

Ultrasound)の延長線にあり、集束(収束)点の標的性に関し、頭蓋骨によるビーム歪という難問に影響されている。つまり大口径のトランスジューサを頭部表面に当て、それ程強力でない超音波を頭部表面で発射させながら、頭蓋内標的部位に集束させるには、ビーム伝搬経路上の頭蓋骨の厚さ、曲率、性状(粘弾性特性)に大きく影響され、目的の標的部位に焦点を持ち込めないリスクが存在するからである。また頭蓋内に発生する多重反射、さらにはその反射の重量による定在波の存在は、脳組織損傷を招来する可能性が高いので、それを回避する研究と技術開発に多くの研究者が関与している現状がある。これに対し、HIFU程の集束性を求めず、焦点径1cm弱程度の収束性にとどめ、MBによる局所性で標的性を確保するという考え方が、我々の狙いである。表5の中でも同様の考え方のものであるが、中周波数100KHzで、それを狙っているのは我々だけである。また、治療技術としては、実時間的な監視能力が求められるが、多くはMRIを併用し、HIFU並の高温化状態を監視する方式である。しかし我々には、超音波振動子配列(phased array)を2段階層する新方式を採用し、診断用の2MHz Phased arrayとその後に治療用の500KHz Phased arrayを重ね、両者を交互に作動させ、治療とその状態監視とをほぼ実時間的に実現する方式を提案中である。これを用いられれば、MRIの様な大型システムを用いずとも、治療状態をモニターすることが出来ることになる。ただし薬物動態をモニターするには恐らく適さず、血管破壊による大出血などの安全管理が中心となると考えている。この診断用の超音波画像navigationによる標的治療法は、頭蓋骨の影響をHIFU法に比べ、相当抑制することができるというメリットのあることは言うまでもない。その様な新手法を用いて、薬物投与を支援するUS-DDSの本研究は狙っており、その有効性が今回明らかになったものである。

この超音波画像誘導型標的照射型中周波数超音波脳血栓溶解システムが狙急慢性脳梗塞状態に対する薬物透過性については、既に、SHR/SPについて一部予備的研究を通して、Evans Blueの透過性向上を確認している。これはMBを用いない状況での成績である。MBを用いずとも、虚血脳では、また高血圧で脳動脈硬化亢進状態では、BBBの物質透過性を超音波によって容易に増高することを示したものである。今回はMBを用いることで虚血状態でなくともBBBの透過性を向上し得ることを示唆した(条件5)。この条件は、予備的成績を示した時の0.7 W/cm<sup>2</sup>より低い0.3 W/cm<sup>2</sup>で得られていることに、MBの強力さが認められる。従って、AIS状態では経頭蓋的脳

血栓溶解法の臨床適用条件0.3 W/cm<sup>2</sup>より相当弱い値で、物質透過の閾値が存在するものと考えられる。そのMBの血中濃度と共に、今後の詳細検討課題である。表4に、実験系の条件と標的薬物(物質)の関係を整理した。

今回の実験では、市販のMBであるSonazoidをヒト適用量の倍量の濃度となる量を投与した。Sonazoidは肝腫瘍などの検査に供されるもので、肝臓以外の診断に用いることは承認されていないので、適用外使用で本実験は行われた。単にMBとしての超音波による崩壊時に発生する局所高圧高温性のBBBへの影響を評価したものである。しかし、その結果は診断用装置のもつ最大MI値1.9未満でもSonazoidは崩壊され、血管損傷を局所に発生させるのではないかと危惧される。濃度の問題ではないMB崩壊に伴う生体への作用を含むと考えられるからである。単位容積中のMB濃度が高い程、BBB破壊力を増加することも考えられるので、BBB透過性の検討には濃度依存性を無視することはできない。条件5で出血を伴わず、ProhanceとMBのみが透過したという結果は、病理学的所見やMRI T2Wの、いわば検出限界以下であった可能性を完全否定できないからである。検出限界以下の出血があったかもしれないと考えることもできるので、多数例による分析を追加すべきと考えている。またMB自体の性質、すなわち超音波に対する耐久性などにも崩壊特性は依存するはずであるので、新規の専用MB開発も二つの方向である。この可能性として、古幡が関与していた相変化型ナノ液滴の活用も考えられる。相変化として、液体化したCarbon PFCをUS照射で気相化させ局所にMBを発生させるものである。これを活用する主な目的は、固型がんにおける新生血管からの漏出を液体状態にしておくことによる高め、そこに超音波を体表から照射し、MB化させ、さらに発熱、キャピテーションを誘発させて、がん治療に供することであった。このPFCのエマルジョンを静注し、狙ったBBBの部位で気相させそのMBを崩壊させれば、標的性局所性はさらに向上し、安全性担保の観点からも優利であろう。この様な相変化ナノ液滴にはポリマーを用いたミセル等をはじめ様々なものが提案されているが、臨床実用にはPMDAの承認を得ることなどを含め、相当時間を要するものと考えられる。ただしそのような各種MB(たとえばBubble Liposom)や相変化ナノ液滴などの活用が、超音波強度との関係で想起され、その適切な技術の最適化の検討が、今日の動物実験法など様々な方法で積み重ねる必要もあるだろうかと考えている。以上、US条件、動物モデル(血管特性)、MBの課題などを研究した。BBBには課題もUS-DDS

法として、MB併用には少なくない。が、逆に制御する可能性も幅広く存在することを意味していることにもなる。本年度の成績はその様な技術可能性を広範に示す起爆剤的データとなったと考えている。

#### E. 結論

経頭蓋的US照射によるBBB開放制御に関し次の結論を得た。

1) 中周波数500KHzの波形及び強度の適切な選択によって、BBBの透過性を高めつつ、出血の様な副作用の招かない適切なMB併用超音波BBB透過性向上の可能性が示唆された。

2) ただし、そのUS条件はMBの血中濃度に加え、MB自体の固有特性などに関する検討が必要になる。

3) また脳血管系自体の特性（脳動脈亢進程度や虚血状態など動的な負荷状態）によって変わる可能性のあること。

4) 現在開発中の経頭蓋超音波脳血栓溶解法のUS条件と、今回のMB併用時のUS条件の間には、有効性についても安全性についても、技術的検討を試みるに十分な強度や波形など余裕があり、今後の研究展開の幅の広いことが示唆された。

以上の本年度の成果から、その実用的超音波BBB透過性制御のためのUS条件を明確な定量的指標として掌握するための研究展開が必要である。そのため次年度は①US条件②MB濃度③MBの種類④脳血管状態などを主なパラメータとして変化させ、最適なBBB開放制御条件を、小動物モデル実験を通して探索決定することとする。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

表 1.

## BBB 透過実験条件

実験条件		1	2	3(1)	3(2)	4	5
US 条件	波形	BW	BW	CW	CW	BW	CW
	freq.(MHz)	0.498	0.498	0.498	0.498	0.498	0.498
	PRF	20	20	/	/	20	/
	ISATA	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1
	ISPTA	1.2	1.2	1.2	1.2	0.4	0.4
	ISPPA	24	6	1.2	1.2	8	0.4
	duty clcle	5	20	100	100	5	100
	MI	1.20	0.60	0.27	0.27	0.69	0.16
	mMI	3.61	1.80	0.81	0.81	2.08	0.47
	TIC	5.89	5.89	5.89	5.89	1.96	1.96
	TIS	0.56	0.56	0.56	0.56	0.19	0.19
動物	種	Wistar	SHR	Wistar	SHR	Wistar	Wistar
	モデル	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
	匹数	3	2	2	2	1	1
	体重	378.7	374.8	376.0	365.3	345.0	334.0
	週齢	12.6	20.2	13.7	20.2	11.0	11.0
造影 剤	sonazoid (ul/kg)	30	30	30	30	30	30
	prohance (ml/kg)	1	1	1	1	1	1
	Evans blue (ml/kg)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

Note: Evans blue の濃度は 4%(g/100ml), sonazoid と prohance の濃度はそのまま

動物の詳細						
実験条件	1	2	3(1)	3(2)	4	5
体重	459	370.5	423	379	345	334
	339	379	329	351.5		
	338					
Average	378.7	374.8	376.0	365.3	345.0	334.0
週齢(day)	114	141	116	141	77	77
	74	142	76	142		
	76					
Average(day)	88	141.5	96	141.5	77	77
Average(week)	12.6	20.2	13.7	20.2	11.0	11.0

表 2.

