Japan Society of Obstetrics and Gynecology

日本産科婦人科学会雑誌 ACTA OBST GYNAEC JPN Vol. 32, No. 1, pp. 61—68, 1980 (昭55, 1月)

超音波連続波の生体作用に関する研究

東京大学医学部産婦人科学教室（主任：坂元正一教授）
原　量　宏

Effects of Ultrasonic Irradiation on Chromosomes, Cell Division and Developing Embryos

Kazuhiro HARA
Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo
(Director: Prof. Shoichi Sakamoto)

概要 超音波連続波の胎児に対する安全性を確認する目的で，染色体レベル，細胞レベル，胎芽発生レベル，の3つの異なつた段階に対し，超音波照射実験を行つた．照射装置として，特に超音波出力，周波数の安定した発振器を用いた．照射は再現性が高く，定在波および cavitation の発生を最小とするような条件のもとで行つた．

1．染色体に及ぼす影響

胎児臍帯静脈血リンパ球，人工流産児 fibroblast，羊水中 fibroblast に対して，2MHz，最大 2,000mw/cm²，2時間の照射を行つたが，染色体異常の増加は認められなかつた．

2．培養細胞増殖速度に及ぼす影響

20日間継代培養後の人工流産児 fibroblast に 2MHz，最大 2,000mw/cm²，1時間の照射を試みたが，対照群と照射群の間に増殖速度の差は全く認められなかつた．

3．ICR 系妊娠マウスに対する照射

12週齢 ICR 系妊娠マウスの妊娠8日めに，2MHz，最大 2,000mw/cm²，5分間の照射を行つた．その結果，2,000mw/cm² 照射群では妊娠8日以降の母体重増加が有意に抑制された．又，着床数，黄体数，胎仔数については，対照群，照射群に差は認められないが，胎仔死亡総数は2,000mw/cm² 照射群に有意に多く，その原因は着床痕の増加，即ちごく早期の胎仔死亡の増加であつた．胎仔奇形については，2,000mw/cm² 照射群に，脱脳，無脳，口蓋破裂，肋骨癒合，椎骨非対称が認められた．

以上の結果より，超音波連続波の副障害はワットオーダー以上で生じることを明らかにし，現用のドプラ装置の安全性を確認した．

Synopsis These experiments were planned to acquire any informations about the possibilities of harmful effects of ultrasonics on the chromosomes, the cell division of cultured cells and the developing embryos of the ICR mice.

1. The effects of ultrasonics on the chromosomes

Lymphocytes of fetal blood, fibroblasts of fetal skin and fibroblasts from amniotic fluid were exposed to the continuous ultrasonics of 2MHz with the intensity of 2W/cm², 1 hour.

No significant increase of chromosomal aberrations was found in the exposed groups.

2. The effects on the growth of cultured cells

Fibroblasts of fetal skin were exposed to the continuous ultrasonics of 2MHz (max 2MHz, 2 hours). The cell growth was observed during 14 days, but no suppression on the cell division appeared in the exposed groups.

3. The effects on the ICR pregnant mice

In total, 125 ICR pregnant mice were exposed to the ultrasonics of 2MHz on 8th day of pregnancy (I; control group, II; buffered control group, III; 200 mw/cm² and IV; 2000 mw/cm², 5 min).

The weight gain of maternal body was suppressed in group IV.

The number of implantation sites in group IV was significantly higher than the other 3 groups.

The external, skeletal and visceral abnormalities were examined for 1251 fetuses. Brain hernia, anencephaly, cleft palate and skeletal abnormalities were found in group IV and its incidence was significantly higher than the other 3 groups.

