

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、計測の直前に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%ホルムアルデヒドロー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。

電磁界急性曝露実験

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 が 0.5, 2.0, 10W/kg の 3 条件で、30 分間の連続曝露を行った。また、ラットは、成熟条件として 8~10 週齢、幼若条件として 5~6 週齢のものをを用いた。成熟条件での結果を図 10 に、幼若条件の結果を図 11 に示した。この結果においては、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ある。

条件の設定により、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 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。しかしながら、このレベルを考えると非常に低レベルであり、sham 群でも同程度の蛍光シグナルが見られることから、常態生理的条件として問題ないと考えることができる。

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っとも小さい週齢である5~6週齢のものを用いた。図12には、各曝露条件毎のグラフを示し、図13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13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ある。

条件の設定により、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 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13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14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摘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 SAR 2 W/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こ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。本研究においては、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。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～図12に各曝露レベルでの結果を示し、図13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。

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シスサンプリング法を用いて検討を行った。

本研究では、急性曝露影響、亜慢性曝露影響について検討をおこなった。曝露条件としては、脳の平均 SAR で、0.5, 2.0, 10W/kg の曝露条件を適用したが、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, 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)

H. 発表 (平成 17 年度のみ)

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.

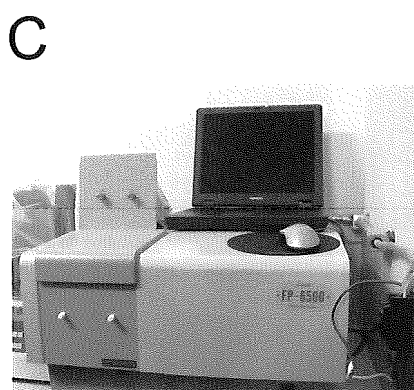
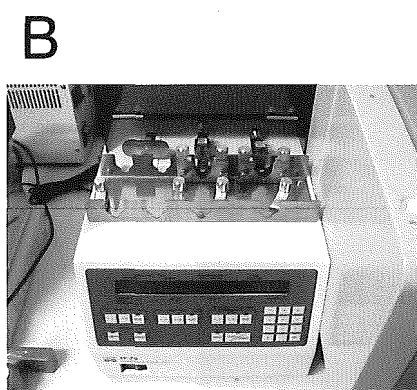
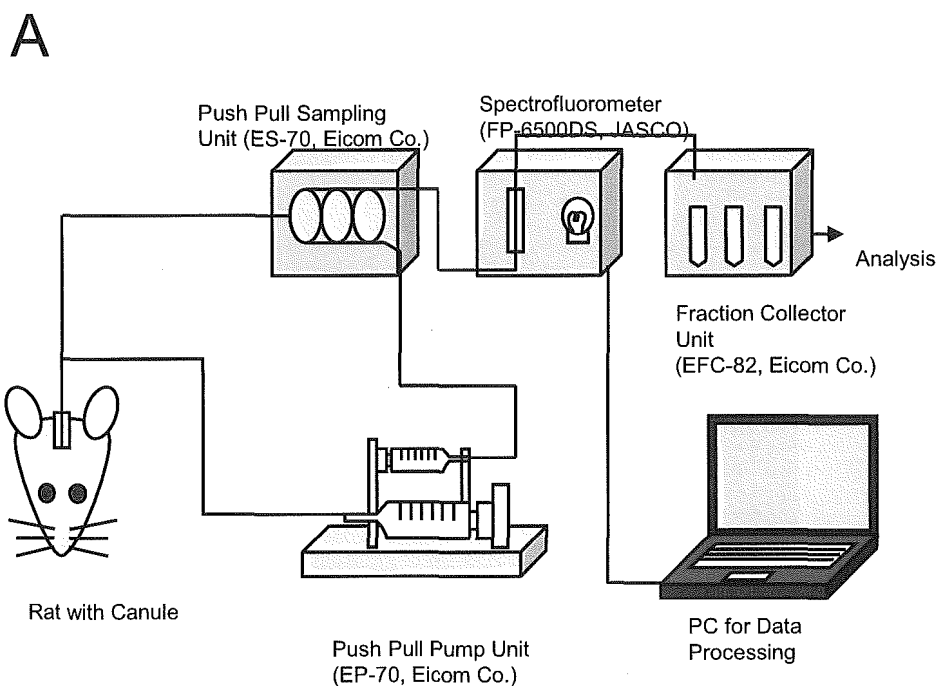


図1 計測システムの構成図および各接続機器

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

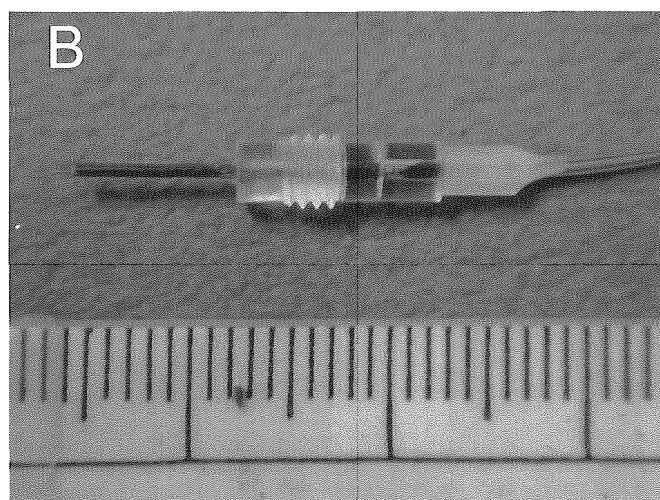
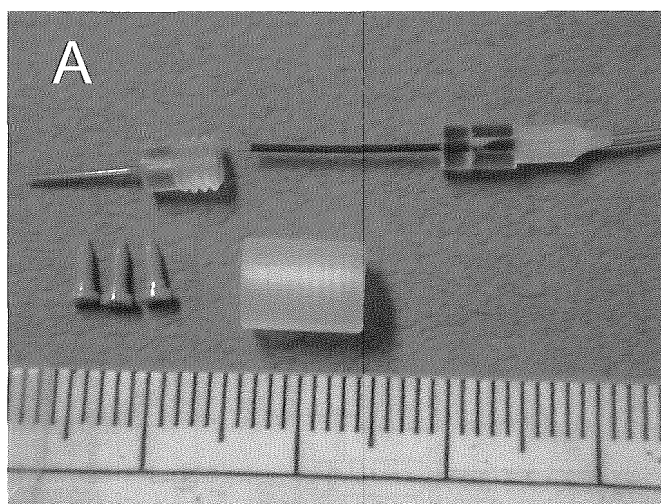


