

[研究助成 (A)]

非侵襲的な振動感覚刺激を用いたうつ病症状緩和システムの基盤構築

2231024



研究代表者
(助成金受領者)
共同研究者

聖マリアンナ医科大学 医学部
生理学

講 師

藤 岡 仁 美

聖マリアンナ医科大学 医学部
生理学

講 師

藤 原 清 悦

聖マリアンナ医科大学 医学部
生理学

研究技術員

鳴 海 栄

[研究の目的]

日本では現在 100 万人以上がうつ病と診断され、治療を受けている。患者が受ける苦痛に加え、うつ病によって生じる社会経済的損失は大きい。うつ病の治療の基本は抗うつ薬を中心とした薬物療法であるが、およそ 3 分の 1 の患者は寛解に至らず、このような治療抵抗性を示すうつ病に対する新たな治療方法を開発することは急務である。

うつモデル動物を用いた基礎研究では外側手綱核ニューロンの活動が健常ラットと比較して高い事が知られている。また、うつモデル動物の小脳皮質活動を人為的に上昇させるとうつ様行動が改善される (Baek, Elife 2022)。さらに、体性感覚情報は小脳にも入力している事が知られている。これより、我々は動物の体幹に慢性的に感覚刺激を与えれば、小脳皮質活動が増加し、その変化は前頭前野を経由して外側手綱核の活動頻度を低下させて、うつ病様行動が改善される可能性があると考えに至った (図 1)。

我々は上記可能性を検証するために、動物用

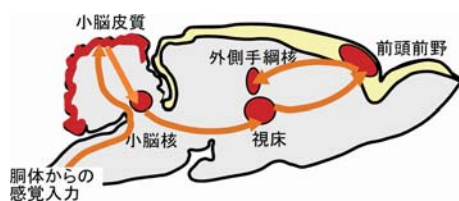


図 1 想定される神経経路

振動刺激装置を新たに開発し、うつモデル動物に対して慢性的に振動刺激を与えて、うつ様行動の変化を観察した。さらに、振動刺激に対する当該動物の脳神経活動の変化についても検討した。

[研究の内容、成果]

1. うつモデル動物の選定

うつモデル動物を作成するには、健常動物に対して、慢性的なストレスを与えてうつ様行動を発現させる手法が一般的に用いられている。このモデル動物では、セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) 等の一般的な抗うつ剤の効果が高く、新規薬剤の評価に頻繁に使用されている。しかしながら、時間の経過による自然治癒の可能性を考慮する必要がある、治療効果の判定には慎重な対応が求められる。Wistar Kyoto rat (WKY rat) は先天的にうつ脆弱性を持ち、特別な操作無しで、うつ様行動をとる事が知られており、うつ様行動の自然治癒の見込みはなく、さらに、SSRI 等の一般的な抗うつ剤の効果が無いことが知られている。そのため、WKY ラットは、ヒトの抗治療性うつ病のモデルとして使用されている。

先に述べたとおり、本研究では、治療抵抗性うつ病を主なターゲットとする新たな治療法を開発する事を目的としているため、WKY ラッ

トを被験動物として使用した。

2. 慢性的な振動刺激による動物のうつ様行動の改善

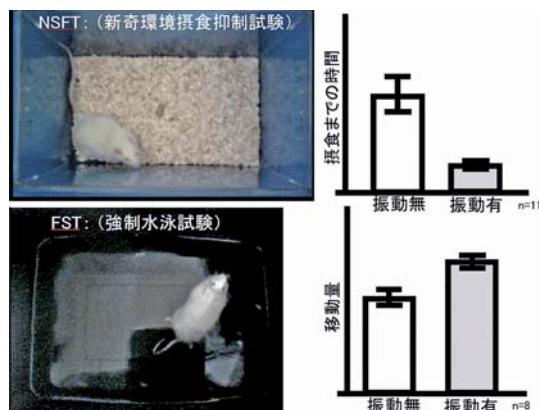
2.1 慢性振動刺激

開発した動物用振動刺激装置を WKY ラットに装着し、数週間程度、慢性的に振動刺激を加えた（装置の諸元と詳細なプロトコルに関しては、知的財産保護の観点から省略）。

2.2 新奇環境摂食抑制試験 (Novelty Suppressed Feeding Test; NSFT)

