

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総合研究報告書

急性脳梗塞治療加速のための薬物超音波併用
次世代普及型低侵襲システムの開発

研究代表者 井口 保之 東京慈恵会医科大学 教授

研究要旨 超急性期脳梗塞に対して強く勧められる治療法として広く行われているのが rt-PA 静注療法である。本研究はこの rt-PA 静注療法の有効性と安全性を飛躍的に高めるための超音波照射併用療法を開発する。この開発は、中周波数超音波照射、定在波抑制、貼付型超音波振動子、バブルリボソムの技術を組み合わせることで、より効果が高く安全な線溶療法を確立する。さらに、臨床のヒストリカルデータを精密に収集・解析することで、より少人数・短期間の臨床試験を可能とする。平成 24 年度～26 年度の 3 年間の研究期間を通して、超音波照射装置開発、超音波照射最適化のための定在波・透過率測定と変調による最適化、in vitro 超音波血栓溶解促進能測定法の開発、ヒト頭蓋骨超音波透過率測定、変調による超音波透過率変動の抑制、臨床試験の対照となる rt-PA 治療ヒストリカルデータ解析、経頭蓋カラードプラ法における探触子頭部固定具の開発、バブルリボソムの性能測定、そして超音波による超急性期脳梗塞血栓溶解促進療法の臨床試験プロトコル構築などを遂行した。以上の遂行により、臨床試験に進む、技術的および臨床的基盤が確立した。

A．研究目的

本研究の目的は、貼付型振動子を使用した新規超音波併用 rt-PA 脳血栓溶解技術開発である。

脳梗塞は、本邦死因の第 4 位を占める脳血管障害の 6 割を占め、かつ要介護老人の 4 割を占める。年間約 20 万人近い脳梗塞発症患者に対し、強く勧められる(グレード A) 治療法として一般に行われているのは組織プラスミノゲンアクチベーター (rt-PA) 静注療法である。偽薬と rt-PA 静注療法を比較した研究では、図 1 に示す様に治療後の予後は改善する。(本邦で行われた J-MARS テストで rt-PA 投与量を NINDS テストより少ないにもかかわらず、NINDS テストと同様に転帰

重症度などの厳しい制限がある。ひとたび脳出血を併発した場合には、転帰は著しく悪化する。

以上より rt-PA 静注療法の有効性のみならず安全性をもさらに高めることが喫緊の課題である。本邦では、2012 年 9 月より rt-PA 静注療法の治療ウインドウ(発症から投与までに許される時間)が、3 時間から 4 時間半に延長された。また、2014 年には、rt-PA 投与と血管内治療による血栓除去を組み合わせた治療法が、rt-PA 単独治療に比べて有意な予後改善効果を示すことが、オランダのグループから発表された。その発表に続き、現在までこの組み合わせ治療が、rt-PA 単独治療に比べて優れていることが 4 つの臨床試験で報告された。この組み合わせ治療が、血管内治療が実施できる医療機関では日本の標準治療となる日も近い。現在、脳卒中の救急の現場では、よりよき予後に向かって積極的に治療を成してゆく機運が大いなる高まりを見せている。しかしながら、脳血管内治療は実施可能な医師、施設が未だ限られているうえ、より多くの医療機関でより多くの患者に対して急性期脳梗塞治療を施行する点からは



図 1 rt-PA 療法の臨床効果

血栓溶解を促進しながら rt-PA 静注療法実施患者の 4-7%に起こりうる脳出血発症率を下げる事が重要である。そのために rt-PA 静注療法の適用は、発症からの経過時間、年齢、

、rt-PA の静脈投与治療をより安全により効果的に施行することの重要性は少しも減じていない。超音波血栓溶解促進療法において最重要な医療技術は、有効で安全な超音波照射である。この超音波照射 + rt-PA 静注併用療法で血栓溶解が促進される主要なメカニズムは、経頭蓋的超音波照射によって rt-PA 分子のフィブリン網目への浸透が促進されることである。当然、その浸透促進作用は超音波強度が大きければその作用は強くなるが、強い超音波照射による生体への障害が懸念されることとなる。

これまでに、超音波血栓溶解促進療法の臨床試験は数件実施されたが、未だ認可に到った例は無い。それらのうちで代表的な臨床試験の2つを表1にまとめ、有効性と安全性について述べてみたい。

表1 過去に行われた超音波照射・rt-PA併用療法の臨床試験

- | |
|--|
| 1. CLOTBUST 試験(2004年) 2MHzの超音波
・血流再開率の有意な増加は得られたが、3ヶ月後の臨床症状では有意な改善が見られなかった (P=0.20) |
| 2. TRUMBI 試験(2005年) 300kHzの超音波
・症候性出血が36%発生して、試験中止 |

周波数 2MHz の超音波を用いた CLOTBUST 試験では、血流再開率の有意な増加が観察されたが、臨床のエンドポイントである、3ヶ月後の臨床症状では有意な改善が得られなかった。この理由としては、用いた超音波の周波数が高く、高周波数のため頭蓋骨による超音波の減衰が大きいため、血栓の患部に実際に届く超音波強度が低すぎたためと推測されている。

一方、周波数 300kHz の超音波を用いた TRUMBI 試験の場合には、非常に大きな割合の症候性脳出血が起こって、臨床試験は途中で中断する事態となった。この出血の理由としては、照射した低周波数 (300kHz) の超音波に起因するキャビテーション作用と 定在波のために、予想以上の組織障害を生じたと推察されている。この2つの臨床試験から抽出される教訓は次の通りである。

- 1 照射超音波の周波数選択が重要であること
- 2 ,新たに臨床試験を行うためには、定在波問題を克服するための技術開発が必須となること

このような背景の下に本研究では、頭蓋骨透過性の高い中周波数超音波を用いて溶解促進効果が大きく (有効性が高い)、定在波抑制技術によって脳出血発症リスクを下げる (安全性が高い) ことのできる超音波照射 + rt-PA静注併用療法を開発する。さらに新たに貼付型超音波振動子を開発し、高度な手技を要せずに適切な超音波照射を可能とすることで、超音波照射 + rt-PA静注併用療法のさらなる普及を目指す。さらに、次世代の技術としてバブルリポソームによる超音波照射効果の増強技術開発も合わせて研究する。気体を界面活性剤で安定化したマイクロバブルは、超音波照射による血栓溶解作用を大きく増幅できるものとして注目されている。事実、CLOTBUST試験の後を継ぐ臨床試験ではマイクロバブル投与を併用するプロトコルで進められている。これらのマイクロバブルは直径が3 μm程度のものであるが、本研究で用いるのは直径が500nm程度のバブルリポソームである。血流を通して血栓部位に到達する点においても、血栓の網目構造をより深いまで浸透する点においても、より小さな粒径は大いに有利である。本研究では、バブルリポソーム投与の無いプロトコルでの臨床試験を目指す。現在の最先端の臨床試験の技術を越えたバブルリポソーム併用の可能性を次世代の医療技術として研究してゆく。

一方、臨床サイドでは、臨床試験の際に必須となる超急性期脳梗塞のヒストリカルデータの臨床的蓄積と解析を行なう。この解析により、超音波によるrt-PA血栓溶解促進療法において、rt-PA単独治療群の対照を置くこと無く臨床試験の実施を可能とし

、より少人数・短期間の臨床試験を可能とする。また、rt-PA静注療法の経過観察には閉塞血管の血流再開通現象を経時的に観察することが重要である。評価に使用する経頭蓋カラードプラ法での観察を容易にする頭部固定具の開発を推進する。実際の臨床試験プロトコルにおいて、経頭蓋カラードプラ法計測を必須の施行項目としてするかどうかは、計測にかかる手間と時間の問題もあり、判断の難しいところである。しかしながら、急性脳梗塞の病態計測の大変有力な方法である経頭蓋カラードプラ法の臨床使用を容易にする頭部固定具の開発は、大変大きな意義を有する。

本研究の特長を表2にまとめる

表2 本研究が開発する超音波rt-PA血栓溶解療法の特長

- (1)効果と安全性に優れた500kHzの中周波数超音波を使用
- (2)定在波回避技術を開発
- (3)ソフトな貼付型超音波振動子による簡便な装着
- (4)豊富な臨床データに基づいた治験プロトコル作製
- (5)バブルリポソーム投与による更なる加速効果

