



Title	培養細胞にたいする傾斜静磁場の生物学的効果と ⁶⁰ Coガンマ線との併用効果
Author(s)	小林, 英敏; 佐久間, 貞行
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1992, 52(12), p. 1679-1685
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16261
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

培養細胞にたいする傾斜静磁場の生物学的効果と

^{60}Co ガンマ線との併用効果

1) 名古屋大学医学部附属病院分院

2) 名古屋大学医学部名誉教授

小 林 英 敏¹⁾ 佐久間 貞 行²⁾

（平成3年10月21日受付）

（平成4年5月13日最終原稿受付）

Biological Effects of Static Gradient Magnetic Field on Cultured Mammalian Cells and Combined Effects with ^{60}Co Gamma-Rays

Hidetoshi Kobayashi¹⁾ and Sadayuki Sakuma²⁾

1) Division of Radiology, Nagoya University School of Medicine, Branch Hospital

2) Professor Emeritus, Nagoya University School of Medicine

Reserach Code No. : 408

Key Words : Magnetic field, Gamma-rays, Combined effect, FM3A

The biological effects of a static gradient magnetic field and its combined effects with ionizing radiation on FM3A cultured cells were investigated. The magnetic strength of the center of the field was 5.8×10^{-2} T esla, the mean gradient of the magnetic field was 0.6 T esla/m. The magnetic field influenced cell cycle. The relative amount of cultured cells in G1 phase decreased for eight hours after exposure. The growth rate of the cells was slowed by about 5%. Following exposure to the magnetic field, the survival rate of cells decreased to about 20% less than that of the non-exposed control. The combined effect of ^{60}Co irradiation with exposure to the magnetic field showed a greater effect than a simple additive one. The combined effect was influenced by the interval between ^{60}Co irradiation and exposure to the magnetic field. The biological effects of the magnetic field may be related to age-dependent cellular damage in the cell cycle, blockage of cell progression in the cell cycle, and increased repair from radiation damage.

緒 言

磁場の生物学的効果については既に多くの報告がある¹⁾²⁾。しかしながら静磁場の生物学的効果について、特に培養細胞の増殖にあたる影響及びコロニー形成能にあたる影響についての決定的な結論はない^{3)~5)}。静磁場と電離放射線との併用効果については未だ充分には検討されていない。我々は mouse 乳癌細胞である FM3A 細胞を用いて細胞内 DNA 量、増殖速度、およびコロニー形成

能を指標として磁場勾配のある静磁場の生物学的効果を検討した。加えて静磁場曝露と ^{60}Co ガンマ線照射との併用時間間隔を変えることにより併用効果に差異が認められたので報告する。

材料ならびに方法

培養細胞は mouse 乳癌細胞由来の FM3A 細胞を使用した。FM3A 細胞は仔牛血清10%，緩衝剤として0.12%の NaHCO_3 を含む Eagle MEM 培地を用い、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で培養した。この条件下での

FM3A の対数増殖期における集団倍加時間（以下、PDT: population doubling time）は12時間である⁶⁾。実験にはすべて分注後48時間の対数増殖期にある FM3A 細胞を用いた。殺細胞効果の判定には細胞のコロニー形成能を指標として用いた。コロニー形成能の測定には、以下のような方法で分注した FM3A 細胞を含む flask を用いた。即ち、30% 仔牛血清を含む 2 倍濃度の Eagle MEM 培地と 0.3% の寒天溶液を等量混合したものを 40℃ に保った。溶液 5ml 中の細胞数が 200 となるように FM3A 細胞懸濁液を混入し、これを各 flask に 5ml ずつ分注し直ちに冷水中で寒天を凝固させた。凝固したときの寒天の濃度は 0.15% となる。凝固後 1 時間室温に静置したものを実験に用いた。一回の実験には必ず対照を 5 本以上取り実験値は対照との相対値として表した。標本数が最低 15 となるように実験を繰り返した。対照全てのコロニー形成能が 75~100% 内にあったときその実験のデータを採用し、対照のうち一つでもコロニー形成能がそれ以下であったものは実験全体を失敗したものとして捨てた。

