磁界による細菌細胞の DNA 損傷及び生理状態への影響 Mutagenic and Physiological Effects on bacterial cells by Exposure to Magnetic Fields

柿川真紀子・細野隆次*・橋本松進**・岩原正吉***・山田外史**

金沢大学大学院自然科学研究科, 金沢市小立野 2-40-20 (〒920-8667)

*金沢大学医学部, 金沢市小立野 5-11-80 (〒920-0942)

**金沢大学自然計測応用研究センター, 金沢市小立野 2-40-20 (〒920-8667)

***金沢大学工学部, 金沢市小立野 2-40-20 (〒920-8667)

M. Kakikawa, R. Hosono*, S. Hashimoto**, M. Iwahara***, S. Yamada**.

Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, 2-40-20 Kodatsuno, Kanazawa, 920-8667

*School of Medicine, Kanazawa University, 5-11-80 Kodatsuno, Kanazawa, 920-0942

**Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University, 2-40-20 Kodatsuno, Kanazawa, 920-8667

***Faculty of Engineering, Kanazawa University, 2-40-20 Kodatsuno, Kanazawa, 920-8667

In this study, we investigated whether extremely low frequency magnetic fields (ELFMF) induce DNA damage or physiological abnormality in the bacterial cell using bacteriophage λ . By exposure to magnetic fields for about 8 hours, the bacteriophages shifted to lytic growth 2 times as often as control. The mitomycin C, mutagenic reagent, was shifted the bacteriophages from lysogenic to lytic growth 46-times as often as control. These results suggested that ELF magnetic field (60 Hz, 45 mT) did not induce DNA damage in the bacterial cell as mitomycin C. But ELF magnetic field (60 Hz, 45 mT) might induce physiological damage in the bacterial cells.

Key words: extremely low frequency, magnetic fields, bacteriophage λ , DNA damage, *Escherichia coli*

1. はじめに

現在、電磁場の生体への影響については多くの報告があり、環境レベルでの ELF 磁界の生体影響評価については、2001 年、国際保健機関 (WHO) - 国際がん研究機関 (IARC) は、不十分な実験証拠を含めた全体の評価として「2B: 発ガンの可能性があるかもしれない」と分類した。しかし、分子レベルでの実験的裏付けや客観的基準に乏しいため、正確な生物への影響についてはまだ不明である。

我々はこれまでに分子レベルでの磁界影響実験として、*in vitro* でカタラーゼや制限酵素、核酸合成、DNA 修復能などについて検討し、カタラーゼ活性については磁界により 20% 程の減少がみられたが、その他の活性については、顕著な差は認められないとの結果を得た。また *in vivo* では線虫 *C. elegans* を用い、磁界曝露により heat shock protein の発現が増加したこと、Differential Display 法により線虫における磁界応答性遺伝子の探索を行い、20 の候補遺伝子を同定し、神経系で機能する *ncs* 遺伝子群の mRNA 量が有意に変化すること等を明らかにしてきた^{1),2)}。

そこで今回は、溶原化ウイルス・ λ ファージを用い、*in vivo* で、細菌細胞への DNA 損傷及び生理状態への影響を測定し、さらに磁界の生体制御、特に遺伝子発現制御への利用の可能性について検討した。

2. 実験材料と方法

2.1 交流磁界発生装置

交流磁界発生装置は Fig. 1 に示すような装置を用い、2 相電源による回転磁界を発生することができる。今回、直交する一方のコイルのみを励磁して交番磁界 (直線磁界) を発生させた。磁極間の距離は 11 cm である。周波数 $f = 60$ Hz, 磁界強度 $B = 0 \sim 45$ mT の磁界を実験領域内 (直径 $\phi = 52$ mm, 高さ $h = 75$ mm) に発生させることができる。コイルにより発生する熱の影響を避けるため、恒温装置により水を循環させることで実験領域内部温度を 0.1°C 以内の精度で制御した。

2.2 使用菌株

本研究で、磁界曝露に *Escherichia coli* W3110 λ 857 を、プラークアッセイの指示菌に、*Escherichia coli* W3110 を用いた。

2.3 λ ファージとその増殖サイクル

大腸菌の溶原化ウイルスである λ ファージは、大腸菌細胞に感染し、2つの増殖パターン (溶菌サイクル、溶原サイクル) を示す (Fig. 2)。溶菌サイクルでは λ ファージは感染した細菌細胞内で増殖後、細菌を溶菌、子孫ウイルスを放出し、周囲の菌に感染

Fig. 1 Extremely low frequency magnetic field generator

Fig. 2 Life cycle of λ phage

を繰り返す。一方、溶原サイクルでは、 λ ファージはゲノム DNA を細菌ゲノム DNA に組み込ませて休眠状態となり、その細菌（溶原菌）は λ ゲノムを保持したまま増殖する。増殖サイクルの切り替え（誘導：溶原から溶菌へ）は、細菌の生理状態に依存し、特に細菌及びファージ DNA に損傷を与える紫外線や MMC（マイトマイシン C）によって引き起こされることが明らかとなっている^{3), 4)}。

そこで本研究では λ ファージを有する溶原菌 *Escherichia coli* W3110 λ 857 に ELF 磁界暴露し、溶菌サイクルへ切り替わり、増殖したファージ数をプラークアッセイ法³⁾ (Fig. 3) により測定を行った。

2.4 プラークアッセイ法による磁界影響測定

実験に用いる溶原菌 W3110 λ 857 は LB 培地で前培養し、 1×10^7 cfu/ml 程度に達した菌体を使用した。2つのエッペンドルフチューブに菌液 1.2 ml 取り、一つは 32°C で磁界暴露中に設置し、もう一方は対照群として 32°C の恒温槽に設置した。磁界暴露後、チューブを遠心分離により、菌体とファージを分離し、ファージ分画 0.1 ml を指示菌 *E. coli* W3110, LB 軟寒天培地とともに寒天培地に播種した。一晚培養後、出現したプラーク数をカウントし、曝露群、対照群のファージの誘導率を比較した。また、陽性対照としてマイトマイシン C 添加群を設けた。

(a) Method

Control Exposure (45 mT, 7 h)
(b) Detection of plaques

Fig. 3 Plaque Assays

3. 交流磁界によるファージ誘導結果

3.1 交流磁界暴露によるファージ誘導率

32°C で 60 Hz, 45 mT の磁界暴露後 1 時間ごとにサンプリングし、溶原菌からのファージ誘導をプラークアッセイ法により計測した結果を Table 1 に示す。

Table 1 内の数字は、1 ml 当りに換算したプラーク数を示し、括弧内は各曝露時間における磁界暴露していない対照群のプラーク数を 1.00 としたときの倍率を示している。

7 時間及び 8 時間曝露時には、磁界によりファージ誘導が 1.38, 1.71 倍に増加した。これらの値は 8 回の実験結果の平均値であり、統計学的に比較したところ有意差が認められた。

一方、陽性対照に用いたマイトマイシン C (MMC) 添加群においては、3 時間曝露で 46 倍のファージ誘導が見られた。これらの結果より、今回用いた交流磁界、60 Hz, 45 mT はマイトマイシ

Table 1. Effects of magnetic fields (MF) on induction of λ phage

* n = 8, p < 0.012

Time (h)	Induced Phage Titer :pfu/ml (Relative Titer)		
	Control	MF (45 mT)	MMC (10 μ g/ml)
		Exposure	Treatment
0	122 (1.00)	122 (1.00)	124 (1.02)
1	80 (1.00)	70 (0.87)	55 (0.69)
2	77.5 (1.00)	127.5 (1.65)	65 (0.84)
3	217 (1.00)	269.5 (1.24)	9985 (46.01)
4	171 (1.00)	170 (0.99)	
5	141 (1.00)	140 (0.99)	
6	325.5 (1.00)	392.7 (1.21)	
7	373 (1.00)	515.5 (1.38) *	
8	1786.7 (1.00)	3060 (1.71) *	
12	1860 (1.00)	2450 (1.32)	

ンC 程の強いDNA 損傷作用はないことが判明した。しかしながら明らかに2 倍ほどのファージ誘導率の昇進が認められ、磁界は細菌細胞に何らかのダメージを与えることが示唆された。

3.2 交流磁界暴露とマイトマイシンの併用によるファージ誘導率

ELF磁界はマイトマイシンCやX線と併用した場合、染色体異常が曝露密度依存的に増加したとの報告⁵⁾があることから、交流磁界とマイトマイシンCの併用によるファージ誘導率の測定を試みた。その結果を Table 2, Fig. 4 に示す。

交流磁界とマイトマイシンCを併用した場合、3時間及び4時間曝露後に2.37, 1.79倍のファージ誘導が見られた。一方、磁界曝露のみの実験結果では7, 8時間曝露した際に2倍程のファージ誘導の増加が見られたことから、マイトマイシンCと交流磁界の併用ではファージ誘導における速度が2倍程度はやくなり、磁界はマイトマイシンC作用を時間的に増強することが示唆された。

Table 2. Effects of magnetic fields (MF) and mitomycin C (MMC) on induction of λ phage

* n = 6, p < 0.0010

Time (h)	Induced Phage Titer :pfu/ml (Relative Titer)	
	MMC (10 μ g/ml)	MMC (10 μ g/ml) + MF(45 mT) Exposure
0	295 (1.0)	310 (1.05)
2	153.1 (1.0)	181.3 (1.18)
2.5	420.9 (1.0)	281.3 (0.67)
3	421.2 (1.0)	996.4 (2.37) *
4	14404.2 (1.0)	25075 (1.79) *

Fig.4 Effects of magnetic fields (MF) and mitomycin C (MMC)

4. 考察

4.1 交流磁界暴露によるファージ誘導率

溶原化ウイルスを用いて、交流磁界 (60 Hz, 45 mT) の細菌細胞へのDNA 損傷及び生理状態への影響を検討した結果、マイトマイシンC程の強いDNA 損傷作用はないことが明らかとなった。この点では、同程度の磁界密度における変異原性はなかったという他の報告⁶⁾と一致する。しかし、Table 1 の実験結果より、60 Hz, 45 mT の交流磁界曝露により、交流磁界は明らかに2 倍程度ファージ誘導率を上げることから、細菌細胞に何らかのダメージを与えることが示唆された。

交流磁界の影響実験において、曝露時間8時間後に比べ、12時間後にファージ誘導率が1.32と減少したことの原因としては、大腸菌は増殖が早く、本実験条件では12時間ほど経過すると十分量増殖し、飢餓状態に近づき、増殖がほぼ停止する定常期に入ることと、大腸菌は好気性菌であり、液体培地では振とう培養でより増殖するが、本実験において磁場発生装置内では菌体試料を振とうできないため、12時間程では酸素不足によるストレスなど、複数の影響要因によるものと考えられる。

4.2 交流磁界暴露とマイトマイシンの併用によるファージ誘導率

交流磁界とマイトマイシンCの併用実験において、3時間後に急にプラーク数が増加しているが、これは32℃の本実験条件下において λ ファージが大腸菌内で増殖し、菌の細胞膜を壊し、菌体外へ出るまで2時間ほどかかるためと考えられる。

Table 2 の結果から、60 Hz, 45 mT の交流磁界曝露とマイトマイシンCの併用では、磁界のみの結果に比べファージ誘導における速度は2倍程度はやくなり、時間的な相乗効果があることが示唆された。

また、ファージ誘導の際にはファージゲノムにおいて遺伝子発現パターンに変化が起こることが知られている。このことから、本研究結果より、遺伝子発現制御への磁界の応用の可能性が示唆

された。

4.3 交流磁界の細菌細胞への影響

マイトマイシンCやUV照射による、 λ ファージ誘導の際には細胞内DNA損傷により、大腸菌のRecAが活性化されることにより、 λ ファージのリプレッサー蛋白質が不活性化、それによって抑制されていたプロモーターが活性化しファージ誘導に至る。

現時点では、交流磁界が細胞にどのようなダメージを与えたかという点に関して、可能性はいくつか挙げられるが、確かなことは、まだデータがなく言及できない。

可能性としては、

i) マイトマイシンCの数十分の1程度の弱いDNA損傷作用を持つ

ii) 蛋白質は立体構造をとることで各活性や機能を保持するが、例えば α ヘリックスを伸び縮みさせる、 β シートやターンの角度を歪める等、磁界は蛋白質の立体構造や機能にいくらか影響を与える

などが考えられる。

今後は、様々な磁界強度や周波数における細菌細胞への影響測定と分子レベルでの磁界影響の解析、さらに磁界の遺伝子発現制御への利用の可能性について検討していきたい。

5. まとめ

λ ファージを有する溶原菌の磁界曝露実験では、8時間曝露に

より1.7倍のファージ誘導がみられたことから、交流磁界は細菌細胞に対し、マイトマイシンC(46倍)程のDNA損傷作用はないが、何らかの生理的ダメージを与えることが示唆された。磁界とマイトマイシンCの併用実験では、ファージ誘導における速度が2倍程度はやくなり、マイトマイシンC作用を増強することが示唆された。

また、ファージ誘導の際には、ファージゲノムにおいて遺伝子発現パターンに変化が起きることから、磁界の生体制御への応用、特に遺伝子発現制御への利用の可能性が示唆された。

文 献

- 1) Ueno S., Shigemitsu T., Iwasaka M.,: Biology and Electromagnetics p 51-75, Japan Scientific Societies Press (2003)
- 2) Ikeda T., Harada S., Hosono R., Kakikawa M., Iwahara M., Yamada S., *Journal of the magnetism society of Japan*, 27 (2003)
- 3) Sambrook and Russell: Molecular Cloning. Third Edition. CSHL press (2000).
- 4) John w. Little: *J. bacteriol.*, 175, 4943-4950 (1993)
- 5) Yaguchi H., Yoshida M., Diing D-R., Shing K., Miyakoshi M: *Int. Radiat Biol.*, 76, 1677-1684 (2000)
- 6) Ikehata M., Takashima Y., Suzuki Y., Shimizu H., Miyakoshi J., Koana T.: *Environ. Mutagen Res.*, 23, 215-222 (2001)

2003年10月23日受理 2004年1月15日採録