低周波電磁場に曝露されたマウスの免疫機能に関する研究

細川 友秀・宮村美由紀・橋本 哲・沢田 誠二

Studies on the Immune Function of Mice Exposed to a Low Frequency Electromagnetic Field

Tomohide HOSOKAWA・Miyuki MIYAMURA・Satoshi HASHIMOTO and Seiji SAWADA

Received April 28, 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，環境要因としての電磁場と人間の健康について考察するため，通常の交流電流により発生する電磁場内にマウスを一定時間保持して，マウスの体内での腫瘍の増殖と転移および免疫機能に及ぼす交流電磁場の影響を調べた。200V の交流電源を変圧器で250V に変圧してヘルムホルツコイルに接続し，通常の交流電流低周波電磁場を発生させ，マウスを磁場に曝露した。磁場の平均強度は，ケージ内で50～80G（ガウス）であった。近交系の C57BL/6マウスに，抗原として DNP-OVA（ハプテン結合卵白アルブミン）を腹腔内に免疫し，あるいは B16癌細胞（メラノーマ細胞）を背部皮下または尾静脈より接種して，マウスを磁場内に入れて２週間置き，皮下での腫瘍の増殖，肺への転移巣形成数，ハプテン DNP と OVA に特異的な抗体産生反応，および免疫器官の細胞構成を，磁場外に置いた対照群のマウスと比較した。抗原特異的な抗体産生反応は，交流磁場曝露により免疫後１週間前後の反応が増強される傾向がみられた。また，B16メラノーマ細胞を尾静脈より接種後２週間目の肺への癌細胞の転移数は，磁場曝露群で対照群と比べ２～４倍多く，交流磁場曝露により癌の転移が促進される傾向がみられた。３日間交流磁場に曝露したマウスの胸腺では細胞構成に電磁場曝露の影響が認められなかったが，脾臓では CD4陽性細胞が有意に増加し，Ig 陽性細胞は有意に減少した。以上の結果より，日常生活環境にある交流磁場でも，ある種の条件下ではそのような電磁場が我々の免疫機能に影響を及ぼし，また癌の転移を促進するという可能性が示された。本研究の成績は，強力な静止磁場が癌細胞の増殖機能を高く保持するという我々の別の研究の成績[1]とあわせて，静止磁場も電場を伴う変動磁場も共通して磁場が腫瘍細胞の転移機能を促進するという可能性を示す。しかし，２種類の磁場が癌細胞に作用して転移機能を促進する機序はそれぞれ不明であり，今後の研究課題である。

索引語： 低周波電磁場，免疫機能，癌の増殖と転移

Abstract: This paper examines whether a low frequency electromagnetic field affects immune activities, tumor growth and metastasis in an experimental animal model. Two Helmholtz coils were placed parallel to each other, separated by the diamiter of one coil. Two hundred fifty-V, 60-Hz AC power supplied 2.2 A to the coils, generating a low-frequency

electromagnetic field ranging from 5.0×10^{-3} to 8.0×10^{-3} T. Inbred C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally with DNP-OVA in incomplete Freund's adjuvant, or they were injected intravenously or subcutaneously with living B16 melanoma cells and then placed in a breeding cage and exposed to the magnetic field for two weeks. The antigen specific antibody forming responses, the lung metastasis, and growth of injected tumor cells were compared between the exposed group and the non-exposed control mice. The exposed mice tended to produce higher anti-DNP-OVA antibody forming responses eight days after immunization and had two to four times more lung metastatic nodules at day 14 after tumor injection as compared to the controls. These results suggest that even ambient 60-Hz electromagnetic fields may disturb the immune system, promote tumor progression, and injure our health under certain conditions.

Key Words: low frequency electromagnetic field, immune function, tumor growth and metastasis

1. はじめに

我々は，強い静止磁場に曝露された癌細胞の増殖機能が高く維持され，曝露後の癌の増殖と転移が著しく促進されることを観察した[1),2)]。しかし，周期的に変動し電場を伴う低周波電磁場が癌の増殖と転移に及ぼす影響に関する研究報告は少ない。これまでに，十から数十ヘルツの低周波のパルス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，低周波パルス電磁場が増殖機能の低下したリンパ細胞や最適条件でない増殖刺激を受けたリンパ細胞の増殖反応を促進するという結果が報告された[3)~5)]。また，免疫系の細胞以外でも，同様な低周波パルス電磁場がヒトの培養軟骨細胞のコロニー形成を促進し[6)]，培養血管内皮細胞の増殖と血管形成を促進する[7)]という報告がある。これらの報告で，ある条件下で低周波パルス電磁場が正常細胞の培養中での増殖を促進することを示したが，これらの結果は，宿主の防御機構によって抑制された癌細胞の増殖も，低周波パルス電磁場によって促進されるという可能性を考えさせる。低周波電磁場と物理的性状は大きく異なるが同じく磁場である，強い静止磁場が癌細胞の増殖機能を促進するという我々の発見[1)]に促されて，我々はこの可能性を検討することを試みた。

これまでのほとんどの研究は低周波パルス電磁場を使用して実験を行っているが，パルス電磁場は日常環境では特殊な電磁場である。我々は，日常の生活環境にありふれた，60Hzの通常の交流電流により発生する低周波電磁場の影響に関する検討が重要であると考える。本研究では，60Hz交流電源にヘルムホルツコイルを接続して発生する低周波交流電磁場が，マウスの免疫系とマウスにおける癌の増殖と転移に及ぼす影響を調べた。

2. 材料と方法

実験動物：B6.C-H-2^{bm12}（C57BL/6マウスのH-2コンジェニックマウス）を，東京大学医科学研究所，藤原道夫教授より分与していただき，我々の研究室で系統を維持して，3～7カ月齢

の雌雄のマウスを使用した。

抗原と免疫法：ニワトリ卵白アルブミン（OVA, Grade V, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA）に2,4-dinitrophenyl（DNP）基を結合したDNP-OVAを作成[8]して抗原とした。DNP-OVAはFreund's のアジュヴァント（IFA, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA）とともに腹腔内に一匹あたり100 μgずつ投与してマウスを免疫した。免疫後1週間と2週間目に各マウスから採血して個々の血清を-30Cに保存し，DNPとOVAに対する抗体量をELISAで測定した。また，免疫後2週間目に脾臓をとり，脾臓細胞をDNP-OVAとともに培養して，*in vitro*で二次抗体産生反応を誘起した。

脾臓細胞懸濁液の調製：マウスを脱血死させ脾臓を無菌的に取り出し，細胞懸濁液をすでに報告した方法[9]で調整した。

腫瘍細胞：C57BL/6マウス由来のB16.C1細胞とB16.C2細胞（それぞれ，B16メラノーマ細胞の亜株[10]）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（Boehling Diagnostic, La Jolla, California, USA）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，東京）に，牛胎仔血清（FCS, Flow Laboratories, North Ryde, Australia）を5％の濃度に加え，さらに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。B16.C1細胞とB16.C2細胞の培養は，完全培地を使いプラスチックフラスコでモノレーヤー状態に増殖させて行った。そして，3～4日ごとに継代して実験に使用した。脾臓細胞の培養は，完全培地に2－メルカプトエタノールを5×10^{-5}Mの濃度に加えた培地を使い，24穴培養プレート（Falcon, Beckton Dickinson, Lincoln Park, New Jersey, USA）で1穴あたり1×10^{6}個の細胞を2 mlの培地に懸濁して入れ，さらにDNP-OVAを0.1 μg/ml～100 μg/mlの濃度で加えて7日間培養し，培養上清を回収した。これらの細胞の培養は，37C，加湿条件下，5％CO_2の炭酸ガス培養器（BNA111，タバイエスペック，大阪）で行った。

磁場の発生と磁場への曝露：磁場は，ヘルムホルツコイルに60サイクルの通常の交流電源を接続して発生させた。ヘルムホルツコイルは，直径2.15mmの銅線を内径20cmの円周に外径30cmまで厚さ5cm高さ6cmに巻いて作り，同じ仕様のコイルを2つ直列に接続し，両者をコイルの中心部で20cm離して平行に置き，200Vの通常交流電源を250Vに変圧した電源に接続した。コイルに流れる電流は2.2Aであり，ガウスメーター（GK-600P，島津製作所，京都）で測定した磁場強度は，2つのコイルの中心を結ぶ20cmの直線上で5×10^{-3}～8×10^{-3}T（テスラ）（50～80G（ガウス））であった。マウスは，2つのコイルの間にプラスチックのマウス用ケージ（底面でL; 21cm, W; 15cm, 高さ14cm）を挟み，その中に入れて磁場に曝露した。マウスはエサと水を自由に摂取でき，ケージ内を自由に動き回れるようにした。対照群のマウスは，同じ部屋の中でコイルから十分離した同じ仕様のプラスチックケージ内に入れ，エサと水を自由に摂取させ行動を自由にした。

