緩和時間は、 ^{19}F NMR によって測定した。さらに ^{19}F MRI を用いてファントムおよびマウス生体内での造影剤の所在を可視化した。

3. 結果

(2) に示した手法で調製したディスク状 MRI 造影剤は約 10 nm の粒子径を示し、従来の ^{19}F MRI 造影剤よりもはるかに小さい造影剤を開発できた。開発した造影剤の ^{19}F NMR シグナルは T_2 緩和時間は 300 ms を超え、 ^{19}F MRI 造影剤としての応用に十分な性能を示した。ファントム ^{19}F MRI 測定を行った結果、観測限界となる ^{19}F 核の濃度が 6.54 mM であることが示された。これは、別途調製した従来のエマルジョン型造影剤の観測限界 (17.0 mM) よりも低く、開発した造影剤のシグナル強度の高さが示された。

実際にこの造影剤をマウスに投与したところ、肝臓への蓄積は観測されず、膀胱領域に ^{19}F MRI シグナルが観測された (Figure 1a)。従来の ^{19}F MRI 造影剤のほとんどは肝臓へ蓄積しており、この造影剤の約 10 nm という微小な粒子径を持つ特性から、肝臓による捕捉を逃れることができたと考えられる。

さらに、ナノディスク表面を PEG ポリマーで被覆したナノ粒子についてもその性能評価を行ったところ、同様に ^{19}F MRI シグナルを観測できた (Figure 1b)。この粒子をマウス生体内に投与すると、ポリマー修飾していない造影剤に比べて、膀胱への蓄積が遅いことが示された。ナノ粒子に対する PEG 修飾は血中でのタンパク質吸着を抑制し、血中滞留性を向上させることが知られている。このことから、ポリマー被覆によって血中滞留性が向上し、腎排出速度を低下できることが示唆された。

4. 結論

本研究では脂質ナノディスクを ^{19}F MRI 造影剤に応用する戦略により、約 10 nm という非常に小さい粒子中に運動性の高い ^{19}F 核を導入し、極小サイズを持つ ^{19}F MRI 造影剤を開発できた。開発した造影剤はその微小な粒子径により、肝臓に捕捉されにくく、急速に腎排出される性質を示した。この造影剤は約 2 時間にわたって血中を滞留することから、表面をリガンド修飾する設計によって、腫瘍組織の可視化や生体内反応の可視化にさらに応用できることが期待できる。³⁾

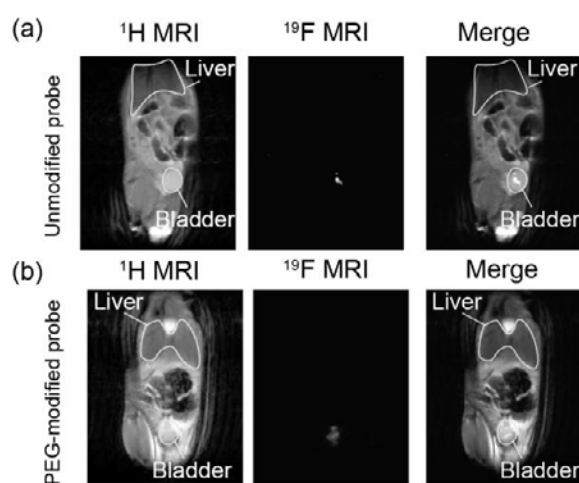


図 1 (a) 非修飾ナノディスク MRI プローブと、(b) PEG 就職したナノディスク MRI プローブを尾静脈投与したマウスの $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ MRI 画像。

本論文の一部の内容は 10 月 3 日にアメリカ合衆国・アンカレッジで開催された『World Molecular Imaging Congress 2025』で報告したものである。

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。

参考文献

- 1) Ilaria Tirota *et al.* *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 1106-1129.
- 2) Ahmed O. Elzoghby *et al.* *Nanotoday*, **2023**, *53*, 102026.
- 3) Kodai Fukushima, Tomoya Yamamoto, Kazuya Kikuchi *J. Am. Chem. Soc.* **2026**, *148*, 12990-12997.

脊磁図を用いた腰椎椎間孔・上位腰椎の 非侵襲的神経機能評価法の開発

Development of a new method to noninvasively assess neurophysiological function
in lumbar spinal area using magnetospinography

橋本淳*, 東川尚人*, 川端茂徳*, 吉井俊貴*

Jun Hashimoto*, ** Hisato Higashikawa, and Shigenori Kawabata*

*東京科学大学整形外科, 〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

*Department of Orthopaedic Surgery, Institute of Science Tokyo,
1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510 Japan

Abstract

This study aims to develop a new method for magnetospinography (MSG) to noninvasively evaluate lumbar nerve function. We measured MSG in ten healthy volunteers using new stimulation methods: lateral femoral cutaneous nerve, saphenous, and femoral nerve stimulation. MSG visualized neural current in lumbar spinal area via lumbar foramen after each nerve stimulation. Lateral femoral cutaneous nerve stimulation effectively visualized the L2/3 foramen, while saphenous nerve stimulation was superior for the L4/5 foramen. Femoral nerve stimulation provided significantly higher current intensity for upper lumbar spinal area. Development of novel nerve stimulation enabled MSG to visualize neural currents flowing through the lumbar region with high spatial resolution.

Keywords: magnetospinography, magnetoneurography

1. 目的

腰椎椎間板ヘルニアや腰部脊柱管狭窄症などの腰椎疾患は、神経圧迫によって下肢の痛みやしびれ、歩行障害を呈し、日常生活は著しく制限される。徒手筋力検査や感覚検査、深部腱反射などの身体診察と、単純 X 線像や磁気共鳴画像(MRI)による画像評価を組み合わせで診断をおこなう。しかし、画像上の神経圧迫が軽度の場合や複数にわたる場合には、責任病変診断に難渋することも多く、電気生理検査を中心とした神経機能評価がおこなわれるが、体表から深い位置にある馬尾神経や神経根の詳細な評価は難しく、侵襲なく詳細に神経機能の評価する方法が求められてきた。

そこで我々は神経活動電流の周囲に生じる磁

場に着目した。電流は生体内の組織ごとに流れやすさが異なるが、磁場は生体内の流れやすさが一定であるため、体表から深く骨や軟部組織に覆われる脊髄や馬尾神経も体表から歪みなく計測できる。生体内の電気活動を磁場を介して評価する方法は、脳や心臓の分野ではすでに脳磁図、心磁図として臨床応用されているが、脊椎においては、脳や心臓と比べて磁場信号強度が 10-1000 分の 1 程度とはるかに小さく、神経電気活動を捉えることが困難であった。そこで、我々は非常に感度の高い超伝導量子干渉素子(SQUID)磁束計を用いた神経磁界計測装置(脊磁計、図 1)を金沢工業大学と共に開発し、これまでに健常者において無侵襲かつ詳細に脊椎の神経電気活動を可視化・評価で

きることを報告してきたが、腰椎椎間孔や上位腰椎においては評価が困難であった¹⁾。そこで本研究では、新たな神経刺激法を開発し、脊磁図を用いて同部位の神経機能評価をおこなうことを目的とした。

図 1. 腰部脊磁図測定



2. 方法

健常者 10 名を対象とし腰部脊磁図を測定した。磁気シールドルーム内にて被検者の腰背部をセンサにあて、下肢末梢神経（大腿神経、外側大腿皮神経、伏在神経、従来法との比較として腓骨神経）を体表から電気刺激後に腰椎部を上行する電流の周囲に生じる磁場を測定した。空間フィルタ法によって磁場信号を電流分布に変換し、さらに腰椎正面・側面単純 X 線像と重畳することで、生体内の形態情報と正確にマッチさせた。また、任意の点の電流波形を算出する仮想電極によって電流波形を求め、電流強度や伝導速度による伝導評価をおこなった。

3. 結果

全症例で各神経刺激後の腰部脊磁図測定が可能であった。外側大腿皮神経刺激後は L2/3、L3/4 椎間孔(図 2)、伏在神経刺激後は L3/4、L4/5 椎間孔(図 3)、大腿神経刺激後は L2/3 から L4/5 椎間孔(図 4)、腓骨神経刺激後は L5/S1 椎間孔を通り、脊柱管内に流入する電流分布図が得られた。神経走行に沿った仮想電極を設定すると、神経に沿って頭側に伝搬する電流波形が得られた。腰椎椎間孔に流入する電流強度を各神経刺激で比較すると、外側大腿皮神経刺激では L2/3、伏在神経刺激では L4/5 に流入する割合が高かった。

図 2. 外側大腿皮神経刺激後の腰部脊磁図

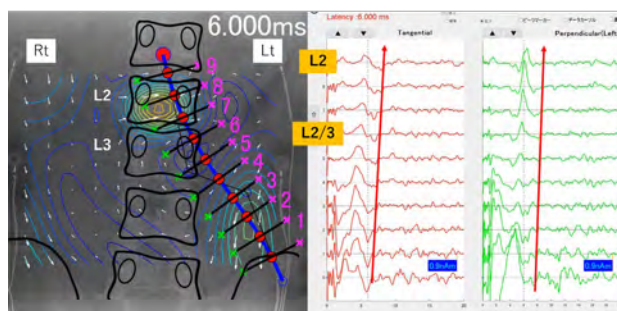


図 3. 伏在神経刺激後の腰部脊磁図

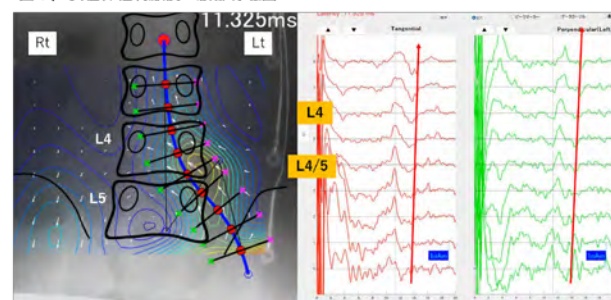
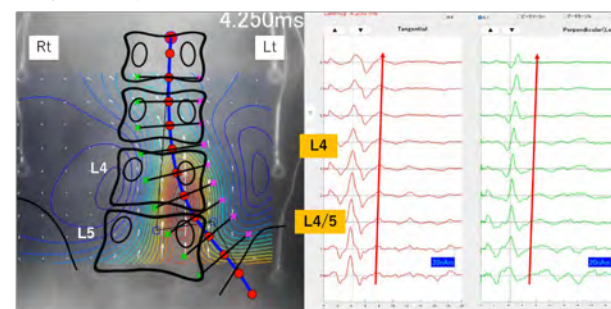
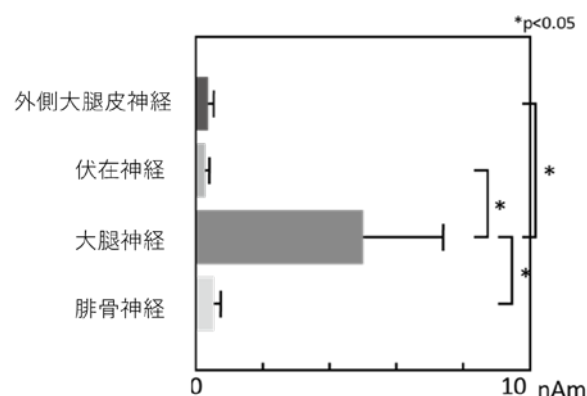


図 4. 大腿神経刺激後の腰部脊磁図



大腿神経刺激においては各椎間孔に流入する電流を分離して求めることが困難であり、椎間孔の詳細な評価は困難であった。一方、上位腰椎脊柱管内を流れる電流強度は大腿神経刺激で有意に大きく、外側大腿皮神経刺激の 14 倍、伏在神経刺激の 18 倍であった(図 5)。

図 5. 各神経刺激後に上位腰椎部を伝搬する電流強度



4. 考察

脊磁図を用いて、外側大腿皮神経、伏在神経、大腿神経刺激後に腰椎椎間孔部から流入し、脊柱管内を上行する電流分布を高い空間分解度で可視化することに成功した。外側大腿皮神経刺激ではL2/3、伏在神経刺激ではL4/5に流入する割合が高く、L2/3椎間孔評価には外側大腿皮神経刺激、L4/5では伏在神経刺激が適していると考えられた。

上位腰椎における電流強度は大腿神経刺激で有意に高かった。その理由として、他神経と比較して神経線維数が多いこと、大腿刺激の刺激位置が記録位置と近く時間的分散の影響を最小限に抑えられていることが考えられた。

これらの結果より、上位腰椎の脊柱管内の評価には大腿神経刺激、L2/3など上位腰椎の椎間孔評価には外側大腿皮神経刺激、L4/5椎間孔評価には伏在神経刺激を用いることで、診断に難渋することの多い腰部神経根症の診断の一助になる可能性が示唆された。今後はさらに研究を続け、健常者より信号強度の低い腰椎疾患患者さんの脊磁図計測をおこない、腰椎疾患患者の診断・機能評価の飛躍的な進歩に貢献したい。

謝辞

本研究は渡邊財団第30回磁気研究助成の補助を受けて実施したものである。第55回日本臨床神経生理学会のシンポジウムで発表し、同学会の刊行する雑誌「臨床神経生理学」²⁾ならびに国際誌「Journal of Clinical Neurophysiology」³⁾に掲載された。この場を借りて、財団関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Shuta Ushio, et al.; Clin Neurophysiol. 130(1): p.1-11. (2019)
- 2) 橋本淳:臨床神経生理学, 53(6) p.673-678 (2025).
- 3) Higashikawa Hisato, et al.; J Clin Neurophysiol. Epub ahead of print (2025).

蝸牛内シスプラチンを磁気誘導技術により

体外回収する革新的難聴治療

Innovative hearing-loss therapy involving extracorporeal recovery
from cisplatin-induced ototoxicity via magnetic guidance

栗岡隆臣

Takaomi Kurioka

北里大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 〒252-0374 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1

Department of otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Kitasato University

1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagamihara-shi, Kanagawa 252-0374, Japan

Abstract

シスプラチン難聴は蝸牛内に薬剤が自然排出されず過剰に蓄積し、DNA 架橋と ROS 産生を介して有毛細胞・蝸牛神経を不可逆的に障害するが、有効な治療・予防法は確立していない。本研究では GSH 搭載 SPION で蝸牛内シスプラチンを捕捉し、磁気誘導で正円窓へ集積して体外回収する磁気マイクロサージェリーを検証した。その結果、蝸牛内薬剤の回収成立を示し、ABR 閾値上昇は改善し、有毛細胞消失は抑制され、死亡や重篤な有害事象は認められなかった。本技術は癌治療後 QOL 改善に資する新規難聴治療基盤となると考えられる。

Keywords: Cisplatin, Ototoxicity, Hearing loss, Magnetic surgery

1. 目的

シスプラチンは悪性腫瘍に有効だが正常細胞にも作用し、骨髄抑制・腎障害に加えて聴覚障害を高頻度（成人 40～80%，小児約 50%）に引き起こす。世界に 5000 万人超の癌生存者がいる中、後遺症軽減は治療後 QOL 改善に重要である。内耳ではシスプラチンが自然排出されにくく蝸牛内に蓄積し、DNA 架橋と ROS 産生を介して有毛細胞や蝸牛神経に不可逆的变化を生じる。従来の抗酸化剤投与やチオ硫酸ナトリウム中和は、蓄積薬剤が体内に残る点が課題となる。そこで、抗酸化作用とシスプラチン結合親和性を持つグルタチオン（GSH）搭載超常磁性酸化鉄ナノ粒子（SPION、約 100 nm）に着目し、正円窓透過後に蝸牛内シスプラチンへ結合させる。さらに磁気力で薬物動態を制御し、正円窓まで誘導して体外回収する「磁気マイクロサージェリー」を新規開発

する。GSH-SPION の結合と磁気制御は in vitro で確認済みであり、生体内で内耳毒性の軽減と難聴治療効果を検証する。

本研究の目的は、①局所投与による毒性抑制、②磁気誘導回収の成立性を明らかにすることである。安全性評価も行い、実用化にもつなげる。新規難聴治療を目指す。

2. 方法

C57BL/6J マウス（雄、8 週齢）を使用し、麻酔はミダゾラム、ベドルファール、ドミトールの混合麻酔を腹腔内投与した。

1) シスプラチン難聴モデルの作成

全身麻酔したマウスを側臥位にし、実体顕微鏡を使用して、シスプラチン（0.0625～1.0 mg/mL）を経鼓膜的に中耳内穿刺し、3 μ L 注入した。

2) 磁気マイクロサージェリー

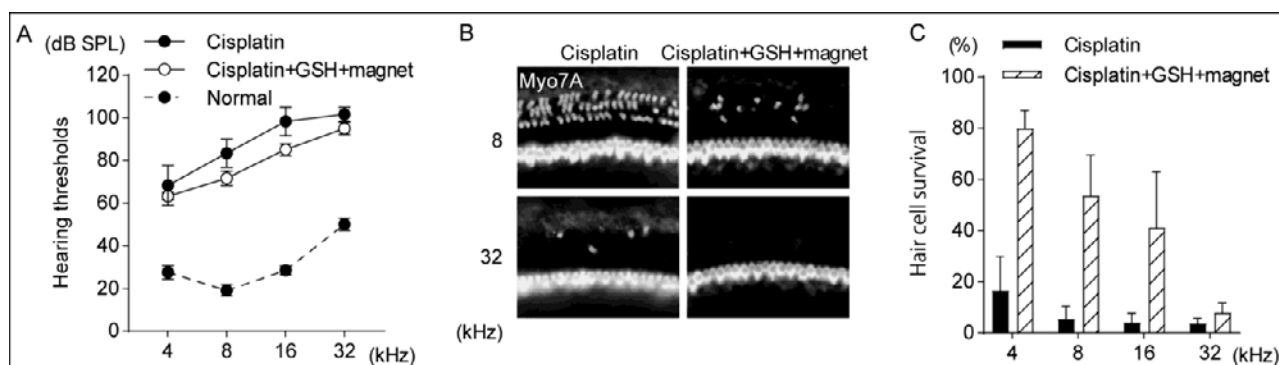


図1 磁気マイクロサージェリーの治療効果

(A) CDDP 難聴モデルと比較して、GSH-SPION(GSH) と磁気マイクロサージェリー (magnet) 治療群で、良好な聴力閾値を示した。

(B) 治療群において、外有毛細胞の生存が確認された。

(C) CDDP 難聴モデルと比較して、GSH-SPION(GSH) と磁気マイクロサージェリー (magnet) 治療群で、良好な有毛細胞生存率を示した。

シスプラチン投与の翌日に磁気マイクロサージェリーを施行した。麻酔したマウスの耳後部を開創し、側頭骨の内耳骨包を露出させる。小孔を作成し、正円窓が確認できるまで小孔を拡大させる。正円窓に GSH-SPION を吸収させたゼラチンスポンジを留置し、耳後部を開創した。

GSH-SPION 留置翌日に、磁石留置を行った。耳後部を開創し、正円窓膜上のゼラチンスポンジを除去し、生食含有ゼラチンスポンジを再留置する。その上に、小磁石を留置し、閉創した。

3) 聴性脳幹反応

シスプラチンを投与した 10 日後に、聴力閾値を聴性脳幹反応 (ABR) により測定した。刺激音には、4, 8, 16 および 32 kHz のトーンバースト音を用い、刺激音圧は 80dB sound pressure level (SPL) から 5 dB ステップで減少させた。V 波が観測されなくなるまで記録し、V 波が観測された最小の刺激音圧を聴力閾値とした。

4) 有毛細胞の評価

蝸コルチ器を摘出し、1 次抗体には Myosin7a 抗体 (Myo7A, 1:200, Proteus Biosciences) を使用した。2 次抗体 (Alexa Fluor, Invitrogen) と反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss) を用いて有毛細胞生存率を算出した。

3. 結果

GSH-SPION の投与や、磁気マイクロサージェリーによる、動物の死亡や著しい健康障害などは観察されなかった。シスプラチンの投与により、

ABR 閾値は著しく上昇を示したが、GSH-SPION と磁気サージェリー (GSH+magnet) により聴力閾値の上昇は改善を認めた (図 1A)。有毛細胞の免疫染色では、シスプラチン群で著名な有毛細胞の消失を認めた一方で、GSH+magnet 群では有毛細胞の生存が確認された (図 1B)。生存する有毛細胞の定量評価では、GSH+magnet 群で生存数の改善を認めた (図 1C)。

4. 考察

今回、我々は磁気誘導薬剤回収技術によって世界で初めて蝸牛内のシスプラチンを正円窓から体外へ排出させることに成功した。本研究の独自性として、① SPION への結合親和性の付与による蝸牛内シスプラチンの選択的「捕獲」、② 磁気誘導薬剤回収技術を駆使した蝸牛内シスプラチンの除去、③ GSH 搭載 SPION による抗酸化治療とシスプラチン除去治療の融合、④ 低侵襲磁気マイクロサージェリーの確立、の 4 点が挙げられる。これまで治療困難であったシスプラチン難聴の治療に向けて「蝸牛中に蓄積されたシスプラチンを体外へ排出する」という新たな発想に基づいた第 3 の治療コンセプトを確立する世界的先端研究であり、シスプラチン難聴の新規治療プラットフォームを世界で初めて創出する。

謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団第 31 回磁気健康科学研究助成の補助を受けて実施したものである。

拡散テンソル磁気共鳴画像を用いた統合失調症の病態研究

Schizophrenia research using diffusion tensor magnetic resonance imaging

越山太輔*

Daisuke Koshiyama*

*東京大学医学部附属病院精神神経科, 〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1

*Department of neuropsychiatry, The University of Tokyo Hospital

7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655 Japan

Abstract

Auditory mismatch negativity has received significant attention as a potential brain marker to investigate pathophysiology of schizophrenia. This study aimed to investigate associations between mismatch negativity and white matter alterations in the thalamocortical pathways to clarify the networks underlying reduced mismatch negativity in individuals with schizophrenia. Mismatch negativity amplitude was significantly positively correlated with white matter alterations only in schizophrenia, but not in healthy comparison subjects. Our study further helps characterize and interpret reduced mismatch negativity as a useful brain marker in the pathophysiology of schizophrenia.

Keywords: mismatch negativity, white matter alteration, schizophrenia, electrophysiology, diffusion tensor imaging

1. 目的

統合失調症は幻覚妄想などの陽性症状、意欲低下などの陰性症状、認知機能・機能的アウトカムの低下を生じる精神疾患であり、その有病率は約1%である。多くは青年期に発症するため、その障害を持つ方の人生への影響は甚大である。しかし統合失調症の病態については不明なことが多く、既存の薬物療法では十分な治療効果が得られていない。

病態の解明に役立つことが期待される脳波指標に、ミスマッチ陰性電位がある。ミスマッチ陰性電位は事象関連電位のひとつであり、脳の聴覚系の情報処理で重要な役割を果たす。これまでに我々は、脳波計を使って統合失調症でのミスマッチ陰性電位の振幅低下について報告し、さらに認知機能低下・機能的アウトカムの低下との関連についても明らかにした。また脳波の電位源を推定

する手法により、ミスマッチ陰性電位の統合失調症における障害が、前頭葉や側頭葉などの大脳灰白質に見られる可能性が高いことを明らかにした。

よって、ミスマッチ陰性電位の基盤となる大脳の神経ネットワークをより詳しく調べることで、統合失調症の病態の解明と、それに基づく治療法の開発が可能になることが期待される。しかしこれまでの研究では、その神経ネットワーク障害については詳しくわかっていなかった。

加えて我々は、磁気共鳴画像装置 (MRI) による拡散テンソル画像検査を用いて、大脳灰白質同士を連絡する構造物で神経ネットワークを構成する大脳の白質についても統合失調症において障害が見られ、その障害が認知機能低下に関連することもこれまでに報告している。

つまり統合失調症において要素的に大脳灰白

質の障害、大脳白質の障害、ミスマッチ陰性電位の障害の報告はあるが、これを統一的に理解し、神経ネットワークとしての機能的な障害に注目した研究はこれまでになかった。また最近の臨床および動物モデル研究により、ミスマッチ陰性電位の振幅低下の神経基盤が、大脳ネットワークにおける皮質視床路の障害と関連している可能性が示されている。

そこで本研究では拡散テンソル画像検査を用いて、統合失調症における大脳白質である皮質視床路の障害とミスマッチ陰性電位との関連について調べることで、統合失調症における神経ネットワーク障害の解明を目指すことにした。それにより統合失調症のモデル動物研究や、磁気刺激などのニューロモジュレーション治療への発展の礎を築くことを目的とした。

2. 方法

本研究では、ミスマッチ陰性電位、拡散テンソル画像を統合失調症患者 30 名、健常者 26 名の同一被験者で測定した。そしてミスマッチ陰性電位障害と、大脳白質のコネクティビティーの関連について観察し、ミスマッチ陰性電位障害の背景にある神経ネットワークを明らかにした。

3. 結果

具体的には、ミスマッチ陰性電位と皮質視床路を含む大脳白質領域の拡散テンソル画像指標が統合失調症群においてのみ関連が見られ、健常群ではその関連が見られなかった（文献 1-3）。

4. 考察

これらの知見は、ミスマッチ陰性電位の生成が皮質視床路の白質束による神経ネットワークによって支えられており、統合失調症ではその関係性が損なわれている可能性がある。本研究によって明らかにされた統合失調症における新たな神経ネットワーク障害は、ヒトでは難しい侵襲を伴う病態の研究と治療法の開発に役立つ動物研究を促し、さらに磁気刺激などを含めた治療介入法での標的となる脳部位を具体的に示すことで、新たな学術領域の発展を促す礎となる。これらの成果は、統合失調症の新たな治療開発の礎になり、

患者およびその家族の福祉に貢献することが期待される。

謝辞

本研究は公益財団法人渡邊財団による第 31 回磁気健康科学研究助成のご支援を受けて実施したものです。財団の関係者の皆様に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Koshiyama D, Shioda R, Kishigami T, Kiriara K, Kasai K. Predictive coding studies using mismatch negativity in schizophrenia. *21st Pacific Rim College of Psychiatrists & 7th World Association of Cultural Psychiatry Joint Congress 2025*, Tokyo, Japan (September 26, 2025; Symposium)
- 2) Koshiyama D, Shioda R, Kishigami T, Kiriara K, Kasai K. Electrophysiological studies of schizophrenia using mismatch negativity and gamma-band auditory steady-state response. *ECNS Annual Conference 2025 & 7th Basic and Clinical multimodal Imaging (BaCI) International Conference*, Munich, Germany (September 4, 2025; Symposium)
- 3) Koshiyama D, Shioda R, Kishigami T, Kiriara K, Kasai K. Electrophysiological studies of schizophrenia using mismatch negativity. *The Korean Society for Brain and Neural Sciences & the 3rd CJK Neuroscience Meeting*, Incheon, Korea (August 26, 2025; Symposium)

交番磁界による慢性疼痛緩和の機序解明

The format requirements for the manuscript

大澤匡弘*

Masahiro Ohsawa*

*帝京大学薬学部, 〒173-8605 東京都板橋区加賀 2-11-1

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

2-11-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605 JAPAN

Abstract

We have investigated the effect of magnetic stimulation on the neuropathic pain model of rat. A single 10-min treatment produced transient analgesia, whereas repeated daily treatment for 7 days induced sustained analgesic effects. Gene expression and cellular analyses suggested modulation of peripheral immune/inflammatory responses and suppression of spinal astrocyte activation. These findings indicate that hybrid magnetic stimulation may provide a novel non-invasive therapy for neuropathic pain.

