

間に 40%の第二塩化鉄をしみこませたる紙を挟み込み 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。血栓作成後、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 (VEVO2100)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ソフト (Image J)で解析した。

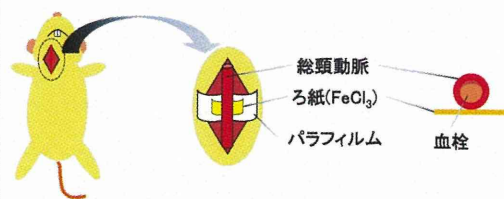


図 4 2 塩化鉄誘発血栓作製法

また、電気刺激誘発血栓を作製して、その血栓への結合を評価した。ラット大腿動脈の心臓側および抹消側を針金を挟み結紮し、血管の3/4程度をせん断。血管の切り口より陽極に繋いだ直径0.3 mmの針金を3~5 mm程度挿入し、陰極側の針金を皮膚に接触させ10分放置。針金を抜去後、血管の切り口より1 mm程度心臓側で結紮し、電気刺激以前に結紮しておいた心臓側の糸を切り、血流を再開通させる。上記の塩化鉄誘発血栓の場合と同様に小動物用超音波画像診断装置 (VEVO2100)にて閉塞動脈であることを確認後、バブルリポソーム投与前と投与後の血栓を撮像し、血栓の輝度を Image Jにて解析した。Dose: 1 mg/mL, 500 mL

(4) RGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤化と復水処理

RGD-バブルリポソーム懸濁液を9%スクロースで希釈して1 mg/mLとし、2mLをバイアル瓶に入れた。その後、バイアル瓶内の気相部分をパーフルオロプロパン7.5mLで

置換し、キャップした。さらにパーフルオロプロパン10 mLで加圧し、バス型ソニケーターを用いて超音波照射した。その後、バイアル瓶のキャップを開け、液体窒素を用いて凍結した。このバイアル瓶を凍結乾燥器 (EYLA FDU-1100, DRC-1100) にセットし、凍結乾燥した後に、パーフルオロプロパンで常圧にし、さらに7.5mLのパーフルオロプロパンで加圧した。調製した凍結乾燥RGD修飾バブルリポソームを室温にて長期保存した。

使用直前に超純水2 mLを加え攪拌することで復水した。腹水処理後、HUVEC細胞との結合性を、4℃、15分間接触させてフローサイトメトリーで評価した。

C. 研究結果

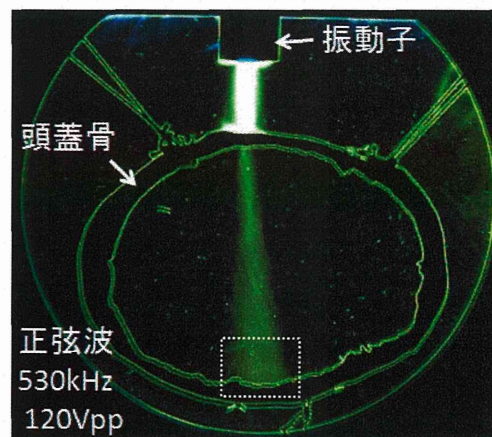
1. 超音波の効果と安全性

(1) 超音波駆動条件の最適化と頭蓋骨透過性の測定

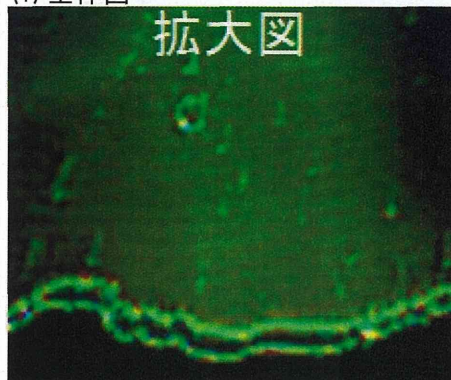
(1-a) 雑音変調方式による定在波抑制シュリーレン画像の一例を図10に示す。

図43には、上方に配置された振動子から発せられた超音波が、輪切りにされた頭蓋骨の側頭部を通過している様子が示されている。この画像から頭蓋骨透過前と後の輝度に大きな差があり、頭蓋骨を透過すると超音波が著しく減衰することが分かる。(周波数が530kHzより高ければもっと減衰が大きいことが知られている) また、頭蓋骨を透過するとビーム幅が狭くなっていることが分かる。これは、側頭骨の厚さの違いにより、ビームが通り易いところが狭いためと考えられる。さらに、頭蓋骨の透過前後でビームの進行方向が変わり、屈折が起きていることが見られる。これは頭蓋骨の凹凸によると考えられる。(この場合では、ビームは脳の中心方向に向かい、中大脳動脈に向かうため都合が良い。) 図10(ii)には(i)において四角で囲った領域を拡大して示している。この図から、明暗の縞模様ができおり、定在波が発生していることが確認される。縞模様が直線的でなく、ゆるやかにカーブしているのは、頭蓋骨の内壁が平面でなく、曲率を持ち、凹凸もあるためである。(平坦な反射板で超音波を反射させた実験では縞模様は直線的になっている)

PMNによって定在波を抑制した結果の一例を図44に示す。図44では判別しにくい位相角度の幅を増していくと、輝度は減少するが、定在波は抑制される。角度偏差を変えていった場合のSWRの変化を図45に示した。角度偏差を大きくしていくと ± 80 度前後でSWRが大きく減少することが判明した。



(i) 全体図



(ii) 上図において点線で囲まれた領域を拡大

図43 シュリーレン画像の一例 超音波が可視化される。振動子は上田日本無線社製の直径16mmの円形。振動子のピークは455kHz、-6dBダウンの帯域は395-570kHz。

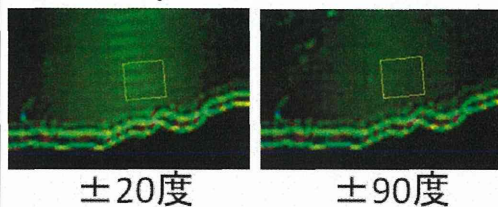


図44 PMNによる定在波抑制 左図は位相角度を ± 20 度とした場合。右図は ± 90 度とした場合。振動子は上田日本無線社製の 24×24 mmの正方形。振動子のピークは535kHz、-6dBダウンの帯域は337-655kHz。印加電圧は55Vpp、周波数は500kHzとした。

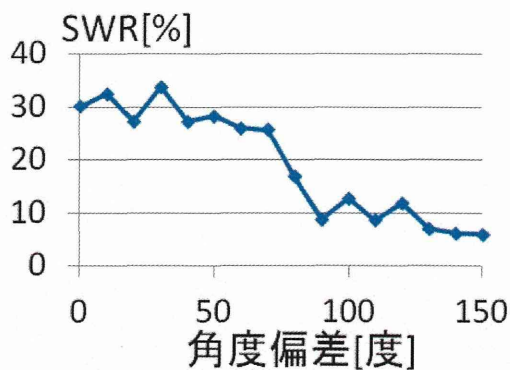


図 4.5 PMNの場合のSWR SWRを算出するときのROIは図 6 中に黄色の枠で示した

次に PSRF の結果の一例を図 4.6 に示す。PSRF は角度偏差の大きい ($\sim \pm 120$ 度)PMN に比べ、超音波強度の減衰が小さい。図 13 中の ROI に対して SWR を算出した結果、左の場合には 8.2%、右の場合には 8.1%となった。変調をかけない正弦波の場合には 30%であるため、定在波が抑制されていることが示された。

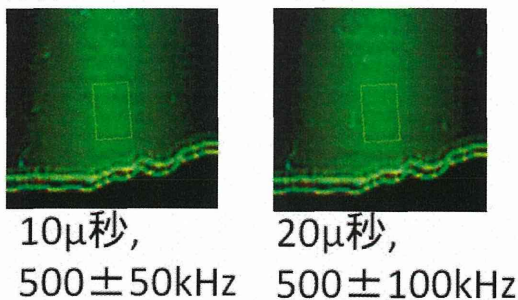


図 4.6 PSRFによる定在波抑制 左図は周波数の範囲を $500 \pm 50\text{kHz}$ とし、周波数の切替を 10μ 秒毎におこなった場合。右図は周波数の範囲を $500 \pm 100\text{kHz}$ とし、周波数の切替を 20μ 秒でおこなった場合。用いた頭蓋骨、振動子は図10のものと同一。

RSBICによる定在波抑制の結果を図 4.7 に示す。縞模様の明暗差がほとんどなくなり、著しく定在波が抑制されている。図中のROIに対してSWRを求めると6.8%となった。

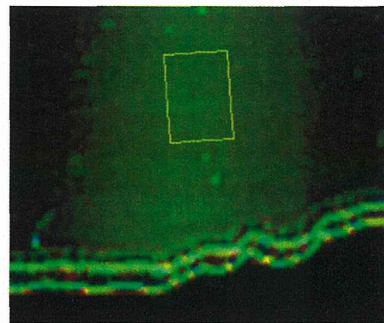


図 4.7 RSBICによる定在波抑制 用いた頭蓋骨と振動子は図11、図13と同じ。印加電圧は 80Vpp 。雑音の帯域は $50\text{-}200\text{kHz}$ とした。

近距離ホットスポット抑制

定在波のように反射は無くとも、超音波プローブから近距離で、ホットスポットと呼ばれる超音波強度が生体に障害を与えるほど、特異的に強くなる箇所が生成する場合がある。安全な生体への照射の観点からは、このホットスポットの生成は避けたいところである。超音波変調によって、ホットスポットの生成が抑制できるかを検討した。

図 4.8 に正弦波駆動と雑音変調RSBIC駆動の場合の音響強度を測定した結果を示す。図 4.8 の左側の列は正弦波の場合であり、上から順に振動子面からの距離が10, 25, 40, 60mmとなっている。振動子面からの距離が近いときには、多数のホット・コールドスポットが存在するが、振動子面から離れるにつれて、ホット・コールドスポットの数が減少していき、60mmのところでは、ピークが中心にあるのみである。なお、 $30 \times 30\text{mm}$ の振動子を 500kHz で駆動した場合、近距離場は 80mm 程度までとなる。これ以後は滑らかな分布となる。40mmの位置で中心の強度が弱くなっている。超音波血栓溶解療法におけるターゲット位置は頭蓋骨から $45 \sim 55\text{mm}$ の場所であり、40mm近傍のコールドスポットは懸念材料となる。

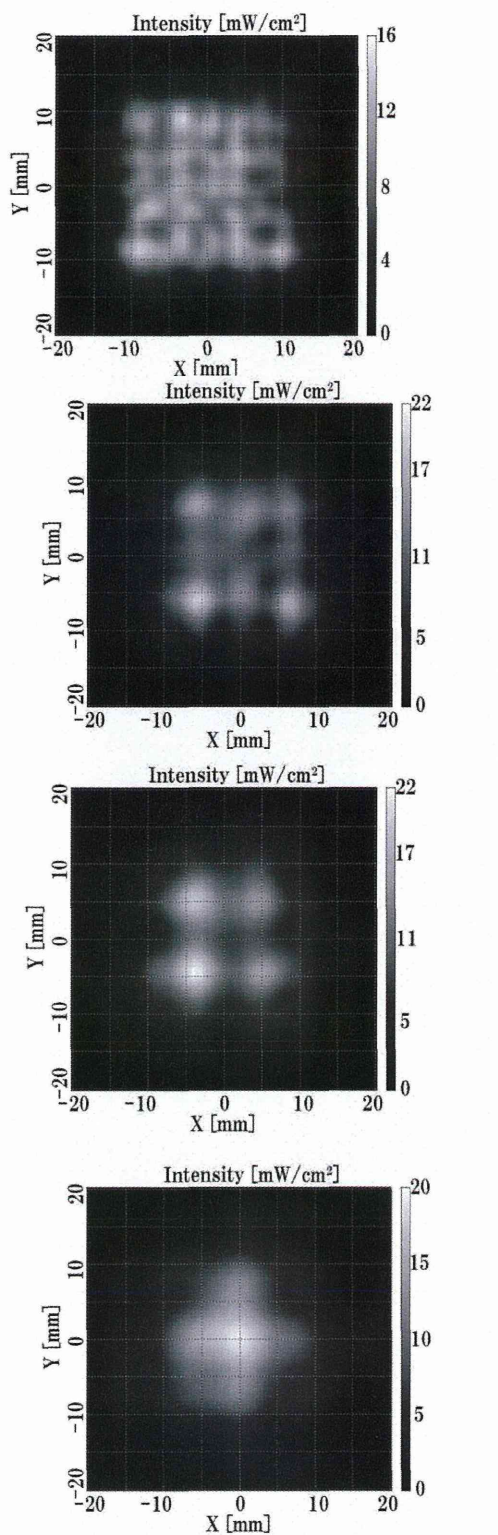
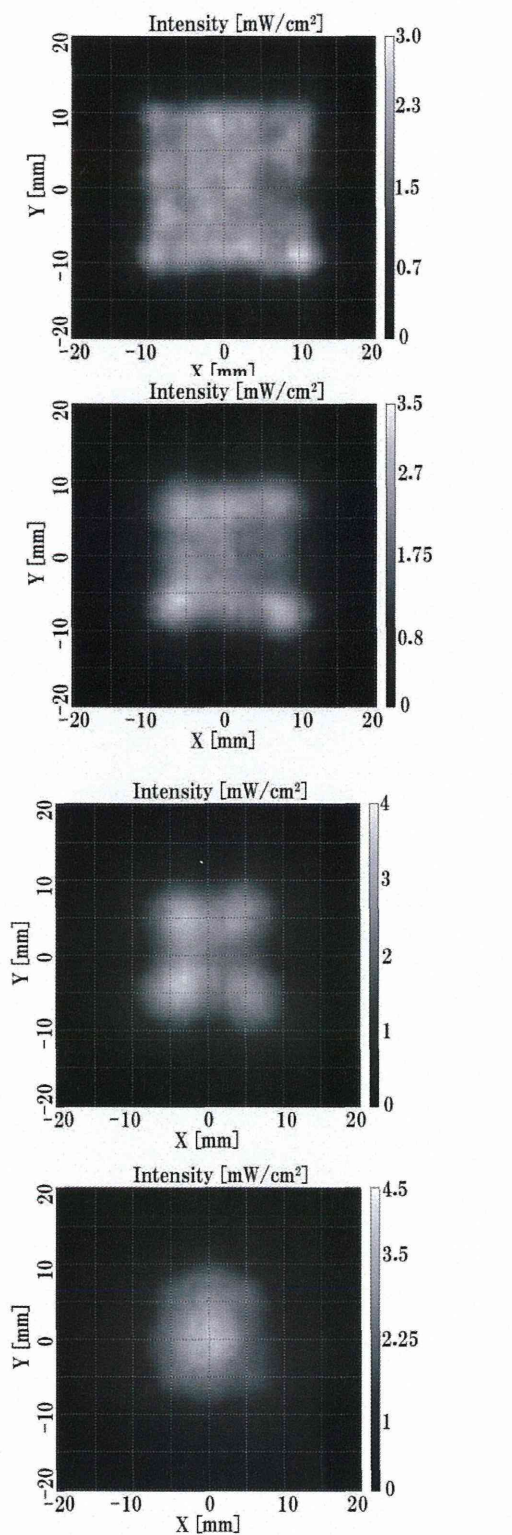


図 4 8 2次元音場分布 500kHz正弦波
とRSBIC(キャリア500kHz、雑音帯域
50-200kHz)の比較



振動子面からの距離が10、25、40、60mm
。2次元ユニフォーミティ・インデック
スの値を各図ごとに示した。

(30×30mm よりもやや大きな径を持つ振動子を用いれば、コールドスポットはより振動子面から離れる傾向にある。)

図 4 8 の右側の列には雑音変調駆動の場合の 2 次元音響強度分布を示した。各 Z ごとに正弦波駆動の場合と比較すると、ホット・コールドスポットが緩和され、音響強度分布が均一化されていることが見て取れる。振動子面に近いほうが均一性が高まっているように見える。Z=40mm における中心付近を見るとコールドスポットが改善されていることが明瞭になっており、ビーム分布は望ましい傾向となった。ただし、超音波強度は正弦波の場合に比べ小さくなっている。

2 次元ユニフォーミティ・インデックスを計算した結果を図 4 9 に示す。横軸は振動子面からの距離である。正弦波に比べて、雑音変調 RSBIC では、ユニフォーミティ・インデックスが小さくなっており、ビームの均一性が増していることが分かる。特に振動子面に近い方(40mm 以下)で差が大きい。なお、遠距離場では正弦波駆動と雑音変調駆動のビーム形状には差が見られなくなる。

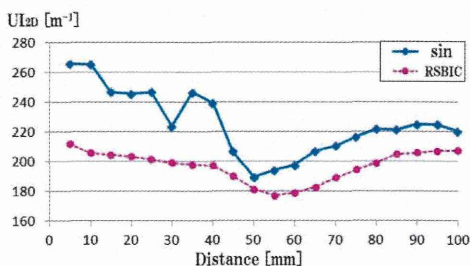


図 4 9 振動子面からの距離と 2 次元ユニフォーミティ・インデックスの関係

Z = 80 mm 付近が焦点が位置しており、その辺りでは超音波が収束しているためユニフォーミティ・インデックスが大きくなっている。次に 1 次元ユニフォーミティ・インデックスを計算した結果を図 5 0 に示す。算出は、図 4 8 の各図において左下から右上に向かう対角線上でおこなった。

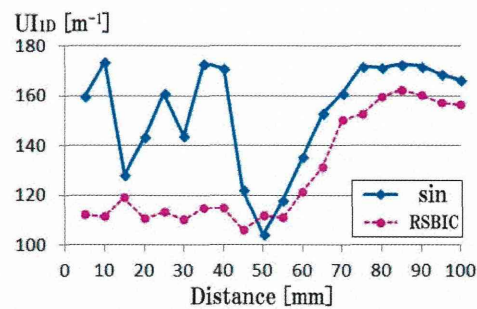


図 5 0 振動子面からの距離と 1 次元ユニフォーミティ・インデックスの関係

骨片透過後の音場分布、透過率計測

骨無しの場合にビームの進行方向に垂直な 2 次元平面上の音場分布を図 5 1 に示す。ほぼ円対称的に強度が分布している。ピーク位置周りの半径 1mm 円内の平均音響強度は 29.75mW/cm²、半径 2mm 円内では 28.04mW/cm² となった。

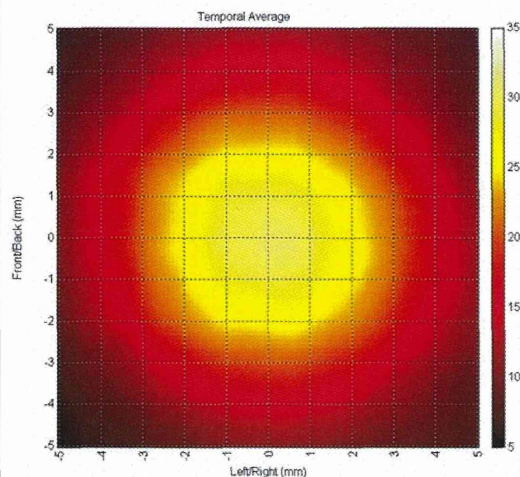


図 5 1 骨無しの場合の 2 次元音場分布 500kHz 15Vpp、振動子面からの距離は 50mm。縦と横の単位は mm。ステップ間隔は縦・横共に 0.2mm。カラーバーの単位は mW/cm²

骨を透過した後の 2 次元分布の一例を図 5 2 に示す。骨を透過しやすい場所と透過しにくい場所があることが見て取れる。座標 (-1,0) 近傍は通り易く (~8mW/cm² 程度)、(2,-1) 近傍は通りにくい (~2mW/cm²) と判断できる。

骨上のミリメートル差で透過率が大きく異なっている。

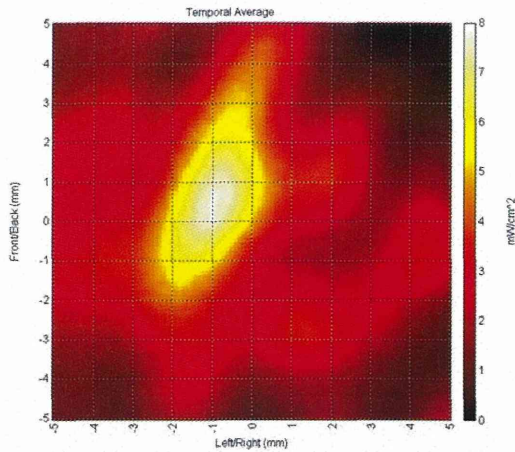


図5 2 骨を透過後の超音波の2次元音場分布1 縦と横の単位はmm。ステップ間隔は縦・横共に0.2mm。カラーバーの単位はmW/cm²

ピーク位置は(-1.0, 0.0)であり、ピーク位置周りの半径1mmの円内の平均音響強度は6.64mW/cm²、半径2mmの円内は5.08mW/cm²となった。一方、原点周りの半径1mm円内の平均音響強度は4.99mW/cm²、半径2mm円内は4.64mW/cm²となった。

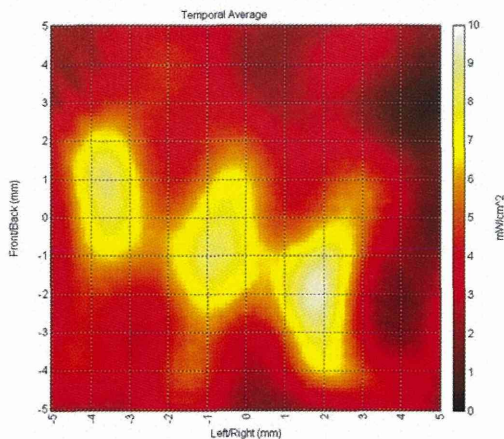


図5 3 骨を透過後の超音波の2次元音場分布2 縦と横の単位はmm。ステップ間隔は縦・横共に0.2mm。カラーバーの単位はmW/cm

骨片の他の場所を測定した結果を図5 3に示す。この領域内には3か所、(-3.5, 1)近傍、(-1, -1)近傍、(2, -2)近傍に透過しやすい所がある。領域内最大のピーク位置は(1.8, -1.8)であり、その周りの半径1mmの円内の平均音響強度は8.14mW/cm²、半径2mmでは6.15mW/cm²となった。一方、原点の周りの半径1mm円内の平均音響強度は6.78mW/cm²、半径2mm円内では6.23mW/cm²となった。

骨片上の20か所に対して得られた平均音響強度を骨無しの場合の平均音響強度で割って算出した透過率を図5 4に示す。(なお、ピークの位置が中心を大きく外れて半径2mmの円が測定領域の外にはみ出る場合は除いた。)

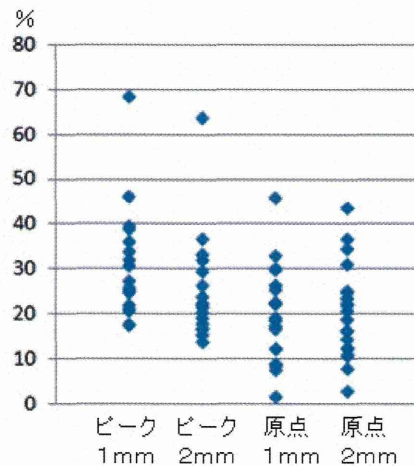


図5 4 透過率の散布図

骨片の超音波透過率の平均値、標準偏差を求めた結果を表8に示した。

表 8 透過率の平均値、標準偏差

	平均値	標準偏差
ピーク 1mm	30.7%	12.0%
ピーク 2mm	25.4%	12.0%
原点 1mm	19.6%	10.6%
原点 2mm	20.5%	10.3%

骨片の透過率はかなりばらつきが観察された。実際の頭蓋骨でどのくらいの透過率とそのばらつきがあるかを測定する必要があると考えられた。

本研究で導入した（2次元、1次元）ユニフォーミティ・インデックスは視覚的に捉えた均一性のイメージを適切に数値化しており、本指標が定量的評価に使用できると考えられる。

n層モデルによる透過率の変動評価

水中に配置された骨の透過率を計算した結果を図5-3に示す。パラメーターは周波数を500kHz、水の密度を998kg/m³、水の音速を1483 m/s、骨の密度を1664 kg/m³、骨の音速を2884m/s、骨の吸収率を4.02dB/MHz/cmとした（骨ファントム板の値を使用）。なお、水と軟組織の音響特性はほぼ等しく、水中は脳内や皮膚の良きモデルとみなせる。骨中の超音波の半波長に相当する3mm間隔で透過率のピークがあることが分かる。

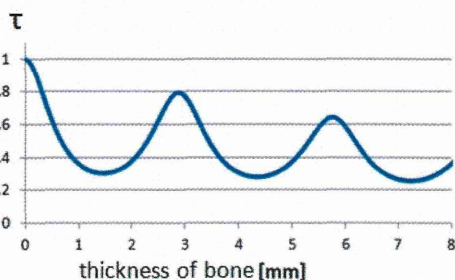


図5-3 骨ファントム板透過率の厚さ依存性

骨の厚みを変え、透過率を計算した結果を図5-4に示す。ここでは、骨の吸収は13dB/cm/MHzとした（NCRP 推奨の値）。500kHz近傍では透過率が変動しており、薄い方が必ずしも通るわけではないことが分かる。一方、周波数が高い領域では、吸収が大きいため、薄い方が通る。また、高い周波数領域では、透過率の変動が小さくなる。これは吸収効果が大きく、多重反射した波の成分が小さく、干渉効果が小さいためである。

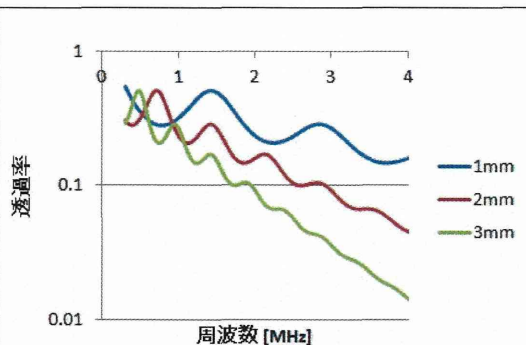


図5-4 透過率の周波数依存性

振動子と骨ファントム板との距離を変えて透過率を計算した結果を図5-5に示す。パラメーターは図2-0と同じである。振動子と骨板との間の水の層の厚さが1.5mm（水中の波長の半分）の間隔で周期的な変動を示している。

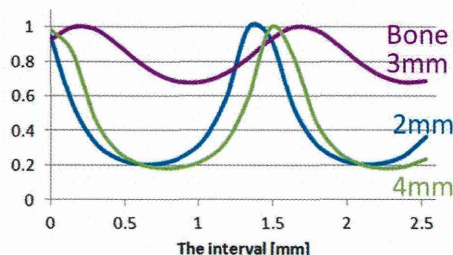


図5-5 透過率の皮膚厚依存性

骨ファントム板を用いた透過率の変動測定と周波数変調による平準化の検証

振動子と骨ファントム板との距離（皮膚厚に相当）を変えて透過率をハイドロフォンで測定した実験結果を図5-6に示す。

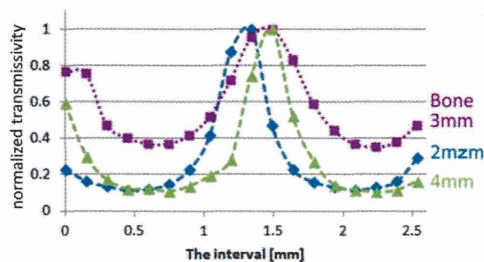


図5-6 透過率の振動子-骨ファントム板間距離依存性

ハイドロフォンと骨ファントム板との距離は60mmとした。周期が約1.5mm間隔であること、厚さが3mmの板は2mmと4mmに比べて変動が小さめになっていること等、モデルの予測と矛盾しない測定結果となった。振動子と骨ファントム板との間隔を変化させて透過率を測定した結果を図57に示す。骨ファントム板の厚さは2.0mmのものを用いた。500kHz正弦波の場合に、透過率の大きな変動が見られるのに対し、変調波PSRF(500±100kHz, 1μ秒切替)の場合には、透過率の変動が正弦波に比べて小さく、透過率が平準化されていることが分かる。

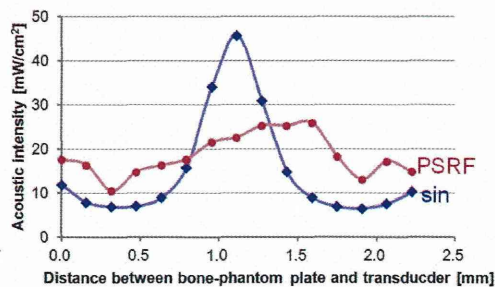


図57 振動子と骨ファントム板との距離を変化させた場合の透過率の比較

骨ファントム板の厚さによる透過率の変動を測定した結果を図58に示す。振動子と骨との距離は12mmとした。500kHz正弦波の場合に、周期が約3mmの変動が見られる。正弦波の場合の最大は26.2mW/cm²、最小は4.4mW/cm²であり、その比は6.0である。PSRF(500±50kHz)の場合には、比は4.1(最大:31.7mW/cm²、最小:7.7mW/cm²)であり、PSRF(500±100kHz)の場合には、比は3.3(最大:29.3mW/cm²、最小:9.0mW/cm²)となった。偏差を大きくするほど、最大最小比が小さくなり、透過率が平準化されることが定量的に示された。

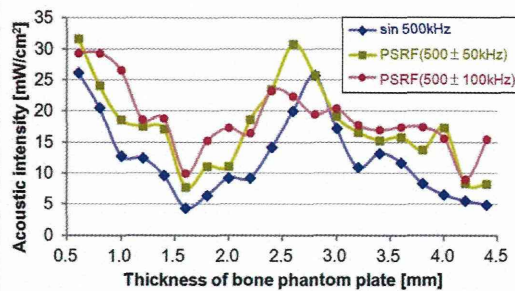


図58 骨板の厚さを変化させた場合の透過率の比較

次に、超音波の周波数を変えたときの透過率変化を測定した。結果を図59に示す

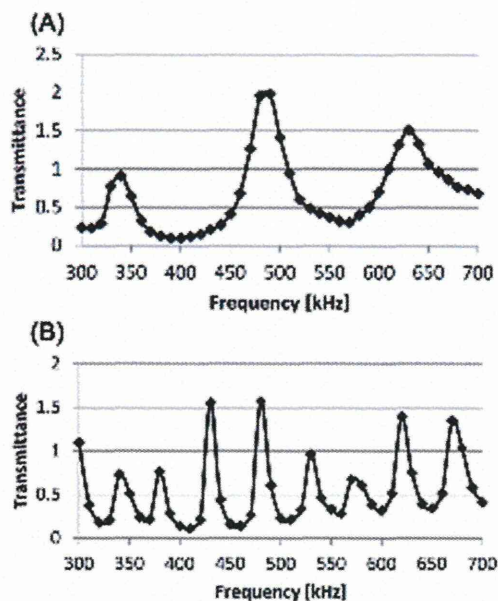


図59 周波数による超音波透過率変動実測値 骨ファントム厚2.0mmを用いる
(A) 皮膚厚相当距離1.3mmの場合
(B) 皮膚厚相当距離12.0mmの場合

実測においても計算から導かれた大きな超音波透過率変動が観察された。(A)の皮膚厚に相当する超音波プローブと骨ファントムの距離が1.3mmの場合、最大と最小の透過率の比は10倍以上となり、現代日本人のこめかみ部の皮膚厚の平均値12mmを模した(B)でも比は約8倍と大きなものとなった。

最大の超音波透過率が骨ファントムのない場合の1よりも大きな値を取ることがあった。これは、反射した超音波が超音波プローブ内部で共鳴を起こした結果、もたらされたものと考えられる。このように大きな超音波透過率変動は、単一の周波数の超音波が干渉した結果であるので、干渉を乱すのに異なる周波数を混ぜる変調は、この超音波透過率変動を小さくする有効な方法であると言える。

ここで、本研究で観測された超音波透過率変動と、従来認識された超音波透過率変動現象を比較して、本研究が提起する超音波透過率変動の重要性を明確にしてみたい。これまでに、頭蓋骨の超音波透過率変動が周期的に変動し得ることは知られていたが、それが超音波を用いる診断と治療に大きな影響を示す程には大きくないと考えられてきた。図60(A)の点線に示すように、Whiteらは周波数によって超音波透過率の周期的変動はあるものの、周波数が大きくなるにつれて超音波透過率が減少する挙動が大きい計算結果を示した。一方、我々の計算値では周波数増大に伴う超音波透過率減少挙動は無い。この差をもたらす最も大きな原因は、我々がこめかみ部での照射を考慮した骨厚2.0mmを用いているのに対し、Whiteらは頭蓋の平均的な厚さの7.1mmを用いていることによる。図60(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

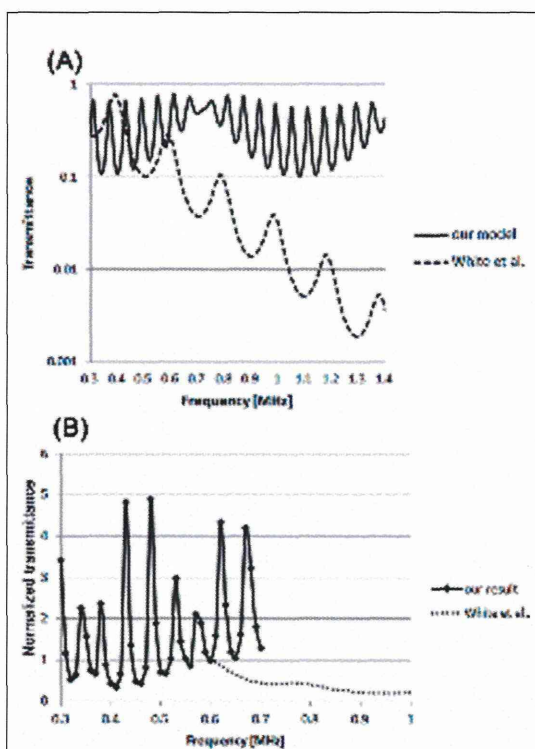


図60 頭蓋骨透過率変動に関する過去の報告との比較。(A) 計算値 (B) 実測値
参照した文献は P.J. White, et al., Phys. Med. Biol. 51 (2006) 2293-2305

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、次の項目で実施する。

以上の骨ファントムの結果を踏まえて、ヒト頭蓋骨を用いて同様の実験を行った。また、前記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集積すること
- ・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。

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 μ s毎に周波数切り替えをする条件を中心的に検討しているが、その中で1 μ s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。

また、周波数変調では500kHzの5周期分の10 μ s毎に周波数切り替えをする条件

を中心的に検討しているが、その中で1 μ s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61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 μ s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。

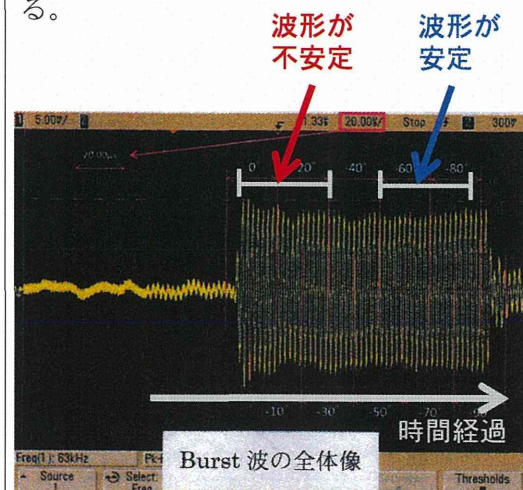


図61 500kHz超音波のオシロスコープ像
このPhaseを-10°から-80°まで変えて、頭蓋骨での超音波透過率を皮膚厚相当の距離を変えて測定し、連続波の場合と比べたのが図62である。