

② 低周波超音波の音響学的安全性評価

図 9 に示したバースト波を発生する装置と我々の連続波インターミッテント照射を行う方法とを比較する超音波プローブおよび駆動装置を用意して次の実験を行った。

②-1. 頭蓋内定在波の発生実験

ヒト頭蓋骨を水平断で切断し、リング状のスライス標本を作製した。これを水中に沈め骨窓より超音波を照射し、そのときに生ずる頭蓋内反射状態をシュリーレン法で検証した。その際ビーム方向を変え、反射波の状況を確認した。また、2MHz のプローブを用いて、その場合の低在波の発生状態を調べた。

②-2. バースト波によるキャビテーション発生実験

バースト波超音波を経頭蓋的に発射させ、反対側の頭蓋骨内面で反射を生じさせる状況を作り、そのときのキャビテーションを観察した。特にバースト波のデューティサイクルを一定にしたままで、パルス持続時間を変化させたときのキャビテーション発生の変異を観察した。

②-3. 定在波によるキャビテーションの発生実験

定在波によって頭蓋内でキャビテーションが発生することをシュリーレン法で確認した。

②-4. 定在波による脳神経細胞への影響

マウス脳のスライスを作り、器官培養モデルを用意し、この脳培養スライスを定在波のキャビテーション群の集まる部位に置いたときの細胞死数を調べた。細胞死の数はPI染色により確認し、デスコントロールと比較した。定在波を発生させるために、ここでは反射ファントムを作って実験した。この反射ファントムの反射面からの距離を指標にして、定在波の腹の部分に脳スライス標本を置いた。

③ 脳梗塞状態に対する医学生物学的安全性評価

1) 脳梗塞領域への影響

ラットの脳梗塞モデルをナイロン糸による MCA 塞栓法で実現した。塞栓子は、外頸動脈より MCA に向けて挿入し、MCA への分岐部に留置することによって MCA を作ることにした。その際、レーザ血流計を用いて、経頭蓋的に MCA 支配下の血流状態を監視し、血流量がある程度現象する状況をもって MCAO モデルの完成とした。この状態で超音波を照射し、脳梗塞領域の拡大が生ずるかどうかを検討した。梗塞領域の評価は塞栓直後と塞栓子抜去後 24 時間時の MRI 評価で行った。なお、この MRI を用いた実験は、ドイツとの共同研究として行われた。

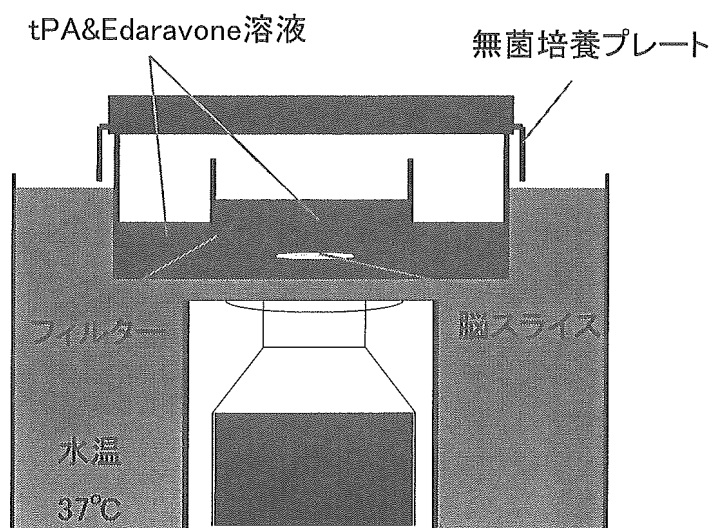
2) 血液脳関門への影響

ラット脳梗塞モデル全 21 例を用いて、上述のような小泉モデルで作成した。虚血時間を 90 分とし、その後にエバンスブルーによる評価および免疫染色（アルブミンおよび GLUT 1）により BBB の破綻状況を調査した。

3) 神経保護薬との併用時の影響

(in vitro 実験方法)

マウス脳スライス標本作製し、その器官培養モデルを用いて低酸素状態化での超音波照射の及ぼす影響を検討した。5%O₂ 状態下で 1 時間スライス標本を留置し、その直後に神経保護薬エダラボン (6 μM) を投与した。評価はスライス脳の死細胞数で行うこととし、死細胞状態は PI 染色で確認した。同観察は 7 日間にわたり行った。



実験シェーマ

<図 12>

(in vivo 実験方法)

ラットの脳梗塞再灌流モデルを小泉モデルで実施した。脳虚血状態は、レーザ血流計で確認し、60分虚血後塞栓子を抜去するとともに、エダラボン(3mg/kg)を静注した。再灌流時にエダラボンを投入したのは薬効が再灌流時にもっともよく保護効果を示すことが明らかだったためである。その7日後に脳を取り出し、2mm間隔のスライスを作成し、梗塞体積を求め、比較した。比較群はすべて脳梗塞状態であり、エダラボン単独投与群、超音波単独照射群、および超音波・エダラボン併用群、および対照群の4群で行った。

4) 霊長類への影響

対象は霊長類カニクイザル12頭、うち3例を非照射例、9例を超音波照射例とした。サルを麻酔下におき、経頭蓋的に開発した超音波プローブをあて、MCA血流を観測した後、治療用ビームを発射した。インターミットtent照射により60分間暴露し、その後覚醒させて神経学的症状を観察した。照射群のうち7例については7日後に脳を取り出し、他は翌日24時間後に脳を取り出した。いずれも図13に示す神経病理組織学的検査を行い、超音波による有害性を検討した。なお、ポジティブ・コントロールデータを得るために、ブタやラビットを用いてその脳に強力な超音波をあて、同標本を用いて同様の神経病理学的評価を行った。

霊長類を用いた安全性評価

対象:カニクイザル 12頭

比較群:正常3例、超音波照射群9例

神経学的評価:24時間後、7日後

神経病理組織学的評価方法:

光顕 : H.E.染色、Kluver-Barrera染色、Bodian染色

免疫光顕 : 抗APP抗体(22C11,Chemicon)、RCA-1抗体、
 α B crystallium、Hsp(heatshock protein)32(HO)、
Hsp40、Hsp60、Hsp70、Hsp90、
TUNEL(apoptosis)、COX2(cyclooxygenase-2)

<図 13>

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は実施施設での実験動物委員会の承認を得、その倫理規定を遵守

して行われた。また探索的臨床研究においては各施設の倫理委員会の承認を得、患者へのインフォームドコンセントを徹底し、同意を得られたものについて行うこととした。

C. 研究結果

① 経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発とその有効性評価

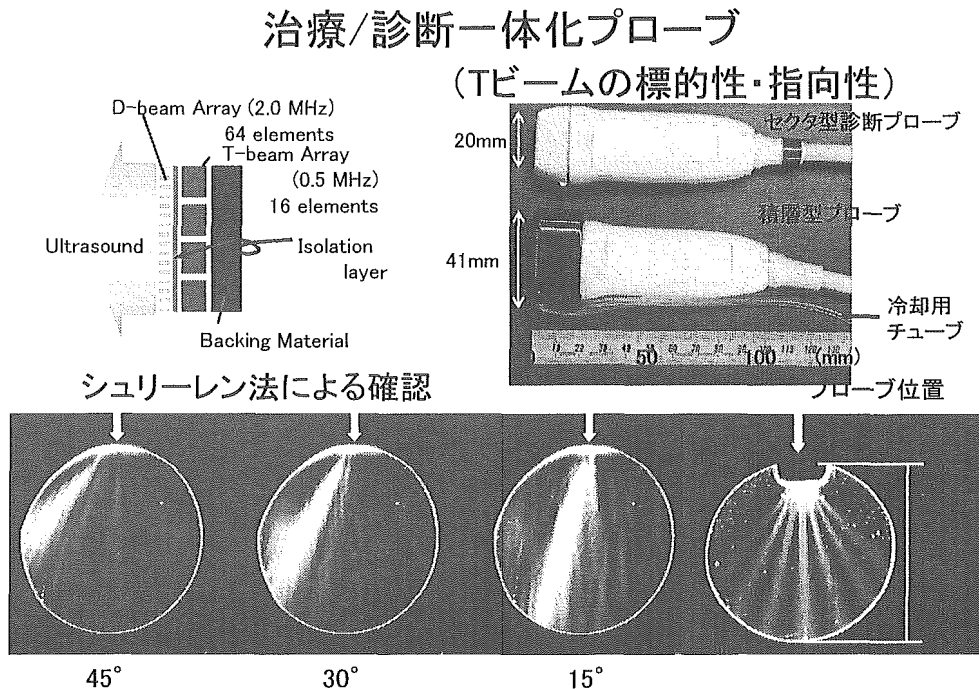
①-1. T/D 積層プローブの特性

1) コンピュータシミュレーション結果によって、積層方式でも目的とする T ビームおよび D ビームの強度および分解能が得られる見込みを得た。

2) 同結果に基づき、実際に積層型プローブを設計・製作した。図 14 のごとく、超音波プローブの表面に 2 MHz の振動子配列 (64 素子) を置き、その背面に T ビーム用振動子配列 (16 素子) を置き、全体として図上段のようなプローブとした。図から明らかなように、このプローブの形状は、市販の死んだ尿超音波プローブ H-50 とほぼ同等とすることができた。

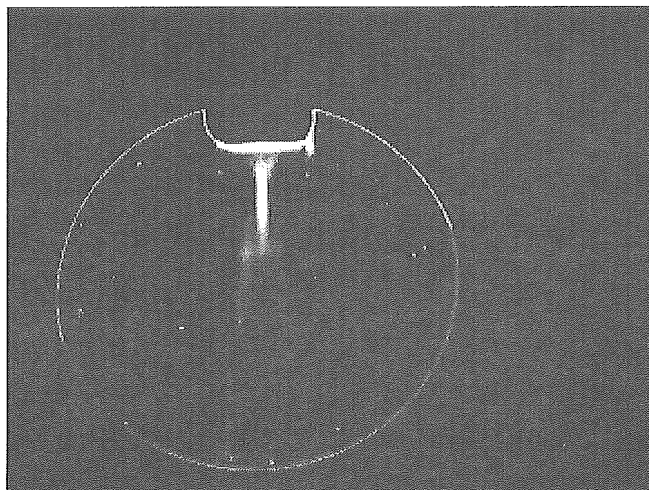
3) シュリーレン法によって確認された T ビームの指向性の例を図 14~15 に示した。設計どおり、 ± 45 度の範囲で低周波超音波ビームを標的方向に発射することができた。

4) また、開発した装置の D ビームによる画像診断特性の結果は、ファントム実験においてほぼ同等であることを示した。また、ヒト健常例による成績でも、図 16 に示すように、市販装置とほぼ同等の良好な画像および血流ドップラー信号を得ることができた。



