

# 回転円磁界がシトクローム P450 2C9 の酵素活性に与える影響

藤本千草<sup>1)</sup>, 平川栄一郎<sup>1)</sup>, 三木洋<sup>2)</sup>, 大森正樹<sup>3)</sup>, Wendell D Winters<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 香川県立医療短期大学臨床検査学科 <sup>2)</sup> 香川医科大学第1病理学

<sup>3)</sup> Department of Microbiology, University of Texas Health Science Center

## Effects of Circularly Polarized 60 Hz Magnetic Fields on an Activity of Cytochrome P450 2C9 in vitro

Chigusa Fujimoto<sup>1)</sup>, Eiichiro Hirakawa<sup>1)</sup>, Hiroshi Miki<sup>2)</sup>,  
Masaki Ohmori<sup>3)</sup> and Wendell D Winters<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Science,

<sup>2)</sup> Department of Pathology, Kagawa Medical University,

<sup>3)</sup> Department of microbiology, University of Texas Health Science Center

### Abstract

Our previous study revealed that exposures to environmental levels of 60 Hz magnetic fields can significantly change DNA synthesis in cell free systems. These magnetic fields appeared to act mainly at the site of DNA polymerase I and reverse transcriptase, both of which require bivalent cations for full activities. Based on these consistent results, we now attempted to elucidate whether or not exposure to these same type magnetic fields could directly influence metal containing enzyme activity. The purpose of the present study was to determine if exposure to an environmental type circularly polarized 60 Hz magnetic field could alter activities of cytochrome P450 (CYP) 2C9, a heme containing enzyme. Replicate sets of tubes containing reaction mixtures, CYP2C9 and diclofenac were prepared and randomly assigned in equal numbers to temperature controlled plastic boxes located within one of two identical units in the same room with 3.5 meters apart. During triplicate experiments, one of the two units was powered to produce magnetic field exposure at levels of 14  $\mu$ T, 70  $\mu$ T, 140  $\mu$ T, or 280  $\mu$ T. The 4'-hydroxylation of diclofenac is catalyzed by CYP2C9, thus the diclofenac assay is specific for measurement of an activity of CYP2C9. In these studies, CYP2C9 metabolized diclofenac to 4'-hydroxydiclofenac was analyzed by high performance liquid chromatographic methods. Exposure to magnetic fields at 70  $\mu$ T, but not at 14, 140 or 280  $\mu$ T, induced decreased amounts of 4'-hydroxydiclofenac with a rate

\*連絡先: 〒761-0123 香川県木田郡牟礼町大字原281-1 香川県立医療短期大学看護科

\*Corresponding address: Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Sciences, 281-1 Hara, Mure-cho, Kita-gun, Kagawa 761-0123, Japan

of decrease of 3.3% compared with non exposed controls. These results show that an activity of CYP2C9 was influenced by 70  $\mu$ T circularly polarized, sine wave varying 60 Hz magnetic fields. One possible explanation for the results is that the magnetic fields may directly affect heme containing CYP2C9 leading to change of its enzyme activities.

**Key Words :** 回転円磁界 (Circularly Polarized Magnetic Fields),

シトクローム P450 (Cytochrome P450), ジクロフェナック (Diclofenac),

4'-ヒドロキシジクロフェナック (4'-hydroxydiclofenac)

## はじめに

現在、電磁場の生体への影響について多くの研究がなされているが、酵素反応や各種生体反応に対する磁場効果の研究も進められている。例えば、様々な種類や強さの電磁場の影響下でグルタミン脱水素酵素<sup>1)</sup>、オルニチン脱炭酸酵素<sup>2,3)</sup>、B<sub>12</sub>エタノールアミンアンモニア脱離酵素<sup>4)</sup>、プロテインキナーゼ<sup>5,6)</sup>などの酵素活性に変化がみられることが報告されている。我々は最近、回転円磁界がDNA合成に影響を与え、2価の陽イオンを必要とする逆転写酵素およびDNAポリメラーゼIの活性が磁場の影響を受けることを報告した<sup>7)</sup>。

