

静止強磁場に曝露された腫瘍細胞の増殖機能に関する研究

細川 友秀・谷岡 直子・沢田 誠二

Studies on the Proliferative Activity of Tumor Cells Exposed to a Strong Static Magnetic Field

Tomohide HOSOKAWA・Naoko TANIOKA・Seiji SAWADA

Received April 12, 1994

抄録： 電磁場が人間の健康に影響を及ぼすという可能性が指摘され、環境要因としての電磁場が注目を集めている。本研究では、電場の影響を除外して、強力な静止磁場がほ乳類の細胞増殖機能に及ぼす影響を調べた。すなわち、ハツカネズミ（マウス）のリンパ系腫瘍細胞である EL-4 細胞（T リンフォーマ細胞の一種）を、超伝導電磁石から発生する強い静止磁場（6.34 テスラ）内に 24 時間静置して磁場曝露した。その後、細胞を磁場から取り出し、様々な細胞濃度で様々な時間培養して増殖させ、磁場に曝露しなかった細胞の増殖と比較して、細胞増殖機能に及ぼす強い静止磁場曝露の影響を評価した。磁場に曝露された細胞は非曝露対照群の細胞に比べて、どの細胞濃度の培養においても、また、どの培養時間においてもよく増殖し、磁場への曝露は細胞の増殖機能を高く保つことが分かった。

索引語： 静止磁場、リンパ系腫瘍細胞、細胞増殖

Abstract : Recently, electromagnetic fields have attracted public attention as an environmental factor which may affect health seriously. In this paper, we examined whether a strong static magnetic field generated by a superconductive electromagnet modifies the proliferative activity of mammalian cells. Mouse EL-4 T-lymphoma cells (a kind of malignant lymphoid cell) were held in a static magnetic field at 6.34 T (Tesla) for 24 hours at 37 C. After being exposed to the magnetic field, the EL-4 cells as well as non-exposed control EL-4 cells were cultured at various cell concentrations for various time intervals, to compare the proliferative capacity between the two groups. The EL-4 cells which had been exposed to the magnetic field proliferated much better than the control EL-4 cells at all cell concentrations and for all durations in the culture. These results indicate that cells in the strong static magnetic field augment or retain high proliferative capacity.

Key Words : static magnetic field, lymphoma cell, cell proliferation

1. はじめに

生命はすべて地磁気の影響下で生まれ進化してきた。ミツバチ、ハト、イルカなどの動物は地

磁気を感じし方向感覚に利用していると考えられているが、地磁気の強さは0.5ガウス (5×10^{-5} テスラ) 程度で弱く、地磁気が人間の生理機能に及ぼす影響は知られていない。しかし、最近では医療用の NMR-CT 装置が普及し、超伝導電磁石によるリニアモーター超特急の実用化が近づくなど、人間が強い磁場に曝される機会は非常に多くなりつつあり、人間の健康に及ぼす磁場の影響の基礎的研究が必要になっている。

これまでに、十から数十ヘルツの超低周波の電磁場がヒトや動物の培養細胞の増殖反応に及ぼす影響についていくつかの研究が行われている。そして、超低周波の電磁場が、増殖機能の低下した細胞における増殖刺激によって引き起こされた増殖反応を促進し、また、最適条件に満たない条件で増殖刺激された細胞の増殖反応も促進するという結果が報告された^{1)~3)}。一方、同様の超低周波電磁場は、生理的な増殖刺激を受けていない細胞の増殖を誘起しないという報告がある^{4)~6)}。これらの実験系は周期的に変動する電場と磁場が不可分の形で細胞の増殖機能に及ぼす影響をみていると考えられ、両者がそれぞれどの程度実験結果に関与しているかは明らかでない。また、健全な増殖機能を持つ細胞の増殖反応や最適条件で増殖刺激された細胞の増殖反応においては電磁場の増殖促進効果が明確でないということと、電磁場そのものは細胞の増殖反応を誘起しないということから、これらの研究で観察された現象の生理的意義が不確実であったと考えられる。

本研究では、電場と磁場の影響を切り離して評価できるように超伝導電磁石から発生させた静止磁場を用い、また、結果の解析を容易にするため、被検細胞に単一の細胞集団として扱うことができる株化癌細胞を選んだ。すなわち、マウスのリンパ系腫瘍細胞を磁場内に一定時間保持した後、細胞を磁場から取り出し様々な条件下で培養し、静止磁場への曝露が増殖機能に及ぼす影響を調べた。

