

# Vero 細胞と HSV-1 のウイルス感染系生体モデルに 及ぼす ELF 磁場の影響に関する研究

2005 年 3 月



北海道工業大学大学院

澤口 裕太

# 目次

第 1 章	序論	1
第 2 章	生体に及ぼす ELF 磁場の影響に関する従来の研究	8
2.1	疫学研究	9
2.2	<i>in vivo</i> 研究	10
2.3	<i>in vitro</i> 研究	12
2.3.1	細胞膜に及ぼす ELF 磁場の影響	
2.3.2	遺伝子発現に及ぼす ELF 磁場の影響	
2.3.3	細胞活動に及ぼす ELF 磁場の影響	
2.3.4	微生物および昆虫に及ぼす ELF 磁場の影響	
2.4	生体に及ぼす ELF 磁場影響の評価	16
2.4.1	暫定的なガイドライン	
2.4.2	生体に対する ELF 磁場の物理的作用	
第 3 章	被感染細胞とウイルスとの感染系モデル	19
3.1	現代社会におけるウイルス感染	20
3.2	ウイルス感染機構	21
3.2.1	ウイルスの構造と分類	
3.2.2	ウイルスの増殖様式	
3.3	アフリカミドリザル腎細胞由来の株化細胞(Vero 細胞)	25
3.3.1	Vero 細胞の特徴	
3.3.2	細胞培養の準備	
3.3.3	Vero 細胞の培養方法	
3.3.4	Vero 細胞数の測定法	
3.4	単純ヘルペスウイルス	32
3.4.1	HSV の特徴	

3.4.2 HSV-1 の増殖様式	
3.5 ウイルス感染系モデルの作製	35
第 4 章 Vero 細胞に及ぼす 50Hz 磁場曝露の影響	36
4.1 Vero 細胞をガラス板に単層培養する方法	37
4.2 磁場曝露装置	38
4.3 実験方法	40
4.3.1 試料作製と磁場曝露条件	
4.3.2 Vero 細胞の増殖率の測定	
4.4 Vero 細胞の増殖に及ぼす 50Hz 磁場曝露の結果	42
4.5 Vero 細胞に及ぼす 50Hz 磁場曝露の影響に関する検討	43
第 5 章 HSV-1 に及ぼす 50Hz 磁場曝露の影響	45
5.1 HSV-1 の基本操作	46
5.1.1 HSV-1 の培養法	
5.1.2 HSV-1 の定量法	
5.2 HSV-1 への 50Hz 60mT 磁場曝露の方法	49
5.2.1 HSV-1 浮遊液の作製	
5.2.2 磁場曝露条件	
5.3 50Hz 60mT 磁場を曝露した場合の HSV-1 感染価の変化	50
5.4 HSV-1 に及ぼす 50Hz 磁場曝露の影響に関する検討	51
第 6 章 Vero 細胞に感染する HSV-1 の増殖に及ぼす 50Hz 磁場の影響	52
6.1 ウイルス感染過程の定義	53
6.2 ウイルス感染系試料	54
6.2.1 Vero 細胞に HSV-1 を感染させる方法	
6.2.2 ガラス板に単層培養した Vero 細胞の生存率	
6.2.3 Vero 細胞に接種する HSV-1 感染価の決定	
6.3 ウイルス感染系モデルに対する 50Hz 磁場曝露の方法と条件	58
6.3.1 感染過程全体への 50Hz 60mT 磁場曝露の方法	
6.3.2 感染過程の吸着期と増殖期に対する 50Hz 60mT 磁場曝露の方法	
6.3.3 24 時間曝露した Vero 細胞に感染する HSV-1 の増殖への 50Hz 60mT 磁場曝露の方法	
6.3.4 プラーク法による HSV-1 の定量	
6.4 50Hz 60mT 磁場曝露の結果	62

6.4.1	HSV-1 増殖の経時的変化	
6.4.2	各感染過程に 50Hz 60mT 磁場曝露した場合の HSV-1 増殖数	
6.4.3	24 時間曝露した Vero 細胞に感染した HSV-1 の増殖変化	
6.5	ウイルス感染に対する 50Hz 磁場の作用に関する検討	66
6.5.1	HSV-1 感染価の経時的変化の特徴	
6.5.2	各感染過程に及ぼす 50Hz 60mT 磁場の影響	
6.5.3	50Hz 60mT 磁場を 24 時間曝露した Vero 細胞に感染する HSV-1 の増殖に及ぼす 50Hz 磁場の影響	
第 7 章	ウイルス感染系モデルに対する様々な磁場の生体影響	69
7.1	50Hz 10mT 磁場のウイルス感染への影響	70
7.2	10Hz 60mT 磁場のウイルス感染への影響	71
7.3	60mT 静磁場のウイルス感染への影響	73
7.4	ウイルス感染に及ぼす 50Hz 60mT 磁場の物理的影響に関する検討	75
第 8 章	結論	77
	謝辞	82
	参考文献	84
	研究業績	95



## 図表リスト

### 【第2章】

表 2-1 商用周波数帯域を中心とした規制の動向	16
表 2-2 誘導電流密度と生体作用の関係	17

### 【第3章】

図 3-1 ウイルスの基本構造	21
図 3-2 ウイルスの増殖過程の概略図	24
図 3-3 Vero 細胞の顕微鏡写真	25
図 3-4 プラスティック製の培養瓶	28
図 3-5 96 穴マイクロプレート	29
図 3-6 血球計数盤	31
図 3-7 単純ヘルペスウイルス DNA の構造	33
図 3-8 ヘルペスウイルスの細胞内増殖過程	33
図 3-9 細胞変性効果	34
図 3-10 ウイルス感染系モデル	35
表 3-1 ウイルスによる感染症例	20
表 3-2 動物ウイルスの分類	22
表 3-3 ヒトヘルペスウイルスとその疾患	32

### 【第4章】

図 4-1 ガラス板を用いた Vero 細胞の培養	37
図 4-2 磁場曝露装置の概略図	38
図 4-3 50Hz 磁場の強度分布	39
図 4-4 50Hz 磁場の曝露方向	40
図 4-5 Vero 細胞の増殖率	42
図 4-6 細胞周期	43

## 【第5章】

図 5-1 HSV-1 浮遊液の作製.....	46
図 5-2 HSV-1 の定量.....	48
図 5-3 100%組織培養感染価の定義.....	48
図 5-4 HSV-1 の感染価の経時変化(37℃).....	50

## 【第6章】

図 6-1 ウイルス増殖過程の定義.....	53
図 6-2 試料作製の手順.....	54
図 6-3 HSV-1 接種量に対する増殖変化.....	56
図 6-4 感染過程の磁場曝露時間.....	59
図 6-5 磁場曝露の手順.....	60
図 6-6 HSV-1 増殖の経時変化.....	62
図 6-7 各感染過程に及ぼす磁場影響.....	63
図 6-8 24 時間曝露した Vero 細胞に感染した HSV-1 の増殖.....	64

## 【第7章】

図 7-1 50Hz 10mT 磁場中での HSV-1 増殖.....	70
図 7-2 10Hz 60mT 磁場中での HSV-1 増殖.....	71
図 7-3 60mT 静磁場中での HSV-1 増殖.....	73
図 7-4 誘導電流の作用機構.....	75

# 第 1 章

## 序論

地球上には様々な電磁現象が存在する。地球自身が作り出す電場・磁場，太陽活動に伴う低周波電磁場などである。生物は古くからこのような磁場の中で進化してきたが，その生体影響についてはほとんど関心がなかった。しかし，近年，高压送電線や電気・電子機器などが多く存在するようになり，これらから発生する人工的な極低周波数(Extremely low frequency: ELF)磁場の生体影響が注目されるようになった。

その発端は，高压送電線付近に生活する子供たちが小児白血病になりやすいとする疫学調査が発表されたことにある<sup>[1]</sup>。この研究報告を裏付けるために，世界中で多数の研究が数十年にわたり行われてきた。

一般に生体への磁場影響の研究は，疫学調査，実験動物を用いた *in vivo* 研究および培養細胞を用いた *in vitro* 研究がある。疫学調査は，ある条件を満たす被験者を長期間かけて追跡し，磁場との因果関係を統計的に導き出す研究である。また，動物や培養細胞を用いた研究は，生体に及ぼす磁場の影響を調べ，その機序を解明するために行われている<sup>[2,3,4]</sup>。従来の研究では，実験動物や培養細胞，微生物など単体に対して，主に 50Hz または 60Hz の商用周波数磁場の影響が検討され，様々な報告がなされてきた。しかし，磁場影響を認められているものの，その作用機序は未だに明確に示されていない。そのため，ELF 磁場の人体への影響が払拭されない現状がある。

一方，日常の生活環境で健康を脅かす要素としてウイルス，細菌，紫外線，化学物質などがあり，これらと ELF 磁場との複合的な生体影響に関心が持たれつつある。これまで報告されてきた研究には，紫外線と ELF 磁場が重なった場合の生体影響<sup>[5]</sup>や細菌などの微生物に及ぼす磁場の影響が検討されてきたが<sup>[6]</sup>，ウイルスに関する ELF 磁場の影響についてはほとんど研究が行

われていない。

このような背景から本研究では，日常生活でしばしば身体に影響を及ぼすウイルス感染に着目し，ELF 磁場とウイルスとの複合的な生体影響について検討することを目的とした．ウイルスは生きた細胞(被感染細胞)に感染することによってはじめて増殖できるという性質を持っている<sup>[7]</sup>．その増殖様式は 1)吸着，2)侵入，3)複製，4)組立て，5)放出の段階があり，動物よりも単純な生体機構モデルとして見ることができる．つまり，この各段階について詳細に調べることが ELF 磁場の作用機序の解明につながる．本研究では，被感染細胞としてアフリカミドリザルの腎細胞由来の株化細胞(Vero 細胞)を選択し，それに単純ヘルペスウイルス 1 型(herpes simplex virus type 1: HSV-1)を感染させた．これをウイルス感染系モデルと名付け，従来では見られなかった生物間の相互作用という新しい観点から生体に及ぼす ELF 磁場の影響について検討した．

ウイルス感染のような生体間の相互作用への影響を調べる際には，両者への ELF 磁場の影響を把握しておく必要がある．そこで，まず Vero 細胞に対して 50Hz 60mT 磁場を曝露し，その影響を観察した．その結果，Vero 細胞は 24 時間で約 2 倍，48 時間で約 4 倍に増殖し，50Hz 磁場中でも正常に増殖することを明確にした．一方，HSV-1 も 50Hz 磁場曝露の影響を受けないことも確認した．これらの結果を前提に，本研究で用いたウイルス感染系モデルが 50Hz 磁場の影響を受けるのか否かをウイルスの増殖を指標にして検討した．その結果，Vero 細胞に感染した HSV-1 は，磁場を曝露しない場合に比べて，24 時間曝露した場合にウイルスの増殖数が減少し，ウイルス感染が抑制されることをはじめて確認した．次に，その作用機序を明らかにするために，ウイルス感染のどの段階に 50Hz 磁場が作用した

のかを確かめるための基礎的検討を行った．ウイルス増殖過程の 1)から 5)までの五つの段階を 1)吸着と 2)進入を「吸着期」とし，3)複製から 5)放出を「増殖期」のように二つのグループに分け，それぞれに対する 50Hz 磁場の影響を観察した．吸着期のみには曝露する目的は，Vero 細胞に HSV-1 が吸着する過程に磁場が作用しているのかどうかを調べることにある．また，増殖期では HSV-1 が Vero 細胞に侵入して増殖する際に，自己の遺伝子を細胞の機能を利用して発現し，それに伴うタンパク質を合成する．それに続いてウイルスが組立てられ，細胞の外に放出される機能への ELF 磁場の作用を調べることにある．吸着期のみには磁場を曝露した結果，ウイルス増殖が抑制され，50Hz 60mT 磁場は HSV-1 の Vero 細胞への吸着を減少させる可能性を見出した．また，増殖期のみには曝露した場合もウイルス増殖が抑制され，ウイルスを増殖させるための機能にも 50Hz 磁場が作用していることがわかった．これらの結果は，HSV-1 を Vero 細胞で 24 時間増殖させた場合に観察したものである．

50Hz 磁場中での Vero 細胞は正常に増殖できるにもかかわらず，ウイルス感染は抑制された．そこで，本研究では Vero 細胞側のウイルス感染に関わる部分に磁場が影響しているのかを確認するために，Vero 細胞に 50Hz 60mT 磁場を 24 時間曝露したものと，非曝露の Vero 細胞に HSV-1 を感染させて，Vero 細胞の HSV-1 に対する感受性に違いが現れるのかを検討した．その結果，50Hz 60mT 磁場を 24 時間曝露した Vero 細胞に HSV-1 を感染させた場合の方が，非曝露の Vero 細胞に感染させた場合よりも HSV-1 の増殖数が減少した．この原因の一つには，細胞に HSV-1 が結合することで起こる吸着が減少した可能性が挙げられる．すなわち，50Hz 60mT 磁場の 24 時間曝露は，Vero 細胞の HSV-1 に対する感受性を低下させる作用があることを示し

ている．このことから，50Hz 磁場は Vero 細胞と HSV-1 との感染系モデルに対して，ウイルス増殖を抑制する作用があることをはじめて明確にした．

以上のように，ウイルス感染系モデルに 50Hz 磁場が影響することを明らかにしたことを受けて，さらに磁場周波数や磁場強度の異なる他の磁場での影響について検討した．本研究では，50Hz 磁場のウイルス感染抑制作用が磁場強度に依存するののか否かを調べた．磁場強度を 60mT から 10mT 磁場に変更した結果，HSV-1 は正常に増殖した．このことから，少なくとも 10mT 程度ではウイルス感染に影響しないものといえる．

最近，10 から 50Hz までの周波数帯域の変動磁場を磁気治療に応用しようとする試みがあり，特に 10Hz 磁場が注目されている．10Hz 磁場の生体影響に関する従来の研究では，ラットの脳内ホルモンの増加作用<sup>[8]</sup>や金魚のストレス緩和効果が報告されている<sup>[9]</sup>．このことから，本研究でも 10Hz 磁場の生体作用について注目し，磁場周波数を 50Hz から 10Hz にして磁場曝露を行い，本感染系のウイルス増殖にどのような変化を示すのかを検討した．その結果，10Hz 60mT 磁場中でも Vero 細胞に感染した HSV-1 は，増殖が抑制される傾向を示した．

また磁場には，変動磁場の他に静磁場がある．自然界では地磁気が存在し，人工的には超伝導技術の向上により，強力な静磁場を作り出すことに成功し，医療など様々な分野に応用されている．さらに，静磁場の特徴として誘導電流が発生しないことが挙げられる．ELF 磁場の生体影響を検討する場合，誘導電流の刺激による影響にも着目する必要がある．そこで，この静磁場の特徴を利用し，50Hz 60mT 磁場のウイルス感染抑制作用が誘導電流の作用であるのかどうかを検討した．本研究では，50Hz 磁場の強度と合わせるため，60mT の静磁場をウイルス感

染系モデルに曝露したところ、HSV-1 の増殖抑制は認められなかった。これは、誘導電流の発生しない静磁場と誘導電流が発生する変動磁場とで生体影響が異なったことを示し、ウイルス感染の抑制は誘導電流が関与している可能性を示唆するものである。

以上のように、Vero 細胞と HSV-1 とのウイルス感染系モデルに対して 50Hz 磁場を曝露するとウイルスの増殖数が減少した。この原因は、50Hz 磁場が Vero 細胞へのウイルスの吸着を妨害する作用があること、増殖に関わる機能に作用している可能性が考えられる。また、その作用には誘導電流の関与が示されたことも一つの成果である。このように本研究では、ウイルス感染系モデルに対して 50Hz 磁場は、感染を促進するのではなく、抑制する作用があることをはじめて見出すことができた。今後さらに、動物よりも本研究のような単純な生体システムで成り立っているウイルス感染系モデルに対する ELF 磁場の作用を詳細に調べることにより、生体に対する ELF 磁場の作用機序の解明につながるものと期待している。

本論文は全 8 章で構成されており、次章以降では次のような内容が取り扱われている。第 2 章では、従来に行われてきた生体に及ぼす ELF 磁場の影響について紹介する。続いて、本研究では、従来に無い全く新しい着眼点として、ウイルス感染を取り上げた。そのため第 3 章では、ウイルス感染の基礎について述べ、被感染細胞として Vero 細胞を用い、それに感染させるウイルスとして単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)を選択し、ウイルス感染系モデルを作製した。第 4 章では、ウイルス感染が被感染細胞とウイルスとの相互作用で成立しているため、それぞれの ELF 磁場の影響を把握しておく必要がある。本研究では被感染細胞に Vero 細胞を選択し、それに及ぼす 50Hz(商用周波数)



磁場の影響について検討した．第5章では，Vero細胞に感染させる HSV-1 に及ぼす磁場影響について述べた．続く第6章では，Vero細胞と HSV-1 とのウイルス感染系モデルに対して 50Hz 磁場を曝露し，HSV-1 の増殖に変化が現れるのかを検討した．さらに，第7章では，その他の磁場でのウイルス感染の影響を調べ，生体に対する ELF 磁場の物理的作用について検討した．最後の第8章では，得られた知見を整理し，それらに基づいて本研究の結論を述べた．

## 第 2 章

# 生体に及ぼす ELF 磁場の影響に 関する従来の研究

極低周波数(Extremely Low Frequency: ELF)磁場が及ぼす生体影響について数十年にわたり研究されてきている。一般に生体への磁場影響の研究は、疫学調査、実験動物を用いた *in vivo* 研究および培養細胞を用いた *in vitro* 研究がある。疫学調査は、ある条件を満たす被験者を長期間かけて追跡し、磁場との因果関係を統計的に導き出す研究である。また、動物や培養細胞を用いた研究は、生体に及ぼす磁場の影響を調べ、その機序を解明するために行われている。この章では、従来に報告された生体への磁場影響について紹介する。

## 2.1 疫学研究

疫学研究は、ヒトの健康とELF磁場との因果関係を調べるための重要な研究である。例えば、1979年に米国のウエルトハイマー博士が磁場と小児ガンに関する疫学研究の結果を発表し、配電線近傍に住む子供に小児白血病の発生率が高いことを示唆した<sup>[1]</sup>。また、1992年にはスウェーデンのカロリンスカ研究所のアルポム博士が、 $0.2\mu\text{T}$ 以上の磁場で小児白血病などの健康への影響が考えられると示した<sup>[10]</sup>。また、職業的に磁場に曝露されるヒトを対象に白血病と脳腫瘍の関係について調査された報告もある<sup>[11]</sup>。今日ではこのような疫学的研究の報告によってELF磁場の生体影響に関心が持たれる発端となり、人間の健康に与える磁場の影響について問題になっている。

しかし、この研究は十数年の月日を要し、報告事例が少ない。また、たとえ結果が得られたとしても、その信憑性を問う研究者も多く存在し、ELF磁場が人体に影響を及ぼすのか否かは、現在も議論されている。

## 2.2 *in vivo* 研究

前述したような疫学調査の報告を受けて、世界中で生体に及ぼす ELF 磁場の影響について検討されるようになった。ELF 磁場の中でも特に、高圧送電線から発せられる商用周波数 50Hz あるいは 60Hz を中心に研究が盛んに行われ、多数の報告がなされてきた。その中には実験動物を用いて生体全体への影響を調べる研究(*in vivo* 研究)や試験管内で細胞を培養し、生体の細胞への影響を調べる研究(*in vitro* 研究)がある。

*in vivo* 研究の目的は、生体活動の要である神経性調節(中枢神経系、体性神経系、自律神経系など)と体液性調節(ホルモンなど)による影響やそれらの個々の作用といくつかの複合的な作用などを解析が検討されている。

神経系に関する影響として、20Hz で 3~5mT 以上の磁場をヒトの頭部に曝露すると、視覚的なわずかな光の明滅現象(磁気閃光)が生じる。これは頭部に微弱な電流を直接流すことでも起こる。このとき、変動磁場の磁束密度の変化によって網膜に発生する誘導電流密度  $10\text{mA/m}^2$  が閾値であると推定されている<sup>[12]</sup>。また、ヒトに 37Hz 80 $\mu\text{T}$  磁場を曝露すると血圧が上昇することも報告されている<sup>[13]</sup>。

生体の恒常性を維持するためにホルモンを介して生体の機能を調節しているのが内分泌系である。磁場に置かれた鳥や魚、その他の動物では昼と夜の日周リズムに変化が生じる。これは、松果体(後頭部の奥にある内分泌器官)に磁場が作用したことによって起こったものと考えられている。例えば、乳牛に 60Hz 30 $\mu\text{T}$  磁場を曝露すると、昼間でメラトニンやプロラクチンといったホルモンの血中濃度が低下することが報告されている<sup>[14]</sup>。また、ラットに 50Hz 25 $\mu\text{T}$  磁場を曝露すると生殖能力に影響を及ぼすこと<sup>[15]</sup>や 50Hz 5.5mT 磁場でマウスの生存率の増加、

ガン細胞の増殖抑制などが確認されている<sup>[16]</sup>.

