

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 高頻度経頭蓋的磁気刺激によるラット脳損傷の効果に関する研究

指導教官 上野照剛教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

生体物理医学専攻

船水 博文

### 1. はじめに

本論文は脳損傷モデルラットを用いて、高頻度経頭蓋的磁気刺激が損傷を受けた神経細胞とグリア細胞に対してどのような作用を及ぼすかについて組織化学的な手法で研究を行ったもので、5 章より成る。第 1 章では、経頭蓋的磁気刺激の発展と歴史から、動物実験の重要性について述べた。第 2 章では、経頭蓋的磁気刺激の効果について神経毒である MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)を用いて脳損傷モデルラットを作製し、刺激周波数が 25Hz の高頻度経頭蓋的磁気刺激を暴露することで得られる効果について黒質および海馬領域において得られる神経細胞の変化について解析した。その結果、脳損傷ラットにおいて磁気刺激は損傷を受けた神経細胞を回復させるもしくは損傷の影響を軽減する効果があるということを組織化学的に明らかにした。第 3 章では、あらかじめ磁気刺激を施した後に MPTP を投与して脳損傷に対する磁気刺激の前処理的效果を検討した。ここでは 2 章での結果を踏まえて、磁気刺激による損傷を受けた神経細胞に対しての効果は細胞修復なのか保護効果なのかをより明確にするために検討した。その結果、高頻度経頭蓋的磁気刺激による脳損傷に対する効果は神経細胞の保護効果と神経細胞の回復効果の両方の効果をもつことを明らかにした。第 4 章は考察で、第 2 章、および第 3 章での結果について総合的に論じた。第 5 章では本論文をまとめ結論とした。

第 1 章では高頻度経頭蓋的磁気刺激の歴史を述べ、高頻度経頭蓋的磁気刺激が基礎の研究のみならず、治療へも応用可能であり、鬱病やパーキンソン病など神経系の疾患の治療への応用が期待されているにもかかわらず、その基礎になる脳損傷モデルに対する磁気刺激研究が十分に行われていないことを指摘した。

第 2 章では高頻度経頭蓋的磁気刺激がラット脳損傷に及ぼす効果の検討（本章での実験を実験 1 とする）を行った。

#### 2. 1. 目的

ラット脳の海馬においては高頻度経頭蓋的磁気刺激により c-fos, GFAP, BDNF などの mRNA やタンパク質を発現すると言われている。本研究では、神経毒であり Parkinsonism をひきおこすと言われている

MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)を用いて脳損傷モデルラットを作製し、刺激周波数が 25Hz の高頻度経頭蓋的磁気刺激を暴露することで得られる効果について黒質および海馬領域での神経細胞とグリア細胞の形態的变化を組織化学的手法により解析することを目的とした。

## 2. 2. 方法

MPTP をラット腹水に 2 時間間隔で一日に 4 回注射し、最後の注射から 4 8 時間後にラット頭部から 11mm の高さに円形コイルを固定し 25Hz, 1.13T, (コイルの中心の刺激強度)  $238 \mu\text{sec}, 8\text{sec} \times 10\text{trains} = \text{total } 2000 \text{ pluses}$  の高頻度経頭蓋的磁気刺激を施行した。その後 72 時間後に還流固定により脳を取り出し、ニッスル、クリューバーバレラ、HE の組織染色および GFAP, BDNF, NeuN の免疫染色を行い黒質ドーパミンニューロンや海馬 CA1, CA3, CA3c の領域について組織学的な検討をした。

## 2. 3. 結果

黒質ドーパミンニューロンにおいてニッスル染色と抗 NeuN 抗体により損傷を受けた細胞について割合を比較検討した結果、磁気刺激群のほうが約 17% 損傷を受けた細胞の割合が少ないという結果が得られた。rTMS 群と sham 群において有意な差が認められた。また、抗 GFAP 抗体の免疫染色では rTMS 群で陽性部位がやや多かったが、アストロサイトの強い活性化は見られなかった。抗 BDNF 抗体による免疫染色では sham 群と rTMS 群で顕著な違いはみられなかった。また、海馬の神経細胞については黒質でみられた以上に明らかな違いがみられた。rTMS 群では CA3 領域で 48%、CA1 領域で 53% 損傷を受けた細胞の割合が少なかった。いずれも有意な差が認められた。また、抗 GFAP 抗体の免疫染色では rTMS 群が陽性部位が多くアストロサイトの活性化もみられた。抗 BDNF 抗体による免疫染色では sham 群の方が陽性が強く、染色部位に違いがみられた。このことから高頻度経頭蓋的磁気刺激によって脳損傷ラットにおいて神経細胞が修復もしくは保護される可能性が示唆された。

