

によって t-PA の薬効を高めることを目的としているが、その超音波がエダラボンの薬効を減じることがあってはならないと考える。特に使用予定の超音波は 1MHz より低い周波数で生体組織に対する安全性も必ずしも充分には検討されておらず、生体脳組織を用いた評価が不可欠である。

本分担課題の目的は以上の様な現行の神経保護薬投与治療法に対する低周波超音波 (500kHz) 照射が無害であるかその毒性を評価することである。その為具体的には次の *in vitro/in vivo* 実験を行って超音波の無害性を評価する。

まず *in vitro* 実験ではマウスの脳スライス標本を作成し数週間培養した、言わば脳機能の生きている器官培養標本を用い、これを 5%O₂ の擬似虚血状態下に置いて神経保護薬エダラボンの投与と低周波超音波照射を行い、細胞死亡率 (死細胞数など) を以って評価することとした。また更に神経芽細胞に対しても同様の負荷試験を行い、超音波のエダラボンに対する効果を細胞培養障害を持って評価した。この様な *in vitro* 実験に比べより臨床に近いラット脳梗塞モ

デルを用いて超音波の無害性を検証した。すなわち、虚血脳梗塞モデルを作成後、血栓栓子を除去して再還流状態を作り、その血流再開直後の有効性が最も高いといわれるエダラボンを投与すると同時に経頭蓋的に超音波を照射し脳梗塞容積を以って評価した。

神経学的な意味でその障害の明らかとなる 7 日後に *in vitro/in vivo* 両実験共に行った。また超音波照射条件として現在考えている最大出力状態を診断用超音波装置の安全限界音響強度 0.72W/cm² と等しい値とした。本経頭蓋超音波の最大限界を初期臨床応用では診断装置の安全限界値と等しいところからスタートすべきと考えているからである。

B. 研究方法

B-1 マウス脳器官培養スライスを用いた *in vitro* 実験

t-PA 及びエダラボン (薬剤) と超音波 (US) の複合作用が虚血再灌流時の中枢神経系に及ぼす影響を下表 1 の群間で比較することにより検討した。

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	death control
低酸素	非処理				5% O ₂ に 1 時間留置				2%パラフォルムアルデヒド処理
薬剤	非添加		添加		非添加		添加		
US	非照射	照射	非照射	照射	非照射	照射	非照射	照射	

表 1. 比較群 1

(1) 脳器官培養スライスの作成法

生後 3 日以内の新生児マウスから大脳を摘出し、マイクロスライサーを用いて厚さ 350 μm にスライスした。これをフィルター

に乗せ、スライスが培地と空気の両方に接触した状態にして 6 ウェルプレートで培養した。スライス時に傷害を受けた細胞がスライスから除去されるまで 4 週間培養した。

(2) 低酸素条件

正常モデルは培養状態 (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂) から直接超音波照射 / 非照射を行い、低酸素モデルは実験を行う前に (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) 条件下で1時間インキュベートした後直接超音波照射 / 非照射を行った。

(3) 超音波照射条件

直径 5 mm の超音波プローブを用い、周波数 490 kHz、出力 0.72 W/cm² の連続波を照射した。2 分間照射 30 秒休止を 4 回繰り返し、これを 1 セットとして、各々のサンプルに対して 4 セット計 1 時間ずつ超音波を照射した。照射方法は 37℃ の恒温槽の水面に 6 ウェルプレート を固定して、プレートの下面からプレートとフィルターを通して超音波を照射した。

(4) 薬剤投与条件

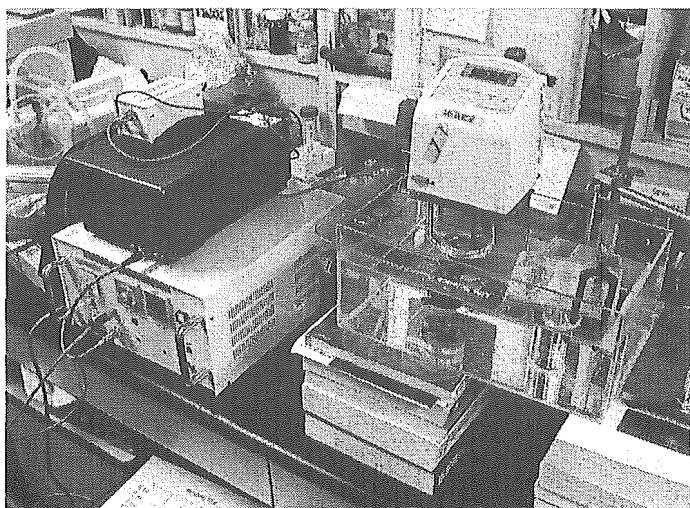
tPA は 5000 U/ml, エダラボンは 6 μM で使用し、tPA, エダラボンの投与は超音波照射 / 非照射の直前とした。

(5) 細胞死の評価方法

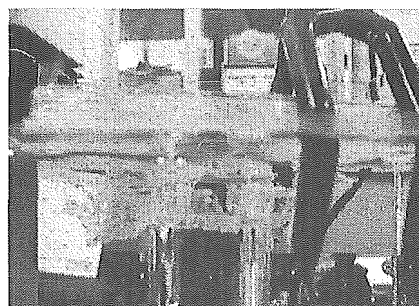
ラット海馬器官培養スライスの実験において広く用いられているプロピディウムイオダイド (PI) 染色法を用いて細胞死の評価を行った。PI は死んで細胞膜に穴の開いた細胞に取り込まれて DNA に結合すると赤色の蛍光を発する。細胞傷害性の低い 1 μM となるように培地に PI を加えて、継続的に細胞死の評価を行った。このスライスを蛍光顕微鏡下で撮影し、赤色のヒストグラムを出して細胞死の程度を評価した。

(6) 統計学的评价法

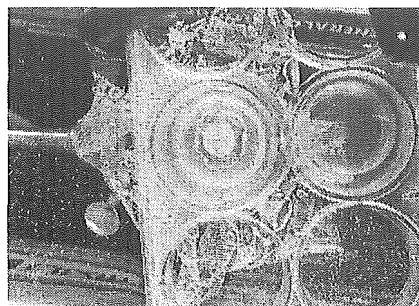
群とも 4 サンプルの実験を行って平均値と標準偏差を算出した。また 3 日後に関しては 3 元の ANOVA 解析で有意差の有無を検定した。



実験装置全景



照射部真横から



照射部真上から

図 1. 脳スライス標本に超音波を照射しているシーン

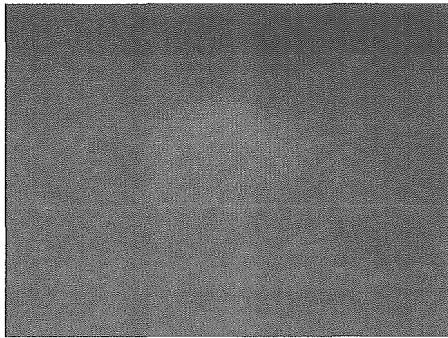


図 2. PI 染色された脳スライス標本
(写真は death control)

B - 2 培養細胞を用いた in vitro 実験

t-PA 及びエダラボン(薬剤)と超音波(US)の複合作用が及ぼす影響を培養細胞を用いて表 1 の群間で比較することにより検討した。

(1) 対象

ヒト神経芽細胞腫由来 SK-N-MC 細胞及び正常ヒト血管内皮細胞由来 HU-VEC 細胞を対象とした。

(2) 細胞死の評価方法

アポトーシスした細胞は染色体 DNA が細分化され、無数の DNA 断片が生じる。この DNA 断片を標識する TUNEL 法を用いた。超音波照射、非照射終了後に細胞を引き続いて 3 日間、アポトーシス細胞において DNA が完全に細分化されるまで培養した。3 日後にアポトーシス細胞を標識した。この標識された細胞を計数し、アポトーシス細胞の割合を算出した。n 数は各群 2 サンプルずつ用意し、撮影場所を変えながら 1 サンプルにつき 4 回撮影して n = 8 とした。

(3) 統計学的評価法

3 元の ANOVA 解析で有意差の有無を検定

した。

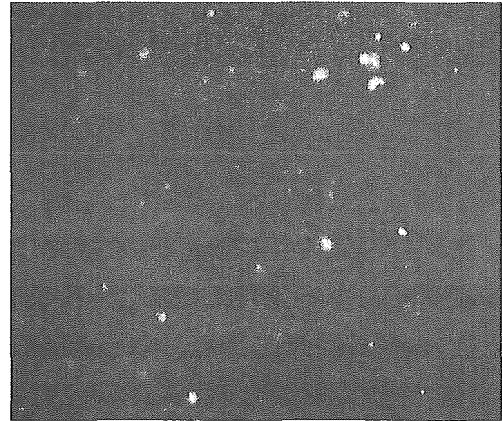


図 3. 標識されたアポトーシス細胞
(写真はポジティブコントロール)

B - 3 透過型、走査型電子顕微鏡観察による安全性評価

マウス脳スライス及び培養細胞に対して t-PA 及びエダラボン(薬剤)と超音波(US)の複合作用が及ぼす影響を表 1 の群間で比較することにより検討した。

(1) 試料の作成

超音波照射、非照射終了直後に細胞を固定したサンプルと、引き続いて 3 日間培養した後固定したサンプルを作成した。

(2) 透過型、走査型電子顕微鏡による観察
細胞に対する悪影響の有無を、特にアポトーシス小体に注意して電子顕微鏡観察した。

B - 4 ラット脳虚血モデルを用いた in vivo 実験

1) 脳塞栓モデルの作成

生後 11 週、体重 200? 300g の Wistar 系雄性ラットを用いた。右中大脳動脈閉塞/再灌流モデルは小泉ら¹⁾、Zhang²⁾ および

Longa ら³⁾ が報告した方法で作成した。イソフルレン 2%と酸素 100%の吸入麻酔で導入し全身麻酔を維持した。右側頭骨を露出してレーザー血流計 (FLO-N1、オメガウェーブ社、東京) の光ファイバプローブを装着し、脳血流量を持続的にモニターした。頸部正中切開にて右総頸動脈と右外頸動脈を露出させた。遠位部を二重結紮して切断した右外頸動脈から右総頸動脈分岐部を経由して頭蓋内内頸動脈へ塞栓子を挿入し、右中大脳動脈分岐部を 1 時間閉塞した。脳血流量が確実に低下していることを以って、脳虚血状態とし、また、栓子抜去により血流量が上昇して戻ることを以って再灌流とした (図 4)。

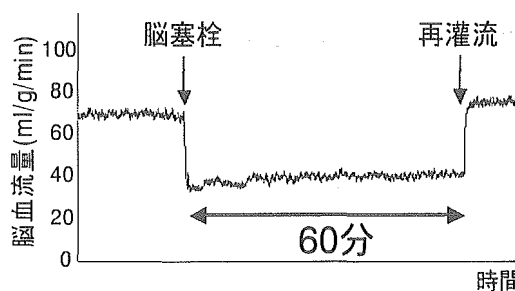


図 4. レーザー血流計による脳血流動態の評価

2) 塞栓用のマテリアル

脳塞栓モデルに使用した塞栓子は、4-0 ナイロン糸の先端 5mm をシリコンラバーでコーティングしたもの¹⁾ を用いた (図 5)。

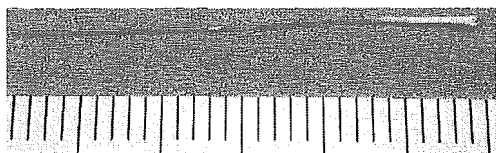


図 5. 塞栓子

3) 動物モデル群の比較

動物モデルは、以下の 4 群に分けた。

- A) 虚血/再灌流群
- B) 虚血/再灌流/超音波照射群
- C) 虚血/再灌流/薬物投与群
- D) 虚血/再灌流/薬物投与/超音波照射群

4) 経頭蓋超音波照射法

本研究の超音波照射条件は、

周波数：490kHz、

出力：0.8W/cm²

波形：正弦波 連続波

照射法：インターミットtent法

(2分間の連続照射後に30秒間の休止を繰り返し4回行った後、5分間の休止を行う照射及び休止のパターンを4回繰り返した)

照射時間：1時間

間欠的照射法を用いる目的は、超音波照射に伴う頭蓋内温度上昇の軽減を図るためである。経頭蓋超音波照射用のプローブは、動物実験用に作成した先端部の直径が 5mm のセラミック製 (PZT) のものを用いた。

5) 安全性の評価方法 組織学的評価

10%ホルマリンにより灌流固定後、摘出した脳より組織標本を作成し、HE染色を施した。梗塞領域を analysis (西華産業 (株)) を用いて計測し、梗塞率 (%) を以下の計算式より算出し評価した。

$$\text{脳梗塞率} = (\text{梗塞体積} / \text{健常側大脳半球体積}) \times 100 (\%)$$

C. 研究結果

C-1 マウス脳器官培養スライスを用いた in vitro 実験

正常モデルにおける、超音波照射単独、tPA 及びエダラボン投与単独、両者併用及び対象の各群について、例数 $n = 4$ となるマウス脳スライス標本の経時的細胞死の状

況を追跡した結果を図 6 に示した。同様に低酸素モデルにおける結果を図 7 に示した。縦軸は death control の細胞死量に対する百分率である。

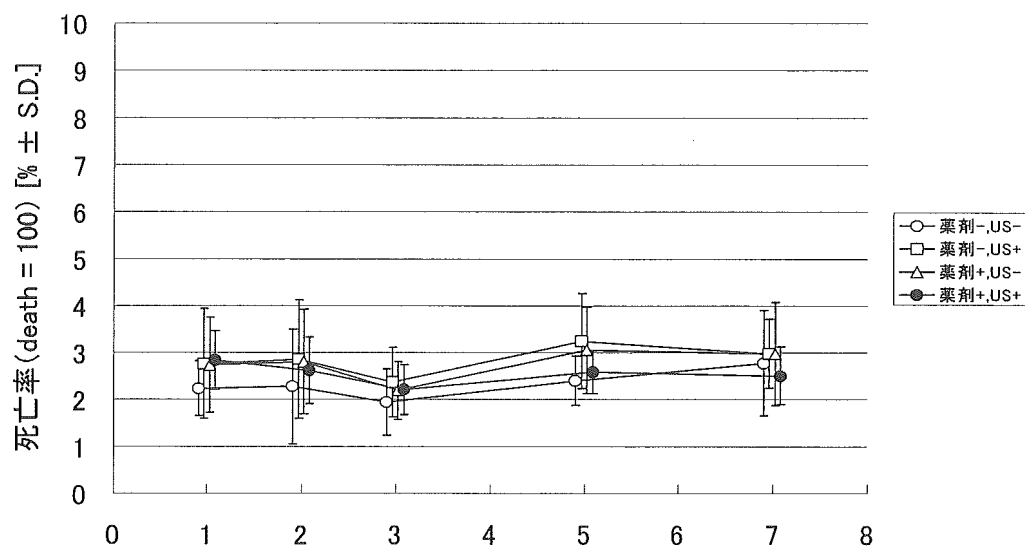


図 6. 正常モデルにおける細胞死亡率の経時的変化

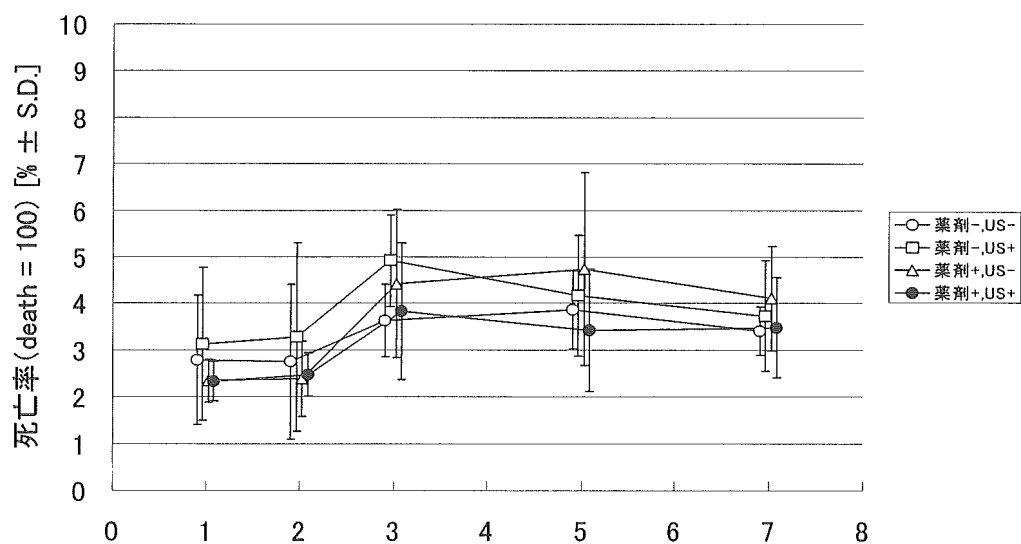


図 7. 低酸素モデルにおける細胞死亡率の経時的変化

正常モデルと低酸素モデルとの間には 3 日後に有意差を認めた ($p < 0.0001$) が、

超音波照射と tPA 及びエダラボン投与の影響について有意差は認められなかった。

C-2 培養細胞を用いた in vitro 実験

SK-N-MC 細胞における、超音波照射単独、tPA 及びエダラボン投与単独、両者併用及び対象の各群について、例数 n = 8 となるアポトーシス細胞の割合を図 8 に示した。