これらの特長を順番にここで解説する。

(1) 500kHzの中周波数超音波を使用
照射超音波の周波数が低いほど、rt-PA分子の浸透性増加に寄与する機械作用は高くなるが、同時に細胞や組織への障害作用も高まってゆく。一方、周波数が高いほど細胞・組織障害の副作用は小さくなるが、発熱作用による副作用は大きくなる。また、高周波数ほど頭蓋骨や脳組織の透過性が低く、十分な超音波強度を脳梗塞部位に到達させるためには、より大きな超音波強度を加える必要がある。そのため高強度超音波に

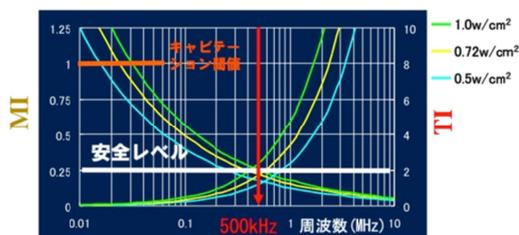


図2 超音波周波数と機械作用、発熱作用との関係

よって生じる発熱が組織を障害するリスクが高まる。図2に機械作用(Mechanical Index: MI)及発熱作用(Thermal Index: TI)の関係を示す。MIとTIをどのレベルで治療に最適と見なすかは、必ずしも一致した見解はないが、白線のように設定した場合には、500kHzが最も安全に超音波照射できる周波数となる。本研究においては他の周波数と比較した場合の超音波特性に注意を払いつつ、500kHzを用いた超音波照射を行うことに本研究の独自性と優れた点がある。

(2) 定在波回避技術を開発

定在波とは、反射した超音波が干渉することで、波形が進行せず一定の場所で振動しているようにみえる波動である。この定在波の強度が高まった部位で組織障害が発生する懸念がある。前述したTRUMBI試験での予想を遙かに上まわる高頻度の脳出血の原因が定在波であると臨床試験で確定することは不可能であるが、その強い疑いがある限り、新たな臨床試験実施には、定在波抑制技術が必須のこととなるのは疑いないところである。

本研究においては照射する超音波に変調を加えることで、超音波振動の規則性に基づく定在波発生を抑制しようという戦略である。この戦略は本研究グループの世界に誇るオリジナリティーである。また、本研究中に超音波のその干渉作用により、頭蓋骨透過率が患者毎に大きく変動する可能性について検討を行い、その変動を小さくして(平準化して)、より有効で安全な超音波血栓溶解促進療法の構築を目指す。従来、超音波の頭蓋骨透過は、「周波数が大きいかほど小さくなり、また骨が厚くなるほど小さくなる」が常識と考えられてきた。一方、我々はモデル計算をしてみると周波数、皮膚の厚さの微妙な違いによって、頭蓋骨透過率は大きく変動することが予想された。

もし頭蓋骨透過率の変動が従来考えられてきた以上に大きなものであるならば、超音波血栓溶解促進療法において、その有効性と安全性に対する重要な因子が従来では見逃されてきたこととなる。この変動を平準化する技術としても変調超音波は有効と考えられる。

よって、変調超音波技術を用いることで、有効性と安全性に関して従来から重要と考えられてきた問題解決に加えて、従来見過ごされてきた問題の解決を計る点において、本研究の先進性がある。

(3) 貼付型超音波振動子

本研究が対象とする超急性期脳梗塞は救急搬送で病院に到着する患者が主たる対象となるので、超急性期脳梗塞に対するの経験と技術が豊富な医療スタッフが常に対処できるとは限らない。よって、より簡便にかつ確実に有効な超音波照射を実施できる医療機器開発は、この医療技術をより広範囲に普及させるためには最重要と言える。特に、患者の体動に対する適応性を超音波医療機器に付与することが鍵となる。本研究で開発する貼付型超音波振動子は、高度な超音波操作手技を要さず、rt-PA静注と同時に側頭部表面に貼付するだけで、血栓溶解加速が実現するという、極めて簡便かつ有効な医療機器となる。本研究の開始当初は、柔軟性のあるソフト素材の超音波振動子を目指したが、要求する発信性能が得られなかったために、従来のハードな素材を用い、皮膚接着用のゲルを工夫することで目的の貼付型という要件は満たすことに成功した。

(4) 豊富な臨床データに基づいた治療プロトコル作製

臨床試験において有効性を実証する最も望ましい方法はランダムスクリーニングによるコントロール群との比較で

ある。しかし超急性期脳梗塞治療現場において患者・家族に、短時間でランダムスクリーニングの複雑な仕組みを理解して同意を得ることは困難なだけでなく治療そのものの遅滞を招きかねない。また臨床試験の対象となる rt-PA 静注療法単独対象例は、急性期脳梗塞例の 5%、超急性期脳梗塞の 15%と少なく、さらに 2 群に分けての臨床試験実施は、登録症例数の充足、試験期間の設定からも非現実的である。対して、比較群を含まない臨床試験ではこれらの問題点が解消できる。この場合には、コントロール群として過去の臨床データを用いて、本臨床試験の結果と比較するために、コントロール群として解析に足りうる精密なヒストリカルデータ収集が重要となる。本研究では、臨床試験実施予定の国立循環器病研究センターにおいて、このデータ収集を行うと共に、それを用いた臨床試験のプロトコルを作製する。

rt-PA の血栓溶解作用の最も直接的な観察事項は、血流の再開通である。神経症状の改善、転帰等は、血栓溶解以外の様々な要因が複雑に絡みあうために、臨床研究において治療の有効性を統計学的に証明するにはより多くの登録症例数が必要となる。MR angiography を用いた過去の研究では、早期再開通と転帰の関連性は高く、再開通現象評価は極めて重要である。本研究においては、MR angiography と比較しより簡便かつ非侵襲的な経頭蓋カラードブラ (TCCS) を用いて脳血流再開通現象を経時的に観察することを重視して研究開発を行う。しかし、従来の TCCS 装置では脳血流が観測可能な位置と角度に長時間固定することは不可能であった。本研究は、同装置のプロブを頭部に容易、かつ確実に固定する用具の開発も実行する。

(5) バブルリポソーム投与によるさらなる血栓溶解促進

超音波照射による血栓溶解促進をさらに加速するために、マイクロバブルを投与する研究・開発が進められている。例えば、CLOTBUST試験の後を継ぐ臨床試験ではマイクロバブル投与を併用するプロトコルで進められている。超音波照射により、マイクロバブルは血栓近傍で振動及び破裂し、rt-PAのフィブリン網目構造への浸透を亢進させる。従来この目的に用いられるマイクロバブルは、超音波造影剤である直径3 μm程度のミクロンサイズのエマルジョンである。マイクロバブルのサイズが小さくなればなるほど、血流を通じての血栓部位へのアクセス、およびフィブリン網目構造内へ侵入が容易となる。しかしながら、従来、超音波に応答するパーフルオロプロパンを、ミクロン以下のサイズの粒子に封入する技術は存在しなかった。分担研究者（丸山一雄）は、封入するキャリアーをリポソームとすることで、パーフルオロプロパンを封入したナノサイズのナノバブルを得ることに成功した。本研究では、超音波照射、rt-PA投与、ナノバブル投与の3つの併用技術を次世代の脳梗塞血栓溶解医療技術としての開発のための基礎研究を実行する。すなわち、バブルリポソーム開発研究は、超音波照射 + rt-PA静注併用療法が認可された後にその効果を高める医療技術としての研究であり、基礎研究段階から多面的に評価し、研究成果を蓄積する。

B. 研究方法

本研究は大きく4つのグループに分け、表3に示すようにそれぞれの役割を分担している。

表3 研究組織の構成

- | |
|--|
| 1, 東京慈恵会医科大学：超音波の効果と安全性
井口保之、小川武希、横山昌幸、福田隆浩村 三秀 榎
小松鉄平、幸 敏志（田辺三愛製薬（株）） |
| 2, 帝京大学：バブルリポソーム
丸山一雄 |
| 3, (株)カネカ：貼付型超音波振動子
川島裕幸 |
| 4, 国立循環器病センター：臨床研究プロトコル
峰松一夫、山本晴子、古賀政利 |

