

# 超本波の染色体に及ぼす影響

## 培養細胞増殖に対する超音波照射の影響に関する研究

鳥取大学医学部産科婦人科学教室

前田一雄  
寺原賢人  
村尾文規  
吉賀峻  
山内長三郎

### 研究目的

我々は、これまで本研究班で製作された実験用超音波照射装置を用いて培養細胞増殖に対する超音波照射の影響を研究し報告した。同装置の中心周波数は1, 2, 4 MHzで、振動子は直径2 cmの両面放射型である。これを37℃脱気水を満した恒温槽中に入れ、水平方向に超音波を放射し、振動子から10 cm離して置いたポリスチレン製培養チューブの下端に培養細胞浮遊液を入れて2.5 rpm回転しながら60分間照射した。羊膜起原のJTC-3細胞をリン酸緩衝塩類溶液に浮遊して照射したとき、2 MHz、約0.8 w/cm<sup>2</sup>では増殖曲線の変化をみず、約2.6 w/cm<sup>2</sup>で明らかな抑制が現れた。また1 MHz、1.7 w/cm<sup>2</sup>でも抑制を認め、この結果から、2 MHzでは値が0.8~2.6 w/cm<sup>2</sup>のあいだにあるものと考えた。また、培養フラスコ内面側壁に付着した細胞層を照射すると以上の強さの超音波でも増殖曲線抑制はみられなかったが、2.6 w/cm<sup>2</sup>、60分照射後に細胞層に多くの小孔形成を認め、約1.7 w/cm<sup>2</sup>では孔は小さくなり、0.8 w/cm<sup>2</sup>では認められなくなった。この現象は閾の存在を示唆するものと考えられた。以上はすでに報告したところであるが、本年は超音波音強度測定法につき検討し、また超音波照射の影響については照射時間と音響強度を変え、井出教授製作の新しい振動子を用いる実験も行った。さらに、増殖曲線だけでなく、細胞コロニー形成に対する影響も検討した。

### 研究方法

#### A. 超音波音響強度測定に関する検討

これまで直径0.958 cmの鋼球を170 cmの高さから細ナイロン糸で吊し、水槽中における移動距離から音響強度を計算した。その後、井出教授から電子天秤法で校正した2 MHz振動子の提供を受けたので、さらに直径0.317 cmの鋼球を9.9 cmの高さから吊し、微動装置に吊糸支持具をつけ、支持具、糸、鋼球の全部を水中に沈め、移動距離は側方から望遠鏡で側定した。端子電圧を一定とした振動子の前面に沿い、これと平行に小鋼球を移動させて垂直方向の移動距離をグラフ上に書き、又は端子電圧を変化させたときの中心軸方向の小鋼球の移動や直径5 mm超音波受信子に生じる端子電圧の変化、あるいは同受信子を振動子前面と平行に動かしたときの受信子端子電圧の変化を検討し、以前に用いた直径0.958 cm鋼球による成績との比較、又は旧振動子と井出教授提供振動子の比較などを行った。

#### B. 培養細胞増殖曲線に対する影響

超音波連続波1 MHz回転照射を0.1~0.5 w/cm<sup>2</sup>及び0.8~2.0 w/cm<sup>2</sup>5分間、0.8~2.0 w/cm<sup>2</sup>10分間、0.1~2.0 w/cm<sup>2</sup>30分間行い、また井出教授振動子により2.018 MHz回転照射を0.1~0.5 w/cm<sup>2</sup>で5分間行った(本論文では0.958 cm直径鋼球による鋼球法で測定した音響強度を用いた。井出教授振動子の全出力は0.12~0.58 wであるが、以下いずれも前記鋼球法による音響強度に統一して記載する)。照射は本研究班で製作された実験装置によって行い、継代培養後ほぼ均一な細胞層を形成した時期にトリプシンで剝離したJTC-3細胞をリン酸緩衝塩類溶液中に浮遊させ、これをいれたポリスチレン培養チ

## 研究成績

ューブを、1 MHz では振動子から10 cm、2 MHz では15 cmの距離におき2.5 rpm 回転しながら照射した。1 MHz では振動子(両面放射型)の背後及び培養チューブ背後に、2 MHz (前面放射型振動子)ではチューブの背後に吸音材を置いた。対照群細胞も同じ塩類溶液に浮遊し、チューブに入れて周囲を吸音材でおおい、実験水槽に照射群に相当した時間浸した。

培養液にはイーグルMEM培地にL-グルタミン及び仔牛血清を20%の割合に添加したものをを用いた。超音波照射後直ちに培養液2 ml に $10^4$ 又は $2 \times 10^4$ 個の割合で細胞をプラスチックシャーレに植え、炭酸ガス恒温器に入れ培養した。超音波照射日を0日とし、奇数日に培養液を交換した。細胞数算定には、トリブシン法により細胞浮遊液を作り遠沈し上澄を除き残部に0.05%クリスタルバイオレット加0.1 Mクエン酸溶液とリン酸緩衝塩類溶液を加え、37°C 30分間放置後血球計算板上で検鏡し、2、4、7日目に算定した。細胞増殖程度は細胞実数・増殖比率曲線及び照射群増殖比率/対照群増殖比率により検討した。

### C. 培養細胞コロニー形成に対する影響

培養細胞増殖曲線への影響を検討した実験と同様の超音波連続波回転照射を行った。1 MHz では音響強度 $0.1 \sim 2 \text{ w/cm}^2$ 、照射時間は5分、10分及び30分とした。2 MHz では井出教授の振動子を用い、周波数2.018 MHz、音響強度 $0.1, 0.2, 0.5 \text{ w/cm}^2$ で5分間照射した。

JTC-3細胞のリン酸緩衝塩類溶液浮遊液をポリスチレンチューブにいれて回転照射した。照射後に細胞は培養液で希釈し500個/2 mlの割合でプラスチックシャーレ(直径3.5 cm)に植え、5%炭酸ガス恒温器で培養した。培養液は照射翌日及びその後4日目ごとに交換した。照射13日後にシャーレをとり出し、細胞をギムザ液で染色した。形成されたコロニーをかぞえ、コロニー形成率(算定コロニー数/最初に植えこんだ細胞数、%)及び照射群コロニー数比率(照射群コロニー数/対照群コロニー数、%)を算出した。

### A. 超音波音響強度測定に関する検討

#### 1. 0.958 cm直径鋼球による成績

両面放射型振動子の端子電圧を変化させたときの鋼球移動距離による音響強度曲線は十分滑らかであり、大きい誤差はないものと思われた。音響強度が大きいために鋼球吊糸などの影響が少なく、距離測定を肉眼で行っても十分な精度であったものと考えられる。吉岡のY因子を考慮に入れなければ、従来我々が発表してきた音響強度に補正を加える必要はない。Y因子を、例えば0.9にとれば、その逆数、すなわち1.1を乗じて補正すればよい。

#### 2. 0.317 cm直径鋼球による成績

##### a. 振動子面に平行に動かした成績

井出教授振動子を用い、2.018 MHz、端子電圧9.8 Vで測定し、縦軸を鋼球移動距離、横軸を平行移動距離としたグラフに画くと滑らかな山形の曲線がえられた。その中心部(鋼球移動距離 $0 \pm 5 \text{ mm}$ )の面積は全面積の86%に当り、全出力に対する直径10 mm鋼球法音響強度の比率を示唆するものと考えた。

##### b. 振動子端子電圧を変えたときの成績

鋼球の移動を、縦軸に移動距離、横軸に端子電圧をとったグラフ上に画くと、上に凹の滑らかな曲線がえられ、十分高い精度で測定できると思われた。

#### 3. 種々の計測法による成績の比較

井出教授振動子を用い、2.018 MHz、端子電圧10 Vのとき、0.317 cm直径の鋼球では $3.1 \text{ w/cm}^2$ 、0.958 cm径鋼球では $1.49 \text{ w/cm}^2$ となり、その比は2.08であった。この比は端子電圧を変えても、また両面放射型振動子の場合でもほぼ同様であった。

0.958 cm径鋼球による音響強度値の全出力に対する比率は、種々の端子電圧とYPの場合に83~93%であり、「a」項と似た結果がえられた。

両面放射型振動子は2.04 MHz、で駆動したが、端子電圧が等しければ井出教授の前面放射型とほぼ同じ音響強度がえられた(両振動子とも直径は2 cmである)。

#### 4. 直径5 mmの超音波受信子を用いた成績

受信子(共振周波数2.55 MHz)を井出教授振動子前面中心軸上に固定し、端子電圧を変えると受信子端子電圧は直線的に変化した。また、振動子端子電圧を一定にし、受信子を振動子面に平行に動かすと、滑らかな山形の曲線がえられ、標準化すると井出教授測定の結果に殆んど一致した。

#### B. 培養細胞増殖曲線に対する影響

##### 1. 1 MHz 回転照射5分間の成績

0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0 w/cm<sup>2</sup>の各音響強度で実験したが、細胞実数、増殖比率、照射群増殖比率/対照群増殖比率に有意な所見は認められず、陰性の成績であった。

##### 2. 1 MHz 回転照射10分間の成績

上記実験では2日目細胞数が減少したので、培養液PHを7.6から7.3に変え、植えこむ細胞数を10<sup>4</sup>個から2×10<sup>4</sup>個に変更したところ、2日目の減少が消失した。0.8, 1.0, 2.0 w/cm<sup>2</sup>の強度で10分間照射しても各パラメータにおいて対照群との差を認め難かった。

##### 3. 1 MHz 回転照射30分間の成績

培養条件は「2」と同じである。0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0 w/cm<sup>2</sup>において対照とのあいだに明瞭な差は認められなかった。

##### 4. 2 MHz 回転照射5分間の成績

0.1, 0.2, 0.5 w/cm<sup>2</sup>の各強度において増殖比率及び照射群増殖比率/対照群増殖比率に明瞭な所見は認められなかった。

#### C. 培養細胞コロニー形成に対する影響

##### 1. 1 MHz 回転照射5分間の成績

コロニー形成率において、0.1及び0.5 w/cm<sup>2</sup>では促進、0.2 w/cm<sup>2</sup>では抑制の傾向が認められ、一定の傾向がえられなかった。

##### 2. 1 MHz 回転照射10分間の成績

コロニー形成率及び照射群コロニー数比率において0.2及び0.8 w/cm<sup>2</sup>で促進傾向、1 w/cm<sup>2</sup>で軽度抑制傾向をみ、一定の傾向は認められなかった。

##### 3. 1 MHz 回転照射30分間の成績

0.1, 0.5, 0.8, 1, 2 w/cm<sup>2</sup>に軽度抑制傾向をみ、0.2 w/cm<sup>2</sup>では差がなかった。抑制傾向

は音響強度と比例せず、したがって再検討を要する。

##### 4. 2 MHz 回転照射5分間の成績

0.1, 0.2 w/cm<sup>2</sup>に軽度抑制傾向をみたが、0.5 w/cm<sup>2</sup>には差がなかった。

## 考 察

#### A. 実験に用いた超音波の音響強度

本研究では当科で鋼球法により測定した音響強度を用いてきた。鋼球直径0.958cm、垂下距離170cmであり、移動距離測定も肉眼によったので、本年はその精度について再度検討し、また他の種々の測定法を併用して多面的に考慮を加えた。その結果、これまで報告してきた音響強度は、生物学的実験に用いる程度であれば十分正確と思われる。全出力との関係や、もっと小さい鋼球を用いたときの結果についても検討し、また超音波受信子を用いた成績もえられたので、種々の音響強度測定と比較することも可能かと考える。我々の培養細胞実験における音響強度は、0.958cm直径鋼球によって表現した。

#### B. 培養細胞の増殖におよぼす影響

増殖曲線、増殖比率、あるいはコロニー形成において、1 MHz、5~30分間、0.1~2 w/cm<sup>2</sup>の照射、あるいは2 MHz、5分間、0.1~0.5 w/cm<sup>2</sup>の照射は影響を与えなかった。一部に僅かな抑制や促進の傾向をみたが、超音波照射の影響よりも、むしろ細胞培養過報での諸因子の変動による効果を考慮する必要があると考える。条件を種々変更した場合についてはさらに今後検討の予定である。

## 要 約

羊膜起原のJTC-3細胞を、通常の培養液中にでなく、リン酸緩衝塩類溶液というやや非生理的で粘度の低い溶液中に浮遊してポリスチレン培養チューブにいれ、2.5 rpm 回転しながら37℃脱気水中で2 MHz 超音波連続波を60分間照射するとき、細胞増殖抑制の値は0.8~2.6 w/cm<sup>2</sup>の間にあると考えられる。2 w/cm<sup>2</sup>以下で照射時間を短かくして実験すると、増殖曲線やコロニー形成率に対し明瞭な影響が認められなかった。

↓ **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

研究目的

我々は、これまで本研究班で製作された実験用超音波照射装置を用いて培養細胞増殖に対する超音波照射の影響を研究し報告した。同装置の中心周波数は1,2,4MHzで、振動子は直径2cmの両面放射型である。これを37℃脱気水を満した恒温槽中に入れ、水平方向に超音波を放射し、振動子から10cm離して置いたポリスチレン製培養チューブの下端に培養細胞浮遊液を入れて2.5rpm回転しながら60分間照射した。