同様に HU-VEC 細胞における結果を図 9 に示した。

低酸素、tPA 及びエダラボン投与、超音波照射の全てについて有意差は認められなかった。

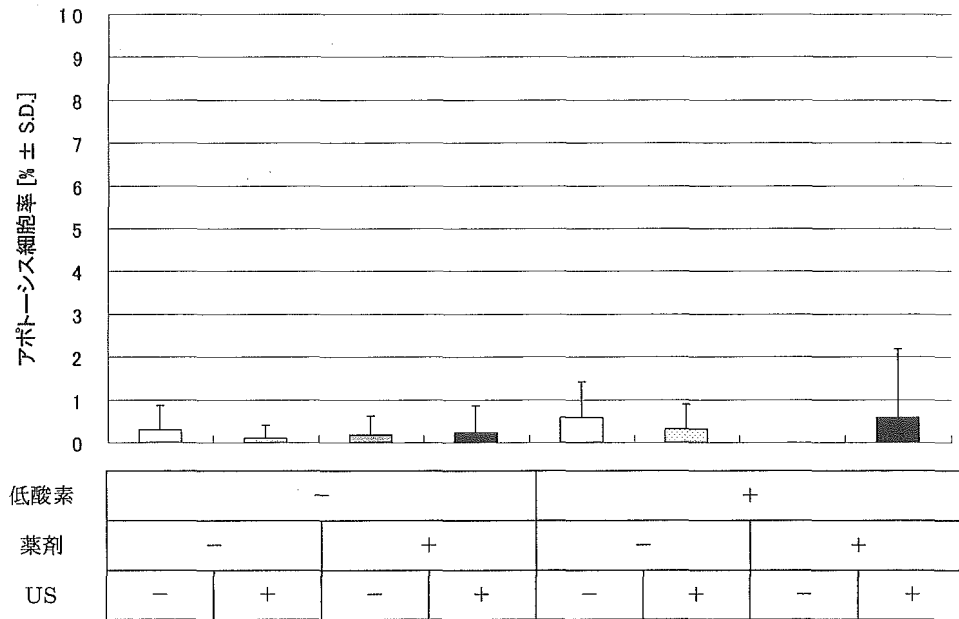


図 8. SK-N-MC 細胞におけるアポトーシス細胞の割合

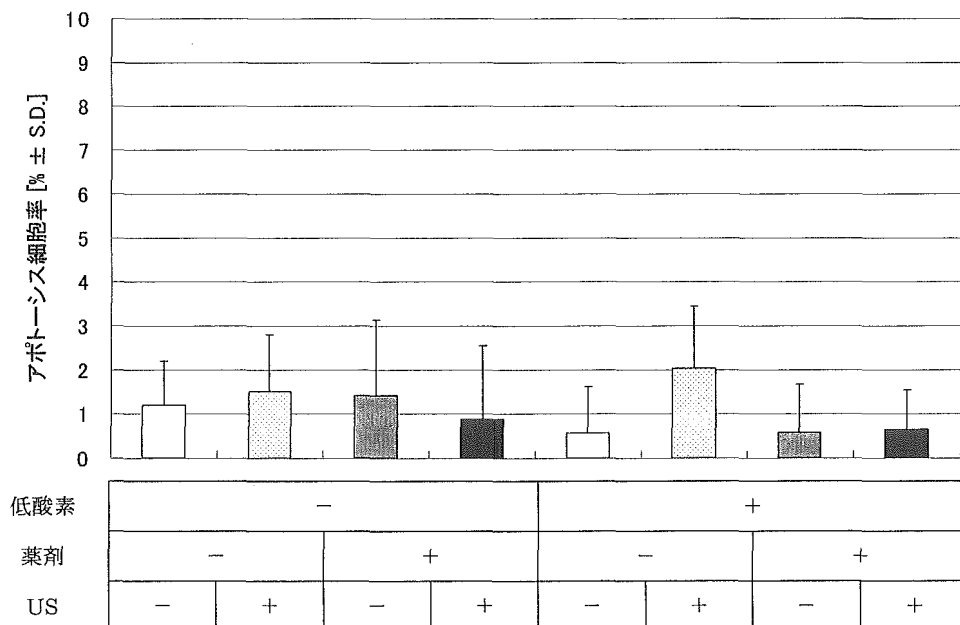


図 9. HU-VEC 細胞におけるアポトーシス細胞の割合

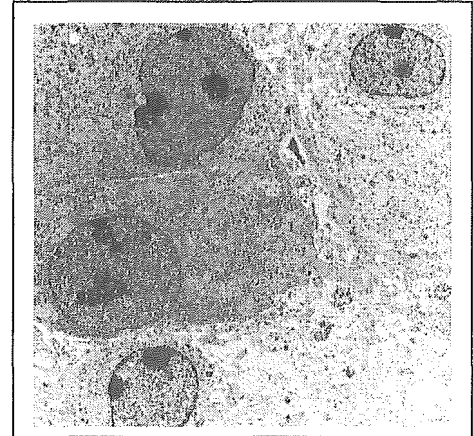
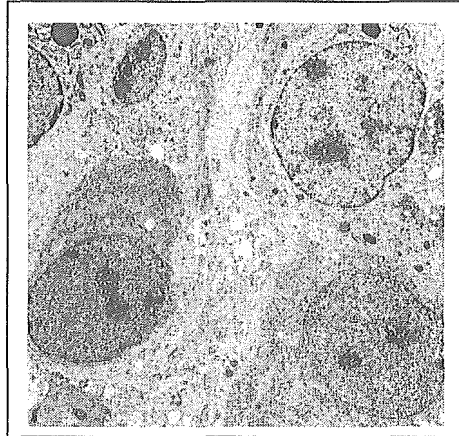
C-3透過型、走査型電子顕微鏡観察による
安全性評価

撮影した画像全ては掲載できないので、
特に重要と思われる条件、すなわち低酸素
モデルにおける超音波照射単独群と超音波

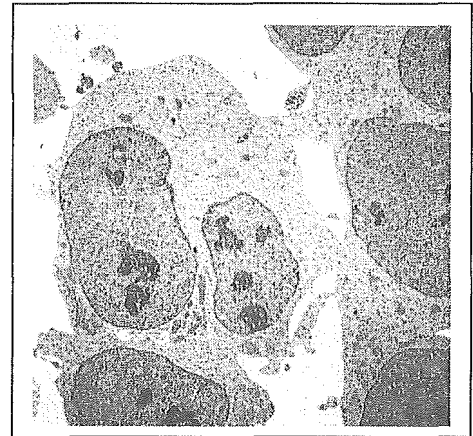
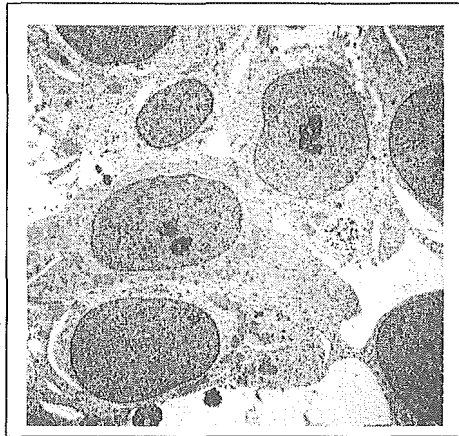
照射及び tPA・エダラポン投与併用群につ
いて、透過型顕微鏡像を図 10 に示した。同
様に走査型顕微鏡像を図 11 に示した。

