

は水の 24°C における値 $4179.7\text{J/K}\cdot\text{kg}$ を用いた。

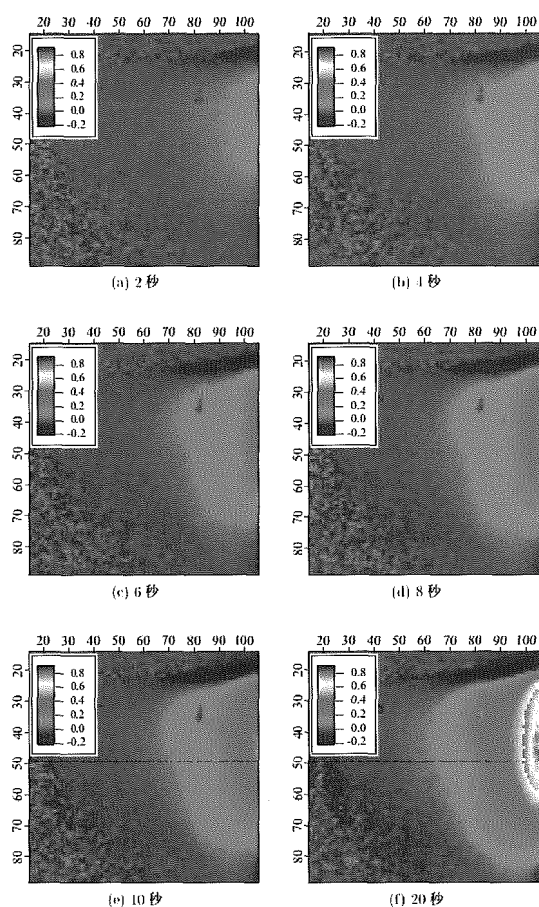


図 1.3 温度分布から求めた 0 秒時からの温度上昇の分布。電磁界エネルギーの吸収の様子がわかる。

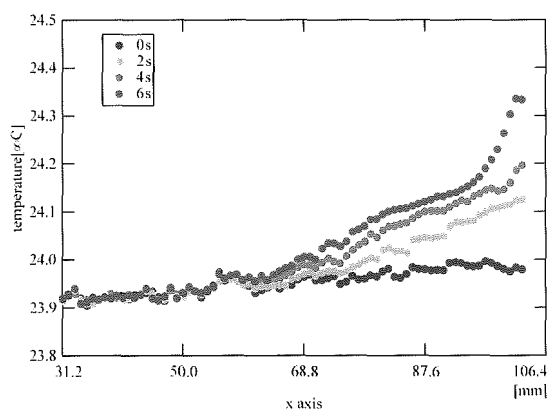


図 1.4 $y=47\text{mm}$, $z=20\text{mm}$ における x 軸方向の温度分布の時間変化。

前述の方法より求められた $z=20\text{mm}$ 断面における SAR 分布を図 1.5, また $y=47\text{mm}$, $z=20\text{mm}$ における x 軸上の SAR 分布を図 1.6 に示す。 $x=60\text{mm}$ 付近から, アンテナ方向に向かって SAR が増加していることが図 1.6 よりわかる。

得られた SAR 分布が妥当なものであるか, サーミスタ温度プローブの測定結果から得られる SAR と比較を行い, 検討する。このプローブについても曝露開始から 4 秒間での温度上昇幅を用いる。サーミスタ温度プローブと MTLC で測定した 0 秒と 4 秒での温度と, それらの値を用いて求めた SAR 結果を表 4 に示す。温度計の絶対値表示は, サーミスタ温度プローブの較正を精度よく行っていないことからその精度は高くないが, 温度差については信頼できるものとする。表より MTLC で測定した方がやや SAR 値が大きく出ているが, オーダーは同じである。また, 2つの手法に関してその測定点間の距離が 7mm あることも SAR 値の差に関連すると考えられる。さらに本実験では温度上昇幅が小さいため, 求められる SAR の精度が悪いと考えられるが, 入射電力を大きくすることにより温度上昇幅を大きくし, 精度を上げることができると考えられる。

