

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とで多数の共役因子を始めとする転写因子群がリクルートされ、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発現したルシフェラーゼを検出することである。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。

(2.1) 細胞株

IF 磁界曝露によるエストロゲンの転写系の応答性の評価には、Reporter gene Assay を用いた。使用細胞は、エストロゲンレセプターが高発現しているヒト乳癌由来 MCF-7 細胞にエストロゲン応答配列 (-AGGTCACAGTGACCT-) を tandem に 3 回繋ぎ、その下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ pTransLucent ベクターを形質導入した株を用いた。培養条件は、MEM 非必須アミノ酸、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、ヒト組み換え型インスリン、活性炭処理済みウシ胎児血清を含むフェノールレッド不含 MEM 培地で 37°C、5%CO₂、湿度 100% で 3 日間培養した後、同培地中で以下に示す各種処理を 24 時間行った。

(2.2) トリコスタチン A (TSA) 及びタモキシフェン (TAM) のエストロゲン応答性に対する評価

確立された評価系であることを示す目的で、コントロールとして TSA や TAM を用いて、それら化合物とエストロゲンの同時処理によりエストロゲン応答性変動を検討した。また、TSA 処理によるエストロゲン応答遺伝子の発現増強作用について調べた。

DNA はヒストンタンパク質に巻きついていて緻密にたたみ込まれたクロマチン構造をとっている。クロマチンの一部が弛緩する領域(ユークロマチン)で遺伝子発現は活性化され、遺伝子発現が起こると考えられている。その高次構造を調節する酵素がヒストンアセチラーゼ(HAT)やヒストンデアセチラーゼ(HDAC)等である。HAT は、ヒストン H4 のリジン残基のアセチル化によりクロマチン構造を弛緩させ、遺伝子発現を活性化する。また、アセチル化ヒストンは HDAC によりアセチル基が取り除かれ、クロマチン構造は凝縮して発現は抑制される。そこで本評価法における遺伝子発現系の陽性コントロールとして、HDAC 阻害剤であるヒドロキサム酸系の TSA を作用させ、アセチル化ヒストンが蓄積した時、本遺伝子発現系に影響を及ぼすか否かをルシフェラーゼ活性の増強を指標に検討を行った。また、エストロゲンのアンタゴニストである TAM 処理によるエストロゲン応答遺伝子の発現減弱作用の確認を行った。

(2.3) MCF-7 細胞の TSA 処理によるルシフェラーゼ発現の変動

内在性のエストロゲンを枯渇させるため、活性炭処理済みウシ胎児血清を含むフェノールレッド不含 MEM 培地を使用し、3 日培養した細胞を 24 well plate 当たり 3.15×10⁵ cells/well で細胞を播種した。その後、TSA を 20×10⁻⁹M 及

び E2 を 1×10⁻¹⁰M で添加し、24 時間培養後、細胞粗抽出液の調製を行った。抽出は界面活性剤を含む Cell Culture Lysis Reagent [CCLR : 組成 ; 25mM Tris(pH7.8) -H₃PO₄、2mM EDTA、2mM DTT、10% グリセロール、1% Triton X-100] を使用して細胞を溶解することで行い、遠心分離後に得られた上清をルシフェラーゼ活性測定及びタンパク質量に用いる試料とした。ルシフェラーゼの活性測定には化学発光を用い発光量 Relative light units (RLU) を測定した。タンパク質量には Lowry 法を用い、比活性は次式により求めた。

比活性(RLU/mg タンパク質)=試料 RLU×50(RLU/mL)÷タンパク質量(mg/mL)

(2.4) MCF-7 細胞への E2、TAM 処理によるルシフェラーゼの発現変動(24well plate での培養)

活性炭処理済みウシ胎児血清を含むフェノールレッド不含 MEM 培地で 3 日培養した後に E2 と TAM の混液 (TAM 終濃度 1×10⁻⁵、1×10⁻⁶、1×10⁻⁷M、E2 終濃度 1×10⁻¹¹M) を添加し、24 時間処理を行った。同濃度の E2 のみの処理も同時に行ないルシフェラーゼの発現量を比較した。

(2.5) MCF-7 細胞における IF 磁界短時間曝露によるエストロゲン応答性の変化

磁界曝露は、首都大学と共同開発した Meritt4 コイルと専用電源による装置であり、21kHz で最大 3.9mT の長時間曝露が可能な装置を使用した⁽⁵⁾。この曝露装置は、非磁性体である、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培養器を備えている。この曝露装置は、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。

曝露時の培養には、IF 磁界曝露用、疑似曝露用、及び対照として、通常の CO₂ 培養器の、計 3 種類のインキュベーターを用いた。活性炭処理済みウシ胎児血清を含むフェノールレッド不含 MEM 培地で 3 日培養した MCF-7 細胞を 6.0×10⁶cells/ well で播種後、E2 を終濃度 1×10⁻¹¹mol/L となるように添加し最大 3.9mT までの IF-MF に 24 時間曝露した。細胞は曝露の間 37°C、5% CO₂、湿度 100%の曝露装置用インキュベーターに静置した。

曝露後ただちに細胞を回収し、ルシフェラーゼの発現量を比較した。

3. 結果および考察

(3.1) MCF-7 細胞のエストロゲン処理濃度の検討

MCF-7 を 3.15×10⁵ cells/well となるように 24 穴プレートに播種し各濃度の E₂ を添加し 24 時間培養した (n=5)。E₂ 濃度 1×10⁻¹²M から 1×10⁻⁸M までの濃度で処理を

行ったところ $1 \times 10^{-11} \text{M}$ で RLU 最大比活性の約 50%を示したことより、E₂濃度を $1 \times 10^{-11} \text{M}$ に決定し、種々の実験に用

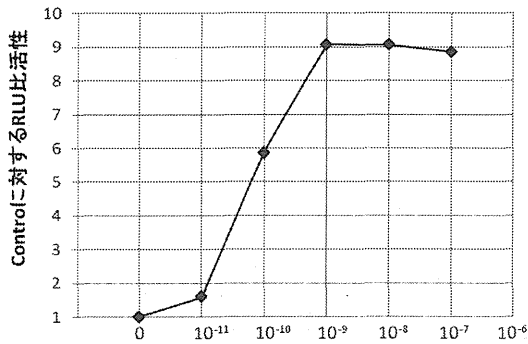


図1 MCF-7細胞のエストロゲン応答性

いた(図1)。

(3.2) TSA 処理によるルシフェラーゼの発現変動

MCF-7細胞を $3.15 \times 10^5 \text{ cells/well}$ となるように24穴プレートに播種し、TSA($2 \times 10^{-8} \text{M}$)と E₂($1 \times 10^{-10} \text{M}$)を添加し、24時間培養した。TSAによるルシフェラーゼ遺伝子応答性変動の検討実験の結果を図2に比活性を示した(n=5)。検定を行った結果、E₂処理と E₂・TSA処理間で有意差が認められた(有意水準は1%で検定した)。この結果より、IF磁界曝露の想定のうち転写共役因子、基本転写因子への量的変化・質的变化の影響における影響については検出可能であることが示された。

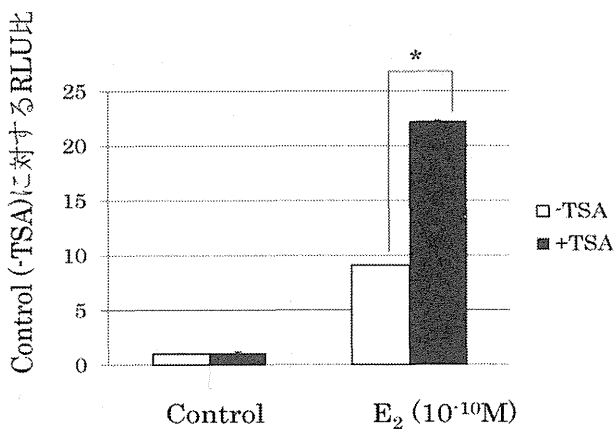


図2 トリコスタチンAによるエストロゲン応答性への影響ルシフェラーゼ遺伝子の発現変動 (*:p<0.01)

(3.3) TAM 処理によるルシフェラーゼの発現変動

MCF-7を $3.15 \times 10^5 \text{ cells/well}$ となるように24穴プレートに播種し、TAM ($1 \times 10^{-6} \text{M}$, $1 \times 10^{-7} \text{M}$)と E₂ ($1 \times 10^{-11} \text{M}$)を添加し、24時間培養した(n=3)。図3にTAM処理によるルシフェラーゼ遺伝子の変動について検討した結果を示した(n=5)。Unpaired Student's *t*-testにより検定を行ったところ、E₂処理と E₂・TAM終濃度 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 処理、E₂処理と E₂・TAM終濃

度 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 処理群間で有意差が認められた(有意水準は1%で検定した)。この結果より、IF磁界曝露の想定のうちエス