図2 脳内カニューレの各パーツ

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 カニューレを装着したラット

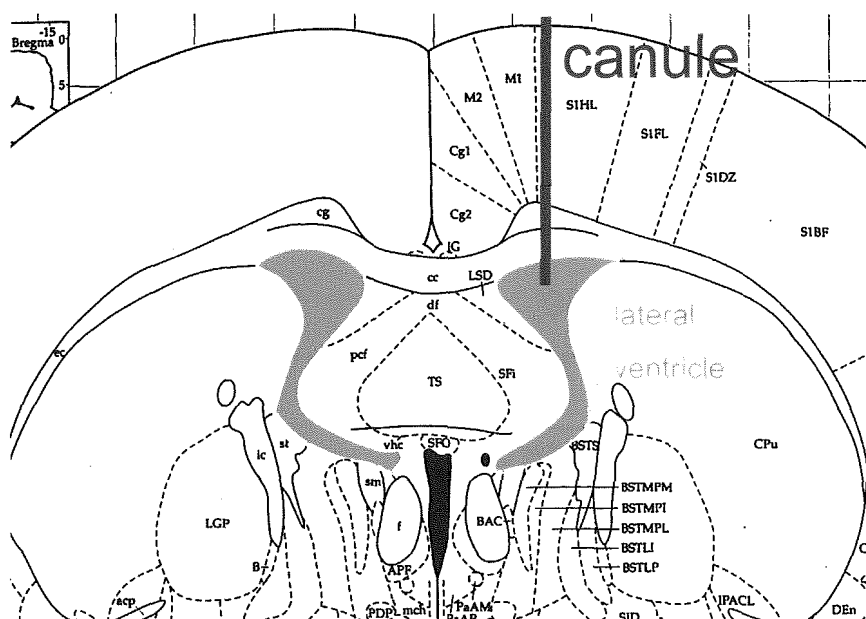


図4 カニューレの挿入部位

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、カニュ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。