Key words: Ultrasonics•Doppler•Chromosomes•Teratogenecity

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

緒　言

産科領域における超音波ドプラ装置および超音波断層装置は，その診断的価値が極めて高く，日常臨床に広く利用されている．しかしながら，最も基本的な超音波の生体に対する安全閾値については，世界的なレベルにおいてさえ明確にされていないのが現状である．超音波診断装置は，超音波エネルギーを生体に照射して，その反射波を検出するものである以上，特に感受性の高いと思われる器官形成期の胎児細胞などに対する影響は，常に危惧されるところである．1971年 Mac-Intosh et al.[5] はリンパ球を用いた超音波照射実験を行い，照射量に応じて染色体異常が増加すると報告した．この報告を契機として，超音波の特に胎児に対する安全性の問題がクローズアップされ，その後数多くの超音波照射実験が行われた．それにもかかわらず，これまでの報告から安全性についての一定した結論が得られていないのは，超音波発生装置の安定性，出力の測定法，トランスジューサの特性，照射法の問題（照射対象・トランスジューサ間の定在波発生，cavitation 等），さらに照射対象の選択の問題などの諸条件が一定せず，又，適当な超音波エネルギー可変装置，エネルギー測定装置が得られなかつたことによる．

本研究は，最も汎用されているものがドプラ装置であることに鑑み，超音波連続波の安全性を可能な限り，従来の欠点を除いた形で知るべく計画したものである．

そこで，著者らが検討を重ね，超音波出力と周波数の安定化に重点をおき，相互に比較検討可能なように設計された発振器を用いて，超音波照射実験を行つた．照射法は，再現性が高く，しかも定在波，cavitation の発生を最小限にするような条件とし，照射対象を（1）染色体レベル，（2）細胞レベル，（3）胎芽発生レベルと，3つの異なつた段階を選び，これらに対する照射成績を総合することにより，超音波の生体に対する安全性の検討を行つた．

実験 I. 照射装置および照射条件に関する基礎的検討

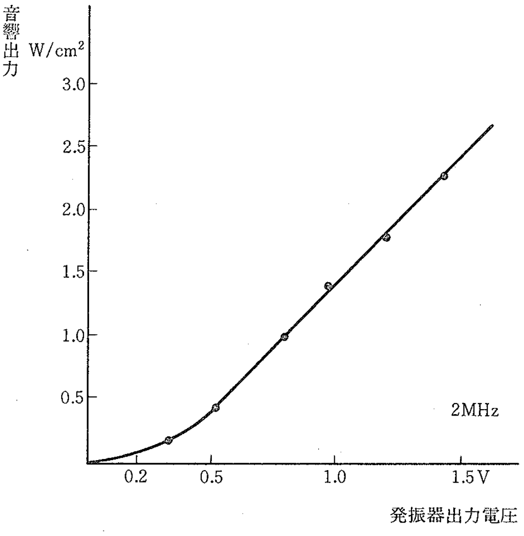
1）超音波照射装置の構成・規格，および出力測定

（1）超音波照射装置：装置は超音波照射実験用に特別設計された発振器 Aloka USG 5 と，超音波振動子，レコーダ，恒温水槽から成る．

発振周波数は，1，2，4 MHz，最大出力は3 w/cm^2 で，任意に出力を設定できる．恒温水槽（40×20×20cm，アクリル製）は37±0.1℃に設定され，この水槽に脱気水を充たし，最大 2,000 mw/cm^2 の超音波照射を試みたが，cavitation は発生しなかつた．

（2）超音波音響出力の測定：鋼球を用いて，音圧を測定することによつて行つた．図1は振動子から10cm の距離における音響出力と発振器出力電圧との関係を示すものである．

図1　音響出力と発振器出力電圧との関係



2）照射条件に関する検討

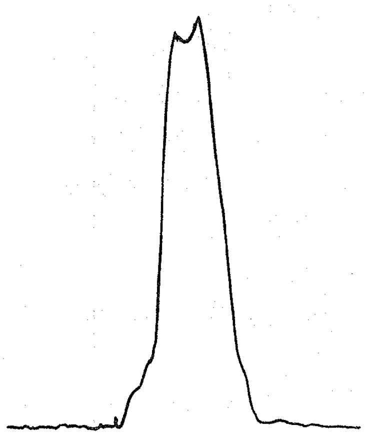
（1）超音波振動子の音場パターン：超音波ビームを確実に対象に照射させるため，振動子の音場パターンを知る必要がある．脱気水中に振動子と超音波マイクロホンを10cm 間隔で設置し，マイクロホンを平行移動させて音圧を測定し，音場パターンを得た（図2）．振動子には直径20mmφの平面の振動子を用いた．

