

癌細胞にアポトーシスを誘導するための 超音波照射装置に関する基礎研究

—— ϕ 35シャーレと96ウェルプレートの底の振動速度の測定——

Basic study on the ultrasound exposure system for apoptosis induction
to cancer cells — Measurement of vibrating velocity on the bottom of
 ϕ 35 dish and well plate

菅俣 浩明¹、佐藤 貴亮¹、竹内 真一¹

¹ 桐蔭横浜大学大学院工学研究科

(2016年3月28日 受理)

1. 背景

超音波が非侵襲的で体内透過性に優れ、超音波エネルギーを集中させることで治療手段にもなることから、当研究室では超音波を用いた癌治療法に着目してきた。低侵襲な超音波を利用して癌細胞をアポトーシスに誘導できれば、正常細胞に影響を与えず死滅させることにより、安全かつ正確に治療を行うための新しい治療法として臨床応用できるのではないかと考えている。

当研究室の従来の研究で、我々が使用している周波数150 kHzの定在波型超音波照射システム^[1]で癌細胞を播種した細胞培養容器へ超音波を照射した際に、細胞が剥離してしまうという問題が発生した^[2]。この問題により、超音波照射後の細胞生存率やアポトーシス評価に影響を及ぼす可能性があるため、原因を追究する実験が必要であると考えた。

本実験では、超音波照射実験で使用している細胞培養容器の ϕ 35シャーレと96ウェルプレートの底面の振動速度の測定を行った。

2. 実験方法

2.1 ϕ 35シャーレと96ウェルプレートの底面へのスパッタリング

本実験では、LDV (LV-1710, ONO SOK-KI) を使用して、測定対象である ϕ 35シャーレと96ウェルプレートの底面の振動速度を測定するために、 ϕ 35シャーレの内側と外側の底面、及び96ウェルプレートの外側の底面にスパッタリング法を用いて金を成膜した。LDVは、レーザービームを測定対象に当て、出射時のレーザービームとドップラシフトを起こした反射ビームとの周波数差より測定対象の振動速度を測定する。そのため、 ϕ 35シャーレと96ウェルプレートの底面がそのままだと、出射時のビームが透過してしまったり、反射ビームを得ることが困難である。底面に金を成膜することで、反射ビームを得ることができると考え、本実験に利用した。本実験で使用した ϕ 35シャーレを図1に、スパッタリング法を用いて内側に金を成膜した ϕ 35シャーレを図2に、スパッタリング法を用いて外側に金を成膜した ϕ 35シャー

SUGAMATA Hiroaki¹, SATOU Takaaki¹ and TAKEUCHI Shinichi¹

¹ Graduate School of Engineering, Toin University of Yokohama, 1614 Kurogane-cho, Aoba-ku, Yokohama, Kanagawa, 225-8502, Japan

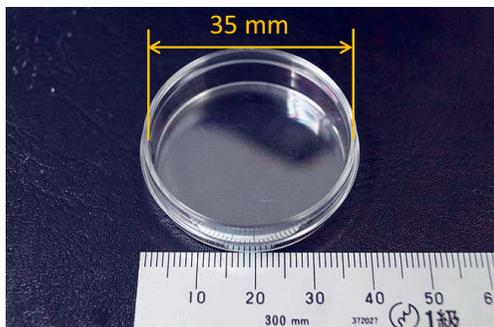


図1 超音波照射実験で使用しているφ35シャーレの写真



図2 φ35シャーレの内側に金を成膜した写真

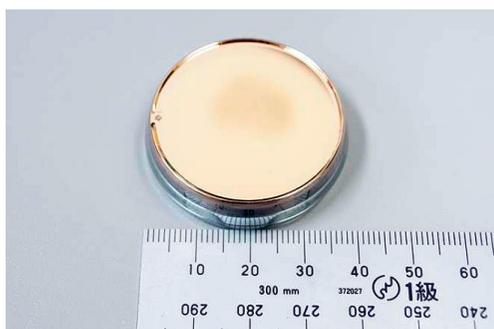


図3 φ35シャーレの外側に金を成膜した写真

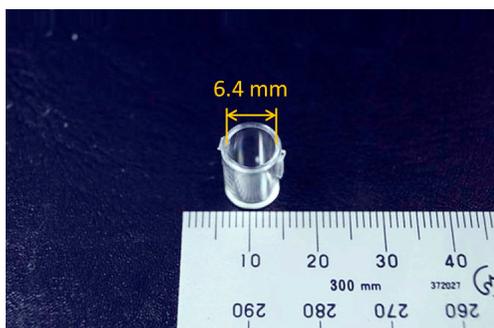


図4 超音波照射実験で使用している96ウェルプレートの1穴の写真

レを図3に、96ウェルプレートの1穴を図4に、スパッタリング法を用いて外側に金を成膜した96ウェルプレートの1穴を図5に示す。成膜した金の厚さは、φ35シャーレの内側で 300 \AA (= 30 nm)、φ35シャーレの外側と96ウェルプレートの1穴の外側で 400 \AA (= 40 nm) となっている。

2.2 測定方法

我々は、癌細胞に対する超音波照射実験に、当研究室の卒業生である渡辺晶子先輩が作製した周波数150 kHz 定在波型超音波照射システムを使用している。ファンクションジェネレータから出力した信号をパワーアンプ(2100L, ENI)で50dB増幅し、ランジュバン振動子(Honda Elec, HEC-45402)に印加する。ランジュバン振動子で水槽底部に装着されたステンレス振動板を振動させることで、水槽中に定在波を発生させる。水槽中に発生させた定在波超音波をステンレス振動板から高さ45 mmの位置になるように設置し、φ35シャーレと96ウェルプレート内の癌細胞に照射している。振動速度の測定を行うにあたり、高さ45 mmに設置した測定対象となるφ35シャーレと96ウェルプレートの底面から、レンズの先端部の距離が $170 \text{ mm} \pm 60 \text{ mm}$ となるようにLDVのセンサ部を設置した。また、レーザーの焦点位置が、φ35シャーレと96ウェルプレートの中心になるように固定した。図6に、本実験で使用した振動速度の測定システムブロック図を示

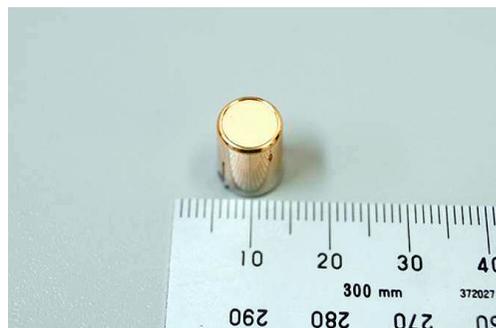


図5 96ウェルプレートの1穴の外側に金を成膜した写真

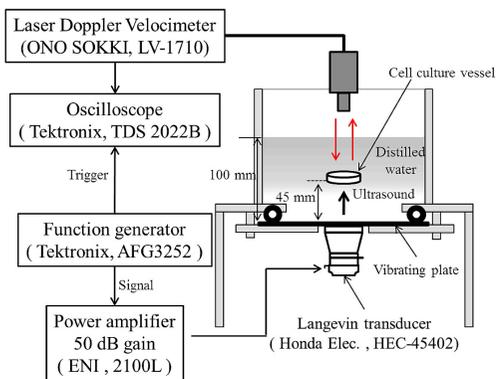


図 6 本実験で使用した振動速度の測定システムブロック図

表 1 本実験における測定条件

周波数	150 kHz
F.G.の出力電圧	320 ~ 720 mV _{pp}
測定場所	中心, 中心から10 mm
波形	20波のバースト波

す。また、振動速度の測定システムの写真を図 7 に示す。今回の測定では、内側と外側に金を成膜したφ35 シャーレの中心付近と中心付近から 10 mm 移動させた位置の振動速度、及び外側に金を成膜した 96 ウェルプレート 1 穴の中心付近の振動速度の測定を行った。本実験における測定条件を表 1 に示す。

3. 実験結果

本実験の測定結果であるグラフをそれぞれ、

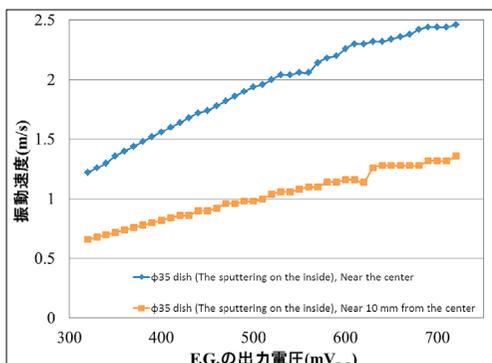


図 8 φ35 シャーレの内側に金を成膜した時の中心付近と中心から 10 mm 移動させた位置の出力電圧と振動速度の関係

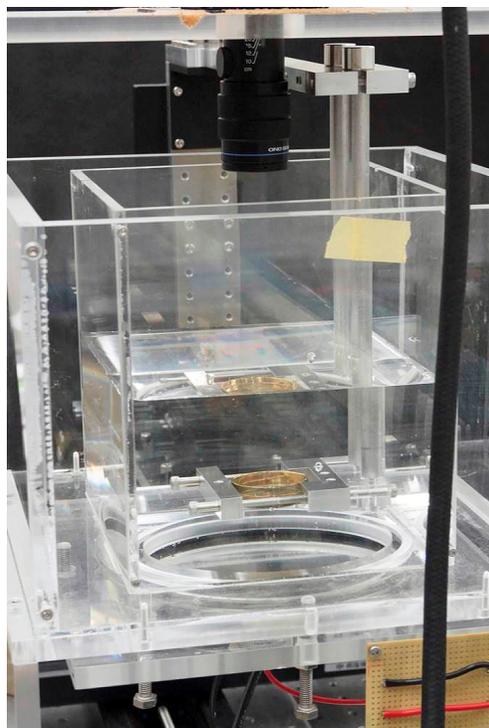


図 7 振動速度の測定システムの写真

φ35 シャーレの内側に金を成膜した時の中心付近と中心から 10 mm 移動させた位置の出力電圧と振動速度の関係を図 8 に、φ35 シャーレの外側に金を成膜した時の中心付近と中心から 10 mm 移動させた位置の出力電圧と振動速度の関係を図 9 に、φ35 シャーレの内側と外側及び 96 ウェルプレート 1 穴の外側に金を成膜した時の中心付近の出力電

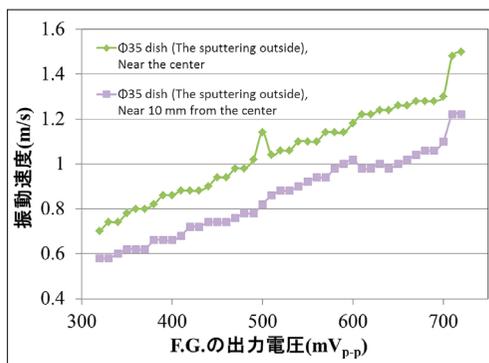


図 9 φ35 シャーレの外側に金を成膜した時の中心付近と中心から 10 mm 移動させた位置の出力電圧と振動速度の関係

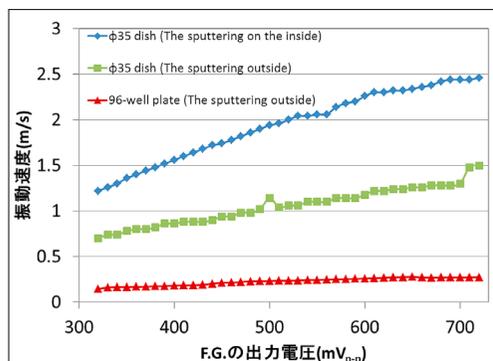


図 10 φ35シャーレの内側と外側及び96ウェルプレート1穴の外側に金を成膜した時の中心付近の出力電圧と振動速度の関係

圧と振動速度の関係を図 10 に示す。今回の測定結果により、実際の超音波照射実験で使用している発振器の出力電圧 520 mV_{p-p} (印加電圧 189.2 V_{p-p}) 時の振動速度は、図 8 では中心付近で 2.00 m/s、中心から 10 mm 移動させた位置で 1.04 m/s であった。図 9 では中心付近で 1.06 m/s、中心から 10 mm 移動させた位置で 0.88 m/s であった。図 10 の 96 ウェルプレート 1 穴の中心付近で 0.23 m/s であった。φ35 シャーレの中心付近の振動速度が大きいことが、超音波照射時に起こった細胞剥離の原因ではないかと考えられる。更に、φ35 シャーレと 96 ウェルプレートの 1 穴では、振動速度に約 6 倍もの差があったことから、底面の厚さや大きさの違いで振動速度に変化が現れることが考えられる。

4. まとめと今後の課題

細胞培養容器である φ35 シャーレと 96 ウェルプレートの底面の振動速度を、LDV を用いて測定した結果、φ35 シャーレ内側の底面の中心付近で振動速度が 2.00 m/s、外側の底面の中心付近で振動速度が 1.06 m/s であった。中心から 10 mm 移動させた位置での振動速度は内側の底面で 1.04 m/s、外側の底面で 0.88 m/s であった。また、96 ウェルプレート 1 穴の中心付近での振動速度は 0.23 m/s であった。この結果より、超音波

照射実験時に起こった中心付近での細胞剥離の原因は、中心付近での大きな振動速度が影響しているのではないかと考えられる。更に、φ35 シャーレと 96 ウェルプレートの 1 穴では、振動速度に約 6 倍もの差があったことから、底面の厚さや大きさの違いで振動速度に変化が現れることが考えられる。

【参考文献】

- [1] 平成 25 年度 博士学位論文 渡邊 晶子
- [2] 平成 27 年度 基礎技術研究会 (Vol. 2015, No. 5) 佐藤貴亮