癌細胞のアポトーシスに及ぼす静止強磁場の影響

細川友秀*・西村尚子**・沢田誠二*

Effect of a Strong Static Magnetic Field on Noradrenaline-induced Apoptosis of Tumor Cells

Tomohide HOSOKAWA, Naoko NISHIMURA and Seiji SAWADA

Received October 13, 1995

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た強力な静止磁場がほ乳類の癌細胞のアポトーシス（細胞自滅，細胞死）の過程に及ぼす影響を調べた。マウスのTリンパ系の癌細胞であるEL-4細胞を適当な濃度のノルアドレナリンとともにインキュベートすることにより，アポトーシスの過程が誘導された。インキュベーション時間の増加に伴ってアポトーシスは誘導され，インキュベーション開始後2時間前後からミトコンドリアの酵素活性が低下し始め，時間の経過とともにさらに進行した。また，核内DNAの断片化もインキュベーション開始後4時間前後から観察され，時間の経過とともに徐々に進行した。さらに，いったんアポトーシスを誘導するシグナルが細胞内に入ると，ノルアドレナリンを除去してもアポトーシスの過程の進行を停止することは出来ないことが分かった。そして，静止強磁場はEL-4 細胞のアポトーシスの過程を促進することが分かった。アポトーシス促進の機序として，磁場がカルシウムイオンの細胞質内への流入を促進することが考えられる。

索引語：　静止強磁場，癌細胞，アポトーシス

Abstract：　Recently, electromagnetic fields have attracted public attention as an environmental factor which may seriously affect health. In this paper, we examined whether a strong static magnetic field generated by a superconductive electromagnet modifies the process of apoptosis (programmed cell death) in mammalian cells. Mouse EL-4 T-lymphoma cells (a kind of malignant T-lymphoid cell) were treated with an appropriate

* 京都教育大学教育学部
** 京都教育大学教育学部生命科学専攻

concentration of noradrenaline (norepinephrine) at 37 ℃ in a CO_2 incubator. After about 2 hours of incubation, enzymatic activities of mitochondria started to decline and the decline continued constantly with incubation time. After about 4 hours of incubation, fragmentation of the nuclear DNA started and the fragment DNA gradually increased with time. When EL-4 cells were incubated with noradrenaline for 4 hours in a strong static magnetic field at 6.34 T (Tesla) at 37 ℃, the magnetic field accelerated the process of apoptosis. It is possible that the magnetic field may accelerate the process by promoting the influx of Ca^{2+} into cytoplasma through the calcium ion channel. Then, the increased concentration of Ca^{2+} ion in the cytoplasma ($[Ca^{2+}]i$) could lead to earlier activation of endonuclease that cause DNA fragmentation.

Key Words : strong static magnetic field, lymphoma cell, apoptosis

1. はじめに

人間の健康に影響を与える環境要因としての電磁場が最近一段と注目を集め，様々な電磁場が生体の機能に有意な影響を及ぼすという報告が増加している。培養細胞の増殖機能に及ぼす影響についてはいくつかの研究があり，電磁場は一定の条件下で種々の細胞の増殖を促進するという報告が多い[1)~3)]。我々も，強い静止磁場が癌細胞の増殖と転移を有意に促進することをすでに報告した[4)]。

細胞にとって増殖機能は基本的で重要な機能であるが，それと同等に重要な細胞の機能として“自殺”機能がある。すなわち，細胞は本質的に自己消去の機構を備えており，必要に応じてその機構を作動して自己を消滅させる。この自己消去はアポトーシス（細胞自滅）と呼ばれ，初期発生における形態形成，神経系ネットワークの形成，免疫系の形成などに際して必須の機能である。通常，癌細胞でもアポトーシスの機構を保持し，適切な刺激によってアポトーシスの機構を作動させれば癌細胞を自滅させることができる。このように，アポトーシスは増殖と同等に重要で本質的な細胞の機能である。にもかかわらず，アポトーシスの過程に及ぼす磁場の影響の研究はこれまで行われていない。このような研究は，アポトーシスが胎児の形態形成，神経系の形成や免疫系の形成などにおいて不可欠の過程であるため，妊娠と胎児の正常な発育に及ぼす磁場の影響について評価するときの基礎的知見をもたらすと考えられる。

本研究では，マウスのT細胞腫瘍である EL4 細胞に，種々の濃度のノルアドレナリンを作用させて様々な時間培養して，ノルアドレナリンによるアポトーシス誘導の条件を検討した。そして，適切なノルアドレナリン濃度と培養時間をいくつか選び，EL4 細胞を対照群と磁場群に分け，磁場群を本学の理学科に設置されている NMR 装置の超伝導電磁石より発生する，最高6.34 $\times 10^4$ ガウスの静止磁場に暴露しつつ培養し，対照群は通常の培養をして，アポトーシスの過程に及ぼす磁場の影響を評価した。

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：RPMI 1640培地（ニッスイ製薬）に，牛胎仔血清（FCS，フローラボラトリー）を10%の濃度に加え，L-グルタミンを2 mM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，37℃，加湿条件下，5 %CO_2の炭酸ガス培養器で行った。

ノルアドレナリンの濃度調整：L-ノルアドレナリン（ナカライテスク）をRPMI 1640培養液に加え，さらに5 N塩酸を加えて完全に溶解し，0.5mg/ml，もしくは1.0mg/mlの濃度の溶液をつくり，0.2㎜のポアサイズのフィルター（コーニング）を通して滅菌した。さらに培養液で希釈を繰り返し，最終濃度1.5×10^{-3}Mから6.0×10^{-8}Mまで種々の濃度のノルアドレナリンとともに細胞をインキュベートした。また，ノルアドレナリンを溶解するために加えた塩酸のコントロールとして，最高の最終濃度のノルアドレナリンを含む培養中に含まれる塩酸と同じ濃度の塩酸を含み，ノルアドレナリンを含まない培養をpHコントロールとした。

磁場の発生と細胞の磁場への曝露：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，5×10^6個の細胞を口径10㎜長さ20㎜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，37℃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，37℃の孵卵器内に静置して，非曝露対照とした。実験によっては，培地に適当濃度にノルアドレナリンを加えて細胞を磁場に曝露し，非曝露対照のチューブは同濃度のノルアドレナリンを加えたものと加えないものを一本づつ用意し，37℃の孵卵器内に静置した。

トリパンブルー染色による死細胞と生細胞の判別：トリパンブルー（ナカライテスク）0.2 gを100mlのPBSに溶解して，その75μlを細胞懸濁液25μlに加えて混合し死細胞を染色し，染色されない細胞を生細胞と判定した。

MTT試薬による細胞の染色と細胞数の定量：96-well培養プレートの各wellに，種々の濃度に細胞を懸濁した完全培地を200μlづつ入れて種々の時間培養後，培養プレートを1000rpmで10分間遠心し，各wellから150μlの培養液をすて50μlのMTT溶液を加えて，炭酸ガス培養器内で3時間反応させて細胞を染色した[5]。MTT溶液は，MTT（3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]- 2,5-diphenyltetrazolium bromide，シグマ）を5 mg/mlの濃度でリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解して得たものを，必要時にPBSで5倍希釈して使用した。反応時間後，各wellの反応液を捨て，100μlのdimethyl sulfoxide（ナカライテスク）を各wellに加えて反応産物を完全に溶出した後，595nm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）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[5]，我々もそのことを予備実験で確認している。

ヨウ化プロピジウム（PI）による核DNAの染色とフローサイトメトリー：アポトーシスによる核DNAの断片化の程度を測定するために，ヨウ化プロピジウム（PI）による核DNAの染色とフローサイトメトリー[6]を行った。略記すると，5×10^5個のサンプル細胞をPBSに縣濁し1000 rpmで10分間遠心し上清をすてた後，Triton X-100（ナカライテスク）を0.1%の濃度で含む，0.1%のクエン酸三ナトリウム水溶液中にヨウ化プロピジウム（PI，カルビオケミカル）を50

μg/mlの濃度に溶解した溶液1mlを加えて優しく懸濁した。その懸濁液を遮光し約1時間氷上で反応させた後，遠心し上清をすて，FCSを1％含むPBS 1mlで再び懸濁した。懸濁液をナイロンメッシュに通した後，FACScan（ベクトンデッキンソン）によりフローサイトメトリーを行い，細胞核あたりのDNA量を測定しDNAの断片化を評価した。

ノルアドレナリン処理された細胞の増殖活性の測定：プラスチックチューブにEL-4細胞を5.0×10^5個づつ分注し，1.5×10^{-3}M，6.0×10^{-4}Mまたは0M（control）の濃度のノルアドレナリンとともにCO_2インキュベーター内で，0，2，4，6，または8時間インキュベートした。それぞれのインキュベーション時間終了後，遠心操作により細胞懸濁液からノルアドレナリンを洗浄除去し，チューブごとに通常の培養液に細胞を再懸濁し，96-well培養プレートの各wellに1.0×10^4個づつ分注し，インキュベーション時間の合計が24時間になるように，それぞれ，さらに24，22，20，18，または16時間培養し，各wellで増殖した細胞数をMTT染色により評価した。

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) EL-4細胞のノルアドレナリンによる処理条件の検討

EL-4細胞を10段階の濃度のノルアドレナリンとともに様々な時間インキュベートし，細胞の生存と増殖機能に及ぼす影響を調べた。すなわち，96-well培養プレートにEL-4細胞を1250 cells/wellと2500 cells/wellの2種類の濃度で分注し，それぞれの培養に添加するノルアドレナリン濃度は，3.0×10^{-3}～6.0×10^{-8}Mの10段階と，さらに，無添加のmedium controlとpH controlを加え計12種類とした。そして細胞を37℃，加湿条件下，5％CO_2，95％ airのCO_2インキュベーター内で，16，24，または48時間インキュベートした後，MTT染色を行い各wellの吸光度によってwellあたりの細胞数を評価した（図1）。medium controlとpH controlを比較すると，pH controlのほうが多少吸光度は低いが，ノルアドレナリンがアルカリ性であるため，ノルアドレナリン添加群の培養では塩酸の影響はほとんど考慮しなくてよいと考えられる。どの培養時間においても，ノルアドレナリンの濃度が6.0×10^{-5}Mと3.0×10^{-5}Mで吸光度が減少した。それよりうすいノルアドレナリン濃度のwellの吸光度は，2つのコントロール（medium controlとpH control）のwellの吸光度とほぼ同じ値を示し，インキュベート時間の増加に従い増加し，well内で細胞が増殖していることを示した。そして，6.0×10^{-4}M以上のノルアドレナリン濃度では，再び吸光度が上昇しているが，顕微鏡で観察する限りそれらのwellでは細胞の増殖はなく生細胞もほとんどないようにみえた。また，これらのwellでは，インキュベートする時間が延びるにつれて逆に吸光度が減少する傾向がみられることからも，well内で細胞が増殖しているとは考えにくい。これらのwellではノルアドレナリンの濃度が増加すると吸光度の増加がみられたことから，ノルアドレナリンはMTT試薬と反応し発色させる可能性が考えられる。このことは，細胞を含まず各濃度のノルアドレナリンのみを各wellにいれ，24時間または48時間インキュベートしてMTT染色を行った結果から確認された（図1B，1C）。ノルアドレナリンのみのwellの吸光度は，24時間インキュベートでノルアドレナリン濃度が6.0×10^{-4}M以上で上昇し，48時間後でも3.0×10^{-3}Mで高い値を示した。これらの各点での吸光度は，それぞれ対応する濃度のノルアドレナリンと細胞をインキュベートしたwellの吸光度の値とほぼ一致している。以

