

図13(B)は実測値比較である。Whiteらは頭蓋骨に対し600kHz以上の周波数のみを測定し、超音波透過率の周期的変動は観測されなかった。一方、我々の骨ファントムを用いた結果では300kHz~700kHzの範囲で周波数増大による超音波透過率の減少は無く、大きな周期的変動のみが観察された。測定の重なっている周波数は600~700kHzのみであるが、両者の超音波透過率挙動の違いは明らかである。また、図13(B)でのデータは、本研究は単純な構造の骨ファントムにおける結果であり、Whiteらの結果はヒト頭蓋骨の結果であるが、以上のことより、「超音波の頭蓋骨透過は、周波数が大きいほど小さくなり、また骨が厚くなるほど小さくなる」との従来の認識は、少なくとも500kHz周辺の中周波数超音波を骨厚が薄いこめかみ部分に照射する際には改めることが、必要に思われる。この「必要に思われる」という表現が「必要である」に変わるのは、単純な平板構造の骨ファントムでは無く、ヒト頭蓋骨において大きな超音波透過率変動が示されたときであり、以下の(3)で実施する。

(2) 皮膚厚変化による超音波透過率変動

昨年度に、皮膚厚に相当するプローブとファントム間の距離を変化させると超音波透過率が大きく変動し、その変動が周波数変調超音波を用いることで顕著に小さくなることを報告したが、そのプローブとファントム間の距離は0~2.2mmの間の変化に限られていた。今年度は、現代日本人のこめかみ部の皮膚厚の平均値12mm周辺を検討すると共に、理論計算と比較した。500kHzの場合の計算結果を図14に、実測の結果を図15に示す。比較すると、計算の結果と実測の結果は、超音波透過率の極大極小を示す距離、超音波透過率の絶対値、変動周期のすべてにおいて極めて高い一致をみている。

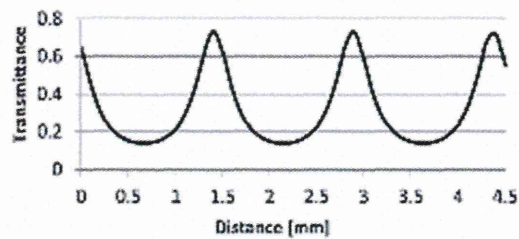


図14 皮膚厚相当距離を変化させた場合の超音波透過率の計算値。(骨厚：2mm、周波数：500kHz)

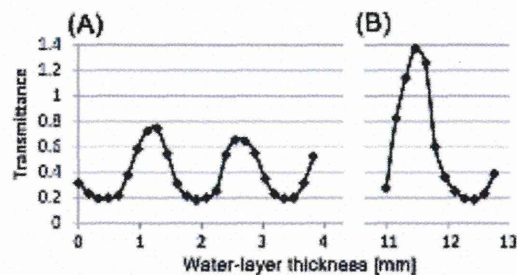


図15 皮膚厚相当距離を変化させた場合の超音波透過率の実測値。(骨厚：2mm、周波数：500kHz) (A) 皮膚厚相当距離4mm未満、(B) 皮膚厚相当距離12mm周辺

以上の実験結果から、本研究で用いた計算法と骨ファントムによる実験が共に、有効かつ適切な方法であることが実証された。また、12mm付近の図15(B)では、プローブ内部の共鳴によって超音波透過率が1を越えてはいる点を除いては、図15(A)と類似性が極めて高く、同じ周期の変動を示した。皮膚厚は骨厚と主に、患者毎に異なるパラメーターであり、この値の違いによる超音波透過率変動は、臨床的に大きな重要性を有することをこの結果は示す。

この骨ファントムの結果を踏まえて、ヒト頭蓋骨片を用いて同様の実験を行った。結果を図16に示す。500kHzの正弦波を照射した実線のプロットでは、骨ファントムでの超音波透過率変動に比べると小さめではあるが、それでも2倍以上の超音波透過率変動が観察された。この実験では、皮膚厚に相当する距離は日本人の

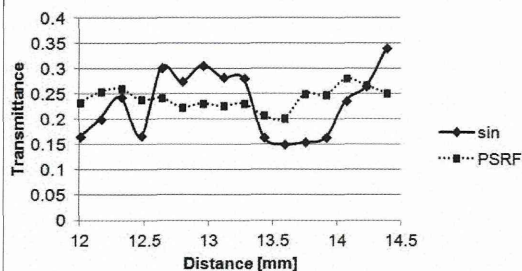


図16 ヒト頭蓋骨の骨片での透過率変動平均的な値の範囲で行っている。また、超音波透過率変動挙動もファントムの場合のように高度に規則的なものではなかった。骨の複雑な形状により、超音波が散乱・屈折する影響と考えられる。一方、周波数変調 (PSRF, $500 \pm 100\text{kHz}$) をかけると、骨ファントムの場合と同様に顕著に超音波透過率変動が小さくなった。

以上のヒト頭蓋骨片を用いた実験結果から、ヒト頭蓋骨での超音波透過率測定を行うに当たり次の事柄が考察された。

- 多数の測定点のデータを蓄積すること
- 超音波が屈折しないで直進する測定点を探すこと
- 測定点の選び方をシステム化すること (→再現性のある測定点選択法の確立)

以上の事柄を踏まえてヒト頭蓋骨標本による測定を行った。

(3) ヒト頭蓋骨の超音波透過率測定

ヒト頭蓋骨のデータを蓄積するに当たり、これまで余り注意を払っていなかったバースト波の照射条件について検討を加えた。

超音波照射には連続波とバースト波の2種類の方式があり、血栓溶解性能、発熱、生体に対する障害作用などを検討して、選択させるがこれまでの慈恵医大の研究・開発では連続波で行われてきた。よって、今後より良き方式としてバースト波が選ばれる可能性はあるものの、連続波での結果が基準となることには疑いは無い。一方、ハイドロフォンによる超音波強度の測定は、バースト波で行われる。ハイドロフォンはその構造上、

極めて脆弱であるために、連続波の測定を続けることが難しいためである。

また、周波数変調では500kHzの5周期分の10 μs 毎に周波数切り替えをする条件を中心に検討しているが、その中で1 μs 毎の周波数切り替えの場合に比べて、超音波透過率変動挙動の周期性が低いことが観察された。この観察事項は、バースト波の場合に、超音波発信が安定しない状態があることを示唆した。そこで、オシロスコープによる波形観察と、ハイドロフォンによる超音波強度測定を組み合わせ、観測条件の最適化を実行すると共に、連続波とバースト波の差異について検討を加えることとした。

図17に500kHzのバースト波のオシロスコープ像を示す。左からの時間経過を見ると、発信初期の赤い矢印時間帯では強度が安定していないことがわかる。一定時間が経過した青色矢印の領域になると強度が安定する。ハイドロフォンでの測定条件にPhaseがある。バースト波の発信からどのくらい遅れて受信を開始するかを規定する。10°で10 μs の遅れとなる。これは500kHzでは5波長分に相当する。表現法はマイナスを伴い、-10°で5波長遅れての受信開始、-60°で30波長遅れての受信開始を意味する。

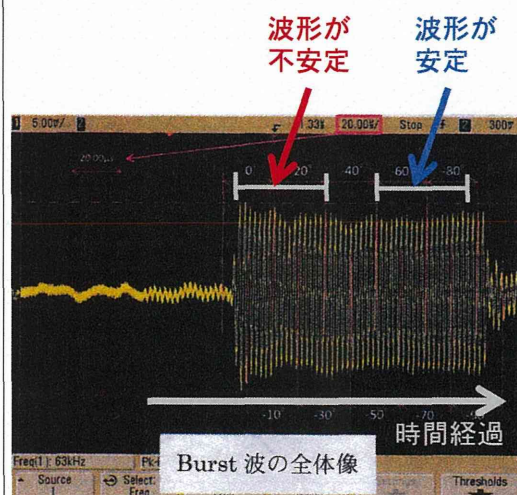


図17 500kHz超音波のオシロスコープ像

このPhaseを -10° から -80° まで変えて、頭蓋骨での超音波透過率を皮膚厚相当の距離を変えて測定し、連続波の場合と比べたのが図18である。 -10° から -30° までの遅れが小さい条件では、超音波透過率変動が連続波に比べて著しく小さくなっている。これは、不安定な超音波発信が原因である。Phaseを -40° から -80° に設定すれば、超音波透過率変動挙動は安定し、連続波に近いものとなる。(連続波の -10 と -80° とは完全に重なっている) この結果から、バースト波の観測のPhaseを -50° よりマイナス側に設定することで、安定な測定が得られ、その結果は連続波の結果と見なすことができることが判明した。以降の頭蓋骨の測定は、すべてこのPhase条件を満たすことで安定な結果を得ることができた。

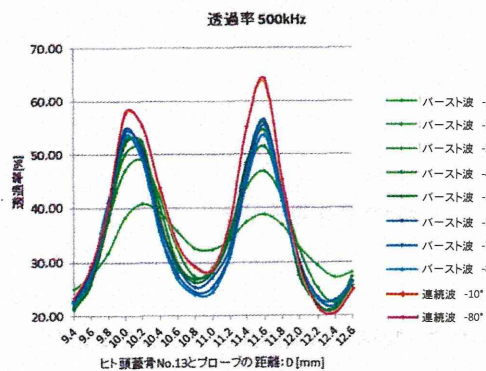


図18 観測Phaseの角度を変えた場合の超音波透過率の挙動

測定ポイントの設定

井口のカラー Doppler の臨床的経験から頭蓋骨こめかみ部に測定候補点を3点設定した。この候補点から、B. 研究方法の(3)に記述した方法で、骨による屈折の影響のない、測定ポイントを設定した。一例としてNo. 13の右側の場合を図19に示す。青色のR1' ~ R3' が候補点で、赤色のR1 ~ R3がそこから導き出された測定ポイントである。