腫瘍の肺転移の測定と背部皮下での腫瘍増殖の測定：B16.C1細胞，あるいはB16.C2細胞を$4\sim5\times10^{5}$個マウスの尾静脈から接種し，2週間後に肺を取り出し，生理食塩水で洗って70％エタノールで固定した。肺の転移巣は実体顕微鏡下で計数した。また，B16.C1細胞2×10^{5}個を50 μlのイーグルMEM培地（ニッスイ製薬，東京）に懸濁して，マウスの背部皮下に接種し，腫瘍の増殖をノギスで週2回測定した。

血清中と培養上清中の抗DNP抗体と抗OVA抗体量の測定：各抗原特異的抗体量はEnzyme-

linked immuno-solvent assay (ELISA) により測定した。ELISA 用マイクロプレート (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, New Jersey, USA) に, 100 μg/ml の OVA, あるいは1 μg/ml の DNP 結合ウシ血清アルブミン (DNP-BSA, BSA (Cohn Fr. V, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) に2,4-dinitrophenyl 基を Eisen の方法[8] で結合) の濃度に吸着用緩衝液に溶解した溶液を, それぞれ各穴に100 μl ずつ分注し, 4C で 1 夜放置し各穴の底面に抗原を吸着させた。翌日, Tween 20 (ナカライテスク, 京都) を0.05％の濃度にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶かした液 (PBS-Tween) で各穴を洗浄後, 蒸留水で10倍希釈したブロックエース液 (大日本製薬, 大阪) で室温 1 時間各穴をブロックした。次に, 各血清あるいは培養上清サンプルを倍々希釈して希釈系列をつくり, それぞれの系列の希釈液を100 μl ずつ各穴に分注し, 室温で 2 時間放置後, PBS-Tween で各穴を 7 回洗浄し, alkaline phosphatase 結合ヤギ抗マウス IgM, あるいは抗マウス IgG 抗体液 (Zymed Laboratories, San Francisco, California, USA) を各穴に100 μl ずつ分注し室温で 2 時間放置した。PBS-Tween で各穴を 7 回洗浄後, パラニトロフェニルリン酸ニナトリウム (ナカライテスク, 京都) をジエタノールアミン緩衝液に 1 mg/ml の濃度に溶解した液を100 μl ずつ各穴に分注し, 室温で適切な時間 (30～60分) 反応させ, 各穴の発色の程度を415nm と450nm の 2 波長でマイクロプレートリーダー (Model 3550, Bio Rad Laboratories, Hercules, California, USA) により測定し, 測定値をコンピューターにより計算し, 各サンプル中の抗体量をユニット数で表した。

蛍光抗体による細胞の染色とフローサイトメトリーによる細胞構成の解析：胸腺と脾臓からそれぞれ細胞懸濁液を調製し, 2 % FCS を含む PBS にて 1×10^7/ml とし, その100 μl にフルオレッセンイソチオシアネート (FITC) 標識抗マウス Thy.1,2抗体 (明治ヘルスサイエンス社, 小田原, 神奈川) のみ, あるいは, フィコエリスリン (PE) 標識抗マウス CD4抗体 (rat IgG2b, clone GK-1.5, Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, California, USA) と FITC 標識抗マウス CD8抗体 (rat IgG2a, clone 53-6.7, Becton Dickinson Immunocytometry System) を適当量加えて遮光し, 氷上に20分静置した。各細胞懸濁液に 2 % FCS-PBS 1 ml を加え遠心して洗浄し, 細胞ペレットを再度1ml の 2 % FCS-PBS に懸濁して, フローサイトメーター (FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry System) にて蛍光抗体による染色の程度を測定し, Consort 30/Lysis ソフトにて解析した。

統計学的検定：実験群と対照群の各測定値の差の検定は, 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) 抗原特異的抗体産生反応と免疫記憶形成に及ぼす影響

DNP-OVA を IFA とともに腹腔免疫したマウスを, 60Hz の交流電磁場内あるいは対照環境に保持して, 1 週間後に部分採血し, 2 週間後に全採血し脾臓を得た。個々の血清サンプル中に含まれる, 抗 DNP 抗体と抗 OVA 抗体について IgM と IgG クラスに分けて定量し, 電磁場曝露群と非曝露対照群の抗原特異的抗体産生反応を比較した。免疫後 8 日目の血清中の抗 DNP 抗体量は, IgM と IgG クラスともに電磁場群の方が対照群よりも多い傾向がみられたが, 統計学的には有意差はなかった (図 1)。同じ血清中の抗 OVA 抗体量は, 抗 DNP 抗体と同様, IgM と IgG クラスともに電磁場群の方が対照群より多い傾向がみられ, さらに, 抗 OVAIgG 抗体量は電磁場

