

両生類の生活環に対する強磁場の影響—初期発生 of 形態学および分子生物学的解析—

広島大 柏木 啓子、藤原 好恒、坂尾 智美、古野 伸明、柳澤 誠、花田 秀樹、大阪大谷大
谷本 能文、JAXA 山下 雅道、徳島大 渡部 稔、東京都老人総合研 新海 正、鳥取大
吉留 賢、東京都臨床研 久保 英夫、鹿児島大 坂井 雅夫、札幌医大 藤井 博匡、放送大
内藤 富夫、愛媛大 鈴木 賢一、山陽女子短大・広島工大・広島大 柏木 昭彦

Effect of strong static magnetic fields on amphibian life cycle —morphological and molecular biological analyses of early development—

Keiko Kashiwagi, Yoshihisa Fujiwara, Satomi Sakao, Nobuaki Furuno, Makoto Yanagisawa,
Hideki Hanada, Yoshifumi Tanimoto, Masamichi Yamashita, Minoru Watanabe, Tadashi Shinkai,
Satoshi Yoshitome, Hideo Kubo, Masao Sakai, Hirotada Fujii, Tomio Naitoh, Ken-ichi Suzuki and
Akihiko Kashiwagi

Institute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima
739-8526

E-mail: kkashiwa@sci.hiroshima-u.ac.jp

Abstract: Life on earth is constantly exposed to a variety of natural and artificial electromagnetic and static magnetic forces. In order to help clarify the effects of such exposure on biological systems, we investigate the effects of static magnetic fields on embryos of *Xenopus laevis* as well as the expression of *Xotx2* (an important regulator of fore- and midbrain morphogenesis) and *Xag1* (essential for cement gland formation). Results showed that: (1) Embryos developed from treated eggs were non-viable and had multiple malformations including two- or microcephalic heads, deformed cement glands and abnormal body proportions. The eyes and brain were morphological deficient or entirely absent. (2) *Xotx2* and *Xag1* expression was suppressed. Abnormal expression of these genes together with poor viability are possibly responsible for obstruction of egg cortex rotation, incomplete formation of grey crescent and changes in spatial distribution of genes.

Key words: Biological effects of magnetic fields, amphibian embryonic development, *Xotx2* and *Xag1* gene expression

地球上の生物は、宇宙からの磁場、太陽の磁場、地磁気といった自然磁場、および人工磁場に絶えず曝されている。宇宙磁場の起源については、宇宙が誕生した頃に生じた物質の密度むら、すなわち密度ゆらぎが有力視されている¹⁾。宇宙磁場は微弱であるが、重力とともに、天体活動に重要な役割を演じている。地磁気圏は太陽からの有害な荷電電子（プラズマ）の流れ（太陽風）を遮断して地表の生物を保護している。液状外核の複雑な運動によって地球の南北磁極が生じて、地球の磁場が保たれている。現在の磁場は南極（N極）から北極（S極）に向かっているが、過去に何度も磁場が逆転したことがわかっている²⁾。

地球生命史において、その時代に生存した生物種のうちの70%以上が減んだ大絶滅事件が、オルドビス紀/シルル紀境界（約4億4370万年）、デボン紀後期（約3億6700万年前）、ペルム紀/三畳紀境界（2億5100万年前；史上最大規模の絶滅）、三畳紀/ジュラ紀境界（1億9960万年前）、白亜紀/古第三紀境界（6550万年前；恐竜が絶滅）、と少なくとも5回起きている³⁾。この大絶滅の原因に、隕石衝突、大規模な火山活動による気候変動、大気や海洋の酸素量の極端な減少、海退、寒冷化の他に、地球磁場の逆転があげられる。この大絶滅のあとで生物相は大きく変化し、それまで繁栄していたグループは滅び、それに代って別な小グループが勢力を拡大して多様化し新時代が到来している。

水から陸に最初に上がった脊椎動物は両生類で、3億7700万年前のことである。上陸後に4回も大絶滅事件に遭遇したはずであるが、消滅しないで今日でも南極大陸と大洋の島々を除く世界各地に広く分布している。両生類には、おそらく、磁場変動など絶滅に至らしめるような外因から身を守り種の存続を可能にさせる何らかのメカニズムが備わっているものと思われる。両生類は磁場影響について調べるには格好な実験動物となりうる。

私たちの身边には電磁場を利用する機器が多数存在し、電磁場による健康影響に対する関心は高いが、疫学研究と動物実験では相反する結果が出ている。湯ノ口ら⁴⁾は、電磁調理器とメリットコイルで発生する20kHzの電磁場曝露は、アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)オタマジャクシの変態を早めることを報告している。両生類の磁

