

Effects on the Attraction and Avoidance Behavior of *C. elegans* by Exposure to ELF Magnetic Fields

S. Maeda, M. Kakikawa, M. Iwahara and S. Yamada

Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan

In this research, we examined whether magnetic fields exerted any influence on the nervous system of the nematode *C. elegans*. Both during exposure to magnetic fields and after exposure to magnetic fields, we examined the influence of magnetic fields by observation of the behavior of the worm in response to certain chemicals. After exposure to magnetic fields (60 Hz, 0.5 T) for one hour, some achievement rates for the volatile attractant *Diacetyl* of the worm decreased in comparison with the non-exposure group. Moreover, some breakthrough rates for CuSO_4 , a chemical that the worm avoids, increased in comparison with the non-exposure group. In particular, the breakthrough rate for CuSO_4 of the worm during exposure to magnetic fields increased greatly in comparison with the breakthrough rate of the worm after exposure to magnetic fields. These results suggest that the parts of the worm's nervous system that relate to DA and CuSO_4 are influenced by magnetic fields, and that there are more effects on the nervous system during than after exposure to magnetic fields.

Key words: magnetic fields influence, extremely low frequency (ELF), nervous system, *C. elegans*, chemotaxis

線虫の誘引・忌避行動における 60 Hz 交流磁界影響

前田秀一・柿川真紀子・岩原正吉・山田外史

金沢大学大学院自然科学研究科, 金沢市角間町 (〒920-1192)

1. はじめに

近年, 交流磁界と神経との関係が注目されている。神経伝達においては微細な電流がシグナルとして細胞間を高速に流れており, 交流磁界曝露によって生じる二次電流がこの神経伝達機構に何らかの影響を及ぼしているのではないかと考えられている。医療応用分野では, 難治性神経疾患の治療にパルス磁界によって生じる渦電流の利用が検討されており, 研究が進められている^{1, 2)}。しかしながら, どの周波数の磁界が神経機能に作用するのか, また, その影響メカニズムについては不明な点が多い。

一方, 50 Hz 交流磁界がマウスの行動異常を引き起こすという研究報告^{3, 4)}や 60 Hz 交流磁界曝露により線虫の行動軌跡に異常が認められたとの報告がある⁵⁾。交流磁界のさらなる医療応用に向けて, 交流磁界が神経機能へ及ぼす影響のメカニズム解明は重要な問題である。

そこで本研究では, 線虫の誘引・忌避行動解析による商用周波数交流磁界の神経機能への影響評価を行った。

2. 線虫の行動解析実験

2.1 実験対象

実験対象としては線虫 *C. elegans* (N2 株) を用いた (Fig. 1)。この虫は全長約 1 mm 程度であり, 半透明で, 生きたまま顕微鏡で細胞を観察することが可能である。成虫の全細胞数は 959 個で, その内 302 個が神経細胞であり, 神経細胞を有する最も小さなモデル動物でもある。これまでの研究により化学走性や各刺激への反応, 記憶の保持等における神経回路網がかなり判明しており, 現在もこれら行動

解析により線虫の神経機能を解明する研究が広く行われている^{6~8)}。

本研究では, 特に線虫の化学物質への誘引行動と忌避行動に着目し, 行動を解析することで, それらに関連した神経機能への磁界影響を調査した。

2.2 実験装置

線虫への磁界曝露に用いた交流磁界発生装置を Fig. 2 に示す。この装置は, 周波数 $f = 60 \text{ Hz}$, 磁束密度 $B = 0.5 \text{ T}$ の均一磁界をギャップ部に発生するように設計されている。ギャップ部にはアクリルケースが取り付けられており, ケース内部に水を循環させることで, 実験環境の温度を一定 (20°C) に保った。この中央部に線虫を入れたプレートを挿入し, 磁界曝露を行った。

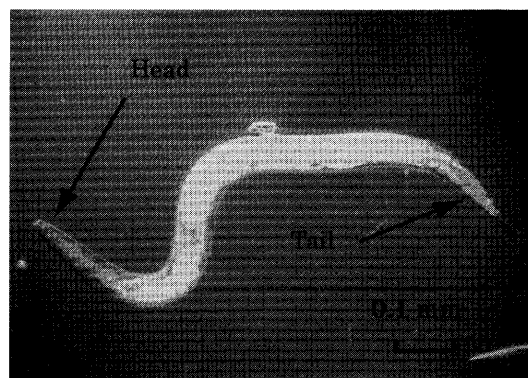


Fig. 1 The nematode (*C. elegans*).