Keywords: Neuropathic pain, Alternative magnetic stimulation, Anti-inflammatory effect

1. はじめに

超高齢社会となった本邦では、慢性疼痛を有する患者が増加しており、生活の質を著しく低下させる重要な課題となっている。慢性疼痛に対しては薬物療法や理学療法などが行われているが、十分な効果が得られない症例も多く、新たな治療法の開発が求められている^{1,2)}。既存の赤外線治療器やマイクロ波治療器は、温熱作用や血行促進作用を介して一時的に疼痛を緩和するが、効果の持続性や安全性に課題がある。また、経頭蓋磁気刺激装置 (rTMS) を用いた疼痛治療も試みられているが、十分な鎮痛効果が得られないことに加え、頭部固定や長時間の拘束が必要であり、頭痛、不快感、失神、痙攣発作などの有害事象も課題となっている³⁾。

近年、極めて弱い低周波磁場がマイトファジーを活性化し、パーキンソン病や炎症などに関連する病態を改善し得ることが報告されている。この知見は、超低強度交番磁界が生体反応を制御し得ることを示している⁴⁾。本研究では、低周波帯と高周波帯を組み合わせた微弱な交番磁界を末梢神経近傍に照射する新規磁気刺激装置を用い、神

経障害性疼痛に対する鎮痛効果とその作用機序を検討した。

2. 実験方法

2.1 実験動物

雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、各施設の動物実験指針および倫理基準に従って実験を行った。動物は一定の明暗サイクルおよび温度条件下で飼育し、飼料および水は自由摂取とした。

2.2 神経障害性疼痛モデル

神経障害性疼痛モデルとして、Bennett らの方法⁵⁾に準じて坐骨神経慢性絞扼損傷 (chronic constriction injury: CCI) モデルを作製した。ラットを 2%イソフルラン吸入麻酔下で左大腿部を切開し、坐骨神経を露出させた。坐骨神経を 4-0 絹糸で 1 mm 間隔に 4 箇所、緩く結紮した後、創部を縫合した。偽手術群では坐骨神経を露出させたが、結紮は行わずに縫合した。

2.3 交番磁界照射

磁気刺激は、CCI 手術後に坐骨神経結紮部近傍へ

プローブを接触させ、1日1回10分間行った。刺激条件として低周波刺激および低周波と高周波を組み合わせた混合波刺激を用いた。偽治療群では同様にプローブを接触させたが、磁気刺激は行わなかった。

2.4 機械的痛覚閾値の評価

疼痛閾値は von Frey テストにより評価した。単回刺激実験では刺激後 30、60、90、120 分に測定し、反復刺激実験では経日的に痛覚閾値を評価した⁶⁾。

2.5 遺伝子発現解析

行動薬理試験後に坐骨神経を摘出し、total RNA を抽出した。RNA-seq により網羅的遺伝子発現解析を行い、得られたデータについて発現変動解析および GO エンリッチメント解析を実施した。また、RNA-seq で認められた変化を検証するため、定量的 RT-PCR により炎症応答、免疫応答、神経線維および髄鞘関連遺伝子の発現を解析した。

2.6 組織学的解析および統計解析

脊髄組織を用いて、ミクログリアマーカー Iba-1 およびアストロサイトマーカー GFAP の免疫染色を行い、脊髄後角におけるグリア細胞活性化を評価した。データは平均値±標準誤差で示し、統計解析には二元配置分散分析および Bonferroni 補正による多重比較を用いた。

3. 結果

3.1 磁気刺激による神経障害性疼痛の抑制効果

CCI モデルでは、手術後に患側の機械的痛覚閾値が低下し、神経障害性疼痛様行動が確認された。単回の磁気刺激を行ったところ、低周波刺激および混合波刺激のいずれにおいても、刺激後 60 分をピークとして痛覚閾値が上昇し、急性の抗痛覚過敏効果が認められた。特に混合波刺激は、低周波刺激よりも強い鎮痛効果を示した (図 1a)。一方、この効果は 120 分後には消失し、単回刺激のみでは長期的な疼痛改善効果は認められなかった (図 1b)。

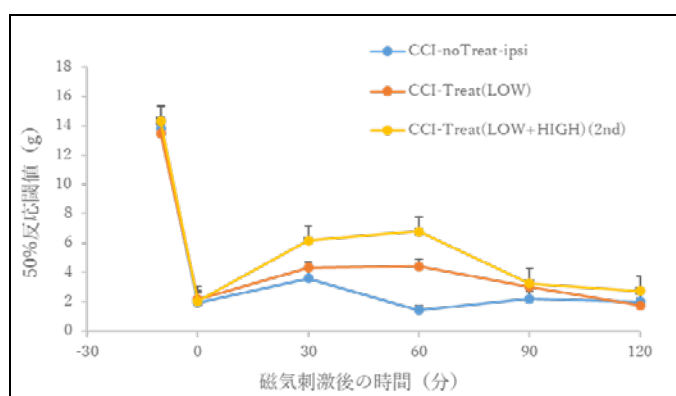


図 1a. CCI モデルにおける痛み閾値低下に対する急性磁気刺激の影響。CCI 手術は 0 日目に行い、8 日目に痛み閾値を von Frey テストにより評価した。磁気刺激は低周波と混合波（低周波と高周波）を用い、CCI 手術 8 日目に 10 分間行った。痛み閾値の評価は、刺激後 30、60、90、および 120 分後に行った。

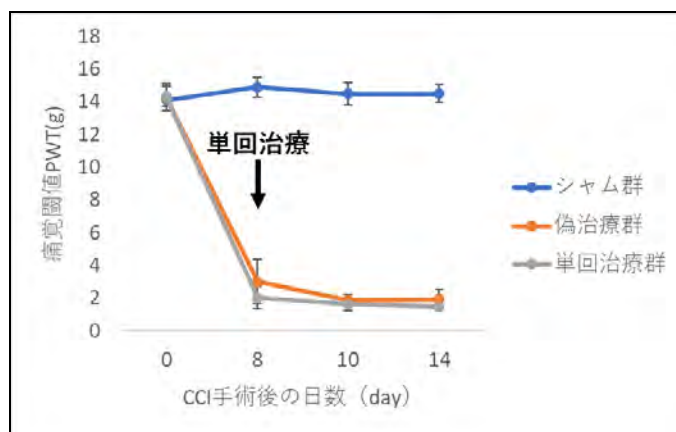


図 1b. CCI モデルにおける痛み閾値低下に対する急性磁気刺激の長期的な影響。CCI 手術は 0 日目に行い、8 日目、10 日目、14 日目に痛み閾値を von Frey テストにより評価した。磁気刺激は混合波（低周波と高周波）を用い、CCI 手術 8 日目に 10 分間行った。

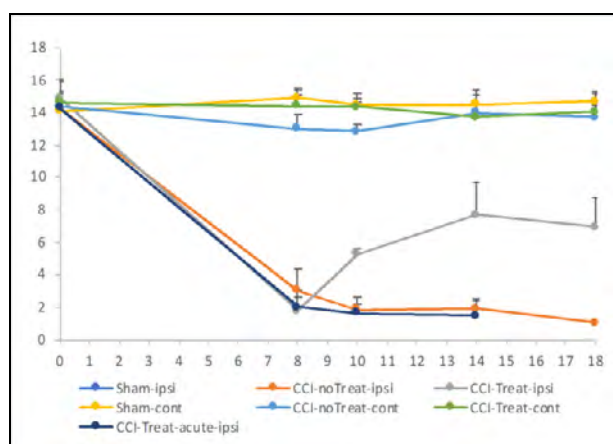


図 2. CCI モデルにおける痛み閾値低下に対する磁器刺激 (混合波) の影響。CCI 手術は 0 日目に行い、8 日目に痛み閾値を von Frey テストにより評価した。磁気刺激は 8 日目より 14 日目まで、1 日 1 回 10 分間行った。痛み閾値の評価は、磁気刺激を行っている際には、磁気刺激 2 4 時間後に、磁気刺激完了後 (15 日目以降) は、午後に行った。

これに対し、1 日 1 回 10 分間の磁気刺激を 7 日間反復して行くと、刺激開始後 2 日目から痛覚閾値が上昇し、7 日目には神経障害性疼痛の明らかな改善が認められた (図 2)。

3.2 磁気治療による損傷神経の遺伝子発現変化
坐骨神経組織の RNA-seq 解析により、CCI では炎症応答、創傷応答、ストレス応答、自然免疫応答に関連する遺伝子群が大きく変動することが示された⁷⁾ (図 3a)。磁気治療群では、CCI により上昇した炎症性サイトカイン、ケモカイン、インターフェロン関連遺伝子などの発現が低下し、炎症・ストレス応答の抑制が示唆された。一方で、獲得免疫、白血球活性化、神経線維、髄鞘構成タンパクに関連する遺伝子の発現変動も認められた (図 3b)。qPCR 解析においても、RNA-seq で認められた炎症関連遺伝子の低下、免疫応答関連遺伝子の変動、神経線維・髄鞘関連遺伝子の上昇が確認された。

3.3 磁気刺激による炎症細胞応答の制御
LPS により活性化したミクログリアに磁気刺激を行ったところ、いくつかの炎症性サイトカイン mRNA 発現が抑制された。また、CCI 後の脊髄後

角ではミクログリアおよびアストロサイトの活性化が認められたが、反復磁気治療は脊髄ミクログリア活性化には明確な影響を示さず、脊髄アストロサイトの活性化を抑制した。

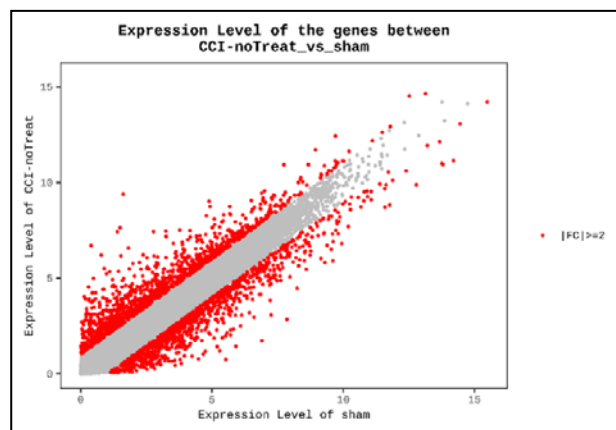


図 3a CCI 手術により 2 倍以上 発現が変動する転写物 (MA plot)。CCI 手術による神経傷害部位においては、約 1200 の転写物が上方制御、約 1000 の転写物が下方制御を受けた。

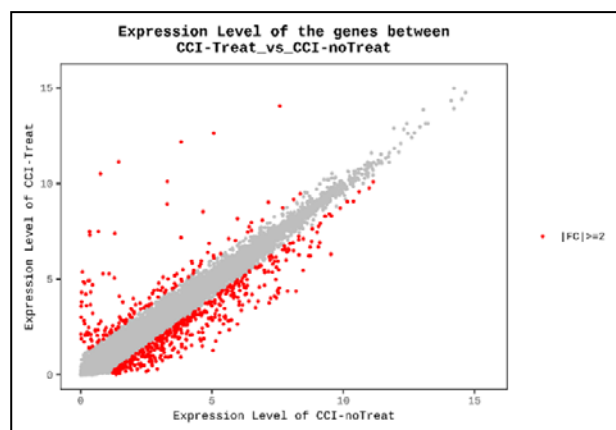


図 3b CCI モデルに対する磁気刺激により 2 倍以上 発現が変動する転写物 (MA plot)。神経傷害部位への磁気刺激により、約 150 の転写物が上方制御、約 400 の転写物が下方制御を受けた。

4. 考察

本研究により、磁気刺激装置による急性および反復刺激は、神経障害性疼痛に伴う痛み閾値の低下を改善することが明らかとなった。末梢神経の遺伝子発現解析では、免疫応答や炎症関連因子の変動が認められた。また、中枢では、磁気治療により脊髄アストロサイトの活性化が抑制された。これらの結果から、本治療法の鎮痛作用には、末梢

神経における炎症制御に加え、中枢側でのグリア細胞応答の調節が関与する可能性が示された⁷⁻¹⁰⁾。

以上より、本装置による末梢神経への混成磁気刺激は、即時的な鎮痛効果に加え、末梢および中枢の炎症制御を介して持続的な鎮痛効果をもたらす可能性が示された。今後は、下行性ノルアドレナリン疼痛抑制系やアストロサイト上のアドレナリン α_2 受容体の関与を含め、末梢・中枢双方の機能改善機構についてさらに検討する¹¹⁾。

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。

参考文献

- 1) Treede RD, Rief W, Barke A, et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain*. 2019;160(1):19–27. doi:10.1097/j.pain.0000000000001384.
- 2) Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2015;14(2):162–173. doi:10.1016/S1474-4422(14)70251-0.
- 3) Lefaucheur JP, Aleman A, Baeken C, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): an update (2014–2018). *Clin Neurophysiol*. 2020;131(2):474–528. doi:10.1016/j.clinph.2019.11.002.
- 4) Toda T, Ito M, Takeda JI, et al. Extremely low-frequency pulses of faint magnetic field induce mitophagy to rejuvenate mitochondria. *Commun Biol*. 2022;5:453. doi:10.1038/s42003-022-03389-7.
- 5) Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87–107. doi:10.1016/0304-3959(88)90209-6.
- 6) Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994;53(1):55–63. doi:10.1016/0165-0270(94)90144-9.
- 7) Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain*. 2013;154 Suppl 1:S10–S28. doi:10.1016/j.pain.2013.06.022.
- 8) Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 2003;424(6950):778–783. doi:10.1038/nature01786.
- 9) Clark AK, Old EA, Malcangio M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J Pain Res*. 2013;6:803–814. doi:10.2147/JPR.S53660.
- 10) Nakagawa T, Kaneko S. Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain. *J Pharmacol Sci*. 2010;114(4):347–353. doi:10.1254/jphs.10R04CP.
- 11) Bahari Z, Meftahi GH. Spinal α_2 -adrenoceptors and neuropathic pain modulation; therapeutic target. *Br J Pharmacol*. 2019;176(14):2366–2381. doi:10.1111/bph.14580.

経頭蓋静磁場刺激が脳卒中後半側空間無視症状に及ぼす影響

Effects of transcranial static magnetic stimulation on unilateral spatial neglect after stroke

松本 杏美莉*

Amiri Matsumoto*

*広島大学大学院医系科学研究科感覚運動神経科学教室,

〒734-8551 広島市南区霞一丁目2番3号

* Department of Sensorimotor Neuroscience, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-Ku, Hiroshima 734-8553, Japan

Abstract

Unilateral spatial neglect (USN) affects 33–82% of right-hemisphere stroke patients, impairing daily activities and increasing fall risk. This study investigated whether transcranial static magnetic stimulation (tSMS)—a cost-effective, comfortable, non-invasive method—can alleviate USN symptoms. A single patient received 20-minute tSMS or sham stimulation over the P3 region for five days each. Evaluations included paper-and-pencil tests and a Computer-Based Test (CBT). Although paper-and-pencil tests revealed no clear neglect, tSMS appeared to facilitate leftward attention, potentially increasing subjective task difficulty. Specifically, CBT showed a post-tSMS speed-accuracy trade-off: more correct left-sided responses alongside prolonged reaction times. These preliminary results suggest tSMS over the contralateral parietal cortex can modulate attentional distribution in USN, though further investigation is required to confirm clinical efficacy and underlying mechanisms.

Keywords: transcranial static magnetic stimulation, unilateral spatial neglect

1. 目的

半側空間無視 (Unilateral space neglect; USN) は主に右頭頂葉領域を損傷した脳卒中患者に観察される症状で、「右方向に偏倚した空間性注意・知覚と感覚運動情報処理, 及び両側に対する覚醒レベル, 注意力, 作業記憶の非定常的欠損」と定義されている¹⁻³⁾。発症率は右半球損傷の33-82%とされており⁴⁾, その内1/3が慢性化するとの報告がある⁵⁾。半側空間無視症状を呈した患者は, 正中線から左側の空間を認識せず, 日常生活動作能力の著しい低下⁶⁾, 転倒など外傷の危険性の上昇⁷⁾, 介護者の負担増⁸⁾などの問題が生じる。

非損傷半球頭頂葉用領域の過剰な興奮性及び

損傷半球への皮質半球間抑制入力を, 従来型の反復経頭蓋磁気刺激や経頭蓋直流電流刺激によって抑制することにより, 半側空間無視症状が改善するとの報告がある⁹⁻¹⁰⁾。しかしながら, これらの脳刺激法をホーム・リハビリテーションに活用するためには, 非常に高額な装置と高い操作技術が必要とすることが障壁となっている。また, 非侵襲的とはいえ, 多くの被験者に不快感や違和感を与えるため, そのこと自体に加えて正確な sham 実験の妨げにもなっている¹¹⁾。

本研究では, 安価で操作性に優れ, 適用時に対象者に不快感を与えない経頭蓋静磁場刺激 (Transcranial static magnetic stimulation: tSMS)¹²⁻¹³⁾

を使用し、脳卒中後に半側空間無視症状を呈する患者への介入効果を検証する事を目的とする。

また、協力施設の病棟都合等により対象者のリクルートが限定的であったため、USN に関する検討に加え、tSMS の生理学的な作用機序の解明を目的に、健常成人を対象とした tSMS の電気力学的遅延 (electromechanical delay: EMD) および痛覚閾値への影響を並行して検討した。

2. 方法

2.1 対象

脳卒中後、半側空間無視を有する患者 4 名 (左 USN; 3 名, 右 USN; 1 名) をリクルートし (表 1), ドロップアウトがなかった 1 名 (#4) を対象とした。

表 1 研究参加者のプロフィール

	年齢	性別	発症後期間	損傷半球	ドロップアウト理由
#1	92	女	58 日	右	参加への同意を得られなかった
#2	89	女	9 日	右	USN が認められなかった
#3	76	男	57 日	左	介入期間中に外出をした
#4	58	男	25 日	右	

2.2 手順

Sham 刺激, tSMS の順に各 5 日間実施し, 各刺激間に wash out 期間を 2 日間設けた。Sham 刺激開始前, tSMS 開始前, tSMS 終了後に評価を行った (図 1)。

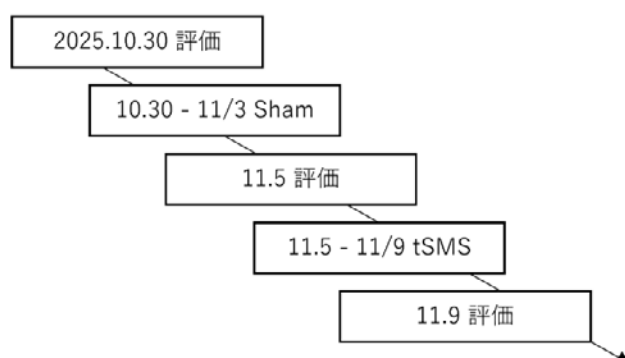


図 1 スケジュール

tSMS には, 3 つのネオジム磁石を直径 140mm, 厚さ 48mm の非磁性筐体に埋め込んだシン磁場刺激¹⁴⁾ (図 2) を使用し, 国際 10-20 法の P3 が中心に位置するように多軸可変スタンドで 20 分間固定した。Sham 刺激には非磁性体シリンダを使用した。



図 2 シン磁場刺激ユニット

2.3. 机上検査による評価

線分二等分試験, 線分抹消試験, Catharine Bergego Scale; CBS の自己評価質問紙を用いた。

2.4. Computer Based Test¹⁵⁾ (図 3)

ガボールパッチ図が 14 インチモニタの左, 中央, 右に 100 ms 提示される。視覚呈示後, 対象者は可及的速やかに刺激図の提示位置を←, ↑, →キーの押下で回答する。刺激図のコントラストは 5 段階あり, 正答が続くと難易度が上がる (輝度が下がる)。刺激図は各位置 10 回, ランダムな順序で提示した。刺激はキー押下の 1200±200ms 後に提示された。

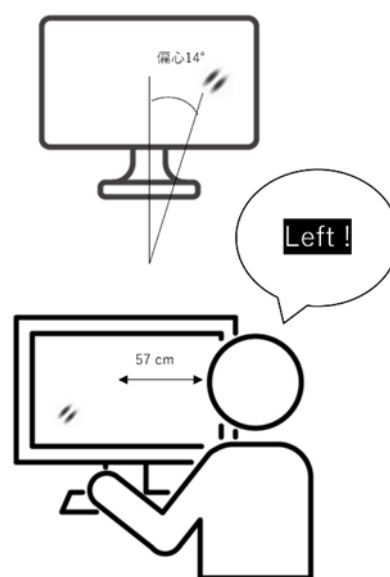


図 3 CBT

3. 結果

3.1. 机上検査 (表 2)

線分二等分試験では, 著名な変化は認められなかった。線分抹消試験では, Sham 刺激開始時に右側の見落としが 3 本あったが, tSMS 前後では見落としはなかった。CBS 自己評価では, tSMS 刺

激後に更衣、整容の項目においてより難しいと感じるようになった。

3.2. CBT (表 3, 4, 5)

左刺激時では, tSMS 前後において正答数は増加し, 無視の回数は減少した。一方, 反応時間は延長した。両側刺激時では, tSMS による介入効果は認められなかった。左または右刺激時と比較して反応時間が早い傾向が認められた。右刺激時には著明な変化は認められなかった。提示される刺激の輝度は, tSMS 前後で著名な変化は認められなかった。右刺激時の輝度は左刺激または両側刺

激と比較し低い傾向が認められた。両側刺激時は tSMS 前後で重みづけスコアが低下し, 右刺激時及び左刺激時は tSMS 前後で著名な変化は認められなかった。

4. 考察

机上検査では USN の傾向はみられなかったが, tSMS 後に左側への注意が促通され主観的に動作を難しいと感じるようになった可能性が示唆された。tSMS 前後の変化に限定すれば, 左刺激時の CBT の正答数が増え, 反応時間が延長するという

表 2 机上検査の結果

線分二等分試験 (左端からの距離)			線分抹消試験 (見落とし数)			CBS (30点中)		
Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS
110	107	115	3	0	0	3	3	6

表 3 刺激位置別の結果

左刺激

正答			反応なし			誤答			反応時間		
Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS
4	0	4	5	9	6	1	1	0	1.12	0.62	1.46

両側刺激

正答			反応なし			誤答			反応時間		
Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS
3	8	6	0	0	0	7	2	4	0.55	0.65	0.63

右刺激

正答			反応なし			誤答			反応時間		
Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS
7	7	7	3	3	2	0	0	1	1	1.17	1.09

表 4 刺激位置ごとの平均輝度

左刺激			両側刺激			右刺激		
Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS
0.45	0.95	0.95	0.95	0.71	0.88	0.13	0.16	0.16

表 5 重みづけスコア (正答数を平均輝度により重みづけ スコア=正答数*(1-平均輝度))

左刺激			両側刺激			右刺激		
Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS
2.22	0.00	0.20	0.15	2.33	0.74	6.11	5.91	5.91

トレードオフ効果が観察された。提示される刺激の輝度は、右刺激時と比較し左刺激時及び両側刺激時に高くなる傾向があり、左 USN の影響により難易度の低い刺激が提示されたと推察される。重みづけスコアは、各条件間のパラメータの変化を顕著に表すことができる。よって前述の左 USN の影響がより明確になる一方、本実験では正答数と平均輝度の変化が過剰に強調される側面があり、変化をとらえる有効なパラメータとなりにくいと考えられる。両側刺激時、右刺激時に tSMS 前後におけるパラメータに著明な変化が認められなかったことから、右頭頂葉領域に対する広範囲な静磁場曝露の副作用は、極めて軽微であったと推察される。

5. 並行実験

5.1. EMD

健康成人 16 名を対象とした。単一磁石、シン磁場刺激、擬似刺激のいずれかを腓腹筋外側頭上に 15 分間設置した。膝窩にて脛骨神経を刺激し、腓腹筋外側頭 (lateral gastrocnemius : LG) および内側頭 (medial gastrocnemius : MG)、ヒラメ筋 (soleus : SOL) から M 波を記録した。ゴニオメーターを用いて足関節底屈トルクを計測し、電気的な興奮から張力発生までの時間 (EMD) を介入前 (pre)、介入直後 (post0)、介入 15 分後 (post15) で経時的に評価した。最大 M 波の振幅と潜時はすべてのタイムポイントおよび刺激条件において差がなかった。M 波発現から足底屈開始までの時間は、単一磁石条件では腓腹筋外側頭および内側頭において、シン磁場刺激条件では第二層のヒラメ筋においても有意に延長した (図 4)。以上より、静磁場環境は、神経筋接合部及び筋膜の興奮後、筋収縮蛋白のクロスブリッジの形成以降の過程に抑制的に作用する可能性が示唆された。

5.2. 痛覚閾値

健康成人 12 名を対象とし、手関節部背面に単一磁石または擬似刺激を 20 分間設置した。表皮内電気刺激法を用いて刺激電極を右手背の橈骨皮神経支配領域に装着し、手背部の A δ 線維および C 線維を選択的に刺激した。介入前後に A δ 線維および C 線維の痛覚閾値と反応時間を計測した。

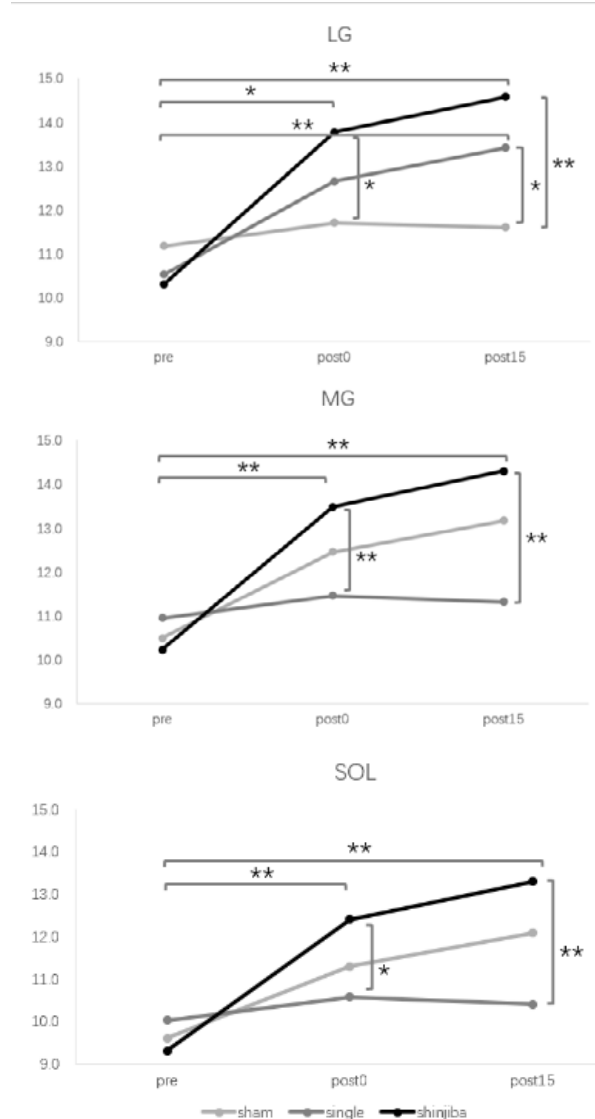


図 4 EMD の結果

C 線維の痛覚閾値は単一磁石刺激後に有意に上昇したが、A δ 線維では差は認められなかった (図 5)。反応時間は A δ 線維と C 線維ともに介入前後で差はなかった。tSMS の影響が髄鞘を持たない C 線維に特異的に表れたことから、C 線維の興奮異常が関与している慢性疼痛に対する補助的治療として tSMS が有効である可能性が示唆された。

謝辞

この研究は公益財団法人渡邊財団第 31 回磁気研究助成の補助の補助を受けて実施したものである。

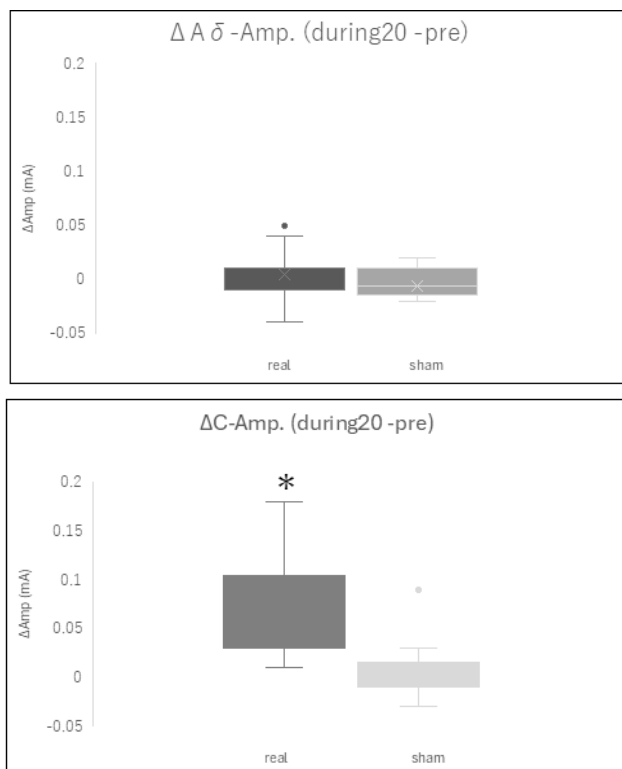


図5 疼痛閾値の結果

参考文献

- 1) Husain M, Rorden C. Non-spatially lateralized mechanisms in hemispatial neglect. *Nat Rev Neurosci.* 4(1): 26-36, 2003.
- 2) Hillis AE. Neurobiology of unilateral spatial neglect. *Neuroscientist.* 12(2): 153-163, 2006.
- 3) Bartolomeo P, Thiebaut de Schotten M, et al. Brain networks of visuospatial attention and their disruption in visual neglect. *Front Hum Neurosci.* 6: 110, 2012.
- 4) Bowen A, McKenna K, et al. Reasons for variability in the reported rate of occurrence of unilateral spatial neglect after stroke. *Stroke.* 30(6): 1196-1202, 1999.
- 5) Karnath HO, Rennig J, et al. The anatomy underlying acute versus chronic spatial neglect: a longitudinal study. *Brain.* 134(Pt 3): 903-912, 2011.
- 6) Nijboer TC, Kollen BJ, et al. The impact of recovery of visuo-spatial neglect on motor recovery of the upper paretic limb after stroke. *PLoS One.* 9(6): e100584, 2014.
- 7) Campbell GB, Matthews JT. An integrative review of

- factors associated with falls during post-stroke rehabilitation. *J Nurs Scholarsh.* 42(4):395-404, 2010.
- 8) Buxbaum LJ, Ferraro MK, et al. Hemispatial neglect: Subtypes, neuroanatomy, and disability. *Neurology.* 62(5): 749-56, 2004.
- 9) Koch G, Bonni S, et al. θ -burst stimulation of the left hemisphere accelerates recovery of hemispatial neglect. *Neurology.* 78(1): 24-30, 2012.
- 10) Salazar APS, Vaz PG, et al. Noninvasive Brain Stimulation Improves Hemispatial Neglect After Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* 99(2): 355-366, 2018.
- 11) Brunoni AR, Amadera J, et al. A systematic review on reporting and assessment of adverse effects associated with transcranial direct current stimulation. *Int J Neuropsychopharmacol.* 14(8):1133-1145, 2011.
- 12) Oliviero A, Mordillo-Mateos L, et al. Transcranial static magnetic field stimulation of the human motor cortex. *J Physiol.* 589(Pt 20): 4949-458, 2011.
- 13) Kirimoto H, Watanabe T, et al. Influence of Static Magnetic Field Stimulation on the Accuracy of Tachystoscopically Presented Line Bisection. *Brain Sci.* 10(12): 1006, 2020.
- 14) Shibata S, Watanabe T, et al. Triple tSMS system ("SHIN jiba") for non-invasive deep brain stimulation: a validation study in healthy subjects. *J Neuroeng Rehabil.* 19(1): 129, 2022.
- 15) Schuhmann T, Duecker F, et al. Transcranial alternating brain stimulation at alpha frequency reduces hemispatial neglect symptoms in stroke patients. *Int J Clin Health Psychol.* 22(3): 100326, 2022.

