

200942032A

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

居室における中間周波電磁界に関する研究

(H21-健危-一般-008)

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 大久保千代次

平成22(2010)年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 居室における中間周波電磁界に関する研究 大久保千代次・・・ 1

### II. 分担研究報告

1. 居室における中間周波電磁界に関する研究（細胞研究班）・・・ 9

池畑政輝、吉江幸子、石井一行、小笠原裕樹

2. 居室における中間周波電磁界に関する研究（動物研究班）・・・ 19

牛山 明

3. 居室における中間周波電磁界に関する研究（電気工学班）・・・ 24

鈴木敬久、和田圭二、酒井泰二

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策研究事業）  
総括研究報告書

居室における中間周波電磁界に関する研究

大久保千代次 財団法人電気安全環境研究所 電磁界情報センター所長

研究要旨

中間周波電磁界を利用した機器が居室内を含め生活空間にも普及を遂げ、生活の利便性は益々向上しているものの、その健康影響に関する科学的情報が不足なため、国民の間にはこれらの機器からの電磁界の健康影響に対する不安が発生しており、健康安全・危機管理として早急な対応が求められている。本研究は、これに対応して、そのハザードの有無について、細胞ならびに動物を用いた基礎的な研究により追究することにある。電磁界の生体影響評価研究では電気工学的な定量が不可欠であるため、研究を電気工学班、細胞研究班、動物研究班の3班が共同研究を実施した。そもそも研究を目的とした中間周波電磁界ばく露装置が存在しないため、初年度、平成21年度の主目的は、細胞用の電磁界ばく露装置の開発であり、細胞研究班によるバリデーションである。これと平行して次年度以降の動物用電磁界ばく露のあり方等に関する検討も含まれる。これらの目的に沿って、電気工学班では主にばく露指標の検討と細胞用ばく露装置の設計手法の構築とばく露装置開発を行い、予定通りに20kHzの磁界を最大3.4mT（ICNIRPの一般公衆参考レベル(6.25 μT)の約540倍)の均一磁界（±5%以内）を持つ細胞用ばく露装置を開発した。細胞研究班では、主としてばく露装置のバリデーションとほ乳類培養細胞を用いた細胞影響評価の基礎試験を行った。磁界発生コイルに適合した培養装置として、非磁性体の培養器本体や温度・空気環境制御装置を用いることによって、上記の強磁界下でも安定的に動作する細胞ばく露用ばく露装置を開発した。また、ほ乳類培養細胞を用いた細胞影響評価の基礎試験を行い、予備実験として細胞の生育や染色体異常にばく露影響が無い事を確認した。動物研究班では、中間周波電磁界の生体影響に関する実験動物を用いた研究をレビューし、次年度以降の研究の方向性について検討を行った。

大久保千代次 財団法人 電気安全環境研究所 電磁界情報センター 所長  
多氣 昌生 首都大学東京大学院 教授

<研究の背景と目的>

電磁界の生体作用は、低周波領域では神経

や筋の刺激作用が支配的であり、高周波領域では生体の組織で電力エネルギーが吸収されることによって生じる温度上昇（熱作用）が支配的である。

中間周波（intermediate frequency, 以下IFと略）電磁界は、これらの間に挟まれる周

波数帯、すなわち 300Hz から 10MHz 程度の周波数の電磁界であり、刺激作用を持つ低周波領域と、熱作用を持つ高周波領域の中間に属する。これまで、この周波数領域においては、工業用の誘導加熱等を除けば、生活基盤を支える技術には応用されてこなかったため、その生体影響に関する研究についても余り行われていない。しかし近年、オール電化の推進に伴い、中間周波帯に含まれる電磁界を使用する IH 調理器の普及が進んでいる。IH 調理器では基本的に 20kHz~90kHz の電磁界を誘導加熱に利用するものである。しかしこの周波数帯の電磁界に関しては、これまで研究対象としての関心が低く、十分な科学的な知見が存在していない。そのため、2007 年に発刊された WHO の超低周波電磁界に関する環境保健クライテリア (EHC 238) では以下の通りに記載され、研究の推進が必須とされている。

「この領域のデータが欠落している現状を考慮し、すべてを包括する必要事項として、通常は 300Hz~100kHz (訳注：原文の儘) とされる中間周波電磁界に関する更なる研究が必要である。健康リスク評価に必要とされる知識ベースの極少数しか集まっておらず、既存の研究の多くは結果が一貫していないので、更なる具体化が必要である。健康リスク評価のための十分な IF データベースを構成するための一般的な要件には、ばく露評価、疫学研究、ヒト実験室研究、動物および細胞 (*in vitro*) 研究が含まれる」

本研究の目的は、IF 磁界を発する IH 調理器への健康影響に対する国民の懸念は国会でも取り上げられ、社会的問題になっており、健康安全・危機管理の対象となってい

ることも考慮し、生物学的なハザードの有無を明らかにすることである。そのためには、正確なばく露評価が可能になる細胞用ばく露装置を開発が不可欠である。申請者らは平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金特別研究において、ばく露装置の技術的検討を進めた。その知見を生かし本研究においては、初年度に、正確なばく露評価が可能になるばく露装置を開発するとした。更には、細胞研究班によるバリデーションがある。これと平行して次年度以降の動物用電磁界ばく露のあり方等に関する検討も含まれる。

なお、研究の特殊性からばく露装置の開発とばく露量評価を主目的とする電気工学班、ばく露に伴う細胞への影響評価を主目的とする細胞研究班および動物への影響評価を主目的とする動物研究班に分けて、それぞれ報告する。

## <電気工学班>

### A. 研究目的

物理工学的な視点から IF 電磁界における生体影響について検討する。本年度は特に細胞ばく露に必要なばく露条件の検討と細胞用ばく露装置の開発を目的とし研究を行った。また、アーチファクトに関する基礎検討として、磁界発生コイルに起因する温度上昇測定を目的とした。

