

中周波数経頭蓋超音波脳血栓溶解法の安全性に関する検討  
—サル急性脳梗塞モデル実験に於ける polyubiquitination とオートファジー—

研究分担者 福田隆浩 東京慈恵会医科大学神経病理学研究室

研究要旨

ユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系は不要な細胞内物質や異常な蛋白質、凝集物の主要な分解系として機能しており、前者はユビキチン自身のリジン48 (K48) を介したポリユビキチン化がプロテアソームに認識され特異的タンパク質の分解へと働く。後者はリジン63 (K63) を介したポリユビキチン化がp62に認識され、オートファゴソームへ取り込まれ、ライソゾームと融合し、非特異的分解・リサイクルが行われる。今回、右内頸動脈（あるいは中大脳動脈）塞栓術を行った後、組織型プラスミノーゲン活性化因子 (tPA) のみで治療した群（5頭）と、tPAと超音波照射群（5頭）において、脳塞栓によるユビキチン化および超音波照射による影響を免疫組織化学的に検索した。塞栓術の24時間後に採取したすべてのサル脳梗塞病変および病変周囲脳組織に、ubiquitin, K48 polyubiquitin, K63 polyubiquitin, p62, LC3の発現を認めず、ユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系の関与はないことが示唆された。梗塞発症24時間後に虚血による細胞障害にユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系が顕著に発現する可能性はあるため、今後検索の必要がある。

A. 研究目的

ユビキチン・プロテアソーム系<sup>1</sup>及びオートファジー・リソソーム系<sup>2</sup>は不要な細胞内物質や異常な蛋白質、凝集物の主要な分解系として機能しており、何れもユビキチンが関与している。

ユビキチンは、76個のアミノ酸からなる蛋白質で、標的タンパク質に対するユビキチンの付加はユビキチンシステムと呼ばれている。ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、さらにユビキチン転移酵素 (E3) の3つの酵素によってユビキチン化が行われており、標的タンパク質のリジンの側鎖のアミノ基 (-NH<sub>2</sub>) とユビキチンのC末端のグリジジンがアミド結合することでユビキチンが付加され、更にそのユビキチンの中の7つのリジンの側鎖 (K<sup>6</sup>, K<sup>11</sup>, K<sup>27</sup>, K<sup>29</sup>, K<sup>33</sup>, K<sup>48</sup>, K<sup>63</sup>) に更にユビキチンが付加され、ポリユビキチン化される。タンパク質分解に関与するのが、K<sup>48</sup> のポリユビ

キチン化であり、26Sプロテアソームに認識されタンパク質分解が行われる<sup>3,4</sup>。一方、K<sup>63</sup>のポリユビキチン化は、DNA修復<sup>5</sup>、翻訳調節、シグナル伝達などに関わり機能しているとともに、神経変性疾患の封入体等変異タンパク質をオートファジー・リソソーム系非選択的分解に導くものとしてK<sup>63</sup>ポリユビキチン化が注目されている<sup>6,7</sup>。

オートファジーは一般に非選択的なタンパク質分解経路であり、栄養飢餓や異常タンパク質の蓄積などの刺激により、細胞質の単膜構造体・隔離膜が伸張し細胞内小器官を含む細胞質成分を取り囲んだ脂質二重膜構造体（オートファゴソーム）が形成される。オートファゴソームはライソゾームと膜融合を起こし、取り込まれた物質が分解される。このオートファジー形成には、オートファジー関連タンパク質 (Atg) が関与し、特に、Atg8である microtubule-associated protein 1 light

chain 3 (LC3)とオートファジー選択的基質である p62 がオートファゴソーム形成に重要であると考えられている<sup>9</sup>。

神経変性疾患以外に、脳挫傷や硬膜下血腫など外傷性頭蓋内損傷<sup>9,10</sup>、虚血性脳障害<sup>11</sup>において、ユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系が発現することが報告されている。本研究では、プロテアソームおよびオートファジーに関与するポリユビキチン化の病態をサル急性脳梗塞モデル動物脳において検索した。

## B. 研究方法

対象は右内頸動脈あるいは中大脳動脈塞栓術を行った後、tPAのみで治療した群（5頭：monf705, monf706, monf707, monf708, monf710）とtPA+超音波照射群（5頭：monf701, monf702, monf703, monf704, monf709）の脳梗塞病変部と病変周囲脳組織である。血栓数、血栓サイズ、tPA治療法（投与時間、投与量）および超音波照射は既に錢谷らが報告した条件と同一である。中枢神経系は塞栓術24時間に採取している。ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用い、ユビキチン、K<sup>48</sup> polyubiquitin、K<sup>63</sup> polyubiquitin、p62、LC3に対する抗体による免疫組織化学的検索を施行した。免疫組織化学法は、抗原賦活法として0.01M citrate bufferにて121°C 10分オートクレーブ処理後、10% normal horse serum, 5%BSA, 0.01%Tween20, 0.01MPBSにて希釈した一次抗体に4°C overnight反応後、biotinylated anti-Ms/Rb IgG R.T. 1時間、avidin-biotin HRP complex, R.T. 1時間反応後、hematoxylinにて核染を行った。

### （倫理面への配慮）

霊長類実験は国立循環器病研究センター先進医工学センター内放射線部で行われ、脳摘出後は東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター医用エンジニアリング研究室（ME）及び、神経科学研究部神経病理学研究室で病理組織学的評価を行った。両施設それぞれにおいて実験動物委員会の承認を得、実験動物委員会規定に基づく倫理的措置の下に実験全体が施行された。ただし、塞栓状態から10時間以上生存していたので

ここでは死亡例も含めて、検討した。

## C. 研究結果

今回検索したすべてのサル脳梗塞病変および病変周囲脳組織に、ubiquitin, K48 polyubiquitin, K63 polyubiquitin, p62, LC3の発現を認めなかった。

## D. 考察

ユビキチン化はフォールディング異常な蛋白質や不要になった蛋白質を細胞から除去するユビキチン-プロテアソーム系が、K<sup>48</sup>リジン残基を介してポリユビキチン化することにより活性化すると考えられている。一方、オートファジーは細胞内の蛋白質を分解し、異常な蛋白質の蓄積を防いだり、過剰に蛋白質合成したときや栄養環境が悪化したときに蛋白質のリサイクルを行うシステムで、K<sup>63</sup>リジン残基を介してポリユビキチン化が関与していると考えられている。ラット脳梗塞において、超音波照射後24時間後に heat shock protein 70 (HSP70) が病変周囲神経細胞や星状膠細胞に発現していることを以前我々は報告した。HSP70発現から、梗塞病変および病変周囲脳組織の組織変化にユビキチン化の関与が推測され、今回ポリユビキチン化を免疫組織化学的に検索した。ヒトおよびげっ歯類の脳外傷においては、生化学的検索で、発症後4時間より24時間で、K<sup>48</sup>あるいはK<sup>63</sup>のリジン残基を介するポリユビキチン化が始まることが知られている<sup>9,12-15</sup>。また、中枢神経系の虚血モデルにおいて、オートファジー・リソソーム系が関与していることが知られている<sup>16,17</sup>。今回のサル塞栓モデル動物では、梗塞発症24時間経過時の組織所見であり、梗塞病変および病変周囲組織に、ユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系の関与はないことが示唆された。しかし、これは免疫組織化学的に同定できなかっただけで、梗塞発症24時間後に虚血による細胞障害にユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー

ジー・リソソーム系が顕著に発現する可能性はあり、今後検索の必要がある。

## E. 結論

サル塞栓モデル動物では、梗塞発症24時間経過時の組織所見であり、梗塞病変および病変周囲組織に、ユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系の関与はない。