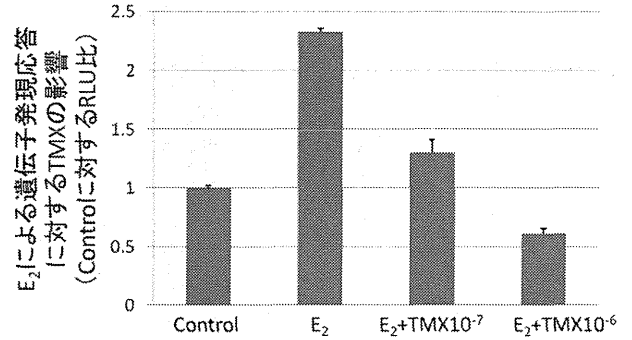


図3 タモキシフェン (TMX) によるルシフェラーゼ遺伝子発現への影響

トロゲンレセプターへの結合阻害については検出可能であることが分かった。

(3.4) IF磁界曝露によるルシフェラーゼの発現変動

MCF-7を $8 \times 10^5 \text{ cells/well}$ となるように6穴プレートに播種し、エストラジオール($1 \times 10^{-11} \text{M}$)を添加し、磁束密度2mT、3mTおよび3.9mTのIF-MFによる24時間の曝露を37°C、5%CO₂、湿度100%のインキュベーター内で行った(n=3)。図4にIF磁界曝露実験の結果例を示す。2標本 t 検定を行った結果、DMSO群、E₂処理群において、曝露群、疑似曝露群間で有意差は認められなかった(有意水準は5%で検定した)。

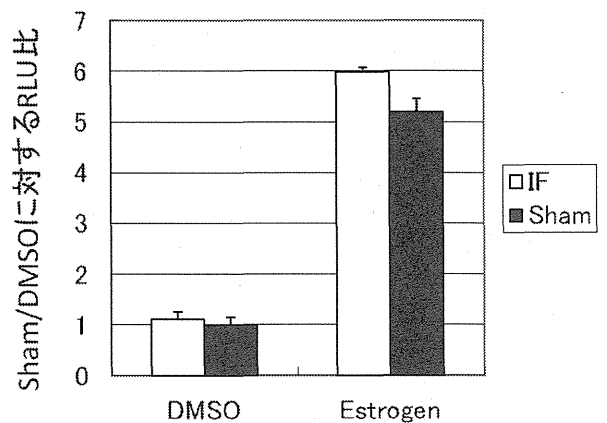


図4 IF磁界曝露(21kHz, 2mT)によるエストロゲン応答性に対する評価例

また3mT、3.9mTについても、曝露群と疑似曝露群間のルシフェラーゼ発現量はE₂未処理、処理に係わらず認められなかった(図5および図6)。これらの結果から、エストロゲン枯渇後の細胞、および枯渇させた細胞のエストロゲン応答に対して中間周波磁界が影響しないことがわかった。これは、言い換えれば、中間周波磁界がエストロゲン様の作用を持たないこと、またエストロゲンによる遺伝子

発現の過程にも作用しないことを示すといえる。

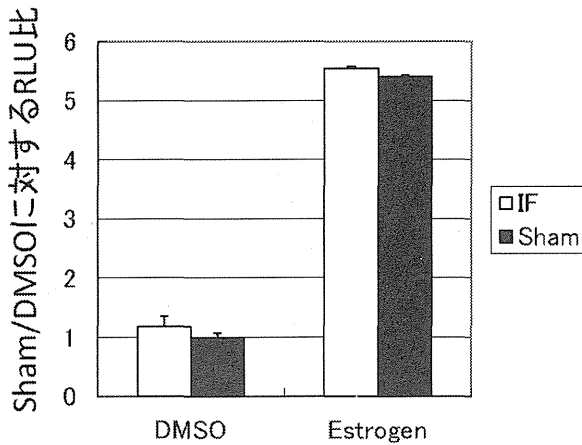


図5 IF磁界ばく露(21kHz, 3mT)によるエストロゲン応答性に対する評価例

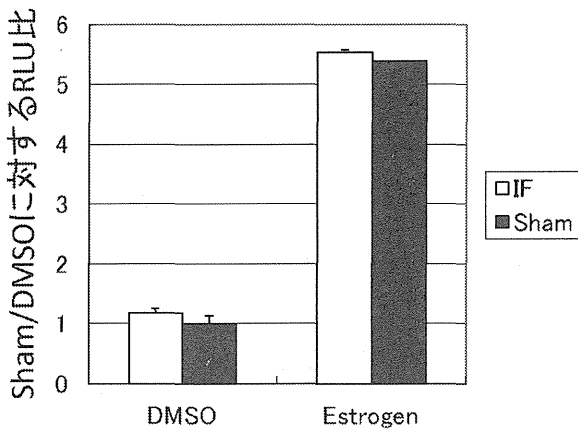


図5 IF磁界ばく露(21kHz, 3.9mT)によるエストロゲン応答性に対する評価例

ただし、遺伝子の発現の変化については、極めて早い応答もあれば、遅い応答もあり、最終的にタンパク質として発現する際の時間は多岐に富んでいるため、さらに長時間曝露した際の影響を評価する必要があると考えており、最大4日間程度の長時間曝露実験を検討しているところである。

4. まとめ

本研究では、IF磁界曝露の生物影響として、女性および胎児への影響を基礎的に評価するため、女性の乳がん由来の細胞(MCF-7)にレポーター遺伝子を導入した検出系を用いて、21kHz、最大3.9mT(ICNIRPガイドライン公衆曝露参考レベルの144倍)の磁界曝露によるエストロゲン様作用およびエストロゲンに対する応答への影響を検討した。その結果24時間曝露では、エストロゲン様作用およびエストロゲン応答に対する影響は認められなかった。

5. 謝辞

本研究の一部は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(08150668)によって行われた。

文 献

- (1) WHO Environmental Health Criteria 238 ; Extremely Low Frequency Fields, 2007.
- (2) J. Miyakoshi, E. Horiuchi, T. Nakahara, T. Sakurai, Magnetic field generated by an induction heating (IH) cook top do not cause genotoxicity in vitro, Bioelectromagnetics. 28 (2007) 529-537.
- (3) S. Nakasono, M. Ikehata, M. Dateki, S. Yoshie, T. Shigemitsu, T. Negishi, Intermediate frequency magnetic fields do not have mutagenic co-mutagenic or gene conversion potentials in microbial genotoxicity tests, Mut. Res., 649 (2008) 187-200.
- (4) T. Sakurai, T. Kiyokawa, K. Kikuchi, J. Miyakoshi, Intermediate frequency magnetic fields generated by an induction heating (IH) cooktop do not affect genotoxicities and expression of heat shock proteins. Int. J. Radiat. Biol. 85 (2009) 883-890.
- (5) 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20kHz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)。

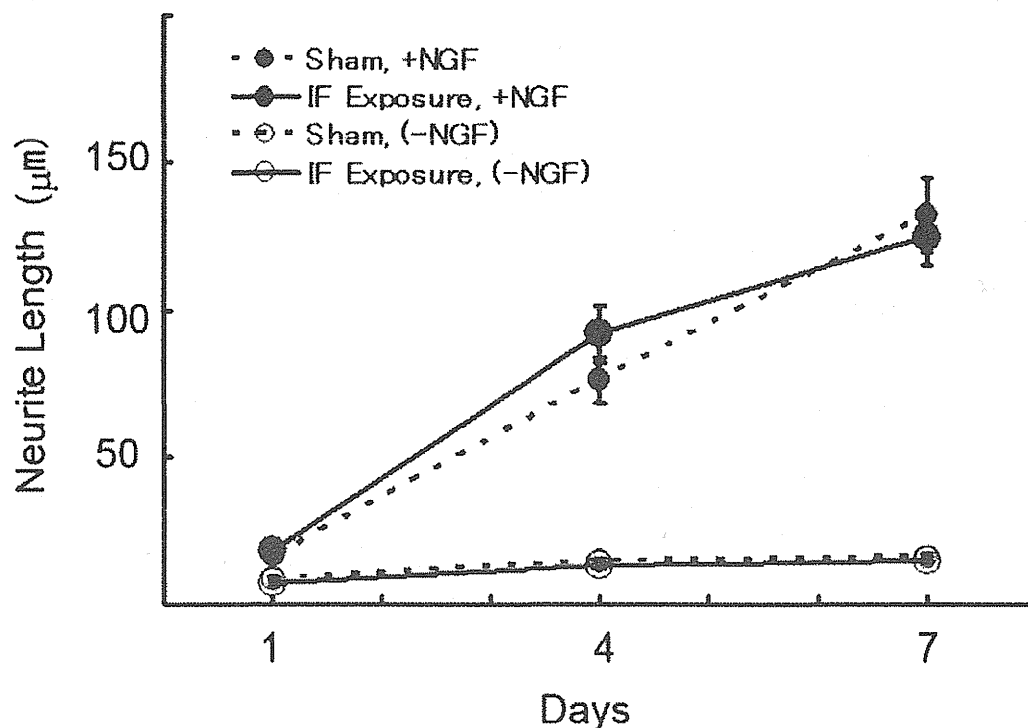


Figure 2. Neurite outgrowth (average length)

PA-67 [10:30]

Effects of exposure to 21kHz magnetic fields on estrogen-regulated gene expression in MCF-7 cells

Yuki Ogasawara¹, Masateru Ikehata², Sachiko Yoshie², Yukihiisa Suzuki³, Satoshi Nakasono⁴, Chiyoji Ohkubo⁵ & Kazuyuki Ishii¹

¹Meiji Pharmaceutical University, Kiyose, Japan, 204-0004

²Railway Technical Research Institute, Kokubunji, Japan, 185-8540

³Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Japan, 192-0364

⁴Central Research Institute for Power Electric Industry, Abiko, Japan, 270-1194

⁵Japan EMF Information Center, Minato-ku, Japan, 105-0014

To evaluate biological effects of intermediate frequency magnetic fields (IF-MF), estrogen-regulated gene expression under magnetic fields were studied using ERE-luc integrated MCF-7 cell. Exposure to IF-MF (21 kHz, up to 3.9mT) for 24 hr did not affect luciferase activity. Also, no significant difference in luciferase activity was observed by IF-MF exposure for 4 days although slight tendency of increase was observed. These results suggest that IF-MF is unlikely to affect directly estrogen-regulated gene expression.

Long Abstract

INTRODUCTION

IH hobs that uses intermediate frequency magnetic field (IF-MF) to generate heat by its electromagnetic coupling with metallic cookware are becoming popular in Japan. However, the fact remains that people concern about health risk of IF-MF because assessment of health risk is not enough to date.

We have evaluated mutagenicity and promotion potential of the IF-MFs using several test systems, so far. The IF-MFs (0.91mT at 2kHz, 1.1mT at 20kHz or 0.11mT at 60kHz) did not have mutagenicity itself or co-mutagenicity for known various mutagens in the bacterial mutation assay [1] and also did not induce micronucleus formation in V79 cells [2]. The IF-MF (21kHz, up to 3.9mT) did not induce micronucleus formation in CHL/IU cells [3] and did not increase gene mutation at *hprt* locus in CHO and DNA repair defective derivative cells [4].

To evaluate a possible health risk of the IF-MF, it is important to investigate various biological effects of exposure to the IF-MFs. In case of using IH cooking hob, effect on the pregnant woman and the fetus should be carefully investigated in addition to evaluate its carcinogenic and toxic effect. In this study, estrogen-regulated gene expression under IF-MFs was studied in order to clarify its possible effect on hormonal responsiveness of female derived cells.

MATERIALS AND METHODS

Genetically modified MCF-7 cells (human breast adenocarcinoma cell line) that were transfected with the ERE-Trans Lucifer Reporter Vector (Panomics) using Lipofectamine were used in this study. As the result of transfection, EREs-luc fusion gene (Estrogen Response Elements with luciferase gene) was translocated on genome of the cells. Thus, estrogen induces expression of the luciferase in these cells.

For IF-MFs exposure, an original exposure system that was capable of generating 21 kHz, IF-MF up to 3.9mT (144 times higher than reference level for public in the ICNIRP guideline) within exposure space (150mm×150mm×150mm) within ± 5% deviation was used [5].

In short term test, pre-cultured cells are re-inoculated in estradiol free media (phenol red free MEM media with insulin and activated charcoal treated FBS) for three days to deprive cellular estradiol. Then cells were harvested and divided into three 6-well plates. One was for the IF-MF exposure, second group was for sham exposure. Last one was incubated in a conventional incubator for control. In each plate, three wells contained 10^{-11} M estradiol. For exposure period, exposure group was incubated under 21 kHz IF-MF for 24 hrs while sham exposure group was incubated in identical exposure device without power unit (sham device). In long term test, pre-cultured cells were divided three petri dishes with estradiol free media. Exposure group was incubated under the IF-MF for three days while sham exposure group was incubated in the sham device. Then cells in each group were transferred to 6 well plate and were incubated for another 24 hrs under each condition.

After exposure period, total protein was extracted from each well using cell culture lysis reagent (Promega Co., U.S.A.) on ice. The extract was directly used for chemiluminescence assay using the Luciferase assay kit (Promega Co., U.S.A) and chemiluminescence meter (Lumat LB 9507, Berthold Technologies, U.S.A). Protein concentration was determined by Lowry method using Bio-Rad DC protein Assay Kit (Bio-Rad, U.S.A.). Measurements of experimental samples were conducted with blind manner.

RESULTS AND DISCUSSION

We confirmed environmental condition of both exposure and sham exposure devices in 0mT-sham experiment. There was no significant difference between 0mT and sham with/without 10^{-11} M estradiol.

In short term test, we performed two to four independent tests in sham-sham, 2mT-sham, 3mT-sham and 3.9mT-sham condition in short term test, respectively. As the result, there was no significant difference between exposure and sham group with/without 10^{-11} M estradiol in each exposure condition.

In long term test, 2mT-sham experiment has finished. There was no significant difference in luciferase activity between exposure and sham groups although slight tendency of increase in luciferase activity of exposure group compared with sham group was observed several times.

Therefore, it is suggested that the 21kHz IF-MF is unlikely to cause biological effect based on perturbation of estrogen responsiveness.

CONCLUSION

The possible effects of strong 21kHz magnetic fields on estrogen-regulated gene expression under were evaluated. As the results, we did not found any significant effect by exposure to 21kHz, strong IF-MF (up to 3.9mT for 24 hrs and 2mT for 4 days) in female breast adenocarcinoma derived MCF-7 cells.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported in part by The Ministry of Health Labour and Welfare in Japan, Health Labour Sciences Research Grant (08150668).

REFERENCES

- [1] S. Nakasono, M. Ikehata, M. Dateki, S. Yoshie, T. Shigemitsu and T. Negishi, Intermediate frequency magnetic fields do not have mutagenic, co-mutagenic or gene conversion potentials in microbial genotoxicity tests. *Mutation Research*, 649, 187–200, 2008
- [2] S. Nakasono, M. Ikehata, M. Dateki, S. Yoshie, T. Shigemitsu and T. Negishi, Intermediate Frequency Magnetic Fields did not Have Micronucleus Formation Potential in *in vitro* Tests. Abstract of 30th Annual Meeting of Bioelectromagnetics Society, p.340-341, San Diego, USA, June 8-12,2008
- [3] M. Ikehata, K. Wada, Y. Suzuki, S. Yoshie, T. Sakai, K. Wake, S. Nakasono, M. Taki, C. Ohkubo, Evaluation of genotoxic effects of intermediate frequency magnetic field in *in vitro* micronucleus assay using CHL/IU cells, 2010 Asia-Pacific Radio Science Conference, KP-2, Toyama, Japan, September 22-25, 2010
- [4] 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, The XXX General Assembly and Scientific Symposium of the International Union of Radio Science (URSI), Istanbul, Turkey, August 13-20, 2011
- [5] S. Kogure, K. Wada and Y. Suzuki, "Development of a magnetic field generator at 20 kHz using a voltage source inverter for a biological research", Technical report of IEICE, Vol. 109, No. 350, EMCJ2009-88, pp. 19-24, 2009 (in Japanese)

P1-94 中間周波磁界が細胞分化に与える影響の評価

Evaluation of effect of intermediate frequency magnetic field on cell differentiation

○吉江 幸子¹⁾、池畑 政輝²⁾、小笠原 裕樹²⁾、石井 一行²⁾、大久保 千代次³⁾¹⁾公益財団法人鉄道総合技術研究所、²⁾明治薬科大学、³⁾電磁界情報センター

鉄道やIH調理器などから発生する中間周波磁界（IF磁界；周波数300Hz～10MHz）の生体影響については、未だ知見が少なく、科学的知見の収集とそれに基づく健康リスク評価を行うことが課題となっている。特に強磁界の長期曝露に関する研究が少ないことから、我々は、周波数21kHz、最大磁束密度3.9mT（国際非電離放射線防護委員会（ICNIRP）のガイドライン参考レベル（公衆）の約144倍）の条件下で、連続して安定した曝露が可能なin vitro試験用のIF磁界曝露装置を開発してきた。本装置は、炭酸ガスインキュベータの周りにコイルが設置されており、細胞の培養条件を維持しながら、磁界の曝露が可能である。これまでに、本曝露装置を用いて、哺乳類細胞株を用いた小核試験およびhprt突然変異試験により、IF磁界の変異原性を評価したところ、3.9mTのIF磁界曝露においても変異原性は認められないという結果が得られている。

本研究では、マウスES細胞を用いてIF磁界が細胞分化に与える影響を調べた。具体的には、マウスES細胞が胚様体を形成し、形成した胚様体が分化し、心筋細胞の拍動が確認されるまでの10日間、磁束密度3.9mTのIF磁界に連続的に曝露した。10日目に顕微鏡観察を行うことにより、心筋に分化した細胞の拍動を確認し、全細胞塊数に

対する拍動の確認された細胞塊数を算出した。この結果、疑似曝露群とIF磁界曝露群とでは、拍動する細胞塊の割合に統計的に有意な差は見られなかった。一方、陽性コントロールとして用いた5-Fluorouracil曝露群では、疑似曝露群と比較して、拍動の観察された細胞塊の割合は有意に低かった。また、培養5日目の胚様体の大きさや培養10日目の細胞塊の大きさを顕微鏡観察したところ、陽性コントロール群は疑似曝露群と比較して顕著に小さかったのに対し、IF磁界曝露群との比較では、ほとんど差が見られなかった。以上の結果から、3.9mTの磁束密度のIF磁界を曝露しても、マウスES細胞の心筋への分化に影響を与えない、もしくはあったとしても本評価法では検出できない極めて弱いレベルの影響であると考える。

本研究の一部は、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によって行われた。

中間周波磁界、細胞分化、発生毒性

P1-95 マウスを用いた放射線の遺伝的影響調査結果についての考察

○浅川 順一、中村 典
放射線影響研究所 遺伝学部

RLGS法（Restriction Landmark Genome Scanning）は、³²Pで末端標識した数千個のDNA断片を2次元オートラジオグラムのspotとして可視化できる技法であり、常染色体に生じた遺伝子欠失をspotサイズの50%減少として検出できる。この方法を4GyのX線を照射された精原細胞に由来するマウス個体のゲノム解析に適用し、検出された欠失突然変異に基づいてゲノムワイドな突然変異誘発頻度の推定を行った。

対照群502頭と照射群505頭の合計1,007頭の子供を対象として、各マウスについて1,190個の父親由来spotと1,240個の母親由来spotの解析を行った。その結果、非照射の父親由来の502ゲノム中に1個の欠失突然変異（0.2%）を、X線照射した父親由来の505ゲノム中に5個の欠失突然変異（1%）を検出した。遺伝子欠失の大きさは2Mbから13Mbであった。線量反応が直線的であると仮定し、上記の欠失突然変異の数をそのまま用いるならば、4Gy照射による正味の突然変異率の増加は0.8%となるから、1Gy当たりでは0.2%となる。ゲノムの全ての部分に生じる欠失突然変異に着目するならば、今回のRLGSではゲノムの0.2%を検索しているので、欠失突然変異生成の確率は推定値0.2%の500倍（1/0.002）、即ち1Gy当たりゲノムに約1個とい

う計算になる。

一方、1枚のスライドに210万プローブを平均1kb間隔で貼り付けた高密度マイクロアレイを用いた比較ゲノムハイブリダイゼーション（HD-アレイCGH）法を用いると、ゲノムの約70%について欠失突然変異を調べることができる（RLGS法と比較して約350倍；70%/0.2%）。今回、HD-アレイCGH法で4Gyのガンマ線を照射した精原細胞に由来するマウス80頭と対照80頭について解析した。検出された欠失突然変異は、対照群で7個、照射群で6個であった（今中他、本学会発表）。照射群での欠失突然変異数は、RLGS法の結果から期待される値（約220個； $80 \times 4Gy / 1Gy \times 70\%$ ）よりはるかに少ない。この結果は、ゲノム全般では放射線で誘発される大きな欠失突然変異は従来考えられているよりかなり少ない可能性を示唆している。

放射線、遺伝的影響、欠失突然変異

P1-96 p53遺伝子発現抑制細胞での放射線適応応答の検討

○安井 尚彦、立花 章
茨城大学院理工学研究科理学専攻生物系

細胞にあらかじめ低線量の放射線を照射すると、その後の高線量放射線照射による染色体異常、突然変異誘発、細胞死などの影響が軽減される現象が知られており、放射線適応応答と呼ばれている。適応応答は広く生物界に見られることから、生物が普遍的に有する基本的な防御機構であると考えられるが、その分子機構はまだ明らかではない。放射線適応応答に関しては、これまでにp53ノックアウトマウスの胎児由来線維芽細胞では放射線適応応答が見られないことなど、p53遺伝子が関与することが明らかにされているが、その分子機構の詳細は分かっていない。本研究では、これまでに我々が放射線適応応答の解析に用いていたマウスm5S細胞を用いて、p53遺伝子の役割を解析することを目的としている。これまでの解析で、m5S細胞ではp53遺伝子が高発現していることがわかっている。p53タンパク質が放射線適応応答に必要であることを確認するために、RNA干渉法（RNAi）を用いてm5S細胞のp53タンパク質発現量を抑制することを試みた。3種類のsiRNAをm5S細胞に導入したところ、いずれのsiRNAを用いてもp53タンパク質はある程度低下していた。これら細胞を用いて、微小核形成を指標として、低濃度過酸化水素の前処理による放射線適応応答の誘導を検討した。RNAi処理をしていない

細胞では、低濃度過酸化水素前処理をした場合は前処理をしなかった場合に比べて微小核頻度が低下し、放射線適応応答が確認できるのに対し、RNAi処理を行った細胞では微小核頻度の低下はほとんど見られなかった。従って、p53タンパク質が一定量存在することが放射線適応応答誘導には必要であると考えられる。低濃度過酸化水素処理によりp53タンパク質に何らかの変化が生じるものと考え、現在リン酸化を解析中であり、その結果も併せて報告する予定である。

放射線適応応答、p53、DNA損傷

(鉄道総研月例発表会講演要旨)

中間周波磁界の生物影響の評価

人間科学研究部 生物工学研究室
主任研究員 池畑政輝

1. まえがき

鉄道の電気設備が発する商用周波数（50/60Hz）の磁界について、平成24年8月より鉄道に関する技術基準の改正により規制が導入された。今後は、鉄道で発生する幅広い周波数の磁界についての規制のあり方が議論される予定である。この中でも、鉄道の主変換装置等に関連する数kHz～数十kHzの磁界は、安全性に関する研究が十分ではなく、近年少しずつ生物学的な影響に関する研究が進められている段階にある。鉄道総研では、これまでに様々な磁界の生物影響評価を進めている。本発表では、最大21kHz、3.9mT（国際ガイドライン（ICNIRP）の一般公衆向けの磁界参考レベルの144倍の磁束密度）の磁界曝露によるヒトや哺乳類の培養細胞における遺伝子への影響やホルモンへの応答性に対する影響を調べた結果について述べる。

2. 電磁界の健康リスク評価、わが国における規制の現状および鉄道の電磁環境

1996年に、世界保健機関（WHO）では、0～300GHzの周波数帯の電磁界の健康への影響を評価するために国際電磁界プロジェクトを発足させた。その結果、100kHz以下の磁界については、磁界に曝露することで、電磁誘導により体内に生じる電界／電流が一定の値を超えた場合に神経が刺激されるという短期的な効果（磁気閃光や刺激による不随意運動など）は確実に認められるとされた。その一方で、商用周波数（50/60Hz）磁界の影響として疫学研究から報告されている、居住環境もしくは一般的な使用での微弱な磁界への長期間曝露による小児白血病発症の増加などの健康への悪影響については、明確な科学的証拠は得られていない。これらの知見をもとに、WHOは、健康リスクの評価として電磁界に関する2つの環境保健クライテリア（静電界・静磁界；2006年¹⁾、100kHz以下の変動電磁界；2007年²⁾）を発表しており、現在では100kHz以上の高周波電磁界についての準備を進めている。また、この評価に基づき国際非電離放射線防護委員会（ICNIRP）が人体曝露の許容値を定めたガイドラインを発行し³⁾、WHOはこれら国際ガイドラインを採用し、各国で施策することを推奨している。

我が国においては、このWHOの評価・勧告を受け、平成24年3月に経済産業省の所轄する電力会社の電気設備に、また同8月には国土交通省が所轄する鉄道の電気設備に対してICNIRPのガイドラインを根拠とした商用周波数磁界の規制が導入された。この規制により、今後対象となる電気設備を施設する場合は、一般公衆が立ち入る箇所に発生する当該設備からの磁界（実効値）が200 μ T以下となるように施設することとなった。

これらのガイドラインや規制は、上記の短期的な効果を防止するために定められているが、その根拠となる知見は幅広い周波数全体を網羅しているわけではなく、代表的な周波数帯以外は外挿により定められている。また、発がんなどの疾病の原因とされる長期的影響については、未だ科学的根拠が弱いため、このガイドラインでは防護すべき対象とされていないが、WHOの評価では、この問題の解決に向けて更なる研究が推奨されている。

鉄道における電磁環境を考えた場合、今回の規制では、主として電力を受電し鉄道の運行に必要な電気に変換して供給する電力設備や車両に電力を供給する電車線等が対象となる。しかし、これ以外にも鉄道システムは様々な電気・電子機器によって構築されており、例えば車両の場合には、「電車線（き電線、トロリ線、第三軌条など）」および変電所への電気の帰り道である「帰線（レールなど）」からの電磁界

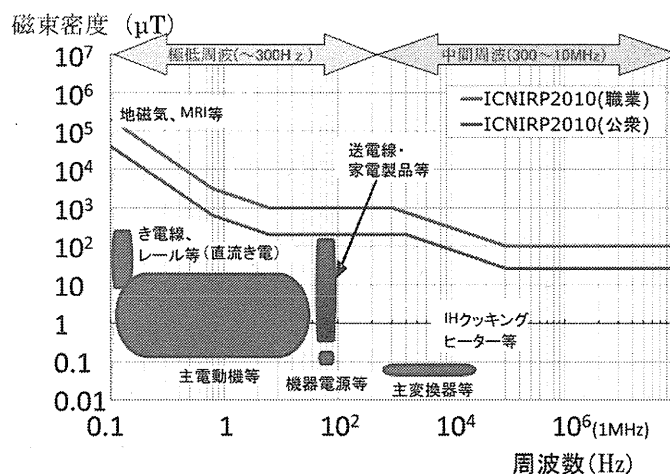


図1 ICNIRPガイドラインと鉄道の電磁界

に加え、車載機器であるリアクトル、電動機、電力変換器など、強度は弱いものの様々な周波数の電磁界が発生する(図1)。特に車両内の電磁環境は時間・空間的に不均一で、複数周波数が同時に発生するということが特徴である。これまでに鉄道環境で電磁界を測定した例では、ICNIRPガイドラインを超える例はほとんどないため、緊急に対策が必要とされる問題は生じないと考えられる。ただし、上記のような特徴を持つ電磁界の健康リスクを具体的に評価した例は少ない。今後、規制の議論を進める上では、鉄道で発生しており、かつガイドラインでは外挿で許容値が定められている領域について、生物学的に適切な評価を行うことは重要である。特に今回は、鉄道の主変換装置等に関連する周波数が数kHz~数十kHzの中間周波帯磁界(WHOの定義では300Hz~10MHzの磁界)に着目し、WHOが発刊した環境保健クライテリアの中で研究の推進が奨励されていることも踏まえ評価を行った。

3. 研究方法

我々は、先行研究においてバクテリアおよびマウス由来の培養細胞を用いた遺伝毒性試験を実施し、20kHz、1mT程度までの磁界には遺伝子変異を起こす影響がないことを明らかにした^{4),5)}。現在は、さらに生物影響評価を深度化するため、新規曝露装置を開発し、様々な影響を指標とした評価を進めている。本発表では、①培養細胞を用いた小核試験および②培養細胞における女性ホルモンによる遺伝子発現への影響評価の結果を報告する。

3.1 中間周波磁界曝露装置

高磁束密度中で多数の生物サンプルを同時に曝露するための新規曝露装置を開発した。本曝露装置は、曝露用コイルと細胞培養器からなり、15cm×15cm×15cmの曝露空間に21kHzで最大3.9mT(2010年に改訂されたICNIRPガイドラインの一般公衆に対する参考レベルの144倍)の磁界を長時間安定して発生させながら37±1℃、炭酸ガス5%、飽和水蒸気的环境下で細胞を安定に培養することが可能である(図1)。

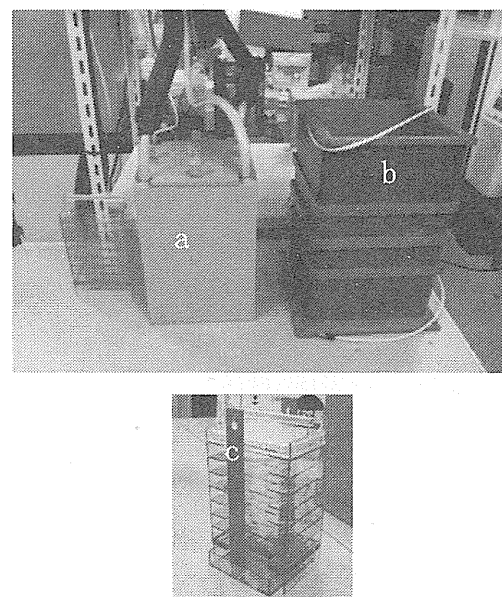


図1 細胞用中間周波磁界曝露装置
a. 曝露用培養器, b. 曝露用コイル,
c. 生物試料保持用ラック

3.2 小核試験を用いた中間周波磁界の遺伝毒性評価

「小核」とは、細胞の遺伝情報が収められている細胞核もしくは遺伝情報そのものである染色体に異常が生じた結果、細胞が分裂する過程で生じる正常な細胞核以外の小さな核状物質を指す。細胞内に小核が残った状態は、遺伝的に重篤な異常を起こした事を示し、これを誘発する作用は同時にがんを起こす過程にも大きく関わると考

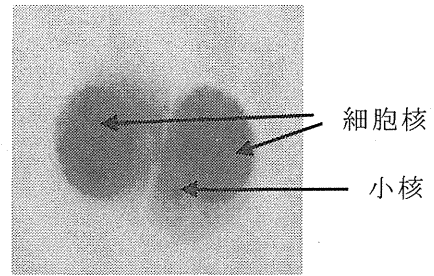


図2 小核を持つ細胞の染色例

えられているため、小核の誘発能力の評価は、簡易な発がん性の評価として用いられている。本研究では、標準的に用いられる、チャイニーズハムスターの肺由来細胞であるCHL/IU細胞を用いた。培養した細胞を4群に分け、1群は曝露群として21kHz、最大3.9mTの中間周波磁界の中で、1群は疑似曝露群として疑似曝露装置（磁界無し）の中で、またこの他に対照群と陽性対照群（マイトマイシンC（MMC；抗がん剤でDNAを損傷する作用を持つ）処理群）として24時間培養した。培養後、細胞をスライドガラス上に固定して、1枚毎に最低1000個の細胞を顕微鏡下で観察し、小核を持つ細胞の頻度を算出した。

3.3 中間周波磁界曝露によるエストロゲン応答性の遺伝子発現への影響評価

本評価法の原理は、エストロゲン応答配列を有するホタルルシフェラーゼ遺伝子を利用して、女性ホルモン的一种であるエストロゲンやエストロゲン作用を持つ物質が存在すると、染色体上に組み込まれたこの遺伝子の転写が促されるため、発現したルシフェラーゼタンパク質の活性により影響を検出することである。本研究では、ヒト乳がん由来MCF-7細胞に、上記遺伝子を組み込んだ遺伝子改変細胞を用いた。培養した細胞を、曝露群、疑似曝露群、対照群の3群に分け、エストロゲンを含まない培地でそれぞれ3日培養した後、さらにそれぞれの細胞を2群に分け、一方のみにエストロゲンを追加して、さらに24時間曝露した後、細胞からタンパク質を抽出し、ルシフェラーゼの活性と全タンパク質濃度を測定し、単位タンパク量当たりのルシフェラーゼ活性を算出した。

4. 結果および考察

4.1 小核試験

細胞1000個あたりの小核形成頻度を算出した結果、疑似曝露群と磁界曝露群との間で統計的に有意な差は見られなかった（図3）。一方で、MMC処理群では統計分析上有意に小核出現頻度が上昇した。したがって、中間周波磁界曝露により小核は誘発されないことが明らかとなった。

4.2 中間周波磁界曝露によるルシフェラーゼの発現変動

細胞内のルシフェラーゼの発現量を、曝露群、疑似曝露群、対照群で比較した（図4）。その結果、エストロゲン処理によりルシフェラーゼの発現量は有意に

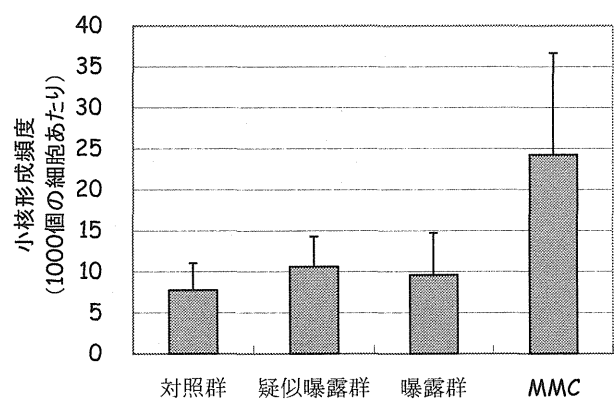


図3 中間周波磁界(21kHz、3.9mT)への24時間曝露に関するCHL/IU細胞を用いた小核試験結果

*; $p < 0.05$, Studentのt検定による

対照群は汎用の培養器で培養した非曝露対照群、曝露群は中間周波磁界曝露群、疑似曝露群は曝露群と同様の曝露装置で、通電しない状態で培養した非曝露の対照群を示す。

増加するが、磁界の曝露による影響については、いずれの群においても顕著な差は認められず、DMSO群およびエストロゲン処理群双方において、曝露群、非曝露群（疑似曝露および対照）間で有意な差は認められなかった。

4.3 考察

本研究では、21kHz、最大3.9mTの中間周波磁界への長時間曝露であっても、一般的な安全性評価で用いられる小核試験にお

いて小核を誘発しないことから、第一に、遺伝毒性は持たないと評価できうることを示された。実際に細胞と磁界の結合によるエネルギーは大変小さいことから、磁界そのものがDNAを切断することは予期されないうえに、他の様々な要因を含めた上でも、磁界曝露が遺伝子、核に重篤な影響を与えることは無いことが示された。また、女性乳がん細胞のエストロゲンによる遺伝子発現への磁界曝露の影響が認められないこと、さらに磁界曝露によるエストロゲン応答性遺伝子の発現などの現象が認められないことから、胎児の発生に大きな影響を及ぼす母体への特有な影響がある可能性も低いことが示唆された。以上の結果から、本研究で検討した21kHz、最大3.9mTの中間周波磁界には、健康に対する顕著な作用はないと考える。

5. おわりに

本発表では、新規磁界曝露装置を用いて、染色体や核の損傷を検出する小核試験およびエストロゲンにより発現する遺伝子への影響を評価し、磁界曝露による影響は認められないことを報告した。我々は、この研究成果以外にも、発がんの過程に関わるDNAの後天的修飾であるメチル化や、胎性幹細胞（ES細胞）の分化過程に及ぼす影響などの検討を進めている。

一方、商用周波数の磁界に対する規制が導入された短期影響（神経刺激）については、鉄道で発生している商用周波数以外の幅広い周波数帯の磁界について、規制のありかたに関する議論を進める必要が有る。この際に、特に科学的根拠ではなく外挿によって許容値が定められている周波数領域については、現時点での許容値が適切かどうかを科学的に検証することが必要である。そのため、今後は試験管レベルで短期影響（神経刺激）を再現し、その試験系を用いて、短期影響の許容値の検討を進める予定である。

なお、本研究で使用した曝露装置を共同で開発した、首都大学東京鈴木敬久准教授、同和田圭二准教授に深く感謝する。また、本研究の一部は厚生労働省科学研究費補助金（08150668）により遂行された。

参考文献

- 1) WHO, Environmental Health Criteria 232 Static Field, Geneva: WHO Press; 2006
- 2) WHO, Environmental Health Criteria 238 Extremely Low Frequency Fields, Geneva: WHO Press; 2007
- 3) ICNIRP Health Physics 99(6):818-836; 2010
- 4) S. Nakasono, M. Ikehata, et al, Mut. Res., 649, (2008), 187-200
- 5) 池畑政輝他、鉄道総研報告、Vol. 22、No. 5、41-44、2008

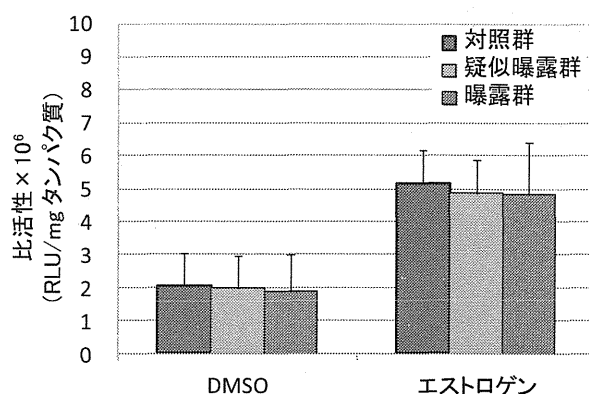


図4 中間周波磁界(21kHz, 3.9mT)へ4日間曝露した細胞のエストロゲン応答性の評価

EMF issue in Railway systems

- Evaluation of Biological Effects and Trends of Regulation in Japan -

Masateru Ikehata

Biotechnology Laboratory, Human Science Division,
Railway Technical Research Institute

Introduction

Last 30 years, biological effects of non-ionizing radiation have been strenuously investigating because of its uncertainty of adverse health effects. In 50/60 Hz power frequency magnetic field, findings in epidemiology show weak evidences of relationship between exposure to magnetic field and a risk of child leukemia[1]. Similarly, a few studies show weak evidences of relationship between exposure to radio frequency electromagnetic field used in mobile telephony (or duration of mobile telephone usage) and a risk of brain tumor [2]. These two fields are both categorized its carcinogenicity as Group 2B by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [3,4]. Then, the World Health Organization reviewed scientific evidences and published their monograph (Environmental Health Criteria No. 232 in static field and No. 238 in low frequency field.) and recommended to imply international guideline for limiting exposure to protect people from acute effects and also to promote further fundamental research.

Following this, various responses are seen in the world. In EU, EU adopted the ICNIRP guideline and the EU recommendation for general public was released and EU directive for workers have been discussed. Then, each EU member countries and other countries such as Korea, Israel, etc. including Japan have their own implementation.

In basic scientific knowledge, there is still a little information about biological/health effects by exposure to an intermediate frequency magnetic field (IF-MF, IF; 300Hz-10MHz by the description of WHO) although several devices or technologies that uses intermediate frequency magnetic field have already been installed in our society. Especially, induction heating (IH) cooktops that commonly uses 20kHz to 100kHz magnetic field to heat metallic pans became widely used at home in Japan recently. Besides, several sources are existed such as transportation systems that use inverters to drive main motors on electric railway cars.

In my talk, following three topics 1. trends of regulation in Japan, 2. evaluation of biological MF, 3. evaluation of dosimetry in human body will be presented.

1. Trends of regulation in Japan

In Japan, the regulations of MF for protection of general public from short term health effects such as nerve stimulation were enforced for electric utility company and railway business operator recently. Power frequency (50Hz or 60Hz in Japan) MF emitted from Substation, transformer, power line, etc. was the target of these regulations.

Table Summary of ELF-MF regulations in Japan

Responsible ministry	Ministry of Economy, Trade and Industry	Ministry of Land, Infrastructure, Transport and Tourism
Type	Ordinance of the Ministry	Ordinance of the Ministry
Name of Ordinance	Ministerial Ordinance setting technical standards concerning electrical facilities and its interpretation	Ministerial Ordinance to Provide the Technical Standard on Railway and its interpretation
Target MF	Power frequency (50/60Hz)	Power frequency (50/60Hz)
Limit value	200 μ T	— (200 μ T is noted in interpretation)
Target facilities	Electric installations such as Substation, Power line, Transformers, etc except consumer	Fixed electric installations such as substation, catenary, electric devices, etc.
Measurement method	Adopted IEC62110	Adopted IEC62110 and IEC/TS62597

2. Evaluation of biological effects by exposure to MF

Besides the recommendation of short term effect, the WHO also recommends further research to elucidate scientific uncertainty about health effects of long term exposure. In fact, there are a few reports on biological effects of various EMFs that exist in railway systems, such as intermediate frequency (IF) MFs that are related to variable-frequency drive (VFD) installations in rolling stock and combined MFs with different frequencies. To respond this, we've been performed biological studies for years.

For example in our study, mutagenicity, that related to cause cancer, and hormonal effect by 21kHz IF-MF were evaluated. Mutagenicity was evaluated in *in vitro* micronucleus assay (MN) using Chinese hamster lung derived CHL/IU cell that is a part of the standard test battery for genotoxicity in the OECD guideline. For evaluation of hormonal effect, MCF-7 cell (human breast adenocarcinoma cell line) modified with an estrogen response genetic element (luciferase) as a reporter of gene expression was used. The cells exposed to 21 kHz, IF-MF up to 3.9mT (144 times higher than reference level for public in the ICNIRP guideline) for up to 4 days. Frequency of micronucleus was analyzed by microscopic observation and hormonal effect was determined as

expression of luciferase in the cellular extract measured by its chemiluminescence assay.

As the result, there is no significant effect by exposure to 21 kHz, up to 3.9mT IF-MF in both biological assays. Therefore, with taking into account these results and practical situation that will be much weaker MFs than experimental conditions exist where person can be in railway environment, it would suggest that IF-MFs in railway have no or extremely small mutagenic and hormonal potential that will be not able to be detected in general biological assays. Thus, it should not be considered that IF-MFs in environment have any adverse health effect. Other data in strong DC MF, 50Hz and their combined exposure condition will be presented at the conference.

3. Evaluation of dosimetry

For plausible safety evaluation of MFs should include clarification of MF that are generated in our environment and estimation of the induced current/voltage using the numerical model of human whole body. So far, we studied two types of numerical human model are used to construct model condition in an electric train car. One model is heterogeneous whole-body voxel models of Japanese adult male (Taro) and female (Hanako) that developed by National Institute of Information and Communications Technology (NiCT) and the other is homogeneous numerical human model Quete (OGIS-RI, Japan). Two types of magnetic field source were examined. One is the magnetic field by line current that considered the power cable under the floor. The other is the magnetic field by magnetic dipole that considered the equipments such as reactor. Induced current was calculated by impedance method [5]. In this calculation, voxel size was 2mm and amount of voxels ranged 24,243,520 to 52,115,960. In addition, the compliance of "reference level" of ICNIRP guideline for these magnetic fields was evaluated. Maximum or average magnetic field density to expose human body was normalized to the "reference level" and calculated the induced current in head and trunk. These data compared with basic restriction (2 mA/m^2) of ICNIRP1998 guideline.

Standing and seated position was examined in Quete. In each position, induced current concentrated at bending region such as ankle, knee, crotch, armpit. On the other hand, strong induced current was observed in organs that contained high water content such as cerebral fluid and blood within bladder in inhomogeneous model Taro and Hanako. However, the density of induced current in inhomogeneous model is lower than homogeneous model Quete. Highest density of induced current was observed in the magnetic field of line current because attenuation of the magnetic field lower than that of magnetic dipole. Induced current by normalized average/maximum magnetic field

to “reference level” of ICNIRP guideline shows approx. 10^{-1} mA/m² (average) or approx. 10^{-2} mA/m² (maximum) in head and trunk. These results suggest that allowance in basic restriction of ICNIRP guideline will be 10 times (average) and 100 times (maximum) respectively. Evaluation of induced voltage is under evaluation.

Acknowledgement

This work was supported in part by The Ministry of Health Labour and Welfare in Japan, Health Labour Sciences Research Grant (08150668), the Research Program from the Japan Railway Construction, Transport and Technology Agency and a Grant-in-Aid from the Research for the Future Program, Japan Society for the Promotion of Science.

References

- [1] Ahlbom A, Day N, Feychting M, Roman E, Skinner J, Dockerty J, Linet M, McBride M, Michaelis J, Olsen JH, Tynes T, Verkasalo PK. A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br J Cancer* 2000;83: 692-698.
- [2] Hardell L, Carlberg M, Hansson Mild K. , Pooled analysis of case-control studies on malignant brain tumors and the use of mobile and cordless phones including living and deceased subjects., *Int J Oncol.* 2011 May;38 (5):1465-74.
- [3] IARC monograph Vol. 80 (2002): Non-Ionizing Radiation, Part 1: Static and Extremely Low-Frequency (ELF) Electric and Magnetic Fields
- [4] Baan R, Grosse Y, Lauby-Secretan B, Ghissassi FE, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Islami F, Galichet L, Straif K, Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields, *The Lancet Oncology*, Vol. 12, (7), pp. 624 – 626
- [5] N. Orcutt and O. P. Gandhi, “A 3-D Impedance Method to Calculate Power Deposition in Biological Bodies Subjected to Time Varying Magnetic Field”, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, Vol.35, pp.577-583, (1988).

EMF issue in Railway systems

- Evaluation of Biological Effects and Trends of Regulation in Japan -

Masateru Ikehata, Sachiko Yoshie, Toshio Hayakawa, Railway Technical Research Inst.

Yuki Ogasawara, Kazuyuki Ishii, Meiji Pharmaceutical University

Satoshi Nakasono, Central Research Institute of Electric Power Industry

Keiji Wada, Yukihisa Suzuki, Masao Taki, Tokyo Metropolitan University

Kanako Wake, National Institute of Information and Communications Technology

Chiyoji Ohkubo, Japan EMF Information Center

The World Health Organization (WHO) published an Environmental Health Criteria monograph of Extreme Low Frequency Field (EHC, No. 238) in 2007. In the EHC, they recommended that the international exposure guidelines should be adopted by policy makers. To deal with this, Japan has recently introduced regulations for protecting public people based on the ICNIRP guideline from short term health effect of power frequency MFs that is generated by electric installations in power utility and railway systems.

On the other hand, WHO also recommends further research to elucidate scientific uncertainty about health effects of long term exposure. In fact, there are a few reports on biological effects of various EMFs that exist in railway systems, especially about intermediate frequency (IF) MFs that are related to variable-frequency drive (VFD) installations in rolling stock. To respond this, we've been performed biological studies.

In our study, mutagenicity, that related to cause cancer, and hormonal effect by 21kHz IF-MF were evaluated. Mutagenicity was evaluated in *in vitro* micronucleus assay (MN) using Chinese hamster lung derived CHL/IU cell that is a part of the standard test battery for genotoxicity in the OECD guideline. For evaluation of hormonal effect, MCF-7 cell (human breast adenocarcinoma cell line) modified with an estrogen response genetic element (luciferase) as a reporter of gene expression was used. The cells exposed to 21 kHz, IF-MF up to 3.9mT (144 times higher than reference level for public in the ICNIRP guideline) for up to 4 days. Frequency of micronucleus was analyzed by microscopic observation and hormonal effect was determined as expression of luciferase in the cellular extract measured by its chemiluminescence assay.

As the result, there is no significant effect by exposure to 21 kHz, up to 3.9mT IF-MF in both biological assays. Therefore, with taking into account these results and practical situation that will be much weaker MFs than experimental conditions exist where person can be in railway environment, it would suggest that IF-MFs in railway

have no or extremely small mutagenic and hormonal potential that will be not able to be detected in general biological assays. Thus, it should not be considered that IF-MFs in environment have any adverse health effect.

In addition, trends in Japanese regulation of MFs and future agenda in railway systems will be presented at the conference.

This work was supported in part by The Ministry of Health Labour and Welfare in Japan, Health Labour Sciences Research Grant (08150668).

Theme

-Systems and Information: Electro Magnetic compatibility (EMC)

Evaluation of Health effect of intermediate frequency magnetic field

Sachiko Yoshie ^a, Masateru Ikehata ^a, Yuuki Ogasawara ^b, Kazuyuki Ishii ^b, Yukihiisa Suzuki ^c, Keiji Wada ^c, Kanako Wake ^d, Satoshi Nakasono ^e, Masao Taki ^c, Chiyoji Ohkubo ^f

^a Railway Technical Research Institute

^b Meiji Pharmaceutical University

^c Tokyo Metropolitan University

^d National Institute of Information and Communications Technology

^e Central Research Institute of Electric Power Industry

^f Japan EMF Information Center

Objectives: Considering human health effect related to railway environment is important to provide reassurance and safety for customers and workers. It is known that zero to several tens kHz magnetic fields (MF) are generated in rolling stock. However, there are still a few studies on health effects of MF with frequency of kHz which is named intermediate frequency (IF), which are generated by several devices such as inverter on electric train. In this study, the health effect of the IF-MF was evaluated by *in vitro* study using mammalian cell.

Method and Result: So far, we have newly developed an IF-MF exposure apparatus for *in vitro* study, which cells can be exposed to 21 kHz up to 3.9 mT continuously under appropriate incubation condition. In this study, the effect of the IF-MF on early phase of mammalian development using murine embryonic stem (ES) cell. Twenty-one kHz and 3.9 mT IF-MF was exposed to cells for 10 days when murine ES cell formed embryonic body (EB) and differentiated into embryonic tissues (Fig. 1).

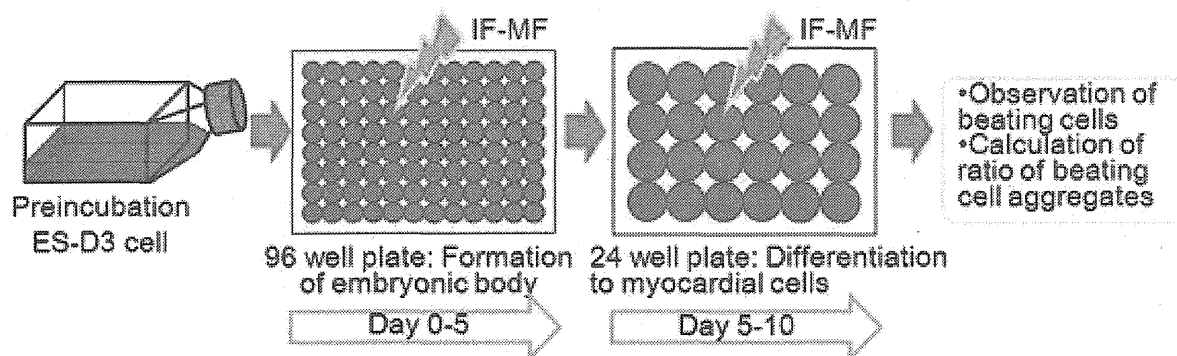


Fig. 1 Schematic of IF-MF exposure to ES cells

In this experiment, contracting myocardial cell was an index of differentiation. On the day 10th, each cell aggregate that was originated from an EB was observed by optical microscope and calculated the ratio of the number of the cell aggregates including contracting myocardial cell to that of all cell aggregates. As a result, there was no significant difference in the ratio of cell aggregate including myocardial cell between sham and IF-MF exposed cells (Fig. 2).

* Corresponding author. Tel.: +81-42-573-7316.
E-mail address: syoshie@rtri.or.jp.

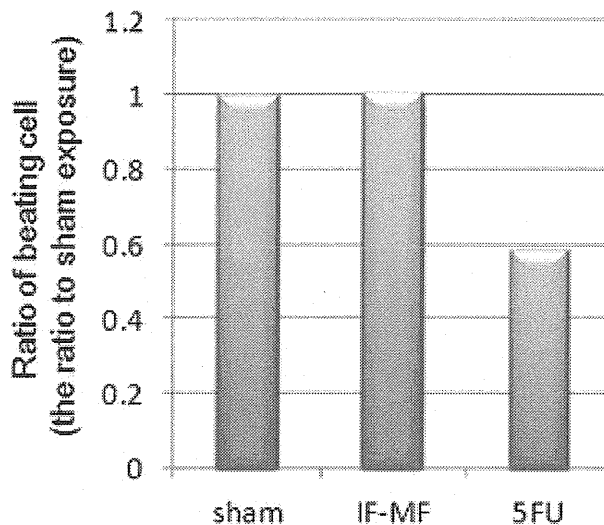


Fig. 2 Result of cell differentiation in 3.9 mT IF-MF exposure. The ratio of beating cell aggregation to all of cell aggregation was calculated. Each bar is indicated as ratio to sham exposure. 5FU (5-fluorouracil) was positive control.

Impact: These results indicated that IF-MF did not affect the process of differentiation to myocardial cell of murine ES cell under the conditions in this study. Namely, this result suggests that IF-MF would not affect on early development of fetus, since the magnetic flux density of the IF-MF generated in railway environment is lower than the one used in this study. This finding will contribute to explain the safety of MF in railway environment.

Implementation / What's new: The regulation to protect human for power frequency magnetic field (MF) (50 and 60 Hz), which are generated from railway facilities, has been introduced in Japan since August 2012. The other frequency range has not been regulated yet, however, evaluation of health effect is necessary for future countermeasure.

Novel: There is no report to investigate the effect of IF-MF on the differentiation of murine ES cell.

International Collaboration: Welcome.

Acknowledgment: This work was supported in part by Research on Health Security Control, Health and Labour Sciences Research Grants (08150668).

Development of novel *in vivo* exposure apparatus for intermediate frequency magnetic field

Shin Ohtani¹, Akira Ushiyama^{1*}, Aiko Unno¹, Yuki Hirai², Yukihisa Suzuki², Keiji Wada²,
Naoki Kunugita¹ and Chiyoji Ohkubo³

¹National Institute of Public Health, ²Tokyo Metropolitan University,

³Japan EMF Information Center

* corresponding author e-mail: ushiyama@niph.go.jp

Introduction

Although the use of induction heating (IH) cooking hob in Japan is increasing, there exist the public concerns on health effect about the magnetic field from IH cooking hob, which generates intermediate frequency (IF) magnetic field (MF). Due to the lack of the evidences, WHO recommended to study the effects to biological system by IF-MF in the Environmental Health Criteria monograph (No.238, 2007). We, therefore, intended to develop the exposure apparatus which can generate high magnetic flux density and uniform IF-MF to examine the biological effects *in vivo*. In this study, we succeeded to develop novel *in vivo* exposure apparatus of IF-MF which equipped with the water-cooling system to avoid thermal elevation derived from its coil.

Materials and Methods

We made a coil as shown in Figure 1 whose inner space is 23 x 23 x 40 cm. This coil can be set both vertical (Figure 1-a) and horizontal (Figure 1-b) direction. The apparatus can generate IF-MF at 21 kHz (frequency) and up to 3.8 mT (magnetic flux density). Induced current densities and electric fields within rats were calculated by the computer simulation for two each direction (Figure 1-c,d,e). Impedance method was applied to calculate the induced current densities and induced electric fields.

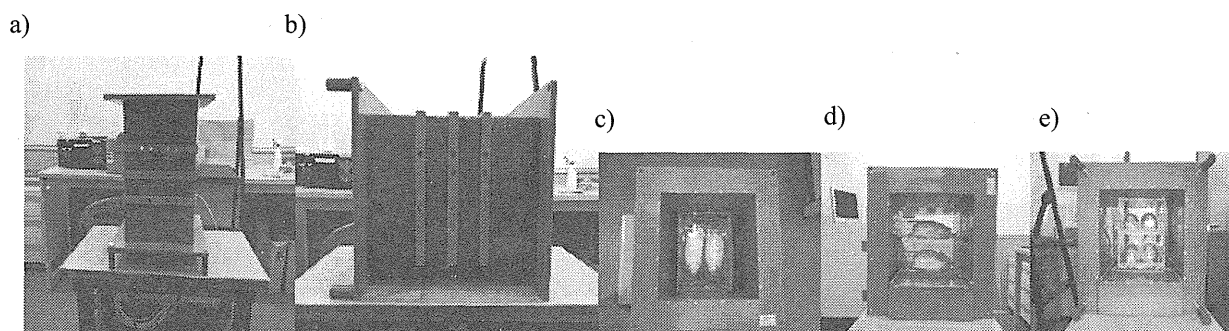


Figure 1: *In vivo* exposure apparatus for IF-MF and three axes of placement of rats

To avoid the temperature increase by the heated coil, we prepared the water-cooling system as shown in Figure 2. During the exposure period for 60 minutes at 3.8 mT, the inside temperature of the coil was measured by the fiber-

optic thermometer, while the surface temperature on the coil was measured by the infrared camera.

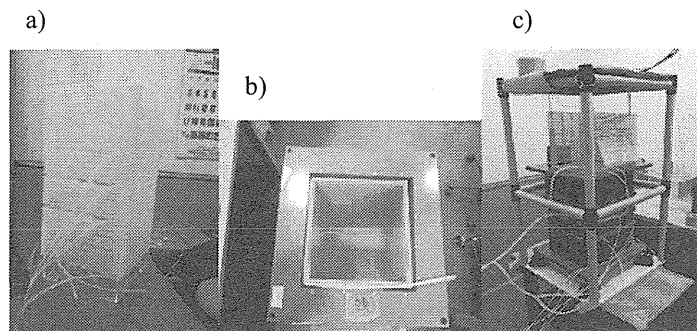


Figure 2: Experimental setup of water-cooling; a) Water loop piping, b) The coil with water loop, c) Water-cooling system.

Results

Homogeneous IF-MF ($<\pm 5\%$ range) was generated in the space of 20 x 20 x 20 cm inside of the coil. When the rats were located as Figure 1-c, d and e, induced current densities and electric fields within rats were shown in Table 1.

Table 1 : Induced current density and electric field of rats

Direction of MF	Induced current density [A/m^2]		Induced electric field [V/m]	
	Max.	Mean	Max.	Mean
Back-abdominal (Figure 1-c)	9.64	0.57	34.29	4.71
Right-left (Figure 1-d)	6.44	0.38	41.71	3.16
Head-tail (Figure 1-e)	5.75	0.31	22.81	2.68

As shown in Fig 3, the surface temperature increased by 25 °C during the exposure for 60 min. Although the inside temperature increased by approximately 8 °C without any countermeasure, it appeared that the inner temperature was within the range of room temperature variation (24 ± 1 °C) under the water cooling condition.

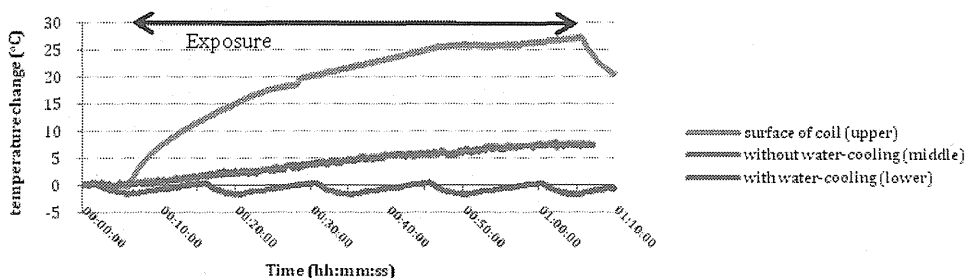


Figure 3: Variation of surface and inside temperature of the coil

Summary and Conclusions

The apparatus, we reported here, enable to expose high flux density of IF-MF to rodents uniformly. The computer simulation provided us the detailed information as induced current density and electric field. It also appeared that water-cooling is effective to avoid thermal elevation derived from coil. The maximum magnetic flux density of this apparatus (3.8mT) is more than 600 times higher than that of the reference level to general public of ICNIRP guideline (6.25 μT). In conclusion, this apparatus is appropriate to elucidate the biological effects of IF-MF exposure *in vivo*. We are planning to examine the haematological and immunological effects by using this apparatus.