使用した静磁場装置は対放射線治療用の直線加速器に用いられていた電磁石を用いた。今報の実験には図中に flask として示した使用部位の中心部が $5.8 \times 10^{-2} \text{T}$ 、辺縁が $6.9 \times 10^{-2} \text{T}$ 、磁力勾配が 0.6 T/m に設定した条件で使用した (Fig. 1)。放射線は放射線治療用の ^{60}Co ガンマ線を使用した。放射

線照射の際、磁場装置からの散乱線の関与を考慮して対照であっても磁場との併用と同じ位置条件で照射を行った。今報の実験条件での線量率は 0.4 Gy/分であった。

1) 静磁場単独の生物学的効果

細胞内 DNA 量測定には、FM3A 細胞 10^4 個/ml を試験管内に分注し、磁場内に 30 分間静置する。磁場曝露後 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 下に 2, 4, 6, 8 時間置き細胞 10^4 個当りの細胞内 DNA 量をフローサイトメトリー (Cytofluorograf ICP22A, Ortho Co., USA) を用いて測定した。G₁, S および G₂-M 期の頻度分布は酒井らの方法⁷⁾により算出した。FM3A 細胞を室温に静置したのみの細胞を対照とした。

細胞増殖の測定には、FM3A 細胞 10^4 個/ml を試験管内に分注し、磁場内に 30 分間静置する。磁場曝露後 72 時間まで 1ml 当りの細胞数を測定し、PDT を計測した。室温に 30 分間静置しただけの FM3A 細胞を対照とした。

殺細胞効果の測定には、磁場曝露を 5, 10, 20, 30, 60 分とし、曝露後 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ にて 9 日間培養し、コロニー数を肉眼にて計測した。60 分間室温中に静置したものを対照とした。

2) 磁場と放射線の併用による生物学的効果

同時併用効果の測定には、磁場曝露を 10 分間とし、放射線照射は磁場曝露と同時にを行い、6 Gy まで検討した。4 Gy 以下の照射の際には磁場曝露の途中に放射線照射が行われ、4 Gy 照射の際には放射線照射と磁場曝露には完全に重なり、6 Gy の際には放射線照射の途中に磁場曝露が行われた。磁場曝露を行わず、放射線照射のみのものを対照とした。処理後 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ にて 9 日間培養し、コロニー数を肉眼にて計測した。

磁場と放射線の併用の時間関係の変化が併用効果に与える影響の測定には、磁場曝露を 10 分間とし、放射線照射を 4 Gy とした。磁場曝露の前 8 時間までのいろいろな時間に放射線照射を行った。処理後 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ にて 9 日間培養し、コロニー数を肉眼にて数えた。

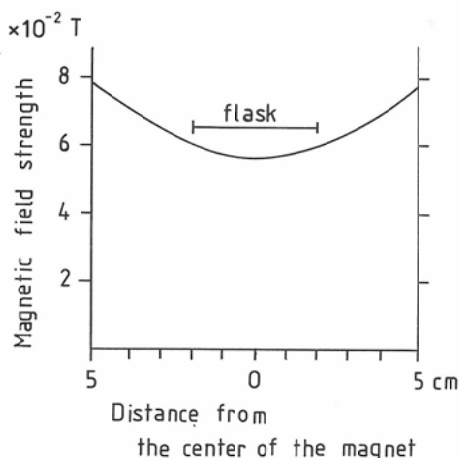


Fig. 1 Distribution of the magnetic field strength

結 果

1) 静磁場単独の生物学的効果

磁場の細胞内 DNA 量への影響を示す (Fig. 2). A は対照で, B, C, D, E は磁場曝露 2, 4, 6, 8 時間の DNA 量ヒストグラムを示している. 2 及び 4 時間後において G_1 期を示すピークの減少がみられた. 酒井らの方法により⁷⁾算出した細胞周期の相対分布を示す (Fig. 3). O は対照 (Fig. 2A) を示す. 磁場曝露後 8 時間で対照と同じ細胞周期分布に戻っており, 磁場の細胞周期への影響

は一過性のものであった.

磁場の FM3A 細胞の増殖速度に与える影響を示す (Fig. 4). FM3A 細胞の増加速度は, 対照の PDT が 12 時間であり磁場曝露後の細胞の PDT は 12.5 時間であった.

磁場単独の殺細胞効果を示す (Fig. 5, Table 1). コロニー形成能は対照に比して磁場曝露時間に応じて低下し, 曝露時間が 20 分で 80% まで低下した. しかし磁場曝露を 20 分以上にしてもそれ以上の低下は認められなかった. 図では 60 分の結

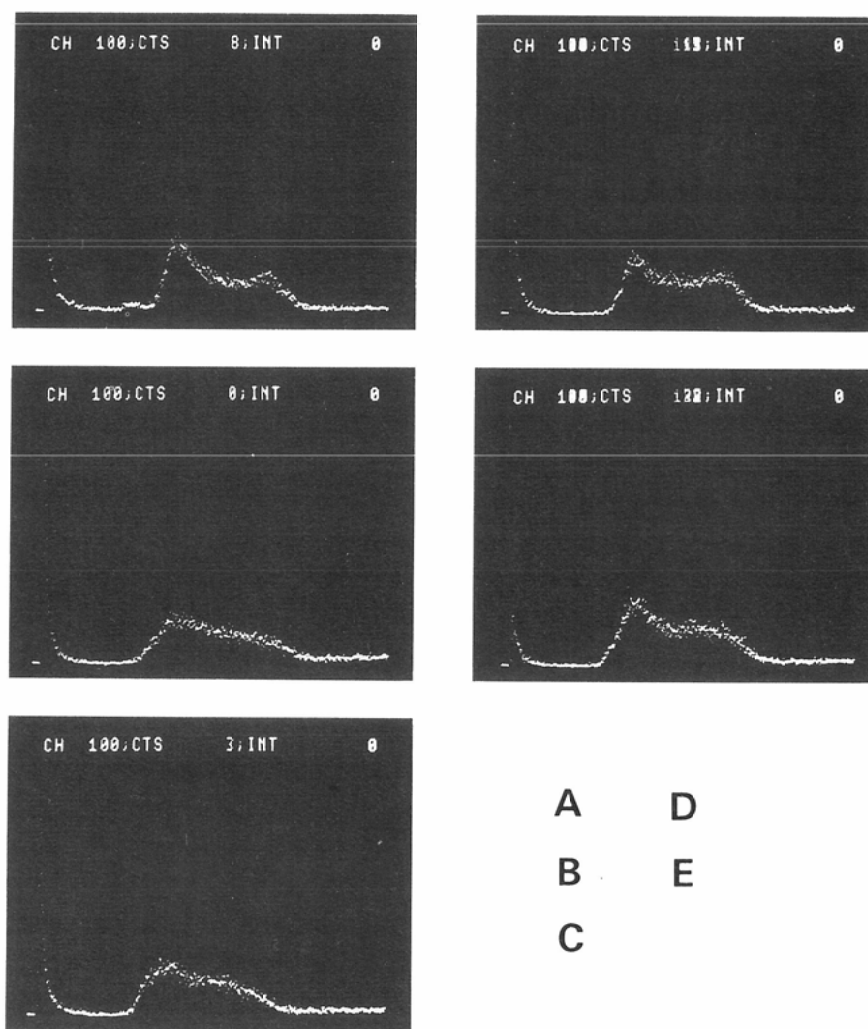


Fig. 2 DNA histograms. Relative amounts of intracellular DNA per 10,000 cells at 2 (B), 4 (C), 6 (D), and 8 (E) hours after exposure to the magnetic field. (A) shows relative amount of intracellular DNA per 10,000 cells in the exponential phase of growth.

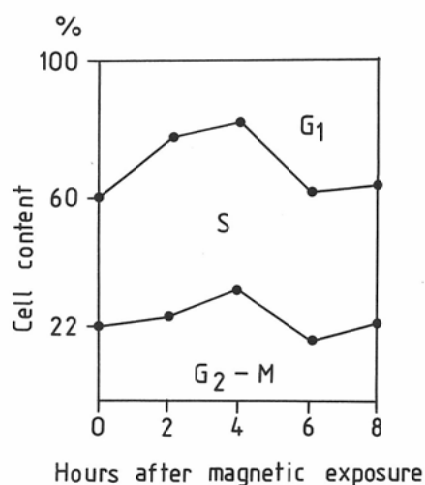


Fig. 3 Percentage of G₁ phase, S phase, and G₂-M phases after exposure to the magnetic field

