

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：82641

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20689

研究課題名（和文）脳深部イメージングに基づくマイクロ磁気刺激応答評価手法の開発

研究課題名（英文）Development of evaluation method for micromagnetic stimulation based on deep brain imaging

研究代表者

齋藤 淳史（Saito, Atsushi）

一般財団法人電力中央研究所・サステナブルシステム研究本部・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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脳深部の微小な領域を磁気的に刺激できるマイクロ磁気刺激法と呼ばれる新しい医療技術の確立を目指し、刺激領域の更なる局所化を可能とするマイクロ8の字コイルを設計・製作し、細胞実験、動物実験による刺激性能の評価を実施した。各実験の結果より、新たに製作したマイクロ8の字コイルの有効性を確認することができ、マイクロ磁気刺激法の性能向上に資する科学的知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マイクロ磁気刺激法による刺激領域の更なる局所化を実現するため、未だ十分な検討がなされていない8の字型の形状を有するマイクロ8の字コイルを製作し、その有効性を示したことに学術的意義がある。また、今後もマイクロ磁気刺激法の有効性や安全性に関する科学的な根拠を蓄積していくことで、反復経頭蓋磁気刺激（rTMS）法や脳深部刺激（DBS）法の課題を克服できる新しい脳・神経刺激技術への発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, I designed and fabricated a micro figure-of-eight coil that enables further localization of the stimulation area with the aim of establishing a micro magnetic stimulation method that can magnetically stimulate a small area of the deep brain region. In addition, the stimulation performance was evaluated by cellular and animal experiments. The results of each experiment confirmed the effectiveness of the newly fabricated micro figure-of-eight coil and provided scientific knowledge that contributes to improving the performance of micro magnetic stimulation technology.

研究分野：生体電磁気学

キーワード：マイクロ磁気刺激 脳・神経 細胞・組織 8の字コイル リアルタイムイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

反復経頭蓋磁気刺激 (repetitive Transcranial Magnetic Stimulation, rTMS) 法は、頭部近傍に配置したコイルからパルス磁界を脳に連続的に印加し、誘導電流により神経活動を非侵襲的に調節する技術である。近年、うつ病などの治療においては薬剤療法のみでは回復が期待できない重篤な患者を対象にその有効性が確認されている。しかしながら、rTMS 法では大脳皮質のような脳の表層組織を効果的に刺激できるものの、脳深部領域の刺激は困難となり、刺激領域も電極を用いた刺激方法と比較して広範となってしまう課題がある。そのため、パーキンソン病などの脳深部領域における神経細胞死が原因となるような神経変性疾患に対しては脳深部電気刺激 (Deep Brain Stimulation, DBS) 法が一般的に用いられるが、一方で電極を利用した刺激方法については強い電磁環境下での発熱・振動の発生、電極表面へのグリア細胞の浸潤に起因する刺激性能の低下などが課題となっている。このため、rTMS 法、DBS 法の課題をクリアし、脳深部へのアプローチが実現できる新しい脳・神経刺激法の開発が望まれる。

近年、国内外の様々なグループにより、脳深部への配置を想定したサブミリオーダーの微小なコイル (マイクロコイル) を用いたマイクロ磁気刺激 (Micromagnetic stimulation,  $\mu$ MS) 法という新しい刺激方法が考案されている。 $\mu$ MS 法では、rTMS 法と同様に磁界が誘導する電流で神経刺激を行っているが、その空間分解能は、DBS 法にも匹敵する 100 マイクロメートル (0.1 mm 程度) 程度にまで達する。したがって、 $\mu$ MS 法による脳深部刺激が実用化すれば、上記で rTMS 法 / DBS 法における課題の多くを解決できる可能性がある。