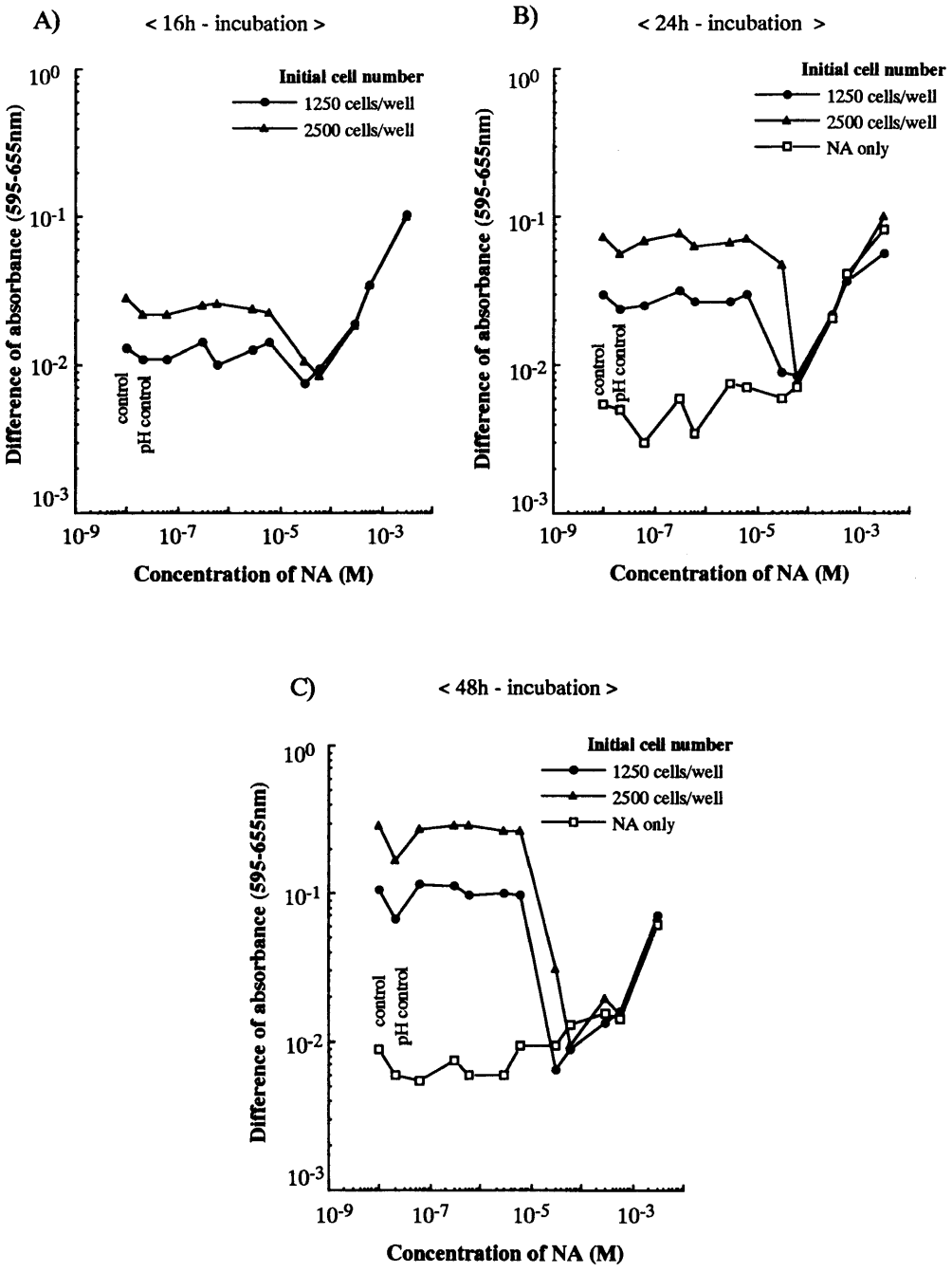

図1.　EL-4細胞の増殖に及ぼすノルアドレナリンの影響

細胞は96-well培養プレートの各wellあたり1250個または2500個づつ，16時間（A），24時間（B），または48時間（C）培養した。

上の結果より，細胞を含むwellで最低の吸光度を与えるノルアドレナリンの濃度あるいはそれ以上の濃度では，培養24時間後にEL-4細胞はMTTの発色反応にほとんど関与せず死滅していると考えられる。

(2)　ノルアドレナリンによる早期の細胞障害のインキュベーション時間依存性

プラスチックチューブにEL-4細胞を5.0×10^5 cells分注し，3.0×10^{-3} M，1.5×10^{-3} M，6.0×10^{-4} Mまたは0 M（control）の濃度のノルアドレナリンとともにCO_2インキュベーター内で，0，2，4，6，または8時間インキュベートし，細胞死に至る前の早期の細胞障害の有無について調べた。それぞれのインキュベーション時間終了後，遠心操作により細胞懸濁液からノルアドレナリンを洗浄し，以下の3項目の測定，すなわち，(a)トリパンブルー染色による細胞膜の選択的透過性機能の測定，(b)MTT染色によるミトコンドリア酸化還元酵素機能の測定，(c)PI染色による核内DNAの断片化の程度の測定，を行った。

