

高定常磁場およびパルス RF 電磁場環境における 細菌変異の有無

峯田昌之¹, 高橋康二¹, 油野民雄¹, 吉田逸朗²

¹旭川医科大学放射線医学 ²同細菌学

はじめに

最近の画像診断の日進月歩には目を見はるものがあり、特に MRI 装置の出現は画像診断領域では革命的な出来事であった。MRI 装置では高定常磁場、電磁波（パルスラジオ波）、傾斜磁場を用い核磁気共鳴現象を生じさせ、それを画像化するが、電磁場、電磁波の安全性が完全に保証されていないがために、3 か月未満の妊婦は検査の際十分な注意を要するなどの警告がある。事実、FDA¹⁾や NRPB²⁾では、根拠はないものの胎児や妊娠初期妊婦に対する使用は十分な注意を喚起しており、催奇形性を含めた催変異作用の有無に関しても、今後、確立しなくてはならない課題の一つである。

本研究は、MRI 装置の安全性を確認することを目的として行われた。MRI 装置で用いられる高定常磁場およびパルスラジオ波環境を近似的に作成し、高定常磁場単独、高定常磁場にパルスラジオ波が加えられた環境は増殖期の細菌に変異を生じさせることができるか否かを検討することが目的である。

方 法

1. 高定常磁場およびパルスラジオ波環境の作成

本研究に用いられた高定常磁場およびパルスラジオ波環境はすべて以下のとおりに設定され、実験に使われた環境は同一条件である。

使用した機器はパルスフーリエ変換 NMR 装置（日本電子製 GX-270 FT-NMR）であり、磁場強度は 6.3T（定常磁場）である。MRI 装置のスピネコー法による画像作成時に使われるパルスラジオ波を想定するために、90 度パルスと 180 度パルスのパルス系列を作成した。6.3T の定常磁場における水素のラーモア周波数（270 MHz）で 90 度パルスは 375 μ s、180 度パルスは 750 μ s のパルスラジオ波暴露により近似的に設定することができ、90 度パルス終了後、50 ms 後に 180 度パルスが暴露され、その後 1950 ms の間を置いて 90 度パルスが再度繰り返されるパルス系列が決定された（Fig. 1）。なお、今回設定した高定常磁場単独、高定常磁場およびパルスラジオ波の 1 時間暴露

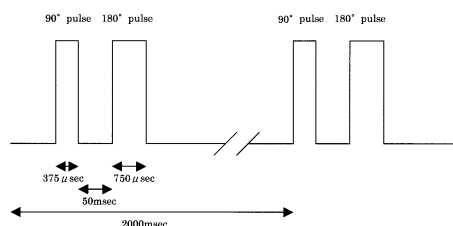


Fig. 1. Pulse sequence (6.3T, 270 MHz)

キーワード magnetic resonance imaging, mutagenicity, safety, bacteria, mutation

での水温上昇は認められず、温度による影響は無視できると考えられた。

2. 細菌の変異パターンの検出方法

point mutation, frameshift type mutation, SOS 反応, 各々 3 パターンの変異作用に関して検討を行った。

1) point mutation, frameshift type mutation の検出

point mutation と frameshift type mutation の検出に使用した細菌は、AMES 法で用いられる *Salmonella typhimurium* 変異株を用いた。

point mutation は *Salmonella typhimurium* のヒスチジンオペロンで生じ、細菌はヒスチジン要求性となる。これらの単塩基の置換はヒスチジン遺伝子の特定の部位に生じることが事前にわかっておりヒスチジンが外部から供給されない限り細菌増殖は生じない。変異原に暴露され、*Salmonella typhimurium* 変異株に復帰変異が生じれば、ヒスチジン非依存性に菌は変化し、再度、増殖能を獲得することとなる。

frameshift type mutation は遺伝子 DNA へのスクレオチドの欠失、付加により遺伝暗号の読み取りにミスが生じヒスチジン合成できなく

なっている変異パターンである。化学物質や放射線等の変異原暴露により復帰変異することが知られている。

point mutation の検討には *Salmonella typhimurium* TA7001-7006 混合株(混合株), frameshift type mutation の検討には *Salmonella typhimurium* TA98 株 (TA98 株) を使用した。混合株は 6 種の菌が等量ずつ含まれており、ターゲットとなるスクレオチドはいずれも異なっている。菌の詳細は Table 1 に示した。

