

Influence of Magnetic Fields on Potency of Cisplatin and MitomycinC

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-12-07 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	https://doi.org/10.24517/00049214

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 International License.



日本AEM学会誌

Journal of the Japan Society
of
Applied Electromagnetics and Mechanics

別 刷

Volume 19 Number 2

(平成23年6月)

日本AEM学会

交流磁界曝露による抗がん剤シスプラチンおよび マイトマイシン C の作用増強

Influence of Magnetic Fields on Potency of Cisplatin and MitomycinC

西頭浩司 (学生員), 柿川真紀子 (正員), 山田外史 (正員)

K.Sait (Stu. Mem.), M.Kakikawa (Men), S.Yamada(Men),

Anticancer drug treatments are accompanied with intense side effects. Because anticancer drug spreads in the whole body acts on not only the cancer cells but also normal cells. Therefore, if it is possible that magnetic fields enhance the potency of anticancer drugs on target region only, the dosage can be reduced and thus side effects can be suppressed. There are some reports that the potency of MitomycinC or Cisplatin with magnetic fields (50 mT, 60 Hz) were found to be higher than that of each agent only. This study focused on the effect of frequencies (6, 30, 60 Hz) of the magnetic fields on enhancement of anticancer drug potency in same flux density (50 mT). These result suggested that higher frequency magnetic fields caused greater enhancement of the potency of MitomycinC and Cisplatin.

Keywords: anticancer drug, MitomycinC, Cisplatin, magnetic fields, frequency

1 諸言

がんは 1981 年から日本人の死亡原因の 1 位であり、現在では死因の約 3 割を占めている。がんの治療法には外科療法、化学療法、放射線療法、免疫療法などがあり、がんの発症している場所、進行状況、患者の状態によって治療法が異なる。化学療法とは抗がん剤を用いてがん細胞の分裂を抑え、がん細胞を破壊する治療法である。しかし、体内に投与された抗がん剤は血流を流れて全身に分布してしまい、がん細胞だけでなく正常細胞の分裂をも阻害してしまう。このため、骨髄抑制、消化器症状、脱毛などの副作用が現れる。また、がん細胞には体内に投与された抗がん剤の数千分の 1 しか届かないため、治療が長引くという欠点がある。効果を得ようと抗がん剤の投与量を増やすと副作用も強くなると考えられている。

抗がん剤の副作用を抑えるためドラッグ・デリバリー・システムや副作用の少ない新薬の開発などの研究がおこなわれている[1]。その中でシスプラチンとマイトマイシン C において交流磁界を曝露した結果、細胞

毒性が増強したとの報告がある[2-4]。この報告を医療応用すると、例えば、がん治療に用いる抗がん剤の投与量を減らし全身の正常細胞への細胞毒性を抑えながら、がんの発症している患部にのみ交流磁界を曝露することで、必要な場所に必要な量の細胞毒性を得ることができる可能性がある。しかし、どの磁界条件が細胞毒性の増強において効果的であるのかは解明されていない。

これまでにシスプラチンとマイトマイシン C において交流磁界の周波数を 60 Hz に統一した場合、磁束密度 5, 30, 50 mT では磁束密度が大きいほど磁界曝露による抗がん剤の細胞毒性が増強されること、交流磁界(磁束密度 50 mT, 周波数 60 Hz)の条件下では、抗がん剤シスプラチンの濃度を変えても磁界曝露による細胞毒性の増強率が一定であることを報告した[2]。

本研究では、交流磁界曝露によるシスプラチンとマイトマイシン C の細胞毒性の増強が磁界周波数に依存性があるのかを評価することを目的としている。そこで磁束密度 50 mT_{rms} で統一し、周波数 6, 30, 60 Hz の磁界条件下でコロニーアッセイ法を用いて抗がん剤の細胞毒性における影響評価を行った。

2 シスプラチンとマイトマイシン C の細胞毒性における交流磁界の影響評価方法

連絡先: 柿川真紀子, 〒920-1192 石川県金沢市角間町, 金沢大学環日本海域環境研究センター

e-mail:kakikawa@magstar.ec.t.kanazawa-u.ac.jp

*1 金沢大学環日本海域環境研究センター

2.1 抗がん剤シスプラチン

シスプラチン(Table 1)は化学療法で用いられる代表的な抗がん剤の1つであり、白金製剤(プラチナ製剤)に分類され、金属の白金を含んだ薬である[5,6]。細胞のDNA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細胞毒性を持ち、抗がん作用も示す。