アポトーシス小体も認められず、特に異
常な所見は無かった。

マウス脳
スライス
×5000



SK-N-MC
×5000



HU-VEC
×2500

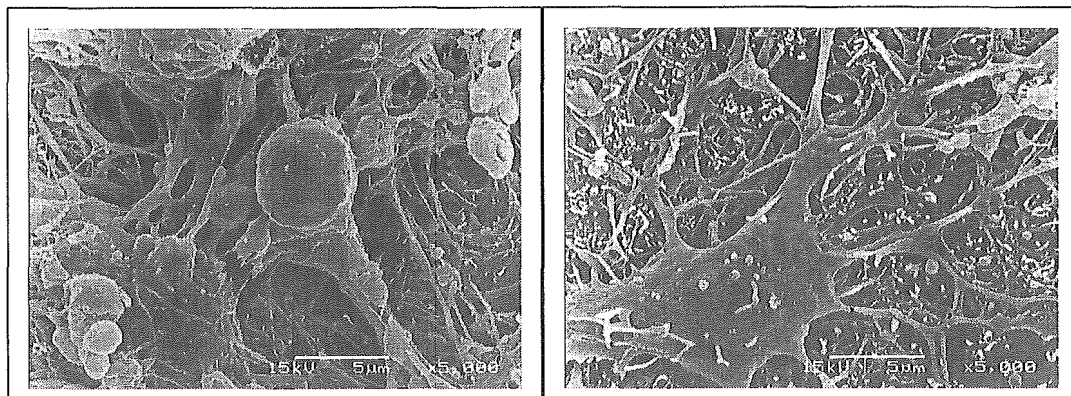


US+, 薬剤-

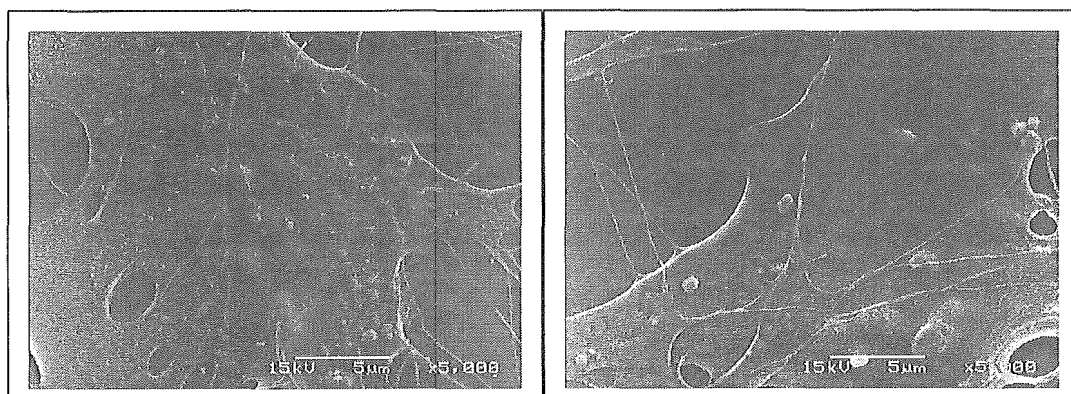
US+, 薬剤+

図 10. 低酸素モデル、72 時間後における透過型電子顕微鏡写真

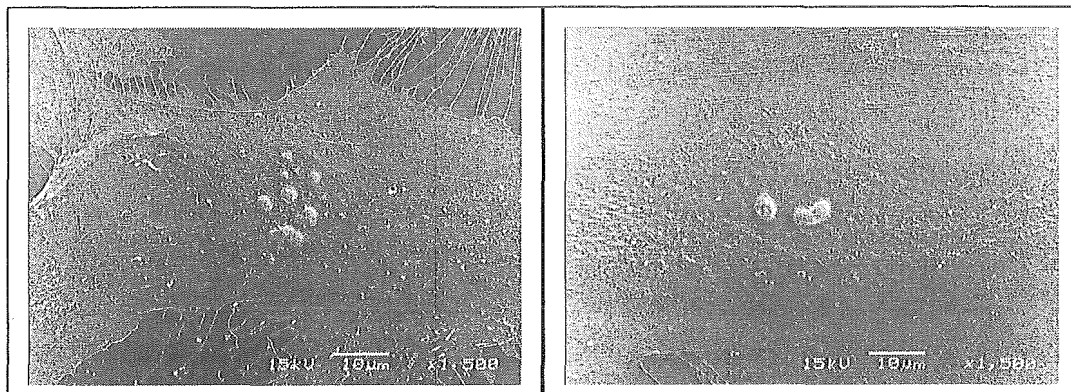
マウス脳
スライス
×5000



SK-N-MC
×5000



HU-VEC
×1500



US+, 薬剤-

US+, 薬剤+

図 11. 低酸素モデル、72 時間後における走査型電子顕微鏡写真

C-4 ラット脳虚血モデルを用いた in vivo 実験

Edaravone 投与群 (C 群、D 群) において脳梗塞率の減少が観察された。超音波照射

群 (B 群、D 群) において脳梗塞率への影響は観察されなかった。薬物・超音波併用群 (D 群) において脳梗塞率への影響は観察されなかった (図 12)。

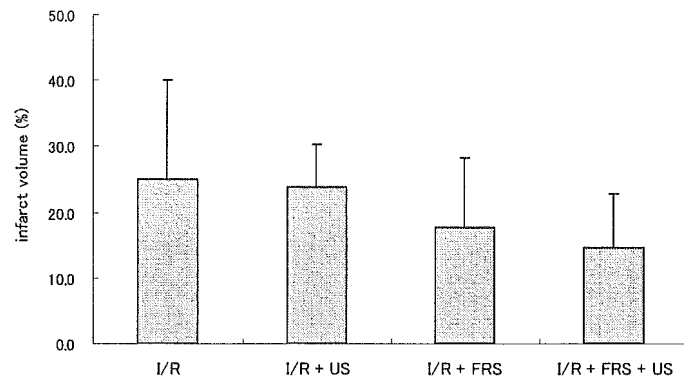


図 12. 脳梗塞体積に及ぼすエダラボン (FRS) と超音波 (US) の影響

D. 考察

本論文では周波数 490 kHz, 音響強度 0.3 W/cm² で連続波超音波の 1 時間間歇照射が、マウス脳スライス及び培養神経芽細胞に対して有意な傷害を招来しないことを示した。また、フリーラジカルスカベンジャー”Edaravone”投与下においても同様に、この超音波条件が安全であることを示した。ここで安全性の実証された超音波条件は元々経頭蓋超音波照射併用脳血栓溶解療法に用いることを目的に採用された条件であるので、本結果の妥当性について、超音波作用機序の観点から考察する。

《頭蓋骨における超音波減衰》

本論文は経頭蓋的超音波照射法を前提としたため、頭蓋骨における超音波減衰を差し引いた、頭蓋内音場で安全性評価を *in vitro* 実験にて行なった。連続波超音波を用いた我々の以前の実測値としては、周波数 490 kHz の場合、超音波プローブ表面での音響強度が 0.83 W/cm² の時、ヒト頭蓋で 84%減衰し、音響強度は 0.13 W/cm² であった。また以前に行なったラットの場合はプローブ表面で 0.8 W/cm² の時、頭蓋で 63%減衰し

0.3 W/cm² であった。この差は骨の厚さと種類が主な原因で、事実石橋等の用いたヒト側頭骨はほぼ緻密質から成り、厚さ 4 mm であった。ラットの頭頂骨は緻密質と海綿質から成り、厚さは 0.6 mm であった。この差が超音波減衰量を決めていると考えられた。本研究では安全性を検討するという意味で、より厳しい音響強度条件であるラットの場合を採用し、音響強度を 0.3 W/cm² とした。なお、診断用超音波装置の頭皮上における音響強度の安全限界 0.72 W/cm² (SPTA) を参考に、本研究ではその約 110% 値である 0.8 W/cm² を用いた場合に相当する頭蓋内音圧 0.3 W/cm² を採用し実験した。

《間歇照射法の意義》

超音波を用いる場合、対象部位内および超音波プローブ自体の温度上昇が問題となる。ここでは超音波を連続的に照射し続けるのではなく、照射と休止を繰り返す間歇照射を行うことにより温度上昇を抑制した。これは 490 kHz, 0.8 W/cm² (頭蓋内 0.3 W/cm²) の超音波条件下において、2 分間照射, 30 秒休止を 4 回繰り返した後 5 分間休止する間歇照射を 4 回繰り返した 1 時間中

に、ラット頭蓋内温度上昇が最大でも 1.5℃以下に抑えられた我々の実験事実に基づいている。

《超音波照射によるキャビテーションの発生》

ウロキナーゼや t-PA などの血栓溶解剤と超音波照射とを組み合わせた際の血栓溶解効率の上昇がどのようなメカニズムによるかは未だに完全には証明されていない。少なくとも血栓の表面より深部へ t-PA が入り込ませ、同時にその分解産物を血栓外へ搬出するメカニズムの存在は考えられている。さらに、超音波照射に伴うキャビテーション効果のメカニズムもあるとされており、キャビテーションの発生は細胞傷害を招来する。Daniels 等の行った *in vitro* 実験においては、周波数 750 kHz の連続波超音波では、531 kPa (約 8.5 W/cm²) より大きい音圧を照射すると、キャビテーションが生じて容器内の赤血球が溶解された。また、マウス神経芽細胞腫由来の C1300 細胞を対象とした研究では、1 MHz, 0.8 W/cm² の連続波超音波を 5 分間照射した結果、50% の細胞が細胞膜に傷害を受け、この時キャビテーションも発生していた等、キャビテーションの発生には不具合を伴う事例が多い。ただし、本論文における超音波条件 (周波数 490 kHz , 音響強度 0.3 W/cm²) ではマウス脳スライスは傷害を受けなかった。キャビテーション発生が目安とされるメカニカルインデクス (MI) は、Daniels 等の 0.613、Fahnestock 等の 0.163 と比べて本条件は 0.142 であり、後述するフリーラジカル産生の閾値である 0.154 より低いことから、キャビテーションが発生しにくかったと考えられる。

