

機関番号：32414

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：21700562

研究課題名（和文）

非温熱下における電磁波障害の分子生物学的解析

研究課題名（英文）

Molecular biological analysis of microwave irradiation under a non-thermal condition

研究代表者

井上 茂樹（INOUE SHIGEKI）

目白大学・保健医療学部・助教

研究者番号：40531447

研究成果の概要（和文）：私は、電磁波照射による PC12 細胞と線維芽細胞の影響を調査した。電磁波照射により神経突起誘導は、対照群よりも約 10 倍高い結果であった。電磁波照射により PC12m3 細胞は、p38 MAPK 活性化が増加した。一方、様々な刺激による電磁波照射は p38 MAPK 活性化がある PC12 親細胞の毒性を引き起こした。これらの結果から、p38 MAPK が PC12m3 細胞の生存に影響することが示唆された。PC12m3 細胞において電磁波照射は、CREB 系路を介して神経突起誘導を引き起こす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：I investigated damage and differentiation of PC12 cells and fibroblast cells caused by microwave irradiation. The frequency of neurite outgrowth induced by 2.45 GHz (200 W) of microwave irradiation was approximately 10-fold greater than that in non-irradiated control cells. Microwave treatment of PC12m3 cells resulted in an increased level of p38 MAPK activity. On the other hand, microwave irradiation had a toxic effect on PC12 parent cells with normal levels of p38 MAPK activity induced by various stimuli. These findings indicate that p38 MAPK is responsible for the survival of PC12m3 cells and might induce neurite outgrowth via a CREB signaling pathway in PC12m3 cells subjected to microwave irradiation.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：培養細胞、電磁波障害、神経突起形成率、三次元様増殖、細胞生存率

1. 研究開始当初の背景

リハビリテーションにおける物理療法は、温熱、寒冷、電気、光線、あるいは浮力や牽引力などの外力をはじめとする様々な物理的ストレスに対する生体の反応を、主として筋・骨格系障害の治療に応用するものである。極超短波ジアテルミーは、電磁波刺激で発生

する温熱療法であり、医療の中で広く用いられている。

近年、情報社会により携帯電話などの通信用電波として極超短波の使用は増加し、電磁波における健康への影響が危惧されている。国際的に使用される GSM (global system for mobile communication) 携帯電話は、217Hz

の律動的な周波数で作動する電磁波刺激である。この電磁波における脳への被曝は、*in vivo*と*in vitro*の実験において、シグナル伝達経路と神経伝達物質系に影響を与えるという報告がある。医療においても情報社会により電磁界の健康に及ぼす影響が危惧されている。また、医療施設では電磁界の影響を受けやすい医療機器が存在し、これらが誤作動を起こすことが懸念されている。リハビリテーションにおいては、超短波や極超短波等の電磁波を発生する物理療法機器を使用するため、マイクロ波治療器等による生体への影響が危惧され、基礎研究の成果が求められる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、基礎研究の成果が求められる電磁波障害に対する影響について神経細胞や線維芽細胞を用いて、われわれが開発した非温熱下による電磁波障害検出システムを使用し、電磁波障害の最小の量（閾値）や細胞死を引き起こす量（致死量）、また閾値と致死量の範囲で増殖活性や神経突起形成が高まる量（最適値）を検証することにある。つまり、その効果（形成率）および影響（細胞死）を見出し、そのメカニズムについて検証を行う。

3. 研究の方法

培養細胞を用いて、われわれが開発した非温熱下による電磁波障害検出システムを使用し、刺激強度や刺激時間および頻度を変えることにより、電磁波障害の最小の量（閾値）や細胞死を引き起こす量（致死量）、さらに閾値と致死量の範囲で三次元様増殖や神経突起形成が高まる量（最適値）を三次元様増殖や神経突起形成率および細胞生存率から検証を行う。

