

文献調査2-表2 電磁場の影響について、幹細胞を用いた研究(2006-2009)

著者	発表 電磁場	サンプルに用いた細胞	研究方法	結果
Tsai MT (22)	2009 pulsed EMF	human mesenchymal stem cell	ALP (an early marker of osteogenesis)	osteogenesisに修飾的作用
Gaetani R (23)	2009 ELF-EMF	human cardiac stem cell (CSC)	Ca(2+) ion cyclotron energy resonance	cardiac-specific な分化へ働く
Sun LY (24)	2009 pulsed EMF	human bone marrow mesenchymal stem cell	proliferation and differentiation	proliferationを強める
Schwartz Z (25)	2009 pulsed EMF	human mesenchymal stem cell	Osteoprotegerin production	減少
Schwartz Z (26)	2008 pulsed EMF	human mesenchymal stem cell	osteogenic effects of BMP-2	増強する
Rao VS (27)	2008 800MHz	mouse stem cell-derived neuronal cell	the number of Ca(2+) spikes	増加する
Walther M (28)	2007 LF-EMF(BEMER)	type human mesenchymal stem cell	gene expression, RT-PCR	変化なし(cancer-related genes)
Park SH (29)	2006 EMF	rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cell	immunohistochemistry, gene expression	分化誘導に有効
Ahujia YR (30)	2007 EMF	stem cell lines	immunohistochemistry, gene expression	研究対象として有用
Schwenzer NF (31), 2007	MRI 3T	human lung fibroblast	environmental mutagenesis and drug development	影響認めず
Panagopoulos DJ (32)	2007 900MHz, 1800MHz	Drosophila follicle cell, cell, oocyte	TUNEL assay	cell deathを起こす

## 文献

1. Bas O, Odaci E, Kaplan S, Acer N, Ucok K, Colakoglu S. 900 MHz electromagnetic field exposure affects qualitative and quantitative features of hippocampal pyramidal cells in the adult female rat. *Brain Res.* 2009 Feb 20.
2. Odaci E, Bas O, Kaplan S. Effects of prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field on the dentate gyrus of rats: a stereological and histopathological study. *Brain Res.* 2008 Oct 31;1238:224-9.
3. Ammari M, Lecomte A, Sakly M, Abdelmelek H, de-Seze R. Exposure to GSM 900 MHz electromagnetic fields affects cerebral cytochrome c oxidase activity. *Toxicology.* 2008 Aug 19;250(1):70-4.
4. Ahmed Z, Wieraszko A. The mechanism of magnetic field-induced increase of excitability in hippocampal neurons. *Brain Res.* 2008 Jul 24;1221:30-40. Epub 2008 May 15.
5. St-Pierre LS, Mazzuchin A, Persinger MA. Altered blood chemistry and hippocampal histomorphology in adult rats following prenatal exposure to physiologically-patterned, weak (50-500 nanoTesla range) magnetic fields. *Int J Radiat Biol.* 2008 Apr;84(4):325-35.
6. Wang X, Liu Y, Lei Y, Zhou D, Fu Y, Che Y, Xu R, Yu H, Hu X, Ma Y. Extremely low-frequency electromagnetic field exposure during chronic morphine treatment strengthens downregulation of dopamine D2 receptors in rat dorsal hippocampus after morphine withdrawal. *Neurosci Lett.* 2008 Mar 15;433(3):178-82.
7. Jadidi M, Firoozabadi SM, Rashidy-Pour A, Sajadi AA, Sadeghi H, Taherian AA. Acute exposure to a 50 Hz magnetic field impairs consolidation of spatial memory in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2007 Nov;88(4):387-92.
8. Brillaud E, Piotrowski A, de Seze R. Effect of an acute 900MHz GSM exposure on glia in the rat brain: a time-dependent study. *Toxicology.* 2007 Aug 16;238(1):23-33.
9. Deans JK, Powell AD, Jefferys JG. Sensitivity of coherent oscillations in rat hippocampus to AC electric fields. *J Physiol.* 2007 Sep 1;583(Pt 2):555-65.
10. Li MQ, Wang YY, Zhang GB, Yu ZP. Effects of electromagnetic irradiation on glucocorticoid in serum and its receptor expression in rat hippocampus. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 2007 Apr;25(4):215-9.
11. Manikonda PK, Rajendra P, Devendranath D, Gunasekaran B, Channakeshava, Aradhya RS, Sashidhar RB, Subramanyam C. Influence of extremely low frequency magnetic fields on Ca<sup>2+</sup> signaling and NMDA receptor functions in rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 2007 Feb 14;413(2):145-9.
12. Platano D, Mesirca P, Paffi A, Pellegrino M, Liberti M, Apollonio F.

- Bersani F, Aicardi G. Acute exposure to low-level CW and GSM-modulated 900 MHz radiofrequency does not affect Ba<sup>2+</sup> currents through voltage-gated calcium channels in rat cortical neurons. *Bioelectromagnetics*. 2007 Dec;28(8):599-607.
13. Inomata-Terada S, Okabe S, Arai N, Hanajima R, Terao Y, Frubayashi T, Ugawa Y. Effects of high frequency electromagnetic field (EMF) emitted by mobile phones on the human motor cortex. *Bioelectromagnetics*. 2007 Oct;28(7):553-61.
14. Joubert V, Leveque P, Cueille M, Bourthoumieu S, Yardin C. No apoptosis is induced in rat cortical neurons exposed to GSM phone fields. *Bioelectromagnetics*. 2007 Feb;28(2):115-21.
15. Vargas JP, Siegel JJ, Bingman VP. The effects of a changing ambient magnetic field on single-unit activity in the homing pigeon hippocampus. *Brain Res Bull*. 2006 Jun 30;70(2):158-64.
16. Ferreira AR, Bonatto F, de Bittencourt Pasquali MA, Polydoro M, Dal-Pizzol F, Fernández C, de Salles AA, Moreira JC. Oxidative stress effects on the central nervous system of rats after acute exposure to ultra high frequency electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 2006 Sep;27(6):487-93.
17. Goto Y, Taniura H, Yamada K, Hirai T, Sanada N, Nakamichi N, Yoneda Y. The magnetism responsive gene Ntan1 in mouse brain. *Neurochem Int*. 2006 Sep;49(4):334-41.
18. Hirai T, Taniura H, Goto Y, Ogura M, Sng JC, Yoneda Y. Stimulation of ubiquitin-proteasome pathway through the expression of amidohydrolase for N-terminal asparagine (Ntan1) in cultured rat hippocampal neurons exposed to static magnetism. *J Neurochem*. 2006 Mar;96(6):1519-30.
19. Jelenković A, Janać B, Pesić V, Jovanović DM, Vasiljević I, Prolić Z. Effects of extremely low-frequency magnetic field in the brain of rats. *Brain Res Bull*. 2006 Jan 30;68(5):355-60.
20. Aalto S, Haarala C, Brück A, Sipilä H, Hämäläinen H, Rinne JO. Mobile phone affects cerebral blood flow in humans. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006 Jul;26(7):885-90.
21. Prina-Mello A, Farrell E, Prendergast PJ, Campbell V, Coey JM. Influence of strong static magnetic fields on primary cortical neurons. *Bioelectromagnetics*. 2006 Jan;27(1):35-42.
22. Tsai MT, Li WJ, Tuan RS, Chang WH. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation. *J Orthop Res*. 2009 Mar 9.
23. Gaetani R, Ledda M, Barile L, Chimenti I, De Carlo F, Forte E, Ionta V,

