

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500452

研究課題名（和文）超音波を用いた細胞へのメカニカルストレス負荷システムの開発

研究課題名（英文）Development of a system for cell culture under mechanical stress by using ultrasound

研究代表者

紺野 啓 (KONNO KEI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00323139

研究成果の概要（和文）：超音波が細胞に与えるメカニカルストレスが、培養細胞にもたらす種々の促進的効果を得ながら培養が行い得るシステムを開発した。初期の基礎的照射実験では超音波照射部である振動子の、次段階の実験では照射対象の、いずれも予想を大きく上回る温度上昇が判明したため、これらを回避しつつ目的とする効果が得られるよう装置の改良を進め、照射におけるおおまかな安全域を決定し得た。この条件は現在の装置で単純に設定できる範囲を超えるため、今後、装置の改良をさらに進める必要がある。

研究成果の概要（英文）：I developed a novel system for cell culture under mechanical stress by using ultrasound. At the first stage of development, unexpected rise in temperature occurred at ultrasound element, and that in cell culture dish at the second stage. I developed a water jacket suitable for cooling ultrasound element, and determined a margin of safety for output and interval of exposure of ultrasound. However, in order to make my system possible to work with adequate interval of ultrasound exposure, I need to operate it manually now. More refine is necessary for my system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：超音波医科学

1. 研究開始当初の背景

様々な機械的刺激（メカニカルストレス）が細胞活動に与える影響については近年盛んに研究されているが、細胞培養をメカニカルストレスを負荷しながら行えば、従来の細胞培養系では失われてしまう細胞本来の生理的活性が保たれる可能性があり、種々の効果が期待される。

超音波をはじめとする“音”は生体に振動に

よるメカニカルストレスをもたらす。整形外科領域では微弱なパルス波超音波の骨折治療促進効果が既に明らかにされており、これを利用した骨折治療機器は日常臨床に普及して久しい。しかしこうした効果に関する知見はほとんどが臨床的・経験的なもので、研究開始当初、基礎的知見はごくわずかであった。

2. 研究の目的

まず超音波により培養細胞にメカニカルストレス負荷を付与するために適切な装置を開発し、次いで基礎的実験により照射条件を決定する。さらにこれらを用いて各種細胞における促進的効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) 市販の培養装置と独自に開発する超音波照射装置を組み合わせる実験を重ね、細胞照射に適した装置を開発する。

(2) 予備実験を重ね、無数にある照射条件の中からまず安全域を決定する。

(3) 次に予備的な細胞照射実験で超音波照射に対する培養細胞の形態変化を指標に照射の至適条件を明らかにする。以上により照射システムを確立する。

(4) 求めた条件を用いて各種細胞において照射実験を行い、超音波照射が細胞に与える促進的効果を検証し、実験系として確立する。

(5) その後超音波照射によるメカニカルストレス負荷の自由度を生かすべく、照射方向、複数の照射方向の組合せなど特殊な照射方法を試み、その効果を検討するなどの研究を進める。

4. 研究成果

(1) 平成 21 年度内に開発したシステムを用いて予備照射実験を行ったところ、超音波照射部の予想を超える温度上昇が生じ、このままでは実験を継続することが困難と考えられた(図1)。このため平成 21 年度は主としてこれを除去するシステムの開発に当たった。これは生体内の血液循環による組織冷却効果を模した循環水型の冷却システムであり、照射装置を入れた樹脂製のケース内に一定温度の水を循環させることにより、照射部を冷却しようとするものである。加工に特殊技術を要するため、装置の作成に時間を要したが、試作を重ねて装置を完成させることができた。これにより照射装置(超音波振動子)の温度上昇を防止することに成功した。

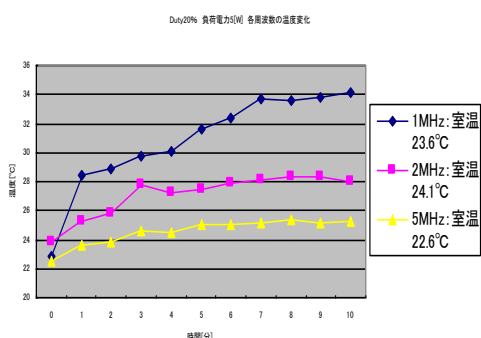


図1. 超音波振動子の温度上昇の1例



図2. 循環水型冷却装置を備えた超音波振動子

(2) 超音波照射はそれ自体、照射対象に対するエネルギーの付与に他ならないため、超音波照射に際しては、上述の超音波振動子の温度上昇のほか、照射対象(培養細胞)の温度上昇も生じ得る。今回開発したシステムでは、培養細胞を容れたディッシュに超音波照射装置である振動子を直接浸して照射を行う形態であるため、上述の超音波振動子冷却システムが照射対象である培養細胞およびその周囲の環境の温度上昇をも抑止する効果も期待されたが、実際の測定実験ではその効果が限定的で、照射する超音波の出力が弱く、間歇的で照射時間が短い場合以外には温度上昇の抑止が不十分であることが判明した。こうした照射対象(培養細胞)の温度上昇は条件によっては継続的な照射を困難にするため、至適条件における照射が困難な可能性が明らかにされたことになる。よって平成22年度は照射対象である培養細胞の温度上昇を詳細に解析できるシステムを開発し、本実験で用いる照射の安全域を決定することを試みた。

(3) 上記実験の結果、本システムにおいて過度の温度上昇を抑止しながら培養細胞に超音波を照射するための出力、照射パターンを明らかにすることができた。最も重要な点は照射間隔であり、少なくとも2秒間以上の間隔をあけて照射することが必要と考えられた。こうした解析結果は、理論的には説明可能でも実測が非常に難しい、超音波照射の熱的作用の実際をin vitroで再現し検証することに他ならず、その成果は超音波の安全性という観点から見てもきわめて大きな意義を持つ。そこでこの結果を「生体に対する超音波照射の影響：組織照射モデルによるin vitroの検証」と題して第85回日本超音波医学会学術集会にて発表した。

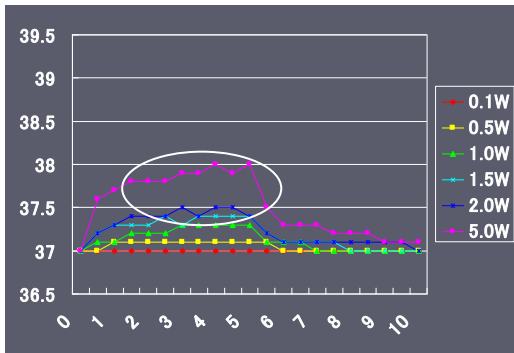


図3. 望ましい照射パターンと温度上昇

(4) しかし現状の装置では設定可能な照射条件の範囲に限界があり、こうした安全な照射パターンを再現しつつ培養細胞に超音波を照射するには、装置をマニュアルでコントロールしなければならず、長時間照射を繰り返しながら行う細胞培養実験は事実上困難であった。

(5) 現状の装置において照射間隔を2秒以上とすることは、大幅な変更とはなるものの、設定を変更すれば可能である。今後はこうした方向で装置を使用可能な状態に改良する方向で計画している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Kyoko Tsuda, Kei Konno, Harumi Koibuchi, Hiroaki Matsunaga, Yasutomo Fujii, Nobuyuki Taniguchi: Ultrasonography findings in temporal arteritis. J Med Ultrasonics 39:201-203, 2012

2. Harumi Koibuchi, Yasutomo Fujii, Kazuhiko Kotani, Kei Konno, Hiroaki Matsunaga, Michiaki Miyamoto, Nobuyuki Taniguchi: Degradation of ultrasound probes caused by disinfection by alcohol J Med ultrasonics 38 97-100,2011

3. Michiaki Miyamoto, Kazuhiko Kotani, Hiroaki Yagyu, Harumi Koibuchi, Yasutomo Fujii, Kei Konno, Toshiyuki Yamada, Shun Ishibashi, Nobuyuki Taniguchi: The correlation between CVR-R

and carotid atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus patients with diabetic neuropathy. J Physiol anthropol 29:149-152,2010

4. Harumi Koibuchi, Shunji Hayashi, Kazuhiko Kotani, Yasutomo Fujii, Kei Konno, Yoshikazu Hirai, Nobuyuki Taniguchi: Comparison of methods for evaluating bacterial contamination of ultrasound probes. J Med Ultrasonics 36:187-192,2009

[学会発表] (計22件)

1. 紺野 啓, 谷口信行: 生体に対する超音波照射の影響: 組織照射モデルによる in vitro の検討. 日本超音波医学会第85回学術集会, 平成2012年5月25-27日, (東京都港区)

2. 津田恭子, 紺野 啓, 鯉渕晴美, 宮本倫聡, 神田美穂, 松永宏明, 藤井康友, 谷口信行: 側頭動脈炎の超音波所見. 日本超音波医学会第85回学術集会, 平成2012年5月25-27日, (東京都港区)

3. 鯉渕晴美, 紺野 啓, 尾本きよか, 神田美穂, 津田恭子, 宮本倫聡, 松永宏明, 藤井康友, 谷口信行: 超音波検査が有用であった小児甲状腺癌の4例. 日本超音波医学会第85回学術集会, 平成2012年5月25-27日, (東京都港区)

4. 松永宏明, 紺野 啓, 神田美穂, 津田恭子, 宮本倫聡, 鯉渕晴美, 藤井康友, 谷口信行: 頸部における IgG4 関連疾患の超音波像: Mikulicz 病、Kuttner 腫瘍と Riedel 甲状腺炎. 日本超音波医学会第85回学術集会, 平成2012年5月25-27日, (東京都港区)

5. 柄澤浩一, 吉澤昌純, 入江喬介, 田川憲男, 伊東紘一, 横山卓, 紺野 啓, 谷口信行, 守屋正: 穿刺型超音波顕微鏡用溶融石英棒センサの分解能向上. 日本超音波医学会第85回

学術集会, 平成 2012 年 5 月 25-27 日, (東京都港区)

6. 紺野 啓, 藤井康友, 鯉渕晴美, 松永宏明, 荻原友美菜, 谷口信行, 石田秀明: カラー Doppler における音響流の可視化について. 日本超音波医学会第 84 回学術集会, 平成 2011 年 5 月 27-29 日, (東京都港区)

7. 紺野 啓, 藤井康友, 鯉渕晴美, 松永宏明, 倉井順子, 荻原友美菜, 谷口信行: venous aneurysm の超音波所見. 日本超音波医学会第 84 回学術集会, 平成 2011 年 5 月 27-29 日, (東京都港区)

8. 石田秀明, 長沼裕子, 大山葉子, 渡部多佳子, 小松田智也, 古川佳代子, 宮内孝治, 紺野 啓, 小川眞広: 超音波はこの点で絶対的に強い! - 腹部領域において超音波は多くの点で CT、MRI に勝る - . 日本超音波医学会第 84 回学術集会, 平成 2011 年 5 月 27-29 日, (東京都港区)

9. 石田秀明, 長沼裕子, 大山葉子, 渡部多佳子, 小松田智也, 古川佳代子, 佐藤美知子, 宇野 篤, 紺野 啓, 小川眞広: 超音波アーチファクトの 3D 像. 日本超音波医学会第 84 回学術集会, 平成 2011 年 5 月 27-29 日, (於 東京都港区)

10. 石田秀明, 小松田智也, 古川佳代子, 渡部多佳子, 長沼裕子, 大山葉子, 紺野 啓: 技師の技量の精度管理 - 指導医の立場から - . 日本超音波医学会第 84 回学術集会, 平成 2011 年 5 月 27-29 日, (於 東京都港区)

11. 紺野 啓, 鯉渕晴美, 藤井康友, 松永宏明, 高橋純子, 谷口信行, 石田秀明: 門脈血流障害に伴う代償性変化 (2) - 門脈血流減少と肝腫瘍様変化 - . 日本超音波医学会第 83 回学術集会, 2010 年 5 月 29-31 日 (京都)

12. 入江喬介, 佐藤正和, 田川憲男, 守屋 正,

吉澤正純, 飯島高志, 伊東紘一, 横山 卓, 紺野 啓, 谷口信行: 細径ファイバーを用いた 100MHz 帯超音波伝送による画像化の検討. 日本超音波医学会第 83 回学術集会, 2010 年 5 月 29-31 日 (京都)

13. 石田秀明, 小松田智也, 古川佳代子, 渡部多佳子, 大山葉子, 長沼裕子, 紺野 啓, 幕田倫子: 診断報告書抄録作成の指導について - 超音波検査士受験のためのレポート作成 - . 日本超音波医学会第 83 回学術集会, 2010 年 5 月 29-31 日 (京都)

14. 鯉渕晴美, 小谷和彦, 藤井康友, 紺野 啓, 松永宏明, 宮本倫明, 谷口信行: 超音波探触子のアルコール消毒における耐性の研究. 日本超音波医学会第 83 回学術集会, 2010 年 5 月 29-31 日 (京都)

15. 紺野 啓, 鯉渕晴美, 藤井康友, 谷口信行, 石田秀明: Velocity Vector Imaging を用いた肝の動き評価の試み. 日本超音波医学会第 82 回学術集会, 2009 年 5 月 22-24 日 (東京)

16. 紺野 啓, 鯉渕晴美, 桃谷孝之, 四元茂, 谷口信行: 門脈血行動態異常に伴う良性肝腫瘍性病変についての検討. 日本超音波医学会第 82 回学術集会, 2009 年 5 月 22-24 日 (東京)

17. 入江喬介, 佐藤正和, 飯島高志, 守屋正, 伊東紘一, 横山卓, 紺野 啓, 谷口信行: 細径ファイバーを用いた 100MHz 帯超音波伝送の検討. 日本超音波医学会第 82 回学術集会, 2009 年 5 月 22-24 日 (東京)

18. 吉澤昌純, 川畑宏貴, 江本龍二, 入江喬介, 伊東紘一, 横山卓, 紺野 啓, 谷口信行, 守屋正: 干渉型音響インピーダンス計測法による穿刺型超音波顕微鏡用振動走査法. 日本超音波医学会第 82 回学術集会, 2009 年 5 月 22-24 日 (東京)

〔図書〕（計 4 件）

1. 紺野 啓:Ⅷ画像検査 第 1 章超音波検査
A 超音波検査法の基礎. 矢富 裕, 横田浩充
(監修), 谷口信行(編) 標準臨床検査学 生
理検査学・画像検査学. 医学書院, 東京,
pp211-228, 2011
2. 紺野 啓:Ⅷ画像検査 第 1 章超音波検査
C 上腹部の超音波検査. 矢富 裕, 横田浩充
(監修), 谷口信行(編) 標準臨床検査学 生
理検査学・画像検査学. 医学書院, 東京,
pp246-261, 2011
3. 紺野 啓:Ⅷ画像検査 第 1 章超音波検査
D 下腹部の超音波検査. 矢富 裕, 横田浩充
(監修), 谷口信行(編) 標準臨床検査学 生
理検査学・画像検査学. 医学書院, 東京,
pp262-267, 2011
4. 紺野 啓:Ⅷ画像検査 第 1 章超音波検査
E その他臓器の超音波検査. 矢富 裕, 横田
浩充(監修), 谷口信行(編) 標準臨床検査
学 生理検査学・画像検査学. 医学書院,
東京, pp268-276, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紺野 啓 (KONNO KEI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00323139