

Effects of extremely low Frequency Magnetic Fields and eddy current on Potency of Anticancer Drugs Bleomycin

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/30092

ブレオマイシンの細胞毒性作用における交流磁界効果とうず電流の影響評価

藤畑貴史, 柿川真紀子, 山田外史
環日本海域環境研究センター 生体機能計測研究部門

T. Fujihata, M. Kakikawa, S. Yamada

Effects of extremely low Frequency Magnetic Fields and eddy current on Potency of Anticancer Drugs Bleomycin

1. はじめに

放射線や変異原性試薬などと磁界とを併用をすることにより、生体への作用の変化を生じさせるという報告がある^[1,2]。例えば、肺癌マウスにおいて抗がん剤シスプラチン投与後、磁界に曝露するとシスプラチンのみに比べ延命効果がみられたと報告されている。また、これまでに著者らはバクテリオファージを用いた実験系により、抗がん剤マイトマイシン C と 45 mT, 60 Hz の ELF 磁界曝露を併用することにより、DNA 損傷が 2 倍ほど高まることを見出した^[3]。また、大腸菌を実験対象とした場合、抗がん剤マイトマイシン C およびシスプラチンにおいて交流磁界曝露を併用することにより抗がん剤の作用が上昇し、この時作用増強率は曝露した交流磁界の磁束密度に依存的であった^[4]。一方、濃度などの依存性は不明であり、加えて、なぜ交流磁界を曝露することによって抗がん剤の作用が上昇するのかというメカニズムについても解明されていない。

そこで、本研究では、ブレオマイシンの作用増強率を求め、濃度依存性の検討を行う。また、メカニズムの解明のため、交流磁界によって誘導されるうず電流の影響について検討を行った。

2. 抗がん剤作用における交流磁界曝露の影響評価方法

2.1. 交流磁界発生装置

(1) 交流磁界発生装置

本研究で使用した 60 Hz 交流磁界発生装置を図 1 に示す。磁界発生装置では、U字型鉄心を用いその鉄心の頭頂部に立方形のギャップを設け、アクリルケースを設置し実験領域とした。実験領域内の磁束密度分布を計測した結果、最大で 54.5 mT, 最小で 45.0 mT であり、ばらつきが 10%以内であった。また、アクリルケース内部には鉄心およびコイルによって発生する熱の影響を避けるため、恒温装置で一定温度の水を循環させ、実験領域内の水温を 36 °C の一定にした。

(2) うず電流影響評価用交流磁界発生装置

本研究で、うず電流の影響評価において使用した 60 Hz 交流磁界発生装置の図を図 2 に示す。図 2 において、励磁コイルは、コイルの銅線の直径 1.66 mm(銅の直径 1.6 mm)、巻数 252 ターンのものを上下のフェライトコアに設置してある。また、コイルの発熱に対して、冷却剤として本装置においてはフロリナートを使用し、恒温装置によって、アクリルケース内を循環させることにより、実験領域内の室温を 36°C にし、コイルの発熱を冷却させた。

2.2 うず電流検出用シャーレの作製

空間的に一様な交流磁界下ではうず電流密度の大きさは、径に比例する。このことは Maxcell の方程式から導き出すことができる。

$$J = -\sigma \pi r f B \quad (2.1)$$

ここで、 J はうず電流密度、 σ は導電率、 r は径、 f は交流磁界の周波数、 B は磁束密度である。

このことを利用し、本研究において図 3 のようなシャーレを作製した。このシャーレにおいて、3 つの溝がある。図 3 において、それぞれの溝を Inner ring, Middle ring, Outer ring とする。交流磁界条件は磁束密度を 50 mT, 周波数を 60 Hz で行った。導電率は、大腸菌を培養するための溶液である LB 溶液には 1% の NaCl を含んでおりその影響が主にあると考えられる。1% の NaCl の導電率は 1.6 S/m であることが分かっている。以上の条件を式(2.1)に代入し、各 ring のうず電流密度の平均および Inner ring と Middle ring および Outer ring の比率を表 2.1 に示す。表 2.1 より、Inner ring と Outer ring において、うず電流密度の差が最大 15 倍まで生み出すことが分かった。

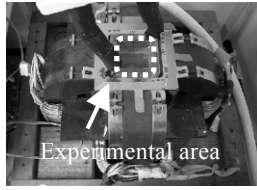


図1 60 Hz 交流磁界発生装置

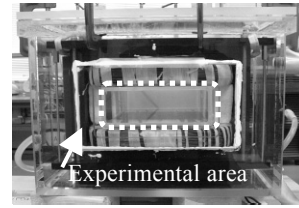


図2 うず電流影響評価用 60 Hz 交流磁界発生装置

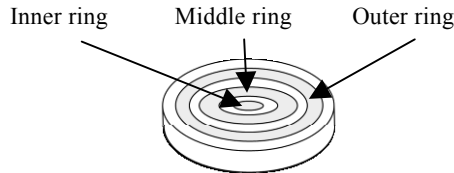


図3 うず電流影響評価用シャーレ

表 2.1 各 ring における電流密度平均

	Average of current density[A/m ²]	Ratio to inner ring
Inner ring	3.77×10^{-2}	1.0
Middle ring	27.1×10^{-2}	7.2
Outer ring	57.3×10^{-2}	15

2.3 抗がん剤

抗がん剤ブレオマイシンはがん細胞内の鉄イオン (Fe⁺⁺) と結合して細胞内の DNA を切断することによって DNA の複製を阻害する。これによりがん細胞の増殖を止めることができ、抗がん作用が得られる^[6]。一方、うず電流影響評価用の抗がん剤には、すでに磁界により作用増強が明らかなシスプラチンを使用した。シスプラチンはプラチナ化合物であり、プラチナ化合物はがん治療において広く使われている。その中でもシスプラチンは最も広く使われている抗がん剤の一種である。シスプラチンはがん細胞の DNA 鎖に架橋結合することにより DNA の複製・転写を阻害する。これによりがん細胞の増殖を止めることができ、抗がん作用を得られる^[7]。

2.4 大腸菌 (*Escherichia coli*)

本研究の実験対象として、大腸菌を使用した。大腸菌は増殖サイクルが早く、ヒトがん細胞と同様に抗がん剤ブレオマイシンおよびシスプラチンの作用を受けるからである。

本研究では、W3110 と JE5595 という 2 つの大腸菌を使用した。W3110 は大腸菌の中で野生株である。これに対して、JE5595 は DNA 修復遺伝子の 1 つである recA を人工的に欠損させたものであり、DNA 損傷に対して、感受性の高い株である。

2.5 抗がん剤の細胞毒性作用における交流磁界の影響評価方法

抗がん剤の作用における交流磁界曝露の影響を評価する場合、大腸菌の数を評価指数として、抗がん剤と交流磁界曝露を併用した場合 (Exposure) と抗がん剤のみで交流磁界曝露を併用しない場合 (Control) とを比較することにより交流磁界曝露の影響を評価することができる。大腸菌の数を比較するためには大腸菌の数を定量化する必要があるが、本研究ではそのための方法としてコロニーアッセイ法を用いた。抗がん剤を投与したあと、コロニーアッセイ法で定量化した、大腸菌の生菌数を比較することにより、交流磁界曝露の併用が抗がん効果を評価した。

3. 抗がん剤の細胞毒性作用における交流磁界の影響評価測定結果

3.1 抗がん剤ブレオマイシンの交流磁界の影響測定結果

ブレオマイシンの濃度は 3, 6, 12 μg/ml で行った。磁界条件は、磁束密度 50 mT, 周波数 60 Hz とし、曝露時間は 1 時間で行った。その際、0.5 時間ごとに非磁界曝露 (Control) と磁界曝露 (Exposure) の生菌数を 2.5 節で述べたコロニーアッセイ法で定量化し測定を行った。各濃度における大腸菌の生菌数の時間変化を図 4 に示した。なお測定結果の生菌数は 6 回の実験の平均値である。グラフの横軸は磁界曝露時間(Control は培養時間)、縦軸を培養液 1 ml あたりの大腸菌の生菌数としている。

0.5 時間目における各濃度における Control の生菌数に対する、Exposure の生菌数の存在比 (Exposure の生菌数/Control の生菌数)をそれぞれ計算し、ブレオマイシンの濃度 3 μg/ml では 0.89 倍、6 μg/ml では 0.79 倍、12 μg/ml では 0.61 倍となった。ここで、統計学的に有意な差があるのかを T 検

定により検討した結果、ブレオマイシンの濃度が 6, 12 $\mu\text{g/ml}$ において有意な差 ($p < 0.05$) が認められた。この結果をもとに、作用増強率を求めた結果を図 5 に示す。図 5 が示すように交流磁界により抗がん剤の効果が 1.2 倍上昇した。また、作用増強率のブレオマイシンの濃度の依存は認められなかった。

3.2 うず電流の影響測定結果

シスプラチンの濃度は 2.5 $\mu\text{g/ml}$ で行った。交流磁界条件は磁束密度 50 mT, 周波数 60 Hz とし、曝露時間は 6 時間で行った。その際、3 時間ごとに非磁界曝露 (Control) と磁界曝露 (Exposure) の生菌数の測定を行った。各時間における Control の生菌数に対する, Exposure の生菌数の存在比 (Exposure の生菌数/Control の生菌数)をそれぞれ計算し、図 6 に示す。グラフの横軸は時間、縦軸は生菌数の存在比としている。6 時間目における生菌数の存在比は各 ring とも 1 より小さくなっており、交流磁界の影響によりシスプラチンの作用が増強した。

この増強が交流磁界によって誘導されるうず電流の影響であるかについて評価した結果について述べる。評価方法は、2つの ring の各時間の生菌数の存在比(どちらか一方の ring の生菌数を 1 とした時のもう一方の比率)を求め、Control と Exposure のその存在比を比較することによりうず電流の影響を評価した。

6 時間目における Inner ring の生菌数を 1 としたときの Middle ring, Outer ring の生菌数の存在比および Middle ring の生菌数を 1 としたときの Outer ring の生菌数の存在比を図 7 に示す。グラフの横軸は時間、縦軸は生菌数の存在比としている。Inner ring との比較において、Middle ring と Outer ring において磁界を曝露することによって、生菌数が減少した。このことから、交流磁界曝露によるシスプラチンの細胞毒性作用の増強がうず電流によるという傾向が見られた。

4. 結論

抗がん剤ブレオマイシンにおいても交流磁界の影響で細胞毒性作用が 1.2 倍上昇した。この作用における抗がん剤の濃度の依存性は見られず、過去の結果を踏まえると、抗がん剤の作用における交流磁界に影響に抗がん剤の濃度の依存性がないことが示唆できる。濃度依存がないということは、将来臨床応用する際、患者によつての投与量の違いに関係なく治療することができるかもしれない。

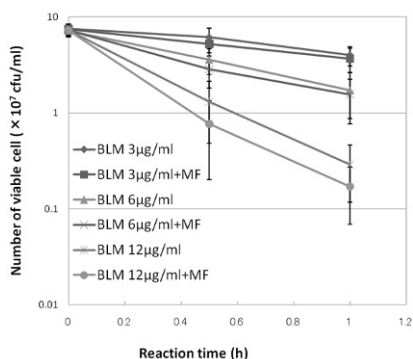


図 4 交流磁界曝露でのブレオマイシンの各濃度における生菌数の時間変化

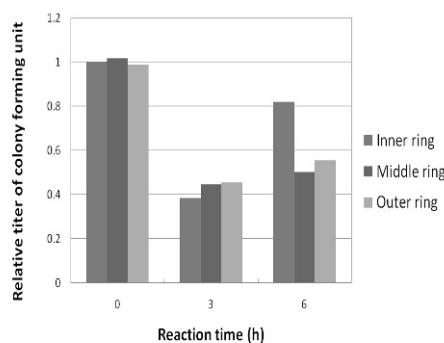


図 6 各 ring におけるコロニー存在比の時間変化

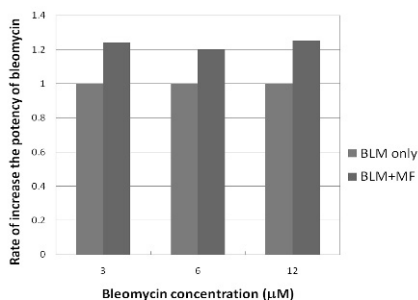


図 5 交流磁界によるブレオマイシンの作用増強率

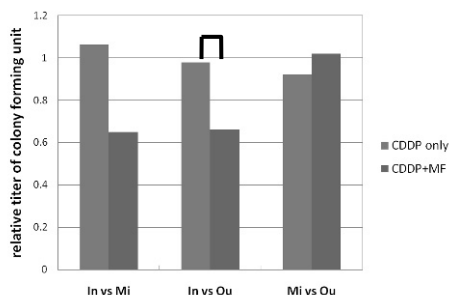


図 7 生菌数の各 ring での比較結果

※ BLM : Bleomycin
MF : Magnetic fields

※ CDDP : Cisplatin MF : Magnetic fields
In : Inner ring Mi : Middle ring
Ou : Outer ring

シスプラチンの細胞毒性作用における交流磁界効果におけるうず電流の影響について検討を行った。この結果、交流磁界による抗がん剤の作用の上昇はうず電流の影響があると考えられる。また、この結果より交流磁界による抗がん剤の作用の上昇においては、ある一定以上のうず電流が誘導される必要あると考えられた。

今後は、他の抗がん剤でも検討を行い、交流磁界の影響がどの抗がん剤でも影響があるかなどの検討を行う必要がある。また、交流磁界による何がどこに影響を与えているのか、メカニズムの解明を進める必要がある。今回は、より効果的な抗がん剤やメカニズムの解明を目的としたため、培養サイクルが早い大腸菌を使用した。今後は大腸菌で得られたデータをもとに、ヒト培養細胞での検討を行う。

文 献

- [1] Juutilainen J. et al., Do extremely low frequency magnetic fields enhance the effects of environmental carcinogens? A meta-analysis of experimental studies, *Int. J. Radiat. Biol.*, 82, 1-12 (2006).
- [2] Tofani S. et al, Static and ELF magnetic fields enhance the in vivo anti-tumor efficacy of cis-platin against lewis lung carcinoma, but not of cyclophosphamide against B16 melanotic melanoma, *Pharmacol. Res.* 48, 83-90 (2003).
- [3] Kakikawa M. et al., 磁界による細菌細胞の DNA 損傷及び生理状態への影響, *日本応用磁気学会誌*, 28 (2004) 437-440
- [4] 平井雄一郎：平成 20 年度修士論文，金沢大学
- [5] 藤畑貴史：平成 19 年度卒業論文，金沢大学
- [6] 日本標準商品分類番号 874234 医薬品インタビューフォーム 抗腫瘍性抗生物質 プレオ注射用，日本化薬株式会社，2009 年 10 月改訂
- [7] 日本標準商品分類番号 874291 医薬品インタビューフォーム 抗悪性腫瘍剤 シスプラチン注「マルコ」，マルコ製薬会社，2008 年 1 月改訂