

博士論文

50 ヘルツ磁場がもたらす細胞酸化ストレスの研究

中山 希祐

平成 28 年

概要

研究の背景と目的

近年における、電子機器の著しい使用増加に伴って、低周波磁場（1・300 kHz）の健康影響についての関心が増している。環境磁場としての低周波磁場と生体物質との相互作用は、生体が持つ熱エネルギーに比べて低く、またその変動時間は生体内の化学反応速度と比べて遅いため、生体へ影響を与えないと考えられている。その一方で、低周波磁場による生体影響として、いわゆる遺伝毒性が報告されてきた。遺伝毒性の本質は DNA 損傷であるが、これは発がん性を誘導するため、生体にとって大きなリスクとなりうる。国際がん研究機関（IARC）は、低周波磁場には発がん性リスクの可能性があることを報告している。一般的に、DNA 損傷は放射線、紫外線によって水分子からラジカルが生成されることで起こされることが知られているが、低周波磁場のエネルギーは低く、直接 DNA 損傷を引き起こすことはできない。

一方、DNA 損傷を引き起こす原因の一つとして、酸化ストレスが知られている。この酸化ストレスは多くの場合、ラジカルによって誘導される。磁場のラジカル反応へ与える影響については、地磁気を感じ取る渡り鳥の研究から Schulten らによって明らかにされてきた。それによると渡り鳥の目の中の青色光受容体が光励起されるとラジカル対が生じる。このラジカル対が再結合するレートに地磁気の影響を与え、その結果としてラジカル対が関与する光受容反応のレートが変化するという可能性が示されてきた。したがって、低周波磁場は酸化ストレスに関与する形で DNA 損傷の誘導を促進していることが考えられる。

上に述べたように、DNA 損傷には、ラジカル、あるいはより広くは酸化ストレスが関与する。先行研究からラジカルが DNA 損傷を誘導する過程に、低周波磁場が影響を与える可能性が疑われている。低周波磁場が生体へ影響を与えるメカニズムは、まだ解明されていないが、Lai らによって、低周波磁場による DNA の損傷度がラジカル消去剤を用いることで、抑制されることが報告された [1]。この仮説を元に Lai らは、以下の二段階のプロセスを主とする一つの仮説を提唱した。1) DNA 損傷を引き起こすラジカルとしてヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) がある。この $\cdot\text{OH}$ を過酸化水素と二価鉄から生成する反応として Fenton 反応が知られているが、低周波磁場はこれを促進する。2) $\cdot\text{OH}$ はまた脂質の過酸化を通じて一酸化窒素（ラジカル）産生量 (NO) を増加させ、これにより誘導される鉄貯蔵タンパク質からの鉄イオン放出が Fenton 反応をフィードバック的に増強させる。私はこの仮説に興味を持ち、検証することを目指した。

各章の内容、実験結果

第一章では酸化ストレスが生体影響と磁場影響の関連とそれを導く Lai らのスキームを詳しく述べる。

第二章では 50-Hz 磁場が線維芽細胞 (Swiss Albino 3T3) の DNA 損傷を促進する作用に関する実験結果を述べる。実験では 500- μT 、1000- μT 磁場を 2~24 時間曝露し、DNA 損傷度をコメットアッセイ（単一細胞ゲル電気泳動法）によって測定した。その結果、1000- μT 磁場を 24 時間連続曝露することによって DNA 二本鎖切断量が有意に増加した。また、断続波形磁場を 18 時間曝露することによって、DNA 一本鎖切断量が有意に増加した。断続波形を用いて得られた結果は先行研究 [2] と類似のものである。これにより、低周波磁場に DNA 損傷作用があることが確認された。

第三章では、Lai の仮説を検証するために、免疫細胞マクロファージ (RAW264) を用いて 50-Hz 磁場曝露による NO 産生量、DNA 損傷度、細胞死を調べた結果を述べる。Lai の研究と異なる点は、LPS による酸化ストレス誘導を行ったことである。免疫細胞を LPS 刺激すると NO 合成酵素発現量

が増加し、結果的に NO (酸化ストレス源) 産生量が増加し、細胞内酸化ストレスも増加することが知られている。このことを利用して、マクロファージへの LPS 刺激を行い、その後さらに 500- μ T 磁場を 24 時間曝露したのちに、上記の指標を測定した。その結果、DNA 損傷度とネクローシス (細胞の突発死) は、LPS 刺激によって促進され、50-Hz 磁場曝露によって更に増加した。一方で、50-Hz 磁場曝露による NO 産生量の有意な増加は測定されなかった[3]。したがって、NO による酸化ストレスは 50-Hz 磁場曝露による DNA 損傷や細胞死の直接原因ではないことが示唆された。

第四章では DNA 損傷を引き起こしうる他の酸化ストレス分子の可能性を検討した結果を述べる。酸化ストレス分子として NO 以外に $O_2\cdot$ や $\cdot OH$ 、 $ONOO^-$ がある。このうち $\cdot OH$ と $ONOO^-$ は酸化力が高いことが知られているが、 $\cdot OH$ は DNA 損傷を引き起こすには寿命が短すぎるため、 $ONOO^-$ に着目した。 $ONOO^-$ は NO と O_2 の反応によって生成される。そこで、私は O_2 産生量増加経路へ低周波磁場が作用した可能性を考えた。先行研究において、50-Hz 磁場が O_2 産生を促進することが示されている[4]。 O_2 は、ミトコンドリアの ATP 合成の過程で、恒常的に放出されている。本研究では、このミトコンドリア膜から生成される O_2 に磁場曝露が与える影響に着目し、測定した。その結果、マクロファージへ 500- μ T 磁場を 24 時間曝露することによって、細胞内の O_2 産生量が増加した。次にこの O_2 増加の原因を検討した。ミトコンドリアが機能不全を起こすと膜の中と外の電位差 ($\Delta\Phi_m$) が低下し、放出される O_2 は増加する。実際に、 $\Delta\Phi_m$ を測定したところ磁場曝露によって、有意な低下が測定された。一方、ミトコンドリア膜電位差を減少させることが知られている FCCP (イオノフォア) の存在下で測定を行った結果、 O_2 産生量が増加したことから、50-Hz 磁場曝露による $\Delta\Phi_m$ 低下が O_2 産生量を増加させるということが分かった。 $\Delta\Phi_m$ 低下によるミトコンドリア機能不全が起こるとアポトーシス (プログラム細胞死) を誘導する。これはミトコンドリアからシトクロム c が放出され、アポトーシスを誘導する酵素カスパーゼを活性化するためである。実際に、50-Hz 磁場曝露によりカスパーゼが活性化される傾向が示された。この結果も 50-Hz 磁場によるミトコンドリア機能不全誘発という考えと矛盾しない。

本研究と先行研究の知見を合わせると、50-Hz 磁場のターゲットの候補としては a) O_2 の産生と消去に関係する酵素 (前者として NADPH oxidase、後者として superoxide dismutase が知られている) の活性、b) ミトコンドリア膜における電子伝達系の 2 つが考えられる。前者に関して、50-Hz 磁場が superoxide dismutase の活性を抑制するという報告がある。また後者に関しては、時間的に変動する磁場により膜上に非常に微小ではあるが渦電流が発生する可能性が理論的に指摘されている。これが電子伝達系に影響した可能性が考えられる。しかし、前者に関しては報告が少なく、後者に関しては実験的研究はない。従って、これらの仮説の検証は今後の課題である。

結論

本研究から、低周波磁場によるミトコンドリア膜電位差減少によって O_2 生成経路促進にされること、また、遺伝毒性、細胞毒性を誘導することが示された。この結果から、低周波磁場はミトコンドリア膜や O_2 産生を通じて生体へ作用するという仮説を新たに提唱した。

参考文献

- [1] Lai, H., & Singh, N. P. (2004). Environ. Health Perspect. 112(6), 687.
- [2] Nakayama, M., Hondou, T., Miyata, H. (2014). In Proceedings of APCC12 p. 012057.
- [3] Nakayama, M., Nakamura, A., Hondou, T., Miyata, H. (2016). Int J Radiat Biol 92(10), 583-589
- [4] Simkó, M., Droste, S., Kriehuber, R., Weiss, D. G. (2001). Eur J Cell Biol 80(8), 562-566.

目次

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | 序論 | 4 |
| 1.1 | 生体、生体物質と電磁場の相互作用概論..... | 4 |
| 1.1.1 | 地磁気を感受する生物..... | 4 |
| 1.1.2 | 化学的・生化学的側面の先行研究..... | 7 |
| 1.2 | 生体への磁場影響の重要性..... | 8 |
| 1.2.1 | 低周波磁場..... | 8 |
| 1.2.2 | ラジオ波とマイクロ波磁場..... | 9 |
| 1.3 | 本研究の位置付けと流れ..... | 10 |
| 2 | 低周波磁場曝露による遺伝毒性評価 | 12 |
| 2.1 | 本研究の背景..... | 12 |
| 2.2 | 材料と方法..... | 13 |
| 2.2.1 | 実験に用いた材料等..... | 13 |
| 2.2.2 | 実験で用いたバッファー..... | 13 |
| 2.2.3 | 細胞培養..... | 14 |
| 2.2.4 | 磁場曝露装置..... | 14 |
| 2.2.5 | 磁場曝露条件..... | 17 |
| 2.2.6 | コメットアッセイによる DNA 損傷度測定..... | 18 |
| 2.2.7 | DNA 損傷度の解析方法..... | 18 |
| 2.2.8 | 統計処理..... | 19 |
| 2.3 | 結果と考察..... | 20 |
| 2.3.1 | コイルによる差の有無を調べる実験..... | 20 |
| 2.3.2 | 連続波形磁場曝露実験..... | 20 |
| 2.3.3 | 断続波形磁場曝露実験..... | 23 |
| 2.4 | まとめ..... | 25 |
| 3 | 酸化ストレス物質存在下における低周波磁場による DNA 損傷測定 | 27 |
| 3.1 | 本研究の背景..... | 27 |
| 3.2 | 材料と方法..... | 28 |
| 3.2.1 | 実験に用いた材料等..... | 28 |
| 3.2.2 | 実験で用いたバッファー..... | 28 |
| 3.2.3 | 細胞培養..... | 28 |
| 3.2.4 | LPS 添加..... | 29 |
| 3.2.5 | 磁場曝露装置..... | 29 |
| 3.2.6 | 磁場条件..... | 29 |

| | | |
|--------|---------------------------------------|-----------|
| 3.2.7 | マイクロプレートリーダー | 29 |
| 3.2.8 | コメットアッセイによる DNA 損傷度測定 | 30 |
| 3.2.9 | コメット画像解析 | 30 |
| 3.2.10 | 総細胞数測定 | 30 |
| 3.2.11 | カスパーゼ活性測定 | 31 |
| 3.2.12 | ネクローシス測定 | 31 |
| 3.2.13 | 統計解析 | 31 |
| 3.3 | 結果と考察 | 32 |
| 3.3.1 | DNA 損傷度 | 32 |
| 3.3.2 | 総細胞総数測定 | 35 |
| 3.3.3 | カスパーゼ活性測定 | 37 |
| 3.3.4 | ネクローシス測定 | 38 |
| 3.4 | まとめ | 41 |
| 4 | 酸化ストレス下の浮遊細胞における低周波磁場による生理活性測定 | 43 |
| 4.1 | 本研究の背景 | 43 |
| 4.2 | 材料と方法 | 44 |
| 4.2.1 | 実験に用いた材料等 | 44 |
| 4.2.2 | 細胞培養 | 45 |
| 4.2.3 | LPS 刺激 | 45 |
| 4.2.4 | 磁場曝露 | 45 |
| 4.2.5 | 磁場曝露装置 | 45 |
| 4.2.6 | 磁場条件 | 45 |
| 4.2.7 | マイクロプレートリーダー | 45 |
| 4.2.8 | 総細胞数測定 | 45 |
| 4.2.9 | 細胞生存率測定 | 46 |
| 4.2.10 | カスパーゼ活性測定 | 46 |
| 4.2.11 | O2 -産生量測定 | 47 |
| 4.2.12 | ミトコンドリア膜電位差測定 | 47 |
| 4.2.13 | 統計解析 | 48 |
| 4.3 | 結果と考察 | 49 |
| 4.3.1 | 総細胞数測定 | 49 |
| 4.3.2 | カスパーゼ活性測定 | 51 |
| 4.3.3 | 細胞死亡率測定 | 53 |
| 4.3.4 | O2 -産生量測定 | 54 |
| 4.3.5 | ミトコンドリア膜電位差測定 | 57 |
| 4.4 | まとめ | 65 |

| | | |
|----------|-------------------------------------|-----------|
| 5 | 付録1 低周波磁場による生体影響と鉄の関連性 | 67 |
| 5.1 | 本研究の背景..... | 67 |
| 5.2 | 材料と方法..... | 67 |
| 5.2.1 | 実験に用いた化学物質..... | 67 |
| 5.2.2 | 実験で用いたバッファー..... | 67 |
| 5.2.3 | 細胞培養..... | 67 |
| 5.2.4 | 鉄イオン添加..... | 67 |
| 5.2.5 | 磁場曝露装置..... | 68 |
| 5.2.6 | 実験で用いたバッファー..... | 68 |
| 5.2.7 | 磁場条件..... | 68 |
| 5.2.8 | コメットアッセイによる DNA 損傷度測定..... | 68 |
| 5.2.9 | コメット画像解析..... | 68 |
| 5.2.10 | 統計解析..... | 68 |
| 5.3 | 実験結果と考察..... | 69 |
| 5.3.1 | 繊維芽細胞による実験..... | 69 |
| 5.3.2 | マクロファージによる実験..... | 72 |
| 5.4 | まとめ..... | 76 |
| 6 | 付録2 DNA 電気泳動実験 | 77 |
| 6.1 | 本研究の背景..... | 77 |
| 6.2 | 材料と方法..... | 78 |
| 6.2.1 | 実験に用いた化学物質..... | 78 |
| 6.2.2 | プラスミド処理..... | 78 |
| 6.2.3 | 磁場曝露..... | 78 |
| 6.2.4 | 電気泳動..... | 78 |
| 6.2.5 | 観察..... | 78 |
| 6.2.6 | 解析方法..... | 78 |
| 6.2.7 | 統計解析..... | 79 |
| 6.3 | 実験結果..... | 80 |
| 6.4 | まとめ..... | 80 |
| 7 | 結論 | 82 |
| 8 | 付記 | 83 |
| 9 | 参考文献 | 83 |

1 序論

1.1 生体、生体物質と電磁場の相互作用概論

1.1.1 地磁気を感じる生物

自然界に存在する地磁気は、 $25 \sim 65 \mu\text{T}$ の強度幅があり、北半球では伏角を持つ、準定常の静磁場である (Fig. 1、Fig. 2) [1]。この地磁気を感じる生物の種類は多岐にわたっている。例えば、走磁性細菌は体内のマグネトソームと地磁気の相互作用を利用し、生存に有利な酸素濃度の領域へ遊泳する (南半球と北半球では真逆の方向)。また、軟体動物であるウミウシ、両生類ではイモリ、魚類ではニジマス、昆虫類ではゴキブリ、爬虫類ではカメ、鳥類ではヨーロッパコマドリのような渡り鳥が地磁気を感じる、コンパスとして活用していることがわかっている [2] [3]。

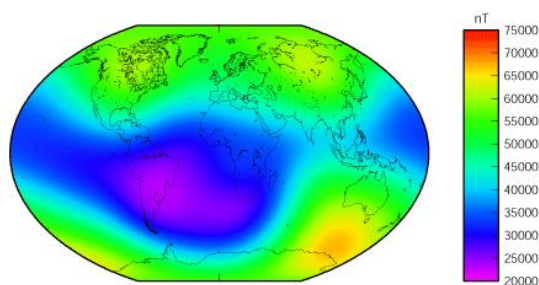


Fig. 1 : 地表の地磁気強度分布 (2000 年) [1]。地磁気の強度は、場所によって異なる。同じ場所においてもその強度は、時々刻々と変化することが知られている。

磁気感覚を持つ生物種が多様なことから、環境磁場として地磁気は生体にとって重要な因子であり、共通の祖先が持っていた磁気知覚器官が進化の過程で、それぞれの環境に適応し受け継がれてきたと考えることが出来る。また、地磁気は数十万年に一回の頻度で反転する。この変化は、タンパク質の進化の時間スケールに比べると、早い。したがって、磁気受容の機能は原始生命時代にすでに備わっており、やはりその点からも進化の過程でそれぞれの環境に適応したことが疑われる。誕生したばかりの走磁性細菌の集団では、半数は泥の方向に進む極性を持つが、半数はその正反対の方向に進む極性を持ち生き残ることが出来ない。地磁気が逆転してもその半数が生き残ることができるという意味では、地磁気の逆転に適応し、生存する方法とも考えられる。



Fig. 2 : A) 地磁気を感じる生物。B) 磁力線の伏角概念図 [2]。

生物の地磁気を感じるためのメカニズムは、後述の理由で、生物の種類によって異なることが予想される。例えば、前述の走磁性細菌の場合、外部から鉄イオンを取り込み磁鉄鉱のナノ結晶が一行に並んだものを生成し、その結晶の磁気モーメントが磁力線の向きと配向し、コンパスのような役割を果たす。他の生物の地磁気感受性についても研究が推進されており、特に、渡り鳥の長距離飛行の際の地磁気感受性について詳しい研究が行われてきた。動物行動学の分野の研究から、渡り鳥は体内に伏角コンパスとして働く磁気感覚を持っており、目の中にある色素タンパク質であるクリプトクロムが関与している可能性があることが示された [4] [5]。クリプトクロムは青色の光励起によって、分子内にラジカル対を生成するタンパク質である。現在提唱されている仮説によると、クリプトクロムの中に存在し、概日リズムにも関連のある FAD が光子を吸収して励起されることで電子が一個飛出し、不對電子を生成する。飛び出した空隙を埋めるように同じくクリプトクロムの中に存在するトリプトファン（アミノ酸）の電子が供給される。このとき、供給された電子と対になった電子同士は量子もつれ状態を取り、このとき、電子は一重項と三重項の重ね合わせの状態である。この一重項と三重項が混合した過程へ地磁気 ($\sim 50 \mu\text{T}$) が影響を与える。このとき必要なラジカルの寿命は、少なくとも $\sim 1 \mu\text{s}$ である [6] が、クリプトクロムの場合、光励起で生成されたラジカルは長寿命 ($\sim 100 \text{ms}$) であることが知られている [7]。さらに、一重項と三重項の混合状態が、地磁気の強さや伏角の角度に敏感なため、渡り鳥がどの方向に飛んでいるかによって、磁場の方向変化に応じて状態が一重項か三重項に決まり、最終的な生成物は異なってくる。このような機構により、渡り鳥は文字どおり、地磁気を見ることが出来ると考えられている。

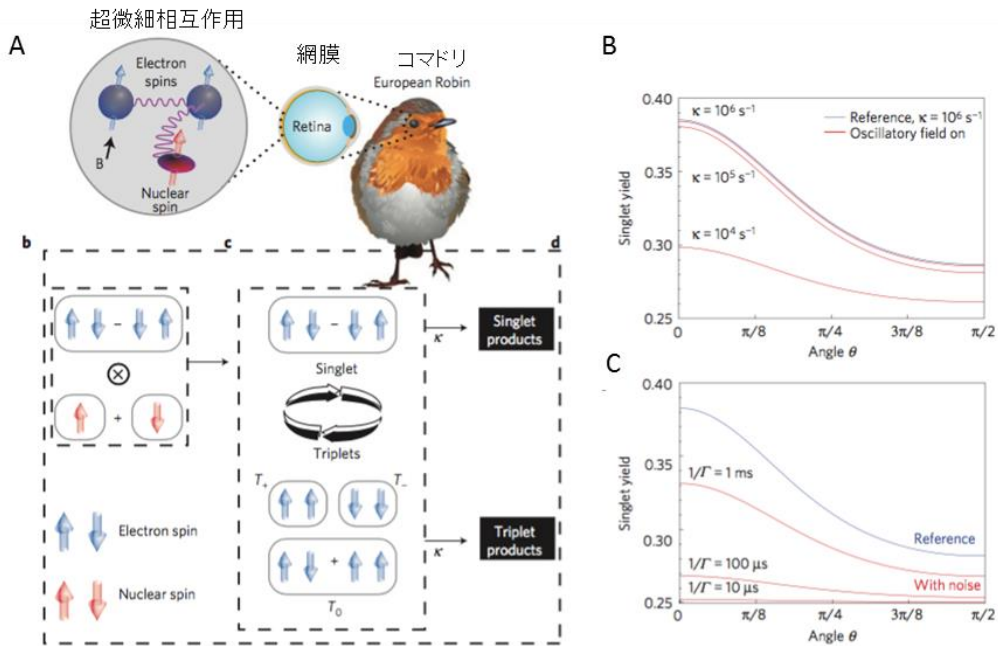


Fig. 3 : A)ヨーロッパコマドリの磁気受容メカニズム仮説 [8]。ラジカル対の磁気受容のメカニズムは、ヨーロッパコマドリの網膜に存在するタンパク質、クリプトクロム内で起こっていると考えられている。クリプトクロムが網膜に対して配向して並んでいる。色素分子 FAD 内の電子が青色光によって放出され、ドナー分子であるクリプトクロム内のアミノ酸であるトリプトファンから電子を受け取ることで、ラジカル対を生成し、一重項状態と三重項状態の重ね合わせの状態を取る。その後、最終的に、一重項、三重項ラジカル対はそれぞれ一重項、三重項生成物へ再結合する。B)一重項生成による磁場の角度依存性を表している。青線は地磁気強度 ($47 \mu\text{T}$) の作用を示し、赤線は 150 nT の 1.316-MHz 変動磁場が地磁気の方に垂直に重なったときの作用を示す。 κ はラジカルの崩壊レートを示す。C)一重項生成に対する磁場影響の角度依存性と、ノイズ磁場の関係について示している。 Γ はノイズのレートを示すパラメータである。青線は地磁気強度 ($47 \mu\text{T}$) の作用を示し、赤線は $\kappa = 10^4 \text{ s}^{-1}$ の変動磁場ノイズが存在するときの作用を示す [9]。

地磁気のような強度の弱い磁場の生体影響の研究は、培養細胞を用いた基礎研究においても行われてきた。地磁気を遮蔽したとき、神経芽細胞においてアクチン細胞骨格を減弱させ、その運動性を変化させた [10]。同様に地磁気の遮蔽はラットの免疫系へ影響を与え、一酸化窒素 (NO) の放出とスーパーオキシドアニオン (O_2^-) の合成を減少させた [11]。また、低強度 (60、120 μT) の磁場がヒト臍帯静脈内皮細胞の成長を促進し、一酸化窒素合成酵素 (eNOS) が増加した [12]。渡り鳥の仮説と同様に、磁場強度の僅かな変化が、電子スピン状態を遷移させるエネルギーの変化を引き起こし、結果としてフリーラジカルに関連した化学反応レートがわずかに変化するモデルも報告されている [13]。代謝は化学反応のネットワークであるため、もしこのモデルが正しければ、一部の化学反応の変化が代謝全体の変化を導き、たとえば細胞の成長率の変化を引き起こすのかもしれない。

1.1.2 化学的・生化学的側面の先行研究

静磁場や交流磁場が生体に影響を与えるとき、考え得る生体内の反応のひとつは、脂質過酸化反応 (LPR : Lipid Peroxidation Reaction) (Fig. 4)である [14] [15]。LPRは、フリーラジカルを連鎖的に生成し、細胞死を誘導する [16]。

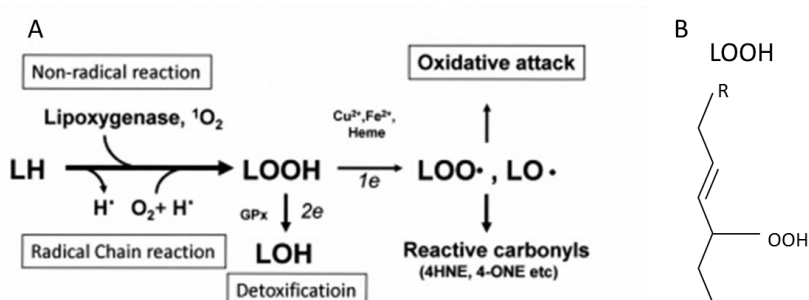


Fig. 4 : A) LPR を示す概要図 [17]と B) 過酸化脂質 (LOOH) 構造式。LH は細胞膜を構成する脂質、LOOH は過酸化脂質、 $LOO\cdot$ はアルキルペルオキシラジカル、 $LO\cdot$ はアルキルラジカルを示している。Lipoxygenase は酵素反応によって、過酸化脂質を生成する。また、GPx (グルタチオンペルオキシダーゼ) は、脂質過酸化物を消去する抗酸化酵素である。

細胞膜を構成する脂質は LH と表す。LH は酵素 (Lipoxygenase) によって、酸化され、過酸化脂質 LOOH を生成し、最終的にアルキルペルオキシラジカル ($LOO\cdot$)、アルキルラジカル ($LO\cdot$) を生成する。これを細胞において表した図を Fig. 5A に示した。これらの化学反応式と速度定数から、常微分方程式が導ける [18]。この常微分方程式の周期解は、インヒビターの濃度と $LOO\cdot$ の濃度という二つのパラメータによって性質が変わる分岐現象を引き起こす (Fig. 5B)。Fig. 5B において実線は磁

場がないとき、点線は磁場があるときの周期解を示している。100~1000 μT のオーダーの磁場はスピン状態の遷移に影響を及ぼし、特定の条件下において遷移が誘起され、相転移（図中の 1→2）が起こり、 $LOO\cdot$ 濃度が変化する。その結果、LPR を引き起こすラジカル反応のレートを最大 10% 変化させる [19]。最終的に、連鎖生成物の濃度が変化する、過酸化ラジカルである $RO_2\cdot$ 同士の再結合によって、生成物への反応速度が変化する。したがって、この理論にしたがえば低強度の磁場であっても、生体へ影響を与えることが可能である。

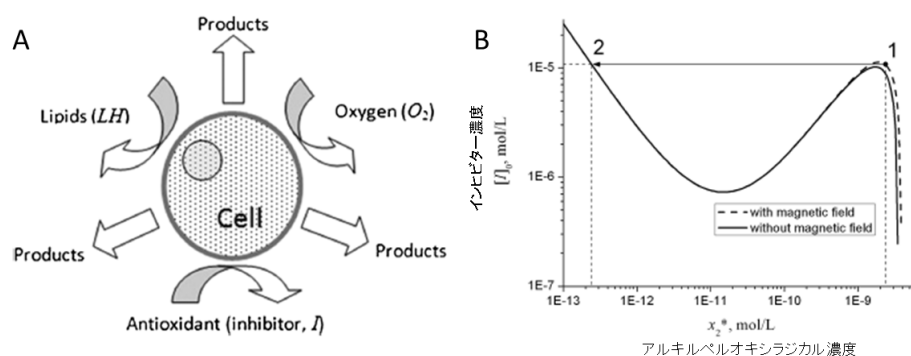


Fig. 5 : A) 細胞への物質の流れを示している。脂質 LH 、酸素 O_2 、抗酸化物質（インヒビター） I の供給によって生成物が生産される。B) 縦軸はインヒビター濃度、横軸はアルキルペルオキシラジカル ($LOO\cdot$) 濃度を示す、常微分方程式の周期解。実線は磁場がないとき、点線は磁場があるときの周期解を示す。磁場の有無によって $LOO\cdot$ 濃度が変化する。図は [19] より引用。

1.2 生体への磁場影響の重要性

1.2.1 低周波磁場

30 kHz 以下の周波数帯の磁場は WHO によって低周波磁場と定義されている (Fig. 6)。低周波の電流は、商用電源への利用等、広く活用されてきた。低周波電流にともなう生じる低周波磁場においても送電線付近での生活と小児白血病の関連性を指摘した 1979 年の報告 [20] 以降、低周波磁場の生体影響について臨床医学研究がなされてきた。プール解析結果やメタ解析 [21] [22] [23] の結果は、強度が 0.3 μT 以上の低周波磁場曝露によって小児白血病のリスクが 1.4 ~ 2 倍増加したことを報告している。しかしながら、この強度の磁場に曝されていた小児の数は統計を取った総数のうち多くても 3% 以下であったことから、低周波磁場による小児白血病リスクについて確たる証拠は得られていない。この現状から、国際がん研究機関 (IARC) は低周波磁場を発がん性の可能性が否定できないクラス 2B に分類している [24]。

低周波磁場による生体影響は、培養細胞を用いた基礎研究分野においても行われてきた。細胞が癌化する要因として核内の DNA の損傷が知られている。DNA 損傷には一重鎖切断で Single Strand Break (SSB)と二重鎖切断の Double Strand Break (DSB)がある (Fig. 8)。しかしながら、低周波磁場の持つエネルギーでは、熱エネルギーに埋もれてしまうので、直接分子を電離し DNA 損傷を起こすことは不可能である。したがって、低周波磁場は DNA 損傷を引き起こす生体反応の経路を活性化させ、間接的に DNA 損傷を増加させた可能性が考えられる。Lai (2014) によると、低周波磁場による DNA を変化させるような遺伝毒性に影響があると結論づける論文 (2006 年から 2014 年) は 82% (37 論文)、影響がないと結論づける論文は 18% (8 論文) であった [25]。この結果から、基礎研究の分野においても低周波磁場による生体影響について、まだ統一した結論が得られていないということが分かる。

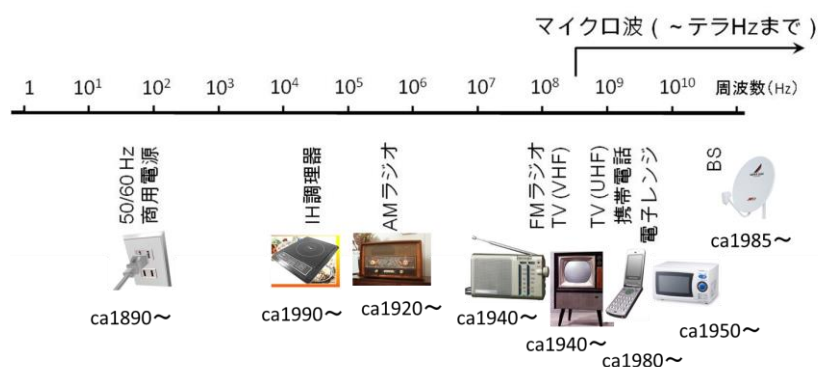


Fig. 6 : 生活に利用されている電磁場とその周波数。< 30 kHz の周波数帯の磁場を低周波磁場、30 kHz ~ 300 MHz の周波数帯の電磁波をラジオ波磁場と定義している。

1.2.2 ラジオ波とマイクロ波磁場

30 kHz ~ 300 MHz の周波数帯の電磁波は、ラジオ波磁場 (Radiofrequency magnetic field) に分類される。携帯電話などの機器の普及に伴い、ラジオ波磁場周波数帯に曝されることによる生体影響への関心が高まってきている。これらの周波数帯の電磁場も低周波磁場と同様に非電離放射線に分類されるが、この効果を考えるため、比吸収率 (SAR ; Specific Absorption Rate) が、重要なパラメータとなる。SAR とは、単位物質質量へ単位時間あたりに吸収されるエネルギー量のことである。国際非電離放射線防護委員会 (ICNIRP) による局所 SAR (人体が電波にさらされることで任意の 10 g あたりの組織に 0.1 時間に吸収されるエネルギー量の平均値) の基準値は側頭部で 2 W/kg、四肢で 4 W/kg である。これらの熱量の持つエネルギーは生体影響を起こすには低すぎる。それにも拘らず、次に述べるように生体組織、器官や細胞へ何らかの影響を与えうる。

基礎研究に関して、上述の総説によると、ラジオ波磁場による遺伝毒性があると結論づける論文は 63% (64 論文)、影響がないと結論づける論文は 37% (38 論文) であった [25]。Lai と Singh は、2450-MHz マイクロ波磁場周波数を 2 時間照射することで DNA の SSB と DSB が増加することを報告した (SAR は 0.6 ~ 1.2 W/kg ; ICNIRP の基準値より低い) [26] [27] [28] [29]。ラジカル消去剤である抗酸化剤の添加によって、ラジオ波電磁場による SSB、DSB は阻止された。このことから、2450-MHz マイクロ波磁場がフリーラジカルの関与する反応を活性化したなどの可能性が考えられる。Diem らは、断続による携帯電話信号 (1800-MHz、SAR = 1.2, 2 W/kg) の線維芽細胞の DNA 損傷効果が連続のときより、強いことを示した [30]。一方、2450-MHz マイクロ波の曝露によって、精子細胞の遺伝子の構造変化や運動性の低下が報告されている [31] [32]。細胞膜の NADH Oxidase は、スーパーオキシドアニオンの生成ならびに、最終的に細胞への刺激応答経路である ERK (extracellular-signal-regulated kinase) cascade (リン酸化カスケード) を活性化する。Friedman らは、875 MHz の電磁波による ERK 活性化が NADH oxidase 活性の阻害によって、抑制されたことから、電磁波は NADH oxidase 活性に影響を与えると結論付けた [33]。

これらの結果から、ラジオ波やマイクロ波が酸化ストレスを増加させ最終的に発がんを引き起こすことが疑われており、IARC は 2011 年に、ラジオ波磁場を「発がん性の可能性あり」に分類した。ごく最近、米国立衛生研究所 (NIH : National Institutes of Health) に属する研究機関である米国国家毒性プログラム (NTP : National Toxicology Program) は、携帯電話による健康影響を目的とした大規模な動物実験結果 [34] を報告し、以下のように報じられた。

...強度の高周波電磁波を照射された数千頭のラットにおいて、まれな種類の脳と心臓のがんがわずかな頻度で発症したが、それは他の要因で説明できるものではなく、むしろ直接的な用量反応関係を示唆していることが発見された。実験環境においてもがんの発症率は依然として低かったけれども、曝露水準が高まるほど発症率も高まっていた。脳のグリア細胞腫や心臓のシュワン細胞腫を発症したラットさえいた。

... ([35] より一部抜粋要約)

NIH は、人間に関するデータ収集にもとづく大規模な臨床研究においては、携帯電話使用による発がんリスクについて、限られた証拠しか得られていないことに、注意しなければならないと述べている。携帯電話使用の際の健康リスクについては、社会的影響も大きいいため、NIH は慎重な姿勢を取っている。

1.3 本研究の位置付けと流れ

低周波磁場が生体へ影響を与えるメカニズムは、まだ解明されていない。しかしながら、低周波磁場が DNA 損傷を引き起こす一つの有力な仮説として、Lai らは、彼らの実験結果をもとにして、低周波磁場が細胞内の鉄のホメオスタシスに影響を与える可能性を提唱した (Fig. 7) [36]。実際には、鉄を触媒として Fenton 反応により酸化力が強く、DNA 損傷や脂質過酸化を引き起こす $\cdot\text{OH}$ を生成する。さらに、 $\cdot\text{OH}$ によって誘導される脂質過酸化によって引き起こされる一酸化窒素産生量 (NO) の増

加によって、ラジカル生成や、鉄貯蔵タンパク質からの鉄イオン放出を誘導し、Fenton 反応を増強させる。私はこの仮説に興味を持ち、検証することを目指した。

以上をふまえ、本研究においては、

1. 低周波磁場による遺伝毒性の有無と実験結果の再現性の検証
2. Lai と Singh によって提唱された仮説の中の一酸化窒素をターゲットと考えた、低周波磁場による細胞毒性、遺伝毒性の評価
3. スーパーオキシドアニオンを酸化ストレス源と考え、低周波磁場によるミトコンドリア膜電位差、細胞内スーパーオキシドアニオンの測定

を行い、それらの結果をもとに低周波磁場による生体影響について酸化ストレスの面から考察を行った。

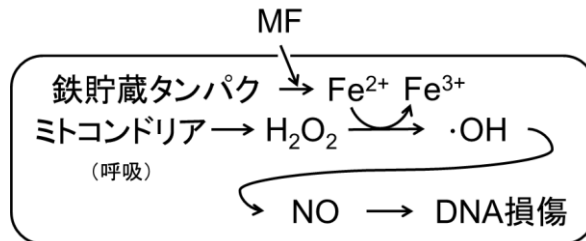


Fig. 7: Lai らは、彼らの実験結果をもとにして、低周波磁場が DNA 損傷を引き起こすプロセスの仮説を唱えた。低周波磁場が細胞内の鉄のホメオスタシスに影響を与え、鉄を触媒として Fenton 反応により酸化力が強く、DNA 損傷や脂質過酸化を引き起こす $\cdot\text{OH}$ を生成させる。さらに、 $\cdot\text{OH}$ によって誘導される脂質過酸化によって引き起こされるNOの増加によって、ラジカル生成や、鉄貯蔵タンパク質からの鉄イオン放出を誘導し、Fenton 反応を増強させる。生成されるラジカルによって最終的にDNA 損傷が引き起こされる。

2 低周波磁場曝露による遺伝毒性評価¹

2.1 本研究の背景

生体は細胞によって形作られており、細胞のはたらきは細胞核に収められている DNA によって司られている。その DNA が損傷を受けるということは、遺伝情報が読み出せなくなることや、遺伝情報に誤りが生じることを意味する。したがって、DNA 損傷は、生体にとって大変深刻な問題であり、場合によっては、細胞死を導く。前述 (1.2.1) したように DNA 鎖が直接切断される損傷形式は 2 種類ある。1 つは、DNA の 2 重鎖のうち、片方のみが切断された SSB、もう 1 つは、DNA の 2 重鎖の両方が切断された DSB である (Fig. 8)。ちなみに、放射線による損傷では、必ずしも DSB は 2 重鎖の同じ箇所が切断される必要はなく、2 本の鎖の切断箇所が 10bp 程度離れている場合でも、DSB が発生することがある [37]。

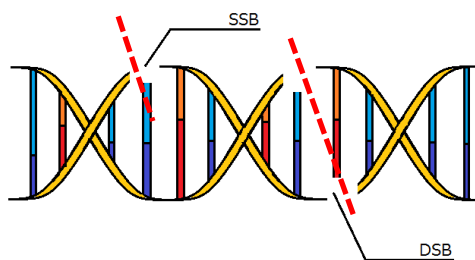


Fig. 8 : DNA は二重鎖からなる。一重鎖の切断を SSB、二重鎖の切断を DSB とよぶ。必ずしも DSB は二重鎖の同じ箇所が切断される必要はなく、二本の鎖の切断箇所が 10bp 程度離れている場合でも、DSB が発生することがある。図は [38]から引用。

DNA が損傷を受けると、修復酵素により修復が行われる。SSB は切断された箇所を比較的容易に修復することができる他、残った相補鎖から失われた遺伝情報を復元することもできる [39]。そのため、SSB の修復は細胞の状態に依らず比較的短時間で完了する。一方 DSB は、完全に DNA が切断されてしまっているため、直接再接続させるのは難しい。DSB を修復するには、姉妹染色体から遺伝情報をコピーしてくる必要がある。染色体の複製直後であれば、姉妹染色体が同一細胞内にあるため、DSB を修復できる。

低周波磁場のような、非電離放射線は、直接 DNA 損傷を引き起こすことは不可能である。しかしながら、多くの先行研究 ([36] [40] [41] [42] [43] [44] [45]) によって、7.5 ~ 7000- μ T の 50、60-Hz 磁場を 1 時間 ~ 32 日間曝露した結果、細胞内 DNA

¹ 本章の内容の一部は [109]に掲載されている。

損傷の増加が報告されている。また、プラスミド溶液中へ銅イオン (II) と過酸化水素 (H_2O_2) を添加し、低周波磁場を曝露することでプラスミド DNA の切断量が増加 [46]、また、遷移金属 (スズ) 処理したプラスミドへ磁場を曝露することで DNA の切断量が増加したことが報告されている [47]。これらの結果を通して、低周波磁場に遺伝毒性がある可能性が考慮され、WHO は低周波磁場を発がん性の可能性を示すクラス 2B へ分類した [48]。一方、細胞を用いた実験系において、Ivancsits らの一連の研究が 50-Hz で 5 分 ON、10 分 OFF 断続波形磁場曝露が繊維芽細胞 DNA 損傷を増加させ、連続波形磁場では増加させないことを報告した [49] [50] [51] [52]。一方、McNamee et al. は DNA 損傷が起こらなかったことを報告している [53] など、磁場と DNA 損傷の関係性については、非常に複雑で、DNA 損傷の有無は細胞種や曝露する磁場の条件 (強度、周波数、波形) など実験条件に依存している可能性が考えられる。

本実験の目的は、さまざまな磁場条件の低周波磁場曝露した株化細胞の DNA 損傷度を測定し、磁場の強度や曝露時間に関してスクリーニングを行い、低周波磁場の遺伝毒性評価を行うことならびに先行研究の検証を行うことである。

2.2 材料と方法

2.2.1 実験に用いた材料等

細胞培養には、ダルベッコ最小必須培地、ペニシン-ストレプトマイシン、L-グルタミン、ウシ胎児血清はライフテクノロジーズジャパン (東京) から購入し、用いた。PH 緩衝溶液調整用のトリスヒドロキシメチルアミノメタン (トリス)、その他の化学薬品は和光純薬 (大阪) から購入した。細胞溶解溶液 (2.5 M 塩化ナトリウム、100 mM Na_2EDTA 、10 mM トリス (pH 10))、細胞電気泳動用に低融点アガロース、DNA 染色用 SYBR[®] Green I ($\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{S}^+$)、コメットアッセイ用スライドはトレビジェン社 (Gaithersburg, MD, USA) から購入した。超純水は MilliQ Simplicity UV (ミリポア、東京) によって調整し、実験に用いた。

2.2.2 実験で用いたバッファー

DNA 損傷度測定のためのコメットアッセイ (後述) には、塩基性緩衝液 (200 mM NaOH、1 mM Na_2EDTA 、pH 13.5)、あるいは中性緩衝液 (100 mM Tris Base、300 mM 酢酸ナトリウム、pH 9.0) を使用した。その他、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (137 mM NaCl 、 2.7 mM KCl 、 $8.1\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $1.47\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$)、トリス-EDTA バッファー (5 mM tris、1 mM Na_2EDTA 、pH 8.5) を使用した。

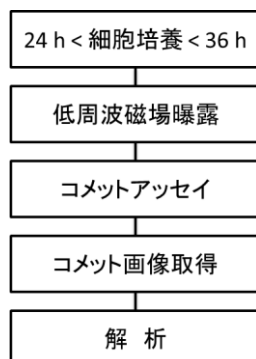


Fig. 9 : 実験工程を示すフローチャート。細胞培養し、低周波磁場曝露を行ったのちすぐにコメットアッセイを行い、画像解析を行うことで DNA 損傷度測定を行った。

2.2.3 細胞培養

実験には入手、培養が容易な株化繊維芽細胞 (Swiss 3T3 Albino ; 以下繊維芽細胞) を用いた。細胞は SWISS 3T3 Albino 線維芽細胞 (理研バイオリソースセンターから購入) を用いた。培地はダルベッコ最小必須培地をベースとし、10% ウシ胎児血清、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、2% L-グルタミンを添加し、調整した。6 cm ディッシュあたり 2×10^5 の密度で細胞を播種し、CO₂ インキュベータ (Model 5410、NAPCO) 内 (37 °C、5% CO₂、湿度 95%) で培養した。播種後 24 時間以上 36 時間以内で、磁場印加を開始した。

2.2.4 磁場曝露装置

Merritt らによって開発されたメリットコイル [54] を、インキュベータ内に設置することで、細胞を培養しながら磁場を印加した。このメリットコイルにおいては内部磁場が均一な空間はヘルムホルツコイルに比べて広い [54]。本実験で用いたコイルは四角形 (20 cm × 20 cm) のコイルを 4 つ連ねて構成されている (Fig. 10)。各コイルはエナメル線を巻いており、それぞれのコイルの巻き数は、上から 1 段目・4 段目が 26 巻、2 段目・3 段目が 11 巻である。磁場印加に伴う熱を考慮して、コイル内の配線は導線を二重配線にした。曝露用では二本の導線に同方向に電流を流し、非曝露用コイルでは電流を逆方向に流すことで、同様のジュール熱効果が生じる。配線を切り替えることで曝露用コイル、非曝露用コイルの条件は入れ替えることができる。コイルに通電していないとき、Sham と呼ばれ、通電した状態の非曝露条件を Active Sham と呼ぶ (Table. 1)。メリットコイルは、2 セットあり、1 セットずつインキュベータ

内に設置された。コイル内の電場を抑えるためにアースを取り、銅箔を巻きつけ、コイル内の電場が 1 V/m 以下になるようにした。

電流の出力は、マルチファンクションジェネレータ WF1973 または、WF1943A (エヌエフ回路設計ブロック)、オーディオアンプ PMA-390SE または、PMA-390AE (Denon、川崎) によって行った。(Fig. 10)

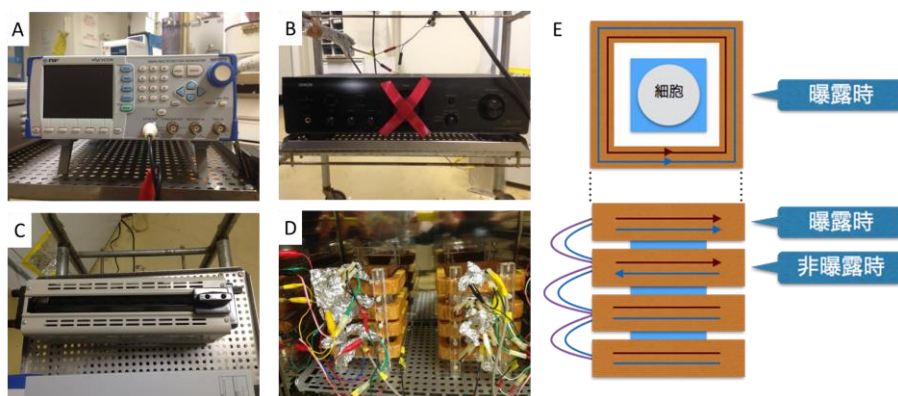


Fig. 10 : A)ファンクションジェネレータ、B)アンプ、C)抵抗、D)メリットコイル写真 E)メリットコイル内の配線と電流の流れを示す概略図。電流の向きをそろえる (→→) ことで磁場曝露を、電流の向きを逆方向 (→←) に設定することで非曝露条件を作り出すことができる。

Table. 1 : 磁場曝露の際に使用される表記とその説明。

| 表記 | 説明 |
|-------------|-------------------------|
| Sham | コイルに通電していない状態 |
| Active Sham | 通電した状態の非曝露条件 (通電の方向は→←) |
| Exposure | 通電した状態の曝露条件 (通電の方向は→→) |

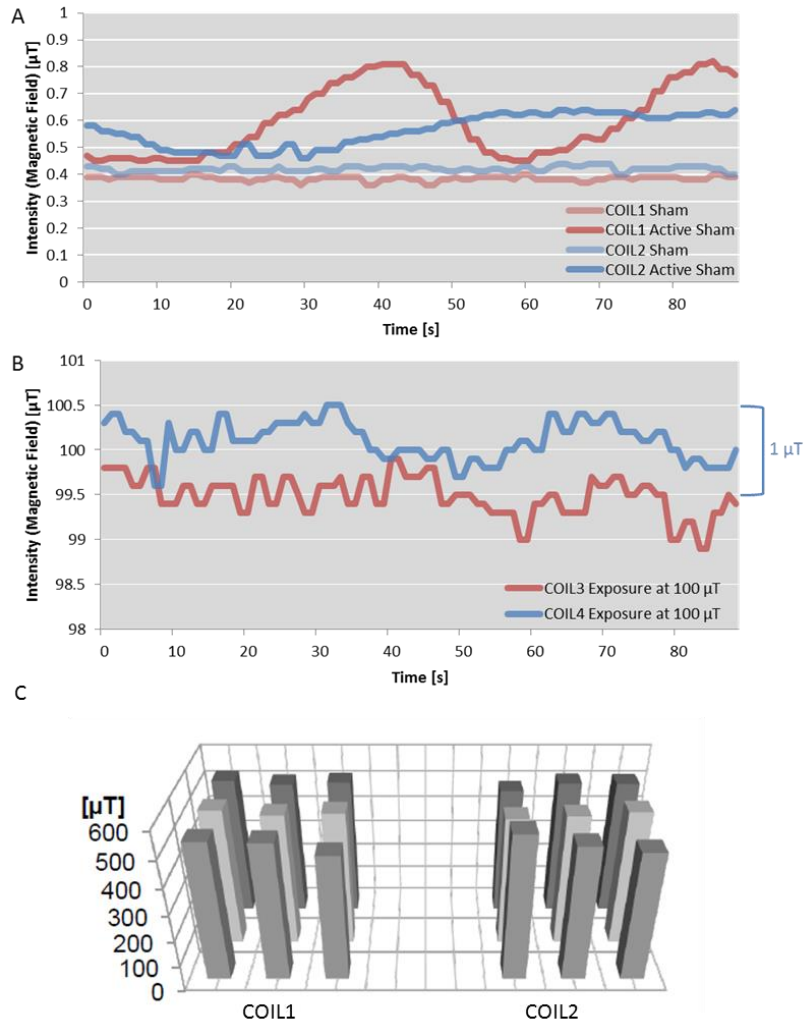


Fig. 11 : A)非曝露コイル内の一秒ごとの磁場強度変化。コイルに通電していないとき、Sham と呼ばれ、その背景磁場の強度は約 0.4 μT であった。通電した状態の非曝露条件を Active Sham と呼び、磁場強度は 0.6 μT 付近で緩やかに上下した。B)100- μT 磁場曝露 (Exposure) 時のコイル内の磁場強度を示した。磁場強度の揺れは $\pm 1 \mu\text{T}$ 以内に収まっている。C)メリットコイルの特徴は広く一様な磁場を生成することが出来ることである。図は 500- μT 磁場曝露中のコイル内の磁場強度の分布を示している。中心の強度からのずれは最大 10%程度であった。図 C は [55]から引用。

コイル内の Z 軸方向（垂直方向）の磁場強度の測定は、ガウスメーター（FW Bell 4190：周波数反応 30～2 kHz、強度範囲 0.01～199.9 μT ）によって、1 秒ごとに行った（Fig. 11A、B）。非曝露条件ではコイルによっては、強度が安定しないことがわかった。これは、アンプを含めた電気回路の何らかの不安定性によって生じると考えられる。本研究では、比較的安定したコイルを非曝露コイルとして用いた。コイル内の磁場強度は、中心の強度からのずれは最大で 10%程度であった [55]（Fig. 11C）。

温度データは記録式のサーミスタ温度計 TR71U（T&D corporation、松本）で計測し、磁場曝露群、コントロール群の間の温度差は 0.2°C 以下となるようにインキュベータの温度設定を調整した（Fig. 12）。

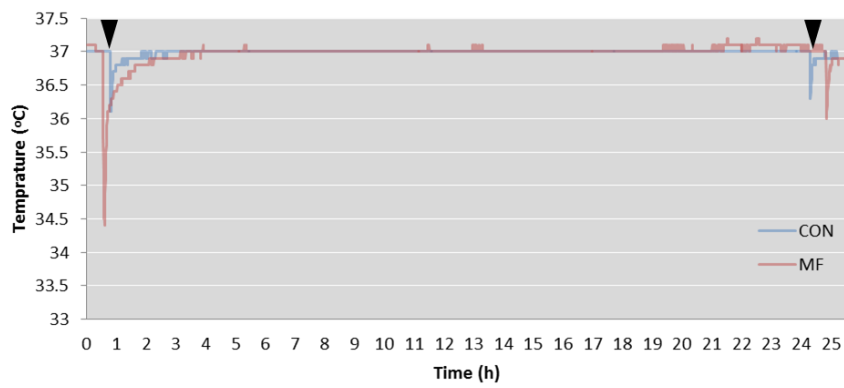


Fig. 12: 磁場曝露実験時の温度コントロール例。定常状態での温度が約 37°C になるようインキュベータの調整を行った。サンプルの入出の際、インキュベータ扉の開閉（図中▼）によって下がった温度は約 2～3 時間で 37°C に戻った。

2.2.5 磁場曝露条件

本実験においては、ICNIRP によるガイドラインで職業曝露上限値に指定されている 1000- μT [56]とその半分の強度の 500- μT 正弦波連続波形の 50-Hz 磁場を 2～24 時間印加した。

Table. 2：実験に用いた磁場強度と曝露時間、磁場波形条件を示している。

| 強度 | 連続波形磁場 | 断続波形磁場 |
|--------------------|-------------|-------------|
| 500 μT | 15、18、24 時間 | 15、18、24 時間 |
| 1000 μT | 2、24 時間 | — |

また、前述のとおり、Ivancsits らの一連の研究が 50-Hz で 5 分 ON、10 分 OFF 断続波形磁場曝露が DNA 損傷を増加させることを報告した [49] [50] [51] [52]。この結果を検証するため、本実験においても 5 分間 ON、10 分間 OFF の断続波形の 500- μ T、50-Hz 正弦磁場を 15~24 時間印加した。

2.2.6 コメットアッセイによる DNA 損傷度測定

細胞核内の DNA の損傷度を評価する方法として、コメットアッセイ（単一ゲル電気泳動法）を用いた。コメットアッセイは、アガロースゲル中に包埋した細胞を界面活性剤で処理し、細胞膜その他のタンパク質を溶解し、残った DNA をゲル中で電気泳動する手法である [57]。コメットアッセイは、比較的容易なため、医療分野の研究に利用されている。遺伝子に対する放射線の毒性や、薬品の毒性や発ガン性の判定がその一部である。本実験においては、磁場印加ののち、細胞をセルスクレイパーでディッシュからはがし回収、5 分間 28 x g で遠心し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で 2 回洗う。最終的に 10⁵ cell/ml の密度で PBS 内に懸濁し、低融点アガロースゲルに 10⁴ cells/ml の密度で細胞を包埋後、それぞれのサンプルを Comet Slides へ滴下し、4°C で凝固させた。その後、4°C で 60 分間界面活性剤で処理した。この後、SSB 測定時には、20 分間塩基性緩衝液に浸漬し、塩基性環境下 4°C で 40 分間電気泳動（1 V/cm、300 mA）を行った。その後、MilliQ に 5 分間浸漬を 2 回行い、70%エタノールに 5 分間浸漬し室温で乾燥した。一方、DSB 測定時には、塩基性緩衝液の代わりに、中性緩衝液を使用し、電気泳動終了後、30 分間 7.50 M 塩化アンモニウム溶液へ浸漬し、30 分間 70%エタノールに浸漬した。室温で EDTA バッファーに溶解させた SYBR Green I (20 μ g/ml)によって DNA を染色し、コメットパターンを観察した。

損傷を受け切断された DNA は電気泳動によって、ゲル中を移動する。損傷のない DNA はももとの核の位置に留まる。泳動し、蛍光染色後、顕微鏡によって、泳動しなかった損傷の無い DNA の集合（以下 Head）と、その集合に尾を引いた部分である損傷した DNA（以下 Tail）が観察できる（Fig. 13）。観察される Tail の彗星のような形状をコメットと呼び、コメットの DNA 損傷部の Tail について画像解析する事で DNA 損傷度を評価する。Tail の長さや強度の積算値、Tail 部分の全体に対する割合から、DNA の損傷度を定める（次節）。

一連の実験は光による DNA 損傷を避ける為一連の実験は黄色光の下で行った。陽性対照実験には、DNA 損傷作用のある過酸化水素を用いた。細胞を 4°C で 500 μ M 過酸化水素で保温したのち、コメットアッセイを行い、濃度ごとに評価を行った。

2.2.7 DNA 損傷度の解析方法

コメットアッセイによって得られたコメット画像解析は安藤樹氏（平成 27 年度卒業）と共同開発したプログラム [38]によって行った。処理条件によってそれぞれ 100 ~ 200 のコメットを解析し、DNA 損傷度として Olive Tail moment [58]を下の計算に基づいて求めた。

$$\text{Olive tail moment} \equiv \frac{\sum x(i,j) \cdot I_{Ti}}{\sum I_{Ci}} \quad (1)$$

$i(\geq 0)$ は、水平軸のヘッド中心からの Tail 方向への距離を、 j は垂直方向への距離を表す。 I_T は Tail 部分の位置 $x(i, j)$ における強度 $I(i, j)$ 、 I_C はコメット全体の位置 (i, j) における強度 $I(i, j)$ を表している。

DNA 損傷度を定量化するためのパラメータには、Tail の長さ、Tail の強度などいくつかある。安藤氏の研究によって、Olive Tail Moment は、わずかな違い (10- μ M 過酸化水素による刺激 (Fig. 13C の青と赤のバーを比べる)) を定量化することが出来ることがわかったため本研究で採用された。

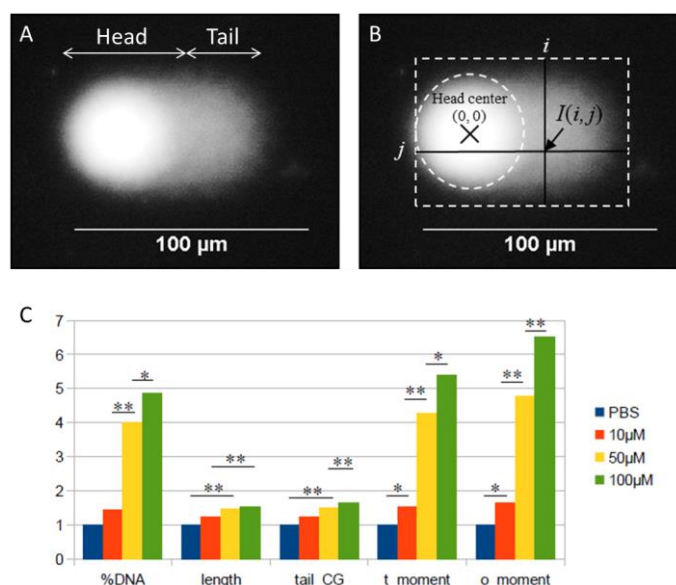


Fig. 13 : A) コメット画像。DNA の損傷がなく、凝集した部分を Head、損傷して電気泳動によって流れた部分を Tail と呼ぶ。B) 解析にもちいた Olive Tail Moment は、Head Center からの距離とその強度を用いて式(1)によって求められる (式(1))。C) 安藤による解析例。OliveTail Moment (図中では o_moment) を用いることによって 5- μ M 過酸化水素刺激による DNA 損傷度まで測定が可能となった [38]。

2.2.8 統計処理

統計解析には対による t-検定を用いた。各実験の平均値 \pm 標準誤差 (SEM) を計算した。結果の図におけるエラーバーは標準誤差を示している。P値 < 0.05 のとき、差は有意であるとした。

2.3 結果と考察

本実験において、繊維芽細胞に各条件の磁場曝露を行い、コメットアッセイを行い、OliveTail Moment を DNA 損傷度の指標として、解析を行った。以下にその結果と考察を記述する。

2.3.1 コイルによる差の有無を調べる実験

磁場曝露装置であるメリットコイル間で差があるかどうか両コイルとも Active Sham に設定してネガティブコントロール実験を行い、SSB を指標として、評価した。結果は Fig. 14 に示した。コイル間で差がないことが確認された (21.11 vs. 19.52 ; P=0.313)。

Active Sham 同士の DNA 損傷度測定結果

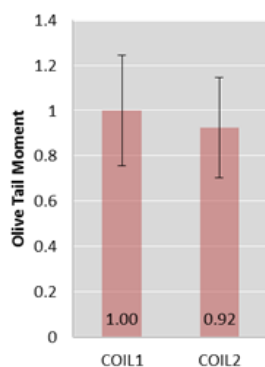


Fig. 14 : DNA 損傷度 (SSB) 測定結果 (コイル間での差) (n = 6)。

2.3.2 連続波形磁場曝露実験

繊維芽細胞への連続波形磁場曝露実験の結果を Table. 3、Fig. 15 に示した。1000- μ T 磁場を 2 時間または、24 時間曝露したとき、SSB に関して有意な差は見られなかった (Table. 3、Fig. 15)。2 時間、24 時間連続磁場曝露実験によるコントロール群と曝露群の DNA 損傷度 (SSB) に、有意な変化は見られなかった。一方、24 時間曝露し、DSB を測定した結果、有意な差が観察された。500- μ T 磁場を 15 時間、18 時間、24 時間曝露したときの DNA 損傷度 (SSB、DSB) は、いずれも有意な差は見られなかったが全体的に曝露群が増加する傾向が見られた (Table. 4、Fig. 16)。

本実験において連続波形磁場曝露における DNA 損傷度は 1000- μ T 磁場の 24 時間曝露 DNA 切断の DSB のみ有意に増加した。24 時間の磁場曝露による SSB の有意な変化が測定されなかった理由としては、生体内の SSB 修復機構によって修復されたことが考えられる。500- μ T 磁場では DNA 損傷の有意な変化は見られなかったが全体として増加傾向は見られた。Mattsson と Simko のメタアナリシスで 1000- μ T 以上

の強度の磁場による生体作用において有意な変化が見られる傾向にあることが発表された [59]。本実験結果においても DSB についてはこれと矛盾しない。

Table. 3 : 1000- μ T 連続波形磁場曝露による DNA 損傷度。

| 500- μ T MF (Continuous) | | 平均値 | 標準誤差 | n |
|---------------------------------|-----|-------|------|---|
| 2 h (SSB) | CON | 8.54 | 1.23 | 7 |
| | MF | 7.89 | 1.39 | |
| 24 h (SSB) | CON | 5.90 | 0.23 | 4 |
| | MF | 5.90 | 0.39 | |
| 24 h (DSB) | CON | 19.17 | 5.87 | 6 |
| | MF | 20.82 | 6.32 | |

Continuous は断続波形磁場曝露、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、n は、実験回数を示す。

1000- μ T 連続波形磁場曝露による DNA 損傷度測定結果

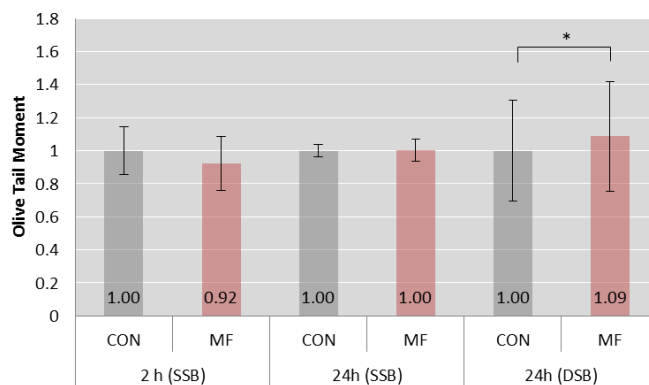


Fig. 15 : 繊維芽細胞を用いた 1000- μ T 連続波形磁場曝露実験結果。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF) について、曝露時間条件、DNA 損傷度のタイプ (SSB、DSB) ごとの実験値をコントロール群の平均値で規格化し、平均値 \pm SEM を示している。* は $P < 0.05$ を示している。

Table. 4 : 500- μ T 連続波形磁場曝露による DNA 損傷度。

| 1000- μ T MF (Continuous) | | 平均値 | 標準誤差 | n |
|----------------------------------|-----|-------|------|---|
| 15 h (SSB) | CON | 18.57 | 1.18 | 6 |
| | MF | 19.11 | 1.46 | |
| 18 h (SSB) | CON | 17.76 | 0.86 | 6 |
| | MF | 19.87 | 2.39 | |
| 24 h (SSB) | CON | 12.53 | 4.06 | 5 |
| | MF | 13.80 | 4.86 | |
| 24 h (DSB) | CON | 19.12 | 3.13 | 4 |
| | MF | 23.18 | 4.03 | |

Continuous は断続波形磁場曝露、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、n は、実験回数を示す。

500- μ T 連続波形磁場曝露による DNA 損傷度測定結果

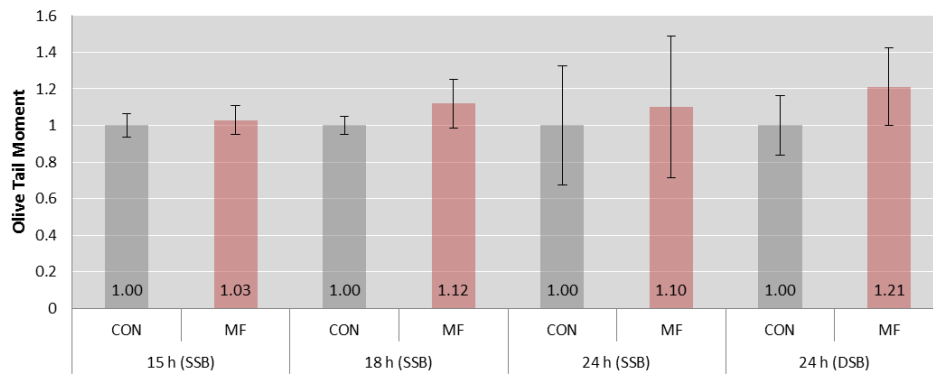


Fig. 16 : 繊維芽細胞を用いた 500- μ T 連続波形磁場曝露実験結果。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF) について、曝露時間条件、DNA 損傷度のタイプ (SSB、DSB) ごとの実験値をコントロール群の平均値で規格化し、平均値 \pm SEM を示している。

2.3.3 断続波形磁場曝露実験

線維芽細胞への断続波形磁場（5 分間 ON、10 分間 OFF）曝露実験の結果を Table. 5 と Fig. 17 に示した。500- μ T 磁場を 15、24 時間曝露したときの DNA 損傷度 (SSB) は、いずれも有意な差は見られなかったが、15 時間曝露による DNA 損傷傾向が見られた。一方、曝露時間の中間値である 18 時間曝露をしたとき、有意な差が見られた。24 時間曝露による DSB の測定も行ったが、有意な差は見られなかった。

Table. 5 : 500- μ T 断続波形磁場曝露による DNA 損傷度。

| 500- μ T MF (Intermittent) | | 平均値 | 標準誤差 | n |
|-----------------------------------|-----|-------|------|---|
| 15 h (SSB) | CON | 9.13 | 2.17 | 4 |
| | MF | 10.26 | 2.46 | |
| 18 h (SSB) | CON | 13.38 | 3.79 | 6 |
| | MF | 15.82 | 3.94 | |
| 24 h (SSB) | CON | 7.15 | 1.69 | 4 |
| | MF | 7.11 | 1.34 | |
| 24 h (DSB) | CON | 25.46 | 4.20 | 6 |
| | MF | 24.84 | 3.99 | |

Intermittent は断続波形磁場曝露、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、n は、実験回数を示す。

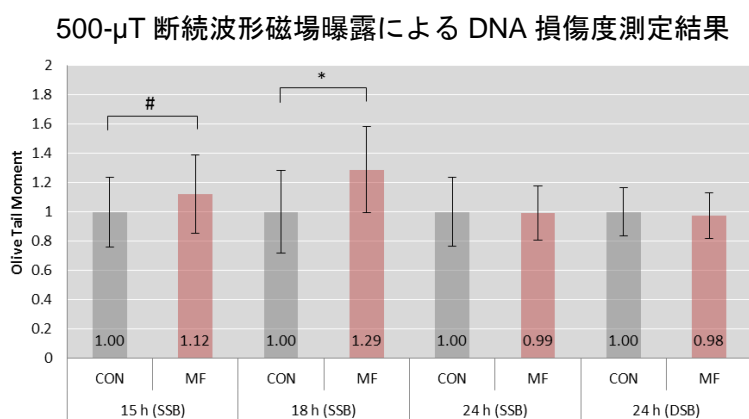


Fig. 17 : 線維芽細胞を用いた 500- μ T 断続波形磁場曝露実験結果。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF) について、曝露時間条件、DNA 損傷度のタイプ (SSB、DSB) ごとの実験値をコントロール群の平均値で規格化し、平均値 \pm SEM を示している。# は $0.05 < P < 0.10$ 、* は $P < 0.05$ を示している。

本実験において断続波形磁場曝露実験の結果は 18 時間曝露によって DNA 損傷 SSB が有意に増加した。この結果は、Ivancsits らによる同様の繊維芽細胞を用いた断続波形磁場曝露実験 [60]の中間時間において DNA 損傷度が最大になるという結果を一部再現している (Fig. 18)。この結果から、DNA 損傷の程度は、磁場曝露時間に依存している。また 24 時間曝露で DNA 損傷は見られなかったのは修復時間によっていると考えられる。本実験結果では連続波形磁場曝露による DNA 損傷度は測定されなかった。この結果に関しても、[49] [50] [51] [52]の結果を再現している。これらの結果から、連続波形磁場曝露より断続波形磁場曝露の方が DNA の損傷を促進しやすいことが確認できた。断続波形磁場による先行研究は非常に少ない。ちなみに、我々の研究室の先行研究では、同様の断続波形磁場で 100- μ T 磁場を 24 時間曝露したとき、HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) のカルシウムイオンチャンネルに関する遺伝子発現が変化した [61]。

低周波磁場の生体システムへの作用のメカニズムは、未だ解明されていないが、生体分子の電荷の移動への相互作用の可能性が考えられている [62]。DNA の塩基対内で電子は移動が可能であり [63] [64]、Blank と Goodman によって、低周波磁場が特定の DNA 配列 (n CTCTn : C、T はデオキシリボ核酸のうちシトシンとチミンを示す) において連鎖的に分離を引き起こす斥力 (ローレンツ力) を発生させ、DNA 内の電子移動と相互作用するという仮説が唱えられた [65]。つまり、DNA が転写される際に、磁場の影響を受けやすい場所が存在、断続波形の低周波磁場の ON、OFF の変換によって、そこから DNA 鎖の開裂が引き起こされ、DNA 損傷が誘導されるという。この機構によって、本実験の結果が導かれた可能性が考えられるが、確定的なことは本実験からは言えない。

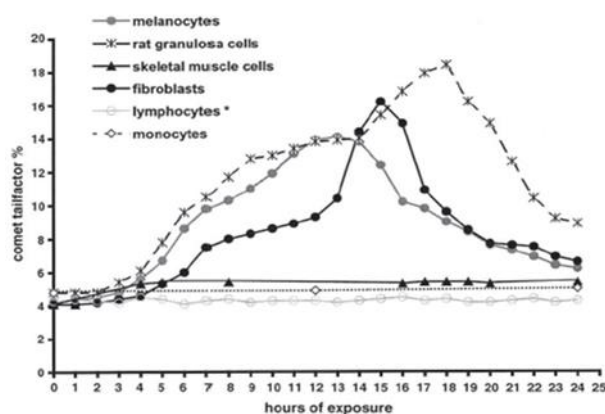
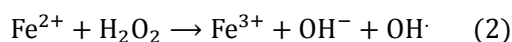


Fig. 18: Ivancsits らによる断続波形磁場曝露実験結果 [52]。縦軸は DNA 損傷度、横軸は磁場曝露時間を示している。繊維芽細胞を用いた実験結果 (2.3.3) は 15 時間曝露をしたとき、最大値を示している。これは本実験の結果と類似している。

2.4 まとめ

本実験の結果から、1000- μ T、24時間の連続磁場曝露ならびに500 μ T、18時間の断続磁場曝露によって、DNAのDSB損傷が見られ、低周波磁場が生体内のDNA損傷を引き起こす可能性が確認できた。部分的だがIvancsitsらの研究の再確認ができた。この分野の研究では、異なった研究者で現象が再現しない例が多いことを考えると、本研究は特筆すべきである。また、Ivancsitsらが初代細胞を用いたのに対し、株化細胞でもDNA損傷が見られたことは、この現象が一般的であることを伺わせる。LaiとSinghの先行研究[36]によると、低周波磁場曝露によるDNA損傷は、フリーラジカル捕捉剤やビタミンE誘導体、一酸化窒素合成酵素(NOS)阻害剤(一酸化窒素(NO)はフリーラジカル的一种)、鉄キレート剤を加えることによって、阻害された。フリーラジカルはDNAだけでなく脂質膜、タンパク質に損傷を与え、細胞内のホメオスタシス(恒常性)へ影響を与える[66][67]。一方、鉄イオンポンプが核膜上に存在しているため、鉄は細胞質内より細胞核に多く存在[68]することや、DNAと二価鉄の複合体において、ラジカルが生成されやすいことが報告されている[69]。この結果から、彼らは低周波磁場の遺伝毒性は生体内の鉄やフリーラジカルを介して起こっていると考え、鉄を触媒としたフリーラジカル生成反応であるFenton反応に磁場が影響する事によってDNA損傷が引き起こされるという仮説を提唱した。Fenton反応とは鉄を触媒とし、過酸化水素を \cdot OHに変化させる反応である(式(2))。



彼らの仮説によると、細胞内の鉄イオンのホメオスタシスへ低周波磁場が影響を及ぼし、Fenton反応によって生成された \cdot OHがDNA鎖切断や細胞膜の脂質過酸化、タンパク質変性を引き起こすという。カルシウム(Ca)貯蔵オルガネラである小胞体膜が過酸化されるとCaイオンが漏れ出す。その結果、カルシウム結合タンパク質カルモジュリンに依存したNOSが活性化する。NOSによってつくられたNOは鉄イオンを触媒としてフリーラジカル生成[70]、また、フェリチンから鉄の放出を増加させる[71]。これはFig. 19に示すような、正のフィードバックである。これにより生成したフリーラジカルによる、DNAの損傷が細胞内の抗酸化作用や修復作用によって修復されなければ、フリーラジカルの脂質過酸化作用によって細胞死が引き起こされる。この仮説を念頭に、本実験の結果として得られたDNA損傷が誘導された経路について詳細に研究する必要があるだろう。

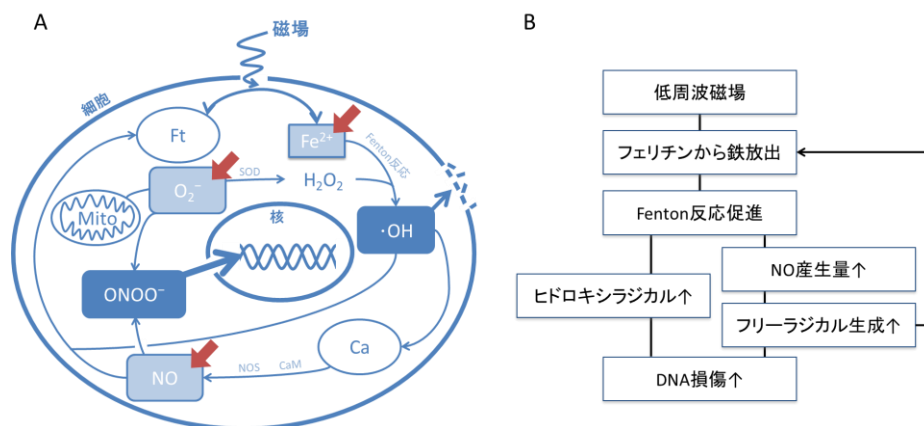
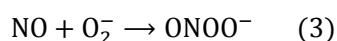


Fig. 19 : Lai と Singh による低周波磁場が DNA 損傷を誘導する仮説概念図 [36]。図 A の Ft : フェリチン、Fe²⁺ : 鉄イオン、·OH : ヒドロキシラジカル、Ca : カルシウム、NO : 一酸化窒素、Mito : ミトコンドリア、O₂⁻ : スーパーオキシドアニオン、ONOO⁻ : ペルオキシドアニオンを示している。·OH、NO、O₂⁻、ONOO⁻はフリーラジカルとして分類されている。また、図 A の赤い矢印で刺された物質は Lai と Singh の論文において阻害することで磁場による DNA 損傷が抑制された物質である。図 A を簡略化して表した図が図 B である。細胞内のフェリチンからの鉄イオン放出へ低周波磁場が影響を及ぼし、Fenton 反応によって生成された·OHが DNA 鎖切断や細胞膜の脂質過酸化、タンパク質変性を引き起こす。過酸化されたカルシウム (Ca) 貯蔵オルガネラである小胞体膜から Ca イオンが漏れ出し、その結果、カルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンに依存した NOS が活性化する。NOS によってつくられた NO は鉄イオンを触媒としてフリーラジカル生成、また、フェリチンから鉄の放出を増加させる (正のフィードバック ; 図中の紫矢印)。

3 酸化ストレス物質存在下における低周波磁場による DNA 損傷測定²

3.1 本研究の背景

前章にて低周波磁場が DNA 損傷という形で生体へ影響を及ぼすという実験結果を示した。低周波磁場が DNA 損傷を引き起こす要因の一つとして Lai と Singh による仮説においては、細胞内に存在する鉄とフリーラジカルが関与している可能性が示されている。フリーラジカルの中でも、 $\cdot\text{OH}$ は寿命が非常に短く ($\sim 1\ \mu\text{s}$) 短距離 ($\sim 40\ \text{\AA}$) しか拡散できず、また、測定するのが困難である一方で、 NO は寿命も長く ($\sim 1\ \text{s}$)、比較的広い範囲に拡散 ($\sim 1000\ \mu\text{m}$) することから、比較的容易に測定が可能である。これらの事実から、本研究室においても、 NO に着目し、低周波磁場曝露による NO 産生量の研究を以前から行ってきた。HUVEC (ヒト臍帯静脈皮細胞) への $1000\text{-}\mu\text{T}$ の 50-Hz 磁場曝露によって NO 生成物の変化が観察された [72]。しかしながら、その後実験結果を再現することが出来なかった [73]。また、先行研究 [74]と比較したとき、得られた NO 産生量が微量であり、測定の信頼性が低いことが課題であった。そこで私は、免疫細胞マクロファージとリポポリサッカライド (LPS) との関連性に注目した。LPS は培養培地に含まれる血清内の LPS 結合タンパク質と結合し、複合体が免疫細胞膜にあるレセプターに結合する。これにより、細胞内信号伝達経路が活性化され細胞分化、遺伝子発現変化など、様々な影響を与える (Fig. 20)。特に、 NOS の一種である iNOS を発現させ、 NO 産生量を劇的に増加させることが知られている。生成された NO は LPS 刺激によって生成されるスーパーオキシド (O_2^-) と反応し、強力なラジカル的一种で DNA 損傷や脂質過酸化を引き起こすペルオキシナイトライト (ONOO^-) を生成する (式(3))。



したがって、低周波磁場による DNA 損傷作用がフリーラジカルによるものであるならば、LPS を添加したマクロファージでは、低周波磁場による DNA 損傷は促進されるという仮説を立てた。そこでマクロファージを用いた、LPS 刺激によって NO 産生を促し、低周波磁場の曝露による、DNA 損傷 (遺伝毒性) と細胞死 (細胞毒性) を同時測定した。細胞死には、プログラム死であるアポトーシスと環境の悪化によって生じる細胞壊死、ネクローシスがあることが知られている。本実験ではアポトーシスの指標としてアポトーシスを誘導するカスパーゼ、そして、ネクローシスした細胞は細胞自身を染めることによって測定を行った。さらに、DNA 損傷作用を誘導するフリーラジカルである NO 産生量の測定を行った [55]。

² 本章の内容は [108]に掲載されている。

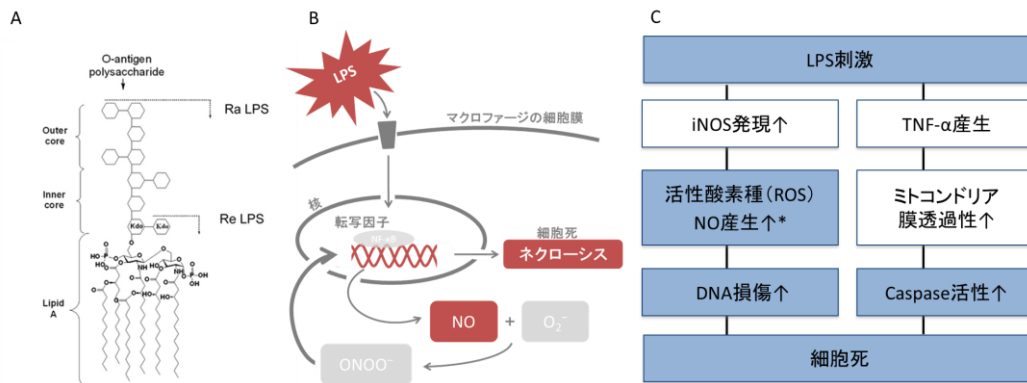


Fig. 20: LPS の分子構造と LPS 刺激による主な活性作用を示した(青で示した部分)。LPS は免疫細胞膜にあるレセプターに結合することより、細胞内に様々な作用を引き起こす。本実験において LPS による NO 産生、DNA 損傷、細胞死を調べた。それぞれに関連する経路を示した。*は中村によって測定された。