私が所属する生体電子・システム工学部門では、金魚を用いてELF磁場の影響を検討してきた。50Hz 60mT磁場を曝露すると金魚の行動<sup>[17]</sup>や体色、尿排泄といった生理現象に影響を及ぼすことを明らかにしてきた<sup>[18]</sup>。金魚の体色は、色素を維持するホルモンの分泌が抑制されたことによると考えられている。また、尿排泄では24時間以上の磁場曝露によって水槽中に排泄されたアンモニアの濃度(尿排泄量)が非曝露の金魚よりも増加した。これは、50Hz 60mT磁場が金魚にとってストレスになっている可能性を示すものである。また、ストレスを与えた金魚に10Hz 60mT磁場を曝露すると尿排泄量が減少し、ストレスを緩和するという興味深い結果を見出している<sup>[9]</sup>。

10Hz磁場に着目した生体影響に関する従来の研究では、ラットに10Hz磁場(強度1.8-3.8mT)を曝露し、脳内ホルモンの分泌を調べたところ、ドーパミンとセロトニンの量が増加することが確認されている<sup>[8]</sup>。

このように、ELF磁場の100Hz以下、特に1~15Hzの周波数帯の電磁現象と生物との関わり合いについての可能性が指摘されていることから<sup>[3]</sup>、今後は、報告例が少ない10Hz付近の変動磁場の生体影響にも着目せざるを得ない。

## 2.3 *in vitro* 研究

*in vivo* 研究によって生体全体への影響について確認されている一方で、その作用の機序について解明するための研究も行われている。それが *in vitro* 研究と呼ばれる試験管内で生体機能を維持したままで細胞内の細部の機能を解析する方法である。

ELF 磁場の作用点として、細胞膜自体の構造、膜表面の荷電状態、膜に存在する種々のチャネル、レセプタなど、その構造と機能に及ぼす影響が挙げられる。また、細胞外からのタンパク質の刺激に応じて遺伝子が発現し、生体に重要なタンパク質を生成している。このような生理化学的な機能に及ぼす ELF 磁場の影響が報告されている。

### 2.3.1 細胞膜に及ぼす ELF 磁場の影響

細胞膜には様々な機能が備わっている。細胞内外のイオン濃度を調節するイオンチャネル、ホルモンや成長因子などのタンパク質を取り込むためのレセプタなどが挙げられる。

イオンチャネルへの影響としては、カルシウムイオンに関する報告が多い<sup>[19,20,21,22,23]</sup>。また、レセプタの影響としては、ELF 磁場は、それに特異的に結合しようとするタンパク質を妨害する作用<sup>[24]</sup>やレセプタの感度が低下させる作用<sup>[25]</sup>を有する可能性が見出されている。

細胞膜自体の影響としては、膜の構造に変化が生じる可能性があることが示されている<sup>[26,27]</sup>。

### 2.3.2 遺伝子発現に及ぼす ELF 磁場の影響

レセプタを含むタンパク質は遺伝子の発現によって生成されるため、その遺伝子発現に及ぼす影響も検討されている。

遺伝子レベルの磁場影響で、これまでに活発に議論されてき

た分野の一つに遺伝子発現が挙げられる．遺伝子発現とは遺伝子 DNA の持つ情報をメッセンジャーRNA(mRNA)に転写し，さらにアミノ酸の配列に翻訳して，最終形質のタンパク質として生成する過程をいう．

この分野の研究では，ガン遺伝子の一種である c-myc の転写が ELF 磁場で増強するという報告が知られている<sup>[28]</sup>．c-myc 遺伝子は細胞の増殖に深く関わっており，増殖因子などの刺激により，その転写活性が一過性ではあるが高まることが知られている．しかし，この報告がなされて以来，c-myc 遺伝子に注目して他のいくつかの研究グループにより曝露条件，使用細胞株など十分に考慮されて再現実験が試みられた．その結果，著者らの報告を含めて，磁場曝露によりこの遺伝子の発現増強は観察されず，再現実験は成功していない<sup>[29,30]</sup>．このことから，転写活性(mRNA レベル)で見る c-myc の発現に限っていえば，変動磁場の影響は小さいものと考えられている．

また，前節でも述べたが，細胞表面にあるレセプタもタンパク質であり，遺伝子発現によって生成される．サイトカインという細胞成長因子を取り込むための HL60 細胞のレセプタは，50Hz 0.8 $\mu$ T 磁場でそれに関わる遺伝子発現に影響が認められている<sup>[31]</sup>．他にも 50Hz 0.5mT 磁場曝露で細胞付着分子に関わる遺伝子発現など<sup>[32,33]</sup>や 50Hz 2mT 磁場では，成長因子に関わる遺伝子発現<sup>[34]</sup>への影響が報告されている．

遺伝子への ELF 磁場の影響は，発現だけではなく，外的要因，例えば放射線で傷つけられた DNA の修復に ELF 磁場が関与するか否かも報告されている．60Hz 0.15mT 磁場の曝露で DNA 損傷の修復率を減らす効果があるとする報告もある<sup>[35]</sup>．一般に DNA 損傷が生じて修復が行われると，稀に突然変異が起こることがある．60Hz 5mT 磁場の場合，それを促進させる可能性が確

認されている<sup>[36,37]</sup>.

このことから、放射線などが細胞に作用する過程において、ELF磁場が修飾的に働いている可能性は考えられるものの、この外的要因に対する修飾効果については、研究業績が非常に乏しいため、現時点では明確な結論には至っていない。

### 2.3.3 細胞活動に及ぼす ELF 磁場の影響

前述した研究報告に見られたイオン調整や遺伝子発現などの生体システムは、細胞の活動に必須な機能である。このような生体活動に必要な機能にELF磁場の影響が認められていることから、細胞増殖や特殊な役割を担っている細胞に備わっている機能への影響にも着目されてきた。例えば、免疫細胞は50Hz磁場を曝露によって影響をうける可能性が示されており、これはカルシウムイオンの影響が関係していると推測されている<sup>[21,38]</sup>。また、50Hz 800 $\mu$ T磁場曝露のよって細胞の活性が上がることを示した報告もある<sup>[39]</sup>。

細胞増殖に関しては、50Hz 2mT磁場の曝露により、成長因子を取り込むためのレセプタが減少し、結果的に増殖が減少したという報告がある<sup>[33]</sup>。また、50Hz 0.8mT磁場曝露によるヒトのリンパ球の増殖に及ぼす影響<sup>[40]</sup>および60Hz 1.2 $\mu$ T磁場ではMCF-7細胞の成長抑制作用<sup>[41]</sup>、50Hz 1mT磁場では細胞分化への影響<sup>[42]</sup>も見られている。

細胞活動には、酵素のはたらきが必要となるが、75Hz 125 $\mu$ T磁場ではそのはたらきが減少し<sup>[43]</sup>、その一方で60Hz 1.2mT磁場の場合、促進することが見出されている<sup>[44]</sup>。

### 2.3.4 微生物および昆虫に及ぼす ELF 磁場の影響

微生物に及ぼすELF磁場の影響についても検討されている。



イースト菌に紫外線と 50Hz 120 $\mu$ T 磁場を曝露すると菌の増殖に影響を及ぼす可能性<sup>[5]</sup>や線虫に 60Hz 0.5T 磁場を曝露するとストレス応答に関する遺伝子発現に影響を及ぼすことが報告されている<sup>[45]</sup>。この遺伝子発現によって生成されるタンパク質は熱ショックタンパク質 70(heat shock protein 70: HSP70)と呼ばれ、ELF 磁場とストレスとの関係を検討するために注目されることが多い<sup>[46]</sup>。

この他にも、ゾウリムシ<sup>[47]</sup>やショウジョウバエ<sup>[48]</sup>といったものを対象にして、ELF 磁場中での生態について観察されている。

## 2.4 生体に及ぼす ELF 磁場影響の評価

これまでに述べてきた生体に及ぼす ELF 磁場の影響に関する研究報告を集積し，暫定的な評価が行われている．その評価には，商用周波数(50 または 60Hz)を主に取り上げ，磁場強度の基準を示している．ELF 磁場の生体影響を検討する場合，生体に発生する誘導電流の刺激が作用していることが定説となっている．その電流密度の大きさによって生体影響が異なるとしている．

### 2.4.1 暫定的なガイドライン

現在までに，動物や培養細胞を用いた研究によって報告された知見を評価し，世界保健機関(World Health Organization: WHO) の報告<sup>[2]</sup>やアメリカの調査機関 NIEHS (National Institute

表 2-1 商用周波数帯域を中心とした規制の動向<sup>[49]</sup>

国と機関	磁場 (μT)		備考
	公衆	職業者	
ICNIRP	100 (50Hz) 83.3 (60Hz)	500 (50Hz) 416.7 (60Hz)	1998 年ガイドライン
イギリス	1600	1600	ガイドライン, NRPB
オーストリア	100	500	ガイドライン
オーストラリア	100	500	ICNIRP 準拠
ドイツ	100	100	1997 年, 規制
イタリア	100	500	1992 年, ガイドライン
スウェーデン			国の規制値はない
日本			1976 年, 磁場の制限はなし
スイス	100	400	
アメリカ フロリダ	15μT (230kV 送電線の ROW 端) 20μT (500kV 送電線の ROW 端)		1989 年
ニューヨーク	20μT (ROW 端)		1978 年

[注] ICNIRP: 国際非電離放射線防護委員会

NRPB: イギリス放射線防護評議会

ROW: Right of Way 通行権のある送電線用地

ガイドライン: 法的拘束力のない自発的な基準

規制: 法規に基づく義務的な基準. アメリカは国レベルの規制はない.

of Environment Health Sciences)による EMF RAPID (Electric and Magnetic Fields Research and Public Information Dissemination) 計画<sup>[50]</sup>によって生体に及ぼす ELF 磁場の影響についてまとめられている。また、表 2-1 に示すように、国際機関や各国独自に評価し、規制している場合もある。なお、日本では現在、磁場に関する規制はない。

#### 2.4.2 生体に対する ELF 磁場の物理的作用<sup>[4]</sup>

時間的に変化する磁場(変動磁場)と人体との物理的作用は、誘導電場および渦電流である。誘導電場(E)および電流密度の大きさ(J)は、(1)、(2)式で与えられ、電流ループの半径 R、生体組織の導電率 $\sigma$ 、および磁束密度の大きさ B とその時間変化率(周波数)fに比例する。磁場の大きさと周波数を一定にすると、ループが最大の場合に誘起される電場は最も強くなる。人体のどの部分であろうと、誘導電流の正確な経路と組織の導電率によって決まる。

$$E = \pi f B R \quad \cdots (1)$$

$$J = \sigma E \quad \cdots (2)$$

現在考えられている誘導電流による生体影響は、表 2-2 に示すように、 $1\text{mA/m}^2$  以下では生物学的影響は認められない、 $10\sim 100\text{mA/m}^2$  ではわずかな生理学的影響がみられる、 $10\sim 100$

表 2-2 誘導電流密度と生体作用の関係<sup>[4]</sup>

誘導電流値 ( $\text{mA/m}^2$ )	生体影響
< 1	確立された影響はなし
1~10	わずかな生理学的影響
10~100	視覚、神経系への影響の可能性 骨折の再合促進

mA/m<sup>2</sup>になると磁気閃光のような視覚，神経への影響の可能性がでる，あるいは骨折の合成が促進される効果があるとされている．

## 第 3 章

# 被感染細胞とウイルスとの感染系モデル

近年，ウイルスによる感染症が大きな問題となっている．ウイルスは細菌とは違い，単独では増殖できず，生きた細胞に感染することではじめて増殖することができる．本研究では，生体にウイルスが感染する際に ELF 磁場がどのように作用するのかを検討することを目的としている．

感染成立の最低限の条件は，ウイルスが感染可能な細胞(被感染細胞)に接触することである．本研究では，多種類のウイルスに感受性を示すアフリカミドリザル腎細胞由来の株化細胞(Vero 細胞)<sup>[51]</sup>に対して，ヒトに感染する病原性ウイルスの単純ヘルペスウイルス 1 型(herpes simplex virus type 1: HSV-1)<sup>[7]</sup>を感染させ，ウイルス感染系モデルを作製した．この章では，ウイルス感染に関する基礎を述べる．

### 3.1 現代社会におけるウイルス感染

現代社会においてウイルスによる感染症が大きな問題となっている．例えば，表 3-1 に示したように，ヒト免疫不全ウイルス(HIV)による後天性免疫不全症候群(AIDS)や肝炎ウイルスによる肝炎の発症，新型コロナウイルスによる SARS の発生，さらには，インフルエンザウイルスによるインフルエンザの流行やヘルペスウイルスの感染によって生じる口唇ヘルペスや性病，帯状疱疹などの感染症が挙げられる．また，ヒト以外の動物でもコイヘルペスやトリインフルエンザなども発生した．また，日本に限らず世界中でこのようなウイルス感染は問題となっている．

表 3-1 ウイルスによる感染症例<sup>[52]</sup>

ウイルス名	感染症
ヒト免疫不全ウイルス	AIDS(後天性免疫不全症候群)
単純ヘルペスウイルス	口唇ヘルペス，性器ヘルペス
ヒトコロナウイルス	風邪，SARS
肝炎ウイルス	肝炎
インフルエンザウイルス	流行性感冒(インフルエンザ)

## 3.2 ウイルス感染機構<sup>[52]</sup>

ウイルス感染とは，ウイルスが増殖するために必要な行為である．ウイルスは単独では増殖できないため，生きた細胞(被感染細胞)に感染することでそれを可能にする．また，ウイルスによって感染できる細胞が決まっており，その細胞との相互作用によってウイルスは増殖することができる．また，ウイルスの構造や種類によって感染様式が異なる．

### 3.2.1 ウイルスの構造と分類

ウイルスは他の微生物とは大きく異なり，細胞壁，細胞膜，細胞質，核という構造体を持たず，大きさ 20～300nm と著しく小さい微生物である．ウイルスは遺伝子の核酸(DNA か RNA のいずれか一方のみ)を中心にして，その周囲がタンパク質の殻(カプシド)で包まれた構造からできている(図 3-1(a))．ウイルスの種類によっては，この外側にさらに脂質と糖タンパク質から

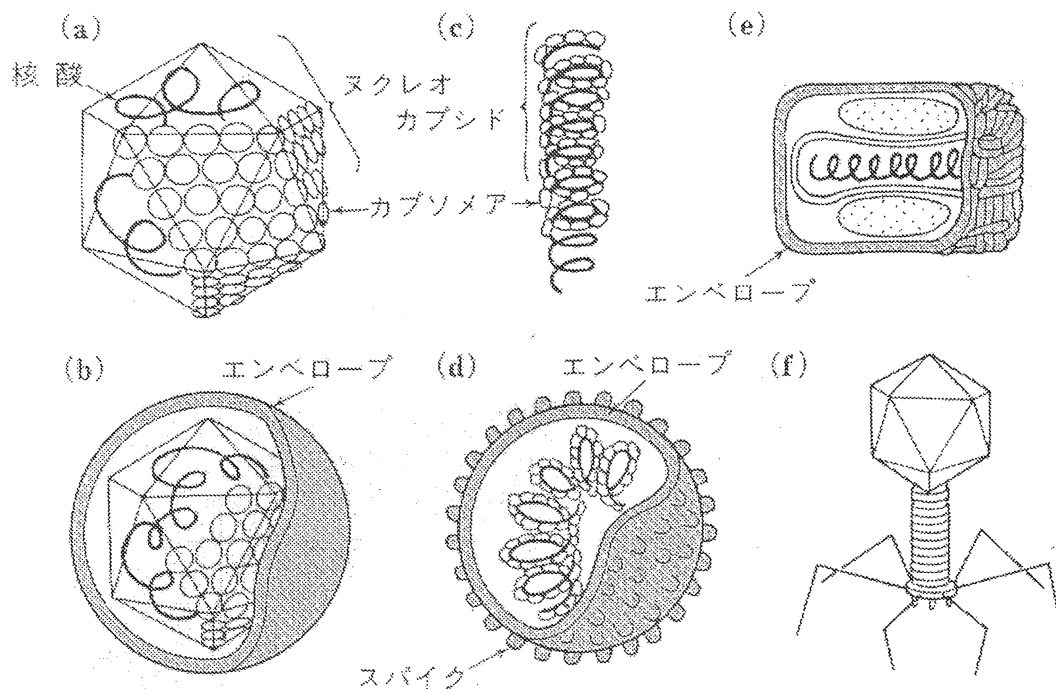


図 3-1 ウイルスの基本構造

なる被膜(エンベロープ)が存在する(図 3-1(b)). ある種のウイルス(インフルエンザウイルスなど)のエンベロープ表面に存在する糖タンパク質の突起(スパイク)は動物赤血球表面に結合する性質がある.

ウイルスの構造には, 上述した二つの型を含めて, 次の六つの型がある. その基本構造は核酸とカプシドが組み合わさったヌクレオカプシドである. 完全な粒子構造を持ち, 感染性を有するウイルス粒子をビリオンという.

- 1)カプシド配列が正 20 面体を形成し, その中に核酸を有する正 20 面体ヌクレオカプシド型(図 3-1(a)).
- 2)正 20 面体ヌクレオカプシドの外側にエンベロープを有する型(図 3-1(b)).
- 3)核酸のらせんにカプシドが付いているらせん対称ヌクレオカプシド型(図 3-1(c)).
- 4)らせん対称ヌクレオカプシドがエンベロープに包まれた型(図 3-1(d)).
- 5)複雑構造からなる型(図 3-1(e)).
- 6)おたまじゃくし型(図 3-1(f)).

表 3-2 動物ウイルスの分類

核酸の種類	ウイルス科	代表的なウイルス種	ウイルス粒子	
			大きさ (nm)	カプシド構造など
DNA	ヘルペスウイルス ヘパドナウイルス	単純ヘルペスウイルス, 水痘-帯状ヘルペスウイルス	150~200	正 20 面体
		B 型肝炎ウイルス	42	+エンベロープ 複雑な内部 +エンベロープ
RNA	レトロウイルス	ヒト免疫不全ウイルス	100~120	複雑な内部 +エンベロープ
	コロナウイルス	ヒトコロナウイルス	80~130	らせん対称 +エンベロープ
	オルソミクソウイルス	インフルエンザウイルス	80~120	らせん対称 +エンベロープ



また，表 3-2 に示すようにウイルスは核酸の種類によって，DNA ウイルスと RNA ウイルスに分けられ，さらに構造と組成，物理化学的性状によって科に分類される．

### 3.2.2 ウイルスの増殖様式

ウイルスが細胞に感染するときの第一段階が吸着である．ウイルス粒子はブラウン運動によって細胞膜表面に接近し衝突する．この繰り返しのうちに，ウイルス表面のタンパク質(あるいは糖タンパク質)が細胞のレセプタに特異的に結合する．このようなウイルスレセプタは，細胞によって異なり，各々のウイルスと鍵と鍵穴の関係にある．つまり，レセプタを持たない細胞にはウイルスは吸着できず，その後のウイルス増殖過程に入らない．すなわち，ウイルス感染が成立しない．

ウイルスの増殖過程は，一般に図 3-2 のような 6 段階に分かれる．

- 1)吸着(absorption): ウイルス粒子が細胞膜の特定の部位(レセプタ)に付着する．
- 2)侵入(penetration): ウイルス粒子は細胞の食作用によって取り込まれるか，ウイルス粒子表面のエンベロープと細胞膜が融合して，ウイルス粒子のヌクレオカプシドが細胞質内に入る．
- 3)脱殻(uncoating): ヌクレオカプシドからタンパク質が取り除かれ，裸の核酸となる．多くのウイルスでは，細胞のリボソームのタンパク質分解酵素によって起こる．
- 4)素材の合成(synthesis of viral components): ウイルス核酸の遺伝子情報がメッセンジャーRNA(mRNA)に転写され，細胞のリボソームでカプシドタンパク質やエンベロープ組成が生合成される．一方では自己の核酸が複製される．

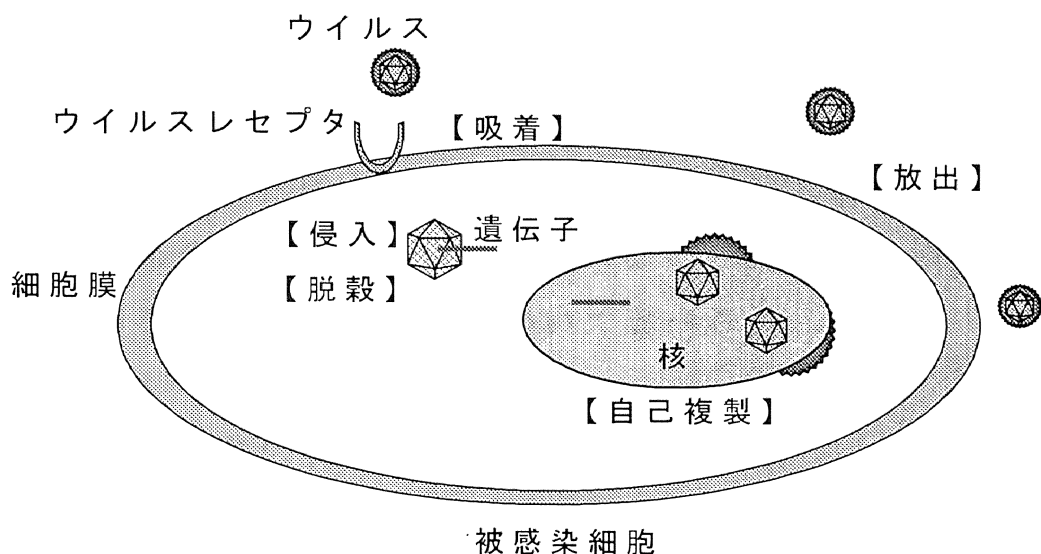


図3-2 ウイルスの増殖過程の概略図

5)組立て(成熟 maturation): 生合成された核酸とカプシドタンパク質が組み合わされ, ウイルス粒子(ヌクレオカプシド)ができる.

6)細胞外への放出(release): 細胞の破壊によって,あるいはエンベロープを持つ RNA ウイルスの場合は, ウイルスタンパク質で置き換えられた細胞膜をかぶって, またエンベロープを持つ DNA ウイルスは核膜をかぶって細胞外に遊離する.

以上の過程でのウイルス増殖は, 1 個の細胞に 1 個のウイルス粒子が感染することからはじまり, ウイルスの種類と細胞の種類で異なるが, 一般に 10 時間前後の時間を経て行われ, 産生される子孫ウイルス粒子数は数百から数千個である. このように, ウイルスが細胞内で増殖すると, 多くの場合細胞は破壊し死滅する. これがウイルスの病原性に結びつく.

