

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700508

研究課題名（和文）交流磁場と抗がん剤の併用療法の開発

研究課題名（英文）Research of the combined effect of magnetic fields and anticancer drugs

研究代表者

柿川 真紀子（KAKIKAWA MAKIKO）

金沢大学・環日本海域環境研究センター・助教

研究者番号：10359713

研究成果の概要（和文）：抗がん剤と磁場の併用曝露法の有効性を明らかにするため、基礎研究として交流磁場曝露による数種類の抗がん剤作用増強を測定した結果、検討した全ての薬剤で磁場による作用増強が見られ、作用増強率に影響する要因は薬剤の作用機序や半数阻害濃度ではなく分子量であることが示唆された。また、マイトマイシン C とシスプラチンの薬剤 2 種について、細菌細胞への作用時の交流磁場曝露による作用増強メカニズムを薬剤の細胞膜透過性の点から検討した結果、交流磁場曝露により薬剤の細胞膜の透過性が高まることで各薬剤作用は増強されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Our results indicated that each potency of cisplatin, mitoxantrone, daunorubicin, actinomycin D, bleomycin, and zinostatin, was enhanced by exposure to 60 Hz, 50 mT magnetic fields. The analysis of the potency of supernatant remaining drugs in the culture medium indicated that the intracellular drug potency was increased and extracellular drug potency was decreased by exposure to magnetic fields. The values of drug potency revealed a significant inverse correlation between intracellular and extracellular cells. The results suggested that magnetic fields (60 Hz, 50 mT) change the permeability of cell membrane and influence the drug intake.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：低侵襲治療システム、交流磁場、抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

近年、変異原性薬などの化学物質と磁場の複合影響に関する研究がいくつかなされており、がん細胞移植マウスにおいて抗がん剤シスプラチンと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や、多剤耐性を持つがん細胞をマウスに移植し、パルス磁界曝露下で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のグループに対して縮小し、がん細胞の増殖を 57%抑制したなどの報告がある。

申請者は研究開始当初までに抗菌剤マイトマイシンCの作用が60 Hz交流磁場曝露により増強されることを見出していた。しかしながら、他の薬剤でも交流磁場で作用増強効果が得られるのか、またこの薬剤作用の増強における交流磁場の条件(磁束密度、周波数、曝露時間)など不明な点が多い状況であった。

2. 研究の目的

マイトマイシンCはDNA損傷作用により殺細胞効果をもつため、抗生物質として細菌の殺菌のみならずヒト細胞にも作用し抗がん剤としても用いられる。抗がん剤は、がん化学療法において、体内へ投与後、全身へまわり、がん細胞だけでなく正常細胞にもダメージを与え、副作用を引き起こす。この副作用の抑制は化学療法において重要な課題である。これまでにマイトマイシンCの作用が60 Hz、50 mTの交流磁場曝露により増強されることを見出しており、この増強効果が確実であれば、交流磁場をがん細胞に曝露することで、薬剤の効能を患部のみで高められれば、投薬量を減らし、副作用を抑えられる可能性がある。しかしながら、マイトマイシンC以外の薬剤でも交流磁場により作用増強効果が得られるかどうか、また効果的な磁場条件も不明である。

そこで本研究では数種類の薬剤における交流磁場効果を検討し、薬剤と交流磁場の併用法の有効性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 60 Hz 交流磁場発生装置

図1に本研究で使用した60 Hz交流磁界発生装置を示す。磁界発生装置はU字型鉄心を用いて、その鉄心の頭頂部を実験領域とした。この実験領域内において周波数60 Hzの磁束密度50 mTの交流磁界を発生させ実験を行った。交流磁界発生装置のコイルからの発熱により実験領域内の温度が上昇し、実験対象物が温度変化による影響をうける可能性があるため、曝露群、非曝露群にアクリルケースの恒温槽を設け、この内部をクーリングポンプにより一定温度の水を循環させ恒温槽内(実験領域内)に水をはり、水温を36°C付近で一定に保つようにした(図2)。