### BBB透過薬物と投与量

通過物質	サイズ	投与等
プロハンス(prohance)	1nm(558.6)	0.5mmol/kg
エバンスブルー(Evansblue)	4 × 14nm(66KD)	100mg/kg
赤血球(Red blood cell)	biconcave 3~7 μm	
MB(ナノゾイド)	5 μm	30μt/kg

表 3. 超音波条件とBBB透過状態 (MB併用経頭蓋US照射法の場合)

US条件	Prohance	EB	出血	備考	図番
1 (1)	○	○	◎*1	BBB破綻	3-1
1 (2)	○	○	◎*2	BBB破綻	3-2
1 (3)	○	○	◎	BBB破綻	3-3
2(1)	○	○	○	BBB破綻	4-1
2(2)	○	○	×	BBB破綻	4-2
3(1)	○	○	×	BBB破綻	5-1
3(2)	○	○	○*3	BBB破綻	5-2
3(3)	○	○	○	BBB破綻	5-3
3(4)	○	○	×	BBB破綻	5-4
4	○	○	○	BBB破綻	6
5	○	○	×	脳内軽度のBBB破綻	7

\* 1 : 大出血及びSAH

\* 3 : 瀰漫性小出血

\* 2 : 大出血及びSAH

◎ 大出血、○小出血、×出血なし

表 4. 非MB,MB併用USによるBBBの透過性

500KHz CW0.3W/cm<sup>2</sup>★★

		非MB	MB併用
AIS	SHR	○	未
	WR	未	未
正常	SHR	×	○
	WR	×	○

× : 透過性なし ○ : 透過性有

● : 出血 (BBB破壊) 未 : 未実験



New York	Konofag 2010	PMB	BBBO threshold	in vivo	60/90	1.5	20	10	0.15-0.6	30-90	Definity							BBB h/c= 0.3MPa
New York	Konofag 2010	UMB	BBBO size	in vivo	60/90	1.5	20	10	0.37	7e-49	7e-49	No						BBBO size=79 (h, c) 2000 (h)
New York	Konofag 2011	UCBPM	PL & PRF of US	CD7B8 mice	60/90	1.5	0.05-30	0.1-20	0.48	30kA1 1m	Definity							BBBO could be achieved at short PLs and low PRF
New York	Konofag 2010	UMB	mechanism and safety	CRS7L/6 mice	60/90	1.523	20	10	0.15-0.88	30k-300	Definity	0.05	0.75ml	TL				BBBO threshold 0.15-0.3 MPa, safe pressure 0.3-0.48 MPa
New York	Vlachos 2010	PMB	compute the BBB permeability	mice	60/90	1.523	20	10	0.15-0.88	30k-300	Definity	0.05	0.75ml	TL				BBBO threshold 0.15-0.3 MPa, safe pressure 0.3-0.48 MPa
NC	Howles 2010	JMRI	high-resolution MRI	mice	12/58	2.15	23	15.6	0.38	180	Definity	30ul	IP, 10min prior	11k51W				BBBO assessed in whole brain, and high-resolution (5kx5kx100um) 3D maps was acquired
NC	Howles 2010	angiography	functional MRI	mice	2.15	14	10	0.52		180	Definity	30ul	IP, 10min prior	11k51W				angiography could be quickly administered to the whole mouse brain, and MRI was acquired in 10min
NE	Xie 2008	UMB	BBBO in large animal	pig	46/fat	1	2	100	550-350kPa	30min	PEEDA	3.5kx3.5kmm 700ul/kg	20min after	30, 60, 110kV, 4times				MB and TCU can transiently increase BBB permeability in a large animal. But no visually evident Gadolinium retention was observed on T1W image
MI	Dang 2010	UMB	US-induced microvascular contrast	microbleeds, microvascular endothelial (bcrd3) cells	0.35/fat	1.25	10cycles single	0.24		10 <sup>7</sup> /ml	Definity							sonoporation cells could survive with modulation of [Ca2+] and uptake of PI. Cells located near microbleeds in [Ca2+] that were changed from the time of US application and without PI uptake.
Munich, DE	Alonso Herrero 2010	UCBPM	gap junctions	Wistar rats	30/416	1	10	1	2.5-1.27	80	Option	100	EB	immediate	No			US-BBBO leads to a gap-junctional phase-uncoupled tumor progression (see 31, 0.05 cm/30 + or 0.1 standard deviation) vs 0.08 cm/30 + or 0.1 standard deviation)
Munich, DE	Alonso Herrero 2010	NS	molecular cross pathways	Wistar rats	30/416	1	10	1	2.5-1.27	80	Option	100	EB	immediate	No			US-MB induce specific cellular stress response and apoptosis only in neuronal cells
Troyan	Liu Wang JI 2008	UMB	Hemorrhage Detection by SWI	SD rats	60/60	1.5	10	1	0-4.9	30	Sonovue	35ul/kg(1/4)						US-BBBO leads to a gap-junctional phase-uncoupled tumor progression (see 31, 0.05 cm/30 + or 0.1 standard deviation) vs 0.08 cm/30 + or 0.1 standard deviation)
Troyan	Liu Wei KC 2010	Radiology	glibenclamide treatment	SD rats	60/60	0.4	10	1	0.45-1.38	30	Sonovue	0.25mg/kg						SWI is more sensitive than standard T2-weighted and contrast-enhanced T1-weighted MRI
Troyan	Liu Lu 2010	UMB	LFU	SD rats	60/60	28kHz	10-100	1	0.8	40min	Sonovue	35ul/kg(1/4)						controlled tumor progression (see 31, 0.05 cm/30 + or 0.1 standard deviation) vs 0.08 cm/30 + or 0.1 standard deviation)
Tajel	Yang Lin WL 2007	UMB	effect of UCA focus	Wistar rats	38/635	1	90	1	0.8-1.2	60	Sonovue?	0.20,80,90						LFU increased permeability, obtained early wide area of BBB opening and a low incidence of hemorrhagic complications
Tajel	Yang Lin WL 2008	USC	flow-dependent effects of UCA	Wistar rats	38/635	1	90	1	?	60	Sonovue	4 doses						an appropriate quantity of UCA effectively increases and localizes the BBBO
Tajel	Yang Yang 2010	JMRI	MPREB&time	male SD rats	38/635	1	90	1	1.43-4.29W	60	Sonovue	150	EB	0, 10, 20, 40, 60 min				The contrast-enhanced MRI signal can potentially be used to evaluate the amount of chemotherapeutic agents entering the targeted tissue
Tajel	Yang Yang 2010	JCR	Evens Blue (EB) extravasation	male SD rats	38/635	1	90	1	same	60	Sonovue	150	EB					dependent on duration, times and interval
Chongqing	Wang Chen Y 2009	JUM	MREEB	rabbit	190/150	1.1	GW			6	Sonovue	30	Magnest	1.37 (T1, T2)				peak 2h; repaired 8 h
Melbourne	Collins 2010	Ultrasound	microstreaming generated by	in vitro	12/													many different microstreaming patterns are possible around a microbubble when it is on a surface. About 100 microbubbles much larger than used in clinical practice
Herts	Krauszova H 2011	PMAS	in vivo & uninfected model	stimulation	1, 3													

