

令和元年6月19日現在

機関番号：82641

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16396

研究課題名(和文)磁気刺激法のメカニズム解明に向けた脳深部リアルタイム計測

研究課題名(英文)Real-time detection of stimulus evoked response in deep brain region for elucidation of mechanisms of magnetic stimulation

研究代表者

齋藤 淳史(Saito, Atsushi)

一般財団法人電力中央研究所・環境科学研究所・主任研究員

研究者番号：30714539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：磁気刺激による生体内での刺激誘発応答の閾値やメカニズムの解明を目的とし、実験動物(ラット)の脳深部神経活動を指標とした刺激誘発応答評価手法を開発し、脊髄への磁気刺激による刺激誘発応答の評価を行った。本研究を通じて、強電磁界中でも神経活動をリアルタイムで検出できる計測手法やラットの脊髄を局所的に磁気刺激可能な小型の8の字型コイルを開発するとともに、脊髄への磁気刺激により誘発された体性感覚誘発電位(SEP)を脳深部領域より直接検出することに成功した。また、SEPは運動誘発電位(MEP)より低い磁界強度でも観察されることや、睡眠/覚醒下では閾値が変化することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

磁気刺激法は、薬剤療法のみでは回復が期待できない重篤な神経疾患の治療等での有効性が確認されている。しかし、磁気刺激による生体内神経系での刺激閾値や興奮伝搬経路、異常な神経活動の発生メカニズムに関して未解明な部分も残されている。本研究では、磁気刺激による刺激誘発応答を脳深部領域と末梢神経領域より同時かつリアルタイムで検出できる評価手法を確立することができた。今後、同手法を最適な磁気刺激法の確立に向けた刺激パラメータの探索や安全性評価、人体防護ガイドライン策定のための科学的根拠の収集といった研究に展開することで、新規磁気刺激法の開発や安全性評価に関連する多様な課題の解決に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：To clarify the threshold and mechanism of stimulus evoked responses by magnetic stimulation, we developed an evaluating method which was based on the neuronal activity in deep brain region of experimental animal (rat), and detected the somatosensory evoked potential (SEP) and the motor evoked potential (MEP) after magnetic stimulation on spinal cord. Through these experiments, we succeeded the development of a method for real-time detection of stimulus evoked responses in the deep brain region and sciatic nerve region during high-intensity magnetic stimulation, a small figure-of-eight coil for animal experiments, and the real-time detection of SEP and MEP after magnetic stimulation on spinal cord. The experimental results also revealed that the SEP was observed at a magnetic flux density lower than that of MEP, and the threshold values of SEP were changed under sleep/awake state.

研究分野：生体電磁気学

キーワード：磁気刺激 脳・神経 細胞・組織 リアルタイム計測 光ファイバー シリコンプローブ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

磁気刺激法は、生体外に配置したコイルからパルス磁界を生体内に印加し、神経活動を非侵襲的に調節する技術である。近年、うつ病やパーキンソン病等の治療において、薬剤療法のみでは回復が期待できない重篤な疾患患者を対象にその有効性が確認されている。特に、磁気刺激を連続的に脳・神経系に印加する反復経頭蓋磁気刺激（repetitive Transcranial Magnetic Stimulation; rTMS）法では、刺激周波数を変えることで神経活動の抑制（低頻度刺激： $< 1$  Hz）や興奮（高頻度刺激： $> 5$  Hz）を制御できることが報告（Ridding and Rothwell, Nat. Rev. Neuroci. 2007）されており、てんかん時の過剰な神経活動を抑制する治療や、うつ病時に抑圧された神経活動を賦活化する治療へと展開されている。一方、磁気刺激に対する神経興奮メカニズム、特に生体内の複雑な神経回路網を介した刺激効果の伝搬や、健常/疾患状態または睡眠/覚醒状態での刺激誘発応答の変化については、現在でもなお未解明な点が多く残されている。また、新規の磁気刺激手法を確立するには各種刺激パラメータ（周波数/強度/時間等）の探索が必要となるが、ヒトを対象とした被験者実験では磁気刺激時の刺激誘発応答を生体内でリアルタイムに検出することは困難であり、てんかん/痙攣の発生リスクに関する安全性の問題も存在する。そのため、新規の磁気刺激法の開発や安全性評価を効率的に行うには、磁気刺激時の生体内における刺激誘発応答のメカニズムの解明や、多様な刺激パラメータから有効な刺激手法を選定するための評価手法の確立が必要となる。

### 2. 研究の目的

本研究では、磁気刺激法のメカニズムの解明や安全性評価に必要な各種要素技術の確立に向け、磁気刺激後に生体内に伝搬する刺激誘発応答を実験動物（ラット）の脳深部領域よりリアルタイムで検出することができる評価手法を確立し、同手法を用いて末梢/脳深部領域での刺激誘発応答の比較や刺激効果の伝搬メカニズムを調べる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脳深部神経活動をリアルタイム検出するための計測方法の開発

##### ① 光学計測による方法

磁気刺激による実験動物の脳深部神経活動をリアルタイムで検出するために、電磁界による影響を受けない光ファイバーを用いた光学計測を検討した。本研究では極細径の光ファイバーを用いて脳深部における神経活動を細胞内カルシウムイメージング法により検出することを試みた。光ファイバーは、脳定位固定装置を用いて実験動物（Wistar ラット、日本チャールスリバー）の大脳皮質1次体性感覚野（S1）領域に配置した。光ファイバーをラット脳アトラスにより選定した標的部位へガイドするために、非導電性のカニューラを吸入用麻酔薬（Isoflurane, Pfizer）および脳定位固定装置を用いた麻酔下での開頭手術により移植した。光学計測実験時には、カニューラを介して蛍光指示薬（Oregon Green 488 BAPTA-1, Thermo Fisher Scientific）の導入を行い、ファイバーフォトメトリーシステム（Photometry Basic, Dric Lenses）を用いて光学計測を行った。

##### ② 電気計測による方法

光学計測に加えて、微小なシリコンプローブ電極（Qtrode, NeuroNexus）を用いた電気計測を検討した。脳深部への電極の配置に際しては、光学計測の場合と同様の方法で刺入部位を決定した。なお、シリコンプローブ電極に付属する基板部は脳深部には配置できないため、頭蓋にアンカーボルトを設置し、歯科用セメントを用いて頭蓋と接着固定した。なお、シリコンプローブによる脳深部神経活動の電気計測は、手術後1週間以上が経過した動物に対して行った。生体信号は、4chヘッドアンプシステム（HAS-4, BRC）により最大で2000倍まで増幅し、その後データ収録システム（PowerLab 2/26, ADInstruments）によりPCに記録した。記録された信号は専用ソフトウェア（LabChart Pro, ADInstruments）を用いて解析した。

#### (2) 実験動物を対象とした磁気刺激実験のためのコイルおよび動物固定器具の開発

実験動物として使用したラットの生体内を局所的に磁気刺激するために、本研究ではサイズが115×65×13 mm（コイル部：内径20 mm、外径48 mm）、巻き数が4×6巻×2段で構成される磁気刺激用8の字コイル（特注製、テクノ電気工業）を製作した。なお、本コイルは、これまでに製作した20 kHzの磁気刺激用電源と接続してするために、コイル端子間のインダクタンスを34.8  $\mu$ Hとした。また磁気刺激時に印加する波形は、18 kHz、8波長分のバースト状の正弦波とした。また、強磁界発生空間内の定位置にラットの頭部を固定しておくために、金属材料を使用しない非導電性動物固定器具を製作した。同器具は、アクリル製の動物固定用台座とコイル固定用支持棒で構成され、動物頭部固定のための麻酔吸入用器具としては、市販のプラスチック製頭部固定器具および麻酔用マスク（SRP-AR, ナリシゲ）を使用した。

#### (3) 初代培養神経細胞を用いた磁気刺激誘発応答の評価実験

製作した磁気刺激コイルによる刺激誘発応答の有無を検証するために、培養神経細胞を用いた磁気刺激応答評価実験を実施した。単一神経細胞の細胞内カルシウム濃度変化を指標とした

