

極低周波電界処置による MC3T3-E1 細胞の石灰化促進効果の再現 — 装置差による影響の検証 —

非会員 富川 武記* 非会員 黒井 俊哉** 正員 原川 信二***a)

Reproduction of Calcification-Promoting Effects of MC3T3-E1 Cells by Exposure to Extremely Low-Frequency Electric Fields — Verification of the Influence of Equipment Differences —

Takeki Hamasaki*, Non-member, Toshiya Kuroi**, Non-member, Shinji Harakawa***a), Member

(2025 年 6 月 27 日受付, 2025 年 8 月 25 日再受付)

In this study, we aimed to verify the reproducibility of a previous report suggesting that extremely low-frequency electric fields (ELF-EFs) promote calcification in differentiated MC3T3-E1 cells. A follow-up experiment was conducted using a system engineered to produce the most spatially uniform 60 Hz EF achievable under experimental conditions, which constituted a feature of this study. The exposure conditions were 3 hours per day for 9 consecutive days, and calcium deposition was quantified using alizarin red staining. As a result, a significant enhancement of calcification was observed in the ELF-EFs exposure group, consistent with previous findings. These results reinforce the hypothesis that exposure to ELF-EFs enhances mineralization in osteoblast-like cells.

キーワード: 物理療法, 外因性電界, 骨粗しょう症

Keywords: physical therapy, exogenous electric fields, osteoporosis

1. はじめに

極低周波帯の電界 (EF) 処置は筋骨格系の疼痛, 不眠や便秘などの不定愁訴の緩解を効能とする治療に応用され⁽¹⁾, 日本や韓国, 中国など数カ国で普及している⁽²⁾。体表の振動及び体内に誘導される電流などが効果のトリガーと考えられている⁽³⁾。齧歯類を用いた研究において, 拘束が誘導する

ストレスホルモン (グルココルチコイド・硫酸蛍光法, コルチコステロン・ELISA) の血中濃度上昇が EF 処置により抑制され, 同作用への EF 強度や体表分布の違いの関与が示されている⁽⁴⁾⁽⁵⁾。極低周波電界 (ELF-EF) の生物学的作用に着目した研究は依然として限定的である中で, 近年著者らは, 分化 MC3T3-E1 細胞における ELF-EF の石灰化促進作用を報告した⁽⁶⁾。本研究では, 平等電界性を強化した装置を用いることより, 骨芽細胞様細胞に対する ELF-EF の作用の再現性について検討した。

2. 材料と方法

〈2・1〉 ELF-EF 処置 実験は先行研究に準じた⁽⁶⁾。安定的な EF 強度および方向を維持するため平行平板電極を用いた (Fig.1, (360 mm×360 mm, 厚さ 1 mm, 電極間 100 mm, 白寿科学研究所, 東京)。上部電極を接地し, 下部電極に 60 Hz 1kV (昇圧装置: 白寿科学研究所) を入力し, 電界強度は 10 kV/m とした。実験区は次の 4 種類を設定した。Group A, gA, 下部電極中央で培養; Group B, gB, 下部電極中央にてスパーサーにて 20 mm 浮かせて培養; Group ng, ng, 電極外で培養; Group pc, pc, 電極外且つ分化培地で培養 (Fig.1)。な

a) Correspondence to: Shinji Harakawa. E-mail: sharakawa_hakuju@obihiro.ac.jp

* 九州大学農学研究院

〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1

Laboratory of Functional Water, Food and Energy, Faculty of Agriculture, Kyushu University

3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

** 白寿科学研究所

〒151-0063 東京都渋谷区富ヶ谷 1-37-5

Hakuju Institute for Health Science Co., Ltd.

1-37-5, Tomigaya, Shibuya-ku, Tokyo 151-0063, Japan

*** 帯広畜産大学 生命平衡科学講座

〒080-8555 北海道帯広市稲田町

Bio-Self-Regulating Science Laboratory, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

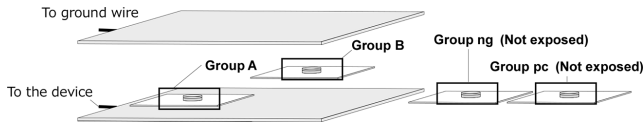


Fig. 1. Overview of the apparatus used to produce ELF-EF and expose cells to ELF-EF. The upper electrode is grounded and a voltage is applied to the lower electrode. Four test conditions were used, each named Group A (gA, cultured on lower electrode), Group B (gB, cultured in the center of parallel metal plates), Group ng (ng, cultured without ELF-EF exposure), and Group pc (pc, cultured without ELF-EF exposure in differentiation medium).

お、EF 処置は平行平板部を 37℃、5%CO₂、95%湿度のインキュベータ内に組み込み、1 日 3 時間として連続 9 日間行った。

〈2・2〉 細胞培養及びアリザリンレッド染色 マウス骨芽細胞前駆細胞株 MC3T3-E1 の培養およびアリザリンレッド染色によるカルシウム沈着定量は Hamasaki らの方法を用いて行った⁽⁶⁾。染色された細胞から塩化セチルピリジニウム溶液にて色素を溶出し、マイクロプレートリーダーを用いて 550 nm での吸光度を測定した。細胞培養の概要は次のように行った。MC3T3-E1（理研バイオリソース）を 10%FBS およびペニシリンを加えた α -MEM（東洋紡）で培養した。骨芽細胞分化誘導のため、L-アスコルビン酸（100 μ g/mL）および β -グリセロリン酸（10 mM）を含む骨形成分化培地で培養した。

3. 結果と考察

骨形成過程において、骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化誘導され、骨前駆細胞、未成熟骨芽細胞、成熟骨芽細胞を経て最終的に骨細胞へと分化する。骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 は分化誘導培地で培養することで、同様の段階を経ることが知られている。MC3T3-E1 細胞は、分化誘導培地で約 20 日間培養することで成熟骨芽様細胞へと分化し、石灰化能が上昇する。先行研究において我々は ELF-EF 処置がこの成熟骨芽様細胞における石灰化能を促進することを明らかにした⁽⁶⁾。本研究では、同作用の再現性検証を目的として、EF の向きと強度を安定させた条件にて行ったもので、結果を Fig.2 に示す。

図中 ng は分化培地にて 20 日培養した MC3T3-E1 細胞を通常培地に戻しさらに 9 日間培養したものであり、染色量の増加は 9 日間後においてもほとんど認められなかった。pc は、20 日以降も引き続き分化培地で培養したもので、明らかなカルシウム沈着の増加が認められた。gA 及び gB は ng と同じ条件で培養しているが ELF-EF を処置されている点異なる。gA は下部電極の直上に配置し、gB は電極中央からスパーサーによって浮かされた状態にて配置した。9 日間の ELF-EF 処置期間後、gA 及び gB のいずれにおいても、アリザリンレッド染色によって示されるカルシウム形成量が ng と比較して有意に増加していることが確認された

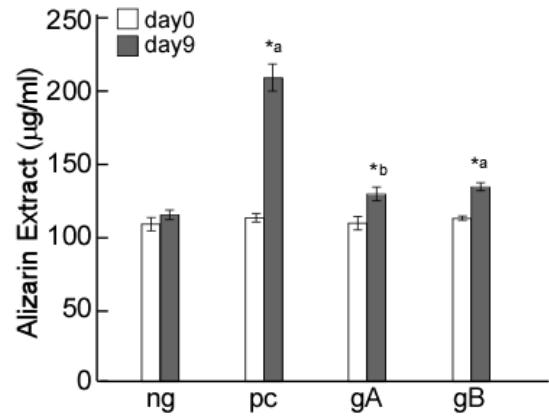


Fig. 2. Calcium deposition in differentiated MC3T3E1 cells. See Fig. 1 for notation. Data indicate average \pm SE of three independent experiments (n=6). *a and *b indicate $p < 0.01$ and $p < 0.05$ versus control (ng), respectively.

($p < 0.01, 0.05$)。gA 及び gB 間での染色量に有意差は認められなかった。以上の結果は、先行報告の結果とも一致している⁽⁶⁾。平行平板内の ELF-EF 強度は理論上一定であることから、ng との差は、同細胞のカルシウム沈着への EF 処置の関与を支持すると考えられる。

本研究では、ELF-EF による骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の石灰化促進効果の再現性の検証を、平等電界を形成する環境を整え実施したところ、ELF-EF 処置群では非処置群と比較してカルシウム沈着の有意な増加が認められ、先行研究と同様の傾向が確認された。今後は、本作用における EF 条件の最適化や作用機序の解明を通じて、ELF-EF に関するさらなる基礎的情報の蓄積と、本知見の医療応用への展開、特に、骨粗鬆症など骨代謝異常疾患への展開が期待される。さらに、将来的応用に向けて、in vivo モデルを用いた検証も重要である。

文 献

- (1) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構：「家庭用電位治療器」，<https://www.pmda.go.jp/safety/consultation-for-patients/on-devices/qa/0013.html> (2023/3/14) (in Japanese)
- (2) 日本医療機器産業連合会：「医療技術のアジアとの連携・交流拡大に向けた政策提言」，https://www.jfmda.gr.jp/metis/teigen/pdf/110603/asia_teigen_siryou.pdf (2023/6/20) (in Japanese)
- (3) International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection ICNIRP：「Principles for Non-Ionizing Radiation Protection」，Health Phys., Vol.118, No.5, pp.477-482 (2020)
- (4) S. Harakawa, T. Nedachi, and H. Suzuki：「Extremely low-frequency electric field suppresses not only induced stress response but also stress-related tissue damage in mice」，Sci. Rep., 10, 20930 (2020)
- (5) D. Kantar, A. D. Acun, H. Er, E. Afsar, and P. Yargicoglu：「Anxiolytic-Like Effects of Extremely Low Frequency Electric Field in Stressed Rats: Involvement of 5-HT2C Receptors」，Int. J. Radiat. Biol., 1-10 (2022)
- (6) T. Hamasaki, K. Teruya, and Y. Katakura：「Exposing differentiated osteoblast-like MC3T3-E1 cells to extremely low-frequency electric fields has calcification-promoting effects」，IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul., Vol.31, No.2, pp.642-648 (2024)