

2. 生体内脳微小循環動態観察システムを用いた商用周波数帯電磁界の全身暴露影響評価に関する研究

担 当 機 関 厚生労働省 国立保健医療科学院 大久保 千代次

重点強化事項 リスク 研究期間 平成 11 年度～平成 14 年度
研究予算総額 48,294 千円

研究の背景と目的

近年 IT 機器をはじめとする様々な電気機器の普及は利便性の向上と共に省力化をもたらし、国民生活の質の向上をもたらしている。その一方で、電力消費の増大にともない、送配電線、送配電設備および電気機器から発生する電磁界レベルも増大し、一般公衆に対する暴露量も増加することが予想される。電磁界の公衆への暴露については、一部の疫学研究においてがんとの関連が指摘されている。また国民の間にも電磁界に対する漠然とした不安が高まっており、国および専門家からのより多くの正確な情報提供が必要となっている状況である。WHO（国際保健機関）においても、電磁界のリスクを正しく理解し、国際協調に基づく環境保健基準を策定するために、1996 年より国際電磁界プロジェクトを開始し活動をおこなっている。

電磁界の生体への影響については、一般に刺激作用、熱作用および「非熱作用」に大別することができるが、いわゆる「非熱作用」については不明な点が多く、健康リスクについて十分な情報が得られていない。そこで本研究では、脳に対する「非熱作用」を明らかにするために全身への均一かつ慢性的な電磁界暴露が可能なマウスを対象に、脳軟膜微小循環を生きたまま顕微鏡的に評価できる Cranial Window（CW）法（図 1）により、様々な条件の電磁界暴露が脳に与える生理学的影響を検討することを目標とした。また本課題では脳腫瘍組織を脳内に移植し、かつ CW 法の特徴を生かしてその微小循環系を観察できるようにした脳腫瘍モデルマウスを用いて、電磁界暴露の病態生理学的影響について研究をすすめることとした。

研究の成果

1. 周波数 50 Hz 電磁界単独の暴露影響

本研究では、亜慢性暴露装置（図 2）を用いてマウスに対し 18 日間、22 時間/日の亜慢性暴露をおこないその影響を検討した。暴露群は 2 つにわけ、周波数 50 Hz で磁束密度は各群に対して実効値（RMS 値）で 0.3 mT、と 3 mT とした。

1-1 腫瘍の増殖に対する影響（図 3）

ヒト脳腫瘍細胞 U87 の組織片を免疫不全（SCID）マウスの CW に移植し、生体顕微鏡的に腫瘍の増殖を観察した。移植した当日から暴露を開始し、その後定期的に CW 内の腫瘍の大きさを計測した。移植直後の数日の間、移植片は増殖をしないが、移植後 8 日目頃から激しい血管新生を伴う増殖が見られた。撮影した画像から腫瘍の領域をトレースして、各観察日の腫瘍の面積を算出した。8 日目以降、暴露群、対照群共に腫瘍の面積は増大したが、0.3 mT、3 mT の各暴露群と対照群との間で差は見られず、電磁界の暴露は、腫瘍の増殖に対して影響がないことが示唆された。

1-2 微小循環諸指標に対する影響（図 4）

U87組織片を移植し、電磁界を暴露開始後16日目に、尾静脈より蛍光標識デキストラン (FITC-dextran₂₀₀₀) を注射し、蛍光造影される血管を実時間型共焦点レーザー顕微鏡システムを用いて、観察をおこなった。移植されたU87細胞片は増殖にともなって、組織内に腫瘍血管を新生する(図1)。腫瘍血管は血管の形態、および密度が明らかに通常組織のそれらと異なるものであった。高倍率で撮影した血管画像を解析し、微小循環の指標である、血管密度、平均血管径、血管容積密度、及び血管分岐数を算出した。その結果、全ての指標において、暴露群と対照群での差は見られなかった。これらの結果は電磁界が腫瘍血管の血管新生過程および新生された血管の微小循環動態に特筆すべき影響を与えていないことを示唆している。

1-3 血管の物質透過性に対する影響(図5)

電磁界暴露による血管透過性への影響について、蛍光標識アルブミン (TMR-BSA) を用いて検討した。血管透過性は、電磁界暴露開始後16日目のマウスを用いておこなった。血管からの漏出がある場合は、TMR-BSAに由来する蛍光値は時間に対して直線的な増加を認めることができる。本研究では、血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB) の機能を保持している健常マウスの脳軟膜血管についても透過性を検討し、BBBに対する電磁界暴露の影響も検討した。その結果、健常マウスの脳表血管では、蛍光の漏出が見られず透過性も極めて低い値を示した。このことより健常マウスのCW内においてもBBB機能が保持されており、電磁界暴露群と対照群との間でこの値は差がないことから、電磁界の亜慢性暴露は脳軟膜血管透過性に影響を与えないこと、すなわちBBBは電磁界暴露によって機能的に影響を受けないことが示唆された。一方、U87組織片を移植した担がんマウスの腫瘍新生血管では、蛍光アルブミン導入直後から血管外への漏れが観察され、腫瘍内新生血管においては通常脳軟膜組織の微小血管に比べて透過性が亢進していることが明らかになった。しかしながら、腫瘍新生血管の透過性は電磁界暴露によって変化することはなく、電磁界暴露の影響はないと考えられる。

1-4 白血球挙動に対する影響(図6)

電磁界亜慢性暴露による白血球 - 内皮相互作用は、暴露18日目に蛍光色素 (Rhodamine 6G) 投与による白血球の選択的蛍光染色を行い調べた。微小血管中を流れる血液では一部の白血球が血管内皮に接着し血流があるにも拘わらず同じ部位にとどまったり、ゆっくりと転がったりする現象(rolling)が認められる。動画を解析して得られた指標、rolling countを暴露群と対照群の群間で比較した。その結果群間には有意な差は認められなかったが、3 mT暴露群は対照群および0.3 m T暴露群に比べてrolling countに増加傾向が認められた。

2. トランジェント電磁界の影響

本研究では亜慢性暴露装置(図2)に改良を加え、周波数7.44 kHzに調整された50 msec signal - 1sec interval (50ミリ秒シグナル - 1秒停止の繰り返しモード)で暴露をおこなった。この際の磁束密度は、ピーク値で162.6 μ T (7.44 kHz)であった。本研究ではトランジェント磁界と同時に、50 Hz、3 mT (RMS) の磁界を作り暴露をおこなった(以下 "トランジェント暴露"と略す)。実験にあたっては、暴露を1日15時間と設定した。

2-1 腫瘍の増殖に対する影響(図7)

CW内に脳腫瘍由来U87 cellの組織片を移植し、トランジェント暴露による影響を調べた。トランジェント暴露には、対照群と同様の増殖を示し、それぞれの観察日においてランジ

ェント暴露群と対照群の間には統計的な有意差は見られなかった。このことから本実験の条件下においてトランジェント暴露は腫瘍の増殖に影響をあたえないことが示唆された。

2-2 微小循環諸指標に対する影響

トランジェント磁界暴露による腫瘍内微小循環諸指標を暴露 11 日と 15 日目の画像から算出した。対象は腫瘍内部の新生血管である。平均血管径は、トランジェント磁界暴露群 $9.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$ に対し、偽暴露の対照群は $10.9 \pm 0.6 \mu\text{m}$ であり、統計的に対照群の方が有意に大きい値を示した。また、血管容積密度 (volume density) も同様に、トランジェント磁界群 $2.06 \pm 0.22 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ に対し、対照群は $3.03 \pm 0.34 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ であり有意に異なる値を示した。しかしながら、血管密度 (vascular density) は、トランジェント暴露群 $262.4 \pm 32.0 \text{cm}/\text{cm}^2$ に対し、対照群が $235.4 \pm 9.35 \text{cm}/\text{cm}^2$ 、また、血管分岐数はトランジェント暴露群 50.3 ± 3.7 本に対し、対照群が 50.8 ± 3.9 本で統計的には差は認められなかった。本項目でみられた血管径などの差が生理的に意味を持つものか否かについては、現在対象となる個体数増やして解析を進めている。

2-3 血管の物質透過性に対する影響 (図 8)

1-3の項と同様に、TMR-BSAを用いて血管外へのアルブミンの透過性を検討した。対象には、健常マウスの脳軟膜血管と担がんマウスの新生腫瘍血管を用い、それぞれトランジェント暴露の有無による比較をおこなった。その結果、健常マウスの脳表血管ではトランジェント暴露群と対照群との間で差はなくどちらもBBB機能が正常であり、トランジェント暴露はBBBに影響を与えないことが示唆された。また腫瘍血管の物質透過性もトランジェント暴露群、対照群間の差は見られなかった。このことから病態生理的環境下においても、トランジェント暴露は影響を与えないことが明らかになった。

研究のまとめ

本研究では、商用周波電磁界の全身亜慢性暴露による生体影響を明らかにするために、cranial window 法を用いて、脳の循環動態に与える影響を調べた。本研究では、脳腫瘍移植マウスを用いて、50 Hz、0.3 及び 3 mT、18 日間の亜慢性暴露という条件、さらに、50Hz 3mT にトランジェント成分 (周波数 7.44 kHz で、1 秒に 1 回 50 ミリ秒、磁束密度はピーク値で $162.6 \mu\text{T}$) を加えた電磁環境下で検討をおこなったが、脳腫瘍の増殖に対する影響は見られなかった。微小循環の指標においては、血管径などがトランジェント暴露群で統計的に小さい値が示されたが、透過性については対照群と差はなく、血管の機能としての異常性はないと考えられる。また、脳腫瘍内血管においては、透過性の亢進が見られるものの、電磁界の暴露の有無によってその値に影響はなく、電磁界の影響はないものと考えられた。健常マウスの脳軟膜血管について透過性を調べたが、亜慢性暴露、あるいはトランジェント暴露の有無に関係なく透過性は非常に低い値を示し、血液脳関門への影響は見られなかった。以上の結果より、商用周波電磁界および限られた条件のトランジェント暴露は病態生理学的に大きな影響を及ぼす可能性がない、あるいは極めて低いことを示唆している。本研究は国際非電離放射線防護委員会 (ICNIRP) で承認されている公衆曝露制限のガイドライン値 (50Hz で 0.1mT) を大きく上回る電磁環境でおこなった実験であることから、現在のガイドラインは現時点では安全性を担保していると考えられる。しかし、トランジェント等のノイズ成分についての検討については限られた条件下の結果であるため、今後の継続的な研究が必要である。

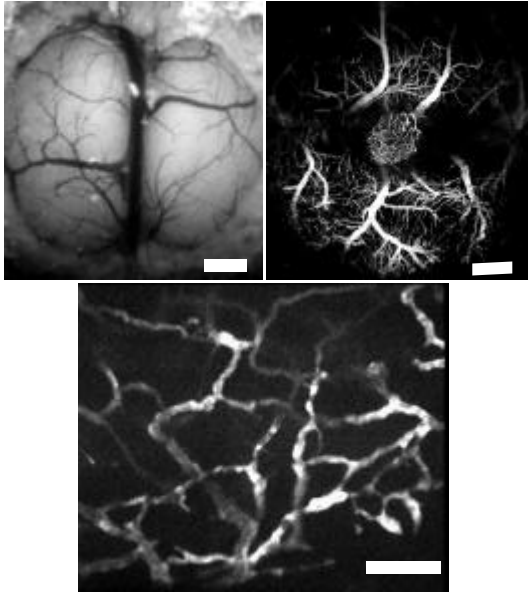


図1 マウスCW顕微鏡像
 A:手術後の可視光による像
 B、C:U87細胞を移植し11日目の蛍光色素による血管造影像
 スケールバーは1mm(A,B)、100 μ m(C)を示す。

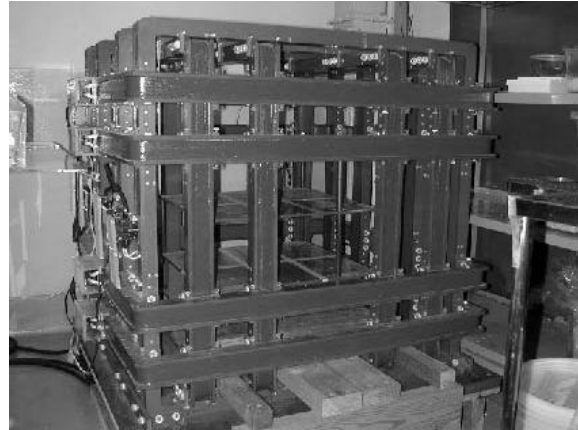


図2 超低周波電磁界慢性暴露装置
 本暴露装置は3軸各4個のコイルから構成され、各軸で独立した電源装置を通して内部で均一な電磁界を発生することができる。またコイル内部には3段からなるケージ棚があり、動物はその棚の上で飼育する。

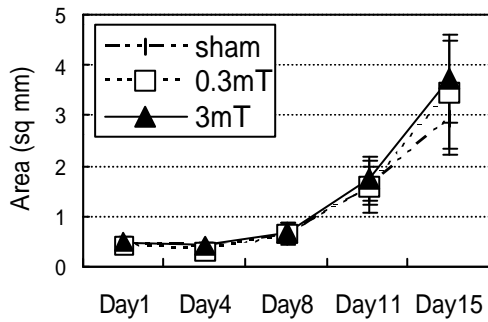


図3 電磁界慢性暴露とCW内移植脳腫瘍組織の増殖
 対照群(偽暴露群: N=18)、0.3mT暴露群(N=10)、3mT暴露群(N=18)で図中のプロットはそれぞれ mean \pm S.E.を示す。

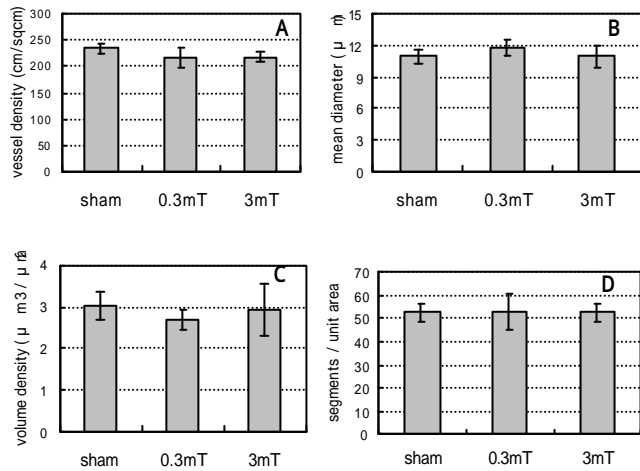


図4 Window内に観察される腫瘍血管の微小循環指標に対する電磁界暴露の影響
 A 血管密度、B 平均血管径、C 血管容積密度、D 平均分岐数を示す。対照群(sham :N=11)、暴露群(3mT : N=10)でそれぞれ mean \pm S.E.を示す。

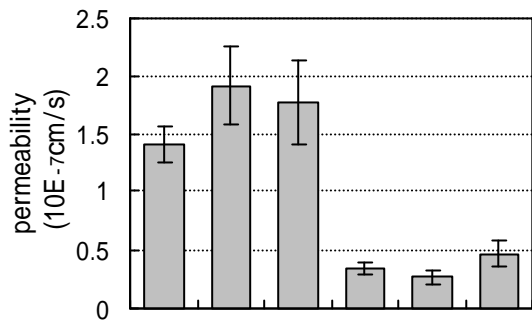


図5 腫瘍血管及び健常脳軟膜血管における物質透過性
U87は腫瘍血管を、Pialは健常脳軟膜血管を示し、それぞれ、対照群（sham）、0.3mT暴露群、3mT暴露群を示す。

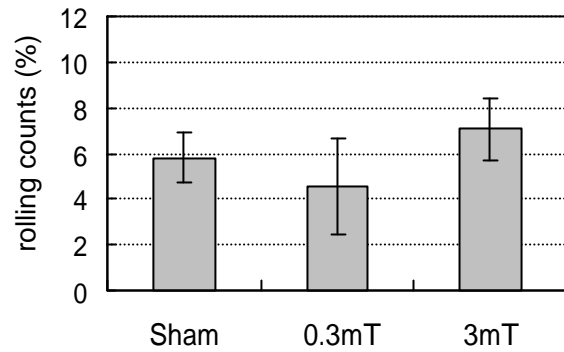


図6 腫瘍血管内の白血球粘着能の比較
Rhodamine6Gにより蛍光染色した白血球を解析し、一定時間に血管を流れる総白血球に対する粘着白血球の割合を示した。非暴露群（sham：N=11）暴露群（3mT：N=14）のrolling countをそれぞれmean±S.E.で示す。

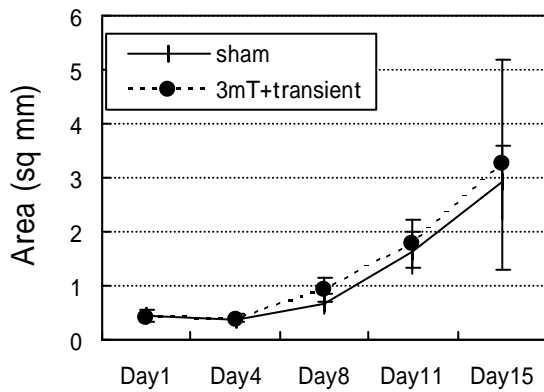


図7 トランジェント電磁界亜慢性暴露とCW内移植脳腫瘍組織の増殖
対照群（偽暴露群：、N=18）、3mT(50Hz)+トランジェント暴露群（N=4：Day15のみN=2）で、図中のプロットはそれぞれmean±S.E.を示す。

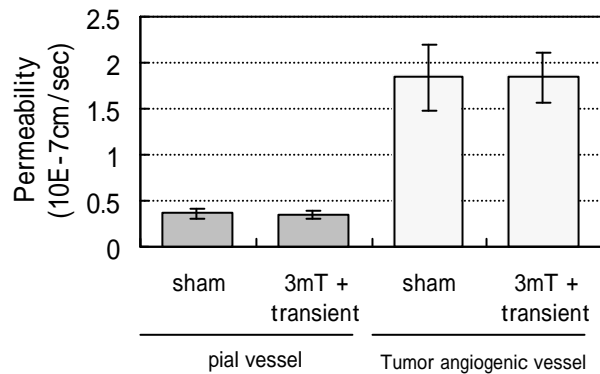


図8 トランジェント暴露による血管の物質透過性
健常マウスの脳軟膜血管（Pial vessel）と腫瘍モデルマウスの腫瘍内血管のTMR-BSAに対する透過性を定量化した。

研究発表

発表題名	掲載法/学会等	発表年月	発表者
(紙上発表) ・ Subchronic effects of whole body exposure to 50 Hz electoromagnetic fields on leukocyte-endothelium interaction in the microcirculation in mice	Microcirculation annual. 2002; 18, 111-112	14.8	A. Ushiyama, H. Masuda, C. Ohkubo
・ Effects of subchronic exposure to extremely low frequency electromagnetic fields on tumor growth and angiogenesis in the mouse cranial window.	Microcirculation annual. 2003; 19	15.8 in press	A. Ushiyama, H. Masuda, C. Ohkubo
(口頭発表) ・ マウス背側皮膚透明窓内微小血管の白血球 - 内皮相互作用における超低周波電磁界亜慢性暴露の影響	第 27 回日本微小循環学会総会	14.2	牛山 明、増田 宏、大久保千代次
・ Effects of whole body exposure to 50 Hz electromagnetic fields on the leukocyte adhesion to the endothelial walls in mice.	24th Annual meeting, bioelectromagnetic society (第 24 回米国生体磁気学会年会)	14.6	Ushiyama A, Ohkubo C.
・ Effects of whole body exposure to threshold levels of 50Hz electromagnetic fields on the intramicrovascular leukocyte adhesion in conscious mice.	The 1st Asian and oceanic congress for radiation protection (第 1 回アジア放射線防護会議)	15.10	Ushiyama A, Ohkubo C.
・ 超低周波電磁界暴露による移植脳腫瘍の増殖および血管新生に及ぼす影響	第 28 回日本微小循環学会総会	15.2	牛山 明、増田 宏、大久保千代次
・ 腫瘍血管新生によって構築された微細血管の 3 次元形態解析	第 28 回日本微小循環学会総会	15.2	森田充彦、本間恭二、志田 卓、谷下一夫、牛山明、大久保千代次、安村和彦
・ 商用周波電磁界暴露の脳腫瘍微小循環に及ぼす生体顕微鏡的影響評価	電気学会マグネティクス研究会	15.1	牛山 明、増田 宏、大久保千代次
・ Effects of subchronic exposure to extremely low frequency electromagnetic fields on the cranial microcirculation in the brain tumor bearing mouse.	25th Annual meeting, bioelectromagnetic society (第 25 回米国生体磁気学会年会)	15.6 (Accepted)	A. Ushiyama, H. Masuda, C. Ohkubo

工業所有権

・なし