

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：平成 19 年度～平成 20 年度

課題番号：19510032

研究課題名（和文）神経細胞の生理機能におよぼす通信領域の高周波電磁波の影響

研究課題名（英文）Effects of radio-frequency electromagnetic field on physiological functions of nerve cells

研究代表者

池原 敏孝 (IKEHARA TOSHITAKA)

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：40111033

研究成果の概要：

ウシ副腎髄質由来のクロマフィン細胞 (1, 2) とマウス骨芽細胞 (3) の実験を試みた。

1. クロマフィン細胞を低張溶液にインキュベートすると、その直後にその細胞容積は一過性の増加を引き起こし、その後次第に液交換前の容積に回復した。1.5Tの変動磁界曝露およびサイトカラシンDを添加すると、F-actin量が減少したが、低張溶液への置換は交換直後の容積増加の最大値の増加と、回復時間の遅延が認められた。この影響は複数のF-actin重合阻止剤添加でも確認された。このことは磁界がactinの重合、脱重合に影響を及ぼすことを示唆する。

2. 高周波電磁界曝露がアセチルコリン添加および高K<sup>+</sup>溶液置換による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度増加に及ぼす影響を調べた。細胞内Ca<sup>2+</sup>は両者において一過性の増加を示し、時間経過と共に次第に減少する傾向を示した。このとき周波数は438.5MHzに一定とし、電磁場強度を26.6から54.6Wに変化させた。行ったすべての実験で、高周波電磁場曝露は上記の細胞内Ca<sup>2+</sup>増加には有意の影響をおよぼさなかった。これらの結果は438.5MHzの高周波電磁場は小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出および細胞膜のCa<sup>2+</sup>チャネルを介するCa<sup>2+</sup> influxには影響をおよぼさないことを示した。

3. マウス骨芽様MC3T3-E1細胞の分化における極低周波磁界 (ELF-EMF: 3mT, 60Hz) の影響を調べた。ELF-EMF曝露によりコラーゲン合成が刺激されるが、これはp38MAPK経路の介入により引き起こされる。またPI3K経路はこのELF-EMF曝露により誘導されるコラーゲン合成の抑制に関与し、このPI3K経路の抑制はコラーゲン合成を促進する可能性があり、磁界の関与を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	2,600,000	780,000	3,380,000
平成20年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：F-actin, 変動磁界, 高周波電磁界, クロマフィン細胞, 細胞内Ca<sup>2+</sup>, コラーゲン合成, アセチルコリン, 小胞体

1. 研究開始当初の背景

高周波電磁波は、熱発生がその影響の主なるものとされるが、磁界影響も大いに示唆される。特に脳や神経細胞への影響が危惧されている。我々研究グループは低周波変動磁界について、細胞内外の電気的性質、蛋白質構

造、および情報伝達機構の変化が磁界曝露に影響されることを明らかにしてきた。

これらの実績を踏まえ、高周波電磁波発生装置を製作し、通信に使われるレベルの電磁波が上記細胞内外の生理的機構、構造及び性質に影響を及ぼすか否か、及ぼすのであればどのようなメカニズムで生じるかを調べる。

## 2. 研究の目的

高周波電磁波が影響を及ぼす器官として脳や神経系などがクローズアップされている。そのためこの研究の目的は、電磁波曝露により、神経様細胞における神経伝達機構（神経伝達物質の生成、分泌顆粒の動き、神経・神経および神経・筋間のシナプス伝達）、神経細胞の形態変化、細胞小器官や細胞骨格蛋白質および膜電位などの電気的性質等がどのように影響をうけるかについて綿密に測定・解析する。また、周波数を変化させ、影響を及ぼす周波数帯を探索する。

## 3. 研究の方法

磁界曝露実験と平行し、同種の実験を行っていく。

1) 神経細胞の細胞膜、細胞骨格蛋白質および細胞内小器官の動態への磁界、電磁波の影響

① 細胞はウシ副腎髄質由来正常細胞(クロマフィン細胞)及びラット由来の同種腫瘍化細胞(PC12細胞)および平滑筋細胞を培養し、実験に使用する。

② 高周波発生装置は市販の装置が無く、電磁波領域の専門家をグループに加え、装置の製造および調整をグループ内で行う。また、細胞保温装置は磁界曝露実験で使用した容器を使用する。