末梢磁気刺激による運動機能改善と効果機序の解明

Investigation of the Neural Mechanisms Underlying Motor Recovery Induced by Peripheral Magnetic Stimulation

仁藤 充洋*
Mitsuhiro Nito*

*山形県立保健医療大学保健医療学部作業療学科, 〒990-2212 山形県山形市上柳 260

* Department of Occupational Therapy, Yamagata Prefectural University of Health Sciences
260 Kamiyanagi, Yamagata, 990-2212, Japan

Abstract

This study investigated the neural mechanisms underlying the effects of repetitive peripheral magnetic stimulation (rPMS). We demonstrated that rPMS facilitates corticospinal excitability in an intensity-dependent manner, with suprathreshold stimulation producing the greatest effects. This facilitation depended primarily on large-diameter group I afferent input and occurred without changes in cervicomedullary motor evoked potentials, suggesting the involvement of supraspinal mechanisms rather than changes in cortico-motoneuronal transmission. In addition, rPMS induced direction-dependent modulation of disynaptic Ia inhibition between antagonist muscles. These neurophysiological changes may contribute to motor recovery and provide a physiological basis for optimizing rPMS-based neurorehabilitation.

Keywords: group Ia afferents, neuromodulation, rehabilitation, sensory inputs, transcranial magnetic stimulation

1. 目的

近年、中枢神経疾患後の運動機能改善を目的としたリハビリテーションとして、末梢神経への反復磁気刺激（repetitive peripheral magnetic stimulation: rPMS）が注目されている。しかし、運動機能改善をもたらす最適な刺激条件や、その神経生理学的機序については十分に解明されていない。本研究では、rPMS による運動機能改善の神経機序を明らかにすることを目的とし、①刺激強度が皮質脊髄路興奮性に及ぼす影響¹⁾、②皮質脊髄路興奮性増大の作用機序²⁾、③脊髄相反性抑制に対する影響³⁾を検討した。

2. 方法

健康成人を対象に、右橈側手根伸筋（ECR）あ

るいは上腕二頭筋（BB）に対して rPMS を実施した。刺激周波数は、先行研究⁴⁾を参考に 25 Hz とし、ON と OFF の時間をそれぞれ 2 秒間に設定して連続 45 回（合計 3 分）を 5 セット（合計 15 分）実施した。刺激強度は、1) 運動閾値（motor threshold: MT）以下（ $0.9 \times MT$ ）、2) わずかに運動が生じる強度（ $1.2 \times MT$ ）、3) 最大関節運動が誘発される強度（最大背屈強度; mean $\pm$ SD: $1.8 \pm 0.3 \times MT$ ）の 3 条件とした。また、I 群求心性線維の関与を検証するため、上腕の虚血により ECR の H 反射を抑制した条件下で rPMS の効果を評価した。

皮質脊髄路興奮性は経頭蓋磁気刺激により誘発される運動誘発電位（motor evoked potential: MEP）を用い、ECR と橈側手根屈筋（FCR）から

記録した。さらに、経乳様突起電気刺激により誘発される cervicomedullary MEP (CMEP) を測定し、脊髄運動ニューロンレベルでの変化を評価した。

脊髄反射回路への影響を検討するため、FCR および ECR 間の相反性抑制を評価した。FCR の H 反射は肘での正中神経に対する電気刺激により誘発し、橈骨神経への条件刺激による H 反射の変化から、disynaptic Ia inhibition および D1 inhibition (Ia 求心性神経に対するシナプス前抑制を主に反映) を測定し⁵⁾、rPMS 前後で比較した。さらに、逆方向の抑制効果を評価するため、ECR の H 反射を橈骨神経刺激により誘発し、正中神経への条件刺激による変化についても同様に評価した。

3. 結果

rPMS は皮質脊髄路興奮性を強度依存的に増大させた。運動閾値を超える rPMS では MEP 振幅が有意に増大し、高強度刺激ほど短時間で効果が発現した (図 1)。一方、運動閾値以下の rPMS では有意な変化は認められなかった。さらに、上腕虚血により group I 求心性入力を抑制すると、rPMS による MEP 増大効果は消失した。

rPMS による MEP と CMEP への影響を比較した結果、MEP は有意に増大した一方、CMEP には有意な変化を認めなかった。したがって、rPMS

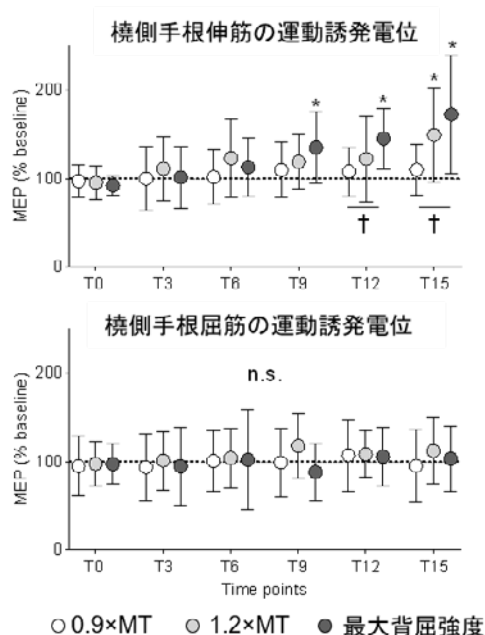


図1. 刺激強度の違いによる皮質脊髄路興奮性への影響。各プロットは平均値，エラーバーは標準偏差を示す。*：T0と比較して有意差あり。†：他の刺激強度条件と比較して有意差あり ($p < 0.05$)。 (文献1の図を改変)

による MEP の増大は、皮質運動ニューロンから脊髄運動ニューロンへの伝達効率の変化によるものではないことが示唆された。

脊髄相反性抑制に関しては、rPMS は刺激筋から拮抗筋への disynaptic Ia inhibition を増強した一方で、反対方向の disynaptic Ia inhibition を減弱させた。これらの変化は方向依存的であり、D1 inhibition および H 反射には有意な影響を認めなかった。

4. 考察

本研究により、rPMS は運動閾値を超える強度で実施することにより、皮質脊髄路興奮性を効率的に増大させることが明らかとなった。また、その効果には group I 求心性入力、特に Ia 求心性線維が重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、CMEP が変化しなかったことから、rPMS による皮質脊髄路興奮性の増大は、脊髄運動ニューロンの興奮性変化ではなく、より上位中枢における神経可塑性を反映することが示唆された⁶⁾⁷⁾。

加えて、rPMS は脊髄相反性抑制回路を方向依存的に修飾することが明らかとなった。刺激筋から拮抗筋への disynaptic Ia inhibition を増強する一方で、反対方向の disynaptic Ia inhibition を減弱させた。中枢神経疾患では、痙縮筋に対する Ia 抑制の低下と、その拮抗筋に対する過剰な Ia 抑制が生じることが報告されている⁸⁾⁹⁾。本研究で認められた方向依存的な変化は、こうした相反性抑制の異常なバランスを改善する可能性を示唆している。特に、痙縮筋の拮抗筋に rPMS を適用することで、痙縮筋への Ia 抑制を強化するとともに、非痙縮筋に対する過剰な抑制を軽減できる可能性がある。これらの結果は、rPMS が脊髄介在ニューロン回路の機能的バランスを調整し、運動機能改善に寄与する可能性を示すものである。今後は、中枢神経疾患患者を対象として、相反性抑制の改善と機能回復との関連を検証する必要がある。

これらの結果から、rPMS は group I 求心性入力を介して皮質脊髄路興奮性を増大させるとともに、脊髄相反性抑制回路を方向依存的に修飾することが明らかとなった。これらの神経生理学的変化が、rPMS による運動機能改善の基盤となる可能性が示唆された。

謝辞

本研究は、公益財団法人渡邊財団による第 31 回磁気研究助成の補助を受けて実施したものであり、その多大なるご支援に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Yoshida K, Nito M, Miyazaki D, et al. Intensity-dependent corticospinal facilitation by repetitive peripheral magnetic stimulation: evidence for a major contribution of group I afferents. *J Neurophysiol.* 135(6): 1455–66 (2026).
- 2) Omiya A, Shitara K, Miyazaki D, et al. Effects of different intensities of repetitive peripheral magnetic stimulation on corticospinal excitability and motor performance in healthy humans. *PLoS One.* 21(5): e0349300 (2026).
- 3) Miyazaki D, Omiya A, Shitara K, et al. Differential Modulation of Reciprocal Inhibition Between Wrist Extensors and Flexors by Repetitive Peripheral Magnetic Stimulation of the Wrist Extensors. *J Neurophysiol.* In Press.
- 4) Nito M, Katagiri N, Yoshida K, et al. Repetitive Peripheral Magnetic Stimulation of Wrist Extensors Enhances Cortical Excitability and Motor Performance in Healthy Individuals. *Front Neurosci.* 15: 632716 (2021).
- 5) Day BL, Marsden CD, Obeso JA, et al. Reciprocal inhibition between the muscles of the human forearm. *J Physiol.* 349: 519–34 (1984).
- 6) Taylor JL, Gandevia SC. Noninvasive stimulation of the human corticospinal tract. *J Appl Physiol* (1985). 96(4): 1496–503 (2004).
- 7) Ugawa Y, Rothwell JC, Day BL, et al. Percutaneous electrical stimulation of corticospinal pathways at the level of the pyramidal decussation in humans. *Ann Neurol.* 29(4): 418–27 (1991).
- 8) Yanagisawa N, Tanaka R, Ito Z. Reciprocal Ia inhibition in spastic hemiplegia of man. *Brain.* 99(3): 555–74 (1976).
- 9) Okuma Y, Lee RG. Reciprocal Inhibition in

Hemiplegia: Correlation with Clinical Features and Recovery. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques.* 23(1): 15–23 (1996).

令和7年度 研究助成テーマ

令和7年度は、以下のように、第32回 17名(基礎6名・応用5名・テーマ指定6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. 磁気集積能を有する脂肪組織幹細胞スフェロイド移植による骨盤臓器脱に対する再生医療の実現
長崎大学 大学院 医歯薬学総合研究科 外科学講座 移植・消化器外科学分野 助教／宮本 大輔
- I -2. 超高磁場MRIによる非侵襲的3次元培養筋組織の立体構造評価
東京大学情報理工学系研究科知能機械情報学専攻 助教／趙 炳郁
- I -3. 転移性尿路上皮癌に対する磁性ナノ粒子を用いた磁気温熱化学療法の開発
名古屋市立大学大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野 助教／永井 隆
- I -4. 磁気を発光によりイメージング可能な発光ラジカルの開発
九州大学先端物質化学研究所 准教授／アルブレヒト 建
- I -5. 脳炎症の機能的診断を指向した超偏極-核磁気共鳴分子プローブの開発
東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻 助教／谷田部 浩行
- I -6. 人工細胞膜を反応場とする生体分子に対する弱磁場の影響評価
岩手大学理工学部 理工学科 准教授／岡 芳美

II.応用研究

- II -1. 生体磁場計測装置を用いた筋活動の評価と神経筋疾患の診断
東京科学大学 整形外科分野 特任助教／大谷 泰
- II -2. 神経障害性疼痛に対する短期集中シータバースト経頭蓋磁気刺激の有効性に関する国際多施設共同研究
大阪大学大学院医学系研究科 脳神経外科学 特任講師／細見 晃一
- II -3. 磁気粒子イメージングに向けた磁気イメージセンサーの開発
九州大学大学院システム情報科学研究院 准教授／笹山 瑛由
- II -4. 高頻度反復性経頭蓋磁気刺激の鎮痛作用を増強するプライミング刺激の効果検証
慶應義塾大学医学部リハビリテーション医学教室 研究員／奥山 航平
- II -5. レビー小体型認知症および軽度認知障害の抑うつ症状への脳磁気刺激療法の有効性と安全性を検討する探索的介入研究
大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室 講師／高橋 隼

III.テーマ指定研究

- III -1. 磁化率共鳴画像磁化率分離法によるアルツハイマー病患者の脳アミロイド β 定量
名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員／打田 佑人
- III -2. 脳波疾患内サブタイピングに基づくrTMS治療予測アルゴリズムの開発
九州大学大学院医学研究院 大学院生／金光 芳樹
- III -3. 反復性経頭蓋磁気刺激法(TMS)の磁場作用による神経可塑性機構の解明と心理療法効果増強への応用
慶應義塾大学保健管理センター 専任講師／片山 奈理子
- III -4. 上肢運動機能再建を目的とした反復経頸椎磁気刺激法の機能的誘発運動評価
公益財団法人 東京都医学総合研究所 研究員／辻 寛謙
- III -5. 磁性ナノ粒子の細胞小器官への標的化を利用したエンドソーム脱出の磁場条件の研究
岩手大学理工学部材料科学コース 准教授／芝 陽子
- III -6. 脊髄損傷後異常同時収縮に対する経頭蓋磁気刺激を用いた皮質-網様体脊髄路評価法の確立
順天堂大学大学院医学研究科 日本学術振興会 特別研究員／片桐 夏樹

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

31TH

(STUDY DURATION : April 1, 2025 – March 31, 2026)

CONTENTS

Preface	1
Director Makoto Kotani	
I. Basic Research	
I-1. Diffusion-weighted imaging of adipocyte microstructure	2
Institute of Science Tokyo Associate Professor Madoka Ogawa	
I-2. Development of a Brain Tumor Treatment System Using Intranasal Administration and Magnetic Drug Delivery for Selective Drug Delivery to Brain Areas	9
Nagoya-City University Lecturer Koki Ogawa	
I-3. Elucidation of neural circuits for monitoring and regulation of response inhibition: A multimodal study using TMS and fMRI	11
Juntendo University Associate Professor Takahiro Osada	
I-4. Development of a method for characterizing magneto-liposome via the AC Cotton-Mouton effect	14
Osaka University Assistant Professor Masayori Suwa	
II. Application Research	
II-1. Realization of photo-thermo-chemical nano-theranotics to achieve simultaneous magnetic imaging and therapy.	17
Nagoya University Designated Lecturer Kazuhide Sato	
II-2. Spatial visualization of brain energy metabolism using hyperpolarized ¹³ C-pyruvate magnetic reso- nance spectroscopy and its preclinical applications	22
National Institutes for Quantum Science and Technology Researcher Maiko Ono	
II-3. Integration of transcranial magnetic stimulation and magnetoencephalography	25
The University of Tokyo Hospital Lecturer Yuichiro Shirota	
II-4. Development of novel cancer magnetic thermochemotherapy using magnetized mesenchymal stem cells	29
Laboratory of Pharmaceutics, Kobe Pharmaceutical University Associate Professor Yusuke Kono	
II-5. Disk-shaped nanoparticles as ¹⁹ F MRI contrast agent	31
Center for Future Innovation, Graduate School of Engineering, Osaka University Assistant Professor Tomoya Yamamoto	
III. Specific Research	
III-1. Development of a noninvasive method to assess neurophysiological function in lumbar spine diseases using magnetospinography	34
Dept. of Advanced Technology in Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University Assistant professor Jun Hashimoto	
III-2. Innovative treatment for cisplatin-induced hearing loss using magnetic guidance technology	37
Otolaryngology-Head and Neck surgery, Kitasato University Associate Professor Takaomi Kurioka	
III-3. Diffusion Tensor Imaging Research on Schizophrenia	39
Department of Neuropsychiatry, the University of Tokyo Hospital Assistant Professor Daisuke Koshiyama	
III-4. Investigation of the mechanism of chronic pain relief by alternating magnetic fields.	42
Laboratory of Systems Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University Professor Masahiro Ohsawa	
III-5. Effects of transcranial static magnetic stimulation on unilateral spatial neglect after stroke	47
Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University Assistant Professor Amiri Matsumoto	
III-6. Elucidation of the effects of repetitive peripheral magnetic stimulation on the central nervous system and its underlying mechanisms	53
Yamagata Prefectural University of Health Sciences Professor Mitsuhiro Nito	

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 2024. 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.

Director Makoto Kotani
The Watanabe Foundation

The use of time-dependent diffusion-weighted imaging for adipocytes

Madoka Ogawa^{*}, Hinako Oshiro^{**},^{***}, Ayaka Ichinose^{****}, Hata Junichi^{**},^{***}, Miwako Nishio^{****}

^{*}Institute for Liberal Arts, School of Environment and Society and Society, Department of Social and Human Sciences, Institute of Science Tokyo

2-12-1 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8550, Japan

^{**}Laboratory for Neural Computation and Adaptability, RIKEN Center for Brain Science

2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan

^{***}Graduate School of Human Health Sciences, Tokyo Metropolitan University

7-2-10 Higashiogu, Arakawa-ku, Tokyo 116-8551, Japan

^{****}Graduate School of Medical and Dental Sciences, Institute of Science Tokyo

1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan

Abstract

The feasibility of time-dependent diffusion-weighted imaging (td-DWI) for fat phantoms and brown adipocytes (BA) derived from human induced pluripotent stem cells was investigated. Apparent diffusion coefficient (ADC) measurements at multiple diffusion times (DT16–DT676 ms) showed three distinct diffusion time-dependence patterns. In the absence of fat suppression, lipid proton signals from triglycerides influenced ADC measurements, plateauing at approximately 40% fat content. Cell viability was 1% in the BA after MR imaging. These findings demonstrate that td-DWI can detect diffusion time dependence in fat phantoms. However, maintaining cell viability will be necessary for future studies.

Keywords: induced pluripotent stem cells, brown adipocyte, apparent diffusion coefficient

1. PURPOSE

Human brown adipose tissue plays a role in thermoregulation through heat production and in energy metabolism(1). A technique for inducing brown adipocytes from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) has been established(2-4), and it is expected to be applied as a treatment for metabolic diseases such as obesity. However, no non-invasive method has been established for observing the engraftment and proliferation of adipocytes, and there is a need for such an evaluation method.

Diffusion weighted imaging (DWI) is method of imaging based on the differences in the Brownian motion of water molecules within biological tissue and non-invasively assess the tissue's

microstructure. Conventional DWI measures the diffusion coefficient at a single diffusion time. In contrast, time-dependent diffusion-weighted imaging (td-DWI) acquires more detailed microstructural information by measuring the apparent diffusion coefficient (ADC) at multiple diffusion times (5, 6). The aim of this study was to investigate td-DWI sequence parameters in phantoms with varying fat content and in brown adipocytes (BA) derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs), to explore the potential for adipocytes.

2. METHOD

(1) Containers for MR imaging

The holder and microtubes for MR imaging were

fabricated in collaboration with the Core Facility Centre at Institute of Science Tokyo using a 3D printer (KEYENCE AGILISTA-3100). The holder has been designed to securely hold the microtubes in the centrifuge tube (AGC Techno Glass Co., Ltd., 2363-025-MYP) and ensure positional reproducibility during MR imaging. The microtubes were designed with a screw-lock mechanism and lids to enable the filling, sealing and removal of cell suspensions. The material used was transparent resin (KEYENCE AR-M2).

(2) MR imaging protocols

Referring to previous study (7), we fabricated a fat phantom modeled after the human body and evaluated the optimal td-DWI parameters specifically for adipocyte in advance. The composition of the fabricated phantom is shown in Table 1.

Table 1. Fat phantom components

Fat content, %	Water, μL	Coconut oil, μL	Tween-80, μL	Gelatin (Sigma-Aldrich®), g
0	975	0	0	0.025
20	749	218	24	0.025
40	523	437	48	0.025
60	297	655	72	0.025

Density: Water 1.0 g/mL, Coconut oil (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 0.916 g/mL, Tween-80(bioWORLD) 1.080 g/mL

MR imaging was performed using a 9.4 T system (660 mT/m; Bruker Biospin) and a 23 mm inner diameter solenoid coil (Takashima seisakusho Co.,Ltd). The parameters for diffusion-weighted, gradient-stimulated echo (STEAM) imaging were as follows: Diffusion time ($\Delta\delta/3$): 16, 36, 64, 100, 144, 196, 256, 324, 400, 484, 576 and 676 ms; diffusion direction: 1; b-values: 900 and 2,225 s/mm²; Gradient duration (δ): 2.4 ms; TR: 5,000 ms; TE: 15.8 ms; FOV: 24 × 24 mm²; Matrix size: 64 × 64; Resolution: 0.375 × 0.375 mm²; slice thickness: 0.5 mm; number of averages: 1; acquisition time: 10 min 40 s × 12 (multi-diffusion time) × 6 terms. The MR room temperature was set to 22 °C.

(3) Culture of brown adipocytes derived from human iPSCs

Preliminary experiments were conducted at Institute of

Science Tokyo and the RIKEN Institute after confirmation was obtained that they were exempt from human ethics review. The induction of differentiation into BA using human iPSCs was carried out in accordance with established protocols (4). The BA differentiation induction medium contained IMDM, Ham's F-12, 1/100 Chemically Defined Lipid Concentrate, 1/100 Insulin Transferrin Selenium, 50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid-2-phosphate, and GlutaMAX™ Supplement.

Human iPSCs were dissociated using TrypLE Express and seeded onto Corning Elplasia multi-well plates at a density of approximately 2,000 cells per spheroid. On day 8 of differentiation induction, the cells were seeded onto i-Matrix-coated plates. The cells were harvested on day 10.

We examined cell viability and pellet thickness following the formation of BA pellets at room temperature (Table 2). Cell viability was measured using trypan blue staining. Based on the results of preliminary experiments, three cell concentration conditions were selected for this experiment: 10×10^5 cells, 20×10^5 cells and 25×10^5 cells, as these were predicted to yield cell viability of 50% or higher after 10 hours.

Table 2. Cell viability at room temperature

Elapsed time	Cell viability (%)	
	10×10^5 cells	60×10^5 cells
0	100	100
12	56.9	18.0
18	37.7	14.9

(4) Preparation of phantoms and BA prior to imaging
Fat phantoms with different fat contents were stored at 4 °C and allowed to return to room temperature prior to imaging. Furthermore, BA was adjusted to cell counts of 10×10^5 cells (S1), 20×10^5 cells (S2), 20×10^5 cells (S3) and 25×10^5 cells (S4), injected into tubes together with culture medium, and then transported from the culture facility to the imaging facility at room temperature.

Before MR imaging, the sample was

centrifuged at room temperature (1,000 rpm $\times$ 3 minutes) to confirm the presence of the BA pellet. The BA was then transferred to a microtube, filled with culture medium and capped. These were inserted into commercially available microtubes (VIOLAMO) and centrifuged (room temperature, 300 rpm $\times$ 3 min, 700 rpm $\times$ 3 min) to form a pellet (Figure 1C). The thickness of the formed BA pellet was approximately 0.3 mm. Each fat phantom and the microtubes S1–S4 were carefully placed in a holder, after which they were filled with a fluorinated inert liquid (Galden, Solvay Specialty Polymers Japan) and imaged using the td-DWI sequence previously evaluated.

(5) Cell viability and AQP7 expression

After MR imaging, BA was removed from the microtubes, and cell viability was assessed. Furthermore, the expression of aquaporin 7 (AQP7) was confirmed by fluorescent histochemical staining of the BA samples (S1–S4) on later days. AQP7 is responsible for the membrane permeability of water and glycerol in adipocyte membranes (8, 9), as its expression influences the movement of water between the intracellular and extracellular spaces, it is thought to be involved in the diffusion-time dependence of td-DWI. In this study, the following procedures were performed. After removing the culture medium, the samples were washed twice with 1 $\times$ PBS and fixed in a 4% PFA/PBS solution at room temperature for 15 minutes. Following fixation, the samples were washed three times with PBS for 5 minutes each and stored at 4°C.

Blocking was performed for 1 hour using a solution of 1 $\times$ PBS, 5% BSA and 0.1% Tween-20. After washing with PBS, the samples were incubated with anti-AQP7 antibody (SC-376407 FITC, Santa Cruz Biotechnology, diluted 1:100) for 2 hours. Following washing with PBS, the nuclei were stained with DAPI and the sections were mounted with a fluorescent mountant. Observation of the fluorescent histochemical staining was carried out at the Bioscience center, Institute of Science Tokyo.

(6) Image Analysis

After MR imaging, the DICOM data were converted to NIfTI format using dcm2nii (version 1.0). Using Fiji ImageJ (version 2.16), nine regions of interest (ROIs) were manually defined at the centre of the microtubes on the NIfTI images (Figure 2) and applied to all conditions. The mean intensity values within each ROI were calculated using an automated macro script. The ADC was calculated from the obtained values.

3. RESULTS

Figures 3A–D show the ADC ($\times 10^{-3}$ mm²/s) for phantoms with different fat contents. Figures 3E–I show the ADC for diffusion times (DT16–DT676 ms) for each cell count condition (S1–S4) across the 1st to 6th terms.

In the 0% fat phantom, the ADC increased from 0.178×10^{-3} mm²/s (DT16) to 0.291×10^{-3} mm²/s (DT676), and the inter-term variation was smaller in the short diffusion time domain and increased after DT484. A similar increase was observed in the 40% fat phantom, and the inter-term variation was smallest of all conditions (DT16; CV 0.9%). In contrast, for the 20% fat phantom, the value at DT16 was 1.515×10^{-3} mm²/s; it peaked at DT324 (1.811×10^{-3} mm²/s) and then declined. The 60% fat phantom exhibited similar results.

The ADC values for DT16 under each BA condition were: S1; 1.534×10^{-3} mm²/s, S2; 1.213×10^{-3} mm²/s, S3; 1.522×10^{-3} mm²/s, S4; 1.531×10^{-3} mm²/s, with only S2 showing a lower value compared to the other conditions. Compared to DT16, a decrease in ADC was observed for S1 and S4 in DT676, whereas CM, S2 and S3 showed almost no change.

Figures 4a–l show comparisons of ADC values across all conditions for each diffusion time and each term. When ADC values were classified according to their diffusion time-dependent patterns, three distinct patterns were observed: (1) increasing with diffusion time (fat content 0% and 40%), (2) increasing to decrease (fat content 20% and 60%), and (3) plateau to decrease (CM, S1–S4) (Figure 4). The phantom with a fat content of 0% exhibited the lowest

ADC values across all conditions and was clearly distinguishable from the other conditions. The phantoms with fat contents of 40% and 60%, as well as CM, S1, S3 and S4, showed values of a similar magnitude, whilst only S2 exhibited lower values than the other BA conditions. Furthermore, no significant differences were observed between the individual terms under any of the conditions.

The cell viability of S1 to S4 immediately after imaging was 1% in all conditions. Fluorescent immunostaining using anti-AQP7 antibodies was performed on BA samples that had been fixed promptly after imaging; however, no expression of AQP7 was observed in any of the samples.

4. DISCUSSION

The ADC in the 0% fat phantom ranged from 0.178 to $0.291 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ (Figure 3A), which was lower than the self-diffusion coefficient in water at 20 °C ($2.025 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)(10). This result is thought to be due to the three-dimensional network structure of gelatin physically restricting the diffusion of water molecules.

As fat suppression was not used in this study, the inter-term variability observed in the 20% and 60% fat phantoms may be attributed to the mixed signal from water protons and triglyceride molecules affecting the ADC. Furthermore, as the proton peaks of triglyceride molecules have different relaxation times(11), the signal ratio between water and triglycerides may have changed due to T2 decay in the long diffusion time range, potentially causing variations between terms.

In the ADC of BA, a decreasing trend in ADC was observed from DT16 to DT676 in both S1 and S4. However, as cell viability was only 1%, this is believed to be due to the presence of dead cells and the diffusion characteristics of the culture medium. The decline in cell viability is thought to have been caused by physical stress resulting from two hours of transport, around 15 hours of standing and repeated pellet formation. Reasons for failing to detect AQP7 expression may include loss of antigenicity due to dead cells and signals below the detection limit due to

low cell numbers and expression levels of AQP7 in BA.

This study demonstrated that td-DWI could detect diffusion time dependence in phantoms and can capture differences in ADC resulting from variations in fat content. We also confirmed that, in the absence of fat suppression, lipid proton signals interfere with the ADC, and that this effect plateaus at a fat content of 40%. In future study, the important tasks will be ensuring an adequate number of cells and shortening transport time it takes to transport them and improving the containers used for MR imaging. Furthermore, imaging cells in a spherical suspension culture state without detaching the cells could be expected to reduce stress and ensure sufficient volume.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a research grant from the Watanabe Foundation.

REFERENCES

1. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature medicine*. 2013;19(10):1252-63.
2. Nishio M, Saeki K. Differentiation of human pluripotent stem cells into highly functional classical brown adipocytes. *Methods in enzymology*. 2014;537:177-97.
3. Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, Suzuki S, Saeki K, Hasegawa M, et al. Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer. *Cell metabolism*. 2012;16(3):394-406.
4. Oka M, Kobayashi N, Matsumura K, Nishio M, Saeki K. Exogenous Cytokine-Free Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Classical Brown Adipocytes. *Cells*. 2019;8(4).
5. Grussu F, Bernatowicz K, Casanova-Salas I, Castro N, Nuciforo P, Mateo J, et al. Diffusion MRI signal cumulants and hepatocyte microstructure at fixed diffusion time: Insights from simulations, 9.4T imaging, and histology. *Magnetic resonance in medicine*. 2022;88(1):365-79.
6. Maekawa T, Hori M, Murata K, Feiweier T, Kamiya K, Andica C, et al. Time-dependent Diffusion in Brain Abscesses Investigated with Oscillating-gradient Spin-echo. *Magn Reson Med Sci*. 2022;21(4):525-30.

7. Scholey JE, Chandramohan D, Naren T, Liu W, Larson PEZ, Sudhyadhom A. Technical Note: A methodology for improved accuracy in stopping power estimation using MRI and CT. *Med Phys.* 2021;48(1):342-53.
8. Madeira A, Camps M, Zorzano A, Moura TF, Soveral G. Biophysical assessment of human aquaporin-7 as a water and glycerol channel in 3T3-L1 adipocytes. *PloS one.* 2013;8(12):e83442.
9. Costa IP, Schiano G, Sacnun JM, Herzog R, Kerr A, Dahlman I, et al. AQP7 deficiency drives adipose tissue remodeling and disrupts homeostasis. *NPJ Metab Health Dis.* 2025;3(1):44.
10. Manfred Holz SRHaAS. Temperature-dependent self-diffusion coefficients of water and six selected molecular liquids for calibration in accurate 1H NMRPFG measurements *Physical Chemistry Chemical Physics.* 2000;2(20):4740-2.
11. Peterson P, Trinh L, Månsson S. Quantitative (1) H MRI and MRS of fatty acid composition. *Magnetic resonance in medicine.* 2021;85(1):49-67.

