

## 反復経頭蓋磁気刺激によるラット海馬における 神経細胞新生の増加

上山栄子<sup>1)</sup>, 鵜飼 聡<sup>1)</sup>, 小川朝生<sup>2)</sup>, 山本雅清<sup>2)</sup>, 川口俊介<sup>2)</sup>,  
石井良平<sup>2)</sup>, 篠崎和弘<sup>1)</sup>

Eiko Ueyama, Satoshi Ukai, Asao Ogawa, Masakiyo Yamamoto, Shunsuke Kawaguchi,  
Ryouhei Ishii, Kazuhiro Shinosaki

うつ病に対する反復経頭蓋磁気刺激 (rTMS) の作用機序はいまだ解明されていないが、最近の動物を用いた研究からは、海馬の神経細胞新生が抗うつ薬や電気けいれん療法を含む種々のうつ病治療の効果発現に関与している可能性が示唆されている。そこで、本研究では連日の rTMS がラットの海馬の神経細胞新生に及ぼす効果について検討した。強制水泳試験を用いて抗うつ効果が報告された先行研究に準じて直径 70 mm の 8 の字コイルを用い、刺激強度は同規格の rTMS 装置の最大出力の 70 %、刺激頻度は 25 Hz、刺激時間を 10 秒とした。先行研究の 5 日間よりも長い 14 日間連日、1 日 1 回の bromodeoxyuridine (BrdU) の投与と 1,000 発/日の rTMS を施行した後、海馬歯状回における細胞増殖について免疫組織化学的に検討した。rTMS 施行群では、海馬歯状回における BrdU 陽性細胞が sham 刺激群に比較して有意に増加していた。結果は連日の rTMS によって海馬の神経細胞新生が増加することを示すとともに、この増加が抗うつ効果に関与している可能性を示唆する。

<索引用語：神経細胞新生，海馬，経頭蓋磁気刺激，ラット，うつ病>

### はじめに

反復経頭蓋磁気刺激 (repetitive transcranial magnetic stimulation: rTMS) は非侵襲的に反復して脳を電気刺激する技術の 1 つである。現在、種々の精神・神経疾患に対して rTMS を用いた治療の臨床研究が行われているが、症例数や有効性の報告はうつ病に対するものが圧倒的に多い<sup>2,5)</sup>。一方、rTMS の抗うつ効果の作用機序については、ヒトの脳機能画像を中心とした検討とともに、げっ歯類などの動物を用いた神経生物学的な検討も多数報告されているが、いまだ解明されていないのが現状である<sup>4,10)</sup>。

そのような中で、海馬での神経細胞新生が種々のうつ病の治療効果発現に、中心的ではないかもしれないが、関与している可能性を示唆する報告がある<sup>12)</sup>。例えば、マウスの脳の一部に X 線を照射して海馬の神経細胞新生を阻害すると抗うつ薬の効果が認められなくなると報告されたり<sup>13)</sup>、抗うつ薬の慢性投与や、ヒトの電気けいれん療法に相当する電気けいれん刺激によって海馬の神経細胞新生が促進されることがげっ歯類<sup>6,7,14)</sup> や霊長類<sup>9)</sup> で報告されている。

これらの報告からは、ヒトのうつ病の治療で用いるような連日の rTMS が海馬の神経細胞新生

著者所属：1) 和歌山県立医科大学医学部神経精神医学教室，2) 大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室  
本論文は、PCN 誌に掲載された最新の研究論文<sup>15)</sup> を編集委員会の依頼により、著者の 1 人が日本語で書き改め、その意義と展望などにつき加筆したものである。