各グループの実施項目を以下の表4にまとめる。

表4 研究開発実施項目

- | |
|--|
| 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
(2) in vitro 血栓溶解作用の定量法
(3)MRIによる脳梗塞モデルの分類 |
| 2, 貼付型超音波振動子
(1)超音波照射システムの作製
(2)ラットでの超音波照射安全性評価* |
| 3, 臨床研究プロトコル
(1)治験プロトコル案作製
(2)ヒストリカルデータ収集
(3)経頭蓋カラードブラ用探触子固定具の開発 |
| 4, バブルリポソーム
In vitro, in vivo での血栓特異性, 血栓溶解性能の評価 |

- 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
- 定在波とは、波形が進行せず一定の場所で振動しているように見える波動のことである。定在波は、ある一方向に向かう進行波と、壁で反射した波とが重なりあうことによって発生する。音圧の時間的変動が大きいところは腹、小さい所は節と呼ばれる。この様子を、図1に示した。定在波を抑制するとは、腹と節を緩

和し、時間的な平均音圧分布が空間的に滑らかになるようにすることである。

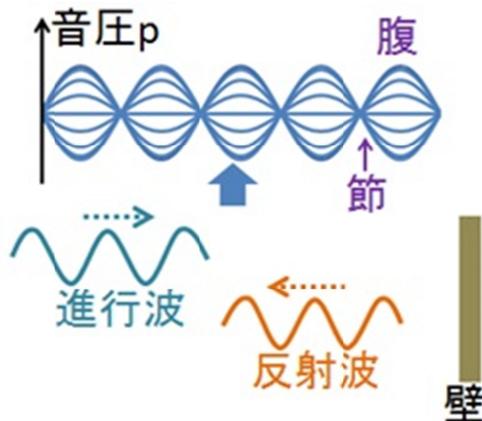


図1 定在波の発生

定在波を抑制するための雑音変調方式として本研究では、以下の方式を従来の正弦波駆動の場合と比較した。

(i) 雑音位相変調

(Phase modulation by noise: PMN)

送信周波数を 500kHz に固定するがその位相を全くランダムに振る方式。時間 t におけるシグナル $s(t)$ は、振幅を A 、周波数を f 、位相角度を $\varphi(t)$ とすると

$$s(t) = A \sin(2\pi ft + \varphi(t))$$

と表される。

この式において $\varphi(t)$ が時間的にランダムに変動する。この位相角度の振り幅を $\pm 150^\circ$ 程度まで変化させて比較検討した。

(ii) 周波数ランダム選択法 (Periodic selection of random frequency: PSRF) 一定時間 (例えば 10 マイクロ秒) 毎に周波数を切り替える方式。周波数は予め定めた上限周波数と下限周波数の間の値がランダムに選択される。

(iii) 逆相信号雑音スイッチング方式 (Random switching of both inverse carrier: RSBIC)

180° 位相の異なる 500kHz の単一周波数波形を 2 種類用意し、両者をランダムに切り替える方式。位相反転のタイミングは雑音のゼロクロスタイミングとする。

以下に上述の 3 種の雑音変調方式の波形の一例を示す。

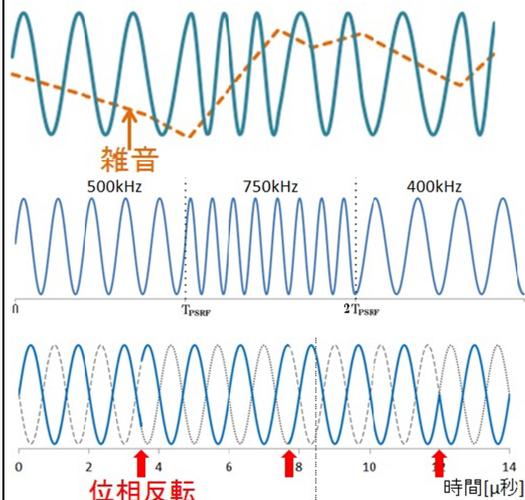


図2 雑音変調方式の波形

(図の上から PMN, PSRF, RSBIC の各方式)

定在波の発生の様子はシュリーレン法によって観察した。全体の実験装置概略図を図3に示す。信号生成器 (AFG3102; Tektronix, OR, USA) は 500kHz 正弦波に限らず、PMN を発生させることができる。波は増幅器 (HSA4101; NF Co, 横浜, 日本) によって増大され、振動子に入力された。駆動波はオシロスコープ (TDS3012; Tektronix, OR, USA) を用いて観測された。振動子は水槽の中に配置され、鉛直下方に超音波が出力された。

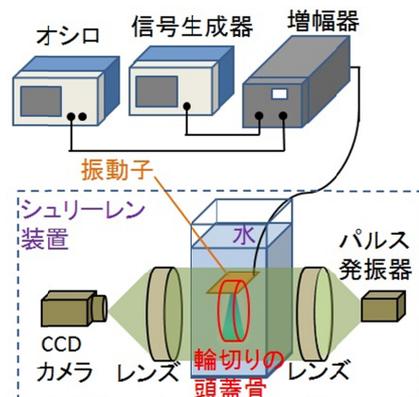


図3 実験系の概略図

水槽の中には、輪切りにされた頭蓋骨が固定された。頭蓋骨は輸入会社 (General

science corporation, Tokyo, Japan)を通じて、会社(ETS DU DOCTEUR AUZOUX, Paris, France)から購入した。ヒト頭蓋骨を用いる本実験は慈恵会医科大学内の倫理委員会(IRB)に承認され、本実験のすべての手続きは倫理委員会の規則に則っておこなわれた。頭蓋骨は右と左の両方の側頭骨ウィンドウを含むように、4~6cm幅でカットした。頭蓋骨の側頭部の外側に向けて照射された超音波は頭蓋骨を透過して、頭蓋内に入り、その後、頭蓋骨内壁で反射した波と、進行波とが重なりあって、定在波が発生するようにした。なお、水と脳内の音速はほぼ等しく(~1500m/s)、(したがって波長もほぼ等しく500kHzで約3mm)、水中は脳内の良きモデルとみなせる。

超音波を可視化するには、シュリーレン装置(US-250SL; 溝尻光学, 東京, 日本)を用いた。図4の下部に示されているように、装置はパルス発振器、2枚のレンズ、水槽、CCDカメラから構成されている。パルス発振器から発射された光は、1枚目のレンズ、水槽、2枚目のレンズを順に通過し、CCDカメラで検出される。シュリーレン装置は水中に生じた密度差を検出する。定在波が発生したとき、シュリーレン画像上で、腹は明るい領域として、節は暗い領域として観測される。

定在波抑制効果を定量化するために、シュリーレン画像の輝度に基づくStanding Wave Ratio(SWR)を導入した。最初に、シュリーレン画像上で、定在波を幾つか含むような興味領域(ROI)を決めた。ROIは長方形の領域とし、長方形の一辺は定在波の明線に平行であるようにとった。次にROIの輝度をフリーソフトImageJを用いて決定した。輝度は定在波の明線に平行な方向に沿って平均した。SWRは輝度から次式により計算した。

$(SWR) = ((\text{音圧の平均極大値}) - (\text{音圧の平均極小値})) / ((\text{音圧の平均}))$

この定義より、SWRの値が小さいほど、波の強弱の差が小さく、定在波が抑制されていることになる。

本実験では、AIMSを用いて3次元的な音場分布を測定した。定在波の実験に用いた貼付型振動子(中心周波数500kHz、1-3コンポジットPZT)を図4に示す。

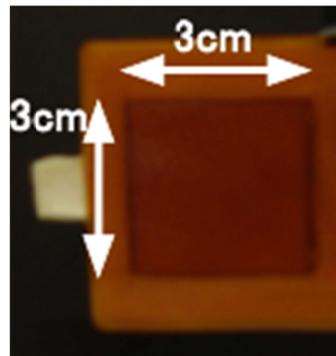


図4 貼付型超音波振動子
30×30mm、厚さ6mm

使用したハイドロホンを図5に示す。ハイドロホンの先端部には、口径0.5mmの振動子が装着されており、その周波数感度は0.25MHzから10MHzである。このハイドロホンを空間的に走査し、音場分布を測定した。3次元の座標(X,Y,Z)の原点を振動子面の中心に取り、Z軸を振動子の中心軸に沿って、ビームの進行方向に取り、XYは振動子面と平行な面とした。Zの値を変えながら、XY平面の音場分布を1mm間隔で測定した。