- Giuliani L, D'Emilia E, Frati G, Miraldi F, Pozzi D, Messina E, Grimaldi S, Giacomello A, Lisi A. Differentiation of human adult cardiac stem cells exposed to Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields. *Cardiovasc Res.* 2009 Feb 19.
24. Sun LY, Hsieh DK, Yu TC, Chiu HT, Lu SF, Luo GH, Kuo TK, Lee OK, Chiou TW. Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics.* 2009 Feb 9.
25. Schwartz Z, Fisher M, Lohmann CH, Simon BJ, Boyan BD. Osteoprotegerin (OPG) production by cells in the osteoblast lineage is regulated by pulsed electromagnetic fields in cultures grown on calcium phosphate substrates. *Ann Biomed Eng.* 2009 Mar;37(3):437-44.
26. Schwartz Z, Simon BJ, Duran MA, Barabino G, Chaudhri R, Boyan BD. Pulsed electromagnetic fields enhance BMP-2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2008 Sep;26(9):1250-5.
27. Rao VS, Titushkin IA, Moros EG, Pickard WF, Thatte HS, Cho MR. Nonthermal effects of radiofrequency-field exposure on calcium dynamics in stem cell-derived neuronal cells: elucidation of calcium pathways. *Radiat Res.* 2008 Mar;169(3):319-29.
28. Walther M, Mayer F, Kafka W, Schütze N. Effects of weak, low-frequency pulsed electromagnetic fields (BEMER type) on gene expression of human mesenchymal stem cells and chondrocytes: an in vitro study. *Electromagn Biol Med.* 2007;26(3):179-90.
29. Park SH, Sim WY, Park SW, Yang SS, Choi BH, Park SR, Park K, Min BH. An electromagnetic compressive force by cell exciter stimulates chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2006 Nov;12(11):3107-17.
30. Ahuja YR, Vijayalakshmi V, Polasa K. Stem cell test: a practical tool in toxicogenomics. *Toxicology.* 2007 Feb 28;231(1):1-10.
31. Schwenzer NF, Bantleon R, Maurer B, Kehlbach R, Herberts T, Claussen CD, Rodegerdts E. In vitro evaluation of magnetic resonance imaging at 3.0 tesla on clonogenic ability, proliferation, and cell cycle in human embryonic lung fibroblasts. *Invest Radiol.* 2007 Apr;42(4):212-7.
32. Panagopoulos DJ, Chavdoula ED, Nezis IP, Margaritis LH. Cell death induced by GSM 900-MHz and DCS 1800-MHz mobile telephony radiation. *Mutat Res.* 2007 Jan 10; 626(1-2):69-78.
33. Ruediger HW. Genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic fields. *Pathophysiology.* 2009 Mar 12.

34. Phillips JL, Singh NP, Lai H. Electromagnetic fields and DNA damage. *Pathophysiology*. 2009 Mar 3.
35. Blank M. Protein and DNA reactions stimulated by electromagnetic fields. *Electromagn Biol Med*. 2008;27(1):3-23.
36. Simkó M. Cell type specific redox status is responsible for diverse electromagnetic field effects. *Curr Med Chem*. 2007;14(10):1141-52.
37. Blank M, Goodman R. A mechanism for stimulation of biosynthesis by electromagnetic fields: charge transfer in DNA and base pair separation. *J Cell Physiol*. 2008 Jan;214(1):20-6.
38. Schwenzer NF, Bantleon R, Maurer B, Kehlbach R, Schraml C, Claussen CD, Rodegerdts E. Do static or time-varying magnetic fields in magnetic resonance imaging (3.0 T) alter protein-gene expression?—A study on human embryonic lung fibroblasts. *J Magn Reson Imaging*. 2007 Nov;26(5):1210-5.
39. Qutob SS, Chauhan V, Bellier PV, Yauk CL, Douglas GR, Berndt L, Williams A, Gajda GB, Lemay E, Thansandote A, McNamee JP. Microarray gene expression profiling of a human glioblastoma cell line exposed in vitro to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. *Radiat Res*. 2006 Jun;165(6):636-44.
40. Wang LL, Chen GD, Lu DQ, Chiang H, Xu ZP. Global gene response to GSM 1800 MHz radiofrequency electromagnetic field in MCF-7 cells. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2006 May;40(3):159-63.
41. Blank M. Do electromagnetic fields interact with electrons in the Na, K-ATPase? *Bioelectromagnetics*. 2005 Dec;26(8):677-83.
42. Simkó M, Mattsson MO. Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: possible immune cell activation. *J Cell Biochem*. 2004 Sep 1;93(1):83-92.
43. Blank M, Goodman R. Initial interactions in electromagnetic field-induced biosynthesis. *J Cell Physiol*. 2004 Jun;199(3):359-63.