一方、 $\mu$ MS 法で用いられるマイクロコイルの形状や配線パターンについては未だ様々な検討が行われている段階にある。特に、rTMS 法において局所的な磁気刺激で用いられる 8 の字型のコイルの適用可能性については未だ十分な検討がなされていない。したがって、脳深部への配置が可能な 8 の字型の形状を有するマイクロコイルを開発することができれば、マイクロ磁気刺激法における刺激空間分布の更なる高度化が期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳深部にも配置可能な 8 の字型の形状を有するマイクロコイル (マイクロ 8 の字コイル) を製作し、培養神経組織や実験動物を用いた刺激性能の評価実験を実施することで、マイクロ 8 の字コイルを用いたマイクロ磁気刺激法の有効性を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) マイクロ 8 の字コイルの製作と性能評価

マイクロ 8 の字コイルを作製するため、本研究では 3 軸マイクロメーターステージを用いて、図 1A に示すような 2 つの平面型のチップインダクタを 8 の字型に結合した。その後、チップインダクタの両端を挟む形で 2 つの電極を結合し、コイルへの通電を試みた。チップインダクタと電極の結合には UV 照射装置と UV 硬化型の非導電性接着剤を使用し、図 1B に示すようにマイクロ 8 の字コイルと電極部全体を同接着剤でコーティングした。上記の方法により、大きな電流を通電させた場合でもコイルや電極から培地内に漏洩する電流を防いだ。

次に、製作したマイクロ 8 の字コイルによるマイクロ磁気刺激の性能評価を行うため、本研究ではコイル近傍の磁束密度分布を評価した。コイルへの通電にはファンクションジェネレータと高速バイポーラ電源を使用し、マイクロ 8 の字コイルの両端に 85 kHz 正弦波、200~2000 Vpp の電圧を印加した。マイクロ 8 の字コイル近傍の磁束密度分布は、ガウスメータと極細径磁界測定プローブを用いて測定した。具体的には、コイルへの通電中にコイル表面近傍でプローブを走査し、各測定点での磁束密度のピーク値を検出した。また、マイクロ磁気刺激実験を行う際にはコイルを培養神経組織や脳表に接触させる必要があるため、マイクロ 8 の字コイル表面の温度上昇についての評価も行った。温度測定には、光ファイバー温度計を使用し、マイクロ磁気刺激中におけるコイル表面温度の変化を調べた。

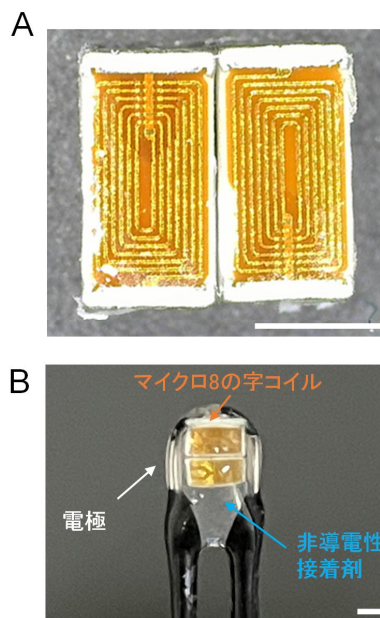


図 1 マイクロ 8 の字コイルの外観  
(A) チップインダクタの結合、  
(B) UV 硬化樹脂を用いたマイクロ 8 の字コイルと電極の結合

## (2) 培養神経組織を用いたマイクロ磁気刺激実験

マイクロ磁気刺激実験で用いる培養神経組織として、ヒト人工多能性幹( induced Pluripotent Stem, iPS) 細胞由来の神経前駆細胞から分化誘導により作製されたヒト培養神経回路網を使用した。分化誘導には専用培地(Repro Neuro MQ medium)を使用し、分化誘導後の長期培養には、2%の B-27 および 1%の GlutaMAX, 1%の penicillin-streptomycin を含む Neurobasal 培地を使用した。また、低密着性基質を有する 96 ウェルマルチプレートを用いて 3 次元状の組織構造を有する培養神経組織(ヒト神経スフェロイド)を作製した。マイクロ磁気刺激による刺激応答の評価にはカルシウム蛍光指示薬(Fluo-8 AM)を使用した。同指示薬を用いて検出される細胞内カルシウム( $[Ca^{2+}]_i$ )濃度の変化は、蛍光顕微鏡と冷却 CCD カメラを組み合わせた蛍光イメージングシステムを用いて計測した。培養神経組織へのマイクロ磁気刺激の際には、マイクロマニピュレータを使用し、蛍光顕微鏡観察下での位置合わせによりコイルの配置位置を決定した。