図5 AIMSで使用したハイドロホン
型名ONDA HNC-0400

図6に実際の実験風景を示す。500kHzの正弦波駆動の場合と雑音変調方式の場合の音場分布を比較した。

変調による定在波抑制の効果を定量化するために、新たに指標を考案した。

それは、超音波ビームの均一化指標(UI)である。振動子によって形成される超音波音場の均一性を評価する指標で、このUIの定義式と説明を以下に示す。

2次元(x,y)平面における音響強度分布を $f(x,y)$ [W/cm²]とすると2次元ユニフォーミティ・インデックスUI2Dは次式で定義する。

$$UI_{2D} = \frac{\int \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial y}\right)^2} dx dy}{\int f(x,y) dx dy} [m^{-1}]$$

ここで積分範囲は音響強度分布が零でない範囲に亘って取る。分子における微分項によって、変化の激しさを捉えようとしている。分母は全音圧である。全音圧で割ることによって、音響強度が全体的に定数倍 f f になっても(f は定数)、UI2Dは不変になっている。この性質により、振動子の駆動電圧に依らずに均一性を評価することができる。また、UI2Dは(x,y)平面を回転させても不変となっている。すなわち変換

$$\begin{aligned} x &= \cos \theta x + \sin \theta y \\ y &= -\sin \theta x + \cos \theta y \end{aligned}$$

によって不変に保たれる。また、鏡映変換や平行移動のもとでも不変となっており、合わせてユークリッド変換不変性を持つ。

定義よりUI2Dの値が小さいほうがビームの均一性が高いこととなる。

1次元のユニフォーミティ・インデックスUI1Dは、2次元の場合のy依存性を落として、次式によって定義する。

$$UI_{1D} = \frac{\int \left| \frac{\partial f}{\partial x} \right| dx}{\int f(x) dx} [m^{-1}]$$

1次元の場合も音響強度が全体的に定数倍になっても指標の値は不変に留まる。

1次元の場合、次のようにして分子の意味が明確になる。分子の積分をおこなうとき、次のように区間を分ける。簡単の為、始点を極小点とする。

$$\int_{\text{始点}}^{\text{終点}} = \int_{\text{極小点1}}^{\text{極大点1}} + \int_{\text{極大点1}}^{\text{極小点2}} + \int_{\text{極小点2}}^{\text{極大点2}} + \dots$$

極小値から極大値に向かうときには、 $df/dx \geq 0$ であり、極大値から極小値に向かうときには $df/dx \leq 0$ であるから、絶対値記号を外せて、分子をIとおくと

$$I = \int_{\text{極小点1}}^{\text{極大点1}} \frac{df}{dx} dx - \int_{\text{極大点1}}^{\text{極小点2}} \frac{df}{dx} dx + \int_{\text{極小点2}}^{\text{極大点2}} \frac{df}{dx} dx - \dots$$

となり、積分を実行すると、

$$I = (f(\text{極大点1}) - f(\text{極小点1})) + (f(\text{極大点1}) - f(\text{極小点2})) + (f(\text{極大点2}) - f(\text{極小点2})) + \dots$$

となる。これは、隣接する極大値と極小値の差を加えたものである。

$$I = \sum_{\text{隣接する組}} |(極大値) - (極小値)|$$

これが分子の意味である。これは、また、 $I = 2 \times ((極大値の総和) - (極小値の総和))$

ともなる。

本実験で使用した骨片を図7に示す。この骨片はヒト頭蓋骨の側頭部に相当している。厚さは骨の場所によって異なり、薄い所で0.62mm、厚い所では3.3mm程度となっている。



図7 使用した骨片

図8に実験系を示す。信号生成器 (AFG3102; Tektronix, OR, USA)から 500kHz、1.5Vppの正弦波を発生させ、増幅器(HSA4101; NF Co, 横浜, 日本)で10倍に増幅した後、水槽中の振動子に印加した。なお、印加波形はオシロスコープ (TDS3012; Tektronix, OR, USA)を用いて観測した。本実験で用いた振動子は上田日本無線社製の直径24mmのポーラス円形振動子であった。超音波の焦点位置は、振動子面から約45mmである。本実験ではこの焦点位置に骨片を配置した。その理由は、この位置でビームが滑らかでビーム幅が狭いからである。骨を透過した超音波をハイドロフォン (ONDA HNC-0400) で測定した。ハイドロフォンの位置はコンピューターで制御されており、縦・横・高さの3方向に移動できるようになっている。ハイドロフォンの先端の位置は骨片から数mm離れた。

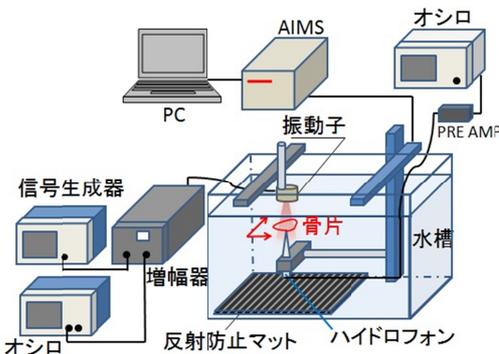


図8 音響強度測定装置(AIMS)

図9に振動子と骨片とハイドロフォンの位置を示した。ハイドロフォンの原点を振動子の中心軸上に取り、ビーム軸に垂直な面上を±5mm四方にわたって、0.2mm間隔で走査し、2次元音場分布を測定した。骨片の位置を移動させて、測定をおこなうことを20回繰り返した。



図9 振動子と骨片とハイドロフォン

(1-b) 頭蓋骨透過率の計算による推定
超音波透過率の実測に先立ち、理論式から計算で透過率の推定を行った。これは、どのような実測を行うべきであるかという実験方針を導くことと、理論と実測がどの程度一致するかを検証するためである。

計算のモデルとしては、n層モデルを用いた。このモデルは、平面波がn層を透過する簡潔なモデルである。このモデルを用いると透過率の変動が評価でき、実験計画の立案や結果の解釈に役立った。

モデルは図10のように層が並んでおり、第0層から平面波が入射した場合、各層の境界において、波の一部は反射し、残りは透過する。この反射と透過の割合は音圧と粒子速度が連続という条件から定まる。



図10 層を伝播する平面波

第 m 層における入射波の音圧振幅を A_m 、反射波の音圧振幅を B_m とすれば、超音波は $A_m e^{i(\omega t - k_m x)} + B_m e^{i(\omega t + k_m x)}$ と表現される

A_0 が入射波の振幅で、 A_f が透過波の振幅である。

各境界に対して行列 $T_{m+1 m}$ を

$$T_{m+1 m} = \begin{pmatrix} \frac{Z_m + Z_{m+1}}{2Z_m} & \frac{Z_m - Z_{m+1}}{2Z_m} \\ \frac{Z_m - Z_{m+1}}{2Z_m} & \frac{Z_m + Z_{m+1}}{2Z_m} \end{pmatrix},$$

と定義し各層内に対して行列 D_m を

$$D_m = \begin{pmatrix} e^{-ik_m d_m} & 0 \\ 0 & e^{-ik_m d_m} \end{pmatrix}, \quad (m = 0, \dots, n),$$

と定義すれば、入射波と透過波との間に

$$\begin{pmatrix} A_f \\ 0 \end{pmatrix} = M \begin{pmatrix} A_0 \\ B_0 \end{pmatrix},$$

の関係が成立する。ここで、

$$M = \begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} \\ M_{21} & M_{22} \end{pmatrix} \equiv$$

$T_{fn} D_n T_{n-1 n} D_{n-1} \dots D_2 T_{21} D_1 T_{10}$ である。

エネルギー透過率 は

$$\tau = \frac{Z_0}{Z_f} \left| \frac{\det(M)}{M_{22}} \right|^2$$

で求められる。

なお、媒質による吸収は運動量を $k \rightarrow k - i\alpha$ のように複素化によって扱った。

超音波透過率は、ヒト頭蓋骨を測定する前に、骨ファントム板での測定を行った。これは、骨の各種物性を模した板で、均一で平坦であるので、モデル計算との対比が容易である。

