

厚生労働科学研究費補助金  
(平成 14 年度)  
研究報告書

別添 1

厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書概要版

研究費の名称=厚生労働科学研究費補助金

研究事業名=生活安全総合研究事業

研究課題名=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（総括研究報告書）

国庫補助金精算所要額（円） = 9,000,000

研究期間（西暦）=2000-2002

研究年度（西暦）=2002

主任研究者名=大久保 千代次（国立保健医療科学院）

分担研究者名=牛山 明（国立保健医療科学院）、増田 宏（国立保健医療科学院）、岡田 秀親（名古屋市立大学）、多氣 昌生（東京都立大学）、伊坂 勝生（徳島大学）

研究目的=建築物内における商用周波電磁界とトランジェント磁界への暴露状況を把握すると共に電磁界暴露と白血球及び免疫機能との関連の有無を含めて、電磁界の健康影響を追究する。

研究方法=①居住環境内の電磁界影響を把握するには、その暴露実態解明が必要となる。我々はこれまでに、商用周波の正弦波のほかに、WHOで議論されている、家電製品の電源オンオフ時に生じる波形が非正弦波的に変化する性質（トランジェント）磁界を含む磁界の時間波形を検出し、この波形をデジタル的に取り込むことによって同一の波形を繰り返し発生させることができる磁界曝露装置の基礎的システム開発し、国立保健医療科学院の既設の低周波磁界曝露装置にトランジェント磁界発生装置を付加して設計製作したが、今年度はトランジェント磁界と50Hzの商用周波磁界暴露を並行してマウスへ亜慢性的に暴露し、その時の波形分析を行った。

②商用周波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。

結果と考察=①これらのトランジェント成分により、生体中に誘導される電流度の大きさ、分布を明らかにするための解析手法の開発を行った。生活空間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。ピーク値が1mTを超える磁界の発生源としてブラウン管式ビデオモニタと盗難防止ゲート監視装置を取り上げ、それらが発生する磁界の特性を測定した。盗難防止ゲート内では人体の頭部付近で最大、約2.8mTの磁界を観測した。これらの知見からトランジェント磁界発振器をヘルムホルツコイルに付け、配線は曝露装置のZ軸方向の磁場を形成するコイルに接続、発振器からは周波数7.4kHzの磁界を50 msec signal-1sec interval (50ミリ秒シグナルを出し、1秒停止の繰り返し)の設定でトランジェント磁界曝露装置を開発した。この装置を用いたときの実際の曝露磁界を測定し、トランジェント磁界波形を模擬した7.4kHz、300 $\mu$ Tのバースト波形のほぼ均一な磁界をヘルムホルツコイル内に発生できることを確認した。この条件での磁束密度は、ピーク値で162.6 $\mu$ T (7.4kHzの値)であった。その上で、トランジェント磁界を実験動物に曝露するための曝露装置を50Hzの磁界との同時曝露も可能な仕様として、トランジェント磁

界と同時に 50Hz、3.0mT (RMS) の磁界を作り重層暴露を行った。

②一方、3.0mT の商用周波磁界を 1 週間に亘って継続的に暴露すると、有意 ( $p < 0.001$ ) な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。しかし、それ以下の磁界強度ではそのような変化は生じなかった。免疫学的解析では、3.0 mT の電磁界に 1 週間置いたマウスでは有意 ( $p < 0.05$ ) 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 (CPR 前駆体) の mRNA 量には大きな変動は認めなかった。生体内の白血球挙動も CPR 共に 3.0 mT が閾値であり、その他の免疫系機能も同様と推察された。この結果から商用周波磁界暴露マウスにおいて変動する可能性があることを示唆する知見を得た。そこで、炎症時や電磁界暴露時などにおける ProCPR の動物体内での役割を解析する手段として、ProCPR の遺伝子をノックアウト (KO) した、ProCPR 欠損マウス作成に成功することができた。次に開発したトランジェント電磁界発生器を用いて、トランジェント電磁界との複合暴露に対する影響を調べた。マウスには皮膚微小循環の観察が可能な背側皮膚透明窓を装着し、暴露開始 8 日目及び 15 日目における白血球の血管内皮への相互作用を *in vivo* 顕微鏡システムで解析した。その結果、磁束密度 3mT とトランジェントの複合暴露においては、15 日目で暴露前に比べて白血球粘着能について有意な亢進がみられた。しかし、トランジェント磁界を重畳することによる影響の増強は見られなかった。少なくともトランジェント磁界が白血球粘着能に大きな影響を与えている可能性は低いと考えられる。したがって、本研究で観察された白血球粘着能の亢進現象はおもに 3mT の強い磁界 (一般生活環境の数千倍の強度に相当) によって惹起されたものと考えられる。この結果は電磁界が免疫系に直接的、間接的に何らかの影響を与えることを示唆しているが、ヒトの健康に対してどれだけの影響を及ぼすのかについてそのメカニズムも含めてさらに検討が必要である。一方、KO マウスに対する電磁界全身暴露を行ったが、統計学的に有意差を検定するには実験動物の数が充分用いることができなかったため、白血球の活性化にカルボキシペプチダーゼ R の関与が示唆されたものの、詳細な解析は今後に残された。

結論=建築物内における商用周波磁界とトランジェント磁界への暴露状況が把握し、これに基づいてトランジェント磁界発生装置を開発し、商用周波磁界と共にトランジェント磁界を並行して暴露する事に成功した。一方、3mT (一般生活環境の数千倍に相当) という高レベル商用周波磁界に 2 週間に亘って継続的に暴露すると、生体内の白血球活性化も CPR 共に 3.0 mT で変化を示し、これが閾値であると同時に、白血球の活性化にカルボキシペプチダーゼ R の関与が推察された。しかし、トランジェント磁界には白血球活性化への関与は認められなかった。

