

[別紙 1]

論文内容の要旨

論文題目 The effects of transcranial magnetic stimulation on the rat hippocampus
和訳 経頭蓋的磁気刺激のラット海馬に及ぼす影響に関する研究

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 12 年 4 月入学

医学博士課程

生体物理医学専攻

氏名 池田（荻上）真理

[はじめに]

経頭蓋的磁気刺激（Transcranial magnetic stimulation, TMS）は、非侵襲的で痛みを伴わない新しい脳神経疾患治療法として研究されている。最近では、高頻度磁気刺激（repetitive TMS, rTMS）による遺伝子発現の研究や各種神経系疾患・精神疾患の診断や治療を目的とした研究も進められている。しかしながら、磁気刺激の脳への作用メカニズムはいまだに解明されておらず、安全性についても十分に検討されていない。そこで本研究では、磁気刺激の有効性・安全性について検討するために、以下の 2 点について実験を行った。

- ① 海馬におけるシナプス伝達長期増強現象（Long-term potentiation, LTP）は、学習・記憶のメカニズムと深い関わりを持っている。そこで、様々な強度の磁気刺激が LTP に及ぼす影響を電気生理学的に検証した。また、シナプス伝達に深く関わっているとされているグリア細胞の一種アストロサイトの活性、および神経栄養因子の一種である脳由来神経栄養因子（BDNF）の発現の変化を、免疫組織染色法によって検証した。
- ② 海馬は虚血に対して脆弱であり、数分間の一過性脳虚血に対しても遅発性神経細胞死

を引き起こす。そこで本研究では、磁気刺激による脳虚血耐性獲得について検証し、脳虚血治療法としての磁気刺激の有効性について検討した。

①海馬における長期増強現象(LTP)に対する磁気刺激の影響

実験法

実験には、ウイスターラット(4週齢、オス)を使用した。4種類の刺激強度(0.50T, 0.75T, 1.00T, 1.25T)を用い、25pulses/sec、1000pulses/dayで7日間(計7000pulses)磁気刺激を施した。磁気刺激のMotor thresholdは約0.93 Tであった。Sham群は、磁気刺激以外の条件をすべて同じとした。最後の刺激から約15時間後にラットを断頭して海馬を取り出し、400 μm のスライスを作成した。スライスを常温で1時間以上回復させた後、刺激用の灌流チャンバーに移し、CA1領域のシャプファー側枝に刺激電極を挿し、錐体細胞樹状突起に記録電極を挿した。20秒おきに刺激を入力し、細胞外シナプス後電位(fEPSP)を得た。fEPSPが20分以上安定したところでテタヌス刺激(100 Hz, 1秒間)を入力し、LTPを誘導した。テタヌス刺激後は60分間計測し、安定したfEPSPの増強が見られた場合にLTPとみなした。

組織染色に関しては、最後の刺激から約15時間後に、ラットを10%ホルマリンにて灌流固定し、全脳を取り出してパラフィン包埋した。海馬の横断面を含む位置で10 μm 厚のスライスを作成した。神経細胞の形態的变化を検証するためにニッスル染色を行い、さらにアストロサイトの主要骨格タンパクであるGFAP(glial fibrillary acidic protein)とBDNFの免疫組織染色を行った。

結果および考察

磁気刺激強度が0.50Tおよび1.00Tの場合は、LTPに変化は生じなかった。一方、0.75Tでは磁気刺激群のLTPがSham群に比べて有意に増強した(図1左)。つまり、0.75Tの磁気刺激では海馬の機能を活性化する作用があると考えられる。逆に1.25Tの磁気刺激では、磁気刺激群のLTPはSham群に比べて有意に抑制された(図1右)。1.25Tの磁気刺激は、Motor thresholdを超える強い刺激であるため、ストレスによって海馬の機能が低下したと考えられる。以上のことから、磁気刺激がラット海馬におけるLTPに及ぼす影響は、刺激強度に依存していると考えられる。

また、神経細胞の形態、アストロサイトの活性、および BDNF の発現に関しては、いずれの磁気刺激強度においても変化が見られなかった。したがって、磁気刺激による LTP の変化は、アストロサイトと BDNF 以外の別のメカニズムによって引き起こされていると考えられる。

