

するために、機械的介入の懸念がなく、測定精度も高い。よって、従来法に比べて測定の精度と効率の両者ともに大幅に向上させることができる。この新方法を用いて、超音波照射併用によるウシ血栓の溶解促進効果を計測し、超音波強度と周波数との関係を解析した。

B. 研究方法

(1) 血栓作製セル

本研究の基本設計は、セルの中にシート状の血栓を作製し、血栓溶解剤を加えて密封した後、水浴中で超音波を照射するものである。そして、超音波照射強度と溶解促進の程度との関係を定量的に解析する。この解析のためには、血栓の各場所 (ROI) が実際に受ける超音波強度を正確に把握しなければならない。密封したセル中の血栓の正確な位置の音響強度分布の直接測定は不可能だが、水浴中でのハイドロホーンの測定位置との差をなるべく小さくすべく、薄い素材でセルを作製した (Fig.1)。新規作製したセルの外郭は80mm(L)×80mm(D)で、内腔は50mm(L)×50mm(D)で、内腔の厚さはスペーサーによって2、3、4、5、6mmに調整できる。

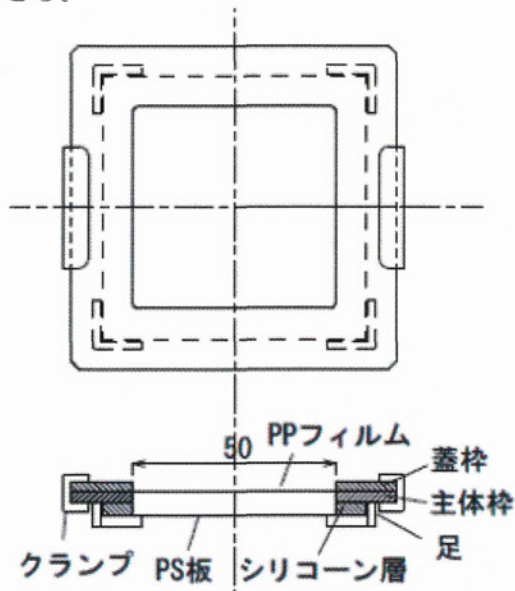


Fig. 1 血栓セル。上図は上面図、下図は中心軸断面図。

Acoustic Intensity Measurement System (AIMS Onda corporation, Sunnyvale, CA) を用いて、血栓セルの音場への影響を

評価した。ハイドロホーンを血栓セルの底板の下方2mmにおいて音場分布をスキャンし、血栓セルなしでの測定結果と比較した。

(2) 血栓作製

Fig. 2を参照。血栓カバー (緑色で表示) のリブは血栓作製セル本体 (黒色で表示) のフレーム上にかけて、その下にシリコンスペーサーが配置されている。そのシリコンスペーサーの下面にはポリプロピレン (PP) フィルムが接着している。一方、セル本体の底にはポリスチレン (PS) シートが接着している。このPPシートとPSシート間のスペースに血栓形成用混合液を入れ、予定の時間後、血栓カバーを外して、均一のシート状血栓

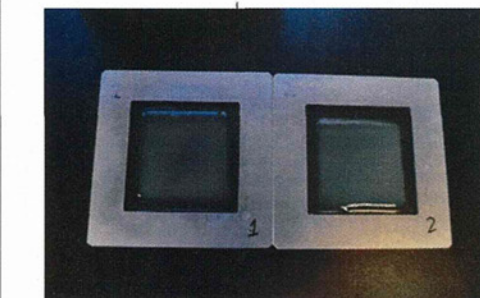
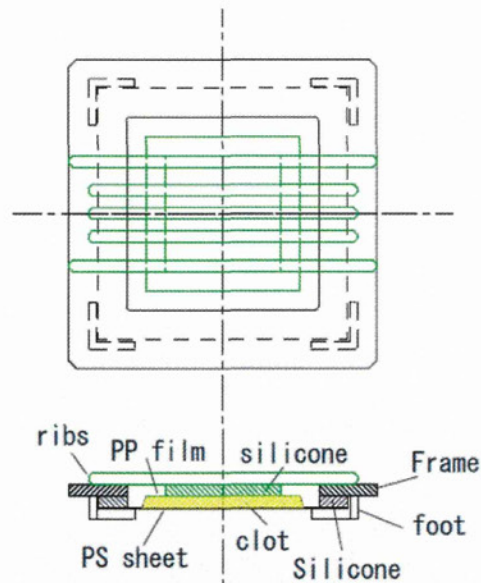


Fig. 2 血栓の作製。上図はセル本体 (黒色で表示) と血栓カバー (緑色で表示) の組合せを上から見た図、中央図はその垂直断面図、下図は作成した二つの血漿血栓の様子。

をセル本体底のPSシート上に作製した。血栓の大きさは40mm×40mmで、その厚さはシリコンスペーサーの厚さを変えることで約1、2、3mmに調節した。

(3) 血栓厚さ測定法

血栓の厚さは分光光度計(日本分光株式会社)を改造して得た微小部位吸光度マッピング装置を用いて測定した。(Fig.3)

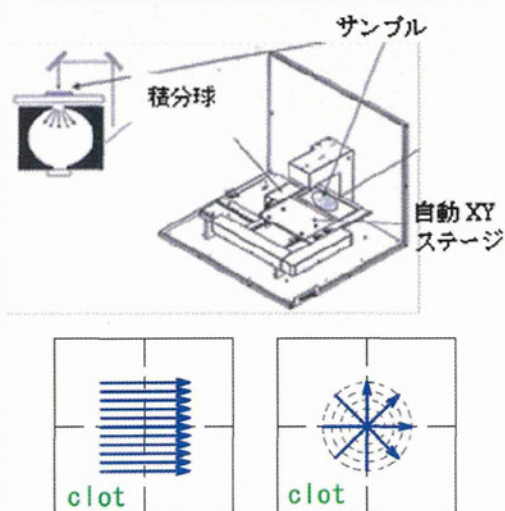


Fig. 3 微小部位吸光度マッピング装置の写真及び内部構造図。

Fig. 3に示す様に分光光度計から分光した光線を導出し、サンプルと光センサー(積分球)の間に自動XYステージを設けている。血栓セルを自動XYステージに乗せて、コンピュータのコントロールで、サンプル(セルにある血栓)を移動させ、その各関心領域(ROI)を順次に光線の中心軸と合わせて、吸光度を測定する。これと事前に測定した検量線と照合すれば、各領域の血栓の厚さが分かる。下図に示すように、XYステージは格子状スキャンまたは放射状スキャンが可能である。

(4) 検量線作成

検量線用セル(Fig. 4)の上下2層の透明PSシート間に楔状の空間が設けてあり、そこに血栓形成用混合液を入れて、血栓セル内の血栓と同様な条件(温度、湿度及び時間)にて楔状の血栓を作成した。血栓の有る場合と無い場合(蒸留水充填)検量線用セルを、上記血栓厚さ測定装置に乗せて横方向にスキャンし、血栓と蒸留水の測定値の差分をとり、各厚さの対応する血栓吸光度を求めた。

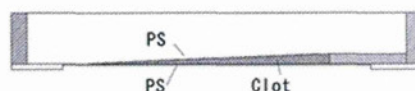


Fig. 4 検量線セルの垂直断面図

(5) 超音波照射

超音波照射台に固定したプローブと血栓セルステージの位置関係と距離はXY及びZステージ(中央精機)で任意に調整可能、且つプローブの先端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. 5)。また、同時に超音波暴露血栓、非暴露血栓を同時に検討できるようにした。超音波照射は、37℃の水槽内にプローブ先端を水面より2mm程度沈め照射を行った。その際、超音波の反射を防ぐため、水槽底面には15mmの専用超音波吸音材を敷いた。

使用した超音波振動子の音場分布及び血栓セルの音場への影響をAcoustic Intensity Measurement System (AIMS Onda Corporation, Sunnyvale, CA)を用いて測定した。

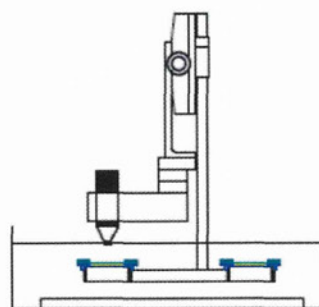


Fig. 5 超音波照射時の装置模式図

(6) 牛血漿血栓溶解実験

6-1 血栓の作製法

凍結乾燥ウシ血漿 (sigma) を超純水で溶解したウシ血漿に対し、200 mM CaCl₂ を10%加えた (最終濃度: 20 mM) 溶液1.6mL を、上記血栓セル内で37℃ 30分間放置することで、40mm×40mm、厚さ1.0 mmのシート状血栓を作製した。

6-2 牛血漿血栓の吸光度 spectrum 及び検量線の測定

検量線用セル (Fig. 4) の楔状の空間に上記と同様な血栓形成用混合液を入れ、同様な条件 (温度、湿度及び時間) にて楔状の血栓を作成した。光波長200nm-800nmの範囲内の吸光度を1nmの間隔、2nmのバンド幅でスキャンした。蒸留水入れたセルでの測定値をブランクとした。測定した吸光度 spectrum を参考に、吸収ピークの波長を選んで、血栓の斜面を0.5mmの間隔 (対応する厚さ変化0.02mm) でスキャンし、当該波長での吸光度と血栓厚さの関係 (検量線) を求めた。

6-3 超音波照射条件

400kHz, 500kHz, 600kHz, 1MHz, 及び2MHzの超音波連続波を、それぞれ中心最大音圧を標準では0.35MPaで血栓を照射した。また、音圧をこの値以上に設定した照射も行った。

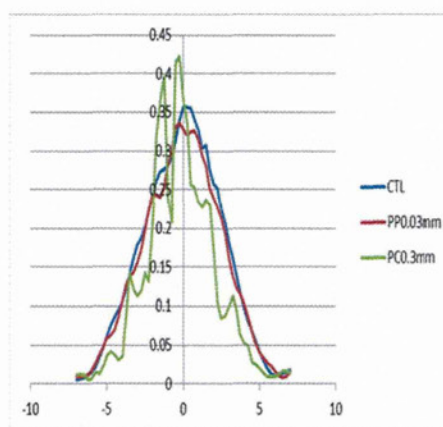
6-4 統計学的評価法

本実験では、シート状血栓を2個ずつセットで用意し、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's-test を用いて検定し、信頼度95%をもって有意とした。

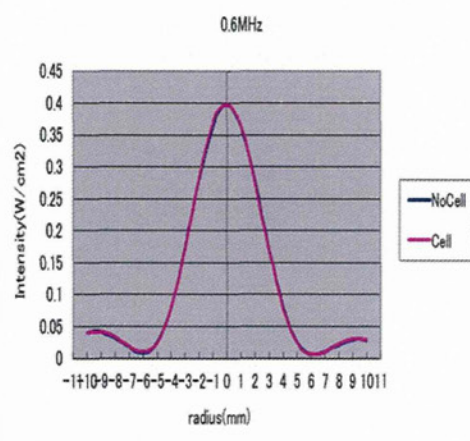
C. 結果

(1) 血栓セルの音場への影響

以前に設計した内腔15mm及び26mm四方の血栓セルの場合、超音波がセルに反射する影響が大きく、セルがある場合には、音場がセルなしの場合 (コントロール) に比べて著しい差が観察される。Fig. 6(a)に内腔26mm四方のセルの場合を示す。これに対して、今回新規工夫した内腔50mm四方の血栓セル (Fig. 6(b)) では、反射の影響が無く、セル有りの場合の音場は、コントロールにぴったり重なることがわかった。以上のことから、この新規セルを用いることで、音場と血栓溶解度の関係の精密な解析が可能となる。



(a) 内腔26mm四方のセルの場合



(b) 内腔50mm四方のセルの場合
Fig. 6 セルの音場への影響

(2) 牛血漿血栓の吸光度spectrum及び検量線

牛血漿血栓の吸光度スペクトルをFig. 7に示す。288nmに大きな吸収ピーク、412nmに小さな吸収ピークがある。それぞれのピーク波長を選んで検量線を作った。Fig. 8(a)に示すように、288nmの検量線は厚さ0.5mm位以上で傾きが減少し、検出能力が落ちる。それと対照的に、Fig. 8(b)に示す412nmでは、1.5mmの厚さまでほぼ直線関係が得られた。288nmではセルの底面に使われたPSも吸光度を示すこともあり、その吸光度が相対的に低いものの、412nmがこの血栓厚さ測定には適していると判断された。

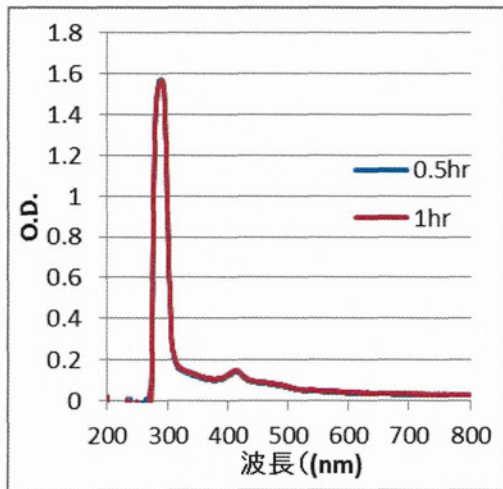


Fig. 8 牛血漿血栓の吸光度スペクトル

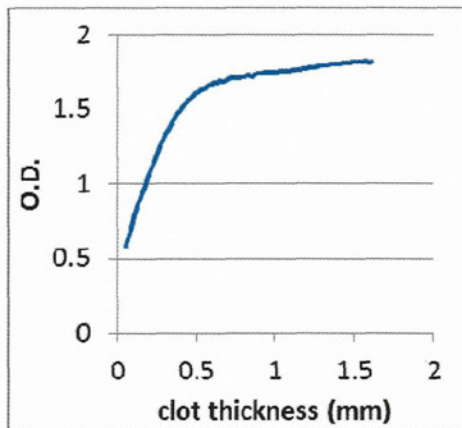


Fig. 9 (a) 牛血漿血栓288nmでの検量線

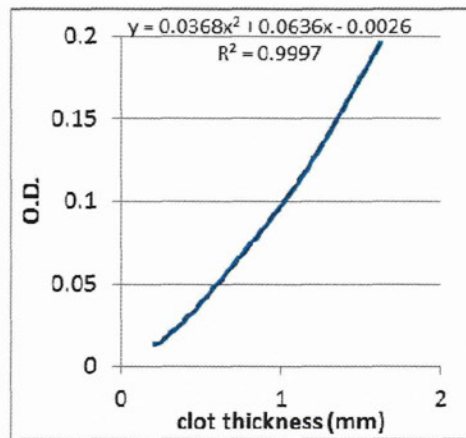


Fig. 9 (b) 牛血漿血栓の412nm検量線

(3) 牛血漿血栓に対する超音波の血栓溶解促進

前項目で確立した血栓の厚さの新規測定法を用いて、超音波照射によるrt-PA血栓溶解促進作用の測定を行ったところ、超音波強度に対応した溶解促進を観察することができた。その一例をFig. 10に示す。500kHzの周波数で、中心最大音圧0.35MPaで30分照射した際の、照射中心からの距離を横軸に、血栓厚さの減少量を縦軸にプロットした。L1~L4は各々一つの方向の放射状スキャンの結果を示し、その平均を紫色(Av)で示した。また、グラフ中には超音波の音圧の実測値を黄土色で表示した。この結果から、超音波の強度に従った血栓溶解促進作用が明瞭に観測することが示された。