(a)のトリパンブルー染色による細胞膜の選択的透過性機能の測定の結果を図2に示す。EL-4細胞を3.0×10^{-3} M，6.0×10^{-4} Mまたは0 M（control）の濃度のノルアドレナリンとそれぞれの時間インキュベート後，洗浄し直ちにトリパンブルーで染色し，インキュベート時間の増加に伴う染色細胞数の増加をcontrol群と比較した。しかし，インキュベート時間の増加に伴う染色細胞数の増加はどの群にもみられず，どの群の細胞にも障害は全くみられなかった。それゆえ，細胞膜の選択的透過性機能に基づく判定では，調べた濃度のノルアドレナリンとの8時間までのインキュベーションによってはEL-4細胞は細胞障害を起こさないと判断される。

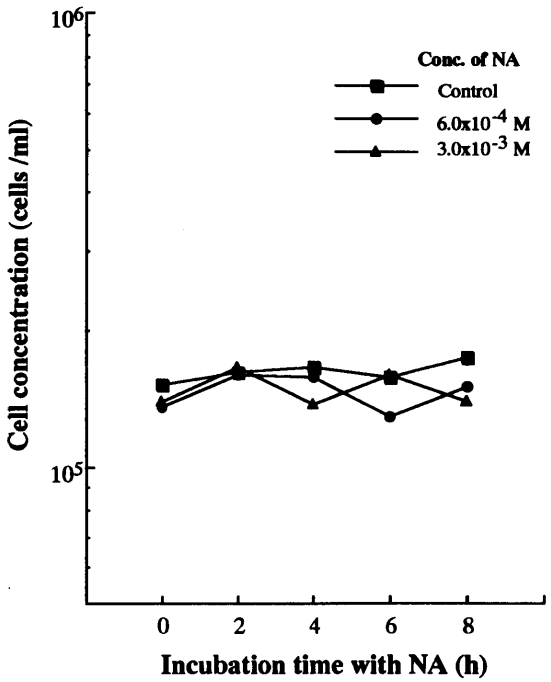

図2.　ノルアドレナリンとのインキュベーション時間に依存する細胞障害－細胞膜の選択的透過性について

ノルアドレナリンと0～8時間インキュベート後直ちにトリパンブルーで染色し，染色されない細胞を生細胞としてカウントした。

次に，(b)のMTT染色法によるミトコンドリア酸化還元酵素機能の測定の結果を図3に示す。EL-4細胞を1.5×10^{-3} M，6.0×10^{-4} Mまたは0 M（control）の濃度のノルアドレナリンとそれぞれの時間インキュベート後，洗浄し，96-wellマイクロプレートの各wellに1×10^4個/200 μ lづつ分注し，直ちにMTT試薬で染色し，インキュベート時間の増加に伴う染色性の変化をcontrol群と比較した。すなわち，各インキュベーション時間でのcontrol群細胞の吸光度を1として，それに対するノルアドレナリン群の細胞の吸光度の比をとり，インキュベー

ション時間の増加に伴う比の値の変化を調べた。ノルアドレナリンとのインキュベーションが2時間で，わずかにMTT染色性が下がる傾向がみられ，さらにインキュベーション時間が6時間までのびるに伴い染色性は直線的に低下し，8時間のインキュベーションでは，control群細胞の吸光度の40%程度まで低下した（図3）。この結果から，ミトコンドリアの酸化還元酵素の機能障害が，ノルアドレナリンとEL-4細胞とのインキュベーション後かなり早期に起こることが示された。

次に，(c) PI染色による核内DNAの断片化の程度の測定結果を図4に示す。(b)の場合と同様，EL-4細胞をノルアドレナリンとそれぞれの時間インキュベート後，洗浄し，ただちにPI染色液にて各群の細胞を処理し，核内の染色体DNAを染色し，フローサイトメトリーを行い断片化されたDNAの割合を調べた。ノルアドレナリンとのインキュベーション時間が2時間の段階では，control群とノルアドレナリン群の間には差はなかった。しかし，インキュベーションが4時間を超えると両群間に差があらわれ始め，ノルアドレナリン群の細胞で断片化されたDNAの割合が高くなり，インキュベーション時間の増加に伴い断片化されたDNAの割合は大きくなった。また，4時間以上のインキュベーション時間では，ノルアドレナリン濃度の高い方がDNA断片化が顕著であった（図4）。