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）  
分担研究報告書

磁界の発がんへの影響とその機構の解明

研究分担者 久保田俊一郎 東京大学大学院教授

研究要旨

電磁界（高周波、中間周波、低周波）の健康への影響が懸念されており、生体への影響について、種々の研究がなされてきた。特に、低周波磁界曝露の健康影響については、白血病・発癌との関係が危惧されているが、発がんの機構に関与すると考えられている細胞増殖、増殖抑制、細胞死に関して十分な研究がなされていない。WHO の環境保健クライテリア 238 (2007) では、低周波磁界の影響として、細胞増殖、細胞死、細胞悪性化に関しては、一貫性がなく、決定的でないとして記載されている。そこで、本分担研究は、低周波磁界曝露による細胞増殖、細胞死、細胞悪性化に関して、実験的研究を行い、健康影響を明らかにすることを目的とする。細胞増殖、細胞死、細胞悪性化は、発癌性、脳・生殖系への影響に密接に関連する。そこで、本分担研究では、低周波磁界曝露が、種々の臓器由来の培養細胞（神経系細胞として、神経芽細胞腫、ラットグリウ細胞、ヒトグリオーマ、生殖系細胞として、ラット精巣腫瘍細胞、腫瘍細胞として、ヒト肝癌細胞、ヒト網膜芽細胞腫、ヒト横紋筋肉腫、ヒト乳癌細胞）を用いて、低周波磁界曝露が、細胞にどのような影響があるかを解析した。種々の臓器由来培養細胞の反応は異なり、細胞増殖・細胞生存率に変化のない細胞、細胞増殖を惹起する細胞、細胞死を起こす細胞に分けられた。Triplicate の実験ではあるが、結論を出すには実験回数を増やして再現性を確認する必要がある。また、今年度は、磁束密度が 80mT で実験を実施したが、生活環境レベルの磁束密度での細胞への影響は来年度実施し、その結果を含めて、発癌性への影響を評価する必要がある。

A. 研究目的

厚生労働行政の課題として、低周波磁界（送電線、家電など）および高周波のマイクロ波（携帯電話）曝露のヒトへの健康影響（発癌性、妊産婦とその児への影響、脳への影響）が挙げられる。IH 調理器（20kHz）の健康影響も重要な課題である。健康影響を明らかに

して（安全域と危険域を明らかにする）、国民の漠然とした不安に回答を与え、かつその対策をとることが求められている。低周波磁界曝露の健康影響については、発癌（1）、神経変性疾患との関連が報告されている。妊婦への曝露が、先天性奇形、流産、発達異常を惹起するとの危惧もある。携帯電話の健

健康影響に関して、脳腫瘍との関連性に関する報告、携帯電話使用でのグリオーマ発生のリスク増加が報告された(2-6)。中間周波磁界に関する文献調査・メタアナリシス、実験的研究はいずれも数が少ない。WHOの環境保健クライテリア 238 (2007)では、低周波磁界の影響として、細胞増殖、細胞死、細胞悪性化に関しては、一貫性がなく、決定的でないとして記載されている(7)。そこで、本分担研究は、低周波磁界曝露による細胞増殖、細胞死、細胞悪性化に関して、実験的研究を行い、健康影響を明らかにする。細胞増殖、細胞死、細胞悪性化は、発癌性、脳・生殖系への影響に密接に関連する。影響を認めた場合は、その機序も含めて解明することを目的とする。本研究は、国民の健康維持、磁界による健康への影響を予防するために必要な研究である。WHOの国際電磁界プロジェクトで、2007年に低周波電磁界への曝露による健康リスクに関して、環境保健クライテリア 238 (EHC238)を刊行した。評価対象となった文献は、商用周波(50/60Hz)磁界に関する研究であるが、細胞レベルでの実験的研究が少ないことから、本分担研究では、商用周波(50/60Hz)磁界の細胞への影響を明らかにすることを目的として研究を行った。

## B. 研究方法

培養細胞レベルで解析した。

培養細胞：種々の培養細胞(神経系、生殖系細胞、腫瘍細胞)を低周波磁界(50Hz, 80mT)に2時間曝露後、あるいは、0.5-4時間曝露し、48時間後にトリパンプルー法で細胞数をカウントして、

細胞生存率(細胞死あるいは細胞増殖効果)をtriplicateで解析した。この2つの方法を用いた理由は、2時間の磁界曝露で直接細胞死が惹起される可能性もあるため、また、0.5-4時間の磁界曝露で情報が伝達されてそのシグナルが、48時間後に細胞生存率(細胞死あるいは細胞増殖効果)に影響する可能性があるためである。

神経系細胞として、神経芽細胞腫、ラット神経系(グリア)細胞、ヒトグリオーマ(T98G)、生殖系細胞として、ラット精巣腫瘍細胞、腫瘍細胞として、ヒト肝癌細胞、ヒト網膜芽細胞腫、ヒト横紋筋肉腫、ヒト乳癌細胞を用いた。培養および曝露方法：ヒトグリオーマ細胞(T98G)、ラット精巣腫瘍細胞(LC540)、ラット神経系(グリア)細胞、ヒト肝癌細胞、ヒト横紋筋肉腫細胞、ヒト乳癌細胞は100mm細胞培養ディッシュを用い10%ウシ胎児血清(FBS)を添加したDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)中で37°C、5%炭酸ガスインキュベーター内で培養した。ヒト網膜芽細胞腫は100mm細胞培養ディッシュを用い10%FBSを添加したRPMI-1640 Mediumで培養した。ラットグリア細胞は、20%FBS含有DMEMで培養した。

5%炭酸ガスインキュベーター内に設置した低周波発生装置にディッシュを静置し、細胞を低周波磁界に曝露した。低周波磁界に2時間曝露後、あるいは、0.5-4時間曝露し、48時間後に細胞を回収し、トリパンプルー液で染色した。血球計算板を用い死細胞数、生細胞数を解析して生存率を算出した。

タンパク質定量：回収した細胞は、細胞破砕液に懸濁後、超音波破砕機で破砕した。破砕した細胞を 12,000rpm で遠心し、上清を得た。Bradford 法で、タンパク質を定量した。1.0mg/ml BSA 溶液を 0、0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8 mg/ml に調製し、標準溶液とした。分光光度計を用いて、595nm で吸光度を測定した。

#### ウェスタンブロッティング

種々の一次抗体および対応する二次抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった。シグナルの検出は化学発光法で解析した。

SDS ポリアクリルアミドゲル(10%)を用いて電気泳動後、ゲルを転写板に移し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンを 2%スキムミルク溶液で 1 時間ブロッキング後、一次抗体と 4°C で、一晩反応させた。メンブレンを Tris-Buffered-Saline(TBS)で 10 分、3 回洗浄した後、HRP 標識二次抗体に浸し、1 時間反応させた。TBS で 15 分、2 回洗浄後、メンブレンを 1 分間発光液に浸し、ChemiDoc (BioRad)を用いてシグナルを検出した。

#### ・一次抗体

actin Antibody (Santa Cruz)

phospho-p42/44 Mapkinase Antibody (Santa Cruz)

phospho-JNK, p38 Antibody (Santa Cruz)

#### C. D 研究結果および考察

まず、4つの腫瘍系培養細胞（ヒト肝癌細胞 (PLC)、ヒト網膜芽細胞腫 (Y79)、ヒト横紋筋肉腫 (RD)、ヒト乳癌細胞 (MDA)) を用いて、低周波磁界

曝露（2時間）による細胞への影響を 2 時間後に細胞生存率で検討した（平均値でデータを示す）。

#### 1. ヒト肝癌細胞生存率への効果

細胞生存率は、曝露前 97%、曝露後 2 時間 95%であった。

#### 2. ヒト網膜芽細胞腫細胞生存率への効果

細胞生存率は、曝露前 96%、曝露後 2 時間 89%であった。

#### 3. ヒト横紋筋肉腫細胞生存率への効果

細胞生存率は、曝露前 100%、曝露後 2 時間 98%であった。

#### 4. ヒト乳癌細胞生存率への効果

細胞生存率は、曝露前 99%、曝露後 2 時間 85%であった。

以上のように、低周波磁界に曝露したヒト各種癌細胞は、ほとんど影響がないか、少しの影響が見られたのみであったが、細胞内情報伝達系に影響があるかどうかを解析した。

細胞情報伝達系のキーとなる MAPkinase の発現 (p-Erk) (42kDa および 44kDa)、phospho-JNK, phospho-p38 は、リン酸化のカスケードにより細胞生存や細胞死に密接に関与すると考えられている。4つの腫瘍系培養細胞（ヒト肝癌細胞 (PLC)、ヒト網膜芽細胞腫 (Y79)、ヒト横紋筋肉腫 (RD)、ヒト乳癌細胞 (MDA)) とも、2 時間までの解析では、発現が検出できなかった。

次に、0.5-4 時間低周波磁界曝露後、4-8 時間培養後の細胞増殖（生存）への影響を解析した。対象とした細胞は、



神経系細胞として、ヒト神経芽細胞腫、ラット神経系（グリア）細胞、ヒトグリオーマ（T98G）、生殖系細胞として、ラット精巣腫瘍細胞である。

#### 1. 磁界曝露によるヒト神経芽細胞腫増殖への影響

0.5時間、1時間、2時間、4時間磁界曝露後、48時間培養し、細胞数を算定した。図1に示すように、曝露時間0.5時間から細胞増殖が抑制され、4時間曝露で最も増殖が抑制された。曝露時間0と比較して、有意な増殖抑制であった ( $p<0.05$ )。

#### 2. 磁界曝露によるヒトグリオーマ細胞増殖への影響

0.5時間、1時間、2時間、4時間磁界曝露後、48時間培養し、細胞数を算定した。図2に示すように、曝露時間0.5時間から細胞増殖が促進され、2時間曝露で最も増殖が促進された。曝露時間0と比較して、有意な増殖促進であった ( $p<0.05$ )。4時間曝露で、0.5時間、1時間、2時間曝露と比較して、逆に有意の細胞増殖抑制が見られた ( $p<0.05$ )。

#### 3. 磁界曝露によるラット神経（グリア）細胞増殖への影響

0.5時間、1時間、2時間、4時間磁界曝露後、48時間培養し、細胞数を算定した。図3に示すように、曝露時間0.5時間から細胞増殖が促進され、1時間曝露で最も増殖が促進された。曝露時間0と比較して、有意な増殖促進であった ( $p<0.05$ )。2時間および4時間曝露でも、曝露0時間と比較して有意

の増殖促進が見られたが ( $p<0.05$ )、1時間の増殖促進と比較して増殖の程度は抑制された ( $p<0.05$ )。

#### 4. 磁界曝露によるラット精巣腫瘍細胞増殖への影響

0.5時間、1時間、2時間、4時間磁界曝露後、48時間培養し、細胞数を算定した。図4に示すように、曝露時間0.5時間で、0時間曝露と比較して、有意に細胞増殖が抑制されが、1時間、2時間、4時間曝露では、曝露0時間と比較して有意の増殖促進はみられなかった。

以上の結果をまとめると、低周波磁界曝露は、神経系細胞では、グリア細胞とグリア系腫瘍細胞の増殖を促進したが、神経芽細胞腫では、逆に細胞増殖を抑制した。また、精巣腫瘍細胞では、短時間（0.5時間）曝露のみ、細胞増殖抑制効果を惹起した。

Kimらは、60Hz、14 microT の16週間の低周波磁界曝露がマウスの testicular germ cell の細胞死を誘導すると、報告している（8）。我々の精巣腫瘍細胞では、むしろ、短時間（0.5時間）曝露のみ、細胞増殖抑制効果を惹起した。この違いは、磁束密度の相違、マウスと細胞の相違等によると考えられる。Gottwaldらは、HL-60, H9c2, Girardi heart cells の3つの細胞株に低周波磁界（50Hz 2 $\mu$ T-4mT）を15分—30分曝露し、HL-60, Girardi heart cells において、Heat Shock Protein (HSP)72 の mRNA の発現が誘導されると報告しており（9）、細胞への影響が示唆される。X線で誘導され

る肝臓癌細胞死が低周波磁界曝露で増強されるとの報告もある(10)。

また、子供の急性リンパ性白血病と低周波磁界曝露との関係について、動物実験の報告が出された(11)。白血病発症に関して、50Hz, 100 $\mu$ Tの曝露は、影響がなかった(11)。

以上のように、低周波磁界曝露による細胞への影響について報告があるが、我々が見いだした低周波磁界による細胞増殖効果は、実験N数を増やして再現性が確認されれば、新規の発見で学術的価値がある。現在、増殖促進機構と増殖抑制機構の解明を行っているが、細胞の種類により反応が正反対であることから、個々の細胞毎に詳細な解析が必要で、この機構の解明を行うことで、低周波磁界による生体の影響を細胞あるいは組織別に明確にできると考えられる。

今回対象とした細胞には腫瘍系の細胞がある。癌細胞は、温度上昇により細胞死が誘導されることが良く知られている。そのため、本実験では、低周波磁界曝露が細胞培養インキュベータ内の温度上昇を来たすかどうかをモニターしながら実験を行った。その方法は、インキュベータ内および培養液中の温度測定を行い37 $^{\circ}$ Cを確認した。問題点としては、培養細胞が1層であることから、通常の方法では細胞内の温度を測定できないことであった。この点は課題として残った。ただ、次年度の研究では、磁束密度を80mTではなく、4 $\mu$ T~1mTの間で実験を設定するため、温度上昇は全く考慮する必要はないと考えられる。

低周波磁界曝露の健康影響については、発癌との関連が報告されている(1)。携帯電話の健康影響に関して、脳腫瘍との関連性に関する報告、携帯電話使用でのグリオーマ発生のリスク増加が報告されている(2-6)。WHOの環境保健クライテリア238(2007)では、低周波磁界の影響として、細胞増殖、細胞死、細胞悪性化に関しては、一貫性がなく、決定的でないとして記載されている(7)。そこで、本分担研究は、低周波磁界曝露による細胞増殖、細胞死、細胞悪性化に関して、実験的研究を行い、健康影響を明らかにすることとした。細胞増殖、細胞死、細胞悪性化は、発癌性、脳・生殖系への影響に密接に関連する。今年度は、磁束密度が80mTで実験を実施し、細胞増殖や増殖抑制を惹起したが、生活環境レベルの磁束密度での影響は来年度実施し、その結果を含めて、発癌性への影響を評価する必要がある。

## E. 結論

低周波磁界の細胞への影響を検討した。4つの腫瘍系培養細胞(ヒト肝癌細胞(PLC)、ヒト網膜芽細胞腫(Y79)、ヒト横紋筋肉腫(RD)、ヒト乳癌細胞(MDA))を用いて、低周波磁界曝露(2時間)による細胞への影響を2時間後に細胞生存率で検討した。低周波磁界に曝露したヒト各種癌細胞は、ほとんど影響がないか、少しの影響(生存率の低下)が見られたのみであった。一方、0.5-4時間低周波磁界曝露後、4-8時間培養後の細胞増殖(生存)への影響を解析したところ、低周波磁界曝露は、神経系細胞では、グリア細胞と

グリア系腫瘍細胞の増殖を促進したが、神経芽細胞腫では、逆に細胞増殖を抑制した。また、精巣腫瘍細胞では、短時間（0.5時間）曝露のみ、細胞増殖抑制効果を惹起した。Triplicateでの実験ではあるが、実験回数Nを増やして再現性を確認し、結論を導く必要がある。低周波磁界による細胞増殖効果は、再現性が得られれば、新規の発見で学術

的価値があるのみでなく、低周波磁界による生体の影響を細胞あるいは組織別に明確に分類できると考えられる。現在、細胞増殖や抑制の機序を解析中であるが、21年度は、生活環境の磁場強度（50Hz,  $1\mu\text{T}$ - $1\text{mT}$ ）での影響を中心に解析を行い、低周波磁界曝露の細胞への影響を評価する。

