

パルス超音波照射の培養細胞増殖に およ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 (主任：前田一雄教授)

津 崎 恒 明

Experimental Studies on the Bioeffects of Pulsed Ultrasound to the Cultured Mammalian Cell in Vitro

Tsuneaki TSUZAKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Tottori University School of Medicine, Yonago

(Director: Prof. Kazuo Maeda)

概要 リン酸緩衝生理食塩水や仔牛血清添加培養液に浮遊させた培養ヒト羊膜上皮由来細胞に 2MHz のパルス超音波を各種の音響強度で30～60分間照射し、照射後2, 4, 7日の増殖比率によつて細胞増殖抑制の有無を検討した。また照射超音波音場を鋼球法によつて測定し、以下の結果をえた。1) 実験に用いた範囲で、鋼球法による空間ピーク音響強度と電子天秤法による空間平均音響強度の比率は2.00～5.15であつた。2) 実験に用いた超音波音場幅は約1.7cmで、細胞浮遊容器内径約1.2cmのすべてを含んでいた。3) 照射後4～7日における細胞増殖抑制閾値は、空間平均時間ピーク音響強度 (SATP) で、それぞれ20.5w/cm²～20.0w/cm²となり、パルス幅 3μs, 繰り返し周波数1,000Hz のパルス波に適用すると、空間ピーク時間平均音響強度 (SPTA) で、それぞれ246mW/cm²～240mW/cm²となつた。4) 細胞浮遊溶液の粘度を上昇させると細胞増殖抑制がみられなくなるが、照射時間の延長や音響強度の上昇によつて再現した。5) 照射後の細胞浮遊溶液の温度上昇は1℃未満で著明でなかつた。6) 浮遊細胞の増殖抑制は主としてキャビテーションによるものと考えられた。7) パルス超音波では、音響強度表示として時間ピーク値が有意義であると思われた。

Synopsis Cultured cell originated from human amniotic epithelium was sonicated in 2 MHz pulsed ultrasound at various intensities for 30-60 min. Cell suspending medium on sonication was either phosphate buffered saline solution or Eagle's MEM containing calf serum of 20%. On the evaluation of cell growth suppression, relative growth ratios, the growth ratios in sonicated groups to control groups were calculated on 2, 4 and 7 days after sonication. Regression analysis between these relative growth ratios and spatial average-temporal peak intensities on 4 and 7 days after sonication showed linear correlation. Cell growth suppression threshold in the period was 246 or 240 mW/cm² in spatial peak-temporal average value respectively. On the other hand, intensity measurements in experimental acoustic field by steel ball method showed that spatial peak values were about 2-5 times as large as spatial average values, and beam width in acoustic field (1.7 cm) was a little broader than the inner diameter of the cell suspending tube (1.2 cm).

Cell growth suppression disappeared by elevation of viscosity in the cell suspending medium, and reappeared by the prolongation of sonication time or the increment of temporal peak value.

Key words: Pulsed ultrasound • Cultured mammalian cell • Bioeffects • Acoustic intensity • Cavitation

はじめに

臨床医学分野で診断に応用される超音波には連続波とパルス波がある。産科婦人科領域では、前者はドプラ法胎児心拍検出装置に、後者は各種超音波断層装置にそれぞれ応用され、いずれもその有用性に関して数多くの報告がある。超音波がさまざまな物理・化学的特性を有していることから、その生物学的作用有無の検討や作用機序に関

する研究も行われ、連続波に関しては、現在使用されている診断装置が生物学的作用閾値からみて約200倍程度の安全域を有すると考えられている⁴⁾。一方、パルス波に関しては、安全限界確立への努力が続けられているのが現状である⁵⁾。

著者は、培養細胞浮遊液に種々の音響強度のパルス超音波を照射し、細胞増殖抑制閾値の検索を行い、音響強度測定に関しても実験的検討を加え

た。

材料と方法

1. 培養細胞照射実験

a. 使用細胞とその継代培養

実験に用いた細胞株は JTC-3 (ヒト羊膜上皮起源) で、照射実験には単層培養対数増殖期の本細胞を0.1%トリプシン液で単離させて用いた。細胞株継代維持の培養液にはイーグル Minimum Essential Medium (以下 MEM と略) (大五栄養) に20%の仔牛血清 (阪大微研) と100単位/ml のペニシリンG (明治製菓) を加え、10%炭酸水素ナトリウム液で pH 7.2~7.4 に調整し、ゼイツ濾過滅菌器を通じて使用した (以下20% CSMEM と略)。継代にはガラスシャーレ (60φ×15Hmm) を用い、照射後細胞の培養にはプラスチックシャーレ (ヌンク, 35φ×12Hmm) を用い、いずれも5%炭酸ガス培養器 (平沢製作所, TOKIWACO-1 型及び TH-HER, WJ-3C 型) 内で行った。

b. 照射装置

超音波発振器、振動子、照射用水槽並びに細胞浮遊容器支持具、恒温器及び各種モニター装置から成る。

1) 超音波発振器 (三栄測器, USP-1 型)

2MHz のバースト信号波形を出力とし、パルス幅 (以下 PD と略) は3, 5 及び10μs に、またパルス繰り返し周波数 (以下 PRF と略) は250, 500 及び1,000Hz の3段階にそれぞれ可変であり、出力電圧も連続的に変化させることができる。

2) 振動子 (三栄測器)

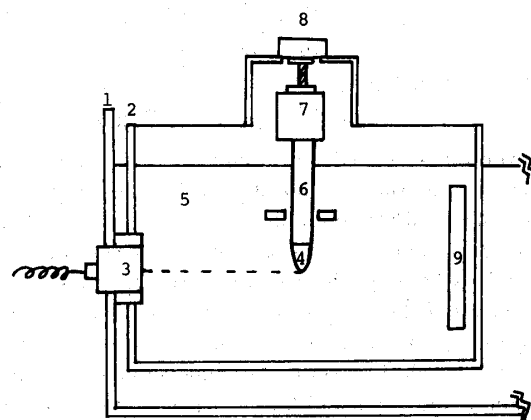
共振周波数 2MHz の PZT 製平面振動子で、振動部分の直径は15mm である。本研究では、照射水槽の側壁に円孔をあけて挿入し、固定具で固定して使用した。

3) 照射用水槽並びに細胞浮遊容器支持具

主水槽は40×30×20cm の透明アクリル樹脂製で、実験時には37°Cに冷却した脱気水を振動子面が全部没するように注入し C-5550型恒温器によつて37±0.1°Cに保った。

また、主水槽内には31×9.5×14.5cm のプラスチック製補助水槽を取り付けた。この補助水槽の横径面の片側に約3.5cm 径の円孔をあけ、主水槽に固定した振動子が挿入されるようにし、補助水槽上に2.5rpm のシンクロナスモータを取り付けたプラスチック製フードを置き、このフードを補助水槽長径に沿つて移動着脱できるようにした。なお、本研究では、照射試料容器並びに対照試料容器としてポリスチレン製細胞培養用試験管 (ファルコン, 16φ×150Hmm) を用い、シンクロナスモータ回転軸に連結した保持具 (発泡スチロール製) で試験管中心軸が振動子面から10cm の位置にくるよう保持した。また実験時には試験管が回転軸に対して垂直方向に動揺するのを防ぐため、試験管底近くで音場外に保持具 (プラスチック板) を設置し補助水槽の振動子と反対側に吸音材 (スポンジ) を置いた。管底面は超音波音軸を含む水平面に一致するようにした (図1)。

図1 照射用水槽の構成図



1. 主水槽, 2. 補助水槽, 3. 振動子, 4. 細胞浮遊液, 5. 脱気水, 6. ポリスチレン容器, 7. 連結具, 8. シンクロナスモータ, 9. 吸音材

4) 各種モニター装置

超音波照射中は発振器の高周波出力電圧を VP-960A 型電圧計で観測し、その検波出力を放電型記録器 (三栄測器) で連続記録した。また PRF は TR-5-142型周波数カウンタでモニターし、出力端子の電圧及び波形はシンクロスコープで観測し、いずれも大きな変動のないことを確認した。なお、30分間超音波照射後の細胞浮遊液の温度上

昇は1℃未満であつた。

c. 実験に用いた細胞の取扱い

1) 照射実験までの操作

5%炭酸ガス培養器内でガラスシャーレに単層培養した細胞層を、培養液を除去し、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} を含まないリン酸緩衝生理食塩水液 (Phosphate Buffered Saline Solution, 以下 PBS と略) で洗浄, ついで0.1%トリプシン液を細胞層に約0.5 ml 滴下し, 平沢製, テーバー式電気孵卵器内で37℃, 5分間処理した。20% CSMEM 1ml を加えてトリプシンの作用を停止させたのち, さらに1ml の PBS を加えて静かにピペッティングを繰り返し細胞懸濁液とし, さらに細胞洗浄を行つた。スピッツグラスを CD-50SN 型低速遠心分離器で800rpm 5分間遠沈し, 上清を除去したのち沈渣に30ml の PBS を加えて同様操作を繰り返した。洗浄終了後, 細胞沈渣に4ml の PBS 又は20% CSMEM を加えてピペッティングし, 2ml ずつ前記の試験管2本に分注し, 1本は照射用, 他方は対照用とした。照射用試験管は前記の保持具に挿入し, 対照用試験管は吸音材で包囲したうえ主水槽内で超音波音場から離れた場所に置いた。

2) 照射終了後の操作

各試験管の細胞浮遊液はそれぞれ10ml 容量のスピッツグラスに移し, 20% CSMEM 5ml を加えたのち800rpm で遠沈した。上清を除去したのち20% CSMEM 4ml を加えピペッティングののち, その一部を用いて倒立位相差顕微鏡と血球計算盤で細胞濃度を算定した。この細胞濃度を考慮して上記細胞浮遊液と20% CSMEM を混合し, 最終濃度 $0.5 \times 10^4/\text{ml}$ に調整した。この細胞浮遊液を照射群, 対照群それぞれ9個のプラスチックシャーレに2ml ずつ分注し, 静置ののち5%炭酸ガス培養器内で培養した。培養液交換は分注後1, 3及び5日に行つた。なお, この際各シャーレは倒立位相差顕微鏡で細菌汚染等について点検し, 異常のあつたシャーレは廃棄した。分注した濃度調整細胞浮遊液の一部を用いて細胞濃度を算定し, 再培養0日の細胞濃度として用いた。再培養後, 原則として2, 4及び7日に照射群, 対照

群それぞれ3個ずつのシャーレの細胞濃度を求め, 算定日ごとに照射群及び対照群の平均値並びに標準偏差を算出した。なお, 各シャーレの細胞濃度算定はそれぞれ3回ずつ行い, 平均値をとつた。

d. 細胞増殖比率及び相対増殖比率の算定

細胞濃度算定日ごとに, 再培養0日の細胞濃度に対する算定日の細胞濃度の比すなわち増殖比率を照射群並びに対照群について算出し, 照射群増殖比率と対照群増殖比率のあいだの有意差を有意水準5%でt検定した。

また, 照射群増殖比率/対照群増殖比率 (以下相対増殖比率と略) を各算定日ごとに求めた。

2. 超音波音響強度測定

パルス超音波の強度表示には, 空間的分布と, PD や PRF による時間的パラメータにより, 空間平均時間平均値 (spatial average-temporal average value : 以下 SATA と略), 空間平均時間ピーク値 (spatial average-temporal peak value : 以下 SATP と略), 空間ピーク時間平均値 (spatial peak-temporal average value : 以下 SPTA と略) 及び空間ピーク時間ピーク値 (spatial peak-temporal peak value : 以下 SPTP と略) が用いられる。