《キャビテーションに伴うフリーラジカルの産生》

キャビテーションが発生するとフリーラジカルが産生される。フリーラジカル産生には超音波条件の閾値があり、周波数 970 kHz の連続波超音波では音響強度 0.7 ~ 0.8 W/cm² からフリーラジカルが産生し始め、1.7 ~ 1.9 W/cm² において最高値を示した。チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO 細胞を用いた研究において、周波数 1.07 MHz 連続波超音波では音響強度 1 ~ 2 W/cm² で最大の細胞傷害作用が現れ、同時にフリーラジカルスカベンジャーの 1 種である細胞膜透過性の cysteamine を加えると、その細胞傷害作用が抑制されたことから、超音波照射による細胞傷害作用は、細胞内に産生されるフリーラジカルによって引き起こされると考えられた。本論文の超音波条件 (MI = 0.142) はフリーラジカル産生の閾値である 970 kHz , 0.7 W/cm² (MI = 0.154) よりも小さい。すなわち本超音波条件においては、フリーラジカルは産生されないと考えられ、実際に超音波による細胞傷害作用は認められなかった。

以上のように、本論文の条件においては細胞傷害作用が無いと考察される。TUNEL 法による検討において、有意差は無いものの超音波・Edaravone 併用群ではアポトーシス細胞の割合が他群よりもやや高くなった。しかし、P 値は 0.3561 であり、これは実験操作によるばらつきの範囲内と考えられる。

超音波照射と Edaravone 作用への影響を明確にするためには、超音波条件を拡大し、細胞障害が起こる条件を明らかにし、フリ

ーラジカルスカベンジャーの効用を検討すべきである。その意味では本論文は周波数を 490 kHz に固定し、音響強度を 0.3 W/cm² に固定した成績であり、周波数範囲や強度範囲に関する閾値を探究していない。前述の血栓溶解療法で想定される最大条件についてのみ検討したもので、多様な条件の一つにおける生物学的作用を示したものである。そのため、安全限界的問題を検討するためには条件を広げ、フリーラジカルに対するスカベンジ効果を指標とした探求的研究が必要である。

《本超音波条件の有効性》

超音波照射に伴うキャビテーションが血栓溶解剤の効果を増強する主因だと考えられているが、本論文の超音波条件ではキャビテーションは発生しにくく、フリーラジカルも産生されないと考えられる。しかし、強度のより弱い超音波照射でも t-PA の血栓溶解効果を増強させたという報告もある。さらに近年には実際の臨床において、超音波診断装置（2MHz、パルスドプラ波）を用いて塞栓部監視をしているだけで t-PA の血栓溶解効率が上昇するという報告もあり、超音波による血栓溶解剤効果の増強はキャビテーションによるものだけでは無いと考えられる。

《in vivo 実験》

500kHz 連続波超音波のインターミット照射の安全性は、ラット脳梗塞/再灌流モデルを用いた神経保護薬エダラボン投与下でも確保されることを示した。この実験はエダラボンが最も有効とされる再灌流発生時において、エダラボンと超音波照射を行って確認されたものである。ただし、評価法は Koizumi モデルによる梗塞側の体積

を健常側の体積で除した梗塞容積比で比較し、A：コントロール群、B：エダラボン投与単独群、C：超音波照射単独群及び D：エダラボン投与及び超音波照射併用群の四群間に統計的有意差がなく、しかも平均値は A>B>C>D の傾向を示したことを以て、安全であると判定したものである。

しかしながら、四群ものエダラボン投与単独群の脳梗塞容積比とコントロール群との間に有意差がなく、神経保護薬としての有効性が示されていない。Free Radical Scavenger としての効果は、ラット脳梗塞/再灌流モデルにおいて梗塞体積を摘出脳の乾燥重量で評価し、その差が 3% 程度で統計学的有意差を出したものである。本実験のように 2mm 間隔のスライスの SE 染色から断面積を求め、三次元構成する方法では、エダラボンの効果を統計学的に評価するには困難があるように考えられる。両群間に有意差を認めず、平均値にやや減少項目を認める程度の改善効果もやむを得ない限界かと考える。

エダラボンの臨床的有意性は神経学的評価をスコア化して得られたものである。多施設の臨床試験を我が国で行った成績であり、国際的には必ずしも高い評価を得ていないようである。しかし、我が国の多数の施設で脳梗塞患者に適用されており（承認薬、商品名：ラジカット）、本プロジェクトによる経頭蓋超音波脳血栓溶解療法を臨床適用する時には、エダラボンとの併用という事態が必ず生ずると考え、本実験を行った。本実験結果から、エダラボンとしての有効性は示し得ない状況であるが、低周波超音波 500kHz の経頭蓋的照射が脳梗塞/再灌流状態を悪化させることは統計学的にな

いことが明かとなり、臨床応用に際しての問題が一つ減ったと考える。

E. 結論

490 kHz, 0.3 W/cm² の低周波超音波では脳神経細胞を損傷しないことが明らかとなった。そして t-PA による血栓溶解効率を上昇させることができる超音波条件の中でも、ヒト頭部に適用可能な条件、周波数 490 kHz, 音響強度 0.72 W/cm² (頭蓋内 0.13 W/cm²)⁷⁾ は中枢神経系への損傷を生じず、Edaravone 投与下においても細胞傷害性が無い。また最大頭蓋内音響強度 0.3 W/cm² まで強くしても無害であることが示唆された。

また、経頭蓋超音波照射 (500kHz、連続波、0.72W/cm² SPTA、インターミッテント照射 60 分) は神経保護薬エダラボンを阻害することがないことをラット脳梗塞/再灌流モデルで確認した。このことから、臨床現場においても同様に神経保護薬エダラボンの薬効を阻害することはないものと予想された。

Reference

1. Koizumi et al. Jpn J Stroke 1986; 8:1-8
2. Zhang et al. Brain Research 1997;766: 83-92
3. Longa et al. Stroke 1989;1:84-91.
4. Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Saqqur M, Demchuk AM, Moyer LA, Hill MD, Wojner AW : Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. N Engl J Med 351: 2170-2178, 2004
5. Armour EP, Corry PM : Cytotoxic effects of ultrasound in vitro dependence on gas content, frequency, radical scavengers, and attachment. Radiat Res 89: 369-380, 1982
6. Clarke PR, Hill CR : Physical and chemical aspects of ultrasonic disruption of cells. J Acoust Soc Am 47: 649-653, 1970
7. Daniels S, Kodama T, Price DJ : Damage to red blood cells induced by acoustic cavitation. Ultrasound Med Biol 21: 105-111, 1995
8. Fahnestock M, Rimer VG, Yamawaki RM, Ross P, Edmonds PD : Effects of ultrasound exposure in vitro on neuroblastoma cell membranes. Ultrasound Med Biol 15: 133-144, 1989
9. Francis CW, Blinc A, Lee S, Cox C : Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots. Ultrasound Med Biol 21: 419-424, 1995
10. Ishibashi T, Akiyama M, Onoue H, Abe T, Furuhata H : Can transcranial ultrasonication increase recanalization flow with tissue plasminogen activator? Stroke 33: 1399-1404, 2002
11. Kimura M, Iijima S, Kobayashi K, Furuhata H : Evaluation of the thrombolytic effect of tissue-type

- plasminogen activator with ultrasonic irradiation: in vitro experiment involving assay of the fibrin degradation products from the clot. *Biol Pharm Bull* 17: 126-130, 1994
12. 工藤澄彦: 超音波併用による血栓溶解療法に関する研究. *慈恵医大誌* 104: 1005-1012, 1989
 13. Lauer CG, Burge R, Tang DB, Bass BG, Gomez ER, Alving BM : Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis. *Circulation* 86: 1257-1264, 1992
 14. Luo H, Steffen W, Cercek B, Arunasalam S, Maurer G, Siegel RJ : Enhancement of thrombolysis by external ultrasound. *Am Heart J* 125: 1564-1569, 1993
 15. Mclean JR, Mortimer AJ : A cavitation and free radical dosimeter for ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 14: 59-64, 1988
 16. 岡田和悟, 小林祥泰 : EBM に基づいた急性期脳梗塞の治療の現状と評価. *日本内科学会雑誌* 93(9): 1814-1820, 2004
 17. Pfaffenberger S, Devcic-Kuhar B, Kollmann C, Kastl SP, Kaun C, Speidl WS, Weiss TW, Demyanets S, Ullrich R, Sochor H, Wober C, Zeitlhofer J, Huber K, Groschl M, Benes E, Maurer G, Wojta J, Gottsauner-Wolf M : Can a commercial diagnostic ultrasound device accelerate thrombolysis? An in vitro skull model. *Stroke* 36(1): 124-8, 2005
 18. Siegel RJ, Atar S, Fishbein MC, Brasch AV, Peterson TM, Nagai T, Pal D, Nishioka T, Chae JS, Birnbaum Y, Zanelli C, Luo H : Noninvasive, transthoracic, low-frequency ultrasound augments thrombolysis in a canine model of acute myocardial infarction. *Circulation* 101: 2026-2029, 2000
 19. Stoppini L, Buchs PA, Muller D : A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37: 173-182, 1991
 20. Suchkova VN, Baggs RB, Francis CW : Effect of 40-kHz ultrasound on acute thrombotic ischemia in a rabbit femoral artery thrombolysis model: Enhancement of thrombolysis and improvement I capillary muscle perfusion. *Circulation* 101: 2296-2301, 2000
 21. Tachibana K, Koga E : Ultrasonic vibration for boosting fibrinolytic effect of urokinase. *Blood Vessels* 12: 450-453, 1981
 22. Tsujita K, Shimomura H, Kawano H, Hokamaki J, Fukuda M, Yamashita T, Hida S, Nakamura Y, Nagayoshi Y, Sakamoto T, Yoshimura M, Arai H, Ogawa H : Effects of edaravone on reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 94(4): 481-484, 2004