2.2 抗がん剤マイトマイシンC

マイトマイシンC(Table 2)は生体内で還元されてDNAへの架橋結合、アルキル化、フリーラジカルによるDNA鎖の切断、DNAの複製を阻害し、細胞の分裂・増殖を抑制する[7,8]。

2.3 大腸菌細胞 JE5595 recA1

大腸菌(*E.coli*)はヒト細胞と同様にシスプラチンとマイトマイシンCの細胞毒性を受ける。大腸菌細胞は直径1 μ m、長さ2 μ mの桿菌である。最適条件下(35~37 $^{\circ}$ C)では20分程で1回細胞分裂するため、ヒト細胞が1日に1回程度の細胞分裂をするのに比べ、実験結果が早く得られるという利点がある。また、親の遺伝子と子の遺伝子が同じであることから集団として取り扱うことができ、統計的処理が容易である[9]。よって本研究ではシスプラチン、マイトマイシンCの作用を受ける実験媒体として大腸菌を用いた。

原核細胞は比較的細胞が単純なため生化学や分子生物学における重要な問題を研究するための理想的なモデル生物である。最も研究されているのが大腸菌細胞であり分子遺伝学の基本的機構の研究で長い間使われてきた。すでにゲノムDNAの全塩基配列が決定されており、DNA複製、遺伝暗号、遺伝子発現あるいはタンパク質合成といった現在の分子生物学の基本的概念のほとんどが大腸菌細胞の研究で得られたものである[10,11]。また、mutant(遺伝子変異体)が多く構築されており、磁界の影響メカニズムを調べる点で有利である。

次に、本研究で扱った大腸菌 JE5595 *recA1* について述べる。この大腸菌は国立遺伝学研究所より分譲されたもので、DNA修復機能の一つである *recA* 遺伝子を人工的に欠損した変異株であり、野生株よりもDNA損傷に対する感受性が高い大腸菌である。よって交流磁界曝露による細胞毒性の変化が顕著に現れやすいと考えられるため用いた。この

大腸菌は野生株 W3110 と比べて、大きさや増殖サイクル、遺伝情報など、機能していない遺伝子以外は同じである。

2.4 交流磁界発生装置

本研究で用いた交流磁界発生装置を Fig.1 に示す。同じ磁界発生装置で磁束密度 50 mT_{rms}、磁界周波数 6, 30, 60 Hz の交流磁界を発生できるように設計した。

電源にはバイポーラ電源 BP4620(定格出力電圧 ± 60 V_{rms}、定格出力電流 ± 20 A_{rms})を使用した。磁束密度と磁界周波数にはファラデーの法則より次式で表される。

$$B = \frac{V_p}{2\pi fNS} \quad (1)$$

ただし、 B : ギャップ部の磁束密度、 V : コイルの端子間電圧、 f : 磁界周波数、 N : コイルの巻数、 S : ギャップ部の断面積である。よって磁束密度 50 mT_{rms} で統一した場合、磁界周波数 60 Hz に対して 6, 30 Hz ではコイルの端子間電圧がそれぞれ 1/10, 1/2 になるため磁束密度 50 mT_{rms}、磁界周波数 60 Hz を出力できる磁界発生装置の作製を行った。

Table 1 Anticancer Drug, Cisplatin

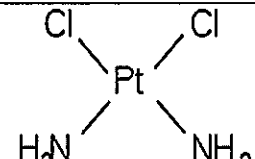
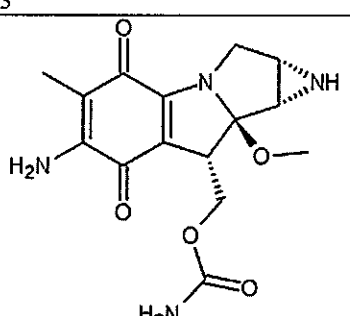
Name	シスプラチン (Cisplatin)
Formula	Cl ₂ H ₆ N ₂ Pt
Molar weight	300.05
Chemical structure	

Table 2 Anticancer Drug, Mitomycin C

Name	マイトマイシンC (Mitomycin C)
Formula	C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₅
Molar weight	334.33
Chemical structure	