- 1: Cho EE, Drazic J, Ganguly M, Stefanovic B, Hynynen K. Two-photon fluorescence microscopy study of cerebrovascular dynamics in ultrasound-induced blood-brain barrier opening. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011 Apr 20. [Epub ahead of print]
- 2: Vlachos F, Tung YS, Konofagou E. Permeability dependence study of the focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening at distinct pressures and microbubble diameters using DCE-MRI. *Magn Reson Med.* 2011 Apr 4. doi:10.1002/mrm.22848. [Epub ahead of print]
- 3: O'Reilly MA, Waspe AC, Ganguly M, Hynynen K. Focused-ultrasound disruption of the blood-brain barrier using closely-timed short pulses: influence of sonication parameters and injection rate. *Ultrasound Med Biol.* 2011 Apr;37(4):587-94. Epub 2011 Mar 3.
- 4: Krasovitski B, Frenkel V, Shoham S, Kimmel E. Intramembrane cavitation as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Feb 22;108(8):3258-63. Epub 2011 Feb 7.
- 5: Huang Y, Hynynen K. MR-guided focused ultrasound for brain ablation and blood-brain barrier disruption. *Methods Mol Biol.* 2011;711:579-93.
- 6: Deffieux T, Konofagou EE. Numerical study of a simple transcranial focusedultrasound system applied to blood-brain barrier opening. *IEEE Trans UltrasonFerroelectr Freq Control.* 2010 Dec;57(12):2637-53.
- 7: Jalali S, Huang Y, DumontDJ, Hynynen K. Focusedultrasound-mediated bbb disruption is associated with an increase in activation of AKT: experimental study in rats. *BMC Neurol.* 2010 Nov 15;10:114.
- 8: Tung YS, Vlachos F, Choi JJ, Deffieux T, Selert K, Konofagou EE. In vivo transcranial cavitation threshold detection during ultrasound-induced blood-brain barrier opening in mice. *Phys Med Biol.* 2010 Oct 21;55(20):6141-55. Epub 2010 Sep29.
- 9: Shang X, Wang P, Liu Y, Zhang Z, Xue Y. Mechanism of low-frequency ultrasound in opening blood-tumor barrier by tight junction. *J Mol Neurosci.* 2011 Mar;43(3):364-9. Epub 2010 Sep 18.
- 10: Choi JJ, Selert K, Gao Z, Samiotaki G, Baseri B, Konofagou EE. Noninvasive and localized blood-brain barrier disruption using focused ultrasound can be achieved at short pulse lengths and low pulse repetition frequencies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011 Feb;31(2):725-37. Epub 2010 Sep 15.
- 11: Yang FY, Horng SC, Lin YS, Kao YH. Association between contrast-enhanced MR images and blood-brain barrier disruption following transcranial focused ultrasound. *J Magn Reson Imaging.* 2010 Sep;32(3):593-9.
- 12: Baseri B, Choi JJ, Tung YS, Konofagou EE. Multi-modality safety assessment of blood-brain barrier opening using focused ultrasound and definity microbubbles: a short-term study. *Ultrasound Med Biol.* 2010 Sep;36(9):1445-59.
- 13: Howles GP, Bing KF, Qi Y, Rosenzweig SJ, Nightingale KR, Johnson GA. Contrast-enhanced in vivo magnetic resonance microscopy of the mouse brain enabled by noninvasive opening of the blood-brain barrier with ultrasound. *Magn Reson Med.* 2010 Oct;64(4):995-1004.
- 14: Vlachos F, Tung YS, Konofagou EE. Permeability assessment of the focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening using dynamic contrast-enhanced MRI. *Phys Med Biol.* 2010 Sep 21;55(18):5451-66. Epub 2010 Aug 25.
- 15: O'Reilly MA, Huang Y, Hynynen K. The impact of standing wave effects on transcranial focused ultrasound disruption of the blood-brain barrier in a rat model. *Phys Med Biol.* 2010 Sep 21;55(18):5251-67. Epub 2010 Aug 18.
- 16: Park J, Fan Z, Kumon RE, El-Sayed ME, Deng CX. Modulation of intracellular Ca2+ concentration in brain microvascular endothelial cells in vitro by acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol.* 2010 Jul;36(7):1176-87.
- 17: O'Reilly MA, Hynynen K. A PVDF receiver for ultrasound monitoring of transcranial focused ultrasound therapy. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2010 Sep;57(9):2286-94. Epub 2010 May 27.
- 18: Goertz DE, Wright C, Hynynen K. Contrast agent kinetics in the rabbit brain during exposure to therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 2010 Jun;36(6):916-24. Epub 2010 May 5.
- 19: Tung YS, Choi JJ, Baseri B, Konofagou EE. Identifying the inertial cavitation threshold and skull effects in a vessel phantom using focused ultrasound and microbubbles. *Ultrasound Med Biol.* 2010 May;36(5):840-52.
- 20: Alonso A, Reinz E, Fatar M, Jenne J, Hennerici MG, Meairs S. Neurons but not glial cells overexpress ubiquitin in the rat brain following focused ultrasound-induced opening of the blood-brain barrier. *Neuroscience.* 2010 Aug 11;169(1):116-24. Epub 2010 Apr 21.

- 21: Liu HL, Hua MY, Chen PY, Chu PC, Pan CH, Yang HW, Huang CY, Wang JJ, Yen TC, Wei KC. Blood-brain barrier disruption with focused ultrasound enhances delivery of chemotherapeutic drugs for glioblastoma treatment. *Radiology*. 2010 May;255(2):415-25.
- 22: Alonso A, Reinz E, Jenne JW, Fatar M, Schmidt-Glenewinkel H, Hennerici MG, Meairs S. Reorganization of gap junctions after focused ultrasound blood-brain barrier opening in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 Jul;30(7):1394-402. Epub 2010 Mar 24.
- 23: Forsberg U, Jonsson P, Stegmayr C, Stegmayr B. Microemboli, developed during haemodialysis, pass the lung barrier and may cause ischaemic lesions in organs such as the brain. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Aug;25(8):2691-5. Epub 2010 Mar 19.
- 24: Howles GP, Qi Y, Johnson GA. Ultrasonic disruption of the blood-brain barrier enables in vivo functional mapping of the mouse barrel field cortex with manganese-enhanced MRI. *Neuroimage*. 2010 May 1;50(4):1464-71. Epub 2010 Jan 22.
- 25: Liu HL, Pan CH, Ting CY, Hsiao MJ. Opening of the blood-brain barrier by low-frequency (28-kHz) ultrasound: a novel pinhole-assisted mechanical scanning device. *Ultrasound Med Biol*. 2010 Feb;36(2):325-35. Epub 2009 Dec 16.
- 26: Choi JJ, Wang S, Tung YS, Morrison B 3rd, Konofagou EE. Molecules of various pharmacologically-relevant sizes can cross the ultrasound-induced blood-brain barrier opening in vivo. *Ultrasound Med Biol*. 2010 Jan;36(1):58-67.
- 27: Collis J, Manasseh R, Liovic P, Tho P, Ooi A, Petkovic-Duran K, Zhu Y. Cavitation microstreaming and stress fields created by microbubbles. *Ultrasonics*. 2010 Feb;50(2):273-9. Epub 2009 Oct 13.
- 28: Wang F, Cheng Y, Mei J, Song Y, Yang YQ, Liu Y, Wang Z. Focused ultrasound microbubble destruction-mediated changes in blood-brain barrier permeability assessed by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Ultrasound Med*. 2009 Nov;28(11):1501-9.
- 29: Choi JJ, Feshitan JA, Baseri B, Wang S, Tung YS, Borden MA, Konofagou EE. Microbubble-size dependence of focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening in mice in vivo. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2010 Jan;57(1):145-54. Epub 2009 Oct 20.
- 30: Meairs S, Alonso A, Fatar M, Kern R, Hennerici M. Microbubbles traversing the blood-brain barrier for imaging and therapy. *Med Biol Eng Comput*. 2009 Aug;47(8):839-49. Epub 2009 Mar 13.
- 31: Choi JJ, Wang S, Brown TR, Small SA, Duff KE, Konofagou EE. Noninvasive and transient blood-brain barrier opening in the hippocampus of Alzheimer's double transgenic mice using focused ultrasound. *Ultrason Imaging*. 2008 Jul;30(3):189-200.
- 32: Hynynen K. Macromolecular delivery across the blood-brain barrier. *Methods Mol Biol*. 2009;480:175-85.
- 33: Xie F, Boska MD, Lof J, Uberti MG, Tsutsui JM, Porter TR. Effects of transcranial ultrasound and intravenous microbubbles on blood brain barrier permeability in a large animal model. *Ultrasound Med Biol*. 2008 Dec;34(12):2028-34. Epub 2008 Aug 9.
- 34: Vykhotseva N, McDannold N, Hynynen K. Progress and problems in the application of focused ultrasound for blood-brain barrier disruption. *Ultrasonics*. 2008 Aug;48(4):279-96. Epub 2008 Apr 14. Review.
- 35: Raymond SB, Treat LH, Dewey JD, McDannold NJ, Hynynen K, Bacskai BJ. Ultrasound enhanced delivery of molecular imaging and therapeutic agents in Alzheimer's disease mouse models. *PLoS One*. 2008 May 14;3(5):e2175.
- 36: Schmitz G. Ultrasonic imaging of molecular targets. *Basic Res Cardiol*. 2008 Mar;103(2):174-81. Review.
- 37: Liu HL, Wai YY, Chen WS, Chen JC, Hsu PH, Wu XY, Huang WC, Yen TC, Wang JJ. Hemorrhage detection during focused-ultrasound induced blood-brain-barrier opening by using susceptibility-weighted magnetic resonance imaging. *Ultrasound Med Biol*. 2008 Apr;34(4):598-606. Epub 2008 Mar 3.
- 38: McDannold N, Vykhotseva N, Hynynen K. Blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound and circulating preformed microbubbles appears to be characterized by the mechanical index. *Ultrasound Med Biol*. 2008 May;34(5):834-40. Epub 2008 Jan 22.
- 39: Sheffield P, Trehan A, Boyd B, Wong OL. Microbubbles as ultrasound contrast agents and in targeted drug delivery. *Crit Rev Biomed Eng*. 2008;36(4):225-55. Review.



