

動物実験レベルの実験結果と考察

1) 帯状回での興奮性の評価：刺激強度-反応特性

まず帯状回皮質浅層ニューロンの興奮性に対する影響を評価する目的で、深層を通過する求心性線維刺激の応答特性を、暴露群と対照群で比較した。刺激強度（双極電極間を流れる電流量）を増大させることにより被刺激線維数が増加し、それに比例してシナプス反応が増大すると考えられる。（図1、2）

図に示すように、コントロール群と磁場暴露群の間で、刺激強度に応じた fEPSP-1（急性暴露：図3～5、図9～10、慢性暴露：図23）および fEPSP-2（慢性暴露：図24）の刺激-反応関係におおむね差はなかった。これらをもとに、正常灌流液と bicuculline 灌流下における PPR を計算したが、コントロール群および磁場暴露群ともに、両者の間に差は見られなかった（図6～8、図11～12、図25）。

扁桃体におけるオシレーション活動に対しては、0.5 から 3Hz の周波数域内での総活動量を評価対象としたが（図13）、磁場暴露の影響は見られなかった（図14～22）。

考察

今回の実験で、2回に亘り ACC における興奮性および抑制性シナプス伝達機構を評価することが出来たが、慢性磁場暴露による影響は本実験条件下では見いだされなかった。特に bicuculline による脱抑制の前後で PPR を比較することで内在性 GABA 抑制機構を推定することができ、この指標は種々ストレスに反応するものであるが、磁

場暴露の影響は観察されなかった。

また第2年次での扁桃体解析では、磁場暴露は扁桃体神経回路におけるシステム活動に顕著な影響をもたらさなかった。

今回の実験計画全体をとおして反省される点としては、電気生理学実験による中枢神経系を対象とした機能評価という、非常に鋭敏な観測手段を用いながら、なんら変化の兆しが見られなかったことである。これは検討対象の磁界強度、暴露条件が生活環境を模すものであったため、無視できるか極めて弱い影響しかないと考察される。但し、これだけでは解析手段の限界が示されていない点が危惧される。通常の科学的解析の立案としては、解析手段の正当性を示すために、何らかのポジティブコントロールを明示することがまず必要である。その点、多くの先行研究で影響が出ることが示されている高強度暴露条件をまず試験的に与え、実験系が機能していることを確認することが重要であったのではないかと考慮された。

参考文献

1. Ammari M, Lecomte A, Sakly M, Abdelmelek H, de-Seze R (2008) Exposure to GSM 900MHz electromagnetic fields affects cerebral cytochrome c oxidase activity. *Toxicology* 250: 70-74.
2. Bikson M, Inoue M, Akiyama H, Deans JK, Fox JE, Miyakawa H, Jefferys JG (2004), Effects of uniform extracellular DC electric fields on excitability in rat hippocampal slice in vitro. *J. Physiol.* 557: 175-90.

3. Bush G, Valera EM, Seidman LJ (2005), Functional neuroimaging of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: a review and suggested future directions. *Biol Psychiatry* 57:1273-1284.
4. Buzsaki G (2006) *Rhythm of the brain*, Oxford Univ. Press.
5. Cuccurazzu B, Leone L, Podda MV, Piacentini R, Riccardi E, Ripoli C, Azzena GB, Grassi C (2010) Exposure to extremely low-frequency (50 Hz) electromagnetic fields enhances adult hippocampal neurogenesis in C57BL/6 mice. *Experimental Neurology* 226: 173-182.
6. Goto Y, Taniura H, Yamada K, Hirai T, Sanada N, Nakamichi N, Yoneda Y (2006) The magnetism responsive gene *Ntan1* in mouse brain. *Neurochemistry International* 49: 334-341.
7. Gray, C.M., Koenig, P., Engel, A.K. & Singer, W. Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature*, 338: 334-337, 1989.
8. Hamner MB, Lorberbaum JP, George MS (1999), Potential role of the anterior cingulate cortex in PTSD: review and hypothesis. *Depress Anxiety* 9:1-14.
9. Paré, D. (2003) Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Prog. Neurobiol.*, 70, 409-420.
10. Paré, D. & Gaudreau, H. (1996) Projection cells and interneurons of the lateral and basolateral amygdala: distinct firing patterns and differential relation to theta and delta rhythms in conscious cats. *J. Neurosci.*, 16, 3334-3350
11. Pliszka SR (2007), Pharmacologic treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: efficacy, safety and mechanisms of action. *Neuropsychol Rev* 17:61-72.
12. Schlösser RG, Wagner G, Koch K, Dahnke R, Reichenbach JR, Sauer H (2008) Fronto-cingulate effective connectivity in major depression: A study with fMRI and dynamic causal modeling. *Neuroimage*, 15:645-655.
13. Yucel K, McKinnon MC, Chahal R, Taylor VH, Macdonald K, Joffe R, Macqueen GM (2008), Anterior cingulate volumes in never-treated patients with major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology* 33:3157-3163
14. Wieraszko A (2004) Amplification of evoked potentials recorded from mouse hippocampal slices by very low repetition rate pulsed magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 25: 537-544.
15. Woodward SH, Kaloupek DG, Streeter CC, Martinez C, Schaer M, Eliez S (2006), Decreased anterior cingulate volume in combat-related PTSD. *Biol Psychiatry* 59:582-587.
16. 村越隆之 (2009) 『脳機能と認知機能』: 精神疾患と認知機能、pp35-41、山内俊雄、新興医学出版社

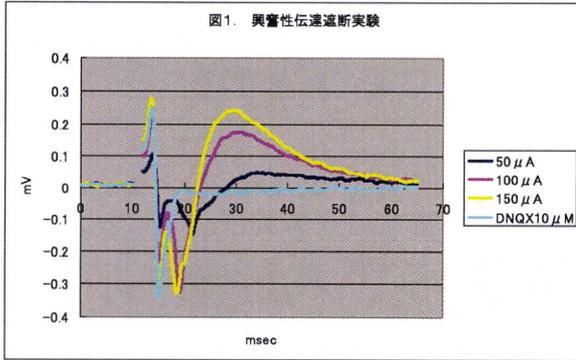


図2. 磁場暴露による帯状回興奮性シナプス伝達の影響
刺激強度依存性とPaired pulse ratio (PPR)