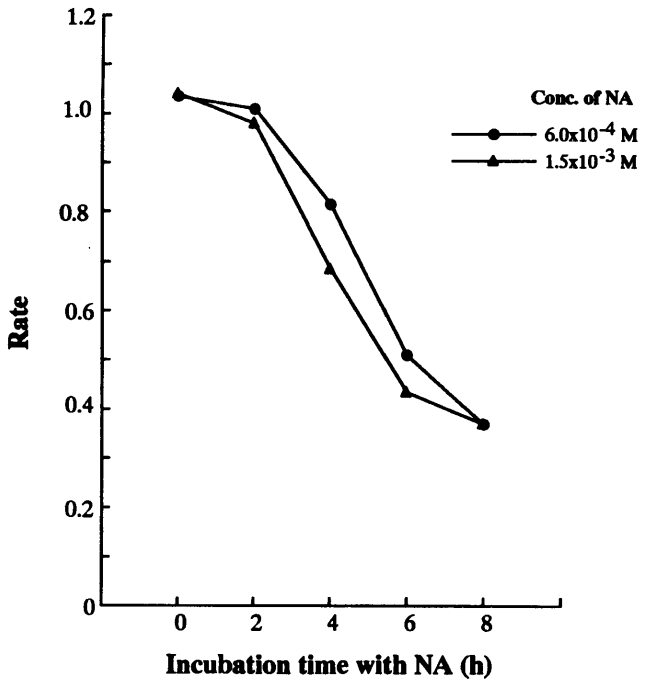

図3.　ノルアドレナリンとのインキュベーション時間に依存する細胞障害－MTTによる染色性について

ノルアドレナリンと0～8時間インキュベート後直ちにMTTによる染色をおこない，ノルアドレナリンを含まない培養液でそれぞれの時間インキュベートした細胞の吸光度にたいする，実験群の細胞の吸光度の比を求めた。

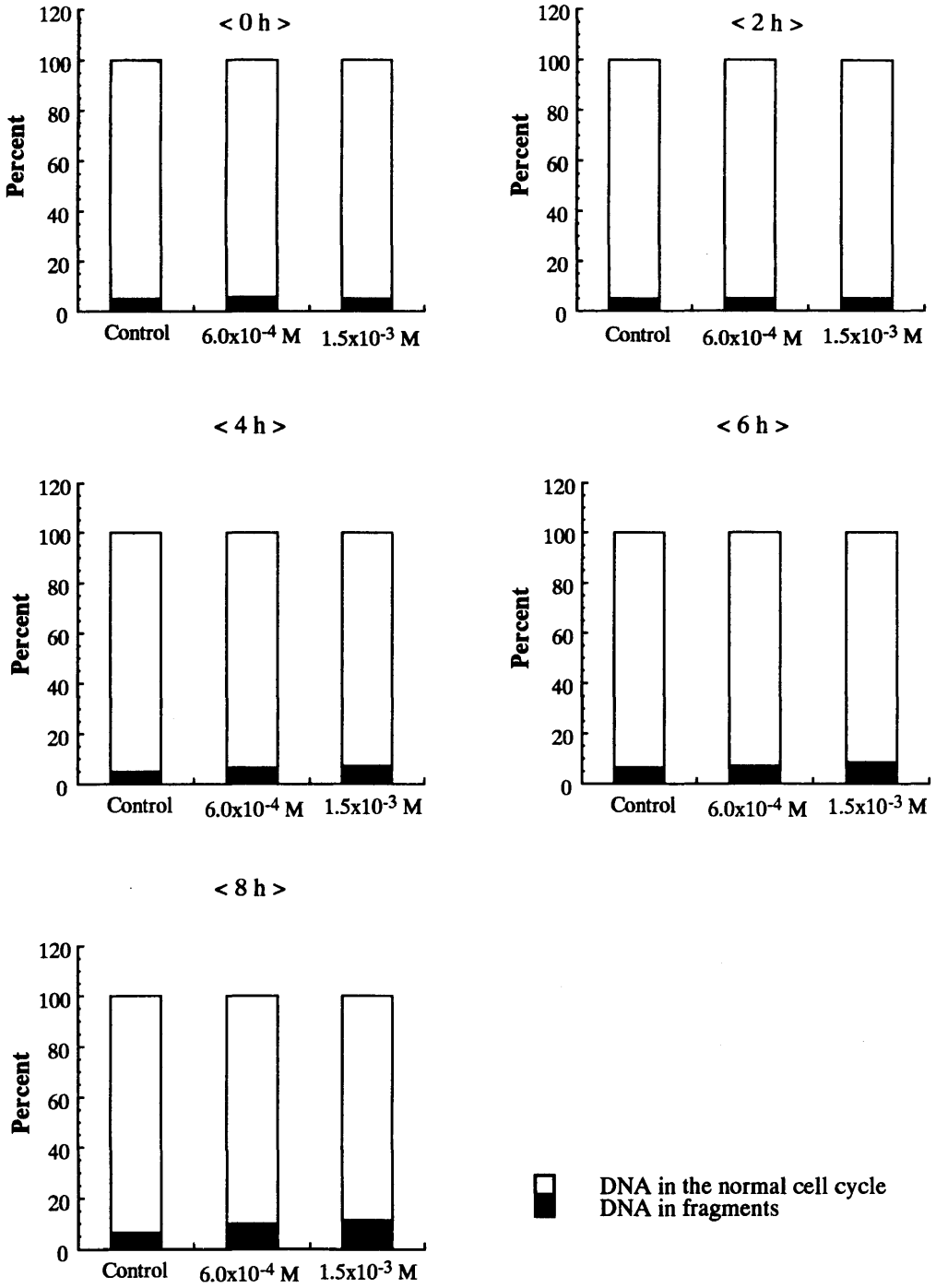

図4. ノルアドレナリンとのインキュベーション時間に依存する細胞障害－染色体DNAの断片化について
ノルアドレナリンと0～8時間インキュベート後直ちにPIによる染色をおこない，フローサイトメトリーを行って断片化されたDNAの割合の，インキュベーションによる変化を求めた。

