

とで全体像、統一対象の知覚が可能になるとの説がある (Gray et al 1989)。

より古い皮質や皮質下の脳部位が連絡されたいわゆる大脳辺縁系でもオシレーションが重要と考えられる。辺縁系は嗅覚に関連して哺乳動物脳で共通に発達した一群の神経核のつながりであって、視覚野や体性感覚野などの新皮質とは層構造が異なる古皮質 (paleocortex, 扁桃体など), 原皮質 (archicortex, 海馬, 中隔など), 中間皮質 (mesocortex, 帯状回など), さらにそれらと緊密な線維連絡をもつ, 前頭葉眼窩回, 視床前核, 側坐核, 視床下部, などが主だった要素である。これらは脳と個体の基本的活動レベル, 意識状態や情動状態に応じて, 記憶学習等の高次機能を摂食生殖等基本的生存活動に結びつけ, 自律神経系の調節を通じた内部状態の調節と身体行動決定を行っている。その際にはニューロペプチド, アミン類等, 多くの神経伝達物質の作用により個々のニューロンの活動状態が変化し, 特にシナプス伝達機能が修飾される。その中でも, ドーパミン, セロトニン, ノルアドレナリン, アセチルコリンなどの生体アミン類は, それらのほとんどが脳幹に位置する小領域の神経核からの投射により放出され, 睡眠覚醒レベル, 注意, 侵害刺激などに応じてほぼ全脳のニューロン活動を全般的に変化させることができる (村越 2009)。

辺縁系に属する神経核として, 扁桃体は古くから情動活動の中核的位置にあると考えられている。動物の個体と種の存続のために, 有益あるいは有害な刺激を区別, 記憶し, それに基づいて接近, 逃避の身体反応, 自律神経反応を指令する。一方帯状回皮質はより統括的機能を司る前部前頭葉の内側部に位置するが, その中でもやはり情動状態を強く反映して葛藤, 精神的苦痛, ストレスに対応して行動の選択に関わると考えられている (Sensory-Motor interface)。これらの領域は, 記憶形成 (記銘) や空間認知にとり重要な海馬との間に強い双方向性の線維連絡を形成しており,

後述する同期現象の基盤をなしている。

これら辺縁系部位でのオシレーション活動について, 現在精力的に研究が進められている。扁桃体では, 恐怖条件付けなどの強い情動負荷に際して θ 領域 (4-7 Hz) での神経回路リズムが発すること, またそれが海馬周辺の内嗅皮質, 傍嗅皮質 (Entorhinal cortex, Perirhinal cortex) と同期するという実験事実が知られ, このことで恐怖記憶, 情動学習が成立するとの考え方が有力なものとなっている (Pare & Gaudreau 1996)。

これらの脳部位は成長期を含め, 成熟後も様々な身体的, 心理的ストレスに対して, 解剖学および物質的基盤が脆弱性を示すことが知られている。実験的にも周産期の薬物や放射線暴露, 乳幼児期の栄養異常, 母子分離などがこれらの神経回路の機能異常をもたらすことが報告され, 現在精力的にその分子メカニズムが解明されつつある。

脳組織に対する身体的ストレスとしては, 遠隔的に作用する物理的因子として電磁場の影響が考えられる。すでに脳神経系に対する電磁場の影響については様々な角度からの実験的検討が進められてきた。動物の脳組織を用いた本格的な電気生理学的解析としては, 低周波数 (0.03-0.5 Hz) 高強度 (9-15 mT) パルス磁場を動物個体に暴露したのちに, 海馬スライス標本を用いた実験を行い, Schoffer 側枝刺激, CA3 領域細胞外記録での集合スパイクサイズがコントロールに比べ増大したとの報告がある (Wieraszko 2004)。またニューロンの生存, 代謝面での影響としては, 900 MHz 電磁場を1時間ずつ7日間暴露した結果, 大脳皮質からの培養細胞に対し, 脂質代謝 (亢進), 活性酸素系 (亢進), チトクロムオキシダーゼ活性 (低下) に影響した (Ammari et al. 2008)。さらに遺伝子発現を介する影響として, 100 mT の定常磁場を2時間7日間周産期のマウスに与えることにより, 海馬内で Ntan1 遺伝子発現が上昇し, 動物の行動量が低下した (Goto et al. 2006) 報告や, また成熟動物でも低周波数 (50 Hz) 磁場を4-5週間暴露

することで、海馬歯状回におけるニューロン新生が増加し、これにはカルシウムチャンネル発現に至る様々な転写因子群が関与することが示されている (Cuccurazzu et al. 2010)。

先に触れた神経回路オシレーションに対する影響も検討されている。やはり遅い周波数 (ELF: extremely low frequency) として 50 Hz 暴露の最中に、海馬スライスの CA3 領域で薬物誘発性に観察される高頻度オシレーション (γ 帯域: 15-100 Hz) が増大することが示されている (Busch et al. 2005)。

しかしながら、中枢神経系に対する電磁場作用のなかで、これまで情動・認知活動の基盤である辺縁系神経回路のシナプス機能に焦点を絞った解析は必ずしも体系的に研究されたとは言えない。殊にオシレーションに関しては上に挙げた研究のように新皮質や海馬が対象となっているにとどまる。

以上の背景のもとに一昨年度からの本研究では、ラット脳組織よりスライス標本作製し、帯状回、扁桃体神経回路のニューロンからシナプス活動を記録、磁場暴露群と対照群との間における電気生理学的差異を見出すことを目的とした。

一昨年度は、磁場暴露群と対照群のラットからの帯状回スライスにおいて、皮質内神経伝達機能が基本的には変化しないことを報告した。また昨年度は扁桃体において見出された自発的な抑制性の神経回路オシレーションに注目し、磁場が脳組織の複合的高次機能変化に影響を与えるか否かを検討した。そして最終年度ではふたたび帯状回皮質に戻り、昨年度になって実験条件として整った方法である慢性均一磁界暴露の条件下での皮質機能、特に GABA 抑制機能を再検討することとした。

B. 研究方法

・ 磁場暴露条件

生後 1-2 週齢 Wistar 系ラットを母獣による哺育状態で購入し、1 日から 1 週間動物飼育施設に

おいて安定化する。急性暴露条件として 12-14 日齢で 1 日 1-4 時間を 3 日間、慢性暴露条件として 7 日齢から 14 日間、あるいは 14 日齢から 7 日間、の暴露条件を設けた。また、対照群としては、同時間、同じ暴露槽に置きながらも磁場暴露は行わない動物を用いた。

・ スライス標本作成

磁場暴露または非暴露後の生後 12-14 日齢ないし、28-32 日齢の段階で電気生理実験に供した。吸入麻酔薬であるエンフルレンによる深麻酔下で断頭し、前脳部より冠状断にて帯状回または扁桃体を含む厚さ 350-400 μ m の脳スライスを複数枚作成した。損傷からの回復のため 1-2 時間待った後に、顕微鏡ステージ上の実験槽に配置した。標本に対し 32.5 度 C の人口脳脊髄液 (ACSF) を毎分 2.5ml の速度で灌流した。ACSF の組成は以下のとおりである (単位 mM)。120 NaCl, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 15 glucose。また ACSF は 95%O₂-5%CO₂ により飽和され、pH は 7.2 に維持された。

・ 電気生理学実験

< 帯状回細胞外記録 >

帯状回 Cg1 領域の皮質浅層 (第 II/III 層) より細胞外フィールド記録法によりシナプス電位記録を行った。記録用電極には内液として 0.5 M NaCl 溶液を用いた。また刺激電極を同領域の皮質深部層 (第 V/VI 層) に配置し、0.06 Hz の頻度で (15 秒に 1 回) 求心性線維の電気刺激を行った。この条件で記録されるシナプス電位は初期の単シナプス性興奮性シナプス後電位 (m-fEPSP) と、それに引き続く多シナプス性の興奮性および抑制性シナプス後電位 (p-fEPSP, p-fIPSP) から構成される。刺激は一回あたり、50ms の間隔で 2 発ずつ与え、それぞれで誘発される fEPSP を fEPSP-1、および fEPSP-2 とし、それらの比率 (fEPSP-2 / fEPSP-1) を PPR (paired-pulse ratio) とした。fEPSP は

刺激直後の二つ目の陰性波（通常 10-15 ms）の初期相最大陰性スロープを計測して得た。また、それぞれの刺激により誘発される GABA 作動性抑制性神経伝達は、fEPSP-1 と fEPSP-2 に対し異なる減弱作用を持ち、結果的に PPR に影響するが、GABA_A 受容体拮抗薬 bicuculline を適用後に同じ実験を行うとその作用がなくなり、PPR が変化することが知られている。そこで bicuculline 適用前後の PPR 変化を見ることで、帯状回皮質内で機能している GABA 抑制系を評価することができる。

<扁桃体細胞内記録>

扁桃体基底外側核よりホールセルパッチクランプ法により膜電流記録を行った。記録用電極には内液として（単位 mM）、150 K-methanesulphonate, 5 KCl, 0.1 K-EGTA, 5 Na-HEPES, 3 Mg-ATP, 0.4 Na-GTP, pH7.4 を用いた。また記録細胞には保持電位 -45mV での電位固定を行い自発的なシナプス活動の結果発生する全膜電流を記録した。この条件で記録される膜電流は興奮性シナプス後電流（EPSC）が内向き電流、抑制性シナプス後電流（IPSC）が外向き電流となる。

・実験ガイドライン

すべての実験は東京大学および埼玉医科大学動物実験指針に基づき、認可を得たものである。

C. 結果

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）、磁界暴露の影響は見られなかった（図 14～22）。

D. 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応答するものであるが、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み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えられる。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

E 結論

種々の磁場暴露群において対照群との統一的な
差は見られなかった。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

学会発表

第 25 回日本生体磁気学会大会 さわやかちば県民
プラザ

低周波磁界の妊娠マウスへの影響

堀内 新一郎, 郭 文智, 佐藤 清敏, 深津 晋, 奥野
誠, 梅景 正, 牛山 明, 村越 隆之, 久保田 俊一郎
日本生体磁気学会誌 Vol.23 No.1 July 2010(第 25
回日本生体磁気学会大会 論文集) p.28-29.

第 25 回日本生体磁気学会大会 さわやかちば県
民プラザ

低周波磁界の神経系への影響とその機構の解明

郭文智, 大城博矩, 堀内新一郎, 梅景正, 牛山明,
奥野誠, 深津晋, 村越隆之, 久保田俊一郎
日本生体磁気学会誌 Vol.23 No.1 July 2010(第 25
回日本生体磁気学会大会 論文集) p.160-161.

H. 知的財産権 なし

□

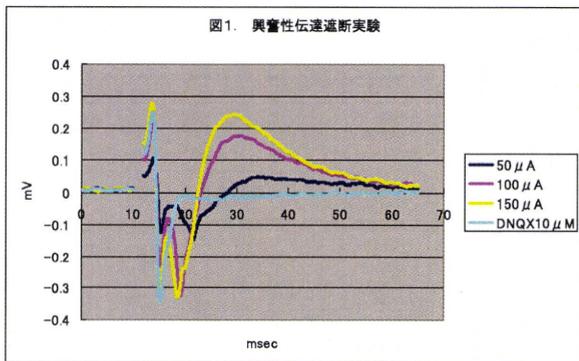


図2. 磁場暴露による帯状回興奮性シナプス伝達の影響
刺激強度依存性とPaired pulse ratio (PPR)

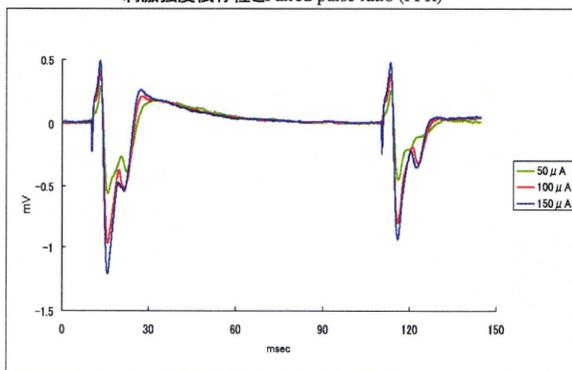


図3 : 1時間、3日

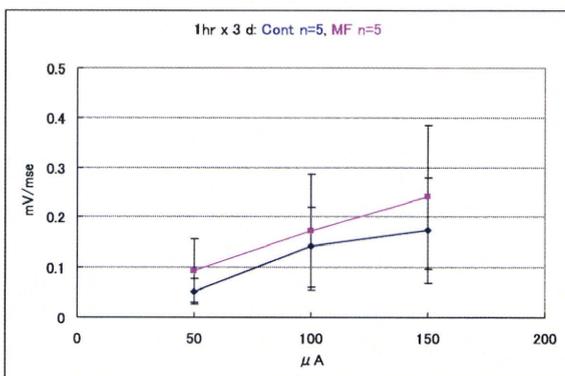


図4 : 2時間、3日

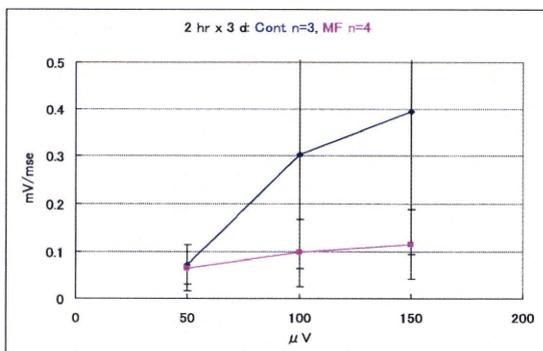


図5 : 4時間、3日

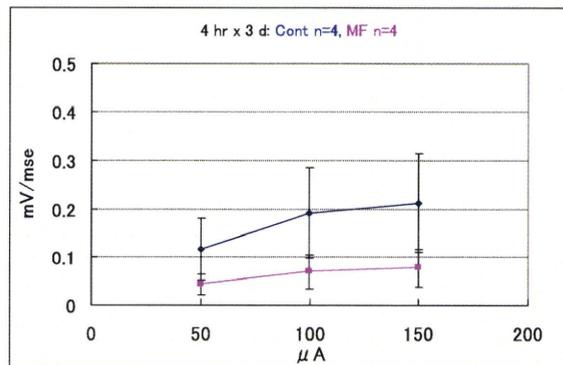


図6 : 1時間、3日

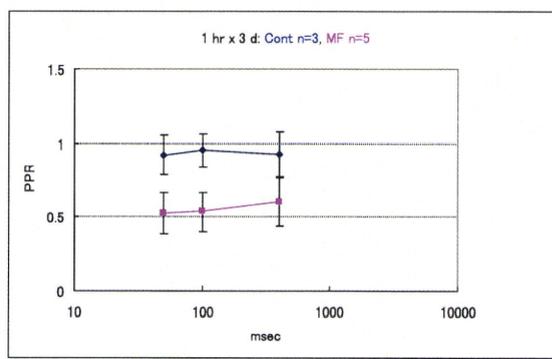


図7 : 2時間、3日

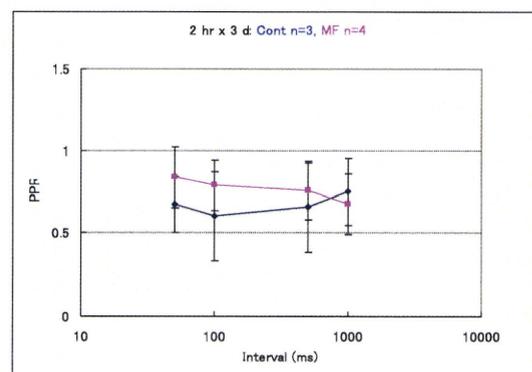
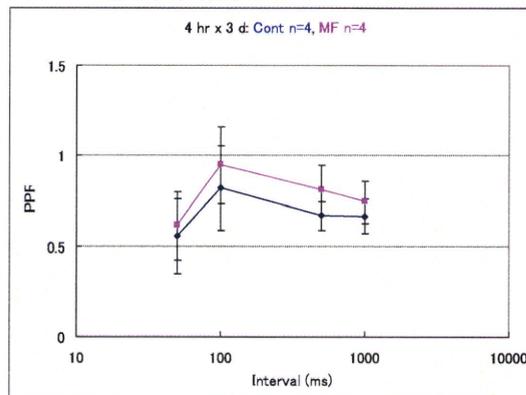


図8 : 4時間、3日



□

図9 : 1時間、2日

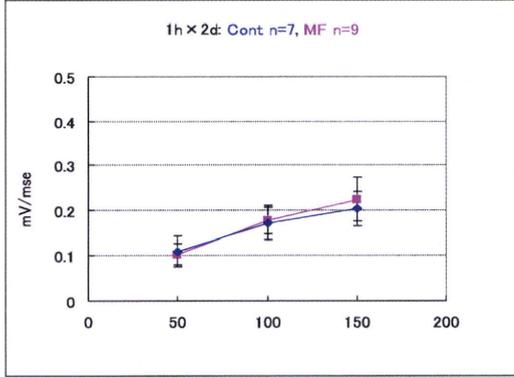


図12 : 1時間、3日

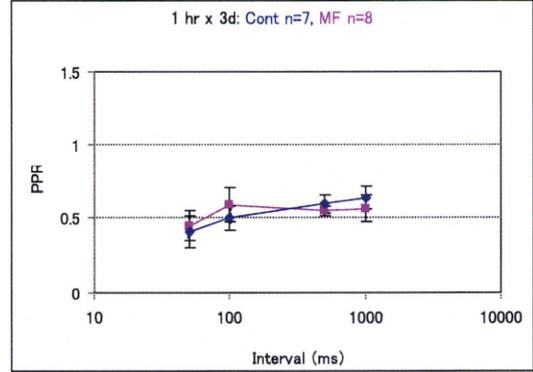


図10 : 1時間、3日

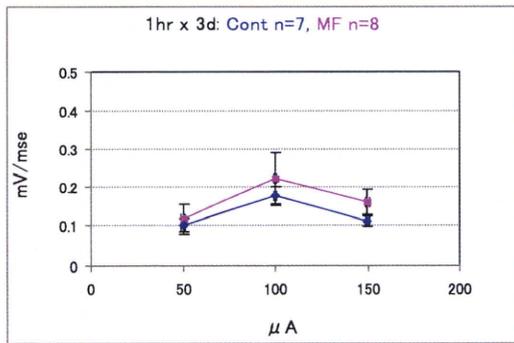


図13: パワースペクトル

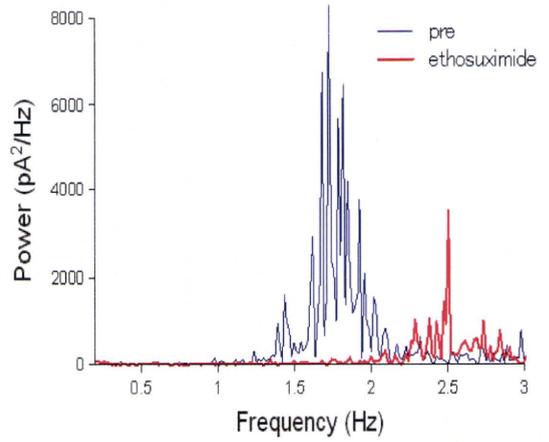


図11 : 1時間、2日

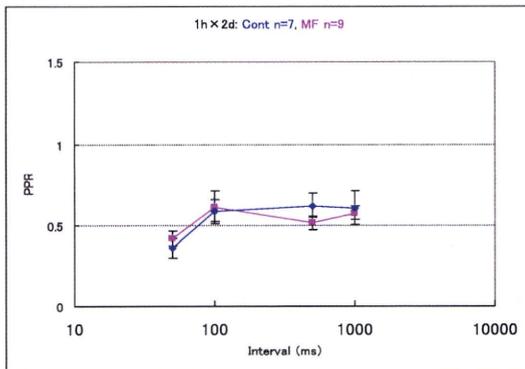


図14: 急性コントロール群

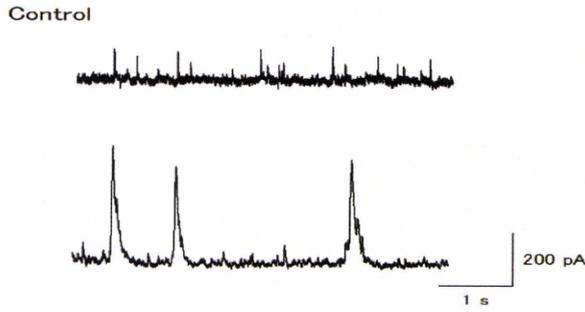


図17: 慢性コントロール群

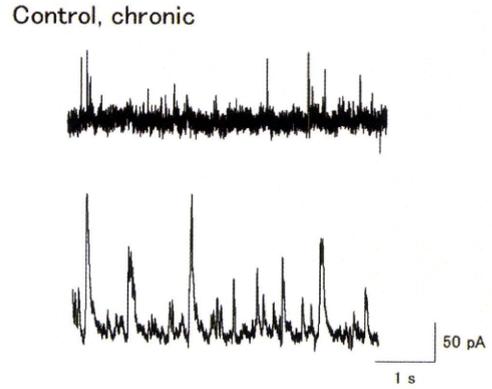


図15: 急性暴露群

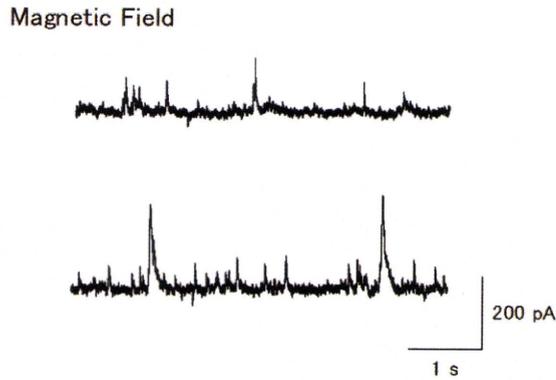


図18: 慢性磁場暴露群

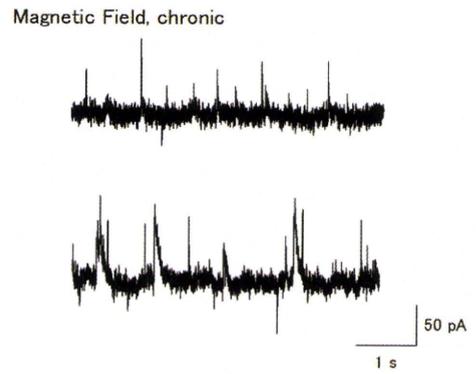


図16: オシレーションパワー比較(急性)

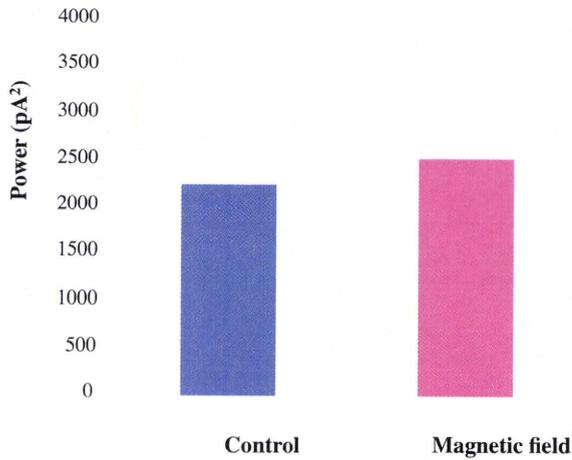


図19: オシレーションパワー比較(慢性)

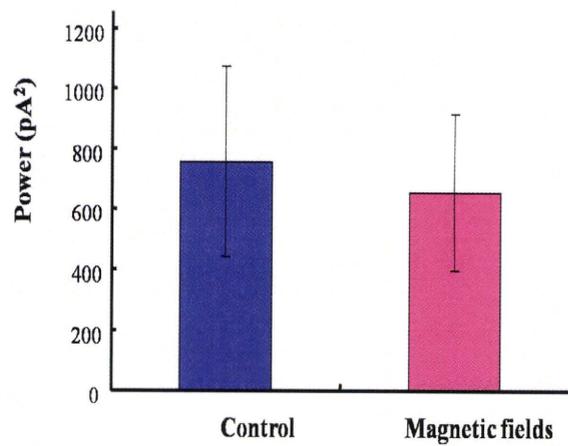


図20: オシレーション発生時の周波数

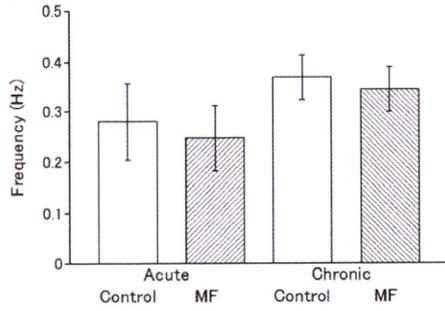


図23: 1st EPSP の刺激強度-応答特性

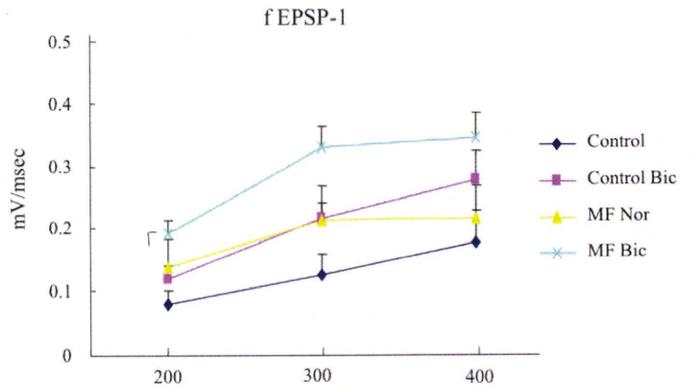


図21: 最大振幅

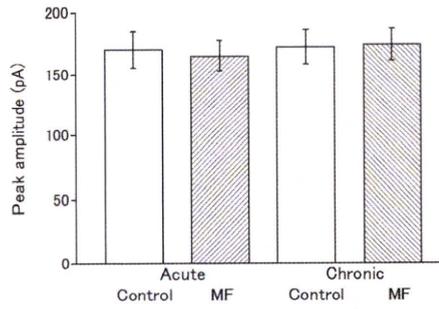


図24: 2nd EPSP の刺激強度-応答特性

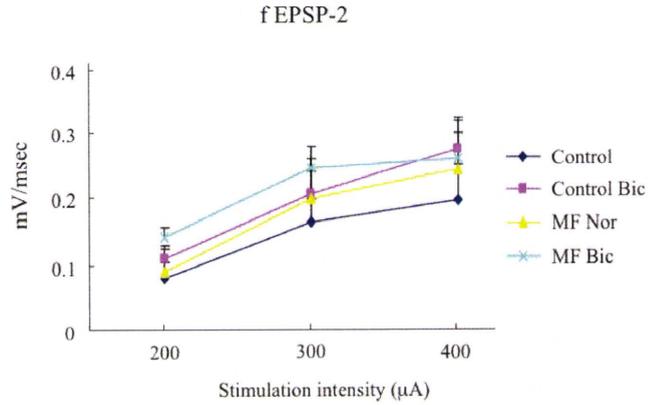


図22: 時間幅

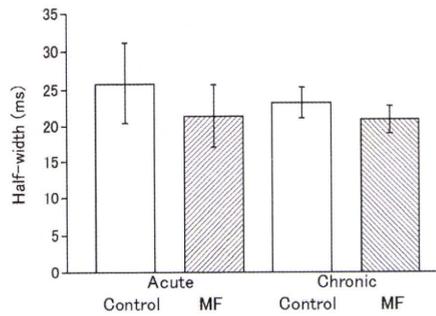
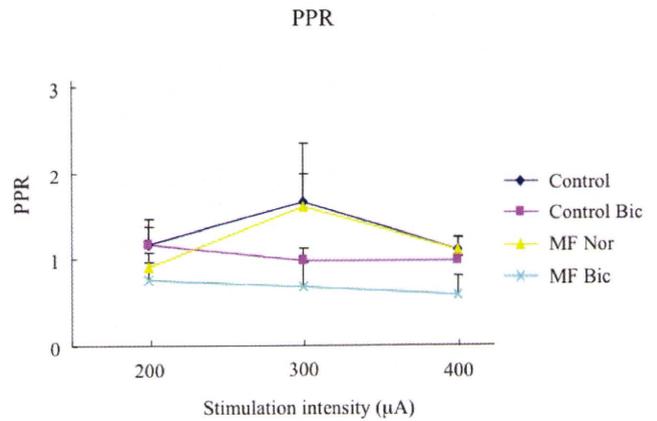


図25: Paired-pulse ratio



厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

分担研究報告書（平成 20 年度～22 年度）

電磁場のオスマウス生殖機能に及ぼす影響

分担研究者 奥野 誠

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系 准教授

研究要旨

低周波数（50Hz）低強度（40、400 μ T）および強強度（80mT）の磁場がオスマウスの生殖機能に及ぼす影響について検討した。離乳直後（3 週齢）から 2～3 週間の成長期の ICR オスマウスを磁場に曝露させたが、体重や臓器の成長に関しては、ほとんど影響が見られなかった。また、精子形成が正常に進むかを調べたところ、精巣上体に出現した精子の密度、精子運動率、精子運動の質ともに有意な差は見られなかった。また飼育期間を通じて、ストレスについても曝露群とコントロール群では有意な差は見られなかった。長期的に作用する食欲・生殖調節ホルモンであるインスリンとレプチンについても磁場曝露の影響を調べたが、やはり有意な差は検出できなかった。明確な結論を出すためには、今後検体数を増やすとともに、より長期間の曝露実験を行うことが必要である。

A. 研究の背景と目的

我々は日常生活において様々な電磁場にさらされている。近年の電力使用機器の増加に伴い自然界に存在する以外の人工的な電磁場に曝される機会が増え、その影響が懸念されている。本研究では、高圧送電線や家庭電気製品から発生する低周波交流低磁場がオスの生殖に影響を及ぼす可能性について検討した。高圧送電線下に居住する場合や、日常の電化製品を考慮すると、50 もしくは 60Hz の交流によって引き起こされる低周波交流磁場を想定する必要がある。そしてこのような磁場環境は、そこに住む住人にとって長期間続くものであり、微弱な磁場といえどもその影響は看過できないものとなる可能性がある。この場合懸念されるのは発癌などとともに生殖機能に対する影響

であろう。そこで本研究では、雄の生殖に対する影響を明らかにする目的で、マウスを用いた実験を行った。オスマウスはおよそ 3 週齢で離乳し、5 週齢を過ぎると成熟した精子が精巣上体尾部に出現し、生殖力を持つようになる。このオス生殖器が完成される器官は様々な環境因子の影響を受けやすい。そこで、この期間の 2～3 週間、様々な交流磁場に曝露する実験を行った。

B. 方法

3 週齢の ICR オスマウスを用いた。それら 4 匹を一つのケージに入れ、均一に磁場に曝した。磁場発生装置は久保田の項に記載したものをを用いている。磁場の強度は 40、400 μ T、および 80mT の強度で行った。コントロール群としては装置の近傍で磁場の影響のない場所に

同じケージを用いて飼育したものを用いた。

磁場への曝露は 40 および 400 μ T においては 2~3 週間、連続曝露を行った。また、80mT においては、毎日 13 時~14 時の 1 時間、曝露を行った。

ストレスの影響を見るためには糞中のコルチコステロンを測定した。0、8、14 日目に一旦ケージを換え、4 時間分の糞を採取した。糞はおおよそ 10 \pm 2 時間前の血中コルチコステロンを反映している。採取した糞は凍結乾燥し、乾燥重量を測定した後、20 倍量のメタノールを加えてホモジェナイズした後、遠心して上澄みを回収し、それを凍結乾燥した後 ELISA 法による測定キット (Corticosterone EIA kit, Cayman Chemical Co, USA) を用いて測定した。

曝露 15 および 22 日後、マウスをジエチルエーテルで麻酔し、体重を測定した後、開腹し、大動脈から血液を採取した。この血液から遠心により血清を分取し、インスリンとレプチンを測定した。インスリンは Mouse Insulin ELISA KIT (シバヤギ、日本) を、またレプチンは Quantikine Mouse Leptin Immunoassay (R & D Systems, USA) を用いた。

その後、精巣-精巣上体の部分を摘出し、精巣とそこに付着している脂肪の重量を測定した。精巣脂肪は体脂肪の指標として一般に用いられている。

その後精巣上体尾部から可能な限りの精液を絞り出し、100 μ l のシヨ糖溶液 (300mM sucrose, 10mM HEPES-NaOH pH 7.6) に希釈した。射出精液を得ることはマウスでは難しく、また射出精子濃度も一般に大きく変動することが知られており、産生される精子の量を正確に測定することは困難である。そこで本研究

では、精巣上体尾部から絞り出した精子の密度を相対値として比較することとした。ここではその精子懸濁液をさらに希釈して、血球換算盤にて精子数をカウントした。

シヨ糖溶液に希釈した精子は遊泳活性が低い。そこで 37 $^{\circ}$ C の Hank's 液にさらに希釈し、希釈およそ 5 分後に遊泳しているも精子をビデオ記録し、運動率を調べた。Hank's 液の組成は、150 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 10 mM NaHCO₃, HEPES-NaOH (pH=7.4) である。精子の運動率はビデオ画像から、鞭毛運動を示すものを運動精子としてカウントした。1 回のサンプルから複数画面で 100 以上の精子をカウントし、それらを平均して運動率を算出した。また、精子の質は運動率だけでは決められないので、精子鞭毛運動の質を定量化した。その一つの鞭毛振動数は、ビデオ画面から屈曲サイクルを割り出し、算出した。また精子の鞭毛運動の屈曲角が大きいことが質の良い精子の条件でもある。そこで鞭毛中央部付近の屈曲に着目し、その屈曲の両側の湾曲点での接線のなす角を屈曲角として求めた。屈曲角が大きいほど鞭毛は大きな振幅を示し、早く遊泳する。

一般に精子の運動性などを調べる場合は、一定 (一般には 50%) の運動率以上を示す個体を用いるが、本研究では磁場曝露面積に制約があるため個体数を多くできなかつた。そのため、磁場曝露群、コントロール群ともに全ての個体で測定したので、運動率などは低い値となった。また、精子の形状については、磁場曝露群、コントロール群ともに異常は見られなかつたので、その解析は行わなかつた。

C.D. 結果と考察

1. 強度の低周波磁場曝露の影響

(1) 成長における強度の低周波磁場曝露の影響

まず、体重や代表的な臓器の成長における磁場の影響を調べた。図1は3週齢のマウスを、毎日、13時から14時までの1時間、50Hz、80mT磁場に曝露させた場合の影響を調べた結果である。曝露期間の0日は22日齢で、18日の終了時には40日齢と言うことになる。この結果、このような今日磁場でも体重の増加にはほとんど影響が無いことが分かった。また、図2は曝露18日目に解剖したマウスの臓器重量の体重に対する割合で、コントロールのものを100として表している。この結果も、磁場の影響がほとんどないことを示している。

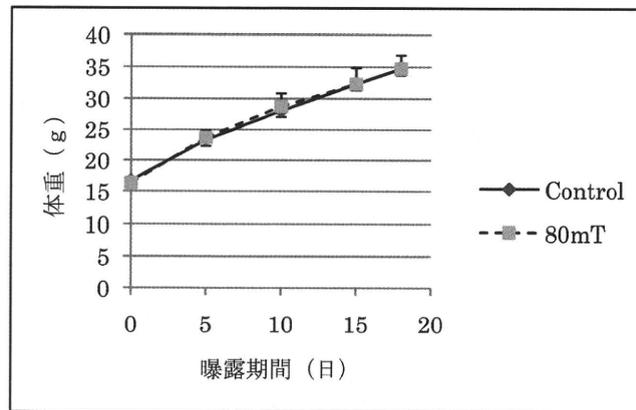


図1. 体重における磁場の影響。磁場は50Hz、80mTで、毎日、13時から14時までの1時間曝露した。(N=3) バーは標準偏差を表す。

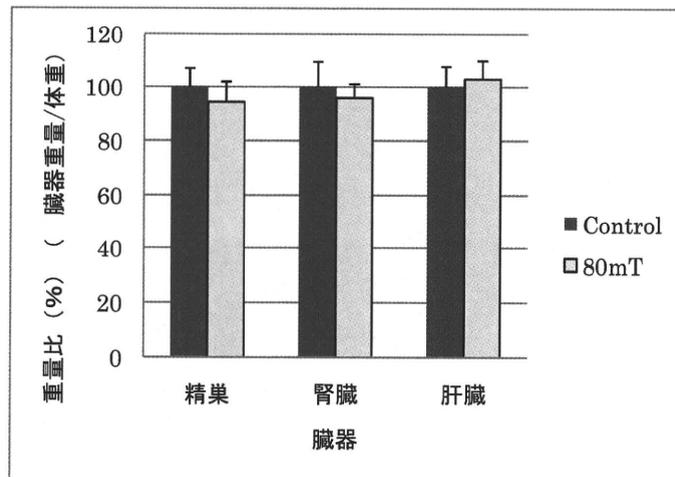


図2. 臓器における磁場の影響。磁場は50Hz、80mTで、毎日、13時から14時までの1時間曝露した。(N=3) バーは標準偏差を表す。

(2) 血糖値およびインスリンにおける影響

食餌量および長期の食欲調節に関連する指標として、インスリンおよび血糖（血中グルコース濃度）を選び、測定した。図 3.に示すように、18 日間曝露後の 40 日齢においても、有意な差は見られなかった。

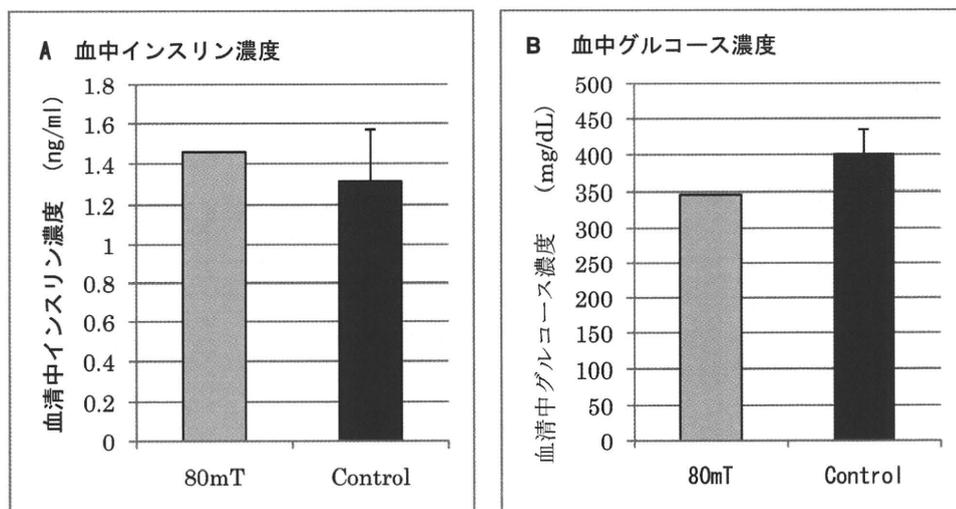


図 3. 血中インスリンおよび血中グルコース濃度に対する磁場の影響。18 日間の磁場曝露の後、血液を採取し、測定した。実験群は 2 例しか採決できなかったため、標準偏差バーは除いてある。A ; 血中インスリン濃度、B ; 血中グルコース濃度。 (N=3)

(3) 精子の機能に対する影響

オスの生殖機能の最も重要な要素である精子の質について調べた。図 4.は精巣上部尾部から採取した精子の運動率を示している。曝露群とコントロール群の間に有意差はなく、むしろ曝露群の方が高いぐらいだった。精子産生数に関してもやはり差は見られなかった。

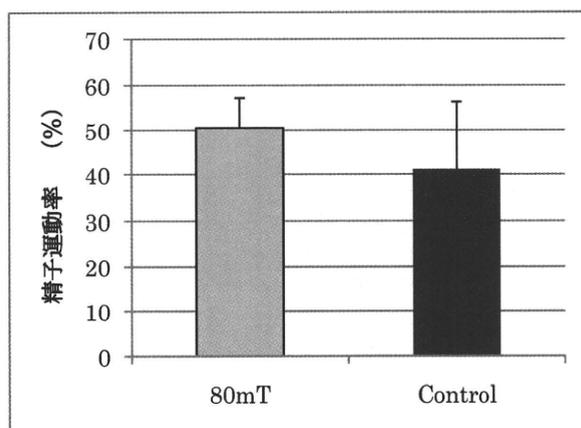


図 4. 精子の運動率に対する磁場の影響。採取した精子を、Hanks 液に希釈後、位相差顕微

鏡で観察した。1匹のマウスの精子 100 以上を計測し、3匹の平均を求めた。バーは標準偏差。

精子の運動率が良くても、精子の遊泳速度などの、精子の質が良くなければ受精率のみならず様々な問題が生じる。そのためにはメスと番わせ、産仔数や奇形の有無などを調べる必要があるが、それには膨大な時間と実験数が必要である。そこで本実験では精子の運動性を調べることとし、鞭毛の振動数と鞭毛屈曲波の屈曲角を測定した。屈曲角は鞭毛の中央部付近の屈曲の両側の湾曲点における接線のなす角度を求めた。それらの結果でも磁場の有無による違いは見られなかった。よって精子の運動の質に関しても 50Hz, 80mT の交流磁場の影響はないと結論づけられた。

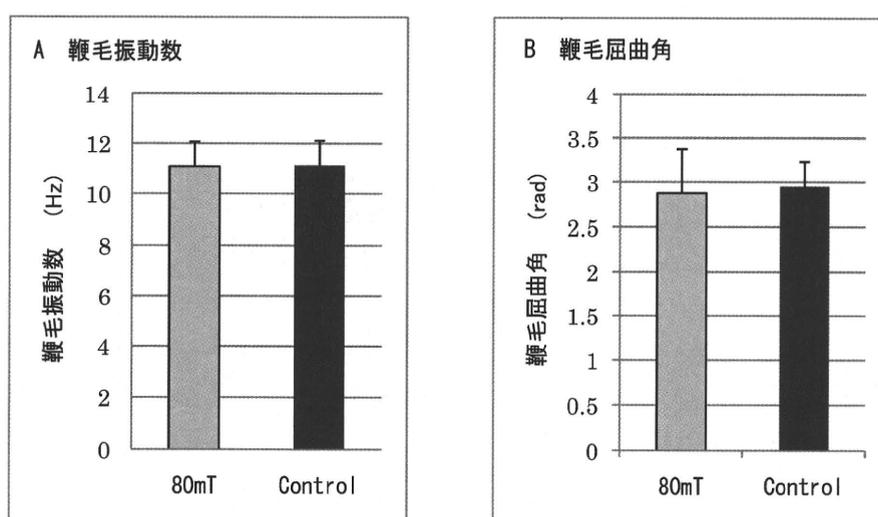


図 5. 鞭毛運動の振動数と屈曲角度。スライドグラス上で、頭部をガラス面に付着させ焦点面で屈曲運動をしている精子の鞭毛を記録し、測定した。A; 鞭毛の振動数。B; 鞭毛の中央部にてできる屈曲の屈曲角。ともに一つの精子で 4 回以上測定し、3 精子以上の平均値を求めた。バーは標準偏差

(4) 低周波強磁場 (50Hz、80mT) のオスマウス生殖機能に対する影響

地磁気の強度は場所により異なるが、日本国内ではおよそ 40~50 μ T である。本研究で用いた強磁場環境は、そのおよそ 1000 倍であり、しかも交流磁場である。このような強力な磁場においても、精子形成能および精子機能にはほとんど影響が無いことが分かった。

2. 低強度の低周波磁場曝露の影響

(1) 成長における強度の低周波磁場曝露の影響

すでに強磁場での測定で体重変化の継時的測定は行っており、差が見られなかったことから、磁場に 15 日間曝露させた後の測定のみを行った。また、低磁場の場合、強磁場と異なり、例えば高圧線下に居住している場合のように長期間被曝することを想定し、15 日間もしくは 22 日

間連続曝露させた。

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。次に、体重、体脂肪、精巣重量を測定した。図 6 に $40\mu\text{T}$ で 15 日間曝露した結果を示した。いずれもコントロール群と磁場曝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、 $400\mu\text{T}$ の結果は図 7 に示した。ここでもコントロール群と $400\mu\text{T}$ 群の間に有意差は見られなかった。なお、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。

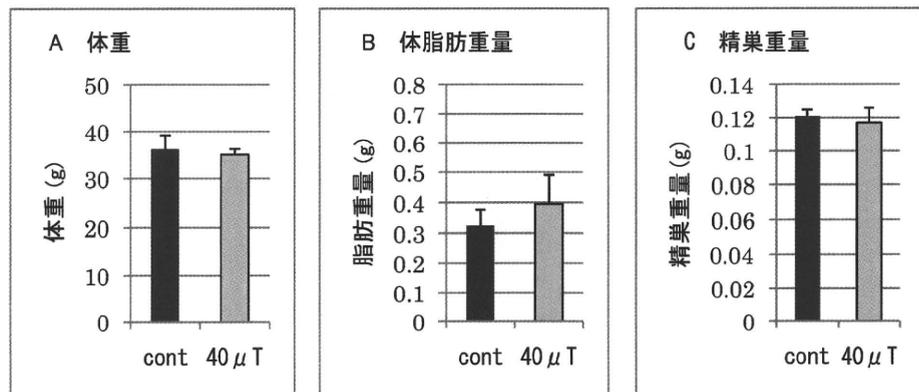


図 6. 体重 (A)、体脂肪重量 (B)、精巣重量 (C) における $40\mu\text{T}$ 磁場曝露の効果。コントロール群と曝露群に有意な差はなかった。体脂肪については、精巣に付着している脂肪が体脂肪を反映しているため、その脂肪の重量を計測した。(N=4)

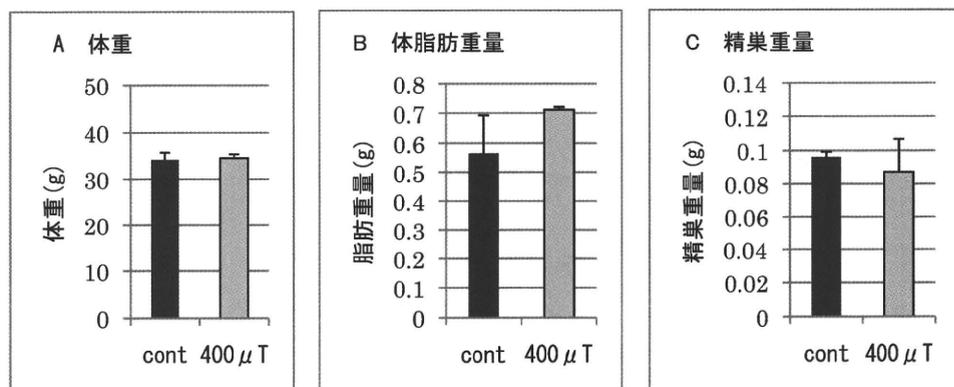


図 7. 体重 (A)、体脂肪重量 (B)、精巣重量 (C) における $400\mu\text{T}$ 磁場曝露の効果。コントロール群と曝露群に有意な差はなかった。体脂肪については、精巣に付着している脂肪が体脂肪を反映しているため、その脂肪の重量を計測した。(N=4)

ところで、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ているからである。精子形成にも関与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。磁場曝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、有意差はなかつ

(2) 内分泌における影響

(2-1) ストレスホルモン (コルチコステロン) に対する磁場の影響

次に生殖に関連する内分泌系について検討を行った。まず、磁場曝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曝露直後、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 8 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

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ブチン分泌量にも差がないであろうことを予想させた。

が大きいため、測定数をさらに増やす必要があるが、 $40\mu\text{T}$ と $400\mu\text{T}$ 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。これは曝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。磁場曝露の前に、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 $40\mu\text{T}$ と $400\mu\text{T}$ 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、磁場曝露の影響はないといえるであろう。

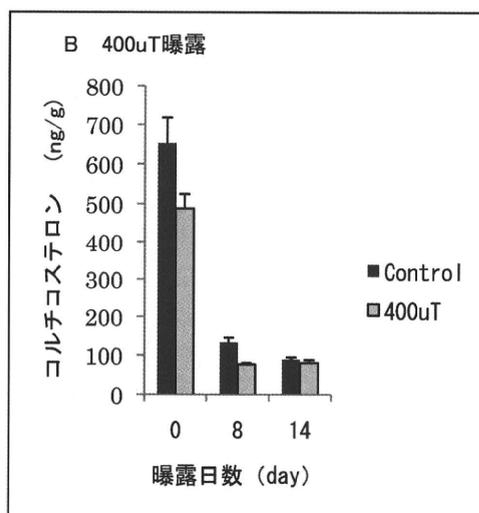
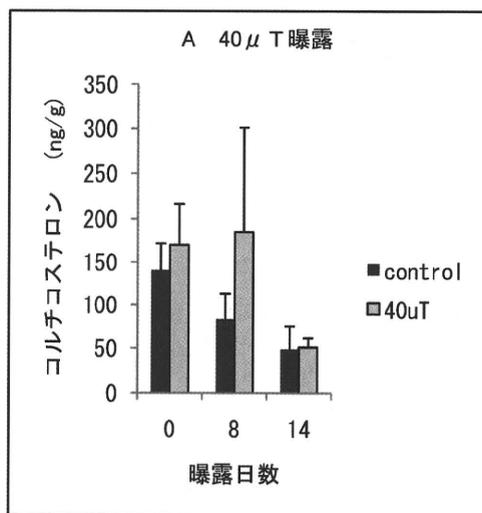


図 8. コルチコステロンに対する磁場曝露の影響。(A)は $40 \mu\text{T}$ 、(B)は $400 \mu\text{T}$ に曝露したものの。それぞれがコントロールと対に示されている。絶対値に差はあるものの、コントロール群と曝露群の間には有意な差はない。0 日目の値が高いのは狭い実験ケージに移動したためと考えられる。コントロール群と曝露群に有意な差はなかった。(4 匹の糞の合計から求めた値)

(2-2) 食欲・生殖系ホルモンに対する 磁場の影響

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 9 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。やはり 3 週齢マウスを 2 週間、 $40 \mu\text{T}$ および $400 \mu\text{T}$ に曝露させた。それぞれの実験結果において、コントロール群と $40 \mu\text{T}$ 曝露群および

$400 \mu\text{T}$ 曝露群において、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ものであり、今後のサンプル数を増やす必要がある。しかし、 $40 \mu\text{T}$ 曝露群および $400 \mu\text{T}$ 曝露群ともに曝露群の値が大きくなっていることは、図 6B、図 7B のコントロール群に対する曝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。以下の精子運動性の結果に示されるように、本実験の程度の磁場曝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。

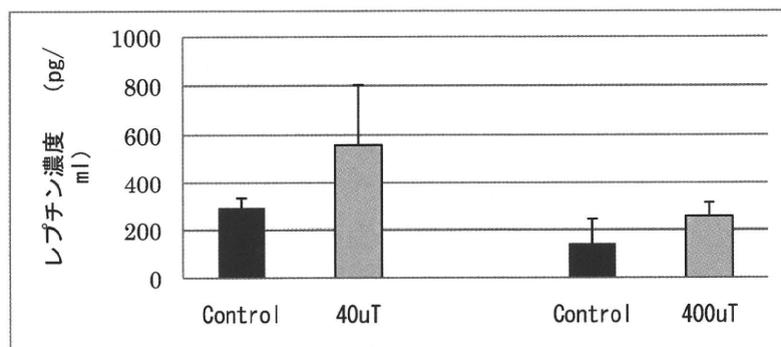


図 9. オスマウスの血中レプチンに対する 2 週間交流磁場曝露の影響。40 μ T、400 μ T の黒棒の左はそれぞれのコントロール実験の結果である。(N=4) バーは標準偏差を示す。

レプチンに関してはさらに 400 μ T で 3 週間曝露を行った (2010 年度)。その結果を図 10 に示す。繰り返したが、絶対値はばらつくものの、コントロール群と有意な差は見られなかった。以上から、レプチンの分泌に関して、磁場は影響を与えていないことが分かった。しかし、図 6 B、7B に示されるように、有意差はないものの、磁場曝露で脂肪量の増加傾向が見られること、またレプチンも磁場曝露で増加傾向があることから、より例数を増やした実験が必要であろう。その場合には、現在の磁場曝露装置では一時にマウスを 4 匹までしか飼育できず、より大きな飼育装置を整える必要がある。

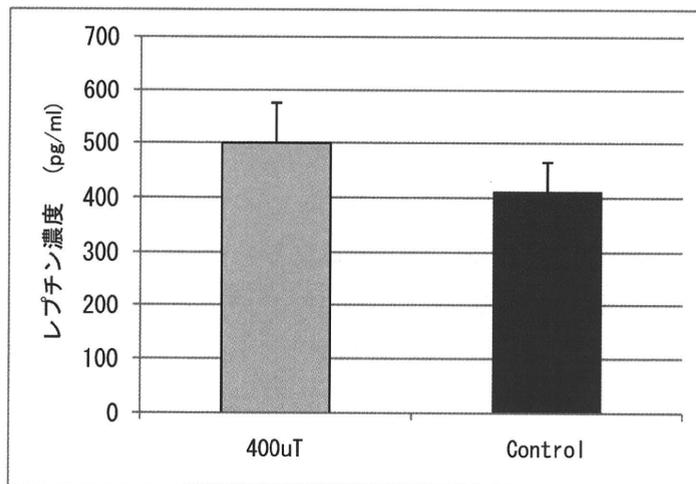


図 10. オスマウスの血中レプチンに対する 3 週間 400 μ T 交流磁場曝露の影響。(N=4) バーは標準偏差を示す。

次にインスリンについても調べた。図 11 に示すように、レプチンと同様に磁場曝露の影響は見られなかった。すなわち、40 μ T 曝露および 400 μ T 曝露で、絶対値の大きな違いは見られたが、それぞれコントロール群との差は見られなかった。40 μ T 曝露および 400 μ T 曝露実験は、実験実施時期が異なるので何らかの測定誤差が生じた可能性があり、原因については詳細な検討をする必要がある。

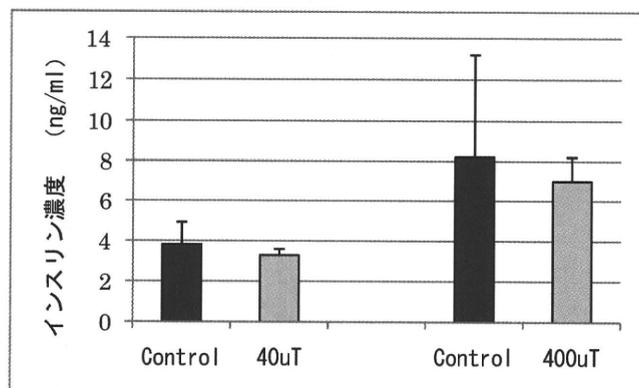


図 11 オスマウスの血中インスリンに対する 2 週間交流磁場曝露の影響。40 μ T、400 μ T の黒棒の左はそれぞれのコントロール実験の結果である。(N=4) バーは標準偏差を示す。

(3) 精子の機能に対する影響

(3-1) 精子密度に対する磁場の影響

強度の磁場曝露実験でも精子の質に対する磁場の影響はほとんどみられなかった。そして、連続低磁場曝露においても影響は見られなかった。

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。そこで雌乳(3 週齢)後 2 週間の間連続的に磁場に曝露し、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曝露 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 12A 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 ではむしろ磁場曝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、個体差が出るのが考えられた。そこで、3 週間曝露した 6 週齢の結果が図 12B である。A、B ともに相対値 (Arbitrary Unit) であるため、直接は比較できないが、400 μ T でもコントロールと差が無いことが明らかになった。今後はもう少し曝露期間を伸ばし、普通の条件ではほぼ確実に精子が出現する時期まで曝露を行うことを計画している。

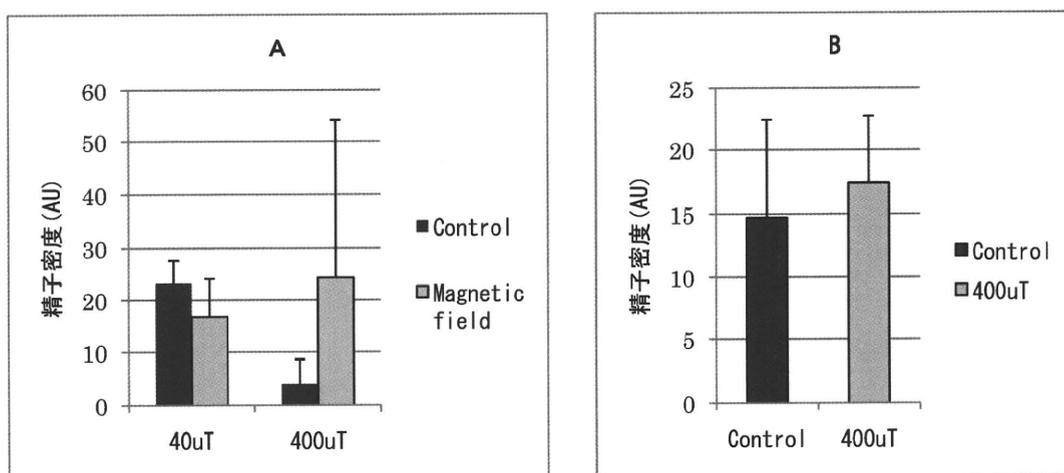


図 12 精子密度に対する磁場の影響。精巣上体尾部に出現した精子の密度 (相対値、AU、であらわしている)。位相差顕微鏡で記録した映像から精子数を計算した。A ; 3 週齢から 2 週間 40 μ T および 400 μ T に曝露したマウスの精巣上体精子の密度。 B ; 3 週齢から 3 週間

400 μ T に曝露したマウスの精巣上体精子の密度。(N=4)

(3-2) 精子運動率に対する磁場の影響

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、本実験では精子密度を調べるために、精子を精巣上体から可能な限り絞り取っているため、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、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 13 A

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 11A で明らかなように、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。そこで、上記実験と同様に 3 週間曝露した 6 週齢での結果が図 13B である。結果として少なくとも 400 μ T の磁場曝露は精子運動率に影響を与えないといえるであろう。

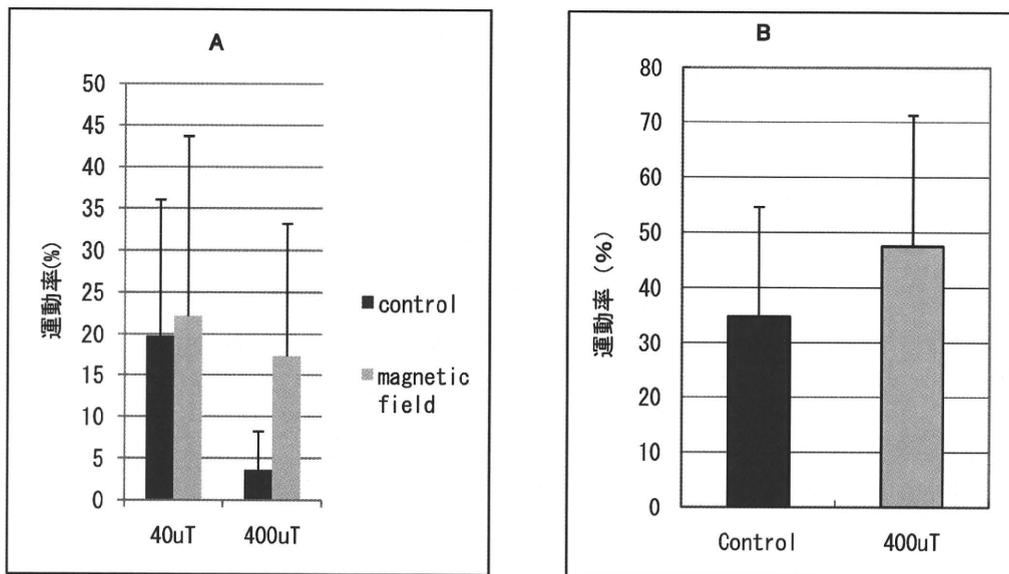


図 13. 精子の運動率に対する磁場の影響。位相差顕微鏡で記録した映像から運動精子の割合を計算した。A ; 3 週齢から 2 週間 40 μ T および 400 μ T に曝露したマウスの精巣上体精子の運動率。B ; 3 週齢から 3 週間 400 μ T に曝露したマウスの精巣上体精子の運動率。(N=4)