

計畫編號：DOH 89-TD-1211

行政院衛生署八十九年度委託研究計畫

利用震波對生物技術製劑滅菌之研究

委託研究成果報告

執行機構：國立成功大學

研究主持人：梁勝明

研究人員：黃嘉新、辛致煒、顏經洲、黃尹虹、陳宏模、何奇幸、  
王嘉輝

執行期間：88年11月01日至89年12月31日

## 目錄

中文摘要.....	ii
英文摘要.....	v
1. 前言.....	1
2. 材料.....	2
3. 方法.....	4
4. 結果.....	10
5. 討論.....	14
6. 結論與建議.....	19
7. 參考文獻.....	20
表.....	22
圖.....	40

## 利用震波技術對生物製劑滅菌之研究

### 摘要

生物製劑為利用生物體產生或生物體本身的物質運用於人體上的一種劑型，其具有活性。故處理不當會造成一種破壞使劑型無法使用。生物科技的產品為未來明星之工業，但該產品大都為蛋白質、基因或細胞。故生物製劑運用於人體上必須不會對人體造成非治療性傷害，如污染或再次感染，否則再有用的生物製劑亦為廢品。因此病原體在此製程中，必須完全去除才不造成藥害。若生物製劑劑型為溶液，若生物製劑溶於溶液中可通過  $0.2\ \mu\text{m}$  之過濾器，吾人可用過濾法去除大於  $0.2\ \mu\text{m}$  的病原體。若小於  $0.2\ \mu\text{m}$  者，則無法去除病原體。若其產品大於  $0.2\ \mu\text{m}$ ，因它無法通過濾網，則過濾法為無法使用。

血液製品可區分有形固體的細胞與無形液體的化合物-如蛋白質。因蛋白質經 Cohn 的血漿分離技術可產生各種有用的產品 (Fraction I - Fraction V)。這些物質都是來自人體血液，故含有多種潛在性的病原體，在進入人體前需要適當的處理。

因體外震波碎石機 (ESWL) 產生的震波可擊碎體內結石，亦破壞細胞。故本計劃以此震波技術來作為血液製劑滅菌之新方法。若以一般方法 (加熱  $60^{\circ}\text{C}$  10 小時、UV 及溶劑-清潔劑) 處理 fibrinogen (Fraction I) 會使

活性降低達 30% 以上，不符經濟成本。故利用震波滅菌為可嘗試一種非侵略式新方法。

震波需有介質才能傳遞能量，但不同介質有不同聲阻。不同聲阻介質將會使震波能量因反射、散射而衰減。ESWL 使用水為介質，故將血液製品置放於水中之容器需與水介質有相同之聲阻為最佳之容器。本實驗工作之一為尋找最佳容器，以進行各項實驗分析。曾選用氣球、PP 試管、PS 試管、Eppendorff tube 及 PE 吸管。吾人發現 PE 吸管有較佳滅菌結果。直到目前為止，因尚未有其他人報導嘗試 PE 吸管的結果，如何使用充填器具，亦是研究課題。吾人嘗試用 Micropipet tip、Teflon tubing 及 20cm 長細金屬中空管，發現以後者為效果最佳。

本實驗與 Reid 等人研究所得結果有不同，Reid 等人用 Eppendorff tube 所得結論為震波對細菌滅菌是無效。但本計劃經多次嘗試，發現 Eppendorff tube 有良好滅菌效果。而且對存放冷藏二星期以上且生存良好之細菌，施以 900 次震波(4kV, 1.5Hz)，滅菌效果可達到完全滅菌境界，這可能是老化細菌較無法承受高壓所致。若是如此，此法亦可作為處理血庫細胞存放過久之新技術。

理論上加入對比劑 (Contrast agent) 之使用，似乎可增加空蝕效應 (cavitation effect) 促進細菌死亡，已有多篇報導對比劑有助細胞破裂。本實

驗選用 Levovist 的對比劑，得到不佳滅菌結果。原因為何，可能需用 Albunex 再試驗來驗證。由美國採購之 Optison (albumin) 產品。實驗結果發現對低濃度菌量有幫助滅菌作用，若以高濃度菌量( $10^7$  以上)者並無助益，原因有待探討。細菌數目在  $10^6$ - $10^7$  之濃液者，有滅菌功效，但無法完全滅菌。但細菌數目在  $10^2$ - $10^6$  之濃液者，有完全滅菌之功效。Optison (albumin) 產品對不同細菌有不同滅菌功效，若用 *neisseria* spp. 可較佳滅菌效果，而 *bacillus* spp. 有較差效果。而對 *enterobacteriae* 效果中鼎等。至於病毒方面，若用 Herpes Simplex -1 可得較佳滅菌效果，但對 adenovirus 需較高的電壓才可實施。

運用真實血漿以加入各種細菌與病毒，發現細菌在 10 kV，使用 1500 次震波後並無完全滅菌，可能血漿有消耗震波能量。最後本研究以不同能量對人類紅血球、鰻魚紅血球與枯西式錐蟲側鞭型進行試驗，在 50% 殘存率與存活率相同條件下，吾人發現以鰻魚紅血球優於人類紅血球，最差為枯西式錐蟲側鞭型。在本實驗中，僅有人類紅血球能完全被壞。

**關鍵字：**震波、寄生蟲、細菌、病毒、滅菌

## Abstract

A bio-technological product is one type of doses that employ the material from a living body itself or generated by the living body to a human body. Since the bio-technological product has its activity, an improper productive process can result in the product to be useless because of contamination. The bio-technological products can become a star industry in the future. Up to date, the bio-technological products mainly are of protein, gene or cell. The use of these products needs no therapeutic harm to human being. Otherwise, these products with contamination would become waste materials. Therefore the pathogen during a productive process is necessary to be sterilized so that no medicine harm will result. If the bio-technologic products are liquids, we could use a filter with a  $0.2 \mu\text{m}$  grid size to filter out the pathogen that is greater than  $0.2 \mu\text{m}$ . The product component that is smaller than  $0.2 \mu\text{m}$  in size could pass through the filter. If the pathogen is smaller than  $0.2 \mu\text{m}$ , the filter is useless. If the size of the product component is greater than  $0.2 \mu\text{m}$ , the filtering method is useless too.

Blood products can be classified to be two types. One is a solid-typed cell. The other is a liquid-typed chemical compound such as protein. The protein can produce various useful products of Fraction I to Fraction V by using the plasma separation technique of the Cohn method. Since the blood products come from the human blood, they may potentially contain pathogens. We need carefully handle the blood product before injection into the human bodies.

In this study we try to use a new method for the sterilization of the bio-

technological product by employing shock waves. The shock waves are generated by an extracorporeal shock wave lithotripter that is originally used for treatment of kidney stones. For the treatment of a fibrinogen by a traditional method of heating at 60°C for 10 hours or Ultra-Violet and solvent-cleanser, it can reduce the activity of more than 30%. This method is not an economic way. In contrast, using shock wave is a new non-invasive method for sterilization.

A wave medium is needed for shock wave propagation. Water is used for our electro-hydraulic lithotripter. Since different media have different sound impedance. The shock wave energy may decay when it propagates through different media due to reflection and scattering. The sound impedance of a container for blood products is better close to that of water. In this study, one of our research tasks is to seek an optimal container. Several containers were tried. They are balloon, PP tube, PS tube, Eppendorff tube, and PE tube. It was found that the PE tube has the best efficiency. Up to date, there is no report of using the PE tube with success. We also found that the container may have different operation methods. We tried Micropipet tip, Teflon tubing, and small hollow metal tube of 20cm in length. We found that the latter is the best. Reid found that shock waves could not sterilize bacteria by using the Eppendorff tube. From our experiments, we found that our result is different from that obtained by Reid et al. However, our result indicated that the Eppendorrrff tube is a beter container. In addition, using this container, complete sterilization can be achieved for two-week frozen bacteria after 900 shocks at the condition of 4kV voltage and 1.5Hz. Note that the bacteria can survive after two-week frozen. The reason for it may be due to the aging of bacteria, since the aged bacteria can not sustain a pressure

than the young ones. The actual reason needs a further investigation. This result suggests that the method may become a new method for processing the cell in the aged blood bank.

In our experiment a contrast agent of Levovist added in bio-technological products was tried in order to enhance the sterilization of bacteria, since Levovist can induce a cavitation effect. However, the Levovist was found to be useless. However, we tried the Optison (albumin) product obtained from US worked well for sterilizing the low-concentration bacteria with a number of  $10^2$  to  $10^6$ . For bacteria with a number of  $10^6$ -  $10^7$ , the Optison product worked, but complete sterilization could not be obtained. For a high-concentration bacteria with number of  $10^7$  or more, the Optison product did not work well. The reason may be the average energy received by each bacterium is too low to be sterilized.

The sterilization of bacteria by shock waves has different effects for different bacteria. We found that shock waves have the best effect on the *Neisseria* spp., the moderate effect on the *Enterobacteria*, and the least effect on *Bacillus* spp. As for virus, shock waves have a better effect on herpes simplex-71. For bacteria and virus mixed with blood, it was found that complete sterilization could not be obtained under the condition of 1500 shocks at a 10kV voltage setting. This may be due to the blood viscosity that could dissipate the shock wave energy. Finally, human and Japanese eel (*Anguilla japonica*) erythrocytes, and *Trypanosoma cruzi* epimastigote form were treated by shock waves under different voltages and shock number. Based on the remanent rate (or survival rate) 50%, the eel erythrocyte produces a better result than the human red-blood cell and *T. cruzi*

epimastigote form under the same circumstance. Only the human red-blood cell can be destroyed completely in our experimental conditions.

**Keywords: shock wave, parasite, bacteria, virus, sterilization**

## 1. 前言

本計劃為利用體外震波碎石機可產生壓力波及張力波效應來擊碎體內結石之技術[1]，因結石擊碎後發現其週圍細胞發生有壞死之現象，此壞死是因為震波擊碎細胞造成之結果，已有多篇報導利用此可殺死癌細胞之研究[2, 3]；因張力波會使細胞膜的通透性增加，進而使細胞死亡。[4 - 8]

細菌與細胞之次細胞構造差異性為細胞壁，故研究細菌可的兩極性現象[9]，本計劃經研究之結果，對細菌、寄生蟲與病毒的破壞性有正面的影響。

因生物技術之產品很難達量產化的原因，其為蛋白製劑為主，利用物理性如熱，或化學性如清潔劑，很難達滅菌之效果，因為處理後會使蛋白變性，變成無用產品[10, 11]，故本計劃選定 fibrinogen 血液製劑來初步分析其病原體及處理後蛋白變性與否。

因體外碎石機之震波為機械波，故生物製劑品之盛裝容器為本計劃研究之工作之一。經分析得較佳結果為以 PE 吸管為容器可得較佳，故本計劃以吸管為容器裝病原體分析。

## 2. 實驗材料

本研究選用下列實驗材料:

1. ATCC 標準菌種(Staphylococcus aureus 、Neisseria spp. Escherichia Coli、Pseumonas aeruginosa、Klebisella pneumonias、Bacillus subtilis) 及病毒( Herpes Simplex virus-1、Adenovirus、Enteric virus-71、 $\lambda$  phage 來自成功大學附設醫院)
2. BaCl<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、Crystal violet、formaldehyde(來自和光 ) —調配菌液濃度
3. NaCl、CaCl<sub>2</sub>、NaHCO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Plate count agar、CH<sub>3</sub>COOH、CH<sub>3</sub>COONa、Acrylamide、SDS(來自 Merck)
4. DMEM、EMEM(來自 GIBCO)
5. 細胞培養瓶、24 well 細胞培養盤、細胞刮取液(來自 NUNC)
6. 0.2  $\mu$  m Cellulose 無菌過濾器(來自 Sartorus)
7. Fibrinogen 、Thrombin (來自 Sigma)(血纖維蛋白元)
8. 血漿 (來自台南捐血中心)(凝血酵素)
9. Spectrophotometer (分光比色計)
10. Micropipet & yellow tip & blue tip (微量吸管及黃色和藍色吸管尖)
11. Tip & tube rack (吸管尖及試管架)

12. Sterile pipet (50ml、5ml、1ml) (無菌吸管)
13. Teflon tubing (特福隆管)
14. HPLC syring (50 微升高壓液相層析儀注射器)
15. Sterile syring (1ml、10ml) (1ml、10ml 無菌注射器)
16. Sterile syring filter (0.2  $\mu$ ) (0.2 微米無菌注射式過濾器)
17. 20cm 長細金屬中空管
18. 15ml PP tube (15ml 聚丙烯試管)
19. 50ml PP tube (50ml 聚丙烯試管)
20. 15ml PS tube (15ml 聚苯乙烯試管)
21. 氣球&棉線
22. Laminar flow (無塵無菌操作台)
23. 電極棒(自製)
24. ESWL 儀器 (Lite-Med 體外震波碎石機)
25. Petri dish (培養皿)
26. Sterile dropper (無菌吸管)
27. Ethanol & Chlorax (乙醇與漂白劑)
28. Glove (塑膠手套)
29. Autoclave bag (滅菌袋)

### 3. 方法

#### A. 寄生蟲實驗

##### 一、測試樣本

本實驗利用人類紅血球（無細胞核；Fig. 1.A）作為總對照組，自捐血中心取得），日本鰻 (*Anguilla japonica*; Japanese eel)（市場購得）紅血球（含細胞核；Fig. 1.B）為對照組，枯西氏錐蟲 (*Trypanosoma cruzi*) 側鞭毛型 (epimastigote)（國立中山大學生物科學系趙大衛教授提供）（血液鞭毛蟲；Fig. 1.C）為實驗組。