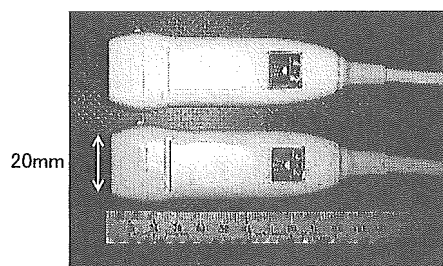
<図 14>

Tビームの標的スキャン



<図 15>

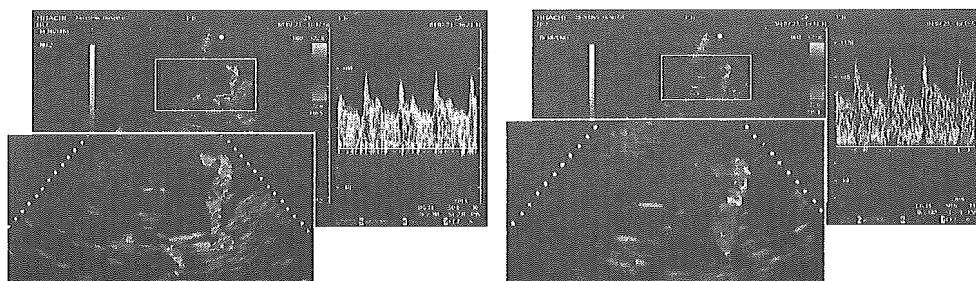
治療/診断一体型プローブ（診断像）



積層型プローブ

セクタ型診断プローブ

被験者: 28y.o. M

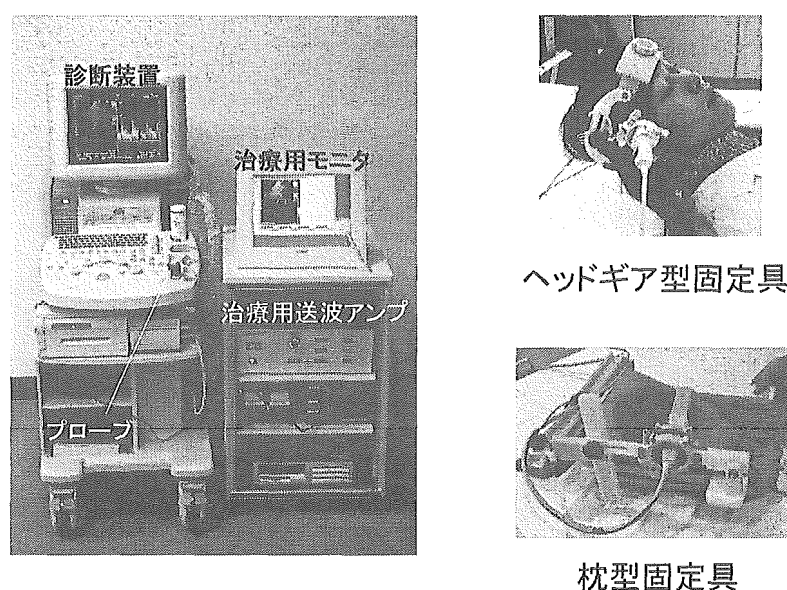


<図 16>

①-2. T/D 複合化システムの実験的検証結果

開発装置は上述のように T ビーム、B ビームそれぞれ初期の目的を達成する成績を示した。これは診断装置と結合した治療用システムを含む全システムが良好に作動した結果であり、その全体像を図 17 に示す。なお、制御システムがインターミット照射における照射・休止の時間設定および超音波照射強度の任意の設定が可能であり、そのことを示す操作画面も開発された。

治療システムの全体像



<図 17>

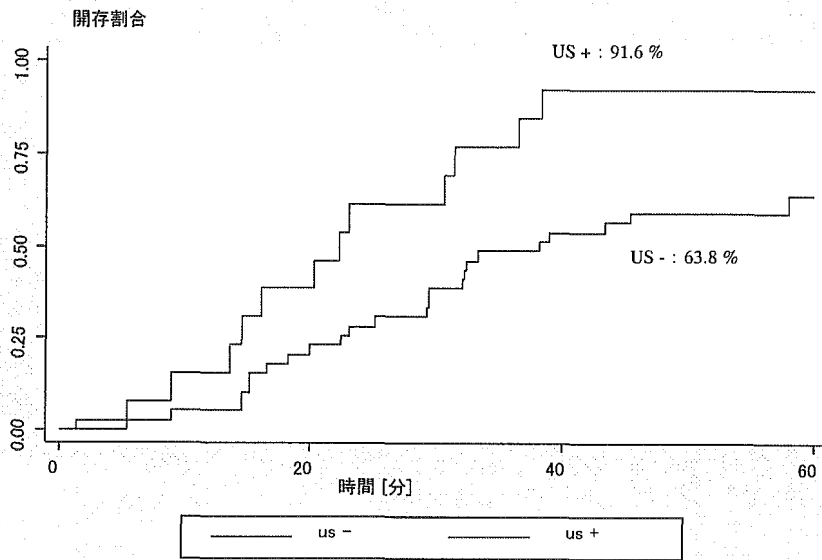
①-3. 頭部へのプローブ固定具

図 17 に示すように、2 種類のプローブ固定具を開発した。頭部固定に際しての被験者の痛み、圧迫感などについてそれぞれ意見を聴取した。その結果を踏まえ、再三固定具の微細な加工や変更を重ね、最終的に全員がおおむね満足する固定具とすることができた。

①-4. in vitro 実験による有効性評価結果

開発装置を用いて行った有効性の結果を図 18 に示した。図から明らかなように、60 分後の開通率はコントロール群 63.8%、超音波照射群 91.6%となり、両群間には優位な差があった。この結果は超音波照射強度が $0.05\text{W}/\text{cm}^2$ での結果であり、この値は採用したモデルのボトルネックとなる注射針装着部における超音波強度である。すなわち、この微弱な超音波強度の低周波超音波 500kHz、インターミット照射でも血流再開通率が十分得られることを実証するものである。

開存率の経時的変化(0.5W/cm²)



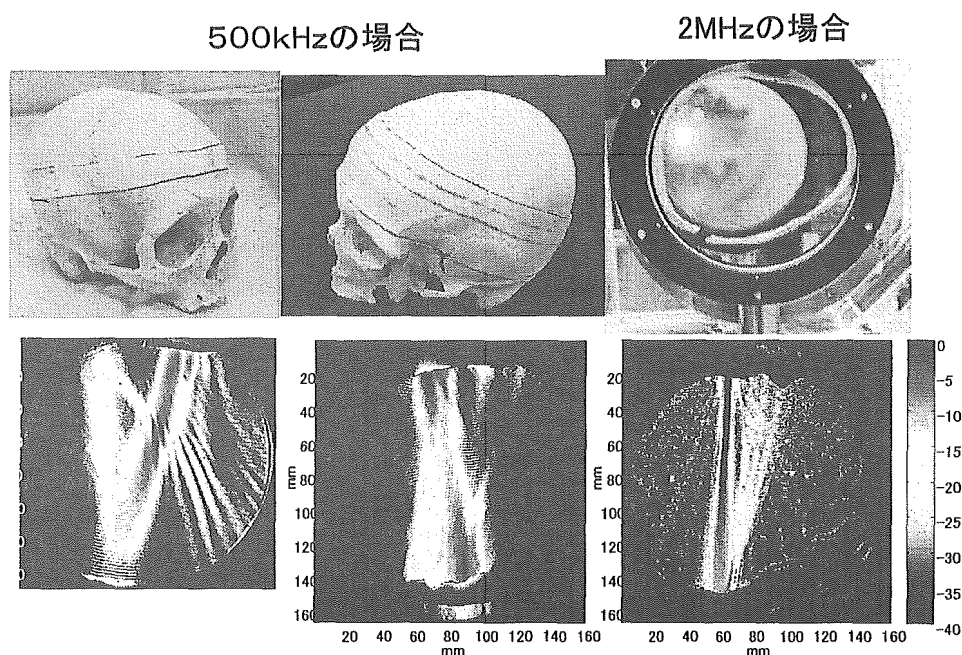
< 図 18 >

② 低周波超音波の音響学的安全性評価

②-1. 経頭蓋超音波照射による頭蓋内定在波

図 19 に頭蓋骨を介して照射された超音波による定在波の例を示す。図の上段は頭蓋骨とそのスライスを水槽内に入れ、シュリーレン実験をしているシーンであり、下段はシュリーレン法によって得られたビームが頭蓋内で多重反射している状況である。図から明らかなように、500kHz の低周波を照射した場合には、入射側に対する反対側での反射がおき、それが全体として2～3回の反射を繰り返す状況が明らかとなった。頭蓋内はこのような反射の繰り返しにより思わぬ方向に超音波ビームが到達しているものと予想された。しかもその反射波は入射波と重なり定在波を発生していることが明らかとなった。この定在波の音響強度はシュリーレン法によっては測定できなかったが、その輝度から理論値に近い音圧増強効果のあることが示唆された。なお、2MHz を用いた場合には、反対側に超音波が到達する時点で相当減弱しており、反射波の存在が確認できなかった。

頭蓋内での定在波の発生



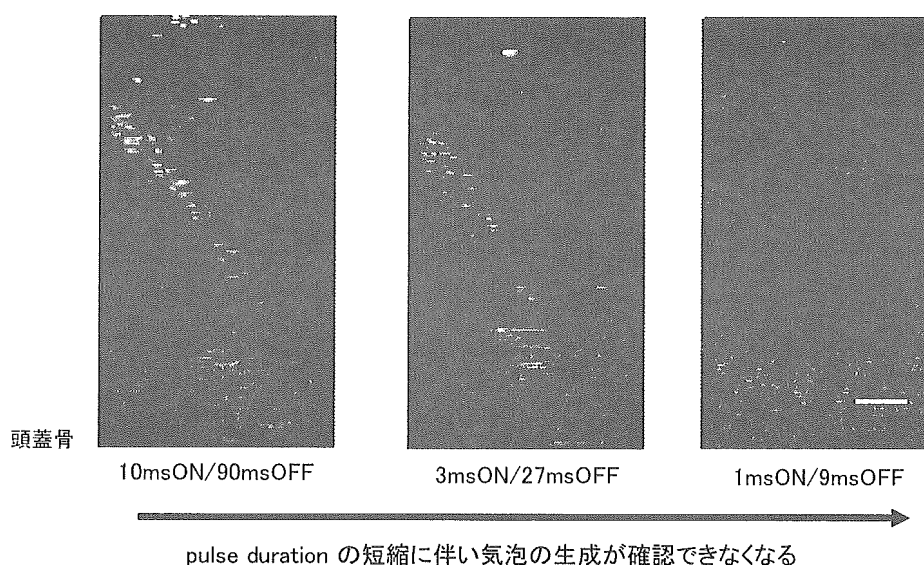
<図 19>

②-2. パースト波によるキャビテーションの発生

上述のように、頭蓋内では定在波が発生した。パースト波によっても定在波はもちろん発生し、音響強度が強い分だけ発生率は高いものと考えられた。実際にパースト波による定在波も存在した。この定在波によってキャビテーションを招く恐れがあるが、キャビテーションは1ms以上の持続時間がないとキャビテーションとして形成されないことが知られている。図 20 は、定在波が強く発生するように反射波

の方向と入射波の方向とを重ねた場合の例で、このときのキャビテーション発生状況を示している。図から明らかなように、デューティーサイクル 20% であっても、パルス持続時間が短くなるにしたがって定在波によるキャビテーションの発生は軽減された（図 20 右端参照）。このことから、本実験でのバースト波条件を調整することにより、場合によってはキャビテーションを発生させないバースト波照射法の可能性が示唆された。

バースト波によるキャビテーション発生

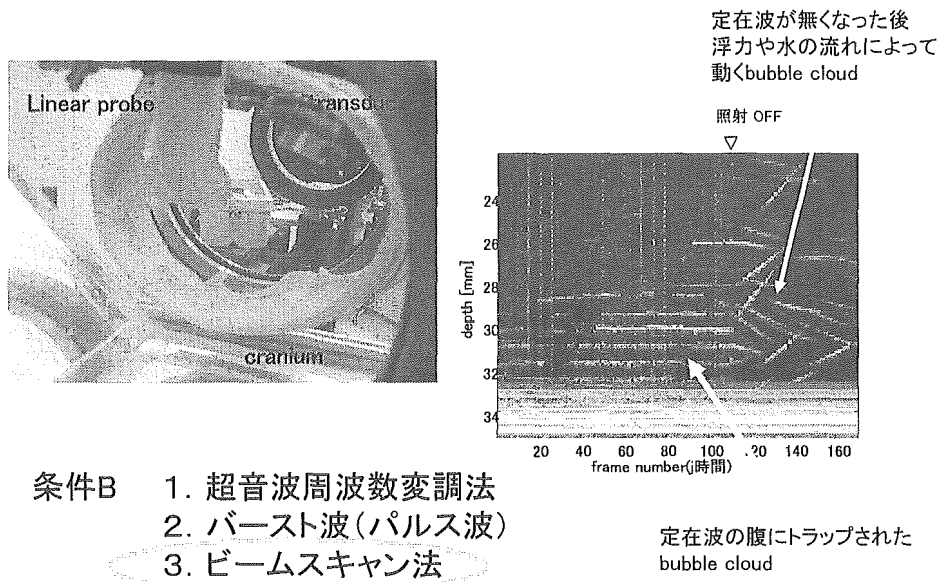


< 図 20 >

②-3. 定在波によるキャビテーションの補足

定在波によってキャビテーションが発生する可能性があったが、定在波は同時に発生したキャビテーションを補足する効果ももっていた。図 21 は、シュリーレン法によって確認されたキャビテーションの補足効果を示すものである。トラップされたキャビテーション群が超音波照射を停止することで持続的にその周辺にキャビテーションが拡散していく様子を撮影したものである。このことから、仮に頭蓋内にキャビテーションが発生した場合には定在波によってキャビテーション群として増強され、かつ、発生したキャビテーションは単純に消失することなく浮遊し続けること、また、このキャビテーションバブルに超音波を照射すると、診断レベルの超音波でもこのバブルを破壊し、バブル破壊に伴い極所的な温度上昇や細胞破壊を招く恐れのあることが明らかとなった。それゆえ、本開発における治療・診断併用法においては、治療ビームによる定在波の発生がまったくないように設計されることが要求されることが明らかとなった。

定在波によるバブルのトラップ



<図 21>

②-4. マウス脳培養スライスへの影響

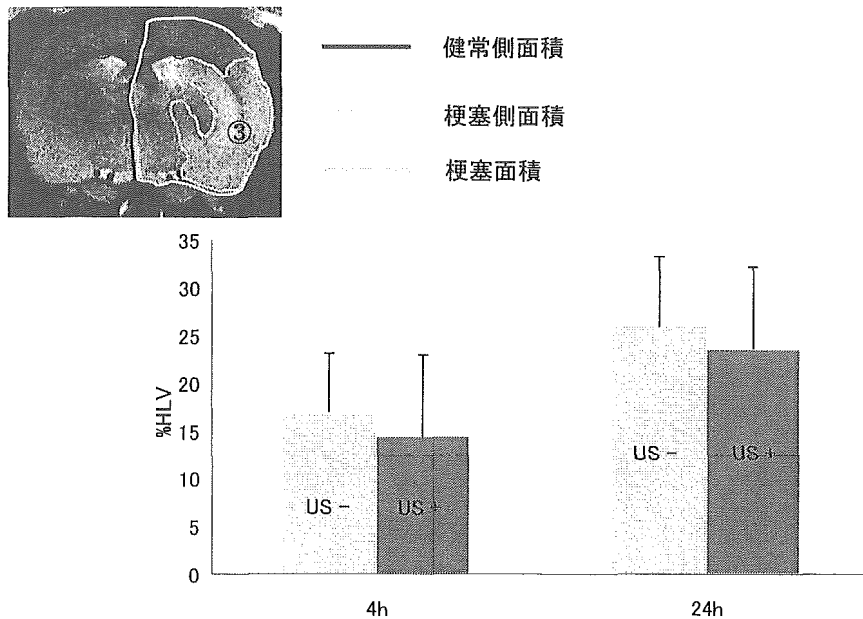
PI 染色による脳神経系の死細胞数を光学顕微鏡で検査した結果、定在波の腹の部分、すなわちもっとも音圧の高い領域にスライスを置いてもそれによる死細胞数の増加はみられなかった。すなわち、本開発における治療用超音波条件が最大の状況でも神経細胞には無害であることを確認した。