1. Lehman, N.L. *Acta Neuropathol* **118**, 329-347 (2009).
2. Uchiyama, Y., *et al. Histochem Cell Biol* **129**, 407-420 (2008).
3. Petroski, M.D. *et al. Cell* **123**, 1107-1120 (2005).
4. Ciechanover, A. *EMBO J* **17**, 7151-7160 (1998).
5. Bergink, S. *et al. Nature* **458**, 461-467 (2009).
6. Lim, K.L. *et al. Neurobiol Dis* **43**, 9-16 (2011).
7. Tan, J.M., *et al. Hum Mol Genet* **17**, 431-439 (2008).
8. Itakura, E. *et al. J Cell Biol* **192**, 17-27 (2011).
9. Yao, X., *et al. Brain Res* **1182**, 116-122 (2007).
10. Liu, C.L., *et al. J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 674-683 (2008).
11. Ginet, V., *et al. Am J Pathol* **175**, 1962-1974 (2009).
12. Chen, H.C., *et al. Spine (Phila Pa 1976)* (2011).
13. Luo, C.L., *et al. Neuroscience* **184**, 54-63 (2011).
14. Smith, C.M., *et al. Neurobiol Dis* **43**, 52-59 (2011).

15. Siman, R., *et al. J Neurotrauma* **26**, 1867-1877 (2009).
16. Liu, C., *et al. J Neurochem* **115**, 68-78 (2010).
17. Qin, A.P., *et al. Autophagy* **6**, 738-753 (2010).

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kyosen SO, Iizuka S, Kobayashi H, Kimura T, Fukuda T, Shen J, Shimada Y, Ida H, Eto Y, Ohashi T. Neonatal gene transfer using lentiviral vector for murine Pompe disease: long-term expression and glycogen reduction. *Gene Ther.* 2010 Apr;17(4):521-30.

Fukuda T, Akiyama N, Ikegami M, Takahashi H, Sasaki A, Oka H, Komori T, Tanaka Y, Nakazato Y, Akimoto J, Tanaka M, Okada Y, Saito S. Expression of hydroxyindole-O-methyltransferase enzyme in the human central nervous system and in pineal parenchymal cell tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010 May;69(5):498-510.

### 2. 学会発表

松果体実質細胞腫瘍の腫瘍マーカー その3 第41回日本神経病理学会 2010年04月 東京

Fabry病knockoutマウスの神経病理 第41回日本神経病理学会 2010年04月 東京

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

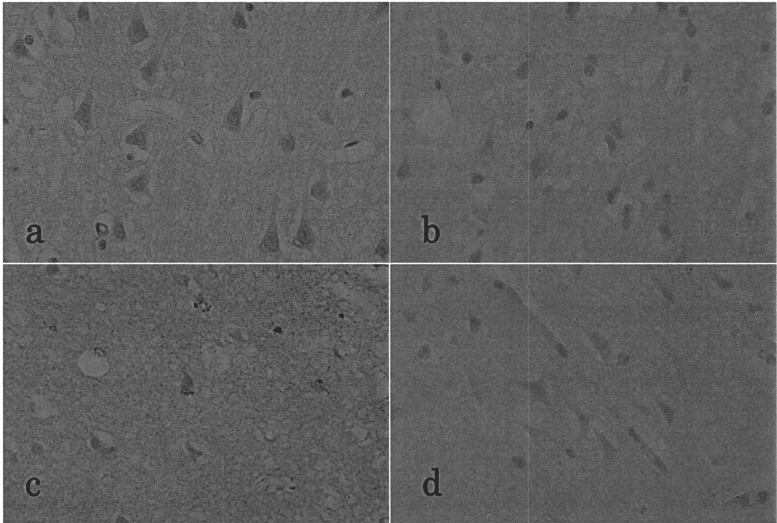


図1 サル灰白質梗塞巣における免疫組織化学  
梗塞巣において、LC3 (a)、K63 polyubiquitin (b)、K48 polyubiquitin (c)、p62 (d)  
の発現は認められなかった。



厚生労働省科学研究費補助金(医療技術実用化総合研究事業)  
分担研究報告書

超音波血栓成長抑制効果の研究  
—血栓成長抑制・再開塞予防の可能性—

研究分担者	金本光一	東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター 医用エンジニアリング研究室 准教授
	古幡 博	東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター 医用エンジニアリング研究室 教授
研究協力者	澤口 能一	東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター 医用エンジニアリング研究室 研究員
	王 作軍	東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター 医用エンジニアリング研究室 研究員
研究分担者	小川 武希	東京慈恵会医科大学 救急医学講座 教授

研究要旨

本厚労科科研の目的の一つは、TPA 適用開始時間の延長である。これを実現する為には、再灌流障害の抑制と再開通時間の短縮が根本的な課題解決ポイントと考えられる。後者の再開通時間短縮には、血栓自体のサイズの重要が治療開始までの間に血栓の成長を抑制することができれば、再開通時間短縮にもつながる、ものと期待される。それゆえ本分担研究では、超音波による血栓溶解効果の可能性を検討した。この超音波血栓抑制効果は一般的に再開塞の予防にも関与することは周知であろう。様々な血流再開通療法において、血栓再形成による再開塞は非常に重要な問題である。血栓形成時点で超音波を照射すると、血栓形成が妨げられたという報告がすでにある。本研究では、超音波照射による血栓成長抑制を検証すべく、*in vitro*にてウシフィブリン血栓および、低強度中周波数超音波を用いて、超音波による血栓成長抑制効果を超音波の音響強度ごとに定量的な評価を行った。

血栓成長過程に超音波照射した群と超音波非照射群とを比較した結果、適切な音響強度の範囲において顕著に血栓成長を抑制できることが示された( $p < 0.05$ )。また、この血栓抑制効果は音響強度依存的に増強することが示唆された。本研究で見出した低強度の中周波数超音波による血栓成長抑制効果は、臨床的な意味で血栓溶解時間の短縮に貢献すると共に、血流再開通法に伴う再開塞リスクを低侵襲的に抑制するという可能性がある。今後の超音波振動子など臨床適用可能な実用化研究を進めることで、実際の臨床現場に活用される期待が高い。それにより超音波血栓溶解療法の開始時間延長という所期の目的実現に少なからぬ貢献がありうるものと考ええる。

## A. 研究の目的

本邦死因第二位の心臓疾患の四割を占める心筋梗塞および同三位の脳血管障害の六割を占める脳梗塞は、いずれも血栓形成による血管閉塞状態が主原因である。この血流途絶状態、すなわち組織へのライフラインの遮断状態を救済するために、急性期治療として血栓溶解療法やバルーンカテーテル、ステント留置等の経皮的血管形成術 (PTA) による再開通法が適用されている。

本研究では、血栓溶解剤と併用する経頭蓋的超音波照射により、TPA 用量の減少化が第一の目的であり、治療開始時間延長が第二の目的となっている。我々はその第二の目的である治療開始までの時間延長には、再灌流障害等による頭蓋内出血の軽減が重要であると共に、超音波による再開通時間短縮それ自体も極めて重要な解決策と考えている。その為には血栓自体の成長を抑制することで血栓サイズを小さく抑えておけば再開通時間も一層短縮できるものとする。それ故、急性脳梗塞発症時から TPA 治療開始までの時間帯、すなわち脳梗塞発症から考え救急車内、及び病院内に搬入されてからの諸検査の時間帯も含め、成長し続ける血栓を抑制し、そのサイズを初期サイズのままにとどめることができれば、溶解時間も短縮できると考える。