##### 二、日本鰻的採血

所有鰻魚於採樣後 3 天內完成採血及血球收集。採血前鰻魚先以冰水混合液冷凍麻醉，再剪開胸帶由動脈球抽血。抽血之塑膠針筒預先以 200 iu/ml 之肝素 (heparin) 潤濕。每尾鰻魚依體型大小約可抽得 1-3.5 ml 不等之血液。所採得之部份血液立即進行血球收集。

##### 三、血球收集

血球收集過程為將抽得之血液置入 15 ml 離心管，以 3,000 rpm (600 x g) 低速離心三分鐘，分離血漿及血球。移除血漿後加入約血球體積 5 倍之 Ringer's solution 沖洗；經搖晃後再以 3,000 rpm 低速離心，移除沖洗液。反覆沖洗 3 次後，加入約血球 5 倍體積的 Ringer's

solution，調整細胞數目為  $1 \times 10^6$  /ml 後備用。

#### 四、枯西氏錐蟲體外培養與收集

蟲體培養於環終期培養液 (liquid metacyclic stage culture medium, LMC)，置於 27°C 恆溫培養箱培養，每隔 7-10 日繼代一次。收集生長至對數期之蟲體置入 15 ml 離心管，以 3,000 rpm (600 x g) 低速離心 10 分鐘，分離蟲體及培養基。移除培養基後加入體積 5 倍之磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffered saline; pH 7.4) 沖洗；經搖晃後再以 3,000 rpm 低速離心，移除沖洗液。反覆沖洗 3 次後，加入適量之磷酸鹽緩衝液，調整細胞數目為  $1 \times 10^6$  /ml 後備用。

#### 五、震波試驗

所有實驗組與對照組均利用體外震波碎石機處理，條件分別為 25 °C，1 大氣壓下，試驗電壓分別為 7, 8, 9, 與 10 KV，每秒一次撞擊，時間分別為 0, 60, 120, 240, 480, 1000, 1500 與 2000 秒。

#### 六、細胞計數

人類紅血球與鰻魚紅血球利用自動細胞計數器計算 Sysmex F-800，枯西氏錐蟲則以細胞計數板 (hemocytometer) 計數。

### B、細菌實驗

#### 一、找尋合適震波處理容器

取成功大學附設醫院病理部取 ACTT 標準菌種 E.Coli  $10^8$ /ml，以無菌生理水稀釋為  $10^6$ /ml，分別裝入氣球(事先以消毒鍋滅菌)、氣球與無菌 PS 試管、無菌 PP 試管、PS 試管、Eppendorff tube 及無菌吸管各 1ml。用固定 90Hz，200、400、600、800 及 1000 次數震波，電壓為 4、5、6、7、8、9、10KV，以生理食鹽水稀釋，以傾倒法倒入 PCA (Plate count agar)，48hrs，35°C 培養，計算菌落數(發現以 PE 的塑膠吸管較佳)。

## 二、找尋合適震波處理滅菌條件

取成功大學附設醫院病理部取 ACTT 標準菌種 Staphylococcus aureus、Neisseria spp.、Escherichia Coli、Pseumonas aeruginosa、Klebisella pneumonias、Bacillus subtilis  $10^8$ /ml，以無菌生理水稀釋為  $10^6$ /ml，分別裝入無菌 PE 塑膠吸管各 1ml。用固定 90Hz，200、400、600、800 及 1000 次數震波，電壓為 4、5、6、7、8、9、10KV。以生理食鹽水稀釋，以傾倒法倒入 PCA (Plate count agar)，48hrs，35°C 培養，計算菌落數。

## 三、找尋合適震波處理滅菌條件中加對比劑效應

取成功大學附設醫院病理部取 ACTT 標準菌種 Staphylococcus aureus、Neisseria spp.、Escherichia Coli、Pseumonas aeruginosa、Klebisella pneumonias、Bacillus subtilis  $10^8$ /ml，以無菌生理水稀釋為  $10^6$ /ml，分別裝入無菌 PE 塑膠吸管各 1ml 加入 1、10、0.1% 的 Levovist 及 Optison

(albumin)，用固定 90Hz，200、400、600、800 及 1000 次數震波，電壓為 4、5、6、7、8、9、10kV，以生理食鹽水稀釋，以傾倒法倒入 PCA (Plate count agar)，48hrs、35°C 培養，計算菌落數。

#### 四、找尋合適震波處理滅菌含有纖維蛋白元條件

稱取 fibrinogen 3 mg/ml in NaCl，取成功大學附設醫院病理部取 ACTT 標準菌種 *Staphylococcus aureus*、*Neisseria spp.*、*Escherichia Coli*、*Pseumonas aeruginosa*、*Klebisella pneumonias*、*Bacillus subtilis*  $10^8$ /ml，以無菌生理水稀釋為  $10^6$ /ml 和 Fibrinogen 混合，分別裝入無菌 PE 塑膠吸管各 1ml。用固定 90Hz，200、400、600、800 及 1000 次數震波，電壓為 4、5、6、7、8、9、10kV，以生理食鹽水稀釋，以傾倒法倒入 PCA (Plate count agar)，48hrs，35°C 培養，計算菌落數。

#### 五、Fibrinogen 分析方法

取 100  $\mu$ l 經震波處理的溶液，加 100  $\mu$ l thrombin 3NIH/ml NaCl，ST4 儀器分析其 fibrinogen coagulation time

#### 六、分析 Fibrinogen 片段

##### (1) 配製 SDS-PAGE

水 7.71ml，Acrylamide:disacrylamide (30% , 2.6% )為 4ml，4X Resolving gel buffer 4ml，10% SDS 0.16 ml，TEMED 0.008 ml，10% Ammonium persulfate

0.12 ml。

(2) Stacking gel

水 3.17ml, Acrylamide:disacrylamide (30% , 2.6% )為 0.5 ml, 4X Resolving gel buffer 1.25ml, 10% SDS 0.05 ml, TEMED 0.005 ml, 10% Ammonium persulfate 0.025 ml。

(3) 取 2ul 經震波處理的溶液和 sample buffer solution 18ul, 共煮 5 分鐘, 取檢體和 dye solution 1 : 1 為 30ul, 置入 Acrylamide – Bisacrylamide SDS PAGE, 電流為 30mA, 電壓為 150V, 30 分鐘, TCA 處理, Coomassie blue G-250, 電泳分析段裂片段。

七、病毒分析

由附設醫院取 Herpes simplex-1 取 1/10 的量和 MEM、DMEM(內有 Vero、A549)

讓病毒繁殖到三天後  $10^6$ /ml, 取 200ul 病毒, 放入 24 well 內有長滿細胞及培養基, 和入每隔 15 分鐘混合, 1 小時後佳入 1% methyl cellulose, 和 2% FBS DMEM(或 MEM)medium 一起培養(5% CO<sub>2</sub>, 35°C), 三天後觀察並加入 10% Formalin 固定 30 分, 1% Crystal violet 1 小時, 染色計算出腐蝕斑點計算其死亡量。

八、找尋合適震波處理滅菌含有纖維蛋白元條件

稱取 fibrinogen 3 mg/ml in NaCl ，取成功大學附設醫院病理部取 ACTT 標準菌種 *Staphylococcus aureus*、*Neisseria spp.*、*Escherichia Coli*、*Pseumonas aeruginosa*、*Klebisella pneumonias*、*Bacillus subtilis*  $10^8$ /ml，以無菌 EMEM 生長需 3 天稀釋為  $10^6$ /ml 和 Fibrinogen 混合，分別裝入無菌 PE 塑膠吸管各 1ml，用固定 90Hz，200、400、600、800 及 1000 次數震波，電壓為 4、5、6、7、8、9、10KV，以 MEM 稀釋，以傾倒入 PCA (Plate count agar)，48hrs，35°C 培養，計算菌落數。

#### 4. 結 果

本研究為以選定革藍氏陽性菌(*Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*)和革藍氏陰性菌(*Escherichia Coli*、*Pseumonas aeruginosa*、*Klebisella pneumonias* 及 *Neisseria spp.*)。寄生蟲採用錐蟲，病毒採用 *Herpes Simplex-1*、*Adenovirus*、*Entervirus-71* 及  $\lambda$  phage，都有其意義。細菌可初步瞭解其滅菌之各種細菌差異性。

因分析以 PE 吸管為容器，粗大部分盛裝 1ml 檢體，但開口如何處理，否則會漏出檢體。故吸管開口處需以 Eppendorff tube 倒放，塞注開口處。故可能空氣是否受影響。本研究將吸管上端挖洞，避免空氣是否影響。經震波處理結果如下，發現密閉比打開較多 1-2 對數值，故實驗以採用在吸管用針札個洞進行見表十六、表十七。發現頻率亦會有所影響，若以 *Staphylococci spp.* 以相同 9 kV 下 1300 由  $10^{11}$  在 1.5Hz 降到  $10^6$ ，若用 1Hz 則降到  $10^6$  見表十六、表十七、表十八。

在細菌發現 *E. Coli* 未實施震波為 control，菌量為  $10^6$ ，在 9 kV、400 震波、1.5Hz 條件下，可降菌量剩下  $10^3$  以下，見表十五，但菌量為  $10^7$  或  $10^8$ ，相同震波次數下，菌量剩下為  $10^5$ ，見表十八、表十九。因細菌中以 *Bacillus spp.* 具有芽胞，抵抗外來物理環境，故將此菌經一系列稀釋發現若菌量為  $10^7$ ，以 9 kV，2200 震波下，菌量可降為  $10^4$ ，若若菌量為  $10^6$  則降

到  $10^3$ ，若若菌量為  $10^4$  則降到  $10^2$ ，若以 10kV 菌量為  $10^5$ ，在 2000 次震波菌量可降為 10 以下，但加入 1% Optison (對比劑) 若菌量為  $10^5$ ，在 10kV 2000 次震波，菌量可降至 40 個，若以 0.1% Optison，菌量可降至 50 個，參考表二十、二十一、二十二、二十三、二十四、二十五、二十六。而 Neisseria 以不同 kV 進行，發現以 5kV 菌量為  $10^8$ ，經震波在 2000 次菌量降至  $10^3$ ，見表四十、四十一、四十二、四十三、四十四、四十五，若以 6kV 則菌量降至 10，7kV 時菌量降至為 21 個。若以 fibrinogen，分析發現當無震波處理為 17-25 秒，但處理後亦在此範圍，但用 10kV，可微增加由 60 次震波到 2000 次，其為 24 到 30 秒，表三十一、三十二、三十三，其電泳發現並無斷裂，但電泳圖並無斷裂，圖十六、十七、十八、十九、二十、二十一，需再近一步求證。

分析病毒發現 Herpes Simplex-1 用 9kV，1200 次震波，可由菌量  $10^5$  降到 30 個，表三十五，若以 Adenovirus 則降為 773-385 個，需以較高次數到 2000 次震波，菌量降為 12 個，不管如何由此資料顯示，震波可消滅病毒，但放真實血漿發現，放入混合菌，且一系列稀釋由  $10^7$ 、 $10^5$  及  $10^4$  個，發現以 10kV、1500 次數震波、1Hz 條件下，並在不同菌量加入 1% 對比劑，發現(1)無加入對比劑，菌量由  $10^7$  個降成平均菌量 1290 個，但加入對比劑，菌量降成 76 個；(2)無加入對比劑，菌量由  $10^5$  個變成平均菌

量 1250 個，但加入對比劑，平均菌量降為 107 個；(3) 無加入對比劑，菌量由  $10^4$  個降成 1100 個，加入對比劑時，菌量降為 122 個，表三十四。

人類紅血球與鰻魚紅血球細胞數目均會隨著能量（電壓）的增加與撞擊時間的增長而呈現出較低的殘存率 (remanent rate)，表四十六。在 9KV 與 10KV 電壓下，1500 次震波撞擊後，所有的人類紅血球能完全被破壞。不論在何種電壓下，2000 次震波撞擊後，所有的人類紅血球亦能完全被破壞 圖十二。鰻魚紅血球不論在何種電壓下，2000 次震波撞擊後仍有部份殘存，圖十三。枯西氏錐蟲細胞數目亦隨著能量（電壓）的增加與撞擊時間的增長而呈現出較低的存活率 (survival rate)。且與鰻魚紅血球相似，不論是在不同電壓與撞擊次數下均無法殺死所有的蟲體 圖十四、圖十五。

在比較各式不同細胞（人類紅血球，日本鰻與枯西氏錐蟲）受到不同電壓與撞擊次數的結果，7kV 時，隨著撞擊次數的增加，所有的細胞數目隨著遞減下降，人類紅血球的殘存率在 1000 次震波撞擊後，會有明顯的下降，日本鰻紅血球的殘存率在 2000 次震波撞擊後，會有明顯的下降，枯西氏錐蟲的存活率在 60 次震波撞擊後，明顯的下降，在 120 次震波撞擊後，降低約為原先的一半 (47.4%)。8kV 時，隨著撞擊次數的增加，所有的細胞數目隨著遞減下降，人類紅血球的殘存率在 480 次震波撞擊後，會有明顯的下降，日本鰻紅血球的殘存率在 1500 次震波撞擊後，會有明

顯的下降，枯西氏錐蟲的存活率在 60 次震波撞擊後，明顯的下降，在 480 次震波撞擊後，降低約為原先的一成(9.5%)。9kV 時，隨著撞擊次數的增加，所有的細胞數目隨著遞減下降，人類紅血球的殘存率在 1000 震波撞擊後，會有明顯的下降，日本鰻紅血球的殘存率在 120 次震波撞擊後，降至原先的一半(49.0%)，枯西氏錐蟲的存活率在 60 次震波撞擊後，明顯的下降，在 480 次震波撞擊後，降低為原先的 7.7%。10kV 時，隨著撞擊次數的增加，所有的細胞數目隨著遞減下降，人類紅血球的殘存率在 1000 次震波撞擊後，降低為原先的 1.5%，日本鰻紅血球的殘存率在 240 次震波撞擊後，降至原先的 30.6%，枯西氏錐蟲的存活率在 240 次撞擊後，明顯下降為原先的 9.8%。總體而言，電壓越高，撞擊次數越多細胞被破壞的越多，相對的殘存率與存活率亦越低。

## 5. 討 論

本機在擊碎體外結石為以氣球包覆其中，故本實驗亦為利用氣球裝有  $10^6$ /ml E. Coli，在用布製棉線將氣球口，綁緊見如圖一及表一，發現其結果為未實施的對照組生長不佳，反而以震波處理後生長量增加，當時認為可能在氣球綁緊後，使得氣球無空氣致死，但 E. Coli 對於微氧甚而厭氧仍可生長，故取 15ml 的無菌 PS 試管打開瓶蓋，放入 Laminar flow 五分鐘，再以氣球填充 E. Coli  $10^6$ /ml

，見圖二及表二其結果與圖一結果為一樣，無意義的，其原因待研究。

故本計劃以各種不同材質來選定其實驗方法，本計劃最初為利用 15ml PP 及 50ml PP，其所得結果比裝入氣球佳，見圖三及表三。若以 PS 材質測試因為其比 PP 較為透明，其結果比 PP 差，見圖四及表四。若以 1.5ml Eppendorff tube 其結果並不佳，見圖五及表八。國外文獻用此法得結果一樣，若以 PE 吸管頭，結果令人極滿意，見圖六及表六；故再用連續不同之打擊次在 90Hz 下，不同電壓可得發現 8Kv 有初步結果，見表九~十三，若細菌於冷藏二星期可得效果非常佳，見表十四，表示可能細菌細胞壁變較脆弱，需進行多次再現性實驗，見圖七細菌於培養皿生長與否圖，故本計劃將與 PE 材質為實驗容器。

此實驗為具有致病菌的病原體，故操作之工作人員，需非常小心取樣。

因 PE 吸管頭較大，而期吸管嘴較小，只有 5mm 管口徑，最初以微量管用吸管尖注入吸管頭；因其有大氣壓力之影響，無法強破擠入吸管頭內。若以擠入入吸管頭，其吸管頭仍殘留其中，故取菌液則將吸管剪除，見圖八，內容液取 100~300 微升，再以生理食鹽水連續稀釋到  $10^3\sim 10^4$  細菌量。

本計劃則以 Teflon 細管接上 HPLC 的注射器，見圖九，吸取菌液，(因 Teflon、注射器均可高溫高壓滅菌，可避免浪費耗材)，因 Teflon tubing 取菌入 PE 吸管頭，tubing 進入吸管嘴會污染及手會抖，見圖十，進入吸管嘴不易，且取出會將菌留於吸管頭，故一個滅菌衛生紙來將取後吸管表面擦乾吸管壁。後來找到長針形的金屬管可裝上 1ml 注射器，取樣標本極佳，見圖十一。

本計劃本以對比劑(contrast agent)可助於因震波而造成空蝕效應(cavitation effect)[12 - 14]，但本計劃以 Levovist (內容物主要為 4 克中半乳糖 galactose 3.996 克及 4 毫克棕櫚酸 palmitate)[15]，其結果為表十五，令人不滿意，原因待研究，在國外乃用 Albunex，因其為白蛋白(albumin)[16, 17]，可能往後會影響蛋白分離，故無考慮此對比劑；表六結果不佳；可能此對比劑不適用，可能選定 Albunex 在探討，在用層析法分離。

選訂材質在以各項致病菌分析，細菌需以廣範性性的革蘭氏陰陽性菌，由結果得知 *Neisseria* spp 破壞性較容易，而選定 *Bacillus* spp. 為可產生

芽胞，故先放於 4°C 下及 56°C 30 分鐘，反復培養三次使其耐環境，其經震波處理確實不易破壞，但經 10kV，1500 - 2000 次震波仍可將其破壞，但本想加入對比劑(Albumin)發現可破壞需在  $10^6$  以下量較有意義，而分析病毒發現及效果與細菌同，但因部分可能細胞(A549)老化，故分析蝕斑出現無法判讀，分析 fibrinogen 的活性與量，用 thrombin test 和電泳，所得結果很好，差異不大，但到 10kV 有微上升，故真實檢體採用 10kV，1500 次震波在 60Hz，發現有滅菌效果，若單獨加 Fibrinogen 可完全滅菌，而加入血漿則無法完全，可能血漿內物質多造成黏度高，震波無法通過，但其真正原因需再一步實驗才可得知。

人類紅血球的形狀是雙凹盤狀 ( $7\mu\text{m}$ )，中間較薄 (厚度為  $1.9\mu\text{m}$ ，中心最薄處的厚度為  $1\mu\text{m}$  或更少)，就好像是一個甜甜圈一樣，只是當中沒有一個洞而已，同時沒有細胞核存在中間，所以能夠在較低的能量 (壓力與時間的乘積) 下就被破壞。鰻魚紅血球的形狀是橢圓 ( $15\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ )，細胞膜較厚，而且中間有細胞核，體積約為人類紅血球的一倍。比較兩者 50% 的殘存率，當電壓超過 8KV 後，打破鰻魚紅血球所需的時間約為打破人類紅血球所需的時間的一倍。因此，細胞大小與形狀對於震波的耐受性有相當程度的關連。

錐蟲與原生植物有共同的祖先，最大的特色為具有鞭毛為其運動器

官。結構上比較複雜，多數具有鞭毛 (flagellum)、波動膜 (undulating membrane)、原口及細胞核。枯西式錐蟲側鞭型的形狀是細長 ( $15-30\mu\text{m} \times 1.5-3.0\mu\text{m}$ )，細胞膜較厚，具短波動膜，而且中間有細胞核與動基體 (kinetoplast)，體積約為人類紅血球的一半，比較人類紅血球、鰻魚紅血球與枯西式錐蟲側鞭型三者 50% 的殘存率(存活率)，當電壓超過 8KV 後，打破枯西式錐蟲側鞭型所需的時間約為打破鰻魚紅血球所需的時間的一半，為打破人類紅血球的 25%。綜觀上述結果，細胞體積大小與抗震波能力有關。鰻魚的紅血球體積較人類紅血球為大，外型單一呈橢圓形，並具有細胞核，所以就抗壓性而言，較優於人類紅血球。因而相同條件下，其 50% 殘存率較人類紅血球高出約一倍。枯西式錐蟲側鞭型雖然具有細胞核，及特殊的波動膜，但是其細胞體積約為人類紅血球的一半，在相同條件下，其 50% 殘存率約為人類紅血球的二分之一。由此看來，細胞體積越小，形狀越不單一，在受到撞擊後較易受到破壞。

動物細胞的細胞膜由糖類、脂質、蛋白質所組成的結構，是細胞的屏蔽並含有運輸以及訊號系統。細胞膜有是細胞的基本組成物質之一，它對細胞有相當重要的功能，少了它細胞就無法正常地進行生理機能。膜上鑲嵌有不同種類的蛋白質，脂質構成膜的主要結構，但蛋白質的種類決定了膜的功能。膜蛋白有兩大類，分別是嵌合蛋白質 (integral protein) 及

周圍蛋白質 (peripheral protein)。嵌合蛋白質鑲在膜上，可能越過整個膜或只是一半，具有親水性區及忌水性區，忌水性區在中央部分，親水性區在中央。周圍蛋白質附在嵌合蛋白質上，位靠細胞質的那面，有些和細胞骨骼相連。在人類紅血球表面，所含有的糖蛋白 (glycoprotein) 較單一，在鰻魚的紅血球表面上存在較多種的糖共構物 (glycoconjugates) 初級胺群 (primary amino group)[19]。因此，當受到相同能量的刺激後，鰻魚紅血球能產生較強的抗性。錐蟲體表亦存在著許多糖蛋白，而這些糖蛋白是構成細胞膜的主要成份 (variant surface glycoproteins)[20]。由於這些動物細胞膜構成較人類紅血球細胞膜構成複雜，故在本實驗中，當受到最高能量撞擊 (10KV, 2000 次震波) 後仍有少數細胞能夠殘存與存活，或許與細胞膜構成與細胞核的存在與否有關，相關的資訊仍待未來更進一的實驗證實。

## 6. 結論與建議

本計劃對細菌研究中，發現由 PP、PS、Eppendorff 材質和軟性橡膠材質(如氣球)之容器對滅菌無效，而 PE 材質者則有滅菌效果。用 PE 吸管材質發現，若在管內有穿洞，比整支吸管密封效果為佳，這可能與自由基有關，其原因待探討。並發現若以 1.5Hz 和 1Hz 之震波頻率(f)，結果 1Hz 效果大於 1.5Hz，可能是高頻充電能量不足所致

在相同條件 5kV 下，菌量為  $10^7$ ，施以  $f=1.5\text{Hz}$ ，800-1000 次震波，大腸菌（革蘭性陰性桿菌）菌量剩餘  $10^4$ ，而金黃葡萄球菌（革蘭性陽性球菌）剩餘  $10^6$ ，奈氏菌（革蘭性陰性球菌）剩餘  $10^2$ 。枯草菌屬（革蘭性陽性桿菌）則在 9kV，震波 1300 次數剩餘  $10^5$ 。由此資料顯示震波可破壞細菌，與細菌形狀無關，但與其細胞壁組成有關。因為革蘭性陽性被破壞程度小於革蘭性陰性，而枯草菌屬最不易被破壞。此外，當菌量為  $10^6$ ，以 9kV 電壓，菌量可降到  $10^3$  以下，但革蘭氏陽性菌需 10kV 電壓，才可降到 10 左右。這表示若單獨一種蛋白質滅菌可行，但在真實血漿中，菌量卻只降到  $10^2-10^3$ 。原因可能是血漿中黏性增加，造成震波能量盾損耗。

利用震波處理有核細胞(鰻魚血)與無核細胞(人血)，在 9kV 與 10kV，1500 次震波人血完全破壞，但鰻魚血仍有未完全破壞現象。鰻魚的紅血球體積較人類紅血球為大，外型單一呈橢圓形，並具有細胞核，所以就抗

壓性而言，較優於人類紅血球。因而相同條件下，其 50%殘存率較人類紅血球高出約一倍。枯西式錐蟲側鞭型雖然具有細胞核，及特殊的波動膜，但是其細胞體積約為人類紅血球的一半，在震波相同條件下，其 50%殘存率約為人類紅血球的二分之一。由此看來，細胞體積越小，形狀越不單一，在受到撞擊後較易受到破壞。對病毒研究中發現有封套的脂疹病毒-1 比無脂封套的腺病毒易被震波破壞。

本計劃亦用纖維蛋白原加入病原體，分析纖維蛋白活性減少程度，發現凝固時間無變化，只有在 10kV 電壓下有輕微延長凝固時間，但分析其電泳發現纖維蛋白活性並改變。

利用對比劑以空蝕效應滅菌效果，用較少量對比劑的半乳糖則無效應，但用較多對比劑的白蛋白則有效。當無對比劑時細菌量可由  $10^4$  降為  $10^3$ ，加入 1% 對比劑菌量可由  $10^4$  降為  $10^2$ ，表示適量對比劑具有加成作用但仍需探討濃度對滅菌之功效。

總之，血液製劑滅菌過去一直是一項很困難工作，經本計畫研究發現震波可成為一種新血液製劑滅菌方法。震波因其破壞蛋白質活性較少，在本實驗室提供震波強度(10kV 以下能量)，血液製劑內病原體個數在  $10^6$  左右下，震波滅菌是可行的方法。而對比劑可幫助其震波滅菌功能，未來可運用 liposomes 為對比劑，使得震波滅菌可能成為腫瘤治療之新方法。

## 参考文献

1. David A, et al., Quantization of shock wave cavitation damage in vitro. Miller DL, Thomas RM, The role of cavitation in the induction. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 23(3):461- 471,1997.
2. Shiping B, et al., In vivo transaction of melanoma cells by lithotripter shock waves. *Cancer Research*.58:219-221,1998
3. Feigl T, et al., Biophysical effects of high-energy pulsed ultrasound on human cell. *Ultrasound in Medicine and Biology*.22(9)1267-1275,1996.
4. Gambihler S, et al., Biological effects of shock wave: cell disruption, viability, and proliferation of L1210 cell exposed to shock wave in vitro. *Ultrasound in Medicine and Biology*.16(6):587-594,1990.
5. Pulcinelli FM, et al., Blood cellular and biochemical changes after extracorporeal shock wave lithotripsy. *Urological Research*. 18(1):49-51,1990.
6. Kohri K, et al., Effect of high-energy shock waves on tumor cells. *Urological Research*. 18(2):101-105,1990.
7. Holmes RP, et al. , Altered neutrophil permeability following shock wave exposure in vitro. *Journal of. Urology*. 147(3):733-737,1992.
8. Lauer U, et al., Shock wave permeabilization as a new gene transfer method.  
*Gene Therapy* 4(7):710-715,1997.
9. Reid G, et al., Effect of extracorporeal shock wave lithotripsy on bacterial viability. Relationship to the treatment of struvite stones. *Urological Research* 18(6):427,1990.
10. Burnouf RM, et al., Biochemical and physical properties of a solvent-detergent treated fibrin glue, *Vox Sanguinis*. 58(2):77-84,1990.
11. Wieding JU, et al., Inactivation of viruses in fresh-frozen plasma, *Annals of Hematology*. 67(6):259-266,1993

12. Danny H, Bradford S., In vitro study of the mechanical effects of shock-wave lithotripsy. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 23(7):1107-1122,1997.
13. Miller DL, Thomas RM, The role of cavitation in the induction of cellular DNA damage by ultrasound and lithotripter shock wave in vitro. *Ultrasound in Medicine and Biology* .22:681-687,1996.
14. Dalecki D, et al., Hemolysis in vivo from exposure to pulsed ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 23(2):307-313,1997.
15. Barry B, et al., Galactose-based intravenous sonographic contrast agent: experimental studies. *Journal of Ultrasound in Medicine*. 12:463-470,1993.
16. Douglas L, et al., Contrast-agent gas bodies enhance hemolysis induced by lithotripter shock waves and high-intensity focused ultrasound in whole blood. *Ultrasound in Medicine and Biology* 22:1089-1095,1996.
17. Andrew A, et al., Hemolysis of 40% hematocrit, Albunex-supplemented human erythrocytes by pulsed ultrasound: frequency, acoustic pressure and pulse length dependence. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 23(8):1237-1250,1997.
18. Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL. Jr,et al. Preparation and properties of serum and plasma protein.IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissue and fluids. *J Am. Chem.Soc.*1946 ; 68,459
19. Barni, S., and Gerzeli, G., (1985) Comparative aspects of circulating erythrocytes in the trophic and reproductive phases of European eel. Ultrastructure and cytochemistry. *Biol. Cell*, 54(3):261-269.
20. Carrol, M., and McCrorie, P., (1987) Glycoproteins of trypanosomes: their biosynthesis and biological significance. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 88(1):7-12.

表一、以氣球為容器細菌量

Test case		1	2	3
Number of bacteria		$1.30 \times 10^6$	$1.40 \times 10^6$	$1.34 \times 10^6$
Number of bacteria after 900 shocks	4kV	無實施	無實施	無實施
	5 kV	無實施	無實施	無實施
	6 kV	無實施	無實施	無實施
	7 kV	無實施	無實施	無實施
	8 kV	$8.0 \times 10^6$	$1.68 \times 10^6$	$1.42 \times 10^6$
	9 kV	$7.38 \times 10^6$	$9.40 \times 10^6$	$8.88 \times 10^6$

表二、以氣球與 PS 試管為容器細菌量

Test case		1	2	3
Number of bacteria		$1.36 \times 10^6$	$8 \times 10^5$	$1.1 \times 10^6$
Number of bacteria after 900 shocks	4 kV	$3.1 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6$	$3.6 \times 10^6$
	5 kV	$3.6 \times 10^6$	$3.3 \times 10^6$	$2.9 \times 10^6$
	6 kV	$4.3 \times 10^6$	$4.7 \times 10^6$	$5.7 \times 10^6$
	7 kV	$3.4 \times 10^6$	$3.7 \times 10^6$	$3.6 \times 10^6$
	8 kV	$3.9 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6$
	9 kV	無實施	無實施	無實施

表三、以 15mlPP 為容器細菌量

Test case		1	2	3
Number of bacteria		$7.3 \times 10^6$	$6.7 \times 10^6$	$6.1 \times 10^6$
Number of bacteria after 900 shocks	4 kV	$5.9 \times 10^6$	$5.8 \times 10^6$	$5.4 \times 10^6$
	5 kV	$1.1 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$
	6 kV	$3.6 \times 10^6$	$3.1 \times 10^6$	$3.4 \times 10^6$
	7 kV	$4.0 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$
	8 kV	無實施	無實施	無實施
	9 kV	無實施	無實施	無實施

表四、以 15mlPP 為容器細菌量

Test case		1	2	3
Number of bacteria		$3.15 \times 10^6$	$3.24 \times 10^6$	$3.41 \times 10^6$
Number of bacteria after 500 shocks	4 kV	$2.05 \times 10^6$	$2.13 \times 10^6$	$2.37 \times 10^6$
	5 kV	$5.78 \times 10^5$	$7.64 \times 10^5$	$1.32 \times 10^7$
	6 kV	$5.45 \times 10^4$	$6.39 \times 10^4$	$5.68 \times 10^4$
	7 kV	無實施	無實施	無實施
	8 kV	無實施	無實施	無實施
	9 kV	無實施	無實施	無實施

表五、以 50mlPP 為容器細菌量

Test case		1	2	3
Number of bacteria		$1.47 \times 10^6$	$1.23 \times 10^6$	$1.35 \times 10^6$
Number of bacteria after 900 shocks	4 kV	無實施	無實施	無實施
	5 kV	無實施	無實施	無實施
	6 kV	$1.8 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$
	7 kV	$1.3 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$
	8 kV	$1.1 \times 10^4$	$5.0 \times 10^3$	$5.0 \times 10^3$
	9 kV	$<1.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$

表六、以 15mlPS 為容器細菌量

Test case		1	2	3
Number of bacteria		$6.17 \times 10^6$	$6.12 \times 10^6$	$6.21 \times 10^6$
Number of bacteria after 500 shocks	4 kV	$4.67 \times 10^6$	$4.38 \times 10^6$	$3.65 \times 10^6$
	5 kV	$2.13 \times 10^6$	$1.79 \times 10^6$	$1.80 \times 10^6$
	6 kV	$1.92 \times 10^6$	$2.10 \times 10^6$	$2.05 \times 10^6$
	7 kV	$3.8 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$	$3.0 \times 10^5$
	8 kV	$2.8 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	$2.3 \times 10^4$
	9 kV	$6.7 \times 10^4$	$6.3 \times 10^4$	$5.9 \times 10^4$

表七、以 1.5mlEppendorff tube 為容器細菌量

Test case		1	2
Number of bacteria		$1.3 \times 10^6$	$1.8 \times 10^6$
Number of bacteria after 900 shocks	4 kV	$3.7 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$
	5 kV	$3.8 \times 10^6$	$1.0 \times 10^5$
	6 kV	$12.3 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$
	7 kV	$1.3 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$
	8 kV	$4.9 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$
	9 kV	$4.8 \times 10^6$	$2.0 \times 10^5$

表八 PE 吸管為容器細菌量

Test case		1	2	3	4	5
Number of bacteria		$7.59 \times 10^6$	$6.74 \times 10^6$	$7.21 \times 10^6$	$2.70 \times 10^7$	$2.02 \times 10^7$
Number of bacteria after 900 shocks	4 kV	$2.60 \times 10^6$	$2.34 \times 10^6$	$2.65 \times 10^6$	無實施	無實施
	5 kV	$1.3 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$5.0 \times 10^4$	$1.4 \times 10^4$
	6 kV	$<1.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$
	7 kV	無實施	無實施	無實施	$2.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$
	8 kV	無實施	無實施	無實施	$2.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$
	9 kV	無實施	無實施	無實施	無實施	無實施

表九、在 PE 吸管下用不同電壓與打擊 200 次細菌變化存活

Test case		1	2	3
Control				
No. of Bacteria survival		1.90 x10 <sup>6</sup>	2.00 x10 <sup>6</sup>	2.41x10 <sup>6</sup>
200 shocks	4kV	1.67 x10 <sup>6</sup>	1.80 x10 <sup>6</sup>	2.12 x10 <sup>6</sup>
	5kV	7.5 x10 <sup>5</sup>	8.0 x10 <sup>5</sup>	9.0 x10 <sup>5</sup>
	6kV	4.0x10 <sup>5</sup>	7.0 x10 <sup>5</sup>	7.2 x10 <sup>5</sup>
	7kV	3.1 x10 <sup>5</sup>	3.5 x10 <sup>5</sup>	3.7 x10 <sup>5</sup>
	8kV	1.33 x10 <sup>4</sup>	1.20 x10 <sup>4</sup>	1.25 x10 <sup>4</sup>
	9kV	4.0 x10 <sup>3</sup>	3.0 x10 <sup>3</sup>	3.0 x10 <sup>3</sup>

表十、在 PE 吸管下用不同電壓與打擊 400 次細菌變化存活

Test case		1	2	3
control				
No. of Bacteria survival		1.90 x10 <sup>6</sup>	2.00 x10 <sup>6</sup>	2.41x10 <sup>6</sup>
400 shocks	4kV	1.78 x10 <sup>6</sup>	1.91 x10 <sup>6</sup>	2.12 x10 <sup>6</sup>
	5kV	1.0x10 <sup>5</sup>	1.0 x10 <sup>5</sup>	1.2 x10 <sup>4</sup>
	6kV	5.0 x10 <sup>3</sup>	3.0 x10 <sup>3</sup>	2.0 x10 <sup>3</sup>
	7kV	5.2 x10 <sup>4</sup>	2.8 x10 <sup>4</sup>	1.7 x10 <sup>4</sup>
	8kV	1.8 x10 <sup>4</sup>	3.59 x10 <sup>4</sup>	3.6 x10 <sup>4</sup>
	9kV	4.0 x10 <sup>4</sup>	3.0 x10 <sup>4</sup>	3.0 x10 <sup>4</sup>

表十一、在 PE 吸管下用不同電壓與打擊 600 次細菌變化存活

Test case		1	2	3
control				
No. of Bacteria survival		1.90 x10 <sup>6</sup>	2.00 x10 <sup>6</sup>	2.41x10 <sup>6</sup>
600 shocks	4kV	1.67 x10 <sup>6</sup>	1.80 x10 <sup>6</sup>	2.12 x10 <sup>6</sup>
	5kV	7.5 x10 <sup>5</sup>	8.0 x10 <sup>5</sup>	9.0 x10 <sup>5</sup>
	6kV	1.0x10 <sup>4</sup>	1.2 x10 <sup>4</sup>	1.3 x10 <sup>4</sup>
	7kV	4.0x10 <sup>4</sup>	4.7x10 <sup>4</sup>	3.6 x10 <sup>4</sup>
	8kV	1.0 x10 <sup>3</sup>	2.0 x10 <sup>3</sup>	1.0x10 <sup>3</sup>
	9kV	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	1.0 x10 <sup>3</sup>

表十二、在 PE 吸管下用不同電壓與打擊 800 次細菌變化存活

Test case		1	2	3
control				
No. of Bacteria survival		1.90 x10 <sup>6</sup>	2.00 x10 <sup>6</sup>	2.41x10 <sup>6</sup>
800 shocks	4kV	1.60 x10 <sup>6</sup>	1.71 x10 <sup>6</sup>	2.03 x10 <sup>6</sup>
	5kV	7.5 x10 <sup>5</sup>	8.0 x10 <sup>5</sup>	9.0 x10 <sup>5</sup>
	6kV	7.0x10 <sup>4</sup>	1.0 x10 <sup>4</sup>	3.0 x10 <sup>4</sup>
	7kV	1.2 x10 <sup>4</sup>	1.1 x10 <sup>4</sup>	1.6 x10 <sup>4</sup>
	8kV	<1.0x10 <sup>3</sup>	2.2 x10 <sup>4</sup>	1.0x10 <sup>3</sup>
	9kV	1.0x10 <sup>3</sup>	1.0 x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>

表十三、在 PE 吸管下用不同電壓與打擊 1000 次細菌變化存活

Test case		1	2	3
control				
No. of Bacteria survival		1.90 x10 <sup>6</sup>	2.00 x10 <sup>6</sup>	2.41x10 <sup>6</sup>
1000 shocks	4kV	1.58 x10 <sup>6</sup>	1.88 x10 <sup>6</sup>	1.92 x10 <sup>6</sup>
	5kV	2.0 x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>
	6kV	4.0x10 <sup>4</sup>	5.0 x10 <sup>4</sup>	6.0 x10 <sup>4</sup>
	7kV	6.0 x10 <sup>4</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	2.0 x10 <sup>4</sup>
	8kV	1.0 x10 <sup>3</sup>	1.0 x10 <sup>3</sup>	3.0 x10 <sup>3</sup>
	9kV	1.5 x10 <sup>4</sup>	1.6 x10 <sup>4</sup>	2.3 x10 <sup>4</sup>

表十四、細菌冷藏 4°C 二星期在放入 PE 吸管

Test case		1	2	3
Number of bacteria		1.51x10 <sup>6</sup>	1.63x10 <sup>6</sup>	1.55x10 <sup>6</sup>
900 shocks	4 kV	2.0x10 <sup>3</sup>	3.0x10 <sup>3</sup>	1.0x10 <sup>3</sup>
	5 kV	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>
	6 kV	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>
	7 kV	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>
	8 kV	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>
	9 kV	無實施	無實施	無實施

表十四、細菌冷藏 4°C 二星期在放入 PE 吸管

Test case		1	2	3
Number of bacteria		1.51x10 <sup>6</sup>	1.63x10 <sup>6</sup>	1.55x10 <sup>6</sup>
900 shocks	4 kV	2.0x10 <sup>3</sup>	3.0x10 <sup>3</sup>	1.0x10 <sup>3</sup>
	5 kV	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>
	6 kV	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>
	7 kV	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>
	8 kV	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>
	9 kV	無實施	無實施	無實施

表十五、E. Coli 1.5Hz 不同電壓下不同次數的細菌量

Test case		1	2	3	mean(個)
Number of bacteria		1.60E+06	1.58E+06	1.62E+06	1.60E+06
400 shocks	9 kV	< 1.00E+03	< 1.00E+03	< 1.00E+03	< 1.00E+03
	8 kV	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	< 1.00E+03
	7 kV	< 1.00E+03	< 1.00E+03	< 1.00E+03	< 1.00E+03

表十六、Klebisella pneumonias. 9kV 在吸管密封下關閉, 頻率為 1Hz 細菌量

Test case		1	2	3	mean
Number of bacteria		1.08E+07	1.68E+07	1.52E+07	1.43E+07
Number of shocks	600	2.52E+06	2.80E+06	1.20E+06	2.17E+06
	120	7.52E+04	6.52E+04	8.32E+04	7.45E+04
	1500	1.90E+05	9.35E+04	8.63E+04	1.23E+05

表十七、*Klebisella pneumonias* 在 9kV 下吸管有扎孔,頻率為 1Hz 細菌量

Test case		1	2	3	mean
Number of bacteria		3.20E+07	3.90E+07	4.10E+07	3.73E+07
Number of shocks	600	4.10E+05	7.33E+05	7.00E+05	6.14E+05
	1200	6.10E+02	5.10E+02	6.70E+02	5.97E+02
	1500	8.00E+05	7.00E+04	6.00E+05	4.90E+05

表十八、*Klebisella pneumonias* 9kV 1.5Hz 細菌量

Test case		1	2	3	mean
Number of bacteria		8.50E+07	9.50E+07	6.30E+07	8.10E+07
Number of shocks	600	4.00E+05	5.30E+05	3.60E+05	4.30E+05
	600+10 % 對比劑	6.00E+05	8.90E+05	5.20E+05	6.70E+05
	1200	7.40E+03	5.80E+03	9.60E+03	7.60E+03
	1200+10 % 對比劑	6.00E+05	5.80E+05	2.30E+05	4.70E+05

表十九、Staphylococci auerus 1.5Hz 細菌量

Test case		1	2	3	mean
Number of bacteria		6.00E+07	1.00E+08	9.00E+07	8.33E+07
200 shocks	4kV	1.00E+08	1.30E+08	1.20E+08	1.17E+08
	5kV	1.00E+08	1.30E+08	1.20E+08	1.17E+08
Number of shocks (5kV)	600	1.32E+06	1.41E+06	1.47E+06	1.68E+06
	400	1.00E+06	1.05E+06	9.73E+05	8.70E+05
	800	4.00E+06	1.54E+06	1.39E+06	2.31E+06

表二十、Bacillus.spp. 在 9kV, 1290 次震波下, 1.00E+01 稀釋細菌量

Test case	1	2	3	mean
Number of bacteria	2.48E+07	6.10E+07	5.20E+07	4.59E+07
NaCl (1830)	2.92E+05	1.07E+05	2.00E+05	2.00E+05
Fibrinogen	5.00E+050	2.00W+05	2.00E+5	2.87E+05

表二十一、Bacillus.spp. 在 9kV, 2200 次震波下, 1.00E+01 稀釋細菌量

Test case	1	2	3	mean
Number of bacteria	2.48E+07	6.10E+07	5.20E+07	4.59E+07
Fibrinogen	1.70E+04	1.60E+04	1.51E+04	1.60E+04

表二十二、Bacillus.spp. 在 9KkV, 2200 次震波下, 1.00E+02 稀釋細菌量

Test case	1	2	3	mean
Number of bacteria	3.45E+06	5.12E+06	4.79E+06	4.45E+06
NaCl (1830)	3.45E+06	5.12E+06	4.79E+06	4.45E+06
Fibrinogen	7.62E+03	7.60E+03	8.40E+03	7.87E+03
NaCl	2.56E+04	9.32E+04	7.89E+04	6.59E+04

表二十三、Bacillus.spp. 在 9kV, 2200 次震波下, 1.00E+03 稀釋細菌量

Test case	1	2	3	mean
Number of bacteria	2.05E+06	1.02E+06	2.09E+06	1.72E+06
NaCl (1830)	5.32E+03	5.20E+03	5.42E+03	5.31E+03
Fibrinogen	1.04E+03	1.05E+03	1.10E+03	1.06E+03
NaCl	2.56E+04	9.32E+04	7.89E+04	6.59E+04

表二十四、Bacillus.spp. 在 9KkV, 2200 次震波下, 1.00E+04 細菌量

Test case	1	2	3	mean
Number of bacteria	3.70E+06	3.00E+06	6.00E+06	4.23E+06
NaCl (1830)	1.14E+04	1.61E+04	8.30E+04	3.68E+04

表二十五、Bacillus.spp. 在 9kV, 2200 次震波下, 1.00E+05 細菌量

Test case	1	2	3	mean
Number of bacteria	1.50E+06	1.38E+06		1.44E+06
Fibrinogen	3.68E+03	3.30E+03	3.40E+03	3.46E+03
NaCl	2.70E+03	2.98E+03	2.50E+03	2.73E+03

表二十六、Bacillus.spp. 在 9kV, 2200 次震波下, 1.00E+06 細菌量

Test case	1	2	3	mean
Number of bacteria	1.00E+04	2.00E+04	3.00E+04	2.00E+04
NaCl	3.60E+02	3.30E+02	3.00E+02	3.30E+02

表二十七、Bacillus. 在 9kV, 1300 次震波下, 1.00E+08 細菌量

Test case	1	2	3	mean
Number of bacteria	6.35E+03	4.25E+03	3.78E+03	4.79E+03
Fibrinogen	1.33E+03	7.50E+02	8.90E+02	9.90E+02
NaCl	9.00E+02	7.10E+02	8.40E+02	8.17E+02

表二十八、Bacillus. 在 10kV 下細菌量

Test case	1	2	3	mean
Number of bacteria	1.10E+05	1.30E+05	2.10E+05	1.50E+05
60 (次震波)	1.33E+03	7.50E+02	8.90E+02	9.90E+02
120	11000	13000	14000	1.27E+04
240	20000	18000	21000	1.97E+04
480	340	380	350	3.57E+02
1000	350	310	320	3.27E+02
1500	<10	<10	<10	<10
2000	<10	<10	<10	<10

表二十九、Bacillus. 在 10kV, 1% optison 下細菌量

Test case	1	2	3	mean
Number of bacteria	1.10E+05	1.30E+05	2.10E+05	1.50E+05
60 (次震波)	4000	3920	4150	4.02E+03
120	5800	6000	6120	5.97E+03
240	2220	2150	2410	2.26E+03
480	1530	1720	1260	1.50E+03
1000	1640	1860	1510	1640
1500	20	30	10	20
2000	50	40	30	50

表三十、Bacillus. 在 10kV, 0.1% optison 下細菌量

Test case	1	2	3	mean
Number of bacteria	1.10E+05	1.30E+05	2.10E+05	1.50E+05
60 (次震波)	1.10E+05	1.30E+05	2.10E+05	1.50E+05
120	5820	6000	5600	5.81E+03
240	270	420	350	3.47E+02
480	980	1010	650	8.80E+02
1000	9000	9000	8650	8.88E+03
1500	2150	2220	2200	2.19E+03
2000	400	600	500	5.00E+02

表三十一、Neisseria 在 5kV 下細菌量

Test case	1	2	3	mean(個)
Number of bacteria	5.86E+08	5.84E+08	5.87E+08	5.86E+08
60 (次震波)	6.60E+06	7.42E+06	6.80E+06	6.94E+06
120	1.40E+05	1.00E+05	7.00E+04	1.03E+05
240	1.20E+06	9.40E+05	1.02E+06	1.05E+06
480	2.40E+03	1.40E+03	1.60E+03	1.80E+03
1000	200	300	150	2.17E+02
1500	298	302	312	3.04E+02
2000	1175	987	1012	1.06E+03

表三十二、Neisseria 在 6kV 下細菌量

Test case	1	2	3	mean(個)
Number of bacteria	5.86E+08	5.84E+08	5.87E+08	5.86E+08
60 (次震波)	9.20E+05	1.31E+06	1.25E+06	1.16E+06
120	3.67E+05	2.58E+05	2.12E+05	2.79E+05
240	6.00E+04	1.30E+05	6.90E+04	8.63E+04
480	2.40E+03	1.40E+03	1.60E+03	1.80E+03
1000	200	300	150	2.17E+02
1500	587	569	270	4.75E+02
2000	10	20	2	1.07E+01

表三十三、Neisseria 在 7kV 下細菌量

Test case	1	2	3	mean(個)
Number of bacteria	1.90E+07	1.60E+07	2.50E+07	2.00E+07
60 (次震波)	9.20E+05	1.31E+06	1.25E+06	1.16E+06
120	6.00E+04	9.00E+04	5.00E+04	6.67E+04
240	2.30E+01	2.20E+01	2.40E+01	2.30E+01
480	1.50E+01	9.00E+00	1.20E+01	1.20E+01
1000	10	11	9	1.00E+01
1500	56	64	80	6.67E+01
2000	20	21	22	2.10E+01

表三十四、血漿中混合菌在 10kV, 1500 次震波, 1Hz 下細菌量

Test case	1	2	3	mean(個)
Number of bacteria	85	75	69	7.63E+01
1.10E+07	1250	1280	1340	1.29E+03
1.10E+07加1% optison	1520	1056	1160	1.25E+03
8.00E+05	118	98	105	1.07E+02
8.00E+05加1% optison	1250	1056	985	1.10E+03
4.60E+04	110	125	132	1.22E+02

表三十五、HSV-1 病毒量 (1200 次震波, 1Hz)

Test case	1	2	3	Mean (個)	
Number of bacteria	6.32E+05	4.00E+05	5.12E+05	1.15E+05	
Number of bacteria after 900 shocks	5 kV	8.50E+04	8.50E+04	9.45E+04	8.28E+04
	6 kV	3.00E+04	2.00E+04	1.00E+04	1.67E+03
	7 kV	2.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	1.33E+03
	8 kV	4.20E+03	7.50E+03	2.00E+03	2.67E+03
	9 kV	4.30E+02	2.20E+02	2.50E+02	2.33E+03

表三十六、Adenovirus 病毒量(6 kV, 1Hz)

Test case	1	2	3	mean(個)
Number of bacteria	720000	815000	658000	731000
60 (次震波)	315000	452000	565000	444000
120	17500	18600	24500	20200
240	6000	8600	6600	7067
480	5000	2600	4800	4133
1000	分析有誤需 重新check			
1500				
2000				

表三十七、Adenovirus 病毒量(7 kV, 1Hz)

Test case	1	2	3	mean(個)
Number of bacteria	720000.00	815000.00	658000.00	731000
60 (次震波)	110000.00	121000.00	165000.00	132000
120	285000.00	225000.00	165000.00	225000
240	120000.00	135000.00	111000.00	122000
480	1500.00	6508.00	1250.00	3086
1000	分析有誤需 重新check			
1500				
2000				

表三十八、Adenovirus 病毒量 (8 kV, 1Hz)

Test case	1	2	3	mean(個)
Number of bacteria	720000	815000	658000	731000
60 (次震波)	485200	584600	685400	585067
120	360000	256800	259800	292200
240	15000	176000	185000	125333
480	14500	4400	6600	8500
1000	5500	6500	4800	5600
1500	2500	3200	3800	3167
2000	720000	815000	658000	731000

表三十九、Adenovirus 病毒量 (9 kV, 1Hz)

Test case	1	2	3	mean(個)
Number of bacteria	550000	1500000	689000	5413000
60 (次震波)	456000	586000	5896100	2312700
120	6100	57000	56000	39700
240	5000	76000	6500	29167
480	1400	2600	1500	1833
1000	890	680	750	773
1500	350	420	380	383
2000	5	10	21	12

表四十、Fibrinogen 量 (5kV, 1Hz)

Test case	1	2	3	mean(sec)
Number of bacteria	35.80	19.70	19.10	25
60 (次震波)	23.90	23.30	23.50	24
120	29.70	17.70	19.10	22
240	27.40	29.50	34.10	30
480	25.30	26.80	29.90	27
1000	26.10	24.50	25.70	25
1500	21.60	23.50	20.60	22
2000	28.5	25.4	21.6	25

表四十一、fibrinogen 量 (6 kV, 1Hz)

Test case	1	2	3	Mean (sec)
Time of fibrinogen activating	17.30	19.70	19.10	19
60 (次震波)	23.50	21.60	18.20	21
120	16.90	19.40	15.00	17
240	21.80	19.40	17.90	20
480	13.70	15.60	14.30	15
1000	15.60	21.30	20.30	19
1500	25.3	24.3	21.3	24
2000	22.6	20.3	20.5	21

表四十二、fibrinogen 量 (7 kV, 1Hz)

Test case	1	2	3	mean(sec)
Time of fibrinogen activating	17.10	20.30	19.60	19
60 (次震波)	18.60	15.30	18.90	18
120	16.90	17.50	16.30	17
240	19.40	15.40	16.50	17
480	18.20	18.90	19.30	19
1000	20	18.5	19	19
1500	18.2	22.5	20.6	20
2000	10.3	16.4	15.6	14

表四十三、Fibrinogen 量 (8 kV, 1Hz)

Test case	1	2	3	mean(sec)
Time of fibrinogen activating	17.50	19.20	17.50	18
60 (次震波)	14.30	16.50	15.10	15
120	17.90	16.20	18.60	18
240	19.10	18.50	18.30	19
480	21.70	13.50	19.50	18
1000	28.7	27.5	24.6	27
1500	22.3	21.9	24.9	23
2000	21.5	23.8	21.2	22

表四十四、Fibrinogen 量 (9 kV, 1Hz)

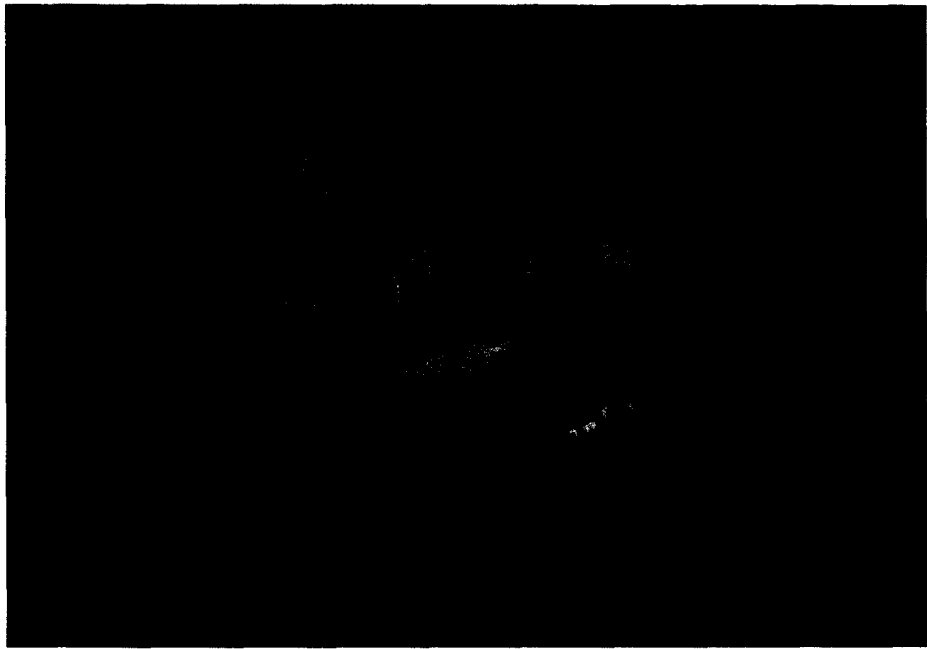
Test case	1	2	3	mean(sec)
Time of fibrinogen activating	15.60	17.20	16.40	16
60 (次震波)	17.90	18.20	16.90	18
120	8.00	23.00	14.30	15
240	20.00	22.30	21.60	21
480	17.50	24.40	18.60	20
1000	24.6	23.4	20.3	23
1500	14.9	20.1	18.5	18
2000	23.6	19.5	21.5	22

表四十五、Fibrinogen 量 (10 kV, 1Hz)

Test case	1	2	3	mean(sec)
Time of fibrinogen activating	16.80	18.50	17.30	18
60 (次震波)	24.90	22.50	25.00	24
120	17.50	28.90	24.60	24
240	19.00	21.50	18.40	20
480	16.20	37.00	29.70	28
1000	45.1	24.6	21.6	30
1500	16.1	31.2	30.8	26
2000	30.1	29.5	31.5	30

表四十六. The remanent rate (percentage) of human erythrocyte (HE), and *Anguilla* erythrocyte (EE) and survival rate of *Trypanosome cruzi* treated by different frequency and strength (kV) of shock wave.

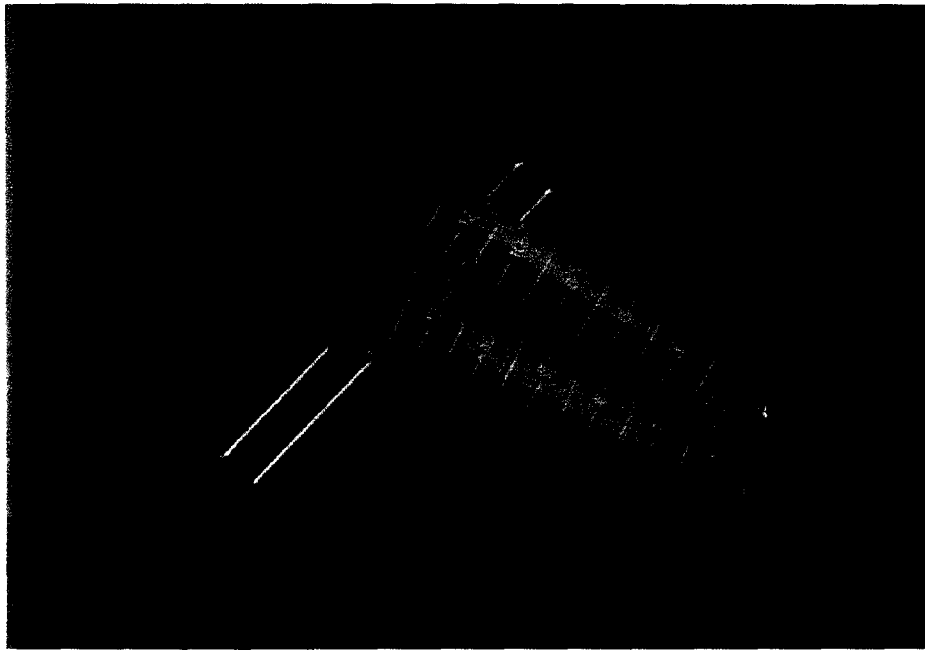
Frequency (times/minute)	7kV			8kV			9kV			10kV		
	HE	EE	TC	HE	EE	TC	HE	EE	TC	HE	EE	TC
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
60	91.6	93.9	65.5	90.4	78.5	67.2	80.1	54.9	58.3	80.3	64.6	41.0
120	84.8	80.3	47.4	58.7	68.8	38.3	66.0	49.0	43.0	71.1	37.1	19.3
240	82.0	78.9	37.2	46.3	64.9	30.3	55.5	29.8	42.3	50.7	30.6	9.8
480	68.5	67.4	25.5	19.7	44.8	9.5	31.7	26.7	7.7	24.2	26.2	9.5
1000	10.9	33.0	12.6	12.4	26.5	3.6	1.7	20.4	4.9	1.5	17.0	7.1
1500	2.9	25.4	6.9	1.7	22.3	3.4	0.0	11.8	2.1	0.0	9.2	6.8
2000	0.0	2.5	6.4	0.0	2.9	3.4	0.0	5.9	0.6	0.0	8.3	3.8



圖一：裝細菌用之氣球容器



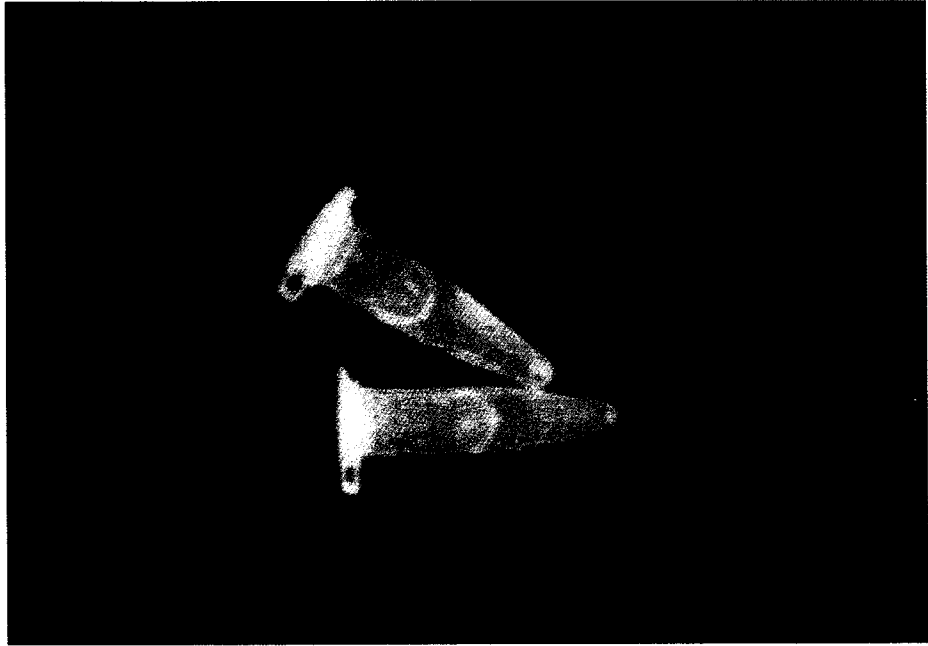
圖二：裝細菌於氣球內並接於 PS 試管



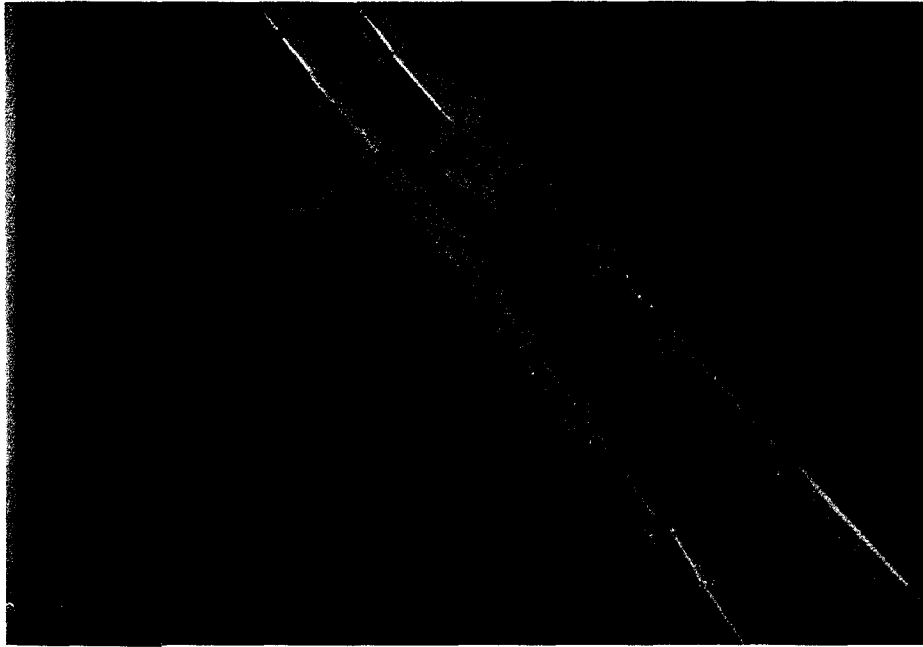
圖三：15ml PP 容器



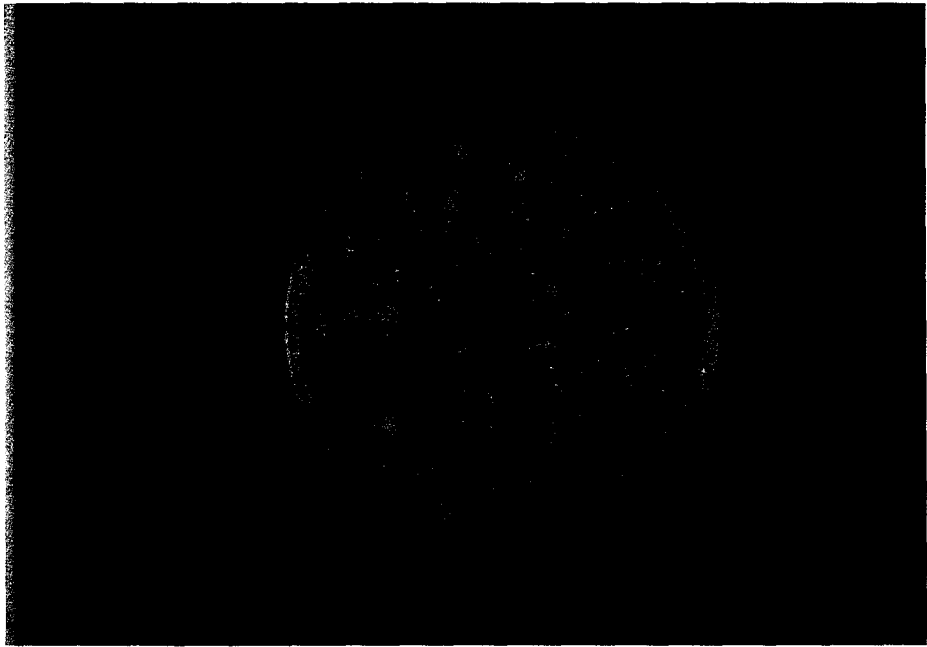
圖四：PS 材質之容器



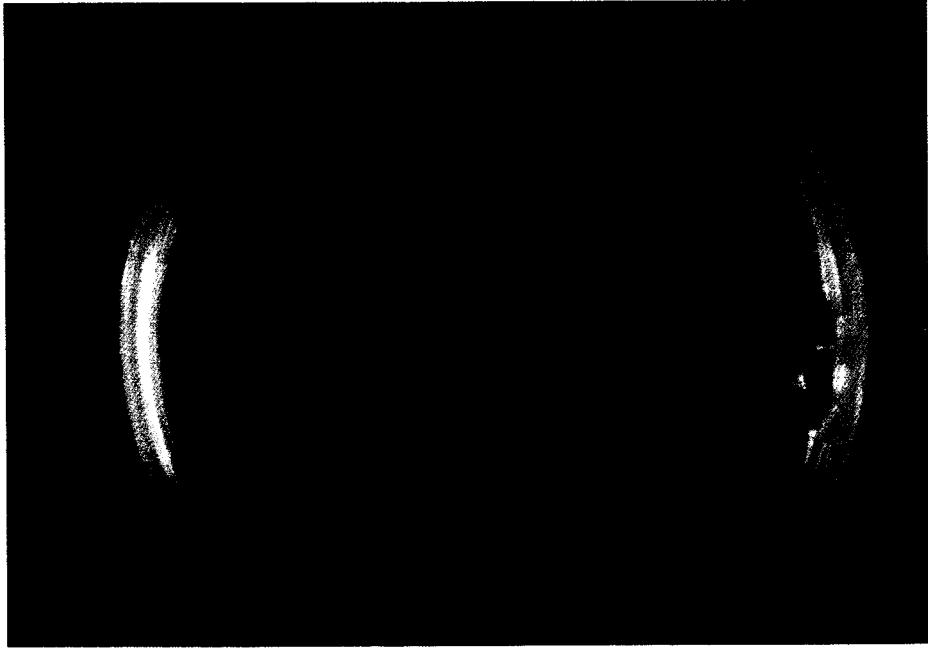
圖五：Eppendorff 試管



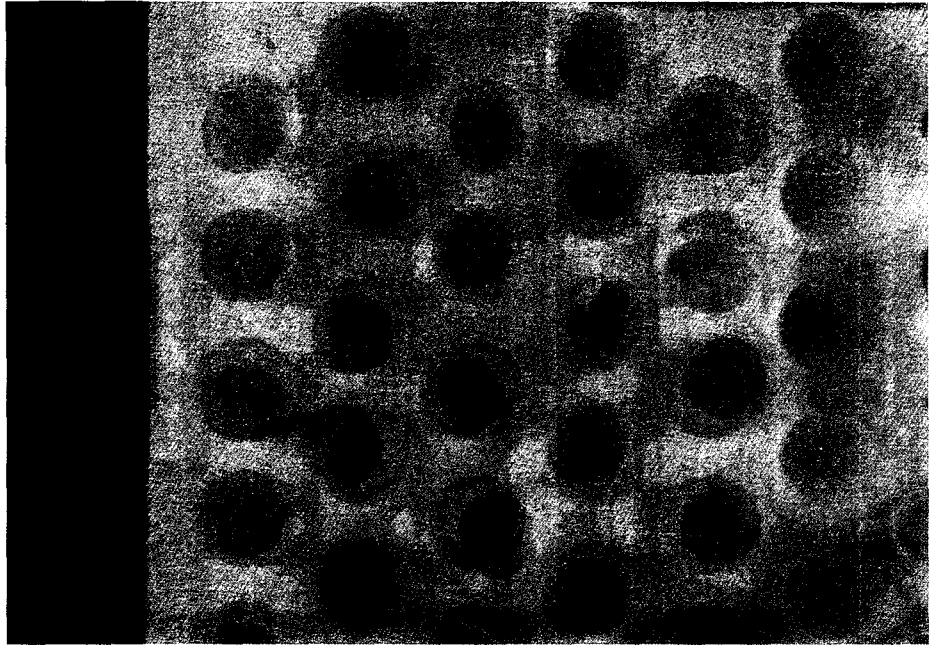
圖六：有吸管頭之 PE 容器



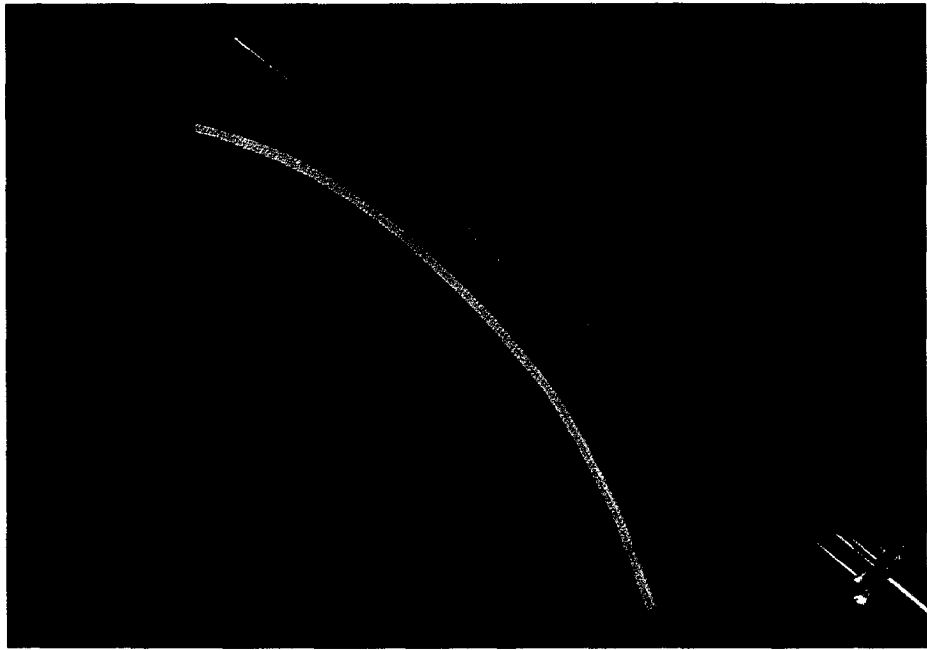
圖七之一：細菌於培養皿中之生長圖



圖七之二：細菌於培養皿中之消滅圖



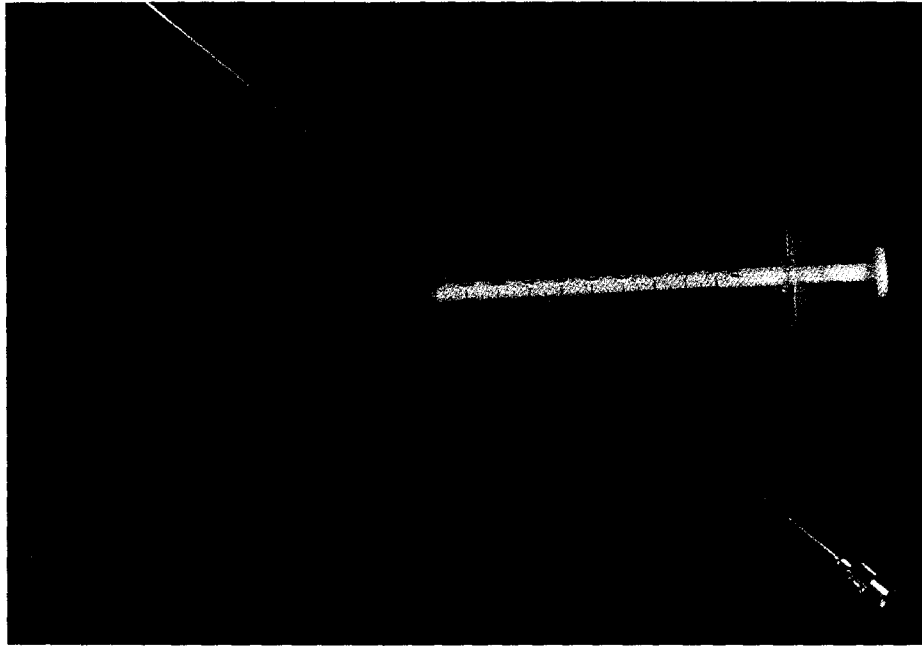
圖八：自管內取出之容液樣本



圖九：Teflon 細管和 HPLC 注射器



圖十：Teflon 細管接吸管



圖十一：長針形金屬管和 1 ml 注射器

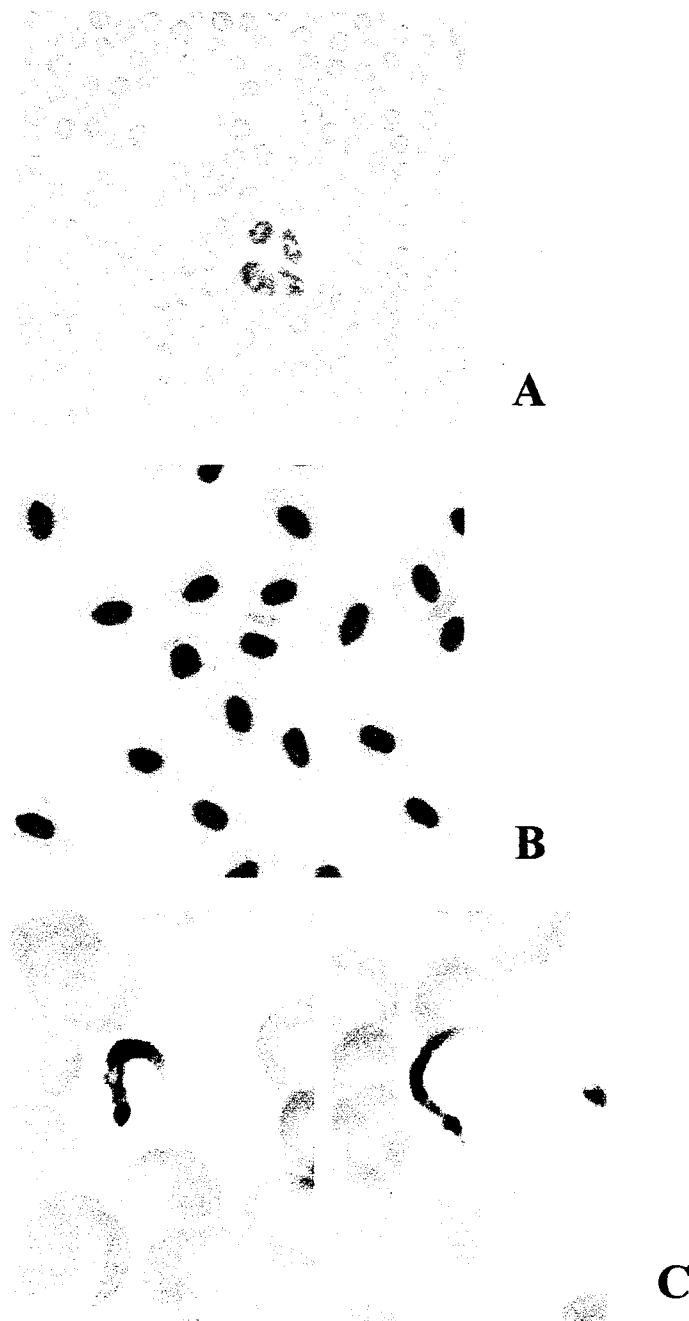
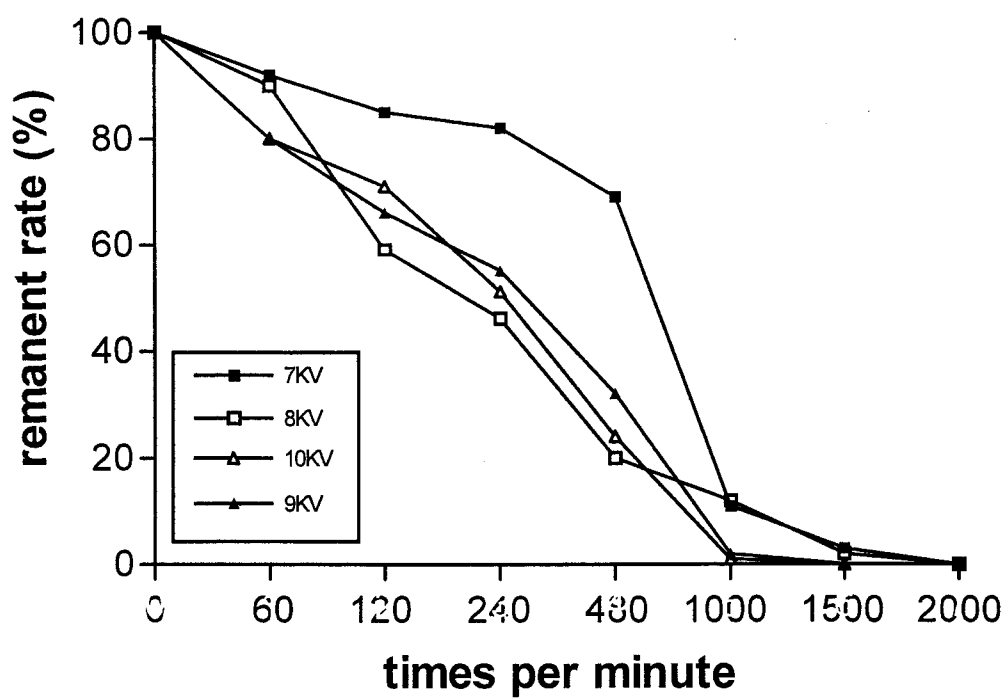
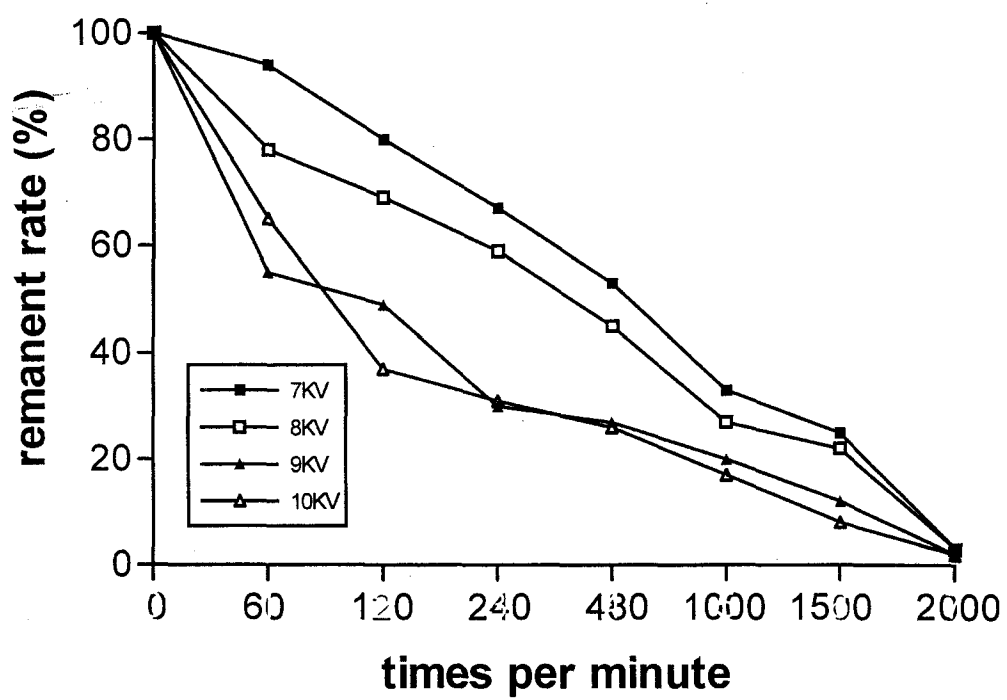


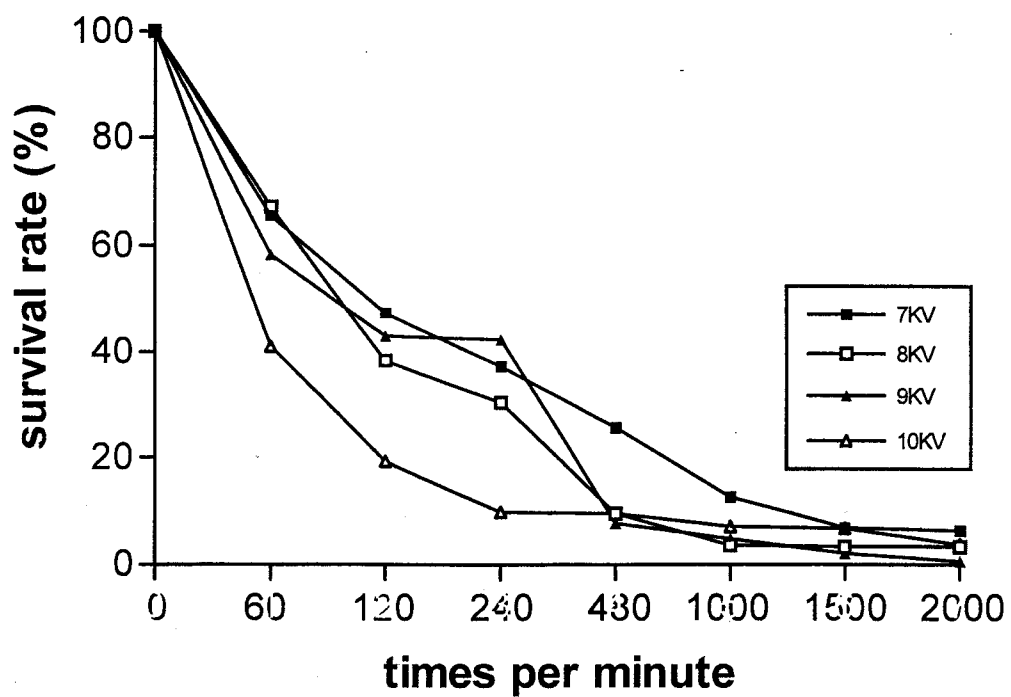
Fig. 12 Three different eukayotes samples applied in the shock wave experiment.  
A: human erythrocytes; B: *Anguilla japonica* (Japanese eel) erythrocytes; C:  
*Trypanosoma cruzi* trypomastigotes (left) and epimastigotes (right), oil  
immersion (Wright's stain).



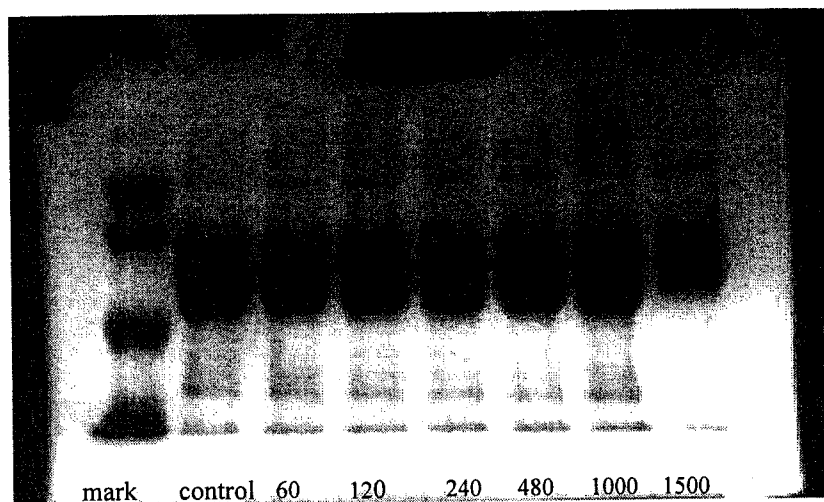
圖十三 The remanent rate (percentage) of human erythrocyte treated by different strength of shock wave.



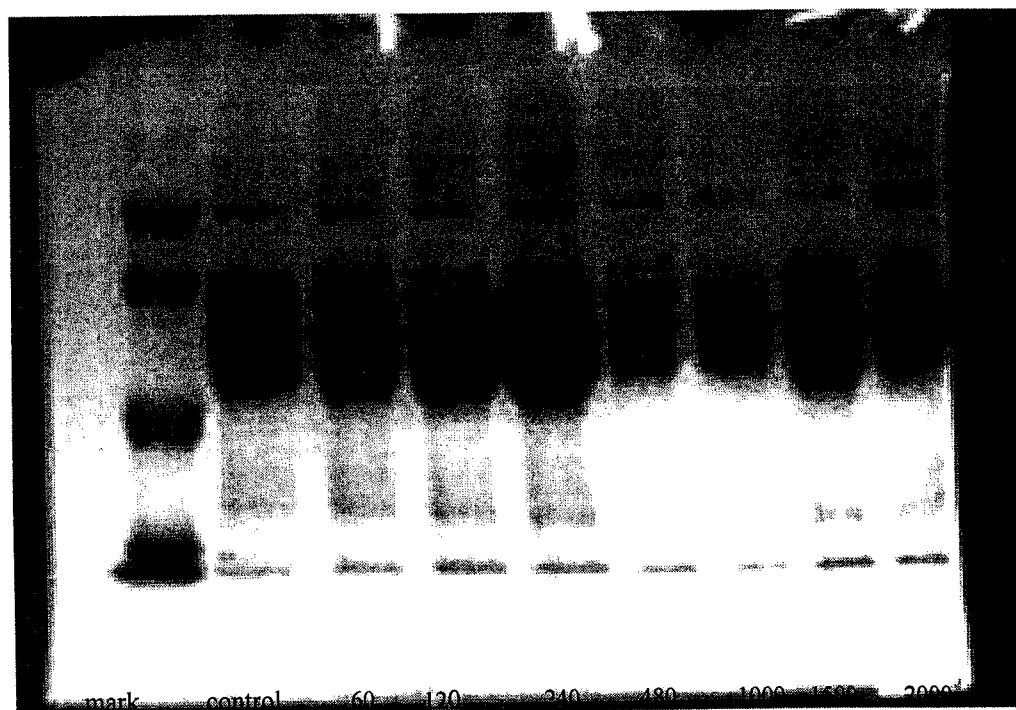
圖十四 The remanent rate (percentage) of *Anguilla japonica* (Japanese eel) erythrocyte treated by different strength of shock wave.



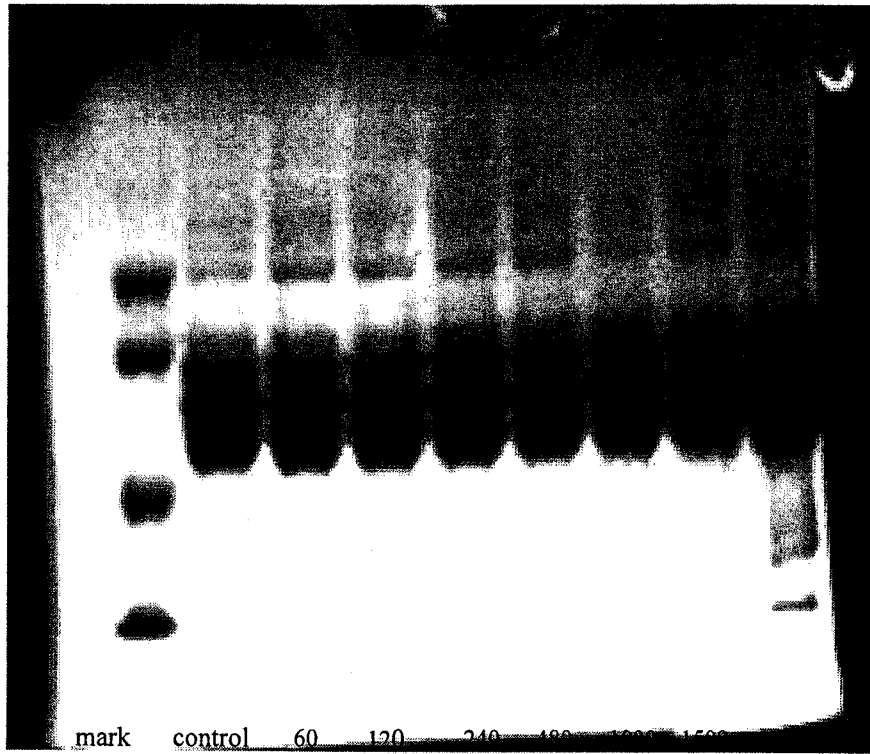
圖十五 The survival rate (percentage) of *Trypanosoma cruzi* treated by different strength of shock wave.



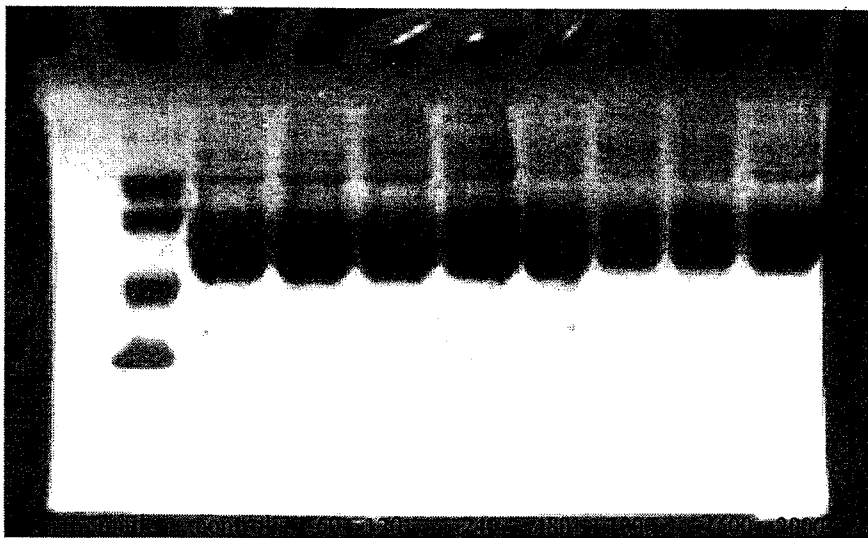
圖十六 以電泳分析在 5kV, 60Hz 震波處理下的 fibrinogen



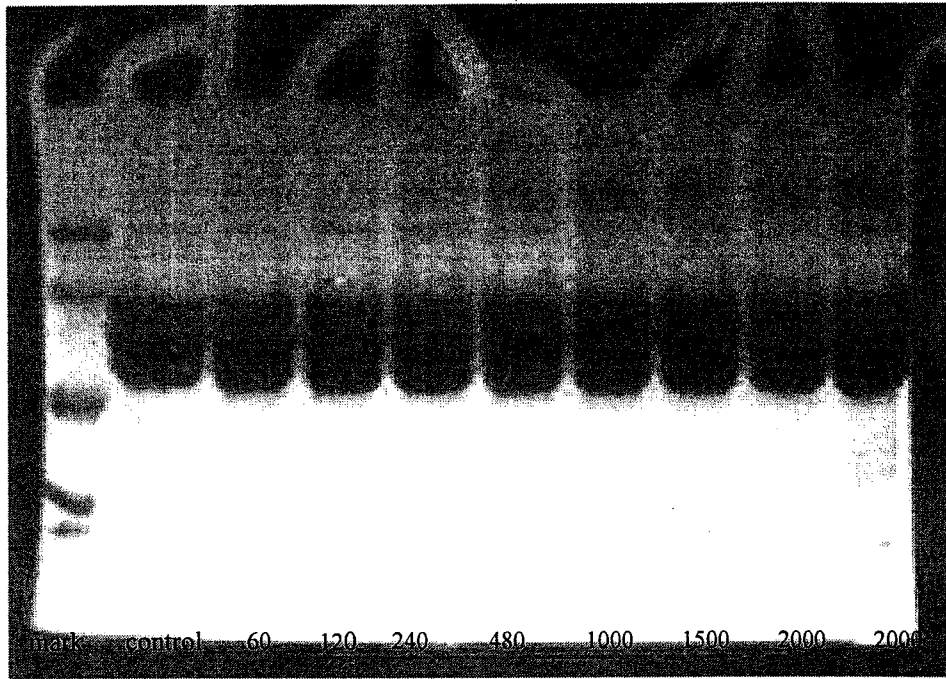
圖十七 以電泳分析在 6kV, 60Hz 震波處理下的 fibrinogen



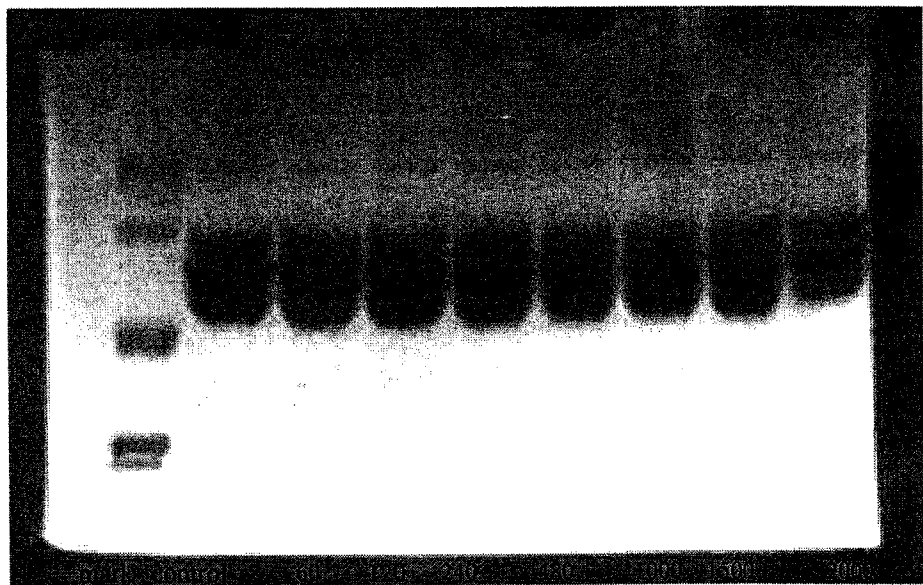
圖十八 以電泳分析在 7kV, 60Hz 震波處理下的 fibrinogen



圖十九 以電泳分析在 8kV, 60Hz 震波處理下的 fibrinogen



圖二十 以電泳分析在 9kV, 60Hz 震波處理下的 fibrinogen



圖二十一以電泳分析在 10kV, 60Hz 震波處理下的 fibrinogen