実験装置の概略を図 1 1 に示す。ランダムな周波数のデータを USB メモリーに格納し、そのデータを基に信号生成器 Signal Generator (AFG3102; Tektronix, OR, USA) が変調波信号を出力した。信号は増幅器 AMP (HSA4101; NF Co, 横浜, 日本) によって増幅された後、振動子 transducer に入力された。振動子から出力された超音波は骨ファントム板を透過した後、ニードル型ハイドロホン (ONDA HNC-0400) によって観測された。

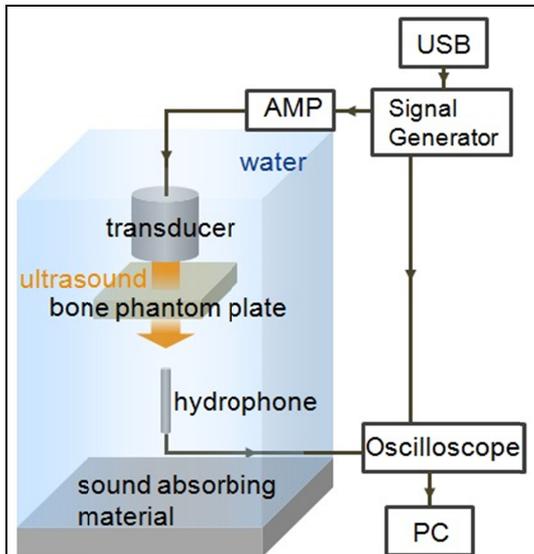


図 1 1 実験系

本実験に用いた振動子を図 1 2 に示す。振動子は上田日本無線株式会社製によって作成されたものであり、振動子面は直径 24mm の円板で、周波数帯域は 357-665kHz (6dB ダウン) となっている。



図 1 2 実験に用いた振動子

実験に用いた骨ファントム板を図 1 3 に示す。音速は 2884m/s、密度は 1664 kg/m³、吸収率は 4.02 dB/cm/MHz であり、ヒト



図 1 3 実験に用いた骨ファントム板

頭蓋骨を模したパラメーターとなっている。大きさは5cm×7cm、厚さは0.6mmから4.4mmまで0.2mm間隔で計20枚用いた。実測とMRI画像によればヒトの側頭骨の厚みはこの範囲内で十分にカバーできている。透過した超音波強度は図5に示したハイドロフォンを用いて測定した。

骨ファントム板と振動子との距離(これは皮膚厚に相当する)を変えながら透過超音波強度の測定をおこない、500kHz正弦波と変調波駆動とを比較した。また、骨ファントム板の厚さを変化させながら透過超音波強度を、500kHz正弦波と変調波駆動とで比較した。

次に、ヒト頭蓋骨の測定を行った。測定対象としては治療対象となる日本人高齢者の頭蓋骨で慈恵会医科大学解剖学講座に保管されている献体を用いた。用いた3体の頭蓋骨は次の通りである。

No. 4737...66歳、男性

No. 13.....56歳、男性

No. 4759...72歳、男性

それぞれの画像を図14, 15, 16に示す。本実験では図のように頭部がカットされているものを使用した。



図14 頭蓋骨4737



図15 頭蓋骨13



図16 頭蓋骨4759

ヒト頭蓋骨の超音波透過率の測定をおこなうためには頭蓋骨固定具が必要であり、市川工業株式会社に依頼し作成した。頭蓋骨固定具を図17, 18, 19に示す。図18が頭蓋骨を保持する部分であり、頭蓋骨は3点で保持される。頭蓋骨と接する箇所は、柔らかい素材でできており、頭蓋骨に傷がつかないように配慮されている。図19が振動子を保持する部分である。振動子保持部はステージに取り付けられ、X,Y,Zの3方向の平行移動と、2つの角度方向に微調整が可能となっている。

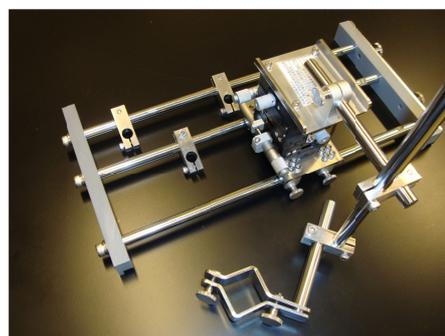


図17 頭蓋骨固定具

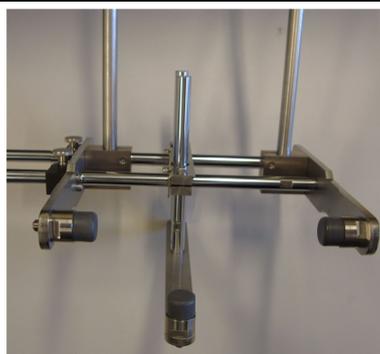


図 1 8 頭蓋骨保持部

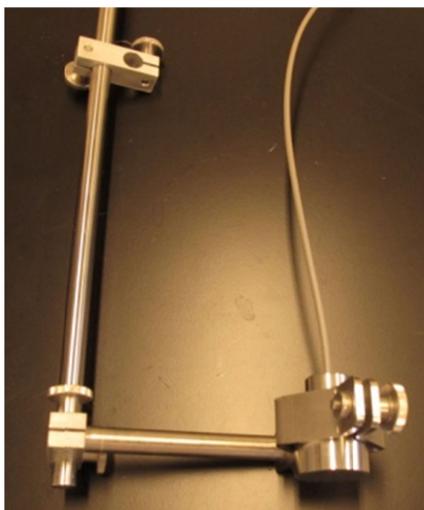


図 1 9 振動子保持部

頭蓋骨のプラスチックモデルを固定した様子を図 2 0 , 2 1 に示す。振動子は側頭骨ウィンドウの位置に合わせて配置する。振動子は上田日本無線社製の直径24mmの円形振動子 (357-665kHz) を用いた。

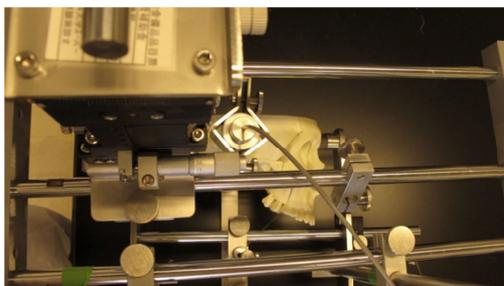


図 2 0 頭蓋骨のプラスチックモデルを固定した様子 (側頭部)

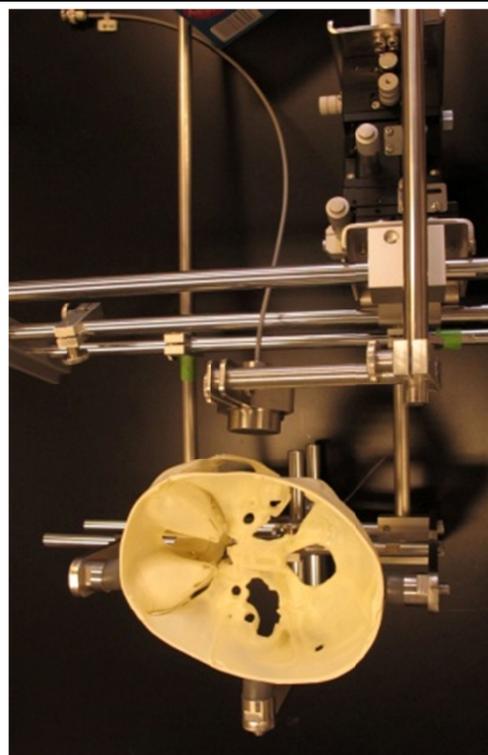


図 2 1 頭蓋骨のプラスチックモデルを固定した様子

頭蓋骨透過後の音響強度分布の測定は次のようにおこなった。まず、振動子の中心を通り、振動子面に垂直な軸(以後、Z軸)に沿って、ハイドロフォンを動かしながら音響強度を測定した(図 2 2)。

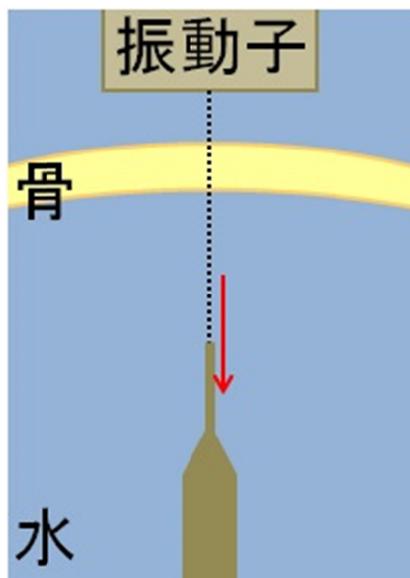


図 2 2 Z 軸方向の音響強度分布測定

3点選び(図23)、それぞれのZの値に対して、ビームに垂直な面上の2次元プロットを取得した(図24)。測定の様子を図25に示す

駆動方式は、400kHz正弦波、500kHz正弦波、600kHz正弦波、PSRF(500±100kHz, 10μ秒)とし、これらの比較を行った。

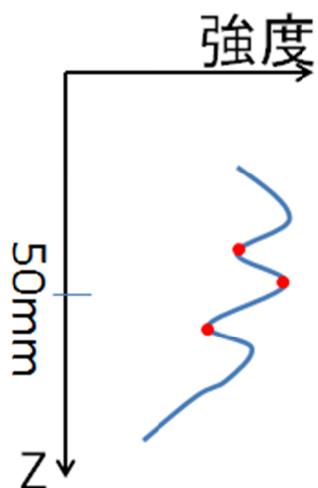


図17 Z=50mm 付近の3つの極値

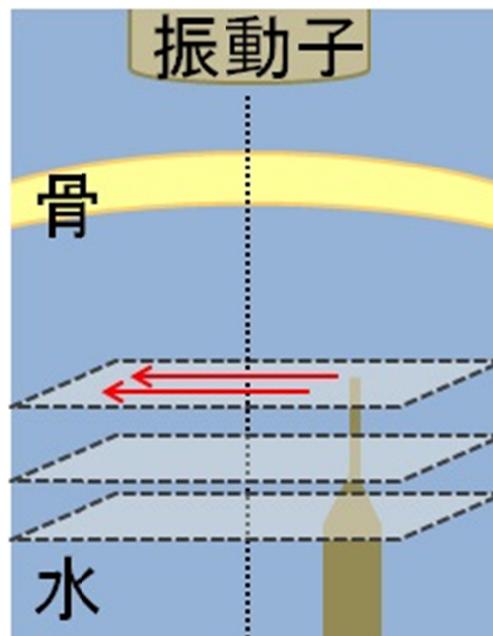


図24 Z=50mm 付近の3つのZの値それぞれで2次元プロット

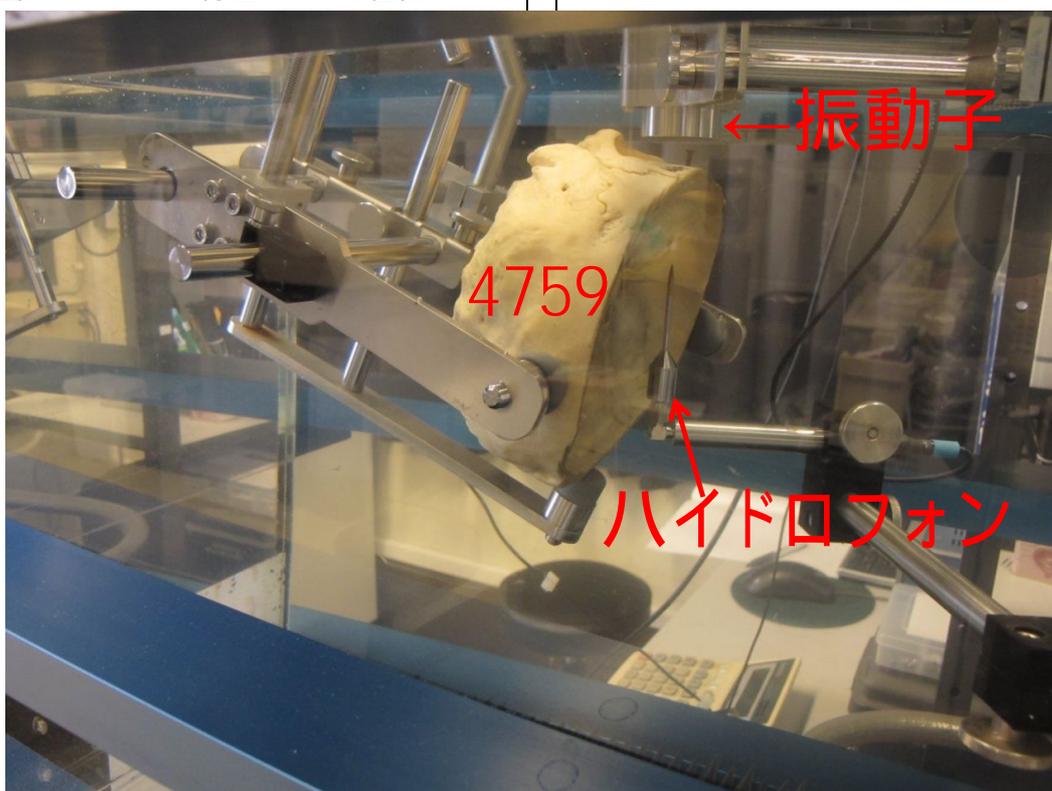


図25 頭蓋骨測定の様子

ヒト頭蓋骨の測定ポイントの見出し方

完全な平らな骨ファントム板の場合と異なり、頭蓋骨透過実験の場合には、超音波が屈折してプローブを向けた方向に直進しない場合がある。つまり、超音波プローブ中心とハイドロフォン中心を結ぶ線（中心軸）から超音波の照射強度中心がずれる場合である。中心軸に対して直角方向の2次元にハイドロフォンを走査させて、超音波強度の2次元マップを作成する。図26に一例を示す。図26では、超音波プローブの中心線（グレーの線の交差点）から、ハイドロフォンによる測定強度の最強の点が5mm以上ずれている。超音波プローブの照射位置をハイドロフォンが観測する超音波強度の最も強い位置に移動して、この交差点と最強点のずれを小さくする。この作業を繰り返して、観測される超音波の最強な点が、中心軸から2mm以内に収まるようにする。図27には、超音波プローブの中心線からのずれのほとんどない例である。上記の作業を行う出発点として、臨床におけるカラードップラーでの経験から頭蓋骨のこめかみ部に片側に3点候補点を挙げて、この3点から上記の作業をして、選んだ点を測定ポイントとした。左右両側の測定を行うと一つの頭蓋骨あ

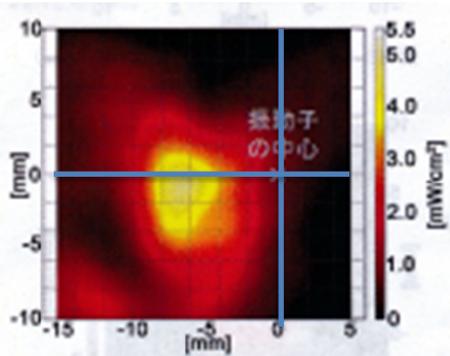


図26 超音波透過率測定の様子
(屈折による超音波の中心のずれは5mm以上ある)

たり6点の測定点があることになるが、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、6箇所未満の測定ポイントとなった頭蓋骨もあった。各測定ポイント毎に上下2mmずらした4点を加えて測定した。

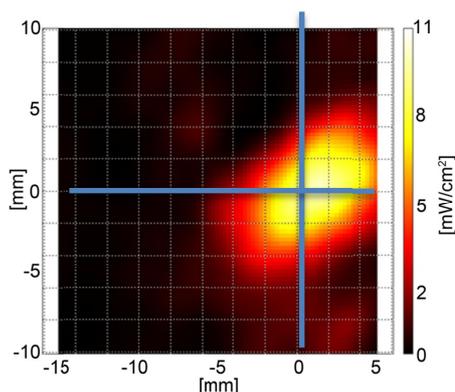


図27 超音波透過率測定の様子
(屈折による超音波の中心のずれは2mm以内に収まっている)

