

氏名・(本籍)	越智守生(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第7号
学位授与の日付	平成4年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(課程博士)
学位論文題目	骨原性細胞株MC3T3-E1に与えるパルス 電磁場の影響
論文審査委員	主査 教授 坂口 邦彦 副査 教授 賀 來 亨 副査 教授 馬 場 久 衛

## 論文内容の要旨

### I 目 的

パルス電磁場刺激法は、1974年に Bassett らの報告以来、偽関節や難治性骨折の治療に広く臨床応用されている。現在、一般に臨床応用されている磁場強度は、Bassett の使用した 2 ガウス (以下 G) のものが大多数であるが、パルス幅や周波数においては、統一されていない。また、2 G 以外での磁場強度の骨形成作用の有無を定量的かつ客観的に研究した報告も少なく、電磁場刺激による最適刺激条件を検索することが重要と思われる。そこで本研究は、パルス電磁場刺激の歯科領域の応用の可能性を検索するにあたり、MC 3T3-E1 細胞の細胞増殖能および分化能に対する最適刺激条件(磁場強度、パルス幅、周波数)を明らかにするために、DNA 合成およびアルカリホスファターゼ(以下 ALPase)活性を指標としてパルス電磁場刺激の効果を検討した。

### II 実験材料および方法

#### 1. 培養細胞および培地

細胞は、Kodama らが C57BL/6 マウス新生仔頭蓋冠より株化細胞を樹立した骨原性細

胞株 MC3T3-E1 を用いた。培養培地は、 $\alpha$ -MEM に牛胎仔血清を 10% と硫酸カナマイシンを  $60 \mu\text{g/ml}$  の割合で添加したものをを用いた。培養条件は温度  $37^\circ\text{C}$ 、湿度 100%、5%  $\text{CO}_2$ -95% 空気的环境下で行った。また、培地交換は 3 日毎に行った。

## 2. 実験方法

### 1) 細胞播種

直径 35mm ポリスチレンディッシュに  $7 \times 10^4$  個 (但し DNA 量の測定には  $6.5 \times 10^4$  個) の細胞を播種し、培地を 2.0ml 添加し、パルス電磁場を作用させた実験群ならびに電磁場を作用させない対照群を各々 5 枚ずつ用いた。

### 2) パルス電磁場刺激

パルス電磁場発生には、理研式パルス電磁場発生装置を用いた。ポリスチレンディッシュ底面の細胞に均等な磁場強度の分布が得られるように、2つの励磁コイルを同軸上に配置し、その中心に実験群のディッシュを 5 段重ねで固定した状態で、磁場強度は 1 ~ 8 G まで、パルス幅を 6 ~ 100  $\mu\text{sec}$  まで、さらに周波数を 50 ~ 200 Hz まで変えてパルス電磁場刺激を行った。また予備実験より、DNA 合成促進には 3 日間の連続刺激、ALPase 活性には 6 日間の連続刺激が適当であることが分かったので、刺激期間はそれぞれの期間とした。

### 3) DNA 合成の測定

DNA 合成の測定は、丸野内の方法に準じて行い、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。DNA 合成率の変化は電磁場刺激を作用させていない対照群の放射能の取り込みを 1 とした場合の割合で比較した。

### 4) DNA 量の測定

DNA 量は Kapuscinski and Skoczylas の方法に従い、DAPI を用いて蛍光分析を行った。なお、標準試料の仔牛胸腺 DNA で標準曲線を描き、サンプル中の DNA 量を求めた。

### 5) ALPase 活性の測定

ALPase 活性は、Lowry らの方法に準じて吸光度を測定して求めた。さらに、これを反応に用いた蛋白量で除して比活性を求めた。また、蛋白量は、Bradford の方法に準じて吸光度を測定し求めた。

### 6) 細胞の形態観察

パルス電磁場刺激実験群と対照群の細胞形態に与える変化を位相差顕微鏡で観察した。

## Ⅲ 結 果

### 1. 磁場強度, パルス幅および周波数の交互作用

1と8 G, 6と100  $\mu$ sec, 50と200 Hzの3因子2水準で3元配置による実験を行ったときの磁場強度, パルス幅および周波数の3因子のDNA合成に及ぼす交互作用は, 統計的に有意とならなかった。このことから, これらの条件では3因子間には交互作用がないものと考えた。

### 2. DNA合成促進作用に及ぼす最適パルス電磁場

MC3T3-E1細胞に与えるパルス電磁場刺激の影響をDNA合成率で評価した結果, 磁場強度3 G, パルス幅25  $\mu$ sec, 周波数100 Hzの組み合わせが対照群に比べてDNA合成を92%促進させ (t-test,  $p < 0.001$ ), 細胞を増殖させるための最適な刺激条件であることが確認された。

### 3. DNA量に及ぼすパルス電磁場の影響

MC3T3-E1細胞に3 G, 25  $\mu$ sec, 100 Hzの条件で, パルス電磁場刺激を細胞培養開始から持続的に与えた場合のDNA量の経時的変化を検討した。3および6日目で対照群と比較した結果, 3日目で実験群が対照群に比べ126%の最大増加率を示し, 6日で36%の増加を認め, 両者の間はいずれも統計的に有意であった。9および14日目では対照群との間に有意差は認められなかった。

### 4. ALPase活性促進作用に及ぼす最適パルス電磁場

本細胞では, 3 G, 25  $\mu$ sec, 100 Hzのパルス電磁場刺激の組み合わせが対照群に比べてALPase活性を28%促進させ, 変動させた刺激条件の中で最適な条件であることが確認された (t-test,  $p < 0.01$ )。