2. 材料と方法

細胞：C57BL/6マウス由来の EL-4細胞 (T リンフォーマ細胞) を使用した。使用する細胞がマイコプラズマに感染されていないことは、ヘキスト33258色素による染色によって確認した。

培地と培養条件：RPMI1640培地 (ニッスイ製薬) に、牛胎仔血清 (FCS, ギブコ社) を10%の濃度に加え、L-グルタミンを2mMの濃度に加え、pH 調整のために炭酸水素ナトリウムを適当量加えて完全培地とした。細胞はプラスチックフラスコで継代し、継代操作後2日目の対数増殖期の細胞を実験に使用した。細胞の培養は、37C、加湿条件下、5% CO₂の炭酸ガス培養器で行った。磁場曝露後の細胞と非曝露対照の細胞の増殖能を比較するために、両群の細胞をそれぞれ、96-well 平底マイクロ培養プレートで well あたり625個から40000個まで7段階の細胞濃度で播き、well あたりの培養液を200 μ l にそろえて1~4日間培養し、各時点での well 内の細胞数を、MTT 試薬で細胞を染色して評価した。

磁場の発生と磁場への曝露：磁場は、核磁気共鳴 (NMR) 装置 NMRJNM-EX270 (日本電子) の超伝導電磁石 NM-JSCM2754から発生する、強度6.34テスラの静止磁場を使用した。細胞の磁場への曝露は、 3×10^6 個の細胞を口径10mm のガラス製丸底 NMR サンプルチューブに入れ、チューブ内の培地を8 ml としてシリコン栓で密閉し、チューブを電磁石の中心に静置し、37C に温度を保って行った。全く同様の条件で細胞をサンプルチューブ内に密閉し、37C の孵卵器内に静置して、非曝露対照とした。

MTT 試薬による細胞の染色と細胞数の定量：培養開始後の各時点で、培養プレートを 1000rpm で 10 分遠心し、各 well から 150 μ l の培養液をすて 50 μ l の MTT 溶液を加えて、炭酸ガス培養器内で 8 時間反応させて細胞を染色した⁷⁾。MTT 溶液は MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, シグマ社) を 1mg/ml の濃度でリン酸緩衝液に溶解して得た。反応時間後、各 well の反応液を捨て、100 μ l の dimethyl sulfoxide を各 well に加えて反応産物を完全に溶出した後、490nm と 655nm における各 well の吸光度をマイクロプレートリーダー (model 3550, バイオラド社) により測定し、吸光度の差により各 well 内の細胞数を評価した。Well 内の細胞数と、各 well の吸光度は極めてよい直線関係を示すことが報告され⁷⁾、我々もそのことを予備実験で確認している。

統計学的検定：各時点での実験群と対照群の吸光度の差の検定は、Student's *t*-test により行い、 $P < 0.05$ で有意差ありと判定した。

3. 結 果

(1) 細胞増殖のタイムコースの比較

磁場に曝露された細胞と非曝露細胞の増殖のタイムコースを比較した。結果を図 1 に示す。Well あたりの培養細胞数が 625 で最も少ない場合、非曝露対照群の細胞は培養 2 日目以降に対数増殖期にはいったのに対し、磁場曝露群の細胞は培養 1 日目以降に対数増殖期にはいった (図 1 a)。Well あたりの培養細胞数が 1250 と 2500 の場合、両群の細胞とも 1 日目から対数増殖期の増殖を行い、細胞数倍化時間は両群の細胞でほぼ同じであった (図 1 b, c)。Well あたりの培養細胞数が 5000 から 20000 の場合は、すでに培養 1 日目から 2 日目に両群の細胞とも増殖の勢いが弱まったが、1 日目では明らかに磁場群の細胞数が多かった (図 1 d, e, f)。Well あたりの培養細胞数が 40000 の場合は、両群の細胞とも増殖はみられず、細胞密度の増殖限界と考えられた (図 1 g)。

(2) 細胞増殖の培養密度依存性の比較

磁場曝露群と非曝露群のそれぞれの細胞の増殖における培養密度依存の程度を比較した。結果を図 2 に示す。培養 1 日目から 2 日目にかけて、増殖限界と考えられる細胞密度の well 以外は、明らかに磁場曝露群の細胞数が多かった (図 2 a, b)。しかし、培養日数が 3 日間から 4 日間と長くなるにつれて、培養開始時の細胞密度が多い well から順に磁場曝露群の細胞数と非曝露対照群の細胞数に差がなくなっていく (図 2 c, d)。

4. 考 察

マウスの T リンフォーマ細胞である EL-4 細胞を均一な細胞集団として用い、超伝導電磁石から発生する強い静止磁場に 24 時間曝露して、その後の増殖機能への影響を調べた。そして、静止磁場への曝露は細胞の増殖機能を高めるか、あるいは、高く維持するという結果が得られた。これまでに、電場を伴い周期的に変動する超低周波の磁場がある種の細胞の増殖を促進することが報告されている^{1)~3)}が、これらの研究では、そのような効果が周期的に変動する電場によるものか、磁場によるものか、あるいはその両者によるものかは明らかでなかった。我々の結果は、

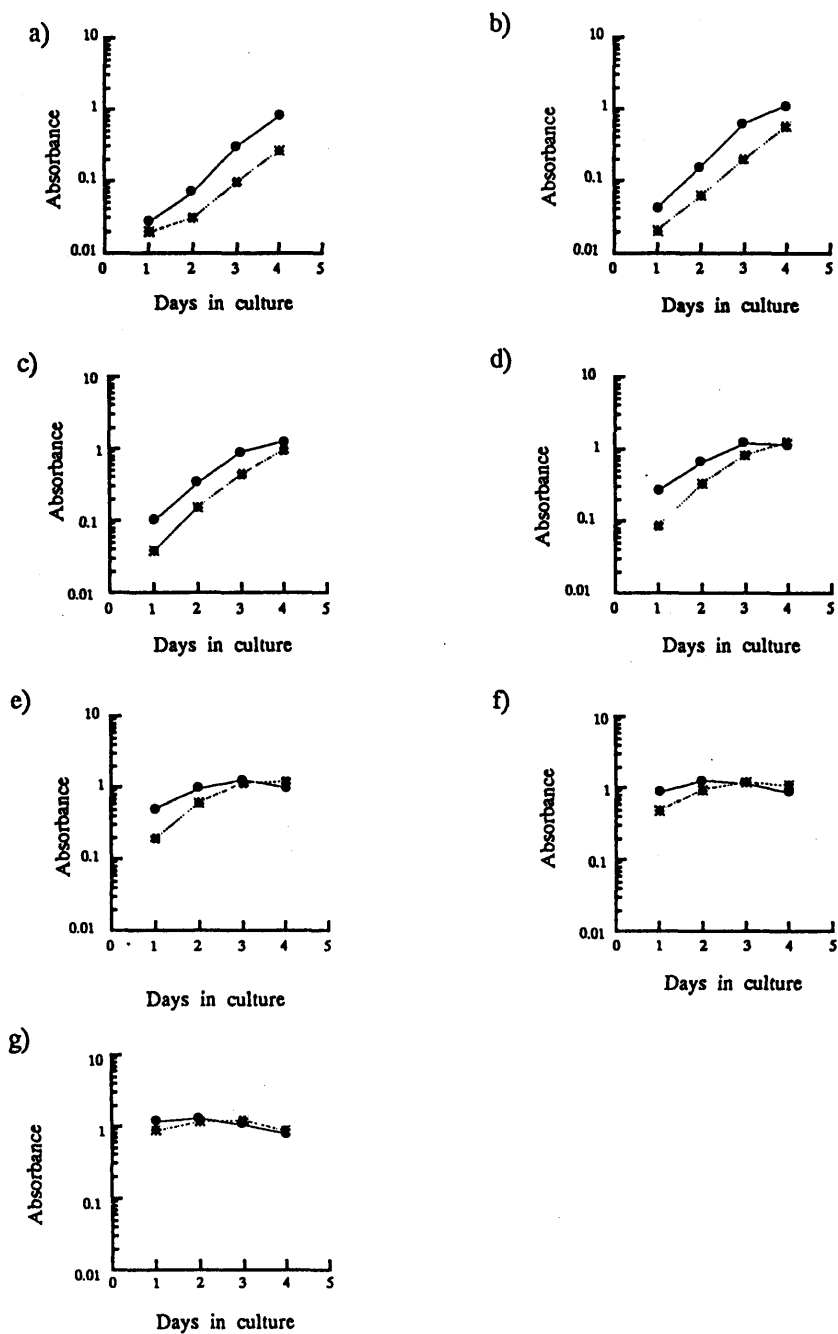


図 1. 静止磁場に曝露された EL-4細胞の増殖活性—増殖の時間依存性の比較—

細胞は96穴培養プレートの各穴あたり a) 625個, b) 1250個, c) 2500個, d) 5000個, e) 10000個, f) 20000個, g) 40000個づつ, 1~4日間培養した。黒丸実線は磁場曝露群を, 灰色四角破線は対照群を, それぞれ示す。