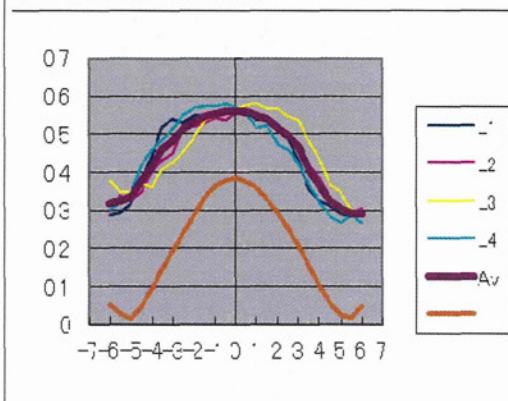


Fig. 10 新規開発法による超音波rt-PA血栓溶解作用促進の測定。単位は両軸ともにmm。

本方法は血栓溶解作用促進を極めて精度高く測定できるので、超音波プローブの種類・規格、超音波照射諸条件を血栓溶解効果の目的に最適化するためには、大変に適している。

また、この方法は1回の実験で得られる結果は溶解作用促進平均値ではなく、照射した超音波強度が明確に測定できる微小領域の溶解作用の値の集合（現時点では100点）である。よって、従来法に比べて、照射超音波強度と血栓溶解作用の関係が直接的である。よって、この方法を用いた超音波プローブ及び照射条件の最適化は、従来法による最適化に比べて、信頼性の極めて高いものとなる。

さらに、100点もの測定値の集合が1回の実験で得られるので、これを解析することで超音波強度と血栓溶解作用の定量的関係の解析が可能となる。その500kHzの結果をFig. 11に示す。上図のように横軸に超音波強度をプロットすると、血栓厚さ減少量は上に凸の曲線となるが、下図のように横軸を粒子速度に変換すると、きれいな直線となる。つまり、超音波の血栓溶解促進作用は粒子速度という物理量で扱うことが最も適切であるということが発見された。さらに、この下図のプロットを500kHz以外の周波数の400kHz, 600kHz, 1MHz, 及び2MHzでの測定値は全て、500kHzの直線に重なることが見いだされた。これは、「超音波によるrt-PA血栓溶解作用促進は周波数に無関係で、その粒子速度のみに線形の関係がある」という極めて重要な仮説が導かれる。（実験データがありながら「仮説」としたのは、連続波・間欠波などの超音波条件、rt-PA濃度などの血栓溶解剤の諸条件を変化させた実験を積み重ねた上で、一般的法則となると確信するからである。）この仮説が真であるとすれば、超音波血栓溶解促進療法の開発では大きなメリットがもたらされる。すなわち、この療法開発では、頭蓋骨透過性・定在波発生程度、組織障害性など超音波条件最適化で考慮すべき要素が多い状況の中で、第一に重要な要素である血栓溶解促進作用の最適化

のプロセスが大幅に簡略化できることになるからである。

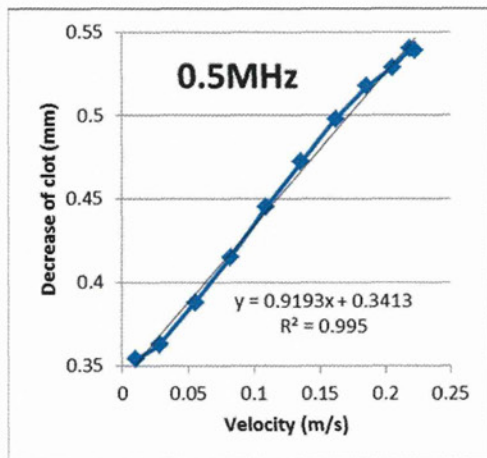
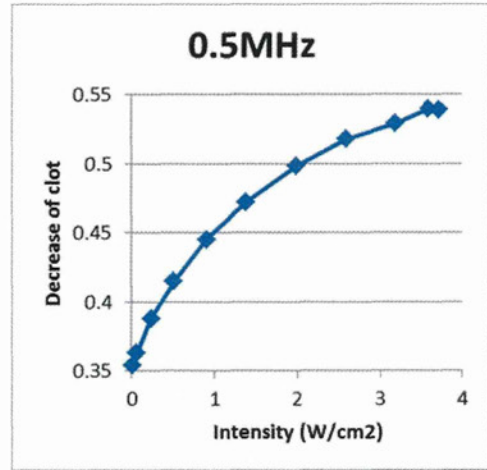


Fig. 11 超音波血栓溶解促進効果と超音波強度 (上図) 及び粒子速度 (下図)。

D. 考察

今回開発した D式超音波血栓溶解評価システムは、高精度、簡便、かつ多数の実験結果が1回の実験で得られる特長があり、本研究における超音波プローブおよび超音波照射条件の最適化に有用な方法である。今後、血栓溶解作用をより多面的に解析するために、今回のウシ白色血栓のみならず、ヒトの白色血栓及び赤色血栓での検討を今後して行く。

また、本法を用いて得た、血栓溶解促進効果と超音波の粒子速度との関係は、今後更なる検討の必要と重要性のある、極めて重要な発見であると考えられる。

E. 結論

高精度で簡便な超音波rt-PA血栓溶解促進作用測定法を新規に確立した。また、「超音波によるrt-PA血栓溶解作用促進は周波数に無関係で、その粒子速度のみに線形の関係がある」という極めて重要で興味深い現象が観察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 王 作軍、古幡 博、「超音波パラメーターと血栓溶解増強効果の関係に関する実験的研究」第15回 日本栓子検出と治療学会2012年10月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ラット急性脳梗塞モデルによるバブルリポソームの有効性安全性評価

研究分担者 丸山 一雄 帝京大学薬学部 教授
研究協力者 澤口 能一 帝京大学薬学部 研究員

研究要旨 我々が独自に開発したバブルリポソームは超音波診断のみならず、ターゲット分子を修飾することで特異的な薬物・遺伝子デリバリーにも応用可能である。このように様々な機能を有するバブルリポソームは疾病の診断から治療まで包括的に行うことのできる優れたツールになり得る。そこで、本研究ではバブルリポソームを虚血性脳血管疾患の診断・治療に応用すべく、バブルリポソームの膜表面に血栓（活性化血小板）特異的結合能を有するRGDペプチドを修飾（RGD-BL）し、活性化血小板および血栓への結合能を評価した。RGD-BLは活性化血小板結合能を有し、超音波診断装置下で血栓造影能を有することが示唆された。

A. 研究目的

虚血性疾患の治療では、表1に示すようにt-PA、超音波、マイクロバブルの三者併用時に血流再開率が最高値を示した臨床研究がある。三者併用による再開率の向上のメカニズムは、血栓を形成しているフィブリンの網目構造が超音波の振動作用と超音波によるバブルの振動作用によって開口し、t-PAの血栓浸潤を促進させるためである。その際、バブルを血栓に集積させることが出来れば、より効率的に血栓溶解を促進できると推察される。

・脳梗塞治療における血流再開率	
t-PA単独	23.9%
t-PA + TCD(経頭蓋超音波ドブラ)	40.8%
t-PA + TCD + マイクロバブル	54.5%

Reference・・・Molina CA et al. stroke, 2006.

表1 超音波、マイクロバブル併用による血栓溶解促進効果

バブルリポソームはパーフルオロプロパンを内封した超音波造影効果を有する小胞であり、超音波出力や周波数をコントロールすることにより、超音波診断のみならず、薬物・遺伝子デリバリー、発熱による温熱療法にも応用可能なツールである。さらにバブルリポソームには様々なターゲット分子を容易に修飾可能であるため、標的組織・部位特異的な診断・治療が可能になると期待される。このように様々な機能を有するバブルリポソームは疾病の診断から治療まで包括

的に行うことのできる優れたツールになり得る。24年度は、翌25年度から予定しているバブルリポソーム併用超音波血栓溶解効果の評価に向け、図1に示す血栓標的型バブルリポソームの作製および血栓結合能の評価を行った。本検討では、バブルリポソーム（BL）へ血栓集積能を付与すべく、ターゲット分子として、血栓（活性化血小板）に高発現するGPIIb/IIIa分子と高親和性を持つ環状化RGDペプチドを用いた。

