

血液構成物質の磁気物性に関する研究

Magnetic Properties of Proteins and Cells in Blood

研究代表者 東京大学大学院医学系研究科 講師 岩坂 正和

Lecturer, Dept. of Biomedical Engineering, University of Tokyo

Masakazu IWASAKA

We investigated the effects of intense magnetic fields on the blood platelet aggregation process with and without static magnetic fields of up to 14 T. A rabbit plasma and collagen mixture was used as the model system for a wounded blood vessel. Platelet aggregation was activated by the stimulation of acid soluble collagen. The platelet aggregates in strong magnetic fields were larger than the aggregates in an ambient field. An optical transmission of blood plasma during platelet aggregation also indicated that strong magnetic fields enhanced blood platelet aggregation in plasma. Also, we observed the orientation of endothelial cells and smooth muscle cells after long-term magnetic field exposures at 8 T and 14 T. Furthermore, we investigated the effect of magnetic fields on the population of oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin around the brain of a rat. A noninvasive oxyhemoglobin monitor applying near infrared optical absorption was used.

1. 研究目的

磁場の生体作用については、いまだに不明な点が多い。また、強磁場をもっと幅広く利用していくためには、まだ十分に解明されていない磁場中の生体现象を明らかにし、強磁場の医学応用に取り組む必要があると考えられる。生体内のほとんどの物質は反磁性と呼ばれる弱磁性物質であるが、強磁場中では生体内の反磁性物質が、弱磁場中の強磁性物質に匹敵する影響を受けることが考えられる。これまでのところ、生体物質の構造変化や物質間の相互作用、および生体機能発現への磁場効果について十分な解明がなされているとはいえない。

最近の強磁場発生技術の進歩により超伝導マグネットが普及するとともに、血栓線維等の反磁性の生体物質に対する磁場効果が国内外で徐々に報告されている。例えば、数テスラの強磁場のもとで生体組織が配向する現象は磁場配向と呼ばれる。この現象の研究では最初にフランスの強磁場研究グループにより幾つかの生体組織が磁場により配向することが報告された。血栓線維であるフィブリン重合体は磁力線に平行に並ぶことが知られている。超伝導マグネットなどの磁場発生技術が進歩した今日、強磁場下での室温空間において様々な生化学的実験を行えるようになり、磁場の生体作用に関する新たな知見が得られつつある。

本研究は血液を構成する生体物質および細胞への磁場の作用機構を明らかにし、弱磁性をもつ生体物質の磁気物性の解明を行い、強磁場中での生体物質の新機能解明を目指す。特に、数テスラの静磁場が血栓形成に与える磁場効果を解明するため、静磁場下で磁場配向するフィブリンや血小板、血管細胞などの磁気特性を明らかにすることを目的とする。

的とする。

本研究ではさらに、赤血球中ヘモグロビンの磁場中での酸素化特性について実験動物を用いた磁場中計測を行うことで、生物個体レベルでの磁気応答の可能性についても追加検討を行った。

2. 研究経過

2. 1. 方法

2. 1. 1 血小板凝集に対する強磁場効果

本研究では最初に、血小板が刺激されて凝集および血液凝固因子放出を行うことで血栓形成反応が開始する場合を想定した実験を行った。血小板を刺激する物質として ADP など様々なものがあるが、本実験ではコラーゲンを刺激物質として用いた。すなわち、血管壁が損傷し血管内皮細胞が剥離してコラーゲン繊維が露出し、そこに血小板が接触して血小板凝集がまず起こり、次に血小板内部から放出された顆粒などにより血液凝固系が進行して最終段階のフィブリン形成にまで至る場合に相当する。

磁場曝露装置として 8 T および 14 テスラの超伝導磁石を用いた。また、凝固に伴う血漿の透過光強度の時間変化を超伝導磁石のボア内にてリアルタイムで測定するため、光ファイバーと分光器外部セル室を持つ磁場中分光システム〔図 1〕を用いた。