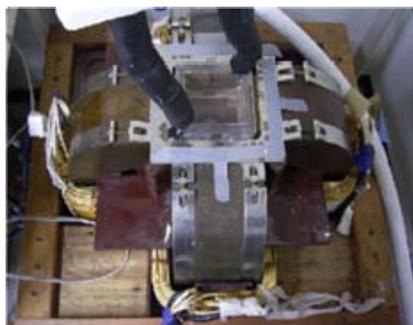


図1 60Hz交流磁界発生装置

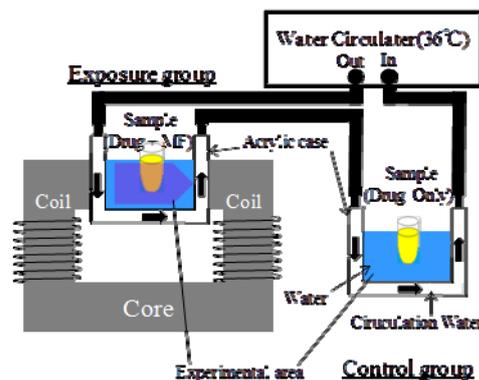


図2 実験環境概略図

(2) 抗がん剤作用に対する磁界曝露影響評価

本研究で使用した交流磁場発生装置はCO₂の供給ができず培養細胞を実験に用いることができないため、大腸菌で磁場影響評価を行った。また抗がん剤にはブレオマイシン(BLM)、ミトキサントロン(MTX)、ダウノルビン(DNR)、アクチノマイシンD(ACD)、ジノスタチン(ZNS)を使用し、これらはDNAに対して作用し、もちろん大腸菌のような細菌にも細胞増殖阻害作用をもつ。これら抗がん剤の作用機序は大別すると抗がん剤がDNAの塩基に結合し、DNA合成を阻害するタイプのもの(DNA binding)、DNA鎖を切断(DNA strand break)し、DNA合成を止めるタイプのものがある。今回用いた抗がん剤においてはMTX、DNR、ACDがDNA bindingタイプに該当し、BLM、ZNSがDNA strand breakタイプである。また分子量についてはダウノルビンと分子量の大きいジノスタチンには約30倍の差がある。

抗がん剤作用に対する交流磁場影響測定では、マイトマイシンCとシスプラチンの2種の抗がん剤を使用した。まず大腸菌を培養した菌液に抗がん剤を添加したものを、磁界曝露群、非曝露群に等分し、それぞれのチューブを各恒温槽の実験領域に設置し、一定時間培養を行う。反応後、コロニーアッセイ法を用いることにより、それぞれの生菌数を測定し、磁場曝露群、非曝露群の生菌数比較から抗がん剤作用の交流磁場影響を評価した。

交流磁界による抗がん剤の細胞膜透過性の影響測定では、抗がん剤を大腸菌液に添加後、等分し、磁場曝露下と非曝露下で反応後、各試料を遠心分離機にかけ、大腸菌と培養液に分離し、抗がん剤を含む上澄みの培養液を取り出す。この時の上澄み液の抗がん剤の量が減ってい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。そこで培地中の抗がん剤の量(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、

2 h についてロニーアッセイ法により生菌数を測定した。

4. 研究成果

(1) 交流磁場による数種類の抗がん剤作用増強率

抗がん剤ブレオマイシン(BLM), ミトキサントロン(MTX), ダウノルビシン(DNR), アクチノマイシン D(ACD), ジノスタチン(ZNS) の5種について周波数 60 Hz, 50 mT の磁界曝露による作用増強の変化を測定した。図3ではブレオマイシン(BLM)の生菌数-反応時間特性を示す。この BLM と同様にどの抗がん剤でも非曝露群(Drug Only)に対して曝露群(Drug + MF) の生菌数が減少している結果となり、分子量の違いに関わらず作用が増強されるという結果が得られた(有意差有り)。そこで各抗がん剤作用の増強率を調べるため、各抗がん剤に対して反応時間 6h 後の菌数減少率-濃度の特性を求めた。抗がん剤に磁界曝露を併用したものを濃度換算し、実際に添加した濃度で割ることにより作用増強割合を算出した。例としてブレオマイシン(BLM)を図4に示す。横軸は BLM 濃度($\mu\text{mol/L}$)で縦軸は0hを1として細胞減少率を表している。BLMの濃度 8.1 μM に磁界曝露を併用したものの 8.1 $\mu\text{M}+\text{MF}$ が濃度換算すると 10.5 μM になっておりこれから計算すると増強率は 1.29 倍となった。同様にほかの抗がん剤についても算出した結果を表1に示す。

また、各抗がん剤の作用の強弱を比較するため細胞数を半分にするのに必要な濃度である半数阻害濃度(IC₅₀)を求めた。作用増強率(Enhancing rate)を見ていくとミトキサントロン(MXT), ダウノルビシン(DNR), アクチノマイシン D (ACD) ブレオマイシン(BLM)はおよそ 1.3 倍(30 % 増加), 一方でジノスタチン(ZNS)のみ 1.03 倍(3.2 % 増加)と増強率が著しく低くなった。IC₅₀ 値は DNA 鎖切断型(DNA strand break)である BLM と ZNS の値がほかの DNA 結合型(DNA binding)の抗がん剤より小さくなっており、この値は作用機構に関連しているといえる。増強率の違いについて、分子量があまり変わらず作用機構が違う ACD と BLM の増加割合が同程度であることから作用機構や IC₅₀ 値が磁場影響に関連しているとはいえない。一方、ZNS は分子量がほかの抗がん剤と比べて 1 オーダー違い顕著に増強率が低いことから、薬剤の分子量は交流磁場曝露の影響に関連することが示唆された。

(2) 抗がん剤マイトマイシン C シスプラチンにおける細胞膜透過性の影響評価

マイトマイシン C, シスプラチンについて 0, 2 時間経過後の生菌数について非曝露群を 1 として曝露群を相対比で表すと 2h 後マイトマイシン C は 0.57, シスプラチンは 0.75, となり非曝露群に対して曝露群の生菌数が

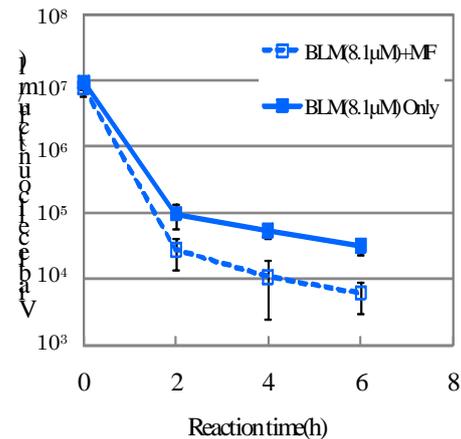


図3 BLMの生菌数-反応時間特性

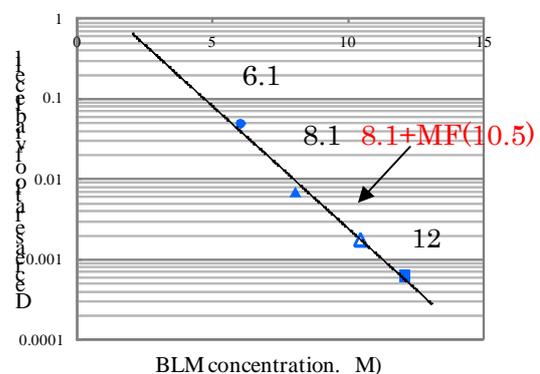


図4 BLMの殺菌率-薬剤濃度特性

表1 5種の抗がん剤の半数阻害濃度と磁場による作用増強率

Drug	MXT	DNR	ACD	BLM	ZNS
MW	517	564	1255	1487	15000
Action	DNA binding	DNA binding	DNA binding	DNA strand break	DNA strand break
IC ₅₀ (μM)	216	42	21	2.2	1.4
Enhancing rate	1.31	1.27	1.35	1.29	1.03

減少していることがわかる(表2, ()は生菌数の相対比)。非曝露群と磁界曝露群との間で有意差検定を行ったところどちらの薬剤でも磁場による影響に有意差が認められた(**P< 0.001*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ことが確認できた。

表2 マイトマイシンC、シスプラチンの細胞膜透過性における磁場曝露影響

Drug	Intracellular drug amount	Extracellular drug amount
Mitomycin C	1.90±0.24** (0.57±0.079)	0.6±0.054** (1.68±0.16)
Cisplatin	1.38±0.11* (0.75±0.069)	0.80±0.052* (1.26±0.074)

Data are represented as the mean ±SEM from 6 independent experiments.