慢性振動刺激終了直後より、被験動物を 24 時間絶食した。その後、新奇環境下で中央に餌ペレットを 1 つ置いた状態の新規ケージ中に被験動物を入れて、摂食するまでの時間を計測した。この試験における摂食までの時間は、うつ様行動を発現している動物では長く、健常動物では短い事が知られている。

我々の実験結果では、慢性的な振動刺激を印加した群は、印加しなかった群と比較して摂食するまでの時間が有意に短縮した（図 2 上段右）。



上段左：新奇環境摂食抑制試験の様子
 上段右：試験の結果（摂食までの時間）（合計 11 匹）
 下段左：強制水泳試験の様子
 下段右：試験の結果（移動量）（合計 8 匹）
 （具体的な数値に関しては、知的財産保護の観点から省略）

図 2 行動試験結果

2.3 強制水泳試験 (Forced Swimming Test; FST)

前述した NSFT から約 1 週間後に、被験動物を温水で満たしたプールに入れて、上方より 5 分間ビデオ撮影を行った。記録されたビデオ

動画を解析して動物が泳動した累積移動量を求めた。この試験における累積移動量は、うつ様行動を発現している動物では短く、健常動物では長い事が知られている。我々の実験結果では、慢性的な振動刺激を印加した群は、印加しなかった群と比較して 5 分間の累積移動量が有意に長かった（図 2 下段右）。

2.4 行動試験のまとめ

NSFT および FST の結果より、体幹への慢性的な振動刺激は、先天的なうつモデル動物である WKY ラットにおいて、うつ様行動を改善させる効果がある事が判明した。

3. 振動刺激に対する前頭前野ニューロンの応答

前節で述べた慢性振動刺激によって、振動刺激に対する神経系の応答が変化している可能性を検討するために、慢性振動刺激を行った後の被験動物に対して、麻酔下で前頭前野に電極を刺入し、ニューロンからの細胞外記録を行いながら、体幹に対して振動刺激を行い、振動に対する反応の変化を記録した。

3.1 実験系

被験動物にウレタン麻酔を腹腔内投与した後、開頭し、前頭前野にタングステン電極を刺入して細胞外記録を行った。慢性振動刺激に用いた振動刺激と同等なパラメータで刺激できる振動子を新たに作成し、本実験の振動刺激に用いた。当該振動子を被験動物の体幹に当てて、2 s の刺激期間、2 s の休止期間を持つ振動パターンを 100 回繰り返し、その間の神経活動を記録した。記録箇所を変更して、同様な刺激—記録を繰り返した。

3.2 データ処理

記録された波形に対してカットオフ周波数 400 Hz でハイパスフィルタをかけて低周波成分を除去し、波形全体の平均と標準偏差を求めた。平均値から標準偏差の 3 倍の値 (mean-3SD) を閾値とし、閾値より低いピーク値を示した箇所をスパイク（活動電位）として検出した（図 3）。

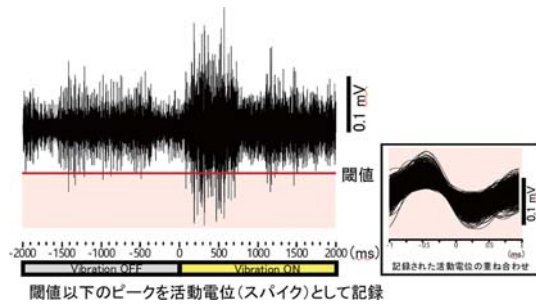


図3 記録された波形 (例)

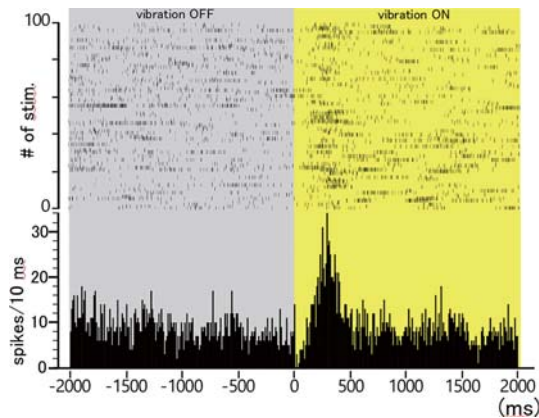


図4 スパイクのラスタプロット (上段) とヒストグラム (下段) の例

検出したスパイクを1つの点として示したラスタグラムを作成し、それを100回繰り返したラスタプロットを作成した (図4上段)。さらに、このラスタプロットに対して、bin幅10 msでスパイク数をカウントしたヒストグラムを作成して、これを振動刺激に対する神経活動の応答とした (図4下段)。

