衝撃波の変異原性と変異原性修飾作用

玉川 勝美, 庵谷 尚正*

仙台市衛生研究所

(〒983 仙台市若林区卸町東2丁目5-10)

*東北大学医学部

(〒980 仙台市青葉区星陵町2-1)

[平成5年7月16日受理]

Mutagenicity and mutagenic modifying effects of shock waves

Katsumi TAMAKAWA and Naomasa IORITANI*

Sendai Municipal Institute of Public Health

(2-5-10 Oroshimachihigashi, Wakabayashiku, Sendai 983)

*Tohoku University, School of Medicine

(2-1 Seiryohcho, Aoba-ku, Sendai 980)

[Received July, 16, 1993]

Summary

The Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy (ESWL) is well recognized to be one of the important clinical treatments for destruction of calculi in kidney and bladder by employing underwater shockwave focusing. However, the genotoxic effects of shock waves have not been clarified, yet. In this study, mutagenic and mutagenic modifying effects of shock waves were examined by using the Ames test.

Each bacterial tester strain (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA97, TA102) and the mixture of tester strain and mutagen [*cis*-diaminedichloroplatinum (CDDP)] were shot by shock waves. Mutagenic response of shock waves was not detected in any strains, with and without S9 mix, by the shot of shock waves with maximal pressure between 0 and 100 MPa.

Mutagenic and cytotoxic effects of CDDP were enhanced after shock wave shots on the mixture of tester strain and CDDP, indicating that shock waves may have indirect effects on the genotoxicity of chemicals.

Key Words: ESWL, shock waves, mutagenicity, the Ames test, *S. typhimurium* strains, CDDP, enhancing effect

1. はじめに

最近、水中衝撃波が腎結石などの体内結石の破壊を目的とする治療手段に利用されつつある。衝撃波や磁場、超音波などの物理作用を診断や診療に応用する試みは、広く行われてきているがその生体影響、特に遺伝的影響について論じた報告は比較的少ない。

衝撃波の生体影響について、庵谷ら¹⁾は電顕による所

見から腎の小動脈の中膜筋層や尿管上皮に細胞レベルの壊死や細胞内小器官の破壊が見られることを既に報告している。また、衝撃波の細胞レベルでの障害については大島ら²⁾によっていくつかの報告がなされている。大島らはフェニルアラニン脱水素酵素活性を増強した大腸菌組換え体 (*E. Coli* JM109/pKPDH2) のスフェロプラストを用い、衝撃波照射の際に副次的に起きる細胞破壊の程度を漏出酵素の活性を計ることによって調べてい

る。その中で、衝撃波による細胞破壊の際には発生する cavitation（気泡）が重要な役割を演じていることを示した。また、細胞内小器官を持つ真核細胞として酵母（*Candida boidinii* DSM 70026）を用いて、衝撃波の生物影響を調べ、衝撃波の照射回数の増加とともに、生菌数の減少が認められると述べている。

このような、細胞レベルでの障害が、紫外線や放射線などのように DNA レベルでの障害に起因している可能性を必ずしも否定することはできない。

衝撃波の遺伝的影響についての報告は非常に少ないが、大島ら³¹⁾は *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 を用いた umu テストにより、衝撃波には変異原性は認められないことを報告している。

本研究では変異原性試験法として一般に広く用いられている Ames テストにより、衝撃波の変異原性の有無について検討を試みた。さらに、化学変異原の活性発現に対する衝撃波照射の影響について考察を加えた。

2. 方法

1) 試薬

1,2-benzopyrene（以下、B(a)P と略す、特級、和光純薬）、2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide（以下、AF-2 と略す、特級、和光純薬）、2-aminoanthracene（以下、2-AA と略す、特級、和光純薬）、6-chloro-9-[3-(2-ethyl-amino 9 propylamino)-2-methoxy-acridine（以下、ICR-191 と略す、SIGMA 社）、mitomycin C（以下、MMC と略す、生化学用、和光純薬）、cis-diaminedichloroplatinum（以下、シスプラチン、あるいは CDDP と略す、抗悪性腫瘍剤ランダ注-シスプラチン製剤、日本化薬）

S9（フェノバルビタール、ベンゾフラボンにより酵素誘導、オリエンタル酵母）、コ・ファクター（混合凍結乾燥品、オリエンタル酵母）

2) 衝撃波の照射方法

片面にラテックス膜を張ったプラスチック製円筒管を消毒用アルコールで洗浄し、無菌箱内でよく乾燥した。これに Ames テスト用の試験菌の前培養菌液 3 ml を入れ、Fig. 1 に示すように、37℃ 温浴中で衝撃波発生装置の焦点部セットし、衝撃波を照射した。衝撃波の発生には以下の 2 つの方法を用いた。

〔方法 1（低圧用）〕

直径 125mm、曲率半径 180mm のワンピース型ピエゾ素子を水中底部に固定し、高圧駆動回路から高電圧パルス波を印加する方法。最高圧力領域の半値幅：4 × 4 × 37mm、ピーク圧：20MPa

〔方法 2（高圧用）〕

直径 300mm、曲率半径 260mm のピエゾ素子 24 枚で構成される装置を用い、高圧駆動回路から高電圧パルス波を印加する方法。最高圧力領域の半値幅：1 × 1 × 19mm、ピーク圧：0 ~ 100MPa で可変

3) 変異原性試験

変異原性試験は、Ames テスト（プレート法）⁴⁾を用いた。試験菌として *S. typhimurium* TA97、TA98（フレイムシフト型変異原検出用菌）、TA100（塩基対置換型検出用菌）および、TA102（架橋型変異原、酸化型変異原検出用菌）の 4 種を用い、±S9mix の系で試験を行った。

Fig. 1 Experimental setup for shock waves treatment of bacterial strains

4) 生菌数の測定

前培養菌液は衝撃波を照射した後、Vogel Bonner 緩衝液により段階的に 10^6 倍に希釈した。ここから、 $100\mu\text{l}$ を滅菌試験管に分注し、 45°C に保温したソフトアガーを2 ml 加え、よく混合した後、予め調製しておいた栄養寒天培地に重層した。これを1～2日間、 37°C で培養後、出現したコロニー数をカウントした。

3. 結果および考察

1) 衝撃波の変異原性

衝撃波は一般にその強度（ピーク圧）、照射回数、照射間隔の3つの要素で規定される。

そこでまずはじめに、強度を0から100MPaまで変化させた場合の変異原性と、試験菌の生存数を調べた。結果をTable 1にまとめた。

S. typhimurium TA98, TA100, TA97, TA102について

試験を行った結果、菌種、S9 mixの有無にかかわらず衝撃波には変異原性は認められなかった。また、生菌数にも変化は認められなかった。衝撃波の強度を100MPaに固定し、照射回数を0から3000回まで変化させた場合の結果をTable 2に示した。復帰変異コロニー数の増加は認められなかったが、生菌数がわずかながら減少する傾向が認められた。衝撃波の強さを20MPaに固定し、照射回数を毎秒1回から5回まで増やして試験を行った場合にも変異原性は認められなかった（Table 3）。

実際の診療では60MPaから100MPaのピーク圧の衝撃波が用いられることが多いが、今回の結果ではこの条件下でも衝撃波に変異原性は確認されなかった。

大島ら³⁾はumuテストによる試験結果から、撃波には変異原性は認められないと述べているが、今回の*S. typhimurium*を用いたAmesテストにおいても変異原性

Table 1 Mutagenicity of of shock waves (I) (Effect of peak pressure of shock waves)

1) *S. typhimurium* TA98

press. [MPa]	int. [n/sec]	freq. [n]	+S9mix			-S9mix			survivors [$\times 10^9$]
			[rev./plate]	(mean)		[rev./plate]	(mean)		
0	2	300	38	41 (40)		29	24 (27)		2.5
20	2	300	25	35 (30)		45	38 (42)		2.3
40	2	300	33	44 (39)		35	24 (30)		2.3
60	2	300	35	35 (35)		38	28 (33)		2.4
80	2	300	28	33 (31)		38	29 (34)		2.5
100	2	300	22	43 (33)		40	41 (41)		2.5
100	2	900	38	39 (39)		39	35 (37)		2.6
B(a)P(5 $\mu\text{g}/\text{plate}$)			341	364 (353)		—	—		
AF-2 (0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$)			—	—		360	382 (371)		

*B(a)P : bezo(a)pyrene

**AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2) *S. typhimurium* TA100

press. [MPa]	int. [n/sec]	freq. [n]	+S9mix			-S9mix			survivors [$\times 10^9$]
			[rev./plate]	(mean)		[rev./plate]	(mean)		
0	2	300	72	73 (73)		101	103 (101)		2.6
20	2	300	83	83 (83)		92	84 (88)		2.6
40	2	300	73	71 (72)		91	106 (99)		2.5
60	2	300	84	86 (85)		80	118 (99)		2.5
80	2	300	73	92 (83)		96	83 (90)		2.3
100	2	300	75	86 (81)		93	95 (94)		2.5
100	2	900	94	75 (85)		80	65 (73)		2.3
B(a)P(5 $\mu\text{g}/\text{plate}$)			523	491 (507)		—	—		
AF-2(0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$)			—	—		367	344 (356)		

*B(a)P : bezo(a)pyrene

**AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

3) *S. typhimurium* TA97

press. [MPa]	int. [n/sec]	freq. [n]	+S9mix			-S9mix			survivors [$\times 10^9$]
			[rev./plate]	(mean)		[rev./plate]	(mean)		
0	2	300	215	226 (221)		199	191 (195)		2.6
20	2	300	247	209 (228)		185	180 (183)		2.5
40	2	300	237	240 (239)		196	180 (188)		2.5
60	2	300	239	251 (245)		195	179 (187)		2.5
80	2	300	240	290 (265)		221	213 (217)		3.1
100	2	300	226	237 (232)		180	209 (195)		3.0
100	2	900	244	214 (229)		178	195 (187)		2.7
2-AA (1 μ g/plate)			1092	1172 (1132)		—	—		
ICR191 (0.05 μ g/plate)			—	—		808	812 (810)		

*2-AA : 2-amino-anthracene

4) *S. typhimurium* TA102

press. [MPa]	int. [n/sec]	freq. [n]	+S9mix			-S9mix			survivors [$\times 10^9$]
			[rev./plate]	(mean)		[rev./plate]	(mean)		
0	2	300	214	177 (196)		187	242 (215)		2.5
20	2	300	250	248 (249)		241	225 (233)		2.7
40	2	300	275	251 (263)		255	186 (221)		2.6
60	2	300	277	270 (274)		271	260 (266)		2.8
80	2	300	292	255 (274)		271	271 (271)		2.8
100	2	300	275	285 (280)		271	273 (272)		2.4
100	2	900	264	308 (286)		295	275 (285)		2.5
2-AA (1 μ g/plate)			665	606 (636)		—	—		
MMC (0.005 μ g/plate)			—	—		380	330 (355)		

*2-AA : 2-amino-anthracene

**MMC : Mitomycin C

は認められなかった。

2) 変異原物質に対する衝撃波の影響

衝撃波を照射した菌としない菌について変異原物質に対する応答を比較した。試験菌としてTA98を用い、13時間前培養した菌液に、10~20MPaの衝撃波を毎秒1回の間隔で、300回照射したものをを用いた。結果をTable 4に示した。B(a)P, AF-2について検討を行ったが、衝撃波を照射した菌としない菌とで有意の差は認められなかった。

次に、試験菌と変異原物質の混合溶液に対する衝撃波照射の影響について検討を行った。試験菌は*S. typhimurium* TA98, TA100, TA97, TA102の4種とし、それぞれ13時間前培養したものをを用いた。また、変異原物質としてシスプラチンを、衝撃波の照射はピーク圧100MPa, 照射間隔は毎秒2回, 照射回数は1000回とした。

シスプラチンは抗腫瘍性を有する白金化合物で膀胱癌、腎盂・尿管腫瘍、胃癌などに広く用いられているが、*S. typhimurium* TA98, TA100に変異原性を有することが知られている。結果をTable 5にまとめた。

いずれの菌についても、衝撃波を照射した場合は、しない場合に比べ、シスプラチンの変異原性、細胞毒性が共にやや増強される傾向が認められた。

廣田ら^{5,6)}は磁場の遺伝子への影響についてAmesテストや小核試験により検討を行い、磁場そのものには変異原性は認められないものの、種々の化学変異原に対し活性修飾作用(増強作用、抑制作用)を有することを示している。

このような物理作用による変異原活性修飾の作用機構については必ずしも明らかではないが、化学物質の生物活性の発現に物理作用が影響しているという点で大変に興味深い。

Table 2 Mutagenicity of of shock waves (II) (Effect of frequency of shock wave shots)

1) *S. typhimurium* TA98

press. [MPa]	int. [n/sec]	freq. [n]	+S9mix		-S9mix		survivors	
			[rev./plate]	(mean)	[rev./plate]	(mean)	[$\times 10^9$]	
100	2	0	40	59 (50)	35	47 (41)	2.1	
100	2	1000	72	71 (72)	57	44 (51)	2.0	
100	2	3000	80	85 (83)	43	61 (52)	1.8	
B(a)P(5 μ g/plate)			447	447 (447)	—	—		
AF-2 (0.1 μ g/plate)			—	—	388	376 (382)		

* B(a)P : bezo(a)pyrene

** AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2) *S. typhimurium* TA100

press. [MPa]	int. [n/sec]	freq. [n]	+S9mix		-S9mix		survivors	
			[rev./plate]	(mean)	[rev./plate]	(mean)	[$\times 10^9$]	
100	2	0	87	106 (97)	119	117 (118)	2.6	
100	2	1000	111	123 (117)	134	120 (127)	2.4	
100	2	3000	93	83 (88)	123	107 (115)	1.7	
B(a)P(5 μ g/plate)			611	646 (629)	—	—		
AF-2(0.01 μ g/plate)			—	—	334	356 (345)		

* B(a)P : bezo(a)pyrene

** AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

3) *S. typhimurium* TA97

press. [MPa]	int. [n/sec]	freq. [n]	+S9mix		-S9mix		survivors	
			[rev./plate]	(mean)	[rev./plate]	(mean)	[$\times 10^9$]	
100	2	0	268	275 (272)	222	241 (232)	2.3	
100	2	1000	299	274 (287)	259	259 (259)	2.1	
100	2	3000	274	297 (286)	237	252 (245)	1.1	
2-AA (1 μ g/plate)			973	936 (955)	—	—		
ICR191(0.05 μ g/plate)			—	—	773	625 (699)		

* 2-AA : 2-amino-anthracene

4) *S. typhimurium* TA102

press. [MPa]	int. [n/sec]	freq. [n]	+S9mix		-S9mix		survivors	
			[rev./plate]	(mean)	[rev./plate]	(mean)	[$\times 10^9$]	
100	2	0	341	391 (366)	185	147 (166)	2.8	
100	2	1000	345	353 (249)	226	210 (218)	2.2	
100	2	3000	355	315 (335)	242	246 (244)	2.1	
2AA (1 μ g/plate)			502	551 (527)	—	—		
MMC(0.005 μ g/plate)			—	—	293	297 (295)		

* 2-AA : 2-amino-anthracene

** MMC : Mitomycin C

Table 3 Mutagenicity of of shock waves (Ⅲ) (Effect of intervals of shock wave shots)

1) *S. typhimurium* TA98

press. [MPa]	int. [n/sec]	freq. [n]	+S9mix			-S9mix		
			[rev./plate]		(mean)	[rev./plate]		(mean)
-	-	0	41	33	(37)	35	23	(29)
20	1	45	34	41	(33)	24	20	(22)
20	1	150	42	50	(46)	27	28	(28)
20	1	300	37	42	(40)	29	36	(33)
20	5	300	56	38	(47)	31	22	(27)
20	5	1000	49	45	(47)	28	25	(27)
20	5	3000	52	39	(46)	29	20	(25)

2) *S. typhimurium* TA100

press. [MPa]	int. [n/sec]	freq. [n]	+S9mix			-S9mix		
			[rev./plate]		(mean)	[rev./plate]		(mean)
-	-	0	72	102	(87)	86	94	(90)
20	1	45	72	81	(77)	77	88	(83)
20	1	3000	96	89	(93)	79	85	(82)
20	1	300	74	75	(75)	88	100	(96)

Table 4 Mutagenic responses of shock wave treated thester strains

1) *S. typhimurium* TA98, +S9mix

B(a)P ¹⁾ [μg/plate]	SW treated ²⁾			SW non-treated ²⁾		
	[rev./plate]		(mean)	[rev./plate]		(mean)
0	54	54	(54)	53	52	(53)
1.25	143	129	(136)	127	131	(129)
2.5	266	261	(264)	235	232	(234)
5.0	428	418	(423)	408	412	(412)

¹⁾ B(a)P : bezo(a)pyrene²⁾ SW treated: shock wave treated
(peak pressure: 20MPa, interval: 1/sec, frequency: 300)2) *S. typhimurium* TA98, -S9mix

AF-2 ¹⁾ [μg/plate]	SW treated ²⁾			SW non-treated ²⁾		
	[rev./plate]		(mean)	[rev./plate]		(mean)
0	44	38	(41)	45	36	(41)
0.025	172	176	(174)	165	160	(163)
0.05	327	326	(327)	273	310	(292)
0.1	604	610	(607)	614	617	(616)

¹⁾ AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide²⁾ SW treated: shock wave treated
(peak pressure: 20MPa, interval: 1/sec, frequency: 300)

Table 5 Mutagenic effects of shock waves of the mixture of CDDP and tester strains

mixture	shock waves treatment	+S9mix			-S9mix		
		[rev./plate](mean)			[rev./plate](mean)		
TA 98 & CDDP	-	37	35	(36)	29	11	(20)
	+	21 ^{LE}	30 ^{LE}	(26 ^{LE})	13 ^{LE}	12 ^{LE}	(13 ^{LE})
TA100 & CDDP	-	73	78	(76)	60	67	(64)
	+	82 ^{LE}	68 ^{LE}	(75 ^{LE})	30 ^{LE}	46 ^{LE}	(38 ^{LE})
TA 97 & CDDP	-	301	283	(292)	211 ^{LE}	220 ^{LE}	(216 ^{LE})
	+	611	448	(530)	7 ^{LE}	18 ^{LE}	(13 ^{LE})
TA102 & CDDP	-	3352	3000	(3176)	2740	2500	(2620)
	+	4616	4512	(4564)	3056	2956	(3006)

* 3ml of CDDP (*cis*-diamine dichloroplatinum) solution (50 μ g/ml) was mixed to bacterial solution (3ml).

200 μ l of this mixture was used for mutation test.

Final dose of CDDP is 5 μ g/plate.

** SW:shock wave

(peak pressure:100MPa, interval:2/sec, frequency:1000)

*** LE:lethal effect

4. おわりに

超音波などの物理作用の変異原性については、最近いくつかの報告がなされている。

Libeskindら^{7,8,9)}は診断用超音波について、ヒトリンパ球を用いた姉妹染色分体交換 (SEC) により、変異原性が認められたと報告している。しかし、超音波に変異原性が認められたとする報告は少なく^{10,11)}, Morrisら¹⁰⁾や Wegnerら^{11,12)}を始め、大半の報告では SEC で変異原性は認められていない。さらに、Wegnerら^{12,13)}は Ames テストにより変異原性を調べ、変異原性は認められないと述べている。

本研究では衝撃波の変異原性、変異原性修飾作用について Ames テストを用い検討した。その結果、衝撃波のピーク圧、照射回数、照射間隔のいずれを変化させた場合にも変異原性は認められなかった。また、変異原物質 (CDDP) と試験菌との混合液に衝撃波を照射した場合には、CDDP の変異原性、細胞毒性共にやや増強されることがわかった。

庵谷ら¹⁾は、犬を用いた実験結果から、衝撃波照射によって腎組織に障害の生じる可能性のあることを指摘している。微生物と動物では細胞の膜組織が音響学的に大きく異なることから、今後は動物細胞を用い同様の試験を行っていく必要があると考えられる。

要 約

体外衝撃波療法は水中衝撃波の照射により腎結石や膀胱結石を破碎する治療手段である。しかし、その遺伝的影響に関しては必ずしも明らかではない。本研究ではエームズテストを用いて衝撃波の変異原性について検討を行った。試験菌 (TA98, TA100, TA97, TA102) および試験菌と変異原の混合液を衝撃波発生装置の焦点領域にセットし衝撃波を照射した。衝撃波の最高圧力を 0 から 100MPa まで変化させたが、菌種、S9mix の有無に係わらず衝撃波には変異原性は認められなかった。試験菌とシスプラチン (CDDP) の混合液に衝撃波を照射した場合には、CDDP の変異原性や細胞毒性が増強された。このことから、衝撃波は化学物質の遺伝毒性を増強する可能性のあることが示唆された。

文 献

- 1) Ioritani, N. and Kuwahara, M.: Renal tissue damage induced by focused shock waves. *AIP Conf.Proc.*, 208-Current Topics in Shock Waves, Am. Inst. Physics, 831-836 (1989)
- 2) 大島敏久, 田中悟広, 手島光司: 微生物細胞および生体機能成分に対する衝撃波の影響 - III, 平成 2 年度衝撃波シンポジウム講演論文集, 71-72p (1990)
- 3) 大島敏久, 田中悟広, 西谷泰子, 手島光司: 微生物

- 細胞および生体機能成分に対する衝撃波の影響－IV評価法の検討，平成3年度衝撃波シンポジウム講演論文集，315-316p（1992）
- 4) Ames, B.N., McCann, J. and Yamazaki, E.: Method for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* / mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, **31**, 347-364（1975）
 - 5) 廣田秀美，鈴木勇司，清水英祐，磁場の変異原性に与える影響，第16回日本環境変異原学会講演要旨集，113p（1987）
 - 6) 清水英祐，檜山雅子，鈴木勇司，林 和夫：磁場の変異原性に与える影響（第2報）．第17回日本環境変異原学会講演要旨集，68p（1988）
 - 7) Liebeskind, D.: Sister chromatid exchanges in human lymphocytes after exposure to diagnostic ultrasound. *Science*, **205**, 1273-1275（1979）
 - 8) Barnett, S. and Kossoff, G.: Temporal peak intensity as a critical parameter in ultrasound dosimetry. *J. Ultrasound Med.*, **3**, 385-389（1984）
 - 9) Haupt, M.: Ultrasonic induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Hum. Gent.*, **59**, 221-226（1981）
 - 10) Morris, S., Palmer, C., Fry, F. and Johnson: Effect of ultrasound on human lymphocytes. Sister chromatid exchange analysis. *Ultrasound Med. Biol.*, **4**, 253-258（1978）
 - 11) Wegner, R.D. and Meyenburg, M.: The effects of diagnostic ultrasonography on the frequencies of sister chromatid exchanges in chinese hamster cells and human lymphocytes. *Ultrasound Med.*, **1**, 355-358（1982）
 - 12) Wegner, R.D. and Lang, R.: Absence of mutagenic effect of diagnostic ultrasound in the *Salmonella* mutagenicity test (Ames test). *IEEE Transaction on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, UFFC **33**(2), 171（1986）
 - 13) Meyenberg, M., Lang, R., Saling, E., and Wegner, R.D.: Has pulse-doppler ultrasound mutagenic effects? Application of the Ames mutagenicity assay to test pulse-doppler equipment. *Echocardiography, A Jnl. of CV Ultrasound & Allied Tech.* **7**(5), 1-4（1990）