この血栓成長を抑制する、という考え方は、治療開始前の血栓成長に効果があるばかりでなく、広く Intervention 手法として適用されている各種 PTA 技術の再開塞問題にも敷衍することができる。再開塞は血管内皮やステント表面での血栓成長によって生じるからで、そのような治療後

の血栓再形成を招来するからである。それ故今日二次予防として各種抗血小板薬、抗凝固薬療法が施行されている。また凝血学的観点から、抗高脂血症薬等が適用され、一般的に言われる「血液さらさら」という考え方で再開塞予防が施行されている。このような血栓の発生からその成長、そして再塞栓化を抑制するための薬学的療法に対し、物理的な効果を主体とする超音波による新規療法の可能性を我々は考えている。

超音波による血栓成長抑制効果については、既に吉澤によって大股動脈血栓モデルを用いた非閉塞化実験で一部その有効性が示されている。彼らは股動脈内をバルーンカテーテルで内皮損傷させ、さらに血流を 2 時間遮断することで、血栓形成により 100 % 血管が閉塞される状態を作成し、その 2 時間の血流遮断中に 200 kHz の超音波を照射し続けることで、閉塞状態にいたらず、血栓成長を抑制可能であると報告している。すなわち音響力学的な振動作用によっても、血栓成長抑制が可能ではないかという成果を示している。しかし、このような物理的の血栓成長抑制法の報告は筆者らの知る限りにおいて、ほかになく、またこの血栓成長抑制効果の定量的評価法についても不明であった。本研究では、超音波による血栓成長抑制効果の検証と、定量的評価を目的として、吉澤らと類似の 500 kHz 中周波数超音波照射による *in vitro* 実験を行い、血栓成長抑制効果を定量的に評価した。

## B. 研究方法

以下の方法で一対の血栓を作成し、さらに血栓の上に血漿を加えて血栓を厚み方向に成長させた。この間一方に

超音波を照射し、もう片方には超音波曝露がないようにして、血栓の厚みを比較することにより照射した超音波による、血栓成長抑制効果を評価した。

### B. 1 血栓作製

厚さ 3 mm のアクリル板を上下よりそれぞれ 1.5 mm ずつ 15Φ、17Φ の円形に削り、階段状に穴を開けたものの 15Φ 側に 0.3 mm のポリカーボネート板を張り付けた。これを血栓作製セルとして用いた (Fig. 1a)。この 15Φ の穴に、凍結乾燥ウシ血漿 (sigma) を超純水で溶解したウシ血漿に、水に 250 mM CaCl<sub>2</sub> を 10% 加えた溶液 (最終濃度: 25 mM) を 270 μL 注ぎ、湿潤させた密閉容器内で 37°C、20 分間放置して、直径 15 mm、深さ 1.5 mm の円盤状血栓を作製した。

### B. 2 超音波照射条件

超音波照射実験装置として、超音波照射プローブと血栓作製セルの距離をダイヤルで任意に調整可能とし、かつプローブ (直径: 10Φ) を血栓の中心軸上にしっかりと固定できるようにデザインした (Fig. 1c)。また、超音波曝露、非曝露血栓を同時に検討できるようにした。超音波照射は、37°C の水槽内に超音波プローブ先端を水面より 2 mm 程度沈めるようにして行った。その際、底面からの超音波の反射がセルに到達しないように、超音波の反射を防ぐため、水槽底面には 5 mm の超音波吸音材を敷き、さらにプローブと血栓の固定台自体を数度傾けて配置した。

超音波振動子の音場分布を AIMS (Onda corporation, Sunnyvale, CA) を用いて測定した。実測結果を Fig. 3 に示す。この音場分布をもとに超音波振動子表面から血栓セルまでの距離を 28 mm にセットした。この距離は、Fig.

3 左図から明らかなように遠距離音場における中心軸上のピーク値を呈する箇所である。その距離での音場断面は Fig. 3 右図に示すように、中心より ±8 mm の範囲内において一峰性の強度分布を示す箇所であった。実験は、同分布のピーク値、すなわち中心軸上の値が 0.72 W/cm<sup>2</sup> となるように、駆動電圧を調整した。

### B. 3 血栓増加抑制実験

血栓上部の 17Φ の穴に新たにウシ血漿 (400 μL) を注入し、気泡が入らないように十分に留意しながら 0.3 mm のポリカーボネート板で蓋をした。このように血漿と血栓を直接接触させることで血栓を成長させた。この血栓成長状態の血栓を同時に 2 つ作製し、37°C の水浴中で一方は超音波を曝露、もう一方は超音波非曝露の状態で 30 分間放置した (Fig. 1c)。その後、両者の血栓の成長の程度、すなわち円盤状血栓の厚さの差をもって、超音波による制御の程度を比較した。

### B. 4 血栓増加抑制作用の評価

超音波照射前後で血栓の吸光度 (波長: 412 nm) を測定した。血栓の増加量 (mm) を、その吸光度の差から求めた。その際、吸光度と血栓の厚さであらかじめ作製した検量線により厚さを換算した。円盤状の血栓の吸光度分布は、日本分光製 (特注) の吸光度計を用いて、次のように自動計測した。円盤状血栓の中心を通る直径方向 25 点 (中心から ±6.0 mm、0.5 mm 間隔) の吸光度 (波長: 412 nm) をまず自動計測する。続いて、この直径に対し 45° ずつ傾けた、3 方向の直径上の吸光度分布を同様に自動計測する (Fig. 2)。

すなわち、8方向の半径上の吸光度分布を測定することになる。この、中心軸から等距離の8点の吸光度の平均値を求め、その距離における音響強度に対する平均吸光度とみなす。

吸光度と血栓の厚さで作製した検量線によりこの平均吸光度を厚さに換算した。ただし、中心(0 mm)のみ1点の吸光度の結果より評価した。

## B. 5 統計学的評価法

本実験では、円盤状血栓を2個ずつ5セット(計10個)用意し、2個セットの一方を超音波曝露させ、非曝露側との血栓厚の差をStudent t-testを用いて検定し、信頼度95%をもって有意とした。

## C. 研究成果

Fig. 4. aに超音波照射群、および非照射群の血栓厚を示した。横軸は円盤状血栓の中心から0.5 mmごとの距離とその距離における超音波強度の測定結果で、■は超音波非曝露時の血栓増加量(mm)、□は超音波曝露時の血栓増加量(mm)である。各値は5セットの平均値と分散で、中心からの距離での各血栓厚に有意差のある場合\*を付してある。図から明らかのように、中心から4 mmの距離まで有意差を認め、超音波による血栓成長抑制効果が示された。この有意な差を示した中心からの距離をFig. 3の音場データより音響強度に変換すると、音響強度0.28~0.72 W/cm<sup>2</sup>の範囲になった。特に中心軸上では非曝露時の成長が約0.4 mmであったのに対し、超音波曝露時には約0.15 mmに抑制された。

音響強度と血栓成長抑制率の関係をFig. 4bに示した。図から明らかのように、音響強度依存的に血栓成

長抑制率は上昇し、その曲線は僅かにS字特性を示した。中でも、Fig. 4aで統計学的に有意な値を示した強度閾値0.28 W/cm<sup>2</sup>では、約30%の抑制率となり、中心軸上の強度0.72 W/cm<sup>2</sup>では約64%となった。