フィブリノーゲンと血小板を含む血漿の凝固に対する磁場効果について、コラーゲンによる血小板刺激を開始反応として調べた。ウサギ (約 2 kg) の血液 (10ml) を 1200rpm にて約 12 分間遠心分離処理し、赤血球を取り除いた血漿を得た。血漿中の血小板濃度は約 100 万/ μ l であった。

最初に、血漿 600 μ l をプラスチック製光学セル

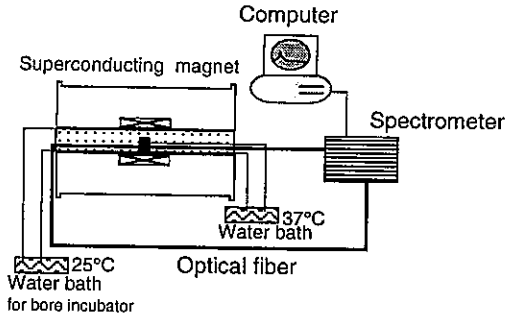


Figure 1. Optical measurement system under magnetic fields of superconducting magnet's bore for platelet aggregation experiments.

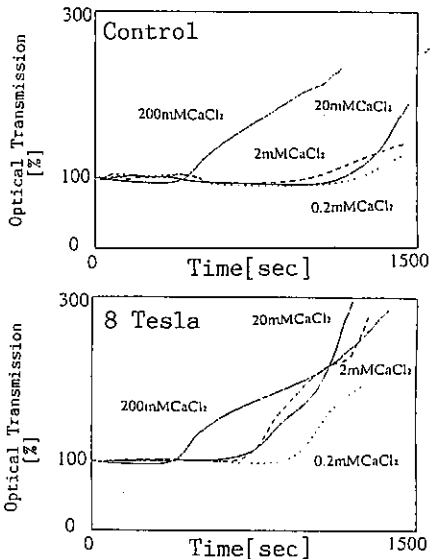


Figure 2. Time course of optical transmission of platelet suspension at 600 nm after the addition of collagen.

に注入して塩化カルシウム溶液を添加し、分光器外部セル室で 37°C にて 10 分間保温して、反応開始前の血漿の温度を安定させた。次に、コラーゲン (3mg/ml) を 20 μ l 添加し pipetting により攪拌した後、超伝導磁石のボア内にセルを設置した。

この時点での血漿の透過光度を 100% とし、37°C で保温しつつその後の透過光度変化を波長 600nm において測定した。

2. 1. 2 血管構成細胞に対する磁場効果

次に、血管壁を構成する成分である血管内皮細胞、血管平滑筋細胞およびコラーゲン線維の磁気的性質について実験を行った。磁場配向する蛋白高分子の例としてフィブリンやコラーゲンがある。いずれも分子量が数十万の 1 分子では磁場配向しないが、107 個程度分子が重合することで重合体全体の反磁性エネルギーが熱エネルギーを上回り磁場配向する。しかし、附着細胞レベルでの磁場配向についての研究は、コラーゲンで平滑筋細胞

の配向をガイドできることが明らかにされている以外ほとんど例がないといえる。

本研究では、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞を最大 14T の直流強磁場で長期間 (2 日~) 曝露した際の配向性変化を、超伝導磁石内で細胞培養可能な温度制御システムを用いて調べた。なお、数テスラの強磁場空間では空間磁場勾配の影響により細胞培養液の表面が割れる現象が生じるため、培養液の量を通常の培養に比べて多く (培養プラスチック内 90% 以上) 満たして行った。

コラーゲンと混合した附着細胞の磁場配向実験では、継代時の細胞浮遊液を酸性コラーゲン溶液と混合し、37°C の恒温容器内にて 1 時間程度放置することで、中性の pH に曝されたコラーゲン分子は徐々に重合した。コラーゲンの重合段階に 1 時間程度の磁場曝露を行うことで、磁力線方向に垂直に配向したコラーゲン繊維を得た。その後、細胞が埋没したコラーゲン・ゲルを細胞培養器に移動し、約 12 時間培養した後の細胞の形態観察を行った。

2. 1. 3 血液中ヘモグロビン酸素化に対する磁場効果

生体で酸素運搬の役割を担うヘモグロビンに対する酸素分子の結合・離脱に及ぼす直流強磁場影響についても調べた。近赤外光を用いた非侵襲酸素モニタ・システム (島津製作所 (株) 製 OM-100S) を用いて実験動物 (ラット) の頭部に近赤外光を照射して散乱光を測定し、赤血球細胞内のヘモグロビン分子の酸素化・脱酸素化に伴う波長 600-900 nm 近傍の光吸収変化より、オキシヘモグロビン、デオキシヘモグロビンの相対的な量の経時変化を観測した。

2. 2. 結果および考察

2. 2. 1 血小板凝集に対する強磁場効果

8 T および 0 T (環境磁場) における凝固過程を透過光測定した結果を図 2 に示す。図における透過光の増加は、血小板が凝集したために、1 μ m 程度の大きさの血小板による光の散乱が減少したことを示す。

図中にカルシウムの最終濃度 (200 mM, 20m M, 2m M, 0.2 mM) を変化させた際の、血小板浮遊液の透過光強度の経時変化を示す。図に示すのはゼロ時間においてコラーゲンを添加した後のデータである。カルシウムの最終濃度が 20m M, 2m M, および 0.2 mM の場合、8 T 磁場曝露群において透過光強度の最初の立ち上がり (on-set) 時間が 200~400 秒、非磁場曝露群よりも早くなった。

また、コラーゲンを添加した後、500 秒後に血小板浮遊液を曝露用プラスチック容器からシャーレに移動させ、即座に顕微鏡撮影を行った結果を図 3 に示す。曝露に用いた磁場は 8 T である。非磁場曝露サンプルと比較して 8 T 磁場曝露サンプルでは大きな血小板凝集塊が観測された。

14 T 磁場曝露を行った場合の結果 (コラーゲン

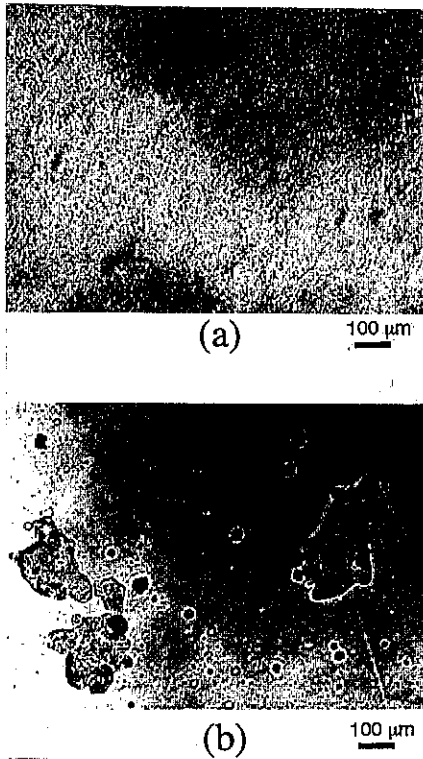


Figure 3. Platelet aggregation without (a) and with (b) magnetic field exposure at 14 T.

添加 500 秒後に曝露用プラスチック容器からシャーレに移動させた血小板浮遊液)を図4に示す。図3とは別のウサギ個体であり血小板凝集能は図3で用いた血小板よりも劣っていた。非磁場曝露サンプルでは $10\mu\text{m}$ 以下のサイズの粒子のみが見られ、シャーレ全体を探しても数 $10\mu\text{m}$ 以上の凝集塊は認められなかった。これに対し、14 T磁場曝露サンプルでは直径 $100\mu\text{m}$ の血小板凝集塊が1シャーレあたり33個観測された。

以上より、8および14テスラの強磁場下においてコラーゲンによる血小板凝集が促進されること、磁場中分光システムによる透過光強度の継時変化測定および顕微鏡観察によって明らかになった。

コラーゲン、血小板、フィブリンともに磁場配向した状態で血栓形成反応が行われているとき、各分子集合体の相互作用が磁場配向により変調され、それが細胞接着機能や血小板放出反応にまで影響を及ぼしている可能性が示唆されると考えられる。

2. 2. 2 血管構成細胞に対する磁場効果

血管内皮細胞および血管平滑筋細胞を用いて行った実験の結果、配向していないコラーゲン繊維上で成長した細胞がランダムに配向したのに対し、

磁場配向したコラーゲン上の細胞は、ほぼ1方向に配向した。

例えば、平滑筋細胞を磁場配向したコラーゲン繊維上で培養した場合、図6に示すように、磁力線に垂直に磁場配向したコラーゲン繊維に平行に配向した。細胞1つ1つがコラーゲン配向方向を軸にしてほぼ同一方向を向いている様子が観測された。

次に、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞が細胞自身の反磁性磁化率異方性によって配向するかどうかについて実験を行った。

また、ラット平滑筋細胞 A7r5、およびウシ胎児大動脈の内皮細胞を継代直後から直流磁場 (8 T および 14 T) 中に曝し、配向状態の観察を行った。8 T 磁場では、1~2日培養したが磁場配向は認められなかった。しかし、17日間連続磁場曝露した場合、磁場非曝露群に比較して、細胞集団が全体的に磁力線方向に平行に配向する傾向を見ることができた。一方、14 T 磁場では、2日間曝露により磁力線方向に平行な配向を観察した。

付着細胞の磁場配向が、浮遊細胞のように細胞膜あるいはマイクロ・チューブルのような細胞内骨格蛋白質の磁気異方性に起因しているのかどうか、現段階では不明である。



Figure 4. Orientation of smooth muscle cells which were guided by magnetically oriented collagen fibers.

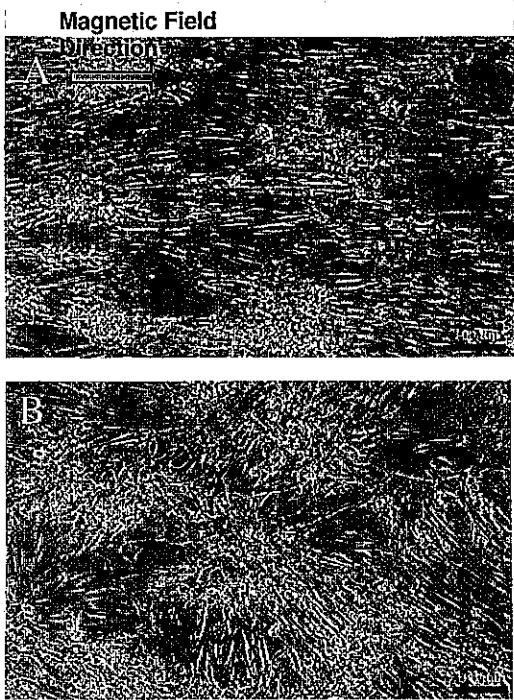


Figure 5. Magnetic orientation of rat's smooth muscle cell for itself after 2 weeks of incubation without (A) and with (B) an 8 T magnetic field.