鉄心材料にフェライトコアを用いて、両脚にコイルを巻き中央脚にギャップを設けて実験領域とした(Fig. 2). この実験領域にプラスチック製の 1.5 ml サンプルチューブに入れた試料を配置する. コイルは銅線の直径 1.66 mm, 巻数 46 ターンとし, 5 層同心配置にすることでコイル電流を分散した. 磁界周波数 60 Hz における磁束密度と磁界発生装置のコイル電流の総量およびコイル間電圧の特性を Fig.3 に示す. Fig.3 から磁束密度 50 mT_{rms} を出力するためにはコイル間電圧 37.5 V_{rms}, コイル電流の総量 14.6 A_{rms} 必要であり定格内で実現できた. 以上より作製した磁界発生装置は同一回路で磁界周波数 6, 30, 60 Hz において磁束密度 50 mT_{rms} まで出力可能である. また, 実験領域内は磁束密度 50 mT_{rms} ±2% 以内の均一性があり, サンプルチューブ内の試料には均一磁界が加わる.

本研究のような実験を行う際, 毎回同じ実験環境で実験を行う必要がある. しかし, 交流磁界発生装置のコイルからの発熱や外気温の変化により実験領域内の温度が変化し, 実験対象物が温度変化による影響を受ける. 特に大腸菌などを扱う場合, 温度変化に敏感であるため外部からの影響を排除する必要がある. したがって毎回同じ実験環境で装置の連続運転を行うために中央脚のギャップにアクリルの容器を配置し, 容器内を恒温装置の水が循環することによって実験領域内を 36 °C 一定に保った. また, シスプラチンは光によって分解されやすいため, 装置全体を遮光した.

2.5 恒温装置

非磁界曝露領域においても磁界曝露領域と同様に温度を一定にしなければならない. そのため Fig.4 の恒温水槽(TAITEC, THEMO MINDER Jr-100) 内にチューブに入れた試料を配置し水温を磁界曝露領域と同じ 36 °C に調整して実験を行った. その際, 磁界非曝露領域付近の磁界強度は強いところでも 3 μT_{rms} なので磁界非曝露領域の磁界の影響は無視することができる. また, シスプラチンは光によって分解されやすいため, 交流磁界発生装置と同様に装置全体を遮光した.

2.6 コロニーアッセイ法

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.

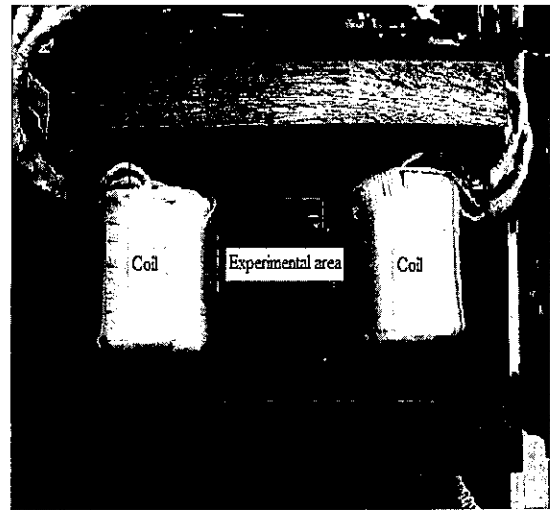


Fig.1 Magnetic-field generator

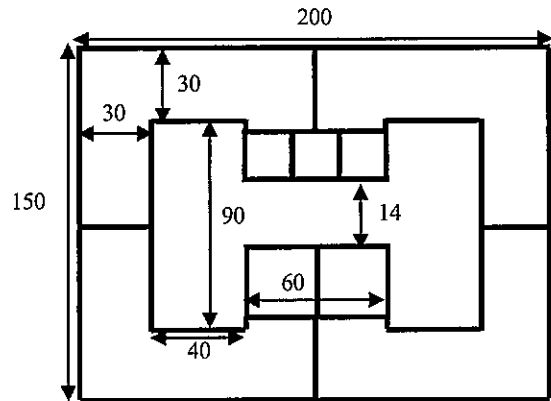


Fig.2 Ferrite core (mm)

