

# 眼部への電波ばく露の定量的調査に関する研究

研究実施期間: H23-26年度

京都大学・生存圏研究所

宮越順二・小山眞・成田英二郎

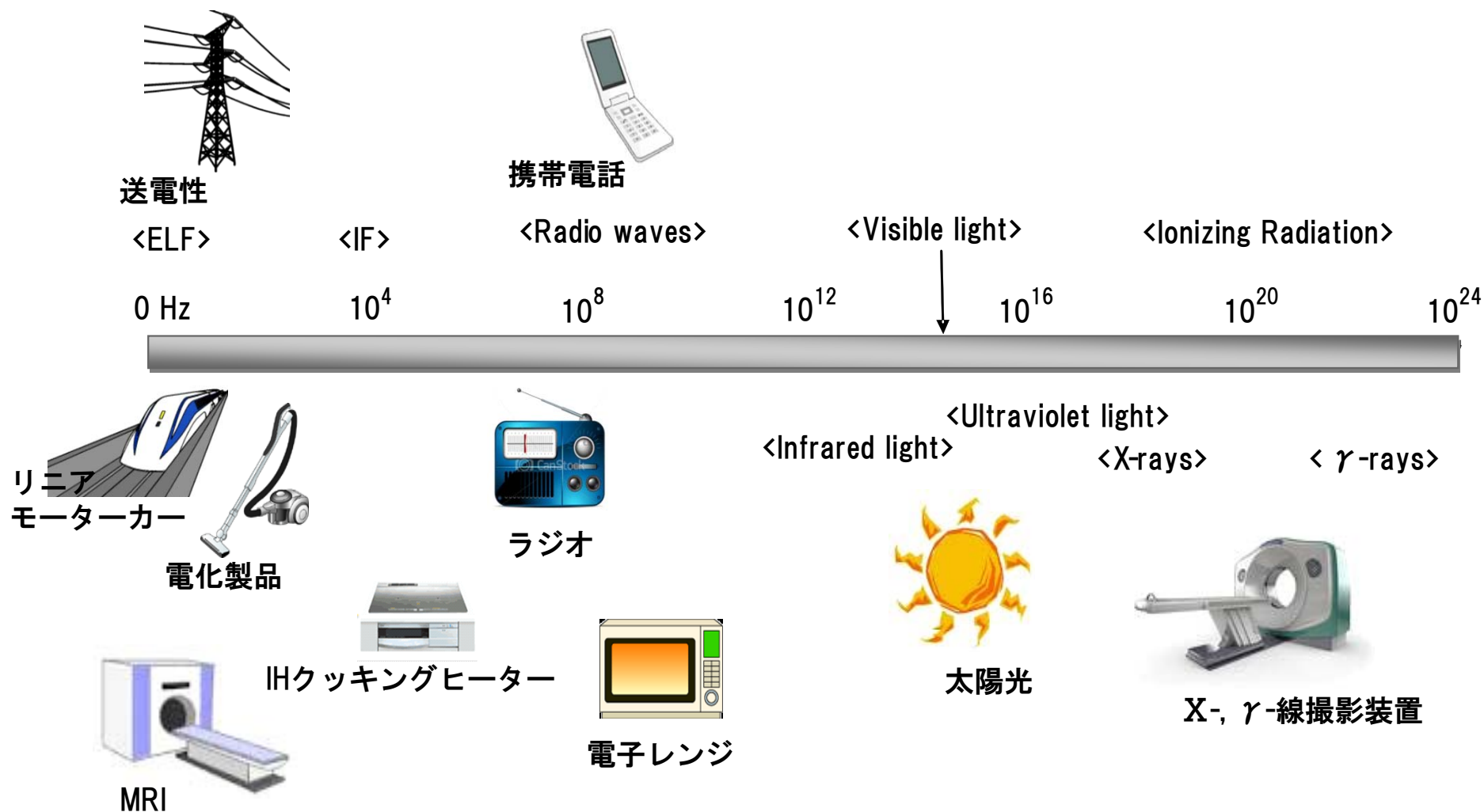
金沢医科大学

佐々木洋(研究代表)・小島正美・佐々木一之

首都大学東京・大学院理工学研究科

多氣昌生・鈴木敬久・笠井陽子

# 生活環境における電磁波



# 細胞研究における研究目的

ミリ波の低レベルばく露については、これまでに確立された生体作用は知られていない。しかし、ミリ波帯電波についての研究例が少ないことから、その可能性の探索が必要である。動物実験では実験条件や実験個体数が限られるため、細胞レベルの実験により、ミリ波帯電波が非熱的な作用を有するかどうかについて、その可能性を探索する。

そこで、60, 40GHzミリ波帯電波ばく露による細胞影響を評価するため、京都大学に設置された、首都大学東京作製による60, 40GHzミリ波帯電波細胞ばく露装置を用いて、アーチファクトのない正常培養環境を保持しているかについて、細胞基本動態試験による確認を行い、遺伝毒性に関して細胞実験を行う。具体的には、細胞を用いた電波ばく露の発がん性影響評価研究として、小核形成およびDNA切断に関する細胞遺伝毒性について検討を行う。さらに、生理的影響評価として、電波の影響で注目されているストレスタンパクを中心として遺伝子発現への影響を検索する。

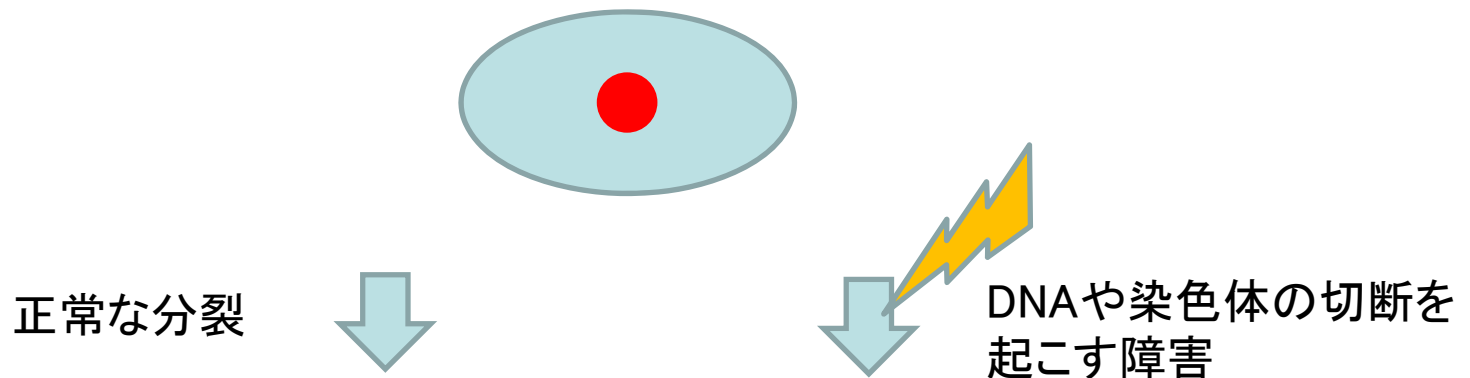
# ミリ波ばく露による生体への影響（陽性論文）

	論文タイトル	雑誌名	発行年	号、ページ	概要	ばく露条件	細胞株、動物種	実験方法	国名
1	In vivo analysis of THz wave irradiation induced acute inflammatory response in skin by laser-scanning confocal microscopy	Optics Express	2014	22, (10) 11465-11475 DOI:10.1364/OE.22.011465	マウス耳皮膚で急性炎症反応が見られた。(大量の好中球の移動が見られた)。赤外線カメラではばく露による温度上昇は見られなかった。	パルス波(2.7THz、4μsパルス幅、61.4μJ/パルス、3Hz repetition) 260mW/cm <sup>2</sup> 、30分	マウス(耳の皮膚)	共焦点レーザー顕微鏡による観察	韓国
2	Terahertz Radiation Induces Spindle Disturbances in Human-Hamster Hybrid Cells	Radiation Research	2011	175, 569-574	細胞分裂の後期・終期において、核が分離するときに機能する器官である紡錘体の異常が観察された。	連続波(106GHz、0.043、0.43、4.3mW/cm <sup>2</sup> )、30分	ヒト-ハムスターハイブリッド(雑種)細胞(A <sub>L</sub> cell)	エタノール固定後、酢酸オルセインで染色し、分裂後期・終期の紡錘体を観察。	ドイツ
3	Non-thermal effects of terahertz radiation on gene expression in mouse stem cells	Biomedical Optics Express	2011	2, (9), 2679-2689	糖取り込み促進、脂肪酸燃焼等の様々な機能を持つアディポネクチン、グルコースの輸送体GLUT4や脂肪細胞の分化に関わる転写因子PPARGの遺伝子発現の変化(増加)が見られた。	パルス波(ブロードバンド10THz)9時間、 連続波(CWレーザー2.52THz)2時間	マウス(間葉系幹細胞)	qRT-PCR	USA
4	Effects of 100 GHz Radiation on Alkaline Phosphatase Activity and Antigen Antibody Interaction	Bioelectromagnetics	2009	30, 167-175	ばく露により酵素活性の低下、抗原抗体反応の低下が見られた。	100GHz、0.08W/cm <sup>2</sup> 、15分～2時間	Calf alkaline phosphatase、マウスモノクローナル抗体と抗原	ELISA	イスラエル
5	Terahertz Radiation Increases Genomic Instability in Human Lymphocytes	Radiation Research	2008	170, 224-234	ヒトリンパ球の染色体数変化を調べたところ、細胞分裂の際、染色体の同等な分配がされず、動原体(染色体と紡錘体が接続する部位)の複製が同時に起こらず、遺伝的不安定性が見られた。	連続波(100GHz、0.031mW/cm <sup>2</sup> )、1、2、24時間	ヒト(リンパ球)	FISH	イスラエル
6	Frequency and irradiation time-dependent antiproliferative effect of low-power millimetre waves on RPMI 7932 human melanoma cell line	Anticancer Research	2005	25, 1023-1028	細胞増殖に影響あり。細胞形態の変化が見られた。	53.57-78.33 GHz(wide band) 51.05 GHz 65.00 GHz、3時間	メラノーマ、RPMI 7932	光学顕微鏡観察 組織染色	イタリア
7	Plant sensitivity to low intensity 105 GHz electromagnetic radiation	Bioelectromagnetics	2004	25, 403-407	アマ植物の成長分裂組織の数が増加した	105GHz、2時間	植物アマ(Linum usitatissimum)	顕微鏡観察	UK

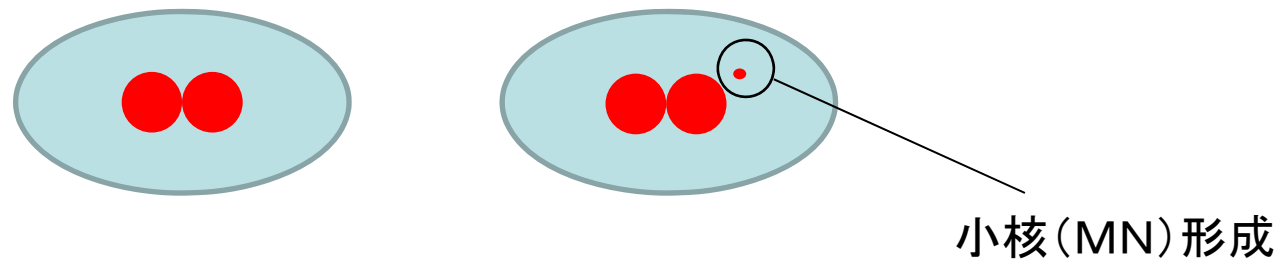
陽性報告の論文は限られているが、上記に加え、陰性報告の論文が多数存在する。

# <小核形成試験>

細胞分裂の際、細胞質分裂を阻害し、核分裂のみを起こした細胞内で、核に組み込まれなかった小核 (Micronucleus: MN) を観察することにより、細胞への障害を判断する手法。

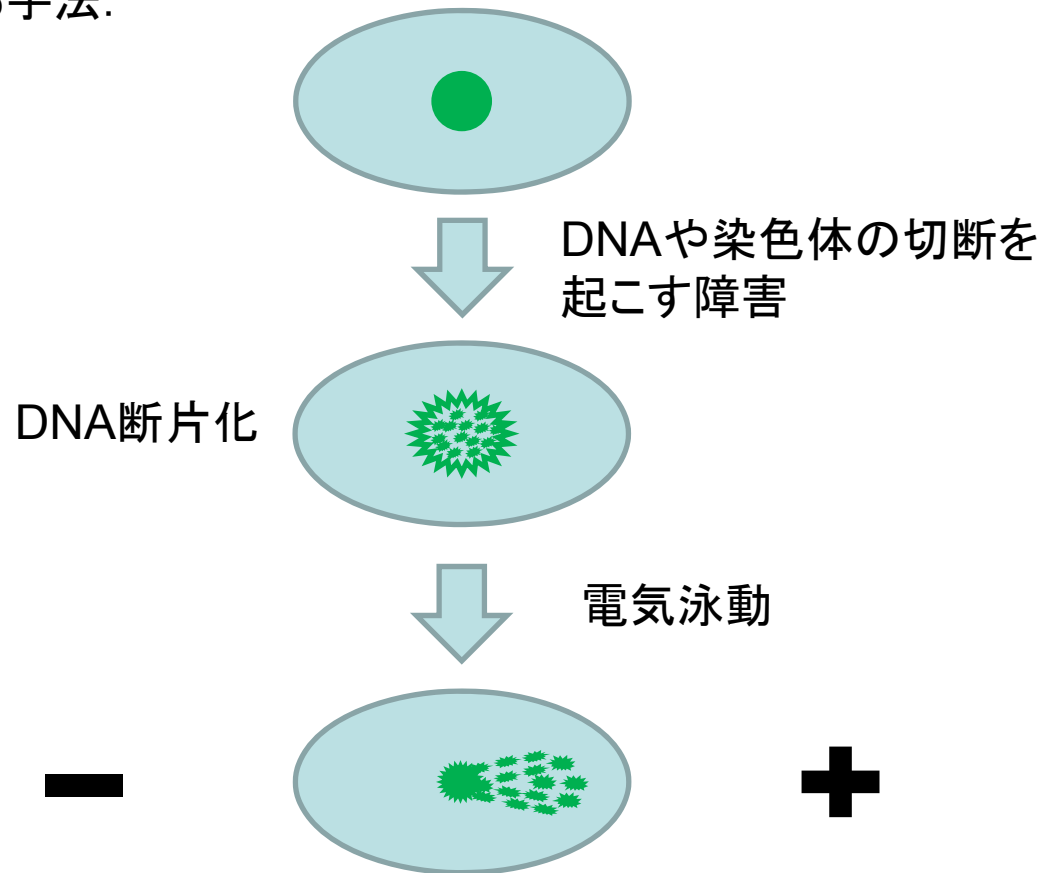


サイトカラシン処理・・・核分裂後に、分裂後期で停止する。



# <コメットアッセイ原理>

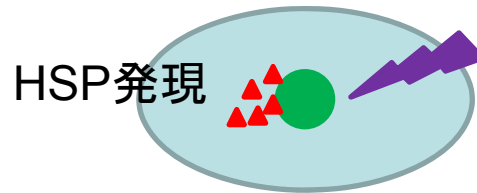
変異原性試験の一種で、電気泳動の原理を利用し、細胞または細胞核におけるDNAの切断を検出する方法を観察することにより、細胞への障害を判断する手法。



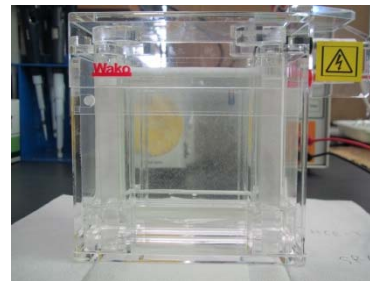
DNAがーに帯電しているため、断片化したDNAが陽極に移動し、彗星(コメット)のように見える。

# <熱ショックタンパク質発現実験>

熱ショックタンパク質 (Heat shock protein: HSP) は、ストレスタンパク質とも呼ばれ、細胞が熱等のストレス条件下にさらされた際に発現が上昇して細胞を保護するタンパク質の一群で、このタンパク質の発現量を比較することで、細胞がダメージを受けたかどうかを判定する。



熱や化学物質によるストレス障害

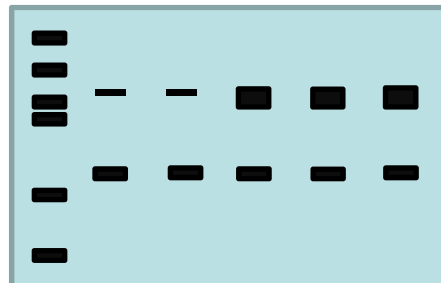


細胞を融解し、タンパク質精製後、電気泳動 (SDS-PAGE)



ブロッティング (ゲルからニトロセルロース膜に転写)

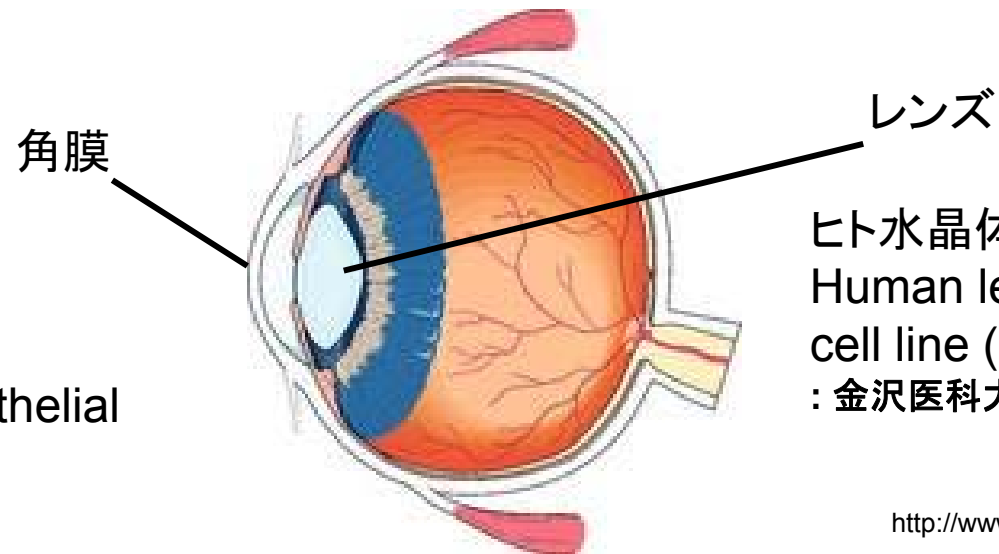
一次抗体、二次抗体を結合させ、HRP試薬で発色



バンドの面積、強度比較により、タンパク質量を測定

Hsp/β-actin (内部標準) で計算

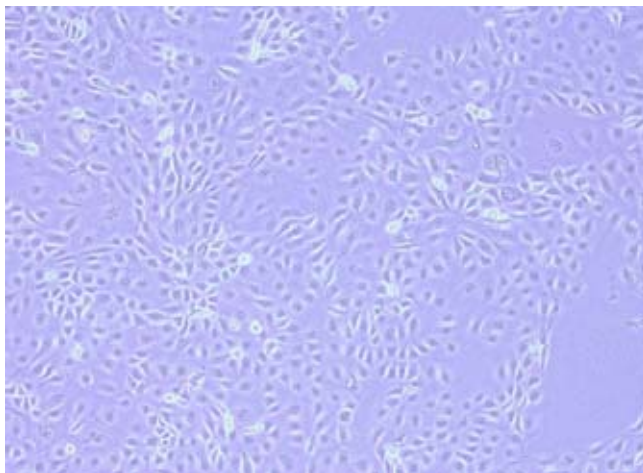
# 細胞



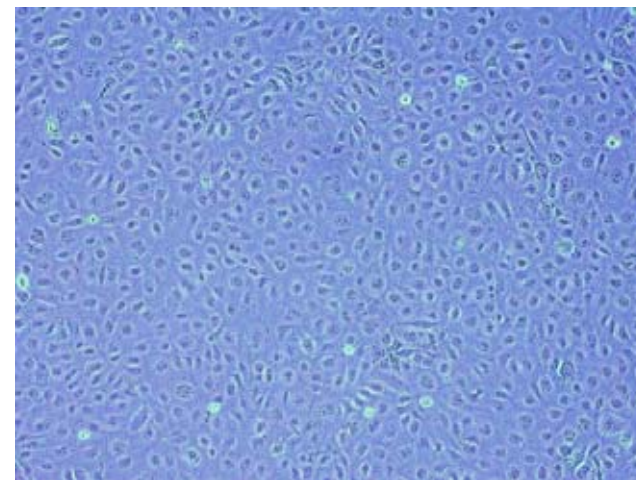
ヒト角膜上皮細胞  
Human corneal epithelial  
cell line (HCE-T)  
: 首都大学東京

ヒト水晶体上皮細胞  
Human lens epithelial  
cell line (SRA01/04)  
: 金沢医科大学

<http://www.fotosearch.jp/illustration/眼球.html>



HCE-T 細胞



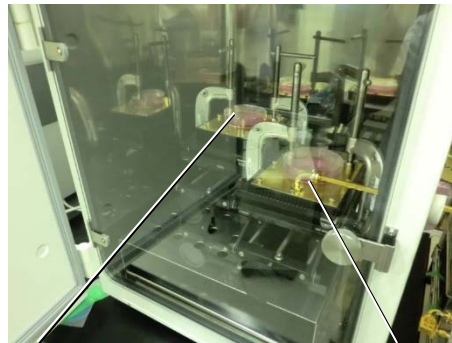
SRA 細胞



# ばく露装置

## ばく露条件

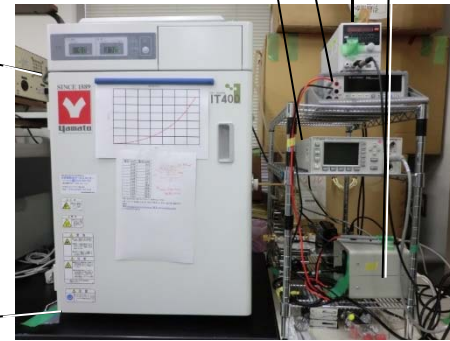
- ・周波数: 60 GHz
- ・電力密度: 1 mW/cm<sup>2</sup>



Sham部

60 GHzばく露部

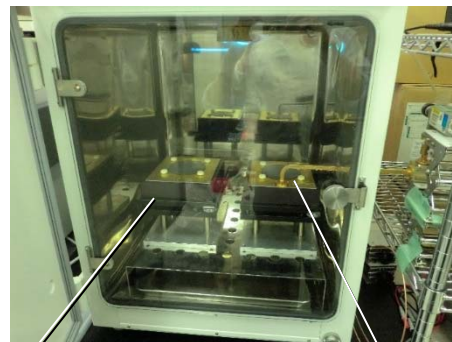
ばく露装置



インキュベータ  
(37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 湿度100%)

## ばく露条件

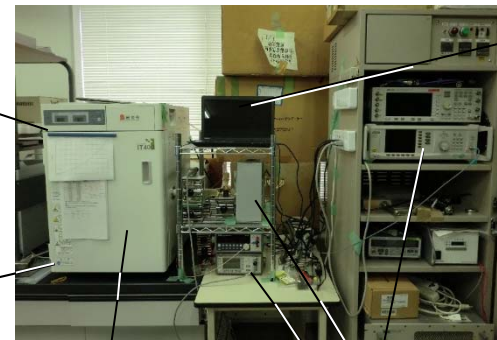
- ・周波数: 40 GHz
- ・電力密度: 1 mW/cm<sup>2</sup>



Sham部

40 GHzばく露部

データロガー



ばく露装置  
インキュベータ  
(37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 湿度100%)

# ばく露装置インキュベータの細胞動態

HCE-T (ヒト角膜上皮細胞)

もしくは、SRA01/04 (ヒト水晶体上皮細胞)

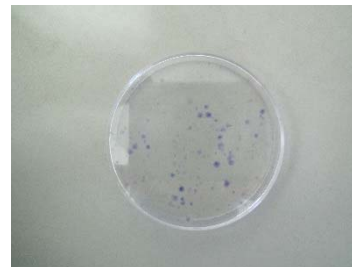
 播種

24時間



↓ 24時間

コロニー形成能



500~1000 個 /plate で播種し、  
7~10日間放置。エタノール固定  
後、ギムザ染色を行い、コロニー  
数をカウント



通常インキュベータ

↓ 48時間

細胞周期分布



フローサイトメータで細胞周  
期を計測

(FACSCalibur: BECTON DICKINSON)

60GHz用インキュベータ 40GHz用インキュベータ



ばく露用インキュベータ

↓ 24時間

細胞増殖



$5 \times 10^4$  (HCE-T) もしくは  $1 \times 10^5$   
(SRA) cells/plate で播種した細  
胞を24時間ばく露用インキュベ  
ータで培養後、7日間にわたりコ  
ールターカウンターで計測

(Particle counter Z1: BECKMAN COULTER)

# ミリ波ばく露装置内環境の評価 (細胞増殖)

HCE-T(ヒト角膜由来上皮細胞)およびSRA01/04(ヒト水晶体由来上皮細胞)



播種(HCE-T: $5 \times 10^4$  個/plate、SRA: $1 \times 10^5$  個/plate: n=3 × 7日分)



ミリ波ばく露装置



通常インキュベータ



およそ24時間毎に細胞を回収し、細胞数をカウント  
(コールターカウンター: BECKMAN COULTER)

# ミリ波ばく露装置内環境の評価 (コロニー形成能)

HCE-T(ヒト角膜由来上皮細胞)およびSRA01/04(ヒト水晶体由来上皮細胞)



播種 ( $5 \times 10^5$  個/plate)



24時間インキュベータ内で培養

再播種(HCE-T: $5 \times 10^2$  個/plate、SRA: $1 \times 10^3$  個/plate 各 n=10)



ミリ波ばく露装置



通常インキュベータ



7~10日間各インキュベータ内で培養

エタノール固定後、ギムザ染色を行い、コロニー数を計測

# ミリ波ばく露装置内環境の評価 (細胞周期分布)

HCE-T(ヒト角膜由来上皮細胞)およびSRA01/04(ヒト水晶体由来上皮細胞)



播種( $1 \times 10^5$  個/plate)



ミリ波ばく露装置

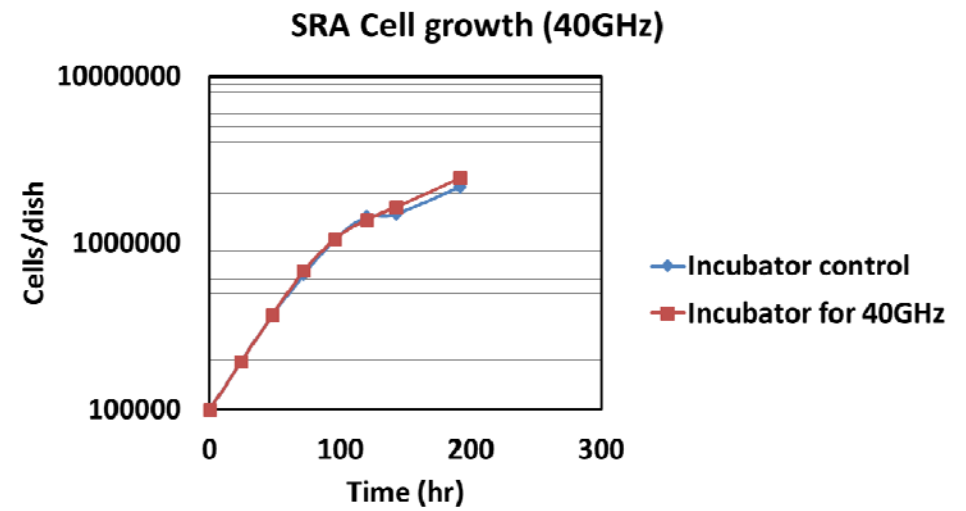
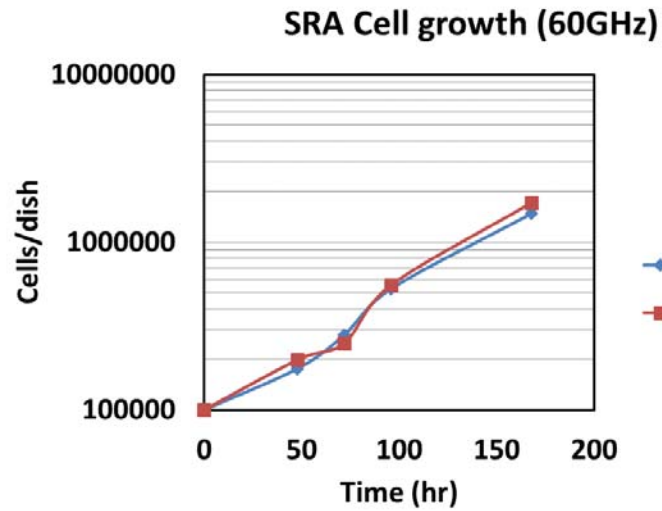
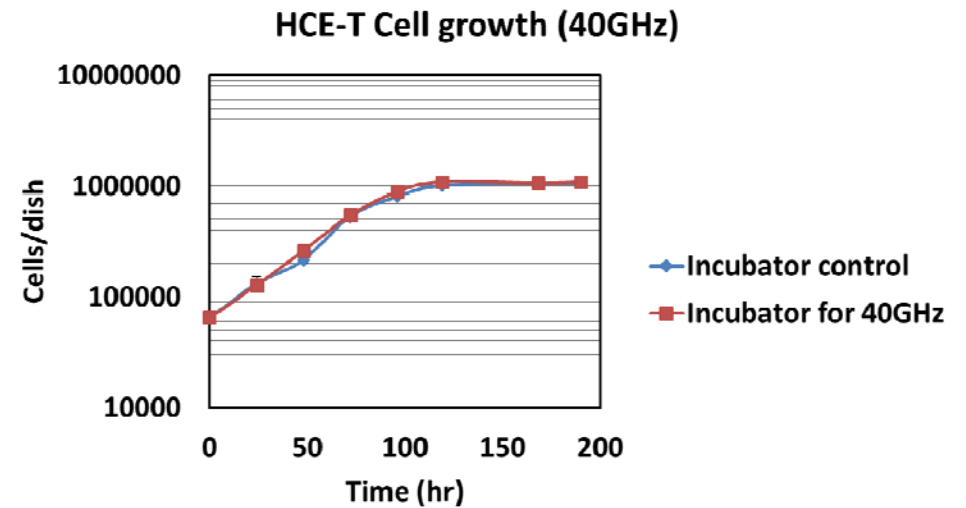
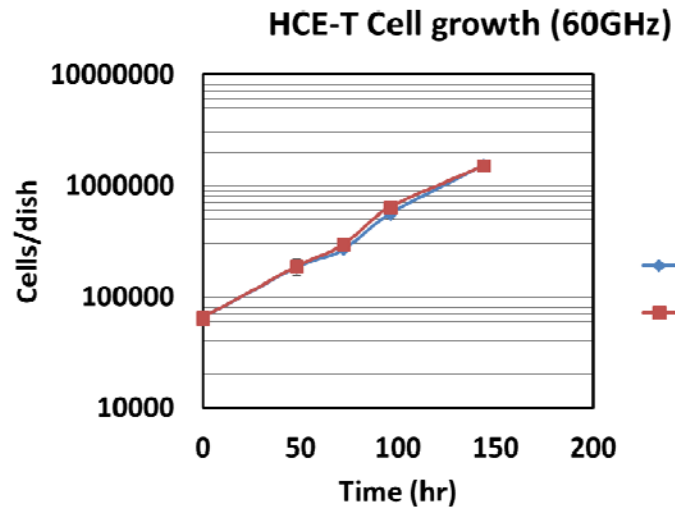


通常インキュベータ



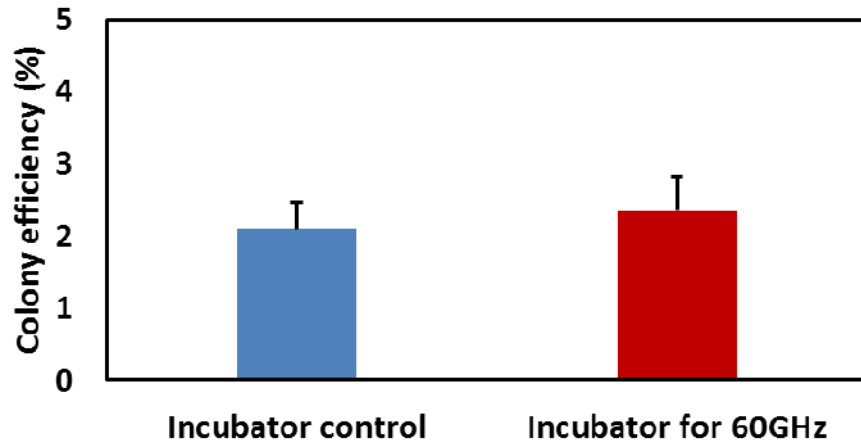
48時間後に細胞を回収し、フローサイトメーターにて細胞周期を測定  
(FACSCalibur: BECTON DICKINSON)

# 細胞増殖結果

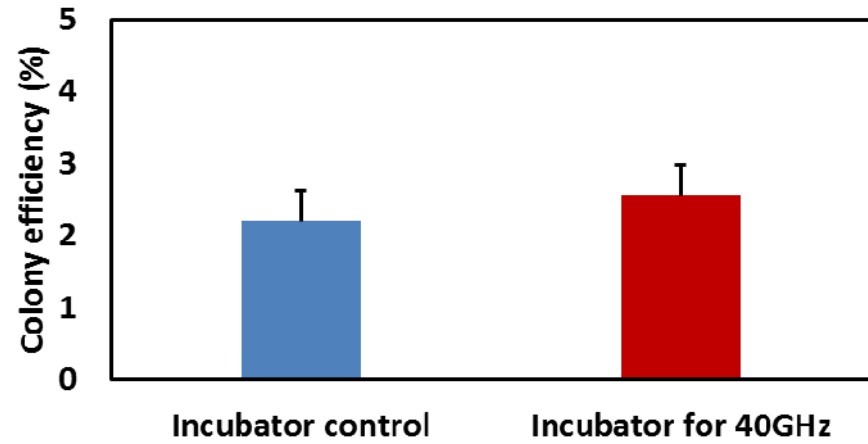


# コロニー形成能結果

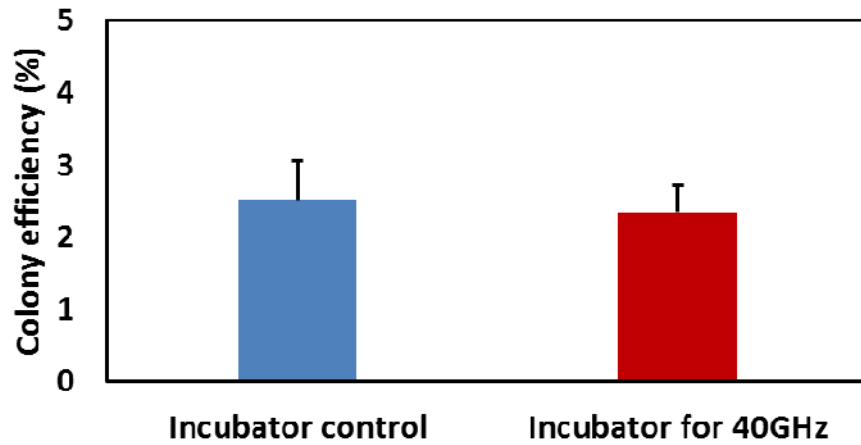
HCE-T colony efficiency (60GHz)



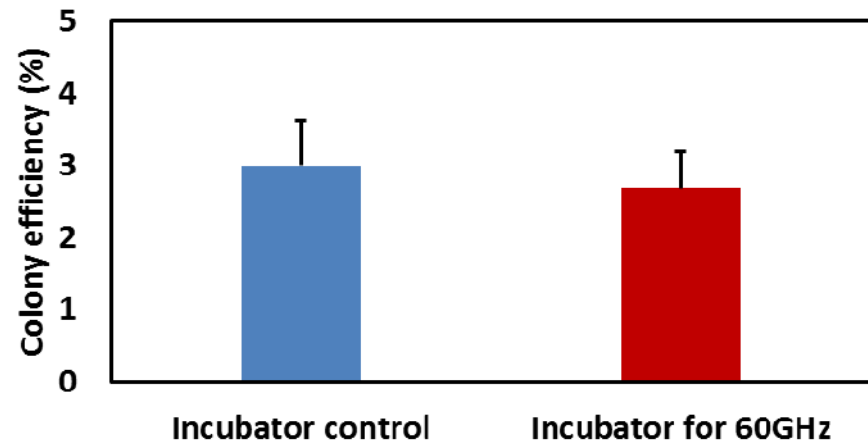
HCE-T colony efficiency (40GHz)



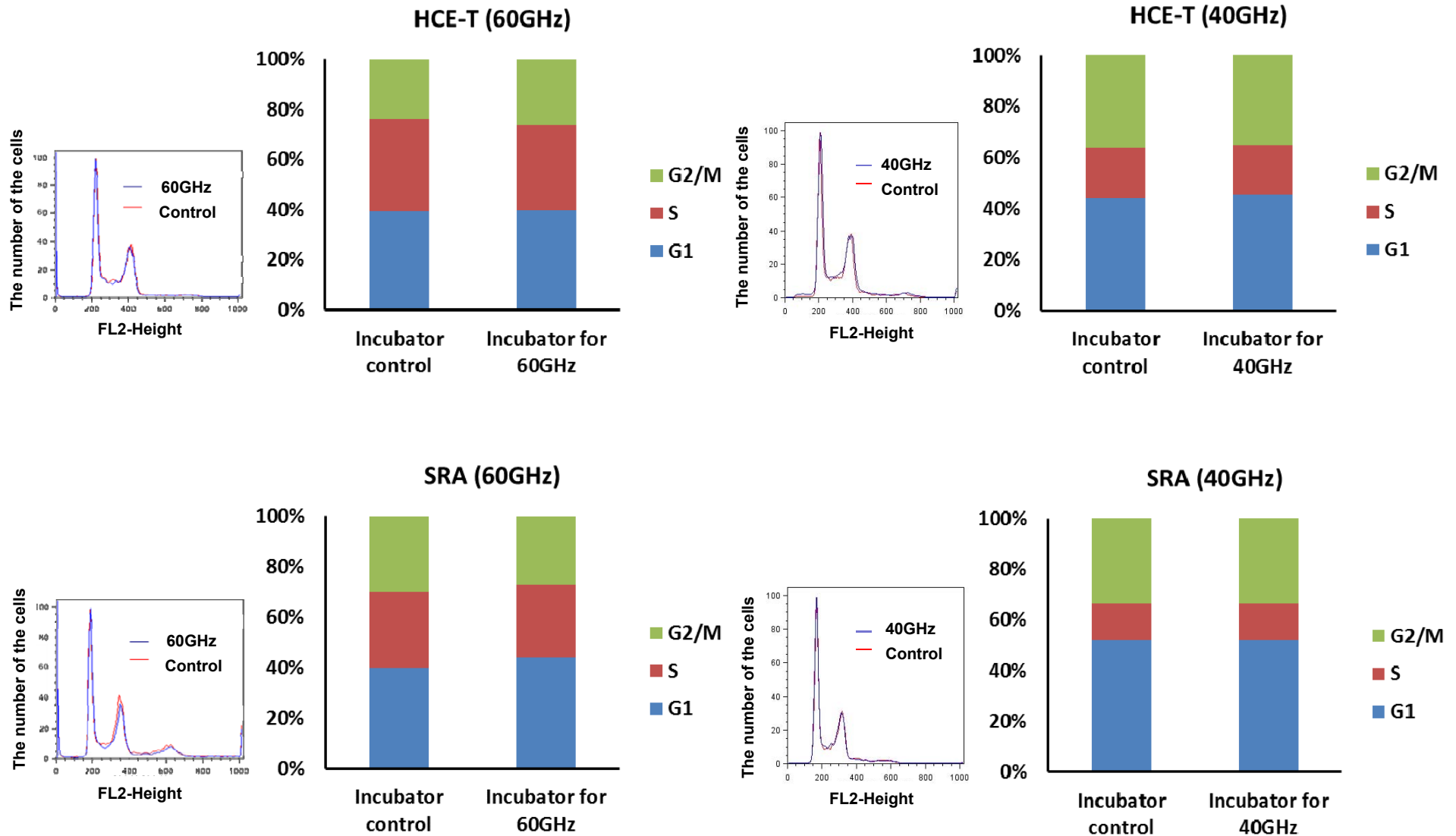
SRA colony efficiency (40GHz)



SRA colony efficiency (60GHz)

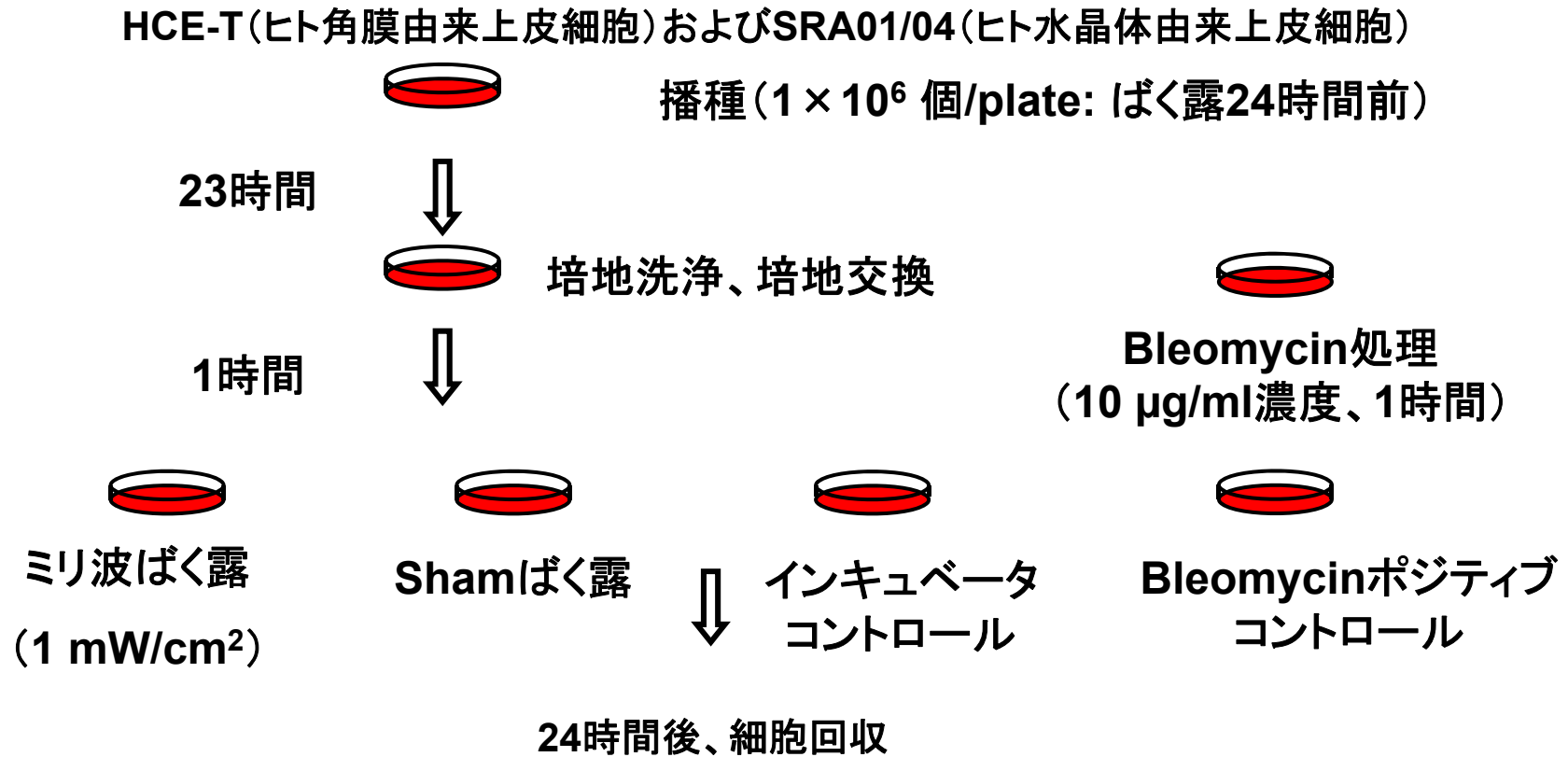


# 細胞周期分布結果





# ミリ波ばく露による細胞への影響評価(小核形成試験)



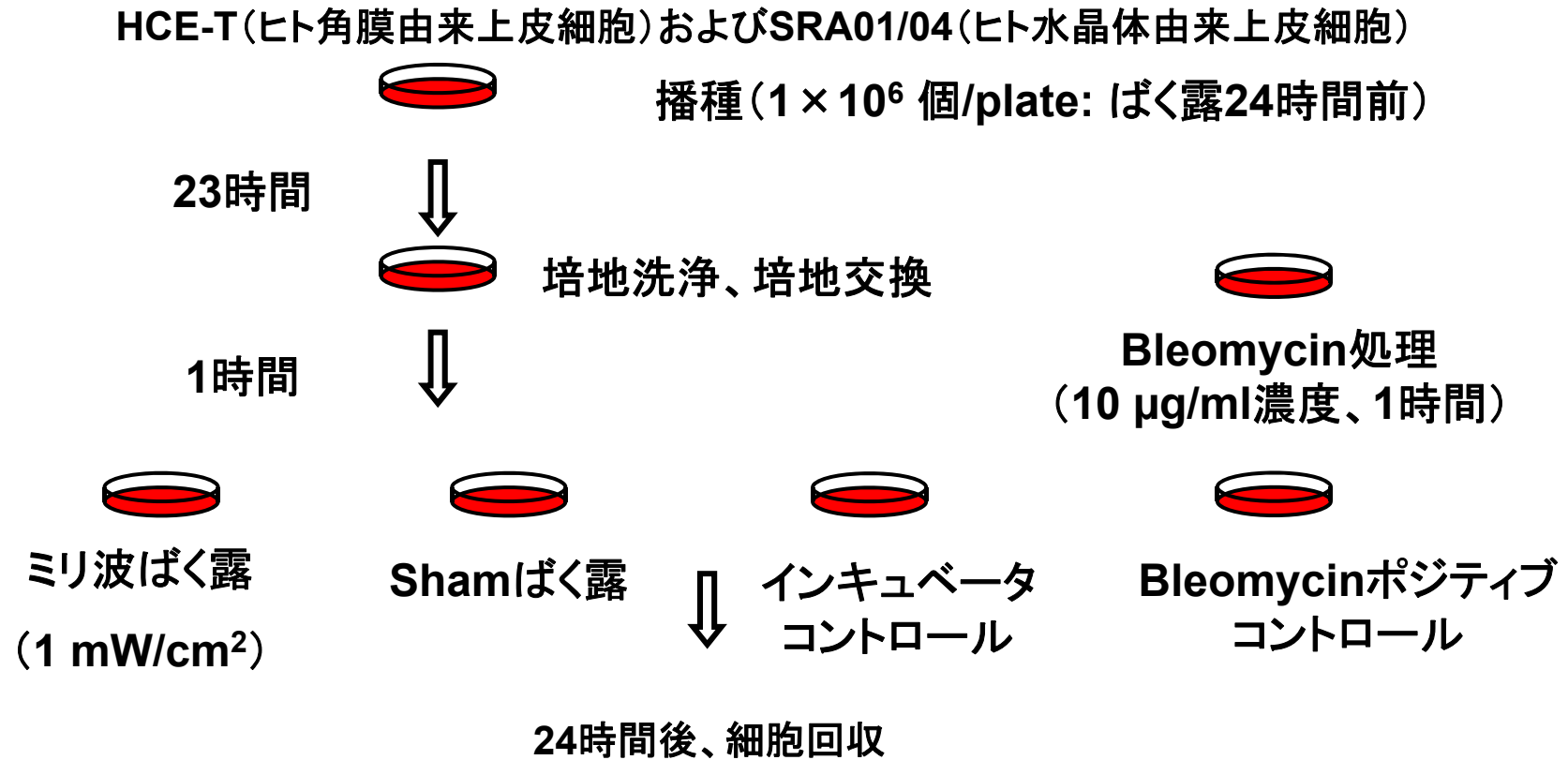
小核試験による解析(二核細胞300~1000個中の小核を持った細胞の個数)

6回の実験を行い、ANOVAで検定後、ボンフェローニ多重比較により  
 $p < 0.05$ 、 $0.01$ で有意差検定を行った。

## <小核形成試験実験方法>

1. 回収した細胞を3  $\mu\text{g}$  /ml濃度のサイトカラシンB入り培地で24時間培養した。
2. 37°Cインキュベータで24時間培養した。
3. 細胞を回収し、270  $\times$  100 cell/mlに調節した。
4. サイトスピン(900 rpm、5 min)にて細胞をスライドグラスに展開した。
5. 冷80%エタノールで30分細胞固定を行った。
6. PBSで3回洗浄を行った。
7. プロピジウムイオダイド(PI:0.2  $\mu\text{g}$ /ml) 20  $\mu\text{l}$ で染色し、カバーガラスで封入した。
8. 蛍光顕微鏡観察を行った。
9. 二核細胞を300~1000個カウントし、MNが1個および2個以上の細胞をカウントし、統計処理で有意差を検討した。

# ミリ波ばく露による細胞への影響評価(コメットアッセイ)



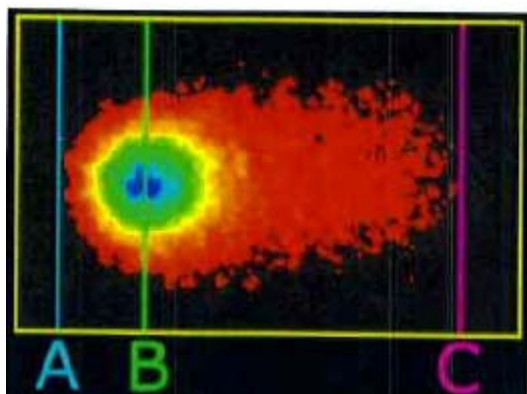
コメットアッセイによる解析(100個以上の細胞をカウント)

3回の実験を行い、ANOVAで検定後、ボンフェローニ多重比較により  
 $p < 0.05$ 、 $0.01$ で有意差検定を行った。

# コメットアッセイ実験方法

(CometAssay reagent kit for Single Cell Gel Electrophoresis Assay: TREVIGEN社)

1. 回収した細胞を $1 \times 10^5$ cell/mLに希釈.
2. 溶かしたアガロースゲルと混合し、スライドガラス上に固定化.
3. 細胞溶解液につけた後、アルカリ溶液に浸潤.
4. 0.8V/cm(電源20V設定)・350mA条件で30分間電気泳動を行う.
5. 70%エタノールで固定.
6. 乾燥後、SYBR green溶液で染色.
7. 蒸留水で洗浄後、蛍光顕微鏡観察.
8. 解析ソフトComet assay IV (perceptive社)にて解析.

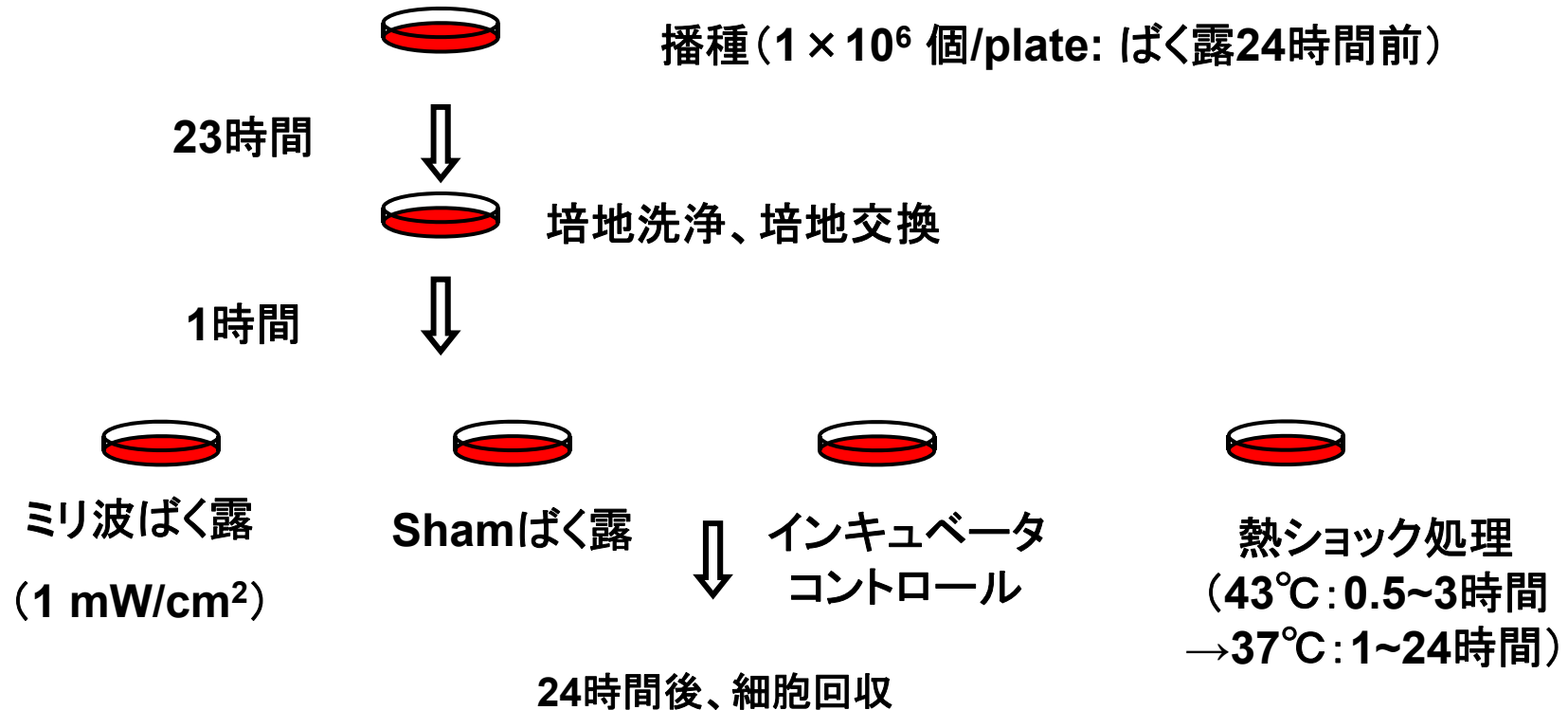


先端(A)、中央(B)、尾部終点(C)を決定し、尾の部分がどれくらい長い、どれくらいの領域があるかを分析し、Tail Length、Tail%DNAを計算する。この値をもとにDNAの損傷具合であるTail Momentを算出する。

$$\text{Tail Moment (TM)} = \text{Tail length} \times \text{Tail\%DNA}/100$$

# ミリ波ばく露による細胞への影響評価(ストレスタンパク)

HCE-T(ヒト角膜由来上皮細胞)およびSRA01/04(ヒト水晶体由来上皮細胞)



SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングによるHSPの定量

3回の実験を行い、ANOVAで検定後、ボンフェローニ多重比較により  
 $p < 0.05$ 、 $0.01$ で有意差検定を行った。

# <HSP実験方法>

(タンパク質抽出および濃度測定)

1. CelLytic溶液で細胞を回収し、タンパク質濃度を測定.

(SDS-PAGE)

2. 1もしくは2mg/mlに調製したサンプルとサンプルバッファー(2ME+)を1:1で混合し、100°Cで1min加熱.

3. 氷で急冷し、アクリルアミドゲルで電気泳動(20mA, 35V).

(ブロッティング)

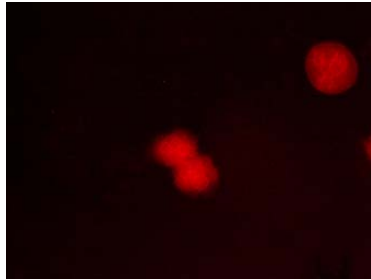
4. 電気泳動で分離したタンパク質をiBlotによりニトロセルロースメンブレンに転写する.

(免疫染色)

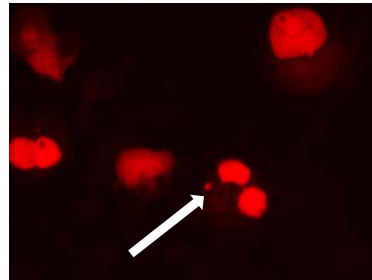
5. 各HSPに対応する一次、二次抗体を結合させる.

6. HRP発色にてタンパク量を定量する.

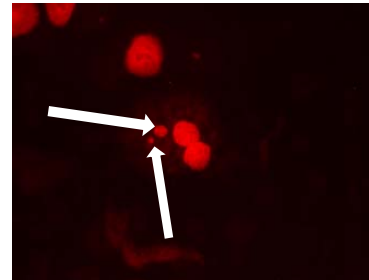
## 小核形成試験結果(HCE-T: 60GHz)



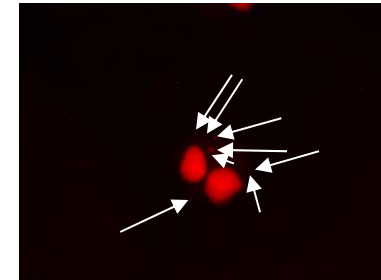
No MN formation



One MN in a binucleated cell

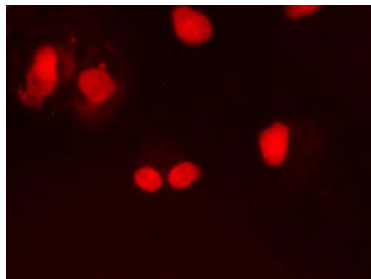


Two MN in a binucleated cell

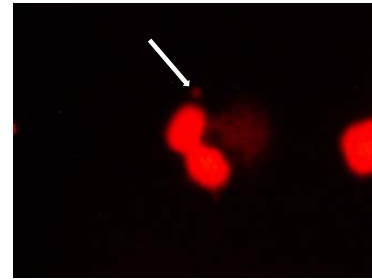


Eight MN in a binucleated cell

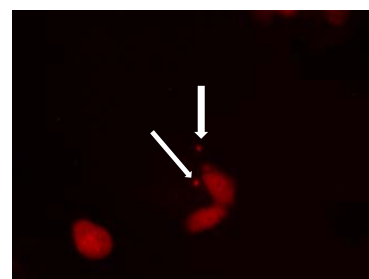
## 小核形成試験結果(SRA: 60GHz)



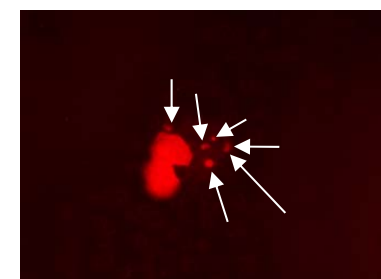
No MN formation



One MN in a binucleated cell



Two MN in a binucleated cell

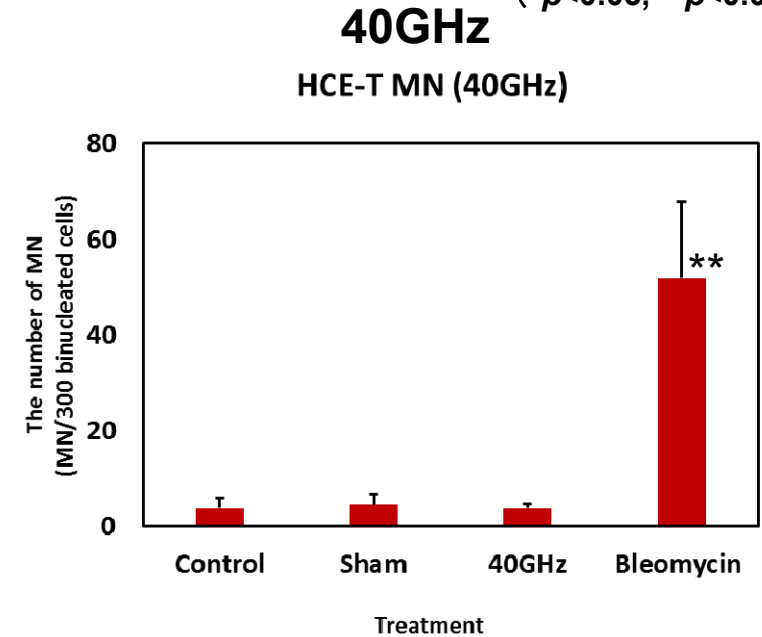
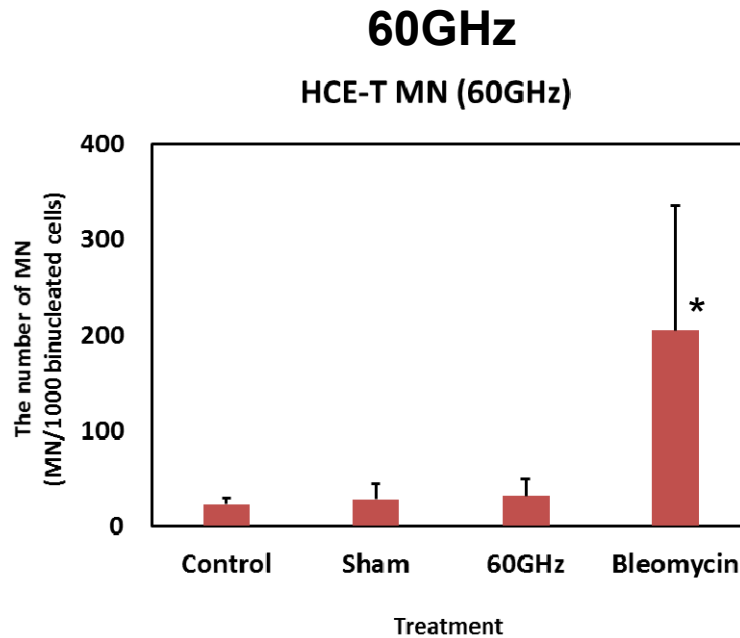


Six MN in a binucleated cell

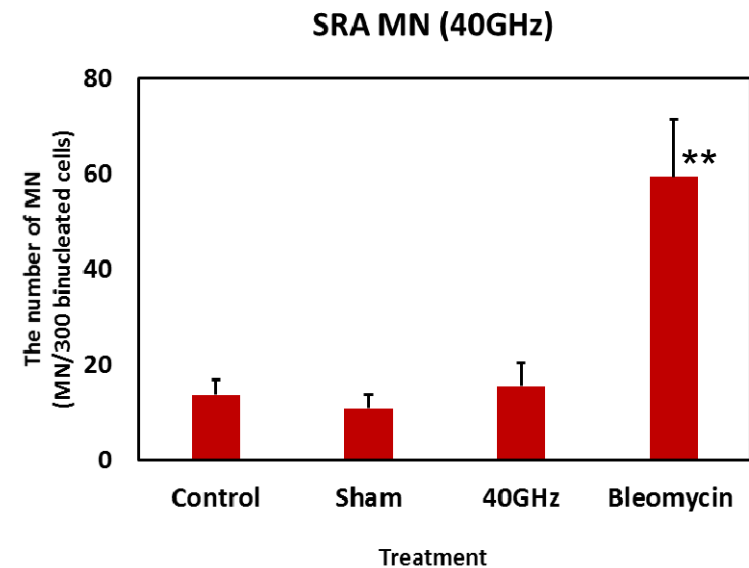
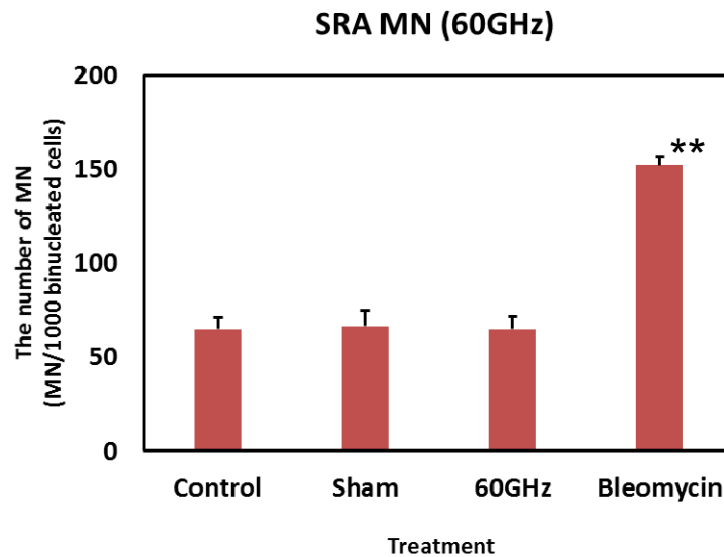
# HCE-TおよびSRA細胞における60・40GHzミリ波ばく露による小核形成試験結果

(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

HCE-T cells

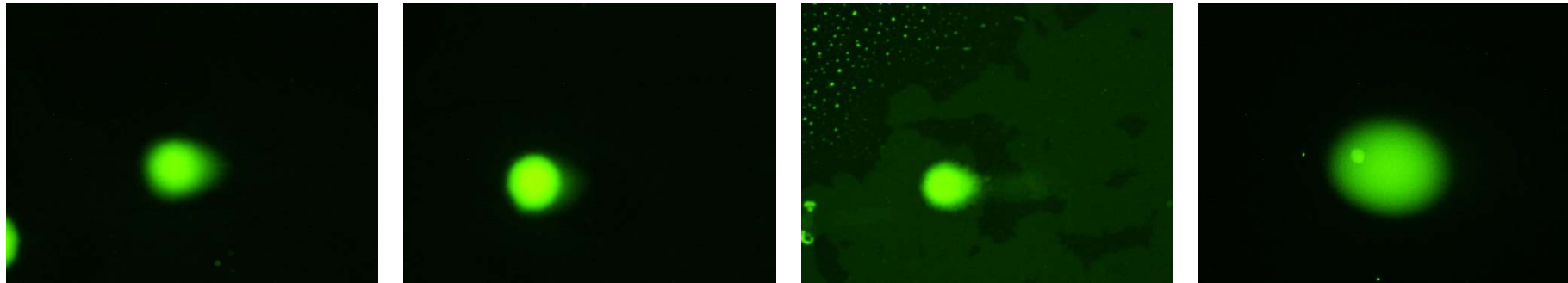


SRA cells





## コメットアッセイ結果 (HCE-T: 60GHz)



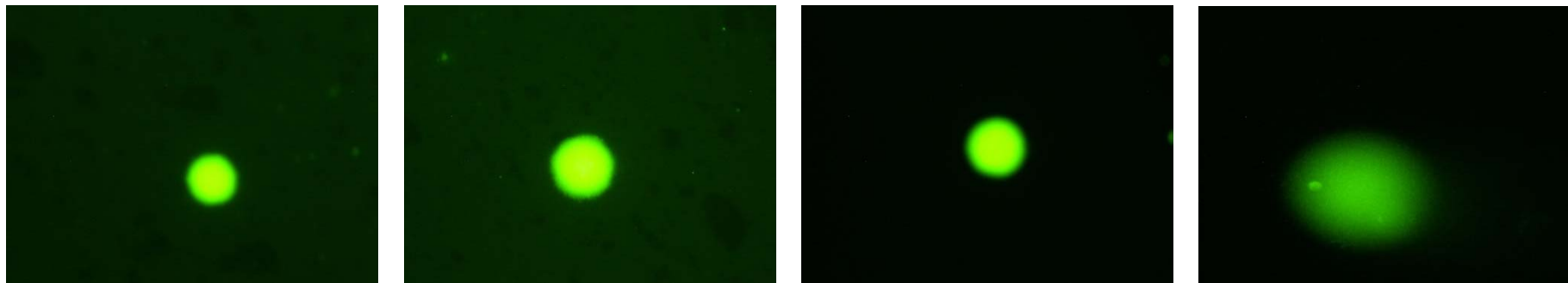
Incubator  
control

Sham

60 GHz  
exposure

Bleomycin  
treatment

## コメットアッセイ結果 (SRA: 60GHz)



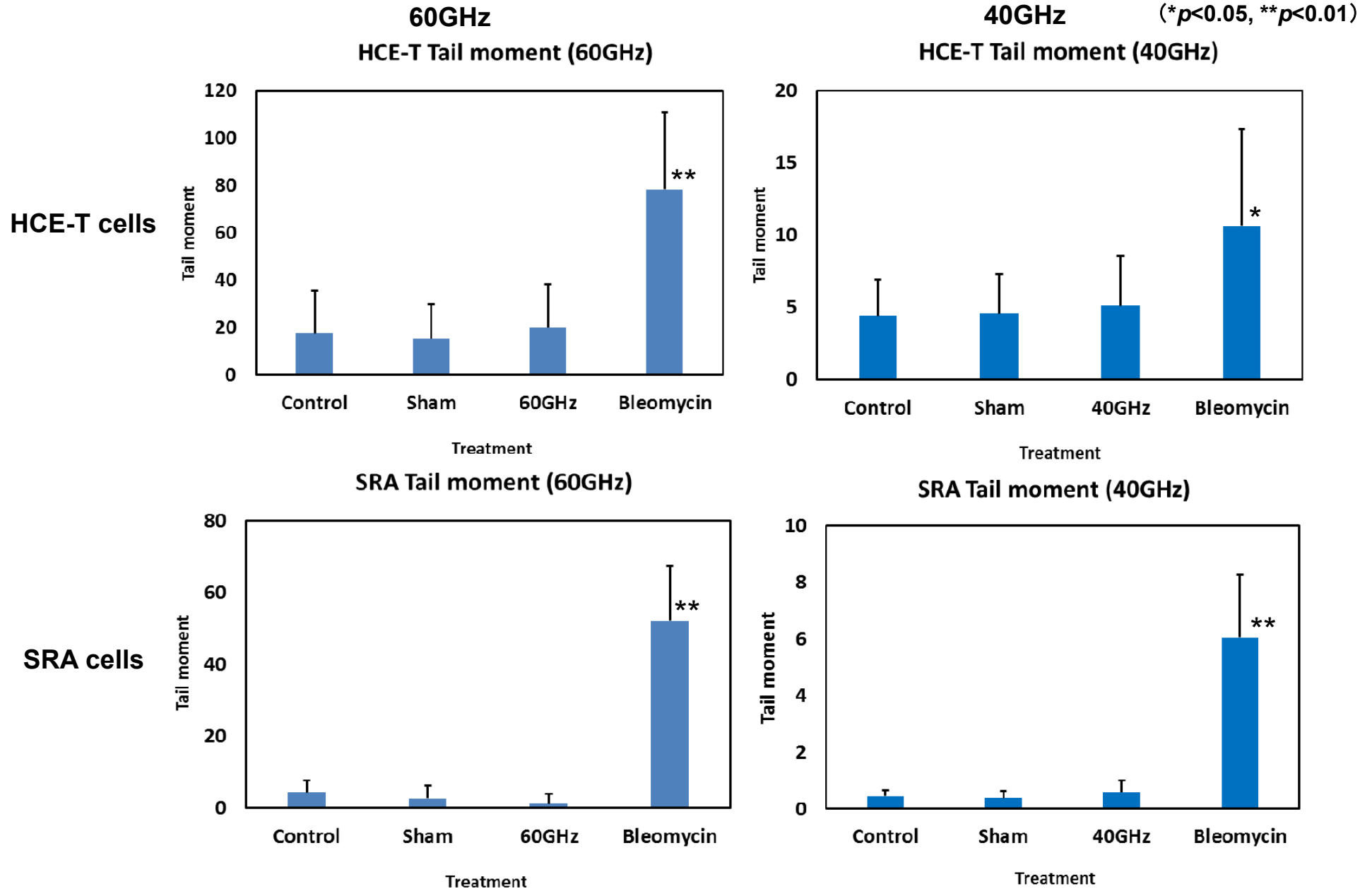
Incubator  
control

Sham

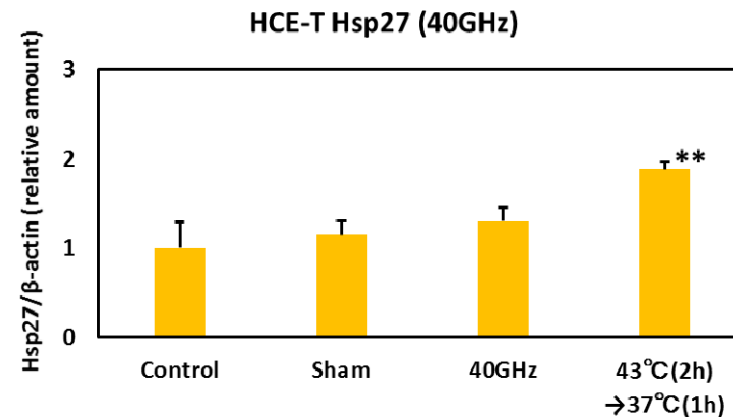
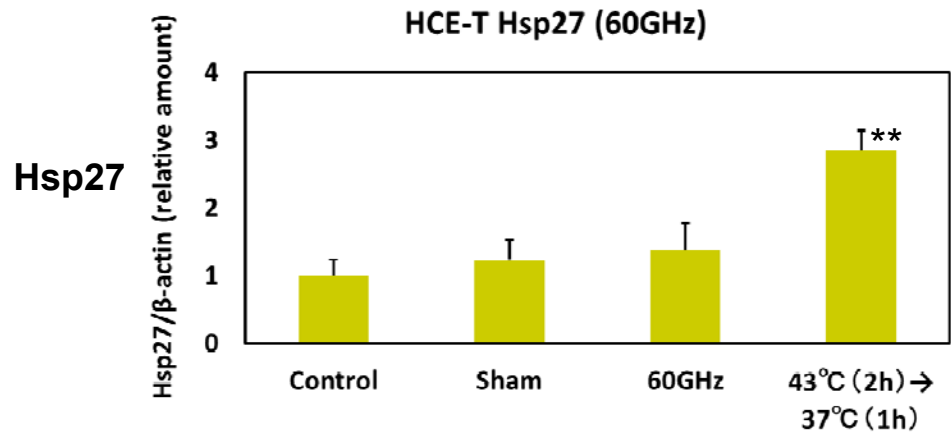
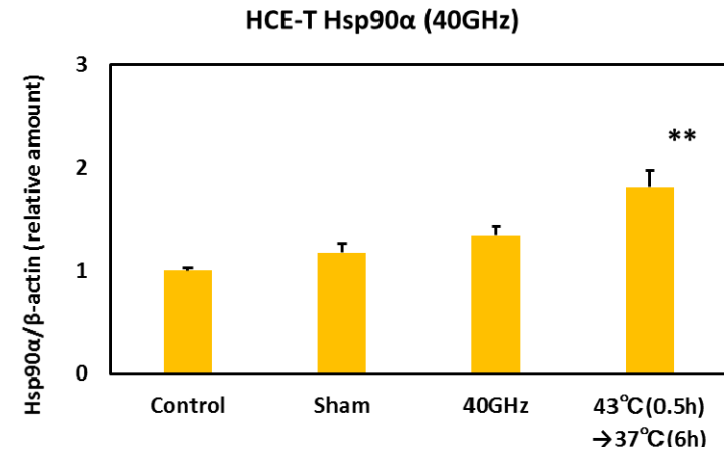
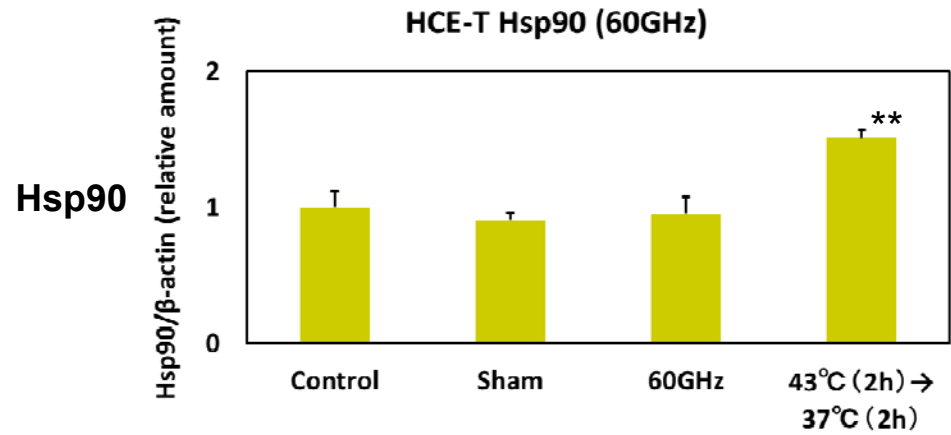
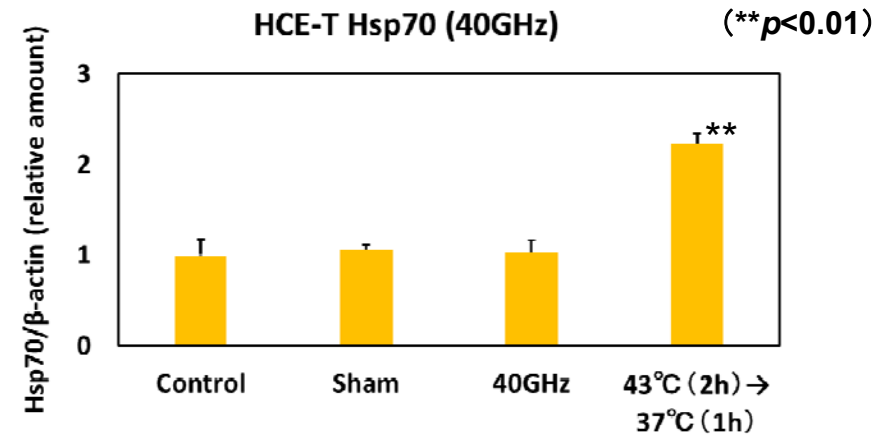
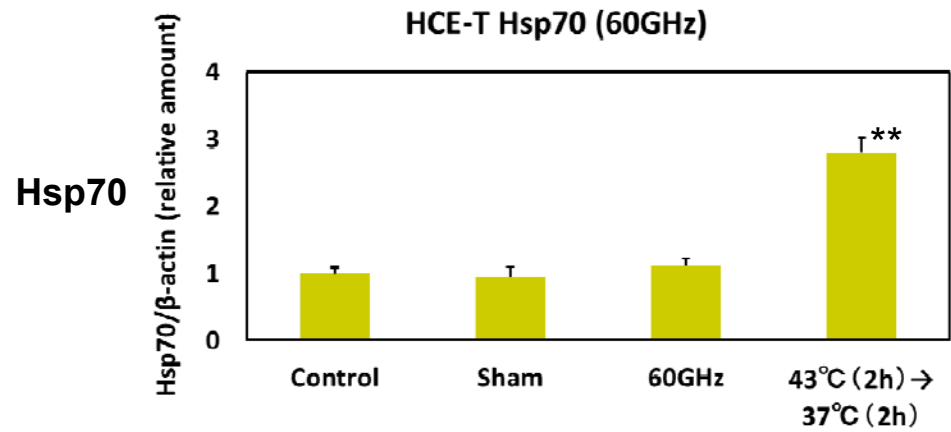
60 GHz  
exposure

Bleomycin  
treatment

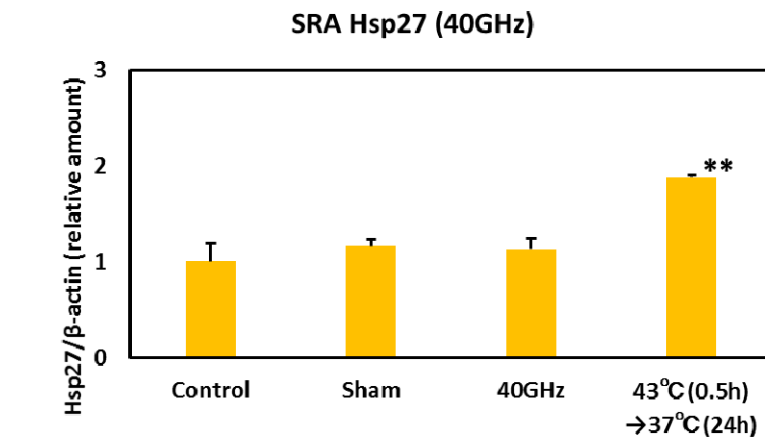
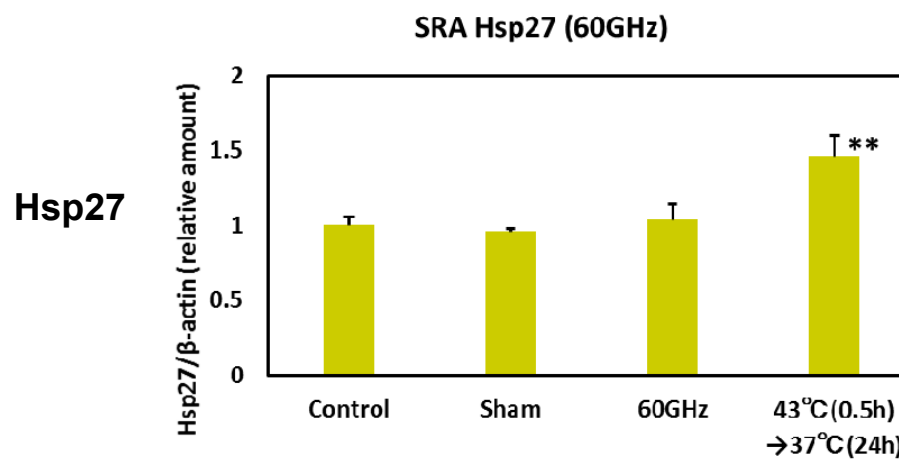
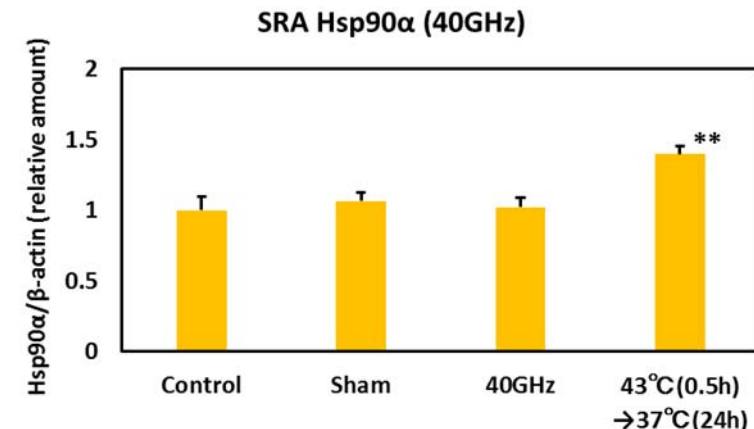
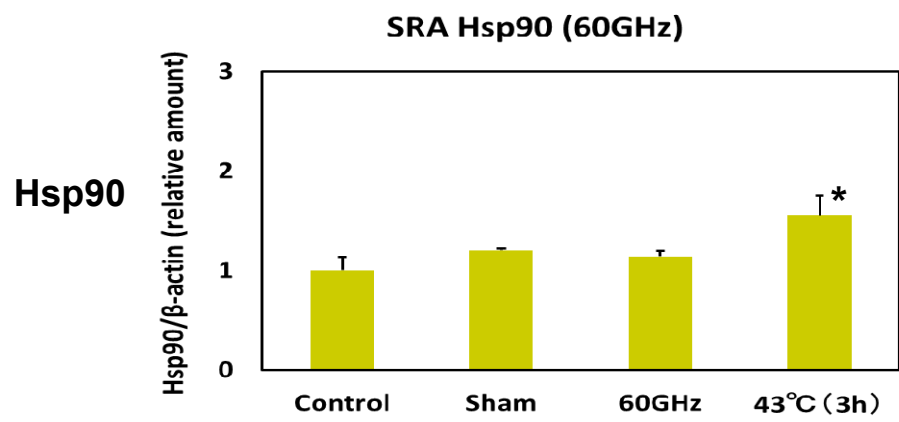
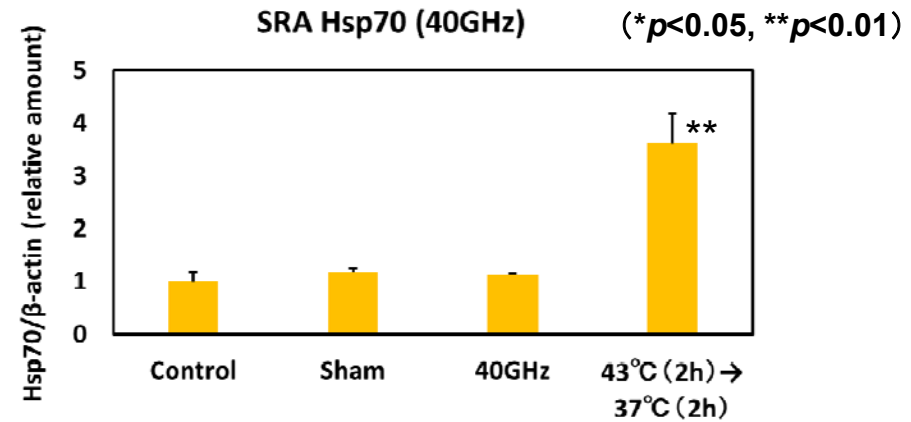
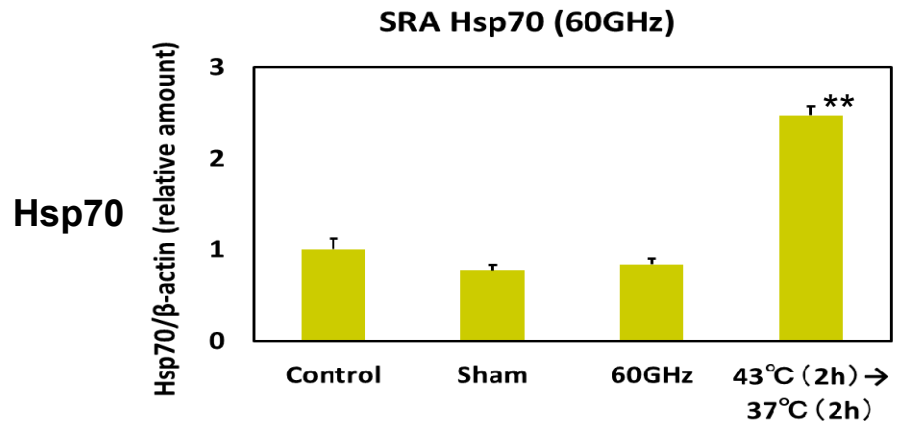
# HCE-TおよびSRA細胞における60・40GHzミリ波ばく露によるコメットアッセイ結果



# HCE-T細胞における60・40GHzミリ波ばく露によるストレスタンパク結果



# SRA細胞における60・40GHzミリ波ばく露によるストレスタンパク結果



# 結 論

- 60もしくは40GHzミリ波ばく露により、コントロール、Shamばく露に比べ、小核形成頻度の上昇は見られなかった。ポジティブコントロールであるブレオマイシン処理で有意に小核形成頻度は上昇した。
- 60もしくは40GHzミリ波ばく露により、コントロール、Shamばく露に比べ、DNA切断の増加は見られなかった。ポジティブコントロールであるブレオマイシン処理で有意にDNA切断の増加が見られた。
- 60もしくは40GHzミリ波ばく露により、コントロール、Shamばく露に比べ、Hspストレスタンパク (Hsp70, Hsp90 $\alpha$ , Hsp27) の増加は見られなかった。ポジティブコントロールである温熱処理により、すべての種類で有意にHspの増加が見られた。

# まとめ

ヒトの目から確立した二種類の上皮細胞(角膜上皮由来:HCE-Tおよび水晶体上皮由来:SRA)に60、40GHzのミリ波(電力密度:1mW/cm<sup>2</sup> (ICNIRP 一般公衆ばく露ガイドライン))を24時間ばく露した。

遺伝毒性への影響を検索するための小核形成試験およびDNA切断検出試験(コメットアッセイ)において、コントロール、Shamばく露と比較して、ミリ波をばく露した細胞で、それぞれ上昇は見られなかった。

また、生理学的影響を検索するためのストレスタンパク実験において、コントロール、Shamばく露と比較して、ミリ波をばく露した細胞で、Hspの上昇は見られなかった。

以上の結果から、60、40GHzのミリ波(電力密度:1mW/cm<sup>2</sup>)ばく露による、ヒトの角膜および水晶体上皮への遺伝毒性・ストレスタンパクへの影響はほとんどないと考えられる。

# 細胞実験研究まとめと考察

- 60、40GHzミリ波細胞ばく露装置用インキュベータの基本動態を調べた。60、40GHzミリ波細胞ばく露装置において、細胞増殖、コロニー形成能、細胞周期分布評価のいずれにおいても、コントロールのインキュベータと比較して有意な差はなかった。このことから60、40GHzミリ波ばく露用ばく露装置は、細胞生物学的にアーチファクトのない正常培養環境を保持していると考えられる。
- 60、40GHzミリ波ばく露による遺伝毒性の有無および生理的影響の有無を検索するため、ヒト角膜由来上皮細胞(HCE-T)およびヒト水晶体上皮細胞(SAR)における小核形成、コメットアッセイならびに、ストレスタンパクの発現を検索した。全ての実験において、コントロール、Shamばく露、60、40GHzミリ波ばく露において、有意な差は観察されなかった。このことから1mW/cm<sup>2</sup>、24時間の条件では、60、40GHzミリ波ばく露により細胞に遺伝毒性は誘発されなかった。また、生理的影響の指標であるストレスタンパクの発現(3種類: Hsp70, Hsp90α, Hsp27)も増加しなかった。従って、60、40GHzミリ波ばく露の非熱的長期ばく露は細胞の小核形成、コメットアッセイおよびストレスタンパクの発現に影響を及ぼさないと考えられる。

# 発表論文



Article

## Effects of Long-Term Exposure to 60 GHz Millimeter-Wavelength Radiation on the Genotoxicity and Heat Shock Protein (Hsp) Expression of Cells Derived from Human Eye

Shin Koyama <sup>1,\*</sup>, Eijiro Narita <sup>1</sup>, Yoko Shimizu <sup>1</sup>, Yukihisa Suzuki <sup>2</sup>, Takeo Shiina <sup>2</sup>, Masao Taki <sup>2</sup>, Naoki Shinohara <sup>1</sup> and Junji Miyakoshi <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Applied Radio Engineering for Humanosphere, Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan; narita.eijirou.4e@kyoto-u.ac.jp (E.N.); yoko\_shimizu@rish.kyoto-u.ac.jp (Y.S.); shino@rish.kyoto-u.ac.jp (N.S.); miyakoshi@rish.kyoto-u.ac.jp (J.M.)
- <sup>2</sup> Department of Electrical & Electronic Engineering, Graduate Schools of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, 1-1, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan; y\_suzuki@tmu.ac.jp (Y.S.); shiina-takeo@ed.tmu.ac.jp (T.S.); masao@tmu.ac.jp (M.T.)

\* Correspondence: shin\_koyama@rish.kyoto-u.ac.jp; Tel./Fax: +81-774-38-4954

Academic Editor: Irena Cosic

Received: 22 June 2016; Accepted: 4 August 2016; Published: 8 August 2016



International Journal of  
Environmental Research  
and Public Health



Article

## Twenty Four-Hour Exposure to a 0.12 THz Electromagnetic Field Does Not Affect the Genotoxicity, Morphological Changes, or Expression of Heat Shock Protein in HCE-T Cells

Shin Koyama <sup>1,\*</sup>, Eijiro Narita <sup>1</sup>, Yoko Shimizu <sup>1</sup>, Takeo Shiina <sup>2</sup>, Masao Taki <sup>2</sup>, Naoki Shinohara <sup>1</sup> and Junji Miyakoshi <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Applied Radio Engineering for Humanosphere, Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan; narita.eijirou.4e@kyoto-u.ac.jp (E.N.); yoko\_shimizu@rish.kyoto-u.ac.jp (Y.S.); shino@rish.kyoto-u.ac.jp (N.S.); miyakoshi@rish.kyoto-u.ac.jp (J.M.)
- <sup>2</sup> Department of Electrical & Electronic Engineering, Graduate Schools of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, 1-1, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan; shiina-takeo@ed.tmu.ac.jp (T.S.); masao@tmu.ac.jp (M.T.)

\* Correspondence: shin\_koyama@rish.kyoto-u.ac.jp; Tel./Fax: +81-774-38-4954

Academic Editor: Irena Cosic

Received: 22 June 2016; Accepted: 3 August 2016; Published: 5 August 2016