③ 脳梗塞状態に対する医学生物学的安全性評価

1) 脳梗塞領域への影響

図 22 は、梗塞領域を健常側の面積で除した梗塞率を出し、4 時間ごと 24 時間後の結果をグラフに示したものである。その結果から明らかなように、超音波照射の有無にかかわらず、梗塞領域は一定に存在し、経頭蓋的超音波照射が脳梗塞領域を拡大することのないことを確認した。

虚血脳に対する超音波の安全性

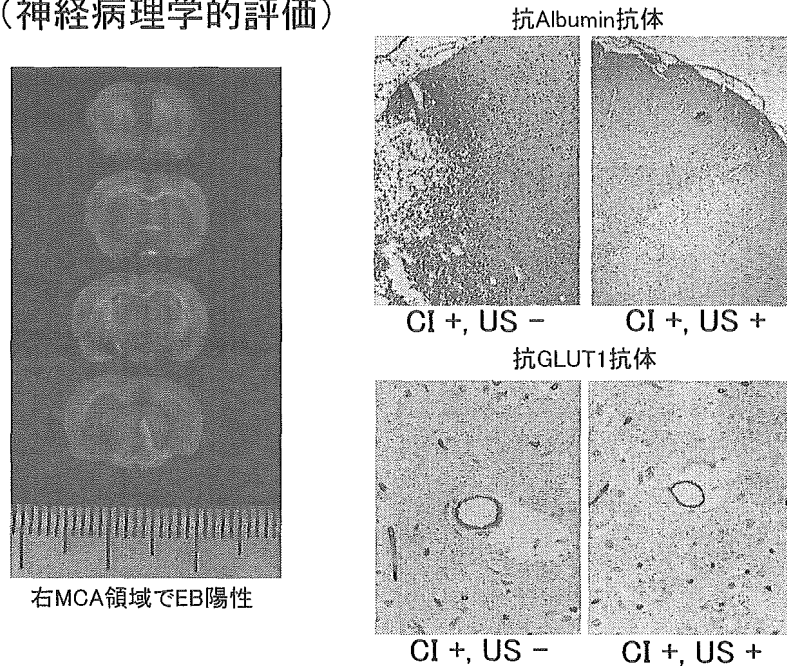


<図 22>

2) 血液脳関門への影響

図 23 に結果の典型例を示す。脳梗塞により血液脳関門が破綻していることをエバンスブルーで確認した例を同図左に示した。エバンスブルーの評価では、超音波の照射により血液脳関門破壊領域が拡大することはなかった。また、免疫染色による結果の典型例を同図右に示した。アルブミン染色においても、GLUT1 染色においても、BBB の破綻が超音波照射によって増強されることはないことが示された。すなわち、開発した低周波超音波照射の最大条件によって血液脳関門の破壊が増強されることは脳梗塞状態において認められなかった。

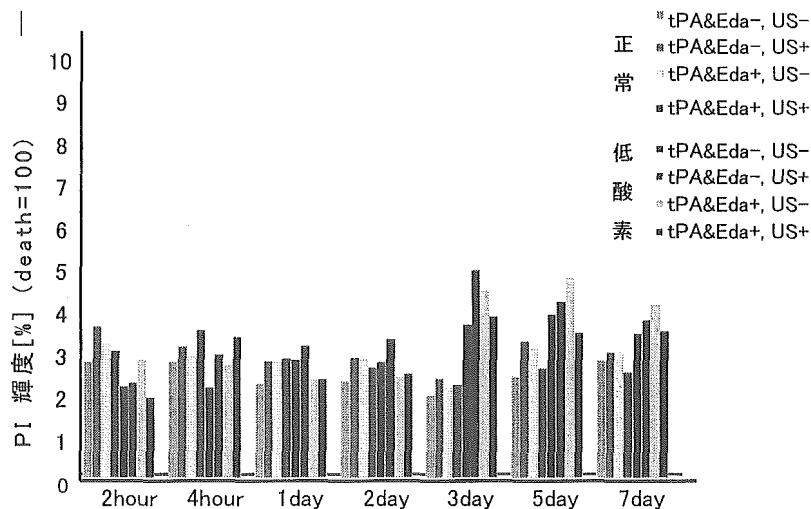
ラット脳梗塞モデルを用いたBBBへの超音波作用
(神経病理学的評価)



<図 23>

3) 神経保護薬との併用時の影響
(in vitro 実験方法)

図 24 に示すように、7 日間にわたり死細胞数は徐々に増加するが、各群間に有意差を認めなかった。エダラボン投与による神経保護効果を低周波超音波が阻害しないことを明らかとした。



マウス脳スライス内死細胞率の経時的変化

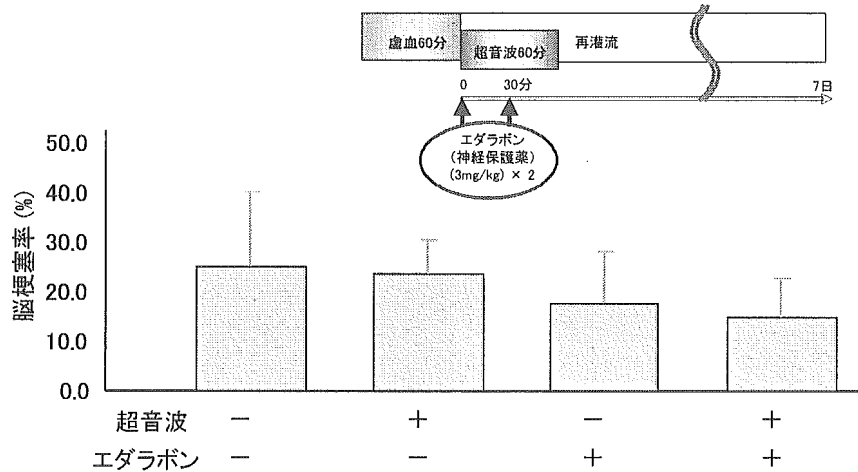
(n > 4, bar = S.D.)

<図 24>

(in vivo 実験成績)

神経保護薬投与下の脳梗塞領域を図 25 に示す。図から明らかなように、全群間に有意差はなく、超音波照射を行っても、神経保護薬の薬効を阻害しないことが明らかとなった。

神経保護薬投与下虚血脳における超音波作用 (in vivo 実験)

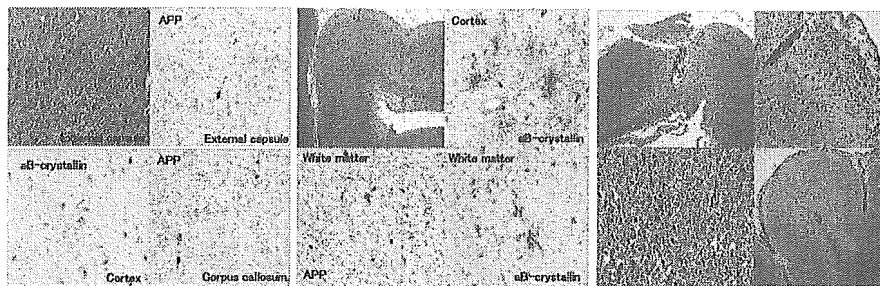


<図 25>

4) 霊長類への影響

(1) 図 26 にブタおよびラビットによって得られたポジティブ・コントロールの神経病理学的所見を示す。すなわち、超音波による障害は、軽度・中等度・重度に大別された。

Positive Control (ラビット、ブタの脳へ強力US照射)



軽度

白質に軸索断裂出現APP陽性軸索 αB-crystallin陽性星状膠細胞

中等度

軸索断裂、血管の断裂(出血)。Hsp32陽性の microglia/macrophagesの浸潤 αB-crystallin陽性反応性星状膠細胞増生。急性期に星状膠細胞のclasmotodendrosis

重度

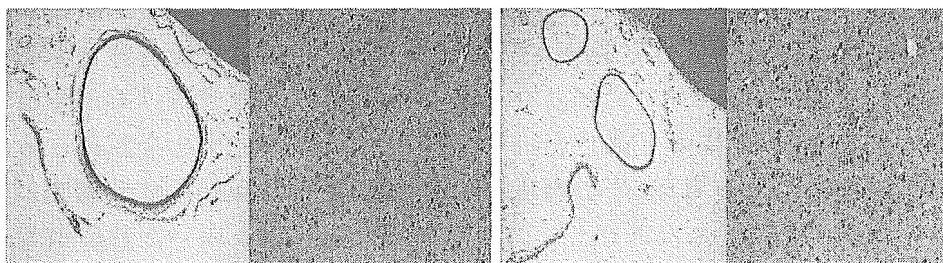
大脳皮質表層に強い外傷性病変(二次性血管障害) 軸索断裂・出血。Hsp32陽性の microglia/macrophagesの浸潤 αB-crystallin陽性反応性星状膠細胞増生。急性期には星状膠細胞のclasmotodendrosis

<図 26>

(2) カニクイザルについては、図 27 に示すように、神経病理・組織学的に有意な障害のないことが実証された。すなわち、経頭蓋超音波脳血栓溶解装置を用いた経頭蓋的超音波照射が正常脳組織に対してはまったく無害であることを実証した。

霊長類健常脳に対する安全性の神経病理学的結論

- 1) 肉眼的に明らかな出血、軟化、腫脹、腫瘍を認めない。
- 2) 断面所見でも明らかな出血、軟化、腫脹、腫瘍を認めない
- 3) 神経細胞変性像および脱落像、反応性ミクログリアや反応性星状膠細胞の出現、髄鞘脱落、軸索断裂、APP陽性軸索の出現、熱ショック蛋白(α B-crystallin、Hsp27、Hsp32、Hsp40、Hsp60、Hsp70、Hsp90)陽性細胞などを認めなかった。



<図 27>

D. 考察

① 経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発とその有効性評価

開発した経頭蓋超音波脳血栓溶解装置は初期の目的を達成し、治療下においても従来の診断装置の精度と等しい精度で治療状態を実時間的に監視可能であり、かつ標的部での塞栓については優位な再開通率増高をきわめて微弱な超音波強度でも実現しうることを示した。今日、経頭蓋超音波血栓溶解療法として、診断用の経頭蓋ドップラー法 (Transcranial Doppler; TCD) や経頭蓋カラードップラー断層法 (Transcranial color flow imaging; CFI) などによる診断装置を用いた有効性が臨床的に示されている。それらの診断装置は 2MHz のパルス波を使用している。TCD を用いた臨床成績では、tPTA 投与単独例での血流再開通率が 30%程度であるのに対し、50%程度に再開通率が達した。また、TCCFI によってもその有効性が示唆されてきた。しかしながら、1MHz 以下の低周波超音波を用いた血栓溶解療法の臨床的有用性は次に述べる成績以外に報告されていなかった。低周波超音波を用いた脳血栓溶解療法の臨床成績としては、Duffert Schofer らによる成績のみが報告されていた。彼らの成績は 14 例中 4 例において梗塞領域以外での出血を認め、うち 1 例は死亡例となるものであった。その原因については未だ明快な科学的解明はなされていなかったが、後述するように、その主原因のひとつは、用いた超音波ビームの特性によるものであると考えられた。したがって、本開発装置を臨床応用する場合には、彼らの臨床失敗例を回避する適切な実験成績と安全性確保の手法を採用する必要があるものと考えられる。

② 低周波超音波の音響学的安全性評価

バースト波および連続波による音響学的安全性の問題点を明らかにし、条件によっては平均音圧が同じであっても頭蓋内においてはキャビテーションの発生しうることを実験的に示した。その結果によれば、Duffert Schofer が用いた超音波バースト条件は頭蓋内の反射により定在波を発生し、梗塞領域以外でのキャビテーションの発生が示唆された。本実験は、水中での実験結果であり、生体組織においては水に比べてキャビテーションなどは発生しにくいものと予想される。しかしながら、この水中での実験成績は生体組織内で起こりうるキャビテーション発生の状況を推測させるものである。

③ 脳梗塞状態に対する医学生物学的安全性評価

経頭蓋超音波照射がもたらす医学生物学的問題はほとんどないことを、MRI による脳梗塞領域の評価、BBB の破綻状態、神経保護薬との併用状態、および霊長類 (健康例) への暴露実験をとおして確認した。我々の経頭蓋超音波脳血栓溶解装置がもつ最大出力条件においても、正常組織および脳梗塞組織、さらには再灌流状態において、なんらの有害事象を招かないものと考えられる。しかしながら、Duffert

Schofer の臨床成績が示す高齢者における正常組織での出血問題については必ずしも十分こたえられる結果を我々は得ていない。ここで行った動物実験は、健常成獣による成績であり、糖尿病、高血圧、動脈硬化などによって脆弱化した血管に対する安全性は検討されていないからである。今後脆弱化した血管に対する本超音波照射法の無害性を実証することが必要と考えている。このような動物実験をとおしてから臨床応用へ展開できるものと考えられる。

E. 結論

① 経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発とその有効性評価

開発装置はその機能・性能において臨床適用可能な能力を有するものであることを確認した。

② 低周波超音波の音響学的安全性評価

低周波超音波による経頭蓋照射法の場合には、頭蓋内における多重反射およびそれによる定在波の発生、また、その定在波によるキャビテーションの発生、さらにはキャビテーションの補足効果などを考慮しなければならないことが明らかとなった。本開発で我々が用いている超音波条件では、キャビテーションのような組織破壊的状况が頭蓋内においても生じないことを明らかにした。

③ 脳梗塞状態に対する医学生物学的安全性評価

開発した経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の最大超音波照射条件が、医学生物学的に概ね無害であることを示した。

(今後の展望)

3年間にわたる本研究事業の結果、ヒトに適用できる経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発に成功した。図 28 に開発装置の全容を示す。当初の課題であった治療と診断を一体化した超音波システムの開発に成功し、特にその治療診断併用プローブの同一化は、臨床適用上きわめて有効であると考えられた。また、音響学および医学生物学的安全性を確認し、その臨床応用を待つばかりの状態に概ね至っていた。しかしながら、これを臨床応用するには、血栓溶解剤 (tPA) の国内承認を得る必要がある。現在、その承認の得られることを待ち、倫理委員会に提出する資料を用意している。tPA の国内承認と承認後の審査成績を待つて本開発装置による臨床応用に進みたいと考えている。

本研究開発による探索的臨床研究への展開はできなかったが、次のような派生効果があることを言及しておきたい。図 29 に示すように、本法は脳梗塞患者の超急性期治療に貢献し、同死亡者数や要介護老人数の軽減に結びつくものと期待される。さらに、他の虚血臓器への適用も可能であり、治療診断併用プローブの活用範囲はきわめて広いものと考えられる。また当然であるが、本法は一種の超音波による DDS であり、このような手法が薬物やマイクロバブル、ナノバブルとの併用によってさらに多くの DDS への道が開かれるものと期待されている。このような超音波の治療領域への活用は、新たな超音波医療産業の拡大にも寄与するものと考えている。

完成装置による治療過程

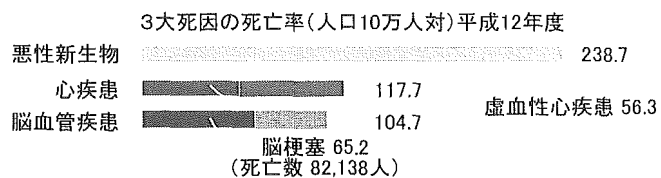


<図 28>

成果のまとめ II

派生効果

- (1) 脳梗塞患者数の(同死亡者数や要介護老人数)の軽減
 家族・介護人の負担軽減
 医療費(2兆円/年)からの軽減



- (2) 他の虚血臓器への適用(治療・診断一体化プローブと装置)
 心筋梗塞、深部静脈血栓など
- (3) 新DDS技術への応用
 血栓親和性薬剤 + US (標的性と診断能力)
 ↓
 リガンドなどによる標的性薬剤 + US
 マイクロバブル等の非標的薬剤

<図 29>

II. 年度別研究概要