効果の判定として、神経細胞は7日間培養後、神経突起の長さや細胞数を測定し神経突起形成率を算出する神経突起形成率、三次元様増殖形成の割合は、フラスコに存在するハイドロキシアパタイト顆粒100個の内、その周囲に200 μ m以上の三次元様増殖をいくつあるかを数え $X = (\text{三次元数}/100) \times 100$ として算出する三次元様増殖形成率を用いた。また、1個の細胞が増殖を繰り返し、細胞群を形成するものを生きていると判定するコロニー形成法とトリパンブルー染色により細胞死と判定する分染法による細胞生存率の検出を行う細胞生死判別法を用いた。

培養細胞は、PC12細胞、PC12m3細胞、ヒト線維芽細胞、マウス線維芽細胞を用いた。マイクロ波治療器は、OG技研製(microthermy ME-7200)を用いてフラスコ底面から垂直方向に10cmとする。非温熱下による電磁波刺激の影響をみるため、TAITEC社製卓上型振と

う恒温槽(personal-11・SD set)内に貯水した温水をEYELA社製定量送液ポンプ(RP-1000型)で環流し、常時培地内を37℃に保てるよう独自に実験装置を考案した。非温熱下による電磁波刺激の強度、時間、頻度は、刺激強度として0W～200W、刺激時間は10分～1時間、刺激頻度が1回/1週間～7回/1週間とした。

電磁波刺激の細胞内メカニズムの検証は、活性化したp38 MAPKと転写因子の検出は免疫ブロット法によって行なう。方法は、PC12細胞または線維芽細胞100万個を25cm²のフラスコに蒔き、5日間培養後無血清下で神経伝達物質処理を行い酵素活性の計測を行なう。測定は細胞から全蛋白質を抽出し10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後ポリビニルメンブレンにブロットした。ブロットした蛋白質はホスホp38/p38 MAPキナーゼまたは転写因子の抗体を作用させてリン酸化したp38 MAPキナーゼまたは転写因子の検出を行なう。

4. 研究成果

(1) 三次元様増殖形成率は、対照群に対して200W 10分で1.1倍、200W 30分が2.4倍であった(図1)。ヒト線維芽細胞とハイドロキシアパタイトを混合培養し電磁場刺激を与えると三次元様増殖が促進された。

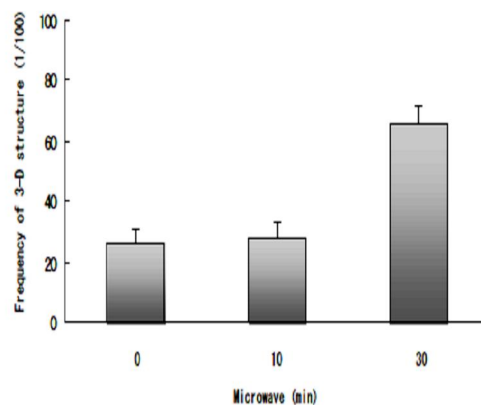


図1 電磁波照射(200W)における三次元様増殖形成率

(2) 神経突起の誘導は、対照群に対して100Wにおいてはあまり影響を認めなかった(図2)。一方、対照群に対して200W 30分では約10倍高い結果となった(図3)。PC12m3細胞に電磁波刺激を与えると神経突起形成が誘導された。