カニューレ挿入時のエネルギー吸収分布

本手法を用いてカニューレ挿入時の電磁界エネルギー吸収分布に関して, カニューレ内に存在する脳脊髄液のような比較的導電率の高い物質が影響を与えるか

どうかを検討する。

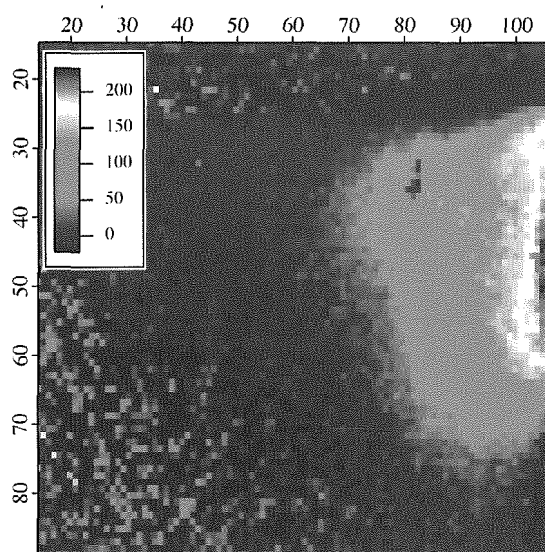


図15 $\Delta t=4s$ 間の温度上昇分布から推定された $z=20\text{mm}$ 断面の SAR 分布。

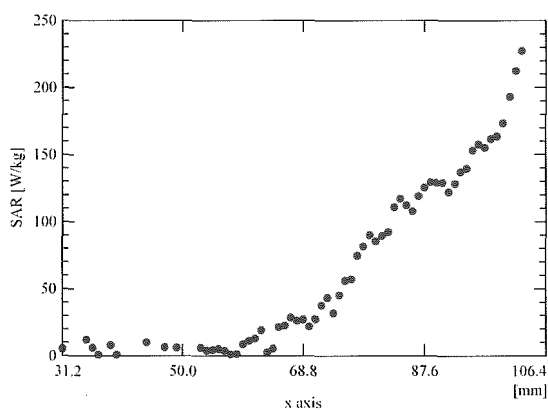


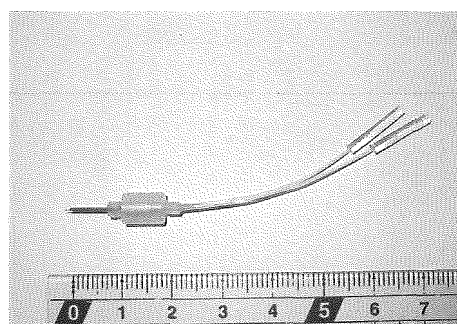
図16 図15における $y=47\text{mm}$ の x 軸方向の SAR 分布

表4 MTLC およびサーミスタ温度プローブにより推定された SAR

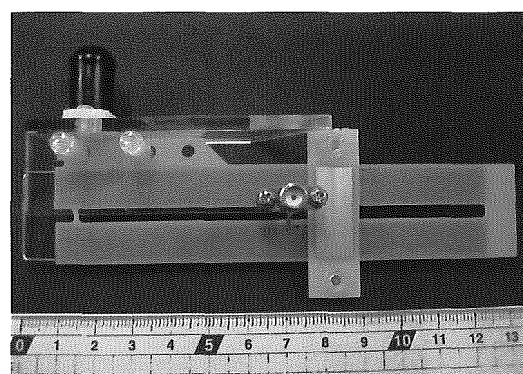
温度測定法	測定位置 (x, y)[mm]	温度			SAR [W/kg]
		0秒 [°C]	1秒 [°C]	差 [°C]	
サーミスタ	(82, 10)	23.99	24.05	0.066	62.70
MTLC	(82, 17)	23.98	24.06	0.086	89.71

ここでは、脳の代わりに MTLC を加えた透明なファントムを用い、これにカニューレを挿入してループアンテナで曝露を行い、ファントム内部の電磁界エネルギー吸収による温度分布の変化を可視化することにより、脳脊髄液のような導電性の物質およびカニューレの影響を調べる。

実験に用いるカニューレとループアンテナは図17のとおりである。カニューレは図18に示すように実際の実験に近い状態を再現するためにループアンテナの近傍に配置する。実験の際にはカニューレの2本の管に脳脊髄液の代わりに0.1mol/lの食塩水を満たした。

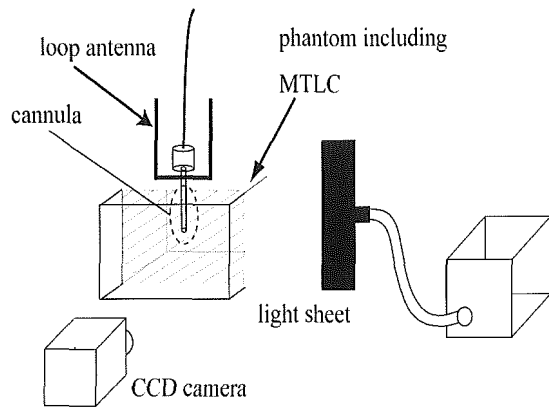


(a)

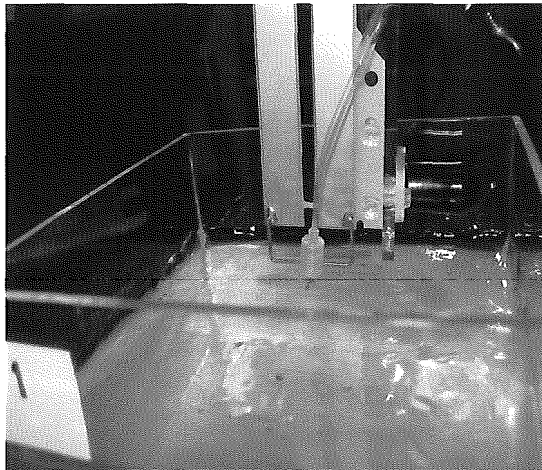


(b)

図17 (a)実験に用いたカニューレ。非金属物質で構成されている。(b)小動物曝露用に開発されたループアンテナ。



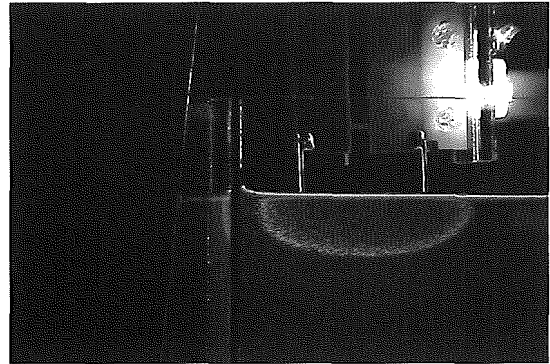
(a)



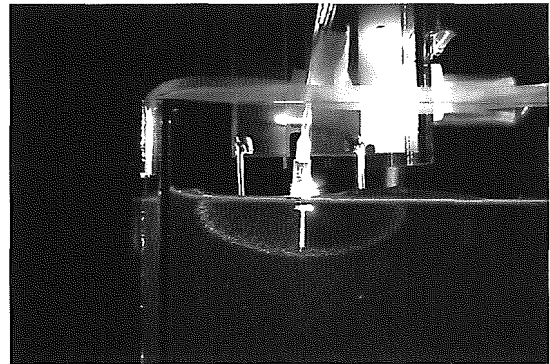
(b)

図 18 (a)曝露実験の概略図. (b)ループアンテナとカニューレの実際の配置.