超音波プローブからハイドロフォンまでの距離は50mmに固定した。これは、上記のようにして測定ポイントを決めた後に、50mmから距離を前後してその強度変化を観察したところ、図28に示すようにその変化が小さかったからである。

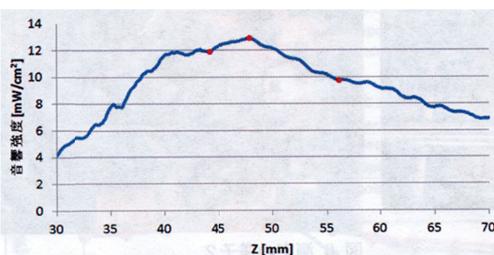


図28 超音波プローブとハイドロフォンの距離(z)を変えたときの音響強度変化(500kHzでの照射)

(2) in vitro血栓溶解作用の定量法

超音波血栓溶解促進療法の実施においては、照射する超音波にはパラメーター（周波数、波形、パルス長さ、繰り返し回数、音圧、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が大きく、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できない。

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、実験の効率が非常に悪い。

それで、われわれは新しく2D式超音波血栓溶解評価法を考案、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（今現在は百個、今後はそれ以上も可能）の関心領域(Region of Interest, ROI)からの血栓厚さのデータを取得可能で、各ROIの血栓変化と照射強度を対応させることで、超音波照射強度（又は音圧）と血栓溶解促進率の関係を一つの血栓から分析できる。また、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。

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値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（図29）。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、内腔の厚さはスパーサーによって2、3、4、5、6mmに調整できる。

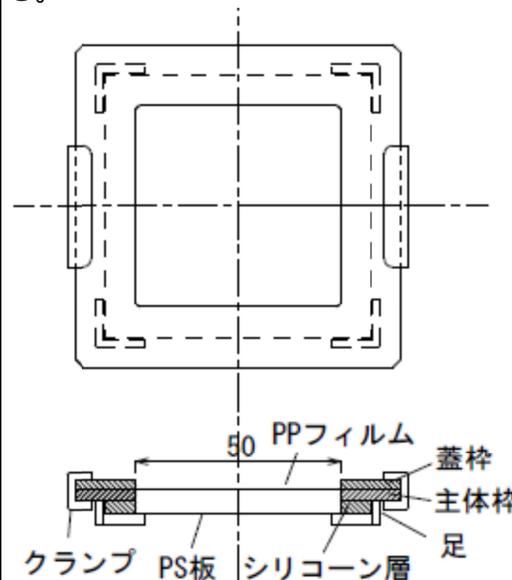


図29 血栓セル。上図は上面図、下図は中心軸断面図

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。

血栓作製

図30に示すように、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をセル本体底のPSシート上に作製した。

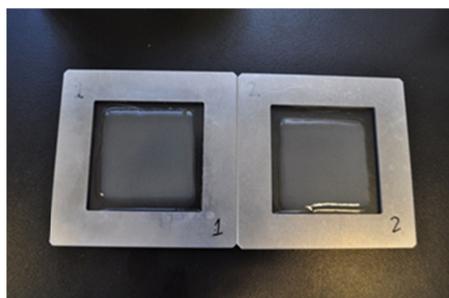
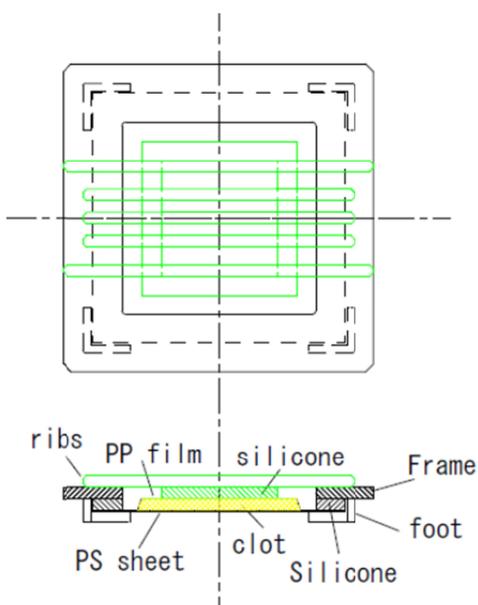


図30 血栓の作製。上図はセル本体（黒色で表示）と血栓カバー（緑色で表示）の組合せを上から見た図、中央図はその垂直断面図、下図は作成した二つの血漿血栓の様子

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。

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。

（図31）

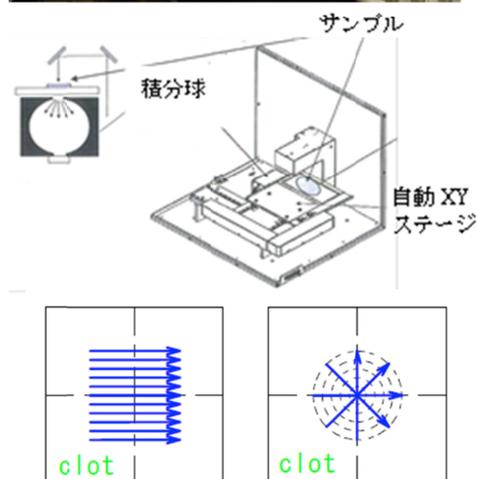


図31 微小部位吸光度マッピング装置

図31に示すよう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、コンピュータによるコントロールで、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ることにより、各領域の血栓の厚さを求める。なお、図3 1の下図に示すように、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り、各々検量線セルとサンプルセルのスキャンに対応している。

検量線作成

検量線用セル(図3 2)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。



図3 2 検量線セルの垂直断面図

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(図3 3)。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。

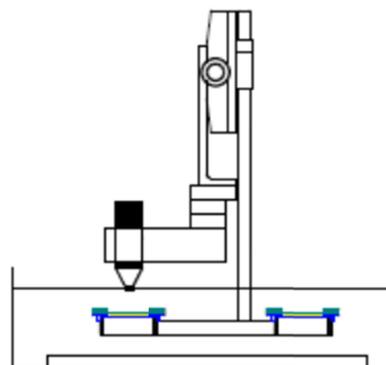


図3 3 超音波照射装置

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、厚さ約1.2mmのシート状血栓を作製した。血漿は血栓セル本体の上面PPフィルム(40mm×40mm×25µm(厚さ))と底面PSフィルムからなる厚さ1.5mmの空間に図3 4のように加えられた。予定の時間後、PPフィルムを外して、シート状血栓がセル本体のPSフィルム上に作製される。

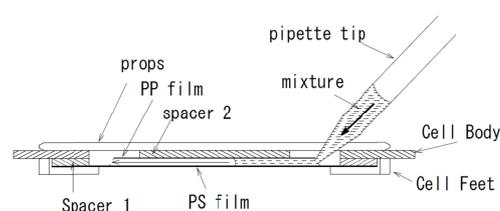


図3 4 血栓作製法 セル本体とその上にかけたPPフィルムの間に血漿混合液をピペットで注入

ヒト血漿からの血栓作製の場合には、37℃ 解凍した後、はシリンジフィルター(Millex® Syringe Filter Units, PES, 0.45 µm, 33mm)で、はガラス微繊維フィルター(GF/D: 2.7 µm, 47mm)でろ過した。凍結したヒト血漿は Lot BJ2592と Lot BJ3299をコージンバイオ株式会社から購入した。

ヒト全血からの血栓は、抗凝固剤CPDA-1添加したヒト全血（コード：12081645）から作製した。（コージンバイオ株式会社から購入）購入後は4℃で保存、採血日から35日以内使用した。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牛トロンピン、加えた容積比率は18:1:1）2.3mlを作製して、血栓セル内に注入し、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フィルム上に作製した。

(3)MRIによる脳梗塞モデルの分類

本研究の経頭蓋超音波血栓溶解促進療法の開発では、in vivoでの超音波照射安全性評価が大変重要な項目である。通常健康なラットでの超音波照射実験も一定の意味はあるが、脳梗塞モデルラットを用いて虚血による様々な生体応答が惹起された状態で超音波照射によって脳出血が促進することの有無を知ることが適切と考えられる。この脳梗塞モデルとして比較的良く確立された方法は、ナイロン糸をラット中大脳動脈（MCA）に塞栓させるモデル（小泉モデル）である。ほぼ一定の長さの糸を術者の手の感覚により挿入するのであるが、塞栓の程度には差があると考えられる（MCA血流の完全・部分閉塞、他動脈の閉塞の有無など）が、閉塞後のラットの状態（脚の麻痺や、旋回拳動）で判断するのみであるのが常法である。特に塞栓時間が長い（例えば3時間）と、予後（生存や脳出血等）に大きく差が出やすいことを我々も経験している。