を増加させ、その増加がうつ病治療の効果発現に  
関与する可能性が示唆されるが、げっ歯類を用い  
て連日の rTMS が海馬の神経細胞新生に及ぼす  
効果を検討した報告はこれまでに 1 編のみであり、  
その検討では有意な増加は認められなかった<sup>1)</sup>。  
この否定的な結果には種々の要因が想定されるが、  
ヒトのうつ病の治療はもとより、実験動物モデル  
においても最適な rTMS の刺激条件が確立して  
いない現状を考えると、用いられた rTMS の刺  
激条件が適切ではなかった可能性がその 1 つに挙  
げられる。そこで、本研究では、強制水泳試験に  
よるラットに対する rTMS の抗うつ効果の検討  
で Sachdev らが用いた刺激条件<sup>11)</sup> にできるだけ  
準じて rTMS を施行し、rTMS が海馬の神経細胞  
新生に及ぼす効果について予備的に検討した。

## I. 研究の方法および結果

### 1. rTMS と BrdU 投与

rTMS には Magstim 社製の Magstim Super  
Rapid を用いた。16 週齢の雄性 Sprague-Dawley  
ラットを rTMS 施行群 (実刺激群; n=5)  
と sham 刺激群 (対照群; n=5) に分け、直径  
70 mm の 8 の字コイルを用い、刺激強度は  
rTMS 装置の最大出力の 70 %、刺激頻度は 25  
Hz、刺激時間は 10 秒で、頭部に 1,000 発/日、  
14 日間連日 rTMS を施行した。コイル面は頭部  
に対して接線方向とし、ハンドルをラットの体部  
に平行となるようにした。sham 刺激ではコイル  
面を頭部に対して垂直にし、他の全ての刺激条件  
は実刺激群と同一とした。両群ともに実験期間中  
にけいれんや特段の見かけの行動上の変化は認め  
なかった。刺激期間中、bromodeoxyuridine  
(BrdU) を rTMS 施行後に連日腹腔内投与し、  
最終刺激の 24 時間後に灌流固定した。

### 2. 免疫組織学的検討

最終刺激終了 24 時間後、ラットを深麻酔下に  
4 %パラホルムアルデヒド液にて灌流固定を行  
い、後固定後、摘出脳を用いて海馬を含む冠状断  
で 5  $\mu$ m のパラフィン切片を作製した。脱パラフ

イン後、抗 BrdU 抗体を一次抗体として反応後、  
ABC 法を経て 3,3'-diaminobenzidine tetrahy-  
drochloride (DAB) を用いて発色させ、  
hematoxylin で対比染色し、BrdU 陽性細胞数を  
カウントした。また、二重免疫組織染色では抗  
BrdU 抗体、抗 neuron-specific class III  $\beta$ -  
tubulin (TuJ 1) 抗体を一次抗体として反応後、  
biotinylated donkey anti-rat IgG と Cy3-con-  
jugated donkey anti-mouse IgG、Cy2-conjugat-  
ed streptavidin を使用し、蛍光顕微鏡にて観察  
した。

### 3. 統計学的解析

カラー 3 CCD カメラを備えた顕微鏡 (Eclipse  
E800) にて画像を取り込み、一個体あたり 6 切  
片ずつ (-2.8mm ~ -4.5mm, relative to breg-  
ma<sup>8)</sup>) 歯状回の顆粒細胞層 (granule cell layer:  
GCL)、下顆粒細胞層 (subgranular zone:  
SGZ) における BrdU 陽性細胞数をカウントし  
た。実刺激群、対照群で海馬歯状回の GCL、  
SGZ の面積を NIH Image を用いて計測し、単  
位面積あたりの BrdU 陽性細胞数を算出した。  
次に、各個体あたり少なくとも 50 以上の BrdU  
陽性細胞について、抗 TuJ 1 抗体との二重染色  
の割合を解析した。統計検定は Student の t 検定  
を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。

### 4. 結 果

ほとんどの BrdU 陽性細胞は SGZ に認められ  
た。実刺激群では対照群と比較し、海馬歯状回の  
GCL、SGZ における単位面積あたりの BrdU 陽  
性細胞数の有意な増加を認めた (図 1, 2)。

