

齧歯類を用いた *in vivo* 中間周波磁界曝露のための新規曝露装置の開発

大谷真¹, 牛山明¹, 海野愛子¹, 平井佑樹², 鈴木敬久², 和田圭二²,
 樺田尚樹¹, 大久保千代次³

¹国立保健医療科学院 生活環境部

²首都大学東京 理工学研究科

³電磁界情報センター

Development of novel *in vivo* exposure apparatus for intermediate frequency magnetic field with rodents

Shin Ohtani¹, Akira Ushiyama¹, Aiko Unno¹, Yuki Hira², Yukihisa Suzuki², Keiji Wada²,
 Naoki Kunugita¹, Chiyoji Ohkubo³

¹Department of Environmental Health, National Institute of Public Health

²Graduate School of Social Sciences, Tokyo Metropolitan University

³Japan EMF Information Center

Abstract: Induction heating (IH) cooking hob generates intermediate frequency (IF) magnetic field (MF). The safety of IH cooking hob is in current topics in Japan. Due to the lack of the evidences, WHO recommended to study the biological effects of IF-MF exposure in the environmental health criteria monograph (No.238, 2007). We, therefore, intended to develop the exposure apparatus, which was able to generate high flux density and uniform IF-MF to examine the biological effects *in vivo*. The computer simulation provided us the dosimetry as induced current density and induced electric field. It also appeared that water-cooling circuit was effective to avoid spatiotemporal thermal elevation derived from coil. The maximum magnetic flux density of this apparatus (3.8mT) was more than 141 times higher than that of the reference level to general public of ICNIRP guideline (27 μ T). In conclusion, this apparatus was appropriate to elucidate the biological effects of IF-MF exposure *in vivo*.

1. Introduction

Although the use of IH cooking hob in Japan is increasing, there exist the public concerns on health effect about the magnetic field from IH cooking hob, which generates intermediate frequency (IF; from 300Hz to 10MHz) magnetic field (MF). Due to the lack of the evidences, WHO recommended to study the effects to biological system by IF-MF in the Environmental Health Criteria monograph (No.238, 2007). We, therefore, intended to develop the exposure apparatus which generated high magnetic flux density and uniform IF-MF to examine the biological effects *in vivo*. On the other hand, it was necessary to avoid the heats derived from the coil, the power supply, and the fan when this apparatus was operated. In this study, we developed the novel *in vivo* exposure apparatus for IF-MF, focusing the dosimetry for rats with computer simulation and the structure with negligible change of temperature. Our study-goal is elucidating the biological effects of IF-MF exposure *in vivo*.

2. Materials and Methods

We made a coil as shown in Figure 1 whose inner space is 23 x 23 x 40 cm. This coil was able to be set both vertical (Figure 1-a) and horizontal (Figure 1-b) direction. The apparatus was capable of generating IF-MF at 21 kHz (frequency) and up to 3.8 mT (magnetic flux density). Induced current densities and electric fields within rats were calculated by the computer simulation for two each direction (Figure 1-c,d,e). Impedance method was applied to calculate the induced current densities and induced electric fields. To avoid the temperature increase by

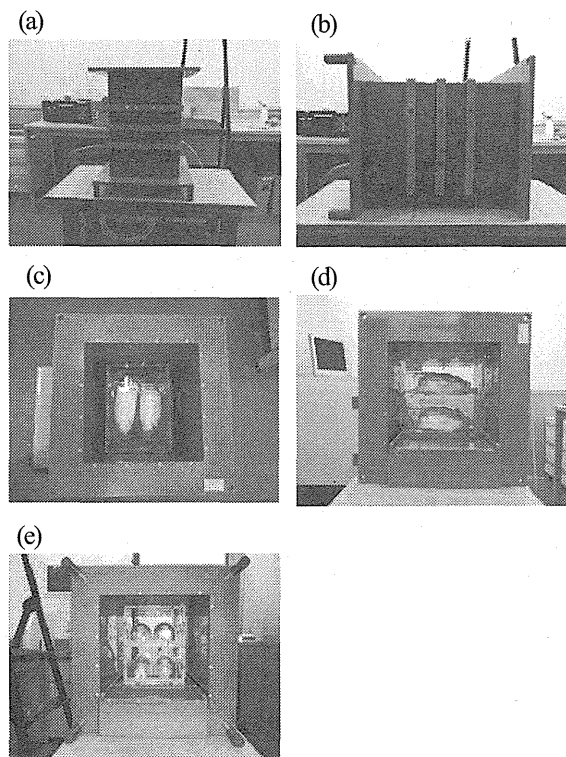


Figure 1. *In vivo* exposure apparatus of (a) vertical and (b) horizontal direction for IF-MF, and three axes of placement of rats: (c) back-abdominal, (d) right-left, and (e) head-tails.

the heated coil, we prepared the water-cooling system as shown in Figure 2-c. The water in the loop was circulated by cooling pump at 20 °C. During the exposure period for 60 minutes at 3.8mT, the inside temperature of the coil was measured by the fiber-optic thermometer, while the surface temperature on the coil was measured by the infrared camera.

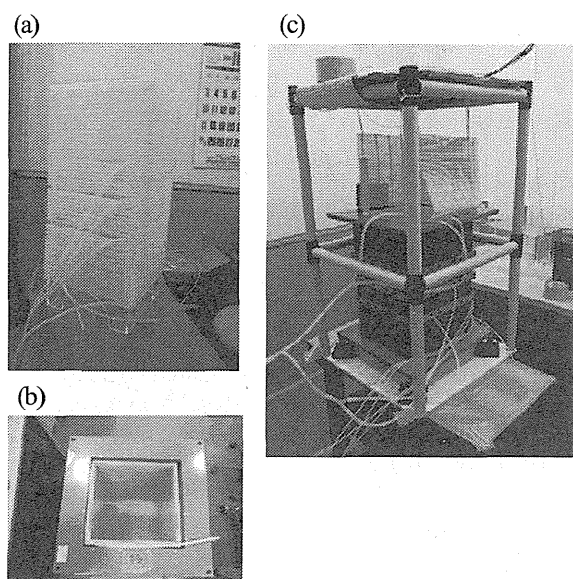


Figure2. Experimental setup of water-cooling. (a) Water loop piping; (b) The coil with water loop; (c) Water-cooling system.

3. Results

Homogeneous IF-MF ($\leq \pm 5\%$ range) was generated in the space of 15 x 15 x 15 cm inside of the coil. When the rats were located in three positions as shown in Figure 1-c, d and e, induced current densities and induced electric fields within rats were shown in Table1. Max induced current density were 9.64 [A/m²] in Figure 1-c, 6.44 [A/m²] in Figure 1-d, and 5.75 [A/m²] in Figure 1-e, respectively. When the apparatus was at work, the surface temperature of coil increased by 25 °C during the exposure for 60 min, as shown in Figure 3. This results made us to control the inside temperatures of the coil. At first, the inside temperature increased by 8 °C without any countermeasures. Secondly, the temperature increased by about 3 °C through the use of cooling with fan only. Finally, the temperature was within the range of room temperature variation (24±1 °C) with the water cooling system.

4. Conclusions

The apparatus, we reported here, was able to generate high flux density of IF-MF to rodents uniformly. The maximum magnetic flux density of this apparatus (3.8mT) was more than 141 times higher than that of the reference level to general public of ICNIRP guideline2010 (27μT). The computer simulation for rat-body provided us the dosimetry as induced current density and induced electric field. It also appeared that water-cooling circuit was effective to avoid thermal elevation derived from coil.

In conclusion, this apparatus was appropriate to elucidate the biological effects of IF-MF exposure *in vivo*. We are planning to examine the haematological and immunological effects by using this apparatus.

Table1. Induced current density and Induced electric field .

Direction of MF	Induced current density [A/m ²]		Induced electric field [V/m]	
	Max.	Mean	Max.	Mean
Back-abdominal (Figure 1-c)	9.64	0.57	34.29	4.71
Right-left (Figure 1-d)	6.44	0.38	41.71	3.16
Head-tail (Figure 1-e)	5.75	0.31	22.81	2.68

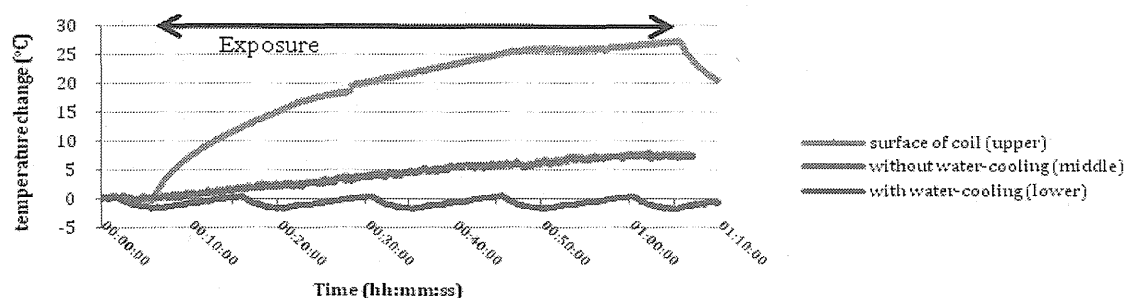


Figure3. Profiles of surface and inside temperature of the coil.

第50回日本生体医工学会大会抄録集

ラットにおける中間周波磁界の全身曝露影響に関する研究

牛山明¹, 海野愛子¹, 大谷真¹, 鈴木敬久²,和田圭二², 樺田尚樹¹, 大久保千代次³¹ 国立保健医療科学院 生活環境部² 首都大学東京 大学院理工学研究科³ 電磁界情報センター**Study on The Biological Effects of Whole Body Exposure to The Intermediate Frequency Magnetic Field**Akira Ushiyama¹, Aiko Unno¹, Shin Ohtani¹, Yukihisa Suzuki², Keiji Wada², Naoki Kunugita¹,
Chiyoji Ohkubo³¹Department of Environmental Health, National Institute of Public Health²Graduate School of Social Sciences, Tokyo Metropolitan University³Japan EMF Information Center

Abstract: There exists the public concerns on health effect about the magnetic field from IH cooking hob, which generates intermediate frequency (IF) magnetic field (MF). Due to the lack of the evidences of biological effects, we explored the effects of IF-MF to the experimental animals. Male Sprague-Dawley rats (6-7 week old) were divided into 4 groups; cage-control, sham, 2 mT and 3.8 mT exposure group, respectively. IF-MF at 21 kHz were exposed to the animal fixed in the acrylic holder. Exposure was done for 1hour/day and three consecutive days. At the 4th day, the whole blood was collected and sent to the analysis. Biochemical and the hematological parameters in the blood were analyzed. Results indicate that there is no effect to these parameters, even if the high magnetic flux density (3.8 mT; 141 times higher than the reference level to general public of ICNIRP guideline 2010) was exposed to the animals.

Keywords: Magnetic field, IH cooking hob, biological effect

1. Introduction

It is one of public concerns that the use of IH cooking hob may affect the human health. IH cooking hob emit 20-50 kHz magnetic fields, which called intermediate frequency (IF) range. Although there are many studies were reported on the biological effects of electromagnetic fields of extremely low frequency and radio frequency, there were very few studies regarding IF. Therefore, WHO recommended to study the biological effects of intermediate frequency magnetic field (IF-MF) exposure in the environmental health criteria monograph (No.238, 2007)

In this study, we explored the effects of IF-MF to the experimental animals by using the exposure apparatus which emit high intensity of IF-MF at 21 kHz (Ohtani *et al.*). After the IF-MF exposure to rats, we explored the biochemical and the hematological parameters of the peripheral blood.

2. Materials and Methods*Animals and IF-MF exposure*

Male Sprague-Dawley rats (6-7 week old, Japan SLC Inc.) were used. We made a coil as shown in Figure 1, whose inner space was 23 x 23 x 40 cm (Ohtani *et al.*). The apparatus was able to generate IF-MF at 21 kHz (frequency) and up to 3.8 mT (magnetic flux density). Uniform magnetic intensity

was obtained in an area of 15 x 15 x 15 cm inside of the coil. To avoid the thermal effect from the coil, we use water-loop cooling circuit during the IF-MF exposure. According to the dosimetry calculation, mean induced electric density were 4.7 [V/m], which is corresponding to 1.7 fold compared to basic restriction to the general public of ICNIRP guideline which revised in 2010.

Rats were divided into 4 groups; cage-control, sham, 2 mT and 3.8 mT exposure group (n=11-14). IF-MF at 21 kHz were exposed to the animal fixed in the acrylic holder (Natsume Seisakusho Co. Ltd.). Exposure to IF-MF was done for 1hour/day and three consecutive days. On the 4th day of experiment, the whole blood was collected and sent to the analysis.

Analysis

Biochemical and the hematological parameters in the blood were analyzed. For the biochemical analysis, the biochemical analyzer (VetScan VS2, Avaxis Inc., USA) was used. By using the analyzer, 14 parameters can be analyzed. On the other, for hematological analysis, a fully-automated 5-part differential cell counter (VetScan HM5, Avaxis Inc., USA) was used. By using the counter, 22 parameters can be measured. One-way ANOVA was applied for statistical analysis by using SPSS software (ver18, Japan IBM Inc.).

Ethical approval of animal study

This study was approved by the committee of

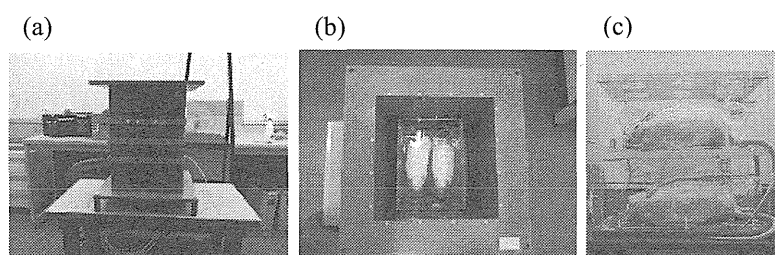


Figure 1. Vertical (a), and horizontal (b) views of *in vivo* IF-MF exposure apparatus. Rats were fixed in the acrylic holders (c) and located inside of the coil during the IF-MF exposure.

Table 1 Comparison of biochemical data of peripheral blood

	(unit)	cage control (n=14)	sham (n=12)	2 mT (n=12)	3.8 mT (n=11)
Albumin	g/dL	4.54 ± 0.15	4.85 ± 0.27*	4.61 ± 0.19	4.78 ± 0.19*
Total protein	g/dL	5.75 ± 0.23	6.04 ± 0.30	5.76 ± 0.23	6.03 ± 0.25 *
Total globulin	g/dL	1.24 ± 0.17	1.19 ± 0.15	1.14 ± 0.12	1.24 ± 0.12
ALP	U/L	554.9 ± 87.4	566.1 ± 108.5	612.9 ± 96.8	505.9 ± 103.1
ALT	U/L	56.5 ± 10.11	55.5 ± 8.82	61.2 ± 8.3	51.6 ± 6.2
Amylase	U/L	938.1 ± 85.7	940.3 ± 109.7	882.8 ± 61.2	906.2 ± 100.9
TBIL	mg/dL	0.19 ± 0.27	0.2 ± 0	0.2 ± 0	0.19 ± 0.03
BUN	mg/dL	18.7 ± 3.34	19.1 ± 2.8	19.3 ± 3.4	20 ± 3.8
Phosphate	mg/dL	10.08 ± 0.66	9.77 ± 0.93	10.15 ± 0.64	9.72 ± 0.79
Creatinine	mg/dL	0.3 ± 0.88	0.29 ± 0.10	0.28 ± 0.06	0.23 ± 0.05
Glucose	mg/dL	283.4 ± 47.2	232 ± 25.6*	254.3 ± 34.5	242.9 ± 50.2 *
Ca ⁺⁺	mg/dL	11.2 ± 0.29	11.1 ± 1.66	10.7 ± 1.92	11.6 ± 0.35
Na ⁺	mmol/L	139.1 ± 1.83	141.3 ± 2.53	140.5 ± 4.50	140.2 ± 1.60
K ⁺	mmol/L	6.06 ± 0.55	6.13 ± 0.51	5.95 ± 0.46	5.9 ± 0.49

ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine aminotransferase, TBIL: bilirubin, BUN: blood urea nitrogen

* $p < 0.05$ (vs cage control group)

animal experiment in National Institute of Public Health.

3. Results and discussion

The data showed no difference on body weight among the groups. Biochemical data of peripheral blood was shown in Table 1. Significant differences compared to that of cage control group were observed in total protein and glucose level. However, these differences were not due to the IF-EMF exposure, because they were not dose-dependent effects. Hematological data did not show any significant differences (data not shown).

4. Conclusion

In this study, we reported the biochemical and the hematological effects of 21 kHz IF-MF exposure at the high magnetic flux density to rat. Our experimental condition was maximum 3.8 mT, which is 141 times higher than the reference level to general public of ICNIRP guideline. Even under this extremely high intensity of magnetic field, the parameters did not affect by the exposure. From these results, we concluded that IF-MF does not show any

toxicity to peripheral blood under this experimental condition. However, the exposure protocol in this study was limited only 3 consecutive days and total 3 hours, therefore, further study will be needed to provide more information.

5. Reference

Ohtani S, Ushiyama A, Unno A, Hirai Y, Suzuki Y, Wada K, Kunugita N, Ohkubo C. Development of novel *in vivo* exposure apparatus for intermediate frequency magnetic field with rodents. The 50th Conference of Japanese Society of Medical and Biological Engineering, April. 2011, Tokyo (*This conference*).

6. Acknowledgement

This work was supported by The Ministry of Health Labour and Welfare, Health Labour Science Research Grant.

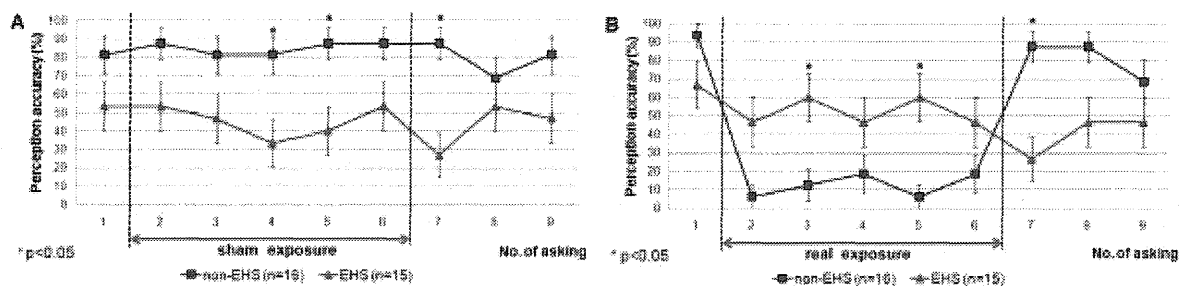


Figure 2.

Perception accuracy (%) of nine inquiries in the EHS and non-EHS groups for sham (A) and real (B) exposure sessions.

PA-65 [10:30]

The effects of 21 kHz intermediate frequency magnetic fields on blood properties and immune systems in rats

Akira Ushiyama¹, Aiko Unno¹, Shin Ohtani¹, Yukihiisa Suzuki², Keiji Wada², Naoki Kunugita¹ & Chiyoji Ohkubo³

¹Department of Environmental Health, National Institute of Public Health, Wako, Japan, 351-0197

²Graduate School of Social Sciences, Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Japan, 192-0397

³Japan EMF Information Center, Minato-ku, Japan, 105-0014

Due to the lack of the science based evidences, we explored the biological effects of intermediate frequency magnetic fields (IF-MF) to rats. IF-MF at 21 kHz was exposed to the animals fixed in acrylic holder. Following the short- or long-term exposure, biochemical, hematological parameters and some of immunological function were analyzed. Results indicate that IF-MF does not affect these parameters, even high magnetic flux density (3.8 mT; 141 times higher than the reference level to general public of ICNIRP guideline 2010) was exposed to the animals.

Long Abstract

Introduction

The use of induction heating (IH) cooking hob makes our life more convenient. On the other hand, there exist public concerns on possible health effect about the intermediate frequency magnetic fields (IF-MF) from IH cooking hob. Although there are many studies on the biological effects of electromagnetic fields exposure to extremely low frequency and radio frequency, there are very few studies on IF-MF. Therefore, WHO recommended to study the biological effects of IF-MF exposure in the environmental health criteria monograph No.238 [1]. In this study, we explored the effects of IF-MF to the experimental animals by using newly developed exposure apparatus which emit high intensity of IF-MF at 21 kHz [2]. Following the IF-MF exposure to rats, we analyzed the biochemical and the hematological parameters of the peripheral blood and several immune functions.

Materials and Methods

Animals and IF-MF exposure

Male Sprague-Dawley rats (Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan) were used. For IF-MF exposure, we used an apparatus which we originally developed [2]. The apparatus was able to generate IF-MF at 21 kHz and up to 3.8 mT. Uniform magnetic intensity was obtained in a space of 15 x 15 x 15 cm inside of the coil. To avoid thermal effect from the coil, we employed water-loop cooling circuit during the IF-MF exposure. Dosimetry calculation showed that mean induced electric density were 4.7 [V/m], which is corresponding to 1.7 fold compared to basic restriction to the general public of ICNIRP guideline revised in 2010.

IF-MF at 21 kHz was exposed to the animals under fixed condition in an acrylic holder (Natsume Seisakusho Co. Ltd.). For short term exposure, rats (6-7 week old) were divided into 4 groups; cage-control, sham, 2 mT and 3.8 mT exposure group (n=11-14, each). Exposure to IF-MF was done at 1 hour/day for 3 consecutive days. For long term exposure, rats (4-5 week old) were divided into 3 groups; cage-control, sham and 3.8 mT exposure group (n=11-12, each). Exposure to IF-MF was done at 1 hour/day for 14 consecutive days (2 weeks). On the next day of the last exposure, the blood and spleen was collected and sent to the analysis. This animal study was approved by the committee of animal experiment in National Institute of Public Health.

Analysis

Biochemical and the hematological parameters in the blood were analyzed. For the biochemical analysis, 14 parameters were analyzed using a biochemical analyzer (VetScan VS2, Avaxis Inc., USA). For hematological analysis, 22 parameters were measured by use of a fully-automated 5-part differential cell counter (VetScan HM5, Avaxis Inc., USA). For the cytotoxic assay, natural killer cell fraction prepared from spleen was used as an effector cell. Cultured YAC-1 cell (mice lymphoma) was used as a target cell. The cytotoxic activity was assayed by using CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega Co., USA). Experimental procedure was basically followed by the standard protocol. For the phagocytotic assay, granulocytes were fractionated from peripheral blood by density separation method using percoll (GE Healthcare Bioscience Co., USA). Granulocytes were co-incubated with FITC-conjugated polystyrene beads for 1 hour at 37 °C. After washing granulocytes, cells were analyzed by flowcytometer (Cytomics FC500, Beckman Coulter, Inc., USA). One-way ANOVA was applied for statistical analysis by using SPSS software.

Results

Biochemical data Significant differences were observed in total protein concentration and glucose level for short term exposure, in amylase activity and glucose level for long term exposure, respectively. However, these differences do not attribute to the intensity of IF-MF exposure because the data did not show dose-dependent relationship. Hematological data did not show any significant differences. Under short term exposure condition, immune function such as cytotoxic activity and phagocytotic activity did not show

any difference among the groups. The data of immunological function from long term exposure condition are currently under analysis.

Conclusions

In this study, we reported the biochemical, hematological and immunological effects of 21 kHz IF-MF exposure to rats' whole body. From the results, we could conclude that IF-MF did not show any toxicity under this experimental condition so far. The final data will be presented at the BEMS meeting.

The magnetic density we was maximum 3.8 mT, which is 141 times higher than the reference level to general public of ICNIRP guideline (2010). However, the exposure protocol in this study was limited only 3 consecutive days (total 3 hours) for short term and 2 weeks (total 14 hours) for long term, therefore, further study will be needed.

Acknowledgments

This work was supported by Health Labour Science Research Grant, The Ministry of Health Labour and Welfare, Japan.

References

- [1] WHO Environmental Health Criteria 238 (2007): Extremely Low Frequency (ELF) Fields. WHO, Geneva, Switzerland
- [2] Ohtani S, Ushiyama A, Unno A, Hirai Y, Suzuki Y, Wada K, Kunugita N, Ohkubo C. Development of novel in vivo exposure apparatus for intermediate frequency magnetic field. 10th International Conference European Bioelectromagnetics Society, Rome, Feb.21-24, 2011, proceedings.

PA-67 [10:30]

CCDF Model for Predicting the Dosimetric Probe Response to Complex Modulation Communication Signals

Jagadish Nadakuduti¹, Marcel Fehr², Mark Douglas¹, Sven Kuehn¹, Katja Pokovic² & Niels Kuster¹

¹ITIS Foundation, Zurich, Switzerland, 8004

²Schmid & Partner Engineering AG, Zurich, Switzerland, 8004

A model and its limitations are presented for the estimation of non-linearity errors in diode-loaded electromagnetic field probes when measuring complex modulation communication signals. A numerical model was developed and validated to predict the response of diode detector for continuous waveform signals, and a numerical analysis was performed using the Complementary Cumulative Distribution Function of various communication signals.

Long Abstract

Introduction

Dosimetric and electromagnetic field probes are used to assess the Specific Absorption Rate (SAR), electric- and magnetic-fields in the vicinity of a wireless transmitting devices to demonstrate compliance with safety standards [1,2] and compatibility with hearing aids [3]. These probes employ an electrically small dipole or a loop loaded with a diode detector to induce a voltage that is proportional to the incident electric and magnetic fields, respectively. These probes are typically calibrated over a broad dynamic range using continuous waveform (CW) signals to compensate for the limited square-law operation region of the diode detector. In this study, we have performed numerical and experimental analysis to demonstrate the non-linearity errors arising from the measurement of complex modulation signals using CW-calibrated probes.

Methodology

Kanda [4] performed analytical and numerical analysis of an electrically short dipole loaded with a diode detector in the presence of an incident CW signal. He derived the closed-form expressions for response of diode detector as a function of incident signal showing the transition from square-law detection region to linear detection region. We have developed a numerical model based on this analytical evaluation to predict the diode response to a given incident signal on the dipole. This numerical model was validated using the theoretical response as well as using measurements performed on the dosimetric probe when irradiated with CW signal.

Kanda's analysis on CW signals was extended to CDMA IS-95 signals by DiNallo and Faraone [5]. They demonstrated overestimation of measured SAR using dosimetric probes especially when operating the diode detector near the saturation region. They studied the modulation and bandwidth details and the stochastic properties of the bit stream, considering effect of signal-shaping filters. Such detailed analysis is necessary to quantify the time-variation of complex modulation waveforms. Since it is not easy to obtain closed-form expressions for time-domain behavior for all these signaling schemes, we employed a model which can be applied numerically to any complex modulation scheme using the signal's Complementary Cumulative Distribution Function (CCDF). For each of these signals, after a sufficiently long time, the probability of the signal having an instantaneous peak-to-average power ratio greater than a certain value is given by the CCDF. Figures 1(a) and 1(b) show the time domain variation of the instantaneous power and the CCDF, respectively, for CDMA 1x-EVDO signal. Figure 1(c) shows a new signal that has been generated from the inverse CCDF. It is periodically cycled and mirrored in the horizontal and vertical axes to keep the DC level at zero and prevent sharp fall times for the stability of the numerical model. This periodic signal was used as an input to the numerical model to predict the diode response as a function of induced voltage on the dipole sensor. The analysis was performed on different communication signals and compared with the probe response to CW signal to determine the non-linearity error as a function of incident signal strength.

Measurement Setup

Dosimetric, electric and magnetic field probes were measured by exposing them to a known signal inside a TEM cell at 900 MHz. The output power of the TEM cell was monitored in a feedback loop to accurately estimate the signal strength incident on the probe. The signal strength was gradually increased until the diode detector was driven into saturation for various communication signals and the deviation from the probe response to CW signal was recorded.

Results

The deviation in the diode response to different signals compared to the CW response is shown in Figure 2 for an ET probe (Schmid & Partner Engineering AG, Zurich, Switzerland). The deviation is compared for both the measurements and the numerical model. At

Short-term whole body exposure of intermediate frequency magnetic fields to rats does not affect blood properties and immune systems

Akira Ushiyama¹, Aiko Unno², Shin Ohtani³, Yukihiisa Suzuki⁴, Keiji Wada⁵, Naoki Kunugita⁶, Chiyoji Ohkubo⁷

⁽¹⁾Department of Environmental Health, National Institute of Public Health, 2-3-6 Minami, Wako, Saitama, Japan, tel +81-48-458-6257, fax +81-458-6270, e-mail ushiyama@niph.go.jp

⁽²⁾ As (1) above, but e-mail: a.unno.72572@niph.go.jp

⁽³⁾ As (1) above, but e-mail: ohtani@niph.go.jp

⁽⁴⁾ Graduate school of Social Sciences, Tokyo Metropolitan University, 1-1 Minami-osawa, Hachioji, Tokyo, 192-0397, Japan
e-mail: y_suzuki@tmu.ac.jp

⁽⁵⁾ As (4) above, but e-mail: kj-wada@tmu.ac.jp

⁽⁶⁾ As (1) above, but e-mail: kunugita@niph.go.jp

⁽⁷⁾ Japan EMF Information Center, 2-9-11 Shiba, Minato-ku, Tokyo, 105-0014, Japan
e-mail: ohkubo@jeic-emf.jp

Abstract

Due to the lack of the science based evidences, we explored short term exposure effects of intermediate frequency of magnetic fields (IF-MF) to the experimental animals. Male Sprague-Dawley rats (6-7 week old) were divided into 4 groups; cage-control, sham, 2 mT and 3.8 mT exposure group, respectively. IF-MF at 21 kHz was exposed to the animals under fixed conditions in an acrylic holder. Exposure was done at 1hour/day for 3 consecutive days. On the 4th day following the exposure, biochemical and hematological parameters in the blood were analyzed. We also examined the effects to the immunological functions such as cytotoxic activity and phagocytotic activity. Results indicate that there is no effects to these parameters, even high magnetic flux density (3.8 mT; 141 times higher than the reference level to general public of ICNIRP guideline 2010) was exposed to the animals.

1. Introduction

The use of induction heating (IH) cooking hob makes our life more convenient. On the other hand, there exist public concerns on possible health effect about the intermediate frequency (IF) magnetic fields from IH cooking hob. Although there are many studies on the biological effects of electromagnetic fields exposure to extremely low frequency and radio frequency, there are very few studies on IF-MF. Therefore, WHO recommended to study the biological effects of IF-MF exposure in the environmental health criteria monograph No.238 [1]. In this study, we explored the effects of IF-MF to the experimental animals by using newly developed exposure apparatus which emit high intensity of IF-MF at 21 kHz [2]. Following the IF-MF exposure to rats, we analyzed the biochemical and the hematological parameters of the peripheral blood and several immune functions.

2. Materials and Methods

Animals and IF-MF exposure

Male Sprague-Dawley rats (6-7 week old, Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan) were used. For IF-MF exposure,

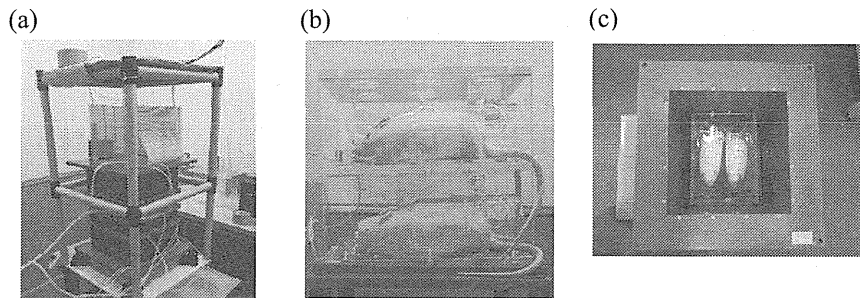


Figure 1. Overall view of IF-MF exposure apparatus (a). Rats were located in the acrylic holders (b) and put them inside of the coil during the IF-MF exposure (c).

we used a coil as shown in Figure 1, whose inner space was 23 x 23 x 40 cm [2]. The apparatus was able to generate IF-MF at 21 kHz (frequency) and up to 3.8 mT (magnetic flux density). Uniform magnetic intensity was obtained in a space of 15 x 15 x 15 cm inside of the coil. To avoid thermal effect from the coil, we use water-loop cooling circuit during the IF-MF exposure. According to the dosimetry, mean induced electric density were 4.7 [V/m], which is corresponding to 1.7 fold compared to basic restriction to the general public of ICNIRP guideline revised in 2010.

Rats were divided into 4 groups; cage-control, sham, 2 mT and 3.8 mT exposure group (n=11-14). IF-MF at 21 kHz was exposed to the animals under fixed condition in an acrylic holder (Natsume Seisakusho Co. Ltd.). Exposure to IF-MF was done at 1 hour/day for 3 consecutive days. On the 4th day following the exposure, the whole blood was collected and sent to the analysis. After scarification with deep anesthesia, spleen was excised to prepare the lymphocytes.

Analysis

Biochemical and the hematological parameters in the blood were analyzed. For the biochemical analysis, 14 parameters were analyzed using a biochemical analyzer (VetScan VS2, Avaxis Inc., USA). For hematological analysis, 22 parameters were measured by use of a fully-automated 5-part differential cell counter (VetScan HM5, Avaxis Inc., USA).

For the cytotoxic assay, natural killer cell fraction prepared from spleen was used as effector cell. Cultured YAC-1 cell (mice lymphoma) was used as target cell. The cytotoxic activity was assayed by using CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega Co., USA). Experimental procedure was basically followed by the standard protocol.

For the phagocytotic assay, granulocytes were fractionated from peripheral blood by density separation method using percoll (GE Healthcare Bioscience Co., USA). Granulocytes were co-incubated with FITC-conjugated polystyrene beads for 1 hour at 37 °C. After washing granulocytes, cells were analyzed by flowcytometer (Cytomics FC500, Beckman Coulter, Inc., USA).

One-way ANOVA was applied for statistical analysis by using SPSS software.

Ethical approval of animal study

This study was approved by the committee of animal experiment in National Institute of Public Health.

3. Results

Biochemical data of peripheral blood was shown in Table 1. Significant differences compared to that of cage control group were observed in total protein concentration and glucose level. However, these differences do not

attribute to the intensity of IF-MF exposure. The data did not show dose-dependent relationship. Hematological data did not show any significant differences (data not shown).

Immune function such as cytotoxic activity and phagocytotic activity also did not show any effects due to IF-MF exposure (data not shown).

Therefore, no effects were noticed under these experimental conditions.

Table 1 Comparison of biochemical data of peripheral blood

	(unit)	cage control (n=14)	sham (n=12)	2 mT (n=12)	3.8 mT (n=11)
Albumin	g/dL	4.54 ± 0.15	4.85 ± 0.27*	4.61 ± 0.19	4.78 ± 0.19
Total protein	g/dL	5.75 ± 0.23	6.04 ± 0.30	5.76 ± 0.23	6.03 ± 0.25 *
Total globulin	g/dL	1.24 ± 0.17	1.19 ± 0.15	1.14 ± 0.12	1.24 ± 0.12
ALP	U/L	554.9 ± 87.4	566.1 ± 108.5	612.9 ± 96.8	505.9 ± 103.1
ALT	U/L	56.5 ± 10.11	55.5 ± 8.82	61.2 ± 8.3	51.6 ± 6.2
Amylase	U/L	938.1 ± 85.7	940.3 ± 109.7	882.8 ± 61.2	906.2 ± 100.9
TBIL	mg/dL	0.19 ± 0.27	0.2 ± 0	0.2 ± 0	0.19 ± 0.03
BUN	mg/dL	18.7 ± 3.34	19.1 ± 2.8	19.3 ± 3.4	20 ± 3.8
Phosphate	mg/dL	10.08 ± 0.66	9.77 ± 0.93	10.15 ± 0.64	9.72 ± 0.79
Creatinine	mg/dL	0.3 ± 0.88	0.29 ± 0.10	0.28 ± 0.06	0.23 ± 0.05
Glucose	mg/dL	283.4 ± 47.2	232 ± 25.6*	254.3 ± 34.5	242.9 ± 50.2 *
Ca ⁺⁺	mg/dL	11.2 ± 0.29	11.1 ± 1.66	10.7 ± 1.92	11.6 ± 0.35
Na ⁺	mmol/L	139.1 ± 1.83	141.3 ± 2.53	140.5 ± 4.50	140.2 ± 1.60
K ⁺	mmol/L	6.06 ± 0.55	6.13 ± 0.51	5.95 ± 0.46	5.9 ± 0.49

ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine aminotransferase, TBIL: bilirubin, BUN: blood urea nitrogen

* $p < 0.05$ (vs cage control group)

4. Discussion and Conclusion

In this study, we reported the biochemical and the hematological effects of 21 kHz IF-MF exposure at the high magnetic flux density to rat. Additionally, we also tested some of immune function. Our experimental condition was maximum 3.8 mT, which is 141 times higher than the reference level to general public of ICNIRP guideline (2010). Even under this extremely high intensity of magnetic fields, the parameters did not change by the exposure. From these results, we concluded that IF-MF did not show any toxicity under this experimental condition. However, the exposure protocol in this study was limited only 3 consecutive days and total 3 hours; therefore, further study will be needed.

5. References

- [1] WHO Environmental Health Criteria 238 (2007): Extremely Low Frequency (ELF) Fields. WHO, Geneva, Switzerland
- [2] Ohtani S, Ushiyama A, Unno A, Hirai Y, Suzuki Y, Wada K, Kunugita N, Ohkubo C. Development of novel in vivo exposure apparatus for intermediate frequency magnetic field. 10th International Conference European Bioelectromagnetics Society, Rome, Feb.21-24, 2011, proceedings.

6. Acknowledgement

This work was supported by Health Labour Science Research Grant, The Ministry of Health Labour and Welfare, Japan.

中間周波電磁界の生体影響評価

○牛山明、大谷真、海野愛子、樺田尚樹
(国立保健医療科学院)

1. はじめに

近年オール電化住宅の普及に伴い、IH調理器の普及が進んでいる。日本電気工業会の統計によれば、平成21年度までにIH調理器の総出荷台数は568万台となり、世帯普及率は15%程度になっていると推定されている。IH調理器は基本的に周波数20kHz~50kHzの中間周波電磁界を鍋などの金属を通じた誘導加熱に利用するものである。火力を使わないため火災のリスクが低く利便性が高い一方、機器から発せられる電磁界の健康影響について懸念する声もある。特に、妊婦はIH調理器の高さが胎児の近傍となることから胎児への影響についての懸念が大きい。しかしながらこの周波数帯の電磁界に関しては、これまで研究対象としての関心が低く、十分な科学的な知見が存在していない。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。

以上を背景に、本研究では最終的にIF電磁界の動物に対する影響の有無を明らかにすることを目的とし、研究を進めている。本稿においては小動物用全身均一ばく露装置を用いて、1日1時間のばく露を行った際の影響について調べることを目的とした。

2. 方法

動物への中間周波電磁界ばく露は、首都大学東京の鈴木らと共同開発した動物実験用ばく露装置を用いてばく露を行った。動物は、雄のSprague Dawley (SD) ラット(日本SLC)を実験に供した。ばく露は、平均磁束密度で、2mT、3.8mTとした。なお、3.8mTの磁束密度は国際非電離放射線防護委員会の定めるガイドラインの約140倍である。

本研究では3日間(短期)と14日間(長期)のばく露実験を行った。短期ばく露においては実験開始時点で6~7週齢のラットを用いた。ラットをアクリル製ラットホルダーに無麻酔で保定し、所定のばく露を1日あたり3時間行った。ばく露は連続する3日間にわたり行い、4日目に麻酔下において心臓穿刺による全採血および脾臓の摘出を行い、分析に供した。また、長期ばく露実験においては、実験開始時点で、4~5週齢のラットを用いて、短期ばく露と同様の方法で1日1時間のばく露を連続する14日間行い、15日目に採血および脾臓の摘出を行い分析に供した。なお、短期ばく露実験においては、ケージコントロール群、シャムばく露(偽ばく露)群、2mTばく露群、3.8mTばく露群の4群とし、長期ばく露実験においては、ケージコントロール群、シャムばく露群、3.8mTばく露群の3群を作成した。

これらの動物から採取した血液、及び脾臓を用いて、①血液生化学指標、②血球分析指標、③ナチュラルキラー(NK)細胞活性測定、④顆粒球の遊走能・貪食能、⑤T細胞のサブセット解析を行い、免疫系への影響を検討した。①および②は、生化学自動分析装置VS2、および自動血球計測装置HM2(いずれもAvaxis社)を用いて分析を行った。ナチュラルキラー細胞活性測定には摘出した脾臓から調整したリンパ球浮遊液をNK画分を含むエフェクター細胞として使用した。また、マウスリンパ腫細胞YAC-1(理化学研究所バイオリソースセンターより入手)をターゲット細胞としてNK活性を測定した。

NK 細胞活性は CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega 社) を用いて、非 RI 法による LDH 定量法によって測定した。顆粒球走化性および貪食能の測定は血液から Percoll の不連続密度勾配遠心分離法により顆粒球画分を調製し、得られた顆粒球画分を用いた。走化性は、細胞動態解析装置 EZ-TAXIScan (GE ヘルスサイエンス社) を用いて検討を行った。貪食能の測定は 100 倍に希釈した蛍光ビーズ (Fluoresbrite Microspheres, $1.0\ \mu\text{m}$ YG) と顆粒球を混和し、 37°C で 1 時間振とうした。その後遠心により洗浄し、貪食されていない蛍光ビーズを除去し、細胞をフローサイトメーター Cytomics FC500 (ベックマンコールター社) で解析を行った。

T 細胞サブセットの分析では、EDTA 採血を行った末梢血を溶血させた細胞懸濁液に PE (Phycoerythrin) 標識抗-CD3 抗体, FITC 標識抗-CD4 抗体, PE-Cy7 標識抗-CD8 抗体を加え抗体の結合反応を氷上で 30 分行った後に PBS で洗浄したのちフローサイトメーター FC500 (ベックマン・コールター社) で検出を行った。なお、本研究の実施にあたり国立保健医療科学院動物実験委員会の承認を得ておこなった。

3. 結果と考察

血液生化学及び血球分析の結果はばく露による有意な変化を認めないものが殆どであったが、分散分析の結果、生化学指標いくつかの項目で統計的に有意な差を示したものがあつた。しかしながら、磁界ばく露がこれらの差を発生させる原因であると考えると 2mT および 3.8mT 群で量反応関係を示すはずであるが、そのような現象は確認できないこと、また、後日、追試実験を行ったところ、同様の傾向は見られなかったことを考慮すると、観察された差は必ずしも生物学的な意味を持たないと考えられた。

なお、それぞれの群の間での体重には有意な差を認めなかった。

また、NK 活性、顆粒球走化性、貪食能、T 細胞サブセット等の免疫系への影響を示唆する指標についても検討を行ったが、いずれも有意な差を認めなかった。

4. 結論

本報告においては、中間周波 (20kHz) を発生させるばく露装置を用いて、ラットに 1 日 1 時間で連続 3 日間、または連続 14 日間のばく露を行い、磁界ばく露の影響を調べ、体重、血液生化学、血球分画の各指標に健康に影響を与えるような変化が見られないことを確認した。

また同様に一部の免疫毒性の指標について検討し、NK 活性、顆粒球の走化性・貪食能、T 細胞サブセット (CD4・CD8) に関しては影響を与えないことを示した。

なお、本研究に用いたばく露強度は最大で 3.8mT (国際ガイドラインの約 140 倍) であり、公衆が IH 調理器を使用する場合はガイドラインよりも十分に低いという結果もあることから、日常の IH 調理器が免疫系に影響を与えることはないものと推測される。

今後は、妊娠動物を用いた発生影響 (催奇形性等) についての検討を進めていく予定である。

5. 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金によって行われた。

本研究で使用した中間周波電磁界ばく露装置は首都大学東京鈴木敬久准教授ならびに和田圭二准教授との共同開発を行ったものである。

電気学会研究会資料

マグネティックス研究会

MAG-11-073~082

中間周波電磁界の生体影響に関する研究

牛山 明* 大谷 真 櫻田尚樹 (国立保健医療科学院)

鈴木敬久 和田圭二 (首都大学東京) 大久保千代次 (電磁界情報センター)

The biological effects of intermediate frequency electromagnetic fields on rats
Akira Ushiyama*, Shin Ohtani, Naoki Kunugita (National Institute of Public Health)
Yukihisa Suzuki, Keiji Wada (Tokyo Metropolitan University),
Chiyoji Ohkubo (Japan EMF Information Center)

In response to public concern on possible health effects of intermediate frequency magnetic fields being widely used in IH cooking hobs in Japan, rats were successively exposed 1 hour/day for 3 days or 14 days whose magnetic field intensity was up to 3.8 mT at 21 kHz. We evaluated the immunotoxicity by whole-body exposure. As our preliminary results obtained, there are no significant difference between exposed and sham-exposed animals. We do not find any harmful effects under our experimental conditions. The evaluation on developmental toxicity by local exposure to pregnant rats is ongoing.

キーワード：中間周波磁界，免疫毒性，発生毒性，生物影響，動物実験，IH調理器
(intermediate frequency magnetic field, immune toxicity, developmental toxicity, biological effect, animal experiment, IH cooking hob)

1. はじめに

電磁界の生体作用は、低周波領域では神経や筋の刺激作用が支配的であり、高周波領域では生体の組織で電力エネルギーが吸収されることによって生じる温度上昇（熱作用）が支配的であると言われる。

中間周波 (intermediate frequency, 以下 IF と略) 電磁界は、これらの間に挟まれる周波数帯、すなわち 300Hz から 100kHz 程度の周波数の電磁界であり、刺激作用を持つ低周波領域と、熱作用を持つ高周波領域の中間に属する。これまで、この周波数領域においては、工業用の誘導加熱等を除けば、生活基盤を支える技術には応用されてこなかったため、その生体影響に関する研究についても余り行われてきていなかった。しかしながら近年、オール電化の推進に伴い、中間周波電磁界を使用する IH 調理器の普及が進んでいる。IH 調理器では基本的に 20kHz~50kHz の電磁界を誘導加熱に利用するものである。しかしながらこの周波数帯の電磁界に関しては、これまで研究対象としての関心が低く、十分な科学的な知見が存在していない。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)⁽¹⁾ では「この領域のデータが欠落している現状を考慮し、すべ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少数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、更なる具体化が必要である。(下線は筆者)」と記載され、研究の推進が指摘とされている。

以上を背景に、本研究では最終的に IF 電磁界の動物に対する影響の有無を明らかにすることを目的としている。研究は大きく分けて 2 つの柱からなり、一つは全身均一ばく露による免疫系を中心とする毒性評価であり、もう一つは、妊娠動物への腹部局所ばく露による発生毒性評価である。これら実験において、高い磁束密度による全身均一ばく露、局所ばく露を達成するために中間周波磁界のばく露装置の開発・ドシメトリも併せて行った。本論文ではこれまでの研究成果を紹介する。

2. 研究方法

(2-1) ばく露装置

本研究では、①全身均一ばく露用コイル (図 1)、②腹部局所ばく露用コイル (図 2) ならびに①と②を駆動するインバーターを用いた。全身均一ばく露コイルは細胞実験用に開発した装置^{(2),(3)}を動物実験用に使用した。なお、①の装

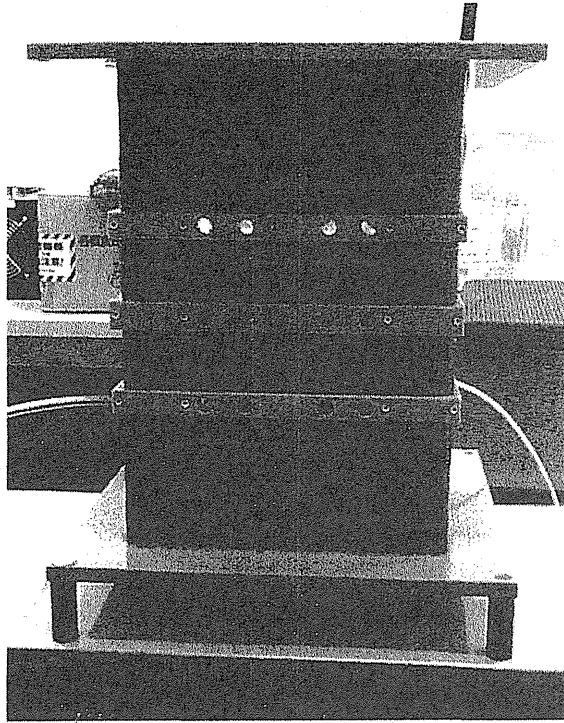


図1 中間周波磁界全身均一ばく露用コイル
Fig1 Exposure coil for whole-body exposure

Rats which fixed in acrylic holder are located inside of the coil during exposure.

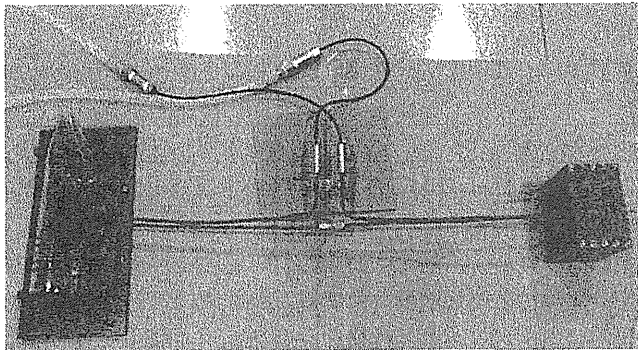


図2 中間周波磁界局所ばく露用コイル
Fig2 Exposure coil for whole-body exposure
Rat which fixed in acrylic holder is put on the coil located inside of the coil during exposure.

置は 21 kHz で最大 3.8mT の全身均一ばく露が可能であり、②の装置はラットの腹部表面において最大約 10mT の局所ばく露が可能である⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾。

〈2.2〉 全身ばく露実験

動物への中間周波電磁界ばく露は、全身均一ばく露用コイ

表1 全身均一ばく露装置における磁束密度と誘導電界
Table 1 Comparison of International guideline and our experimental condition for whole-body exposure

	magnetic density induced electric field	
ICNIR guideline *	27 μ T (reference level)	2.7 V/m (basic restriction for general public)
This study	3800 μ T	4.7 V/m ^(mean) 34.3 V/m ^(max)
ratio	140	1.74 (mean)

* International Commission of Non-Irradiation Radiation Protection guideline, revised in 2010.

ルを用い、動物は、雄の Sprague Dawley (SD) ラット (日本 SLC) を実験に供した。ばく露は、平均磁束密度で、2mT、3.8mT とした。なお、3.8mT の磁束密度は国際非電離放射線防護委員会の定めるガイドラインの約 140 倍の磁束密度である (表1)。

本研究では 3 日間 (短期) と 14 日間 (長期) のばく露実験を行った。短期ばく露においては実験開始時点で 6~7 週齢のラットを用いた。ラットをアクリル製ラットホルダーに無麻酔で保定し、所定のばく露を 1 日あたり 3 時間行った。ばく露は連続する 3 日間にわたり行い、4 日目に麻酔下において心臓穿刺による全採血および脾臓の摘出を行い、分析に供した。また、長期ばく露実験においては、実験開始時点で、4~5 週齢のラットを用いて、短期ばく露と同様の方法で 1 日 1 時間のばく露を連続する 14 日間行い、15 日目に採血および脾臓の摘出を行い分析に供した。なお、短期ばく露実験においては、ケージコントロール群、シャムばく露 (偽ばく露) 群、2mT ばく露群、3.8mT ばく露群の 4 群とし、長期ばく露実験においては、ケージコントロール群、シャムばく露群、3.8mT ばく露群の 3 群を作成した。

これらの動物から採取した血液、及び脾臓を用いて、①血液生化学指標、②血球分析指標、③ナチュラルキラー (NK) 細胞活性測定、④顆粒球の遊走能・貪食能、⑤T 細胞のサブセット解析を行い、免疫系への影響を検討した。①および②は、生化学自動分析装置 VS2、および自動血球計測装置 HM2 (いずれも Avaxis 社) を用いて分析を行った。ナチュラルキラー細胞活性測定には摘出した脾臓から調整したリンパ球浮遊液を NK 画分を含むエフェクター細胞として使用した。また、マウスリンパ腫細胞 YAC-1 (理化学研究所バイオリソースセンター) をターゲット細胞として NK 活性を測定した。NK 細胞活性は CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega 社) を用いて、非 RI 法による LDH 定量法によって測定した。顆粒球走化性および貪食能の測定は血液から Percoll の不連続密度勾配遠心分離法により顆粒球画分を調製し、得られた顆粒球画分を用いた。

走化性は、細胞動態解析装置 EZ-TAXIScan (GE ヘルスサイエンス社) を用いて検討を行った。食食能の測定は 100 倍に希釈した蛍光ビーズ (Fluoresbrite Microspheres, 1.0 μm YG) と顆粒球を混和し、37°C で 1 時間振とうした。その後遠心により洗浄し、食食されていない蛍光ビーズを除去し、細胞をフローサイトメーター Cytomics FC500 (ベックマン・コールター社) で解析を行った。

T 細胞サブセットの分析では、EDTA 採血を行った末梢血を溶血させた細胞懸濁液に PE (Phycoerythrin) 標識抗-CD3 抗体、FITC 標識抗-CD4 抗体、PE-Cy7 標識抗-CD8 抗体を加え抗体の結合反応を氷上で 30 分行った後に PBS で洗浄したのちフローサイトメーター FC500 (ベックマン・コールター社) で検出を行った。

(2.3) 局所ばく露実験

中間周波磁界ばく露には、局所ばく露用コイルを用いて、動物は、SD ラット (日本 SLC) を用いた。10 週齢の雌の性周期確認のためラット用膣インピーダンス・チェッカー (室町機械 (株)) を用いて、インピーダンスチェックを行い、発情期と判定された雌を 12 週齢の雄と同居させ、交配を行った。翌朝交配確認のため、膣スメアチェックを行い、精子を確認した個体を交配成立と判定し、その日を妊娠 0 日とした。ばく露は妊娠 7 日~17 日目まで 1 日 1 時間、無麻酔下でアクリル製ラットホルダーに保定して、ばく露を行った。実験では、ばく露群、シャムばく露群、ケージコントロール群の計 3 群を作成した。妊娠 20 日目にケタミンキシラジン混合液による全身麻酔の下、腹部切開により胎児を摘出した。胎児の数、体重、雄雌比、着床痕数、を計測するとともに、外形異常の有無を目視で行った。摘出胎児を 2 群に分け、一つは 10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬しその後、ブアン液固定を行い内臓発生異常の病理検索に、もう一つは表皮、内臓を除去したのちにエタノールに浸漬しアリザリンレッド、アルシアンブルーを用いた骨格染色を用いて骨形成の病理検索を行った。

(2.4) 統計処理

統計処理はいずれも一元配置分散分析によって行い、有意差が認められた場合は Dunnett 法により、ケージコントロール群との比較を行った。統計処理は、SPSS を用いた。

(2.5) 動物実験における倫理上の配慮

本研究における動物実験の実施にあたっては国立保健医療科学院動物実験委員会の承認を得て行った。

3 結果

(3.1) 全身均一ばく露装置の検討

全身均一ばく露装置について、コイルは縦型、横型のいずれにも配置可能な仕様とし、ラットの配置を考えるとラットの体軸の 3 方向いずれに対しても磁界を発生させることが可能であった。すべての場合について、体内に誘導される誘導電流密度と誘導電界密度をシミュレーションによる計算したところ、ラットの体に対して背腹方向に磁界を発生させることが、より大きな誘導電流密度、誘導電界密度

を発生させることが可能であった (表 1)。本研究のばく露では、すべての実験において磁界を背腹方向に発生させて実験をおこなった。なお、このときに発生する誘導電界密度は、ICNIRP ガイドライン (2010 年度改訂版) で示されている 2.7V/m に比べて、約 1.74 倍である。

また、全身均一ばく露用のばく露装置は構造上、作動時にコイルを流れる電流によって熱を発生するが、本研究では水冷コイルを用いることでその熱を冷却するシステムを採用した⁽⁴⁾。

(3.2) 局所ばく露装置の開発

妊娠動物用の局所ばく露装置を図に示す。ラットの保定用ホルダーは前後に移動することが可能であり、妊娠経過日数に応じて、適切な部位に局所的にばく露を行うことが可能である。この装置の詳細については別途文献を参照されたい⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾。

(3.3) 全身均一ばく露による血液生化学・血球指標・免疫系指標への影響

短期ばく露実験では 1 日 1 時間、3 日間連続のばく露を行い、4 日目に血液を採取し分析し、長期ばく露では 1 日 1 時間、14 日間のばく露を行い、15 日目に分析に供した。

分散分析の結果、血液生化学指標のいくつかの項目で統計的に有意な差を認めた (表 2)。さらにケージコントロールを基準にしてアドホック分析を行ったところ、に示した部分において有意な差を認めた。しかしながら、磁界ばく露がこれらの差を発生させる原因であると考え、2mT および 3.8mT 群で量反応関係を示すはずであるが、そのような現象は確認できないこと、また、後日、追試実験を行ったところ、同様の傾向は見られなかったことを考慮すると、観察された差は必ずしも生物学的な意味を持たないと考えられた。また、血球分析においては、分散分析において有意な差を認めなかった (表 3)。なお、それぞれの群の間での体重には有意な差を認めなかった。

脾臓から調整を行ったリンパ球の NK 活性を検討した結果では、短期ばく露、長期ばく露のどちらにおいても、磁界ばく露による有意な影響を認めなかった (data now shown)。

Percoll の不連続密度勾配遠心分離法によって分離した顆粒球の走化性および食食能について検討を行ったところ、短期ばく露、長期ばく露のどちらにおいても、ばく露による影響は認めなかった。また、末梢血の T 細胞サブセットの検出についてもばく露による有意な差を認めなかった (data now shown)。

(3.4) 局所ばく露による発生毒性評価

現在進行中であり、今後解析を行い影響の有無を明らかにしていく計画である。

4 考察

本研究においては、中間周波 (20kHz) を発生させるばく露装置を用いて、ラットに 1 日 1 時間で連続 3 日間、または連続 14 日間のばく露を行い、磁界ばく露の影響を調べ、体重、血液生化学、血球分画の各指標に健康に影響を与え

表2 短期(3日間)ばく露サンプルにおける血液生化学指標の結果

Table2 Biochemical data of peripheral blood after IF·MF exposure (1hour/day, for 3days)

	(unit)	cage control n=14	シヤム n=12	2mT n=12	3.8mT n=12
ALB	アルブミン g/dL	4.54 ± 0.15	4.85 ± 0.27 *	4.61 ± 0.19	4.78 ± 0.19 *
ALP	U/L	554.9 ± 87.4	566.1 ± 108.5	612.9 ± 96.8	505.9 ± 103.1
ALT	GPT U/L	56.5 ± 10.11	55.5 ± 8.82	61.2 ± 8.3	51.6 ± 6.2
AMY	アミラーゼ U/L	938.1 ± 85.7	940.3 ± 109.7	882.8 ± 61.2	906.2 ± 100.9
TBIL	総ビリルビン mg/dL	0.19 ± 0.27	0.2 ± 0	0.2 ± 0	0.19 ± 0.03
BUN	尿素窒素 mg/dL	18.7 ± 3.34	19.1 ± 2.8	19.3 ± 3.4	20 ± 3.8
Ca ⁺⁺	mg/dL	11.2 ± 0.29	11.1 ± 1.66	10.7 ± 1.92	11.6 ± 0.35
PHOS	リン mg/dL	10.08 ± 0.66	9.77 ± 0.93	10.15 ± 0.64	9.72 ± 0.79
CRE	クレアチニン mg/dL	0.3 ± 0.88	0.29 ± 0.10	0.28 ± 0.06	0.23 ± 0.05
GLU	グルコース mg/dL	283.4 ± 47.2	232 ± 25.6 *	254.3 ± 34.5	242.9 ± 50.2 *
Na ⁺	mmol/L	139.1 ± 1.83	141.3 ± 2.53	140.5 ± 4.50	140.2 ± 1.60
K ⁺	mmol/L	6.06 ± 0.55	6.13 ± 0.51	5.95 ± 0.46	5.9 ± 0.49
TP	総タンパク g/dL	5.75 ± 0.23	6.04 ± 0.30	5.76 ± 0.23	6.03 ± 0.25 *
GLOB	総グロブリン g/dL	1.24 ± 0.17	1.19 ± 0.15	1.14 ± 0.12	1.24 ± 0.12

* p < 0.05 (vs cage control group)

表3 短期(3日間)ばく露サンプルにおける血液分析結果

Table3 Hematological data of peripheral blood after IF·MF exposure (1hour/day, for 3days)

	(unit)	cage control n=14	シヤム n=12	2mT n=12	3.8mT n=12
WBC	白血球 10 ⁶ /mL	6.06 ± 2.07	5.3 ± 1.64	5.18 ± 1.70	5.57 ± 1.68
LYM	リンパ球 10 ⁶ /mL	4.99 ± 1.69	4.39 ± 1.51	4.06 ± 1.38	4.52 ± 1.33
MON	単球 10 ⁶ /mL	0.19 ± 0.08	0.17 ± 0.06	0.17 ± 0.09	0.68 ± 1.80
GRA	顆粒球 10 ⁶ /mL	0.83 ± 0.38	0.74 ± 0.24	0.96 ± 0.54	0.87 ± 0.50
RBC	赤血球 10 ⁹ /mL	6.86 ± 0.28	7.02 ± 0.71	7.02 ± 0.32	7 ± 0.34
HGB	ヘモグロビン g/dL	14.1 ± 0.45	14.1 ± 1.48	14.6 ± 0.54	14.5 ± 0.42
HCT	ヘマトクリット %	35.4 ± 1.7	35.7 ± 3.0	36.2 ± 1.7	35.9 ± 1.3
MCV	赤血球容積量 fl	51.8 ± 1.8	51 ± 2.8	51.4 ± 1.8	51.4 ± 2.2
MCH	平均ヘモグロビン量 pg	20.7 ± 0.83	20.1 ± 0.44	19.7 ± 5.48	20.8 ± 0.98
MCHC	平均ヘモグロビン濃度 g/dL	40.1 ± 1.62	39.4 ± 1.8	40.5 ± 2.0	40.4 ± 1.5
RDWc	赤血球分布幅 %	16.7 ± 0.56	16.8 ± 0.5	16.6 ± 0.3	16.7 ± 0.25

るような変化が見られないことを確認した。

また同様に一部の免疫毒性の指標について検討し、NK 活性、顆粒球の走化性・食食能、T細胞サブセット (CD4・CD8) に関しては影響を与えないことを示した。

なお、本研究の全身均一ばく露実験において用いた磁束密度は最大で 3.8mT (国際ガイドライン参考レベルの約 140 倍) であり、このときのラットの大きさや磁界の入射方向を考慮し算出した誘導電界密度も国際ガイドラインの基本制限に対して最大約 12.7 倍であった。公衆が IH 調理器を使用する場合はガイドラインよりも十分に低いという結果もあることから、日常の IH 調理器が免疫系に影響を与えることはないものと推測される。

今後は、現在進めている妊娠動物を用いた局所ばく露の発生毒性影響についての検討を進めていく計画である。

5 謝辞

本研究は厚生労働省 科学研究費補助金 (健康安全・危機

管理対策総合研究事業)「居室における中間周波電磁界に関する研究 (H21-健危-一般-008)」によって実施されたものである。

文 献

- (1) World Health Organization (WHO). Environmental Health Criteria 238. Extremely Low Frequency (ELF) Fields. Geneva: World Health Organization; 2007.
- (2) S.Kogure, K.Wada, and Y.Suzuki: "Development of a magnetic field exposure at 20kHz"(in Japanese)
木暮晋太郎・和田圭二・鈴木敬久:「20kHz 高磁界発生装置の開発」, 電気学会半導体電力変換研究会資料, Vol.SPC-08 No.161-172 pp.37-42(2009)
- (3) S.Kogure, K.Wada, and Y.Suzuki: "Development of a Magnetic Field Generator at 20 kHz using a Voltage Source Inverter" (in Japanese)
木暮晋太郎・和田圭二・鈴木敬久:「電圧形インバータを用いた 20kHz 磁界発生装置の開発」, 電気学会全国大会講演論文集, Vol.2009 No.1 pp.198-199 (2009)
- (4) S.Ohtani, A.Ushiyama, A.Unno, Y.Hirai, Y.Suzuki, K.Wada,

N.Kunugita, and C.Ohkubo: "Development of novel in vivo exposure apparatus for intermediate frequency magnetic field with rodents." The 50th Conference of Japanese Society of Medical and Biological Engineering, April, 2011, Tokyo, pp.284

- (5) 鈴木伸也, 和田圭二, 鈴木敬久: 「2重渦巻コイルを用いた動物用局所磁界曝露装置電気学会産業応用部門大会」, No.1-118, pp. 543-548, 2011
- (6) Y.Hirai, Y.Suzuki, K.Wada, K.Wake, M.Taki, A.Ushiyama, and C.Ohkubo: "Dosimetry on the induced current density and the induced electric field in the pregnant rat model exposed to localized magnetic fields at 20 kHz." 2010 Asia-Pacific Radio Science Conference(AP-RASC'10). 2010.9.22-26. Toyama, Japan. Program CD-ROM.
- (7) Y.Hirai, Y. Suzuki, K Wada, K Wake, A Ushiyama, and C Ohkubo: "Development of the exposure apparatus with the localized magnetic field at 20kHz for pregnant rats." The 33rd annual meeting of bioelectromagnetics society. 2011.6.12-17. Halifax, Canada

中間周波磁界の全身亜慢性ばく露影響 に関する研究

牛山明¹, 大谷真², 鈴木敬久³, 和田圭二³, 樺田尚樹¹, 大久保千代次⁴

¹国立保健医療科学院 生活環境研究部

²明治薬科大学 薬学部 衛生化学

³首都大学東京 大学院理工学研究科

⁴(財)電気安全環境研究所 電磁界情報センター

Study on the biological effects of Long term and whole body Exposure to the Intermediate frequency magnetic Field

Akira Ushiyama¹, Shin Ohtani², Yukihisa Suzuki, Keiji Wada, Naoki Kunugita, Chiyoji Ohkubo

¹Department of Environmental Health, National Institute of Public Health

²Department of Health and Environmental Science, Meiji Pharmaceutical University

³Graduate School of Social Sciences, Tokyo Metropolitan University

⁴Japan EMF Information Center

Abstract: There exists the public concerns on health effect about the magnetic field from IH cooking hob, which generates intermediate frequency (IF) magnetic field (MF). Due to the lack of the evidences of biological effects, we explored the effects of IF-MF to the experimental animals. Male Sprague-Dawley rats (4 weeks old) were divided into 3 groups; cage-control, sham, 3.8mT exposure group, respectively. IF-MF at 21kHz were exposed to the animal fixed in the acrylic holder. Exposure was done for 1hour/day and 14 consecutive days. At the 15th day, the whole blood was collected and sent to the analysis. Biochemical and the hematological parameters in the blood were analyzed. We also evaluated the immunotoxicity by several methods. Results indicate that there is no effect to these parameters.

Keywords: Immune Toxicity, Intermediate frequency magnetic field, rat

1. Introduction

磁界の生体作用は、低周波領域では神経や筋の刺激作用が支配的であり、高周波領域では生体の組織で電力エネルギーが吸収されることによって生じる温度上昇(熱作用)が支配的であると言われる。

中間周波 (intermediate frequency, 以下 IF と略) 電磁界は、これらの間に挟まれる周波数帯、すなわち 300Hz から 100kHz 程度の周波数の電磁界であり、刺激作用を持つ低周波領域と、熱作用を持つ高周波領域の中間に属する。これまで、この周波数領域においては、工業用の誘導加熱等を除けば、生活基盤を支える技術には応用されてこなかったため、その生体影響に関する研究についても余り行われてきていなかった。しかしながら近年、オール電化の推進に伴い、中間周波電磁界を使用する IH 調理器の普及が進んでいる。IH 調理器では基本的に 20kHz~50kHz の電磁界を誘導加熱に利用するものである。しかしながらこの周波数帯の電磁界に関しては、これまで研究対象としての関心が低く、十分な科学的な知見が存在していない。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^[1]。「この領域のデータが欠落している現状を考慮し、すべ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なとされる知識ベースの極少数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、更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」(下線は加筆)

以上を背景に、本研究では最終的に IF 電磁界の動物に対する影響の有無を明らかにすることを目的とする。本研究では、動物用全身均一ばく露装置を用いて、1日1時間のばく露を連続14日間行った際の影響について、血液生化学指標、血球分析指標の検討を行い、同時に免疫系の指標に対する検討を行った。免疫系の指標としては、①免疫毒性試験において非特異的免疫機能の評価項目の一つに挙げられるナチュラルキラー (NK) 細胞活性測定、②顆粒球の遊走能・貪食能、③T 細胞のサブセット解析を行った。

2. 方法

2.1 動物とばく露条件

本研究では、全身均一ばく露装置を用いて、ばく露影響を検討した。動物は、Sprague Dawley (SD) ラット (日本エスエルシー) を実験に供した。ばく露は平均磁束密度で、3.8mT とした。実験開始時点で、4週齢のラットを用いて、ばく露の際にはアクリル製の保定用筒に入れて1日1時間のばく露を連続する14日間行い、15日目に採血および脾臓の摘出を行い分析に供した。なお、実験においてはケージコントロール群、シャムばく露群、3.8mT ばく露群の3群を作成した。

2.2 分析用血液の採取

採血の際は血液生化学分析用にヘパリンリチウム含有微量採血管（ヘルスウェーブ社）、及び血球分析用に EDTA 含有微量採血管（ヘルスウェーブ社）にそれぞれ 300 μ l 程度ずつ分注し、残りの血液は後述する顆粒球調整およびリンパ球タイピング用に 50mM EDTA を含む PBS 1 容量に血液が 9 容量になるよう混和した。

2.3 血液生化学的分析

ヘパリンリチウム含有微量採血管に採取した血液は直ちに動物用・生化学自動分析装置 VS2（Avaxis 社）を用いて分析した。

2.4 血球分析

EDTA 含有微量採血管に採取した血液は直ちに動物用・自動血球計測装置 HM2（Avaxis 社）を用いて分析を行った。

2.5 ナチュラルキラー細胞活性測定

摘出した脾臓から調整したリンパ球浮遊液を NK 画分を含むエフェクター細胞として使用した。また、マウスリンパ腫細胞 YAC-1（理化学研究所バイオリソースセンターより提供）をターゲット細胞として非 RI 法により NK 活性を測定した。

2.6 顆粒球走化性の測定

測定に用いる顆粒球は Percoll の不連続密度勾配遠心分離法により調製した。走化性は、細胞動態解析装置 EZ-TAXIScan（GEヘルスサイエンス社）を用いて検討を行った。

2.7 顆粒球貪食能の測定

上述した方法に従って回収した顆粒球を用いて、貪食能を測定した。100 倍に希釈した蛍光ビーズ（Fluoresbrite Microspheres, 1.0 μ m YG）と顆粒球を混和し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間浸透しながらインキュベートした。その後、細胞をフローサイトメーター Cytomics FC500（ベックマン・コールター社）で解析を行った。

2.8 T 細胞サブセットの検出

溶血させたのちの細胞懸濁液に PE (Phycoerythrin) 標識抗-CD3 抗体 (0.2 μ g), FITC 標識抗-CD4 抗体 (0.2 μ g), PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cy7) 標識抗-CD8 抗体 (0.2 μ g) を加え抗体の結合反応を氷上で 30 分行った後に PBS で洗浄した。染色細胞はフローサイトメーター FC500（ベックマン・コールター社）で検出を行った。

2.9 統計処理と倫理的配慮

統計処理はいずれも一元配置分散分析によって行い、有意差が認められた場合は Dunnett 法により、ケージコントロール群との比較を行った。統計処理は、SPSS を用いた。

本研究の実施にあたっては、国立保健医療科学院動物実験委員会の承認を得た。

3. 結果と考察

3.1 血液生化学・血球分析

1 日 1 時間のばく露を 14 日間連続して行い 15 日目に採血して分析をした。その結果、一部の指標において、統計的には有意差を観察したが再現性が十分に得られていないため、生物学的な意味を持たない可能性がある今後さらに検討が必要である。

3.2 ナチュラルキラー細胞活性

NK 活性を検討した結果、磁界ばく露による有意

な影響を認めなかった。

3.3 顆粒球走化性、貪食能

Percoll の不連続密度勾配遠心分離法によって分離した顆粒球の走化性について検討を行った。本研究においては、顆粒球の移動を 30 分間、30 秒おき計 61 枚の画像に納め、それを AVI ムービーに変換し、画像解析ソフトで細胞の輝度を追跡する方法により細胞の平均移動速度を求めた。通常、走化性物質が添加されない場合は、移動速度が低い細胞が多くを占めるのに対して、走化性物質 fMLP の存在下では細胞の移動速度が上昇する。しかしながら、移動速度の変化などに磁界ばく露が有意な影響を与えることはなかった。

また、貪食能について検討を行ったところ、ばく露による影響は認めなかった。

3.4 T 細胞サブセットの検出

本研究では、電磁波をばく露したラットにおいて T 細胞由来の免疫機構の異常の有無を確認するため、T 細胞表面マーカーである CD3/CD4/CD8 を用いたフローサイトメトリーにより、CD4/CD8 比の検出、CD4⁺/CD8⁺ (double positive) および CD4⁺/CD8⁻ (double negative) を呈する T 細胞の検出を試みた。末梢血中の CD3 陽性細胞における CD4/CD8 比 CD4⁺/CD8⁺ (double positive) および CD4⁺/CD8⁻ (double negative) を呈する T 細胞の検出を試みた。その結果、長期磁界ばく露がこれらの数値に有意な影響を与えることはなく、T 細胞の分化には磁界ばく露が影響を与えることはないと考えられた。

4. 結論

本研究においては、21 kHz で最大 3.8 mT の磁界を発生することが可能な装置を用いて、ラットに 1 日 1 時間、連続 14 日間のばく露を行い、磁界ばく露の影響を調べ、体重、血液生化学、血球分画の各指標に健康に影響を与えるような変化が見られないことを確認した。また同様に一部の免疫毒性の指標について検討し、NK 活性、顆粒球の走化性・貪食能、T 細胞サブセット (CD4⁺・CD8⁺) に関しては影響を与えないことを示した。

5. 謝辞

本研究は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）により行われた。

Reference

[1] WHO Environmental Health Criteria 238 (2007): Extremely Low Frequency (ELF) Fields. WHO, Geneva, Switzerland

The Effects of 21 kHz Intermediate Frequency Magnetic Fields on Blood Properties and Immune Systems in Juvenile Rats

Akira Ushiyama*¹, Shin Ohtani¹, Yukihisa Suzuki², Keiji Wada², Naoki Kunugita¹, Chiyoji Ohkubo³

¹Department of Environmental Health, National Institute of Public Health
2-3-6 Minami, Wako City, Saitama, 351-0197, Japan
ushiyama@niph.go.jp (A.U.)

²Graduate School of Social Sciences, Tokyo Metropolitan University
1-1 Minami-Osawa, Hachioji-shi, Tokyo, 192-0397 Japan

³Japan EMF Information Center
2-9-11 Shiba, Minato-ku, Tokyo, 105-0014, Japan.

1. INTRODUCTION

The use of induction heating (IH) cooking hob makes our life more convenient. On the other hand, there exist public concerns on possible health effect about the intermediate frequency (IF) magnetic fields (MF) from IH cooking hob. Although there are many studies on the biological effects of electromagnetic fields exposure to extremely low frequency and radio frequency, there are very few studies on IF-MF. Therefore, WHO recommended to study the biological effects of IF-MF exposure in the Environmental Health Criteria monograph No.238 [1]. In this study, we explored the effects of IF-MF to the experimental animals by using newly developed exposure apparatus which emit high intensity of IF-MF at 21 kHz [2]. Following the IF-MF exposure to rats, we analyzed the biochemical and the hematological parameters of the peripheral blood and several immune functions.

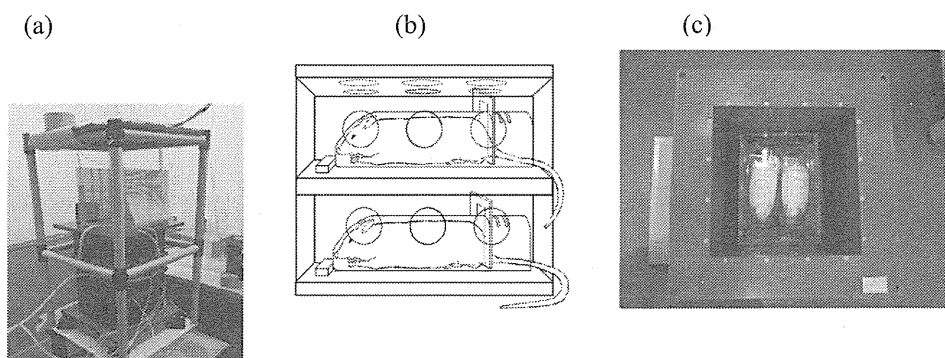
2. MATERIALS AND METHODS

Animals and IF-MF exposure

Male Sprague-Dawley rats (Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan) were used. For IF-MF exposure, we used an apparatus which we originally developed [2]. The apparatus was able to generate IF-MF at 21 kHz up to 3.8 mT. Uniform magnetic intensity was obtained in a space of 15 x 15 x 15 cm inside of the coil. To avoid thermal effect from the coil, we applied a water-loop cooling circuit during the IF-MF exposure. Dosimetry calculation showed that mean induced electric density were 4.7 [V/m], which is corresponding to 1.7 fold higher than the value of basic restriction for general public of ICNIRP guideline [3].

IF-MF at 21 kHz was exposed to the animals under fixed condition in an acrylic holder (Natsume Seisakusho Co. Ltd.). For short term exposure, rats (6-7 week old) were divided into 4 groups; cage-control, sham, 2 mT and 3.8 mT exposure group (n=11-14, each). Exposure to IF-MF was done at 1hour/day for 3 consecutive days. For long term exposure, rats (4-5 week old) were divided into 3 groups; cage-control, sham and 3.8 mT exposure group (n=11-12, each). Exposure to IF-MF was done

at 1hour/day for 14 consecutive days (2 weeks). On the next day of the last exposure, the whole blood and spleen of animals were collected and subjected to the analysis. The protocol of animal study was approved by the committee of animal experiment in National Institute of Public Health, Japan.



ed in
(c).

Analysis

To explore biological effects of IF-EMF exposure, biochemical and the hematological parameters of blood were analyzed. For the biochemical analysis, 14 parameters were analyzed using a biochemical analyzer (VetScan VS2, Avaxis Inc., USA). For hematological analysis, 22 parameters were measured by use of a fully-automated 5-part differential cell counter (VetScan HM5, Avaxis Inc., USA).

For the cytotoxic assay, natural killer cell fraction prepared from spleen was used as effector cell. Cultured YAC-1 cell (mice lymphoma) was used as target cell. The cytotoxic activity was assayed by using CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega Co., USA). Experimental procedure was basically followed by the standard protocol.

For the phagocytotic assay, granulocytes were fractionated from peripheral blood by density separation method using Percoll (GE Healthcare Bioscience Co., USA). Granulocytes were co-incubated with FITC-conjugated polystyrene beads for 1 hour at 37 °C. After washing granulocytes, cells were analyzed by flowcytometer (Cytomics FC500, Beckman Coulter, Inc., USA).

T cell population was detected by flow-cytometric analysis with three antibodies, which were added to the bloods and splenocyte as followed: fluorescein isothiocyanate conjugated anti-rat CD4 antibody, phycoerythrin anti-rat CD8 antibody, and phycoerythrin-cyanine-7 conjugated anti-rat CD3 antibody (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA). As for all CD3 positive cell, the ratios of CD4-CD8+ (Killer T cell), CD4+CD8+ (double positive), CD4-CD8- (double negative), and CD4+CD8- (Helper T cell) were compared among groups. Data obtained from FC500 were analyzed with CXP software (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA).

One-way ANOVA was applied for statistical analysis by using SPSS software.

3. RESULTS AND DISCUSSION