

図B2.2 インピーダンス法のx-y平面内の簡
単化された計算モデル

インピーダンス法は生体を分割された各セルで近似し、各セルの辺をインピーダンスZで仮定して磁界が入射したときの各辺の電流を求める方法である。生体に低周波の変動磁界が入射する場合、入射磁界の波長が生体に比べ非常に大きいことから、準静的な近似が行える。インピーダンス法

は準静的な近似を行うことができる場合に最も有効な手法のひとつである。図B2.2にインピーダンス法におけるx-y平面内の簡単化された計算モデルを示す。

2.3 誘導電流密度・誘導電界の算出方法

インピーダンス法においてループ電流から枝電流を求めるとき式(B2.5)を用いる

$$I_z(i + \frac{1}{2}, j + \frac{1}{2}, k) = I_y(i + 1, j, k) - I_y(i, j, k) - I_x(i, j + 1, k) + I_x(i, j, k) \quad (B2.5)$$

その後、図3に示すように平行なボクセル4辺の枝電流から式(B2.6)を用いてそのボクセルでの枝電流の値を求めている。

$$I_z(i, j, k) =$$



$$(B2.6)$$

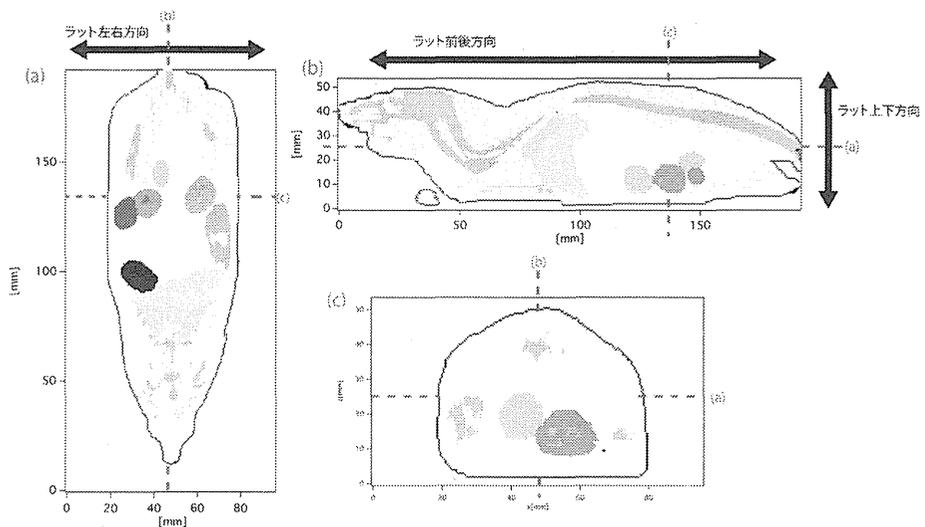


図 B2.3 妊娠ラットモデルの断面図

誘導電流密度は(B2.6)式で求めた枝電流の値をボクセルの断面積で割ったものとする。

$$J_z(i, j, k) = \frac{I_z(i, j, k)}{l^2} \quad (\text{B2.7})$$

誘導電界の値は式(B2.7)より算出した誘導電流密度の値を用いて、式(B2.8)から求める。

$$E(i, j, k) = \frac{J(i, j, k)}{\sigma(i, j, k)} \quad (\text{B2.8})$$

このように誘導電流密度 J を導電率 σ で割ることで誘導電界 E が求まる。ボクセルごとの電界を求めるために、誘導電流密度、導電率は同じ位置 (i, j, k) の値を用いている。

2.4 妊娠ラットモデル

局所磁界ばく露装置のばく露評価に用いるラットモデルは情報通信研究機構でMRI画像から作成されたものを使用している[4]。組織数は15となっていて、11匹分の胎児がモデル内に作成されている。胎児の組織は脳組織と脳以外の組織の2組織となっている。図B2.3にラットモデルの各軸方向での断面図を示す。本研究では、この図に示すとおり、ラットの左右方向、前後方向、上下方向を定義しておく。(a)、(b)、(c)は破線における各断面図となっている。

妊娠ラットモデル内での生体組織の導電率を表B2.1に示す。導電率の値は4-cole-coleモデルから求めている[5]。な

お、胎児の導電率の値はラット母体での組織の比率から重み付けを行い、脳組織とそれ以外の各導電率の値を求めている。羊水は文献[6]を参照した。

表 B2.1 妊娠 ラットの各生体組織の導電率 [S/m]

| | | | |
|------|---------|--------|----------|
| 組織なし | 0.0 | 盲腸 | 0.568 |
| 脂肪 | 0.0240 | その他内臓 | 0.345 |
| 筋肉 | 0.345 | 胃 | 0.531 |
| 肝臓 | 0.0607 | 胎児(羊水) | 1.27 |
| 肺 | 0.0971 | 胎児(実質) | 0.2 |
| 眼球 | 0.512 | 胎児(脳) | 0.095 |
| 脳 | 0.0727 | 皮膚 | 0.000214 |
| 骨 | 0.00290 | | |

3. ばく露装置制御方式の検討

複数台コイルを用いた磁界曝露装置の設計について示す。電流制御付き 200 kHz スイッチングインバータを各々のコイルの電源に用いて電流制御を行い、従来1つのコイルでは実現が困難である磁界分布を出力することが可能となる。制御付きのインバータを用いる理由は、複数のコイルを組み合わせることでコイルとコイルの相互インダクタンスにより電力授受が発生する可能性があるためである。そのため、局所磁界曝露装置で使用していたインバータと異なるため、インバータの定格等を考慮して設計する必要がある。また、これまでの曝露装置のコイルは1つであったので、複数台による磁界計算方法や出力する磁界分布について検討する必要がある。そこで、本研究では2台のコイルによる磁界曝露装置の設計の1例を示す。

ここで、重要となるのが複数台コイルによってどのような磁界分布を出力すること

ができるかである。以下に複数台コイルによって考えられる磁界分布を示す。

(1) 局所磁界分布

本研究では局所性を考慮したコイルについて検討を行い、コイル中心軸上で局所的に高磁界出力可能であることを示した。そこで、本研究で用いたような平面渦巻状のコイルを複数個用いて組み合わせることである点やある軸上で局所的に高磁界出力することが可能になると考えられる。

(2) 零磁界分布

これまでのコイル 1 台では流れる電流値で磁界強度を変化させられるが、同じコイルで電流値を変えずに磁界強度を変化させることは困難である。そこで、例えば各々のインバータで制御している電線を 1 つの筒に巻いたコイルを用いると振幅は同じで同位相電流と逆位相電流を流すことで異なる磁界を出力する事が可能になると考えられる。

(3) 複数周波数成分を含んだ磁界分布

複数のインバータで制御しているコイルを出力したい周波数成分ごとに組み合わせることで複数の周波数成分による磁界出力が可能になると考えられる。また、装置回路パラメータを変えなくてもインバータを制御しているプログラムを変更するだけで任意の周波数成分を出力することができる。

(4) 高磁界出力

磁界強度は電流値に比例するため高磁界出力するには電流密度を上げることが必要である。しかし、電流密度を高くすると電線の発熱が問題になったり、インバータ定格により制限されてしまう。そこで、複数のコイルを組み合わせることで電流密度やインバータ容量の制限を気にせずに高磁界

出力が可能になると考えられる。

以上より、複数のインバータとコイルを組み合わせることでこれまでの 1 つのコイルでは困難であった磁界分布を出力することが可能になる。また、これまでの共振回路を用いた磁界曝露装置と違い、正弦波電流出力のインバータを使用することで制御パラメータのみの変更をするだけで異なる磁界出力が可能となる。

3.1 電源と負荷インピーダンス

複数台のコイルによる 20kHz 磁界出力を行うためには 200kHz のスイッチングを行うインバータを使用する必要がある。文献 [7] では、200kHz スwitchingによる単相 PWM インバータについて示されている。この文献によると入力電圧 200V 時に 1kW のインバータ出力が可能であり、出力電流は $10A_{rms}$ 流すことができる。今後は、入力電圧 330V、1.5kW 出力が可能になると考えられるため、このインバータ定格より負荷の上限値を求めることができる。ここで想定するインバータ定格は、単相フルブリッジインバータ、200kHz スwitching、インバータ容量 $P_{out}=1.5kW$ 、入力最大電圧 $V_{in}=330V$ 、出力最大電流 $i_{out}=10A_{rms}$ (20kHz の正弦波)、振幅変調率 $m_a=0.9$ とする。ここで回路負荷は磁界発生コイルのみで考えると、インバータ定格より求められる最大インダクタンス L は、

$$L = \frac{V_{in} \times m_a \times \frac{1}{\sqrt{2}}}{\omega} = 167 \mu H \quad (B3.1)$$

となる。これより、インバータ出力の最大電流を流すためには式 (B3.1) で導出したインダクタンス L 以下の値でコイルを設計する必要がある。

3.2 円柱コイルによる磁界計算

コイルを設計するために必要な磁界計算方法について示す。複数のコイルが作る磁界分布を計算するには、コイルを単体として計算するのではなく、1 巻線ごとに磁界計算を行い巻線の間だけ足し合わせることでコイル全体の磁界分布となる。図 B3.1 にコイル長を ℓ 、円柱の半径を a 、コイルの中心軸を z 、半径方向の距離を r とした空芯コイルの円柱座標系を示す。1 ループコイルが作る任意の位置における磁界は文献 [8] より、以下のように示すことができる。

$$H_r(a, r, z) = \frac{zI}{2\pi r \sqrt{(a+r)^2 + z^2}} \left\{ -K(a, r, z) + \frac{a^2 + r^2 + z^2}{(a-r)^2 + z^2} E(a, r, z) \right\} \quad (\text{B3.2})$$

$$H_z(a, r, z) = \frac{I}{2\pi \sqrt{(a+r)^2 + z^2}} \left\{ K(a, r, z) + \frac{a^2 - r^2 - z^2}{(a-r)^2 + z^2} E(a, r, z) \right\} \quad (\text{B3.3})$$

$$|H| = \sqrt{H_z^2 + H_r^2} \quad (\text{B3.4})$$

$$K(k) = \int_0^{\frac{\pi}{2}} \frac{1}{\sqrt{1 - k^2 \sin^2 \theta}} d\theta \quad (\text{B3.5})$$

$$E(k) = \int_0^{\frac{\pi}{2}} \sqrt{1 - k^2 \sin^2 \theta} d\theta \quad (\text{B3.6})$$

$$k^2 = \frac{4ar}{(a+r)^2 + z^2} \quad (\text{B3.7})$$

$$B = \mu_0 H \quad (\text{B3.8})$$

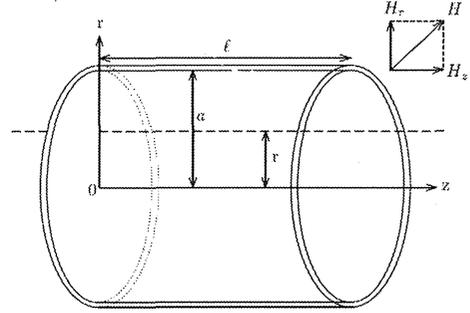


図 B3.1 円柱座標系におけるコイルの配置

ここで、 K は第一種完全楕円積分、 E は第二種完全楕円積分を指す。但し、この 2 つの関数は特殊関数のため文献 [9] に記されている値を参考にしてしている。また、 μ_0 は透磁率を示し、 $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} \text{H/m}$ である。

この計算より、コイル 1 ループが作る半径方向の磁界、中心軸方向の磁界を求め、コイルの巻数分を足し合わせることでコイル全体の磁界分布とする。

3.3 円柱コイルのインダクタンス計算

複数のコイルを用いた場合のインダクタンス計算は、大きく分けて 2 つある。1 つは各々のコイル単体による自己インダクタンス、もう 1 つはコイル間による相互インダクタンスである。インダクタンス計算も前述と同じように、1 巻線ごとに計算する必要がある。今回は文献 [10] の円形コイルによるインダクタンス計算方法を基にコイル全体のインダクタンス計算方法について示す。

まず、1 巻きの自己インダクタンスの計算は、

$$L_{\text{self}} = a \left\{ \mu_0 \left(\log \frac{8a}{\phi} - 2 \right) + \frac{\mu}{4} \right\} \quad (\text{B3.9})$$

となる。ここで、 a はコイル半径、 ϕ は電線

径、 μ_0 は透磁率である。

次に、巻線と巻線の相互インダクタンスと各コイル間の相互インダクタンスの計算を示す。ここで、各コイル間の相互インダクタンスも各コイルの巻線同士の相互インダクタンスと置き換えることができる。そこで、1組の1巻きコイル間の相互インダクタンスの計算方法を以下に示す。

$$M = \mu_0 a \left\{ \left(\frac{2}{k_M} - k_M \right) K(k_M) - \frac{2}{k_M} E(k_M) \right\} \quad (\text{B3.10})$$

$$k_M^2 = \frac{4a^2}{(2a)^2 + d^2} \quad (\text{B3.11})$$

ここで、 μ_0 は透磁率、 a はコイル半径、 d は各1巻きのコイル間距離、 $K(k_M)$ は第1種完全楕円積分、 $E(k_M)$ は第2種完全楕円積分である。

これらより、インダクタンスを求めると、コイル単体の自己インダクタンスは式(B3.9)の巻数分と式(B3.10)のコイル単体の巻線間分の和となる。一方、相互インダクタンスは式(B3.10)の各コイル間の巻線分の和となり、各コイルに流れる電流方向によって相互インダクタンスの正負が異なる。

3.4 零磁界出力を目的とした磁界曝露装置

前項で複数台コイルによって可能となる磁界分布について示した。そこで、零磁界分布を出力するための磁界曝露装置を1例として設計を行う。

まず、零磁界出力の必要性について述べる。生体影響評価の実験では、磁界曝露による影響を調査するために sham 群を用いて実験評価を行う。一般的に sham 群は、磁

界曝露評価で用いる装置に電源を入れず、曝露を行っている対象物と同様に拘束している。しかし、本装置で行われる曝露評価では磁界曝露による影響を評価したいため磁界曝露されている以外の実験や環境の条件が同じであることが望まれる。磁界曝露装置が動作し磁界発生コイルに電流を流すことで、磁界が発生する以外に装置の騒音や振動、また磁界発生コイルの電線による発熱や振動(音)が発生する。そのため、磁界以外の条件を一致させるためには、装置を動作させて磁界発生コイルに電流を流した状態でも磁界強度が零になるような磁界曝露装置が有用であると考えられる。そこで、2台のコイルを用いて逆位相の電流を流すことで磁界発生コイル内に零磁界の領域を出力させる。ただし、コイル形状により完全な零磁界領域を出力することは困難である。

そこで、本研究では sham 用を想定して設計する。まず、sham 用であるので、曝露評価を行うための磁界分布条件を決める。今回は、 $\pm 5\%$ の均一領域で曝露評価を行う際の sham 用としてコイル設計を行う。基準とする $\pm 5\%$ の均一領域の大きさは、ラット1匹分が収まる領域として、コイル形状はソレノイドコイルとする。ここでは、2台コイルによる零磁界領域を出力する磁界曝露装置の設計が目的であるので、均一領域や均一性に優れたコイルについては考慮せず、一般的なソレノイドコイルを用いて検討を行う。図 B3.2 に2つのコイルからなる磁界発生コイルの概略図を示す。今回は零磁界を出力したいので、1つの筒に各コイルの電線を交互に巻き、2つのコイルからなるソレノイドコイルとする。また、図 B3.2 では各電線が間を離して描かれているが、

実際に巻くときには隙間がないように密に巻く。

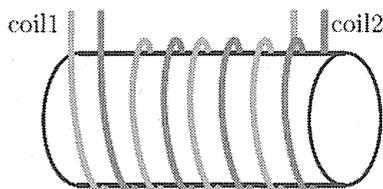


図 B3.2 2つのコイルからなる磁界発生コイルの概略図

次に、図 B3.3 に 2 台コイルを用いた磁界曝露装置の回路構成を示す。2 台コイルの部分は等価回路で示し、 L_1 は coil1 の自己インダクタンス、 L_2 は coil2 の自己インダクタンス、 M は coil1 と coil2 の相互インダクタンス、 r はインバータのスイッチング損失である。相互インダクタンス M は互いのコイルに流れる電流方向によって正負の値をとる。また、FPGA を用いて $2.5\mu\text{s}$ 間隔で各コイルの電流を制御する。

C. 結果

1. ばく露装置の保守管理

本年度の実験において、細胞用ばく露装置、動物用ばく露装置ともに設計通りの動作をしており、目標の磁界強度及び空間分

布でばく露が行われていたことを確認した。

2. ドシメトリに関する考察

2.1 誘導電界と磁束密度の比較

局所磁界ばく露装置において誘導電界と磁束密度が各胎児においてどの程度の量になっているかを比較した。図 C2.1 に解剖学的ラットモデルとコイルの配置の関係を示す。コイルの中心はラットモデルの尾の付け根を基準として、 49mm の位置に配置した。

図 C2.2 にこのときの各胎児における磁束密度の平均値と全胎児平均値を示す。また図 C2.3 に胎児内誘導電界の各胎児の平均値と全胎児平均値(胎児数は 11)を示す。コイルに流す電流が 90A の時、コイル中心の直上において 19.1mT の磁界を発生する。このとき磁束密度の全胎児平均値は 4.55mT であり、標準偏差は 1.33mT である。また誘導電界に関しては全胎児平均値は 3.01V/m 、標準偏差は 1.71V/m である。平均値に対して標準偏差は磁束密度に関しては 29% 、誘導電界に関しては 57% であり磁束密度のほうがばらつきが小さくなっている。これは解剖学的モデルの各胎児の大きさのばらつきが大きいからと考えられる。

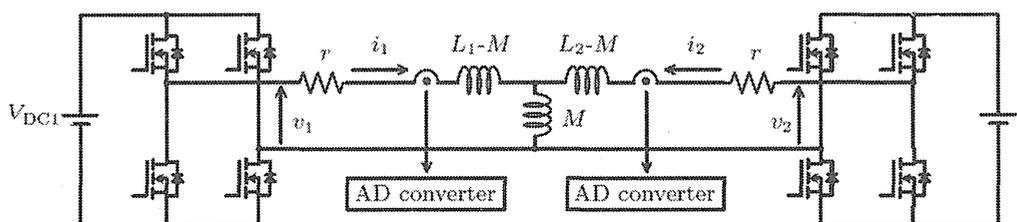


図 B3.3 2台コイルとインバータを用いた磁界曝露装置の回路図

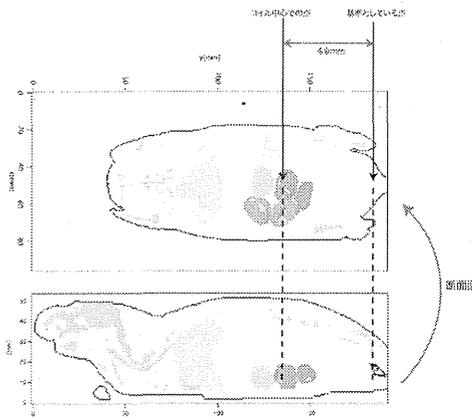


図 C2.1 胎児群とコイルの位置関係

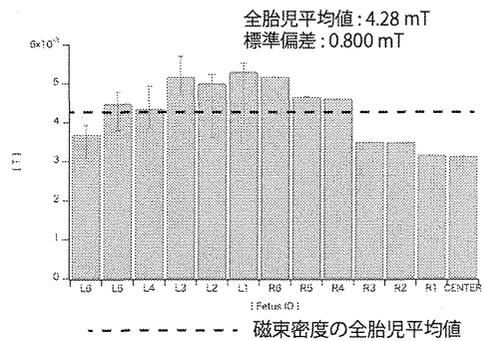


図 C2.4 簡易モデルにおける各胎児に入射する磁束密度の平均値 (妊娠 14 日目)

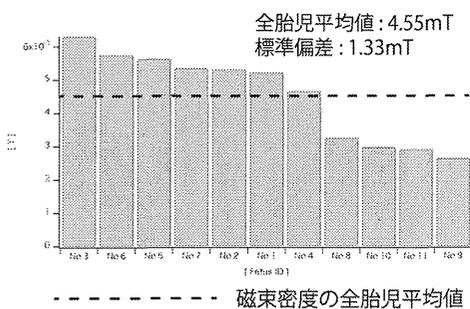


図 C2.2 解剖学的モデルにおける各胎児に入射する磁束密度の平均値

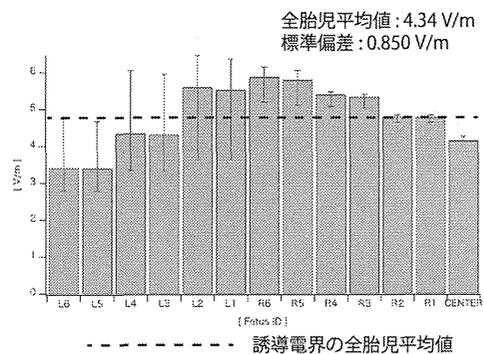


図 C2.5 簡易モデルにおける各胎児の内部誘導電界の平均値 (妊娠 14 日目)

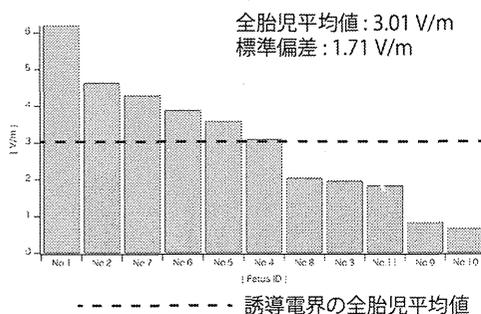
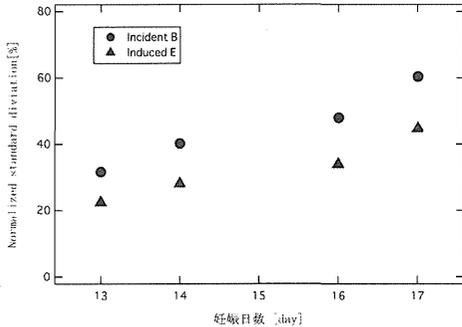


図 C2.3 解剖学的モデルにおける各胎児の内部誘導電界の平均値

図 C2.4、図 C2.5 はそれぞれ胎児を球体で模擬した簡易モデルにおける各胎児の磁束密度平均値と誘導電界平均値である。胎児の大きさは妊娠 14 日目の実際の体重データから胎児の密度を 1.0g/cm^3 として推測した。標準偏差の平均値に帯する割合は磁束密度の場合 18.6%、誘導電界の場合 19.5% である。簡易モデルの場合それぞれの量のばらつきは解剖学的モデルよりも小さくなった。これらのデータから、生物学的な評価をする場合、対象とする母体に置ける胎児の大きさ(重量)のばらつきを注意深く観察すべきである。

次にコイルの中心位置がずれて、より尾

の付け根に近づいたときの場合について考察する。ここでは尾の付け根の基準点からコイルの中心までを25mmとした。このときの入射磁界、誘導電界それぞれの標準偏差を平均値で規格化した値の妊娠日数に対する依存性を図C2.6に示す。コイルが尾の方にずれた場合、入射磁界のばらつきが誘導電界よりも大きくなっている。このように、コイルの位置によって、入射磁界と誘導電界のばらつきが逆転することもあることが分かる。また妊娠日数が大きくなるに従って、入射磁束密度、誘導電界の両方の標準偏差が大きくなっていることがわかる。これは胎児が大きくなるにつれて子宮の先端が母体の頭部側にのびていき、空間的に胎児が分布する領域が広がるからと考えられる。



図C2.6 各胎児への入射磁界と誘導電界に関する規格化された標準偏差の妊娠日数に対する依存性 (●磁束密度、▲誘導電界)

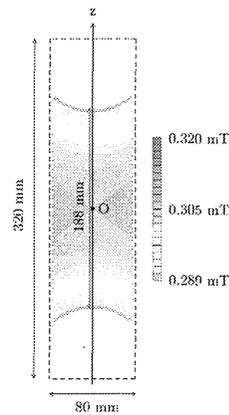
3. ばく露装置の制御方式に関する検討

3.1 試験装置

今回必要な±5%の均一領域をラット1匹分の大きさ(長さ160mm、幅56mm)とする。ソレノイドコイル場合では、均一領域を大きくするにはコイル径よりコイル長を長く

することが必要になるので、コイル内径を76mm、コイル長を必要な領域の2倍の320mmとする。また、電線は電線径 $\phi=4\text{mm}$ のリッツ線を使用するので、coil1とcoil2の巻数は40巻づつ(合計80巻)となり、このパラメータで試験コイルを製作する。

図C3.1に、試験コイルに同位相電流($1A_{\text{rms}}$)を流した場合のコイル中心Oに対して±5%均一磁界分布を示す。ここで、コイル中心Oはコイル長 l の半分とコイル径 $2a$ の中心の交点である。図C3.1より、±5%均一磁界は幅80mm、長さ188mmとなり条件を満たしている。図C3.2に、試験コイルに逆位相電流($1A_{\text{rms}}$)を流した場合で同位相電流時のコイル中心Oに対して1/1000の磁界強度にあたる領域を示している。図C3.2より、コイル中心Oに対して1/1000の磁界は幅68mm、長さ108mmとなり、特にコイル中心O付近の磁界強度はほぼ零である。これらより、逆位相の電流を流すことでコイル駆動時でも磁界強度の低い磁界出力が可能である。また、実際にどの程度の磁界強度を零磁界とするのかは、装置使用者が決める必要がある。



図C3.1 試験コイルに同位相電流($1A_{\text{rms}}$)を流した場合の±5%磁界分布領域

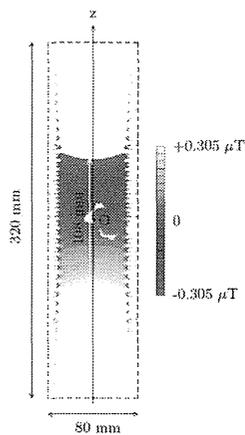


図 C3.2 試験コイルに逆位相電流 ($1A_{rms}$) を流した場合で同位相電流時のコイル中心 O に対して $1/1000$ の磁界分布領域

図 C3.3 に試験装置の写真を示す。ここで、写真には 200kHz スイッチングインバータが 2 台、デジタル制御器の FPGA、電流センサ、磁界発生コイル、外付けインダクタンスが写っている。磁界発生コイルは、各コイル (coil1 と coil2) の巻線を交互かつ密に巻きつけてある。そのため、磁界発生コイルのコイル間による浮遊キャパシタンスが存在し、今回設計したコイルで測定

(インピーダンスアナライザ) したところ 2 nF であった。また、磁界発生コイル以外に外付けのインダクタンスを接続している理由は、磁界発生コイルに逆位相電流を流すと等価的にコイルインダクタンスが小さくなるため、出力電流波形が歪まないようにインダクタンスを挿入している。そして、直流電源は各々のインバータにそれぞれ電源を接続して、GND は共通にしない。この理由は、直流電源の GND が共通であるとスイッチング周波数成分が直流電源を介して回り込んでしまうため指令値通りの出力が困難になるからである。以上の装置構成により、試験装置を駆動させて実験により設計の妥当性を確認する。

3.2 実験結果

図 C3.4 に coil1 と coil2 に同位相の電流を流した場合の各インバータ出力電圧波形と電流波形を示す。この時の実験条件は、直流電圧 100V、コイル電流 1.06A、比例ゲイン 50、外付け空芯インダクタンス 153 μ H を各インバータ出力に接続している。ま

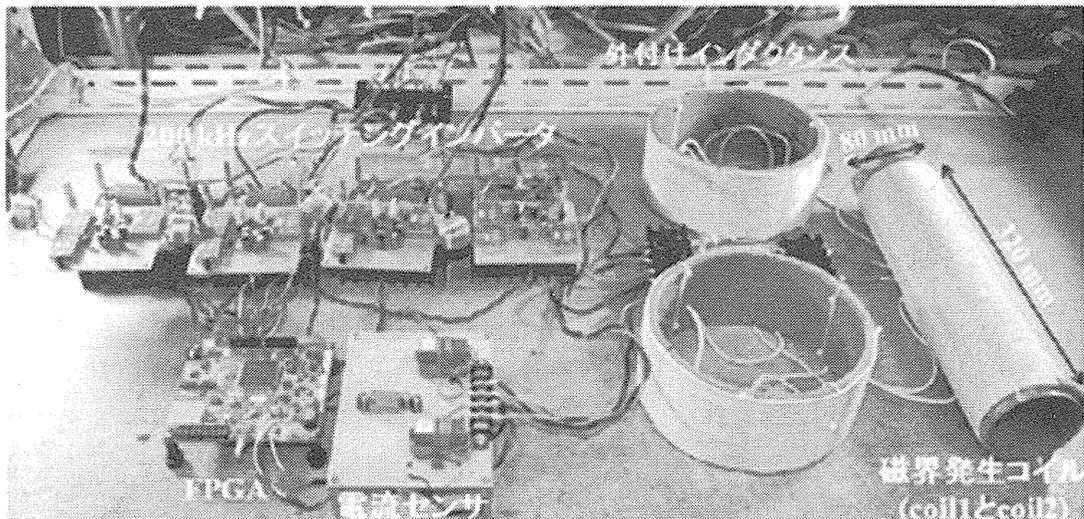


図 C3.3 2 台コイル用磁界曝露装置のインバータと制御器

た、計算による同位相電流でのコイルインダクタンスは、自己インダクタンス $28\mu\text{H}$ 、コイル間の相互インダクタンス $27\mu\text{H}$ となるので合計で $55\mu\text{H}$ となる。図 C3.4 より、各コイルに流れる電流は同位相で指令値通りの 20kHz 正弦波出力していることを確認できる。

図 C3.5 に coil1 と coil2 に逆位相の電流を流した場合の各インバータ出力電圧波形と電流波形を示す。この時の実験条件は、直流電圧 100V 、コイル電流 1.06A 、比例ゲイン 50 、外付け空芯インダクタンス $153\mu\text{H}$ を各インバータ出力に接続している。また、計算による逆位相電流でのコイルインダクタンスは、同位相電流時の各々のインダクタンス値は同じであり、逆位相のため相互インダクタンスが負となるので $1\mu\text{H}$ となる。図 C3.5 より、各コイルに流れる電流は逆位相で指令値通りの 20kHz 正弦波出力していることを確認できる。

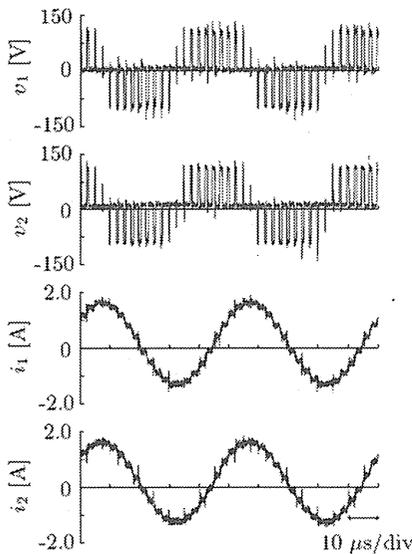


図 C3.4 coil1 と coil2 に同位相の電流を流した場合の出力波形

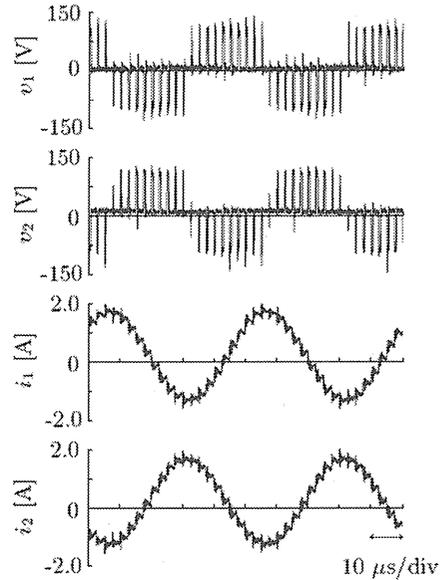


図 C3.5 coil1 と coil2 に逆位相の電流を流した場合の出力波形

以上より、PWM インバータとデジタル制御器を用いた磁界曝露装置を使用することで、同一装置の制御パラメータ変更により任意の磁界出力や制御が可能であることが確認できた。

D. 結論

本年度は開発した磁界ばく露装置のばく露管理と保守を行った。これにより本プロジェクトでは細胞実験及び動物実験における磁界ばく露量、内部誘導量を適正に評価できている。また数値ドシメトリに関しては各胎児に入射する磁束密度のばらつきと内部誘導電界のばらつきに関して比較を行った。その結果、設計したラットとコイルの位置関係では誘導電界のばらつきが入射磁束密度のそれよりも解剖学的モデルでは大きなことがわかった。しかしこの関係はコイルの位置ずれによって逆転することも分かった。また胎児の成長に依存して、入

射磁束密度、誘導電界の各量のばらつきが大きくなることがわかった。これらから、ばく露時には胎児とコイルの位置関係、胎児の重量とそのばらつきを実験時に把握することがより精密なばく露評価に結びつくことがわかった。さらにはばく露装置の新しい制御方式に関して検討し、試験的な装置の実装を行った。その結果 PWM インバータとデジタル制御器を用いることにより、同一のばく露装置で磁界分布の制御がある程度任意に出来ることが確認できた。

E. 参考文献

[1] OM P. GANDHI、 et al.、 ”Impedence Method for Calculation of Power Deposition Patterns in Magnetically Induced Hyperthermia、” IEEE Transaction on Biomedical Engineering、 BME-31、 Issue-10、 pp.644-651. 1984.

[2] N. Orcutt、 et al.、 ”A 3-D impedance method to calculate power deposition in biological bodies subjected to time varying magnetic fields、” IEEE Transaction on Biomedical Engineering、 35、 Issue-8、 pp.577-583. 1988.

[3] K. Wake、 T. Tanaka、 and M. Taki、 ”Analysis of induced currents in a rat exposed to 50 Hz linearly and circularly polarized magnetic fields、” Bioelectromagnetics、 21、 p354-363、 2000.

[4] J. Wang、 et al.、 ” Development and Dosimetry Analysis of a 2-GHz Whole-Body Exposure Setup for Unrestrained Pregnant and

New- born Rats、” IEEE Transactions On Microwave Theory And Techniques、 56、 pp.2008-2013、 2008.

[5] Gabriel S、 et al.、 ” The dielectric properties of biological tissues: III. Paramagnetic models for the dielectric spectrum of tissues. ” Physics in Medicine and Biology、 41、 pp.2271-2293. 1996.

[6] F De Luca、 et al.、 ” Use of low-frequency electrical impedance measurements to determine phospholipid content in amniotic fluid” Physics in Medicine and Biology、 41、 pp.1863-1869、 1996.

[7] 田栗 賢人、和田 圭二：「200 kHz 1 kW 出力 単相 PWM インバータ」、電気学会産業応用部門大会、Y-21(2011).

[8] ランダウ、リフシッシ：“電磁気学 1”、 pp. 150 - 159、東京図書 (1956).

[9] 森口 繁一、宇田川 久、一松 信：“岩波 数学 -特殊函数-”、pp. 162 - 163、岩波書店 (1960).

[10] 後藤 憲一、山崎 修一郎：“電磁気学演習”、pp. 222-282、pp. 301、共立出版株式会社 (1970).

F 論文発表

1. 木暮晋太郎、和田圭二、鈴木敬久：“変型 Merritt コイルを用いた細胞曝露評価用 20 kHz 磁界発生装置の開発”、(電子情報

通信学会論文誌 B 投稿予定) .

2. 鈴木伸也、平井佑樹、和田圭二、鈴木敬久：“中間周波電磁界の生体影響評価を目的とした局所磁界発生装置”、(電気学会論文誌 A 投稿予定) .

居室における中間周波電磁界に関する研究
～細胞を対象とした遺伝子と分化に関する研究～

| | | |
|-------|-------|---|
| 分担研究者 | 池畑政輝 | (公財)鉄道総合技術研究所 人間科学研究部 生物工学研究室 主任研究員 |
| | 吉江幸子 | (公財)鉄道総合技術研究所 人間科学研究部 生物工学研究室 副主任研究員 |
| | 石井一行 | 明治薬科大学 衛生化学教室 教授 |
| | 小笠原裕樹 | 明治薬科大学 衛生化学教室 准教授 |

研究要旨

IF 磁界の健康影響評価に関しては、これまでに非常に限られた知見しかないため、少なくとも安全性評価の常法に則り、*in vitro* および *in vivo* 双方での種々の試験の実施が必要である。本研究では、開発した *in vitro* 試験用 IF 磁界ばく露装置（21kHz において最大 3.9mT（ICNIRP ガイドラインにおける公衆ばく露の参考レベルの 144 倍）を発生）を用いて、内分泌かく乱性の評価としてレポーター遺伝子を導入したヒト乳がん由来細胞（MCF-7）のエストロゲン応答性、DNA メチル化およびマウス ES 細胞の分化に対する影響を遺伝子発現のレベルで検討した。その結果、MCF-7 細胞のエストロゲン応答性については、4 日間の長期ばく露による有意な影響は認められなかった。また、2 週間の長期ばく露によりクローン化した MCF-7 細胞のがん抑制遺伝子(p53)およびがんの悪性化に寄与する細胞接着因子 e-cadherin 遺伝子の発現制御部位のメチル化についても、ばく露による有意な影響は認められなかった。さらに、分化中のマウス ES 細胞の催奇形性候補遺伝子 5 種(Xrip1、Smyd1、Myl7、Colla2、Hba-x)及び 2 種の心筋分化マーカー遺伝子(Myl2、Cardiac actin)いずれの発現に対しても、ばく露の影響は認められなかった。これらの結果より、居室等での環境中でのばく露より 100 倍以上高い磁束密度の中間周波磁界であっても、遺伝子やその発現、また分化に対して顕著な影響を与えないことが明らかとなった。

A. 研究目的

IH 調理器などの家電製品や盗難防止装置等の設備、また鉄道などの高出力インバーターなど、身の回りの IF 磁界源からばく露する機会が増えているが、IF 磁界の健康

影響に関しては、これまでに行われた研究は限られている。そのため、2007 年に発刊された WHO の超低周波電磁界に関する環境保健クライテリア（EHC238）では以下の通りに記載され、研究の推進が必須とさ

れている。

「この領域のデータが欠落している現状を鑑み、全てを包括する必要事項として、通常は 300Hz~100kHz とされる中間周波数 (IF) 電磁界に関する更なる研究が必要である。健康リスク評価に必要とされる知識ベースの極僅かしか集まっておらず、既存の研究の多くは結果が一貫していないので、さらなる具体化が必要である。健康リスク評価のための十分な IF データベースを構成するための一般的な要件には、ばく露評価、疫学研究、ヒト実験室研究、動物および細胞 (*in vitro*) 研究が含まれる。」

したがって、早期に IF 磁界の安全性の評価を進める必要がある。この評価のためには、*in vivo* および *in vitro* 双方の試験系において、影響評価を行った知見を積み重ねていくことが必要である。

本分担研究では、このうち *in vitro* 研究として、培養細胞を用いた IF 磁界ばく露の影

響評価を実施している。平成 24 年度は、これまでの3年間の研究のフォローアップとして、ヒト乳がん由来細胞を用いたエストロゲンレポーター遺伝子アッセイ系による IF 磁界ばく露によるエストロゲン応答遺伝子の発現変化の有無に関する、長期ばく露による影響評価、同細胞を用いたばく露下での培養による DNA メチル化への影響評価を行った。更に、マウス ES 細胞の心筋への分化に与える影響を、催奇形性マーカーとして報告されている候補遺伝子および心筋分化マーカー遺伝子の発現変動を調べることにより評価した。

B. 研究方法

B 1 IF 磁界ばく露による内分泌かく乱性の評価

胎児への影響評価の必要性を鑑み、胎児の神経分化過程に関わる代表的な女性ホルモンの一つであり、その高値は双児や巨大

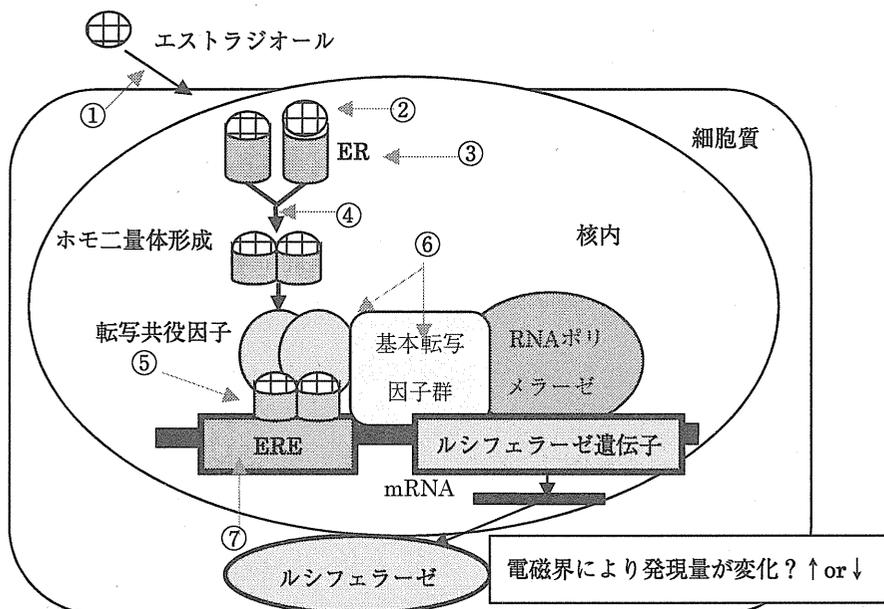


図 1 核内でのエストロゲン応答遺伝子の活性化機構

児、低値により胎児死亡や仮死、無脳児の出生の危険性を高めるエストロゲンへの応答性に着目し、IF 磁界ばく露によるエストロゲン応答性変化の有無を、昨年度に引き続き内分泌攪乱化学物質のスクリーニング系であるレポータージーンアッセイを用いて調べた。

その原理はエストロゲンが細胞膜を通過し核内に存在するエストロゲンレセプターに結合してホモ 2 量体の複合体を形成する。その複合体が染色体に組み込まれたベクターの有するエストロゲン応答配列に結合することで多数の共役因子を始めとする転写因子群がリクルートされ、下流にあるホタルルシフェラーゼ遺伝子の転写活性化を促してルシフェラーゼが発現される。ルシフェラーゼはヒト細胞内に存在しないため、微弱なシグナルもエストロゲン活性として評価できる。

この系における磁界ばく露の影響として

- ① 細胞へのエストロゲンの取り込み阻害
- ② エストロゲンレセプターへの結合阻害
- ③ エストロゲンレセプターの量的変化
- ④ エストロゲンレセプターのホモ二量体形成阻害
- ⑤ エストロゲン応答配列への結合阻害
- ⑥ 転写共役因子、基本転写因子への量的変化・質的变化の影響
- ⑦ メチル化等の DNA への影響 等が検出可能と考えられる (図 1)。

B1.1 細胞株

IF 磁界ばく露によるエストロゲンの転写系の応答性の評価には、レポータージーンアッセイを用いた。使用細胞は、エストロゲンレセプターが高発現しているヒト乳癌由来 MCF-7 細胞にエストロゲン応答配列 (-AGGTCACAGTGACCT-) を tandem に 3

回繋ぎ、その下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ pTransLucent ベクターを形質導入した株を用いた。培養条件は、MEM 非必須アミノ酸、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、ヒト組み換え型インスリン、活性炭処理済みウシ胎児血清を含むフェノールレッド不含 MEM 培地で 37℃、5% CO₂、湿度 100% で 3 日間培養した後、同培地中で以下に示す各種処理を 24 時間行った。

B1.2 MCF-7 細胞における IF 磁界ばく露によるエストロゲン応答性の変化

凍結保存した細胞を、インシュリンを添加した MEM 培地にて前培養し、一度植え継いだ細胞を試験細胞とした。

前培養後の試験細胞を試験細胞を活性炭処理を行ったウシ胎児血清を含むフェノールレッド不含 MEM 培地に懸濁したのち、90mm の滅菌済みプラスチックシャーレ 3 枚に分注し、それぞれ IF 磁界ばく露用、疑似ばく露用、対照とする通常の CO₂ 培養器用として、3 箇所 3 日間培養し、磁界ばく露群では IF 磁界をばく露しながら内在性のエストロゲンを枯渇させた。3 日間培養後、それぞれの細胞を回収し、それぞれ 6well のアッセイプレートに 6.0-7.0 × 10⁶ cells/well で播種後、半数の well には DMSO で溶解したエストラジオール (E2) を終濃度 10⁻¹¹ mol/L となるように 30 μL 添加し、残りの 3well にはエストラジオール溶解に使用した DMSO のみを 30 μL 加えた。作成したプレートは、再度それぞれの条件 (IF 磁界ばく露、疑似ばく露、対照) 下で 24 時間培養後、それぞれの試験プレートを取り出し、培地を吸引した後、ルシフェラーゼ活性測定試験まで氷上に保持した。ル

シフェラーゼ活性測定では、界面活性剤を含む 1 倍濃度の Cell Culture Lysis Reagent [CCLR : 組成 ; 25mM Tris(pH7.8) -H₃PO₄、2mM EDTA、2mM DTT、10% グリセロール、1% Triton X-100]で細胞を溶解し、遠心分離上清を細胞粗抽出液とし、ルシフェラーゼ活性測定及びタンパク質定量に用いる試料とした。ルシフェラーゼの活性測定には Luciferase Assay System (Promega) を用い、ルシフェリン-ルシフェラーゼによる化学発光の発光量を測定した。タンパク質定量には Lowry 法を用い、DC Protein Assay Kit (Bio-Rad)を用いて定量した。比活性は次式により求めた。

$$\text{比活性} \left(\frac{\text{RLU}}{\text{mg protein}} \right) = \frac{\text{試料発光量} \times 50 \left(\frac{\text{RLU}}{\text{ml}} \right)}{\text{タンパク濃度} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

B2 DNA メチル化に対する磁界ばく露の影響評価

IF 磁界に関しては、安全性評価に関する研究報告が極めて限られるため、有害性の評価の中でも特に管理上の大きな要素となる発がん性の有無を調査することは重要である。そのため、本研究ではこれまでに小核、遺伝子変異を対象として、変異原性の評価を行った。その結果、遺伝子修復能力の異なる培養細胞を用いた増殖に対する影響、培養細胞を用いた小核試験ならびに *HPRT* 遺伝子変異試験いずれにおいても、磁界ばく露による影響を認めなかった。し

たがって、一般的な安全性評価における遺伝毒性は認められないと考えられる。ただし、近年のがんの研究においては、直接的な遺伝子の DNA 配列の変化、欠失に加え、遺伝子の制御部位のメチル化やタンパク質をコードしない種々のノンコーディング RNA が大きな要因となっていることも示され、機能性遺伝子の構造や配列などと生物の関係を研究するジェネティクスに対し、個体内での後天的な修飾等による変化を研究するためエピジェネティクスと呼ばれ、様々な研究が進められている。

本節では、DNA メチル化に着目し、ゲノム中のメチル化度について評価を行った。

B2.1 細胞株

DNA メチル化の評価には、エストロゲン応答の評価に用いたヒト乳がん由来細胞の MCF-7 細胞を用いた。

B2.2 IF 磁界へのばく露

DNA メチル化は、メチル化に感受性のある制限酵素切断配列を持つ DNA 配列を対象とする遺伝子部位から選び、それを増幅することで評価する。本研究では、ヒトの遺伝子データベースより、発がんに関与する、がん抑制遺伝子 p53 およびがんの悪性化に関与することが明らかとなってきた細胞接着因子の一つである e-cadherin を評価対象として選んだ。それぞれの遺伝子発現制御領域を検討し、それぞれに 319bp の DNA 配列を対象として選定した。この配列の中には、メチル化感受性の制限酵素で

表 1 本研究で設計したプライマー

| 対象遺伝子 | | 配列 | 増幅長(bp) |
|------------|-----|----------------------|---------|
| p53 | fwd | TATCTACGGCACCAGGTCGG | 319 |
| | rev | CCAATCCAGGGAAGCGTGTC | |
| e-cadherin | fwd | GCCCTTTCTGATCCCAGGTC | 319 |
| | rev | GCAAGCTCACAGGTGCTTTG | |

ある hpaII により切断される箇所がそれぞれ 2 箇所 (p53)、4 箇所 (e-cadherin) 存在する。この配列に基づき、DNA を増幅するためのプライマーを表 1 の通り設計・製作した。

前培養した細胞を 2 枚の 96 穴の培養プレートに、8 細胞/ml となるように調整した細胞液を 200 μ l ずつ分注した。これにより、各培養穴には平均して 1.6 個、実際にはおよそ 0~2 個の細胞が存在する。この試験プレートを作成後、1 枚ずつばく露と疑似ばく露に分け、2 週間それぞれの環境下で培養し、増殖させた。2 週間後、一細胞から増殖した細胞の塊を、それぞれ独立した細胞系統とし、各々の全 DNA をスピニング型 DNA 抽出キット ((株) グライナー) で抽出した。

OneStep qMethyl Kit (Zymo Research 社) により、まず DNA メチル化に感受性のある制限酵素を用いて全 DNA を切断する。この際、酵素の切断対象として認識される DNA 配列がメチル化されている場合には、酵素による切断が起こらないため、DNA 配列は保存されるが、メチル化されていなければ小さい断片となる。この処理の後、表 1 に示したプライマーを用いた PCR 反応 (対象とした DNA 部位の増幅反応) を行うと小さな断片では増幅が起こらないため、個々の細胞塊の中の対象とした DNA 配列中のメチル化度に応じて増幅量が変わる (図 2)。この増幅量の違いを利用して、メチル化の有無を調べた。具体的には、下記の計算式に基づき、制限酵素を入れない対照サンプルと制限酵素による切断処理を行ったサン

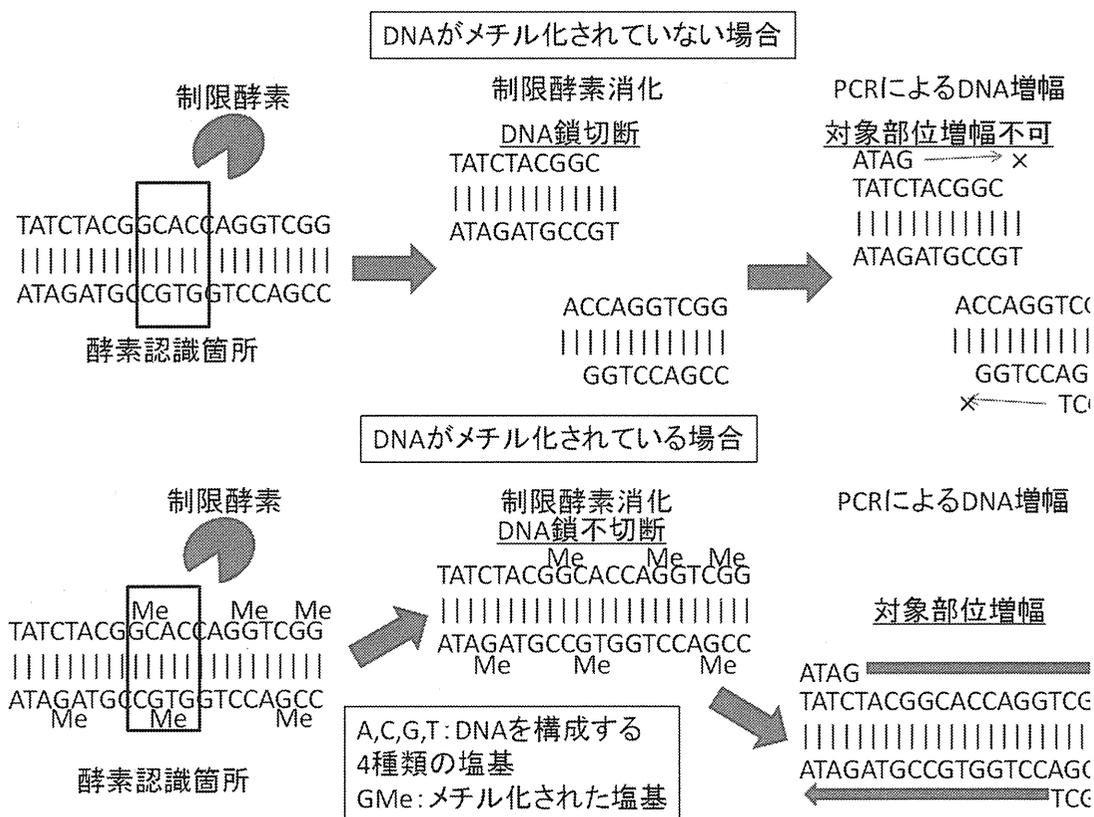


図2 DNAメチル化度の検出原理

プルの PCR 増幅度 (Ct 値=対数的に増幅するある一定の数値に達する PCR の繰り返し回数) の差をもとに、各細胞塊のメチル化度を算出した。

得られたメチル化度データに対して、今回設計したプライマーによる DNA の増幅領域では、メチル化を検討するそれぞれの DNA 断片にあるメチル化感受性制限酵素の認識配列が p53 では 2 箇所 (実際には他の酵素もあるため 3 箇所以上)、e-cadherin では 4 箇所以上 (実際には他の酵素もあるため 5 箇所以上) あるため、メチル化度 20% 未満を低メチル化、20%以上 50%以下を中メチル化、50%より高い場合を高メチル化した細胞塊と分類し、その出現頻度を χ^2 検定にて統計解析した。

B3 催奇形性マーカーによる分化中の細胞への影響評価

中間周波数磁界については、WHO も指摘している通り研究例自体が少なく、健康リスクを評価するためには幅広い知見が必要とされている。特に本研究で対象とする IH 調理器や鉄道の主インバーターなどに起因する 20kHz 帯の正弦波磁界の場合、調理作業に起因する妊産婦のばく露なども考慮すべきである。本研究では動物実験班によ

り中間周波磁界の催奇形性が評価されているところであるが、異なる試験系でも評価を行うことにより、より信頼性の高い結果が得られると考えられる。そのため、本節では、催奇形性物質処理により特異的に発現が低下する事が報告されている催奇形性マーカーの候補遺伝子および既知の心筋分化マーカーに着目し、分化中のマウス ES 細胞中の前記マーカー遺伝子の発現を対象として、IF 磁界ばく露による影響評価を行った。

B3.1 細胞株

細胞株として、マウス由来の ES 細胞 D3 株 (ATCC CRL-1934) を用いた。本細胞を Geltrex マトリックス (Life Technologies 社) でコーティングしたフラスコ中で、15%KSR (Life Technologies 社) および mLIF を含む Knockout DMEM (Life Technologies 社) 培地で 37°C、5%CO₂ 条件下でフィーダーレスに馴化し、試験に用いた。試験に用いる際の前培養は、同じ培養液を用いて行った。一方、ばく露試験には FBS を 20% 含む DMEM 培地を用いた。

B.3.2 胚様体細胞のばく露試験

細胞の濃度が 3.75×10^3 cells/ml となるよう

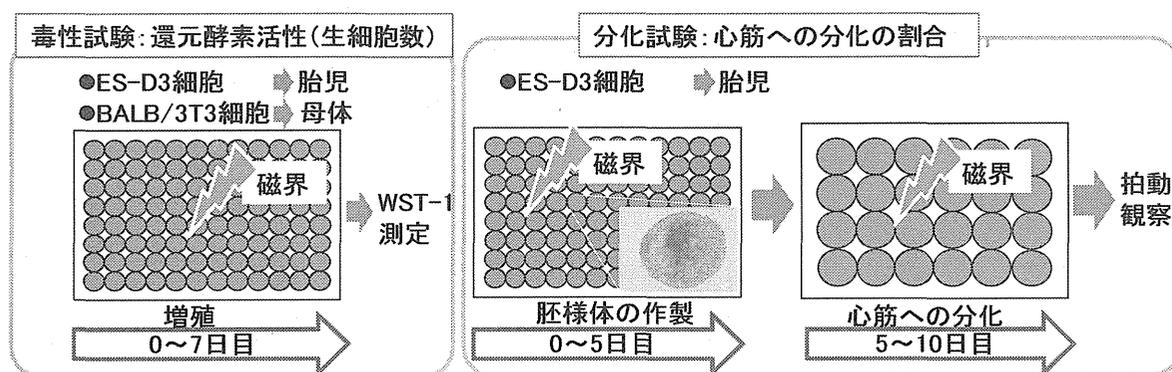


図3 胚様体のIF磁界ばく露

に細胞懸濁液を調整し、丸底型 96 穴細胞培養プレート（リピジュアコートプレート、Thermo Scientific 社）に 200 μ l/well（750cells/well）ずつ分注した。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下で 5 日間培養を行い、胚様体を形成させた。数日ごとに培地を交換し、培養 5 日目に 1 ウェルに 1 つの胚様体が入るよう、ゼラチンコートした 24 穴細胞培養プレートに胚様体を移し、さらに 5 日間培養を行った。培養期間 10 日の間、21kHz、0 または 3.9mT の IF 磁界に連続ばく露した。この後、胚様体を回収した。陽性コントロールには、5-Fluorouracil を 0.05 μ g/ml 含む培地を用いた（図 3）。