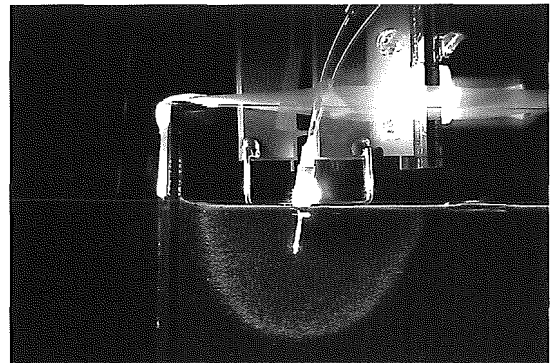
図 19 に実験結果を示す. 図 19(a)はループアンテナのみ, 図 19(b)はカニューレ内に食塩水を満たしていない条件, 図 19(c)はカニューレ内に食塩水を満たしている条件でそれぞれ曝露を行った結果である. 曝露時の入力電力は全て 40W であり, それぞれの画像は曝露開始から 60s 後のものである. またアンテナとカニューレの位置関係, スリット光を照射した位置は全て同じである.



(a)



(b)



(c)

図 19 ループアンテナ近傍のカニューレ内における導電性の液体が電磁界エネルギー吸収分布に与える影響を評価するための実験 (a)ループアンテナのみ (b)カニューレ挿入時ただしカニューレ内に食塩水は満たされていない. (c)カニューレ内に食塩水を満たした条件

図 19 の(a)と(b)を比較すると, 曝露開

始から 60s 後の温度分布はカニューレの有無に関わらずほとんど同じであることがわかる。このことからカニューレ自身はその近傍の電磁界エネルギーの吸収に影響を与えないと考えられる。また図 19(c)とその他の条件を比較すると、温度分布の様子が少し異なっている。この結果からここで用いているカニューレのような非常に細い管の中に導電性物質が満たされた場合には、その周辺の電磁界エネルギー吸収分布に影響を与えることが示唆される。図 19からは NaCl をカニューレ内に満たすことにより、カニューレ周辺の電磁界エネルギー吸収が増加していることが確認できる。

ただし本実験は試行回数が少なく細い領域内に閉じこめられた脳脊髄液がその周辺の SAR 分布に影響を与えるかどうかを結論づけるためにはさらなる再現実験が必要である。また図 19 に用いた画像を取得するためのデジタルビデオカメラは画像に時間・空間的な非可逆的な圧縮がかかっており、取得したデータが圧縮により劣化しており定量化するのが困難であった。

今後、非圧縮で画像が取得できるような撮影装置を用いて本実験の検証を行い、導電性の液体の有無による SAR 分布の違いを定量的に評価する予定である。

D. 結論

本研究では、細いカニューレ内に比較的導電率が高い液体が満たされている場合の電磁界エネルギー吸収への影響を評価することを目的とし、最近我々が開発してきた非破壊非接触で高周波電磁界曝

露下における三次元温度分布を可視化できる手法を SAR 推定に適用することを試みた。

我々が提案してきた手法では感温液晶マイクロカプセル(MTLC)を温度プローブとして用いる。この MTLC を含むファントムを作成するためにカラギーナンゲルを基材とするファントムを作成し、それらの特性を調べ、複素比誘電率の調整に関する知見を得た。これによって 900MHz 帯および 1.45GHz 帯での筋肉の複素比誘電率の値に調整された MTLC を含むカラギーナンを基材とするファントムの作成に成功した。

作成したファントムが SAR 推定に用いることが可能であるか評価するため、半波長ダイポールアンテナを用いた 1.45GHz における電磁界曝露を行った。その結果、ファントム内部の色の分布をスリット光により可視化できることを確認した。さらに可視化されたファントムを撮影した画像から、色相の値を取り出し、色相(H)-温度校正曲線によりファントムの深部の温度分布を定量的に得ることができた。またこれらの温度分布の時間発展から、SAR 分布推定を行い、ファントム内部の SAR 分布を推定できることを示した。

本手法を用いてカニューレ内の比較的導電率の高い液体がその近傍の SAR 分布に与える影響について検証する実験を試みた。その結果、カニューレ自体はほとんど SAR 分布に影響を与えないことがわかったが、カニューレに導電性の液体が満たされた場合、カニューレ近傍の SAR 分布に影響を与える可能性が示唆された。

ただしこの結果に関しては、精密に条件をコントロールされた状況下での再現実験が今後必要であると考えます。

E. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

Baba M, Suzuki Y, Taki M, Fukunaga K, Watanabe S, “Three Dimensional Visualization of the Temperature Distribution in a Phantom for the Assessment of Localized

Exposure to Microwaves,” Abstract Book of Bioelectromagnetics 2005, Dublin, pp. 250-251, 2005.

Suzuki Y, Baba M, Taki M, Fukunaga K, Watanabe S, “Visualization of energy absorption due to high frequency electromagnetic field within tissue equivalent gel phantom,” Bio-Dielectrics: Theories, Mechanisms and Applications, Annual Conference 2006 of the Dielectrics Group of the Institute of Physics, Leicester, UK, pp. 21, 2006.

厚生労働科学研究費補助金（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曝露の
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 牛山 明 国立保健医療科学院生活環境部主任研究官
分担研究者 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

携帯電話で使用されている電磁界による非熱的な影響の科学的な知見を集め、さまざまな角度から安全性を検討することは重要である。本研究ではこれまでに構築した脳髄液のリアルタイム連続サンプリングシステムを使用して、様々な強度の電磁界を曝露し電磁界曝露による血液髄液関門のバリア機能への影響を検討した。本年度においては、8の字ループアンテナを適用し、幼若のラットを用いて、電磁界強度は脳の平均 SAR（比吸収率）で、0.5W/kg, 2.0W/kg, 10W/kg レベルの曝露条件で1日30分間、6日間連続で曝露をした際の亜慢性影響について、幼若期および成熟期のラットを用いて検討を行い、これらの曝露条件下においては血液髄液関門については生体影響が見られないことを明らかにした。

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 9400 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近傍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、さらに5倍の安全率を勘案して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、電磁界曝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いる。非熱作用の検討においては、遺伝子レベルの研究や培養細胞レベルの研究も重要ではあるが、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、器官組織としての脳への影響を多面から詳細に検討することはより重要であると考えられる。そのような観点より本研究においては、実験動物を用いて脳特有の機能である血液のバリア機能について検討を行った。高周波電磁界による血液脳関

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いるため、それら明らかにすることは科学的にも、また公衆衛生学的にもその意義は大きいと考えられる。本研究では実験動物のラットを用いて電磁界曝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、工学班によって評価された電磁界放射アンテナを用いて、脳に電磁界曝露を行い、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、ラットに電磁界曝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、曝露による脳髄液中の蛋白質濃度変化を調べることで、電磁界曝露中のバリアの機能を検証することとする。本年度は構築された計測システムを用いて、幼若ラット（5～6週齢）における1日30分連続6日間の曝露を行い、その亜慢性曝露影響を検討した。

B. 研究方法

実験動物

本研究の遂行にあたっては、動物実験に関する政府指針及び学会等のガイドラインを遵守するとともに国立保健医療科学院の動物実験委員会の承認を得ておこなった（動物実験委員会倫理審査承認番号17-005）。実験は、手術の時点で5～6週齢の雄性SPF-SDラット（東京実験動物（株））を用いた。カニューレ装着後のラットは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った。また以下に述べる手術並びに実験の全ては、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シス分析システム（エイコム株式会社、ニューロペプチドダイアリシスサンプリングシステム EPPS-10）を使用した。本システムの概要を示した（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 Co.) 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。前部は嗅球の上、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）を嗅球の上

（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。成熟ラットの場合は Bregma から caudal（縦）0.8mm、lateral 1.3mm、ventral 3.0mm の位置に、また幼若ラットの場合は Bregma から caudal 0.8mm、lateral 1.3mm、ventral 2.7mm 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 2 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 に示した。これらは、いずれも電磁界曝露による電界の集中を最小限にするために、非金属製のものをを用いた。手術を完了しカニューレを装着したラットの頭部を図 3 に示した。また、カニューレの挿入部位の概念図を図 4 に示した。ここに示すとおり、カニューレの先端が側脳室内に入るよう、深さ方向に正確にカニューレを挿入する必要がある。

電磁界曝露装置および曝露条件

電磁界曝露については、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 8 の字ループアンテナ、シグナルジェネレーター、パワーアンプより構成され、実験は電磁界シールドルーム

内で行った。図5に8の字ループアンテナを示す。本研究においては、ループアンテナより周波数1.5GHz (PDC方式)の電磁界をラット頭部へ30分間照射した。曝露は、1日30分間を毎日連続6日間に渡って行った。曝露の際にはラットには ketamine hydrochloride / xylazine hydrochloride カクテル液(10:1, 100mg/kg)による麻酔を処置し、麻酔下の動物の体温低下を防止するため、温度を37°Cに保った温水をプレート内で循環させその上にラットを保定してすべての実験をおこなった。ラットを4群に分け、3つの異なる電磁界強度の曝露群と、全く電磁界を曝露しない偽曝露群(対照群)とした。3つの曝露群の電磁界強度は、脳平均 SAR (比吸収率) でそれぞれ 0.5, 2.0, 10 W/kg とした。

血液髄液関門への影響を調べるためにラットには、連続する6日間の曝露の最終日の曝露の直前に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。30分間の曝露(偽曝露)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6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、十分に脱気したものを使用した。

NaCl	133.5mM
KCl	3.2mM
MgCl ₂	1.33mM

NaHCO ₃	24.5mM
CaCl ₂ /2H ₂ O	1.5mM
Glucose	3.3mM.

灌流固定 (*in vivo*) 並びに凍結標本の作製

曝露操作の終了後に、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%ショ糖液、30%ショ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、ショ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 10 μm の切片を作製した。

凍結標本は、レクチン染色 (Rhodamine-labeled RCA-1 lectin ; Vector Laboratories) により、脳における血管内皮細胞を特異的に蛍光染色した。

C. 結果

検出装置の構築とその基礎特性

昨年度の検討において FITC-albumin の検出においては励起波長 491nm、蛍光波長 520nm に固定すると極大蛍光がみられたので、本年度も同一の波長にて測定した。

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 3 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確認される。

電磁界亜慢性曝露実験

図 6 の実験プロトコールに従って、電磁界曝露を行った。本研究においては、脳平均 SAR (比吸収率) でそれぞれ 0.5, 2.0, 10 W/kg の 3 条件で、1 日 30 分間の曝露を連続 6 日間行った。また、ラットは、カニューレが正常に装着が可能であったもつとも小さい週齢である 5~6 週齢のものを用いた。図 10 には、各曝露条件毎のグラフを示し、図 11 にはこれらを取りまとめて一つのグラフにしたものを示した。また、図 11 には同時に熱影響によりバリアが障害を受けた結果と考えられるデータを合わせて示した。これらの結果の中においては、曝露をしたものの、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測定個体数は各グラフに示してあるとおりでである。

条件の設定により、蛍光のピーク的位置にややずれがあるが、全体の傾向として sham 群ならびに曝露群の双方において、75 分から蛍光強度の一過性の上昇が見られ、脳髄液に若干の蛍光物質が含ま

れることが示唆された。一方、熱影響でバリアが影響を受けたと思われる場合は、図11に示したように高い蛍光値を示すことを考えると、今回の曝露群、また対照群共に非常に低レベルであり、常態生理的条件として問題ないと考えることができる。

また、実験後、ホルムアルデヒドによる灌流固定摘出した脳の切片をHE染色、また、血管内皮細胞特異的に認識することが可能な、RCA-1 蛍光抗体にて染色を行った。図12にその一例を示したが、示したように、免疫組織学的な検討によっても、FITC-Albumin の血管外への漏れは観察されなかった。

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曝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については、電磁界による影響有りまたは無しという相反する報告がある。スウェーデン Lund 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時間曝露し、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。計算による曝露条件は、全身平均 SAR で、2, 20, 200mW/kg であり、これらが透過性と量の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時間の曝露の後に、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、電磁界曝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曝露実験を行い、血液脳関門透過性

亢進とSAR並びに曝露時間の組み合わせについて曝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SAR2W/kgの強度で、2週ないし4週の連続曝露をおこなったが、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言われている。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、電磁界曝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手術により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。偽曝露条件下で、検出器の設定を最適化をおこなった。昨年度の 30 分間連続曝露による急性曝露影響の検討に引き続き、1 日 30 分の曝露を 6 日間連続で行った際の影響について検討をおこなった。本研究では 6 日目の曝露の際に図 6 の実験プロトコールにしたがってバリア機能への影響を検討した。曝露においては、携帯電話の使用を模した条件をラットで再現できる 8 の字ループアンテナを使用し、成長過程にある幼若なラットに対して、脳平均 SAR (比吸収率) でそれぞれ 0.5, 2.0, 10 W/kg の電磁界強度で曝露をおこなった。図 10 に各曝露レベルでの結果を示し、図 11 には熱によってバリア機能に影響が見られた条件との対比を示した。これらより曝露条件においては顕著な FITC-Albumin の漏出は見られず、電磁界による影響はないことが示唆された。

以上をまとめると、今年度は幼若ラットを用いて、1 日 30 分間で連続 6 日間の電磁界曝露を異なる 3 つの電磁界強度の条件で検討を行ったが、脳バリア機能への影響は見られなかった。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ったが、本研究の条件下ではすべて陰性であり、電磁界曝露の影響は見られなかった。

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、蛍光検出器を組み込んだダイアリスサンプリング法を用いて検

討を行った。

今年度は幼若段階のラットを対象に、で脳関門が亜慢性曝露の影響を受けるか否かの検討をおこなった。亜慢性曝露条件としては、脳の平均 SAR で、0.5, 2.0, 10W/kg の曝露条件で1日当たり30分間の曝露を連続6日間で行ったが、いずれの電磁界強度の条件においても本実験条件下ではバリア機能への影響は見られなかった。

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、高橋美雪さんに感謝致します。

G. 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, Utteridge 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)

H. 発表

Masuda H, Ushiyama A, Hirota S, Watanabe H, Wake K, Watanabe S, Yamanaka Y, Taki M, Ohkubo C. Real-time measurement of brain microcirculation during RF-EMF exposure using an "8"-shaped loop antenna. In: Abstract Collection of the 27th Annual meeting of Bioelectromagnetic Society; 2005 Jun 19-24; Dublin, Ireland. 2005. p.170 in CD-ROM.

Ushiyama A, Masuda H, Hirota S, Watanabe H, Wake K, Watanabe S, Yamanaka Y, Taki M, Ohkubo C. Development of real-time measuring system for blood-brain barrier function and acute effects on BBB function by RF

exposure to rat brain. In: Abstract Collection of the 27th Annual meeting of Bioelectromagnetic Society; 2005 Jun 19-24; Dublin, Ireland. 2005. p.510-11 in CD-ROM.

Ushiyama A, Masuda H, Hirota S, Watanabe H, Wake K, Watanabe S, Yamanaka Y, Taki M, Ohkubo C. Acute effects on blood barrier function by RF-EMF exposure to rat brain in vivo. In: Abstract book of the 28th General Assembly of International Union of Radio Science; 2005 Oct 23-29; New Delhi, India. 2005. KP.6(01436) in CD-ROM.

Masuda H, Ushiyama A, Hirota S, Watanabe H, Wake K, Watanabe S, Yamanaka Y, Taki M, Ohkubo C. Real-time measurement of brain microcirculation during RF-EMF exposure using an "8"-shaped loop antenna. In: Abstract book of the 28th General Assembly of International Union of Radio Science; 2005 Oct 23-29; New Delhi, India. 2005. K03.5(097) in CD-ROM.

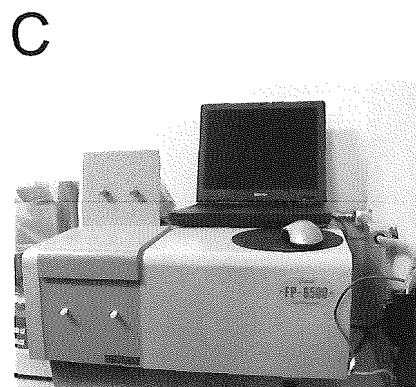
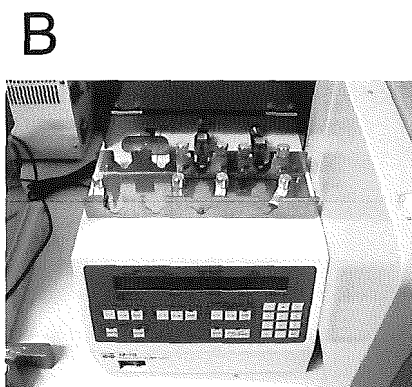
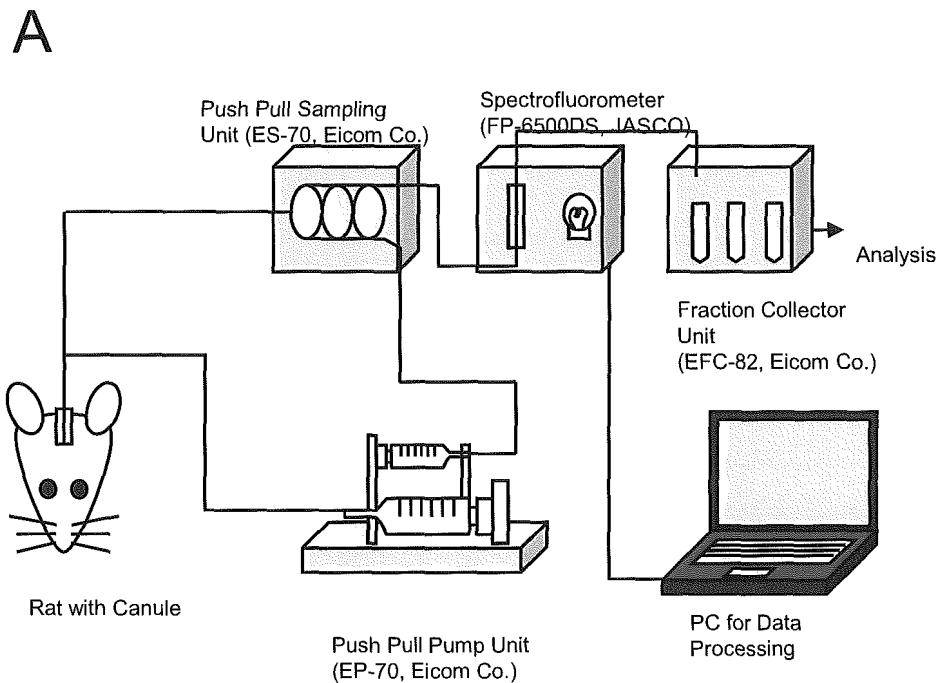


図1 計測システムの構成図および各接続機器

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

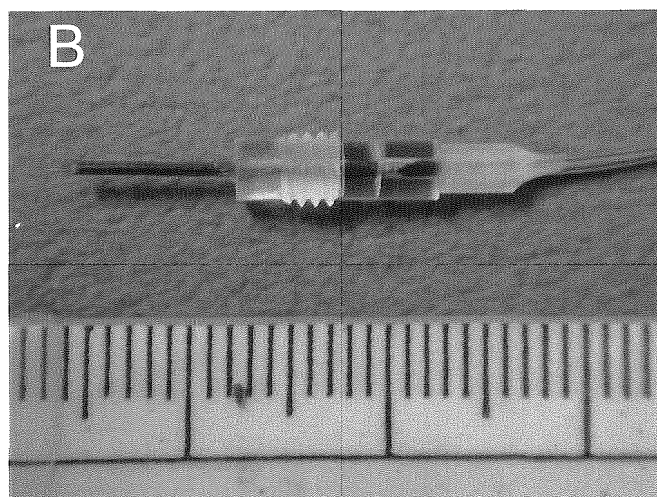
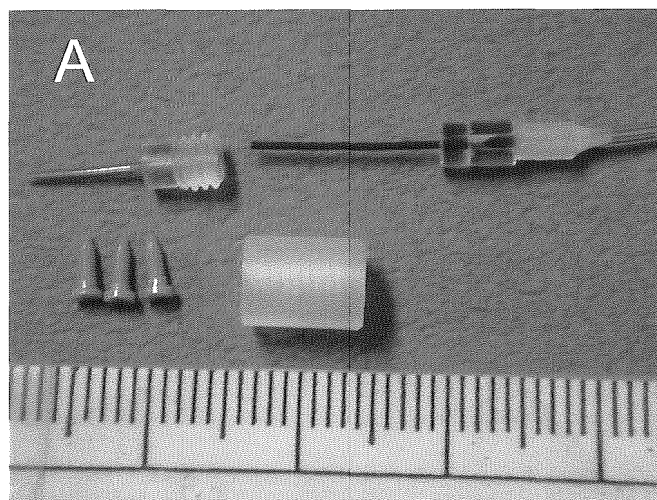


