

極低周波電磁界による遺伝毒性の検出

平野 稔*・日下部 眞一**

* : 広島大学生物圏科学研究科

** : 広島大学総合科学部

The detection of the genotoxic potential of extremely low frequency electromagnetic field

Minoru Hirano* and Shinichi Kusakabe**

* : *Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,
Higashihiroshima 739 Japan*

** : *Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University,
Higashihiroshima 739 Japan*

Abstract : The *Drosophila* strain that is genetically sensitive to various mutagens was introduced in order to assess the genotoxic potential of extremely low frequency (ELF) magnetic field. The males of this strain have high sensitivity to mutagens, because they have double mutant alleles, one can't carry out a normal nucleotide excision repair against somatic mutations and the other fail to arrest cell cycle when the replicated chromosome has any aberration. If the males were exposed to mutagen, the fitness of the males would be lower than that of the females owing to accumulation of somatic mutations on single X chromosome. It is possible to estimate the genotoxic potential exposing larvae to the ELF magnetic field during the whole larval development and measuring the male-to-female ratio which would be less than that of the control group, if the genotoxic potential exists. Therefore, we exposed this strain to extremely low frequency ($10\mu\text{T}$ and $100\mu\text{T}$) magnetic field, and compared the sex ratio of the exposed groups with that of the control. The result showed that the number of males which were exposed to the $10\mu\text{T}$ ELF magnetic field reduced by about 5% compared with that of the control, however it was not the statistically significant level. The number of males exposed to the $100\mu\text{T}$ field significantly reduced by 14%. The numbers of females with two X chromosomes and normal repair genes hardly changed among those of control and exposed groups, but slight decrease (2%) was observed in the number of females exposed to $100\mu\text{T}$.

These results suggest that the male X chromosomes in somatic cells that are deficient in two kinds of repair genes could accumulated mutations induced by the mutagenic effect of the extremely low frequency magnetic field.

Keywords : extremely low frequency (ELF), somatic mutation.

序 論

極低周波電磁界(extremely low frequency : ELF)は0 ~ 300Hzの変動電磁界と定義され、送電線や家庭電化製品のような50Hzもしくは60Hzの商用周波数の電流の周りに生じる電磁界である。これは電磁波の一種であるが γ 線、X線さらに一部の周波数の紫外線で見られるような電離作用は引き起こさない。また、マイクロ波のように、分子間結合の振動を促進して発熱するような特性をもたないため、極低周波電磁界は生体内物質との相互作用はありえないとされてきた。このような中で、米国において「送電線・配電線付近の住民に小児性白血病患者が多い」とする疫学的調査結果が報告された(Wertheimer & Leeper 1979)。この報告は当初疑問視されていたが、同地域で、異なる期間、さらなる追試調査(Savitz et al. 1988)が行われ、これを支持する結果が得られたため、この問題が注目を集め、各国で同様の疫学的調査(Feychting & Ahlbom 1993)が行なわれることになった。これまで約20年間にわたり様々な疫学的調査が行なわれてきたが、極低周波電磁界が発がん性を有する可能性を示唆する報告とそれに否定的なものとが混在しているのが現状である。

このような疫学的調査を受けて生物実験が米国を中心として開始されることになった。これには標準的な微生物実験による復帰突然変異試験や *in vitro* での染色体異常誘発実験をはじめ、動物の急性・慢性曝露による腫瘍誘発実験、および実験動物のホルモン等の代謝産物量測定などがある。多くの実験は極低周波電磁界による遺伝毒性・がん誘発性やその他、生体内物質との相互作用を否定する結果を得ている(McCann et al. 1998)。したがって、今日では研究者の間で極低周波電磁界の生体影響は全く存在しないか、あるいは存在してもほんのわずかで問題とはならないであろうという見解で一致している。

一方、十分信頼度が高く再現性のある実験系において極低周波電磁界の生体への影響を示す報告がいくつか提出されている。その中には特定遺伝子座における突然変異誘発(Miyakoshi et al. 1996)のように、DNAに直接もしくはその複製あるいは修復過程において間接的に作用しているという報告や、松果体におけるメラトニン分泌量が減少し(Kato et al. 1993)、その結果として免疫機能低下やメラトニンによるフリーラジカル除去能(Reiter 2000)が低下して、誘発突然変異率が上昇しているのではないかというもの、あるいはprotein kinase Cを介した細胞内シグナル伝達による遺伝子の発現が促進されるのではないかという実験(Ohtsu et al. 1995)など、ELFが細胞内環境に様々な影響をおよぼす可能性も示している。

極低周波電磁界はエネルギーが極めて低いため、生体内の物質との相互作用はありえないとされながらも、疫学的調査において各種がんの誘発要因として挙げられ、また一部の生物実験において生体への影響が認められることから、現代人の生活空間に充填しているこの極低周波電磁界にそもそも遺伝毒性が存在するかどうかは再検討の余地がある。疫学的調査において指摘されたのは極低周波電磁界が発がん誘発能を持つ、すなわちDNAに対し突然変異を誘発しているのではないかということである。したがって、極低周波電磁界がどこで作用しているのかを同定するために細胞レベルあるいは組織レベルで解析を行なうことも重要である。しかし、複合要因の結果として遺伝毒性が存在する可能性も考えられるため、それらに先駆けて個体レベルでの影響を定量化することが重要である。これまでにマウスやラットを用いた極低周波電磁界への曝露実験が行なわれたが、生体影響が全く存在しないかあるいは存在しても非常に弱いとされる極低周波電磁界の影響の検出を行なうにはこれらのモデル動物は設備や検体数などの制約から困難である。むしろ微小と推定される遺伝毒性を個体レベルで検出しようとするならば、ショウジョウバエを用いた曝露実験が短時間で多くの検体を同時に曝露可能であり、また変異原に対して超感受性突然変異体が利用可能なため、ショウジョウバエはこの実験

に適している。小穴らは超高密度(0.6 T)の静磁界をショウジョウバエの変異原感受性系統の幼虫に曝露したところ、変異体の羽化個体数が野生型のそれに比べて有意に減少する結果を得ている(Koana et al. 1995)。またショウジョウバエの翅に生じた変異細胞を検出する系を用いて、5Tの静磁界が組換え変異を誘発するという結果を示した(Koana et al. 1997)。非常に強い静磁界において遺伝毒性が検出されたことは、これらの結果がELFのような密度の低い極低周波電磁界についても当てはまるかどうかは興味深い。

そこで本研究では上記の小穴ら(Koana et al. 1995)が開発したオスのみ2つの突然変異修復関連酵素が欠失している系統を用いて、卵から成虫になるまでの期間、極低周波電磁界に曝露して羽化に達した個体数およびその性比を対照群と比較することにより極低周波電磁界の遺伝毒性の有無を評価、検討する。

方 法

実験材料

ショウジョウバエ系統

曝露検体として用いるショウジョウバエ系統の遺伝子型(X染色体以外は野生型)は以下の通りである。

♂ : $sc\ z^1\ w^{+TE}\ mei-9^a\ mei-41^{D5} / Y$

♀ : $C(1)DX, y\ f / Y$

オスのX染色体には塩基除去修復に関与する *mei-9* およびDNA損傷依存性細胞周期チェックポイントとなる *mei-41* の遺伝子(Sekelsky et al. 1998)が欠失している。このためこれらの野生型遺伝子を持つ個体と比べると、この系統のオスの染色体上に発生した様々な塩基修飾に対する修復効率は著しく低下する。これは複製フォークが未修復の塩基修飾点に進行する際に二重鎖切断を引き起こすこともあり、またM期チェックポイントの欠失が構造異常染色体を持つ細胞を蓄積してしまうからである。体細胞の突然変異は二倍体生物の場合、仮にどちらかの遺伝子が機能欠失となっても相同染色体上のもう一つの正常な遺伝子が存在すれば、細胞および個体の生存に直接的影響をあたえない。しかし、ショウジョウバエのオスは、X染色体が一本であり、しかもY染色体上には精子形成やrDNAのようなごく一部の遺伝子しか存在しないため、ゲノムのおよそ2割を占めるオスの一本のX染色体上の遺伝子に生じた突然変異は直接的にその細胞および個体の生存力の低下へとつながる。またメスの染色体構成として *C(1)DX* という付着X染色体(2本のX染色体が末端で結合したもの)を用いるがこれはrDNAのようなヘテロクロマチン領域に存在する一部の遺伝子が欠失し、また可視マーカーとなる変異遺伝子が存在することを除けば野生型の遺伝子構成を持つ。つまりこの系統において突然変異原物質(もしくはガンマ線、X線のような高エネルギー電磁波そして本実験におけるELF電磁界)を卵から成虫になるまでの期間中に曝露することによりメスに対してオスの方がより体細胞突然変異を蓄積しやすく、また生じた突然変異遺伝子を補完する相同染色体を持たないため様々な変異原に対して感受性が強く、適応度を著しく減少させたオスは発生の途中で死亡するため曝露した物質あるいは電磁界等の遺伝毒性の効果が推定可能である(図1)。

ショウジョウバエ生育培地および飼育環境

ショウジョウバエはガラス製試験管(直径2.2cm、高さ12cm)に培地を入れウレタン製の栓をして飼育した。培地は標準的に用いられているトウモロコシ砂糖寒天培地を用いた。その成分は水

1000mlに対してアガー6g、コーンミール(トウモロコシを破碎乾燥したもの)80g、乾燥酵母(アサヒビール)40g、グルコース100g、プロピオン酸4mlで作製した。ショウジョウバエの飼育および曝露はインキュベーター(MIR-552,サンヨー)内にて $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で行なった。このインキュベーター内のバックグラウンド極低周波磁界強度 $0.2\mu\text{T}$ 以下の地点に曝露装置および試験管を設置して飼育した。

曝露装置

ELFへの曝露装置は、広島市的美機電株式会社に本実験のために特注した装置である。

曝露装置は発生磁界が鉛直方向になるように設置し、磁界の向きに平行になるように(縦向きに)コイルの中の空洞に試験管を設置した。磁界強度は $10\mu\text{T}$ 、 $100\mu\text{T}$ および対照実験区としては磁界出力ゼロの曝露装置を用いた。内部磁界強度は曝露管の軸中心部の最上端ではおよそ指定磁界強度の30%となるが曝露管内の磁界強度が80~100%となるような場所に試験管を設置した(図2)。

曝露実験

曝露検体はあらかじめ各々40匹の雌雄を24時間交配させ、次に新しい試験管内に移し替えて24時間産卵させた。産卵完了時点を「産卵後一日目(24時間)」とし、直ちに曝露装置へと導入した。羽化計数最終日までこの曝露管内に試験管を設置するので、羽化した検体は発生のほぼ全期間において磁界の曝露を受けたことになる。また最初の羽化個体(9日目以降)の確認およびその後の計数は産卵後24時間ごとに行い、最終計数日となる産卵後18日目まで行なった。

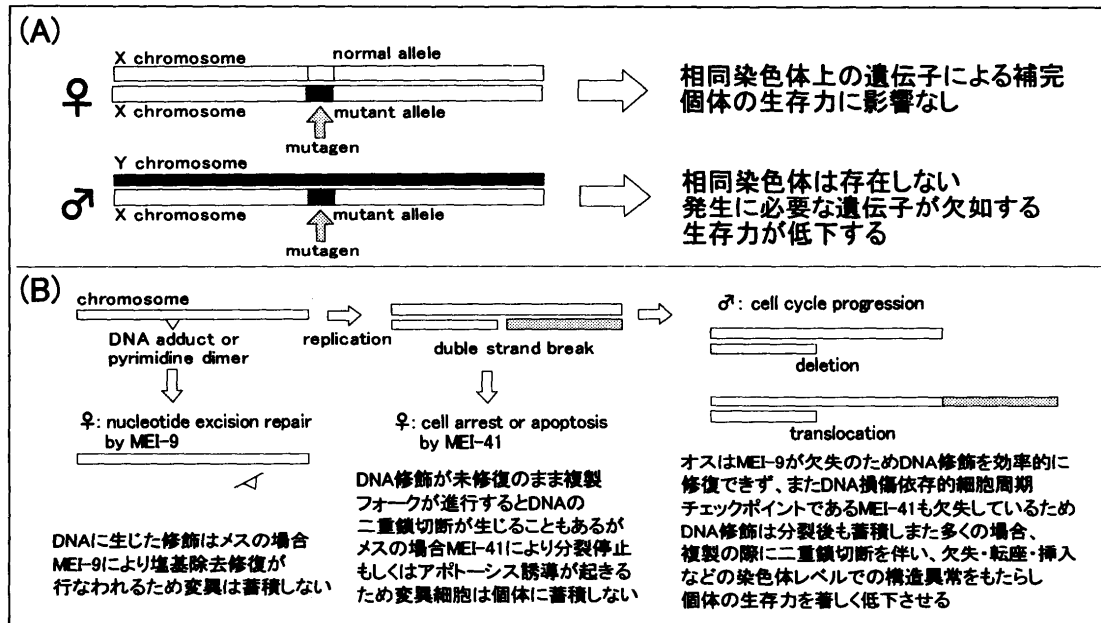


図1. 突然変異原感受性ショウジョウバエ系統

- (A) X染色体上に生じた突然変異はメスの場合もう一つの相同X染色体上の正常遺伝子によって補完される。一方、オスの場合相同X染色体を持たないため、この突然変異遺伝子は細胞機能の欠失として直接的にその個体の適応度を低下させる。
- (B) メスは塩基就職変異に対し修復可能で、仮に未修復のまま複製が進行しても正常なチェックポイント機構を持つために変異細胞は個体に蓄積しない。一方、オスにおいては修復機能欠失となっているため変異細胞が個体に蓄積しやすく、個体の適応度は低下する。

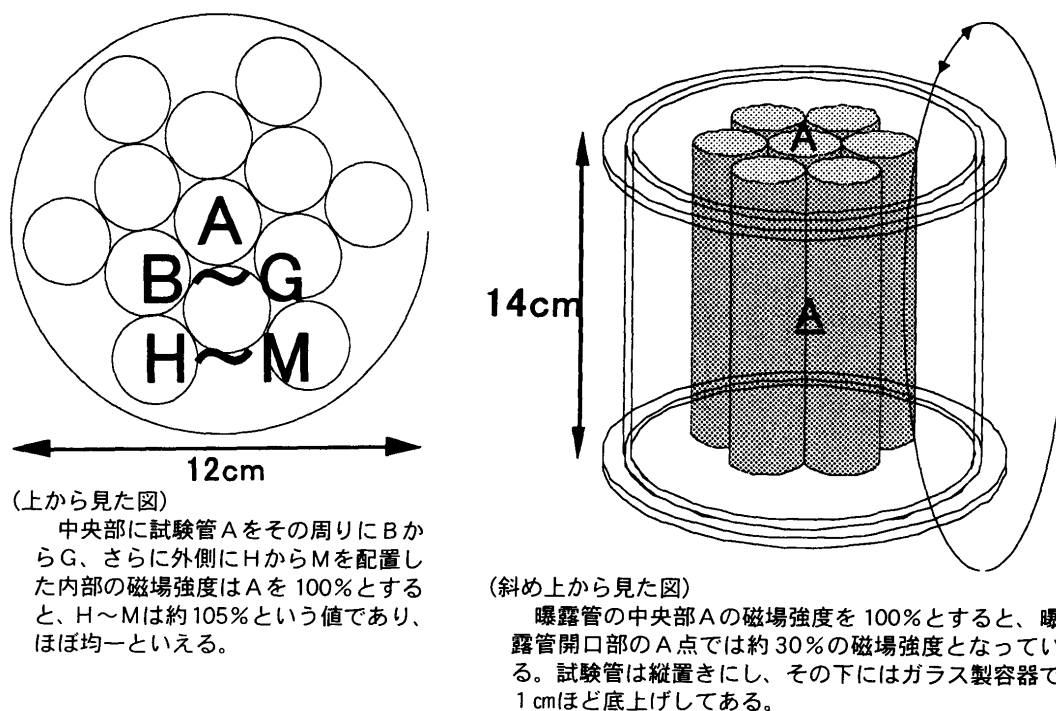


図2. 曝露管および磁界強度

遺伝毒性の評価

曝露および対照群の試験管から羽化を完了し生存している個体を取り出し、ジエチルエーテル麻醉をかけた。この系統の眼色は、オスはマーカー遺伝子による白色に近い薄い黄色、メスは野生型形質の鮮やかな赤色となっているため肉眼で容易に雌雄分別が可能である。上述したようにこの系統はオスがメスに対して突然変異原超感受性であるため、変異原がこの系統に作用しているならばオスの生存羽化個体数がメスのそれに比べて大きく減少していることが期待される。極低周波電磁界の遺伝毒性を推定するために曝露強度ごとに雌雄の数を集計し、 2×2 の χ^2 独立性検定により雌雄の生存羽化個体数の差に対照群および曝露群との間で有意な差が見られるかを確認した。

結 果

産卵後から成虫になるまでの期間に曝露を受け、羽化を完了した生存個体数とその際の曝露条件を表1に示す。10 μ Tの曝露により修復機構が欠失となっているオスは対照群と比べ5.9%の減少が見られた。ただしこれは5%の有意水準を満たしていない ($p=0.066$)。100 μ Tの曝露においてオスはおよそ14.5%もの減少が見られた。これは0.1%で有意であった ($p=0.00022$)。また修復機構に関して正常なメスは10 μ Tおよび100 μ Tの曝露により対照群と比べ大きな差は見られなかったが、それでも100 μ Tの曝露により約2%の減少が見られた。しかしコントロール群および100 μ T処理群のメスの羽化数の中でt検定を行なったところこの差は有意な違いとは言えなかった ($t=0.47415$, $p=0.31845$)。

表 1. 各曝露条件における生存羽化個体数の変化

	対照群	10 μ T	変化率	100 μ T	変化率
オスの羽化数/試験管数	89.3 \pm 19.6	84.4 \pm 18.3	-5.49%	76.9 \pm 21.3	-13.89%
メスの羽化数/試験管数	120.7 \pm 23.2	121.4 \pm 21.6	0.58%	118.3 \pm 22.0	-1.99%
オスの羽化数/メスの羽化数	0.743 \pm 0.108	0.700 \pm 0.131		0.656 \pm 0.146	
試験管数	33	36		37	
オス羽化総個体数	2948	3040		2846	
メス羽化総個体数	3984	4372		4364	
χ^2 (f=1)	-	3.37		13.63	
p	-	0.0663		0.0002	

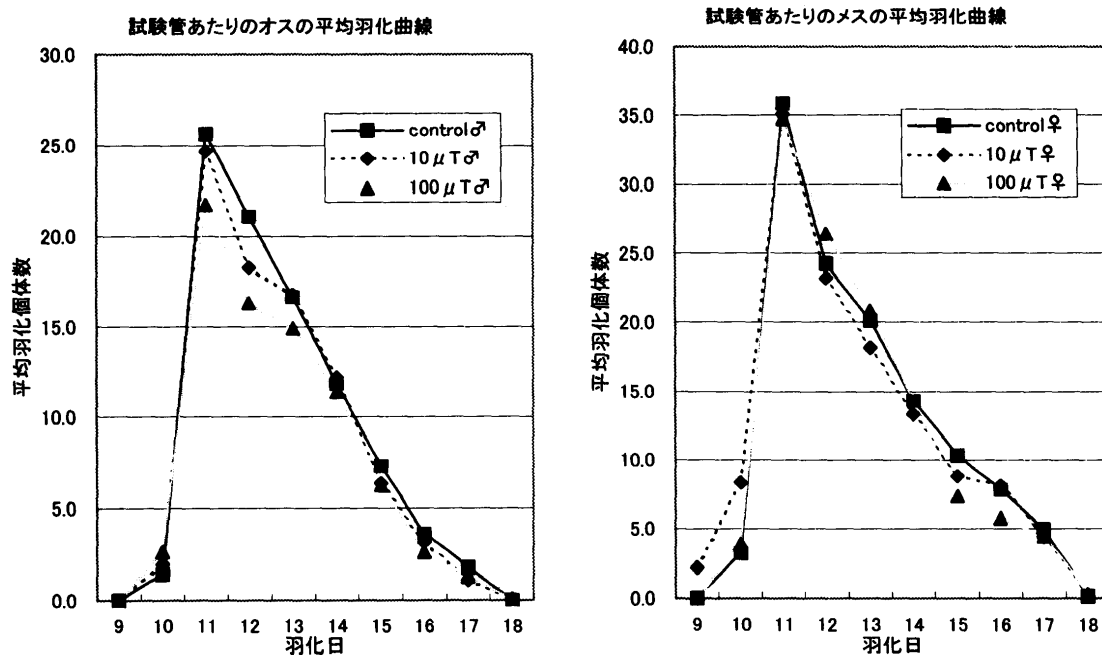


図 3. 試験管あたりの平均羽化曲線

次に試験管あたりの平均羽化曲線を図3に示す。オスにおいては、ほぼ全ての羽化日において対照群よりも羽化個体数が少なくなっており、また曝露強度に応じてこの減少傾向が見られた。またメスにおいては、総羽化個体数ではさほど変化は見られなかった。しかし、最も早い羽化日となる産卵後9日目、続いて10日目において10 μ Tの曝露検体が多く羽化し、その後は対照群とほぼ同様の経過をたどった。

さらにメスの100 μ T曝露検体においては羽化のピーク日まではほぼ対照群と同様のペースで羽化をしているがその翌日、翌々日はやや対照群よりも多く羽化し、その後はむしろ対照群よりも羽化個体数は少なくなっており、羽化総数としては若干減少した。

考 察

100 μ Tの極低周波電磁界曝露によりオス羽化個体がコントロールと比べ有意に減少する結果を得た。

本研究で用いたショウジョウバエ系統はオスのみ修復酵素欠失体であるため、変異原に対して感受性である。これは、この強度における極低周波電磁界がショウジョウバエの発育段階に突然変異を誘発し、X染色体を1本しか持たず修復系を欠いているオスの羽化個体数が著しく減少したのではないかと考えられる。

またこの傾向は少なくとも10 μ Tよりも100 μ Tで強く見られ線量依存的な関係がオスの減少量から推測される。これはオスの生存力の減少に極低周波電磁界の曝露が強く関与していることを意味している。

本研究では極低周波電磁界が生体に対して遺伝毒性を持ちうるかどうかの確認自体に主眼を置いていた。なぜならこれまでの研究において極低周波電磁界の遺伝毒性に関しては否定的な生物学実験の結果が大勢を占めていたからである。そこで我々は極低周波電磁界の生体への直接的な影響、プロセス等の解明を研究の目的とせず、生体内での反応をブラックボックスとして、結果として生じたDNA損傷のみを効率的にスクリーニングできるショウジョウバエ系統を用いたのである。そして変異原感受性のオスのみが極低周波電磁界の強度に応じて生存力を低下させたという実験結果からも、直接あるいは間接的にこの電磁界がDNAに作用しているという示唆を得るに至った。

それではこの遺伝毒性はいったいどのような生体反応の結果として得られたのだろうか。X線やガンマ線のような電離放射線と呼ばれる電磁波はその高エネルギーにより進路周辺の原子から電子を弾き飛ばした結果として分子のイオン化や活性酸素のようなラジカルを生成することによってDNAが修飾を受けるため有害となる。またある波長の紫外線では隣接するピリミジン塩基を共有結合させることによってDNAの構造変化を引き起こしたり、DNA複製フォーク通過の際にDNA二重鎖切断を引き起こす原因となるため有害である。また可視光線よりもずっと波長の長いマイクロ波のような波長域では水などの分子振動を引き起こすことにより組織の温度上昇をもたらすタンパクの変性により生体機能に影響をもたらす。しかしわれわれが日常的に浴びている極低周波電磁界はこのような高エネルギーをもたないことから、本研究で得られたこの電磁界の遺伝毒性は意外な結果といえる。

オフィスにおけるパーソナルコンピューターが爆発的に普及して以来、多くの人がブラウン管方式の画面に至近距離に位置する時間が多くなり極低周波電磁界にさらされている機会が多くなってきている。また、送電線付近や直下の住民は高密度の極低周波電磁界に慢性的にさらされている。このような、われわれの生活状況を考慮すれば、本実験で検出された生体への極低周波電磁界の遺伝毒性は今後、さらに詳細な分析が求められる。本実験は、極低周波電磁界による誘発突然変異の効果を生存

力の低下によって定量的に評価したものである。体細胞突然変異が極低周波電磁界への曝露によって可視的に誘発されることを遺伝的マーカーを用いて検出、評価することがこれからの実験として重要である。

文 献

- Feychting, M., Ahlbom, A.: Magnetic fields, and cancer in children residing near Swedish highvoltage power lines. *Am. J. Epidemiol.*, 1993, 138: 467-481.
- Kato, M., Honma, K., Shigemitsu, T., Shiga, Y.: Effects of exposure to a circularly polarized 50-Hz magnetic field on plasma and pineal melatonin levels in rats. *Bioelectromagnetics* 1993; 14(2): 97-106.
- Koana, T., Ikehata, M., Nakagawa, M.: Estimation of genetic effects of a static magnetic field by a somatic cell test using mutagen-sensitive mutants of *Drosophila melanogaster*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1995; 36: 95-100.
- Koana, T., Okada, M., Ikehata, M., Nakagawa, M.: Increase in the mitotic recombination frequency in *Drosophila melanogaster* by magnetic field exposure and its suppression by vitamin E supplement. *Mutation Research* 373 (1997) 55-60.
- McCann, J., Dietrich, F., Rafferty, C.: The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update. *Mutat. Res.* 441 (1998) 45-86.
- Miyakoshi, J., Yamagishi, N., Ohtsu, S., Mori, K., Takebe, H.: Increase in hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene mutations by exposure to high-density 50-Hz magnetic fields. *Mutat. Res.* 349 (1996) 109-114.
- Ohtsu, S., Miyakoshi, J., Tsukada, T., Hiraoka, M., Abe, M., Takebe, M.: Enhancement of beta-galactosidase gene expression in rat pheochromocytoma cells by exposure to extremely low frequency magnetic fields. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jul 6; 212(1): 104-9.
- Reiter, R. J.: Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. *News Physiol Sci* 2000 Oct; 15: 246-250.
- Savitz, D., Wachtel, H., Barnes, F.A. John E.M., Tvrdik, J.G.: Case-control study of childhood cancer and exposure to 60-Hertz magnetic fields. *Am. j. Epidemiol.*, 1988, 128: 21-38.
- Sekelsky, J.J., Burtis, K. C., Hawley, R.S.: Damage Control: The pleiotropy of DNA repair genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, vol. 148, 1587-1598, April 1998.
- Wertheimer, N., E.Leeper: Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am. J. Epidemiol.*, 1979, 109: 273-284.