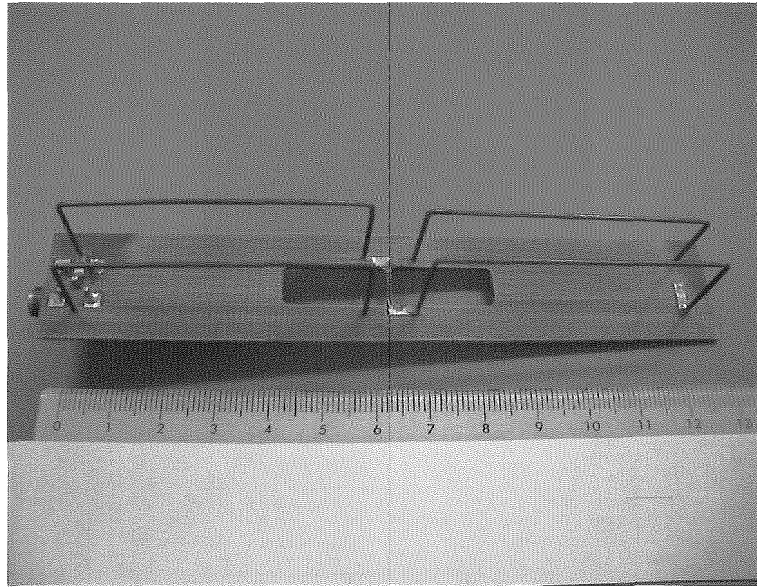


図5 曝露に使用したアンテナ

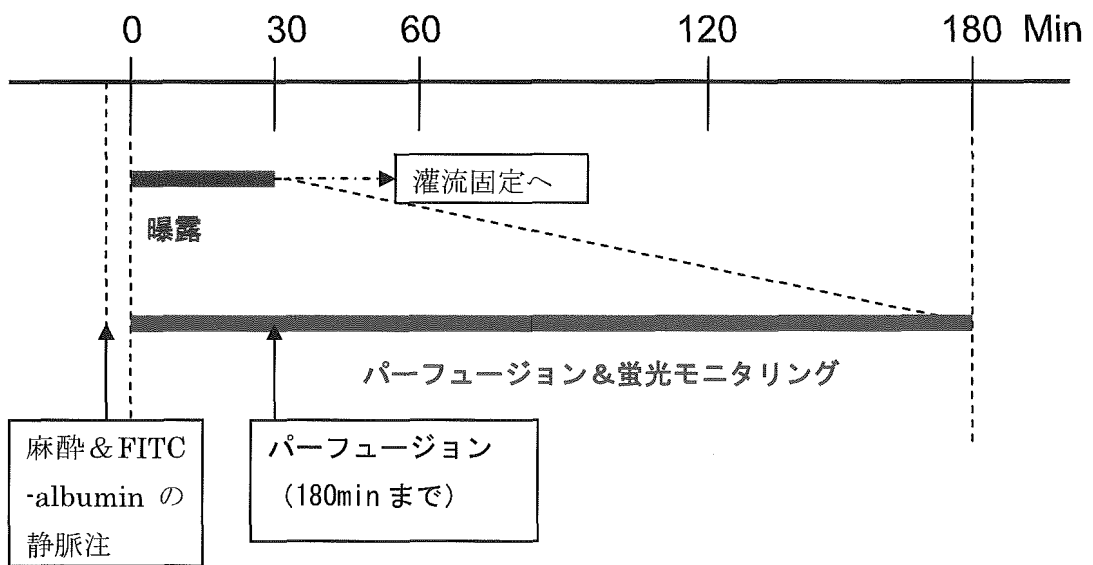


図6 曝露実験におけるプロトコール（急性曝露影響・亜慢性曝露（最終日）の場合）

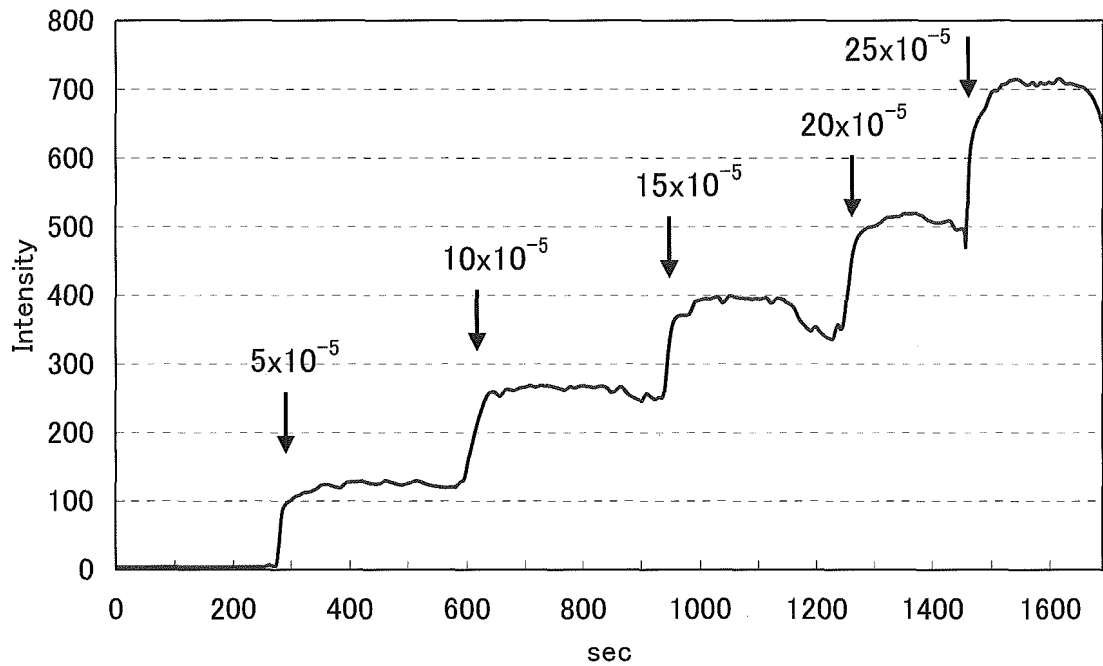


図7 FITC-Albumin の蛍光スペクトル (A) と検量線 (B)
 検量線における各プロットは平均値を示す。数値は濃度を示し、人工脳
 髄液に溶解した FITC-Albumin の濃度(w/v)%の値を示す。

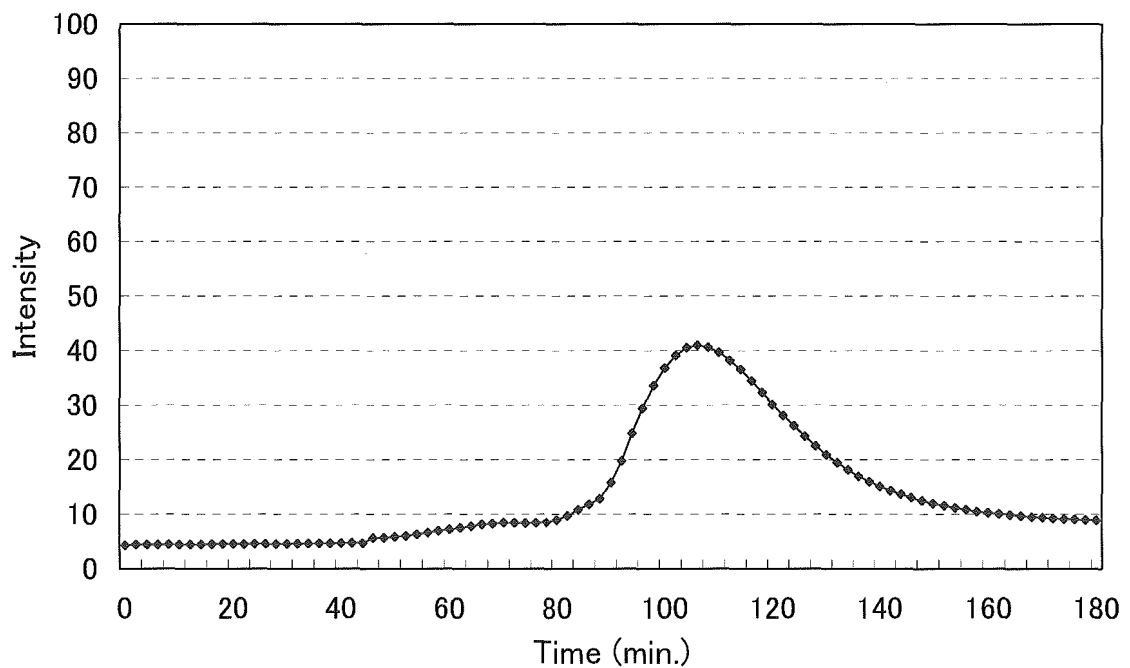


図8 Push Pull ポンプによる脳髄液灌流による溶出液の蛍光チャート
 プロトコールにしたがって灌流を行った場合の溶出チャートを示す。本
 個体には電磁界曝露を行っていない。