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

①. 論文発表

なし

②. 学会発表

1. Manome Y., Nakayama N., Nakano M., Mizuno S., Furuhata H. "Safety evaluation of insonation for thrombolysis with a free radical scavenger, edaravone.", 9th Meeting of the European Society of Neurosonology. 9-11 May 2004, Wetzlar.

2. 中山尚人, 馬目佳信, 中野みどり, 水野聡子, 古幡 博. "フリーラジカルスカベンジャー薬剤投与時における超音波血栓溶解療法の安全性評価—in vitro 実験による検討—". 第23回日本脳神経超音波学会, 2004年6月3~4日, 久留米.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

頭蓋内超音波音場と血栓溶解超音波照射法の検討

分担研究者 梅村晋一郎 (株) 日立製作所中央研究所ライフサイエンス研究センタ主管研究員

分担研究者 東 隆 (株) 日立製作所中央研究所ライフサイエンス研究センタ研究員

研究要旨

超音波脳梗塞治療における超音波の生体作用を検討するために、頭蓋内キャビテーション生成を超音波断層像により観測した。脳梗塞の後遺症の低減には、梗塞部での血流遮断時間を短くする超音波血栓溶解が有効である。血栓溶解では、治療効果と正常組織の損傷がトレードオフの関係にあり、治療時に出血を起こした臨床例も報告されている。出血の原因として、頭蓋内で反射した超音波が定在波を形成、キャビテーションを誘発、血管が破壊されている可能性がある。定在波音場におけるキャビテーション生成を調べるために、頭蓋内定在波音場にて、バブルが生成する様子を超音波画像により観察した。その結果、定在波音場でマイクロバブルが生成する様子が画像として、観察出来た。また、気泡の生成より短い周期で振幅変調を行うことにより、キャビテーションの抑圧が出来る見通しを得た。

A. 研究目的

脳梗塞は本邦死因第3位の脳血管障害の約7割を占め、回復後もしばしば言語障害や麻痺を多く残し、要介護老人増加の原因ともなっている。その治療は、主原因である塞栓(血栓)を、発症後数時間以内に溶解することが第一選択であり、その再開通が早ければ早い程、予後は良好と言われている。これを実現するための基本技術として、代表研究者らは、脳血栓溶解を加速する経頭蓋的超音波照射併用法の有効性を *in vitro*, *in vivo* 実験により示してきた。本研究は、様々な脳梗塞の病型に対する本脳血栓溶解療法の有用性を探索的に研究するために、臨床適用可能な、次の特徴を有する「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置」を開発することを主目的としている。

- ① 診断/治療用両装置を一体化
- ② 同一プローブで実時間ドプラ断層血流監視と経頭蓋血栓溶解を実現

③ 診断/治療用両超音波の自動切換

④ 血流状態に合致した血栓溶解剤の最適投与

⑤ 再開通状態適応超音波照射制御

開発装置の原理は脳血栓塞栓症患者に血栓溶解剤を静注又は動注すると同時に、体外から塞栓部へ向けて無侵襲的に超音波照射し、脳血栓の早期溶解、急速再開通を行うもので、虚血耐性の脆弱な脳神経系ライフラインを確保することで救出する目的のものである。開発装置の特徴は、血栓溶解超音波治療法に加え、経頭蓋超音波診断画像法を合体させ、梗塞部(含周辺部)へ照射方向をある程度限局して治療用ビーム(Tビーム)を走査し、更に、診断画像を用いて血流再開通をモニタすることにより血栓溶解剤投与量と超音波照射の両Doseを調節可能としていることである。すなわち、実時間カラードプラ断層血流監視と経頭蓋血栓溶解とを統合し、脳血流監視により治療の最適化を可能として、副作用抑制を図るフィードバック型治療法を実現する。そのためには、特に、

診断装置と治療装置の結合技術（治療・診断同一プローブ）が必要となる。頭蓋骨の限られた超音波透過ウィンドウに対応し、治療用ビーム（Tビーム）及び診断用ビーム（Dビーム）の両トランスジューサは一体化する。治療用ビーム（Tビーム）は、周波数500kHz、強度0.72W/cm²以下、一方、診断用と治療用両超音波の交互（インターミテント）照射で、診断用ビーム（Dビーム）は、周波数2MHz近傍、強度0.72W/cm²以下の何れも診断装置の規格内とするが、安全上、限局照射の必要性が生じた場合に対応すべく、治療用超音波ビームの2次元走査も可能とする。

3年計画の初年度に次の2点について実施し、昨年度報告した。

（1）診断・治療一体型プローブの設計と原理試作

（2）一体化に伴う診断・治療切替システムの設計と要素試作

本年度は第2年度として次の3項を実施し、臨床適用可能な経頭蓋超音波脳血栓溶解装置をほぼ完成した。

（1）T/D複合プローブの振動子配列比較

走査面を共有するようにT/D各アレイ振動子を配置する方法として、音響窓を分割利用する並置型と、共用する積層型とについて試作し試験・検討を行う。

（2）超音波ビーム三次元走査法の検討

頭部の限定された音響窓へのプローブ固定を前提としたT/D両ビーム照射方向の限局走査に関し、二次元配列振動子によるコーン状電子走査法と、一次元配列による扇形電子回転機械走査法とを比較検討する。

（3）頭蓋内超音波拳動の検討

キャビテーションを生起する可能性のある定在波が頭蓋内において発生するのを抑制するTビーム制御方式として、振幅あるいは周波数変調、ビーム方向微小偏向、パースト・パルス化などを検討する。

定在波が音響キャビテーションを促進するメ

カニズムについて、もう少し詳しく説明する。音響キャビテーションとは、次の3段階よりなる現象の総称である。

（1）微小気泡核の生成または導入

（2）音場における微小気泡の呼吸振動と成長

（3）成長した微小気泡の圧壊

超音波に共振する微小気泡の半径は、超音波周波数にほぼ反比例し、1MHzにおいておよそ3ミクロンである。典型的なシナリオとしては、この共振気泡に比べてはるかに小さな気泡核が（1）の過程で出現し、それが、（2）の過程で超音波により成長する。成長して共振気泡に達した気泡は、その振動振幅が著しく大きくなり、（3）の過程で破綻的に圧壊する。この瞬間、衝撃波が発生し、これが場合によっては、機械的な生体作用を及ぼす。同じ瞬間、気泡内部の気体が、断熱的に圧縮されて、その温度が数千度まで上昇し、これにより、場合によっては、音響化学的な生体作用が生ずる。この段階（3）まで至る音響キャビテーション現象は、圧壊型キャビテーション（collapse cavitation）あるいはイナーシャルキャビテーション（inertial cavitation）あるいはトランジエントキャビテーション（transient cavitation）などと呼ばれ、上記のように、生体作用を引き起こす場合が多い。一方、段階（2）で留まる安定型キャビテーション（stable cavitation）と呼ばれるキャビテーション現象も知られている。これは、圧壊型キャビテーションほど顕著な生体作用を引き起こす場合は少ないが、マイクロマッサージ効果や超音波吸収などを増大させるなどの作用があることが知られている。

過程（2）において微小気泡が成長するには、主に2通りのメカニズムがある。共振気泡よりも小さな気泡は、超音波周期の中で、陽圧半周期のあいだは静止時よりも小さく、陰圧半周期のあいだは静止時よりも大きい。このことが、微小気泡が成長する2通りのメカニズム両方のもととなる。1つは、rectified diffusion と呼ばれる。

