

## 論文の内容の要旨

論文題目 電磁界の細胞機能発現への影響とその応用に関する基礎的研究

氏 名 齋藤 淳史

本論文では、電磁界の中樞神経系に対する作用メカニズムを調べ、またその効果を医療分野で積極的に利用するために、培養神経細胞を用いた新しい影響評価方法および細胞操作方法の検討を行った。ここで、電磁界の生体効果の特徴はその周波数特性にあり、時間的に変動しない電磁界は電界・磁界が直接作用するが、周波数が高くなるにつれて刺激作用や熱作用が支配的となる。そのため、ここでは生体影響および医療応用の両面でのメカニズムがほとんどわかっていない刺激作用を対象とし、電磁界により生体内に誘導される電流（誘導電流）の（1）ガイドラインレベルでの効果および（2）強い刺激効果を培養神経回路網の活動を指標として調べた。具体的には、（1）のガイドラインレベルでの作用については国際非電離放射線防護委員会（International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, ICNIRP）の防護指針で制定されている閾値を用いて中樞神経系の発生モデルに対する影響を調べた。（2）の強い刺激効果については中樞神経系の非侵襲的治療のために利用される反復経頭蓋磁気刺激（Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation, rTMS）のメカニズムを調べるために、培養神経回路網への局所的な誘導電流刺激方法を検討し、刺激に伴う神経活動の変調効果を刺激部位と非刺激部位の各効果と対応づけて調べた。また、生体に対して刺激作用や熱作用といった物理的作用を与えない非侵襲的な細胞操作技術の開発を目的として、（3）定常磁界および磁性ナノ粒子を用いた高密度・3次元培養神経回路網の作製に関する検討を行った。ここでは、磁性ナノ粒子を導入した細胞を外

部磁力によってボトムアップ的に高密度集積化する方法を試み、そのために必要となる細胞への磁性ナノ粒子導入条件の検討および導入細胞を用いた培養神経回路網の高密度・3次元化方法に関する検討を行った。

## 1. 低周波磁界が神経分化能・回路網形成能に与える影響の長期的評価

中枢神経系の発生・発達への環境中の電磁界の影響を調べるために、神経分化誘導中のP19胚性癌腫 (Embryonal Carcinoma, EC) 細胞に対して 50 Hz 正弦波の低周波磁界を印加し、神経分化と回路網形成への影響を長期的に評価した。磁界印加はインキュベータ内に設置したヘルムホルツコイルによって行い、数値シミュレーションおよび実測により得られた結果から、磁束密度分布が $\pm 5\%$ 以内となる領域に培養試料を設置した。また、磁束密度については ICNIRP のガイドラインの基準値である 1 mT と、その 10 倍の強度である 10 mT を使用した。制作した低周波磁界印加装置を用いて P19EC 細胞の分化誘導に伴う胚様体形成過程で 4 日間恒常的に磁界印加を行った結果、10 mT 印加群について胚様体サイズの有意な低下を確認した。さらに 10 mT 印加群の胚様体を回収し、分化初期の細胞形態、神経分化能、回路網形成過程での自発電気活動への影響を調べた。その結果、非印加群と比較して、神経突起伸長速度の有意な低下および神経分化効率の有意な増加を確認した。微小電極アレイ (Microelectrode Array, MEA) 基板上での長期培養による自発電気活動の評価を行った結果、分化誘導後 2-3 週目でのスパイク発火頻度の有意な増加を確認した。この傾向は、Fluo-4 AM を用いた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化の蛍光イメージングにおいても確認できた。なお、1 mT 印加群については上記の指標での有意な影響は確認できなかった。

そこで次に、10 mT 印加時の培養容器内の誘導電流密度分布を数値シミュレーションにより推定し、誘導電流密度に対する影響を評価した。その結果、容器内での誘導電流密度の最大値は約  $0.1 \text{ A/m}^2$  であった。ここで、得られた誘導電流密度分布をもとに培養容器内に Polydimethylsiloxane (PDMS) によってコンパートメント構造を作製し、誘導電流密度の強度依存性を調べた。その結果、誘導電流密度が高くなるほど胚様体のサイズおよび神経分化時の細胞形態への影響が顕著となった。一方、磁界印加時の Ca 振動をリアルタイムで調べた結果、磁界印加が胚様体内の Ca 振動に影響は確認できなかった。

以上の結果から、P19EC 細胞の神経分化誘導時に対して、10 mT の低周波磁界印加は神経分化・回路網形成に影響を与える可能性が示唆された。ここで、影響が確認できた誘導電流密度は ICNIRP の防護指針の閾値の約 10 倍の強度であり、閾値での影響はないことが考えられた。また、誘導電流の刺激作用による直接的な細胞活動の変調は引き起こされないことから、電位感受性イオンチャネルを介さないシグナル伝達への影響が示唆された。

## 2. 培養神経回路網に対する局所誘導電流刺激方法の開発と刺激効果の観測

rTMS の刺激効果のメカニズムを調べることを目的として、培養神経回路網の局所的な領域を誘導電流によって非侵襲的に電気刺激できる実験システムを構築した。また、刺激効果は MEA によりリアルタイムで評価した。刺激時には軟磁性材料である Mu-metal を利用し、外部磁界を Mu-metal へ集束させることで Mu-metal 近傍で約  $20 \text{ A/m}^2$  程度の強い誘導電流を発生させた。ここで、Mu-metal を培養神経回路網の近傍に配置するためには PDMS を用いて作製した高さ  $100 \text{ }\mu\text{m}$  程度の細胞培養チャンバーをコンパートメントとして用いた。さらに、チャンバー構造を複数個作製し、各チャンバーをマイクロ流路によって結合させることで非刺激部位の回路網活動と刺激応答性の関係を調べた。低周波 ( $0.5 \text{ Hz}$ ) および高周波 ( $5 \text{ Hz}$ ) の 2 種類の双極性パルス磁界を用いて培養神経回路網を局所誘導電流刺激した結果、各刺激に対してそれぞれ抑制効果および増強効果を確認した。このことから、本システムを用いることで培養系においても rTMS でみられるような回路網活動の変調効果を確認できることがわかった。次に、刺激部位と非刺激部位の関係を調べるために軸索を介して双方向に接続されたクラスター状の培養神経回路網の一部を局所誘導電流刺激した。その結果、同期バースト発火の抑制効果が非刺激部位に伝搬することを確認した。また、同部位を局所薬理刺激した結果からも非刺激部位での同期バースト発火の抑制および増強を確認した。このことから、回路網の局所的な刺激は刺激部位と非刺激部位の同期バースト発火を強く変調する可能性が示唆された。そこで次に、局所的な薬理刺激によって同期バースト発火の発生を停止させた状態で  $0.5 \text{ Hz}$  の低周波刺激を行った。その結果、抑制効果は確認できず、刺激中におけるスパイク発火頻度の有意な増加のみを確認した。また、同条件下においては刺激終了後の神経活動の持続的な変化を確認した。

以上の結果から、作製した局所誘導電流刺激システムを用いることで、培養環境下での神経回路網活動の変調効果を確認した。また、同システムを用いた実験から局所的な刺激効果は同期バースト発火を介して非刺激部位の神経回路網活動に伝搬し、さらに非刺激部位の神経活動が刺激部位の誘発応答の急激な変化に関与することが示唆された。

### 3. 磁性ナノ粒子および定常磁界を用いた高密度・3次元培養神経回路網の作製

生体への物理的作用として刺激作用や熱作用が生じない人工的な磁界の神経科学分野への応用を目的として、磁性ナノ粒子と定常磁界を用いた培養神経回路網の 3次元化に関する検討を行った。ここではまず、磁性ナノ粒子の導入条件を調べるために大脳皮質培養神経回路網を用いて培地内の磁性ナノ粒子の濃度に対する細胞死、回収効率、導入後の自発電気活動への影響を調べた。その結果、 $500 \times 10^4 \text{ cells/dish}$  の試料において  $1 \text{ mg/ml}$  以下の濃度では神経細胞・グリア細胞の各細胞での細胞死は確認できず、また 80%以上の導入効率を確認した。一方、同濃度での導入後に MEA を用いた長期的な影響評価を行った結果、1週間程度継続するスパイク発火頻度の変化を確認した。さらに、磁性ナノ粒子導入後は接着細胞を一度回収する必要があるが、この過程では神経細胞の大規模な細胞死がみられた。

一方、グリア細胞の一種であるアストロサイトについては顕著な細胞死およびアストロサイト間のギャップ結合への影響がみられなかった。そのため、ここではアストロサイトのみに磁性ナノ粒子を導入し、磁性ナノ粒子の導入・非導入アストロサイト間でのギャップ結合を用いた培養神経回路網の3次元化を検討した。

単層培養神経回路網上に磁性ナノ粒子導入アストロサイトを集積化し、24時間培養した結果、外部磁力を用いて単層の培養神経回路網を回収・移動できることがわかった。また、回収した培養神経回路網を別の神経回路網上に配置した結果、底面の細胞を剥離させずに単層培養神経回路網上へ別の培養神経回路網を集積化することができた。そこで、次にMEAを用いて磁性ナノ粒子導入アストロサイトの集積化および回収した培養神経回路網の集積化による自発電気活動パターンへの影響を調べた結果、磁性ナノ粒子導入アストロサイトの集積化により、培養24時間以内でのスパイク発火頻度およびパターンの急激な変化を確認した。一方、回収した培養神経回路網を単層培養神経回路網上へ集積化した試料については、培養24時間以内で急激な発火パターンの変化はみられなかったものの、観測電極毎で発火頻度の増減傾向が異なることを確認した。

以上の結果から、磁性ナノ粒子導入アストロサイトを用いることで、外部磁力を用いた培養神経回路網の回収と集積化を行うことができ、集積化する細胞によって異なる自発電気活動の変化を確認した。また本手法は、高密度・3次元構造を有する脳・神経回路網を培養系で作製し、その活動パターンを調べるための方法として応用が期待できる。