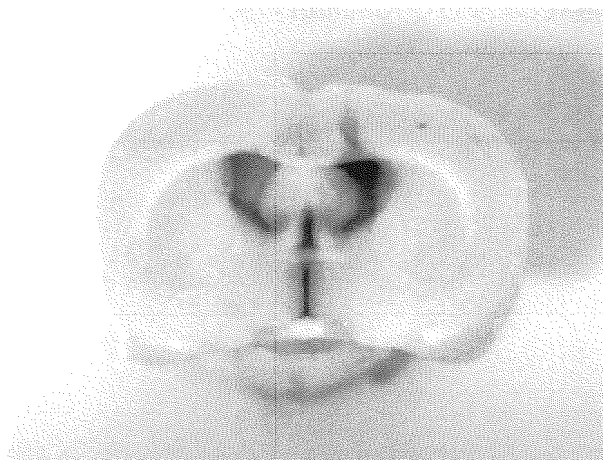


図9 ラット脳の灌流固定後の脳（上図）と凍結切片像（下図）
側脳室にカニューレが挿入された場合の例を示す。

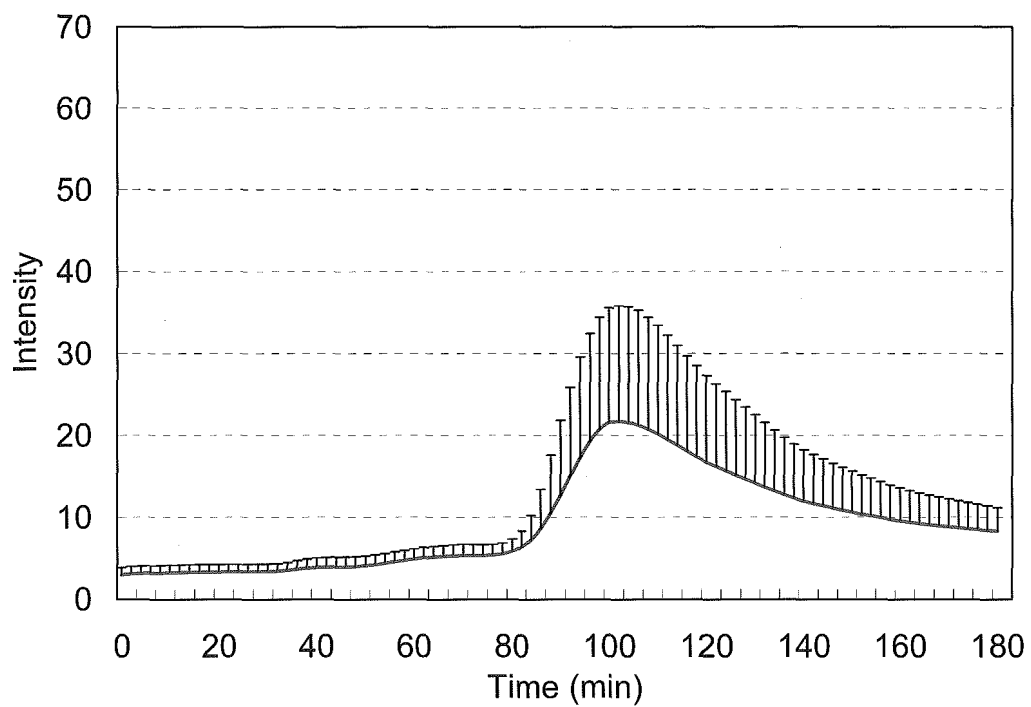
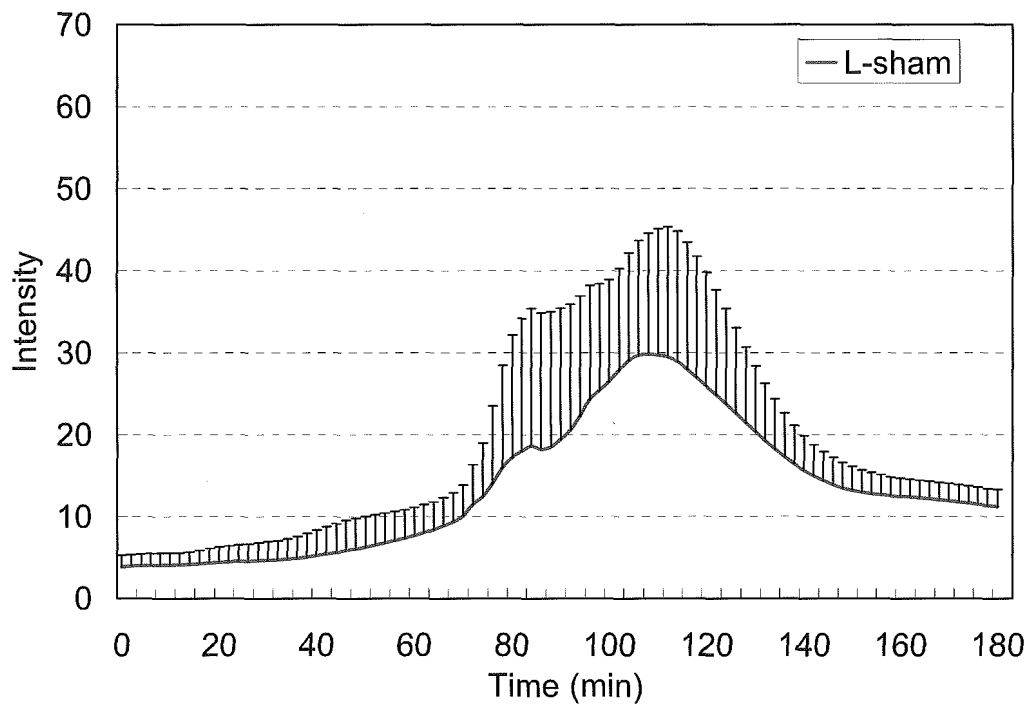


図 10-1 成熟ラットに電磁界曝露を行った際の溶出液の蛍光チャート
 上図：sham 群 (N=6)、下図：0.5W/kg 群 (N=9)
 (誤差範囲は SD を示す)