実際の AMES 試験には Xenometrix 社製 AMAX manual system を用いた。このシステムは使用する菌の自然復帰変異が極めて少なく、また培地に菌をまいてコロニーをカウントするのではなく、変異原に暴露された菌を 48 wells プレートに分配し、その well の色調変化で復帰変異数を見ることが特徴となっている。

2) SOS 反応の検出

大腸菌の DNA に放射線や化学物質などの変異原で傷害を与えると、細胞分裂停止、プロファージやコリシン産生能促進、DNA 修復能促進、突然変異能の誘導が生じる。これらの現象は DNA の損傷という緊急事態に対して、分

Table 1. Genotype of Mixed Strain and TA98 *Salmonella Typhimurium*

Strain	Mutation	Type	Target	Cell wall*	Repair**	pKM101***
Mixed strain						
TA7001	his G1775	point mutation	A : T>G : C	rfa	uvr B	yes
TA7002	his G9138	point mutation	T : A>A : T	rfa	uvr B	yes
TA7003	his G9074	point mutation	T : A>G : C	rfa	uvr B	yes
TA7004	his G9133	point mutation	G : C>A : T	rfa	uvr B	yes
TA7005	his G9130	point mutation	C : G>A : T	rfa	uvr B	yes
TA7006	his G9070	point mutation	C : G>G : C	rfa	uvr B	yes
TA98	his D3052	frameshift	GC	rfa	uvr B	yes

* These mutations affect the lipopolysaccharide component of the cell envelop. These strains have increased permeability for bulky molecules.

** Strains carrying the uvr B mutation are deficient in excision repair of bulky lesions as measured by their lack of survival following UV 254 irradiation.

*** Plasmid pKM101 acts to increase the activity of the antibiotic ampicillin.

2001年1月16日受理 2001年3月13日改訂

別刷請求先 〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目1-1 旭川医科大学放射線医学 峯田昌之

裂を一時的に停止し、DNA を修復する酵素群を作成し、効率良く傷害を修復し、生存をはかるといふ応答機構と考えられている。これら一連の現象は SOS 反応として定義されているが、関与する遺伝子群は総称して SOS レギュロンと呼ばれている。SOS レギュロンの各遺伝子は通常 Lex A レプレッサーにより発現が抑制されているが、DNA 損傷状況下で作成される単鎖 DNA により Rec A タンパクのプロテアーゼ活性が活性化され、これらが Lex A レプレッサーを分解するために SOS 遺伝子群が発現する。

SOS 反応検出の際に用いた菌は、SOS レギュロンの一つである umu オペロンの umu C' 遺伝子とラクトースオペロンの一つである lac Z' 遺伝子を結合させた umu C'-lac Z' 融合遺伝子をもつプラスミド pSK1002 を *Salmonella typhimurium* TA1535 に導入した菌株を用いた。umu C'-lac Z' 融合遺伝子は umu オペロンのプロモータ下に調節されているために、SOS 反応が生じると β ガラクトシダーゼ活性をもつ雑種タンパクが作成される。したがって、変異原暴露後、菌液の β ガラクトシダーゼ活性を測定することにより SOS 反応の発現の有無を判定することができる。実際の試験には日本抗体研究所製ウムラックキットを用いた。

3. 使用したシステムおよびキットの概要並びに方法

1) Xenometrix AMAX manual system (point mutation, frameshift type mutation の検出)

混合株、TA98 株は専用液体培地内で 37°C、12 時間、攪拌培養し 1 回に暴露をうける菌数は約 10^7 個に調節された。1 回の分裂が可能な濃度に調整されたヒスチジンを含む専用液体培地内に菌は移され、室温下で高定常磁場単独並びに高定常磁場およびパルスラジオ波に暴露されることになる。暴露時間は 15, 30, 45, 60 分であるが、暴露時間以外は同じ環境を保つために室温下に置かれた。その後、90 分、37°C で再度攪拌培養され、pH indicator (bromocresol

purple) を加え、48 wells plate に分配した。分配された菌液は 48 時間、37°C で静置培養され、2 日後、色調変化 (青→黄) があつた well をカウントし復帰変異数を検討した。なお、陰性対照群として非暴露群を設定し、陽性対照群としては 2-nitrofluorene (2-NF : 250 ng/ml) と 4-nitroquinoline N-oxide (4-NQO : 62.5 ng/ml) 混合溶液を用いた。

2) 日本抗体研究所製ウムラック (SOS 反応の検出)

TA1535/pSK1002 株を専用液体培地 (TGA 培地) 内で 37°C、3 時間静置培養した。菌液は 100 μ l ごとに室温下で高定常磁場並びに高定常磁場+パルスラジオ波に暴露された。暴露時間は各々、10 分、20 分、30 分である。その後、90 分、37°C で静置培養し、発色液 (0.22% X-gal 溶液) が加えられ、再度 60 分、37°C で培養された。60 分後に反応停止液 (SDS/DMSO 混合溶液) を加え、色調の安定を確認し 620 nm で吸光度を測定し β ガラクトシダーゼ活性を検討した。陰性対照群として非暴露群を設定し、陽性対象群としては furylfuramide (AF-2) 0.033 μ g/ml 溶液 10 μ l (最終 AF-2 濃度 0.00303 μ g/ml) を用いた。

結 果

統計解析には one-way analysis of variance (ANOVA) を用いた。point mutation, frameshift type mutation, SOS 反応の発現については Table 2, Table 3, Table 4, Table 5 に結果を示した。

1. 高定常磁場単独暴露による point mutation, frameshift type mutation の検出結果

暴露された混合株および TA98 株には統計学的有意差をもって復帰変異は生じなかった。陽性対照群とはいずれも有意の差が認められた ($P < 0.001$; ANOVA)。標本数はいずれも 6 検体である。結果の詳細は Table 2 に示した。

2. 高定常磁場およびパルスラジオ波混合暴露

Table 2. Number of Revertant Mutation in Salmonella Typhimurium Exposed in 6.3T Magnetic Field

Tester strains	Exposure time				Control	
	15 min	30 min	45 min	60 min	negative	positive
Mixed Strain (per/48 wells) (n)	1.01 ± 1.48 (6)	0.81 ± 1.02 (6)	0.72 ± 1.04 (6)	1.03 ± 0.97 (6)	1.22 ± 1.32 (6)	22.21 ± 2.87* (6)
TA98 (per/48 wells) (n)	0.83 ± 1.28 (6)	0.81 ± 1.19 (6)	1.29 ± 1.51 (6)	0.82 ± 1.20 (6)	1.29 ± 1.01 (6)	33.80 ± 6.57* (6)

P < 0.001 ANOVA.

Table 3. Number of Revertant Mutation in Salmonella Typhimurium Exposed in 6.3T Magnetic Field and Radiofrequency Radiation

Tester strains	Exposure time				Control	
	15 min	30 min	45 min	60 min	negative	positive
Mixed Strain (per/48 wells) (n)	0.44 ± 0.53 (9)	1.00 ± 0.71 (9)	1.33 ± 1.87 (9)	0.78 ± 0.97 (9)	0.89 ± 0.90 (18)	16.67 ± 6.47* (9)
TA98 (per/48 wells) (n)	1.67 ± 2.12 (6)	1.11 ± 1.05 (6)	0.89 ± 1.05 (6)	0.56 ± 0.53 (6)	0.94 ± 1.10 (6)	12.51 ± 4.37* (6)

P < 0.001 ANOVA.

Table 4. Absorbance of Salmonella Typhimurium Solution Exposed in 6.3T Magnetic Field

Tester strains	Exposure time			Control	
	10 min	20 min	30 min	negative	positive
TA1535/pKM1002 (n)	0.342 ± 0.025 (36)	0.328 ± 0.041 (36)	0.339 ± 0.031 (36)	0.335 ± 0.049 (18)	0.878 ± 0.068* (36)

P < 0.001 ANOVA.

Table 5. Absorbance of Salmonella Typhimurium Solution Exposed in 6.3T Magnetic Field and Radiofrequency Radiation

Tester strains	Exposure time			Control	
	10 min	20 min	30 min	negative	positive
TA1535/pKM1002 (n)	0.359 ± 0.037 (36)	0.338 ± 0.038 (36)	0.352 ± 0.027 (36)	0.355 ± 0.021 (18)	0.859 ± 0.012* (36)

P < 0.001 ANOVA.

における point mutation, frameshift type mutation の検出結果

暴露された混合株および TA98 株には統計学的有意差をもって復帰変異は生じなかった。

陽性対照群とはいずれも有意の差が認められた ($P < 0.001$; ANOVA). 混合株の標本数は暴露群, 陽性対照群は 9 検体, 非暴露群は 18 検体である. また, TA98 株の標本数はいずれも 6 検体である. 結果の詳細は Table 3 に示した.

3. 高定常磁場単独暴露における SOS 反応の検出結果

高定常磁場単独暴露群の吸光度に関して暴露群と非暴露群との間に統計学的有意差は指摘できなかった. AF2 を使用した陽性対照群とは有意差が認められた ($P < 0.001$; ANOVA). 標本数は暴露群, 陽性対照群は 36 検体, 非暴露群は 18 検体である. 結果の詳細は Table 4 に示した.

4. 高定常磁場およびパルスラジオ波混合暴露における SOS 反応の検出結果

高定常磁場およびパルスラジオ波混合暴露群の吸光度に関しては暴露群と非暴露群との間に統計学的有意差は指摘できなかった. AF2 を使用した陽性対照群とは有意差が認められた ($P < 0.001$; ANOVA). 標本数は暴露群, 陽性対照群は 36 検体, 非暴露群は 18 検体である. 結果の詳細は Table 5 に示した.

5. 結果のまとめ

高定常磁場単独, 高定常磁場にパルスラジオ波を加えた環境下では, *Salmonella typhimurium* TA7001-7006 混合株に有意に point mutation は指摘できず, *Salmonella typhimurium* TA98 株にも frameshift type mutation は有意に生じないと考えられた. また, *Salmonella typhimurium* TA1535 / pSK1002 株における SOS 反応も有意に生じないと推測された.

考 察

本邦に MRI が導入されたのは 1982 年で, 約 20 年近い歳月が流れたが, 使用される高定常磁場やパルスラジオ波の安全性はいまだに十分に確立されていない. MRI 装置の説明書には妊娠初期の妊婦に対しての警告は記載された

ままであり, MRI 装置を有する機関の 36% は妊婦を適応外にしているとの報告³⁾もあり, 催変異作用, 催奇形作用に関しては早急に解決しなくてはならない問題点である.

MRI 装置の変異原性や催奇形性に関係する研究は, MRI 開発当初の 1970 年代から現在に至るまで行われており, negative data, positive data いずれも認められている. MRI で使用され問題となる環境は, 高定常磁場, パルスラジオ波, 傾斜磁場であるために, 個々および三者の複合環境について検討をしなくてはならない. 変異原作用を有する可能性を示唆する報告としては, 定常磁場単独の影響として, 胚形成期の白色レグホンにおける奇形誘発率の上昇⁴⁾, イモリ胚の奇形率の上昇⁵⁾, ショウジョウバエの wing spots 変化⁶⁾などの報告がある. 時間ごとに変化する磁場の影響としては, DNA 合成作用の促進⁷⁾, パルスラジオ波の暴露環境では Sprague-Dawley rat 子宮内での胎児の reabsorption 率や頭部奇形率の上昇⁸⁾を認めるとされている. また, これらの混合状態を検討したものは, 時間で変移する磁場単独および定常磁場との組み合わせで線虫の成長と成熟が抑制される⁹⁾とされ, 現実的な MRI 装置を念頭に置いたものとしては, 1.5T の MRI 装置中ではニワトリ胚は高い奇形率と致死率が見られる¹⁰⁾と報告されている. しかし, これら positive data を裏付けるために行われた追試実験では, 再現性が認められなかったり^{11)~17)}, positive data が得られたものについても, その変異作用の発現機序は明確に言及されていない.

このような背景の中で, 我々は変異原性試験に用いられる細菌を利用し, MRI 近似条件を NMR 装置で作成し, 高定常磁場単独暴露, 高定常磁場およびパルスラジオ波混合暴露は細菌に変異を生じさせるか検討を行ったが, いずれの環境でも, 細菌に point mutation, frameshift type mutation, SOS 反応は誘導できないという結果になった. 過去に行われた検討と我々の試みの違いは, それまでの実験は多細胞生物など

の比較的複雑な生物を対象としているのに対し、単純な細菌を用いたことにある。加えて、変異があった場合には事前に変異原の作用機序および標的がわかっているために、作用ポイントがわかるという特徴をもっている。使用したNMR装置は実際のMRI装置と異なり磁場の強度は6.3Tであるが、MRI装置では暴露部位の磁場が十分に均一になる条件設定は困難であり、NMR装置を用いたことにより暴露検体に対して定常磁場、パルスラジオ波暴露は均一に保てたと考えられる。傾斜磁場の影響に関しては検討できていないが、MRIの傾斜磁場は位置情報を付加するためのものであり、実際のMRIでは水素のプロトンが共鳴を起こす部位の決定に使用されている。今回の実験は磁場に合わせたラーモア周波数のパルスラジオ波が選択されており、暴露検体内では水素のプロトンは十分に共鳴を受けていると考えられ、90度と180度スピンを倒すことに関しても変異原性はないものと推測された。

発癌性や催奇形性は細胞の突然変異により起こるといわれている。それらと変異原性が密接に関係するのは明らかであり、変異原性の有無を調べるのに様々な試験法が開発されてきた。数ある試験法の中でも微生物を用いたAMES試験¹⁸⁾とumu試験¹⁹⁾は動物の発癌性試験結果と最も相関が高いことから用いられる検査法である。これらのテストを用いて電磁場や電磁波の変異原性の検出を行った報告では、AMES法を用いた報告がある。0.3mT磁場単独、60、600、6000 Hz電磁波単独、両者の混合暴露実験²⁰⁾では変異原性は認めていない。一方、0.2T磁場、60 Hz電磁波の48時間暴露ではazide-induced TA100は有意に変異を生じたとの報告²¹⁾や、27 MHzと2.45 GHzの電磁波暴露で菌は有意に増加した²²⁾との報告もある。しかし、いずれの報告もMRI装置を対象として行われたものではない。

細菌に変異を生じさせなかったという結果のみで人体に対して催奇形性、変異原性がないと

は安易に結論できないが、少なくとも今回の実験では明らかな変異原性は指摘できず、MRI近似環境内では細菌にpoint mutation, frameshift type mutation, SOS反応は生じないことが確認された。

結 論

6.3Tの高定常磁場単独、高定常磁場に90度パルス、180度パルスラジオ波を加えても細菌にpoint mutation, frameshift type mutation, SOS反応は有意に生じず、変異原性は明らかではないと考えられた。

文 献

- 1) U. S. Food and Drug Administration : Magnetic resonance diagnostic device : panel recommendation and report on petitions for MR reclassification. Federal Register 1988 ; 53 : 7575-7579
- 2) National Radiological Protection Board : Guidance on acceptable limits of exposure during nuclear magnetic clinical imaging. Br J Radiol 1983 ; 56 : 974-977
- 3) Kanal E, Shellock FG, Sonnenblick D : MRI clinical site safety survey : phase 1 results and preliminary data. Magn Reson Imag 1988 ; 7(S1) : 106
- 4) Joshi M, Karn M, Damle P : Effect of magnetic field on chick morphogenesis. Differentiation 1978 ; 10 : 39-43
- 5) Asashima M, Shimada K, Pfeiffer C : Magnetic shielding induces early developmental abnormalities in the newt, cynops pyrrhogaster. Bioelectromagnetics 1983 ; 4 : 295-301
- 6) Koana T, Okada OM, Ikehata M, et al. : Increase in the mitotic recombination frequency in Drosophila melanogaster by magnetic fields exposure and its suppression by vitamin E supplement. Mutation Res 1997 ; 373 : 55-60
- 7) Liboff A, Williams T, Strong D, et al. : Time varying magnetic fields : effect on DNA synthesis. Science 1984 ; 223 : 818-820

- 8) Tofani S, Agnesod G, Ossola P : Effect of continuous low-level exposure to radiofrequency radiation on intrauterine development of rats. *Health Physics* 1986 ; 51 : 489-499
- 9) Peeling J, Lewis J, Samoiloff M, et al. : Biological effect of magnetic fields : chronic exposure of the nematode *panagrellus redivivus*. *Magn Reson Imag* 1988 ; 6 : 655-660
- 10) Yip YP, Capriotti C, Talagala SL, et al. : Effects of MR exposure at 1.5T on early embryonic development of the chick. *J Magn Reson Imag* 1994 ; 4 : 742-748
- 11) Ngo F, Blue J, Roberts W : The effect of a static magnetic field on DNA synthesis and survival of mammalian cells irradiated with fast neutrons. *Magn Reson Med* 1987 ; 5 : 307-317
- 12) Sutherland R, Marton J, MacDonald J, et al. : Effect of weak magnetic field on growth of cells in tissue culture. *Physiol Chemistry Physics* 1978 ; 10 : 125-131
- 13) Kay H, Herkens R, Kay B : Effect of magnetic resonance imaging on *Xenopus Laevis* embryogenesis. *Magn Reson Imag* 1988 ; 6 : 501-506
- 14) Prasad N, Wright D, Ford J, et al. : Safety of 4-T MR imaging : study of effects on developing frog embryos. *Radiology* 1990 ; 174 : 251-253
- 15) Prasad N, Wright D, Foster J : Effect of nuclear magnetic resonance on early stages amphibian development. *Magn Reson Imag* 1982 ; 1 : 35-38
- 16) Heinrich W, Fong P, Flannery M, et al. : Midgestational exposure of pregnant balb/c mice to magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imag* 1988 ; 6 : 305-313
- 17) Yip YP, Capriotti C, Norbash SG, et al. : Effect of MR exposure on cell proliferation and migration of chick. *J Magn Reson Imag* 1994 ; 4 : 799-804
- 18) Maron DM, Ames BN : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res* 1983 ; 113 : 173-215
- 19) Oda Y, Nakamura S, Oki I, et al. : Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat Res* 1985 ; 147 : 219-229
- 20) Morandi MA, Pak CM, Caren RP, et al. : Lack of an EMF-induced genotoxic effect in the Ames assay. *Life Sci* 1996 ; 59 : 263-271
- 21) Tabrah FL, Mower HF, Batkin S, et al. : Enhanced mutagenic effect of a 60 Hz time-varying magnetic field on numbers of azide-induced TA100 revertant colonies. *Bioelectromagnetics* 1994 ; 15 : 85-93
- 22) Hammerius Y, Rasmuson A, Rasmuson B : Biological effects of high-frequency electromagnetic fields on *Salmonella typhimurium* and *Drosophila melanogaster*. *Bioelectromagnetics* 1985 ; 6 : 405-414

A Study of Bacterial Mutation in High Magnetic Field and Radiofrequency Radiation

Masayuki MINETA¹, Kohji TAKAHASHI¹, Tamio ABURANO¹,
Itsuroh YOSHIDA²

¹*Department of Radiology, ²Department of Microbiology, Asahikawa Medical College
2-1-1 Midorigaoka-Higashi, Asahikawa, Hokkaido 078-8510*

Recent epidemiological studies have indicated that magnetic fields and radiofrequency (RF) radiation have an adverse effect on the body. Several studies have investigated the possible adverse effects of the electromagnetic fields used for magnetic resonance imaging (MRI) procedures and their effect on pregnancy. The purpose of this study was to examine the safety of MRI by observing if bacterial mutation occurred in the MRI environment.

We used a GX-270 FT-NMR unit (JEOL, Ltd) with a magnetic field strength of 6.3T. *Salmonella typhimurium* tester strains used in AMES and umu-testing were exposed. The incidence of point mutation, frameshift mutation, and SOS regulation was evaluated. TA98, mixed TA7001-7006, and TA1535/pSK1002 strains were used to detect frameshift mutation, point mutation, and SOS regulation respectively. Tester strains were exposed to the 6.3T magnetic field only and to the field with RF radiation (90° and 180° refocusing pulse were repeated in the hydrogen Larmor frequency at 2 second intervals). After each exposure, the rate of mutation was evaluated.

Rates of revertant mutation in mixed strains and TA98 were not observed after 15, 30, 45, and 60 minutes of exposure. SOS regulation was not observed after 10, 20, and 30 minutes of exposure. Statistically significant incidence in the 6.3T magnetic field only and with RF radiation were not observed. Therefore, it was concluded that bacterial mutations ; point mutation, frameshift mutation, and SOS regulation are not increased by a 6.3T magnetic field alone or with a 6.3T magnetic field and RF radiation.