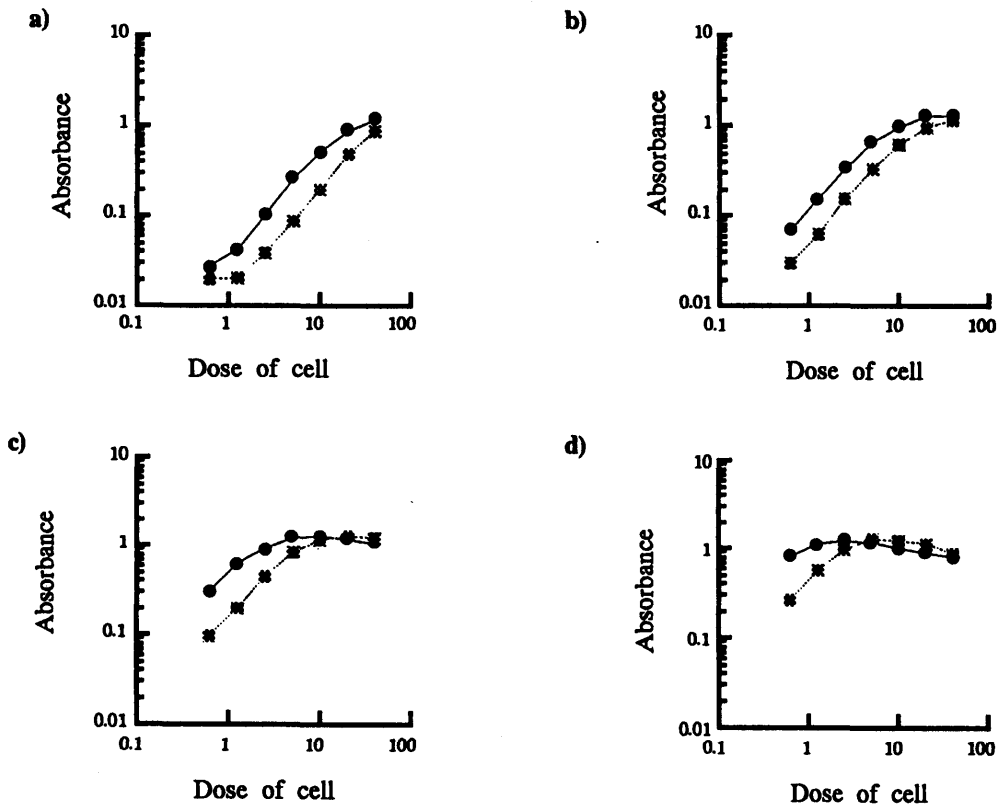


図2. 静止磁場に曝露されたEL-4細胞の増殖活性—培養密度依存性の比較—

細胞は96穴培養プレートの各穴あたり625個から40000個まで数を変えて、a) 1日間、b) 2日間、c) 3日間、d) 4日間培養した。黒丸実線は磁場曝露群を、灰色四角破線は対照群を、それぞれ示す。

少なくとも磁場単独で細胞の増殖機能を増強するというを示している。

また、これまでの研究は、電磁場に曝露されている細胞の電磁場内における増殖反応が促進されることを示したが、我々の研究結果は、静止磁場に曝露された細胞が磁場から取り出された後でも、非曝露対照群の細胞よりも高い増殖活性を保持していることを示している。しかし、対数増殖期に入った細胞の倍化時間は磁場曝露群と非曝露対照群とで顕著な差はないので、両者の増殖活性の差は培養開始時点から対数増殖期にはいるまでに要する時間の差によると考えられる。すなわち、磁場曝露は、培養開始から対数増殖期までのラグタイムを短縮すると考えられる。

細胞が磁場に曝露される時は、直径10mmのNMRサンプルチューブの丸底の狭い空間に 3×10^6 の細胞が自然に沈んだ状態であり、かなり高い細胞密度で24時間保持されたことになる。培地はチューブあたり8 ml入っているので、24時間でチューブ全体として栄養が不足することは考えられない。しかし、磁場曝露時は実験群と対照群ともチューブを直立させ静置しているため、チューブの丸底部分に密集する細胞からの代謝産物の拡散や細胞周囲の酸素、二酸化炭素などのガス交換が不十分となり、磁場曝露24時間の細胞保持条件が最適ではなかった可能性が考えられ