3.3 振動刺激に対する反応

健常で慢性刺激を印加していない動物、うつモデルで慢性刺激を印加していない動物、うつモデルで慢性刺激を印加した動物 (各1匹) それぞれに関してスパイクのヒストグラムを作成した (図5)。健常動物では体幹への振動刺激開始から500 ms前後でピークが現れる記録箇所が多く見られ (図5上段)、うつモデルで慢性刺激を印加した動物でも同様なピークが見られた (図5下段)。これを振動刺激に対する前頭前野ニューロンの反応として、この反応が観察された記録箇所をカウントし、全記録箇所に対する反応出現箇所の割合を算出したところ、

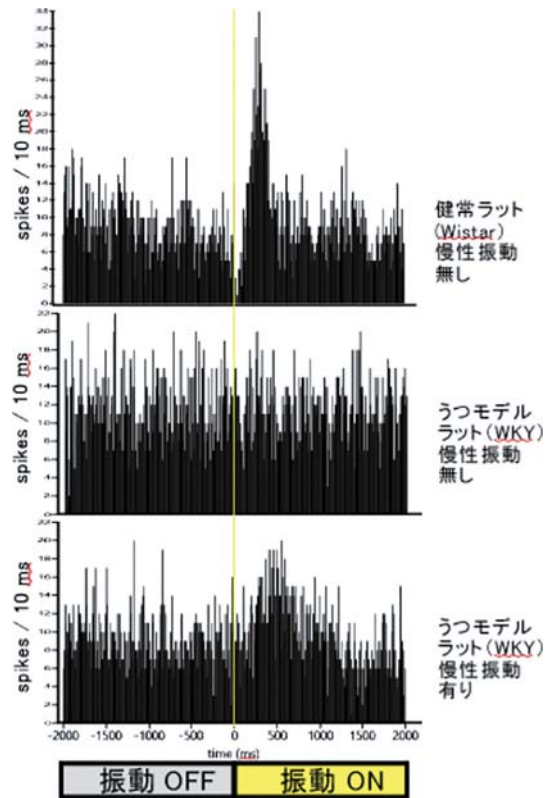


図5 スパイクのヒストグラム (代表例)

健常動物では72.7%, うつモデルで慢性刺激を印加していない動物では0%, うつモデルで慢性刺激を印加した動物では43.8%となった (表1)。

表1 振動刺激に対して反応を呈した箇所数とその割合

	健常 慢性振動無	うつモデル 慢性振動無	うつモデル 慢性振動有
A: 全記録箇所数	47	25	16
B: 反応を呈した 箇所数	34	0	7
(B/A)×100 [%]	72.7	0	43.8

以上より、前頭前野の振動刺激に対する反応性は、健常動物は高く、うつモデル動物では反応しない、もしくは反応性が低いことが示唆される。さらに慢性的な振動刺激を与えられたうつモデル動物では、振動刺激に対する前頭前野の反応性がある程度回復していると考えられる。

4. 振動刺激に対する応答脳領域の免疫蛍光染色による検討

2節で述べた慢性振動刺激により神経応答の変化する脳領域を検討するため、うつモデル動物に慢性振動刺激を行った後、脳組織切片を作成し、神経活動マーカータンパク質である c-Fos に対する免疫組織蛍光染色を行い、うつとの関連が示唆される各脳領域での c-Fos の発現の変化を観察した。

4.1 免疫蛍光染色

被験動物またはコントロール動物をベントバルビタール深麻酔下にて、4% パラホルムアルデヒドによる灌流固定を行った後、脳を摘出した。摘出した脳からクリオスタットにて厚さ 30 μm の脳切片を作成した。作成した切片のうち、前頭前野、視床下部室傍核、外側手綱核を含む切片について、抗 c-Fos 抗体を用いた免疫染色を実施し、続いて脳領域を同定するため蛍光ニッスルによる対比染色を行った。

背側縫線核を含む切片については、縫線核領域を明らかにするためセロトニンニューロンのマーカーである抗-TPH 抗体と抗 c-Fos 抗体との二重蛍光染色を実施した。