シトクローム P450 (CYP) は450nm付近に吸収を示す一群のプロトヘムタンパク質の総称である。モノオキシゲナーゼとして働き、2個の電子と酸素分子を用いて脂溶性基質の酸素添加反応を触媒する。各種のステロイドホルモン、胆汁酸、プロスタノイドの合成・分解反応、脂肪酸の $\omega$ 酸化、ビタミンDの活性化反応などの他に、無数の外来薬物や体内に取りこまれた環境汚染物質などの酸化解毒反応に関与している。CYPは肝臓に多く存在し、CYP2CとCYP3Aはヒト肝臓ミクロゾームの主要構成要素である<sup>8)</sup>。その中でもCYP2C9はジクロフェナック、トルブタミド、ワーファリン、ヘキサバルビタールなどを基質とする酵素群であり、ジクロフェナックを4'-ヒドロキシジクロフェナックへと代謝する<sup>9,10)</sup>。

そこで今回、ヘム酵素であり生体において重要な役割を果たすシトクローム P450に着目し、CYP2C9とジクロフェナックを用いてその酵素活性と磁界の関係について検討した。

## 材料と方法

### サンプル調製

CYP2C9にはCYP2C9 RECO System (Pan-Vera Co. WI USA) を用いた。その添付されたプロトコール<sup>9)</sup>に従い、ミリQ水に溶解した5mMジクロフェナック (GENTEST Co. MA USA) を基質として反応を行った。25 pmol/mlのCYP2C9 (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5) と100  $\mu$ Mのジクロフェナックを含む反応液を作り、37°C 3分間プレインキュベイト後、ミリQ水に溶解した50 mM NADPH (シグマ) を加え直ちに磁場発生装置内に設置したプラスチック製恒温水槽へセットした。37°C 20分間反応させ、その間磁場を照射した。同時に行った対照実験は磁場発生装置から3.5m離れた場所に設置した同様の恒温水槽にて37°C 20分間反応させた。反応後、Stop Solution (94:6 v/v アセトニトリル:氷酢酸) を加え反応を停止させ、HPLCにて分析した。各磁界強度において磁場照射群5サンプル、対照群5サンプルの計10サンプルずつ行い、これを3回繰り返した。

### 磁場発生装置

X-Y (2軸) ヘルムホルツ式磁場発生装置 (日本電磁測器) を使用し、照射には回転円磁界を用いた<sup>7)</sup>。変圧器には出力電圧を0~15 Vまで連続的に可変できる摺動型単巻変圧器であるボルトスライダ (山菱電機)、電源装置にはヘルムホルツ式コイル用スイッチング方式交流安定化電源 SEGO-30-15 (山菱電機)、循環式恒温装置にはスーパースタットミニPID (アトー) を用い、循環用のポンプにはテンプコン (アトー) を用いた。磁場照射装置中央20cm四方の空間内は一定磁場を保たれていることを確認後、恒温水槽をその空間内に設置した。37°C 20分間インキュベイト時に0  $\mu$ T (スイッチ OFF)、14  $\mu$ T、70  $\mu$ T、140  $\mu$ T、280  $\mu$ Tの5種類の磁場を照

Table 1. Activity of CYP2C9 in each magnetic field strength

Strength of Magnetic Field ( $\mu\text{T}$ )	CYP2C9 activity % of control
0	100.6 $\pm$ 1.0*
14	101.5 $\pm$ 0.7
70	97.3 $\pm$ 0.6
140	101.3 $\pm$ 1.5
280	99.4 $\pm$ 1.0

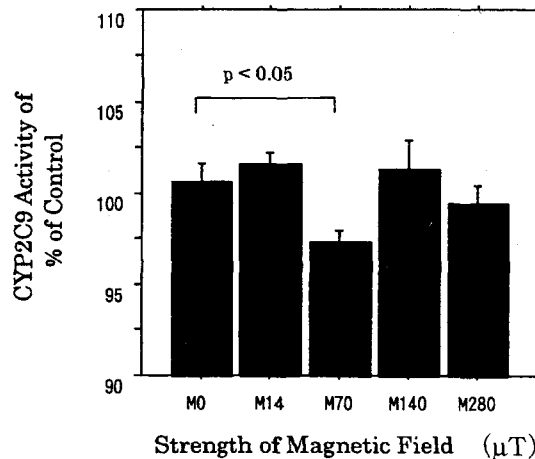
\* Mean  $\pm$  S.E (n = 15)

Fig. 1 Activity of CYP2C9 in each magnetic field strength.

