

病原性細菌の培養細胞への感染に及ぼす  
静磁場の影響に関する研究

1997年3月

北海道工業大学大学院

齋藤章史

# 目次

第 1 章 序論	1
第 2 章 従来の研究	7
2.1 磁場の安全基準	8
2.2 生体に対する磁場影響	11
2.3 微生物に対する磁場影響	16
第 3 章 微生物の生態	21
3.1 細菌類の生態	22
3.1.1 細菌の分類	22
3.1.2 細菌の性状	25
3.1.3 真菌の性状	27
3.1.4 グラム染色	28
3.1.5 細菌の培養	29
3.1.6 細菌の帯電機序	35
3.2 病原性細菌の感染	36
3.2.1 病原性細菌	36
3.2.2 病原性細菌の感染機序	38
第 4 章 実験材料及び実験方法	41
4.1 被験微生物	42
4.1.1 増殖実験に使用した微生物	42

4.1.2 感染実験に使用した微生物	44
4.2 細胞と細菌の培養に用いた培地及び試薬	45
4.2.1 培養基(培地)	46
4.2.2 塩類溶液	48
4.2.3 試薬	48
4.3 実験方法	50
4.3.1 磁場暴露装置	50
4.3.2 増殖実験に関する方法	54
4.3.3 感染実験に関する方法	56
第5章 細菌類の増殖に対する静磁場の影響	60
5.1 富栄養条件下での静磁場の影響	62
5.1.1 細菌の増殖に対する静磁場の影響	62
5.1.2 真菌の増殖に対する静磁場の影響	70
5.2 貧栄養条件下での静磁場の影響	74
5.3 細菌類の増殖に対する静磁場の影響に関する検討	79
第6章 病原性大腸菌の細胞付着に対する磁場影響	81
6.1 病原性大腸菌の HeLa 細胞に対する付着能力	83
6.2 混合培養に対する静磁場の影響	84
6.3 大腸菌の単独培養に対する静磁場の影響	89
6.4 HeLa 細胞の被感染性に対する静磁場の影響	91
6.5 混合培養に対する変動磁場の影響	93
6.6 混合培養に対する磁極方向の影響	95
6.7 磁束方向と細胞培養面との関係	97
6.8 混合培養に対する培養液の粘性影響	99

6.9 病原性大腸菌の細胞付着に対する磁場影響の検討	-----	102
第7章 磁場暴露による感染の機序	-----	106
第8章 結論	-----	114
謝辞	-----	120
参考文献	-----	123
研究業績	-----	138

# 第 1 章

## 序論

地球上に生きる全ての生物は、太古の時代から地球自体が作り出す電磁場や太陽活動に伴う電磁場の影響を受けてきた。しかし、これらの電磁場が生物に与える影響は極めて小さく、長期間に渡って与えられたものであった。

近年、この電磁環境の様子が劇的に変化してきている。それは産業革命以来めざましい進歩を遂げた科学技術のひとつ、すなわち電気技術が著しく発展したからである。この発達は、自然電磁場の強度をはるかに上回る電磁場を発生させる機器を人々の間に普及させ、その結果、かつては特殊な職業人だけが人工磁場に曝されていたのに対し、現在は核磁気共鳴画像診断装置（MRI）や磁気浮上超高速列車（リニアモーターカー）など、一般市民（健常者）だけでなく傷病者までもが人工磁場に曝される時代となりつつある。

このような人工磁場が人々の身の回りに増えているにもかかわらず、磁場の生体に対する影響、特に人体に対する影響については不明な部分が多く、統一的な見解が得られていないというのが現状である。このことは人工磁場の被曝による不測の事態が、今後出現する可能性を示唆している。

磁場の生体影響に関する研究は、1930年代より世界各国で行われ、多くの報告がなされている<sup>1)</sup>。しかし、これらの報告では実験条件や培養条件、被験生物の種類などが多岐に及んでいる。

これまでの研究では被験生物の代表として、単細胞生物である細菌類や株化培養細胞が多く使用されてきた。これは細菌類や細胞が、生物として非常に小さいため、小規模な実験装置ですみ、さらに大量培養が容易であるという他の被験生物にはない長所を持つためである。また、ラットやマウスなどの高等生物を用いる場合に問題となる心理的な外乱を考慮する必要がないこと、最も代表的な細菌である大腸菌は生物としての特性が他の生物に比べて相当明らかにさ

れてきているなど、研究を進める上で有利な特徴を数多く持つためでもある。

これまでに報告されてきた研究成果を見ると、静磁場、変動磁場のいずれの場合も磁場の暴露によって細胞や細菌の増殖に影響がなかったとするもの<sup>21-27)</sup>、細胞や細菌の増殖が亢進され、よく増えるようになったとするもの<sup>28,33,34)</sup>、また逆に抑制され増え難くなったとするもの<sup>29-31)</sup>など様々な結果が得られている。

通常、生物は、それ自体が複数の生物による共同体であり、例えば宿主である人間と体内微生物の関係のように、ある一定のバランスの上に成り立っている。人間の体内にいる微生物の中には、食物の消化を助けるものがあるが、これは適正な菌数だけの場合であり、菌数が多すぎても少なすぎても人間にとっては害になる。また、体外から侵襲してきた病原性の細菌などに対して、人間は免疫系の働きで対処し、発病を防ぐが、侵襲した菌数が多い場合や毒性が強すぎる場合には、防御する事ができなくなり、発病に至る。このように人間や他の高等生物が生存していくためには、体内の常在菌や体外からの侵襲菌との間に一定のバランスが必要である。このため、人体に対する磁場影響について検討する際には、この点についても考慮する必要があるが、これまでの研究は単独の生物に対する磁場影響を観察したのにとどまっている。

このことから本研究では、これまでになかった全く新しい視点から磁場の生体影響を検討するために、研究対象として2種類の生物の相互作用に対する影響を取り上げ、詳細な検討をはじめて行った。具体的には、2種類の生物間の相互作用の例として感染を取り上げ、この系に対する磁場暴露の影響を検討した。実験対象には、感染系の最も単純なモデルと考えられる株化培養細胞と、これに特異的に付着性を示す病原性細菌を用いた。特に、感染に対する磁場影響を

検討する場合には、従来の研究報告とは栄養条件が全く異なり、栄養価の低い培養液を使用することから、本研究では低栄養価の培養液を作成し、その中での細菌の増殖に対する静磁場の影響について基礎的な検討から始めた。研究に使用した被験微生物は、生物学的に性質の異なる大腸菌、黄色ブドウ球菌、カンディダ・アルビカンズの3種類である。

また、本研究では暴露磁場として、150~450 mTの静磁場に注目している。これは一般に、生物に対して磁場が暴露された場合、時間的に変化する変動磁場と静磁場では本質的に異なる影響を及ぼすと考えられるからである。変動磁場の場合には磁力線の時間的変化によって誘起される電流の影響があるため、従来の研究結果を見ると、静磁場暴露の場合よりも変動磁場暴露の方が、生物に対して影響が表れたとする例が多い。一方、国連世界保健機関（WHO）は、変動磁場暴露において50~500mTの磁場が興奮性組織に刺激を与え（健康ハザード）、500mT以上の磁場が心臓の期外収縮や細動を発生させる（急性健康ハザード）との見解を示しているが、静磁場については明確な判断基準がない。しかし、今後の発展が期待されている超伝導技術による装置が一般に普及した場合を想定すると、静磁場暴露の生物への影響を明らかにすることは極めて重要になってくるものと思われる。変動磁場の見解をそのまま静磁場の暴露基準とはできないものの、500mT以上の磁場による急性ハザードよりも、それ以下の強度による慢性的な健康ハザードの問題について検討する方が、より現実的に重要であると本研究では考え、暴露する磁場強度を本研究装置で発生し得る450mT以下とした。

検討の結果、静磁場の暴露によって細菌類の増殖が抑制される傾向が認められることが明らかとなり、その抑制の程度は暴露する磁場強度によって異なることが判明した。また、培養液の栄養価を低



下させた場合には、同様の現象がさらに顕著に観察されることもわかった。さらに本研究では細菌の増殖に対する磁場の影響を検討する際に、従来から用いられている各測定時刻ごとの細菌数の他に、新たに世代時間という評価指標を導入している。これにより、従来の比較方法での僅かな差異が、より明確にはじめて判定できるようになった。

このような基礎的な検討に基づいて、次に本研究の主目的である病原性細菌の細胞への付着に対する磁場暴露の影響を観察した。被験微生物には、感染細菌として尿路感染症患者由来の病原性大腸菌を、また標的細胞としてヒト子宮頸部ガン由来の HeLa 細胞を用いた。

その結果、感染状態である大腸菌と細胞の混合培養時に、磁場強度 450mT の静磁場を暴露すると、細胞に対する付着細菌数が増加することをはじめて見出した。またこの現象には磁場強度依存性があり、150mT では付着細菌数の増加が認められず、200mT 付近より付着細菌数の増加が観察された。さらに、この現象の要因が被験生物単体の生物学的影響によるものか否かを検討するために、病原性細菌及び株化培養細胞各々単独に対する静磁場の影響について検討を行った結果、被験生物単独に 450mT の静磁場を暴露しても、付着細菌数の増加につながるような生物学的影響は観察されなかった。また本現象の要因が、被験生物に対する磁場の物理的な影響（ローレンツ力）によるものか否かを検討するために、周波数 10, 30, 50Hz の正弦波状に変化する変動磁場を混合培養時に暴露した。その結果、30, 50Hz 変動磁場は付着細菌数に変化を及ぼさなかったが、10Hz の場合には付着細菌数が減少した。さらに、本研究では細胞をプラスチックプレートの片面に培養して用いているが、これを暴露する磁束の向きに対して異なる方向に向けて混合培養を行

い、静磁場を暴露すると、付着細菌数に差異が生じた。これらのことから、静磁場暴露による付着細菌数の増加現象は、細胞や細菌の生物学的な変化により生ずるのではなく、磁場の物理的な影響による可能性が強く示唆された。

このように、本研究で得られた結果から、静磁場暴露が複数の生物間の相互作用（感染）に影響を与える可能性が十分に高いことが確認された。このため、人間が長時間強い静磁場に曝されるような環境に置かれた場合、体内微生物や侵襲細菌との間で保たれていたバランスが崩れ、感染のように人間が細菌に侵される状態、すなわち病的な状態に移行する危険性が考えられた。

本論文は7章から構成されており、次章以降は次のような内容となっている。まず第2章では、細菌や細胞への磁場暴露による影響について従来の研究報告をまとめ、本研究の立場を明確にした。第3章では、実験に使用した微生物である細菌の一般的な性状についてまとめ、第4章では実験に使用した機器や材料、実験の手順について述べた。第5章では、3種類の細菌の増殖に及ぼす静磁場の影響について実験的に検討し、さらに第6章では、病原性大腸菌とHeLa細胞を用いて、両者の付着に対する磁場の影響とその要因についての検討を行った。第7章では、第6章で観察された静磁場暴露による付着細菌数の増加現象の要因を分析するために、数値を用いた計算を行い、ローレンツ力が感染の一要因である可能性が高いことを示した。第8章は本研究の結論であり、得られた結果を整理し、重要な知見をまとめた。

## 第 2 章

# 従来の研究

## 2.1 磁場の安全基準

これまで、磁場は人体に対して無害であるとされてきた。しかし、科学技術の発達により、我々の生活空間で強力な磁場が使用されるようになるに伴い、実害の有り無しの判別が明確にならないまま、その危険性が危惧されるようになった。そのため、最近では高強度の磁場を使用する場所での安全基準が設定されるようになってきている。

現行の安全基準は概ね施設、装置ごとに決められてはいるが、各国によって多少異なっている。しかし、その内容は全般的に見ておおよそ一致している。また、ほぼ一様に次のような注釈がついている。①磁場の人体影響についての諸研究者の成績は一致していないが実用上は何か定めなければならないため、②科学的根拠は不十分だが、仮に次のように定める。③将来、信頼できる研究成果が出たら、この基準に変更する。このように、あいまいな部分があるものの、現行で定められている磁場の安全基準を以下に示す。

静磁場に関する初期の安全基準としては大型加速器についてアメリカとロシアのものがあり、第 2.1 表に示す<sup>2)</sup>。いずれも非公式のものである。

アメリカの基準は、比較的長期にわたる職業的暴露と、ごく短期間の一般人の暴露とに区別されている。加速器周辺で働く人の長時間（8 時間/日）全身被曝は 20~30mT 以下または地磁気（30~70 $\mu$ T）の 1000 倍程度を限界としている。これに対して、ロシアは空間的な磁場勾配を配慮している。

第 2.1 表 静磁場の安全基準<sup>2)</sup>

A アメリカの非公式の基準 (1970 年代)

	全身または頭部	腕および手
長時間	20mT	200mT
短時間	200mT	2T

B ロシアの非公式の安全基準 (1970 年代)

	全身	手
均一磁場	30mT	70mT
磁場勾配	50~200mT/m	100~200mT/m

最近の安全基準の例として MRI の安全基準を第 2.2 表に示す<sup>3,4)</sup>。静磁場の最大値は暴露時間の短い被験者 (患者) については 2.5T に引き上げられた。ただし、オペレータの長時間被曝は 20mT 以下と昔の基準値が引き継がれている。

静磁場とは異なり、変動磁場は時間的に磁場強度が急変する。このため生体内の組織に誘導電流を誘起し、筋や神経の興奮を引き起こす。これは、生体組織や体液が導電性を持つため、変動磁場中に暴露されると電磁誘導により生体内に渦電流が生ずるためである。数十 kHz 以下の低周波磁場では興奮性膜への刺激効果が主であるが、数百 kHz 以上の高周波になると熱作用が主体となる。この点を考慮して MRI では時間的に変動する磁場についての基準が設定されている (第 2.2 表)<sup>3,4)</sup>。

第2.2表 MRIの安全基準(1983, イギリス)<sup>3)</sup>

静磁場	全身	手
被検者, 患者	2.5T	—
オペレータ, 長時間	0.02T	0.2T
オペレータ, 15分以内	0.2T	2T
変動磁場		
持続時間 10msec 以上	20T/s	(root mean square)
ラジオ波磁場		
体温上昇		1°C以下
局所温上昇(1g以下の組織)		1°C以下
全身	0.4W/kg 以下	
局所(1g以下の組織)	0.4W/kg 以下	

その他の注意

心臓ペースメーカーなどの電子装置や体内の金属製品(例: 血管クリップ、義肢、骨釘など)は強磁場内に入れてはならない。

空間的に不均一な磁場勾配については、ロシアのもの以外には考慮されていない。しかし、しばしば磁場強度と磁場勾配の積が問題となることがあり、さらに研究を進める必要がある。

このほか、過去に磁場の安全基準の1つとして考えられた磁気閃光という現象は、眼球をはさんでパルス磁場を与えるとき閃光を感じる現象で1896年にD'Arsonvalによって報告された<sup>5)</sup>。例えば、20Hzで誘導電流が0.02A/m<sup>2</sup>を超えると起こり、これは変動磁場2T/sに相当する。1959年にP.Lovsundらは、この閾値を定量的に調べている<sup>6)</sup>。なお、眼球に低周波通電を行うと、やはり閃光が感知される。この研究は1930年代に始まり、日本ではMotokawaとIwamaによる研究がある<sup>7)</sup>。

本節の始めでも述べたとおり、このような磁場の安全に関する基準は未だ不完全なものである。これは磁場の生体、特に人体に対する影響が明らかになっていないことに原因がある。

そこで次節以下で、磁場の生体に対する影響についてこれまで報告されてきた研究をまとめ、不明な点を明らかにする。

## 2.2 生体に対する磁場影響

生体に対する磁場影響が注目を集めたのは、前節でも述べたように人体への危害があるのか否かということがきっかけであった。このため、初期の研究は、人体、特に磁場に暴露され続けている労働者に対する疫学的なものであった。

磁場の人体影響調査に関して初期の有名なものとしては 1974 年のソ連の Vyaiov<sup>8)</sup>による研究がある。これは磁場に暴露される職場の労働者を対象とする調査で、永久磁石製作工場や機械製作工場の職員について 6 年間、1068 人の健康調査である。

対象者の磁場暴露量は一定しないが、1 日の 20~60%の時間、手に 50~550mT 程度の磁場暴露を受けた労働者である。この調査研究では様々な報告がされているが、解析法などについては不備な点が多いため、現在ではこの報告にはあまり信頼性が無いとされている。例えば、血圧については「磁場に暴露される職場に就いてから始めの 2~3 年間は 34~43%の人に最高血圧で 10~16mmHg の低下、最低血圧で 4~8mmHg の低下があり、その後は正常値に回復した」と書いてあるが、統計処理や有意差検定もなく、暴露の程度によるグループ分けも明確でない場合がある。

アメリカでも、1982年に Marsh<sup>9)</sup>らによつての労働者への磁場暴露調査が行われており、オンタリオ、ニューヨーク、テキサスの3か所で計5つの電解プラント工場について行われた。320人の磁場暴露群（男子）と186人の対照群（男子）について定常磁場暴露の影響を調査している。被験者の暴露程度はオペレータ作業者の労働位置における計測値で  $7.63 \pm 6.67 \text{mT}$ （最高値  $14.6 \text{mT}$ ）である。この研究では対照群を設定するに当たつて、年齢、性別、人種、喫煙、飲酒、作業状況、職場の化学環境をできる限り統一させた。被験者のアンケート調査、内科的診察、血液検査を行なつた結果、暴露群でわずかな白血球減少（全員）と血圧上昇傾向（黒人のみ）が認められたが、一般症状及び貧血については対照群と暴露群の間に有意差が見られなかった。

最近では、1995年に Bracken<sup>10)</sup>らによつてアメリカ合衆国、カナダ、アイルランド、ニュージーランドの4ヶ国、55の電気関係の公共団体についての磁場暴露調査が行われた。ただし、この調査は職種ごとの暴露量を明らかにすることを目的としており、このため磁場暴露影響の疫学的、医学的な検討は行われなかった。

この種の職場調査で最も困難なことは観察対象とする各個人の暴露条件の見積りをどうするのかということである。現在の職場環境の測定はできるが、勤続何年間かにわたる平均暴露量の算出は困難である。また、就職前の健康状態や環境も判断しにくい。

血球数などの検査値は反復検査すれば信用できるデータが得られるが、一般症状や聞き取り調査から症状（不定愁訴）をどう客観化するか、また、その比較は非常に困難である。

正確な検討のためには年齢、性別、人種、経済的条件、居住地域と職場環境、煙草、飲酒などの条件を整合させた対照群を選ぶ必要がある。しかし、現実には暴露群と対照群とで磁場の暴露量だけが



異なり、その他の条件が全く等しいというような場合はありえない。個人的な因子としては直接的あるいは間接的な喫煙量、食生活の問題など、地域的には大気汚染の程度、水質など、職場環境では、磁場暴露の起こる職場における特定の化学物質、微粒子、粉塵などの濃度、騒音や温度条件など、定常磁場暴露より強い病原因子がありうる。従って、調査自体が綿密な計画に基づいて行わなければならない。

このような職業的磁場暴露以外にも、1970年代後半から1980年代の間、欧米で商用周波数電磁波と小児ガンの関係が問題視され、注目を集めた。また、成人では電気技師と白血病との関係が指摘され、全白血病、特に急性骨髄性白血病が電磁波暴露となんらかの関係を持つ可能性が危惧された。

1979年にWertheimerとLeeperは小児の癌死亡が交流電磁波の暴露によって増えるという論文を発表し<sup>11)</sup>、続いて1982年に電気関係の技師の癌死亡も同様であると発表した<sup>12)</sup>。すなわち、職業として高圧電源などの近くで働いたり、強力な送電線の近くに住んでいたり、家庭でも強い電磁波に常に暴露されたりすると癌になる危険性があるという内容であった。

この研究を受けて、欧米各地で死亡統計と商用周波数電磁波への暴露量との関係が解析されたが、その結果は一致していない。多くの統計では暴露量を測定したわけではなく、単に死亡者の職業分類を基に各人の暴露量を2~4段階に分類しているに過ぎない。小児の家庭での暴露量は家屋の動力線の配線から推定している場合もある。以下にそれらを上げる。

1988年にSavitz<sup>13)</sup>らは、14歳以下の小児癌の調査と家屋内の電場、磁場の実測を行い、356例中128件について磁場が強い時、白血病頻度はわずかに増すと結果を得た。またSavitz<sup>14)</sup>らは1990

年にも小児癌と商用周波数電磁波暴露との関係を研究した論文を発表した。これによると、0~14歳の間にはどの程度60Hz交流電磁波を被曝したかの推定以外に、母胎内での被曝量も計算に入れている。この研究では家庭の収入、子供の性別の他に、枕元の電気時計、電気パッド、家屋内の配電線なども考慮されている（最も強い磁場暴露を与える機器は電気毛布であった）。結果としては、出生前および後の電気毛布使用は小児の癌（中でも脳腫瘍）に関係するかもしれないとしている。

これとは逆に、同年のSeverson<sup>15)</sup>らの調査では、商用電力線による磁場と急性白血病との間に、関係が認められなかったとしている。この場合、164例の非リンパ球性白血病症例のうち114例について詳細な調査を行い、住居内の磁場強度も寝室・居間・台所の3か所で測定している。しかし翌年（1989年）、WertheimerとLeeper<sup>16)</sup>はこのデータを見直すと磁場のリスクが有意に現れるとした。すなわち、暴露量の見直し、及び各群の再分類によって同じデータでもリスクが認められるということである。同年、Severson<sup>17)</sup>らはこれに対して返答しており、特定の原則に基づいて分類したものを、結果を見てから再分類したりすることに意味は無いとした。

このほかにも多くの研究結果が発表されたが、それらは統計的に有意であってもぎりぎりであったり、また有意でなかったりと確定的なデータはまだ得られていないのが現状である。1988年にAhlbom<sup>18)</sup>はこの関係の研究をまとめ、次のように評価した。いくつかの論文は、方法論の上で問題があったり、結論づけがあまりにも単純すぎるが、全体として現在までのところ、電磁波が癌死亡に関係があるともないとも明確な結論はだせない。しかし、今までの研究結果から言えることは、さらに研究しなければならないということである。

これ以後も、この種の疫学的検討は行われ、最近では 1995 年に Wertheimer<sup>19)</sup>らによって小児ガンに対する電力設備からの磁場暴露の影響が検討された。この検討では、磁場暴露によって小児ガンになるリスクが増加すると報告している。

以上のような疫学的調査では、電磁波の個人暴露量（過去の磁場暴露も含む）の推定精度を向上させる必要があり、生活環境中や職場内の発ガン性化学物質濃度も配慮しなければならない。もちろん、母集団の大きさも問題になる。このような問題からボランティアを募集し、短時間ながら強磁場を暴露して暴露群、対照群の条件を合わせて検討が行われた。

1986 年に Oberhaensli<sup>20)</sup>らが磁場強度 1.6T の磁場中での肝臓の核磁気共鳴について検討を行ったが、短時間の磁場暴露では特別な影響はなかったと発表した。また、1989 年に Jehenson<sup>21)</sup>らは 2T の静磁場内で 12 名のボランティアの心臓リズムを調べ、約 1 時間の磁場暴露の期間中は徐脈となり、磁場暴露終了後は約 10 分ですみやかに元に戻ると報告した。さらに強磁場では、1989 年に Weigl<sup>22)</sup>らが 4T の静磁場中でも 5 名のボランティアの心電図には変化がなかったと報告した。

この種の人体を被験体とした実験は散発的で被験者数、実験例数共に少数のものが多く、データ相互間の不一致も見られる場合が多い。これは心理的外乱による影響が大きく現れるためであると思われる。また、過激な実験条件での検討は倫理的、社会的問題を含むことから行うことができず、またそれほど磁場強度の高くない磁場を用いる場合であっても、人体を対象とする場合には実験装置全体が大きくなり、常にコストの問題が付きまとうことになる。

以上のような理由から、人体のかわりに牛や豚などの大型哺乳類や猿類、またラットやマウスなどの小型哺乳類を用いた実験も計画

され、いくつかの報告がなされた。特にラットやマウスは、今日においても動物実験を必要とする検討の際、最も良く用いられる<sup>23-26)</sup>。しかし、人体の場合と同様に心理的外乱を全て取り除くことが困難であること、大容量の強磁場空間を作るために莫大な費用がかかり大規模な実験ができないこと、また最近の動物愛護運動の問題などが研究の発展を妨げることになった。このため、生体に及ぼす磁場の影響についての検討に用いられる被験生物は、細菌や培養細胞に代表される微生物が主流となった。

## 2.3 微生物に対する磁場影響

細胞や細菌などの微生物を被験体として用いる研究では、観察の際の指標として、増殖(成長)速度や DNA 合成<sup>27-42)</sup>、細胞形態<sup>43-47)</sup>、組織内での細胞の運動<sup>48-53)</sup>、細胞の配向<sup>54-70)</sup>、染色体異常<sup>71-79)</sup>、物質代謝と酵素反応<sup>80-93)</sup>、膜輸送と分泌<sup>94-96)</sup>など多くの現象が用いられる。また、超低温処理<sup>97,98)</sup>や放射線処理<sup>99-105)</sup>との相乗作用も検討されている。

特に、増殖や DNA 合成への影響は、他の影響を指標とする場合よりも観察や検討が容易であり、実験を行う際のコストも比較的安価であるため、磁場影響を検討する際の指標として最も多く用いられてきた。なお、本研究でも検討の際の指標の1つとして微生物の増殖を用いている。以下に微生物の増殖や DNA 合成に対する磁場影響について要約する。

この方面の研究は 1930 年代後半より行われており、培養技術が確立され一般に普及した 1960 年代半ばからは多くの研究者の間に急速に広まった。しかし現在においても、それらの研究報告から統

一した結果は得られておらず、磁場暴露が微生物に対して増殖抑制という人間で言うならば健康障害に当たる影響を与えるとする報告がある一方で、増殖亢進を与えるとする報告もある。また、これらとは逆に微生物の生体に対して磁場暴露が全く影響を与えないという報告もある。

磁場暴露が微生物に対して影響を与えないとする報告としては、やや古いものになるが 1979 年に Nath<sup>27)</sup>らが一度に多くを公表している。これによるとまず、電磁石により発生させた 140mT の均一磁場でマウス乳癌細胞 (EMT6) を 48 時間培養し、細胞増殖速度や細胞生存率を磁場の外に置いた対照群と比較したが、有意な差異は認められなかった。また同様に 570mT で 6 時間暴露した場合も同様の結果であった。さらに別種のチャイニーズハムスター細胞 (DON) を 2.05T の均一磁場に暴露した場合及び磁場強度 1.74T、勾配 0.23T/cm の不均一磁場に暴露した場合にも明確な影響は観察されなかった。なお、この実験では細胞増殖速度は細胞数の増加を、細胞生存率はコロニー形成能を指標とした。

工学分野での磁場影響についての研究では、この報告のように磁場暴露に電磁石を用いるのがほとんどであるが、医学、特に歯学の分野では強磁場の永久磁石を長期間応用するのに必要な安全基準を作成するための重要な資料として各種の永久磁石を用いた研究がなされている。この種の報告では磁場暴露が微生物に対して影響を及ぼさないとするものがほとんどである。古いものでは 1964 年に Halpern と Green<sup>28)</sup>がヒト子宮頸ガン由来の HeLa 細胞を馬蹄形磁石の極付近 (120mT) で 7 日間培養し、細胞増殖速度に対して影響がなかったと報告している。さらに強い磁場を得るため、近年ではサマリウム・コバルトをはじめとする希土類磁石が多く使われるようになり、1979 年に Tsutsui<sup>29)</sup>らが希土類永久磁石を用いて最大値

0.3Tの不均一磁場をつくり、マウスFL細胞を96時間培養したが、細胞増殖速度に影響がなかったと報告している。これ以後にも1981年にはEsformes<sup>30)</sup>ら、1985年にはGalarとSanchez<sup>31)</sup>、1986年にはSatoh<sup>32)</sup>らによって検討が行われたが、その結果は同様に影響が無いとするものであった。1980年代後半からは世界的に研究者の関心が極低周波 (Extremely Low Frequency: ELF) 磁場に移行したためか、この方面の研究はあまり見かけられなくなった。

変動磁場を用いた場合には、影響が見られないという報告はほとんど無く、1984年のKaune<sup>33)</sup>らの報告が知られている程度である。これは静磁場の場合には純粋な磁気の効果とみなすことができ、これが細胞中の荷電粒子に影響を与えるためには高強度の磁場が必要であると考えられるのに対し、変動磁場の場合には磁場によって誘起される誘導電流の影響が無視し得ないからであると思われる。事実、磁場暴露が微生物に対して影響を与えた例について見ると、静磁場での報告数が少なくなり、逆に変動磁場での報告数が急増する。

静磁場の暴露により影響があったとする報告では、増殖亢進影響があったとするものはほとんど無く、1985年にFeinendegenとMühlensiepen<sup>34)</sup>がマウス骨髄細胞のチミジンキナーゼ活性とI標識ウリジン取り込みが1.4T、約30分の磁場暴露で増加し、また磁場暴露終了後、ウリジン取り込みが正常値に戻る時、暴露時間が長いほど、復帰が遅れると発表した程度である。

これに対して、静磁場暴露による影響が認められたものの大部分は増殖抑制影響についてであり、その磁場強度もmTオーダからTオーダまでとかなりの広がりがある。

古い報告では磁場暴露に永久磁石が使用されており、1961年のMulayとMulay<sup>35)</sup>の研究ではアルニコ磁石の400mT静磁場を用いている。カバーガラスの下面に付着させた滴状培養液でマウス腹水

肉腫 37 細胞を培養し、18 時間後に対照群と比較すると、腫瘍細胞の大部分が変性していた。1964 年に Butler と Dean<sup>36)</sup>が KB 細胞を 3 日間 400mT の静磁場で培養し、その増殖について調べ、磁場外に置いた対照群が通常通りの増殖を示したのに対し、磁場暴露群では統計学的に有意な著しい抑制を受けたと発表した。1969 年には D'Souza<sup>37)</sup>らは同じアルニコ磁石で発生した 370mT 静磁場が腹水肉腫 37 細胞の DNA 合成に与える影響をオートラジオグラフを用いて観察し、グレイン計数法で <sup>3</sup>H 標識チミジン取り込み速度を測定した。1,2 及び 3 時間の磁場暴露によって、それぞれ 17.8, 23.7, 21.7%の合成低下が見られたと報告している。

最近の例では 1984 年に Ardito<sup>38)</sup>らが、培養ヒトリンパ球に対する 74mT の比較的弱い均一磁場の影響について調べた。その結果、第一、第二及び第三分裂を行っている細胞数を $\chi^2$ テストで分析すると、48 時間の磁場暴露は細胞増殖を強く抑制すると発表した。

静磁場とは逆に、変動磁場の影響については 1980 年代以降特に多い。これは商用周波数帯域を中心とする ELF の変動磁場の影響が社会的に問題になったためである。

この方面の多くの報告は、50 または 60Hz といった単一の周波数についてのみの研究であることが多いが、1986 年に Goodman と Henderson<sup>39)</sup>が発表した報告では、周波数 72~4400Hz、磁場強度のピーク値 18 $\mu$ T~1.15mT の正弦波形で暴露すると、唾液腺細胞の RNA 転写が正弦波によって促進することを認めた。これより前、1984 年に Liboff<sup>40)</sup>らが行った検討はさらに広帯域を使用しており、周波数 15~4000Hz、磁場強度 2.3 $\mu$ T~56mT の磁場がヒト繊維芽細胞の DNA 合成を促進すると報告した。

