

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500541

研究課題名(和文) 交流磁場を用いた抗がん剤の標的治療技術の開発

研究課題名(英文) Development of targeted techniques of anticancer drug using magnetic fields

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌の実験系では、交流磁場曝露により薬剤作用が増強される結果が得られており、本研究ではヒトがん細胞における交流磁場曝露の薬剤作用への効果を検討するため、まずCO2インキュベータ内に設置できる磁場曝露システムを製作した。その装置を用いてヒト肺がん細胞株A549におけるシスプラチン作用への交流磁場影響を測定したところ、磁場曝露群(60 Hz, 50 mT, 24時間)は非曝露群に比べ生細胞数が減少し、磁場による薬剤作用の増強が認められた。

研究成果の概要(英文)：Our results in previous study indicated that magnetic fields (60 Hz, 50 mT) enhance the potency of drugs in bacterial cells and suggested that magnetic fields change the permeability of cell membrane and increase drug uptake. If magnetic fields enable us to enhance the potency of anticancer drug on target region only, the dosage can be reduced and thus side effects can be suppressed in clinical cancer chemotherapy. In present study, we made a magnetic fields exposure system for cultured human cells and measured the effect of magnetic fields on a potency of anticancer drug, cisplatin to human lung cancer cell line. The viabilities of A549 cells treated with cisplatin only and cisplatin under magnetic fields exposure (60 Hz, 50 mT for 24 hours) were measured by colony assay. The result suggested that magnetic fields (60 Hz, 50 mT for 24 hours) enhance the potency of cisplatin on human cancer cells.

研究分野：生体工学

キーワード：がん細胞 薬剤作用 交流磁場

1. 研究開始当初の背景

(1) マイトマイシン C (MMC) 作用増強における交流磁場の磁束密度依存的効果

マイトマイシン C (MMC) は DNA 損傷作用により殺細胞効果をもつため、抗がん剤として用いられるだけでなく、バクテリアにも効くため抗生物質としても用いられる。これまでに大腸菌に MMC のみ作用させた場合と MMC + 磁場(60 Hz, 50 mT) 曝露した場合で、磁場曝露群と非磁場曝露群に違いが見られないことから、磁場曝露のみでは生菌に影響を与えないことが明らかとなっている。一方、MMC + 磁場曝露では、MMC 各濃度でいずれも MMC のみよりも生菌数が減少しており、磁場により MMC の殺傷作用が高まることが明らかとなっており、濃度換算で 60 Hz, 50 mT の磁場曝露により MMC 作用を約 2.4 倍増強することが判明した。また、磁場強度 30 mT, 5 mT の実験を行ったところ、それぞれ MMC 作用を 1.8 倍、1.4 倍に増強され、磁場強度依存的に、磁場強度が高くなるほど MMC 作用の増強率も高くなることも判明している。

(2) 60 Hz, 50 mT 磁場曝露による 7 種の薬剤の増強効果を検証

抗がん剤には様々な種類のものがあるため、前述のマイトマイシン C の他に 6 種の抗がん剤作用についても 60 Hz, 50 mT 磁場曝露の影響評価を行った。使用した抗がん剤は、アクチノマイシン D, シスプラチン, ダウノルピシン, ミトキサントロン, プレオマイシン, ジノスタチンステマラマー(スマクス)である。その結果、交流磁場曝露により使用したほとんどの薬剤において作用増強が認められたが、分子量の大きいジノスタチン(分子量 平均 15,000)では増強率 1.03 となり、あまり磁界の影響を受けないことが明らかとなった。

(3) 交流磁場による薬剤の細胞膜透過性の変化を検証

マイトマイシン C 作用増強における交流磁場の影響メカニズムについて、基礎的に検討を試みて反応時間後に培地中に残っている薬剤の量を測定した結果、磁場曝露群では培地中に残る薬剤は少なくなった。つまり、細菌細胞では交流磁場曝露はマイトマイシン C の細胞膜透過性に影響を与え、細胞内にマイトマイシン C が多く取り込まれた結果、殺細胞作用が増強されることが示唆された。

2. 研究の目的

これまでの大腸菌での実験系において、交流磁場曝露は薬剤作用を高める効果が認められている。この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。

本研究では、CO₂ インキュベータ内に設置できる磁場曝露システムを構築し、ヒトがん

細胞での抗がん剤作用の交流磁場影響を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) がん細胞用の交流磁場曝露システムの製作

ヒト細胞の培養には 5% CO₂ ガスが必要なため、CO₂ ガスインキュベータ内に設置可能な磁場発生装置を製作した(図 1)。鉄心に鉄心にコイルを巻き、ギャップ部に実験領域(100×150×40 mm³)を設けた。コイルに交流電圧をかけることにより、実験領域内に交流磁界を最大 85.0 mT 程度まで出力が可能である。本装置では磁束密度は、 $B=70.7$ mT まで発生できるようにした。また、磁界曝露側のコイル下部には電流を流すことによるコイルの発生熱を逃がすためにファンがとりつけてある。非曝露群においても曝露群と同様のアクリル製の恒温装置が設置されており、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。二つの恒温槽の温度を一定に保つために、外部出力によるクーリングポンプを用いてアクリル内部に一定温度の水が循環されるようになっており、二つの恒温槽の実験領域は 37.0 で一定に保たれている。

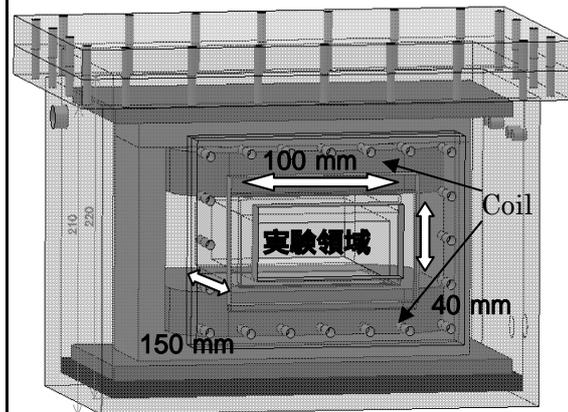


図 1. 細胞用磁場曝露装置

(2) ヒト肺がん細胞における抗がん剤シスプラチン作用の交流磁場曝露影響の測定

ヒト肺がん細胞株 A549 を用い、シスプラチンの細胞毒性における 60 Hz 磁場の影響を Trypan blue 染色による生死細胞の判別や、コロニーアッセイにて測定した。コロニーアッセイでは実験時の個々の細胞の増殖能を測定できる。A549 は接着細胞であり、ディッシュに付着した単一細胞は、その場で細胞分裂を繰り返し、増殖することで、2 週間ほどで目視できる 2 mm ほどの細胞の塊(コロニー)を形成する。このため、A549 細胞をトリプシン処理後、同数の細胞を複数のディッシュに播き、細胞がディッシュに付着後、各ディッシュにシスプラチンを添加し、一方は磁場曝露の培養槽へ、もう一方は磁場非曝露の培養槽へ設置し、24 時間の培養後、シス

プラチンを含む培地を除き、フレッシュな培地添加後、コロニー形成のため2週間培養を行なった。コロニーはギムザ染色後、カウントした。

4. 研究成果

がん細胞にシスプラチン添加し、交流磁場を24時間曝露後の細胞をTrypan Blue染色し、非曝露群との比較を行なった。なお、Trypan Blueは生細胞を染色せず、死細胞のみを染色する。その結果、表1(数回の実験の平均値)に示すように、まずシスプラチン添濃度が0 µg/mlではcontrol群の死細胞の割合は5.8%に対してExposure群は7.9%となっており、両者の間に大きな差はなく、交流磁界単独曝露では細胞数に影響がないことがわかる。また、シスプラチン20 µg/mlにおいては抗がん剤を添加したことにより死細胞数の増加が見られたが、Control群の死細胞の割合は14.5%に対し、Exposure群は15.5%と磁界曝露による影響は見られなかった。40 µg/mlにおいてもControl群の死細胞が26.5%に対し、Exposure群は24.5%と、両者の死細胞の割合に明確な差は確認されなかった。添加濃度60 µg/mlではControl群の死細胞の割合は32.3%に対し、Exposure群は43.2%となりExposure群が10.9%高い結果となった。シスプラチン添加濃度80 µg/mlではControl群の死細胞の割合は29.5%に対し、Exposure群は45.5%となり、Exposure群が16.0%高い結果となった。この結果よりシスプラチン添加濃度60,80 µg/mlにおいて、交流磁界曝露によるヒト培養細胞の抗がん剤シスプラチン作用への影

シスプラチン濃度 (ug/ml)		0	20	40	60	80
Control (%)	生細胞	94.2	85.5	73.5	67.7	70.5
	死細胞	5.8	14.5	26.5	32.3	29.5
Exposure (%)	生細胞	92.1	84.5	75.5	56.8	54.5
	死細胞	7.9	15.5	24.5	43.2	45.5

表1. Trypan Blueによる生死判別

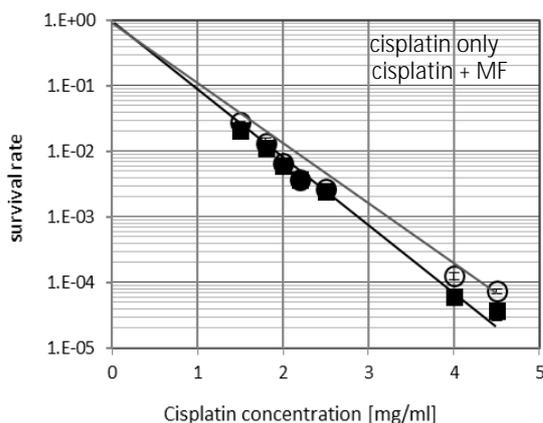


図2 ヒト肺がん細胞におけるシスプラチン濃度による生存率と交流磁界影響

響が有ることが示唆された。シスプラチン添加濃度20, 40 µg/mlにおいて磁界曝露による影響が確認されなかった理由としてはTrypan Blueの作用原理の問題が挙げられる。Trypan Blueの作用原理は細胞膜が傷ついた細胞を染色する。しかし、細胞膜の損傷は細胞の生死を判断する形態上の特徴の一つであり、抗がん剤が作用したすべての細胞がすぐに細胞膜を損傷するわけではない。本研究で用いたシスプラチンはDNAに作用し、細胞増殖阻害を引き起こすものである。そのため、濃度が低い点においては磁界曝露による細胞膜損傷への影響が顕著に表れなかったと考えられる。

図2はヒト肺がん細胞株A549でのシスプラチン濃度(24時間反応)による生存率(○)と、シスプラチンと60 Hz, 50 mT磁界併用曝露(24時間反応)による生存率(●)を示す。シスプラチン濃度1.5~2.5 µg/mlでは両群の差は小さいが、シスプラチン濃度4.0 µg/ml付近では差が顕著にみられ、磁界により生存率が約50%の減少し、薬剤作用の増強影響がみられた。なお、シスプラチン濃度1.5~4.5 µg/mlの磁場曝露群と非曝露群の細胞生存率について統計処理を行なったところp=0.0131(n=22)となり有意差があることが示された。

磁場がどのように薬剤の細胞膜透過性に影響を与えているのか分子レベルでの詳細なメカニズムは、まだ不明であるが、細胞膜への磁場影響として、50 Hz磁場は細胞膜タンパク質のペプチド結合に影響を与え、立体構造(αヘリックスやβシート)を変化させること、またこの影響は磁場曝露時に見られ、可逆的な変化であることが報告されている。他にも50 Hz磁場が細胞表面の構造を変化させるという報告や植物の根からのアミノ酸の取り込み量が増加したとの報告がある。このように50 Hz, 60 Hz磁場は細胞膜タンパク質へ影響を与えている可能性があることから、今後はさらに分子レベルでの磁場影響メカニズムを解明したいと考えている。

一方、ヒトがん細胞においてシスプラチン作用の磁場影響がみられたが、増強率は大腸菌細胞の結果に比べて小さい。これはヒト細胞実験で磁場曝露時間を24時間として測定を行なったが、ヒト細胞において24時間は細胞数が2倍になる時間(細胞分裂1回)に相当するが、大腸菌細胞では30分程度で分裂し2倍にふえる。大腸菌の実験系では反応時間6時間まで測定しており、図1にもあるように2時間以降から磁場曝露群と非曝露群に顕著な差が見られる。そのため今後はヒト細胞実験において、磁場曝露時間を数日までのばし薬剤作用への影響について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 9 件)

Kakikawa M., Imai, S., Yamada S., Effect of Extremely Low-Frequency (ELF) magnetic fields on the potency of drugs in bacterial cells, IEEE Transactions on Magnetics, Vol. 50, No.4, pp. 1-4 (2014), DOI: 10.1109/TMAG.2013.2286781, 査読有.

Yamada S., Ikehata Y., Ueno T., Kakikawa M., Control of exciting frequency of pancake applicator having wireless transmission for hyperthermia therapy, J. Magn. Soc. Jpn., Vol. 38, pp. 37-41 (2014), DOI: 10.3379/msjmag.1402R004, 査読有.

https://www.jstage.jst.go.jp/browse/msjmag/38/2-1/_contents/-char/ja/1402R004
Hoang H., Kakikawa M., Yamada S., High spatial resolution Non-contact measurement of low current signal by needle-type GMR probe, 日本 AEM 学会誌, Vol. 21, pp. 386-390 (2013). DOI: 10.14243/jsaem.21.386, 査読有.

Yamada S., Nakamura S., Kakikawa M., Ueno T., Sterilization Action on Cavitation Phenomenon Generated by Magnetostrictive, 日本 AEM 学会誌, Vol.21, pp.20-23 (2013). DOI: 10.14243/jsaem.21.352, 査読有.

柿川真紀子, 山田外史, 池畑芳雄, 培養細胞における薬剤増強評価のための磁場曝露システム, 電気学会誌 Vol. 133, pp. 385-386 (2013). DOI: 10.1541/ieejfms.133.385, 査読有.

Maki T, Kakikawa M., Kobayashi F, Yamada M, Matsuki A, Hasegawa H, Iwasaka Y, Assessment of composition and origin of airborne bacteria in the free troposphere over Japan, Atmospheric Environment, Vol. 74, pp. 73-82 (2013). DOI: 10.1016/j.atmosenv.2013.03.029, 査読有.

Kakikawa M., Yamada S., Effect of extremely low-frequency (ELF) magnetic fields on anticancer drugs potency, IEEE Transactions on Magnetics, Vol. 48, pp.2869-2872 (2012). DOI: 10.1109/TMAG.2012.2200881, 査読有.

Kakikawa M., Yamamoto T, Satoh Y, Kitamura K-I, Sekiguchi T, Chowdhury VS, Funahashi H, Omori K, Endo M, Yano S, Yamada S., Hayakawa K, Chiba A, Srivastav AK, Ijiri K, Hattori A, Suzuki N, Determination of

calcium sensing receptor in the scales of goldfish and induction of its mRNA expression by acceleration loading, Biological Sciences in Space, Vol. 26, pp. 26-31 (2012). DOI: 10.2187/bss.26.26, 査読有.

Suzuki N, Sekiguchi T, Satake H, Kato, K, Nishiyama Y, Takahashi H, Danks JA, Martin TJ, Hattori A, Nakano M, Kakikawa M., Yamada S, Ogoshi M, Hyodo S, Yamaguchi Y, Chowdhury VS, Hayakawa K, Funahashi H, Sakamoto T, Sasayama Y., Cloning of two members of the calcitonin-family receptors from stingray, *Dasyatis akajei*: Possible physiological roles of the calcitonin family in osmoregulation, Gene, Vol. 499, pp. 326-331 (2012). DOI:10.1016/j.gene.2012.03.042, 査読有.

[学会発表](計 12 件)

牛丸透, 柿川真紀子, 山田外史, ヒト細胞への抗がん剤シスプラチン作用に対する交流磁界曝露影響, マグネティックス・リニアドライブ合同研究会, MAG-14-51, 信州大学, 長野県長野市, 2014年6月26日.

Kakikawa M., Ushimaru T, Yamada S., Effect of Magnetic Fields on Potency of Anticancer Drug Cisplatin to Human Cancer Cell Line, Asia Pacific Symposium on Applied Electromagnetics and Mechanics 2012, Taichung, Taiwan 2014.7.23-25.

上口友輔, 岩本洋子, 岩田歩, 原和崇, 木ノ内健人, 牧輝弥, 小林史尚, 柿川真紀子, 松木篤, 黄砂粒子の組成と混合状態の高度による違い, Japan Geoscience Union Meeting 2014, Yokohama, Kanagawa, Japan, 2014年5月1日.

牛丸透, 柿川真紀子, 山田外史, ヒト細胞への抗がん剤作用に対する交流磁界曝露影響, 第38回日本磁気学会学術講演会, 慶応義塾大学, 神奈川県横浜市, 2014年9月4日.

牛丸透, 柿川真紀子, 山田外史, ヒト細胞への抗がん剤パクリタキセル作用に対する交流磁界曝露影響, 平成26年度電気関係学会北陸支部連合大会, A42, 富山高専, 富山県富山市, 2014年9月12日.

牛丸透, 柿川真紀子, 山田外史, ヒト細胞に対する交流磁界曝露による抗がん剤シスプラチン作用への影響, 平成27年電気学会全国大会, 東京都世田谷区, 2015年3月25日.

小林誠, 牛丸透, 柿川真紀子, 水野史朗,

山田外史, 梅博久, 抗がん剤の交流磁場併用による薬理作用増強に関する基礎的検討, 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区, 2015 年 4 月 18 日.

Yamada S, S. Nakamura S, Kakikawa M, Ueno T, Sterilization Action on Cavitation Phenomenon Generated by Magnetostrictive, Asia Pacific Sympoium on Applied Electromagnetics and Mechanics2012, Ho Chi Minh city, 2012.7.25-27.

Kakikawa M, Yamada S, The change of the membrane permeability of anticancer drugs by exposure to ELF magnetic fields, Asia Pacific Sympoium on Applied Electromagnetics and Mechanics2012, Ho Chi Minh city, 2012.7.25-27.

森一也, 柿川真紀子, 山田外史, 交流磁界曝露による抗がん剤薬効作用への影響, 平成 24 年度電気関係学会北陸支部連合大会, A-88, 富山県立大学, 富山県射水市, 2012 年 9 月 2 日.

Yamada S, Ikehata Y, Ueno Y, Kakikawa M, Flustuation of resonance frequency of applicator having wireless power transmission for hyperthermia therapy, International Confrence of the Asia Union of Magnetic Societies, 4pPS-104, Nara, Japan,2012.10.2-5.

山田外史, 池畑芳雄, 上野敏幸, 柿川真紀子, がん誘導加温療法におけるワイヤレス励磁コイルの共振周波数の制御と磁界分布, 平成 25 年電気学会全国大会, 2-108, 愛知県名古屋市, 2013 年 3 月 22 日.

〔図書〕(計 1 件)

共著 電気学会マグネティックス技術委員会 編, 『改訂 磁気工学の基礎と応用』(コロナ社)ISBN:978-4-339-00856-2

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

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

山田 外史 (YAMADA, Sotoshi)
金沢大学・環日本海域環境研究センター・
教授
研究者番号: 80019786

(3) 研究分担者

小林 誠 (KOBAYASHI, Makoto)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20460355