③ 上記培養細胞に高周波発生装置から発生する電磁波を曝露し、その後次の測定を行う。

2) 生理、薬理的測定：神経伝達物質分泌量、細胞膜電位、 $Ca^{2+}$ を含む細胞内情報伝達物質量の測定

① 上記測定項目に対する磁界や電磁波曝露の影響を探る。曝露時間、周波数のよる変化を調べる。

② 以前に磁界が影響を及ぼす項目を報告したが、細胞内小器官や細胞内骨格蛋白質量などがこれに相当するので、この蛋白質やエネルギー生成系についてもその影響を探る。

## 4. 研究成果

### (1) 副腎髄質クロマフィン細胞に及ぼす変動強磁界の影響

副腎髄質細胞は交感神経節後線維の性質をもち、アセチルコリン投与によりカテコールアミン(アドレナリン等)の分泌を引き起こす。副腎より髄質のみを取り出し、コラゲ

ナーゼ処理により細胞を個々に分離し、3~5日間炭酸ガス培養装置にて培養したのち、血清を含まない実験液(pH7.4)に交換した。これを2時間最大1.5Tで3秒間隔で変動する磁界に曝露した。ただし、細胞を付着培養したプラスチックシャーレは、銅製の特殊温度保持装置に挿入し、この装置ごと磁界内に曝した。

クロマフィン細胞を磁界に2時間曝露すると、Western blotにてF-actin量の低下およびG-actinの上昇が有意に測定された。また、phalloidinを用いた蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察すると、明らかに対照群に比較し、磁界作用群には分布密度の低い部分があり、平面的には細胞の中央部に見える。また、アクチン蛋白質の重合促進剤jasplakinolideの添加は、この蛋白質の全体的な密度の増加を示し、同阻害剤cytochalasin Dの添加はアクチン蛋白質の乱れた分布を示した。磁界作用群への重合促進剤の添加は、分布密度の増加細胞と低下細胞の両観察像が見られた。

この細胞を低浸透圧溶液に曝すと、初期の細胞容積の増加が急速に見られ、その後次第に低浸透圧溶液への置換以前のレベルに回復した。即ち多くの細胞で見られるregulatory volume decrease(RVD)がこの細胞でも測定された。この測定は蛍光物質calcein-AMをこの細胞に負荷させ、細胞内に流入したこの化合物の蛍光強度を用いARGUS20CA system(Hamamatsu Photonics社製)により測定された。

この容積調節機構が生じている間は、アクチン蛋白質の重合、脱重合が短時間内に生じることがEhrlich ascites tumor cellsにより報告されており、この現象がこの細胞でも生じることを証明すると共に、磁界曝露がアクチンの重合および脱重合反応にどのように影響するかを調べた。

この容積変化は、塩化バリウムやDIDS添加により、低浸透圧溶液への置換後のピーク値(最大値)になった後、置換前の容積に戻る現象が遅延するかあるいはこのピーク値が維持され容積調節機構が見られなくなることがわかった。即ち他の多くの細胞で観察・報告されたRVDが観察され、さらにこのピーク値から正常値に戻る機構は $Ca^{2+}$ -依存性 $K^{+}$ や $Cl^{-}$ チャンネルの関与が示唆された。

2時間上記磁界を曝露させ、次に顕微鏡上で等浸透圧溶液で細胞容積を測定した後、低張溶液に交換した後もこの容積の測定を続けた。磁界曝露群の細胞は低張溶液交換後のピーク値が2倍に増加し、液交換以前に回復する時間も延長した。

次に形態変化を起こさせることが報告されているactin蛋白質に注目し、形態変化でも示したactin重合阻害剤cytochalasin Dを前もって添加しておくことで磁界作用群と同様にピ

ーク値の上昇と初期値への回復が遅延した。しかし、latrunculin Bの添加はピーク値は変わらないが、このピーク値は以後維持し、初期値には10分間では戻らなかった。

次にこれらの細胞容積変化あるいはこれに伴う細胞形態変化を誘導すると見られるF-actin量の時間的変化を分光蛍光法にて定量した。染色剤には、Rhodamin-phalloidinを使用した。磁界曝露によりF-actin量は有意に低下しているが、このレベルから低張液に交換し、10秒後、15分後にサンプリングした。結果は、対照群、cytochalasin Dおよび曝磁群とも10秒後には急速に低下したが、15分後対照群では同じ値を保持あるいは増加に転じる傾向にあった。しかし、cytochalasin Dおよび曝磁群では低下を続けた。しかし、latrunculinは低い一定値を保持した。