- 40: Yang FY, Fu WM, Chen WS, Yeh WL, Lin WL. Quantitative evaluation of the use of microbubbles with transcranial focused ultrasound on blood-brain-barrier disruption. *Ultrason Sonochem*. 2008 Apr;15(4):636-43. Epub 2007 Aug 26.
- 41: Choi JJ, Pernet M, Brown TR, Smal SA, Konofagou EE. Spatio-temporal analysis of molecular delivery through the blood-brain barrier using focused ultrasound. *Phys Med Biol*. 2007 Sep 21;52(18):5509-30. Epub 2007 Aug 31.
- 42: Yang FY, Fu WM, Yang RS, Liou HC, Kang KH, Lin WL. Quantitative evaluation of focused ultrasound with a contrast agent on blood-brain barrier disruption. *Ultrasound Med Biol*. 2007 Sep;33(9):1421-7. Epub 2007 Jun 11.
- 43: Treat LH, McDannold N, Vykhodtseva N, Zhang Y, Tam K, Hynynen K. Targeted delivery of doxorubicin to the rat brain at therapeutic levels using MRI-guided focused ultrasound. *Int J Cancer*. 2007 Aug 15;121(4):901-7.
- 44: Kinoshita M. Targeted drug delivery to the brain using focused ultrasound. *Top Magn Reson Imaging*. 2006 Jun;17(3):209-15. Review.
- 45: Meairs S, Hennerici M. Future developments in neurovascular ultrasound. *Front Neurol Neurosci*. 2006;21:261-8. Review.
- 46: Hynynen K. Focused ultrasound for blood-brain disruption and delivery of therapeutic molecules into the brain. *Expert Opin Drug Deliv*. 2007 Jan;4(1):27-35. Review.
- 47: Meairs S, Alonso A. Ultrasound, microbubbles and the blood-brain barrier. *Prog Biophys Mol Biol*. 2007 Jan-Apr;93(1-3):354-62. Epub 2006 Aug 4. Review.
- 48: Raymond SB, Skoch J, Hynynen K, Bacskaï BJ. Multiphoton imaging of ultrasound/Optison mediated cerebrovascular effects in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 Feb;27(2):393-403. Epub 2006 May 10.
- 49: McDannold N, Vykhodtseva N, Hynynen K. Targeted disruption of the blood-brain barrier with focused ultrasound: association with cavitation activity. *Phys Med Biol*. 2006 Feb 21;51(4):793-807. Epub 2006 Jan 25.
- 50: McDannold N, Vykhodtseva N, Raymond S, Jolesz FA, Hynynen K. MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits. *Ultrasound Med Biol*. 2005 Nov;31(11):1527-37.
- 51: Yin X, Hynynen K. A numerical study of transcranial focused ultrasound beam propagation at low frequency. *Phys Med Biol*. 2005 Apr 21;50(8):1821-36. Epub 2005Apr 6.
- 52: Sheikov N, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz F, Hynynen K. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound Med Biol*. 2004 Jul;30(7):979-89.
- 53: Unger EC, Porter T, Culp W, Labell R, Matsunaga T, Zutshi R. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004 May 7;56(9):1291-314. Review.
- 54: Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA. Non-invasive opening of BBB by focused ultrasound. *Acta Neurochir Suppl*. 2003;86:555-8.
- 55: Chuang VT, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin. *Pharm Res*. 2002 May;19(5):569-77. Review.
- 56: Schlachetzki F, Hölscher T, Koch HJ, Draganski B, May A, Schuierer G, Bogdahn U. Observation on the integrity of the blood-brain barrier after microbubble destruction by diagnostic transcranial color-coded sonography. *J Ultrasound Med*. 2002 Apr;21(4):419-29.
- 57: Schwarz KQ, Church CC, Serrino P, Meltzer RS. The acoustic filter: an ultrasonic blood filter for the heart-lung machine. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992 Dec;104(6):1647-53.
- 58: Hills BA, James PB. Microbubble damage to the blood-brain barrier: relevance to decompression sickness. *Undersea Biomed Res*. 1991 Mar;18(2):111-6.

図 1.

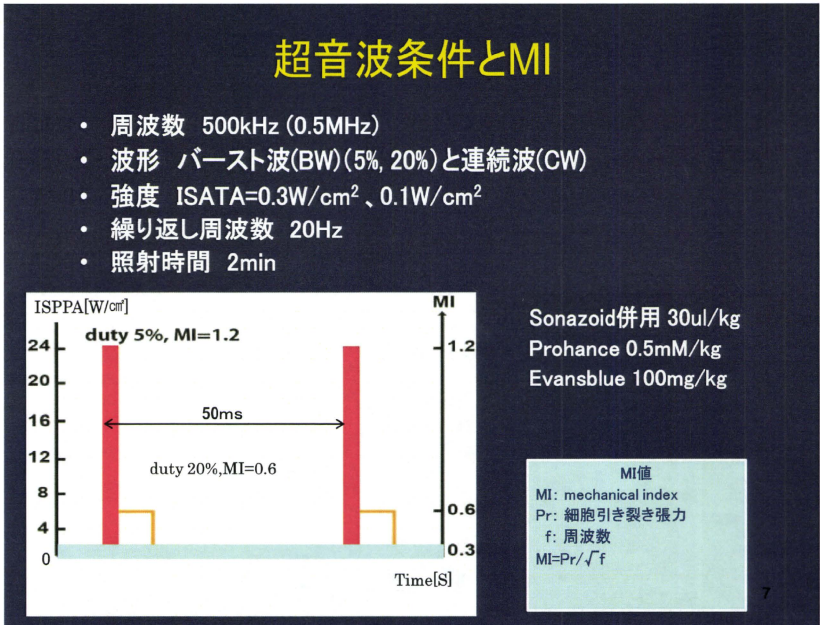


図 2.

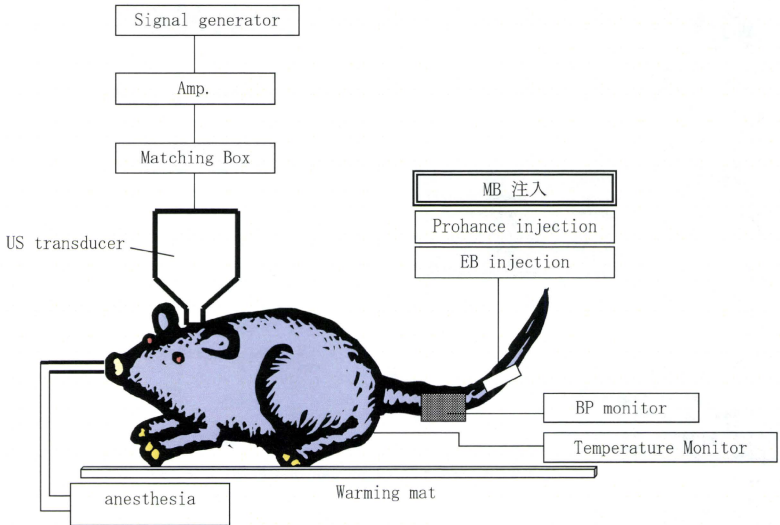


図 3-1.

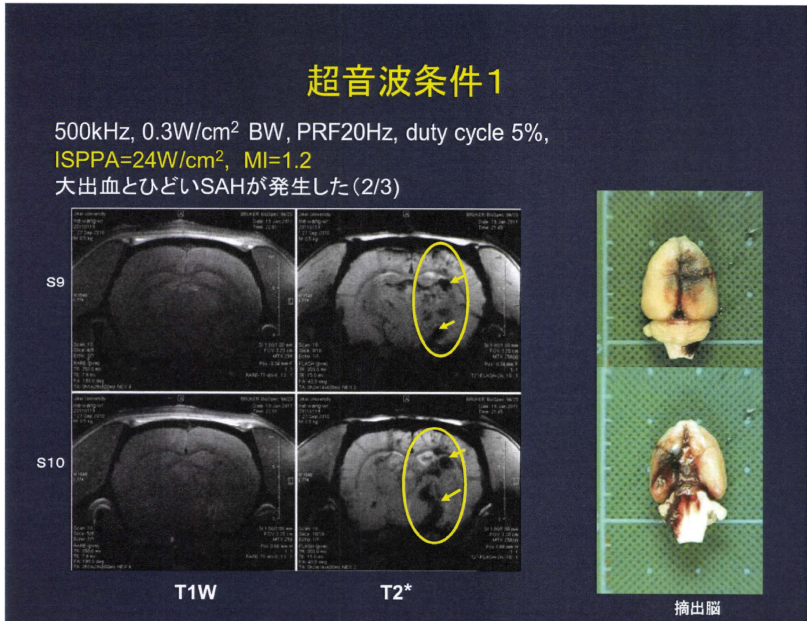


図 3-2.

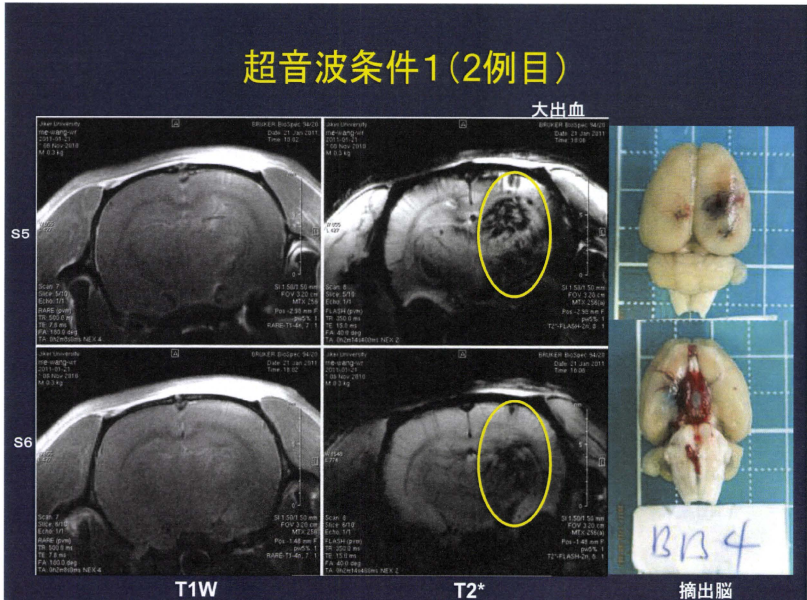


図3-3.

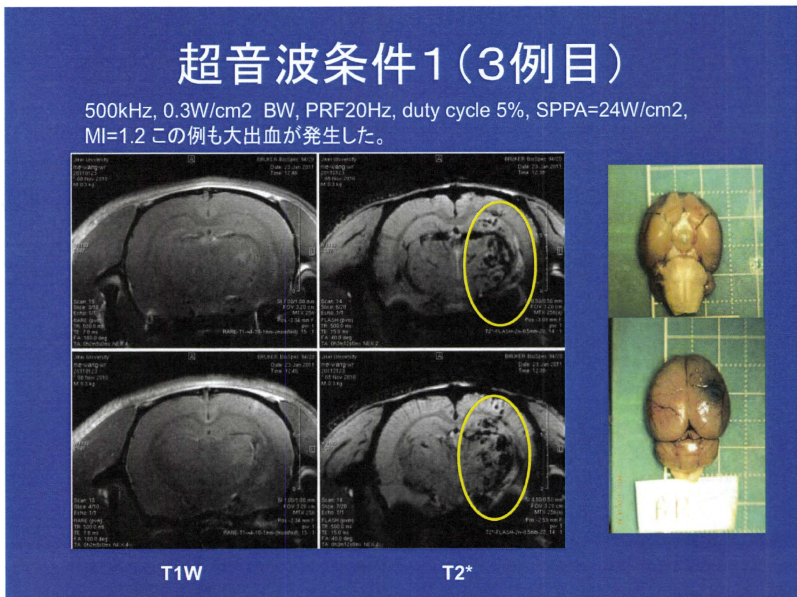


図4-1.

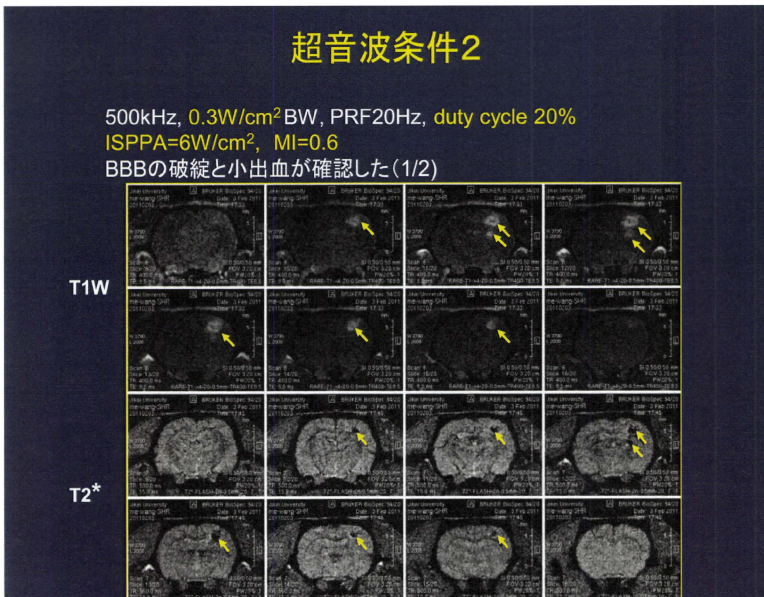


図 4-2.

# 超音波条件2(2例目)

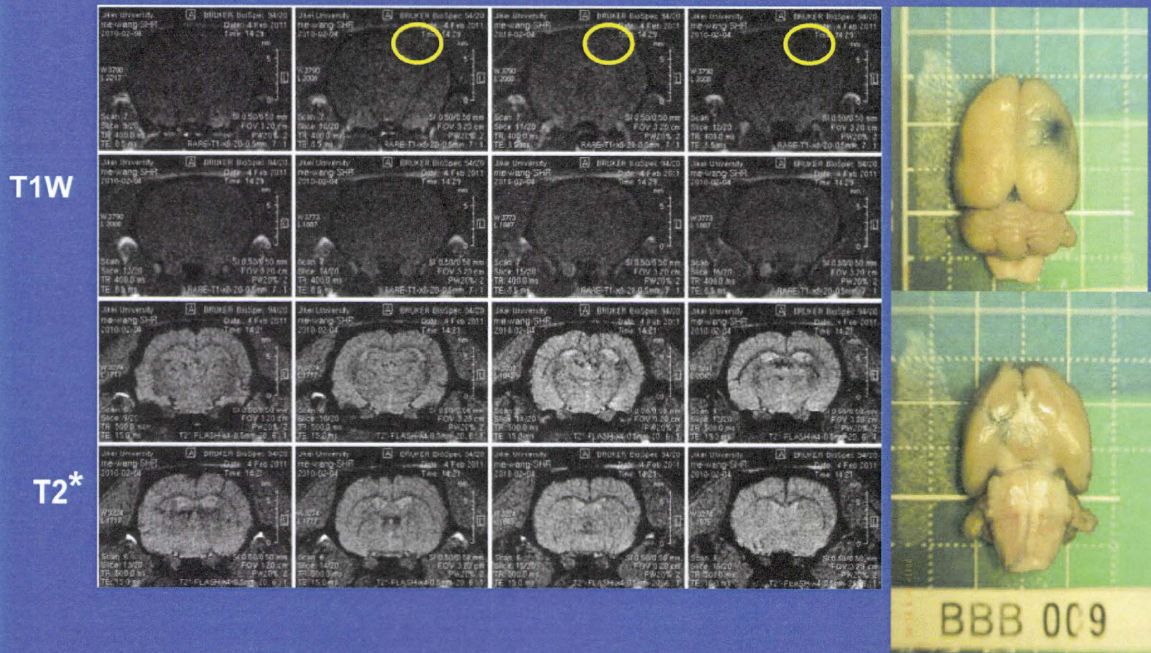


図 5-1.

# 超音波条件3

500kHz, 0.3W/cm<sup>2</sup> CW ISPPA=1.2W/cm<sup>2</sup>, MI=0.27  
 瀰漫性小出血が発生した(1/3)

瀰漫性小出血

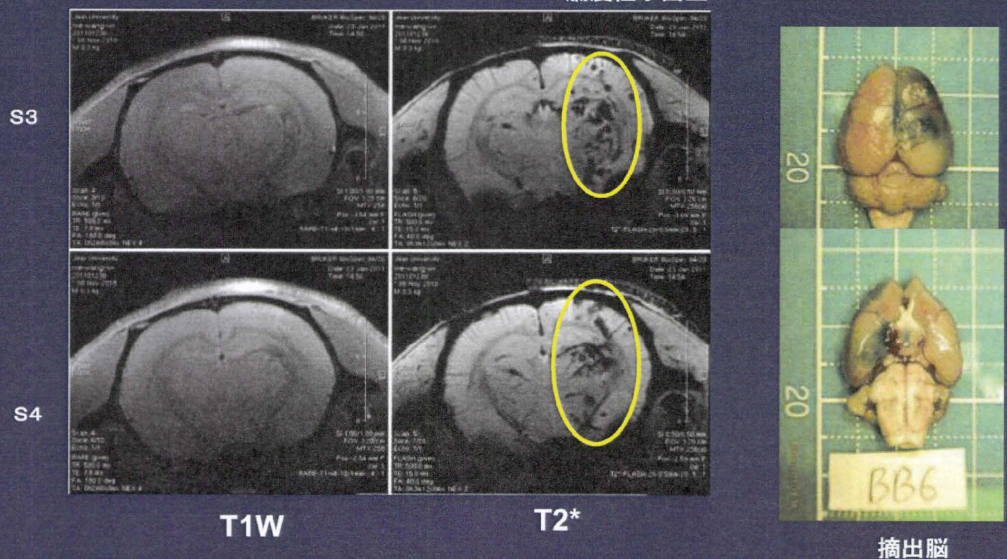


図 5-2.

## 超音波条件3 (Wistar2例目)

500kHz, 0.3W/cm<sup>2</sup> CW ISPPA=1.2W/cm<sup>2</sup>, MI=0.27、出血は認めなかったが、BBB破綻が確実だ。

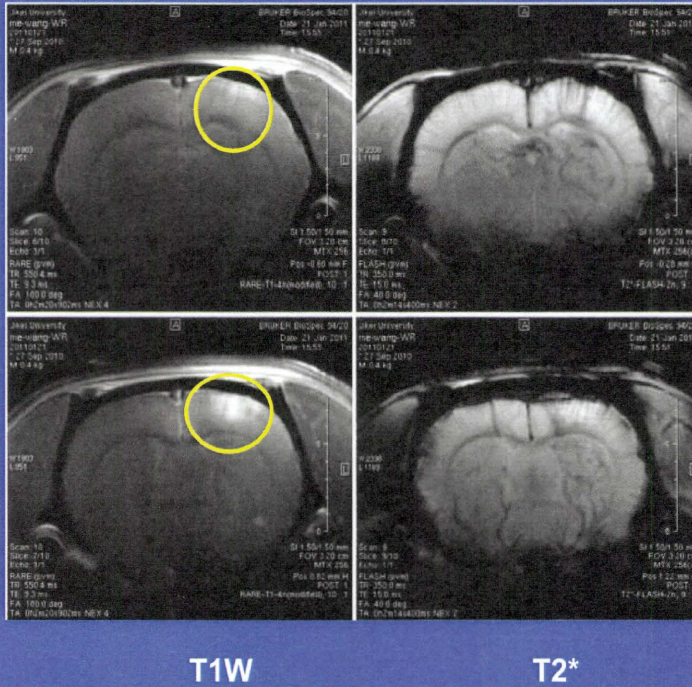


図 5-3

## 超音波条件3 (SHR1例目)

500kHz, 0.3W/cm<sup>2</sup> CW ISPPA=1.2W/cm<sup>2</sup>, MI=0.27、出血は認めなかったが、BBB破綻が確実だ。

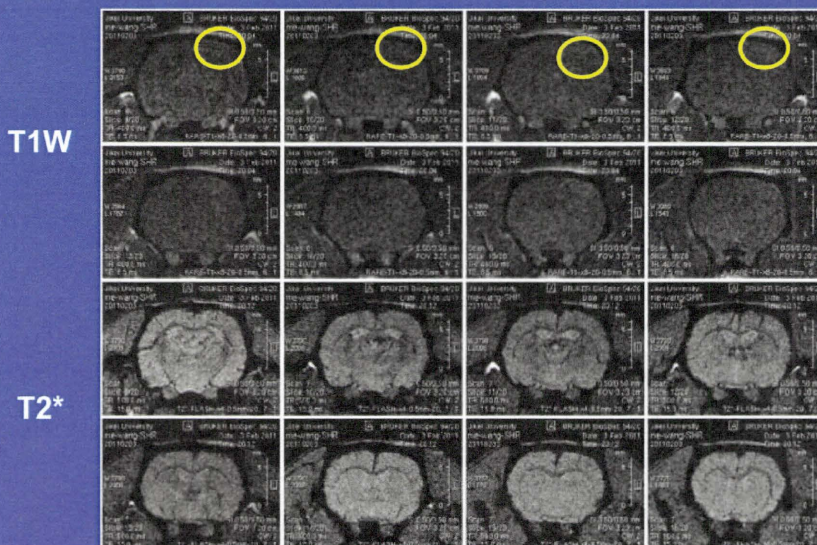
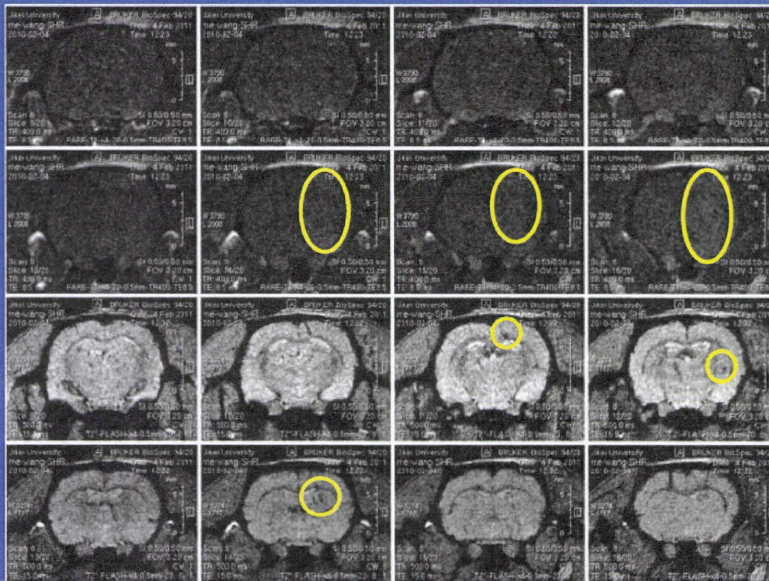


図 5-4.

# 超音波条件3 (SHR2例目)

500kHz, 0.3W/cm<sup>2</sup> CW ISPPA=1.2W/cm<sup>2</sup>, MI=0.27、小出血があつて、BBB破綻も確実だ。

T1W



T2\*

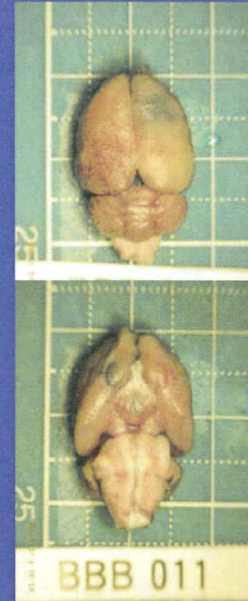


図 6.

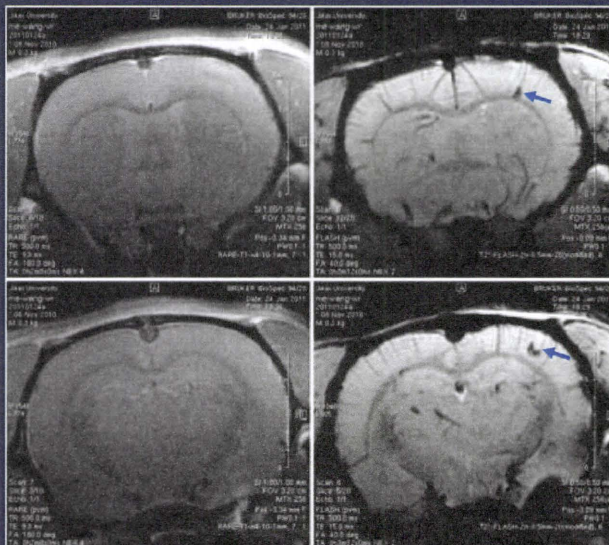
# 超音波条件4

500kHz, 0.1W/cm<sup>2</sup> BW, PRF20Hz, duty cycle 5%  
ISPPA=8W/cm<sup>2</sup>, MI=0.69  
BBBの破綻と小出血が発生した(1/1)

小出血

破綻と小出血

S4



T1W

T2\*



摘出脳

図 7.

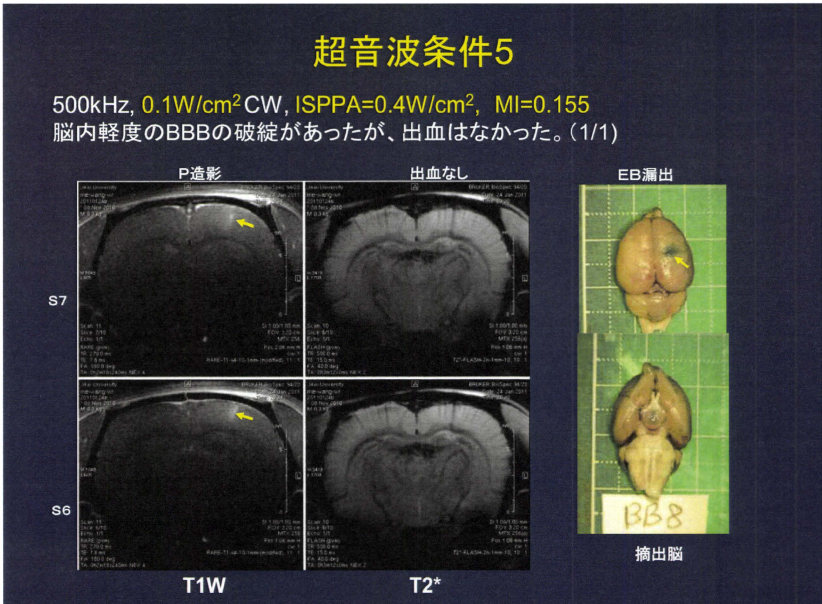
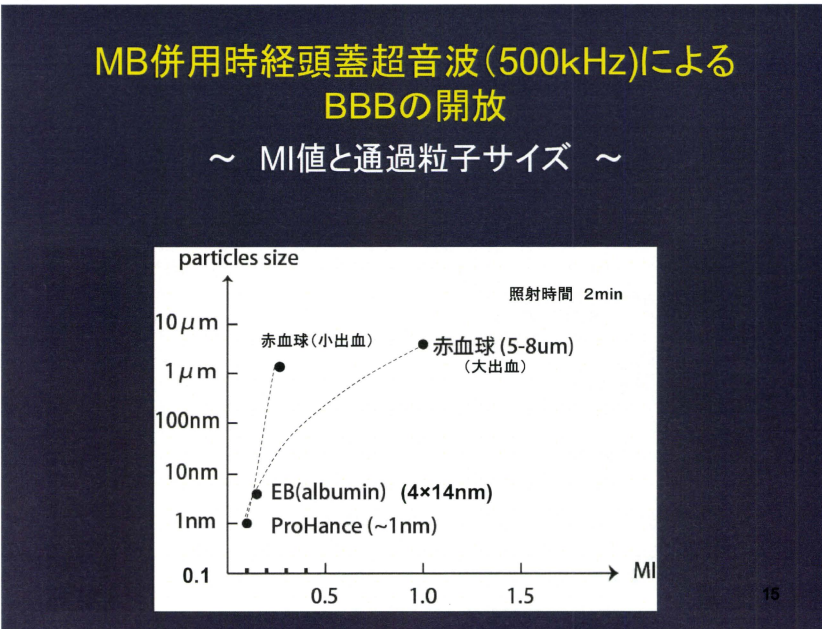


図 8.





## MRI画像評価に関する研究

研究分担者 横山 昌幸 東京慈恵会医科大学・准教授

### 研究要旨

WisterラットMCAのナイロン糸塞栓脳梗塞モデルで、3時間後に抜糸して再環流の後、高分子ミセルMRI造影剤を静脈注射した。静注の後にMRI（9.4T）T1強調画像で、梗塞半球にこの造影剤の集積を認めた。高分子のMRI造影剤が脳虚血の血管透過性亢進部位を明瞭に画像化できることが発見された。

### A. 研究目的

本研究の目的は、高分子ミセル型造影剤を用いて、脳梗塞部位のMRIによる新規分子イメージング画像診断システムを構築することである。

図1上側に示す様に、急性脳梗塞に対するt-PA治療の最も懸念すべき副作用である脳出血は、高分子タンパクであるt-PAが血液の中から血管を透過して脳組織間質に移行し、そこでマトリックスメタロプロテアーゼ-9（MMP-9）の活性化を通して、細胞外マトリクスを分解することが主要なメカニズムである。つまり、脳組織の虚血状態に反応して、脳梗塞部位では血管の高分子物質に対する透過性が大きく亢進するのである。よって、図1下側に示す様に、同じ高分子である高分子ミセルMRI造影剤を用いてこの血管透過性の亢進部位を画像診断して、t-PA副作用による出血の危険性を定量化することは、合理的であり、医療での価値が高いと考えられる。

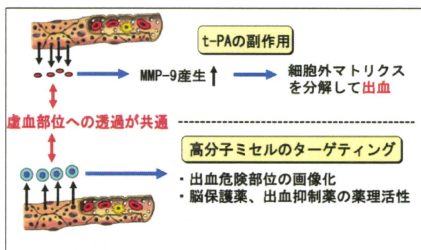


図1 脳梗塞虚血部位へのターゲティング戦略

高分子ミセルキャリアーとは、図2に示すように、ブロックコポリマーという形態の合成高分子が数百

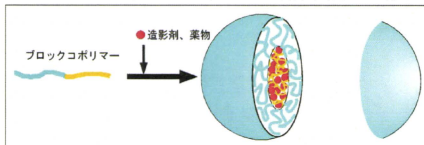


図2 高分子ミセルキャリアーシステム

分子会合して形成するナノサイズのキャリアーシステムである。本分担研究者は、脳梗塞部位と同様に血管透過性が亢進している固形がんモデルにおいて、高分子ミセルMRI造影剤が選択的に集積（ターゲティング）し、MRI画像での顕著なコントラストの増大を得ている。また、同じく高分子ミセルキャリアーを用いて脳保護薬や出血抑制剤（MMP-9阻害剤）を脳虚血部位にターゲティングすることは新規な急性脳梗塞治療法として価値の高いことと考えられる。

この高分子ミセル型MRI造影剤をラット脳梗塞モデルに投与して、脳梗塞画像診断における高分子造影剤のProof of Conceptを得るのが本年度の研究目的である。

### B. 研究方法

(1) 高分子MRI造影剤による脳梗塞部位のMRI観察  
ラット脳梗塞モデルは、Wister雄ラット（300-320g）の中大脳動脈（MCA）を2-0のナイロン糸で塞栓する小泉モデルを用いた。イソフルラン麻酔下にナイロン糸を内径動脈に19-21mm進ませて、塞栓する。3時間塞栓してから、抜糸して再開通を行った。再開通直後に高分子ミセルMRI造影剤を静脈内投与し、その後3時間と24時間にMRI測定を行う。用いた造影剤は図3に示す、ポリエチレングリコール（PEG）とポリリシンからなるブロックコポリマーにDOTAのキレート基を介して、 $Gd^{3+}$ （ガドリニウム）イオンを結合したものである。このポリマーから高分子ミセルが形成する。ブロックコポリマーの組成は、 $n=118$ 、 $m=23$ であり、DOTAユニットの10個に $Gd^{3+}$ イオンが結合している。

MRI観察は9.4Tの磁場強度のBruker BioSpec 94/20 USRを用いた。測定中は体温と呼吸数をそれぞれ、 $36.5^{\circ}C \pm 0.7^{\circ}C$ 、 $49.2 \pm 6.3$  /minに保った。

造影剤の分布を観察するT1強調画像はTR=160.0ms、TE=4.3ms、FA=80.0deg、NEX=4の条件で得た。また、脳浮腫と出血をそれぞれ観察す

るためのT2強調画像とT2\*強調画像は以下の条件で取得した。

T2強調画像 (TR=5000.0ms, TE=33.0ms, FA=180.0deg)

T2\*強調画像 (TR=500.0ms, TE=15.0ms, FA=30.0deg)

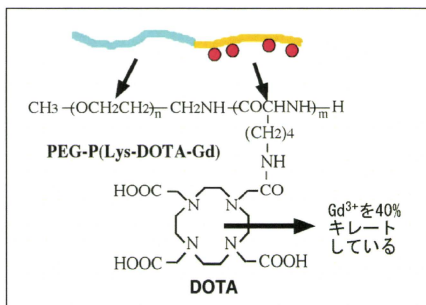


図3 高分子ミセル造影剤の化学構造

また、各ラットの中大脳動脈が塞栓していることをMRIアンギオ画像で確認してから造影剤投与以降の実験を行った。

(2)時間経過の観察および低分子造影剤との比較  
 造影剤を投与してからすぐにMRI測定を行うために、造影剤投与を再開直後の1時間後に設定した。(再開直後のために抜糸直後に、MRI装置にラットを設置することは不可能なので) また、低分子Gdキレート剤のMagnevistを用いての比較実験を行った。このような低分子造影剤の場合には、投与数分後が最も鮮明なMRI画像が得られる可能性が高く、そのために投与直後からの測定を可能にする必要があった。その他の実験条件は上記の(1)に準じた。

#### (倫理面への配慮)

倫理面への配慮は、本研究では動物実験に関するものに限られる。具体的には、ラットを用いた動物実験である。この実験は、東京慈恵会医科大学の動物実験倫理規定に基づき実施された。すなわち、実験動物の苦痛を伴う可能性のある作業(犠牲死など)は麻酔下で行い、倫理基準を厳守された。以上より、動物実験に対する倫理は十分に遵守された。

### C. 研究結果

(1)高分子MRI造影剤による脳梗塞部位のMRI観察  
 高分子ミセルMRI造影剤を再開直後に投与し、3時間後のMRI画像を図4に示す。造影剤の分布を示すT1強調画像(図4(a))では、梗塞半球側の黄色線で囲った部位に明確な陽性画像が得られた。この時の投与量は含まれるGd<sup>3+</sup>が0.025mmol/kgであり、現在Gd系のMRI造影剤で用いられている投与量の1/4と少ないものであった。また、興味深いことに図4(a)で白く映し出された部位は、図4

(b)とは一致していない。図4(b)はT2強調画像であり、梗塞半球での浮腫の程度を白く描出する画像である。

(a)T1強調画像



(b)T2強調画像



(c)T2\*強調画像

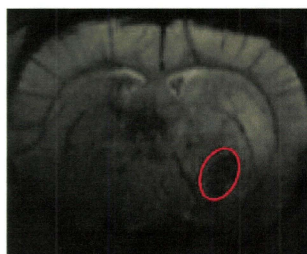


図4 高分子ミセル造影剤投与3時間後のMRI画像

造影剤によるT1強調画像は、浮腫部位(黄色線で囲まれた部位)の中の特定部位をコントラスト高く描出している。T2\*強調画像を図4(c)に示す。赤線で囲まれた黒い陰影画像は軽度の出血を意味している。この画像が黄色線内のT1強調画像と重なっていないことは、高分子ミセル造影剤が出血によって脳組織に移行したのではなく、出血していない脳血管を透過して移行したことを示す。

また、この図4(a)の明瞭な画像が投与後3時間で得られたことは意義深い。高分子キャリアーによるターゲティングでは低分子のシステムに比べて時間がかかることが、大きな欠点になり得る。

固形がんへのターゲティングでは、その集積濃度が最大になるのは2-4-8時間であることが知られているが、急性脳梗塞の診断・治療では投与から2-4時間後初めて結果が得られるのでは遅すぎるからである。

図5 (a)には、高分子ミセル造影剤投与後2-4時間後のT1強調画像を示す。投与後3時間の図4 (a)に比べると白い画像の輝度は低い。この高分子ミセル造影剤はマウスでは血中半減期が1-2時間程度あり、固形がんへの集積は2-4時間後に最大であることがわかっている。このことを考慮すると、脳梗塞モデルでは、再開通後の早期にConvectionによって造影剤が血液から脳虚血部位に移行すること（拡散によるのではなく）が集積の主たる機構であると推察される。

また、図5 (b)には梗塞の時間を4時間と長くしたより重篤なモデルの画像を示す。梗塞時間が3時間の図4 (a)よりもよりコントラストの強いT1強調画像が得られている。この造影剤による画像が、急性脳梗塞の重症度の診断に有用であることを示唆している。

(a)造影剤投与2-4時間後



(b)4時間塞栓モデル、造影剤投与3時間後

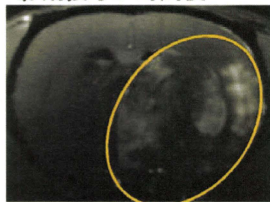


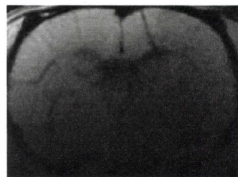
図5 種々の条件でのT1強調画像

(2) 時間経過の観察および低分子造影剤との比較

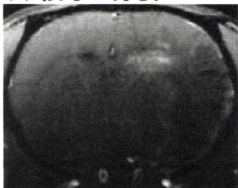
再開通後1時間で高分子ミセル造影剤を投与してT1強調画像の時間経過を示したのが図6である。投与後わずか30分(図6 (b))で、投与前(図6 (a))にはなかった明瞭な白い部位が梗塞半球に確認できる。その白い画像は投与後1時間(図6 (c))

となるとそのコントラストは増すが、投与後2時間(図6 (d))ではほとんど変わらなくなる。投与量はGd 0.033mmol/kgであった。

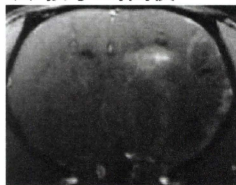
(a)投与前



(b)投与15分後



(c)投与1時間後



(d)投与2時間後



図6 高分子ミセル造影剤でのT1強調画像

次に、低分子のGdキレートであるMagnevistを投与して得たMRI画像を解析した。投与直後から3時間までT1強調画像を観察したが、高分子ミセル造影剤のような明確な画像は全く得られなかった。その代表的な画像を図7に示す。投与前の図7 (a)に比べて明瞭な白い部位は投与後3分、15分、60分のいずれでも観察されることはなかった。また、この時の造影剤投与量は高分子ミセルの場合の3倍のGd 0.10 mmol/kgであった。(この量は臨床でのMagnevistの標準投与量である。)

以上のことから、Gd系の陽性造影剤による脳梗塞虚血部位のMRI画像は、高分子ミセル造影剤での

み得られるものであることが判明した。このことは、低分子のGd造影剤が現在の脳梗塞診断では用いる意義がない事実と一致する。

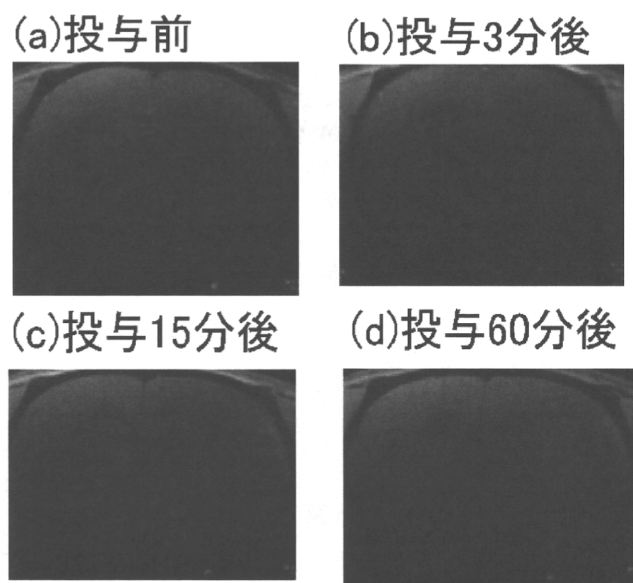


図7 MagnevistでのT1強調画像

#### D. 考察

急性脳梗塞に対する現状の画像診断は、梗塞部位、浮腫などの病状の進行度、そして出血の有無を診断してt-PA治療の可否の判断に供する。t-PAの最重要な副作用は脳出血で約6%に出現する。この出血は血管外に漏出したt-PAの作用であるが、t-PA脳組織漏出による危険性を定量化する診断法は存在しない。

今回、脳梗塞虚血部が、血管から漏出した高分子造影剤によってコントラスト高く造影されることが見いだされた。急性脳梗塞画像診断に高分子造影剤を用いる概念は、これまで存在せず、今回の結果は、出血のリスクを定量化し得る新規画像診断法として期待できる。結果の中で興味深いことは、

- 1, 造影された部位が浮腫部位の一部であること  
造影剤による造影部位は、T2強調画像による浮腫部位の中に含まれるが、その一部特定部位である。このT2強調画像の浮腫部位は血管浮腫によって、血液から大量の水が脳組織内に侵入した結果である。高分子MRI造影剤は、浮腫部位全てに侵入するわけではない。この事実は、同じ浮腫部位でも水のような低分子しか侵入できない、すなわち血管の透過経路が狭い部位と、T1強調画像で白くなった高分子が透過できる透過経路が広い部位があることを意味する。論理的に考えれば、透過経路が広い後者の部位は、t-PAが侵入し、出血のし易い部位であると考えられる。つまり、高分子ミセル造影剤が映し出す部位は、単に脳梗塞虚血部位ではなく、t-PA治療での出血危険部位といえる。

来年度はこの仮説がラットモデルで実証されるかを、t-PA投与によって検証することが求められる。2, 造影剤投与後、短時間でコントラストの高い画像が得られたこと

高分子のキャリアシステムの弱点は、その血液から組織への移行が低分子に比べて遅い場合があることである。この移行が濃度差に基づく拡散による場合には、分子量が大きく拡散定数が小さい高分子の移行は極端に遅くなる。一方、組織移行が流れに乗ってなされるConvectionに基づく場合は、低分子と同等の移行速度を高分子は示すことができる。急性脳梗塞の場合には、造影剤投与から診断までに長時間を要することは許されない。その観点から今回の結果からは、投与30分後でも十分にコントラストの高い画像が得られたことは意義が大きい。高分子ミセル造影剤は血管浮腫に伴って、Convectionによって透過経路の広い脳虚血部位に選択的に移行したと考えられる。低分子造影剤も同様に移行するのであるが、拡散が早いので血液に戻る速度が速く、どの時間においても虚血部位の明確な画像を与える集積がなかったと考えられる。その意味では、高分子ミセル造影剤の拡散が遅いことが、明確な画像を与えるために有効に働いている。

以上の結果を踏まえて、来年度以降は以下の事柄の実行が求められる。

- t-PA投与によって、高分子ミセル造影剤で画像化された部位が出血危険部位であることの証明
- 永久梗塞モデルにおけるMRI画像取得（再開通なしで血管透過性亢進部位の検出）

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hori, K., Nishihara, M., and Yokoyama, M., Vital microscopic analysis of polymeric micelle extravasation from tumor vessels: macromolecular delivery according to tumor vascular growth stage, *J. Pharm. Sci.* 99: 549-562, 2010.
2. Ma, H., Shiraishi, K., Yokoyama, M., Maitani, Y., et al., Accelerated Blood Clearance Was Not Induced for a Gadolinium-Containing PEG-poly (L-lysine)-Based Polymeric Micelle in Mice, *Pharmaceutical Research*, 27: 296-302, 2010.
3. Hori, K., Nishihara, M., and Yokoyama, M., The Combretastatin Derivative Cderiv, a Vascular Disrupting Agent, Enables Polymeric Nanomicelles to Accumulate in Microtumors, *J. Pharm. Sci.* 99, 2914-25, 2010.
4. Akiba, I., Sakurai, K., Shiraishi, K., Yokoyama, M. et al., Encapsulation of a Hydrophobic Drug into a Polymer-Micelle Core Explored with Synchrotron SAXS. *Langmuir*, 26, 7544-7551, 2010.