今日においても磁場の生体影響に関する検討は、様々な指標を用いて続けられており、1996 年に Barbier<sup>41)</sup>らがラットの脳下垂体細

胞のカルシウムイオンの移動に注目して検討を行い、周波数 50Hz、磁場強度の最大値 50 $\mu$ T の正弦波状変動磁場を暴露すると、細胞のカルシウムイオン移動量が増加すると報告している。同じく 1996 年に Hirakawa<sup>42)</sup>らがウサギの細胞を周波数 60Hz、磁場強度の最大値 5, 10, 50, 100 $\mu$ T の変動磁場中に置き、そのグロビン cDNA の合成を観察した。その結果、磁場暴露によって cDNA の合成が増加し、また高分子の合成も活性化されたと発表している。

以上に述べたように、磁場の生体影響は微生物に限定した場合でも、その程度は未だ不明である。現在、微生物に磁場の影響が発現した場合には、その要因としてイオン反応<sup>106,107)</sup>や酵素反応<sup>108)</sup>など、細胞内での化学反応に対する影響が挙げられることがあるが、いずれも推測の域を脱しておらず、依然不明なままである。また、従来報告された研究は、いずれも単一の生物のある特定の反応系に注目して観察を行っている。しかし、自然界では、生物が単独で存在していることはほとんどなく、例えば人間と体内微生物のような複数の生物が互いに影響を及ぼし合うという非常に複雑な系となっている。このため、生物間の相互作用に対する磁場影響を知ることは、極めて重要であるにもかかわらず、未だこの方面に関する報告は見られない。



# 第 3 章

## 微生物の生態

本研究では、被験微生物として3種類の細菌類と、株化培養細胞を用いた。これらの細菌や培養細胞などの微生物は、工学分野のみならず、従来から様々な方面の研究で利用されており、特に大腸菌は今日の遺伝子工学の基礎を築いた最も代表的な被験微生物である。本章では、この大腸菌を中心として実験に使用した微生物の一般的な性質や生態について述べる。

### 3.1 細菌類の生態

#### 3.1.1 細菌の分類

細菌学の発生初期には、進化の機構が明確ではない細菌に完全な分類法は無いとされてきた。しかし、1974年に出版されたD.H.Bergeyの分類書(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)第8版<sup>109)</sup>で初めて細菌を原核動物(Procaryotae)界に属させた。

この著書では、Procaryotaeを

Division(門) I 青色細菌(Cyanobacteria)

Division(門) II 細菌(Bacteria)

に分類し、Division(門) IIをPart1からPart19に分け、藍藻以外の光合成細菌、非光合成細菌、リケッチア(Rickettsia)およびクラミジア(Chlamydia)を含めた。

例えば、この著書の中で大腸菌は次のように分類されている。

第8類 グラム陰性通性嫌気性桿菌

(Part 8, Gram-negative facultatively anaerobic rods)

科 (Family) Enterobacteriaceae

属 (Genus)    *Escherichia*

種 (Species)    *coli*

D.H.Bergey の分類書第 8 版で示されている各分類とその各類に  
属する主要な菌属の分類表を第 3.1 表に示す。

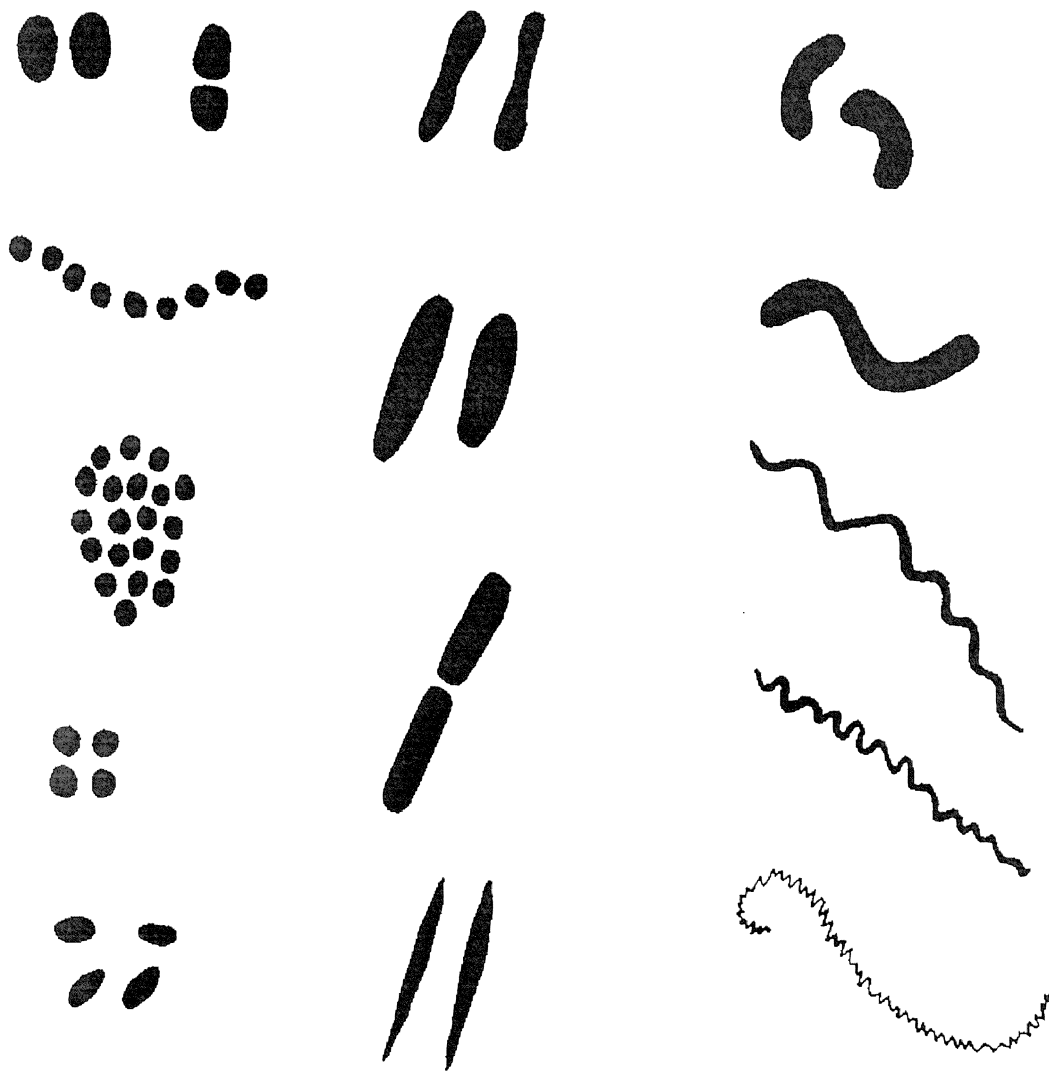
第 3.1 表 細菌の分類

Key	Part (類)	主な属 (Genus)
I. 光合成	1	
II. 物質栄養性		
A. 無機栄養性	2,3,12,13	
B. 有機栄養性		
1. 滑走細胞	2	<i>Myxococcus</i>
2. 非滑走細胞 (19 類を除く)		
a. 菌糸体及び被鞘細胞	3	<i>Streptothrix</i>
aa. 非菌糸体及び非被鞘細胞		
b. 不同の二分分裂体 (鞭毛や線毛以外の付属器官をもち分芽で増殖する)	4	<i>Hyphomicrobium</i>
bb. 上記の性質なし		
c. 境界不明瞭の細胞		
d. 螺旋型、細胞壁あり	5	<i>Treponema,</i> <i>Borrelia,</i> <i>Leptospira</i>
dd. 非螺旋型、細胞壁なし	19	<i>Mycoplasma</i>
cc. 境界明瞭の細胞		
d. グラム陰性		
e. 偏性細胞内寄生体	18	<i>Rickettsia,</i> <i>Coxiella,</i> <i>Chlamydia</i>
ee. 上記の性質なし		
f. 曲桿菌	6	<i>Spirillum</i>
ff. 非曲桿菌		
g. 桿菌		
h. 好気性	7	<i>Pseudomonas,</i> ( <i>Brucella,</i> <i>Bordetella</i> )
hh. 通性嫌気性	8	<i>Escherichia,</i> <i>Salmonella,</i> <i>Shigella, Klebsiella, Proteus,</i> <i>Yersinia,</i> <i>Vibrio,</i> ( <i>Hemophilus, Pasteurella</i> )
hhh. 嫌気性	9	<i>Bacteroides</i>
gg. 球菌または球桿菌		
h. 好気性	10	<i>Neisseria</i>
hh. 嫌気性	7	
11	11	<i>Villonella</i>
dd. グラム陽性		
e. 球菌		
f. 内性孢子形成	15	<i>Sporosarcina</i>
ff. 内性孢子非形成	14	<i>Staphylococcus,</i> <i>Streptococcus, Peptococcus</i>
ee. 桿菌ないし菌糸体		
f. 内性孢子形成	15	<i>Bacillus, Clostridium</i>
ff. 内性孢子非形成		
g. 直桿菌	16	<i>Lactobacillus(Listeria)</i>
	17	
gg. 不規則桿菌 (コリネ型) ないし菌糸形成	17	<i>Corynebacterium,</i> <i>Actinomyces, Mycobacterium,</i> <i>Nocardia, Streptomyces</i>

### 3.1.2 細菌の性状

細菌は顕微鏡を利用することで観察が可能な単細胞生物であり、一般的には核膜の存在しない原核生物(Procaryote)に分類される。その大きさおよび形状は種によって遺伝的に一定であり、分類学的に重要な意味を持つ。具体的には、長径でその長さが  $0.1\sim 20\mu\text{m}$  の範囲に入り、病原性細菌ではおおよそ  $7\mu\text{m}$  前後のものが多く、これに対して、土壤中に生息する土壌細菌では  $10\sim 20\mu\text{m}$  と比較的大型のものが多。しかし、細菌の大きさはその生活形態、栄養条件および水素イオン濃度(pH)などにより影響を受けやすく、一般的に細菌の大きさから菌種を判別することは難しい。形態学で用いられる長さの単位としては micrometer( $\mu\text{m}$ )、nanometer(nm)ならびに angstrom( $\text{\AA}$ )が国際的に用いられている。

細菌の外形は球形の球菌、桿状の桿菌、ラセン状のラセン菌、コマ状のビブリオおよびスピロヘータに大別される。このうち球菌の配列はその種類によって特有であり、2個ずつ対をなす双球菌、4個が集合する4連球菌、鎖状に連なるレンサ球菌、ブドウの房状に集合するブドウ球菌そして4個ずつか8個ずつになっている8連球菌などがある。このような配列は、それぞれの菌種によって分裂様式および方向が異なることによるものである。桿菌もその長径と短径の比は様々であり、球形に近い球桿菌から長径が短径の2~10倍にも達する長桿菌までである。桿菌の先端は半円形をなすもの、直角をなすもの、次第に細くなって紡錘形をなすものなどがある。また、一般に桿菌は単独で存在するものが多いが、中には結核菌のように柵状配列をとるもの、ある種の土壌細菌のように連鎖を示すものなどもある。第3.1図に細菌の形態と配列を示す。



- | A. 球菌    | B. 桿菌     | C. ラセン菌    |
|----------|-----------|------------|
| 1. 双球菌   | 6. クラブ状桿菌 | 10. ビブリオ   |
| 2. レンサ球菌 | 7. 円形桿菌   | 11. スピリルム  |
| 3. ブドウ球菌 | 8. 角形桿菌   | 12. ボレリア   |
| 4. 四連球菌  | 9. 紡錘形桿菌  | 13. トレポネーマ |
| 5. 球桿菌   |           | 14. レプトスピラ |

第 3.1 図 細菌の形態と配列

### 3.1.3 真菌の性状

真菌 (fungus) とは、一般に枝分かれした菌糸 (hyphae) が網の様に交差、集合した菌糸体 (mycelium) となって生育し胞子を作り、また光合成を行わない微生物の総称である。真菌は下等な真核生物 (植物) であるが、近年は独立化され、1つの界 (Kingdom) として扱われている。

真菌の特徴は以下の点である。

I) 真核生物である。

①核、ミトコンドリア、液胞などの小器官がある (分化している)。

②核膜に包まれた核を持つ。核は通常1個 (単核) であるが、多核のものもある。染色体 (DNA とヒストンよりなる) は複数であり、高等な真核生物と同様に減数分裂及び有糸分裂を行う (ただし後者の核分裂の方法は、他の真核生物とは異なる)。

II) 細胞壁を持つが、主成分は細菌や植物とは異なり、糸状菌はキチン、酵母は $\beta$ -グルカンである。

III) 従属栄養生物を持つが、光合成はしない (葉緑素が無い)。また根、茎、葉の分化が無い。

IV) 運動性がない。

V) 特有の生活環を持つ。

真菌は5万種以上存在するが、ヒトに病原性を示すのはごく一部であり、逆に発酵食品 (パン、チーズ、味噌、醤油など) や医薬品 (抗生物質、ビタミンなど) の製造に利用される種が一般的である。真菌の基本的な形態は細胞、菌糸及び胞子であり、これら特徴ある構造を真核要素 (fungus element) という。また、真菌は大腸菌な

どの細菌とは異なり、核を持つ真核生物であり、進化論上では細菌よりも高位に位置する。胞子は真菌類の増殖器官であり、その形成様式は菌種によって異なる。雌雄の核の融合によって形成されるものを有性胞子、無性生殖によって生ずるものを無性胞子という。真菌類の中で、ヒトに病原性を示すものの多くは後者の無性胞子のみを形成し、不完全菌類に属する。

#### 3.1.4 グラム染色

デンマークのクリスチャン・グラムが考案した染色方法をグラム染色といい、細菌の分類法にも利用されるほど有名な染色方法である。この染色方法はスライドガラスプレートに細菌を擦り付け、乾燥させてから軽く加熱して固定した後、クリスタル紫液で染める。次にヨード溶液で媒染し、さらにアルコールまたはアセトンで短時間脱色する。この様な操作により濃い青紫色に染まった細菌をグラム陽性菌といい、脱色されて無色になった細菌をグラム陰性菌という。グラム陰性菌はアルコールやアセトンでの脱色の後、サフラニンやフクシンなどの赤色色素で染めることが多い。この染色法による染まる色の違いは、主に細菌の細胞壁の構造と関連するものと考えられている。

グラム陽性菌と陰性菌を比べると、細胞壁の構造に大きな違いがある。陽性菌の細胞壁は厚さが 15~16nm で、陰性菌の細胞壁と比べて厚いが、その層構造は一層である。一方、陰性菌は 2~3nm の薄い内層と 8~10nm のやや厚い外層からなる二層構造の細胞壁を有する。また、陽性菌の細胞表面には RNA と特殊なタンパク質との複合体が含まれていて、それがクリスタル紫及びヨード溶液と反応



してアルコールやアセトンで脱色されない化合物を作るため、グラム染色法で青紫に染まる。

### 3.1.5 細菌の培養

細菌の増殖に必要な環境条件、つまり、栄養素、温度、pH、通気などを整えて細菌を増殖させることを培養という。栄養素を含み水分、pH などの増殖因子を調整し培養に用いられるものを培地という。培地は他の微生物の混入を防ぐため、全て滅菌したものをいなければならない。

#### a) 培養基

単に培地ともいう。培養基には、液体培地と固形培地がある。液体培地の基本となるものはブイヨン培地である。またブイヨン培地に寒天を加えて固化させたものが寒天培地であり、固形培地の基本となる。本研究では液体培地として普通ブイヨン培地 (broth)、固形培地としてブイヨン培地に寒天を 1.5% 加え普通寒天培地 (nutrient agar) を用いた。

これら通常用いられる培地は無血清培地と呼ばれ、この他に血清を含有する血清培地もある。血清の役割としては、栄養素の供給ばかりではなく、培地の物理化学的条件の調整、代謝産物やタンパク質分解酵素などの細胞障害因子の中和、培養面の改善、ホルモンや細胞成長因子、微量元素など生理活性物質の供給などがある。細菌の種類によっては要求される栄養素や活性物質、物理化学的生理条件などが異なる場合があり、血清は多くの場合、それらの要求を個々

に知ることなく培養条件を満たすことが出来る現在知られている中では最も良質の培地である。

## b)培養条件

細菌を培養するためには、栄養と物理的環境の二つの条件を整えなければならない。

### ■ 栄養条件

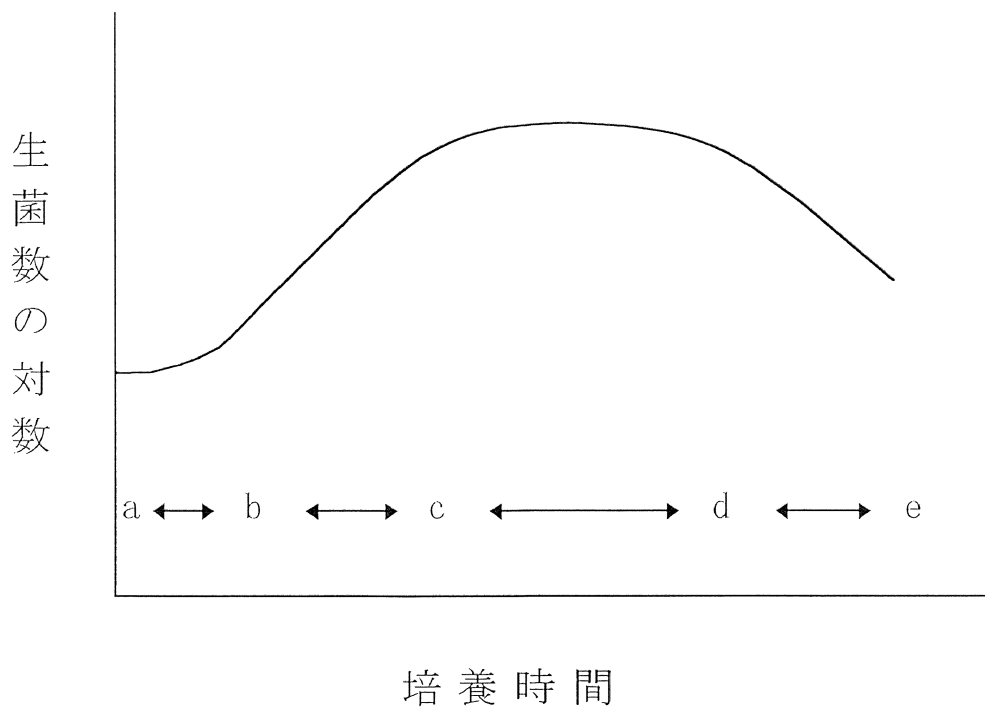
- 1)水 細菌の菌体の 75~85%は水分であり、菌体内の化学反応は水分の存在下で行われ、また栄養素は水溶液の状態外界から菌体内に取り込まれる。そのため細菌の増殖には十分な水分が必要であり、乾燥状態では栄養素が十分であっても増殖できない。
- 2)無機塩 無機塩類としてはリン、硫黄が比較的多量に必要である。リンはリン酸として ATP、核酸、リン脂質、NAD、NADP などの補酵素の構成元素として必須であり、硫黄はメチオニン、シスチンなどの含硫アミノ酸の構成元素として必要である。
- 3)炭素源 多くの従属栄養菌はブドウ糖などの糖類をエネルギー源として有機物を合成している。
- 4)窒素源 アミノ酸、タンパク質、核酸の必須成分である。大腸菌などは無機窒素化合物を用いて必須成分(アミノ酸など)の合成を行っている。
- 5)発育因子 自らは合成することのできない物質を発育因子というが、細菌の増殖には必須である。菌種によりその発育にビタミン、アミノ酸、プリン、ヌクレオチドなどを要求するものがある。

## ■ 物理的環境条件

- 1) 温度 細菌が増殖する過程において最も適した温度(至適温度)は菌種によって異なる。至適温度が 12~18℃の低温で増殖する低温菌、30~38℃の中温で増殖する中温菌、55~60℃の高温で増殖する高温菌に分けられる。なお、本研究で用いられている細菌類は中温菌に属するものである。
- 2) pH 細菌にはその増殖に適した pH(至適 pH)がある。一般に多くの細菌は pH 5~10 の間で増殖し、至適 pH を離れた培地では増殖率が低下する。
- 3) 酸素 増殖のために酸素を必要とし、呼吸により代謝を行う細菌を偏性好気性菌(obligate aerobe)と呼ぶ。一方、酸素の存在が有害に作用し、無酸素の状態では増殖できない細菌を偏性嫌気性菌(obligate anaerobe)と呼ぶ。また、酸素の有無に関係なく増殖可能な細菌を通性嫌気性菌(facultative anaerobe)と呼ぶ。この細菌はエネルギー代謝を酸素の存在下では呼吸で、無酸素状態では発酵で行う。大腸菌などの大多数の細菌は通気性嫌気性菌に属する。

### c) 細菌の増殖

単細胞生物である細菌の増殖の基本型は 2 分裂である。分裂に際しては、まず核酸(DNA)の複製が起こり、次いで細胞質膜が菌体の長軸をほぼ垂直な面で伸び、間に仕切りを作り、細胞質が二つに分かれる。さらに細胞膜が伸びてこれを包み、2 個の娘細胞が生成される。



a-b : 誘導期 b-c : 対数期 c-d : 定常期 d-e : 下降期

第 3.2 図 増殖曲線

発育の停止している細菌を十分な栄養をもつ新しい液体培地に移した場合、第 3.2 図のような増殖曲線を示す。

この増殖曲線は次の 4 期に分けることができる。

1) 誘導期(lag phase) : a-b

細菌を新しい培地に接種したとき、一定時間(普通は数十分)細菌数が増加しない時期がある。この時期を誘導期という。接種された細菌が新しい環境下で適応するための時期である。

2) 対数増殖期(logarithmic phase) : b-c

誘導期後、二分裂をくりかえして活発に増殖を行う時期である。この時期では菌体成分が一定の率で合成され、細菌の体積および細菌数が対数的に増加し、細胞分裂が規則正しく一定時間ごとに起こる。この際、細菌数が 2 倍になるために要する時間を世代時間とい

う。世代時間は菌種、培養条件により異なり、最も適した条件下での大腸菌の世代時間は約 30 分と短い。大腸菌の場合 1 個の菌は 10 時間で  $2^{20}$ (約  $10^6$ )個になる。対数増殖期は栄養素が消費されるか、あるいは有害代謝産物が培地に蓄積して増殖を抑制するまで続く。

### 3)定常期(stationary phase) : c-d

細菌数が一定に保たれる時期で細胞分裂によって増加する細菌数と死滅する細菌数とが平衡状態にある。対数増殖期の後に続く、培地中の栄養素の消耗、有毒代謝産物の蓄積、pH の変化などで定常期となる。

### 4)下降期(declining phase) : d-e

定常期に続いておこる生菌数の減少する時期をいう。死滅菌数が増殖菌数を上回り、生菌数が減少する。

固形培地表面上では細菌は塊となって増殖し、肉眼で見える程の大きな塊となって存在する。これを集落(colony)という。

集落とは、培養により固形の培地の表面あるいは内部にできる細菌の集団で、前者を表在性集落、後者を深部集落という。集落の大きさ、外形(辺縁の形状、中心部の隆起、陥の有無など)、色調、透明度、粘度(粘性)などは、細菌の鑑別上重要なものである。また、通常個々の集落はそれぞれの 1 個の細菌から出発した集団と考えられ、それを釣菌して得た培養は純培養という。1 つの集落は  $10^7\sim 10^8$  個の細菌からなり、その大きさはほとんどの場合直径数 mm である。

### d)世代時間

細菌は細胞分裂から次の細胞分裂まで規則正しく一定時間ごとに起こり、この時間を世代時間 (generation time)という。世代時間は菌株、および培養条件により異なる。大腸菌の世代時間は  $37^{\circ}\text{C}$  の

ブイヨン培地では約 30 分である。分裂が 1 回起こるたびに細菌数は 2 倍になる。

いま、 $t_1$  時の細菌数を  $N_0$ 、 $t_2$  時の細菌数を  $N$ 、この間の分裂回数を  $z$  とすると、

$$N = 2^z \cdot N_0$$

であるから、

$$\log N = z \log 2 + \log N_0$$

となり、分裂回数は、

$$z = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

で示される。これより世代時間  $T$  は次式で求められる。

$$T = \frac{t_2 - t_1}{z}$$

よって、

$$z = \frac{t_2 - t_1}{T}$$

であるから、

$$\frac{t_2 - t_1}{T} = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

となる。

したがって世代時間  $T$  は、

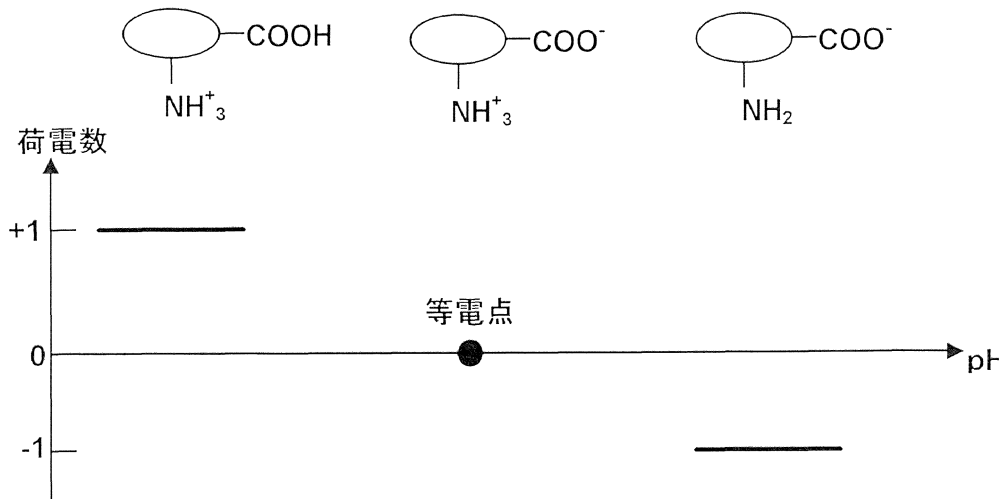
$$T = \frac{(t_2 - t_1) \log 2}{\log N - \log N_0}$$

で示される。

### 3.1.6 細菌の帯電機序

水溶液中の微生物の表面は、通常負に帯電している<sup>118)</sup>。そのため、正に帯電した表面を持つ物質には容易に吸収される。強塩基性陰イオン交換樹脂は表面が正に帯電しており、1g 当たりおよそ  $10^{10}$  個以上の微生物を吸収する能力があるが、これは微生物表面と陰イオン交換樹脂の間に発生する静電氣的引力に起因する。

微生物表面の荷電は、カルボキシル基、リン酸基、あるいはアミノ基などの電離による（第 3.3 図）。実際にはカルボキシル基、アミノ基などの解離基の数及び解離度によって微生物表面の荷電状態は決まる。微生物表面は基本的に電荷数が 0 になる pH の値（等電点）を挟んで、pH の低い方では正の電荷、逆に高い方では負の電荷を持つ。また、1697 年に Marshaall<sup>110)</sup>は電気泳動によって電荷を測定し、pH2 以下では正電荷、pH4~10 では負電荷を持つという結果を得た。



第 3.3 図 微生物表面の荷電状態

## 3.2 病原性細菌の感染

### 3.2.1 病原性細菌

病原性細菌は、宿主に付着（感染）した際、1つの種あるいは限られた種にのみ寄生して疾病を発現させる。病原性細菌が感染した場合、宿主に与える弊害は2種類ある。一方は細菌そのものが増殖して細胞や組織を破壊してしまう場合であり、他方は細菌そのものはそれほど増えないものの細菌によって生産される毒素が宿主に大きな弊害を与える場合である。ほとんどの病原性細菌は、この2つの病原因子を併せ持っているが、いずれが強いかは細菌の種類によって異なる。

現在、細菌の分類に関しては、いくつかの体系が発表されている。多くの細菌の中で最も大きなグループは真正細菌と呼ばれるもので



ある。真正細菌の主な特徴は、固い細胞壁を持つこと、二分裂で増えること、運動するものは鞭毛を用いて動くことである。真正細菌には球菌や桿菌などが含まれている。また、グラム陽性菌や陰性菌、さらに好気性菌や嫌気性菌、独立栄養型、従属栄養型というように全ての菌種が含まれていることから、ある意味では実に雑多な集まりということが出来る。真正細菌は全体として1つの目とされ、その中に10以上の科が含まれている。真正細菌に分類されているものにはジフテリア菌、破傷風菌、肺炎双球菌、淋菌、ペスト菌、チフス菌、赤痢菌、ぶどう球菌、そして大腸菌と、多くの病原性細菌がある。またこの他に、鞭毛がなく粘液を出して滑るように動く粘性菌や滑走菌、梅毒で有名なスピロヘータ、発疹チフス、ロッキー山紅斑熱、Q菌、多くの場合ダニなどの節足動物の組織中に生存していてそれらに噛まれることで人間に伝染するリケッチア、細胞壁がなく形も一定していないマイコプラズマなどがある。

本研究で用いているような病原性を有する大腸菌の種類と分類方法を以下に示す。

#### ■種類

腸管病原性大腸菌 (EPEC)

~サルモネラ症に類似した病態。

組織侵入性大腸菌 (EIEC)

~赤痢菌の様に大腸粘膜に進入して病気を引き起こす。

腸管組織侵入性大腸菌 (ETEC)

~海外旅行者下痢症の主要な原因菌。

腸管出血性大腸菌 (EHEC)

