

# 超音波パルス波照射の培養細胞増殖に 及ぼす影響に関する研究

鳥取大学医学部産科婦人科学教室

前田 一雄  
寺原 賢人  
津崎 恒明

## 1. 研究目的

著者ら<sup>4,5)</sup>は、これまで超音波連続波照射の影響を検討した結果、JTC-3培養細胞を生理食塩水に浮遊し、60分間回転照射を行うと、 $0.8\text{ W/cm}^2$ をこえる音響強度に培養細胞増殖抑制作用閾値のあることを認めた。

超音波パルス波の生体作用を検討するに当たっても、著者らは培養細胞の増殖に対する影響を検討することとし、その際には、すでに連続波において上記のように確立された実験方法を用いることとした。

照射に用いるパルス波は、診断装置では持続時間(パルス幅)が1~数 $\mu\text{S}$ であるが、今回はこれまで使用した連続波照射装置を改造して利用したため、パルス幅は $160\mu\text{S}$ となった。その音響強度は今後綿密に校正するが、これまでの連続波による実験と、パルス波による今後の実験との中間的接点として重要である。パルス幅の短い超音波については、もちろん別に実験の予定である。

## 2. 研究方法

### (1) 超音波照射装置

#### a) 超音波振動子

背面密閉型の、井出教授提供の $2\text{ MHz}$ 振動子を用いた。電子天秤法による校正が終わっているので、今回は振動子端子電圧から超音波音響強度を推定しようとした。

#### b) 超音波発振器

これまで超音波連続波の実験<sup>4,5)</sup>で使った統一仕様の発振器を改造した。すなわち、この発振器の高周波発振管のグリッドに $0.01\mu\text{F}$ 及び $650\Omega$ ( $1\text{ K}\Omega$ 半固定)を直列に接続し、他端に可聴

周波試験発振器を接続して $1\text{ KHz}$ 方形波を与えた。前記の振動子は発振器出力端子に接続して水中に沈めておき、出力モニター端子(振動子端子に接続)をシンクロスコープに接続して発振波形を観察した。

最初に可聴周波発振器電源をオフにし、超音波発振器に連続波を発振させ、パフア段及び終段の同調回路とパネル面の周波数可変つまみを動かして、波形ひずみが最も少なく、しかも振幅が最大となるように調節し、そのときの発振周波数を周波数カウンタで測定すると約 $2.1\text{ MHz}$ で、振動子端子電圧は最高 $56\text{ V}$ に達した。つぎに可聴周波発振器をオンにし、方形波振幅を調節すると、 $160\mu\text{S}$ のパルス幅をもつ断続波がえられた。

超音波放射は、連続波の場合と全く同様に水槽内で行った。水槽内には $37^\circ\text{C}$ の脱気水を満たし、さらにそのなかに補助槽を入れ、その一端に振動子を取りつけて振動子から約 $10\text{ cm}$ の距離に培養細胞浮遊液を入れたポリスチレン・チューブをおき、チューブ長軸を中心として $2.5\text{ rpm}$ 回転した。

チューブ照射に先立ち、 $2.55\text{ MHz}$ 共振、 $5\text{ mm}$ 径受信振動子を超音波音束内において、その端子電位をシンクロスコープで観察した(図1,2)。受信振動子支持棒を手で持って観測したので超音波音響強度を正しく表現しているとはいえないが、発振振動子の端子にみられたのと同様なパルス波が認められ、しかも相当大きい振幅であったので発振振動子から超音波が放射されていることは確かと思われた。

#### c) 超音波音響強度

発振振動子端子電圧が $56\text{ V}$ のとき、井出教授測定的全出力を求めた図から読みとると約 $70\text{ W}$ (約 $22\text{ W/cm}^2$ )となったが、本発振装置でこ

のように大きい電気出力がえられるか否か明らかでないので、今後さらに検討の予定である。また  $160\mu\text{S}$  オン、 $840\mu\text{S}$  オフとすると、時間平均値では約  $3.5\text{W}/\text{cm}^2$  となる。

## (2) 培養細胞

培養細胞には JTC-3 細胞を用いた。本細胞はヒト羊膜細胞起原で、これまで超音波連続波照射実験において一貫して用いた細胞であるので、パルス波の実験にも適していると考えられた。細胞培養液、培養法、細胞浮遊液調製法、対照群及び照射群設定、試験管数、増殖比率算出法などは連続波における実験 とほとんど同様であるため詳細は省略するが、ただ細胞数算定にあたり従来は細胞核を染色して算定したのに対して、今回は無染色で、位相差顕微鏡を用いた点が異なっている。

## 3. 研究結果

JTC-3 培養細胞に  $160\mu\text{S}$  の持続時間をもち、繰返し周波数  $1000\text{Hz}$  の  $2.1\text{MHz}$  超音波パルス波を回転照射してえた成績は次の通りである。

### (1) リン酸緩衝生理食塩水浮遊照射

音響強度を最大にし、照射時間は 30 分間とした。照射後の培養において、培養細胞増殖比率は対照群に比較して培養 2 日目に抑制傾向を示した。その後の培養では明瞭な差が認められなかった (図 3, 向かって左端)。

このため、同一条件でもう 1 回照射を行って培養したところ、上記の第 1 回実験と同様の結果がえられた (図 3, 向かって左から 2 番目)。

### (2) 血清加培養液浮遊照射

ウシ血清を添加した培養液に培養細胞を浮遊して、生理食塩水浮遊の場合と同様に音響強度を最大にし、30 分間及び 60 分間照射したのちの培養細胞増殖比率は、対照群に比較して特別な傾向を示さなかった (図 3, 向かって左から 3 番目及び最右端)。ただし 60 分間照射の成績は抑制を示すものかも知れないので、さらに実験を反復する必要がある。

## 4. 考 察

培養細胞に対する超音波照射の報告をみると、連続波については、Clarke<sup>1)</sup>が回転照射によって  $1\text{W}/\text{cm}^2$  付近に閾値を認め、前田<sup>4)</sup>は生理食塩水浮遊回転照射によって  $0.8\text{W}/\text{cm}^2$  をこえる領域に閾値を認めた。なお、Clarke<sup>1)</sup>は、静止照射では回転照射の  $1/100$  程度の作用しかえられないと述べた。

超音波パルス波の生体作用については種々の報告があるが、典型的業績とされる報告をあげると Dunn<sup>2)</sup>は、幼若動物中枢神経系についての検討で、機能障害を起こさせる閾値を認め、市販の超音波診断装置の出力はその  $1/100$  以下であると述べた。Taylor<sup>3)</sup>は、受精後 18 時間の、高い感受性を示す鶏胚に幅  $20\mu\text{S}$  のパルス波を照射し、ピーク値  $10\sim 25\text{W}/\text{cm}^2$  に異常発生の閾値を認めたという。

培養細胞に対する照射では、Clarke<sup>1)</sup>の報告があり、パルス幅が  $1\text{mS}$  以上のときに障害を生じ、 $30\text{mS}$  で最高となり、このときピーク値  $3\sim 6\text{W}/\text{cm}^2$  で細胞への作用を示したという。なお  $1\text{mS}$  未満のパルス幅では  $6\text{W}/\text{cm}^2$  でも作用がないという。

本研究では、これまでの連続波における成績と関連させるため、まず連続波照射装置を改造してパルス波を作り照射実験を行った。音響強度については、今後の校正が必要であり、また、パルス幅が  $160\mu\text{S}$  であって通常の診断装置よりも著しく大であるので、今後は定格化された装置による照射も平行して実験しなければならない。培養細胞を照射するときの細胞浮遊液の種類が成績に影響を及ぼすようであるが、これは連続波照射実験でもみられたところであり、したがって本研究における生食水浮遊の場合の増殖比率抑制傾向には意味があるのかも知れない。いずれにしても今後の実験が必要である。

