

平成28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29年3月

総務省

(以下、理化学研究所 受託分)

目次

I. 要旨	3
II. 研究目的	3
III. 実施内容	4
ア) 300-600 GHz における非熱作用に関する研究	4
アー 1 300-600 GHz ばく露装置の開発およびばく露評価法の検証	4
・ばく露装置の開発とばく露評価	4
・ばく露装置の培養環境の検証	7
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	8
・ばく露細胞と非熱作用検出のための評価法の検討	8
IV. 結果	9
アー 1 300-600 GHz ばく露装置の開発およびばく露評価法の検証	9
・ばく露装置の開発とばく露評価	9
・ばく露装置の培養環境の検証	13
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	13
・ばく露細胞と非熱作用検出のための評価法の検討	13

I. 要旨

H28年度の実施計画書に基づき「300-600GHz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)300-600GHzのばく露装置の開発とばく露評価の検証 (2)ばく露装置の培養環境の検証 (3)ばく露細胞と非熱作用検出のための評価法の検討 を実施し、おおむね目標を達成した。達成状況として、(1)300-600GHzのテラヘルツ波光源が安定して動作するよう装置の確立を行った。装置のばく露量評価について、既存の測定法で検出できるか検討を行った。出力が測定できた光源を新たな実験装置に組み込むため、ばく露装置の開発を行った。(2)ばく露実験に適した細胞の検討・培養条件の検討を行い、細胞の選出を行った。CO₂インキュベータ庫内温度変化のモニタリングを行い、熱生成の有無について検討した。(3)培養細胞で評価法の検討を行った。他の細胞や評価法の検討についても実施した。

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・新規特定の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。このような背景から、本研究において、皮膚(低レベル、長期ばく露)の研究データ蓄積を目標として、非熱作用の細胞照射実験を行う。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、連続波(CW)やパルス波の光源を用いて、主に300-600 GHzまでの全域での生体安全性を検証することを目的とする。

非熱作用の検証実験で使用する光源としては広帯域周波数可変で掃引できる照射系のUTC-PDと超短パルス型照射系の2つを用いて、300-600 GHzまでの周波数を掃引しつつ培養細胞へのばく露実験を繰り返し行い、非熱作用に関するデータを取得する。

300-600 GHzまで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基礎的な検討、弱いパワーによるばく露実験を理化学研究所が実施する。

本研究は、テラヘルツ波を用いた通信やイメージングなど様々な利用技術の開発が進められている中で、テラヘルツ波の非熱的な作用により人体の健康に

好ましくない影響を与える可能性を調べ、評価することを目的としている。研究期間で得られた成果から、テラヘルツ波等における非熱作用の有無に関して基礎的検討を行う。

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 ばく露装置の開発および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

Ⅲ. 実施内容

ア) 300-600 GHz における非熱作用に関する研究

アー 1 300-600 GHz ばく露装置の開発およびばく露評価法の検証

- ・ ばく露装置の開発とばく露 評価

非熱作用に関する研究を実現するには、600 GHzまでの周波数におけるばく露装置の開発とばく露量評価に関する方法を検討する必要がある。ばく露に用いる光源として、周波数可変光源(単一走行キャリアフォトダイード(UTC-PD)による差周波数発生)および広帯域光源(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300-600 GHzまでの周波数域で安定して動作するよう装置の構築を行う。また照射するパワーが数 μ W程度以下と弱いため、装置内におけるばく露量評価について検討を行う。

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波長可変光源(UTC-PD)の動作概念図および外観写真を示す。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から数百GHzまで連続的に可変できる数少ない光源のうちの一つである。ダイオード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。左上方より近赤外用光ファイバー(白色)によって周波数の異なる2種類の近赤外光を重ねてダイオードへ入射し、左下電線(青白)により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。発生したテラヘルツ光は右側の超半球レンズ(銀色)を透過して外へ取り出される。

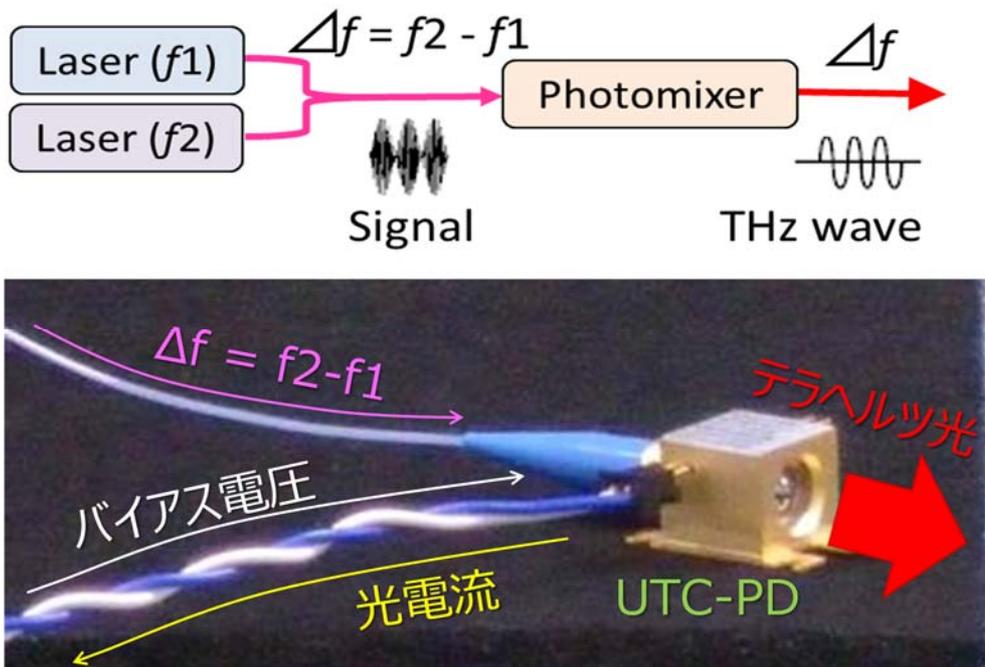


図 1. 周波数可変光源概念図（上図）および単一走行キャリアフォトダイオード（Uni-Travelling Carrier Photo Diode）写真（下図）

UTC-PD上に周波数の異なる2種類の近赤外光を同時に照射すると、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光を発生させることができる。本実験においては、 $1.5\ \mu\text{m}$ 帯の2つの狭線幅半導体レーザー光源を用意した。一方はアセチレンガスの吸収線に周波数を固定しておき、他方の周波数を掃引することによって発生するテラヘルツ光の周波数を制御した。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2.5THz以上まで、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単調に減少しており、1THz以下で $1\ \mu\text{W}$ 以上が得られている。

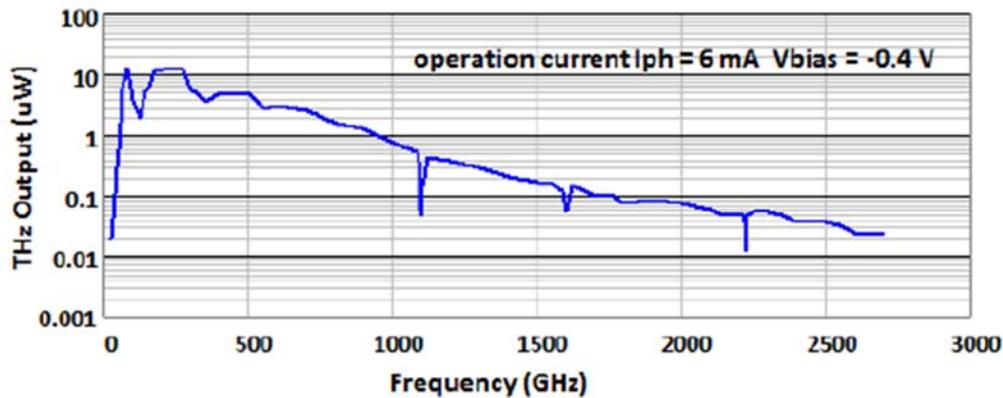


図 2. UTC-PDを利用した周波数可変光源の出力の周波数依存性

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 3 に、出力総量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。

出力校正を行った後、リアリタイム計測実現のため、マルチモードマイクロプレートリダー装置への組み込みを行った。

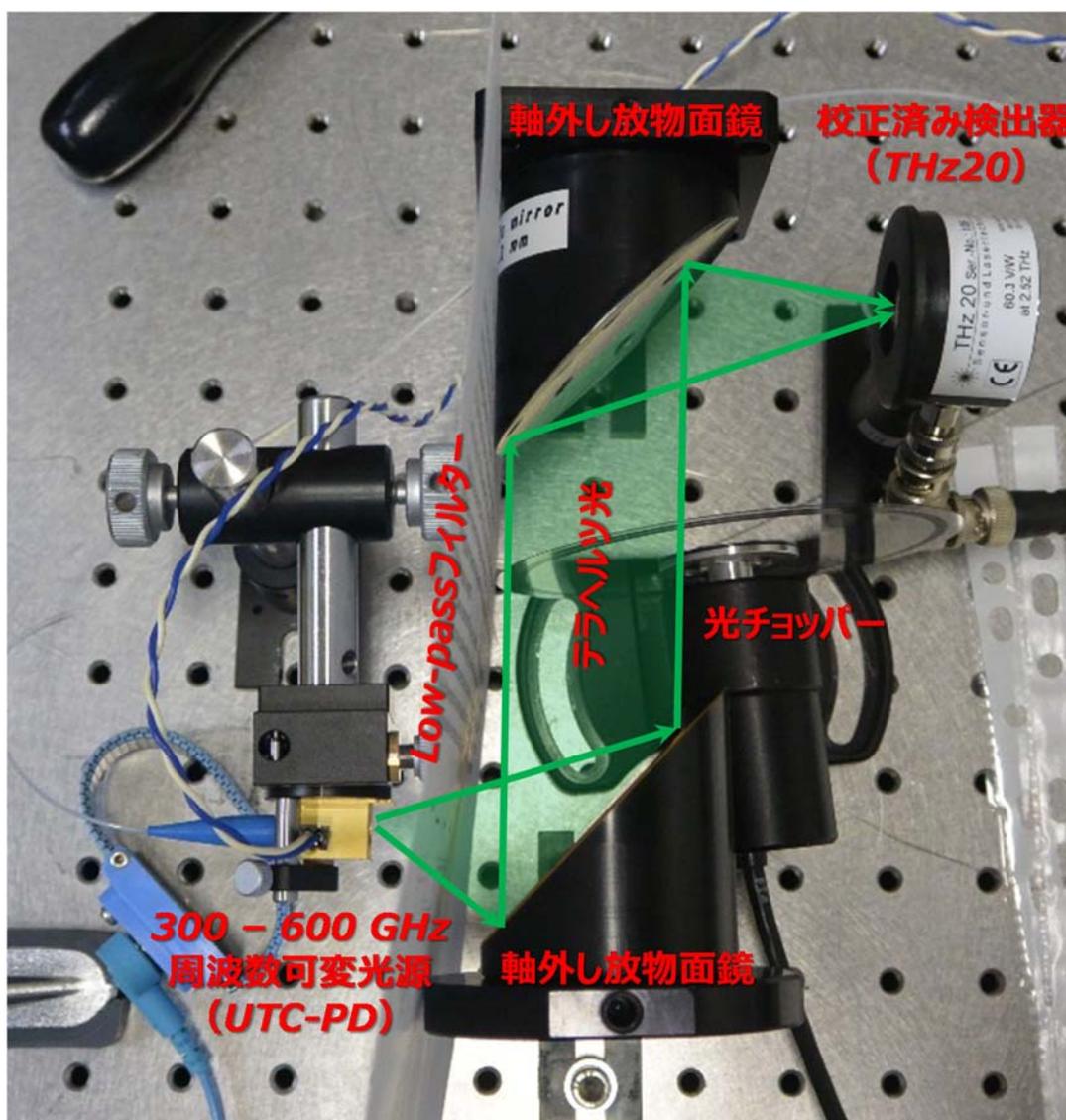


図 3. テラヘルツ光出力測定のための実験系写真

・ばく露装置の培養環境の検証

ばく露装置の確立を行いながら、正常培養環境を保持しているかについて、培養環境の検証を行う必要がある。このため、テラヘルツ波照射時におけるCO₂インキュベータ庫内の温度変化のモニタリングを行い、熱生成の有無について検討を行う。光源には図1で示した周波数可変光源を使用した。この光源のテラヘルツ波の発生による温度変化を検証した。照射条件は、細胞活性率測定時のばく露条件である70時間とし、細胞を培養プレートに播種し、インキュベータ庫内で2時間静置、培養した。その後、テラヘルツ波の照射を開始した。照射範囲

は300-600GHzであり、13分47秒ごとに1GHzずつ掃引した。掃引回数は1回である。温度変化測定には、図4の写真にある4-channel digital thermometer (MT-309, 株式会社マザーツール) を、センサにはビーズ型K熱電対4本を使用し、5分毎に測定した。温度分解能は0.1°C, 精度は±0.2%+1°Cである。

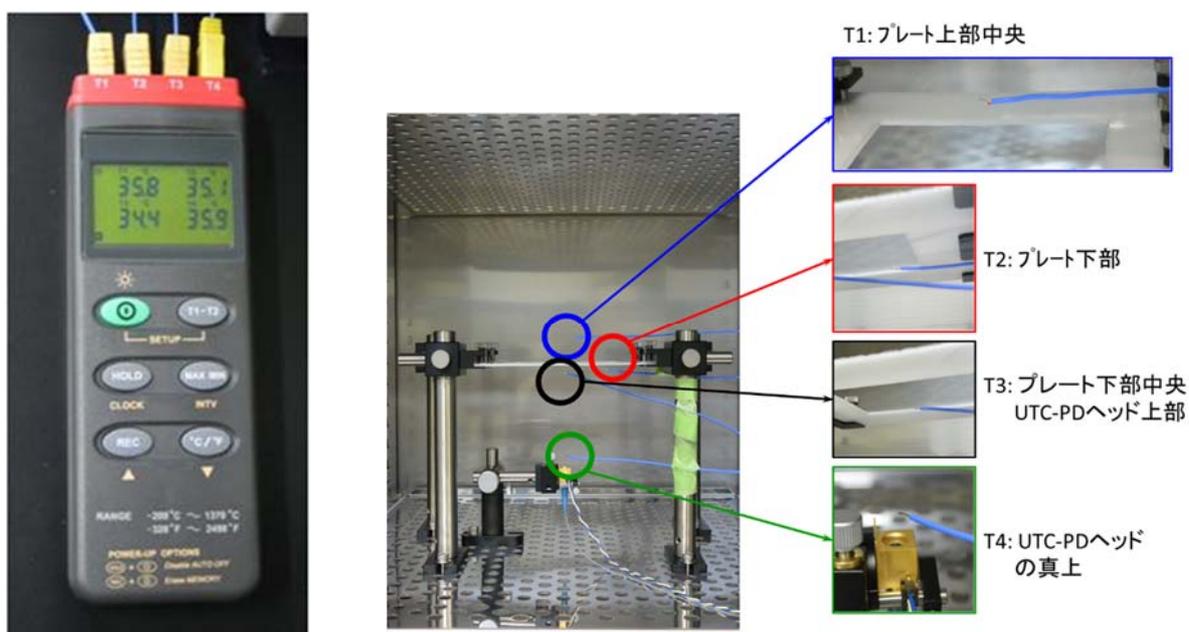


図4. 4-channel digital thermometer (左) および熱電対センサ設置場所 (右), 熱電対センサ拡大写真

ア-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

非熱作用に関する研究を実現するには、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、ばく露実験に適した培養細胞種の選定と培養条件の検討を行う。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。続いて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う。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方法の基礎的な検討を行う。

IV. 結果

アー 1 300-600 GHz ばく露装置の開発およびばく露評価法の検証

・ばく露装置の開発とばく露評価

図5に、テラヘルツ光出力信号の時間波形の一例を示す。図中の黄色線であらわされるグラフが検出器からの出力信号である。横軸は時間、縦軸が検出器より出力される焦電素子電圧である。検出器に到達するテラヘルツ光は光チョッパによる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してあるため、出力信号の電圧差からテラヘルツ光出力を求めることができる。

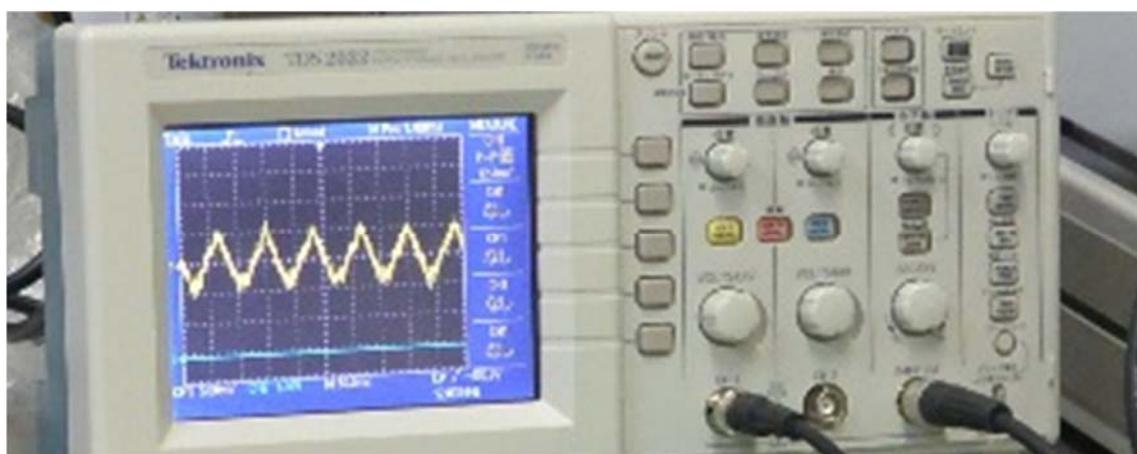


図5. テラヘルツ光出力の計測例

図6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300-600GHz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。

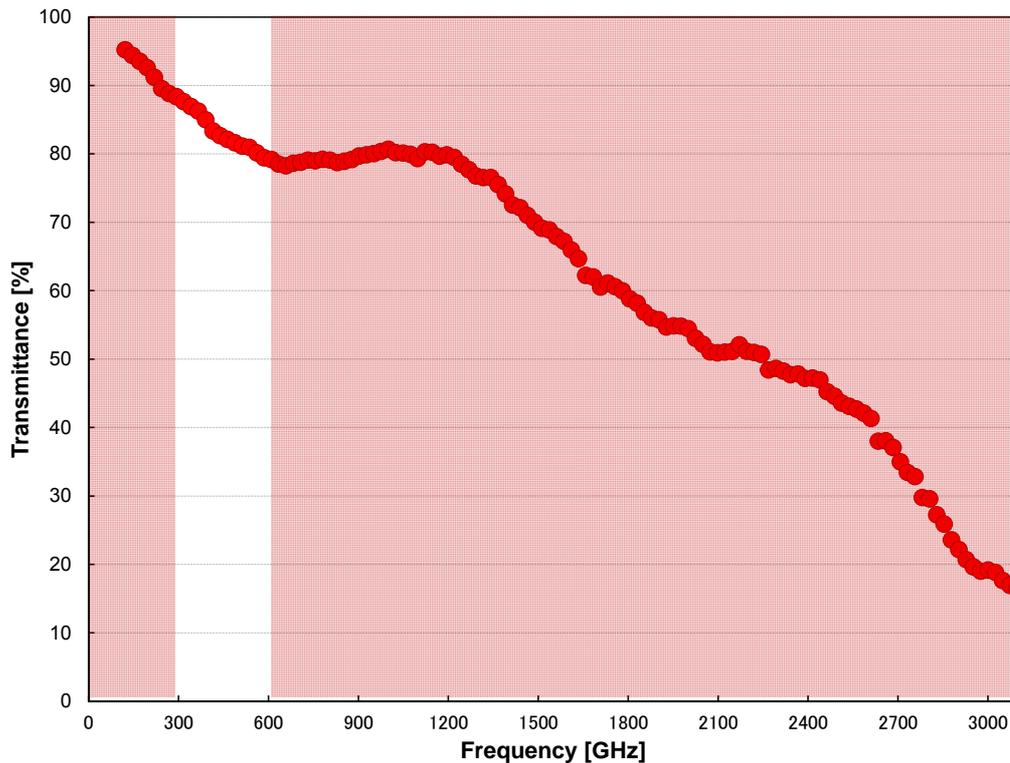


図6. ローパスフィルターの透過スペクトル。白枠内が本研究において使用した周波数帯域である

図7に、テラヘルツ光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 16mW, 印加電圧-1.0V, 光電流が-4.0mA 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きた。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 300GHz 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。超半球レンズを通じて取り出されるテラヘルツ光の広がり角は周波数が高くなるにつれて小さくなるため, ぼく露量の評価として重要な基準となる単位面積当たりのテラヘルツ光強度はほぼ一定であると見積もることができる。

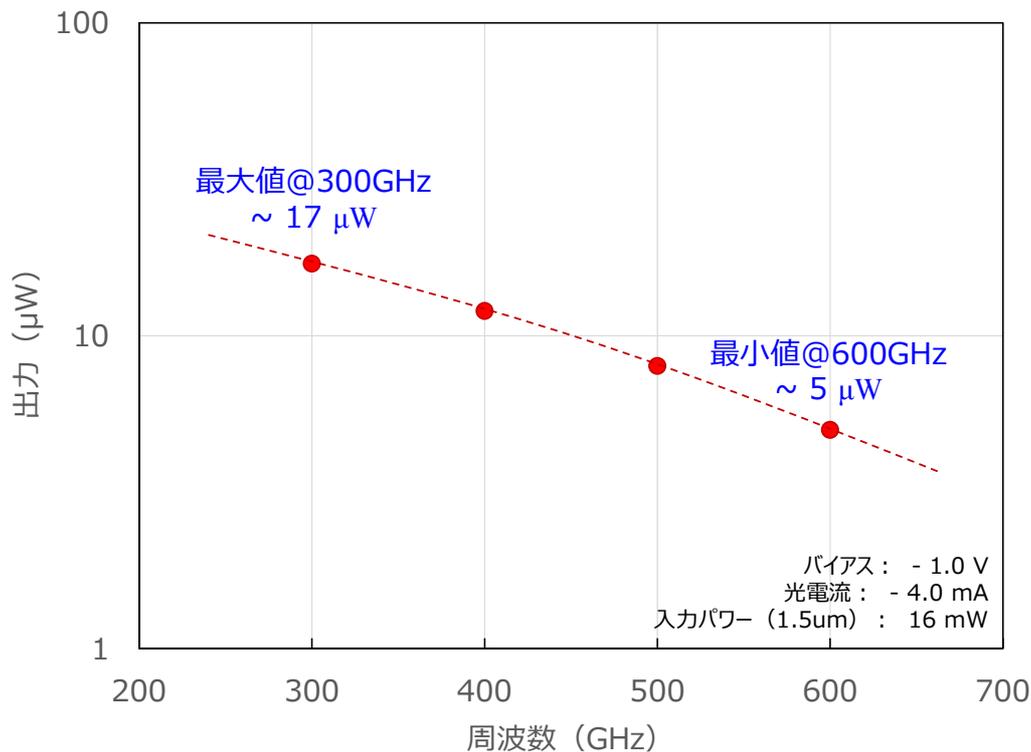


図7. テラヘルツ光出力の周波数依存性。出力は検出器により、横軸は入力する近赤外光をモニターする光計測機により校正済みである

図8に、開発したばく露装置の外観および模式図、テラヘルツ光源設置部分の写真を示す。本研究において、照射するテラヘルツ光周波数を掃引しながらリアルタイムに蛍光染色による細胞動態の計測を行うため、マルチモードマイクロプレートリーダー (SpectraMax i3X, MOLECULAR DEVICES)を導入し、テラヘルツ光が照射できるよう UTC-PD を導入し、ばく露装置を構築した。このマルチモードマイクロプレートリーダー装置は、テラヘルツ波ばく露の環境下における細胞動態をリアルタイムに観測でき、同時に下方より、顕微鏡観察用の窓が設けられている。この顕微鏡用ポートを利用すれば、マイクロプレート内の細胞へテラヘルツ光を直接照射することができる。そこで本研究において、顕微鏡ユニットの代わりに、UTC-PD を上向きに設置 (図7下方写真) し、プレート上の任意の細胞へテラヘルツ光を照射しながらリアルタイムに蛍光計測が実現できる。

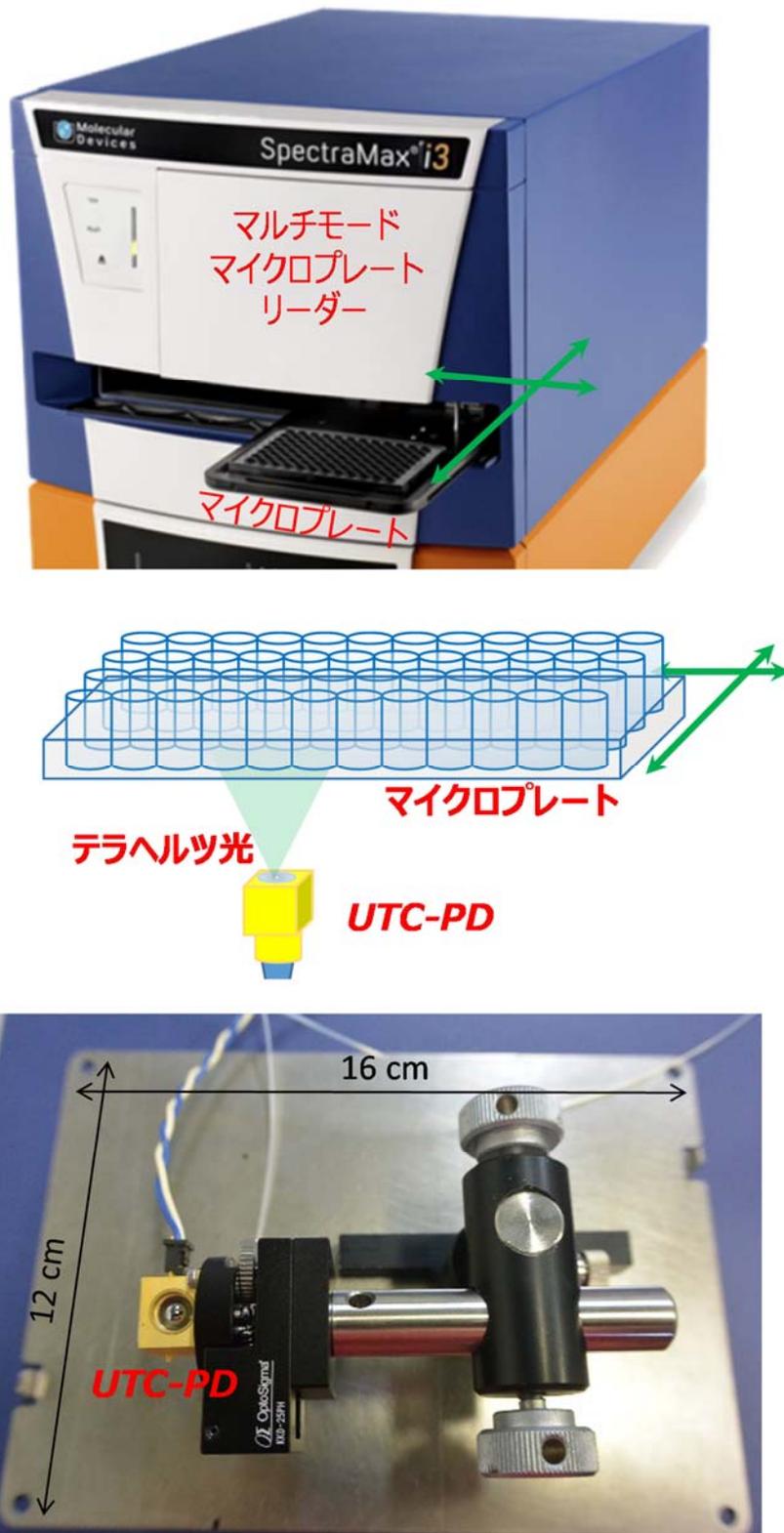


図 8. ばく露装置外観（上）および模式図（中），テラヘルツ光照射部分写真

・ばく露装置の培養環境の検証

図9に、テラヘルツ波照射におけるCO₂インキュベータ庫内の温度変化を示す。照射したテラヘルツの出力は図7で示したように、最大で300GHzの約17 μ W、最小で600GHzの約5 μ Wであった。この300-600GHzの周波数域を照射開始(0h)から照射終了(70h)まで1GHzあたり約14分ずつ掃引しながらばく露したが、CO₂インキュベータ庫内の温度変化はみられなかった。よって細胞にばく露する予定のテラヘルツ帯域において、照射による熱の生成は無視できるものと考えられる。

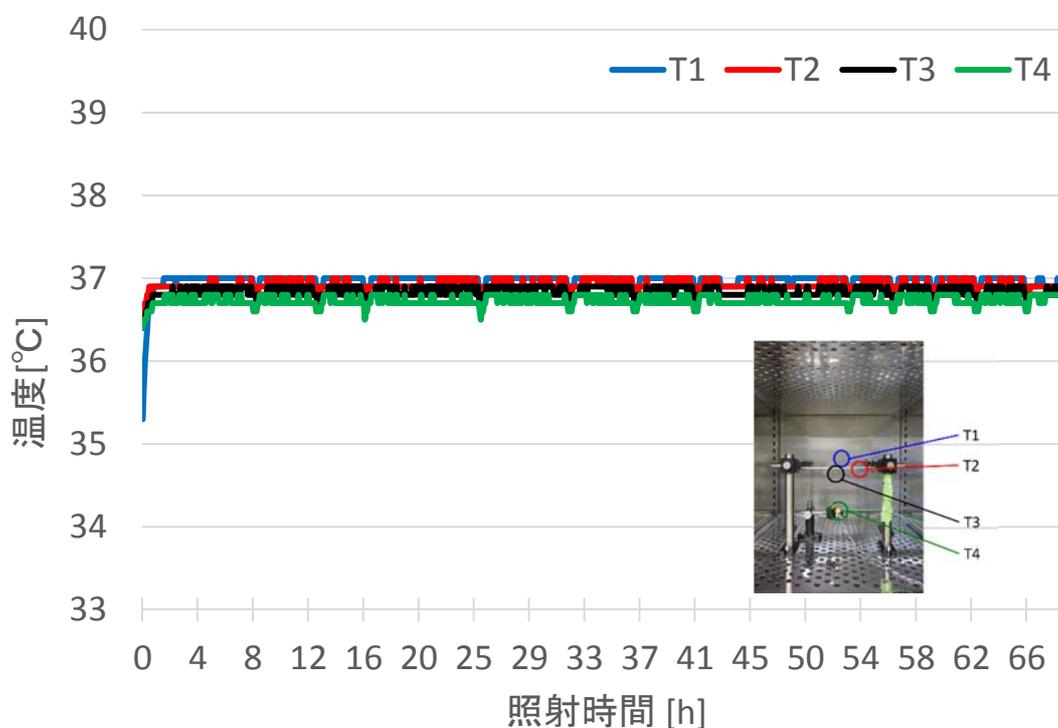


図9. 温度測定における熱電対センサ設置位置および温度測定グラフ

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

テラヘルツ波は水に吸収されることから、ばく露実験では培養ディッシュの底面から照射する実験法となる。このため、実験に用いる培養細胞の選定には、ディッシュの底面に接着する性質がある細胞が条件となる。さらに、生体でテラ

ヘルツ波がばく露された時、皮膚表面までの到達となるため、細胞の種類は皮膚や角膜の培養細胞から検討を行った。この結果、皮膚細胞としては、これまでにばく露実験の実績があるヒト皮膚線維芽細胞（RCB0222, 理研バイオリソース）と正常ヒト線維芽細胞（JCRB0220, JCRB 細胞バンク）を選定した。角膜細胞では、ヒト、ウサギ、ウシにおける培養細胞を検討した結果、増殖能や培養条件から、ヒト角膜上皮細胞株（RCB2280, 理研バイオリソース）を選定した（図10）。今後、選定した培養細胞を用いて、ばく露実験を行っていく。

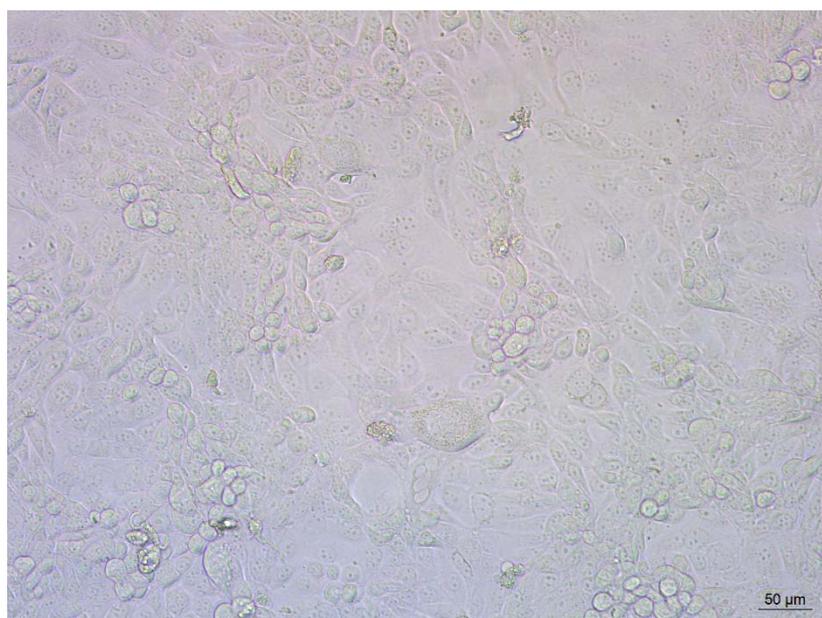
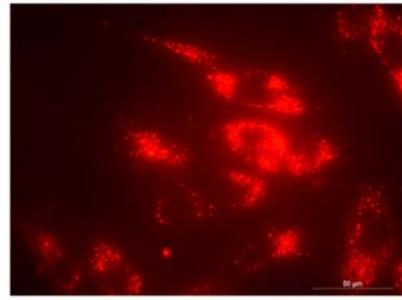
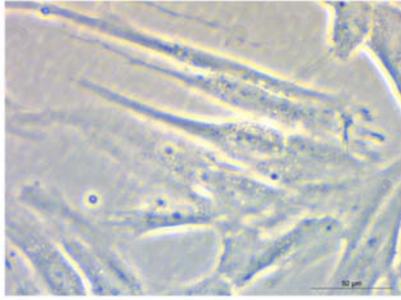


図10. ヒト角膜上皮細胞株の写真

細胞膜を蛍光染色する方法の検討として、蛍光色素部の尾部が細胞膜に入り込み、膜の動きを観察できる試薬である PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labelling (SIGMA-ALDRICH, MINI26)を検討した。培養細胞の種類や、蛍光色素の濃度、染色時間により、顕微鏡観察時の条件が変化した。今後は安定した蛍光染色が出来るよう引き続き検討を行い、テラヘルツ波ばく露における細胞膜の動態について観察していく。



染色24時間後 630 ×

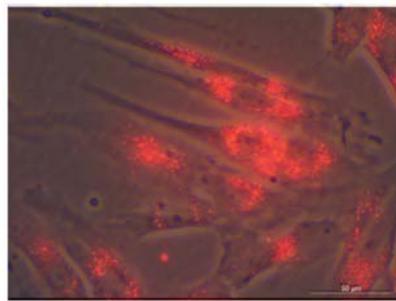


図 1 1. ヒト皮膚線維芽細胞の PKH26 染色による蛍光顕微鏡観察写真

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 28 年度は、昨年度、総務省委託研究「超高周波の電波ばく露による影響の調査」で実施した 0.3THz 超高周波ばく露による細胞影響の研究に引き続き、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、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う。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る。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、同時に行う。

上記、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ことを確認した後、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。

平成 29 年度は、0.3THz 単独ばく露での影響評価を引き続き行う試験に加えて、陽性対照として用いた薬剤や紫外線等をばく露中・ばく露前後に添加・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)

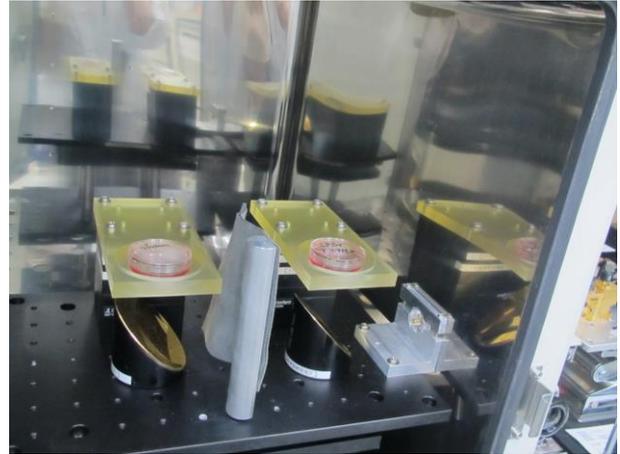


図 1-2 ばく露用インキュベータ内部
Sham 部（左）とばく露部(右)



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）

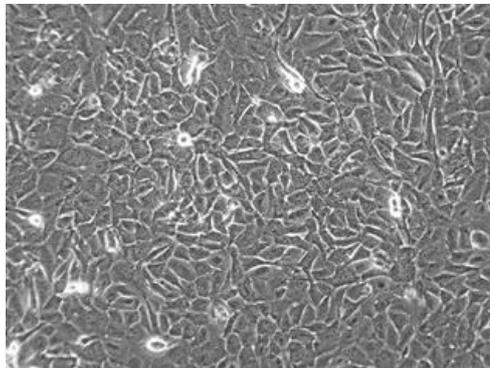
II-2. 細胞・培養条件

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 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 2 に示す。

細胞：ヒト皮膚由来角化細胞（HaCaT）（図 2）

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 2 HaCaT 細胞

II-3. 細胞基本動態試験-1（細胞増殖能）

- ① 2×10^5 個の HaCaT 細胞を播種した 3.5 cm シャーレを 24 時間通常インキュベータで培養した。
- ②培養後、0.3THz 用インキュベータの Sham 部とばく露部および通常インキュベータでさらに 24 時間培養した。
- ③各シャーレから細胞を回収し、フィブロネクチン (20 $\mu\text{g/ml}$) をコートした E-Plate に 2500 個/well で再播種し、リアルタイム細胞アナライザー (Roche) (図 3) で一定時間ごとに Cell Index を測定した。Cell Index は、プレート底面の電極で、細胞の電気抵抗値 (インピーダンス) を測定した値で、接着の抵抗値、増殖の際は 2 倍の抵抗値、伸展による接着抵抗値の増加の 3 種の抵抗値で測定することにより、細胞の増殖を測定することができる。



図 3 リアルタイム細胞アナライザー (インキュベータ内設置)

II-4. 細胞基本動態試験-2（細胞生存率）

- ① 2×10^5 個の HaCaT 細胞を播種した 3.5 cm シャーレを 24 時間通常インキュベータで培養した。
- ②培養後、0.3THz 用インキュベータの Sham 部とばく露部および通常インキュベータでさらに 24 時間培養した。
- ③各シャーレから細胞を回収し、同量のトリパンブルーで染色した後、直ちに自動セルカウンター (Countess™: Invitrogen 社) で生存数を計測した。

II-5. 細胞基本動態試験-3 (細胞周期分布)

- ① 1×10^5 個の HaCaT 細胞を播種した 3.5 cm シャーレを 24 時間通常インキュベータで培養した。
- ② 培養後、0.3THz 用インキュベータの Sham 部とばく露部および通常インキュベータでさらに 48 時間培養した。
- ③ 各シャーレから細胞を回収し、 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個ずつ PBS に分散させた。
- ④ 氷冷した 70% エタノールで細胞を固定し、 -20°C で 30 分放置した。
- ⑤ 固定後、細胞を遠心回収し、PBS にて洗浄した。
- ⑥ PBS に再懸濁後、RNase (最終濃度 0.2 mg/ml) を加え、室温で 30 分放置し RNA 処理を行った。
- ⑦ Propidium iodide (PI) (最終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$) を添加し、氷中で 10 分遮光して放置した。
- ⑧ ナイロンメッシュを通し、フローサイトメーター (BECTON DICKINSON) で測定した。

II-6. 皮膚免疫応答評価 (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-1 α)、eBioscience 社 (IL-6、IL-8) のものを用いた。

なお、今回の実験において、実験データが信頼できるかを検証するためのポジティブコントロール (陽性対照) の選定に様々な条件下で予備実験を行い、適切と考えられる条件のポジティブコントロールを使用し本実験を行った。

1. インターロイキン 1 α (IL-1 α) …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、 $1 \mu\text{g/ml}$ 濃度のリポサッカライド (LPS)、および $1 \mu\text{g/ml}$ 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。

(サイトカイン産生量測定 : IL-1 α)

- ④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。
- ⑤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 ($20 \sim 25^\circ\text{C}$) で 1 時間放置の後、Biotinylated antibody reagent $50\mu\text{l}$ を各 well に加え、室温 ($20 \sim 25^\circ\text{C}$) で 1 時間放置。
- ⑥Wash buffer で各 well を完全に洗浄 ($\times 3$) した後、Streptavidin-HRP 溶液を各 well に $100\mu\text{l}$ ずつ加え、室温 ($20 \sim 25^\circ\text{C}$) で 30 分放置。
- ⑦Wash buffer で各 well を完全に洗浄 ($\times 3$) した後、TMB $100\mu\text{l}$ を各 well に加え、室温 (暗所) で 30 分放置。
- ⑧Stop solution $100\mu\text{l}$ 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。
- ⑨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)

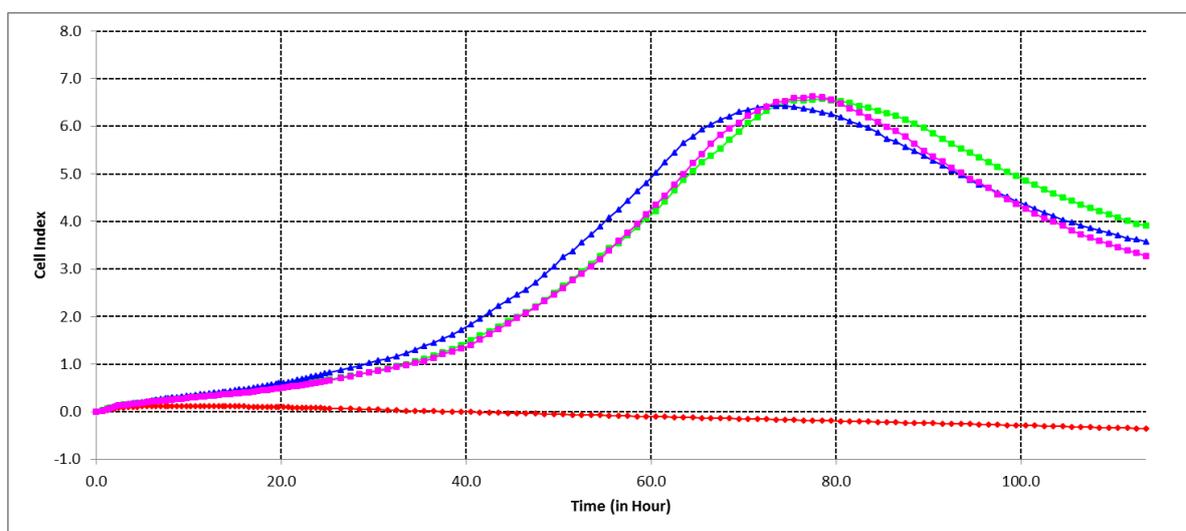
- ④細胞外のサイトカイン測定用として、培養上清を分注し、細胞内のサイトカイン測定用として、付着細胞を Cell lytic 120ul で溶解した。BCA タンパク質アッセイでタンパク量を測定し、濃度を揃えた。
- ⑤スタンダードを作成し、スタンダード、ブランク、サンプル用 well に規定量の蒸留水を加えた。
- ⑥サンプルを $50\mu\text{l}$ ずつ加え、軽く混ぜ、 400rpm で揺らしながら室温で 3 時間放置。
- ⑦Wash buffer 各 well を洗浄 ($\times 6$) し、TMB substrate を $100\mu\text{l}$ 加えた。
- ⑧室温、遮光で 10 分放置し、Stop solution ($100\mu\text{l}$) 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。

⑨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。

Ⅲ. 結果と考察

Ⅲ-1. 細胞基本動態試験-1（細胞増殖能）結果

リアルタイム細胞アナライザーにより計測された HaCaT 細胞の Cell Index の値を図 4 に示す。培地のみを入れた well の Cell Index に変化は見られなかった。通常インキュベータにおけるコントロールおよび Sham 部と 0.3THz ばく露部における細胞増殖能はほぼ同等であった。



- 培地のみ
- 通常インキュベータ
- 0.3THzばく露装置Sham部
- 0.3THzばく露装置ばく露部

図 4 Cell Index 値（細胞増殖能）

III-2. 細胞基本動態試験-2（細胞生存率）結果

HaCaT 細胞の細胞生存率を図 5 に示す。通常インキュベータにおけるコントロールおよび Sham 部と 0.3THz ばく露部における細胞生存率に有意な差は認められなかった。

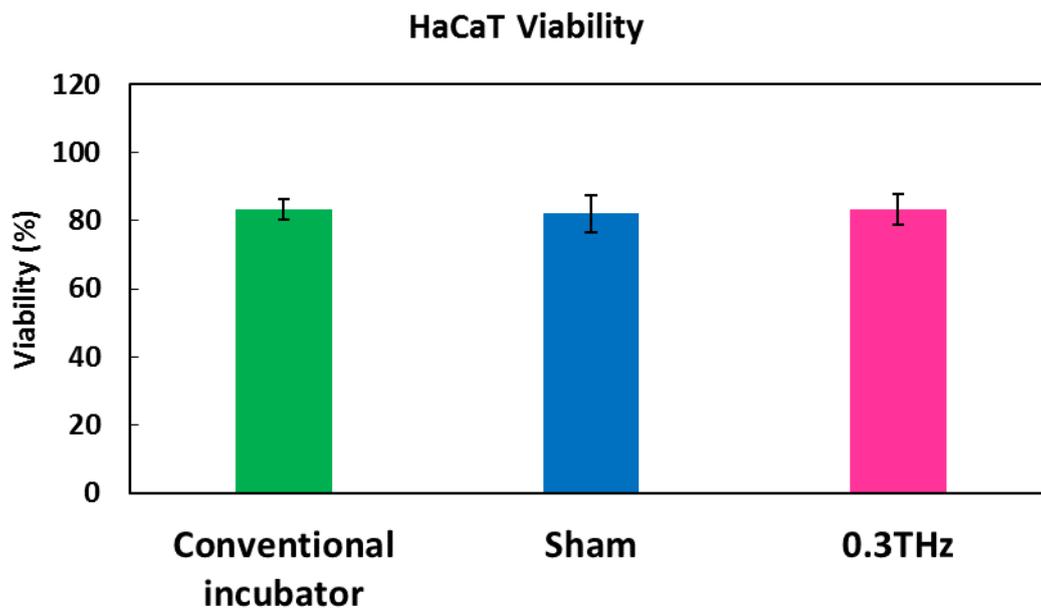


図 5 細胞生存率

III-3. 細胞基本動態試験-3（細胞周期分布）結果

フローサイトメーターにより計測された HaCaT 細胞の細胞周期分布結果を図 6 に示す。通常インキュベータにおけるコントロールおよび Sham 部と 0.3THz ばく露部における細胞周期分布はほぼ同等であった。

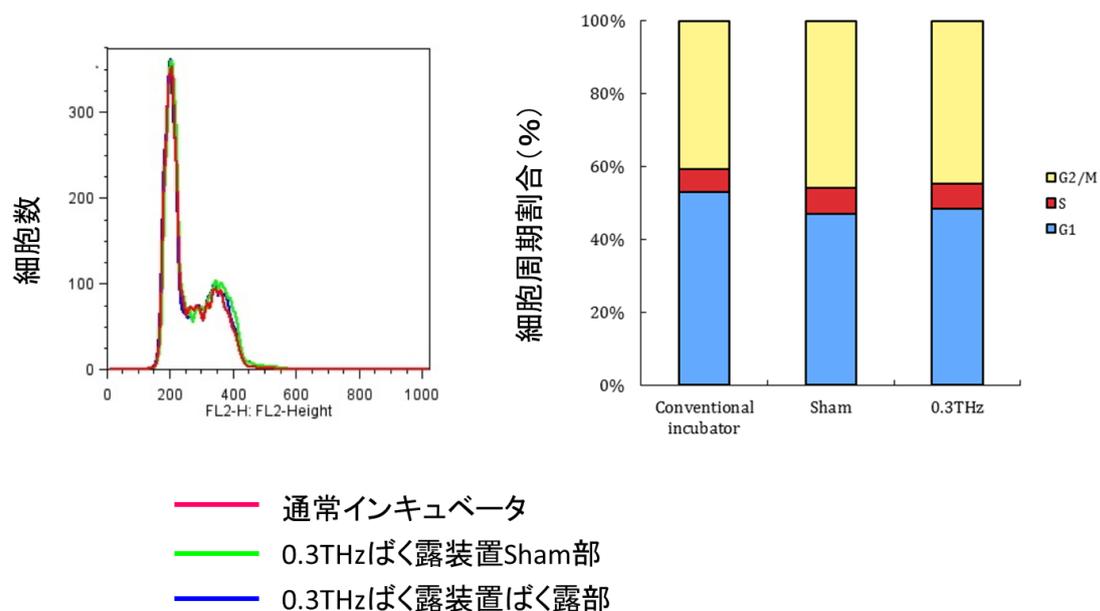


図 6 細胞数と蛍光強度グラフ（左図）および細胞周期割合ヒストグラム（右図）

III-4. 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、細胞外（上清）および細胞内（細胞抽出物）の IL-1 α 産生量の計測結果を、それぞれ図 7-1 および図 7-2 に示す。細胞外および細胞内、両者の 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 LPS、または 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（LPS : $p < 0.05$ 、イオノマイシン : $p < 0.01$ ）が見られた。

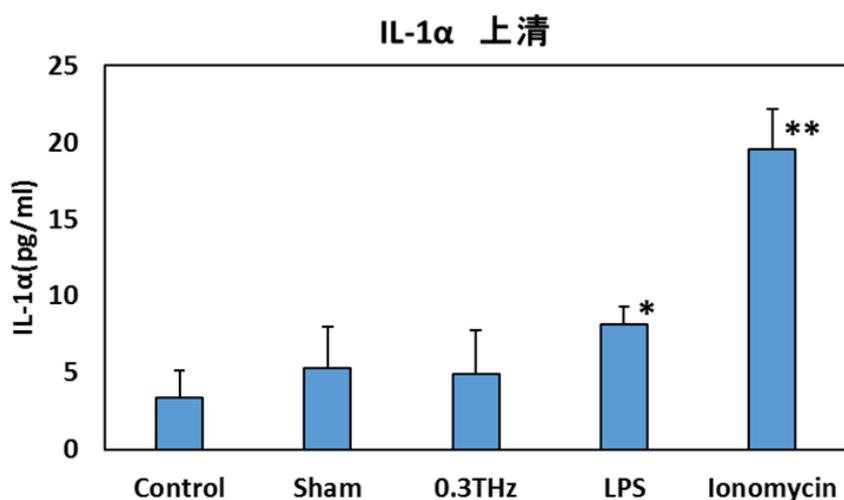


図 7-1 HaCaT 細胞における細胞外（上清）IL-1 α 産生量

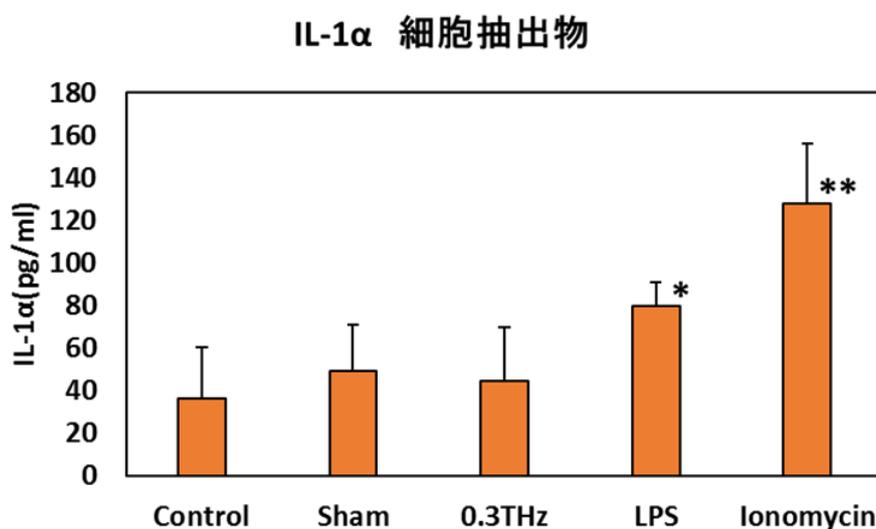


図 7-2 HaCaT 細胞における細胞内（細胞抽出物）IL-1 α 産生量

IL-6

HaCaT 細胞における、細胞外（上清）の IL-6 産生量の計測結果を図 8 に示す。細胞外の 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。LPS で処理した細胞では、コントロールに比べ、IL-6 の産生量に変化は見られなかった。細胞内（細胞抽出物）における IL-6 の産生量は、すべての処理において、今回の試験で測定できる測定下限より低い値 (< 0.92 pg/ml, 測定範囲：3.1～200pg/ml)を示し、ほぼ細胞内に残留している IL-6 はなかったと考えられる。

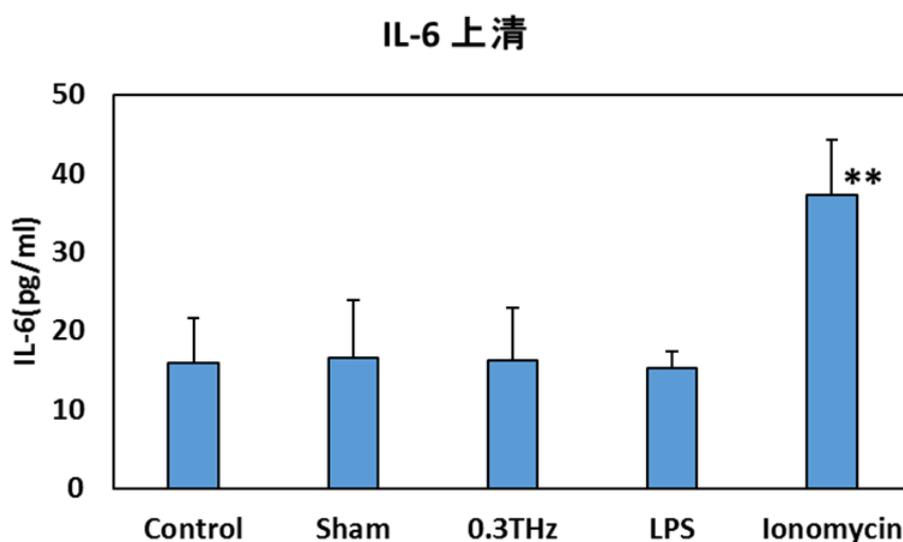


図 8 HaCaT 細胞における細胞外（上清）IL-6 産生量

IL-8

HaCaT 細胞における、細胞外（上清）および細胞内（細胞抽出物）の IL-8 産生量の計測結果を、それぞれ図 9-1 および図 9-2 に示す。細胞外および細胞内、両者の 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、細胞外の IL-8 産生量について、ポジティブコントロールとして、1 μ g/ml 濃度の LPS、または 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（LPS : $p < 0.01$ 、イオノマイシン : $p < 0.01$ ）が見られた。細胞内の IL-8 産生量については、LPS で有意差はなく、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（イオノマイシン : $p < 0.01$ ）が見られた。

IL-8 上清

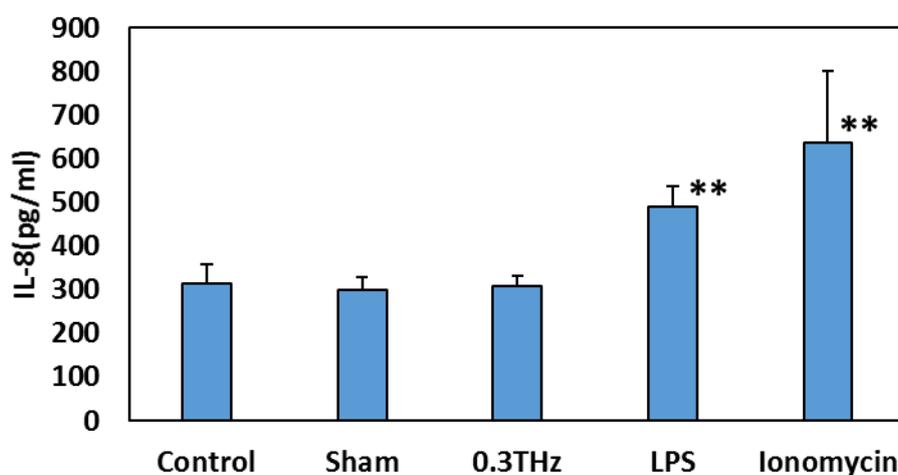


図 9-1 HaCaT 細胞における細胞外（上清）IL-8 産生量

IL-8 細胞抽出物

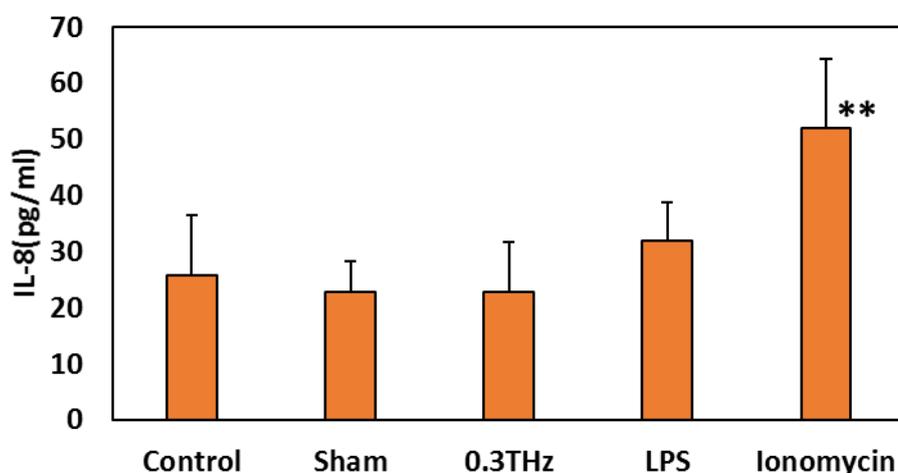


図 9-2 HaCaT 細胞における細胞内（細胞抽出物）IL-8 産生量

IV. 平成 28 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 LPS、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。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、およびばく露部の細胞外 (上清)、細胞内 (細胞抽出物) とともに有意な差は見られなかった。また、一部検出限界値以下であったものの、ポジティブコントロールで有意な差が見られたことから、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) に対し、ほとんど影響はないか、もしくは非常に小さいものと考えられる。