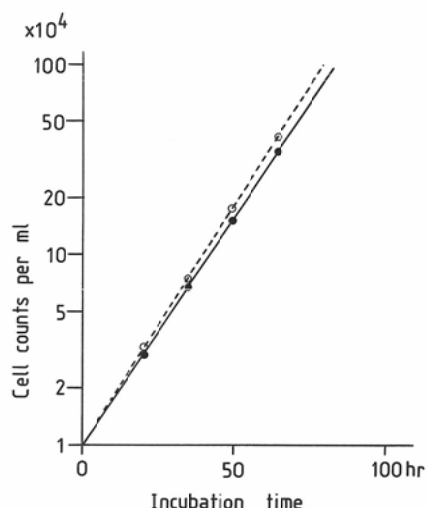


Fig. 4 Growth curve of FM3A cells. The dashed line and open circles are the growth curve of the control (PDT=12 hours). The solid line and closed circles are the growth curve after exposure to the magnetic field for 30 minutes (PDT=12.5 hours).

果は省略したが、いずれも対照に対して1%以下の危険率で有意に低下していた。

2) 磁場と対射線の併用による生物学的効果

磁場と放射線の同時併用効果を示す (Fig. 6, Table 2). 磁場単独によるコロニー形成能の低下を補正して線量-生存率曲線を示している。ガン

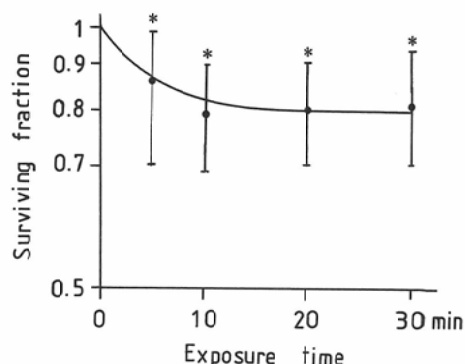


Fig. 5 Relation between colony-forming ability and exposure time Significance: (*) $p < 0.01$ by unpaired test.

Table 1 Effect of exposure time to the magnetic field on cell survival

Exposure time (min)	No. of samples	Surviving fraction (mean $\pm$ SD)	Significance*
0	16	1	—
5	16	0.85 ± 0.14	$p < 0.01$
10	16	0.79 ± 0.11	$p < 0.01$
20	16	0.80 ± 0.10	$p < 0.01$
30	16	0.81 ± 0.11	$p < 0.01$
60	16	0.79 ± 0.13	$p < 0.01$

* : Significance : Survival of non-exposed control versus that of exposed

Table 2 Combined effects of magnetic field exposure and ionizing radiation on cell survival

Dose (Gy)	No. of samples	Survival rate (combined) (mean $\pm$ SD)	Survival rate (irradiation) (mean $\pm$ SD)	Significance*
0	15	1	1	—
1	15	0.90 ± 0.08	0.82 ± 0.02	$p < 0.05$
2	15	0.93 ± 0.08	0.69 ± 0.01	$p < 0.05$
3	15	0.67 ± 0.11	0.64 ± 0.02	N.S.
4	29	0.41 ± 0.04	0.45 ± 0.01	$p < 0.025$
6	15	0.19 ± 0.15	0.18 ± 0.03	N.S.

* : Significance : Survival of irradiation only control versus that of combined

マ線のみの照射を受けた細胞生存率曲線は既に報告した我々のデータ⁶⁾⁸⁾とほぼ同じであり標準偏差 (以下 SD) は、0.02から0.03と僅かであったので省略した。磁場曝露を同時に併用することにより肩の部分が広くなり、直線部分が急峻になる傾向がある。磁場併用の群の SD は大きく、全ての線量において対照に対して有意差がみられたわけで