場に対する影響については、Neurath⁵⁾の報告が最初である。この研究者によれば、磁場強度1T（勾配+83.5T²m⁻¹）の静磁場(SMF)に曝露するとヒョウガエル(*Rana pipiens*)胚の発生が著しく阻害される。Denegreら⁶⁾も、両生類胚の卵割面に対するSMF(≤16.7T)の曝露影響を報告した。これに対して、磁場(14T)は胚に対して影響をおよぼさないという報告⁷⁾もある。

ここでは、私たちの研究「両生類胚の発生および遺伝子発現に対する強度のSMF（強磁場）の影響」⁸⁾について紹介する。

1. 材料と方法

本実験に用いた超伝導磁石は最大15T、1500T²m⁻¹の垂直磁場を直径40mmの室温ボア内に365日連続して発生が可能である。本実験では、私たちが長年にわたって広島大学大学院附属研究施設で継代繁殖を行ってきたアフリカツメガエルの成熟した雌雄を使用した。雌にhCGの注射による排卵を促進させ、雄との人工媒精によって受精卵を得た。この受精卵の一部を過重力実験にも用いた。受精卵は正常卵割率が90%以上で、先在する障害のないことを示していた。ボア内の恒温筒中に、媒精後20分の卵（第二極体が放出された場所を確認）・2細胞期・胞胚を入れた小型シャーレを置いてから、異なる3磁場——11T（-1400T²m⁻¹）、15T（0T²m⁻¹）、12T（+1200T²m⁻¹）——を印加した。筒の温度は恒温槽から水を還流させて20°Cに保った。発生段階の判別はNiewkoopとFaber⁹⁾に従った。受精卵を無処理対照群とし、20°Cに置いて発生させた。内部構造を調べるために、胚をブアン液で固定し、連続切片を作製したのち、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。対照群の胚が尾芽胚期に到達したときに、2個の遺伝子—*Xotx2*(前脳・中脳・眼の発生に役割を担う)および*Xag1*(セメント腺の形成を調整する)—の発現についてwhole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションで調べた。

2. 結果

2-1. 初期発生に対する影響

媒精後20分の未分割卵を2細胞期（以下では、‘処理卵から発生した胚’と表現する）、2細胞期胚を胞胚期、胞胚を神経胚期まで磁場に曝した。曝露後の胚は、同一条件下に併置した無処理対照群との間で生存率を比較し

た。処理卵から発生した胚の場合、のう胚期ではもとのレベルの20~30%、神経胚期では60%まで下がり、時間経過とともにさらに低下した(図1a)。生存の見込みのない個体には、短軀、丸みを帯びて膨らんだ腹部、矮小、小頭症や双頭症、セメント腺形成不全症などの異常が見られた(図1c, d)。それらの内部構造にもさまざまな異常——形態的に不完全な眼や脳、未分化な脊索、発達異常のセメント腺など——が見られた(図1b)。これに対して、他の2つの実験群では生存率および内部形態ともに対照群との間に違いは認められなかった。

2-2. 遺伝子発現に対する影響

対照群では *Xotx2* は前脳や中脳の領域で発現したが、一方、処理卵から発生した胚では *Xotx2* の発現は著しく縮小したり、あるいはまったく見られなかった(図1c)。 *Xag1* は対照群のセメント腺で見られたが(図1d)、処理卵から発生した胚では異所性発現が起こった。他の実験群の胚における2遺伝子の発現は正常であった。

3. おわりに

強磁場下でのアフリカツメガエル胚の発生および遺伝子発現に関する本研究結果から、受精後20分での処理は顕著な発生阻害と遺伝子の異常発現をもたらすことが示唆された。

本研究で印加した3磁場の強度は、(A) 15 T、(B) 12 T、(C) 11 Tと大差はない。ところが、磁場強度×勾配の3磁場間での違いは大きい。つまり、(A) は磁気力の作用しない普通の1 G環境にあるが、(B) では磁気力により水に対して1.8 Gの過重力、(C) では0 Gの擬似微小重力が負荷された状態になっている。ここで勾配磁場による磁気力の影響が問題になるが、否定する証拠がある。その研究を取り上げてみよう。

その一つは私たちの過重力に関する研究である。本実験で用いた雌雄から得た受精卵を過重力実験でも使用した。受精後20分の卵に2 Gまたは5 Gを曝露した結果、5 G処理群において、①著しい発生阻害と、小頭や双頭などをもつ個体の出現、② *Xotx2* と *Xag1* 発現の抑制、③ 眼や脳にアポトーシスが見られた。一方、2 G処理群に

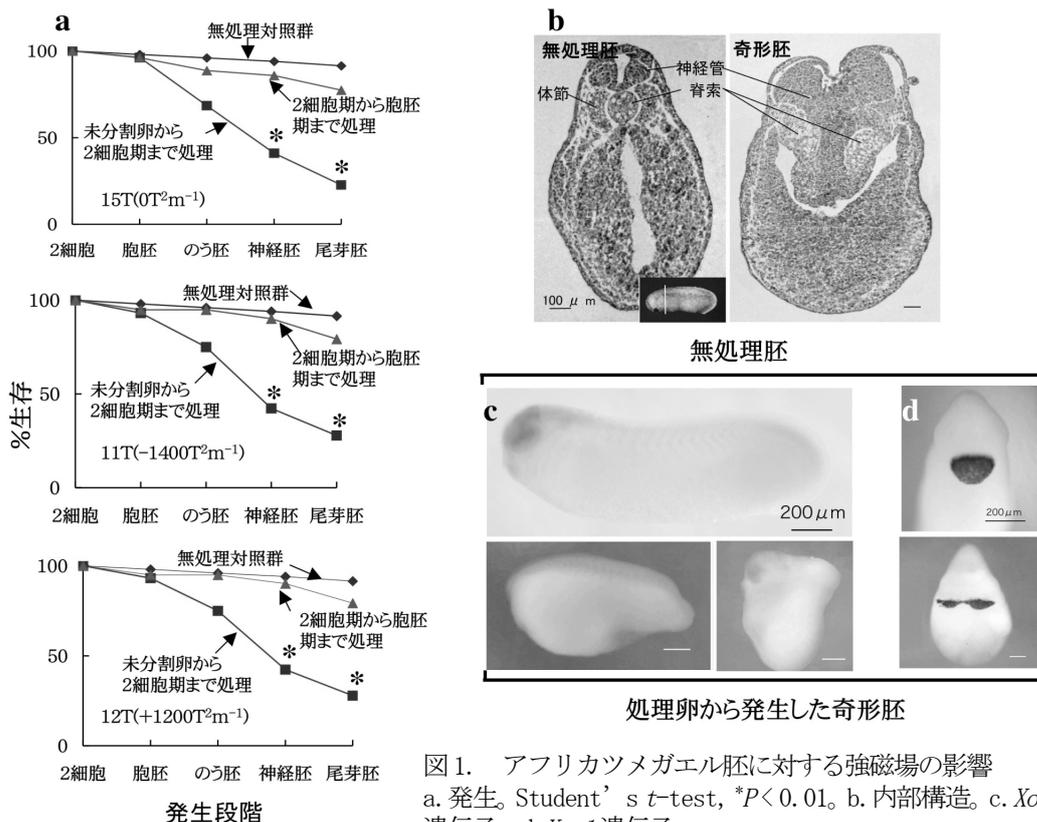


図1. アフリカツメガエル胚に対する強磁場の影響
a. 発生。Student's *t*-test, **P* < 0.01. b. 内部構造。c. *Xotx2* 遺伝子。d. *Xag1* 遺伝子。

異常はなかった。

al., *Biol. Sci. Space* **16**, 3-11 (2002).

もう一つが宇宙実験である。受精卵を宇宙などの無重力環境に暴露し、発生経過をたどる実験が両生類を用いて行われている¹¹⁾。宇宙では実際に受精が可能で胚も発生する。たとえ異常が生じたとしても軽度で調整能力が働いて正常に戻る。

以上の事実から、受精卵に対する磁場影響は磁場強度に起因すると考えられる。磁場強度は、①卵と精子の接触・融合に引き続いて起こるはずの卵表層回転を阻害する、②胚発生に重要な灰色三日月環を形成不全にする、③遺伝子の空間配置を変更する、などして受精卵の発生に影響を与えるものと推測される。磁場の生体に対する作用メカニズムの解明にはさらなる研究が必要である。

参考文献

- 1) Ichiki, K. *et al.*, *Science*, **311**, 827-829 (2006).
- 2) Uffen, R. J., *Nature*, **198**, 143-144 (1963). Raup, D. M., *Nature*, **314**, 341-343 (1985).
- 3) Raup, D. M., *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 6758-6763 (1994). Jablonski, D., *Science*, **253**, 754-757 (1991).
- 4) Chuman, A. *et al.*, *J. Magn. Soc. Jpn.*, **31**, 263-267 (2007).
- 5) Neurath, P. W., *Nature*, **219**, 1358-1359 (1968).
- 6) Denegre, J. M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 14729-14732 (1998).
- 7) Iwasaka, M. *et al.*, *Applied Electromagnetics and Mechanics*, (eds.) Takagi, T. and Uesaka, M., (JSAEM, Tokyo), 401-402 (2001).
- 8) Kawakami, S. *et al.*, *Jap. J. Appl. Phys.*, **45**, 6055-6056 (2006).
- 9) Nieuwkoop, P. D. and Faber, J., *Normal Tables of Xenopus laevis (Daudin)*. North-Holland, Amsterdam (1956).
- 10) Kawakami, S. *et al.*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **Part A 145**, 65-72 (2006).
- 11) Aimar, C. *et al.*, *Biol. Rep.*, **63**, 551-558 (2000). Souza, K. A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 1975-1978 (1995). Gualandris-Parisot, L. *et*