### 3.3 アフリカミドリザル腎細胞由来の株化細胞 (Vero 細胞)

本研究では被感染細胞にアフリカミドリザル腎細胞由来の株化細胞 (Vero 細胞) を用いた。Vero 細胞はウイルス研究を進展させた細胞であり、多様に用いられる。ここでは、Vero 細胞の特徴と細胞培養の基礎的な技術について述べる。

#### 3.3.1 Vero 細胞の特徴<sup>[51]</sup>

Vero 細胞の特徴は、多種類のウイルスを感染させることが可能である (ウイルス感受性が高い) こと、ウイルス感染を抑制する働きのあるインターフェロンを分泌しないため、ウイルスの感染を観察しやすいことが挙げられる。Vero 細胞は付着性細胞であるため、培養瓶やガラス板などの基質に付着させて培養する。図 3-3 の写真は、単層培養された状態の Vero 細胞である。

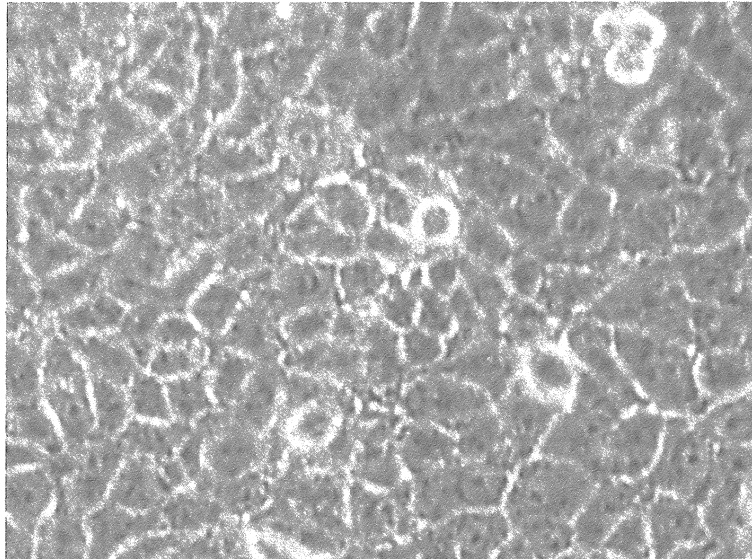


図 3-3 Vero 細胞の顕微鏡写真

### 3.3.2 細胞培養の準備<sup>[53,54]</sup>

Vero 細胞を取り扱うためには、雑菌に汚染されないようにすることが最も重要なことである。そのためには、無菌操作を行う必要がある。また、細胞の培養に使用する培養液や試薬も無菌のものを使用する。

#### (1) 無菌操作

Vero 細胞やウイルスを扱う場合には、雑菌が入らないように細心の注意を払わなければならない。そのためには、クリーンルームで作業を行い、使用する器具や培養液などの薬品などは無菌状態のものを使用する。また、ウイルスを外に漏れないようにすることも重要である。そのため、ウイルスを用いた場合には、それに接触した器具などを必ず滅菌する。

ここで、滅菌とはあらゆる微生物を死滅させることを指す。その方法には、高圧蒸気滅菌(121℃, 15 分)や乾熱滅菌(150℃, 2 時間)などがある。

(a)実験設備：培養細胞はウイルスを取り扱う場合には、雑菌の無い空間(無菌状態)での操作が要求されるため、外から雑菌が入らないようになっているクリーンベンチと呼ばれる装置が必要となる。

(b)使用道具：培養液を保存するガラス瓶や培養液を出し入れるピペットは必ず高圧蒸気滅菌や乾熱滅菌をして使用する。

(c)培養液などの試薬：培養液中に雑菌が入っていては、その雑菌が増殖してしまうため、培養しようとする細胞が死滅してしまう。それを防ぐために、全ての培養液や試薬は無菌状態にして用いる。なお、熱によって試薬の効果を失うものは、フィルタに通して雑菌を取り除く濾過滅菌法で無

菌状態にする。

実験後にはウイルスが外に漏れないように，その都度，滅菌処理することが重要である。

## (2) 細胞培養に必要な試薬

Vero 細胞を培養するためには，栄養成分となる血清と必要な成分が含まれる培養液が必要である。本研究では，ウシ胎児血清 (foetal bovine serum: FBS) を使用し，培養液には RPMI1640(Roswell Park Memorial Institute 1640)培養液とイーグル MEM(Eagle's Minimum Essential Medium)培養液を用いた。また，付着性細胞である Vero 細胞を剥がすための酵素としてトリプシンを使用し，実際に用いる場合は，EDTA 液で 0.2%に薄める。Vero 細胞の洗浄にはハanks 緩衝液を用いた。

### 3.3.3 Vero 細胞の培養方法<sup>[53]</sup>

#### (1) 初期培養

Vero 細胞の培養は，凍結保存しておいた Vero 細胞懸濁液(1ml)を解凍し，遠心分離する。上澄みを捨てて，RPMI1640 培養液 1ml を加えて攪拌する。その後，FBS が 5%含まれた RPMI1640 培養液(5%FBS-RPMI1640 培養液)5ml に Vero 細胞懸濁液をすべて入れて，CO<sub>2</sub> インキュベータ(37℃)内で Vero 細胞を培養瓶に単層培養した。

本研究では，図 3-4 に示したプラスチック製で底面に細胞が付着しやすいように工夫されたものを使用した。

#### (2) 継代培養

培養瓶の底(25cm<sup>2</sup>)に Vero 細胞がびっしりと培養されると，細胞が増殖しなくなり，活性が悪くなる。そのまま放置してし

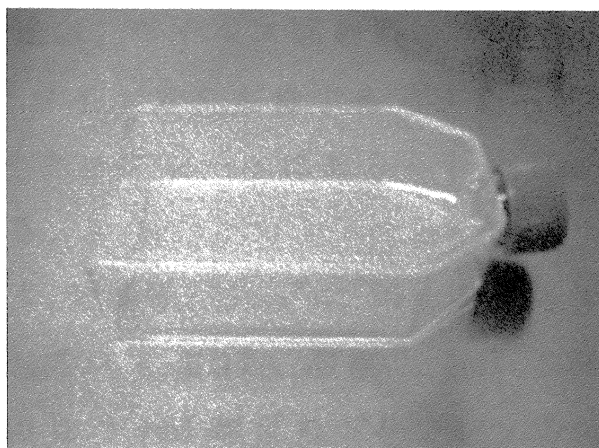


図 3-4 プラスティック製の培養瓶

まうと Vero 細胞は死滅してしまうため，その都度，Vero 細胞を剥がして，細胞数を減らす必要がある．これを継代培養という．

継代培養は，Vero 細胞が単層状態になったときに行う．まず，培養瓶内の培養液を取り除き，ハンクス緩衝液で細胞を数回洗浄する．ハンクス緩衝液を取り除いた後，0.2%トリプシン EDTA 溶液を 0.5ml 入れ，CO<sub>2</sub> インキュベータ (37℃) 内で 10 分間浸す．十分に剥がれた Vero 細胞懸濁液に，トリプシンの効果を抑えるために 5%FBS-RPMI1640 培養液を 0.5ml 入れ，全量 1ml にし，滅菌された試験管に移す．空になった培養瓶に，5%FBS-RPMI1640 培養液を 5ml 入れ，その中に，適量の Vero 細胞懸濁液を添加する．加える量によって培養日数を制御することができる．これを繰り返して，Vero 細胞を維持していく．

また，底面 75cm<sup>2</sup> の培養瓶で培養すると，培養瓶 (25cm<sup>2</sup>) と比べて約 3 倍に増やすことも可能であり，複数の培養瓶で培養すると，さらに Vero 細胞を多量に培養することができる．

### (3) マイクロプレートでの培養

Vero 細胞の用途は、ウイルス感染系モデルの被感染細胞としてだけでなく、ウイルスを定量するときにも用いる。その際、図 3-5 に示すマイクロプレートにあらかじめ Vero 細胞を培養しておく必要がある。

本研究ではまず、培養瓶(75cm<sup>2</sup>)に Vero 細胞を単層培養する。これを 0.2%トリプシン EDTA 溶液 1.5ml で剥がし、その後 5%FBS-RPMI1640 を 3.5ml 加えてトリプシンの効果を抑える。さらに、5%FBS-RPMI1640 を 90ml 加える。これをマイクロプレート(96 穴)に 1 穴あたり 0.2ml ずつ入れていく。この方法でマイクロプレート(96 穴)4 枚に同時に Vero 細胞を培養することができる。培養瓶に残った Vero 細胞と作製したマイクロプレートを CO<sub>2</sub> インキュベータ(37℃)内で培養すると約 2 日間で単層となる。

また、ウイルス定量法の一つであるプラーク法を行う場合、6 穴のマイクロプレートを用いる。その際には MEM 培養液で Vero 細胞を培養し、45ml の Vero 細胞懸濁液を作製する。これを 6 穴のマクロプレート 2 枚に 1 穴あたり 2.5ml 入ると、約 2 日間

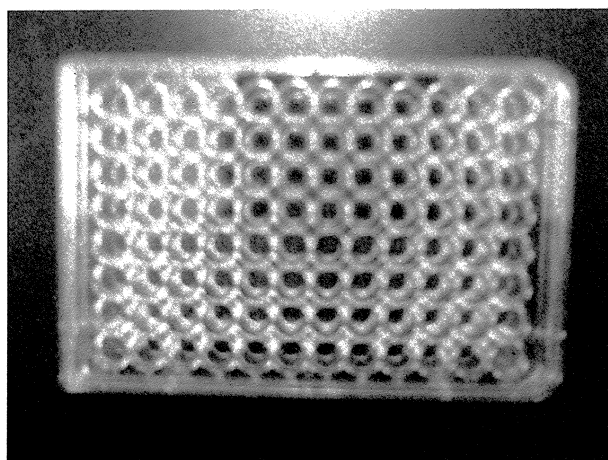


図 3-5 96 穴マイクロプレート

で単層ができる．MEM 培養液で培養する理由は，培養液の濃度を調整することができるためである．プラーク法(6.3.4 項参照)を行う場合，ウイルスの拡散を抑えるための寒天を用いる．その際，通常培養液の 2 倍の濃度の培養液が必要になるため，濃度調整が自由にできる粉末の MEM 培地が最適である．

### 3.3.4 Vero 細胞数の測定法

細胞数を測定する方法には血球計数盤を用いる方法と吸光度を測定する方法がある．これらの方法を用いることによって細胞の生存率や増殖率を調べることができる．

#### (1) 血球計数盤<sup>[54]</sup>

細胞懸濁液中に存在する細胞数を算定する基本的な手法として血球計数盤を用いる．採取した細胞懸濁液を遠心分離し，生理食塩水 1ml で再懸濁する．その中に死んでいる細胞だけを染色する 0.1%トリパンブルー染色液 50 $\mu$ l を滴下し，よく攪拌する．これを直ちに，血球計数盤に数量を流し込み，光学顕微鏡で観察する．本研究では，図 3-6 に示した Thoma 血球計数盤を使用した．囲いの中の生きている細胞(○)と死んでいる細胞(●)を数える．この血球計数盤の場合，生細胞数 $\times 10^4$ 個が 1ml 中に存在した細胞数となり，生存率は(生細胞数 $\div$ 全細胞数) $\times 100(\%)$ で算出する．

例えば，図 3-6 の状態が光学顕微鏡で観察された場合，生細胞数は 6 個，死細胞は 1 個である．これを 1ml 中に換算するとそれぞれ  $6 \times 10^4$  個/ml， $1 \times 10^4$  個/ml となる．このときの生存率は 85%と算出できる．



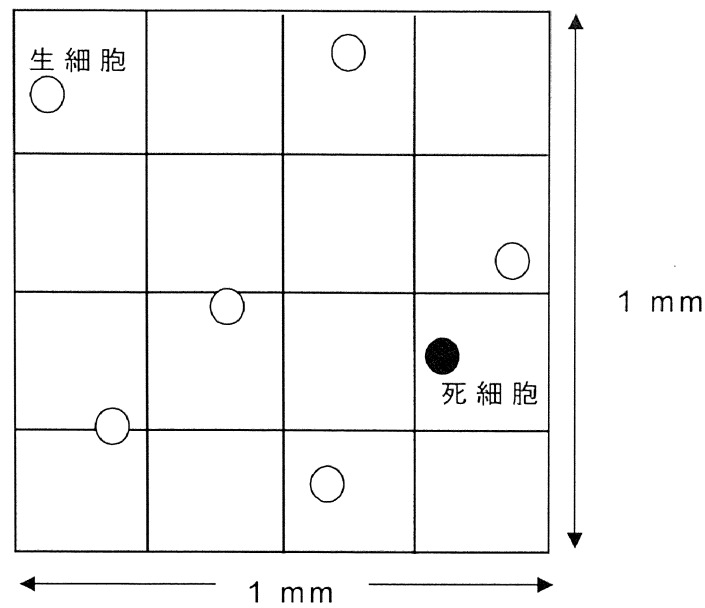


図 3-6 血球計数盤

#### (b) 細胞染色による吸光度測定法

吸光度測定による細胞数の算定方法は、細胞を剥がさずに行う。まず、単層培養された細胞に生細胞のみを染色するギムザ染色液で染色する。その後、2ml ジメチルエタノールで色素を抽出し、波長 550nm の吸光度を測定する。細胞数が多ければ抽出される色素も多くなり、吸光度が増大する。

### 3.4 単純ヘルペスウイルス [7,52]

ウイルス感染系モデルの供試ウイルスとして比較的取り扱いが容易な単純ヘルペスウイルス1型(herpes simplex virus type 1: HSV-1)を用いた．ここでは，HSVの特徴と増殖様式について具体的に述べる．

#### 3.4.1 HSVの特徴

単純ヘルペスウイルスは，ヒトに感染する病原性ウイルスであり，ヒトにおける感染の特徴は，皮膚，表皮，粘膜(口腔内，呼吸器，性器など)を通じて伝播すること，生体内のある部分に潜伏感染し，生体の様々な条件の変化によって再発してくること，生体の抵抗力と減弱したときには重症な全身感染を引き起こすことなどである．本研究で取り扱う1型は口内炎や口角ヘルペス，角膜ヘルペスを引き起こす．また，この他にも性病を引き起こす2型や帯状疱疹を引き起こすウイルスも存在する(表3-3)．

#### 3.4.2 HSV-1の増殖様式

このウイルスの性状は，エンベロープに覆われた正20面体のウイルスで，外形が150nmから200nmである．遺伝子はDNA

表3-3 ヒトヘルペスウイルスとその疾患

ウイルス	初感染	再 発	抵抗力減弱状態での感染
単純ヘルペスウイルスⅠ型	口内炎	口唇ヘルペス 角膜ヘルペス	ヘルペス性湿疹 全身性感染 成人の脳炎
単純ヘルペスウイルスⅡ型	性器ヘルペス	性器ヘルペス	全身性感染
水痘-帯状疱疹ウイルス	水痘	帯状疱疹	汎発性帯状疱疹肺炎

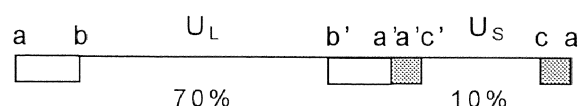


図 3-7 単純ヘルペスウイルス DNA の構造

で線状二本鎖, 分子量は  $80 \sim 160 \times 10^6$  である. この遺伝子から, ウイルス粒子を構成するカプシドやエンベロープのタンパク質 (後期蛋白または  $\gamma$  蛋白) のほかに, ウイルス遺伝子からの転写発現を調整する蛋白 (前初期蛋白または  $\alpha$  蛋白) ウイルス DNA の複製に関与する酵素蛋白 (初期または  $\beta$  蛋白) などがコードされている (図 3-7). また, ヘルペスウイルスの増殖は図 3-8 に示すように, 細胞表面のレセプタに吸着した後, 細胞の食作用によって取り込まれ, リソソーム内でエンベロープやカプシドが取り

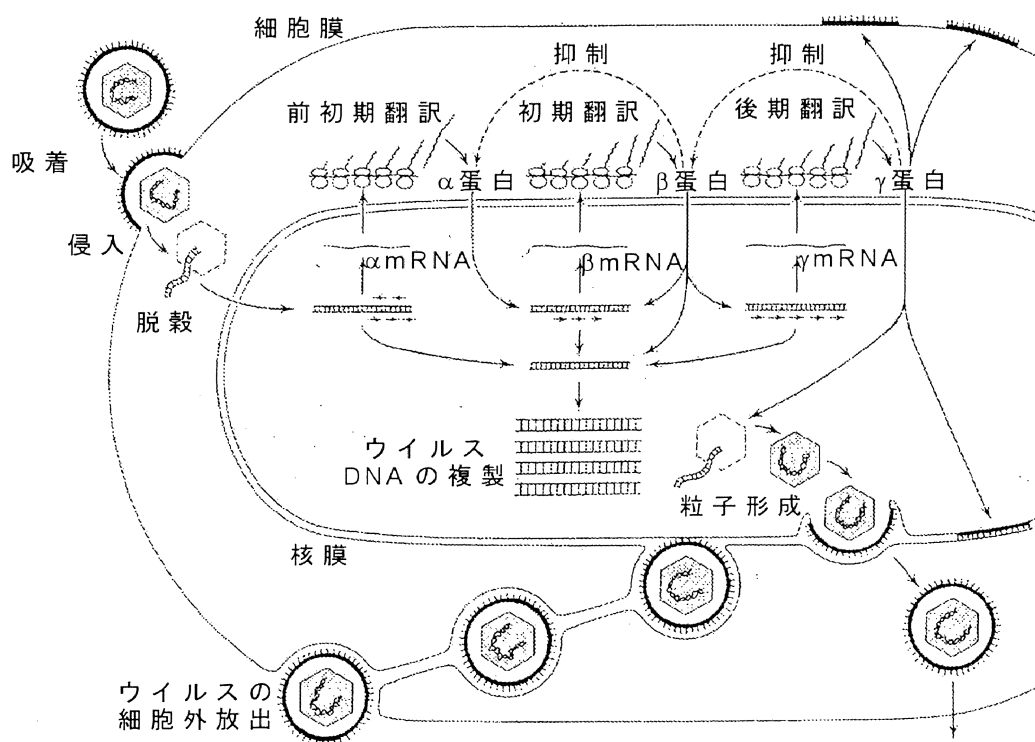


図 3-8 ヘルペスウイルスの細胞内増殖過程

除かれる．ウイルス DNA は細胞質から核内に至り，その一部分が転写されて mRNA となり，細胞質内のリボソームで少量の蛋白(前初期蛋白( $\alpha$ 蛋白)および初期蛋白( $\beta$ 蛋白))を作る．初期蛋白はウイルス DNA の合成に必要な酵素類(チミジンキナーゼ，DNA ポリメラーゼなど)で，複製された DNA はやがて，再び転写，翻訳されてカプシドやエンベロープなどの後期蛋白( $\gamma$ 蛋白)を作る．エンベロープ蛋白は細胞の核膜内にできるため，ウイルス粒子は核膜をかぶる形でエンベロープを得て，細胞内に放出される．ここまでに要する時間は 14~16 時間とされている．やがて，細胞を死滅させて外に拡散し，次の細胞へと感染を繰り返す．このときの細胞の死滅は，細胞変性効果(Cytopathic effect: CPE)と呼ばれ，図 3-9 の写真のような病変が見られる．

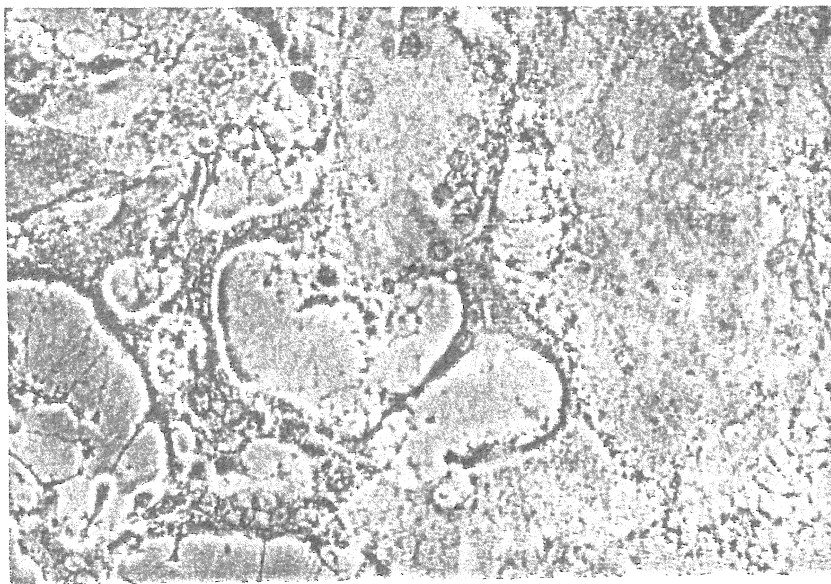


図 3-9 細胞変性効果

### 3.5 ウイルス感染系モデルの作製

実際に Vero 細胞と HSV-1 の感染系に ELF 磁場を曝露する場合，次のことを考慮して試料を作製する必要がある．

- 1) ウイルスが外に漏れないこと．
- 2) Vero 細胞を 5%CO<sub>2</sub> インキュベータ(37 度)内で培養するのとほぼ同じ環境を作ること．
- 3) 本研究で用いる磁場発生装置は，地面と平行に磁場が発生するため，Vero 細胞の単層を垂直にすること．

が求められる．

そこで，これらの条件を満たすように図 3-10 のような試料を作製した．これは，試験管に HSV-1 浮遊液を 10ml 入れ，その中にガラス板に単層培養した Vero 細胞を入れたものである．

次章以降でこのモデルの具体的な作製方法と有効性について述べていく．

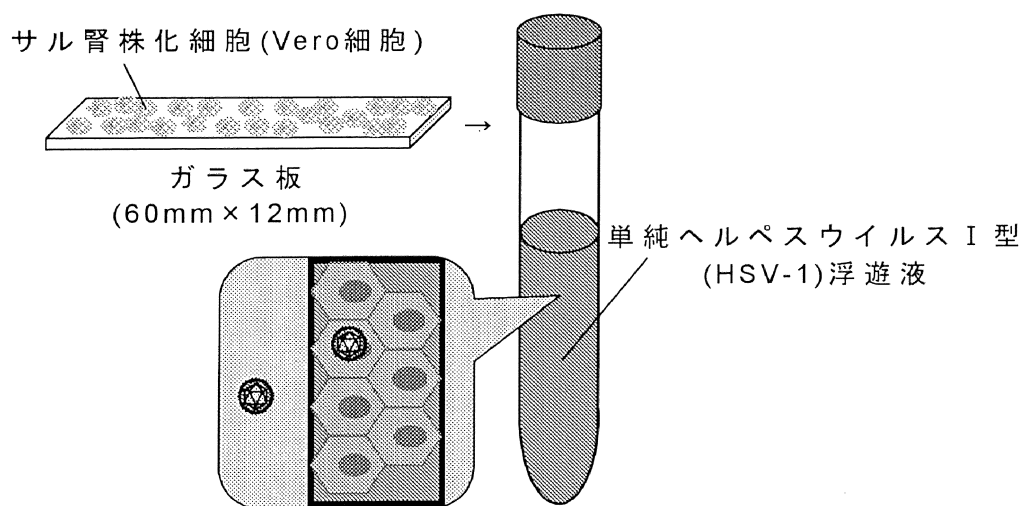


図 3-10 ウイルス感染系モデル

## 第4章

# Vero細胞に及ぼす50Hz磁場曝露の影響

本研究ではVero細胞とHSV-1とのウイルス感染系をモデルにした。ウイルス感染はVero細胞のような被感染細胞との相互作用によって行われる。つまり、Vero細胞の活性がウイルス増殖に関与する。この章では、ELF磁場の中でも特に、商用周波数である50Hzの変動磁場に着目し、Vero細胞の増殖に及ぼす影響を検討している。