（2）マウス腹部剃毛の効果：超音波をマウス腹腔内の子宮に確実に到達させるために，剃毛マ

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

図2 トランスジューサの音場パターン



ウス4例と非剃毛マウス2例に対する超音波照射を行い，照射中の直腸温・子宮近傍温を測定することによつて，マウス腹部剃毛による超音波通過の効果を検討した(図3)．なお，操作はすべて無麻酔下に行い，照射は2MHz，2,000mw/cm²，5分間とした．更に，腹部非剃毛による超音波減衰の状態を確認するために，超音波ホログラフィー法による検討も行つた．

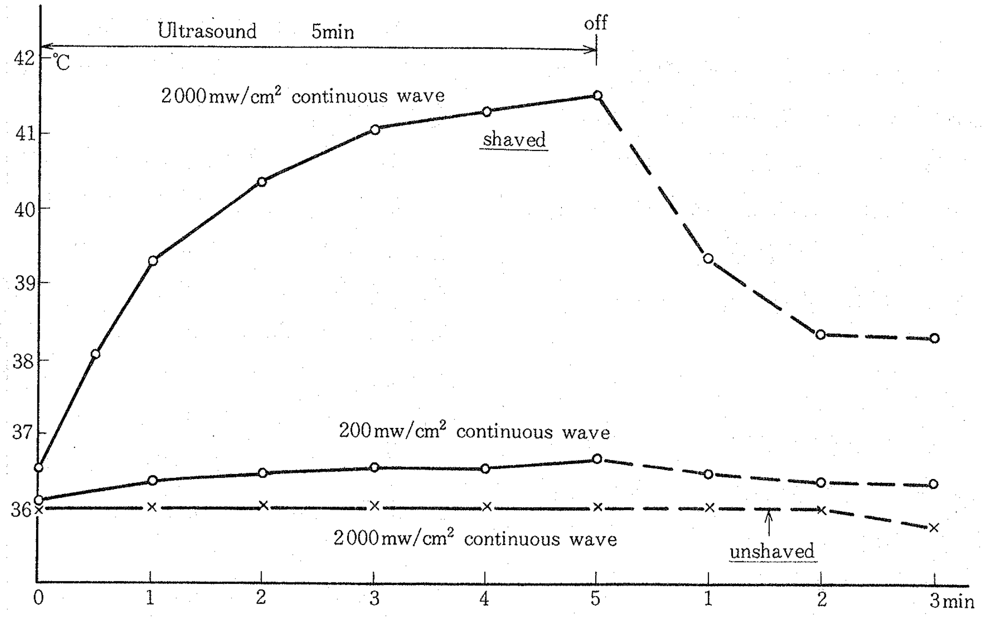
(3) マウスに対する超音波照射強度の上限について：妊娠マウスに対する照射強度の上限を設定する目的で，dd系非妊娠マウス6例を用いて予備実験を行つた．対象をbuffered control群，2,000mw/cm² 照射群に分類し，各群とも10分間1回，及び10分間2回以上の照射を行い，マウスの体重変動について検討した．

結果 I—2)

(1) 超音波振動子の音場パターンについて：図2に示すような，比較的鋭いパターンが得られた．従つて超音波を確実に対象に照射するためには，対象の固定が重要となる．

(2) マウス腹部剃毛の効果：剃毛群では照射後直ちに温度上昇が認められ（5分後に41.5℃），照射終了後は直ちに温度下降が認められた（図3）．しかし，非剃毛群では2,000mw/cm² の照射にもかかわらず，温度上昇は全く認められなかつた．又，超音波ホログラフィー法によつても，マウス腹部の剃毛切片ではほぼ完全に超音波が通過するが，非剃毛切片ではほとんど通過しない．す

図3 照射中の温度上昇カーブ（直腸温度）



NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

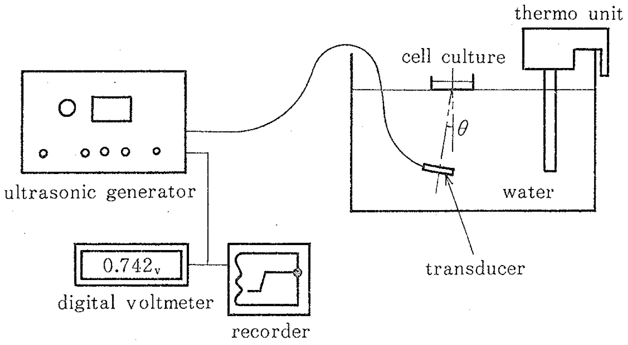
なわちマウス腹部の毛の存在によつて，超音波はほとんど反射，減衰してしまうことが明らかになり，剃毛の重要性が証明された．

