

# 超音波パルス波の染色体に及ぼす影響に関する研究

## —超音波パルス波照射の増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

津崎 恒明

### 1. はじめに

各種超音波断層法として産科臨床への普及がめざましい超音波パルス反射法に利用されている超音波パルス波（以下パルス波）の安全性については、診断装置の出力レベルでは問題がないとされているが、生物学的に影響を及ぼす音響出力があるとすれば、それを明らかにしパルス波の安全基準を設定することが必要となる。ところが、パルス波の特性表示は連続波のそれに比べて複雑で、音響強度についても空間的音響強度、時間的音響強度があり、それぞれピーク値、平均値が存在し得る。したがって、これらの組み合わせにより、空間平均・時間平均音響強度（以下SPTA）、空間平均・時間ピーク音響強度（以下SATP）、空間ピーク・時間平均音響強度（以下SATA）、および空間ピーク・時間ピーク音響強度（以下SPTP）と4種類がパラメーターとして考えられる。さらに、パルス幅やくり返し周波数（pulse repetition frequency: 以下PRF）も考慮の対象となり、その生物学的作用の検討は多角的にならざるを得ない。著者らは、昭和52年度からパルス波の培養細胞増殖に及ぼす影響を上記パラメーターならびに他の照射条件を種々変化させて検討してきたので報告する。

### 2. 研究方法

#### (1) 使用細胞

ヒト羊膜上皮由来のJTC-3細胞株で、実験は、その単層培養対数増殖期に0.1%トリプシンを用いてガラスシャーレから剝離されたものを用いた。

#### (2) 超音波照射装置 (USP-1型)

パルス波発振器は、発振周波数2MHzで、パルス幅は3, 5, 10 $\mu$ sec, PRFは250, 500, 1000Hzにそれぞれ可変であって、発信出力は最大値としてSATAで0.674W/cm<sup>2</sup>まで自由に設定できる。振動子は直径15mmのPZT製平面振動子で天秤法によりSATAが測定されている。また実験中に振動子端子に加わる平

均電圧、平均電流をモニター可能となっており、著者らもこれらをモニターしながら実験を行なった。なお、昭和52年度については、連続波発振器をパルス波発振器に改造し、パルス幅約160 $\mu$ sec, PRF1000Hz, SATA3.5W/cm<sup>2</sup>, SATP22W/cm<sup>2</sup>のパルス波を用いて実験を行ない、その結果については既に報告した<sup>1)</sup>。

#### (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 $^{\circ}$ C脱気水を満たした。なおここでいう脱気水とは「清水を15分間以上沸湯させた後、振盪せずに試験環境温度に冷却したもので作成後12時間以内のもの（日本電子機械工業会、臨時MEJIS 制定委員会超音波ドブラー 法胎児診断装置部会）」とした。振動子から約10cmの距離にリン酸緩衝生理食塩水液（以下PBS）ないし20%仔牛血清加MEM（以下20%CSMEM）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シンクロナスモーター軸により2.5rpm回転させた。また一部では静止照射した。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、ポリスチレン管は、その管底が超音波音束の中心にくるよう保持した。また照射実験に先立ち、2.55MHz共振、5mm径受信振動子をポリスチレン管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、管外で測定した端子電圧に比し減衰はほとんどみられず、発信した超音波が管内に有効に到達していることを確認した。なおポリスチレン管の背後には吸音材を置き、対照細胞浮遊液は照射を除き、実験対象と同様条件下に置いた。

#### (4) 照射条件

各種パラメーターの組み合わせによって複雑になるので研究結果の項で併せて表示する。

#### (5) 細胞増殖の検討

再培養当日の細胞濃度を血算盤法によって求め、

1個のシャーレあたり $1.0 \times 10^4$ 個の細胞濃度となる様に20%CSMEMで調整したのち、9個のプラスチックシャーレに分注し、5%炭酸ガス培養器内で培養した。そして、再培養後原則として、2、4および7日にそれぞれ3個のシャーレの細胞数の平均値ならびに標準偏差を求め、平均値を用いて、増殖比率および照射群比率/対照群比率を算定日ごとに求めた。

### 3. 研究結果

#### (1) 細胞増殖抑制閾値に関して

A. 実験装置の最高音響出力から実験を開始し、次第に音響出力を低下させて実験を重ねたところ、図-1の結果を得た。実験番号(以下No.)9で増殖抑制はみられなくなり、このときのSATA, SPTA, SATPおよびSPTPは、それぞれ0.038, 0.152, 12.7および50.8W/cm<sup>2</sup>となった。

B. 次に実験条件のパラメーターを診断装置のそれに近づけるためパルス幅を3μsに固定し、他の実験条件を変化させて実験を行なった結果をまとめたのが図-2である。増殖抑制のみられるNo.4, 6, 8, 10, 12, 14の群と抑制のみられないNo.9, 13, 15の群に分離する傾向があったので、再培養後2, 4および7日の増殖抑制とSATAおよびSATPの間の直線相関関係について検討したところ、7日のSATPとの間に高い相関がみられ、図-3のように、 $y = 1.23 - 0.01x$ で表わされる関係が認められ、相関係数は0.73で、これは有意水準5%で有意であった。そこでこの式から増殖抑制のみられなくなる点を求めるとSATP=23W/cm<sup>2</sup>となり(パルス幅3μs, くり返し周波数500Hzで)、SPTAに換算すると140mW/cm<sup>2</sup>となった。

C. また細胞浮遊液の粘度を変化させて照射を行なったときの増殖抑制の有無に関する検討結果を図-4に示した。すなわち、SPTAが2.7W/cm<sup>2</sup>と高い音響出力レベルでは浮遊液の粘度を上昇させても増殖抑制はみられるが、SPTA0.180W/cm<sup>2</sup>と出力レベルを低下させると浮遊液の粘度を上昇させることによって増殖抑制はみられなくなっている。

#### (2) 音響出力測定に関して

時間的平均音響強度にも平均値とピーク値が存在することは前述したが、著者らは、支点から10.5cmの距離に木綿糸で吊り下げた直径3.2mmの鋼球に各種実験条件と同様のパルス波を照射して鋼球の振れ

を校正された望遠鏡で読みとり、SPTAを算出してSATAとの比を求めたところ約2から5となり、SATAが小さくなる程この比は増大傾向にあった(図-5)。

### 4. 考 察

パルス波の特性表示が複雑で、その生物学的作用を考えると、いずれのパラメーターが最も関与するかはまだ不明であることは前述した通りであるが、我々は実験結果を統計学的に処理した結果、SATPと照射後再培養7日の増殖抑制に最も高い相関( $R = 0.73$ ,  $\alpha < 0.05$ )を認め、増殖抑制のみられなくなる閾値として、パルス幅3μsのときSATP=23W/cm<sup>2</sup>を得た。すなわち、パルス波の生物学的作用の検討にあたって、時間的ピーク値が重要であることをうかがわせるが、Nyborgも、同じSPTA値で超音波照射を行なった場合、パルス波よりも連続波の生物学的作用は少なかった<sup>2)</sup>、と述べており、パルス波における時間的ピーク値の重要性を示唆している。また、パルス幅3μs, くり返し周波数500HzでSATP=23W/cm<sup>2</sup>のとき、SATA=0.035W/cm<sup>2</sup>, SPTA=0.140W/cm<sup>2</sup>となり、SPTAが100mW/cm<sup>2</sup>以下では何ら生物学的影響を及ぼさないと述べたFDAのStatement Aに反する結果ではなかった。また細胞浮遊液をPBSと20%CSMEMとに分け、SPTAを2.7W/cm<sup>2</sup>と高い出力レベルと0.180W/cm<sup>2</sup>と低い出力レベルで増殖抑制の有無を検討した結果では、前者では細胞浮遊液の粘度を上昇させても抑制傾向があったが、後者では抑制はみられなくなっており、照射後ポリスチレン管内溶液の温度上昇についても検討したところ約1℃以内であったので、培養細胞に対するパルス波の生物学的作用のなかで、cavitationやmicrostreaming等の物理学的現象の関与をうかがわせる結果となり興味深い。

最後に、我々の行なったSPTA値の測定は、SPTAがSATAの約2~5倍となっており、Nyborgが、平面振動子から発振される超音波音場でSPはSAの2から4倍となると述べている<sup>2)</sup>ことに近似しており、井出がUSP-1型の特性として、最終音圧極大値は、音軸上76mmにあり、これ以降では音圧分布は比較的単純である<sup>3)</sup>とした結果からみても妥当と考えられた。

### 5. おわりに

培養細胞に対する超音波パルス波の作用について検討を加え、増殖抑制の出現する閾値がSPTAが140 mW/cm<sup>2</sup>付近にあることを示した。

#### 参 考 文 献

1. 前田一雄, 寺原賢人, 津崎恒明: 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。研究報告書, 昭和52年度, 厚生省心身障害研究母体外因研究班。
2. Nyborg, W. L.: Physical mechanisms for biological effects of ultrasound, Evelyn Byers Surles, Rockville, Maryland, 1979.
3. 井出正男: 超音波装置の開発・改良に関する研究— USP - 1 型パルス超音波照射装置の開発—。母体および胎児に対する外的因子に関する研究。研究報告書, 昭和53年度, 厚生省心身障害研究母体外因研究班。

JTC-3細胞、送信周波数2MHz、くり返し周波数1KHzは共通

JTC-3細胞、送信周波数2MHz、パルス幅3μsecは共通

実験番号	パルス幅 (μs)	SATA (W/cm <sup>2</sup> )	SPTA (W/cm <sup>2</sup> )	SATP (W/cm <sup>2</sup> )	SPTP (W/cm <sup>2</sup> )	照射時間 (min)	照射様式
1	10	0.674	2.696	6.74	26.96	60	PBS浮遊回転
2	10	0.674	2.696	6.74	26.96	30	"
3	10	0.674	2.696	6.74	26.96	30	20%CSMEM浮遊回転
4	3	0.157	0.628	5.23	20.92	30	PBS浮遊回転
5	10	0.530	2.120	5.30	21.20	30	"
6	3	0.157	0.628	5.23	20.92	30	PBS浮遊静止
7	10	0.218	0.872	2.18	8.72	30	PBS浮遊回転
8	3	0.068	0.272	2.26	9.04	30	"
9	3	0.038	0.152	1.27	5.08	30	"
10 <sup>a</sup>	3	0.045	0.180	3.00	12.00	30	"

実験番号	PRF (Hz)	SATA (W/cm <sup>2</sup> )	SPTA (W/cm <sup>2</sup> )	SATP (W/cm <sup>2</sup> )	SPTP (W/cm <sup>2</sup> )	照射時間 (min)	照射様式
4	1000	0.157	0.628	5.23	20.92	30	PBS浮遊回転
6	1000	0.157	0.628	5.23	20.92	30	PBS浮遊静止
8	1000	0.068	0.272	2.26	9.04	30	PBS浮遊回転
9	1000	0.038	0.152	1.27	5.08	30	"
10	500	0.045	0.180	3.00	12.00	30	"
12	250	0.028	0.112	3.73	14.92	30	"
13	250	0.008	0.032	1.07	4.28	90	"
14	250	0.035	0.140	4.65	18.64	30	"
15	250	0.003	0.012	4.0	1.60	30	"

\*印はくり返し周波数500Hz

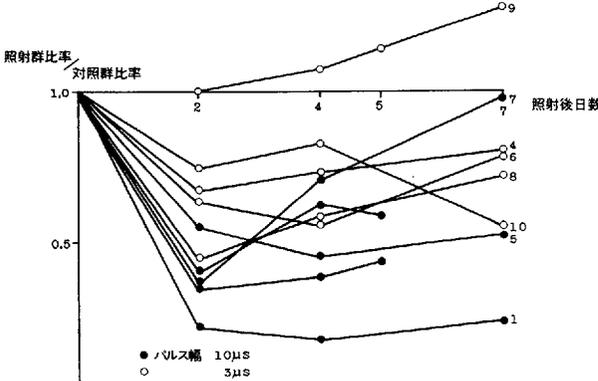


図1 細胞増殖抑制閾値の検討 (a)

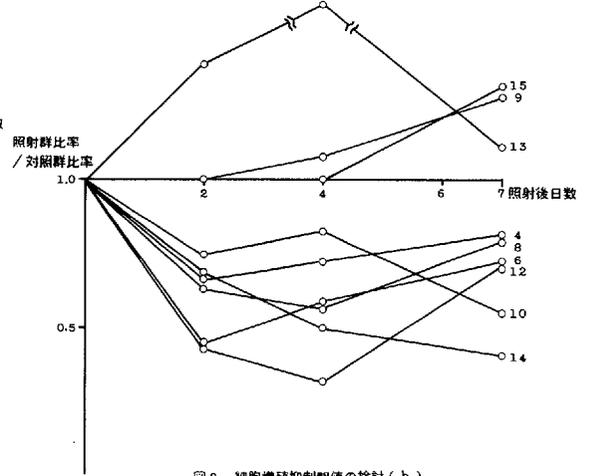


図2 細胞増殖抑制閾値の検討 (b)

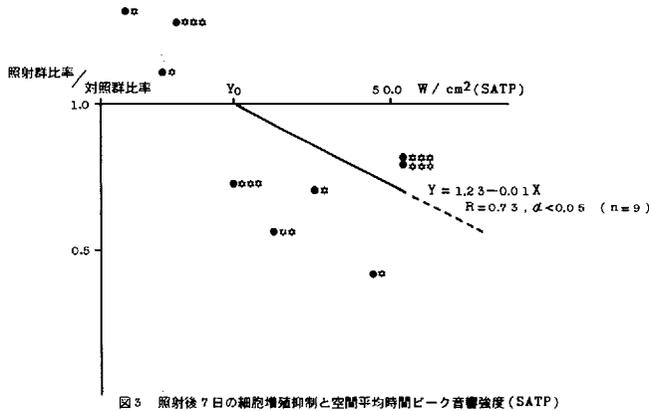


図3 照射後7日の細胞増殖抑制と空間平均時間ピーク音響強度 (SATP)

使用細胞: JTC-3細胞(ヒト羊膜上皮由来)  
 照射方法: PBS浮遊回転照射(2.5r.p.m)  
 照射時間: 30分間  
 パルス送信周波数: 2MHz  
 パルス幅: 3μs  
 くり返し周波数: \*250Hz, \*\*500Hz, \*\*\*1000Hz  
 (注)  $Y_0 = 23 \text{ W/cm}^2$  (SATP)  
 $SPTP = 92 \text{ W/cm}^2$   
 $SATA = 2.3 \times 10^5 \times 3 \times 10^6 \times 0.5 \times 10^3 \div 35 \text{ mW/cm}^2$   
 $SPTA \div 35 \times 4 = 140 \text{ mW/cm}^2$   
 (パルス幅3μs, くり返し周波数500Hzのとき)

JTC-3細胞、送信周波数 2MHz は共通

実験 番号	パルス幅 ( $\mu$ s)	PRF (Hz)	SATA ( $W/cm^2$ )	SPTA ( $W/cm^2$ )	SATP ( $W/cm^2$ )	SPTP ( $W/cm^2$ )	照射時間 (min)	照射様式
2	10	1000	0.674	2.696	67.4	269.6	30	PBS浮遊回転
3	10	1000	0.674	2.696	67.4	269.6	30	20%CSMEM浮遊回転
1.6	3	500	0.045	0.180	3.00	12.00	15	PBS浮遊回転
1.7	3	500	0.045	0.180	3.00	12.00	30	20%CSMEM浮遊回転

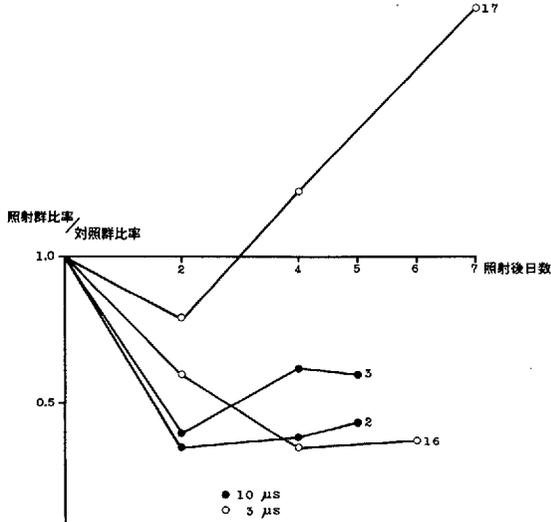


図4 細胞増殖抑制と細胞周囲環境の変化

Acoustic Intensity Measured by Steel Ball of 3.2 cm Diameter

No.	Pulse duration ( $\mu$ sec)	Repetition frequency (Hz)	Spatial* and temporal mean intensity	Spatial* and temporal peak intensity	Spatial** and temporal mean intensity	SPTA SATA
			SATA( $W/cm^2$ )	SATP( $W/cm^2$ )	SPTA( $W/cm^2$ )	
1	10	1000	0.674	67.4	1.350	2.00
2	10	1000	0.530	53.0	1.120	2.11
3	10	1000	0.218	21.8	0.583	2.67
4	3	1000	0.157	52.3	0.469	3.00
5	3	1000	0.068	22.6	0.180	2.64
6	3	500	0.045	30.0	0.157	3.49
7	3	500	0.013	8.7	0.067	5.15

\* Catalog \*\* Measured by the author

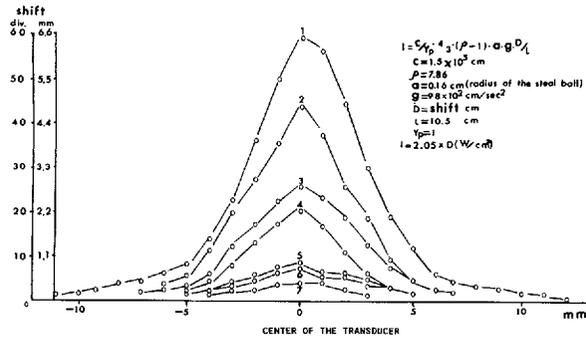


図5 SPTAの測定



## 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.はじめに

各種超音波断層法として産科臨床への普及がめざましい超音波パルス反射法に利用されている超音波パルス波(以下パルス波)の安全性については、診断装置の出力レベルでは問題がないとされているが、生物学的に影響を及ぼす音響出力があるとすれば、それを明らかにしパルス波の安全基準を設定することが必要となる。ところが、パルス波の特性表示は連続波のそれに比べて複雑で、音響強度についても空間的音響強度、時間的音響強度があり、それぞれピーク値、平均値が存在し得る。したがって、これらの組み合わせにより、空間平均・時間平均音響強度(以下 SPTA)、空間平均・時間ピーク音響強度(以下 SATP)、空間ピーク・時間平均音響強度(以下 SATA)、および空間ピーク・時間ピーク音響強度(以下 SPTP)と4種類がパラメーターとして考えられる。さらに、パルス幅やくり返し周波数(pulse repetition frequency:以下 PRF)も考慮の対象となり、その生物学的作用の検討は多角的にならざるを得ない。著者らは、昭和52年度からパルス波の培養細胞増殖に及ぼす影響を上記パラメーターならびに他の照射条件を種々変化させて検討してきたので報告する。