

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：82629

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12875

研究課題名(和文)強度と勾配を統制した磁場条件による造骨細胞系への影響評価

研究課題名(英文)Evaluation of magnetic field effects on osteoblastic cell lines under controlled magnetic conditions

研究代表者

山口 さち子 (Sachiko, Yamaguchi-Sekino)

独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所・環境計測研究グループ・上席研究員

研究者番号：30548954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、強度と勾配を統制した磁場環境の下で実験を行うことで、造骨細胞系の磁場影響についてこれら二要素の整理を目的とするものである。マウス骨芽細胞に中程度の静磁場を磁界勾配を制御した条件で21日間ばく露したところ(磁束密度：75～239 mT、磁気力：0.95～4.75 T<sup>2</sup>/m)、培養開始14、21日目においてばく露群では分化後期マーカーのオステオカルシンの発現が抑制されており、かつその効果は磁気力依存性であった。細胞増殖及び分化前期マーカーのアルカリフォスファターゼには影響はなかった。これら中程度の磁界ばく露では磁気力が主として効果し、骨芽細胞の分化遅延が生じている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が明らかにした中程度静磁場はMRI装置など静磁場の既存リソースの中にも存在するため、造骨細胞系の磁場影響について強度と勾配の二要素の整理がなされるならば、安全性情報として資するだけでなく、静磁場を細胞処理に積極的に応用するための手立てとなり得る。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the effects of moderate static magnetic fields (moderate SMFs) with the high field gradients on proliferation and differentiation of mice osteoblast MC3T3 cells to clarify whether the magnetic field or the force contribute to the biological effect. Cells were exposed to SMFs of 75 to 239 mT with the field gradient (0.95 to 4.75 T<sup>2</sup>/m). No significant effect was observed in cell proliferation by moderate SMFs exposure. The early biomarker of osteogenesis, alkaline phosphatase, was not affected by moderate SMF exposure. However, Osteocalcin productions, which is known as a later biomarker of differentiation of osteoblasts, were significantly suppressed in the exposure group with the correlation between exposed magnetic field levels, suggesting that the delay in differentiation occurred in SMF exposed cells.

研究分野：医用工学

キーワード：静磁場 磁場勾配 骨芽細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在までに骨芽細胞や分化誘導したラット間葉系幹細胞 (MSCs) など造骨細胞系では数十 mT の中程度静磁場により細胞増殖や骨芽細胞関連マーカーの上昇が報告されている[1][2]。しかしながら、申請者らが均一度の高い 7T の磁場環境で MSCs のばく露 (3 hrs/day、10 days) を行った結果、細胞上清及びラット移植後の骨片中のオステオカルシン (OC) 発現量及びアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性に影響は観察されず[3]、同一細胞系であっても静磁場強度に応じた応答が存在する可能性が示唆された。加えて、強勾配の静磁場も細胞に磁場効果をもたらすことが報告されており[4]、静磁場影響は強度と勾配の二要素が影響する可能性がある。しかしながら、中程度静磁場のリソースはネオジム磁石が用いられることが多いため不均一性が高く、影響報告も磁場強度の報告に主体が置かれるため勾配まで明記のある報告は非常に少ない。このため、現状では影響の本質となる磁場条件が強度であるのか勾配であるのか明らかでない。中程度静磁場は MRI 装置など静磁場の既存リソースの中にも存在するため、造骨細胞系の磁場影響について強度と勾配の二要素の整理がなされるならば、安全性情報として資するだけでなく、静磁場を細胞処理に積極的に応用するための手立てとなり得る。

### 2. 研究の目的

本研究では、磁場強度と勾配を統制した磁場環境の下で実験を行うことで、造骨細胞系の磁場影響について強度と勾配の二要素の整理を行う。現在までに造骨細胞系への潜在的な磁場影響が示されているものの条件の整理がなされていないことから、本研究を実施し影響の本質の解明や試適条件を探索することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ①文献調査

現在までに造骨細胞系への潜在的な磁場影響が示されているものの条件の整理がなされていないことから、関連文献より影響のあるばく露条件の抽出を試みた。PubMed 及び EMF-net の 2 つのデータベースを用い、検索条件は(((static magnetic field) AND ("2004/01/01"[Date - Publication] : "3000"[Date - Publication]))) OR (bone)) OR (osteoblast) とした。

#### ②磁束密度と磁気力を統制した条件における、マウス骨芽細胞への影響評価

非磁性化した CO<sub>2</sub> インキュベーター内において、SmCo 磁石上 (W60 mm×H60 mm×D9 mm) に 24 well plate を設置し、5.0×10<sup>4</sup> cells/well で調整し播種した MC3T3 細胞 (RCB1126、理研 BRC) を 21 日間培養した。培養にはα-MEM に骨分化誘導用サプリメント (MK430、TAKARA) の Ascorbic acid、Hydrocortisone、β-glycerophosphate を添加した分化誘導培地を用いた。

培養細胞におけるばく露磁束密度を 3 軸ホール素子磁界計 (THM1176、Metrolab 社) を使用し測定した。測定は 24 well plate の各ウェルについて中央と 4 側面の 5 点/1 ウェル (9.3 mm 間隔) と、ウェル外周部分について計 165 点の測定を行った。細胞培養は底面でのみ行われるため上下方向の測定は行わなかった。得られた結果を Matlab にて計算し、ウェル底面における磁束密度 (mT) および磁気力 (T<sup>2</sup>/m) を算出した。

細胞はばく露群、sham 群 (磁界ばく露なし、分化誘導あり)、コントロール群 (磁界ばく露なし、分化誘導なし) の 3 群に分け、プレート 1 をばく露群として SmCo 磁石上に設置した。設置には治具を用い磁石とプレートが移動しないようにした。プレート 2 に sham 群とコントロール群を播種し、プレート 1 を設置したのと同じインキュベーターにおいて、磁束密度が十分減衰した場所に設置した。培養 14 日目に 1 度目の培地のサンプリングを行い、21 日目に 2 度目のサンプリングと Cell counting kit-8 を用いて細胞増殖を吸光度法により測定した。サンプリングした培地は骨芽細胞の分化前期のマーカーとしてアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase : ALP) と分化後期のマーカーとしてオステオカルシン (osteocalcin : OC) に着目し、ELISA 法により培養上清中の活性及びタンパク量に注目した。ALP は BioAssay Systems 社の QuantiChrom Alkaline Phosphatase Assay Kit (DALP-250) を用い活性を測定し、オステオカルシンは Takara の Mouse Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (MK127) を使用し定量した。

### 4. 研究成果

#### ①文献調査

現在までに造骨細胞系への潜在的な磁場影響が示されているものの条件の整理がなされていないことから、関連文献より影響のあるばく露条件の抽出を試みた。PubMed 及び EMF-net の 2 つのデータベースより、2004 年以降の静磁界に関する 139 件の論文を抽出し、うち 41 件について評価を行った。その結果、静磁界ばく露のみである場合数十～数百 mT の磁束密度の条件で影響が検出されていたが報告は限定的であった。このため、中程度静磁場の影響について研究内容を補完するため、強度 (磁束密度) 条件は 400 mT 程度までとすることとした。

②磁束密度と磁気力を統制した条件における、マウス骨芽細胞への影響評価

計算された磁束密度および磁気力を図1に示す。磁束密度は75–239 mT（平均:  $181 \pm 76$  mT）、磁気力は0.95–4.75 T<sup>2</sup>/m（平均:  $2.85 \pm 1.47$  T<sup>2</sup>/m）であった。磁束密度は磁石端面で最も高く、ばく露群のうちB2、B5、C2、C5 ウェルのサンプルは最大高い磁束密度上で培養されていた。また、同様の地点で磁気力も高いため、これらサンプルは高磁界かつ高勾配（高磁気力）上で培養されていた。一方でB3、B4、C3、C4 ウェルのサンプルは中程度で均一度が比較的高く磁気力が低い条件で培養されていた。残りのサンプルについては、磁束密度及び磁気力は低い条件であった。これらの結果から、ばく露群のサンプルは①高磁界・高勾配（磁気力）（B2、B5、C2、C5）、②中程度の磁界、低勾配（B3、B4、C3、C4）、③低磁界、低勾配（B1、B6、C1、C6）の3群に分けることが可能であった。

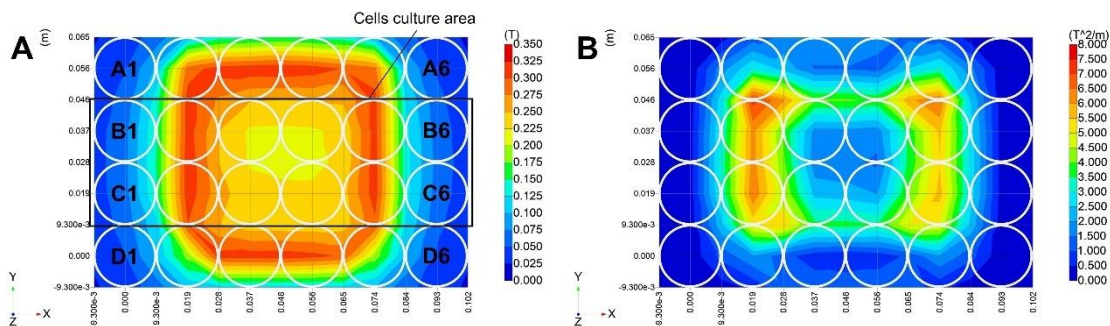


図1 24 well plate での細胞培養における、(A) 磁束密度及び (B) 磁気力。

続いて、培養開始より21日後にWST-8により細胞増殖を比較した結果、ばく露群とSham群との間に差は観察されなかった ( $99.49 \pm 4.38\%$  v.s. sham group,  $p=1.000$ , ANOVA and subsequent Bonferroni tests, 図2A)。しかしながら、磁束密度と吸光度 ( $OD_{450}$ ) との間に中程度の正の相関が観察された ( $r=0.631$ ,  $p=0.028$ , Pearson's correlation coefficient)。ばく露群を磁束密度及び勾配で3群に分け (①高磁界・高勾配、②中程度の磁界、低勾配、③低磁界、低勾配) 分析をしても、3群間で統計的有意差は観察されなかった (図2B)。

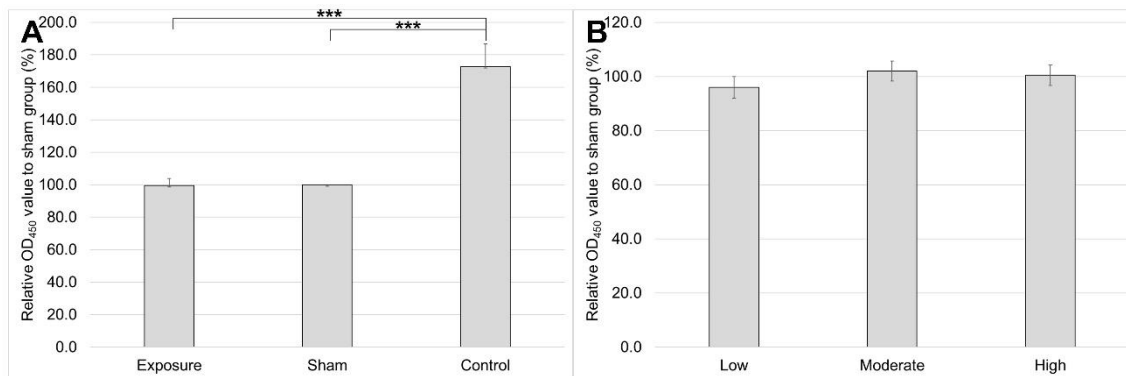


図2 培養開始21日目における細胞増殖アッセイ。(A) ばく露条件別の比較、(B) ばく露群内での比較。\*\*\* :  $p<0.001$ 、ばく露群 (N=12)、Sham群 (N=4)、コントロール群 (N=4)。

培養開始より14日目及び21日目の培地中のALP活性及びOCを測定した結果を図3に示す。ALP活性は培養開始14日目、21日目いずれにおいてもばく露群とsham群との間で差は観察されなかった。一方で、OCについては、14、21日目いずれにおいてもばく露群はsham群より有意に発現が抑制されており ( $50.1\%$  (Day 14) and  $50.3\%$  (Day 21) v.s. sham group,  $p<0.001$ , ANOVA and subsequent Bonferroni tests)、かつその効果は磁束密度依存的に抑制効果が出ていた (図4)。しかしながら、ばく露群を磁束密度及び勾配で3群に分け分析をすると、14日目のOC発現量について中程度の磁界、低勾配で他2群と比較して低下傾向があったが、統計的有意差は観察されなかった。表1に細胞増殖、ALP活性、OC発現量と磁束密度及び磁気力との相関を示す。細胞増殖及び培養開始14日目におけるOC発現量と磁気力との間に相関が観察された。

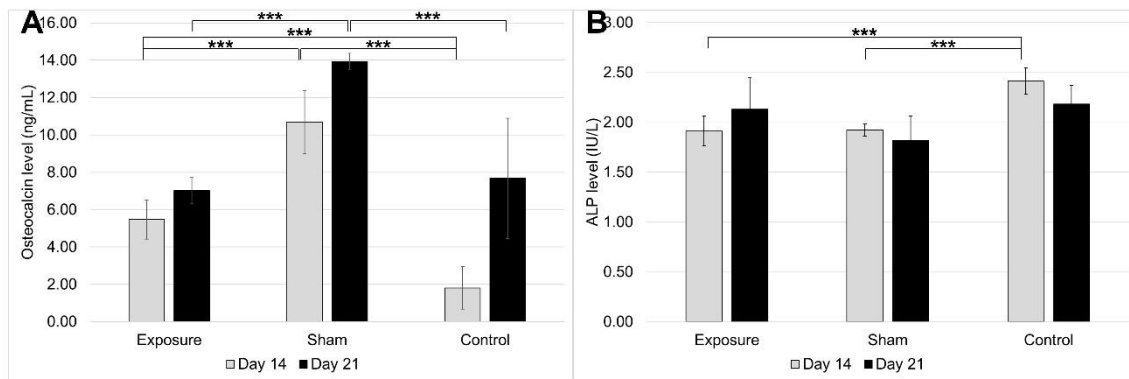


図3 培養開始14日目及び21日目における (A) OC 発現量及び (B) ALP 活性。  
\*\*\* :  $p < 0.001$ 、ばく露群 (N=12)、Sham 群 (N=4)、コントロール群 (N=4)。

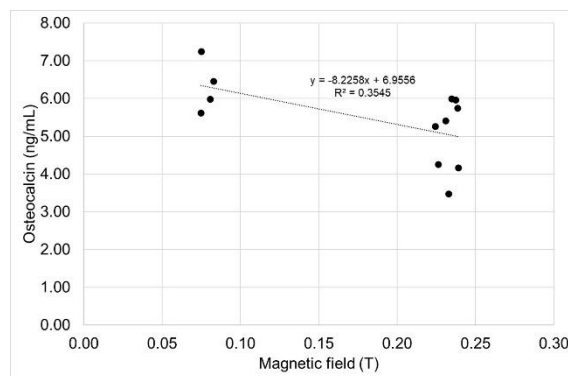


図4 培養開始14日目のOC発現量における磁束密度との相関。\* :  $p < 0.05$ 、N=12

		Magnetic field (T)	Magnetic force (T <sup>2</sup> /m)
Cell proliferation	correlation coefficient	0.631*	0.534
	P	0.028	0.074
Osteocalcin (Day 14)	correlation coefficient	-0.599*	-0.451
	P	0.040	0.141
Osteocalcin (Day 21)	correlation coefficient	-0.247	-0.205
	P	0.439	0.523
ALP (Day 14)	correlation coefficient	-0.269	-0.409
	P	0.398	0.187
ALP (Day 21)	correlation coefficient	0.256	0.199
	P	0.422	0.536

OCは骨芽細胞の分化の後期過程で発現することから、14日目、21日目のOC群でばく露群で観察された発現抑制は、中程度の磁界ばく露によって分化の遅延が生じていると考えられる。また、14日目のOC発現量についてはその効果には磁束密度依存的な作用が観察されたことから(図4)、ばく露群を3群に分け解析すると、磁束密度が比較的高く磁界勾配の低い群で発現抑制傾向があったが、磁気力とは統計的有意差は観察されなかった。これらの結果から、骨芽細胞への中程度の磁界ばく露では磁気力が主として効果し、骨芽細胞の分化遅延が生じている可能性が示された。

- [1] Chuo et al., J Hard Tissue Biol 2013; 22(2):227-232.
- [2] Kim et al., Bioelectromagnetics 2015;36(4):267-276.
- [3] Yamaguchi-Sekino et al., Bioelectromagnetics, accepted.
- [4] Vergallo et al., PLoS One. 2014 25;9(11):e113530.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sachiko Yamaguchi-Sekino and Masaki Sekino
2. 発表標題 Effects of moderate intensity magnetic field and magnetic force on the proliferation of bone cells
3. 学会等名 BioEM2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sachiko Yamaguchi-Sekino and Masaki Sekino
2. 発表標題 Effects of Magnetic Field and Magnetic Force on Proliferation and Differentiation of Osteoblast cells
3. 学会等名 Intermag2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	赤羽 学  (Akahane Manabu)  (00418873)	奈良県立医科大学・医学部・准教授   (24601)	2019年度までの分担研究者。それ以降は分担研究者なし。

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------