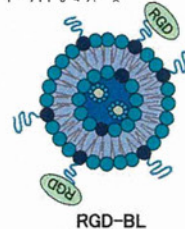


図1 RGD-BL模式図

B. 研究方法

(2) BLの調製

脂質組成をDSPC: DSPE-PEG (2k) -OMe: DSPE-PEG (3k) -Mal:cholesterol = 64:1: 5: 30 (モル比) とし、総脂質量100 μmolをクロロホルム4 mLに溶解させ、ジイソプロピルエーテル4 mLとPBS 4 mLを加え、バス型ソニケーターでエマルジョン化を行った。その後、エバポレーターを用いて逆相蒸発法によりリポソームを調製した。これを凍結融解を3回繰り返した後、エクストルージョン法により粒子径を100-200 nmに調整した。

調製したリポソームを二等分し、一方には12.5 mmolのRGDペプチド (CGGc (RGDf K)) 溶液を加え、もう一方には12.5 mmolのコントロールペプチド (CGGc (DGRfK)) 溶液を加え、静かに攪拌しながら4℃で一晩反応させた。各種リポソームを1 mg/mLとなるようにPBSで希釈し、このリポソーム懸濁液2 mLを5 mLバイアル瓶に入れた。C₃F₈ガス7.5 mLで置換・加圧し、バス型ソニケーターで5分間超音波照射することでバブルリポソームとした。

(2) C₃F₈ガス封入量の測定

BLの入ったバイアル瓶を開封し、常圧とした後に、ガスタイトシリンジを用いてBLを採取した。このバブルリポソーム500 μLを測定用のバイアル瓶に移し、ガスクロマトグラフによりC₃F₈ガス封入量を測定した。

(3) 粒子径の測定

BLの入ったバイアル瓶をバイアルオープナーで静かに開封し、常圧とした後に、PBSで100倍希釈した。このBL懸濁液の粒子径を動的光散乱法により測定した。

(4) RGD-BLの活性化血小板結合能評価

ラット尾静脈より3.2 %のクエン酸溶液に採血した血液5 uLを500 μLの0.2 mMのADP溶液を500 μLへ添加し、血小板の活性化を行った。そこへ、蛍光色素 (DiO) を内封したRGD-リポソームを50 μL添加し、さらに血小板の活性化マーカーであるCD62Pに対する蛍光色素 (PerCP) 修飾抗体を添加した。室温にて30分間反応後、Flowcytometry法にて、活性化血小板へのRGD-リポソームの結合能について解析した。

(5) RGD-BLの活性化血小板結合能評価

ラット尾静脈より3.2 %のクエン酸溶液に採血した血液1 mLを100×g、室温にて10分間遠心分離し、その上清 (PRP: platelet rich plasma) を回収した。生理食塩水でPRPを20倍に希釈し、ガラスボトムディッシュに播種、1時間室温で放置した後にADP溶液を最終濃度0.02 mM

となるように添加して血小板の活性化を行った。10分間後、RGD-BLを添加して5分間静置した後、生理食塩水で10回、活性化血小板表面を静かに洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察を行った。

(6) RGD-BLの血栓結合能評価

イソフルラン麻酔科でラットの総左頸動脈を剥離後、総頸動脈の下部にパラフィルムを敷き、総頸動脈とパラフィルムの上に40 %の第二塩化鉄をしみ込ませたろ紙を挟み込み、15分間刺激することで塩化鉄誘発血栓を総頸動脈内に作製した。血栓作製後、塩化第二鉄のろ紙を除去後、生理食塩水で術部を3回洗浄し、10分間放置した。血栓を小動物用超音波画像診断機 (VEVO 2100) でモニタリングしながら、尾静脈よりRGD-BLを投与し、10分後にRGD-BLの投与前後での血栓の輝度変化を観察および画像解析ソフト (Image J) で解析した。



図2 塩化鉄誘発血栓作製法

C. 研究結果

(1) バブルリポソームのC₃F₈ガス封入量の検討

バブルリポソーム中のC₃F₈ガス封入量をガスクロマトグラフィーで測定した。その結果、バブルリポソームのガス保持量は11.2 μL/mL、RGD修飾バブルリポソームのガス保持量は10.8 μL/mLとなった。C₃F₈ガス封入量はペプチド修飾の有無にかかわらず同程度であり、バブルリポソームのガス保持量はRGDペプチド修飾に影響を受けないことが示唆された。

(2) バブルリポソームの粒子径の測定
バブルリポソームの粒子径を動的光散乱法を用いて測定した。その結果、BL (591.5 ± 230.3 nm)、DGR-BL (647.2 ± 342.7 nm)、RGD-BL (613.8 ± 107.5 nm) となり、粒子径の変化は認められなかった。これらの結果から、バブルリポソームの平均粒子径はオリゴペプチド修飾による影響をほとんど受けないことが示唆された。

(3) フローサイトメトリーを用いたRGD-リポソームの活性化血小板結合能解析
調製したRGD-リポソームの活性化血小板結合能を解析するために、CD62P陽性分画の血小板との結合をフローサイトメトリーで解析した。なお、フローサイトメトリーでの解析にあたり、バブルが細胞に結合した際に細胞の挙動(分画のシフト)が読めないため、バブル化前のリポソームの状態を検討を行った。

コントロールペプチドとして利用した、DGRペプチドを修飾したリポソームと比較し、RGDペプチドを修飾したリポソームではCD62P陽性細胞において蛍光強度の増大が観察され、RGD-リポソームが活性化血小板と結合することが示唆された。

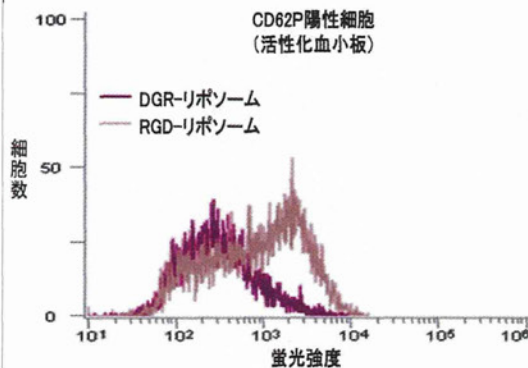


図3 RGD-リポソームの活性化血小板結合能解析

(4) 共焦点レーザー顕微鏡によるRGD-BLと活性化血小板の結合観察

フローサイトメトリー解析ではバブル化していないRGD-リポソームを用いて活性化血小板結合能解析を行ったため、本検討では共焦点レーザーを用いてRGD-BLの活性化血小板結合能を解析した。

DGR-BLを処置した活性化血小板では細胞上に蛍光を観察することは出来なかったが、一方RGD-BLを処置した活性化血小板では多くの蛍光が観察された。

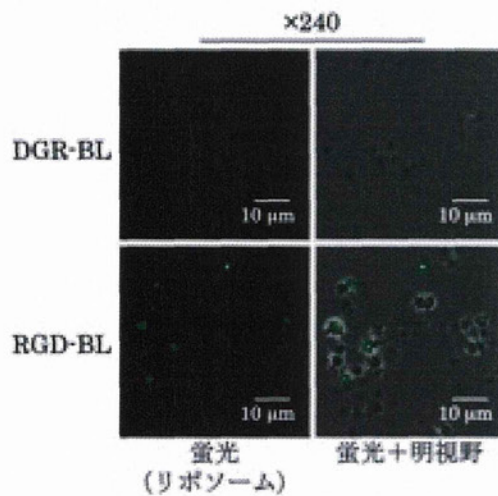


図4 RGD-BLの活性化血小板結合観察

(5) 超音波造影装置下におけるRGD-BLの血栓結合能評価

RGD-BLの血栓結合能を検討すべく、ラット総頸動脈に塩化鉄誘発血栓を作製し、RGD-BL投与前後の血栓の輝度変化を超音波造影装置モニタリング下で観察することで評価した。その結果、対照として用いたDGR-BLを投与した際にはほとんど血栓の輝度に影響を与えなかったのに対し、RGD-BLを投与した群では血栓の輝度上昇が確認された。