### 5. ALPase活性の経時的変化に及ぼすパルス電磁場の影響

3 G, 25  $\mu$ sec, 100 Hzのパルス電磁場刺激を培養開始時期から持続的に作用させた場合の実験群と対照群のALPase活性の経時的変化は, 細胞播種後14日目まで, 実験群と対照群で同様の増加傾向を示した。しかし, 播種後3日目で磁場刺激群が対照群に比べ20%の増加を示し, 6日目で28%と最大増加率を, 9, 14日目でもそれぞれ18, 11%の増加を認め, 両者の差はいずれも統計的に有意であった。

### 6. 細胞の形態観察

対数増殖期, コンフルエント形成期のいずれの時期においても対照群と実験群の間で細

胞形態に顕著な差を認めなかった。

#### Ⅳ 考 察

従来、線維芽細胞などを用いてパルス電磁場刺激の最適条件を検討した報告がなされており、Liboffらは、ヒト包皮由来線維芽細胞に0.023～5.6 Gの範囲のパルス電磁場刺激を作用した時、またTakahashiらは、チャイニーズハムスターV79細胞に0.2～0.8 Gの範囲で刺激した時にDNA合成を促進すると報告している。本研究では、従来用いられたことのない骨原性細胞株MC3T3-E1を3 G、25  $\mu$ sec、100 Hzの組み合わせで刺激したときに対照群に比べて92% DNA合成を促進させ、細胞を増殖させるための最適な条件であることが示された。このように培養線維芽細胞系と骨原性細胞系での結果の不一致は、細胞のパルス電磁場に対する感受性の差によるものと思われる。DNA量の経時的変化は、対数増殖期の立ち上がりが高く、コンフルエント形成時において、その有意性が認められなかったことは、細胞増殖の活発な時期においてパルス電磁場の効果が得られるものと推察される。ALPase活性の経時的変化において培養6日目で刺激群と対照群の差が最大を示し、分化段階の細胞は、パルス電磁場刺激の影響を強く受けるものと思われる。

#### Ⅴ 結 論

骨原性細胞株MC3T3-E1の細胞増殖能および分化能に対する、パルス電磁場刺激を明らかにする目的で、DNA合成およびALPase活性を指標としてパルス電磁場の効果を検索し、以下の結論を得た。

1. 細胞の増殖および分化に対する最適刺激条件は、磁場強度3 G、パルス幅25  $\mu$ sec、周波数100 Hzの組み合わせであった。
2. パルス電磁場の細胞に対する効果は、骨原性細胞の増殖を促進させ、また骨芽細胞へと分化を促進させることが示唆された。
3. 今回の研究で、最適刺激条件の決定となる基礎的データが得られたことは、今後、パルス電磁場刺激を歯科臨床へ応用する際に役立つと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

パルス電磁場刺激法は、整形外科領域で、偽関節や遷延治癒骨折などの難治性骨折の治療に広く臨床応用されている。しかし、臨床的な研究が先行し基礎的研究が少ないため、その詳細な作用機序はいまだ解明されていない。また、刺激条件（磁場強度、パルス幅、周波数）についても、一定の見解が得られていない。

そこで本研究は、パルス電磁場刺激の歯科領域への応用の可能性を検索するにあたり、まず、細胞レベルにおける磁場刺激の基礎的条件を検討するため、骨原性細胞株 MC3T3-E1 の細胞増殖能および分化能に対する最適刺激条件を DNA 合成および Alkaline phosphatase (以下 ALPase) 活性を指標として検討した最初のものである。

まず本申請者は、<sup>3</sup>H-Thymidine を用いて DNA 合成促進作用に及ぼす最適パルス電磁場の検索をした。骨原性細胞株 MC3T3-E1 に与えるパルス電磁場刺激は、磁場強度 3 G、パルス幅 25  $\mu$ sec、周波数 100 Hz の組み合わせが対照群に比べて DNA 合成を 92% 促進し、細胞を増殖させるための最適な刺激条件であることを明らかにした。また、本最適刺激条件で DNA 量の経時的変化を検索した場合、播種後 3 日目で磁場刺激実験群が対照群に比べ 126% の最大増加率を示し、6 日目で 36% の増加することを認めた。

次に本申請者は、ALPase 活性促進作用に及ぼす最適パルス電磁場の検索をした。骨原性細胞株 MC3T3-E1 に与えるパルス電磁場刺激は、3 G、25  $\mu$ sec、100 Hz の組み合わせが対照群に比べて ALPase 活性を 28% 促進させ、変動させた刺激条件の中で最適な条件であることを認めた。また、本最適刺激条件で ALPase 活性の経時的変化を検索した場合、播種後 3 日目で磁場刺激実験群が対照群に比べ 20% の増加を示し、6 日目で 28% と最大増加率を、9, 14 日目でもそれぞれ 18, 11% の増加することを認めた。

また、本申請者は、パルス電磁場刺激作用による細胞の形態的变化において、位相差顕微鏡所見では対照群との形態的差が認められなかったことも明らかにした。

すなわち本申請者は本研究において、磁場強度 3 G、パルス幅 25  $\mu$ sec、周波数 100 Hz のパルス電磁場刺激の MC3T3-E1 細胞に対する効果は、骨原性細胞の増殖を促進させ、また骨芽細胞へと分化を促進させることを示唆したものである。

以上本審査委員会は、パルス電磁場刺激の骨原性細胞株 MC3T3-E1 に対する影響を理解する上できわめて重要な研究であると判断し、本申請者に対して博士（歯学）を授与するのに十分に値するものと認めた。