射し, その都度対照実験も同時に行った. 対照の磁場強度はそれぞれ10 nT, 10 nT, 10 nT, 20 nT, 20 nTであった. 温度計測には小型デジタル温度計 D615 (TECHNOL-7) を使用し, 恒温水槽は常に  $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$  に保ち, 磁場による温度上昇のないことを確認した. 実験場所の地磁気は水平分力31646 nT (広島) であり, 磁場計測には magnetic field meter MFM16A (SHODEN) を使用した.

#### HPLC による分析

4'-ヒドロキシジクロフェナックは Leemann ら<sup>9)</sup>の方法に従い高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (東ソー) で測定した. カラムは TSKgel ODS-80Ts (東ソー) を用い, 緩衝液 A (1 mM 過塩素酸を含む30%アセトニトリル), 緩衝液 B (メタノール) を用いた. 30%緩衝液 B (70%緩衝液 A) で開始, 1分後に直線勾配をかけ始め6分後に100%緩衝液 B (0%緩衝液 A) にした. 2.5倍希釈した試料を流速1.2 ml/min で溶出し, 280 nm の吸光度で検出した. 逆相 HPLC による4'-ヒドロキシジクロフェナックの測定結果をもとに, それぞれの磁界

強度における磁場照射群と対照群との比 (照射群/対照群) をとり比較した. すなわち, 対照群を100%として照射群の酵素活性を比較検討した. 結果は StatView4.5を用いて t 検定を行った.

## 結 果

0  $\mu\text{T}$ , 14  $\mu\text{T}$ , 70  $\mu\text{T}$ , 140  $\mu\text{T}$ , 280  $\mu\text{T}$  の各磁界強度照射における CYP2C9 酵素活性の変化を Table 1 と Fig. 1 に示す. その結果, 70  $\mu\text{T}$  照射時に  $97.3 \pm 0.6\%$  (平均値  $\pm$  標準誤差) であり, コントロールである 0  $\mu\text{T}$  時の値  $100.6 \pm 1.0\%$  と比較すると, 3.3% の減少がみられた ( $p = .0105$ , t test). しかし, 14  $\mu\text{T}$  照射時  $101.5 \pm 0.7\%$ , 140  $\mu\text{T}$  照射時  $101.3 \pm 1.5\%$ , 280  $\mu\text{T}$  照射時  $99.4 \pm 1.0\%$  においては, 有意な差は認められなかった.

## 考 察

この数十年間に電磁場の生体への影響について関

心が高まり、磁場が酵素活性に与える影響について多くの報告がなされている。これらには、影響を認めた報告とないとする報告がみられる。Haberditzl<sup>1)</sup>のグルタミン酸脱水素酵素に関する報告、Byusら<sup>2)</sup>のオルニチン脱炭酸酵素に関する報告、Tuinstraら<sup>6)</sup>のプロテインキナーゼに関する報告では使用した磁界の種類や強さ、実験条件は異なるが、磁場により各酵素活性に増加あるいは減少が認められている。ところが、Rabinovitchら<sup>11,12)</sup>のリボヌクレアーゼ、ポリフェノール酸化酵素、アルドラーゼに関する報告、Uenoら<sup>13)</sup>のキサンチン酸化酵素に関する報告などでは各酵素活性には磁場の影響は認められていない。我々は、回転円磁界が2個の陽イオンを必要とする逆転写酵素およびDNAポリメラーゼIの活性に影響を与えることを報告したが<sup>7)</sup>、一方で、mRNAからの翻訳あるいはDNAからの転写に作用するRNAポリメラーゼ活性には影響は認められなかったと報告した<sup>14,15)</sup>。以上のように相反する結果が生じる原因としては、用いた磁界の種類や強度が異なることや酵素や核酸あるいは用いた細胞の種類によって磁場に対する感受性が異なるなどの要因が関与していると想像されるが、未だ結論は出しておらず酵素活性への影響については統一した見解は得られていない。

今回の実験では、70  $\mu$ Tの回転円磁界によりCYP2C9の活性が3.3%減少したが、その原因として磁場が細胞や細胞膜へ影響した可能性が考えられる。磁場の影響が認められたと報告されているオルニチン脱炭酸酵素活性は、細胞膜を介したシグナル伝達により制御されており<sup>2,3)</sup>、また、細胞や組織を使った実験において、超低周波(50 Hz)変動磁界はサイクリックAMPや細胞内カルシウムイオンの濃度の変化、プロテインキナーゼCを介したシグナル伝達系に影響を及ぼす可能性が示唆されている<sup>16)</sup>。しかし、本実験では細胞や細胞膜を必要としないrecombinant CYP2C9を用いているので、これらの細胞や細胞膜が関係するシグナル伝達系などの要因は除外できると考える。

次にラジカルペア形成の可能性であるが、Grisomら<sup>4)</sup>はB<sub>12</sub>エタノールアミンアンモニア脱離酵素の酵素反応系に0.15 Tの静磁場を照射し、ラジカルペアが形成されることにより活性が減少したと報告している。最近では、ペルオキシダーゼの酵素活性もラジカルペア形成により影響を受けたと報告されている<sup>17)</sup>。また、Eichwaldら<sup>18)</sup>は磁場照射によるラジカルペア形成で、シトクロームP450の活性

がどれぐらいの影響を受けるか理論的に計算しているが、それによれば1-10 mTでシトクロームP450の酵素活性は数%の変化を受けるだろうと予測している。本実験で使用した磁界は変動回転円磁界ではあるが、ラジカルペア形成が酵素活性を減少させた可能性は十分に考えられる。しかし、磁場が酵素反応に与える影響について統一した見解はみられず、またラジカルペア以外のメカニズムが存在する可能性もあるので、引き続き厳密な反応条件下での研究が必要である。

また、酵素活性の減少は70  $\mu$ T照射時のみ認められた。近年、磁場の影響は単に磁場の強度に比例するものではなく、特定の周波数や特定の強度に対して影響がみられる活性の窓が存在すると考えられている<sup>7)</sup>。従って、70  $\mu$ T照射時のみに変化がみられたのはおそらくこの活性の窓によるためと考えられた。

薬物代謝とは、一般に極性化によって薬物の生理活性や毒性が失われることが多いため解毒と称されてきたが、最近、化学発癌物質の多くがP450による代謝活性化によってDNAとの反応性を獲得すると報告され、さらに化学物質がP450による代謝を受けて毒性を増す例が報告されるようになった<sup>19-21)</sup>。今回、回転円磁界を用いた70  $\mu$ T照射でCYP2C9酵素活性に3.3%の減少がみられたが、*in vitro*の実験であるため、この3.3%の減少が生体内での薬物代謝などの反応に直接影響をもたらすかどうかは断定できない。しかし、このような背景を考えると、今回の実験結果はシトクロームP450と化学発癌との関係を考える上でも重要なことと思われる。

## 文 献

- 1) Haberditzl, W (1967) Enzyme activity in high magnetic fields. *Nature*, 213:72-73
- 2) Craig V. Byus, Susan E. Pieper and W. Ross Adey (1987) The effects of low-energy 60-Hz environmental electromagnetic fields upon the growth-related enzyme ornithine decarboxylase. *Carcinogenesis*, 8:1385-1389
- 3) M. Azadniv, C. M. Klinge, R. Gelein, E. L. Carstensen, C. Cox, A. A. Brayman and M. W. Miller (1995) A Test of Hypothesis That A 60-Hz Magnetic Field Affects Ornithine Decarboxylase Activity In Mouse L929 Cells *in vitro*. *Biochem Biophys Res*

- Commun, 214 : 627-631
- 4) Timothy T. Harkins and Charles B. Grissom (1994) Magnetic Field Effects on B<sub>12</sub> Ethanolamine Ammonia Lyase: Evidence for a Radical Mechanism. *Science*, 263 : 958-960
  - 5) Fatih M. Uckun, Tomohiro Kurosaki, Jizhong Jin, Xiao Jun, Andre Morgan, Minoru Takata, Joseph Bolen and Richard Luben (1995) Exposure of B-lineage Lymphoid Cells to Low Energy Electromagnetic Fields Stimulates Lyn Kinase. *The Journal of Biochemical Chemistry*, 270 : 27666-27670
  - 6) R. Tuinstra, E. Goodman and B. Greenebaum (1998) Protein Kinase C Activity Following Exposure to Magnetic Field and Phorbol Ester. *Bioelectromagnetics*, 19 : 469-476
  - 7) Eiichiro Hirakawa, Masaki Ohmori and Wendell D. Winters (1996) Environmental Magnetic Fields Change Complementary DNA Synthesis in Cell-Free Systems. *Bioelectromagnetics*, 17 : 322-326
  - 8) Murray M. Reidy GF (1990) Selectivity in the inhibition of mammalian cytochrome P450 by chemical agents. *Pharmacol Rev*, 42 : 85-101
  - 9) T. Leemann, C. Transon and P. Dayer (1992) Cytochrome P450TB (CYP 2 C) : A Major Monooxygenase Catalyzing Diclofenac 4'-hydroxylation in Human Liver. *Life Sciences*, 52 : 29-34
  - 10) Miura SM, Mori M, Takiguchi M, Tatibana M, Furuta S, Miyazawa S, Hashimoto T (1984) Biosynthesis and intracellular transport of enzyme of peroxisomal beta-oxidation. *J Biol Chem*, 259 : 6397-6402
  - 11) Rabinovitch, B., Maling, J. E and Weissbluth, M (1967) Enzyme-substrate reactions in very high magnetic fields. I. *Biophys. J*, 7 : 187-204
  - 12) Rabinovitch, B., Maling, J. E and Weissbluth, M (1967) Enzyme-substrate reactions in very high magnetic fields. II. *Biophys. J*, 7 : 319-327
  - 13) Ueno, S and Harada, K (1986) Experimental difficulties in observing the effects of magnetic fields on biological and chemical processes. *IEEE Trans. Mag. MAG-22* : 868-873
  - 14) Eiichiro Hirakawa, Masaki Ohmori, Hiroshi Miki and Wendell D Winters (1999) Environmental magnetic field exhibit no quantitative change in rabbit reticulocyte lysate translation system. *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*, : 553-556
  - 15) Hiroshi Miki, Masaki Ohmori, Eiichiro Hirakawa and Wendell D Winters (1999) Effects of Environmental Level Magnetic Field Exposures on Transcription of CMV Immediate Early Promoter DNA in A Cell-Free In Vitro Transcription System. *Bioelectromagnetics*, 20 : 519-521
  - 16) 上野照剛 (1998) 電磁界の性質と生体影響. *Jpn. J. Biometer.*, 35 : 5-11
  - 17) Taraban, M. B., Leshina, T. V., Anderson, M. A. and Grissom, C. B. (1997) Magnetic field dependence of electron transfer and the role of electron spin in heme enzymes: Horseradish peroxidase. *J. Am. Chem. Soc*, 119 : 5768-5769
  - 18) C. Eichwald and J. Walleczek (1995) Transition Metal Enzymes as Primary Targets of Magnetic Field Action on Biological System: A Theoretical Simulation with Cytochrome P450. *BEMS Abstract Book*, June 18-22 : 113
  - 19) 今井嘉郎, 鎌滝哲也 (1998) P450-その多様な機能と応用-. *蛋白質核酸酵素*, 43 : 203-215
  - 20) Vermeulen NPE (1996) Pole of Metabolism in Chemical Toxicity in Cytochromes P450. *Mwtabolic and Toxicological Aspects*. CRC Press, : 29-53
  - 21) 吉田雄三 (1998) 解毒反応の主役ダイバーソザイム P450の生物学. *肝臓胆*, 37 : 81-83

---

受付日 2001年1月5日