4.2 画像解析

正立光学蛍光顕微鏡を用いて、背側縫線核、室傍核および外側手綱核の画像を取得した。これらの領域に対応する関心領域 (ROI) は、蛍光ニッスルまたは TPH2 免疫反応性の蛍光パターンに基づき、各画像から手動で描出した。

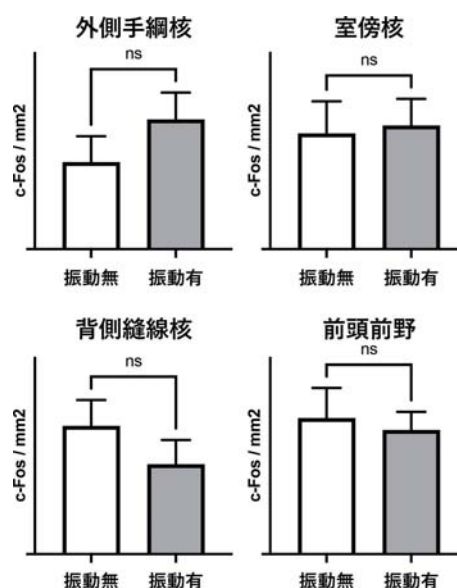
前頭前野の ROI は、共焦点レーザー走査型顕微鏡と ZEN 3 blue edition ソフトウェアを用いて取得した。前頭前野を含む切片全体のタイリング画像から、蛍光ニッスル染色パターンを指標に、Fiji ソフトウェアと ABBA プラグインを使用して、Waxholm Space Atlas に照らし合わせ決定した。

定義した各 ROI 内の c-Fos 免疫陽性細胞数は、SimpleCellCounter ソフトウェアを用いて自動的にカウントした。データはラット 1 匹あたり 1 領域につき 3 枚の脳スライスから取得し、

各群 5 匹のラットを使用した。

4.3 慢性振動刺激による c-Fos 発現の変化

うつとの関連が示唆される各脳領域について、慢性刺激を印加した群と対照群における 1 mm^2 あたりの c-Fos 陽性細胞数を比較した。その結果、対象とした、前頭前野、室傍核、外側手綱核、背側縫線核のいずれの領域においても、統計的に有意な差は検出されなかった (図 6)。



(具体的な数値に関しては、知的財産保護の観点から省略)

図 6 各うつ関連脳領域における c-Fos 発現細胞数の比較 (n=5 each)

本報告書の 3 節で示した電気生理学的実験では、うつモデル動物への慢性振動印加により、振動刺激に対し前頭前野の応答が増加することが示唆された。しかしながら、本項目では、前頭前野における神経活動のマーカーである c-Fos 発現細胞数においては、慢性振動刺激の有無による差は観察されなかった。この差異については、特定の刺激への反復暴露がその刺激による c-Fos 発現誘導を減少させるという報告があることから、本実験でも振動刺激を繰り返し与えた結果、誘導される c-Fos 発現が、対照群のレベルまで減少していた可能性が考えられる。

5. 全体のまとめと今後の展望

うつモデル動物の体幹に対して慢性的に振動刺激を加えたところ、うつ様の行動指標に改善が見られた。また、慢性的に振動刺激を加えた動物では、振動刺激に対する前頭前野ニューロンの反応性が高くなっている事が判明した。これらは、体幹に対する慢性的な振動刺激が、前頭前野の活動性を変化させて、うつ様行動を改善させた可能性を示唆する。一方、振動刺激によるうつ様行動改善に関わる前頭前野以外の領域については、今後さらなる検討を重ねる必要がある。

本助成研究により得られた結果は、治療抵抗性うつ病に対して慢性的な振動刺激が有効な治

療方法である事を示唆する事から、我々は次の段階としてヒトへの適用を目指し、ヒト用振動刺激装置の開発に着手している。振動刺激を用いたうつ病治療装置が実現できれば、非侵襲的で患者負担が少なく、容易に従来手法と併用可能な治療機器となる。これによりうつ病の寛解率の向上に貢献できる事から、本研究の結果は医学的に重要であり、人間と機械（振動装置）の調和の促進に貢献すると考えられる。

[成果の発表、論文など]

【特許出願】 藤岡仁美，鳴海栄，藤原清悦，特願 2024-82629：振動刺激装置，振動刺激器具，及び治療方法