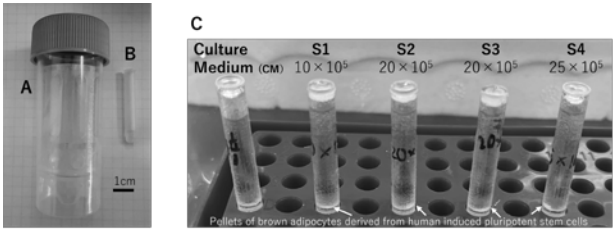


Figure 1.

A. Imaging holder and a centrifuge.

B. A microtube with a lid.

C. Culture medium; human-induced pluripotent stem cell-derived brown adipocytes (S1–S4) after pellet formation at different cell densities.

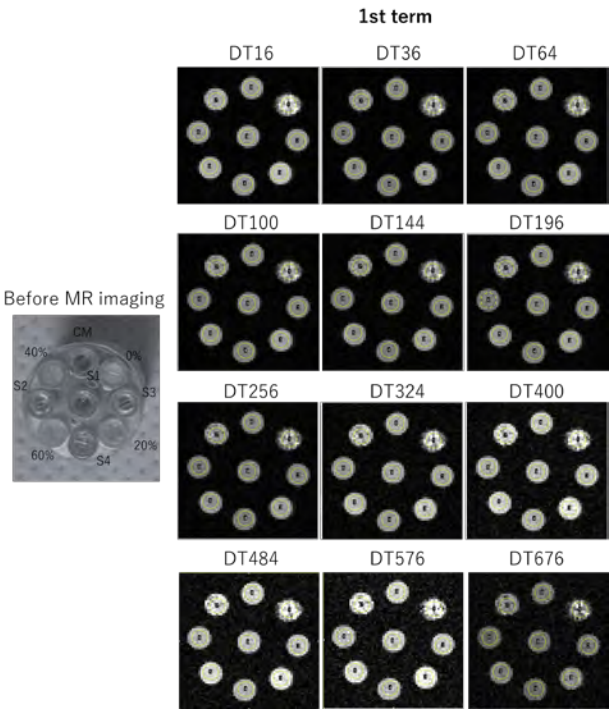


Figure 2. Example of a time dependent diffusion imaged (1st term, b-values: 2,225 s/mm²).

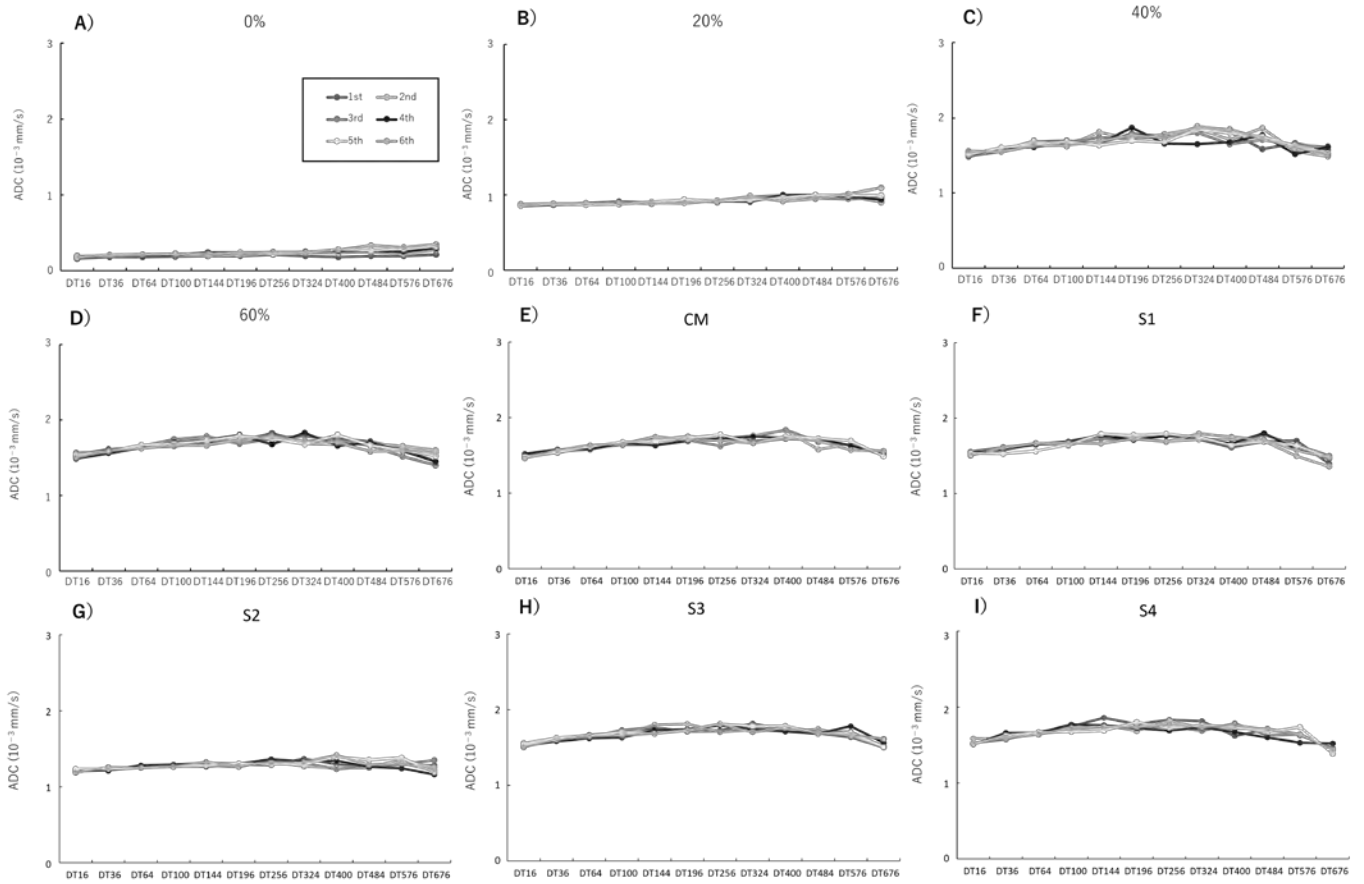


Figure 3. Apparent diffusion coefficients (ADC, $\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) and diffusion times (DT16–DT676 ms) for the 1st to 6th terms. A) Phantom with 0% fat content, B) Phantom with 20% fat content, C) Phantom with 40% fat content, D) Phantom with 60% fat content, E) Culture medium (CM), F) S1; brown adipocytes derived from human induced pluripotent stem cells (BA), 10×10^5 cells, G) S2; BA 20×10^5 cells, H) S3; BA 20×10^5 cells, I) S4; BA 25×10^5 cells.

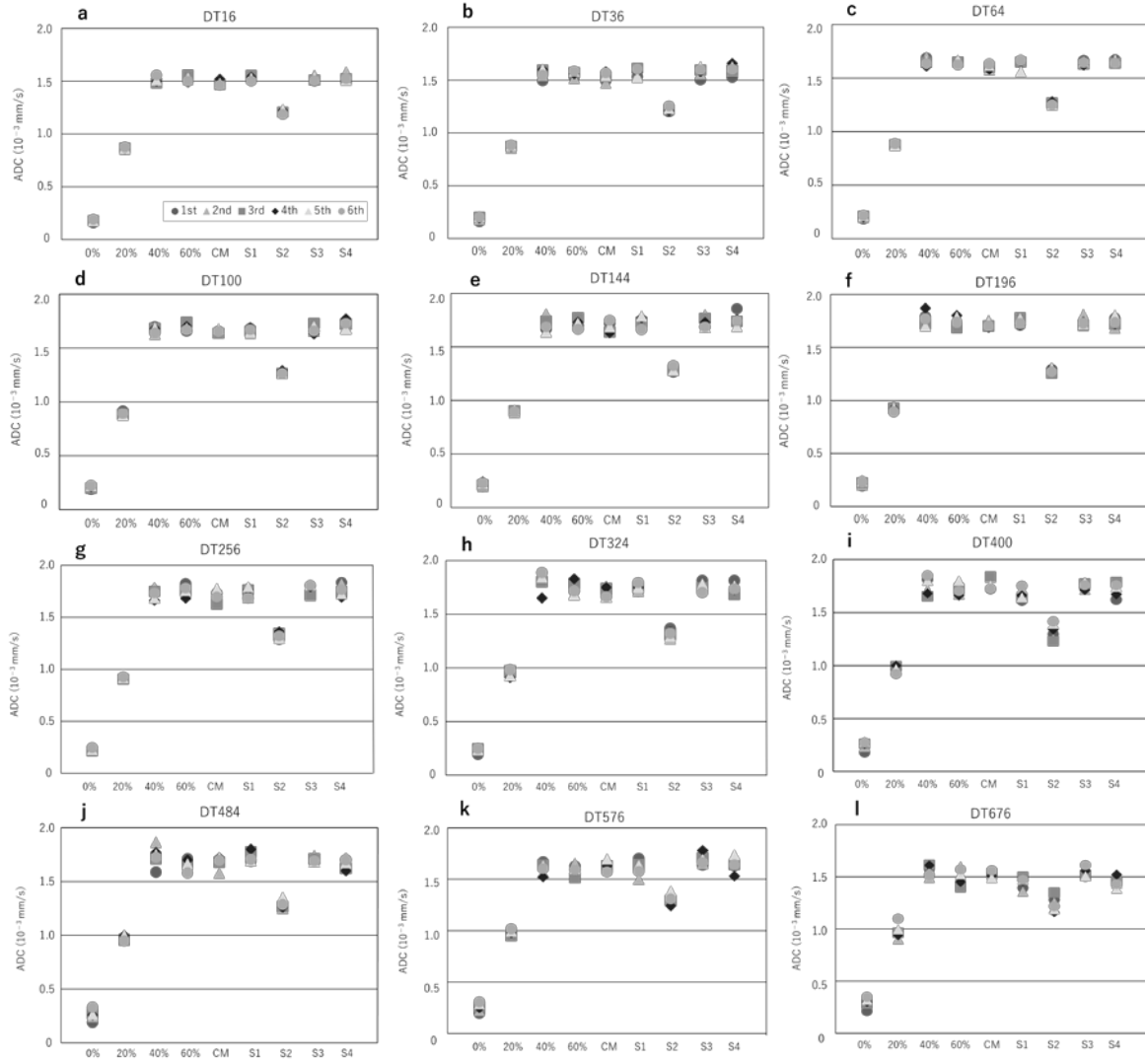


Figure 4. Apparent diffusion coefficients (ADC, $\times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) for terms 1 to 6 at each diffusion time (DT)

Construction of a Brain Tumor Treatment System Using Brain Region-Selective Drug Delivery via Nasal Administration and Magnetic Targeting

Koki Ogawa

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

Abstract

This study aimed to construct a novel intracerebral drug delivery system combining nasal administration with magnetic targeting, and developed iron oxide nanoparticle-encapsulated PLGA nanoparticles (IONP@PLGA). Magnetic field application was confirmed to significantly enhance the uptake of IONP@PLGA by glioma cells. Furthermore, applying a magnetic field to the brain after nasal administration in rats significantly improved the brain translocation of IONP@PLGA. This approach improves brain translocation following nasal administration and demonstrates potential utility as a platform technology for future control of intracerebral drug distribution.

[Research Progress and Results]

[Introduction]

The blood–brain barrier (BBB) strictly limits the transport of substances into the brain. Therefore, the use of drug delivery system (DDS) technology is essential for the efficient delivery of drugs to the brain. Meanwhile, a nose-to-brain pathway that transports drugs from the nasal cavity directly to the brain has been suggested to exist, and brain delivery research exploiting this route has been actively pursued. However, nose-to-brain delivery tends to result in biased distribution toward brain regions near the nasal cavity, limiting the brain regions that the drug can reach. Consequently, a new methodology capable of precisely controlling drug distribution within the brain is required for the broad application of this approach to the treatment of brain diseases.

As a method for controlling the pharmacokinetics of drugs, “magnetic targeting,” which utilizes magnetic materials and an external magnetic field, has been actively studied; however, its application to nose-to-brain delivery has not yet been reported. We therefore hypothesized that combining nose-to-brain delivery with magnetic targeting would enable efficient, disease site-selective drug delivery within the brain. The aim of this study was to design a magnetically guided DDS carrier suitable for nasal administration and to develop a system capable of delivering drugs to targeted sites within the brain through nasal administration combined with magnetic targeting.

[Methods]

As a DDS carrier capable of simultaneously

loading a magnetic material and a drug, iron oxide nanoparticles (IONPs) were encapsulated in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles to prepare IONP@PLGA. The basic physicochemical properties of IONP@PLGA were evaluated by electron microscopy and particle size measurement using dynamic light scattering. Next, the cellular uptake of IONP@PLGA under magnetic field exposure was measured using the glioma cell line C6. Furthermore, IONP@PLGA was administered intranasally to rats, and brain translocation and intracerebral distribution were evaluated after applying a magnetic field to the brain.

[Results and Discussion]

Preparation of IONP@PLGA

IONPs were prepared by the conventional co-precipitation method using FeCl_3 and FeSO_4 , yielding a standard particle size of 26 nm. To improve the encapsulation efficiency into PLGA nanoparticles, the IONP surface was cationically modified with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES). IONP@PLGA was prepared by mixing an acetone solution of PLGA with an aqueous solution containing the IONPs under stirring. The resulting particles had an average particle size of approximately 200 nm and a zeta potential of approximately 13 mV. Electron microscopy revealed punctate structures inside the spherical particles, suggesting that the IONPs were encapsulated within the PLGA nanoparticles.

Uptake by C6 Glioma Cells

Coumarin-6-labeled IONP@PLGA was added to C6 cells, a magnetic field was applied from beneath the culture using a magnetic plate, and the cells were

cultured for a defined period before quantifying the intracellular Fe content. At all time points from 1 to 4 hours, the magnetic field-exposed group showed significantly higher cellular uptake than the non-exposed group. This result was consistent with the coumarin-6 fluorescence observations, demonstrating that magnetic field exposure promotes the cellular uptake of IONP@PLGA. Because IONP@PLGA also allows simultaneous encapsulation of a drug, loading it with an anticancer agent in the future is expected to enhance the therapeutic efficacy of drug therapy.

Evaluation of Brain Translocation In Vivo

After intranasal administration of IONP@PLGA to rats, a magnetic field was applied to the brain using a neodymium magnet, and brain translocation and intracerebral distribution were evaluated. Magnetic field exposure increased the brain translocation of IONP@PLGA by approximately 3-fold. IONP@PLGA also showed higher brain translocation than IONP alone (Fig. 1).

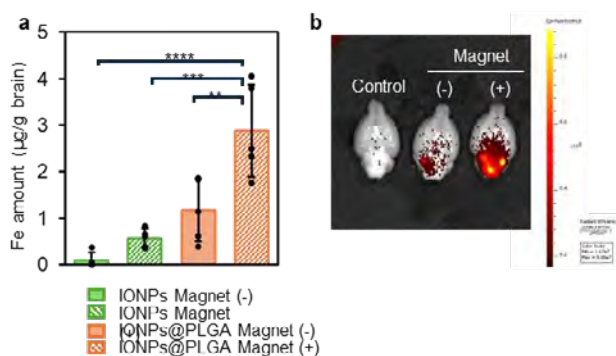


Fig. 1) Accumulation of iron in the brain after administration of IONPs or IONPs@PLGA with or without a magnetic field. Data represent mean $\pm$ S.D. (n = 3) and analyzed with one-way ANOVA with Tukey's test. Significant at **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001. (b) Representative in vivo imaging system (IVIS) images of untreated rats (left), rats treated with DiR-IONPs@PLGA without a magnetic field (middle), and rats treated with IONPs@PLGA with a magnetic field (right).

[Conclusion]

In this study, IONP@PLGA was developed as a magnetically responsive DDS carrier, and its enhanced uptake by glioma cells under magnetic field exposure was confirmed. Furthermore, applying a magnetic field to the brain after intranasal administration in rats was demonstrated to improve brain translocation. However, precise control of drug distribution within the brain has not yet been achieved. Combining this approach with the future development of medical devices capable of pinpoint magnetic field application is expected to expand its application to the treatment of brain diseases.

[Acknowledgment]

This work was supported by the the Watanabe Foundation.

[Publications and Presentations]

The content of this report has been presented in the following publication and symposia.

- K. Sato, K. Ogawa, S. Nabeshima, S. Suwabe, T. Ozeki. Fabrication and Application of Iron Oxide-Encapsulated PLGA Nanoparticles with Dual Responsiveness to Magnetic Fields and Light for Nose-to-Brain Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 107535, 2025.
- K. Ogawa, S. Suwabe, T. Totoki, S. Nabeshima, T. Ozeki. Formulation Technology to Enhance Nose-to-Brain Efficiency and Its Application to New-Modality Pharmaceuticals. Academy of Pharmaceutical Science and Technology, Japan, Pulmonary/Nasal Delivery Focus Group, 2024 Annual Meeting (Invited Lecture).
- K. Ogawa, T. Ozeki. Formulation Design to Enhance Brain Translocation via Nasal Administration and Magnetic Field-Responsive DDS. 4th Annual Meeting of the Society for Ultrasound Molecular Diagnosis and Therapy, (Invited Lecture).

Elucidating the neural circuits underlying the monitoring and adjustment of action stopping: A multimodal study of TMS and fMRI

Takahiro Osada

Department of Neurophysiology, Juntendo University School of Medicine
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421 Japan

Abstract

This study aimed to clarify neural circuits underlying the monitoring and adjustment of response inhibition. Using fMRI, resting-state network analysis, and TMS during a stop-signal task, we identified candidate fronto-parietal regions involved in post-error behavioral adjustment and found evidence suggesting that these regions contribute to subsequent stopping performance in a time-dependent manner.

Keywords: response inhibition, stop-signal task, functional MRI, transcranial magnetic stimulation, fronto-parietal network

1. Purpose

Response inhibition is a cognitive function that enables individuals to suppress inappropriate actions and select appropriate behavior according to changes in the environment. It is one of the key executive functions supporting adaptive behavior in humans. For example, the ability to stop suddenly after detecting danger immediately after starting to walk is essential for flexible behavioral control in daily life. Impairment of response inhibition is also known to be associated with various psychiatric and neurological disorders, including attention-deficit/hyperactivity disorder, obsessive-compulsive disorder, and addiction.

Previous studies have shown that response inhibition involves multiple brain regions, including the posterior inferior frontal cortex (pIFC), presupplementary motor area (preSMA), intraparietal sulcus (IPS), and basal ganglia. Using functional magnetic resonance imaging (fMRI) combined with transcranial magnetic stimulation (TMS), we previously demonstrated that the right pIFC contains functionally distinct subregions: the ventral pIFC (vpIFC), which is involved in stopping per se, and the dorsal pIFC (dpIFC), which is involved in the

monitoring and adjustment of response inhibition^{1), 2)}. More recently, by combining fMRI, TMS, and transcranial ultrasound stimulation (TUS), we clarified large-scale brain circuits supporting response inhibition from visual processing to action stopping³⁾.

However, the neural circuits underlying monitoring after response inhibition and behavioral adjustment in subsequent trials remain incompletely understood. In particular, it remains unclear what kind of neural processing occurs after failed stopping and how such information is reflected in subsequent behavioral control.

The present study aimed to clarify the neural components and temporal dynamics of the circuits underlying post-error monitoring and behavioral adjustment during response inhibition. In particular, we sought to identify brain regions activated during failed response inhibition and to examine their causal contribution using TMS intervention, thereby elucidating the neural basis of behavioral adjustment after failed stopping.

2. Method

We conducted an fMRI experiment in healthy adults

using the stop-signal task, a representative task for investigating response inhibition⁴). In this task, participants responded to visually presented arrow stimuli by pressing either the left or right button in go trials. In a subset of trials, a stop signal was presented, and participants were required to suppress the ongoing motor response. In the present study, we focused particularly on brain activity during failed response inhibition and explored brain regions involved in monitoring and behavioral adjustment after failed stopping.

In the fMRI analysis, we compared brain activity associated with successful and failed stop trials and extracted regions showing characteristic activity during failed stopping. In addition, resting-state fMRI data were used to analyze functional connectivity among the identified candidate regions. This analysis was performed to examine how each region was positioned within large-scale brain networks.

Furthermore, we conducted a causal intervention experiment using TMS targeting candidate regions identified from the fMRI and resting-state network analyses. While participants performed the stop-signal task, single-pulse TMS was applied to candidate regions as a transient intervention, and its effects on subsequent stopping performance were evaluated. By applying stimulation at different time points during the task, we examined the time periods during which each brain region may contribute to behavioral adjustment after failed stopping.

3. Results

The fMRI analysis identified candidate regions showing activity during failed response inhibition. In addition to the dpIFC and IPS, which we had previously reported, the middle frontal cortex (MFC) and anterior preSMA were identified as additional candidate regions.

The dpIFC and IPS had been implicated in behavioral monitoring and adjustment after response inhibition in our previous studies^{1), 2)}. The present study further suggested the involvement of the MFC and anterior preSMA. These regions showed increased

activity during failed stopping and may be involved in subsequent behavioral adjustment.

Resting-state fMRI-based functional network analysis further suggested that these regions were located within a broader network centered on the fronto-parietal network. This finding indicates that monitoring and behavioral adjustment after failed response inhibition may be supported not by a single brain region, but by a distributed network composed of multiple frontal and parietal regions.

In addition, the single-pulse TMS experiment showed that stimulation of candidate regions at specific time periods during failed stopping affected performance in the subsequent stop trial. The effects varied depending on stimulation timing, suggesting that time-dependent neural processing occurs after failed stopping and that this processing may be reflected in subsequent behavioral control (Figure 1).

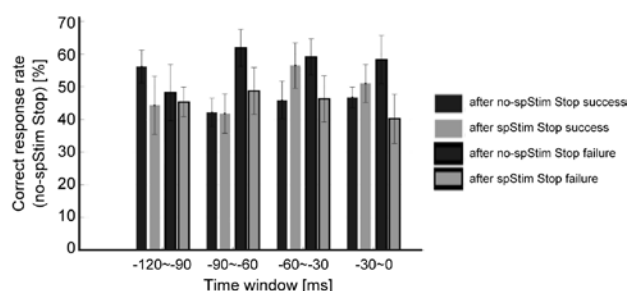


Figure 1. Single-pulse TMS applied to candidate regions suggested that neural processing during specific time periods of failed stopping may influence performance in the subsequent stop trial.

4. Discussion

In this study, we examined the neural circuits underlying the monitoring and adjustment of response inhibition by combining fMRI-based activity analysis, resting-state fMRI-based network analysis, and causal intervention using TMS.

The results suggest that, in addition to the dpIFC and IPS, which have been considered candidate regions in previous studies, the MFC and anterior

preSMA may also be involved in behavioral adjustment after failed stopping. In particular, the finding that these regions were positioned within the fronto-parietal network supports the possibility that monitoring and adjustment after response inhibition are supported by network dynamics involving multiple brain regions.

The time-specific TMS intervention further suggested that neural activity during specific time periods during failed stopping may influence response inhibition performance in the subsequent trial. This finding indicates that response inhibition should not be understood simply as a binary process of whether stopping succeeds or fails. Rather, it should be considered a dynamic control process that includes monitoring after failed stopping, evaluation of behavioral outcomes, and updating of behavioral strategy in subsequent trials.

The findings of this study may also contribute to understanding the pathophysiology of psychiatric and neurological disorders associated with impaired response inhibition. For example, in disorders such as ADHD and obsessive-compulsive disorder, abnormalities may exist not only in stopping ability itself but also in behavioral adjustment after failed stopping. The candidate neural circuits suggested by this study may provide a basis for understanding such pathophysiological mechanisms.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from the Watanabe Foundation through the 31st Magnetic Research Grant Program.

References

- 1) Osada T, Ohta S, Ogawa A, Tanaka M, Suda A, Kamagata K, Hori M, Aoki S, Shimo Y, Hattori N, Enomoto H, Shimizu T, Hanajima R, Ugawa Y, Konishi S. An essential role of the intraparietal sulcus in response inhibition predicted by parcellation-based network. *Journal of Neuroscience* 39: 2509–2521 (2019).
- 2) Osada T, Ogawa A, Suda A, Nakajima K, Tanaka M, Oka S, Kamagata K, Aoki S, Oshima Y, Tanaka S, Hattori N, Konishi S. Parallel cognitive processing streams in human prefrontal cortex: Parsing areal-level brain network for response inhibition. *Cell Reports* 36: 109732 (2021).
- 3) Osada T, Nakajima K, Shirokoshi T, Ogawa A, Oka S, Kamagata K, Aoki S, Oshima Y, Tanaka S, Konishi S. Multiple insular-prefrontal pathways underlie perception to execution during response inhibition in humans. *Nature Communications* 15: 10380 (2024).
- 4) Verbruggen F, Logan GD. Response inhibition in the stop-signal paradigm. *Trends in Cognitive Sciences* 12: 418–424 (2008).

Development of a characterization method for magneto-liposome by alternating current Cotton-Mouton effect

Masayori Suwa*

*Graduate School of Science, The University of Osaka
1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043 Japan

Abstract

Magneto-liposomes, functionalized lipid bilayer vesicles containing magnetic nanoparticles (MNPs), are expected to serve as nanosized carriers for drug delivery systems. It is suggested that the magnetic response of magneto-liposomes strongly depends on the spatial distribution of MNPs in the vesicle. In this study, we have developed a characterization method for magneto-liposomes using the Cotton-Mouton effect under an alternating magnetic field.

Keywords: magneto-liposome, magnetic nanoparticles, Cotton-Mouton effect

1. Purpose

Magnetic liposomes are lipid bilayer vesicles functionalized with magnetic nanoparticles (MNPs) and are expected to serve as carriers in drug delivery systems (DDS). By using a magnetic field to accumulate magnetic liposomes at the target site and then increasing membrane fluidity through heat generation and rotational motion of the MNPs induced by an alternating magnetic field, locally selective drug release can be achieved. Furthermore, since MNPs serve as contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI), their accumulation in the target tissue can be confirmed. Additionally, when targeting cancer cells, effective treatment in combination with magnetic hyperthermia is anticipated.

Differences in the spatial distribution of MNPs within magnetic liposomes strongly influence their functionality. For example, the drug-release efficiency varies depending on whether the MNPs are adsorbed to the membrane or suspended in the internal aqueous phase. It has been reported that this spatial distribution can be altered by factors such as lipid composition, ionic strength, and pH of the aqueous phase, and surface modification of MNPs¹⁾. Therefore, verification is necessary whenever the preparation conditions change.

While transmission electron microscopy (TEM) is conventionally used for verification, it is time-consuming and labor-intensive, and issues such as shape changes due to sample drying and difficulties in statistical analysis exist. It is desirable to characterize magnetic liposomes using methods that allow direct measurement of the dispersion.

MNP suspensions exhibit a significant Cotton-Mouton effect (CME)²⁾. CME is a general term for optical anisotropy (linear dichroism and linear birefringence) caused by the magnetic field orientation of particles. By measuring CME under an alternating magnetic field (AC-CME), the orientation dynamics of MNPs can be observed. The objective of this research project is to clarify the differences in AC-CME resulting from the spatial distribution of MNP and to apply this as a method for characterizing magneto-liposomes.

2. Methods

AC-CME measurement

The apparatus for AC-CME measurement (Fig. 1) has been reported previously³⁾. In order to observe the phase transition of the lipid bilayer, we conducted a detailed investigation of the relationship between the set temperature of the circulating water used for coil

cooling and the sample temperature. We performed CME measurements over the range of 20–60 °C with an accuracy of ± 0.5 °C relative to the target temperature. The intensity of the alternating magnetic field was swept over a range of up to 15 mT, and the frequency was swept over 0.3 Hz to 40 kHz.

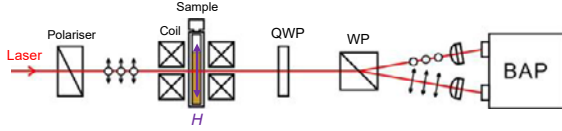


Figure 1 The experimental setup for the measurement of AC-CME. QWP: quarter wavelength plate, WP: Wollaston prism, BAP: balanced amplified photo-detector. The laser light of 785 nm in wavelength was used for the light source.

CME induced in MNP suspension under an alternating magnetic field $H = H_0 \cos(2\pi ft)$ with the frequency f , oscillates with $2f$, and then the retardation can be written as

$$R_{2f}(t) = R'_{2f} \cos(4\pi ft) + R''_{2f} \sin(4\pi ft)$$

where R'_{2f} , R''_{2f} are the in-phase (imaginary) and quadrature (real) components. We precisely measured R'_{2f} and R''_{2f} with a lock-in amplifier, and plotting their values against f yielded the CME frequency spectrum. The Cole-Cole equation, which is given by

$$R_{2f} = \frac{R_0}{1 + (i4\pi f\tau_0)^\beta}$$

with the amplitude at lower frequencies R_0 , the imaginary unit i , the time constant τ_0 , and the parameter β indicating the distribution of τ_0 , fits well CME frequency spectra⁴.

MNP

Maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) MNPs were synthesized by the co-precipitation method. The average diameter was estimated to be 9 nm from the transmission electron microscope. The ζ -potential was +45 mV.