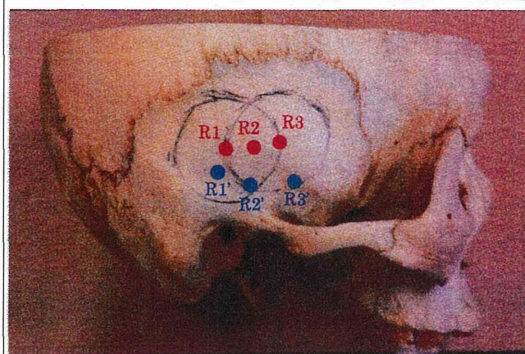


図19 測定ポイントの設定 (No. 13頭蓋骨) 青色が候補点で、赤色が測定ポイント

候補点から測定ポイントまでの距離は以下のようになっている。

- ・ R1' -R1: 7mm
- ・ R2' -R2: 11mm
- ・ R3' -R3: 14mm

この測定ポイントを探す過程は、臨床でカラー Doppler の超音波プローブを動かしながら最も信号が強くなる点を探す過程と同じように考えられるが、用いる周波数が異なるので現段階では確定的ではない。

図20に示す様に、この各測定ポイント(中心の赤色の丸)から上下に2mmずらした点の4点(白抜きの点)を含めて5点で測定を行った。すなわち、一つの頭蓋骨の片側で $3 \times 5 = 15$ 点の測定を行った。2つの出発点から1つの測定点に収束したり、頭蓋骨切断面の延長上に測定ポイントがある挙動などを取ることもあり、一つの頭蓋骨の片側で15点よりも少ない数の測定となることもあった。

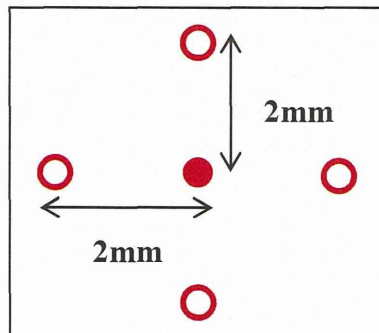


図20 測定点の設定

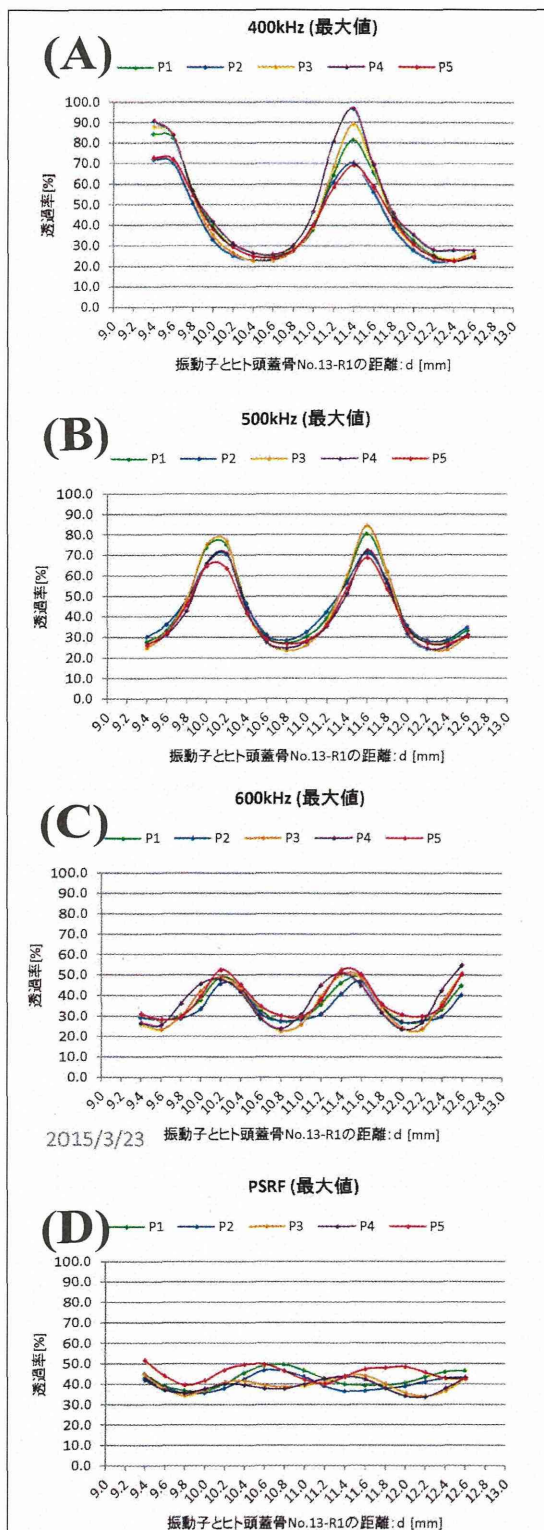


図21 皮膚厚による超音波透過率の変動
(頭蓋骨No. 13、R1測定ポイント)
(A) 400kHz正弦波、(B) 500kHz正弦波、
(C) 600kHz正弦波、(D) 500±100kHzの周波数変調波 (PSRF)

頭蓋骨超音波透過率の変動

上記の過程を経て設定した測定点について、

(1) 皮膚厚に相当する超音波プローブ表面と骨表面の距離を11.0mmから前後2.0mmで変化させる、

(2) 400kHz, 500kHz, 600kHzの正弦波と500±100kHzの周波数変調波を比較するの検討を行った。

(超音波は10μsのバースト波) No. 13の頭蓋骨のR1測定ポイントの結果を図21に示す。P1は中心の測定ポイントであり、P2～P5はP1から上下左右に2.0mm離れた測定点である。

- (a) 頭蓋骨においても相当大きな超音波透過率変動が観察された。400kHzでは最大で3.8倍もの強度差があった。
- (b) 一つの測定ポイント (P1) の周辺の4つの測定点 (P2～P5) では似た変動を示した。正弦波の (A)～(C) では超音波透過率の極大や極小を示す皮膚相当距離はどの点でもほぼ同じであった。極大の超音波透過率に差があるものの、大きな変動を示すことにおいてはどの点も同じであった。

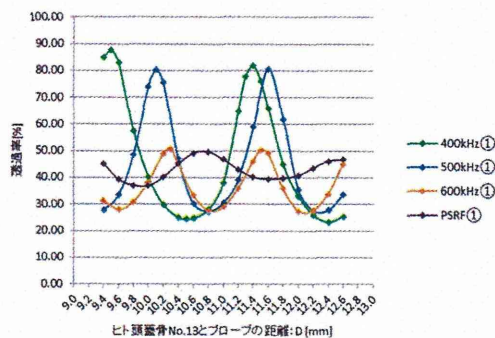


図22 超音波種類による超音波透過率変動の比較 (頭蓋骨No. 13、R1測定ポイント、P1測定点)

(緑) 400kHz正弦波、(青) 500kHz正弦波、(黄) 600kHz正弦波、(紫) 500±100kHzの周波数変調波 (PSRF)

2mm離れた5つの点の測定を行った意味は、臨床においては常に最適な点から照射位置がずれる可能性を考慮したことである。以上の結果は、頭蓋骨超音波透過率の変動が、超音波プローブの極めて特殊で狭い範囲の場所に設置された希な場合に起きる現象ではなく、常時起こる現象であることを示している。

(c) 超音波透過率変動の大きさは400kHz > 500kHz > 600kHz > PSRF変調波となっている。図22には測定点P1における各超音波の変動を比較した。超音波透過率が極大や極小になる距離が周波数によって異なっていることがわかる。

次に、比較的観察された変動が小さかったNo. 13頭蓋骨のL2 (=L3, 2つの候補点からの選択過程で1点に収束した)の超音波透過率変動を図23に示す。

- 先のR1に比べて全体的に超音波透過率は低めであり、変動も小さい。
- 周波数の比較では、600kHzが最も超音波透過率変動が大きい点がR1と異なっている。
- 400kHz, 500kHz, 600kHzの正弦波に比べてPSRF変調波が最も超音波透過率変動が小さいことはR1と共通している。

以上の図21～図23で代表例を示した超音波透過率透過率の変動をまとめたのが表1 (No.13)と表2 (No. 4737とNo. 4759)である。

各測定ポイント (No. 13のL1など) 毎に5つの測定点があるが、表にはその5点の中で最大超音波透過率と最小超音波透過率の比が最も大きかった1点を選んでいる。超音波照射の有効性と安全性という観点からは、この比が大きい場合に注意を払う必要があるからである。また、平均値は最大と最小の平均ではなく、表記した測定点のすべての超音波透過率の平均である。比は、表記した最大値と最小値の比である。

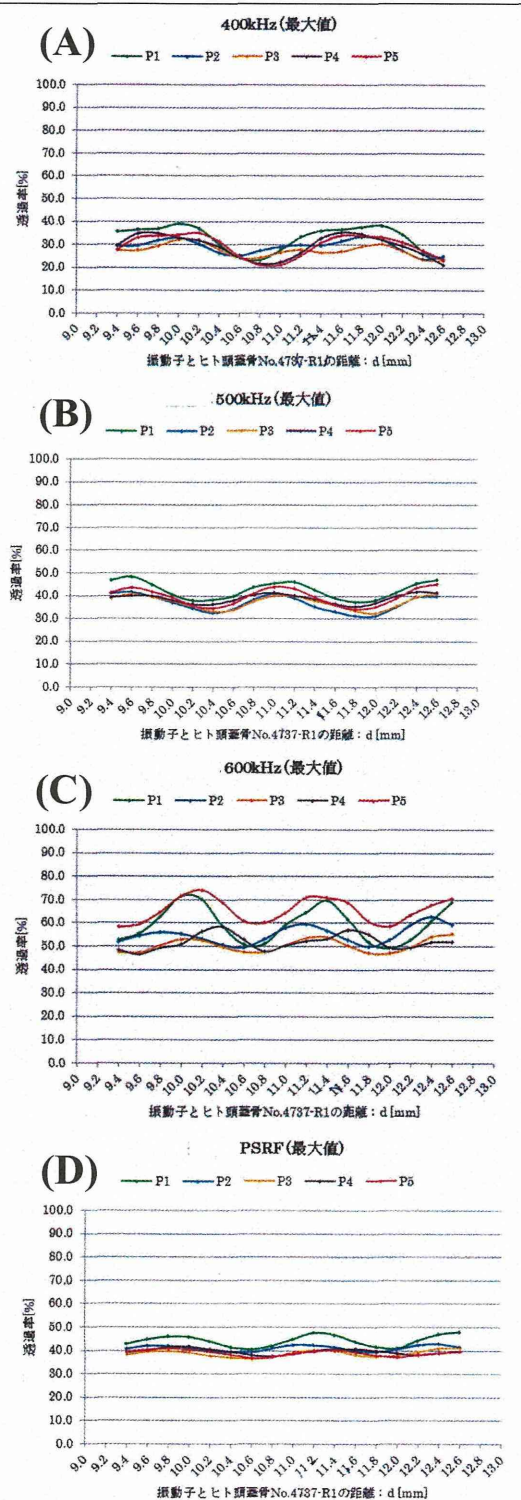


図23 皮膚厚による超音波透過率の変動 (頭蓋骨No. 4737、R1測定ポイント)
 (A) 400kHz正弦波、(B) 500kHz正弦波、
 (C) 600kHz正弦波、(D) 500±100kHzの周波数変調波 (PSRF)

表1 No. 13頭蓋骨の超音波透過率変動

頭蓋骨		No. 13				
測定ポイント		R1	R2	R3	L1	L2
400kHz	最大値	96.8%	63.6%	57.0%	90.2%	38.0%
	最小値	22.7%	23.8%	27.8%	21.4%	19.8%
	平均値	44.8%	40.9%	39.4%	40.9%	28.8%
	比	4.26	2.67	2.05	4.21	1.92
500kHz	最大値	84.5%	64.4%	34.8%	61.8%	31.0%
	最小値	23.7%	27.3%	19.6%	24.6%	16.9%
	平均値	42.6%	42.6%	26.6%	38.7%	21.8%
	比	3.57	2.36	1.78	2.51	1.83
600kHz	最大値	54.7%	60.8%	32.9%	67.4%	37.8%
	最小値	22.8%	25.0%	19.0%	37.4%	15.6%
	平均値	36.0%	43.2%	25.9%	52.5%	25.6%
	比	2.40	2.43	1.73	1.80	2.42
PSRF	最大値	51.7%	57.6%	35.9%	51.8%	35.6%
	最小値	33.8%	31.5%	26.1%	34.2%	20.4%
	平均値	41.4%	44.7%	30.9%	41.7%	27.6%
	比	1.53	1.83	1.38	1.51	1.75

注) L3はL2と同一の測定ポイントに収束した。

表2 No. 4737とNo. 4759頭蓋骨の超音波透過率変動

頭蓋骨		No. 4737			No. 4759			
測定ポイント		R1	R3	L2	R1	R2	R3	L1
400kHz	最大値	39.1%	7.8%	37.8%	33.9%	27.9%	17.4%	62.4%
	最小値	21.2%	2.8%	24.3%	9.5%	17.8%	12.4%	39.6%
	平均値	29.7%	4.7%	31.3%	17.5%	22.4%	15.3%	45.7%
	比	1.84	2.79	1.56	3.57	1.57	1.40	1.58
500kHz	最大値	48.5%	3.0%	50.7%	25.9%	15.4%	19.5%	42.2%
	最小値	31.3%	0.8%	27.2%	5.1%	8.9%	12.7%	27.3%
	平均値	39.0%	1.6%	38.1%	12.0%	12.0%	16.9%	35.3%
	比	1.55	3.75	1.86	5.08	1.73	1.54	1.55
600kHz	最大値	74.1%	2.2%	57.6%	14.1%	10.6%	12.3%	36.4%
	最小値	46.5%	0.6%	33.9%	6.9%	6.1%	7.4%	17.2%
	平均値	56.4%	1.3%	45.8%	10.0%	8.9%	9.7%	24.5%
	比	1.59	3.67	1.70	2.04	1.74	1.66	2.13
PSRF	最大値	48.2%	2.6%	47.3%	19.4%	12.3%	24.4%	51.3%
	最小値	36.4%	0.7%	29.0%	9.4%	9.6%	16.9%	36.6%
	平均値	40.6%	1.6%	37.6%	12.8%	11.2%	19.6%	44.3%
	比	1.32	3.71	1.63	2.06	1.28	1.44	1.40

注) No. 4737のR2はR1と同一の測定ポイントに収束した。No. 4737のL1は切断頭蓋骨の範囲に測定ポイントが得られなかった。No. 4737のL3はL2と同一の測定ポイントに収束した。
No. 4759のL2とL3は未測定。

表1と表2の合計12の測定ポイントの平均値と比の平均と標準偏差をまとめたのが表3である。

表3 頭蓋骨の超音波透過率変動の比較

	透過率	比
400 kHz	35.1 ± 13.8 %	2.45 ± 1.05
500 kHz	31.5 ± 14.9 %	2.43 ± 1.13
600 kHz	38.4 ± 24.6 %	2.11 ± 0.58
PSRF	36.5 ± 18.0 %	1.74 ± 0.66

注) 値は平均±標準偏差で表示

表3では、PSRF変調とすることにより超音波透過率の比(最大値と最小値の比)が正弦波のどの周波数の場合よりも小さくなっていた。500±100 kHzのPSRFの中心周波数である500kHzの正弦波と対応するt-検定で比べるとp<0.05と有意に最大と最小超音波強度比が減少したことがわかる。周波数変調超音波を用いれば、頭蓋骨を透過して脳組織に照射される超音波強度の変動を小さくし、より安全で有効な超音波血栓溶解促進療法の実現に結びつくといえる。次に、超音波透過率と照射部位の骨厚との比較を試みた。骨厚は、狭い部分の厚みを計測できるマイクロメーターを用いたが、首尾良くマイクロメーターを挿入して計測できたのは5点であった。以下のその数値を表4にグラフを図24に示す。

表4 骨厚と超音波透過率の関係

測定ポイント	骨厚(mm)	平均超音波透過率(%) ^{注1)}
No. 13 L1	1.77	34.2
No. 13 L2	1.37	20.4
No. 4737 R1	1.13	40.6
No. 4737 R3	1.94	1.6
No. 4737 L2	2.12	37.6

注1) PSRFの平均値

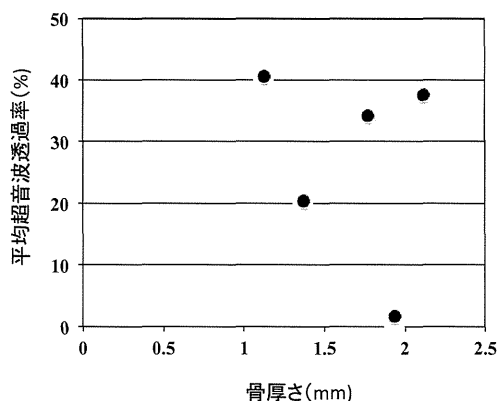


図24 骨厚さと超音波透過率の関係

図24を見るとプロット数は少ないものの、骨の厚さと超音波透過率の相関は無いように見える。尚、平均超音波透過率としてはPSRFの平均値を用いた。表1及び表2から見て取れるようにPSRFの値が各測定ポイントの全般的な超音波透過率の大小を良く表現しているからである。

この結果からも従来は「常識」と考えられた「超音波透過率は骨が厚くなるほど小さくなる」ということが正しくなく、周波数や皮膚厚などによって変動する要素の方が支配的であり、安全で有効な超音波照射を実現するためにはより重要な要素であると言える。

E. 結論

経頭蓋超音波透過率に関して骨ファントム板を用いたモデル実験を行い、ヒト頭蓋骨の実測をおこなった。そして、超音波透過率が変動することと、周波数変調による平準化が可能なことが定量的に示された。また、超音波透過率が平均35%程度との知見が得られ、この値は今後の治療機器開発を設計する上での重要な指標となるであろう。

今後、頭蓋骨の測定箇所を臨床で使用するポイントに絞ってさらなるデータ取得を続け、多数の頭蓋骨の測定が計画されている。

超音波血栓溶解促進療法に用いる経頭蓋超音波において、変調駆動は、当初は定在波抑制のために導入されたが、その他に、コールド・ホットスポット解消効果、超音波透過率平準化効果があることが判明した。変調駆動方式を積極的に利用した治療機器は、海外を含めてこれまでになく、本研究の成果は前例のない斬新な治療機器に結実するであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Osamu Saito, Zuojun Wang, Hidetaka Mitsumura, Takeki Ogawa, Yasuyuki Iguchi, Masayuki Yokoyama: Substantial fluctuation of acoustic intensity transmittance through a bone-phantom plate and its equalization by modulation of ultrasound frequency: Ultrasonics 59 (2015) 94-101.

2. 学会発表

- 1) Osamu Saito, Zuojun Wang, Hidetaka Mitsumura, Takeki Ogawa, Yasuyuki Iguchi, Masayuki Yokoyama: Equalization of transcranial ultrasound Transmissivity by random modulation: 19th meeting of European Society of Neurosonology and Cerebral Hemodynamics. 2015年5月ローマ (イタリア)
- 2) 横山 昌幸、齋藤 理、王 作軍、小川 武希、三村 秀毅、井口 保之、「超音波頭蓋骨透過率の大きな変動と変調による平準化」第40回日本脳卒中学会総会 2015年3月広島

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

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

ヒト血栓の作り方及び超音波血栓溶解促進効果の定量評価研究

研究代表者	井口 保之	東京慈恵会医科大学	神経内科学	教授
研究分担者	小川 武希	東京慈恵会医科大学	救急医学	教授
研究分担者	三村 秀毅	東京慈恵会医科大学	神経内科学	助教
研究分担者	横山 昌幸	東京慈恵会医科大学	ME研究部	准教授
研究分担者	幸 敏志	田辺三菱製薬株式会社	マネジャー	
研究協力者	王 作軍	東京慈恵会医科大学	ME研究部	研究員

研究要旨 超音波血栓溶解促進療法の急性期脳梗塞への早期臨床応用が期待されている。ただし、超音波照射条件にはパラメーターが多く、現状の評価方法は精度と効率が不十分で、最適な超音波条件は判明していない。われわれはすでに牛及びヒト血漿血栓を用いて、測定精度が高い効率的な2D式超音波血栓溶解評価システムを開発し、ヒト血漿血栓に対しての超音波促進能を評価した。本研究はさらにヒト全血を用いて、シート状な均一なヒト全血血栓の作製及びその厚さ検出法を確立した。さらに、これらの技術を利用して、超音波パラメーターのヒト全血血栓溶解促進作用に及ぼす影響を解析した。

A. 研究背景と目的

WHOの統計データによると、世界で毎年およそ1500万人が新規に脳卒中に罹り、その中、500万人が死亡、500万人が身体に障害が残る。脳卒中のおよそ67-87%が虚血型で、病因はほとんど血栓に由来する。血栓で閉塞した重要血管の再開通の可否及び再開通までの経過時間が急性期脳梗塞患者の予後のカギである。急性期脳梗塞患者に対して、現在まで、FDA、欧州、及び日本で許可されている唯一の血栓溶解治療薬はrecombinant tissue plasminogen activator (rt-PA)であるが、その治療効果はいまだに十分とは言えない。例えば、再開通率は内頸動脈閉塞に対してわずか10%で、大脳中動脈閉塞の場合でも30%位に留まっている。しかも、rt-PAの投与によって脳内出血のリスクは有意に増大している。

このrt-PAの血栓溶解治療効果を高める医療として期待されているのが、超音波照射を併用することによるrt-PA血栓溶解促進技術である。In vitro、in

vivo動物実験で、超音波照射が血栓溶解を促進させることが実証されていて、一部臨床試験においても脳血管再開通率の向上が観察されている。ただし、照射する超音波にはパラメーター（周波数、強度、波形、パルス長さ、duty cycle、ビーム太さなど）が多くて、現時点でも血栓溶解促進に最適な超音波条件は判明していない。

現在、超音波血栓溶解促進作用の評価法として血栓重量法、アイソトープ法、FDP法、顕微測量法などがあり、各々利点もあるが、問題点もある。例えば、最も常用されている重量法では、重量を測定する前後に血栓を移動する際の機械的介入、付着した水分の除去など人為的誤差が大きい。しかも血栓重量の変化率は血栓の形、大きさ、表面積などに依存し、違う形の血栓同士の比較は難しい。さらに、血栓表面の各部分が受ける超音波照射強度は通常異なるから、超音波強度と溶解促進率の間の正確な関係は把握しにくい。

また、以上に述べた手段はほとんど一つの血栓から一つのデータしか得られないため、超音波強度と溶解促進率の関係解析には多数回の実験が必要で、実験の効率が悪い。それで、我々はウシ及び血漿から作製した血栓を用いて新しい2D式超音波血栓溶解評価法を開発した。この新方法では、照射前後ごとに一つのシート状血栓から、百個単位の関心領域 (Region of Interest, ROI) から血栓厚さのデータを取得可能で、各領域の血栓厚さ変化と照射強度を対応させることで、超音波照射強度と血栓溶解促進率の関係を効率よく分析できる。しかも、血栓の厚さを分光学的に計測するために、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た。

しかし、血漿血栓の溶解特性は必ずしも全血と一致しないと考えられる。本研究はヒト全血を用いて、安定かつ均一なヒト全血血栓の作り方を検討した。続いて、ヒト全血血栓の吸光特徴を分析し、血栓の厚さの安定した測定ができる検出波長を見出した。さらに、この最新技術を利用して、開発中の経頭蓋超音波の多種パラメーターとヒト血栓溶解促進作用との関係を解析した。特に、超音波強度及びDuty Cycleの影響を検討した。

B. 研究方法

(1) 血栓セル

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ため、超音波音場への影響がほとんど生じない血栓セルを開発した。このセルは一對のアルミフレーム (外枠 80mm×80mm、開口部 50mm×50mm) を含んでいる。そのうち

の一つは厚さ1mmでカバーフレームとし、もう一つは厚さ2mmで本体フレームとする。カバーフレームの裏側に厚さ25 μ mのポリプロピレン (PP) フィルムがセルの前壁として貼ってあり、主体フレームの裏側には1mmのシリコンのインサート及び50 μ mのポリスチレン (PS) フィルムが貼ってある。この PS フィルムがセルの後壁とする。蓋フレームと主体フレームを二つのクランプで固定すれば、PPとPSフィルムの間に厚さ3mm、広さ50mm×50mmの血栓溶解空間が得られる。

(2) 血栓作製法

抗凝固剤CPDA-1添加したヒト全血 (コード: 12081645) をコージンバイオ株式会社から購入。4℃で保存、採血日から35日以内使用した。

血栓セル本体の上、PPフィルム (40mm×40mm×25 μ m (厚さ)) がシリコンスペーサーと平行棒の支持下で底膜 (PSフィルム) から1.5mmの所にかけて (図1)。この PPフィルムとPSフィルム間に血栓形成用混合液 (抗凝固剤CPDA-1添加ヒト全血+0.4M塩化カルシウム+20NIHU/ml牛トロンビン、比例18:1:1) を2.3ml入れ、室温5分間後37℃湿気ボックスに入れて30分で成熟させた後、PPフィルムを外して、シート状全血血栓がセル本体のPSフィルム上に作製できた。

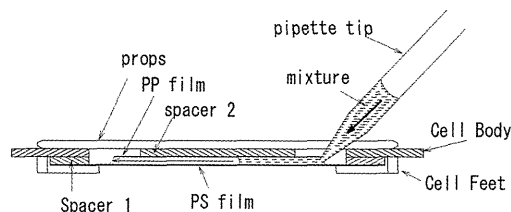


図1 血栓作製法 セル本体とその上にか
けたPPフィルムの間にトロンビン添加し
た血液混合液をピペットで注入。

(3) 血栓吸光spectrum及び厚さ測定

血栓吸光度spectrum及び厚さは微小部位マッピング装置(日本分光株式会社)を用いて測定した。(図2)

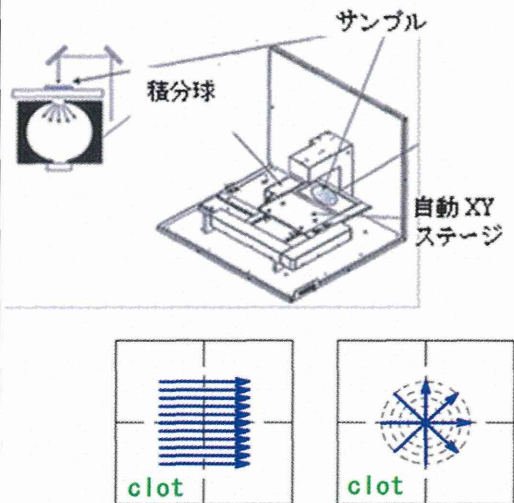


図2 微小部位マッピング装置

図2上に示す様に分光した光ビーム開口と光センサー(積分球)の間に自動XYステージが設けてある。血栓セル(サンプル)を自動XYステージに乗せ、コンピュータのコントロールで移動させて、その各関心領域(ROI)のspectrum及び吸光度を測定できる。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。図2下に示すように、自動XYステージは必要に応じ格子状(検量線セルの場合)または放射状(サンプルセルの場合)スキャンができる。

(4) 検量線作成

検量線用セル(図3)の上下2層の透明PSシートの間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、普通の血栓セルと同様な条件下で楔状の血栓を作成した。検量線用セルを上記血栓厚さ測定装置に乗せて図2下左に示す様に横方向にスキャンし、各々の厚さの血栓と蒸留水での吸光度測定値の差分をとり、各厚さに対応する血栓吸光度が求められた。

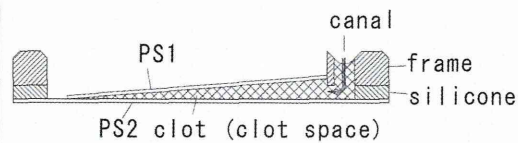


図3 検量線セル構造

(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)で任意に調整可能で、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(図5)。また、同時に超音波暴露血栓、非暴露血栓を同時に検証できるようにした。超音波照射は、37℃の水槽内にプローブ先端を水面より2mm程度沈めて照射を行った。その際、超音波の反射を防ぐため、水槽底面には10mmの専用超音波吸音材(EUA201A型, EASTEC社)を2枚敷いた。

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。

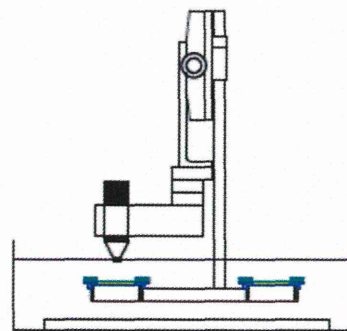


図4 超音波照射装置

(6) 統計学的評価

本研究は、超音波音場の対称性を利用し、セル中心から同じ距離の測定ポイントを1組とした。データはmean±SDで表示した。超音波照射の有効性はDunnett法を用いて検定し、 $p < 0.05$ を有意とした。