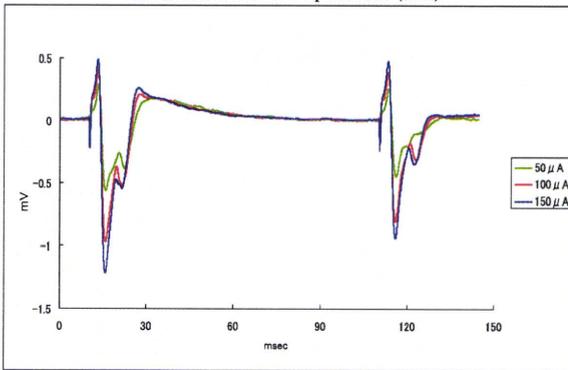


図3 : 1時間、3日

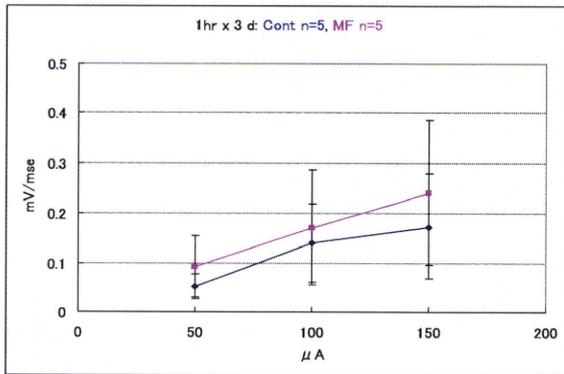


図4 : 2時間、3日

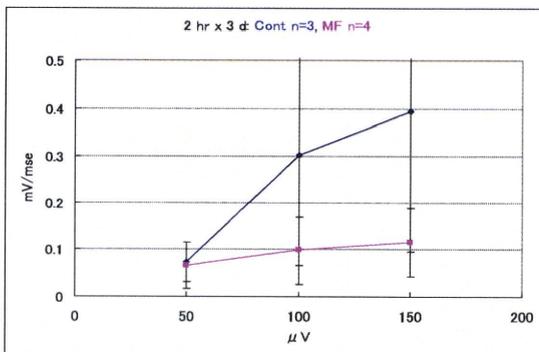


図5 : 4時間、3日

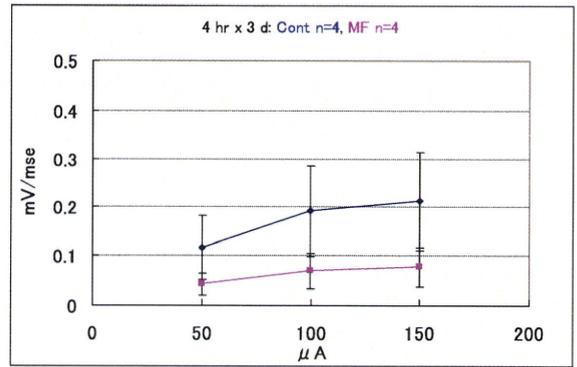


図6 : 1時間、3日

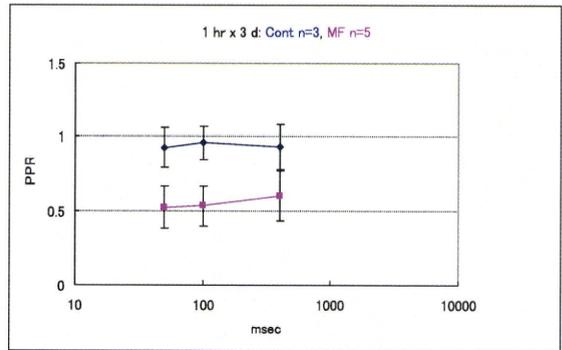


図7 : 2時間、3日

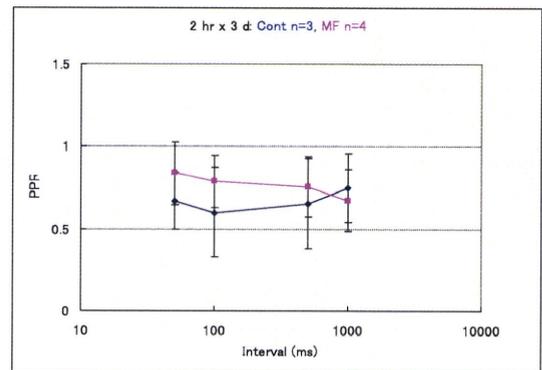
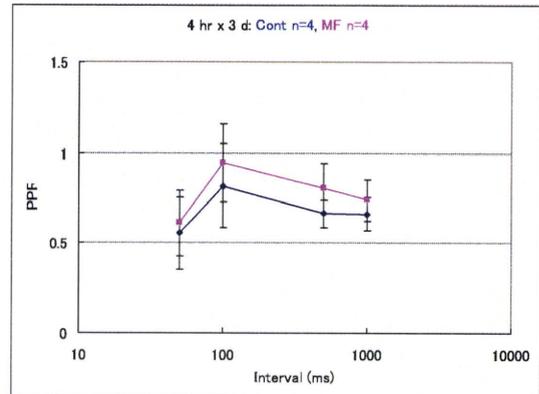


図8 : 4時間、3日



□

図9 : 1時間、2日

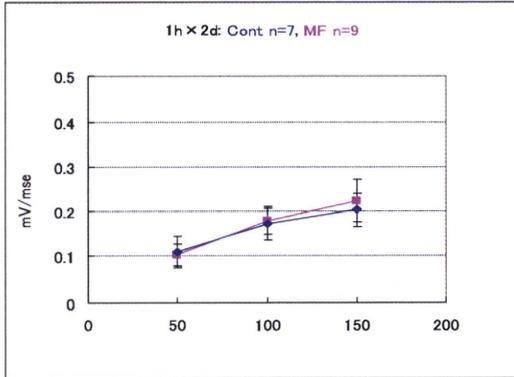


図12 : 1時間、3日

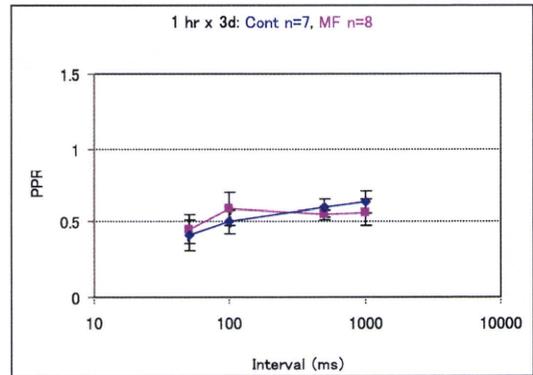


図10 : 1時間、3日

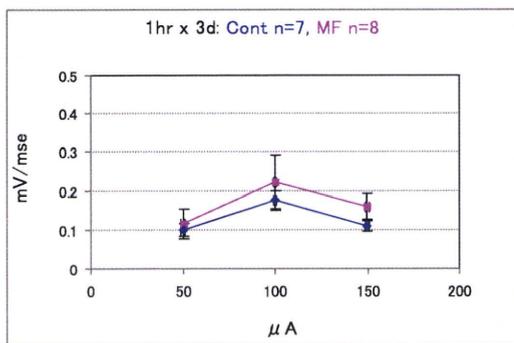


図13: パワースペクトル

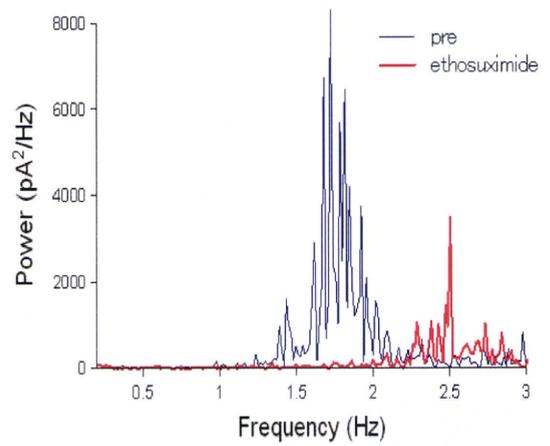


図11 : 1時間、2日

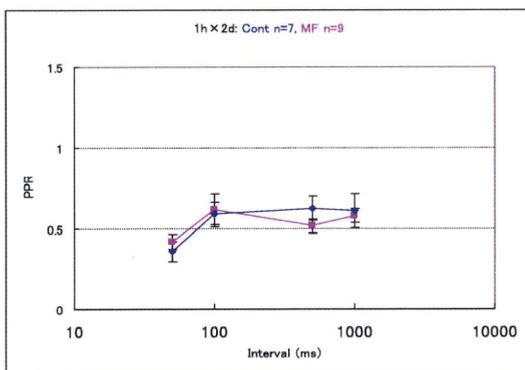


図14:急性コントロール群

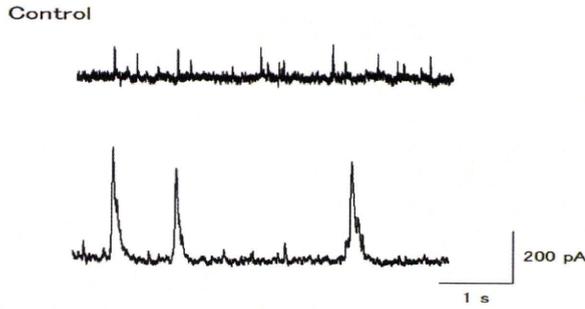


図17:慢性コントロール群

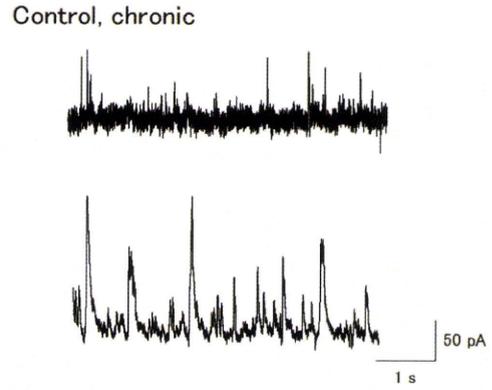


図15:急性暴露群

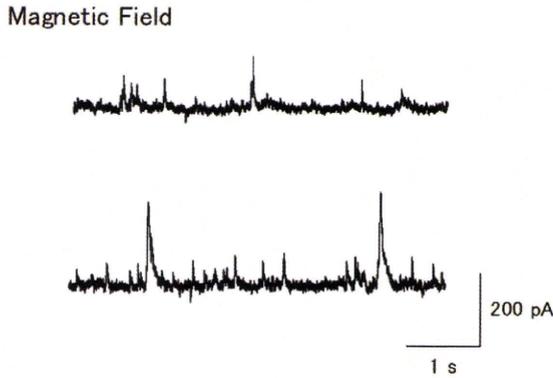


図18:慢性磁場暴露群

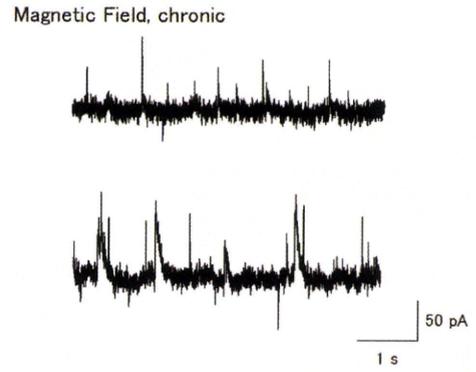


図16:オシレーションパワー比較(急性)

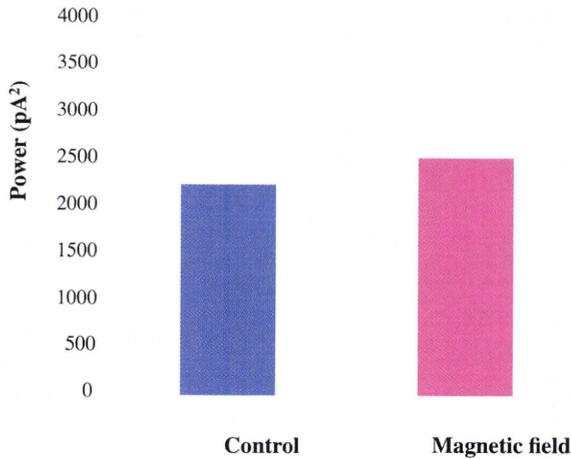


図19:オシレーションパワー比較(慢性)

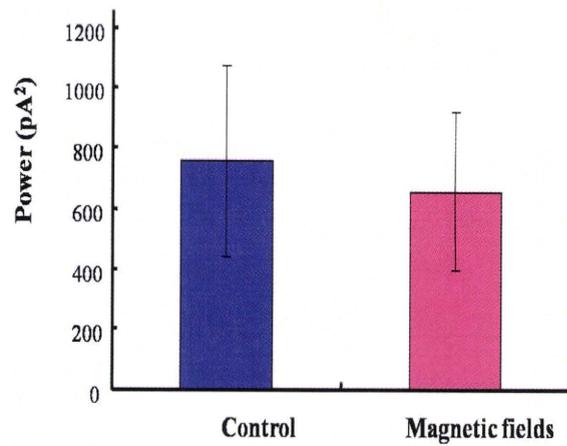


図20: オシレーション発生時の周波数

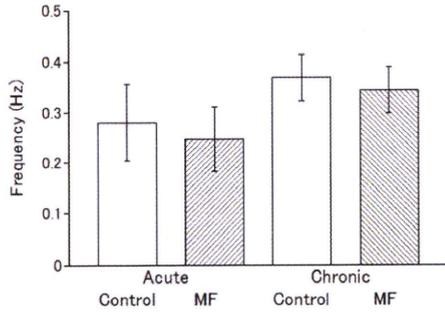


図23: 1st EPSP の刺激強度-応答特性

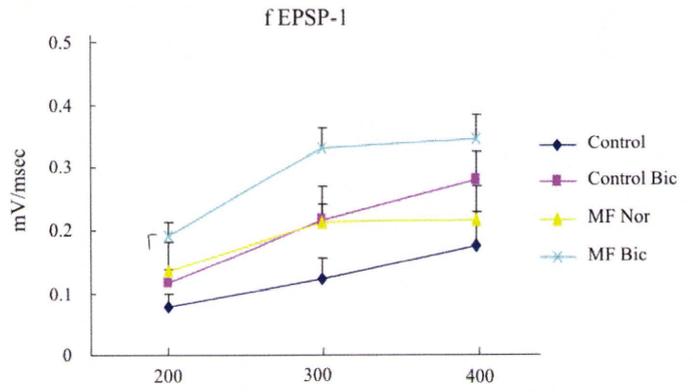


図21: 最大振幅

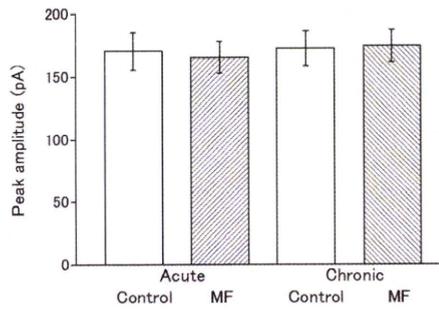


図24: 2nd EPSP の刺激強度-応答特性

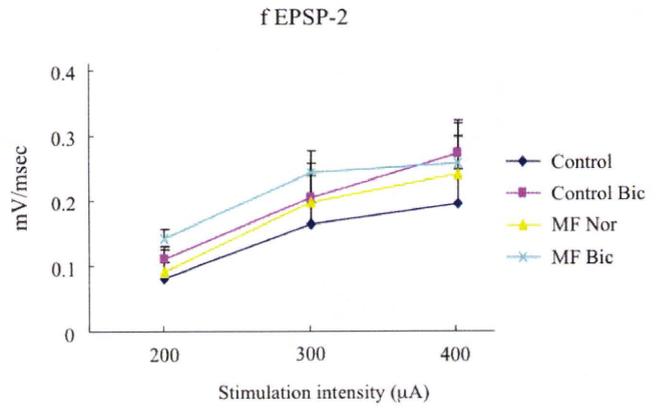


図22: 時間幅

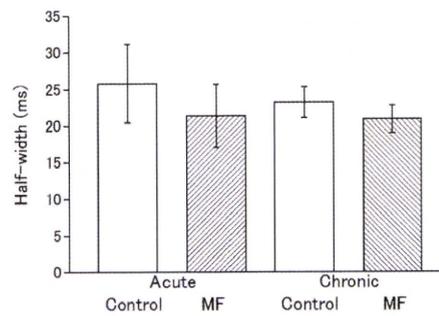
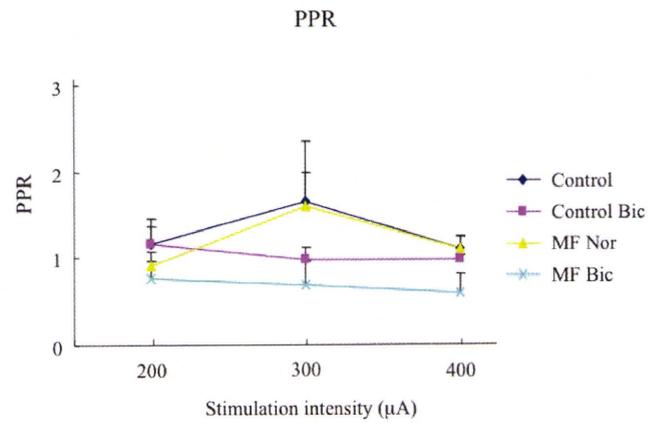


図25: Paired-pulse ratio



2. 妊娠マウスへの影響（久保田、郭、深津）

低周波磁界の生殖系への影響

生殖系への影響を明らかにするため、ICR mice（妊娠マウス）（コントロール3匹、曝露群3匹）を低周波磁界(50Hz, 40あるいは400 μ T)に16日間曝露し、胎児の生死、奇形の有無および母獣への影響で評価した。実験は2回実施した。その結果を表1に示す。

低周波磁界(50Hz, 40あるいは400 μ T)曝露は、胎児死亡に影響はなかった。また奇形も見られなかった。母獣に下痢は見られず、行動異常も見られなかった。

以上のように、低周波磁界に曝露した妊娠マウス（母獣）及び胎児には影響はなかった。考察として、コントロール群および磁界曝露群の胎児に死亡例が見られたが、文献にも記載されているように、自然の胎児死亡率の範囲内であり、問題はないと考えられる。

表 1 低周波磁界の妊娠への影響

		磁界			地磁気			カイニ乗検定 P-Value
		個体1	個体2	個体3	個体1	個体2	個体3	
40 μ T	生存	13	13	9	14	15	5	0.09
	1回目 死産	2	0	1	0	0	0	
	流死産率 (%)	7.9			0			
	生存	16	14	15	17	13	15	0.57
	2回目 死産	1	0	0	1	0	1	
	流死産率 (%)	2.2			4.3			
400 μ T	生存	14	12	14	15	8	9	0.88
	1回目 死産	1	0	0	1	0	0	
	流死産率 (%)	2.4			3.0			
	生存	13	12	14	9	18	12	0.28
	2回目 死産	0	1	1	1	1	3	
	流死産率 (%)	4.9			11.4			

3 精子への影響（奥野、久保田、深津、郭）

平成21年度の結果

1. 体重、体脂肪、精巣重量における磁場暴露の影響

まず、形態的な異常が見られないかを見たが、特に異常は見られなかった。また、体重、体脂肪、精巣重量を測定した。図1に400 μ Tで15日間暴露した結果を示した。いずれもコントロール群と磁場暴露群との間に優位な差は見られず、磁場による影響は見られなかった。なお、400 μ Tの結果(図2)に示されるように、40 μ Tと400 μ Tの間にも有意差は見られなかった。ここで体脂肪としては、体脂肪の指標として広く用いられている精巣に付着している脂肪の重量である。

体脂肪を量った意義は、体脂肪は脂肪細胞の肥大に関連し、そして精子形成にも関するといわれているレプチン (Brash, I. A. et al., 1996; Tena-Sempere, M & Barreiro, M. L., 2002) はこの脂肪細胞から分泌されるからである。磁場暴露群の方が多少脂肪量が多いように見えるが、測定数 (n) が小さいため、有意差はなかった。今後データを蓄積する必要がある。脂肪量に有意な差が見られないことはレプチン分泌量にも差がないであろうことを予想させた。

2. 磁場暴露によるストレス

磁場暴露がマウスにどれほどのストレスを与えるかを検討した。ストレスホルモンであるコルチコステロンを磁場暴露直後、8日目、14日目に測定した。マウスは非常にストレスを感じやすい。血液採取による方法では採取の過程そのものがストレスを与え、ホルモン量を変化させる可能

性がある。そこで糞からの測定を試みた (Touma, C. et al., 2003)。糞はおよそ10時間前の血中ホルモン量を反映しているといわれている。

図3はその結果である。測定数 (N) が少ないことと絶対値としてのばらつきが大きいため、測定数をさらに増やす必要があるが、40 μ Tと400 μ Tのいずれにおいても0日目にストレスが多くかかっているが、日を追って減少し、14日目ではほとんど無くなっていることが分かった。これは暴露のためのケージが小さいため、そこに入れた直後に高いストレスが生じたと考えられる。磁場暴露の前に、実験ケージに入れ、数日の馴致期間をとることが考えられるが、今回の実験では精子形成に関わる影響を見るために離乳直後からの2週間という期間に重点をおいた。この点に関しては見当の余地がある。しかし、14日目の値では40 μ Tと400 μ Tともほとんど同じ値であり、且つコントロールともほとんど差がなかったため、磁場暴露の影響はないといえるであろう。

3. 精子の密度と運動性に対する磁場の影響

精子形成における磁場の影響を調べた。オス ICR マウスでは、生後5~6週間で精巣上体尾部に精子が出現する。そこで離乳 (3週齢) 後2週間の間連続的に磁場に暴露し、精子形成における影響を調べた。マウスで射出精子を得ることは難しいため、運動能を獲得した成熟精子が現れる精巣上体尾部を暴露2週間後 (5週齢) に摘出し、そこから出来る限り精子を搾り出して一定量の希釈液に希釈してその密度を量ることとした。この方法では運動性の悪い精子も多量に混入して

くるため、一般の精子調整法に比べると運動率はかなり悪くなる。

図4は得られた精子密度で、40 μ Tでは全く影響がなかった。また400 μ Tではむしろ磁場暴露の方が高い値を示したが、これはコントロール群にほとんど無精子の個体がいたためである。5週齢は精子が出現するクリティカルな時期なので、今後はもう少し暴露期間を伸ばし、普通の条件ではほぼ確実に精子が出現する時期まで暴露を行うことを計画している。

次に精巣上体尾部に出現している精子の運動率を調べた。上述したように、今回の方法では見かけの運動率が悪くなる傾向にある。遊泳運動をしている精子と頭部や尾部の一部をガラス上に付着させているために遊泳は指定ないが、鞭毛を運動させている精子を運動精子としてカウントした。図5にその結果を示した。40 μ Tではコントロールとの差は全く見られなかった。また、400 μ Tではコントロール群が非常に悪かった。これは図4で明らかのように、精子密度が少なく、精子形成が少し遅れていることを示している。この点からも、もう少し実験期間を長くして、正常飼育でほぼ100%精子が出現する時期に調べた方が良いと考えられる。しかし図5の結果は、少なくとも今回の磁場暴露は精子形成に影響を与えないといえるであろう。

本研究と比較されるのはKimらの実験(Kim, Y. W., et al., 2009)であろう。彼らはマウスを用いて、16週連続で14又は200 μ Tの60Hz電磁界に暴露した結果、精巣における精原細胞のアポトーシスが有意に増加したと報告している。今回の実験でもより長期間の暴露によって

影響が出てくる可能性は否定出来ない。長期間の実験は今後必要となるであろう。今回の実験と違う高周波電磁場に関しては、Ynaら(Yan, J. G., et al., 2007)の報告がある。そして高周波(1.9 GHz)の暴露で精子形成に影響はないと報告している。

一方、ヒトにおいてはIorioら(Iorio, R., et al., 2007)が50Hz 5mT暴露実験を行っているが、はっきりした影響は見られていない。また、最近ではDe-Kunら(De-Kun et al., 2010)のボランティアの協力による研究報告がある。そこでは3ヶ月間、50-1000Hzの磁場に暴露された場合、160 μ T (1.6 mG)以上を浴びていると精子の異常が生じるリスクが2倍以上になるというものである。

以上のように、精子形成及び精子機能に関しては本研究を含めて明確な影響は見られていないといえるであろう。しかし本研究は2週間暴露であり、より長期間の暴露実験、さらには世代を超えた暴露実験を検討すべきであろう。

4. 食欲・生殖関連ホルモンの検討

視床下部で働くNPY (Neuropeptide Y)は食欲促進作用を持つと同時にゴナドトロピン分泌の抑制作用を持つ(McShane, T. M. et al., 1992)。NPYは様々なホルモンによって調節されるが、レプチンはそのひとつである。レプチンはNPY分泌を抑える働きがあり、負に調節していると言える。またインスリンはレプチン分泌を促進させる働きを持つ。これらはいずれも長期的に食欲や生殖を調節している。そこで本研究においてはゴナドトロピン分泌の上流にあるこの制御系として、レプチンとインスリンの分泌における磁場の影響を調べ

た。

図 6 は血中レプチン濃度に対する磁場の作用を調べた結果である。コントロール群と $40\ \mu\text{T}$ 暴露群および $400\ \mu\text{T}$ 暴露群において、有意な差は見られなかった。 $40\ \mu\text{T}$ 群および $400\ \mu\text{T}$ 群の絶対値に差が生じているのは、実験時期の違い、サンプル数が少ないためのばらつきによるものであると考えられる。今後サンプル数を増やす必要がある。しかし、 $40\ \mu\text{T}$ 暴露群および $400\ \mu\text{T}$ 暴露群ともに暴露群の値が大きくなっていることは、図 1. B、図 2. B のコントロール群に対する暴露群の脂肪増加と関連があるかもしれない。しかしこれらの違いについても有意な差が明らかにあるとは言えないので、やはり実験を積み重ねる必要がある。さらにレプチンの増加はゴナドトロピン上昇をもたらす可能性があるため、生殖器形成と精子形成を早める可能性がある。これは図 5. に示されるように、本実験の程度の磁場暴露群ではコントロール群より高い運動率を示す傾向を持つこと、少なくとも精子の活性には悪影響を及ぼしていないということを支持するものである。

また、インスリンについても図 7 に示すように、磁場暴露の影響は見られなかった。すなわち、 $40\ \mu\text{T}$ 暴露および $400\ \mu\text{T}$ 暴露で、絶対値の大きな違いが見られたが、それぞれコントロール群との差は見られなかった。 $40\ \mu\text{T}$ 暴露および $400\ \mu\text{T}$ 暴露実験は、実験実施時期が異なるで何らかの測定誤差が生じた可能性があり、原因については検討中である。

平成 22 年度の結果

1. 体重および臓器重量における磁場暴露の影響

形態的な異常はすべての項目において見られなかった。体重、肝臓、腎臓、精巣の重量を調べた結果を表 1 に示した。すべての項目について、有意な差は見られなかった。

2. 精子の密度と運動性に対する磁場の影響

精子形成における磁場の影響を調べた。オス ICR マウスでは、生後 5~6 週間で精巣上体尾部に精子が出現する。そこで離乳 (3 週齢) 後 3 週間の間連続的に磁場に暴露し、精子形成における影響を調べた。マウスで射出精子を得ることは難しいため精巣上体尾部を摘出し、そこから出来る限り精子を搾り出して、一定量の希釈液に希釈して精子密度を測りコントロール群と比較することとした。この方法では運動性の悪い精子も多量に混入してくるため、一般の精子調製法に比べると運動率はかなり悪くなる。図 8A は精子密度の測定結果を失している。 $400\ \mu\text{T}$ 暴露ではむしろ磁場暴露の方が高い値を示したが、これはコントロール群に精子数が極端に低い個体がいたためである。標準偏差をとると、有意差は認められなかった。精子の運動率についても図 8B に示すように、むしろ暴露群のほうが多少高めの値を示したが、有意な差はなかった。これもコントロール群に非常に精子数が少なく運動性も悪い精子がいたためである。今回の結果も、磁場暴露は精子形成に影響を与えないといえるであろう。本研究と比較されるのは Kim らの実験 (Kim, Y. W., et al., 2009) であるが、彼らの実験に比べると、本実験は磁場の強度は 2 倍であるが暴露時間がおよそ $1/5$ であった。より長期間の暴露によって影響が出てくる可能性は否定出来ないが、実験スケジュール上長期間暴露ができなかった。

3. 磁場のレプチンに対する影響

長期食欲・生殖力の指標として、血中レプチン濃度を測定した。結果を図9に示す。前年度不十分だった $400\ \mu\text{T}$ の結果であるが、有意な差は得られなかった。今回は3週齢から3週間の曝露実験を行った。この期間、3週齢では乳離れし、6週齢では生殖器がほぼ形成され、精巣上部尾部に精子が出現する時期であり、様々な環境要因に感応しやすい時期である。しかし結果では、 $400\ \mu\text{T}$ の50Hz交流磁場はほとんど影響しないことが明らかになった。

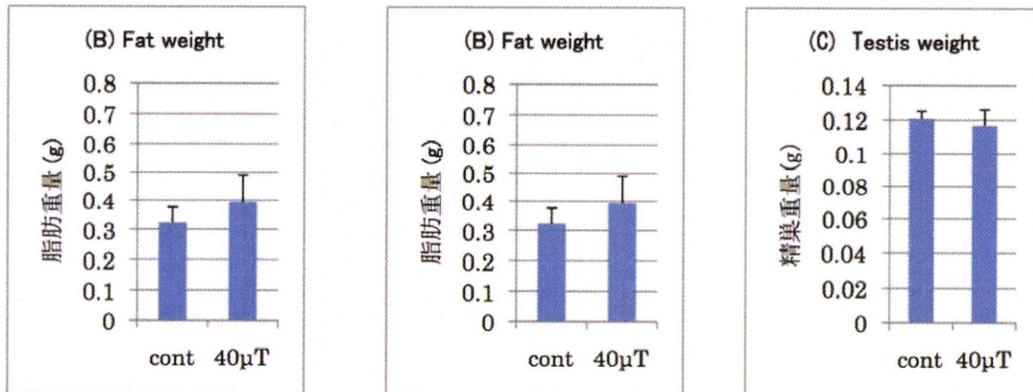


図1 体重 (A)、体脂肪重量 (B)、精巣重量 (C) における $40\mu\text{T}$ 磁場暴露の効果。コントロール群と暴露群に有意な差はなかった。(N=4)

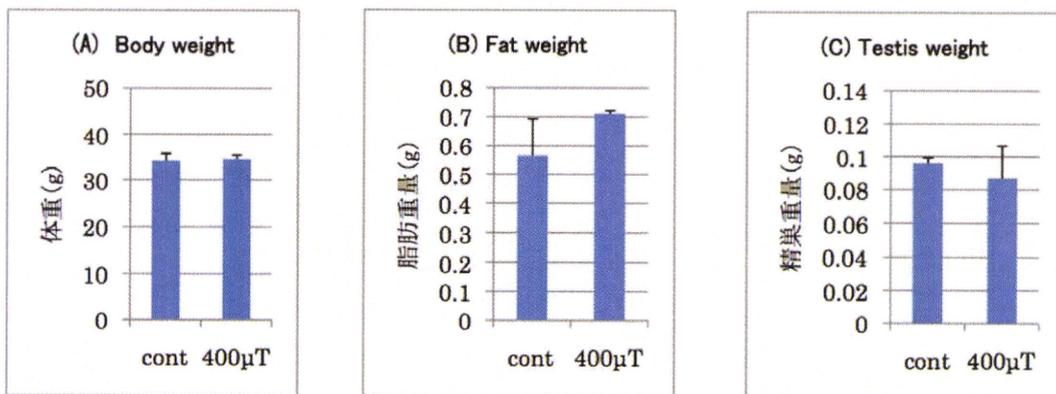
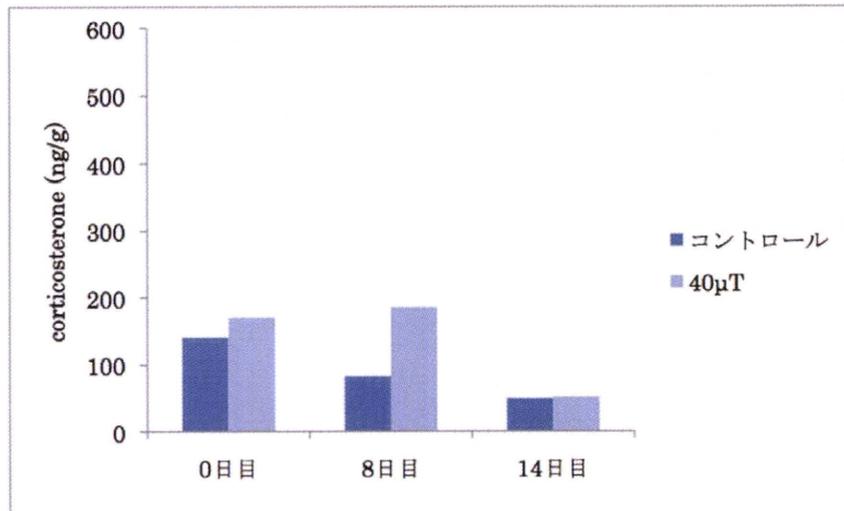


図2 体重 (A)、体脂肪重量 (B)、精巣重量 (C) における $400\mu\text{T}$ 磁場暴露の効果。コントロール群と暴露群に有意な差はなかった。(N=4)

(A)



(B)

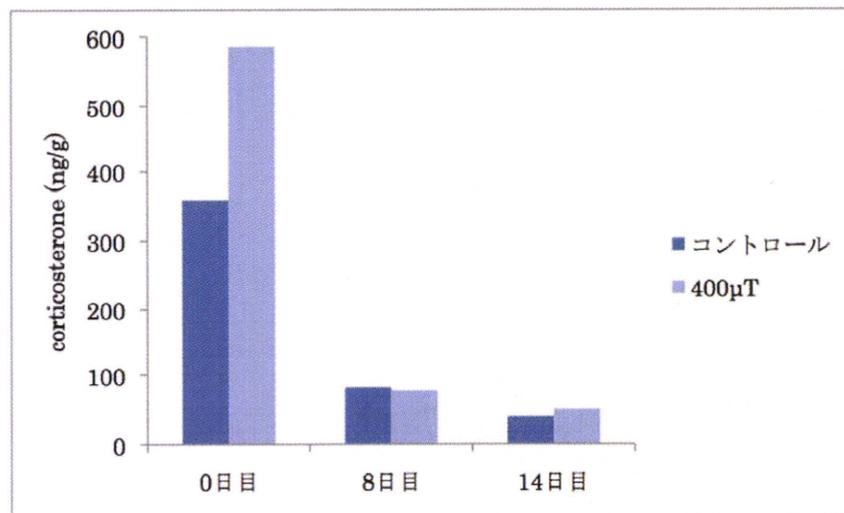


図 3. コルチコステロンに対する磁場暴露の影響。(A)は 40 μ T 、(B)は 400 μ T に暴露したものの。それぞれがコントロールと対に示されている。絶対値に差はあるものの、コントロール群と暴露群の間には有意な差はない。0 日目の値が高いのは狭い実験ケージに移動したためと考えられる。コントロール群と暴露群に有意な差はなかった。(4 匹の糞の合計から求めた値)

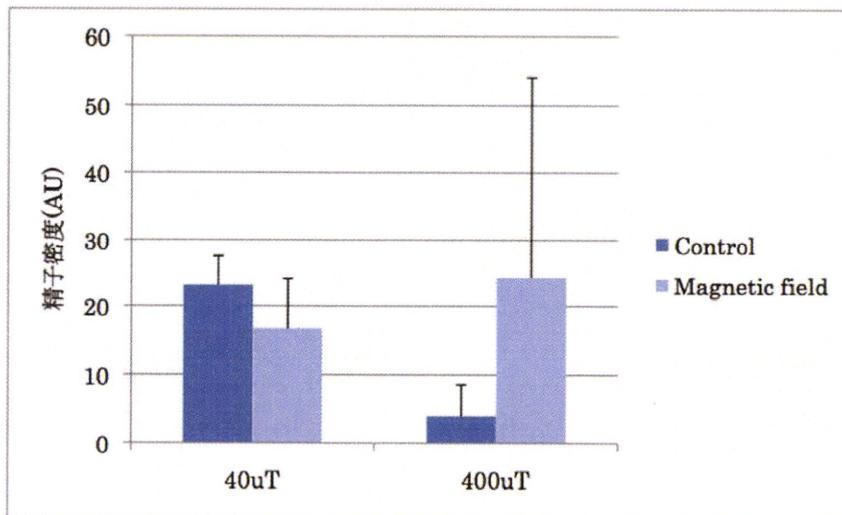


図 4. 5 週齢の精巣上体に出現した精子の密度。単位は相対的なものである。コントロール群と暴露群に有意な差はなかった。(N=4)

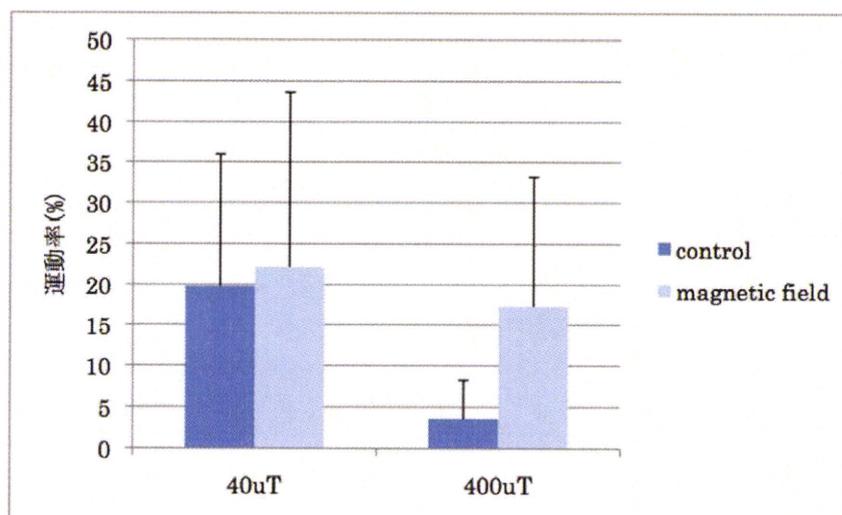


図 5. 5 週齢の精巣上体に出現した精子の運動率。通常の運動率測定値に比較して非常に低いが、これは精子密度を調べるために精巣上体尾部を強く押して絞り出したためである。コントロール群と暴露群に有意な差はなかった。(N=4)

図 6. 5 週齢オスマウスの血中レプチンに対する磁場の影響。N=4

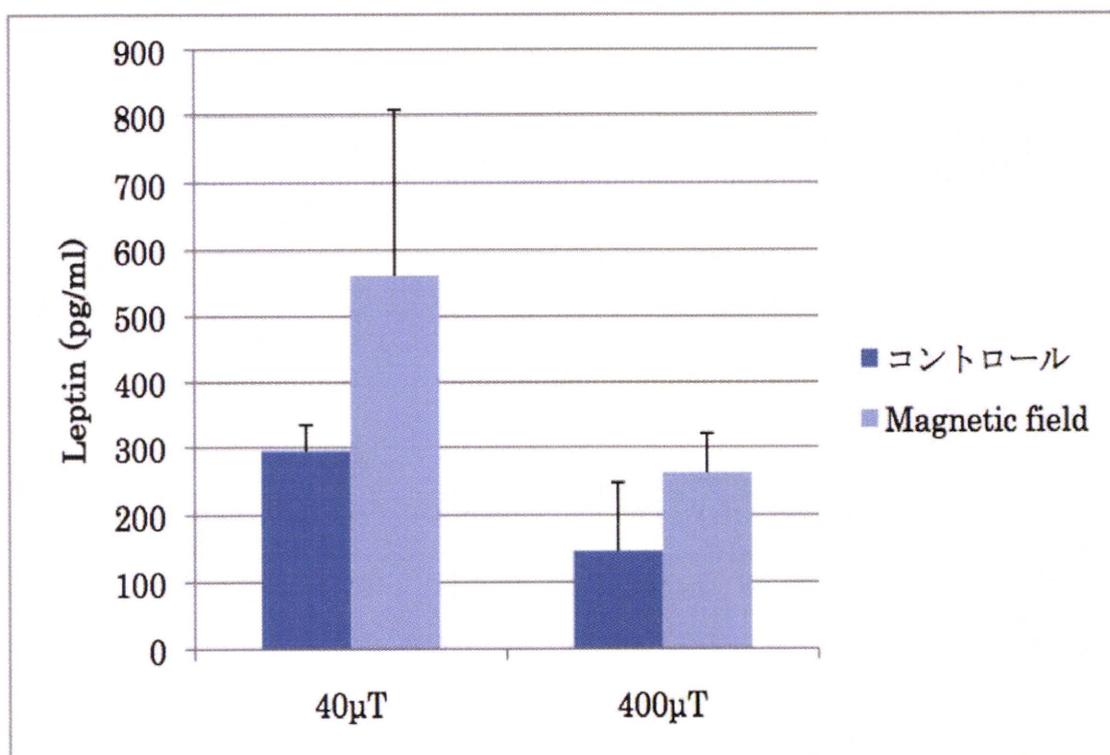


図 7. 5 週齢オスマウスの血中インスリンに対する磁場の影響
N=4

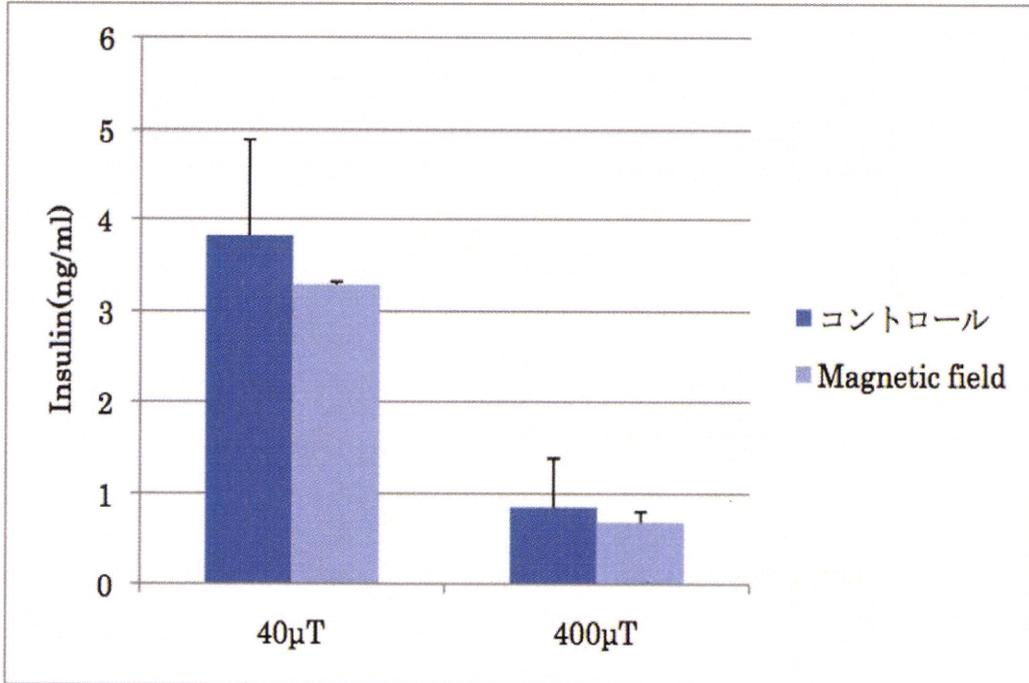


表 2 体重および各臓器における交流磁場 (400 μ T, 21日間) の影響

	Control		400uT	
	AV	SD	AV	SD
Body weight (g)	32.6	1.4	30.7	1.4
Liver weight (g)	2.1	0.13	1.99	0.14
Kidney weight (mg)	618	28	634	29
Testis weight (mg)	93	22	89	17

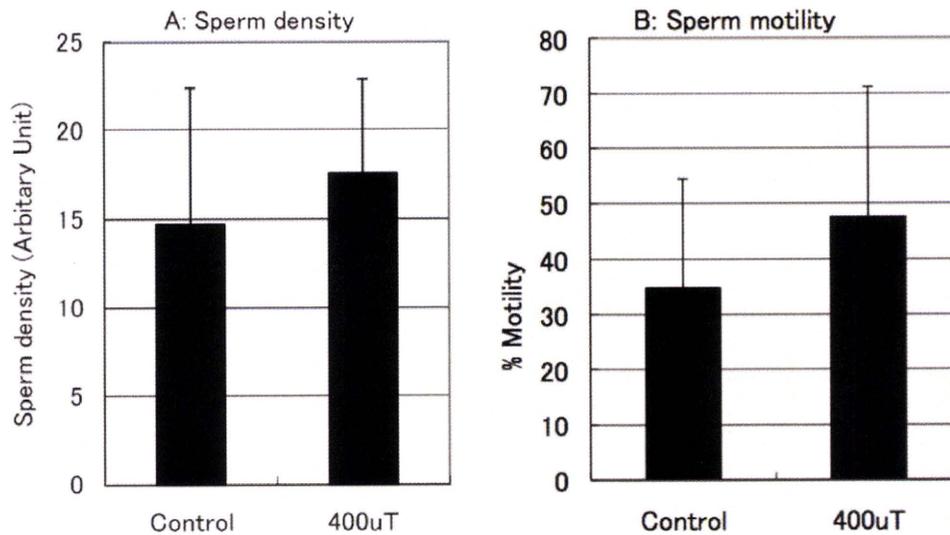


図8 精子形成における低周波数交流磁場 (400 μ T) の影響。A: 精子の密度における磁場暴露の影響。相対値で表してある。B: 精子の運動率における磁場暴露の影響。運動率は%で表してある。N=4

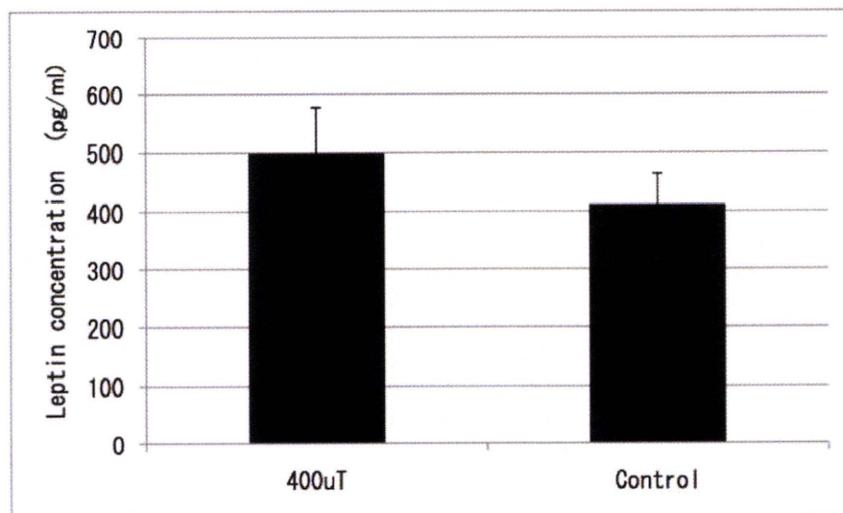


図9. 3週齢から6週齢までの3週間の低周波数交流磁場 (400 μ T) 曝露によるオスマウスの血中レプチンに対する磁場の影響。N=4

変動磁場の誘導による磁場分布の変調
結果と考察(深津)

1. 外部交番磁場の分布計測

計算に先立って磁場の空間分布の直接計測をおこなった。グレーティングは直径約1mmで約10mmの等間隔で配置されている。不均一磁場を発生用に20mm径の鉄心コアをもつテスト用の小型交流(電)磁石を用意し、磁場の局所分布計測を行った。アナログ信号発生器をもちいて周波数50Hzの正弦波的振動磁場を発生させた。コア直上の最大磁場振幅(実効値)の実測値は120 μ Tである。地磁気として既存値45 μ T(35°41'N, 139°46'E)を用いた。磁場検出には検出能1 μ T、ダイナミックレンジ \pm 300 μ Tのチップ埋め込み型磁気抵抗センサ(TDS01V)を用いた。

その結果、図2に示すようにグレーティングの有無に依存せず磁場の分布は同じであることがわかった。左方向への一様シフトは機械部品の影響で生じており誘導の影響ではない(図3)。

この結果は、ある意味当然である。実際、図3のようにグレーティングの内部ループどうしで電流はキャンセルするので反磁性電流は最も外側のループ(全長780mm)のみを流れるからである。

尚、SUS グレーティングには側板がある

が(図3)、これは磁場に垂直に配置されているため誘導の影響が無視できるとした。比較のためアルミ(ジュラルミンともに透磁

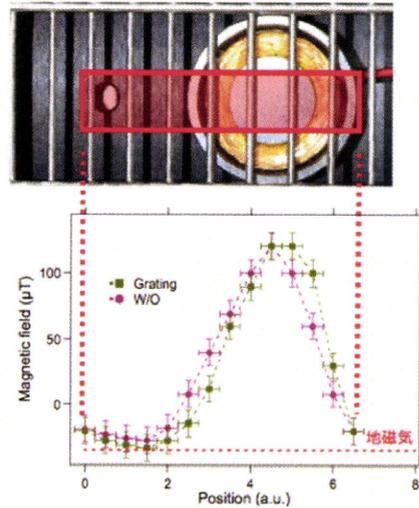


図2. 磁場分布のラインプロファイル

率1.00002)製のパンチングメタルプレートに対して同様の測定を行ったところパンチ孔の径や密度が変化しても計測される磁場にはほとんど変化はなかった(<0.1%)。

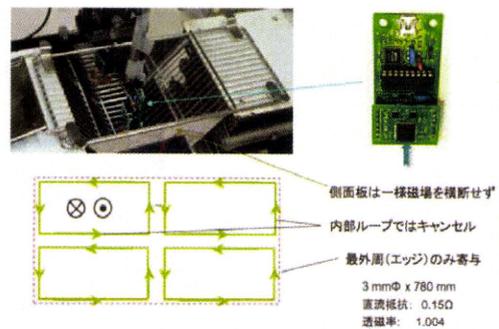


図3. 磁場計測の配置とループ