上記に示した細胞内Ca<sup>2+</sup>依存性イオンチャネルへの磁界の影響を調べた。すなわち、Ca<sup>2+</sup>濃度への影響を介してこれらイオンチャネル活性への阻害は容積調節機構への影響を示す。しかし、細胞内Ca<sup>2+</sup>は低張液交換により一過性にその濃度が上昇したが、磁界作用群と対照群との間にはピーク値に有意な差はなく、磁界のCa<sup>2+</sup>濃度変化に対する阻害作用によるものではない可能性が高い。磁界作用群が対照群に比較して低いが、この程度のCa<sup>2+</sup>濃度の低下は、イオンチャネル活性に影響しないことは以前に報告している。

Alexa fluor 488 phalloidinによる蛍光染色を行い、細胞容積調節中のactin蛋白質の形態変化について共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。F-actinは対照群では10秒後に低下したactinが増加に転じ、初期像より密度が高いようにも見える。磁界作用群では低下が著しく、対照群に比較し、回復度が弱いように観察された。cytochalasin D添加は磁界作用群と同様にアクチン量の回復が見られなかった。

以上の結果から、磁界の容積調節機構への影響はアクチン蛋白質の重合、脱重合反応に影響を及ぼすために生じることを示唆する。

## (2) 高周波電磁波の培養細胞に及ぼす影響

最近、電磁波のエネルギーを使って情報伝達機器が開発・改良され、急速に社会に氾濫し、ラジオ電磁波の健康に及ぼす可能性に対する関心が高まってきた。この研究の目的は神経伝達物質により誘導される細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加に対し、438.5MHz電磁波照射の効果を調べた。

ウシ副腎髄質クロマフィン細胞は酵素的に分散させ、プラスチックシャーレにおいたカバーガラス上に培養させた。細胞がカバーガラス上に接着した後2-6日間培養した。電磁波は電磁波発生装置により発生させたが、この電磁波は438.5 MHzであった。この装置の出力はワットメーターで測定した。

細胞は0.5、1および2時間電磁場内で曝露し、その電場強度は26.6V/mおよび54.6V/mであった。電磁波曝露後の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加は、アセチルコリン添加および高K<sup>+</sup>溶液置換の2つの方法により促進させた。Ca<sup>2+</sup>濃度測定は、Fura-2を使用し、ARGUS-50CA装置にて測定した。

いずれの実験とも、アセチルコリン添加、高K<sup>+</sup>液置換直後より細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が見られ、ピーク後は次第に低下しこれらの操作以前のレベルに回復する経過をたどった。しかし、電磁波曝露群、対照群の間にはCa<sup>2+</sup>濃度のピーク値、回復に要する時間には統計的に有意な差は見られなかった。

すなわち、438.5MHzの電磁波のクロマフィン細胞への曝露は細胞内Ca<sup>2+</sup>増加機構には影響を及ぼさないことがわかった。

## 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 3 件)

- (1) 池原敏孝、庄野正行、吉崎和男、木内陽介、宮本博司、白石泰郎、西迫寛隆、川添和義、水口和生、山口久雄  
ウシ副腎髄質由来細胞の容積調節機構におよぼす強い変動磁界の影響  
マグネティックス研究会資料、MAG—07—78、11—15、2007

- (2) Yagi, N., Mori, M., Hamamoto, A., Nakano, M., Akutagawa, M., Tachibana, S., Takahashi, A., Ikehara, T. and Kinouchi, Y.  
Sterilization using 365 nm UV-LED  
Proceeding of the 29<sup>th</sup> Annual International Conference of the IEEE EMBS, 5841-5844, 2007

- (3) Soda, A., Ikehara, T., Kinouchi, Y., and Yoshizaki, K.  
Effects of exposure to an extremely low frequency-electromagnetic field on the cellular collagen with respect to signaling pathways in osteoblast-like cells.  
Journal of Medical Investigation,, 55(3,4), 267-278, 2008

[学会発表] (計 10 件)

- (1) Yagi, N., Mori, M., Hamamoto, A., Nakano, M., Akutagawa, M., Tachibana, S., Takahashi, A., Ikehara, T., Kinouchi, Y. Sterilization using 365 nm UV-LED  
29<sup>th</sup> Annual international Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, August 23-26, 2007. Lyon, France