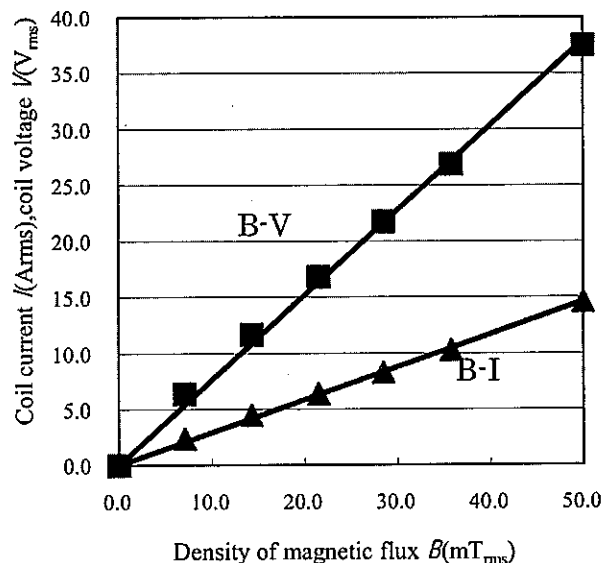


Fig.3 B-V property and B-I property of Magnetic-field generator

大腸菌の増殖サイクルを Fig.5 に示す. 大腸菌には遅滞期(lag phase), 対数増殖期(log phase), 定常期(stationary phase)がある. 遅滞期は殖菌後, 増殖が停止している時期である. 対数増殖期は細胞が最も健康な状態にあり, 細胞数は単位時間ごとに2倍に増殖する時期である. 定常期は栄養素の消耗あるいは有毒代謝物の蓄積によって対数増殖期が終わる時期であり, 大腸菌群の細胞が増殖する一方で, 一部が死ぬため, 数に増減が起こらない. 本研究では最終的にがん細胞に対する検討を考えており, 大腸菌の状態は最も細胞が活発に増殖する対数増殖期が適している. また, 実験には, 各実験での開始の大腸菌の数が一定であることが望ましい. Fig.5 より, まず 36°C で 12 時間 LB(Luria-Bertani)溶液 (組成: Tryptone 10 g/l, Yeast Extract 5 g/l, NaCl 10 g/l, 2N NaOH 0.5 ml/l)に入れた大腸菌を培養することにより, 大腸菌増殖サイクルは定常期になり菌数が一定になる. この定常期にある大腸菌の培養液を新しい LB 溶液に入れる. この時, 大腸菌は休止期になり, 36°C で 2 時間増殖を行わなくなる. この後, Fig.5 に示しているが対数増殖期になり実験に適した大腸菌の状態になるため, これにシスプラチンまたはマイトマイシン C を加え磁界非曝露と磁界曝露に分ける. 一定時間経過後に試料を採取し LB プレート (LB 培地を寒天で固めたプレート, LB 培地 1 l に対して寒天 15 g) にプレーティングしてコロニーアッセイ法により生菌数をカウントする. 大腸菌を LB プレートにプレーティングすると寒天により動くことができず, 生菌はその場で増殖を繰り返してコロニーを形成する (Fig.6). 大腸菌は肉眼で数えることができないが, コロニーを形成することで可能になる. 1 個の大腸菌につき 1 個のコロニーを形成するため, コロニー数が少なければそれだけ大腸菌を死滅させたことになり, 細胞毒性が強いということになる.

シスプラチンの濃度は 2.5 $\mu\text{g/ml}$ を加え, 磁界条件は磁束密度 50 mT_{rms} とし, 磁界周波数 6, 30, 60 Hz の 3 つの条件で行った. 曝露時間 0, 2, 4, 6 時間とし, 各時間において磁界非曝露と磁界曝露の生菌数をコロニーアッセイ法で測定を行った.

マイトマイシン C の濃度は 0.7 $\mu\text{g/ml}$ を加え, シスプラチンと同様に磁界条件は磁束密度 50 mT_{rms} とし, 磁界周波数 6, 30, 60 Hz の 3 つの条件で行った. 曝露時間を 0, 2, 4, 6 時間とし, 各時間において磁界非曝露と磁界曝露の生菌数をコロニーアッセイ法で測定を行った.

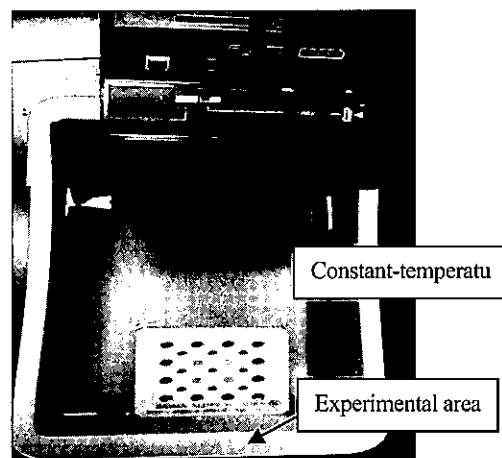


Fig.4 Constant-temperature unit

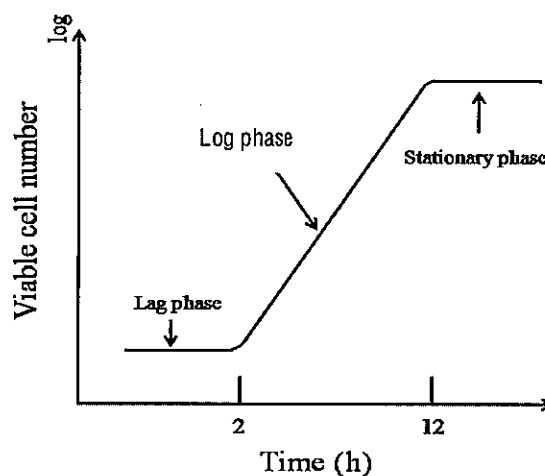


Fig.5 Cell growth cycle of *E.coli*

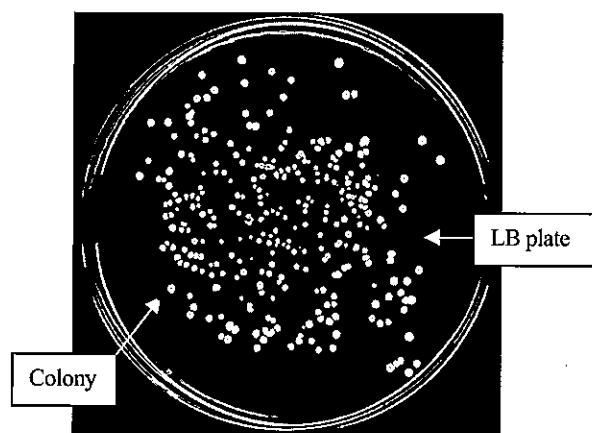


Fig.6 *E.coli* colony on the solid medium

3 シスプラチンとマイトマイシン C の細胞毒性における交流磁界の影響結果

3.1 シスプラチンに対する交流磁界影響評価

抗がん剤シスプラチンに対して磁束密度 50 mT_{rms}, 周波数 60 Hz の交流磁界曝露の磁界影響について述べる。抗がん剤シスプラチンの濃度 0, 2.5 μg/ml において磁界曝露開始から 0, 2, 4, 6 時間後においてコロニーアッセイ法を用いて定量化し実験を行った。

Fig.7 は磁界曝露と磁界非曝露の大腸菌の生菌数を各時間において表している。横軸は磁界曝露時間 (h), 縦軸は培養液 1 ml あたりの大腸菌 (*E. coli*) のコロニー数 (生菌数) である。まず磁界非曝露の抗がん剤シスプラチンが入っていない "Control" 群は溶液内の大腸菌が抗がん剤によって増殖を阻害されないため、溶液内の LB 培地の養分を栄養に時間が経過するとともにコロニー数が増加する。また, "Control" 群と "MF(60 Hz)" 群は各時間においてコロニー数がほぼ等しいことから、生命の維持, 増殖は磁界影響を受けないと考えられる。

次に抗がん剤シスプラチン (濃度 2.5 μg/ml) が入っている "Cisplatin only" 群についてみると, 抗がん剤の細胞毒性によって大腸菌の生菌数が時間とともに減少しているのが分かる。さらに磁界を併用曝露した "Cisplatin+MF(60 Hz)" 群の方が生菌数の減少がみられた。