## 5. 要 約

これまで連続波照射実験に用いてきた発振装置を改造してパルス波の照射を可能にし、培養細胞に回転照射を行ったところ、 $2.1\text{MHz}$ 、パルス幅  $160\mu\text{S}$ 、 $1000\text{Hz}$ 、推定ピーク音響強度

約  $20 \text{ W/cm}^2$  (今後校正予定) で、培養細胞を生理食塩水に浮遊して30分間照射した場合に増殖比率の抑制傾向がみられたが、さらに今後検討を続ける必要があり、また診断装置と同様にパルス幅の小さい、かつ定格化された発振装置を用いる実験も必要である。

### 参 考 文 献

1. Clarke, P. R. and Hill, G. R. ;  
J. Acous. Soc. Amer. 47: 649, 1970.
2. Dunn, F. and Fry, F. J. ; IEEE  
Trans. BME, BME-18, No. 4, 1971.
3. Taylor, K. J. W. and Dyson, M. ;  
Proc. 2nd World Cong. Ultras. Med.  
1973.
4. 前田一雄, 村尾文規, 吉賀峻, 山内長三郎 ;  
超音波医学 4: 259, 1977.
5. 村尾文規 ; 米子医学雑誌 27: 1,  
1976.

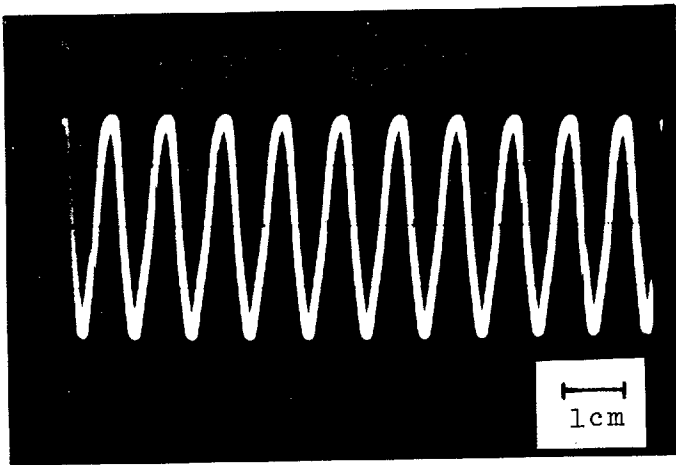


図1 本研究の超音波を受信振動子に放射し、その端子電位の変化をシンクロスコープで観察し記録した ( $2 \text{ V}$ ,  $5 \mu\text{S/cm}$ )。ただし可聴周波発振器電源はオフにし、連続波にしてある。

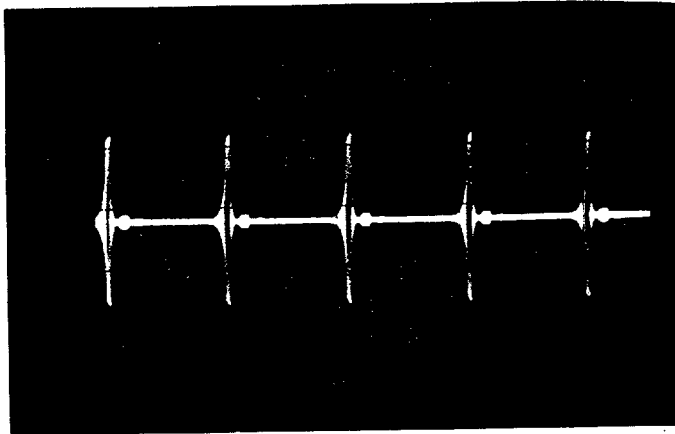


図2 図1と同様にして記録した。ただし、シンクロスコープ走引速度を遅くし、可聴周波発振器電源をオンにして、 $1000 \text{ Hz}$  のパルス波とした。1 cm の大きさは図1と同じである ( $2 \text{ V}$ ,  $0.5 \text{ mS/cm}$ )。