図1 低周波磁界曝露のヒト神経芽細胞腫増殖への影響

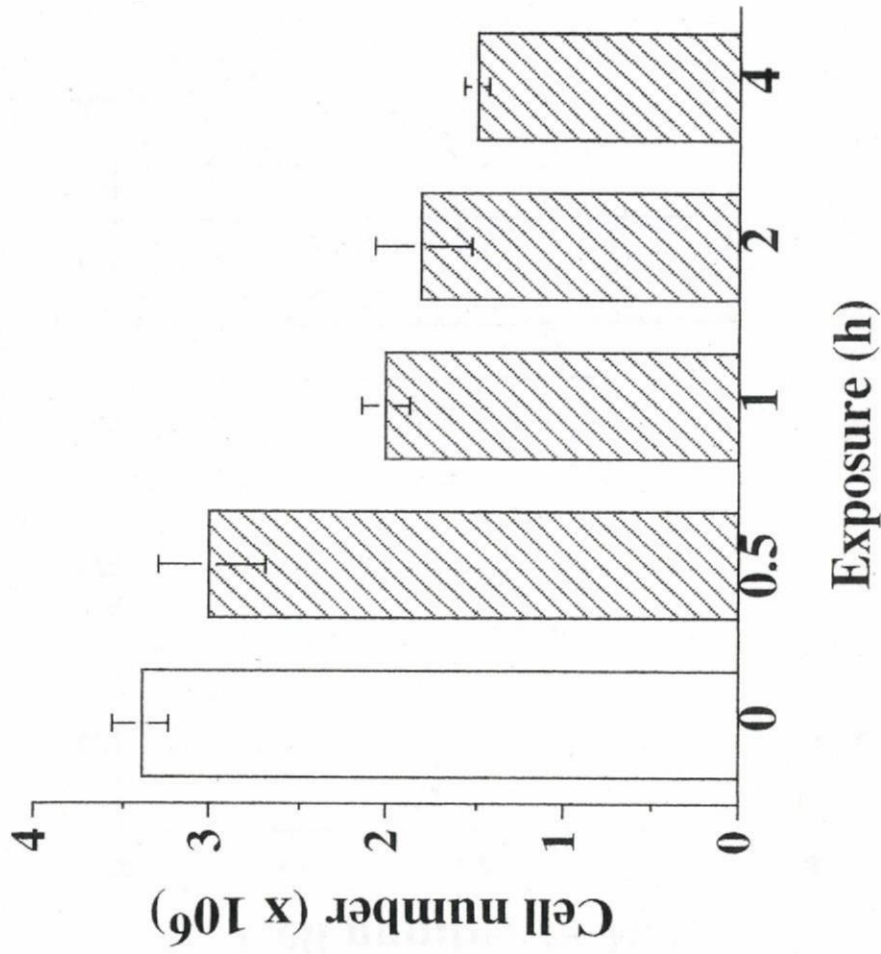


図2 低周波磁界曝露によるヒトグリオーマ細胞増殖への影響

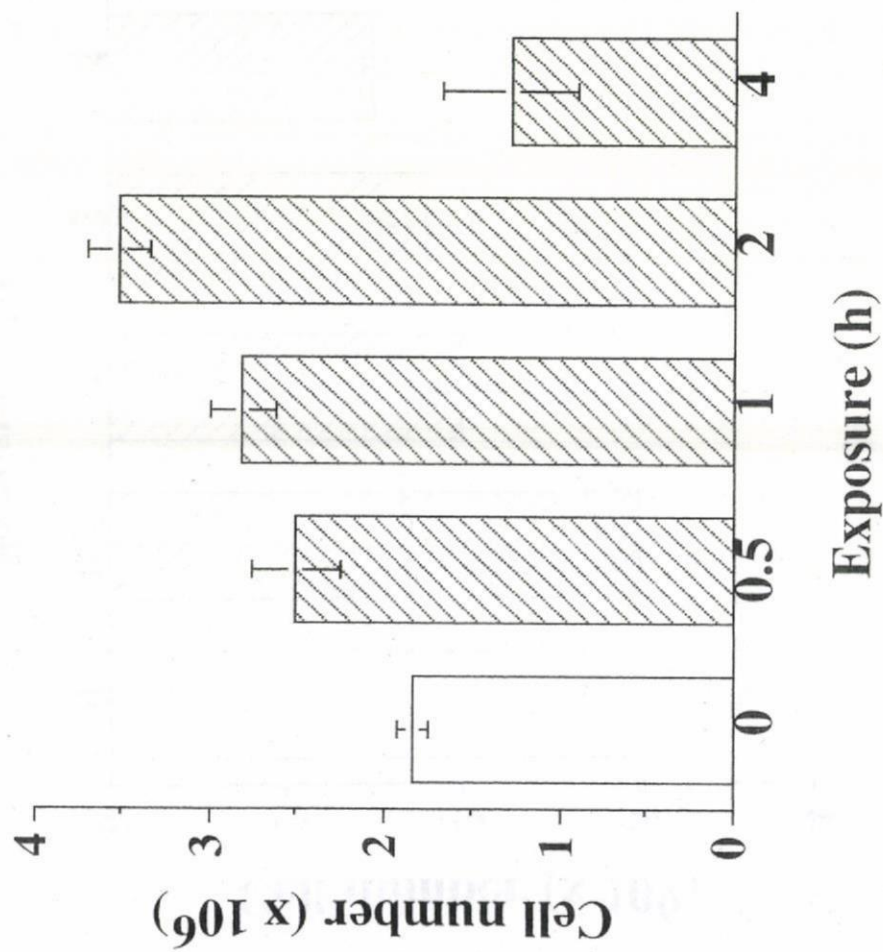


図3

低周波磁界曝露のラット神経（グリア）細胞増殖への影響

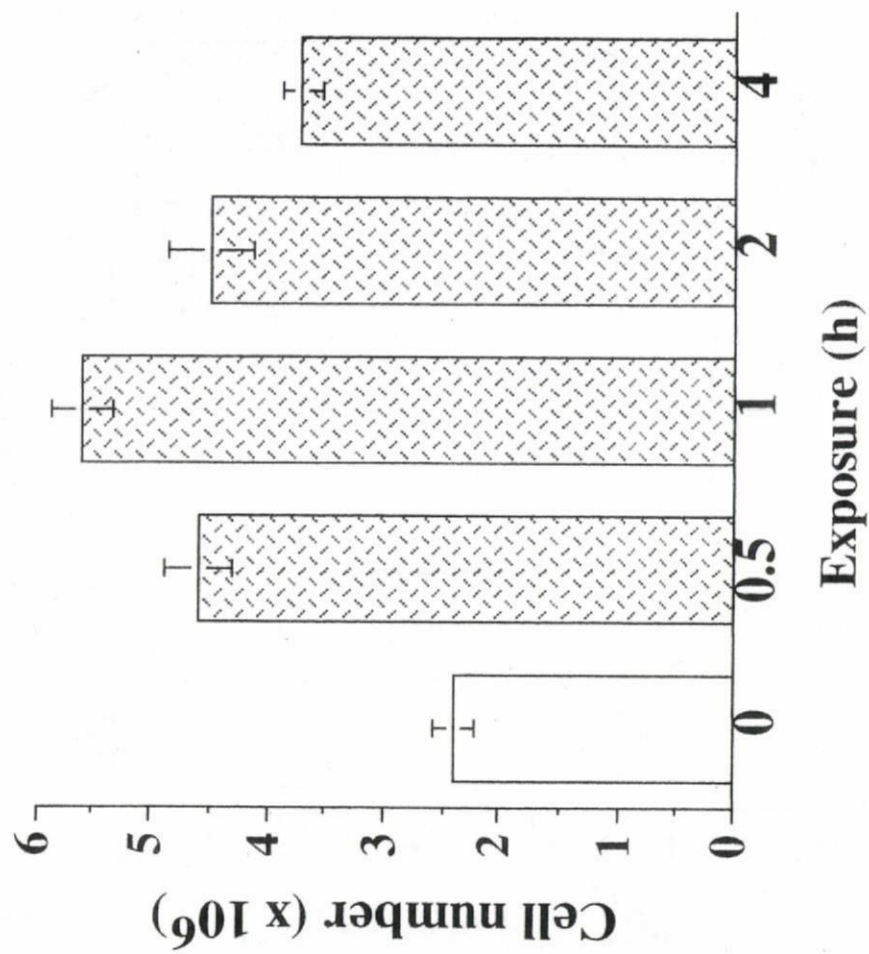
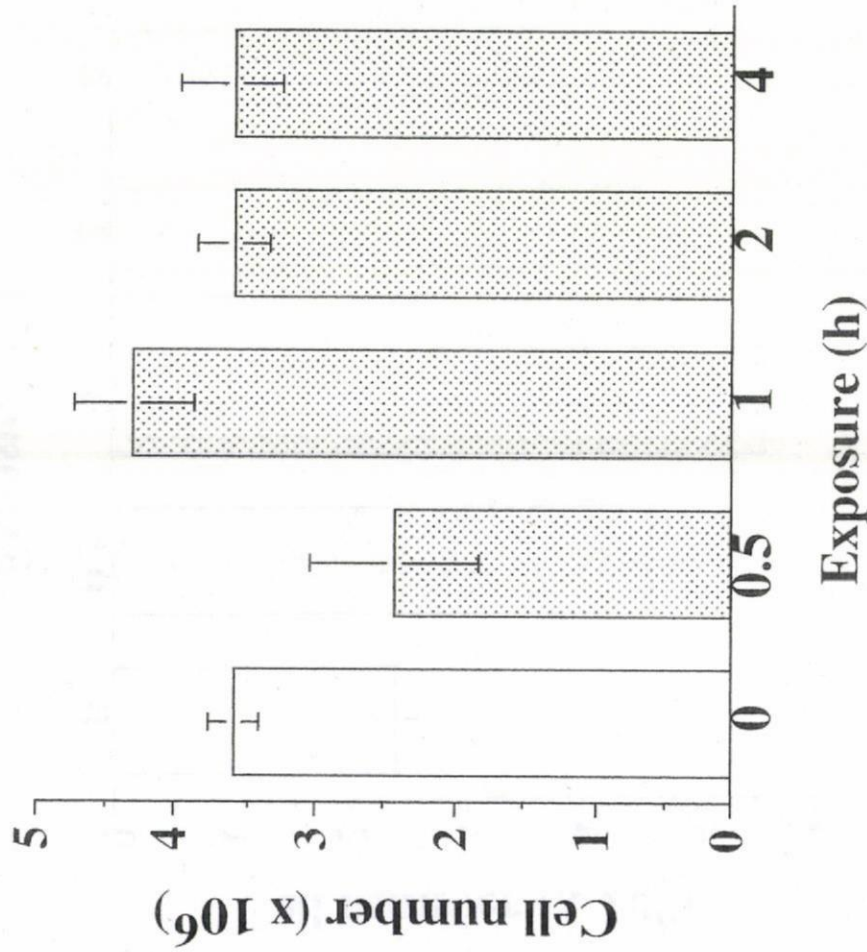


図4 低周波磁界曝露のラット精巣腫瘍細胞増殖への影響



低周波磁界曝露のラット精巣腫瘍細胞増殖への影響

## 参考文献

1. Kheifets L, Repacholi M, Saunders R, van Deventer E. The sensitivity of children to electromagnetic fields. *Pediatrics*. 2005 Aug;116(2): 303-13.
2. Christensen HC, Schüz J, Kosteljanetz M, Poulsen HS, Thomsen J, Johansen C.. Cellular Telephone Use and Risk of Acoustic Neuroma. *Am. J. Epidemiol.* 2004 159: 277-283.
3. Kundi M. Mobile phone use and risk of glioma in adults: conclusions are questionable. *BMJ*. 2006 Apr 29; 332 (7548):1035-6.
4. Maier M. Brains and mobile phones. *BMJ*. 2006 Apr 15;332(7546):864-5.
5. Rubin GJ, Hahn G, Everitt BS, Cleare AJ, Wessely S. Are some people sensitive to mobile phone signals? Within participants double blind randomised provocation study. *BMJ*. 2006 Apr 15;332(7546):886-91.
6. Hepworth SJ, Schoemaker MJ, Muir KR, Swerdlow AJ, van Tongeren MJ, McKinney PA. Mobile phone use and risk of glioma in adults: case-control study. *BMJ*. 2006 Apr 15;332(7546):883-7. Epub 2006 Jan 20.
7. WHO. Extremely Low Frequency Fields. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2007.
8. Kim YW, Kim HS, Lee JS, Kim YJ, Lee SK, Seo JN, Jung KC, Kim N, Gimm YM. Effects of 60 Hz 14 microT magnetic field on the apoptosis of testicular germ cell in mice. *Bioelectromagnetics*. 2009 Jan;30(1):66-72.
9. Gottwald E, Sontag W, Lahni B, Weibezahn KF. Expression of HSP72 after ELF-EMF exposure in three cell lines. *Bioelectromagnetics*. 2007 28(7):509-18.
10. Jian W, Wei Z, Zhiqiang C, Zheng F. X-ray-induced apoptosis of BEL-7402 cell line enhanced by extremely low frequency electromagnetic field in vitro. *Bioelectromagnetics*. 2009 30(2):163-5.
11. Bernard N, Alberdi AJ, Tanguy ML, Brugere H, Helissey P, Hubert C, Gendrey N, Guillosson JJ, Nafziger J. Assessing the



potential leukemogenic effects of 50 Hz magnetic fields and their harmonics using an animal leukemia model. J Radiat Res (Tokyo). 2008 Nov;49(6):565-77. Epub 2008 Oct 4.

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 平成21年1月6日班会議で発表

H. 知的財産権 なし

## 辺縁系神経回路オシレーションを指標とした中枢神経活動への磁場の影響

研究分担者

村越 隆之

東京大学大学院准教授

### 研究要旨

電磁界の哺乳動物中枢神経系、殊に情動・認知機能にとって重要な役割を担う大脳辺縁系機能に対する影響をシナプスレベルで検討した研究は見られない。そこでラット生体を低周波交流磁界に暴露させ、これらの動物から作成した帯状回を含む脳スライス標本を用いて、帯状回皮質内興奮性シナプス伝達機能を電気生理学的に評価した。

低周波交流磁界では、一日2時間ないし4時間を3日間暴露した動物において、グルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプス伝達が低下する傾向が見られた。PPR (Paired-pulse ratio)が増大する傾向も見られたことから、この現象はシナプス前終末からの伝達物質放出低下の可能性を示唆するものかもしれない。

今後、さらに例数を増やして有意差が得られるかどうかを検討し、さらに扁桃体神経回路における律動的同期抑制現象に対する影響を検討することを計画している。

### A. 研究目的

大脳辺縁系を構成する脳部位である帯状回皮質および扁桃体は、前頭葉前頭前野、海馬との連絡が密であり、様々な情動・認知活動において非常に重要な調節を行う部位である。また、これらの部位の脳機能異常は様々な精神疾患や情動障害の病態に関わるとされ、うつ病、PTSD（精神外傷後ストレス症候群）、ADHD（注意欠陥多動障害）、不安障害、などに際し変化が報告されることから、それらの予防、治療にとっても重要な対象となりうる（Yucel et al., 2008; Schlösser et al., 2008, Hamner et al., 1999; Woodward et al., 2006, Bush et al., 2005; Pliszka, 2007）。

これらの脳部位では、成長期を含め成熟後も様々な身体的、心理的ストレスに対し、解

剖学的小および物質的基盤での脆弱性を示すことが知られている。実験的にも周産期の薬物や放射線暴露、乳幼児期の栄養異常、母子分離などがこれらの神経回路の機能異常を引き起こすことが報告され、現在精力的にその分子的メカニズムが解明されつつある。脳組織に対する身体的ストレスのなかで、遠隔的に作用する物理的因子として電磁場の影響が考えられる。なぜならば、脳機能はその構成要素としてのニューロンの細胞膜上に存在する膜たんぱく質であるイオンチャネルの活性化・不活性化過程の総和であると換言することが可能であり、そのチャネルの作動原理は電場の与えるクーロン力に由来すると言えるからである。しかしながら、これまで中枢神経系に対する電磁場作用は必ず

しも体系的に研究されたとは言えず、殊に情報・認知活動の基盤である辺縁系神経回路のシナプス機能に焦点を絞った解析は例を見ない。

現代社会において、身体に直接間接に作用する電磁場変動が増している。一方、様々な年代層の人々において重大な犯罪を含む「異常行動」が頻発している。これらの間に何らかの関連があり得るのかを、脳神経生物学の面から早い時期に検証しておくことは非常に重要であると考えられる。

そこで、本研究では、ラットおよびマウスの脳組織よりスライス標本を作製し、帯状回、扁桃体神経回路のニューロンからシナプス活動を記録することで、電磁場暴露群と対照群との間における電気生理学的差異を見出すことを目的とした。

我々はこれまでに、慢性拘束ストレスマウスからの帯状回スライスにおいて、皮質内神経伝達機能が変化すること、これには抑制性神経伝達物質である GABA (ガンマアミノ酪酸) 機能の変化が関与していることを見出している。また扁桃体においては自発的な抑制性の神経回路オシレーションを見出しており、これがドーパミンによる調節を受けることを解析中である。これらは、*in vitro* 標本を用いることで、完全に実験条件をコントロール可能とし、非常に鋭敏な時間的空間的分解能を備えた解析法である。従って電磁場のように微弱な影響が、莫大な要素数から構成される脳組織に与える複合的統合的な高次機能変化を見出す上で、最適な実験系であると考えられる。