各磁界周波数においても同様の実験を行った。各磁界周波数における結果を比較するため, Fig.8 に "Cisplatin only" 群のコロニー数を 1 としたときの "Cisplatin+MF" 群のコロニー数を比率で表した。縦軸はコロニー相対比, 横軸は磁界曝露時間を表す。実験回数は磁界周波数 6 Hz を 7 回, 30 Hz を 8 回, 60 Hz を 8 回行い棒グラフは実験結果の平均値を示す。棒グラフ上のエラーバーは実験のばらつきを表す。Fig.8 より, 磁束密度 50 mT_{rms} に統一した場合, 今回実験を行ったすべての磁界周波数条件において交流磁界曝露によってシスプラチンの細胞毒性が増強される結果になった。統計学的に有意な差があるのかを t 検定により評価した結果, 磁界周波数 6 Hz では曝露時間 2 時間 (p=0.0004), 4 時間 (p=0.0059), 6 時間 (p=0.0151), 磁界周波数 30 Hz では曝露時間 2 時間 (p=0.0001), 4 時間 (p=0.0011), 6 時間 (p=0.0037), 磁界周波数 60 Hz では曝露時間 2 時間 (p=0.0046), 4 時間 (p=0.0054), 6 時間 (p=0.0161) となり磁界周波数 6, 30, 60 Hz それぞれにおいて曝露時間

2, 4, 6 時間で有意差が認められた。また, 磁界曝露から 6 時間後において磁界周波数 60 Hz が最も細胞毒性を増強させる傾向にあったが, 各磁界周波数間に対して t 検定による評価を行った結果, 有意差は認められなかった。

3.2 マイトマイシン C に対する交流磁界影響評価

各磁界周波数における結果を比較するため, Fig.9 に "Mitomycin C only" 群のコロニー数を 1 としたときの "Mitomycin C +MF" 群のコロニー数を比率で表した。縦軸はコロニー相対比, 横軸は磁界曝露時間を表す。実験回数は磁界周波数 6 Hz を 11 回, 30 Hz を 8 回, 60 Hz を 8 回行い棒グラフは実験結果の平均値を示す。棒グラフ上のエラーバーは実験のばらつきを表す。

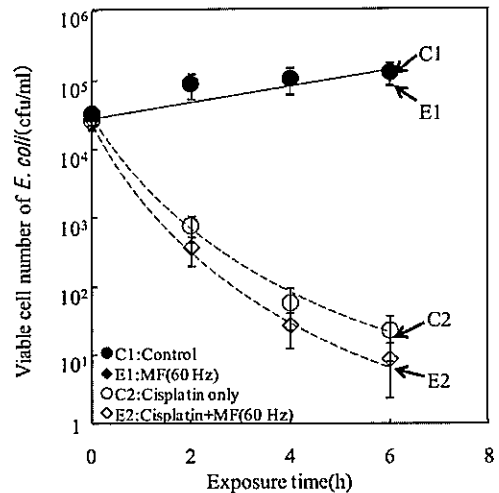


Fig.7 Influence of magnetic field (50 mT_{rms}, 60 Hz) on cytotoxic activity of anticancer drug Cisplatin

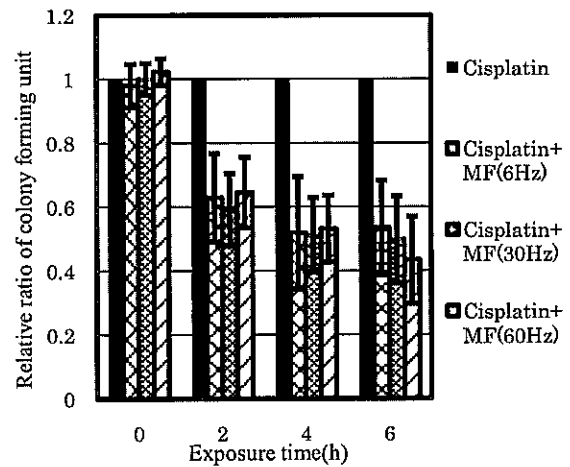


Fig.8 Effect of magnetic fields on the potency of Cisplatin

Fig.9 より, 磁束密度 50 mT_{ms} に統一した場合, 磁界周波数 6 Hz では交流磁界曝露によるマイトマイシン C の細胞毒性の増強がみられず, 磁界周波数 30, 60 Hz では交流磁界曝露によってマイトマイシン C の細胞毒性が増強される結果になった. 統計学的に有意な差があるのかを t 検定により評価した結果, 磁界周波数 30 Hz では曝露時間 4 時間(p=0.0164), 6 時間(p=0.0041), 磁界周波数 60 Hz では曝露時間 2 時間(p=0.0308), 4 時間(p=0.0154)となり磁界周波数 30 Hz では曝露時間 4, 6 時間, 60 Hz では曝露時間 2, 4 時間において有意差が認められた. また, 磁界周波数が高いほど細胞毒性を増強させる傾向にあった. 各磁界周波数間に対して T 検定による評価を行った結果, 磁界周波数 6Hz と 30 Hz では曝露時間 4 時間(p=0.0351), 6 時間(p=0.0181), 磁界周波数 6 Hz と 60 Hz では曝露時間 4 時間(p=0.0256), 6 時間(p=0.0089)となり磁界周波数 6 Hz と 30 Hz, 6 Hz と 60 Hz に対して磁界曝露時間 4 時間後と 6 時間後で有意差が認められた.

4 結言

今回, シスプラチンの作用における磁界周波数による効果の大きな違いは得られなかったが, マイトマイシン C において磁界周波数が高いほど細胞毒性が高まる傾向にあった. これは磁界周波数が高いほど抗がん剤に加わるローレンツ力の作用方向が変化することや, 交流磁界によって生じたわず電流などから生じるイオンの流れによって大腸菌細胞との接触回数が増加したのではないかと考えられる. また, 交流磁界により大腸菌細胞の細胞膜が変形し抗がん剤の取り込み量の増加が関与している可能性がある. 同じ磁界条件でも抗がん剤によって影響の現れ方が異なることから細胞毒性におけるプロセスや分子量などが影響している可能性がある.

しかし, 磁界周波数 6~60Hz の範囲でしか検討していないため磁界周波数 600, 6 kHz などで検討を行う必要がある. また, より低い周波数や静磁界においても検討することにより, 磁界曝露による細胞毒性の増強に対するメカニズム解明に取り組んでいく.

臨床応用に向けて今回用いた大腸菌細胞よりもヒトに近いヒトの培養細胞での検討も行い, 同様の傾向が得られるのか検討する予定である.

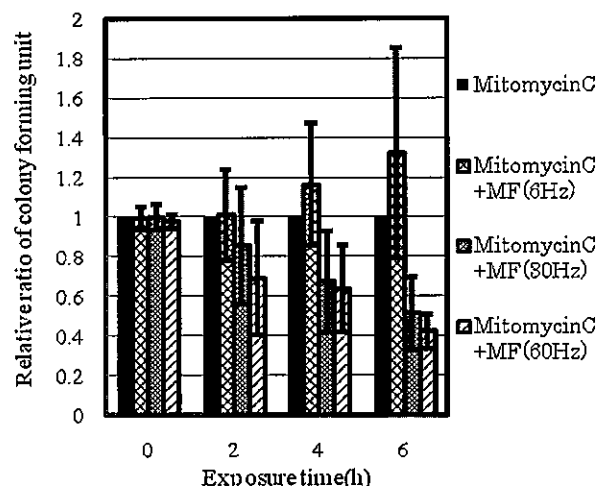


Fig.9 Effect of magnetic fields on the potency of Mitomycin C

謝辞

本研究は科学研究費補助金 若手研究(B) 課題番号 22700508 の助成のもと実施されたものであり, この場を借りて感謝致します.

(2010年9月24日受付, 2011年2月25日再受付)

参考文献

- [1] 瀨崎仁, ドラッグデリバリーシステム, 南江堂, 1986.
- [2] Hirai, Y, *et al.*, Influence of ELF Magnetic Fields on Anticancer Drug Cisplatin Potency, 日本 AEM 学会誌, Vol.17, No.3, pp.489-492, 2009.
- [3] Hannan Jr, *et al.*, Chemotherapy of human carcinoma xenografts during pulsed magnetic field exposure, *Anticancer Research*, 14, pp.1521-1524, 1994.
- [4] Omote, Y, *et al.*, Treatment of experimental tumors with a combination of a pulsing magnetic field and an antitumor drug, *Japanese Journal of Cancer Research*, 81, pp.956-961, 1990.
- [5] Zijian Guo, Peter J. Sadler, *Metals in Medicine*.
- [6] 日本標準商品分類番号 874291 取扱説明書, ヤクルト本社
- [7] 梅田, 常用医薬品の副作用, 南江堂, 491, 5, U49, 1996.
- [8] 日本標準商品分類番号 874231 取扱説明書 マイトマイシン C, 協和発酵工業株式会社
- [9] 田中, 基礎分子生物学, 東京化学同人, 1997.
- [10] 中村, *Essential 細胞生物学*, 南江堂, 1999.
- [11] 須藤, 堅田, 榎森, 足立, 富重, *クーパー細胞生物学*, 東京化学同人, 2008.

