

# 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

本研究の最終的な目的は、診断装置パルス超音波のパルス幅や繰り返し周波数に近い実験条件で、種々の音響強度について培養細胞増殖抑制の有無を検討し、もし増殖抑制があれば、増殖抑制をきたす音響強度閾値を検討することにあるが、閾値の検討にあたって、パルス波の場合は種々のパラメータがそれぞれ関与する可能性があり、連続波における検討より一層多角的にならざるを得ない。

著者らは、これまで統一仕様の連続波照射装置を改造したパルス波発生装置を用いて行った予備実験で、JTC-3細胞をリン酸緩衝生理食塩水（以下PBSと略）に浮遊し、30分間回転照射を行い、再培養開始2日目に増殖抑制傾向がみられることを報告したが、この時のピーク値は約22 W/cm<sup>2</sup>、平均音響強度 3.5 W/cm<sup>2</sup>、パルス幅160 μ sec、パルス繰り返し周波数1000Hzであった。

今回は統一されたUSP-1型仕様による超音波パルス波発生装置を用いて、前述の実験よりパルス幅の短い超音波を照射して培養細胞増殖に及ぼす影響を検討した。

## 2. 研究方法

### (1) 使用細胞

ヒト羊膜上皮起源のJTC-3細胞で、実験は対数増殖期にあるものを用いて行った。

### (2) 超音波照射装置

パルス波発振器は発振周波数2 MHzで、パルス幅は3, 5, 10 μ sec、繰り返し周波数は250, 500, 1000 Hzにそれぞれ可変であって、送信出力パワーは自由に設定できる。

振動子は直径15mmの平面振動子で、天秤法により平均音響強度が測定されたものである。

### (3) 照射方法

プラスチック水槽側壁に振動子を固定し、水槽内には振動子が完全に没するまで37°C脱気水を満たした。振動子から約10cmの距離に、PGS中に浮遊させた培養細胞をいれたポリスチレンチューブを置き、チューブ長軸を中心として2.5 rpm回転させた。なお、照射時間が長時間となるにしたがい浮遊細胞が管底に沈澱堆積する傾向があるため、ポリスチレンチューブは、その管底が超音波音束の中心にくるように保持した。また、照射実験に先立ち、2.55 MHz共振、5 mm径受信振動子をポリスチレンチューブ内に入れて振動子面が発振振動子面とほぼ平行になるよう保持し、受信波形をシンクロスコープで観察し端子電圧を測定したが、チューブ外で測定した端子電圧に比し減衰はほとんどみられなかった。

### (4) 照射条件

今回の実験は装置の最大出力を用いて行い、パルス幅10 μ sec、繰り返し周波数1,000 Hz、平均音響強度0.674 W/cm<sup>2</sup>、ピーク出力67.4 W/cm<sup>2</sup>であった。照射時間は60分間と30分間であるが、上記の条件からすれば、真の照射時間はそれぞれ600 mS、300 mSとなることになる。

### (5) 細胞増殖の検討

細胞増殖検討の方法は、連続波における実験とほとんど同様であるが、細胞数算定に従来クリスタルバイオレットによる核染色を用いたのに対し、今回は位相差顕微鏡による細胞の直接観察法を用いた点だけ異なっていた。

### 3. 研究結果

細胞の増殖比率（培養0日目を1とした比率）で検討すると、60分間照射では照射後2日から7日目まで有意に増殖抑制がみられた（図1）。30分照射でもほぼ同様の結果であったが、経時的にみると、4日目以降に抑制がみられており（図2）、対照群比率に対する照射群比率の割り合いでみると、抑制の程度は30分間照射より60分間照射の方が著しかった（図3）。なお、図には示されていないが、30分間照射の場合、細胞浮遊溶媒を20%仔ウシ血清加MEMに変えて粘度の上昇を図って同様の増殖抑制が観察された。

図1 60分間照射

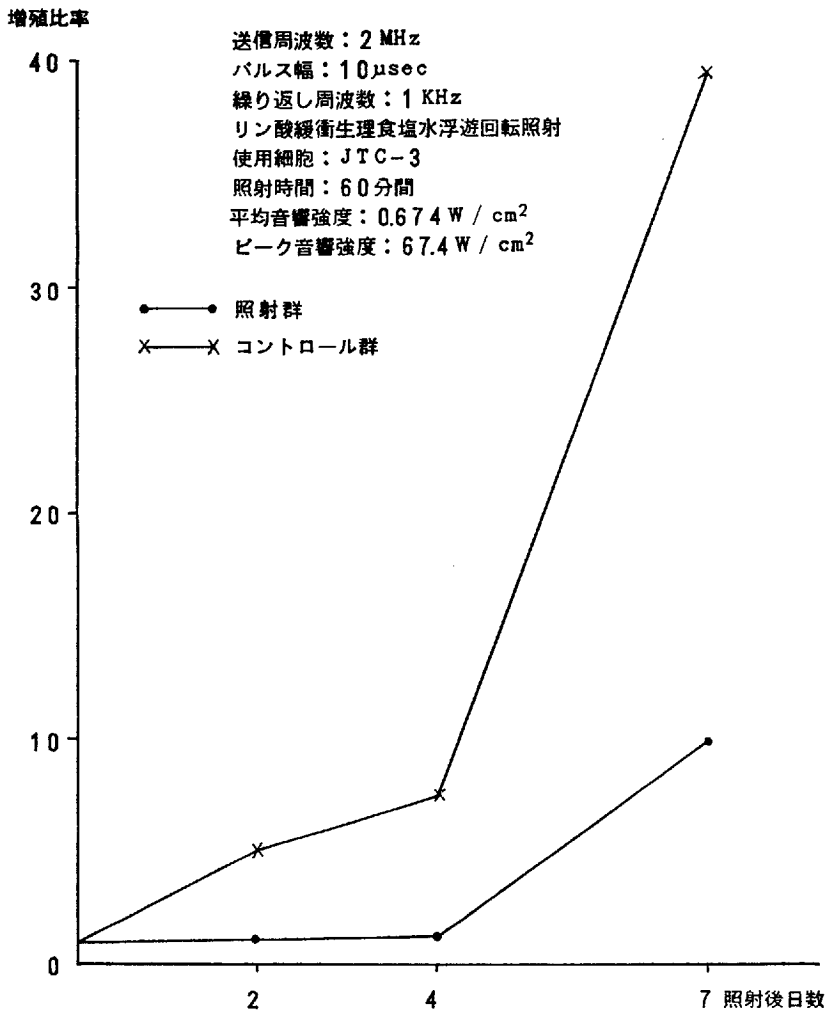


図2 30分間照射

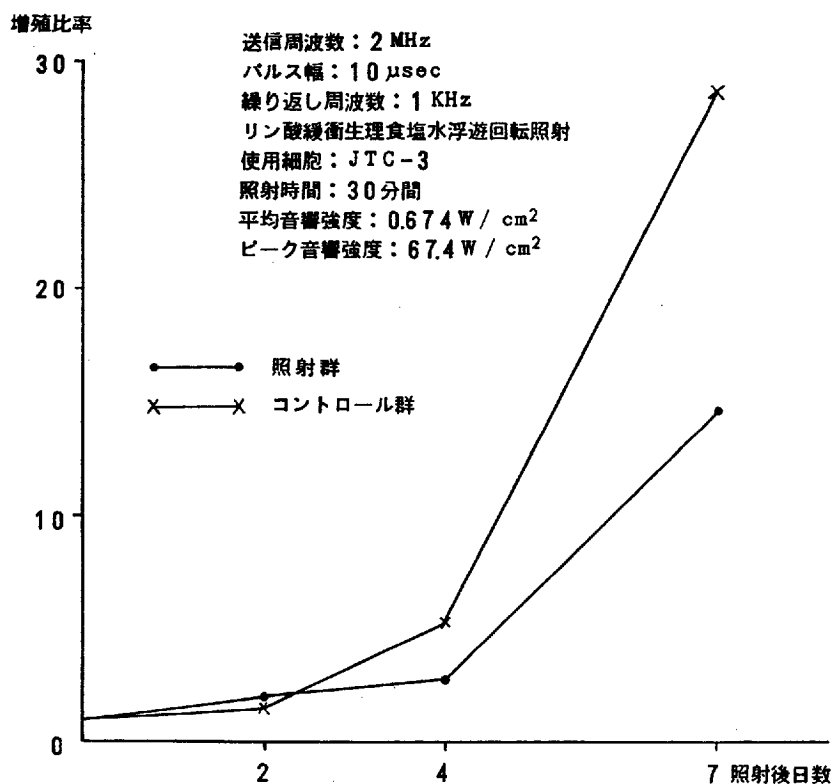
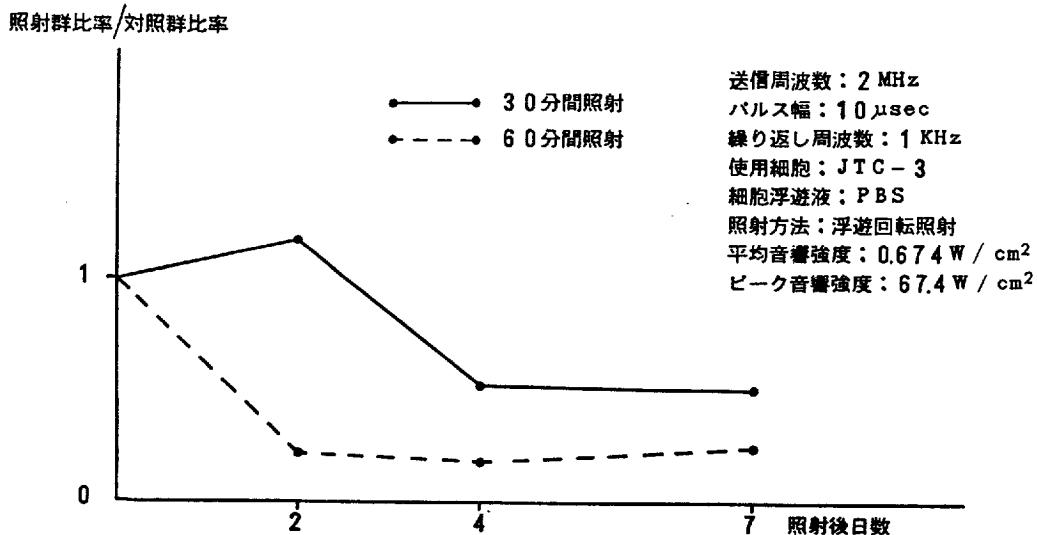


図3 増殖抑制の経日的変化



#### 4. 考 察

著者ら<sup>1)</sup>は、昭和52年度の本研究報告において、連続波照射装置を改造してパルス波発生装置を作り、培養細胞に対する照射実験を行った結果について報告した。それによると、今回と同じPGS浮遊回転照射において、パルス幅160  $\mu$  sec, パルス繰り返し周波数1000 Hz, 推定ピーク値約22 W/cm<sup>2</sup>, 時間平均音響強度約3.5 W/cm<sup>2</sup> 30分間照射で培養2日目に増殖抑制傾向が見られ、細胞浮遊溶媒を20%仔ウシ血清加MEMとすると抑制傾向は消失した。またこの抑制傾向は4日目以降は認められなかった。

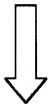
今回の実験条件は、パルス幅、時間平均音響強度では小さくなっているが、前回実験時のピーク値が校正を要するもののピーク値で約3倍となっており、細胞増殖抑制に影響を及ぼしているパラメータとしてピーク値が重要ではないかと考えられる。しかし、Childら<sup>2)</sup>のエンドウ根部への照射後の根発育に関する検討では、ピーク値を10 W/cm<sup>2</sup>に固定し、パルス幅を変化させて実験した結果から、パルス幅3  $\mu$  sec以下では増殖に有意の影響力がなくなったとしており、Clarkeら<sup>3)</sup>も、培養細胞に対する照射で、1 mS未満のパルス幅では、パルス幅が1 mS以上の時作用がみられるピーク値6 W/cm<sup>2</sup>でも作用がみられなくなったと報告しており、パラメータの1つとしてパルス幅も無視し得ない。又、今回の実験では抑制傾向が60分間照射では2日目から、30分間照射では4日目からみられ、7日目まで続いているが、前回実験時には抑制傾向は2日目のみであった点で異なっている。child<sup>2)</sup>らもエンドウ根の発育抑制は照射後24時間までに起こり、照射後3日までに遅延した成長率が対照群のレベルまで回復したとしており、照射により受けた傷害からの回復という側面からも検討を進める必要があるかも知れない。今回は10  $\mu$  secというパルス幅で実験を行ったが、今後診断装置のそれに近い3  $\mu$  secのパルス幅でも実験を重ねる予定である。

#### 5. 要 約

パルス幅10  $\mu$  sec, 繰り返し周波数1000 Hz, ピーク音響強度67.4 W/cm<sup>2</sup>, 平均0.674 W/cm<sup>2</sup>, 2 MHzの超音波パルス波をPBS液浮遊のJTC-3細胞に照射して培養細胞増殖に及ぼす影響を検討したところ、60分間及び30分間照射で増殖抑制を認めた。抑制の程度は60分間照射の方でより著しかった。今後さらにパルス幅やピーク及び平均音響強度などを変化させて実験を試みる予定である。

#### 参 考 文 献

1. 前田一雄, 寺原賢人, 津崎恒明: 母体および胎児に対する外的因子に関する研究。厚生省心身障害研究母体外因研究班研究報告書, 86, 1977.
2. Child, S. Z., Carstensen, E. L. and Miller, M. W.: J. Acous. Soc. Amer., 58; 1109, 1975.
3. Clarke, P. R. and Hill, C. R.: J. Acous. Soc. Amer., 47; 649, 1970.



## 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

本研究の最終的な目的は、診断装置パルス超音波のパルス幅や繰り返し周波数に近い実験条件で、種々の音響強度について培養細胞増殖抑制の有無を検討し、もし増殖抑制があれば、増殖抑制をきたす音響強度閾値を検討することにあるが、閾値の検討にあたって、パルス波の場合は種々のパラメータがそれぞれ関与する可能性があり、連続波における検討より一層多角的にならざるを得ない。