~志賀毒素様毒素を産出し血便を主とする下痢を引き起こす。

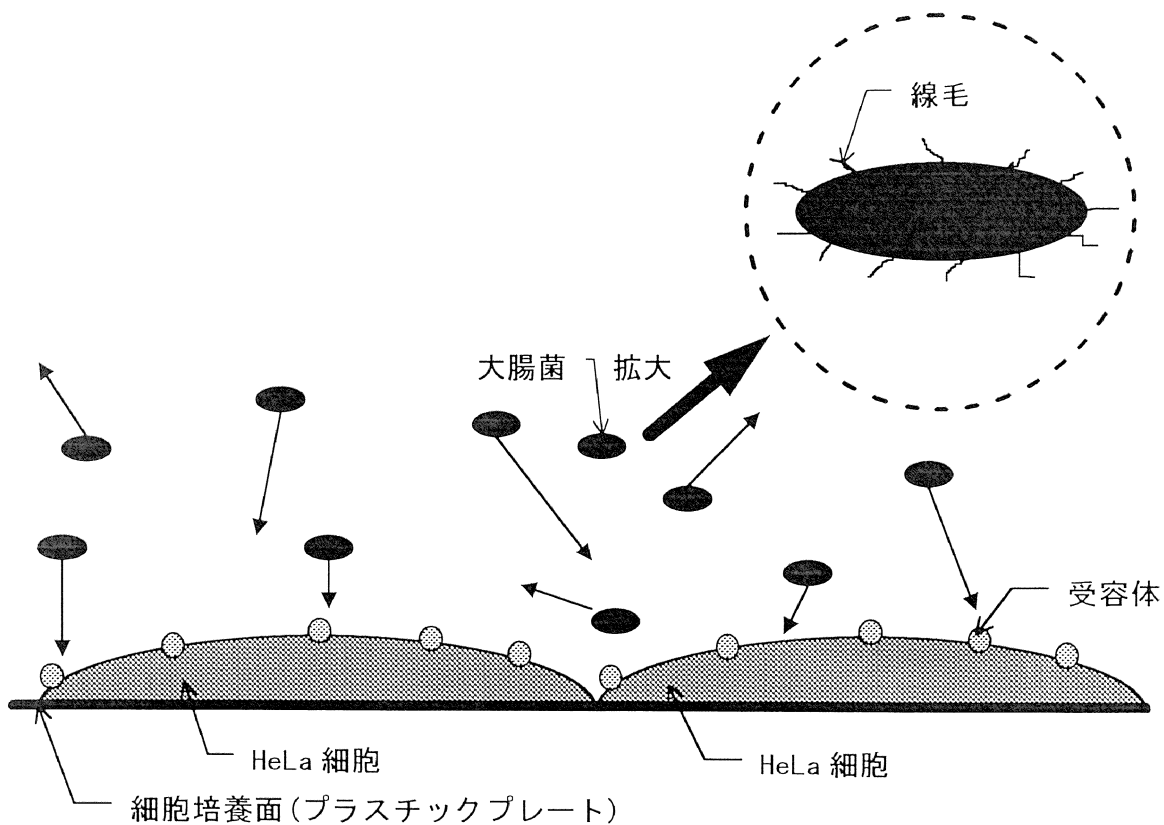
## ■ 分類方法

- 血清型 他の多くの細菌と同様に、大腸菌は耐熱性の O 抗原（164 種類）、易熱性の K 抗原（90 種類）及び H 抗原（55 種類）を有し、この組み合わせで O157:H7:K9 などと表現する。病原性のある大腸菌は特定の血清型を有する場合が多く、血清型は病原性のある大腸菌の推定に利用したり、疫学調査の指標に用いられたりする。
- 病原性 大腸菌はヒトや動物の腸管、特に回盲部から大腸にかけての常在菌で、通常糞便 1g 中に約  $10^6\sim 10^8$  個含まれている。従って、大腸菌が検出される飲料水や食品は糞便に汚染されていると推測でき、他の種々の病原性細菌の混入も予想されるので、飲料水の適否などの指標に大腸菌の検査が実施される。通常の大腸菌は正常細胞の 1 つであると体内では認識されて無害な菌であるが、腸管以外の胆道や尿路、呼吸器などに大腸菌が異所に迷入した場合は病原性を発現する（異所性感染）。しかし、最近では本研究で用いているような尿路感染症を引き起こす大腸菌は尿路系細胞に付着しうる特別な病原因子（線毛）を有しており、また他の部位に感染する大腸菌も正常細胞と異なり、それぞれに特異的な病原因子を有している可能性が考えられるようになっている。

### 3.2.2 病原性細菌の感染機序

病原性がある細菌は、菌体表面に細胞付着用の器官である線毛を有している。線毛の長さは  $0.1\sim 0.5\mu\text{m}$  程度で、細胞に付着する機能

を持つことから定着因子と呼ばれることもある。ただし、細菌が細胞のどの部分であっても、付着しうるわけではなく、細胞の表面に存在する感覚器である受容体にのみ特異的に付着する。細菌が細胞に対して感染する際、細菌は細胞の持つ受容体に線毛を化学結合させることで付着し、その状態から増殖して感染症などを引き起こす。この様子を第 3.4 図に示す。



第 3.4 図 病原性大腸菌の HeLa 細胞への付着

培養液中に浮遊している細菌は、自己遊泳(運動用の器官である鞭毛を有する細菌のみ)やブラウン運動によって、ランダムな方向に移動する。移動している細菌が、細胞表面の受容体に衝突した場合、

その接触回数と受容体と線毛の化学結合に十分な時間があれば、細菌は細胞に付着する。受容体以外の場所に衝突した場合や、線毛と受容体の接触時間が十分でない場合、細菌は細胞に付着することができず、再度、培養液中を浮遊することになる。

## 第 4 章

# 実験材料及び実験方法

## 4.1 被験微生物

### 4.1.1 増殖実験に使用した微生物

#### (a) 大腸菌 (*Escherichia coli*)<sup>111-114)</sup>

菌型：AHU No.1714 株

性質：非病原性

通性嫌気性のグラム陰性菌の一種で、ブドウ糖を発酵し、酸とガスを作る。外形は長径 1.0~6.0 $\mu\text{m}$ 、短径 0.5~1.0 $\mu\text{m}$  のまっすぐな桿菌で、周毛性鞭毛を持ち運動性を持つ種もある。通常、単独か対になって存在し、時析鎖状のものも形成される。普通寒天培地上のコロニー (Colony、集落) の典型的なものは円形で、直径 2~3mm の白っぽい半透明な低い凸状をしている。コロニーの表面には光沢があり、硬さは柔らかいバター程度である。

本研究で使用した大腸菌は生化学的、免疫学的に大腸菌と同定された菌種で、非病原性であり菌体表面に線毛を持たない。また鞭毛も有していない。

#### (b) 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)<sup>111-114)</sup>

菌型：AHU No.1721 株

性質：病原性 (食中毒事例由来)

好気性のグラム陽性菌で、常に多数が葉まって葡萄の房に似た配列を示す。個々の菌は直径 0.8~1.0 $\mu\text{m}$  の球菌である。鞭毛を持たず、芽胞も形成しない。普通寒天上のコロニーの形状は直径 1~2mm の丸い凸状で、バター程度の硬さを持つ。コロニーの色は黄色もしくは白色である。

典型的な黄色ブドウ球菌の菌株は血漿中の凝固系を活性化する酵素であるコアグラゼ（Coagulase）を生産する。また、種々の毒素も生産する。一部の菌株では食中毒の原因となる腸管毒（エンテロトキシン）を生産するものもある。

グラム陽性菌をグラム陰性菌と比較すると、陽性菌の細胞壁は陰性菌に比べ肥厚である。陽性菌の細胞壁の厚さは 15~80nm 程度で、電子顕微鏡を用いた場合、細胞壁は均質な、電子密度の高い層として観察される。

(c) カンディダ・アルビカンス (*Candida albicans*)<sup>111-114)</sup>

菌型：不明

性質： 病原性（深在性真菌症、肺カンディダ症由来）

不完全菌類に属する酵母型真菌のひとつで、グラム陽性菌である。培養条件が良い場合には円形または卵形の分芽胞子の分芽により増殖する。条件が悪い場合には分芽により作られた胞子が長く伸びてお互いに連なり仮性菌糸を作る。菌の外形は長径 5~6 $\mu\text{m}$ 、短径 3~4 $\mu\text{m}$  の楕円形である。細胞膜は電子密度の高い内外の 2 層と、電子密度の低い中間層の 3 層から構成され、本研究で使用した細菌の中では物理的に最も強い構造を有する。

最も簡単なカンディダ・アルビカンスの判別方法として以下の方法が知られている。菌種の不明な菌を適当な培地で培養し、膜の厚い巨大な厚膜胞子（菌糸の一部に晩壁ができ、そこに周囲の原形質が渡縮されて外膜が厚くなったもの）が観察されたならば、その菌種はカンディダ・アルビカンスと判断できる。

#### 4.1.2 感染実験に使用した微生物

##### (a) 大腸菌 (*Escherichia coli*)<sup>114-116)</sup>

菌型：ATSH No.0,12,15,16,17,18,25,27,28,29 株 (全 10 株)

性質：病原性 (尿路感染症患者由来)

この全 10 株の大腸菌は札幌市厚別区内の泌尿器科病院に受診した主に膀胱炎症状を呈した複数複数の患者から分離したもので、一般的な生化学的性状から大腸菌と考えられる菌株である。

前述の 4.1.1 (a) に記した非病原性の大腸菌と比較すると、本菌は細胞への定着因子である線毛を有しているため病原性を持つことが性質の違いとなっているが、それ以外の特性については非病原性大腸菌と同様である。

##### (b) HeLa 細胞 (HeLa cell)<sup>114-116)</sup>

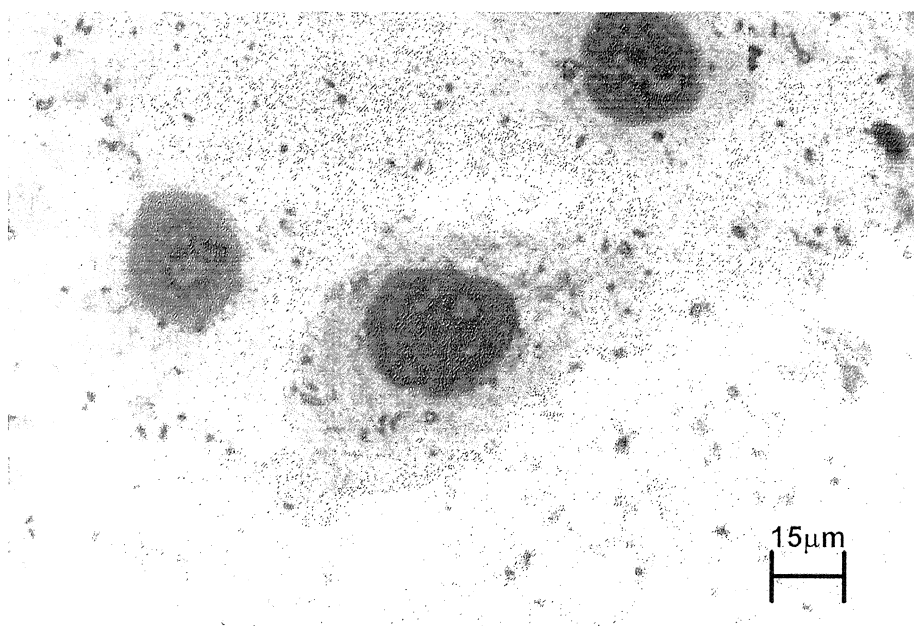
この細胞はヒト子宮頸部ガン由来の培養細胞である。この細胞は、1951 年 2 月にアメリカの George Otto Gey (1899-1970) らが人間の子宮頸部扁平上皮ガンの組織培養を行った中で 1 例だけ長期間継代培養しても形態学的に安定で、生存能力を維持できた株であり、これに採取した患者の名前 Helen Lane の略称を付けたものである。

この細胞は容易に継代培養できる上に、ウイルスなどに侵され易く、その増殖に好適であるため、組織培養の研究やウイルス研究の手段として広く応用されており、現在多くの研究室で最も広く実験に使用されているヒト細胞株の一つである。

HeLa 細胞は最初から非二倍性の染色体 (39~187、モード 79) を有する。形態は上皮性で培養条件によって高い増殖性を示し、支持細胞層を用いたクローン分離や同調培養、変異株の分離など培養細胞の遺伝学的研究の基礎的技術の発達に大きく貢献した。



第4.1図に光学顕微鏡による観察写真を示す。これは HeLa 細胞が大腸菌の感染（付着）を受けている様子で、大きな円状の部分が細胞の核、まわりの薄い色の部分が細胞膜、そして黒い粒に見えるものが大腸菌である。この写真から HeLa 細胞が大腸菌に比較して非常に大きいことがわかる。



第4.1図 病原性大腸菌の付着（感染）を受けた HeLa 細胞

#### 4.2 細胞と細菌の培養に用いた培地及び試薬

実験に使用した溶液は大別すると、細胞や細菌の増殖に用いられる培地（培地）と、細胞や細菌の希釈や維持（細胞や細菌を増殖も減少もさせずに一定数に保つこと）などに用いられる塩類溶液に分けられる。

また、培地と塩類溶液はそれぞれ細菌用のものと細胞用のものがあり、細胞用の塩類溶液は細菌に使用することもできる。細菌用の培地には液体と固形培地があり、これらを用いる場合には必ず滅菌処理されたものでなければならない。

#### 4.2.1 培養基（培地）

##### (a) 細菌用

- ・ 普通ブイヨン培地（Nutrient Broth）

液体培地であり、細菌を培養する際に最も多く用いられる液体培地である。

本研究では細菌の前培養に用いた。

- ・ 普通寒天培地（Nutrient Agar）

固形培地であり、普通ブイヨン培地に寒天を加えて固まらせたものである。本培地は 40℃以下になると固化し、その色は液体時は透明な黄色、固化後は白濁している。

本研究では細菌の保存、細菌のコロニー形成に使用した。

##### (b) 細胞用

- ・ GIT 培地

赤色の液体培地で、接着性細菌及び富裕性細菌の施栓閉鎖培養、CO<sub>2</sub> インキュベータでの開放培養、回転浮遊培養などいずれの培養にも無調整で使用できる。本研究ではプラスチックボトルを用いた施栓閉鎖培養で使用した。また GIT 培地は完全調整培地であり、購入後、室温で融解するだけで使用できる。

GIT 培地は次のような特性を有する優れた培地である。

- ①細胞増殖促進能は牛胎児血清添加培地と同等
- ②多種類の細胞（ハイブリドーマを含むリンパ球系細胞、接着性細胞）の培養が可能
- ③GIT 培地への細胞馴化培養は不要
- ④細胞融合培地として使用可能
- ⑤クローニング用培地として使用可能
- ⑥牛血清由来抗体（IgG）が除去されている
- ⑦ハイブリドーマなどの浮遊細胞の大量回転培養が可能
- ⑧細胞培養上清中の細胞産生物質の精製が用意
- ⑨牛血清由来の微生物（細菌、真菌、ウイルス、マイコプラズマなど）を完全に薬品滅菌している
- ⑩細胞培養促進活性の保存性が良い

本研究においては、研究初期に本培地を使用していたが、研究途中から、より簡便に利用できる MEM 培地、さらには RPMI-1640 培地に変更した。

#### ・MEM 培地

研究途中より GIT 培地に替えて使用した赤色の液体培地である。本研究で使用した場合、HeLa 細胞の増殖能において GIT 培地との差は認められなかった。使用方法は GIT 培地と同様であるが、購入時は粉末の要調整培地である。

#### ・RPMI-1640 培地

研究途中より MEM 培地に替えて使用した赤色の液体培地で、GIT 培地と同様に液体の完全調整培地である。本研究で使用した場

合、HeLa細胞の増殖能においてGIT培地、MEM培地との差は認められなかった。

#### 4.2.2 塩類溶液

##### (a) 細菌用

- ・生理食塩水

細菌の希釈や維持、再浮遊などに使用する。また、増殖実験においてはブイヨン培地を希釈して栄養度を調整するためにも用いた。液色は無色透明で塩化ナトリウムの濃度は0.75%である。

##### (b) 細胞用

- ・ハンクス平衡塩類溶液 (Hank's Balanced Salt Solution: BSS)

細胞の希釈や維持に使用する。感染実験の際はBSSを実験用溶液として用いた。

#### 4.2.3 試薬

##### (a) 細菌用

- ・グラム染色液 (Gram Solution)

細菌をグラム染色するときに使用する染色液で、グラム液A,B,Cの3種類からなる。なお、染色時には脱色用に99.9%エチルアルコールも別途必要となる。

グラム染色は細菌の分類にも使用されるほど代表的な細菌染色方法であり、染色後は赤または紫というはっきりとした判別し易い色に分かれる。

(b) 細胞用

・ギムザ染色液 (Giemsa's solution)

細胞をギムザ染色する時に使用する染色液で強い毒性と引火性を持つ。なお、染色時には細胞固定用に 99.9%メチルアルコールも別途必要となる。

ギムザ染色をすると細胞の核は濃い赤色に染まり、細胞膜や原形質は薄い紫色に染まる。また、この染色液で細菌を染めると黒色になる。このことから、本研究のように細胞に細菌を付着させた場合、ギムザ染色によって細胞の核、細胞膜、細菌を明確に判別することができる。これを利用して、本研究では 1 個の細胞に付着した細菌数を顕微鏡観察により算定した。

・トリプシン EDTA (Trypsin EDTA)

トリプシン溶液と EDTA 溶液の混合溶液で、透明な黄色を呈し、細胞を培養面からの剥離する場合に使用する。

トリプシンとは高等動物の消化酵素の中でも代表的なプロテアーゼ (タンパク質分解酵素) である。細胞を剥離するときにはこの消化酵素の性質を利用するが、注入と同時に剥がれるのではなく、ある程度の時間そのまま放置する必要がある (37°C で約 30 分)。この時、長時間放置すると目的とする細胞自体にダメージを与えることがあるため、使用には注意が必要である。

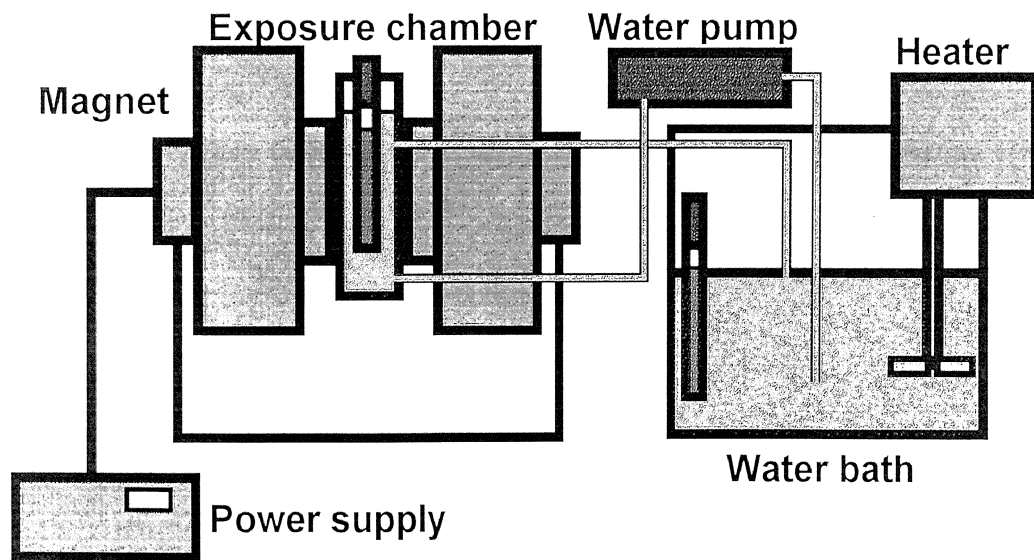
本研究での EDTA 溶液に対するトリプシン溶液の濃度は 2.5% である。

## 4.3 実験方法

### 4.3.1 磁場暴露装置

本研究で使用した磁場暴露装置の構成を第 4.2 図に示す。

静磁場を発生させるために使用した電磁石及び定電流、電圧直流電源はマエズミ電気株式会社及びTAKASAGO電気株式会社製のものである。この電磁石で 450mT を得るためには電流 10A、電圧 38V を要した。この際の磁極間距離は 40mm である。なお、磁場強度 450mT はこの装置で得られる最大値である。



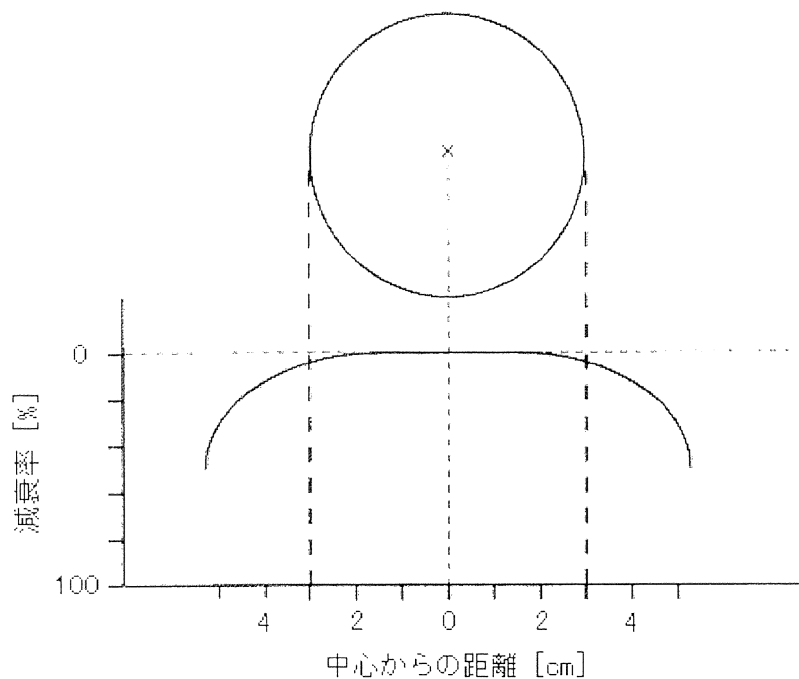
第4.2図 磁場暴露装置

変動磁場の場合、電磁石及び交流電源はそれぞれ電磁機械工業株式会社製のものである。この電磁石で周波数 50Hz、磁場強度 70mT を得るためには電流 15A、電圧 80V を要した。この際の磁極間距離も 40mm であり、周波数、磁場強度共にこの装置で得られる最大値である。

電磁石の磁極間には容量 710cc の水槽を置き、この中に磁場暴露群の試験管を定置した。また、この暴露群に対して、比較となる対照群を得るため、電磁石による人工磁場の影響を受けない位置にも水槽を置き、ここで対照群の培養を行った。

実験中、細菌や細胞の培養温度条件を安定化させるために、対照群の置かれている恒温水槽内の水温をヒータにより  $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  に保ち、さらに温水を水流ポンプで磁場暴露用水槽に循環させることで、暴露群と対照群の環境温度を一定に保った。使用した水流ポンプは 1060cc/min の送水能力である。

電磁石の磁極間の磁力分布はガウスメータ (MG-532D : ME マエズミ電機製) を用いて測定した。その結果を第 4.3 図に示す。図中の円は電磁石の磁極の形状を示し、その下の曲線は磁極間距離を 40mm に設定した際の磁場の減衰率である。



第4.3図 電磁石の磁力分布

実験を進めていく上で、培養や滅菌のためのいくつかの機器が必要であり、それらの機器を以下に記す。

- ・クリーンベンチ

日本医化機器製作所、NK 式卓上型エコノミークリーンベンチ (VET-850G)

フィルタを通じて外気を吸入するため、空気が濾過される。さらにベンチ内でガスバーナを使用することにより、無菌操作をするための作業空間が無菌状態となる。

- ・インキュベータ

三洋インキュベータ (UIR-551)



庫内の温度を 37.0℃に保つことにより、試験管内やシャーレ内の細菌や細胞を維持、増殖させるために使用する。

- ・ CO<sub>2</sub> インキュベータ

三洋 CO<sub>2</sub> インキュベータ (UCO-96)

庫内の温度と炭酸ガス濃度を設定値（一般には 37.0℃、5.0%）に保つことにより、微生物培養用培地の温度と pH を一定に保つことができる。細胞を使用した感染実験の際、細胞を前培養するが、シャーレは密封型容器ではなく開放系となっている。このため、通常の培養法では試料が生物汚染（空気中の細菌などの感染を受け、純粋な細胞のみの培養ができなくなることを）を受けてしまう。また、シャーレ内の培地量に比べて培養する細胞量が多いので培地の pH が変化してしまい細胞の増殖が悪化する。そこで CO<sub>2</sub> インキュベータを用いて培養を行う。

- ・ 遠心器

日立卓上遠心器

細胞や細菌と、その死骸などのゴミの比重の差を利用することで、遠心分離を行う。

- ・ 高圧蒸気滅菌器

三洋ラボ・オートクレーブ

121℃、1 気圧で高圧蒸気滅菌をする。主に試薬、試験管、シャーレなどの滅菌に使用する。

- ・ 乾熱滅菌器

EYELA ナチュラルオーブン

161°Cの熱を用いて 2 時間滅菌をする。主に、ピペットやガラス器具の滅菌に使用する。

#### 4.3.2 増殖実験に関する方法

##### (a) 前培養

本研究で使用した被験生物は、前培養を必要とした。一般に前培養とは維持（保存）状態で培養されている細菌や細胞を、実験に使用できるように新しい実験に使用し易い培地で培養することである。

本実験で使用した細菌類（大腸菌、黄色ブドウ球菌、カンディダ・アルビカンス）は同じ方法で前培養が可能である。これらの細菌類は通常、普通寒天培地もしくは 1.0%のブレインハートインフュージョン培地で作成した斜面培地の表面に塗布して維持した。前培養に際しては、細菌をこの保存培地から白金耳を用いてひとすくい（一白金耳という）釣菌し、小試験管（直径 10mm、長さ 100mm）中に入った 3ml の普通ブイヨン培地に接種した。接種後、小試験管ごと庫内温度を 37°C に保ったインキュベータ内で一夜（約 16 時間）培養した。

##### (b) 実験

前培養した細菌類は、培養液中の不純物を取り除くため遠心分離器（3000rpm、10 分間）を用いて上清と細菌層に分離した。その後、上清のみを抜き、新たに 3ml の生理食塩水（濃度 0.75%）を入れてミキサで攪拌した。同様の操作さらにを 2 回続けて行い、細菌の洗浄操作とした。洗浄後に菌液を、生理食塩水で希釈することで細菌

数の調整を行った。調整後の菌数は、大腸菌と黄色ブドウ球菌で  $1 \times 10^2$  cells/ml、カンディダで  $1 \times 10^3$  cells/ml とした。

調整後の菌液 1ml を 9ml の培養液(ブイヨン培地または希釈栄養培地)が入った試験管(直径 13mm、長さ 160mm)に入れ、これを 2 本用意し、一本を電磁石の磁極間(人工磁場内:暴露群)、他方を人工磁場の影響を受けない位置にある恒温水槽(人工磁場外、ただし地磁気は受けている:対照群)で培養した。また、培養温度は対照群、暴露群共に  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  とした。

本研究では、以下のように暴露する磁場強度や培養液の栄養度を変化させ、細菌の増殖を観察した。

#### ① 静磁場強度

暴露する静磁場の強度を 150mT、450mT の 2 種類とし、暴露磁場強度の違いによる細菌の増殖動態の相違を検討した。なお、この時の培養液はブイヨン培地である。

#### ② 培養液の栄養度

通常の培養液であるブイヨン培地を、生理食塩水を用いて希釈して培養液の栄養度を低下させ、低栄養状態で細菌を培養した場合の磁場暴露影響について検討を行った。なお、この時の暴露磁場は磁場強度 450mT の静磁場とした。

実験開始後は測定時刻ごとに対照群、暴露群それぞれから菌液を 0.2ml 採取し、混釈培養法によって培養した。混釈培養法とは、菌液を 10 倍の階段希釈を繰り返して、最終的に菌数が  $10 \sim 10^2$  cells/ml 程度になるよう生理食塩水で調整する方法である。混釈後の菌液を 0.5ml ずつシャーレに入れ、これに約  $45^\circ\text{C}$  の液化した普適寒天培地を加えてよく混合し固化させた。固化後、シャーレを反転してインキュベータ内で 24 時間培養した。培養後、シャーレ内に生じた細菌のコロニー数を数え、これに混釈時の希釈倍率を乗じて、元の菌

液 1ml 中の細菌数を算出した。以上の操作を各測定時刻ごとに行って菌数の変化を記録し、実験結果とした。

本研究では、各測定時刻での細菌数と、測定時刻間での細菌の増殖速度を表す世代時間の 2 つを用いて実験結果の検討を行った。なお、実験結果の統計学的検定には二標本 t 検定を用いた。

#### 4.3.3 感染実験に関する方法

##### (a) 前培養

本実験の場合も、増殖実験の場合と同様に前培養を必要とする。病原性大腸菌は保存方法が増殖実験の場合とは異なり、病原性維持のために凍結保存している。実験に際して、この凍結した菌液の一片を採取し、3ml の普通ブイオン培地を入れた小試験管に接種した。その後、増殖実験と同様に庫内温度を 37°C に保ったインキュベータ内で一夜（約 20 時間）培養した。

一方、株化培養細胞である HeLa 細胞は、細菌類と維持の方法、前培養の方法が全く異なる。通常、HeLa 細胞は GIT 培地や MEM 培地、RPMI-1640 培地を用いて維持培養をした。具体的には、細胞培養用プラスチックボトル内に上記の培地を 5ml 注入し、さらに細胞数が適当になるように調整した細胞浮遊液を 0.3~1.0ml 入れ、ボトルの細胞培養面が下になるようにインキュベータ内（庫内温度 37°C）で培養した。その後 24~48 時間ごとに光学顕微鏡を用いて観察し、培地はその時の状態に応じて交換した。細胞が増殖し、細胞培養面いっぱいになった時（フルシートという）はトリプシン EDTA を用いて細胞を細胞培養面より剥離し、前述の操作を再び行い、細胞の培養を再度行った。前培養に際しては、トリプシン EDTA を用

いて剥離した細胞浮遊液を遠心分離器（1500rpm、5分間）を用いて上清と細胞層に分け、上清を取り除いた後、ハンクス平衡塩類溶液（Hank's Balanced Salt Solution: BSS）で再浮遊した。これとは別に、実験用に細胞を固定して培養するために細胞培養用のプラスチックプレートを敷いて細胞用培地で満たしたシャーレに、細胞浮遊液を適量接種して CO<sub>2</sub> インキュベータ内（CO<sub>2</sub> 濃度 5.0%、庫内温度 37℃）で一夜培養を行った。

## (b) 実験

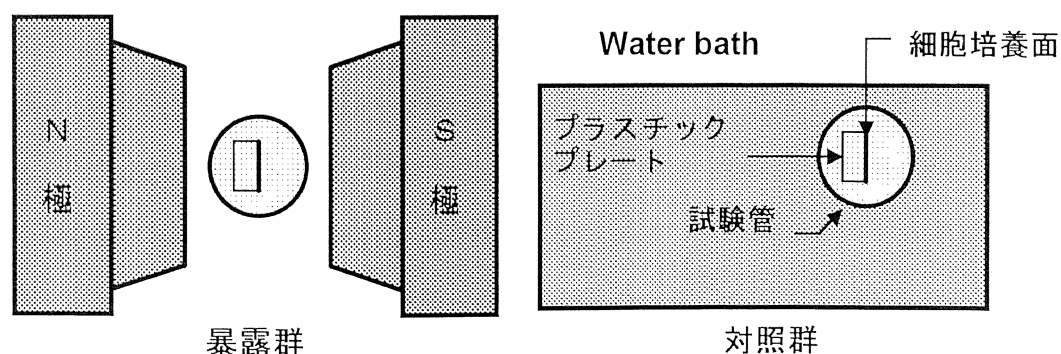
本研究では大別して 3 種類の実験を行った。

第一は混合培養（病原性大腸菌を HeLa 細胞に感染させるために両者を同じ容器の中で培養すること）と同時に磁場暴露を行ったもので、実験時間は 4 時間である。この時の実験群は次の 2 群とした。

暴露群：人工磁場内で混合培養

対照群：人工磁場外で混合培養（ただし地磁気の暴露はある）

各群の配置を第 4.4 図に示す。



第 4.4 図 実験対象の配置

この時の実験方法は次のように行った。前培養した HeLa 細胞が、プラスチックプレート上で適当な密度で増殖していることを確認してから、5ml の培養液が入った試験管にプレートを 1 枚入れた。さらに同じ試験管に、前培養した病原性大腸菌を細胞 1 個当り  $5 \times 10^4$  個になるように調整して接種した。同様な試験管を 2 本用意し 1 本を暴露群、他方を対照群として、それぞれ磁石の磁極間、恒温水槽内に置き、混合培養を行った。この時の培養温度は対照群、暴露群共に  $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  である。

暴露に使用する磁場は、静磁場と変動磁場の 2 種類である。静磁場の場合には、磁場強度 150~450mT の間で、50mT ごとに 7 種類設定して暴露を行った。また、磁場強度 450mT の場合には、磁束に対する細胞培養面の向きを幾種類かに設定して暴露する実験も行った。変動磁場の場合には、波形が正弦波状に変化する最大磁場強度 70mT の磁場を用い、周波数を 10, 30, 50Hz の 3 種類に設定して暴露を行った。

混合培養終了後の処理は、次のように行った。試験管を磁極間の水槽（暴露群）、恒温水槽（対照群）からそれぞれ取り出し、無菌状態のまま、滅菌済みピンセットで試験管内からプレートを取り出した。ピンセットにつままれたままのプレートを 20ml の BSS が入ったシャーレ内で静かに振って細胞に付着していない大腸菌を洗い落とし、乾燥させた。乾燥後、99.9%メチルアルコールを滴下して細胞と細菌をプレート上に固定した（メタノール固定）。再乾燥後、キムザ染色液に 1 時間浸し、染色を行った。その後、プレートを光学顕微鏡の観察台に設置し、付着細菌数を数えた。この時、1 枚のプレートにつき任意の 10 個の細胞について算定し、結果を各実験条件ごとにまとめて、その平均値を試料（プレート）の付着細

菌数とした。対照群と暴露群の比較はこの試料ごとの付着細菌数によって行い、統計学的検定は二標本 t 検定を用いた。

第二の実験は、病原性大腸菌の増殖に対する磁場影響についてである。前培養した病原性大腸菌のみを 5ml の培養液が入った試験管に、第一の実験の場合と同量だけ接種した。同形の試験管を 2 本用意し、1 本を暴露群、他方を対照群として、それぞれ電磁石の磁極間、恒温水槽内に置き、培養を行った。この時暴露した磁場は 450mT の静磁場で、培養温度は対照群、暴露群共に  $37.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  である。培養終了後の処理は、増殖実験の場合と同様に、混釈培養法によって行い、増殖細菌数の検討方法についても、増殖実験の場合と同様である。

第三は、HeLa 細胞の細菌被感染性について検討を行うために、病原性大腸菌を接種する前に、HeLa 細胞のみを 5ml の BSS が入った試験管に入れ、4 時間磁場の内外で単独培養した。その後、大腸菌を接種し、さらに 4 時間磁場の内外で混合培養した。これらの条件を整理すると以下のようなになる。

- ① HeLa 細胞を人工磁場外で 4 時間単独培養し、その後大腸菌を接種して人工磁場外でさらに 4 時間混合培養を行ったもの。
- ② HeLa 細胞のみを 4 時間磁場暴露し、その後大腸菌を接種してからさらに 4 時間暴露を行ったもの。
- ③ HeLa 細胞を 4 時間磁場暴露し、その後大腸菌を接種してから人工磁場外で 4 時間混合培養したもの。
- ④ HeLa 細胞を人工磁場外で 4 時間単独培養し、その後大腸菌を接種してから磁場内で 4 時間暴露したもの。

この時の暴露磁場は、450mT の静磁場であり、培養温度は  $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  である。また、磁場暴露終了後の洗浄やその他の処理は先の実験と同様である。

第 5 章  
細菌類の増殖に対する  
静磁場の影響



第2章「従来の研究」でも述べたように、微生物の増殖に対する報告は数多くあるものの、現在においても統一された見解を得るには至っていない。さらに、従来の研究のほとんどは磁場の暴露を受けた生体に対する直接的な生理影響のみについての検討であり、例えば人間と体内微生物の関係のような、複数の生物間における相互関係に磁場暴露がどのような影響を与えるのかといった間接的な、または複合的な条件についての報告が見られない。

このような観点から、本研究では生物間相互作用に対する磁場影響に注目し、検討を行っている。実験モデルには、生物間相互作用の代表的な例である感染を取り上げ、このモデルの最も単純な系である株化培養細胞とこれに特異的な付着性を示す病原性大腸菌を用いた。

本章は、この研究を進めるための基礎的な段階として、単独の微生物に対して磁場暴露が影響を及ぼすのか否かについて検討を行った結果をまとめたものである。これは前述のように、従来までの研究では統一的な見解が得られていないことから、本研究での実験系における、単独の微生物に対する磁場影響について検討する必要があるためである。特に本研究の主題である感染系に対する磁場影響を検討する際、細胞と細菌を混合培養するために、ハンクス平衡塩類溶液という細胞を維持培養するのに適した溶液を用いる。これは、培養細胞が非常にデリケートな生物であるために、細胞数を一定に維持する際には、細菌を維持培養する場合よりも培養条件を厳密にする必要があるためである。この溶液には、一般に細菌を維持培養する際に用いられている生理食塩水よりも若干ではあるが栄養素が含まれている。しかし、細菌にとっての至適栄養条件であるブイヨン培地よりも、栄養価の点で劣る。このため、従来の研究で用

いられていた培養条件とは異なるため、本章で改めて、細菌の増殖に対する磁場暴露の影響について検討を行った。

また、従来の方法では細菌増殖の評価方法として、各測定時間ごとに増殖した細菌の数を用いていたが、本研究では新たに細菌の世代時間を指標として用いた。ここで世代時間とは、細菌が1回の分裂に要する時間のことで、各測定時刻間の菌数から計算される。例えば、大腸菌の場合、最適な培養条件での世代時間は約30分であり、培地の栄養価の低下のように培養条件が劣悪化すると世代時間が延長する。

この世代時間を用いる評価方法は、従来の報告には見られない全く新しい方法であり、この点からも本研究で得られた微生物単体に対する磁場暴露の影響例は注目すべきものである。

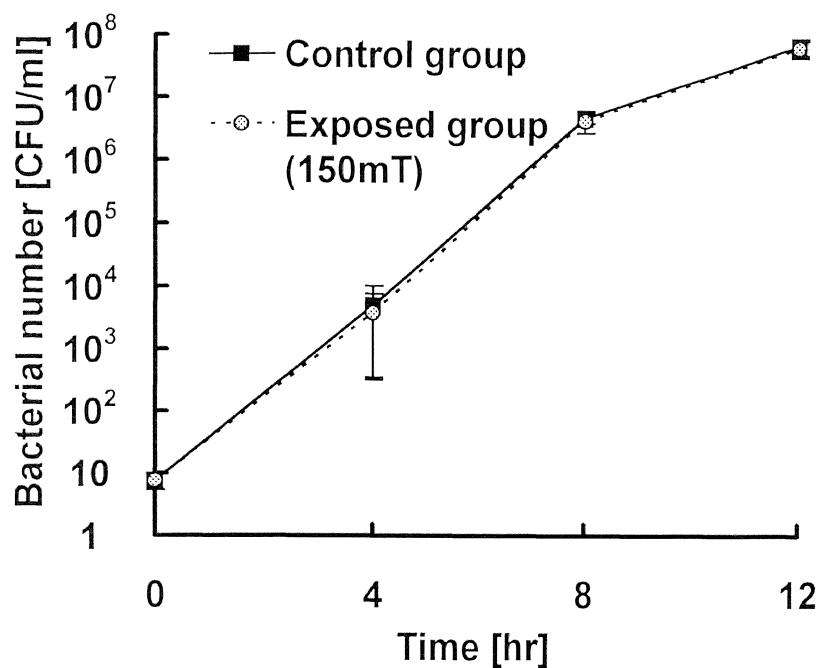
## 5.1 富栄養条件下での静磁場の影響

### 5.1.1 細菌の増殖に対する静磁場の影響

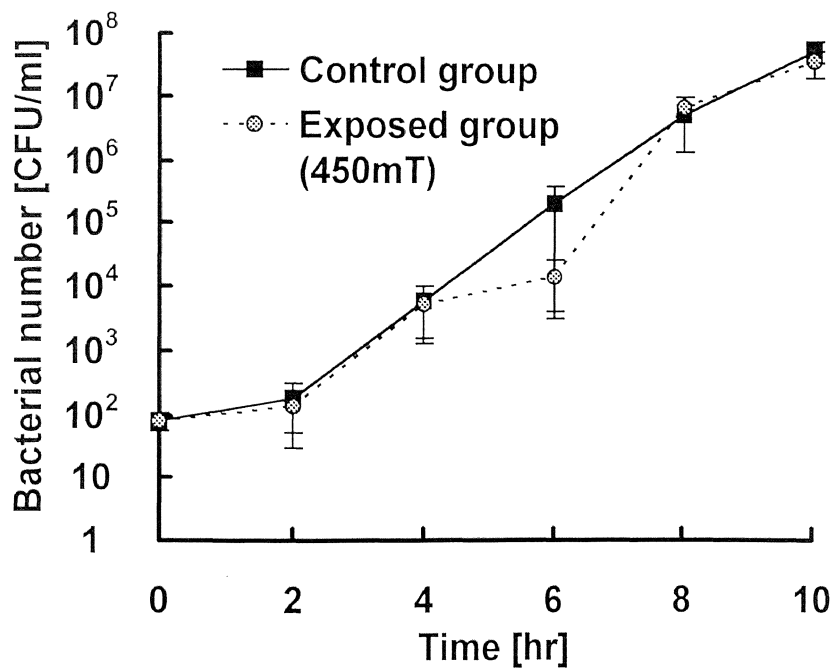
本項では被験微生物として、グラム陰性菌である大腸菌 AHU No.1714 株と、陽性菌である黄色ブドウ球菌 AHU No.1721 株の2種類を用いた。

実験は4.3.2項に記述したように、測定時刻ごとに暴露群、対照群それぞれの試験管より菌液を一部採取し、混釈培養法によって細菌数を測定することで行った。また、細菌数を用いて各測定時刻間の世代時間を算出した。暴露に使用した静磁場の磁場強度は150mTと450mTの2種類である。

第 5.1 図及び第 5.2 図に、大腸菌を被験菌として使用した場合の結果を示す。これらの図は、横軸に測定時刻を、縦軸に細菌数を対数で示している。ここで、縦軸の菌数の単位が[CFU/ml]で表されているが、これは 1ml の菌液の中に含まれる細菌数を集落形成単位 (Colony Forming Unit: CFU) で示したもので、これはそのまま 1ml 溶液中の細菌数を表す。磁場強度 150mT の場合には、実験開始時を 0 時間目として 12 時間目まで 4 時間ごとに測定しており、第 5.1 図に見られるように、大腸菌は時間の経過と共に増殖している。また暴露群、対照群ともに同様の増殖曲線を描いており、どの測定時刻においても暴露群と対照群の間に差異が認められず、150mT 程度では、大腸菌の増殖に影響が表れないことが明らかとなった。次に、磁場強度 450mT の静磁場暴露を行った。150mT の場合よりも詳細な結果を得ることを目的として、450mT の場合の測定時刻は実験開始時を 0 時間目として 10 時間目まで 2 時間ごとに設定した。この場合にも暴露群、対照群ともに大腸菌が時間と共に増殖しており、両者の間に顕著な差異は認められなかった。しかし、磁場強度 450mT の場合には対数増殖期の後期にあたる培養開始 6 時間目において若干ではあるが増殖を抑制する傾向が認められた。これは単に対照群との増殖の比率のみで比較すると 27%程度の減少であるが、これを実際の菌数に換算すると 1ml 当りで約 53000 個体の大腸菌が減少している計算になり、このことから磁場強度によって、弱いながらも大腸菌の増殖に何らかの影響が現われる可能性が示唆された。



第 5.1 図 大腸菌の増殖に対する静磁場 150mT の影響

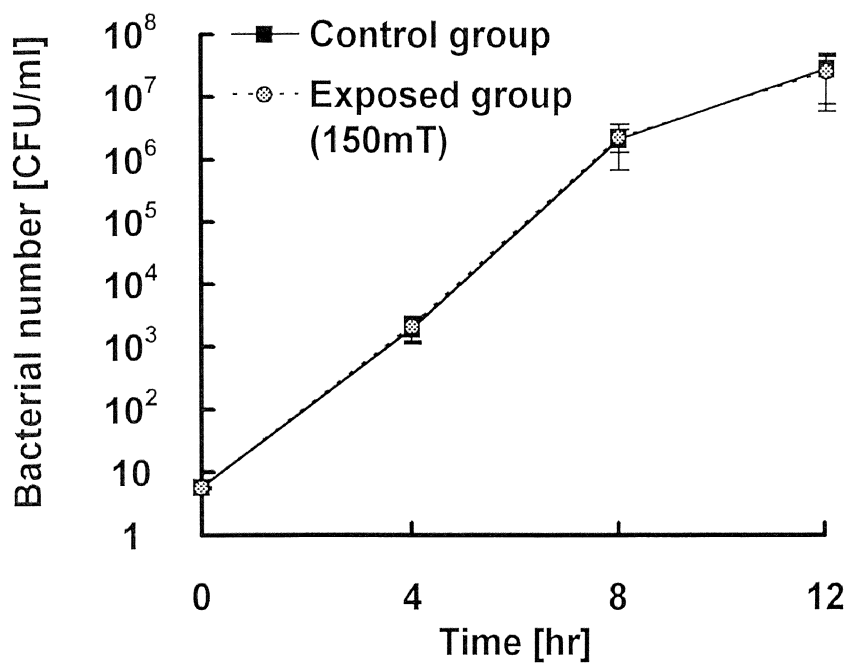


第 5.2 図 大腸菌の増殖に対する静磁場 450mT の影響

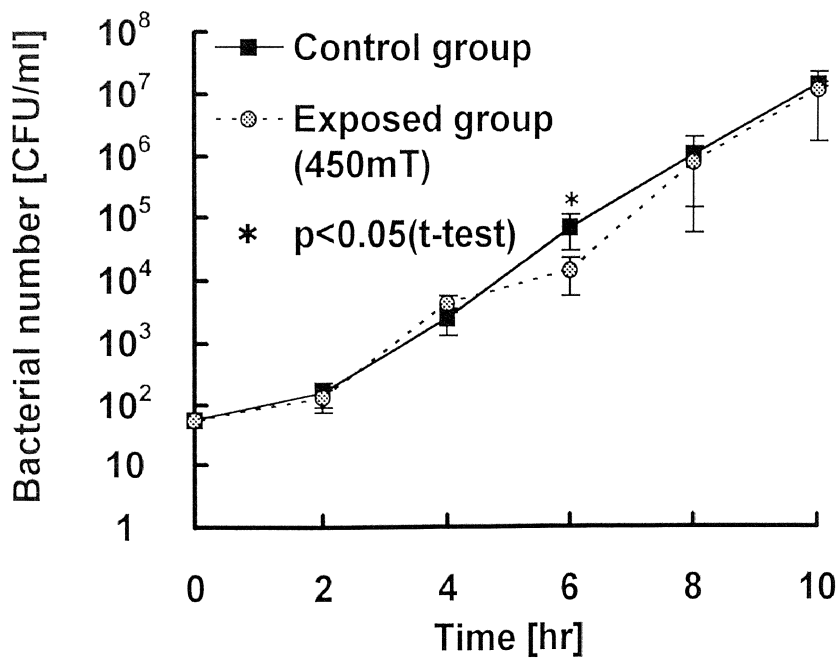
次に、生物学的に大腸菌とは性質の異なる細菌に対する静磁場の影響を観察するために、被験菌としてグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌を用いて、大腸菌の場合と同様の磁場暴露を行った。前述の大腸菌はグラム陰性菌であり、グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌とは細胞壁の構造が異なる。

実験結果を第 5.3 図及び第 5.4 図に示す。暴露に使用した静磁場の強度は、大腸菌の場合と同様に 150mT と 450mT であり、その他の実験条件も大腸菌の場合と同様である。また、暴露群と対照群の細菌数を各測定時刻ごとに二標本 t 検定により比較して、両者の間に棄却率 5%以下の有意差があった場合には図中のその箇所に \* 印を示した。150mT の場合には、暴露群と対照群の間に差異が認められず、大腸菌の場合と同様の結果となった。磁場強度を 450mT に設定して暴露した場合には、大腸菌の場合よりも顕著に、対数増殖期の後期にあたる 6 時間目に統計学的に有意な増殖抑制という結果が観察された。

このように大腸菌と黄色ブドウ球菌という生物学的性質の異なる 2 種類の細菌の増殖時に静磁場を暴露すると、増殖細菌数に変化が認められることが明らかとなったが、増殖の様子全体については暴露群と対照群の間の差異の程度は顕著なものではなかった。そこで、この僅かではあるが認められる差異を判定する手段として、細菌の数で比較するのではなく、細菌の分裂に要する時間を明らかにして再度検討を行った。これは 1 個の細菌が二分裂するのに要する時間で表され、一般に世代時間と呼ばれる。



第 5.3 図 黄色ブドウ球菌の増殖に対する静磁場 150mT の影響

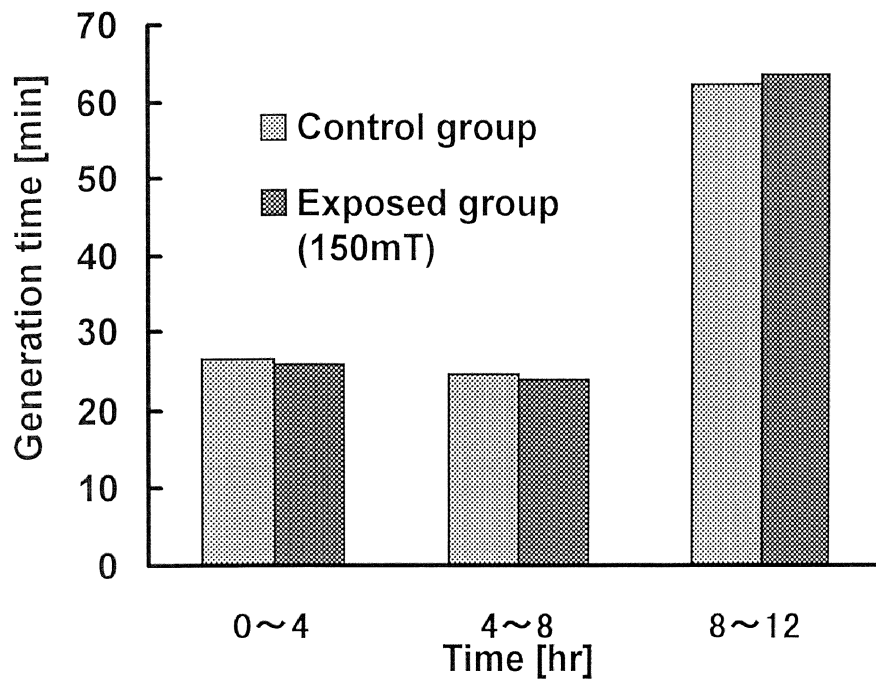


第 5.4 図 黄色ブドウ球菌の増殖に対する静磁場 450mT の影響

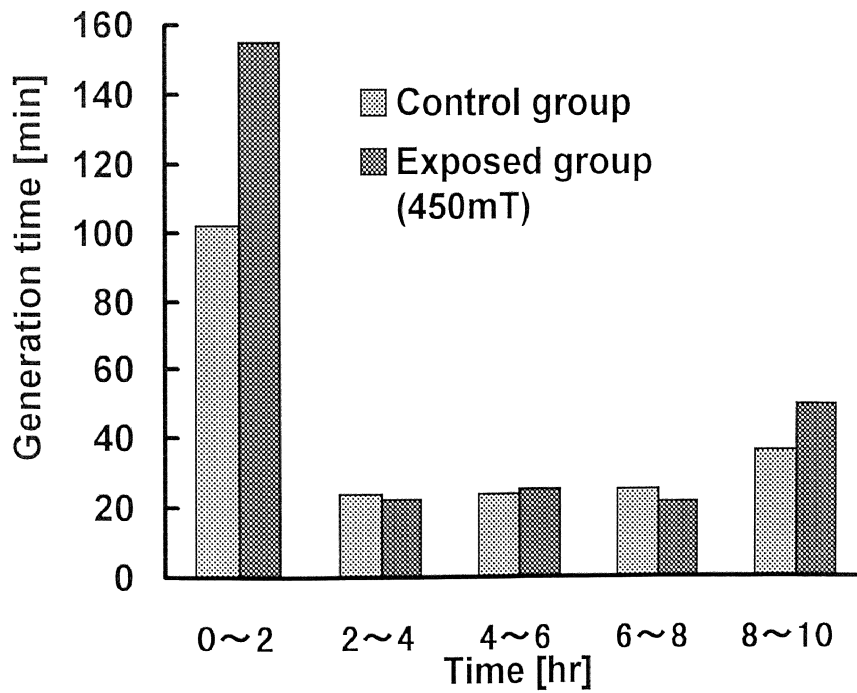
第 5.5 図から第 5.8 図は、大腸菌と黄色ブドウ球菌の世代時間を算出した結果である。これらの図は縦軸に細菌の分裂時間である世代時間を分単位で示し、横軸に世代時間を算出する際の時間間隔を示している。時間間隔は第 5.1 図から第 5.4 図で示したとおり、150mT の場合で 4 時間ごと、450mT の場合で 2 時間ごとである。

まず大腸菌について比較すると、暴露する磁場強度が 150mT の場合には暴露群の世代時間と対照群の世代時間の間に差異は認められなかった。暴露磁場強度を 450mT に設定した場合、第 5.2 図では特別な差異が観察されなかった、細菌の誘導期にあたる 0~2 時間目で暴露群と対照群の間に大きな世代時間の差が認められた。また対数増殖期の後期に当たる培養開始 8~10 時間目にも若干の世代時間の延長が認められた。しかし、第 5.2 図で若干の差が見られた 6 時間目については、その前後との世代時間に顕著な差異が認められなかった。

次に黄色ブドウ球菌について比較すると、150mT の場合には、大腸菌の場合と同様に世代時間の間に差異が認められなかった。また、450mT に設定した場合には、0~2 時間目で暴露群に若干の世代時間の延長が認められた。さらに第 5.4 図でも示されたように、培養 6 時間目については、その前後の時間との間で暴露群と対照群の間に世代時間の差異が認められた。

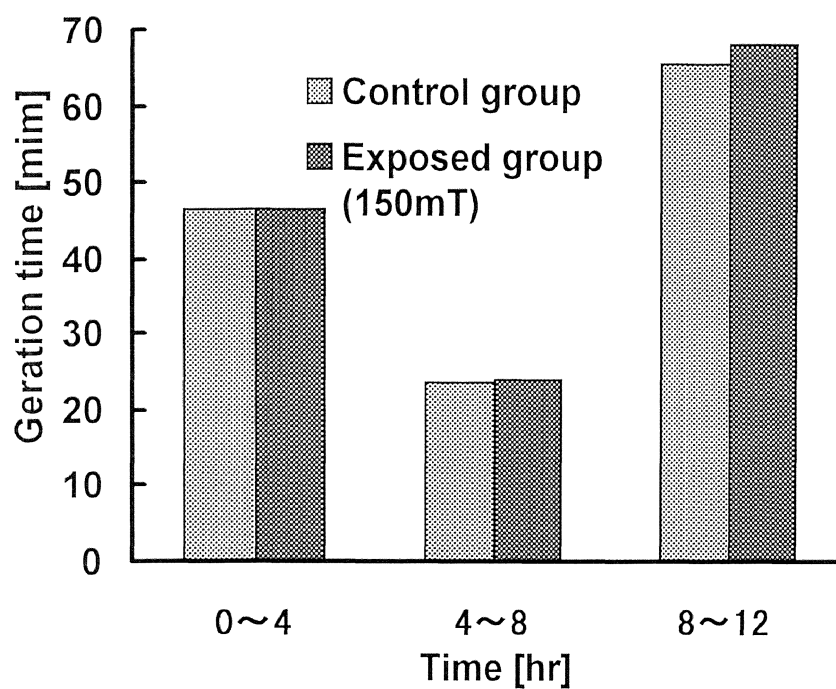


第 5.5 図 大腸菌の世代時間に対する静磁場 150mT の影響

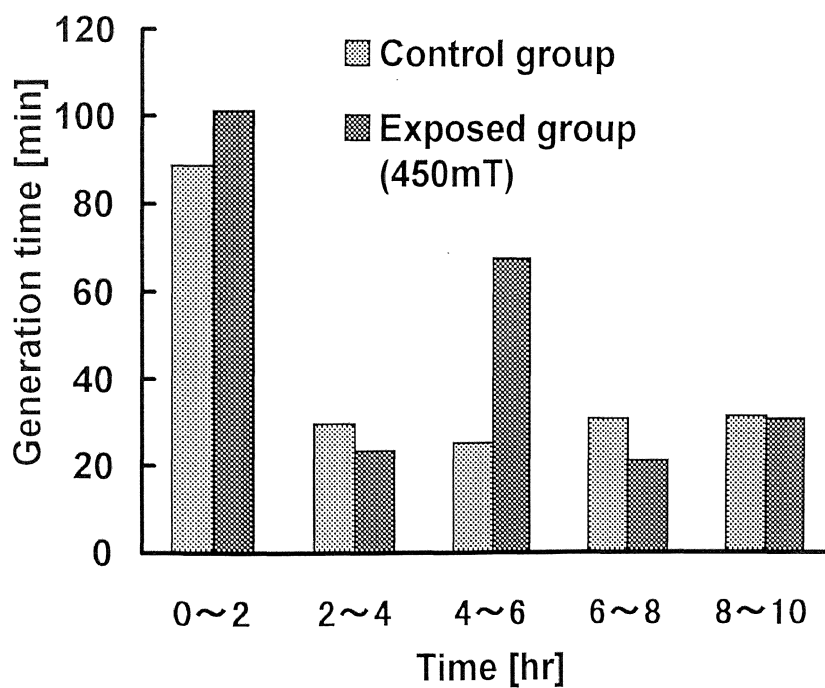


第 5.6 図 大腸菌の世代時間に対する静磁場 450mT の影響





第 5.7 図 黄色ブドウ球菌の世代時間に対する静磁場 150mT の影響



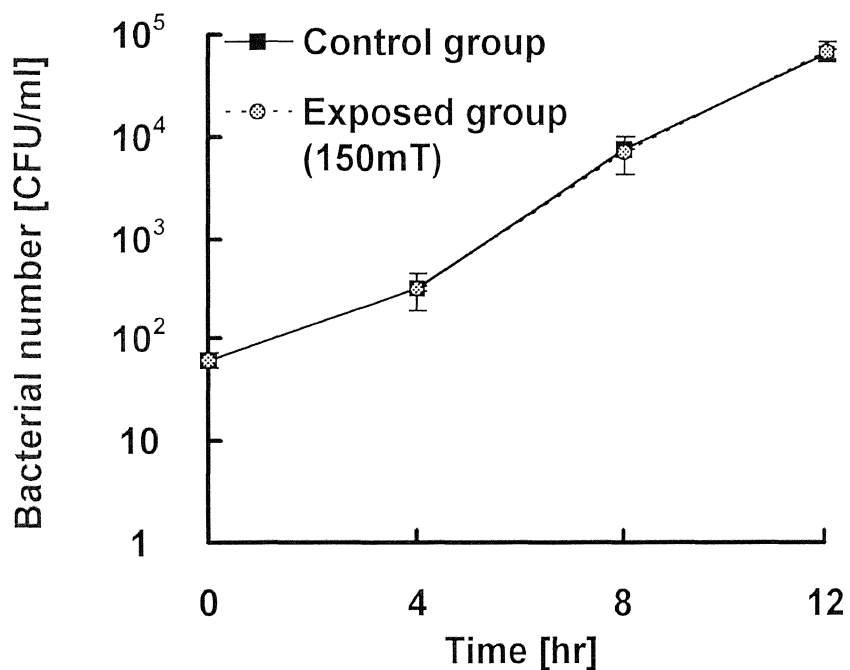
第 5.8 図 黄色ブドウ球菌の世代時間に対する静磁場 450mT の影響

### 5.1.2 真菌の増殖に対する静磁場の影響

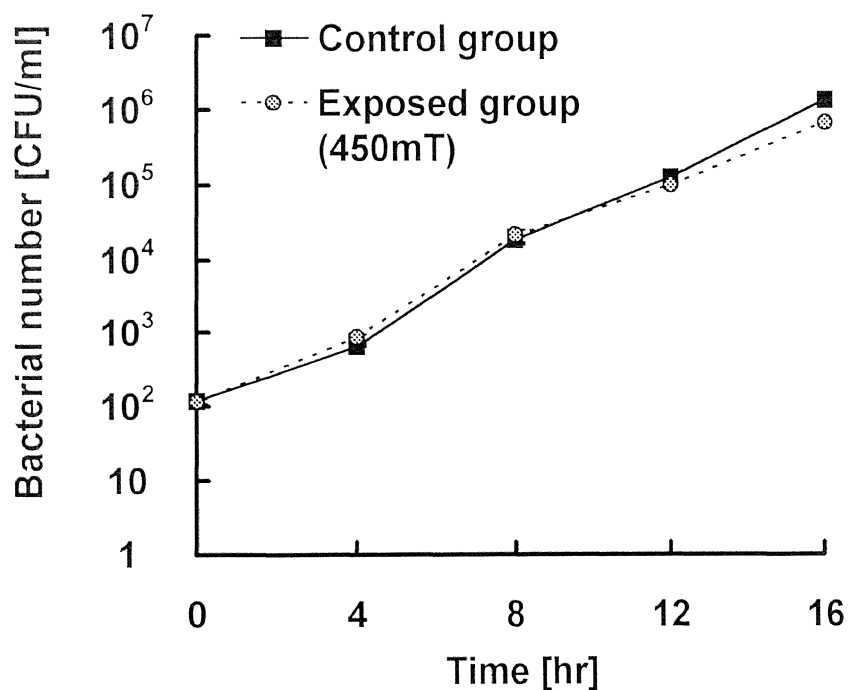
本項では、被験菌として大腸菌や黄色ブドウ球菌（原核生物）よりも生物学的に高等である酵母型真菌（真核生物）のカンディダ・アルビカンスを用いて、150mTと450mTの2種類の静磁場を暴露し、被験菌の増殖の変化を観察した。実験方法は、前述の大腸菌や黄色ブドウ球菌の場合と同様である。また、測定時間は150mTの場合には実験開始時を0時間目として12時間目まで4時間ごと、450mTの場合にはさらに詳細な結果を得ることを目的として実験開始時を0時間目として16時間目まで4時間ごとに設定した。

結果を第5.9図及び第5.10図に示す。この結果の特徴としては対照群、暴露群両群で増殖細菌数が大腸菌や黄色ブドウ球菌に比べて少ないことである。これは、カンディダ・アルビカンスが酵母型真菌であり、前述の大腸菌や黄色ブドウ球菌よりも生物学的に高等なためである。一般に、生物学的に高等になるほど成長（分裂）に時間がかかるため、結果として一定時間経過後の増殖細菌数に差が出ることになる。培養条件が最適な場合、カンディダ・アルビカンスの増殖速度は、大腸菌の1.5~2倍である。

以上の点を考慮した上で第5.9図、第5.10図を見ると、暴露する静磁場の強度が150mTの場合には、暴露群と対照群の間に明確な差異が観察されないが、450mTの場合には、対数増殖期の後期にあたる培養開始12時間目以降で、対照群に比べて暴露群の増殖細菌数がやや減少し、16時間目には暴露群の細菌数が対照群の50%程度になっていることが確認できる。

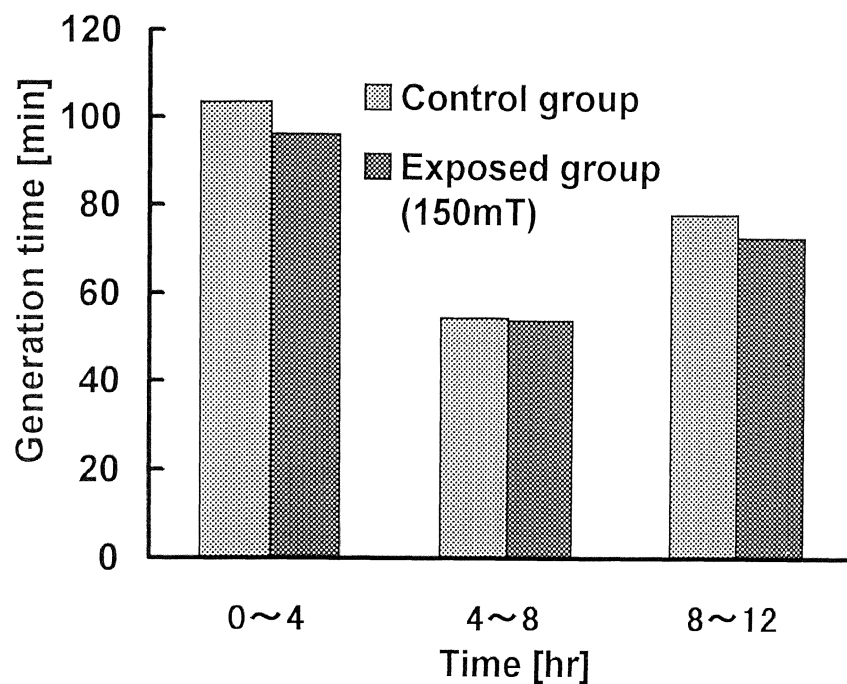


第 5.9 図 カンディダ・アルビカンスの増殖に対する  
静磁場 150mT の影響

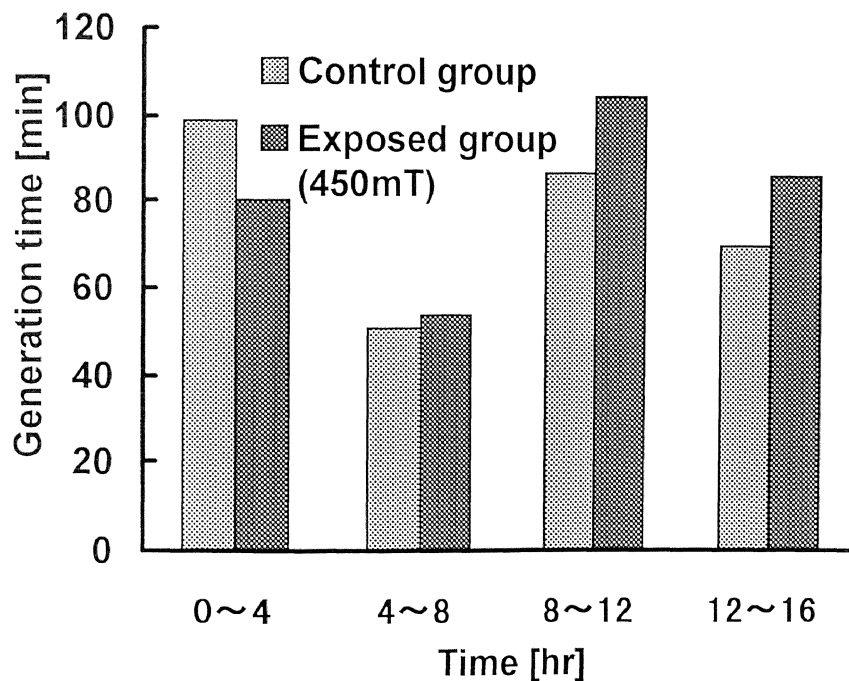


第 5.10 図 カンディダ・アルビカンスの増殖に対する  
静磁場 450mT の影響

次に前述の大腸菌、黄色ブドウ球菌の場合と同様に、カンディダ・アルビカンスの増殖の様子をより明確に観察するために、世代時間を算出したものが第 5.11 図及び第 5.12 図である。これらの結果から暴露群と対照群の世代時間を比較すると、150mT の場合には増殖細菌数で比較した場合と同じく、暴露群と対照群の世代時間の間に顕著な差異は認められなかった。一方、450mT の場合には 0~4 時間目で暴露群の世代時間の短縮が観察され、その後 8~12 時間目及び 12~16 時間目で暴露群の世代時間の延長が観察された。このことから、磁場強度 450mT の静磁場暴露によって、大腸菌などよりも高等生物に位置する真菌であっても増殖亢進及び抑制という影響が現れることが明らかとなった。



第 5.11 図 カンディダ・アルビカンスの世代時間に対する静磁場 150mT の影響



第 5.12 図 カンディダ・アルビカンスの世代時間に対する静磁場 450mT の影響

以上の大腸菌、黄色ブドウ球菌、カンディダ・アルビカンスの増殖に対する静磁場の影響から、対照群に対する暴露群の増殖細菌数の比較では明確な差異が観察されない場合でも、各測定時刻間の世代時間で比較すると、差異が認められるようになることが明らかとなった。

ここで、世代時間とは第 3 章でも示したように、以下の式で表される。

$$T = \frac{(t_2-t_1)\log 2}{\log N - \log N_0}$$

この式から明らかなように、世代時間の算出は、対数的な変化で増加する数値を、直線的な変化に置き換える計算を行っていると言える。一般的な増殖細菌数の比較では曲線的に急激に変化するために、顕在化しないように見えた差異が、この一種の数値変換を行うことで明確な差異として表れることになる。このことより、過去に行われてきた数々の研究のように、磁場暴露の影響を各測定時刻における細菌数のみで検討するだけでなく、測定時刻間の世代時間もあわせて検討することで、これまで検知し得なかった微小な差異も知り得ることができるということが本研究によりはじめて明らかとなった。

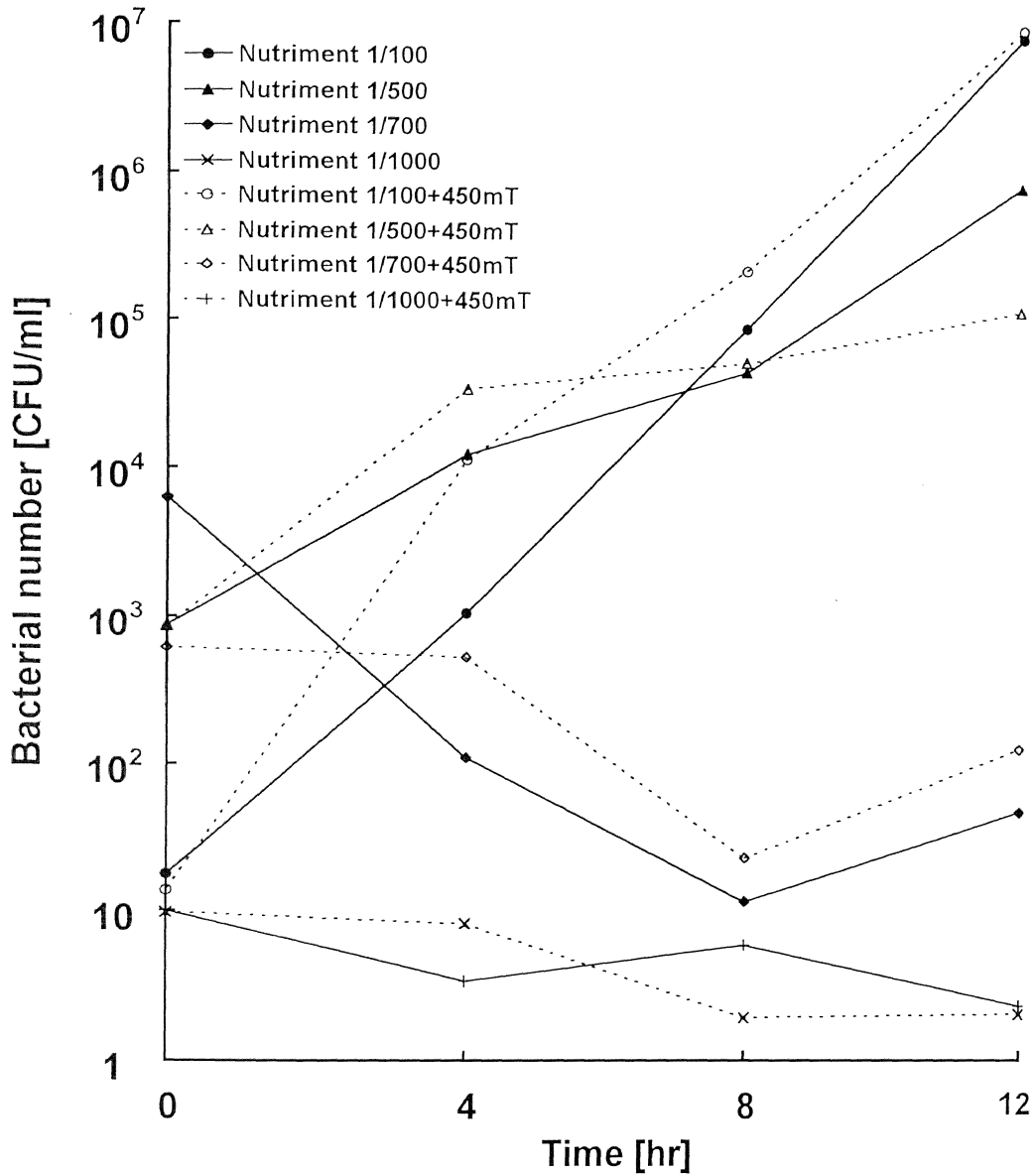
## 5.2 貧栄養条件下での静磁場の影響

本研究の中心的課題である感染状態における磁場影響を検討する際の条件の 1 つとして、細菌培養時の栄養価がある。

通常、細菌を培養する際は普通ブイヨン培地などのように栄養価に富んだ培地を使用し、至適条件に保つのに対して感染実験ではその培養液としてBSS(ハンクス平衡塩類溶液:Hank's Balanced Salt Solution) という栄養条件としては低栄養価のものを使用する。このため、従来の研究で用いられていた培養条件とは異なるため、細菌の増殖に対する磁場暴露の影響を厳密に検討しておく必要がある。

本節で使用した細菌は、5.1.1.項でも用いた非病原性大腸菌 AHU No.1714 株で、前培養及び菌数の調整方法、菌数算定方法は 5.1.1 項と同様である。また、静磁場の強度は 450mT である。低栄養価の培養液を作成するために、希釈を行っていない普通ブイヨン培地を基本溶液に設定して、これを生理食塩水により 1/100, 1/500, 1/700, 1/1000 の割合で希釈し、それぞれ栄養希釈率 1/100, 1/500, 1/700, 1/1000 の溶液とした。

まず、従来までの方法と同じく増殖細菌数で比較を行うために、実験結果を第 5.13 図に示す。



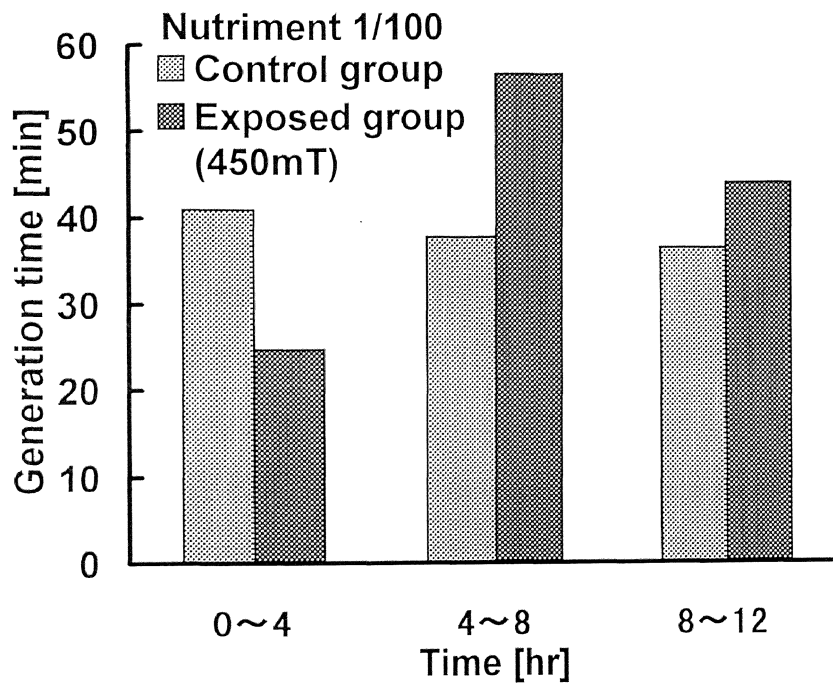
第 5.13 図 栄養条件を変化させた場合の大腸菌の増殖に対する静磁場 450mT の影響

この図は横軸に培養時間を、縦軸に増殖細菌数を対数で示した。この図に示されたように、普通ブイヨン培地を希釈して培養時の栄養条件を低下させた場合、1/500 に希釈した培地までは菌の増殖が確認され、これ以上の希釈率では大腸菌は増殖できないかもしくは徐々に死滅して菌数が減少することが明らかとなった。

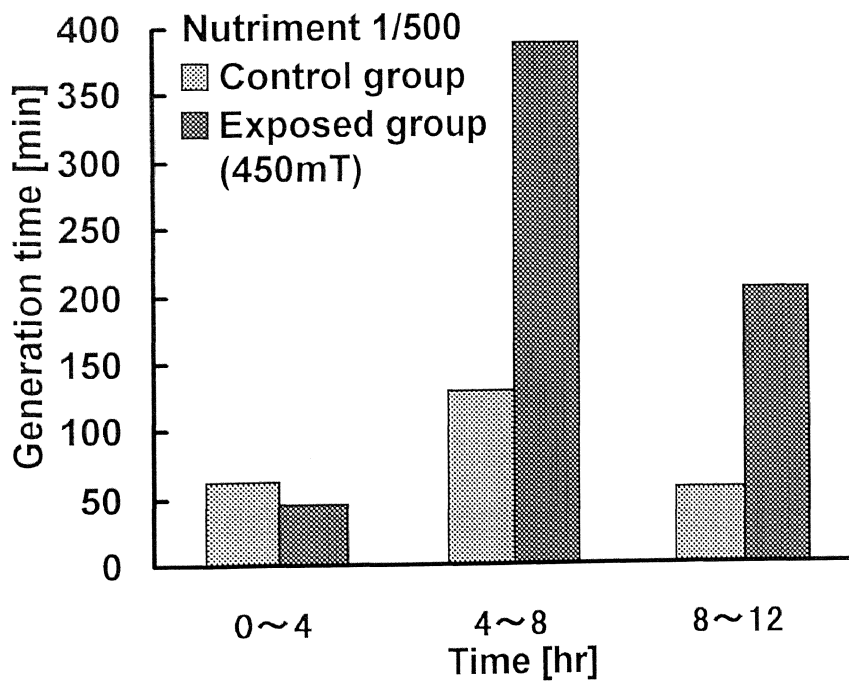


この結果を参考にして、細菌が増殖している栄養希釈率 1/100, 1/500 の 2 種類について世代時間の算出を行った。これは世代時間は計算の性質上、細菌が増殖している場合のみにしか適用できないためである。仮に細菌数が減少した場合に世代時間を算出するとその値は負になるため、検討に用いることができない。

世代時間を算出した結果を、第 5.14 図及び第 5.15 図に示す。この図は横軸に培養時間、縦軸に世代時間を示している。各栄養希釈率ごとに対照群と暴露群の比較を行うと、希釈率 1/100 では対数増殖期中期である培養 4~8 時間目に 50%程度、対数増殖後期である 8 時間目以降に 20%程度対照群に比べて暴露群の方が世代時間が延長していた。さらに希釈率 1/500 では、対数増殖中期である培養 4~8 時間目に約 3 倍、対数増殖後期である培養 8 時間目以降では約 4 倍も暴露群の世代時間が対照群よりも延長していた。これらの結果から、各栄養希釈率ごとに対照群と暴露群の増殖を世代時間で比較検討すると、普通ブイヨン培地を希釈した状態での静磁場暴露が、大腸菌の世代時間を顕著に延長させていることがわかった。さらにこの傾向は栄養希釈率が高い程、顕著になることも明らかとなった。



第 5.14 図 貧栄養条件下(1/100)での大腸菌の世代時間に対する静磁場 450mT の影響



第 5.15 図 貧栄養条件下(1/500)での大腸菌の世代時間に対する静磁場 450mT の影響

### 5.3 細菌類の増殖に対する静磁場の影響に関する検討

本章では、静磁場の生物間相互作用への影響を探るための基礎的段階として、性質の異なる3種類の細菌（グラム陰性桿菌：大腸菌、グラム陽性球菌：黄色ブドウ球菌、酵母型真菌：カンディダ・アルビカンス）を用いて検討した。

実験では、静磁場で培養する暴露群と、磁場の影響を受けない位置で培養する対照群の2種類の状態に分けて培養し、対照群を基準として暴露群との比較を行った。また、この時の静磁場強度を150mTと450mTの2種類とし、細菌の増殖に磁場暴露が影響を及ぼすのであれば、それは磁場の強度に依存し得るのかも検討した。

その結果、対照群と暴露群の増殖細菌数の比較から、静磁場暴露は細菌類の増殖に若干ではあるが、影響を及ぼすことが明らかとなった。また、この差をより明確にするために、細菌の1回の分裂に要する時間である世代時間という新しい指標を用いて検討を行った結果、従来の比較の方法を用いた場合よりも、増殖細菌数の僅かな差異を確認することができた。

増殖細菌数及び世代時間による観察の結果、磁場強度450mTの静磁場暴露の場合には、大腸菌と黄色ブドウ球菌で培養初期と培養中期に、カンディダ・アルビカンスで培養後期に細菌の増殖の抑制が観察された。また、カンディダ・アルビカンスの場合には培養初期に若干の増殖亢進が認められた。磁場強度150mTの場合では、各菌種とも対照群と暴露群の世代時間の中に顕著な差異が見られず、150mT程度の磁場暴露では細菌類の増殖に影響を与えないことが確認された。

現在までのところ、静磁場の暴露によって細菌増殖の様子がなぜ変化するのは明らかとなっていない。従来までの報告では、微生物が増殖し生存していくのに必要ないくつかの酵素活性が磁場暴露により変化することや、カルシウムイオンなどが細胞膜を通して出入りする際に変化が生じるという報告があることから、これらの要因が重複されて起っているのではないかと考えられる。しかし、細菌など微生物の生態自体、未だ不明な点が多いため、今後、微生物の生態が明らかになるにつれて、本現象のような、細菌の増殖に対する磁場影響の分析も出来るようになるのではないかと考えられる。

次に、本研究の中心的課題である感染状態における静磁場暴露の影響を検討するための前段階として、低栄養条件下での大腸菌の増殖に対する静磁場の影響を観察したところ、次のような結果が得られた。栄養希釈率 1/700 以下では細菌は増殖することができず、菌数自体を減少させてしまう場合もあるが、一定の栄養希釈率 1/500 以上であれば細菌の増殖速度は低下するものの増殖は可能であり、同条件で磁場強度 450mT の静磁場を暴露することで、その増殖速度の低下がさらに顕著に認められることが明らかとなった。このような現象が起こる要因としては、例えば人間が衰弱している時に病気にかかり易くなるように、貧栄養状態という細菌にとって劣悪な状態に、さらに磁場が暴露されることにより、その影響がより顕著に加速されたのではないと考えられる。

この結果は、磁場の生体への影響を感染モデルを用いて確認する際に、細菌に対して留意する必要があることを示すばかりでなく、細菌単体に対する磁場影響を観察する際に、栄養条件を低下させることで、より変化の大きい結果を得ることが可能であるという、新たな結論として注目すべきものである。

第 6 章  
病原性大腸菌の細胞付着  
に対する磁場影響

近年、磁場の生体に及ぼす影響に関して多くの関心が寄せられ、この方面の研究が活発に行なわれている。

しかし、これらの研究は生体に対する直接的な磁場影響を観察したものであり、今後この方面において最も重要になる我々人間を含めた生物が磁場暴露を受けた場合、体内に生息する各種の微生物と宿主である我々との相互関係が全く不明である。

自然界で生存している生物は、それ自体が一種の複数の生物による共同体であり、例えば宿主である人間と体内微生物の関係のように、ある一定の生物間のバランスの上に成り立っている。人体に対する磁場影響について検討する際には、この点についても考慮する必要があると考えられるが、これまでの研究は単独の生物に対する磁場影響を観察したのにとどまっており、体内での常在微生物、例えば腸管内の大腸菌などと宿主の相互関係が磁場を暴露されることにより影響を受けるのか否かや、影響がある場合には、それはどのようなものなのかといった事項については現在ほとんど検討されていない。

特に、これまで明らかにされてきた磁場暴露の生体影響に関する報告（その実験対象が動物であっても微生物であっても）についても、それぞれの単独の生物の生理状態に対して一定の成果をあげてはいるが、これをもって完全に安全であるか否かの決定的な判定を下せない状況にあるのは、このような側面からの配慮がなされていないこともその一因であると思われる。

このため、長時間または短時間であっても非常に高い強度の磁場に曝された場合に、何らかの病気にかかり易くなるのではないかと、の危惧が生じる可能性は否定できない。

このことから本研究では、これまでになかった新しい視点から磁場の生体影響を検討するために、研究対象として2種類の生物の相

相互作用に対する磁場暴露の影響を取り上げ、詳細な検討を行っている。

以下にその詳細を記述する。

## 6.1 病原性大腸菌の HeLa 細胞に対する付着能力

病原性大腸菌が HeLa 細胞に付着するのに必要な時間を確認するために、分与を受けた 10 株の病原性大腸菌について混合培養時間の設定を行なった。

一般に、培養細胞への病原性細菌の付着はおおよそ 1 時間で完了することが多いので、実験を開始した当初は 1~2 時間程度の混合培養を行ったが、この時間条件では標的細胞に対する明確な細菌の付着が観察できず、結果的に 4 時間程度、混合培養した場合に明確に付着する菌と付着しない菌との判別がつくことがわかった。そこで、混合培養時間を 4 時間として 10 株それぞれの病原性大腸菌の HeLa 細胞への付着能力の比較を行なった。

第 6.1 表に分与を受けた 10 種類の菌株を 4 時間、標的細胞である HeLa 細胞と混合培養した場合の付着の程度を示す。なお、この時には人工磁場の暴露は行っていない。この結果から 10 株の病原性大腸菌の細胞に対する付着の程度は大きく 3 群に分けられることが明らかとなった。そのため、この表では中間的な付着程度を示した ATSH No.17, 18, 29 の 3 株を標準 (Control) として、これより付着能力が低い群を Weak、高い群を Strong と表記し、分類した。

第 6.1 表 病原性大腸菌の HeLa 細胞への付着能力

Strain number	Adhesion Ability
ATSH No.0	Weak
ATSH No.12	Weak
ATSH No.15	Weak
ATSH No.16	Strong
ATSH No.17	Control
ATSH No.18	Control
ATSH No.25	Weak
ATSH No.27	Strong
ATSH No.28	Weak
ATSH No.29	Control

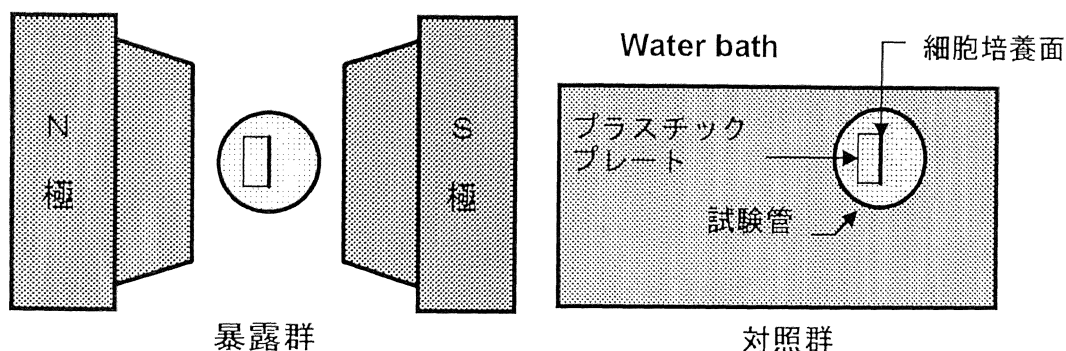
第 6.1 表に示したように、今回設定した実験条件では全 10 株の内 5 株で他の菌種よりも低い付着能力が、2 株の菌種で高い付着能力が確認された。

このことから実験には、付着能の差による磁場暴露の影響についても検討することを目的として付着能力の高い菌株である ATSH No.16 及び ATSH No.27 株と、付着性の低い菌株である ATSH No.0 及び ATSH No.12 株の 4 種類の菌株を用いて以後の実験を行なった。

## 6.2 混合培養に対する静磁場の影響

病原性大腸菌と HeLa 細胞の混合培養時に、磁場強度 450mT の静磁場を暴露して、対照群と暴露群の間で細胞に付着する細菌数の差異を観察した。実験対象の配置を第 6.1 図に示す。

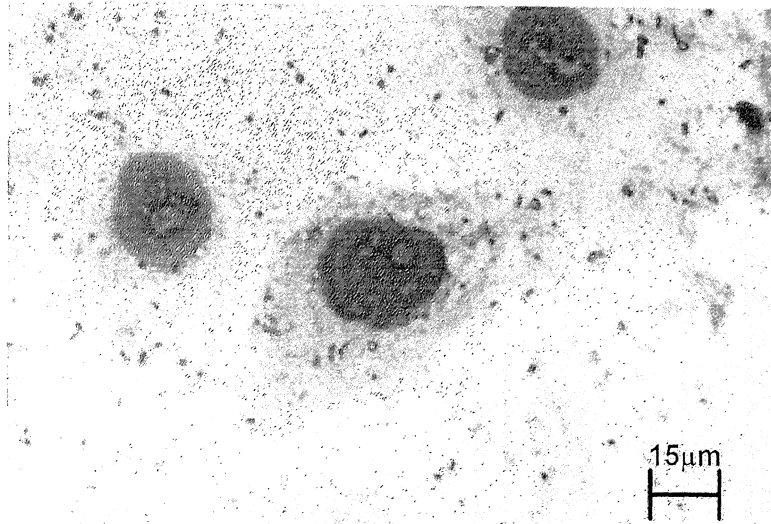




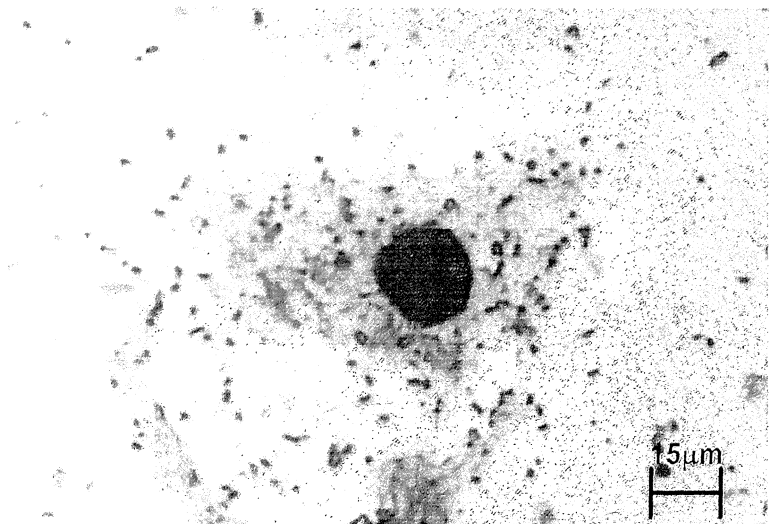
第 6.1 図 実験対象の配置 (培養細胞に対する静磁場の影響)

この時用いた病原性大腸菌は前節で選出した 4 種類の菌株 (ATSH No.0, ATSH No.12, ATSH No.16, ATSH No.27) である。

まず、計測した数値による比較を行う前に、本実験における代表的な付着例を第 6.2 図に示した。この写真撮影時に使用した病原性大腸菌は ATSH No.27 株である。図中、黒く丸く見えている部分は HeLa 細胞の核であり、その周りの薄い色にぼやけて見える部分が細胞膜である。また、写真中に数多く存在する小さな黒い点一つ一つが病原性大腸菌である。第 6.2 図から、静磁場暴露を受けた暴露群の HeLa 細胞の方が、人工磁場の暴露を受けない対照群の細胞よりも、多くの病原性大腸菌の付着を受けていることが確認できる。



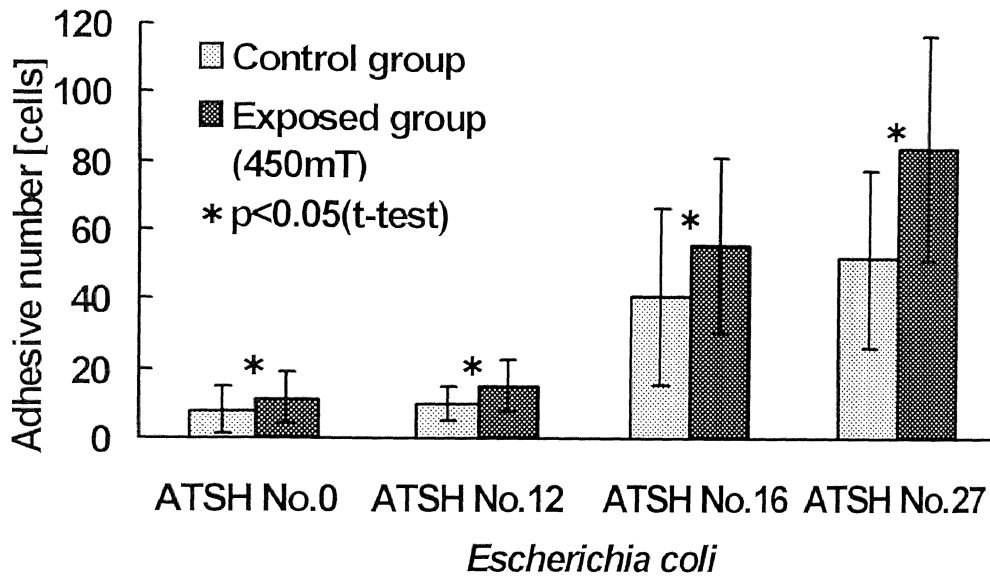
(a) 対照群



(b) 暴露群

第 6.2 図 静磁場暴露の有無による付着細菌数の差異

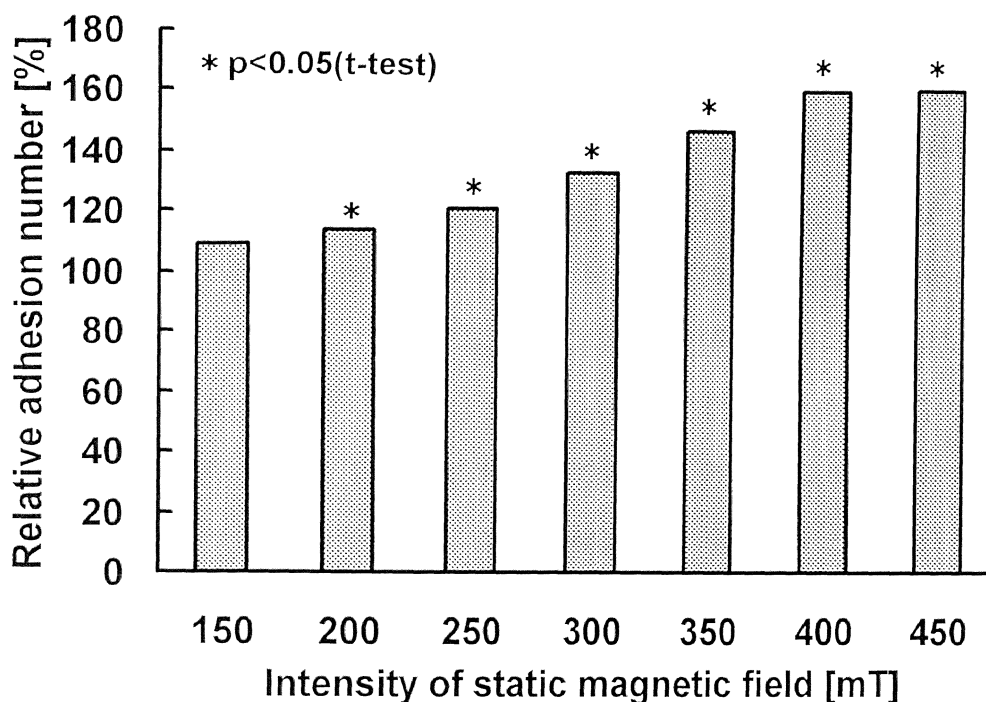
次に、実験結果を第 6.3 図に示す。この図は横軸に病原性大腸菌の菌株と暴露条件を、縦軸に HeLa 細胞 1 個に対する付着細菌数の平均値と標準偏差を示している。また、暴露群と対照群の付着細菌



