

平成29年度研究報告書
テラヘルツ波等における
非熱作用の有無に関する調査

平成30年3月

総務省

目次

I. 要旨	3
II. 研究目的	3
III. 実施内容	5
ア) 300 – 600 GHz における非熱作用に関する研究	5
ア–1 300 – 600 GHz ばく露装置の開発およびばく露評価の検討	5
ア–2 培養細胞での非熱作用検出のための評価法の検討	11
・ばく露による非熱作用検出のための評価法の検討	11
ア–3 300 – 600 GHz ばく露時における培養細胞での非熱作用の検証	14
・ばく露実験による非熱作用検証	14
・電波ばく露時の培養細胞のストレス等の検証	16
IV. 結果	18
ア) 300 – 600 GHz における非熱作用に関する研究	18
ア–1 300 – 600 GHz ばく露装置の開発およびばく露評価の検討	18
・ばく露評価とばく露管理	18
ア–2 培養細胞での非熱作用検出のための評価法の検討	22
・ばく露細胞と非熱作用検出のための評価法の検討	22
ア–3 300 – 600 GHz ばく露時における培養細胞での非熱作用の検証	24
・ばく露実験による非熱作用検証	24
・電波ばく露時の培養細胞のストレス等の検証	27

I. 要旨

H29年度の実施計画書に基づき「300 – 600 GHzにおける非熱作用に関する研究」課題のうち今年度の年次目標であった（1）300 – 600 GHz ばく露装置の開発およびばく露評価の検証（2）培養細胞での非熱作用検出のための評価法の検討（3）300 – 600 GHz ばく露時における培養細胞での非熱作用の検証を実施し、おおむね目標を達成した。

達成状況として、（1）照射するパワーが数 μW と弱い 300 – 600 GHz のテラヘルツ波光源のばく露評価の検討を行い、既存の装置を使用した評価法で検出できた。（2）ばく露による非熱作用検出のための評価法について細胞を蛍光染色して観察する方法検討した。（3）培養細胞で非熱作用の検証として、ばく露した細胞の細胞増殖、細胞活性評価、細胞毒性試験を行った。ばく露時のストレスの検証としてヒートショックプロテイン（HSP）70 の mRNA の発現量について検討を行った。

II. 研究目的

超高速無線通信、セキュリティ検査等での実用化に向けた研究開発が進められているが、600 GHz までの人体への影響に関する研究はこれまでに十分に行われていない。EU の新興・新規特定健康リスクに関する科学委員会（The Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks : SCENIHR）が発表した最近の研究動向によればミリ波・テラヘルツ波（0.1-1.0 THz）の生体影響研究の数が少なく、さらなる研究の必要性が指摘されており、特に皮膚（低レベル、長期ばく露）と眼部（高レベル、短期ばく露）の研究が推奨されている。

さらに、テラヘルツ波帯の生体安全性に関して、1960 年代にイギリスの誘電体学者の H.フレーリッヒ博士が提唱した「細胞膜（二重リン脂質膜）が 0.1-1 THz のいずれかの周波数で共鳴振動しており、その周波数の微弱な電磁波を照射することで、何らかの非熱作用が予想される」という「フレーリッヒ仮説」が存在する。これは、細胞膜に共鳴振動を起こす可能性のある周波数がテラヘルツ帯に存在し、生体に影響する可能性があることを意味している。この仮説についてドイツのマックスプランク研究所を中心とする肯定派と少数の否定派の間で論争が続いたが、テラヘルツ波帯をカバーする広帯域周波数可変光源が乏しかったことなどの理由で決着を見ないまま今日に至っている。研究代表者らは、過去 15 年にわたって、細胞膜電位、生体極微弱光などをパラメータとしてフレーリッヒ仮説の検証実験を進めてきたが、現在まで非熱作用は確認されていない。

近年、光源技術の進展によりフレイリッヒ仮説を検証するための理想的な広帯域周波数可変ミリ波・テラヘルツ波光源である NTT エレクトロニクス社が開発した Uni-Traveling Carrier Photodiode (UTC-PD) がある。この光源は、特殊なフォトダイオード上でのレーザーの 2 波長の差周波光混合により、10 GHz から 1 THz 以上まで約 1 GHz ステップで自在に周波数掃引が可能である。さらに、テラヘルツ領域で世界的に広く用いられている TDS (時間領域分光法) システムから放射されるピコ秒程度の超短テラヘルツパルスが生体に及ぼす影響についても、TDS の肌計測や火傷診断などへの実用化が進む中で調査研究が急務である。TDS からのテラヘルツ出力は連続波ではなく、平均出力も μW 以下であるが、超短パルスゆえに尖頭値が高く、パルス電界が細胞膜などに及ぼす影響は注視すべきである。

このような背景から、本研究においては、皮膚 (低レベル、長期ばく露) をはじめ、各種の培養細胞のばく露実験データ蓄積を目標として、非熱作用の細胞照射実験を繰り返し行う。熱作用による影響を考慮して照射強度は $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 程度以下に抑え、広帯域周波数可変掃引型照射系の UTC-PD による連続波 (CW) や超短パルス型照射系によるパルス波の光源を用いて、主に 300 – 600 GHz までの全域での非熱作用を検証することを目的とする。また 300 – 600 GHz の全周波数域の非熱作用の有無を評価するための手法や反応の早いリアルタイム性の高いパラメータの検討など基礎的な検討実験を実施する。

本年度は「300 – 600 GHz における非熱作用に関する研究」に関して、以下の項目を明らかにすることを目的とした。

- ・ 300 – 600 GHz ばく露量評価の検証
- ・ 培養細胞での非熱作用検出のための評価法の検討
- ・ ばく露実験による非熱作用検証
- ・ 電波ばく露時の培養細胞のストレス等の検証

Ⅲ. 実施内容

ア) 300 – 600 GHz における非熱作用に関する研究

ア－1 300 – 600 GHz ばく露装置の開発およびばく露評価の検討

・ばく露評価とばく露管理

300 – 600 GHz帯の電磁波ばく露下における非熱作用に関する研究を実現するには、当該周波数帯で動作可能なばく露装置の開発とばく露量の評価手法の検討が必要である。電磁波ばく露に用いる光源として、300 – 600 GHz帯域で動作可能な周波数可変連続波光源（単一走行キャリアフォトダイオード（Uni Travelling Carrier Photo Diode（UTC-PD））による差周波数発生）および広帯域パルス光源（超短パルス光励起光伝導アンテナによる双極子放射）を用いた。これらの光源を使用して当該周波数帯域で安定して動作するか、照射するパワーが数 μ Wと弱いため、装置のばく露量について検討を行った。これまでに300 – 600 GHzの出力を測定する確立された装置はない。このため本研究では、弱い出力を測定する方法についても検討を行った。

図1に、本実験中のテラヘルツ波ばく露装置において使用した周波数可変連続波光源の動作ブロック図およびフォトミキサーの外観写真を示す。フォトミキサーとしてUTC-PDを用いた差周波数光発生手法は、周波数を数十GHz以下から数百GHz以上まで連続的に可変できる数少ないテラヘルツ波光源の一つである。UTC-PD自体は非常に小型で図中の金色筐体中に入っており、直接見ることはできない。左下電線（青白）によりフォトダイオードにバイアス電圧を印加しながら光電流を計測できる構成となっている。左上方より光ファイバー（白色）によって周波数の異なる2種類のレーザー光を重ねてフォトダイオードへ入射すると、その差の周波数に相当する電場変調がダイオード上に印加され、それを追従するキャリアにより電磁波が放射されるため、入射する近赤外光の周波数差を制御することによって任意の周波数のテラヘルツ波を発生させることができる。発生したテラヘルツ波は、右側のシリコン製超半球レンズ（銀色）を透過して外へ取り出す。

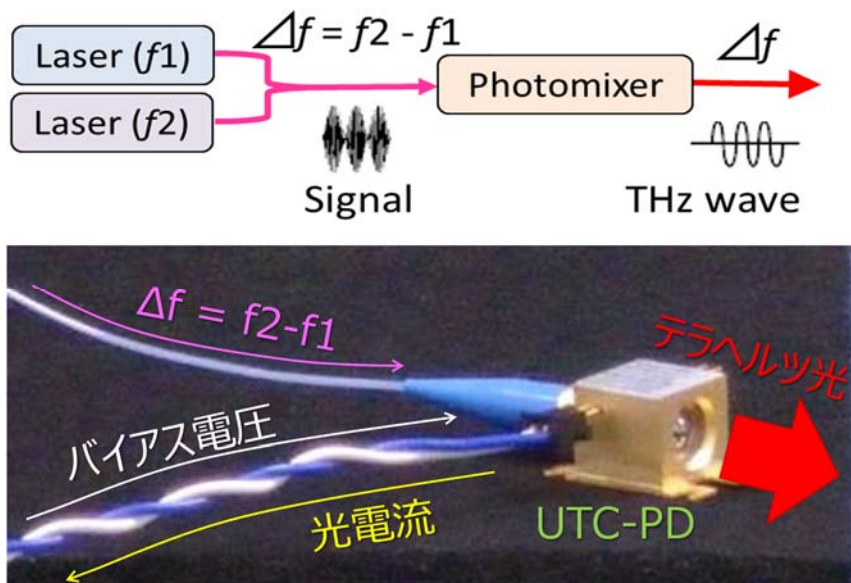


図1 周波数可変連続波光源ブロック図（上）およびテラヘルツ波発生部分（UTC-PD）写真（下）

本実験においては、 $1.5\ \mu\text{m}$ 帯域で動作する狭線幅半導体レーザー光源を複数個用意し、周波数を個別に制御することによって発生するテラヘルツ光の周波数を選択した。図2に、本光源システムにおけるテラヘルツ光出力の周波数依存性を示す。数十GHzから数THzまで、非常に広帯域にわたって連続的に周波数を可変できていることがわかる。出力は、周波数が高くなるにつれて減少する傾向にあり、 $300 - 600\ \text{GHz}$ の領域において十数 - 数 μW 程度の出力が得られる。

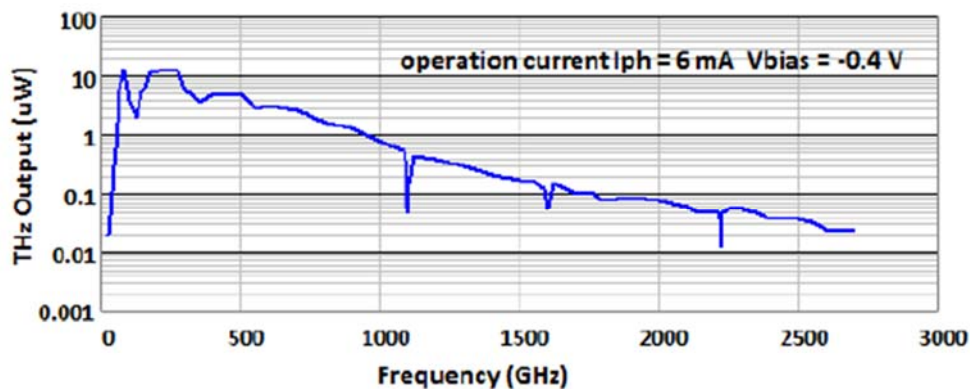


図2 UTC-PDを利用した周波数可変連続波テラヘルツ光源出力の周波数依存性

図3に、本実験中のテラヘルツ波ばく露装置において使用した広帯域パルス光源のテラヘルツ光発生部分外観写真を示す。超短パルス光励起光伝導アンテナによる双極子放射によるテラヘルツ光発生手法は、極めて短い時間(1 ps程度)の間に周波数数十GHzから数THz以上まで含んだ広帯域テラヘルツ光パルスを発生させることができる光源である。アンテナ自体は非常に小型で図中の銀色筐体中に入っており、直接見ることはできない。右下金色端子よりアンテナにバイアス電圧を印加しながら右上方より光ファイバー(黄色)によって超短パルスレーザー光をアンテナへ入射し、その時間に流れる光電流による双極子放射によって広帯域テラヘルツ光を発生させ、左下側の超半球レンズ(銀色)を透過して外へ取り出す。



図3 光伝導アンテナを利用した広帯域テラヘルツ波パルス光源写真

図4に、本光源システムにおける広帯域テラヘルツ波パルス出力の周波数依存性を示す。数十GHzから数THzまで、非常に広帯域にわたって出射していることがわかる。出力強度分布曲線は数百GHz帯に極大値をもち、時間平均数nW程度の出力が得られる。

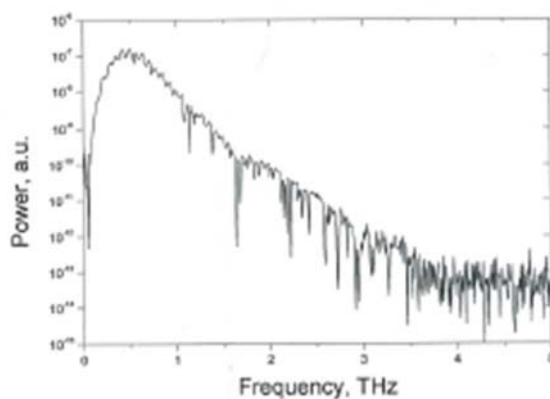


図4 広帯域テラヘルツ波パルス強度の周波数依存性

ばく露量評価のためには、照射されるテラヘルツ波の強度分布の測定が必要である。しかしながら、この帯域・出力の分布を正確に測り得る測定器は市販されていないため、実験系を新たに構築し、測定した。

図5に、周波数可変連続波テラヘルツ波出力の周波数依存性測定のための実験系を示す。光源（UTC-PD）およびローパスフィルター、軸外し放物面鏡、光変調器、校正済み焦電素子型検出器から構成される。UTC-PDより出射されたテラヘルツ光は、熱の影響を避けるためにローパスフィルターを透過させ、軸外し放物面鏡によって平行光とする。この時、光チョッパーによってON/OFF変調を加え、その後、再び軸外し放物面鏡によって集光し、全てのテラヘルツ光を出力校正済み検出器へ導入する。

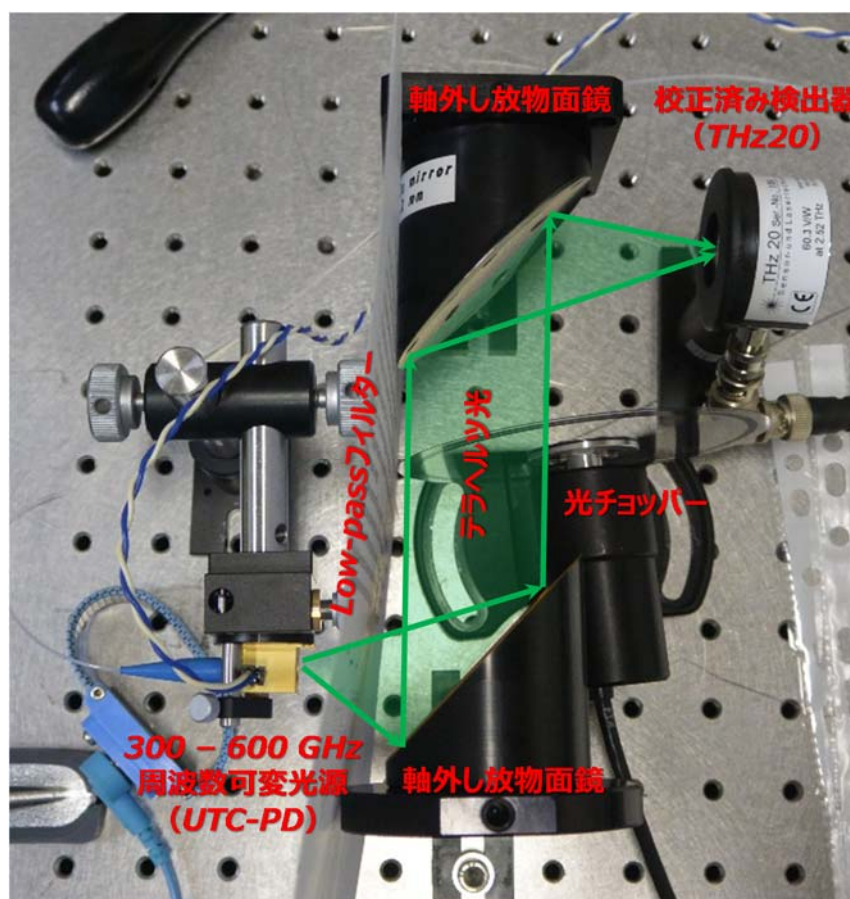


図5 テラヘルツ波出力測定のための実験系写真

図6に、周波数可変連続波テラヘルツ波出力強度分布測定のための実験系を示す。光源（UTC-PD）および測定窓（ピンホール）、レンズ、高感度検出器（InSb

HEB) から構成される。UTC-PDより出射された全テラヘルツ光はレンズによって集光され、高感度検出器によって検出できるようにしておく。この時、ピンホールを2次元に掃引することによってテラヘルツ光出力の強度分布を計測した。

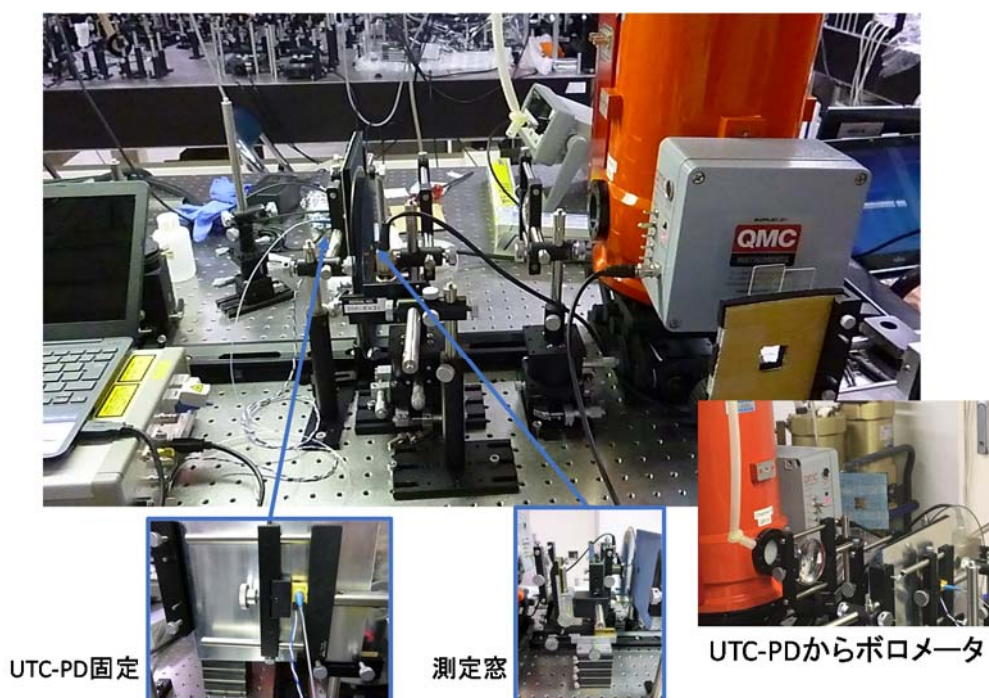


図6 周波数可変連続波テラヘルツ波出力強度分布測定実験系写真。

図7に、広帯域テラヘルツ波パルス光源出力の周波数分布測定のための実験系を示す。光源(光伝導アンテナ)およびローパスフィルター、軸外し放物面鏡、光変調器、高感度検出器から構成される。光伝導アンテナより出射された広帯域テラヘルツ波パルスは、光チョッパーによってON/OFF変調を加え、軸外し放物面鏡によって平行光とする。その後、熱の影響を避けるためにローパスフィルターを透過させ、再びレンズによって集光し、全てのテラヘルツ波を高感度検出器へ導入する。測定後、出力校正済みの連続波テラヘルツ波光源(UTC-PD)との比較により出力校正を行った。

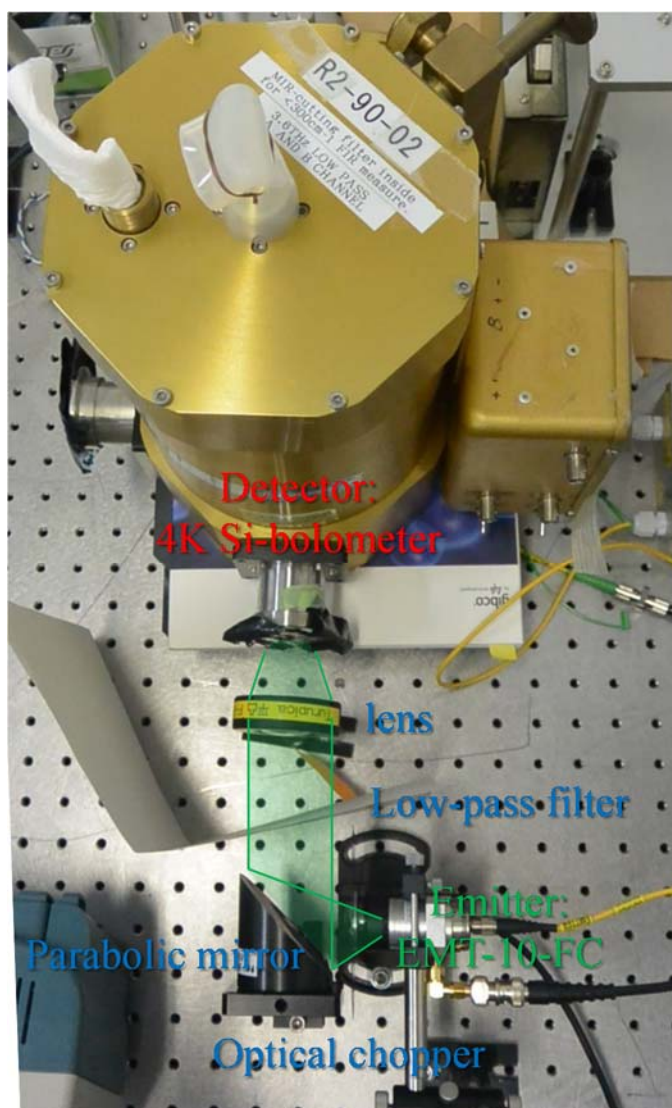


図7 広帯域テラヘルツ波パルス光源出力強度分布測定実験系写真

アー 2 培養細胞での非熱作用検出のための評価法の検討

・ばく露による非熱作用検出のための評価法の検討

非熱作用に関する研究を行うためには、非熱作用を検出する方法の検討とその評価法に関して検証する必要がある。非熱作用を検出するために、ばく露実験評価法を検討する必要がある。ばく露対象とする細胞は、接着性のある皮膚や角膜の培養細胞を用いる。その理由として、再現性の高い試料準備および細胞活性の測定が比較的容易であること、および、テラヘルツ波は皮膚表面の深さ1mm以内でほぼ全ての電磁エネルギーが吸収されることが挙げられる。培養細胞ならびに細胞膜における非熱作用の動向を捉えるための測定・評価法について検討実験を行った。具体的には細胞膜を蛍光染色して顕微鏡でモニタリングする評価法についての基礎的な検討を行った。

【細胞形状観察のための蛍光染色の条件検討】

生体におけるテラヘルツ波の照射影響を考慮した場合、皮膚表面までの到達となるため、対象とする細胞をヒト皮膚繊維芽細胞 (NB1RGB) およびヒト角膜上皮細胞 (HCE-T) の2種とした。培養細胞ならびに細胞膜における非熱作用の動向を捉えるため、細胞形状の観察を明視野における直接観察と、蛍光染色による蛍光観察によって行なった。

細胞膜を蛍光染色する方法として、蛍光色素部の尾部が細胞膜に入り込み、安定的に細胞膜を染色することが可能なPKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labelling(SIGMA-ALDRICH,MINI26)を用いた。染色条件を検討したところ、蛍光強度は染色後培養2日~7日間で強く、その後徐々に低下し、培養2週間では観察が難しい強度まで低下した。また、培養2日目から7日目にかけてもわずかに低下がみられることから観察は培養2日目に行なうこととした。また、蛍光顕微鏡での観察では、連続した励起光の照射によって蛍光強度が徐々に低下し、20分間でほぼ完全に消失した。細胞形状を観察するために必要な強度を保っているのは約10分間であった。そのため、細胞形状の観察は、明視野での直接観察によって行い、蛍光画像は照射前後の細胞形状の変化をより詳細に比較するために用いた。

【培養細胞へのばく露装置の構築】

今回用いた細胞 (ヒト皮膚繊維芽細胞、ヒト角膜上皮細胞) はいずれも接着細胞であり、培養段階でディッシュ底面に定着する。テラヘルツ波は水に吸収されやすい性質があることも考慮し、細胞への照射はディッシュ底面から行なうこととした (図 8, 9)。光源にはUTC-PDを用いた。

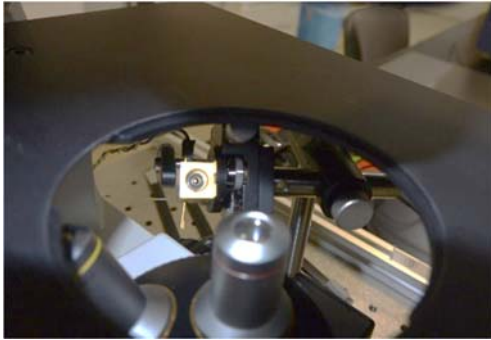


図8 顕微鏡下部に設置した光源

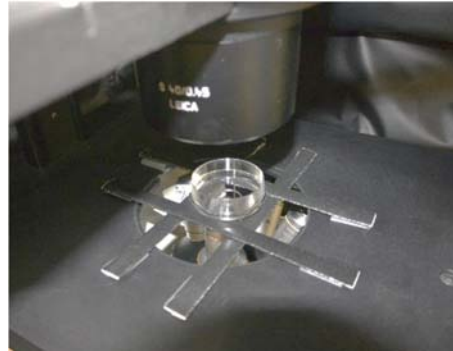


図9 ディッシュ底面からの照射

【ヒト皮膚繊維芽細胞（NB1RGB）およびヒト角膜上皮細胞（HCE-T）における 300 – 600 GHz ばく露試験】

前述の蛍光色素（PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labelling(SIGMA-ALDRICH,MINI26)）によって染色し、37°Cで2日間培養した細胞をリン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)）で3回洗浄し、2 ml の PBS（-）を培地に加えて照射実験に用いた。照射は 300, 400, 500, 600 GHz を 15 分間行い、ばく露前後での細胞形状の変化を観察し、さらに動画による比較も行なった。

【新規蛍光色素による染色条件の検討】

新たな蛍光色素として CellBrite™ Green Cytoplasmic Membrane Dyes (Biotium)を用いた。この蛍光試薬は、脂溶性カルボシアニン色素で脂質二重膜に取り込まれると強い蛍光を発する。培地に直接添加して染色を行なうことができ、細胞毒性も低いため本実験においては細胞の培養状態を確認した上で染色できるという利点がある。

37°Cで5日間培養したヒト皮膚繊維芽細胞（NB1RGB）およびヒト角膜上皮細胞（HCE-T）を上記の蛍光色素（CellBrite™ Green Cytoplasmic Membrane Dyes(Biotium)）を用いて染色した（図10）。染色条件は細胞によって染色液の濃度や染色時間の検討を行ない最適化した。また、細胞活動による変化やディッシュからの細胞の剥離を最小限に抑えるため、細胞の洗浄には 37°Cに温めた培地を用いた。

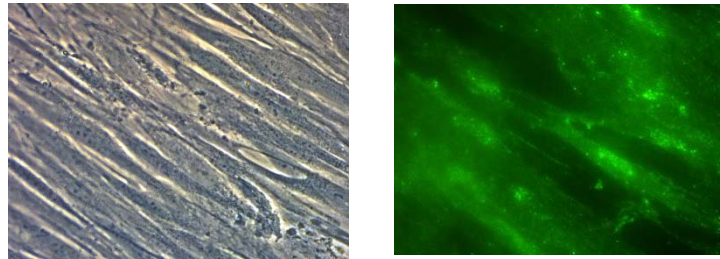


図 1 0 ヒト皮膚繊維芽細胞の蛍光染色

【新たなばく露装置の構築】

ディッシュ上部からの照射を行なうため、顕微鏡ステージ上部に照射系の構築を行なった。光源には周波数可変光源（単一走行キャリアフォトダイオード（UTC-PD）による差周波数発生）を用い、光源からの照射光はレンズによって集光し、ディッシュ上の細胞に照射されるように設置した（図 1 1）。テラヘルツ波は水による吸収が大きいいため、細胞に添加する培地量を極力抑え、さらに観察中に細胞に十分な培地が供給される状態を検討した。

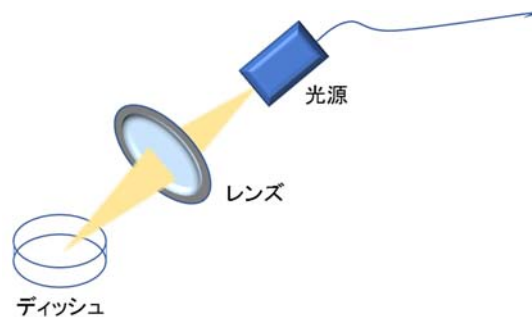


図 1 1 ディッシュ上部からの照射系の模式図

アー 3 300 – 600 GHz ばく露時における培養細胞での非熱作用の検証

・ばく露実験による非熱作用検証

交流インピーダンス測定法を使った細胞増殖に対するばく露の影響を細胞増殖曲線で検討した。さらに、細胞の酵素における還元反応を利用する比色定量法の1つMTS法を使って、70時間連続ばく露による細胞活性評価を行った。また通常培養で72時間細胞を成長させた後、MTS法の試薬を細胞に添加して、細胞が酵素活性による呈色反応している間の3時間、ばく露した細胞毒性試験を行った。これらの実験は繰り返し行い、非熱作用の検証実験としてデータを蓄積した。

細胞膜の共鳴周波数が未知なため、可能性のある全周波数域を周波数掃引しつつ細胞増殖のパラメータを計測するため、リアルタイム性の高い交流インピーダンス測定法 (BM2401, 日置電機) を用いた。測定には、ITO膜電極が底面に施された測定専用ウェル (底面積0.785cm²) に細胞を12,000 cells/wellまたは24,000 cells/wellで播種し、24時間培養した。その後、測定用電極ピンをセットし、2時間通常培養した後、100kHzの測定周波数により5分間隔で94時間連続して抵抗値 (インピーダンス値) を測定した。ITO膜電極上に細胞が接着し、増殖する事によりインピーダンス値が変化する。このインピーダンス値の変化をリアクタンス比として算出することにより、間接的に細胞増殖の挙動をリアルタイムに測定した。ばく露時間は、94時間測定中に1GHzあたり18分34秒で300 – 600 GHzを掃引した。この測定法では、非ばく露細胞 (Unexposed) とばく露細胞 (Exposed) を比較検討するために、両者のインピーダンス値を同時に測定する必要がある。このため、光源であるUTC-PDにアルミパイプを取り付け、スポット的にばく露したい細胞 (Exposed) だけに照射するようにした。非ばく露細胞 (Unexposed) には、アルミパイプからテラヘルツ波がもれて照射されないように、底面をアルミホイルで覆って遮蔽した。

また一部の細胞には、超短パルス型細胞用ばく露実験を行った。このばく露装置では、およそ300 GHzから600 GHzまでの超広帯域電磁周波数を同時に含むことから周波数掃引を要しないばく露実験ため、94時間パルス光源でばく露しながら細胞によるインピーダンス値の測定を行った。

一方、ばく露影響や非熱作用の有無を調べるにあたり、複数のパラメータによるクロスチェックは必須であるため、本研究では確立された細胞のパラメータ計測手法として細胞活性や細胞毒性試験に一般的に用いられるMTS測定法 (CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) を用いた。この方法は、細胞中の脱水素酵素活性による還元反応を利用して、培養細

胞の活性率や細胞への毒性試験を添加した試薬の色の变化（呈色反応）を吸光度により、エンドポイントで測定した（比色定量法）。

細胞を96ウェルプレート（Corning）のウェルに4,000 cells/wellで播種し、2時間通常培養したものを、各ばく露実験に用いた。すべての実験において、播種から72時間後にMTS試薬を添加し、3時間呈色反応させた後、490 nmの波長で吸光度（Absorbance）を測定した（iMarkマイクロプレートリーダー, Bio-Rad）。

70時間のばく露条件（Exposed-70h）では、細胞増殖時に1GHzあたり13分47秒で300-600GHzを掃引して行う掃引型ばく露実験を行った。ポジティブコントロールとして、42°Cで70時間ばく露した。一方、細胞の還元能にばく露影響があるかを測定するため細胞毒性試験として、72時間通常培養した後、呈色反応時の3時間に1GHzあたり25秒で300 – 600GHzを掃引しながらばく露を行う実験（Exposed-3h）を行った。ポジティブコントロールとして高濃度（1.4 M）で細胞毒性があるジメチルスルホキシド（DMSO）を添加した。比較のため、培養条件を同じにした擬似ばく露（sham）の測定も行った。

ばく露実験に使用した細胞は、正常細胞3種とがん細胞2種であり、正常細胞には、ヒト皮膚線維芽細胞（NB1RGB, 理研バイオリソース）と正常ヒト胎児由来線維芽細胞（NTI-4, JCRB細胞バンク）を、ヒト角膜上皮細胞（HCE-T, 理研バイオリソース）、がん細胞にはヒト悪性メラノーマ（Mewo, JCRB細胞バンク）ヒト神経膠芽腫（A172, 理研バイオリソース）であった。

アー 3 300 – 600 GHz ばく露時における培養細胞での非熱作用の検証

・電波ばく露時の培養細胞のストレス等の検証

300 – 600 GHz照射後の細胞に対するストレス等の検出実験を行う。温度変化のような細胞にストレスがあると変動するmRNA発現量検出など細胞内部のパラメータを用いて、ばく露による細胞への影響について検証する。

テラヘルツ波のばく露後、ストレス等で変動するmRNA検出実験をヒートショックプロテイン (HSP) 70や β -actinの遺伝子領域を用いて行い、ばく露による細胞への影響はあるのかを検証した。HSP70は、細胞が熱・寒さ・酸素欠乏などの様々な環境のストレスにさらされると発現量が増えるので、mRNA発現量検出のため、逆転写酵素 (RT) とDNA増幅 (PCR) を使用してcDNA量の熱によるストレス判定を行うことにし、内部標準には β -actinを用いてRNA抽出とRT-PCR増幅の確認を行った。HSP70を用いる確認を行うため、ポジティブコントロールとして、インキュベータを通常の37°Cから43°Cに変化させ、2時間培養することで細胞にヒートショックを与えた。

表 1 使用したプライマー配列

プライマー名	配列	目的の増幅長(bps)
HSP70_1	F 5'-CAATAACCTGCTGGGCAAG-3'	90
	R 5'-GCGTCAATGTCGAAGGTAA-3'	
HSP70_2	F 5'-TTCCGTTTCCAGCCCCCAATC-3'	1500
	R 5'-GAGTTAGAACATGCCACCTC-3'	
HSP70_5	F 5'-TTCCGTTTCCAGCCCCCAATC-3'	558
	R 5'-CGTTGAGCCCCGCGATGACA-3'	
β -actin_9	F 5'-CCGCGAGAAGATGACCCAGAT-3'	299
	R 5'-TTCTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'	

はじめに 300 – 600 GHz の細胞へのばく露実験を行った。通常培養で使用している 100mm の培養用ディッシュを用い、ディッシュの下から 100mm の距離でばく露した。使用した細胞は、ヒト皮膚線維芽細胞 (NB1RGB)、ヒト胎児由来線維芽細胞 (NTI-4)、ヒト角膜上皮細胞 (HCE-T)、ヒト悪性メラノーマ (Mewo)、ヒト神経膠芽腫 (A172) の 5 種で行った。ばく露条件は、交流インピーダンス測定法と MTT 測定法における照射条件と同様にし、94 時間

ばく露と 70 時間ばく露・72 時間通常培養後の 3 時間ばく露とした（表 2）。次に、ばく露した直後に RNeasy Plus Mini Kit（QIAGEN）でトータル RNA を抽出した。PCR には PrimeScript OneStep RT-PCR kit ver.2.0 (TaKaRa) を用い、目的とする領域を表 1 のプライマーを用いて、トータル RNA から相補的 DNA（cDNA）を増幅させて検出した。このとき、Kit に付属されている PCR control を用いて増幅に使用する酵素や装置が正常に機能しているか確認した。PCR 装置は 9700 GeneAmp PCR System (ABI) を用い、50°C 30 分→94°C 2 分反応後、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 60 秒 を 30 cycles の反応条件で RT-PCR を行った。この後、2% アガロースゲルを用いて、cDNA 増幅産物 7 μL に核酸染色蛍光試薬である Midori Green Direct DNA Stain（日本ジェネティクス株式会社）1 μL を添加し、全量をウェルに流し込み、100v で約 28 分間電気泳動した。その後、UV 灯照射によるゲル撮影装置にて、cDNA 産物の確認を行った。

表 2 各ばく露実験におけるばく露条件
 <交流インピーダンス測定法の条件>

ばく露時間（全体）	ばく露時間（1GHzあたり）	ばく露条件
94時間	1,114秒（18分34秒）	播種2時間後から94時間ばく露
0時間（非照射）	-----	非照射

<MTS測定法の条件>

ばく露時間（全体）	ばく露時間（1GHzあたり）	ばく露条件
70時間	827秒（13分47秒）	播種2時間後から70時間ばく露
3時間	25秒	72時間通常培養後3時間ばく露
0時間（擬似ばく露）	-----	擬似ばく露

IV. 結果

ア) 300 – 600 GHz における非熱作用に関する研究

ア-1 300 – 600 GHz ばく露装置の開発およびばく露評価の検討

・ばく露評価とばく露管理

図 1 2 に、テラヘルツ波検出器からの出力信号の一例を示す。図中グラフの縦軸が強度、横軸が時間、黄色線が検出器からの出力信号である。検出器に到達するテラヘルツ波は光チョッパーによる ON/OFF 変調を受けているため、変調の周期に同期したノコギリ状の信号が出力される。この出力電圧差がテラヘルツ光出力に対して校正済みであるため、テラヘルツ光出力を見積もることができる。

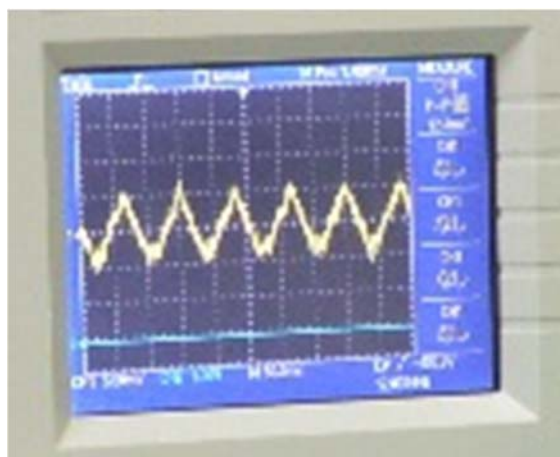


図 1 2 テラヘルツ光出力の計測例

図 1 3 に、出力測定時に使用したローパスフィルターのテラヘルツ帯透過スペクトルを示す。テラヘルツ帯域において、周波数が高くなるにつれて透過率が減少している。本研究において利用した 300 – 600 GHz 帯域において、透過率はおおむね高く 80-90% 程度である。熱輻射の影響が大きくなる中赤外領域はこのグラフの右方向であり、透過率はほぼゼロであると考えられることから、本計測において有効なローパスフィルターとして働いているものと考えられる。

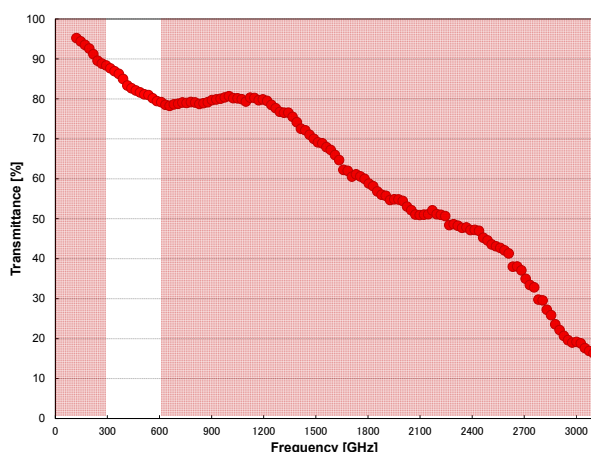


図 1 3 計測時使用したローパスフィルターのテラヘルツ帯透過スペクトル

図 1 4 に、周波数可変連続波光源からのテラヘルツ波出力の周波数依存性を示す。UTC-PD へ入射する赤外光強度が合計約 16 mW，印加電圧 -1.0 V，光電流が -4.0 mA のとき，300 – 600 GHz の範囲において，UTC-PD へ入射する近赤外光の周波数を制御することにより連続的に可変であった。周波数可変範囲内において，テラヘルツ光出力は周波数が高くなるにつれて単調に減少しており，最大のテラヘルツ光出力は周波数 300 GHz の時約 17 μ W，最小のテラヘルツ光出力は周波数 600GHz のとき約 5 μ W であった。出力は検出器により，周波数は入力する近赤外光をモニターする光計測機器により校正済みである。

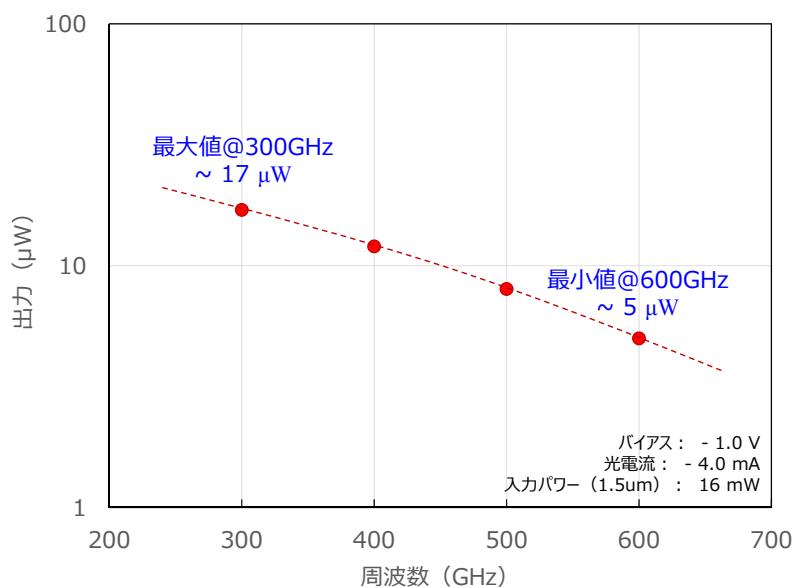


図 1 4 周波数可変連続波光源からのテラヘルツ波出力の周波数依存性。

図15に、周波数可変連続波光源からのテラヘルツ波出力の強度分布を、周波数が300, 400, 500, 600 GHzの時の計測結果を並べて示した。すべての周波数において、全体に広がって照射されている様子が観測された。また、照射範囲内におけるテラヘルツ波強度は $0.2 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 程度以下となっており、テラヘルツ波吸収による温度変化の影響は無視できると考えられる。

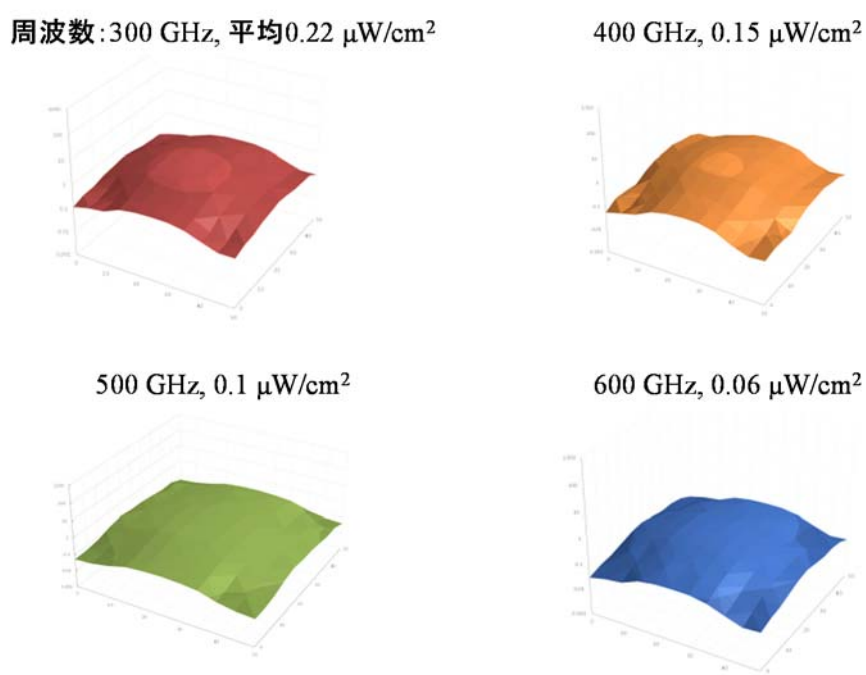


図15 周波数可変連続波光源からのテラヘルツ波出力の強度分布。周波数が300 (左上), 400 (右上), 500 (左下), 600 (右下) GHzの時の計測結果を並べて示した。

図16に、広帯域パルス光源からのテラヘルツ波出力の時間波形およびスペクトルを示す。テラヘルツ波パルスの時間幅は約 0.6 ps 、平均出力は約 10 nW であった。このうち、 $300 - 600 \text{ GHz}$ 帯域には全体の約60%の出力が含まれること、繰り返しが 40 MHz であることから、同帯域において、時間平均出力約 6 nW 、尖頭値約 $240 \mu\text{W}$ と見積もることができる。

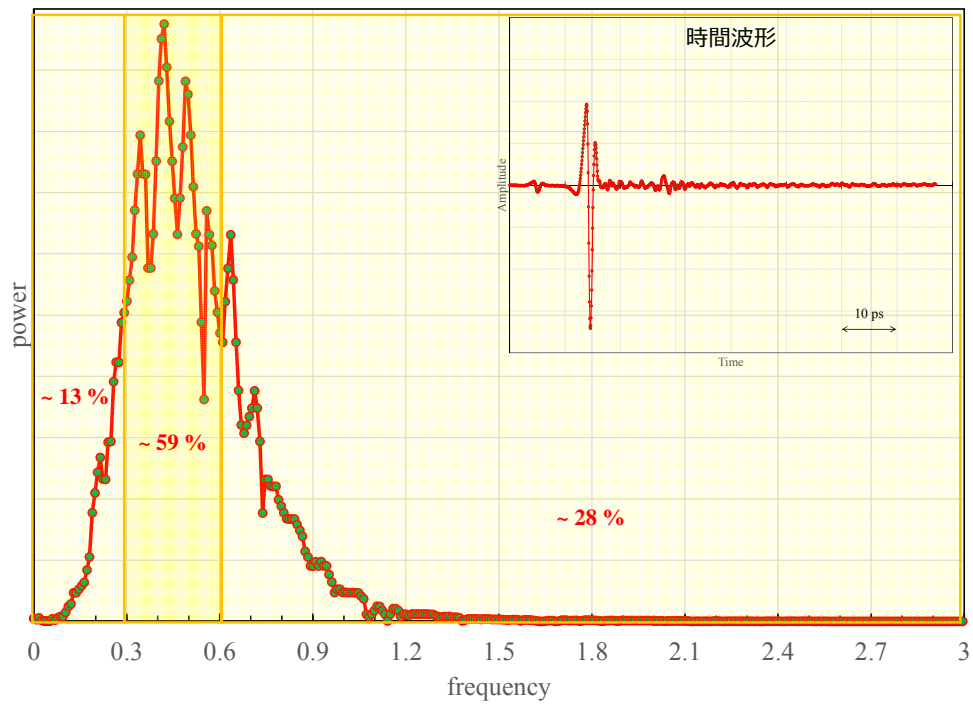


図 16 広帯域パルス光源からのテラヘルツ波出力スペクトル。右上挿入図は時間波形である。

アー 2 培養細胞での非熱作用検出のための評価法の検討

・ばく露細胞と非熱作用検出のための評価法の検討

【ヒト皮膚繊維芽細胞 (NB1RGB) およびヒト角膜上皮細胞 (HCE-T) における 300 – 600 GHz ばく露試験】

本実験で用いたヒト角膜上皮細胞は、加温処理 (43°C、6 分間) や薬剤 (ジメチルスルホキシド, DMSO) 処理によって細胞形状が変化し、蛍光が消失することが確認されたため、比較のための Positive Control とした (図 17)。

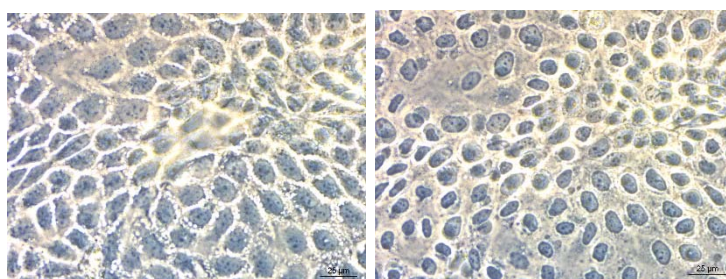


図 17 DMSO 処理によるヒト角膜上皮細胞の形状変化 (左が処理前, 右が処理後)

各周波数における照射前後の比較では、明確な細胞形状の変化は見られなかった (図 18)。使用した蛍光色素は十分な蛍光強度を持ち合わせているが、今回用いたヒト皮膚繊維芽細胞 (NB1RGB) およびヒト角膜細胞 (HCE-T) では細胞膜どうしの隣接部を観察することは難しかったため、新たな蛍光色素の使用を検討する必要があると考えられた。また、2 日間の培養ではどちらの細胞もコンフルエント状態には達しておらず、細胞自身の変化や、緩衝液 (PBS(-)) を用いた洗浄過程においてディッシュから細胞が剥離する現象が観察された。そのため、培養期間の再検討と観察前の細胞の処理方法の改善が必要であると判断した。さらに、光源を顕微鏡のステージ下部に設置し、ディッシュ底面から照射を行なう光学系を構築していたが、細胞形状のより詳細な観察のために高倍率の対物レンズを用いると、対物レンズによって照射光の一部が遮られる可能性が考えられたため、ディッシュ上部からの照射を検討し、そのための光学系の構築を試みた。

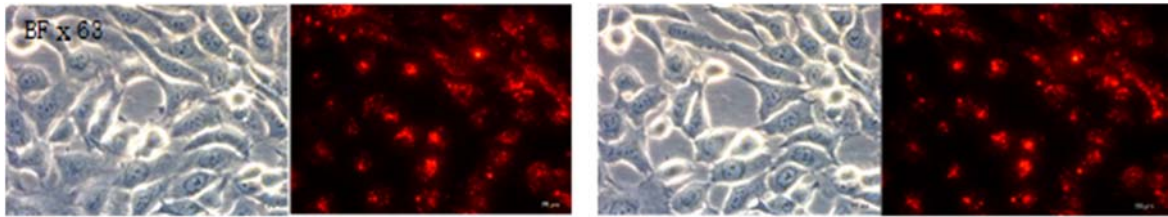


図 18 400 GHz 照射によるヒト角膜上皮細胞の変化（左が照射前，右が照射後）

【新規蛍光色素と新たなばく露装置によるヒト皮膚繊維芽細胞（NB1RGB）およびヒト角膜上皮細胞（HCE-T）における 300 – 600 GHz ばく露試験】
 実験には 300, 400, 500, 600 GHz を 10 分間細胞にばく露し、ばく露前後での細胞形状の変化を観察し、さらに動画による比較も行なった。

各周波数におけるばく露前後の比較では、明確な細胞形状の変化は見られなかった。今回用いた蛍光色素では細胞膜の隣接部の変化も観察することが可能であるが、蛍光観察においても明確な変化は観察されなかった（図 19）。

本実験では、細胞活動による変化やディッシュからの剥離は観察されなかったが、それは細胞の培養期間を延ばしてコンフルエント状態にしたことや、細胞の洗浄に培養条件と同じ温度（37°C）に温めた培地を用いたことで安定した状態で細胞観察が可能になったと考えられる。また、ばく露中細胞に十分に培地が供給される状態を確保することも可能であった。今後はさらに同条件での照射実験を繰り返し行い、再現性の確認を行う予定である。

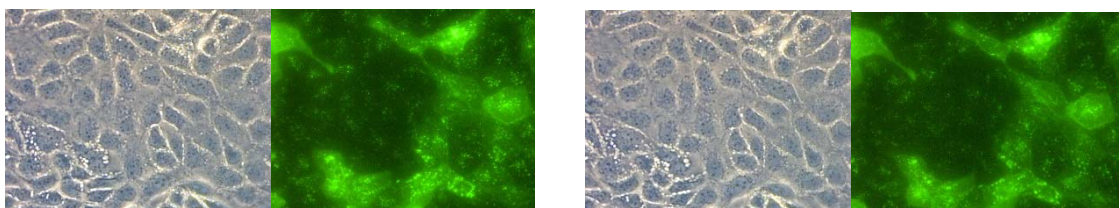


図 19 400 GHz ばく露によるヒト角膜上皮細胞の形状変化（左が照射前，右が照射後）

ア-3 300-600 GHz ばく露時における培養細胞での非熱作用の検証

・ばく露実験による非熱作用検証

交流インピーダンス測定法による周波数掃引型ばく露実験で異なる細胞種における細胞増殖の結果を図20に示す。3回繰り返し実験を行い、その平均値のリアクタンス比を増殖曲線として示した。細胞種によりリアクタンス比が高い、低いはあるものの、300-600 GHz 照射によるばく露細胞 (Exposed) と非ばく露細胞 (Unexposed) のリアクタンス比における増殖曲線に違いは認められず、ばく露による細胞増殖への影響は見られなかった。細胞によるリアクタンス比の違いは、細胞の形状によるものと考えられ、ばく露による影響ではない。

次に、交流インピーダンス測定法による正常ヒト胎児由来線維芽細胞 (NTI-4) における超短パルス型ばく露実験の結果を図7bに示す。超短パルス型ばく露装置の光源では、300-600 GHz も含む超広帯域電磁周波数を同時に含むため、周波数掃引を要しないばく露実験であったが、非ばく露細胞と比べて細胞増殖に特異的な変化は現れなかった。

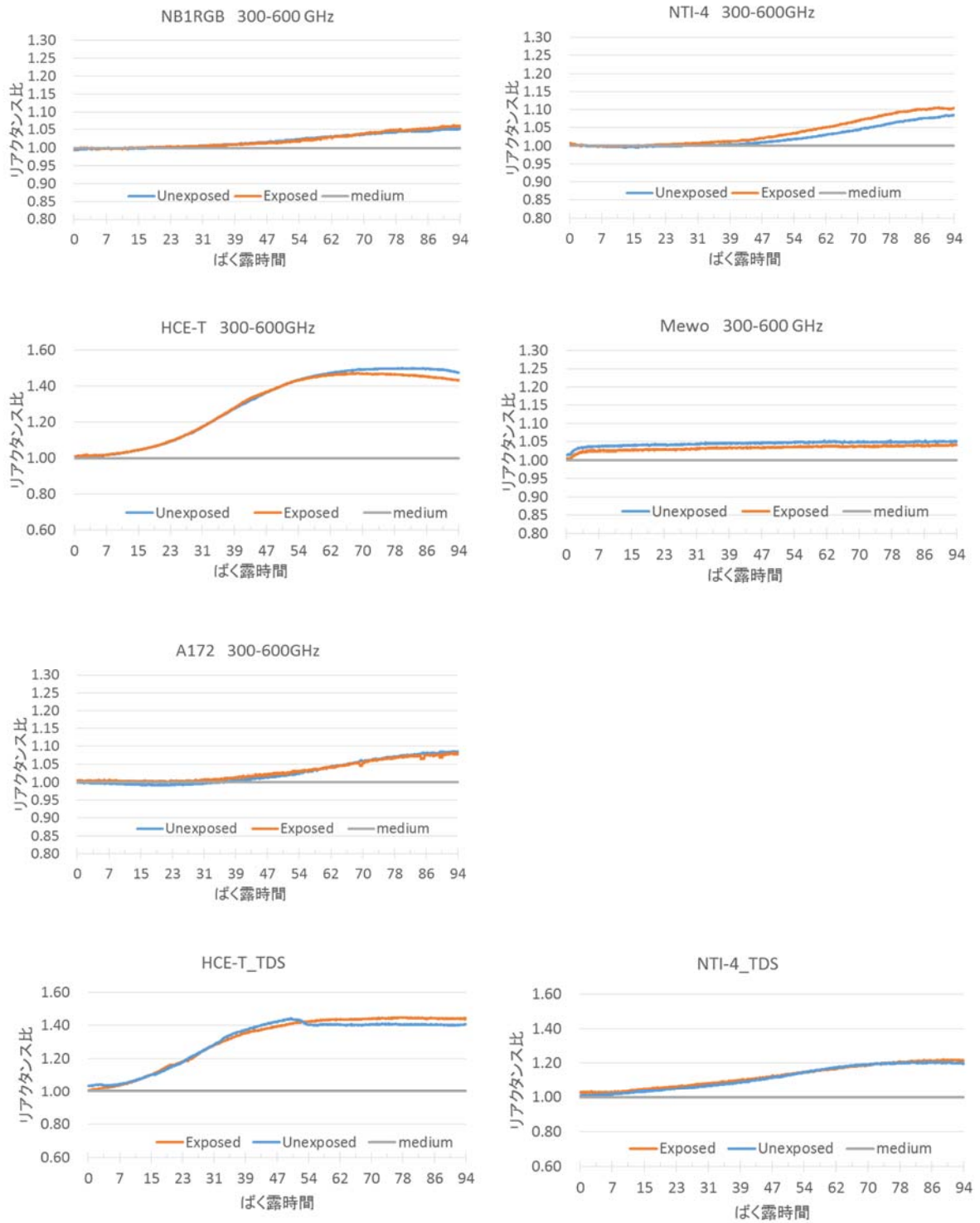


図20 交流インピーダンス測定法による細胞増殖曲線

300–600 GHz を掃引しながら、5 種類の細胞へばく露実験を行った。ばく露する時間を細胞が増殖する 70 時間（図 2 1）と、細胞が増殖した後の呈色反応の 3 時間にばく露する 2 つの実験系（図 2 2）で行った結果、擬似ばく露群（Sham）と比較して、ばく露による有意な差は見られなかった。

以上の結果より、MTS 測定法において 300–600 GHz のばく露による細胞活性への影響や細胞毒性を示す結果は見られなかった。

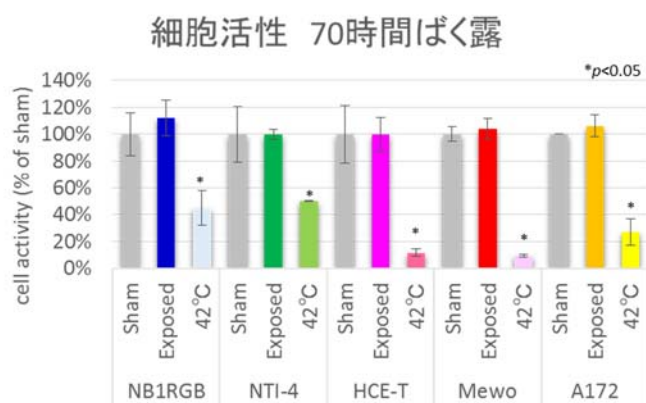


図 2 1 300 – 600GHz をばく露した細胞活性評価結果

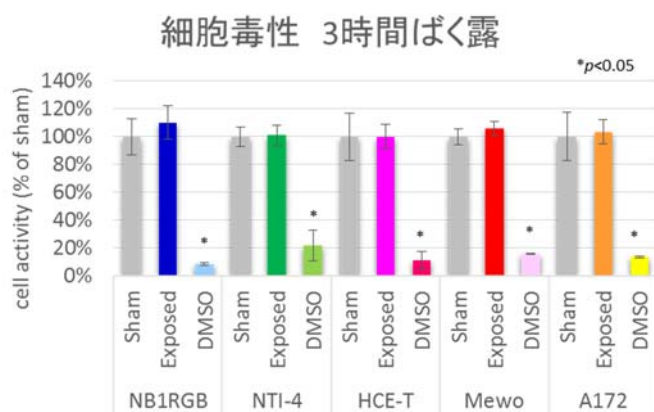


図 2 2 300 – 600GHz をばく露した細胞毒性試験結果

アー 3 300 – 600 GHz ばく露時における培養細胞での非熱作用の検証

・電波ばく露時の培養細胞のストレス等の検証

テラヘルツ波の照射におけるストレス等によって変動するパラメータの検出実験を行い、電波ばく露が培養細胞にストレスを引き起こしているかを検索した。ポジティブコントロールとして、3種（NB1RGB、NTI-4、A172）の細胞を43°Cのインキュベータ内で2時間培養して、細胞へ熱によるばく露を行った。温度変化によるヒートショックプロテイン（HSP）70のcDNA検出結果を図23に示す。結果、ストレス条件下に置いたときにはHSP70のcDNA量が多く検出され、熱によりmRNA産生量が増加すること、内部標準であるβ-actinでは細胞をストレス条件下においてもcDNA量に変化はないことを確かめた。

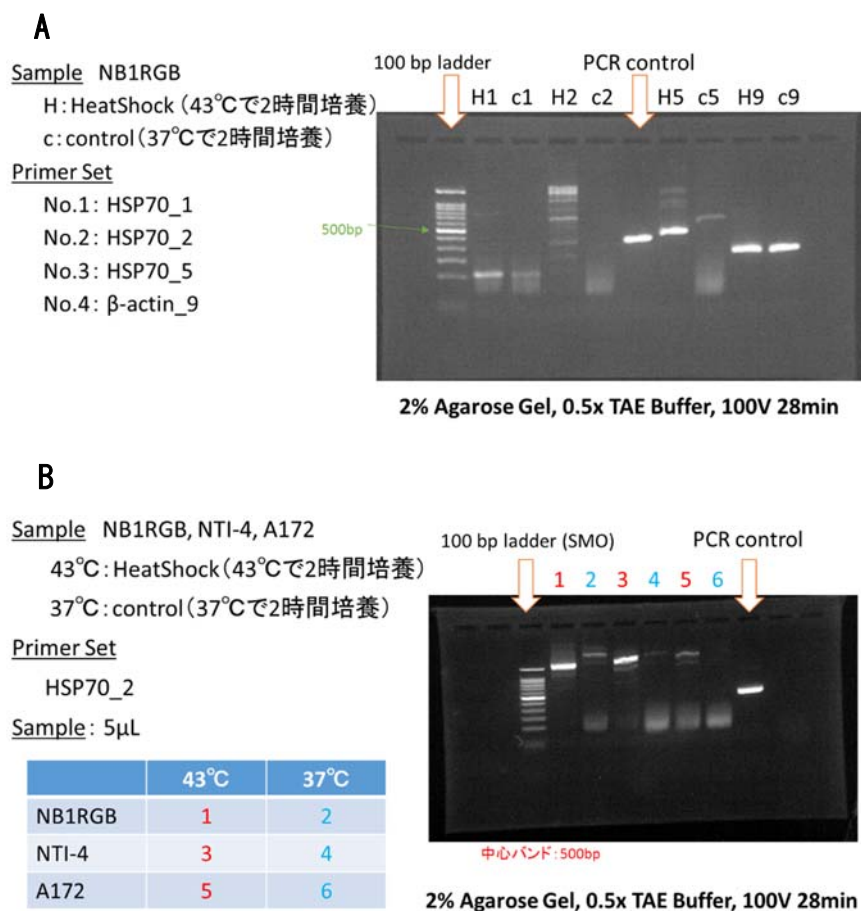


図 2 3 温度変化による cDNA 検出結果 (A-各プライマーによる増幅産物の検出、B-異なる細胞での cDNA の検出例)

さらに、5種（NB1RGB、NTI-4、HCE-T、Mewo、A172）の細胞におけるヒートショックプロテイン（HSP）70とPCR Control（P）のcDNA増幅の結果を図24、25に示す。交流インピーダンス測定法条件である94時間ばく露実験では、細胞種によりプライマーNo.1とNo.2で増幅産物が確認出来ないものも合ったが、プライマーNo.5のHSP70とプライマーNo.9の内部標準β-Actinはすべての細胞において検出された（図24）。94時間ばく露と非ばく露の細胞では、増幅産物の検出の強さに違いは認められなかったことから、ばく露によるHSP70のcDNA量に変化は無かったと考えられる。

MTS測定法条件である細胞増殖中の70時間ばく露または、細胞増殖後の呈色反応中の3時間ばく露でも、プライマーNo.1とNo.2は検出できない細胞もあったが、プライマーNo.5とNo.9ではすべての細胞において増幅産物が検出でき、その増幅量はばく露と擬似ばく露の細胞に違いは無かった（図25）。

以上のことより、細胞へのストレス条件化で産生量が増加するHSP70が、テラヘルツ波ばく露によってcDNA産生量の増加が認められなかったことから、300-600GHzをばく露された細胞でストレスによる細胞反応が起きているという結果は得られなかった。

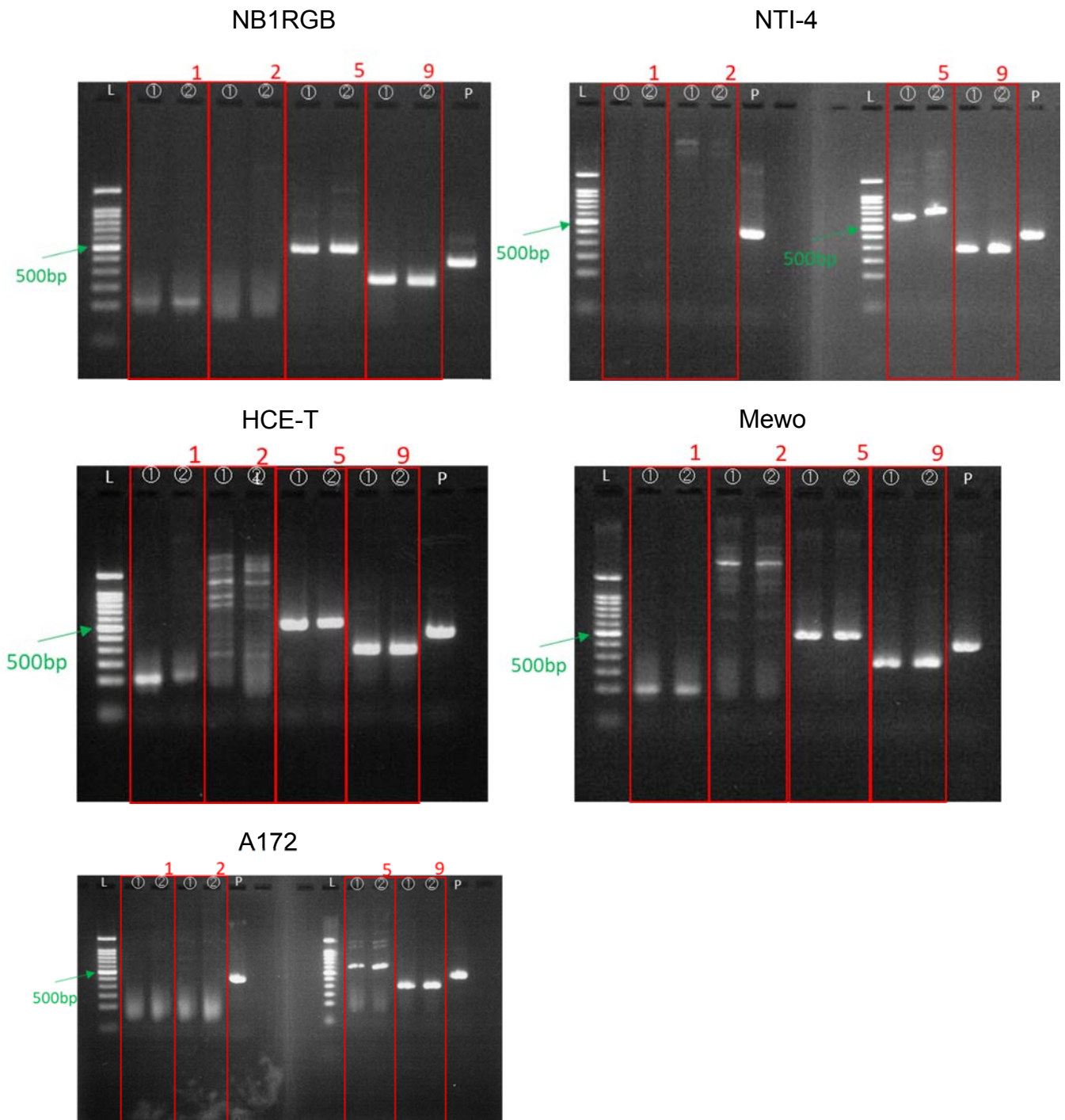


図 2 4 交流インピーダンス測定法における細胞への 300 – 600 GHz ばく露による cDNA の電気泳動結果 (①94 時間ばく露、②非ばく露、P:PCR control)

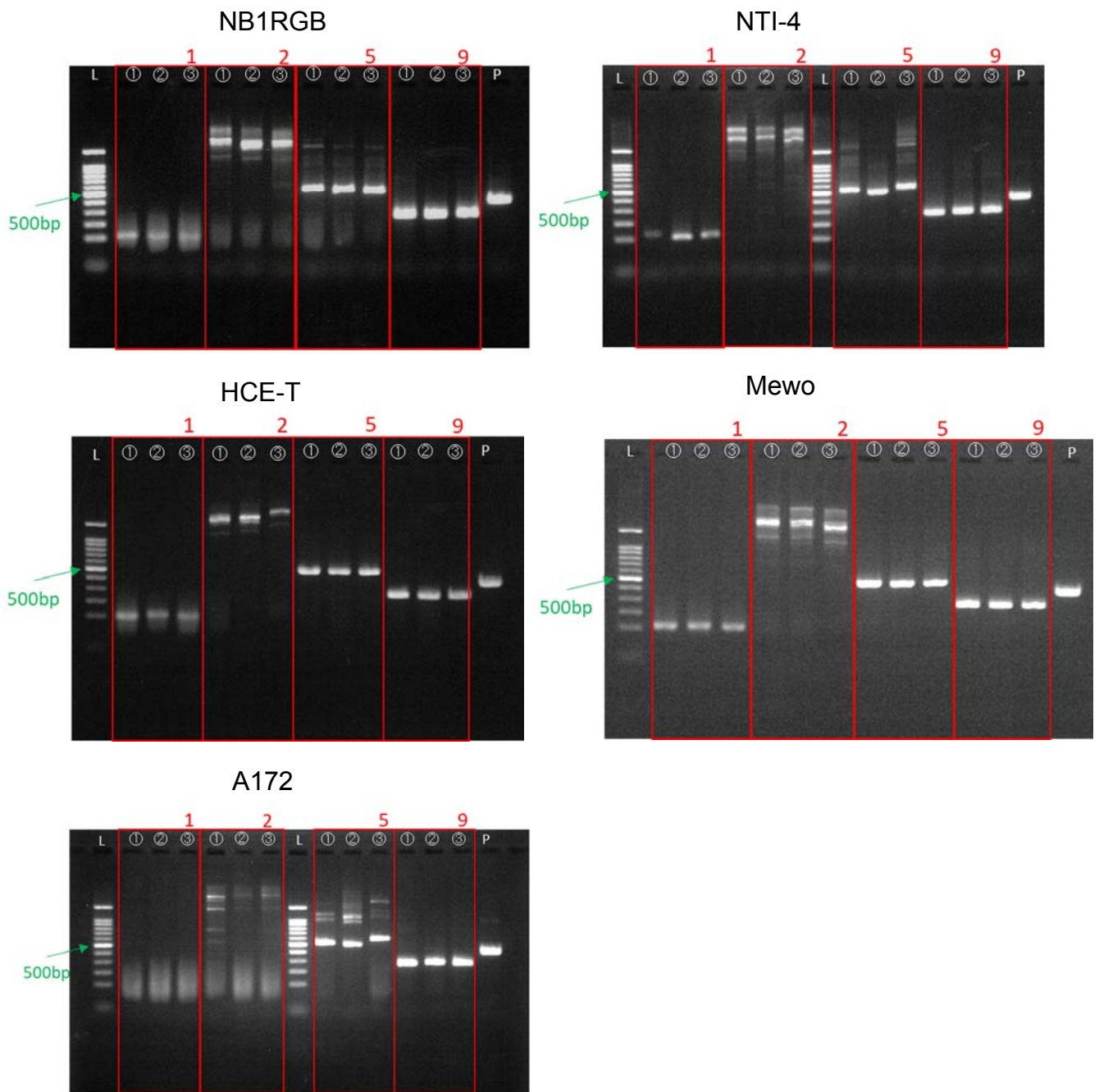


図 2 5 MTT 測定法における細胞への 300 – 600 GHz ばく露による cDNA の電気泳動結果 (①70 時間ばく露、②3 時間ばく露、③擬似ばく露、P:PCR control)

I. 研究目的

超高周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、超高周波テラヘルツ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、超高周波テラヘルツ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。

平成 29 年度は、0.3THz 超高周波ばく露装置（首都大学東京・多気研究室の設計・製作）を用いて、皮膚免疫への影響、アレルギー反応への影響および色素細胞への影響を検証する。本実験を行うに際し、昨年度、0.3THz 超高周波帯電波細胞ばく露装置が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、本実験の開始前に、細胞基本動態試験を行った。具体的には細胞の基本動態である細胞増殖能、細胞生存率、細胞周期分布について調べ、対照として、同じ指標の細胞試験を通常の CO₂インキュベータを用いて、同時に行ったところ、アーチファクトのない正常培養環境を保持していることを確認した。今年度は、昨年度に引き続き、超高周波テラヘルツ帯電波ばく露による細胞影響を検索する。具体的には、皮膚免疫応答への影響評価として、サイトカインの産生量を測定し、アレルギー反応への影響評価として、ヒスタミンの放出量を測定する。さらに、色素細胞への影響評価として、メラニンの生成量を測定し、それぞれ、0.3THz 超高周波をばく露した際、コントロールと比較することで影響評価を行う。同時に 0.3THz 超高周波帯電波細胞ばく露装置内の Sham ばく露および陰性対照として、通常の CO₂インキュベータを用いる。同時に陽性対照として、薬剤処理または紫外線照射を行う。また、0.3THz 単独ばく露での影響評価に加えて、陽性対照として用いた薬剤や紫外線等をばく露中・ばく露前に添加・照射することによる複合ばく露による皮膚免疫応答、アレルギー反応ならびに色素細胞への修飾効果を検証する。

平成 30 年度は、これまでに欧米などから発表されている論文に、テラヘルツ波ばく露が生体に影響を及ぼすことを示唆する陽性報告があることから、その検証が必要である。平成 30 年度の研究では、上記同様、首都大学東京・多気研究室の設計・製作による 100GHz 波帯ばく露装置を用い、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、本実験の開始前に、細胞基本動態試験を行い、陽性報告に見られる結果について検証実験を行う。

II. 試験方法

II-1. 0.3THz 超高周波ばく露装置

図 1-1 に 0.3THz 超高周波ばく露装置（首都大学東京・多気研究室の設計・製作）と 0.3THz 超高周波ばく露用インキュベータを、図 1-2 に超高周波ばく露用インキュベータの内部を示す。また、対照に用いた通常のインキュベータとその内部を図 1-3 に示す。



図 1-1 超高周波ばく露装置（右）と
超高周波ばく露用インキュベータ(左)

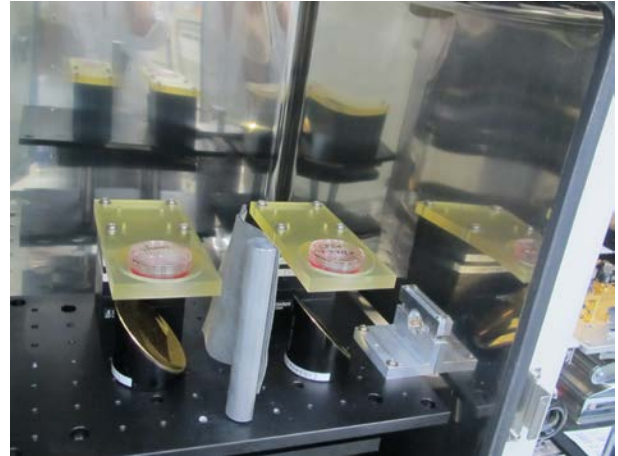


図 1-2 ばく露用インキュベータ内部
Sham 部（左）とばく露部(右)



図 1-3 対照に用いた通常のインキュベータ（左）とその内部（右）

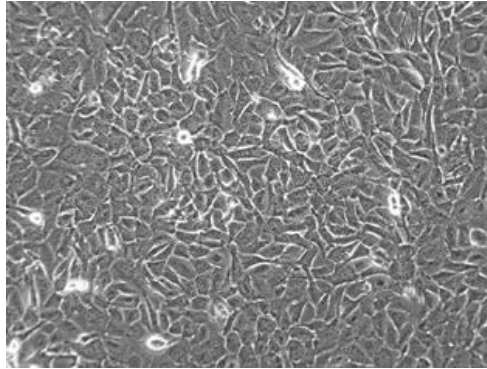
II-2. 細胞・培養条件

0.3THz 超高周波ばく露実験に適した細胞として、ヒト皮膚由来角化細胞（ケラチノサイト）HaCaT およびヒト皮膚由来メラニン細胞（メラノサイト）NHEM を用い、0.3THz、約 0.5mW/cm²、ばく露時間 24 時間でばく露を行った。対照として通常インキュベータを用い、超高周波ばく露用インキュベータ、通常インキュベータとも同条件で培養した。以下、用いた細胞株とその培養条件を図 2A、2B に示す。

細胞：ヒト皮膚由来角化細胞（HaCaT）（図 2A）

培養液：DMEM 培地（10%牛胎児血清）

培養条件：37℃、5%二酸化炭素、飽和湿度



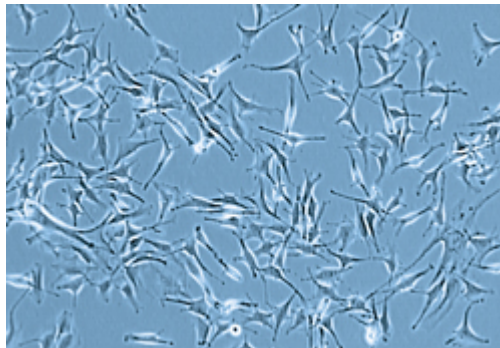
www2.brc.riken.jp

図 2A HaCaT 細胞

細胞：ヒト表皮由来メラニン細胞（NHEM）（図 2B）

培養液：DermaLife®M 培地（正常ヒト表皮メラニン細胞用増殖添加剤セット）

培養条件：37℃、5%二酸化炭素、飽和湿度



<http://catalog.takara-bio.co.jp/IMAGES/D10067b.jpg>

図 2B NHEM 細胞

II-3 膚免疫応答評価（サイトカイン産生量計測試験）

0.3THz 超高周波ばく露実験に適した細胞として、ヒト皮膚由来角化細胞である HaCaT 細胞を用いて皮膚免疫応答評価試験を行った。主に角化細胞で構成されている表皮は人体の最外層にあり、外界からの刺激に一番初めに反応が起こる場所である。この角化細胞は、体表を覆っているだけでなく、免疫担当細胞であることが、近年の研究で解明しており、種々のサイトカインを産生している。今回は、表皮に多く存在しているとされる以下の 3 種類のサイトカイン産生量の計測を行った。各サイトカイン産生量測定において使用されたプレートリーダー用試薬は、Thermo Scientific 社（IL-1α）、eBioscience 社（IL-6、IL-8）のものを用いた。

1. インターロイキン 1α（IL-1α）…炎症時の発熱や急性期タンパク質の産生誘導、免疫系細胞の増殖促進、ランゲルハンス細胞の活性化、遊走の調節に働く。
2. インターロイキン 6（IL-6）…マクロファージを刺激して急性反応を誘導する働きを持つ。
3. インターロイキン 8（IL-8）…ケモカインの一種で、好中球の遊走、活性化、T 細胞の遊走を促す働きを持つ。

実験方法

（超高周波ばく露）

- ①ばく露用シャーレに 1 枚当たり 2×10^5 個の HaCaT 細胞を播種し、24 時間培養した。
- ②陽性対照（ポジティブコントロール）として、 $1 \mu\text{g/ml}$ 濃度のイオノマイシンを添加した。
- ③超高周波ばく露（0.3THz、約 0.5mW/cm^2 ）、Sham ばく露をばく露装置内で 24 時間行い、インキュベータコントロール、ポジティブコントロール処理を通常インキュベータ内で 24 時間行った後、細胞を回収した。

（複合ばく露）

- ④ $1 \mu\text{g/ml}$ 濃度のイオノマイシンを添加した細胞に超高周波ばく露（0.3THz、約 0.5mW/cm^2 ）を 24 時間行った後、細胞を回収した。

（サイトカイン産生量測定：IL-1α）

- ⑤細胞外のサイトカイン測定用として、培養上清を分注し、細胞内のサイトカイン測定用として、付着細胞を Cell lytic 120ul で溶解した。BCA タンパク質アッセイでタンパク量を測定し、濃度を揃えた。
- ⑥スタンダードを作成し、スタンダードおよびサンプルを $50\mu\text{l}$ ずつ well に加え、Standard dilution を各 well に追加し、室温（20～25℃）で 1 時間放置の後、Biotinylated

antibody reagent 50 μ l を各 well に加え、室温（20～25 $^{\circ}$ C）で1時間放置。

⑦Wash buffer で各 well を完全に洗浄（ \times 3）した後、Streptavidin-HRP 溶液を各 well に100 μ l ずつ加え、室温（20～25 $^{\circ}$ C）で30分放置。

⑧Wash buffer で各 well を完全に洗浄（ \times 3）した後、TMB 100 μ l を各 well に加え、室温（暗所）で30分放置。

⑨Stop solution 100 μ l を各 well に素早くピペッティングしながら加え、プレートリーダー（450nm）で測定した。

⑩コントロール、Sham ばく露、0.3THz 超高周波ばく露、ポジティブコントロールにおけるサイトカイン産生量の平均値を統計処理し、有意差を検討した。

（サイトカイン産生量測定：IL-6、IL-8）

⑤細胞外のサイトカイン測定用として、培養上清を分注し、細胞内のサイトカイン測定用として、付着細胞を Cell lytic 120 μ l で溶解した。BCA タンパク質アッセイでタンパク量を測定し、濃度を揃えた。

⑥スタンダードを作成し、スタンダード、ブランク、サンプル用 well に規定量の蒸留水を加えた。

⑦サンプルを 50 μ l ずつ加え、軽く混ぜ、400rpm で揺らしながら室温で3時間放置。

⑧Wash buffer 各 well を洗浄（ \times 6）し、TMB substrate を 100 μ l 加えた。

⑨室温、遮光で10分放置し、Stop solution（100 μ l）を各 well に素早くピペッティングしながら加え、プレートリーダー（450nm）で測定した。

⑩コントロール、Sham ばく露、0.3THz 超高周波ばく露、ポジティブコントロールにおけるサイトカイン産生量の平均値を統計処理し、有意差を検討した。

II-4 アレルギー反応

0.3THz 超高周波ばく露実験に適した細胞として、ヒト皮膚由来角化細胞である HaCaT 細胞を用いてアレルギー反応を検索する試験を行った。今回は、公式に発表された論文では報告がないが、電波ばく露により搔痒（そうよう）感が増すという事例がインターネットなどで報告されている。そこで、電波ばく露により痒み成分として知られているヒスタミンの産生量が増加するかを検索した。使用されたプレートリーダー用試薬は、bertin pharma 社のものを用いた。

実験方法

（超高周波ばく露）

①ばく露用シャーレに1枚当たり 2×10^5 個の HaCaT 細胞を播種し、24時間培養した。

②陽性対照（ポジティブコントロール）として、0.5mM濃度の水酸化ナトリウムを添加した。

③超高周波ばく露（0.3 THz、約 0.5mW/cm²）、Sham ばく露をばく露装置内で 24 時間行い、インキュベータコントロール、ポジティブコントロール処理を通常インキュベータ内で 24 時間行った後、培養上清を回収した。

（複合ばく露）

④0.5mM 濃度の水酸化ナトリウムを添加した細胞に超高周波ばく露（0.3 THz、約 0.5mW/cm²）を 24 時間行った後、培養上清を回収した。

（ヒスタミン産生量測定）

⑤スタンダードを作成し、スタンダードおよびサンプル各 200ul をチューブに取り、derivatization buffer 50ul を加え攪拌した。その後 derivatization reagent 20ul を加え攪拌し誘導体化させた。

⑥Wash Buffer でプレートを洗淨（×5）後、誘導体化したスタンダードおよびサンプルを各 well に 100ul 加える。

⑦各 well にトレーサーを 100ul 加えた後、4℃で 24 時間放置。

⑧Wash Buffer で各 well を洗淨（×5）後、Ellman's 試薬を 200ul 加え、室温暗所下、シェーカーで揺らしながら放置。毎 30 分ごとにプレートリーダー（450nm）で測定した。

II-5 メラニン生成

ケラチノサイト以外に表皮を構成する細胞としてメラノサイトなどが存在する。メラノサイトは、紫外線照射により、メラニン色素を生成し、DNA 損傷から守る働きをする。そこで、0.3THz 超高周波ばく露実験によって、同様の反応が見られるかを検索するため、メラニン生成実験に適した細胞として、ヒト皮膚由来メラニン細胞である NHEM 細胞を用いてメラニン生成量を検索する試験を行った。

実験方法

（超高周波ばく露）

①ばく露用シャーレに 1 枚当たり 1×10^5 個の NHEM 細胞を播種し、24 時間培養した。

②陽性対照（ポジティブコントロール）として、60J/m²の紫外線を照射した。

③超高周波ばく露（0.3 THz、約 0.5mW/cm²）、Sham ばく露をばく露装置内で 24 時間行い、インキュベータコントロール、ポジティブコントロール処理を通常インキュベータ内で 24 時間行った後、細胞を回収した。

（複合ばく露）

④60J/m²の紫外線を照射した細胞に超高周波ばく露（0.3 THz、約 0.5mW/cm²）を 24 時間行った後、細胞を回収した。

（メラニン生成量測定）

⑤メラニン測定濃度を揃えるため回収した細胞のうち 400ul をカウントし、残りをメラニン測定用サンプルとした。

⑥ペレット状にしたサンプルに 1N 濃度の水酸化ナトリウム 250ul を加え 2 分間ピペティングし溶解した。

⑦市販メラニン標準試薬を水酸化ナトリウムに溶解しスタンダードを作成。スタンダードとサンプルを 200ul ずつ well に加えてプレートリーダー(405nm)で測定した。

II-6 ポジティブコントロールの選択

（サイトカイン生成）

昨年度、サイトカイン産生のポジティブコントロールとして、1μg/ml 濃度のイオノマイシンおよび 1μg/ml 濃度のリポ多糖（Lipopolysaccharide, LPS）を使用したところ、イオノマイシン処理においては、全てのサイトカインで有意な差が見られたが、LPS 処理においては、IL-6 の上清で有意な差が見られなかったことから、今回の実験においては、イオノマイシンを使用することを決定した。また、濃度依存的にサイトカインの産生量は増加し、1μg/ml 濃度のイオノマイシン処理で、細胞の致死がないことを確認した。

（ヒスタミン放出）

ヒスタミン放出のポジティブコントロールとして、いくつかの薬品（NaOH、SDS、LPS、イオノマイシン、α-MSH、UV、H₂O₂）を使用したところ、NaOH でヒスタミンが放出されることを確認した。0.1、1.0、10.0mM 濃度の NaOH で処理したところ、0.1 および 1.0mM でヒスタミンの放出があったことから、0.1、0.2、0.5、1.0mM 濃度の NaOH で比較した。そこで、放出量が最大であった 0.5mM 濃度 NaOH をポジティブコントロールとして決定した。

（メラニン生成）

メラニン生成のポジティブコントロールとして、10~120 J/m²の UVB 紫外線照射を行ったところ、細胞の致死はほとんどなく、60 J/m²の UVB 紫外線照射をポジティブコントロールとして決定した。

Ⅲ. 結果と考察

Ⅲ-1. 皮膚免疫応答評価（サイトカイン産生量計測試験）結果

IL-1 α

HaCaT 細胞における、細胞内（細胞抽出物）の IL-1 α 産生量の計測結果を図 7 に示す。細胞内の IL-1 α 産生量は、0.3THz ばく露を行った細胞では、通常インキュベータにおけるコントロールおよび Sham ばく露と有意な差は見られなかった。また、ポジティブコントロールとして、1 μ g/ml 濃度のイオノマイシンで処理した細胞で有意な差 ($p < 0.01$) が見られた。さらに、1 μ g/ml 濃度のイオノマイシンを添加しながら 0.3THz ばく露を行った複合ばく露における細胞では、1 μ g/ml 濃度のイオノマイシンを単独で処理した細胞と有意な差はなかった。

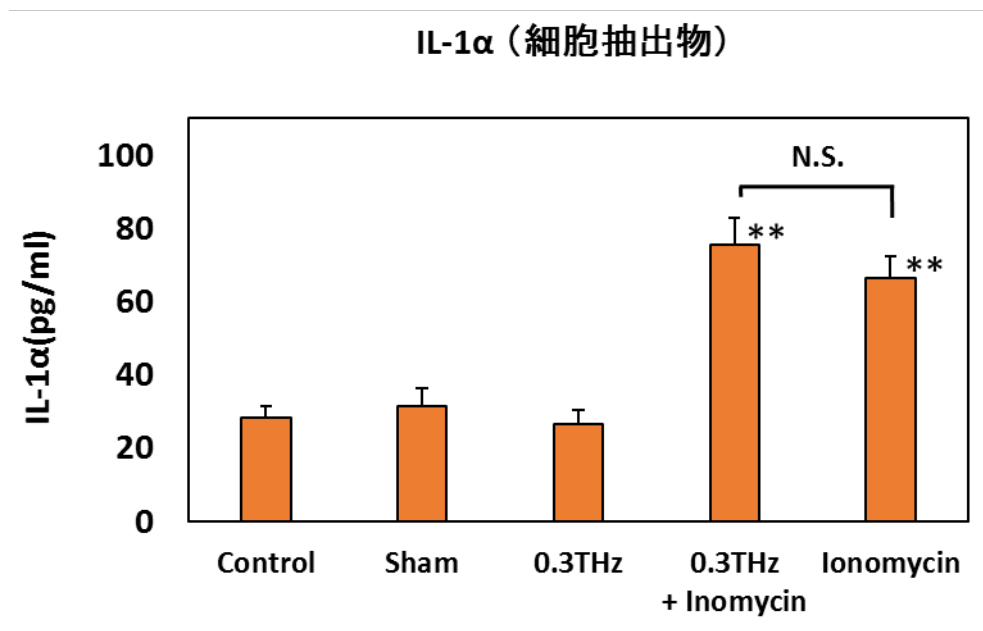


図 7 HaCaT 細胞における細胞内（細胞抽出物）IL-1 α 産生量

IL-6

HaCaT 細胞における、細胞上清中の IL-6 産生量の計測結果を図 8 に示す。細胞上清中の IL-6 産生量は、0.3THz ばく露を行った細胞では、通常インキュベータにおけるコントロールおよび Sham ばく露と有意な差は見られなかった。また、ポジティブコントロールとして、1 μ g/ml 濃度のイオノマイシンで処理した細胞で有意な差 ($p<0.01$) が見られた。さらに、1 μ g/ml 濃度のイオノマイシンを添加しながら 0.3THz ばく露を行った複合ばく露における細胞では、1 μ g/ml 濃度のイオノマイシンを単独で処理した細胞と有意な差はなかった。

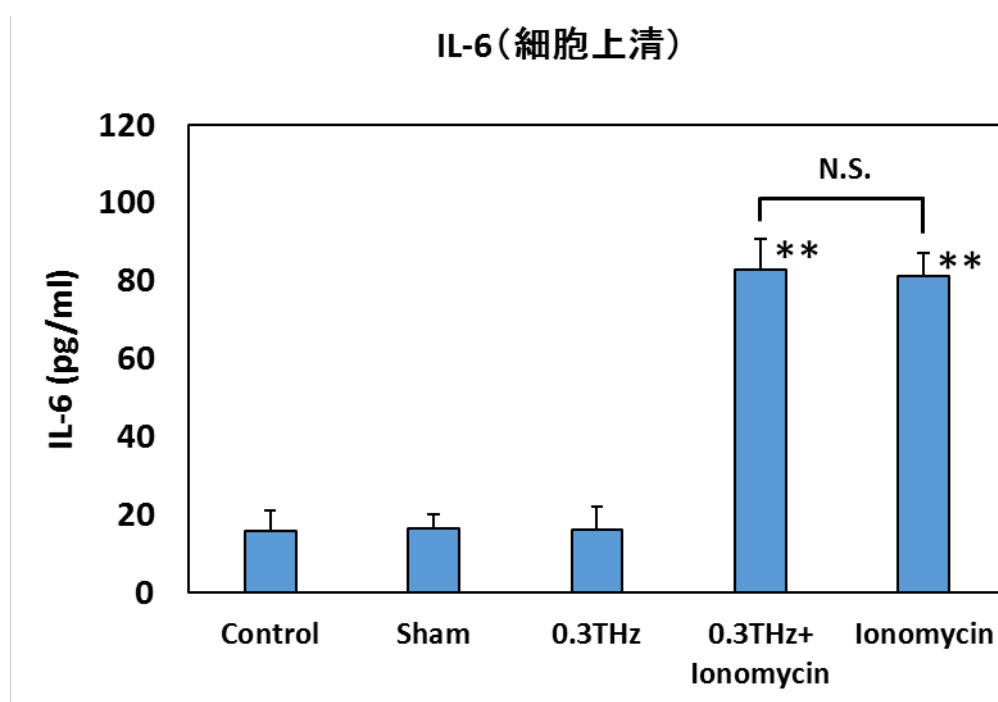


図 8 HaCaT 細胞における細胞上清中 IL-6 産生量

IL-8

HaCaT 細胞における、細胞上清中の IL-8 産生量の計測結果を図 9 に示す。細胞上清中の IL-8 産生量は、0.3THz ばく露を行った細胞では、通常インキュベータにおけるコントロールおよび Sham ばく露と有意な差は見られなかった。また、ポジティブコントロールとして、1 μ g/ml 濃度のイオノマイシンで処理した細胞で有意な差 ($p<0.01$) が見られた。さらに、1 μ g/ml 濃度のイオノマイシンを添加しながら 0.3THz ばく露を行った複合ばく露における細胞では、1 μ g/ml 濃度のイオノマイシンを単独で処理した細胞と有意な差はなかった。

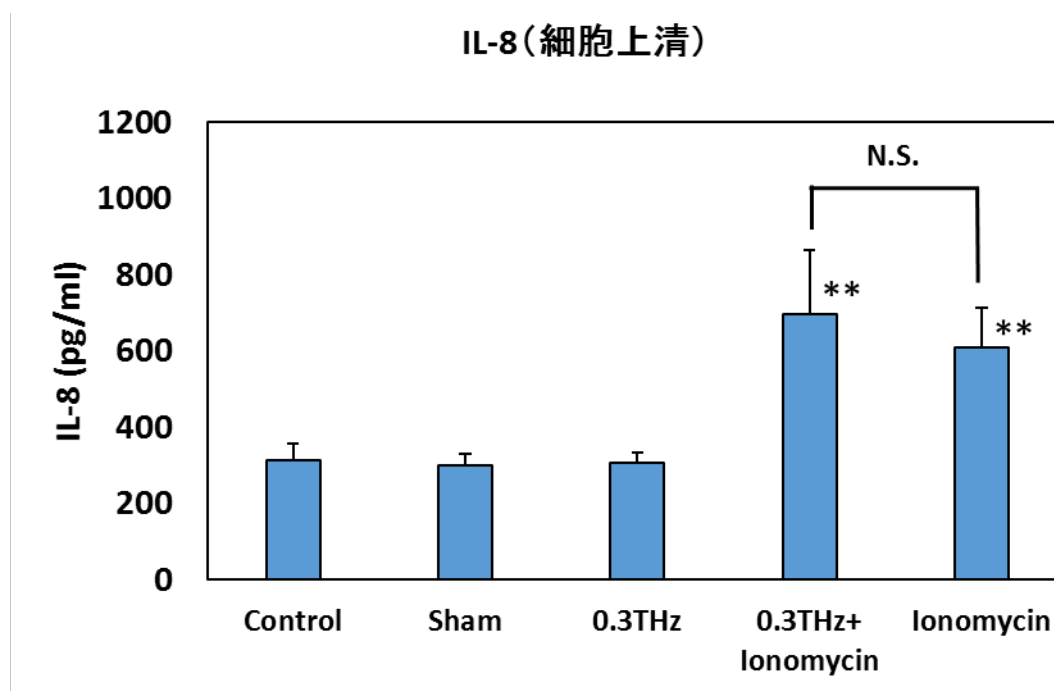


図 9-1 HaCaT 細胞における細胞上清中 IL-8 産生量

III-2. アレルギー反応（ヒスタミン放出量計測試験）結果

HaCaT 細胞における、細胞上清中のヒスタミン放出量の計測結果を図 10 に示す。細胞上清中のヒスタミン放出量は、0.3THz ばく露を行った細胞では、通常インキュベーターにおけるコントロールおよび Sham ばく露と有意な差は見られなかった。また、ポジティブコントロールとして、0.5mM 濃度の NaOH で処理した細胞で有意な差 ($p<0.01$) が見られた。さらに、0.5mM 濃度の NaOH を添加しながら 0.3THz ばく露を行った複合ばく露における細胞では、0.5mM 濃度の NaOH を単独で処理した細胞と有意な差はなかった。

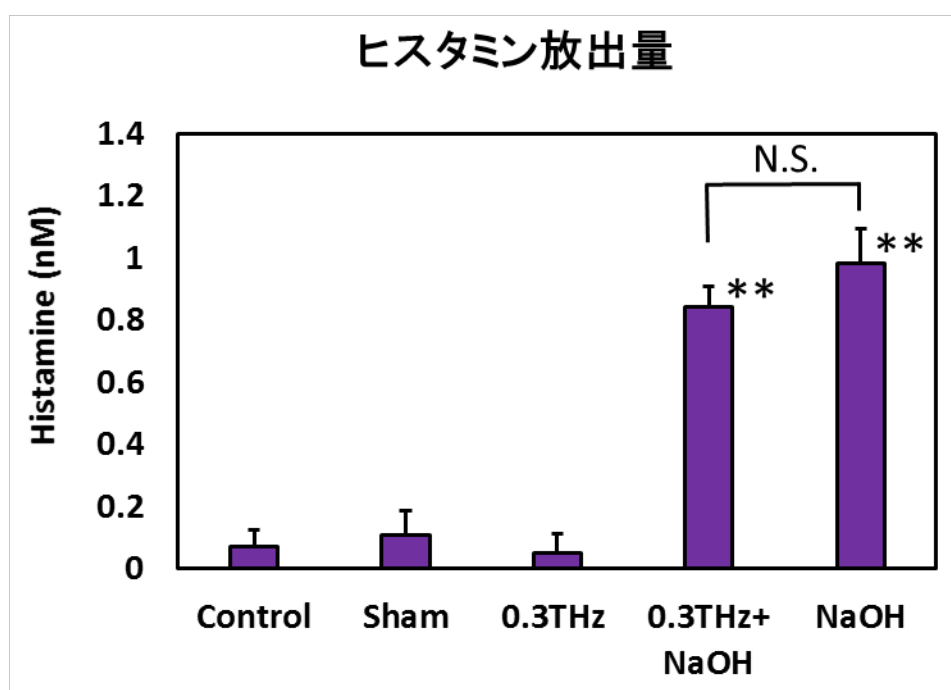


図 10 HaCaT 細胞における細胞上清中ヒスタミン放出量

III-3. (メラニン生成量計測試験) 結果

NHEM 細胞における、細胞内のメラニン生成量の計測結果を図 11 に示す。細胞内のメラニン生成量は、0.3THz ばく露を行った細胞では、通常インキュベータにおけるコントロールおよび Sham ばく露と有意な差は見られなかった。また、ポジティブコントロールとして、60J/m²の紫外線を照射した細胞で有意な差 ($p<0.01$) が見られた。さらに、60J/m²の紫外線を照射した後、0.3THz ばく露を行った複合ばく露における細胞では、60J/m²の紫外線を照射した細胞と有意な差はなかった。

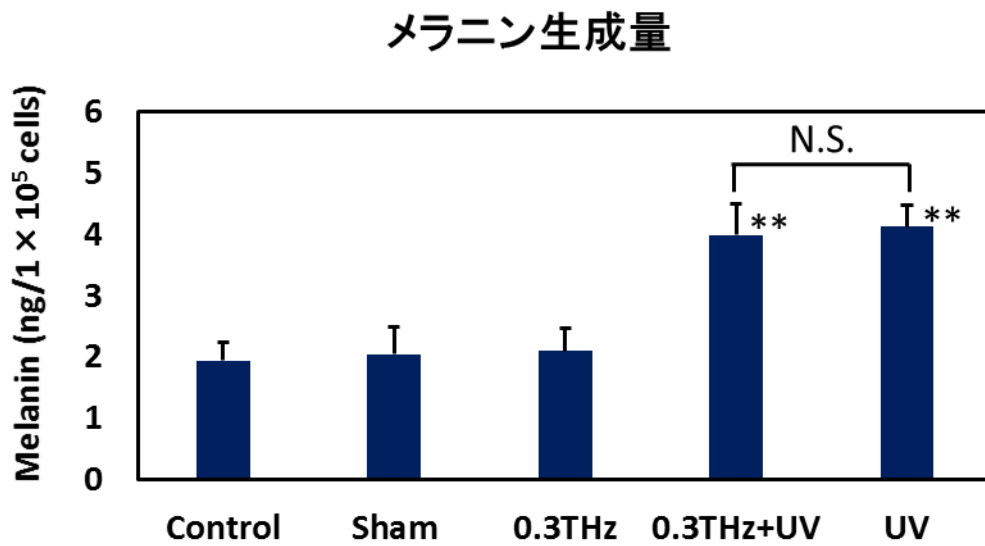


図 11 NHEM 細胞における細胞内メラニン生成量

IV. 平成 29 年度研究成果のまとめと考察

ヒト皮膚由来角化細胞 (HaCaT 細胞) を用いて、0.3THz 超高周波細胞ばく露装置による超高周波ばく露の皮膚免疫応答を調べた。

本試験に先立って行われた細胞動態試験では、0.3THz ばく露に使用するインキュベータがアーチファクトのない培養環境を有しているか確認するため、細胞増殖能、細胞生存率、細胞周期分布の試験を行ったところ、通常インキュベータと 0.3THz ばく露装置内 Sham 部およびばく露部で差が見られなかった。以上の結果から、0.3THz 超高周波細胞ばく露装置は、適切な培養環境を有していることが確認できた。

培養環境が正常であることを確認した上で、HaCaT 細胞に 0.3THz 超高周波ばく露を行い、サイトカインの産生量を測定した。本実験では、0.3THz 超高周波ばく露を行った際の細胞上清および細胞抽出物内における IL-1 α 、IL-6、IL-8 の 3 種類のサイトカインの産生量を、通常インキュベータにおけるコントロール、0.3THz 超高周波細胞ばく露装置内の Sham 部、およびイオノマイシン処理によるポジティブコントロールと比較することで、0.3THz 超高周波ばく露が皮膚免疫応答に変化があるか検索した。また、複合ばく露として、イオノマイシンを添加し、同時に 0.3THz 超高周波ばく露した際のサイトカイン産生について同様に検索した。すべてのサイトカインにおいて、通常インキュベータにおけるコントロール、0.3THz 超高周波細胞ばく露装置内の Sham 部、およびばく露部の産生量に有意な差は見られなかった。また、複合ばく露においても、イオノマイシン単独で処理した細胞とイオノマイシン添加と同時に 0.3THz 超高周波細胞ばく露を行った細胞におけるサイトカイン産生量に有意な差は見られなかった。

アレルギー反応の指標として、ヒスタミン放出量について、0.3THz 超高周波ばく露による影響を検索したところ、通常インキュベータにおけるコントロール、0.3THz 超高周波細胞ばく露装置内の Sham 部、およびばく露部のヒスタミン放出量に有意な差は見られなかった。また、複合ばく露においても、NaOH 単独で処理した細胞と NaOH 添加と同時に 0.3THz 超高周波細胞ばく露を行った細胞におけるヒスタミン放出量に有意な差は見られなかった。

色素細胞の反応として、メラニンの生成量を検索したところ、通常インキュベータにおけるコントロール、0.3THz 超高周波細胞ばく露装置内の Sham 部、およびばく露部のメラニン生成量に有意な差は見られなかった。また、複合ばく露においても、UV 照射した細胞と UV 照射後、0.3THz 超高周波細胞ばく露を行った細胞におけるメラニン生成量に有意な差は見られなかった。

以上の実験から、0.3THz 超高周波ばく露は、皮膚免疫応答の代表的なサイトカイン (IL-1 α 、IL-6、IL-8)、アレルギー反応の指標であるヒスタミン、および色素細胞の反応によるメラニンの生成に対し、本実験では、電波ばく露の有意な差は認められなかった。