図2 脳内カニューレの各パーツ

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。

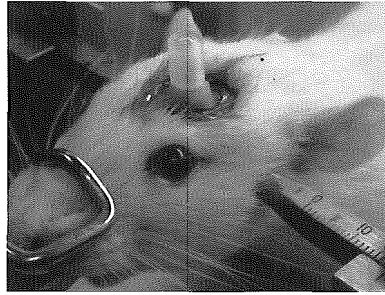


図3 カニユーレを装着したラット

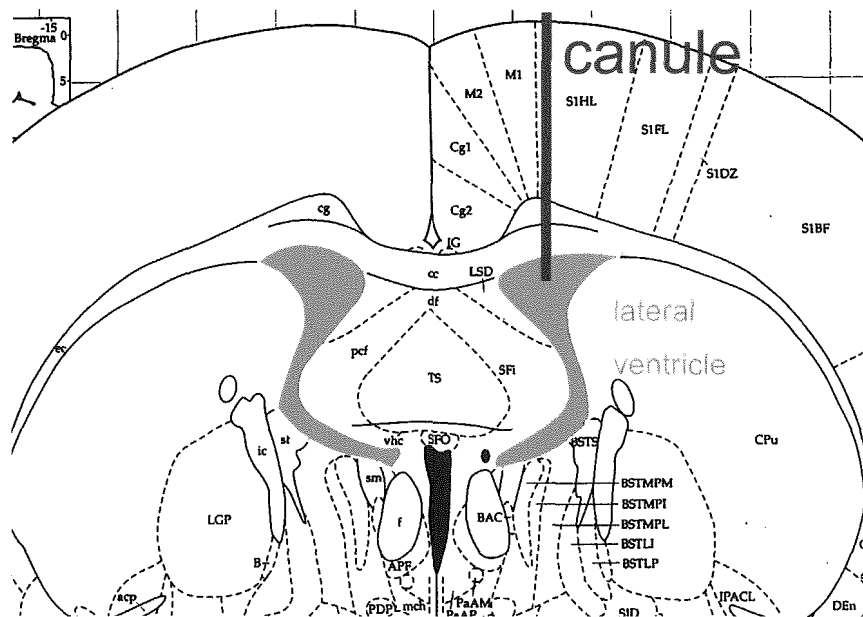


図4 カニユーレの挿入部位

本図は Bregma から後方 0.8mm の断面を示す。黒く塗りつぶしてある部分は、側脳室および、第3脳室であり、カニユーレの挿入部位は黄色い線で示したとおり、側脳室に先端が入るようにする。

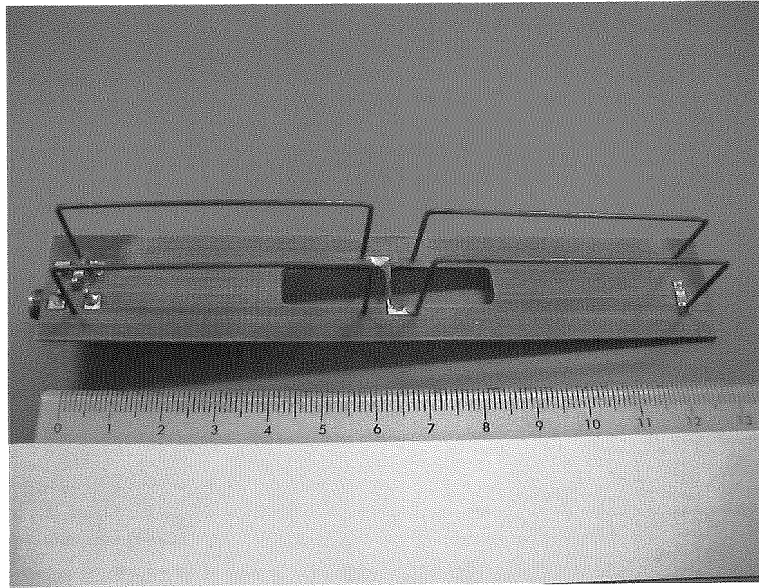


図5 曝露に使用したアンテナ

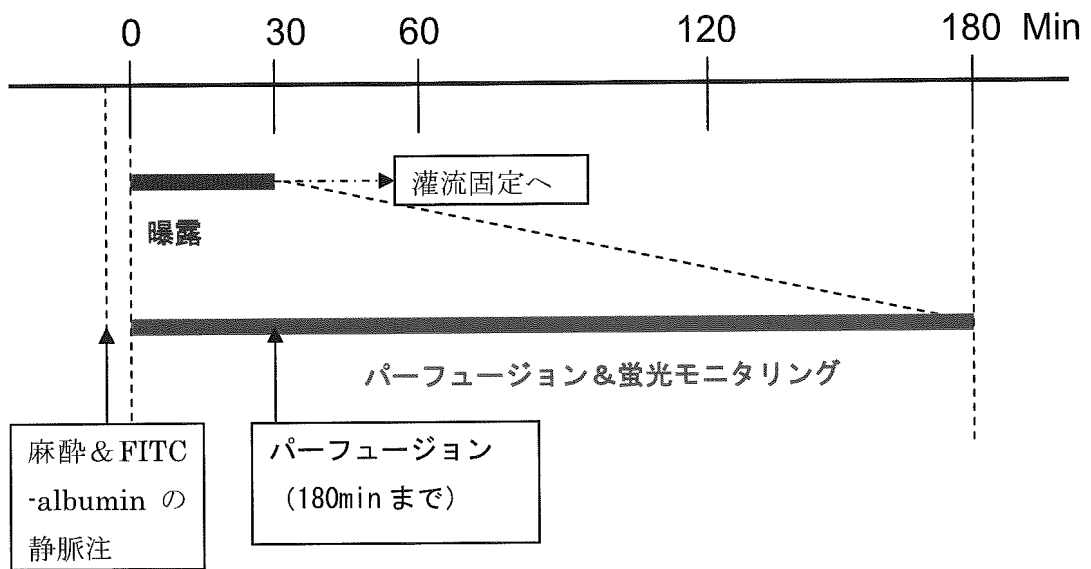


図6 曝露実験におけるプロトコール (曝露最終日の場合)

