

として、通常は 300Hz~100 kHz とされる中間周波数 (IF) 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僅か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、さら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」。

したがって、早期に IF 磁界の安全性の評価を進める必要がある。そのためには、*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不可欠である。

本分担研究では、このうち *in vitro* 研究として、培養細胞を用いた IF 磁界ばく露の影響評価を実施した。研究を進めるにあたり、生物影響として重篤と考えられるのは、死に至るような急性毒性、発がん性がまず挙げられるため、細胞増殖や遺伝子・細胞核への影響および DNA メチル化への影響を評価を基本とした。さらに、IH 調理器の主たる使用者は女性であると考えられることから、女性ホルモンにより発現誘導される遺伝子の応答性への影響や、胎児の発生への影響評価として、マウス ES 細胞を用いた細胞分化への影響を合わせて評価することで、IF 磁界ばく露による顕著な生物影響の有無を検討することを目的とした。

B. 研究方法

B1 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。ま

た、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ため、塩化ビニルを溶接する方法で、生物試料の出し入れに用いる上部を除いた 5 面をウォータージャケット方式で温度制御する培養器を製作した。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 穴プレートをは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、

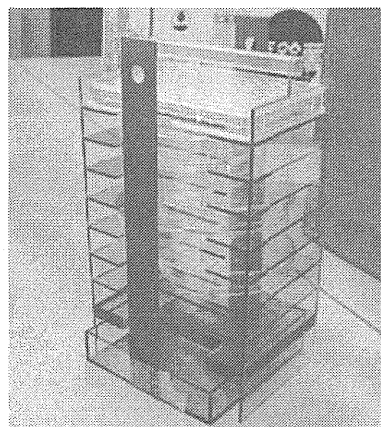
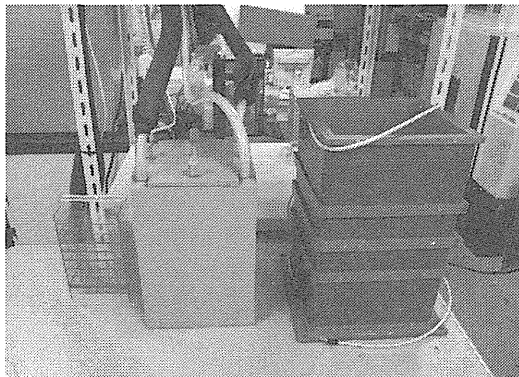


図 1 開発した細胞用 IF 磁界ばく露装置
a. ばく露用培養器, b. ばく露用コイル, c.
生物試料保持用ラック

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。

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°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°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。

B2 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)に用いられる試験である、培養細胞を用いた小核試験および遺伝子突然変異試験の一種であるHPRT試験を実施した。また、近年発がんへの寄与が明らかとなってきたDNAのメチル化についても検討を行った。

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ことから、女性や妊娠女性の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、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、次にその方法を用いた評価を行った。また胎児の発生への影響評価として、細胞の分化に対する影響評価として、個体の発生に伴う分化に比較的近い条件で影響評価が可能な動物代替試験法であるEmbryonic Stem Cell Test (EST)法に準じた方法で、④IF磁界が細胞分化に与える影響の評価を行った。

B2.1 遺伝子への影響評価

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、安全性評価に資する知見を得るため、①遺伝子修復能力の異なる培養細胞を用いた増殖に対する影響評価、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）に用いられる試験として挙げられている、培養細胞を用いた小核試験ならびに HPRT 遺伝子変異試験を実施した。

B2.1.1 細胞株

遺伝子修復能力が正常な哺乳類培養細胞、または一部を欠損するため様々な遺伝子損傷に対する感受性が高い哺乳類培養細胞数株を用いて、細胞の増殖に対する IF 磁界の影響を検討した。本研究では、チャイニーズハムスター由来の卵巣由来細胞の CHO-K1 および CHO-K1 細胞に由来する二重鎖 DNA 切断修復欠損株である xrs5 細胞（非相同組換え末端結合修復欠損）、V-3 細胞（非相同組換え末端結合修復欠損）、irs1SF 細胞（相同組換え修復欠損）および DNA 損傷修復欠損株である EM-9 細胞（塩基除去修復等の欠損）、ならびに肺由来の CHL/IU を用いた(表 1)。細胞培養は、CHO-K1 は

FBS を 10%含む Ham's F-12 培地、その他の細胞は FBS を 10%含む α MEM 培地中で 37°C、5%炭酸ガスの条件で行った。

B2.1.2 細胞増殖の測定方法

各細胞の濃度が 1×10^4 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 μ l/穴ずつ分注した。炭酸ガスインキュベータ内で 24 時間培養した後、21kHz、3.9mT 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 μ 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 穴以上とし、2 回の測定から平均値を算出した。

B2.1.3 小核試験

最も一般的に用いられている CHL/IU 細胞を用いた。凍結保存細胞を融解し、 2×10^5 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

表 1 遺伝子への影響評価で用いた細胞

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)

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、最大 3.9mT 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 μ 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 $^{\circ}$ 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 \times 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。

B2.1.4 遺伝子突然変異試験

CHO-K1 細胞ならびに EM-9 細胞を用いた。DNA の生合成に関わる遺伝子であるヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) における突然変異を指標として評価を行った。細胞濃度 1.25×10^5 cells/ml の細胞を 60mm シャーレ中で培養を行い、24 時間後に IF 磁界へのばく露を開始した。陽性対照群として、CHO-K1 細胞に対しては 5 μ g/ml、EM-9 細胞

に対しては 1 μ g/ml のメタンスルホン酸メチル (MMS：発がん性物質) を用いた。IF 磁界または MMS に 24 時間ばく露した後、新鮮な培地に交換し、通常の炭酸ガスインキュベータ内で更に 24 時間培養を行った。変異を遺伝子上に固定させるため、2、3 日ごとに継代培養しながら 5 日間培養した。トリプシン処理によりシャーレから剥がした細胞を顕微鏡下で計数した後、コロニーを形成する細胞を検出するため HPRT 遺伝子上に突然変異が起こった細胞を検出するため、6-チオグアニンを含む Ham's F-12 培地または α MEM 培地に継代した。コロニー形成細胞は 6 日後に、変異細胞は 10 日に出現したコロニーを計数した。顕微鏡下で計数した細胞数に対するコロニーを形成した細胞数をコロニー形成率として、コロニー形成細胞 10^6 細胞あたりの変異細胞の数を突然変異頻度として算出した。

B2.2 遺伝子の後天的修飾 (エピゲノミクス) に関する DNA メチル化の評価

近年、発がんの原因として、直接的な遺伝子の DNA 配列の変化、欠失に加え、遺伝子の制御部位のメチル化やタンパク質をコードしない種々のノンコーディング RNA が大きな要因となっていることも示され、機能的な遺伝子の構造や配列などと生物の関係を研究するジェネティクスに対し、遺伝子が後天的にメチル化などの修飾を受け、その修飾が遺伝子の働きに大きく影響すると共に、がんなどの疾病の発生や悪性化に寄与していることが明らかになってきた (エピゲノミクスと呼ばれる)。したがって、遺伝子自体の変化を評価する変異原性試験に加えて、後天的な修飾に対する影響を評価することの重要性が増している。本研究

では、がん抑制遺伝子である p53 およびがんの悪性化に関わることが知られる細胞接着因子の遺伝子である e-cadherin を対象として、それらの遺伝子の発現制御部位の DNA メチル化を評価した。

B2.2.1 DNA メチル化の評価方法

この実験には、ヒト乳がん由来細胞の MCF-7 細胞を用いた。

DNA メチル化は、メチル化に感受性のある制限酵素切断配列を持つ DNA 配列を対象とする遺伝子部位から選び、それを増幅することで評価する。本研究では、ヒトの遺伝子データベースより、発がんに関与する、がん抑制遺伝子 p53 およびがんの悪性化に関与することが明らかとなってきた細胞接着因子の一つである e-cadherin を評価対象として選んだ。それぞれの遺伝子発現制御領域を検討し、それぞれに 319bp の DNA 配列を対象として選定した。この配列の中には、メチル化感受性の制限酵素である hpaII により切断される箇所がそれぞれ 2 箇所 (p53)、4 箇所 (e-cadherin) 存在する。この配列に基づき、DNA を増幅するためのプライマーを表 2 の通り設計・製作した。

前培養した細胞を 2 枚の 96 穴の培養プレートに、8 細胞/ml となるように調整した細胞液を 200 μ l ずつ分注した。これにより、各培養穴には平均して 1.6 個、実際にはおよそ 0-2 個の細胞が存在する。この試験プ

レートを作成後、1 枚ずつばく露と疑似ばく露に分け、2 週間それぞれの環境下で培養し、増殖させた。2 週間後、一細胞から増殖した細胞の塊を、それぞれ独立した細胞系統とし、各々の全 DNA をスピнкаラム型 DNA 抽出キット ((株) グライナー) で抽出した。

OneStep qMethyl Kit (Zymo Research 社) により、まず DNA メチル化に感受性のある制限酵素を用いて全 DNA を切断する。この際、酵素の切断対象として認識される DNA 配列がメチル化されている場合には、酵素による切断が起こらないため、DNA 配列は保存されるが、メチル化されていなければ小さい断片となる。この処理の後、表 1 に示したプライマーを用いた PCR 反応 (対象とした DNA 部位の増幅反応) を行うと小さな断片では増幅が起こらないため、個々の細胞塊の中の対象とした DNA 配列中のメチル化度に応じて増幅量が変わる (図 2)。この増幅量の違いを利用して、メチル化の有無を調べた。具体的には、下記の計算式に基づき、制限酵素を入れない対照サンプルと制限酵素による切断処理を行ったサンプルの PCR 増幅度 (Ct 値=対数的に増幅するある一定の数値に達する PCR の繰り返し回数) の差をもとに、各細胞塊のメチル化度を算出した。

得られたメチル化度データに対して、今回設計したプライマーによる DNA の増幅領域では、メチル化を検討するそれぞれの

表 2 本研究で設計したプライマー

対象遺伝子		配列	増幅長 (bp)
p53	fwd	TATCTACGGCACCAGGTCGG	319
	rev	CCAATCCAGGGAAGCGTGTC	
e-cadherin	fwd	GCCCTTTCTGATCCCAGGTC	319
	rev	GCAAGCTCACAGGTGCTTTG	

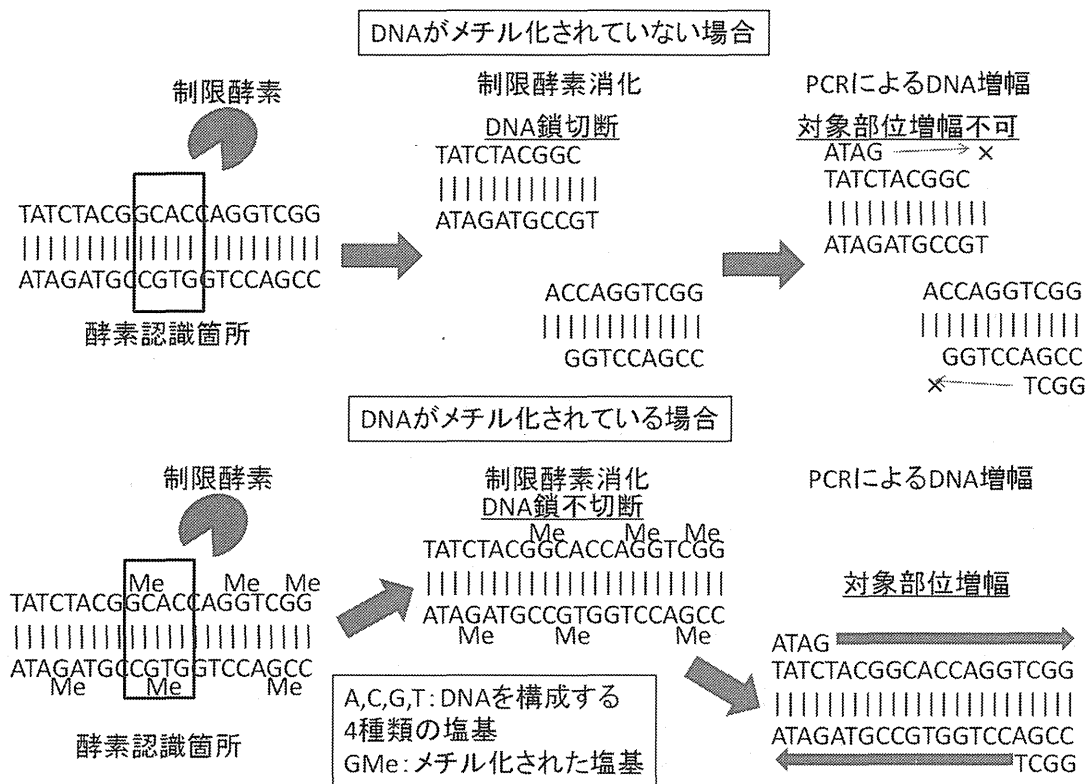


図2 DNAメチル化度の検出原理

DNA断片にあるメチル化感受性制限酵素の認識配列が p53 では2箇所（実際には他の酵素もあるため3箇所以上）、e-cadherinでは4箇所以上（実際には他の酵素もあるため5箇所以上）あるため、メチル化度20%未満を低メチル化、20%以上50%以下を中メチル化、50%より高い場合を高メチル化した細胞塊と分類し、その出現頻度を χ^2 検定にて統計解析した。

B2.3IF 磁界ばく露による内分泌かく乱性の評価

磁界の生体影響を調べる上で、生体へのリスクを考えた場合、致死や発がんに至る重篤な作用の有無を明らかにする優先順位は最も高いが、一方で社会における磁界の生体影響に関する懸念を考えた場合、磁界ばく露による何らかの体調不良などを主観

的に訴える不定愁訴があることも事実である。また、生物影響についての知見が少ない中間周波帯の磁界については、鉄道でわずかに発生する以外にも、誘導加熱器、誘導加熱調理機など同様の周波数を用いる機器も社会に導入されており、女性の使用に伴う特有のリスクに対する評価も重要である。エストロゲンは、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であり、その高値は双児や巨大児、低値により胎児死亡や仮死、無脳児の出生の危険性を高める。本節では、エストロゲンへの応答性に着目し、IF磁界ばく露によるエストロゲン応答性変化の有無を内分泌攪乱化学物質のスクリーニング系であるレポーター遺伝子アッセイを用いて調べた。

B2.3.1 レポーター遺伝子アッセイの原理

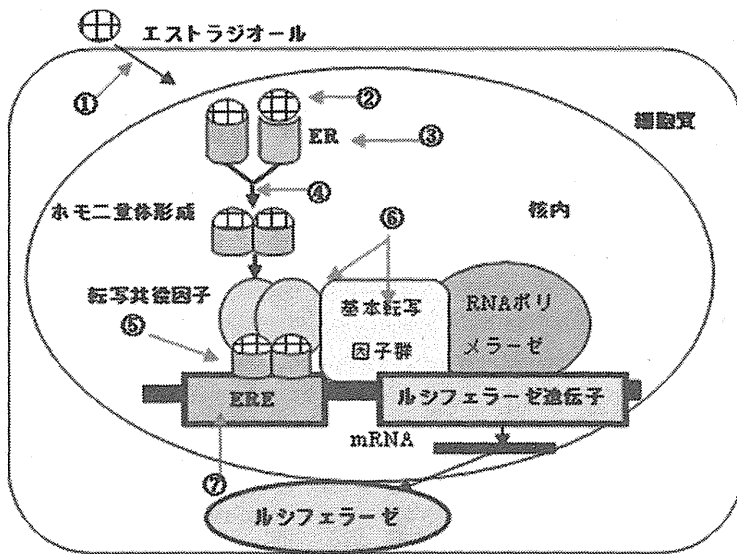


図3 核内でのエストロゲン応答遺伝子の活性化機構

エストロゲンは細胞膜を通過し核内に存在するエストロゲンレセプターに結合してホモ2量体の複合体を形成する。複合体が形成されると、その複合体は核内に移行し、染色体に組み込まれたベクターの有するエストロゲン応答配列に結合する。この結合により、多数の共役因子を始めとする転写因子群が集められ、エストロゲン応答配列の下流にあるホタルルシフェラーゼ遺伝子の転写活性化を促してルシフェラーゼが発現される。ルシフェラーゼはヒト細胞内に

存在しないため、微弱なシグナルもエストロゲン活性として評価できる。

この系を用いることで、磁界ばく露による①細胞へのエストロゲンの取り込み阻害 ②エストロゲンレセプターへの結合阻害 ③エストロゲンレセプターの量的変化 ④エストロゲンレセプターのホモ二量体形成阻害 ⑤エストロゲン応答配列への結合阻害 ⑥転写共役因子、基本転写因子への量的変化・質的变化の影響 ⑦メチル化等のDNAへの影響等が検出可能と考えられる(図3)。

①細胞へのエストロゲンの取り込み阻害 ②エストロゲンレセプターへの結合阻害 ③エストロゲンレセプターの量的変化 ④エストロゲンレセプターのホモ二量体形成阻害 ⑤エストロゲン応答配列への結合阻害 ⑥転写共役因子、基本転写因子への量的変化・質的变化の影響 ⑦メチル化等のDNAへの影響等が検出可能と考えられる(図3)。

B2.3.2 レポータージーンアッセイ系の構築

レポータージーン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4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

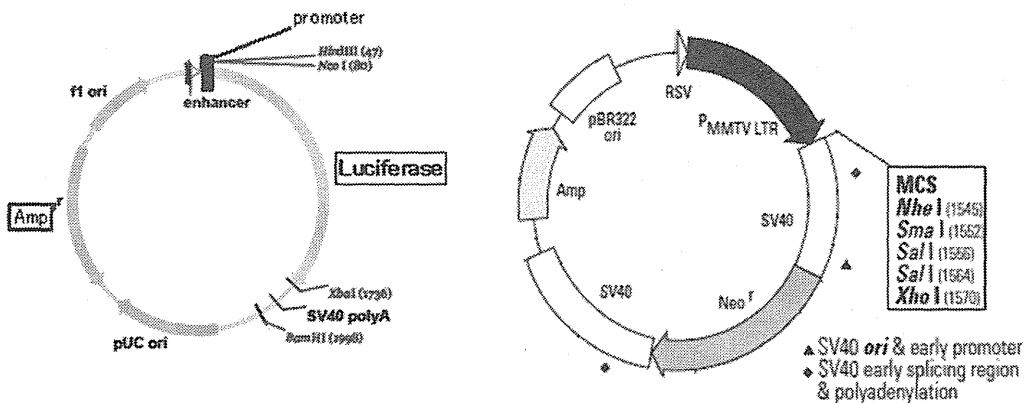


図4 pTransLucentとpMAMneoの構造

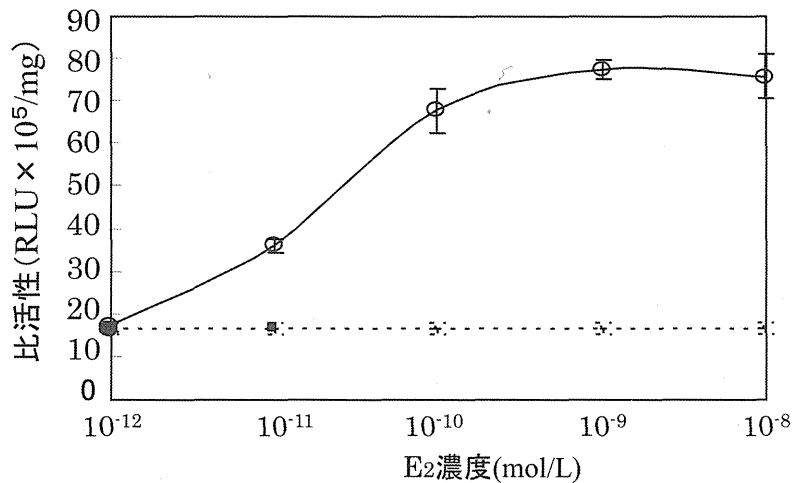


図5 エストラジオール(E2)各濃度における発現誘導ルシフェラーゼの比活性の変化：○は各E2濃度における比活性を表し、破線はネガティブコントロールとして終濃度を0.5%DMSOで処理した時の比活性(×10⁵RLU/mgタンパク質)を示す。

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。

B2.3.3 レポータージーンのアッセイ手法の構築

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、0.01μg/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、エストロゲンを除去した後、MCF-7を48穴プレートに撒き(1.25×10⁵cells)、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℃、5% CO₂、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5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、ルシフェラー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。樹立した細胞は凍結保存し、IF磁界ばく露実験に供した。

B2.3.4 エストロゲン応答性に対する IF 磁界ばく露の影響評価

前節により樹立した細胞を、インシュリンを添加した MEM 培地にて前培養し、一度植え継いだ細胞を試験細胞とした。

24 時間のばく露試験では、試験細胞は、エストロゲンおよびエストロゲン様物質を除去するため活性炭処理を行ったウシ胎児血清を含むフェノールレッド不含 MEM 培地で 3 日培養し、内在性のエストロゲンを枯渇させた。この MCF-7 細胞を 6well のアッセイプレートに $6.0-7.0 \times 10^6$ cells/well(3ml)で播種後、半数の well には DMSO で溶解したエストラジオール (E2) を終濃度 10^{-11} mol/L となるように $30 \mu\text{L}$ 添加し、残りの 3well にはエストラジオール溶解に使用した DMSO のみを $30 \mu\text{L}$ 加えた。同一試験プレートを 3 枚作成し、それぞれ IF 磁界ばく露用、疑似ばく露用、対照とする通常の CO_2 培養器用の 3 箇所へ静置した。培養は 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、湿度 100%のインキュベータ内で行い、IF 磁界ばく露群では磁界ばく露を行った。

24 時間培養後、それぞれの試験プレートを取り出し、培地を吸引した後、ルシフェラーゼ活性測定試験まで氷上に保持した。ルシフェラーゼ活性測定では、界面活性剤を含む 1 倍濃度の Cell Culture Lysis Reagent [CCLR : 組成 ; $25\text{mM Tris}(\text{pH}7.8) - \text{H}_3\text{PO}_4$ 、 2mM EDTA 、 2mM DTT 、 $10\% \text{グリセロール}$ 、 $1\% \text{Triton X-100}$]で細胞を溶解し、遠心分離上清を細胞粗抽出液とし、ルシフェラーゼ活性測定及びタンパク質定量に用いる試料とした。ルシフェラーゼの活性測定には Luciferase Assay System (Promega) を用い、ルシフェリン-ルシフェラーゼによる化学発光の発光量を測定した。タンパク質

定量には Lowry 法を用い、DC Protein Assay Kit (Bio-Rad)を用いて定量した。

比活性は次式により求めた。

$$\text{比活性} \left(\frac{\text{RLU}}{\text{mg protein}} \right)$$

$$= \frac{\text{試料発光量} \times 50 \left(\frac{\text{RLU}}{\text{ml}} \right)}{\text{タンパク濃度} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

長時間ばく露については、前培養後の試験細胞を活性炭処理を行ったウシ胎児血清を含むフェノールレッド不含 MEM 培地に懸濁したのち、90mm の滅菌済みプラスチックシャーレ 3 枚に分注し、それぞれ IF 磁界ばく露用、疑似ばく露用、対照とする通常の CO_2 培養器用として、3 箇所へ 3 日間培養し、磁界ばく露群では IF 磁界をばく露しながら内在性のエストロゲンを枯渇させた。3 日間培養後、それぞれの細胞を回収し、6well のアッセイプレートに $6.0-7.0 \times 10^6$ cells/well で播種し、24 時間のばく露試験と同様の処理によりそれぞれの細胞での試験プレートを作成した後、再度それぞれの培養環境下で 24 時間培養した。その後、24 時間のばく露試験と同様にルシフェラーゼ活性を測定した。

B2.4 細胞分化に与える影響の評価

本研究で対象とする IH 調理器などに起因する 20kHz 帯の正弦波磁界の場合、調理作業に起因する妊産婦のばく露なども考慮するべきである。本研究では動物実験班により中間周波磁界の催奇形性が評価されているところであるが、異なる試験系でも評価を行うことにより、より信頼性の高い結果が得られるため、本節では、特に胎児の発生に関連する細胞の分化に対する影響評価を行った。

個体の発生は、受精した卵細胞から、細胞が分裂・増殖すると共に、プログラムされた通りに細胞が分化し、様々な器官を形成する過程を経る。本研究では、個体の発生に伴う分化に比較的近い条件で影響評価が可能な動物代替試験法である Embryonic Stem Cell Test (EST) 法に準じた方法で、IF 磁界が細胞分化に与える影響の評価を行った。EST 法では、マウス ES 細胞を用いる。マウス ES 細胞は胚盤胞に戻し発生させることでマウス個体中の全ての細胞に分化する能力を持ち、培養によっても心筋細胞、神経細胞その他多くの種類の細胞へと分化させることができる。EST 法では、このマウス ES 細胞が培養皿中で心筋細胞に分化する過程で化学物質などにばく露し、分化した心筋細胞の拍動を指標として ES 細胞において、発生毒性に関連する細胞分化への影響を評価する。この試験は、未分化細胞が分化する過程で影響を評価するため、動物を用いる発生毒性試験において、評価すべき対象をばく露または投与する感受性の高い期間である器官形成期（ラットにおいて受精後 7 日～17 日）と比較して、似通った細胞の分化過程を評価し、発生毒性の評価を補完するものである。さらに、近年報告された催奇形性マーカーを用い、遺伝子発現レベルでの検討も実施した。

B2.4.1 細胞の馴化

細胞株として、マウス由来の ES 細胞 D3 株 (ATCC CRL-1934) を用いた。本細胞を Geltrex マトリックス (Life Technologies 社) でコーティングしたフラスコ中で、15%KSR (Life Technologies 社) および mLIF を含む Knockout DMEM (Life Technologies 社) 培地で 37℃、5%CO₂ 条件下でフィーダ

ーレスに馴化し、試験に用いた。試験に用いる際の前培養は、同じ培養液を用いて行った。一方、ばく露試験には FBS を 20% 含む DMEM 培地を用いた。

B2.4.2 細胞増殖測定

細胞の濃度が 5×10^3 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 μ l/well (50cell/well) ずつ分注した。炭酸ガスインキュベータ内で 2 時間培養した後、各ウェルに培地 100 μ l を添加し、IF 磁界または陽性コントロールの 5-フルオロウラシル (最終濃度 0.1 μ g/ml) に 7 日間ばく露した。培養開始時および 3、5、10 日後に WST-1 (Premix WST-1、TAKARA 社) を各ウェルに 10 μ l ずつ添加し、2 時間反応させた。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行なった。1 回の測定につき、各細胞の吸光度は少なくとも 6 ウェル以上とし、2 回の測定から平均値を算出した。

B2.4.3 細胞分化試験

細胞の濃度が 3.75×10^3 cells/ml となるように細胞懸濁液を調整し、丸底型 96 穴細胞培養プレート (リビジュアコートプレート、Thermo Scientific 社) に 200 μ l/well (750cells/well) ずつ分注した。37℃、5% CO₂ 条件下で 5 日間培養を行い、胚様体を形成させた。数日ごとに培地を交換し、培養 5 日目に 1 ウェルに 1 つの胚様体が入るよう、ゼラチンコートした 24 穴細胞培養プレートに胚様体を移し、さらに 5 日間培養

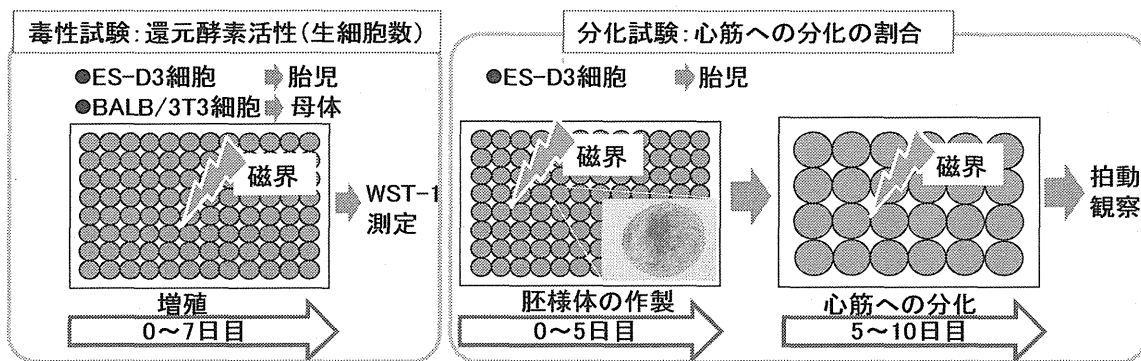


図6 EST法の流れ

を行った。培養期間 10 日の間、21kHz、0 または 3.9mT の IF 磁界に連続ばく露した。陽性コントロールには、5-フルオロウラシルを 0.05 μ g/ml 含む培地を用いた。培養 10 日目に各ウェル中の細胞塊を顕微鏡により観察し、心筋に分化した細胞の拍動の有無を確認した。全細胞塊数に対する拍動する細胞塊数の割合を算出し、この割合を指標として、細胞分化に与える IF 磁界の影響を評価した (図 6)。

B2.4.4 催奇形性マーカーによる検討

mES 細胞を心筋に分化誘導する過程で 2.0mT-3.9mT の電磁界暴露を行い、10 日後における細胞内の催奇形性候補遺伝子 5 種 (Xrip1、Smyd1、Myl7、Colla2、Hba-x) 及び 2 種の心筋分化マーカー遺伝子 (Myl2、Cardiac actin) の発現レベルをリアルタイム PCR 法により定量し、非暴露群における発現レベルと比較した。

C. 研究結果

C1 遺伝子への影響評価

C1.1 細胞増殖

CHL/IU 株、CHO-K1 株および DNA 修復系を欠損したいずれの細胞株についても、磁束密度 2mT ならびに 3.9mT の IF 磁界による細胞増殖に対する統計的に有意 ($p < 0.05$; 危険率 5% 以下の確率で差があるとする) な影響は認められなかった (図 7)。したがって、本研究で検討した IF 磁界ばく露下では細胞の増殖に対する阻害または亢進の影響は認められなかった。これらの結果は、72 時間という比較的長時間の IF 磁界 (21kHz、最大 3.9mT) のばく露が、細胞に対して顕著な影響を持たないことを示す。さらには、種々の DNA 修復能の欠損株であっても、その増殖に影響が見られないことから、細胞死の誘発または増殖の抑制を引き起こすような重大な DNA 損傷等を起こす可能性も小さいことが示唆された。

以上から、本研究で検討した IF 磁界 (21kHz、最大 3.9mT) は哺乳類培養細胞に対して致死などの急性毒性を示さないことが明らかとなった。

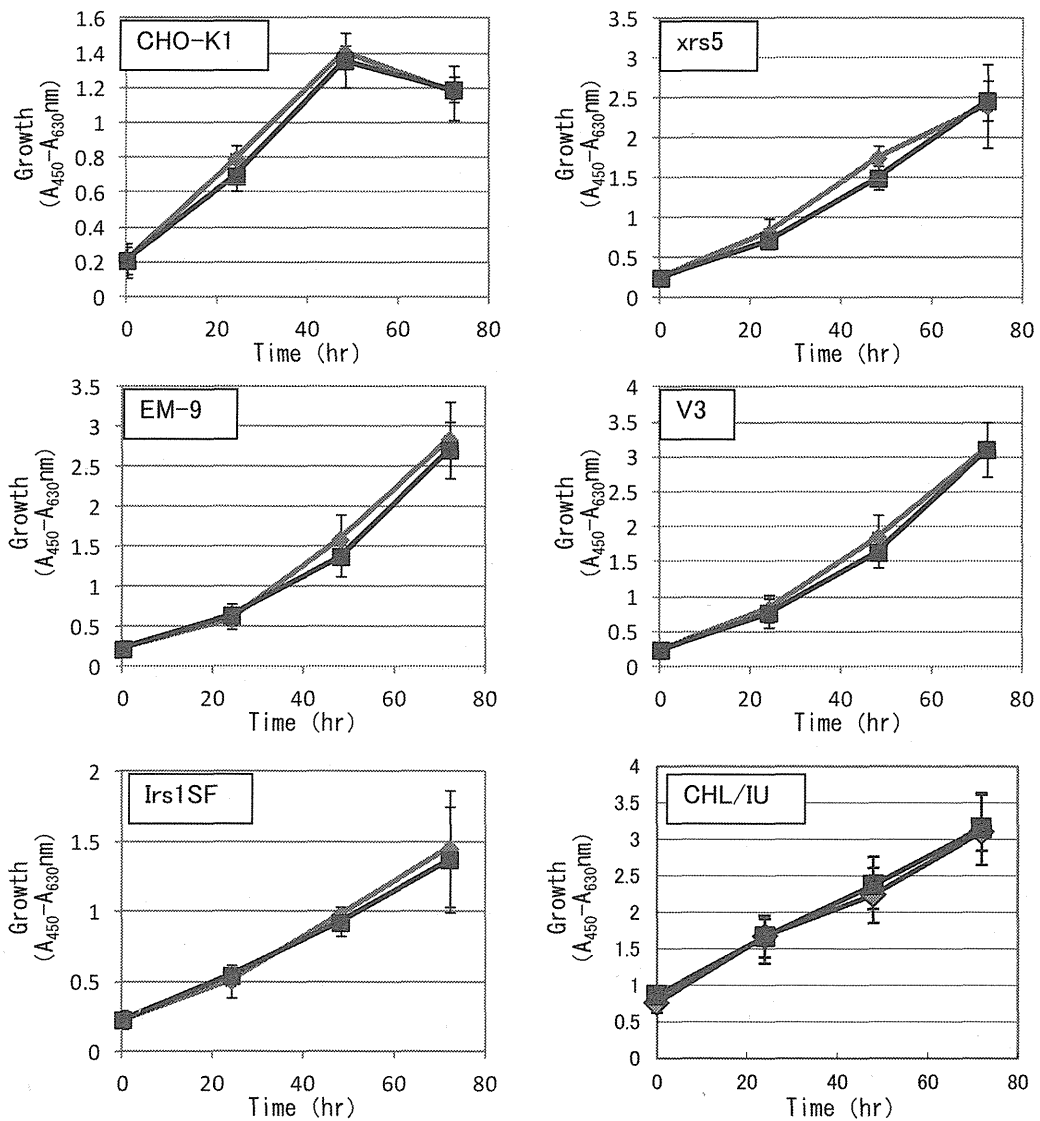


図7 細胞増殖に対するIF磁界 (3.9mT) の影響

◆ : 疑似ばく露群, ■ : IF磁界ばく露群

C1.2 小核試験

CHL/IU細胞1000個辺りの小核形成頻度を計数した結果、MMC 処理群（陽性対照群）では有意に小核出現頻度が上昇した。一方、疑似ばく露群とIF磁界ばく露群との間では統計的に有意な差は見られな

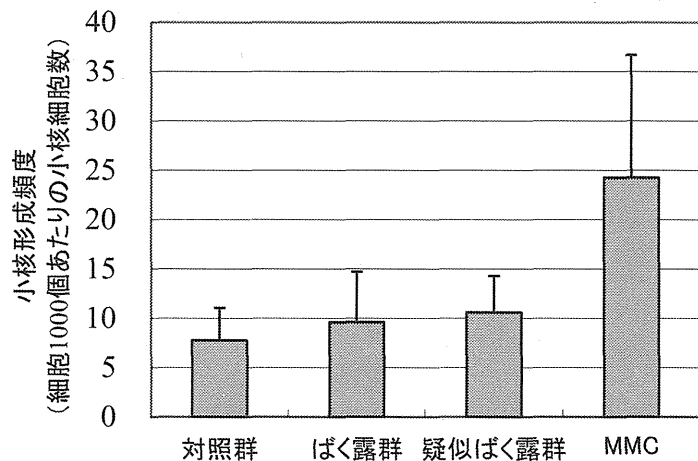


図8 IF磁界 (3.9mT) に関するCHL/IU細胞を用いた小核試験結果

った(図8)。したがって、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。この結果より、IF磁界ばく露は、発がんの要因の一つである染色体の構造異常などを起こす能力を持たないことを示す。

C1.3 突然変異試験

磁束密度2、3、3.9mTのIF磁界のばく露を対象とした突然変異試験の結果を図9に示す。試験に用いたCHO-K1、EM9の双方とも、IF磁界ばく露によるコロニー形成率への影響は見られなかった。また、HPRT遺伝子の突然変異出現頻度については、CHO-K1と比較すると、DNA修復能が欠損しているEM-9では、疑似ばく露群におけ

る突然変異の発生が数倍多いことが分かる。これは、通常状態でも生じるDNAの傷害に対する修復能力の差により、自然に発生する突然変異の頻度に違いが生じることを示す。しかしながら、この突然変異の出現頻度に対するIF磁界ばく露の影響は、双方の細胞ともに認められなかった。一方、変異原物質であるMMS処理群(陽性対照群)では、双方の細胞とも有意な突然変異出現頻度の上昇が観察された。これらの結果は、IF磁界へのばく露は、DNA修復能力の有無に関わらず遺伝子の突然変異頻度に影響しないこと、したがって、発がんの要因の一つである変異原性を持たないことを示す。

C1.4 DNAのメチル化に対する影響評価

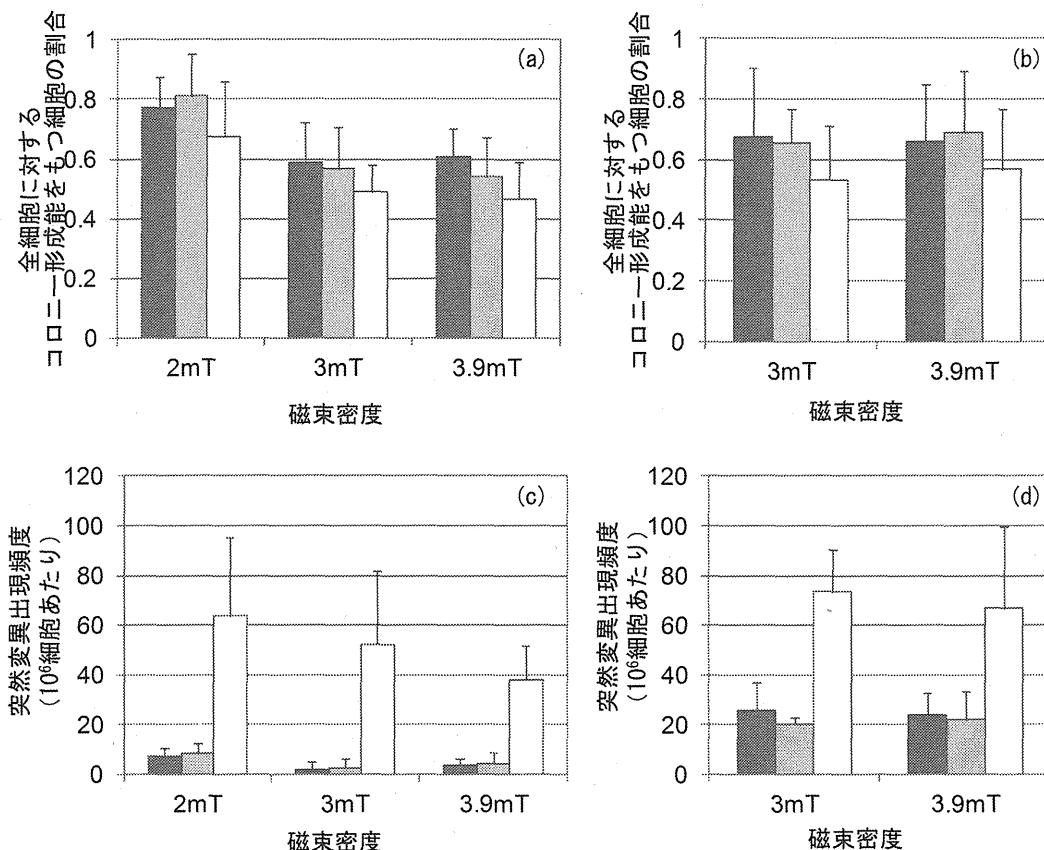


図9 突然変異試験結果 (a)CHO-K1細胞のコロニー形成率, (b)EM9細胞のコロニー形成率, (c)CHO-K1細胞の突然変異出現頻度, (d)EM9細胞の突然変異出現頻度

■: 疑似ばく露群、▨: IF磁界ばく露群、□: 陽性対照群

IF 磁界 (3.9mT) ばく露下または疑似ばく露下で2週間培養した細胞の p53 および e-cadherin 遺伝子の発現制御領域におけるメチル化度別の割合を図10に示す。全体的に e-cadherin と比べ p53 の遺伝子発現でのメチル化度が高い傾向にあるものの、同一遺伝子における IF 磁界ばく露群と疑似ばく露群の間には、統計的に有意な差は認められなかった。したがって、IF 磁界は、21kHz、3.9mT への2週間という長期ばく露によっても、遺伝子の後天的修飾 (DNA のメチル化) に影響を及ぼさないと考えられる。

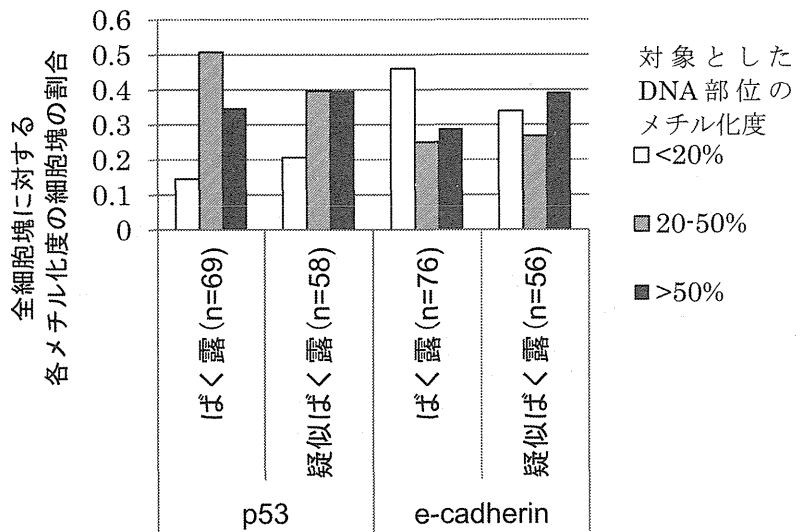


図10 DNAのメチル化度の評価

C2.内分泌かく乱性の評価

磁束密度 0 (疑似ばく露), 2, 3, 3.9mT の IF-MF による 24 時間のばく露を 37°C、5% CO₂、湿度 100%のインキュベータ内で行った (n=3 以上)。図11にそれぞれのばく露

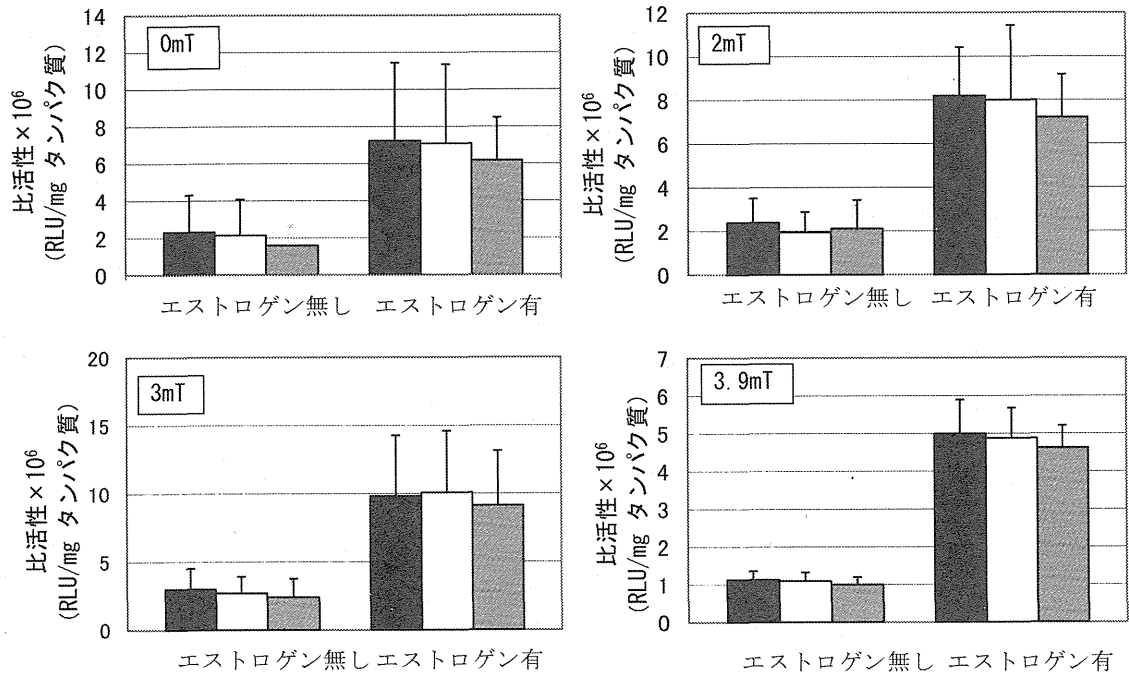


図11 0, 2, 3, 3.9mTのIF磁界への24時間のばく露下でのエストロゲン応答性のルシフェラーゼ遺伝子の発現

■ : IF磁界ばく露群 □ : 疑似ばく露群 ▨ : 対照群

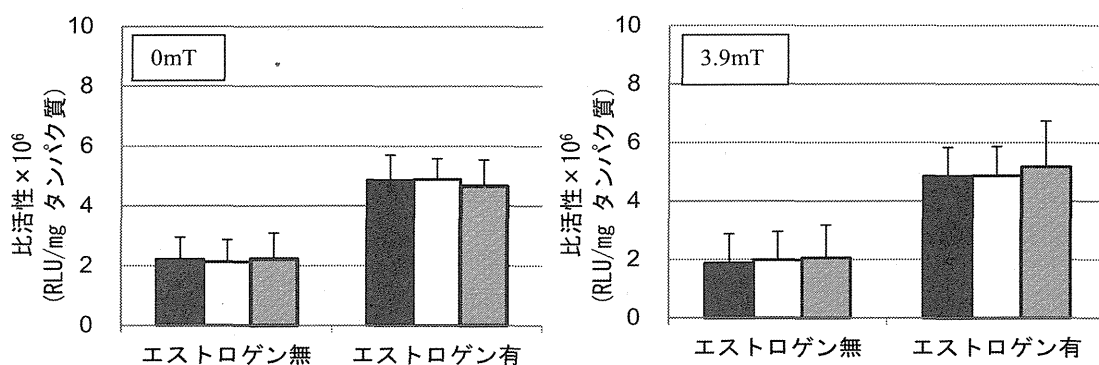


図12 3.9mTのIF磁界への4日間のばく露下でのエストロゲン応答性のルシフェラーゼ遺伝子の発現

■ : IF磁界ばく露群 □ : 疑似ばく露群 ▨ : 対照群

条件におけるIF磁界ばく露によるルシフェラーゼ遺伝子の発現を測定した結果を示す。0mTばく露の結果では、対照群、ばく露群、疑似ばく露群のいずれの間にも2標本t検定による統計的な有意差はなかった。したがって、この試験系を用いた実験を行う上で、磁界ばく露以外の条件が同等であることが示された。また、実際に磁界のばく露を行った結果、エストロゲンの有無に関わらず、IF磁界ばく露群、疑似ばく露群間で、最大3.9mTまでのいずれのばく露条件であっても、有意差は認められなかった。有意水準は5%で検定した。

また、長時間ばく露試験(4日間)においても、24時間ばく露と同様に、0mTでの実験で対照群、ばく露群、疑似ばく露群の間に統計的な有意差がないことを確認し、試験条件を確認した後に、3.9mTのばく露実験を行ったが、対照群、ばく露群、疑似ばく露群のそれぞれの間には統計的に有意な差は見られず、影響は観察されなかった(図12)。

これらの結果から、本実験系により影響を検出することが可能であると考えられる、

図7に示した7つの要因(①細胞へのエストロゲンの取り込み阻害 ②エストロゲンレセプターへの結合阻害 ③エストロゲンレセプターの量的変化 ④エストロゲンレセプターのホモ二量体形成阻害 ⑤エストロゲン応答配列への結合阻害 ⑥転写共役因子、基本転写因子への量的変化・質的变化の影響 ⑦メチル化等のDNAへの影響)のいずれも、IF磁界の影響を受ける可能性は低いことが示された。すなわち、IF磁界のばく露により、①エストロゲンを介する遺伝子発現系の遺伝子発現は誘導されない、②エストロゲンによる遺伝子発現が起こっている状態への影響を与えないことが示された。

C3 細胞分化への影響評価

本試験では、細胞増殖と細胞分化の試験を並行して行い、評価を行う。細胞増殖の結果を図13に示す。結果より、7日間のIF磁界ばく露を行ってもmES細胞およびBALB/3T3細胞のどちらにおいても、IF磁界ばく露群と疑似ばく露群では統計的に有意な差は見られないことがわかる。このこ

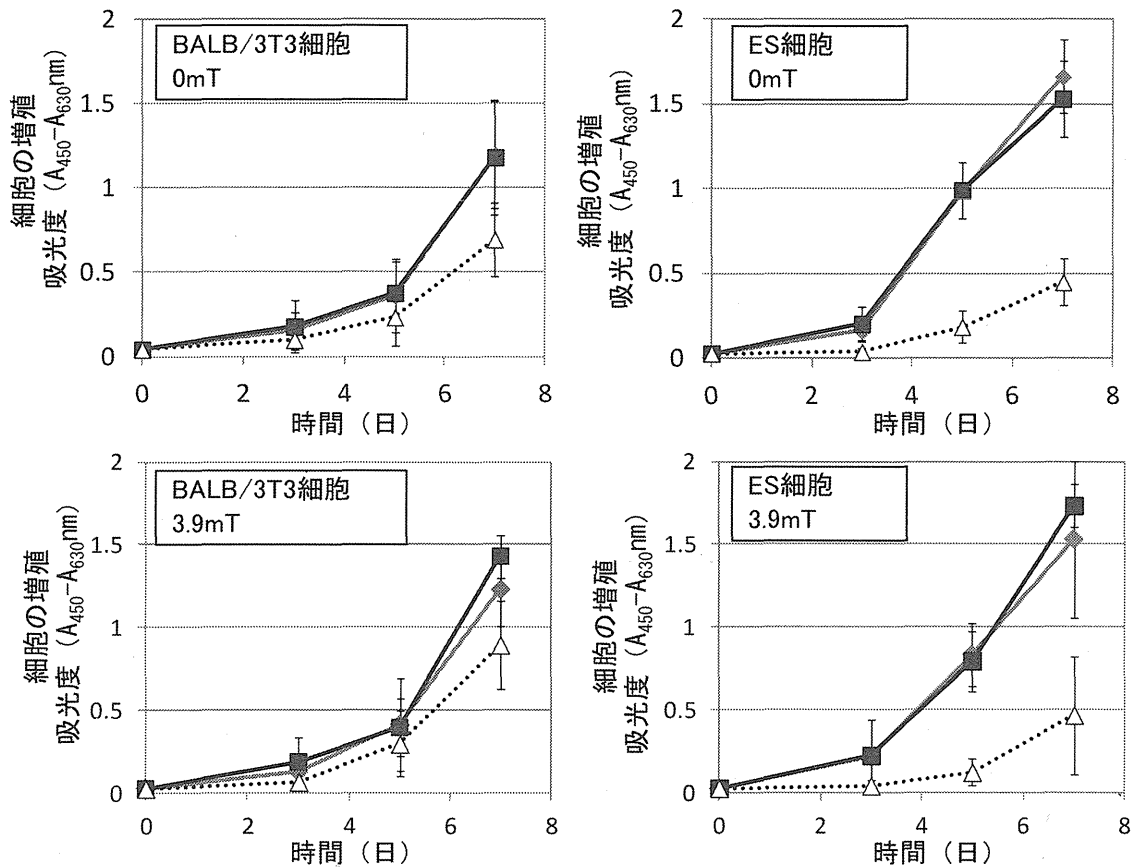


図13 EST法における細胞増殖試験の結果
 ◆：疑似ばく露群，■：IF磁界ばく露群，△：陽性対照群

とから、今回ばく露した IF 磁界条件では、発生初期における胎児細胞および母体細胞を想定した 2 種類の細胞について、毒性を示さないことがわかった。また、5-フルオロウラシル（陽性対照）処理群では、有意に増殖の抑制が見られた。一方、細胞分化への影響については、図 14 に結果を示す。0mT の結果から、ばく露装置で培養した細胞群と疑似ばく露装置で培養した細胞群では、拍動する細胞塊の割合に統計的に有意な差がないことがわかった。このことは、IF 磁界ばく露装置と疑似ばく露を行う装置とでは、EST 試験を行う上での培養条件がほぼ同等であることを示す。この結果を踏まえて、IF 磁界のばく露実験を行った。磁

束密度 3.9mT の IF 磁界ばく露の結果、IF 磁界ばく露群と疑似ばく露群の間に統計的に有意な差は観察されず影響は認められなかった。一方、5-フルオロウラシル（陽性対照）では、心筋細胞に分化し拍動する割合が有意に減少した。

また、培養 10 日目の細胞塊のおおよその面積を顕微鏡観察した画像上で計測したところ、陽性対照群は疑似ばく露群に対して顕著に小さかったのに対し、IF 磁界ばく露群は疑似ばく露群とほとんど差がなかった。

更に、胚発生における IF 磁界の影響を細胞レベルで検証する一環として、催奇形性物質処理により、発現が低下する事が報告された遺伝子 5 種と心筋分化マーカー 2 種

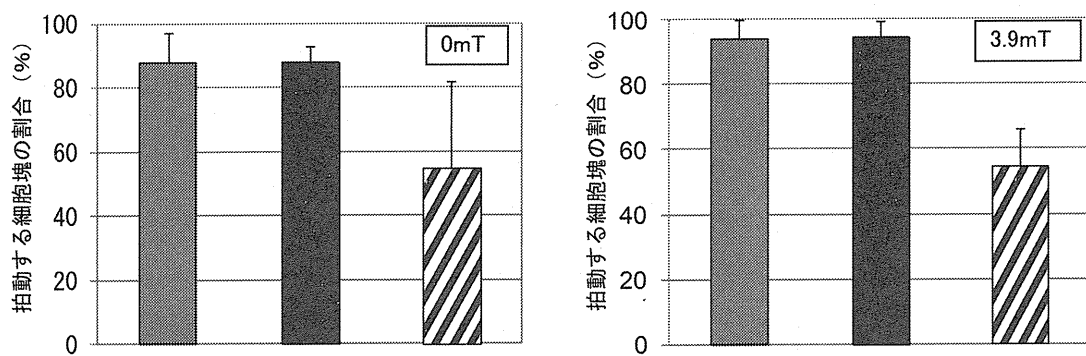


図14 EST法における細胞分化試験の結果

■：疑似ばく露群, ■：IF磁界ばく露群, ▨：陽性対照群

について、ばく露による影響を調べた。mES細胞を用いて3.9mT、10日間のIF磁界ばく露を行ったところ、いずれの遺伝子でも、ばく露による有意な変動は見られなかった。代表例として、心筋マーカー遺伝子である *Myl2* と催奇形性マーカー候補遺伝子である *Hba-x* の結果を図15に示す。

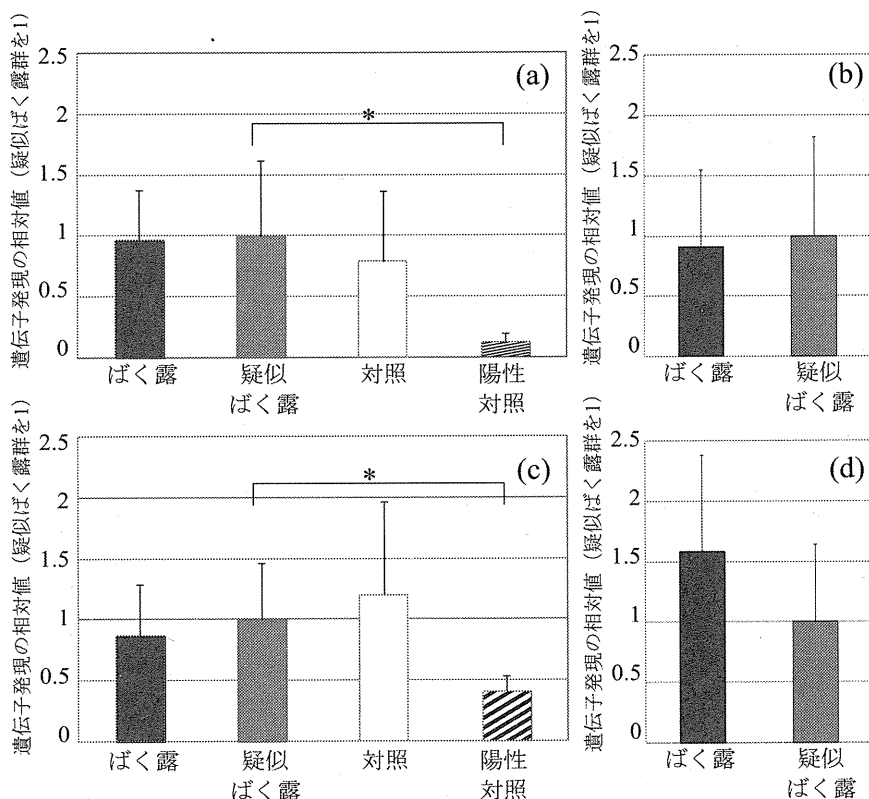


図15 β -actin遺伝子発現に対する各遺伝子発現の相対値
(a)*Myl2*, 0mT, (b) *Myl2*, 3.9mT, (c) *Hba-x*, 0mT, (d) *Hba-x*, 3.9mT

これらの結果より、IF磁界ばく露は、mES細胞の心筋への分化に影響を与えず、個体の発生初期における細胞分化への影響は見られないことが示された。

D. 考察

人体ばく露防護のための国際的なガイドラインとして、国際非電離放射線防護委員会 (ICNIRP) や IEEE (米国電気電子技術者協会) などが発行されている。特に ICNIRP のガイドラインは、欧州連合の指針となっているほか、日本においても同ガイドライ

ンに準拠した磁界規制が電力設備に関して導入された。2010年に改訂されたガイドラインでは、本報告で検討した21kHzの磁界ばく露に関しては、参考レベルとして一般環境で27 μ T、職業環境で100 μ Tが示されている。ただし、このICNIRPガイドラインは、低周波磁界については神経刺激などの影響を防止するために策定されたものであり、その他の影響については、科学的根拠が確立していないため、対象としていない。その理由としては、商用周波数の磁界については、研究結果が一貫していないことが指摘されているが、IF磁界については、十分な研究が行われていないことが挙げられている。

これまでに、IF磁界の生物影響を細胞レベルで検討した結果としては、宮越らの研究や中園らの研究が主なものとして挙げられる。櫻井らは、遺伝毒性、遺伝子発現、タンパク発現などを強磁界の短時間ばく露で検討し、影響が見られないことを報告している。また、中園らは、微生物変異原性試験、酵母変異原性試験、マウスリンフォーマアッセイなど本研究で用いた試験法とは異なる一般的な変異原性評価試験法を用いて、ICNIRPガイドラインの最大50倍弱の磁界の影響評価を行い、変異原性を示さないことを報告している。

本研究は、これらの報告を踏まえ、ICNIRPガイドラインの100倍強の磁束密度を長時間曝露した際の影響について、変異原性に加え、後天的遺伝子修飾、内分泌かく乱性、細胞分化など様々な可能性を考慮して評価を行った。

また実験においてばく露下で細胞を長期間培養するため、ばく露環境を十分に制御した条件で評価を行った。その結果、検討

したすべての指標について影響が認められないことを明らかにした。本研究で用いたIF磁界(21kHz、最大3.9mT)は、ICNIRPガイドラインの参考レベルよりの150倍弱の強度であり、実際に環境中で想定されるばく露と比較した場合、数百~数千倍となる。しかしながら、このように強い磁界であっても、そのエネルギーは化学結合などと比べると極めて小さく、例えばDNAなどの生体物質を切断・分解するほどのものではない。また、磁界による電磁誘導によるエネルギーも同様である。

これ以外に、誘導による膜への影響や遺伝子発現への影響などについては、明確な根拠は確立しておらず、本研究においても影響は見られなかったことから、少なくとも顕著な影響はないと考えられ、もって重篤な影響を持つ可能性は小さいと考えられる。

E. 結論

本研究は、日本において普及が進む家電製品などから漏洩する20kHz帯のIF磁界について、一般の関心は高いものの、研究に限られ科学的不確かさも高い生物影響に関して、科学的な不確かさを減らし必要な情報を得るために研究を実施した。具体的な評価法として、ヒトおよびげっ歯類の培養細胞を用いて21kHz、最大3.9mTの磁界の影響を評価した。その結果として、

- ① 細胞の増殖抑制や致死に至るような急性毒性は無い。
- ② 発がんの因子となる遺伝子変異や核の異常、ならびに後天的なDNAの修飾を誘導しない。
- ③ 女性ホルモン(エストロゲン)により制御される遺伝子の発現をおこさ

ず、またエストロゲンによる遺伝子発現へ影響を与えない。

- ④ 生物の発生初期段階の分化に対して影響を与えない。

以上4点が示された。

従って、本研究で得られた結果から判断する限り、居住環境に存在する微弱なレベルでのIF磁界ばく露の影響については、影響が無いか、もしくは一般的な安全性評価試験では検出できないレベルの極めて弱い影響しか持たず、したがって生体影響としてのリスクは低いと考えられる。

F. 研究発表

F.1 論文発表

1. M. Ikehata, S. Yoshie, Y. Suzuki, K. Wada, K. Wake, T. Sakai, S. Nakasono, M. Taki and, C. Ohkubo, 21 kHz Magnetic Field Did Not Affect Cell Growth And Mutagenesis in Mammalian Cells (準備中)
2. S. Yoshie, Y. Ogasawara, M. Ikehata, K. Ishii, Y. Suzuki, K. Wada, K. Wake, S. Nakasono, M. Taki and C. Ohkubo, Evaluation of Biological Effects of Intermediate Frequency Magnetic Field Based on Differentiation of Embryonic Stem Cell (準備中)

F.2 学会発表

1. 池畑政輝、吉江幸子、早川敏雄、中間周波磁界の生物影響評価、第83回日本産業衛生学会、2010年5月、福井市
2. M. Ikehata, K. Wada, Y. Suzuki, S. Yoshie, T. Sakai, K. Wake, S. Nakasono, M. Taki and C. Ohkubo, Development of exposure system of intermediate frequency magnetic fields for in vitro test systems,

32th Annual meeting of the Bioelectromagnetics Society, June 2010, Seoul

3. M. Ikehata, K. Wada, Y. Suzuki, S. Yoshie, T. Sakai, K. Wake, S. Nakasono, M. Taki and C. Ohkubo, Evaluation of Genotoxic Effects of Intermediate Frequency Magnetic Field in in vitro Micronucleus Assay Using CHL/IU Cells, Asia-Pacific Radio Science Conference 2010, Sep. 2010, Toyama
4. S. Yoshie, M. Ikehata, Y. Suzuki, K. Wada, C. Okubo, T. Hayakawa, Evaluation of biological effects of intermediate frequency magnetic field based on growth of DNA repair deficient mammalian cells and mutation assay, Asia-Pacific Radio Science Conference 2010, Sep. 2010, Toyama
5. M. Ikehata, S. Yoshie, Y. Ogasawara, K. Ishii, K. Wada, Y. Suzuki, T. Sakai, K. Wake, S. Nakasono, M. Taki and C. Ohkubo, Evaluation of biological effects by exposure to intermediate frequency magnetic fields, 6th IWBEF, Oct. 2010, Bodrum
6. 吉江幸子、池畑政輝、鈴木敬久、和田圭二、和氣加奈子、酒井泰二、中園聡、多氣昌生、大久保千代次、中間周波磁界の変異原性およびDNA修復系欠損細胞を用いた毒性の評価、第39回環境変異原学会、2010年11月、つくば
7. 池畑政輝、吉江幸子、和田圭二、鈴木敬久、酒井泰二、和氣加奈子、中園聡、多氣昌生、大久保千代次、*In vitro* 小核試験による中間周波磁界の生物影響評価、第二回医用生体電磁気学シンポジ

- ウム、2011年1月、小金井
8. 吉江幸子、池畑政輝、鈴木敬久、和田圭二、和氣加奈子、酒井泰二、中園聡、多氣昌生、大久保千代次、哺乳類細胞を用いた中間周波磁界の変異原性評価、第84回産業衛生学会、2011年5月、東京
 9. M. Ikehata, S. Yoshie, T. Hayakawa, Y. Suzuki and M. Taki, EMFs in Railway system -Evaluation of Biological Effects and Current Trends of its Health Risk Assessment-, WCCR2011, May 2011, Lille.
 10. M. Ikehata, K. Wada, Y. Suzuki, S. Yoshie, T. Sakai, K. Wake, S. Nakasono, M. Taki and C. Ohkubo, Evaluation of Genotoxic Effects of Intermediate Frequency Magnetic Field in in vitro Micronucleus Assay Using CHL/IU Cells, XXX URSI-GA, Aug. 2011, Istanbul
 11. S. Yoshie, Y. Suzuki, K. Wada, K. Wake, T. Sakai, S. Nakasono, M. Taki, C. Ohkubo, and M. Ikehata, Estimation of Mutagenic Effects of Intermediate Frequency Magnetic Field using mammalian cells, XXX URSI-GA, Aug. 2011, Istanbul
 12. Y. Ogasawara, M. Ikehata, R. Sakaguchi, S. Awano, S. Yoshie, C. Ohkubo and K. Ishii, Effects of exposure to intermediate frequency magnetic fields on gene expression of estrogen-regulated gene in MCF-7 cells, XXX URSI-GA, Aug. 2011, Istanbul
 13. M. Ikehata, Evaluation of Biological Effects of Magnetic Fields -from static to intermediate frequency- ISAP2011, Oct. 2011, Jeju.
 14. 小笠原 裕樹、坂口 涼、粟倉 志歩、石井 一行、池畑 政輝*、吉江 幸子、大久保千代次、エストロゲン応答性レポータージーンアッセイを用いた中間周波磁界の生物影響評価、マグネティックス研究会、MAG-11-080、2011年11月、我孫子
 15. Y. Ogasawara, M. Ikehata, S. Yoshie, S. Nakasono, C. Ohkubo and K. Ishii, Effects of exposure to 21kHz magnetic fields on estrogen-regulated gene expression in MCF-7 cell, 34th Annual meeting of the Bioelectromagnetics Society, Jun. 2012, Brisbane
 16. 吉江幸子、池畑政輝、小笠原裕樹、石井一行、大久保千代次、中間周波磁界が細胞分化に与える影響の評価、日本放射線影響学会第55回大会、2012年9月、仙台
 17. 池畑政輝、中間周波磁界の生物影響の評価、第262回鉄道総研月例発表会、2012年12月、東京
 18. M. Ikehata, EMF issue in Railway systems- Evaluation of Biological Effects and Trends of Regulation in Japan-, ISEF' 2013, Sep. 2013, Ohrid (invited).
 19. M. Ikehata, S. Yoshie, T. Hayakawa, Y. Suzuki and M. Taki, EMF issue in Railway systems - Evaluation of Biological Effects and Trends of Regulation in Japan-, WCCR2013, Nov. 2013, Sydney. (accepted for oral presentation)
 20. S. Yoshie, M. Ikehata, Y. Ogasawara, K. Ishii, Y. Suzuki, K. Wada, K. Wake, S. Nakasono, M. Taki and C. Ohkubo,