B3.3 催奇形性マーカーによる検討

胚様体形成開始から 10 日目に、各試験プレート一枚、24well 相当の胚様体を混合して 1 群とし、3 群以上の細胞を回収した。回収した細胞は RNA later 液に懸濁して -80 $^{\circ}$ C にてトータル RNA 抽出まで保存した。

トータル RNA 抽出には Fast Pure RNA(Takara)または Isogen II(ニッポンジーン)を用い、凍結保存したサンプルを融解後、遠心分離して得られた細胞沈査から、トータル RNA 抽出・精製を行った。抽出した RNA は、ナノドロップ及びバイオアナライザーにより、純度と濃度、及び電気泳動パターンによる分解状態の評価を行った。

正常に抽出できたトータル RNA を用いて、ばく露群及び非ばく露群についてリアルタイム PCR によりマーカー遺伝子を解析した。解析対象は、Xrip1、Myl-7、Smyd1、Colla2、Hba-x、Myl-2、Cardiac actin の 7 種とし、それぞれの遺伝子に対して新しく設計・製作したプライマーを用いて qPCR を行った。qPCR データ(Ct 値)はマ

ウス β アクチン遺伝子により補正して発現量を比較した。

C. 研究結果

C1 内分泌かく乱性の評価

磁束密度 0 (疑似ばく露), 3.9mT の IF-MF による 4 日間のばく露を 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、湿度 100% のインキュベータ内で行った (n=3 以上)。図 4 にそれぞれのばく露条件における IF 磁界ばく露によるルシフェラーゼ遺伝子の発現を測定した結果を示す。0mT ばく露の結果では、対照群、ばく露群、疑似ばく露群のいずれの間にも 2 標本 t 検定による統計的な有意差はなかった。したがって、この試験系を用いた実験を行う上で、磁界ばく露以外の条件が同等であることが示された。また、実際に磁界のばく露を行った結果、エストロゲンの有無に関わらず、IF 磁界ばく露群、疑似ばく露群間で、最大 3.9mT までのいずれのばく露条件であっても、有意差は認められなかった。有意水準は 5% で検定した。

これらの結果、および前年度までの結果と合わせ、本実験系により影響を検出することが可能であると考えられる、図 7 に示した 7 つの要因 (① 細胞へのエストロゲンの取り込み阻害 ② エストロゲンレセプターへの結合阻害 ③ エストロゲンレセプターの量的変化 ④ エストロゲンレセプターのホモ二量体形成阻害 ⑤ エストロゲン応答配列への結合阻害 ⑥ 転写共役因子、基本転写因子への量的変化・質的变化の影響 ⑦ メチル化等の DNA への影響) のいずれも、IF 磁界の影響を受ける可能性は低いことが示された。すなわち、IF 磁界のばく露により、① エストロゲンを介する遺伝子発現系の遺伝子発現は誘導されない、② エス

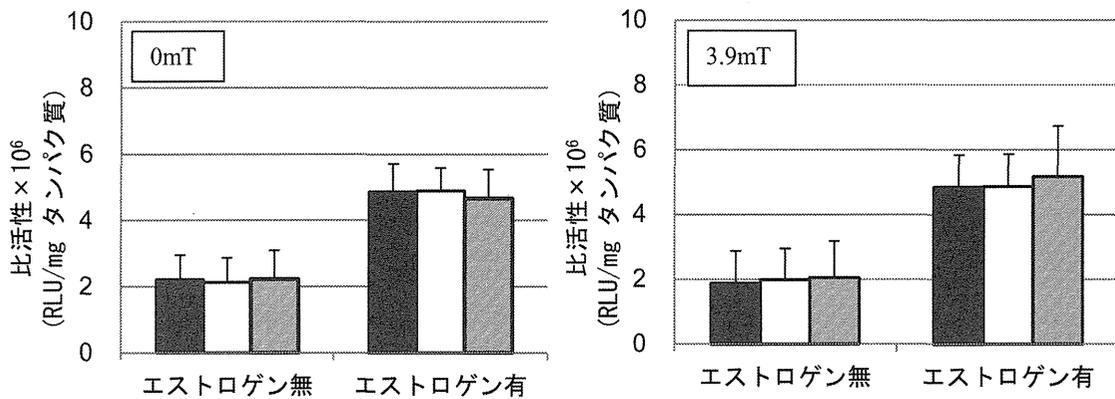


図4 3.9mTのIF磁界への4日間のばく露下でのエストロゲン応答性のルシフェラーゼ遺伝子の発現

■ : IF磁界ばく露群 □ : 疑似ばく露群 ▨ : 対照群

トロゲンによる遺伝子発現が起こっている状態への影響を与えないことが示された。

C2 DNAのメチル化に対する影響評価

IF磁界(3.9mT)ばく露下または疑似ばく露下で2週間培養した細胞のp53およびe-cadherin遺伝子の発現制御領域におけるメチル化度別の割合を図5に示す。全体的にe-cadherinと比べp53の遺伝子発現でのメチル化度が高い傾向にあるものの、同一遺

伝子におけるIF磁界ばく露群と疑似ばく露群の間には、統計的に有意な差は認められなかった。したがって、IF磁界は、21kHz、3.9mTへの2週間という長期ばく露によっても、遺伝子の後天的修飾(DNAのメチル化)に影響を及ぼさないと考えられる。

C3 催奇形性マーカー遺伝子の発現による影響評価

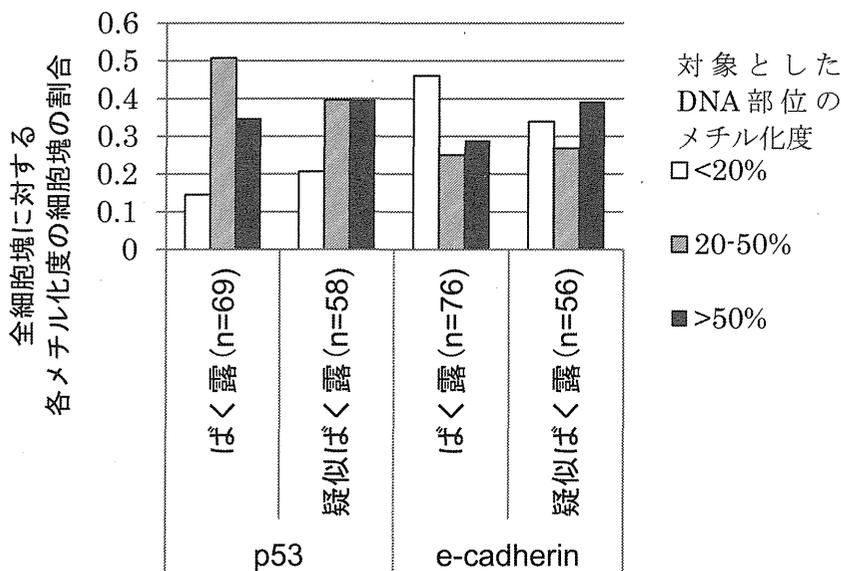


図5 DNAのメチル化度の評価

催奇形性物質処理により特異的に発現が変化する事が知られる遺伝子および典型的な心筋分化マーカーを対象として、IF磁界ばく露による影響を分化中のmES細胞を用いて行った。その結果、検討した全ての遺伝子について、IF磁界ばく露による有