る。つまり、観察された培養開始から対数増殖期までのラグタイムは、磁場曝露の24時間に一部の細胞が休止期に入ったために現れたのであり、静止磁場内では対照に比べ休止期に入る細胞数が少なく、結果的に静止磁場に曝露された細胞集団の増殖活性が高く保持されるようにみえたのかもしれない。このような考え方は、最適条件に満たない培養条件下で低周波電磁場への曝露が細胞の増殖を促進したという報告^{1)~3)}と一致する。

超低周波の電磁場が、レクチンによって刺激されたリンパ球へのカルシウムイオンの流入を促進するという報告^{5), 9), 10)}がある。また、老化して機能の低下したリンパ球を超低周波電磁場に曝露すると、そのリンパ球による増殖因子の一種であるインターロイキン-2 (IL-2) の消費が促進され、IL-2レセプターの発現も促進されるという報告¹¹⁾や、超低周波電磁場への曝露により骨髓細胞からのある種の増殖因子の生産が促進されるという報告¹²⁾がある。これらの実験結果は、超低周波電磁場が適当な条件下でリンパ球などの細胞の増殖を促進する仕組みを説明できる。静止磁場への曝露により細胞増殖が促進される仕組みは不明であるが、超低周波電磁場への曝露と同様に、各種の増殖因子の生産と特異的な増殖因子レセプターの発現の両方が静止磁場への曝露により促進される可能性がある。

以上の考察をとおして、電磁場と磁場が細胞の癌化、癌の増殖、癌の転移を促進する可能性を指摘したい。これらの可能性について実験的に検討する必要があるだろう。

本論文は平成4年度特定研究経費による援助を受けて行われた研究成果の一部であることを付記する。

文 献

- 1) Cantini, M., Cossarizza, A., Bersani, F., Cadossi, R., Ceccherelli, G., Tenconi, R., Gatti, C., and Franceschi, C. Enhancing effect of low frequency pulsed electromagnetic fields on lectin-induced human lymphocyte proliferation. *J. Bioelect.*, **5**, 91-104, 1986.
- 2) Cossarizza, A., Monti, D., Bersani, F., Cantrini, M., Cadossi, R., Sacchi, A., and Franceschi, C. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**, 692-698, 1989.
- 3) Cossarizza, A., Monti, D., Scarfi, M.R., Zannotti, M., Cadossi, R., and Franceschi, C. Exposure to low frequency pulsed electromagnetic fields increases mitogen-induced lymphocyte proliferation in Down's syndrome. *Aging*, **3**, 241-246, 1991.
- 4) Conti, P., Gigante, G.E., Cifone, M.G., Alesse, E., Ianni, G., Reale, M., and Angeletti, P.U. Reduced mitogenic stimulation of human lymphocytes by ELF electromagnetic fields. *FEBS Lett.*, **162**, 156-160, 1983.
- 5) Emilia, G., Torelli, G., Ceccherelli, G., Donelli, A., Ferrari, S., Zucchini, P., and Cadossi, R. Effect of low-frequency, low-energy PEMFs on the response to lectin stimulation of human normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *J. Bioelect.*, **4**, 145-162, 1985.
- 6) Mooney, N.A., Smith, R.E., and Watson, B.W. Effect of extremely low frequency pulsed magnetic fields on the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells. *Bioelectromagnetics*, **7**, 387-394, 1986.
- 7) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation

- and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63, 1983.
- 8) Motoi, S., Hosokawa, T., and Aoike, A. Studies on the pulmonary metastasis of B16 melanoma: Resistance of a highly metastatic subline to NK cell lysis. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.*, **101**, 763-771, 1992.
- 9) Walleczek, J., and Liburdy, R.P. Non thermal 60 Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. *FEBS Lett.*, **271**, 157-160, 1990.
- 10) Lyle, D.B., Wang, X., Ayotte, R.D., Sheppard, A.R., and Adey, W.R. Calcium uptake by leukemic and normal T-lymphocytes exposed to low frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, **12**, 145-156, 1991.
- 11) Cossarizza, A., Monti, D., Cantini, M., Paganelli, R., Montagnani, G., Cadossi, R., Bersani, F., and Franceschi, C. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase interleukine-2 (IL-2) utilization and IL-2 receptor expression in lymphocytes from aged subjects. *FEBS Lett.*, **248**, 141-144, 1989.
- 12) Fitzsimmons, R., Farley, J.R., Adey, W.R., and Baylink, D.J. Frequency dependence of increased cell proliferation, in vitro, in exposures to a low-amplitude, low-frequency electric field: evidence for dependence on increased mitogen activity released into the culture medium. *J. Cell Physiol.*, **139**, 586-591, 1989.