## (3) 実験動物を用いたマイクロ磁気刺激実験

マイクロ磁気刺激実験で用いる実験動物として、成獣の Wister ラットを使用した。実験では雌雄の各個体について体重が 400 g の時点で大脳皮質 1 次視覚野の深部領域に幅 83  $\mu$ m のシリコンプローブ電極(Qtrode)を配置する手術を行った。マイクロ磁気刺激実験は、急性実験により実施した。脳深部に配置したシリコンプローブ電極より出される電気信号は、4ch ヘッドアンプシステム(HAS-4)により 500 倍まで増幅した後、データ収集システム(PowerLab 2/26)を介して PC に記録した。記録されたデータは専用ソフトウェア(LabChart Pro)を用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 局所刺激性能を有するマイクロ 8 の字コイルの製作と性能評価

マイクロ 8 の字コイルの中心からの距離と磁束密度の関係性を調べるため、コイルの交点から長手方向 5mm まで 1mm の間隔で磁界測定プローブを配置し、磁束密度の分布を評価した。入力電圧の値は、200~2000 Vpp の範囲に設定した。図 2 に示す結果より、入力電圧の値に応じて磁束密度が増加し、プローブとコイルの間の距離の増加に応じて磁束密度は減少することがわかった。コイルの中心からの距離が 1mm を超えると磁束密度は著しく減少した。また、コイル中心から 1000 Vpp の電圧印加条件では 1mm 以下の距離で 8 mT 程度の磁界を概ね均一に印加できていた。これらの結果より、作製したマイクロ 8 の字コイルを用いて 1 mm 以下の空間分解能でマイクロ磁気実験を行うことができることを確認することができた。

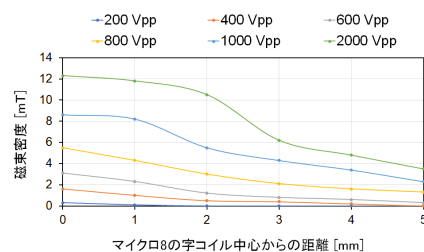


図 2 マイクロ 8 の字コイルにおけるコイル入力電圧と磁束密度の関係

一方、マイクロ 8 の字コイルを用いたマイクロ磁気刺激実験においてコイル両端に 1000 Vpp 程度の大きな電圧を印加した場合、電極部やコイル部の金属材料の発熱の影響が懸念された。そこで、本実験では光ファイバー温度計をマイクロ 8 の字コイルの表面に接触させ、マイクロ磁気刺激中の表面温度の変化をリアルタイムで評価した。ここでは、本実験での最大曝露条件を想定し、1000 Vpp の電圧を 5 分間連続で印加した際の温度上昇を評価した。その結果、刺激前後のコイル表面の温度変化は  $\pm 0.5$  の範囲に収まっており、ヒト培養神経回路網に影響を与える程度のコイル表面温度の上昇がみられないことを確認した。同結果より、非導電性接着剤のコーティングによりマイクロ 8 の字コイルの発熱を抑制できていたことがわかった。

以上の結果より、サブミリオーダーの空間分解能での磁界ばく露が可能であり、かつ熱的な影響を伴わないマイクロ 8 の字コイルを製作することができた。

### (2) 培養神経組織を用いたマイクロ磁気刺激応答の評価

本実験条件では、コイル表面温度の上昇がみられなかったため、マイクロ 8 の字コイルを培養溶液中の培養神経組織近傍に配置し、刺激応答の評価を実施した。製作したマイクロ 8 の字コイルの配線パターンは蛍光顕微鏡観察下でも視認できることから、マイクロマニピュレータを用いた微動操作により、図 3 に示すように 8 の字型コイルの交点と培養神経組織の中心部を合わせ、その後培養神経組織を傷つけないように慎重に接触させた。マイクロ磁気刺激実験時には、焦点を培養神経組織の表面に合わせ、刺激応答を  $[Ca^{2+}]_i$  の変化を指標として評価した。