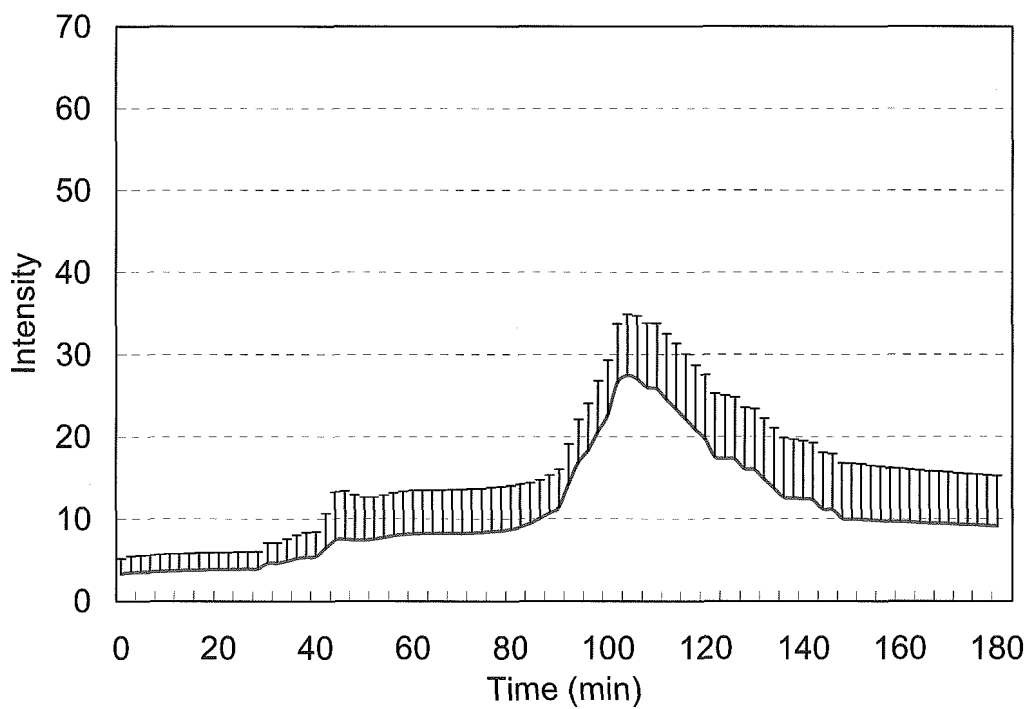
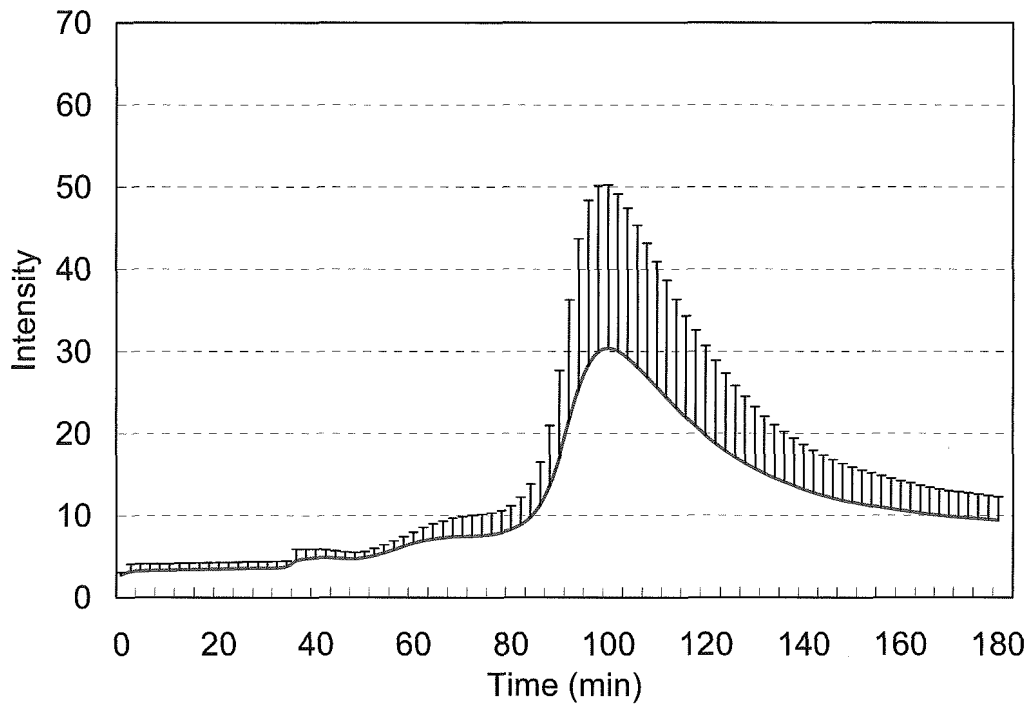


図 10-2 成熟ラットに電磁界曝露を行った際の溶出液の蛍光チャート
 上図：2.0W/kg 群 (N=7)、下図：10W/kg (N=5)
 (誤差範囲は SD を示す)

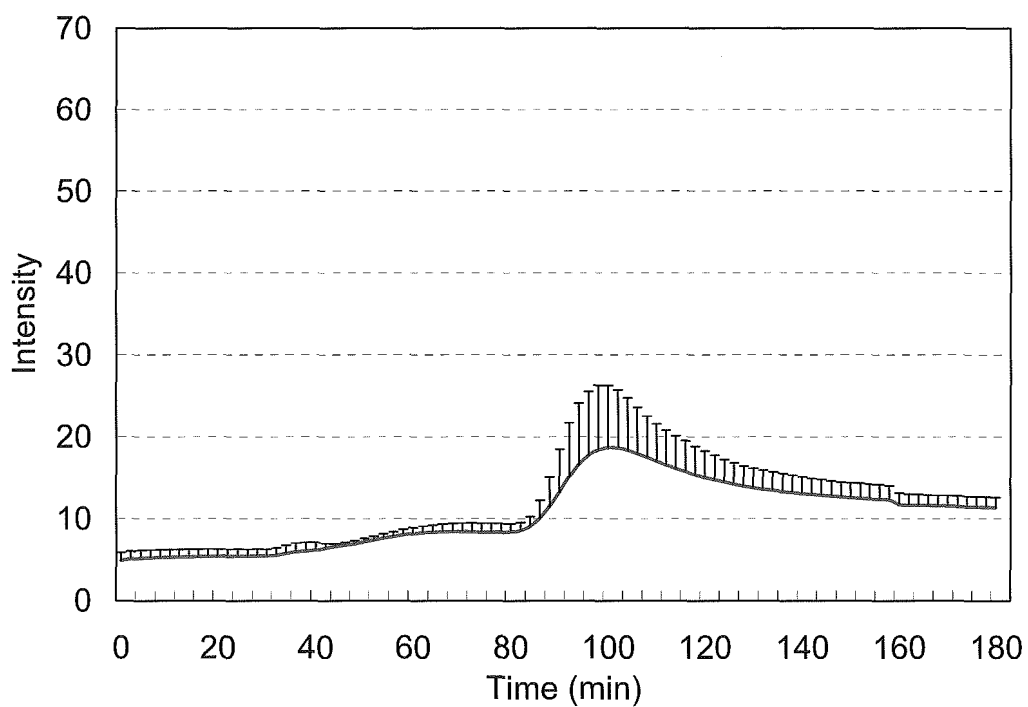
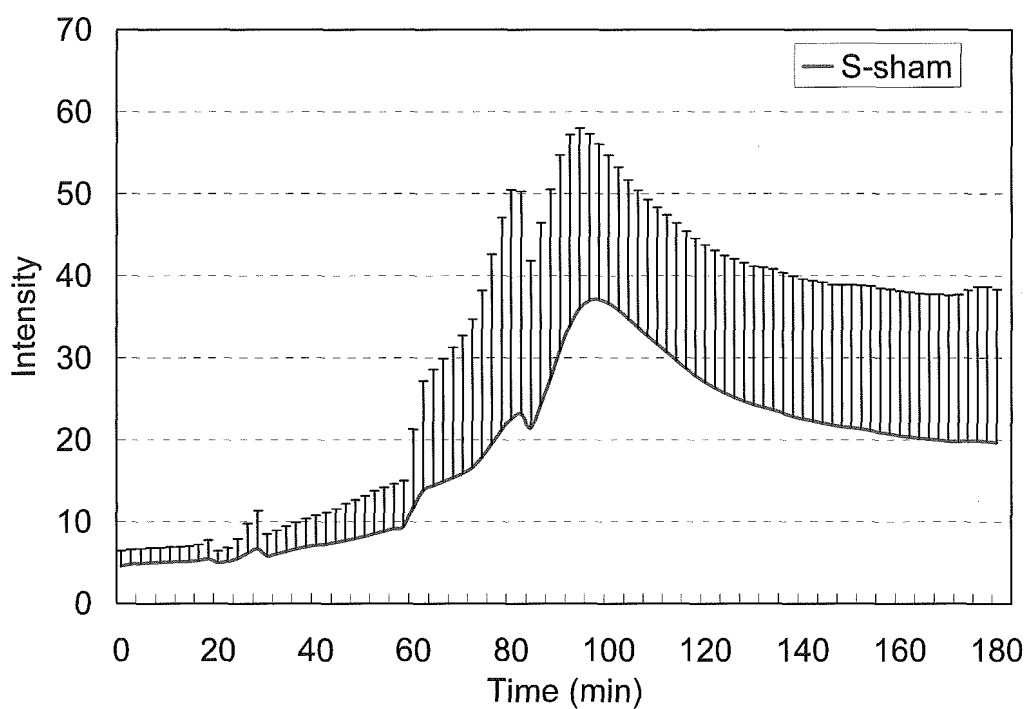


図 11-1 幼若ラットに電磁界曝露を行った際の溶出液の蛍光チャート
 上図 : sham 群 (N=5)、下図 : 0.5W/kg 群 (N=7)
 (誤差範囲は SD を示す)

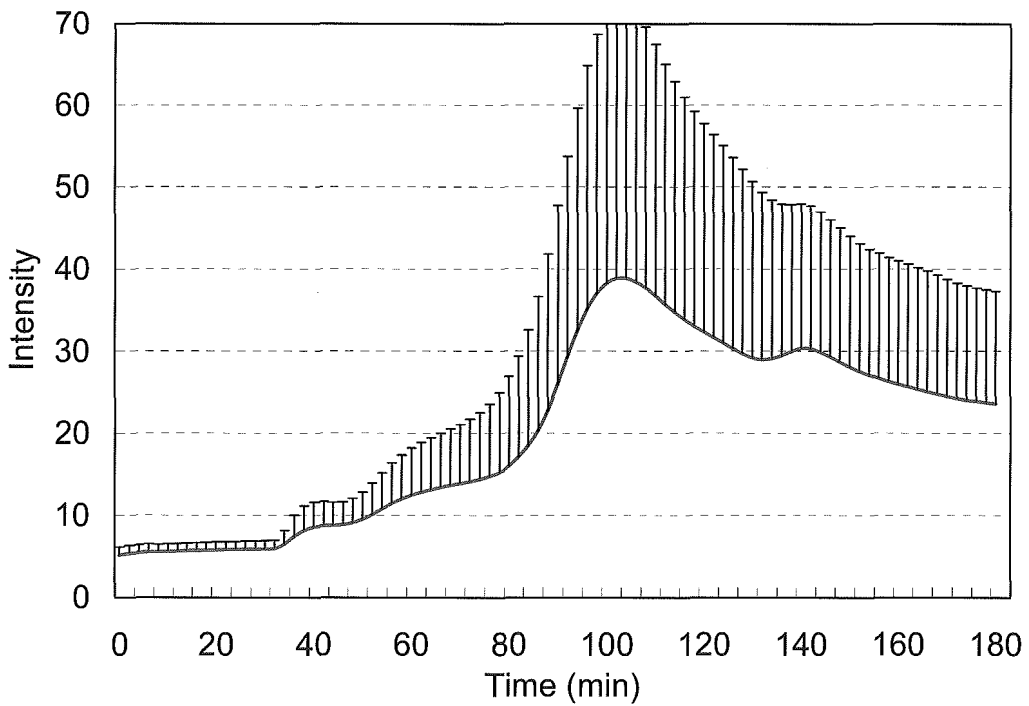
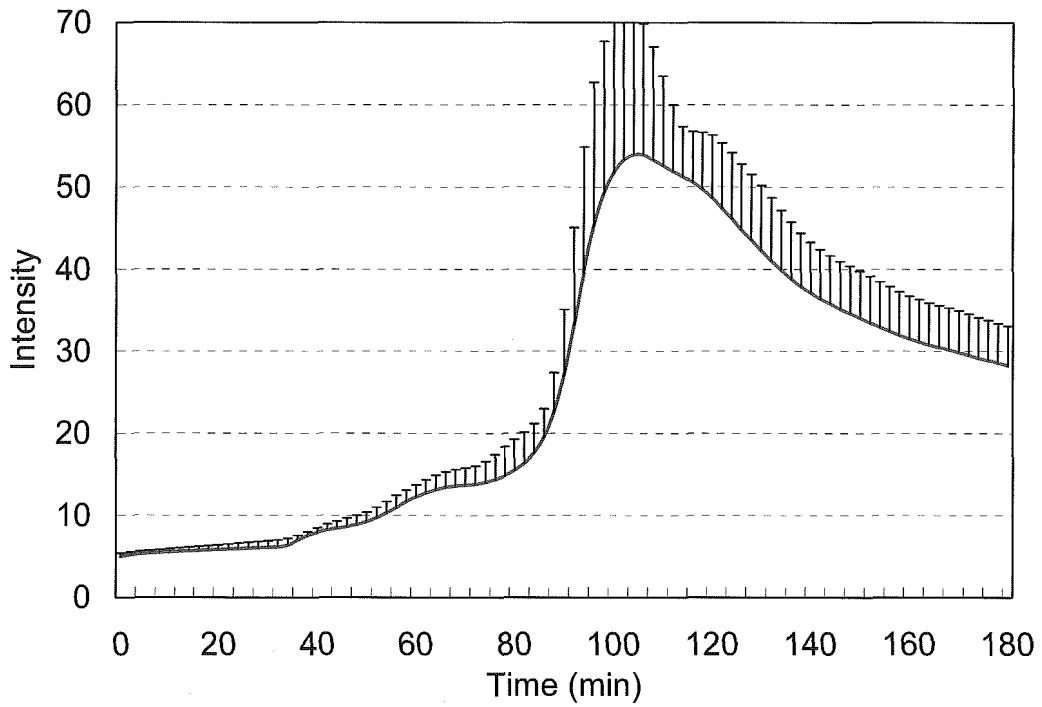


図 11-2 幼若ラットに電磁界曝露を行った際の溶出液の蛍光チャート

上図：2.0W/kg 群 (N=6)、下図：10W/kg (N=6)

(誤差範囲は SD を示す)

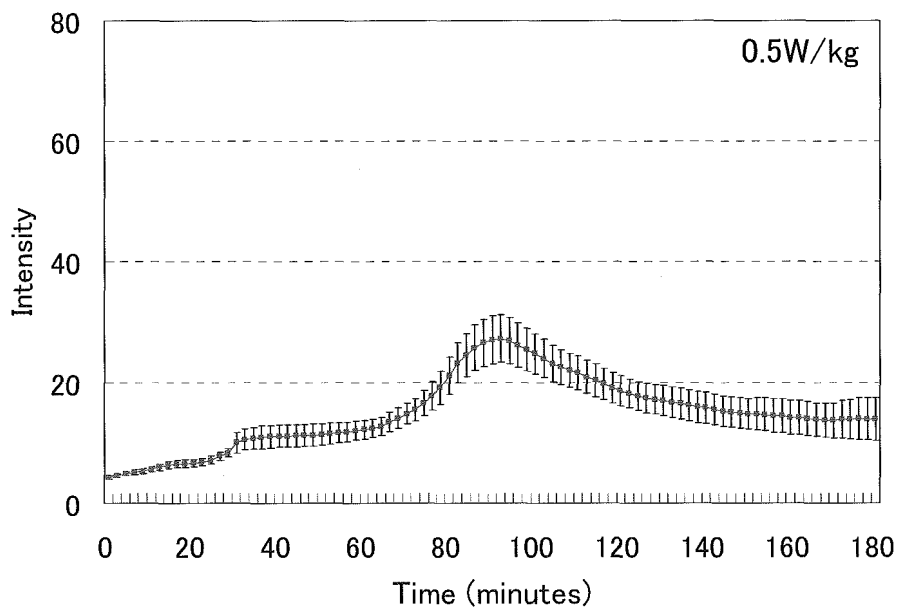
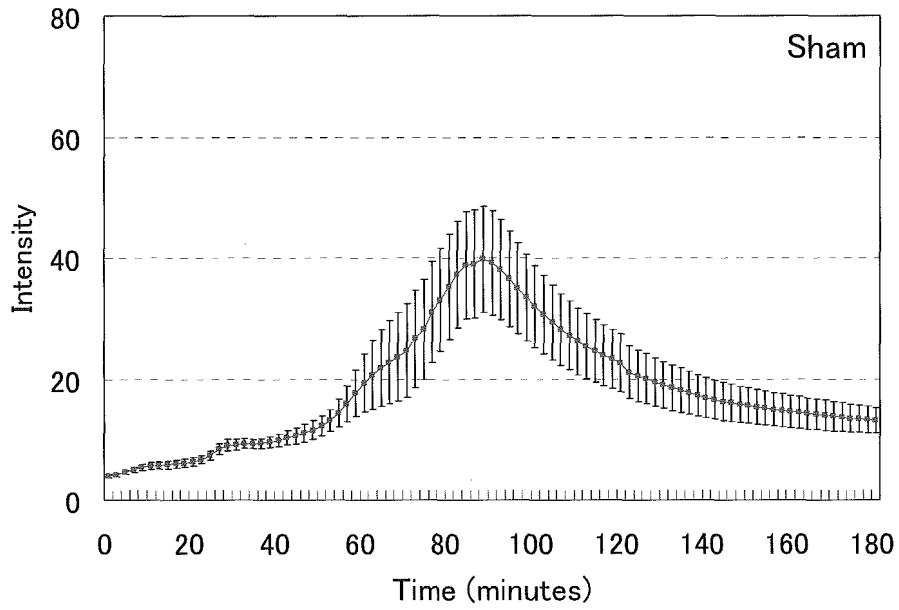


図 12-1 幼若ラットに電磁界の亜慢性曝露を行った際の溶出液の蛍光チャート

上図：sham 群 (N=14)、下図：0.5W/kg 群 (N=12)

(誤差範囲は SEM を示す)

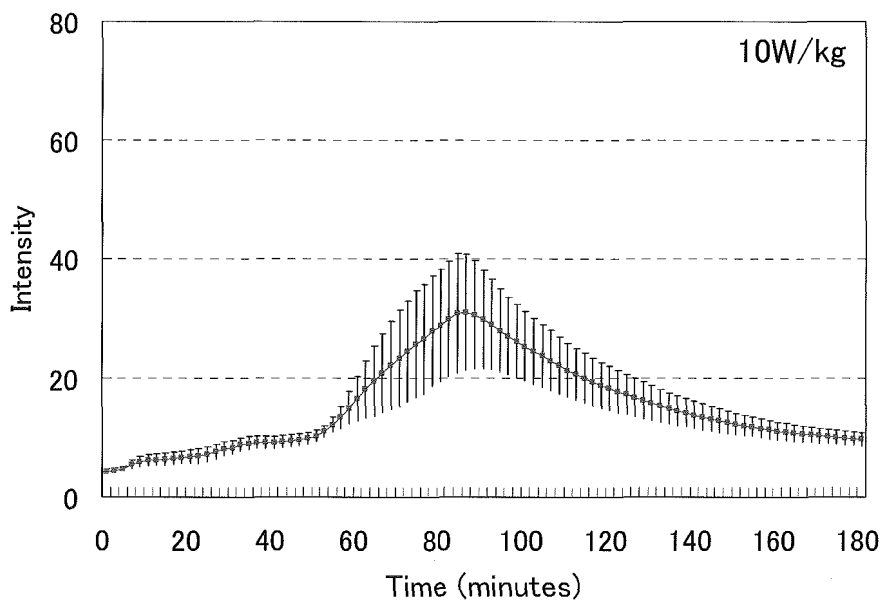
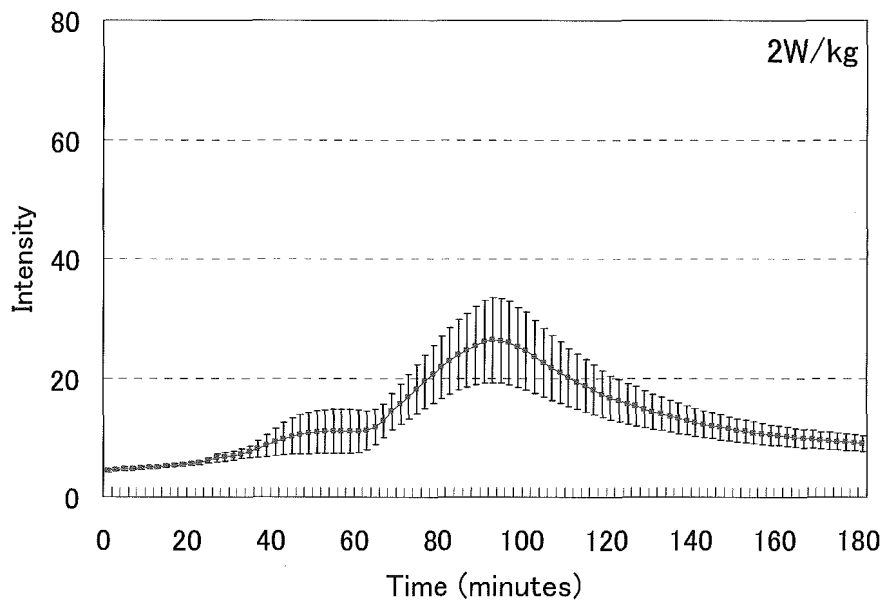


図 12-2 幼若ラットに電磁界の亜慢性曝露を行った際の溶出液の蛍光チャート

成熟ラットに電磁界曝露を行った際の溶出液の蛍光チャート

上図：2.0W/kg 群 (N=5)、下図：10W/kg (N=9)

(誤差範囲は SEM を示す)

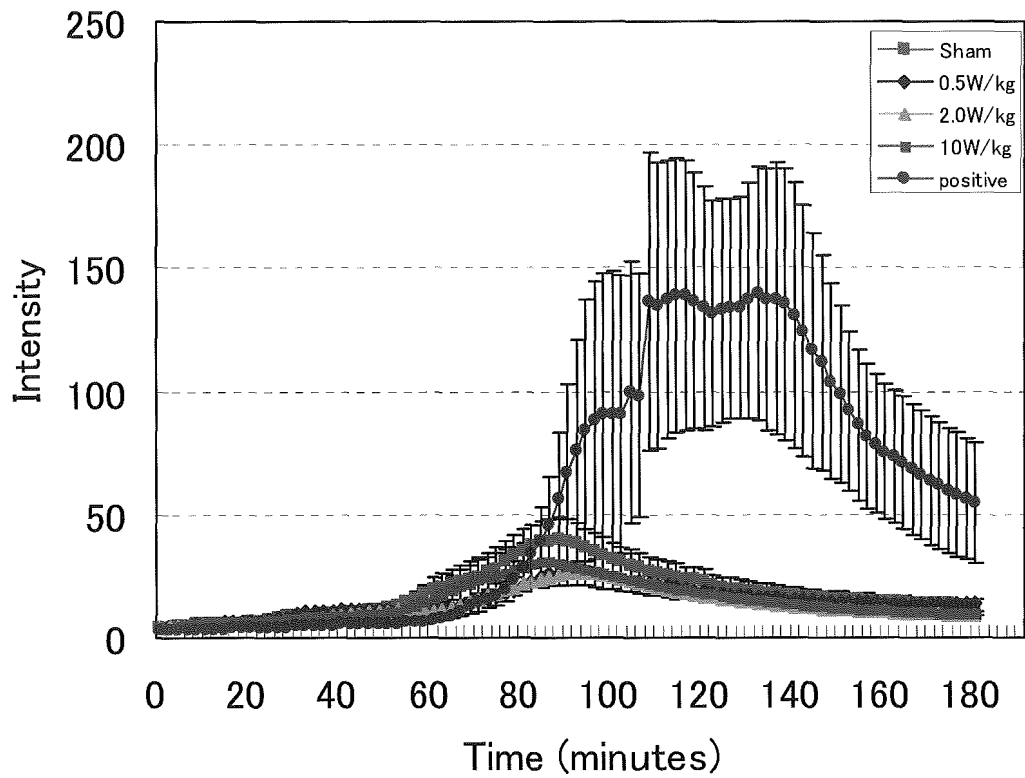


図 13 幼若ラットに亜慢性電磁界曝露を行った際の溶出液の蛍光チャート総合図
 赤線で示したものは熱作用によりバリアが影響を受けた場合のプロフィールを示す。(誤差範囲は SEM を示す)