別添 2

厚生労働科学研究研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大久保 千代次

平成15（2003）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. 分担研究報告書	
1. 分担研究報告書 大久保千代次、牛山 明、増田 宏	----- 12
2. 分担研究報告書 岡田 秀親	----- 31
3. 分担研究報告書 伊坂 勝、多氣 昌生	----- 64
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 111
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 112

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）

総括研究報告書

電磁界の白血球及び免疫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（国立保健医療科学院生活環境部長）

研究要旨

電磁界の生体影響の一つとして、免疫システムへの影響が懸念されている。本研究においては、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。昨年度に開発したトランジェント電磁界発生器を用いて、トランジェント電磁界との複合暴露に対する影響を調べた。マウスには皮膚微小循環の観察が可能な背側皮膚透明窓を装着し、暴露開始8日目及び15日目における白血球の血管内皮への相互作用を *in vivo* 顕微鏡システムで解析した。その結果、磁束密度 3 mT とトランジェントの複合暴露においては、15日目で暴露前に比べて白血球粘着能について有意な亢進がみられた。また、前年度までの研究で、3mT の暴露時に活性の低下が見られたカルボキシペプチダーゼ R (CPR) の前駆体 ProCPR 欠損マウスを開発し、これに対するトランジェント磁界の影響を検討した。その結果、白血球の活性化にカルボキシペプチダーゼ R の関与が推察された。しかし、トランジェント磁界には白血球活性化への関与は認められなかった。

岡田英親 名古屋市立大学大学院教授  
牛山明 国立保健医療科学院主任研究官  
増田宏 国立保健医療科学院研究員  
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

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して、発

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。

また、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

近年報告されたヒト末梢の血液を用いた研究においては、電磁界曝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。しかしながら生体内での免疫系への影響については不明な点が多い。免疫系の生理的な影響は様々な形でヒトの健康リスクとなる可能性が考えられるため、超低周波磁界曝露と白血球の活性化および免疫系への影響を明らかにしたい。

本研究の方法としては、白血球を *in vivo* において可視化し、その挙動を追究するために、マウス背側皮膚透明窓 (dorsal skinfold chamber; DSC) を用いた。DSC を用いると、同一個体の背側皮膚の微小循環を最長 4 週間にわたり連続的に生体顕微鏡下で観察することが可能である。また種々の蛍光色素を用いることで、必要な情

報を限定して取得することも可能である。本研究においては白血球挙動を Rhodamine 6G で選択的に可視化した。可視化した白血球をビデオ記録可視化した画像をもとに、*in vivo* での白血球の粘着能を定量化した。

昨年度まで本研究においては、15 日間連続曝露をおこない、3mT 曝露群において白血球粘着能の有意な亢進を見いだした。今年度は、昨年度までに開発したトランジェント磁界発生装置を用いて、トランジェント磁界曝露をおこない、その影響について検討を行った。

また、昨年度までの検討において、カルボキシペプチダーゼ R (CPR) およびカルボキシペプチダーゼ N (CPN) の活性測定を行った結果、3mT で CPR 活性の有意な低下を見いだしたため、本年度は、CPR の前駆体ある ProCPR 遺伝子の欠損マウスを用いて、電磁界曝露条件下における DSC 内の白血球挙動を解析した。

### 実験動物

本研究の遂行にあたっては、国立保健医療科学院動物実験指針、及び動物実験に関する各ガイドラインを遵守して行った。実験は、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。一方、後述する ProCPR 欠損マウス (B6/129 系) については、手術の時点で 7~14 週齢のものを用いた。本マウスについては、福祉村病院長寿医学研究所赤津裕康博士から分与されたものである。実験期間中の飼育及び全ての実験は、室温が  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  に制御されたバリア領域で行い、室内照明によって 12 時間毎の明暗調節を行った。

### ①DSC 装着

DSC は電磁界の影響を受けない素材（ジュラコン樹脂）を用いてマウスの後背部に外科的に装着した。

### ②電磁界暴露装置および暴露条件

磁界暴露にあたっては、Helmholtz 型 3 軸コイル暴露装置を用いた。本暴露装置は、暴露チャンバー内に飼育ケージを最大 18 個配置可能な棚を持つ。棚上の 18 箇所の測定点（飼育ケージを配置した際の中心点）における誤差は±5%以内（実測値）であった。50Hz の出力側では、2 軸各々の出力を 2.12mT(RMS 値)として、合成磁界が 3 mT (RMS 値)となるようにした。軸均等出力によって形成される直線磁界を適用した。一方、トランジェント発生装置からの出力は、7.4 kHz に調整された 50 msec signal - 1sec interval (50 ミリ秒シグナルー 1 秒停止の繰り返しモード)とした。この際の磁束密度は、ピーク値で 162  $\mu$ T (7.4 kHz) であった。暴露時間は食餌交換、ケージ交換などのため基本的に 1 日 15 時間とした。

### ③リアルタイム微小循環観察システム

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、波長 532nm の固体レーザーを用いた。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。また、ステージは 3 軸の変位をコンピュータ端末から制御できる電動ステージを使用し、これによりチャンバー内観察部位の血管の位置を PC 内に記憶させ、観察毎に常に同じ血管部位を観察した。

### ④白血球-血管内皮相互作用 (in vivo)

白血球の可視化のために、Rhodamine 6G を使用した。尾静脈から投与し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。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る白血球（ローリング白血球）との和と定義した。

白血球動態の観察は、暴露開始直前と、8 日目、15 日目の計 3 回にわたり、基本的に各個体の同一血管床でおこなった。

### ⑤白血球粘着能 (in vitro)

in vitro での白血球粘着能計測も行った。マウスより採取した血液にアクリジンオレンジを加え、ヘマトクリット毛細管に分取し、37°C のインキュベーター内で 30 分間保温する。その後 1ml/min の速度でヘマトクリット毛細管内に生理的食塩水 (0.9% NaCl) を流し、粘着した白血球以外の成分を洗い流し、毛細管内壁に粘着した白血球は蛍光顕微鏡（を用いて観察をおこない、領域内に見られる白血球数をカウントする。同一個体血液からそれぞれ 3 本の毛細管を作り計測をおこない、その平均値を個体の代表値とした。

### ProCPR 遺伝子欠損マウス作成

1989年に岡田らは血液中に存在する新しいカルボキシペプチダーゼを発見した。それは以前から知られていた



Carboxypeptidase N (CPN)と同様にペプチドのC末端の塩基性アミノ酸(リジンおよびアルギニン)を遊離させる作用を持つが、前駆体として存在し一度活性化されると非常に熱に不安定な性質を持つなど明らかにCPNとは異なる新しいカルボキシペプチダーゼであった。我々はその酵素がCPNと比較してリジンよりもアルギニンを遊離させる能力が高いことからアルギニンのRをとって'Carboxypeptidase R (CPR)'と名づけた。CPRはその酵素活性から2つの大きな役割を担うことがin vitroにおいて証明されている。1つは炎症性ペプチド(ブラジキニンやアナフィラトキシン)のC末端アルギニンを遊離することでそれらのペプチドを不活性化する機能で、2つ目はプラスミノゲンの結合に必要なフィブリン表面のリジンを遊離させ、プラスミノゲンがプラスミンとして活性化することを阻害することで血栓の溶解を遅らせる機能である。後者の作用から血液学分野でCPRはThrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)という名で知られている。

最近、岡田らはLPSによる刺激がCPRの遺伝子発現を増強させ血液中のカルボキシペプチダーゼ活性を上昇させることを発見した。またBoffaらによってCPR遺伝子のプロモーター部位に炎症に関与することで知られる転写因子C/EBPの結合部位が存在し実際に機能していることが報告された。炎症性ペプチドを不活性化する機能と共にかつた点からも我々はCPRが炎症時において大きな役割を担っていると考えている。特にDICやSeptic shockなどはまさに炎症と凝固線溶系というCPRに関わる2つのシステムが密接に関連している病態なのでCPRはその病態形成の重要な構成要素であ

ると推測される。生体内でのCPRやその前駆体のProCPRの生体内の役割を検討する手段としてProCPRを欠失させたノックアウトマウスを作成して活用する方法が考えられた。そして、磁界暴露におけるProCPRやCPRの動態を探るためにも有用である。そこで、ProCPR遺伝子欠損マウスを作成した。方法は多岐に亘るので、その手順のみ下記にしめす。詳細は分担報告書に譲る。

①マウス129/SV  $\lambda$ FIX II ゲノムライブラリーからProCPR遺伝子を含むクローンの単離

②ProCPR遺伝子を含むクローンの制限酵素マップ作成

③ターゲティングベクター作成

④ES細胞の培養

⑤トランスフェクション～Positive and Negative Selection

⑥変異体ES細胞クローンの単離

⑦胚盤胞へのマイクロインジェクション～キメラマウス誕生まで

⑧野生型マウスとの交配によるヘテロマウス作成

⑨CPRノックアウトマウス(ホモ)作成

#### 統計処理

全てのデータは、t検定を行い有意水準5%(両側)で棄却した。

#### 電気工学的検討

本研究では、今までに行われた生活環境における磁界発生状況の実測経験から、最も大きな波高値を有するトランジェント磁界を発生する電気機器として、ブラウン管式パソコンモニタと盗難防止ゲート監視装

置を取り上げ、その時間波形の観察を行うと共に波高値の空間分布の測定を行った。

## 測定

トランジェント磁界の時間波形を観察するために増幅器付き磁界センサーコイルと波形観察装置を用いた。

### ①磁界センサ

トランジェント磁界の測定には昭電(株)製の増幅器付き一次元磁界センサーコイルを用いた。その帯域は 40Hz~10kHz となっている。その測定分解能は  $0.01\mu\text{T}$  で、最大の検出磁界は交流実効値で  $2\text{mT}$  である。三次元空心コイルを内蔵した可搬式磁界メータにより各測定点における交流磁界の測定も行った。この測定器の周波数帯域は 30Hz~1000Hz で、測定分解能は  $0.01\mu\text{T}$  である。

### ②時間波形観察装置

本研究の目的のためには通常のアナログオシロスコープが使用できるが、多数の波形観察を行ない、それらを分析・保存するために、観察装置メモリハイコーダを用いた。装置は、周波数帯域が DC~1MHz であり、高速記録、データ保存が可能で、周波数解析 (FFT) 機能を有する。

## 測定対象機器

### ①ブラウン管式パソコンモニタ

実験に使用したモニタは Gateway 17 型のブラウン管式である。

### ②盗難防止ゲート監視装置

最近、書店、CD 店、デパートなどの出入口に商品盗難防止のために監視装置が置かれるようになって来た。大学の図書館にも設置されているが、どのような動作原理に基づいているか、磁界の特性はどのよう

なものか、などはまだあまり明らかにされていない。予備的な磁界実測を行った結果、大きなトランジェント磁界が発生していることが分かったので、本研究で取り上げることにした。

## 測定方法

### ①ブラウン管式モニタからのトランジェント磁界の測定

モニタは高さ 20 cm、幅 40cm、奥行き 25cm の木製の台の上に置き、その周辺の磁界の測定を行った。測定点の総数は、トランジェント磁界に対して 125 となった。定常磁界に対しては空間分布を細かく調査するため 605 点を測定点とした。モニタの電源スイッチをオフにしてから 3 分後にオンすることを繰り返し測定を行った。

### ②盗難防止ゲート監視装置からのトランジェント磁界の測定

図書館の出入口に設置されている盗難防止ゲートは、足元にある人感センサにより磁界発生回路が作動するようになっている。そこで、通過する人の頭部、腹部、膝の 3 つの部位に相当する位置における磁界を測定した。頭部および腹部については 3 箇所、膝については左右 2 箇所を測定点とした。

## 動物実験用曝露装置における磁界測定

### ①トランジェント磁界曝露装置の構成

本研究で用いた in vivo 用のトランジェント磁界曝露装置はトランジェント磁界生成用電源、ELF 磁界生成用電源、曝露用コイルから構成される。曝露用コイルは 3 軸方向に独立に磁界を発生できるコイルから構成されており、z 軸方向の磁界 ( $B_z$ ) 生成用コイルにはトランジェント磁界生成用電源、x, y 軸方向の磁界 ( $B_x, B_y$ ) 生成用コイル

には ELF 磁界生成用電源がそれぞれ接続されている。このような構成にすることによりトランジェント磁界と ELF 磁界を同時に曝露できる。

## ②トランジェント磁界発生部

トランジェント磁界発生部は信号発生器、精密電力増幅器、約 0.01 $\mu$ F のコンデンサスタック、約 40mH の磁界発生用コイルから構成されている。コイルとコンデンサは直列に接続されており、共振現象を利用することによりコイルに大電流を流し磁界を発生している。共振周波数の実測値は約 7.4kHz であり、連続波を入力した場合、磁界がほぼ均一になると考えられるコイルの中心部では最大値で約 0.7mT の磁界を発生できる。

トランジェント磁界は信号発生器をプログラムすることにより生成する。トランジェント磁界の波形として、50ms の間 7.4kHz の連続波をバースト発振し 1s 信号を出さない設定（設定 1）と 500ms の間 7.4kHz の連続波をバースト発振し 30s の間信号を出さない設定（設定 2）の 2 通りを典型的なトランジェント磁界としてプログラムして用いた。

磁界測定は磁界測定用プローブを曝露装置の中心部に設置し、その出力をデジタルストレージオシロスコープに取り込むことにより行った。

## C. 研究結果

### 生物学的検討

#### BALB/c マウスの白血球粘着能に対するトランジェント電磁界の影響

超低周波電磁界曝露とトランジェント暴

露の曝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、曝露開始当日（Day 1）および、8 日目（Day 8）、及び 15 日目（Day 15）に、前述の方法でおこなった。曝露群の曝露レベルについては、50Hz、3 mT の超低周波曝露に 7.4 kHz で 162  $\mu$ T の 50 msec signal - 1sec interval（50 ミリ秒シグナル - 1 秒停止の繰り返しモードとした。また、非曝露群を対照とした。曝露群は 18 匹、非曝露群は 13 匹を対象とし実験をおこなった。曝露群においては、曝露 15 日目において、曝露開始日および 8 日目と比較して粘着白血球が有意に増加 ( $p < 0.01$ ) することが観察された。

#### ProCPR 遺伝子欠損マウスの白血球粘着に対するトランジェント電磁界の影響

白血球の粘着能と電磁界曝露との間に、カルボキシペプチダーゼ R(CPR) がどの程度関与しているか否かを調べるために、CPR の前駆体 (ProCPR) 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、曝露条件下の白血球挙動について DSC 法を用いた in vivo での解析、及び in vitro での解析をおこなった。本研究では、ProCPR 遺伝子について、+/+、+/-、-/- の 3 群について各 6 匹、計 18 匹に DSC を取り付け、実験を行った。しかしながら、途中でチェンバー破損、血流不全などが見られ、最終的に Day1、Day 8、Day15 の全てのデータが取れたのが、+/+(野生型)群で 4 匹、+/- (ヘテロ) 群で 2 匹、-/- (欠損) 群で 4 匹の計 10 匹であった。したがって、データは 10 個体分である。その結果、群内では、+/+群、+/-群、-/-群ともに、曝露期間の増大に応じて、白血球粘着能は亢進している傾向が伺えた

が統計的有意差は見られなかった。また、群間比較をおこなうと、いずれの測定点においても ProCPR 遺伝子欠損群 (-/-群) の粘着能は、Wild type 群 (+/+群) に比べて、低い傾向が見られたが、これについて統計的有意差は見られなかった。

次に、暴露を始めてから4週間後に、全てのマウスを対象に *in vitro* での白血球粘着能を検討した。その結果、+/+群および +/-群については一定面積あたりの粘着白血球の数が-/-群よりも多く、個体間のばらつきも多かった。-/-群は他の2群よりも粘着した白血球の数が少なく、ProCPR 遺伝子と粘着について何らかの影響がある可能性は排除できないもののこれらの違いには統計的な有意差は検出されなかった。

#### ProCPR 遺伝子欠損マウスの作成

以下①から⑨の段階を経て ProCPR 遺伝子ノックアウトマウス作成に成功した。詳細は分担研究報告書に譲る。

①マウス 129/SV  $\lambda$ FIX II ゲノムライブラリーから ProCPR 遺伝子を含むクローンの単離

②ProCPR 遺伝子を含むクローンの制限酵素マップ作成

③ターゲティングベクター作成

④ES 細胞の培養

⑤トランスフェクション～Positive and Negative Selection

⑥変異体 ES 細胞クローンの単離

⑦胚盤胞へのマイクロインジェクション～キメラマウス誕生まで

⑧野生型マウスとの交配によるヘテロマウス作成

⑨CPR ノックアウトマウス (ホモ) 誕生

#### 電気工学的検討

##### モニタからの磁界測定結果

モニタの電源スイッチを入れると、消磁用コイルに 10A を超える電流が流れ、60Hz の周波数の磁界が発生し、1 秒以内には減衰することが分かった。トランジェント磁界の最大値は 1mT を超えるものであり、日常生活空間では極めて大きな磁界がブラウン管式モニタの周辺に発生することを見つけた。

##### 盗難防止ゲート監視装置

ゲートを通過中の人の頭部、腹部および膝付近の磁界の時間波形を測定した結果、これらの波形から、(1)減衰交流磁界が断続的に3回発生している、(2)その時間間隔は約 0.15 秒である、(3)1 つの磁界波形の継続時間は約 24.9 秒である、そして(4)その減衰波形の基本周波数は 900Hz である。警報機が反応する場合は1回目の磁界発生から 0.1 秒以内にもう1度磁界を発生させて盗難の確認を取っているようである。

実験で得られたトランジェント磁界のピーク値を人体の部位ごとに整理すると、頭部、腹部、膝の周辺で 1mT を超える磁界が現れているが、それらの磁界は、頭部と膝周辺では左右方向、腹部では垂直方向、に向いていることが分かる。また、頭部の中心部ではどの方向の成分も小さいことが分かった。

##### トランジェント磁界発生装置に関する検討

動物実験用曝露装置について、垂直方向 (Bz 方向) のトランジェント磁界だけを発生した場合の磁界の測定結果、設定1の場合のバースト発振時の 50ms 間の波

形では、約  $300\mu\text{T}_{\text{p-p}}$  の  $B_z$  成分の磁界の発生が確認できる。この時  $B_x, B_y$  成分は無視できる程度の大きさであった。この波形はアンプの最大出力時に得られた波形であり、アンプがバースト発振の立ち上がりには追従できず、連続波入力時の最大出力  $1400\mu\text{T}_{\text{p-p}}$  と比較してバースト発振時の磁界強度は弱いことがわかる。詳しく見ると、バースト on 時にはこのような約  $7.4\text{kHz}$  の正弦波の磁界を発生していることが確認できる。設定 2 の  $500\text{ms}$  間のバースト発振時の  $B_z$  成分の磁界波形を示す。この場合も  $B_x, B_y$  成分は  $B_z$  と比較して無視できる程度であった。 $200\text{ms}$  では約  $300\mu\text{T}_{\text{p-p}}$  の磁界波形が  $700\text{ms}$  あたりで約  $1100\mu\text{T}_{\text{p-p}}$  まで増加しているのが確認できた。このような波形は設定 1 の場合と同じく精密電力増幅器が信号発生器の入力信号に正確に追従出来ないことによって生じている。ただし両方の設定に関してトランジェント磁界の曝露実験に十分な強度の磁界波形が得られているものと考えられた。

#### D. 考察

本研究では、トランジェント磁界および商用周波磁界の亜慢性曝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、通常マウスと ProCPR ノックアウトマウスを用いて検討した。

トランジェント磁界は、スイッチのオンオフ操作によって生じる過渡電流に由来する周波数、数百 Hz から数  $100\text{kHz}$  に及ぶ周波数的に幅の広い、かつ時間的には数ミリ〜数十ミリ秒程度の短い瞬間的な電磁界である。最近このようなトランジェント磁界が生体に何らかの作用を及ぼし、結果と

して健康影響につながるのではないかと注目されている。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が、その実態はまだ不明な点が多い。トランジェント電磁界に関する実験的研究として、Kurokawa らは、健常なヒトを対象にトランジェント電磁界曝露を行い、血清中のメラトニン、成長ホルモンなどの濃度変化を測定したところ電磁界の急性影響が見られないことを報告している。しかしながら、それ以外の実験的研究については報告がない。研究報告が少ない背景としては、トランジェント磁界は既に述べたように非常に多様な環境を示すものであること、またトランジェント磁界を発生させる発振器に統一の規格が存在しないなどが考えられる。しかしながら、トランジェント電磁界の研究を進めることの必要性は、WHO の国際 EMF プロジェクトでも強調されていることから今後電磁界の生体リスクを考える際に重要な問題になることが予想される。そのような背景から、本研究においては、昨年度までに本研究で開発された発振器を用いて、トランジェント磁界を発生させ、トランジェント磁界に対する生体影響、特に白血球挙動を解析することにより生体の免疫系への影響を検討した。

本研究では、 $50\text{Hz}$ 、 $3\text{mT}$  の磁場環境にさらに、トランジェント磁界を重畳し、白血球挙動について、検討をおこなった。その結果、15 日間の曝露群の白血球粘着能は同様の操作をした非曝露群よりも有意に高い値を示した。また、曝露群の群内比較においても、15 日間曝露時の白血球粘着能は、曝露開始日及び 8 日目に比べて有意に亢進していた。しかしながら、 $50\text{Hz}$ 、 $3\text{mT}$  の単独曝露による影響と比較をすると、

トランジェント磁界を重畳することによる影響の増強は見られなかった。少なくともトランジェント磁界が白血球粘着能に大きな影響を与えている可能性は低いと考えられる。したがって、本分担研究で観察された白血球粘着能の亢進現象はおもに 50Hz、3mT の強い磁界によって惹起されたものと考えられる。この結果は電磁界が免疫系に直接的、間接的に何らかの影響を与えることを示唆しているが、一方でヒトの健康に対してどれだけの影響を及ぼすのかについてそのメカニズムも含めてさらに検討が必要である。

また、本研究では、カルボキシペプチダーゼ (CP) R の前駆体である、ProCPR 遺伝子のノックアウトマウス作成に成功した。そこでこれを用いて白血球粘着能の検討をおこなった。CPR は、生体内ではその前駆体 ProCPR から生成され、カルボキシペプチダーゼ (CP) N と同様に生体内のいくつかの活性ペプチドの不活性化に関与している。また CPR 活性は生体内においてはリポ多糖 (LPS) の投与に伴って活性化を受けることから、CPR の生体内の役割としては過剰な炎症反応を抑えるために炎症のメディエーターを分解するよう働いていると考えられている。従って、この CPR の活性が炎症反応の程度を表す指標として考えられる。CPR に関してはこれまでの研究で、Wild type のマウスに 50Hz、3 mT の暴露を 1 週間おこなうとその活性が低下することが示されている。本研究においては、分担研究者の岡田らによって作成された ProCPR ノックアウトマウスを用いて生体顕微鏡的に観察される白血球の挙動を観察し、電磁界暴露下の白血球粘着能における ProCPR の関与について検討をおこなった。

その結果、2 週間の連続暴露の範囲内では、有意差はなかったが遺伝子型に関係なく、粘着能が増加傾向を示した。統計的に検出できなかったことの原因としてそれぞれの群に用いた個体数が限られてしまったことが要因と考えられる。また遺伝子型間での違いを見ると、-/- 群では他の 2 群に比べ粘着能が低い傾向が見られた。これについても有意差はみられなかったが、ProCPR 遺伝子が何らかの形で白血球粘着性に関わりを持っていることが、推察される。動物に対して引き続き計 4 週間の亜慢性暴露を行い、その血液を採取し毛細ガラス管を用いて白血球の粘着能を調べたがここでも暴露による統計的な差は見られなかった。しかしながら、*in vivo* での結果と同様に、-/- 群で他の 2 群に比べて低い値を示す傾向がみられ、*in vitro* の結果からも ProCPR 遺伝子が、電磁界暴露による白血球粘着能に関連している可能性が推測される。前述したように、本研究においてはそれぞれの群の個体数が限られた実験であるため、今後、例数を増やして詳細に検討する必要があると思われる。

我々が日常生活で暴露される本研究で用いた条件 (50Hz、3 mT) は日常生活で暴露される磁束密度に比べて、レベルに比べ数千倍強いレベルであるため、通常環境では本研究で見られた影響は見られないであろう。しかしながら本研究においても 8 日目と比較して 15 日目では白血球粘着性亢進現象が顕著になっていることからさらに長期間に亘っての暴露も検討する必要がある。

生体内における白血球の粘着亢進には各種サイトカイン、活性酸素や一酸化窒素をはじめとする様々な因子が関与しており、

本研究課題では昨年度までの研究でサイトカインの血清中濃度を測定したが、暴露による影響は認められなかった。今後は、たとえば、電磁界暴露と活性酸素の発生の関係などからの検討も必要である。

今回の結果からはトランジェント磁界が重畳された低周波電磁界においても白血球の粘着が惹起されることが示された。このことから低周波電磁界（含むトランジェント磁界）が生体の免疫反応に作用することが考えられるが、本研究で用いた磁場環境は（特殊な作業環境を除いて）日常生活では存在しえない、生活環境レベルの数千倍以上も強いものであるため、ヒトへの健康影響への直接的な外挿をおこなうことはできない。また今回採用したトランジェントの発生条件は、発振器の機械的制約により、限られた一条件のみの検討であったが、日常生活の電磁界レベルは一定ではなく常に変動があり、トランジェント現象においても様々な波形、強度が存在することから、今後は日常生活環境を模倣したような低レベルかつ長期間暴露といった暴露条件で検討を行う必要があるものと思われる。これらの点について今後詳細な検討を行うことで、電磁界のリスク評価に対してさらなる貢献が可能となると考えられる。

なお、

## E. 結論

建築物内における商用周波磁界とトランジェント磁界への暴露状況が把握し、これに基づいてトランジェント磁界発生装置を開発に成功した。一方、3mT（一般生活環境の数千倍に相当）という高レベル商用周波磁界に2週間に亘って継続的に暴露する

と、生体内の白血球活性化も CPR 共に 3.0 mT で変化を示し、これが閾値であると同時に、白血球の活性化にカルボキシペプチダーゼ R の関与が推察された。しかし、トランジェント磁界には白血球活性化への関与は認められなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Rational Structure-Based Design of a Novel Carboxypeptidase R Inhibitor. Eliada Lazoura, William Campbell, Yoshiki Yamaguchi, Koichi Kato, Noriko Okada, and Hidechika Okada, *Chemistry & Biology*, 9: 1129-1139, 2002

Distribution of Rat C5a Anaphylatoxin Receptor. Hiroyasu Akatsu, Masayoshi Abe, Takashi Miwa, Hisashi Tateyama, Seiji Maeda, Noriko Okada, Kiyohide Kojima, and Hidechika Okada. *Microbiol Immunol.*, 46(12): 863-874, 2002

Inactivation of C3a and C5a Octapeptides by Carboxypeptidase R and Carboxypeptidase. William D. Campbell, Eliada Lazoura, Noriko Okada and Hidechika Okada. *Microbiol Immunol.*, 46(2): 131-134, 2002

Effect of Anticoagulants in Colorimetric Assay for Basic Carboxypeptidases. Hidefumi Komura Kyoko Obata, William Campbell Miho Yumoto, Yasuyo Shimomura, Hirotada Katsuya, Noriko Okada, and Hidechika Okada. *Microbiol Immunol.*, 46(2): 115-117, 2002

Heat Stability of Carboxypeptidase R of Experimental Animals. Hidefumi Komura Yasuyo Shimomura, Miho Yumoto, Hirotada Katsuya Noriko Okada, and

Hidechika Okada. *Microbiol Immunol.*, 46(3): 217-223, 2002

Elastase from Activated Human Neutrophils Activates Procarboxypeptidase R. Takeshi Kawamura, Noriko Okada, and Hidechika Okada. 46(3): 225-230, 2002

Subchronic Effects of Whole Body Exposure to 50 Hz Electromagnetic Fields on Leukocyte-Endothelium Interaction in the Microcirculation in Mice. Akira Ushiyama, Hiroshi Masuda, and Chiyoji Ohkubo. *Microcirculation Annual*, 18:111-112, 2002

Modulation of Procarboxypeptidase R(ProCPR) Activation by Complementary Peptides to Thrombomodulin. Yasuyo Shimomura, Takeshi Kawamura, Hidefumi Komura, William Campbell, Noriko Okada, and Hidechika Okada, *Microbiol. Immunol.* 47(3): 241-245, 2003

Preferential Detection of Pro-Carboxypeptidase by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Sayuri Tani, Hiroyasu Akatsu, Yasushige Ishikawa, Noriko Okada, and Hidechika Okada, *Microbiol. Immunol.*, 47(4): 295-300, 2003

Complement C5a Receptor-Mediated Signaling May Be Involved in Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. Imre Farkas, Mitsuo Takahashi, Atsuo Fukuda Naoki Yamamoto, Hiroyasu Akatsu, Lajos Baranyi, Hisashi Tateyama, Takayuki Yamamoto, Noriko Okada, and Hidechika Okada. *The Journal of Immunology*, 170: 5764-5771, 2003

## 2. 学会発表

マウス背側皮膚透明窓内微小血管の白血球・内皮相互作用における超低周波電磁界

亜慢性暴露の影響。 牛山 明、大久保千代次、第 27 回日本微小循環学会総会、抄録集、P63

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



## 超低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 国立保健医療科学院生活環境部部長  
分担研究者 牛山 明 国立保健医療科学院生活環境部主任研究官  
増田 宏 国立保健医療科学院生活環境部研究員

## 研究要旨

電磁界の生体影響の一つとして、免疫システムへの影響が懸念されている。本分担研究においては、超低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、昨年度に開発したトランジェント電磁界発生器を用いて、トランジェント電磁界との複合暴露に対する影響を調べた。マウスには皮膚微小循環の観察が可能な背側皮膚透明窓を装着し、暴露開始8日目及び15日目における白血球の血管内皮への相互作用を *in vivo* 顕微鏡システムで解析した。その結果、磁束密度3mTとトランジェントの複合暴露においては、15日目で暴露前に比べて白血球粘着能について有意な亢進がみられた。また、前年度までの研究で、3mTの暴露時に活性の低下が見られたカルボキシペプチダーゼR (CPR) の前駆体 ProCPR 欠損マウスを用いてトランジェント電磁界の影響を検討した。

## A. 研究目的

各種電気機器や送・配電線からの超低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国際的に研究が進んでいる。超低周波電磁界の慢性的な暴露による健康影響としては、疫学調査によって発がんリスクの上昇などが明らかにされている例もあるが、その生物学的メカニズムについては依然として明らかになっていない。しかしながら、国際がん研究機関 (IARC)

では、2001年6月に超低周波磁界が疫学研究において発がん (小児白血病) との関連が認められるとして、「ヒトにとって発がん性があるかもしれない (possibly carcinogenic)」(グループ2B) と判定した。その結果を受けて WHO の国際電磁界プロジェクトにおいても、2003年の末を目標として、再評価をおこなうことが予定されており、また同時に環境基準 (Environmental Health Criteria) の設定作業が進行している。IARC でのリスク評

価のプロセスにあたっては、主に疫学の結果が評価に影響を与えたが、リスクの正確な理解のためには、実験的研究の結果も科学的根拠として考慮する必要があり、より多くの科学的知見が求められている。

近年報告されたヒト末梢の血液を用いた研究においては、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 (Jonai *et al.*; Cossarizza *et al.*)。しかしながら生体内での免疫系への影響については不明な点が多い。免疫系の生理的な影響は様々な形でヒトの健康リスクとなる可能性が考えられるため、超低周波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。

本研究の方法としては、白血球を *in vivo* において可視化し、その挙動を追究するために、マウス背側皮膚透明窓 (dorsal skinfold chamber; DSC) を用いた。DSC を用いると、同一個体の背側皮膚の微小循環を最長 4 週間にわたり連続的に生体顕微鏡下で観察することが可能である。また種々の蛍光色素を用いることで、必要な情報を限定して取得することも可能である。本研究においては白血球挙動を Rhodamine 6G で選択的に可視化した。可視化した白血球をビデオ記録可視化した画像をもとに、*in vivo* での白血球の粘着能を定量化した。

昨年度まで本研究においては、15 日間連続暴露をおこない、3mT 暴露群において白血球粘着能の有意な亢進を見いだした。今年度は、昨年度までに開発したトランジェント磁界発生装置を用いて、ト

ランジェント磁界暴露をおこない、その影響について検討を行った。

また、昨年度までの検討において、カルボキシペプチダーゼ R (CPR) およびカルボキシペプチダーゼ N (CPN) の活性測定を行った結果、3mT で CPR 活性の有意な低下を見いだしたため、本年度は、CPR の前駆体ある ProCPR 遺伝子の欠損マウスを用いて、電磁界暴露条件下における DSC 内の白血球挙動を解析した。

## B. 研究方法

### 実験動物

本研究の遂行にあたっては、国立保健医療科学院動物実験指針、及び動物実験に関する各ガイドラインを遵守して行った。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。一方、ProCPR 欠損マウス (B6/129 系) については、手術の時点で 7~14 週齢のものを用いた。本マウスについては、福祉村病院長寿医学研究所赤津裕康博士から分与されたものである。実験期間中の飼育及び全ての実験は、室温が  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  に制御されたバリア領域で行い、室内照明によって 12 時間毎の明暗調節を行った。

### DSC 装着

DSC は電磁界の影響を受けない素材 (ジュラコン樹脂) を用いてマウスの後背部に外科的に装着した。

DSC の装着手順を以下に簡単に述べる。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。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。この際、皮膚の血管網の観察を容易にするために、円形窓部分の筋膜層を微小ピンセットなどを用いて取り除く。皮膚の上からさらに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、暴露開始の 3 日以上前におこない、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

磁界暴露にあたっては、Helmholtz 型 3 軸コイル暴露装置 (AC30G20A, 高野技研) を用いた (図 2)。本暴露装置は、暴露チャンバー内に飼育ケージを最大 18 個配置可能な棚を持つ。棚上の 18 箇所の測定点 (飼育ケージを配置した際の中心点) における誤差は ± 5% 以内 (実測値)

であった。本研究では、X 軸、Y 軸方向に磁界が生じるコイルに 50Hz (正弦波) の出力を接続し、Z 軸方向に磁界が発生するコイルには、トランジェント発生装置 (図 3) からの出力を接続した。50Hz の出力側では、2 軸各々の出力を 2.12mT(RMS 値)として、合成磁界が 3 mT (RMS 値) となるようにした。軸均等出力によって形成される直線磁界を適用した。一方、トランジェント発生装置からの出力は、7.4 kHz に調整された 50 msec signal - 1sec interval (50 ミリ秒シグナルー 1 秒停止の繰り返しモード) とした (図 4)。この際の磁束密度は、ピーク値で 162  $\mu$ T (7.4 kHz) であった。磁束密度の計測には、電磁界計測器 (model EFA-2, Wandel & Gortermann 社) を用いた。暴露時間は食餌交換、ケージ交換などのため基本的に 1 日 15 時間 (19:00 ~翌 10:00) 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, Crysta Laser 社) 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。また、ステージ

は3軸の変位をコンピュータ端末から制御できる電動ステージ (MAC5000, Ludl社) を使用し、これによりチャンバー内観察部位の血管の位置を PC 内に記憶させ、観察毎に常に同じ血管部位を観察した。本装置の概要を図5に示した。

#### 白血球-血管内皮相互作用 (in vivo)

白血球の可視化のために、本研究においては Rhodamine 6G (和光純薬) を使用した。Rhodamine 6G を濃度 0.02% (w/v) となるよう生理的食塩水に溶解し、口径 0.2 $\mu$ m のフィルター (Millex-GN, Millipore) で不溶物を除き、注射用原液とした。マウスを保定し、30G の注射針を用いて本液 100 $\mu$ l を尾静脈から投与し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 $\mu$ m 前後の細静脈とし、流れ方向に 100 $\mu$ m の距離を観察対象とした。また、記録について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る白血球 (ローリング白血球) との和と定義した。本研究で用いたシステムで取得した白血球の蛍光画像の例を図6に示す。

白血球動態の観察は、暴露開始直前と、8 日目、15 日目の計 3 回にわたり、基本的に各個体の同一血管床でおこなった。

#### 白血球粘着能 (in vitro)

in vitro での白血球粘着能を以下の方法で調べた。マウスにジエチルエーテル吸入による麻酔を施し、全身を保定する。腹部を切開し腹部大動脈に 25G の注射針を用いて 500  $\mu$ l の血液を採血する。なお採血の際にはあらかじめ注射筒に 50 $\mu$ l のヘパリン液 (5000U/ml) を入れておく。採取した血液 100  $\mu$ l あたり 1  $\mu$ l の 0.1% アクリジンオレンジを加え、軽く攪拌し直ちにヘマトクリット毛細管 (ヘパリン処理: テルモ VCH075H) に血液を充填する。血液を入れた毛細管は乾燥しないようタッパー内に横向きに並べ、37 $^{\circ}$ C のインキュベーター内で 30 分間保温する。30 分後にインキュベーターより取り出し、シリンジポンプを用いて、1ml/min の速度でヘマトクリット毛細管内に生理的食塩水 (0.9% NaCl) を流し、粘着した白血球以外の成分を洗い流す。毛細管内壁に粘着した白血球は蛍光顕微鏡 (Olympus BH-2) を用いて観察をおこない、対物レンズで 4 倍を用いた際にモニター画面上の領域内に見られる白血球数をカウントする。同一個体血液からそれぞれ 3 本の毛細管を作り計測をおこない、その平均値を個体の代表値とした。

#### 統計処理

全てのデータは、t 検定を行い有意水準 5% (両側) で棄却した。