2. 2. 3 血液中ヘモグロビン酸素化に対する磁場効果

ラットをマグネットボア内に設置したままで超電導コイルに流す電流を上昇・下降させ無侵襲酸素計測を行った結果、磁場の上昇に従いオキシヘモグロビンの濃度が上昇し、磁場の下降に従ってオキシヘモグロビンの濃度が減少した。これとは対照的に、磁場の上昇に従い、デオキシヘモグロビンの濃度が減少し、磁場の下降に従い濃度は増加した。すなわち、約 8 T の強磁場下において、ラット頭部でのオキシ/デオキシヘモグロビンの濃度は、それぞれ上昇および減少した。

さらに、磁場中分光装置を用いて赤血球およびヘモグロビン（ヒト・精製品）の光吸収スペクトル測定を行い、酸化型ヘモグロビンの酸化状態に 8 T 磁場が影響を及ぼすか否かを調べた。赤血球サスペンションの光吸収スペクトルでは、赤血球の磁場配向による光強度の変化等が観測された。しかし、ヘモグロビン溶液ではきれいなネガティブ・データが得られた。

以上の結果は、ヘモグロビンの酸素運搬機能に関して、分子レベルでは 10 テスラの強磁場影響は見られないが、細胞あるいは生物個体レベルで何らかの応答が強磁場に対して起きている可能性を示唆すると考えられる。

3. 研究成果

本研究は血液を構成する生体物質・細胞への磁場効果の有無とそのメカニズムを明らかにするため、血小板、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などの細胞、およびコラーゲン、ヘモグロビンなどの蛋白高分子を最大 14T の直流磁場に曝露し、機能や形態の変化が磁場中で生じる過程を光学的測定法を用いて研究した。その結果、以下のような成果を得ることができた。

- i) 8~14T 直流磁場による血小板凝集促進効果を光透過測定および顕微鏡観察で明らかにした。
- ii) 血管内皮細胞および血管平滑筋細胞の磁場配向現象が、8~14T 直流磁場下での数 2 日間以上の曝露で起こることを明らかにした。
- iii) ラット頭部の赤血球中ヘモグロビンの酸素化が 8 T 磁場中で促進される現象を、近赤外光を用いた非侵襲酸素濃度測定法を用いて明らかにした。

4. 今後の課題と発展

今回の主に細胞を用いた実験により、血液中で生じる血液凝固や血管形成に関与するプロセスが 10 T 程度の磁場の影響を受ける要因を示唆することができたが、今後、磁場下における血小板刺激時の形態変化や細胞内カルシウム濃度変化を調べて分子生物学的なメカニズム解明を行う必要がある。特に、細胞膜および細胞内骨格蛋白（マイクロチューブル）が数テスラ級の直流磁場で受ける反磁性磁気トルクによる細胞への力学的ストレス作用が、細胞機能変化とどのように関連するかを検討する。

また、血流の存在下において、磁場による血小板凝集促進効果がどの程度の影響をもつのか、生体内において実際に血小板凝集が起こりやすいのか否かについて、動物実験等により明らかにする必要がある。通常の血流速度の状況下でも凝集促進が観測されるのならば、凝固異常などの血栓症の治療に磁場を応用できる道が拓かれる。

血管内皮細胞と血管平滑筋細胞が磁場配向コラーゲン上あるいは細胞自身の磁化率異方性で並ぶ現象は、人工血管作成の際に細胞の配向方向を整えるための手段として利用されることも考えられる。

5. 発表論文

1. 強磁場下での付着細胞の配向現象、岩坂、小谷、上野、宇宙利用シンポジウム（第 16 回）論文集、2000、16、115-117
2. Aggregation of Blood Platelets in Static Magnetic Fields, Iwasaka, M., Takeuchi, M., Ueno, S., *IEEE Transactions on Magnetics*, 2000, (印刷中)
3. Magnetic Orientation of Collagen and Bone Mixture, Kotani, H., Iwasaka, M., Ueno, S., Curtis, A., *Journal of Applied Physics*, 2000 (印刷中)
4. ラット頭部の酸素化・脱酸素化ヘモグロビンに対する直流磁場効果、吉村、山口、岩坂、上野、*日本生体磁気学会誌*, 1999, 12, 39-46