### B. ばく露指標に関する検討

生物学的な影響を評価するためにばく露指標に関する検討を行っておく必要があり、ばく露装置の設計指標として、以下の項目を達成することを目的とした。

(1)周波数：20kHz。

(2)最大入射磁界：短時間運転時：

3.4mT（参考レベル（一般公衆）の約 540 倍）、連続運転時：2.0mT（参考レベル（一般公衆）の約 320 倍）。

(3) 細胞用のばく露空間は最低限 150mm×150mm×150mm とし、その領域内では磁界強度の偏差を±5% 以内とする。

(4) 容器のサイズを変更することにより、内部誘導量（誘導電流密度、誘導電界）の条件を変更可能であること。

## C. 関連研究

本研究の設計指針を明確にするために、過去の開発例の特徴を調べた。

### 1. 磁界発生用コイルに関する研究例

磁界発生装置を開発する上で、まず検討しなければならないのが磁界発生用コイル設計である。コイル設計次第で磁界強度・分布は勿論、電源回路部の設計も異なってくる。均一磁界分布領域を比較対象として、6種類のコイルについて、最も均一磁界を出力できるコイル構造を検討した。結論として、Merritt et al. によって提案されたコイル（以下Merritt4コイル）が最も均一磁界分布に優れており、尚且つ4台のコイルが同1辺長であるため製作面を考慮しても磁界発生用コイルとして実現性のあるコイルと言える。しかし、ここで検討されているのは非常に細い電線から構成されるコイルであり、実設計する際には電線径×巻数分のコイル長を考慮する必要がある。

### 2. Merritt 4 コイルと汎用交流電源を用いた開発例

前項でMerritt4コイルが最も均一磁界分布に優れたコイルであることがわかった。ここでは、Merritt4コイルを磁界発生用コイ

ルとして用いた開発例を検討した。2件の先行開発があったが、最高出力磁界強度は200  $\mu$ T（20 kHz）であったり、磁界発生装置の設計法に関しては述べられていないため、参考とはならなかった。

### 3. ソレノイドコイルとインバータを用いた開発例

ここでは、ソレノイドタイプの磁界発生用コイルと電源部にインバータを用いた開発例を検討した。

最高6.25 mT（23 kHz）を出力することができるものの、直径100 mm、高さ20 mmのシャーレを4台しか設置できない限局性が問題として残った。また、設計法に関しては全く述べられておらず、設計指針を示すのみとなっていた。

### 4. まとめ

Merritt4コイルが最も均一磁界分布に優れていると結論づけられている。しかし、検討されているのは非常に細い電線から構成されるコイルであり、実設計する際には電線径×巻数分のコイル長を考慮した設計が求められる。

## D. 磁界発生装置設計

本磁界発生装置は電源部に単相フルブリッジインバータとLC直列共振回路を用いた。また、装置全体を考慮した設計指針を示す。

### 1. 装置構成

磁界発生装置は、フルブリッジインバータとLC直列共振回路から構成されている。検討の結果、磁界発生装置の実用設計を構築するには、電流 $i_L$ とコイル形状の関係を明確にすることが求められると同時に、共振用コンデンサの耐圧など電氣的制限も同時に考慮する必要があることが分かった。

### 2. 設計指針

ここでは、磁界発生装置の設計指針を示す。次に示す4点を設計指針として磁界発生装置開発を行った。

- ・ 広範囲の均一磁界領域
- ・ 高磁界出力
- ・ ひずみの少ない20kHz交流磁界を発生
- ・ 長時間連続駆動に伴う発熱

### 3. まとめ

磁界発生装置の構成と設計指針を示した。電源部は単相フルブリッジインバータとLC直列共振回路で構成される。共振周波数20kHzで設計し、共振周波数付近で駆動させることでひずみの少ない正弦波交流磁界を出力させる。また、高磁界かつ広範囲の均一磁界を出力可能な磁界発生用コイルの設計が求められる。電源回路部の耐圧を考慮し、実現可能性を含めた設計法の構築を目指した。

#### E. 磁界発生用コイル設計

四角型コイル磁界発生用コイル設計とMerritt4コイルの実現可能性を含めた詳細設計法も検討した。

##### 1. 四角型コイル

四角型コイル設計について、磁界計算、インダクタンス計算を行った。

##### 2. Merritt4コイル

電線の電流密度と構造的な設計制限を明確にすることによって、磁界強度と均一磁界領域の関係を明確化させ、実用的なMerritt4コイル設計法をおこなった。なお、ここではコイル発熱を考慮し、一層巻きコイルとし、Merritt4コイルの構造設計、構造的制限の確認、磁界出力に関する設計、インダクタンス設計を行った。今回の磁界出力に関する設計検討では、Merritt4コイルの出力磁界を電線径 $\phi$ と1辺長 $a$ の2つのパラ

メータによって表し、 $4 \text{ A/mm}^2$ の電流密度におけるMerritt4コイルの最高出力磁界強度を電線径 $\phi$ 、1辺の長さ $a$ の関数として計算した。さらにここでは、電線径 $\phi = 4 \text{ mm}$ で構成される1辺長 $a = 196 \text{ mm}$ のCoil A、1辺長 $250 \text{ mm}$ のCoil Bの出力磁界の比較検討を行った。その結果、磁界出力はCoil Aで5.0 mT、Coil Bでは3.9 mTとなった。一方、偏差を $\pm 5\%$ の均一磁界領域を最高出力設計であるCoil Aで求めると122 mmであり、Coil Bの187 mmと比較し50%の差があり、磁界強度と均一磁界領域はトレードオフの関係にあることが分かった。

### 3. まとめ

コイルの設計制限を明らかにし、出力磁界強度と磁界分布の関係を明確にすることで、装置使用者が要求する磁界強度、均一磁界領域から逆算した最適コイル・電源設計が可能であることを示した。

#### F. 実験による検証

出力磁界確認実験と長時間連続駆動させた場合のコイル発熱検討実験を行った。

##### 1. 共振用コンデンサ

安定した磁界出力と安全面における容量変動に阻止、コンデンサ発熱による容量変動を抑制するために、電圧・電流定格を2倍程度余裕をもたせて設計した。

##### 2. 出力される磁界の確認実験

コイル中心軸上の磁界分布については、コイル電流5Aでの磁界計算値に対して誤差が2%以内であり、磁界設計通りに出力していることが確認できた。コイル電流 $I_L$ とコイル中心の出力磁界強度の関係でも、磁界設計通りに出力できていることが確認できた。コイル電流19 A、コイル中心磁界強度3.4 mTを発生させたときの実験波形であるが、