第 3 章では前処理的な高頻度経頭蓋的磁気刺激がラット脳損傷に及ぼす効果の検討 (本章での実験を実験 2 とする) を行った。

## 3. 1. 目的

あらかじめ高頻度経頭蓋的磁気刺激を施行しておいたラットに脳虚血を引き起こす操作を施行しても虚血が抑制されると言われている。また実験 1 において磁気刺激が損傷を受けた神経細胞に対して細胞修復もしくは保護の効果を示すことが示唆されたことから、前処理的な高頻度経頭蓋的磁気刺激がラット脳損傷におよぼす効果を検討し、高頻度経頭蓋的磁気刺激が脳損傷に及ぼす効果について明らかとすることを目的とした。

## 3. 2. 方法

ここでは 25Hz, 1.13T (コイルの中心の刺激強度)  $238 \mu\text{sec}, 8\text{sec} \times 2\text{trains} \times 3\text{days} = \text{total } 1200 \text{ pluses}$  高頻度経頭蓋的磁気刺激を施行しておきその後 48 時間後に神経毒である MPTP をラット腹水に 2 時間間隔で一日に 4 回注射し、最後の注射から 5 日および 11 日後に還流固定し脳を取り出し、ニッスル、クリューバーバレラ、の組織染色および GFAP, BDNF, NeuN の免疫染色を行い黒質、ドーパミンニューロンや海馬 CA1, CA3, CA3c などの領域について組織学的な検討をした。

ここで、11 日後に還流固定した実験を 2-A、5 日後に還流固定した実験を 2-B とした。

### 3. 3. 結果

黒質ドーパミンニューロンにおいてニッスル染色と抗 NeuN 抗体により損傷を受けた細胞について割合を比較検討した結果、実験 2-A で磁気刺激群のほうが約 23% 損傷を受けた細胞の割合が少ないという結果が得られた。sham 群と rTMS 群において有意な差が認められた。実験 2-B で磁気刺激群のほうが約 8% 損傷を受けた細胞の割合が少ないという結果が得られた。有意差は認められなかった。また、抗 GFAP 抗体の免疫染色および抗 BDNF 抗体による免疫染色では rTMS 群と sham 群で顕著な違いはみられなかった。また海馬の神経細胞については実験 2-A で磁気刺激群では CA3 領域で約 28% 損傷を受けた細胞の割合が少なかった。実験 2-B で磁気刺激群のほうが約 25% 損傷を受けた細胞の割合が少ないという結果が得られた。実験 2-A、2-B いずれも磁気刺激群と非磁気刺激群において有意な差が認められた。また、抗 GFAP 抗体の免疫染色では rTMS 群と sham 群で顕著な違いはみられなかった。抗 BDNF 抗体による免疫染色では sham 群の方が陽性が強い傾向にあった。このことから高頻度経頭蓋的磁気刺激によって脳損傷ラットにおいて神経細胞が保護される可能性が示唆された。また、実験 1 と実験 2 より高頻度経頭蓋的磁気刺激によってラット脳損傷において神経細胞が修復および保護される可能性が示唆された。

第 4 章は考察である。

本研究において MPTP による損傷がラットにおいても組織化学的手法により観察されることが明らかとなった。また、本研究において MPTP による損傷が海馬 CA3 でもみられることが明らかとなった。

これまで、磁気刺激によりラット海馬での発現が増強すると報告されていた、BDNF については本研究では増強は見られなかったが、本研究で損傷後に磁気刺激をすることで海馬 CA1, CA3 で神経細胞が回復する可能性が示唆された、これによりこれまで電気刺激療法が主流であった臨床の分野において、非侵襲的で痛みが少ない磁気刺激を用いることでより効果的で副作用が少ない精神神経疾患治療法を開発できる可能性が示唆された。また、本研究では BDNF 以外の神経栄養因子が磁気刺激により活性化された可能性が示唆された。

特に海馬 CA1、CA3 での GFAP の結果から磁気刺激によりアストロサイトを活性化する因子の発現が増強された可能性が考えられる。これらのことから、磁気刺激には損傷後の神経細胞に対して生存維持を制御するような効果があることが示唆された。これまで磁気刺激を用いた治療法の開発を目指す基礎研究では長期的な磁気刺激の効果に関するものがほとんどであったが、本研究で急性的な磁気刺激によっても損傷をうけた海馬や黒質の神経細胞に対して保護効果や修復効果が得られる可能性が示唆された。本研究により神経損傷疾患について磁気刺激を用いた新たな治療法を確立するのに役立つと考えられる。本章ではさらに詳しく磁気刺激の保護効果と回復効果について考察した。

第 5 章は結論である。

本研究では経頭蓋的磁気刺激の効果について神経毒である MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) を用いて脳損傷モデルラットを作製し損傷後の磁気刺激実験と予防的な前処理的磁気刺激実験の二つを 25Hz の高頻度経頭蓋的磁気刺激を用いて行い、磁気刺激の効果について黒質および海馬領域の神経細胞およびグリ

ア細胞の変化について解析した。その結果、ラットにおいて MPTP により海馬 CA3 で神経細胞変性がみられることを組織化学的手法により明らかにした。また、MPTP 脳損傷ラットでは、磁気刺激により損傷を受けた神経細胞を回復させる効果、損傷の影響を軽減する効果、および神経細胞保護効果を示すことを組織化学的手法により明らかにした。