

Fig. 10 に、ラットホルダーに入れた生体等価媒質で作成したラットファントムとアンテナを示す。

本実験では、アンテナ入力として 16.26[W]、暴露時間を 30 秒とした。本方法の一つの問題点は、実際に動物実験で使用する電力よりもかなり強い電力を使用しなければならないため、実験に必要な最大入力電力に比べてはるかに大きな入力電力にアンテナが耐える必要があることである。大きな電力を入力した場合に、アンテナ自身が発熱する恐れがあり、これは測定の誤差およびアンテナ自体の焼損につながる。

暴露評価の結果

1. 均一モデルによる暴露評価

サーモグラフ法では通常は均一な媒質を用いる。はじめに、均一媒質のラットファントムを用いてサーモグラフ法により求めた SAR 分布と、同様の均一な数値

ラットモデルを用いた FDTD 法による数値解析を行った。サーモグラフによる温度上昇分布の画像を Fig. 11 に示す。周波数は 1.88[GHz]、入射電力 20[W]、照射時間 30[sec]で測定を行った。また、FDTD 法による SAR 分布の数値計算結果を Fig. 12 に示す。計算条件は、周波数 1.88 [GHz]、セルサイズ 1 [mm]、解析領域 290×280×200、タイムステップ数 2763 である。実験による SAR 分布と数値計算による SAR 分布はほぼ一致している。

次に、アンテナとラット頭部の距離をやや離れた場合として、距離を 5mm としたときの実験および計算結果を Fig. 13 および Fig. 14 に示す。

距離が 5 mm 程度になると、SAR が小さくなり、分布もやや広がる。これらの結果を定量的に比較するために、深さ方向の SAR 分布を、実験測定結果と数値計算結果を重ねて図示したものが Fig. 15 である。

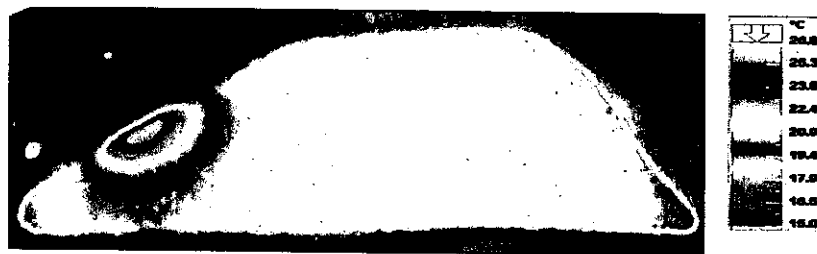


Fig. 11 暴露後のサーモ画像 (アンテナと頭部の距離 1 mm)



Fig. 12 FDTD法による SAR分布の数値計算結果 (アンテナと頭部の距離 1 mm)

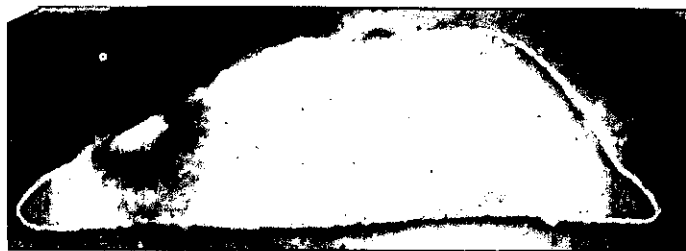


Fig. 13 暴露後のサーモ画像 (アンテナと頭部の距離 5



Fig. 14 FDTD法による SAR分布の数値計算結果 (アンテナと頭部の距離 5mm)

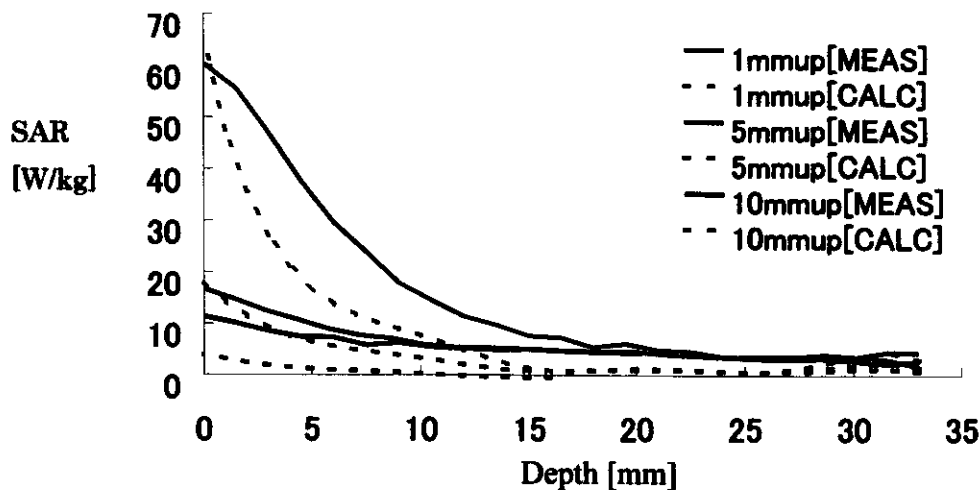


Fig.15 深さ方向の SAR 分布

1mmup、5mmup、10mmup はそれぞれ、脳表から上方向への距離を表し、MEAS は実測値を、CALC は計算値を示す。

以上の結果から、数値解析の結果は十分信頼できるといえる。したがって、ラットの電気定数の不均一を考慮したときの影響は、数値解析で評価できる。また、さまざまな暴露条件における SAR 分布は、実験によらなくても数値計算を用いて推定できる。

2. 不均一モデルによる検討

FDTD 法による数値解析では、ラットの解剖学的構造を考慮した不均一モデルを用いた解析が可能である。数値解析によって求めたラット内の SAR 分布を Fig.

16 に示す。

数値解析結果から、アンテナ入力電力 1 W あたりの脳での平均 SAR を算出すると 13 W/kg となる。これに対して全身平均 SAR は 0.64 W/kg である。すなわち、両者の比は約 20 となり、目的としたレベルに達している。一方、従来用いられてきたモノポールアンテナによる暴露装置では、アンテナ入力電力 1 W のときの脳平均 SAR は 1.8 W/kg であり、全身平均 SAR は 0.25 W/kg である。すなわち、局所 SAR と全身平均 SAR の比は約 7 倍であった。

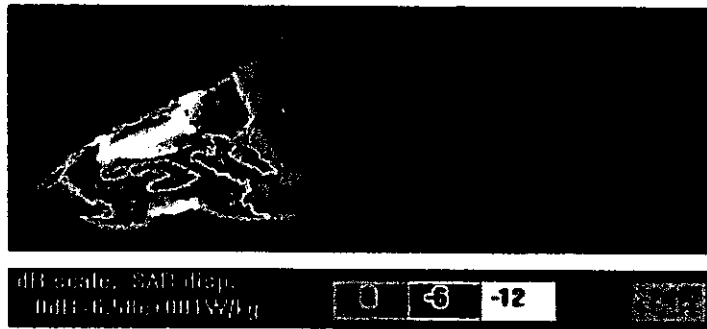


Fig.16 解剖学的構造を考慮した不均一ラットモデル内のSAR分布（計算値）

まとめ

脳の局所に集中したマイクロ波の暴露を行うことのできる暴露システムとして、ループアンテナを用いた暴露システムを開発した。このシステムの暴露評価を行ったところ、全身平均 SAR に対して脳平均 SAR を 20 倍とすることができた。これは、目的を満たすものであり、従来のモノポールアンテナによる暴露より十分に優れたものといえる。

別添 5

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

発達段階にある脳を対象とする携帯電話周波数帯電磁界暴露の血液脳関門に
及ぼす影響に関する研究

—ラット脳マイクロダイアリス法による検討—

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主任研究官

研究要旨

電磁界暴露による血液髄液関門のバリア機能への影響を検討するため、脳髄液のリアルタイム連続サンプリングシステムを構築した。一般的に血液脳関門、血液髄液関門の脳内関門は脳の内部環境を維持するために血液中の物質の脳組織への移行を制限しており、常態生理下では血漿の蛋白質成分の脳間質液への移行も制限されている。脳室とクモ膜下腔を満たしている脳髄液も関門を通じて産生され、脳髄液と脳間質液は相互交換が起こることから生理的に同質であり、液中のアルブミンを主とする総蛋白質濃度は血漿の0.5%以下と少ないのが特徴である。したがって脳髄液（あるいは細胞間液）のアルブミン濃度は血液脳関門の生理機能を示す指標であり、脳髄液中のアルブミン含量が上昇すれば、血液脳関門に障害が生じたことが予想される。しかしながら脳髄液成分は生成と吸収により常に入れ替わるため、脳髄液中の成分分析を行うためには、脳室内脳髄液をリアルタイムにモニタリング可能なシステムを用いることが必須である。そのため本研究では、これらの条件を満たすダイアリスサンプリング法を用いて生体影響評価を行った。この方法はプッシュプルカニューラをラットの脳に埋め込み、カニューラに加圧減圧を施し連続的に局所パーフュージョンを行うシステムである。本年度はこのシステムを構築し、基礎的なデータを取得すると共に、周波数 1.439GHz (Personal-Digital cellular (PDC)変調方式) の非常に強い電磁界を局所平均 SAR 約 35W/kg で 30 分間連続暴露した際の影響を検討した。

A. 研究目的

携帯電話は我が国において爆発的な勢い

で普及し、現在、PHS と合わせて 8000 万台もの端末が利用されている。現在では、その利便性から日常生活において不可欠ともいえる器具のひとつとなっている。しかしながらその一方で、携帯電話の発する高周波の電磁界が健康影響を与えるのではないかと懸念を持っている国民も多い。

携帯電話等の機器の安全性については、総務省の定めた「電磁界利用における人体の防護指針」（通称：電波防護指針）等によってそのガイドラインが示されている。電波防護指針は平成 2 年に定められ、その後の平成 9 年に携帯電話の普及を背景に身体の内側に電磁界の発射源がある場合に適用する局所吸収の指針が追加された。本指針では、管理環境においては、任意の組織 10g 当たりの局所エネルギー吸収率（Specific Absorption Rate:SAR）が 10W/kg を超えないこと、一般環境では、同様に 2W/kg を超えないことと定められている。これらで定めるガイドラインは主に電磁界の発熱作用（組織内における熱の発生）、刺激作用（電気刺激による神経、筋、感覚器の興奮）を根拠にしたものであり、非熱的な生物影響については十分な根拠がないため考慮されておらず、防護指針のなかでも今後検討が必要であると述べられおり、科学的な知見の積み重ねが必要とされている。

一方、国際的な動向としては、1996 年から WHO において電磁界の健康影響について検討する国際電磁界プロジェクトが開始されている。本プロジェクトは、静電磁界～高周波電磁界までの幅広い周波数領域を対象に、電磁界のリスクアセス

メントを行い、広くその情報を発信することを目的の一つとしており、我が国を含め 54 カ国以上の国々と多くの国際機関が参加している。本プロジェクトの研究諮問委員会においても、高周波電磁界の非熱作用とくに脳神経系に及ぼす影響についての検討が急務であるとされている。これらの背景により、電磁界暴露による非熱作用については研究によるデータの蓄積が必要とされており、本研究においても、熱的な作用とは異なる、非熱的な生物影響について追究することとする。本研究では脳を対象とするが携帯電話の使用時は頭部近傍に携帯端末を保持して使用することから、脳への影響を多面から詳細に検討することは重要である。その中でも脳の血液脳関門、及び血液髄液関門に対する影響の有無については現在、研究者の間で議論が別れており、またそれを明らかにすることは重要である。

そこで本研究では実験動物のラットを用いて電磁界暴露による脳関門への影響を明らかにすることを目的とする。本分担研究では、工学班によって作成された電磁界放射アンテナを用いて、脳に電磁界暴露を行い、生理学的側面から影響を評価することとする。影響の評価方法としては、ラットに電磁界暴露を行いながら脳髄液を連続的に採取し、脳髄液中の蛋白質の定量化を行い、暴露による脳髄液中の蛋白質濃度変化を調べることで、電磁界暴露中のバリアの機能を検証することとする。本年度は計測システムの構築を中心として、短時間急性暴露影響について検討を行った。

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政府及びガイドラインを遵守して行った。実験は、手術の時点で10～12週齢の雄性 SPF-SD ラット（東京実験動物）を用い、個別のケージにて飼育し、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、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ に制御されたバリア領域で行い、室内照明によって12時間毎の明暗自動調節を行い、手術並びに実験は、明期に行った。

バリア透過性観察システム

本研究においては、バリア透過性の定量にマイクロダイアリス分析システム（エイコム株式会社、ニューロペプチドダイアリスサンプリングシステム EPPS-10）を使用した。本システムの概要並びに、各機器の設置された写真を示す（図1）。なお、蛍光の検出のため、蛍光分光光度計 FP6500（日本分光）を利用し、オプションとして微量サンプル測定用のマイクロフローセルを光度計に設置した。また連続的に蛍光を測定すると、退光の問題が生じるため、計測は2分おきに1回の計測になるようソフトウェアレベルで制御をおこなった。

カニューレ装着

カニューレの手術はすでに報告されている方法によっておこなった。以下にその詳細について述べる。

ラットに ketamine hydrochloride / xylazine hydrochloride カクテル液(10:1, 100mg/kg, いずれも Sigma Chemical) の筋注により麻酔する。

脳定位固定装置（ナリシゲ）にラットを伏臥位におき装置にしっかりと固定する。頭部を鼻部から後頭部まで正中切開し、術野を確保する。次に、頭骨の上を覆っている膜を眼科用ハサミで切除し頭骨を露出させる。前部は臭球の上、後部は小脳の後ろまで露出し脱脂綿などで出血した血を止血する。

アンカー用のネジ（PEEK 製アンカービス、AN-3PEEK, エイコム）を臭球の上（正中を外すようにする）、ラムダの前部に左右2カ所の計3カ所に埋め込む。なおビスの埋め込みに際しては、0.5mm のドリルチップをつけた精密ドリル（UC200：浦和工業）で予め小穴を開けておく。Bregma から caudal（縦）0.8mm、lateral 1.3mm, ventral 3.0mm の位置にガイドカニューラ（NG-8FS, エイコム）を埋め込む。ガイドカニューラはデンタルセメントでその回りを固める。この際にデンタルセメントはアンカーネジを覆うようにカニューラのネジ山の部分まで盛り上げるようにする。ダミーカニューラ（ND-8, エイコム）をガイドカニューラに入れ、キャップナット（AC-1, エイコム）をかぶせる。手術は、実験の3日前までに行った。

手術に使用したカニューレ部品を図2に、また、手術を完了しカニューレを装着したラットの画像を図3に示した。

電磁界暴露装置および暴露条件

電磁界暴露については、本報告書の工学班によって報告されている装置を用いた。装置はループアンテナ、シグナルジェネレーター、パワーアンプより構成され、実験は電磁界吸収体を内部に貼って

ある電磁界シールドチャンバー内で行った。図4に、ループアンテナならびに、暴露の状態を表す画像を示した。本研究においては、ループアンテナより周波数1.439GHz (PDC方式)の電磁界をラット頭部へ30分間照射した。使用した電磁界強度は、頭部平均SARで35W/kgとした。なお、暴露装置のファンによる強制換気を実施すると麻酔下の動物の体温低下を招くため、暴露装置内の換気は行わなかった。また、暴露と同一の操作は行うが電磁界暴露をしないラットを偽暴露群とした。

ラットには、暴露の直前に2%(w/v)のFITC-albumin (Sigma Chemical)を100ul/kg body weightで尾静脈から注射した。その後カニューレをPush-Pullポンプに装着して流速1ul/minの速度で人工脳髄液(CSF)を流した。また、暴露(偽暴露)は30分間行い、暴露(偽暴露)終了後、カニューレをラインを保ったまま動物から外し、CSFに浸し、その後150分間に亘り、Push-Pullポンプを作動させた。実験のプロトコルを図5に簡便に示す。

本実験におけるCSFの濃度は以下の通りに調整し、アスピレーターを用いて脱気したものを使用した。NaCl 133.5mM, KCl 3.2mM, MgCl₂ 1.33mM, NaHCO₃ 24.5mM, CaCl₂/2H₂O 1.5mM, Glucose 3.3mM。

灌流固定 (*in vivo*) 並びに凍結標本の作製

暴露操作の終了後に、0.1%(w/v)のエバンスブルー溶液を2ulカニューレより注入し、5分後に全身灌流固定を行った。

灌流固定は、ヘパリンナトリウム含有生理食塩水で全身の血液を脱血したのちに、4%ホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定した。固定した後に、脳を摘出し、その後10%シヨ糖液、30%シヨ糖液に順次置換をおこなった。

凍結標本の作製にあたっては、シヨ糖液に置換したサンプルをO.C.T.compound (Tissue Tek, Sakura finetechnical Co.)で包埋し、凍結切片作製機 (CM1850 LEICA)にて厚さ10μmの切片を作製した。

C. 結果

カニューレの特性

一般に、プッシュプル用のカニューレには入路と出路の2本の微小管を1本外管で包む構造になっているものが多い。しかしながら、市販の製品については、外管がスチール管になっているものが多く、本研究でそれを用いると、スチール管がアンテナの役割をしてしまい、電磁界が集中することが考えられた。そこで本研究では、ガラス製外管を使用し、特製のカニューレを作成した。また、管以外の部位も全て非金属材料で作製した。プッシュプル用のカニューレと同様に、ガイドカニューレも管の部分は、ガラス製を用いた。各部品についての外観を図2に示した。

検出装置の構築とその基礎特性

本研究では、FITC-albuminをマーカーとして蛍光検出器で検出を行うため、まず蛍光検出器の性能を検討した。

蛍光検出器にFITC-albuminを流し、そ

の蛍光特性を確かめた。

その結果、FITC-albumin の励起波長 491nm に固定してその蛍光スペクトルを取ると、図 6 に示すようなスペクトル曲線が得られた。このことより、以後の実験においては励起波長 491nm、蛍光波長 520nm に固定して測定を行った。

また、FITC-albumin の濃度と蛍光強度の相関を調べる目的で、様々な濃度の FITC-albumin 溶液をマイクロフローセルに流して、蛍光強度との関係を調べた。その結果、図 7 に示すとおり、FITC-albumin 濃度と蛍光強度は強い相関を持つことが示され、試料中の蛍光強度は FITC-albumin 濃度を反映するものと考えられた。

コントロール実験

カニューレを装着したラットを、麻酔下で保定し、Push-Pull ポンプによる灌流を行った。その典型例を示した。(図 8) カニューレを装着し Push-Pull ポンプを流速 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ で作動させるとカニューレから蛍光検出部までの管内の容量が 75 μl であるため、回収される脳髄液が検出部で観察されるのは、始動から 75 分後からということになる。また、カニューレを 30 分後に外すため、脳髄液が検出器に入ってくるのは原理的には始動から 75 分から 105 分の間であるが、蛍光検出器のマイクロフローセルユニットの容量が 15 μl であること、管径が狭く灌流液(髄液)と管との間の相互作用が働くことなど考慮すると、検出器で検出される蛍光はより幅広い時間帯に観察される。そこで本研究では、ポンプの始動から 180 分までを観察することとした。

始動から 75 分を過ぎると、若干の蛍光値の

上昇が見られるが、これは脳髄液に微量の FITC-Albumin が漏出してきているためだと考えられた。なお、連続的に蛍光を測定すると、退光の問題が生じるため、計測は 2 分おきに 1 回の計測になるようソフトウェアレベルで制御をおこなった。

また、カニューレを外したラットにエバンスブルー液を注入し、即時に灌流固定を行った脳の凍結切片を作成し、カニューレが正しく目的とする側脳室に入っているかどうかを確認した。凍結切片の一例を図 9 に示す。この例においては、脳の実質が青く染まっていないこと、切片中でエバンスブルーによって青く染まっている部分と側脳室の部位が一致すること、また注入されたエバンスブルーが脳室間を移動して第 4 脳室などでも見られることから、カニューレが正しく側脳室に挿入されていたことが推測される。

電磁界急性暴露実験

図 5 の実験プロトコールに従って、電磁界暴露を行った。本研究においては、脳局所 SAR が 35W/kg で、30 分間の連続暴露を行った。その結果を図 10 に示す。この結果においては、暴露をしたものの、固定凍結切片の結果から正しく側脳室にカニューレが挿入されていないものや、ポンプによる灌流中に輸液管が何らかの理由で詰まってシグナルが乱れたものを除いてあり、暴露群、偽暴露群とも N=9 である。

条件の設定がやや困難なため、蛍光のピークの位置にややずれがあるが、全体の傾向として暴露群において、高い蛍光強度を示した。このことは、暴露群において、FITC-albumin の髄液への移行が充

進されていること、すなわち非常に強い電磁界暴露によりバリア機能が何らかの障害を受けたことを示唆している。

D. 考察

電磁界が人々の健康を害するのではないかという電磁界の健康リスクについては大きな社会的関心が持たれている。近年では高圧送電線や電気機器から発生する超低周波（特に商用周波数：50～60ヘルツ）だけでなく、携帯電話等で用いられている高周波（マイクロ波）の議論が国際的に取り上げられている。

電子レンジなどに代表されるように、マイクロ波は高いレベルで生体に暴露されるとエネルギーが組織に吸収されて熱に変換される。これらの熱作用については以前より多くの研究が行われており、現在の国際非電離放射線防護委員会（ICNIRP）によって推奨されているガイドラインも主に、熱作用に基づいて設定されている。しかしながら、非熱作用についての研究はまだ例が少なく、確定した作用は認められておらず、これまでの動物実験の結果は携帯電話で用いられている程度のレベルでは急性、慢性影響とも認められていない。

このような背景をもとに、WHO 国際電磁界プロジェクトでは、2003年に WHO research agenda for radio frequency fields (WHO 高周波(RF)電磁界の研究課題 <http://www.who.int/peh-emf/research/rf03/en/print.html>) を発表し、RF 電磁界に関して、疫学、ヒトの実験的研究、動物の実験的研究、in vitro での組織、細胞、無細胞を用いた研究の各分野

で行われるべき優先的な研究課題を示した。その中で至急行われるべき研究として、動物を用いた血液脳関門の透過性に関する研究が挙げられている。

血液脳関門に関する研究ではこれまでに、いくつかの報告があり、ポジティブとネガティブな相反する結果が報告されている。スウェーデンルンド大学の Salford らは微弱なマイクロ波がラットの脳に影響を与える可能性を示唆する報告を行っている。この研究は、幼若ラットに高周波磁界を2時間暴露し、50日後に脳を調べると、血液脳関門の透過性が高まっていることを示した。計算による暴露条件は、全身平均 SAR で、2, 20, 200mW/kg であり、これらが透過性との量反応関係を示すことを示唆した。彼らの行った SAR 算出法については、専門家からの異論もあり、かつ2時間の暴露の後に、50日間の空白期間があることから、血管の透過性が仮に認められたとしてもその結果はあまりにも限定的であり、電磁界暴露との因果関係については疑問点も多い。

また、最近フランスの Aubineau らは、ループアンテナを用いて電磁界の脳への局所暴露実験を行い、血液脳関門透過性亢進と SAR 並びに暴露時間の組み合わせについて暴露後の屠殺した動物から抽出した脳を用いて免疫組織化学的手法をもちいた結果を報告した。彼らの結果によれば、透過性の認められるいき値として、0.75W/kg で2時間、または 3.0W/kg で40分であるとしている。Salford らの実験同様、免疫組織化学的手法は多くの研究者によって利用されているが、ポジティブな結果を報告しているのは、上に

述べた2つの報告のみで、そのほかの研究ではおおむねネガティブな結果である。たとえば、Tsuritaらは、ラットに1439MHzのTDMA変調波を1日あたり1時間、脳局所SAR2 W/kgの強度で、2週ないし4週の連続暴露をおこなったが、脳内の血管透過性ならびに脳の形態に影響を及ぼさないことを示している。

血液脳関門はイオンや有機物あるいは血球成分が血液から脳組織へ移行するのを防御する選択的機構を持つ毛細血管で連続した内皮細胞層がタイトジャンクションを形成して組織されている。血液脳関門の透過性が亢進する例としては、リポ多糖 (lipopolysaccharide) を末梢投与した場合や、脳虚血を起こした場合、などが知られている。病態的には、中枢神経系の感染症及び脱髄性疾患である多発性硬化症の症例について、液中のアルブミン濃度の上昇が見られ、疾患との関連が報告されている。またかん発作時に脳関門が一過性に影響を受けている可能性も指摘されており、脳関門が脳の保護ならびに生体の恒常性の維持に重要な役割を担っていることが考えられる。

血液脳関門の機能を議論する際には、一般的に、主要血漿蛋白質の一つであるアルブミンの透過度が一つの指標になる。血液脳関門は脳の内部環境を維持するために血液を流れる物質の脳組織への移行を制限しており、常態生理下では血漿の蛋白質成分の脳間質液への移行も制限されている。脳室とクモ膜下腔を満たしている脳髄液も関門を通じて産生され、脳髄液と脳間質液は相互交換が起ることといわれている。このことから、脳髄液と脳間質液は生理的に同質であり、血漿

との大きな違いとして脳関門による選択的な物質透過があるため、脳髄液中の総蛋白質濃度は血漿の0.5%以下と少ない。Felgenhauerの報告によればアルブミンは血漿蛋白質中の約70%をしめ、血漿/髄液比は236であり、血液-髄液間のバリア機能により、その移行は著しく制限されている。このことから脳髄液（あるいは細胞間液）のアルブミン濃度はバリア機能の正常性を示す指標として用いることができる。しかしながら脳髄液成分は生成と吸収により常に入れ替わるため、脳髄液中の成分分析を行うためには、脳室内脳髄液をリアルタイムにモニタリング可能なシステムを用いることが必須である。これらの条件を満たす解析方法として本研究では、プッシュプルポンプを用いるマイクロダイアリシス方法を検討した。プッシュプルの原理は様々な臓器で応用されているが、脳に関しては、これまでに脳髄液の産生速度などを決定する研究に応用されている。マイクロダイアリシスはモノアミンやアミノ酸、アセチルコリンなど低分子の活性物質については、きわめて良いデータを得ることができるが、ペプチド・蛋白など分子量が大きい物質については透過率が低くそのサンプリングは難しいといわれている。また従来のプッシュプルサンプリング法は送液ポンプの精度等に問題が認められていた。本研究で用いたニューロペプチドダイアリシスサンプリングシステムは、ガスタイトシリンジを用いた高精度のプッシュプルポンプとサンプリングのためのバルブ式サンプリングユニット、並びに試料分注のフラクションコレクタから構成されている。本分析システムを用い

ることにより、目的部位に挿入したカニューレより連続的に必要量の試料液を一定速度で採取することができる。本研究では側脳室にカニューレを埋め込み人工髄液を超低速で注入することにより脳内圧を一定に保ちながら脳髄液を採取した。本研究では、脳髄液中の蛍光分子 FITC-Albumin の検出のために、蛍光色素を高感度で検出可能な分光蛍光光度計 FP6500（日本分光）を接続し、さらに検出部ではセル容量 15 μ l のマイクロフローセルユニットを配置し、微量でかつ、高感度に検出することを目的とした。この方法はラットの脳に埋め込んだプッシュプルカニューレに加圧減圧を施し、連続的に局所パーフュージョンを行うシステムである。カニューレ及び固定するガイドカニューレ等は一般的には金属製であるが、電磁界暴露の際の発熱を避けるためメーカーと協議を重ね、フューズドシリカ及びプラスチック素材等の絶縁体で特別に作製した。カニューレはあらかじめ（実験の3日以上前）に手術により成体ラットの脳室内に埋め込んだ。カニューレには入路と出路の2系統の管があり、入路からは人工脳髄液を加圧注入し、出路からは脳髄液を回収した。出路側はマイクロフローセルを取り付けた蛍光検出器に接続し、血液中の蛍光標識アルブミン（FITC-labeled Albumin）を高感度で検出できるように設定した。偽暴露条件下で、検出器の設定を最適化し、次に上記のループアンテナを用いて、30分間連続暴露による急性暴露影響を検討した。図6の実験プロトコールに従って、電磁界暴露を行った。本研究においては、脳局所 SAR が 35W/kg で、30分間の連続

暴露を行った。図11に示した結果では暴露群において、高い蛍光強度を示した。このことは、暴露群において、FITC-albumin の髄液への移行が亢進されていること、すなわち非常に強い電磁界暴露によりバリア機能が何らかの障害を受けた可能性を示唆している。しかしながら、今年度は単一の暴露条件であったことや、アンテナとカニューレの相互作用については検討できなかったため、詳細な検討は今後の課題である。またこれまで多くの報告で用いられている免疫組織染色による検討についても同時に行う必要がある。

E. 結論

脳におけるバリア機能のリアルタイム計測のために、本年度の研究で開発した、蛍光検出器を組み込んだダイアリシスサンプリング法は高感度で脳内変化を追跡可能であった。回収した脳髄液に含まれる蛍光ラベル化アルブミンの濃度を調べることで血液脳関門機能の障害の有無を検証することが可能である。従来、血液髄液関門の研究には放射性物質が使われることが多かったが、本システムは非アイソトープを用いるため、放射線管理区域の外で実験が可能、かつ操作が容易であるという点で優れており将来的に有用である。また、ダイアリシスサンプリング法に用いるカニューレ等器具一式も開発メーカーとの議論を重ね、電磁界によるアンテナ効果や発熱を防ぐために全て非金属素材で作成し、こちらも今後、電磁界の生体影響の実験的研究を行う際に有用である。

これらを用いて、急性暴露影響を検討した結果、非常に強い磁界の長時間連続暴露でバリア機能が何らかの影響を受けている可能性が考えられた。しかしながら、影響のメカニズムなども含めてより詳細な検討が必要であると考えられる。

F. 謝辞

本研究の遂行にあたり、研究補助をしていただいた廣田彰吾さん、佐々木律子さん、鈴木佳子さん、森本美雪さんに感謝致します。

F. 参考文献

総務省 電波防護指針 (諮問第 89 号「電磁界利用における人体防護のあり方」) 平成 9 年

Tsurita G, Nagawa H, Ueno S, Watanabe S, Taki M. Biological and morphological effects on the brain after exposure of rats to a 1439 MHz TDMA field. *Bioelectromagnetics* 2000 21(5): 364-71.

Salford LG, Brun AE, Eberhardt JL, Malmgren L, Persson BR. Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones. *Environ Health Perspect.* 2003; 111(7) :881-3.

Finnie JW, Blumbergs PC, Manavis J, Uttridge TD, Gebiski V, Swift JG, Vernon-Roberts B and Kuchel TR: Effect

of global system for mobile communication (gsm)-like radiofrequency fields on vascular permeability in mouse brain. *Pathology* 33: 338-40., 2001.

Aubineau F, Dulou PE, Haro E, Veyret B, Aubineau P. Effect of 2 hour GSM-900 microwave exposure at 2.0, 0.5, and 0.12 W/kg on plasma protein extravasation in rat brain and dura mater. 24th Annual Meeting of Bioelectromagnetics Society, Abstract Book p60 (2002)

G. 発表

Ushiyama A., Masuda H., Ohkubo C., Effects of subchronic exposure to extremely low frequency electromagnetic fields on the cranial microcirculation in the brain tumor bearing mouse. 25th Annual meeting, bioelectromagnetic society

Masuda H., Ushiyama A., Wake K., Watanabe S., Yamanaka Y., Taki M., Ohkubo C., Sub-chronic effects of local exposure to radio-frequency electromagnetic fields with a loop antenna on the cerebral microcirculation in rats. 25th Annual meeting, bioelectromagnetic society

Ushiyama A, Ohkubo C. Effects of Whole Body Exposure to 50Hz Electromagnetic Fields on the Intramicrovascular Leukocyte

Adhesion in Mice. International Conference on Non-Ionizing Radiation at UNITEN (ICNIR2003), Electromagnetic Fields and Our Health, 2003 October 20-22; Kuala Lumpur, Malaysia; Abstract book

Masuda H, Ushiyama A, Wake K, Watanabe S, Taki M, Ohkubo C. Acute effects of local exposure to radio-frequency electromagnetic fields with a loop antenna on the cerebral microcirculation in rats. The 3rd International EMF Seminar: 2003 Oct 13-17; Guilin, China; Abstract book.

Masuda H, Hirota S, Ushiyama A, Wake K, Watanabe S, Taki M, Ohkubo C. In vivo evaluation of exposure effects to radio-frequency electromagnetic fields on the cerebral circulation in rats. The Blood-Brain Barrier (BBB) Workshop of COST281-Potential health Implications from Mobile Communication Systems: 2003 Nov 2-6; Reischensberg, Germany; Abstract book.

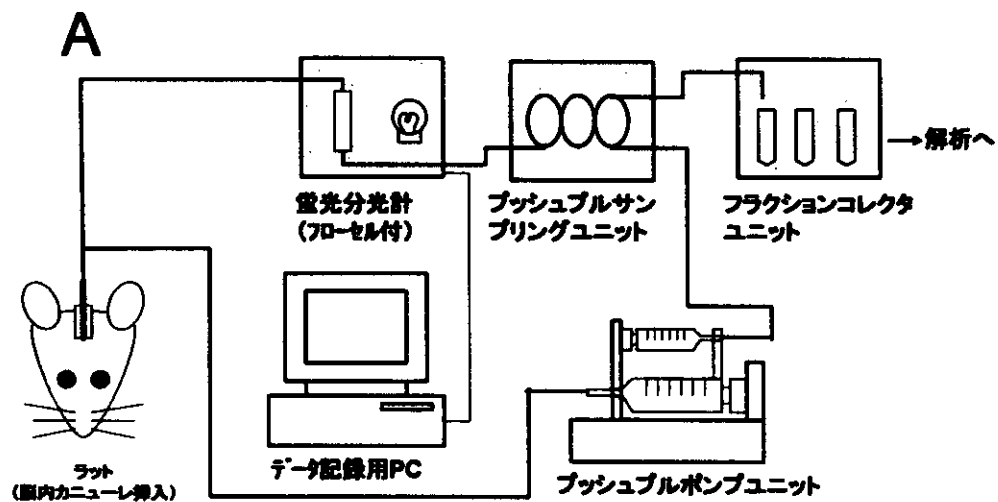
Masuda H, Hirota S, Ushiyama A, Wake K, Watanabe S, Yamanaka Y, Taki M, Ohkubo C. Sub-chronic effects of local exposure to Radio-frequency electromagnetic fields with loop antenna on the cerebral microcirculation in rats. 6th International Congress of the European Bioelectromagnetics

Association: 2003 Nov 13-15; Budapest, Hungary; Abstract book.

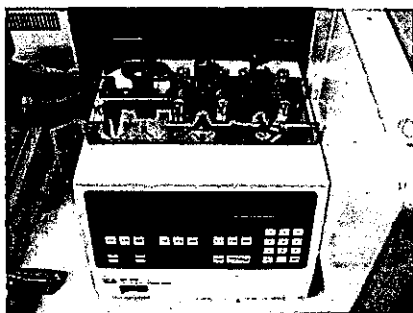
Masuda H, Hirota S, Ushiyama A, Wake K, Watanabe S, Yamanaka Y, Taki M, Ohkubo C. Intravital-microscopic evaluation of exposure effects to radio-frequency electromagnetic fields on the cerebral circulation in rats. Workshop and MCM of COST281-Potential health Implications from Mobile Communication Systems: 2003 Nov 15-16; Budapest, Hungary; Abstract book.

Ushiyama A, Suzuki Y, Masuda H, Hirota S, Taki M, Ohkubo C. Physiological Effect of continuous whole-body exposure to extremely low frequency electromagnetic fields with or without transient magnetic fields on cerebral microcirculation in mice with brain tumor. Asia-Pacific EMF conference 2004 Jan26-30, Bangkok, Thailand, Abstract book p.90

Traikov L, Ushiyama A, Masuda H, Ohkubo C. Acute effects of whole-body exposure to low frequency 16 Hz and 50 Hz electromagnetic fields on cutaneous microcirculation in mice. -EMF-frequency dependence of changes in the blood diameter- Asia-Pacific EMF conference 2004 Jan26-30, Bangkok, Thailand, Abstract book p.91



B



C

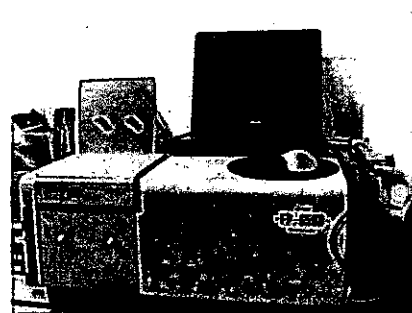


図1 計測システムの構成図および各接続機器

A 本計測システム全体の構成図。プッシュプルポンプユニットならびにサンプリングユニットを介して回収される髄液は、蛍光分析計を経てサンプリングされる。

B プッシュプルポンプユニット 左からプッシュポンプ、プルポンプ、補助プルポンプの各ポンプがある。

C 蛍光光度計とデータ記録用 PC

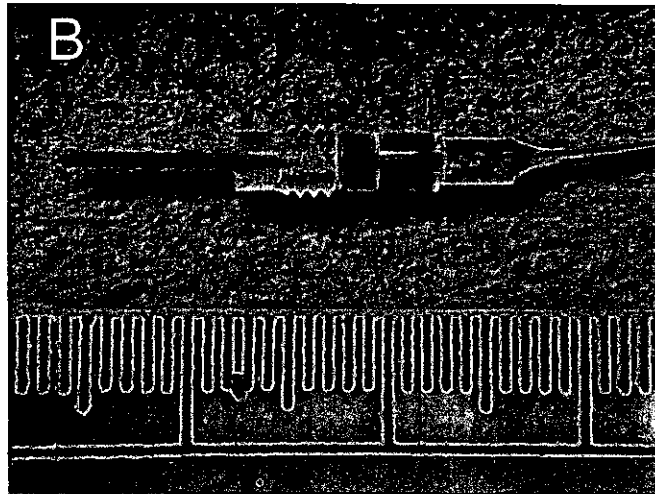
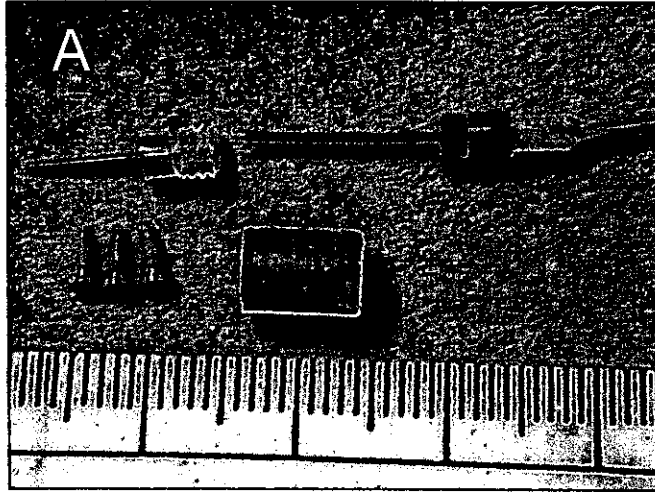


図2 脳内カニューレの各パーツ

A 1個体のカニューレ作成に必要な全パーツ (左上: ガイドカニューレ、左下: アンカービス、右上: カニューレ本体、右下: カニューレキャップ)