**P<0.01 *P<0.05 to Non-Exposure

さらにこの試料から遠心分離により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培地に残る抗がん作用を評価した。2h後、生菌数の相対比はマイトマイシンC、シスプラチンの各曝露群の上澄みは1.68, 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。どちらも非曝露群と磁界曝露群との間で有意差検定により有意差が認められた(**P<0.001, *P<0.05)。表2では非曝露群に対する曝露群の生菌数の相対値から薬剤作用(量)割合を示す。また、マイトマイシンC、シスプラチンのそれぞれ薬剤作用が1.90, 1.38倍に対して細胞外は0.6, 0.8倍(1.68, 1.26の逆数)と細胞内外の値に逆相関の関係があることがわかる。細胞内の抗がん剤の量の増加割合と細胞外の抗がん剤の量の減少割合がほぼ一致しているといえる。

以上の結果より交流磁界曝露によって抗がん剤の細胞膜透過性が増加し、細胞内に抗がん剤が多く取り込まれることで、抗がん作用が増強されたということが示唆された。またこれまで使用した抗がん剤では磁場曝露により作用が抑制されたものはない結果が得られた。今後はヒト培養細胞で交流磁場曝露による抗がん剤の作用増強効果を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① 森一也, 今井俊輔, 山田外史, 柿川真紀子, 抗がん剤の細胞膜透過性に対する交流磁界曝露影響, 電気学会マグネティックス・リニアドライブ研究会資料 (2012), MAG12-21.査読無.
- ② 西頭浩司, 柿川真紀子, 山田外史, 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, 日

本 AEM 学会誌, 19(2011), 195-200.査読有.

- ③ Haraszczuk R, Kakikawa M, Ueno T, Yamada S, Nadi M, Spectroscopic Susceptibility Measurements of Magnetic Markers by SV-GMR Needle Probe, J. Magn. Soc. Jpn., 35(2011), 157-162, 査読有.
- ④ 今井俊輔, 山田外史, 柿川真紀子, 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, 電気学会マグネティックス・医用生体合同研究会資料, (2010), MAG10-171.査読無.

[学会発表] (計7件)

- ① 森一也, 今井俊輔, 山田外史, 柿川真紀子, 抗がん剤の細胞膜透過性に対する交流磁界曝露影響, 電気学会 マグネティックス リニアドライブ合同研究会, 2012年2月22日, 金沢大学 (石川県) .
- ② 山田外史, 柿川真紀子, 竹村泰司, 松下伸広, 松木英敏, 藪上信, 医療技術における磁気応用研究の動向 (5), 電気学会マグネティックス リニアドライブ合同研究会, 2012年2月22日, 金沢大学 (石川県) .
- ③ Makiko Kakikawa, Sotoshi Yamada, Enhanced potency of anticancer drugs by exposure to magnetic fields, The 35th Annual Conference on Magnetism in Japan, 〈招待講演〉2011年9月28日, 新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ (新潟県)
- ④ 西頭浩司, 柿川真紀子, 山田外史, 上野敏幸, 抗がん剤シスプラチンの細胞毒性における交流磁界影響評価, 電気関係学会北陸支部連合大会, 2010年9月12日, 福井工業大学 (福井県) .
- ⑤ 今井俊輔, 山田外史, 柿川真紀子, 交流磁界による抗がん剤の作用増強, 日本磁気学会, 2010年9月5日, つくば国際会議場(茨城県).
- ⑥ 森一也, 今井俊輔, 山田外史, 柿川真紀子, 抗がん剤作用に対する交流磁界の影響評価, 電気学会全国大会, 2011年3月16日, 大阪大学 (大阪府) .
- ⑦ 梅上大勝, 西頭浩司, 山田外史, 柿川真紀子, 抗がん剤シスプラチンとマイトマイシンCの細胞毒性に対する極低周波磁界の影響評価, 電気学会全国大会, 2011年3月16日, 大阪大学 (大阪府) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿川 真紀子 (KAKIKAWA MAKIKO)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・助教

研究者番号：10359713

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし