

電磁波照射の
脳微小循環動態に及ぼす生物学的影響評価

平成12年度 報 告 書

平成13年3月

総 務 省

電磁波照射の脳微小循環動態に及ぼす生物学的影響評価

平成 12 年度 報告書

大久保千代次, 増田 宏, 牛山 明,
山中幸雄*, 渡辺聡一*, 和氣加奈子*, 多氣昌生**

国立公衆衛生院 生理衛生学部, *独立行政法人・通信総合研究所 電磁環境グループ,

**東京都立大学大学院 工学研究科電気工学専攻

目 次

1. 目 的	1
2. 対象と方法	3
3. 結 果	5
4. 考 察	7
5. 表および図	9

1. 目的

我々は平成 11 年度の調査研究により、慢性埋込型の cranial window を開発し脳軟膜微小循環動態を動物が生きた状態で機能的に且つリアルタイムで観察できるようになった。また、この window を埋め込んだラットを用いて、モノポールアンテナより照射される 1,439MHz 電磁波の脳軟膜微小循環に及ぼす影響を、急性ばく露および慢性ばく露について検討したがいずれの条件においても影響は認められなかった。

平成 11 年度に用いたアンテナ出力は脳平均 SAR が最大で 8W/kg に設定した。血液—脳関門(BBB)に影響があるとする Fritze らの用いた脳平均 SAR7.5W/kg よりも大きい出力においても、我々の実験では BBB のみならず微小循環動態諸指標にも変化は認められなかったことを示している。使用した周波数およびばく露時間等多少の実験条件は異なるものの実験結果に違いが生じたのは、Tsurita をはじめ他の研究者が指摘しているように Fritze 等の結果は電磁波照射に伴う全身への熱的影響に起因している可能性が高い。実際、我々のばく露装置では Fritze 等の装置ほど全身平均 SAR が上昇していないことが分かっている。しかし、我々が用いたばく露条件においても脳平均 SAR が最大となる 8W/kg 時の全身平均 SAR は 1.82W/kg であり、加温による生体影響が生じるとされる 1~4W/kg を越えているため、厳密に局所のみの影響を検討したとは言い難い。したがって、この問題をより明らかにするためにも、全身平均 SAR を可能な限り小さく抑さえ、より局所的に電磁波を照射出来るばく露装置を用いて生体影響を検討する必要がある。

そこで、今回は、今年度新たに我々が開発した局所ばく露に適したループアンテナを用いて、昨年度同様に慢性埋込型 cranial window を装着したラットの脳軟膜微小循環動態に及ぼす電磁波ばく露の急性影響を検討した。

2. 対象と方法

1) 実験動物

10 週齢の雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (東京実験動物) に慢性埋込型 cranial window 手術を施し、1 週間経過した動物 (体重 426 ± 18 , $n=19$) を実験に用いた。ラットは window 埋込、電磁波ばく露および生体顕微鏡的観察時いずれも ketamine-xylazine cocktail (10:1, 100mg/kg) の筋注および pentobarbiturate (25mg/kg) の腹腔内投与により麻酔した。

2) Cranial window 埋込

Fig. 1(a)に示すようにラット頭頂部頭蓋骨および硬膜を円形に取り除き、そこに window アダプターを取り付けた後、カバーガラス窓を持つ凸型 window を接着剤にて固定した。術後1週目に Fig. 1(b, c)に示すように window が確実に装着され脳軟膜の血管床が観察可能なことを確認した。

3) 電磁波暴露

電磁波暴露は多氣・渡辺により開発された装置(Fig. 2, a)を用い、ループアンテナ(Fig. 2, b)より周波数 1.439GHz (PDC 方式) の電磁波をラット頭部へ照射した。電磁波強度は以下の3条件とした。

アンテナ入力	0.015	0.15	0.57	(W)
脳平均 SAR	0.2	2.0	7.5	(W/kg)
全身平均 SAR	0.0097	0.097	0.36	(W/kg)

電磁波暴露を 10 分間、観察を 20 分間とし、暴露強度が弱い順からこの組み合わせを 3 回繰り返した (Fig. 3)。なお、暴露装置のファンによる強制換気を実施すると麻酔下の動物の体温低下を招くため、暴露装置内の換気は行わなかった。

以上の条件で電磁波を暴露したラットを EMF 群、同一の操作は行うが電磁波暴露しないラットを Sham 群とした。なお、Sham 群は FITC-Dx を用いた BBB 機能評価実験のみ設けた。

4) 生体顕微鏡的観察

ラットを脳定位固定装置に固定し、蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡下で cranial window 内の脳軟膜微小循環を観察した。血管径の測定には sodium-fluorescein (MW: 354, 2.0%)、血流速度の計測には蛍光粒子 (2.0% Solids-Latex, 1.0μ YG,

1.0 μ m)、BBB 機能の検討には 2.0% sodium-fluorescein または FITC-Dx (分子量: 250000, 50mg/kg)、白血球挙動計測には rhodamine 6G (100 μ g/kg) の 3 種類の蛍光色素を用い、それぞれラット尾静脈より投与した。ただし、FITC-Dx のみ暴露前の計測時に一回だけ投与し、その他に関しては暴露終了毎に投与を行った。これらを投与した後、rhodamine 6G には波長 514nm を、それ以外は波長 490nm の励起光をラット脳表面に照射し window 内蛍光像を蛍光顕微鏡 (BX50WI, OLYMPUS) および共焦点レーザー顕微鏡 (CSU10, YOKOGAWA) により観察した。また、同時に顕微鏡像は image intensifier を有する CCD カメラを介してビデオに記録し画像解析に用いた。

5) 統計解析

全ての計測値は mean \pm s.e. で表した。有意差検定は *t* 検定または ANOVA を用い、有意水準 5%未満を有意差ありとした。

3. 結果

1) 血行力学的変化

電磁波暴露前後の血行力学的変化を検討するため、脳軟膜細静脈の血管径とその血管内を流れる蛍光粒子速度を計測した。なお、細静脈はばく露前の血管径から後毛細血管細静脈(8~30 μm)、集合細静脈(31~50 μm)の2種類に分類して検討を行った。

暴露前の血管径を100%として同一血管の暴露前後の変化を見ると、暴露による影響は認められなかった (Table 1)。

粒子速度は後毛細血管細静脈においてはばく露の前後で変化は認められなかったが、集合細静脈については脳平均 SAR2.0W/kg ばく露後にのみ有意な速度低下が認められた (Table 2)。

2) 電磁波暴露直後における BBB 機能変化

暴露直後に脳軟膜細静脈における sodium-fluorescein の血管外漏出を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

Fig.4 (b)は cranial window より観察される脳表面約 1/4 の像であるが、いずれの部分においても蛍光色素の漏出は認められなかった。更に倍率を上げ共焦点効果により、脳表の集合細静脈(a)、脳表より数十 μm 深部の毛細血管および後毛細血管細静脈(c)を観察したが、いずれの血管においても色素の漏出は認められなかった。

Sodium-fluorescein 投与時の代表的な脳軟膜細静脈顕微鏡像を撮影し、白線で記す部分の蛍光強度変化を調べた(Fig. 5)。その結果、各強度の暴露後に得られたいずれの画像についても血管外における蛍光強度上昇は Pre と同様認められなかった。同様の実験を EMF、Sham それぞれについて 4 例ずつ行ったが、すべての個体で sodium-fluorescein の血管外漏出は認められなかった (Table 3)。

3) 電磁波暴露中および暴露直後における BBB 機能変化

Sodium-fluorescein よりも高分子のため体内代謝に時間を要する FITC-Dx を電磁波暴露前に静脈内投与することにより、暴露中および暴露後の循環血漿中 FITC-Dx の血管外への蓄積を計測した。なお、FITC-Dx は脳平均 SAR 8W/kg となる電磁波強度にて 60 分間暴露をしてもその蛍光強度は変化しないことが分かっている。

Pre の値を 100%としてそれぞれのばく露後に得られた像の平均輝度を求めた(Fig. 6)。その結果、Sham 群および EMF 群共に Pre からの有意な輝度変化はなく、また、両群間においても有意な差は認められなかった。

4) 白血球挙動の変化

Rhodamine 6G により染色された白血球の挙動につて、粘着白血球および回転白血球の

数を指標に電磁波暴露前後の変化を検討した。結果は血行力学的変化と同様血管径により2種類の細静脈に分けて解析した (Table 6)。

粘着白血球について、いずれの細静脈においても電磁波暴露の前後でその数に変化は認められなかった。一方、回転白血球においても、後毛細血管細静脈においてはばく露の前後で有意な変化はなかったが、集合細静脈においては脳平均 SAR2.0W/kg のばく露後に白血球数の有意な低下が認められた。しかしながら、それより強いばく露条件においては同様の現象は見られなかった。

4. 考 察

これまで用いてきたモノポールアンテナよりも全身加温の影響が少なく、且つ脳に対してより局所的に電磁波照射の出来るループアンテナを用いて、電磁波の脳軟膜微小循環動態に及ぼす影響を検討した。

まずばく露条件について、モノポールアンテナにおける局所 SAR の全身 SAR に対する比が 2~4 倍であったのに対し、今回用いたループアンテナでは約 20 倍となった。すなわち、本実験の最大出力ばく露時、脳平均 SAR7.5W/kg においてもラットの全身平均 SAR は 1W/kg 未満となり、全身加温の生じると言われている全身平均 SAR1~4W/kg を下回っている。これにより平成 12 年度の実験から得られた結果のほとんどは、脳への局所ばく露による影響と考えられよう。

このばく露システムを用いてこれまで問題となってきた BBB の透過性について 2 種類の蛍光色素を用いて生体顕微鏡的に検討を行ったが、電磁波ばく露後の血管外への色素漏出による輝度の上昇はなかった。すなわち BBB の透過性の亢進は認められなかった。また、血管透過性に関与すると言われる粘着白血球数についても電磁波ばく露により数が増加するようなことはなかった。この結果はこれまで用いてきたモノポールアンテナの結果を指示するものであり、また、全身平均 SAR が低い条件下で BBB 透過性の亢進が生じないことを改めて示したことになる。

その一方で、微小循環動態の指標となる蛍光粒子速度および回転白血球数において、電磁波ばく露の前後で有意な変化が認められた。細静脈内粒子速度は脳平均 SAR2.0W/kg にて有意に低下し、回転白血球数は脳平均 SAR0.2W/kg にてのみ同じく有意に減少を示した。すなわち、これらの変化は強度変化に依存せず特定の SAR のみに生じた現象であった。Salford 等は 1994 年に BBB の透過性亢進がある特定の SAR に起こりやすいことを報告している。我々の結果は BBB についてはないが、このような SAR の特異性が微小循環動態にも存在する可能性も否定できない。しかしながら、いずれの変化も血管径が太い集合細静脈でのみ認められ後毛細血管細静脈では同一のばく露強度にもかかわらず変化していない。また、もう一つの指標である血管径には変化が認められていない。さらには粒子速度、回転白血球数共にばく露直前の値は他のデータに比べ比較的高値を示しており、その為の影響があるように見えているのかもしれない。いずれにしても更なる検討が必要である。

以上、ループアンテナを用いた 10 分間の急性電磁波ばく露により、脳軟膜細静脈内の粒子速度および回転白血球数に若干の変化が認められたものの、それ以外の血管径、粘着白血球数、BBB 機能変化については有意な影響が認められなかった。今後は、今回変化の認められた微小循環動態指標について更に詳細に検討すると共に、生体影響を及ぼす閾値を調査すること等、ループアンテナの特性を生かした検討を進めていく必要があると思われる。

5. 表 および 図

Table 1 暴露前後の脳軟膜細静脈血管径変化(%)

脳平均 SAR	ばく露前血管径 (μm)	
	8~30	31~50
Pre	100	100
0.2W/kg	105.9±7.6	100.6±4.7
2.0W/kg	103.9±3.7	101.2±4.7
7.5W/kg	105.7±6.1	101.3±4.5

(n = 6)

Table 2 暴露前後の脳軟膜細静脈内蛍光粒子速度変化

脳平均 SAR	血管径 (μm)	
	8~30	31~50
Pre	1.3±0.1	1.9±0.4
0.2W/kg	1.3±0.2	3.0±0.5
2.0W/kg	1.5±0.2	1.3±0.2*
7.5W/kg	1.1±0.2	1.6±0.1

*: $p < 0.01$ v.s 2.0W/kg (mm/s, n = 6)

Table 3 暴露直後の sodium-fluorescein の血管外漏出

脳平均 SAR	Pre	0.2W/kg	2.0W/kg	7.5W/kg
Sham 群	-----	-----	-----	-----
EMF 群	-----	-----	-----	-----

(+): 漏出有り, (-): 漏出無し (n = 4)

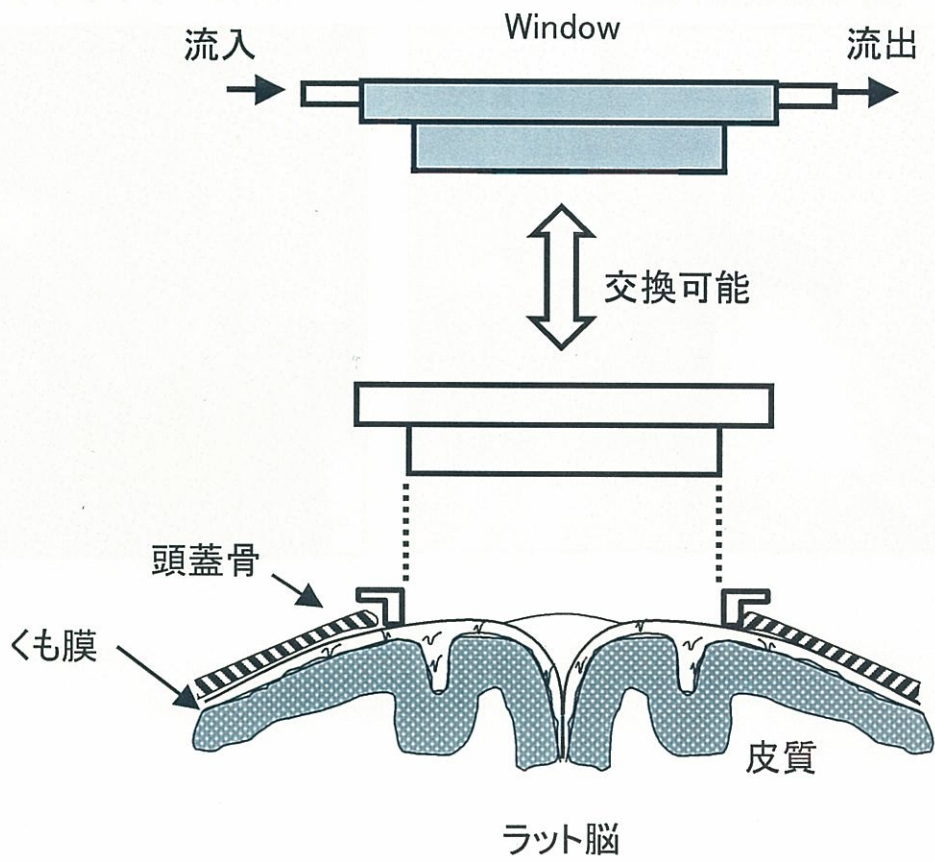
Table 4 暴露前後の脳軟膜細静脈内白血球挙動

血管径 (μm)	粘着白血球数		回転白血球数	
	8~30	31~50	8~30	31~50
Pre	2.6±0.5	3.0±0.4	2.3±0.9	5.7±1.1
脳平均 SAR 0.2W/kg	3.1±0.6	2.8±0.8	1.8±0.4	2.4±0.9*
脳平均 SAR 2.0W/kg	3.5±0.4	4.8±0.6	1.2±0.5	2.4±0.5
脳平均 SAR 7.5W/kg	3.0±0.7	3.3±0.4	1.5±0.7	1.4±0.6

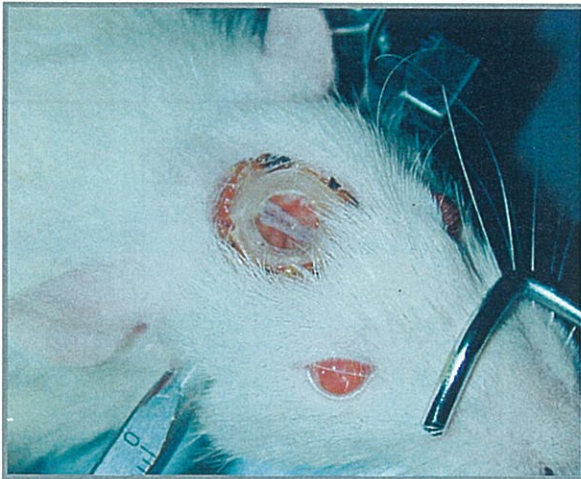
*: $p < 0.05$ v.s Pre

単位: 個 (n = 6)

(a) Window装着法



(b) ラット頭頂部



(c) 脳軟膜血管床

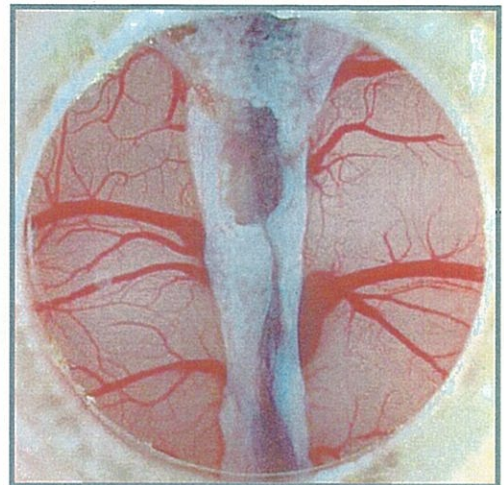
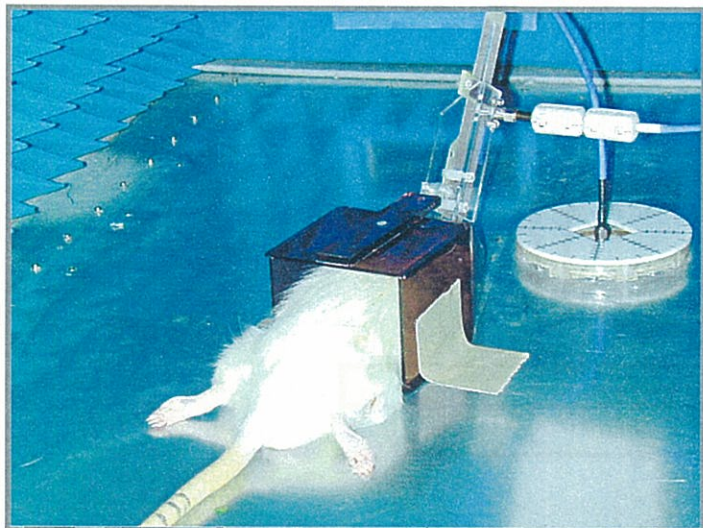


Fig. 1 慢性埋込型cranial window

(a) 曝露装置内部



(b) ループアンテナ

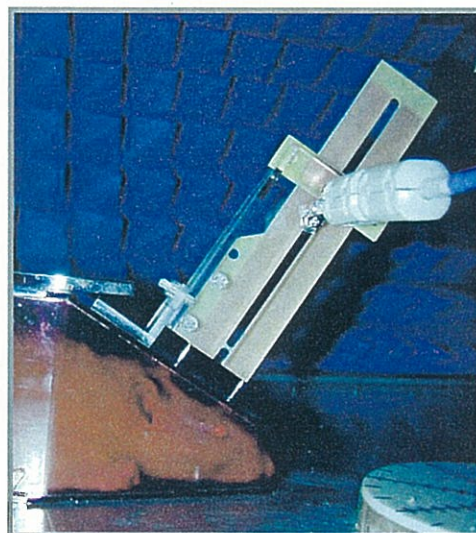


Fig. 2 急性ばく露装置

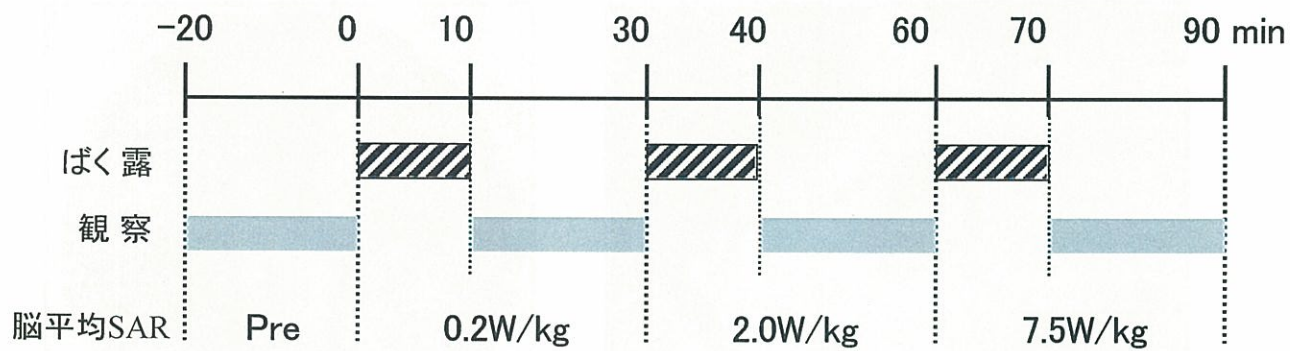


Fig. 3 暴露プロトコル

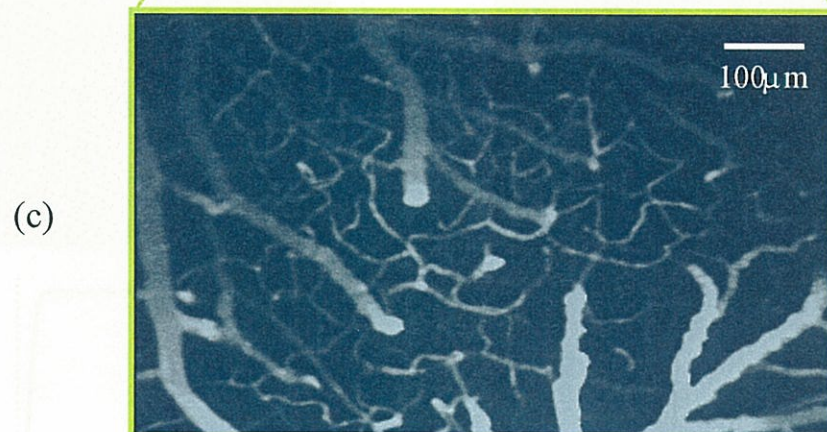
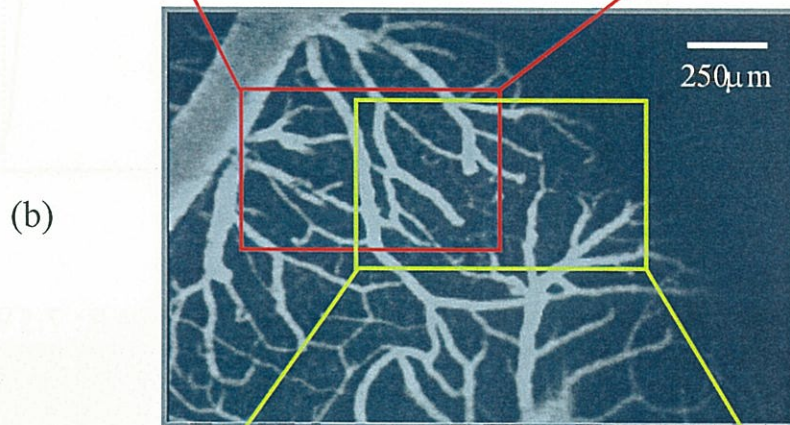
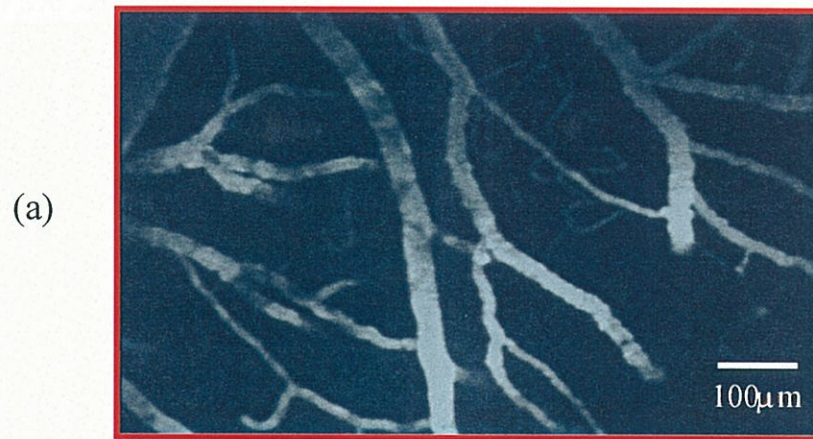


Fig. 4 Sodium-fluorescein 静脈内投与後の脳軟膜共焦点レーザー顕微鏡像

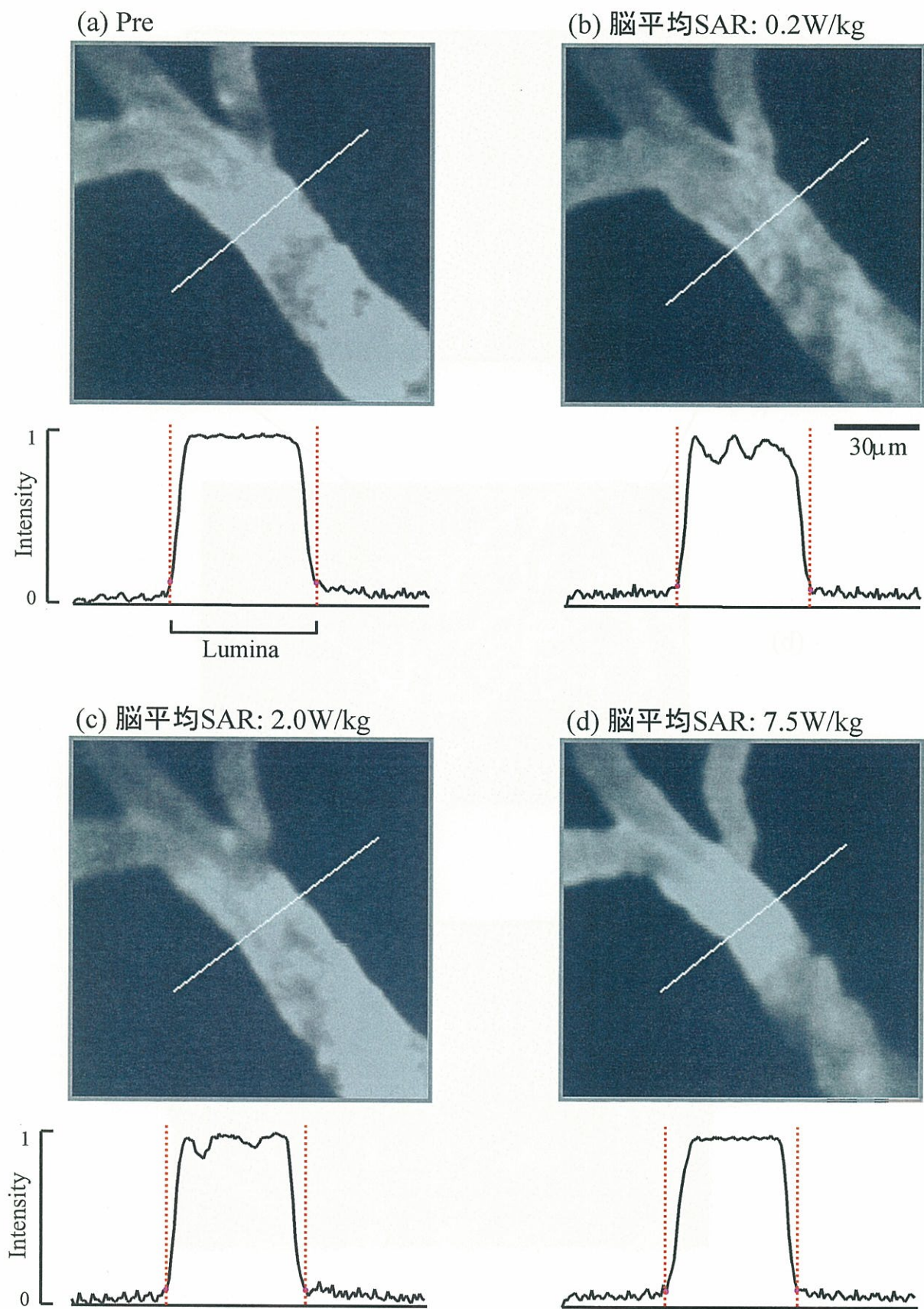


Fig. 5 曝露直後のsodium-fluorescein血管外漏出

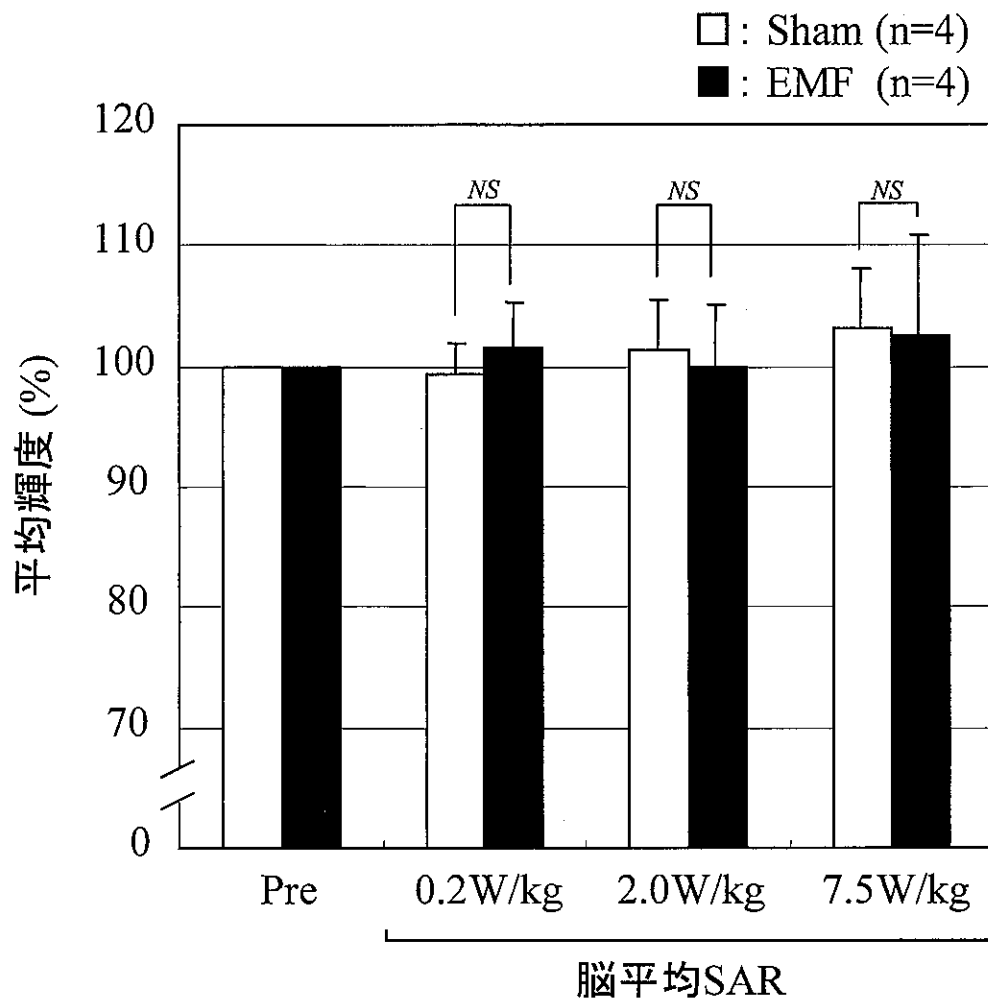


Fig. 6 曝露前後の脳表面顕微鏡像平均輝度変化