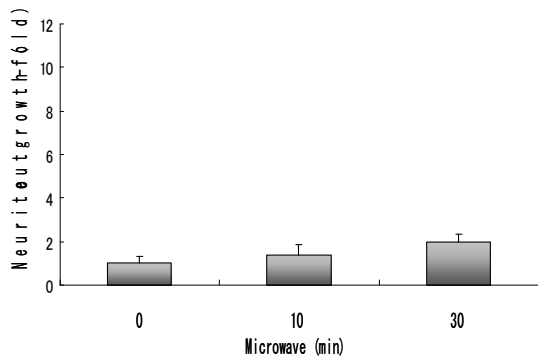


図2 電磁波照射(100W)による神経突起誘導

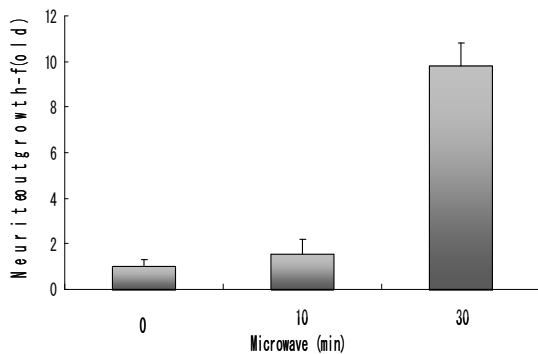


図3 電磁波照射(100W)による神経突起誘導

(3) コロニー形成法を用いた細胞生存率は、200W 30分間群でPC12m3細胞が89.8%、PC12細胞は35.7%であった(図4)。PC12m3細胞では僅かの細胞ダメージがあり、PC12細胞では毒性となったことが考えられた。

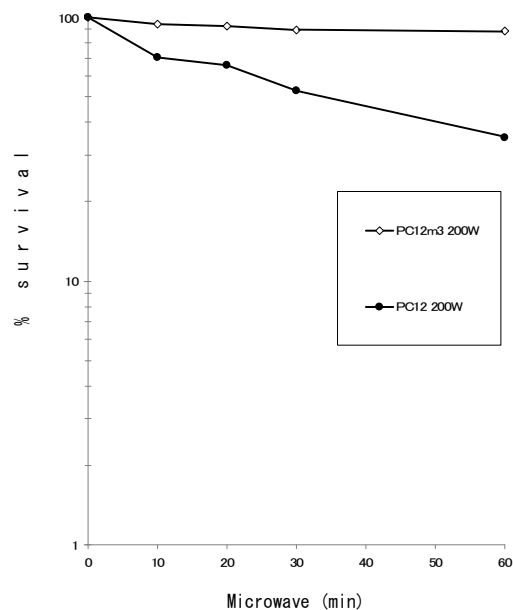


図4 電磁波照射(200W)による細胞生存率

(4) 免疫ブロット法による p38 MAP キナーゼと転写因子の検出は、PC12m3 細胞において 200W 30 分の電磁波刺激の強度と照射時間により、p38 MAPK の活性化と CREB の発現がみられた(図5)。PC12m3 細胞において電磁波照射は、CREB 系路を介して神経突起誘導を引き起こす可能性が示唆された。細胞内シグナル伝達系が活性化し、僅かの細胞ダメージを与え、その応答により神経突起の形成を促進したものと推察された。

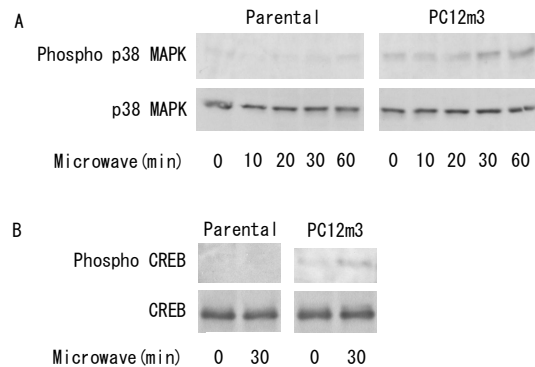


図5 電磁波照射による p38 MAP キナーゼの活性化と CREB の発現

(5) 電磁波を発生する医療用の物理療法機器と同程度の出力、周波数での影響を検討した研究は極めて少なく、電磁波刺激の最適有効量を決定するための基礎となり、電磁波刺激の影響を分子生物学的に示すための重要な知見になるとと思われる。電磁波刺激の新しい知見を細胞内メカニズムより分子生物学的に解明することで、物理療法の適応範囲の拡大に繋がるものと考えられた。

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4件)