- (2) Higasiyama, Y., Ikehara, T., Kinouchi, Y., Akutagawa, M., Yoshizaki, K., Morimoto, M., Inoue, T.  
Effects of 438.5 MHz electromagnetic fields on transient increase in intracellular  $Ca^{2+}$  in adrenal chromaffin cells. International Conference on Magneto-Acience: Magnetic Field Effects in Chemistry, Physics, Biology and Related Phenomena, Hiroshima, 2007, 11, 13
- (3) 池原敏孝, 川添和義, 山口久雄, 木内陽介, 宮本博司  
低浸透圧溶液中のウシ副腎髄質由来細胞の容積調節に及ぼす変動磁界の影響  
日本磁気歯科学会第17回学術大会、東京、平成19年11月17日
- (4) Ikehara, T., Nishisako, H., Shiraiishi, T., Yamaguchi, H., Shono, M., Kitamura, M., Kawazoe, K., Minakuchi, K., Yoshizaki, K., Kinouchi, Y.  
Effects of a time-varying magnetic field on bovine adrenal chromaffin cells. 22<sup>nd</sup> SICE Symposium on Biological and Physiological Engineering, Jan, 13-14, 2008 China, Harbin
- (5) Yagi, N., Mori, M., Hamamoto, A., Nakano, M., Akutagawa, M., Tachibana, s., Takahashi, A., Ikehara, T., Kinouchi, Y.  
Development of a tank-type sterilization device using 365 nm UVA-LED.  
22<sup>nd</sup> SICE Symposium on Biological and Physiological Engineering, Jan, 13-14, 2008 China, Harbin
- (6) 池原敏孝, 白石泰郎, 西迫寛隆, 川添和義, 水口和生, 山口久雄, 北村光夫, 庄野正行, 吉崎和男, 木内陽介, 宮本博司  
培養ウシ副腎髄質クロマフィン細胞の容積調節中のアクチン蛋白質に及ぼす変動磁界曝露の影響  
第85回日本生理学会大会、平成20年3月25-28日  
Effects of a time-varying magnetic field on actin protein during volume regulation of bovine adrenal chromaffin cells.  
Ikehara, T., Shiraiishi, T., Nishisako, H., Kawazoe, K., Minakuchi, K., Yamaguchi, H., Kitamura, M., Shono, M., Yoshizaki, K., Kinouchi, Y., Miyamoto, H.  
85<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan  
March 25-27, 2008
- (7) Ikehara, T., Shiraiishi, T., Nishisako, H., Yamaguchi, H., Kitamura, M., Shono, M., Yoshizaki, K., Kawazoe, K., Minakuchi, K., Kinouchi, Y., Miyamoto, H.  
Effects of time-varying magnetic field on regulatory volume decrease in bovine adrenal chromaffin cells.  
30th Annual meeting of the Bioelectromagnetics Society  
2008. 6. 11 San Diego, USA
- (8) Yagi, N., Mori, M., Hamamoto, M., Lian, X., Nakano, M., Akutagawa, M., Tachibana, S., Takahashi, A., Ikehara, T., Kinouchi, Y.  
Effects of 365nm UVA-LED on bacteria.  
30th Annual meeting of the Bioelectromagnetics Society  
2008. 6. 12 San Diego, USA
- (9) Higashiyama, Y., Ikehara, T., Kinouchi, Y., Akutagawa, M., Yoshizaki, K., Morimoto, T., Inoue, T.  
Effects of micro wave electromagnetic fields (438.5MHz) on transient increase in intracellular  $Ca^{2+}$  in bovine adrenal chromaffin cells.  
30th Annual meeting of the Bioelectromagnetics Society  
2008. 6. 12 San Diego, USA
- (10) 池原敏孝, 川添和義, 木内陽介, 宮本博司  
ウシ副腎髄質細胞の容積調節機構に及ぼす変動磁界の影響  
第18回日本磁気歯科学会大会 2008年10月25日埼玉県さいたま市
- [図書] (計 0件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0件)
- 取得状況 (計 0件)
- [その他]
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
池原 敏孝 (IKEHARA TOSHITAKA)  
安田女子大学・薬学部・教授  
研究者番号: 40111033
- (2) 研究分担者  
木内 陽介 (KINOUCHI YOHSUKE) (19年度)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授  
研究者番号: 80035807  
高橋 章 (TAKAHASHI AKIRA) (19年度)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
石澤 啓介 (ISHIZAWA KEISUKE) (19年度)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：60398013

森本 敏文(MORIMOTO TOSHIFUMI) (19年度)

詫間電波工業高等専門学校・教授

研究者番号：30044689

(3)連携研究者

木内 陽介 (KINOUCHI YOHSUKE) (20年度)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：80035807

高橋 章 (TAKAHASHI AKIRA) (20年度)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

石澤 啓介 (ISHIZAWA KEISUKE) (20年度)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：60398013

森本 敏文(MORIMOTO TOSHIFUMI) (20年度)

詫間電波工業高等専門学校・教授

研究者番号：30044689