## 4.1 Vero 細胞をガラス板に単層培養する方法

Vero 細胞の増殖に及ぼす 50Hz 磁場の影響を調べるために、次の準備を行う。図 4-1 のようにガラスシャーレ(直径 70mm)にガラス板(縦 60mm×横 12mm×厚さ 1.2mm)を 5 枚並べて乾熱滅菌しておく。その中に 5%FBS-RPMI1640 培養液を 8ml 入れる。次に 75mm<sup>2</sup> 培養瓶で単層培養した Vero 細胞を剥がし、5%FBS-RPMI1640 培養液 3ml で懸濁し、この 2ml をガラスシャーレに加えて 10ml とする。これを CO<sub>2</sub> インキュベータ内(37℃)で一晩のみ培養し、ガラス板に Vero 細胞が付着する程度にする。この操作によって Vero 細胞は密集することなく増殖させることができる。

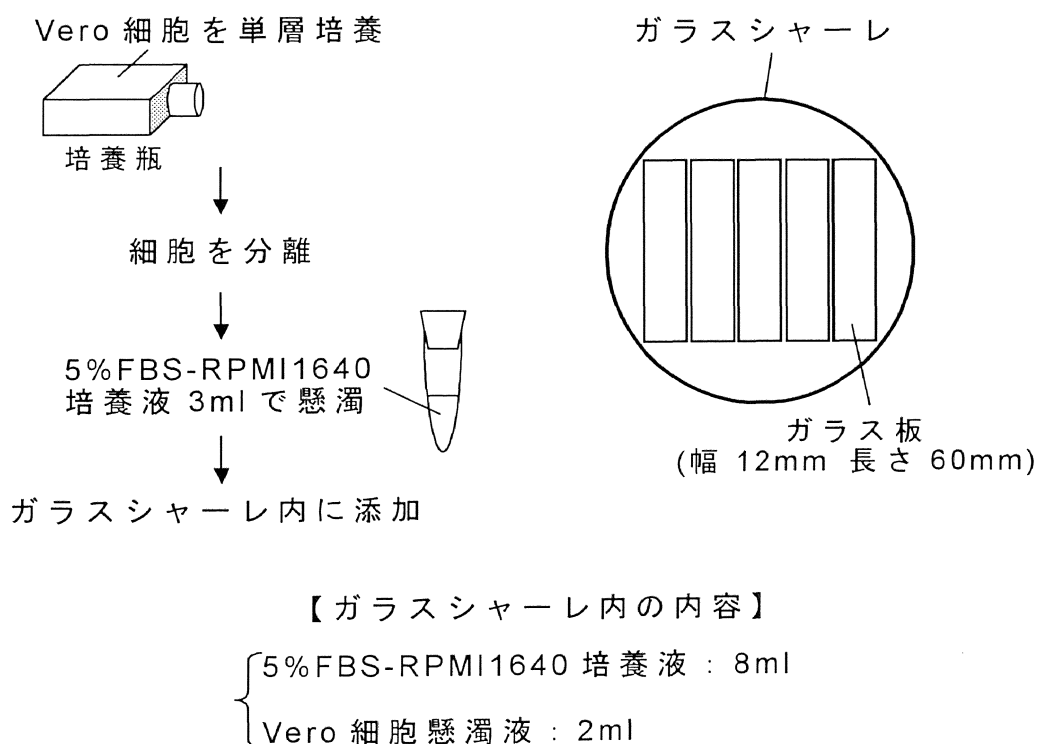


図 4-1 ガラス板を用いた Vero 細胞の培養

## 4.2 磁場曝露装置

本研究では図 4-2 のように構成した磁場曝露装置を用いて Vero 細胞に ELF 磁場を曝露した。一對の電磁石を 50mm 間隔で直列につなぎ、交流安定化電源を接続した。周波数 50Hz、電圧  $77.5V_{p-p}$  の正弦波交流電流を電磁石に通電すると、50Hz 磁場で最大磁場強度  $60\pm2mT$  が発生する。その磁場の分布は図 4-3 に示すように、鉄心の手前から 20~80mm までは均一となっている。

電磁石間に設置した磁場曝露用水層は Vero 細胞の培養温度を保つためのもので、恒温槽( $37\pm0.5^{\circ}C$ )からポンプを用いて温水をくみ上げて循環させ、同じ水温に保つようにした。

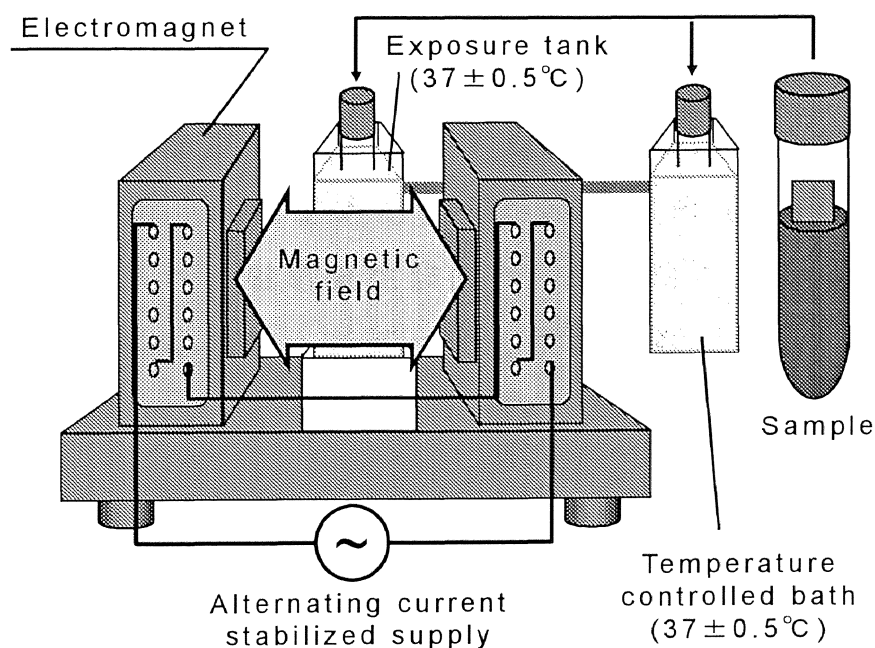


図 4-2 磁場曝露装置の概略図



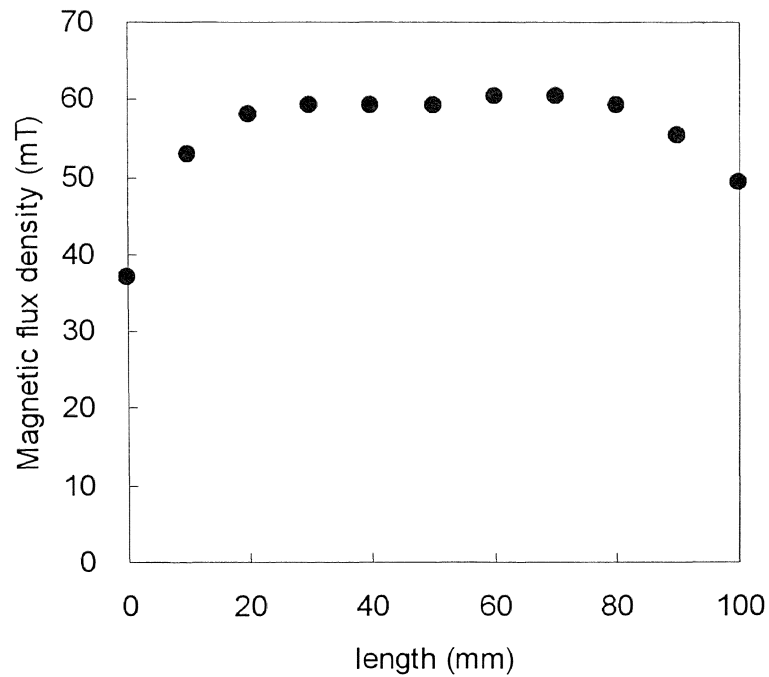


図 4-3 50Hz 磁場の強度分布

本研究では，商用周波数である 50Hz 磁場に着目し，磁場強度は，WHO が暫定的に定めた安全基準 5mT の 10 倍以上の磁場強度を視野に入れ，磁場発生装置の最大強度である 60mT を基準とし，ELF 磁場の生体影響について検討する．

### 4.3 実験方法

Vero細胞に感染するHSV-1の増殖に及ぼす50Hz磁場の影響を検討する際、Vero細胞に対する50Hz磁場の影響を把握する必要がある。そこで、Vero細胞に磁場を曝露する方法と条件について述べる。

#### 4.3.1 試料作製と磁場曝露条件

5%FBS-RPMI1640培養液を試験管に一本あたり10ml入れ、Vero細胞を付着させたガラス板を1枚ずつ入れた。このとき、試験管を密栓しておくことによって5%CO<sub>2</sub>インキュベータで培養することと同じ効果が得られる<sup>[5]</sup>。これを2本ずつ対照群と曝露群に分け、曝露群に50Hz 60mT磁場を48時間曝露した。磁場を曝露する方向は、図4-4に示すようにガラス板の細胞面に対して磁束が垂直になるようにした。曝露開始から24、48時間目にガラス板を両群から1枚ずつ取り出し、Vero細胞の細胞数を測定した。なお、残り1枚は曝露開始直後(0時間目)の細胞数を確認するために用いた。

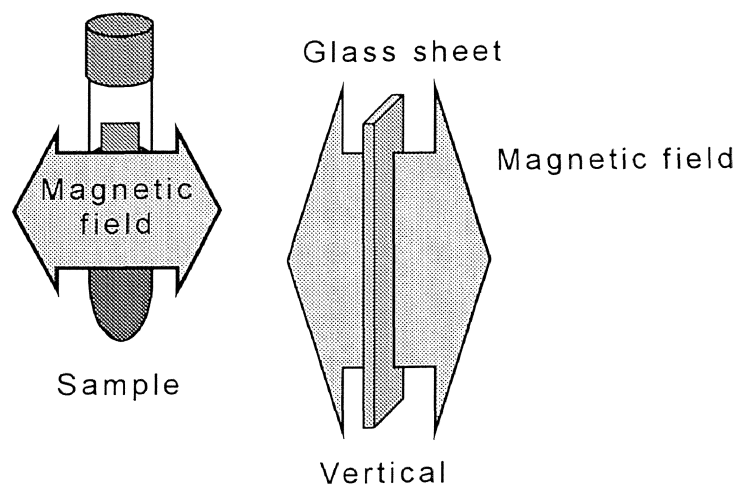


図 4-4 50Hz 磁場の曝露方向

#### 4.3.2 Vero 細胞の増殖率の測定

増殖率を客観的に観察するために, 3.2.3 項で述べた吸光度法を用いた. 0 時間目の Vero 細胞の吸光度の値を基準とし, 24 時間目の吸光度および 48 時間目の吸光度の値が何倍になっているかを算出し, Vero 細胞の増殖率を求めた.

## 4.4 Vero 細胞の増殖に及ぼす 50Hz 磁場曝露の結果

ウイルス感染は Vero 細胞との相互作用で成り立っていることから, 50Hz 60mT 磁場曝露中の Vero 細胞の増殖に影響があるのか否かを検討するために, 増殖率を算出した.

Vero 細胞に及ぼす 50Hz 磁場の影響の結果を図 4-5 に示す. この図は 0 時間目の細胞数を基準に何倍に増加したかを比率で表したものである. 24 時間目を見ると約 2 倍, 48 時間では約 4 倍になっていることが確認できた. また, 対照群と曝露群とを比較したところ, 細胞数に有意差は認められなかった. このことから, 50Hz 60mT 磁場は Vero 細胞の増殖に影響を及ぼさないことがわかった.

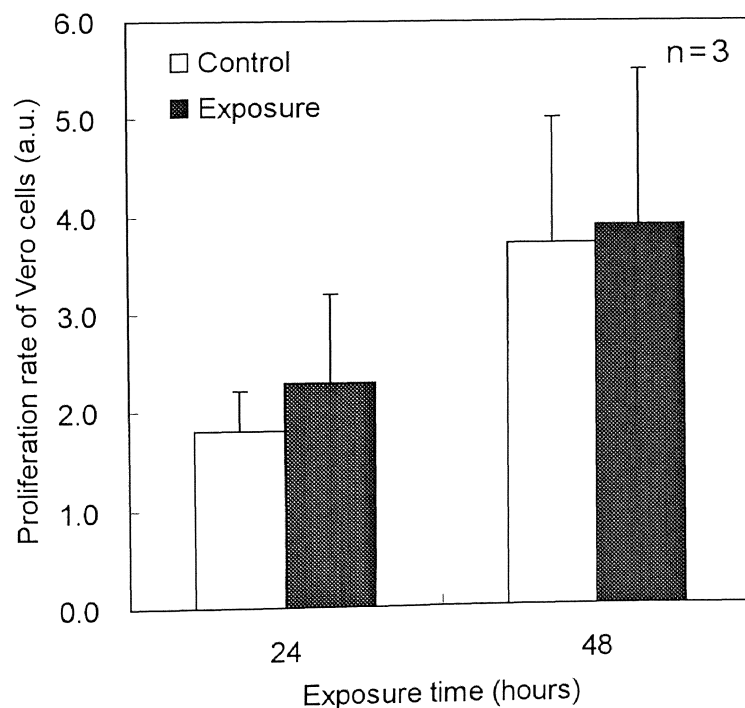


図 4-5 Vero 細胞の増殖率

## 4.5 Vero 細胞に及ぼす 50Hz 磁場曝露の影響に関する検討

Vero 細胞に感染する HSV-1 の増殖に及ぼす ELF 磁場の影響を検討する際に，被感染細胞である Vero 細胞自体の ELF 磁場の影響を把握する必要があった．ガラス板に単層培養した Vero 細胞に対して商用周波数である 50Hz における磁場強度 60mT 磁場を曝露した．その結果，Vero 細胞の増殖には差異が認められなかった．

細胞は，細胞分裂によって増殖する．細胞分裂とは，1 個の母細胞が 2 個の娘細胞に分かれることである．この分裂を繰り返して細胞を増殖させるためには，分裂に先立って，娘細胞への DNA を合成する必要がある．また，RNA や分裂に必要なタンパク質も合成しなくてはならない．これら一連の出来事の後で分裂が起こり，また，同じことが繰り返される．このような分裂に関わる周期のことを細胞周期という．図 4-6 に示す細胞周期のうち，実際に分裂する時期のことを M 期，DNA 合成期のことを S 期と呼ぶ．M 期のあとに G1 期と S 期の後に G2 期

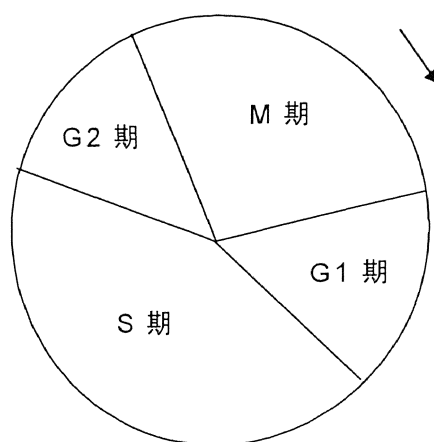


図 4-6 細胞周期

がある．G1 期は遺伝情報の発現が主に行われ，G2 期では直接分裂に使われる物質の合成などが行われる．細胞周期の移行はサイクリンおよび cdk と呼ばれる一連のタンパク質因子の働きによって調節されている<sup>[56]</sup>．

Vero 細胞では，図 4-5 の結果を見ると，24 時間で増殖率が約 2 倍，48 時間で約 4 倍になっていることから，Vero 細胞の細胞周期は 24 時間であることがわかった．さらに，磁場曝露によって細胞の増殖率に変化が見られなかったことから，50Hz 60mT 磁場は細胞周期を変化させない可能性が示され，細胞分裂に関わる機能には影響を及ぼさないことが明らかとなった．

## 第 5 章

# HSV-1 に及ぼす 50Hz 磁場曝露の影響

本研究では Vero 細胞と HSV-1 とのウイルス感染系をモデルにした。ウイルスは被感染細胞に感染してはじめて増殖することができる。つまり、ウイルスは単体では増殖することができず、細胞が存在しない培養液中では、コロイド粒子として存在する<sup>[57]</sup>。第 4 章では被感染細胞である Vero 細胞側の磁場影響を検討したが、この章では、感染系モデルの HSV-1 側の磁場影響について検討する。

## 5.1 HSV-1 の基本操作<sup>[58]</sup>

ウイルスを得るためには，使用するウイルスを培養し，保存しておく必要がある．また，培養によって得られたウイルスの粒子数を把握しておくことも基本的な操作である．ここでは，本研究で用いる HSV-1 の培養法と定量法について述べる．

### 5.1.1 HSV-1 の培養法

ウイルスは，前述のように生きた細胞に寄生して増殖する．したがって，ウイルスを増殖させるためには，生きた細胞が必要となる．ただし，ウイルスが感染できる細胞の種類は一般的に限定されており，最も適するものを選択しなければならない．

HSV-1 の培養には，先に述べた Vero 細胞を用いた．図 5-1 に

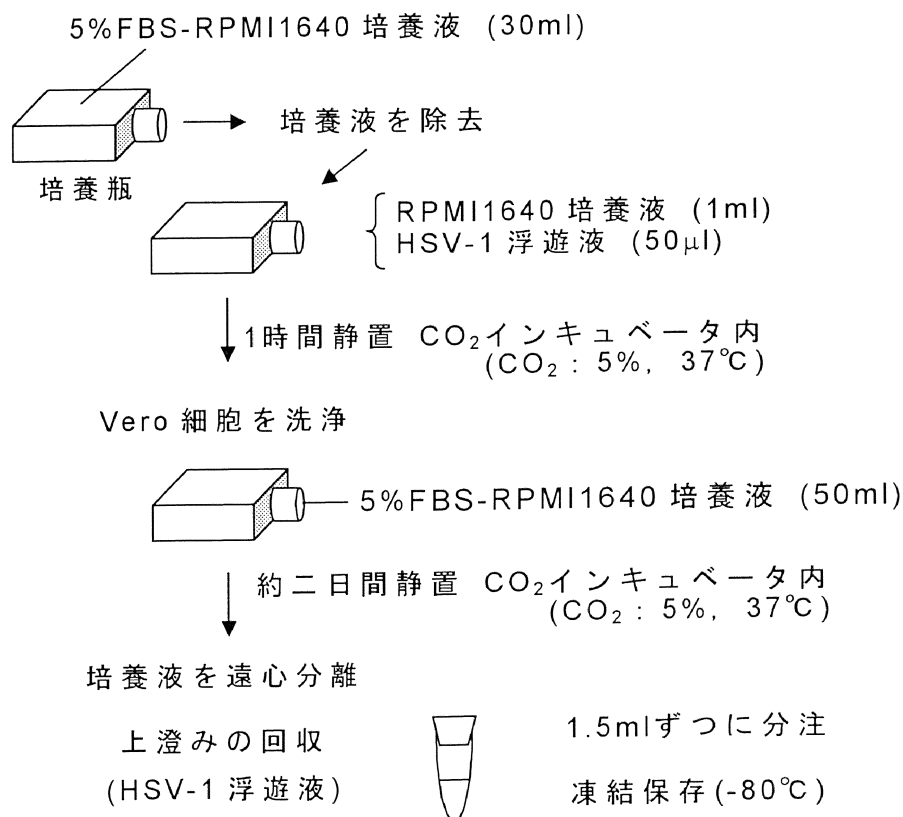


図 5-1 HSV-1 浮遊液の作製



HSV-1 の培養手順を示す．まず，ウシ胎児血清(FBS)が 5%含まれた RPMI1640 培養液 30ml で，Vero 細胞を培養瓶(75cm<sup>2</sup>)に単層培養した．その後，培養液を取り除き，Vero 細胞を洗浄し，RPMI1640 培養液を 1ml 入れる．次に，凍結保存された HSV-1 を解凍し，10<sup>4</sup> 個程度に希釈する．この HSV-1 浮遊液を培養瓶に 50μl 接種し，37℃に保温された CO<sub>2</sub> インキュベータ内で Vero 細胞に HSV-1 を吸着させた．このとき，15 分毎に攪拌し，合計 1 時間静置する．その後，接種した HSV-1 浮遊液を取り除き，5%FBS-RPMI1640 培養液を 50ml 入れ，37℃の CO<sub>2</sub> インキュベータ内で約 2 日間培養した．培養後，HSV-1 の感染によって発生する細胞変性効果(cytopathic effect: CPE)を確認した後，この培養液を遠心分離し，HSV-1 が含まれた上澄みを回収することで，HSV-1 浮遊液を得た．これを 1.5ml ずつ分注してディープフリーザ(-80℃)で凍結保存した．

### 5.1.2 HSV-1 の定量法

ウイルスの定量は，100%組織培養感染価(TCID<sub>100</sub>/ml)を測定する方法を用いた．この方法は Vero 細胞に HSV-1 が感染することで発生する CPE を利用した定量法である．まず，HSV-1 浮遊液を適宜に希釈した後，さらに図 5-2 のように 2 倍段階希釈し，あらかじめ Vero 細胞が単層培養されたマイクロプレート(96 穴)に，各希釈段階の溶液を 50μl/穴で接種し，37℃で 1 時間吸着させた．その後，希釈液を取り除き 5%FBS-RPMI1640 培養液を 0.2ml 入れ，CO<sub>2</sub> インキュベータ(37℃)内で 48 時間培養した．培養後，CPE がどの希釈段階まで現れているのかを光学顕微鏡で観察した．本研究では，図 5-3 のように A 行と B 行に接種し，CPE が現れる最終希釈段階を 100%組織培養感染価(100% tissue culture infectious dose: TCID<sub>100</sub>)として表した．感染価は，

活性を有する HSV-1 が多ければ大きい値となり，逆に少ないと小さい値になる．

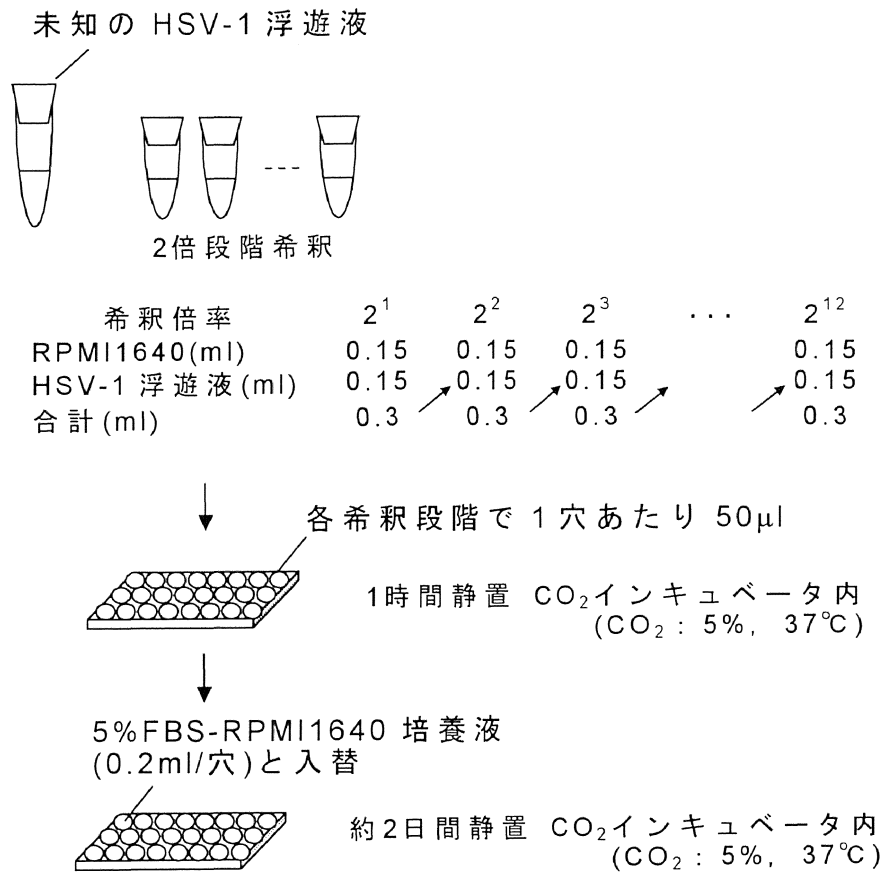


図 5-2 HSV-1 の定量

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

↑  
最終希釈段階

+ : CPE あり  
- : CPE なし

図 5-3 100%組織培養感染価の定義

## 5.2 HSV-1 への 50Hz 60mT 磁場曝露の方法

Vero 細胞に感染する HSV-1 の増殖に及ぼす 50Hz 60mT 磁場の影響を検討するためのもう一つの要素である HSV-1 自体の磁場影響について検討する．以下にその方法について述べる．

Vero 細胞に HSV-1 を感染させる場合の温度環境は，細胞を培養するための最適温度である  $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$  に設定した．それに伴って，HSV-1 に対する温度の影響が懸念される．さらに，HSV-1 が Vero 細胞に吸着させるには 1 時間が必要となるため，その間で HSV-1 の感染価が低下するの可否かを調べ，また， $37^{\circ}\text{C}$  では何時間で感染力が失われるのかを調べる．さらに，50Hz 磁場曝露時の HSV-1 の感染価の変化を確認する．

### 5.2.1 HSV-1 浮遊液の作製

HSV-1 自体に磁場の影響があるのかを調べるために，凍結保存しておいた HSV-1 を解凍し，感染価が低下しないように  $4^{\circ}\text{C}$  以下に保温する<sup>[55]</sup>．試験管に RPMI1640 培養液で  $10^5$  個/ml になるように希釈して 10ml の HSV-1 浮遊液を作製した．

### 5.2.2 磁場曝露条件

作製した HSV-1 浮遊液を対照群と 50Hz 60mT 磁場曝露群に分け，それぞれ図 4-2 に  $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$  で 24 時間静置した．HSV-1 の経時的変化を捉えるために，HSV-1 浮遊液から 0，1，4，8，16，24 時間目に 0.2ml ずつ採取し，その中に含まれる HSV-1 を定量した．

### 5.3 50Hz 60mT 磁場を曝露した場合の HSV-1 感染価の変化

37±0.5℃で高濃度の HSV-1 浮遊液を対照群と曝露群に分け、HSV-1 自体に磁場が影響するのかどうかを調べた結果を図 5-4 に示す。磁場曝露の有無に関わらず、曝露開始から数時間は HSV-1 の感染価に変化は見られなかったが、4 時間を経過すると急激に HSV-1 の感染価が低下し、16 時間程度でほぼ感染価が失われた。感染価とは HSV-1 の感染力と同じ意味であり、37℃の環境下では 4 時間で HSV-1 の感染力は失活することがわかった。このことから、HSV-1 の感染力は温度によって失われるが、50Hz 60mT 磁場の影響は受けないことが明らかとなった。

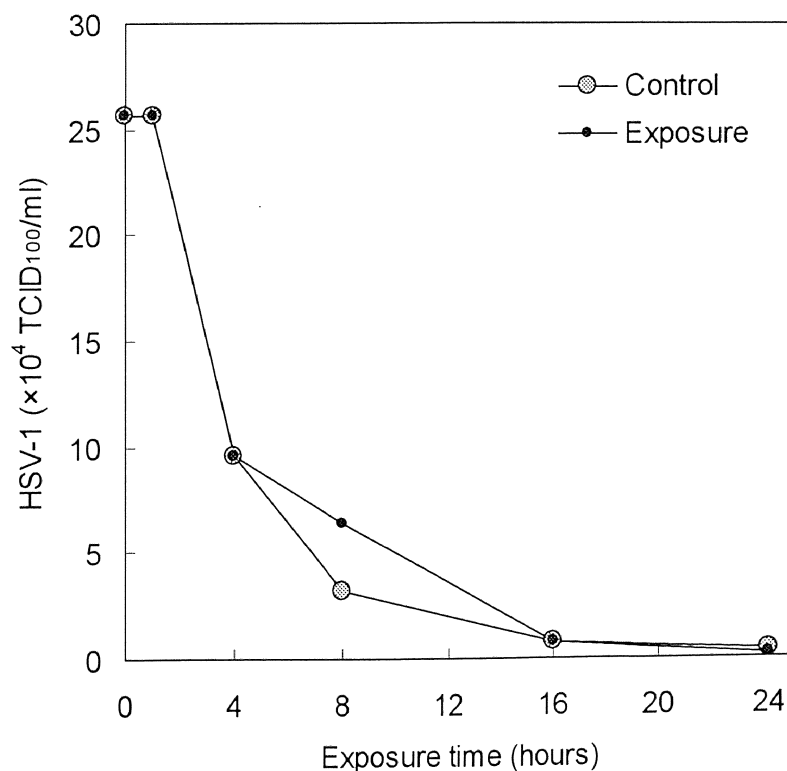


図 5-4 HSV-1 の感染価の経時変化(37℃)

## 5.4 HSV-1 に及ぼす 50Hz 磁場曝露の影響に関する検討

Vero 細胞と HSV-1 の感染系に関する ELF 磁場の影響を検討する要素として、HSV-1 自体への作用を把握することが重要であった。そこで、HSV-1 のみに 50Hz 60mT 磁場を 37℃ の環境下で曝露した結果、50Hz 60mT 磁場曝露の有無に関わらず、HSV-1 感染価は、4 時間程度で急激に低下し、24 時間後の感染価はほとんどなくなった。感染価の低下の原因は温度にあり、HSV-1 は熱に弱く、感染力が失活しやすいとする定説に一致する。また、50Hz 磁場曝露による感染価は、対照群とほとんど同じ変化を示した。このことから、50Hz 磁場はウイルスの構造に変化を生じさせる可能性は低く、ウイルスが細胞に感染するための必要なウイルス表面のタンパク質に影響していないことを明らかにした。

以上に示した吸着に要する時間(1 時間)では感染力の低下は見られないこと、また、HSV-1 側の吸着や増殖機能に 50Hz 磁場の影響は認められなかったことを考慮すると、 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  で HSV-1 を Vero 細胞に感染させる場合に、最初の感染時における温度影響は無視することができる。

## 第 6 章

# Vero 細胞に感染する HSV-1 の増殖に及ぼす 50Hz 磁場の影響

ウイルス感染は，被感染細胞への吸着に始まり，細胞の機能を利用してウイルス遺伝子や蛋白質を合成し，それらが組み立てられて細胞外に放出するという段階を経て行われる．前章では被感染細胞である Vero 細胞とそれに感染する HSV-1 自体の 50Hz 磁場の影響を検討し，各々に影響はほとんど無いことを明らかにした．この章では，Vero 細胞に感染する HSV-1 の増殖に 50Hz 磁場の影響があるのか否かを検討する．

## 6.1 ウイルス感染過程の定義

第3章で述べたように、Vero 細胞に感染する HSV-1 は 1)吸着, 2)侵入, 3)複製, 4)組立て, 5)放出の過程を経て増殖する. 本研究のように実験的に感染を成立させた場合, Vero 細胞に HSV-1 が吸着・侵入させるには1時間で十分である. また, ウイルスの増殖に費やされる時間は, 最低でも 14~16 時間以上が必要である.

本研究では Vero 細胞に感染する HSV-1 の増殖過程を図 6-1 のように, 1)吸着と 2)侵入の段階を「吸着期」, 3)自己複製から 5)放出までの段階を「増殖期」と定義した.

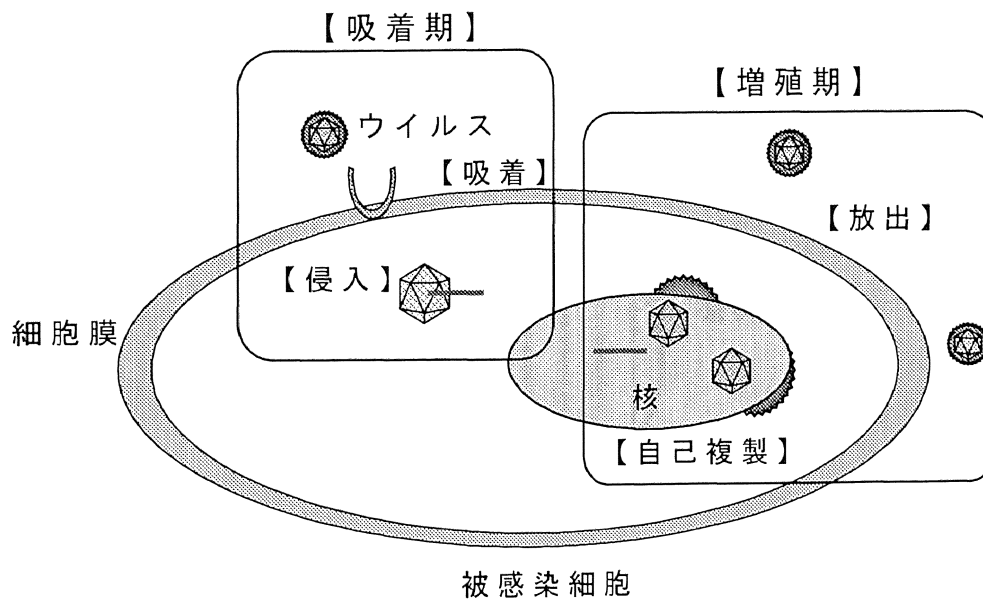


図 6-1 ウイルスの増殖過程の定義

## 6.2 ウイルス感染系試料

Vero 細胞に HSV-1 を感染させるためには, 同一空間に両者が存在しなければ起こり得ない. この原則を試験管内で成立させ, ウイルス感染への ELF 磁場の影響を検討する. ここではその方法と Vero 細胞に接種する HSV-1 数を検討する.

### 6.2.1 Vero 細胞に HSV-1 を感染させる方法(試料作製)

図 6-2 のようにガラスシャーレ(直径 70mm)にガラス板(縦 60mm×横 12mm×厚さ 1.2mm)を 5 枚並べて滅菌しておく. その中に 5%RPMI1640 培養液を 8ml 入れる. 次に 75mm<sup>2</sup> フラスコで単層培養した Vero 細胞を剥がし, 5%FBS-RPMI1640 培養液で 3ml の懸濁液を作製する. この懸濁液の 2ml をガラスシャーレに加えて 10ml とする. これにより二日間の培養で Vero 細胞が

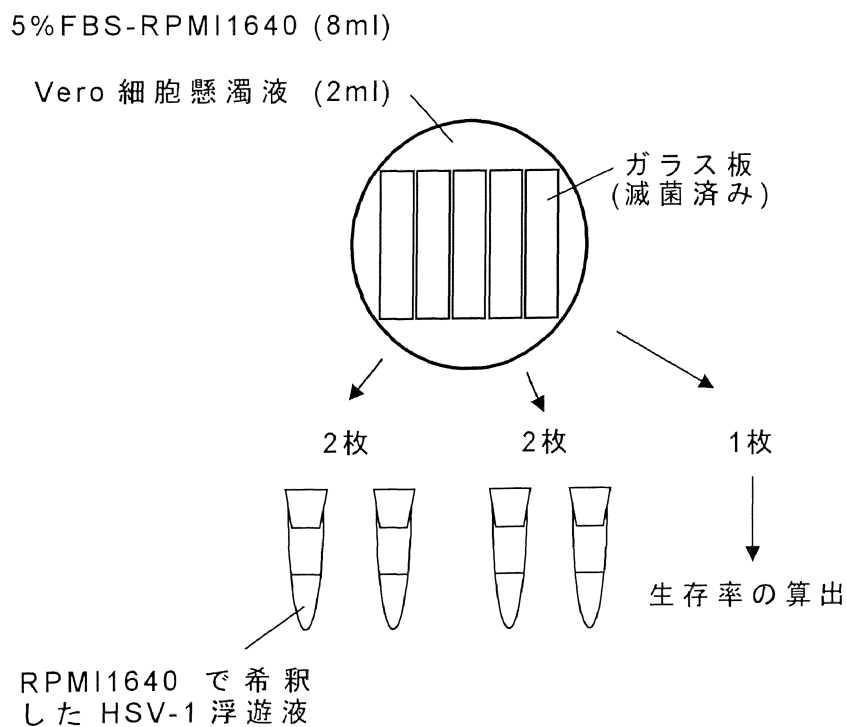


図 6-2 試料作製の手順



1枚当たり  $10^5$  個となる。

次に、凍結保存をしておいた HSV-1 を RPMI1640 培養液で適宜に希釈し、4本の試験管にそれぞれ 10ml 入れた。この試験管の中に、Vero細胞が付着したガラス板を1枚ずつ入れて感染を成立させた。なお、残り1枚はVero細胞の状態を把握するために用いた。

### 6.2.2 ガラス板に単層培養した Vero 細胞の生存率

ガラス板に単層培養した Vero 細胞の活性を客観的に知るために、細胞の生存率を指標にした。生存率は死細胞が多いほど低下していくため、Vero細胞の状態を指標になると考えた。

ガラス板に培養した Vero 細胞を 0.2%トリプシン溶液で剥離し、生理食塩水で懸濁した。さらに、死細胞のみを染色するトリパンブルー染色液を滴下しよく混ぜた。これを直ちに血球計数盤で生細胞数と死細胞数を測定し、その値から生存率を算出した。なお、Vero細胞をガラス板に培養した場合の生存率は90%以上である。

### 6.2.3 Vero 細胞に接種する HSV-1 感染価の決定

ガラス板に単層培養した Vero 細胞に対してどの程度の HSV-1 を接種することが最適であるかを調べる。

解凍した HSV-1 浮遊液を 10 倍ずつ段階希釈し、 $10^1 \sim 10^5$  個/ml の HSV-1 浮遊液を作製する。この中に、1枚ずつ Vero 細胞を入れ、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 1 時間静置し、HSV-1 を Vero 細胞に吸着させる。その後、HSV-1 浮遊液を取り除き、5%FBS-RPMI1640 培養液 10ml に入れ替える。再び、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で静置して、48 時間かけて HSV-1 を増殖させる。この間に、試験管内の培養液を 0.25ml ずつ 1, 15, 18, 24, 36, 48 時間目に採取し、増殖した HSV-1

を定量した．その結果を図 6-3 に示す． $10^1$ ， $10^2$  個/ml を接種した場合に 48 時間で増殖する傾向を示した． $10^3$ ， $10^4$  個/ml では 24 時間で増殖する HSV-1 の感染価が最大となり，それ以降は感染価が低下する傾向が見られた．また， $10^5$  個/ml を接種した場合は，15 時間で最大となり，それ以降は増殖した HSV-1 の感染価が低下した．この結果から，Vero 細胞に接種する HSV-1 の粒子数が多いほど，早い時間に HSV-1 増殖粒子の感染価が最大となり，それ以降は，感染価が低下することがわかった．

本研究では，ウイルス感染に対して 50Hz 磁場の影響を検討することを目的としている．そのため， $10^1$ ， $10^2$  個/ml では全ての Vero 細胞に感染した HSV-1 の増殖に時間がかかるため，増殖にばらつきが生じる可能性があり，接種量としては不適格である．また， $10^5$  個/ml では全ての Vero 細胞に一斉に増殖す

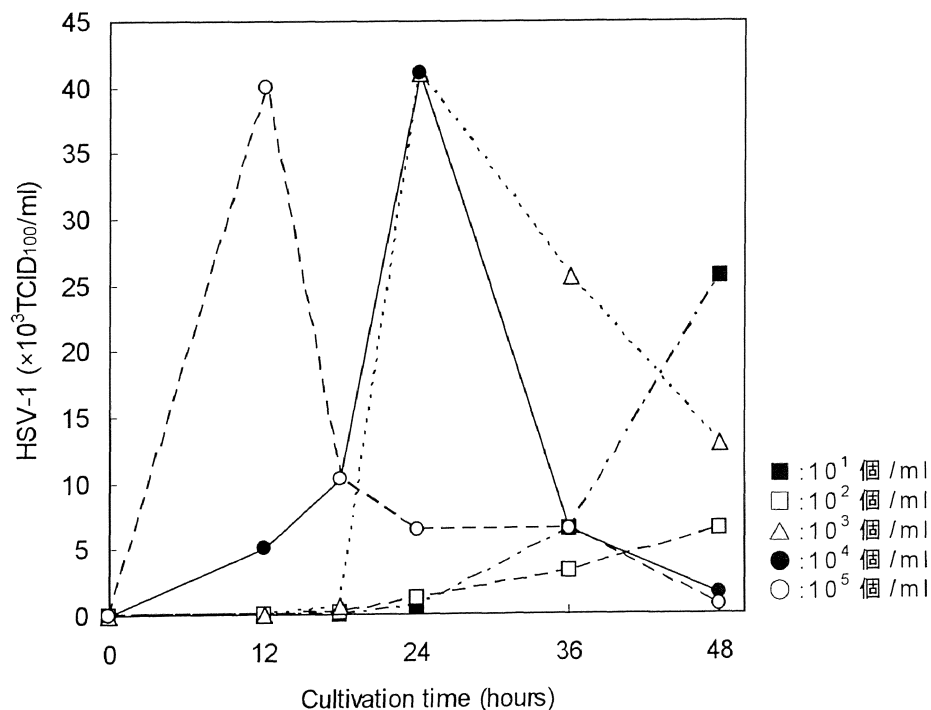


図 6-3 HSV-1 接種量に対する増殖変化

る点では良いが、50Hz磁場曝露によって増殖にどのような変化が生じるのかは不明であり、もし、磁場曝露によって増殖が促進した場合に解析が難しくなると考えられる。

したがって、 $10^3$ 、 $10^4$  個/mlの接種量が良いことになる。ここでさらに、実験的なウイルス感染では、感染多重性 (Multiplicity of infection: M.O.I)を考慮する必要がある、最低でも  $M.O.I \geq 1$  が要求される。感染は細胞1個に対してウイルス粒子は1つのみ吸着する性質がある。M.O.Iとは、被感染細胞数とそれに感染させるウイルス数との関係によって感染が繰り返されるかを示した値である。例えば、細胞数よりもウイルス数が多い場合 ( $M.O.I < 1$ )、最初の感染で生き残る細胞が存在することになる。感染したウイルスが増殖するとその生き残った細胞に次々と感染を繰り返し、細胞が全滅するまで行われる。反対に  $M.O.I \geq 1$  では、理論上全ての細胞に一斉に吸着して増殖が行われる<sup>[55]</sup>。つまり、 $10^3$  個/mlではM.O.Iは1以下となるため、多段増殖となってしまう。以上のことから、本研究では $10^4$  個/mlのHSV-1浮遊液をVero細胞に接種することに決定した。

## 6.3 ウイルス感染系モデルに対する 50Hz 磁場曝露の方法と条件

Vero 細胞に感染する HSV-1 の増殖に及ぼす 50Hz 磁場の影響を検討するために、次の三つの条件で観察する．1)Vero 細胞に HSV-1 が感染する際に 50Hz 磁場が作用するの否か、2)50Hz 磁場が感染過程のどの段階に作用しているのか、3)Vero 細胞が 50Hz 磁場に 24 時間曝露された場合、HSV-1 を受け入れるウイルス感受性に影響があるの否かを検討する．

### 6.3.1 感染過程全体への 50Hz 60mT 磁場曝露の方法

感染系試料 2 本を図 4-2 に示した磁場曝露装置の恒温槽(37±0.5℃)に対照群として静置した．また、曝露群として、恒温槽からポンプにより水を循環させて同じ温度に保った曝露用水層にも試料を 2 本静置した．なお、曝露用水槽には、50Hz 60mT 磁場を発生させてから静置した．

次に、HSV-1 を Vero 細胞に吸着させるため、まず 1 時間曝露し、その後、未感染のウイルスを取り除くために、5%FBS-RPMI1640 培養液に入れ替えた．再び試料を曝露装置に戻し、48 時間の磁場曝露を行った．

本感染系では、Vero 細胞から感染系試料の培養液中に HSV-1 が放出され、培養液中の HSV-1 濃度が高くなる．したがって、HSV-1 の増殖の経時的変化を観察するために、試料を装置に戻した時点から 1, 15, 24, 48 時間目に各試料から培養液を 0.25ml ずつ採取して HSV-1 を定量した．なお、1 時間目は HSV-1 の残存数、15 時間目は増殖し始めの数、24 時間目はその最大値、48 時間目は曝露終了時の増殖数を把握するためである．

### 6.3.2 感染過程の吸着期と増殖期に対する 50Hz 60mT 磁場曝露の方法

ウイルス感染は Vero 細胞への吸着に始まり放出までの過程を経て行われることから,本研究では吸着と侵入の段階を「吸着期」,自己複製から放出までの段階を「増殖期」とし,どの時期に磁場影響があるのかを検討する.

