

厚生科学研究費補助金
(平成 12 年度)
研究報告書

別添 2

厚生科学研究費補助金

生活安全総合研究事業

電磁界の白血球及び免疫系機能に及ぼす影響に関する研究

平成 1 2 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大久保 千代次

平成 1 3 (2 0 0 1) 年 4 月

別添 3

目 次

I. 総括研究報告

電磁界の白血球及び免疫系機能に及ぼす影響に関する研究	1
大久保千代次	

II. 分担研究報告

1. 商用周波電磁界全身暴露による白血球動態への影響に関する研究	8
大久保千代次、牛山 明、増田 宏	
2. 商用周波電磁界全身暴露による免疫指標への影響に関する研究	16
岡田秀親	
3. 電磁界暴露評価に関する研究	24
伊坂勝生、多氣昌生	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

41

42

電磁界の白血球及び免疫系機能に及ぼす影響に関する研究

主任研究者 大久保千代次 国立公衆衛生院生理衛生学部長

研究要旨

電磁界の健康影響の一つとして免疫系への影響が懸念されている。そこで、商用周波電磁界暴露における生体の免疫系への影響を示す一つの指標として、生体内白血球の血管内皮の相互作用と CPR 活性を選び、マウス全身の亜慢性暴露の条件下で検討した。各種の磁束密度において7日間の継続的な暴露をおこなった結果、磁束密度 3.0 mT において、白血球の粘着性が暴露前に比較して統計学的に有意($p < 0.001$)な亢進がみられたが、それ以下の暴露強度では粘着能の変化は認められなかった。CPR 活性も磁束密度 3.0 mT 暴露群で、非暴露群に比較して有意($p < 0.05$)な低下を示し、それ以下の暴露強度では非暴露群との間に差が認められなかった。よって、本実験条件での免疫反応惹起する暴露強度の閾値として 3.0 mT が示唆された。また、居住環境における電磁界暴露評価を行うために、トランジェント磁界に着目した研究を進めた。帯域 2～220kHz のカウンタによる調査によると、電気こたつは発生レベルと頻度の点から他の発生源以上に注目に値することを指摘した。

牛山 明 国立公衆衛生院研究員
増田 宏 国立公衆衛生院研究員
岡田秀親 名古屋市立大学医学部教授
多氣昌生 東京都立大学大学院教授
伊坂勝生 徳島大学工学部教授

して、発がんリスクや心疾患の上昇などが疫学的調査によって示唆されているが、そのメカニズムについては現在までのところ明らかではない。そこで、本研究では、そのメカニズム解明のために、生物学的検討と電気工学的検討を行う。

A. 研究目的

各種電気機器や送配電線からの商用周波電磁界が健康に及ぼす影響についての関心が高まり、そのリスク評価について世界各国で検討が進んでいる。商用周波電磁界の慢性的な暴露による健康影響と

生物学的検討として、発がんリスク等の上昇の原因が、電磁界暴露による免疫機能への影響にあるのではないかを追究した。これまでのわれわれの知見から、商用周波電磁界が白血球の血管内皮への粘着性亢進現象を惹起することが皮膚微小循環系で認

められたので、その分子レベルでの解析を行うと共に、白血球の血管内挙動に変化に関する量反応関係やその閾値を明らかにすることを目的とした。

電気工学的検討として、建築物内における 50Hz あるいは 60Hz の商用周波数を含む超低周波 (300Hz 以下) 電磁界や家電製品のスイッチのオンオフに由来する高周波に及ぶトランジェント磁界による電磁界曝露状況を把握し、トランジェント磁界により誘導される電流密度の高周波成分の及ぼす作用について、高周波領域での研究結果に基づき検討することを目的とした。

B. 研究方法

研究を生物学的検討と電気工学的検討を行う 2 班に分けて実施した。

生物学的検討

商用周波電磁界曝露の生物学的影響を評価するために、曝露装置を有する国立公衆衛生院において動物を飼育し、曝露を実施した。白血球の血管内挙動を追跡するために、背側皮膚透明窓 (dorsal skinfold chamber; DSC) を装着した上で、ラットに各種強度の電磁界を 1 週間曝露し、曝露前後の白血球挙動を計測比較すると共に、曝露後のラット血液および臓器中の免疫指標を曝露強度の異なる各群間で比較した。

白血球挙動

本研究の動物実験は、国立公衆衛生院動物実験指針で示す倫理規定を遵守して行った。雄性 BALB/c マウスを用い、飼育中は個別のケージにて餌と水は自由摂取とした。電磁界の影響を受けない素材 (ジュラコン樹脂) で作られた DSC を

マウスの後背部皮膚の片側に麻酔下で外科的に装着した。

本年度は初年度として、0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mT の異なる曝露強度において、7 日間の継続的曝露影響を調べた。電磁界曝露装置として、ヘルムホルム型 3 軸コイル曝露装置を用いた。曝露装置は、曝露チャンバー内に飼育ケージを配置する棚を持ち、誤差は±5%以内 (実測値) である。曝露中、各個体の曝露条件の均一性を担保するため、マウスケージの位置を毎日変更した。周波数 50Hz でそれぞれの磁束密度 (0~3.0 mT) で 3 軸均等出力によって直線磁界を用いた。曝露は、原則的に 1 日 18 時間とした。なお、実験期間中、電磁コイルの発熱による室温上昇、マウス体重の顕著な増減、行動異常などはみられなかった。

白血球挙動追跡のために、リアルタイム微小循環観察システムを用いた。本システムは、画像取得部として、正立蛍光顕微鏡、レーザー共焦点スキャナユニット及び顕微鏡用高感度ビデオカメラから構成される。レーザー光源としては、YAG レーザー (波長 532nm) を用いた。また画像記録部として、ビデオタイムレコーダー、デジタルビデオレコーダーから構成される。

白血球と血管内皮相互作用の観察には、Rhodamine6G を投与することにより、白血球を選択的に染色した後、リアルタイム微小循環観察システムを用いて、白血球挙動を観察した。観察対象は内径 30 μm 前後の細静脈とし 100 μm の距離を観察対象とした。記録は原則的にチャンバー内の血管床の同一部位を観察をする

こととし、得られた像はデジタルビデオテープに記録し、オフラインで解析を行った。解析には連続する 60 秒間に血管内を流れた白血球数 (f) と粘着白血球数 (a) を数え、全白血球に対する粘着白血球の割合 (%) ($a / (a + f) \times 100$) として算出した。粘着白血球とは、同一部位にとどまる白血球 (接着白血球) と、血管内皮と一定の相互作用を持って流れる白血球 (ローリング白血球) との和と定義して、解析した。

免疫指標

マウスから採取した血清、臓器などの凍結試料を国立公衆衛生院から送付を受け解析に供した。DSC 装着手術を施した BALB/c マウスを対象に、0~3.0mT の電磁界強度を有する商用周波電磁界を 1 週間継続的に暴露した各群から採取した新鮮血清を基質の hippuril-L-arginine と反応させ、遊離した馬尿酸を液体クロマトグラフィーでカルボキシペプチダーゼ(CP)活性を定量した。

暴露評価群として、DSC 装着手術により惹起される炎症反応も考慮に入れて、以下の 8 群(各群 n=5~6)を設けた。DSC 装着・非暴露 (Pre-ope) 群、DSC 装着・擬似暴露(0.0 mT-ope(+))群、DSC 装着・0.1 mT 暴露(0.1 mT-ope(+))群、DSC 装着・0.3 mT 暴露(0.3 mT-ope(+))群、DSC 装着・1.0 mT 暴露(1.0 mT-ope(+))群、DSC 装着・3.0mT 暴露(3.0 mT-ope(+))群、DSC 非装着・非暴露(Pre-ope(-))群、DSC 非装着・擬似暴露(0.0 mT-ope (-))群とした。

血清に Potato carboxypeptidase inhibitor (PCI) を 0.1 mg/ml 添加して

CPR 活性を阻害して測定した時の値を CPN の活性と見なし、添加しなかった値から CPN の活性分を引いた残りの値を CPR の活性として算出した。proCPR および CPN の mRNA 量は凍結保存しておいた肝臓、肺臓および脾臓から RNA を抽出して Northern blot 法により解析した。

電気工学的検討

本研究では、トランジェント磁界発生状況を観測するためにトランジェントカウンタを用いた。その動作原理、校正の結果および実測結果などについて述べる。また、トランジェント磁界波形の観察を行った。

トランジェントカウンタによる方法

トランジェント磁界の波高値を分析する方法、すなわちカウンタによる方法を用いて、乗り物 (新幹線、在来線およびバス) 内で測定を行った。

電気機器のスイッチングにより過渡的に強い磁界が発生することが知られている。最近このようなトランジェント磁界が注目されており、米国では 156 世帯において 24 時間あるいはさらに長時間の実測例がある[3]。この測定ではしきい値を超える頻度が計測できるトランジェントカウンタが使用された。このカウンタは周波数帯域が 2 ~ 220 kHz のバンドパスフィルタを通過する磁界信号が 2 つのしきい値、すなわち 0.03mG および 0.3mG を超える頻度を計数するものである。

今回使用したトランジェントカウンタは Eneritech 社のもので、しきい値として 0.05mG と 0.5mG をもつ 2 チャンネルのカウンタである。周波数特性は上記と同様

で、2～220kHz となっている。校正には、直径 50cm のヘルムホルツコイルを使用して、一様磁界を発生させ、その中にトランジェントカウンタのセンサコイルを配置した。また、関数発生器（岩通製 SG-4111 / 正弦波ひずみ率：1%）より任意の周波数・電圧を発生させ、実験回路の数種類の負荷抵抗を挿入し、回路に流れる電流を調節した。選定した周波数は 60、600、 6×10^3 、および 600×10^3 Hz である。実験に使用したカウンタは商用周波数（60Hz）および高調波（周波数：数 100Hz）電流に因る正弦波磁界では動作しないことがわかった。カウンタの設計条件の通り、6kHz の正弦波磁界では動作していることが確認できた。このカウンタは単発の過渡磁界が 2～220kHz の帯域の信号を有する場合には動作する可能性がある。また、このカウンタは、同一の帯域の成分を含む正弦波状の磁界が繰り返し連続して発生する場合にも動作する可能性がある。後者の場合の磁界は過渡磁界ではないことに注意が必要である。

トランジェント磁界波形の観察

供試電気こたつはファンを有し、交流 100V - 600W のサーモスタット温度制御式である。そのサーモスタットの on/off によってトランジェント磁界が発生する。

磁界センサーコイル・増幅器（周波数特性は 40～10 kHz / 昭電製、MFM-12A）およびオシロスコープ（Fluke 製、190）を用いて、まずいくつかの電気機器等から発生するトランジェント磁界を測定した。その結果、トランジェント磁界の大きさ、そして発生頻度等を、総合的に考察して、電気こたつから発生するトランジェント磁界の波形の測定に力点を置くことにした。

なお、電気こたつの他に、卓上蛍光灯、扇風機、テレビ、電子レンジからの典型的なトランジェント磁界波形のデータを収集することにした。

C. 研究結果

生物学的検討

白血球の蛍光染色による可視化については、従来、落射型蛍光顕微鏡を用いた観察が行われていたが、染色に用いる Rhodamine6G は、核を持つ細胞を染色することが報告されており、血管外の組織をも染色し画像解析に困難を招いていた。本研究では、新たにレーザー共焦点システムを導入した結果、画質が向上し、より精度の高い観察が可能となった。

白血球挙動

商用周波電磁界暴露による白血球粘着能の変化について検討を行った。粘着能の計測は、暴露開始当日（Day 0）および、7日間の暴露終了当日（Day 7）に行った。暴露レベルは、非暴露群（0mT）及び、0.3、1.0、3.0 mT 暴露群の 4 群（ $n=5$ 以上）とした。その結果、非暴露群及び 0.3、1.0 mT 暴露群では暴露の前後において、全白血球に対する粘着白血球数の割合に有意な変化は見られなかった。しかし、3.0 mT 暴露群は、暴露前値 27.0 ± 1.4 （%）から暴露後値 32.5 ± 1.9 （%）（いずれも $\text{mean} \pm \text{SE}$ ）に上昇し、統計学的に有意（ $p < 0.001$ ）であった。

免疫指標

DSC 装着手術前の正常血清の CP 活性を Hippuril-L-arginene を基質として測定した。DSC 装着手術前のコントロールマウスにおける総カルボキシペプチダ

一ゼ活性、CPR 活性、CPN 活性は、それぞれ 457.7 ± 118 U/L、 310.1 ± 102.5 U/L、 147.6 ± 21.2 U/L であった。CPN は手術の有無、商用周波電磁界暴露の有無などに関わらず、ほぼ一定の値を示した。CPR 活性は DSC 手術処置を行った DSC 装着各群で活性が高くなり、手術非試行の DSC 非装着 2つの群では低い傾向にあったが、統計学的な有意差は認められなかった。また、商用周波電磁界暴露強度を 3.0 mT まで高めると CPR 活性が低くなる傾向にあり、その低下には有意差($p < 0.05$)が認められた。

Northern blot 法による mRNA 量の解析結果では手術により ProCPR mRNA の上昇を認めたが、商用周波電磁界暴露強度による一定の変化は認められなかった。

電気工学的検討

トランジェントカウンタによる実測

身の周りの電気製品（コピー機、CRT パソコン、液晶パソコン、テレビ、CD プレイヤ）についての実測を行った。これらの機器についての実測結果を図 9 に示す。テレビや CRT パソコンから 0.5mG を超える磁界が観測されているが、これはのこぎり波状の水平掃引信号によるものと考えられる。この磁界は繰り返し波形となっており、トランジェント磁界と呼ばれるものではなかった。

トランジェント磁界の測定結果

電気こたつからの磁界について検討した。供試電気こたつは熱拡散用のファンを有する交流 100V・600W のサーモスタット温度

制御式のものである。

供試電気こたつはサーモスタットの動作により温度コントロールされるようになっており、その動作瞬時に過渡電流が流れ、トランジェント磁界が発生することがはっきり分かった。なお、一般にサーモスタットの動作は機械的であるから、電流の最大値でオン状態になる場合もあれば、電流零の瞬時にオン状態になる場合もある。したがって、そのスイッチングによる過渡現象は一義的には決まらない。スイッチングの位相が事象ごとに異なることも分かった。

次に、電流波形と磁界波形の比較を行った。実験中に電流波形と磁界波形を比較したところ、本来同一であるべきものが、磁界波形の方が電流波形に比してやや異なっており、直流分が含まれるような波形に対しては磁界センサーは追従が難しいことを示唆していた。

次に、卓上蛍光灯、扇風機、テレビ、電子レンジなどの電気製品から発生するトランジェント磁界の測定を上記の磁界センサーコイルを用いて行った。その研究結果を総括すると、扇風機や電子レンジ、卓上蛍光灯等はそのトランジェント磁界の発生回数が少なく、またその近傍に滞留する事が少なかった。

D. 考察

生物学的検討

本研究では、超低周波電磁界の亜慢性暴露による免疫系への影響を、血管内壁と白血球の相互作用を指標として、実験動物を用いて検討した。

これまでに、ヒト末梢血単球を用いた *in vitro* での研究では、商用周波数である 50 Hz で、磁束密度 1~30mT の超低周波電磁界暴露を 3 日間連続で行うことで、サイトカイン分泌に変化が見られたという報告がある。サイトカインとは一連のインターロイキンや TNF といった生理活性物質の総称であり、その作用は微小環境における免疫応答すなわち細胞間相互作用に関わっている。ここでいう細胞間相互作用とは、白血球の血管内皮に対する相互作用であり、一般に炎症部位などでは、サイトカインの分泌亢進によるローリング白血球の増加や接着白血球の増加が観察される。したがって、*in vitro* 研究での報告に見られるような、電磁界暴露によるサイトカインの変動が起これば、それは *in vivo* では白血球の粘着能の亢進として観察されることが考えられる。

本研究では、0.3, 1.0, 3.0 mT の暴露レベルで、7 日間の継続的暴露を実施し、生理的影響を惹起する暴露レベルについて、検討をおこなった結果、3.0 mT においては有意な増加が見られた。3.0 mT という磁束密度は日常生活ではほとんど存在し得ない非常に強い電磁界環境であると同時に、白血球粘着性の亢進が甚大な健康影響に直接関与するかは不明であるが、後述する CPR 活性の低下との関連を詳細に検討する必要がある。

一方、DSC 装着手術の侵襲でも免疫指標である CPR 活性の上昇傾向が認められたが、3.0 mT の商用周波電磁界暴露を 1 週間実施すると CPR 活性の有意な低下が認められた。今後手術侵襲を与

えない状況での解析が必要と考えられる。手術侵襲があっても、3.0 mT という日常の生活環境レベルより遙かに強い商用周波磁界ではあるものの、暴露により CPR 活性の顕著な低下が認められたことは生物学的に重要な意味を持っている可能性がある。CPR が低下することは、アレルギー等に対する感受性が高まる可能性もあると考えられる。また、生体顕微鏡的にも、白血球の血管内皮に対する粘着性亢進も 3.0 mT で統計学的に有意な差が生じており、偶然の一致と理解しがたく、閾値の存在を示唆している。商用周波電磁界での CPR 活性の低下が白血球の挙動の変化にどの様に関与するかも今後焦点を絞って解析する必要がある。一方、CPR は線溶系にも関与することが明らかにされているので、商用周波電磁界と血栓症が病因となる心筋梗塞などにも注目した疫学調査でも 2, 3 関連性を示唆する報告もあり、これについても検討する必要があると思われる。

電気工学的検討

本研究の目的は、(1)生活環境でのトランジェント磁界を調査する、(2)その磁界を人工的に作り出す、そして(3)その磁界環境下で生体実験を行う、ことである。すなわち、本年度収集されたトランジェント磁界の波形を生体曝露実験システムの入力とし、生体を実際に得られたトランジェント磁界に曝露することを目的としている。このためには、まず典型的なトランジェント磁界の波形とその発生頻度を決定しなければならない。これらの情報を波形発生装置に入力し、増幅器を通してコイルに電流

を流すと、所定の磁界が得られるので、技術的にはさほど難しくない。ただ、トランジェント磁界として高周波成分を取り入れたものになると、曝露ケージの仕様によってはかなり厳しい技術的対応が必要になると考えられる。

E. 結論

生物学的な検討結果から、マウスの DSC 法を用いて白血球と血管内皮の相互作用の計測法を確立し、超低周波電磁界の全身亜慢性曝露に対する影響を追求した。その結果、周波数 50Hz、磁束密度 3mT、7 日間の連続曝露では、曝露前に比べて白血球の粘着が有意に亢進したが、磁束密度 1 mT 以下では変化が見られなかった。一方、マウス血清中免疫指標の一つである CPR 活性も、非曝露群に比べて磁束密度が 1.0 mT 以下の群では差が認めなかったが、3.0 mT 曝露群では、CPR 活性の低下が認められた。

電気工学的検討として、居住環境における電磁界曝露評価を行うために、トランジェント磁界に着目した研究を進めた。帯域 2 ~ 220kHz のカウンタによる調査によると、新幹線 (のぞみ) 内ではディーゼル在来線よりもカウント数が少ないことが分かった。電気こたつは発生レベルと頻度の点から他の家電製品など発生源以上に注目に値することを指摘した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato, T., Miwa, T., Akatsu, H., Matsukawa, N., Obata, K., Okada, N., Campbell, W. & Okada, H. Pro carboxypeptidase R is

an acute phase protein in the mouse, whereas carboxypeptidase N is not. *J. Immunol.* 165: 1053-1058 (2000)

- 2) Kato, T., Akatsu, H., Sato, T., Matsuo, S., Yamamoto, T., Campbell, W., Hotta, N., Okada, N. & Okada, H. Molecular cloning and partial characterization of rat procarboxy-peptidase R and carboxypeptidase N. *Microbiol. Immunol.* 44: 719-728 (2000)
- 3) Guo, X., Okada, N. & Okada, H. CPR-total (TAFI and activated TAFI) levels in plasma/serum of hemophiliacs. *Microbiol. Immunol.* 44 : 77-78 (2000)
- 4) Campbell, W., Okada, N. and Okada, H. Carboxypeptidase R (CPR) is an inactivator of complement derived inflammatory peptides and an inhibitor of fibrinolysis. *Immunol. Rev.* 180: 162-167 (2001)

商用周波電磁界全身暴露による白血球動態への影響に関する研究

主任研究者 大久保千代次 国立公衆衛生院生理衛生学部長
分担研究者 牛山 明 国立公衆衛生院生理衛生学部研究員
増田 宏 国立公衆衛生院生理衛生学部研究員

研究要旨

電磁界の健康影響の一つとして免疫系への影響が懸念されている。本分担研究においては、商用周波電磁界暴露における生体の免疫系への影響を示す一つの指標として、生体内白血球の血管内皮の相互作用をマウス全身の亜慢性暴露の条件下で検討した。本年度は、異なる3つの磁束密度で7日間の継続的暴露をおこない、白血球粘着能の変化を検討した結果、磁束密度3 mTでは、暴露前後において統計学的に有意($p < 0.001$)な亢進がみられたが、0.3および1 mTの暴露では粘着能の変化は認められず、白血球の粘着性と磁界暴露強度との相関が示唆された。

A. 研究目的

各種電気機器や送・配電線からの商用周波電磁界が健康に及ぼす影響についての関心が高まり、そのリスク評価について世界各国で検討が進んでいる。商用周波電磁界の慢性的な暴露による健康影響としては、発がんリスクや心疾患の上昇などが疫学的調査によって示唆されているが、そのメカニズムは現在までのところ明らかではない。近年報告されたヒト末梢の血液を用いた研究では、電磁界暴露によって白血球が活性化され、一部のサイトカイン分泌に影響を与えるという報告があるものの、生体内での免疫系への影響には不明な点が多い。免疫系は様々な形でヒトの健康に影響を及ぼすこ

とが考えられるため、電磁界暴露と白血球の活性化および免疫系への影響を明らかにすることを本分担研究の目的とする。方法としては、免疫系と関連の深い白血球の血管内挙動に着目して、マウス背側皮膚透明窓 (dorsal skinfold chamber; DSC) を用いて、背側皮膚の微小循環を生体顕微鏡下で観察し、蛍光色素で標識した白血球の動態を定量することとした。本年度は初年度として、0.3, 1, 3 mTの異なる暴露レベルにおいて、7日間の継続的暴露をおこない、白血球への影響を調べた。

B. 研究方法

実験動物

本研究の遂行に当たっては、国立公衆衛生院動物実験指針を遵守して行った。全ての実験は、手術の時点で8ないし9週齢の雄性 BALB/c マウス（東京実験動物）を用い、飼育中は個別のケージにて餌と水は自由摂取とした。実験期間中の飼育及び全ての実験は、23°Cに設定したバリア領域で行い、飼育室は 12 時間毎の明暗調節を行った。電磁界の影響を受けない素材（ジュラコン樹脂）で作られた DSC をマウスの後背部に外科的に装着した。

DSC の装着手順は次の通りである。DSC は、2枚のフレームと固定用ビス、観察窓用カバーガラス、カバーガラスの留め具から構成される。装着手術に先立ち、Ketamine-Xylazine 混合液 (10:1 w/w, 10 mg/ml) により麻酔を施す (0.001 mg/g body weight, s.c.)。麻酔したマウスの背側皮膚をバリカンおよび除毛クリームを用い除毛する。マウスの背側の皮膚をつまみ上げ、皮膚が適度に伸展した状態で中央に直径 11mm の観察窓のあるフレームをつまみ上げた皮膚の片側に装着する。

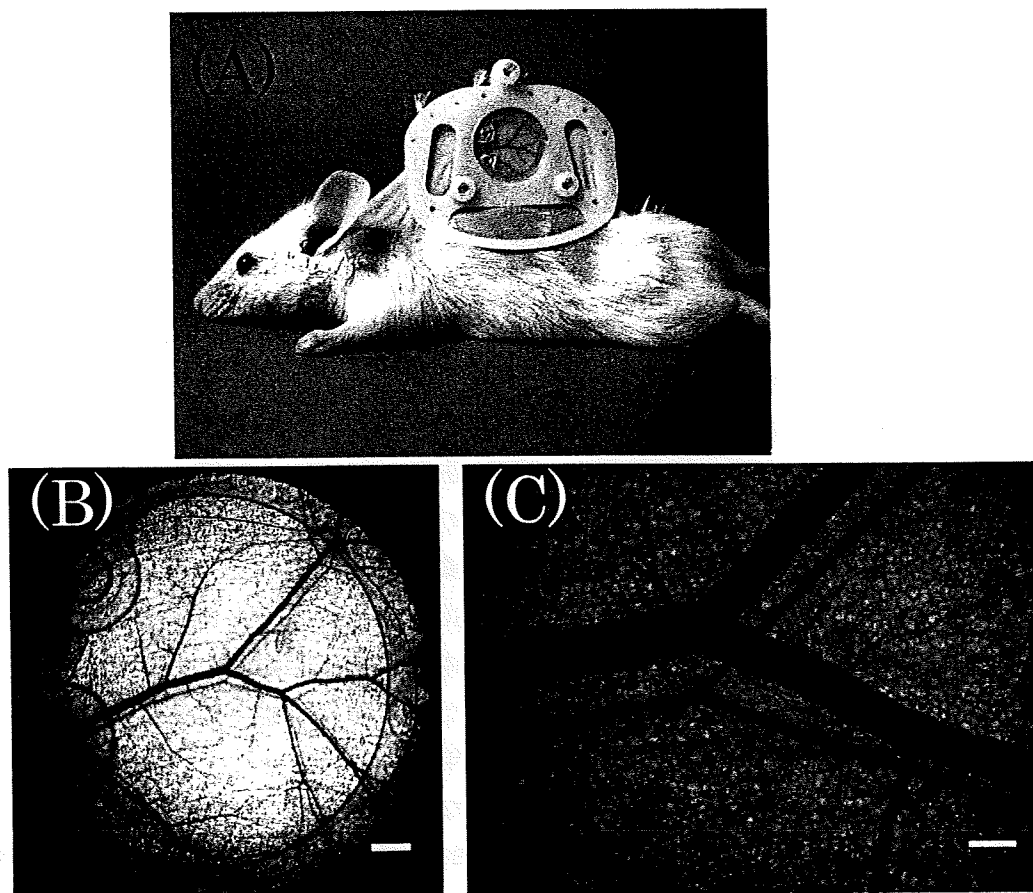


図1 Dorsal Skinfold Chamber を装着したマウス (A) 及び Chamber 内の拡大写真 (B, C)

図中のスケールバーはそれぞれ、1 mm(B), 200 μ m を示す。

フレームと接していない側の皮膚を直径14mm程度の円形に切り取り、切り取った円形窓から残った側の皮膚の血管網が観察できるようにする。その上にもう一枚のフレームを乗せ、皮膚をサンドイッチ状に挟むように重ねて、固定用ビスでフレームを固定する。最後に観察面にカバーガラスを乗せ、留め具で固定する。なお、DSCを装着したマウス及びチャンバー内の血管像を図1に示した。なお、手術部位の炎症反応などによる影響を避けるため、DSCの装着手術は、白血球粘着能観察の72時間以上前におこない、手術の影響によって血流動態、血管構築などに影響がみられた個体は対象から外した。

電磁界暴露装置および暴露条件

電磁界暴露にあたっては、ヘルムホルツ型3軸コイル暴露装置を用いた(図

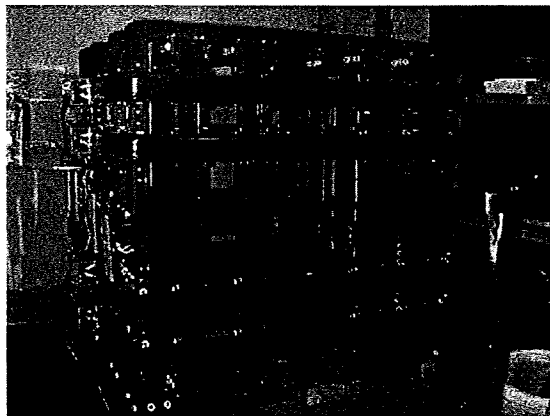


図2 超低周波電磁界亜慢性装置

本暴露装置は3軸各4個のコイルから構成され、各軸で独立した電源装置を通して内部で均一な電磁界を発生することができる。

2)。本暴露装置は、暴露チャンバー内に飼育ケージを配置する棚を持ち、棚の上の18の測定点における誤差は±5%以内(実測値;図3)である。暴露期間においては、暴露条件の均一性を担保するため、マウスケージの位置を毎日変更した。本研究では、周波数50Hzでそれぞれの磁束密度(0~3mT)で3軸均等出力によって形成される直線磁界である。磁束密度の計測には、電磁界計測器(model EFA-2, Wandel&Gotermann社製)を用い、暴露は食餌交換、床敷き交換などのため原則的に1日18時間とした。なお、すべての亜慢性暴露実験については、実験期間中、電磁コイルの発熱による室温上昇、マウス体重の顕著な増減、行動異常などはみられなかった。

リアルタイム微小循環観察システム

本研究本システムは、画像取得部として、正立蛍光顕微鏡(BX50WI, オリンパス光学)、レーザー共焦点スキャナユニット(CSU-10, 横河電機)、及び顕微鏡用高感度ビデオカメラ(EB-CCD camera model C7190, 浜松ホトニクス)から構成される。レーザー光源としては、波長532nmの固体レーザー(model GCL050-L, CrystaLaser社製)を用いた。また画像記録部として、ビデオタイムレコーダー、デジタルビデオレコーダー(WV-DR7, ソニー)から構成される。本装置の概要を図4に示した。

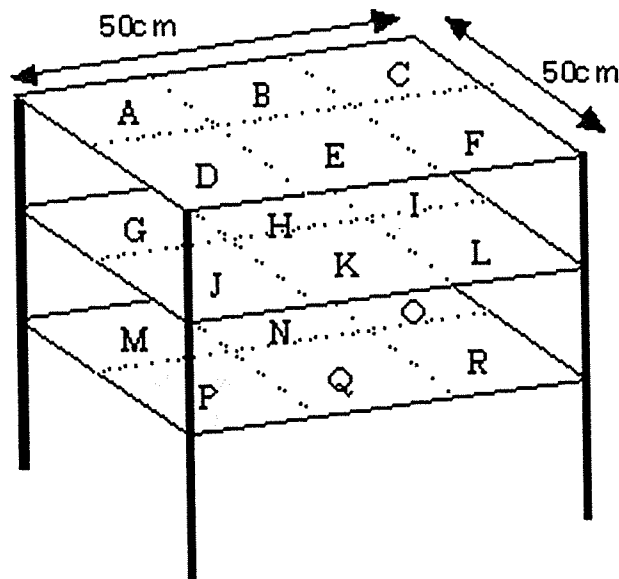


図3 低周波電磁界暴露装置内の電磁界強度分布（実測値）

図2に示した装置内にマウス飼育ケージに合わせて3段の棚を作成し、最大18個のケージをおけるようスペースを区切った。出力を3mTの設定ではそれぞれのスペースの中央での測定値（実効値）を示す。A:3.084mT（以下単位同じ）、B:2.982、C:3.090、D:3.120、E:3.070、F:3.142、G:3.080、H:3.015、I:3.053、J:3.040、K:3.032、L:3.073、M:3.140、N:3.072、O:3.129、P:3.077、Q:3.007、R:3.010

白血球-血管内皮相互作用の観察

Rhodamine6G（和光純薬）を濃度0.04%となるよう調製した後、口径0.2μmのフィルターで不溶物を除き、注射用液とする。マウスを保定し、本液100μlを尾静脈から投与することにより、白血球を選択的に染色した後、リアルタイム微小循環観察システムを用いて、白血球挙動を観察する。観察対象は内径30μm前後の細静脈とし100μmの距離を観察対象とした。また、記録は原則的に

チャンバー内の血管床の同一部位について観察をすることとし、1個体3カ所の測定をおこなった。ビデオカメラを通して得られた像はデジタルビデオテープに記録し、オフラインで解析をおこなった。解析にあたっては連続する60秒間に血管内を流れた白血球数(f)と粘着白血球数(a)を数え、全白血球に対する粘着白血球の割合(%) $(a / (a + f) \times 100)$ として算出した。粘着白血球とは、同一部位にとどまる白血球（接着白血球）と、血管内皮と一定の相互作用を持って流れ

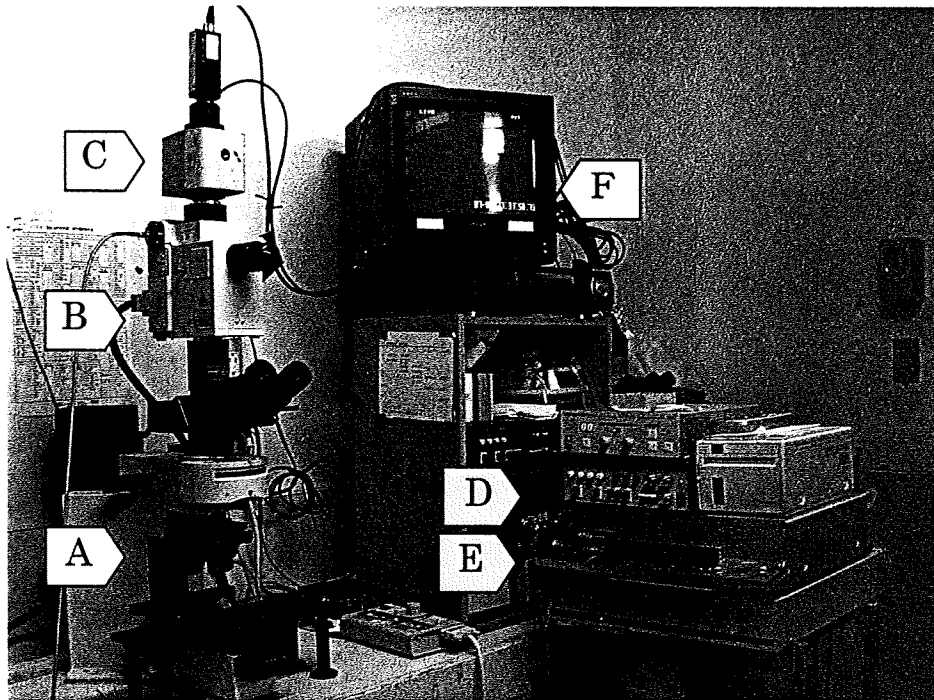


図4 共焦点顕微鏡観察システム

本システムは、正立型落射蛍光顕微鏡 (A)、共焦点ユニット (B)、インテンシファイア付き CCD カメラ (C) を通じて得られた画像を、タイムレコーダー (D) を通じて、デジタルビデオレコーダー (E) 上で記録することが可能である。また、画像は、モニター (F) を通じてリアルタイムでモニタリングが可能である。

る白血球（ローリング白血球）との和と定義した。

本法による白血球動態の観察は、暴露開始直前と、7日間の暴露終了直後におこなった。

C. 研究結果

白血球可視化の方法の開発

白血球の蛍光染色による可視化については、従来、落射型蛍光顕微鏡を用いた観察が行われていた。しかしながら、染色に用いる Rhodamine6G は、一般に核

を持つ細胞を染色することが報告されており、血管内皮、および血管外に漏出した Rhodamine6G が血管外の組織を染色しバックグラウンドが上昇し画像解析に困難を生じる場合があった。本研究では、これまでとは異なり、新たにレーザー共焦点システムを導入した結果、画質が向上し、より精度の高い観察が可能となった。レーザー共焦点顕微鏡は、その特徴として一般にZ軸方向の解像度が非常に高く、バックグラウンドの蛍光レベルを下げる事が可能である。このようなシステムによる白血球の観察は、これまで報

告されていないため重要な成果であると思われる。本研究で用いたシステムで取得した白血球の蛍光画像と、従来の方法による画像を図5に示す。

白血球粘着能について

商用周波電磁界暴露による白血球粘着

能の変化について検討をおこなった。粘着能の計測は、暴露開始当日 (Day 0) および、7日間の暴露終了当日 (Day 7) に、前述の方法でおこなった。暴露レベルについては、非暴露群(0 mT) 及び、0.3、1、3 mT 暴露群の4群とした。それぞれの群については、5個体以上のマウス

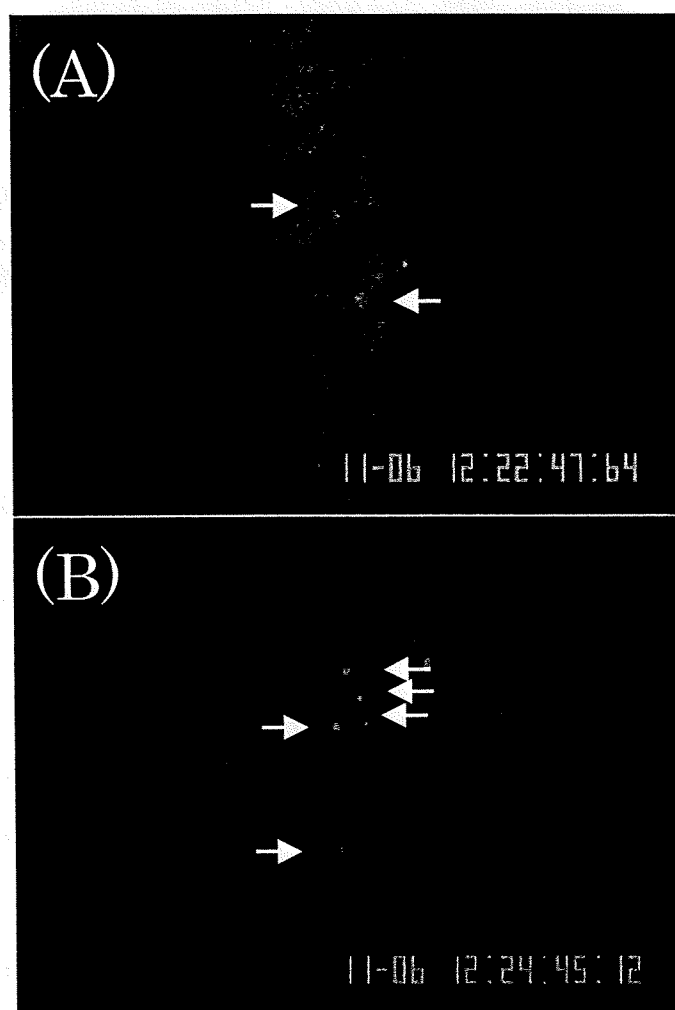


図5 Rhodamine 6Gにより蛍光染色された白血球の落射蛍光顕微鏡による像 (A) とレーザー共焦点顕微鏡による像 (B)
矢印は染色された白血球を示す。(スケールバーは100 μ m)

を用いた。白血球粘着能の結果を図6にまとめた。図に示すように、非暴露群及び0.3、1mT暴露群では暴露の前後において、全白血球に対する粘着白血球数の割合に有意な変化は見られなかったが、3mT暴露群においては、暴露前値 27.0 ± 1.4 (%) から暴露後値 32.5 ± 1.9 (%) (いずれも $\text{mean} \pm \text{SE}$) に上昇し、統計学的に有意($p < 0.001$)であった。

D. 考察

本分担研究では、商用周波電磁界の慢性暴露による免疫系への影響を、血管内壁と白血球の相互作用を指標として、

実験動物を用いて検討した。

ヒト末梢血単球を用いた *in vitro* での研究では、周波数 50Hz で、磁束密度 1～30mT の商用周波電磁界暴露を3日間連続でおこなうことで、サイトカイン分泌に変化が見られたという報告がある。サイトカインとは一連のインターロイキンや TNF といった生理活性物質の総称であり、その作用は微小環境における免疫応答すなわち細胞間相互作用に関わっている。ここでいう細胞間相互作用とは、白血球の血管内皮に対する相互作用であり、一般に炎症部位などでは、サイトカインの分泌亢進によるローリング白血球

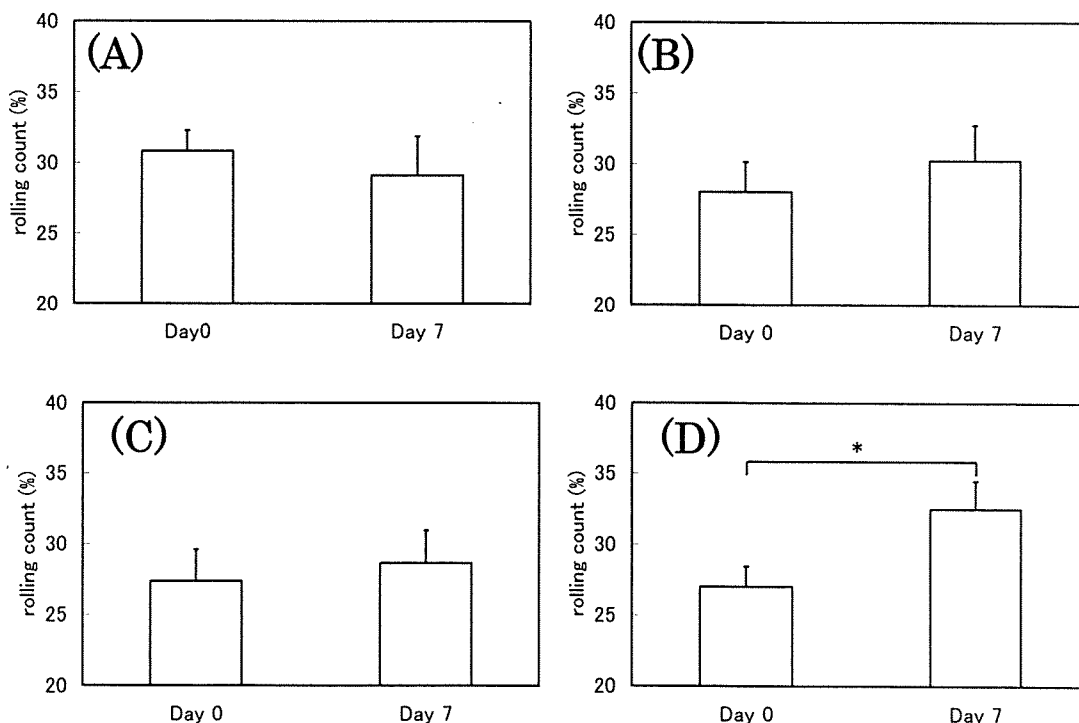


図6 超低周波電磁界暴露前(Day0)と暴露後(Day7)における白血球粘着能の変化
各々のグラフは非暴露群(A)、0.3mT群(B)、1mT群(C)、3mT群(D)を示し、 $\text{mean} \pm \text{SE}$ を示す。* $p < 0.001$

の増加や接着白血球の増加が観察される。したがって、*in vitro* 研究での報告に見られるような、電磁界暴露によるサイトカインの変動が起これば、それは *in vivo* では白血球の粘着能の亢進として観察されると考えられる。

既に我々は、この仮説に基づき、本研究に用いた手法と同じマウス背側皮膚透明窓 (DSC) を用いた研究において、50Hz、3mT の暴露を 15 日間おこなうことが、白血球の粘着能を有意に惹起することを報告している。しかしながら、そのような影響を与える暴露レベルの下限値については、明らかとなっていないため、本分担研究では、0.3, 1, 3mT という異なる 3 つの暴露レベルにおいて、7 日間の継続的暴露をおこない、生理的影響を惹起する暴露レベルについて、検討をおこなった。

その結果、本条件下においては、0.3、1mT では粘着白血球の有意な増加は見られなかったが、3mT においては有意な増加が見られた。3 mT という磁束密度は日常生活ではほとんど存在しえないといえる非常に強い電磁界環境であると同時に、白血球粘着性の亢進が甚大な健康影響に直接関与するかは不明であるが、より長期の暴露影響について詳細に検討が必要であろう。

E. 結論

本分担研究では、マウスの DSC 法を用いて白血球と血管内皮の相互作用の計測法を確立し、商用周波電磁界の全身亜慢性暴露に対する影響を追求した。その結果、周波数 50Hz、磁束密度 3mT、7

日間の継続的暴露では、暴露前に比べて白血球の粘着が有意に亢進したが、磁束密度 1 mT 以下では変化が見られなかった。

F. 研究発表

なし。

商用周波電磁界全身暴露による免疫指標への影響に関する研究

分担研究者 岡田秀親 名古屋市立大学医学部教授

研究の要旨

Carboxypeptidase R (CPR) は、血漿中に存在する前駆体の ProCPR から炎症反応や凝固反応に関わるプロテアーゼによって活性化されて CPR となるが、その寿命は短く、30分ほどで不活化されてしまう酵素である。特に、炎症反応を制御する役割を持つことから、その制御機能に影響があると感染などに対する生体防御機能にも変調をもたらすと予測される。皮膚微小循環系血管内白血球挙動を生体顕微鏡的に観察するためのラット背側皮膚透明窓を装着したマウスを対象に、各種強度 (0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mT) の商用周波電磁界暴露を継続的に7日間実施した時の免疫学的指標の動態を追究する目的で、Carboxypeptidase R に注目して解析を行った。その結果、3.0 mT の電磁界強度では有意 ($p < 0.05$) な CPR 活性の低下が認められた。しかし肝臓から抽出した ProCPR の mRNA 量には大きな変動が認めなかった。

A. 研究目的

商用周波電磁界暴露が白血球の血管内挙動に影響を与えることが皮膚微小循環系血管網での解析で認められているので、その分子レベルでの解析を展開するために、局所炎症反応の抑制に関わると考えられる Carboxypeptidase R (CPR) の変化に焦点を絞り、Carboxypeptidase N (CPN) と共に解析した。CPR はその前駆体である Pro-carboxypeptidase R (proCPR) が thrombin、plasmin、trypsin などの蛋白分解酵素によって限定分解されて活性化型になる塩基性カルボキシペプチダーゼである。ペプチドのカルボキシル基末端のアルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸を切除する活性を持ち、補体フラグメントの C5a などのアナフィラトキシンを不活化する。C5a の他に、C3a、C4a などの補体フラグメントもカルボキシル基末端にアルギニンを持つので、塩基性カルボキシペプチダーゼにより不活化を受ける。更に、ブラジキニン、エンケファリ

ンなどのペプチドも同様に CPR による不活化作用を受ける。この様に、炎症性ペプチドの多くが CPR の作用で不活化されるので、生体内における炎症反応の制御における CPR の役割は極めて大きいと考えられる。CPR は、Carboxypeptidase U (CPU)、Plasma carboxypeptidase B (pCPB) などとも呼ばれる。ほぼ同じ時期に独立に別の研究者により発見されたためである。更に、血液凝固の研究グループが、線溶反応を阻害する因子として Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) の研究を展開していたが、この TAFI は proCPR と同一物質であることが、cDNA が明らかにされることにより 1995 年に判明した。従って、CPR は炎症性ペプチドの不活化に働くだけでなく、その反応が強くと起こるとフィブリンのリジンを切除してプラスミノーゲンの結合を起こせなくしてしまうため線溶反応を阻害することになる。従って、CPR と CPN を解析することは、炎症反応の制御状況

を知る手がかりとなるだけでなく、血栓溶解反応などの炎症修復における状況にも関わるものとして注目に値すると考えられる。

B. 研究方法

暴露評価群として、DSC 装着手術により惹起される炎症反応も考慮に入れて、以下の8群(各群 n=5~6)を設けた。DSC

装着・非暴露 (Pre-ope) 群、DSC 装着・擬似暴露(0.0 mT-ope(+))群、DSC 装着・0.1 mT 暴露(0.1 mT-ope(+))群、DSC 装着・0.3 mT 暴露(0.3 mT-ope(+))群、DSC 装着・1.0 mT 暴露(1.0 mT-ope(+))群、DSC 装着・3.0mT 暴露(3.0 mT-ope(+))群、DSC 非装着・非暴露(Pre-ope(-))群、DSC 非装着・擬似暴露(0.0 mT-ope (-))群とした(表1)。

表1 ラットの血清、臓器の資料コード表

No.	実験条件		血清		肝臓、脾臓、肺	
	DSC手術	磁界暴露	サンプル番号	数	サンプル番号	数
1	○	Pre	C10, C11, C12, C14, C15, C16	6	C11, C12, C13, C14, C17, C18	6
2	○	0.0mT	B11, B12, B14, B16, B17, B18	6	B11, B12, B14, B16, B17, B18	6
3	○	0.1mT	E1, E2, E3, E4, E5, E6	6	E1, E2, E3, E6, E7, E8	6
4	○	0.3mT	D2, D5, D10, D12, D14, D15	6	D2, D5, D10, D12, D14, D15	6
5	○	1.0mT	C2, C4, C6, C7, C8, C9	6	C2, C4, C6, C7, C8, C9	6
6	○	3.0mT	B1, B2, B3, B4, B5, B6	6	B3, B4, B5, B6, B7, B8	6
7	×	Pre	F1, F4, F5, F7, F8	5	F1, F2, F4, F5, F7, F8	6
8	×	0.0mT	F9, F10, F11, F12, F13, F14	6	F9, F10, F11, F12, F13, F14	6

マウスから採取した血清、臓器などの凍結試料を国立公衆衛生院から送付を受け解析に供した。背側皮膚透明窓(dorsal skinfold chamber; DSC)装着手術を施した BALB/c マウスを対象に、0~3.0mT の電磁界強度を有する商用周波電磁界を1週間継続的に暴露したマウスの血清、血餅、肝臓、肺臓および脾臓を解析の対象とした。それらのサンプルは、表2に纏めた。

カルボキシペプチダーゼの活性は以下のこ

とくに行った。各群のマウスから採取した新鮮血清希釈液の 20 ul に 40 ul の 30 mM hippuril-L-arginine を基質として加えて、37°C 45 分間反応させたあと、2.5 M 塩酸を 20 ul 加えて反応を停止させた。この反応液に 300 ul の酢酸エチルを加えて遊離した馬尿酸を抽出した。酢酸エチル分画の 200 ul を取り出し、これを乾固したあと 200 ul の蒸留水に溶解し、液体クロマトグラフィーで馬尿酸量を OD228 の吸光度を測定して、馬尿酸の定量曲線から