

# 1 超音波の染色体におよぼす影響

## ② 培養細胞に対する超音波照射の影響について

鳥取大学医学部産科婦人科学教室

前 田 一 雄  
村 尾 文 規  
古 賀 峻  
山 内 長 三 郎

### 実験方法および実験材料

#### 1, 超音波照射装置

まず比較的音響強度の小さい装置(最大約11  $\text{mw}/\text{cm}^2$ )を用いてJTC-3細胞(羊膜起原細胞)を含む種々の細胞を照射した。続いて本研究室で製作された比較的大きい音響強度の装置(最大数  $\text{w}/\text{cm}^2$ )を用いてJTC-3細胞を照射した(音響強度測定は鋼球法によった)。また、後者の、音響強度の大きい装置による実験では、細胞浮遊液をいれたチューブを回転しながら照射する実験(回転照射)も行った。

#### 2, 培養細胞

羊膜起原のJTC-3細胞のほか、C11D細胞L細胞、MCBLS細胞も用いた。また、セルシートに対する影響では、さらにNZBマウス皮膚組織および胎盤絨毛組織初代培養細胞も加えて実験した。

#### 3, 判定の指標

超音波照射後の培養細胞の増殖状況を判断の指標とした。すなわち、照射し分注してのち2, 4, 7日の細胞数による増殖曲線を対照と比較した。また、培養X日の細胞数を培養0日の細胞数(いずれも  $\text{mm}^2$ あたりの細胞数で表現)と比較し、その比率を求めて「増殖比率」とした。細胞数としては、3本の試験管に分注したものをそれぞれ4回算定するので、12個のデータの平均値をとった。培養0日の増殖比率はすべて1である。つぎに、培養X日における照射群の増殖比率と対照群の増殖比率との比率を求め、これを「照射群増殖比率/対照群増殖比率」とした。培養0日の増殖比率はすべて1であるから、照射群増殖比率/対照群増殖比率も培養0日には1となる。

産科婦人科領域の診療は超音波診断法の導入によって画期的発展をとげ、今日では超音波診断法は種々の疾患の診断に必須の検査法となり、本法のもたらした利点は甚だ大であるが、一方その普及につれて診断に際しての主として胎児に対する安全性が論じられている。臨床的には、Bernstein<sup>1)</sup>, Bishop<sup>2)</sup>, Hellman<sup>4)</sup>, のドブラ法およびパルス法に関する新生児異常発生調査があり、生後の発育についてはKorenyi<sup>5)</sup>らの肉体的、精神的、情緒的発育に関する調査があつて、いずれも超音波診断法の影響は認められていない。わが国における諸家の検討でも同様である。染色体レベルでは、最近では超音波診断法による異常はないというのが定説となった感がある。動物実験では大部分の研究者は異常を認めないとしているが、清水ら<sup>7,8)</sup>は特別の純系動物において非常に長時間の照射、あるいは診断装置にくらべて非常に強い音響強度の照射で胎児に異常を認めると報告した。しかし動物実験では実験条件の設定に非常な困難を伴うため、さらに単純な条件を求めて細胞レベルでの実験を試みようとし、培養細胞に対する超音波照射を行った。すでにClarkeら<sup>3)</sup>,あるいはLochら<sup>6)</sup>の培養細胞照射に関する実験があるけれども、その成績には大きな差がみられ、この方面での見解が一致しているとはいえない。また、アメーバなどをゲル内に固定し、キャビテーションが発生しない状態で実験を行った報告もあるが、ここではキャビテーション発生をとくに防止しようとはしなかつた。生体内におけるある種の極端な条件のもとではむしろ自然かと思われたからである。

## 実 験 成 績

### 1. 比較的弱い音響強度の超音波照射

ポリスチレン製シャーレの底面に JTC-3 細胞などの細胞を単層培養し 37°C の脱気水をいれた水槽の水面にこのシャーレをおき、水槽底に超音波振動子をおいて細胞容器下面から照射した。培養細胞と振動子間の距離は 7 cm, 超音波は 2.1 MHz の連続波で、音響強度は概略 40 または 70  $\text{mw}/\text{cm}^2$  であった。種々の細胞に多様な照射法で照射を行ったが細胞数あるいは増殖比率を用いた増殖曲線で対照とのあいだに一定の傾向の差異を認めることができず、また照射群増殖比率/対照群増殖比率を照射後 2~7 日にわたって検討しても 1 の線を上下して一定の傾向がみられず、また全実験について培養 2, 4, 7 日の照射群増殖比率/対照群増殖比率を培養 0 日のそれと比較したが、t 検定で有意差は認められなかった(表 1)。

以上の成績から、100  $\text{mw}/\text{cm}^2$  以下の音響強度の照射では、培養細胞増殖に影響を与えることはないものと結論した。

### 2. 比較的強い音響強度の超音波照射

この実験には本研究班で製作された照射装置を用いた。すなわち、発振器本体 (VFO, 音響強度ステップ調節), 出力電流および電圧記録器, 恒温水槽からなり、振動子は両面放射型で発振面を垂直にして超音波が水平方向に放射されるようにした。振動子の背面と、培養細胞容器をこえて反対側には写真用スポンジに十分水をふくませた吸音材をおいた。発振周波数は約 1, 2, 4 MHz で、音響強度は約 2.6  $\text{w}/\text{cm}^2$  が最大であった。

ポリスチレン製培養びん側面の内面に、振動子直径に相当する範囲に前記数種の細胞を単層培養し、60 分間照射したのちに培養して増殖曲線を作製したところ、全般的にやや抑制傾向があるにしても、ビンクリスチンを加えて培養したときのように明らかな差は認められなかった。つぎに Clarke らの方法にならない、細胞浮遊液をポリスチレン製培養チューブにいれ、2.5 rpm で回転しながら照射したが、対照との差はなかなか現われなかった(図 1)。

このように陰性成績がつづいたので、つぎに照

射時における細胞周囲溶液の濃度あるいは粘度を下げることを考えた。すなわち、培養液から血清を除き、リン酸衛生理食塩水 (PBS 液) 中に JTC-3 培養細胞を浮遊し、約 2.6  $\text{w}/\text{cm}^2$ , 2 MHz 60 分間回転照射し、かたたび血清を加えた通常の培養液中で培養したところ、対照に比して増殖曲線に明らかな抑制が現われたが、この条件のまま音響強度を 0.8  $\text{w}/\text{cm}^2$  とすると対照との差がみられなくなった(図 2)。

さらに、約 1 MHz, 1.7  $\text{w}/\text{cm}^2$ , 6.0 分間照射では、対照、血清を加えた培養液、PBS 液の順に増殖曲線が低下しており、さらに前述の成績を確かめることができた(図 3)。

また、比較的弱い照射の際に行ったようにして照射群増殖比率/対照群増殖比率を求め、培養 2, 4, 7 日をそれぞれ比較すると、1  $\text{w}/\text{cm}^2$  をこえる照射を行ったものについては t 検定で有意差を認め、2, 4, 7 日とも 0 日にくらべて抑制がみられた。先述のように、2.6  $\text{w}/\text{cm}^2$  でも単層培養あるいは血清加培地内細胞の照射で各実験単独では差を認めにくかったが、このように統計処理を行うと超音波照射の影響を認めることができた。なお 0.8  $\text{w}/\text{cm}^2$  の照射は 2 例にすぎないが、いずれも照射群増殖比率/対照群増殖比率は照射後も 1 をわずかに上下し、影響は認められなかった(表 2)。また、照射群増殖比率/対照群増殖比率のグラフをみても、0.8  $\text{w}/\text{cm}^2$  照射群 (No. 3, 12) を除くとほとんどすべて 1 の線以下にあり、0.8  $\text{w}/\text{cm}^2$  照射との差が明らかであった(図 4)。

以上により、超音波照射の JTC-3 細胞増殖抑制の閾値は 0.8  $\text{w}/\text{cm}^2$  と 2.6  $\text{w}/\text{cm}^2$  のあいだにあるといえる。また 1 MHz の成績を用いることが許されれば 0.8 および 1.7  $\text{w}/\text{cm}^2$  のあいだ閾があることとなる。

なお、培養びん壁面に付着した単層培養細胞に固定照射を行った場合、1.7  $\text{w}/\text{cm}^2$  以上で細胞層に微細な間隙の発生をみ、2.6  $\text{w}/\text{cm}^2$  では著しく拡大して網目状となるのをみた。この現象は超音波放射の一つの作用を示すものと思われ、培養細胞増殖抑制閾値が 0.8  $\text{w}/\text{cm}^2$  より大であることを裏づける一つの資料となるものと思われる。

#### 今後の検討予定

以上の成績は60分という長時間の照射によってえられたものであるから、5、10、30分間の各照射を行って検討する予定である。超音波の周波数も1、2、4 MHzの各周波数を用いることとする。また、培養細胞増殖曲線のみでなく、コロニー形成率も検討の予定である。今日まで予備的に行った実験では、0.1、0.2、0.5 w/cm<sup>2</sup>、約2 MHz 5分間照射で培養細胞増殖比率に対照と差がなく、コロニー形成率は一定の傾向を示さず、1 w/cm<sup>2</sup>以上の音響強度でも2 MHz 連続波5分間の照射で増殖曲線に一定の傾向をもつ変化はみられなかった。さらに詳細な検討を行って報告する予定である。

#### 参考文献

- 1, Bernstine, R. L. Safety studies with ultrasonic Doppler technic. A clinical follow-up of patients and tissue culture study obstet. Gynec. 34, 707, 1969.
- 2, Bishop, E. H. Obstetric uses of the ultrasonic motion sensor. Amer J. Obstet. Gynec. 96, 863, 1966.
- 3, Clarke, P. R. and Hill, C. R. Physical and chemical aspects of ultrasonic disruption of cells. J. Acous. soc. Amer. 47, 649, 1970.
- 4, Hellman, L. M., Duffus, G. M., Donald, I. and van B. Safety of diagnostic ultrasound in obstetrics. Lancet I, 1133, 1970.
- 5, Koranyi, G., Falus, M., Pesti, E., Sobel, M. and van Bao, T. Follow-up study of children intrauterinely investigated with ultrasound in the foetal age. 3rd European Congress of perinatal Medicine, Lausanne, 1972.
- 6, Loch, E., Fischer, A. B. and Kuwect of diagnostic and therapeutic intensities of ultrasonics on normal and malignant human cells in vitro. Amer. J. Obstet. Gynec 110, 457, 1971.
- 7, 清水哲也, 福島務, 東海林隆次郎, 超音波と催奇性の有居について, 産科と婦人科 37, 1339, 1970.
- 8, 東海林隆次郎, 村上氏広, 清水哲也, 超音波照射の安全性に関する実験的研究, 日本超音波医学会第26回研究発表会講演論文実 147 1974

表1 比較的弱い音響強度の超音波照射後の照射群増殖比率/対照群増殖比率  
(2.1 MHz)

No	細胞	単層・浮遊	超音波強度 (mw/cm <sup>2</sup> )	照射時間 (分)	植で込の み時間 ま間	照射群増殖比率 対照群増殖比率		
						2日	4日	7日
1	CI-ID	単	70	10	24時間	1.21	1.47	1.57
2	CI-ID	単	70	10	24時間	0.85	0.86	0.71
3	JTC-3	単	40	10	24時間	0.96	0.88	0.99
4	JTC-3	単	40	60	24時間	0.67	0.67	0.73
5	JTC-3	単	40	60	24時間	-	-	1.12
6	CI-ID	単	40	60	24時間	0.84	0.64	0.70
7	L	単	40	60	24時間	1.76	1.60	1.70
8	MCBLS	単	40	60	24時間	0.99	0.89	0.99
9	JTC-3	単	40	10	1月	0.68	0.90	0.77
10	L	単	40	60	1月	0.58	0.84	0.81
11	L	単	40	30,2日	24時間	0.68	0.89	1.10
12	JTC-3	単	40	60,2日	24時間	-	-	1.70
13	JTC-3	単	40	60,3日	24時間	-	-	0.75
14	MCBLS	単	40	60,3日	24時間	0.84	1.41	1.15
15	JTC-3	単	40	60,3日	2月	0.96	0.62	0.60
16	JTC-3	単	40	60,3日	5月	1.21	1.47	1.57
17	L	単	40	60,5日	2週	0.81	1.19	1.41
18	JTC-3	浮	40	60	直後	-	-	0.81
19	MCBLS	浮単	40	60,6×2日	24時間	1.09	1.08	1.03

平均 ± SD

0.96 1.02 1.07

±0.32 ±0.31 ±0.37

0日(-1)に対する比較 0.5<p<0.6 0.7<p<0.8 0.4<p<0.5

表2 比較的強い音響強度の超音波照射後の照射群増殖比率/対照群増殖比率 (JTC-3細胞60分照射)

1 音強度  $\approx 0.8 \text{ w/cm}^2$

No.	単層・浮遊	静止・回転	血清・PBS	周波数 (MHz)	音強度 ( $\text{w/cm}^2$ )	植で込み時間	照射群増殖比率 / 対照群増殖比率		
							2日	4日	7日
3	単	静	血	4	0.8	直後	1.09	1.02	1.16
12	浮	回	P	2	0.8	直後	1.07	1.21	0.98

2 音強度  $\geq 1.7 \text{ W/cm}^2$

	単層・浮遊	静止・回転	血清・PBS	周波数 (MHz)	音強度 ( $\text{w/cm}^2$ )		照射群増殖比率 / 対照群増殖比率		
							2日	4日	7日
1	浮	静	血	1	1.7	直後	1.12	1.00	1.00
2	浮	静	血	2	2.6	直後	0.83	0.67	0.67
4	単	静	血	1	1.7	10日	0.96	0.82	0.71
5	単	静	血	2	2.6	20日	0.78	0.66	0.81
6	浮	静	血	1	1.7	30日	0.93	0.89	0.78
7	浮	回	血	1	1.7	直後	0.26	0.22	0.35
8	浮	回	P	1	1.7	直後	0.13	0.14	0.16
9	浮	回	血	1	1.7	直後	0.81	0.79	0.82
10	浮	回	血	2	2.6	直後	0.99	0.82	0.79
11	浮	回	P	2	2.6	直後	0.62	0.47	0.33

平均  $\pm$  SD

0日 (=1) に対する比較 0.02 < p < 1.05 p < 0.01 p < 0.001

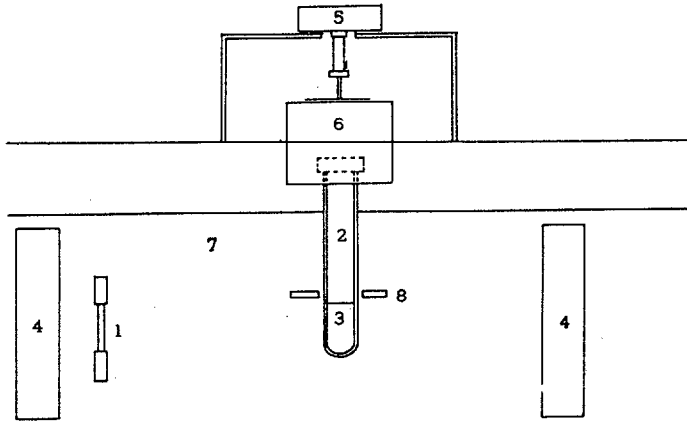


図1 培養細胞に対する超音波回転照射に用いた装置  
 1: 超音波振動子, 2: ポリスチレン製細胞培養チューブ, 3: 培養細胞浮遊液, 4: 吸音材,  
 5: シンクロナスマータ, 6: カブラ, 7: 37°C 脱気水, 8: チューブ保持具

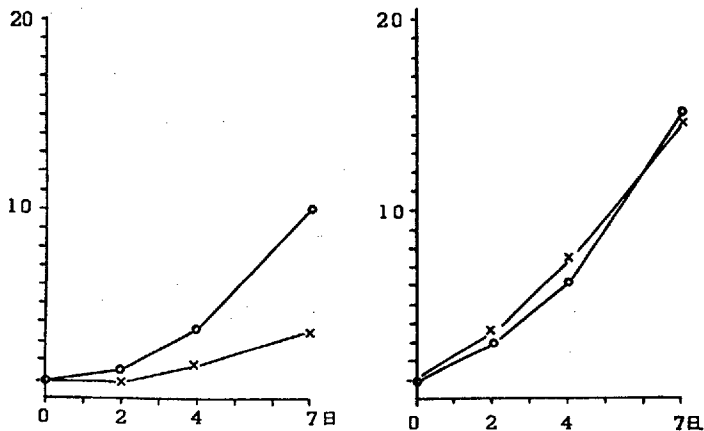
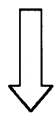
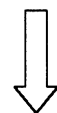


図2 培養細胞増殖曲線に対する超音波回転照射の影響  
 増殖曲線は、培養0日の細胞数を1とし、これに対する培養2, 4, 7日の細胞数の比率で表わした。培養細胞PBS浮遊液では、(A) 2MHz, 約  $2.6 \text{ w/cm}^2$ , 60分の超音波照射(x-x)で、対照(0-0)に比し明らかな増殖曲線抑制が認められるが、(B) 音強度を  $0.8 \text{ w/cm}^2$  とすると対照と差が認められない。



## 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



産科婦人科領域の診療は超音波診断法の導入によって画期的発展をとげ、今日では超音波診断法は種々の疾患の診断に必須の検査法となり、本法のもたらした利点は甚だ大であるが、一方その普及につれて診断に際しての主として胎児に対する安全性が論じられている。臨床的には、Bernstine<sup>1</sup>), Bishop<sup>2</sup>), Hellman<sup>4</sup>), のドプラ法およびパルス法に関する新生児異常発生調査があり、生後の発育については Korcny<sup>5</sup>)らの肉体的、精神的、情緒的発育に関する調査があつて、いずれも超音波診断法の影響は認められていない。わが国における諸家の検討でも同様である。染色体レベルでは、最近では超音波診断法による異常はないというのが定説となった感がある。

図3, 培養細胞増殖曲線に対する超音波  
回転照射の影響

増殖曲線は、培養0日の細胞数を1  
とし、これに対する培養2, 4, 7日  
の細胞数の比率で表わした。1MHz  
約  $1.7 \text{ w/cm}^2$ , 60分の照射では、対  
照(0-0)に比し、20%血清添加培  
養液中で照射した細胞( $\Delta$ - $\Delta$ )では  
増殖曲線の抑制がみられ、PBS溶液  
中で照射した細胞( $\times$ - $\times$ )ではさらに  
強い抑制が認められる。

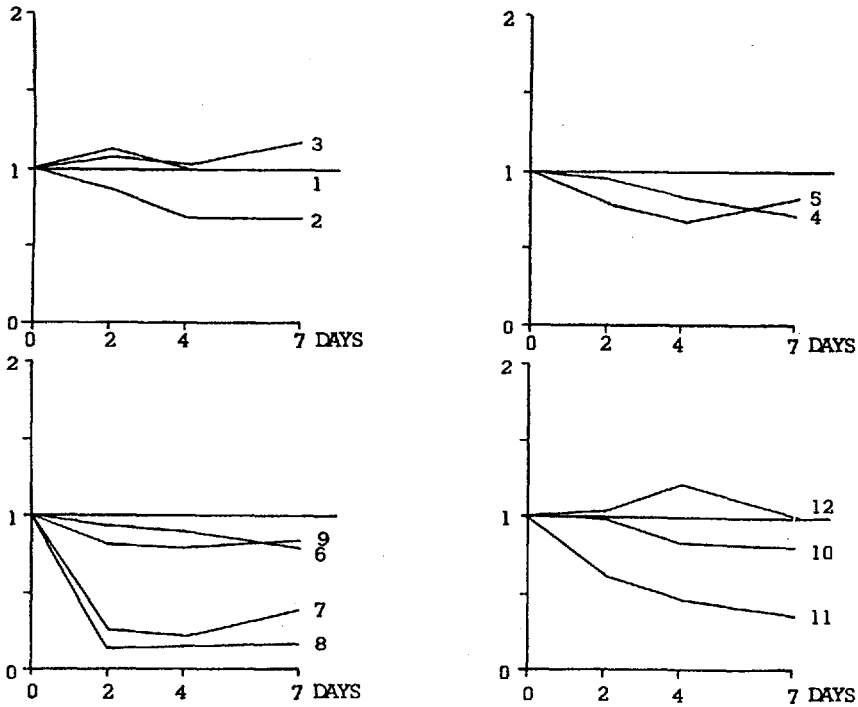
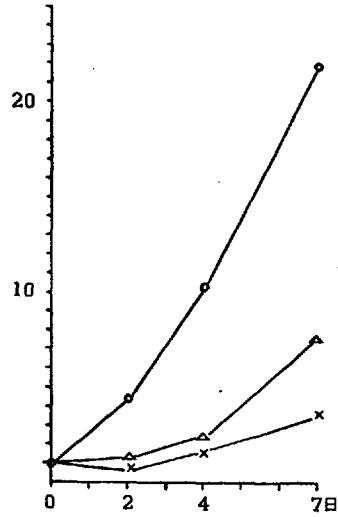


図4, 培養したJTC-3細胞に比較的強い超音波(1~4MHz,  $0.8 \sim 2.6 \text{ w/cm}^2$ ,

60分間)を照射したのちの培養における照射群増殖比率の推移

図中の番号は表2のNoに一致する。No3および12は  $0.8 \text{ w/cm}^2$ 照射で、ほ  
とんど変動を認めない。その他は  $1.7 \text{ w/cm}^2$ 以上の照射で、No1を除いてそ  
の他はすべて抑制傾向が認められる。