## B. 研究方法

### ・磁界暴露条件

生後 10 日齢 Wistar 系ラットを母獣による哺育状態で購入し、1 日間動物飼育施設にお

いて馴化する。11-13 日齢の期間に以下に述べる条件で電磁場 (50Hz, 80mT) に暴露した。また、対照群としては、同時間、同じ暴露槽に置いた動物を用いた。

### ・スライス標本作成

磁界暴露または非暴露後の生後 14 日齢で電気生理実験に供した。吸入麻酔薬であるエンフルレンによる深麻酔下で断頭し、前脳部より冠状断にて帯状回を含む厚さ 350-400  $\mu\text{m}$  の脳スライスを複数枚作成した。損傷からの回復のため 1-2 時間待った後に、顕微鏡ステージ上の実験槽に配置した。標本を 32.5 度 C の人口脳脊髄液 (ACSF) で毎分 2.0ml の速度で灌流した。ACSF の組成は以下のとおりである (mM)。120 NaCl, 3 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 glucose。また ACSF は 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> により飽和され、pH は 7.2 に維持された。

### ・電気生理学実験

帯状回皮質浅層 (第 II-III 層) より細胞外電場電位記録を行った。タングステン線双極刺激電極を同じ皮質カラムの深層 (皮質第 V-VI 層) に置き、200  $\mu\text{s}$  の矩形波電流 (50, 100, 150  $\mu\text{A}$ ) を 15 秒に 1 回の頻度で与えた。記録電極はガラス微小電極に 0.5M の NaCl 溶液を満たした。

上の条件で記録されるフィールド興奮性シナプス後電位 (fEPSP) 波形より、刺激アーティファクト後の 2 つ目の陰性波の初期最大スロープを fEPSP の大きさとした。

通常、刺激は 50, 100, 500ms 間隔で 2 回連続して与え、これに対する 2 つの fEPSP の大きさの比 (fEPSP2/fEPSP1) を PPR (Paired-pulse ratio) として記載した。

### ・実験ガイドライン

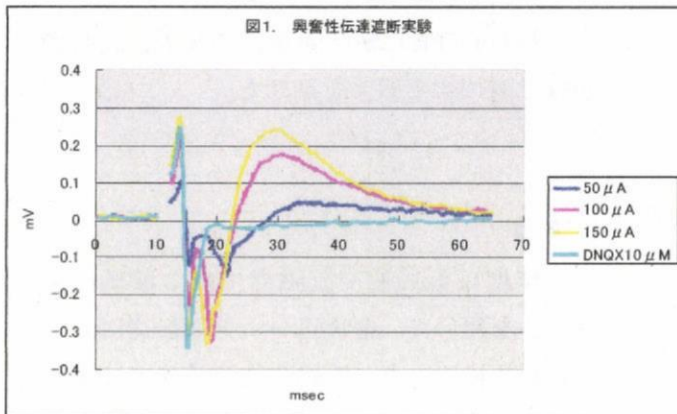
すべての実験は東京大学動物実験指針に基

づき、認可を得たものである。

### C. 結果

#### 1) 入出力関係と PPR (Paired-pulse ratio)

まず始めに、fEPSP 波形の妥当性を検討するため、興奮性神経伝達物質グルタミン酸の受容体阻害薬である DNQX を灌流適用した際の反応変化を示す。図 1 (水色トレース) のように、2 つめの陰性波形が消失しているこ



とから、この部分がシナプス伝達を示していることが確認された。

図 1 には刺激強度を漸次大きくした際の fEPSP 増強も示されている。後節ではこの刺激強度に対する fEPSP サイズ変化をプロットすることで入出力関係を示す。

次に、連続 2 刺激に対する反応性の変化を見た。図 2 にあるように、帯状回では多くの場合、短い時間間隔の後に応答するシナプス伝達は 1 発目よりも 2 発目の方が小さくなる傾向がある (すなわち、PPR が 1 よりも小で

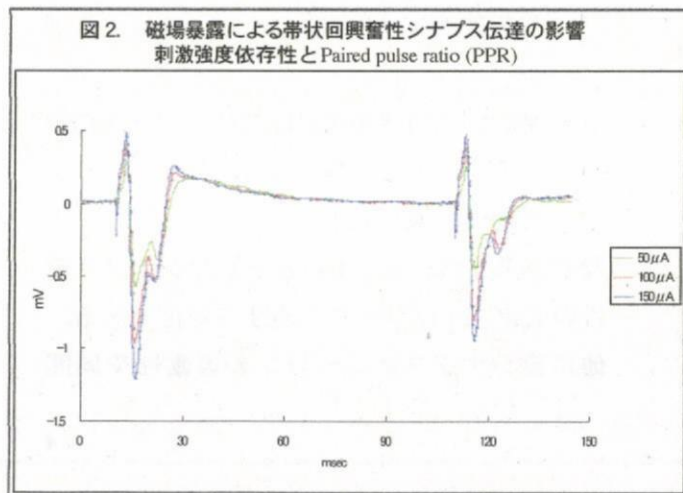


図 2. 磁場暴露による帯状回興奮性シナプス伝達の影響  
刺激強度依存性と Paired pulse ratio (PPR)

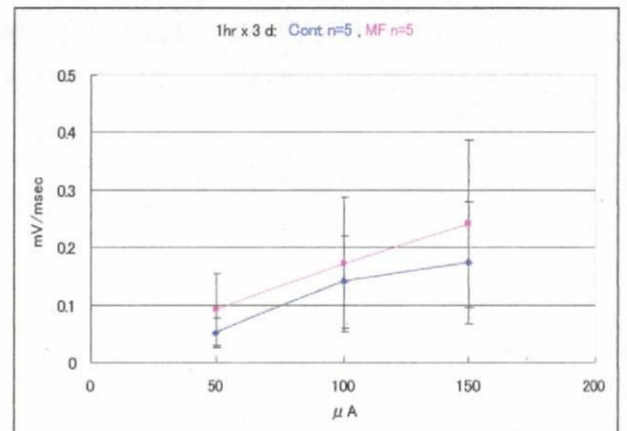
ある)。

#### 2) 低周波交流磁界暴露の効果

低周波磁界 (80mT, 50Hz) を、1 日 1, 2, 4 時間ずつ 3 日間与えた動物からの標本と、同じ拘束条件で磁場なしの対照群動物の標本記録との対応を見た。

まず刺激強度の漸増に対する、興奮性シナプス反応変化の関係を調べた。図 3 から図 5 に入出力関係を示す。

図 3 : 1 時間、3 日



図中青いマークは対照群、赤いマークは磁界暴露群である。また、エラーバーは SEM (標準誤差) を示す (以下同様)。

図 4 : 2 時間、3 日