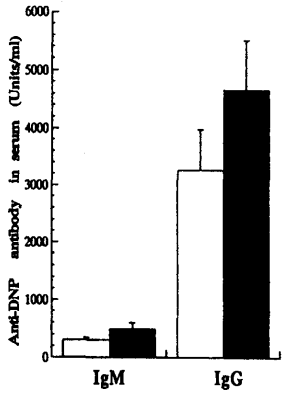

図1．DNP-OVAを免疫後交流磁場内に保持されたマウスの抗体産生反応
——免疫後8日目の血清中の抗DNP抗体濃度——

白いカラムは対照群のマウス，黒色のカラムは磁場曝露群のマウスの抗体濃度を示し，各バーは標準誤差を示す。

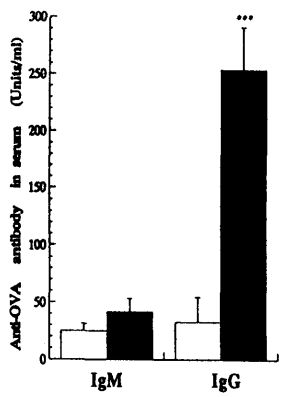

図2．DNP-OVAを免疫後交流磁場内に保持されたマウスの抗体産生反応
——免疫後8日目の血清中の抗OVA抗体濃度——

白いカラムは対照群のマウス，黒色のカラムは磁場曝露群のマウスの抗体濃度を示し，各バーは標準誤差を示す。また，＊＊＊印は，$P<0.01$の危険率で対照群と有意差があることを示す。

群で統計学的に有意に多かった（図2）。

また，免疫2週間後のマウスの個々の脾臓から得た脾臓細胞を個体ごとにDNP-OVAとともに1週間培養し，DNPとOVAそれぞれの抗原決定基にたいする抗体産生反応を起こさせ，両群の脾臓細胞における抗原特異的免疫記憶の発現を，抗DNP抗体と抗OVA抗体産生反応の測定により比較した。結果は有意差はないが，電磁場群マウスの脾臓細胞の培養上清中により多くの抗DNPIgM抗体の産生が認められた（図3）。また，抗OVA抗体産生反応はどちらの群でもほとんど検出されなかった。この結果は，電磁場に曝露されたマウスの方がより免疫記憶を形成しやすい傾向であったことを示す。

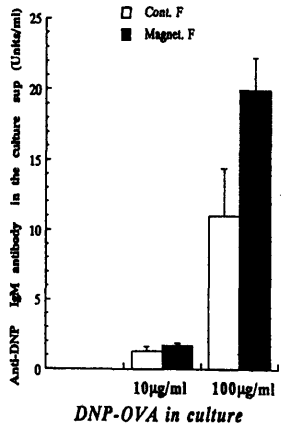

図3．DNP-OVAを免疫後交流磁場内に保持されたマウスの脾臓に形成された免疫記憶——細胞培養による抗DNP免疫記憶の発現——

白いカラムは対照群のマウスの脾臓細胞，黒色のカラムは磁場曝露群のマウスの脾臓細胞をそれぞれ培養し，得られた培養上清中の抗体濃度を示し，各バーは標準誤差を示す。

（2）腫瘍細胞の肺転移巣形成に及ぼす影響

B16.C1細胞を7カ月齢の雄マウスの尾静脈から4×10^5個ずつ注射し，一部のマウスを60Hzの交流電磁場内に，残りのマウスを対照環境に保持して，2週間後に各マウスの肺への腫瘍の転移巣形成数を比較した。結果を表1に示す。統計学的に有意差はないが，電磁場群のマウスにみられた転移巣の平均値は，対照群の約1.5倍であり，電磁場群で腫瘍の肺転移巣が多い傾向であった（表1）。

表1　60Hz交流電磁場に曝露されているマウスにおけるB16.C1細胞の肺転移巣形成

Group	Number of lung metastatic colonies (mean ±1SE)
Control field	213±66
Magnetic field	310±41

次ぎに，転移活性がB16.C1細胞よりやや低いB16.C2細胞を使って同様の実験をくり返した。B16.C2細胞を5カ月齢の雌マウス（実験1）と6カ月齢の雌マウス（実験2）に5×10^5個ずつ尾静脈から注射し，それぞれの実験で一部のマウスを交流電磁場内に，残りを対照環境に保持して2週間後に肺への転移巣形成数を比較した。結果を表2に示す。統計学的に有意差はないが，電磁場群の転移巣の平均値は対照群のそれぞれ約2.3倍と約4.1倍であった（表2）。どの実験でも，1群の個体数が少ないこともあり両群の差は有意ではなかったが，電磁場群で肺転移が促進される傾向の再現性は非常によかった。

表2　60Hz交流電磁場に曝露されているマウスにおけるB16.C2細胞の肺転移巣形成

Group	Number of lung metastatic colonies (mean ±1SE)	
	Expt. 1	Expt. 2
Control field	18±6	2±1
Magnetic field	41±19	8±5

（3）背部皮下に移植された腫瘍の成長に及ぼす影響

B16.C1細胞を2.0×10^5個ずつマウスの背部皮下に接種し，一部のマウスを電磁場内に他のマウスを対照環境下において，腫瘍接種1週間後から2日毎に腫瘍の大きさを測定した。腫瘍塊の発生頻度と発生した腫瘍の発育の速さは，両群間で相違が認められなかった（データ省略）。

（4）胸腺と脾臓の細胞構成に及ぼす影響

電磁場に3日間曝露した3カ月齢の雄マウスの胸腺と脾臓の，Thy.1陽性，CD4/CD8共陽性(DP)，CD4陽性，CD8陽性，あるいは，表面抗体（Ig）陽性細胞の構成割合を，それぞれ，非曝露対照群のマウスと比較した。胸腺では，それぞれの表面マーカー陽性細胞の構成割合は両群間で違いが認められなかった（データ省略）。しかし，脾臓では，Thy.1陽性細胞とCD8陽性細胞の構成割合は両群間で違いが認められなかったが，CD4陽性細胞の割合は電磁場群で有意に増加し，また，逆にIg陽性細胞の割合は電磁場群で有意に減少していた（図4）。

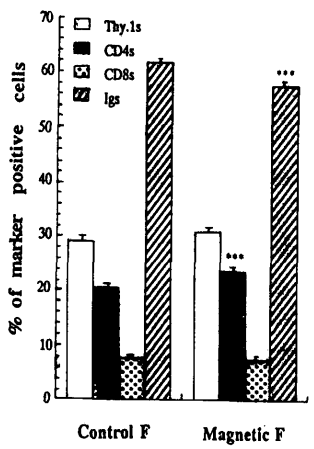

図4　3日間交流電磁場に曝露されたマウスの脾臓の細胞構成

全脾臓細胞中に占める，Thy.1，CD4，CD8，およびIg分子を細胞表面に持つ細胞の割合を%で示す。各バーは標準誤差を示し，＊＊＊印は対照群に比べそれぞれ有意差（$P<0.01$）があることを示す。

しながら，他方で磁場曝露により腫瘍細胞の転移も促進される傾向が認められた。

通常の交流電磁場ではないが，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[11)~13)]がある。また，老化して機能の低下したリンパ球を低周波電磁場に曝露すると，そのリンパ球によるインターロイキン－２（IL-2，リンパ球の増殖因子）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[14)]や，低周波電磁場への曝露により骨髄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[15)]がある。これらの実験結果は，適当な条件下では低周波電磁場がリンパ球などの細胞の増殖を促進することを示している。リンパ球の増殖に関しては，増殖刺激あるいは増殖条件が最適条件よりも弱いあるいは悪い場合に，電磁場の増強効果が顕著にみられたと報告されている。我々の実験結果では，DNP に対する抗体産生よりも OVA に対する抗体産生がより顕著に増強され，また，IgM 抗体産生よりも IgG 抗体産生の方がより顕著に増強された。DNP-OVA を免疫すると，通常 DNP 抗原決定基に対する抗体産生の方が OVA 抗原決定基に対する抗体産生よりも，また，IgM 抗体産生の方が IgG 抗体産生よりも容易に誘起される。それゆえ，我々の結果は，より弱い条件の OVA 抗原決定基に対する IgG 抗体産生反応が，顕著に電磁場により増強されたのではないかと考えられる。

交流磁場への曝露により，適切な条件下で免疫機能は増強されたが，他方で，我々の結果は，同じ磁場への曝露によって腫瘍の転移が促進される可能性を示した。今回の研究で用いた B16細胞はナチュラルキラー（NK）細胞に感受性が高く，この腫瘍細胞の転移は NK 細胞によって顕著に抑制される[10)]。それゆえ，磁場曝露によって NK 細胞などの抗腫瘍免疫機能が低下し，その結果腫瘍の転移が促進されたという可能性が考えられる。我々の今回の結果から，磁場曝露によって弱い抗体産生反応が増強されることが示されたが，NK 細胞やマクロファージの抗腫瘍活性が交流磁場によって，増強されるのか，抑制されるのか，あるいは影響されないのか，は不明である。この点については，今後検討する必要がある。

１個の腫瘍細胞が肺での転移先の毛細血管の内皮に着床し，さらにそこで増殖し転移巣として腫瘍塊を形成するのは，宿主の抗腫瘍免疫系からの攻撃などの悪条件下である。腫瘍細胞といえども細胞であり，最適でない条件下での増殖はリンパ球の増殖と同様に，電磁場曝露により促進されることが十分考えられる。今回の結果もこの考え方で説明できるかもしれない。McLean ら[16)]は，通常の60Hz の交流電流をコイルに通電して発生する交流磁場が化学発癌を促進するかどうか検討した。彼らの成績は，統計学的に有意差はないが，化学発癌物質によって発生した癌の成長が交流磁場によって促進される傾向であり，また，交流磁場は発癌のプロモーターとしては作用しないことも示唆した。彼らの成績は，転移先の悪条件下での腫瘍の増殖を電磁場曝露が促進するという我々の考えを支持する。しかしながら，我々の今回の結果では，背部皮下での移植腫瘍の増殖には磁場曝露は影響を示さなかった。この違いは，皮下に接種された腫瘍細胞は，2×10^5個であり，着床時の細胞数が，肺への転移（おそらく１個）に比べ圧倒的に多いことに起因すると考えられる。

３日間電磁場曝露されたマウスの脾臓では，CD4陽性細胞の割合が有意に増加し，逆に，Ig 陽性細胞の割合が有意に減少していた。CD4陽性細胞は主に抗体産生を促進するヘルパー T 細胞を含み，この細胞の増加は抗体産生の増強とよく一致する。しかし，CD4陽性のヘルパー T 細胞には，インターフェロン－γを産生して NK 細胞やマクロファージの活性を増強するような，抗腫瘍機能を促進する細胞も含まれるため，この点に関してはさらに詳細な検討が必要であろう。

以上の考察をとおして，我々は，通常の生活環境にある交流電磁場といえども，ある種の条件下では我々の免疫機能を増強的にあるいは抑制的に修飾し，癌の転移を促進する可能性を指摘したい。

本論文は平成5年度教育研究学内特別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。

文　献

1）細川友秀，谷岡直子，沢田誠二．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．*京都教育大学紀要 Ser, B*, **85**, 本誌に掲載されるページ数, 1994.

2）谷岡直子，細川友秀．磁場曝露されたB16メラノーマ細胞の増殖能力及び肺転移能力．*日本免疫学会総会・学術集会記録*, **23**, 489, 1993.

3）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.

4）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.

5）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.

6）Sakai, A., Suzuki, K., Nakamura, T., Norimura, T., and Tsuchiya, T. Effects of pulsing electromagnetic fields on cultured cartilage cells. *Int. Orthop.*, **15**, 341-346, 1991.

7）Yen-Patton, G.P.A., Patton, W.F., Beer, D.M., and Jacobson, B.S. Endothelial cell response to pulsed electromagnetic fields: Stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro. *J. Cell. Physiol.*, **134**, 37-46, 1988.

8）Eisen, H.N., Belman, S., and Carsten, M.E. The reaction of 2,4-dinitrobenzene-sulfonic acid with free amino group of proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4583-4585, 1953.

9）細川友秀．簡易化動物細胞培養を組み入れた生命科学学生実験の試み．*京都教育大学環境教育研究年報*, **2**, 65-72, 1994.

10) 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.

11) 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.

12) Walleczek, J., and Liburdy, R.P. Non thermal 60 Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances $^{45}Ca^{2+}$ uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. *FEBS Lett.*, **271**, 157-160, 1990.

13) 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.

14) 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.

15) 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.

16) McLean, J.R.N., Stuchly, M.A., Mitchel, R.E.J., Wilkinson, D., Yang, H., Goddard, M., Lecuyer, D.M., Schunk, M., Callary, E., and Morrison, D. Cancer promotion in a mouse-skin madel by a 60-Hz magnetic field: II. Tumor development and immune response. *Bioelectromagnetics*, **12**, 273-287, 1991.