USP-1 型発振器及び振動子の超音波出力の SATA は, 井出¹⁾によつて電子天秤法で測定された。一方, 著者は鋼球法で SP 値と SA 値の比較を試みた。すなわち0.32cm 径の鋼球を木綿糸で10.5cm の高さから2点間保持により音場中心に吊下げ, 脱気水を満たした水槽中で, 細胞照射時の実験条件下と同様の音場負荷時の鋼球の振れを測定した。なお, 測定には, 接眼レンズに1目盛 $1.1 \times 10^{-2}\text{cm}$ に校正したスケールを入れた望遠鏡を用いた。

得られた振れの大きさから, 村尾³⁾の計算式により音響強度 I (W/cm^2) を算出した。

なお, 鋼球移動距離を $4X$ (cm) とすると著者の測定条件では $I = 2.05 \times 4X$ (W/cm^2) となつた。

3. 抗腫瘍剤添加培養液を用いた細胞増殖の検

討(予備実験 I)

20% CSMEM に硫酸ビクリスチン (オンコビン®) を最終濃度0.25及び0.5 μ g/ml となるよう添加した2種の培養液を用いて JTC-3 の培養を行い、培養後2, 4及び6日の細胞増殖について、それぞれ検討した。

4. 比較的パルス幅の長いパルス波の細胞照射実験(予備実験 II)

短い PD のパルス波による実験に先立ち、村尾³⁾ が用いた連続波発振器を改造して比較的長い PD のパルス波を発振した。

すなわち、周波数約2.1MHz で PD は160 μ s のパルス波がえられた。実験には背面密閉型振動子を用い、その空間平均音響強度 (以下 SA と略) は約22W/cm² であり、パルス波は160 μ s オン, 840 μ s オフであつたので、SATA は約3.5 W/cm² となる。

研究結果

1. 予備実験 I

硫酸ビクリスチンの濃度が0.25 μ g/ml でも強い増殖抑制がみられ、この抑制は非可逆的であつた。また濃度を0.5 μ g/ml に倍加させるとこの傾向はより著しくなつた。

2. 予備実験 II

超音波の音場条件は、発振周波数2.1MHz, PD 160 μ s, PRF 1 KHz, SATA 3.5W/cm², SATP 22 W/cm² と一定にして、照射時間と細胞浮遊溶媒を変化させて回転照射を行つた (表1)。

30分間照射では、PBS 浮遊の場合には増殖抑制が明瞭であつたのが (実験番号1), 細胞浮遊溶媒を20% CSMEM に交換して粘度を上昇させると (実験番号2), この増殖抑制は消失した。ついで細胞浮遊溶媒として20% CSMEM のまま照射時間を60分間に延長すると (実験番号4) 再び増殖抑制がみられた。

3. USP-1 型発振器を用いた照射実験

本実験では、超音波の音場条件、細胞浮遊溶媒及び照射時間をさまざまに変化させ、回転ないし静止照射を行つたのでこれらの詳細を表2及び3にまとめた。

はじめに装置の最大音響強度 (SATP=67.4 W/cm²) で PBS 浮遊細胞を60分間回転照射し、照射後2, 4及び7日の相対増殖比率がそれぞれ0.22, 0.18及び0.25といずれも有意 ($p<0.01$) の増殖抑制がみられたため、以後照射時間は原則として30分間に固定し、音響強度を少しずつ低減させて実験を行つた。

a. 細胞増殖抑制閾値の検索

表1 パルス幅160 μ s のパルス超音波による実験の諸条件および結果

JTC-3 細胞 (ヒト羊膜上皮由来), 浮遊回転照射
周波数=2.1 MHz, パルス幅=160 μ s, 繰返し周波数=1 KHz
空間平均時間平均値=3.5 W/cm², 空間平均時間ピーク値=22 W/cm²
空間ピーク時間平均値=14 W/cm², 空間ピーク時間ピーク値=88 W/cm²
照射時間=30分間(実験4は60分間), 細胞浮遊溶媒: 奇数実験番号は PBS, 偶数実験番号は20% CSMEM

実験番号	培養細胞数 ($\times 10^4$ /ml) (増殖比率)				相対増殖比率		
	0日	2日	4日	7日	2日	4日	7日
1	1.00(1) 0.63(1)	0.56 $\pm$ 0.24(0.56)** 1.32 $\pm$ 0.16(2.10)	2.14 $\pm$ 0.55(2.14)*** 3.62 $\pm$ 0.50(5.75)	5.69 $\pm$ 1.28(5.69)*** 7.37 $\pm$ 0.90(11.70)	0.27	0.37	0.49
2	0.88(1) 1.75(1)	2.87 $\pm$ 0.52(3.26)** 1.99 $\pm$ 0.24(1.14)	6.84 $\pm$ 1.35(7.77)*** 5.02 $\pm$ 0.90(2.87)	17.40 $\pm$ 2.35(19.80)*** 11.40 $\pm$ 3.01(6.51)	2.86	2.71	3.04
3	0.25(1) 0.28(1)	0.16 $\pm$ 0.06(0.64) 0.27 $\pm$ 0.14(0.96)	0.27 $\pm$ 0.09(1.08)* 0.57 $\pm$ 0.25(2.04)	[1.07 $\pm$ 0.35(4.28)] [1.15 $\pm$ 0.24(4.11)]	0.67	0.53	[1.04]
4	0.48(1) 0.28(1)	3.50 $\pm$ 0.40(7.29)** 3.42 $\pm$ 1.54(12.20)	3.13 $\pm$ 1.54(6.52)* 3.19 $\pm$ 0.92(11.40)	[8.91 $\pm$ 2.30(18.60)]** [7.53 $\pm$ 0.77(26.90)]	0.60	0.57	[0.69]

* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$, *** : $P<0.001$,
各実験共に上段は照射群, 下段は対照群

[] 内は照射後6日

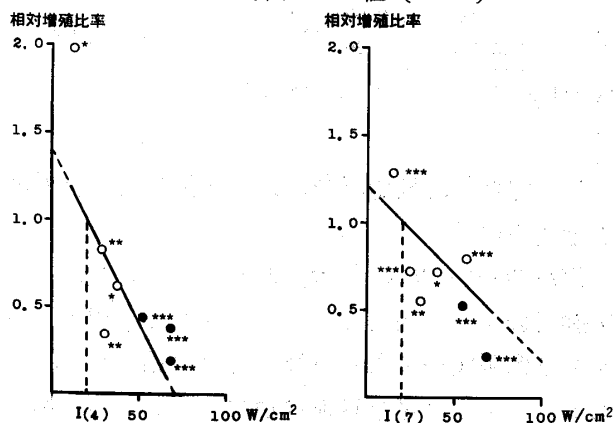
表2 短いパルス幅 (3又は10 μ s) のパルス超音波による実験の諸条件

実験番号	パルス幅 (μ s)	繰返し 周波数 (Hz)	照射時間 (分)	細胞浮遊溶媒	超音波音響強度 (W/cm^2)			
					時間平均 空間平均値	空間ピーク 時間平均値	空間平均 時間ピーク値	空間ピーク 時間ピーク値
1	10	1000	60	PBS	0.674	2.70	67.4	269.6
2	10	1000	30	PBS	0.674	2.70	67.4	269.6
3	10	1000	30	PBS	0.530	2.12	53.0	212.0
4	10	1000	30	PBS	0.218	0.87	21.8	87.2
5	10	1000	30	20% CSMEM	0.674	2.70	67.4	269.6
6	3	1000	30	PBS	0.157	0.63	52.3	209.2
7	3	1000	30	PBS	0.068	0.27	22.6	90.4
8	3	1000	30	PBS	0.038	0.15	12.6	50.8
9	3	500	30	PBS	0.045	0.18	30.0	120.0
10	3	250	30	PBS	0.028	0.11	37.3	149.2
11	3	250	30	PBS	0.028	0.11	37.3	149.2
12	3	250	90	PBS	0.008	0.03	10.7	42.8
13	3	500	15	PBS	0.045	0.18	30.0	120.0
14	3	500	30	20% CSMEM	0.045	0.18	30.0	120.0
15	3	1000	30	PBS	0.157	0.63	52.3	209.2

(注) 実験15以外はすべて回転照射

表2及び3に示した一連の実験群で、細胞浮遊溶媒としてPBSを用い、回転照射を行なった実験に限定して照射後4ないし7日の相対増殖比率(Y)とSATP(X)のあいだの関係について検討すると、照射後4日では、 $Y = 1.41 - 0.02X$,

図2 照射後4日(左)及び7日(右)の相対増殖比率と空間平均・時間ピーク値(SATP)

● ; 10 μ s, ○ : 3 μ s

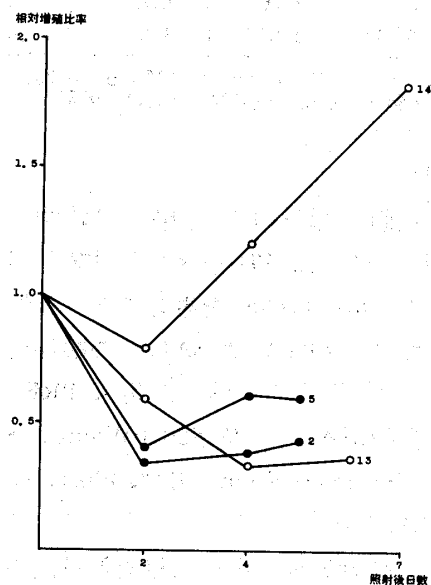
くり返し周波数 ; * 250Hz, ** 500Hz, *** 1000Hz

I (4)=20.5W/cm², I (7)=20.0W/cm²回帰式 ; $Y(4) = 1.41 - 0.02X$, $R = -0.73$ $Y(7) = 1.20 - 0.01X$, $R = -0.77$

X ; 空間平均・時間ピーク値

ただし, Y ; 相対増殖比率

相関係数(以下Rと略)=-0.73, また7日では $Y = 1.20 - 0.01X$, $X = -0.77$ という直線相関関係がみられた。したがって、増殖抑制のみられなくなる点($Y = 1.00$)のSATPは、照射後4及び7日でそれぞれ20.5W/cm²及び20.0W/cm²とな

図3 短いパルス幅 (3又は10 μ s) のパルス超音波を照射したときの細胞浮遊溶媒の種類による増殖状態の差異● ; パルス幅10 μ s ○ ; パルス幅3 μ s

図中の番号は表2の実験番号

表3. 短いパルス幅 (3又は10 μ s) のパルス超音波による実験結果

実験 番号	培養細胞数 ($\times 10^4$ /ml) (増殖比率)				相対増殖比率		
	0日	2日	4日	7日	2日	4日	7日
1	1.00 (1)	1.15 $\pm$ 0.17 (1.15) **	1.35 $\pm$ 0.17 (1.35) **	9.92 $\pm$ 1.90 (9.92) ***	0.22	0.18	0.25
	0.50 (1)	2.62 $\pm$ 0.49 (5.24) **	3.77 $\pm$ 0.63 (7.54) **	19.78 $\pm$ 1.03 (39.56) ***			
2	1.25 (1)	1.05 $\pm$ 0.17 (0.87) ***	2.19 $\pm$ 0.54 (1.75) ***	<u>3.54$\pm$0.36 (2.83)</u> ***	0.35	0.39	<u>0.44</u>
	0.75 (1)	1.78 $\pm$ 0.20 (2.37) ***	3.34 $\pm$ 0.18 (4.45) ***	<u>4.79$\pm$0.35 (6.39)</u> ***			
3	2.25 (1)	2.19 $\pm$ 0.94 (0.97)	4.06 $\pm$ 0.83 (1.80) *	18.35 $\pm$ 1.56 (8.16) ***	0.56	0.45	0.53
	1.00 (1)	1.73 $\pm$ 0.42 (1.73)	3.96 $\pm$ 0.90 (3.96)	15.41 $\pm$ 0.94 (15.41)			
4	0.25 (1)	0.53 $\pm$ 0.36 (2.12) *	2.71 $\pm$ 0.18 (10.80)	9.82 $\pm$ 1.44 (39.30)	0.36	0.72	0.98
	0.25 (1)	1.46 $\pm$ 0.18 (5.84) *	3.75 $\pm$ 0.63 (15.00)	10.00 $\pm$ 1.72 (40.00)			
5	1.50 (1)	1.35 $\pm$ 0.17 (0.90) **	6.35 $\pm$ 0.35 (4.23) **	<u>5.95$\pm$0.42 (3.97)</u>	0.40	0.62	<u>0.60</u>
	1.25 (1)	2.82 $\pm$ 0.33 (2.26) **	8.57 $\pm$ 0.72 (6.86) **	<u>8.28$\pm$0.67 (6.62)</u>			
6	0.75 (1)	0.32 $\pm$ 0.00 (0.43)	2.50 $\pm$ 0.32 (3.33)	10.22 $\pm$ 0.94 (13.60)	0.67	0.73	0.82
	0.50 (1)	0.32 $\pm$ 0.00 (0.64)	2.29 $\pm$ 0.36 (4.58)	8.28 $\pm$ 0.67 (16.60)			
7	0.25 (1)	0.42 $\pm$ 0.18 (1.68) **	2.61 $\pm$ 0.18 (10.40) **	9.50 $\pm$ 1.26 (38.00) *	0.45	0.59	0.73
	0.25 (1)	0.94 $\pm$ 0.00 (3.76) **	4.38 $\pm$ 0.54 (17.50) **	13.03 $\pm$ 0.78 (52.10) *			
8	1.00 (1)	3.67 $\pm$ 1.15 (3.67)	13.00 $\pm$ 1.00 (13.00)	83.30 $\pm$ 1.15 (83.30) ***	1.00	1.18	1.28
	1.00 (1)	3.67 $\pm$ 0.58 (3.67)	12.00 $\pm$ 0.00 (12.00)	65.00 $\pm$ 1.41 (65.00) ***			
9	1.00 (1)	4.00 $\pm$ 1.00 (4.00)	16.00 $\pm$ 1.73 (16.00) **	88.00 $\pm$ 9.17 (38.00) ***	0.33	0.83	0.56
	0.50 (1)	6.00 $\pm$ 0.00 (6.00)	9.67 $\pm$ 1.50 (19.30) **	78.70 $\pm$ 4.16 (157.4) ***			
10	0.50 (1)	1.75 $\pm$ 0.25 (3.50) **	5.17 $\pm$ 0.52 (10.30) *	11.27 $\pm$ 0.25 (22.50) ***	0.44	0.62	0.52
	0.50 (1)	4.00 $\pm$ 0.66 (8.00) **	8.33 $\pm$ 1.15 (16.70)	21.60 $\pm$ 1.51 (43.20)			
11	0.75 (1)	0.67 $\pm$ 0.14 (0.89)	1.17 $\pm$ 0.34 (1.56)	5.17 $\pm$ 0.76 (6.89) *	0.45	0.32	0.71
	0.50 (1)	1.00 $\pm$ 0.50 (2.00)	2.42 $\pm$ 0.72 (4.84)	4.88 $\pm$ 0.18 (9.76) *			
12	0.50 (1)	0.50 $\pm$ 0.00 (1.00)	1.33 $\pm$ 0.14 (2.70) *	4.58 $\pm$ 0.14 (9.20)	1.50	1.90	1.11
	1.00 (1)	0.67 $\pm$ 0.29 (0.67)	1.42 $\pm$ 0.38 (1.40)	8.25 $\pm$ 0.66 (8.30)			
13	1.00 (1)	1.00 $\pm$ 0.13 (1.00) *	1.92 $\pm$ 0.29 (1.92) ***	[6.58 $\pm$ 1.28 (6.58)] ***	0.60	0.35	[0.38]
	0.88 (1)	1.46 $\pm$ 0.19 (1.66) *	4.83 $\pm$ 0.52 (5.49) ***	[15.25 $\pm$ 1.32 (17.32)] ***			
14	0.75 (1)	1.25 $\pm$ 0.00 (1.67)	8.17 $\pm$ 1.38 (10.90)	27.10 $\pm$ 1.04 (36.11) **	0.78	1.23	1.96
	1.13 (1)	2.42 $\pm$ 0.58 (2.14)	10.00 $\pm$ 1.80 (8.85)	21.90 $\pm$ 1.01 (19.40)			
15	1.25 (1)	1.06 $\pm$ 0.51 (0.85)	3.44 $\pm$ 0.54 (2.75) *	11.25 $\pm$ 0.00 (9.00) ***	0.64	0.57	0.80
	1.25 (1)	1.65 $\pm$ 0.47 (1.32)	6.05 $\pm$ 1.19 (4.84) *	13.97 $\pm$ 0.38 (11.20)			

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ [] 内は照射後6日, アンダーラインは照射後5日
各実験共に上段は照射群, 下段は対照群

つた (図2)。

時間平均値 (以下 TA と略) は時間ピーク値 (以下 TP と略) に PD (sec) と PRF (Hz) の積すなわち duty factor を乗じてえられ^{26) 29)}, 平面振動子では, SPTA は SATA の約4倍 (理論値) であるので^{1) 26) 29)}, PD が 3 μ s, PRF が 1000 Hz の場合 20.5W/cm² 及び 20.0W/cm² (SATP) は, それぞれ 246mW/cm² 及び 240mW/cm² (SATA) に換算される。

ただし, 統計処理に用いた相対増殖比率は照射後4及び7日に照射群と対照群の増殖比率のあいだに有意差 ($p < 0.05$) のあつた例に限定した。

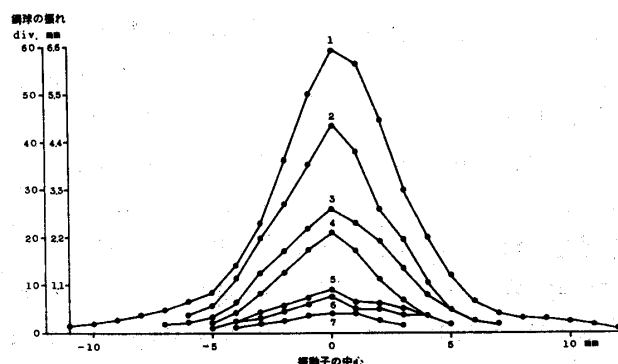
b. 照射時に細胞浮遊溶媒を変換したときの細胞増殖の検討

比較的長い PD (160 μ s) のパルス超音波による実験 (表1) と同じく, 短い (3または10 μ s) パルス波照射実験でも細胞浮遊溶媒の粘度を上昇させることにより増殖抑制は消失したが, TP 値が大きくなると, 20% CSMEM 浮遊細胞にも増殖抑制が再現した (図3)。

4. SPTA の測定

細胞照射実験に用いたのと同様の各種音場条件で, 照射実験時と同部位の自由音場内で測定した (図4) SATA に対する SPTA の比率は2.00～

図4 鋼球法による超音波音響強度の測定



No.	PD (μ S)	PRF (Hz)	SATA* (W/cm ²)	SATP* (W/cm ²)	SPTA** (W/cm ²)	SPTA/SATA
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

* カタログ値 ** 著者による測定値

5.15で、空間平均音響強度が小さいとこの比率が大きくなる傾向を認めた。

考 察

超音波生体作用の研究は1920年代に始まり¹⁴⁾、実験的研究では、実験動物^{12) 13) 22) 27) 33)}、培養細胞^{3) 10) 11) 15) 17) 18) 21) 31) 32)}、染色体²⁵⁾、血液細胞^{19) 30)}、植物組織^{8) 23) 24)}及び昆虫⁹⁾などが用いられた。著者はヒト羊膜上皮起源の株細胞(JTC-3)を用いたが、本細胞株は抗腫瘍剤添加によつて著しい増殖抑制を受け、これは村尾³⁾とほぼ一致した。

細胞レベルの超音波照射実験では、1) 細胞増殖曲線による増殖抑制の検討^{3) 10) 18)}、2) コロニー形成による生着細胞数の検討^{15) 17)}、3) 細胞膜や細胞内小器官の形態学的検討³¹⁾、4) 細胞内酵素活性²⁸⁾や蛋白合成率³²⁾などの生化学的検討、などの方法がある。著者は1)の方法を選んだが、これは特殊な器具や手法を必要とせず、かつ統計量として処理しやすいと考えたためである。

本研究のように細胞集団に超音波を照射する場合、個々の細胞にどの程度の超音波が作用したかを定量的に知ることはできないが³¹⁾、細胞集団に

確実に超音波が照射されていることを確認しておく必要がある。

近藤ら²⁾は、ポリスチレン板で放射圧が約1/2に減衰したと報告し、Kaufman¹⁸⁾はポリスチレン管の内部及び背後で音響強度がそれぞれ35及び55%減衰したと述べたが、著者は、PBSを細胞浮遊時と等量容れたポリスチレン管内に受信振動子(2.55MHz 共振, 5mm 径)を入れて受信波形と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なかった。

また、著者は、照射実験中に細胞が管底に沈澱堆積する傾向をみたので、細胞の均等な照射のため、管底を超音波音束中心に移動させ、かつポリスチレン管は回転照射した。Clarke et al.¹⁰⁾は、静止照射の作用は回転照射の約1/100と述べたが、著者の検討では、回転照射の意義は必ずしも明確でなかった。

一方、実験時の超音波音場を把握することも重要である。井出¹⁾の理論的検討では、本振動子の最終音圧極大値は軸上76mmにあり、これ以降では音圧分布は比較的単純であつた。著者の照射

部位は振動子から10cmの距離にあつた。また、音束面積 (beam area) は、空間ピーク音響強度 (以下 SP と略) の5%以上の音響強度の点から成る²⁹⁾。本研究の照射点を含む音束面積は図4から9.1cm²、音場幅も1.7cmで、細胞浮遊液面径1.2cmは音場内に十分含まれる。

パルス超音波による生体作用を論じる場合には、音場条件として空間的及び時間的パラメータが必要であり、SATA, SATP, SPTA, SPTPをさため、またPD, PRF, 全照射時間、及び超音波音束の空間的拡がり又は集束などが考慮されなければならない^{5) 20)}。

Fry¹³⁾は超音波音響強度測定に、5/64インチ (約2mm) 径のステンレス鋼球を用いた方法と、熱電対プローブを用いた方法を比較検討し、両測定法のあいだの相対誤差は5%未満であり、音場が集束し、焦域面積が鋼球径に比して小さい場合は熱電対プローブを用いる方法がよいと述べた。著者はFu et al.¹⁵⁾と同じく3.2mm径の鋼球を用いてSPTA測定を行つた。平面振動子の場合には、SPTA/SATA比は2~4とされるが、著者の測定結果でも2.00~5.15とほぼ一致した。鋼球の振れはTAに依存する¹³⁾が、著者の検討でも同様であつた。著者は、発振周波数、PD, PRF, SATA, SPTA, SATP, SPTP, 照射時間、細胞浮遊液や照射様式を明示してUSP-1型発振器のパルス超音波による細胞増殖閾値を算出し、照射後4及び7日でそれぞれ246及び240mW/cm² (いずれもSPTA) をえた。

超音波照射の影響を培養動物細胞を用いて検討した報告は、連続波によるものが多い。村尾³⁾は、JTC-3細胞株を用いて連続波照射を行い、2MHz, 60分間照射で、0.8~2.6W/cm²のあいだに細胞増殖抑制閾値があると報告した。最近では、Fu et al.¹⁵⁾がチャイニーズハムスターV-79株に1.1MHz連続波を1~15分間照射し、被照射細胞への影響は音響強度と照射時間の関数として表現され、また細胞死の閾値は0.25~0.5W/cm²、コロニー形成抑制閾値は0.5~1.0W/cm² (いずれもSPTA) と報告した。一方、Watmough et

al.³¹⁾は、750KHz超音波を治療レベル音響強度でHeLa細胞に照射し、細胞膜、核、ミトコンドリア、及び粗面小胞体に電顕的形態変化を認め、0.7W/cm² (SP) 以上で細胞破壊をみたと報告した。Webster et al.³²⁾は、3MHz, PD=2ms, PRF=100Hzのパルス波を5分間照射すると、0.5W/cm² (SPTP) でヒト胎児線維芽細胞蛋白合成促進をみた。Loch et al.²¹⁾によると、870KHz, 0.05~3W/cm² (SATA), 10分間照射で、培養ヒト羊膜上皮細胞及びHeLa細胞は0.1W/cm² (SATA) で増殖抑制を示した。

著者の細胞増殖抑制閾値240~246mW/cm² (SPTA) はWebster et al.³²⁾に次いで低いが、Loch et al.²¹⁾の検討では、ヒト2倍体細胞及びHeLa細胞よりもヒト羊膜上皮細胞に増殖抑制が著明であつた。HeLa細胞の破壊閾値についてKaufman et al.¹⁷⁾は1W/cm²、Watmough et al.³¹⁾は、0.7W/cm² (SP) と報告した。またmicrostreamingの剪刀による生物体障害閾値は、細胞の種類によつて異なる²⁹⁾という意見がある。したがつて細胞の種類により超音波感受性に違いがあると考えられる。本研究の結果と同じ細胞株を用いた村尾³⁾の成績はやや相違するが、村尾は連続超音波を用いたことが本研究と異なっている。さらにLele²⁰⁾は、細胞群の細胞周期の相違も、成績の異なる原因にあげている。Clark et al.¹¹⁾はM期の細胞の傷害を推定したが、Fu et al.¹⁵⁾は、MやS期の細胞がG₁やG₂期のものより抵抗性があると述べ、意見の一致はみられない。

音場内に定在波が生じると、やはり空間音響強度は均一でなくなる^{9) 12) 31)}。本研究では吸音材を置いて進行波による実験となるように計画した。

一方、アメリカ超音波医学会 (AIUM)⁶⁾は、動物組織に低メガヘルツ超音波を照射するとき、SPTAが100mW/cm²未満では認むべき生体作用はなく、また1~500秒のあいだでは、SPTA (W/cm²) と照射時間 (パルス波ではオン時間とオフ時間の和) (秒) の積が50J/cm²未満ではさらに音響強度が大でも作用はみられないとの見解を発表した。著者の細胞増殖抑制閾値はAIUMの見解を否定するものではない。

超音波の生体作用要因には、熱作用、キャビテーション及び放射圧による直接作用がある²⁰⁾²⁶⁾。超音波照射による温度上昇がないのに生体変化がみられた場合、その作用機序としてはキャビテーションが最も考えられる。Lele²⁰⁾は、細胞を粘稠な培養液中で照射するとキャビテーションや acoustic streaming の影響が小さくなると述べているが、本研究でも細胞浮遊液を PBS から20% CSMEM に変換すると増殖抑制がみられなくなつたことなどから、本研究でみられた細胞増殖抑制にはキャビテーションが関与しているものと思われる。キャビテーションには、stable cavitation と transient cavitation の別があるが、著者が用いた照射条件では前者が主ではないかと考える。

また本研究では、細胞浮遊液の粘度を上昇させても、長い PD (160 μ s) のパルス波では照射時間の延長により、短い PD (3~10 μ s) のパルス波では TP が大きくなると、それぞれ増殖抑制が再現した。これらの結果は照射時間を延長すると細胞死は増加するとした Clarke et al.¹⁰⁾ や Fu et al.¹⁵⁾ の報告と一致する。超音波照射量のパラメータとして何が適当かはなお未解決であるが、パルス超音波ではとくに TP 値が有意義なのかも知れない。

本研究の一部は厚生省心身障害研究補助金によつた。本論文の要旨は日本超音波医学会第35回及び37回研究発表会、並びに第2回世界超音波医学会議(1979年、宮崎市)で発表した。稿を終るに臨み、御指導御校閲を頂いた恩師前田一雄教授に感謝する。また御協力を頂いた第1病理学教室湯本東吉教授、及び松井克明元講師、産科婦人科学教室寺原賢人元講師、並びに多大の御教示を頂いた武蔵工業大学井出正男教授に深謝する。

文 献

1. 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報告書、207、厚生省心身障害研究母体外因研究班、1979。
2. 近藤 隆、吉井義一：培養マウスL細胞に及ぼす1.2 MHz 超音波照射の線量率効果、日超医論文集、35:211, 1979。
3. 村尾文規：培養細胞増殖に対する超音波照射

- の影響について。米子医誌、27:1, 1976。
4. 坂元正一、原 量宏：超音波生体作用の研究概説。現代産科婦人科学大系 77-C, 91, 中山書店、東京、1977。
5. Barnett, S.B.: Bioeffects of pulsed ultrasound. Australasian Physical Science in Medicine, 2: 397, 1979。
6. Bioeffects Committee (AIUM): Statement on mammalian in vivo ultrasonic biological effects. J. Clin. Ultrasound., 5: 2, 1977。
7. Carson, P.L., Fiscella, P.P. and Oughton, T.V.: Ultrasonic power and intensities produced by diagnostic ultrasound equipment. Ultrasound Med. Biol., 3: 341, 1978。
8. Child, S.Z., Carstensen, E.L. and Miller, M.W.: Growth of pea roots exposed to pulsed ultrasound. J. Acoust. Soc. Am., 58: 1109, 1975。
9. Child, S.Z., Carstensen, E.L. and Smachlo, K.: Effects of ultrasound on Drosophila-l. Killing of eggs exposed to traveling and standing wave fields. Ultrasound Med. Biol., 6: 127, 1980。
10. Clarke, P.R. and Hill, C.R.: Physical and chemical aspects of ultrasonic disruption of cells. J. Acoust. Soc. Am., 47: 649, 1970。
11. Clarke, P.R. and Hill, C.R.: Biological action of ultrasound in relation to the cell cycle. Exp. Cell Res., 58: 443, 1970。
12. Dyson, M., Pond, J.B., Woodward, B. and Broadbent, J.: The production of blood cell stasis and endothelial damage in the blood vessels of chick embryos treated with ultrasound in a stationary wave field. Ultrasound Med. Biol., 1: 133, 1974。
13. Fry, F.J.: Ultrasonic toxicity study. Ultrasound Med. Biol., 3: 351, 1978。
14. Fry, F.J.: Biological effects of ultrasound. A review. Proceeding of IEEE., 67: 604, 1979。
15. Fu, Y.K., Miller, M.W., Lange, C.S., Dan Griffiths, T. and Kaufman, G.E.: Ultrasound lethality to synchronous and asynchronous chinese hamster V-79 cells. Ultrasound Med. Biol., 6: 39, 1980。
16. Hill, C.R.: The possibility of hazard in medical and industrial applications of ultrasound. Br. J. Radiol., 41: 561, 1968。
17. Kaufman, G.E., Miller, M.W., Dan Griffiths, T. and Ciaravino, V.: Lysis and viability of cultured mammalian cells exposed to 1 MHz ultrasound. Ultrasound Med. Biol., 3: 21, 1977。
18. Kaufman, G.E. and Miller, M.W.: Growth retardation in chinese hamster V-79 cells exposed to 1 MHz ultrasound. Ultrasound Med. Biol., 4: 139, 1978。

19. *Kremkau, F.W., Kaufmann, J.S., Walker, M.M., Burch, P.G. and Spurr, C.L.*: Ultrasonic enhancement of nitrogen mustard cytotoxicity in mouse leukemia. *Cancer*, 37: 1643, 1976.
20. *Lele, P.P.*: Safety and potential hazards in the current application of ultrasound in obstetrics and gynecology. *Ultrasound Med. Biol.*, 5: 307, 1979.
21. *Loch, E.G., Fischer, A.B. and Kuwert, E.*: Effect of diagnostic and therapeutic intensities of ultrasonic on normal and malignant human cells in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 110: 457, 1971.
22. *Lyon, M.F. and Simpson, G.M.*: An investigation into the possible genetic hazards of ultrasound. *Br. J. Radiol.*, 47: 712, 1974.
23. *Miller, D.L.*: Cell death thresholds in Elodea for 0.45-10 MHz ultrasound compared to gas-body resonance theory. *Ultrasound Med. Biol.*, 5: 351, 1979.
24. *Miller, N.W. and Kaufman, G.E.*: Effects of short-duration exposures to 2 MHz ultrasound on growth and mitotic index of *Pisum Sativum* roots. *Ultrasound Med. Biol.*, 3: 27, 1977.
25. *Morris, S.P., Palmer, C.G., Fry, F.J. and Johnson F.K.*: Effect of ultrasound on human leucocytes. Sister chromatid exchange analysis. *Ultrasound Med. Biol.*, 4: 253, 1978.
26. *Nyborg, W.J.*: Physical mechanisms for biological effects of ultrasound. DHEW Publication (FDA) 78-8062, Rockville, Maryland 20857.
27. *O'Brien, W.D. Jr., Brady, J.K. and Dunn, F.*: Morphological changes to mouse testicular tissue from in vivo ultrasonic irradiation (preliminary report). *Ultrasound Med. Biol.*, 5: 35, 1979.
28. *Robinson, H.P., Sharp, F., Donald, I., Young, H. and Hall, A.J.*: The effect of pulsed and continuous wave ultrasound on the enzyme histochemistry of placental tissue in vitro. *J. Obstet. Gynaec. Br. Cwlth.*, 79: 821, 1972.
29. *Stewart, H.F., Haran, M.E., Harris, G.R., Herman, B.A. and Bodie, W.J.*: Characterization of ultrasound sources and standards development. Proceeding of a Conference held in Rockville, Maryland, June 1-3, DHEW Publication (FDA) 78-8048, Rockville, Maryland, 20857.
30. *Ter Haar, G., Dyson, M. and Smith, S.P.*: Ultrastructural changes in the mouse uterus brought about by ultrasonic irradiation at therapeutic intensities in standing wave fields. *Ultrasound Med. Biol.*, 5: 167, 1979.
31. *Watmough, D.J., Dendy, P.P., Eastwood, L.M., Gregory, D.W., Gordon, F.C.A. and Wheatley, D.N.*: The biological effects of therapeutic ultrasound on HeLa cells. *Ultrasound Med. Biol.*, 3: 205, 1977.
32. *Webster, D.F., Pond, J.B., Dyson, M. and Harvey, W.*: The role of cavitation in the in vitro stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.*, 4: 343, 1978.
33. *Woodward, B. and Warwick, R.*: How safe is diagnostic sonar? *Br. J. Radiol.*, 43: 719, 1970.
(特別掲載 No. 4960 昭56・9・7 受付)