## D. 考察

本実験より、中周波数500 kHz連続波超音波には、約0.3 W/cm<sup>2</sup>以上の音響強度であれば、強度依存的に血栓成長を抑制する効果が有意に得られることを認めた。このような超音波による血栓成長抑制効果は、すでに1992年吉澤が行った*in vivo*動物実験によって示されている。すなわち、彼は犬両側股動脈の内皮をバルーンカテーテル擦過により損傷させ、バルーン除去後さらに2時間血流を途絶することにより、処置例の全例(8/8)で血管が完全閉塞するモデルにおいて、一側に200 kHzの連続波超音波を曝露し続けると、8例中7例において『血管が閉塞しない』、という事実を報告している。この内皮損傷後に2時間結紮する血栓モデルは、血栓溶解の*in vivo*実験の際に使われるモデル系であり、血管閉塞の成功率は極めて高いものであったが、この血栓形成時に超音波を照射し続けると、上述のように閉塞状態にならなかった、というものである。吉澤らは、そのメカニズムについて、定量的な考察を行っていなかった。本*in vitro*実験は、超音波に血栓成長抑制効果があることを定量的に示し、彼らの超音波による血管閉塞抑制のメカニズムを説明するものである。

血栓が超音波によって成長阻害される理由は次の様なメカニズムであると考えられる。(付録参照)超音波の分子作用を考える粒子速度は $V=\sqrt{2I/\rho c}$ で表され、音響強度の増大と

とも上昇するものである。Fig. 5に示すように、本検討において血栓成長抑制率と粒子速度の回帰直線は線形性を示し、その相関係数(R)は0.991と非常に高値を示した。この事実は、粒子速度が血栓へのフィブリンの結合を阻害する要因になっていると推察させるものであり、我々は“血栓成長抑制効果は粒子速度に依存する”と考える。この近似直線から得られる血栓成長抑制作用の閾値は、粒子速度では30 mm/s、音響強度に換算すると0.071 W/cm<sup>2</sup>となる。すなわち、超音波による血栓成長抑制作用は、この値以上であれば効果を発揮することを示唆するものである。

本実験での音響強度の値を水中で換算すると、音響強度  $I=0.72 \text{ W/cm}^2$  は  $V=97.7 \text{ mm/s}$ 、有意な血栓成長抑制効果を示した最少強度  $0.28 \text{ W/cm}^2$  は粒子速度は  $61.1 \text{ mm/s}$  となり、秒速6 cmを超えるスピードの振動を血漿に与えれば、自然な血栓成長を進める生化学作用を抑制できることが十分に考えられる。粒子速度は音圧あるいは音響強度に依存し、周波数に依存しないため、超音波による血栓成長抑制効果は本実験で用いた500 kHzに限らず、診断用の超音波(MHz帯)においても、類似の抑制効果を得ることができると推察される。しかし、粒子速度が一定であった場合でも、実際に周波数を変化させると、その振動振幅(Da)は“ $Da=V/2\pi f$ ”より導かれるように粒子の振れ幅も変化させてしまう。この振れ幅の変化が血栓成長抑制効果に影響を与えるか否かについては現在のところデータを持ち合わせていないが、今後の検討で明らかになると考えられる。また、この粒子速度の試算結果は水中を想定した場合のものであり、血漿のような粘性があ

る液体では、水の場合に比べ、それより低い粒子速度であったと考えられる。粘性流体のずり応力は周波数依存性的であるので、血栓成長抑制作用には超音波の周波数依存特性が存在するものと考えられる<sup>9)</sup>。この粘性成分を含む成長抑制作用および診断用の超音波周波数帯など、他の周波数帯における抑制特性については、今後改めて検討を加えたい。従来、分子レベルでの音響的粒子速度が、生化学反応を阻害するという報告は、筆者らの知る限りなく、本実験結果は、ユニークな超音波作用を示している。

しかし、Fig. 4bの血栓成長抑制率と音響強度の散布図の結果がS字状のうねりを示しており、血栓の固定具などの実験器具に超音波のサイドローブ等が反射し、実験結果に影響を及ぼした可能性が懸念される。それゆえ、超音波の反射の影響の有無について、より詳細に検証していくつもりである。また、本検討はウシ血漿を用いており、また吉澤の報告もイヌでおこなったものであるため、今後はヒト新鮮血を用いて検討を重ねるなど、臨床的実用化への実験を展開していく必要があると考える。

従来、血栓成長を阻害するには抗血小板薬、あるいは抗凝固薬などの生化学作用を持つ薬剤が適用されてきた。そのため、これらの薬剤の血栓成長抑制能力と超音波による抑制能力との定量比較は、血栓成長抑制作用を評価する上で興味深く、本実験で使用した器具、条件を用いて試みるつもりである。

本報告で示した超音波単独による血栓成長抑制作用は、次の様な臨床への適用可能性が示唆される。(1、急性脳梗塞発症直後からの血栓成長抑制 2、心筋梗塞発症直後からの血栓

成長抑制 3、深部静脈血栓症等の発症直後からの血栓成長抑制 4、各種血管形成術後の再開塞予防の為の血栓成長抑制、さらには狭心症や一過性脳虚血性発作 (TIA) などに対しても (その主原因と考えられる塞栓状態に対して)、予防的に超音波単独による経胸的、あるいは経頭蓋的照射による介入法が考えられる。

その臨床的実用化のためには、臨床現場の状況と整合性の高い超音波振動子の開発が不可欠である。すなわち、患者の体動に対しても影響されない超音波照射法であり、かつ、救急車内でも使えるような (医師でなくても適切に超音波振動子を固定できるような) 仕様法の簡便な超音波照射法が求められよう。その一例として我々が考案している例を Fig.6. に示す。図は急性脳梗塞患者に対し、頭部曲率に合うような柔らかな素材のプリフッ化ビニルデン (PVDF) を用いて、実現しようとするもので、現在検討中の振動子である。この様な薄く柔らかな振動子であれば、患者側頭部にヘッドバンド等で固定したりあるいは粘着性の材料で表面に張り付けたりすることができ、恐らく救急車内でもまた病院救急部などでも容易に活用し得ると考えられる。未だその音場特性等実用化に向けた検討は不可欠であるが、一つの実現可能性のある振動子系として、考案中である。この様な振動子を用いれば、血栓成長抑制作用により血栓成長それ自体を発症直後のままに抑え込むことが出来、血栓サイズを小さい状態に留められよう。それにより血栓溶解時間の短縮にも繋がり、結果的に治療開始時間の延長を招来することになると考えている。

(付録)

この血栓抑制効果のメカニズムを音響力学的に次の様に考えられる。実効値表現で強度  $I$  は音圧  $P^*$  (実効値)、粒子速度  $V^*$  (実効値)、そして媒質の音響インピーダンス  $Z$  とすると

$$I = P^* V^* = Z V^{*2}$$

と表せられる。水の場合

$$Z = \rho C$$

$P$  : 密度 (1000 kg/m<sup>3</sup>)

$C$  : 音速 (約  $1.5 \times 10^3$  m/s)