3.2 材料と方法

3.2.1 実験に用いた材料等

2.2.1 で記述した物質については省略。

*E*大腸菌 O26 由来のリポポリサッカライド (LPS) は Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA) から購入した。最小必須培地 (MEM) は Life Technologies Japan から購入した。その他の薬品は和光純薬から購入した。Propidium Iodide (PI)、Flourescent-Labeled Inhibitor of Caspases® (FLICA®)、キットは Immunochemistry Technologies から購入した。

3.2.2 実験で用いたバッファー

2.2.2 を参照。

3.2.3 細胞培養

実験で用いたマクロファージ (RAW246) は理研から購入した。細胞は 6 cm ディッシュあたり 2×10^5 cell/ml の密度で播種され、MEM (10% 熱非働化ウシ胎児血清、1% ペニシリン-ストレプトマイシン、2% L-グルタミン含有) によって CO₂ インキュ

ベータ(model 5410、NAPCO、Chicago, IL, USA)内で 37°C、5% CO₂、湿度 95%の条件下で 70 - 90%のコンフルエント（集密）状態まで培養した。

3.2.4 LPS 添加

マクロファージを活性化するために LPS による刺激を行った。LPS は血清中の LPS 結合成分と結合した後細胞膜貫通レセプターLR4 と結合する。LPS 刺激によって細胞周期が停止することで増殖が停止することが知られている。

マクロファージは磁場曝露前、新しい培地で洗ったのち、10 ng/ml LPS を添加し、37°C で 1 時間保温した。その後、培地で二度洗浄し、新しい培地を添加し 24 時間、磁場曝露を行った。

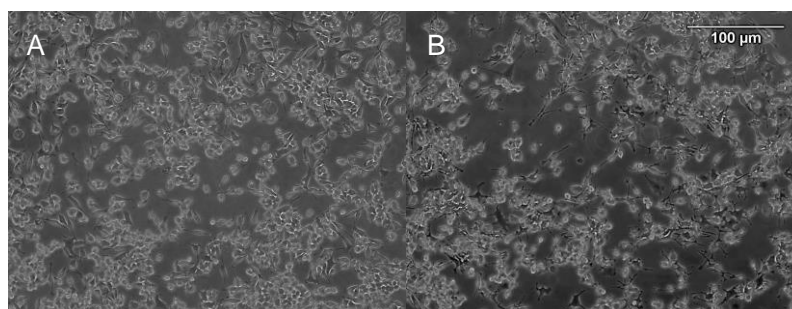


Fig. 21 : A)通常培養細胞、B)LPS 刺激細胞の 10 倍顕微鏡写真。通常培養では丸い形状をしていた細胞は LPS 刺激によって突起をのばし広がったような形状へと変化する

3.2.5 磁場曝露装置

2.2.4 を参照。

3.2.6 磁場条件

LPS 刺激後、メリットコイルによって連続波形 50-Hz、500- μ T 正弦磁場を 24 時間印加した。

3.2.7 マイクロプレートリーダー

蛍光強度、吸光強度の測定にはマイクロプレートリーダー（model SH-9600、Carona electric japan)を用いた。

3.2.8 コメットアッセイによる DNA 損傷度測定

2.2.6 で記述した部分に関しては、省略する。本実験では、DNA 損傷度として SSB を測定した。

低周波磁場曝露結果と比較を行うために、10 μM 、100 μM 過酸化水素で 4°C で 1 時間処理したときの、DNA 損傷度を測定した。

3.2.9 コメット画像解析

2.2.7 を参照。

3.2.10 総細胞数測定

カスパーゼ測定 (3.2.11)、ネクローシス測定 (3.2.12) において 1 細胞当たりの値に規格化するため、細胞数を計数した。計数には、血球計算盤を用いて、数取り器 (Fig. 22) で計測した。



Fig. 22 : 細胞総数測定に用いた数取り器。血球計算盤を用いて細胞数を目視でカウントすることで総細胞数を見積もった。

3.2.11 カスパーゼ活性測定

FAM-FLICA®は細胞内でアポトーシスを誘導するカスパーゼ阻害剤の蛍光性誘導体色素であり、すべての活性化カスパーゼを検出する (Fig. 23)。

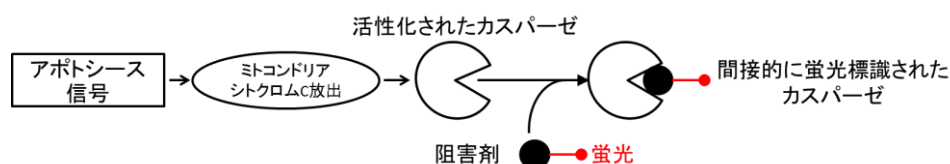


Fig. 23: アポトーシス信号によって、ミトコンドリアからシトクロム C が放出され、カスパーゼが活性化される。本実験で用いた、FAM-FLICA®はカスパーゼ阻害剤の蛍光性誘導体色素であり、すべての活性化カスパーゼを検出する。

本実験においては、磁場曝露後細胞をセルスクレイパーで剥ぎ取り 500 rpm 5 分間遠心し 300 μ l FAM-FLICA®を添加した。60 分間 37°C で保温した後、Apoptosis Wash Buffer を 2000 μ l 添加し、500 rpm 5 分間遠心し、2000 μ l Apoptosis Wash Buffer 懸濁し、10 分間 37°C で保温した。その後 500 rpm 5 分間遠心、300 μ l PBS 懸濁し、100 μ l/well でマイクロプレートに分注し、励起波長 490 nm で、発光波長 520 nm を測定した。

細胞一つ当たりのカスパーゼ活性 (規格化された活性) を測定するため、蛍光強度を細胞数で割った。

3.2.12 ネクローシス測定

PI は膜損傷したネクローシス細胞の内部に浸透し、細胞内のタンパク質や DNA に結合する。PI は DNA の 4 塩基対あたり一分子、結合する。PI は正電荷を持っている。このため生細胞の膜不透過という性質をもっているため、生細胞の DNA に到達することはできず、生細胞と死細胞を区別することが出来る。

本実験においては、磁場曝露後細胞をセルスクレイパーで剥ぎ取り 500 rpm 5 分間遠心し 300 μ l PBS で懸濁した。終濃度が 1.67 μ g/ml になるよう PI を添加し、染色した後、100 μ l/well でマイクロプレートに分注し、励起波長 535 nm で、発光波長 617 nm を測定した。

細胞一個当たりのカスパーゼ活性を測定するため、細胞数を下に述べる方法を用いて測定し、規格化を行った。

3.2.13 統計解析

2.2.8 を参照。

3.3 結果と考察

3.3.1 DNA 損傷度

マクロファージへの LPS 刺激と 50-Hz、500- μ T 磁場曝露実験結果を Table. 6 と Fig. 24 に示した。DNA 損傷度をコメットアッセイの Olive Tail Moment (2.2.7) を指標として評価を行った。その結果、LPS 刺激をしないとき、磁場のみによる DNA 損傷の増加傾向がみられた。LPS 刺激した場合、コントロール群に比べて、DNA 損傷が増加したが、差は有意ではなかった (Table. 7)。一方、磁場曝露群に比べて LPS 刺激と磁場曝露を行った群の DNA 損傷度は、有意に増加した。ポジティブコントロール実験として行った過酸化水素刺激による結果 (Fig. 25、Table. 8) と比較すると、低周波磁場曝露と LPS 刺激による DNA 損傷度は、10 μ M 過酸化水素による DNA 損傷度より小さく、その作用は僅かであることがわかる。

本実験において、LPS 刺激を行ったとき、磁場によって DNA 損傷が有意に増加した。磁場曝露と LPS 刺激したときのそれぞれの DNA 損傷度 Olive Tail Moment の、コントロール群に対する増分を足し合わせた時、LPS 刺激と磁場曝露の両作用の DNA 損傷度の増分にはほぼ等しいことから、磁場による DNA 損傷作用と LPS による DNA 損傷作用は独立な作用だと考えられる。

Table. 6 : 24 時間磁場曝露実験による LPS 刺激の DNA 損傷度。

| 500- μ T MF (Continuous) | DNA 損傷度 | 標準誤差 | n |
|---------------------------------|---------|------|---|
| CON | 12.30 | 2.16 | 7 |
| MF | 14.02 | 1.89 | |
| LPS | 17.21 | 2.04 | |
| MF + LPS | 18.62 | 2.10 | |

Continuous は断続波形磁場曝露、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、LPS は LPS 刺激群、MF 磁場曝露と LPS 刺激をした群は MF + LPS、n は、実験回数を示す。

低周波磁場による DNA 損傷度測定結果

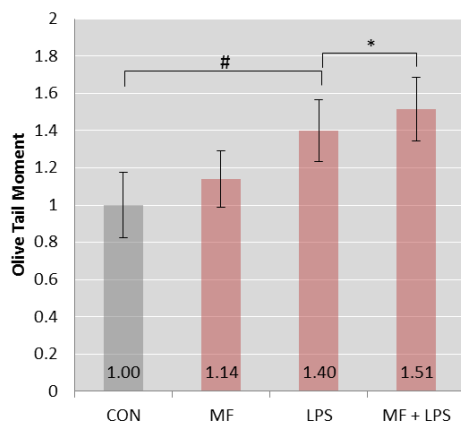


Fig. 24 : マクロファージを用いた 24 時間磁場曝露による DNA 損傷度を Olive Tail Moment を指標として測定した。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、LPS 刺激群 (LPS)、LPS 刺激と磁場曝露群 (MF + LPS) の 4 条件について、DNA 損傷度 (SSB) 測定の結果をコントロール群の平均値で規格化し、示している。実験回数 $n = 8$ 、# は $0.05 < P < 0.10$ 、* は $P < 0.05$ を示している。

Table. 7 : 24 時間磁場曝露実験による LPS 刺激の DNA 損傷度の P-値。

| P 値 | CON | MF | LPS | LPS+MF |
|--------|-------|-------|-------|--------|
| CON | — | — | — | — |
| MF | 0.288 | — | — | — |
| LPS | 0.127 | 0.068 | — | — |
| LPS+MF | 0.090 | 0.042 | 0.030 | — |

Table. 8 : 過酸化水素による DNA 損傷度測定結果。

| H ₂ O ₂ | 平均値 | 標準誤差 | n |
|-------------------------------|------|------|---|
| 0 μM | 8.44 | 0.86 | 4 |
| 10 μM | 14.9 | 2.91 | |
| 100 μM | 46.1 | 4.74 | |

n は、実験回数を示す。

過酸化水素による DNA 損傷度測定結果

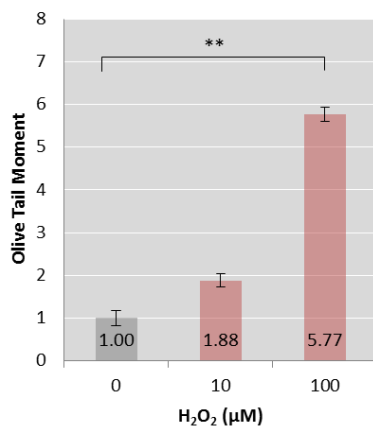


Fig. 25 : 過酸化水素によるマクロファージの DNA 損傷度測定結果を過酸化水素 = 0 の平均値で規格化し、示した。** は P < 0.01 を示している。

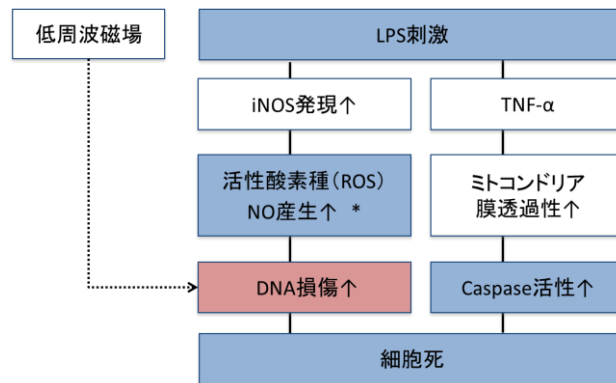


Fig. 26 : 低周波磁場曝露と LPS 刺激によって、DNA 損傷度が増加した。実験結果から低周波磁場曝露と LPS は協働的ではなく、独立な経路によって DNA 損傷を引き起こした可能性が考えられる。*は中村によって測定された。

3.3.2 総細胞総数測定

LPS 刺激したマクロファージへ低周波磁場曝露したとき、総細胞数の測定結果を Table. 9 と Fig. 27 へ示した。LPS 刺激の有無にかかわらず、磁場による細胞数の有意な変化は見られなかった。LPS 刺激を行ったとき、細胞数は有意に減少した ($6.05 \pm 0.74 \times 10^5$ cells vs. $2.78 \pm 0.24 \times 10^5$ cells ; $P < 0.001$)。この LPS の影響は次のように理解される。LPS 刺激によって、マクロファージ中にサイトカイン (免疫システムの情報伝達タンパク質) の一種である腫瘍壊死因子 (TNF α) の産生を引き起こすことが知られている。この TNF α は、細胞膜に存在する TNF レセプターと結合してアポトーシスを誘導するインターフェロン γ (INF γ) を増加させ、その結果インターロイキン (IL) を増加させ、細胞の分化、増殖を抑制する [75]。この機構によって、本実験の結果である LPS 刺激による培養細胞数減少が引き起こされたと考えられる。さらに、LPS 刺激によってミトコンドリア膜電位差が減少することが知られている。ミトコンドリア膜電位差減少に伴う活性酸素種の増加によって、細胞死や細胞周期停止を引き起こす p38 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (p38) が活性化される [76]。この p38 活性化によって、細胞周期の停止や細胞死が誘導されたことによっても、総細胞数の減少が引き起こされた可能性が考えられる。

Table. 9 : 低周波磁場曝露による LPS 刺激マクロファージの総細胞数。

| 500- μ T MF (Continuous) | 平均値 (x 10 ⁵) | 標準誤差 | n |
|---------------------------------|--------------------------|------|---|
| CON | 6.05 | 0.74 | 6 |
| MF | 6.39 | 0.74 | |
| LPS | 2.78 | 0.24 | |
| MF + LPS | 2.41 | 0.34 | |

Continuous は連続波形磁場曝露、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、LPS は LPS 刺激群、MF 磁場曝露と LPS 刺激をした群は MF + LPS、n は、実験回数を示す。

低周波磁場による総細胞測定結果

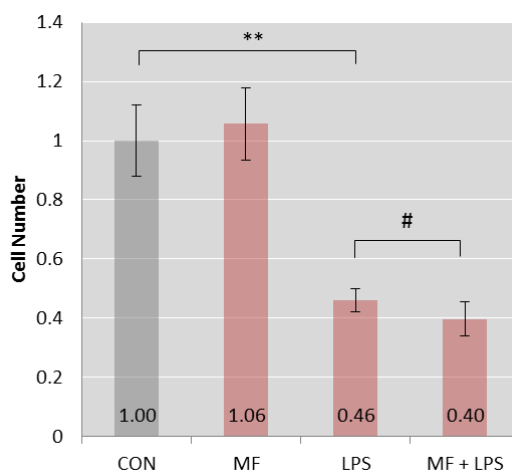


Fig. 27 : マクロファージを用いた 24 時間磁場曝露による総細胞数を測定した。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、LPS 刺激群 (LPS)、LPS 刺激と磁場曝露群 (MF + LPS) の 4 条件について、総細胞数の結果をコントロール群の平均値で規格化し、示している。実験回数は 6 回、** は $P < 0.01$ 、# は $0.05 < P < 0.10$ を示している。

Table. 10 : 低周波磁場曝露による LPS 刺激マクロファージの総細胞数の P-値。

| P 値 | CON | MF | LPS | MF + LPS |
|----------|-------|-------|-------|----------|
| CON | — | — | — | — |
| MF | 0.381 | — | — | — |
| LPS | 0.002 | 0.001 | — | — |
| MF + LPS | 0.001 | 0.000 | 0.097 | — |

3.3.3 カスパーゼ活性測定

一細胞当たりのカスパーゼ活性測定の結果は、Fig. 28 と Table. 11 に示した。LPS 刺激しないとき、磁場曝露による有意な差は見られなかった。LPS 刺激による、カスパーゼ活性の増加は有意ではなかったが、3 倍程度の増加が見られた (Table. 14)。LPS 刺激と磁場曝露は LPS 刺激のみに比べてカスパーゼ活性は増加しなかった。

低周波磁場がアポトーシスを引き起こすという報告はいくつかあるが ([41] [77] [78] [79] [80])、本実験では、低周波磁場曝露によるアポトーシスを誘導することで知られるカスパーゼ活性変化は LPS の有無によらず見られなかった。LPS 刺激によってアポトーシスを誘導する経路は二つある。一つは、LPS 刺激によって、ミトコンドリアの permeability transition pore (PTP) が開き、シトクロム c と Apaf-1 とよばれるたんぱく質が放出され、タンパク質分解酵素カスパーゼ 9 が結合し、アポトソームという集合体をつくる。その結果、カスパーゼカスケード (分解酵素の連鎖反応系) を活性化させる。この結果、カスパーゼ 3 を活性化させ、本実験結果でも見られた細胞死であるアポトーシスを誘導する。二つ目は、前述 (3.3.2) のとおり、LPS は、TNF α を発現させ、この TNF α が細胞膜表面の TNF レセプターに結合することでアポトーシスが誘導される。これによって、カスパーゼ 2、8、10 を活性化される。その結果、カスパーゼ 3、6、7 を活性化する連鎖反応を誘導し、アポトーシスが引き起こされる。二つのアポトーシス誘導経路は互いに関与し合いながらアポトーシスを引き起こす。本実験で用いた試薬 FAM-FLICA[®]による測定は、これらすべてのカスパーゼが測定の対象である。本実験の結果は有意な変化ではなかったが、低周波磁場曝露による各カスパーゼの活性を測定することでアポトーシス活性経路と低周波磁場の関連性を評価することが出来るかも知れない。

Table. 11 : 低周波磁場曝露による FAM-FLICA[®]染色によるカスパーゼ活性強度と P-値。

| 500- μ T MF (Continuous) | 平均値 | 標準誤差 | n |
|---------------------------------|--------|-------|---|
| CON | 367.3 | 68.6 | 6 |
| MF | 269.9 | 74.4 | |
| LPS | 1005.5 | 311.0 | |
| MF + LPS | 820.7 | 125.8 | |

Continuous は連続波形磁場曝露、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、LPS は LPS 刺激群、MF 磁場曝露と LPS 刺激をした群は MF + LPS、n は、実験回数を示す。

低周波磁場によるカスパーゼ測定結果

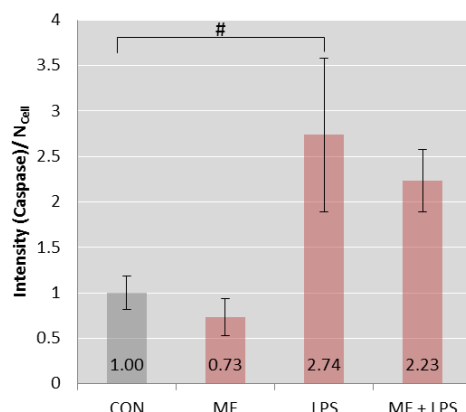


Fig. 28: マクロファージを用いた 24 時間磁場曝露によるカスパーゼ活性を測定した。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、LPS 刺激群 (LPS)、LPS 刺激と磁場曝露群 (MF + LPS) の 4 条件について、カスパーゼ活性の結果をコントロール群の平均値で規格化して示している。実験回数は 6 回、# は $0.05 < P < 0.10$ を示している。

Table. 12 : 低周波磁場曝露による FAM-FLICA®染色によるカスパーゼ活性強度の P-値。

| P 値 | CON | MF | LPS | MF + LPS |
|----------|-------|-------|-------|----------|
| CON | — | — | — | — |
| MF | 0.275 | — | — | — |
| LPS | 0.070 | 0.046 | — | — |
| MF + LPS | 0.008 | 0.002 | 0.452 | — |

3.3.4 ネクロシス測定

PI 染色した細胞の蛍光強度を測定し、総細胞数 (3.3.2) で規格化することによりネクロシス誘導を評価した (Fig. 29、Table. 13)。LPS 刺激をしないとき、磁場によってネクロシスは誘導されず、変化はなかった。コントロール群に比べて、LPS 刺激を行うと、ネクロシスが誘導され、その変化は有意であった (114.7 ± 9.63 vs. 177.6 ± 28.33 ; $P = 0.033$)。LPS 刺激と磁場曝露は LPS 刺激のみに比べて有意にネクロシスを誘導した)。この結果は、以前 [55]のトリパンプルーを用いた死細胞測定の結果を再現していた。低周波磁場曝露による生体影響の実験においては、再現性が低く、同じ研究室の実験ですら再現できないことがある。同じ研究室の結果を再現できたことも本実験の特筆すべきことであるといえる。

磁場のみによるネクロシスの誘導は起こらなかったため、LPS 刺激による作用を磁場が促進させた協働的な作用と考えることが出来る。、DNA 損傷の場合、独立であったが、異なる LPS の細胞死誘導経路を低周波磁場が促進させたことが考えられる。

前節で示した、LPS 刺激によるカスパーゼ活性増加によって、細胞死が導かれたと考えられる。また、低周波磁場曝露によって LPS 刺激による DNA 損傷度が増加した (3.3.1 を参照) ことが、ネクローシスを有意に増加させた原因であると考えられる [39]。

Table. 13: 低周波磁場曝露による LPS 刺激マクロファージのネクローシスと P-値。

| 500- μ T MF (Continuous) | 平均値 | 標準誤差 | n |
|---------------------------------|-------|-------|---|
| CON | 114.7 | 9.63 | 6 |
| MF | 114.1 | 14.14 | |
| LPS | 177.6 | 28.33 | |
| MF + LPS | 238.3 | 38.56 | |

Continuous は断続波形磁場曝露、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、LPS は LPS 刺激群、MF 磁場曝露と LPS 刺激をした群は MF + LPS、n は、実験回数を示す。

低周波磁場によるネクローシス測定結果

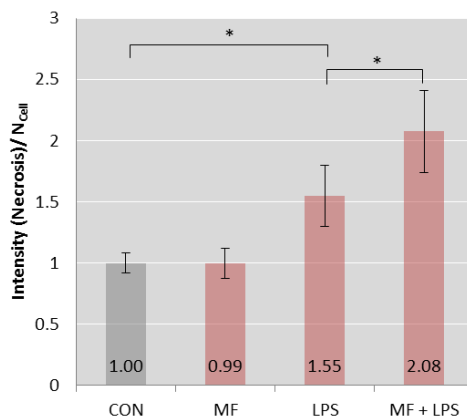


Fig. 29 : マクロファージを用いた 24 時間磁場曝露によるネクローシスを測定した。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、LPS 刺激群 (LPS)、LPS 刺激と磁場曝露群 (MF + LPS) の 4 条件について、ネクローシス測定の結果をコントロール群の平均値で規格化し、示している。実験回数は 6 回、* は $P < 0.05$ を示している。

Table. 14 : 低周波磁場曝露による FAM-FLICA®染色によるカスパーゼ活性強度の P-値。

| P 値 | CON | MF | LPS | MF + LPS |
|----------|-------|-------|-------|----------|
| CON | — | — | — | — |
| MF | 0.917 | — | — | — |
| LPS | 0.033 | 0.013 | — | — |
| MF + LPS | 0.018 | 0.010 | 0.043 | — |

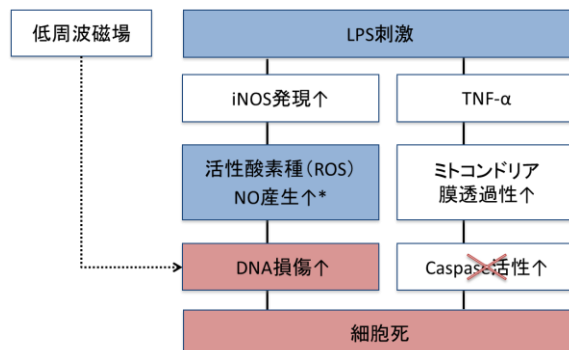


Fig. 30 : 実験結果より、低周波磁場曝露と LPS 刺激によってマクロファージの DNA 損傷とそれに伴うネクローシスが誘導された。一方、アポトーシスを誘導するカスパーゼの活性は見られなかった。*は中村によって測定された。

3.4 まとめ

本実験において、マクロファージに対する LPS 刺激と低周波磁場曝露によって DNA 損傷と細胞死（ネクロシス）が、引き起こされることが示された。前述のとおり、Lai と Singh によれば、NOS を阻害したとき、低周波磁場曝露による DNA 損傷は消失した。この結果から、彼らは、NOの関与を考慮した低周波磁場の DNA 損傷作用仮説を立てた [36]。しかしながら、本実験では、予想とは異なり、LPS 刺激のみによる、NO産生量は増加した一方で、それに重ねて行った低周波磁場曝露による細胞内や細胞外へ放出された一細胞当たりのNO産生量の有意な変化は見られなかった（当研究室西墻ならびに中村 [55]による）。仮説と異なる結果が得られたのは、実験に用いられた細胞種（Lai らは、曝露されたラットから得られた脳神経細胞をターゲットにしていた）違いに起因する可能性が考えられる。したがって、本実験で得られた結果は、Lai らの提唱する仮説とは異なる経路を考慮して説明する必要がある。