(3) ノルアドレナリンで処理されたEL-4細胞の増殖機能

ノルアドレナリンとのインキュベーション時間が2時間を超えると，EL-4細胞のミトコンドリアの酵素活性に障害がみられ始め，インキュベーション時間の増加と共にそれが増大すること，また，インキュベーション時間が4時間を超えると核のDNAの断片化が始まることが分かった。そこで，ノルアドレナリンと4時間または8時間インキュベーションした後に，細胞を洗浄して，ノルアドレナリンを含まない通常の培養液に懸濁し，96-wellプレートでwellあたり1.0×10^4 cellsの細胞密度で培養し，4時間ごとにMTT染色を行い各well内での細胞数を評価してノルアドレナリン処理細胞の増殖機能を調べた（図5）。

ノルアドレナリンと4時間インキュベートした後の細胞は，ノルアドレナリンの濃度が6.0×10^{-4}Mでは，ノルアドレナリンを洗浄した直後ですでに，controlと比較して吸光度が低くミトコンドリアの障害がみられた。そして，この細胞を培養したwellでは，培養時間の増加に伴う吸光度の変化はほとんどなかった。また，1.5×10^{-3} Mの濃度のノルアドレナリンで処理した細胞を培養したwellでは，培養時間の経過とともに吸光度は減少した。これらの結果から，4時間ノルアドレナリン処理したEL-4細胞は，洗浄によりノルアドレナリンを除去しても不可逆的に細胞障害が進行し，培養時間の経過につれて細胞死にいたると考えられる（図5-A）。この傾向は，8時間のノルアドレナリン処理をしたEL-4細胞でさらに顕著であった。すなわち，6.0×10^{-4} Mの濃度のノルアドレナリ

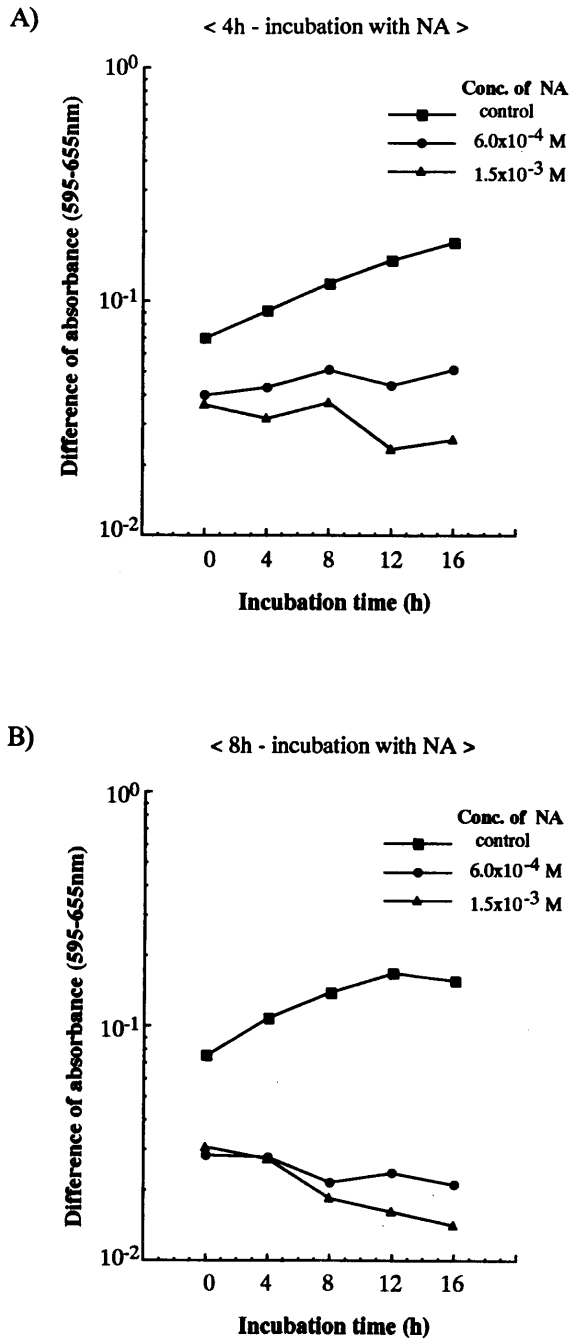

図5. ノルアドレナリン処理されたEL-4細胞の増殖機能

2種類の濃度のノルアドレナリンと，または，ノルアドレナリンを含まない培養液で4時間（A）または8時間（B）インキュベーションした細胞を96-wellプレートで種々の時間培養し，MTT染色して増殖機能を調べた。

ンで処理した細胞でも培養時間の経過につれて吸光度は減少し，1.5×10^{-3} M の濃度のノルアドレナリンで処理した細胞では，培養時間の経過に伴う吸光度の減少はさらに顕著であった（図5-B)。これらの結果から，ノルアドレナリン処理を8時間行った場合，ノルアドレナリンを除去した後も，処理中に始まった細胞障害は進行し，16時間の培養後（ノルアドレナリン処理時間を含めて24時間のインキュベーション後）にはほとんどの細胞がアポトーシスにより死滅することが分かった。

次に，ノルアドレナリン処理時間の長さと処理後の細胞が保持する増殖活性との関係をさらに詳細に調べた。結果を図6に示す。control 群の細胞はチューブでのインキュベーション時間の長さにかかわらず，合計24時間のインキュベーション中にどの control 群の細胞も同じように増殖し，各 well の吸光度がほぼ同じ値を示し，well あたりほぼ同様の細胞数に達した。ノルアドレナリン処理群の細胞については，ノルアドレナリンとのインキュベーション時間が長くなるにつれて，培養終了時点での各 well の吸光度が直線的に減少し，well あたりの細胞数が減少した。この結果は，ノルアドレナリンとのインキュベーション時間の増加に伴い細胞の増殖能力が失われることを示し，また，増殖能力の減衰はノルアドレナリンの濃度が濃いほど速く進むことを示す。

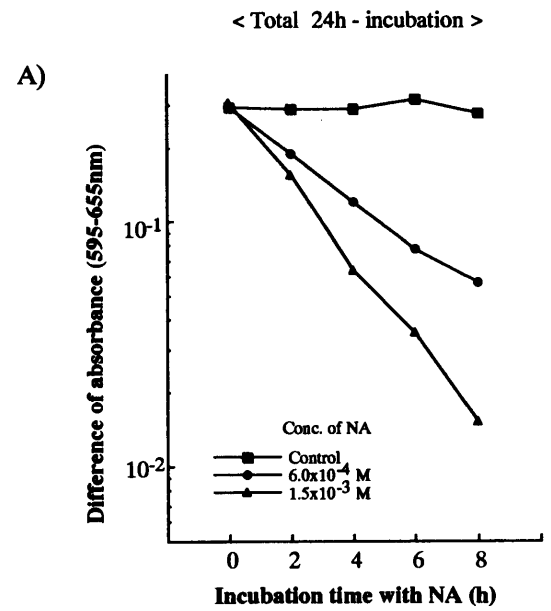

図6. ノルアドレナリンとのインキュベーション時間に依存した EL-4 細胞の増殖能力の減少

2種類の濃度のノルアドレナリンと，または，ノルアドレナリンを含まない培養液で0，2，4，6，または8時間インキュベーションした細胞を96-well プレートで合計24時間のインキュベーションになるように，それぞれ24，22，20，18，または16時間培養し，MTT 染色して増殖機能を比較した。

アポトーシスの過程における磁場の影響を調べるためには，一部の細胞にアポトーシスの過程が起こり一部の細胞は増殖機能を保持するような条件が適当と考えられる。そこで上に述べた実験結果から，EL-4 細胞をノルアドレナリンとともに磁場に曝露する時間を4時間とし，ノルアドレナリン濃度を6.0×10^{-4} M に設定して，ノルアドレナリンの刺激により EL-4 細胞に引き起こされるアポトーシスの過程に及ぼす静止強磁場の影響を調べることにした。

(4) EL-4 細胞のアポトーシスに対する静止強磁場の影響

EL-4 細胞を6.0×10^{-4} M の濃度のノルアドレナリンとともに5×10^{5}個づつプラスチックチューブ内にいれ，NMR の超伝導電磁石の中心に4時間置いた。それと全く同じ条件で用意したチューブ入りの細胞を通常の37℃のインキュベーター内に静置して，磁場曝露群の control とした。ノルアドレナリンを含まない細胞懸濁液を入れたチューブを通常の37℃のインキュベーター内に静

置して，もう一つのcontrol群とした。4時間のインキュベーション後各チューブの細胞を洗浄して，新しい培養液に懸濁して96-wellプレートにwellあたりの細胞数を4とおりに変えてさらに20時間培養した。合計24時間のインキュベーション後，各wellの細胞数をMTT染色により評価し，各群の細胞増殖を比較した。結果を図7に示すように，ノルアドレナリンは4時間のインキュベーションで細胞の増殖機能を明らかに障害した。さらに磁場内でノルアドレナリンとインキュベートされた細胞は，controlのノルアドレナリン群の細胞に比べ培養後のwellあたりの細胞数が有意に少なかった。

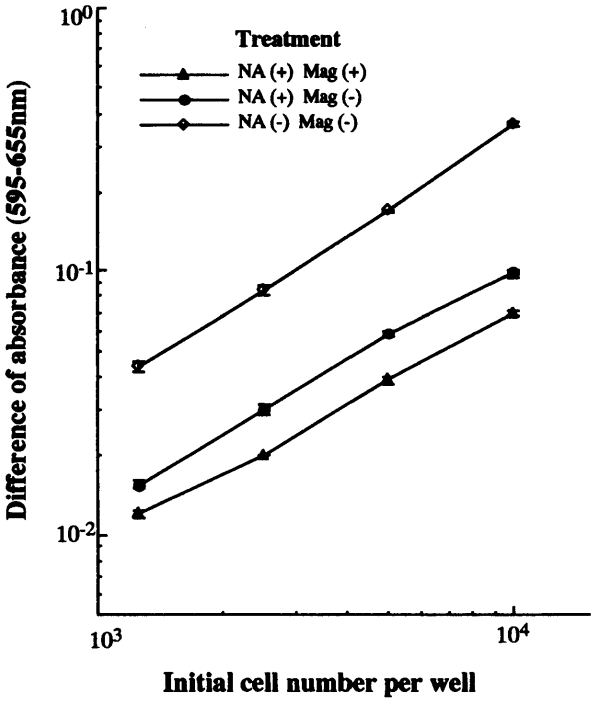

図7.　EL-4 アポトーシスの過程に及ぼす静止強磁場の影響

EL-4 細胞を6.0×10^{-4}Mの濃度のノルアドレナリンとともに5×10^{5}個づつプラスチックチューブ内にいれ4時間強磁場内に置いた。それと全く同じ条件で用意したチューブ入りの細胞を通常の37℃のインキュベーター内に静置して，磁場曝露群のcontrolとした。インキュベーション後96-wellプレートでwell 当たりの細胞数を変えて20時間培養し，増殖能力を比較した。

4. 考　　察

(1)　ノルアドレナリンの刺激により EL-4細胞に誘導されるアポトーシスの過程

適切な濃度（6.0×10^{-4}M～3.0×10^{-3}M）のノルアドレナリンとインキュベートすることにより，T細胞腫瘍であるEL-4細胞にアポトーシスの過程を惹起することができた。最終的に細胞死に至るまでの，細胞膜の選択的透過性機能，ミトコンドリアの酸化還元酵素機能，そして染色体DNAの構造への障害について調べた。ノルアドレナリンとインキュベートする時間が8時間

までの段階では，トリパンブルー色素の排除機能で判断する限り細胞膜への影響はみられない。しかし，MTT染色法によりミトコンドリアの酵素活性を指標とした場合，ノルアドレナリンを添加してから2時間以上になるとミトコンドリアの酵素活性が低下していく。これは細胞の酸素呼吸による ATP産生力の低下を引き起こすと考えられる。PI染色法により核あたりのDNA量の変化を解析し，DNA断片化の進行について調べた結果，ノルアドレナリンを添加してから4時間以降，時間の経過とともにDNAの断片化が徐々に進むことが分かった。以上のことより，ノルアドレナリンを添加してアポトーシスを誘導するシグナルが細胞内に伝えられてから2～4時間の間に，アポトーシスを制御する遺伝子群が発現され，ミトコンドリアの呼吸酵素が障害されATP産生力が低下し，それとともにエンドヌクレアーゼの活性があがりDNAの断片化が徐々に進み，さらに時間が経過すると，細胞膜の透過性にも障害があらわれ細胞死が完了すると考えられる。

ノルアドレナリンを添加することで起こるアポトーシスの過程は，全部の細胞に一斉に起こるのではないようにみえる。これについて，次の2つの可能性が考えられる。一つは，EL-4細胞膜上に分布するノルアドレナリンのレセプターの一定数以上がノルアドレナリン分子を結合することで，アポトーシスを誘導するシグナルが細胞内に伝達される。二つめは，アポトーシスの過程は細胞周期の特定の段階おいて誘導され，個々の細胞がその段階にいたるまで細胞周期を回る時間が必要となり，時間的ずれが生じるということが考えられる。そして，ノルアドレナリンとインキュベーションして，ノルアドレナリンを洗浄後細胞を96-wellプレートで培養した場合，培養終了時点での各wellのMTT染色の吸光度の対数値がノルアドレナリンとのインキュベーション時間に対して直線的に減少した。この結果から，いったんアポトーシスを誘導するシグナルが細胞内に伝達されてしまえば，ノルアドレナリンを除去してもアポトーシスを阻止することはできないと考えられる。

(2) アポトーシスの過程に対する静止強磁場の影響

EL-4細胞の細胞膜表面にあるノルアドレナリンのレセプターにノルアドレナリンが結合すると，レセプターに結合しているG-蛋白を介してホスホリパーゼ-Cが活性化され，イノシトール三リン酸を生成し，それによって小胞体と細胞膜のカルシウムイオンチャンネルが開かれ，細胞質内へのCa^{2+}イオンの流入が起こりイオン濃度が上昇すると考えられる[7]。我々の，今回の実験では，ノルアドレナリンと4時間インキュベート後にはDNAの断片化が認められた。T細胞のアポトーシスの過程で観察されるDNAの断片化に関与しているエンドヌクレアーゼは，細胞質のCa^{2+}イオン濃度の上昇によって活性化される[8,9]。そのため，アポトーシスの初期の過程においては，カルシウムイオンチャンネルの開放とCa^{2+}イオンの細胞質への流入がキーステップとなると考えられる。

種々の電磁場が様々な細胞の機能に有意な影響を与えることが報告されている[10~14]。また，電磁場がカルシウムイオンチャンネルを介したCa^{2+}イオンの細胞質内への流入を促進するという報告もある[15~17]。それゆえ，電磁場の細胞機能への影響の多くは，Ca^{2+}イオンの細胞質内への流入促進によって起こると考えられる[18]。以上のことから，今回の我々の実験結果にみられた強磁場によるアポトーシスの過程の促進は，静止強磁場がノルアドレナリンの刺激によって引き起こされる細胞質内へのCa^{2+}イオンの流入を促進し，エンドヌクレアーゼの活性化を促進したためであると考えられる。

医学の分野で，有望な癌の治療方法の一つとして，癌細胞にアポトーシスを起こさせて一挙に癌を自滅させる方法が考えられる。その際，癌の組織に集中して磁場をかけることによって，癌の自滅をより効果的に引き起こすことができるかもしれない。

本論文は平成7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。

参考文献

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) 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**, 31-37, 1994.
5) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63, 1983.
6) Migliorati, G., Nicoletti, I., Crocicchio, F., Pagliacci, C., D'Adamio, F., and Riccardi, C. Heat shock induces in mouse thymocytes and protects them from glucocorticoid-induced cell death. *Cell. Immunol.*, **143**, 348-356, 1992.
7) Berridge, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**, 315-325, 1993.
8) McConkey, D.J., Hartzell, P., Amador-Perez, J.F., Orrenius, S., and Jondal, M. Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J. Immunol.*, **143**, 1801-1806, 1989.
9) McConkey, D.J., Orrenius, S., and Jondal, M. Cellular signalling in programmed cell death (apoptosis). *Immunol. Today*, **11**, 120-121, 1990.
10) 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.
11) 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.
12) 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.

13) 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.

14) Cadossi, R., Bersani, F., Cossarizza, A., Zucchini, P., Emilia, G., Torelli, G., and Franceschi, C. Lymphocytes and low-frequency electromagnetic fields. *FASEB J.*, **6**, 2667-2674, 1992.

15) 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.

16) 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.

17) 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.

18) Walleczek, J. Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling. *FASEB J.*, **6**, 3177-3185, 1992.