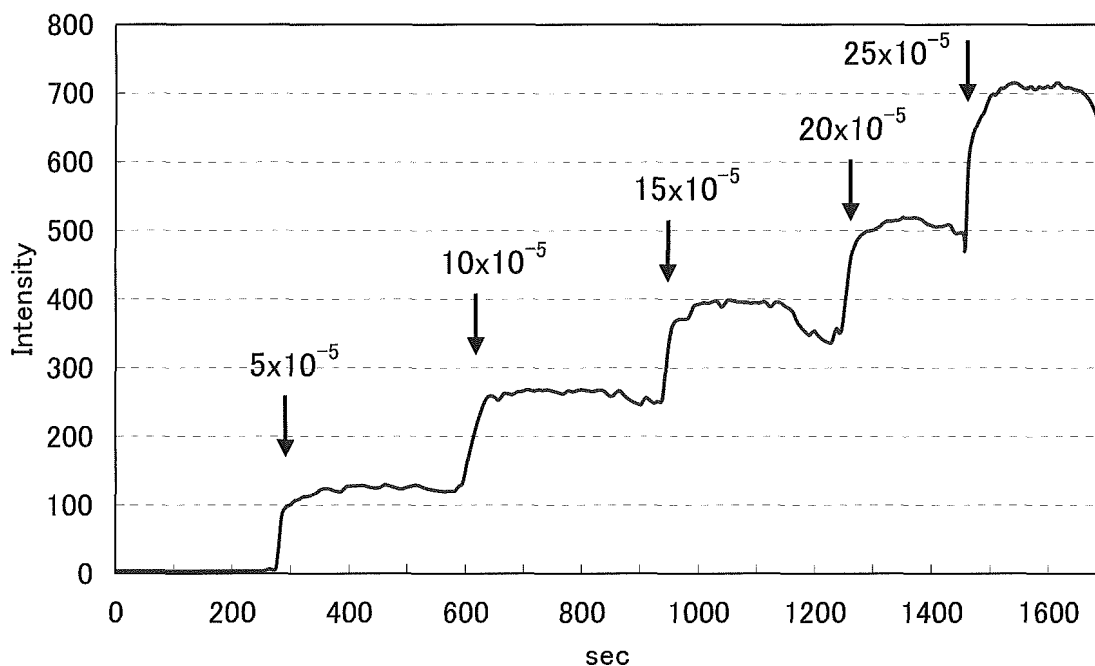


図7 FITC-Albumin の蛍光スペクトル (A) と検量線 (B)
 検量線における各プロットは平均値を示す。数値は濃度を示し、人工脳
 髄液に溶解した FITC-Albumin の濃度(w/v)%の値を示す。

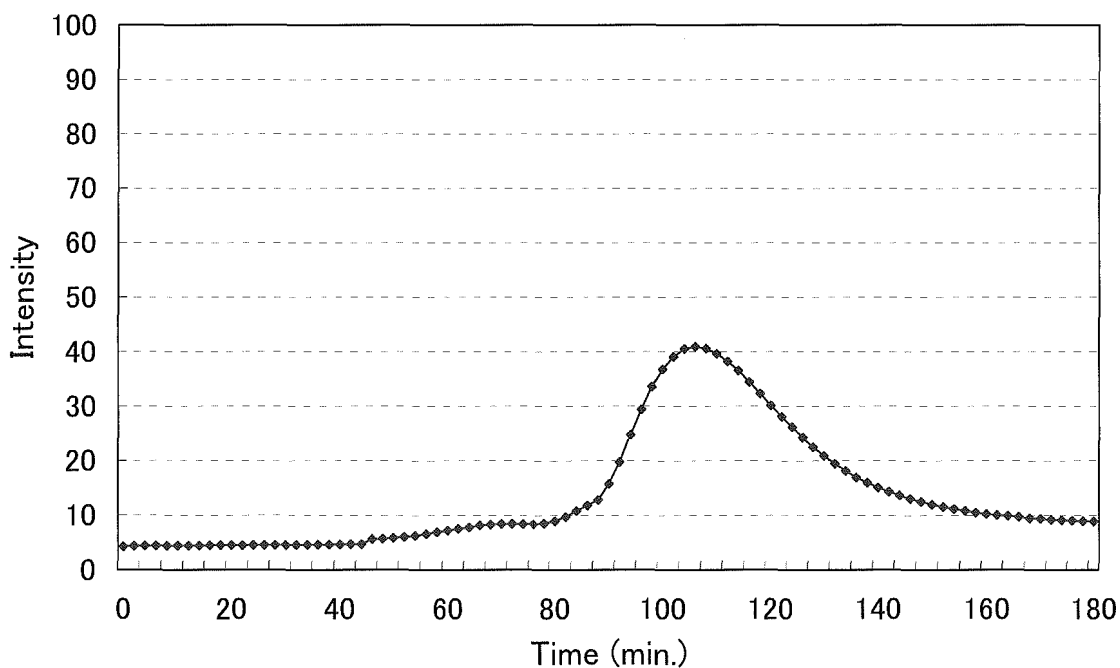


図8 Push Pull ポンプによる脳髄液灌流による溶出液の蛍光チャート
 プロトコールにしたがって灌流を行った場合の溶出チャートを示す。本
 個体には電磁界曝露を行っていない。