で、

$$I = \rho C V^{*2}$$

となるので、実験で用いた強度から粒子速度  $V^*$  は

$$V^* = \sqrt{I / \rho C}$$

ただし、粒子速度の実効値  $V^*$  は、時間関数として

$$v(t) = \sqrt{2} V^* \sin(\omega t + \phi)$$

$\omega = 2\pi f$  : 角周波数

$f$  : 周波数

と表せられるので、その粒子速度による空間的変位の振幅  $Da$  は

$$\begin{aligned} Da &= \int_0^{\pi/2} v(t) dt \\ &= \int_0^{\pi/2} \sqrt{2} V^* \sin(\omega t + \phi) dt \\ &= \left[ \frac{-\sqrt{2} V^* \cos(\omega t + \phi)}{\omega} \right]_0^{\pi/2} \\ &= \frac{\sqrt{2} V^*}{2\pi f} \\ &= \frac{V^*}{2\pi f} \end{aligned}$$

$$\text{振幅} : V = \sqrt{2} V^*$$

となる。従って抑制率を粒子速度の  $V$  でプロットし直せば、Fig. 5 の関係になり、その関係は

$$CGCR = 0.9061V - 27.963$$

$$R^2 = 0.9828$$

となる。この相関係数 ( $R = 0.991$ ) から、CRC は粒子速度と直線的な比例関係にあることが第一義的には解釈される。また、その閾値  $V_T$

$$V_T=30 \text{ [mm/s]}$$

となり、抑制効果は速度でこの値より大きな粒子速度となる強度  $0.071 \text{ W/cm}^2$  以上で抑制効果が生じ得るものと理解される。また、その時の変位振幅の閾値  $D_{a1}$  としては

$$D_{a1}=V_T/2\pi f \\ =9.55 \text{ [nm]}$$

になる。すなわち、変位振幅としては  $10 \text{ nm}$  以上になったところで抑制効果が生ずると考えられる。それ故、抑制効果は粒子速度の観点からは超音波による高速振動速度とその変化幅の増大によって生じたものであると解釈される。

## E. 結論

本年度の研究において、超音波それだけを用いる血栓成長抑制効果を *in vitro* 実験によって定量的に示した。しかもその超音波条件は中周波数  $500 \text{ kHz}$  連続波で、その強度は  $72 \text{ mw/cm}^2$  以上であれば抑制効果が表れ得るとするものである。この超音波血栓抑制効果を活用すれば、血栓自体のサイズを発症初期のサイズに留めておける可能性があり、実用化に向けた現実的超音波照射法の検討を開始することができた。この発見的成果は、治療開始時間短縮という所期の目的ばかりでなく、再三強調したように各種 PTA 手法における再開塞問題にたいする予防的手段としても活用することが示唆される。

さらには超音波を照射するだけという非常にシンプルな方法で血栓成長を抑制し得ることは、新たな超音波予防技術の道を開く可能性を含んでいる。例えば一過性脳虚血性発作や狭心症などへの救急的救済手段にも用いられるものと考えられる。

本年度の成果はその意味で本研究

の所期の目的を達成したばかりでなく、幅広い虚血性疾患に対する新たな治療戦略に加えられる内容を含んでいる。虚血性疾患患者の予後における、2次予防に貢献する新規療法となることを期待する。

## F. 研究発表

学会発表

- ・古幡博：「特別講演」次世代脳神経超音波治療への挑戦的展望，第20回京都脳神経・脈管超音波セミナー，京都，2011年4月
- ・澤口能一：16<sup>th</sup> Meeting of the European Society of Neurosonology and Cerebral Hemodynamics, Munich, Germany May 2011

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
1件
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

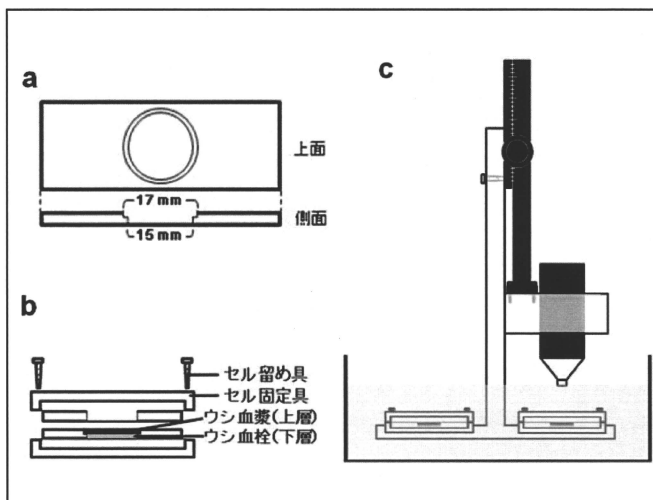


Fig. 1 血栓増加抑制実験容器概略図

血栓作製セル図面を示した (a)。血栓上部に血漿を注入し、ポリカーボネート板で蓋をした後、血栓作製用セルを留め具で固定した (b)。実際に超音波を照射する際の模式図を示した (c)。

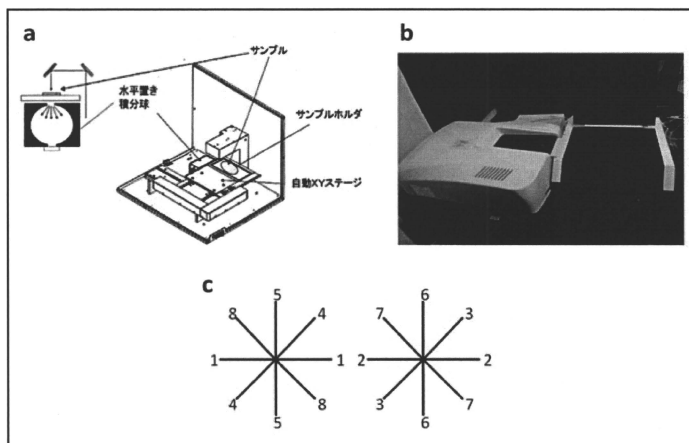


Fig. 2 血栓成長抑制の光学的評価

吸光度計装置原理を示した (a)。次に吸光度計装置 (日本分光; 特注品) の写真を示した (b)。吸光度計による血栓 2 個同時測定の設定方向を示した。血栓は各測定方向ごとに 0.5 mm 間隔で 25 点を測定し、血栓一つあたり計 100 点の吸光度を測定した (c)。



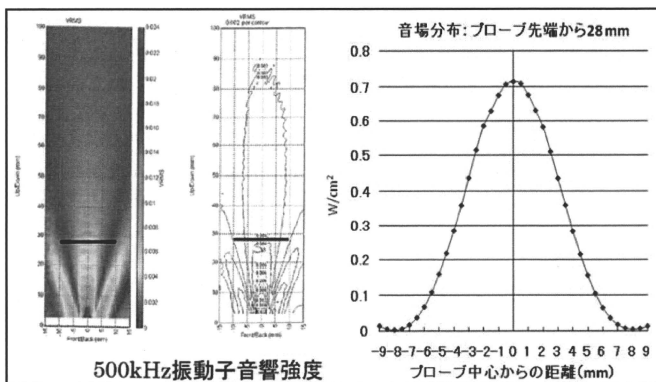


Fig. 3 超音波強度および音場分布データ  
音響強度測定装置AIMSで500kHzの超音波プローブの水中における音響強度を測定し、またプローブから28mm地点の音場分布を示した。

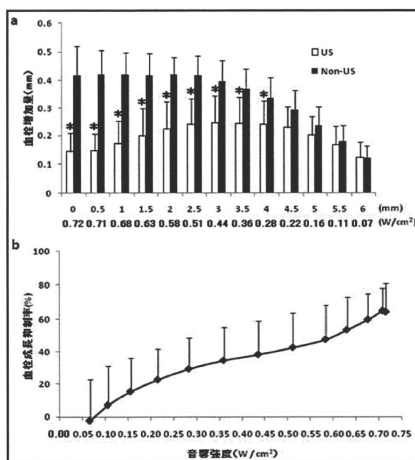


Fig. 4 超音波照射による血栓成長抑制  
500 kHzの超音波を30分間照射し、血栓の成長が抑制できるか否かを検討した。超音波照射前後での血栓増高量(mm)をグラフ縦軸、グラフ横軸上段には血栓中心からの距離、下段にはハイドロホンプローブで測定した音響強度を示した(a)。また、各音響強度における血栓成長抑制率について示した(b)。なお、血栓成長抑制率はFig. 4aの血栓増加量(mm)の結果より、次式を用いて算出した“(ΔNon-US - ΔUS) / ΔNon-US”。\*p < 0.05 vs Non-US. mean±SD. (n=5)