本実験から低周波磁場のマクロファージへの効果がNOに関連がないことがわかったので、LPS 刺激によって活性化される他の経路への影響によって本実験結果（DNA 鎖損傷）が得られたと考える。前述のように DNA 損傷を引き起こすような、高い酸化力を持つラジカルであるONOO⁻は本実験で測定したNOとO₂の反応によって生成される。そこで、私はO₂産生量増加経路へ低周波磁場が作用した可能性を考えた。細胞内のO₂産生過程は主に二つあることが知られている。一つはNADPH Oxidase による生成である。特に LPS 刺激によって、マクロファージの膜に局在する NADPH Oxidase が活性され、細胞外にO₂を生成する。同様に LPS 刺激によって増加された細胞外NOと反応し、ONOO⁻を生成し、細胞膜脂質の過酸化を行うことで、細胞死が誘導する。さらに、このONOO⁻は細胞膜を通過することが可能なので、細胞内の DNA 損傷を引き起こす可能性がある [81]。もう一つの過程は、ミトコンドリアの呼吸鎖内に電子伝達の過程である。ミトコンドリアが ATP 合成をする際にはプロトンの勾配が必要になるそのために電子伝達を行うがその際にO₂が産生する。生成されたO₂は細胞質内に放出され、NADPH oxidase の時と同様にONOO⁻を生成し、細胞膜脂質の過酸化や DNA 損傷を引き起こす。これらの過程への低周波磁場曝露の影響を評価するために、低周波磁場とO₂の関連性について研究を推し進める必要がある。そこで私は、低周波磁場曝露によるO₂の産生量とO₂の生成源であるミトコンドリアの膜電位差の測定を試みた。その結果を第 4 章に述べる。

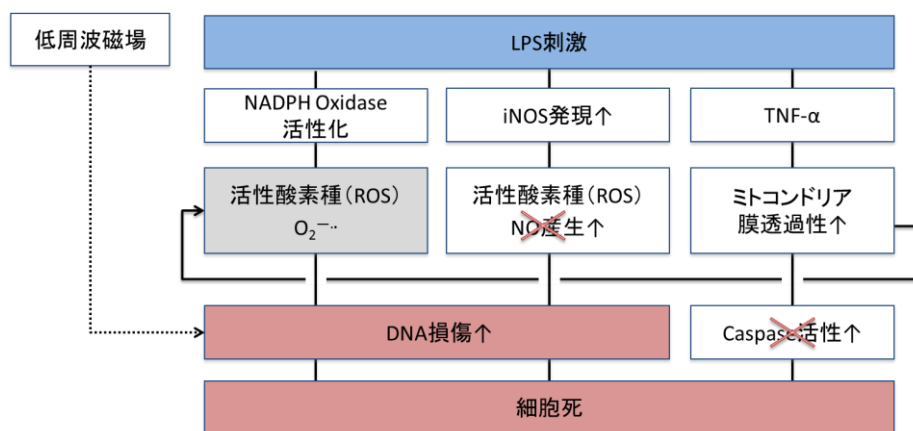


Fig. 31 : 本実験によって低周波磁場曝露と LPS 刺激によって DNA 損傷度と細胞死の増加が観察された。しかしながら NO 産生量の増加は見られなかったことから、Lai と Singh の仮説で唱えられた NO 産生による過程とは異なる過程によって DNA 損傷や細胞死の作用が引き起こされたと考えられる。

4 酸化ストレス下の浮遊細胞における低周波磁場による生理活性測定³

4.1 本研究の背景

先行研究 ([36] [72] [82] [83]) から、低周波磁場による生体影響には、酸化ストレスであるフリーラジカルの関与が考えられる。前章までの結果では、細胞内毒素 (LPS) の存在下において低周波磁場による DNA 損傷度、細胞死は促進されたが、フリーラジカル的一种である NO 産生量は変化しなかった。このことから、DNA 損傷と細胞死は、NO 産生に関与しない経路によって誘導されたことが考えられ、Lai と Singh の仮説とは異なった経路の可能性が示唆された。

前章で述べたとおり、免疫細胞に対する LPS 刺激は、NO 産生を引き起こすと同時に、フリーラジカル的一种である O_2^- の産生も引き起こすことが知られている。LPS 刺激で活性化されると、マクロファージ細胞の膜に局在する NADPH Oxidase が活性化され、細胞外で O_2 を酸化し、 O_2^- が生成される。細胞内外において NO は、 O_2^- を捕捉し、消去する。その際、酸化力が強く、DNA 損傷を引き起こすことのできる ONOO⁻ が生成する。一方、酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) により O_2^- は不均化され、過酸化水素 (H_2O_2) が生成することも知られている (式(4))。

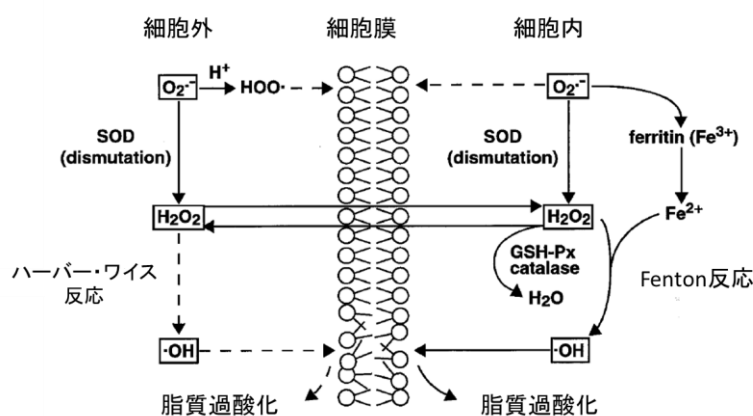
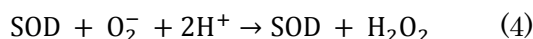


Fig. 32 : 細胞内では、 O_2^- は SOD によって不均化され、過酸化水素へ変化し Fenton 反応によって $\cdot OH$ を生成する。細胞内の過酸化水素は GSH-Px (グルタチオンペルオキシダーゼ) や Catalase などの酵素によって、水へ無毒化される。細胞外でも同様に、 O_2^- は酵素 SOD によって不均化され、過酸化水素へ変化し、ハーバー・ワイス反応によって $\cdot OH$ を生成する。 $\cdot OH$ によって脂質の過酸化が引き起こされる。図は [84] から引用 (一部改)。

³本章の内容の一部は [110]に掲載されている。

この過酸化水素は、細胞膜内外を自由に行き来できる物質である [85]。細胞内において、過酸化水素は、 Fe^{2+} 存在下で Fenton 反応 (2.4 参照) を引き起こし、酸化力の高い $\cdot\text{OH}$ を生成する。さらに、細胞外においては、 Fe^{3+} 存在下で O_2 とのハーバーワイス反応によって、 $\cdot\text{OH}$ が生成される。細胞内外において $\cdot\text{OH}$ による脂質過酸化が引き起こされ、細胞膜のダメージに伴う細胞死や DNA 損傷を引き起こす。したがって、 O_2 の産生量が低周波磁場によって増加するならば、前章で示された DNA 損傷増加が説明可能である。さらに、細胞内外において、過酸化水素から生成されるラジカルによって、脂質膜の過酸化が行われるならば、細胞死を引き起こすことも考えられる。

そこで、本研究では、低周波磁場曝露による O_2 産生量を測定した。また、この O_2 はミトコンドリアの ATP 合成の過程においても、恒常的に生成されている。そのため、低周波磁場による、ミトコンドリアの膜電位差の関与も考慮し、測定を行い、評価を行った。実験結果と従来の接着細胞に対する実験結果を比較するため、第 3 章と同様にネクローシス、カスパーゼ測定を行った。

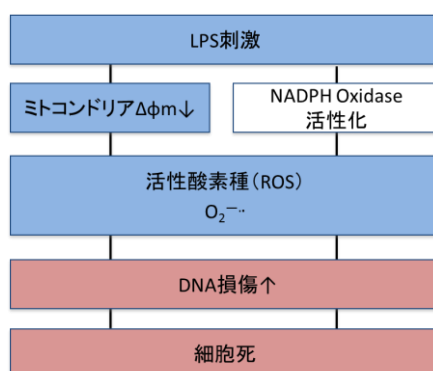


Fig. 33 : 低周波磁場曝露と LPS 刺激によって前章で観察された作用は、 O_2 に関与した反応経路によって引き起こされた可能性が考えられる。結果で述べるように、ミトコンドリア膜電位差減少によって O_2 は産生されることから、本実験ではミトコンドリア膜電位差と O_2 産生量を測定した。

4.2 材料と方法

マクロファージは接着性の細胞であるが、本実験においては、浮遊させた状態で低周波磁場曝露を行い、 O_2 測定、ミトコンドリア膜電位差を測定した。これは、本研究室の先行研究 (Pooam, 2016) の手法に倣ったためである。

4.2.1 実験に用いた材料等

2.2.1、3.2.1 にて前述した化学物質については省略する。

ミトコンドリアを染色するための JC-1 色素は Maker Gene Technologies, Inc. から購入した。O₂ 指示薬のニトロブルーテトラゾリウム (NBT)、は同仁化学から、ミトコンドリア機能の阻害に用いるカルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン (FCCP) はアブカム株式会社から購入した。その他の化学薬品は和光純薬から購入した。

4.2.2 細胞培養

前述 (3.2.2) を参照

4.2.3 LPS 刺激

前述 (3.2.3) を参照

4.2.4 磁場曝露

LPS 刺激した後、細胞をセルスクレイパーによって剥ぎ取り、回収し、マイクロチューブに 1 ml ずつ分注した。50-Hz、500- μ T 磁場曝露を 24 時間マイクロチューブのまま行い、後述の各実験前において、振動攪拌し、完全に培地に懸濁させてから実験を行った。

4.2.5 磁場曝露装置

前述 (3.2.4) を参照

4.2.6 磁場条件

前述 (3.2.5) を参照

4.2.7 マイクロプレートリーダー

前述 (3.2.6) を参照

4.2.8 総細胞数測定

各実験で得られた値を細胞あたりに規格化するための細胞数の計測には Hoechst 33342 を用いた核染色を行った。Hoechst 33342 は デオキシリボ核酸のアデノシンとチミジンが豊富な DNA 配列の副溝 (minor groove) に高親和性で結合することにより、真核細胞および原核細胞の DNA を染色することができる細胞透過性蛍光物質である。Hoechst 33342 が DNA に結合し、UV 光によって励起された場合に 461 nm

に最大発光波長を持つ青い蛍光が検出される。蛍光強度は DNA 量、したがって細胞数に比例する。

本実験においては、磁場曝露後 5000 rpm で 5 分間遠心し、5 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 を添加した。60 分間 37°C 保温し、5000 rpm で 5 分間遠心し、PBS で洗い、300 μl の PBS に懸濁し、100 $\mu\text{l/well}$ でマイクロプレートに分注し、励起波長 357 nm、発光波長 440 nm で蛍光測定した。

検量線は 0、0.25、0.5、1.0、2.0 $\times 10^6$ cell/ml の播種細胞密度で蛍光強度を計測し、二次関数でフィッティングし、作成した (Fig. 34)。

$$y = 1319.8x^2 + 2580.8x + 8.2 \quad (5)$$

上式の y は蛍光強度、 x は細胞数を表している。R² は 0.9808 である。

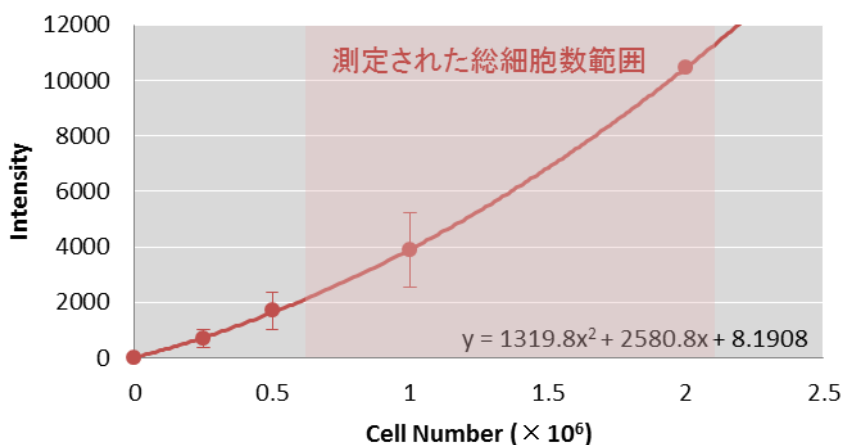


Fig. 34 : Hoechst 33342 染色蛍光強度と数取り器による計数による細胞数を二次関数でフィッティングし、検量線を作成した。実験回数は 3 回 (2×10^6 cell/ml のサンプルによる実験回数は 1 回)。実際には、細胞数が少ないとき強度と比例していたが、細胞数が増えると強度は二次曲線で近似された。

4.2.9 細胞生存率測定

(3.2.11) を参照。

本実験においては、磁場曝露後 5000 rpm 5 分間遠心し、PBS で洗浄し、1.67 $\mu\text{g/ml}$ の PI を添加し、染色した後、100 $\mu\text{l/well}$ でマイクロプレートに分注し、励起波長 535 nm、発光波長 617 nm で測定した。

4.2.10 カスパーゼ活性測定

(3.2.10) を参照。

本実験においては、磁場曝露後 5000 rpm 5 分間遠心し、PBS で洗浄し、FLICA® を添加した。60 分間 37°C 保温し、FLICA キット添付の Apoptosis Wash Buffer を 1ml 添加し、5000 rpm 5 分間遠心し、1000 μ l Apoptosis Wash Buffer 中で懸濁し、10 分間 37°C で保温し、5000 rpm 5 分間遠心し、沈澱した細胞を 300 μ l PBS 中で懸濁し、100 μ l/well でマイクロプレートに分注し、励起波長 490 nm、発光波長 520 nm で蛍光測定した。

4.2.11 O₂ 産生量測定

O₂を検出するために NBT を用いた [86]。NBT は、生成された \cdot O₂によって、550 nm に吸収がある水溶性で青色の NBT - diformazan に変換される。この溶液の吸光度が生成した O₂濃度に比例すると考えられる。

本実験においては磁場曝露後細胞を 5000 rpm 5 分間遠心し、1 mM CaCl₂、1 mM NBT で調製した培地を添加し、37°C で 1 時間保温した。その後、5000 rpm で 5 分間遠心し、1000 μ l の PBS で懸濁し、10000 rpm 5 分間遠心し、上澄み溶液を取り除き、空気乾燥した。細胞内の青色変性結晶である diformazan は 2 M KOH を 50 μ l、DMSO を 100 μ l 加えて溶解した。100 μ l/well でマイクロプレートに分注し、吸光強度を 620 nm で測定した。

また、細胞内の様子を顕微鏡で観察し、画像取得を行った。その際は、NBT と CaCl₂ で染色のみを行い PBS ですすいで、20 倍のレンズで観察を行った (Fig. 35)。

FCCP 存在下で、ミトコンドリア膜電位差を減少させたときの O₂ 産生量測定を行った。25 μ M、50 μ M、100 μ M の FCCP 存在下で 30 分間培養したのち、NBT による染色と吸光測定を行った。

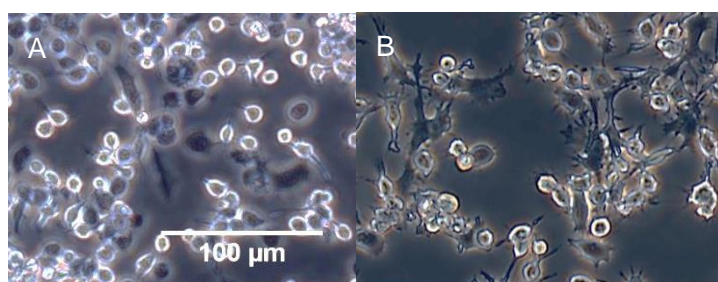


Fig. 35 : NBT による染色した A)通常の細胞 B)LPS 刺激細胞の 20 倍顕微鏡写真。

4.2.12 ミトコンドリア膜電位差測定

ミトコンドリアの膜電位差 (膜外を基準とするため膜内電位 - 膜外電位で定義される) は内膜の電子伝達系によるプロトンの汲み出し、イオンチャンネルで生じるイオンの濃度勾配によって生じる。この内膜を挟んでできた水素イオンの濃度勾配が ATP

合成酵素を通るときに ATP が合成される。アポトーシス、ネクローシスおよび変化の遅い変性疾患ではすべて、ミトコンドリア膜の電気化学勾配の減少を示すため、ミトコンドリアの機能状態（膜を挟んだ電位差の大小；電位差が大きいほどミトコンドリアの状態が「元気」）は毒性の指標となる。

膜透過性のある JC-1 はミトコンドリア中で、脱分極した低い膜電位差の状態ではモノマーとして存在し、緑色に発光する。一方、過分極した通常の膜電位差の状態では、ミトコンドリア内濃度が上がるため凝集し、会合体を生成する結果、橙色に発光する。

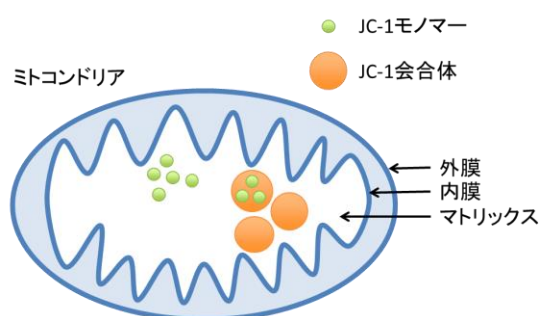


Fig. 36 : 膜透過性の JC-1 は脱分極したミトコンドリアではモノマーの緑色に、過分極したミトコンドリアでは凝集し会合体を生成し、橙色に発光する。

本実験においては、細胞を磁場曝露後 5000 rpm で 5 分間遠心し、PBS で懸濁する操作を 2 回行い、2 回目の懸濁後に 5 μ M JC-1 を添加した。30 分間 37°C 保温したのち、100 μ l/well でマイクロプレートに分注し、モノマー（励起波長 488 nm、発光波長 540 nm）、会合体（励起波長 488 nm、発光波長 600 nm）を測定した [87]。下式 (6) を計算し、強度の比 (Ratio) を求めることによってミトコンドリア膜電位差を相対的に評価した。

$$\text{Ratio} = \frac{I_{600}}{I_{540}} \quad (6)$$

I_{600} は J 会合体、 I_{540} はモノマーの発光強度をそれぞれ表している。

ポジティブコントロール実験には、FCCP を用いた。FCCP は、ミトコンドリアの酸化リン酸化の脱共役を引き起こし、ミトコンドリア内膜からプロトンが漏れ出すことで、ミトコンドリア膜の脱分極を引き起こし、結果的に ATP 合成を阻害する。このため、FCCP 存在下での JC1 の発光は緑へシフトし、Ratio でみれば小さくなる。実験では、1、10、25、50、100 μ M FCCP 存在下で 30 分間培養した。

4.2.13 統計解析

前述 (2.2.8) を参照

4.3 結果と考察

4.3.1 総細胞数測定

Hoechst 33342 による染色を用いて蛍光強度を測定し、細胞数測定を行った。LPS 刺激をしないとき、24 時間の低周波磁場曝露によって細胞数はわずかではあるが有意に減少した。さらに、LPS 刺激によって、有意に細胞数が減少した (1.75 ± 0.11 vs. 1.19 ± 0.15 ; $P < 0.001$)。一方、LPS 刺激した群とさらに低周波磁場曝露した群では、変化は見られなかった。

LPS 刺激による細胞数の減少は、第 3 章の結果と同様の結果であるが低周波磁場の効果は異なっている (第 3 章では細胞数に変化なし (Fig. 27))。実験手法を改良することで低周波磁場曝露によってわずかではあるが細胞数の有意な減少が測定された可能性もあるが、むしろ細胞が浮遊しているという違いによって、結果に違いが生じたのだと考えられる。この違いについては、増殖時間経過の測定が必要かもしれない。

Table. 15 : 低周波磁場曝露による LPS 刺激による細胞数。

| 500- μ T MF (Continuous) | 平均値 (x 10^6) | 標準誤差 | n |
|---------------------------------|-----------------|------|---|
| CON | 1.75 | 0.11 | 7 |
| MF | 1.67 | 0.13 | |
| LPS | 1.19 | 0.15 | |
| MF + LPS | 1.30 | 0.13 | |

Continuous は断続波形磁場曝露、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、LPS は LPS 刺激群、MF 磁場曝露と LPS 刺激をした群は MF + LPS、n は、実験回数を示す。

低周波磁場による総細胞測定結果

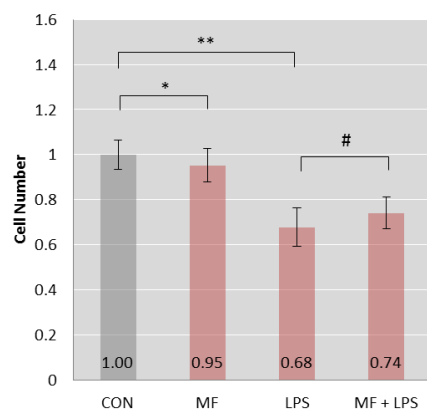


Fig. 37 : マクロファージを用いた 24 時間磁場曝露による総細胞数を測定した。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、LPS 刺激群 (LPS)、LPS 刺激と磁場曝露群 (MF + LPS) の 4 条件について、総細胞数測定の結果をコントロール群の平均値で規格化し、示している。実験回数は 6 回、* は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、# は $0.05 < P < 0.10$ を示している。

Table. 16 : 低周波磁場曝露による LPS 刺激による総細胞数の P-値。

| P 値 | CON | MF | LPS | MF + LPS |
|----------|--------|--------|-------|----------|
| CON | — | — | — | — |
| MF | 0.031 | — | — | — |
| LPS | < 0.01 | < 0.01 | — | — |
| MF + LPS | < 0.01 | < 0.01 | 0.085 | — |

4.3.2 カスパーゼ活性測定

FLICA による染色を用いて蛍光強度を測定し、細胞数で規格化することによってカスパーゼ活性を測定した。LPS 刺激をしないとき、磁場曝露によってカスパーゼ活性は約 2 倍に増加したものの差は有意ではなかった。さらに、LPS 刺激によるカスパーゼ活性も有意な変化は見られなかった (Table. 18)。LPS 刺激した群とさらに磁場曝露した群でも、変化は見られなかった。

第 3 章の結果 (Fig. 28) と比較すると、磁場曝露のみによるカスパーゼ活性の増加傾向が測定されたことが大きく異なる。

Table. 17 : 低周波磁場曝露による LPS 刺激マクロファージカスパーゼ測定。

| 500- μ T MF (Continuous) | 平均値 | 標準誤差 | n |
|---------------------------------|--------|-------|---|
| CON | 136.53 | 18.19 | 4 |
| MF | 306.33 | 66.30 | |
| LPS | 292.53 | 69.58 | |
| MF + LPS | 257.90 | 98.59 | |

Continuous は断続波形磁場曝露、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、LPS は LPS 刺激群、MF 磁場曝露と LPS 刺激をした群は MF + LPS、n は、実験回数を示す。

低周波磁場によるカスパーゼ測定結果

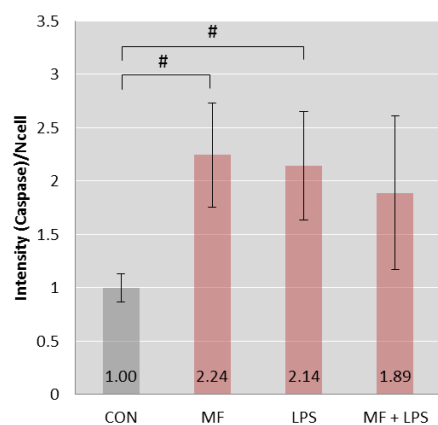


Fig. 38 : マクロファージを用いた 24 時間磁場曝露による総細胞数を測定した。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、LPS 刺激群 (LPS)、LPS 刺激と磁場曝露群 (MF + LPS) の 4 条件について、総細胞数測定の結果をコントロール群の平均値で規格化し、示している。実験回数は 4 回、# は $0.05 < P < 0.10$ を示している。

Table. 18 : 低周波磁場曝露による LPS 刺激マクロファージカスパーゼ測定の結果の P-値。

| P 値 | CON | MF | LPS | MF + LPS |
|----------|-------|-------|-------|----------|
| CON | — | — | — | — |
| MF | 0.062 | — | — | — |
| LPS | 0.070 | 0.856 | — | — |
| MF + LPS | 0.247 | 0.711 | 0.623 | — |

4.3.3 細胞死亡率測定

PIによる染色を用いて蛍光強度を測定し、Fig. 34に示した較正曲線を用いて求めた。細胞数で規格化することでネクロシス測定を行った。LPS刺激をしないとき、磁場曝露による有意な変化は見られなかった。LPS刺激によるネクロシスは有意な変化は見られなかった (Table. 20)。さらに、LPS刺激した群とさらに磁場曝露した群でも有意な変化は見られなかった。

第3章の結果と比較すると、LPS刺激と低周波磁場曝露によって測定された有意なネクロシス増加傾向が本実験では見られなかった。この結果から、磁場曝露やLPS刺激を行ったとき、接着細胞と浮遊細胞では、異なる応答が起こっていると考えられる。

Table. 19 : 低周波磁場曝露と LPS 刺激によるネクロシス測定。

| 500- μ T MF (Continuous) | 平均値 | 標準誤差 | n |
|---------------------------------|--------|--------|---|
| CON | 478.89 | 118.32 | 4 |
| MF | 560.29 | 110.04 | |
| LPS | 640.99 | 150.60 | |
| MF + LPS | 569.70 | 97.47 | |

Continuous は断続波形磁場曝露、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、LPS は LPS 刺激群、MF 磁場曝露と LPS 刺激をした群は MF + LPS、n は、実験回数を示す。

低周波磁場によるネクロシス測定結果

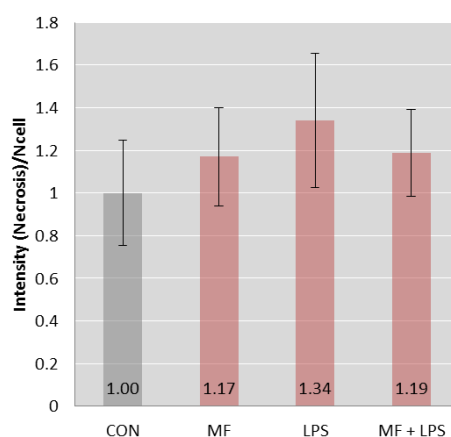


Fig. 39 : マクロファージを用いた 24 時間磁場曝露によるネクロシスを測定した。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、LPS 刺激群 (LPS)、LPS 刺激と磁場曝露群 (MF + LPS) の 4 条件について、ネクロシスの結果をコントロール群の平均値で規格化し、示している。実験回数は 4 回。

Table. 20 : 低周波磁場曝露と LPS 刺激によるネクロシス測定の P 値。

| P 値 | CON | MF | LPS | MF + LPS |
|----------|-------|-------|-------|----------|
| CON | — | — | — | — |
| MF | 0.115 | — | — | — |
| LPS | 0.174 | 0.329 | — | — |
| MF + LPS | 0.263 | 0.829 | 0.278 | — |

4.3.4 O₂ 産生量測定

NBT による染色を用いて O₂ 産生量を測定し、細胞数で規格化することで O₂ 産生量を測定した (Table. 21、Fig. 41)。LPS 刺激をしないとき、磁場曝露によって O₂ 産生量は有意に増加した。さらに、LPS 刺激によって、有意に O₂ の産生量は増加した (Table. 23)。一方、LPS 刺激した群とさらに磁場曝露した群では、有意な変化は見られなかった。

本実験の磁場のみの結果は、先行研究 ([88] [89] [90] [91] [92] [93]) や Pooam (当研究室留学生 2015 年度) の実験結果をよく再現している。また、LPS 刺激による活性酸素種生成は、ミトコンドリアの呼吸鎖に関連して生成されることが報告されてきている [94] [95] [96]。LPS 刺激によってミトコンドリアに存在する NOS (mtNOS) 活性によって生成される ONOO⁻ はミトコンドリア内膜にある呼吸鎖複合体から O₂ を誘導する (Fig. 40) [97]。磁場曝露による O₂ 産生量の増加も同様に、磁場がミトコンドリアの NOS を活性化した結果である可能性が考えられる。

前章の実験によって LPS 刺激と磁場曝露による DNA 損傷の増加と細胞死の誘導が見られたが、本実験では O₂ の産生量の違いは見られなかった。この違いは、磁場曝露時の細胞培養の方法 (接着培養か浮遊培養) の違いに起因すると考える。

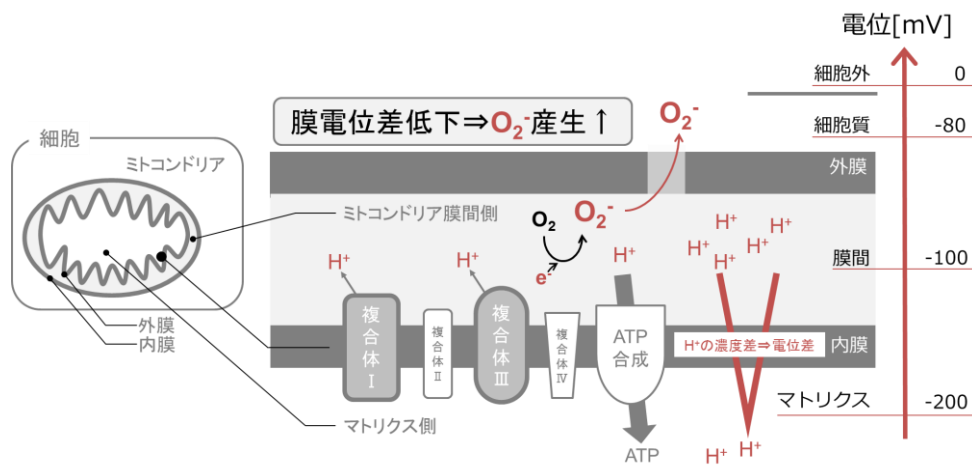


Fig. 40 : ミトコンドリア内膜において ATP が合成される。ATP 合成にはプロトンが必要であるため、プロトンを膜間へ汲み上げる仕組みが内膜には備わっている。プロトンを汲み上げる際に膜間へ電子が漏れ出る。漏れ出た電子と酸素が反応し O_2^- が産生される。膜電位差が低下することでその差を解消しようとプロトンの汲み上げが起こり、 O_2^- が多く生成される。

Table. 21 : 低周波磁場曝露と LPS 刺激による O_2^- 測定。

| 500- μ T MF (Continuous) | 平均値 | 標準誤差 | n |
|---------------------------------|------|------|---|
| CON | 0.31 | 0.07 | 4 |
| MF | 0.34 | 0.07 | |
| LPS | 0.43 | 0.08 | |
| MF + LPS | 0.46 | 0.12 | |

Continuous は断続波形磁場曝露、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、LPS は LPS 刺激群、MF 磁場曝露と LPS 刺激をした群は MF + LPS、n は実験回数を示す。

低周波磁場によるO₂産生量測定結果

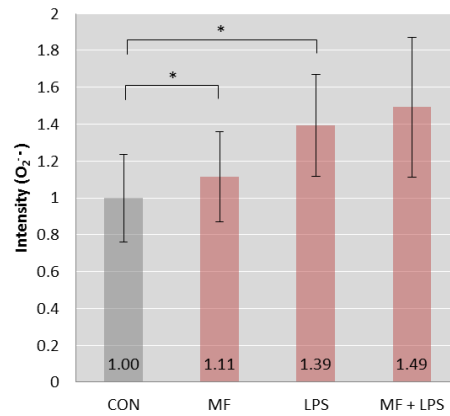


Fig. 41 : マクロファージを用いた 24 時間磁場曝露によるO₂産生量を測定した。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、LPS 刺激群 (LPS)、LPS 刺激と磁場曝露群 (MF + LPS) の 4 条件について、O₂産生量測定の結果をコントロール群の平均値で規格化し、示している。実験回数は 4 回、* は P < 0.05 を示している。

Table. 22 : 低周波磁場曝露と LPS 刺激によるO₂測定のパ-値。

| パ-値 | CON | MF | LPS | MF + LPS |
|----------|-------|-------|-------|----------|
| CON | — | — | — | — |
| MF | 0.013 | — | — | — |
| LPS | 0.029 | 0.066 | — | — |
| MF + LPS | 0.089 | 0.140 | 0.833 | — |

4.3.5 ミトコンドリア膜電位差測定

JC-1 による染色を用いて、ミトコンドリア膜電位差の減少を引き起こす脱共役剤である FCCP による膜電位差の減少を顕微鏡で観察した (Fig. 42)。25 μM の FCCP を添加することで、ミトコンドリア膜電位差が減少 (発光が緑になる) することが観察された。また、488 nm 励起による蛍光スペクトル測定によって、520 nm (緑) と 600 nm (橙) においてピークが測定され (Fig. 43)、その強度比 (式(6)) からミトコンドリア膜電位差の相対的变化を求め、Fig. 44 に示した。顕微鏡観察時と同様に 25 μM の FCCP を添加することによって、ミトコンドリア膜電位差が減少することが確認された。

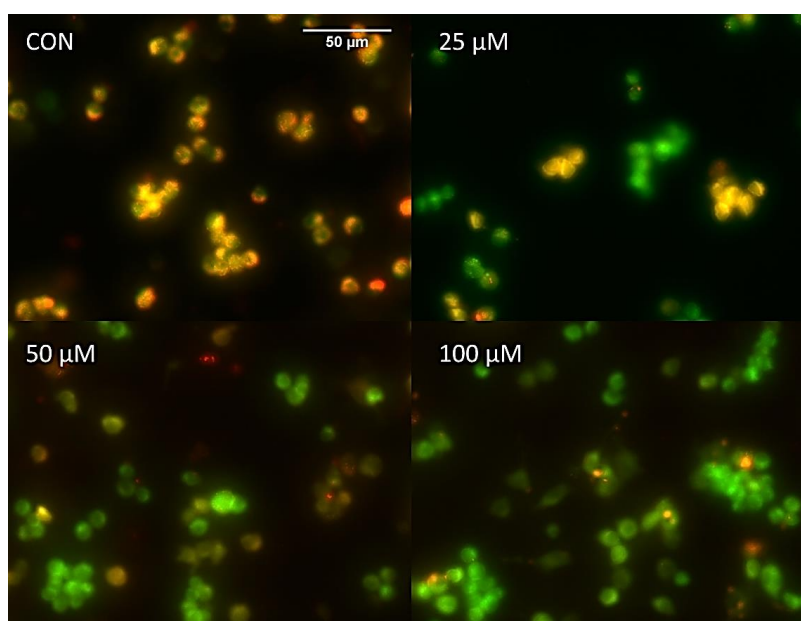


Fig. 42: FCCP によるミトコンドリア膜電位差の 20 倍蛍光染色画像。JC-1 は膜電位差が減少したミトコンドリアを緑色に、膜電位差が大きいミトコンドリアを橙色に発色する。25 μM の FCCP によってミトコンドリア膜電位差が減少し、緑色の JC-1 モノマーが観察されている。

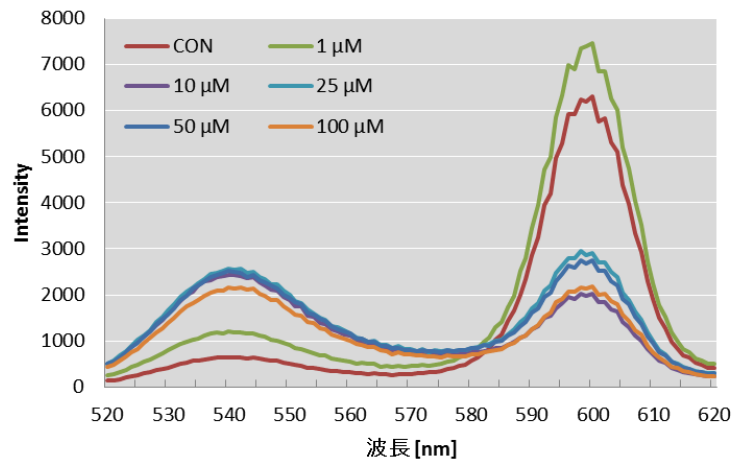


Fig. 43: FCCP によるミトコンドリア膜電位差蛍光スペクトル測定結果。励起波長は、488 nm。蛍光波長は 540 nm (緑) と 600 nm (橙) で、ピークを取る。CON (細胞プラス JC-1 のみ、FCCP : 0 μ M) の場合に 540 nm 得られるピークは JC1 の会合が多少あることを反映していると考えられる。

FCCP によるミトコンドリア膜電位差測定結果

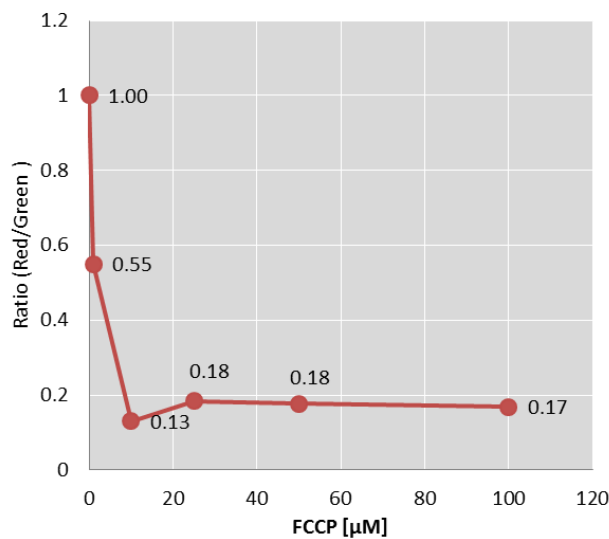


Fig. 44 : 0、1、10、25、50、100 μ M FCCP 存在下で 30 分間培養することによるミトコンドリア膜電位差測定結果。縦軸は 540 nm (Green) と 600 nm (Red) の発光強度の比率を示している。実験回数は 1 回。

LPS 刺激と低周波磁場曝露によるミトコンドリア膜電位差測定結果を Table. 23、Fig. 46 に示した。LPS 刺激をしないとき、低周波磁場曝露によってミトコンドリア膜電位差は有意に減少した。一方、LPS 刺激によるミトコンドリア膜電位差の変化は有意ではなかったが、減少する傾向が見られた。(Table. 24)。LPS 刺激したとき、磁場曝露をすることによる有意な変化は見られなかった。

前節の磁場曝露によるカスパーゼの活性化 (4.3.2) の結果は、磁場曝露によるミトコンドリア膜電位差の減少によってミトコンドリアから放出されるシトクロム c によって導かれたことが考えられる。放出されたシトクロム c によってアポトーシスが誘導され、磁場曝露による総細胞数の減少 (4.3.1) が引き起こされたと考えられる。さらに、ミトコンドリア膜電位差減少に伴う活性酸素種の増加によって細胞死や細胞周期停止を引き起こす p38 (p38 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ) が活性化されることが知られている [76]。この p38 活性化によって、細胞周期の停止や細胞死が誘導されることによっても、総細胞数の減少 (4.3.1) が引き起こされた可能性が考えられる (Fig. 45)。

O₂ 産生とミトコンドリア膜電位差の減少の関係性を調べるために、脱共役によって ATP 合成を阻害し、ミトコンドリア膜電位差減少を導く FCCP を添加した。このとき、FCCP 濃度依存の O₂ 産生量の増加が見られた (Fig. 47)。したがって、磁場曝露によって、ミトコンドリア膜電位差の減少が誘導され、それによって O₂ の増加 (4.3.2) が引き起こされたことが確認された。一方、LPS 刺激によるミトコンドリア膜電位差の変化は有意ではなく、減少傾向に留まった。これは、前節で見られた LPS による O₂ 産生量の増加は NADPH Oxidase によって引き起こされた可能性が考えられる。Lupke et al. は 50-Hz 磁場を 45 分間曝露することによってヒト臍帯血由来の単球の NADPH oxidase の活性を報告した [98]。実際に、LPS は短時間で NADPH oxidase の活性化を誘導することが知られている [99]。本研究で測定された LPS 刺激と 24 時間の磁場曝露による DNA 損傷への NADPH oxidase の関連性についても研究する必要がある。

本実験で測定した低周波磁場曝露と LPS 刺激、FCCP による O₂ 産生とミトコンドリア膜電位差の測定結果の相関図を Fig. 48 に示した。脱共役作用のある FCCP によるミトコンドリア膜電位差の減少に比べて、磁場曝露によるミトコンドリア膜電位差の減少の程度は小さいことがわかる。LPS 刺激による生体作用は FCCP による脱共役作用とは単純に違うカーブを示しているように見える。これは、LPS 刺激や磁場曝露によって O₂ 産生を消去する酵素が阻害された可能性が考えられる。

一般的に O₂ と NO によって生成される ONOO⁻ は、抗酸化物質であるグルタチオンを消耗することでミトコンドリアの機能障害を引き起こし、O₂ を産生する正のフィードバックを起こすことが知られている。LPS 刺激によって引き起こされる酸化ストレスによってグルタチオンの枯渇が起こることが知られている [100]。一方で、FCCP によるグルタチオンの変化は見られない [101]。このことから、LPS 刺激したときと同様に磁場曝露によっても O₂ の生成を促進させるフィードバックが起こる結果として、抗酸化物質の枯渇が起こった可能性が考えられる (Fig. 49)。

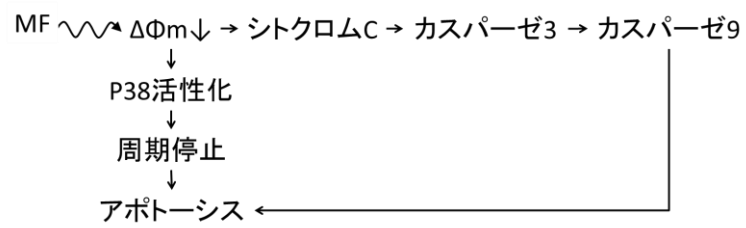


Fig. 45 : ミトコンドリア膜電位差の減少から引き起こされる経路。

Table. 23 : 低周波磁場曝露と LPS 刺激によるミトコンドリア膜電位差測定。

| 500- μ T MF (Continuous) | 平均値 | 標準誤差 | n |
|---------------------------------|-------|------|---|
| CON | 18.41 | 2.06 | 4 |
| MF | 17.06 | 2.05 | |
| LPS | 13.46 | 0.68 | |
| MF + LPS | 12.86 | 1.79 | |

Continuous は連続波形磁場曝露実験、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、LPS は LPS 刺激群、磁場曝露と LPS 刺激した群は MF + LPS、n は、実験回数を示す。

低周波磁場によるミトコンドリア膜電位差測定結果

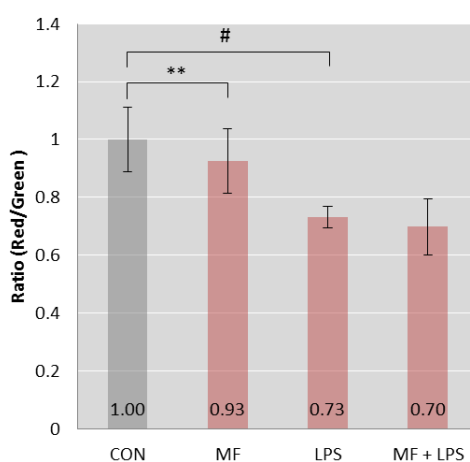


Fig. 46 : マクロファージを用いた 24 時間磁場曝露によるミトコンドリア膜電位差を測定した。縦軸は 540 nm (Green) と 600 nm (Red) の発光強度の比率を示している。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、LPS 刺激群 (LPS)、LPS 刺激と磁場曝露群 (MF + LPS) の 4 条件について、ミトコンドリア膜電位差の結果をコントロール群の平均値で規格化し、示している。実験回数は 4 回、# は $0.05 < P < 0.10$ 、**は $P < 0.01$ を示している。

Table. 24: 低周波磁場曝露と LPS 刺激によるミトコンドリア膜電位差測定差の P-値。

| P 値 | CON | MF | LPS | MF + LPS |
|----------|-------|-------|-------|----------|
| CON | — | — | — | — |
| MF | 0.002 | — | — | — |
| LPS | 0.056 | 0.108 | — | — |
| MF + LPS | 0.031 | 0.050 | 0.643 | — |

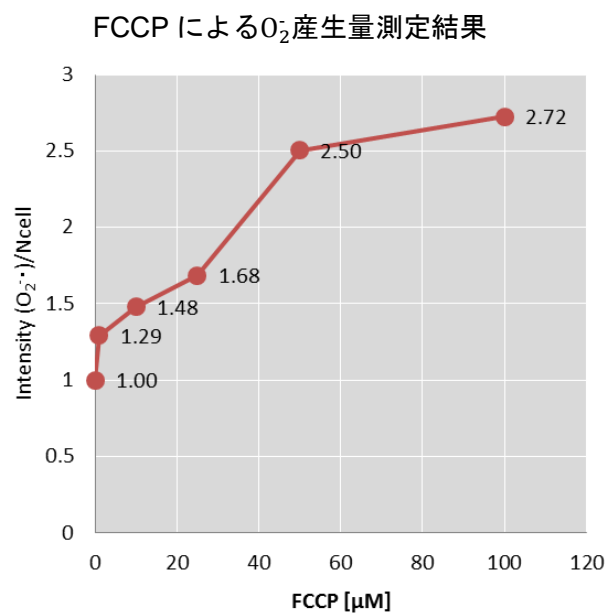


Fig. 47: 0、1、10、25、50、100 μM FCCP 存在下で 30 分間培養することによる O_2 産生量測定結果。実験回数は 1 回。

0₂産生量とミトコンドリア膜電位差測定結果の相関

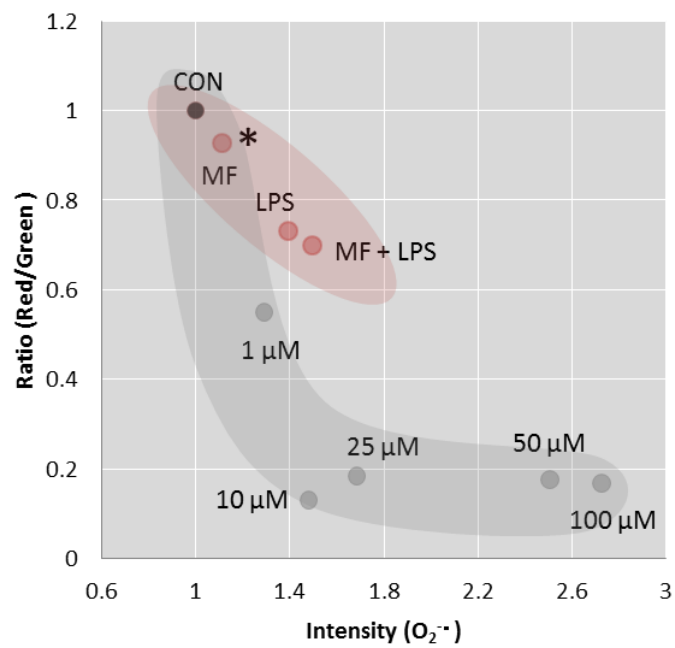


Fig. 48 : FCCP (図中灰色の○)、低周波磁場と LPS 刺激 (図中赤色の○) によるミトコンドリア膜電位差と O₂⁻ 産生量の相関図。25 μM の FCCP によってミトコンドリア膜電位差はコントロール (0 μM) に対して 25%まで減少したが、O₂⁻ は 7%の増加に留まった。これに対して磁場曝露 (MF) の場合は膜電位差が 7%の減少にもかかわらず O₂⁻ 産生は 11%増加した。FCCP による脱共役作用と LPS 刺激による作用が異なることが考えられる。*はコントロール群を基準とした変化が有意であったことを示している。データは、Fig. 41、Fig. 44、Fig. 46、Fig. 47 より。

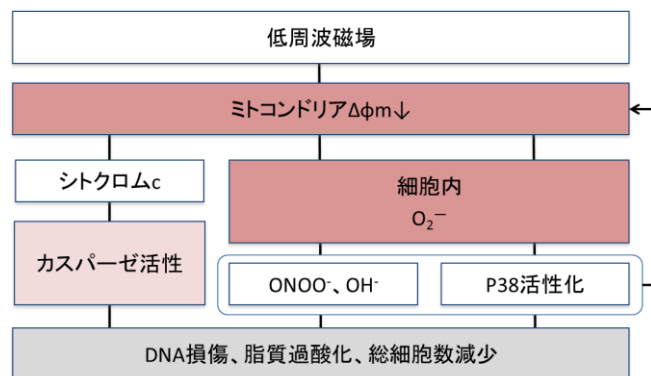


Fig. 49: 浮遊細胞を用いた実験によって低周波磁場曝露によってミトコンドリア膜電位差 ($\Delta\Phi_m$) の減少と O_2^- 産生量の有意な増加が観察され、FCCP による実験によって $\Delta\Phi_m$ 減少が O_2^- 産生量を増加させることがわかった。 O_2^- 産生量の増加が、 $ONOO^-$ や $\cdot OH$ などの有毒なラジカル生成を引き起こし、DNA 損傷や脂質の過酸化を誘導すると思われる。同時に、細胞周期を停止させる p38 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼの活性によって総細胞数の減少が観測されたと考えられる。生成されたラジカルや p38 は $\Delta\Phi_m$ をさらに減少させる [102]。本実験では、カスパーゼ活性の増加傾向も観察された。これは $\Delta\Phi_m$ 減少に伴うシトクロム c の放出によって引き起こされたと考えられる。

4.4 まとめ

本研究では、低周波磁場による DNA 鎖切断が酸化ストレスによるという可能性を受けてミトコンドリア膜から生成される O_2 に LPS 刺激と磁場曝露が与える影響に着目し、測定を行った。その結果、マクロファージへ 500- μ T 磁場を 24 時間曝露することによって、細胞内の O_2 産生量が増加し、同時にミトコンドリア膜電位差の有意な減少を測定した。ミトコンドリアの電子伝達系と ATP 合成が阻害する FCCP (脱共役剤) によって、 O_2 産生量が増加した結果から、磁場曝露によるミトコンドリア膜電位差の減少が、 O_2 産生量を増加させた可能性が示された。生成された O_2 と NO は拡散によって酸化力の高い ONOO⁻を生成する。この ONOO⁻はミトコンドリアの機能障害を引き起こすことでさらに O_2 産生量が増加される (負のフィードバック)。また、ONOO⁻は、膜脂質過酸化や DNA 損傷を引き起こし、細胞死を誘導する。ミトコンドリア機能不全が起こるとアポトーシス (プログラム細胞死) を誘導するシトクロム c が放出され、自殺酵素であるカスパーゼを活性化する。実際に、本実験では磁場曝露によりカスパーゼが活性化される傾向が示された。

磁場がミトコンドリア膜電位差の減少を引き起こした原因については、まだわからない。理論的な先行研究 (シミュレーション) によって 50-Hz 磁場は細胞膜内のチャンネル近辺に渦電流を生じ、また細胞膜内外の電位にも影響するが、その影響は非常に弱い [103]。また、ミトコンドリア膜において ATP 合成の際にはたらく、 O_2 を生成する NADH Oxidase の活性についても磁場の影響が報告されている [33] [91]。これらについてはミトコンドリアを単離し、リアルタイムでの電位差測定を行うことで、さらに研究を推進する必要があると考える。

また、FCCP による結果と LPS 刺激、磁場曝露による結果を比べることで、磁場が抗酸化物質へ影響している可能性が示された。これについても今後詳細な研究が必要であること考える。

一方、前章で示された LPS 刺激と磁場曝露による DNA 損傷度の増加と細胞死の誘導へミトコンドリア膜電位差と O_2 産生量は関与しないことが示された。これによって、DNA 損傷を引き起こしたラジカルは、ONOO⁻ではない可能性がある。本研究では検討しなかったが、 $\cdot OH$ は DNA 損傷を引き起こす。背景 (4.1) で述べたように、細胞膜内外で生成された O_2 は SOD によって不均化され H_2O_2 になることで連鎖的に $\cdot OH$ が生成される。本実験によって LPS 刺激と磁場曝露によって O_2 の産生量の変化は見られなかったが、磁場曝露によって O_2 の消去酵素である SOD が活性化されたなら、 O_2 は消去されることで連鎖的に $\cdot OH$ の生成を促進すると考えられる。したがって磁場曝露の SOD 酵素への影響について調べる必要があると考える。また、(4.3.5) で述べたように細胞膜で生成される O_2 の生成源として知られる NADPH Oxidase への磁場曝露の影響についても同様に調べる必要がある。

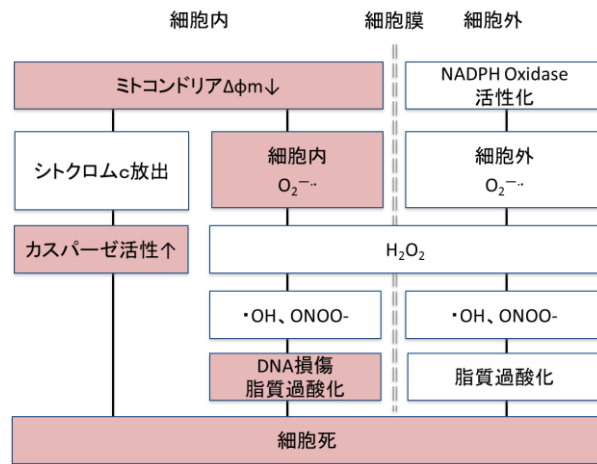


Fig. 50 : 実験結果から考えられる低周波磁場曝露による遺伝毒性誘導経路。赤い背景の枠内が実験を通して確認できた部分。

5 付録 1 低周波磁場による生体影響と鉄の関連性

5.1 本研究の背景

(2.4) で述べたように、Lai と Singh [36]は、低周波磁場曝露によって DNA 損傷度が促進され、酸化ストレス捕捉剤によって磁場曝露による DNA 損傷度が抑制されることを報告した。この結果から、磁場曝露によって酸化ストレスである $\cdot\text{OH}$ の産生を促進させる仮説を提唱した。生体内において、 $\cdot\text{OH}$ を産生する反応として鉄イオンを触媒として Fenton 反応が知られている。提唱されたモデルでは生体内の鉄イオンの恒常性を変化させる可能性を示した。

Zmyslony et al.は培地内に塩化第一鉄が存在するとき、リンパ球の 7-mT 低周波磁場による DNA 損傷は増加したが、その塩化鉄が欠如しているときその DNA 損傷度は変化しないことを報告した [44]。また、Silva et al.は、低周波磁場が遷移金属の存在下でプラスミド DNA の切断を促進したことを報告した[49]。しかしながら、本研究において用いている低強度の磁場条件での実験まだ報告がない。

本実験では、鉄強化血清もしくは、硫酸アンモニウム鉄 (II) を添加し、低周波磁場曝露を行い、磁場曝露による DNA 損傷作用、細胞死誘導作用への鉄イオンの関与を評価しようと試みた。

5.2 材料と方法

5.2.1 実験に用いた化学物質

前述した物質 (2.2.1、3.2.1) は省略。

5.2.2 実験で用いたバッファー

前述 (2.2.2、3.2.2) を参照。

5.2.3 細胞培養

前述 (2.2.3、3.2.3) を参照。

5.2.4 鉄イオン添加

鉄イオン強化血清添加培地を用いた実験には、培養条件の都合から、線維芽細胞 (SWISS Albino 3T3) を用いた。磁場曝露直前までは通常培養用培地 DMEM による培養を行い、磁場曝露時に 2 ml の鉄イオン強化血清添加培地で二回洗ったのち 3 ml 添加し、磁場曝露を行った。

さらに、鉄を細胞培地に直接添加した際の磁場影響を調べるために、二価鉄によるマクロファージへの刺激を行った。二価鉄は細胞の生存率に影響を及ぼすことが知られている。500 μM 二価鉄を添加した培地による 3 時間の培養で繊維芽細胞の生存率

は有意に低下させた [104]。この結果は、鉄そのものが遺伝毒性を持っていることを示している。

本実験において、マクロファージは磁場曝露前、新しい培地で洗ったのち、500 μM 硫酸アンモニウム鉄 (II) (モール塩) を添加し、24 時間、磁場曝露を行った。鉄イオン濃度に関して 1000 μM による実験も試みたが、1000 μM 鉄イオン (II) では細胞が壊されてしまう様子が観察されたため、500 μM という濃度を採用した。

5.2.5 磁場曝露装置

前述 (2.2.4) を参照。

5.2.6 実験で用いたバッファー

前述 (3.2.1) を参照。

5.2.7 磁場条件

鉄強化血清添加培地による実験では、連続波形の 500- μT 、1000- μT 磁場を 24 時間印加した。

硫酸アンモニウム鉄 (II) による実験では、第 3 章と同様に、連続波形の 500- μT 磁場を 24 時間印加した。

5.2.8 コメットアッセイによる DNA 損傷度測定

前述 (2.2.6) を参照。

5.2.9 コメット画像解析

前述 (2.2.7) を参照。

5.2.10 統計解析

前述 (2.2.8) を参照。

5.3 実験結果と考察

5.3.1 繊維芽細胞による実験

1000- μ T 磁場曝露による DNA 損傷度測定結果

鉄強化血清培地によって培養された繊維芽細胞への 1000- μ T 連続波形磁場曝露実験の結果を Table. 25、と Fig. 51 に示した。

1000- μ T 磁場のみによる DNA 損傷度は連続波形磁場を 24 時間曝露したとき、DSB に関して有意な差が見られた。一方、同じ条件でも断続波形磁場（5 分間 ON、10 分間 OFF）を 24 時間曝露したとき、DSB は有意な差が見られなかった。

鉄強化血清添加培地による DNA 損傷の変化は見られなかった。また、鉄強化血清添加培地による培養に加えて磁場曝露をしたとき、磁場曝露の有無によって DNA 損傷の有意な増加は連続波形磁場、断続波形磁場ともに見られなかった。

Table. 25 : 1000- μ T 連続低周波磁場曝露による鉄添加培地培養繊維芽細胞の DNA 損傷度、P-値。

| 1000- μ T MF | | 平均値 | 標準誤差 | P-値 | n |
|----------------------------|---------|-------|------|-------|---|
| 24 h (DSB) Continuous | CON | 19.17 | 5.87 | 0.030 | 6 |
| | MF | 20.82 | 6.32 | | |
| | Fe | 17.52 | 6.08 | | |
| | MF + Fe | 19.23 | 6.74 | | |
| 24 h (DSB) Intermittent | CON | 25.46 | 4.20 | 0.812 | 6 |
| | MF | 24.84 | 3.99 | | |
| | Fe | 25.93 | 3.92 | | |
| | MF + Fe | 27.36 | 3.95 | | |

Continuous は連続波形磁場曝露実験、Intermittent は断続波形磁場曝露実験、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、Fe は鉄イオン添加群、磁場曝露と Fe 添加した群は MF + Fe、n は、実験回数を示す。

1000- μ T 磁場、鉄イオンによる繊維芽細胞 DNA 損傷度測定結果

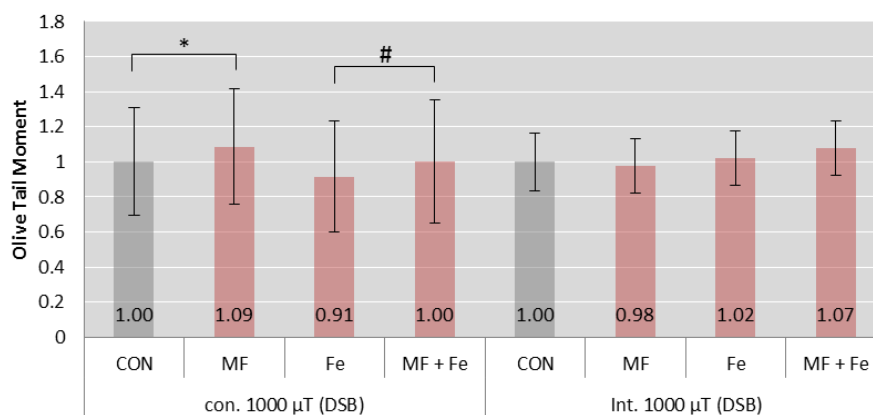


Fig. 51: 鉄強化血清添加培地による 1000- μ T 磁場曝露実験結果。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、鉄強化血清添加群 (Fe)、鉄強化血清添加と磁場曝露群 (MF + Fe) の 4 条件について、コントロールで規格化して示している。Con.は連続波形磁場曝露、Int.は断続波形磁場曝露を示す。*: $P < 0.05$ 。

500- μ T 磁場曝露による DNA 損傷度測定結果

鉄強化血清培地によって培養された繊維芽細胞への 500- μ T 連続波形磁場曝露実験の結果を Table. 26 と Fig. 52 に示した。

500- μ T 連続波形磁場のみよる DNA 損傷度は SSB、DSB ともに有意な差は見られなかった。鉄強化血清添加培地による培養細胞へ磁場曝露をしたときも同様に、SSB、DSB において有意な差は見られなかった。

Table. 26 : 500- μ T 連続低周波磁場曝露による鉄添加培地培養繊維芽細胞の DNA 損傷度と P-値。

| 500- μ T MF | | 平均値 | 標準誤差 | P-値 | n |
|-----------------|---------|-------|------|-------|---|
| 24 h (SSB) | CON | 8.48 | 0.48 | 0.684 | 3 |
| Continuous | MF | 9.11 | 1.82 | 0.586 | |
| | Fe | 8.55 | 1.37 | | |
| | MF + Fe | 8.82 | 1.70 | | |
| 24 h (DSB) | CON | 22.35 | 4.44 | 0.141 | 3 |
| Continuous | MF | 28.55 | 4.24 | 0.456 | |
| | Fe | 32.99 | 3.08 | | |
| | MF + Fe | 30.53 | 2.61 | | |

Continuous は連続波形磁場曝露実験、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、Fe は鉄イオン添加群、磁場曝露と Fe 添加した群は MF + Fe、n は、実験回数を示す。

500- μ T 磁場、鉄イオンによる繊維芽細胞 DNA 損傷度測定結果

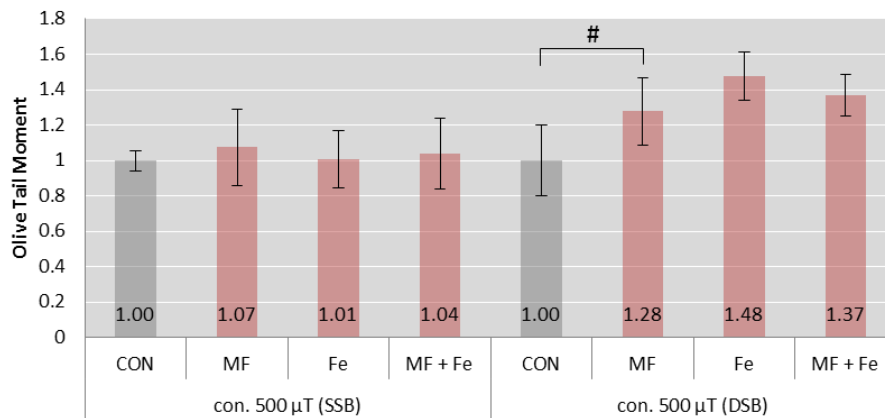


Fig. 52: 鉄強化血清添加培地による 500- μ T 低周波磁場曝露実験結果。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、鉄強化血清添加群 (Fe)、鉄強化血清添加と磁場曝露群 (MF + Fe) の 4 条件について、コントロールで規格化して示している。*: P < 0.05。

本実験において、鉄イオン強化血清添加培地を用いて低周波磁場曝露による DNA 損傷度を測定した。鉄イオンを強化したことによる磁場曝露が誘導する DNA 損傷度に変化は観察されなかった。通常繊維芽細胞の培養に用いる DMEM には、もともと 0.5 μM 鉄イオンが含まれている。鉄強化血清は 0.4 μM の鉄イオン濃度であり、それを加えることによる培地内の鉄の含有濃度の変化は二倍弱に留まるため、変化が見られなかったと考えられる。

5.3.2 マクロファージによる実験

500- μT 磁場曝露による DNA 損傷度測定結果

500- μM 鉄イオン (II) 添加し、50-Hz、500- μT 磁場を 24 時間曝露した DNA 損傷度測定の結果を Table. 27 と Fig. 53 に示した。

磁場曝露のみによる DNA 損傷度は、(2.3.1) と同様に有意な変化は見られなかった。鉄イオンを添加したマクロファージの DNA 損傷度はコントロールに対して増加しなかった。鉄イオンを添加した群に対して、鉄イオンを添加し、磁場曝露した群を比較した場合も同様に DNA 損傷度は有意な差は見られなかった。

Table. 27 : 低周波磁場曝露による鉄添加培地培養マクロファージの DNA 損傷度、P-値、実験回数 (n)。

| 500- μT MF (Continuous) | 平均値 | 標準誤差 | P-値 | n |
|---------------------------------------|------|------|-------|---|
| CON | 5.99 | 1.27 | 0.184 | 3 |
| MF | 7.10 | 0.94 | | |
| Fe | 6.39 | 0.77 | 0.316 | |
| MF + Fe | 7.01 | 0.33 | | |

Continuous は連続波形磁場曝露実験、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、Fe は鉄イオン添加群、磁場曝露と Fe 添加した群は MF + Fe、n は、実験回数を示す。

低周波磁場、鉄イオンによるマクロファージ DNA 損傷度測定結果

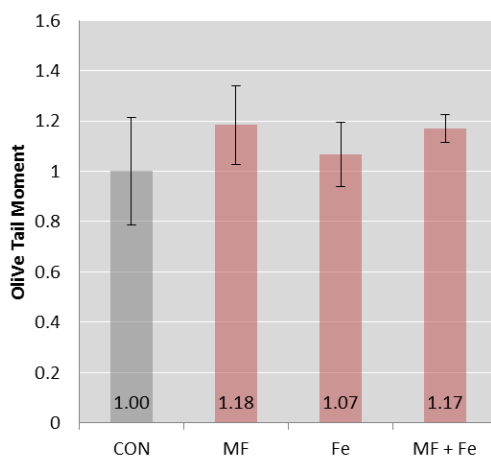


Fig. 53: マクロファージを用いた 24 時間磁場曝露による DNA 損傷度を測定した。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、鉄イオン添加群 (Fe)、鉄イオン添加と磁場曝露群 (MF + Fe) の 4 条件について、DNA 損傷度測定結果をコントロール群で規格化して示している。実験回数は 4 回。

500- μ T 磁場曝露による総細胞数測定結果

500- μ M 鉄イオン (II) 添加し、50-Hz、500- μ T 磁場を 24 時間曝露した総細胞数の測定の結果を Table. 28 と Fig. 54 に示した。

磁場曝露のみによる細胞数は、(2.3.1) と同様に有意な変化は見られなかった。コントロールに対して鉄イオン添加した総細胞数は変化しなかったが、減少傾向が見られた (6.0 \pm 1.27 vs. 6.39 \pm 0.8 ; P = 0.184)。鉄イオンを添加した群に比べて、さらに磁場曝露した群の総細胞数の変化は有意ではなかった。

Table. 28 : 低周波磁場曝露による鉄添加培地培養マクロファージの細胞数と P-値。

| 500- μ T MF (Continuous) | 平均値 | 標準誤差 | P-値 | n |
|---------------------------------|-------|-------|-------|---|
| CON | 27.56 | 17.79 | 0.570 | 3 |
| MF | 20.22 | 7.25 | | |
| Fe | 5.56 | 1.28 | 0.405 | |
| MF + Fe | 9.44 | 3.07 | | |

Continuous は連続波形磁場曝露実験、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、Fe は鉄イオン添加群、磁場曝露と Fe 添加した群は MF + Fe、n は、実験回数を示す。

低周波磁場、鉄イオンによるマクロファージ総細胞数測定結果

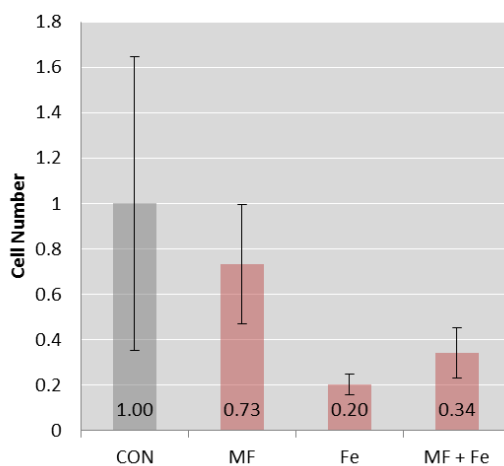


Fig. 54 : マクロファージを用いた 24 時間磁場曝露による総細胞数を測定した。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、鉄イオン添加群 (Fe)、鉄イオン添加と磁場曝露群 (MF + Fe) の 4 条件について、総細胞数測定結果をコントロール群で規格化して示している。実験回数は 4 回。

500- μ T 磁場曝露によるネクロシス測定結果

500- μ M 鉄イオン (II) 添加し、50-Hz、500- μ T 磁場を 24 時間曝露したネクロシスの測定の結果を Table. 29 と Fig. 55 に示した。

ネクロシス測定に関して、磁場のみによってネクロシスは誘導されなかった。硫酸アンモニウム鉄 (II) を添加した際、ネクロシス誘導は増加したものの有意ではなかったが増加傾向があった (15.7 \pm 6.2 vs. 39.7 \pm 7.4 ; P = 0.066)。鉄イオンを添加し、さらに磁場を曝露した際も同様に変化は有意ではなかった。

Table. 29: 低周波磁場曝露による鉄添加培地培養マクロファージのネクロシス測定結果と P-値。

| 500- μ T MF (Continuous) | 平均値 | 標準誤差 | P-値 | n |
|---------------------------------|-------|-------|-------|---|
| CON | 15.67 | 6.21 | 0.740 | 3 |
| MF | 16.38 | 4.78 | | |
| Fe | 39.69 | 7.42 | 0.553 | |
| MF + Fe | 31.63 | 12.84 | | |

Continuous は連続波形磁場曝露実験、CON はコントロール群、MF は磁場曝露群、Fe は鉄イオン添加群、磁場曝露と Fe 添加した群は MF + Fe、n は、実験回数を示す。

低周波磁場、鉄イオンによるマクロファージネクロシス測定結果

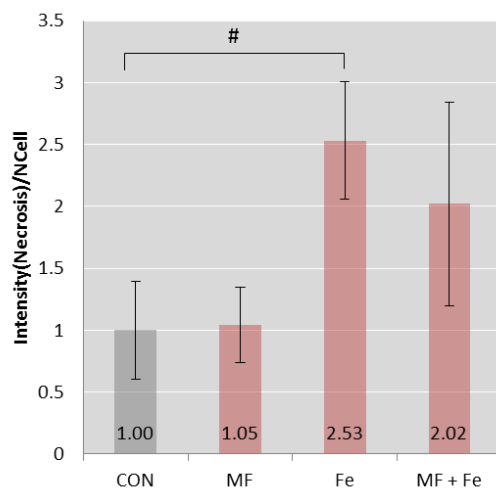


Fig. 55: マクロファージを用いた 24 時間磁場曝露によるネクロシスを測定した。コントロール群 (CON)、磁場曝露群 (MF)、鉄イオン添加群 (Fe)、鉄イオン添加と磁場曝露群 (MF + Fe) の 4 条件について、ネクロシス測定結果をコントロール群で規格化して示している。実験回数は 4 回。# は $0.05 < P < 0.10$ を示している。

鉄イオンと低周波磁場曝露の生体作用の関連性について測定を行ったが、鉄イオンの転嫁の有無に関して有意な変化は見られなかった。生体内の DNA 損傷の修復機構が働き、本実験の結果が得られた可能性が考えられる。

5.4 まとめ

本実験で鉄イオンの存在と低周波磁場曝露の生体作用について繊維芽細胞とマクロファージを用いて測定を行った。おその結果、磁場曝露したとき鉄イオンの有無による変化は観察されなかった。生体の中の生理活性経路は非常に複雑であるため、低周波磁場の DNA 損傷作用に関する鉄イオンの関与、特に Fenton 反応を検証するためには、よりシンプルな実験系の方が有効なのかもしれない。

6 付録 2 DNA 電気泳動実験

6.1 本研究の背景

第 5 章においてマクロファージに鉄イオンを添加し、磁場を曝露した実験を行い、磁場が Fenton 反応に影響を与えるかどうか実験を行った。しかしながらその結果、有意な差は見られなかった。生体内の DNA 損傷などの修復機構によって修復される。磁場曝露による Fenton 反応に与える影響について、シンプルな実験系で検証する必要がある。環状のプラスミド DNA の切断への低周波磁場の影響の報告はいくつかある。低周波磁場曝露によって銅イオンと過酸化水素から生成されるラジカル (Fenton 様反応と呼ばれる反応による) によってプラスミド DNA の切断量が増加することが報告された [46]。さらに、同研究室川嶋 (2014 年度卒業) によってこの結果は再現された。

本実験の目的は、鉄イオンと過酸化水素によって生成されるラジカルが誘導する DNA 鎖切断へ低周波磁場が与える影響について電気泳動による測定を行い、評価した。

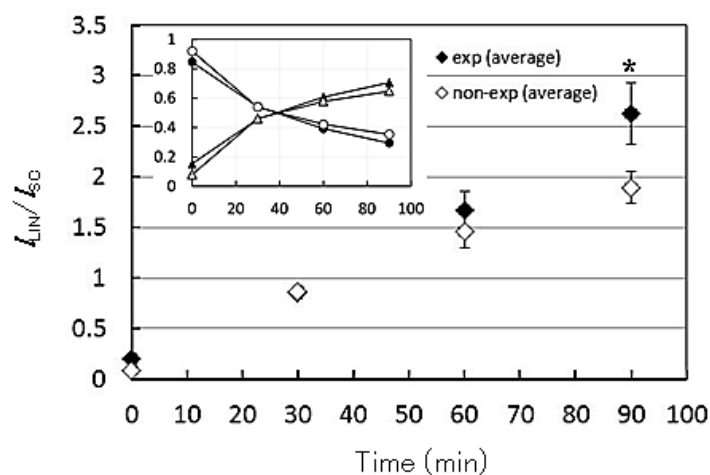


Fig. 56 : 川嶋は、銅イオンと過酸化水素によって生成されたラジカルによる DNA 損傷へ低周波磁場曝露が与える影響について調べた (卒業研究、2015)。90 分の磁場曝露によって DNA 損傷度が有意に増加した。

6.2 材料と方法

6.2.1 実験に用いた化学物質

プラスミドは、トリスヒドロキシメチルアミノメタン（トリス）、EDTA、過酸化水素（30%）、硝酸鉄（Ⅲ）九水和物（鉄イオン（Ⅲ））は和光純薬、アガロース KANTO LE（低電気浸透度）は関東化学株式会社より購入した。ローディングバッファー（10倍）は TaKaRa、GelRed™ Nucleic Acid Stain、10,000 X in water は BIOTIUM から購入した。

6.2.2 プラスミド処理

20 µg/ml プラスミドへ、5 µM 鉄イオン（Ⅲ）、1 mM 過酸化水素となるようにそれぞれを添加し、各条件のマイクロチューブに分注し、磁場曝露用、非曝露用サンプルとした。

6.2.3 磁場曝露

直径 130 mm のヘルムホルツコイル（コイル間の距離は 68 mm）の中央部にサンプルを置き、500-µT の 50-Hz 磁場を 0~120 分プラスミドへ曝露した。温度はエアーコンディショナーと水循環装置で管理し、同程度になるよう調整した。

1000-µT 磁場曝露実験は藤井によって行われた（2015 年度卒業研究）。本研究において、改めて解析をし、再検討を行った。

6.2.4 電気泳動

ローディングバッファーを加えて、電気泳動用ゲル（9%粉末ゲル）へ滴下し、電気泳動を 100 V の電圧下で約 60 分行った。ゲル作成と電気泳動バッファーには TAE バッファーを用いた。

6.2.5 観察

電気泳動後、ゲルを取りだし、10%ゲルレッドによる染色 20 分を行い、紫外線ライトの下、CCD カメラ（HAMAMATSU）で観察し、画像を取得した（Fig. 57）。

6.2.6 解析方法

WesterAnalyzer (ImageJ プラグイン) Ver.12（長谷川修士論文（2015 年度））を用い、空レーンをバックグラウンドとして差し引いて、各レーンの強度を測定した。また、OTSU の二値化処理を行い（Fig. 57）、前述の強度と掛け合わせ、その数値を積算して Linear、Circular の強度 (I_{Linear} 、 $I_{Circular}$) をそれぞれ求めた。統計解析は

$$Ratio = \frac{I_{Linear}}{I_{Circular} + I_{Linear}} = \frac{I_{Linear}}{I_{ALL}} \quad (3)$$

を求め、行った。

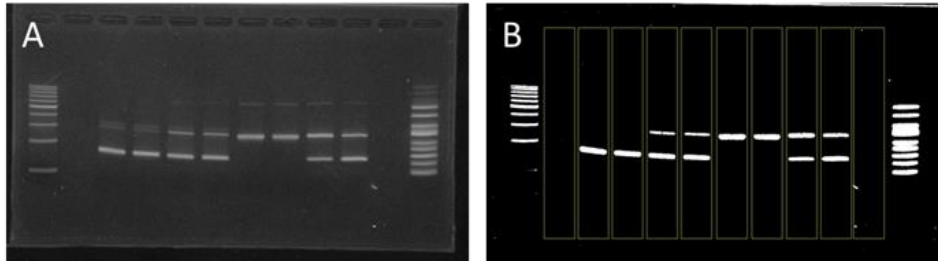


Fig. 57: A) CCD カメラによる撮影画像。B) OTSU の二値化処理後の画像。

6.2.7 統計解析

前述 (2.2.8) を参照

6.3 実験結果

500- μ T 磁場曝露することによって、各時間において DNA 損傷度に有意な変化は見られなかったが 60 分曝露によって磁場曝露群の方がコントロール群を下回る傾向が見られた (0.41 ± 0.07 vs. 0.34 ± 0.03 ; $P = 0.252$) (Fig. 58A)。

1000- μ T 磁場曝露によって、30 分磁場曝露時には、磁場曝露群がコントロール群の DNA 損傷度を上回った (0.29 ± 0.03 vs. 0.32 ± 0.02 ; $P = 0.044$)。逆に、120 分曝露時には、コントロール群が曝露群の DNA 損傷度を上回った (0.63 ± 0.07 vs. 0.61 ± 0.07 ; $P = 0.008$) (Fig. 58B)。

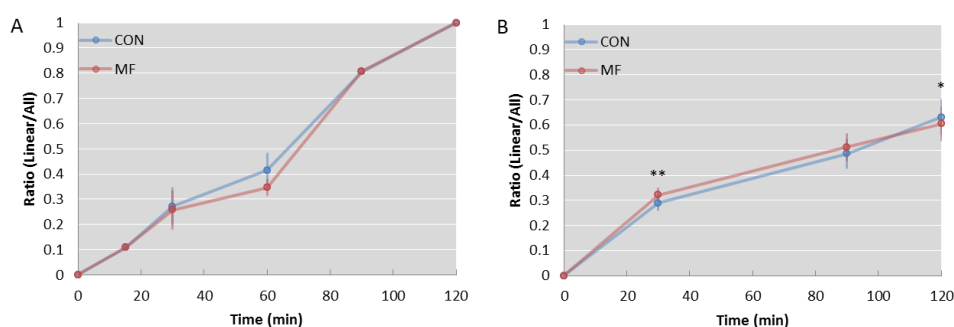


Fig. 58: A)500- μ T、B)1000- μ T 磁場曝露時間ごとの DNA 電気泳動実験結果を示している。1000- μ T 磁場曝露による結果は藤井卒業論文 (2015 年度) を再解析した。コントロール群は CON、磁場曝露群は MF、*は $P < 0.05$ 、** は $P < 0.01$ を示す。

6.4 まとめ

本実験においては、鉄イオンによって生成されたラジカルによる DNA 損傷作用に磁場が与える影響について実験を行った。1000- μ T 磁場を短時間 (30 分) 曝露することで切断が促進され、長時間 (120 分) 曝露することで切断が抑制された。鉄イオンは非常に不安定であることが知られている (Fig. 59)。時間ごとに振る舞いが異なる結果が得られたことはこの不安定性が原因になっているのかもしれない。同研究室川嶋によって銅イオンから生成されるラジカルによる DNA 損傷作用を低周波磁場曝露が促進させる結果が示された。本実験によってはこの結果を再現することが出来なかった。条件の違いを考慮すると銅イオンを用いて磁場条件の詳細な実験を行うべきかもしれない。

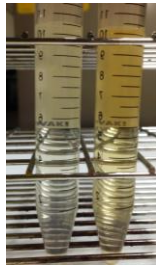


Fig. 59: 本実験で鉄イオンとして用いた塩化鉄(Ⅲ)水溶液(200 μM)。溶解直後(左側のチューブ)は透明だが、時間がたつと次第に黄色く変色する(右側のチューブ)。

7 結論

本研究によって得られた結論を以下に述べる。

1. 500- μ T の 50-Hz 磁場によってマクロファージのミトコンドリア膜電位差の減少とそれに伴う、 O_2 増加が誘導された。さらに、アポトーシスを誘導するカスパーゼの上昇傾向が見られた。
2. LPS 刺激による酸化ストレスによって誘導される DNA 損傷とそれに伴うネクロトーシスの増加は磁場によってさらに増加した。この結果は NO 産生量の増加によらなかった。
3. 上記の結果は一貫した実験条件下において得られ、一部の結果は再現された。

低周波磁場曝露による生体影響への基礎研究においては再現性の低さが一貫した結論を得ることを妨げていた。…*Extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) were reported to affect DNA integrity in human cells with evidence based on the Comet assay. These findings were heavily debated for two main reasons; the lack of reproducibility, and the absence of a plausible scientific rationale for how EMFs could damage DNA*… ([105]より一部抜粋)

異なる研究者ではもちろん、同じ研究室での実験においても、実験結果を再現できないことがある。この現状が磁場曝露による生体作用の研究が信用されない理由の一つである。

本研究においては、この再現性について、細心の注意を払った。一般的に細胞の状態には個体差があることが知られている。それは、細胞の性質でもあるが加えて、培養の際に用いる培地の品質などの血清成分が安定しないことも原因であると考えられる。さらに、実験過程でのピペッティングなどの器具の扱いも結果のばらつきに影響を与えていると考えられる。また、コメントアッセイ解析方法にも工夫を加えた(第2章参照)。これらの点において、注意を払うことで一部の結果の再現性が得られたことは本研究の特筆すべき点である。また、低周波磁場の生体作用について一連の実験を行うことで低周波磁場の生体作用経路について考察できたことも重要である。

近年、磁場曝露による健康への注目が高まっており、磁場過敏症による健康被害も報告されている [106]。本研究では、一番身近な環境磁場といえる 50-Hz 磁場を用いたため、得られた結果が貢献できるかもしれない。一方で、健康リスクの判断に関しては最終的には人よって行われるため、非常に難しく慎重に行わなければならないという面もある。

本研究の今後の課題としては、低周波磁場の作用が疑われる NAD(P)H Oxidase、の活性やミトコンドリア膜電位差の詳細な測定、膜上のうず電流について研究を進め、酸化ストレス存在下で磁場によって促進された DNA 損傷増加の原理を探ることである。

8 付記

研究の一部を、東北大学大学院のリアサーチアシスタント「物質階層を紡ぐ科学フロンティアの新展開」に援助していただきました。

9 参考文献

- [1] 気象庁、地磁気観測所：
<http://www.kakioka-jma.go.jp/knowledge/qanda.html#2>.,
- [2] Lohmann, K. J. (2010). Q&A: Animal behaviour: Magnetic-field perception. , *Nature*, *464*(7292), 1140-1142.
- [3] Vacha, M., Půžová, T., & Kvíčalová, M. (2009). Radio frequency magnetic fields disrupt magnetoreception in American cockroach., *Journal of Experimental Biology*, *212*(21), 3473-3477.
- [4] Wiltschko, W., & Wiltschko, R. (1972). Magnetic compass of European robins., *Science*, *176*(4030), 62-64.
- [5] Ritz, T., Adem, S., & Schulten, K. (2000). A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds., *Biophysical journal*, *78*(2), 707-718..
- [6] Cintolesi, F., Ritz, T., Kay, C. W. M., Timmel, C. R., & Hore, P. J. (2003). Anisotropic recombination of an immobilized photoinduced radical pair in a 50- μ T magnetic field: a model avian photomagnetoreceptor., *Chemical Physics*, *294*(3), 385-399.
- [7] Liedvogel, M., Maeda, K., Henbest, K., Schleicher, E., Simon, T., Timmel, C. R., Hore, P. J., Chemical Magnetoreception: Bird Cryptochrome 1a Is Excited by Blue Light and Forms Long-Lived Radical-Pairs (2007)., *PloS one*, *2*(10), e1106.
- [8] Lambert, N., Chen, Y. N., Cheng, Y. C., Li, C. M., Chen, G. Y., & Nori, F. (2013). Quantum biology. , *Nature Physics*, *9*(1), 10-18.
- [9] Gauger, E. M., Rieper, E., Morton, J. J., Benjamin, S. C., & Vedral, V. (2011). Sustained quantum coherence and entanglement in the avian compass., *Physical Review Letters*, *106*(4), 040503.
- [10] Mo, W. C., Zhang, Z. J., Wang, D. L., Liu, Y., Bartlett, P. F., & He, R. Q. (2016). Shielding of the Geomagnetic Field Alters Actin Assembly and Inhibits Cell Motility in Human Neuroblastoma Cells., *Scientific reports*, *6*.
- [11] Roman, A., & Tombarkiewicz, B. (2009). Prolonged weakening of the geomagnetic field (GMF) affects the immune system of rats., *Bioelectromagnetics*, *30*(1), 21-28.
- [12] Martino, C. F., Perea, H., Hopfner, U., Ferguson, V. L., & Wintermantel, E. (2010). Effects of weak static magnetic fields on endothelial cells., *Bioelectromagnetics*, *31*(4), 296-301.

- [13] Steiner, U. E., & Ulrich, T. (1989). Magnetic field effects in chemical kinetics and related phenomena., *Chemical Reviews*, *89(1)*, 51-147.
- [14] Devasagayam, T. P. A., Boloor, K. K., & Ramasarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits., *Indian journal of biochemistry & biophysics*, *40(5)*, 300-308.
- [15] Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., & Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects., *Biochemical and biophysical research communications*, *338(1)*, 668-676.
- [16] Driomina, E. S., Sharov, V. S., & Vladimirov, Y. A. (1993). Fe 2+-induced lipid peroxidation kinetics in liposomes: The role of surface Fe 2+ concentration in switching the reaction from acceleration to decay., *Free Radical Biology and Medicine*, *15(3)*, 239.
- [17] 寺尾純二. (2009). 生体内における過酸化脂質の発生と消去 (特集 酸化ストレス). , *Journal of analytical bio-science*, *32(4)*, 257-264.
- [18] Wolf, J., & Heinrich, R. (1997). Dynamics of two-component biochemical systems in interacting cells: synchronization and desynchronization of oscillations and multiple steady states. *BioSystems*, *43(1)*, 1-24.,.
- [19] Kipriyanov, A., Doktorov, A., & Purtov, P. (2015). Magnetic field effects on bistability and bifurcation phenomena in lipid peroxidation., *Bioelectromagnetics*, *36(7)*, 485-493.
- [20] Wertheimer, N., & Leeper, E. D. (1979). Electrical wiring configurations and childhood cancer. , *American journal of epidemiology*, *109(3)*, 273-284.
- [21] Ahlbom, A., Day, N., Feychting, M., Roman, E., Skinner, J., Dockerty, J., & Tynes, T. , "A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. ," *British journal of cancer*, , vol. 692., no. 83(5), , (2000).
- [22] Kheifets, L., Ahlbom, A., Crespi, C. M., Draper, G., Hagihara, J., Lowenthal, R. M., & Tittarelli, A. (2010). Pooled analysis of recent studies on magnetic fields and childhood leukaemia. , *British journal of cancer*, *103(7)*, 1128-1135.
- [23] Greenland, S., Sheppard, A. R., Kaune, W. T., Poole, C., Kelsh, M. A., & Childhood Leukemia-EMF Study Group. (2000). A pooled analysis of magnetic fields, wire codes, and childhood leukemia. , *Epidemiology*, *11(6)*, 624-634.
- [24] International Agency for Research on Cancer. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2004) Tobacco smoke and involuntary smoking., *Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, *83*.
- [25] Lai, H. (2014, October). Genetic effects of nonionizing electromagnetic fields., *In International Workshop on Biological Effects of Ionizing Radiation, Electromagnetic Fields and Chemical Toxic Agents” in Sinaia, Romania*.

- [26] Lai, H., & Singh, N. P. (1995). Acute low - intensity microwave exposure increases DNA single - strand breaks in rat brain cells. , *Bioelectromagnetics*, 16(3), 207-210.
- [27] Lai, H. (1996). Single-and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation., *International journal of radiation biology*, 69(4), 513-521..
- [28] Lai, H., & Singh, N. P. (1997). Melatonin and N - tert - butyl - α - phenylnitron block 60 - Hz magnetic field - induced DNA single and double strand breaks in rat brain cells., *Journal of Pineal Research*, 22(3), 152-162.
- [29] Lai, H., & Singh, N. P. (2005). Interaction of microwaves and a temporally incoherent magnetic field on single and double DNA strand breaks in rat brain cells., *Electromagnetic Biology and Medicine*, 24(1), 23-29.
- [30] Diem, E., Schwarz, C., Adlkofer, F., Jahn, O., & Rüdiger, H. (2005). Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro., *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 583(2), 178-183.
- [31] Sarkar, S., Ali, S., & Behari, J. (1994). Effect of low power microwave on the mouse genome: a direct DNA analysis., *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 320(1), 141-147.
- [32] Erogul, O., Oztas, E., Yildirim, I., Kir, T., Aydur, E., Komesli, G., & Peker, A. F. (2006). Effects of electromagnetic radiation from a cellular phone on human sperm motility: an in vitro study. , *Archives of medical research*, 37(7), 840-843.
- [33] Friedman, J., Kraus, S., Hauptman, Y., Schiff, Y., & Seger, R. (2007). Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies., *Biochemical Journal*, 405(3), 559-568.
- [34] Wyde, M., Cesta, M., Blystone, C., Elmore, S., Foster, P., Hooth, M., Kissling, G., Malarkey, D., Sills, R., Stout, M., Walker, N., Witt, K., Wolfe, M., Bucher, J., (2016)., "Report of Partial findings from the National Toxicology Program Carcinogenesis Studies of Cell Phone Radiofrequency Radiation in Hsd: Sprague Dawley® SD rats (Whole Body Exposure).," *bioRxiv*, 055699.
- [35] 上田昌文、携帯電磁波でラットに脳腫瘍 米国国家毒性プログラムで判明 (<http://blogs.shiminkagaku.org/shiminkagaku/2016/06/post-115.html>) ,.
- [36] Lai, H., & Singh, N. P. (2004). Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat., *Environmental health perspectives*, 112(6), 687.
- [37] Watanabe, R., & Saito, K. (2002). Monte Carlo simulation of strand-break induction on plasmid DNA in aqueous solution by monoenergetic electrons. , *Radiation and environmental biophysics*, 41(3), 207-215.
- [38] 安藤樹, (2015) コメントアッセイに対する理論的考察と解析方法の改良, 修士

論文.

- [39] Caldecott, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. , *Nature Reviews Genetics*, 9(8), 619-631.
- [40] Ahuja, Y. R., Vijayashree, B., Saran, R., Jayashri, E. L., Manoranjani, J. K., & Bhargava, S. C., "In vitro effects of low-level, low-frequency electromagnetic fields on DNA damage in human leucocytes by comet assay," *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, vol. 36, no. 5, pp. 318-322, 1999.
- [41] Phillips, J. L., Campbell-Beachler, M., Ivaschuk, O., Ishida-Jones, T., & Haggren, W. (1997). Exposure of molt-4 lymphoblastoid cells to a 1 G sinusoidal magnetic field at 60-Hz: effects on cellular events related to apoptosis. , *1997 Annual Review of Research on Biological Effects of Electric and Magnetic Fields from the Generation, Delivery, and Use of Electricity*. Frederick, MD: W/L Associates, Ltd.
- [42] Svedenstål, B. M., Johanson, K. J., Mattsson, M. O., & Paulsson, L. E. (1998). DNA damage, cell kinetics and ODC activities studied in CBA mice exposed to electromagnetic fields generated by transmission lines., *In vivo (Athens, Greece)*, 13(6), 507-513.
- [43] Svedenstål, B. M., Johanson, K. J., & Mild, K. H. , "DNA damage induced in brain cells of CBA mice exposed to magnetic fields," *In vivo (Athens, Greece)*, vol. 13, no. 6, pp. 551-552, 1998.
- [44] Zmysłony, M., Palus, J., Jajte, J., Dziubaltowska, E., & Rajkowska, E. (2000). DNA damage in rat lymphocytes treated in vitro with iron cations and exposed to 7 mT magnetic fields (static or 50 Hz). , *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms o*.
- [45] Singh, N. P., & Stephens, R. E. (1997). Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching., *Mutation Research/DNA Repair*, 383(2), 167-175.
- [46] Li, S. H., & Chow, K. C. (2001). Magnetic field exposure induces DNA degradation., *Biochemical and Biophysical research communications*, 280(5), 1385-1388.
- [47] Lourencini da Silva, R., Albano, F., Lopes dos Santos, L. R., Tavares Jr, A. D., & Felzenszwalb, I. (2000). The effect of electromagnetic field exposure on the formation of DNA lesions. , *Redox Report*, 5(5), 299-301.
- [48] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2002). International agency for research on cancer IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. , *Iarc Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 80, 273-338.
- [49] Ivancsits, S., Diem, E., Pilger, A., Rüdiger, H. W., & Jahn, O. (2002). Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to

- extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts., *Mutation Research/Genetic toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1), 1-13.
- [50] Ivancsits, S., Diem, E., Jahn, O., & Rüdiger, H. W. (2003). Intermittent extremely low frequency electromagnetic fields cause DNA damage in a dose-dependent way., *International archives of occupational and environmental health*, 76(6), 431-436.
- [51] Ivancsits, S., Diem, E., Jahn, O., & Rüdiger, H. W. (2003). Age-related effects on induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to electromagnetic fields. , *Mechanisms of ageing and development*, 124(7), 847-850.
- [52] Ivancsits, S., Pilger, A., Diem, E., Jahn, O., & Rüdiger, H. W. (2005). Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields., *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 583(2), 184-188.
- [53] McNamee, J. P., Bellier, P. V., McLean, J. R. N., Marro, L., Gajda, G. B., & Thansandote, A. (2002). DNA damage and apoptosis in the immature mouse cerebellum after acute exposure to a 1 mT, 60 Hz magnetic field., *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 513(1), 121-133.
- [54] Merritt, R., Purcell, C., & Stroink, G. (1983). Uniform magnetic field produced by three, four, and five square coils. , *Review of Scientific Instruments*, 54(7), 879-882.
- [55] 中村文. (2014). マクロファージの一酸化窒素産生に及ぼす 50 Hz 磁場の影響の研究, 修士論文,.
- [56] International commission on non-ionizing radiation protection (ICNIRP). (2010). Guidelines for limiting exposure to time-varying electric and magnetic fields (1 Hz – 100 kHz)., *Health Physics*. 99:818–836.
- [57] Lai, H., & Singh, N. P. (1997). Acute exposure to a 60 Hz magnetic field increases DNA strand breaks in rat brain cells., *Bioelectromagnetics*, 18(2), 156-165.
- [58] Olive, P. L., & Durand, R. E. (1992). Detection of hypoxic cells in a murine tumour with the use of the comet assay. , *Journal of the National Cancer Institute*, 84(9), 707-711.
- [59] Mattsson, M. O., & Simkó, M. (2014). Grouping of experimental conditions as an approach to evaluate effects of extremely low-frequency magnetic fields on oxidative response in in vitro studies. *Frontiers in public health*, 2,.
- [60] Ivancsits, S., Pilger, A., Diem, E., Jahn, O., & Rüdiger, H. W. (2005). Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields., *Mutation Research/Genetic Toxicology and*

Environmental Mutagenesis, 583(2), 184-18.

- [61] Miyata, H., Ishido, M., Nakayama, M., Ishizawa, K. I., Murase, M., & Hondou, T. (2015). Analysis of gene expression in human umbilical vein endothelial cells exposed to a 50-Hz magnetic field.,
- [62] Blank, M., & Goodman, R. (1997). Do electromagnetic fields interact directly with DNA?, *Bioelectromagnetics*, 18(2), 111-115.
- [63] Wan, C., Fiebig, T., Kelley, S. O., Treadway, C. R., Barton, J. K., & Zewail, A. H. (1999). Femtosecond dynamics of DNA-mediated electron transfer. , *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6014-6019.
- [64] Dandliker, P. J., Holmlin, R. E., & Barton, J. K. (1997). Oxidative thymine dimer repair in the DNA helix. , *Science*, 275(5305), 1465-1468.
- [65] Blank, M., & Goodman, R. (2001). Electromagnetic initiation of transcription at specific DNA sites. *Journal of cellular biochemistry*, 81(4), 689-692.,.
- [66] Dizdaroglu, M., & Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. , *Free radical research*, 46(4), 382-419.
- [67] Suzuki, Y. J., Forman, H. J., & Sevanian, A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction., *Free Radical Biology and Medicine*, 22(1), 269-285.
- [68] Meneghini, R. (1997). Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. , *Free Radical Biology and Medicine*, 23(5), 783-792.
- [69] Floyd, R. A. (1981). DNA-ferrous iron catalyzed hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide. , *Biochemical and biophysical research communications*, 99(4), 1209-1215.
- [70] Richardson, D. R., & Ponka, P. (1997). The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. , *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1331(1), 1-40.
- [71] Reif, D. W., & Simmons, R. D. (1990). Nitric oxide mediates iron release from ferritin. , *Archives of biochemistry and biophysics*, 283(2), 537-541.
- [72] Miyata, H., Ishizawa, K. I., Ishido, M., Sugawara, K., Murase, M., & Hondou, T. (2012). The effect of a 50-Hz sinusoidal magnetic field on nitric oxide (NO) production by human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)., *In Journal of Physics: Conference Series (Vol. 344, No. 1, p. 012006)*. IOP Publishing.
- [73] 願暢子, (2012) 50Hz サイン波磁場が細胞の一酸化窒素産生に及ぼす影響, 修士論文.,
- [74] Patruno, A., Amerio, P., Pesce, M., Vianale, G., Di Luzio, S., Tulli, A., Franceschelli, S., Grilli, A., Muraro, R., Reale, M. (2010)., "Extremely low frequency electromagnetic fields modulate expression of inducible nitric

- oxide synthase, endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase - 2 in the human keratinocyte cell line HaCat: potential therapeutic effects in wound healing.," *British Journal of Dermatology*, 162(2), 258-266.
- [75] Mo, C., Wang, L., Zhang, J., Numazawa, S., Tang, H., Tang, X., & Wei, D. (2014). The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice., *Antioxidants & redox signaling*, 20(4), 574-588.
- [76] Sato, A., Okada, M., Shibuya, K., Watanabe, E., Seino, S., Narita, Y., Shibui, S., Kayama, T., Kitanaka, C. (2014). Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells., *Stem cell research*, 12(1), 119-131.
- [77] Blumenthal, N. C., Ricci, J., Breger, L., Zychlinsky, A., Solomon, H., Chen, G. G., & Dorfman, R. (1997). Effects of low - intensity AC and/or DC electromagnetic fields on cell attachment and induction of apoptosis. , *Bioelectromagnetics*, 18(3), 264-272.
- [78] Ismael, S. J., Callera, F., Garcia, A. B., Baffa, O., & Falcão, R. P. (1998). Increased dexamethasone - induced apoptosis of thymocytes from mice exposed to long - term extremely low frequency magnetic fields. , *Bioelectromagnetics*, 19(2), 131-135.
- [79] Simko, M., Kriehuber, R., Weiss, D. G., & Luben, R. A. (1998). Effects of 50 Hz EMF exposure on micronucleus formation and apoptosis in transformed and nontransformed human cell lines. , *Bioelectromagnetics*, 19(2), 85-91.
- [80] Singh, N., Anand, S., Rudra, N., Mathur, R., & Behari, J. (1994). Induction of apoptosis by electromagnetic fields., *In International Proceedings of the XVI International Cancer Congress (Rao RS, Deo MG, Sanghvi LD, Mittra I, eds). Bologna, Italy: Monduzzi Editore International Proceedings Division (pp. 545-549).*
- [81] Marla, S. S., Lee, J., & Groves, J. T. (1997)., "Peroxy nitrite rapidly permeates phospholipid membranes.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(26), 14243-14248.
- [82] Grundler, W., Kaiser, F., Keilmann, F., & Walleczek, J. (1992). Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems. , *Naturwissenschaften*, 79(12), 551-559.
- [83] Reiter, R. J. (1997). MELATONIN ASPECTS OF EXPOSURE TO LOW FREQUENCY ELECTRIC., *Advances in electromagnetic fields in living systems*, 2, 1.
- [84] 藤田直. (2002). 活性酸素, 過酸化脂質, フリーラジカルの生成と消去機構並びにそれらの生物学的作用., *YAKUGAKU ZASSHI*, 122(3), 203-218.
- [85] Cordeiro, R. M. (2014). Reactive oxygen species at phospholipid bilayers:

- distribution, mobility and permeation., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(1), 438-444.
- [86] Sim Choi, H., Woo Kim, J., Cha, Y. N., & Kim, C. (2006). A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. , *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 27(1), 31-44.
- [87] Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., & Tzur, A. (2012)., "JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry.," *Cell death & disease*, 3(11), e430.
- [88] Akan, Z., Aksu, B., Tulunay, A., Bilsel, S., & Inhan - Garip, A. (2010). Extremely low - frequency electromagnetic fields affect the immune response of monocyte - derived macrophages to pathogens. , *Bioelectromagnetics*, 31(8), 603-612.
- [89] Frahm, J., Mattsson, M. O., & Simkó, M. (2010). Exposure to ELF magnetic fields modulate redox related protein expression in mouse macrophages. , *Toxicology letters*, 192(3), 330-336.
- [90] Frahm, J., Lantow, M., Lupke, M., Weiss, D. G., & Simkó, M. (2006). Alteration in cellular functions in mouse macrophages after exposure to 50 Hz magnetic fields. , *Journal of cellular biochemistry*, 99(1), 168-177.
- [91] Rollwitz, J., Lupke, M., & Simkó, M. (2004). Fifty-hertz magnetic fields induce free radical formation in mouse bone marrow-derived promonocytes and macrophages. , *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1674(3), 231-238.
- [92] Mannerling, A. C., Simkó, M., Mild, K. H., & Mattsson, M. O. (2010). Effects of 50-Hz magnetic field exposure on superoxide radical anion formation and HSP70 induction in human K562 cells. , *Radiation and environmental biophysics*, 49(4), 731-741.
- [93] Simkó, M., Droste, S., Kriehuber, R., & Weiss, D. G. (2001). Stimulation of phagocytosis and free radical production in murine macrophages by 50 Hz electromagnetic fields., *European Journal of Cell Biology*, 80(8), 562-566.
- [94] Cakir, Y., & Ballinger, S. W. (2005). Reactive species-mediated regulation of cell signaling and the cell cycle: the role of MAPK. , *Antioxidants & redox signaling*, 7(5-6), 726-740.
- [95] Kamata, H., & Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling., *Cellular signalling*, 11(1), 1-14.
- [96] Woo, C. H., Lim, J. H., & Kim, J. H. (2004). Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells., *The Journal of Immunology*, 173(11), 6973-6.
- [97] Escames, G., León, J., Macías, M., Khaldy, H., & Acuña-Castroviejo, D.

- (2003). Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats., *The FASEB Journal*, 17(8), 932-934.
- [98] Lupke, M., Rollwitz, J., & Simkó, M. (2004)., "Cell activating capacity of 50 Hz magnetic fields to release reactive oxygen intermediates in human umbilical cord blood-derived monocytes and in Mono Mac 6 cells.," *Free Radical Research*, 38(9), 985-993.
- [99] O'Leary, D. P., Bhatt, L., Woolley, J. F., Gough, D. R., Wang, J. H., Cotter, T. G., & Redmond, H. P. (2012)., "TLR-4 signalling accelerates colon cancer cell adhesion via NF- κ B mediated transcriptional up-regulation of Nox-1.," *PLoS One*, 7(10), e44176.
- [100] Aggarwal, S., Dimitropoulou, C., Lu, Q., Black, S. M., & Sharma, S. (2012). Glutathione supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in a mouse model of acute lung injury., *Frontiers in physiology*, 3, 161.
- [101] Costantini, P., Chernyak, B. V., Petronilli, V., & Bernardi, P. (1996). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites., *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 6746-6751.
- [102] Emre, Y., Hurtaud, C., Nübel, T., Criscuolo, F., Ricquier, D., & Cassard-Doulcier, A. M. (2007)., "Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages.," *Biochemical Journal*, 402(2), 271-278.
- [103] Martina, K., Miroslava, Š., Tatiana, M., Pavol, Š., Erika, H., Ladislav, J., (2016), "Analysis of Electromagnetic Field Effect on Cell Plasma Membrane Potential," *ELEKTRO*, 2016 : 547-555.
- [104] 山本剛禧. (1995). 二価鉄の培養 3T3 細胞の生存率に及ぼす影響. , 岡山大学 医療技術短期大学部紀要, 5, 91-94.
- [105] Focke, F., Schuermann, D., Kuster, N., & Schär, P. (2010). DNA fragmentation in human fibroblasts under extremely low frequency electromagnetic field exposure., *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 683(1), 74-83.
- [106] Hojo, S., Tokiya, M., Mizuki, M., Miyata, M., Kanatani, K. T., Takagi, A., Tsurikkisawa, N., Kame, S., Tsujiushi, T., Kumano, H. (2016). Development and evaluation of an electromagnetic hypersensitivity questionnaire for Japanese people., *Bioelectromagnetics*, 37(6), 353-372.
- [107] Begall, S., Červený, J., Neef, J., Vojtěch, O., & Burda, H. (2008). Magnetic alignment in grazing and resting cattle and deer. , *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13451-13455.
- [108] Nakayama, M., Nakamura, A., Hondou, T., & Miyata, H. (2016). ,

"Evaluation of cell viability, DNA single-strand breaks, and nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage RAW264 exposed to a 50-Hz magnetic field.," *International Journal of Radiation Biology*, 1-7.

- [109] Nakayama, M., Hondou, T., & Miyata, H. (2014). , "DNA Strand Breaks in Fibroblasts Exposed to a 50-Hz Magnetic Field. ," *In Proceedings of the 12th Asia Pacific Physics Conference (APPC12)* (p. 012057).
- [110] Marootpong, P., Maresuke, N., Chihiro, N., & Hidetake, M., (2017), Effect of 50-Hz sinusoidal magnetic field on the production of superoxide anion and the expression of heat-shock protein 70 in RAW264 cells, *International Journal of Chemistry*, (投稿中).