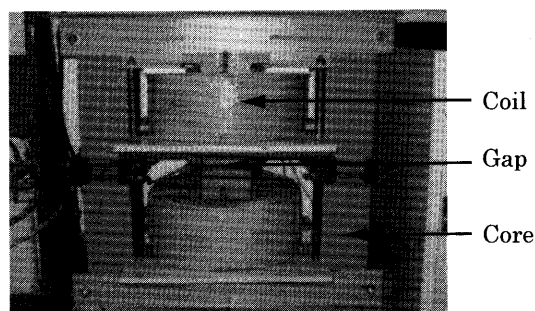


Fig. 2 Magnetic field generator.

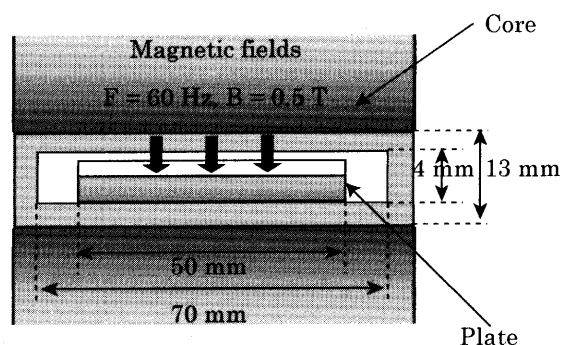


Fig. 3 Plate exposed to magnetic fields.

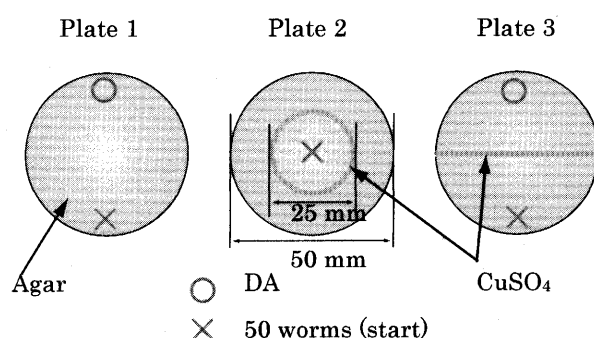


Fig. 4 Assay plate.

2.3 磁界曝露後の行動影響評価法

線虫は、同調培養した孵化後約 72 時間の成虫を用い、3 回程度 M9B (緩衝液) を用いて洗浄後、M9B で満たしたシャーレに移し、Fig. 3 のように装置に挿入し、交流磁界曝露を行った。交流磁界曝露は、これまでに線虫の行動軌跡に異常が認められたと報告のあった磁界曝露条件、周波数 $f = 60 \text{ Hz}$ 、磁束密度 $B = 0.5 \text{ T}$ 、曝露時間 $t = 1 \text{ h}$ で行った⁵⁾。また、比較対象として、装置に挿入し、非曝露の虫を Control 群とした。この後、あらかじめ用意しておいた実験プレート (Fig. 4) のスタート地点に線虫を 50 匹程度置き、行動解析を行った。なお、磁界以外の温度、湿度、光、振動などの環境要因については、線虫にストレスを与えない条件下で実験を行った。

実験プレートは寒天 (3 % Agar, 10 mM MOPS- NH_4 [pH 7.2]) で作成し、Fig. 4 の 3 種を行動解析に使用した。実験プレート 1 は、寒天のみ、実験プレート 2 は、寒天の上に、線虫を置く 10 分前に 1 mM の CuSO_4 水溶液で直径 25 mm の円状障壁を、実験プレート 3 は、寒天の上に線虫を置く 10 分前に 1 mM の CuSO_4 水溶液でシャーレの中心部に寒天地を上下に分断するように障壁を作成した。

実験プレート 1 では、線虫の誘引物質である DA (*Diacetyl*) の原液を 500 倍に希釈し、同容量の 1 M の NaN_3 水溶液との混合液 1 μl を丸印 (線虫の到達地点) にスポット、スタート地点に線虫を約 50 匹置き、線虫の誘引行動を観察した。DA には NaN_3 を混入してあるため、DA まで到達した虫は麻痺し、静止する。この静止した虫を、実験開始から 15 分毎に 1 時間後までの 4 点においてカウントした。

実験プレート 2 では、スタート地点に線虫を約 50 匹置き、線虫の行動を観察した。線虫をスタート地点に置くと、線虫は寒天を移動し、 CuSO_4 の障壁付近で忌避反応を示す。しかし時間が経つにつれ、 CuSO_4 の障壁を突破する忌避反応を示さない虫が出てくる。この突破した虫を、実験開始から 15 分毎に 1 時間後までの 4 点においてカウントした。