Magneto-liposome

Magneto-liposome was prepared by the Bangham method. The inner wall of a round-shaped flask was covered with a thin layer of 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-

glycero-3-phosphocholine (DPPC) by using an evaporator. Hydration of the DPPC layer with an MNP suspension yields a magneto-liposome. Furthermore, an extruder was used to homogenize the magneto-liposomes' average diameter. Three types of filters with pore sizes of 100 nm, 200 nm, and 400 nm were used in the extruder. The viscosity η of the external aqueous phase was adjusted by adding glycerol.

3. Results

The AC-CME for the magneto-liposome dispersion oscillated at a frequency of $2f$. Since CME is caused by the magnetic orientation of MNP, the rotational relaxation time of the MNP can be estimated based on its frequency dependence. Figure 2a shows the CME frequency spectrum for a magneto-liposome suspension. Here, only the orthogonal component (imaginary part) is shown. As the viscosity of the external aqueous phase increased, the peak shifted toward lower frequencies. Estimating τ_0 from the reciprocal of the peak frequency revealed a proportional relationship with the viscosity of the external aqueous phase (Fig. 2b). Furthermore, the rotational relaxation time calculated from the liposome diameter obtained by dynamic light scattering was in good agreement with τ_0 , suggesting that the MNP adsorbs onto the lipid membrane and rotates along with the liposome. Similar results were obtained for magneto-liposomes of different sizes.

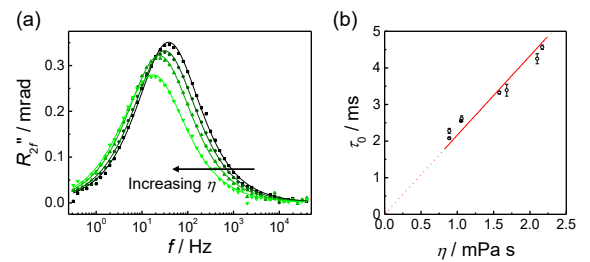


Figure 2 (a) The viscosity evolution of AC-CME frequency spectra, and (b) the dependence of τ_0 on η .

Figure 3a shows the temperature dependence of the AC-CME frequency spectra of a magneto-liposome dispersion. As the temperature rises, the viscosity of the outer aqueous phase decreases, shifting the peak toward higher frequencies. A steep shift was observed near

40 °C. A sharp decrease was also observed in τ_0 , as estimated from the frequency spectrum (Fig. 3b). This temperature coincides with the gel-to-liquid crystal phase transition temperature ($T_m = 41$ °C) of the DPPC bilayer. It is known that membrane fluidity increases in the liquid crystal phase at higher temperatures⁵⁾. In the gel phase, membrane fluidity is low, and only the rotation of the liposomes is responsible for the orientation relaxation of the MNPs. In contrast, in the liquid-crystal phase, because the membrane is fluid, both the rotation of the MNPs within the membrane and that of the liposomes contribute to orientation relaxation. It is plausible that the increase in membrane fluidity accompanying this phase transition caused the abrupt shift in the spectrum to higher frequencies.

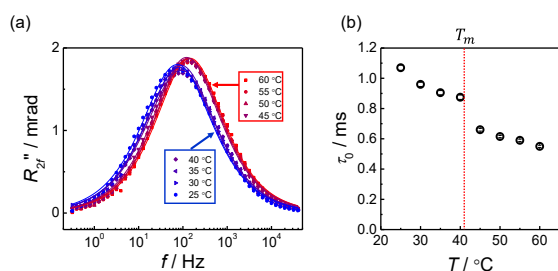


Figure 3 (a) The temperature evolution of AC-CME frequency spectra for a magneto-liposome, and (b) relaxation time as a function of the temperature.

4. Discussion

The dependence of the CME frequency spectrum on the viscosity of the external aqueous phase indicated that the MNP particles rotated with the liposome membrane. Furthermore, its temperature dependence revealed that the MNP particles were adsorbed onto the

membrane. Additionally, the size of the magneto-liposomes estimated from τ_0 was nearly equal to the pore size of the filter used in the extruder, indicating that the magneto-liposomes were not aggregated. This result suggests that the MNP particles were adsorbed on the inner side of the liposome.

Thus, the CME frequency spectrum of magneto-liposomes provides useful insights into the spatial distribution of MNPs within the vesicles. In future studies, we will measure the CME frequency spectra of magneto-liposomes containing negatively charged MNPs or MNPs with different shapes (e.g., rod-shaped) to verify the effectiveness of this method.

Acknowledgement

This study was financially supported by the 31st Magnetic Research Grant from the Watanabe Foundation. Transmission electron microscopy and dynamic light scattering measurements were performed at the Analytical Instrument Facility, Graduate School of Science, The University of Osaka.

References

- 1) M. E. F. Brollo, et al.: Phys. Chem. Chem. Phys. 20, 17829-17838 (2018)
- 2) J. Peterson, E. L. Bominaar: Anal. Chem. 74, 527A-533A (2002)
- 3) M. Suwa, et al.: Anal. Chem. 97, 9239-9247 (2025)
- 4) M. Suwa, et al.: J. Appl. Phys. 134, 233902 (2023)
- 5) R. Biltonen, D. Lichtenberg: Chem. Phys. Lipids, 64, 129-142 (1993)

Photothermal chemical nanotherapeutics that simultaneously achieve magnetic imaging and treatment

Kazuhide Sato*,**

*,**Nagoya University, School of Medicine

65Tsuruma-cho, Showa-ku, Nagoya city, AICHI, 466-8550, Japan

Abstract

Conjugation of mAb-IRDye700DX (mAb-IR700) to dextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (nanomag-D-spio) yielded nanomag-D-spio-mAb-IR700, enabling dual imaging (IR700 fluorescence/MRI) and targeted cytotoxicity upon 690-nm irradiation. The conjugate retained antigen selectivity, exhibited activatable NIR fluorescence after cellular uptake, generated negative T1- and T2-weighted MRI contrast, and demonstrated robust, cycle-enhanced photothermal performance.

Keywords: iron nanoparticle, near infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT), theranostics imaging, magnetic resonance imaging (MRI), photothermal therapy (PTT)

1. Introduction

Antibody preparations, particularly antibody-drug conjugates (ADCs), have recently become key drugs in cancer and infectious disease treatments. Against this backdrop, the applicant has conducted research on Near Infrared Photoimmunotherapy (NIR-PIT), which involves attaching photosensitizers to antibodies as ADCs¹. This therapy employs a mechanism entirely distinct from conventional anticancer modalities. After the antibody-photosensitizer complex binds to the tumor target site, irradiation with near-infrared light triggers a photochemical reaction that leads to cell lysis. The authors demonstrated this photochemical reaction-induced cell death in 2018². Due to the specificity of this cell death, NIR-PIT is attracting attention and is anticipated as the “fifth cancer treatment” (Figure 1). Furthermore, the authors elucidated its detailed molecular mechanism and named this novel cell death “Photochemosis”³.

Variable efficacy among patients who are treated with ADC is a big issue in the clinic, attributed to differences in target antigen expression and ADC metabolism between individuals. Understanding the extent of target binding relative to ADC administration could enable ADC optimization. Regarding NIR-PIT,

quantifying target binding prior to light irradiation would enable flexible optimization of light dose to maximize therapeutic efficacy for each patient. To address these challenges, it would be groundbreaking to evaluate the actual accumulation of antibody preparations and ADCs at the patient's target lesion site using existing imaging techniques. This research aims to establish a next-generation photodynamic composite cancer therapy platform for cancers that remain incurable, realizing photothermal-chemotherapeutic nanotherapeutics that simultaneously achieve magnetic imaging and treatment.

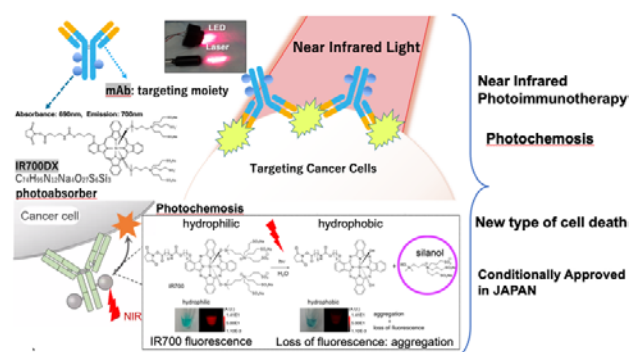


Figure 1. Scheme of NIR-PIT

2. Method

2.1 Antibody Conjugation

Bridged panitumumab-IR700 via carboxylic acid crosslinking with carbodiimide compounds (Antibody Fe-nano conjugates; AFC, pan-IR700-AFC). Transmission electron microscopy images of the prepared drug were acquired using a JEM-F200 microscope. The absorbance of the drug was measured using a UV-1900i Plus (Shimadzu Corporation).

2.2 Drug Property Evaluation Methods

Magnetic properties were detected using a vibrating sample magnetometer (Riken Electronics). MR images were acquired using an MR imager (MR VivoLVA). Real-time temperature-labeled thermal images were recorded using a FLIR C2 IR thermal camera (FLIR Systems, Inc.). 690 nm laser irradiation was performed using an MLL-III-690 (Changchun New Industry Optoelectronic Technology Co., Ltd.). The Fenton reaction was tested by mixing 1 mM GSH solution with drug mixtures containing 10 µg/mL methylchloroisothiazolin-4-one (MB) and 20 mM hydrogen peroxide (H₂O₂) under different pH values (5.4, 6.4, or 7.4) and temperature conditions. To investigate enhanced ·OH generation under NIR irradiation, laser irradiation (200 mW/cm²) was applied after adding 10 µg/mL MB and 20 mM H₂O₂ under pH 5.4 conditions. As a control, 10 µg/mL MB was mixed into each sample at the same concentration. ·OH generation was evaluated based on MB degradation and measured by the decrease in absorbance via spectrophotometry.

2.3 in vitro Cell Evaluation Method

Binding to EGFR-overexpressing A431 and MDA-MB-468 cells, and EGFR-low-expressing H661 cells was evaluated by measuring binding via flow cytometry. Cells (1×10^5) were incubated with pan-IR700-AFC in RPMI-1640 complete medium at 37°C for 6 hours. A competitive assay with excess panitumumab (1 µg) was performed to confirm the binding specificity of the novel conjugate. Cells were analyzed using a flow cytometer (DxFLEX; Beckman Coulter), and results were analyzed using FlowJo v10 (Beckman Coulter). Fluorescence microscopy observations were performed

using A1Rsi; Nikon Instech. A431 cells (2×10^4) were seeded in glass-bottom dishes and cultured for 24 hours. Subsequently, 10 µg/mL pan-IR700-AFC was added to the culture medium, and cells were cultured at 37°C for 6 hours. Cells were then washed twice with PBS. Propidium iodide (final concentration 2 µg/mL) and SYTOX blue (final concentration 2 µg/mL), used to detect cell death, were added 20 minutes prior to microscopic observation. Cells were irradiated with NIR light (16 J/cm²), and continuous microscopic images were acquired.

2.4 in vivo Imaging Evaluation

All *in vivo* procedures were performed in accordance with the policies of the Nagoya University Animal Experiment Committee. All mice were purchased from SLC Japan Co., Ltd. Mice were anesthetized with isoflurane during experimental procedures. A431-luc-GFP cells (2×10^6 cells) were implanted into the right dorsal region of 8–12-week-old Balb/C-Slc-nu/nu mice. Tumors exceeding 1 cm in diameter were used. IR700 fluorescence imaging was performed using PEARL (LICOR) and MRI imaging using MR VivoLVA.

3. Results

3.1 Antibody Conjugation to Iron Nanoparticles

Iron nanoparticles (IONP), antibody (anti-EGFR antibody panitumumab), and IR700 were used to create iron nanoparticle-antibody complexes (Antibody Fe-nano conjugates; AFC) via a condensation reaction of COOH functional groups (pan-IR700-AFC; hereinafter AFC). Iron nanoparticles with a size of 20 nm were used (Figure 2a). Panitumumab, an anti-EGFR antibody, was used. After evaluating multiple conditions, the reaction was performed to prepare the conjugate. In absorbance measurements, the absorbance of the antibody-IR700 complex was quenched and disappeared upon attachment to the iron nanoparticles (Figure 2b).

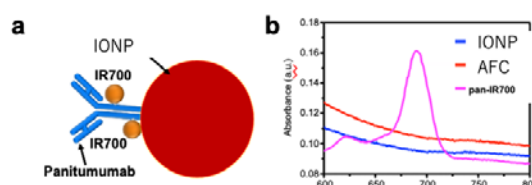


Figure 2. Properties of the Antibody Fe-nano Conjugates (AFC)

- AFC composition: Schematic diagram of panitumumab-IR700 and iron nanoparticle binding
- Absorption spectra of AFC, iron nanoparticles, and pan-IR700

3.2 Magnetic Imaging Evaluation of AFC, Photothermal Effect, and Fenton Reaction

The negative contrast effect of the AFC prepared in Section 2.1 was evaluated under T1-weighted and T2-weighted MRI conditions. A concentration-dependent negative contrast effect was observed (Figure 3a). Furthermore, photothermal effects under 690 nm near-infrared irradiation were evaluated, yielding a favorable temperature increase (Figure 3b). Additionally, a Fenton reaction using methylene blue demonstrated irradiation-dose-dependent enhancement, confirming that this material provides Chemodynamic Therapy (CDT) effects in addition to photothermal effects (Figure 3c). The thermal conversion efficiency (PCE) of this material was 29.21%, confirming sufficient photothermal effects.

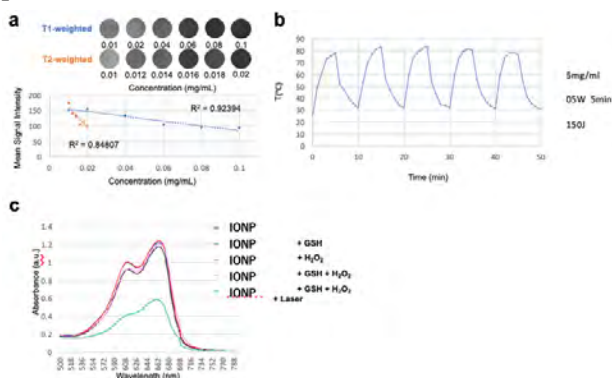


Figure 3. MRI Contrast, Photothermal, and Fenton Reaction Capabilities of Iron Nanoparticles

- MRI Negative Contrast Capability of Iron Nanoparticles
- Photothermal Effect of Iron Nanoparticles
- Fenton Reaction of Iron Nanoparticles

3.3 In vitro evaluation of AFC's activatable fluorescent probe and magnetic imaging

Based on the results in Figure 2b, it was considered that ferric-carboxytrypsin nanoparticles quenched the fluorescence of pan-IR700, and AFC did not retain fluorescence. To investigate the possibility of dequenching (re-emission) due to intracellular metabolism, dequenching was examined by adding 10% SDS. Upon SDS addition, the quenched fluorescence reappeared and increased by 2-3 fold (Figure 4a). This confirmed that AFC is an activatable probe that binds to cells, undergoes endocytosis into the cell, and then emits fluorescence. Furthermore, to evaluate stability in blood, assessment in mouse serum revealed that dequenching did not occur and the probe remained stable in blood (Figure 4b).

To examine targeting, AFC binding was analyzed using a flow cytometer on EGFR-high-expressing cancer cells (breast cancer: MDAMB-468, skin cancer: A431) and EGFR-low/non-expressing cancer cells (lung cancer: H661, mouse cells: 3T3). Fluorescence of pan-AFC was observed in EGFR-high cells, and this fluorescence was inhibited by the addition of excess panitumumab, suggesting specific binding. In contrast, no fluorescence was detected in EGFR-low/non-expressing cells, confirming no binding (Figure 4c). Furthermore, when imaging cell aggregates in tubes while bound, AFC-bound samples appeared as negative contrast agents on MRI, while IR700-containing samples could be evaluated by fluorescence (Figure 4d).

Next, in vitro cell death effects were examined. Both pan-IR700 and AFC induced cell death upon 690 nm light irradiation via photochemosynthesis. However, AFC induced significantly greater cell death, likely due to the additive effects of its Fenton reaction and thermoelectric effects (Figure 4e).

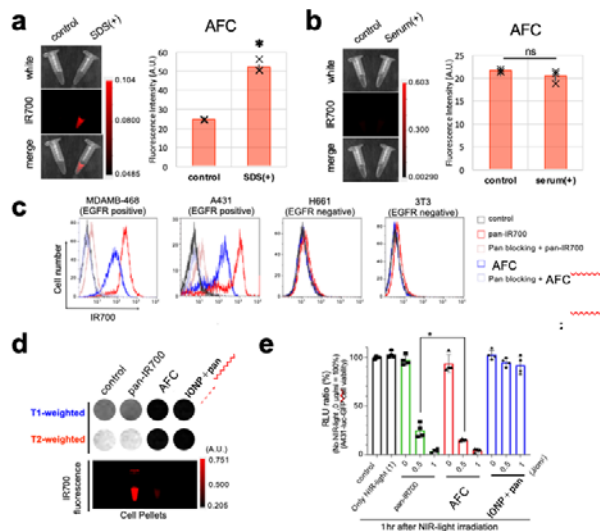


Figure 4. Properties of AFC and Target Cell Death Effects

- Evaluation of AFC's Decoupling Ability
- Evaluation of AFC's Stability in Blood
- Fluorescence Evaluation of AFC's Target Cell Binding
- MRI Contrast Ability and Fluorescence Evaluation of AFC-Bound Cell Clusters
- Quantitative Evaluation of AFC Target Cell Binding and Cell Death Induction by 690 nm Light Irradiation

3.4 In vivo evaluation of AFC as an activatable fluorescent probe and magnetic imaging agent

To evaluate magnetic imaging and IR700 fluorescence in vivo, we assessed the in vivo dynamics of AFC via intravenous administration in a mouse human tumor xenograft model (Figure 5a).

The imaging progression shows the tumor region, originally appearing as high intensity on T1- and T2-weighted MRI, gradually becoming negative over 1 to 9 hours. After peaking between 12 hours and 1 day, the drug began to clear again from day 2, with dynamics detected as an MRI molecular targeted negative contrast agent, returning to pre-administration levels by day 7 (Figure 5b). IR700 fluorescence gradually increased immediately after administration, peaked between 9 and 12 hours, remained stable until day 2, and then gradually

decreased from day 3 (Figure 5b). This demonstrated that AFC can be used as a dual-imaging agent: IR700 fluorescence for molecularly targeted imaging and the magnetic particles for MRI-negative contrast.

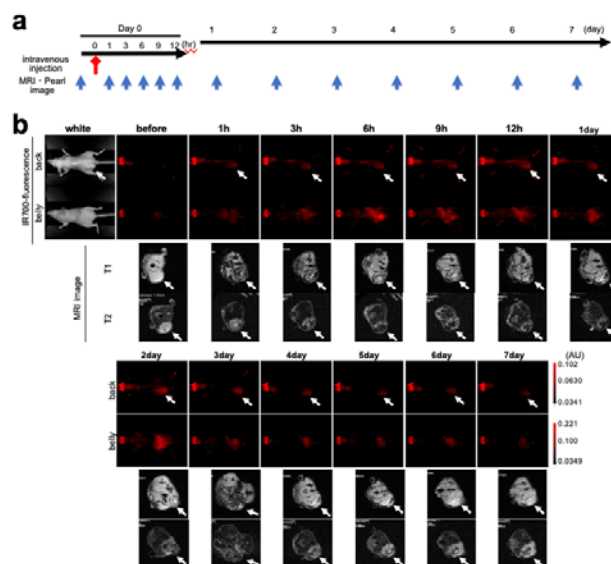


Figure 5. In vivo pharmacokinetics of AFC and its effect on target tumors

- Imaging procedure for MRI and IR700 fluorescence in vivo evaluation
- Time-course IR700 fluorescence and MRI images of mouse tumor models

4. Discussion

We developed an AFC by integrating panitumumab-IR700 with iron nanoparticles (dextran-coated superparamagnetic iron oxide), creating a magnetically trackable EGFR-targeted NIR-PIT platform. This yielded a single diagnostic agent with MRI visibility and cytotoxicity under near-infrared irradiation. *In vitro*, this complex retained EGFR selectivity and induced stronger cell death than panitumumab-IR700 alone. This suggests that the photochemical cell death mechanism (photochemosis) of NIR-PIT is synergistically enhanced, further augmented by PTT (photothermal therapy) and CDT (photochemical death). These multiple cell death mechanisms are thought to contribute to enhanced antitumor effects. It is expected to function as a new platform capable of evaluating the

extent of NIR-PIT drug binding.

Moving forward, we plan to conduct studies using mouse models to verify its efficacy as a preclinical test. If efficacy is confirmed, it could become a drug capable of simultaneously delivering NIR-PIT, CDT, and PTT in combination. Inorganic particle drugs are not currently approved, and we intend to continue future research.

5. References

1. Mitsunaga M, et al., Nat Med. 2011 Nov 6;17(12):1685-91.
2. Sato K, et al., ACS Central Science. 2018 Nov 28;4(11):1559-1569.
3. Sato K, et al., ACS Nano. 2025 Mar 4;19(8):8338-8356.

Spatial visualization of brain energy metabolism by magnetic resonance spectroscopy using hyperpolarized ^{13}C -pyruvate and its application

Maiko Ono

Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum Science and Technology
4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba 263-8555 Japan

Abstract

Abnormalities and alterations in the glycolytic pathway in the pathology of neurodegenerative diseases and brain aging have recently received much attention. Hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate magnetic resonance spectroscopy (MRS) holds great promise for neurological applications because it enables real-time detection of glycolytic and oxidative phosphorylation fluxes in vivo. In this study, we compared hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate metabolism in the brains of awake mice and isoflurane-anesthetized mice using a custom-built awake mouse restraint device with MR spectroscopic imaging (MRSI), which enables spatial mapping of metabolism. Furthermore, we compared hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate metabolism in the brains of young and aged mice using awake MRSI. The results demonstrated that hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate MRSI under awake conditions is useful for the spatial detection of abnormalities and alterations in glycolysis and oxidative phosphorylation flux in the brains of mice. Thus, the use of hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate MRSI has potential in pathological and mechanistic studies of brain diseases and brain aging.

Keywords: hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate, chemical shift imaging, mouse brain, awake condition, aging

1. PURPOSE

Despite the increasing prevalence of Alzheimer's disease (AD) associated with the progression of a super-aging society, the mechanisms underlying its onset remain unclear. Recently, increasing attention has been paid to the involvement of metabolic abnormalities in the pathophysiology of AD. Pyruvate is a key metabolic intermediate at the intersection of glycolysis and aerobic metabolism. In brain energy metabolism, the astrocyte–neuron lactate shuttle has been proposed, in which lactate produced from pyruvate in astrocytes is supplied to and utilized by neurons (Figure 1). We have previously demonstrated, using clinical proton (^1H) magnetic resonance spectroscopy (MRS), that increases in reactive

astrocytes and lactate concentrations in the posterior cingulate cortex of patients with Alzheimer's disease correlate with disease severity¹⁾. In addition, clinical positron emission tomography studies have suggested that cerebral glucose metabolism declines with aging in the human brain²⁾. The aim of this study was to elucidate, in detail, alterations in brain energy metabolism associated with AD pathology and aging in the living brain by applying hyperpolarized MRS technology, which enables highly sensitive, real-time measurements of pyruvate metabolism in vivo. To spatially visualize brain energy metabolism using hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate as a contrast agent, we established an experimental system that enables hyperpolarized MRS evaluation of the mouse brain

under awake conditions. Furthermore, by applying this system to aged mice, we sought to present examples of applications that could contribute to basic neuroscience research and brain disease studies aimed at elucidating mechanisms of brain development and aging through novel in vivo information on brain energy metabolism.

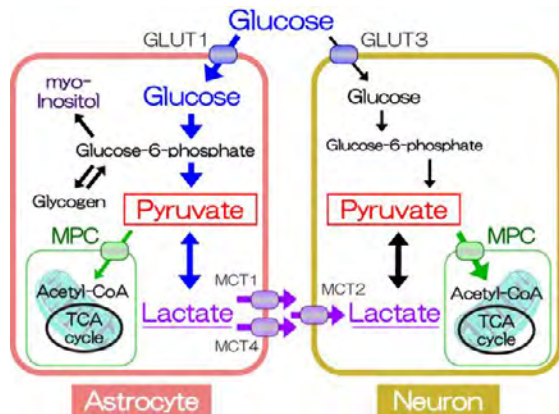


Figure 1. Brain energy metabolism (astrocyte–neuron lactate shuttle).

2. METHOD

To compare brain metabolism of hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate between awake and isoflurane-anesthetized mice, we developed an MRI-compatible awake mouse restraint device and a head plate for securely fixing the mouse to the device, thereby establishing a dedicated measurement system (Figure 2)³⁾. Two-month-old C57BL/6N mice and C57BL/6J mice aged either 2.5 months (young) or 19 months (aged) were used in the experiments. Under isoflurane anesthesia, a head plate was attached to the skull of each mouse. Hyperpolarized MRS measurements were performed using a BioSpec 3T preclinical MR scanner (Bruker BioSpin). After positioning the mouse fixed in the awake restraint device inside the MR scanner, T2-weighted images were acquired. Subsequently, a hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate solution (10 μL per g body weight) was administered via the tail vein, and ^{13}C free induction decay chemical shift images were acquired starting 4 seconds after injection. Peak intensities of each metabolite were measured and overlaid on the T2-weighted images to generate hyperpolarized ^{13}C

metabolite maps.

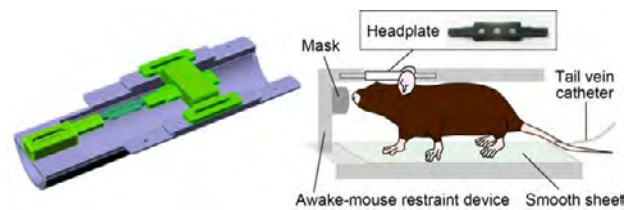


Figure 2. Blueprint (left) and schematic diagram (right) of the awake mouse restraint device.

3. RESULTS

Construction of a measurement system enabling hyperpolarized MRS evaluation of the mouse brain under awake conditions

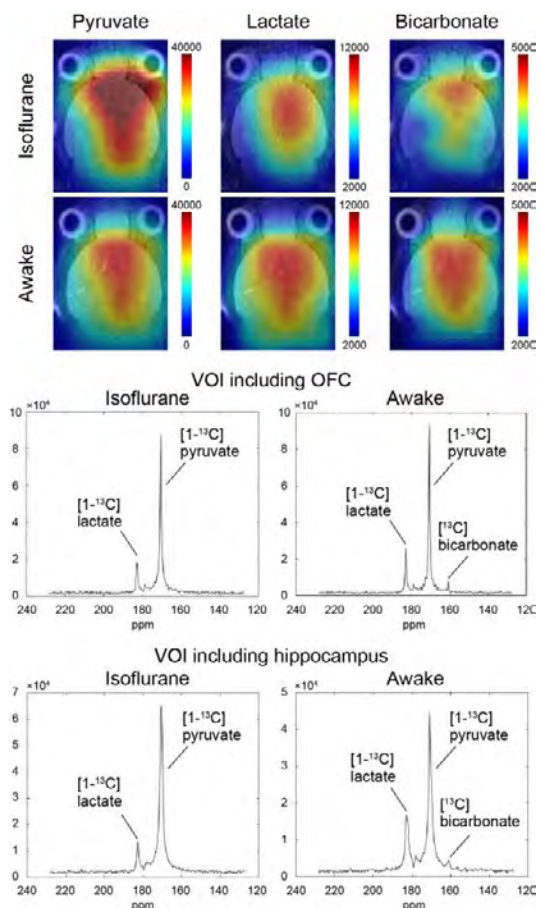


Figure 3. Evaluation of hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate metabolism in the orbitofrontal cortex (OFC) and hippocampus of isoflurane-anesthetized and awake C57BL/6N mice using magnetic resonance imaging (MRSI).

Using the developed awake mouse restraint device

and an MRSI method that enables spatial visualization of metabolism, we compared brain metabolism of hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate between awake and isoflurane-anesthetized mice. Signals corresponding to lactate derived from hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate, an indicator of glycolytic flux, were detected in multiple brain regions, including the OFC and hippocampus (Figure 3)³⁾. In contrast, signals corresponding to bicarbonate derived from hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate, an indicator of oxidative phosphorylation flux, were below the detection limit in the OFC and hippocampus under isoflurane anesthesia but were detectable under awake conditions.

Analysis of age-related changes in brain energy metabolism using awake hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate MRSI

Using awake MRSI, we compared hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate metabolism between young and aged mouse brains. No significant difference in the lactate-to-pyruvate ratio was observed between young and aged mice (Figure 4)³⁾. Similarly, no significant difference in the bicarbonate-to-pyruvate ratio was observed in the OFC between young and aged mice. However, in the hippocampus, the bicarbonate-to-pyruvate ratio was significantly reduced in aged mice compared with young mice.

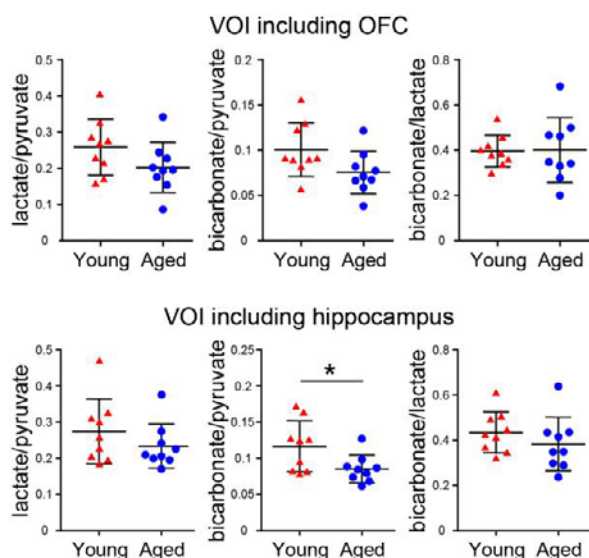


Figure 4. Comparison of hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate

metabolism in the OFC and hippocampus between young and aged C57BL/6J mice using awake MRSI

4. DISCUSSION

The results of this study demonstrate the feasibility of spatially mapping metabolism from hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate to lactate and bicarbonate in the awake mouse brain. Furthermore, the established awake hyperpolarized ^{13}C MRSI evaluation system revealed age-related reductions in oxidative phosphorylation flux in brain regions including the hippocampus, with the magnitude of these changes differing across brain regions. This study provides experimental evidence that hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate MRSI under awake conditions is a useful tool for the spatial detection of abnormalities and alterations in glycolytic and oxidative phosphorylation fluxes in the mouse brain, a widely used disease model. In the future, hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate MRSI is expected to be applied to pathophysiological studies of brain diseases, evaluation of disease-modifying therapies, and basic neuroscience research aimed at elucidating the mechanisms of brain development and aging.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by a grant from the Watanabe Foundation. Part of this work was presented at the 10th International Society of Magnetic Resonance in Medicine, Japanese Chapter Annual Meeting, held in Hyogo, Japan, on August 30, 2025.

REFERENCES

- 1) Hirata K, et al. Altered brain energy metabolism related to astrocytes in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 95(1):104-115 (2024).
- 2) Subtirelu RC, et al. Aging and cerebral glucose metabolism: ^{18}F -FDG-PET/CT reveals distinct global and regional metabolic changes in healthy patients. *Life (Basel)* 13(10):2044 (2023).
- 3) Ono M, et al. Awake brain MRSI reveals anesthetic sensitivity and regional aging effects on $[^{13}\text{C}]$ bicarbonate metabolism in mice. *Front Neuroimaging* 4:1506126 (2025).

経頭蓋磁気刺激による神経調節と

脳磁図による脳活動計測の融合

Combining Transcranial Magnetic Stimulation and Magnetoencephalography

代田悠一郎*

Yuichiro Shiota*

*東京大学医学部附属病院検査部, 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

*Department of Clinical Laboratory, the University of Tokyo Hospital
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033 Japan

Abstract

This study aimed to bridge transcranial magnetic stimulation (TMS) and magnetoencephalography (MEG) by integrating experimental and computational approaches. First, motor evoked potentials (MEPs) were successfully recorded from trunk muscles, identifying optimal stimulation parameters. Second, the precision and accuracy of resting motor threshold (RMT) estimation were quantitatively evaluated, demonstrating early convergence of precision and later achievement of accuracy. Finally, simulation studies based on the Lorentz reciprocity theorem were initiated to estimate TMS-induced electric fields. These findings contribute to improving the reliability and interpretability of TMS-based neuromodulation.

Keywords: transcranial magnetic stimulation (TMS), magnetoencephalography (MEG)

1. PURPOSE

Among non-invasive brain stimulation methods, transcranial magnetic stimulation (TMS) is the only technique capable of directly inducing action potentials in the human brain. Magnetoencephalography (MEG) provides superior spatial resolution compared to electroencephalography (EEG) and offers high temporal resolution, allowing precise estimation of neural activity sources. Despite their complementary strengths, studies integrating these two modalities remain limited. The present study aimed to bridge TMS and MEG through both experimental and computational approaches.

Repetitive TMS (rTMS), which delivers stimuli at a constant rhythm, has attracted considerable attention for its therapeutic effects on neuropsychiatric

disorders. However, the parameter space of rTMS is vast, making it neither efficient nor rational to directly design therapeutic protocols without sufficient physiological grounding. Motor evoked potentials (MEPs), elicited by TMS over the primary motor cortex, are widely used as a practical measure to estimate TMS effects. In this study, we first explored novel target muscles for TMS-MEP by focusing on trunk muscles (Section 2-1). We then evaluated the performance of resting motor threshold (RMT) measurements in terms of precision and accuracy (Section 2-2), both of which have already been reported as published studies. Furthermore, to facilitate integration with MEG, we initiated simulation studies based on the Lorentz reciprocity theorem (Section 2-3).

2. METHOD

2-1. MEP recording from trunk muscles

Healthy volunteers were recruited, and MEPs were recorded from trunk muscles, specifically the external oblique muscle, using TMS. Participants were divided into younger and older groups, and written informed consent was obtained from all individuals without contraindications to TMS. A double-cone coil was used, and the stimulation site was explored around the Cz position based on the international 10–20 system to identify the hot spot where the largest MEP amplitude was obtained.

In the younger group, coil orientation was systematically varied in eight directions at 45-degree intervals to evaluate its effect on corticospinal excitability, particularly on indirect waves (I-waves). Surface electromyography (EMG) was recorded from the right external oblique muscle, while participants maintained mild voluntary contraction. The active motor threshold (AMT) was determined for each condition, and responses were recorded at 120% of AMT. Stimulation was applied to both hemispheres, allowing comparison between contralateral and ipsilateral responses. MEP latency and threshold were analyzed statistically across conditions.

2-2. Precision and accuracy of TMS-MEP

In clinical laboratory medicine, performance of a test is evaluated in terms of precision (the reproducibility of repeated measurements) and accuracy (the closeness to the true value). In this study, the performance of RMT estimation using TMS was assessed from these two perspectives.

A total of 53 healthy participants were included, and MEPs were recorded from the right first dorsal interosseous muscle. A figure-of-eight coil was used, and two target amplitudes (0.05 mV and 0.2 mV) were defined as RMT0.05 and RMT0.2, respectively. Threshold estimation was performed using a sequential adaptive algorithm based on maximum likelihood estimation (MLE). For each condition, 30 trials were conducted, and stimulation intensity was updated based on the presence or absence of MEPs.

Precision was defined as whether the last three estimates fell within $\pm 2\%$ of the maximum stimulator output (MSO), while accuracy was defined as whether each estimate fell within $\pm 5\%$ of a reference value calculated from the mean of the final six trials. The convergence point was defined as the first trial at which these criteria were satisfied and maintained thereafter. Data from all sessions were pooled for analysis.

2-3. Simulation of TMS effects

In recent years, attempts have been made to estimate TMS effects using EEG in addition to MEPs. In this study, we focused on the correspondence between the MEG inverse problem and the TMS forward problem based on the Lorentz reciprocity theorem. Numerical simulations were conducted using head models to improve the estimation of TMS-induced electric fields. Specifically, simulations were performed using SimNIBS, in which tissue parameters were varied to examine their effects on the spatial distribution and magnitude of induced electric fields.

3. RESULTS

2-1. MEP recording from trunk muscles

MEPs from the external oblique muscle were successfully obtained in all participants with contralateral stimulation, whereas ipsilateral MEPs were observed only in a subset of participants in both younger and older groups. Analysis of coil orientation revealed that stimulation inducing an antero-medial current in the brain produced the shortest onset latency and the lowest AMT for both contralateral and ipsilateral conditions (Fig. 1, cited from ref 1). Specifically, contralateral stimulation yielded a latency of 15.8 ± 1.4 ms and an AMT of $44.9 \pm 7.5\%$ MSO, while ipsilateral stimulation showed a latency of 17.8 ± 1.9 ms and an AMT of $56.1 \pm 10.0\%$ MSO. Furthermore, contralateral stimulation resulted in significantly shorter latency and lower AMT compared to ipsilateral stimulation. These findings suggest that an antero-medial current direction is optimal for activating trunk muscles via TMS.

	Contralateral Stimulation							
Onset latencies (ms)	16.1 ± 1.0	15.8 ± 1.4	16.7 ± 1.3	17.3 ± 1.4	17.1 ± 1.5	16.6 ± 1.1	16.8 ± 1.1	16.1 ± 1.0
AMT (%MSO)	45.2 ± 7.8	44.9 ± 7.5	51.8 ± 11.0	55.6 ± 12.8	51.3 ± 12.9	49.6 ± 12.1	50.6 ± 11.5	52.1 ± 11.4
	Ipsilateral Stimulation							
Onset latencies (ms)	18.8 ± 2.3	17.8 ± 1.9	18.7 ± 2.1	19.7 ± 1.6	19.8 ± 2.3	19.5 ± 1.9	18.8 ± 1.8	19.1 ± 2.1
AMT (%MSO)	61.3 ± 13.6	56.1 ± 10.0	59.3 ± 13.4	60.1 ± 14.9	59.6 ± 15.1	58.0 ± 14.1	60.6 ± 14.9	61.6 ± 11.7
Orientation	Anterior	Antero-Medial	Medial	Postero-medial	Posteroir	Postero-lateral	Lateral	Antero-lateral

Fig. 1. MEP latency and AMT for the external oblique muscle, from ref 1).

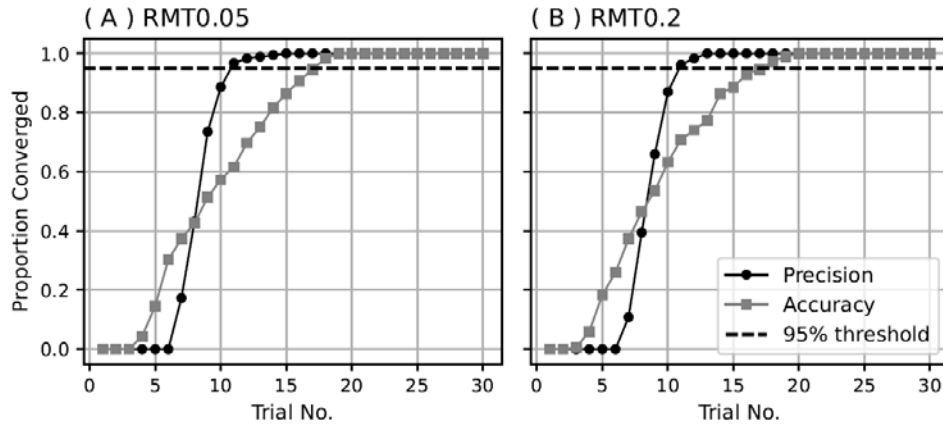


Fig. 2. Precision and accuracy of the threshold hunting estimation, from ref 2).

2-2. Precision and accuracy of TMS-MEP

The temporal evolution of precision and accuracy in RMT estimation was evaluated using pooled data from 185 sessions. Precision was achieved relatively early, with more than 95% of sessions meeting the criterion within approximately 11 trials (Fig. 2, cited from ref 2). In contrast, accuracy required more trials, reaching the 95% criterion at around 18 trials for both RMT0.05 and RMT0.2 conditions. These results indicate that while stable estimates (precision) can be obtained early in the measurement process, additional trials are necessary to ensure that the estimates accurately reflect the true threshold. This suggests that the number of trials in TMS-based threshold measurements should be optimized by considering both precision and accuracy.

2-3. Simulation of TMS effects

This part of the study has not yet reached a

definitive conclusion. However, preliminary simulations using individual MRI-based head models suggest that variations in tissue parameters can influence both the magnitude and spatial distribution of TMS-induced electric fields.

4. DISCUSSION

In this study, we aimed to integrate experimental TMS measurements with computational modeling approaches related to MEG to bridge the two methodologies. As a result, we successfully published findings related to TMS-MEP measurements. Although the MEG-related modeling component has not yet yielded results sufficient for publication, the data obtained thus far provide a valuable foundation for improving the predictive accuracy of (r)TMS effects in future studies.

Acknowledgements

This study was supported by the 31st subsidy from the Watanabe Foundation

References

- 1) Miyano R, Shirota Y, Kodama S, et al. Ipsilateral and contralateral cortical control of the external oblique muscles revealed by TMS. *Clinical Neurophysiology*. 181: 2111400, 2026.
- 2) Shirota Y, Otsuka J, Hamada M. Precision, accuracy, and reliability of a threshold hunting method for transcranial magnetic stimulation. *Clinical Neurophysiology Practice*. 11:24–31, 2026.
- 3) Núñez Ponasso G, Drumm DA, Wang A, et al. High-definition MEG source estimation using the reciprocal boundary element fast multipole method. *NeuroImage*. 320:121452, 2025.

Development of a novel cancer magnetothermal chemotherapy using magnetized mesenchymal stem cells

Yusuke Kono

Kobe Pharmaceutical University

4-19-1 Motoyamakita-machi, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo 658-8558 Japan

Abstract

In this study, we aimed to develop an effective cancer magnetothermal chemotherapy using liposome-modified mesenchymal stem cells (MSCs) in combination with an alternating magnetic field (AMF). Gemcitabine-loaded liposome-modified MSCs significantly inhibited tumor growth, and its effect was further enhanced in combination with hyperthermia. On the other hand, the anti-tumor efficacy of liposome-modified MSCs was not enhanced by the presence of AMF exposure. This may be attributed to the insufficient magnetic flux density of the AMF generator used in this study. Currently, we are investigating the optimization of parameters, such as the particle size of iron oxide magnetic nanoparticles and their loading amount into MSCs to achieve efficient heat generation under an AMF.

Keywords: cancer magnetothermal chemotherapy, liposome, mesenchymal stem cell

1. Purpose

Cancer cells are known to exhibit higher thermosensitivity than normal cells, and exposure to heat further enhances their sensitivity to anti-cancer drugs. Based on these properties, “magnetothermal chemotherapy,” which combines localized tumor heating using iron oxide magnetic nanoparticles and an alternating magnetic field (AMF) with anti-cancer agents, is expected to be an effective novel cancer therapy. In developing this therapeutic strategy, the selective and simultaneous delivery of magnetic nanoparticles and anti-cancer drugs to tumor tissues is a critical factor determining its therapeutic efficacy and safety.

We have previously developed mesenchymal stem cells (MSCs) modified with liposomes encapsulating both anti-cancer drugs and iron oxide magnetic nanoparticles (liposome-modified MSCs), and demonstrated that these cells can accumulate in tumor tissues while stably carrying both agents.¹

In this study, we aimed to develop an effective magnetothermal chemotherapy using liposome-modified MSCs in combination with an AMF.

2. Methods

Preparation of gemcitabine-encapsulated liposome-modified MSCs: Gemcitabine (GEM) was encapsulated into anionic liposome/atelocollagen complexes containing iron oxide magnetic nanoparticles, which we previously developed. The complex was then added to mouse bone marrow-derived MSCs, and the cells were cultured for 30 min under a magnetic field to obtain liposome-modified MSCs.

Evaluation of the anti-tumor efficacy of GEM-encapsulated liposome-modified MSCs with hyperthermia: A solid tumor model was established by subcutaneous inoculation of B16/BL6 mouse melanoma cells. Liposome-modified MSCs were intravenously administered to the tumor-bearing mice.

After 24 h, the tumor tissues were immersed in a 42 °C water bath for 30 min. Tumor volumes were then measured over time.

Evaluation of tumor temperature elevation by combining GEM-encapsulated liposome-modified MSCs with an AMF: An AMF was applied to the tumor tissue for 30 min at 24 h after intravenous administration of liposome-modified MSCs to tumor-bearing mice. During magnetic field exposure, tumor temperature was monitored over time using a thermographic camera.

3. Results

Intravenous administration of GEM-encapsulated liposome-modified MSCs to tumor-bearing mice resulted in significant inhibition of tumor growth, and this effect was markedly enhanced in combination with hyperthermia. Notably, hyperthermia alone exhibited little tumor growth inhibition. Furthermore, the anti-tumor efficacy of GEM-encapsulated liposome-modified MSCs combined with hyperthermia was substantially greater than that observed with the co-administration of GEM and iron oxide magnetic nanoparticles combined with hyperthermia.

In contrast, when GEM-encapsulated liposome-modified MSCs were combined with an AMF, only a slight increase in tumor temperature was observed, and the temperature did not exceed 40°C. Consistently, no significant difference in anti-tumor efficacy was observed between treatments with and without application of an AMF. Extending the duration of magnetic field exposure from 30 min to 1 h yielded similar results.

4. Discussion

In the solid tumor model, hyperthermia alone did not exhibit a significant anti-tumor efficacy, suggesting

that the enhanced tumor growth inhibition observed with GEM-encapsulated liposome-modified MSCs under hyperthermic conditions is attributable to increased chemosensitivity of cancer cells. Moreover, compared with the co-administration of GEM and iron oxide magnetic nanoparticles, the superior anti-tumor efficacy of GEM-encapsulated liposome-modified MSCs is likely due to the simultaneous delivery of both GEM and magnetic nanoparticles to tumor tissues by MSCs, enabling efficient exposure of chemosensitized cancer cells to GEM.

On the other hand, one possible reason for the insufficient heating effect observed with the combination of GEM-encapsulated liposome-modified MSCs and an AMF is the magnetic flux density. The magnetic field generator used in this study provided a flux density of 20 mT, which was likely insufficient to induce effective heat generation from the iron oxide magnetic nanoparticles. We are currently investigating the optimization of parameters such as the particle size of the magnetic nanoparticles and their loading amount in liposome-modified MSCs to achieve efficient heat generation under an alternating magnetic field.

Acknowledgment

This study was supported by The Watanabe Foundation.

References

- 1) Yusuke Kono, Himi Kanbara, Saki Danjo, Aiga Yoshikawa, Yoshihiro Iwayama, Ken-ichi Ogawara. Liposome-loaded mesenchymal stem cells enhance tumor accumulation and anti-tumor efficacy of doxorubicin in mouse tumor models of melanoma. *Pharmaceutics*, 17(8), 947 (2025).

Discoidal Nanoparticle-Based ^{19}F MRI Contrast Agents

Tomoya Yamamoto*

*Department of Engineering, The University of Osaka
2-1 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871 Japan

Abstract

^{19}F magnetic resonance imaging (^{19}F MRI) enables the visualization of the in vivo localization of fluorine-containing probes and has attracted significant attention for tumor imaging applications. In this study, we report the development of a nanoscale ^{19}F MRI contrast agent by employing lipid nanodiscs, achieving a particle size of approximately 10 nm. By leveraging the unique structural features of nanodiscs—namely their small size and the high mobility of constituent lipid molecules—we incorporated ^{19}F -labeled phospholipids into the nanodisc structure to function as an effective contrast agent. The resulting probe exhibited reduced hepatic uptake and rapid renal clearance in vivo. Furthermore, surface PEGylation of the nanodiscs successfully enhanced their blood circulation time.

Keywords: ^{19}F MRI, nanodisc, lipid, probe

1. PURPOSE

Magnetic resonance imaging (MRI) is widely used in medical applications because it enables noninvasive imaging in vivo.¹ While conventional MRI detects signals from ^1H nuclei, ^{19}F MRI obtains signals from ^{19}F -containing contrast agents, allowing the distribution of the agents to be visualized independently of ^1H MRI. Consequently, ^{19}F MRI has attracted considerable attention as a technique for visualizing contrast agent distribution with high contrast, owing to its negligible endogenous background signals.

In the design of ^{19}F MRI contrast agents, it is necessary to incorporate a large number of highly mobile ^{19}F nuclei within the probe to increase the local fluorine concentration and sensitivity. Based on this design principle, emulsions consisting of highly mobile fluorinated liquids solubilized by surfactants, as well as nanoparticles with emulsion surfaces coated with silica or metals, have been developed. However,

these systems suffer from significant hepatic uptake and long-term accumulation, primarily due to their large particle sizes (typically exceeding 100 nm) and rigid surface properties.

To develop a ^{19}F MRI contrast agent that satisfies these requirements, we focused on lipid nanodiscs. Lipid nanodiscs are nanoscale particles in which a phospholipid bilayer is solubilized into a discoidal structure by amphiphilic polymers or proteins, and they have recently been explored for drug delivery applications.²⁾ The lipid molecules within nanodiscs exhibit high mobility due to their translational and rotational motions. Therefore, by incorporating ^{19}F -labeled phospholipids into nanodiscs, it is possible to construct nanoparticles containing highly mobile ^{19}F nuclei.

Lipid nanodiscs possess high size stability, do not require inorganic materials, and typically have diameters of 10-20 nm, making them well suited for delivery to tumor tissues. Based on these

characteristics, we hypothesized that nanodiscs incorporating ^{19}F -labeled phospholipids could serve as effective ^{19}F MRI contrast agents for the selective visualization of tumor tissues.

2. METHODS

After preparing liposomes using chemical synthesized ^{19}F -labeled phospholipids, discoidal ^{19}F MRI contrast agents were obtained by solubilizing the liposomes with an amphiphilic polymer, styrene-maleic acid copolymer. For surface modification, 20 mol% PEGylated phospholipids were incorporated during liposome preparation.

The particle size of the nanoparticle was characterized by dynamic light scattering and transmission electron microscopy. The MR relaxation properties of the ^{19}F nuclei within the nanoparticles were evaluated by ^{19}F MR spectroscopy. Furthermore, ^{19}F MRI was employed to visualize the distribution of the contrast agents in both phantom samples and in vivo in mice.

3. RESULTS

The prepared discoidal MRI contrast agents exhibited a particle size of approximately 10 nm, demonstrating a substantially smaller size compared to conventional ^{19}F MRI contrast agents. The ^{19}F MRI signal obtained from the developed probes showed a T_2 relaxation time exceeding 300 ms, indicating performance sufficient for ^{19}F MRI applications. Phantom ^{19}F MRI measurements revealed a detection limit of 6.54 mM in terms of ^{19}F concentration. This value is lower than that of a conventionally prepared emulsion-type contrast agent (17.0 mM), highlighting the superior signal intensity of the developed probe.

Upon intravenous administration of the contrast agent to mice, no accumulation in the liver was observed, while a clear ^{19}F MRI signal was detected in the bladder region. In contrast, most conventional ^{19}F MRI contrast agents tend to accumulate in the liver. The ability of the present probe to avoid hepatic uptake is likely attributable to its ultrasmall particle size of approximately 10 nm.

We further evaluated PEGylated nanodiscs in which the particle surface was coated with PEG polymers. These particles also produced detectable ^{19}F MRI signals. Notably, in vivo studies showed that PEGylated nanodiscs exhibited slower accumulation in the bladder compared to non-PEGylated probes. PEG modification is known to suppress protein absorption in the blood stream and enhance circulation time. These results suggest that polymer coating improves blood retention and consequently reduces the rate of renal clearance.

4. DISCUSSION

In this study, by applying a lipid nanodisc-based strategy to ^{19}F MRI contrast agent design, we successfully introduced highly mobile ^{19}F nuclei into ultrasmall nanoparticles of approximately 10 nm, thereby developing a ^{19}F MRI contrast agent with an exceptionally small size. Owing to its nanoscale dimensions, the developed probe exhibited minimal hepatic uptake and rapid renal clearance. Furthermore, the contrast agent remained in circulation for approximately 2 hours, suggesting that surface functionalization with targeting ligands could further enable application in tumor imaging and the visualization of biological processes in vivo,

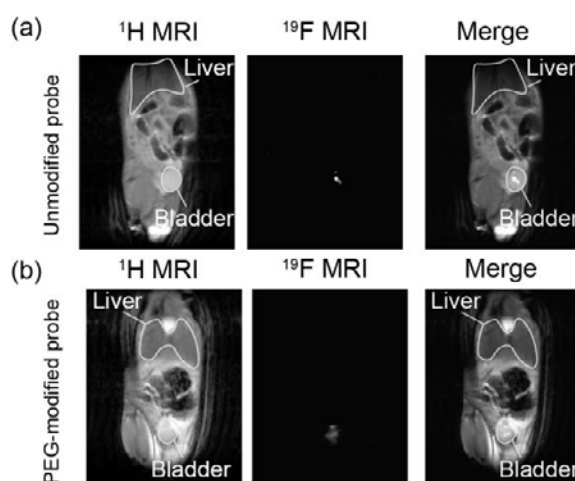


Figure 1 $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ MRI images of mice following intravenous (tail vein administration of a non-PEGylated nanodisc MRI probes and (b) PEGylated nanodisc MRI probes.

Part of the content of this paper was presented at the “World Molecular Imaging Congress 2025,” held in Anchorage, United States, on October 3.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Watanabe Foundation.

REFERENCES

- 1) Ilaria Tirotta *et al.* *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 1106-1129.
- 2) Ahmed O. Elzoghby *et al.* *Nanotoday*, **2023**, *53*, 102026.
- 3) Kodai Fukushima, Tomoya Yamamoto, Kazuya Kikuchi *J. Am. Chem. Soc.* **2026**, *148*, 12990-12997.

Development of a new method to noninvasively assess neurophysiological function in lumbar spinal area using magnetospinography

Jun Hashimoto, Hisato Higashikawa, and Shigenori Kawabata*

*Department of Orthopaedic Surgery, Institute of Science Tokyo,
1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510 Japan

Abstract

This study aims to develop a new method for magnetospinography (MSG) to noninvasively evaluate lumbar nerve function. We measured MSG in ten healthy volunteers using new stimulation methods: lateral femoral cutaneous nerve, saphenous, and femoral nerve stimulation. MSG visualized neural current in lumbar spinal area via lumbar foramen after each nerve stimulation. Lateral femoral cutaneous nerve stimulation effectively visualized the L2/3 foramen, while saphenous nerve stimulation was superior for the L4/5 foramen. Femoral nerve stimulation provided significantly higher current intensity for upper lumbar spinal area. Development of novel nerve stimulation enabled MSG to visualize neural currents flowing through the lumbar region with high spatial resolution.

Keywords: magnetospinography, magnetoneurography

1. Purpose

Lumbar diseases, such as lumbar disc herniation and spinal canal stenosis, cause lower limb pain, numbness, and gait disturbance due to nerve compression, significantly restricting activities of daily living. Diagnosis typically involves physical examinations combined with imaging evaluations such as X-ray and magnetic resonance imaging (MRI). However, identifying the responsible lesion is often difficult when nerve compression on imaging is mild or multilevel. While electrophysiological functional evaluations are commonly used, detailed assessment of the cauda equina and nerve roots is challenging due to their deep anatomical location. Therefore, a non-invasive method for detailed neural functional evaluation has been required.

We focused on the magnetic fields generated around neural activity currents. Unlike electrical currents,

which vary in conductivity across biological tissues, magnetic fields penetrate tissues uniformly. This allows for the undistorted measurement of deep structures, such as the spinal cord and cauda equina, from the body surface. While magnetoencephalography and magnetocardiography are clinically established, applying this technology to the spine has been difficult because the magnetic signal intensity is much weaker than that of the brain or heart. To overcome this, we develop a magnetospinography (MSG) system utilizing highly sensitive Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) sensors (Fig. 1). Although we previously reported the successful visualization of spinal neural activity in healthy subjects, evaluating the lumbar intervertebral foramina and upper lumbar spine remained difficult¹⁾. This study aimed to develop a new nerve stimulation method to evaluate neural function in these specific regions using MSG.

Figure 1. Magnetospinography of lumbar spinal area



2. Method

We measured MSG of lumbar spine in 10 healthy volunteers. In a magnetically shielded room, the subject's lower back lay on SQUID sensors. A new nerve stimulation — lateral femoral cutaneous nerve, saphenous nerve, and femoral nerve stimulation — was applied. The magnetic fields from ascending currents in the lumbar region were measured. The magnetic signals were converted into current distributions using a spatial filter method and superimposed onto frontal and lateral lumbar X-ray images. Additionally, "virtual electrodes" were used to calculate current waveforms at specific points, allowing for the evaluation of conduction through current intensity and conduction velocity.

3. Results

MSG measurements were successfully obtained for all volunteers following each nerve stimulation. Current distribution demonstrated that currents entered the spinal canal through the following specific foramen (Lateral femoral cutaneous nerve stimulation, through the L2/3 and L3/4 foramina (Fig. 2); Saphenous nerve stimulation, through the L3/4 and L4/5 foramina (Fig. 3); Femoral nerve stimulation, through the L2/3 to L4/5 foramina (Fig. 4); Peroneal nerve stimulation, through the L5/S1 foramen). Virtual electrodes placed along the neural pathways captured current waveforms propagating cranially. Comparison of current intensities at the intervertebral foramina revealed that lateral femoral cutaneous nerve stimulation showed a higher inflow ratio at L2/3, while saphenous nerve stimulation showed a higher ratio at L4/5. While femoral nerve stimulation made it difficult to isolate currents for individual foramina, the current

intensity within the upper lumbar spinal canal was significantly higher—14 times greater than lateral femoral cutaneous nerve stimulation and 18 times greater than saphenous nerve stimulation (Fig. 5).

Figure 2. Magnetospinography after lateral femoral cutaneous nerve stimulation

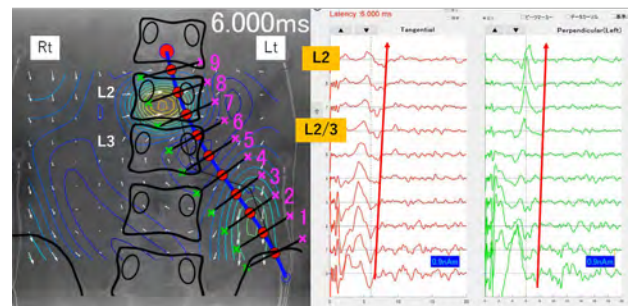


Figure 3. Magnetospinography after saphenous nerve stimulation

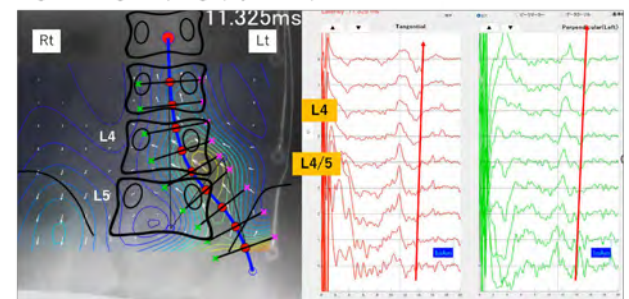


Figure 4. Magnetospinography after femoral nerve stimulation

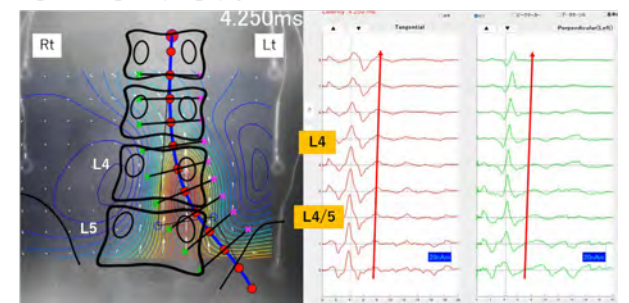
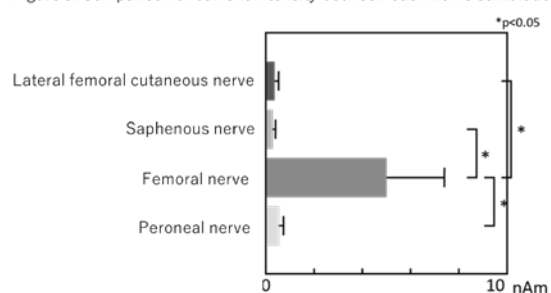


Figure 5. Comparison of current intensity between each nerve stimulation



4. Discussion

MSG successfully visualized the current distribution ascending from the lumbar intervertebral foramina into the spinal canal with

high spatial resolution. Our findings suggest that lateral femoral cutaneous nerve stimulation is most suitable for evaluating the L2/3 foramen, while saphenous nerve stimulation is ideal for the L4/5 foramen. The significantly higher current intensity in the upper lumbar spine during femoral nerve stimulation likely results from a larger number of activated nerve fibers and minimized temporal dispersion due to the proximity of the stimulation site to the recording site. These results indicate that using level-specific stimulation—femoral nerve for the upper lumbar canal, lateral femoral cutaneous nerve for the L2/3 foramen, and saphenous nerve for the L4/5 foramen—can aid in the diagnosis of lumbar radiculopathy, which is often clinically challenging. Future research will focus on MSG measurements in patients with lumbar diseases to advance diagnostic and functional evaluation beyond the capabilities of current methods.

Acknowledgement

This research was supported by the 30th Magnetic Research Grant from the Watanabe Foundation. The findings were presented at a symposium during the 55th Annual Meeting of the Japanese Society of Clinical Neurophysiology (JSCN) and subsequently published in the society's official journal, *Japanese Journal of Clinical Neurophysiology* ²⁾, as well as the international journal, *Journal of Clinical Neurophysiology* ³⁾. We would like to express our profound gratitude to the Watanabe Foundation for their generous support.

References

- 1) Shuta Ushio, et al.; Clin Neurophysiol. 130(1): p.1-11. (2019)
- 2) 橋本淳:臨床神経生理学, 53(6) p.673-678 (2025).
- 3) Higashikawa Hisato, et al.; J Clin Neurophysiol. Epub ahead of print (2025).

Innovative hearing-loss therapy involving extracorporeal recovery from cisplatin-induced ototoxicity via magnetic guidance

Takaomi Kurioka

Department of otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Kitasato University
1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagami-hara-shi, Kanagawa 252-0374, Japan

Abstract

Cisplatin-induced ototoxicity occurs because cisplatin is not readily cleared from the cochlea, leading to excessive accumulation and irreversible damage to cochlear hair cell (HC); however, no effective treatment or preventive strategy has been established. Here, we evaluated a “magnetic microsurgery” approach in which glutathione-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles capture intracochlear cisplatin and are magnetically guided to the round window membrane for extracorporeal retrieval. We demonstrated successful cochlear drug recovery, improved cisplatin-induced hearing loss, and reduced HC loss, with no mortality or severe adverse events. This platform may provide a new therapeutic option for cisplatin ototoxicity and help improve quality of life in cancer survivors.

Keywords: Cisplatin, Ototoxicity, Hearing loss, Magnetic microsurgery

1. Introduction and objective

Cisplatin is a widely used chemotherapeutic agent with established efficacy against malignant tumors, but it also damages normal tissues and causes adverse effects such as myelosuppression, nephrotoxicity, and hearing loss. Hearing loss is particularly common (40–80% in adults and ~50% in pediatric patients), yet no established treatment or preventive strategy exists for cisplatin-induced hearing loss. In the inner ear, cisplatin is poorly eliminated and can persist within the cochlea, leading to excessive accumulation and irreversible injury to cochlear sensory structures, including cochlear hair cells (HCs) and neurons. Conventional approaches—such as antioxidant-based protection or chemical neutralization—are limited because accumulated cisplatin is not physically removed. We therefore sought to develop a strategy for extracorporeal elimination of intracochlear cisplatin. We focused on glutathione (GSH)-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs),

which are ~100 nm in size, can access the inner ear via the round window membrane, and have both antioxidant activity and affinity for binding cisplatin. Based on prior in vitro confirmation of cisplatin binding and magnetic controllability, we hypothesized that intracochlear cisplatin could be captured by GSH-SPIONs and guided magnetically to the round window for extracorporeal retrieval. The aim of this study was to evaluate whether local administration reduces ototoxicity and whether magnetic-guided retrieval is feasible and safe in vivo.

2. Methods

Male C57BL/6J mice received transtympanic cisplatin to induce hearing loss. GSH-SPIONs were locally delivered to the round window, followed by placement of a small magnet. Hearing was assessed by auditory brainstem response (ABR), and cochlear HC survival was quantified by Myosin7a immunostaining and confocal microscopy.

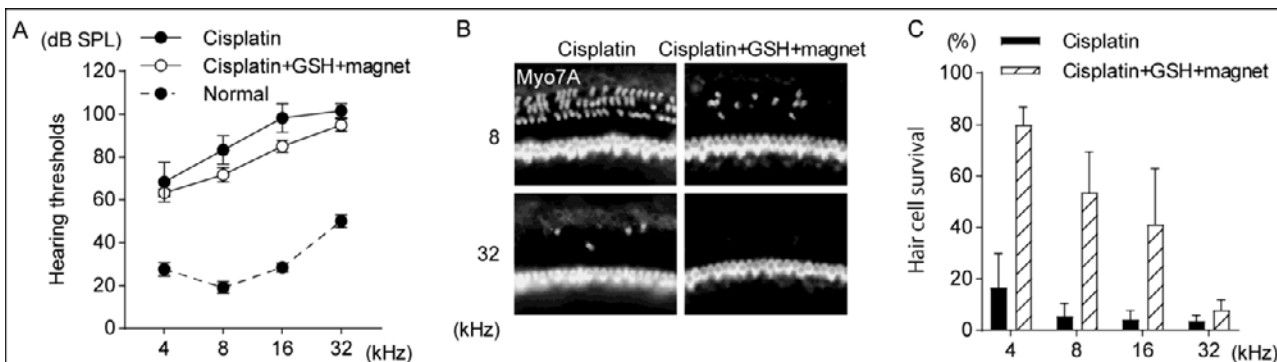


Figure 1 Therapeutic effects of magnetic microsurgery

(A) GSH–SPION (GSH) plus magnetic microsurgery (magnet) group showed better hearing threshold.

(B) Outer hair cell survival was confirmed in the treatment group.

(C) GSH+magnet group exhibited a higher hair-cell survival rate.

3. Results

No animal deaths or marked health impairments were observed after GSH-SPION administration or the magnetic microsurgery procedure. Cisplatin caused a marked elevation of ABR thresholds. In contrast, combined treatment with GSH-SPION and magnetic guidance (GSH+magnet) attenuated the cisplatin-induced hearing loss, indicating preservation of auditory function. Immunostaining showed prominent HC loss in the cisplatin group, whereas outer HC survival was confirmed in the GSH+magnet group. Quantitative analysis demonstrated higher HC survival in the GSH+magnet group compared with the cisplatin-only model.

4. Discussion

Using a magnetic-guided drug retrieval strategy, we achieved extracorporeal elimination of intracochlear cisplatin through the round window and demonstrated associated improvements in auditory thresholds and HC survival in a cisplatin ototoxicity model. This concept differs from prior approaches that primarily aim to protect cochlear tissues or chemically neutralize cisplatin without removing the drug that persists and accumulates in the cochlea. By directly targeting drug retention, magnetic microsurgery aims to shorten intracochlear drug residence time and reduce cumulative toxic exposure to sensory structures. The originality of this work can be summarized in four points. First, we enabled selective “capture” of

intracochlear cisplatin by imparting cisplatin-binding affinity to SPIONs via GSH loading. Second, we coupled capture with physical removal by leveraging magnetic force to guide the cisplatin–nanoparticle complex to an anatomical exit point, thereby implementing a retrieval pathway rather than relying on natural clearance. Third, we integrated cisplatin removal with antioxidant therapy through GSH loading, providing a dual-function therapeutic material. Fourth, we established a minimally invasive surgical workflow for localized nanoparticle delivery and magnetic guidance at the round window.

The observed functional and histological benefits, together with the absence of overt mortality or severe morbidity in treated animals, support the feasibility of this platform. Future studies should optimize nanoparticle formulation, magnetic strength and placement, treatment timing, and retrieval efficiency; evaluate longer-term safety, cochlear microanatomy, and reproducibility; and define the quantitative relationships among retrieved cisplatin burden, residual intracochlear drug levels, and hearing outcomes. Overall, this work supports a third therapeutic paradigm for cisplatin-induced hearing loss based on extracorporeal elimination of retained drug.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Watanabe Foundation (31st Magnetic Health Science Research Grant).

Schizophrenia research using diffusion tensor magnetic resonance imaging

Daisuke Koshiyama*

*Department of neuropsychiatry, The University of Tokyo Hospital
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655 Japan

Abstract

Auditory mismatch negativity has received significant attention as a potential brain marker to investigate pathophysiology of schizophrenia. This study aimed to investigate associations between mismatch negativity and white matter alterations in the thalamocortical pathways to clarify the networks underlying reduced mismatch negativity in individuals with schizophrenia. Mismatch negativity amplitude was significantly positively correlated with white matter alterations only in schizophrenia, but not in healthy comparison subjects. Our study further helps characterize and interpret reduced mismatch negativity as a useful brain marker in the pathophysiology of schizophrenia.

Keywords: mismatch negativity, white matter alteration, schizophrenia, electrophysiology, diffusion tensor imaging

1. PURPOSE

Schizophrenia is a mental disorder characterized by positive symptoms such as hallucinations and delusions, negative symptoms such as reduced motivation, and impaired cognitive function and functional outcomes; its prevalence is approximately 1%. Since the disorder typically onset during adolescence, it has a profound impact on the lives of those affected. However, much about the pathophysiology of schizophrenia remains unclear, and existing pharmacological treatments have not yielded sufficient therapeutic effects.

The mismatch negativity (MMN) is an electroencephalography (EEG) indicator expected to aid in elucidating the pathophysiology of schizophrenia. The MMN is one of event-related potential (ERP) that plays a crucial role in information processing within the brain's auditory system. Previously, we reported MMN amplitude reduction in patients with

schizophrenia using EEG and further clarified its association with impaired cognitive function and functional outcomes. Furthermore, using methods to estimate EEG sources, we have shown that MMN amplitude reduction in patients with schizophrenia is likely to be found in the cerebral gray matter, such as the frontal and temporal lobes.

Therefore, it is expected that a more detailed investigation of the cerebral neural networks underlying MMN will enable the elucidation of the pathophysiology of schizophrenia and the development of treatments based on this understanding. However, previous studies had not provided detailed insights into these neural network impairments.

Furthermore, we have previously reported that, using diffusion tensor imaging (DTI) with magnetic resonance imaging (MRI), impairments in the cerebral white matter—which consists of structures connecting areas of gray matter and

forms neural networks—are also observed in patients with schizophrenia, and that these impairments are associated with cognitive dysfunction.

In other words, while there have been reports of impairments in the cerebral gray matter, cerebral white matter, and MMN reduction in schizophrenia, there has been no previous research that has provided a unified understanding of these findings or focused on functional impairments within the neural network. Furthermore, recent clinical and animal model studies have suggested that the neural basis for MMN reduction may be associated with impairments in the cortico-thalamic pathway within the cerebral network.

Therefore, in this study, we aimed to elucidate neural network dysfunction in patients with schizophrenia by investigating the association between dysfunction in the cortico-thalamic pathway—a component of the cerebral white matter—and MMN using DTI. Our objective was to lay the groundwork for animal model studies of schizophrenia and the development of neuromodulation therapies, such as magnetic stimulation.

2. METHOD

In this study, MMN and DTI were measured in the same group of 30 patients with schizophrenia and 26 healthy comparison subjects. We then examined the association between MMN reduction and white matter alterations to elucidate the neural networks underlying these abnormalities.

3. RESULTS

Specifically, an association was observed between MMN and DTI indices measures of white matter regions, including the cortico-thalamic pathway, only in the schizophrenia group; no such association was found in the healthy comparison group (References 1–3).

4. DISCUSSION

These findings suggest that the generation of MMN is supported by a neural network involving white matter tracts in the cortico-thalamic pathway, and that this relationship may be impaired in patients with schizophrenia. The neural network dysfunction in schizophrenia revealed by this study will promote animal research that aids in the study of pathologies and the development of treatments—areas where human studies are difficult due to the invasive nature of the procedures. Furthermore, by specifically identifying brain regions that can serve as targets for therapeutic interventions, including magnetic stimulation, this research will lay the foundation for the development of a new field of research. These findings are expected to serve as a cornerstone for the development of new treatments for schizophrenia and contribute to the well-being of patients and their families.

Acknowledgements

I would like to thank the Watanabe Foundation for supporting this research with the 31st Magnetic Research Grant.

REFERENCES

- 1) Koshiyama D, Shioda R, Kishigami T, Kiriara K, Kasai K. Predictive coding studies using mismatch negativity in schizophrenia. *21st Pacific Rim College of Psychiatrists & 7th World Association of Cultural Psychiatry Joint Congress 2025*, Tokyo, Japan (September 26, 2025; Symposium)
- 2) Koshiyama D, Shioda R, Kishigami T, Kiriara K, Kasai K. Electrophysiological studies of schizophrenia using mismatch negativity and gamma-band auditory steady-state response. *ECNS Annual Conference 2025 & 7th Basic and Clinical multimodal Imaging (BaCI) International Conference*, Munich, Germany (September 4, 2025; Symposium)
- 3) Koshiyama D, Shioda R, Kishigami T, Kiriara K, Kasai K. Electrophysiological studies of

schizophrenia using mismatch negativity. *The Korean Society for Brain and Neural Sciences & the 3rd CJK Neuroscience Meeting*, Incheon, Korea (August 26, 2025; Symposium)

Mechanisms Underlying the Alleviation of Chronic Pain by Alternating Magnetic Fields

Masahiro Ohsawa*

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University
2-11-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605 JAPAN

Abstract

We investigated the effects of magnetic stimulation in a rat model of neuropathic pain. A single 10-min treatment produced transient analgesia, whereas repeated once-daily treatment for 7 days induced sustained analgesic effects. Gene-expression and cellular analyses suggested that the treatment modulated peripheral immune and inflammatory responses and suppressed spinal astrocyte activation. These findings indicate that hybrid magnetic stimulation may represent a novel non-invasive therapeutic approach for neuropathic pain.

1. Introduction

In Japan, which has become a super-aged society, the number of patients with chronic pain is increasing, and chronic pain has become an important clinical problem that markedly reduces quality of life. Although pharmacotherapy, physical therapy, and other treatments are used for chronic pain, many patients do not obtain sufficient relief, and new therapeutic approaches are needed (1,2). Existing infrared and microwave therapeutic devices can transiently alleviate pain through thermal effects and the promotion of blood flow, but there are concerns regarding the durability of their effects and their safety. Pain treatment using repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) has also been attempted; however, sufficient analgesic effects are not always obtained, and the need for head fixation and prolonged restraint, as well as adverse events such as headache, discomfort, syncope, and seizures, remains problematic (3). Recent studies have reported that extremely weak low-frequency magnetic fields activate mitophagy and may improve pathological conditions related to Parkinson's disease and inflammation. These findings indicate that ultra-low-intensity alternating magnetic

fields can regulate biological responses (4). In the present study, we used a novel magnetic stimulation device that applies weak alternating magnetic fields, combining low- and high-frequency components, near a peripheral nerve. We examined its analgesic effects in neuropathic pain and investigated the underlying mechanisms.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Male Sprague-Dawley rats were used. All experiments were performed in accordance with the animal experimentation guidelines and ethical standards of the relevant institutions. Animals were housed under controlled light-dark cycle and temperature conditions, with free access to food and water.

2.2 Neuropathic pain model

A chronic constriction injury (CCI) model of the sciatic nerve was prepared as a neuropathic pain model according to the method of Bennett et al. (5). Under 2% isoflurane inhalation anesthesia, the left thigh was incised and the sciatic nerve was exposed. The sciatic nerve was loosely ligated at four sites, 1 mm apart,

with 4-0 silk sutures, and the wound was then closed. In the sham-operated group, the sciatic nerve was exposed but not ligated before closure of the wound.

2.3 Irradiation of alternating magnetic field

After CCI surgery, magnetic stimulation was performed once daily for 10 min by placing the probe in contact with the area near the sciatic nerve ligation site. Low-frequency stimulation and mixed-wave stimulation combining low- and high-frequency components were used as stimulation conditions. In the sham-treatment group, the probe was placed in the same manner, but magnetic stimulation was not applied.

2.4 Assessment of mechanical pain threshold

Pain thresholds were assessed using the von Frey test. In the single-stimulation experiment, thresholds were measured at 30, 60, 90, and 120 min after stimulation. In the repeated-stimulation experiment, pain thresholds were evaluated longitudinally (6).

2.5 Gene expression analysis

After behavioral pharmacological testing, the sciatic nerve was collected and total RNA was extracted. Comprehensive gene-expression analysis was performed by RNA-seq, followed by differential-expression analysis and Gene Ontology enrichment analysis. To validate the changes detected by RNA-seq, the expression of genes related to inflammatory responses, immune responses, nerve fibers, and myelin was analyzed by quantitative RT-PCR.

2.6 Histological and statistical analysis

Using spinal cord tissue, immunostaining was performed for the microglial marker Iba-1 and the astrocyte marker GFAP, and glial cell activation in the spinal dorsal horn was evaluated. Data are shown as the mean $\pm$ standard error of the mean. Statistical analyses were performed using two-way analysis of variance followed by Bonferroni-corrected multiple comparisons.

3. Results

3.1 Inhibitory effect of magnetic stimulation on neuropathic pain.

In the CCI model, the mechanical pain threshold on the ipsilateral side decreased after surgery, confirming neuropathic pain-like behavior. When a single magnetic stimulation was applied, both low-frequency stimulation and mixed-wave stimulation increased the pain threshold, with a peak effect at 60 min after stimulation, indicating an acute anti-hyperalgesic effect. In particular, mixed-wave stimulation produced a stronger analgesic effect than low-frequency stimulation (Fig. 1A). However, this effect disappeared by 120 min after stimulation, and a single stimulation alone did not produce long-term improvement in pain (Fig. 1B).

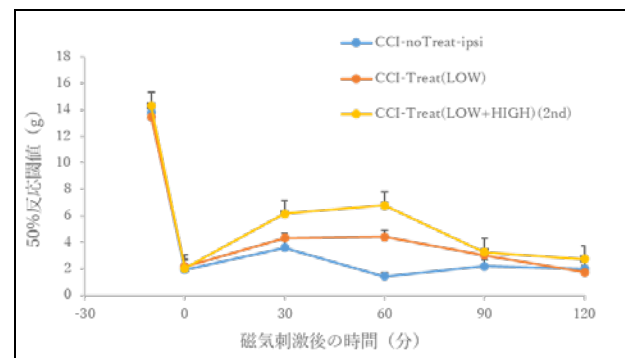


Figure 1A. Effect of acute magnetic stimulation on decreased pain threshold in the CCI model. CCI surgery was performed on day 0, and the pain threshold was assessed using the von Frey test on day 8. Magnetic stimulation using low-frequency or mixed-wave stimulation (low and high frequency) was applied for 10 min on day 8 after CCI surgery. Pain thresholds were assessed at 30, 60, 90, and 120 min after stimulation.

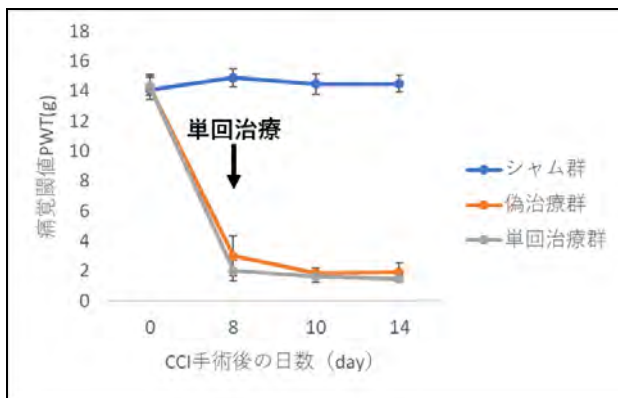


Figure 1B. Long-term effect of acute magnetic stimulation on decreased pain threshold in the CCI model. CCI surgery was performed on day 0, and pain thresholds were assessed using the von Frey test on days 8, 10, and 14. Mixed-wave magnetic stimulation (low and high frequency) was applied for 10 min on day 8 after CCI surgery.

By contrast, when 10-min magnetic stimulation was repeated once daily for 7 days, the pain threshold increased from the second day after the start of stimulation, and a clear improvement in neuropathic pain was observed by day 7 (Fig. 2).

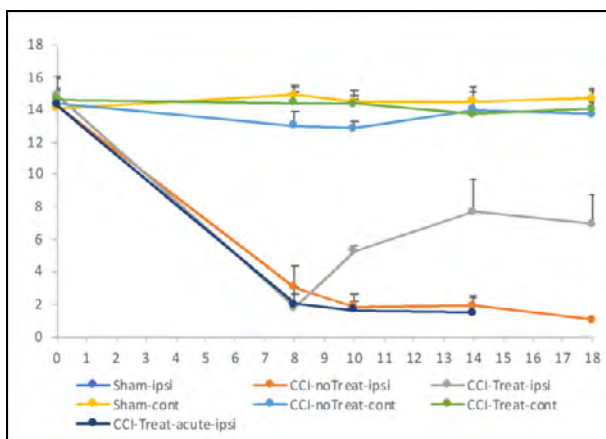


Figure 2. Effect of magnetic stimulation (mixed-wave stimulation) on decreased pain threshold in the CCI model. CCI surgery was performed on day 0, and the pain threshold was assessed using the von Frey test on day 8. Magnetic stimulation was applied once daily for 10 min from day 8 to day 14. During the

stimulation period, pain thresholds were assessed 24 h after magnetic stimulation; after completion of stimulation (from day 15 onward), measurements were performed in the afternoon.

3.2 Gene-expression changes in the injured nerve after magnetic treatment

RNA-seq analysis of sciatic nerve tissue showed that CCI markedly altered gene groups related to inflammatory responses, wound responses, stress responses, and innate immune responses (7) (Fig. 3A). In the magnetic-treatment group, the expression of inflammatory cytokines, chemokines, interferon-related genes, and other genes elevated by CCI was reduced, suggesting suppression of inflammatory and stress responses. On the other hand, altered expression was also observed in genes related to adaptive immunity, leukocyte activation, nerve fibers, and myelin structural proteins (Fig. 3B). qPCR analysis confirmed the RNA-seq findings, including reductions in inflammation-related genes, changes in immune-response-related genes, and increases in nerve fiber- and myelin-related genes.

3.3 Regulation of inflammatory cell response by magnetic stimulation

When magnetic stimulation was applied to microglia activated by LPS, the mRNA expression of several inflammatory cytokines was suppressed. In addition, microglial and astrocyte activation was observed in the spinal dorsal horn after CCI; however, repeated magnetic treatment did not show a clear effect on spinal microglial activation, but suppressed spinal astrocyte activation.

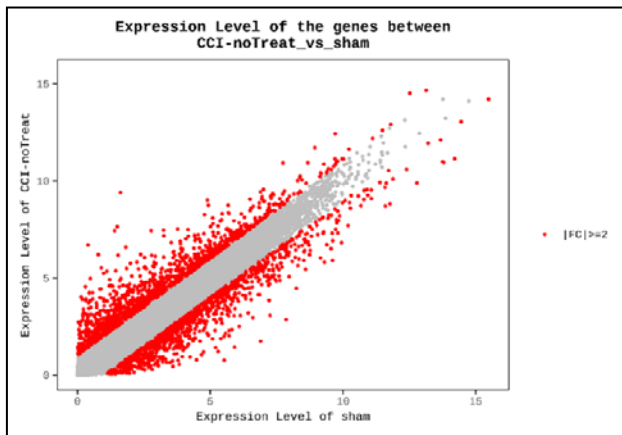


Figure 3A. Transcripts with expression changes of at least twofold after CCI surgery (MA plot). At the nerve-injury site after CCI surgery, approximately 1,200 transcripts were upregulated and approximately 1,000 transcripts were downregulated.

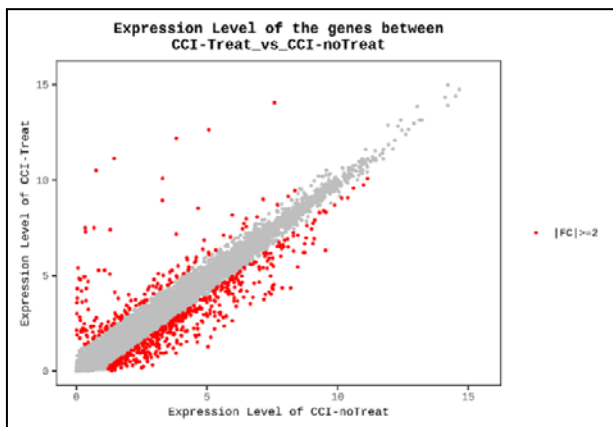


Figure 3B. Transcripts with expression changes of at least twofold after magnetic stimulation in the CCI model (MA plot). Magnetic stimulation at the nerve-injury site resulted in upregulation of approximately 150 transcripts and downregulation of approximately 400 transcripts.

4. Discussion

The present study showed that acute and repeated stimulation using the magnetic stimulation device improves the decrease in pain threshold associated with neuropathic pain. Gene-expression analysis of peripheral nerves revealed changes in immune responses and inflammation-related factors. In the central nervous system, magnetic treatment suppressed

spinal astrocyte activation. These results suggest that the analgesic effects of this treatment may involve not only the control of inflammation in peripheral nerves but also the modulation of glial cell responses in the central nervous system (7-10).

Taken together, these findings suggest that hybrid magnetic stimulation of peripheral nerves using this device may provide immediate analgesic effects and sustained analgesic effects through the regulation of inflammation in both peripheral and central nervous systems. Future studies will further examine the mechanisms underlying functional improvement in both the peripheral and central nervous systems, including the involvement of the descending noradrenergic pain inhibitory system and adrenergic $\alpha 2$ receptors on astrocytes (11).

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Watanabe Foundation.

参考文献

- 1) Treede RD, Rief W, Barke A, et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain*. 2019;160(1):19–27. doi:10.1097/j.pain.0000000000001384.
- 2) Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2015;14(2):162–173. doi:10.1016/S1474-4422(14)70251-0.
- 3) Lefaucheur JP, Aleman A, Baeken C, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): an update (2014–2018). *Clin Neurophysiol*. 2020;131(2):474–528. doi:10.1016/j.clinph.2019.11.002.
- 4) Toda T, Ito M, Takeda JI, et al. Extremely low-frequency pulses of faint magnetic field induce mitophagy to rejuvenate mitochondria. *Commun Biol*. 2022;5:453. doi:10.1038/s42003-022-03389-7.
- 5) Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy

- in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87–107. doi:10.1016/0304-3959(88)90209-6.
- 6) Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994;53(1):55–63. doi:10.1016/0165-0270(94)90144-9.
 - 7) Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain*. 2013;154 Suppl 1:S10–S28. doi:10.1016/j.pain.2013.06.022.
 - 8) Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 2003;424(6950):778–783. doi:10.1038/nature01786.
 - 9) Clark AK, Old EA, Malcangio M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J Pain Res*. 2013;6:803–814. doi:10.2147/JPR.S53660.
 - 10) Nakagawa T, Kaneko S. Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain. *J Pharmacol Sci*. 2010;114(4):347–353. doi:10.1254/jphs.10R04CP.
 - 11) Bahari Z, Meftahi GH. Spinal α 2-adrenoceptors and neuropathic pain modulation; therapeutic target. *Br J Pharmacol*. 2019;176(14):2366–2381. doi:10.1111/bph.14580.

Effects of transcranial static magnetic stimulation on unilateral spatial neglect after stroke

Amiri Matsumoto*

* Department of Sensorimotor Neuroscience, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-Ku, Hiroshima 734-8553, Japan

Abstract

Unilateral spatial neglect (USN) affects 33–82% of right-hemisphere stroke patients, impairing daily activities and increasing fall risk. This study investigated whether transcranial static magnetic stimulation (tSMS)—a cost-effective, comfortable, non-invasive method—can alleviate USN symptoms. A single patient received 20-minute tSMS or sham stimulation over the P3 region for five days each. Evaluations included paper-and-pencil tests and a Computer-Based Test (CBT). Although paper-and-pencil tests revealed no clear neglect, tSMS appeared to facilitate leftward attention, potentially increasing subjective task difficulty. Specifically, CBT showed a post-tSMS speed-accuracy trade-off: more correct left-sided responses alongside prolonged reaction times. These preliminary results suggest tSMS over the contralateral parietal cortex can modulate attentional distribution in USN, though further investigation is required to confirm clinical efficacy and underlying mechanisms.

Keywords: transcranial static magnetic stimulation, unilateral spatial neglect

1. PURPOSE

Unilateral spatial neglect (USN) is a clinical syndrome primarily observed after right parietal stroke, characterized by a rightward bias in spatial attention and sensorimotor processing, alongside deficits in arousal and working memory¹⁻³). Affecting 33–82% of right-hemisphere stroke cases—with one-third progressing to a chronic state—USN significantly impairs activities of daily living (ADL), increases fall risks, and elevates caregiver burden⁴⁻⁸).

Although repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) and transcranial direct current stimulation (tDCS) can alleviate USN by modulating interhemispheric inhibition⁹⁻¹⁰), their high cost and technical complexity limit integration into home-based rehabilitation. Furthermore, these methods often induce discomfort or paresthesia, which can compromise patient compliance and the validity of sham-controlled

experiments¹¹).

This study investigated the effects of transcranial static magnetic stimulation (tSMS)—an affordable, user-friendly, and comfortable alternative—in post-stroke patients with USN¹²⁻¹³). Due to clinical recruitment constraints, we also conducted parallel investigations on healthy adults to examine tSMS effects on electromechanical delay (EMD) and pain thresholds. These concurrent studies aimed to further elucidate the physiological mechanisms underlying tSMS alongside its clinical evaluation for USN.

2. METHODS

2.1 Participants

Four stroke patients presenting with unilateral spatial neglect (USN; left USN: $n = 3$, right USN: $n = 1$) were initially recruited (Table 1). Ultimately, one patient (#4), who completed the study protocol without dropping out,

was included in the analysis.

Table 1 Participant profiles

	年齢	性別	発症後期間	損傷半球	ドロップアウト理由
#1	92	女	58 日	右	参加への同意を得られなかった
#2	89	女	9 日	右	USN が認められなかった
#3	76	男	57 日	左	介入期間中に外出をした
#4	58	男	25 日	右	

2.2 Procedures

The intervention protocol consisted of sham stimulation followed by tSMS, each administered for five consecutive days. A two-day washout period was implemented between the two conditions. Assessments were conducted at three time points: prior to the initiation of sham stimulation, prior to the initiation of tSMS, and upon the completion of the tSMS period (Figure 1).

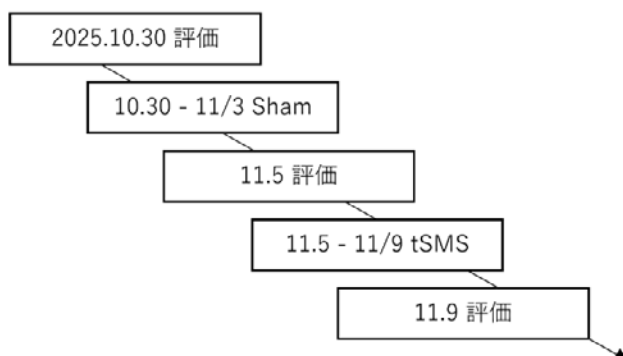


Figure 1. Experimental schedule

For tSMS, static magnetic field stimulation was applied using a stimulator consisting of three neodymium magnets embedded in a non-magnetic housing (diameter: 140 mm; thickness: 48 mm)¹⁴⁾ (Figure 2). The device was secured for 20 minutes using a multi-axis adjustable stand, with its center accurately positioned over the P3 site according to the International 10-20 system. For the sham condition, a non-magnetic cylinder was utilized.



Figure 2. “Shin-jiba” stimulation unit

2.3. Assessment using paper-and-pencil tests

The assessment included the Line Bisection Test, the Line Cancellation Test, and the self-report version of the Catherine Bergego Scale (CBS) questionnaire.

2.4. Computer Based Test¹⁵⁾ (Figure 3)

Gabor patches were presented for 100 ms at one of three positions (left, center, or right) on a 14-inch monitor. Following stimulus presentation, participants were instructed to identify the location as quickly as possible by pressing the corresponding arrow keys (left, up, or right). The stimuli featured five levels of contrast, and the task difficulty was adaptively increased (i.e., contrast was reduced) following consecutive correct responses. A total of 30 trials (10 trials per position) were presented in a randomized order. The inter-stimulus interval was set at 1200 ± 200 ms following each response.

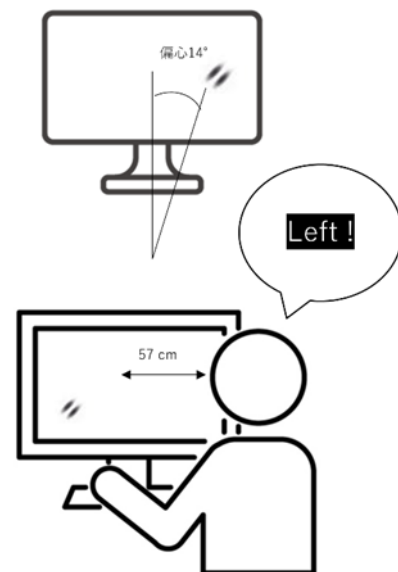


Figure 3. CBT

3. RESULTS

3.1. Assessment using paper-and-pencil tests (Table 2)

No significant changes were observed in the Line Bisection Test. In the Line Cancellation Test, while three omissions were recorded on the right side at the initiation of sham stimulation, no omissions occurred either before or after the tSMS intervention. Regarding the CBS self-report, the participant perceived the items related to dressing and grooming to be more difficult

following tSMS.

3.2. CBT (Table3, 4, 5)

For left-sided stimuli, the number of correct responses increased and the number of neglects decreased following tSMS; conversely, reaction times were prolonged. Regarding bilateral stimuli, no significant intervention effect of tSMS was observed, although reaction times tended to be shorter compared to those for unilateral (left or right) stimuli. No remarkable changes were found for right-sided stimuli.

Stimulus luminance showed no significant differences before and after the tSMS intervention, though luminance for right-sided stimuli tended to be lower than for left-sided or bilateral stimuli. Finally, weighted scores for bilateral stimuli decreased post-tSMS, whereas no significant changes were observed for right- or left-sided stimuli.

4. DISCUSSION

While conventional paper-and-pencil tests revealed

Table 2. Paper-and-pencil test results

線分二等分試験（左端からの距離）			線分抹消試験（見落とし数）			CBS（30点中）		
Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS
110	107	115	3	0	0	3	3	6

Table 3. Results by stimulus position

左刺激

正答			反応なし			誤答			反応時間		
Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS
4	0	4	5	9	6	1	1	0	1.12	0.62	1.46

両側刺激

正答			反応なし			誤答			反応時間		
Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS
3	8	6	0	0	0	7	2	4	0.55	0.65	0.63

右刺激

正答			反応なし			誤答			反応時間		
Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS
7	7	7	3	3	2	0	0	1	1	1.17	1.09

Table 4. Mean luminance by stimulus position

左刺激			両側刺激			右刺激		
Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS
0.45	0.95	0.95	0.95	0.71	0.88	0.13	0.16	0.16

Table 5. Weighted scores (Number of correct responses $\times$ [1 – Mean luminance])

左刺激			両側刺激			右刺激		
Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS	Pre Sham	Pre tSMS	Post tSMS
2.22	0.00	0.20	0.15	2.33	0.74	6.11	5.91	5.91

no clear neglect tendencies, the findings suggest that tSMS may have facilitated leftward attention, potentially leading to an increased subjective perception of task difficulty. Focusing on pre- and post-intervention changes, a speed-accuracy trade-off was observed during left-sided stimulation in the CBT, characterized by an increased number of correct responses alongside prolonged reaction times. Stimulus luminance tended to be higher for left-sided and bilateral stimuli relative to right-sided stimuli, suggesting that the adaptive task presented lower-difficulty stimuli to compensate for the impact of left USN. Although weighted scores effectively reflected parameter variations between conditions and highlighted the influence of left USN, they appeared to overemphasize changes in the number of correct responses and mean luminance, limiting their effectiveness as primary parameters for detecting changes in this specific experimental context. The absence of significant parameter changes for bilateral or right-sided stimuli following tSMS suggests that the side effects of extensive static magnetic field exposure to the right parietal region were negligible.

5. Concurrent studies

5.1. EMD

Sixteen healthy adults participated in this study. A single magnet, thin static magnetic field stimulation (tSMS), or sham stimulation was applied over the lateral gastrocnemius (LG) for 15 minutes. M-waves were recorded from the LG, medial gastrocnemius (MG), and soleus (SOL) following electrical stimulation of the tibial nerve at the popliteal fossa. Ankle plantarflexion torque was measured using a goniometer, and the electromechanical delay (EMD)—defined as the time from electrical excitation to the onset of tension development—was evaluated longitudinally at three time points: pre-intervention (pre), immediately post-intervention (post-0), and 15 minutes post-intervention (post-15). No significant differences were observed in the amplitude or latency of the maximal M-wave across all time points or stimulation conditions. However, the interval from M-wave onset to the initiation of plantarflexion was significantly prolonged in the LG

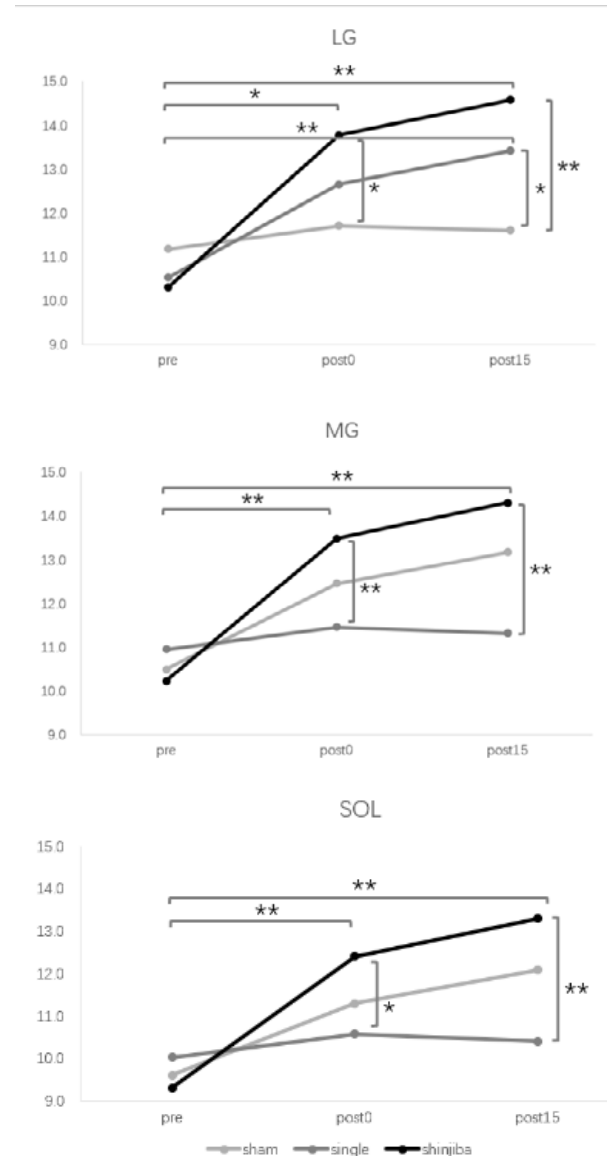


Figure 4. EMD results

and MG under the single-magnet condition. Notably, in the tSMS condition, significant prolongation was also observed in the deeper-layered SOL (Figure 4). These findings suggest that static magnetic fields may exert inhibitory effects on the neuromuscular processes occurring after the excitation of the neuromuscular junction and sarcolemma, specifically from the stage of cross-bridge formation in contractile proteins onward.

5.2. Pain threshold

Twelve healthy adults participated in this study. A single magnet or sham stimulation was applied to the dorsal aspect of the wrist for 20 minutes. To selectively

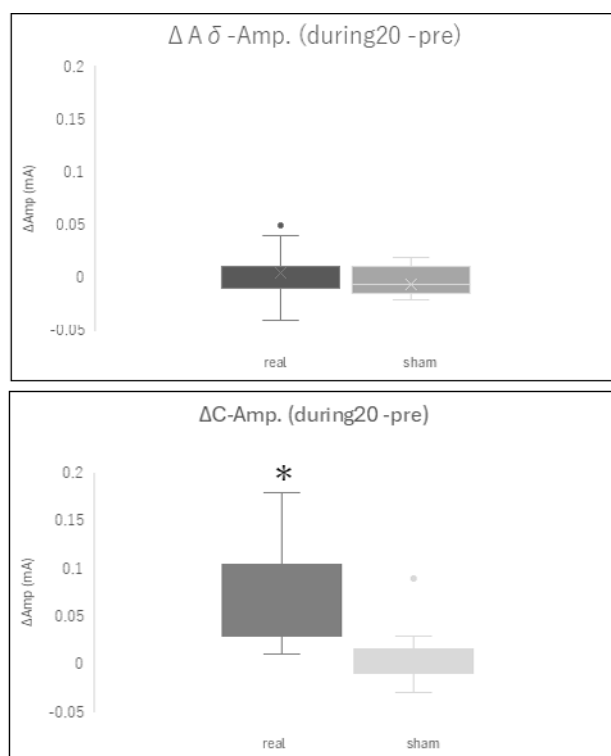


Figure 5 Pain thresholds results

stimulate A δ and C fibers, intraepidermal electrical stimulation (IES) was delivered via electrodes placed over the area innervated by the superficial radial nerve on the dorsum of the right hand. Pain thresholds and reaction times for both A δ and C fibers were measured before and after the intervention. The pain threshold for C fibers increased significantly following single-magnet stimulation, whereas no significant differences were observed for A δ fibers (Figure 5). Reaction times for both fiber types showed no significant changes post-intervention. Since the effects of tSMS were specifically observed in unmyelinated C fibers, these findings suggest that tSMS may serve as an effective adjunctive treatment for chronic pain conditions associated with C-fiber hyperexcitability.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the 31st Magnetic Research Grand from the Watanabe Foundation.

REFERENCES

- 1) Husain M, Rorden C. Non-spatially lateralized mechanisms in hemispatial neglect. *Nat Rev*

- Neurosci.* 4(1): 26-36, 2003.
- 2) Hillis AE. Neurobiology of unilateral spatial neglect. *Neuroscientist.* 12(2): 153-163, 2006.
- 3) Bartolomeo P, Thiebaut de Schotten M, et al. Brain networks of visuospatial attention and their disruption in visual neglect. *Front Hum Neurosci.* 6: 110, 2012.
- 4) Bowen A, McKenna K, et al. Reasons for variability in the reported rate of occurrence of unilateral spatial neglect after stroke. *Stroke.* 30(6): 1196-1202, 1999.
- 5) Karnath HO, Rennig J, et al. The anatomy underlying acute versus chronic spatial neglect: a longitudinal study. *Brain.* 134(Pt 3): 903-912, 2011.
- 6) Nijboer TC, Kollen BJ, et al. The impact of recovery of visuo-spatial neglect on motor recovery of the upper paretic limb after stroke. *PLoS One.* 9(6): e100584, 2014.
- 7) Campbell GB, Matthews JT. An integrative review of factors associated with falls during post-stroke rehabilitation. *J Nurs Scholarsh.* 42(4):395-404, 2010.
- 8) Buxbaum LJ, Ferraro MK, et al. Hemispatial neglect: Subtypes, neuroanatomy, and disability. *Neurology.* 62(5): 749-56, 2004.
- 9) Koch G, Bonni S, et al. θ -burst stimulation of the left hemisphere accelerates recovery of hemispatial neglect. *Neurology.* 78(1): 24-30, 2012.
- 10) Salazar APS, Vaz PG, et al. Noninvasive Brain Stimulation Improves Hemispatial Neglect After Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* 99(2): 355-366, 2018.
- 11) Brunoni AR, Amadera J, et al. A systematic review on reporting and assessment of adverse effects associated with transcranial direct current stimulation. *Int J Neuropsychopharmacol.* 14(8):1133-1145, 2011.
- 12) Oliviero A, Mordillo-Mateos L, et al. Transcranial static magnetic field stimulation of the human motor cortex. *J Physiol.* 589(Pt 20): 4949-458, 2011.
- 13) Kirimoto H, Watanabe T, et al. Influence of Static Magnetic Field Stimulation on the Accuracy of Tachystoscopically Presented Line Bisection. *Brain Sci.* 10(12): 1006, 2020.
- 14) Shibata S, Watanabe T, et al. Triple tSMS system ("SHIN jiba") for non-invasive deep brain

stimulation: a validation study in healthy subjects. J Neuroeng Rehabil. 19(1): 129, 2022.

- 15) Schuhmann T, Duecker F, et al. Transcranial alternating brain stimulation at alpha frequency reduces hemispatial neglect symptoms in stroke patients. Int J Clin Health Psychol. 22(3): 100326, 2022.

Investigation of the Neural Mechanisms Underlying Motor Recovery Induced by Peripheral Magnetic Stimulation

Mitsuhiro Nito*

* Department of Occupational Therapy, Yamagata Prefectural University of Health Sciences
260 Kamiyanagi, Yamagata, 990-2212, Japan

Abstract

This study investigated the neural mechanisms underlying the effects of repetitive peripheral magnetic stimulation (rPMS). We demonstrated that rPMS facilitates corticospinal excitability in an intensity-dependent manner, with suprathreshold stimulation producing the greatest effects. This facilitation depended primarily on large-diameter group I afferent input and occurred without changes in cervicomedullary motor evoked potentials, suggesting the involvement of supraspinal mechanisms rather than changes in cortico-motoneuronal transmission. In addition, rPMS induced direction-dependent modulation of disynaptic Ia inhibition between antagonist muscles. These neurophysiological changes may contribute to motor recovery and provide a physiological basis for optimizing rPMS-based neurorehabilitation.

Keywords: group Ia afferents, neuromodulation, rehabilitation, sensory inputs, transcranial magnetic stimulation

1. PURPOSE

Repetitive peripheral magnetic stimulation (rPMS) is thought to facilitate motor recovery by enhancing corticospinal excitability and has therefore been investigated as a potential adjuvant therapy in physical rehabilitation after central nervous system (CNS) lesions. However, the optimal stimulation parameters and the neurophysiological mechanisms underlying its therapeutic effects remain poorly understood. The aim of this study was to elucidate the neural mechanisms underlying motor recovery induced by rPMS. To achieve this, we investigated (1) the effects of stimulation intensity on corticospinal excitability¹⁾, (2) the mechanisms underlying the enhancement of corticospinal excitability induced by rPMS²⁾, and (3) the effects of rPMS on spinal reciprocal inhibition³⁾.

2. METHODS

Healthy adults received rPMS over the right extensor carpi radialis (ECR) or biceps brachii (BB). Based on a previous study⁴⁾, rPMS was delivered at 25 Hz in cycles of 2 s ON and 2 s OFF. Each session consisted of 45 stimulation cycles (3 min), repeated five times for a total intervention duration of 15 min. Three stimulation intensities were examined: (1) subthreshold stimulation ($0.9 \times$ motor threshold [MT]), (2) suprathreshold stimulation that elicited a slight muscle contraction ($1.2 \times$ MT), and (3) high-intensity stimulation adjusted individually to evoke maximal wrist extension movement (mean $\pm$ SD: $1.8 \pm 0.3 \times$ MT). To examine the contribution of group I afferent input, the effects of rPMS at the high-intensity were also evaluated after the ECR H-reflex had been suppressed by upper-arm ischemia.

Corticospinal excitability was assessed using motor evoked potentials (MEPs) elicited by transcranial magnetic stimulation and recorded from the ECR and flexor carpi radialis (FCR). In addition, cervicomedullary motor evoked potentials (CMEPs) elicited by transmastoid electrical stimulation were recorded to assess changes at the spinal motoneuron level.

To investigate the effects of rPMS on spinal reflex circuits, reciprocal inhibition between the FCR and ECR was evaluated. The FCR H-reflex was elicited by electrical stimulation of the median nerve at the elbow, and changes in the H-reflex conditioned by radial nerve stimulation were used to assess disynaptic Ia inhibition and D1 inhibition, an index of presynaptic inhibition acting on Ia afferent terminals, before and after rPMS⁵⁾. Reciprocal inhibition in the opposite direction was also examined by eliciting the ECR H-reflex with radial nerve stimulation and evaluating its modulation by conditioning stimulation of the median nerve.

3. RESULTS

rPMS increased corticospinal excitability in an intensity-dependent manner. Suprathreshold stimulation significantly increased MEP amplitudes, with higher stimulation intensities producing earlier facilitation (Figure 1). In contrast, subthreshold stimulation did not induce significant changes in MEP amplitude. Furthermore, the facilitatory effect of rPMS on MEPs was abolished when group I afferent input was suppressed by upper-arm ischemia.

Comparison of the effects of rPMS on MEPs and CMEPs showed that MEP amplitudes increased significantly, whereas CMEPs remained unchanged. These findings suggest that the increase in MEPs induced by rPMS was not attributable to changes in cortico-motoneuronal transmission.

rPMS also modulated spinal reciprocal inhibition in a direction-dependent manner. Specifically, disynaptic Ia inhibition from the stimulated muscle to its antagonist was enhanced, whereas that in the opposite direction was attenuated. Neither D1 inhibition nor the

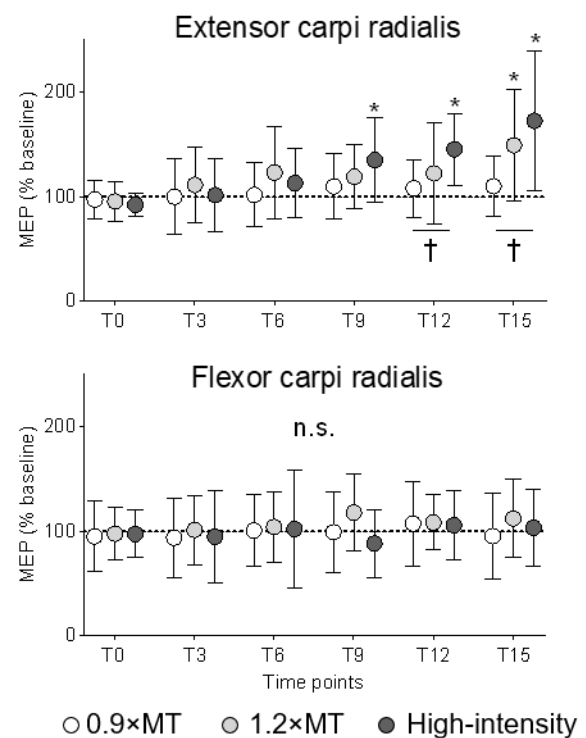


Figure 1. Effects of stimulation intensity on corticospinal excitability.

Each circle and error bar represent the mean value and SD, respectively. *Significant differences compared with “T0,” and †significant differences compared with the other intensities ($P < 0.05$). Adapted from Reference 1.

H-reflex was significantly affected.

4. DISCUSSION

The present study demonstrated that rPMS efficiently facilitates corticospinal excitability when delivered at suprathreshold intensities. The findings also suggest that group I afferent input, particularly Ia afferents, plays a major role in this facilitatory effect. Furthermore, the absence of changes in CMEPs suggests that the increase in MEPs observed in this study is likely to reflect changes at the cortical level rather than at the spinal motoneuron level^{6, 7)}. These findings provide important insights into the neural mechanisms underlying the therapeutic effects of rPMS and support the use of suprathreshold stimulation to maximize its efficacy.

In addition, rPMS induced direction-dependent modulation of spinal reciprocal inhibition. Specifically,

disynaptic Ia inhibition from the stimulated muscle to its antagonist was enhanced, whereas disynaptic Ia inhibition in the opposite direction was attenuated. Previous studies have shown that CNS lesions are associated with impaired Ia inhibition to spastic muscles and excessive Ia inhibition to their antagonists^{8,9}. The bidirectional modulation observed in the present study suggests that rPMS may help restore the functional balance of spinal reciprocal inhibitory circuits. In particular, applying rPMS to the antagonist of a spastic muscle may strengthen Ia inhibition onto the spastic muscle while simultaneously reducing excessive inhibition of the non-spastic muscle. Such modulation of spinal interneuronal circuits may contribute to motor recovery after CNS lesions. Future studies are warranted to determine whether these physiological changes can be translated into functional recovery in individuals with CNS lesions.

Taken together, the present findings demonstrate that rPMS enhances corticospinal excitability through group I afferent input while simultaneously inducing direction-dependent modulation of spinal reciprocal inhibition. These neurophysiological adaptations may constitute an important neural basis for the motor recovery induced by rPMS.

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by the 31st Magnetic Research Grant from the Watanabe Foundation.

REFERENCES

- 1) Yoshida K, Nito M, Miyazaki D, et al. Intensity-dependent corticospinal facilitation by repetitive peripheral magnetic stimulation: evidence for a major contribution of group I afferents. *J Neurophysiol.* 135(6): 1455–66 (2026).
- 2) Omiya A, Shitara K, Miyazaki D, et al. Effects of different intensities of repetitive peripheral magnetic stimulation on corticospinal excitability and motor performance in healthy humans. *PLoS One.* 21(5): e0349300 (2026).
- 3) Miyazaki D, Omiya A, Shitara K, et al. Differential Modulation of Reciprocal Inhibition Between Wrist Extensors and Flexors by Repetitive Peripheral Magnetic Stimulation of the Wrist Extensors. *J Neurophysiol.* In Press.
- 4) Nito M, Katagiri N, Yoshida K, et al. Repetitive Peripheral Magnetic Stimulation of Wrist Extensors Enhances Cortical Excitability and Motor Performance in Healthy Individuals. *Front Neurosci.* 15: 632716 (2021).
- 5) Day BL, Marsden CD, Obeso JA, et al. Reciprocal inhibition between the muscles of the human forearm. *J Physiol.* 349: 519–34 (1984).
- 6) Ugawa Y, Rothwell JC, Day BL, et al. Percutaneous electrical stimulation of corticospinal pathways at the level of the pyramidal decussation in humans. *Ann Neurol.* 29(4): 418–27 (1991).
- 7) Taylor JL, Gandevia SC. Noninvasive stimulation of the human corticospinal tract. *J Appl Physiol* (1985). 96(4): 1496–503 (2004).
- 8) Yanagisawa N, Tanaka R, Ito Z. Reciprocal Ia inhibition in spastic hemiplegia of man. *Brain.* 99(3): 555–74 (1976).
- 9) Okuma Y, Lee RG. Reciprocal Inhibition in Hemiplegia: Correlation with Clinical Features and Recovery. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques.* 23(1): 15–23 (1996).

The Subjects for the 2025 Research Grants

Here are the subjects (6 Basic Researches, 5 Application Researches, 6 Specific Researches) that the 2025 Research Grants are subsidized.

I. Basic Research

- I-1. Realization of Regenerative Medicine for Pelvic Organ Prolapse via Transplantation of Magnetic-Sensitive Adipose Tissue Stem Cell Spheroids
Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Department of Surgery, Division of Digestive Surgery and Transplant Assistant Professor/Miyamoto Daisuke
- I-2. Non-invasive structural evaluation of cultured muscle tissue using ultra-high field MRI
The University of Tokyo Assistant Professor/Byeongwook Jo
- I-3. Development of Magnetothermal Chemotherapy Using Magnetic Nanoparticles for Metastatic Urothelial Carcinoma
Department of Nephro-urology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences Assistant Professor/Takashi Nagai
- I-4. Development of Luminescent Radicals for Magnetic Field Imaging
Kyushu University Associate Professor/Albrecht Ken
- I-5. Development of Hyperpolarized-Nuclear Magnetic Resonance Molecular Probes for Functional Diagnosis of Brain Inflammation
The University of Tokyo Assistant Professor/Hiroyuki Yatabe
- I-6. Evaluation of the effects of weak magnetic fields on bio-related molecules using an artificial cell membrane as a reaction field
Iwate University Associate Professor/Yoshimi Oka

II. Application Research

- II-1. Evaluation of Muscle Activity and Diagnosis of Neuromuscular Disorders Using Biomagnetometer
Institute of Science Tokyo Department of Orthopaedic Surgery Specially Appointed Assistant Professor/Tai Otani
- II-2. International Multicenter Study on the Efficacy of Accelerated Theta-Burst Transcranial Magnetic Stimulation for Neuropathic Pain
Department of Neurosurgery, The University of Osaka Graduate School of Medicine Specially Appointed Associate Professor/Koichi Hosomi
- II-3. Development of Magnetic Image Sensor for Magnetic Particle Imaging
Kyushu University Associate Professor/Teruyoshi Sasayama
- II-4. Evaluation of priming stimulation to enhance the analgesic effects of high frequency repetitive transcranial magnetic stimulation
Department of Rehabilitation Medicine, School of Medicine, Keio University Researcher/Okuyama Kohei
- II-5. Exploratory intervention study for the efficacy and safety of magnetic brain stimulation therapy for depressive symptoms in patients with dementia with Lewy bodies and mild cognitive impairment with Lewy bodies
Department of Psychiatry, Graduate School of Medicine, The University of Osaka Associate Professor/Shun Takahashi

III. Specific Research

- III-1. Susceptibility Separation MRI for Quantification of Brain Amyloid- β in Alzheimer's Disease
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences Researcher/Yuto Uchida
- III-2. This study aims to construct a predictive model for treatment response to rTMS in patients with major depressive disorder, by utilizing disease subtyping derived from resting EEG and the machine learning algorithm HYDRA.
Kyushu University, Faculty of Medical Sciences graduate student/Yoshiki Kanemitsu
- III-3. Elucidating the Neuroplastic Mechanisms of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation and Its Application to Enhancing Psychotherapy Effects
Keio University Assistant professor/Nariko Katayama
- III-4. Functional evaluation of movement evoked by repetitive magnetic spinal stimulation to cervical spine for upper-limb motor function restoration
Okayama University Medical School Assistant Professor/Hironori Tsuji
- III-5. Magnetic Requirements for Endosomal Escape Mediated by Organelle-Targeted Magnetic Nanoparticles
Iwate university, Faculty of Science and Engineering Associate professor/Yoko Shiba
- III-6. Establishment of cortico-reticulospinal pathway assessment using transcranial magnetic stimulation for abnormal co-contraction following spinal cord injury
Juntendo University Graduate School of Medicine Japan Society for the Promotion of Science Research Fellow (DC1)/Natsuki Katagiri

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31回

発 行 日	令和8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ください。



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。