① Fukumi Hiragami, Hirotohi Motoda, Toshiaki Takezawa, Chiyuki Takabayashi, Shigeki Inoue, Yuji Wakatake, Yoshio Kano, Heat Shock - Induced Three - Dimensional-Like Proliferation of Normal Human Fibroblasts Mediated by Pressed Silk, International Journal of Molecular Sciences, 査読有、第12巻10号、2009、4963-4976

② Murai H, Hiragami F, Kawamura K, Motoda H, Koike Y, Inoue S, Kumagishi K, Ohtsuka A, Kano Y, Differential response of heat - shock-induced p38 MAPK and JNK activity in PC12 mutant and PC12 parental cells for differentiation and apoptosis, Acta Med

Okayama、査読有、第64巻1号、2010、55-62
③ 河村顕治、加納良男、片岡光、山下智徳、梅居洋史、酒井孝文、井上茂樹、体幹から足部を環状に閉鎖固定するベルトによるCKC足部出力方向制御、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要、査読無、第11号、2010、17-20
④ 井上茂樹、瀬崎達雄、平上二九三、河村顕治、骨粗鬆症患者の体幹筋力における脊柱変形および骨折との関連、総合リハビリテーション、査読無、第38巻10号、2010、996-997

〔学会発表〕(計10件)

- ① 井上茂樹、元田弘敏、若竹雄治、日高正巳、平上二九三、培養細胞を用いた非温熱下による電磁波刺激の影響、第44回日本理学療法学会大会、2009年5月28日、東京都
- ② 酒井孝文、河村顕治、宮地司、梅居洋史、井上茂樹、横山茂樹、足圧解析機能を有したトレッドミルによる健常高齢者の歩行分析、第44回日本理学療法学会大会、2009年5月30日、東京都
- ③ 久我宜正、武田祐樹、金丸幸、井上茂樹、若竹雄治、齋藤圭介、平上二九三、テキストマイニングの手法を用いた高齢者の脳卒中リハビリテーションにおける特性と構造化に関する基礎的検討、第44回日本理学療法学会大会、2009年5月29日、東京都
- ④ 若竹雄治、元田弘敏、井上茂樹、平上二九三、正常ヒト細胞における温熱療法効果の分子生物学的検討、第44回日本理学療法学会大会、2009年5月30日、東京都
- ⑤ 井上茂樹、元田弘敏、若竹雄治、日高正巳、平上二九三、培養細胞における温熱刺激と電磁波刺激の効果、第17回日本物理療法学会大会、2009年10月18日、兵庫県
- ⑥ 井上茂樹、瀬崎達雄、平上二九三、河村顕治、小出尚志、骨粗鬆症患者の体幹筋力における脊柱変形および骨折との関連、第29回中国四国リハビリテーション医学研究会2009年12月6日、岡山県
- ⑦ 井上茂樹、瀬崎達雄、平上二九三、河村顕治、小出尚志、骨粗鬆症の脊柱変形における体幹筋力および骨折との関連、第9回倉敷骨粗鬆症談話会、2009年11月13日、岡山県
- ⑧ 井上茂樹、元田弘敏、若竹雄治、日高正巳、平上二九三、培養細胞を用いた非温熱下による電磁波刺激の影響第16回岡山県理学療法士学会2010年3月14日、岡山県
- ⑨ 中川昌幸、橋本直樹、元田弘敏、井上茂樹、平上二九三、伸展刺激が培養細胞に及ぼす影響 MyoD、Myogenin の発現パターンの解析、第45回日本理学療法学会大会、2010年5月27日、岐阜県
- ⑩ 酒井孝文、河村顕治、山下智徳、梅居洋史、松尾高行、井上茂樹、横山茂樹、足圧解析機能を有したトレッドミルによる健常高齢者の歩行分析(第2報)、第45回日本理学

療法学会大会、2010年5月28日、岐阜県

〔図書〕(計0件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

2009年5月28-30日まで東京都にて開催された第44回日本理学療法学会大会において奨励賞を受賞した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 茂樹 (INOUE SHIGEKI)
目白大学・保健医療学部・助教
研究者番号：40531447