実験プレート 3 では実験プレート 1 と同様に丸印を線虫の目標地点と定め、DA を 1 μl 置き、スタート地点からの線虫 (約 50 匹) の誘引行動を調べた。線虫は、DA に誘引反応を示し、丸印の方に向かって移動する。しかし、途中には CuSO_4 の障壁があり、障壁に到達した虫は忌避反応を示して後退し、異なる方向に向かって移動する。時間が経つにつれ、障壁を突破し、DA に向かう虫が出てくる。この突破した虫を、実験開始から 15 分毎に 1 時間後までの 4 点においてカウントした。

2.4 磁界曝露中の行動影響評価法

磁界曝露中の影響評価法に、Fig. 4 の 3 つの実験プレートを使用した。線虫は同調培養した孵化後約 72 時間の成虫を用い、この成虫は、3 回程度 M9B を用いて洗浄後、50 匹程度を実験プレートのスタート地点に置き、Fig. 3 のギャップ部に挿入、30 分間線虫が磁界曝露下で行動できるように調製した。また、同時に 50 匹程度を実験プレートに置き、20 $^{\circ}\text{C}$ に保ったインキュベータにいれ、非磁界曝露下での 30 分後の結果を Control とした。

この実験では、途中で線虫の様子を観察することはできないため、磁界曝露開始から 30 分後に実験プレートを装置から取り出し、各実験プレートにおいて DA に到達した虫、 CuSO_4 を突破した虫をカウントした。

3. 線虫の行動解析実験結果

3.1 磁界曝露後の影響結果

磁界曝露 ($f = 60 \text{ Hz}$, $B = 0.5 \text{ T}$, $t = 1 \text{ h}$) 後、実験プレート 1 での解析開始から 15, 30, 45, および 60 分の各時点における線虫の DA への到達率を百分率で表し、Control と Exposure を比較した結果を Fig. 5 に示す。各時点において磁界曝露した虫の DA への到達率は、磁界曝露を行っていな

い虫に比べて 17 ~ 19 % 程度低下し, DA への誘引行動に遅れが認められた. なお各時点での値は Control, Exposure とともに, 10 回の実験プレートで得られたデータの平均値であり, 統計的にも有意差 ($p < 0.05$) が認められた.

一方, 磁界曝露後, 実験プレート 2 における解析開始後, 15, 30, 45, および 60 分の各時点の線虫の CuSO_4 の突破率を百分率で表し, Control と Exposure とで比較した結果を, Fig. 6 に示す. 各時点において磁界曝露した虫の CuSO_4 の突破率は, 非磁界曝露群に比べて 11 ~ 13 % 程度の上昇が認められた. なお各時点の値は Control, Exposure とともに, 10 回の実験プレートで得られたデータの平均値であり, 統計的にも有意差 ($p < 0.05$) が認められた. また, プレート 3 を用いた磁界曝露後の線虫の CuSO_4 突破率の結果を, Fig. 7 に示す. 各時点において磁界曝露した虫の CuSO_4 の突破率は, 非磁界曝露群に比べ, 8 ~ 12 % 程度上昇した. この各時点の値も Control, Exposure とともに, 10 回の実験プレートで得られたデータの平均値であり, 統計的にも有意差 ($p < 0.05$) が認められた. プレート 2 および 3 の結果より, 磁界曝露後, 線虫の CuSO_4 に対する忌避行動は, わずかながら低下することが示唆された.

3.2 磁界曝露中の影響結果

50 Hz 交流磁界曝露によりマウスの行動異常が認められたとの報告では, 磁界曝露の影響は, 曝露直後, 最も顕著にみられる傾向にあった^{3,4)}. そこで, 本研究では, 実験プレート 1 - 3 を用い, 磁界曝露中 ($f = 60 \text{ Hz}$, $B = 0.5 \text{ T}$, $t = 0.5 \text{ h}$) での線虫の行動解析を行った. 実験プレート 1 での線虫の DA への到達率, 実験プレート 2, 3 での線虫の CuSO_4 の突破率をそれぞれ百分率で表し, Control と Exposure とで比較した結果をまとめて Fig. 8 に示す. なお各値は Control, Exposure とともに, 5 枚の実験プレートで得られたデータの平均値であり, 統計的にも有意差 ($p < 0.05$) が認められた.

実験プレート 1 における磁界曝露中の線虫の DA への到達率は, 非磁界曝露の虫に比べて 13 % 程度の低下がみられ, 磁界曝露後の結果 (Fig. 5) と同様の傾向が認められた.

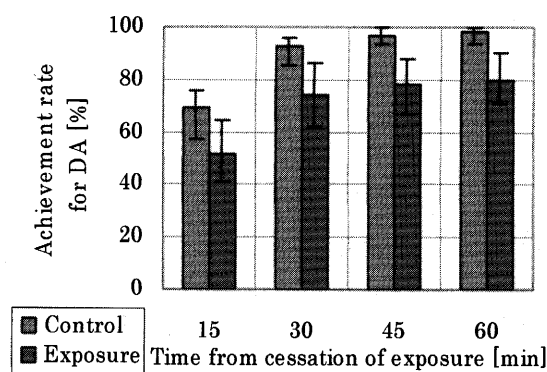


Fig. 5 Achievement rates for plate 1 DA.

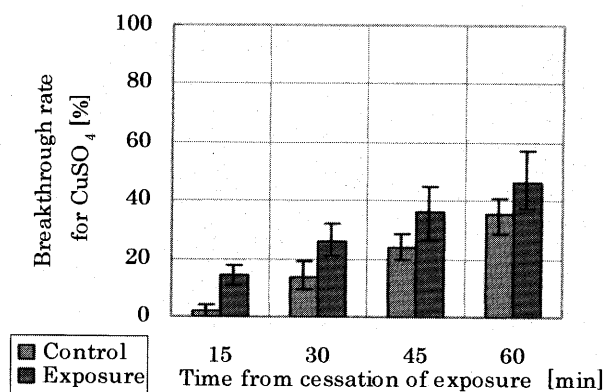


Fig. 6 Achievement rates for plate 2 CuSO_4 .

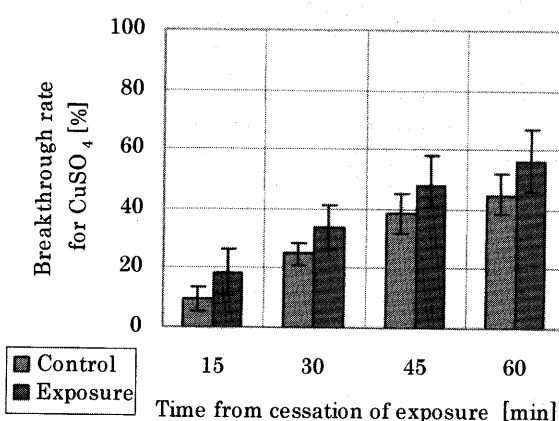


Fig. 7 Achievement rates for plate 3 DA + CuSO_4 .

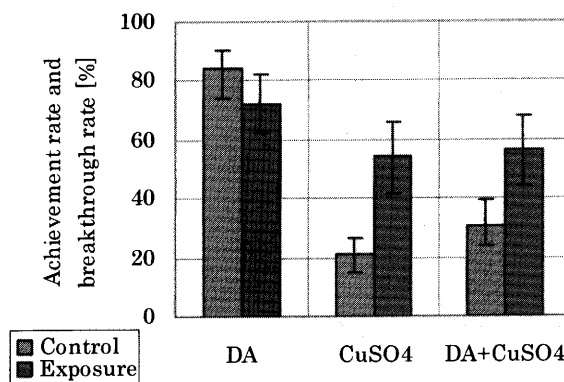


Fig. 8 Influence during exposure to magnetic fields.

実験プレート 2 では磁界曝露した虫の CuSO_4 の突破率は, 磁界曝露を行っていない虫に比べて 34 % 程度の上昇が認められた. また, 実験プレート 3 で磁界曝露した虫の CuSO_4 の突破率は, 非磁界曝露群の虫に比べて 26 % 程度の上昇が認められた. つまり, CuSO_4 の突破率については, プレート 2, 3 の結果共に, 磁界曝露中の方が磁界曝露後の解析結果 (Figs. 6, 7) に比べ, 非曝露群との差も大きく, 有意に CuSO_4 に対する忌避行動の低下が認められた.

4. 考察

Fig. 5 より, 線虫の DA への到達率が低下したことから, 磁界曝露によって, 線虫の DA への誘引行動が低下することが示唆された. 一方, 線虫の CuSO_4 の突破率が上昇し, 磁界曝露によって線虫の CuSO_4 への忌避行動も低下することが示唆された (Fig. 6). また, 実験開始後 15 分の時点では, 磁界曝露していない場合はほとんど CuSO_4 を突破しないのに対し, 磁界曝露した虫は 15 % 近くの突破率を示しており, 磁界影響が顕著に現れている. つまり, 磁界曝露直後ほど, 磁界影響が大きいことが判明した.

プレート 3 においては, 線虫の CuSO_4 の突破率が上昇したことから, DA に対する誘引行動のため, Fig. 6 に比べると若干各時点での突破率が高くなっていることが分かる (Fig. 7).

また, 同様の誘引・忌避行動実験を磁束密度 $B = 0.1 \text{ T}$ の条件で行ったところ, 曝露群と非曝露群との間に有意差は確認されなかった. このことから線虫への磁界影響は磁界強度に依存していることが考えられる.

磁界曝露中の行動解析において, 線虫の CuSO_4 に対する忌避行動の磁界影響は大きいのに対し DA に対する誘引行動の磁界影響は比較的小さかった. このことから, 磁界は CuSO_4 の忌避行動に関連する神経経路により影響を及ぼす可能性が考えられる. 線虫は DA と CuSO_4 を異なる感覚神経で受容し, いくつかの介在神経を介して運動神経まで伝えている. 線虫の DA, CuSO_4 の認識, 及び伝達に

関与している感覚神経, 介在神経やそれらの繋がりについての研究報告も多く, かなり解明されており, モデル図で表すと Fig. 9 のようになる⁶⁾. 両物質の伝達経路は共通の部分も多いが, ADL や ASH といった 1 部の感覚神経細胞は独立している. 今回の結果より, 磁界はこれらの独立した神経細胞等に強い影響を及ぼしている可能性を見出した.

5. まとめ, 今後の課題

線虫を用いた神経機能解明のための行動解析には, 化学物質に対する誘引・忌避行動 (走化性) や物理刺激や迷路を用いた記憶の保持・学習などがあり, これらの行動に関与する神経細胞・回路については多くの知見がある^{6~7)}. 今回の線虫の誘引・忌避行動の解析結果より, DA への誘引行動に比べ, CuSO_4 に対する忌避行動において, より交流磁界曝露による影響が認められたことから, 磁界は CuSO_4 の神経伝達経路における ADL や ASH の感覚神経細胞などにより強い影響を与えると推測できる.

今後は, 他に機械刺激への反応や記憶の保持・学習などについても検討し, さらに細胞および分子レベルでの解析を行う, 交流磁界やそれに伴う渦電流が神経機能に及ぼす影響メカニズムについて解明していきたい.

謝辞 本研究は, 金沢大学医学部保健学科検査技術科学生体情報講座の協力を得て実施された. 講座の細野隆次教授には貴重なアドバイスを数多く頂いた.

References

- 1) Fujita K and Koga Y: *Psychiatry Clin Neurosci*, **59**, 425 (2005).
- 2) Tetsuya T: *Jpn J Rehabil Med*, **40**, 757 (2003).
- 3) Sienkiewicz ZJ, Haylock RG, Bartram R, and Saunders RD: *Bioelectromagnetics*, **19**, 486 (1998).
- 4) Kavaliers M, Ossenkopp KP, Prato FS, Innes DG, Galea LA, Kinsella DM, and Perrot-Sinal TS: *J Comp Physiol*, **179**, 715 (1996).
- 5) T. Ikeda, S. Harada, R. Hosono, M. Kakikawa, M. Iwahara, and S. Yamada, *J. Magn. Soc. Jpn*, **27**, 447 (2003).
- 6) Takeshi Ishihara, Yuichi Iino, Akiko Mohri, Ikue Mori, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, and Isao Katsura: *Cell*, **109**, 639 (2002).
- 7) Penelope J. Brockie, Jerry E. Mellem, Thomas Hills, David M. Madsen, and Andres V. Maricq: *Neuron*, **31**, 617 (2001).
- 8) Janet E. Richmond and Erik M. Jorgensen: *nature neuroscience*, **9**, 791 (1999).

2005年10月19日受理, 2005年12月19日再受理, 2006年2月21日採録

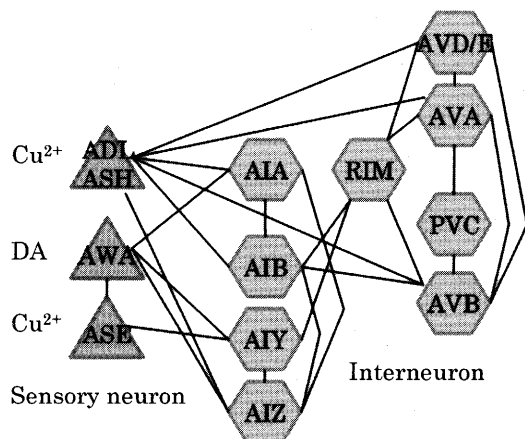


Fig. 9 Nervous system of *C. elegans* in relation to DA and Cu^{2+} .