

# Effect on cell membrane permeability of anticancer drug by exposure to ELF magnetic fields

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-06-11 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	<a href="https://doi.org/10.24517/00049768">https://doi.org/10.24517/00049768</a>

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



# 交流磁界曝露による抗がん剤の細胞膜透過性への影響評価

今井 俊輔\* 山田 外史 柿川 真紀子 (金沢大学)

Effect on cell membrane permeability of anticancer drug by exposure to ELF magnetic fields

Shunsuke Imai\*, Sotoshi Yamada, Makiko kakikawa(Kanazawa University)

Many researchers have been reported about the combination effects of magnetic fields and chemical substances. In previous our research, the potency of anticancer drugs such as Cisplatin, Mitomycin C, Bleomycin, Daunomycin was enhanced by exposure to ELF magnetic fields (60 Hz, 50 mT). We investigated whether the quantity of the anticancer drug which penetrated cell membrane is changed under ELF magnetic fields. The result of two anticancer drugs mitomycin C, cisplatin indicated that the permeability of the cell membrane increased. These results suggest that ELF magnetic fields change the permeability of cell membrane and influence the drug intake.

キーワード：60Hz 交流磁界、抗がん剤、細胞膜透過性、マイトマイシンC、シスプラチン  
(ELF magnetic field, anticancer drug, cell membrane permeability, Mitomycin C, Cisplatin.)

## 1. はじめに

近年、磁界と化学物質等の複合的環境での影響評価がなされている中、マウスによる動物実験において抗がん剤シスプラチンにパルス磁界を併用したところ腫瘍サイズがシスプラチンのみに比べ52%縮小したという報告<sup>1)</sup>がある。また多剤耐性を持つがん細胞をマウスに移植し、パルス磁界を曝露した後、抗がん剤ダウノマイシンを作用させると、がんの腫瘍サイズが抗がん剤のみグループに対して縮小し、がん細胞の増殖を57%抑制した。この時ダウノマイシンについて、細胞の半数を阻害するのに必要な濃度を表す半数阻害濃度(IC<sub>50</sub>)の値もパルス磁界を曝露することで減少したという報告もある<sup>2)</sup>。当研究室では交流磁界によって抗がん剤マイトマイシンC、シスプラチンについてその抗がん効果が磁束密度依存的に増強され、周波数60Hz、磁束密度50mTの曝露条件で最大2倍程度になることがわかった。また、同様の曝露条件で他の抗がん剤ブレオマイシン、ダウノマイシンの作用についても増強されることがわかった。このことから抗がん剤の投薬量を減らして副作用を軽減し、がん患者では磁界を曝露することにより薬剤の効能を高めるといった効果的な化学療法が実現できる可能性がある。

一方で、その磁界による抗がん剤の作用増強効果に対するメカニズムについては不明である。今のところ検討した前述4種類の抗がん剤は作用機構、分子量に関わらずすべての抗がん剤について増強効果が得られていることから、磁界は抗がん剤というよりは細胞に対して、なんらかの変化を及ぼしているのではないかと考えている。実際に磁界によってヒト細胞であるHeLa細胞の細胞膜表面の膜タンパクの構造が変化したという報告<sup>3)</sup>や細胞膜の導電率や誘電率が変化したという報告が<sup>4)</sup>ある。このことから磁界曝露に

よって細胞膜上の膜タンパクの構造が変化し、抗がん剤の細胞膜透過性が増加するのではないかと考えた。そこで今回はメカニズム解明に近づけるべく、磁界曝露による抗がん剤の膜透過性の変化を調べる実験を行った。

## 2. 交流磁界曝露による抗がん剤の細胞膜透過性に対する評価方法

### (2・1) 60 Hz 交流磁界発生装置

交流磁界発生装置は研究で使用した60 Hz 交流磁界発生装置の上から見た図を図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ヤップを設け実験領域とした。コイルに交流電圧をかけて、実験領域内に交流磁界を最大60 mT程度まで出力可能である。本実験では過去の研究で最も効果が得られた50 mTに設定し実験を行った。図2のように実験領域には水を張ったアクリルケースが設置しており、そこに試料を挿入して実験を行う。図2は実験領域を上から見た図と真横から見た図を示している。アクリルケースの内側には一定温度の水がクーリングダンプによって循環されており、実験領域内の温度を一定に保っている。一方、非曝露群に関しても恒温装置が設置されており、曝露群と同じ温度に設定し、温度が一定に保たれている。非曝露群の磁界は強いところでも3 μTでありその影響は無視できる。