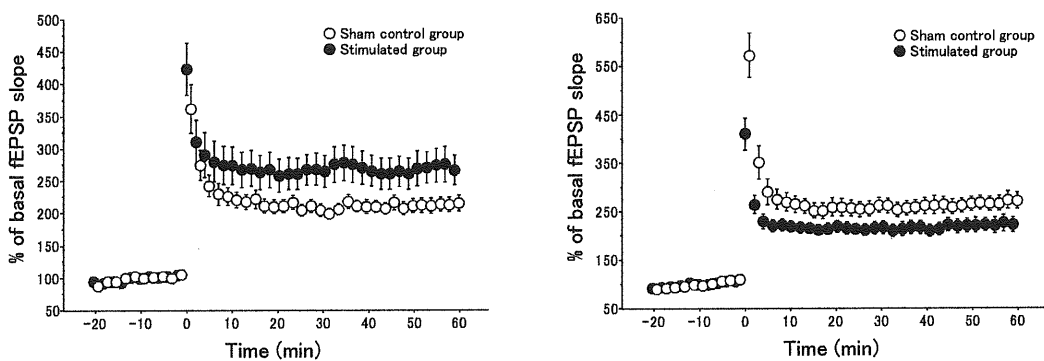


図 1. (左) 0.75T 磁気刺激における LTP。(右) 1.25T 磁気刺激における LTP。●：磁気刺激群、○：sham 群。0.75T の磁気刺激では、LTP が有意に増強されたが、1.25T の磁気刺激では有意に抑制された。

②磁気刺激による脳虚血耐性の獲得

実験法

①の実験結果より、0.75T の磁気刺激が海馬の機能活性に有効であると結論した。そこで脳虚血耐性の獲得に関する実験においては、0.75T の刺激強度を用いた。実験には、ウイスターラット (4 週齢、オス) を使用した。25pulses/sec、1000pulses/day で 7 日間 (計 7000pulses) 磁気刺激を施した。最後の刺激から約 15 時間後にラットを断頭して海馬を取り出し、400 μ m のスライスを作成した。スライスを常温で 1 時間以上回復させた後、刺激用の灌流チャンバーに移し、CA1 領域のシャッフアー側枝に刺激電極を挿し、錐体細胞樹状突起に記録電極を挿した。20 秒おきに刺激を入力し、fEPSP を得た。fEPSP が 20 分以上安定したところで、灌流液を虚血負荷用灌流液 (無酸素・無グルコース) に切り換え、様々な時間の虚血負荷 (5, 10, 20, 30, 40, 50min、長時間 (>50min)) をかけた。虚血負荷後 (5, 10, 20, 30, 40, 50min) は、通常の灌流液で再灌流した。再灌流後に fEPSP が回復しなかった場合は、計測を終了した。再灌流後に fEPSP が回復した場合にのみ、テタヌス刺激 (100 Hz, 1 秒間) を入力し、LTP を誘導した。テタヌス刺激後 60 分間計測を続け、安定した fEPSP の増強が見られた場合に LTP とみなした。

結果および考察

長時間の虚血負荷をかけた場合に、海馬スライスは虚血によるネクロシスを起こし、やがて fEPSP が得られなくなった。しかし、磁気刺激群の海馬スライスでは、fEPSP が得られなくなるまでの時間が Sham 群に比べて有意に延長した。つまり磁気刺激によって虚血性ネクロシスの誘導が遅延したと考えられる。また、短時間の虚血負荷では、再灌流後に fEPSP が回復したが、虚血負荷時間が長くなるにつれて、回復率は徐々に下がっていった (表 1)。しかし磁気刺激群では、虚血後の fEPSP 回復率が Sham 群に比べて高かった (表 1)。また虚血負荷後の LTP は、両群とも虚血負荷なしの場合に比べて抑制されていたが、磁気刺激群が Sham 群に比べて有意に回復していた。特に 10 分間虚血においては、磁気刺激群と Sham 群で fEPSP の回復率に差が見られなかったにもかかわらず、LTP では磁気刺激群が優位に回復していた (表 1、図 2)。以上のことから、0.75T の磁気刺激によって、ラット海馬において虚血耐性が獲得された可能性があると考えられる。

表 1. 虚血負荷後の回復率 (%)

Ischemic period (min)	Viability (%)	
	Sham	Stimulated
5	100	100
10	100	100
20	95	100
30	86	88
40	55	76
50	19	38

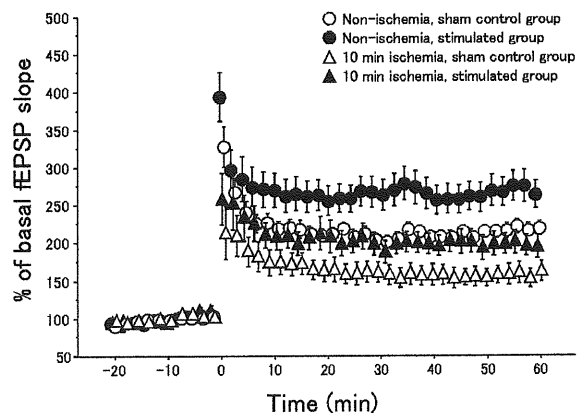


図 2. 10 分虚血後の LTP。●: 虚血負荷なし・磁気刺激群、○虚血負荷なし・sham 群、▲: 10 分虚血・磁気刺激群、△: 10 分虚血・sham 群。

[まとめ]

- ① 磁気刺激が海馬の機能に及ぼす影響は、その刺激強度に依存している。
- ② 適切な強度の磁気刺激を用いることにより、海馬において虚血耐性が獲得される可能性がある。