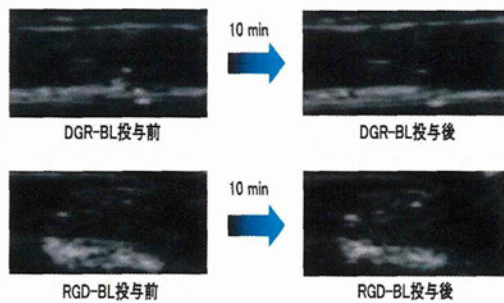


図5 RGD-BL投与による血栓輝度の上昇

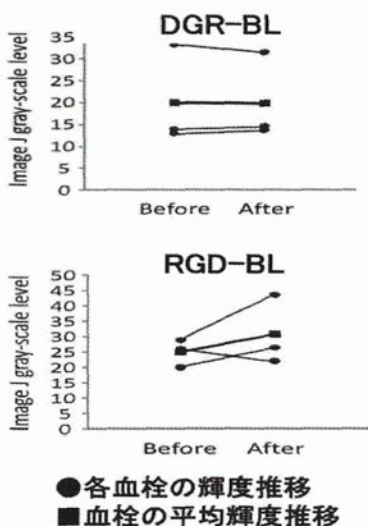


図6 RGD-BL投与による血栓輝度の推移

D. 考察

リポソームへRGDペプチドを修飾したことにより、RGD-BLへ活性化血小板結合能を付与出来たことがフローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析により確認された。また、バブル化する際に超音波照射を行ってもRGDペプチドの活性は失われないことも確認され、製剤の高い安定性も示唆された。

一方、塩化鉄誘発血栓にRGD-BLを処置した際には3例中2例で血栓の輝度上昇が確認されたが、3例中1例で輝度の減少が認められた。輝度が上昇した2例については血栓にバブルリポソームが結合したことが推察されるが、RGDペプチドにはフィブリンと競合的に拮抗することが報告されていることから、輝度が減少した1例についてはバブル表面のRGDペプチドが血栓の一部を崩壊させてしまった可能性が推察された。今後検討数の追加、および投与量を変化させることで詳細に最適な血栓造影条件・超音波血栓溶解条件について検討していく予定である。

E. 結論

BLにRGDペプチドを修飾することで、活性化血小板への結合能の付与が可能であり、ラット総頸動脈に作製した血栓に集積することも確認された。このRGD-BLは超音波診断機での血栓の検出を容易にさせるだけでなく、脳梗塞の際に超音波と併用することでt-PAによる血栓溶解作用の促進にも利用できる可能性が期待された。

また、今後はRGDペプチドのみならず、血栓を標的可能な抗体などのターゲティング分子を修飾したバブルについても検討していくことで、超音波血栓溶解療法に最適な血栓標的型バブルを開発する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 澤口能一、小田雄介、小俣大樹、鈴木亮、萩沢康介、丸山一雄、第133回日本薬学会超音波、2013. 3. 28、バブルリポソーム併用血栓溶解療法の基礎検討

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

超音波血栓溶解補助医療機器の製品化

研究分担者 川島 裕幸 株式会社カネカメディックス

研究要旨

塞栓性脳梗塞の治療にあたり、発症から4.5時間以内であれば、rt-PAを投与できる。しかしながら、rt-PAの血流再開率は30%程度にとどまる。一方rt-PA投与による血流再開率は、診断用超音波を用いることで向上することがアレキサンドロフらによって報告されている。本研究は、2017年度に超音波の血流再開の改善効果を誰もが簡便に享受しうる補助医療機器の製品化を目指す。

A. 研究目的

急性脳梗塞の治療にあたり、発症から4.5時間以内であり、MRI、CTなどで出血がない梗塞性脳卒中を確認した場合、血栓溶解目的にrt-PAが静脈投与され得る。しかしながら、このrt-PA治療の血流再開率は30%程度にとどまる。血流再開率、開通までに要する時間は患者の予後に大きく影響することから、再開率を向上させ、短時間で血流再開することは、医療現場、今後の介護負担軽減から期待される治療となる。rt-PA投与による血流再開率の向上させる方法として、早期投与、投与量増加、塞栓部にカテーテル直接投与などがあるが、診断用超音波を経頭蓋骨照射することによっても短時間で再開を得ることがV. Alexandrov（米）らによって2004年、New England J. Med. に報告されている。しかしながら、診断用超音波照射を用いる治療改善は、目的血管を見出すこと、目的血管に持続照射するという双方において高い技術が求められ、一般治療とはなりにくい。本研究は、梗塞性脳卒中患者の頭皮に超音波振動子を貼付することで、簡便にrt-PAの血栓溶解効果を加速し、患者予後を改善する補助医療機器の製品化を目指す。

【具体的な目標】

- (1) 頭蓋内に安全に超音波を照射・供給する超音波周波数、ならびに変調システムの確立

- (2) 適切な変調を有する超音波信号を供給するポータブルな駆動装置の開発
- (3) 頭蓋内の塞栓部位を安全にカバーする振動子の開発
- (4) 振動子を簡便、確実に貼付する装着システムの開発

である。

2004年のAlexandrovらの超音波照射が血栓溶解を加速するという報告を受け、より効果的に超音波を照射する目的で、2005年Daffertshofer（独）らが、頭蓋骨を透過しやすく、また確実に照射できることを目的に、300kHz/0.7W/cm²をrt-PA投与中ならびに投与後30分までの総計90分間照射した。しかしながらDaffertshoferの臨床トライアルは出血を有意に増加させたことから、中止となっている。これは、超音波を照射することに主眼を置いたため、過度に強い超音波が照射の結果、定在波などによるキャビテーションの発生から脳実質、血管傷害を発生させたと考察されている。

現状でのrt-PA単独治療での血流再開の限られた成果にとどまる多くの患者救済を目指し、血栓除去医療機器が国内承認を受けたこともあり、現在では血管内治療による血栓摘出術も治療選択肢として加わった。この血管内治療の併用も、血流再開困難と判断された時より短時間で治療開始が求められている。さらに治療方法も、全国で発生しうる脳卒中の患者に一次救急として診断、rt-PA投与を行った後、血流が再開されない事態に

に備え、血管内治療が行える施設へ搬送される病院連携治療システムの確立が取組まれている。

搬送の際もrt-PA投与による血流再開治療は継続することから、今回我々が目指す医療機器は、救急車など搬送車両内での使用も考慮し、駆動装置のポータビリティ設計開発も重要な課題となる。

以上より、簡便かつ確実に装着可能であり、定在波、ホットスポットの発生を回避し、適切な超音波を簡便に照射可能なポータブル医療機器の実現を以下の開発計画で目指している。

2012年：振動子・定在波回避超音波変調の基本設計

2013年：血栓溶解強度の明確化。
振動子、駆動装置の製品化基礎設計
安全性確認動物評価

2014年：最終製品設計、安全性・有効性基本検証し、治験・臨床研究準備

2012年は、AIMS (Acoustic Intensity Measurement System) にて振動子の素材、面形状による超音波周波数特性、音響強度分布の把握。シュリーレンにて変調システムの定在波、ホットスポット回避効果を検討した。

B. 研究方法

(1) 振動子の超音波特性把握

振動子は、材料、構造設計により同電圧の広周波数帯域信号を入力した場合でも、振動子特性により出力される周波数帯域が異なる。振動子は大きく分類すると、狭い特定周波数域において電気エネルギーのロスが少なく効率よく振動するため、特定領域では低電圧で、超音波を発振することができる圧電素子（以下ハイQ材）と、同じ音響強度を出力する際にハイQ材に比較し高い電気エネルギーが求められるものの広い周波数帯域の出力に対応する圧電素子（以下ローQ材）がある。ハイQ材は特定領域のみを活用する場合、駆動装置の電気エネルギーが低レベルで済むものの、特定周波数領域を外れた超音波を発信させる場合は、非

常に高い電気エネルギーが求められるため、目的領域が限定されている場合に適した素材である（図1）。

一方、ローQ材は全周波数帯域的に高めの電気エネルギーが求められるが、広い周波数帯域で超音波を安定的に発信することができるため、広い周波数帯域での超音波振動を求められる時には適している素材である（図2）。

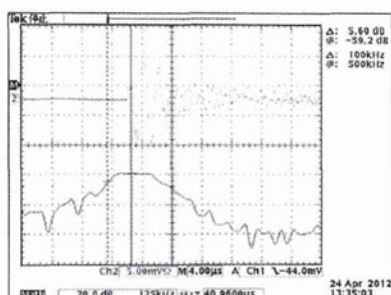


図1 ハイQ材（人工セラミックス）
横軸に周波数、縦軸に音響強度を表す。限られた周波数領域で音響強度が高まっている。

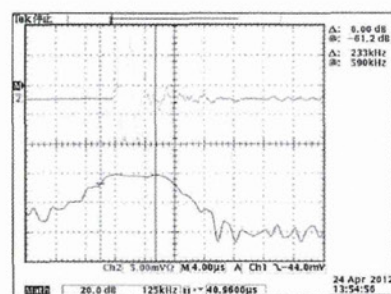


図2 ローQ材
（多孔質人工セラミックス）

ハイQ材、ローQ材は、今回の医療機器開発における周波数帯域で血栓溶解を加速する音響強度と、キャビテーション回避の変調方式を検討の後、駆動に必要な電気エネルギーを考慮して選定を行う。

(2) 振動子形状の音響強度分布把握

従来の超音波振動子は、送受による解像度・画像品質を高める開発が進められていた。2MHzなど、特定周波数の超音波を発信した際、どのような超音波音響強度ならびにタイミングで超音波を発信するか？受信感度を装置でどのように

適正化するか？などの開発が進められ高画質、目的とする情報を得る技術蓄積がなされてきた。しかしながら、振動子から発信される音響特性について体系的に研究された実績、報告はない。また画像診断で使用される超音波は、基本的に平面波が活用されているため、開発目的としている立体的ゾーンを構成させた超音波照射における基礎データ学問は存在しない。製品化にあたり振動子の基本特性把握の目的で素材毎に形状、面積が異なる振動子（表1）を試作し、AIMS（図3）にて音響強度特性、立体分布を測定する。

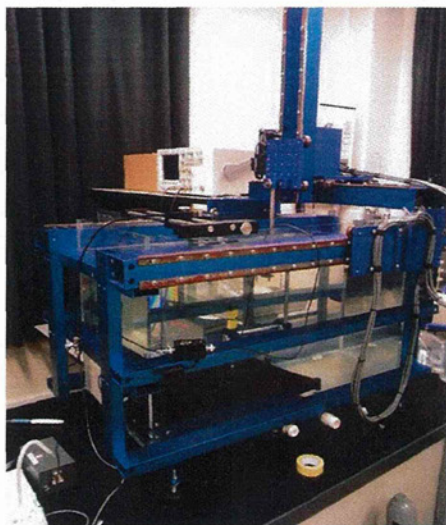


図3 AIMS：水槽内にて超音波照射軸の垂直(XY)断面、および照射軸を通る並行断(XZ)面の音響強度を測定。

【慈恵大学に設置】

表1 試作振動子一覧

	サイズ形状	材質
1	24mmφ	ハイQ
2	24mmφ	□-Q
3	24mm□	ハイQ
4	24mm□	□-Q
5	16mm□	□-Q
6	30mm□	□-Q
7	30×50mm	□-Q
8	24mm□×2連	□-Q

(3) 変調条件による定在波抑制

Daffertshoferらの臨床研究は、低周波超音波の方が高周波の超音波に比べ頭蓋骨の透過性が高いことから、300kHzの超音波を活用して臨床研究を行った。しかしながら、患者14人中13人において、脳出血が確認され、臨床研究は中断している。

Daffertshoferらの報告*1では、超音波の物理的音響強度は問題がないとしながらも、300kHzとrt-PAの組合せにより出血が増加することは認めており、臨床研究を中止したことを述べている。古幡らは、単に薬物と超音波の組合せによる現象と看過せず、Daffertshoferらの条件を解析した。安全とされているメカニカルインデックス1を超える3.54の条件で臨床研究が実施されたことを指摘している*2。

我々も目指している簡便に頭蓋内血栓塞栓部に超音波を照射する医療機器の開発は、頭蓋骨の超音波透過が必要であり、透過性に優れる低周波におけるメカニカルインデックスと発熱課題サーマルインデックスのバランスを鑑み、500kHz付近の中周波数帯域の超音波を照射することを計画している。しかしながら、中周波数帯域の単一周波数の使用は、連続、断続照射にかかわらず、キャビテーションの発生可能性が高まり、局所的に高い物理的ストレスがかかるため安全に照射することが難しい。適用患者の安全確保に当たり、キャビテーションの原因となる定在波の発生回避は重要な開発目的となる。

定在波回避の方法としては、位相、周波数のことなる波を発信することで波の重なりを抑制することが必要である。位相、周波数が異なる超音波を照射するには、複数の振動子から異なる周波数を組合せて発信することで波の重なりを防止する方法と、波の位相や周波数を電氣的に異なるものへと変化させ、結果複数種の超音波が照射される変調を用いた方法がある。今回の開発は、頭蓋骨の超音波

透過可能な薄い部分には面積に限りがあるため、変調方式を中心に検討する。過去、古幡らが雑音ゼロクロスタイミングで逆位相への切替えを行うRSBIC (Random Switching of Both Inverse Carrier) 方式や、位相を $\pm 30 \sim 180^\circ$ の範囲で変化させるPMN (Phase-Difference Modulation by Noise) 方式、ならびに周期的に指定範囲のランダムな周波数を選択するPSRF (Periodic Selection of Random Frequency) 法などが考案された。過去は、それぞれ正弦波発信装置、アンプ、など市販装置の組合せにより基本的な定在波抑制評価を検討し、それぞれ定在波抑制効果を認めたため、RSBIC、PMN、PSRF各条件設定下の変調を行える駆動装置を試作し、変調による定在波抑制効果の検証を行う。

(4) ファントムによる評価

超音波を頭蓋内に照射する場合、頭蓋骨は超音波を透過しにくく、超音波音響強度の低下を招く。これは、頭蓋内の血流確認などの際、超音波診断装置ではしばし画像が得られないことから一般に知られている。

今回開発の医療機器は、超音波による拡散効果で静脈投与されたrt-PAを塞栓原因の血栓に到達させ、さらに血栓の中へ拡散させる効果により血栓溶解を促進させる。本開発の医療機器の効果を得るには超音波が頭蓋骨を透過後に安全かつ有効な音響強度となるような設計が求められる。本医療機器は、従来の診断装置と異なり、簡便な操作性を目指すため、貼付操作のみの適用で、皮膚を含めた頭部表面から超音波が目的部位に到達する設計をする必要がある。

そのため、音響特性を皮膚、頭蓋骨に模した図4に示すファントムを作成し、振動子、変調による透過特性を評価し、入力音響強度の設計基礎情報を収集する。さらに骨の厚みが異なるファントムを作成し、骨厚みによる音響強度透過の影響を評価する。

(5) 音響レンズ

今回開発を目指す超音波による血栓溶

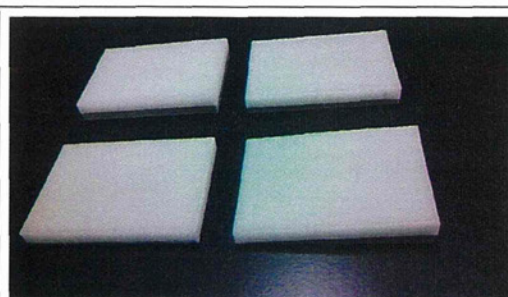


図4 皮膚/骨ファントム：白い部分は皮膚同等、グレー部分は頭蓋骨と同等の音響特性を有する。

解加速医療機器は、診断により目的部位を捕捉することなく貼付装着のみの簡便操作での利用を目指していることから、頭蓋内での超音波音響強度は、広域かつ均一に拡散することが求められる。超音波は、近距離限界点より遠位は拡散するものの、近距離限界点までは振動子幅に並行して進行することが知られている。近距離限界点までの距離は、振動子サイズによりコントロールできる。しかしながら、近距離からの拡散のため小径振動子を用いると、ターゲット部位距離の音響強度を同一に設計した場合、ターゲット部位手前の頭蓋内近距離限界点までの音響強度が高くなり、血管、脳実質に損傷を与えるリスクが高まる。安全に広く頭蓋内に超音波を拡散させる必要があるため、図5に示す超音波照射領域を広げる音響レンズをシリコンにて試作し、音響強度分拡散効果を確認する。

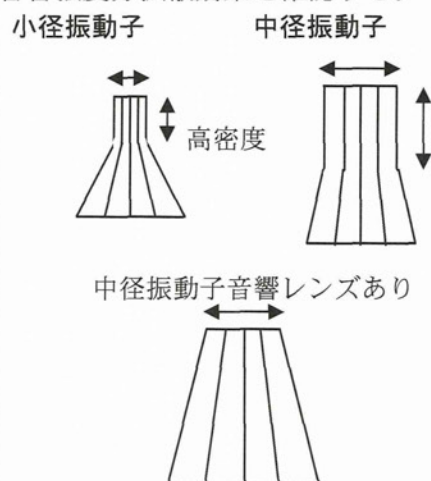


図5 音響レンズの狙いイメージ

C. 研究結果

(1) 振動子素材による音響特性

周波数帯域が異なる振動子の素材により、音響強度の分布特性を計測した。駆動装置出力は、振動子の特性を統一的な基準で評価する目的で、500kHz正弦波、かつ近距離限界点の音響強度が $0.03\text{w}/\text{cm}^2$ となるように駆動電圧を調整のうえ測定した。

24mm角で素材による比較も、近距離限界点の音響強度を $0.03\text{w}/\text{cm}^2$ としたが、ハイQ材のピーク周波数は498kHzのものを使用した。高密度セラミックスを使用のため必要電圧は35.4Vとなり、ピーク周波数435kHzのポーラスセラミックスのローQ材13.0Vより高い電圧が必要であった。適切に比較する場合、双方ピーク周波数が500kHzのものを使用すべきではあったが、任意のピーク周波数の振動子を生産する技術は、未確立のため、同一ピーク周波数での比較は実施できなかったものの、素材による変換効率への影響が大きいことが確認された。形状は同一であるにもかかわらず、近距離限界点は振動子面からハイQ材で54mm、ローQ材で67mmと特性に差が表れた。振動子素材による音響強度分布は図6に示す。

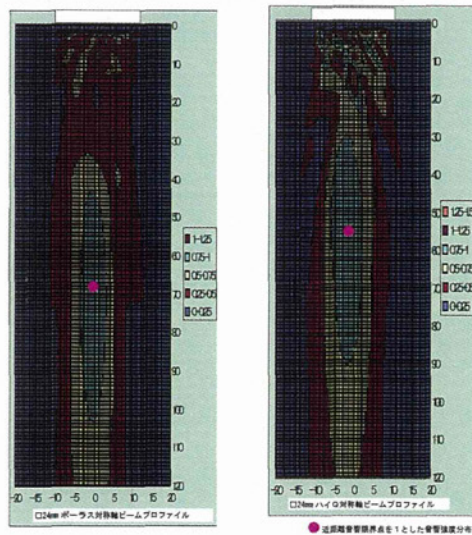


図6 振動子素材によるXZ面音響強度分布
左/ローQ材、右ハイQ材 図中のピンクドットは、近距離限界点を示す。

(2) 振動子形状による音響特性

(2-1) 振動子形状による評価

振動子素材をローQ材に統一し、形状を24mmφ、ならびに24mm角で音響強度特性を比較した。

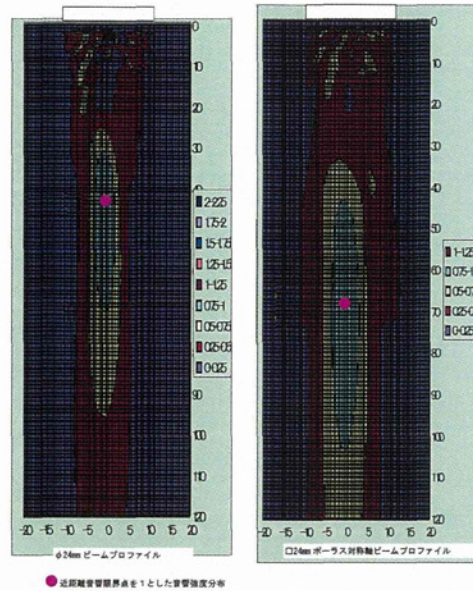


図7 形状による音響特性の影響
左/24mmφ円形、右24mm角型

形状比較も近距離限界点を $0.03\text{w}/\text{cm}^2$ に電圧を設定し、評価した。設定電圧は、24mmφポーラス振動子の中心帯域は535kHzであったが、13.3Vとなり、先のハイQ角型が必要であった電力35.4Vに比べ著しく低い電圧で稼働した。また、形状による差は、角型の方が超音波の広がりをも認めた。図7に、24mmφ、24mm角振動子によるXZ面の音響強度分布を示す。また次ページ図8に近距離領域部のXY音響強度分布を示す。

(2-2) 振動子面積による音響特性

振動子面積による音響強度分布変化を測定した。面積の特性比較は、双方ローQ材で24mm角と、対角が24mmとなる16mm角の振動子を製作して実施した。近距離限界点音響強度を $0.03\text{w}/\text{cm}^2$ とすると、16mm角のピーク周波数は453kHzであるため完全な比較は困難であるが、24mm角の13.0Vに対し、15.1Vと高電圧が必要

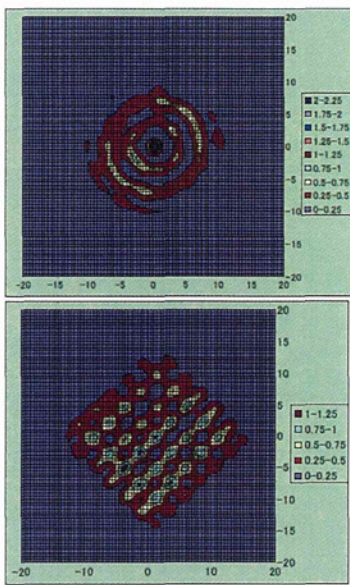


図8 近距離限界点部分XY面音響強度分布：上/24mmφ、下/24mm角

であった。一方、近距離限界点は、24mm角の67mmに対し、16mm角は24mmと著しく短縮し、超音波の広がりを期待できる結果であったが、近距離限界点の25%音響強度を対象とすると、広がり認めず、到達深度も82mmと短くなった。サイズによるXZ面の音響強度分布を図9に示す。

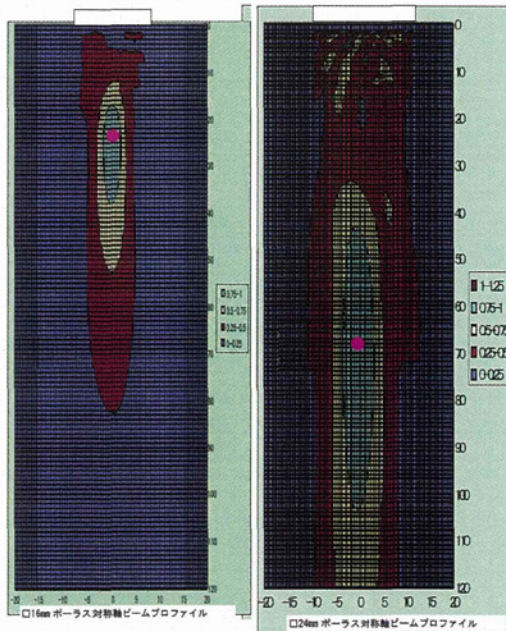


図9 サイズによる音響強度分布
左/16mm角 右/24mm角 (対象軸)

(3) 変調による効果

超音波を頭蓋内で使用する場合、複数回の反射が生じる可能性があり、同一周波数の重なりが繰り返されることは、粗密ストレスを発生させ脳実質ならびに脳血管に傷害を与える可能性がある。

超音波の位相、周波数を可変可能な駆動装置を試作し(図10)音響強度分布を計測した。



図10 試作駆動装置

変調条件は、基板上のディップスイッチを用いて切り替えで実施

変調による定在波抑制効果は以前に古幡教授評価した結果と同等であった。必要駆動電圧、周波数コントロール、再現性などからPSRFが設計に適していることを確認した。各変調方式別特性を次ページ表2に示す。

変調は、定在波抑制のほか音響強度差を緩和する効果が観察された。しかしながら、PMN変調、RSBIC変調は出力ロスが大きく、同音響強度を得るためには高い電圧が必要となる。今回の検討で、均一性、出力効率からPSRFが有力な候補であった。それぞれの変調における音響強度分布を次ページ図11に示す。各項の星の数が多い程、優れていることを示す。

表2 変調特性

項目	説明	PSRF	PMN	RSBIC
定在波抑制効果	SWR	☆☆	☆☆☆	☆☆☆
駆動電圧の低さ	ターゲットに一定の音響強度を与えるための駆動電圧。低いほど発熱や駆動装置サイズ面で有利	☆☆☆	☆☆	☆☆
超音波帯域の狭さ	500kHzを中心に広がりすぎると、安全性を示す動物実験をする必要あり	☆☆☆	☆	☆
検証の容易さ	駆動波形が単純だと、問題発生時などで検証が容易	☆☆☆	☆	☆☆

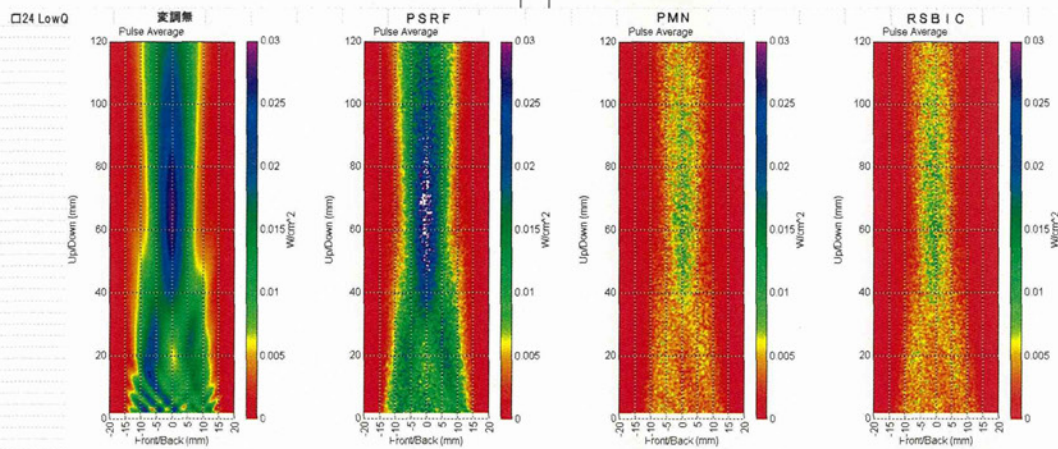


図11 変調による音響強度分布

(4) ファントムによる特性評価

ファントムは500kHzにて近距離限界点0.03W/cm²の出力で皮膚5mm・骨2mmの超音波透過性を計測した。図12と比較するように、約90%減衰となり、ピーク0.0035W/cm²への低減を確認した。

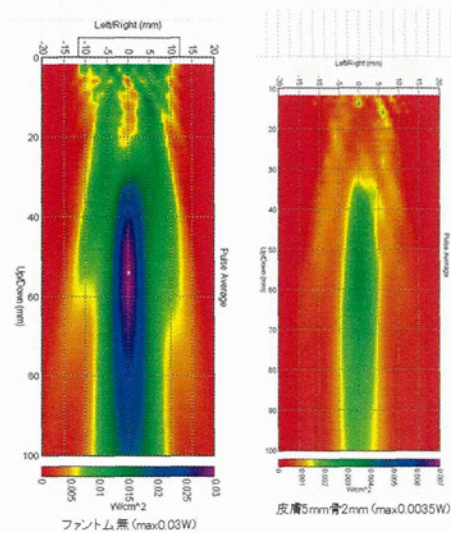


図12 左：ファントム無、右：ファントム透過

(5) 音響レンズによる効果

凹型音響レンズによる超音波照射エリア拡大は、近距離限界点距離67mmに対し、レンズ有が72mmと概ね同等ながら拡大を認めた。一方、エリアが拡大したため、近距離限界点の音響強度を0.03w/cm²とした場合、必要電圧が、13Vに対し27Vとなった。また、10~20mmの部分で音響強度が高まるホットスポットを観察した。

(図13)

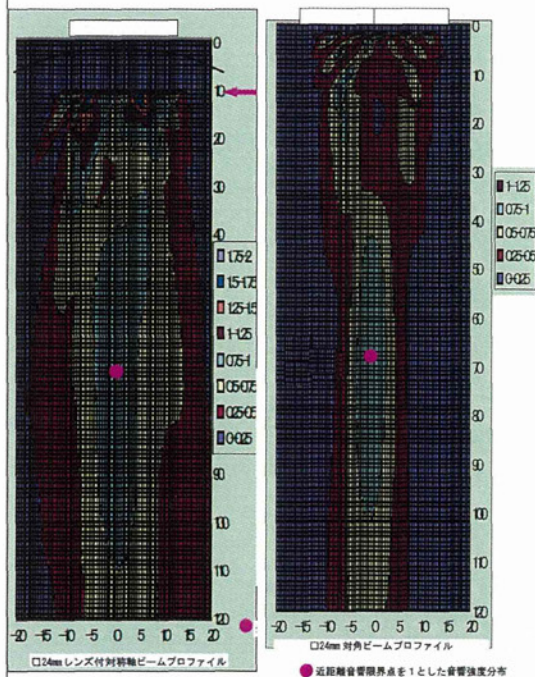


図13 レンズ音響強度 左/レンズ装着

D. 考察

振動子は、特定周波数で効率の高いハイQ材活用が500kHz近傍での利用に適しているため、低電圧となるメリットを期待していたが、ピーク周波数から外れる場合は高電圧を求められることが確認できた。ハイQ材は、振動子のバラツキにより高い駆動電圧が必要となることが判った。

また、キャピテーションを防止しながら安全に超音波を適用するために、定在波を抑制する変調を用いることが有効であることは古幡らが以前に報告した結果と同様であった。変調により、音圧差の緩和効果も確認したことから一定の周波数幅を使用することも鑑み、一定の電圧レベルで対応するローQ材を今後評価を進める。

実際の電圧、発熱とのバランスの課題が予想されるが、均一なゾーン照射の音響強度を高める可能性を見出した。PSRFはホットスポット、ピーク出力を低減させながらも、出力ゾーンを維持することが確認できたことから、第一候補として検討を進める。

照射領域の確保は、安定した音圧を照射する領域として近距離限界点出力の25%出力以上と想定した場合、超音波の基本特性として報告されている近距離限界点から遠位の超音波の広がりには観察できなかった。超音波は、振動子のサイズ・形状面の範囲内に局限することが確認された。小さい振動子は近距離限界点が振動子面に近くなり、近距離限界点以遠の超音波が拡散する効果を期待したが、超音波の広がりにはサイズに影響なく認められなかった。

さらに、簡便操作とする目的で音響レンズによる超音波の広がり、音響レンズ装着によって広がりには観察されたものの、振動子面から1cm付近の近距離部分に音響強度の強いホットスポットが観察された。安全面から音響レンズの適用は、断念した。

特定の部位に貼付することのみで、患部に超音波を照射を実現するためには、ターゲットゾーンに併せた装着方法、振動子サイズならびに形状などから適切な設計を進める必要がある。

今後は、ファントム、ならびに頭蓋骨の超音波透過性データを蓄積し、血栓溶解に必要な超音波特性と併せ、最適な振動子、変調を有する駆動装置設計を進める。

E. 結論

変調による定在波発生防止は有効であり、振動子はローQ材活用が有用であることを確認した。

簡便利用のゾーン照射には、振動子サイズの選定設計が重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

<参考文献>

1) Daffertshofer

Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia: increased risk of hemorrhage with combined ultrasound and tissue plasminogen activator: results of a phase II clinical trial.36.1441-1446 (2005)

2) 古幡博、特集 脳梗塞急性期治療 - t-pa 静注療法 - 超音波による血栓溶解、最新医学 63(7) 92-104 (2008)