その条件は,図 6-4 のように 1)吸着期の 1 時間にのみ磁場曝露し,増殖期の 24 時間は曝露しない状態(吸着期曝露群), 2)吸着期には曝露せずに,増殖期の 24 時間にのみ磁場を曝露する状態(増殖期曝露群), 3)両期間に曝露する状態(全曝露群), 4)両期間を曝露しない状態(対照群)とし,これら四つの状態を一度に観察した.

### 6.3.3 24 時間曝露した Vero 細胞に感染する HSV-1 の増殖への 50Hz 60mT 磁場曝露の方法

Vero 細胞のウイルス感受性が磁場曝露によって変化するのかを調べるために図 6-5 に示す手順で実験を行った.

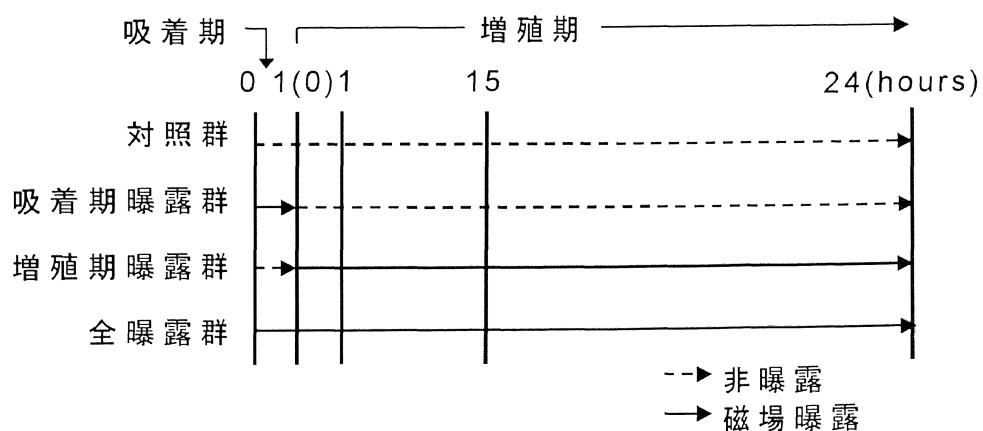


図 6-4 感染過程の磁場曝露時間

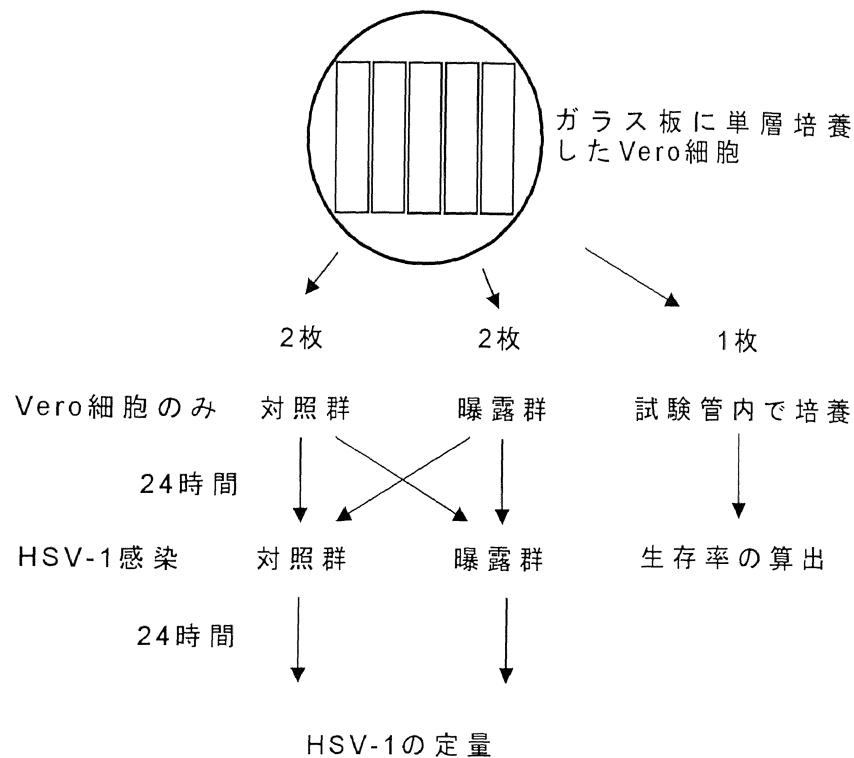


図6-5 磁場曝露の手順

ガラス板に単層培養した Vero 細胞を 5%FBS-RPMI1640 培養液 10ml が入った試験管に入れる．これを 5 本用意し，対照群と磁場曝露群に 2 本ずつ分ける．残り 1 本は細胞の状態を知るために生存率を測定するために用いる．曝露群には 50Hz 60mT 磁場で 24 時間曝露処理をした．その後，両軍の培養液を吸い出し，RPMI1640 培養液で  $10^4$  個/ml に調整した HSV-1 浮遊液 10ml と入れ替えた．次に，これらを再び磁場曝露装置に戻す．このとき，対照群と曝露群の各一本ずつを交換して静置する．この操作により，1)対照群，2)非曝露の Vero 細胞に感染した HSV-1 の増殖への磁場曝露，3)磁場曝露された Vero 細胞に非曝露で感染した HSV-1 の増殖，4)磁場曝露された Vero 細胞に感染した HSV-1 の磁場曝露の四つの状態を作製することができる．曝露

装置に静置後, Vero 細胞に HSV-1 を吸着させるため 1 時間おき, その後, 未感染の HSV-1 を取り除き, 5%RPMI1640 培養液 10ml に入れ替え, 24 時間目の HSV-1 の増殖数を測定した.

#### 6.3.4 プラーク法による HSV-1 の定量

ウイルスの定量は, 100%組織培養感染価(TCID<sub>100</sub>/ml)を測定する方法と一般的にウイルスの定量に用いられるプラーク(PFU/ml)を測定する方法を併用した.

プラーク法は, HSV-1 浮遊液を 10 倍段階希釈し, あらかじめ Vero 細胞が単層培養されたマイクロプレート(6 穴)に, 段階希釈されたそれぞれの溶液を 2.5ml 接種し, 37℃で 1 時間吸着させた. その後, 希釈液を取り除き 1%FBS-MEM 寒天培地を 3ml 入れて固め, CO<sub>2</sub> インキュベータ(37℃)内で 48 時間培養した. その後, 生きた細胞のみを染色する生理食塩水で 0.01%に薄めたニュートラルレッド染色液を 3ml 浸透させ, CO<sub>2</sub> インキュベータ(37℃)内で 6 時間静置する.

これによって感染している細胞は CPE が現れ, そこにプラークとして白い斑点状のものができる. ウイルスは一個の細胞に対して一個だけ感染するという特徴があるため, 一個のプラークがウイルス一個として数えることができる<sup>[58,59]</sup>.

## 6.4 50Hz 60mT 磁場曝露の結果

50Hz 60mT 磁場中で Vero 細胞に HSV-1 を感染させ、ウイルスの増殖に磁場が作用するのかどうかを検討し、次のような結果を得た。

### 6.4.1 HSV-1 増殖の経時的变化

50Hz 60mT 磁場曝露における HSV-1 増殖の経時的变化を図 6-6 に示す。対照群では、HSV-1 は 24 時間で増殖しているのに対し、曝露群ではその増殖が抑制されていることがわかった。この結果より、50Hz 60mT 磁場は本感染系に影響を及ぼすことが明らかとなった。

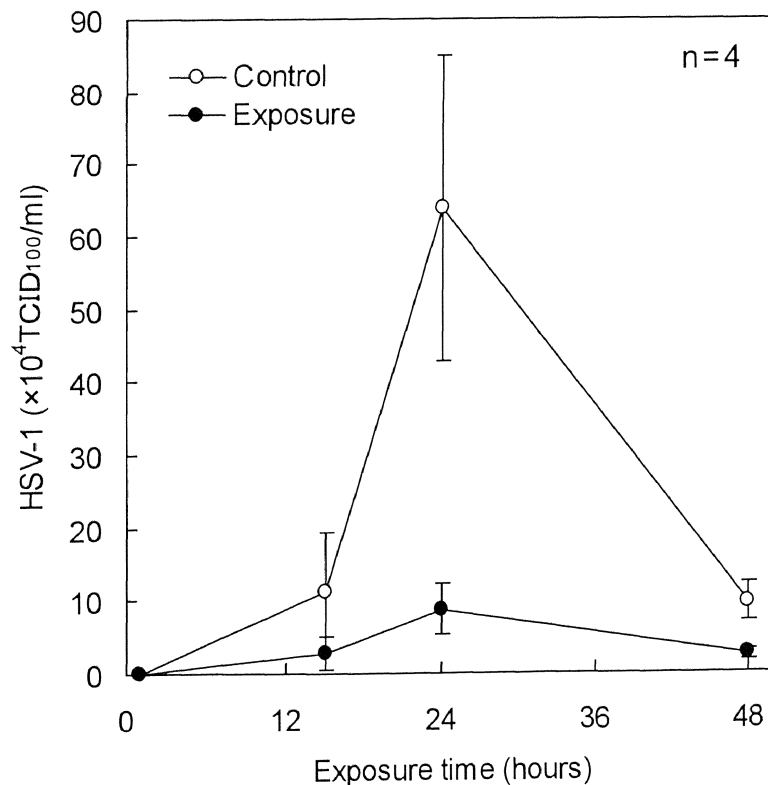


図 6-6 HSV-1 増殖の経時変化



### 6.4.2 各感染過程に 50Hz 60mT 磁場曝露した場合の HSV-1 増殖数

ウイルス感染過程を「吸着期(吸着と侵入)」と「増殖期(複製から放出まで)」の二つの段階に分け、1)吸着期の1時間にのみ磁場曝露し、増殖期の24時間は曝露しない状態(吸着期曝露群)、2)吸着期には曝露せずに、増殖期の24時間にのみ磁場を曝露する状態(増殖期曝露群)、3)両期間に曝露する状態(全曝露群)、4)両期間を曝露しない状態(対照群)とし、これら四つの状態を一度に観察した。その結果を図6-7に示す。この図は、四つの状態における増殖期の24時間後の HSV-1 増殖数を示しており、まず、対照群(Control)と全曝露群(Exposure)を比較すると後者のウイルス数の方が顕著に少ないことがわかった。これは、図6-6

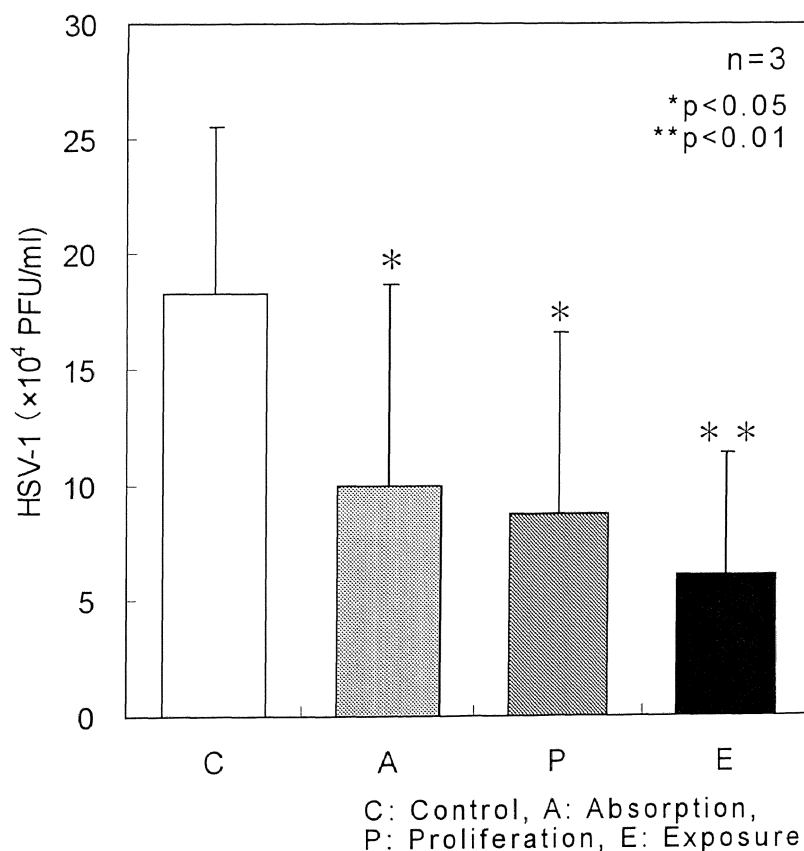


図6-7 各感染過程に及ぼす磁場影響

の24時間目に相当し、結果が一致した。また、対照群と吸着期曝露群(Absorption)および対照群と増殖期曝露群(Proliferation)とをそれぞれ比べた場合もその数は減少したが、全曝露群よりもその度合は小さいことがわかった。

このことから、50Hz 60mT磁場では、曝露時間が長いほどウイルスの増殖を抑制することがわかった。

### 6.4.3 24時間曝露したVero細胞に感染したHSV-1の増殖変化

50Hz 60mT磁場をVero細胞に24時間曝露した後、非曝露でHSV-1を感染させた結果を図6-8に示す。この図に示しているCは非曝露、Eは磁場を24時間曝露したものを表しており、1つ目の記号がVero細胞に対する処理、2つ目の記号がHSV-1

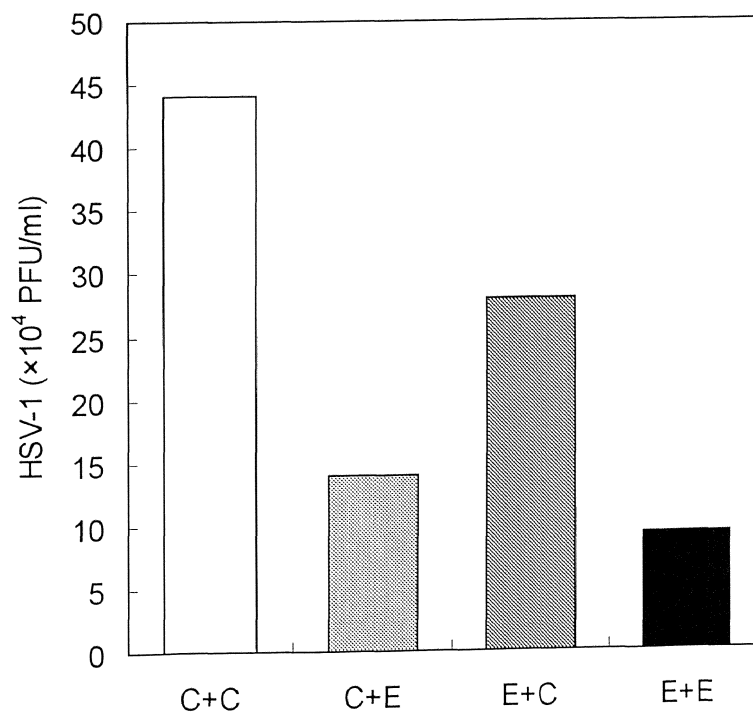


図6-8 24時間曝露したVero細胞に感染したHSV-1の増殖

感染に処理した磁場曝露条件を表す。

非曝露のVero細胞に非曝露でHSV-1が感染させた場合(C+C)と非曝露のVero細胞に50Hz 60mT磁場中でHSV-1を感染させた場合(C+E)を見るとHSV-1の感染価が後者の方が減少する傾向が現れた。これはこれまでに行ってきた実験条件であり，結果も一致している。また，C+Cと50Hz 60mT磁場を24時間曝露したVero細胞に非曝露でHSV-1を感染させた場合(E+C)を見ると24時間曝露されたVero細胞は，HSV-1の増殖を減少させることがわかった。さらに，C+Cと曝露したVero細胞にHSV-1を磁場中で感染させた場合(E+E)とを比較すると，増殖したHSV-1感染価に差が現れた。

非曝露のVero細胞に50Hz 60mT磁場中でHSV-1を感染させた場合(C+E)と50Hz 60mT磁場を24時間曝露したVero細胞に非曝露でHSV-1を感染させた場合(E+C)とを比較すると，後者の方がHSV-1の増殖数が多いことがわかった。このことから，ウイルス感染抑制作用は，Vero細胞自体の磁場影響よりも感染によるHSV-1増殖への磁場影響の方が大きく関与している可能性が考えられる。

以上のことから，50Hz 60mT磁場に24時間曝露されたVero細胞は，HSV-1に対する感受性が低下し，感染させにくい状態に変化した可能性が認められた。

## 6.5 ウイルス感染に対する 50Hz 磁場の作用に関する検討

ウイルス感染に及ぼす 50Hz 磁場の影響について、Vero 細胞と HSV-1 の感染系モデルを用いて調べた結果、50Hz 60mT 磁場を曝露することにより HSV-1 の感染価が低下したことを確認した。この結果について検討する。

### 6.5.1 HSV-1 感染価の経時的变化の特徴

図 6-6 の結果から 50Hz 60mT 磁場が HSV-1 の増殖を抑制したことがわかった。これは 24 時間目で顕著に差を確認することができた。このとき、試験管の中の Vero 細胞は、対照群の細胞よりも生き残っている数が多い可能性がある。つまり、24 時間目以降も HSV-1 は感染を繰り返し、感染価は増え続けることが予想された。しかし、それに反して 48 時間目には HSV-1 の感染価が低下した結果を得た。この原因について検討する。

まず、Vero 細胞に及ぼす 50Hz 60mT 磁場の影響を調べたところ、図 4-5 で示したように細胞増殖に変化は見られなかった。しかし、図 6-8 の C+C と E+C を比較したところ、50Hz 60mT 磁場を 24 時間曝露した Vero 細胞は、ウイルス感受性が低下することがわかった。このことから、24 時間目以降では Vero 細胞への感染が成立しにくいう状態になっていた可能性がある。一方、HSV-1 は図 5-4 で示したように  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  で 4 時間放置すると感染価が低下し、さらに 16 時間後にはほとんどの HSV-1 の感染力が失われることを明らかにした。

以上の結果を考慮すると、図 6-6 で見られた 24 時間以降の HSV-1 の感染価の減少原因は、24 時間の磁場曝露による Vero 細胞のウイルス感受性の低下と熱による感染力の失活が考えられる。したがって、ウイルス増殖の経時変化は Vero 細胞から放

出される HSV-1 と感染価が失活する HSV-1 との割合が関係していることを明らかにした。

### 6.5.2 各感染過程に及ぼす 50Hz 60mT 磁場の影響

ウイルスは一般的に被感染細胞との相互作用により増殖が可能であり、その様式は、1)被感染細胞への吸着、2)細胞内への侵入、3)自己複製、4)組立て、5)放出という段階を経る。本研究では、この感染過程の 1)と 2)を「吸着期」および 3)から 5)までを「増殖期」の二つの段階に分けて ELF 磁場の作用状況をそれぞれ観察したところ、50Hz 60mT 磁場曝露によって増殖した HSV-1 の感染価が減少したことを確認した。

このことから、増殖抑制の原因は次のようなことが考えられる。まず、吸着期のみに曝露すると HSV-1 の増殖数が減少したことから、Vero 細胞への HSV-1 の吸着数が少なくなったことが考えられる。ウイルスは、細胞表面の糖蛋白質に結合することで感染することができるが、このとき 50Hz 磁場が作用した場合、1)結合の阻害、2)結合した HSV-1 の分離の可能性が考えられる。これに関しては、ELF 磁場によって発生する誘導電流がこれらのような作用を示すことを報告した例がある<sup>[24]</sup>。また、増殖期のみに曝露した場合にも増殖抑制が見られたことから、ウイルスの自己複製による蛋白質合成が減少した、あるいは、ウイルスが作られても細胞外に放出されにくくなってしまった可能性が考えられる。従来の研究(2-3 節参照)でも、遺伝子発現による蛋白質合成や細胞膜への影響などが確認されていることから、ウイルス増殖の抑制作用の原因の一つとして考えることができる。

以上のように、本研究において 50Hz 磁場は少なくとも、ウイルス感染に対して増殖様式の一部に磁場が作用しているの

ではなく、全体に作用していることをはじめて明らかにすることができた。

### 6.5.3 50Hz 60mT 磁場を 24 時間曝露した Vero 細胞に感染する HSV-1 の増殖に及ぼす 50Hz 磁場の影響

図 6-8 に示した非曝露の Vero 細胞に非曝露で HSV-1 を感染させた場合(C+C)と 50Hz 60mT 磁場を 24 時間曝露した Vero 細胞に非曝露で HSV-1 を感染させた場合(E+C)の結果は、視点を変えたと 24 時間の 50Hz 60mT 磁場曝露によって、Vero 細胞が HSV-1 を感染させにくい状態に変化したことを示している。このような状態の Vero 細胞に HSV-1 を磁場中で感染させた場合(E+E)、曝露細胞に非曝露で感染させた場合(E+C)と比べて HSV-1 の増殖数が減少する傾向が認められた。

以上のことから、生体に対する 50Hz 磁場とウイルスとの複合的な影響の観点から検討した場合、50Hz 磁場に曝露された生体は、ウイルスに感染されにくくなる可能性が考えられる。

## 第 7 章

# ウイルス感染系モデルに対する 様々な磁場の生体影響

前章では 50Hz 磁場のウイルス感染への影響について検討し，感染抑制作用があることを明らかにした．ELF 磁場の生体影響に関する検討項目として磁場強度の閾値，誘導電流作用が挙げられる．この章では，50Hz 60mT 磁場以外の磁場をウイルス感染系に曝露した場合にどのような影響を示すのかを検討した．

## 7.1 50Hz 10mT 磁場のウイルス感染への影響

Vero 細胞に感染した HSV-1 は 50Hz 60mT 磁場で増殖が抑制された。磁場の感染への作用は強度に関係があるのかどうかを調べるため、60mT から 10mT 磁場に変更し、同じ各感染過程で曝露して 24 時間 HSV-1 を増殖させた結果を図 7-1 に示す。

ここで、対照群(C)と磁場曝露群(E)を比較すると、差は認められなかった。また、吸着期曝露群(A)および増殖期曝露群(P)と対照群を比べても差は見られなかった。

このことから、50Hz 磁場の感染への影響は、磁場強度 10mT 以下で確認される可能性が低いことを明らかにした。

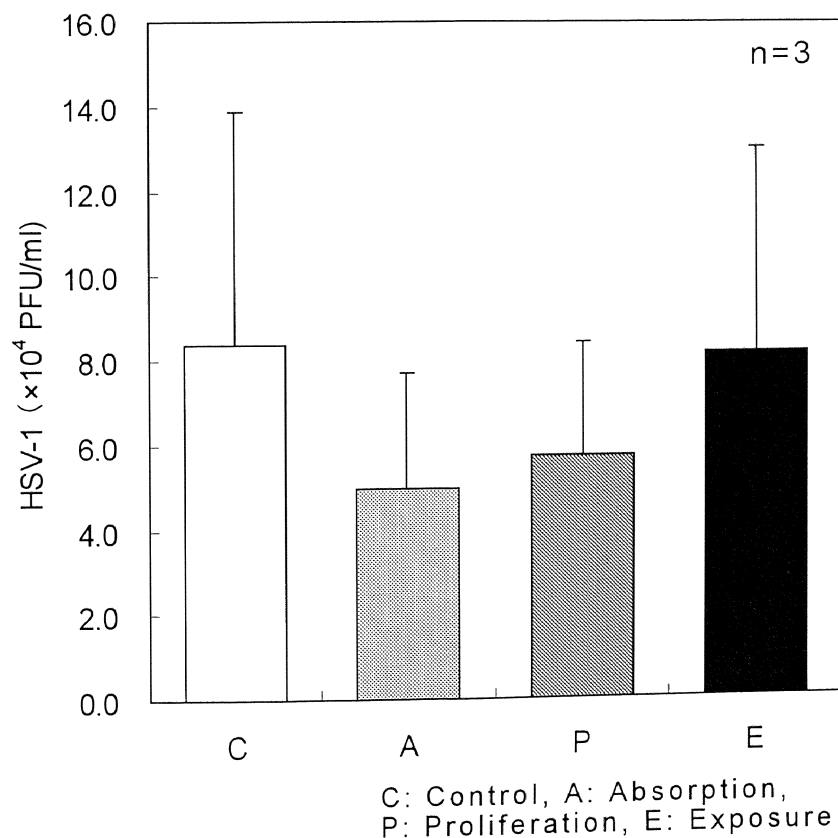


図 7-1 50Hz 10mT 磁場中での HSV-1 増殖



## 7.2 10Hz 60mT 磁場のウイルス感染への影響

最近, 10Hz 磁場の生体影響が確認されつつある中で, 本感染系モデルでもその影響があるのかを調べるとともに, 磁場周波数とウイルス感染の関係について検討を試みた. そこで, 磁場周波数を 50Hz から 10Hz に変更して観察した.

磁場強度を 60mT 一定で磁場周波数を 10Hz にした場合の結果を図 7-2 に示す. 対照群(C)と曝露群(E)を比較すると HSV-1 の増殖が抑制されることがわかった. また, 対照群と吸着期曝露群(A)および対照群と増殖期曝露群(P)とを比較しても増殖が抑制されることがわかった. その作用は吸着期曝露群と増殖期曝露群の方が大きい傾向にあるように見えたが, 全曝露群との比較では差が認められなかった.

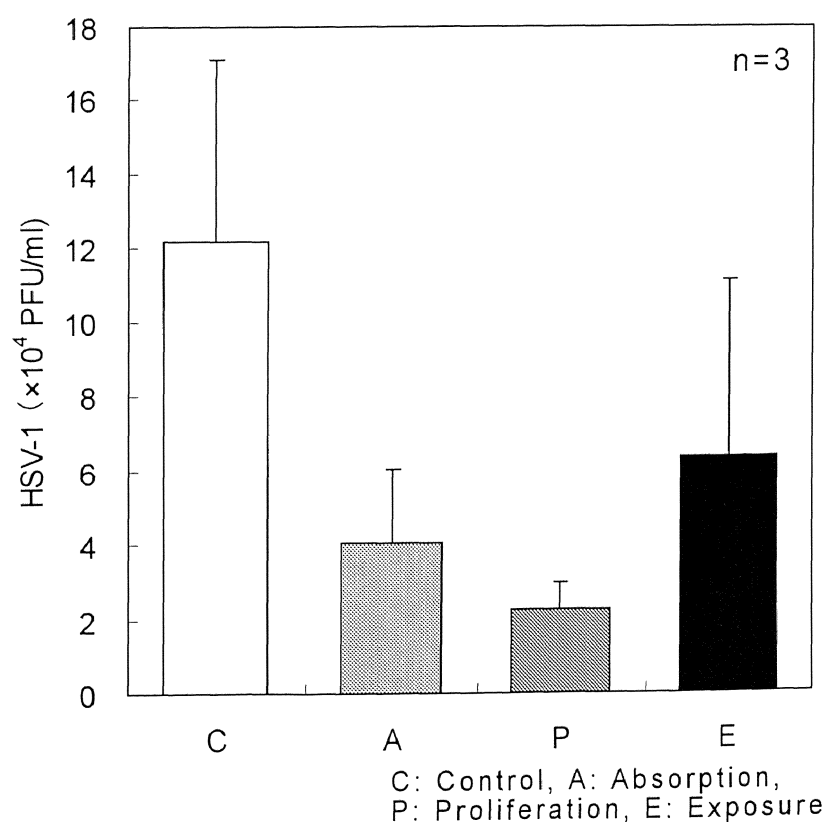


図 7-2 10Hz 60mT 磁場中での HSV-1 増殖

このことから，磁場周波数を 50Hz から 10Hz にしても HSV-1 の増殖抑制作用が確認できた．

### 7.3 60mT 静磁場のウイルス感染への影響

ウイルス感受性を多様に持つサル腎細胞(Vero 細胞)に単純ヘルペスウイルス 1 型(herpes simplex virus type 1: HSV-1)を感染させ磁場の生体影響について検討した. 第 6 章で述べたように, 本ウイルス感染系モデルに対して 50Hz 60mT 磁場を曝露し, ウイルス増殖が抑制することを確認した. その原因としては, ウイルスの細胞への吸着および細胞からの放出に対する作用である可能性を見出した.

このような現象を引き起こす物理的要因として誘導電流刺激がある. この章では, 誘導電流の作用であるか否かを調べるために, それがない静磁場に着目した. 従来から調べてきた 50Hz 60mT 磁場曝露と比較するために, ほぼ同じ強度である 60mT の静磁場を曝露して検討した.

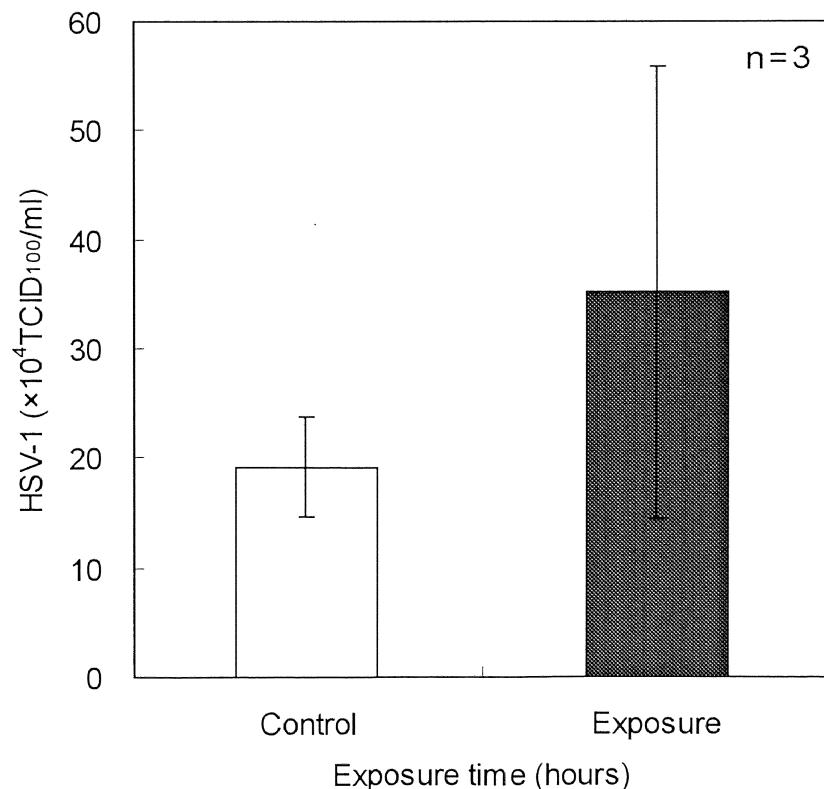


図 7-3 60mT 静磁場中での HSV-1 増殖

感染系に対して 60mT 静磁場を曝露した場合の HSV-1 の増殖変化を図 7-3 に示す．対照群および静磁場曝露群において 15 時間目から HSV-1 が増殖しはじめ，48 時間まで増加していることがわかった．また，曝露により HSV-1 の増殖数が高くなる傾向にあるが，対照群と比べて有意差は見られなかった．

## 7.4 ウイルス感染に及ぼす 50Hz 60mT 磁場の物理的影響に関する検討

50Hz 磁場曝露時の HSV-1 増殖と比較するために、ほぼ同じ強度の 60mT 静磁場を曝露した結果、差は確認されなかった。しかし、従来の研究で検討した 50Hz 60mT 磁場では減少傾向が見られている。静磁場曝露と 50Hz 磁場曝露との物理的な違いとしては、誘導電流発生の有無にある。このことから、誘導電流の作用がウイルス感染にとって大きな要因となり得るものと考えられる。

過去に、変動磁場曝露によって発生する誘導電流が細胞膜の受容体に影響を及ぼすとした報告がある<sup>[24]</sup>。このことは HSV-1 が Vero 細胞に吸着するときに誘導電流が作用する可能性があることを示している。ウイルス吸着も、細胞膜にある糖タンパク質と HSV-1 のタンパク質が結合して感染が成立する<sup>[7]</sup>。このときに 50Hz 磁場による誘導電流が作用して、感染を抑制させるのではないかと考えられる。

ここで、周波数の低い電流が細胞に流れる場合、図 7-4 のよ

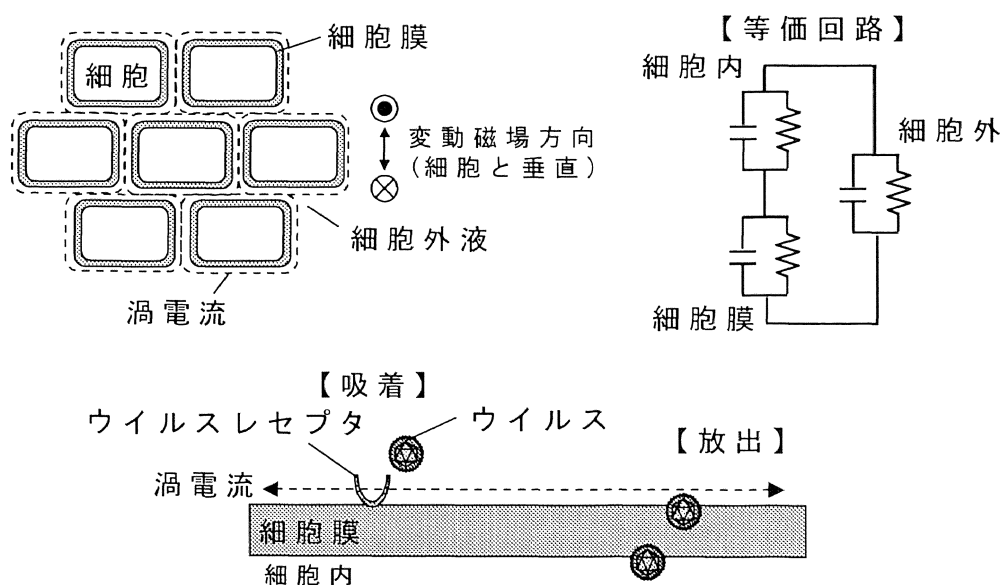


図 7-4 誘導電流の作用機構

うに細胞の外液に流れる<sup>[60]</sup>. つまり, 50Hz 磁場曝露によって磁束密度が変化する際に発生する渦電流が細胞表面全体に流れることになる. そのため, 細胞膜にあるウイルスレセプタへ作用, あるいは, 増殖したウイルスは細胞外に放出する際に細胞膜を利用するため, その部分への誘導電流刺激が考えられる.

## 第 8 章

## 結 論

ELF 磁場が人体に影響があるのか否か，未だ払拭されていない現状の中で，ELF 磁場の生体影響に関する研究が多数行われている．また，ヒトの健康に有害な影響を及ぼす物質，例えば，紫外線や微生物などの影響と ELF 磁場曝露の影響の複合的な生体作用についても関心が持たれつつある．本研究では，これまでに無い全く新しい着眼点として，日常頻繁に起きているウイルス感染と磁場曝露との関係についてはじめて取り上げた．

ウイルスは単独では増殖できず，被感染細胞への吸着によってはじめて増殖でき，生体間の相互作用で成り立っている．本研究では Vero 細胞と HSV-1 のウイルス感染系モデルを用い，そのウイルス増殖様式の吸着から放出までに及ぼす ELF 磁場の影響を検討した．

本章では，得られた結果を総括し，本研究の結論とする．

#### 第 4 章 “Vero 細胞に及ぼす 50Hz 60mT 磁場の影響”に関して

- 1) Vero 細胞の増殖率が 24 時間で約 2 倍，48 時間時間で約 4 倍であったことから，Vero 細胞の増殖周期時間は 24 時間である．
- 2) Vero 細胞のみに 50Hz 60mT 磁場を曝露した結果，細胞増殖に変化が認められなかった．

#### 第 5 章 “HSV-1 に及ぼす 50Hz 60mT 磁場の影響”に関して

- 3) HSV-1 は 37℃ に保温すると，4 時間程度で感染力が低下し，16 時間以上経過するとほとんどのウイルスは失活した．
- 4) Vero 細胞に HSV-1 が吸着するには 1 時間を必要とするが，



その時間程度では，HSV-1 の感染価は低下しない．

- 5) HSV-1 のみに 50Hz 60mT 磁場を曝露しても感染価は，対照群と比較してほとんど変わらない．

## 第 6 章 “Vero 細胞に感染する HSV-1 の増殖に及ぼす 50Hz 磁場の影響”に関して

- 6) Vero 細胞と HSV-1 の感染系モデルに対して 50Hz 60mT 磁場を 24 時間曝露したところ，HSV-1 の増殖数が顕著に減少したことをはじめて確認した．
- 7) 50Hz 60mT 磁場の作用は，感染過程の一部分に働くのではなく，HSV-1 が Vero 細胞に吸着する段階あるいは HSV-1 が細胞内で増殖する段階で影響を及ぼしていることを明らかにした．
- 8) 増殖抑制の原因は，①HSV-1 の Vero 細胞への吸着の妨害，②自己複製から放出に関わる増殖機能の低下，この二つの可能性がある．
- 9) 50Hz 60mT 磁場を 24 時間曝露した Vero 細胞に HSV-1 を感染させると，非曝露の Vero 細胞に感染させたときよりも増殖数は減少した．つまり，磁場曝露によって Vero 細胞の HSV-1 に対する感受性が低下したことを示す．

## 第 7 章 “ウイルス感染系モデルに及ぼす様々な磁場の影響”に関して

- 10) 50Hz 10mT 磁場中で Vero 細胞に HSV-1 を感染させると，

増殖は正常に行われた．したがって，ウイルス感染に及ぼす 50Hz 磁場の影響に関する磁場強度の閾値は 10mT 以上である．

11) 10Hz 60mT 磁場中で Vero 細胞に感染した HSV-1 は，対照群と比較して増殖数が減少した．

12) 誘導電流が発生しない静磁場(60mT)曝露では，ウイルス増殖に影響は見られなかった．したがって，ほぼ同じ強度の変動磁場と静磁場とでは影響が異なっていることから，誘導電流の作用が感染を抑制する一つの原因になり得る．

本研究ではこのように，Vero 細胞と HSV-1 とのウイルス感染系モデルに対して 50Hz 磁場を曝露するとウイルスの増殖が抑制されることを見出した．これは，Vero 細胞および HSV-1 の単独に対して 50Hz 磁場の影響が見られなかったことから，生体相互作用で成立する感染に磁場が作用していることは明らかである．その機序としては，50Hz 磁場が Vero 細胞へのウイルスの吸着を妨害する作用があること，あるいは増殖に関わる機能に作用していると考えられる．また，その作用には誘導電流の関与が示されたことも一つの成果である．

50Hz 磁場とウイルス感染の複合的な生体影響として見た場合，50Hz 磁場に曝露された Vero 細胞は HSV-1 感受性が低下し，その状態の細胞に感染し，複製される HSV-1 数は顕著に減少した．したがって，Vero 細胞と HSV-1 とのウイルス感染系モデルにおいて，50Hz 磁場は感染を促進するのではなく，抑制作用を有することを見出すことができた．

今後の展望としては次のことが挙げられる．ウイルス感染は動物よりも単純な生体システムであると思なすことができる．つまり，ウイルス感染に必要なレセプタや遺伝子発現などの機能に対する ELF 磁場の影響をタンパク質量や遺伝子発現量などの高度な技術と方法を導入することで詳細な検討が望め，従来の研究では観察が困難であった生体機能の連続性に対する磁場影響を解析することが可能となる．また，被感染細胞とウイルスの組み合わせを変えることで，様々なウイルス感染に対する ELF 磁場の影響を検討することが可能となる．

以上のように，感染に関与する様々な生体機能および生体システムを構成するこれらの機能のはたらきとその連続性に対する ELF 磁場の影響，さらに様々なウイルスにおいて磁場影響を検討することができれば，生体に及ぼす ELF 磁場の作用機序の解明につながるものと確信する．

## 謝 辞

本研究は，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，修士課程 2 年間と博士後期課程の 3 年間にわたって継続的行われたものである。

博士後期課程進学にあたり，研究内容が異なるにもかかわらず指導教授として私を受け入れて頂いた上，研究者としての在り方や，投稿論文の作成ならびに学会発表などにおいて，多大なご指導・ご鞭撻を賜った三澤顕次教授に心から感謝申し上げます。

ならびに研究内容が工学とウイルス学の両分野にまたがる学際的で非常に難しい研究にもかかわらず，5 年間にわたって，ウイルス感染に及ぼす ELF 磁場の影響に関する研究に従事できるよう数々のお力添えを頂いたのが有澤準二教授である。長いようで短くもあったこの 5 年間の中で，常日頃より研究に限らず公私にわたって数多くの懇切丁寧なご指導を賜り，また研究を進めるにあたり多大なご配慮を頂いたことに心から感謝申し上げます。

また，木村主幸教授には，本学大学院に入学してから，ご多忙の中，懇切丁寧な微生物の操作方法や生物学的見地からご指導を賜った。本学は工学部のみであるため，微生物に関する知識は非常に乏しいものであった。しかし，先生のご指導により，本研究のような学際的研究をまとめることができたことに，改めて感謝する。

総合教育研究部の秋山敏晴教授には、投稿論文の作成の際、英語に関することや投稿論文の書き方など、親切なご指導を頂いた。ここにお礼申し上げる。

当部門の北間正崇助教授ならびに清水久恵助教授、敦賀健志助教授には、当部門のゼミナールや学会発表の際には日頃から研究に対する数々の御督励を頂いた。ここに御礼申し上げる。最後に、菅原俊継助教授には、私が修士課程 1 年生の時に同じ研究室で研究に励み、先輩としての様々なお助言を頂いた。また、博士後期課程に入学してからも、親身に相談に応じて頂き、さらに投稿論文の作成の際には多大なお力添えを頂いた。ここに厚く御礼申し上げる。

また、公私ともに充実した学生生活を送るために、ご協力頂いた当部門の諸先輩、大学院生および学部生の皆様に心より御礼申し上げます。

本研究は、これら各位の多大な御指導、御協力のもとに進めることができたものであり、ここに改めて感謝申し上げます次第である。

## 参考文献

- [1] Wertheimer N, Leeper E, “Electrical wiring configurations and childhood cancer”, Am J Epidemiol, vol.109, pp.273-284, 1979.
- [2] United Nations Environment Programme, International Radiation Protection Association, World Health Organization, “Magnetic Fields, Environmental Health Criterion 69”, 1987.
- [3] 上野照剛, 重光司, 岩坂正和, 「生体と電磁界」, 学会出版センター, 2003.
- [4] 電気学会 電磁界生体影響問題調査特別委員会 委員長 関根泰次, 「電磁界の生体影響に関する現状評価と今後の課題 第2期報告書」, 電気学会, 2003.
- [5] Ari Markkanen, Jukka Juutikainen, Sakari Lang, Jukka Pelkonen, Tapio Rytomaa, and Jonne Naarala, “Effects of 50 Hz magnetic field on cell cycle kinetics and the colony forming ability of budding yeast exposed to ultraviolet radiation, Bioelectromagnetics, vol.22, pp.345-350, 2001.
- [6] A. Saito, K. Kimura, K. Misawa, and J. Arisawa, “Effects of static magnetic field on bacterial infection to HeLa cells”,

- EMC'96 ROMA International Symposium on Electromagnetic Compatibility, pp.527-531, 1996.
- [7] 畑中正一, 「ウイルス学」, 朝倉書店, 1997.
- [8] Aleksander Sieron, Lukasz Labus, Przemyslaw Nowak, Grzegorz cieslar, Halina Brus, Artur Durczok, Tomasz Zagzil, Richard M. Kostrzewa, and Ryszard Brus, “Alternating extremely low frequency magnetic field in creases turnover of Dopamine and Serotonin in rat frontal cortex”, Bioelectromagnetics, vol.25, pp.426-430, 2004.
- [9] 高橋範行, 澤口裕太, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 「遊泳空間を制限した金魚に及ぼす 10Hz 磁場の影響」, 電子情報通信学会技術研究報告, No.MBE2003-104, 2003.
- [10] 高圧線問全国ネットワーク, 「高圧線と電磁波公害」, 緑風出版, 1997.
- [11] Savitz D, Loomis DP, “Magnetic field exposure in relation to leukemia and brain cancer mortality among electric utility workers”, Am J Epidemiol, vol.141, pp.123-134, 1995.
- [12] J. Silny, “The influence threshold of a time-varying magnetic field in the human organism. In: Biological effects of static and extremely-low-frequency magnetic fields (J.H. Bernhardt)”, Munich, MMV Medizin Verlag, pp.105-112, 1986.

- [13] Sergio ghione, C. Del Seppia, L. Mezzasalma, M. Emdin, and P.Luschi, “Human head Exposure to 37 Hz electromagnetic field: Effects on blood pressure, somatosensory perception, and related parameters”, *Bioelectromagnetics*, vol.25, pp.167-175, 2004.
- [14] M. Rodriguez, D. Petitclerc, J.F. Burchard, D.H. Nguyen, and E. Block, “Blood melatonin and prolactin concentrations in dairy cows espoused to 60 Hz electric and magnetic fields during 8 h photoperiods”, *Bioelectromagnetics*, vol.25, pp.508-515, 2004.
- [15] Moh’d-Ali Al-Akhras, Ahmed Elbetieha, Mohammed-Khair Hasan, Imaddin Al-Omari, Homa Darmani, and Borhan Albiss, “Effects of extremely low frequency magnetic filed on fertility of adult male and female rats”, *Bioelectromagnetics*, vol.22, pp.340-344, 2001.
- [16] Santi Tofan, Marcella Cintorino, Domenico Barone, Michelle Berardelli, Maia Margherita De Santi, Adriana Ferrara, Renzo Orlassino, Piero Ossola, Katia Rolfo, Flavio Ronchetto, Serglo Antonio Tripodi, and Piero Tosi, “Increased mouse survival, tumor growth inhibition and decreased immunoreactive p53 after exposure to magnetic fields”, *Bioelectromagnetics*, vol.23, pp.230-238, 2002.
- [17] 有澤準二, 理寛寺達也, 柿崎政雄, 三澤顕次, 「金魚の行動



に及ぼす ELF 変動磁場の影響」, 北海道工業大学研究紀要,  
no.23, pp.263-268, 1995.

[18] 岸田茂也, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 「金魚の尿排泄  
量に及ぼす ELF 磁場の影響」, MBE99-99, pp81-86, 1999.

[19] Gale L. Craviso, James Poss, Christina Lanctot, Steven S.  
Lundback, Indira Chatterjee, and Nelson G. Publicover,  
“Intracellular calcium activity in isolated bovine adrenal  
chromaffin cells in the presence and absence of 60 Hz  
magnetic fields”, Bioelectromagnetics, vol.23, pp.557-567,  
2002.

[20] Cheryl R. McCreary, Alex W. Thomas, and Frank S. Prato,  
“Factors confounding cytosolic calcium measurements in  
Jurkat E6.1 cells during exposure to ELF magnetic fields”,  
Bioelectromagnetics, vol.23, pp.315-328, 2002.

[21] Fabriziomaria Gobba, Davide Malagoli, and Enzo Ottaviani,  
“Effects of 50 Hz magnetic fields on fMLP-induced shape  
changes in invertebrate immunocytes: The role of calcium  
ion channels”, Bioelectromagnetics, vol.24, pp.277-282, 2003.

[22] C.L.M. Baureus Koch, M. Sommarin, B.R.R. Persson, L.G.  
Salford, and J.L. Eberhardt, “Interaction between weak low  
frequency magnetic fields and cell membranes”,  
Bioelectromagnetics, vol.24, pp.395-402, 2003.

- [23] Maciej Lopucki, Artur Czekierdowski, Wanda Rogowska, and Jan Kotarski, "The effect of oscillating low intensity magnetic field on the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  concentrations in the maternal and fetal circulation of the dually perfused human placental cotyledon", *Bioelectromagnetics*, vol.25, pp.329-337, 2004.
- [24] A.Chiabrera, M. Grattarola, and R. Viviani, "Interaction between electromagnetic fields and cells: micro-electrophoretic effect on ligands and surface receptors", *Bioelectromagnetics*, Vol.5, pp.173-191, 1984.
- [25] Massot O, Grimaldi B, Bailly JM, Kochanek M, Dnschamps F, Lambrozo J, and Fillion G, "Magnetic field desensitizes 5-HT(1B) receptor in brain: pharmacological and functional studies", *Brain Res.* Vol.858, pp.143-150, 2000.
- [26] Vanessa Manni, Antonella Lisi, Deleana Pozzi, Sabrina Rieti, Annalucia Serafino, Livio Gluliani, and Settimio Grimaldi, "Effects of extremely low frequency (50 Hz) magnetic field on morphological and biochemical properties of human keratinocytes", *Bioelectromagnetics*, vol. 23, pp.298-305. 2002.
- [27] Toshitaka Ikehara, Hisao Yamaguchi, Keiko Hosokawa, Hiroshi Miyamoto and Katsuo Aizawa, "Effects of ELF magnetic field on membrane protein structure of living HeLa cells studied by fourier transform infrared spectroscopy",

- Bioelectromagnetics, Vol.24, pp.457-464, 2003.
- [28] Liburdy RP, Callahan DE, Harland J, Dunham E, Sloma TR, and Yaswen P, "Experimental evidence for 60 Hz magnetic fields operating through the signal transduction cascade. Effects of calcium influx and c-MYC mRNA induction", FEBS Lett., vol.334, no.3, pp.301-308, 1993.
- [29] Desjobert H, Hillion J, Adolphe M, Averlant G, Nafziger J, "Effects of 50 Hz magnetic fields on C-myc transcript levels in nonsynchronized and synchronized human cells", Bioelectromagnetics, vol.16, pp.277-283, 1995.
- [30] Miyakoshi J, Ohtsu S, Shibata T, and Takebe H, "Exposure to magnetic field (5mT at 60 Hz) does not affect cell growth and c-myc gene expression", J Radiat Res., vol.37, pp.185-191, 1996.
- [31] Jiliang Zhou, Changlin Li, Gengdong Yao, Huai Chiang, and Zongliang Chang, "Gene expression of cytokine receptors in HL60 cells exposed to a 50 Hz magnetic field", Bioelectromagnetics, vol.23, pp.339-346, 2002.
- [32] Maria Teresa Santini, Gabriella Rainaldi, Antonella Ferrante, Pietro Luigi Indovina, Paolo Vecchia, and Gianfranco Donelli, "Effects of 50 Hz sinusoidal magnetic field on cell adhesion molecule expression in two human osteosarcoma cell lines (MG-63 and Saos-2)", Bioelectromagnetics, vol.24,

pp.327-338, 2003.

- [33] J. Miyakoshi, T. Tsukada, S. Tachiiri, S. Bando, K. Yamaguchi and H. Takebe, "Enhanced NOR-1 gene expression by exposure of Chinese hamster cells to high-density 50 Hz magnetic fields", *Mol Cell Biochem*, vol.181, pp.191-195, 1998.
  
- [34] Vanessa Manni, Antonella Lisi, Sabrina Rieti, Annalucia Serafino, Mario Ledda, Livio Gluliani, Donaella Sacco, Enrico D'Emilia, and Settimio Grimaldi, "Low electromagnetic field (50Hz) induces differentiation on Primary human oral Keratinocytes (HOK)", *Bioelectromagnetics*, vol.25, pp.118-126, 2004.
  
- [35] Jacob G. Robison, Amanda R. Pendleton, Kirk O. Monson, Byron K. Murray, and Kim L. O'Neill, "Decreased DNA repair rates and protection from heat induced apoptosis mediated by electromagnetic field exposure", *Bioelectromagnetics*, vol.23, pp.106-112, 2002.
  
- [36] Miyakoshi J, Koji Y, Wakasa T, and Takebe H, "Long-term exposure to a magnetic field (5mT at 60 Hz) increases X-ray-induced mutations", *J Radiat Res*, vol.40, pp.13-21, 1999.
  
- [37] Gui-Rong Ding, Takehisa Nakahara, and Junji Miyakoshi, "Exposure to power frequency magnetic fields and X-rays

- induces GAP-43 gene expression in human glioma MO54 cells”, *Bioelectromagnetics*, vol.23, pp.586-591, 2002.
- [38] Enzo Otaviani, Davide Malagoli, Alex Ferrari, Davide Tagliazucchi, Angela Conte, and Fabriziomaria Gobba, “50 Hz magnetic fields of varying flux intensity affect cell shape changes in invertebrate immunocytes: The role of potassium ion channels”, *Bioelectromagnetics*, vol.23, pp.292-297, 2002.
- [39] G.R. Verheyen, G. Pauwels, L. Verschaeva, and G. Schoeters, “Effect of coexposure to 50 Hz magnetic fields and aneugen on human lymphocytes, determined by the cytokinesis block micronucleus assay”, *Bioelectromagnetics*, vol.24, pp.160-164, 2003.
- [40] R.Y. Wu, H. Chiang, G.L. Hu, Q.L. Zeng, and J.L. Bao, “The effect of 50 Hz magnetic field on GCSmRNA expression in lymphoma B cell by mRNA differential display”, *Journal of Cellular Biochemistry*, vol.79, no.3, pp.460-470, 2000.
- [41] C.F. Blackman, S.G. Benane, and D.E. House, “The influence of 1.2  $\mu$ T, 60 Hz magnetic fields on melatonin- and tamoxifen-induced inhibition of MCF-7 cell growth”, *Bioelectromagnetics*, vol.22, pp.122-128, 2001.
- [42] M.C. Pirozzoli, C. Marino, G.A. Lovisolo, C. Laconi, L. Mossiello, and A. Negroni, “Effects of 50 Hz electromagnetic

- field exposure on apoptosis and differentiation in a neuroblastoma cell line”, *Bioelectromagnetics*, vol.24, pp.510-516, 2003.
- [43] S. Ravera, E. Reoaci, A. Morelli, I.M. Pepe, R. Botter, and C. Beruto, “Effects of extremely low frequency electromagnetic field on the adenylate kinase activity of rod outer segment of bovine retina”, *Bioelectromagnetics*, vol. 25, pp.545-551, 2004.
- [44] Lee BC, Johng HM, Lim JK, Jeong JH, Baik KY, Nam TJ, Lee JH, Kim J, Sohn UD, Yoon G, Shin S, and Soh KS, “Effects of extremely low frequency magnetic field on the antioxidant defense system in mouse brain: a chemiluminescence study”, *J Photochem Photobiol B*, vol.73, pp.43-48, 2004.
- [45] Tomokazu Miyakawa, Sotoshi Yamada, Shin-ichi Harada, Takayuki Ishimori, Hiroshi Yamamoto, Ryuji Hosono, “Exposure of *Caenorhabditis elegans* to extremely low frequency high magnetic fields induces stress responses”, *Bioelectromagnetics*, vol.22, pp.333-339, 2001.
- [46] R. Goodman, and M. Blank, “Insights into electromagnetic interaction mechanisms”, *J Cell Physiol*, vol.192, pp.16-22, 2002.
- [47] Yasuo Nakaoka, Kikuo Shimizu, Kenji Hasegawa, and Takayoshi Yamamoto, “Effect of a 60 Hz magnetic field on

- the behavior of Paramecium”, Bioelectromagnetics, vol.21, pp.584-588, 2000.
- [48] John H. Graham, David Fietcher, James Tigue, and Malcolm McDonald, “Growth and developmental stability of drosophila melanogaster in low frequency magnetic fields”, Bioelectromagnetics, vol.21, pp.465-472, 2000.
- [49] 「電気の暮らしと健康不安」, 電気学会, 2000.
- [50] National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, “Electric and magnetic fields research and public information dissemination (EMF RAPID) program”, 2002.
- [51] B.Shimizu, T.Terashima, “VERO CELLS –Origin, Properties and Biomedical Applications”, Published by Department of Microbiology School of Medicine Chiba University, 1990.
- [52] 東匡伸, 小熊恵二, 「シンプル微生物学(改訂第 2 版)」, 南江堂, pp.221-225, 1998.
- [53] 日本組織培養学会, 「組織培養の技術(第 3 版) [基礎編]」, 朝倉書店, 2000.
- [54] 渡邊利雄, 「バイオ実験イラストレイテッド 6 すくすく育て細胞培養」, 秀潤社, 2003.

- [55] 北村敬, 「ウイルス検査のための組織培養技術」, 近代出版, 1976.
- [56] 石川統, 「生物化学入門」, 裳華房, pp.72-73, 1998.
- [57] B.ヤーゲンソンス, M.E.ストラウマニス, 玉虫文一(訳), 「コロイド化学」, 培風館, p.3, 1978.
- [58] 日本組織培養学会, 「組織培養の技術(第3版) [応用編]」, 朝倉書店, pp.414-429, 1997.
- [59] 日本薬学会, 「衛生試験法・注釈」, p.131, 2000.
- [60] 北村清吉, 橋本享, 「新編 臨床検査講座 医用工学概論」, (株)医歯薬出版, p.4, 1999.



## 研究業績

### 1. 原著論文

澤口裕太，木村主幸，菅原俊継，三澤颯次，有澤準二，  
“Vero 細胞と HSV-1 の感染系に及ぼす 50Hz 磁場曝露の  
影響”，生体医工学(日本エム・イー学会論文誌)，42 巻 4  
号，pp.384-389，(2004).

### 2. 国際会議

2.1 Yuta Sawaguchi, Kazuyuki Kimura, Kenji Misawa, Junji  
Arisawa: “Influence of the 50 Hz magnetic field on the  
body color and the amount of urine of goldfish”, The 2003  
IEEE International Symposium on Electromagnetic  
Compatibility, WE-A-I3-2, (2003-5). (Turkey)

2.2 Yuta Sawaguchi, Kazuyuki Kimura, Kenji Misawa, Junji  
Arisawa: “Change in the body and the urine quantity of  
goldfish caused by 50 Hz magnetic field exposure”, 25<sup>th</sup>  
Annual International Conference of the IEEE Engineering  
in Medicine and Biology Society, 3267-3270, (2003-9).  
(Mexico)

2.3 Yuta Sawaguchi, Kazuyuki Kimura, Kenji Misawa, Junji  
Arisawa: “Effects of 50 Hz magnetic field exposure on the

body color and the urine quantity of goldfish”, 2004 International Symposium on Electromagnetic Compatibility, Sendai, 773-776, (2004-5). (Japan Sendai)

### 3. 研究会

- 3.1 澤口裕太，福家優，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“ELF 磁場内でのウイルス感染抑制効果”，電子情報通信学会技術研究報告，MBE2001-115，pp.93-98，(2001-11).
- 3.2 福家優，澤口裕太，高橋範行，木村主幸，木村浩一，有澤準二：“復帰誘導後のマクロファージ様細胞による殺菌機能に及ぼす磁場影響について” 電子情報通信学会技術研究報告，MBE2002-69，pp.21-24，(2002-11).
- 3.3 澤口裕太，福家優，高橋範行，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“変動磁場曝露で発生する誘導電流が金魚の尿排泄量に及ぼす影響” 電子情報通信学会技術研究報告，MBE2002-86，pp.5-8，(2003-1).
- 3.4 澤口裕太，高橋範行，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“ヘルペスウイルスの培養細胞への感染に及ぼす 50Hz 磁場の影響” 電気学会研究会資料，マグネティックス研究会，MAG-03-104，pp.9-13，(2003-7).
- 3.5 高橋範行，澤口裕太，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“遊泳空間を制限した金魚に及ぼす 10Hz 磁場の影響”，電子情報通信学会技術研究報告，MBE2003-104，pp.45-48，(2003-12).

- 3.6 澤口裕太，高橋範行，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：  
“60mT と 340mT 静磁場曝露におけるサル腎細胞に感染した単純ヘルペスウイルスの増殖”，電子情報通信学会技術研究報告，MBE2003-119，pp.37-41，(2004-1).
- 3.7 澤口裕太，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“10Hz 62mT 磁場中で Vero 細胞に感染した HSV-1 の増殖変化”，電子情報通信学会技術研究報告，MBE2004-59，pp.29-32，(2004-11).

#### 4. 研究紀要

- 4.1 澤口裕太，福家優，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，：“50Hz 62mT 磁場がウイルスの感染価に与える影響”，北海道工業大学研究紀要，第 30 号，pp.255-260，(2002).
- 4.2 澤口裕太，高橋範行，福家優，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，：“50Hz 磁場の誘導電流に対する金魚の尿排泄量変化”，北海道工業大学研究紀要，第 31 号，pp.75-80，(2003).
- 4.3 福家優，澤口裕太，高橋範行，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，：“ヒト白血病細胞 U937 の分化誘導作用に及ぼす静磁場と変動磁場の影響”，北海道工業大学研究紀要，第 31 号，pp.87-94，(2003).
- 4.4 高橋範行，澤口裕太，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，  
“金魚の尿排泄量に及ぼす 10Hz 磁場の影響”，北海道工

業大学研究紀要，第 32 号，pp.241-246，(2004).

- 4.5 澤口裕太，高橋範行，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，  
“サル腎細胞への単純ヘルペスウイルス感染に対する  
340mT 静磁場曝露の影響”，北海道工業大学研究紀要，第  
32 号，pp.309-314，(2004).

- 4.6 澤口裕太，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，“Vero 細胞  
に感染した HSV-1 の増殖に及ぼす ELF 磁場の影響”，北  
海道工業大学研究紀要，第 33 号，(2005). (投稿中)

## 5. 学会講演

- 5.1 澤口裕太，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“ウイルス感  
染に及ぼす 50Hz 62mT 磁場の影響”，平成 12 年度電気関  
係学会北海道支部連合大会，p.339，(2000).
- 5.2 澤口裕太，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“ELF 磁場  
によるウイルス感染の抑制”，医用電子と生体工学，Vol.39  
Suppl，p.403，(2001).
- 5.3 澤口裕太，福家優，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“ウ  
イルス感染の初期段階に及ぼす ELF 磁場の影響”，第 40  
回日本エム・イー学会北海道支部大会，p.17，(2001).
- 5.4 澤口裕太，福家優，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“ウ  
イルスの細胞感染に及ぼす 50Hz 62mT 磁場の影響”，平  
成 13 年度電気関係学会北海道連合大会，p.267，(2001).

- 5.5 福家優，澤口裕太，木村主幸，木村浩一，有澤準二：“ヒト骨髄性白血病細胞に対する静磁場または変動磁場の影響”，平成 13 年度電気関係学会北海道連合大会，p.266，(2001).
- 5.6 澤口裕太，福家優，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“ウイルス感染の増殖段階に及ぼす 50Hz 62mT 磁場の影響”，生体医工学，Vol.40 Suppl，p.101，(2002).
- 5.7 福家優，澤口裕太，木村主幸，木村浩一，有澤準二：“ヒト白血病細胞 U937 の分化誘導作用に対する静磁場または変動磁場の影響”，医用電子と生体工学，Vol.40 Suppl，p.102，(2002).
- 5.8 澤口裕太，福家優，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“ヘルペスウイルスの感染価に及ぼす 50Hz 変動磁場の影響”，第 41 回日本エム・イー学会北海道支部大会，p.16，(2002).
- 5.9 福家優，澤口裕太，木村主幸，木村浩一，有澤準二：“ジメチルスルホキシドによる U937 細胞の分化誘導作用に及ぼす磁場の影響”，第 41 回日本エム・イー学会北海道支部大会，p.16，(2002).
- 5.10 澤口裕太，福家優，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“Vero 細胞に接種する HSV 量の検討”，平成 14 年度電気関係学会北海道連合大会，p.346，(2002).
- 5.11 福家優，澤口裕太，高橋範行，木村主幸，木村浩一，有

澤 準二：“マクロファージ様細胞の食食機能に及ぼす静磁場と変動磁場の影響”，平成 14 年度電気関係学会北海道連合大会，p.343，(2002).

5.12 高橋範行，澤口裕太，福家優，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“10Hz 磁場が及ぼす金魚の昼と夜の尿排泄量”，平成 14 年度電気関係学会北海道連合大会，p.347，(2002).

5.13 高橋範行，澤口裕太，福家優，木村主幸，木村浩一，有澤準二：“10Hz 及び 50Hz 磁場の金魚の昼夜の尿排泄量と体色変化に対する影響”，生体医工学，Vol.41 Suppl.1，p.587，(2003).

5.14 澤口裕太，高橋範行，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“340mT 静磁場曝露におけるサル腎細胞の生存率”，第 42 回日本エム・イー学会北海道支部大会，p.16，(2003).

5.15 高橋範行，澤口裕太，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“金魚のストレスに及ぼす 10Hz 磁場の影響”，第 42 回日本エム・イー学会北海道支部大会，p.16，(2003).

5.16 澤口裕太，高橋範行，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“単純ヘルペスウイルスのサル腎細胞への感染に及ぼす 60mT 静磁場曝露の影響”，平成 15 年度電気関係学会北海道支部連合大会，p.315，(2003).

5.17 高橋範行，澤口裕太，福家優，木村主幸，三澤顕次，有澤準二：“10Hz 磁場が環境制限下の金魚に及ぼす影響”，

平成 15 年度電気関係学会北海道連合大会, p.312, (2003).

5.18 澤口裕太, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二: “サル腎細胞に感染した単純ヘルペスウイルスの増殖に及ぼす静磁場強度の影響”, 生体医工学, Vol.42 Suppl.1, p.556, (2004).

5.19 澤口裕太, 木村主幸, 菅原俊継, 三澤顕次, 有澤準二: “Vero 細胞と HSV-1 の感染系に及ぼす 50Hz 磁場曝露の影響”, 生体医工学シンポジウム 2004, pp.215-220, (2004).

5.20 澤口裕太, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二: “Vero 細胞と HSV-1 吸着および増殖段階に及ぼす 50Hz 磁場の影響”, 第 43 回日本エム・イー学会北海道支部大会, p5, (2004).