(3) マウスに対する超音波照射強度の上限について：2,000mw/cm²，10分間1回の照射を行つた群では，buffered control群との間に体重変動の差は認められないが，2,000mw/cm²，10分間2回以上の照射を受けたマウスは，すべて死亡した．従つて，ICR系妊娠マウスに対する照射実験の最大照射強度は2,000mw/cm²，5分間1回とした．

実験II. 超音波連続波の生体作用に関する検討

実験Iの結果に基いて，以下の実験を行つた．細胞に対する照射法を図4に示す．周波数は，一般に産科臨床に使用されている診断用超音波機器

図4 照射法（細胞）



と同程度の2MHzを使用した．振動子は直径20mm φの平面振動子を用い，近距離音場を避けるために，照射対象・振動子間距離は10cmとした．又，定在波発生防止の意味で，振動子を対象底面に対して10°傾斜させ，水槽底面には更に吸音材を設置し，超音波の不必要な反射を最小限とするようにした．

なお，照射中の温度変化について，サーミスタを用いてシャーレ内の温度を測定したが，2,000mw/cm²，5～60分の照射によつても，37.5℃以上の温度上昇は認められなかつた．

1) 染色体レベルでの影響

(1) 胎児臍帯静脈血リンパ球に対する照射：妊娠10カ月正常分娩の胎児臍帯静脈血より採取したリンパ球を，66時間開放培養したのち，G_2期に2MHz連続波を照射した．照射時期はcolcemid処理時刻より逆算した．

照射エネルギーの強度別にa：control群，b：buffered control群，c：100mw/cm² 30分照射群，d：100mw/cm² 60分照射群，e：500mw/cm² 60分照射群，f：1,000mw/cm² 60分照射群に群別し，照射終了後，染色体分析を行つた．

(2) 人工流産児皮膚fibroblastに対する照射：妊娠2カ月人工流産児皮膚fibroblastを1カ月間継代培養した後，G_1，G_2期に2MHz，連続波を照射した．照射強度により，a：control群，b：buffered control群，c：100mw/cm² 30分間2回照射群，d：1,000mw/cm² 30分間2回照射群に分類した．又，同fibroblastのG_2期に対しても，a：control群，b：buffered control群，c：250mw/cm² 照射群，d：500mw/cm² 照射群，e：1,000mw/cm² 照射群に群別して，30分間2MHz連続波を照射し，2時間後に再び30分間の照射を行つた．

(3) 羊水中fibroblastに対する照射：妊娠5カ月妊婦の羊水穿刺によつて得られた羊水細胞を20日間継代培養し，a：control群，b：buffered control群，c：1,000mw/cm² 2時間照射群に分け，G_2期に2MHz 60分間連続波を照射した．

2) 細胞レベルでの影響（培養細胞増殖速度に対する影響）

(1) 人工流産児皮膚fibroblastに対する影響：(i)妊娠3カ月人工流産児皮膚fibroblastを20日間継代培養し，a：control群，b：buffered control群，c：500mw/cm² 照射群，d：1,000mw/cm² 照射群，e：2,000mw/cm² 照射群に群別し，2MHz連続波1時間の照射を行つた．照射開始の細胞数は70,000cells/cm² (fibroblasts)とし，7日めに細胞数を算定した．又，照射直後のfibroblastの形態学的変化についても検討した．

(ii) 同材料を用いて，実験(i)の結果に基き，生体にとつて最大量と考えられる超音波エネルギー2MHz，連続波2,000mw/cm²，1時間の照射を行い，15日間培養後buffered control群と細

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

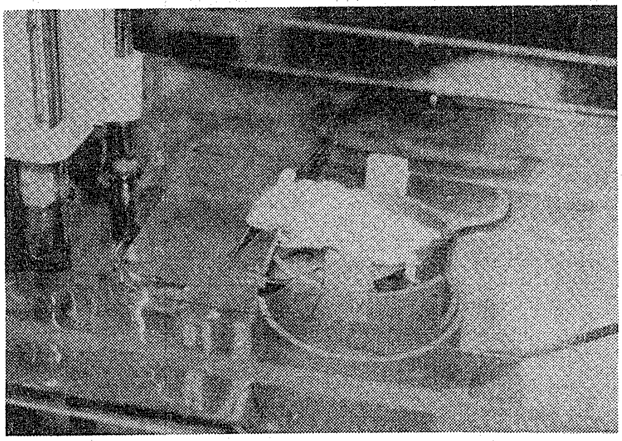
胞増殖速度を比較した.

(iii) 更に, 上記の fibroblast を引き続き150日間培養し, 長期培養後の細胞形態, 増殖能について検討した.

3) 胎芽発生レベルでの影響 (ICR 系妊娠マウスに対する照射)

胎芽発生レベルに与える影響を検討するため, 12週齢 ICR 系妊娠マウス (未経産) に対する照射実験を行つた. 照射直前にマウス腹部を充分剃毛し, 図5に示す様に37°C脱気水中に腹部が充分浸されるような状態に固定した. 尚, この固定に

図5　マウスの固定法



よつてもマウスの呼吸は抑制されなかつた. トランスジューサ・マウス腹壁間距離は10cm, 照射日は交尾栓発見日を0日として妊娠8日めとし, 2MHz連続波1時間の照射を行つた. 季節変動を避けるため, 照射はすべて同一時期(6月)に行い, 薬剤による影響を除くため無麻酔下に行つた.

照射エネルギー別に, a : control 群31匹, b : buffered control 群31匹, c : 200mw/cm² 照射群31匹, d : 2,000mw/cm² 照射群32匹に群別し, すべてのマウスについて妊娠母体重を測定した (測定日は0日, 4日, 8日, 12日, 16日, 18日め). 18日めに開腹し, 黄体数, 着床数, 着床痕, 吸収胚, 侵軟児, 胎仔体重, 性別について, 着床部位別に分類し記録した. さらに胎仔1,251匹について, 外表奇形, 内臓奇形, 骨格奇形を分析した. この場合も着床部位別による差を比較するために, 2:1の割合で, 骨格, 内臓標本を作製した.

結果II

1) 染色体レベルでの影響

(1) 胎児臍帯静脈血リンパ球に対する照射: 各群50 cells について Gap, Break を分析した結果, 染色体異常出現率は, a 群2/50, b 群1/50, c 群3/50, d群1/50, e 群3/50, f 群1/50であつて, 有意差はなかつた (図6は Gap の一例).

図6　Gap の一例 (対照群)

(2) 人工流産児皮膚fibroblastに対する照射: G_1, G_2 期に対する照射後の分析結果は, a 群: 7/100, b 群11/100, c 群9/100, d 群6/50, e 群 9/100で, 有意差は認められなかつた. 又, G_2 期に対する照射の場合も, a 群1/50, b 群 4/50, c 群 4/100, d 群4/100, e 群6/100で, 有意差は認められなかつた.

3) 羊水中 fibroblast に対する照射: 染色体分析の結果, a 群 3/50, b群2/50, c 群3/50と, 有意差は認められなかつた.

2) 細胞レベルでの影響 (細胞増殖速度に対する影響)

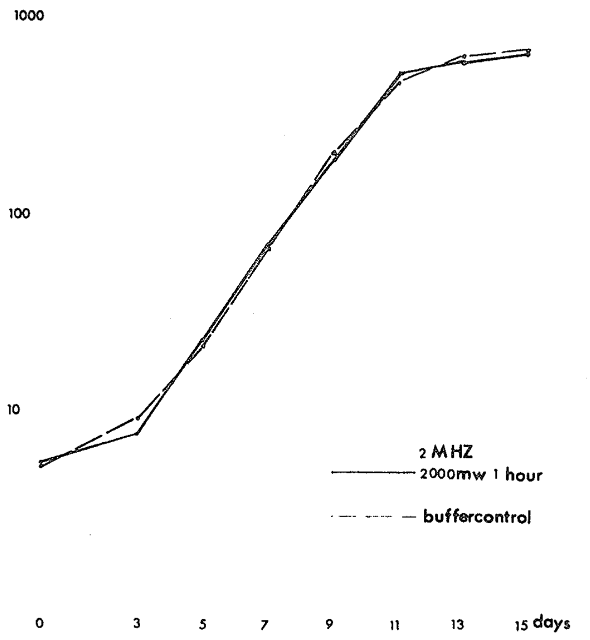
(1) 人工流産児 fibroblast に対する照射:

(i) 照射後7日めにおける細胞数は, a 群 420,000cells/cm³, b 群 700,000cells/cm³, c 群 570,000cells/cm³, d 群560,000cells/cm³ で, 各群間に有意差はなく, 又, 形態学的変化も認められ

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

図7　15日間培養の結果（Fibroblast）



なかつた．

（ii）15日間培養の結果，両群とも全く同様の増殖曲線を描き，細胞数は70,000cells/cm³から7,000,000cells/cm³に増殖した．形態学上の変化も認められなかつた（図7）．

（iii）150日間の長期培養後も，増殖率および形態に差は認められなかつた．

すなわち，生体にとつて最大量と考えられる超音波照射をもつてしても，本実験に関する限り，培養細胞増殖速度および細胞形態に影響を与えないことが判明した．

3）ICR系妊娠マウスに対する照射（胎芽発生レベルでの影響）

（1）妊娠母体重増加について：妊娠0日から8日めまでは，各群の母体重の平均値に統計的な差は認められない．しかし，照射直後から18日までの間では，d群の母体重増加は5％の危険率をもつて，有意に抑制された．すなわち，2,000mw/cm²以上の照射は妊娠母体および胎仔に何らかの抑制的作用を及ぼしていることが示唆された（図8）．

図8　マウス母体重の増加

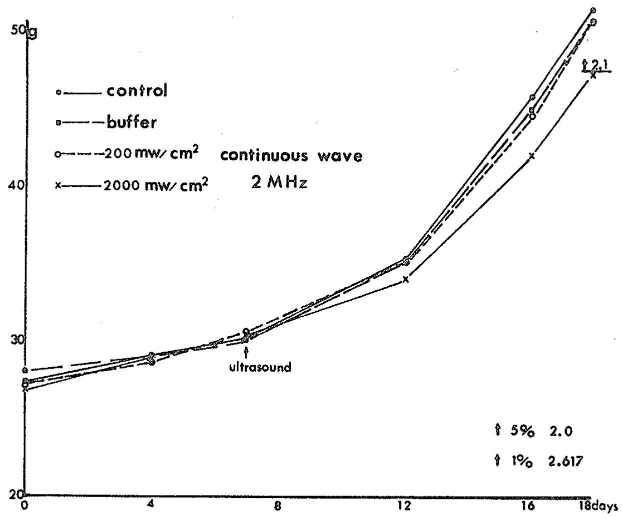


表1　Effect of ultrasonic iradiation on pregnant mice

		Control		Continuous wave	
		Pure control	Buffered control	0.2 w/cm²	2 w/cm²
No of litters		31	31	31	32
Total implants		352	345	339	348
Mean litter size		11.35	11.12	10.93	10.87
Live fetuses	Total No.	331	318	319	283
	Mean	10.68	10.29	10.29	8.84
Total death	Total	21	27	20	65*
	Implantation sites	12	18	13	60* p<0.005
	Placental remnants	6	5	1	3
	Dead embryos	3	4	6	2

（2）マウス母体に対する影響（表1）：黄体数，平均着床数，平均胎仔数については，照射群と非照射群の間に有意差は認められない．又，胎仔の未熟性の指標となる胎仔平均体重についても，各群の間に有意差はなく，母体重量差の原因は，むしろ母体の消もうに基くと想像される．一方，胎仔死亡総数はd群に非常に多く（65），0.5％の危険率で有意に増加している．吸収胚，浸軟児は各群とも数例で有意差はなく，着床痕はd群に60と有意に増加しており，この事からd群における胎仔死亡増加は，着床痕の増加すなわち

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

表2 Effect of ultrasonic iradiation on fetuses

			Control		Continuous wave	
			Pure control	Buffered control	0.2 w/cm²	2 w/cm²
No. of fetuses examined			331	318	319	283
Fetal body weight, Mean			1.25 g	1.23 g	1.24 g	1.26 g
SD			0.13	0.15	0.12	0.15
External malformation		Brain hemiation	0	0	1	1
		Anence phaly	0	0	0	1
		Cleft palate	0	0	0	1
Skelton	No. of examined		219	208	208	184
	No. of vertebral bone Mean		37.7	37.4	37.3	37.6
	SD		1.8	2.1	1.8	2.0
	Malformation of skelton	Branching of ribs	0	0	0	1
		Fusing of ribs	0	0	0	2
		Asymmetry of vertebra	0	0	0	1
						$p<0.005$
Abnormality of visceral organ			0	0	0	0

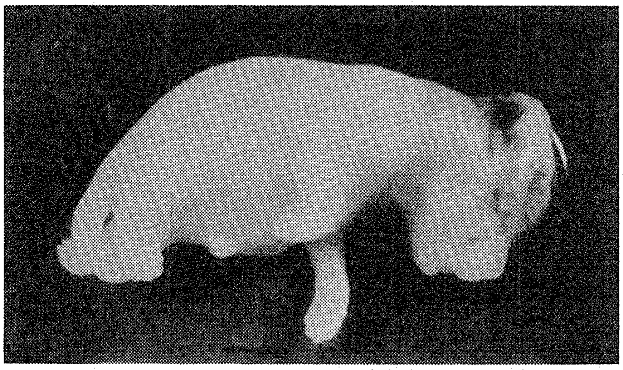


図9 2,000mW/cm² 5分照射群に認められた脱脳奇形

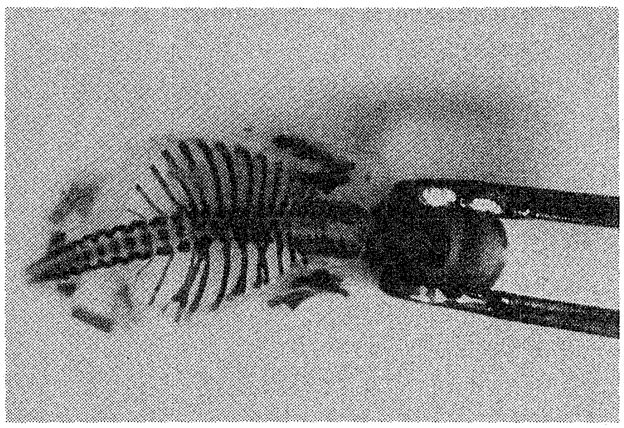


図10 2,000mW/cm² 5分照射群に認められた骨格奇形

妊娠早期に生じた胎仔死亡による吸収現象の増加によることは明らかである.

(3) マウス胎仔に対する影響：(表2)

外表奇形については，c 群，d 群に脱脳奇形が1例ずつ発生し(図9)，無脳，口蓋裂がd群にのみ認められた. a 群，b 群にはこの種の奇形は全く発生しなかつた.

骨格奇形では，胎仔の化骨進行度の指標となる椎骨数は各群とも有意の差はなかつた(図10). d 群には肋骨分岐，肋骨癒合，椎骨非対称が184例中4例発生した. このような肋骨奇形は非常に稀で，超音波照射による骨形成過程への影響が考えられる.

内臓奇形については，特定の奇形が増加するような傾向は認められなかつた.

以上の胎仔奇形の発生率を総合すると，d群において0.5%の危険率をもつて，有意に奇形が多発している. 尚，着床部位による奇形発生率の差は認められなかつた.

考 察

超音波障害に関する実験報告のうち，染色体に対するものとしてはSlotová et al.[6], MacIntosh et al.[5], Bobrow et al.[1], Buckton et al.[2] など多数あるが，かなり強力な超音波照射によつても染色体

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

異常は生じないという結果が大部分である．今回，照射法・照射条件を充分考慮した上で行つた本実験にても，リンパ球，fibroblast，羊水細胞に対しては最大 2,000mw/cm² の照射によつても，染色体異常は生じないことが確認された．

培養細胞増殖速度に対する影響としては Loch et al.[4] および Hill et al.[3]が細胞増殖を抑制する閾値は 1MHz, 500～1,000mw/cm² の間にあると報告している．本研究では人工流産児皮膚 fibroblast を用いて培養細胞の増殖速度に与える影響を検討したが，2MHz, 2,000mw/cm² という強力な照射でも抑制は認められず，又形態学的にも全く変化は認められなかつた．すなわち，かなり強力な超音波照射や非生理的な条件下での照射を行わない限り，細胞単位としてはあまり影響を受けないと考えられる．

妊娠動物に対する催奇性についての実験報告では，脱脳奇形などの報告があるが，これまでの催奇性実験では照射条件が一定でないことが多く，マウスの固定や腹壁の剃毛なども充分でない場合が多い．本研究では，これらの実験条件による変動を最小限にするため，対象として12週齢 ICR 系妊娠マウスを用い，各群の照射時期はすべて同一時期とした．マウスの固定法については，トランスジューサの直径が小さいため，妊娠子宮に確実に超音波を照射させるために，マウスの呼吸を抑制しない範囲で四肢を充分に固定した．尚，定在波については，臨床における超音波照射条件に類似させるため，その発生については特に考慮しなかつた．ただし，腹壁における超音波の反射・減衰を最小限にするため，マウス腹部の剃毛は充分に行つた．照射後の胎仔奇形の分析についても，外表のみならず，内臓，骨格奇形についても厳密に行つた．その結果，2MHz, 2,000mw/cm² 5分の照射群では，

① 妊娠母体重増加の抑制
② 胎仔死亡総数の増加（着床痕の増加）
③ 奇形発生の増加

が有意に認められ，ICR 系妊娠マウスに対して明らかな超音波障害を及ぼすことが確認された．200mw/cm² 照射群では，影響を認めなかつたことも考え合わせると，マウス胎仔に対する超音波の安全限界は，200mw/cm² と2,000mw/cm² の間に存在することが示唆される．

この結果を，そのまま人間にあてはめることはできないものの，現用の超音波診断装置の出力は，およそ 1mw/cm² 程度もしくはそれ以下であり，腹壁・子宮壁での超音波の反射・減衰を考慮すれば，実際に胎児に照射される量は更に少なく，動物実験による危険量の1/1,000～1/2,000程度と考えられる．従つて，無制限に乱用しない限り，現用の超音波診断装置の安全性については特に問題はないと考えられる．

稿を終るに臨み，御指導，御校閲を頂いた坂元正一教授に深謝いたします．

また，多大の御教示，御協力を頂いた，東大 ME 研究施設の渥美和彦教授，および名倉，新井両氏に感謝いたします．

（なお，本研究の一部は厚生省心身障害研究費による）

文　献

1. *Bobrow, M., Blackwell, N., Unrau, A.E. and Bleaney, B.:* Absence of any observed effect of ultrasonic irradiation on human chromosomes. J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw., 78: 730, 1971.
2. *Buckton, K.E. and Baker, N.V.:* An investigation into possible chromosome damaging effects of ultrasound on human blood cells. Br. J. Radiol., 45: 340, 1972.
3. *Clarke, P.R. and Hill, C.R.:* Physical and chemical aspects of ultrasonic disruption of cells. J. Acous. Soc. Am., 47: 649, 1970.
4. *Loch, E.G., Fischer, A.B. and Kuwert, E.:* Effect of diagnostic and therapeutic intensities of ultrasonics on normal and malignant human cells in vitro. Am. J. Obstet. Gynecol., 110: 457, 1971.
5. *MacIntosh, I.J.C. and Davey, D.A.:* Chromosome aberrations induced by an ultrasonic fetal pulse detector. Br. Med. J., 4: 92, 1970.
6. *Slotová, J., Karpfel, Z. and Hrazdira, I.:* Chromosome aberration caused by the effect of ultrasound in the meristematic cell of Vicia faba. Biologia Plantarum, 9: 49, 1967.

（No. 4546 昭54・5・7受付）

NII-Electronic Library Service