

培養細胞を用いた中間周波磁界の遺伝子 および細胞分化への影響評価

吉江 幸子* 池畑 政輝* 小笠原 裕樹**
石井 一行** 大久保 千代次***

Evaluation of Effect of Intermediate Frequency Magnetic Field on Gene and Cell Differentiation

Sachiko YOSHIE Masateru IKEHATA Yuki OGASAWARA
Kazuyuki ISHII Chiyoji OHKUBO

Magnetic field (MF) ranged from zero to several kHz are known to be generated from various sources in rolling stock. However, there are only a few studies on health effects of MF with such frequency of kHz as named intermediate frequency (IF). In this study, biological effect of IF-MF was evaluated using mammalian cells and an IF-MF exposure system which has been developed for this study. The results of micronucleus assay and mutation assay indicated that no effect of 21 kHz IF-MF was found in the cells exposed to up to 3.9 mT for 24 hrs. Also, cell differentiation assay using murine embryonic stem cell did not show any effect of the IF-MF.

キーワード：中間周波磁界，遺伝毒性，細胞分化，哺乳類細胞

1. はじめに

鉄道車両に搭載された一部の機器やIH調理器，盗難防止装置等，様々な機器から発生する中間周波磁界（世界保健機関（WHO）の定義では，周波数300Hz～10MHz）に日常的に曝露する機会が増えている。しかし，中間周波磁界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。

WHOは，1996年より国際電磁界プロジェクトを実施しており，電磁界の健康影響に関する科学的な評価を行っている。この中で，磁界の明らかな短期的影響は，およそ100kHzを境に，低い周波数側では神経刺激作用が，高い周波数側では熱的な作用が主であるとされる。国際非電離放射線防護委員会（ICNIRP）のガイドラインでは，この短期的影響に基づき，人体防護を目的として，基本制限および参考レベルが提案されている¹⁾。一方で，発がん性等の長期的影響に関しては，商用周波磁界や携帯電話等に用いられる高周波電磁界について，疫学的，生物学的な観点から様々な研究がなされてきた。

得られた科学的知見に基づき，WHOの一組織である国際がん研究機関（IARC）は，発がん性の評価を行っている。IARCは発がん性の科学的根拠の確からしさをグループ1～4に分類しているが，これまでに，静磁界をヒトへの発がん性は分類できない（Not classifiable as to its carcinogenicity to humans）とするグループ3に，商用周波磁界を含む超低周波磁界および携帯電話から放射されるような無線周波電磁界を発がん性があるかもしれない（Possibly carcinogenic to humans）とするグループ2Bにそれぞれ分類した^{2) 3)}。しかし，中間周波磁界については科学的知見が少ないため，発がん性やその他の健康リスクを評価するまでに至っておらず，WHOの環境保健クライテリア⁴⁾では，健康リスク評価のための研究の推進が勧告されている。

我々はこれまでに様々な周波数帯の磁界の生物影響を評価しており^{5) 6)}，中間周波磁界に関しても鉄道車両機器の一部から数kHzの磁界が発生することを考慮し，周波数2および20kHz等の磁界について，最大磁束密度1.1mTまでの遺伝毒性を調べてきた⁷⁾。本報告では，新たな曝露装置⁸⁾を用い，より高い磁束密度条件下で，遺伝毒性等の遺伝子への影響，さらに発生初期を想定した細胞分化に与える影響を哺乳類細胞を用いて評価した結果を報告する。

* 人間科学研究部 生物工学研究室
** 明治薬科大学 薬学科
*** 電磁界情報センター

2. 中間周波磁界曝露装置

本研究では、新たに開発した中間周波磁界曝露装置を使用した(図1)⁸⁾。この曝露装置は、Merritt4 コイルとその内側に設置した細胞培養器から成る。培養器は非磁性体材料で作製され、温水循環による温度制御、および5%炭酸ガスの混合空気の通気により、細胞培養に適した環境に制御することが可能な仕様となっている。Merritt4 コイルを用いることにより、細胞が曝露される空間において、偏差が±5%以内の均一な磁界を発生するよう設計・製作された。本装置では、鉄道車両機器から発生する中間周波磁界が数kHzであり、鉄道の磁界測定法の国際技術仕様であるIEC/TS62597では20kHzまでの磁界を対象としていること、周波数が高い方が同じ磁束密度でもエネルギーが高いこと等を考慮し、周波数21kHzとした。最大磁束密度条件は、電気工学的な制約を考慮して最適化した結果、3.9mTとした。これは、ICNIRPガイドラインの公衆に対する参考レベルより100倍以上高いことから、生物影響に関する有用な知見を得るために十分と考えた。曝露装置は2組用意し、磁界を印加する中間周波磁界曝露装置と磁界を印加しない疑似曝露装置として用いた。曝露時間は、1日から10日間とし、以下に示す各試験では、少なくとも4回以上の曝露実験を実施した。