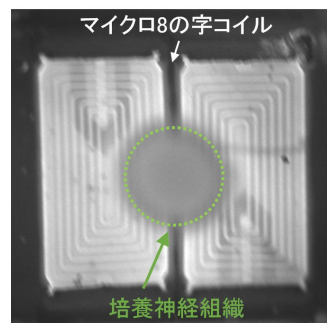


図 3 蛍光顕微鏡観察下でのマイクロ 8 の字コイルと培養神経組織

図 4 に、マイクロ磁気刺激実験による培養神経組織の  $[Ca^{2+}]_i$  の変化の一例を示す。図中の赤色部分では入力電圧 1000 Vpp で 85 kHz 正弦波のマイクロ磁気刺激を 3 分間連続で印加している。図 4A に示す結果よ

り、自発的な $[Ca^{2+}]_i$ の波形がマイクロ磁気刺激中に変化していることがわかった。また、他の異なるサンプルについても同様のマイクロ磁気刺激実験を実施し、刺激前～刺激後における1分間当たりの $[Ca^{2+}]_i$ の発生回数を比較した。各刺激フェーズでのデータを解析したところ、図4Bに示すように刺激中および刺激後に観察された $[Ca^{2+}]_i$ の発生回数は刺激前と比較して有意に減少することがわかった( $n=12$ ,  $\pm$ SD,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.001$ )。

以上の結果より、本研究で製作したマイクロ8の字コイルを用いた場合でもマイクロ磁気刺激応答を発生でき、この刺激誘発応答により神経活動を抑制できることが示された。

### (3) 実験動物を用いたマイクロ磁気刺激応答の評価

培養神経組織を用いた実験において、マイクロ磁気刺激により神経活動が抑制できる可能性が示唆された。そこで次に、*in vivo* 実験により実験動物(ラット)の脳深部領域でのマイクロ磁気刺激応答の評価を実施した。本実験では、図5Aに示すように麻酔下においてラットの大脳皮質内の1次視覚野の深部領域に神経活動を計測するためのシリコンプローブ電極を配置した。その後、マイクロマニピュレータを用いて1次視覚野または網膜の近傍にマイクロ8の字コイルを配置し、マイクロ磁気刺激前～刺激後にシリコンプローブ電極より検出される神経活動の変化を調べた。

図5Bに、マイクロ8の字コイルを1次視覚野の脳表面に配置し、マイクロ磁気刺激による神経活動の変化を評価した結果の一例を示す。シリコンプローブ電極の先端には、GNDを含む4個の多点電極が配置されており、電極1～3に示す波形は、1次視覚野内の近傍から検出される神経活動を示している。同結果より、マイクロ磁気刺激を適用する前には、各電極間で同期した神経活動(同期発火)がみられていたが、マイクロ磁気刺激中はこれらの同期発火が消失し、また刺激後には神経活動の回復(リバウンド)が生じていることを確認することができた。

一方、マイクロ8の字コイルの配置位置を網膜近傍に変更し、同様にマイクロ磁気刺激を行った結果、脳表面へのマイクロ磁気刺激でみられたような同期発火のパターンの明確な変化は確認することができなかった。この理由としては、網膜-視覚野間での神経線維の投射を含む神経回路網の構造の影響が考えられ、本実験で配置したシリコンプローブ電極の位置において網膜を介した刺激誘発応答を十分に検出できていなかった可能性が考えられた。また、その他の可能性としては網膜における刺激閾値の周波数依存性の問題が考えられ、本実験で使用した85 kHz、8 mTの磁気刺激条件では網膜における刺激閾値を超過できていないことが想定された。

以上の結果より、マイクロ8の字コイルを用いたマイクロ磁気刺激によりラットの脳深部領域でのマイクロ磁気刺激応答を検出することができた。一方、今後の課題としては、脳深部での神経回路網の構造や、刺激部位の周波数依存性を考慮した評価手法の確立が必要になると考えられた。

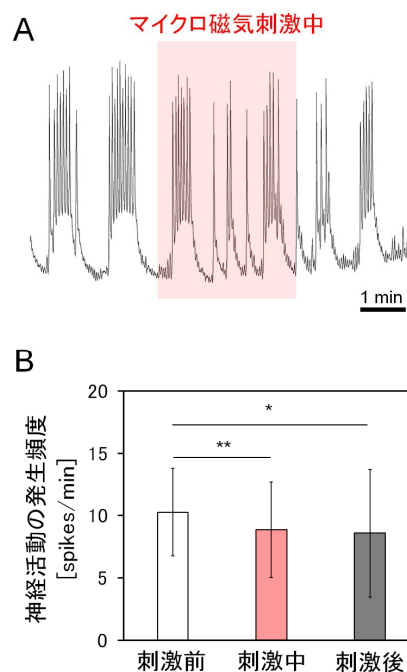


図4 培養神経組織におけるマイクロ磁気刺激応答の評価結果

マイクロ磁気刺激による神経活動の (A) 抑制と (B) 発生頻度の低下

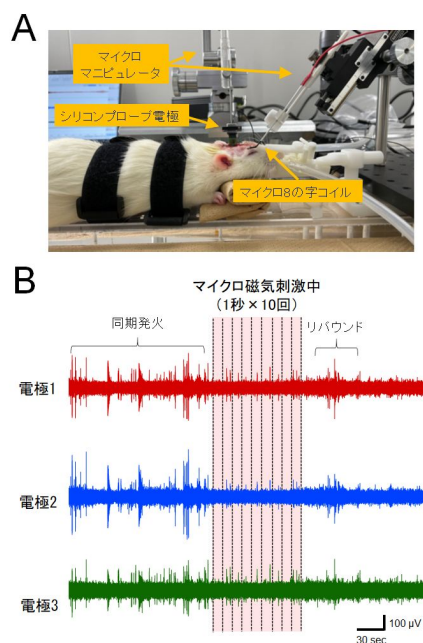


図5 実験動物(ラット)の脳深部領域でのマイクロ磁気刺激応答の評価結果

(A) ラットへのマイクロ磁気刺激と脳深部での刺激誘発応答の評価方法、(B) マイクロ磁気刺激による同期発火の抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Atsushi Saito	4. 巻 3
2. 論文標題 Fabrication of a miniature figure-of-eight coil for micromagnetic stimulation on neuronal tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 URSI Radio Science Letters	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.46620/21-0008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Atsushi Saito, Keiji Wada, Yukihisa Suzuki, Satoshi Nakasono	4. 巻 1747
2. 論文標題 The response of the neuronal activity in the somatosensory cortex after high-intensity intermediate-frequency magnetic field exposure to the spinal cord in rats under anesthesia and waking states	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147063 ~ 147063
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2020.147063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Atsushi Saito, Keiji Wada, Yukihisa Suzuki, Satoshi Nakasono
2. 発表標題 Detection of somatosensory evoked responses in rat induced by high-intensity intermediate frequency magnetic field exposure
3. 学会等名 BioEM2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Saito, Tatsuya Terai, Kei Makino, Masayuki Takahashi, Sachiko Yoshie, Masateru Ikehata, Yasuhiko Jimbo, Keiji Wada, Yukihisa Suzuki, Satoshi Nakasono
2. 発表標題 Real-time detection of IF-MF exposure-induced neuronal response using non-conductive fiber-optic imaging system
3. 学会等名 BioEM2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤淳史, 高橋正行, 中園 聡, 牧野 佳, 鈴木敬久, 神保泰彦
2. 発表標題 培養神経回路網を用いた商用周波強磁界に対する刺激応答の評価
3. 学会等名 2019年 電気学会 電子・情報・システム部門大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------