評価実験においては、実験動物（Wistar ラット，日本チャールスリバー）の大脳皮質より採取したラット初代培養神経細胞を用いて、磁気刺激直後の刺激誘発応答をカルシウムイメージング法により評価した。刺激誘発応答の計測では、上記で開発した非導電性ファイバー型蛍光観察システムを使用し、強磁界ばく露環境下において神経細胞の細胞体および神経線維の興奮のリアルタイム検出を試みた。

#### (4) ラット個体を用いた生体内磁気刺激誘発応答の評価実験

##### ① 末梢神経領域における運動誘発電位（MEP）を指標とした評価

(2) の方法で準備した磁気刺激コイルと動物固定器具を用いて、ラット脊髄への磁気刺激により末梢神経領域に伝搬する運動誘発電位（Motor Evoked Potential; MEP）を評価した。MEP は、ラットの後肢・坐骨神経線維近傍に刺入した針状電極により検出した。ラット脊髄への磁気刺激は、動物磁気刺激用 8 の字コイルをコンピュータにより頭部近傍、胸部、腰部、尾部へ配置し、各部での MEP の波形を取得した。また、坐骨神経細胞の細胞体が存在する腰椎部を刺激した際の MEP については、磁界ばく露強度との関係を調べた。

##### ② 脳・中枢神経領域における体性感覚誘発電位（SEP）を指標とした評価

(1) および (2) の方法で準備した計測方法と磁気刺激法を用いて、ラット脊髄への磁気刺激により脳・中枢神経領域に伝搬する体性感覚誘発電位（Somatosensory Evoked Potential; SEP）を評価した。SEP は、(1) の方法により、ラットの S1 領域に配置した光ファイバーまたはシリコンプローブ電極により検出した。また、脳・中枢神経領域で検出される神経活動は、麻酔／覚醒の各状態で異なることが知られているため、本実験では麻酔下と覚醒下の各条件での磁気刺激に対する SEP を検出し、磁界ばく露強度との関係を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 実験動物の脳深部神経活動検出のための計測用プローブの開発と計測手法の選定

微小なレンズと極細径の光ファイバーバンドル、および非導電性の固定材料を組み合わせ、実験動物の脳深部に低侵襲で配置できる極細径非導電性ファイバープローブを製作した。培養神経細胞を用いた光学計測実験により、製作したファイバープローブが神経細胞の形態を蛍光観察できる程度の高い空間分解能を有していることを確認した。さらに、強磁界中での使用において電磁ノイズ、発熱、振動の影響を受けずに培養神経細胞の細胞内カルシウム濃度変化をリアルタイム検出できることを確認した。しかし、ラットを用いた光学計測実験では、製作したファイバープローブを脳深部に刺入する際に、周辺の神経組織を傷つけてしまい、磁気刺激に伴う SEP をリアルタイムで検出することができなかった。この結果は、よりファイバー径の細いシングルファイバーを用いた実験でも同様であった。

一方、シリコンプローブ電極を用いた脳深部神経活動の電気計測実験では、1 週間程度で自発的な電気信号の検出ができた。また、磁界ばく露に伴うアーチファクトの時間幅が刺激誘発応答の発生時間に対して十分に短く、データに影響を及ぼさないことを確認した。

### (2) 実験動物を対象とした磁気刺激応答評価システムの開発

図 1 に開発した磁気刺激応答評価システムの概略図と外観を示す。本研究では、ラットの生体（脊髄）の局所領域を磁気刺激するための動物磁気刺激用 8 の字型コイルを製作し、脊髄への磁気刺激により脳・中枢神経領域で生じる SEP と末梢神経領域で生じる MEP を同時に検出できる実験システムを構築した。製作した動物磁気刺激用 8 の字コイルは、図 2 に示すように成獣ラットの胴体に収まる程度のコンパクトなサイズとした。

磁気刺激応答評価システムによる磁界ばく露環境を評価した結果、製作した磁気刺激用コイルは、後肢に配置した針状電極および頭部に配置したシリコンプローブ電極と物理的に干渉せず、また磁界ばく露時に混入するアーチファクトに関しては、刺激誘発応答の検出に影響を及ぼさない程度の S/N 比および時間幅となることを確認した。また、コイル入力電圧－磁束密度の測定結果より、本磁気刺激コイルを用いることで末梢お

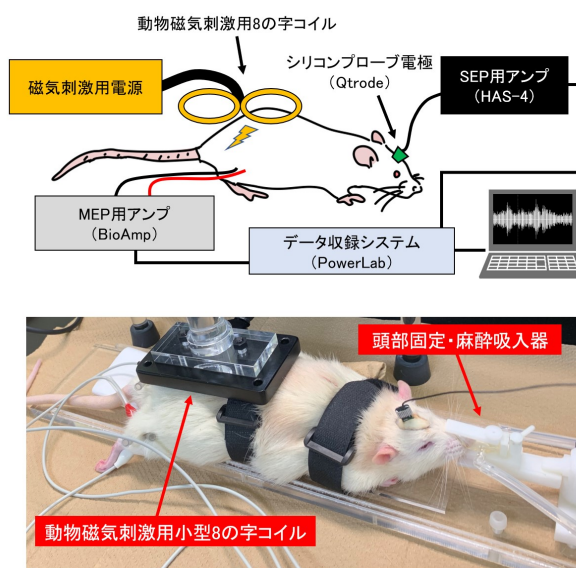


図 1 実験動物（ラット）を対象とした磁気刺激応答評価システムの外観

よび中枢神経系の各神経線維の直接興奮に必要な高強度の磁界を発生できることを確認した。

### (3) 培養神経細胞を用いた磁気刺激誘発応答の評価

本研究では、製作した動物磁気刺激用小型8の字コイルの性能評価を目的として、培養神経細胞を用いた磁気刺激誘発応答の評価実験を実施した。ラットの脳皮質より採取した神経細胞を用いて、単一神経細胞における刺激誘発応答および培養神経回路網の同期的活動を指標とした神経活動調節への影響を調べた結果、いずれの実験においても磁気刺激に対する刺激誘発応答を確認することができた。単一神経細胞の評価においては、細胞内カルシウムイメージングにより、直径  $5\mu\text{m}$  程度の無髄神経線維での刺激誘発応答を検出できたことから、製作した磁気刺激コイルは神経線維を興奮できる性能を有していることを確認した。

また培養神経回路網の同期的活動を指標とした評価実験においては、同期バーストが顕著に観察される培養神経回路網を用いて、磁気刺激を印加に伴う同期バースト間隔の比較を行った結果、磁気刺激後に高強度の磁気刺激においては同期バースト間隔が短くなることがわかった。

以上の結果より、製作した磁気刺激コイルを用いることで培養神経細胞の神経線維の電氣的活動や培養神経回路網の同期的活動を磁氣的に変調できることを確認した。

### (4) ラット脊髄を対象とした生体内磁気刺激誘発応答の評価

ラット脊髄・腰椎部への磁気刺激後に坐骨神経近傍にて検出された MEP の例を図 2 (A) に示す。末梢神経領域より検出される MEP は、繰り返しの刺激に対して再現よく観察され、56 mT 以上の磁界強度においては刺激後約 250  $\mu\text{sec}$  において顕著な MEP の発生を確認できた。一方、実験で用いた雌雄各 4 匹のラットすべてについて、図 2 (B) に示すようにある一定の磁界ばく露強度では MEP が消失した。また、脊髄以外にも頭部と尾部を刺激した結果、それぞれ顔面または尻尾での局所的な筋収縮がみられたものの、後肢における MEP は検出されなかった。

次に、ラット脊髄・腰椎部への磁気刺激後に S1 領域より検出された SEP の例を図 2 (C) に示す。磁気刺激後に誘発される SEP は麻酔時と覚醒時で異なり、図 2 (D) に示すように、同閾値は MEP よりも低い値であった。また、覚醒下のラット頭部近傍にコイルを配置し、磁気刺激が生じない位置において磁界ばく露時のコイル音による SEP の発生を調べた結果、コイル音のみでは SEP が生じないことがわかった。

以上の各実験結果より、本研究で使用した動物磁気刺激用 8 の字コイルは、ラットの脊髄を局所的に磁気刺激し、MEP および SEP を誘発できる磁気刺激性能を有していた。なお、本実験ではラットの末梢神経領域において MEP を誘発するために 40 mT 以上の磁界強度が必要であったが、SEP は MEP の発生閾値よりも最大で 10 倍程度低い磁界ばく露強度においても誘発された。このことから、脊髄への磁気刺激により生じる生体内刺激誘発応答は、末梢神経線維の興奮が伴わない場合においても脳・中枢神経回路網を介して脳深部に刺激効果を伝搬することが明らかとなった。

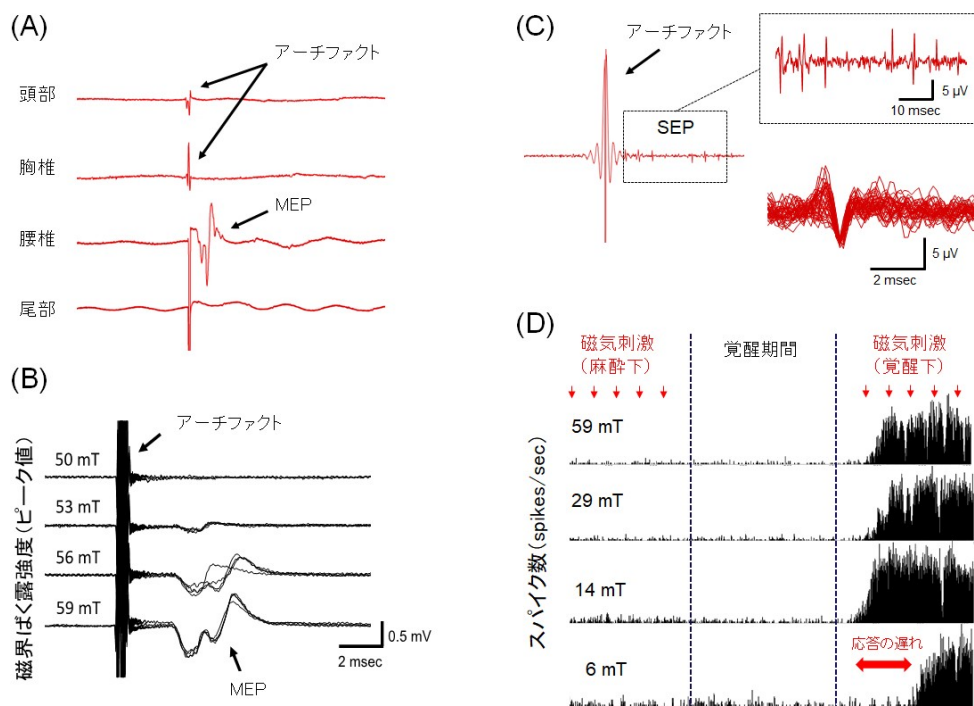


図 2 ラット脊髄磁気刺激に対する末梢/脳・中枢神経系における刺激誘発応答の評価

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計4件）

- ① [Saito A.](#), Terai T., Makino K., Takahashi M., Yoshie S., Ikehata M., Jimbo Y., Wada K., Suzuki Y., Nakasono S., Real-time detection of stimulus response in cultured neurons by high-intensity intermediate-frequency magnetic field exposure, *Integrative Biology*, Vol.10, No.8, pp.442-449, 2018.  
DOI: 10.1039/C8IB00097B
- ② [Saito A.](#), Takahashi M., Makino K., Suzuki Y., Jimbo Y., Nakasono S., Response of cultured neuronal network activity after high-intensity power frequency magnetic field exposure, *Frontiers in Physiology*, Vol.9, pp.1-12, 2018.  
DOI: 10.3389/fphys.2018.00189
- ③ [Saito A.](#), Takahashi M., Jimbo Y., Nakasono S., Non-conductive and miniature fiber-optic imaging system for real-time detection of neuronal activity in time-varying electromagnetic fields, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol.87, pp.786-793, 2017.  
DOI: 10.1016/j.bios.2016.09.024
- ④ Takahashi M., [Saito A.](#), Jimbo Y., Nakasono S., Evaluation of the effects of power-frequency magnetic fields on the electrical activity of cardiomyocytes differentiated from human induced pluripotent stem cells, *The Journal of Toxicological Sciences*, Vol.42, No.2, pp.223-231, 2017.  
DOI: 10.2131/jts.42.223

〔学会発表〕（計11件）

- ① 齋藤淳史, 中園聡, 和田圭二, 鈴木敬久, ラット脊髄への中間周波磁界ばく露による生体内刺激誘発応答の評価, 平成31年電気学会全国大会, 北海道科学大学, 2019.
- ② 齋藤淳史, 高橋正行, 中園聡, 牧野佳, 鈴木敬久, 和田圭二, 吉江幸子, 池畑政輝, 神保泰彦, 中間周波磁界に対する神経刺激応答のリアルタイム検出, 第11回医用生体電磁気学シンポジウム, 首都大学東京, 2019.
- ③ 齋藤淳史, 刺激作用の評価に関する研究, 平成30年度電力中央研究所電磁界情報交換会, 大阪科学技術センター/電力中央研究所我孫子地区, 2018.
- ④ 齋藤淳史, 寺井達哉, 牧野佳, 高橋正行, 吉江幸子, 池畑政輝, 神保泰彦, 和田圭二, 鈴木敬久, 中園聡, 中間周波磁界に対する神経刺激応答評価手法の開発, 計測自動制御学会ライフエンジニアリング部門シンポジウム2018, 会津大学, 2018.
- ⑤ 池畑政輝, 牧野佳, 鈴木敬久, 齋藤淳史, 中園聡, 吉江幸子, 和田圭二, 培養神経細胞による低周波磁界/電界の神経刺激作用の評価, 第91回日本産業衛生学会, 熊本市国際交流会館, 2018.
- ⑥ 齋藤淳史, 高橋正行, 中園聡, 牧野佳, 鈴木敬久, 神保泰彦, 商用周波磁界に対する培養神経回路網の応答, 平成30年電気学会全国大会, 九州大学, 2018.
- ⑦ 中園聡, 齋藤淳史, 商用周波磁界の神経刺激作用に関する研究動向, 電気学会電磁環境研究会, 東北学院サテライトステーション, 2018.
- ⑧ [Saito A.](#), Takahashi M., Jimbo Y., Nakasono S., Response of synchronized activity in cultured neuronal network after high-intensity power frequency magnetic field exposure, 39th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology, International Convention Center, Jeju Island, Korea, 2017.
- ⑨ 齋藤淳史, 高橋正行, 中園聡, 鈴木敬久, 和田圭二, 池畑政輝, 吉江幸子, 神保泰彦, 非導電性ファイバー型蛍光観察装置を用いた神経磁気刺激応答のリアルタイム検出, 平成29年電気学会全国大会, 富山大学, 2017.
- ⑩ Wada K., Hayashi S., Suzuki Y., Ikehata M., Yoshie S., [Saito A.](#), Nakasono S., Design and implementation of multi-frequency magnetic field generator producing sinusoidal current waveform for biological researches, 18th European Conference on Power Electronics and Applications, Karlsruhe Town Hall, Karlsruhe, Germany, 2016.
- ⑪ [Saito A.](#), Takahashi M., Jimbo Y., Nakasono S., Development of a non-conductive fibre-optic imaging system for real-time detection of neuronal activity in electromagnetic fields, 10th FENS Forum of Neuroscience, Bella Center, Copenhagen, Denmark, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

<https://criepi.denken.or.jp/jp/env/profile/saito.html>

※ 科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。