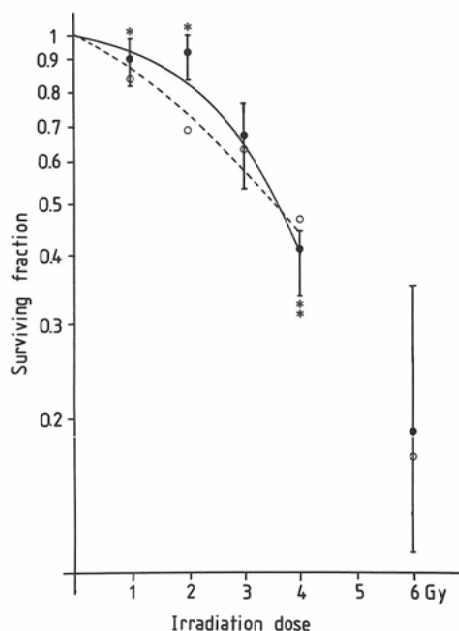


Fig. 6 Survival rate of the control group (dashed line and open circles) and the group exposed to the magnetic field (solid line and closed circles). Significance: (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.025$ by unpaired test.

Table 3 Result of the interval between magnetic exposure and ionizing irradiation on cell survival

Time between irradiation and magnetic exposure (hours)	No. of samples	Survival rate mean $\pm$ SD	Significance*
R-M	8	0.44 $\pm$ 0.04	N.S.
	4	0.50 $\pm$ 0.03	$p < 0.025$
	2	0.43 $\pm$ 0.01	$p < 0.025$
	1	0.42 $\pm$ 0.01	N.S.
	0.5	0.35 $\pm$ 0.06	N.S.
	0	0.34 $\pm$ 0.03	$p < 0.025$
M-R	0.5	0.40 $\pm$ 0.05	N.S.
	1	0.46 $\pm$ 0.04	N.S.
	2	0.47 $\pm$ 0.04	N.S.
	4	0.55 $\pm$ 0.13	N.S.
	8	0.54 $\pm$ 0.02	$p < 0.01$

* : Significance : Versus calculated additive effect (Survival rate = 0.40)

はなかった。しかし、1 および 2 Gy において 5 % 以下の危険率で有意の上昇を、また 4 Gy においては 2.5 % の危険率で有意の低下を認めている、ただし 4 Gy の有意差検定に際してデータの 1 つを危険率 1 % 以下で棄却した。4 Gy 未満の線量においては両者の相加効果以下の、4 Gy 以上の線量においては両者の相加効果以上の併用効果となっていた。磁場曝露と放射線照射を同時に行うという条件を優先したため、高線量部分の検討はなされていない。

磁場と放射線の時間関係の変化が併用効果に与える影響を示す (Fig. 7, Table 3)。同時及び磁場曝露の 30 分前に放射線照射をおこなった細胞が最も生存率が低下しており、磁場および放射線両者の相加効果を越える生存率の低下をみた。放射線照射と磁場曝露との時間が広がるにつれて、放射線照射が先でも後でも、生存率が上昇した。有意差を認めたのは図に示すごとく 4 点で 1 % から 2.5 % の危険率で、計算上の相加効果に対して同時併用は有意に低下し、他の 3 点では有意に上昇していた。

考 案

磁場曝露の生物学的変化は磁力、作用時間³⁾のみならず磁場勾配によっても影響を受けることが知られている⁹⁾。磁場曝露は増殖の早い細胞に比較的影響が出やすい¹⁰⁾。磁場の生物学的効果は中

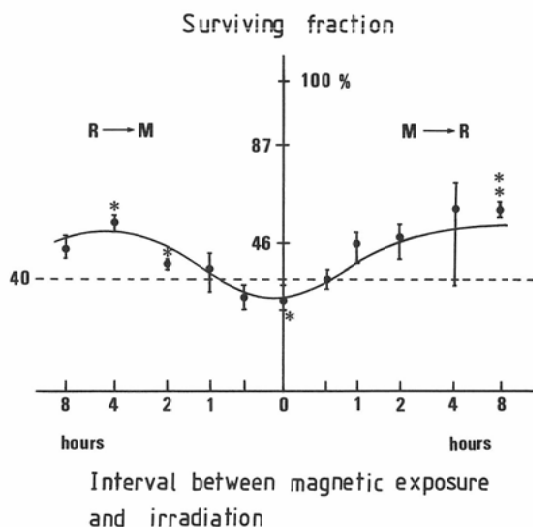


Fig. 7 Influence of the sequence of ionizing radiation and magnetic exposure and the interval between both treatments on cell survival. R-M : Radiation before magnetic exposure, M-R : Radiation after magnetic exposure. Significance: (*) $p < 0.025$, (**) $p < 0.01$ by unpaired test