B カニューレ本体をガイドカニューレに挿入した図。実際の脳内では写真の形で挿入される。

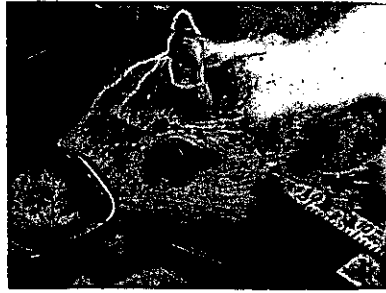


図3 カニューレを装着したラット

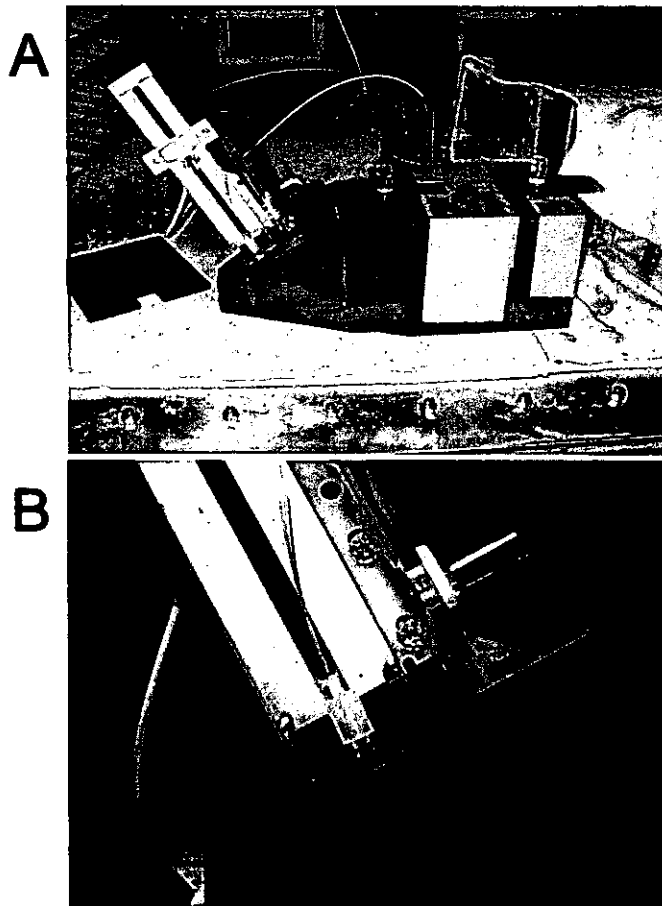


図4 ループアンテナと暴露時のラットの状態

A) 暴露に用いたループアンテナをラットの保定器に取り付けた状態

B) 暴露中のラットの状態

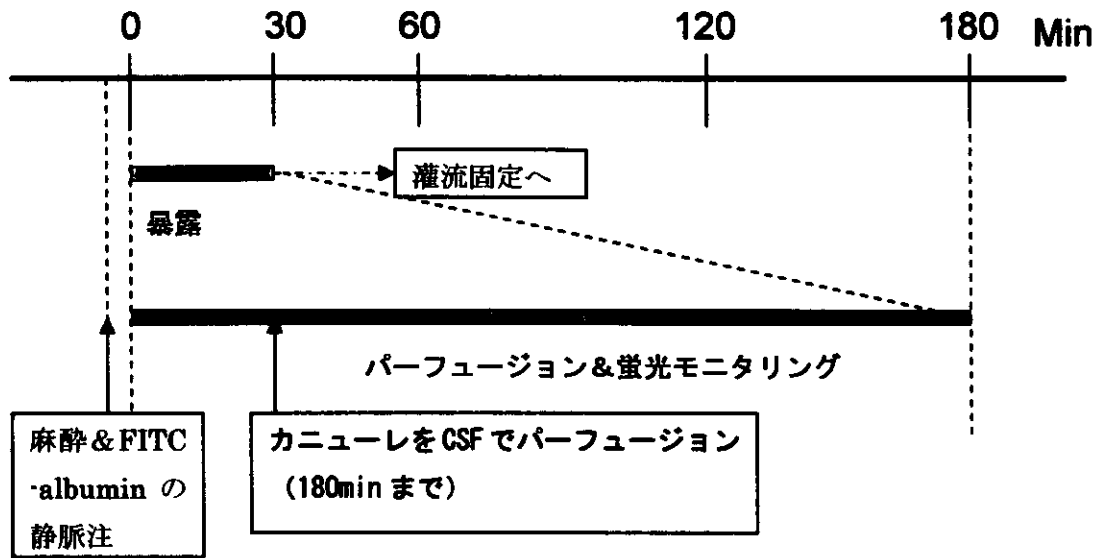


図5 暴露実験におけるプロトコール

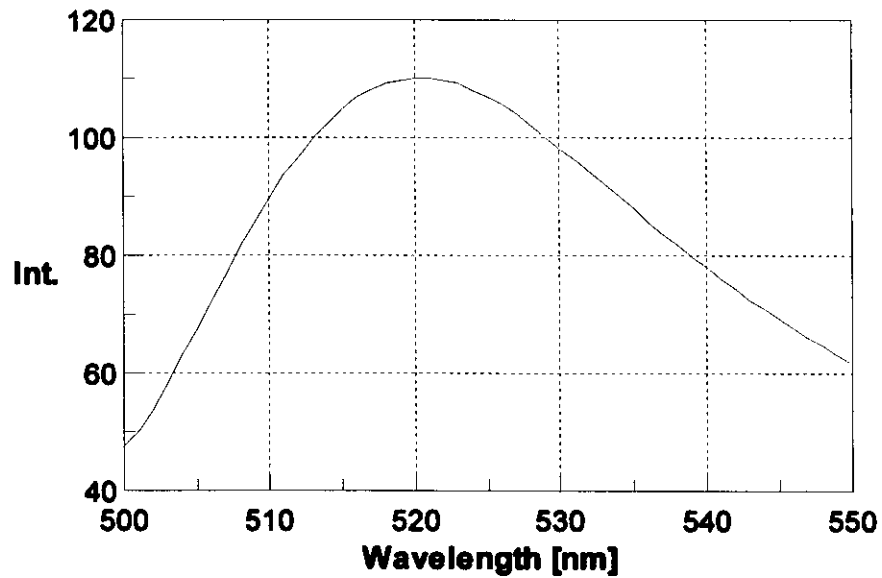


図6 FITC-Albumin 水溶液の蛍光スペクトル

励起波長 491nm で測定波長を走査して蛍光強度を測定した。
520nm で極大を示すため、以後の測定では、励起波長 491nm、
測定波長 520nm で固定した。