コイルから20 cm離れた地点でもひずみのない正弦波の交流磁界が発生できていることが確認できた。

### 3. コイル発熱検討実験

先述したようにコイルには十数～数十Aの大電流が流れるため、冷却器なしでコイルの温度を40°C程度に維持することは非常に難しい。一般的に細胞ばく露実験のためにはコイル内にインキュベータを設置され、コイルの温度上昇の影響は受けにくくなるものの、均一磁界領域を広く確保するためにもインキュベータはできる限り簡易的なものが望まれる。コイル電流19 Aで連続運転させたとき磁界発生用コイル内外面ともに60°C以内の発熱に抑えることができた。この結果は自然空冷とした場合の実験結果であるため、ファンや水冷装置などを使用した場合は大きな冷却効果が期待できる。

### 4. まとめ

共振用コンデンサを設計・試作し、その共振用コンデンサを用いて、試作コイルの駆動実験を行った結果を示した。その結果、長時間駆動させた場合も安定した磁界出力を得ることができた。また、コンデンサ発熱による容量変動を抑制するために、電圧・電流定格を実際の実使用状態に対して2倍として設計した。

出力磁界確認実験では、全ての試作コイルにおいて磁界計算に対して約2 %程度の精度で出力できることが明らかとなった。これより、磁界計算及びコイル設計法の妥当性、有用性を確認することができた。また、各出力波形を確認し、ひずみの少ない交流磁界を出力できていることも確認した。

コイル発熱検討実験では、自然空冷において電流密度4 A/mm<sup>2</sup> という制限が妥当であることを証明した。また、長時間連続駆

動させた場合でも安定した磁界が出力できることを確認した。

## <細胞研究班>

### A. 研究目的

本年度は細胞等へのばく露影響評価のためのIF磁界ばく露装置の開発、特に電気工学研究班が開発を担当するばく露装置のIF磁界発生部（コイル及び電源）に適合した培養装置の開発と、ほ乳類培養細胞を用いたIF磁界の細胞影響評価の基礎試験として、チャイニーズハムスター由来の肺がん細胞などの生育や染色体異常などの変異原性の検討、ならびに居住環境中での主たる使用者が女性であることから、胎児へのIF磁界ばく露によるエストロゲン応答遺伝子の発現変化の可能性を考え、その評価法としてエストロゲンレポータージーンアッセイ系の構築を目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 細胞用IF磁界ばく露装置の開発—ばく露装置用培養器の開発—

電気工学班の研究成果に基づき、ばく露用Meritt4コイルと専用電源を製作した。一方、ばく露用コイル内に設置する生物試料用培養器は非磁性体を用いる必要がある。そのため、塩化ビニルを溶接して製作し、試料の出し入れに用いる上部を除いて、5面をウォータージャケット方式で温度制御する形式とした。

#### 2. 細胞を用いたIF磁界の生物影響評価

IF磁界に関しては安全性評価に資する研究報告が極めて限られるため、ハザード評価の中でも特に管理上の大きな要素となる発がん性の有無を調査することは重要である。そこで、本研究では、基礎的な検討と

して、①遺伝子修復能力の異なる培養細胞を用いた生育に対する影響、②OECD、ICE等の遺伝毒性評価の標準試験バッテリーとして常用される試験の一つである培養細胞を用いた小核試験を実施した。更には、IH調理器の多くは、腹部に近い位置に設置されており、居住環境中での主たる使用者が女性であることから、胎児への影響が懸念されている。そこで本研究では、このエストロゲン応答遺伝子に着目し、IF磁界ばく露が、エストロゲン活性に変動をもたらす可能性を検証する目的で、細胞レベルでの実験に適した、③エストロゲン感受性を評価する方法について検討した。

## C. 研究結果

### 1. 細胞用IF磁界ばく露装置の開発ーばく露装置用培養器の開発ー

電気工学班の研究成果に基づき製作したばく露用コイルは、最大20Aの通電時に21kHzで3.9mTの磁界発生が可能であった。

一方、本研究で開発した磁界ばく露用培養器は、上部から試料を出し入れする構造のため、上蓋に温水を循環させることが困難であった。このため、培養機内の温度を37℃に設定して温度制御を行った場合、試料保持用ラックの上部2段については、設定値より1℃程度温度が低下した状態になることがわかったので評価試験には使用しないこととした。一方、その他の領域の温度制御は $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以内であり、評価試験に供用が可能であると判断した。また、本装置を用いて、仕様上の最大値である3.9mTまでのIF磁界を発生させた状態で温度制御を検討したところ、周囲環境を制御することで長期ばく露試験が実施可能であることを確認した。

## 2. 細胞を用いたIF磁界の生物影響評価

### ①細胞増殖

CHL/IU、CHO-K1 および DNA の二重鎖切断修復に関わる酵素の遺伝子 *ku86* の変異株である *xrs5* 細胞のいずれについても、2mT、24時間のIF磁界ばく露では、疑似ばく露群とIF磁界ばく露群との間で統計的に有意な差は見られなかった。

### ②小核試験

CHL/IU細胞についても、2mT、24時間ばく露では、疑似ばく露群、IF磁界ばく露群ならびに対照群の間に有意な差は認められなかった。

### ③エストロゲン応答性

ヒト乳がん由来のMCF-7細胞のサブクローンをエストロゲン応答配列下流にルシフェラーゼ遺伝子を持つレポーター遺伝子で形質転換し、細胞レベルでのエストロゲン応答性を簡便かつ高感度に検出する評価系を構築することができた。

## D. 結論

*in vitro* 試験用のIF磁界ばく露装置を作成するとともに、チャイニーズハムスター由来の培養細胞を用いて成育および染色体異常に与える影響を検討した。その結果、21kHz、2mTのIF磁界の影響は認められなかった。細胞レベルにおけるエストロゲン感受性の変化については、今後、新たに開発したばく露装置を用い、IF磁界ばく露によるエストロゲンの応答への影響を網羅的に調べる予定である。

## <動物研究班>

### A. 研究目的

IF電磁界の動物に対する影響の有無を明らかにし、リスク評価に資することを目的



とする。本年度は細胞実験を先行して進めるため、動物実験は次年度以降の本格開始に向け、資料の収集や今後のばく露条件の検討などを行った。

#### B. 研究方法

IF電磁界を用いて動物実験を行っている研究を、PubMed や、EMF-Portal（ドイツアーヘン大学が行っている電磁界研究データベースのポータルサイト）、そのほかの関連サイトから収集し分析した。

#### C. 研究結果と考察

これまでで発刊されている論文を総合すると、影響を認めたという報告も散見されるが、いずれもパルス波、鋸波による結果である。今後、正弦波で研究を進めるに当たっては、パルス波で報告されている指標について慎重に検討が必要であることがわかった。

数少ない正弦波による全身ばく露では、生殖能への悪影響は報告されていない。また、免疫毒性については検討されていなかった。IH調理器の特殊性を考慮して、ラット腹部局所に対して、数mT程度のIF電磁界ばく露を検討すると共に、全身ばく露の免疫系への影響を評価していく計画である。

#### D. 結論

これまでの先行研究においては、パルス波や鋸状波のIF磁界ばく露の報告は多いが、IH調理器で使用されている正弦波のIF磁界の影響を動物実験で調べた例は少なく、今後、精力的に正弦波磁界の動物へのばく露の影響を検討することで、リスク評価に向けての科学的なエビデンスを提供できると考えられ、国民の健康を守る重要な知見

となることが期待できる。

#### <倫理面への配慮>

本年度の研究対象はいずれも倫理面への配慮が必要な対象では無かった。

#### <健康危険情報>

該当事項は無かった。

#### <研究発表>

##### 1. 論文発表

無し

##### 2. 学会発表

(1) 木暮晋太郎、和田圭二、鈴木敬久：“電圧形インバータを用いた20 kHz 磁界発生装置の開発”、電気学会全国大会 (2009).

(2) S.Kogure, K.Wada, Y.Suzuki : "Development of a Magnetic-Field Generator at 20 kHz using a Voltage-Source Inverter for Biological Research", European Conference on Power Electronics and Applications (2009).

(3) 木暮晋太郎、和田圭二、鈴木敬久：“電圧形インバータを用いた細胞ばく露評価用20 kHz 磁界発生装置の開発”、電子情報通信学会技術研究報告 EMCJ2009-88 (2009).

(4) 木暮晋太郎、和田圭二、鈴木敬久：“細胞ばく露評価用磁界発生装置の高出力化に向けた検討”、電気学会半導体電力変換研究会、SPC-10-043 (2010).

(5)池畑政輝他、第83回日本産業衛生学会、2010年5月、福井市

(6) M. Ikehata et al, Bioelectromagnetics June 2010, Seoul

(7) M. Ikehata et al、 AP-RASC2010、  
Sep. 2010, Toyama

(8) S. Yoshie et al、 AP-RASC2010、 Sep.  
2010, Toyama

<知的財産権の出願・登録状況>

なし

別添 4

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策研究事業）

分担研究報告書

居室における中間周波電磁界に関する研究

～細胞研究班～

分担研究者	池畑政輝	(財)鉄道総合技術研究所 環境工学研究部 生物工学研究室 主任研究員
	吉江幸子	(財)鉄道総合技術研究所 環境工学研究部 生物工学研究室 副主任研究員
	石井一行	明治薬科大学 衛生化学教室 教授
	小笠原裕樹	明治薬科大学 衛生化学教室 准教授

研究要旨

中間周波磁界の健康影響評価に関しては、これまでに非常に限られた知見しかないため、安全性評価の常法に則り、*in vitro* および *in vivo* 双方での種々の試験が必要である。本報告では、本プロジェクトにおいて平成21年度に実施した、*in vitro* 試験による評価のための IF 磁界ばく露装置の開発、ならびには乳類培養細胞を用いた細胞影響評価の基礎試験を行った。ばく露装置の IF 磁界発生部（コイル及び電源）は電気工学研究班の分担であるが、その磁界発生コイルに適合した培養装置として、非磁性体（塩化ビニル等）を用いた樹脂製の培養器本体、ならびに培養器と分離した温度・空気環境制御装置を用いることによって、21kHz、3.9mT の強磁界下でも安定的に動作する細胞ばく露用 IF 磁界ばく露装置を開発した。また、本装置を用いて、チャイニーズハムスター由来の肺がん細胞などのほ乳類由来の培養細胞の磁界下での生育や染色体異常などの変異原性を検討したが、2mT、24時間ばく露での影響はいずれも認められなかった。更に、居住環境中での主たる使用者が女性であることから、胎児へのばく露によるエストロゲン応答遺伝子の発現変化の可能性を考え、その評価法としてエストロゲンレポーター遺伝子アッセイ系を構築した。

A. 研究目的

IF 磁界の健康影響に関しては、これま

で行われた研究は限られている。した

がって、総合的な安全性の評価を進める

ためには、*in vivo* での影響評価ならびに *in vitro* での影響評価双方の知見を得ることが重要である。

そのため、本年度は細胞等へのばく露影響評価のための IF 磁界ばく露装置の開発、特に電気工学研究班が開発を担当するばく露装置の IF 磁界発生部（コイル及び電源）に適合した培養装置の開発と、ほ乳類培養細胞を用いた IF 磁界の細胞影響評価の基礎試験として、チャイニーズハムスター由来の肺がん細胞などの生育や染色体異常などの変異原性の検討、ならびに居住環境中での主たる使用者が女性であることから、胎児への IF 磁界ばく露によるエストロゲン応答遺伝子の発現変化の可能性を考え、その評価法としてエストロゲンレポーター遺伝子アッセイ系の構築を目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 細胞用 IF 磁界ばく露装置の開発ーばく露装置用培養器の開発ー

電気工学班の研究成果に基づき、ばく露用 Meritt4コイルと専用電源を製作した。一方、ばく露用コイル内に設置する生物試料用培養器は非磁性体を用いる必要がある。そのため、塩化ビニルを溶接して製作し、試料の出し入れに用いる上部を除いて、5面をウォータージャケット方式で温度制御する形式とした。上部蓋は、塩化ビニルのブロックとし、断熱効果に留意した（図1）。内部に設置する生物試料保持用の架台に関しては、シャーレ並びに96穴プレー

トをばく露時の容器として想定し、同時にできるだけ多くの試料がばく露できるように設計し、アクリル板を材料として作成した(図1)。培養器内の温度分布を測定した結果、上部2段は蓋部に温水が循環されていないことから、37℃で温度制御を行った場合、1℃程度低下することがわかった。このため、この2段は試験には使用しないこととしたが、他の領域の温度制御は $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以内であり、試験に供用可能であると判断した。培養器には300ml/minの流量で5%炭酸ガスを含む空気の通気を可能な仕様とした。

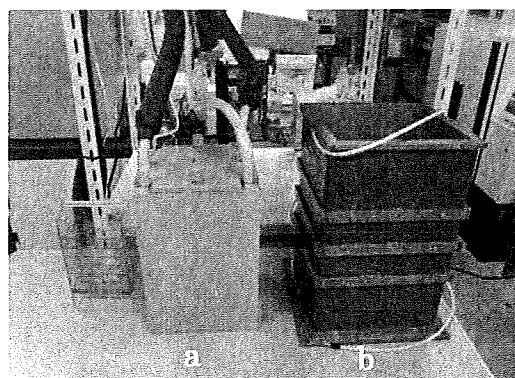


図1 開発した細胞用 IF 磁界ばく露装置  
a. 曝露用培養器, b. 曝露用コイル, c. 生物試料保持用ラック

コイル、培養器をそれぞれ2組ずつ作成し、任意の組み合わせによりばく露装置を構成した。一方はコイル駆動用電源に接続し、IF 磁界ばく露装置とした。他方は電気的な接続はせず、疑似ばく露装置とした。コイルと培養器の組み合わせは容易に交換可能であり、将来的に組み合わせを変更し、磁界ばく露以外の装置の誤差要因を排除することが可能な仕様とした。これらの装置を組み上げた後、ばく露に使用する空間の温度分布測定を行い、非通電時に、双方の装置において温度精度は $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以内を充分満たしていることを確認した。また、ばく露用コイルは、21kHz で最大20A の通電時に3.9mT の IF 磁界を発生することが可能であった。次に、2mT、3mT、3.9mT の磁界発生状況で培養器内の温度制御を検討したところ、2mT ではインキュベータはコイルの発熱の影響を受けず、良好に温度制御できたものの、3mT、3.9mT ではその強度(通電量)に応じたコイルの発熱により温度が $1\sim 3^{\circ}\text{C}$ 上昇することが明らかとなった。これに対して、ばく露装置を設置した恒温室の温度を下げ( $18\sim 20^{\circ}\text{C}$ )空気を強制循環させることでコイルを冷却した結果、インキュベータ内の温度を $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ で安定に制御できることを確認した。したがって、本装置を用いて、3.9mT までの IF 磁界に関して、細胞レベルでの長期ばく露試験が実施可能であることを確認した。

## 2. 細胞を用いた IF 磁界の生物影響評価

IF 磁界に関しては、安全性評価に関する

研究報告が極めて限られるため、有害性の評価の中でも特に管理上の大きな要素となる発がん性の有無を調査することは重要である。そこで、本研究では、基礎的な検討として、①遺伝子修復能力の異なる培養細胞を用いた生育に対する影響、②OECD、ICE 等の遺伝毒性評価のための標準試験バッテリー(標準的な試験の組み合わせ)に用いられる試験の一つである、培養細胞を用いた小核試験を実施した。

更には、IH 調理器の多くは、腹部に近い高さに設置され、居住空間での主たる使用者は女性である事から、胎児への影響を評価する必要があるため、胎児発生に関わる評価系の構築を検討した。胎児の神経分化過程に関わる代表的な女性ホルモンの一つにエストロゲンがあり、エストロゲンが高値になると双児や巨大児、低値により胎児死亡や仮死、無脳児の出生の危険性が高まることが知られている。そこで本研究では、このエストロゲン応答遺伝子に着目し、IF 磁界ばく露が、エストロゲン活性に変動をもたらす可能性を検証する目的で、細胞レベルでの実験に適した、③エストロゲン感受性を評価する方法について検討した。

### 2.1 細胞増殖

#### 2.1.1 細胞株

本研究では、チャイニーズハムスター由来の培養細胞を用いて実験を行った。卵巣由来細胞の CHO-K1およびその DNA 修復系欠損細胞、ならびに肺由来の CHL/IU を用いた(表1)。細胞培養は、CHO-K1は

表1 本研究で用いた細胞

細胞株	欠損遺伝子	参考文献
CHL/IU		Mutation Res., 48: 337-353 (1977).
CHO-K1		J. Exp. Med., 108:945-956 (1958)
xrs5	Ku86遺伝子欠損	Mutat. Res., 112: 313-327 (1983)
V-3	DNA-PK 遺伝子欠損	Int. J. Radiat. Biol., 56: 657-665 (1989)
irs1SF	XRCC3遺伝子欠損	Mutat. Res., 193: 109-121 (1988)
EM-9	XRCC1遺伝子欠損	Somatic cell Genetics, 6; 391-405 (1980)

FBS10%を含む Ham's F-12培地、その他の細胞は FBS 10%を含む  $\alpha$ MEM 培地中で 37°C、5%CO<sub>2</sub>条件で行った。

### 2.1.2 細胞増殖測定

各細胞の濃度が $1 \times 10^4$  cells/ml となるように細胞懸濁液を調整し、96穴細胞培養プレートに100 $\mu$ l/well ずつ分注した。炭酸ガスインキュベータ内で24時間培養した後、21kHz、2mT の IF 磁界に72時間ばく露した。培養開始時および24、48、72時間後に WST-1(Premix WST-1, TAKARA 社)を各穴に10 $\mu$ l ずつ添加し、引き続きばく露を行いながら3時間反応させた (CHL/IU の場合は2時間)。反応後、生成した色素を450nm で測定し、バックグラウンドとして630nm の吸光度を吸光マイクロプレートリーダー (Benchmark, Bio-Lad 社) を用いて測定した。450nm の吸光度と630nm の吸光度の差分を取り、正味の吸光度として各群の比較をおこなった。1回の測定につき、各細胞の吸光度は少なくとも4ウェル以上とし、2回の測定から平均値を算出した。

## 2.2 小核試験

### 2.2.1 細胞株

本年度は、CHL/IU 細胞を用いて検討を行った。

### 2.2.2 実験方法

凍結保存細胞を融解し、 $2 \times 10^5$  cells/ml となるように細胞濃度を調整し、60mm の滅菌プラスチックシャーレに5ml ずつ分注した。このシャーレを炭酸ガスインキュベータ内で24時間培養した後、4群に分け、1群はばく露群として 21kHz、2mT の IF 磁界に24時間ばく露し、1群は疑似ばく露群として疑似ばく露装置で24時間培養を行った。また1群を対照群1群を陽性対照群として、マイトマイシン C (MMC) を最終濃度が0.4 $\mu$ g/ml となるようにシャーレ中に分注し、一般の炭酸ガスインキュベータ中で24時間培養した。

培養後、細胞を0.25%トリプシンを用いて剥離、回収し、0.075M の KCl 溶液4ml に懸濁し、10分間、37°Cに保持して低張処理を行った。次に、冷却した固定液 (メタノール:氷酢酸=3:1) 1ml に懸濁し、半固定したのち、5ml の固定液に懸濁、室温にて

10分間保持し、細胞を固定した。同様の操作を3回繰り返した後、細胞を固定液1~2mlに懸濁し、その懸濁液をスライドグラスに滴下しスメアを作成した。作成したスライドグラスを乾燥後、3.5%ギムザ溶液で染色した。このスライドグラスを光学顕微鏡下、10×40倍で検鏡し、スライド毎に最低1000個の細胞を観察し、観察した細胞数と、小核を有する細胞数を計数した。

## 2.3 エストロゲン応答性

### 2.3.1 アッセイ系と培養条件

エストロゲン応答性を有するヒト乳がん細胞由来 (MCF-7) に対し、2種のベクターを、トランスフェクション試薬を用いて形質導入することでレポーター細胞を得ることを試みた。即ちエストロゲン応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を持つベクター pTransLucent を形質導入して、MCF-7細胞に組み込まれるとエストロゲンのレセプター刺激で発光性物質を生成するルシフェラーゼの転写が行われる。更に、セレクトアブルマーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を持っている pMAMneo を、pTransLucent と共にトランスフェクションし、形質転換後、ネオマイシン含有培地で培養することで、pTransLucent が組み込まれた MCF-7細胞を選別した。

MCF-7の通常の培養にはフェノールレッド (PR) 含有 Minimum Essential Medium(MEM)培地を使用した。ばく露を想定したアッセイ時には PR 不含 MEM 培地を使用した。細胞の溶解抽出には Cell

Culture Lysis Reagent (CCLR) を用いた。

ルシフェラーゼの活性測定は Luciferase Assay Reagent を用い、ルミノメーター(ベルトールド社)で測定した。MCF-7細胞の培地の交換 (継代)は、MEM 培地[PR (+)]培地を除去後、PBS で洗浄し (2回)、PET 処理後、MEM 培地[PR (-)] 5mL で剥がし、15mL 遠沈管に移し、PBS を加えた後、遠心分離 (800rpm、5min) する。上清除去後、MEM 培地[PR (-)] 5mL で細胞を懸濁し、MEM 培地[PR (-)]で4日間(2日後に一度継代) 37°C、5%炭酸ガスインキュベータ中で培養した。これらの培養条件は、IF 磁界のばく露を4日間連続して行うことを想定して構築した。

## C. 研究結果

### 1. 細胞増殖

IF 磁界の細胞増殖に与える影響を調べるため、WST-1による細胞増殖測定を行った結果を CHO-K1、xrs5について図2に示す。この結果、親株である CHO-K1細胞および DNA の二重鎖切断修復に関わる酵素の遺伝子 *ku86*の変異株である xrs5細胞のどちらについても、疑似ばく露群と IF 磁界ばく露群との間で統計的に有意な差は見られなかった。また、CHL/IU 細胞においても、疑似ばく露群、IF 磁界ばく露群ならびに对照群の間に有意な差は認められなかった (図3)。従って、DNA 修復遺伝子欠損の有無に関わらず、72時間という長期の IF 磁界 (21kHz、2mT) のばく露による細胞増殖への影響は見られないことがわかった。

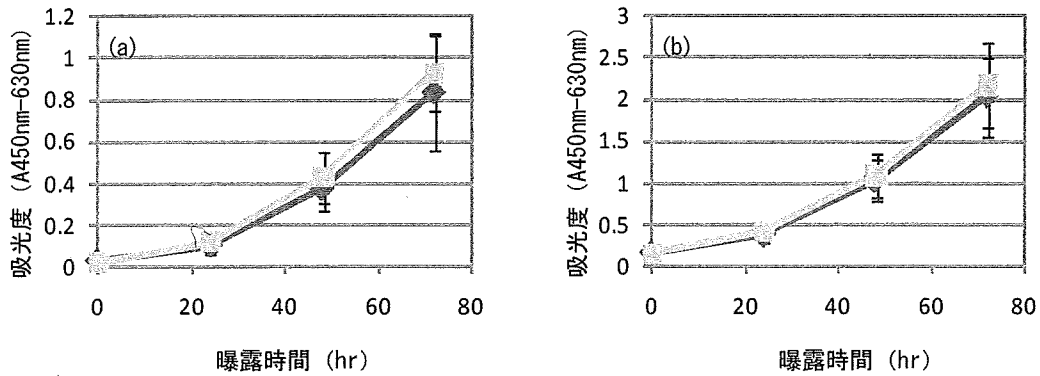


図2 IF磁界(21kHz, 2mT)ばく露による細胞増殖への影響評価  
(◆:疑似ばく露群, ■:ばく露群)  
(a)CHO-K1, (b)xrs5

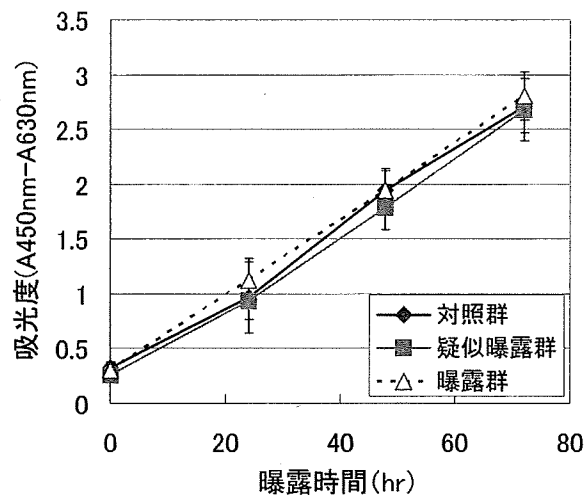


図3 IF磁界(21kHz, 2mT)ばく露による細胞増殖への影響評価(CHL/IU細胞)

xrs5において何ら影響が観察されないことから、本条件でのIF磁界曝露はDNAの二重鎖切断を誘発しない可能性も示唆される。その他の細胞株についての細胞増殖については、現在データを収集しているところである。

## 2. 小核試験

CHL/IU細胞1000個辺りの小核保持細胞を計数した結果、疑似ばく露群とIF磁界ばく露群との間で統計的に有意な差は見られなかった(図4)。一方で、MMC処理群では有意に小核出現頻度が上昇した。したがって、本実験系で発がん性を持つ化学物



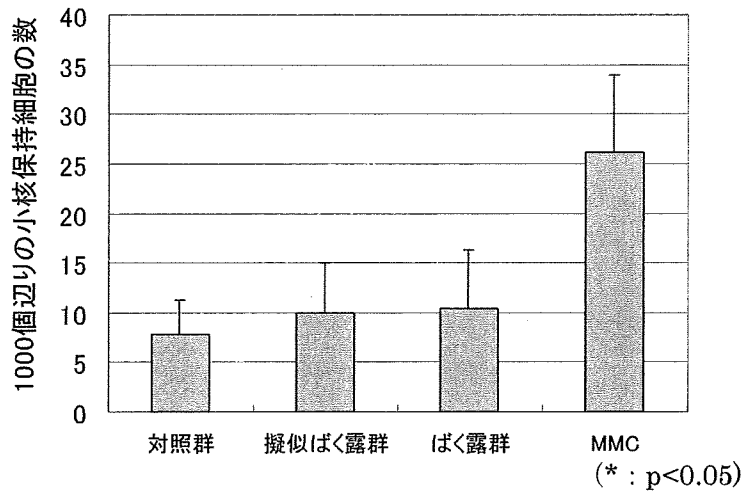


図4 CHL/IU 細胞での小核誘発における IF 磁界 (21kHz, 2mT) の影響

質の発がん性が小核を指標として検出できることと同時に、IF 磁界ばく露により小核は誘発されないことが明らかとなった。

### 3. エストロゲン応答性

#### 3.1 ヒト乳がん細胞 MCF-7 細胞でのルシフェラーゼ誘導発現株の樹立

レポーター遺伝子アッセイを用いて磁界ばく露によるエストロゲン応答性の変動を評価するため、図5に示したエストロゲ

ン応答配列を3回繰り返しもつ、ルシフェラーゼを発現誘導可能なベクター、pTransLucent をヒト乳がん細胞でエストロゲンレセプターを高発現する MCF-7 サブクローン細胞に組込むことによりエストロゲン応答性を評価できる系を確立した。

発現株樹立のため、ネオマイシンによる選択マーカーを有するプラスミドとして pMAMneo を用い、pTransLucent とリポフェクション法によりコトランスフェクション

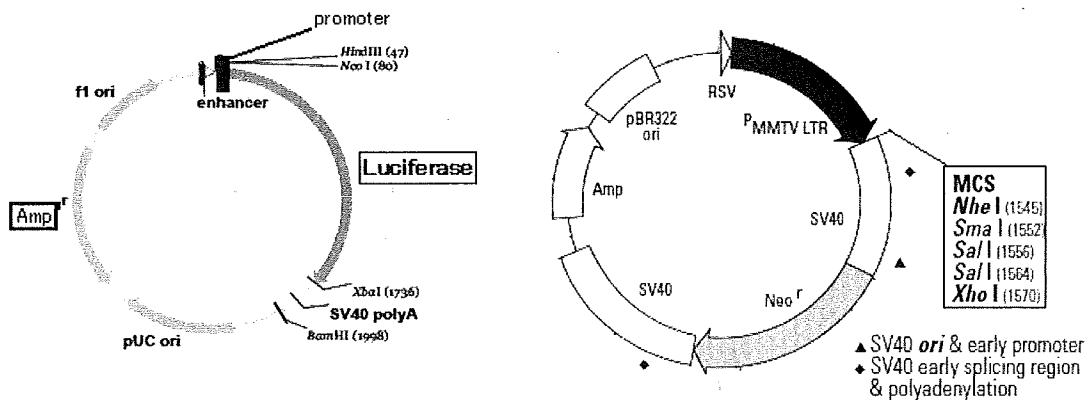


図5 pTransLucent と pMAMneo の構造

を行い、形質転換後、G418含有培地で培養し、pTransLucentを組み込んだMCF-7細胞を選択し、3度コロニー形成によるクローニングを繰り返し、最終的に14株を得た。そのネオマイシン耐性株についてルシフェラーゼ部分を用いRT-PCRにより発現可能な9株を絞り込んだ。更に、エストラジオールによるルシフェラーゼの発現誘導能の高いクローン2株を得た。

### 3.2ルシフェラーゼ誘導発現株を用いたルシフェラーゼアッセイ

アッセイ用培地は、フェノールレッド不含MEM液体培地に1倍濃度になるようにMEM非必須アミノ酸溶液を添加し、2mM L-グルタミン、0.1mg/mLピルビン酸ナト

リウム、0.01 $\mu$ g/mLヒト組換え型インスリン、活性炭処理済み非動化ウシ胎児血清を5%の最終濃度で添加し使用した。アッセイ用培地に交換後5日間培養し、エストロゲン除去した後、MCF-7を48穴プレートに撒き(1.25 $\times 10^5$ cells)、各濃度のエストラジオール、コントロールとしてのDMSOは0.5%となるように各穴に添加した。エストラジオールを添加後、24時間、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、湿度100%のインキュベータ内で培養し、ルシフェラーゼの発現を誘導した。図6に示したようにエストラジオール終濃度1pM処理より比活性は上昇しはじめ、100pM処理で示す値は最大となりそれ以上の濃度でほぼ一定の値を示した。結果からエストラジオール添加により、ルシフェラ

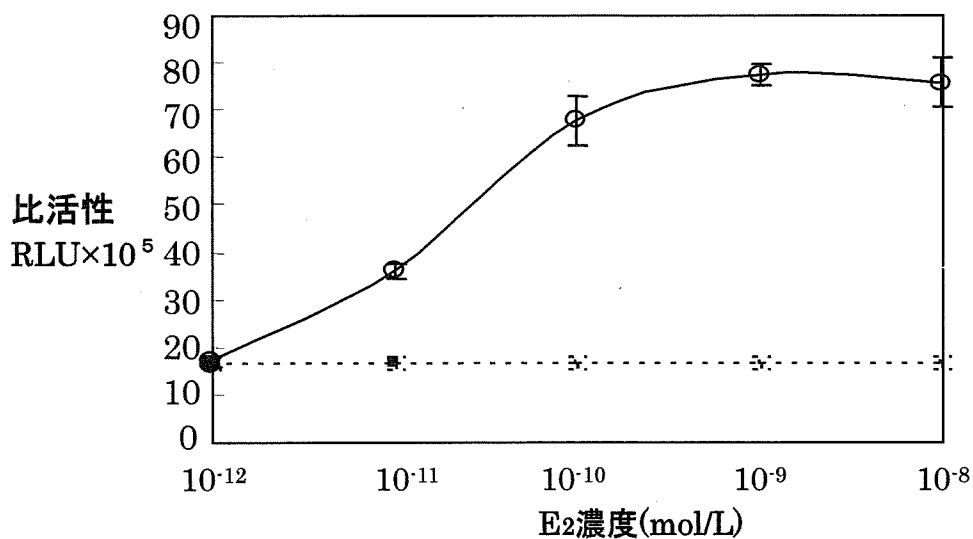


図6 エストラジオール(E2)各濃度における発現誘導ルシフェラーゼの比活性の変化：○は各E2濃度における比活性を表し、破線はネガティブコントロールとして終濃度を0.5%DMSOで処理した時の比活性(×10<sup>5</sup>RLU/mgタンパク質)を示す。

一ゼの抽出タンパク質あたりの比活性が約6～7倍の上昇を認め、十分、実験に供しえるクローンを樹立することができた。

本評価系を用いて評価することで、磁界ばく露の影響としてルシフェラーゼ発現量の変化が生じる可能性が考えられるが、これは、いわば図7に示すような本遺伝子の発現機構全般が対象となる網羅的解析に当たる。今後、この評価系を用いて IF 磁界のエストロゲン応答性に与える影響を詳細に調査する予定である。

#### 4. 考察

培養細胞の生育に関する検討においては、遺伝子修復能力の異なる細胞を用いているが、IF 磁界ばく露の影響はなかったことから、IF 磁界ばく露による遺伝子損傷などの重篤な影響はないことが明らかとなった。

これは、21kHz、2mT の IF 磁界のエネルギーが、電離を誘発するエネルギーと比較して極めて低いこととも符合し、IF 磁界曝露によって、DNA 鎖切断が生じないことが、あらためて確認されたといえる。また、変異原性に関しても、標準的に用いられる試験の一つである CHL/IU 細胞を用いた変異原性試験において影響が認められなかったことから、今回検討した21kHz、2mT の IF 磁界（現行 ICNIRP ガイドライン、一般参考レベルの320倍）には、有害性は認められず、健康に関して顕著な作用はないことが示唆された。

また、エストロゲンによって転写活性化を促がされるルシフェラーゼの定量を用いた IF 磁界の細胞の女性ホルモン応答性への影響評価に関しては、レポーター遺伝子アッセイを利用することで充分高感度な評

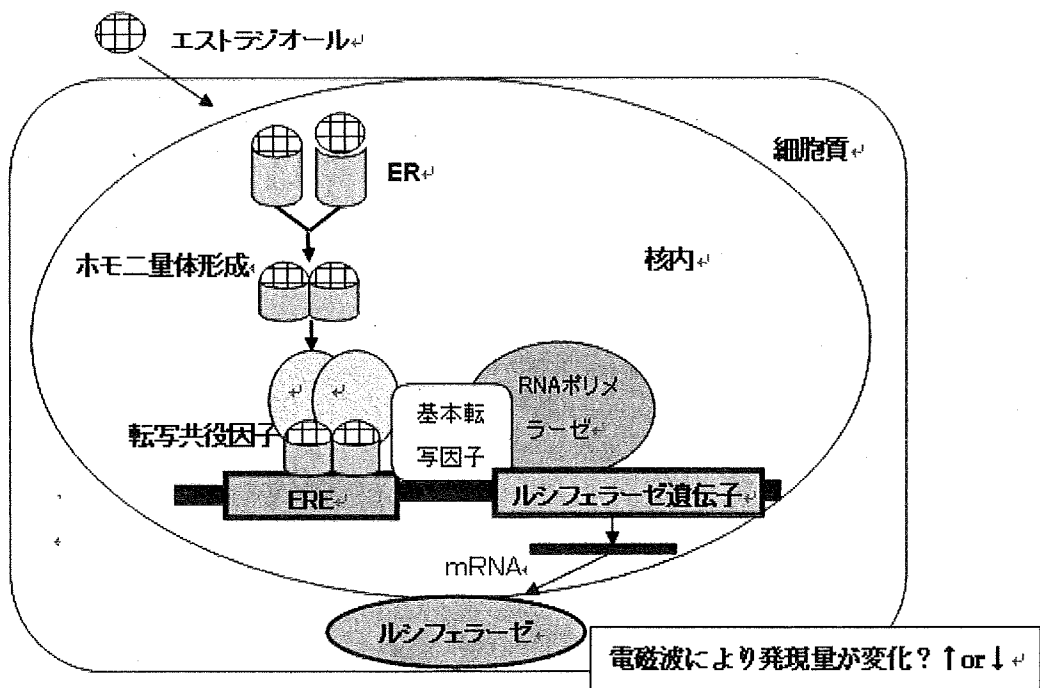


図7 核内でのエストロゲン応答遺伝子の誘導機構

価系を構築することができた。今後、本評価系を用いて、3日間～5日間連続の IF 磁界ばく露を行い、その影響を評価する予定である。

#### D. 結論

本研究では、*in vitro* 試験用の IF 磁界ばく露装置を作成するとともに、チャイニーズハムスター由来の培養細胞を用いて IF 磁界曝露の生育への影響ならびに変異原性を検討した。その結果、21kHz、2mT の IF 磁界のばく露による影響は認められなかった。細胞レベルにおけるエストロゲン感受性の変化については、今後、構築した評価系を用いて網羅的に調べる予定である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

池畑政輝他、第83回日本産業衛生学会、  
2010年5月、福井市

M. Ikehata et al, Bioelectromagnetics June  
2010, Seoul

M. Ikehata et al, AP-RASC2010, Sep. 2010、  
Toyama

S. Yoshie et al, AP-RASC2010, Sep. 2010、  
Toyama

#### F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし