

図9 灌流固定後、頭皮を剥いで得られたラット脳ex vivo SPECT画像。脳への集積が見られる。



図10 ラット摘出脳の2 mm厚のスライスの写真。脳に集積したエバンスブルーが観察される。

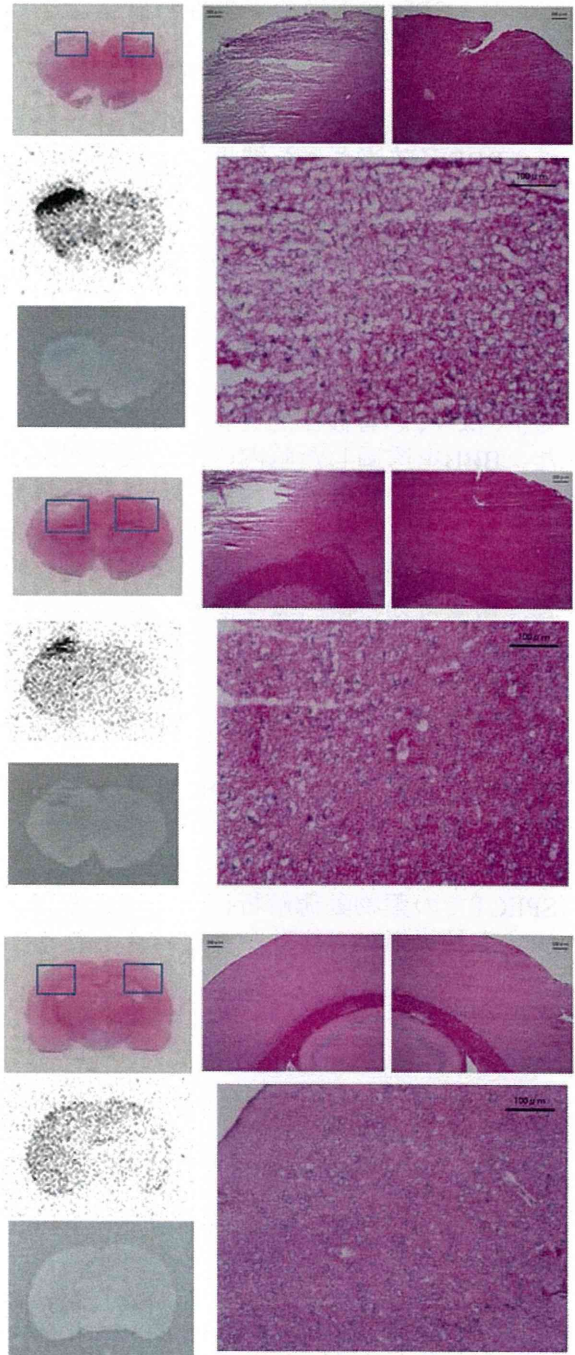


図11 摘出脳の代表的な切片のAutoradiography画像とHE染色画像。上図：集積の多いスライス、中図：集積が少しあるスライス、下図：集積の無い少ないスライス。Autoradiography画像はSPECT画像と同じような集積が見られた。集積が多いスライスは組織にダメージがある。

D. 考察

デジタル検出器回路を開発し、検出器が高解像度化された。同時に、検出器2台搭載およびコリメータ応答関数組み込み画像再構成アルゴリズムによって高感度化も実現した。ソフトウェアもGUI化され、操作性も向上した。脳保護薬のDDS評価などに十分に活用可能な実用的な高解像度、高感度SPECT装置を構築できた。

高解像度SPECTを用いて、ラット脳の超音波照射された領域において ^{99m}Tc -DTPAの集積が確認された。エバンスブルーの集積と良く一致していた。これは超音波照射によってBBBの透過性が向上することをSPECTで評価できたことを示唆する。Autoradiographyの集積とも良く一致しており、SPECT画像の妥当性が確認できた。SPECT製剤を動態解析することで、透過速度定数を定量化できると考えられる。

しかし、HE染色画像から組織がダメージを受けて、BBBが破壊された結果、エバンスブルーや ^{99m}Tc -DTPAがBBBを透過した可能性もある。実際には、BBBを破壊しない条件にて超音波を照射する必要があるため、超音波の出力を低下させるなど照射条件を調整する必要がある。SPECT画像でも、超音波照射付近の頭皮の集積が高く、これは炎症による可能性も考えられるため、やはり、超音波出力を抑える必要がある。また、BBBを透過した脳内のRIをより明瞭に画像化するには、頭皮の集積が低い状態で観察するのが良さそうである。したがって、RI投与から少し時間が経過してからの撮像が良いと考えられ、撮像時刻の検討も今後の課題といえる。

E. 結論

高解像度化、高感度化された実用的な高解像度SPECT装置が開発された。さらに、ラットを対象に超音波照射による低分子化合物のBBB透過性の向上を、高解像度SPECT装置を用いて画像化および評価できることが確認できた。さらにSPECTでの薬物動態解析によって、脳保護薬のDDS定量評価が可能になると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Teramoto N, Koshino K, Yokoyama I, Miyagawa, Zeniya T, Hirano Y, Fukuda H, Sawa Y, Knuuti J, Iida H. Experimental pig model of old myocardial infarction with long survival leading to chronic LV dysfunction and remodeling as evaluated by PET. *J Nucl Med*, vol. 52, no. 5, pp. 761-768 (2011)

Zeniya T, Watabe H, Hayashi T, Ose T, Myojin K, Taguchi A, Yamamoto A, Teramoto N, Kanagawa M, Yamamichi Y, Iida H. Three-dimensional quantitation of regional cerebral blood flow in mice using a high-resolution pinhole SPECT system and

^{123}I -iodoamphetamine. *Nucl Med Biol*, vol. 38, no. 8, pp. 1157-1164 (2011)

Hirano Y, Zeniya T, Iida H. Monte Carlo simulation of scintillation photons for the design of a high-resolution SPECT detector dedicated to human brain. *Ann Nucl Med*, vol. 26, no. 3, pp. 214-221 (2012)

Koshino K, Watabe H, Enmi J, Hirano Y, Zeniya T, Hasegawa S, Hayashi T, Miyagawa S, Sawa Y, Hatazawa J, Iida H. Effects of patient movement on measurements of myocardial blood flow and viability in resting ^{15}O -water PET studies. *J Nucl Cardiol*, online first

Zeniya T, Hirano Y, Tominaga T, Hori Y, Watabe H, Sakimoto T, Sohlberg A, Minato K, Hatazawa J, Iida H. Conceptual design of high spatial-resolution SPECT system for human brain. *2011 IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record*, pp. 3426-3428 (2011)

Huang Q, Zeniya T, Hirano Y, Kudo H, Iida H, Gullberg GT. Evaluation of a brain imaging system with combined parallel hole and pinhole collimation. *Proceedings of 11th International Meeting on Fully Three-Dimensional Image Reconstruction in Radiology and Nuclear Medicine*, pp. 246-249 (2011)

2. 学会発表

Zeniya T, Hirano Y, Tominaga T, Hori Y, Watabe H, Sakimoto T, Sohlberg A, Minato K, Hatazawa J, Iida H. Conceptual design of high spatial-resolution SPECT system for human brain. *2011 IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference (Valencia, Spain)*, October 23-29, 2011

Zeniya T, Kawashima H, Fukuda H, Hashikawa Y, Koshino K, Hirano Y, Hori Y, Miyake Y, Iida H. Optimization of multi-pinhole SPECT imaging for measuring quantitative cerebral blood flow in rats. *Society of Nuclear Medicine's 58th Annual Meeting (San Antonio, USA)*, June 4-8, 2011

銭谷 勉, 河嶋秀和, 福田 肇, 橋川美子, 越野一博, 平野祥之, 堀 祐樹, 山本明秀, 圓見純一郎, 三宅義徳, 飯田秀博. ラット脳血流量のためのマルチピンホールSPECT撮像の最適化. 第51回日本核医学会学術総会(つくば), 2011年10月27-29日

銭谷 勉, 平野祥之, 富永貴則, 堀 祐樹, 湊小太郎, 畑澤 順, 飯田秀博. 頭部用高解像度SPECT装置の概念設計. 第51回日本核医学会学術総会(つくば), 2011年10月27-29日

富永貴則, 平野祥之, 堀 祐樹, 銭谷 勉, 湊小太郎, 畑澤 順, 飯田秀博. 頭部用高解像度SPECT装置の開発と評価. 第51回日本核医学会学術総会(つくば), 2011年10月27-29日

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

治療薬の選択と評価実験の設計

～神経保護薬エダラボンは超音波血液脳関門薬物透過特性に影響を与えるか？～

研究分担者	古幡 博	東京慈恵会医科大学	医用エンジニアリング研究室	教授
研究協力者	福田 隆浩	東京慈恵会医科大学	神経病理学研究室	講師
研究協力者	王 作軍	東京慈恵会医科大学	医用エンジニアリング研究室	研究員
研究協力者	野村 卓史	東京慈恵会医科大学	医用エンジニアリング研究室	研究員

研究要旨

経頭蓋的超音波照射が血液脳関門（blood-brain barrier: BBB）の開放制御に関与することは、内外の研究者によって数多く報告されてきている。特に超音波造影剤（microbubble: MB）を併用した場合のBBBの透過率増高効果については、本分担研究者を含め、有用な成果を示してきた。しかしながら、造影剤MBを超音波で破壊すると、その局所の高圧、高温、ジェット流等が血管内皮に損傷を招来し、血管の自己修復があるとはいえ、脳梗塞患者の様な血管の脆弱化が進んでいる状態では、出血率増高という危険を含んでいる。本研究では、MBを用いずに、経頭蓋的な超音波を加えながら出血率増高を招来しない形での薬物透過率の可能性を実験的に検証した。まず in vivo実験によって、超音波強度、あるいは超音波曝露時間を変えた場合の、Evans blueのBBB透過率の変化を検証し、超音波単独での透過率閾値を確認した。次いで、急性脳梗塞患者等の治療に用いられる血栓溶解剤rt-PAの毒性の効果を考慮した場合のBBB透過率の変化を同様にEvans blueを用いて検証した。さらに、急性脳梗塞患者で臨床的に使用されている神経保護薬エダラボン（Free Radical Scavenger : FRS）を超音波と併用した場合には、その薬物透過率が抑制されるか否かを、in vivo実験で評価した。その結果、（条件1）超音波周波数500kHz、4W/cm²、連続波照射条件下では、数分でBBBの開放が認められたが、その後、4分から32分へ照射時間を変えてもBBB透過率に変化を認めなかった。また、（条件2）音響強度2W/cm²では、ほとんどBBB透過率の増高は32分の間認められなかった。rt-PAを投与したときには、（条件1）の条件下では、BBB開放に大きな差は認められなかったものの、（条件2）の条件下では、32分間の照射でBBB透過率の増高を示した。また、エダラボン投与下では、rt-PAによる透過率増高を抑制する傾向が見られたが、優位な差は認められなかった。これらの結果から、出血傾向を伴わない経頭蓋的超音波照射によってもBBBの薬物透過性を増高させ得る可能性を示すだけでなく、そのBBB透過性増高は超音波照射開始から極めて短時間で起こりうることも示すことが出来た。EBの粒子サイズは数ナノ立方メートルであり、現行のMRI造影剤とほぼ同様である。それゆえ、MRI造影剤等のサイズの薬物のBBB透過性を経頭蓋的超音波照射で制御し得る可能性が示唆された。しかしながら、照射超音波4W/cm²はやや強力で、脳組織の損傷は少なからず認めるとともに頭皮近傍では大きな損傷を惹起しており、その条件をそのまま臨床に適用するには超音波暴露照射法についての適切な制御法を空間的制御も含め採用する必要があることも安全性の面から明らかとなっている。

以上、本年度においては、経頭蓋的超音波照射による非マイクロバブル条件下でのBBB薬物透過性に関する閾値（音響強度、照射時間、併用薬物）について実験的に明らかにした。この安全条件と有効性のtrade-offを図ることに依って臨床実現するための超音波諸条件を整えれば、今後の臨床現場への活用、とりわけ急性脳梗塞治療における急性期の神経保護薬等薬物投与等の超音波制御が実現する可能性を提示した。

A. 研究目的

急性脳梗塞発症患者における超急性期においては、血栓溶解を第一目的として救急救命的治療が行われている。また、その後神経保護的な意味で、再閉塞予防神経保護薬、投与早期リハ

ビリ等の諸治療が1、2週間程度の間行われている。我が国では、来院当初から神経保護薬エダラボン（Free Radical Scavenger: FRS）が投与され、その薬効が神経保護とともにBBBの損傷を予防し血栓溶解剤（recombinant tissue

type-plasminogen activator: rt-PA)の投与量軽減にも関与していると言われている。超急性期におけるrt-PAの投与は、今日、発症3時間以内から4.5時間以内まで延長される見込みがあるが、神経保護的な意味から言えば再開通時間が早ければ早いほど3ヶ月後の神経予後が良好である事は周知の事実である。この再開通時間短縮の観点から、我々は経頭蓋的超音波照射併用による血栓溶解効果加速効果を活用する新たな超音波併用血栓溶解療法を検討を行ってきた。既に、小動物から大動物における有効性・安全性は確認され、その臨床的な展開が期待されているところである。これに加え、経頭蓋的超音波照射がさらに上述の神経保護薬の血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) の薬物透過制御を支援することができれば、超急性期から急性期に渡って経頭蓋的超音波照射法に新たな薬物透過法の制御という役割を持たせることができる。つまり、一種の超音波DDSとしてのBBB透過性制御という可能性が示唆されることになる。

既に、超音波によるBBB透過性については、強力超音波収束法 (high intensity focused ultrasound: HIFU) の研究者らが取り組んで来ている。HIFUの第一目的は脳腫瘍の経頭蓋的破壊・壊死であったが、同時にBBBの損傷を招来しない安全な収束法の重要性に気づき、このBBB開放制御の観点から、比較的軽度な条件のHIFUを利用した薬物投与、言わばMILD-HIFU (MIFU) による新薬物投与法の可能性に目を向けつつあった。しかし、BBB開放には相当強い超音波が必要であり、MIFU単独でのBBBの開放制御は困難であった。そこで、超音波造影剤 (micro bubble: MB) を併用するMIFUに視点を換え、今日、多くのBBB開放制御の可能性が示唆されるに至っている。

このMIFUを用いた血栓溶解もまた可能であるが、既に我々はLow intensity focused ultrasound: LIFUを用いる方法で血栓溶解の臨床的実現性を示してきた。そのLIFUとMBとの併用によるBBB開放制御の可能性については既に昨年度報告した。この超音波によるBBB開放制御については、上述のMIFU+MBとLIFU+MB共に良好な実験動物成績を示し、臨床実現の可能性が高いと考えられている。

しかしながら、脳組織に対する超音波の安全性という観点から考えると、急性脳梗塞を発症した脳血管では元々血管の脆弱化というリスクを背負っている。この血管脆弱性は、高血圧、糖尿病、高脂血症、加齢等の幾つかの成人病的要因によって発生しており、超音波によるBBB開放制御を検討するのであれば、当初からこれらのリスクを踏まえた安全性に関する基礎実験

が必須である。

本研究では、そのようなハイリスク因子を持つ急性脳梗塞患者への超音波薬物投与を考えねばならないので、その第一段階として、改めて我々が従来から検討してきた超音波条件、すなわち中周波数500kHz・連続波での条件に対するBBBの薬物透過性をin vivoラット動物実験によって検証することとした。ハイリスク動物での脳組織の安全性に関する検討は既に十分行われているため、ラットは正常ラットを用いた。また、ハイリスク動物での安全性に関する考察を容易にする為、ここでは単に薬物透過の視点に絞った検討を行った。

本年度では、その意味で、正常ラットにおける中周波数超音波照射単独条件、血栓溶解剤rt-PA併用条件、およびFRS併用条件に対する効果を検討するために、rt-PAとエダラボンをそれぞれ超音波に併用する条件での結果を比較、検討することとした。

B. 研究方法

次のような実験を計画し、実施した。

B-1. 超音波照射実験系の方法

正常ラットにおけるBBBの透過性変化を観察するにあたり、その超音波照射用振動子として写真1の物を試作制作した(特注; 本多電子株式会社、豊橋市)。同振動子は、円形圧電素子 (piezoceramic: PZT 素子) 口径60mmの先端に白色ABS樹脂を装填しラット頭部には口径5mmの発音体となるように製作された。同振動子は過熱の恐れがあるので、空冷による冷却を行うこととした。冷却能力は流量5.0L/minのエアポンプを用い印加電圧60Vppでもその振動子表面(口径60mmの外観部)での表面温度(放射温度計(IT-550S; 株式会社堀場製作所、京都市)により測定)が45℃以下になるように装備された。

駆動装置全体としては、図B-1aに示すように発振器から電力増幅器を通してパワー増幅し整合器(マッチングボックス)を通してから写真1の振動子に接続するかたちで使用することにした。

この製作した振動子の形成する音場分布(三次元的空間音響強度分布、ビーム音場とも言う)をシュリーレン装置によって確認した。シュリーレン装置は、水中に発射された超音波ビームにより生ずる水の圧力歪みをストロボ光源と同期させたCCDカメラにより撮像するものである。試作振動子によるビーム音場の例を写真2に示した。この試作振動子の先端部口径5mm

長さ10mmによる音場はその水深状態によって変化する。同図Aは水深1.0mm、Bは水深2.0mm、Cは水深3.0mmの例である。このシュリーレン実験により、サイドローブが最も少なく、ビーム中心軸上のメインローブが最も強くなるのは写真Bの水深2.0mmの時であることが明らかとなった。この結果から、実験はラット頭頂部に塗布したアコーゼリーの中に先端を2mm沈める形で行ったとき最も強い超音波が頭蓋内に発射されることが理解される。次に述べる動物実験はこの条件下で行う事とした。

水深2mm状態での超音波発射強度と印加電圧の関係を図B-1bに示した。印加電圧10Vppでは、 0.39W/cm^2 であり、60Vppでは、 7.4W/cm^2 となった。この2点間の曲線は概ね電圧と二次曲線を形成する様相を呈した。すなわち、印加電圧と音圧は従来から概ね直線的であるが、音圧の二乗が強度となるので、ほぼ実験的特性はその理論的予測と同様のパターンを呈するものとなっていた。なお、この音響強度は、音響パワーメーター (UPM-DT-1, Ohmic Instruments Co., Maryland) を用いて行った。図B-1cから明らかなように、この振動子を用いれば、頭蓋内の音響強度は 0.39W/cm^2 から 7.4W/cm^2 の値の範囲で形成しうる可能性があることが明らかとなった。勿論、後述するように (B-3.) 頭蓋骨の厚さ等によって実際には超音波が減衰することは明らかである。なお、駆動系として用いた超音波発振器、パワーアンプ、マッチングボックスは、表1に示す通りである。

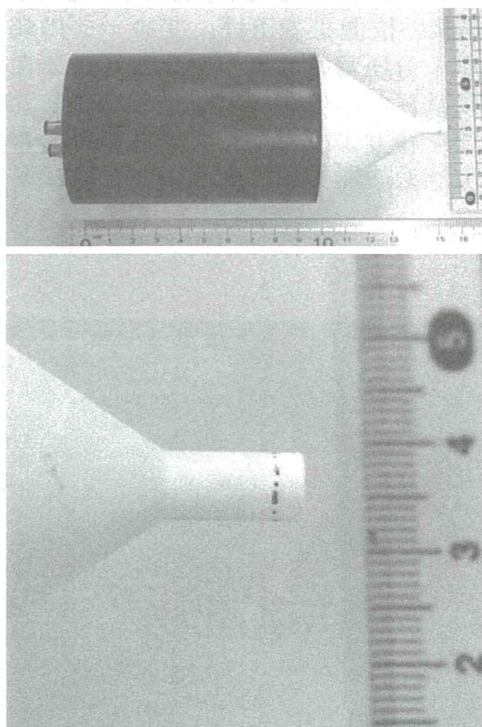
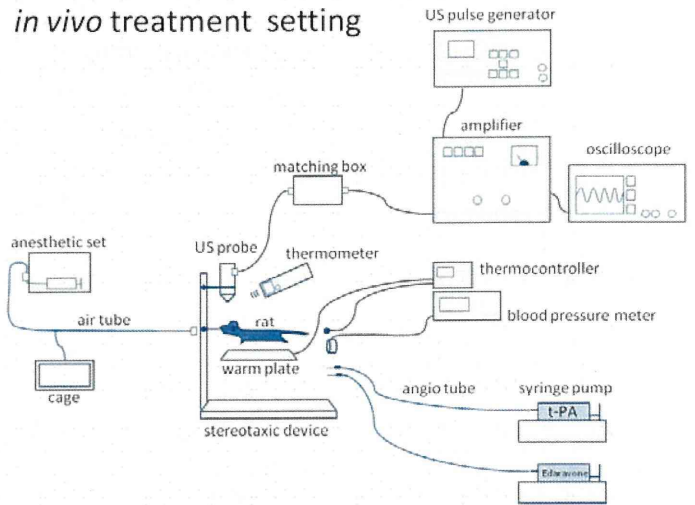


写真1. 口径φ60mm・先端径φ5mmの超音波プローブ



図B-1a. 駆動装置全体シエマ

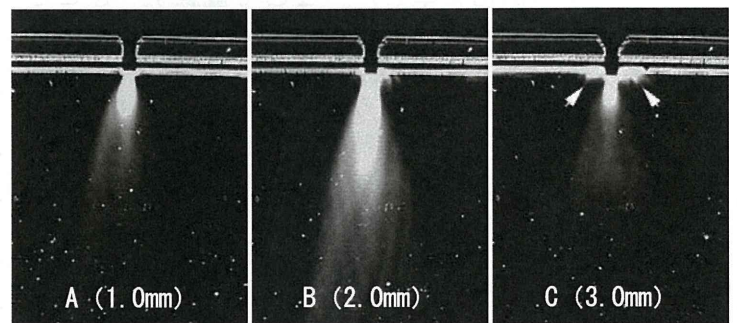
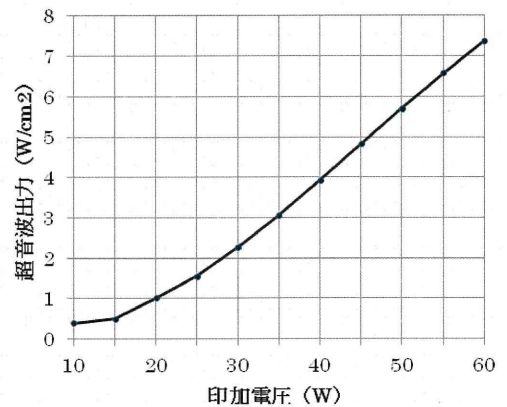


写真2. シュリーレン装置により撮像された超音波ビーム音場



図B-1b. 超音波出力と印加電圧の関係

表1. 使用機器一覧

機器名称	型式	製作会社	所在地
超音波発振器	(特注)	(株)エヌエフ回路設計ブロック	横浜市
パワーアンプ	HSA4101	(株)エヌエフ回路設計ブロック	横浜市
マッチングボックス	(特注)	(株)エヌエフ回路設計ブロック	横浜市
オシロスコープ	TDS3012B	(株)TFF	東京都
φ60mm 超音波プローブ	(特注)	本多電子(株)	豊橋市
ラット固定器具	IMPACT-1000B	室町機械(株)	東京都
パワーメーター	UPM-DT-1	Ohmic Instruments Co.	Maryland
放射温度計	IT-550S	(株)堀場製作所	京都市
エアポンプ	MV-6005P	(株)アルファパーチェス	東京都

B-2. ラット経頭蓋超音波照射実験系の方法

正常ラット (Wistar rat: WR) を腹臥位に固定し、イソフルラン麻酔1~2%の下で実験を行った。超音波プローブを当てる右頭頂部を剃毛し、超音波の透過性に支障のないようにアコーゼリーを塗布した。この状態で右頭頂部からの超音波照射を行う全体的なシエマは図B-1aに示した通りである。なお、動物の加温は、加温マットを用いて37.5°Cに固定するとともに直腸温度計にて測定監視し体温の低下を招かないようにした。次いで、頭蓋骨に対する超音波の投入状態を実際のラット頭蓋骨を用いてシュリーレン法を用いて観察した結果を写真3に示した。超音波ビームは頭蓋骨に投入された後やや拡大するが、脳底部においては口径が約10mm程度に拡大する様相を呈した。ここで留意すべきことは、図から明らかなように、脳底部からの超音波反射によって定在波 (写真3矢印部) が発生することである。投入部の音響強度は図B-2aの如く進行する距離とともに著しく減衰する。このビームは、対側の脳底部の骨からの反射による定在波で音圧の上昇を認めた。すなわち、脳組織に対する損傷の可能性は入口部のみならず反対側の脳底部における領域でもその可能性も少なくないことが示唆された。実験はこの点も踏まえ、脳底部組織の損傷についても注意深く観察することとした。

超音波によるBBBの薬物透過性の指標として、本実験ではEvans blue (EB) を微静脈から注入して、脳内への浸潤の程度を以って評価することとした。EB溶液は濃度5%で調製し、約0.1g/kgの濃度で一過性投与を行った。周知の如く、通常BBBはEBを透過させないので、脳内にEBが浸潤あるいは浸出したならば、脳組織が青色に染まることで確認する事ができる。また、その漏出の程度を、青色に染色された時の濃度より評価可能である。実験では、後述するように、2mm間隔で脳のスライス標本を作成し (図B-2b)、これを撮影記録して評価した。撮影はデジタルカメラ (G11; キヤノン, 東京都) で行い、校正用に18%グレー標準反射板 (銀一株式会社, 東京都) を使用した。染色の濃度判定には、撮影写真をコンピューター内に取り込み、その3原色分析を行い、赤色の光量を以って評価することとした。すなわち、濃い染色であれば、赤色の光量は少なく、薄い染色であれば赤色の光量は多いという逆の関係を活用して定量評価した。尚、この評価事例を図B-2cに示す。染色の程度には背景となる正常組織における光量に影響されるので、我々は左側脳部の同一部位の赤色量Aで正規化し、対象領域である左側脳部の光量Bを比較した (図B-2d)。すなわち、

B/Aを用いて、各WRのEB投下量を評価した。

超音波条件としては、急性脳梗塞治療に有望な中周波数500kHzを用い、その強度を2W/cm²と4W/cm²に固定し、照射時間はインターミットtent照射 (この方式は血栓溶解両方において提唱されている) を適用した。インターミットtent照射法は、2分間500kHz超音波照射し、30秒休止するセットを4回繰り返し、その後5分休止するという組み合わせを4回繰り返す方式である。これは、rt-PA投与時間60分に対応している照射法である。インターミットtent照射時間60分は、実質的に超音波を32分間照射したことに相当する。尚、30秒あるいは5分間の休止時間をいれるのは頭蓋内における温度上昇を回避する目的からである。実験では、このインターミットtent照射法の時間を短縮するなどの方式で照射時間の変化に対するBBBの透過率を評価した。

超音波照射にあたっては、特に超音波プローブのラット頭頂部に対する加圧の状態が頭蓋内への超音波投入量を左右する重要な点であった。我々は、次のような方法でラット頭頂部へのプローブの加圧の程度を一定となるように工夫した。まず、ラット固定器具とクランプ (写真4) を用いて、プローブを照射部位に対して鉛直になるように固定した。この時、プローブの照射面と表皮との距離が0.0mmになるように調節し、器具の目盛を読んでから一度プローブを引き上げた。次に、照射部位にアコーゼリーを適量塗布し、再びプローブを照射部位に接着させた。この時、プローブを先程読んだ目盛からさらに1.0mm深い位置まで下げ、プローブの超音波照射面を十分圧着させた (図B-2e)。また、圧着の際には、ゼリーがプローブ先端から2mmの位置までを覆うようゼリーの量を調節した。使用した実験系の器具類は表1にまとめて示した。

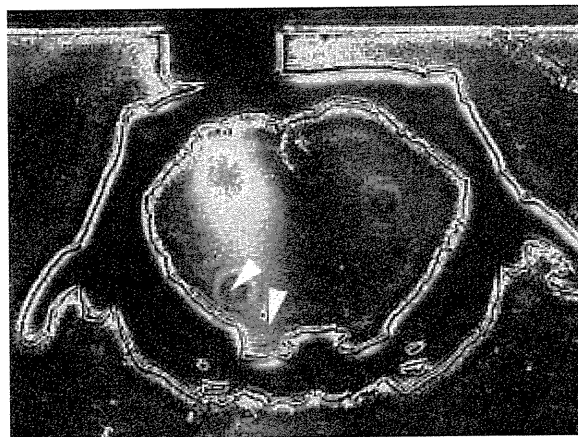
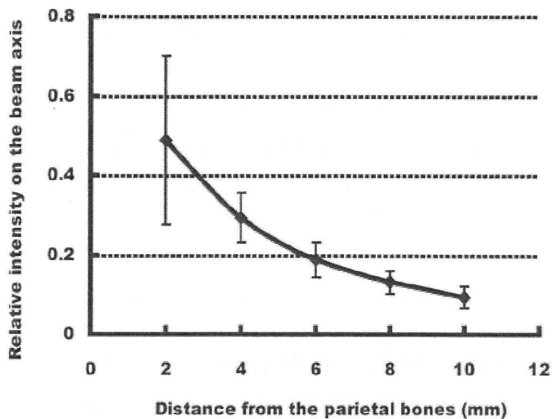
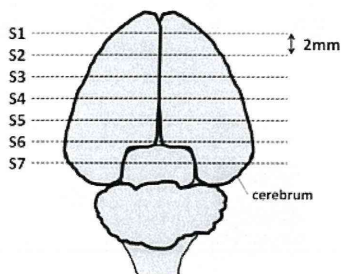


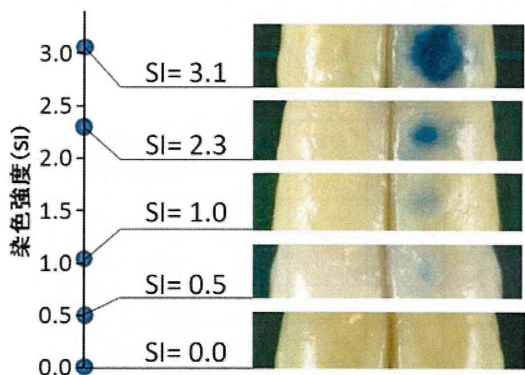
写真3. ラット頭蓋骨内における超音波ビーム音場



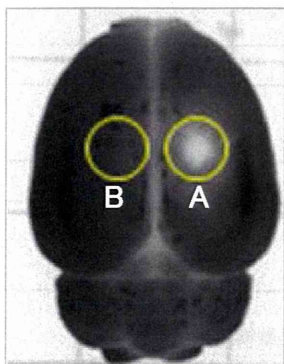
図B-2a. ラット頭蓋骨内からの距離と超音波強度の関係



図B-2b. 脳の切断部位



図B-2c. SI値と実際の脳表面



図B-2d. 輝度測定部位とSI値の算出方法

- ①撮影したフルカラー写真から三原色 (RGB) の内赤色 (R) のみを256階調のグレースケールで抽出し、色を反転する※ (左写真)。
- ②右脳の超音波照射部位、左脳の対称の部位をφ4mmの範囲で輝度測定する。(それぞれの値をA、Bとおく。)
- ③B/AからSI値を算出する。

※EBの色が濃いほど輝度値が高くなるようにするため

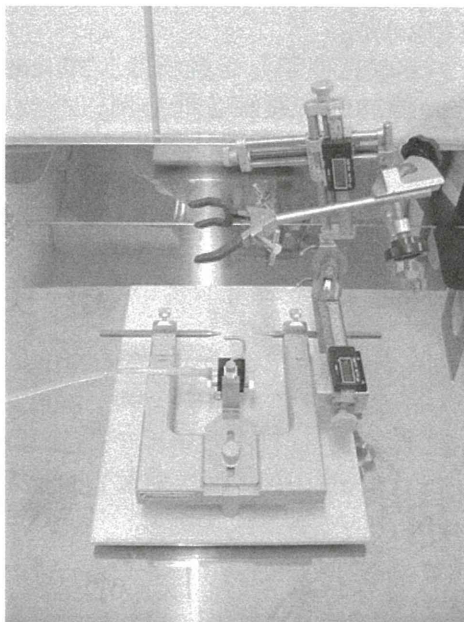
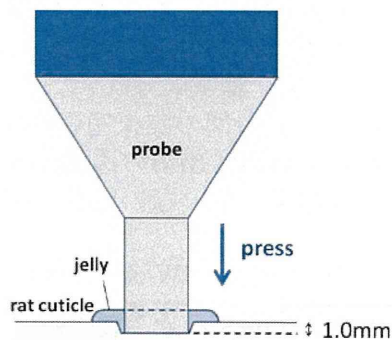


写真4. ラット・超音波プローブ固定器具



図B-2e. 超音波プローブの加圧状況

B-3. BBB透過性に関する実験比較群

超音波によるBBBの透過性を次の方法で比較検討した。比較群としては、まず超音波単独照射による透過性変化を評価する群について実験を行った。その結果を基に、血栓溶解剤rt-PA投与時の超音波によるBBB透過性の変化、さらには神経保護薬エダラボンを追加投与した場合の透過率変化の有無について検討する実験を行った。各実験とも、正常WRラットを用い、超音波照射5分前にEBを投与し、照射終了後に開頭しEBの染色強度値 (steining intensity: SI) を記録・評価した。

i) 超音波単独照射によるBBB透過性

超音波条件は中周波数500kHzとし、その強度を $2\text{W}/\text{cm}^2$ および $4\text{W}/\text{cm}^2$ の2段階とした。照射波形としては、連続波 (CW) とバースト波 (BW) 同duty cycle25%前後と50%前後を設定した。すなわち、duty cycle25%の場合には、そのパルス波の強度は、 $2\text{W}/\text{cm}^2$ の場合 $8\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $4\text{W}/\text{cm}^2$ の場合 $16\text{W}/\text{cm}^2$ となるような状態を設け

た(図B-3)。

この実験に使用した動物は、2W/cm²群7例、4W/cm²群28例、連続波群35例、パースト波群10例であり、その状況は表2にまとめた。表から明らかなごとく、体重の標準偏差は平均体重の15%未満であり、本実験について各群間の体重による影響はそれほど大きなものにならない状態であることを確認している。

ii) rt-PA併用によるBBB透過性評価

ラット尾静脈より、rt-PAを0.1mg/kg一過性投与した後、10mg/kg/hの条件で投与した。rt-PA投与後5分後に超音波暴露を行い、終了後EBのSIを評価した。尚、EBは、rt-PA投与約2分前に注入しておく事とした。

rt-PA投与対象としたのは、実験iの結果を踏まえ、超音波強度4W/cm²の条件についてのみ行い、2W/cm²の条件については試行しなかった。その理由は、実験iの結果、SI値の変化を呈した条件が2W/cm²では認められなかったからである。結果において述べるように、2W/cm²では32分間の臨床適用時間の間に何らSI値の変化を認めずBBBの透過性向上にこの超音波条件が関与していないことが明らかになったからである。

この実験では、4W/cm²の条件のみとし、全て連続波を用いた。その超音波照射時間については、2分、3分、8分に限定して実験を行った。照射時間を短く設定した理由は、実験iにおいて4分照射と32分照射の間にSI値の変化が殆ど認められていなかったため、rt-PAの作用を治療早期の8分までの間に注目して実験を計画した。

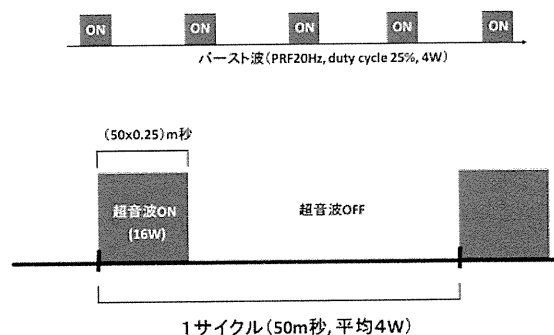
この実験に使用した動物は、rt-PA投与群30例、rt-PA非投与群25例であり、両群とも体重の標準偏差は平均体重の15%未満である(表2)。

iii) rt-PA・エダラボン併用によるBBB透過性評価

ラット尾静脈より、rt-PAとエダラボンを併用投与した。rt-PAは、上述の実験2と同一条件で投与した。エダラボンについては臨床での施行法に合わせ尾静脈からの点滴静注とし、超音波照射15分前より0.6ml/hの速度で30分投与し、投与量3mg/kgとした。この容量値は、臨床適用量よりも高値であるが、多くのラットを用いた動物実験ではこの容量値を用いているのでそれを活用することとした。なお、EBの投与は、実験iiと同様に、rt-PA投与時刻を基本に、その2分前に投与した。すなわち、エダラボン投与後13分でEBを投与することとした。

BBBの透過性については、上述のSI値を以て評価することとした。EBを投与する実験に用いた照射時間は3分18例、8分7例、12分3例の3群で行った。照射時間の短く設定してある理由は、rt-PAによるBBBの変化などの発生予測がrt-PA投与初期に発生していた事実を踏まえたからである。上記と同様、rt-PAの投与とともに超音波暴露を行い、終了後SI値を評価した。

この実験に使用した動物は、rt-PA投与群30例、エダラボン併用群29例であり、両群とも体重の標準偏差は平均体重の15%未満である(表2)。



図B-3. パースト波の説明

2-i) 超音波単独照射によるBBB透過性

比較群	例数	週齢	平均体重とその標準偏差(g)
2W/cm ²	7	8~10	337.5±28.8
4W/cm ²	28	8~11	292.8±43.3
2W/cm ² ・rt-PA投与	10	8~11	337.5±23.4
連続波(CW)	35	8~11	301.7±44.4
パースト波(BW)	10	9~10	329.4±16.3

2-ii) rt-PA併用によるBBB透過性評価

比較群	例数	週齢	平均体重とその標準偏差(g)
rt-PA投与	30	9~12	331.0±26.7
rt-PA非投与	25	8~11	304.3±41.5

2-iii) rt-PA・エダラボン併用によるBBB透過性評価

比較群	例数	週齢	平均体重とその標準偏差(g)
rt-PA投与	30	9~12	331.0±26.7
エダラボン + rt-PA投与	29	9~10	321.4±15.2

表2. 使用した動物の状況

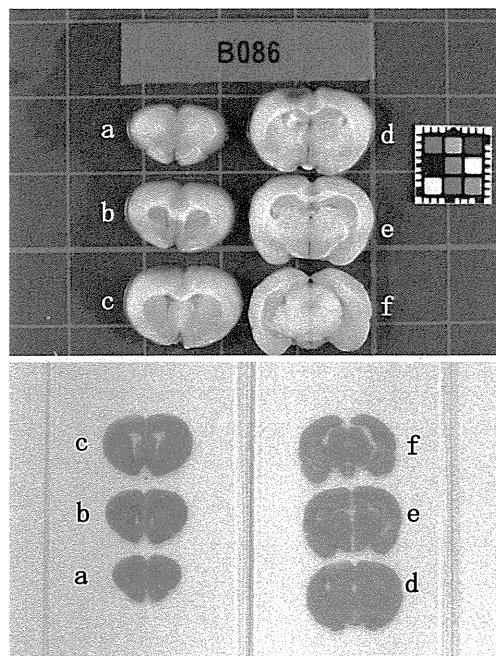


写真5. スライスした脳組織とプレパラートの例

病理学的所見	grade	病理 評価点
所見無し	G0	0
大脳皮質浅層染色性低下、細胞周囲腔拡大	G1	1
大脳皮質全層染色性低下、細胞周囲腔拡大	G2	2
大脳皮質全層染色性低下、細胞周囲腔拡大、神経細胞虚血性変化	G3	3
大脳皮質全層染色性低下、細胞周囲腔拡大、血管周囲出血	G4	4

表3. 病理学的所見とその評価例

B-4. BBB透過性に関する評価法

i) .EBの染色強度SI値に関する統計学的評価

上述の実験を通して得られるEBの染色強度を以ってBBBの透過率を評価する。評価に際しては、脳非照射側に関する染色強度で正規化した形で照射領域のSI値を算出した。各群間の比較においては、SI値の平均と標準偏差を用い、2群間の平均値の差の検定 (t検定) を用いて行った。その際、実験例数が3例未満のものは群自体を除き、3例以上の群について統計学的t検定を試行する事とした。

ii) .病理学的所見による評価

本実験においては、EBによるSI値を基本にBBBの透過率は評価したが、同時に、その安全性の観点から病理学的評価も行った。摘出した脳は図B-2bに示すように、ラット脳を2mm間隔でスライスし、超音波暴露領域を中心にEBのSI値を評価した。図B-2bによるスライス面についての薄切標本を全て作成し、その中で、病理学的に最も損傷の程度の大きな一枚をその個体の所見とした。この際作成したスライス標本の典型例と、そのスライス面から得られるプレパラートの例を写真5に示した。この例では、スラ

イス標本およびプレパラートのdの部位で得られる所見をこの個体の代表的所見として採用した。その際、病理所見を次の概ね5段階で評価した。<グレードゼロ (G0) : 異常所見無し、グレード1 (G1) : 大脳皮質浅層染色性低下および細胞周囲腔拡大、グレード2 (G2) : 大脳皮質全層染色性低下および細胞周囲腔拡大、グレード3 (G3) : グレード2に加え神経細胞虚血性変化、グレード4 (G4) : グレード2に加え、血管周囲出血> (表3) また、それぞれのグレードに対して0~4点の評価点を付けた。これらの所見は、神経病理学者および初心者による二重検査を行うことで得た。

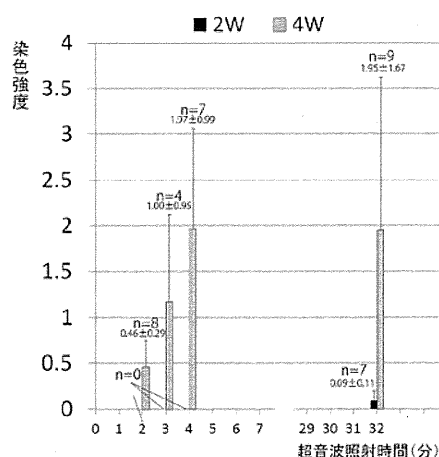
B-5. 倫理面への配慮

本動物実験は、東京慈恵会医科大学実験動物施設内において全て行われた。この実験は、同大学実験動物委員会の承認を得て行われた。また、実験動物委員会の倫理規定を遵守して実験は行われた。

C. 研究成果

正常ラットWRを用いた経頭蓋超音波照射によるBBB透過性向上に関する実験を行い、EBの透過率およびその病理学的所見をもとに有効性と安全性の両面を評価した。ここでは、実験した順序にしたがって、超音波単独照射の結果、これに加え、rt-PAを投与した場合の結果、さらに、エダラボンを併用した場合の結果について順次報告する。

C-1. 超音波照射によるBBB透過率の変化



図C-1. 超音波照射によるBBB透過率の変化

本実験では、まず超音波強度2W/cm²とその倍の4W/cm²についてのSI値について評価した。実験では、その照射時間を様々に変えて行った。図C-1に3例以上の症例のある群についてまと

めた結果を示した。

i) 超音波強度と照射時間

図C-1に示す通り、超音波出力4W（連続波）照射条件において、2分照射群の平均値は0.46（±0.29）でありEBによる染色は殆ど認められなかった。それに対し、3分、4分照射群はそれぞれ平均1.00（±0.95）、1.97（±0.99）であり、照射時間の増加に伴い染色値の増加が認められた。但し、32分照射群は平均1.95（±1.67）で、4分照射群と比較して染色強度の増加は認められなかった。よって、4Wの出力条件では、BBBの開放を完全に（統計学的に優位な状態とするためには）少なくとも4分以上の超音波照射を要する事が明らかとなった。

一方、出力2W32分照射群では、その平均値は0.09（±0.11）でありBBBの開放に優位な増加は認められなかった。経頭蓋的超音波照射によるBBB透過率に関する超音波強度閾値は2W～4Wの間に存在するものと考えられる。又、照射時間については、4W4分以上で透過率の変化を認められなかったことを踏まえれば、4分以下に照射時間閾値が存在すると予測される。この強度と照射時間の関係の間には、より強い超音波であればより短い照射時間で、また、より弱い超音波強度であればより長い照射時間でBBBの透過率の変化を示すような一種の二律背反的な関係が存在する可能性も示唆された。しかし、短時間照射の場合の詳細な検討、また、2W～4Wの間での詳細な強度変化の実験成績を今回は得ていないので、その二律背反的な関係を詳細に見定めることは困難である。

また、4W/cm²の場合に4分と32分におけるSI値がほぼ平均値としては等しいものの、両群ともばらつきが大きく断定的ではないが、超音波照射初期段階でBBBの透過性が決定するように考えられる。それゆえ、急性脳梗塞時に使用されるrt-PAの適用あるいは神経保護薬エダラボンの投与の影響等もこの超音波照射初期段階、おおむね10分未満で検討すれば良いことが示唆された。

ii) バースト波によるBBB透過性

バースト波の影響については例数が少ないために統計学的な意味でのSI値評価は行わなかったが、次のような結果が得られている（表4）。

この表にまとめた結果から、duty cycleを小さくした時、出力2W/cm²でも、病理組織学的な所見としてG2などの状態が発生し得ることが明らかである。安全性と言う意味では、バースト波を用いることは、よほど選択的に標的部位を決めない限り危険性のあることが少なからず示唆された。勿論、パルス強度を十分低く抑え

れば、安全性の問題は回避されるがBBB透過性という効果は低下することになる。このduty cycleと有効性・安全性の間には、適切なtrade-offが求められる。現状では、これを推定する実験成績は無いので、厳密な予測をすることはできない。

週齢	体重 (g)	出力 (W/cm ²)	照射時間 (分)	duty cycle (%)	SI 値	病理評価値	備考
10	348.5	2	32	22	0.0	G0	-
10	336.0	2	32	26	3.3	G3	-
10	342.5	2	32	26	0.1	G0	-
10	333.5	2	32	26	1.6	G3	rt-PA 投与
9	307	4	2	16	0.2	G1	-
9	330.5	4	2	20	0.3	G0	-
9	311.0	4	2	20	0.2	G1	-
9	320.0	4	2	50	0.2	G0	-
9	312.0	4	2	50	0.2	G1	-
10	353.0	4	32	22	1.3	G1	-

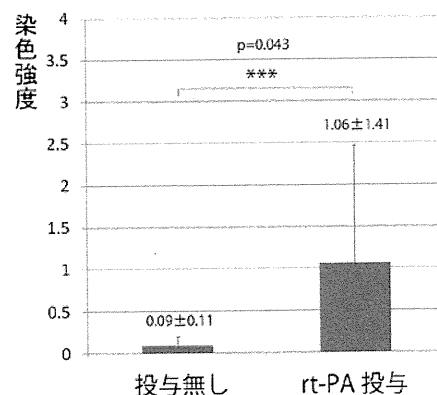
表4. バースト波照射を行った個体とSI値

C-2. rt-PA投与によるBBB透過性

急性脳梗塞患者における超急性期にrt-PA静注療法を施行することが一般的である。rt-PAには、血栓溶解効果とともに、血管内皮に対するMMPの基底膜破壊作用を促進する効果があることが知られている。すなわち、rt-PAにより、BBB破壊が促進され、出血率が向上する可能性がある事が広く知られている。ここでは、このようなrt-PA投与下において、超音波を照射した場合にそのBBB透過性が変化するかを検討した。但し、急性脳梗塞状態ではなく、正常ラット脳について検討した。

急性脳梗塞状態について行ったその理由は、病的状態に陥っているBBBの薬物透過性の検討以前に正常BBBにおけるrt-PAの毒性と超音波併用時の毒性との相乗効果を危惧するためである。このような観点から行った実験の検討結果を図C-2a.および図C-2b.に示した。

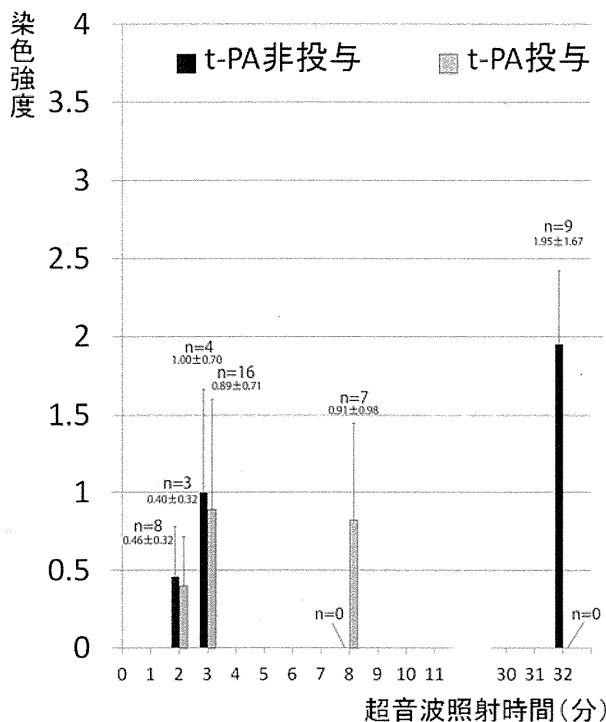
C-2a. 2W照射の場合



図C-2a. 2W32分照射時におけるrt-PA投与群と非投与群の比較

図C-2aに示した通り、2W32分照射の条件において、rt-PAを投与した群のSI値は平均1.06(±1.41)となり、非投与群と比較してBBB透過性に優位な差が認められた(p=0.043)。このことは、超音波照射によるBBB透過性増高効果が、rt-PA投与を併用することでさらに増したことを示すものである。

C-2b. 4W/cm²の場合

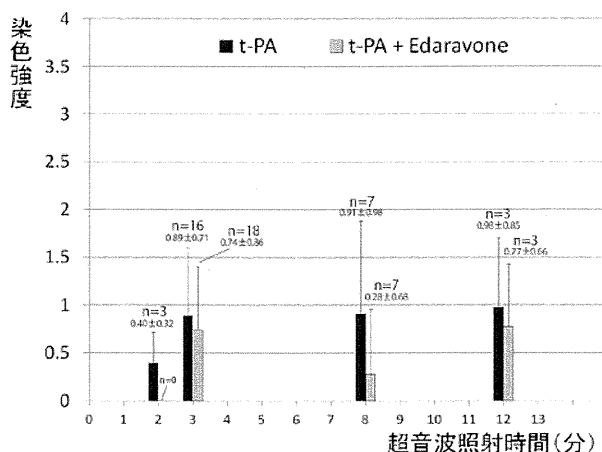


図C-2b. 4W照射条件でのrt-PA投与群と非投与群の比較

図C-2bに示す通り、4W照射の条件において、rt-PA非投与群では超音波照射時間2分(n=8)、3分(n=4)、32分(n=9)の条件における染色強度値は、それぞれ0.46±0.32、1.00±0.70、1.95±1.67となった。一方、rt-PA投与群では、照射時間2分(n=3)、3分(n=16)、8分(n=7)において、それぞれ0.40±0.32、0.89±0.71、0.91±0.98となった。2分および3分照射時の両群の平均値の差については、それぞれ検定値p=0.393、p=0.404となり、2分においても3分においてもrt-PAによる優位な染色度の増高は認められなかった。

この結果から、超音波出力の条件によっては、rt-PAは必ずしもBBB透過性増高効果を持たないことが示された。

C-3. エダラボン併用時でのBBB透過性の結果



図C-3. エダラボン投与群と非投与群の比較

急性脳梗塞発症患者の治療においては、来院当初から神経保護薬エダラボンの投与が一般に行われている。このことが目的でも述べたように、我が国でもrt-PA投与量を欧米の2/3の0.6mg/kgに低減している理由の一つでは無いとも言われている。このエダラボン投与の効果が血管内皮のレベルにも影響を与えている可能性が考えられるので、上述のrt-PA投与実験に加え、さらにエダラボン投与の効果をラット正常脳について試行している。ただし、エダラボン投与はrt-PA投与に先立って行われており、その時間差は15分とした。これは、臨床などではrt-PA投与以前にエダラボンを投与する確立が極めて高いためである。

図C-3に実験結果をまとめた。この図に示す通り、rt-PA投与・エダラボン非投与群において、超音波照射時間3分、8分、12分の条件における平均SI値は、それぞれ0.89±0.71(n=16)、0.91±0.98(n=7)、0.98±0.85(n=3)、エダラボン併用群では、それぞれ0.74±0.36(n=18)、0.28±0.68(n=7)、0.77±0.66(n=3)となり、エダラボン併用群は、比較的低い値となった。照射時間ごとに平均値を比較すると、併用群は3分では大きな差が無かったが(p=0.290)、8分では有意差こそ無いものの単独投与群の1/3以下の値を示し(p=0.069)、12分では再び3分と同水準に戻した(p=0.376)。ただし、12分照射の例数は両群とも3例ずつと少なく、今後の追加試行により平均値が大きく変わる可能性がある。

この結果から、rt-PAとエダラボンを併用投与すると、rt-PA単独投与時よりもBBBの透過性が低く抑えられる可能性が示された。

No.	出力(W/cm ²)	照射時間(分)	duty cycle(%)	投与薬物	平均SI値	例数	G0 例数	G1	G2	G3	G4	合計点	平均点
1	4	4	100	-	1.97	7	0	6	0	0	1	10	1.4
2	4	3	100	rt-PA	0.89	16	3	7	6	0	0	19	1.2
3	4	32	100	-	1.95	9	2	5	1	1	0	10	1.1
4	4	8	100	rt-PA	0.91	7	3	2	2	0	0	6	0.9
5	4	3	100	-	1	4	1	3	0	0	0	3	0.8
6	2	32	100	rt-PA	1.06	10	7	0	2	1	0	7	0.7
7	4	3	100	rt-PA+edaravone	0.74	18	11	5	2	0	0	9	0.5
8	4	2	100	-	0.46	8	5	2	1	0	0	4	0.5
9	4	8	100	rt-PA+edaravone	0.28	7	5	1	1	0	0	3	0.4
10	2	32	100	-	0.09	7	7	0	0	0	0	0	0.0

表5. 超音波条件と病理所見の関係

C-4.病理所見による安全性評価結果

病理所見で得られた結果をもとに、表3に記したように病理評価点を付け、超音波照射条件・薬物投与条件ごとに整理した。その中から、4例以上の試行数をもつ群をまとめ、表5とした。

表5から、超音波照射による脳組織損傷が認められなかったのは連続波2W32分照射・薬物投与無しの群のみであり、同群では7例全てG0であった。一方、同4W群では9例中7例でG1～G3の所見が認められた。両群の病理評価点を比較すると、2Wと4W群の平均点はそれぞれ0.0、1.1となり、その差に優位な差が認められた(p=0.007)。すなわち、連続波2W32分照射・薬物非投与の条件では、超音波治療における脳神経保護の点において十分な安全性を持つ可能性が示された。

また、この2W32分・薬物非投与群と、同超音波条件・rt-PA投与群とを比較すると、rt-PA投与群は10例中3例で病理所見が認められ、その平均点は0.7と非投与群(0.0)より大きな値をとった。ただし、この両群間では優位差を認めるまでに至らなかった(p=0.063)。加えて、この結果は4W3分rt-PA投与群および同非投与群に関しても同様で、rt-PA投与群、非投与群それぞれの平均値は1.2、0.8と、rt-PA投与群がより大きな値を示したが、その差に有意差は無かった(p=0.262)。すなわち、超音波治療の際にrt-PAを併用することは、超音波による脳組織損傷リスクを明らかに増大させるとは言えないまでも、その傾向があることが示された。

rt-PA投与群とrt-PA・エダラボン併用群の病理評価値を比較すると、表5では全てのrt-PA単独投与群でエダラボン併用投与群より高い平均値をとった。その中でも、4W3分条件においては、rt-PA単独投与群とエダラボン併用投与群の平均値はそれぞれ1.2、0.5となり、両群間に優位な差が認められた(p=0.031)。ただし、薬物非投与群(平均0.8)とエダラボン投与群の

平均値を比較した時は、その差に優位な差は認められなかった(p=0.152)。すなわち、エダラボンは、rt-PAによって増高し得る組織損傷リスクを低減する効果をもつ可能性が示された。

D. 考察

上述の研究成果では、次の点を明らかにした。

- 1) 超音波単独照射によってBBBは解放する。BBBの開放を確実にする超音波条件は周波数500kHz、連続波、4分以上である。4分未満の照射当初は継時的に透過率の上昇傾向を示すことが示唆された。
- 2) rt-PA投与はBBBの透過性を高める可能性が高い。500kHz、連続波、2W/cm²の条件では、ほとんど透過性は見られないが、rt-PA投与によってBBBの透過率が上昇した。
- 3) 神経保護薬エダラボンの投与はrt-PAによるBBB透過性の抑制効果を示す。周波数500kHz、連続波、4W/cm²の条件下では、照射後数分間の間で抑制傾向をある程度示した。これはBBBの透過性の継時的上昇傾向が照射後数分間の段階で上昇する傾向があり、この上昇機関の間に抑制効果が働くものと推定された。
- 4) 病理組織学的評価では、上記1)2)3)のいずれの条件下でも脳組織細胞腔拡大のG1及びG2の傾向を呈する例が認められた。その発生割合は条件によって多少異なるが、rt-PA投与条件下では発生割合が増す傾向を示した。

ここでは次の4点について考察を加え、経頭蓋超音波照射によるBBB透過性の向上に関し、実用化の観点からその可能性を述べる。

D-1. 経頭蓋超音波照射BBB透過性向上技術

BBB透過性向上を狙う経頭蓋超音波法(HIFU)は強力超音波集束からスタートした。HIFUはもともと主要組織の壊死・破壊を目的としてきたが、脳については薬物透過性も障壁

となる。BBBの解放にその力学的作用あるいは温熱的作用を活用しようと、その技術方向が広められている。HIFUの持つ集束領域をMRIでnavigationする方法が先端的であり、ボストンMITのグループがその実用化を推進中である。しかし、BBB解放の目的には、HIFUの焦点音響強度は強過ぎ、その制御を低出力で行うためにmicrobubble (MB) を併用する事が提案されている。MBを超音波で崩壊することで局所の高温化を招来し、血管内皮細胞に対する損傷を部分的に発生させることで、薬物透過の可能性を低音響強度で実現している。我々も昨年度の報告において、国内で市販されているMB(ソナゾイド)を用いれば、500kHzでは0.3W/cm²程度でBBBの透過性向上を招来しうることをEBおよびMRI造影剤を用いてラット脳で証明した。0.3W/cm²はMBを用いない場合の安全限界で、Hsp70の蛋白を作動させない限界値であるが、MBを用いた場合にはBBBの透過性をも招来しうることを示したものである。

ここでは、MBを用いない場合の超音波強度閾値を経頭蓋的に明らかにした。音響強度4W/cm²では、500kHz、連続波、4分以上の条件でBBB透過性の上昇を生じさせ、従来の高周波を用いるHIFUより相当に弱い超音波強度で、また短時間で発生させることに成功した。BBB開放を生じさせた最も大きな理由は、使用する超音波周波数を500kHzと低周波数にしたことである。超音波による細胞引き裂き張力が一定であっても、その機械的破壊力は周波数 f に関し $f^{-1/2}$ に比例するため、周波数を1/10にすると破壊力は約3.16倍となる。すなわち、周波数を低くすれば細胞の破壊力が増すため、周波数を500kHzにしたことで血管内皮細胞を破壊しやすい状況が作り出されたと考えられる。またそれに加え、超音波ビームの空間的不均一状態が近距離音場で発生していることを踏まえれば、局所に平均音響強度の最大4倍の音場が生じていた可能性があり、それが血管内皮損傷を引き起こしたことも考えられる。したがって、ビーム音場形状を制御することで、低出力の超音波でも標的性の高いBBB制御が出来る可能性が高い。

D-2. 薬物併用と経頭蓋超音波照射法の関係

血栓溶解剤rt-PAが血管内皮のMMPに作用し、その脳血管の出血性を増高する可能性のことは周知の事実である。特にAIS患者においてrt-PA投与を行った場合の再開通障害の発生は周知の事実で、その対策の一つとして、神経保護薬エダラボンの投与が臨床的に行われている。

本研究成果では、この両薬剤の作用が超音波照射時に生じることをある程度明らかにした。rt-PAによる作用は、4W/cm²では不明瞭であったが、2W/cm²で32分照射したときでは明らかで、BBB透過性を上昇させる超音波強度閾値を引き下げる効果を示した。一方で、エダラボンについては、BBB透過性上昇期に、その透過性抑制傾向が明らかとなった。したがって、超音波によるBBBの透過性は、その超音波条件だけでなく、両薬剤の投与タイミングあるいは投与量によっても制御可能であることが予想される。本研究ではその時間、投与タイミング、投与量に関する詳細な検討を行い得なかった。今後そのようなアプローチを正常脳ではなく脳梗塞状態について検討することで、より明瞭な差異が実用化の指針として得られるものと考えられる。

D-3. 病理組織学的評価

本研究成果では、G1からG4迄の組織障害レベルを設けて評価した。G4の出血は極めて僅かであり、またG3の虚血性神経障害も多くはなかった。しかし、このような重篤な障害を発生せしめるような超音波条件を判定するには、その例数も少なく実施困難である。

現在のそのような重篤障害を発生せしめる超音波条件について、使用超音波の詳細な三次元的音場分布を明らかにした上で、例数を増やした解析が今後必要となる。なぜなら、頭蓋内における音場分布と病理組織学的な損傷発生部位の空間的關係についての解析が行い得ない状況であるからである。

D-4. 経頭蓋超音波のBBB解放法の実現性

本研究により、中周波数500kHzを用いた経頭蓋超音波によるBBBの解放可能性を明らかにしたが、その臨床的実用化には、さらに詳細な超音波強度、照射時間、波形（連続波か、バースト波か）等について、さらに高精度の実験が必要である。ここでは評価因子としてEBを用いて行ったが、これはMRI造影剤とほぼ同等のサイズであったためである。取り扱いの簡便さからEBを用いたが、継続的な追跡には高速MRIによる継続的な評価が必要となる。我々はそのためのソフトもラット用の高磁場MRIも用意しているので、今後そのような追求が可能である。しかし、その前段として、EBを用いる本研究成果は今後の研究展開を図るための必須の基盤的研究であり、その成果はBBB透過性の可能性を明瞭にし得た。ただし、医学生物学的安全上の評価をより詳細に詰め、その安全限界を明瞭にし

ておかなければその安全領域内での継時的照射条件を連続的に追及することは困難となる。その意味で、病理組織学的評価を追加すれば、安全領域を特定でき、その安全領域内での最適なBBB解放の為の経頭蓋的超音波照射法が確立され得るものと考えられる。

(文献)

- Azuma, T. Hitachi Central Res. Lab., Tokyo, Japan
Ogihara, M. ; Kubota, J. ; Sasaki, A. ; Umemura, S.-i. ; Furuhashi, H.
Dual-frequency ultrasound imaging and therapeutic bilaminar array using frequency selective isolation layer.
IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control. 2010;57(5):211-24.
- Baron C, Aubry JF, Tanter M, Meairs S, Fink M.
Simulation of intracranial acoustic fields in clinical trials of sonothrombolysis.
Ultrasound Med Biol. 2009;35(7):1148-58.
- Choi JJ, Pernot M, Small SA, Konofagou EE.
Noninvasive, transcranial and localized opening of the blood-brain barrier using focused ultrasound in mice.
Ultrasound Med Biol. 2007;33(1):95-104.
- Frank RT, Aboody KS, Najbauer J.
Strategies for enhancing antibody delivery to the brain.
Biochim Biophys Acta. 2011;1816(2):191-8.
- Hynynen K, McDannold N, Martin H, Jolesz FA, Vykhodtseva N.
The threshold for brain damage in rabbits induced by bursts of ultrasound in the presence of an ultrasound contrast agent (Optison).
Ultrasound Med Biol. 2003;29(3):473-81.
- Liu HL, Chen HW, Kuo ZH, Huang WC.
Design and experimental evaluations of a low-frequency hemispherical ultrasound phased-array system for transcranial blood-brain barrier disruption.
IEEE Trans Biomed Eng. 2008;55(10):2407-16.
- Liu HL, Chen PY, Yang HW, Wu JS, Tseng IC, Ma YJ, Huang CY, Tsai HC, Chen SM, Lu YJ, Huang CY, Hua MY, Ma YH, Yen TC, Wei KC.
In vivo MR quantification of superparamagnetic iron oxide nanoparticle leakage during low-frequency-ultrasound-induced blood-brain barrier opening in swine.
J Magn Reson Imaging. 2011;34(6):1313-24.
- McDannold N, King RL, Hynynen K.
MRI monitoring of heating produced by ultrasound absorption in the skull: in vivo study in pigs.
Magn Reson Med. 2004;51(5):1061-5.
- McDannold N, Maier SE.
Magnetic resonance acoustic radiation force imaging.
Med Phys. 2008;35(8):3748-58.
- Meairs S, Culp W.
Microbubbles for thrombolysis of acute ischemic stroke.
Cerebrovasc Dis. 2009;27 Suppl 2:55-65.
- O'Reilly MA, Hynynen K.
Blood-Brain Barrier: Real-time Feedback-controlled Focused Ultrasound Disruption by Using an Acoustic Emissions-based Controller.
Radiology. 2012;263(1):96-106.
- O'Reilly MA, Hynynen K.
A PVDF receiver for ultrasound monitoring of transcranial focused ultrasound therapy.
IEEE Trans Biomed Eng. 2010;57(9):2286-94.
- Shimizu J, Fukuda T, Abe T, Ogihara M, Kubota J, Sasaki A, Azuma T, Sasaki K, Shimizu K, Oishi T, Umemura SI, Furuhashi H.
Ultrasound Safety with Mid-Frequency Transcranial Sonothrombolysis: Preliminary Study on Normal Macaca Monkeys.
Ultrasound Med Biol. 2012 Apr 2. [Epub ahead of print]
- Tung YS, Marquet F, Teichert T, Ferrera V, Konofagou EE.
Feasibility of noninvasive cavitation-guided blood-brain barrier opening using focused ultrasound and microbubbles in nonhuman primates.
Appl Phys Lett. 2011;98(16):163704.
- Weng JC, Wu SK, Yang FY, Lin WL, Tseng WY.
Pulse sequence and timing of contrast-enhanced MRI for assessing blood-brain barrier disruption after transcranial focused ultrasound in the presence of hemorrhage.
J Magn Reson Imaging. 2010;31(6):1323-30.
- Weng JC, Wu SK, Lin WL, Tseng WY.
Detecting blood-brain barrier disruption within minimal hemorrhage following transcranial focused ultrasound: a correlation study with contrast-enhanced MRI.
Magn Reson Med. 2011;65(3):802-11.
- 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;34(12):2028-34.
- 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;15(4):636-43.
- Yang FY, Horng SC.
Ultrasound enhanced delivery of macromolecular agents in brain tumor rat model.
Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2011;2011:5573-6.
- 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;32(3):593-9.
- Yang FY, Lin YS, Kang KH, Chao TK.
Reversible blood-brain barrier disruption by repeated transcranial focused ultrasound allows enhanced extravasation.
J Control Release. 2011;150(1):111-6.
- Yang FY, Wang HE, Lin GL, Lin HH, Wong TT.
Evaluation of the increase in permeability of the blood-brain barrier during tumor progression after pulsed focused ultrasound.
Int J Nanomedicine. 2012;7:723-30.

E. 結論

本年度は、経頭蓋超音波照射によるBBB開放制御について、MBを用いない場合の実験的成績を得た。正常ラット脳におけるBBB透過性は、中周波数500kHzの条件下において、低出力・短時間での開放制御が可能であることを明らかにした。この低出力超音波は、通常のMBを併用する集束超音波よりもBBB透過性を増高させることが出来、生体に対する安全性はさらに高まるものと考えられた。ただし、病理組織学的評価の観点からは、さらに詳細な検討を加えなければ実用化は困難であり、実用上の安全閾値を導出することが不可欠である。

本年度の研究成果は、高速BBB透過性制御の可能性も示しており、短時間でのBBB開放制御における安全限界閾値が明瞭とさえなれば、バースト波等の波形を変えることによって、BBB透過性制御の行え得ることも示唆した。

また、医学生物学的意味でも、病理組織学的な評価もある程度明瞭にする事が出来、グレード分類によって、低出力超音波でも軽傷の脳組織損傷から虚血性あるいは出血等の病態の発生し得る事を示した。音場の空間的分布を踏まえた解析が求められるが、そのような空間的制御を行えば、BBBの開放制御を安全な状態で行える事を示唆し得るものとなった。

さらにまた、脳梗塞患者における血栓溶解剤rt-PAの毒性に由来するBBBの開放性向上、また神経保護薬エダラボンによるBBB破壊保護作用の両薬に経頭蓋超音波法を重ねた場合のBBB透過性上昇が、その超音波照射数分内で起こる事を明らかにした。すなわち、両薬併存時に超音波を用いて薬物投与を行うには（BBBを開放させるには）、極めて短時間で実行し得ることを示す事が出来た。

以上、本年度は中周波数超音波の経頭蓋的照射によるBBB開放制御の可能性を明らかにし、またその臨床現場で活用される薬物投与との関係についても極めて有益な成果を得る事が出来た。これらを基に神経保護薬投与に関する超音波併用法の新たな可能性を、定量的に予測し得る事に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Zuojun Wand, Takahiro Fukuda, Takashi Azuma, Hiroshi Furuhashi. Safety of Low-Frequency Transcranial Ultrasound in Permanent Middle Artery Occlusion in Spontaneously Hypertensive Rats. :Cerebrovascular Diseases 2012; 33: 23-29

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

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

高分子ミセルの複数回静脈内投与におけるABC現象（Accelerated Blood Clearance）について検証した。平成21年度の研究で、高分子ミセル型MRI造影剤では2回目の投与時に血液からのクリアランスが大きく亢進するABC現象は起こらなかったことを報告した。今年度は、様々な化学構造の高分子ミセルを用いることで、ABC現象の機構解明を行ったところ、高分子ミセルはABC現象に係わる程度が非常に低く、急性脳梗塞の診断・治療に長期にわたって繰り返し使用できる可能性を示した。

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、急性脳梗塞部位のMRI新規分子イメージング画像診断システムと脳保護薬および止血薬をデリバリーする治療システムを構築することである。

急性脳梗塞に対する唯一の有効な治療法であるt-PA治療の最も懸念すべき副作用は脳出血である。この副作用は高分子タンパクであるt-PAが血管から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の活性化を通して、細胞外マトリクスを分解することによって引き起こされる機構が主たるものと考えられている。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ことが、t-PA治療の出血の原因となるのである。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、図1に示す高分子ミセル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。この高分子ミ

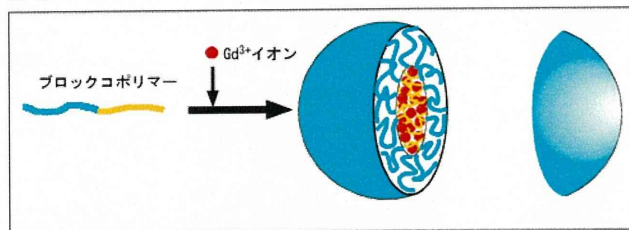


図1 高分子ミセルMRI造影剤システム

セルキャリアーシステムを造影剤として用いれば、t-PAが血管外に漏出して上記の機構により、出血を起こしやすい部位に選択的に分布することで、危険部位の画像診断が可能になると考えられる。また、脳出血やそれに伴う脳神経細胞の障害に対しては、マトリックスメタロプロテアーゼの阻害剤と脳神経保護薬をそれぞれ高分子ミセルキャリアーに封入してターゲティングすることによって、急性脳梗塞の新規治療となす事ができる。

高分子ミセルは多様な化合物を封入することができるので、急性脳梗塞の診断と治療に有用であるが、ミセル外殻にポリエチレングリコール（PEG）を用いている高分子ミセルには一つの懸念がある。ABC現象（Accelerated Blood Clearance）である。図2に示したのは、同じくPEGを外側に有するリポソームの例で、2回目の投与では血中からのクリアランスが大きく増加して、血中濃度が著しく減少している。これは1回目の投与で誘起された免疫現象であり、ABC現象が起こればこのキャリアーシステムによる診断・治療は継続が不可能となる。

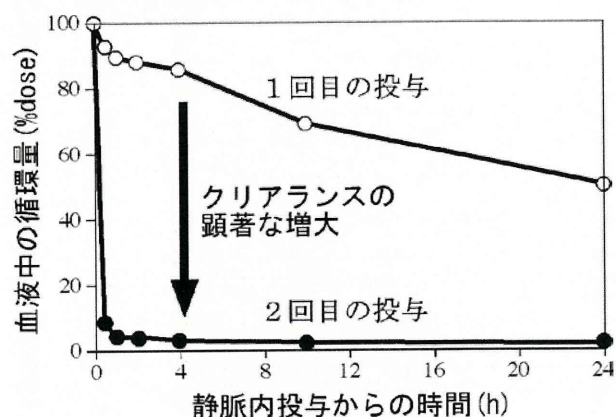


図2 ABC現象の例

（急性脳梗塞で、t-PA投与の適不適を決めるための画像診断は発症から6時間以内に行われる。よって誘起されるのに数日かかるABC現象は、t-PA投与の決定のための診断には無関係である。しかし、その後の経過観察の画像診断、及び脳保護薬での治療は発症数日後も行い得るので、ABC現象の有無は重要となる。）

一昨年度の本研究により、MRIのT1強調用の造影成分であるGd（ガドリニウム）イオンを内核に結合させた高分子ミセルMRI造影剤がABC現象を誘起せず、

またABC現象を起こしたマウスでも認識されないことがわかった。今年度の研究では、薬物キャリアー用の内核が疎水性の高分子ミセルについてABC現象誘起・認識挙動、高分子ミセルMRI造影剤との直接比較、およびABC現象誘起の際の産生抗体の分析を行った。

B. 研究方法

(1) 高分子ミセルの構造

高分子ミセルは2種類用いた。化学構造を図3に示す。

(a) 内核にGdイオンを結合したMRI造影剤用ミセル
親水性の内核を有する

(b) PEG-PBLA これはABC現象を起こすことが判明しているもの。疎水性の内核を有する

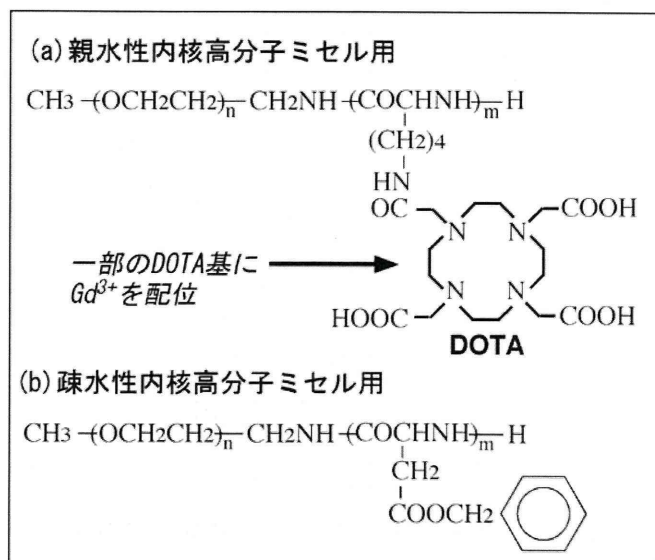


図3 高分子ミセル形成ブロックコポリマーの構造

(2) ABC現象の解析

ABC現象の測定は、ABC現象を引き起こすことがわかっている、PEG-修飾リポソームをポジティブコントロールとして用い、図4に示すように1週間の投与間隔を置いて、2回投与し、2回目投与後6時間後の血中・肝臓・脾臓濃度を測定した。血中濃度が下がり、肝臓・脾臓濃度が上がればABC現象が起きたこ

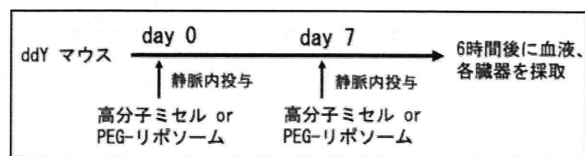


図4 ABC現象測定実験スキーム

とになる。濃度の測定は投与サンプルに含まれるGdイオンをICPで定量することによった。

(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、マウスを用いた動物実験である。この実験は、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) 同時投与によるABC現象観察

以前は、1つのミセルやPEG-リポソームを個別で実験を行ってきたが、今回PEG-リポソームを蛍光試薬とGdイオンのダブルラベルすることで、同時測定を可能とした。つまり、2回目の投与でPEG-リポソームとMRI造影剤高分子ミセルを両者とも投与した系と、それぞれを単独投与したものを比較することで、個々のマウスにおけるABC現象挙動解析をより明確なものとした。

図5にGdで検出したミセルの結果を示す。括弧の左側が1回目の投与、右側が2回目の投与である。2回目にミセルを投与した群は、1回目の投与の有無、2回目の投与がPEG-リポソームとの同時投与に係わらず、全てが同じ血中濃度を示した。これは、MRI造影剤高分子ミセルがどの条件でもABC現象に認識されないことを示す。

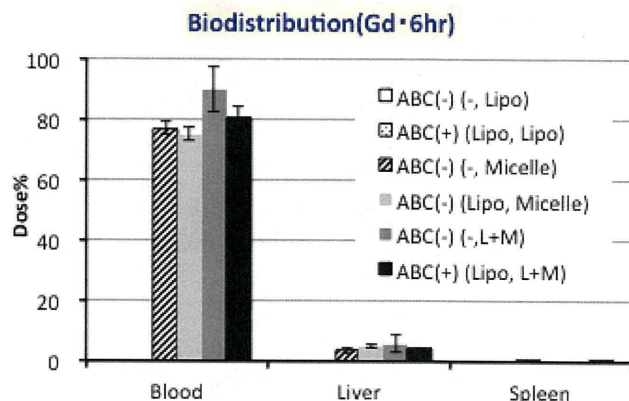


図5 Gdでミセルを検出した結果

次にPEG-リポソームを蛍光物質でラベルした結果を図6に示す。結果はいずれも場合もPEG-リポソームでABC現象が誘起された場合に、2回目投与のPEG-リポソームの血中濃度が低下し、肝臓での分布が増

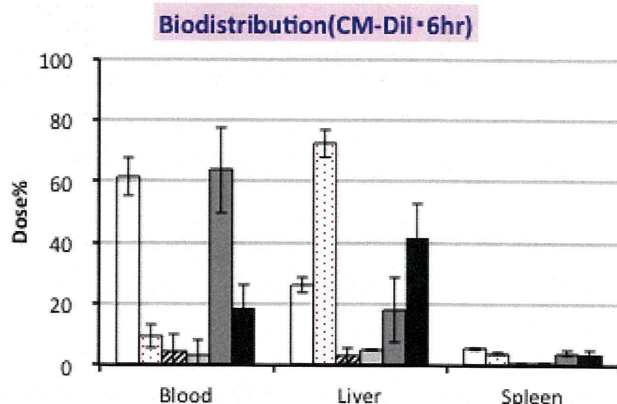


図6 蛍光ラベルで検出したPEG-リポソーム

えていることがわかる。

以上の結果を総合すると、

- 1) 高分子ミセルMRI造影剤はABC現象を誘起せず、また、ABC現象が誘起された場合にも認識されない。
- 2) PEG-リポソームはABC現象を誘起する。また、ABC現象が誘起された場合に生体に認識されて血中濃度が下がる。この認識は、同時に投与された高分子ミセルが認識されていないときも、同様に認識されて血中濃度が減少する。

次にPEG-リポソームと薬物ターゲティング用PEG-PBLAミセルの組合せで同時投与実験を行った。今回はPEG-PBLAを蛍光ラベルした。

Gdで測定したPEG-リポソームの結果を図7に示す。括弧の左側が1回目の投与、右側が2回目の投与である。1回目にPEG-リポソームを投与した群は、血中濃度が下がり、肝臓の分布が増加してABC現象が観察された。1回目にPEG-PBLAミセルを投与した群では、ABC現象が観察されるがその程度はPEG-リポソームに比べて弱い。

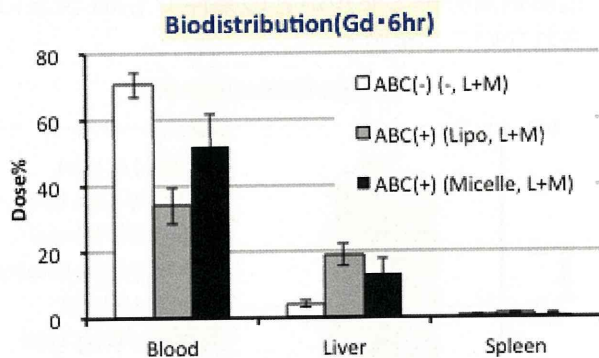


図7 Gdで検出したPEG-リポソーム

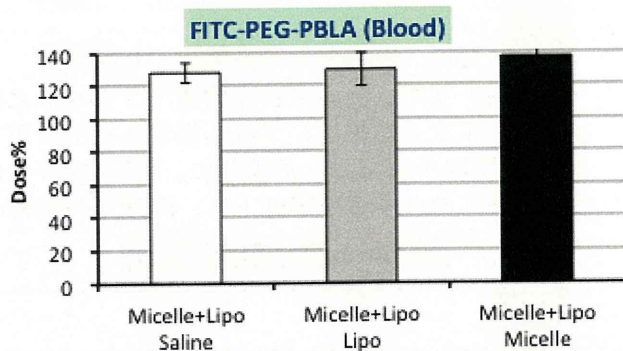


図8 蛍光ラベルしたPEG-PBLAミセルの血中濃度

一方、蛍光ラベルで測定したPEG-PBLAミセルの結果を図8に示す。この測定では、どの場合にもPEG-PBLAミセルの血中濃度は減少していない。

図7と図8の結果を合わせると、PEG-PBLAミセルはABC現象を引き起こすが、2回目の投与では認識されないことが明確に証明できた。

(2) 抗体の測定

PEG-リポソームでABC現象を起こしたマウスABC(+)の血清をサンドイッチELISAアッセイした結果を図9に示す。プレートにRabbit anti-PEG抗体をコートし、それにPEGを加えた後、ABC(+)の血清を加え、anti-mouse IgM-HRPによってマウス抗体を発色させてその吸光度を測定した。ネガティブコントロールとしてはABC現象を起こしていないマウスABC(-)の血清を用い、ポジティブコントロールとしてはRabbit anti-PEG biotinを加えて、streptavidin-HRPで検出した。

図9に示したとおり、PEG-リポソームでABC現象を誘起したマウスの血清からはPEGに結合するIgM抗体は検出されなかった。このサンドイッチアッセイをIgG抗体に対しても行ってみたが、同様にPEG結合IgGは検出されなかった。

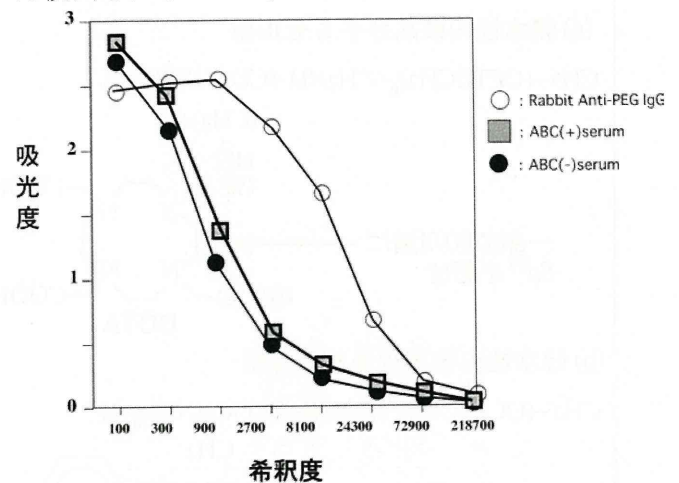


図9 サンドイッチ抗PEG IGM測定

一方、PEG-PBLAでABC現象を起こしたマウス血清を従来のPEGのついた基質をプレートにコートする直接法の結果を図10に示す。

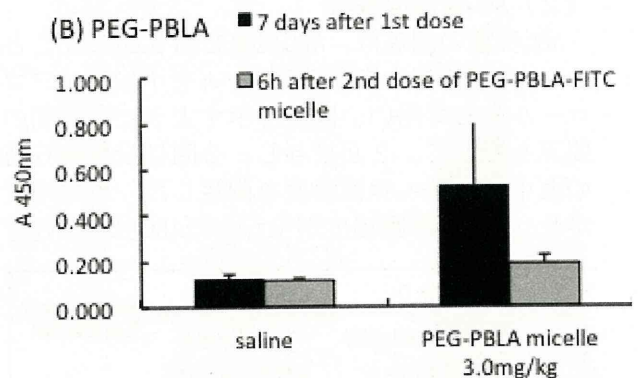


図10 直接ELISA法による抗PEG IgMの検出

この測定では、PEG-PBLAミセル3.0mg/kgを投与したマウス血清から特異IgMが検出された。この特異IgMはPEG-脂質(PEG-リポソームの成分)でプレートをコートした場合も、同様に検出された。つまり、特異抗体IgMはPEGを有する脂質とブロックコポリマーを見分けることなく、両方に結合するのである。

また、2回目のPEG-PBLAを投与して6時間後の血清を測定すると、2回目投与直前の血清に比べて、抗体量の顕著な減少が確認された。また、この測定でも特異IgGの量は、ネガティブコントロール(1回目の投与でsalineを投与したもの)に比べて変化なかった。

図10の結果は図8の結果と一見矛盾しているように見える。すなわち、ABC現象を起こしたマウスに2回目投与すると、PEG-PBLAミセルには生成した特異抗体が結合しているにも係わらず、そのクリアランスは増進されずに血中濃度はABC現象を起こしていないマウスと同等であるからである。

D. 考察

ABC現象は数日以上にわたる診断と治療をPEGを有するキャリアーを用いて行う場合には、重要な案件である。急性脳梗塞診断・治療においても、PEGを有する高分子ミセルキャリアーで診断と治療をする場合に重要な事柄となる。もし、ABC現象が起きるとなると、発症から2-3日以内の診断にのみは高分子ミセルキャリアーが使用し得るが、それ以降の診断と治療は不可能となる。

ABC現象は、PEGで外側を修飾したリポソームについて研究されていて、典型的には投与間隔5-7日で起こり、抗PEG IgM抗体が主要な役割を果たしていると考えられている。この抗PEG IgM抗体がどこを認識しているかを明確に証明した報告はないが、PEGの主鎖部分であるとの暗黙の了解事項となっている。このことからPEGを有する高分子ミセルキャリアーも同様にABC現象を示すと予想されてきて、いくつかの論文ではABC現象が起こると報告されている。

これに対し、我々はPEGを有していても内核が親水性の高分子ミセルではABC現象が起こらない場合があることを報告してきた。本研究は、その免疫的挙動を明確にすることが目的である。また、脳保護薬などをターゲティングするための内核が疎水性の高分子ミセルについてもABC現象を明らかにする。

まず、造影成分であるGdイオンを内核に結合した高分子ミセルMRI造影剤については、ABC現象を誘起することもせず、ABC現象を起こしたマウスでも認識されないことが明らかとなった。よって、この造影剤による急性脳梗塞の診断にはABC現象の懸念は全くないことが判明した。

次に、脳保護薬やメタロプロテアーゼ阻害剤などの封入した治療用の高分子ミセル(これらの薬物を物理的に封入するために疎水性の内核を有する)については、PEG-PBLAブロックコポリマーを用いて検討したところ、極めて興味深いことが判明した。PEG-PBLAはPEG-リポソームよりは程度が弱いながら、ABC現象を誘起する。しかし、ABC現象を起こしたマウスにおいて、2回目の投与でその血中濃度が減少する

ことはない。この結果は、高分子ミセルを脳梗塞の診断と治療の両側面において使うことに問題がないことを示す。

一方で、以上の結果はABC現象の機構解明に対して、重要な事実を提示している。ABC現象を起こしたマウスの血清を用いて従来報告されている直接ELISA法で測定すると、報告通りにPEG脂質やPEG-PBLAに対する特異IgMが検出される。しかし、抗PEG抗体(この場合はPEGの主鎖を認識する抗体)を用いてPEGのみを固定した間接ELISA法を用いると、特異IgMは検出されない。以上の事実から推定されることは、ABC現象で誘導されるIgMはPEGの主鎖を認識するのではなく、PEGと疎水性界面の境界を特異性低く認識すると言える。(PEG-PBLAでABC現象を誘導したマウス血清はPEG脂質をコートした直接ELISAで特異IgMが検出される。また、この逆の場合でも検出されるため。)また、ABC現象を起こしたマウスでPEG-PBLAミセルを2回目に投与しても、血中濃度は下がらないので、一見ABC現象は全く起きていないように見えるが、図10の結果に示す様に、ABC現象を起こしたマウスで2回目のPEG-PBLAミセル投与を行うと特異抗体IgM量が減少することは、この抗体が血液内でPEG-PBLAミセルに結合していることを示す。抗体が結合しながら、血液内のミセル濃度が減少しないのは、結合した状態でも肝臓に認識されて捕捉されることがないことを示す。同じくPEG鎖が外側に結合しているのではあるが、高分子ミセルの場合には疎水-親水界面におけるPEG密度がPEG-修飾リポソームに比べて圧倒的に高い。この構造の違いが、生体の認識の違いに結びついていると考えられる。PEG密度が高い高分子ミセルの場合には、抗体が疎水-親水界面に結合しても厚いPEG層に埋没してしまい、肝臓などの細胞に認識できないためというのが1つの仮説である。

以上の結果を総合すると、高分子ミセルは急性脳梗塞標的診断・治療のキャリアーとしてABC現象の懸念なく使用できることが判明した。また、ABC現象の気候解明に高分子ミセルが有用な知見をもたらし得る事がわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表
1. Harada, Y., Yamamoto, T., Sakai, M., Saiki, T., Kawano, K., Maitani, Y., Yokoyama, M. Effects of organic solvents on drug incorporation into polymeric carriers and morphological analyses of drug-incorporated polymeric micelles. *International Journal of Pharmaceutics*, 404: 271-280 (2011)
2. Shiraishi, K., Endoh, R., Furuhata, H., Nishihara, M., Suzuki, R., Maruyama, K., Oda, Y., Jo, J., Tabata, Y., Yamamoto, J., Yokoyama,

- M. A facile preparation method of a PFC-containing nano-sized emulsion for theranostics of solid tumors. *International J. of Pharmaceutics*, 421, 379-87 (2011)
3. Shiraishi, K., Harada, Y., Kawano, K., Maitani, Y., Hori, K., Yanagihara, K., Takigahira, M., and Yokoyama, M. Tumor environment changed by combretastatin derivative (Cderiv) pretreatment that leads to effective tumor targeting, MRI studies and antitumor activity of polymeric micelle carrier systems, *Pharmaceutical Research*, 29: 178-186 (2012)
 4. Yokoyama, M., Clinical applications of polymeric micelle carrier systems in chemotherapy and image diagnosis of solid tumors, *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 3(4), 151-158 (2011)
2. 学会発表
1. 加藤順一, 白石貢一, 遊佐真一, 伊東聖訓, 橋本和彦, 大川春樹, 横山昌幸, 光架橋可能なカルコン誘導体を用いる内核架橋高分子ミセルの作製、第60回高分子学会年次大会、大阪、2011年5月25日
 2. 白石貢一・遠藤怜子・王作軍・青木伊知男・横山昌幸、急性脳梗塞tPA治療時における出血リスクの高分子ミセルMRI造影剤による評価、第6回日本分子イメージング学会学術集会、神戸、2011年5月26日
 3. 白石貢一, 増田昌子, 眞田 雄介, 櫻井 和朗, 橋本 和彦, 横山 昌幸、薬物封入高分子ミセルの構造解析と放出挙動、第27回日本DDS学会、東京、2011年6月9日
 4. K. Shiraishi, H. Ma, K. Kawano, Y. Maitani, M. Yokoyama, Effect of Inner Core Character of Polymeric Micelles on ABC Phenomenon, 38th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, 2011年7月31日
 5. K. Shiraishi, R. Endo, Z. Wang, I. Aoki, M. Yokoyama, Polymeric micelle MRI contrast agent detects hemorrhage risk of t-PA leakage in a cute ischemic stroke, 2011 World Molecular Imaging Congress, 2011年9月7日
 6. 白石貢一・眞田雄介・櫻井和朗・横山昌幸, 薬物封入高分子ミセルの詳細な構造解析と薬物と高分子の相互作用、第60回高分子討論会、2011年9月28日
 7. 眞田雄介・白石貢一・横山昌幸・櫻井和朗、SAXS、FFF-MALSを用いたブロック共重合体ミセルの精密構造解析、第60回高分子学会年次大会、2011年9月28日
 8. 山口 美智子, 内藤 陽子, 青枝 大貴, 石井 健, 白石 貢一, 横山 昌幸, 米谷 芳枝、Rhodamine 標識PEG 修飾リポソームによるABC 現象誘導の解明、第27回日本DDS学会、2011年6月9日
 9. 眞田雄介・白石貢一・横山昌幸・櫻井和朗、高分子ミセルに内包された臭素修飾化合物の小角X線異常散乱を用いた位置決定、平成23年度繊維学会秋季研究発表会、2011年9月8日
 10. 眞田雄介・白石貢一・横山昌幸・櫻井和朗、小角X線異常散乱を用いた高分子ミセル中の臭素化合物の位置決定、第60回高分子討論会、2011年9月28日
 11. 濱中洋平、権田幸祐、武田元博、白石貢一、横山昌幸、大内憲明、パクリタキセル内包高分子ミセルの新たな抗腫瘍効果評価法、第70回日本癌学会、2011年10月3日
 12. Masayuki Yokoyama, Koichi Shiraishi, Kumi Kawano, Yoshie Maitani, Targeted diagnosis and therapy using polymeric micelle carriers, 14th Asian Chemical Congress, 2011年9月5日
- 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