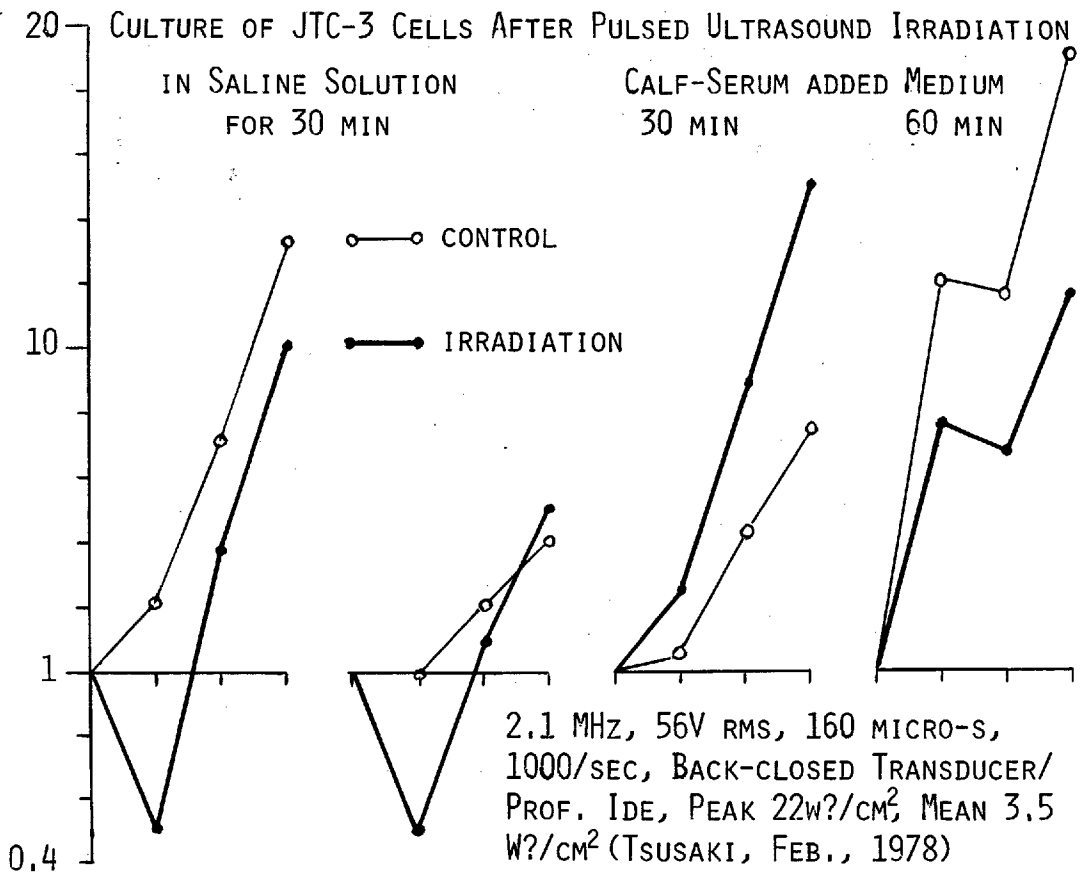

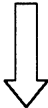


図3 超音波パルス波の培養細胞(JTC-3)照射後の増殖曲線(増殖比率)。細線は対照群。向かって左の2つはリン酸緩衝生理食塩水に培養細胞を浮遊し、右の2つは血清加培養液に浮遊した。照射時間は向かって左の3つが30分間、右端の1つが60分間である。超音波は、周波数2.1MHz、ピーク振幅56Vrms、パルス幅160 $\mu$ S、1000Hz、音響強度ピーク値推定22W/cm<sup>2</sup>(要校正)である。

 **検索用テキスト** OCR(光学的文字認識)ソフト使用   
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

1. 研究目的

著者ら 4,5)は,これまで超音波連続波照射の影響を検討した結果,JTC-3 培養細胞を生理食塩水に浮遊し,60 分間回転照射を行うと,0.8W/cm<sup>2</sup> をこえる音響強度に培養細胞増殖抑制作用閾値のあることを認めた。

超音波パルス波の生体作用を検討するに当たっても,著者らは培養細胞の増殖に対する影響を検討することとし,その際には,すでに連続波において上記のように確立された実験方法を用いることとした。