

# テラヘルツ波等における非熱作用 の有無に関する研究

予定実施期間: H28-30年度

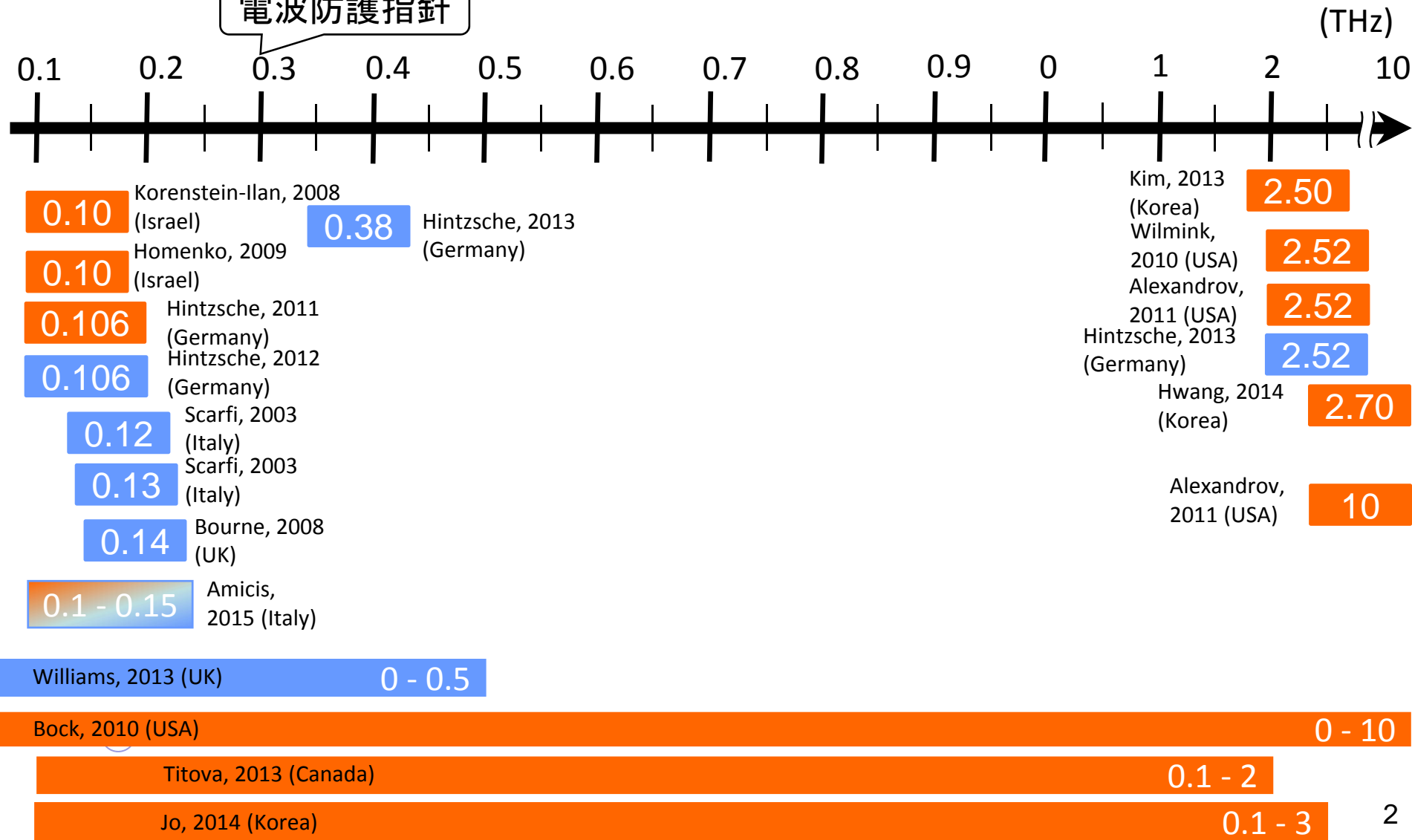
理化学研究所  
京都大学  
(研究協力)  
首都大学東京

川瀬 晃道(研究代表者)・八重柏 典子  
宮越 順二・小山 眞・成田 英二郎  
多氣 昌生

170201 先進的無線システムWG 第3回

# テラヘルツ波の生体影響研究

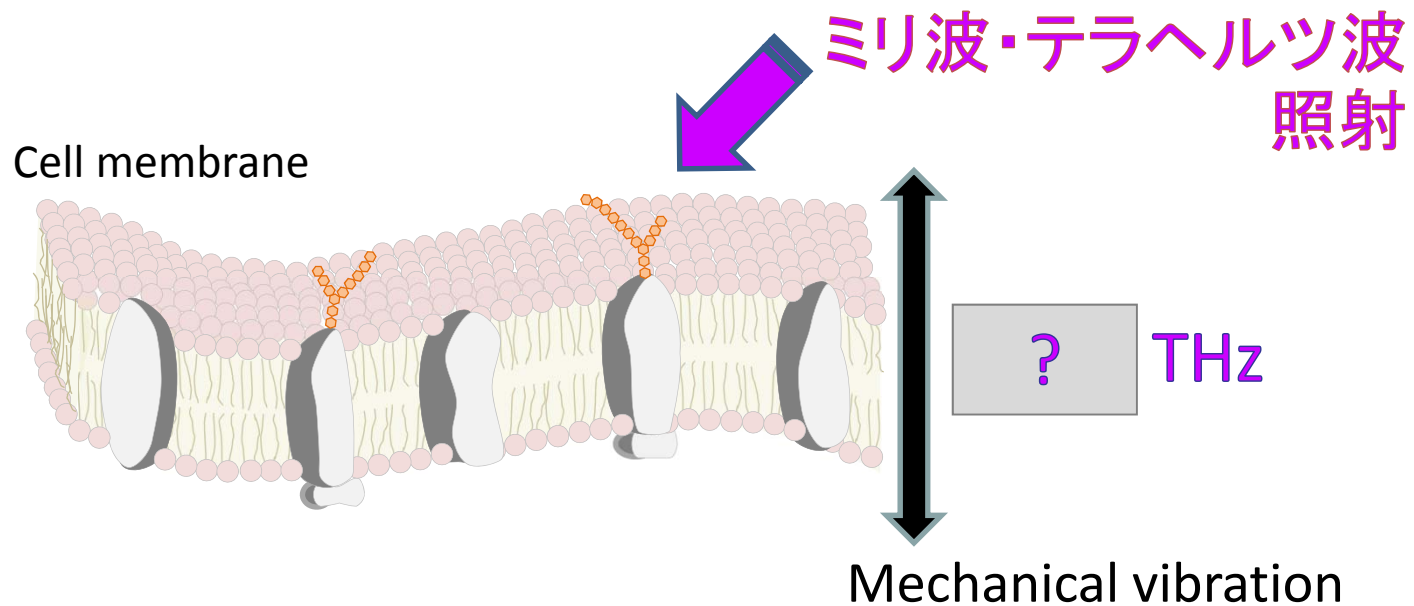
電波防護指針



# 細胞膜のテラヘルツ帯共鳴振動仮説 (フレーリッヒ仮説)

ミリ波・テラヘルツ波(0.1-1 THz)の帯域に、生体膜(二重リン脂質膜)を共鳴振動させる周波数が存在し、何らかの非熱作用が起きるといふ仮説 (H. Fröhlich, 1968)

→ 生体膜への生体影響の可能性



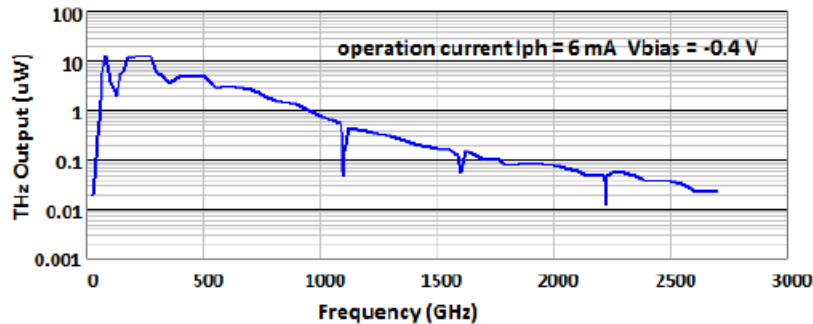
# 研究概要

世界的に急速に研究開発が進むテラヘルツ波が人体に及ぼす影響に関し、国民の不安を解消し、より安全で安心して電波を利用できる環境を確保するため

1. フレーリッヒ仮説を念頭に、培養細胞での300-600 GHzまでの全周波数における非熱作用の有無に関する研究を実施する。
2. 特にテラヘルツ波の生体への陽性報告に関しては、周波数を限定した検証実験を細胞生物学的影響評価により行い、電波防護指針の改定に向けた安全性評価の方向性について実証的な根拠を得る。

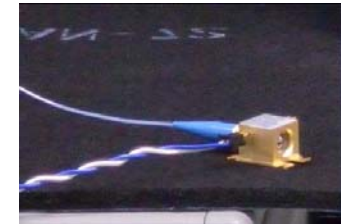
# 1. 300-600 GHzにおける非熱作用に関する研究 使用する光源

## ● 単一走行キャリアフォトダイオード: UTC-PD (NTT Electronics Incorporation)



H. Ito, et al., Proc. of SPIE Vol. 6479, 64790X. 2007.  
T. Ishibashi et al., IRMMW-Thz2013.

- 広帯域周波数可変光源 (CW)
- フォトミキサを使用した差周波掃引ステップ: 1.0 GHz
- 照射範囲: 300-600 GHz
- 出力パワー: <math>< 10 \mu\text{W}</math> **熱作用と区別**



## ● 超短パルス型光源 (EKSPLA)

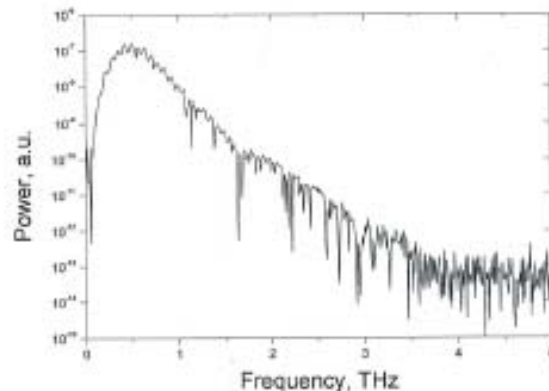


Fig 2. THz pulse FFT spectra in the air (THz emitter serial No.: s/n F1004E).

- 超短パルス
- 出力範囲: 0.1-3 THz
- 繰り返し周波数: 40 MHz
- パルス幅: 1 ps
- 平均出力: 5 nW
- 尖頭値: 1 mW



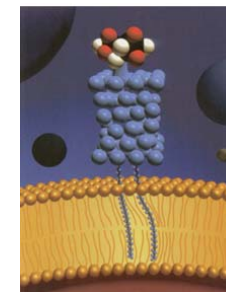
# 1. 300-600 GHzにおける非熱作用に関する研究

## ① 細胞の基本解析におけるばく露影響の検証

- 細胞の増殖測定
- 細胞内酵素活性による細胞活性測定
- ばく露ストレス等の検証

## ② 非熱作用検出のための評価法の検討

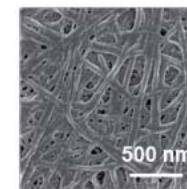
- 蛍光顕微鏡による細胞膜の動態観察



Fluorescent Cell Linker PKH26 (Sigma)

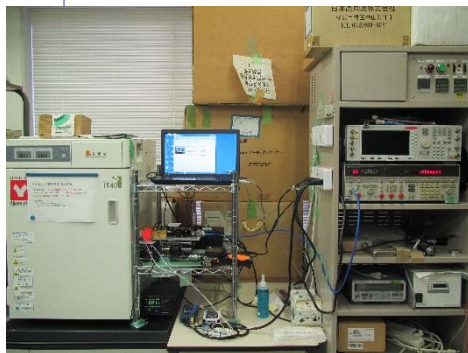
## ③ 実験的皮膚構造モデルにおける非熱作用の検討

- 実験的皮膚モデルの構築
- ばく露による非熱作用の検証

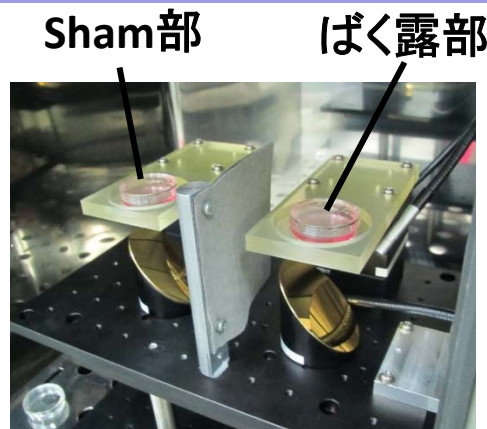


コラーゲン線維(関東化学) 6

## 2. 周波数を限定した細胞実験によるテラヘルツ波ばく露の影響評価で使用するばく露装置



300 GHz波ばく露装置(既存設備)  
37°C、5% CO<sub>2</sub>+95%飽和湿度空気



コントロール用通常インキュベータ  
(既存設備)  
37°C、5% CO<sub>2</sub>+95%飽和湿度空気



100 GHz波帯ばく露装置(既存設備)  
37°C、5% CO<sub>2</sub>+95%飽和湿度空気



- ◆ 300 GHz波ばく露装置(首都大学東京にて設計・作製)のばく露評価・管理を行う。
- ◆ 100 GHz波帯ばく露装置(首都大学東京にて設計・作製)のばく露評価・管理を行う。



## 2. 周波数を限定した細胞実験によるテラヘルツ波ばく露の影響評価

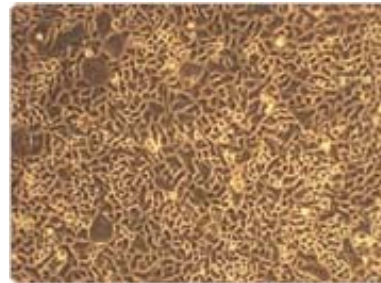
角化細胞(ケラチノサイト)

皮膚断面像

色素細胞(メラノサイト)

皮膚表皮の働き

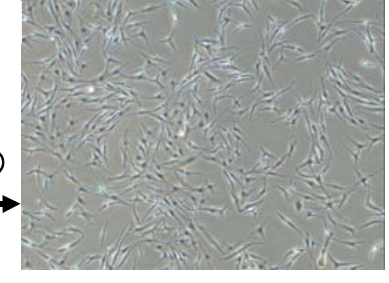
- ・角化作用(内部保護)
- ・皮膚免疫応答
- ・アレルギー反応
- ・メラニン生成



<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-culture/primary-cell-culture/keratinocyte-culture.html>



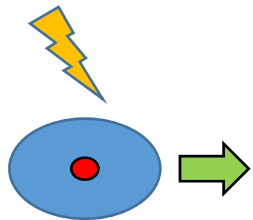
<https://www.google.co.jp/search?q=皮膚断面 画像&client=opera&hs=vsW&biw=1153&bih=787&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwiOzoTXz6HMAhUllaYKHegGAQIQsAQIGg>



<http://www.funakoshi.co.jp/contents/7849>

### ・皮膚免疫応答

- ・抗原 (Antigen)  
細菌、ウイルス等
- ・炎症・外傷  
やけど、紫外線等

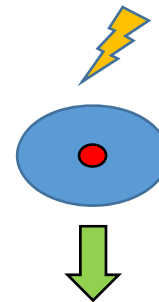


- サイトカイン産生
- ・インターロイキン (IL)  
IL-1 $\alpha$   
IL-3,6,7,12,15,18  
TNF- $\alpha$
- ・ケモカイン  
IL-8
- ・免疫細胞増殖  
GM-CSF
- ・成長因子  
TGF- $\alpha$

アトピー性皮膚炎、アポトーシス等

### ・アレルギー反応

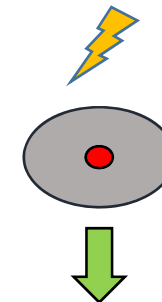
- ・外的刺激  
物理的刺激...乾燥(ドライスキン)  
化学的刺激...化粧品、洗剤等  
アレルギー...花粉、ハウスダスト等



ヒスタミン放出による  
掻痒(そうよう)感の増加

### ・メラニン生成

- ・外的刺激  
物理的刺激...紫外線  
化学的刺激...メラノサイト刺激  
ホルモン



メラニン放出による  
色素沈着等



# 超高周波の電波ばく露による影響 の調査

実施期間：H25-27年度

理化学研究所

川瀬 晃道(研究代表者)・林 伸一郎・八重柏 典子

首都大学東京

多氣 昌生・椎名 健雄

京都大学

宮越 順二・小山 眞・成田 英二郎

170201 先進的無線システムWG 第3回

# 総務省委託研究 生体電磁環境研究 「超高周波の電波ばく露による影響の調査」

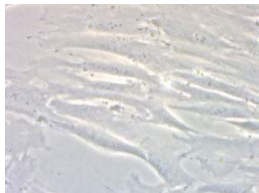
- ✓ 70-300 GHzの全周波数における細胞影響評価・非熱作用の研究(理化学研究所)
- ✓ 120, 300 GHzのばく露装置の開発、ならびにばく露量評価(首都大学東京)
- ✓ 細胞実験による120, 300 GHzのばく露の影響評価(京都大学)



# 70-300GHzにおける非熱作用に関する実験

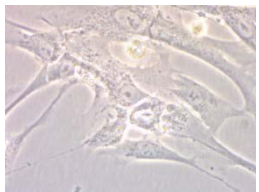
## ばく露実験に使用した細胞

### ■ 正常細胞



ヒト皮膚線維芽細胞 NB1RGB  
Normal human skin fibroblast  
(RCB0222, 理研バイオリソース)

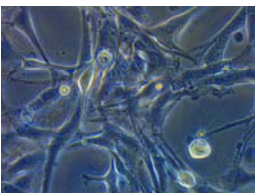
生後3日の男の子の皮膚



正常ヒト線維芽細胞 NTI-4  
Normal human fibroblast  
(JCRB0220, JCRB細胞バンク)

9週目の胎児の胚

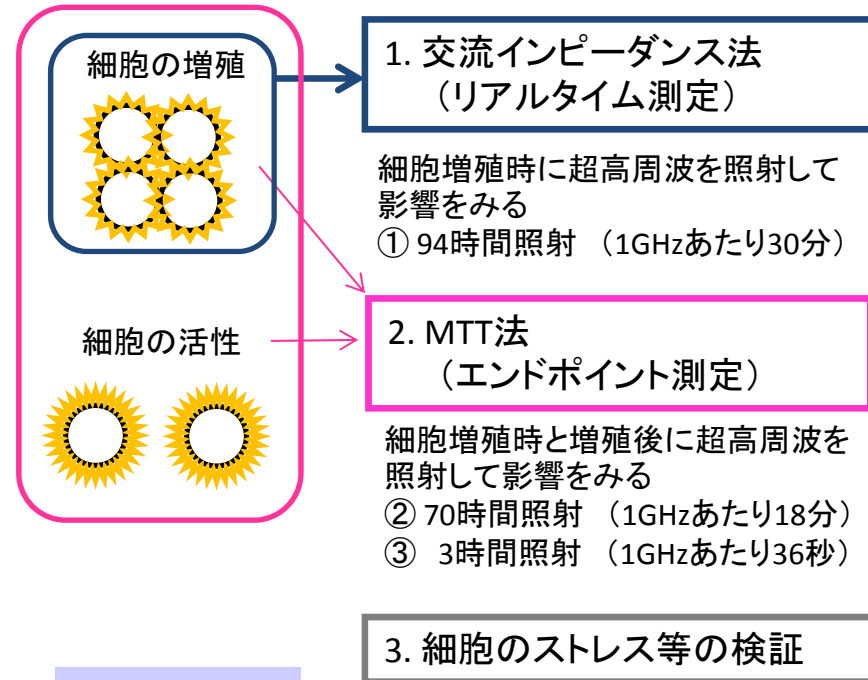
### ■ がん細胞



ヒト神経膠芽腫 A172  
Human cell line derived from  
glioblastoma  
(RCB2530, 理研バイオリソース)

ヒト脳腫瘍 上皮様

## 細胞影響の評価法と照射条件

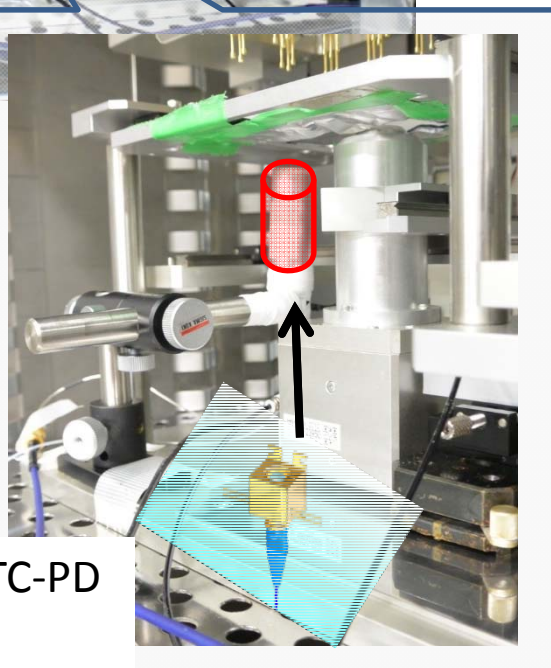
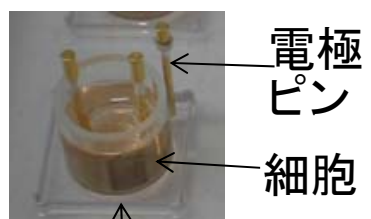
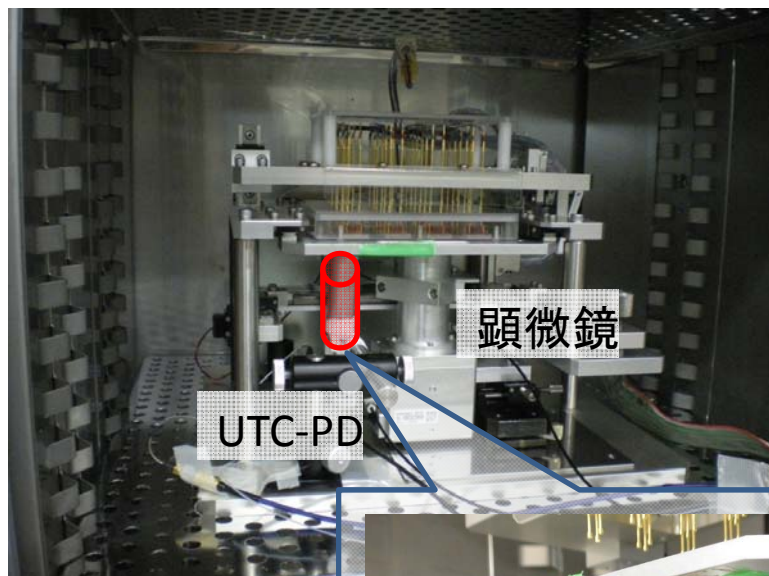


## 照射光源

- 単一走行キャリアフォトダイオード: UTC-PD (NTT Electronics Incorporation)
- 超短パルス型光源 (EKSPLA)

# 70-300GHzにおける非熱作用に関する実験 細胞用ばく露装置とばく露量解析

## 細胞増殖測定：交流インピーダンス測定法



パイプ内部に UTC-PD  
をセットした

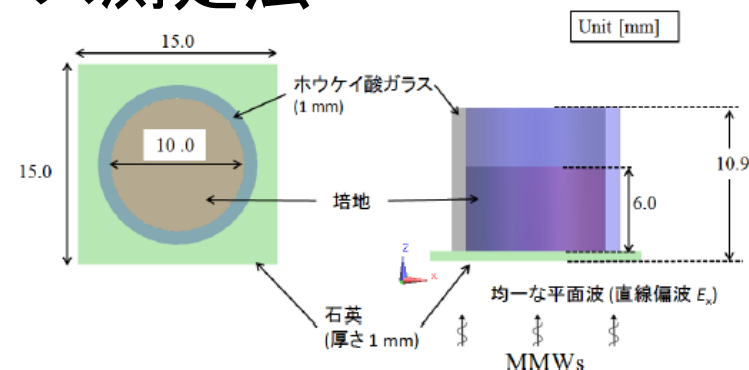


図3-1 Real Time 測定法のばく露評価で用いる計算モデル

- 入力電力:  $10\mu\text{W}$
- 培地内底面のSAR\*の空間平均値

表3-3 Real Time 測定法における各周波数での培地内底面の SAR の空間平均値

Frequency (GHz)	SAR の空間平均値 (W/kg)
70	0.17
100	0.16
200	0.24
300	0.29

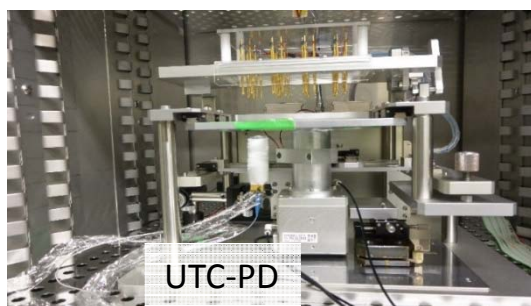
表3-4 Real Time 測定法における各周波数での培地内底面の電界強度の空間平均値

Frequency (GHz)	空間平均値 (mV/m)
70	76.2
100	73.7
200	91.0
300	99.9

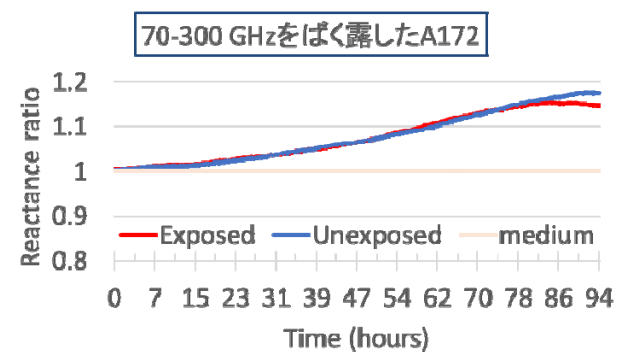
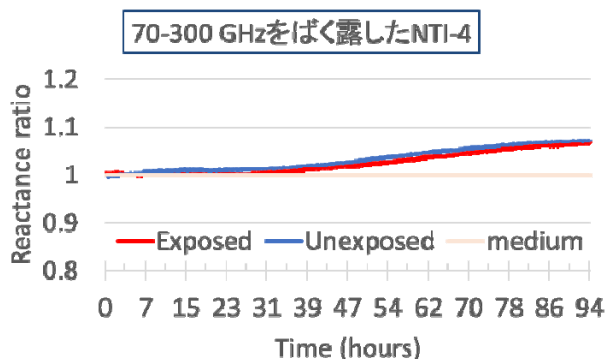
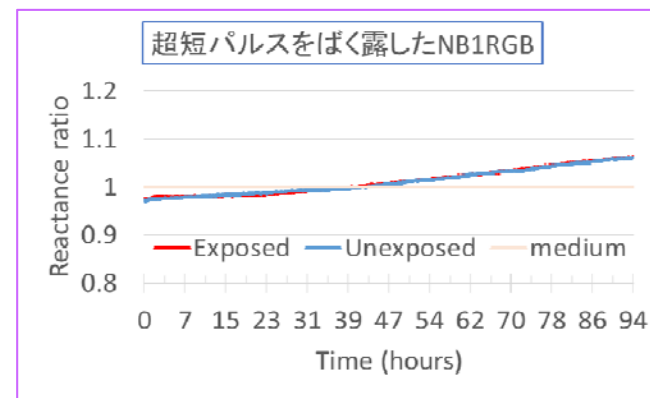
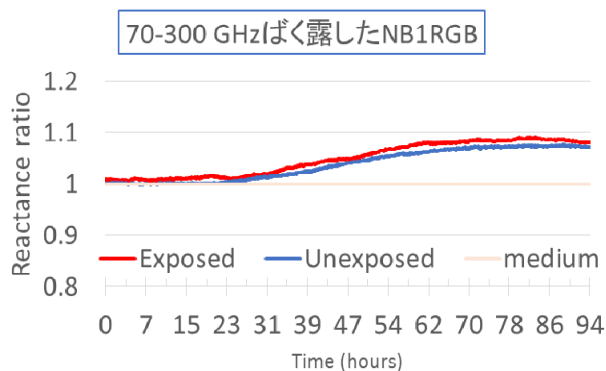
# 結果1 70-300GHzばく露した培養ヒト細胞の増殖曲線

＜方法＞ 70-300 GHzの周波数域を30分ごとに1GHz 変化させながら、または超短パルス照射しながら、細胞の増殖率を5分間隔で94時間、交流インピーダンス測定法により測定した。測定値から、ばく露細胞 (Exposed) と非ばく露細胞 (Unexposed) の細胞増殖への影響を調べた

## 交流インピーダンス測定法におけるばく露装置



(BM2401, HIOKI Inc.)



\* それぞれ独立して3回実験をした平均値

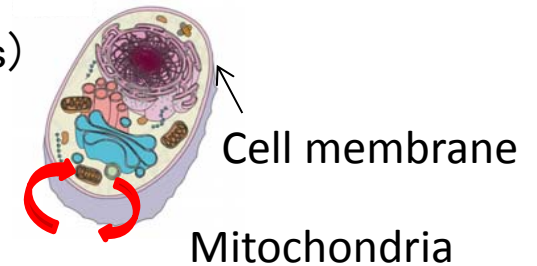
各細胞の増殖において、非ばく露細胞 (Unexposed) とばく露細胞 (Exposed) のリアクタンス比に違いは見られなかった



# 70-300GHzにおける非熱作用に関する実験 ～細胞活性・細胞毒性試験の測定～

比色定量分析用試薬：CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (Promega)

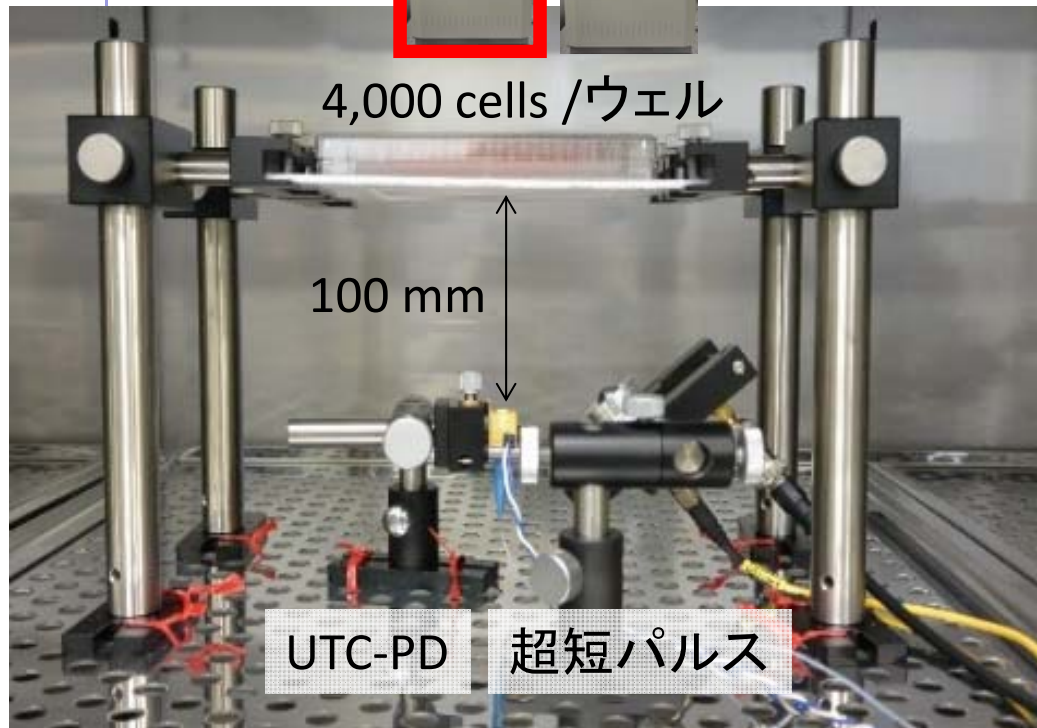
測定機器：iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories)



Exposed



Sham



4,000 cells / ウェル

100 mm

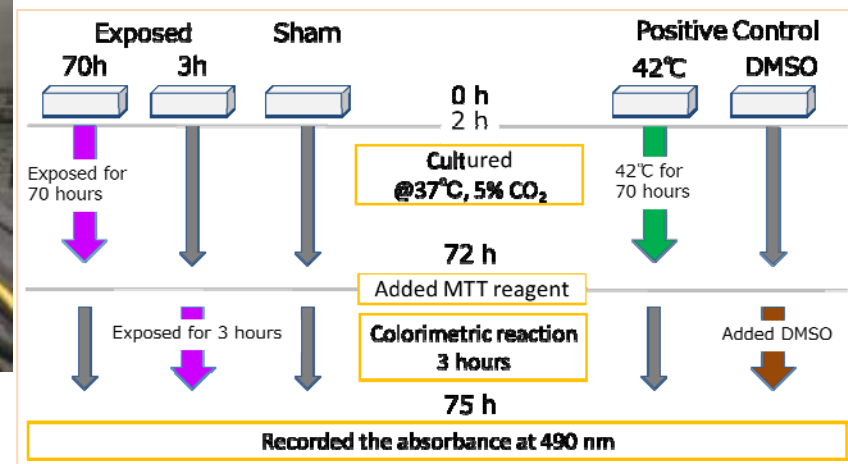
UTC-PD

超短パルス

細胞の呼吸系脱水素酵素により試薬が還元されて色が変わる



吸光度 (Absorbance) 測定





# 70-300GHzにおける非熱作用に関する実験 細胞活性測定用ばく露評価

同時に複数のウェルをばく露するために、ウェル位置によるウェル間のばく露量の差異を評価

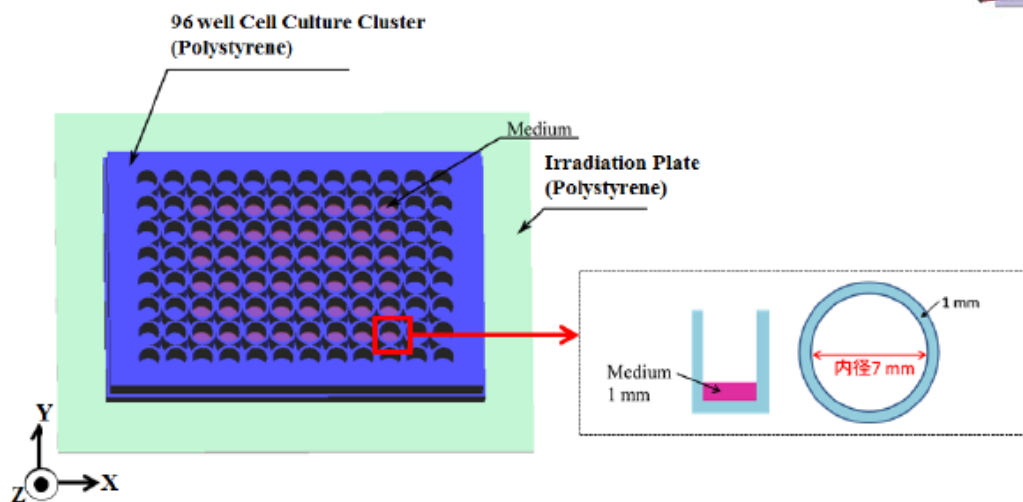


図3-2 End Point 測定法のばく露評価で用いる計算モデル

- 入力電力: 10 $\mu$ W
- 各ウェルでの培地内底面のSARの空間平均値
- 周波数: 80、100、120GHz

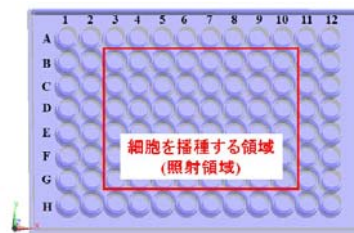


図3-3 96ウェルプレートにおけるウェル番号

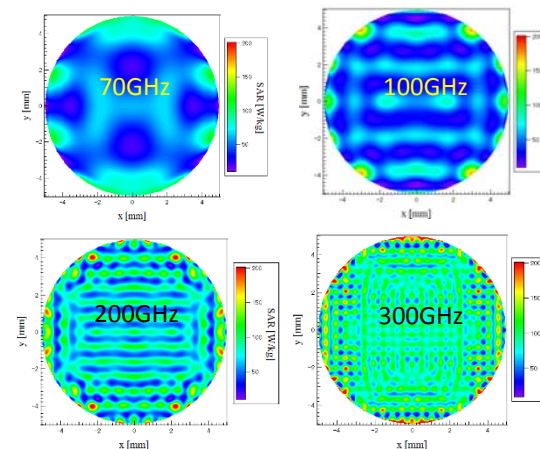
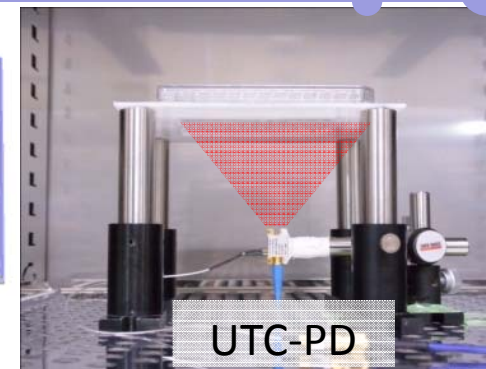
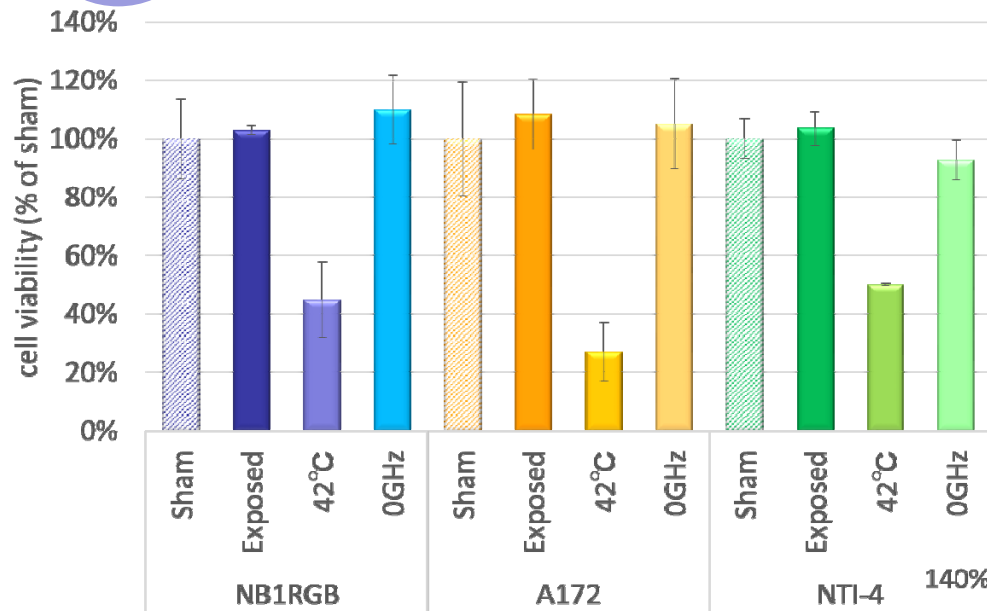


表3-5 100 GHz における End Point 測定法における各ウェルでの培地内底面の SAR の空間平均値 (W/kg)

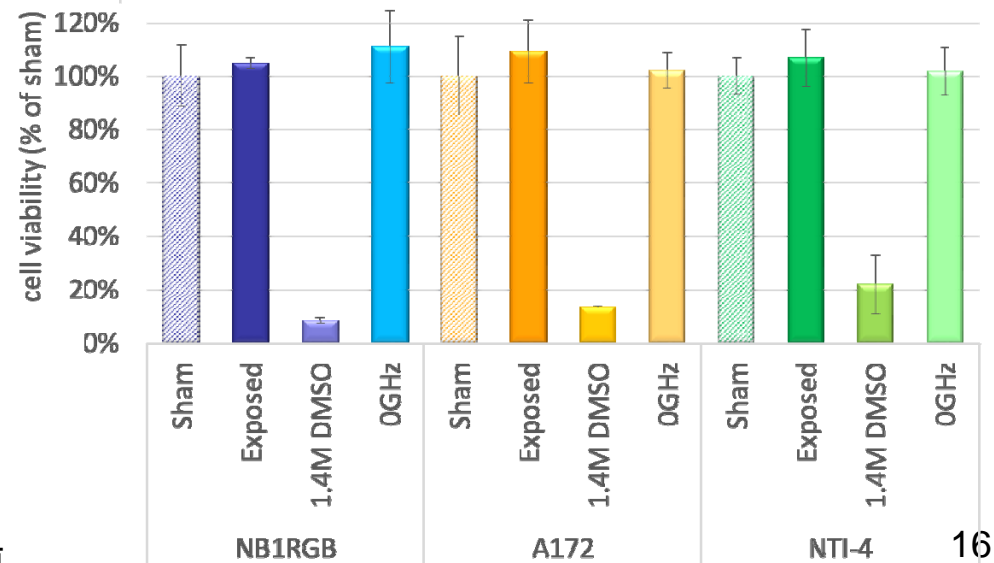
	3	4	5	6	7	8	9	10
B	0.170	0.175	0.176	0.176	0.176	0.176	0.175	0.170
C	0.174	0.176	0.177	0.177	0.177	0.177	0.176	0.174
D	0.173	0.175	0.177	0.177	0.177	0.177	0.175	0.173
E	0.173	0.175	0.177	0.177	0.177	0.177	0.175	0.173
F	0.174	0.176	0.177	0.177	0.177	0.177	0.176	0.174
G	0.170	0.175	0.176	0.176	0.176	0.176	0.175	0.170

## 結果2 細胞活性と細胞毒性試験



70-300GHzを1GHzあたり18分  
70時間ばく露

70-300GHzを1GHzあたり36秒  
3時間ばく露



NB1RGB, A172, NTI-4の細胞で、  
ばく露細胞群 (Exposed) と擬似ばく  
露群 (Sham) の細胞活性に、有  
意な差は見られなかった ( $p < 0.05$ )

\* それぞれ独立して3回実験をした平均値

# 培養細胞のストレス等の検証

～呈色反応法の照射条件におけるHSP70のmRNA検出検討～

Sample NB1RGB, NTI-4, A172

6日間通常培養直後にRNA抽出

43°C: HeatShock (43°Cで2h培養)

37°C: control (37°Cで2h培養)

Primer Set

ヒートショックプロテイン70: HSP70

Sample: 5μL+MidoriDirect 1μL

(日本ジェネティクス株式会社)

	43°C	37°C
Fibroblast	1	2
NTI-4	3	4
A172	5	6

この2サンプルを配列解析し、  
HSP70であることを確認

RT-PCR condition

50°C 30min → 94°C 2min

94°C 30sec

60°C 30sec

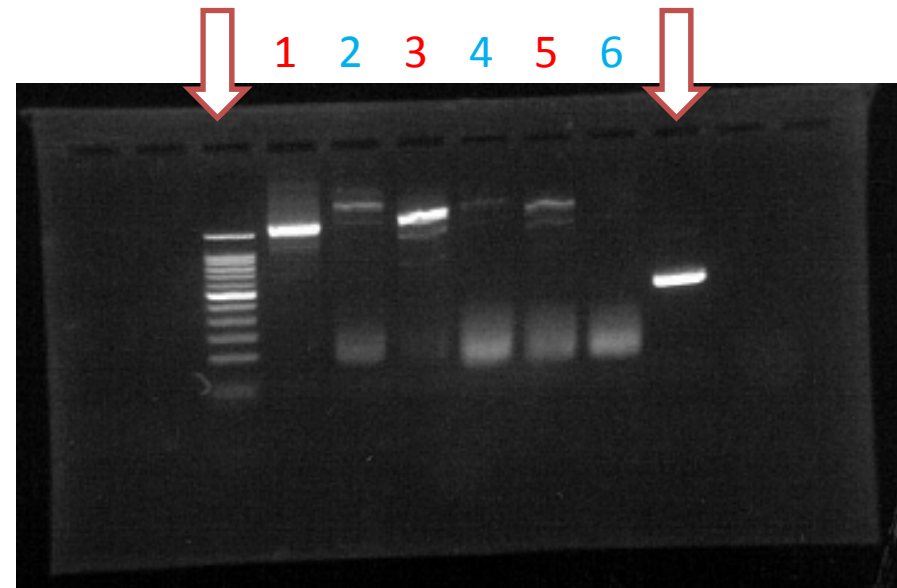
72°C 60sec

→ 4°C

30 cycles

100 bp ladder (SMO)

PCR control



中心バンド: 500bp

2% Agarose Gel, 0.5x TAE Buffer, 100V 28min

# 培養細胞のストレス等の検証

70-300 GHzをばく露した直後の細胞から、mRNAを抽出し、RT-PCR法によりcDNAを合成して、ストレス等で増加するHSP70のmRNA産出量の検証を行った

## Sample

	Exposed 94h	Exposed 70h	Control
NB1RGB	1	2	3
A172	4	5	6
NTI-4	7	8	9

## Primer Set

No.1: HSP70

No.2:  $\beta$ -actin  
(内部標準)

## RT-PCR condition

50°C 30min → 94°C 2min

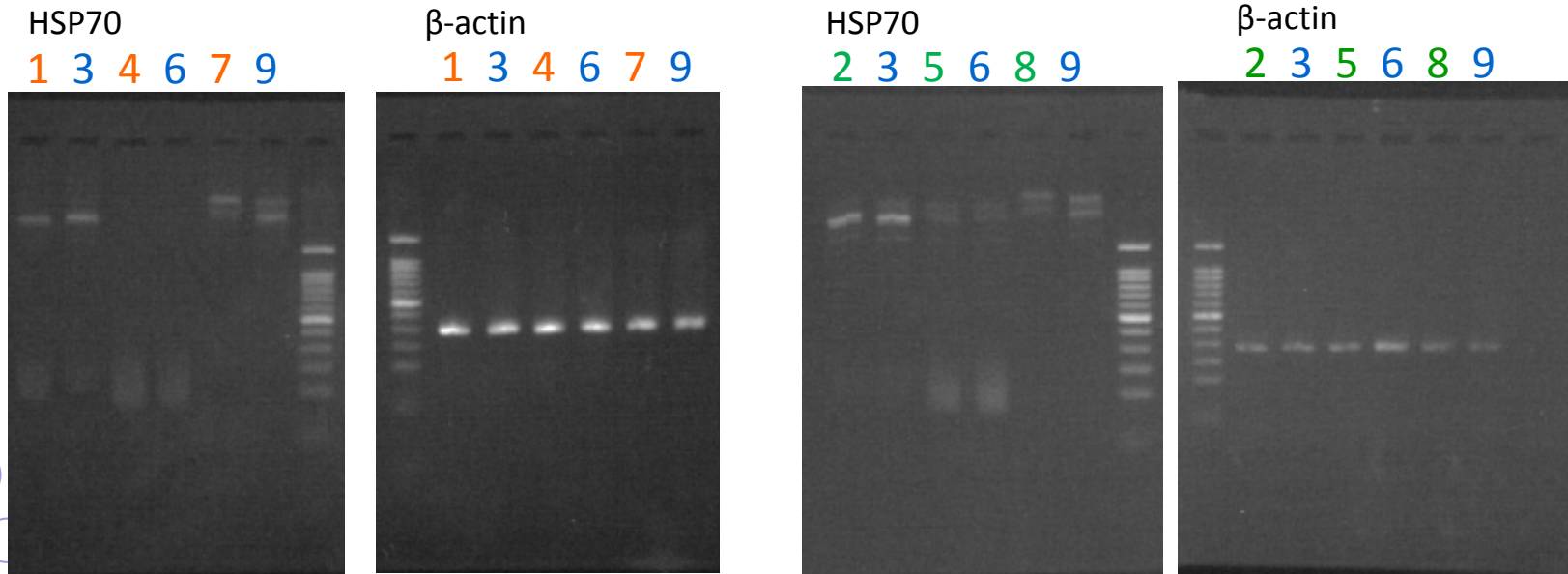
94°C 30sec  
60°C 30sec

72°C 60sec → 4°C

30 cycles

Exposed 94h

Exposed 70h



100 bp ladder (SMO) 中心バンド: 500bp  
2% Agarose Gel, 0.5x TAE Buffer

# 「超高周波の電波ばく露による影響の調査」 ～細胞実験による120, 300 GHzのばく露の影響評価～

1. 0.12, 0.3THz超高周波帯電波ばく露装置の培養環境の検証  
首都大学東京作製による0.12, 0.3THz超高周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**を、増殖能、コロニー形成能、細胞周期分布などについて調べる。
2. 0.12, 0.3THz超高周波帯電波ばく露による細胞影響評価  
0.12, 0.3THz超高周波帯電波細胞ばく露装置を用いて、**遺伝毒性**に関して細胞実験を行う。

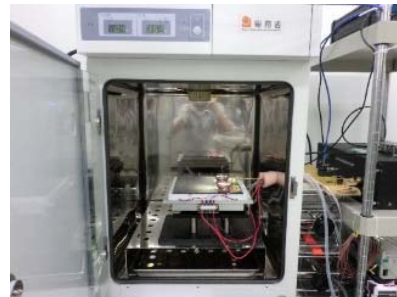
1. 細胞増殖能	}	0.12, 0.3THzばく露用インキュベータの検証
2. コロニー形成能		
3. 細胞周期分布		
4. 小核形成試験	}	0.12, 0.3THzばく露実験
5. 形態変化		
6. ストレスタンパクの発現		



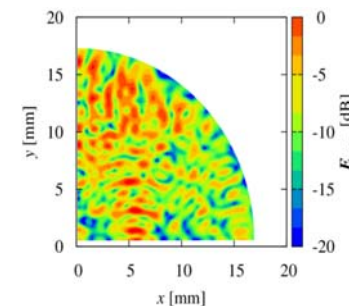
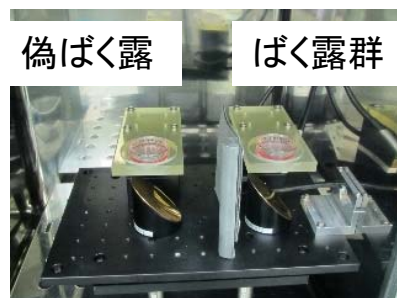
# 細胞実験による120, 300 GHzのばく露の影響評価 ～0.12, 0.3THzばく露装置開発とばく露評価～



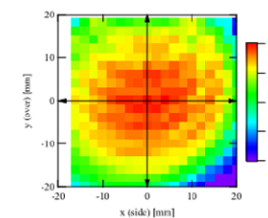
0.12THzばく露用インキュベータ(37°C、5% CO<sub>2</sub>、湿度100%)



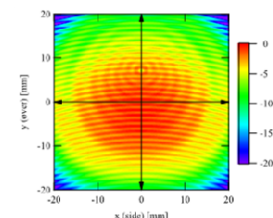
0.3THzばく露用インキュベータ(37°C、5% CO<sub>2</sub>、湿度100%)



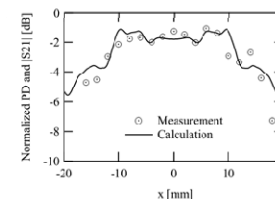
培地内底面におけるSAR分布(計算値)



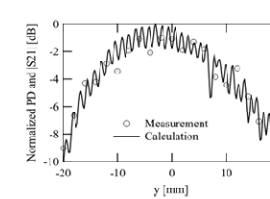
入射電力密度の実測値(|S21|)で測定



入射電力密度の計算値



x方向ライン上



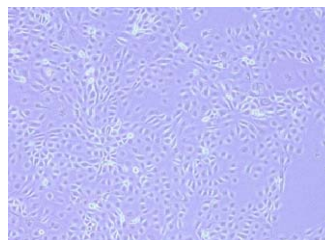
y方向ライン上

入射電力密度の実測値と計算値の比較

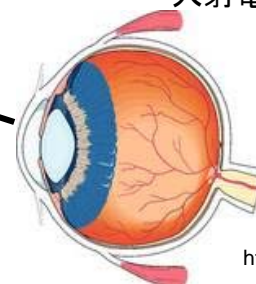
## ～実験に用いた細胞～

### HCE-T 細胞

(ヒト角膜由来上皮細胞)  
 首都大学東京より分与



角膜

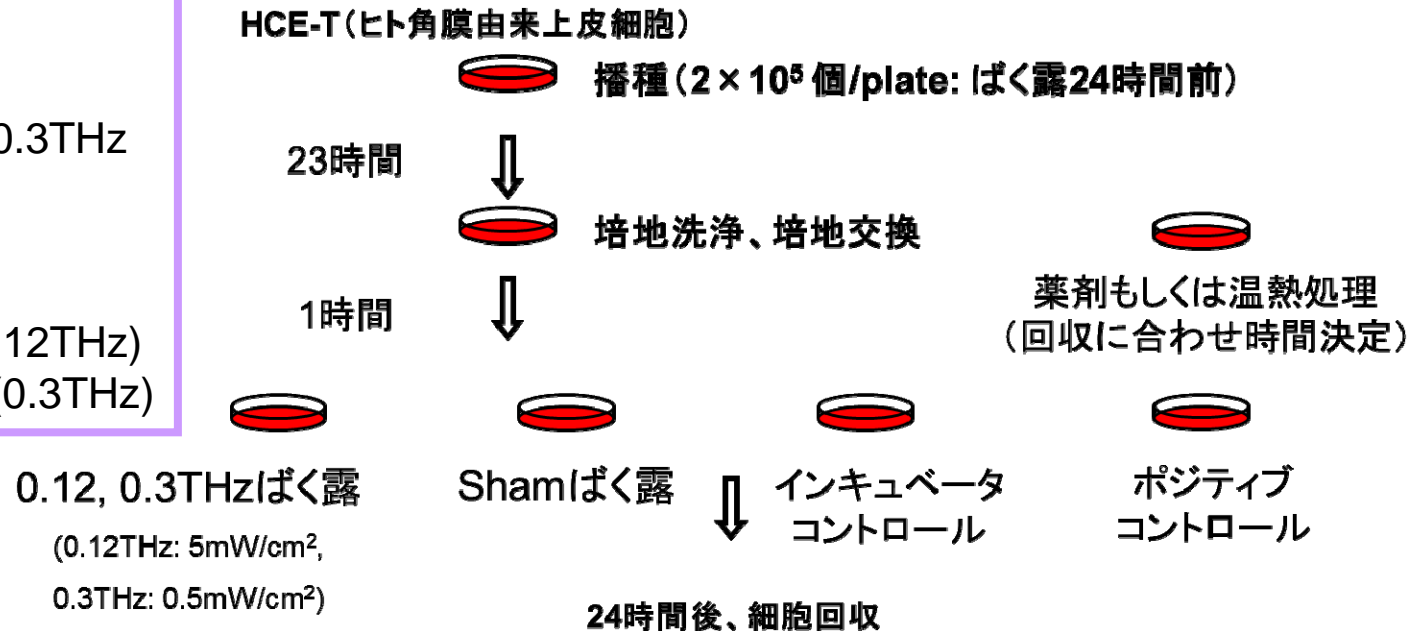




# 細胞実験による120, 300 GHzのばく露の影響評価 ～ばく露条件および方法～

## ばく露条件

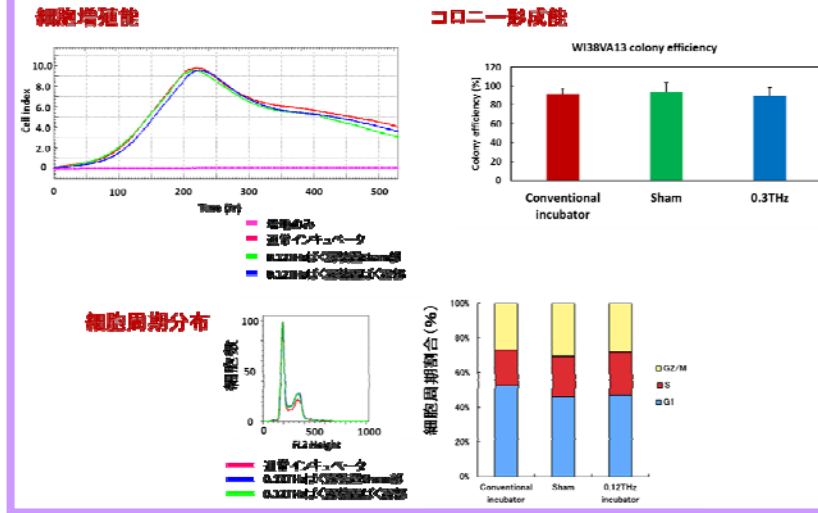
- ・周波数:  
0.12および0.3THz
- ・ばく露時間:  
24時間
- ・電力密度:  
5mW/cm<sup>2</sup> (0.12THz)  
0.5mW/cm<sup>2</sup> (0.3THz)



HCE-T細胞を用いて、電波ばく露(0.12THz (5mW/cm<sup>2</sup>), 0.3THz、(0.5mW/cm<sup>2</sup>), 24時間)することによって、細胞の遺伝毒性(小核形成試験)、細胞機能(形態変化)、生理的影響評価(ストレスタンパクの発現(Hsp70, Hsp90 $\alpha$ , Hsp27))を評価した。

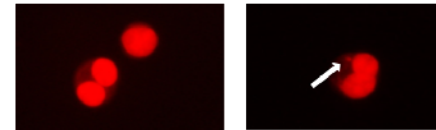
# 結果：細胞実験による120, 300 GHzのばく露の影響評価

## ～細胞動態試験～



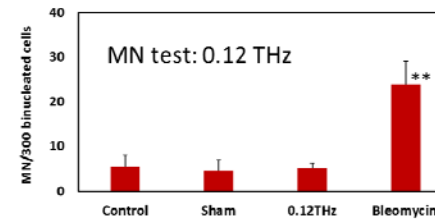
## ～小核形成試験方法および結果～

### 小核形成試験結果の一例

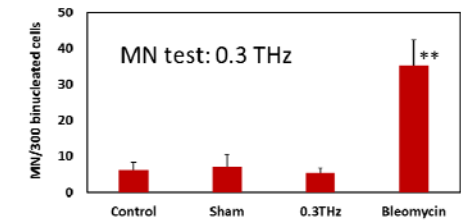


核分裂のみをおこし細胞質分裂を阻害するサイトカラシンを加え、二核細胞になった細胞における小核を顕微鏡にてカウントした。

### HCE-T MN frequency (0.12 THz)

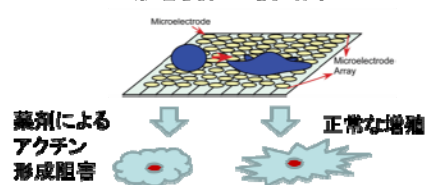


### HCE-T MN frequency (0.3 THz) (\*\*p<0.01)

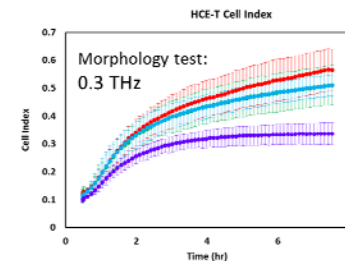
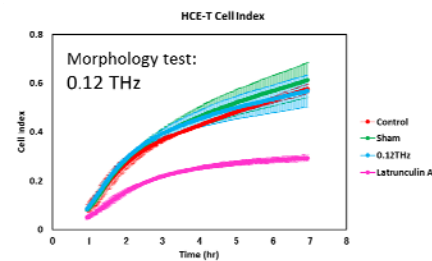


## ～形態変化試験方法および結果～

### 形態変化の模式図

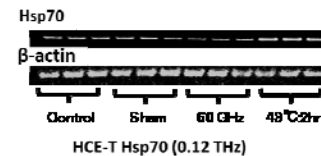


形態変化は、播種直後から4~6時間程度で細胞は底面に定着するまでの形態変化をCell Indexにて観察する

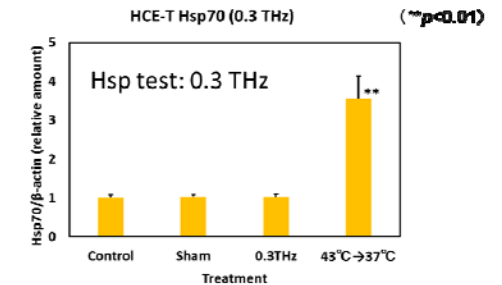
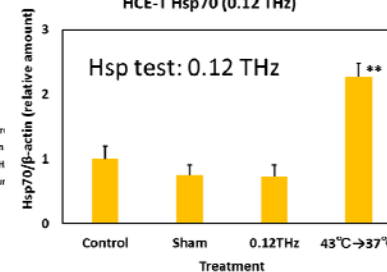


## ～ストレスタンパクの発現実験方法および結果～

### ストレスタンパク ウェスタンブロッック結果の一例



Heat Shock Protein (Hsp) は、熱・酸・アルカリなどのストレスにより発現が上昇し、細胞を保護しようとするタンパク質で、分子量により分類されており、働きが異なる。今回は、Hsp70, 90α, 27の3種類のHspの検出を行った。影響が大きいほど発現量が変化する。



# 「超高周波の電波ばく露による影響の調査」 まとめ

広帯域周波数可変ミリ波源であるUTC-PDを用いて、70-300GHzを1.0GHzステップで掃引して、10 $\mu$ W以下の強度で、3～94時間連続的にばく露した結果、

- ◆ 培養細胞である正常細胞とがん細胞の細胞増殖、細胞活性において、ばく露による影響はみられなかった
- ◆ ばく露による細胞毒性や細胞へのストレス等の反応もみられなかった
- ◆ 特定の周波数における細胞への変化は確認できず、フレイリッヒ仮説に基づく細胞膜の共鳴振動やそれらを引き起こす周波数は確認できなかった

0.12、0.3THz超高周波帯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した結果、

- ◆ ヒト角膜由来上皮細胞(HCE-T)における小核形成、形態変化ならびに、ストレスタンパクの発現、全ての実験において、コントロール、Shamばく露、0.12、0.3THz超高周波帯ばく露において、有意な差は観察されなかった
- ◆ 従って、0.12、0.3THz超高周波帯ばく露の非熱的長期ばく露は細胞の小核形成、形態変化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。