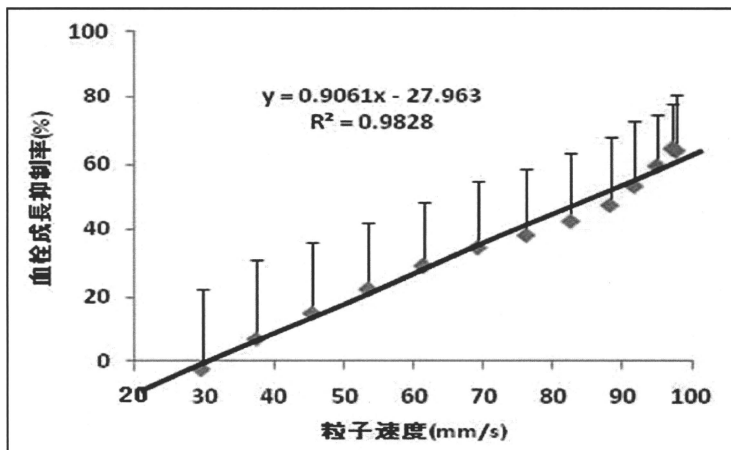


Fig. 5 粒子速度依存的な血栓成長抑制

Fig. 4bの結果をもとに、横軸を音響強度より算出した粒子速度に変換して解析した。また、結果の散布図より得られる近似直線ならびに近似式、決定係数 (R<sup>2</sup>) を算出した。

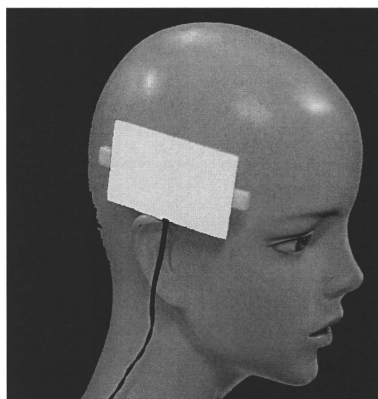


Fig. 6 血栓成長抑制用の張付型ソフト振動子の考案例

血栓溶解治療を開始する前の、救急車内、あるいは病院内で血栓部位における血栓成長を抑制する為の簡便で使いやすい振動子として極めて薄い貼り付け型の振動子が必要で、これを実現する例として PVDF のような素材を用いた振動子を考案した。

実用化に関しては今後の検討課題であるが、可能性の一例として紹介する。(振動子サイズ 60mm × 30mm)

経頭蓋超音波脳血栓溶解法の新広域照射量貼付振動子システムの開発  
—in vitro実験による定在波回避特性の検討—

研究分担者 古幡 博 東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター  
医用エンジニアリング研究室 教授

研究要旨

経頭蓋超音波脳血栓溶解法(Transcranial Sonothrombolysis:TST)に供する新技術として、診断画像誘導型標的照射装置の開発を進めてきたが、製造企業の撤退に伴い、それをを用いた臨床研究が不可能となった。主な理由は当該企業の経済的見通しの難しさにあるとされた。その技術としては問題ないとされ、JSTからの開発経費は全額返納した。この開発中止に対応するため、その超音波条件については有効性・安全性共に満足すべき結果が得られていたことを踏まえ、新技術開発を行った。開発期間が短い、最終年度の臨床研究に供すべく臨床現場での使用上の簡便性、患者QOLに答え得る方式とした。なおこの方式は当初の診断画像誘導型標的照射システムの次世代普及型として想定していた装置・システムであった。

それ故、いわば前倒し先行開発になっている。開発システムは診断用の画像誘導を用いず、また標的性を放棄する方式とし、AIS患者の側頭部に超音波ソフト振動子を貼付し、安全範囲内の強度条件を満たす超音波を、標的領域を含む頭蓋内広領域に向け広角照射するものである。この方式は臨床現場への整合性が高く、頭部超音波検査技術を必要としない方式であるので極めて汎用性が高く、rt-PA静注法適用患者のほぼ全例に適用可能な汎用システムになると考えられる。ただし超音波の音響学特性については、新検討を要する一面がある。最も重要なことは、従来の超音波条件500KHz連続波は頭蓋骨透過率が高く、頭蓋内塞栓部への到達も高いが、その分頭蓋内での多重反射による音圧上昇、反射による定在波の発生を招来し、局所に高音圧を発生させ、組織損傷を招来する危険性があった。これを回避することが、新方式の根本問題であるので、実験系として頭蓋骨を浸めることのできる大型シュリーレン装置を新規に設置した。(東京慈恵会医科大学内のスーパー特区共同利用実験室Ⅱ内)。これをビーム音場特性の包括観察用に供し、新貼付型振動子(PVPF-PZT)の音場分布測定を行った。水中におかれた反射板及びヒト頭蓋骨(スライス水平断のリング状骨)における多重反射、定在波の存在とその消去の実体を明らかにした。その結果、周波数変調(スイープ変調)方式がある程度有用であることを示すことができた。しかしながら完全消去には至らず、雑音変調方式採用が不可欠と考えられた。またスイープ変調の周波数幅が基本周波数500KHzの60%変化、すなわち200KHz~800KHz以上の周波数変化が求められるため、医学生物学的な評価も200KHz、800KHzで改めて評価しなければならないことになった。これらを回避する方式を探索中で、一種の雑音変調方式などを注目しており、その基礎実験用の電子回路系を製作した。

以上、本年度は新規TST法の開発に着手し、その音響特性の安全性確保に主眼を置いた検討を行い、実用化に向けた基礎条件を整えた。

## A. 研究目的

経頭蓋超音波脳血栓溶解法(TST)は、急性脳梗塞(AIS)患者の超急性期治療(発症3時間以内)における血栓溶解剤rt-PA投与と併用して、経頭蓋的に超音波(US)照射を行って、血栓溶解効果を増強するものである。既に超音波診断装置TCDやTC-CFIを用い、臨床成績としてAlexandrovcによるCLOTBUST STUDYでは治療開始から2時間後の再開通率が約30%~40%に増加したこと、またEggersらは20~40分で再開通率が60%を越し、3ヶ月後の神経学的改善の著しかったことが報告されている。さらに、in vitro/ in vivo 実験では診断用US周波数より低い数100KHzでの著しい有効性が示されており、その臨床適用の早期化が期待されている。我々は、ドイツにおける中周波数300KHzバースト波を用いて失敗した臨床試験TRUMBIを凌駕する新US条件500KHz連続波(CW)、インターミットtent照射法を採用した新技術を開発してきた。同技術は経頭蓋的US断層法による画像表示とそれによる塞栓部(主にMCA)に向けて、同一USプローブから治療用500KHz、CWビームを標的照射するもので、いわば診断・治療一体化システムとした新技術である。この画像誘導型標的治療技術を元にした新装置の実用化開発を我々は2009年からスタートし、JSTの「独創的シーズ展開事業(融資事業)」として実用化研究が行われ、これを元に本プロジェクトの臨床研究を行うことが計画されていた。しかし、その製造企業の撤退に伴い、本年度及び次年度計画は大きく変更せざるを得ないものとなった。撤退理由は「考察」に詳しく述べるが基本的には、当該企業の経営状態の悪化に伴い、融資の形で借入しても、製品化した場合の販売量が見込めず、経済的負担が増える事、また試験中のリスクとして、患者死亡例等が生ずれば親会社のブランド名に傷がつくという波及効果が大きすぎる事が理由であった。元々親会社は治療技術に参入しないことを宣言しており、今回技術としては完成したので、融資された分は全額返済した上で撤退を断行したものであった。従って、本プロジェクトとしては、従前から蓄積してきた有効性や安全性(とりわけ医学生物学的安全性)のデータがある治療

用超音波条件を生かした新システム開発に移行した。ただし、その移行システムは、本来JSTプロジェクト開発で行った画像誘導型標的システムの技術成功後に、次世代普及型として計画していたものである。

新次世代システムは①画像誘導のために要する経頭蓋検査技能のある医師(あるいは技師)を必要としないこと、②診断・治療同一プローブを頭部に固定するための専用固定具を必要としないこと、また③塞栓部への標的性は極めて低い、非焦点型(defocused)の照射法であること、④患者頭表部に張り付けることのできるソフト振動子であること、それによって⑤患者の体動などに使うプローブのずれの心配がないこと、⑥患者の頭部を固定するような、患者への抑制的QOLのないことを特徴とする方法として開発に着手された。換言すれば、この次世代システムはAIS患者でrt-PA静注療法を施行する患者全員に使用できる方法とすることを目的に開発されるものとした。

この次世代システムを着実かつ早期に実現するため、遠くに次の点に留意した研究実施を目的とした。

(1) 貼付型ソフトUS振動子として、実用化可能な振動子素材の選択

(2) 非焦点型USビーム照射が惹起する頭蓋内の多重反射等に伴う定在波回避の方法の探索

を挙げ、実施することとした。これらは全て頭蓋骨の沈められるような大型シュリーレン装置を用い、視覚的に音場を確認し得る方法を用いて、実現性の高い方法で示すことも目標の一つに挙げた。

## B. 研究方法

次世代TST用のUS振動子には第一に貼付型、第二に頭部曲面に対応するソフトで柔軟性のあること、第三に定在波などによる空間的高音圧領域(ヒートスポット)を回避することが要求されよう。この内、第三のポイントが、振動子自体が非焦点あるいは拡散型USビームパターンとすること念頭に置いた要求事項で、そのための生ずる問題回避の要求事項で、実際には振動子駆動系に要求される内容である。以下にこの新

方式に関し、次の方法で取り組んだ。

B-1. 貼り付け型振動子の製作とその音場特性

B-2. シュリーレン法による定在波回避の検証実験

B-1.) 貼り付け型振動子の製作とその音場特性

頭部表面に(場合によっては脱毛状態)貼付可能なソフト振動子として次の四種類の振動子を製作した。

- (1) PVDFを用いた500KHz振動子(30×30)
- (2) PZTを用いた500KHz振動子(30×30)
- (3) PVDFを用いた2.5MHz円形振動子(30×30)
- (4) PVDFを用いた500KHz振動子(30×60)

PVDFはポリフッ化ビニルデンで、圧電特性を持つ高分子材料で、0.数mmの厚さのUS振動子材料である。音強インピーダンスが高く駆動時の損失は大きい、感度は悪くないとされている。言うまでもなく薄い振動子ができるので、十数MHz帯の超音波に適している。

PZTは、ピエゾ効果を有するセラミックスで、電気音響変換効率は高く、100KHz～10数MHz帯まで加工可能で、診断装置を始め、広く利用されている。

- (1) 500KHz PVDF 30×30 矩形×2

開発した振動子の写真を図1に示した。厚さ2.2mmにでき、やや柔軟性に欠け、PVDF本来のフィルムのような感触はないものとなった。図1の振動子は30mm×30mmの正方形振動子を2個横に並べて、側頭骨の曲率に合わせ易くした。矩形振動子1個の音場分布を図2に示した。AIMSで測定した結果である。音場分布は図2から明らかな様に遠距離音場としての均一性は7～8cm程度から始まり、図のZ=100mmでは円形ビーム音場(半径15mm相当)に到しているように見られるものとなった。

- (2) 矩形振動子(30×30)500KHz2ch(PZT)

PZTを用いた矩形振動子を図4に示した。PVDFと比較し、その柔軟性には殆ど変らな

い感触となった。同振動子の音場分布測定結果を図5、図6に示した。

- (3) 円形振動子(直径50mm)2.5MHz(PVDF)

PVDF本来の柔軟性のあるフィルム様の円形振動子に金属電極を張り、棒をつけて固定し易くした(図7参照)

この振動子の周波数を2.5MHzに設定した理由は、既報のTCDやTC-CF1では2MHz近傍の周波数帯を使用しているため、それらとの比較検討に供するために用意した、同音場分布は後述するシュリーレン法で測定したもので示すが、近距離音場は約100cm近くになる計算となる。

- (4) 矩形振動子(30×60)PVDF 500KHz

側頭骨貼付面積をカバーするサイズの振動子として用意した。大きさに伴う柔軟性はあるが、それ程柔軟な感触ではなかった。(図8参照)。同音場分布を図9、図10に示した。長方形の音場が20cm近傍まで続き、その領域内は近距離音場的な複雑な分布を呈した。

以上四種類の新作振動子とその音場分布を提示した。PZTを用いた場合には素材としての電気音響変換効率が良いため、サイドローブの存在など、同形のPVDFのものより詳細に把握された。

B-2.)シュリーレン法による定在波回避実験

図11に示す大型シュリーレン装置を東京慈恵会医科大学スーパー特区共同利用実験施設Ⅱの一室に設置した。同装置は直径25cmのレンズを用い、ヒト頭蓋骨横断面を完全摘出できる様にしたものである。従ってUSビームを経頭蓋的に投入した時の、頭蓋内多重反射や定在波の存在の状態を頭部断面内全体像として表示されるものである。

- (1) USビームの比較

次の種類の音場分布を比較した。

- ①500KHz矩形振動子(30×30)PVDF
- ②500KHz矩形振動子(30×30)PZT
- ③500KHz矩形振動子(30×60)PVDF
- ④500KHz円形振動子(10φ)PZT

⑤500kHz円形振動子(5Φ)PZT

⑥2.5MHz円形振動子(50Φ)PVDF

各々の音場分布をシュリーレン法で確認しつつ、次の実験を行った。

#### 1) USビーム形状の比較

各振動子の音場分布を比較し、頭蓋骨を通過後の広角化あるいは広領域化の程度を判定するためのものである。

#### 2) 反射板による定在波の確認

頭蓋内における反射が形成する空間的な音圧上昇部(その位置が動かず、空間的にとどまる状態)をシュリーレン像で確認した。

#### (2) ヒト頭蓋骨における定在波測定

ヒト頭蓋骨から、その水平スライス部分を切り出した。(図12)

スライスしたヒト頭蓋骨側頭部に栓子を置いた場合の音場分布を観察し、定在波を確認した。この定在波を消去するため、中心周波数500kHzに対するスイープ(Sweep)変調を加え、周波数を高速に(1ms以下で)変化させ、音響的振動のずれる様に駆動する方式についても比較した。スイープ変調のためには広帯域化が必要で、特殊な1-3compositタイプの振動子を特注し、実験を行った。この振動子は矩形10×10であるが、貼り付け型のようには設計されたものではない。その周波数変調幅は200kHz~800kHzと広く、実験は300kHz~700kHzで行った。最も低い周波数200kHzに対し3倍の位相ずれを生じ得る形で実験を行った。この位相偏位が定在波形成条件の空間的位相の一致を回避する原理となる。

### C. 研究結果

AIS患者の救急治療に供するため、その操作が容易で、超音波検査も要さない形の簡便に使える張付け型振動子を各種考案し、その音響学特徴をシュリーレン法で把握した。その特徴を踏まえ、ヒト頭蓋骨に通用し、実際の臨床現場で生じ得る問題を整理した。

#### C-1.) 貼付け型振動子の音分布の確認

正方形の矩形振動子(30×30)について、素材として用いたPVDFとPZTの間の分布の

差異を比較した。図13に両者を並べて比較した。両者の間に強度の差を認められるのは、それぞれの電気音響変換効率に差があるためで、PZTの方が効率の高いため、駆動電圧がPVDF駆動電圧より低くても、強い音場ビームが形成されている。ただし、そのパターンに差異はないようで、それはAIMSでの測定結果の図から予想された通りであった。ビームの太さがほぼ振動子と同様のまま発射され、そのビーム拡散が大きくないことは、患者適用に際しては、MCA領域にある程度選択的に合致していないと、効果を上げにくいことになると予想された。なお、振動子が矩形であることの影響は、USが進行するに伴い消失する傾向を認めた。他方、周波数と振動子サイズの関係についても周知のことであるが、確認した。

図14は大口径の直径50mm、2.5MHzの振動子と、小口径10mm、492.7kHzの音場を並べたものである。 $R^2/\lambda$ (R:振動子の半径、 $\lambda$ :波長)が近距離と遠距離音場の分岐点になるので、前者では1041.7mm、後者では8.33mmとなる。後者では振動子から10mm足らずで、遠距離音場としてビーム径拡大が生じているが、2.5MHz50Φでは1m程度までビーム径の拡大は認められないことになる。

さらに図15には、口径5mmと10mmの振動子から発射されたビームがアクリル板で反射した時の結果を示す。言うまでもなく、口径5mmの方が、広角化が大きく、広領域化が可能で、このシュリーレン像の反射板近傍には、反射波による定在波が示されている。空間的に、固定点に音圧上昇領域が縞の様に分布していることが明らかとなっている。この存在が脳組織に対する損傷原因になっていると考えられる。

#### C-2.) ヒト頭蓋骨を用いた定在波回避実験結果

ヒト頭蓋骨側頭部から500kHzCWを投入した時の頭蓋内音場分布の例を図16に示した。アクリル反射板と同様に頭蓋骨内面で反射し、その近傍に定在波が存在していることが明瞭である。この定在波を消去させるために、スイープ変調した時の結果を図17に示す。定在波の軽減は認められるが、完全な消失状態には、ここでは形成さ

れなかった。駆動波形に対する工夫の必要性が明らかとなった。注意すべきことは、定在波の完全回避こそが貼付型非焦点法の本質的技術要素になるはずである。

#### D. 考察

次世代TST法として用いるべく考案されていた頭部貼付型ソフトUS振動子を実際に操作し、非標的照射法として臨床適用可能なことを、その空間的音場特性、及びヒト頭蓋骨を用いての定在波（STW）回避可能性の高い駆動試験結果によって示した。これにより、その様な患者頭部貼付型US振動子の実用化検討へ進むことができ、表1に示す患者QOLの改善、臨床現場への適合性向上に寄与し得る技術開発の見直しを示した。実際のイメージは図18の如くなると考えている。

この新開発TSTの特徴となる貼付型TST用振動子は非集束性のビームを梗塞領域に発射し、標的照射を行わずとも有効な溶解効果の得られることに第一の狙いを置いている。その観点からビームの拡大性（広域照射）の高いのは、口径5φの振動子が最も適していた。（図14参照）。ただし、実験に使用したのはPZTを素材とするもので、張付け型ではなかったため、少なくとも5φ～10φ程度の張付け型のものに再製作する必要がある。既に、30×30の矩形振動子を完成させているので、実現性は高く、その場合の遠距離音場は、 $R^2/\lambda$ （R:振動子の半径、 $\lambda$ は波長）より遠方、すなわち、5φなら2mmより遠方、10φなら約8mmより遠方で、音場分布の安定な状態の広域化が実現できる計算となる。その広がり角度は $\sin^{-1}(1.22\lambda/D)$ から計算し、10φの場合 $\sin^{-1}(\frac{3.65}{10})=21.5^\circ$ となり、もし振動子から5cmではビームは約4cmの口径に拡大する。この大きさではMCAを十分に含められるよう振動子を貼れると考えられる。さらに5φであれば、5cmで、ほぼビーム径10cmに広がる。ここまで拡大できれば、充分と言え得る。しかし5φの振動子で、必要な音響強度を得ることは、発熱が強く、寿命を短くする可能性が高いものとなる。5φ～10φの振動子を複数個、距

離を離して配する工夫が必要となると考えられる。あるいは全く別に矩形60mm×30mmの新作振動子の様に、最初から大口径の振動子でMCA領域をカバーする方式も考えられる。ただしその場合は近距離音場領域が大きく、その内部で生ずる不均一音場に対する工夫が求められる。定在波除去用の広帯域化振動子の製作が必須になると考えられる。

次に、定在波の消去にはSWEEP法がある程度有効であることを、頭蓋骨実験を通して示した。通常PZTの振動子はQが高く、狭帯域であるため、周波数をSWEEP変調しても、その効果は得られず、本実験で示した様な広帯域化の工夫が必要になる。実際に新規に制作した矩形のものは広帯域化を実現しているため、SWEEP変調には適している。しかしながら、結論から言えば、SWEEP変調方式は不十分な成績しか得られなかった。次の工夫として、雑音変調方式の検討が必要になる。しかしその場合も、単純な広帯域化はその帯域全域の医学生物学的副作用研究が必要となる。何故なら、中周波数帯に関する超音波の生体作用の研究が余りに乏しい現状だからである。

謝辞：本研究で行ったシュリーレン実験に際しては、ヒト頭蓋骨切断を行った清水純医師、また実際に実験に協力した東隆氏、齋藤奈美氏、大村千恵氏、樋口悦子氏に謝意を表します。

#### E. 結論

新たな経頭蓋超音波脳血栓溶解法に供する張付型ソフトUS振動子を、実際に製作しその音場特性をシュリーレン法等で検討した。それにより次の結論を得た。

1) 従来からの血栓溶解超音波条件（500KHz連続波インターミット照射）を実現し得る、張付け型（薄型）のソフト振動子を実際に製作した。

2) 張付け型ソフト超音波振動子は、PVDFやPZTなどで実現でき、その形状（丸型、矩形等）やサイズをヒト側頭部に適した形に加工可能である。

3) 中大脳動脈への非集束型照射には、振動子の形状及び周波数帯域を適切に選択す

る必要があるが、その非集束型照射は、開発した張付型ソフト超音波振動子を元に実現し得ることを明らかにした。

4) 頭蓋内での超音波反射による定在波の回避には、振動子の持つ周波数帯域に加え、駆動電気信号系を適切に設計すれば実現可能である。

5) 次世代経頭蓋超音波脳血栓溶解法として、実用化開発の見通しを得た。

6) この次世代型システムは、臨床現場での救急対応、患者QOLの向上、医師をはじめとする操作者の負担軽減などの多くのメリットを有し、普及型システムとして、開発可能である。

以上、22年度下半期より急遽追考した研究ではあるが、急性脳梗塞患者の超急性期において施行されるrt-PA静注療法適用患者の多くに本次世代システムを適用可能と考える。それゆえ早期の実用化を図ることによって、次年度の臨床研究に充分供し得るものと考えている。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
1件
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし