

動脈血液と見なし、作った血栓を AClot と表記した。密封性の良いキャリブレーションセルで作った VClot は 760nm 所にピークがあるが、血栓溶解セルの中で作った VClot 及び AClot 各種はこのピークが消えた。血栓を生食で洗った後も、830nm 周辺の変化がほとんどなかった。故に、830nm を測定波長として選んだ。

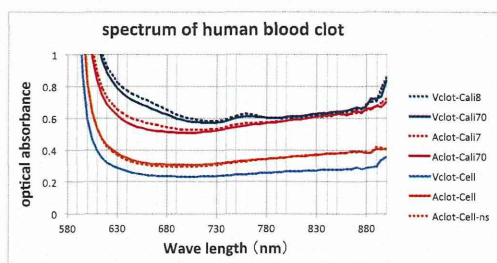


図 8 2 酸素飽和度の全血血栓のスペクトルへの影響

#### ヒト血栓厚さ検量線

図 8 3 に示すように、全血血栓の 830nm での吸光度全体としては規定的な単調増加関数であり、その吸光度は 0.4 まで (赤色で表示) 放物線状に上昇し、その後、ほぼ直線的に上昇する特徴がある。

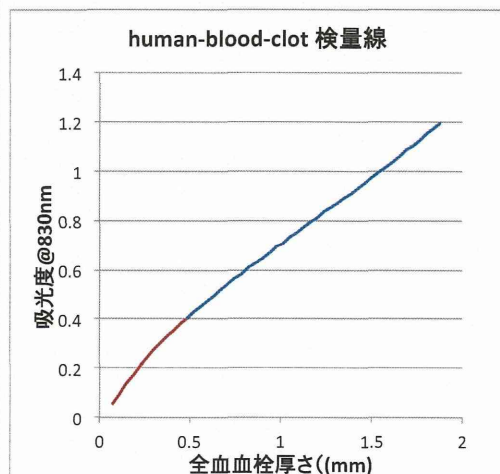


図 8 3 キャリブレーション@830nm

#### 超音波強度と全血血栓溶解促進能の関係 (1 時間溶解実験)

まず、超音波照射を行わない、rt-PA 処理のみのコントロールの結果を図 8 4 A

に示す。図中の赤線は rt-PA 処理前、青線は t-PA 処理後のそれぞれ血栓厚さを示す。実線と点線は、4 方向の測定値を示している。緑線は、rt-PA 処理前後の厚さの差、つまり rt-PA 溶解の深度を示す。黒線は溶解深度の平均値である。以下の議論は主に黒線に挙動に注目して行う。

図 8 4 A のコントロールでは、黒線は水平であり、溶解深度がどの測定ポイントにおいても同一であることを確認した。

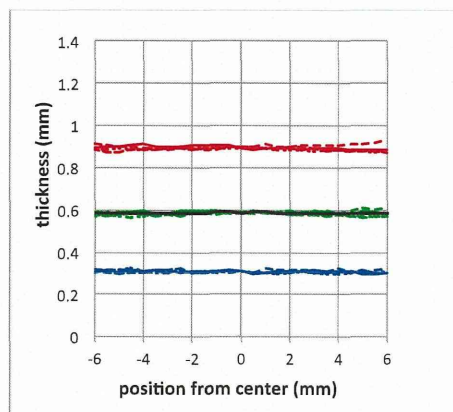


図 8 4 A 超音波なし

次に中心位置での強度が  $8\text{W}/\text{cm}^2$  の大変強力な超音波照射を行うと図 8 4 B に示す様に、黒線が凹の形となり、超音波強度が強い箇所では血栓溶解深度が浅いという奇妙な結果となった。

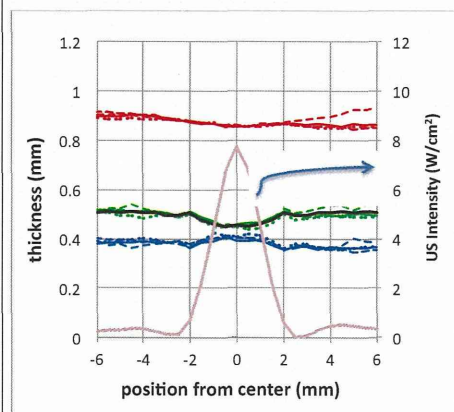


図 8 4 B  $\sim 8\text{W}/\text{cm}^2$  強い超音波照射の場合

次に、超音波強度を  $5\text{W}/\text{cm}^2$  (図 8 4 C)、 $1.7\text{W}/\text{cm}^2$  (図 8 4 D) と弱くしてゆくと、黒線は凸状になり、超音波照射による血栓溶解促進が観察されるようになった。また、図 7 C では、黒線は全体としては凸状ではあるが、中央部分の超音波強度が強い箇所の黒線は水平であり、図 8 4 D 以下のすべての場合で、照射超音波強度とよく対応した、滑らかな凸型になっていることと対照的である。これらのことから  $3\text{W}/\text{cm}^2$  以上の大変強力な超音波照射領域では、溶解した血栓の再吸着などの副次的な現象が起きていて、本研究での血栓溶解促進作用の測定には適さないことがわかった。なおこのような、強力超音波照射での奇妙な現象は、血漿血栓の倍には起こらずに、 $5\text{W}/\text{cm}^2$  の超音波強度領域まで、「照射超音波強度が大きいほど、血栓溶解促進作用は大きい」挙動が観察された。

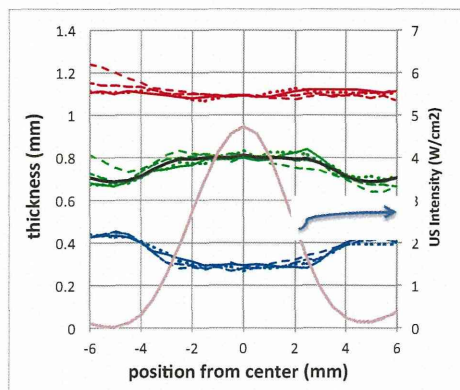


図 8 4 C  $\sim 5\text{W}/\text{cm}^2$  の超音波 (照射中心での増強率 = 18.3%)

図 8 4 D と図 8 4 E にはそれぞれ、中心の照射強度が  $1.7\text{W}/\text{cm}^2$  と  $1.1\text{W}/\text{cm}^2$  で、これらの強度範囲内では血漿と同様に「照射超音波強度が大きいほど、血栓溶解促進作用は大きい」挙動が観察された。

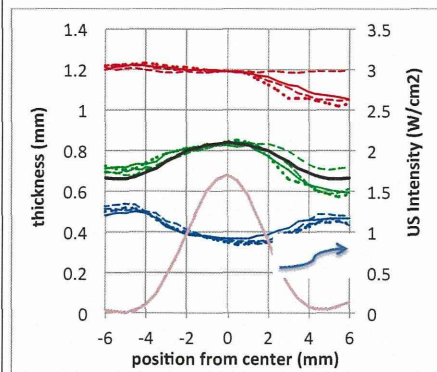


図 8 4 D  $\sim 1.7\text{W}/\text{cm}^2$  の超音波  
増強率  $\sim 26.4\%$ 、 $\sim 5\text{W}/\text{cm}^2$  より高かった

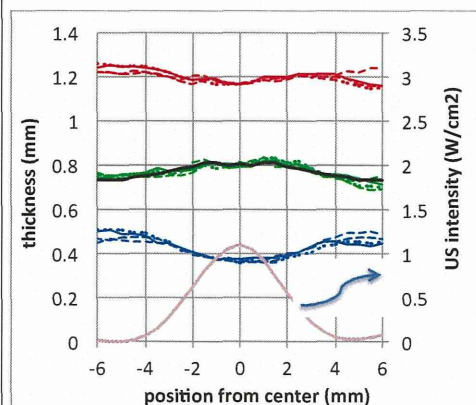


図 8 4 E  $\sim 1.1\text{W}/\text{cm}^2$  の超音波  
増強率  $\sim 9.6\%$ 、かなり落ちた。

#### 超音波 Duty Cycle のヒト全血血栓溶解増強効果への影響

超音波の熱発生副作用を抑えようとして、その Duty Cycle を低くするアプローチがよくなされてきたが、Duty Cycle の超音波血栓溶解促進能への影響は未だ論争中である。本研究は超音波の熱作用を決める要因のその時間平均強度を一定 ( $0.76\text{W}/\text{cm}^2$ ) にして、Duty Cycle の影響を検討した。

図 8 5 A は Duty Cycle が 100% の連続波での測定結果であるが、約 37.8% の促進効果が見られた。この結果は図 7 と大分違うが、これは血液ロットの影響と考えられる。図 7 で使った血液のロットは BJ4948 だったが、それは使用期限が切れたので、こ

れ以下の実験は新しい血液ロットBJ5091を使った。図8 5 A~Dに示したように、Duty Cycleを100%から10%に低くにするにつれて、その血栓溶解促進作用が約38%から14%へ減っていくことを示した。

時間平均強度が同じなので、Duty Cycleが低いほどピーク強度が高くなり、組織等への機械破壊作用指数 (MI) も高くなり、出血などのリスクも高くなるはずであるが、かえってその血栓溶解促進作用が弱くなることはDuty Cycleの低いバースト波などは超音波血栓溶解療法に向いていない可能性を示唆した。臨床試験TRUMBIはDuty Cycle 5%のバースト超音波を使ったことがその失敗(沢山の頭蓋内出血が発生)の重要原因の一つであることを改めて示した。

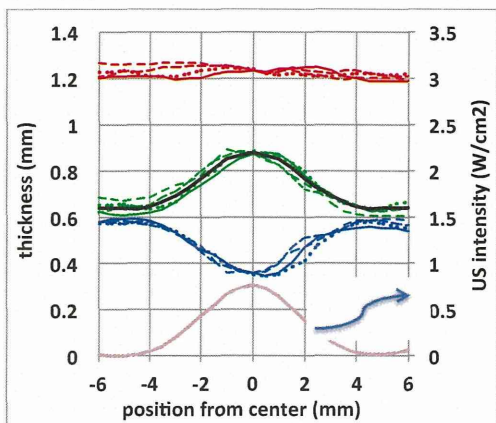


図 8 5 A Duty100% 増強率37. 8%

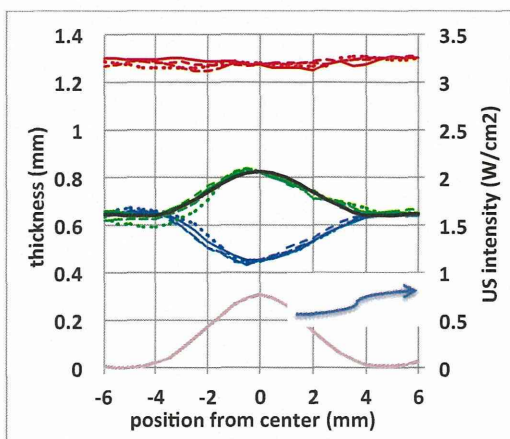


図 8 5 B Duty50% 増強率28. 5%

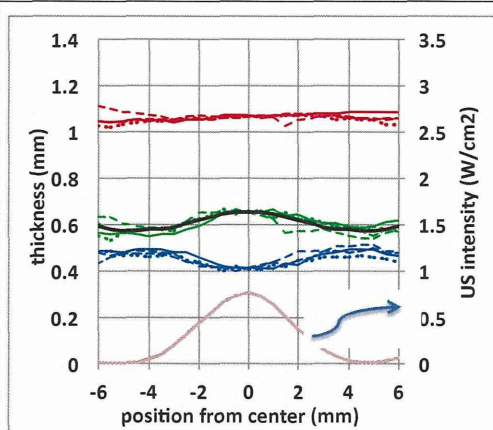


図 8 5 C Duty25% 増強率14. 3%

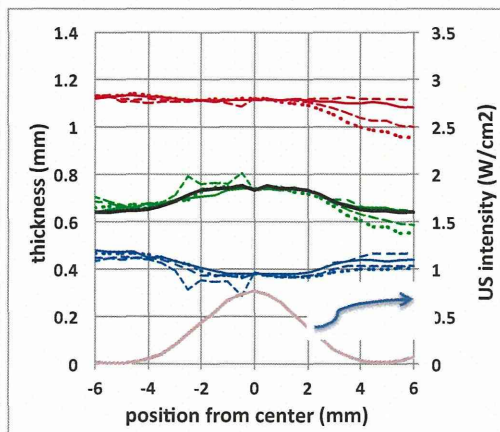


図 8 5 D Duty10% 増強率14. 0%

#### 連続波超音波各強度の比較 (30 分間照射実験)

連続波超音波は最小の機械破壊リスクと最大の血栓溶解促進能が持ち合せるというメリットが示唆されたので、新しい血栓ロットを用いてもっと短い時間帯(30分間)での連続波超音波の各強度の比較実験を細かく行った。

結果は図9に示したように、0.4W/cm<sup>2</sup>未満の各強度は1割以下の増強率を示したが、0.4~0.5W/cm<sup>2</sup>の間増強率が急に上昇し、約2.5割に達した後、又緩やかに上昇し、約2W/cm<sup>2</sup>付近にピーク値になり、3W/cm<sup>2</sup>以上になるとかえって落ちてしまった。