陽圧半周期のあいだ、気泡内部の圧力は大気圧よりも高いので、気体分子は、気泡外の液体に溶け出そうとする。一方、陰圧半周期のあいだは、その逆に、気泡内部の圧力は大気圧よりも低いので、気泡外の液体に溶けていた気体分子は、気泡内に吸い出される。もしも、陽圧半周期と陰圧半周期とのあいだで気泡半径に変化がなければ、陰圧半周期のあいだに気泡内へ吸い出される気体分子の数と陽圧半周期のあいだに溶け出す気体分子の数は等しくなり、さしひき気泡は成長しないことになる。ところが、実際には、陰圧半周期の方が陽圧半周期よりも、気泡の表面積が大きいために、気体分子が気泡表面を介してより拡散しやすい。その結果、陰圧半周期のあいだに気泡内へ吸い出される気体分子の数が優勢となる。これが、rectified diffusion の原理である。この原理にもとづき微小気泡が成長するには、一般に 100 から 1000 周期程度の時間を要することが知られている。

2つ目のメカニズムは、Bjerkness force と呼ばれる一種の超音波放射圧である。これには、primary と secondary の Bjerkness force があり、前者は、定在波音場中ではたらくことが知られている。この primary Bjerkness force が生ずる原理を、図 1 を用いて説明する。圧力勾配のある場におかれた物体には、圧力の高い側から低い側へ向けて、その体積に比例した大きさの力が働く。従って、陽圧半周期には、音圧の腹から節へ向けて、陰圧半周期には、その反対に、音圧の節から腹へ向けて、力が働く。もしも、陽圧半周期と陰圧半周期とのあいだで気泡の大きさに変化がなければ、陰圧半周期のあいだに節から腹へ向けて移動する距離と、陽圧半周期のあいだに腹から節へ向けて移動する距離とは等しくなり、さしひき気泡は移動しないことになる。ところが、実際には、陰圧半周期の方が陽圧半周期よりも、気泡の体積が大きいため、陰圧半周期のあいだに節から腹へ向けてはたらく力が、陽圧半周期のあいだに腹から節へ向けてはたらく力よりも大

きくなり、結果として、節から腹へ向けた移動が優勢となる。これが、定在波音場において微小気泡にはたらく primary Bjerkness force の原理である。この力によって、微小気泡は音圧の腹付近に集まり、複数が合体して、より大きな気泡へと成長する。また、腹の高い音圧のもとで、上記 rectified diffusion が効率的に起こる。

こうして定在波音場の腹付近において共振気泡まで成長した微小気泡は、その高い音圧のもとで激しく圧壊しやすくなる。すなわち、定在波音場のもとでは、キャビテーション発生能を表すとして一般に受け取られている MI 値が例え低い値であっても、生体作用を引き起こすような圧壊型キャビテーションが起こりやすくなるわけである。本研究の治療方法では、この圧壊型キャビテーションを治療効果発生のメカニズムとしては用いないので、内出血など重大な副作用を及ぼす可能性のある圧壊型キャビテーションを促進する定在波の発生は、極力避ける必要がある。幸い、前述のように、微小気泡が、激しく圧壊する共振気泡まで成長するには、ある程度の回数の超音波周期が必要であるので、振幅あるいは周波数変調、ビーム方向微小偏向、バースト・パルス化などによって、圧壊型キャビテーションの原因となるような定在波の発生を抑圧することができると考えられる。

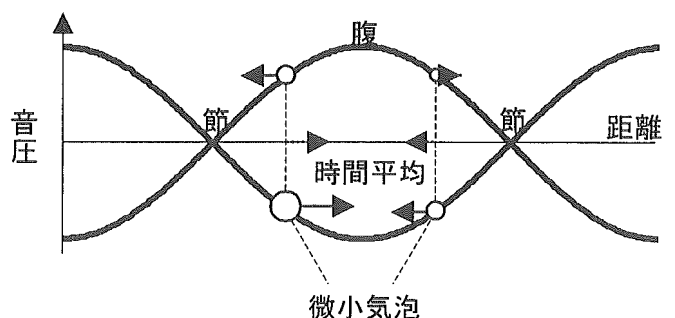


図 1 定在波音場中の微小気泡にはたらく力

脳組織は、超音波を反射しやすい頭蓋骨で囲まれているので、腹部組織などと比較すると、定在波の発生しやすい音響条件にあるということが

できる。そこで、本分担研究では、その音響条件を模擬した実験系を構築して定在波の発生を確認、実際に定在波音場において、キャビテーションが生成するかを観察し、それを抑圧する方法の検討に指針を与えることを目的とした。

B. 研究方法

実際に経頭蓋的に人体に超音波を照射する際には、頭蓋骨、脳実質、硬膜、くも膜など多様な成分が関与するため、厳密には頭蓋内の音場にはこれら全ての成分の影響を検討する必要がある。しかしながら、硬膜、くも膜は超音波の波長に比べ十分に薄く、また脳実質は、部位によってばらつきはあるものの水と同程度の 1500 m/s 程度の音速であることから、これらは水と置き換えても結果に重大な差異を生じるとは考えにくい。一方、骨は音速 3000 m/s 程度であり、脳実質部分と大きく異なる。このため頭蓋内の音場を検討には、均一な音速の脳と頭蓋骨、更には「水と骨」という単純なモデル化をして取り扱うことが可能である。これらのことから、本研究では、水中に吊るした頭蓋骨内の超音波音場と、その超音波音場が周囲の場に与える影響を検討した。

これまでのシュリーレン法を用いた頭蓋内音場の可視化の研究により、500 kHz 程度の超音波照射時には、超音波照射と反対側の骨での反射部位を中心として、その周囲に定在波が生成することが確認されている。今回、頭蓋内定在波音場において実際にキャビテーションが生成するかを検討した。キャビテーションの存在を確認する手法としては、これまでキャビテーションに伴う発光、すなわちソノルミネッセンスを観測する手法があったが、感度が低く、露光時間を秒単位まで長くしなくては、発光を検出出来ないという課題があった。今回、超音波断層像は微小気泡に対して感度が高く、リアルタイム性においても優れることに着目し、バブルのダイナミクスの観察手段として用いた。

図2に光学的定在波検出の実験配置を示す。頭

蓋骨を輪切りにし、得られたハチマキ状のスライスの切断面と、頭蓋外から照射される超音波の伝播する面が平行になる配置で超音波トランスデューサを固定し、かつこれらの面の法線方向とシュリーレン測定光軸が平行になる配置で実験を行った。

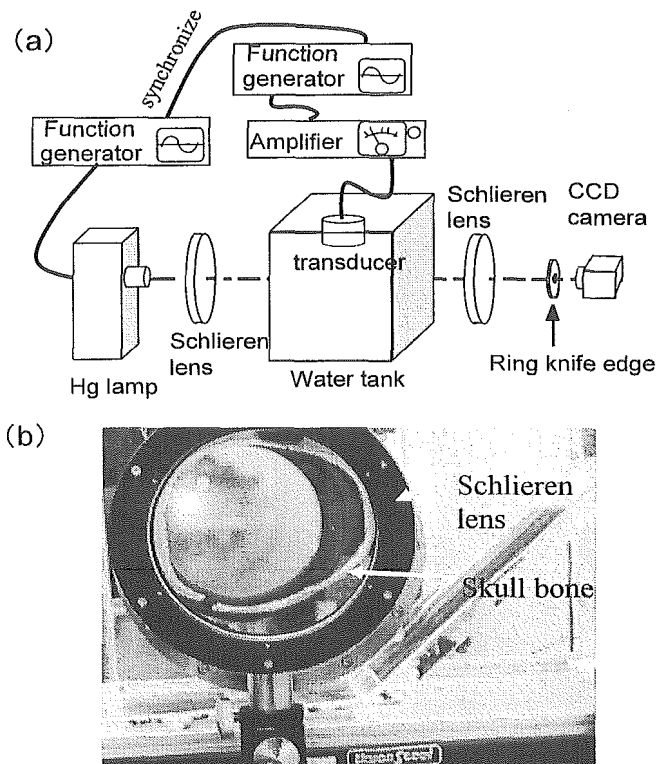


図 2. Optical set up

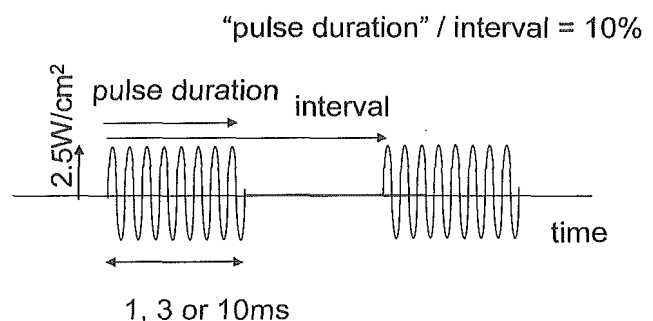


図 3. Pulse sequence for air-backed PZT transducer

超音波照射シーケンスは図3に示すように、パルス長を変えて実験を行った。頭蓋骨は図4に示すものを用い、特に、脳表面の血管走行に沿って存在する頭蓋骨上の溝、すなわち、頭蓋骨が薄く超音波の透過性の良い部分を音響窓として利用した。

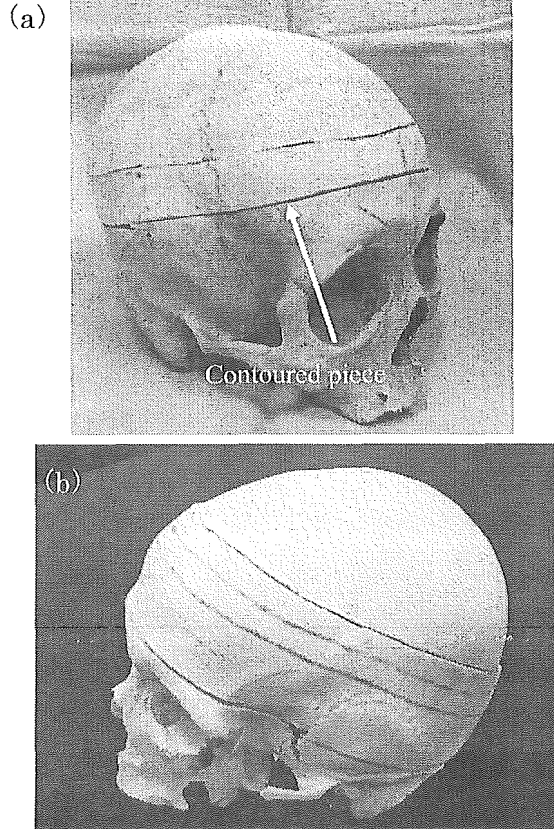


図4. Cranium used in experiment:
contoured piece of cranium and
whole skull bone

図4 (a) はこめかみよりやや上の部分を鉢巻上に切断、(b) はこめかみ部分を含むように切断した。(a) の方は、結果的に、頭蓋骨上に存在する、神経束もしくは血管走行に伴う穴や、骨が薄くなった部分が音響窓となっている。

図5に図4 (b) の骨の X 線 CT 像を示す。この結果から、こめかみ部分は、ほとんど板間層を含んでいないことが確認出来る。またこめかみ部分の厚みは 1mm 程度である。

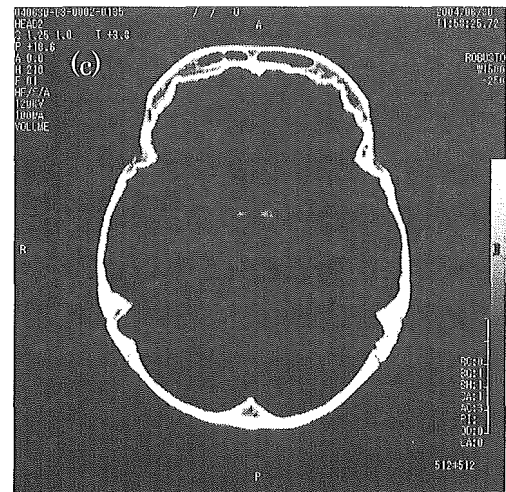
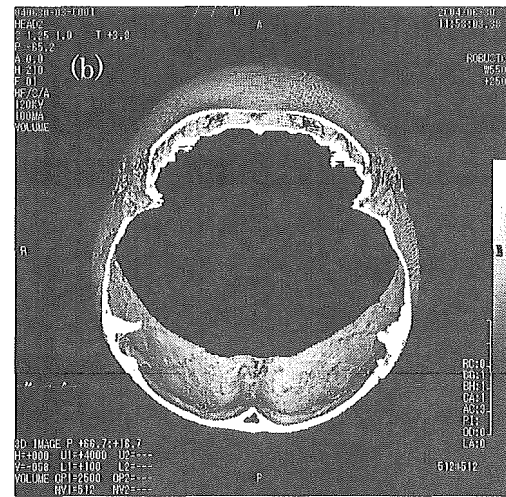


図5. X Ray CT images

図6にバブル生成の超音波観察実験の実験配置写真を示す。治療用超音波照射には中心周波数600kHz、直径24mmの単板トランスデューサを用いた。超音波断層像を用いて、バブルを観測する場合、断層像の撮像に用いている超音波の周波数で共振する直径のバブルが最も感度よく観測されるので、治療用の超音波の周波数600kHzより一桁以上高い周波数である、10MHzを用いることで、微小気泡が生成し、600kHzの治療用超音波の共振サイズまで成長する前に観察可能な実験の構成とした。観察用の超音波探触子にはEUP-L53Sを用いて、超音波診断装置EUB8500に接続して気泡の観測を行った。

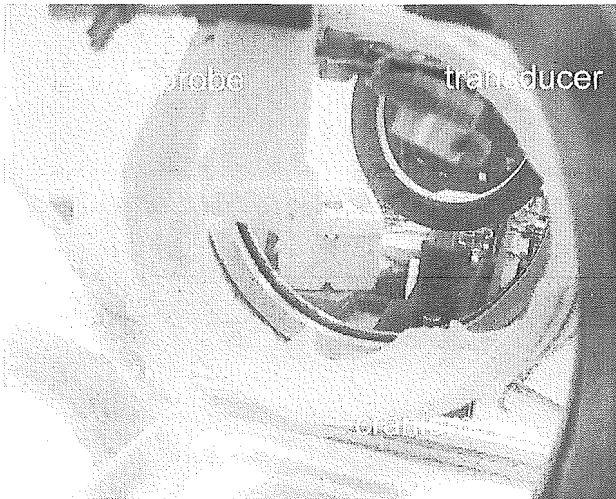


図6. Experimental set up to obtain ultrasonic B-mode image of bubble formation

C. 研究結果と考察

まず光学的な音場の観察結果を図7に示す。上図は図4(a)の骨を用いた結果であり、下図は図4(b)を用いた結果である。超音波入射部と反対側の頭蓋骨で超音波の反射が観測され、反射面に平行に音圧の強弱の縞模様が観測された。この縞の間隔が波長の半分であったので、この縞模様が定在波であることが確認された。特に図4(b)においては、反射部のみでなく、音の経路

広範囲に渡って定在波が生成していることが確認された。

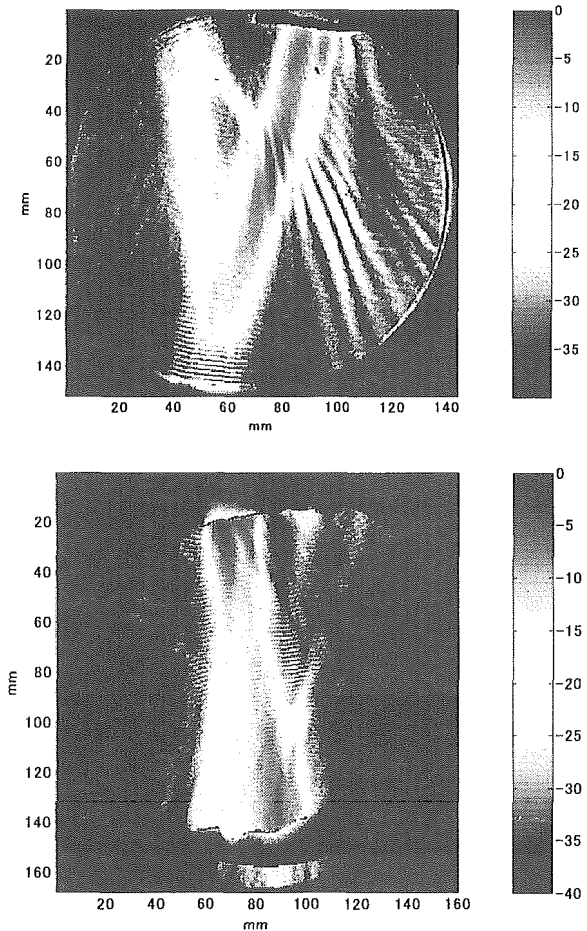


図7. Schlieren image

また図8に超音波断層像を用いた、定在波音場におけるバブル生成の観察を行った結果を示す。照射開始前(a)、開始6秒後(b)、開始15秒後(c)、照射終了後(d)と、時間的な変化を示しており、各画像の下に高輝度に見えている構造物は頭蓋骨である。図の縦に入っている白い帯は、治療用超音波照射時に発生する電気ノイズが診断装置の画像上に重なって表示されている。バブルの時間変化を検討するために、図8の時間変化をMモード像として図9に示す。Mモード像は、前記断層像の特定ラスタの時間変化を表示した画像であり、横軸が時間、縦軸が深さを示している。図9(a)はノイズパターンをそのまま表示しており、照射開始から10秒程度で、気泡が