抗 BrdU 抗体とニューロンのマーカーである  
TuJ 1 に対する抗体を用いた蛍光二重染色では、  
BrdU 陽性細胞の約 80 % が TuJ 1 陽性であった  
が、2 群間での差は認められなかった (実刺激群  
81.3  $\pm$  2.5 %, 対照群 80.4  $\pm$  3.1 %)。

## II. 考 察

本研究では、連日の rTMS がラットの海馬歯

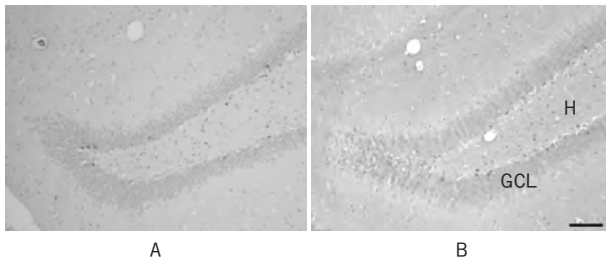


図1 対照群 (A), rTMS 施行群 (B) のラット海馬歯状回における BrdU 陽性細胞  
Scale bar: 100 $\mu$ m. GCL, granule cell layer; H, hilus.

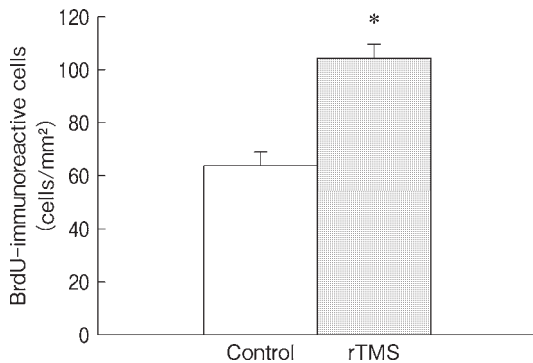


図2 歯状回における単位面積あたりのBrdU陽性細胞数連日のrTMSによりBrdU陽性細胞数が有意に増加した(対照群63.1 $\pm$ 5.1 cells/mm<sup>2</sup>, rTMS 施行群102.3 $\pm$ 6.4 cells/mm<sup>2</sup>, \* $p$ <0.05).

状回の神経細胞新生に及ぼす効果について検討し、BrdU陽性細胞の有意な増加を認めた。rTMSによる海馬の神経細胞新生を検討したこれまでの報告ではその増加は示されておらず、本研究は、我々の知る限りrTMSによる増加を示した初めての報告である。

本研究は、げっ歯類<sup>6,7,12,14</sup>や霊長類<sup>9</sup>において電気けいれん刺激や種々の抗うつ薬の慢性投与により海馬の神経細胞新生が促進されるというこれまでの報告と同様の結果を連日のrTMSを用いて示した。本研究ではうつ病のモデル動物を用いておらず、行動実験も行っていないが、結果は海馬の神経細胞新生が連日のrTMSの抗うつ効果に関与している可能性を示唆するものである。

本研究の刺激条件は、強制水泳試験によってrTMSの抗うつ効果を報告したSachdevらの先

行研究<sup>11</sup>)に準じて設定した。すなわち、彼らと同じ規格の刺激装置と8の字コイルを用い、コイル面を頭部に対して接線方向にあて、刺激パラメーター(刺激頻度は25 Hz, 刺激強度はrTMS装置の最大出力の70%, 刺激回数は1,000発/日)も彼らの報告に準じた。刺激頻度は、彼らが1, 5, 15, 25 Hzの4条件で実験し、最も効果があると報告した25 Hzに設定した。ただし、刺激日数については、彼らの用いた5日間ではなく、ヒトの臨床研究でも用いられる程度の14日間として連日rTMSを施行した<sup>2,5</sup>。

rTMSによるラットの海馬の神経細胞新生の検討の過去の報告はCzehらによるもの1編のみであるが、その報告では有意な増加は認められなかった<sup>1</sup>)。本研究において、Czehらの検討に比べてより高い刺激頻度(25 Hz対20 Hz)で多数回(14,000発/日対5,400発/日)の刺激を行ったことが、海馬の神経細胞新生の促進に有効であった可能性が考えられる。

ラットの脳に対するrTMSでは、単回のTMSで生じる電流や電場の強度と分布にかかわる刺激条件、例えばげっ歯類の小さな脳に対するコイルの大きさ、形状、刺激部位なども重要な検討事項である<sup>3</sup>)。Czehらの検討では本研究と異なり、電流や電場の強度や分布を理論的に推定したうえで刺激条件を設定し、ラット用の小さな円形コイルを用いて左前頭部を刺激している。今後、本研究で用いた刺激条件で生じる電流や電場の強度や分布を理論的に推定し、それらがどのように海馬の神経細胞新生に影響したかを評価する必要がある。

BrdU の投与回数について、先行研究の多くは実験全体で1回あるいは数回程度投与し、約1ヵ月後に海馬の神経細胞新生を検討しているのに対して、本研究では14日間連日 rTMS と BrdU 投与を行い、最終投与の翌日に灌流固定しているため、14日間の実験期間全体での増殖を評価していることになるので、本研究の結果を先行研究と比較するには注意が必要である。また、本研究では新生細胞の生存については検討していない。より正確に比較、議論をするためには、本研究で用いた rTMS の刺激条件と先行研究で用いられた BrdU の投与プロトコルを用いて検討することを含め、さらなる検討が必要である。

### III. 苦勞・工夫したこと

種々のうつ病治療の効果発現に海馬の神経細胞新生が共通して関与している可能性が先行研究から示唆されているので、rTMS を用いて同様の検討を行った本研究のアイデア自体は特段画期的なものではない。

しかし、最適な rTMS の刺激条件に関して、ヒトの場合でも確定したものはないものの、刺激部位（多くは左前頭前野）、刺激頻度（10 Hz 以上）、刺激強度、1日あたりの刺激数、日数などについて、ある程度のコンセンサスが得られた条件が存在するのに対して、ラットの脳に対する rTMS の検討のこれまでの報告は海馬の神経細胞新生以外のものを含めても数少ないうえに、刺激部位やコイルの大きさ・形状を含む刺激条件の差異が大きかったために、これらを参考にして本研究で用いる刺激条件を設定する際に苦慮した。

このようにラットの脳に対する rTMS の報告が少ない理由の1つとして、ヒトに比べて格段に脳や前頭葉が小さいことが挙げられる。小型のコイルで高頻度刺激すると容易にコイルの温度が上昇するのでコイルを多数用意して何度も取り替えるという煩雑さに加えて、小さな脳のために正確な局所刺激が難しい、ヒトと比べて相対的に広範な脳領域で電流が誘導される、導電体である脳が小さいと磁場強度が同じでも誘導電流が小さくな

るなどの問題点が予想された。Czeh らは刺激部位や誘導電流の問題は、小型のコイルを用い、さらに電流や電場の強度や分布を理論的に推定することでクリアしたと主張している。しかし、治療の作用機序に関連する、連日の rTMS の「慢性効果」には神経回路を介した脳全体の neuro-modulation が関与すると想定されるので、局所の電気刺激をヒトの条件にできるだけ近似させることは重要ではあるが、それを十分に行ってもラットの脳に抗うつ効果に関連する効果や変化が得られる保障はないと判断し、結局、コイルが大きくなり、また誘導電流の理論的な推定を行っていない問題はあるものの、強制水泳試験で抗うつ効果を示した実績のある Sachdev らが用いた rTMS の刺激条件に準じた条件を本研究では用いることにした。

ただし、本研究での刺激日数は Sachdev らの5日に対し、ヒトで抗うつ効果を発揮するのに最低限必要と考えられる14日間とした（ヒトでは週毎に5日の施行と2日の休みを繰り返すので、本研究での日数はヒトの約3週間分に相当する）。一方で、神経細胞新生が何日程度の rTMS で有意に増加するのかを推測できる過去のデータがなかったため、その日数の推定や survival の検討が困難となるが神経細胞新生の増加を捉える可能性が少しでも上がることを優先して、BrdU の投与については rTMS の期間中連日施行するという先行研究と比べてやや変則的なプロトコルを用いた。

### おわりに

本研究は、14日間連日の rTMS によってラットの海馬の神経細胞新生が増加することを示した。先行研究の結果と合わせて考えると、この結果は海馬の神経細胞新生が rTMS の抗うつ効果に関連している可能性を示唆するが、その可能性は推測の域を出ないものであり、うつ病のモデル動物や行動実験を用いての検討が、前述の電流や電場の強度・分布の理論的推定、BrdU の投与方法の変更とともに今後の課題と考えられる。

一方、rTMSによる海馬の神経細胞新生の増加が示されたので、この増加を客観的な指標としてラットでの最適なrTMSの刺激条件を求めることができれば、ヒトのうつ病に対するrTMS治療での最適な刺激条件を検討する際に、ヒトへのあてはめには難しい面もあるものの、ラットを用いた基礎的な知見が、臨床症状の改善とは全く異なった次元の判断の指標として寄与できる可能性が期待される。

### 文 献

- 1) Czéh, B., Welt, T., Fischer, A.K., et al.: Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry*, 52; 1057-1065, 2002
- 2) Gross, M., Nakamura, L., Pascual-Leone, A., et al.: Has repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) treatment for depression improved? A systematic review and meta-analysis comparing the recent vs. the earlier rTMS studies. *Acta Psychiatr Scand*, 116; 165-173, 2007
- 3) Keck, M.E., Welt, T., Post, A., et al.: Neuroendocrine and behavioral effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in a psychopathological animal model are suggestive of antidepressant-like effects. *Neuropsychopharmacology*, 24; 337-349, 2001
- 4) Loo, C.: TMS in the treatment of major depressive disorder. *The Oxford Handbook of Transcranial Stimulation*. (ed. by Wassermann, E., Epstein, C., et al.). Oxford University Press, Oxford, p.633-660, 2008
- 5) Loo, C.K., Mitchell, P.B.: A review of the efficacy of transcranial magnetic stimulation (TMS) treatment for depression, and current and future strategies to optimize efficacy. *J Affect Disord*, 88; 255-267, 2005
- 6) Madsen, T.M., Treschow, A., Bengzon, J., et al.: Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry*, 47; 1043-1049, 2000
- 7) Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J., et al.: Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 20; 9104-9110, 2000
- 8) Paxinos, G., Watson, C.: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sydney, 1986
- 9) Perera, T.D., Coplan, J.D., Lisanby, S.H., et al.: Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. *J Neurosci*, 27; 4894-4901, 2007
- 10) Post, A., Keck, M.E.: Transcranial magnetic stimulation as a therapeutic tool in psychiatry: what do we know about the neurobiological mechanisms? *J Psychiatr Res*, 35; 193-215, 2001
- 11) Sachdev, P.S., McBride, R., Loo, C., et al.: Effects of different frequencies of transcranial magnetic stimulation (TMS) on the forced swim test model of depression in rats. *Biol Psychiatry*, 51; 474-479, 2002
- 12) Sahay, A., Hen, R.: Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci*, 10; 1110-1115, 2007
- 13) Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., et al.: Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 301; 805-809, 2003
- 14) Scott, B.W., Wojtowicz, J.M., Burnham, W.M.: Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures. *Exp Neurol*, 165; 231-236, 2000
- 15) Ueyama, E., Ukai, S., Ogawa, A., et al.: Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats. *Psychiatry Clin Neurosci*, 65; 77-81, 2011