この結果は強度0.5~2W/cm<sup>2</sup>の連続波超音波は血栓溶解促進に最も適切であることを示した。

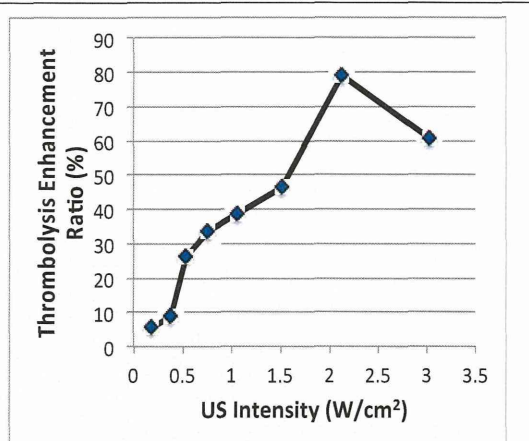


図 8 6 連続波超音波各強度比較実験

また、超音波血栓溶解促進能の評価手段として、血栓周辺部の検出結果と中央部を比較した結果を図 8 6 に示す。

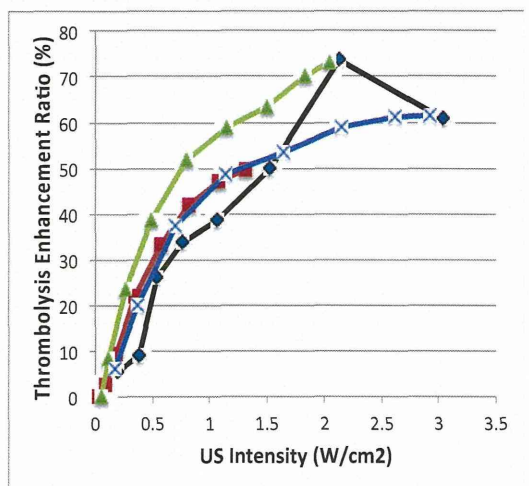


図 8 7 血栓溶解増強率中央部測定値と周辺部測定値の比較

図 8 7 に示したように、血栓周辺部の血栓溶解増強率は同強度の中央部の測定値はよく一致していることを示した。この結果は、一つの血栓だけでもその周辺部の沢山の測定結果を利用すれば、一定強度以下の各強度の超音波とそれぞれの血栓溶解促進能との対応関係を十分に分析できることを示した。

図 8 2 に示したように、血漿と違って、全血は赤血球（ヘモグロビン）があり、光波長 600nm 以下では、大きすぎる光吸収があり、測定が難しい。800nm 周辺では十分な光が透過でき、測定が可能と考えられる。酸素飽和度の低い血液では 760nm の処に小さな吸収ピークがあるが、このピークは酸素飽和度が高くなると消失するので、ヘモグロビン及び血栓の定量測定に向いていない。我々は 830nm 付近には酸素飽和度に左右されにくく、適度な吸収もあることを見付、830nm を血栓厚さの定量指標として採用した。

楔型の血栓を用いて、830nm での血栓厚さと吸光度の関係（検量線）を検討した。全体としては规律的な単調増加関数であるが、その吸光度は 0.4 まで（赤色で表示）放物線状に上昇し、その後、ほぼ直線的に上昇する特徴がある。

830nm の検出光を利用して、500kHz の中周波数超音波の全血血栓溶解増強作用の特徴を検討した。ヒト血漿血栓と違って、2W/cm² 位までの超音波の血栓溶解促進能は強度又は音響強度に依存して上昇するが、3W/cm² 位以上になると、促進作用がかえてだんだん少なくなり、さらに強度が高くなれば、その作用は完全に血栓溶解阻害作用に逆転した。（図 8 4 B）

時間平均強度を一定にして、超音波の Duty Cycle だけを変換して、その影響を調べたが、連続波の促進能が一番大きいことが分かった。時間平均強度を一定にしたら、熱作用が一定になり、Duty Cycle を低くにすれば瞬間強度、音圧が高くなり、機械指数 (MI) が高くなり、血管及び組織への破壊作用のリスクも高くなるが、血栓溶解促進能も減っていくことは Duty Cycle の小さいパルス波 (PW) より連続波 (CW) が最も適切な治療手段と示唆した。

### (3) MRIによる脳梗塞モデルの分類

#### MR Angiographyによる栓糸による中大脳動脈塞栓状態の観察

ナイロン糸による塞栓手術の終了後20分～30分後に（手術後に、MRI用ベットに固定し、プローブチューニング等の撮像準備にこの程度の時間を要する）MR Angiographyで約4分間の撮像を行ったところ、塞栓の様子が明瞭に判別することができた。判別された類型を以下に記す。

まず、糸が深く入りすぎて前大脳動脈までの血流を遮断してしまった例を図88に示す。

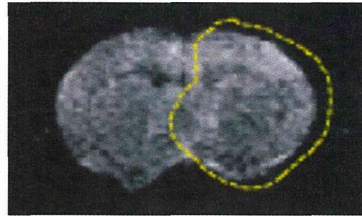


図88 糸が深く入りすぎてしまったMR Angiography像

このナイロン栓子による脳梗塞モデルの手技では、挿入する糸の長さはある程度決まっているものの、手技を行う者が指に感じる抵抗感によって中大脳動脈の塞栓を推定する方法である。よって、ラットの個体毎に異なる血管形状によっては挿入の深さおよび挿入の方向（全く異なる血管系に入ってしまうこともある）、さらには脳動脈を穿刺してしまい脳出血に結びつくことが起き得る。同程度の体重のラットの場合には挿入長さは17.5mm～18.5mmであったのに対し、図88の場合では19.5mmであり、この時だけ1cm長く挿入されたこととなった。（それだけ他のラットに比べて挿入に伴う抵抗感が少なかったことになる。）図88では、中大脳動脈のみではなく、前大脳動脈

まで閉塞していることが判明した。このラットは1日の観察期間が完了する前に手術後数時間で死亡した。このラットの他の撮像法での画像を図89に示す。

(A)



(B)



(C)



図89 糸が深く入りすぎてしまったラットのMR画像 (A) Diffusion画像、(B) T2強調画像、T2\*強調画像

最も早期から脳梗塞症状を診断可能なDiffusion像では、黄色点線で囲った梗塞半球に明確な拡散性の減少の様子がみられ、血管閉塞から30～40分という早期にもかかわらず、明確な脳梗塞症状が確認できる。脳梗塞後期の病状が画像化される(B)のT2強調画像においても、この時点では病状は観察されていない。

一方、(c)のT2\*強調画像では、手術によって脳出血が起きていないことを確認していて、このラットの死亡原因が脳出血ではなく、重篤な脳梗塞症状によることが、確認された。

以上のように、前大脳動脈の閉塞を伴って非常に重篤な脳梗塞となる場合を、このMRI撮像によって排除することができた。この格別に重症となった例の排除はMRI撮像なしにはなし得ない。

また、閉塞早期でのT2\*画像によって脳内出血が確認された例もあった。このような早期の出血は脳梗塞の影響によって生じたのではなく、ナイロン糸挿入によって物理的に穿刺されたものと考えられる。以上のように、前大脳動脈の閉塞や手術操作で生じた脳出血によって、評価対象から外す例は40例のうち4例であったが、精度の高い安全性評価実験には、これらが除外できることは大きな意義がある。

図90には中大脳動脈のみを完全に閉塞した成功例を示す。正常側の脳左半球では、黄色矢印に沿って中大脳動脈の血流がはっきりと観察されるが、梗塞側である脳右半球では、中大脳動脈の血流がなく、完全に閉塞していることがわかる。

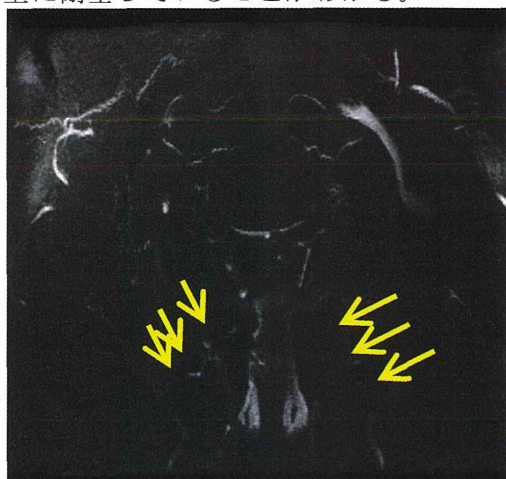
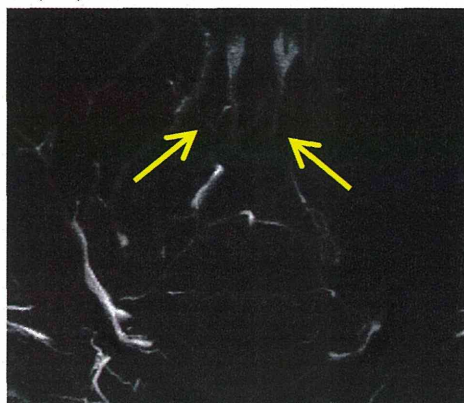


図90 中大脳動脈完全閉塞例のAngiography像 (No. KS3623)

次に、不完全閉塞の例を図91に示す。いずれも正常の左半球側の血流よりは減少しているものの、血流が右半球側には観察されて、不完全閉塞と判定した。この不完全閉塞の3例にも違いがあり、(C)では、かなり正常に近い血流があるのに対し、(B)ではわずかに血流が確認できる程度である。

(A)



(B)

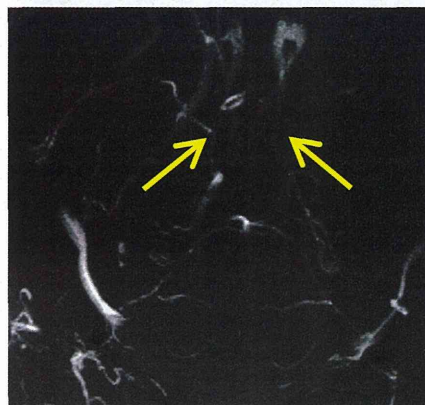


図91 中大脳動脈完全閉塞例のAngiography像 A: KS3520, B:KS3527

次に、1時間から3時間までの閉塞時間での、MR Angiographyで測定した閉塞状態と24時間後の生存・死亡の結果を表1にまとめる。

この表の結果からは、血管の閉塞が完全であるか、不完全であるかによってラットの予後(24時間後の生存と死亡)が規定されていることがわかる。2時間以上完全に閉塞してから再開通すると、例外なく24時間以内に死亡しているのに対し、不完全閉塞の3例では2時間閉塞でも全例が生きていた。1時間の短い閉塞時間では、完全閉塞の場合でも2例が全例生きていた。

MRIで観察した脳梗塞症状の進行具合も完全閉塞と不完全閉塞では明確な差

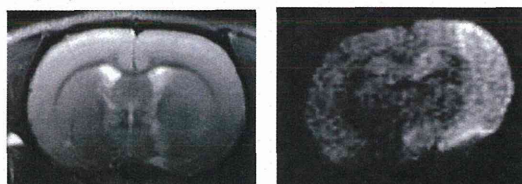
を示した。図9 2には2時間完全閉塞の場合

表1 ラット脳梗塞モデルにおける閉塞状態と予後の関係

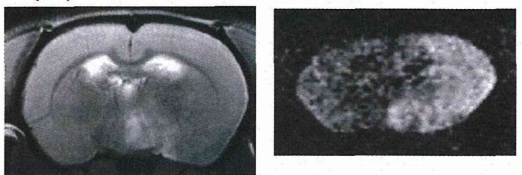
No.	体重 (g)	閉塞時間	閉塞状態	閉塞24時間後の状態*
KS3520	284	3 h	完全	X
KS3527	268	3 h	完全	X
KS3530	276	3h	完全	X
KS3604	277	2 h	完全	X
KS3614	278	2 h	完全	X
KS3616	278	2 h	完全	X
KS3532	298	2 h	不完全	○
KS3537	261	2 h	不完全	○
KS3539	283	2 h	不完全	○
KS3534	303	1 h	完全	○
KS3623	299	1h	完全	○
KS3610	254	1 h	不完全	○
KS3619	274	1 h	不完全	○

\* X : 死亡、○ : 生存

(A)



(B)



(C)

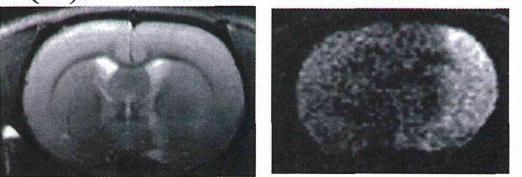
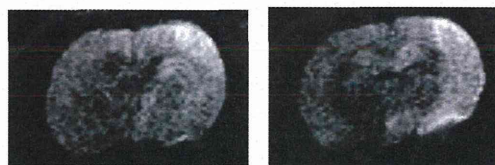


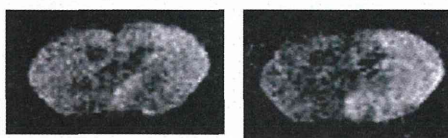
図9 2 2時間完全閉塞例 撮像は再開通後1時間 A:KS3616, B:KS3604, C:KS3614 各々左がT2強調、右がDiffusion画像

合のT2強調画像(左)とDiffusion画像(右)を示す。Diffusion画像では、この撮像法の性質から像が歪んでいるが、脳虚血による水分子の拡散低下が白い領域でコントラスト高く表現されている。一方、T2強調画像では、正常の左半球と著しい違いは、再開通後1時間では見られない。脳梗塞の早期では、Diffusion画像が脳虚血病態を最も良く表現するという従来の知見を確認することとなった。よって、以後にはDiffusion画像のみを提示して比較する。図9 3には図9 2と同じく2時間完全閉塞の場合の時間経過をDiffusion画像で示している。2時間閉塞時においても、完全閉塞の場合にはすでに右半球には広範囲にわたって白い領域が観られる。その後の再開通後1時間には、白い領域がさらに線条体と皮質の両方に広がると共に、コントラストが高くなっていて、病態の進行が見て取れる。

(A)



(B)



(C)

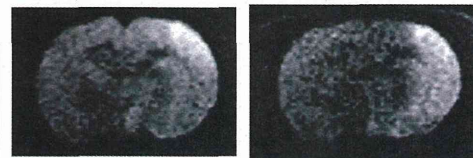


図9 3 2時間完全閉塞例のDiffusion画像時間経過 A:KS3616, B:KS3604, C:KS3614 各々左が2時間閉塞後(再開通直前)、右が再開通1時間後

次に、不完全閉塞の場合のMRI画像を図94に示す。完全閉塞の場合と異なり、病態の進行と広がりとは個体によって異なる。重症度はA>B>Cの順番になっていて最も重症度の高いAでは図93の完全閉塞の場合に近い画像であるのに対し、B、Cでは白い領域は狭く、そしてそのコントラストも低い。これらの3例の閉塞直後のAngiography像から血流の太さを推定すると以下ようになった。尚、すべての場合で正常の左半球での中大脳動脈の太さは0.28mmであった。

A (KS3532) : 0.14 mm

B (KS3532) : 0.14 mm

C (KS3532) : 0.22 mm

この結果と図94の画像を比べてみると、血流が最も太く観察されたCの場合に脳梗塞症状が最も軽いものであった。よって不完全閉塞の場合でも、MR Angiographyによって脳梗塞症状の軽重を予想することができる。

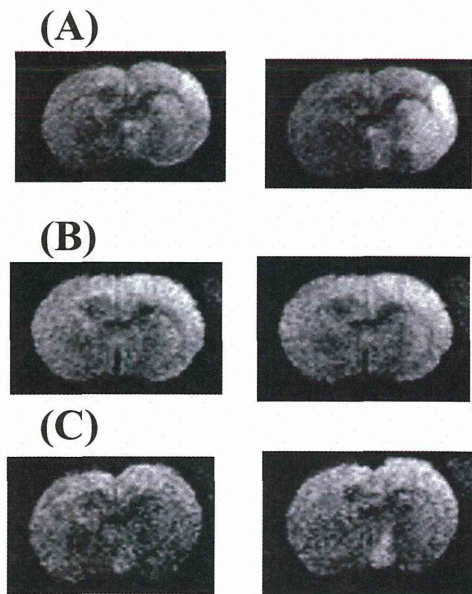


図94 2時間不完全閉塞例のDiffusion画像時間経過 A:KS3532, B:KS3537, C:KS3539 各々左が2時間閉塞後(再開通直前)、右が再開通1時間後

急性期脳梗塞の動物モデルとしてラット中大脳動脈をナイロン糸で塞栓する小泉モデルは広く使用されてきた。閉塞する時間と抜糸による血流開通の有無の条件設定によって、軽度から重篤にわたる様々な程度の脳梗塞モデルが作製できる。しかし、条件を一つに固定してもある程度の症状の軽重の幅があることは避けられなかった。また、症状の軽重に違いが生じる原因が、個体毎の虚血に対する抵抗性の違いであるのか、閉塞状態の違いによるものかは不明であった。また、このように症状の軽重に幅があると、様々な評価実験において有意差を得るためには、多数のラットを1群に使用する必要がある。そこで、同じ手技を施した動物でも、症状の軽重で分類できれば、実験の精度は高まり、用いる動物の数も少なくすることが可能である。

本研究のMRI観察によって明らかになったことは、

(a)糸が深く入りすぎて前大脳動脈閉塞になる場合や、血管穿刺による脳出血など、頻度は高くないにしても正常ではない脳梗塞モデルとなった例の混入を避けられる。これは術者が中大脳動脈閉塞の技術に熟達しようとも避け得ない混入である。10匹に1匹程度としてもその混入を避けられることは精度の高い実験を行う上で大変有意義である。

(b)中大脳動脈が成功裏に塞栓された例においても、血管が完全に塞栓された場合と部分閉塞に留まる場合があることが判明した。ラット中大脳動脈塞栓は4-0あるいはより太い3-0のナイロン糸で実施される。今回は太い方の3-0糸であっても、部分閉塞になる例がほぼ半分の例であったことが判明した。閉塞が完全か不完全かによって脳梗塞症状の進行度合いと予後(24時間後の生死)が大きく異なっていた。従来は中大脳動脈閉塞の



一群として扱ってきた完全閉塞と部分閉塞を、各々異なる群として分類することでさらに高精度の脳梗塞モデルを用いた実験が可能になると考えられる。

(c) 今回の2時間以上中大脳動脈完全閉塞となったラットは全例が再開通後24時間以内に死亡している。この事実はこれまでの小泉モデル脳梗塞ラットの報告と異なる。(3時間閉塞以下の再開通モデルではほとんど死亡例は出現しないとの報告)これは、今回の実験において閉塞開始から再開通後3時間まで連続に麻酔下に置いたことが原因と考えられる。通常の小泉モデルでは、閉塞手術完了後はすぐに覚醒させて症状(手足麻痺や、旋回歩行など)によってモデル作製の成否を確認し、再開通のための抜糸の直前に再麻酔を施す。本実験では、MR画像による症状進行の過程を観察したために麻酔継続が必須であった。閉塞と再開通の2回の手術以外の時は小泉法では覚醒を維持することが、今回の実験と大きく異なっている。この閉塞時間の予後への影響の違いを踏まえた上で、小泉モデル作製の後に、MRI Angiography像でモデル作製の成否と完全・部分閉塞を診断することは大きな意義があると確信する。また、MRI測定を行うには、本実験のように麻酔を継続する場合と閉塞後にMRI撮像を行ってから覚醒させる場合が考えられる。後者の場合では、MRI測定のための準備と撮像に20分ほどの麻酔時間が余分に必要となるのみであるので、従来の小泉法と余り変化の無い条件(閉塞時間が症状と予後に及ぼす影響において)での検討が可能となる。

## 2. 貼付型超音波振動子システムの作製

### (1) 振動子設計<<含:周波数特性改善>>

変調における反応性から、多孔質人工セラミックスを選択したが、周波数変調の際の周波数による音響強度の変動を均一化するため、400~600kHzの範囲での周波数特性が極力平坦になるような発振部の開発を行った。

周波数特性が平坦とならない要因は、振動子のインピーダンス特性が平坦となっていないことであり、インピーダンスマッチング法を検討した。ここでは電氣的専門手法になるため詳細は割愛するが、図95にインピーダンスマッチング無の場合と、マッチングとしてインダクタ:22 $\mu$ H、キャパシタ:1970pFとして均一化した周波数特性を示す。これにて、マッチングした振動子の基本設計にめどを立てた。

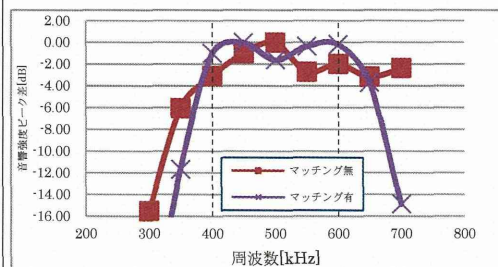


図95 振動子音響強度特性

### (2) 変調による定在波抑制

変調による定在波抑制効果は、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ことも判明した。今回の検討で、均一性、出力効率からPSRFが有力な候補とした。それぞれの変調におけ

る音響強度分布を図9 6に示す。図は、各項の星の数が多い程、優れていることを示した。

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	☆☆☆	☆	☆☆

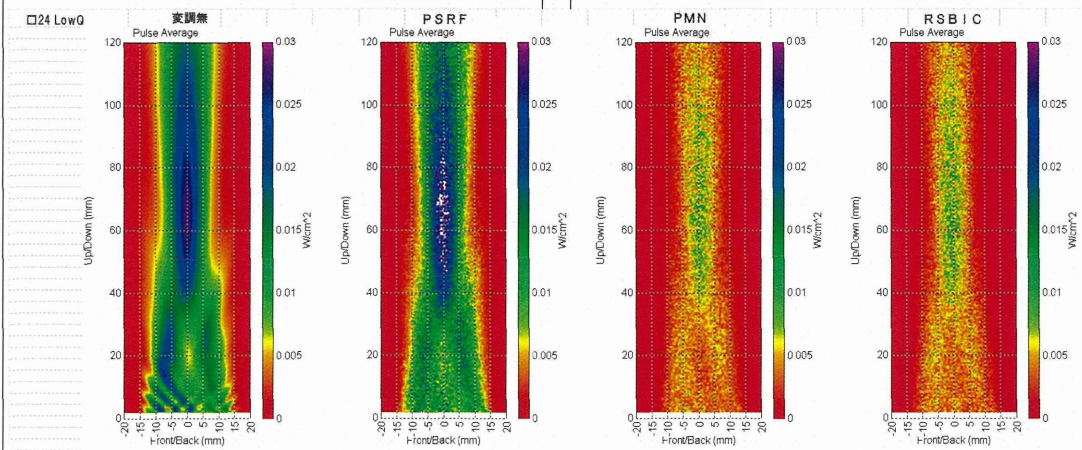


図9 6 変調による音響強度分布

(3) 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/ cm<sup>2</sup> の出力で皮膚 5mm・骨 2mm の超音波透過性を計測した。図9 6に比較するように、約 90%減衰となり、ピーク 0.0035 W/ cm<sup>2</sup> への低減を確認した。骨の透過性を高める周波数特性の改善を認め、当該検討からも変調を採用する必要性を認めた。