第 6.3 図 450mT 静磁場暴露下での HeLa 細胞に対する病原性大腸菌の付着数の変化

数を二標本 t 検定により比較して、両者の間に棄却率 5%以下の有意差があった場合には \* 印を示した。第 6.1 表でも示したように、この図においても ATSH No.0, 12 株と、ATSH No.16, 27 株の間には付着細菌数に大きな差がある。各菌株ごとに暴露群と対照群の付着細菌数を比較すると、4 株全ての大腸菌において、暴露群の方が対照群よりも多くの付着細菌数を示した。暴露群と対照群の間の付着細菌数の比率は、全菌株ともおよそ 1.6 倍であった。さらに、この差を二標本 t 検定によって検定すると、各菌株とも棄却率 5%以下の有意差が得られた。

以上、第 6.3 図の結果より、本研究で用いた 4 種類の病原性大腸菌は磁場強度 450mT の静磁場内で HeLa 細胞と混合培養を行うと、



第 6.4 図 磁場強度による病原性大腸菌の HeLa 細胞付着程度の変化

人工磁場外で混合培養したものよりも数多く HeLa 細胞に付着することが、はじめて明らかとなった。また、本現象は大腸菌の種類によらず、どの菌株においても同程度に生じることも明らかとなった。

次に、HeLa 細胞への付着細菌数に対する磁場強度依存性を明らかにするために、使用する強度を 150~450mT の間で 50mT ごとに設定して、第 6.3 図の場合と同様の実験を行った。結果を第 6.4 図に示す。

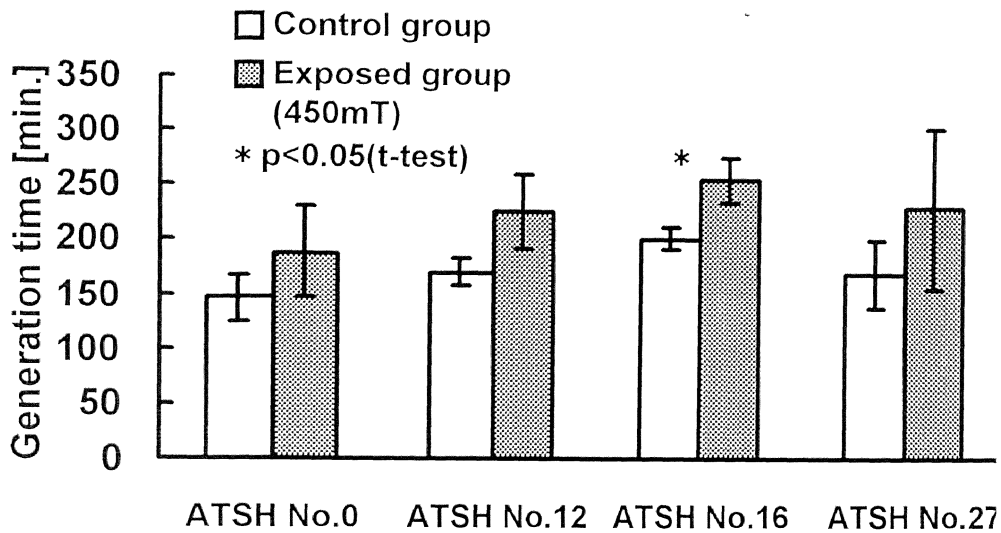
この図は横軸に暴露した静磁場の強度を、縦軸に暴露群の付着細菌数の平均値を対照群の付着細菌数の平均値で規格化した結果を示している。また、暴露群と対照群の細菌数を二標本 t 検定により比較して、両者の間に棄却率 5%以下の有意差があった場合には \* 印

を示した。本実験で使用した病原性大腸菌は ATSH No.27 株である。縦軸の値が 100% の場合、対照群と暴露群の付着細菌数が同数であることを示し、100% 以上で暴露群の付着細菌数が対照群よりも多いことを示している。この図に示されるように、磁場強度 150mT から 450mT にかけて、付着細菌数の比率がほぼ直線的に増加した。最も小さな強度である 150mT においても、対照群よりも暴露群の方が付着細菌数が約 1.1 倍に増加しており、磁場強度が 450mT の場合には前述のように 1.6 倍にもなっている。各磁場強度ごとに対照群と暴露群の付着細菌数を二標本 t 検定により比較すると、磁場強度 200mT 以上から、棄却率 5% 以下の有意差が確認された。

### 6.3 大腸菌の単独培養に対する静磁場の影響

前節の結果のように、病原性大腸菌と HeLa 細胞の混合培養時に静磁場の暴露を行うと、細胞に対する付着細菌数が増加する現象が観察された。この現象の要因として、暴露により病原性大腸菌の増殖に変化が生じた可能性がある。つまり、静磁場の暴露により病原性大腸菌の増殖が活性化され、このため細胞 1 個に対する細菌数が増加し、結果的に細胞に付着する細菌数も増加したのではないかと考えられる。そこで、この現象の機序を明らかにすることを目的として、混合培養時に培養液として使用している塩類溶液である BSS 内で病原性大腸菌のみを単独培養して、増殖の変化を観察した。

本実験で使用した病原性大腸菌の菌株は ATSH No.0, 12, 16, 27 の 4 株で、培養時間は 4 時間とした。また、暴露に使用した静磁場の強度は 450mT とし、温度条件や培養液の条件なども前節の混合



第 6.5 図 病原性大腸菌の増殖に対する静磁場 450mT の影響

培養の場合と同様に設定した。実験は次のような手順で行った。まず、混合培養実験の場合と同様に前培養した病原性大腸菌の菌液を 0.2ml ずつ BSS が 5ml 入った 2 本の試験管に接種し、1 本を暴露群として静磁場内で、他方を対照群として磁場外で培養した。細菌数の測定は第 5 章の実験の場合と同様に、混釈培養法を用いて行い、暴露開始時(0 時間目)と終了時(4 時間目)の細菌数を計測した。その後、細菌数より世代時間を算出して対照群と暴露群の比較を行った。第 6.5 図に結果を示す。

この図は、横軸に菌株と暴露条件を、縦軸に世代時間を表している。また、対照群と暴露群の細菌数を二標本 t 検定により比較して、両者の間に棄却率 5%以下の有意差があった場合には\*印を示した。実験で使用した 4 株の病原性大腸菌では、全ての菌株が静磁場の暴露によって世代時間が延長した。各菌株ごとに対照群の世代時間と暴露群の世代時間を二標本 t 検定により比較すると、ATSH No.16

株のみ棄却率 5%以下の有意差が得られた。これらのことから、培養液を BSS とした条件では暴露群の方が対照群よりも増殖速度が向上することではなく、逆に菌株によっては増殖速度が低下する場合があることが明らかとなった。

#### 6.4 HeLa 細胞の被感染性に対する静磁場の影響

前節の結果より、病原性大腸菌の増殖に静磁場が影響して HeLa 細胞への付着数が増加するのではないことが明らかとなった。そこで、次に細菌ではなく細胞に静磁場が影響しているのではないかと推測した。すなわち、HeLa 細胞が静磁場の暴露によって細菌の付着を受けやすい状態になってしまうのではないかというものである。これを確認するために、HeLa 細胞と病原性大腸菌の混合培養を行う前に HeLa 細胞のみを磁場暴露して、その後の混合培養に影響を及ぼすのか否かについて検討した。

実験は次のような方法で行った。使用した病原性大腸菌の菌株は ATSH No.0, ATSH No.27 の 2 種類である。また、暴露した静磁場の強度は 450mT である。実験は静磁場の暴露条件によって次の 4 種類に分けて行った。暴露時、非暴露時の実験対象の配置は第 6.1 図と同様である。

条件 A : HeLa 細胞のみを磁場外で 4 時間単独培養し、その後病原性大腸菌を接種してからも磁場外で 4 時間混合培養を行った。

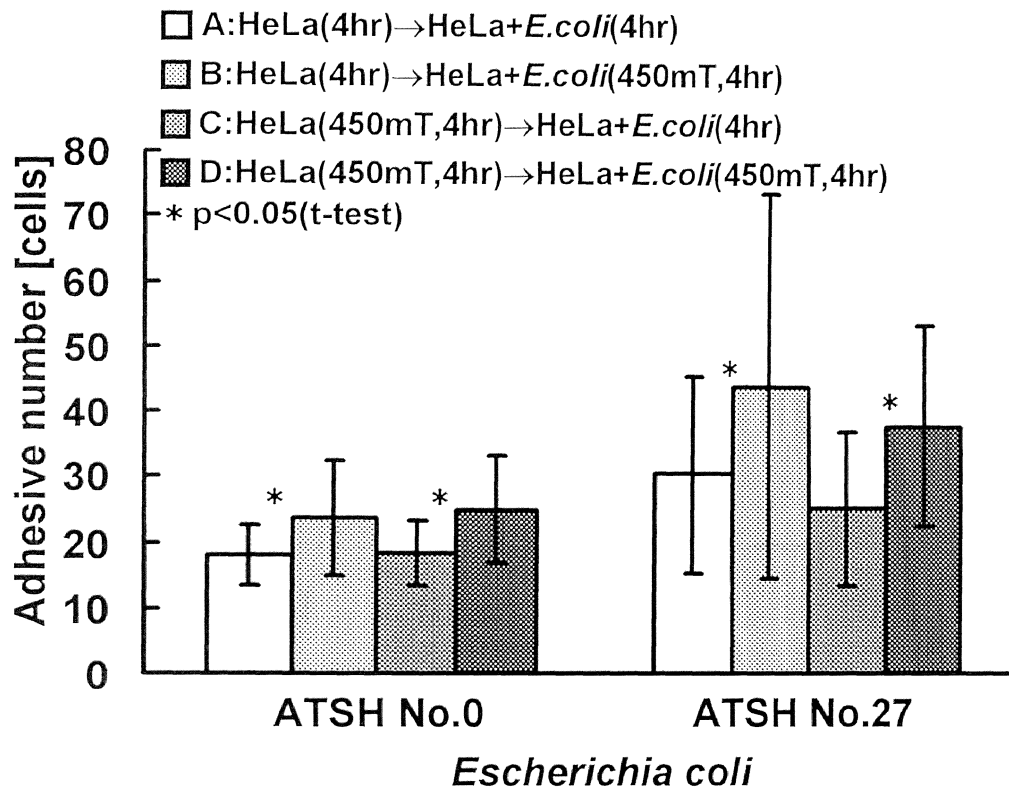
条件 B : HeLa 細胞のみを磁場外で 4 時間単独培養し、その後病原性大腸菌を接種してから、静磁場内で 4 時間混合培養を行った。

条件 C : HeLa 細胞のみを静磁場内で 4 時間単独培養し、その後病原性大腸菌を接種してから、磁場外で 4 時間混合培養を行った。

条件 D : HeLa 細胞のみを静磁場内で 4 時間単独培養し、その後病原性大腸菌を接種してからも静磁場内で 4 時間混合培養を行った。

結果を第 6.6 図に示す。この図は横軸に大腸菌の菌株と実験条件を、縦軸に 1 個の細胞に対する付着細菌数を示している。また、条件 A と B、条件 C と D の付着細菌数をそれぞれ二標本 t 検定により比較して、両者の間に棄却率 5%以下の有意差があった場合には \* 印を示した。この結果から、本節の実験においても前述のように、感染体である病原性大腸菌と標的細胞である HeLa 細胞を混合して培養する際に磁場強度 450 mT の静磁場を暴露すると(条件 B)、磁場外で同様の培養を行った群(条件 A)に比べて付着菌数が多いことが判明した。また、この時の t 検定の結果、棄却率 5%以下の有意差が得られた。また、HeLa 細胞に対し単独培養時にのみ静磁場の暴露を行い、その後の混合培養時には静磁場に暴露しない群(条件 C)と単独培養と混合培養時を通して静磁場暴露した群(条件 D)を比較すると、混合培養時に静磁場暴露した条件 D 群の方が付着細菌数が多く、この 2 群の間にも二標本 t 検定の結果、棄却率 5%以下の有意差が得られた。また、実験の期間中、磁場暴露を受けていた条件 D 群は条件 B 群とほぼ同数の付着細菌数を示した。



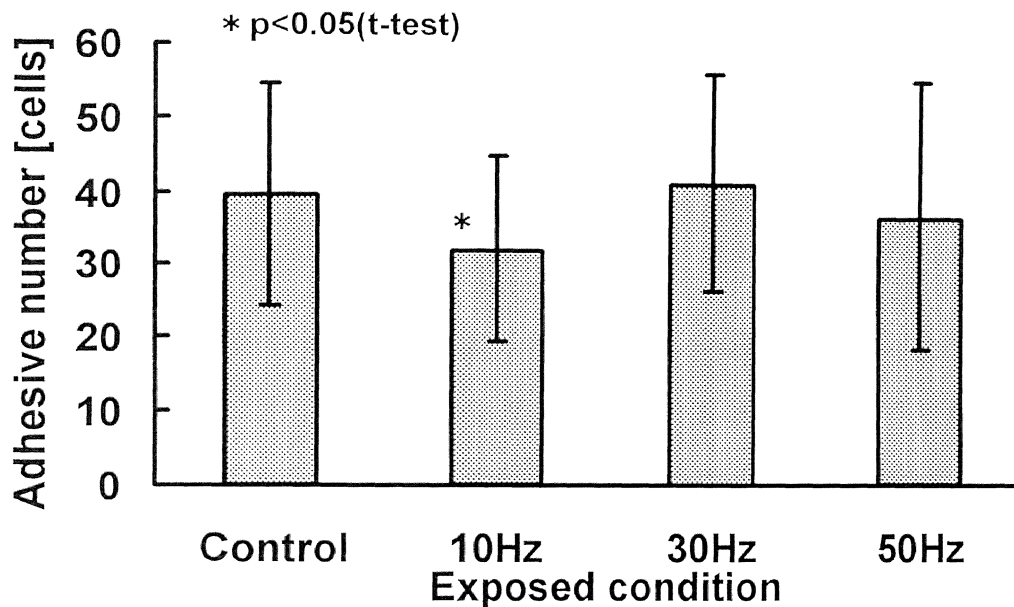


第 6.6 図 暴露条件による病原性大腸菌の HeLa 細胞に対する付着数の相違

これらの結果から、本節のはじめに推測した「静磁場の暴露による付着細菌数の増加の原因が、標的細胞となる HeLa 細胞自体が磁場暴露により生理的影響を受け、病原性大腸菌の付着を受けやすくなるのではないか」という可能性はないことが明らかとなった。

## 6.5 混合培養に対する変動磁場の影響

次に、6.2 節と同様の条件で混合培養している状態で、変動磁場の暴露を行った。暴露に使用した磁場は正弦波状に変化する変動磁



第 6.7 図 病原性大腸菌の HeLa 細胞付着に対する変動磁場の影響

場で、周波数は 10, 30, 50Hz の 3 種類、最大磁場強度は 70mT である。実験対象の配置は第 6.1 図と同様である。ただし、変動磁場であるため、磁極は時間によって反転する。

結果を第 6.7 図に示す。この図は、横軸に変動磁場の周波数と暴露条件を、縦軸に HeLa 細胞 1 個あたりの付着細菌数の平均値と標準偏差を示している。また、対照群と暴露群の付着細菌数をそれぞれの周波数ごとに二標本 t 検定により比較して、棄却率 5% 以下の有意差があった場合には棒線で結んで示した。各周波数ごとに暴露群の付着細菌数を対照群と比較すると、周波数 10Hz の変動磁場を暴露した場合、暴露群の付着細菌数が対照群と比較して約 20% 減少していた。これは前述の静磁場暴露により付着細菌数が増加していたのと相反する結果である。これに対して、周波数 30 及び 50Hz の変

動磁場を暴露した場合には、対照群と実験群の間に明確な付着細菌数の差異が認められなかった。

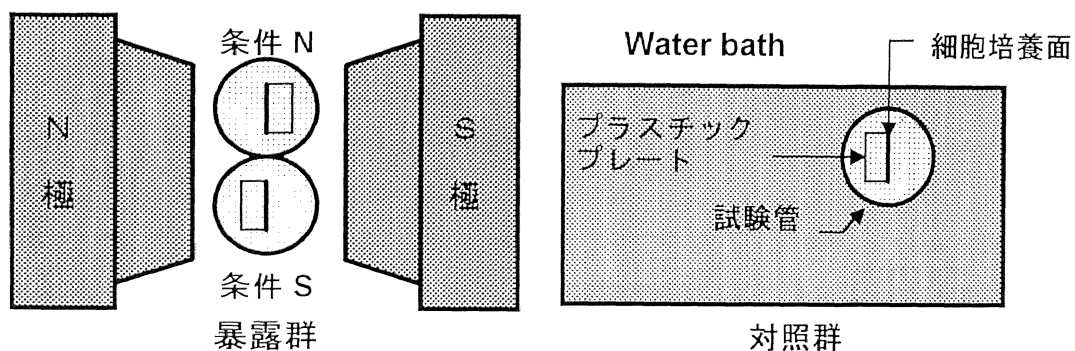
## 6.6 混合培養に対する磁極方向の影響

6.2 節の実験では、混合培養状態で静磁場を暴露をする場合、プラスチックプレートの細胞培養面が電磁石の S 極に向くように配置した。そこで静磁場暴露による付着細菌数の増加現象に静磁場の磁極の方向が影響を及ぼすのか否かを検討するために、プレートの細胞培養面を N 極に向けて静磁場暴露を行った。ここでの実験条件は以下の 3 種類に設定した。暴露した静磁場の強度は 450mT である。実験対象の配置を第 6.8 図に示す。

条件 S : 6.2 節の暴露群と同様に、プラスチックプレートの細胞培養面を電磁石の S 極に向けて静磁場暴露

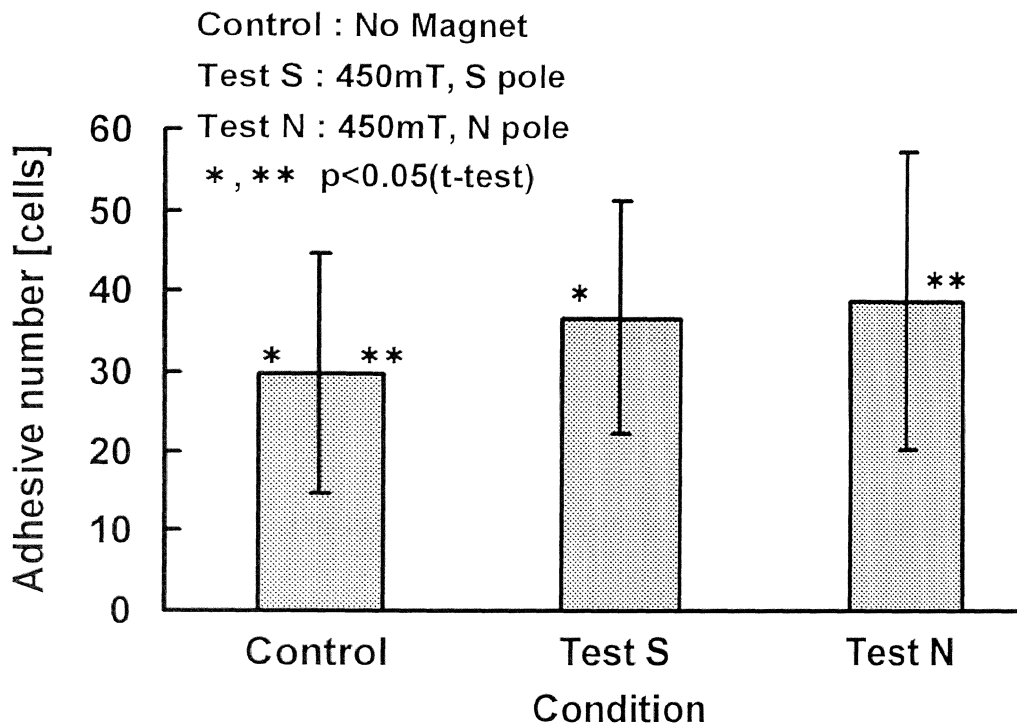
条件 N : プラスチックプレートの細胞培養面を電磁石の N 極に向けて静磁場暴露

対照群 : 磁場外で混合培養



第 6.8 図 実験対象の配置（混合培養に対する磁極方向の影響）

結果を第 6.9 図に示す。この図は、縦軸に HeLa 細胞 1 個あたりの付着細菌数の平均値と標準偏差、横軸に暴露条件を示している。また、各条件ごとに二標本 t 検定により比較して、棄却率 5% 以下の有意差があった場合には \*、\*\* 印を示した。対照群に比べて条件 S 群及び条件 N 群の付着細菌数が増加した。これを二標本 t 検定を用いて統計処理すると、対照群と条件 S 群及び対照群と条件 N 群の間に棄却率 5% 以下の有意差が確認された。このことから、静磁場暴露による付着細菌数増加の現象には磁極の向きは影響を与えないことが明らかとなった。

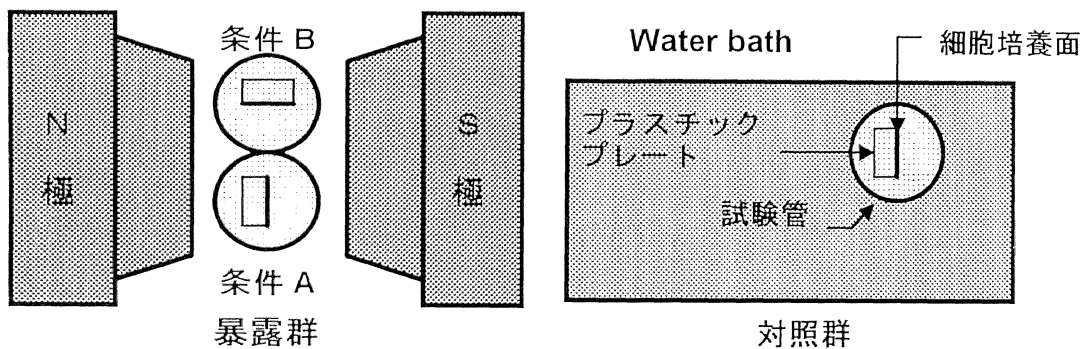


第 6.9 図 病原性大腸菌の HeLa 細胞付着に対する磁極方向の影響

## 6.7 磁束方向と細胞培養面との関係

これまでの実験では磁場暴露の際、磁束に対してプラスチックプレートの細胞培養面が垂直になるように配置していた。そこで次に、磁束に対するプレートの配置が付着細菌数に影響を及ぼすのか否かを確認するために、プレートの細胞培養面の向きを変化させて磁場暴露を行った。磁場暴露条件は以下の 3 種類に設定した。なお、磁場強度は 450 m T である。実験対象の配置を第 6.10 図に示す。

条件 A : 6.2 節の暴露群と同様に、磁束の向きに対して、垂直な方向にプラスチックプレートに向けて静磁場暴露

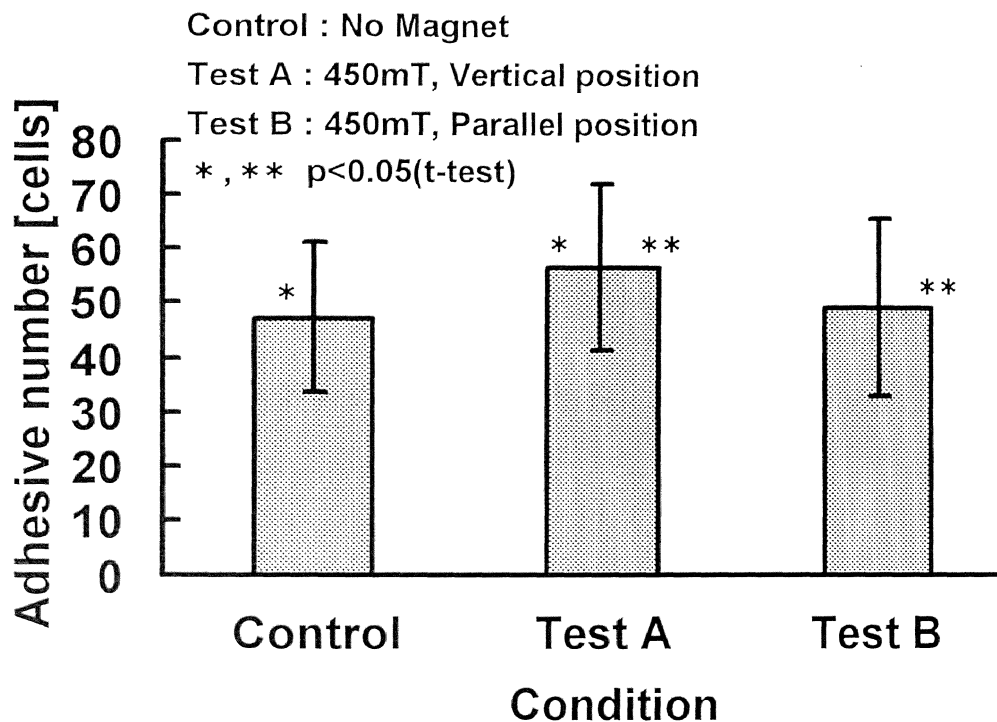


第 6.10 図 実験対象の配置（混合培養に対する磁束方向の影響）

条件 B：磁束の向きに対して、平行な方向にプラスチックプレート  
を向けて静磁場暴露

対照群：磁場外で混合培養

結果を第 6.11 図に示す。この図は、縦軸に HeLa 細胞 1 個あたりの付着細菌数の平均値と標準偏差、横軸に暴露条件を示している。また、各条件ごとに二標本 t 検定で比較して、棄却率 5% 以下の有意差があった場合には \*、\*\* 印を示した。対照群及び磁束方向に平行にプラスチックプレート（HeLa 細胞の培養面）を配置した条件 B 群の付着細菌数は、ほぼ同数であり二標本 t 検定においても有意な差異が認められなかった。これにに対して、これまでの暴露実験と同様にプレートを磁束の方向に対して垂直に配置した条件 A 群では、付着細菌数が対照群に比べて明らかに多く、この値は統計学的にも有意な差となった。また、条件 A 群と条件 B 群を比較した場合にも、両者の間に明らかな付着細菌数の違いが認められた。

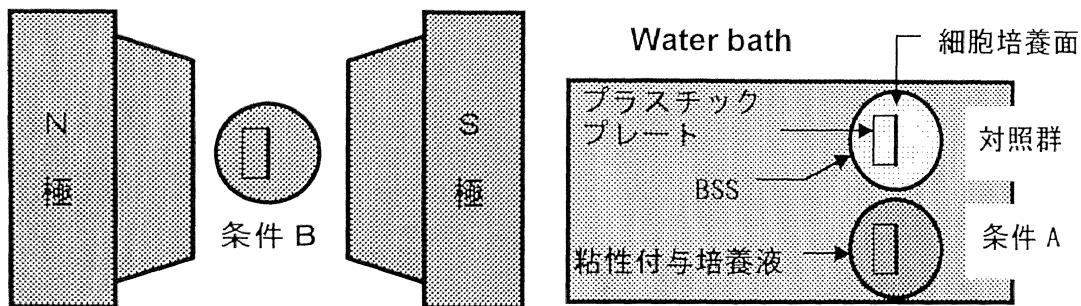


第 6.11 図 病原性大腸菌の HeLa 細胞付着に対する磁束方向の影響

この結果より、静磁場暴露による付着細菌数が増加する現象には、磁束に対する細胞培養面の向きが、重要であることが明らかとなった。

### 6.8 混合培養に対する培養液の粘性影響

6.3 節、6.4 節の結果から静磁場暴露による付着細菌数増加の要因は細胞や細菌の生物学的な変化ではないようである。そこで、培養液中での大腸菌の運動のような、物理的現象への静磁場の影響を検討するために、混合培養時の物理条件を変化させ、付着細菌数の変化を観察した。



第 6.12 図 実験対象の配置 (混合培養に対する培養液の粘性影響)

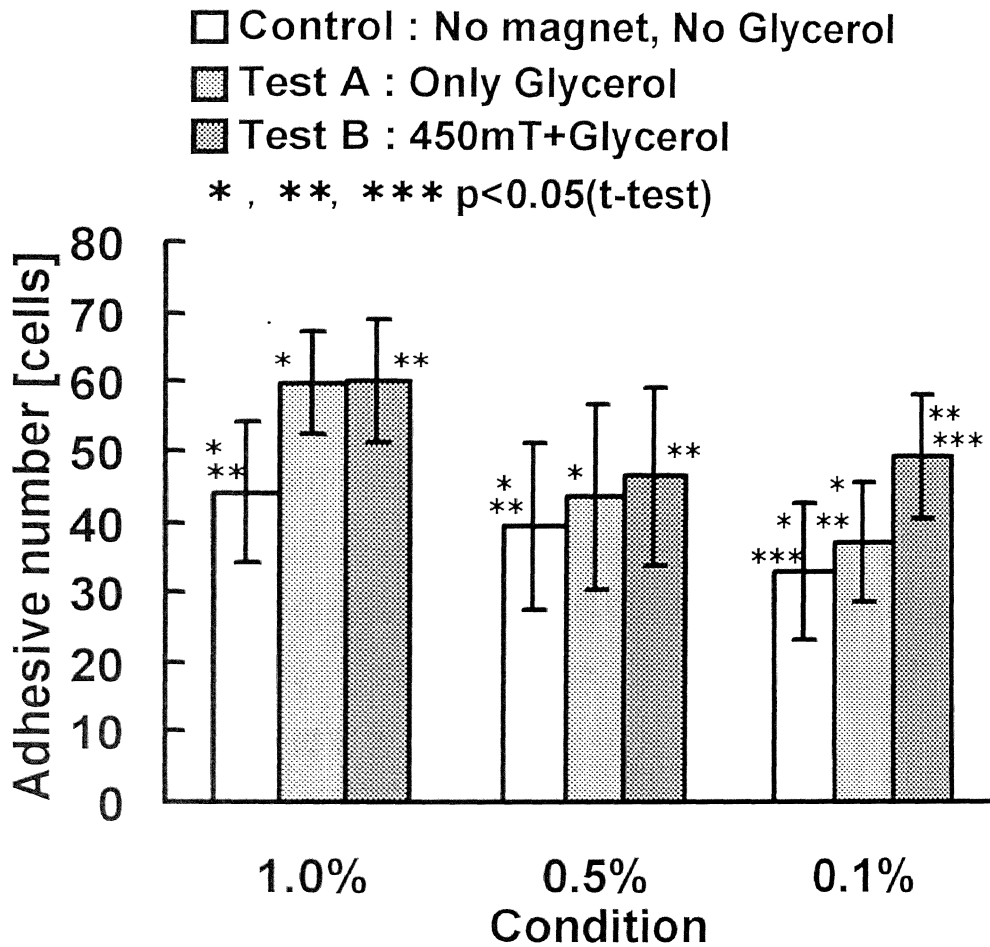
具体的には、培養液である BSS にグリセリンを混入することで、培養液に粘性を付与し、この粘性付与培養液を用いて 6.2 節と同じ実験を行った。この時の培養条件は以下の 3 種類に設定した。また、混入するグリセリンの濃度は、BSS の容量に対して 1.0, 0.5, 0.1% の 3 種類で、暴露する静磁場の強度は 450mT である。実験対象の配置を第 6.12 図に示す。

条件 A: 粘性付与培養液を用いて混合培養。磁場の暴露は行わない。

条件 B: 粘性付与培養液を用いて混合培養。静磁場を暴露。

対照群: BSS を用いて混合培養。磁場の暴露は行わない。





第 6.13 図 粘性付与培養液中での病原性大腸菌の HeLa 細胞付着に対する静磁場の影響

結果を第 6.13 図に示す。この図の横軸はグリセリン濃度と暴露条件を、縦軸は HeLa 細胞 1 個に付着した大腸菌数の平均値と標準偏差を示している。また、対照群と条件 A, B 群及び条件 A 群と B 群の付着細菌数を二標本 t 検定により比較して、棄却率 5%以下の有意差があった場合には\*、\*\*、\*\*\*印を示した。粘性付与培養液のグリセリン濃度が 1.0%の場合には対照群、条件 A 群、条件 B 群の順に付着細菌数が増加した。この内、対照群と条件 A, B 群との間に t 検定による比較で棄却率 5%以下の差異が認められたものの、

条件 A と B の間には差異が認められなかった。グリセリン濃度が 0.5% の場合にも同様の傾向が認められる結果となった。しかし、グリセリン濃度が 0.1% の場合には対照群、条件 A、条件 B の順に付着細菌数が増加し、対照群、条件 A と条件 B の間には棄却率 5% 以下の差異が認められた。

## 6.9 病原性大腸菌の細胞付着に対する磁場影響の検討

本章では、複数の生物間の相互作用に対する磁場暴露の影響を探るために、その例として 2 種類の生物による感染を取り上げ、この系に対する磁場暴露影響について検討した。実験対象には感染の最も単純なモデルである株化培養細胞とこれに特異的に付着性を示す病原性細菌を用いた。

この感染モデルに対して、磁場強度 450mT の静磁場暴露を行ったところ、4 種類の病原性大腸菌は、人工磁場外で混合培養したものよりも数多く HeLa 細胞に付着することが、はじめて明らかとなった。また、この現象は大腸菌の種類によらず、どの菌株においても同程度に生じた。静磁場の強度を 150~450mT の間で 50mT ごとに設定して、同様の実験を行ったところ、この現象には磁場強度依存性があり、強度と付着細菌数はほぼ直線的な関係となっていることが判明した。

このような現象の要因として、静磁場の暴露により病原性大腸菌の増殖が活性化され、このため細胞 1 個に対する細菌数が増加し、結果的に細胞に付着する細菌数も増加するのではないかと第一に考えた。そこで、混合培養時に培養液として使用している BSS 内で病原性大腸菌のみを単独培養して、増殖の変化を観察した。しかし、

この条件では暴露群の方が対照群よりも増殖速度が向上することはなく、逆に菌株によっては増殖速度が低下する場合があることが明らかとなった。特に培養液として用いた BSS は分裂に必要な窒素源をほとんど含まないため、対照群でも世代時間が 150~200 分程度となっており、実験時間である 4 時間では一回の分裂しかできない。これは至適培養条件下での大腸菌の世代時間が通常 30 分程度であることを考慮すると、本実験条件下では病原性大腸菌の増殖が、静磁場暴露によって亢進するという現象の要因とはなり得ない。

次に細菌ではなく細胞に静磁場暴露の影響が現れるのではないかと推測した。すなわち、HeLa 細胞が静磁場の暴露によって細菌の付着を受けやすい状態になるのではないかというものである。これを検討するために、HeLa 細胞と病原性大腸菌の混合培養を行う前に HeLa 細胞のみを磁場暴露して、その後の混合培養に影響を及ぼすのか否かについて検討した。しかし、静磁場暴露による付着細菌数の増加につながるような明確な差は観察されなかった。

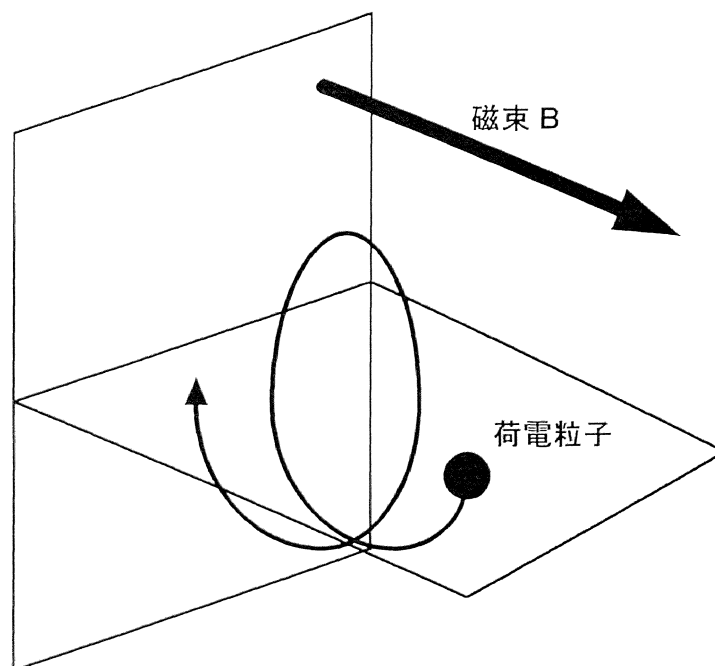
次に静磁場暴露の場合と同様の培養条件で、変動磁場の暴露を行った。結果は、周波数 10Hz の変動磁場を暴露した場合、暴露群の付着細菌数が対照群と比較して約 20%減少していた。これは前述の静磁場暴露により付着細菌数が増加していたのとは相反する結果であった。これに対して、周波数 30 及び 50Hz の変動磁場を暴露した場合には、対照群と実験群の間に明確な付着細菌数の差異が認められず、静磁場暴露の場合とは全く様子が異なった。変動磁場では一定の周期で磁束の向きが逆転する。このため、仮に、磁場の影響により培養液中を浮遊している大腸菌に物理的な外力が加わったならば、静磁場では常に同じ方向に加わるのに対して、変動磁場の場合には外力の加わる方向が時間によって逆転することになる。さらにこの外力が静磁場暴露による付着細菌数の増加現象の要因となっ

ているならば、変動磁場が加わった場合には、磁束方向の反転によって培養液中の病原性大腸菌が揺さぶられることになり、このため安定して HeLa 細胞に付着できなくなるのではないかと考えられる。ただし、周波数が高い場合には、その揺さ振りに細菌の動きが追従できなくなり、結果的に磁場暴露がない場合と同じような振る舞いをするのではないかとと思われる。

また、本章では、混合培養状態で静磁場暴露をする場合、プラスチックプレートの細胞培養面が電磁石の S 極側と N 極側に向くように配置した。しかし、磁極の向きについては、付着細菌数の増加現象に影響を与えなかった。さらに、磁束の方向に対する細胞培養面の影響については、磁束方向に対して平行に配置した場合のみ対照群とほぼ同数になり、この結果より静磁場暴露による付着細菌数の増加現象には、磁束に対する細胞培養面の向きが、関係していることが明らかとなった。

ここで、真空の自由空間に静磁場があり、電荷を持った粒子が存在する場合を考える。荷電粒子が磁束を横切るように移動すると、粒子にはフレミングの左手の法則にしたがって外力が加わる。この外力はローレンツ力と呼ばれる。ローレンツ力は荷電粒子が、磁束と平行に移動する場合には発生せず、磁束に対して垂直に移動する時に最大となる。仮に、荷電粒子が磁束に対して斜めに移動する場合には、磁束に対して垂直な成分がローレンツ力の影響を受け、平行な成分についてはそのまま直進するため、第 6.14 図に示すような、螺旋状の移動軌跡を示すことになる。

第 3 章でも述べたように、一般に細菌は溶液中で電荷を有することが知られている<sup>118)</sup>。このため、溶液中を浮遊する大腸菌に静磁場が暴露され、ローレンツ力のみが働いている場合には、第 6.14 図のような移動になるのではないかと考えられる。実際には、溶液の



第 6.14 図 静磁場中に斜めに進入した荷電粒子の移動の軌跡

粘性や液中に含まれるイオンなど、真空の自由空間を移動する場合とは条件が異なるため、この図のような動きになることはないと思われるものの、大腸菌が溶液中を移動する場合、磁場暴露の有無によって移動の状態に変化が生ずる可能性がある。

## 第 7 章

# 磁場暴露による感染の機序

前章では、2種類の生物間に静磁場暴露がどのような影響を与えるのかを検討した。これは、今後、磁場の安全性について考慮する際、最も重要になるとと思われる人間を含めた生物（宿主）とその体内に生息する各種の微生物との相互関係に磁場がどのように作用するのかを考慮する必要があるためである。

病原性大腸菌は長径 1~6 $\mu\text{m}$ 、短径 0.5~1.0 $\mu\text{m}$  の桿菌で、その周囲には細胞付着用の器官である線毛（長さ 0.1~0.5 $\mu\text{m}$ ）を有する。この線毛は病原性細菌が特異的に有する器官である。このことから、線毛は別名「定着因子」とも言われる。病原性大腸菌が細胞に付着する際、菌は細胞膜上に存在する受容体に線毛を用いて付着する。この様子は第 3.4 図に示した通りである。生体内においてはこの状態から増殖し感染症などを引き起こしたり、細菌の種類によっては細胞内に侵入し害を及ぼすものもある。

前章の結果から、病原性大腸菌のみを単独で培養する際に 450mT の静磁場暴露を行っても増殖が亢進されることはなく、逆に増殖が抑制される傾向が観察されている。一方、HeLa 細胞のみを静磁場暴露した後、病原性大腸菌と混合培養しても付着細菌数に顕著な差異が認められなかった。

このように、本研究での混合培養条件では、静磁場の暴露が HeLa 細胞や病原性大腸菌に対して生物学的な影響をほとんど及ぼさないことが明らかとなった。加えて、一般に生物は外部刺激に対して閾値を有し、例えば磁気閃光の磁場強度対周波数の関係のように閾値を境として指数関数的に変化することが知られている<sup>117)</sup>。しかし第 6.2 図のように、HeLa 細胞に対する付着細菌数の増加は暴露する静磁場の強度に対してほぼ直線的に変化した。

これらのことから、静磁場暴露による付着細菌数増加現象の要因は、磁場の物理的な影響である可能性が強く考えられた。すなわち、

静磁場が培養液中を浮遊している病原性大腸菌の運動に影響を及ぼして、細胞に付着し易い状態になるというものである。この点を考慮して、溶液中での大腸菌の移動について検討するために、磁極及び磁束の方向に対するプラスチックプレートの細胞培養面を替えて配置すると、細胞培養面が磁束と平行な場合には、付着細菌数の増加現象は観察されなかった。

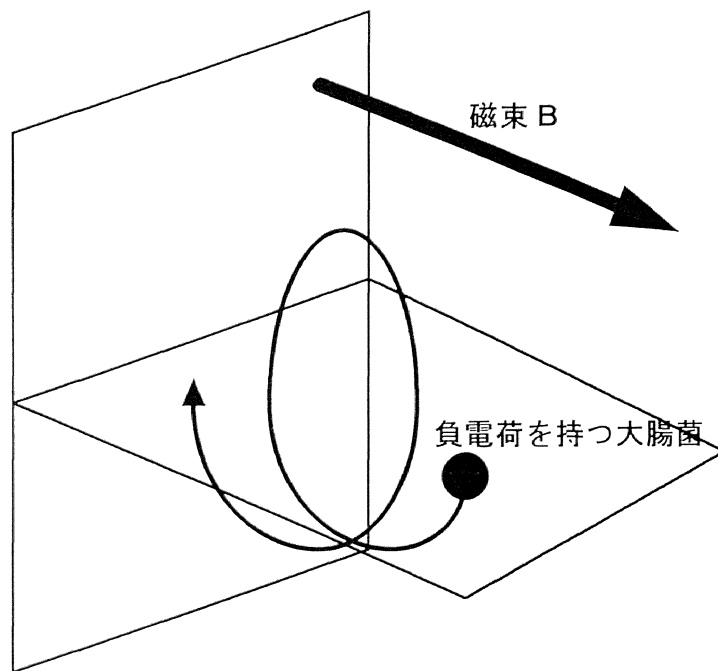
ここで、細菌が細胞に付着する際のプロセスを考えると以下のようになる。

- ①培養液中を移動し細胞近傍に到達する
- ②細胞表面の受容体に線毛が接触する
- ③受容体に線毛が結合する

この内、②から③に移行するためには結合が完了するための時間が必要であると思われる。例えば①より②のプロセスまで進んでも、接触時間が十分でない場合、付着できないこと、また1回の接触で必ず結合するのではなく付着するためには数回の接触を必要とするかもしれないこと、などが想像される。これらの点から細胞への付着細菌数が増加する要因として、プロセス②における接触時間の増加と接触回数の増加の2点が最重要事項となる。

これらを確認するために本研究の6.8節で、培養液にグリセリンを混入することで粘性を付与し、培養液中での細菌の移動速度を低下させ、細胞への接触時間を増加させるような環境にした。結果的には、付着細菌数が増加し、さらに粘性付与培養液に対する静磁場暴露によってこの傾向が増大されたことから、静磁場暴露による付着細菌数の増加現象が細胞と細菌の混合培養に対する磁場の物理的な影響である可能性が示唆された。すなわち、静磁場が培養液中を浮遊している大腸菌の運動に物理的な影響を及ぼすことで、付着細菌数が増加する可能性が見出された。





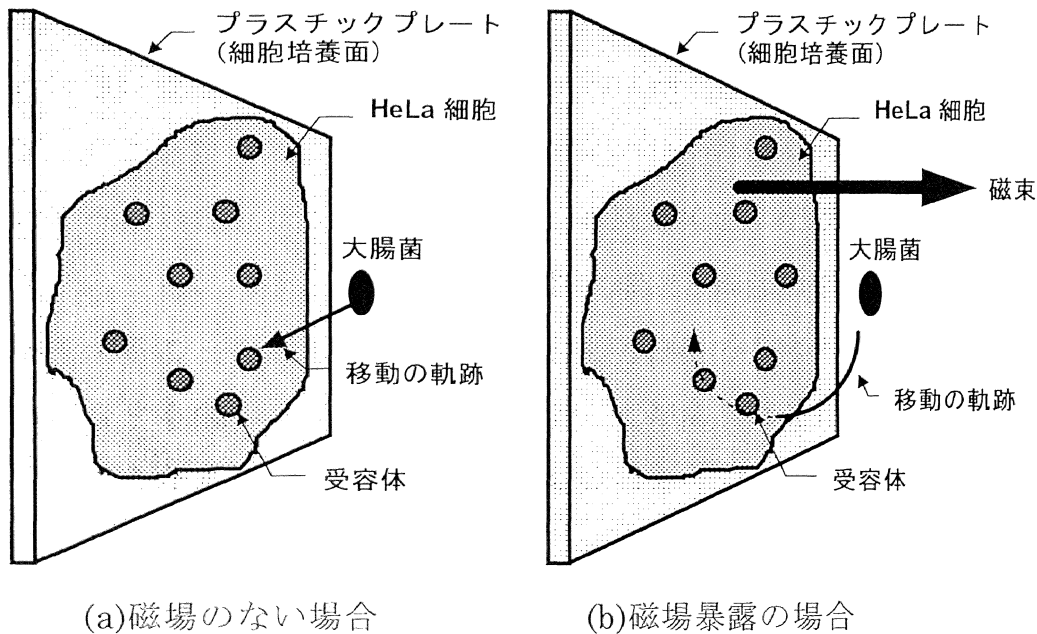
第 7.1 図 静磁場中に斜めに進入した大腸菌の移動軌跡

このような磁場暴露による混合培養への物理的影響の 1 つとして、以下のような機序が考えられる。

一般に細菌は、BSS のような pH 7 程度の溶液中では負電荷を持つ<sup>118)</sup>。ここで電荷  $q$  を有する大腸菌が磁束密度  $B$  の磁場中を速度  $v$ 、磁束に対する角度  $\theta$  で真空の自由空間を直線移動する場合と考えると、細菌には

$$f = qvB \cdot \sin \theta \text{ [N]}$$

の大きさのローレンツ力が加わることになる。この力はフレミングの左手の法則に従って、細菌の移動方向及び磁束方向が作る面に対して垂直な向きに発生する。ローレンツ力は細菌が、磁束と平行に移動する場合には発生せず、磁束に対して垂直に移動する時に最大



第 7.2 図 細菌の移動の軌跡

となる。このため、細菌が静磁場中を磁束に対して斜めに移動する場合には、移動の磁束に対して垂直な成分がローレンツ力の影響を受け、平行な成分についてはそのまま直進するため、第 7.1 図に示すような、螺旋状の移動の軌跡を示すことが考えられる。実際には、細菌は培養液中で培養されているため、溶液の粘性やイオンなどの影響があり、真空の自由空間を移動する場合とは条件が異なるため、第 7.1 図のようになることはないと思われるものの、磁場暴露の有無によって移動の状態に差が生じる可能性が考えられる。第 7.2 図の左側は磁場暴露のない場合の細菌の移動の軌跡を示しており、大腸菌が培養溶液中を移動し、プラスチックプレートの細胞培養面に接触している様子を表している。このように磁場暴露がない場合には、細菌は直線的に移動し、細胞培養面に接触するが、その接触する部分は細胞培養面のある一点である。これに対して、図の右側は磁場暴露がある場合を示しており、磁束に対してある角度を

もって斜めに直線移動する細菌は、ローレンツ力により細胞培養面の近傍に達した後も細胞面に触れつつ移動する（右図の軌跡の点線部分）ことになる。このように、細菌の移動軌跡を考えると、直線状の移動が曲線状の移動に変化し、細胞培養面に接触する距離が増加することになる。すなわち、これは細胞と細菌の接触する機会が増加することを示しており、結果として細胞の受容体に細菌の線毛が結合する機会が増加し、細胞に対して細菌が付着し易くなる。以上のような過程により、静磁場の暴露によって付着細菌数が増加するのではないかと考えた。

この仮定を検証するため、培養液中を移動する大腸菌に加わるローレンツ力を次の方法で概算した。

一般に溶液中で細菌のような微少な物体の運動を支配的しているものはブラウン運動であり、その移動距離 $\bar{L}$ は Einstein の法則で知られる式で表される<sup>118)</sup>。

$$\bar{L}=(2Dt)^{1/2}$$

ここで  $D$  は拡散係数で  $D=0.21 \times 10^{-12}[\text{m}^2/\text{s}]$ <sup>118)</sup>、 $t$  は時間で  $t=14400$  秒（細胞と細菌の混合培養時間である 4 時間）より、移動距離は  $\bar{L}=77.78 \times 10^{-6} [\text{m}]$  となる。ここで、概算を容易にするために、1 個の細菌が $\bar{L}$ だけ直線的に運動しており、この時溶液による運動への抵抗はないものと仮定する。移動距離 $\bar{L}$ より大腸菌の 1 秒間の見掛上の平均速度を求めると  $v=5.40 \times 10^{-9}[\text{m}/\text{s}]$  となった。

次に、大腸菌は菌体成分のほとんどが蛋白質で構成されているため、菌体全てが代表的な蛋白質であるアルブミンであるとする。ただし、ここでは性質や構造などが明らかとなっているヒト血清アルブミン（HSA）を基本的に採用した<sup>119)</sup>。大腸菌の体積は  $196.35 \times 10^{-21}[\text{m}^3]$ <sup>120,121)</sup>、HSA の体積は  $113.31 \times 10^{-27}[\text{m}^3]$ <sup>119)</sup> であるから、大腸菌は  $1.73 \times 10^6$  個の HSA で構成されていることになる。

さらに HSA 一つの電荷は $-2.40 \times 10^{-18}[\text{c}]$ <sup>119)</sup>なので、大腸菌一個体の全電荷は $q=-4.15 \times 10^{-12}[\text{c}]$ となる。

以上の値より、磁場強度 450mT の静磁場中で 1 個の大腸菌に加わるローレンツ力は

$$|f|=10.08 \times 10^{-21}\sin \theta [\text{N}]$$

と概算された。

また大腸菌の質量  $m$  は  $m=1 \times 10^{-15}[\text{kg}]$ <sup>118)</sup>なので、ローレンツ力が加わった場合の加速度  $\alpha$  は、力  $f=m \alpha [\text{N}]$ の式から

$$\alpha=10.08 \times 10^{-6}\sin \theta [\text{m/s}^2]$$

となる。さらに加速度は $\alpha=L/t^2$  ( $L$ :距離,  $t$ :時間) より、ローレンツ力による移動距離は

$$L=10.08t^2\sin \theta \times 10^{-6}[\text{m}]$$

となる。この時仮に  $t=1[\text{s}]$ ,  $\theta=45^\circ$  の条件で移動する菌体について考えると、この距離は $L=7.13 \times 10^{-6}[\text{m}]$ となる。

ここで大腸菌の移動の様子について考えてみる。磁場暴露のない状態で大腸菌が細胞培養面に対して角度  $45^\circ$ 、速度  $5.40 \times 10^{-9}[\text{m/s}]$  で進んだ場合、細胞培養面と平行な方向に注目すると、細胞近傍に存在する大腸菌は 1 秒間に  $3.85 \times 10^{-9}[\text{m}]$  だけ細胞表面をなぞるように触れながら進むことになる。次に 450mT の静磁場が暴露された場合には、前述の計算結果より大腸菌は  $7.13 \times 10^{-21}[\text{N}]$  のローレンツ力を受け、それにより  $7.13 \times 10^{-6}[\text{m/s}^2]$  の加速度を受けることになる。またこれによる 1 秒間の移動距離は  $7.13 \times 10^{-6}[\text{m}]$  となる。ローレンツ力が加わった際の大腸菌の移動を直線に近似して考えると、大腸菌の細胞培養面と平行な方向への移動距離は前述の  $3.82 \times 10^{-9}[\text{m}]$  とローレンツ力による移動距離  $7.13 \times 10^{-6}[\text{m}]$  の合成となり、その値は約  $7.13 \times 10^{-6}[\text{m}]$  となる。この距離は大腸菌の長径の約 7 倍に相当し、磁場暴露のない場合と比較すると、移動距離に

は 1000 倍もの差があることになる。以上の概算値は、移動に対する抵抗のない真空の理想空間におけるものではあるが、実際の培養液中においても磁場の暴露により細菌の移動状態が変化する可能性だけは示唆できる。このように磁場暴露を受けた大腸菌は磁場暴露の無い菌よりも細胞表面で長い距離を移動することによって、受容体への接触確率が増し、結果として付着細菌数が増加したのではないかと考えられる。

一方、変動磁場の場合には磁束の方向が一定の周期で逆転するため、細菌に加わるローレンツ力の方向も同様に逆転する。このため、細菌は常に揺さぶられ細胞に安定して付着することができなくなる。6.5 節の結果はこの推測を裏付けており、10Hz の場合には有意な付着細菌数の減少が認められた。

以上述べてきたように、静磁場暴露による付着細菌数の増加は、大腸菌の移動に対する磁場の物理的な影響が一要因となっていると仮定して説明することができた。

# 第 8 章

## 結論

近年の科学技術の発達によって、自然電磁場の強度をはるかに上回る機器が普及してきた。このような環境であるにもかかわらず、磁場の生体に対する影響、特に人体に対する影響については不明な点が多く、統一的な見解が得られていない。このことは人工磁場の被曝による不測の事態が、今後起こり得る可能性を示唆している。

一方、自然環境で生存している生物は、それ自体が複数の生物による共同体であり、例えば宿主である人間と体内微生物のように、ある一定のバランスの上に成り立っている。この生物間のバランスは生物が生存していく上で極めて重要な要素であり、人体に対する磁場影響について検討する際には、この点についても考慮する必要がある。しかし、これまでの研究では単独の生物に対する磁場影響を観察したものにとどまっていた。

本研究では、これまでになかった新しい視点から磁場の生体影響を検討するために、2種類の生物間の相互作用の例として感染を取り上げ、この最も単純なモデルと考えられる株化培養細胞とこれに特異的に付着性を示す病原性細菌を用いた。また、感染に対する磁場影響を検討する場合には、従来の研究報告とは栄養条件が全く異なり、栄養価の低い培養液を使用することから、本研究では低栄養価の培養液を作成し、その中での細菌の増殖に対する静磁場の影響についても検討を行った。

本章では得られた結果を各章ごとに総括し、本研究の結論とする。

第5章では、生物としての性質が異なる3種類の細菌を用いて、これらの微生物の増殖に対する静磁場の影響について検討した。その結果、次のような結論が得られた。

- ① 3種類の細菌の培養時に150mTの静磁場を暴露しても、増殖状態に影響が観察されなかった。

②暴露する磁場強度を 450mT に設定した場合、大腸菌と黄色ブドウ球菌で培養初期と培養中期に、カンディダ・アルビカンズでは培養後期に細菌の増殖の抑制が観察された。また、カンディダ・アルビカンズの場合には培養初期に若干の増殖亢進も認められた。

以上より、静磁場暴露による細菌の増殖への影響は、細菌の種類によって異なり、また暴露される磁場の強度に依存することが明らかとなった。

③本研究では細菌の増殖の変化を検討する際、各測定時刻ごとの細菌数と、これより算出される世代時間の2つの指標をはじめ採用した。この指標を用いることにより、細菌数を直接比較する従来の方法では判別のつかない差異をより明確に把握することが可能となり、またこれまでに報告されている結果でも、未だ確認されていない新しい知見を得る可能性があると思われた。

④大腸菌を培養する際に培養基の栄養条件を悪化させた状態で磁場強度 450mT の静磁場暴露を行ったところ、至適栄養条件の1/700 以下で大腸菌は増殖することができず、これ以上であれば細菌の増殖速度は低下するものの増殖は可能であった。またこの状態に静磁場を暴露することでその増殖速度の低下がさらに顕著に認められた。この結果は、生体への磁場影響を感染モデルを用いて検討する際に、細菌に対して考慮すべき点があることを示したばかりでなく、細菌単体に対する磁場の影響を示した新たな結果として注目すべきものである。

第6章では、本研究の主目的である2種類の生物間に静磁場暴露がどのような影響を与えるのかを観察するために、具体的な対象として病原性大腸菌の HeLa 細胞への感染について検討した。

その結果、次のような結論が得られた。



- ①病原性大腸菌の中にも HeLa 細胞への付着能力の高い菌株と低い菌株があった。
- ②病原性大腸菌と HeLa 細胞の混合培養時に静磁場を暴露すると細胞への付着細菌数が増加する現象をはじめて見出した。
- ③②の現象には磁場強度依存性があり、200mT 以上 450mT の間で確認された。
- ④病原性大腸菌を BSS 中で単独培養する際に 450mT の静磁場を暴露しても、その増殖が亢進されることはなく、逆に増殖が抑制された。
- ⑤病原性大腸菌の接種前の HeLa 細胞に 450mT の静磁場を暴露しても、その後の混合培養による付着細菌数に影響が見られなかったことから、付着細菌数の増加は標的細胞である HeLa 細胞自体の生理的な変化によるものではないことが明らかとなった。
- ⑥変動磁場暴露を行うと、周波数によって異なる影響が観察され、30, 50Hz では付着細菌数に変化が現れなかったが、10Hz では大腸菌の HeLa 細胞への付着数が減少した。
- ⑦混合培養時に、磁束方向に対する細胞培養面の角度を変えると、その角度によって付着細菌数が変化した。
- ⑧混合培養時の物理的な条件を変化させるために、粘性を付与した培養液で混合培養を行うと、磁場暴露のない場合でも、大腸菌の HeLa 細胞に対する付着数が増加した。また、粘性付与培養液中で静磁場暴露を行いながら混合培養を行ったものの方が、さらに付着細菌数が増加し、粘性付与培養液のグリセリン濃度を 0.1% にすると、静磁場暴露による付着細菌数の増加現象がより顕著に現れた。
- ⑨混合培養時の物理的な条件を人為的に変化させることで、HeLa 細胞に対する付着細菌数が統計学的にも有意に増加したことが

ら、静磁場暴露による付着細菌数の増加現象の一要因は次のように考えられた。すなわち、病原性大腸菌の移動によって生ずるローレンツ力が加わることで細菌の移動状態が変化し、細胞表面にある受容体との接触機会が増加するために起こったとする推測である。

- ⑩本研究の感染モデルから得られた結果が、そのまま人体内の場合に適用できるとは限らないものの、静磁場の暴露により病原性細菌の感染程度が変化するという事実から、核磁気共鳴画像診断装置(MRI)施設のような強磁場があり、さらに病原性細菌の感染を受けている人たちが集中する病院のような所では磁場による悪影響が現れやすいのではないかと思われる。

本研究のような磁場暴露状態における複数の生物間の相互作用に関する研究は世界的に見ても行われておらず、そのため本研究で得られた知見は極めて貴重であり、しかもまったく新しい事実である。

今後に残されている課題としては、単体の生物に対する生理学的な磁場影響について、その機序をさらに明らかにすることであり、その結果次第では生物に対する磁場影響がより明確になるものと思われる。また、人体に対して害を与える生物は細菌の他にも、真菌やウイルスなど多岐に及んでいる。それゆえに今後それらについても検討する必要がある。

これからの時代は、超伝導技術を応用した磁気浮上超高速列車（リニアモーターカー）が実用化され、さらに高圧化した大容量の送電線が必要になるなど、我々の周りには強磁場を発生させる機器が益々増えるようになるとと思われる。また一方、ディスプレイ（Video Terminal Display: VTD）や家庭用電化製品からも低強度、低周波の磁場が発生しており、最近では強磁場ばかりではなく、このよう

な磁場に対しても、その影響が注目されている。このように、磁場と人間の関わり合いは今後益々密になるばかりであり、人間が肉体的にも精神的にも健康で生活するために、生体に対する磁場影響の検討を続ける必要がある。

## 謝辞

本研究は、北海道工業大学大学院応用電子工学専攻生体電子・システム工学部門において修士課程の2年間及び博士後期課程の3年間にわたり継続的に行われたものである。

私は釧路工業高等専門学校電子工学科を卒業後、北海道工業大学応用電子工学科に2年次編入学した。途中入学のため、学業を進める上で悩みも多かったが、この時に相談に乗って下さったのが、現指導教授である有澤準二教授であった。卒業後も先生の御配慮により、北海道工業大学大学院工学研究科応用電子工学専攻生体電子・システム工学部門において、微生物に及ぼす磁場影響についての研究に従事することができた。以来、研究を進めるにあたり、常日頃より多大な御配慮ならびに数多くの懇切丁寧な御指導を賜ったことは誠に幸福なことであり、ここに心から感謝申し上げる。

本学応用電子工学専攻長で、情報伝送・電子機器工学部門の初田健教授には、折りにふれ御激励を頂き、また本論文をまとめるにあたり御査読頂いた。さらに私生活の面においても様々な御訓示を頂いたことは心に残る思い出であり、深く感謝申し上げます。

本学応用電子工学専攻光電波応用・情報処理工学部門の鈴木勝裕教授は、生物に及ぼすマイクロ波の影響の研究に従事されており、専門分野の見地から御指導頂くとともに、本論文をまとめるにあたり御査読頂いた。心より感謝申し上げます。

本学応用電子工学専攻生体電子・システム工学部門の三澤顕次教授には学会へ投稿する論文の作成や学会発表などにおいて、様々な御指導を賜った。また、本論文のまとめるにあたり御査読頂いた。ここに厚く御礼申し上げます。

松本伍良本学名誉教授には大学院入学から修士課程修了までの2

年間、指導教授として厳しくも暖かい御指導を頂いた。また、博士後期課程へ進学後も折りにふれ御指導、御鞭撻を頂いた。ここに深く感謝申し上げます。

当部門の北間正崇講師ならびに清水久恵助手には、本学の先輩として日頃より研究手法などについて数々の御督励を頂いた。心より御礼申し上げます。

本学教養部の木村主幸助教授には生物学的な知識や微生物の操作について懇切丁寧な御指導を賜った。私は高専時代より電子工学の分野しか勉強しておらず、生物学的な知識には乏しかった。しかし、本研究のような工学と生物学の学際領域の研究をまとめることができたのも、ひとえに先生の御指導があったからであり、ここに改めて深く感謝申し上げます。

「磁気と生体」研究会会長の中川恭一医学博士には、学会で大変有意義な御討論を頂いた。学会終了後も御意見を頂く機会があり、さらに過去に行われた磁気と生体に関するシンポジウムの資料などを送付して頂けるなど、ひとかたならぬ御配慮を賜った。心より御礼申し上げます。

本学は工学研究科のみの大学院であり、このため、生物学的な操作をするための器材や試料といった設備は、特に研究初期においては十分ではなかった。このような時期、札幌医科大学微生物教室の藤井暢弘教授ならびに林俊治助手には細菌や細胞を分与して頂き、さらに微生物操作の機器も御拝借させて頂いた。ここに深く感謝申し上げます。

最後に、日頃楽しく、そして円滑に研究ができるように公私ともに御協力頂いた当部門博士課程の葛西扶美夫君、同修士課程の金安植君、坂本将樹君、須藤議雄君、石橋臣友君、岸田英樹君、酒井正勝君、菅原俊継君、コンチャ・ルイス君の学生諸氏に心より感謝の

意を表す。

本研究は、これら各位の多大な御指導、御援助の下で進めることができたものであり、ここに改めて感謝する次第である。

## 参考文献

- 1) 志賀健、宮本博司、上野照剛：磁場の生体影響、てらぺいあ、1991
- 2) E.L.Alpen: Magnetic field exposure guidelines., Magnetic field effect on biological systems Ch.3, pp.25-32, 1981
- 3) Natl.Radial.Protect.Board on MRI; Revised guidance on acceptable limits of exposure during nuclear magnetic resonance clinical imaging., Brit.J.Radiol.56, pp.974-977, 1984
- 4) R.D.Saunders, H.Smith: Safety aspects on NMR clinical imaging., Brit.Med.Bull.40, pp.148-154, 1987
- 5) D'Arsonval M.A.: Dispositifs pour la mesure des courants alternatifs de toutes frequences., Compt.Rend.Soc.Biol.3, pp.450-451, 1896
- 6) P.Lovsund, P.A.oberg, S.E.G.Nilsson, T.Reuter: Magnetophosphores: A quantitative analysis of thresholds., Med. and Biol.Eng. and Comput.18, pp.326-334, 1959
- 7) K.Motokawa, K.Iwama: Resonance in electrical stimulation of the eye., Tohoku J.Exp.Med.53, pp.201-206, 1959
- 8) Vyalov,A.M.: Clinico-hygenic and experimental data on the effects of magnetic fields under industrial conditions., In Kholodov, Yu. A.[ed.] "Influence of Magnetic Fields on Biological Subjects" (Engl.transl.: Joint Publ. Res. Service, Arlington, Virginia, Report No. JPRS-63038), pp.163-174, 1974

- 9) Marsh,J.L., Armstrong,T,J., Jacobson,A.P. and Smith,R.G.: Health effect of occupational exposure to steady magnetic fields., Am. Ind. Hyg. Assoe. J. 43, pp.387-394, 1982
- 10) T.D.Bracken, R.F.Rankin, R.S.Senior, J.R.Allredge and S.S.Sussman: Magnetic field exposure among utility workers., Bioelectromagnetics 16, pp.216-226, 1995
- 11) Wertheimer,N. and Leeper,E.: Electrical wiring configurations and childhood cancer., Am.J.Efidemiol.109, pp.273-278, 1979
- 12) Wertheimer,N. and Leeper,E.: Adult cancer related to electrical wires near the home., Int.J.Epdemiol.11, pp.345-355, 1982
- 13) Savitz,D.A., Wachtel,H., Barnes,F.A., John,E.M. and Tvrdik,J.G.: Case-control study of childhood cancer and exposure to 60-Hz magnetic field., Am.J.Epidemiol.128, pp.21-38, 1988
- 14) Savitz,D.A., John,E.M. and Kleckner,R.C.: Magnetic field exposure from electric appliances and childhood cancer., Am.J.Epidemiol.131, 763-773, 1990
- 15) Severson R.K., Stevens R.G., Kaune W.T., Thomas D.B., Heuser L., Davis S. and Sever L.E.: Acute nonlymphotic leukemia and residential exposure to power frequency magnetic fields., Am.J.Epidemiol.128, pp.10-20, 1988
- 16) Wertheimer N. and Leeper E: Letters to the Editor., Am.J.Epidemiol.130, 423-425, 1989
- 17) Severson R.K., Stevens R.G., Davis S. and Sever L.E.: The authors reply., Am.J.Efidemiol.130, 425-427, 1989



- 18) Ahlbom, A.: A review of the epidemiologic literature on magnetic fields and cancer., *Scand.J.Work Environ.Health* 14, pp.337-343, 1988
- 19) Nancy W., David A.S. and E.Leeper: Childhood cancer in relation to indicators of magnetic fields from ground current sources., *Bioelectromagnetics* 16, pp.86-96, 1995
- 20) Oberhaensli R.D., Galloway G.J., Taylor D.J., Bore P.J. and Radda G.K.: Assessment of human liver metabolism by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy., *Br.J.Radiol.*59, pp.695-699, 1986
- 21) Jehenson P., Duboc D., Lavergne T., Guize L., Guerin F., Degeorges M. and Syrota A.: Change in human cardiac rhythm Induced by a 2-T static magnetic field., *Radiology* 166, 227-230, 1988
- 22) Weikl A., Moshage W., Hentschel D., Schittenhelm R. und Bachmann K.: EKG-Veränderungen durch einwirkung von statischen magnetfeldern bei der kernspintomographie in magneten der feldstärke 0.5 bis 4.0 Tesla., *Z.Kardiol.*78, pp.578-586, 1989
- 23) Y.Dimberg: Neurochemical effects of a 20kHz magnetic field on the central nervous system in prenatally exposed mice., *Bioelectromagnetics* 16, pp.263-267, 1995
- 24) B.M.Svedenstsl and K.J.Johanson: Fetal loss in mice exposed to magnetic fields during early pregnancy., *Bioelectromagnetics* 16, pp.284-289, 1995
- 25) Mustafa I., Ismail G., Gulay L. and Turgay I: Effects of static magnetic field on specific Adenosine-5'-Triphoshatase

- Activities and bioelectrical and biomechanical properties in the rat diaphragm muscle., *Bioelectromagnetics* 16, pp.147-151, 1995
- 26) Sander S, Victor G.L., Quang A.N. and Christopher C.: Exposure to combined static and 60Hz magnetic fields. - Failure to replicate a reported behavioral effect-, *Bioelectromagnetics* 17, pp.279-292, 1996
- 27) Nath R., Rockwell S., Bongiorno P. and Schulz R.J.: Effects of a transverse magnetic field on the dose distribution of high energy electrons and on the responses of mammalian cells in vitro to X-rays., In Tenforde, T.S. [ed.] "Magnetic Field Effect on Biological Systems" pp. 52-53, Plenum Press, New York., 1979
- 28) Halpern M.H. and Greene A.E.: Effects of magnetic fields on growth of HeLa cells in tissue culture., *Nature* 202, p.717, 1964
- 29) Tsutsui H., Kinouchi Y., Sasaki H., Shiota M. and Ushita T.: Studies on the Sm-Co magnet as a dental material., *J.Dent.Res.* 58, pp.1597-1606, 1979
- 30) Esformes I., Kummer F.J. and Livelli T.J.: Biological effects of magnetic fields generated with Co-Sm magnets., *Bull.Hosp.Jt.Dis.Orthop.Inst.* 41, pp.81-87, 1981
- 31) Galar I. and Sanchez J.L.M.: Efectos de campos magneticos variables sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*., *Rev.Lat-amer.Microbiol.* 27, pp.283-291, 1985
- 32) Satoh K., Yamaguchi H., Miyamoto H., Yoshida Y., Nagayama M. and Kinouchi Y.: Effects of nonhomogeneous

- magnetic field on growth of HeLa cells., Proc.Intern.Union  
Physiol.Sci.16, p.618, 1986
- 33) Kaune W.T., Frazier M.E., King A.J., Samuel J.E., Hungate  
F.P. and Causey S.C.: System for the exposure of cell  
suspensions to powerfrequency electric fields.,  
Bioelectromagnetics 5, pp.117-129, 1984
- 34) Feinendegen L.E. and Muhlensiepen H.: Magnetic field  
affects thymidine kinase in vitro., Int.J.Rad.Biol.47,  
pp.723-730, 1985
- 35) Mulay I.L. and Mulay L.N.: Effect of a magnetic field on  
sarcoma 37ascites tumour cells., Nature 190, p.1019, 1961
- 36) Butler B.C. and Dean W.W.: The inhibitory effect of a  
magnetic field upon the tissue culture growth of the  
K.B.cells., Am.J.Med.Electron.3, pp.123-125, 1964
- 37) D'Souza L., Reno V.R., Nutini L.G. and Cook E.S.: The  
effects of a magnetic field on DNA synthesis by ascites  
sarcoma 37 cells., In Barnothy M.F.[ed.]"Biological Effects of  
Magnetic Fields" Vol.2, pp.53-59, Plenum Press, New York.,  
1969
- 38) Ardito G., Lamberti L., Bigatti P. and Prono G.: Influence of  
a constant magnetic field on human lympho-cyte cultures.,  
Boll.Soc.It.Biol.Sper.9, pp.1341-1346, 1984
- 39) Goodman R. and Henderson A.S.: Sine waves enhance  
cellular transcription., Bioelectromagnetics 7, pp.23-29,  
1986

- 40) Liboff A.R., Williams T.Jr., Strong D.M. and Wistar R.Jr.: Time-varying magnetic fields effect on DNA synthesis., Science 223, pp.818-819, 1984
- 41) E.Bardier, B.Dufy. and B.Veyret.: Stimulation of Ca<sup>2+</sup> influx in rat pituitary cells under exposure to a 50Hz magnetic field., Bioelectromagnetics 17, pp.303-311, 1996
- 42) E.Hirakawa, M.Ohmori and W.D.Winters: Environmental magnetic fields change complementary DNA synthesis in cell-free systems., Bioelectromagnetics 17, pp.322-326, 1996
- 43) Yamaguchi H., Hosokawa K., Ikehara T., Sato K., Soda A., Kaku M., Miyamoto H. and Kinouchi Y.: Effects on growth and glycolytic activity of human gingival fibroblasts of long-term exposure to strong homogeneous magnetic field., Bioelectromagnetics (submitted)
- 44) Hall E.J., Bedford J.S. and Leask M.J.M.: Some negative results in the search for a lethal effect of magnetic fields on biological materials., Nature 203, pp.1086-1087, 1964
- 45) Hinsenkamp M., Chiabrera A., Ryaby J., Pilla A.A. and Bassett C.A.L.: Cell behaviour and DNA modification in pulsing electromagnetic fields., Acta Orthop.Belg.44,pp.636-650, 1978
- 46) Cerny R.:The reaction of dental tissues to magnetic fields., Austral.Dent.J.25,pp.264-268, 1980
- 47) Schuetz P.W., Barbenel J.C. and Paul J.P.: Effects of time-varying magnetic fields on fibroblast growth., Clin.Phys.Physiol.Meas.6,pp.155-160, 1985

- 48) Pickard W.F.: Further observations on cytoplasmic streaming in *Charabraunii.*, *Can.J.Bot.*50, pp.703-711, 1972
- 49) Bticking J ., Herbst M. and Piontek P.: The influence of a strong magnetic field on muscular contraction. , *Rad.Environm.Biophys.*11, pp.79-85, 1974
- 50) Goodman E.M., Greenebaum B. and Marron M.T.: Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on *Physarum polycephalum.*, *Rad.Res.*66, pp.531-540, 1976
- 51) Ettienne E., Ripamonti A. and Frankel R.B.: Effect of magnetic fields on the drug-induced contractility of the ciliate *Spirostomum.*, In Tenforde, T.S.[ed.] "Magnetic Field Effect of Biological Systems", pp.54-56, Plenum Press, New York., 1979
- 52) Ripamonti A., Ettienne E.M. and Frankel R.B.: Effect of homogeneous magnetic fields on responses to toxic stimulation in *Spirostomum ambiguum.*, *Bioelectromagnetics* 2, pp.187-198, 1981
- 53) Rosen M.S. and Rosen A.D.: Magnetic field influence on paramecium motility., *Life Sci.*46, pp.1509-1515, 1990
- 54) Arnold W., Steele R. and Mueller H.: On the magnetic asymmetry of muscle fibers., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*44, pp.1-4, 1958
- 55) Murayama M.: Molecular mechanism of red cell "sickling", *Science* 153:145- 149, 1966.
- 56) Geacintov N.E., van Nostrand F., Pope M. and Tinkel J.B.: Magnetic field effect on the chlorophyll fluorescence in *Chlorella.*, *Biochim.Biophys.Acta* 226, pp.486-491, 1971

- 57) Hong F.T., Mauzerall D. and Mauro A.: Magnetic anisotropy and the orientation of retinal rods in a homogeneous magnetic field., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*.68, pp.1283-1285, 1971
- 58) Geacintov N.E., van Nostrand F., Becker J.F. and Tinkel J.B.: Magnetic Field Induced Orientation of Photosynthetic Systems., *Biochim.Biophys.Acta* 267, pp.65-79, 1972
- 59) Oelze J. and Drews G.: Membranes of photosynthetic bacteria., *Biochim.Biophys.Acta* 265, pp.209-239, 1972
- 60) Breton J.: The state of chlorophyll and carotenoid in vivo. II-A linear dichroism study of pigment orientation in photosynthetic bacteria., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 59, pp.1011-1017, 1974
- 61) Becker J.F., Trentacosti F. and Geacintov N.E.: A linear dichroism study of the orientation of aromatic protein residues in magnetically oriented bovine rod outer segments., *Photochem.Photobiol.*27, pp.51-54, 1978
- 62) Boroske E. and Helfrich W.: Magnetic anisotropy of egg lecithin membranes., *Biophys.J.*24, pp.863-868, 1978
- 63) Worcester D.L.: Structural origins of diamagnetic anisotropy in proteins., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*.75, pp.5475-5477, 1978
- 64) Bellosi A. and de Certaines J.: Effect of a constant non-uniform magnetic field on leucocyte migration in vitro., *Acta Haemat.*62, pp.51-53, 1979
- 65) Hong F.T.: Mechanisms of magnetic field interactions with retinal rods., In Tenforde T.S.[ed.] "Magnetic Field Effect on

- Biological Systems", pp.43-45, Plenum Press, New York., 1979
- 66) Geacintov N.E.: Orientation of biological membranes and cells in magnetic fields., In Tenforde T.S.[ed] "Magnetic Field Effect on Biological Systems", pp.46-48, Plenum Press, New York., 1979
- 67) Braganza L.F., Blott B.H., Coe T.J. and Melville D.: The superdiamagnetic effect of magnetic fields on one and two component multilamellar liposomes., *Biochim,Biophys.Acta* 801, pp.66-75, 1984
- 68) Chabre M.: Diamagnetic anisotropy of proteins and magnetic orientation of biological membranes and protein assemblies., In Marret G., Boccara N. and Kiepenheuer J. [eds.] "Biophysical effects of steady magnetic fields", pp.28-33, Springer-Verlag, Berlin. 1986
- 69) Rosenblatt C., Yager P. and Schoen P.E.: Orientation of lipid tubules by a magnetic field., *Biophys.J.*52, pp.295-301, 1987
- 70) 東照正、山岸昭雄、竹内徹也、河口直正、佐川節子、大西俊造、伊達宗行：定常磁場での赤血球の配向、*日本生体磁気学会誌* 3, pp.97-98, 1990
- 71) Goswami H.K. : Biomagnetic effects on plant chromosomes., *The Nucleus* 16, pp.24-25,1973
- 72) Baumann S., Cooper R., Berman E., House D. and Joines W.: Lack of effects of 2000-Hz magnetic fields on mammary adenocarcinoma and reproductive hormones in rats., *Bioelectromagnetics* 10, pp.329-333, 1989

- 73) Wolff S., Crooks L.E., Brown P., Howard R. and Palnter R.B.: Tests for DNA and chromosomal damage induced by nuclear magnetic resonance imaging., *Radiology* 136, pp.707-710, 1980
- 74) Cooke P. and Morris P.G.: The effects of NMR exposure on living organisms. II. A genetic study of human lymphocytes., *Brit.J.Radiol.*54, pp.622-625, 1981
- 75) Baum J.W. and Nauman C.H.: Influence of strong magnetic fields on genetic endpoints in *Tradescantia* tetrads and stamen hairs., *Environ.Mutag.*6, pp.49-58, 1984
- 76) Khandelwal S.: Effect of magnetic field on chromosomal behaviour of *Ophioglossum* Linn., *Cytologia* 50, pp.899-906, 1985
- 77) Cohen M.M., Kunska A., Astemborski J.A. and McCulloch D.: The effect of low-level 60-Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells. II. Sister-chromatid exchanges in peripheral lymphocytes and lympho-blastoid cell lines., *Mutation Res.*172, pp.177-184, 1986
- 78) Juutilainen J. and Liimatainen A.: Mutation frequency in *Salmonella* exposed to weak 1-Hz magnetic fields., *Hereditas* 104, pp.145-147, 1986
- 79) Takahashi K., Kaneko I, Date M. and Fukada E.: Influence of pulsing electromagnetic field on the frequency of sister-chromatid exchanges in cultured mammalian cells., *Experientia* 43, pp.331-332, 1987
- 80) Reno V.R. and Nutini L.G.: Effect of magnetic fields on tissue respiration., *Nature* 198, pp.204-205, 1963



- 81) Maling J.E., Weissbluth M. and Jacobs E.E.: Enzyme substrate reactions in high magnetic fields., *Biophys.J.*5, pp.767-776, 1965
- 82) Haberditzl W. : Enzyme activity in high magnetic fields., *Nature* 213, pp.72-73, 1967
- 83) Pereira M.R., Nutini L.G., Fardon J.C. and Cook E.S.: Cellular respiration in intermittent magnetic fields., *Prec.Soc.Exp.Biol.Med.*124, pp.573-576, 1967
- 84) Rabinovitch B., Maling J.E. and Weissbluth M.: Enzyme-substrate reactions in very high magnetic fields. I., *Biophys.J.*7, pp.187-204, 1967
- 85) Rabinovitch B., Maling J.E. and Weissbluth M.: Enzyme-substrate reactions in very high magnetic fields. II., *Biophys.J.*7, pp.319-327, 1967
- 86) Cook E.S., Fardon J.C. and Nutini L.G.: Effects of magnetic fields on cellular respiration., In Barnothy M.F.[ed.] "Biological Effects of Magnetic Fields" Vol.2, pp.67-78, Plenum Press, New York., 1969
- 87) Batkin S., Guernsey D.L. and Tabrah F.L.: Weak A.C. magnetic field effects -changes in cell sodium pump activity following whole animal exposure-, *Res.Comm.Chem.Pathol.Pharmacol.*22, pp.613-616, 1978
- 88) Goodman E.M., Greenebaum B. and Marron M.T.: Bioeffects of extremely low-frequency electromagnetic fields. Variation with intensity, waveform, and individual or combined electric and magnetic fields., *Rad.Res.*78, pp.485-501, 1979

- 89) Maling J.E., Weissbluth M. and Jacobs E.E.: Enzyme substrate reactions in high magnetic fields., *Biophys.J.*5, pp.767-776, 1965
- 90) Gorczynska E., Galka G., Wegrzynowicz R. and Mikosza H.: Effect of magnetic field on the process of cell respiration in mitochondria of rats., *Physiol.Chem.Phys.Med.NMR.*18, pp.61-69, 1986
- 91) Marron M.T., Goodman E.M., Greenebaum B. and Tipnis P.: Effects of sinusoidal 60-Hz electric and magnetic fields on ATP and oxygen levels in the slime mold, *Physarum polycephalum.*, *Bioelectromagnetics* 7, pp.307-314, 1986
- 92) Ueno S. and Harada K.: Experimental difficulties in observing the effects of magnetic fields on biological and chemical processes., *IEEE Trans.Mag.MAG-22*, pp.868-873, 1986
- 93) Sutter B.Ch., Billaudel B., Sutter-Dub M.-Th. and Bellosi A.: Effects of constant magnetic fields on the B-cells and insulin target cells in the rat., *Aviat.Space Eiviron.Med.*June, pp.537-540, 1987
- 94) Maling J.E., Weissbluth M. and Jacobs E.E.: Enzyme substrate reactions in high magnetic fields., *Biophys.J.*5, pp.767-776, 1965
- 95) Dixey R. and Rein G.: <sup>3</sup>H-noradrenaline release potentiated in a clonal nerve cell line by low-intensity pulsed magnetic fields. , *Nature* 296:253-255, 1982

- 96) Mild K.H., Sandström M. and Løvtrup S.: Cell physiological effects of radiofrequency electromagnetic fields., *Physiol.Chem.Phys.*14, pp31-39, 1982
- 97) Malinin G.I., Gregory W.D., Sharma V.K. and Houck J.C.: Evidence of morphological and physiological transformation of mammalian cells by strong magnetic fields., *Science* 194, pp.844-846, 1976
- 98) Malinin G.I., Gregory W.D., Sharma V.K. and Houck J.C.: Evidence of morphological and physiological transformation of mammalian cells by strong magnetic fields., *Science* 194, pp.844-846, 1976
- 99) Mittler S.: Failure of magnetism to influence production of X-ray induced sex-linked recessive lethals., *Mutation Res.*3, pp.287-288, 1971
- 100) Rockwell S.: Influence of a 1400-gauss magnetic field on the radiosensitivity and recovery of EMT6 cells in vitro., *Int.J.Rad.Biol.*31, pp.153-160, 1977
- 101) Nath R., Schulz R.J. and Bongiorni P.: Response of mammalian cells irradiated with 30MV X-rays in the presence of a uniform 20-kilogauss magnetic field., *Int.J.Radiat.Biol.*38, pp.285-292, 1980
- 102) Feinendegen L.E. and Mithlensiepen H.: In vivo enzyme control through a strong stationary magnetic field the case of thymidine kinase in mouse bone marrow cells., *Int.J.Radiat.Biol.*52, pp.469-479, 1987
- 103) Ngo F.Q.H., Blue J.W. and Roberts W.K.: The effects of a static magnetic field on DNA synthesis and survival of

- mammalian cells irradiated with fast neutrons.,  
Mag.Res.Med.5, pp.307-317, 1987
- 104) 谷本能文：生体酸化還元反応に対する磁場の影響、文部省重点領域研究「人間環境系」研究報告書 G030N20, p.102, 1990
- 105) 法村俊之：細胞増殖に対する変動磁場の効果、文部省重点領域研究「人間環境系」研究報告書 G030N20, p.101, 1990
- 106) Kelly E.J.: Magnetic Field Effects on Electrochemical Reactions Occurring at Metal/Flowing-Electrolyte Interfaces., J.Electrochem.Soc.124, pp.987-994, 1977
- 107) Watanabe T., Tanimoto Y., Nakagaki R., Hiramatu M. and Nagakura S.: The Magnetic Field Effects on Electolysis III -The Anodic Oxidation of Phenylacetate ion-., Bull.ChemSocJpn.60, pp.4166-4168, 1987
- 108) Haberditzl W. ,Mtiller K.: Ein Aüsserer Magnetokatalytischer Effect bei Glutamatdehydrogenase., Z.Natureforsch.20b, pp.517-520, 1965
- 109) D.H.Bergey: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8, 1974
- 110) Marshall K.C. and R.H.Cruickshank: Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interface., Arch.Mikrobiol 91, p.29, 1973
- 111) 飯田広夫：微生物学入門、理工学社、（1977）
- 112) 東匡伸、小熊恵二：シンプル微生物学、南江社、（1990）
- 113) 柳田友道：微生物科学 1－分類・代謝・細胞生理－、学会出版センター、（1980）
- 114) ディー・エヌ・エー研究所編集：バイオテクノロジー用語小辞典、講談社、（1990）

- 115) 内海博司：ポピュラーサイエンスー細胞培養から生命を探るー、衣華、（1980）
- 116) マグローヒル科学技術用語大辞典編集委員会編集：マグローヒル科学技術用語大辞典 第2版、日刊工業新聞社、（1985）
- 117) 渥美和彦，小谷誠，上野照剛：バイオマグネトロニクス入門，オーム社（1986）
- 118) 森崎久雄，服部礼子：界面と微生物，学会出版センター（1986）
- 119) 嶋林三郎，寺田弘，岡林博文：生体コロイドIー基礎と実際ー，廣川書店（1990）
- 120) R.Y.Stanier, E.A.Adelberg, J.L.Ingraham & M.L.Wheelis: 微生物学入門編，培風館（1991）
- 121) 東匡伸，小熊恵二: シンプル微生物学，南江堂（1990）

## 研究業績

### 1. 原著論文

- 1.1 齋藤章史、木村主幸、三澤顕次、有澤準二：尿路感染症患者由来病原性大腸菌の HeLa 細胞付着に対する磁場暴露の影響、日本 ME 学会論文誌、BME1997 年第 1 号掲載決定

### 2. 国際会議

- 2.1 Kazuyuki Kimura, Akihito Saito, Junji Arisawa: The influences of the static magnetic field on the behavior of *Escherichia coli* cultured in the similar environment of Human body, Proceedings of 1994 International Symposium on Electromagnetic Compatibility EMC'94 SENDAI, pp.410-412 (1994-05)
- 2.2 Akihito Saito, Junji Arisawa, Kazuyuki Kimura, Goro Matsumoto: Effects of static magnetic field on bacterial growth and its adhesion to HeLa cells, Proceedings of The 1994 JAPAN-U.S. Science Seminar on Electromagnetic Field Effects Caused by High Voltage Systems(Modeling, Characterization, Measurements, Mitigation), pp.330-339 (1994-6,7)
- 2.3 Akihito Saito, Kazuyuki Kimura, Kenji Misawa, Junji Arisawa: Influence of static magnetic field on infection of *Escherichia coli* to HeLa cells, The 2nd Medical Engineering Week of the World, p.79 (1996-5)
- 2.4 Akihito Saito, Kazuyuki Kimura, Kenji Misawa, Junji Arisawa: Effect of static magnetic field on bacterial infection to HeLa cells, EMC'96 ROMA International Symposium on Electromagnetic Compatibility, pp.527-531 (1996-9)

### 3. 研究会

- 3.1 齋藤章史、木村主幸、有澤準二、松本伍良：希釈栄養培地での培養条件における細菌の増殖に及ぼす直流磁場の影響、電子情報通信学会技術研究報告 ME とバイオサイバネティックス研究会 93-39, pp.9-14 (1993-6)
- 3.2 齋藤章史、有澤準二、木村主幸、松本伍良：病原性大腸菌の培養細胞付着に対する直流磁場の影響、電子情報通信学会技術研究報告 ME とバイオサイバネティックス研究会 93-91, pp.91-96 (1993-11)
- 3.3 齋藤章史、有澤準二、木村主幸：病原性大腸菌の HeLa 細胞付着に与える直流磁場暴露の影響、電子情報通信学会技術研究報告 ME とバイオサイバネティックス研究会 94-104, pp.73-79 (1994-12)

- 3.4 齋藤章史、木村主幸、三澤顕次、有澤準二：病原性大腸菌の HeLa 細胞付着に及ぼす人工磁場暴露の影響、電子情報通信学会技術研究報告 ME とバイオサイバネティクス研究会 95-104, pp.45-50 (1995-11)
- 3.5 齋藤章史、木村主幸、三澤顕次、有澤準二：粘性付与培養液中における病原性大腸菌の HeLa 細胞付着に対する磁場暴露の影響、電子情報通信学会技術研究報告 ME とバイオサイバネティクス研究会 96-86, pp.35-41 (1996-11)
  
4. 研究紀要
  - 4.1 木村主幸、齋藤章史、有澤準二：希釈栄養培地を用いた培養条件下に於ける微生物の増殖に対する曝磁影響、北海道工業大学研究紀要第 21 号 (1993-3)
  - 4.2 有澤準二、齋藤章史、木村主幸、松本伍良：ヒト体内環境と類似の状態に置いた大腸菌の挙動に対する直流磁場の影響、北海道工業大学研究紀要第 22 号 (1994-3)
  - 4.3 有澤準二、齋藤章史、木村主幸、三澤顕次：病原性細菌の株化培養細胞付着に及ぼす静磁場の影響、北海道工業大学研究紀要第 24 号 (1996-3)
  
5. 学会発表
  - 5.1 齋藤章史、木村主幸、有澤準二、松本伍良：尿路感染症患者由来大腸菌の HELA 細胞付着に対する直流磁場の影響、電気関係学会北海道支部連合大会, p.323 (1992-10)
  - 5.2 齋藤章史、木村主幸、有澤準二、松本伍良：直流磁場暴露による大腸菌の HELA 細胞付着性の変化について、日本 ME 学会大会, p.413 (1993-5)
  - 5.3 齋藤章史、木村主幸、有澤準二、松本伍良：HELA 細胞の細菌被感染性に及ぼす直流磁場の影響、電子情報通信学会秋季大会, D-114 (1993-9)
  - 5.4 齋藤章史、有澤準二、木村主幸、松本伍良：直流磁場強度の変化による病原性大腸菌の HELA 細胞付着性の変動、電気関係学会北海道支部連合大会, p.371 (1993-10)
  - 5.5 齋藤章史、有澤準二、木村主幸、松本伍良：病原性大腸菌の HeLa 細胞付着に与える直流磁場の強度、日本 ME 学会大会, p.147 (1994-5)
  - 5.6 齋藤章史、有澤準二、木村主幸：病原性大腸菌の HeLa 細胞付着能亢進に対する直流磁場の強度依存性、電気関係学会北海道支部連合大会, p.301 (1994-10)

- 5.7 齋藤章史、木村主幸、三澤顕次、有澤準二：静磁場暴露による大腸菌の HeLa 細胞付着に対する培養液粘度の影響、日本 ME 学会大会, p.224 (1995-5)
- 5.8 齋藤章史、木村主幸、三澤顕次、有澤準二：病原性大腸菌の HeLa 細胞付着に対する商用周波数変動磁場の影響、電気関係学会北海道支部連合大会, p.12 (1995-10)
- 5.9 齋藤章史、木村主幸、三澤顕次、有澤準二：病原性大腸菌の HeLa 細胞付着に対する静磁場暴露及び培養液粘性の影響、日本 ME 学会大会, p.450 (1996-5)