図1 中間周波磁界曝露装置

3. 遺伝子への影響評価

中間周波磁界の健康リスク評価を行う上で、有害性の評価の中でも発がん性の有無を評価することは重要である。がんは、遺伝子の損傷を修復する際の誤り等、何らかの変化が生じることで遺伝子が異常になる現象が積み重なり進行する。このため、本研究では、中間周波磁界が遺伝子に損傷を与えるかどうかを検討するために①遺伝子修復能力の異なる培養細胞の増殖に対する影響を評

価した。また、遺伝子に変化を与えるかどうかを検討するために、培養細胞を用いた②小核試験、③遺伝子突然変異試験を実施した。なお、②小核試験、③遺伝子突然変異試験は、経済協力開発機構(OECD)等で定める遺伝毒性評価のための標準試験として採用されている。

3.1 方法

3.1.1 細胞株

使用した細胞株とその特徴を表1に示す。本研究では、チャイニーズハムスターの肺由来のCHL/IU細胞、卵巣由来のCHO-K1細胞、およびCHO-K1細胞に由来し2重鎖DNA切断修復欠損株であるxrs5細胞、V-3細胞、irs1SF細胞、DNA損傷修復欠損株であるEM-9細胞を用いた。

3.1.2 細胞増殖

遺伝子修復能力が欠損した細胞は、遺伝子に損傷が起こるとその増殖が大きく阻害される。本研究では、生存細胞だけに認められる酵素活性を色素の変換により検出する試薬WST-1(Premix WST-1, TAKARA社)を用いて、細胞増殖度を測定した。

前培養した細胞を適宜希釈し、96穴細胞培養プレートに分注した。炭酸ガス培養器内で24時間培養した後、21kHz、2または3.9mTの磁界に72時間曝露した。培養開始時および24、48、72時間後にWST-1を各穴に添加し、引き続き曝露を行いながら3時間反応させた(CHL/IU細胞の場合は2時間)。反応後、吸光マイクロプレートリーダー(Benchmark, Bio-Lad社)を用いて、450nmの吸光度、バックグラウンドとして630nmの吸光度を測定し、その差分を正味の吸光度とし、生細胞による色素変換量とした。1回の曝露実験における1測定のデータは、4穴以上の吸光度を2回測定して得られた平均値とした。

3.1.3 小核試験

小核は、細胞内で小さな核状の形態を持つ塊として観察され、染色体に異常が生じた際に、通常の核から分離する等の機序で出現するため、遺伝子への影響の指標として用いられる。そこで、磁界曝露条件下における小核

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	欠損機能
CHL/IU	-	-
CHO-K1	-	-
xrs5	Ku86	2重鎖DNA切断修復 (非同源組換え末端結合修復)
V-3	DNA-PK	2重鎖DNA切断修復 (非同源組換え末端結合修復)
irs1SF	XRCC3	2重鎖DNA切断修復 (同源組換え修復)
EM-9	XRCC1	DNA損傷(塩基除去)修復

の形成頻度を調べることで、染色体レベルでの変化を評価した。

前培養した CHL/IU 細胞を 21kHz、最大 3.9mT の中間周波磁界に曝露する群（磁界曝露群）、疑似曝露装置で培養する群（疑似曝露群）、通常の炭酸ガス培養器で培養する群（対照群）、DNA 損傷性の抗がん剤であるマイトマイシン C (MMC: 0.4μg/ml) に曝露する群（陽性対照群）の 4 群に分け、それぞれ 24 時間曝露を行った。曝露した細胞を回収し、低張処理を行い細胞を膨脹させた後、冷却した固定液（メタノール：氷酢酸 = 3:1）で細胞を固定した。固定した細胞をスライドガラスに滴下して風乾し、ギムザ溶液で染色した。このスライドガラスを光学顕微鏡下で、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。

3.1.4 遺伝子突然変異試験

本研究で用いた突然変異試験は、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) 遺伝子の DNA に損傷が起きると、その機能が欠損し、細胞が 6-チオグアニンという毒物に耐性を持つようになることを利用した方法である。耐性を持つ細胞の出現数を指標として、突然変異の誘発能力を評価する。本研究では、細胞を磁界曝露群、疑似曝露群、DNA 損傷性の発がん性物質であるメタンスルホン酸メチル (MMS: 5μg/ml) に曝露する陽性対照群に分け、24 時間それぞれの条件で曝露を行った。曝露後の細胞を約 2 週間培養し、通常の培地で出現したコロニー形成細胞数、6-チオグアニン耐性細胞の数、顕微鏡下で計数した初期の細胞数から、下記の式により、コロニー形成率と突然変異頻度を算出した。

$$\text{コロニー形成率} = \frac{\text{コロニー形成細胞数}}{\text{初期細胞数}}$$

$$\begin{aligned} \text{突然変異頻度 (10}^6 \text{ 細胞あたり)} \\ = \frac{\text{6-チオグアニン耐性細胞数}}{\text{コロニー形成細胞数}} \end{aligned}$$

3.2 結果

3.2.1 細胞増殖

3.9mT の中間周波磁界に曝露した CHO-K1 細胞、xrs5 細胞の増殖度の測定結果を図 2 に示す。いずれの細胞についても磁界曝露群と疑似曝露群の間に有意な差は見られなかった。同様に、CHL/IU、V-3、irs1SF、EM-9 についても、磁界曝露群と疑似曝露群との間に差は見出されなかった。この結果は、遺伝子修復能力を欠損した細胞であっても、DNA の損傷は生じないことを示す。本

結果は、今回曝露した磁界のエネルギーが化学結合のエネルギーに対しては極めて低く、DNA 鎖切断等を起こす可能性は小さいという予想を支持するものであった。

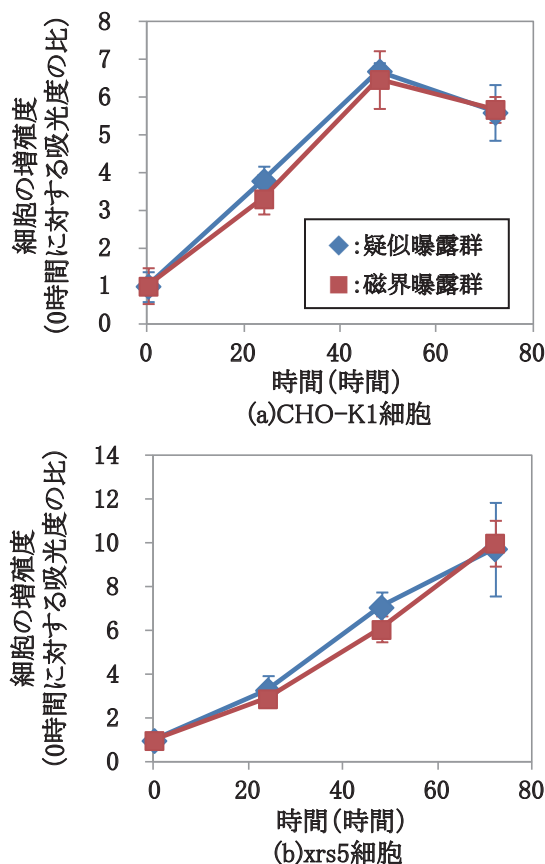


図 2 3.9mT 磁界条件下における細胞増殖
注) 各プロット、エラーバーは、各曝露実験の平均値±標準偏差を示す。

3.2.2 小核試験

CHL/IU 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 (3.9mT) との間で統計的に有意な差は見られなかった (図 3)。一方、陽性対照群 (MMC 処理) では有意に小核形成頻度が上昇した。これらの結果から、中間周波磁界は、小核形成を誘発しないことが明らかとなった。

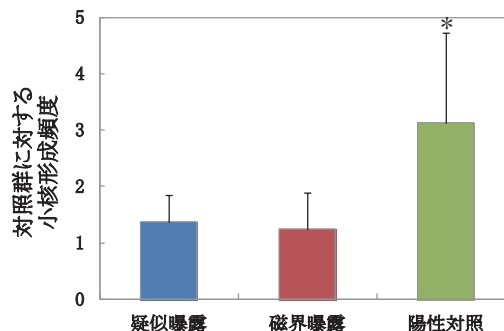


図 3 CHL/IU 細胞を用いた小核試験
注) 各バー、エラーバーは、各曝露実験から得られた平均値、標準偏差を示す。なお、*印は疑似曝露群と比較して 5% 水準で、統計的に有意な差が認められることを示す。

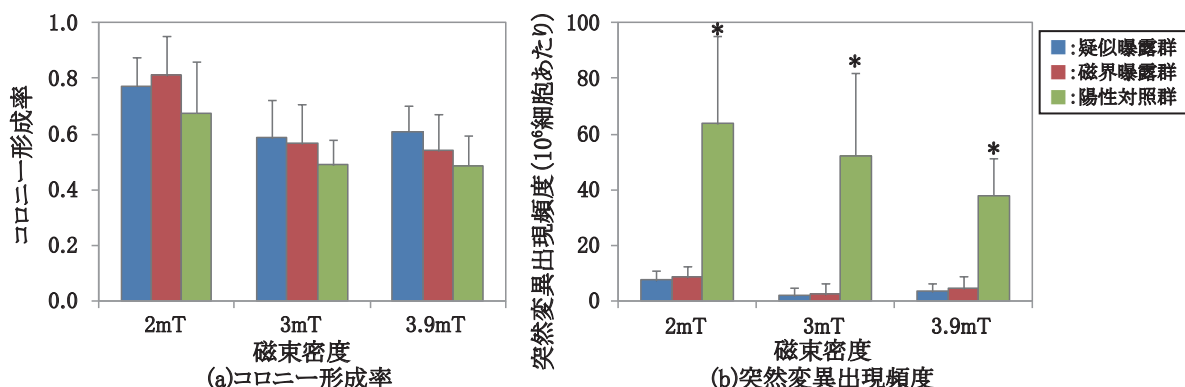


図4 CHO-K1細胞を用いた突然変異試験

注) *印は各磁束密度条件における疑似曝露群と比較して5%水準で、統計的に有意な差が認められることを示す。

3.2.3 突然変異試験

CHO-K1細胞を用いた突然変異試験の結果、2, 3, 3.9mTのどの磁束密度においても、疑似曝露群と磁界曝露群との間に、コロニー形成率および突然変異出現頻度の違いは見られなかった(図4)。一方、陽性対照群(MMS処理)では、突然変異出現頻度の上昇が見られた。これらの結果から、本研究で曝露した強度の中間周波磁界は、突然変異を誘発しないことがわかった。細胞増殖、小核試験の結果を踏まえると、中間周波磁界は遺伝子への影響を及ぼさないことが示されたと考える。

4. 細胞分化への影響評価

中間周波磁界の生物影響を評価するため、本研究では発がん性の他に、個体の発生に関わる影響を細胞実験により評価した。受精卵から個体が発生するためには、細胞が増殖するだけでなく、それぞれの細胞が定められた器官を構成するために、種々の異なる機能を持った細胞へと変化する分化という過程を経る。近年、動物代替試験法としてマウスの胚性幹細胞(ES細胞)を用いたEmbryonic Stem Cell Test (EST)法が開発された⁹⁾。こ

の手法は、母体細胞と胎児細胞を想定した2種類の細胞(繊維芽細胞, ES細胞)への毒性の評価と、胎児細胞(ES細胞)の心筋細胞への分化を指標とした評価の2つの試験を組み合わせて影響評価を行うものである。本研究では、磁界曝露を行うためEST法を一部改変して実施した(図5)。さらに、マウスES細胞が心筋細胞に分化するのに伴い変化する遺伝子の発現量への影響も検討した。

4.1 方法

4.1.1 毒性試験

毒性試験では、母体細胞を想定したマウス由来の繊維芽細胞BALB/3T3細胞および胎児細胞を想定したES細胞であるES-D3細胞を用いた。前培養し、適宜希釈した細胞懸濁液を96穴細胞培養プレートに分注した。炭酸ガス培養器内で2時間培養した後、疑似曝露群、磁界曝露群(3.9mT)、対照群、分化を阻害し奇形を誘導することが知られている物質(催奇形性物質)である5-フルオロウラシル(5-FU: 0.1μg/ml)に曝露する陽性対照群の4つの条件でそれぞれ7日間曝露を行った。培養開始時および3, 5, 7日後に3.1.2節と同様にWST-1による測定を行った。

4.1.2 細胞分化試験

細胞分化試験では、胎児細胞を想定したES-D3細胞を用いた。適宜希釈した細胞懸濁液を1穴あたりの細胞数が750cells/wellとなるよう丸底型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)に分注した。プレートは、疑似曝露群、磁界曝露群(0または3.9mT)、対照群、陽性対照群(5-FU: 0.05μg/ml)についてそれぞれ用意し、曝露を行いながら5日間培養し、胚のような球状の細胞の塊(胚様体)を形成させた。培養5日目に、1穴に1つの胚様体が入るようにゼラチンコートした24穴細胞培養プレートに移し、

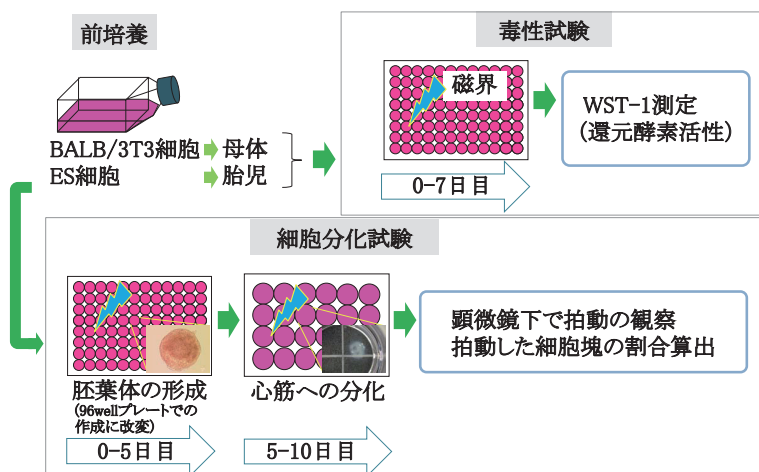


図5 EST法(一部改変)の実験手順の概要

胚葉体を付着させて5日間培養を行った。培養10日目に各穴中の細胞塊を顕微鏡により観察し、拍動する細胞塊を心筋への分化の指標として、全細胞塊数に対する拍動する細胞塊数の割合を算出した。この割合を指標として、細胞分化に与える磁界の影響を評価した。

4.1.3 分化に関わる遺伝子発現の解析

EST法による評価に加え、中間周波磁界による影響の有無を遺伝子の発現レベルでも調べるため、既往研究により、マウスES細胞が心筋に分化する際に変化することが報告されているヘモグロビンの遺伝子の一種(Hba-x)¹⁰⁾および心筋マーカー遺伝子(My12)の細胞内発現レベルを指標として、分化に及ぼす磁界曝露の影響を評価した。細胞分化試験終了後の細胞から抽出したRNAをリアルタイムPCR法により測定し、疑似曝露群における発現レベルと比較した。

4.2 結果

4.2.1 毒性試験

毒性試験の結果、BALB/3T3細胞およびES-D3細胞のどちらの細胞においても、磁界曝露群と疑似曝露群では統計的に有意な差は見られないことがわかった(図6)。これに対し、催奇形性物質に曝露した陽性対照群では、疑似曝露群と比較して吸光度が低下し、毒性が見ら

れた。これらのことから、曝露した磁界は、母体細胞および胎児細胞を想定した2種類の細胞に対して毒性を示さないことがわかった。

4.2.2 細胞分化試験

細胞分化試験の結果を図7に示す。磁束密度3.9mTの磁界を曝露した結果、磁界曝露群と疑似曝露群の間に統計的に有意な差は認められなかった。一方、陽性対照群では、心筋細胞に分化して拍動する細胞塊の割合が有意に減少した。これらの結果は、陽性対照として用いた催奇形性物質は、細胞分化に対して明らかな影響を示すのに対し、磁界曝露は影響を及ぼさないことを示す。

4.2.3 分化に関わる遺伝子発現への影響評価

今回指標とした2種類の遺伝子の発現量を、10日間にわたり3.9mTの中間周波磁界を曝露した細胞から抽出したmRNAサンプルを用いて調べた結果、いずれの遺伝子についても磁界曝露による有意な変動は見られなかった(図8)。この結果から、中間周波磁界は、分化に関わる遺伝子の発現に対しても影響しないことが示された。

5. 考察

哺乳類細胞を用いて、21kHz、最大3.9mTの中間周波磁界の遺伝子および細胞分化への影響について評価を

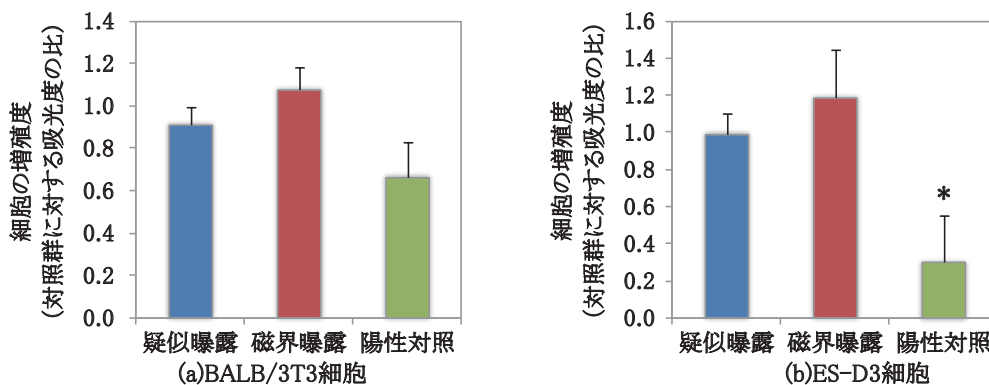


図6 曝露7日目の3.9mT磁界条件における毒性試験

注) *印は疑似曝露群と比較して5%水準で、統計的に有意な差が認められることを示す。

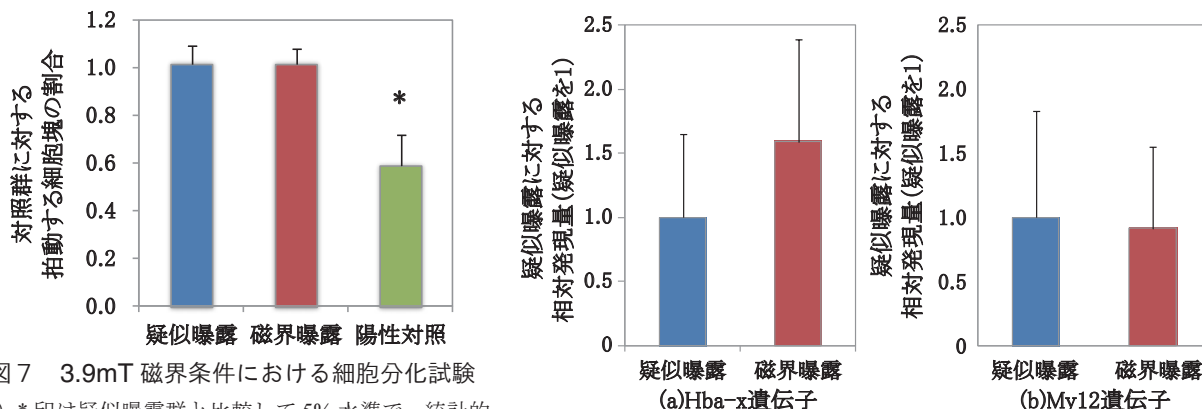


図7 3.9mT磁界条件における細胞分化試験

注) *印は疑似曝露群と比較して5%水準で、統計的に有意な差が認められることを示す。

図8 遺伝子発現

特集：人間科学

行ったところ、いずれも影響は観察されなかった。

中間周波磁界の遺伝毒性については、我々の既往研究において、エイムス試験やマウスリンフォーマ試験により、20kHz、最大1.1mTの磁界の評価を行ったが、影響は見られなかった。今回、より高い磁束密度である3.9mTの磁界条件を対象に、既往研究とは異なる試験手法により遺伝子への影響を評価したが、影響は見られなかった。

一方、個体発生に対する中間周波磁界の影響については、動物を用いた研究が報告されている^{11) 12)}。これらの研究では、妊娠したマウスやラットに国際ガイドラインの指針値レベルの中間周波磁界を曝露し、胎児への影響は見られないとしている。本研究では、受精卵から個体に発生する初期段階における高い磁束密度の磁界曝露の影響を細胞レベルで評価したが、影響は見られなかった。これは、既往研究の結果を補完するとともに、より高い磁束密度においても影響がない可能性を示す。

本研究では、21kHz、最大3.9mTの中間周波磁界が、発がんの原因の一つである遺伝子への影響や、個体の発生初期への分化過程に影響を示さないことを明らかにした。この磁束密度は、ICNIRPガイドラインの公衆に対する参考レベルと比較して100倍以上高い密度である。一方、鉄道車内および周辺における磁界は、通常はICNIRPガイドライン値を十分に満たすと想定される。これらを考慮すると、鉄道環境の中間周波磁界は人体の遺伝子や細胞分化に対して影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

6. おわりに

2011年に経済産業省が人体防護を目的として、変電所、電線路等の電力設備から発生する磁界の規制を導入した。これを踏まえ、鉄道分野における磁界の規制として、2012年に国交省が「鉄道に関する技術上の基準を定める省令」の改正を行い、鉄道の電気設備等から発生する商用周波磁界を公衆が立ち入り可能な空間では200 μ T以下とした。この規制は、ICNIRPガイドラインを参考としているため、人体への短期的な影響を考慮したものである。しかしながら、データのない周波数帯の制限値については、他の周波数帯のデータより外挿しているのが現状である。鉄道環境においては、データの少ない周波数帯も含む様々な周波数帯の磁界が発生していることが分かっているため、本研究で報告した長期的な影響だけでなく、神経刺激等の短期的影響についても、より根拠のあるデータを収集していくことは重要である。

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によって行った。

文献

- 1) International Commission Non-Ionizing Radiation Protection: Guidelines for limiting exposure to time-varying electric and magnetic fields (1 Hz to 100 kHz), *Health physics*, Vol.99, pp.818-836, 2010.
- 2) IARC: *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, non-ionizing radiation, part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields*, IARC Press, Lyon, France, Vol.80, 2002.
- 3) IARC: *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, non-ionizing radiation, part 2: radiofrequency electromagnetic fields*, IARC Press, Lyon, France, Vol.102, 2013.
- 4) WHO, Extremely low frequency fields, *Environmental Health Criteria 238*, WHO press, Geneva, Switzerland, 2007.
- 5) 池畑政輝, 川崎たまみ: 磁場の生体作用評価, 鉄道総研報告, Vol.19, No.6, pp.35-40, 2005
- 6) 吉江幸子, 池畑政輝, 鈴木敬久, 多氣昌生: 静磁界と変動磁界の複合曝露による変異原性の評価, 鉄道総研報告, Vol.25, No.11, pp.41-46, 2011
- 7) 池畑政輝, 中園聡, 和氣加奈子, 鈴木敬久, 吉江幸子, 早川敏雄: 微生物を用いた中間周波磁界の変異原性評価, 鉄道総研報告, Vol.22, No.5, pp.41-44, 2008
- 8) 木暮晋太郎, 和田圭三, 鈴木敬久: 電圧形インバータを用いた細胞曝露評価用20kHz磁界発生装置の開発, 電子情報通信学会技術研究報告, EMCJ, 環境電磁工学, Vol.109, No. 350, pp.19-24, 2009
- 9) Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Pohl, I., Seiler, A., Clemann, N., Bremer, S., Becker, K.: Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests, *Alternatives to Laboratory Animal*, Vol.32, pp.209-244, 2004.
- 10) Suzuki, N., Ando, S., Sumida, K., Horie, N., Saito, K.: Analysis of altered gene expression specific to embryotoxic chemical treatment during embryonic stem cell differentiation into myocardial and neural cells, *The Journal of Toxicological Science*, Vol.36, pp.569-585, 2011.
- 11) Lee, H.J., Pack, J.K., Gimm, Y.M., Choi, H.D., Kim, N., Kim, S.H., Lee, Y.S.: Teratological evaluation of mouse fetuses exposed to a 20 kHz EMF, *Bioelectromagnetics*, Vol.30, pp.330-333, 2009.
- 12) Nishimura, I., Oshima, A., Shibuya, K., Negishi, T.: Lack of teratological effects in rats exposed to 20 or 60 kHz magnetic fields, *Birth Defects Research (Part B)*, Vol.92, pp.469-477, 2011.