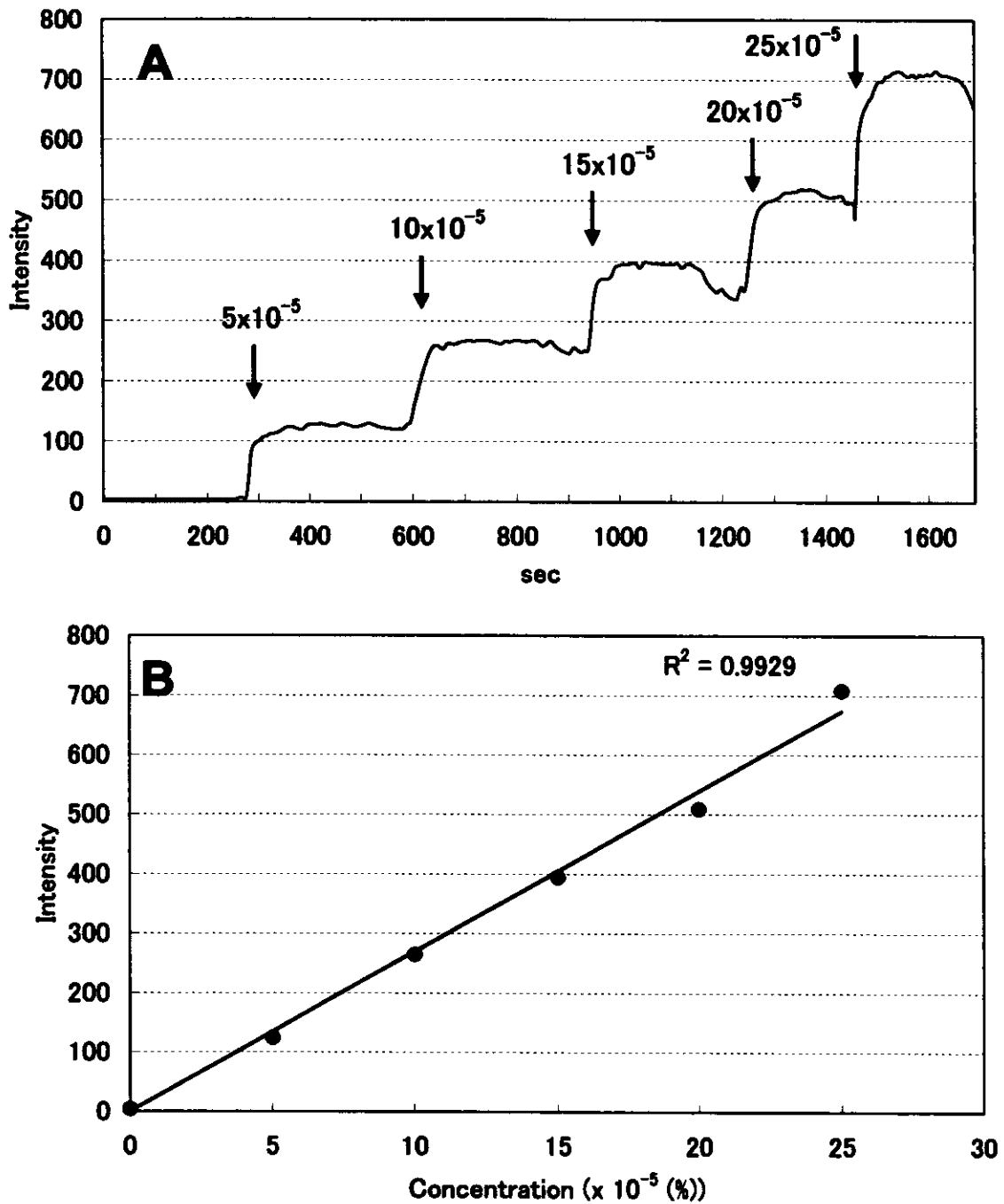


図7 FITC-Albumin の蛍光スペクトル (A) と検量線 (B)

検量線における各プロットは平均値を示す。濃度の数値はそれぞれ、人工脳髄液に溶解した FITC-Albumin の濃度(w/v)%の値を示す。

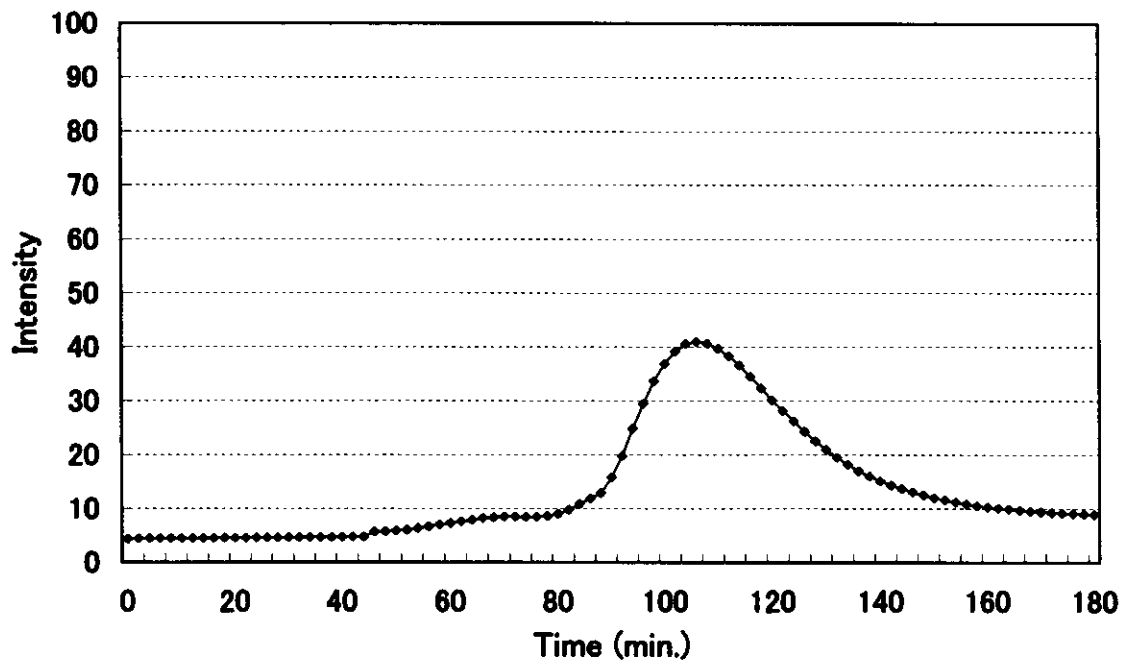


図8 Push Pull ポンプによる脳髄液灌流による溶出液の蛍光チャート
プロトコールにしたがって灌流を行った場合の溶出チャートを示す。本
個体には電磁界暴露を行っていない。