川の指摘した⁵⁾ごとく僅かなものと推察されるが、人体に対する影響につき、Barnothy らは59日間に9回磁力0.42Tの磁場内に曝された女性に血液上の変化を報告している¹¹⁾。培養細胞における磁場曝露の生物学的効果についてもReno およびNutini は¹⁰⁾磁場曝露後にEhrlich 腹水癌細胞の酸素消費量が増加することを報告し、Mullay ら¹²⁾は0.4Tの磁場曝露により培養細胞数が減少することを報告している他いくつかある¹³⁾¹⁴⁾。しかしその結論は一定していない。磁場のおよぼす生物学的効果の機序について仮説がだされてはいるが、従来の実験に用いられた低い磁力での生物学的効果が一定していないこともあり解明されているとはいえない⁴⁾⁵⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。今報で我々が報告した磁場曝露による細胞内DNA変化及び細胞周期に与える影響についての報告はない。

今報において我々は中心が 5.8×10^{-2} で平均磁場勾配が0.6T/mの磁場をFM3Aに曝露し、傾斜静磁場の生物学的効果を検討した。その結果、磁場は細胞周期に8時間で修復される一過性の影響を与え(Fig. 2)、細胞増殖にはPDTにして約5%の遅延をおこした(Fig. 3)。磁場曝露単独による約20%の殺細胞効果(Fig. 5)からみると細胞増殖の遅延への影響は少ないように思われる。細胞周期の変化が影響しているのか、観察期間の違いかそれとも他の原因によるものか今報の検討からは明らかにされなかった。

磁場と放射線との同時併用による線量生存率曲線では、4Gy付近に両者の協同効果に関しての変曲点がみられた(Fig. 6)。両者の処理時間間隔の僅かの違いの影響か、4Gy以上の線量に真の協同効果があるのか今報の結果からだけでは、確定的なことはいえない。磁場と放射線の併用効果に変曲点がある可能性を示唆した報告は無い。高線量を検討する際には今報で検討した同時併用効果の実験の際よりも磁場曝露と放射線照射の時間的な差が大きくなる。今報において、磁場曝露と放射線照射との併用には時間関係が結果に影響を与えることがわかった(Fig. 7)。従来の D_0 および D_a により磁場と放射線との併用効果を判定することは危険が伴う可能性は考慮にいれる必要があるこ

とを示唆していると考えられる。

時間間隔を変えた実験結果からみると磁場曝露を放射線照射に先行させたとき、磁場は細胞の放射線感受性を低下させていた(Fig. 7)。Ogawa らは¹⁴⁾磁場曝露後に細胞分裂が低下することを報告している。磁場の細胞周期に与える影響が放射線感受性の低下に関与していると考えられる。しかし細胞周期が元に戻っている磁場曝露後8時間経過したときに放射線照射を併用した結果が両者の相加効果レベルに戻っていない理由は細胞周期の変化だけからでは説明できない。磁場には放射線の感受性を低下させる原因に細胞周期の変化以外の存在が推察される。磁場曝露を放射線照射以後に行ったときの生存率の上昇は、磁場曝露と放射線照射を同時におこなったときの生存曲線(Fig. 6)において肩が広がっていることからみて障害修復を増強させたものと考えられる。しかしEl-kindの修復の半分以上が終了するといわれている3時間を過ぎても¹⁷⁾生存率の上昇をみた。今報において実験中に培養温度より低い室温に静置したのでPLDからの修復が起き、磁場によるPLDからの修復増強も今報の生物学的効果に含まれていると推察されるが、どの程度のものかについてはさらに詳しい検討が必要であると考えられる。

今報の磁場の生物学的効果の実験結果には誤差が大きく、中川が指摘したごとく⁵⁾室温、気圧、地磁気、湿度などで今報で検討されていない微細な実験条件が影響していると考えられた。この点に関してもさらに詳しい検討が必要であると考えられる。

まとめ

マウス乳癌細胞であるFM3A細胞を用いて磁場勾配のある静磁場の生物学的効果を検討し、その結果以下の結論を得た。

1) 静磁場の細胞増殖速度への影響は少ないが、一時的な増殖抑制をもたらす可能性がある。

2) 細胞周期に影響を与え G_1 期の減少がみられた。影響は約8時間で消失した。

3) 静磁場曝露により細胞生存率が80%まで減少した。20分までは曝露時間に応じて生存率が低下したが、20分以上の曝露時間では生存率は80%

で一定であった。

4) 静磁場と ^{60}Co ガンマ線との併用効果は同時併用が最も効果が高く、相加効果をこえる殺細胞効果がみられた。磁場曝露と放射線照射との間の時間間隔が広がると相加効果以下の殺細胞効果になった。磁場曝露による細胞周期の変化による放射線感受性の低下及び磁場の放射線障害の修復増強によるものと考えられる。

稿を終えるにあたり、Flow Cytometryにつきご協力いただきました新潟大学医療技術短期大学部の藤田勝三先生に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) Federation Proceedings "Bibliography of the Biological Effects of Magnetic Fields", vol 21, Suppl 12, 1962
- 2) Friedman H, Carey RJ: The effect of magnetic field upon rabbit brains. *Physiol Behav* 4: 539, 1969
- 3) Moore RL: Biological effects of magnetic fields: Studies with micriorganisms. *Can J Microbiol* 25: 1145—1151, 1979
- 4) Barnothy MF: A possible effect of the magnetic field upon the genetic code. In *Biological effect of magnetic fields*, vol 1, MF Barnothy (ed), New York, Plenum Press, pp80—89, 1964
- 5) 中川正祥: 磁場が人体に及ぼす作用をどう考えるか, 岩波科学, 50: 198—201, 1980
- 6) Kobayasi H, Sakuma S: The combined effects of ^{60}Co gamma-ray and continuous low concentrtrtions of bleomycin on cultured mammalian cells. *Nagoya J Med Science* 46: 27—33, 1984
- 7) 酒井邦夫, 藤田勝三, 日向 浩, 他: 分割照射における腫瘍細胞動態の Flow Cytometry による解析 1. 培養細胞についての検討, 日本医放会誌, 45: 393—397, 1985
- 8) 小林英敏, 岡江俊治, 酒井美智子, 他: 580 ガウス磁力中での培養細胞の変化, 日本医放会誌, 45: 281, 1985 (Abst)
- 9) Gerencser VF, Barnothy MF, Barnothy JM: Inhibition of bacterial growth by magnetic fields. *Nature* 196: 539—541, 1962
- 10) Reno VR, Nutini LG: Effect of magnetic field on tissue respirtion. *Nature* 198: 204—205, 1963
- 11) Barnothy MF, Barnothy JM: Biological effect of a magnetic field and the radiation syndrome. *Nature* 181: 1785—1786, 1958
- 12) Mulay IL, Mulay LN: Effect of a magnetic field on sarcoma 37 ascites tumour calls. *Nature* 190: 1019, 1961
- 13) Kolodov YA, Alexandroskaya MM, Lukjawova SN, et al: Investigations of the reactions of mammalian brain to static magnetic field. In: *Biological effects of magnetic fields*, vol 2, MF Barnothy (ed), New York, Planum Press, pW215—225, 1969
- 14) Ogawa K, Motoi M, Oka T, et al: Effects of magnetic field on the growth of tumor cells. Fourth International Workshop of Rare Earth-Cobalt Permanent Magnetics and Their Applications, p111—120, 1979
- 15) 渥美和彦, 大道 久: 生体と磁場, 医用電子と生体工学, 20: 47—64, 1982
- 16) 有水 昇: 生体磁場計測と磁場の人体に対する影響, 臨床ME, 7: 630—637, 1983
- 17) 坂本澄彦: 第2章, 2. 細胞に対する放射線の効果を修飾する因子, 医学のための放射線生物学, 坂本澄彦, 佐久間貞行 (ed) p46—57, 秀潤社, 東京, 1985