### (2・2) 実験対象としての大腸菌 (*Escherichia coli*)

本実験では動物実験、臨床応用を目指す上での最初のステップの基礎実験である。したがって抗がん剤の細胞増殖阻害作用を受け、扱いやすく結果が早く得られるものが適している。DNAを有し、単細胞であるバクテリアはヒト細胞における抗がん剤の殺細胞効果との間に相関が認められている。野生株(W3310)の大腸菌(*Escherichia coli*)は生

物実験を行う上で一般的なものである。大腸菌は $1.2\ \mu\text{m}$ の大きさの細菌で簡単に培養でき、最適条件下では20分程で1度細胞分裂し、1個の細胞を一晚で10億個まで増殖させることができる<sup>9)</sup>。また、すでに全ゲノム配列も決定されており生命活動が最もよく解明されている<sup>10)</sup>。そのため変異株等も多く、本研究のようにメカニズムの解明を目標とする研究においては、統計的処理や定量的処理が容易であることも加えて、最適であると言える。

上記のような理由により、大腸菌の生菌数の増減を測定することが抗がん剤による細胞増殖の阻害作用という生命現象を観察する上での単純化された例（モデル系）とし、本実験に適用している。

### 〈2・3〉抗がん剤の選択について

本実験で用いる抗がん剤はすべてDNAに作用し、細胞増殖を阻害することにより抗がん効果を得るタイプのものである。その中でも抗がん剤によって磁界曝露による作用の増強率が違うことが分かっている。今回の実験では過去に磁界により作用の増強が認められ、増強率が高かったマイトマイシン C(MMC)とシスプラチン(CDDP)の2種類を選択した。濃度の設定に関しては、過去の研究も参考にし、実験2時間後、十分に反応していない抗がん剤が残るような濃度に設定した。

### 〈2・4〉抗がん剤と細胞膜

大腸菌のような原核生物は細胞内と細胞外を隔てる、細胞膜がある。膜は脂質二重膜という二重の層に覆われており、膜タンパクが埋め込まれている。そして細胞内の細胞質にDNAが核様体として存在している。本実験で用いている抗がん剤はこの細胞膜上を透過し、細胞内に侵入しDNAに到達しないと抗がん作用を発揮できない。したがって抗がん剤が細胞外に存在しているにもかかわらず、一部の抗がん剤は細胞の外に残留するということになる。したがって、この細胞の外に残っている抗がん剤の作用の変化を測定すれば、細胞膜と透過して細胞内に入った抗がん剤の量の変化を評価することができる。

### 〈2・5〉磁界曝露による抗がん剤の細胞膜透過性への評価 (1)抗がん剤の作用に対する評価

大腸菌液と抗がん剤が入った試験管から等量取り出し非曝露群と曝露群二つに分ける。これらを0~2時間水槽（非曝露群、曝露群）に入れ各時間毎(0, 2 h)に試料を取り出し、コロニーアッセイ法により生菌数を測定する。生菌数がより減少すれば抗がん剤の作用が高まっていると判定する。

### (2)細胞膜透過性に対する評価

(1)で行った手順から、さらに試料をそれぞれ遠心分離機にかける。すると大腸菌は試料の底に沈殿し、抗がん剤を含む上澄み液と分離される。このことにより、上澄み液のみを取り出すことができる。細胞膜を透過した抗がん剤は大腸菌の菌内に入っており、透過せず残った抗がん剤のみ上澄み液中に残る。この時の上澄み液の抗がん剤の量が減っているればそれだけ多く菌内に抗がん剤が取り込まれている

ことになる。そこで液中の抗がん剤の量（作用）を調べるため、非曝露群と曝露群から取り出した上澄み液をそれぞれ新しい大腸菌液に添加し、どちらも恒温装置（非曝露）に0~2時間入れて、0.2hについて(1)と同様コロニーアッセイ法で生菌数を測定した。

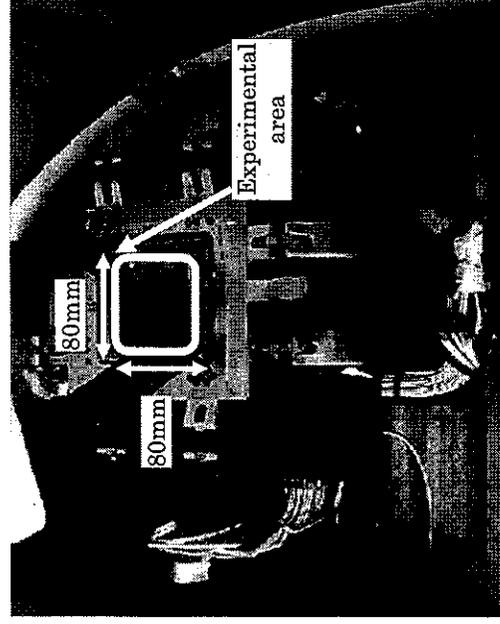


図1 60Hz 交流磁界発生装置  
Fig.1 ELF magnetic fields generator

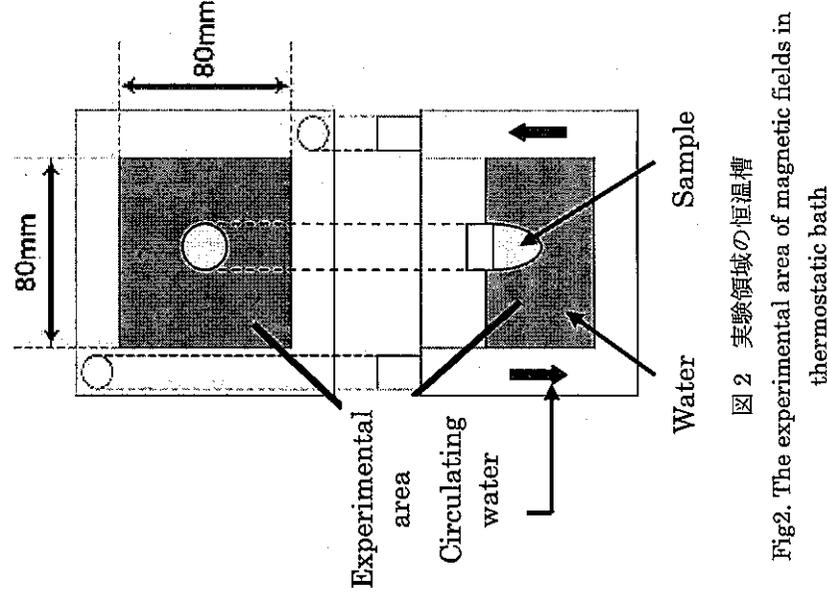


図2 実験領域の恒温槽  
Fig.2. The experimental area of magnetic fields in  
thermostatic bath

### 3. 抗がん剤の細胞膜透過性に対する実験結果および考察

#### (1) 磁界曝露による抗がん剤の作用についての評価

マイトマイシン C(MMC)、シスプラチン(CDDP)について 0,2 時間経過後の生菌数について非曝露群(Drug Only)を 1 として曝露群(Drug + MF)を相対比で表したものをそれぞれ図 3(a),(b)に示す。横軸は経過時間(h)である。どちらのグラフも 0h について相対比はほぼ 1 となっており最初の時点では生菌数が同じであることが確認できた。2h 後であるが相対比がマイトマイシン C は 0.52、シスプラチンは 0.76、と非曝露群に対して曝露群の生菌数が減少していることがわかる。結果に対して有意差検定を行ったところどちらも有意差が認められた( $P < 0.05$ )。このことから磁界曝露により抗がん剤の作用が増加しているということが確認できた。

#### (2) 細胞膜透過性の評価

(1)の結果の時の試料から上澄み液を取り出し新しい大腸菌液に添加し恒温装置で 0~2h 作用させることにより抗がん作用を評価した。結果を図 4(a),(b)に示す。Sup. of Control が非曝露群、Sup. of Exposure が曝露群から取り出した上澄み液を添加したものである。0hの相対比はそれぞれ 0.98、1.03 とほとんど生菌数に差がないことがわかる。一方、2h については相対比がマイトマイシン C、シスプラチンの曝露群の上澄みは 1.7、1.26 と非曝露群に対して曝露群の生菌数が増加していることから抗がん剤の量が減少していることがわかる。こちらも有意差検定により有意差が認められた( $P < 0.05$ )。

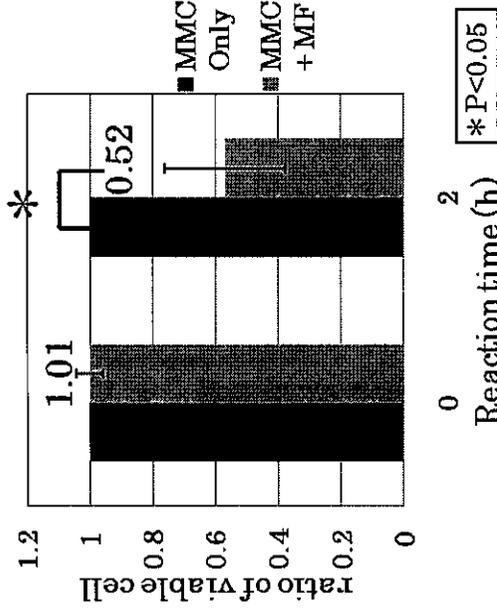
#### (3) 考察

図 3,4 の結果を表 1 にまとめた。これらからマイトマイシン C、シスプラチンどちらも磁界曝露により抗がん剤の作用が増強され、かつその時に反応せず細胞外に残っている抗がん剤が減少しているということがわかった。また表 1 の () 内の数字は相対比の逆数であるが、例えばマイトマイシン C が生菌数の相対比で 0.52 倍つまり 2 倍程度増強されている時、細胞外の抗がん作用は 0.59 倍 (相対比 1.7 倍の逆数) と半分程度になっていることがわかる。このようにマイトマイシン C、シスプラチン共に作用の増強についての相対比と、細胞外の抗がん剤の作用を表す相対比の逆数がほぼ一致していることがわかる。このことは、磁界によって抗がん剤の細胞膜透過性が増加したことで抗がん作用が増強され、細胞内に取り込まれた分、細胞外の抗がん作用が減少したということを示唆している。

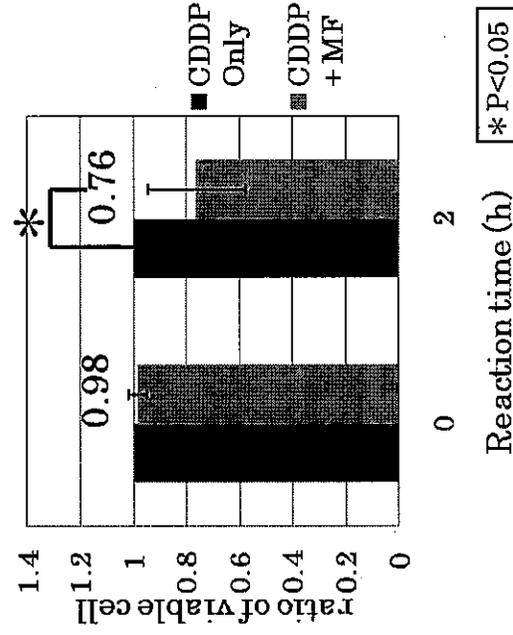
### 4. まとめ

今回は過去の研究から磁界による作用増強効果が大きかったマイトマイシン C、シスプラチンの細胞膜透過性について評価した。その結果、どちらも磁界により作用増強が確認され、さらにその時に細胞外の抗がん剤の量が減少していることが分かり、有意差も得られた。また、作用増

強の度合いと細胞外の作用の減少度合いが相関していた。このことから磁界曝露による抗がん剤の作用増強が、細胞膜透過性の増加により引き起こされるものであることが示唆された。この結果に関連した、磁界によって細胞膜の構造や特性が変わったという報告が多数ある<sup>3)(4)(7)(8)</sup>。磁界曝露によって細胞膜表面にうず電流が誘起され、それが電氣的刺激となって膜タンパクの構造が変化し、抗がん剤が空いた隙間から細胞内へより多く侵入したものと推測している。臨床応用を目指す上で、作用が抑制される抗がん剤があるか、作用増強の度合いが抗がん剤によってどれくらい違うのかなど、不明な点が多い。今後はさらに多くの種類の抗がん剤で磁界曝露による影響の有無をスクリーニングしていく。また次のステップとしてヒト細胞での実験も予定している。



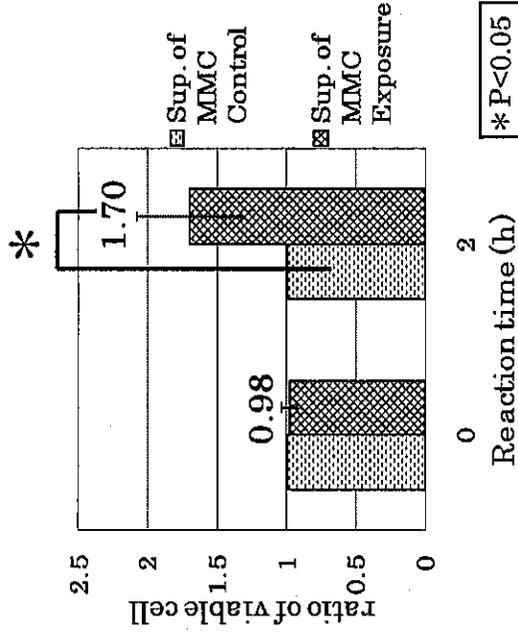
(a) Mitomycin C(MMC)



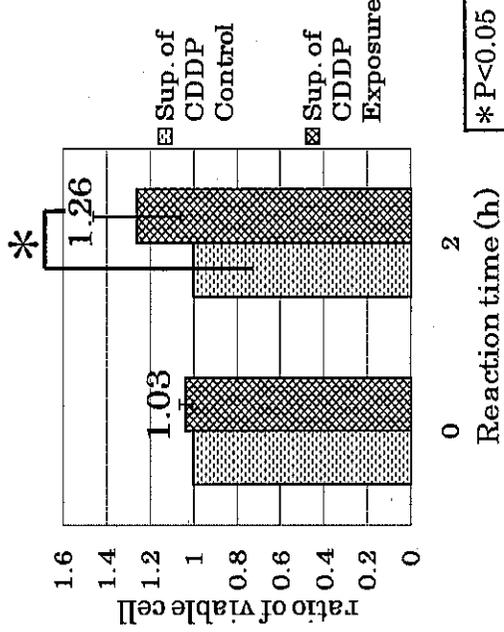
(b) Cisplatin(CDDP)

図 3 交流磁界曝露による抗がん剤作用への影響評価  
Fig.3. Effect of exposure 60 Hz 50 mT magnetic fields on anticancer drug potency

- (1) Hannan C.J. Jr., Liang Y., Allison J.D., Pantazis C.G., Searle J.R., "Chemotherapy of human carcinoma xenografts during pulsed magnetic field exposure", *Anticancer Research*, Vol.14, pp.1521-1524, (1994)
- (2) Liang Y., Hannan C.J. Jr., Chang B.K., Schoenlein P.V., : "Enhanced Potency of Daunorubicin against Multidrug Resistant Subline KB-8-5-11 by a Pulsed Magnetic Field", *Anticancer Research*, Vol.17, pp.2083-2088 (1997)
- (3) Ikehara T., Yamaguchi H., Hosokawa K., Miyamoto H., Aizawa K., "Effects of ELF magnetic field on membrane protein structure of living HeLa cells studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy", *Bioelectromagnetics*, Vol.24, pp.457-464 (2003)
- (4) Santini M.T., Cametti C., Paradisi S., Straface E., Donelli G., Indovina P.L., Malorni W., "A 50 Hz sinusoidal magnetic field induces changes in the membrane electrical properties of K562 leukaemic cells", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Vol.36, pp.39-45 (1995)
- (5) 田村：「基礎分子生物学」，東京化学同人，4，2，10 (1997)
- (6) Miyakoshi J., Kitagawa K., Takebe H., "Mutation induction by high-density, 50-Hz magnetic fields in human MeWo cells exposed in the DNA synthesis phase", *International Journal of Radiation Biology*, Vol.71, pp.75-79 (1997)
- (7) Ferdinando B., Fiorenzo M., Andrea O., Alessandro M., Stefania C., Spartaco S., Stefano S., Nadir M., "Intramembrane Protein Distribution in Cell Cultures Is Affected by 50 Hz Pulsed Magnetic Fields", *Bioelectromagnetics*, Vol.18, pp.463-469(1997)
- (8) Paradisi S., Donelli G., Santini M.T., Straface E., Malorni W., "A 50-Hz magnetic field induces structural and biophysical changes in membranes", *Bioelectromagnetics*, Vol.14, pp.247-255(1993)



(a) Supernatant of Mitomycin C(MMC)



(b) Supernatant of Cisplatin(CDDP)

図 4 交流磁界曝露による抗がん剤の細胞膜透過性についての評価

Fig4. Effect on cell membrane permeability of anticancer drug by exposure to 60 Hz 50 mT magnetic field

表 1. 磁界曝露による抗がん剤作用と細胞外の抗がん作用の比較

Drug	Intracellular and extracellular anticancer drug potency under magnetic fields	
	Anticancer drug potency	Extracellular anticancer drug potency
MMC	1.92(0.52)	0.59(1.70)
p value	P=0.0027	P=0.0059
CDDP	1.32(0.76)	0.79(1.26)
p value	P=0.03	P=0.01