この評価するには、ばらつきの少ない評価法であることが大変望ましい。そこで、最新鋭の高磁場動物用MRI装置によって、塞栓状態の精密な観察を行うと共に、ラットの予後との相関を求めることとした。高磁場MRI装置では、微細な生体情報が得

られると共に、測定に要する時間が短縮されるために、従来は測定時間の長さ故に脳梗塞モデルでの超音波照射実験にMRI測定実施が不可能であった場合でも、測定が可能となることが考えられる。本研究が目的とする脳梗塞モデルラットでの超音波照射実験において、どのようなスケジュールならばMRI測定を繰り返すことが可能になるかの検討も行った。

Wistar雄ラット（体重254g～303g）を用い、ナイロン糸で中大脳動脈を閉塞する小泉法を基にし、抜糸による再開通操作を迅速に行うために、Memezawa法を改良した方法を用いた。すなわち、ポリエチレンチューブPE10で作ったシースとその内側に挿入された3-0ナイロン糸を血管にいれることで、内側のナイロン糸の抜糸をスムーズにする。再開通時には、再び手術面を開ける必要なく、体外に露出したシースを保持して内側のナイロン糸を引けば良い。

イソフルラン吸入麻酔下で、ラットを保温パッド上に仰臥位で固定後、頸部に正中切開を加え、右側の総頸動脈（CCA）、外頸動脈（ECA）、内頸動脈（ICA）及び翼突口蓋動脈（PPA）を露出し、CCAをその分岐部より3mm近位処で結紮し、ECAとPPAをもそれぞれの根底部で結紮する。ICA末梢側に杉田クリップを掛け、CCA分岐部に4-0絹糸を緩く縛り、その直前1mmに穴を開いて、PE10で作ったシース（長さ50mm）とそこに挿入された3-0ナイロン糸（長さ68mm）を一緒にICA内へ入れてからCCA分岐部の絹糸を軽く縛り、ICA部のクリップを外し、シースをICA内6mmまで送り、CCAの結紮糸で固定後、その中のナイロン糸をさらに13mmを進め、前大脳動脈内まで送ってから閉鎖する。こうすることで、ナイロン糸は中大脳動脈（MCA）の入口を塞ぎ、その支配領域への血流は遮断される。再開通時にはシース末端を

ピンセットで掴んで、ナイロン糸の末端をもう一つのピンセットで掴み、10mm位抜いて、MCAの再開通が開創なしに簡単にできる。

塞栓作業の直後に、高分子ミセル型のMRI造影剤(0.033 mmol Gd/kg)を尾静脈から投与してから、9.4TMRI装置(Bruker社製 BioSpec 94/20USR型)にラット脳用のコイル(Model No.: 1P T10324V3)を装着してMRI撮像(Angiography, DWI, T1, T2, T2*)を行った。麻酔下で規定の時間(1~3時間)塞栓を続けた後に、ナイロン糸を抜糸して3時間MRI撮像を継続した後に、麻酔から覚醒させて、血管閉塞24時間後に状態観察を行った。

MRI Angiographyの撮像パラメーターは以下にまとめる通りである。

- TR/TE = 15.0/3.4ms
- FOV = 2.14cm x 3.30cm
- Slice thickness = 6 mm
- 解像度 = 0.01cm/pixel
- Time = 3.43 s
- 積算 = 1回

2, 貼付型超音波振動子システムの作製

超急性期脳梗塞患者に対する超音波血栓溶解促進療法を普及させるためには、より簡便にかつ確実に有効な超音波照射を実施できる貼付型超音波振動子は、大変有意義である。また、2014年に、rt-PA投与と血管内治療による血栓除去を組み合わせた治療法が、rt-PA単独治療に比べて有意な予後改善効果を示すことが示された現在では、貼付型は新たな意義を持つことになる。それは、医療機関に救急搬送されて診断、そしてrt-PA投与を行った後、血流が再開されない事態で血管内治療が行える他施設へ搬送される場合である。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が救急車など搬送車両内での使用できることに意義が見いだせるのである。

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平成33年の上市を目指し開発を推進している。

本研究期間は、平成24年度、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。

平成25年度は、頭蓋透過の個人差を把握し、個人差緩和を実現する超音波条件、振動子、装着具の開発を進めた。

平成26年度は、PMDAと面談を行い、安全性と有効性の評価に向けて機器設計を進めた。

(1) 超音波照射システムの作製

(1-1) 振動子設計

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35)。

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36)。

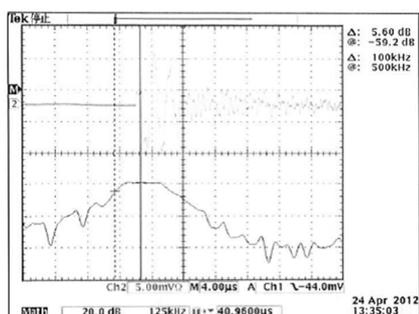


図35 ハイQ材(人工セラミックス)
横軸に周波数、縦軸に音響強度を表す。限られた周波数領域で音響強度が高まっている。

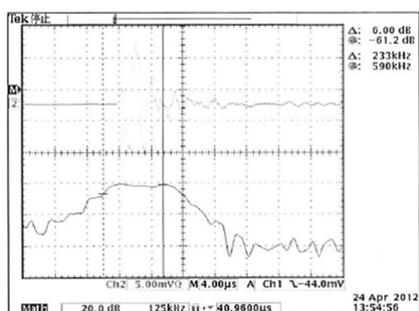


図36 ローQ材
(多孔質人工セラミックス)

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。

(1-2) 変調条件による定在波抑制
目的の項に書いたとおり、300kHzとrt-PAの組合で実施されたDaffertshoferらの臨床研究は、高率の脳出血によって中断を余儀なくされた。古幡らは、Daffertshoferらの超音波条件を解析したところ、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。

(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))

我々も目指している簡便に頭蓋内血栓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選択した。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、我々は超音波変調が有効な方法と考え、RSBIC、PMN、PSRF 各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実施した。

(1-3) 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を血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37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。



図37 皮膚/骨ファントム：白い部分

(1-4) 振動子の周波数特性改善

変調活用は、平成24年度の検討により傷害の原因となる局所的に強い音響強度を生じる定在波、ホットスポットの発生回避にあたり、変調超音波が有用であることを見出したことによる。この変調領域は $500\text{kHz} \pm 100\text{超 kHz}$ を計画しているが、一般的に活用されている 500kHz ローQ材のピーク周波数帯域は、 $320 \sim 620\text{kHz}$ であり、振動子の周波数特性にバラツキが生じた場合、広帯域での超音波が照射されない懸念が残る。定在波、ホットスポットの回避は、安全特性の確保に向けて重要事項であるため、 $400 \sim 600\text{kHz}$ を確実に照射する振動子の設計を行った。

(1-5) 装着システム設計

(1-5-a) 皮膚接触ゲルの透過性評価

超音波を頭蓋内のターゲット部位に照射するためには、空気層は伝搬障壁となる。通常超音波診断では、皮膚と超音波診断プローブの間に空気層が入らないように、接触部に粘性液状ゼリーを厚く塗布し、空気の抱き込みが無いことを超音波診断画像で確認しながら実施する。

本研究開発の医療機器は、装着時に画像診断により超音波遮断の原因となる空気層の有無は確認しない。さらに、側頭部の剃毛作業は簡略化できないものの、より迅速な治療開始のために、超音波振動部に半固形ゲルを装備し、剃毛・装着位置を確認の後、速やかかつ確実に空気層の抱込みを起こさない装着を実現する。

この半固形ゲルは、振動子の装着部位として頭蓋骨の厚みが薄い側頭部前方を計画しているが、装着部位は概して凹凸のある側頭部への装着のため、凹凸を有する皮膚の接点となるため、密着が得られる柔軟性を有するゲル素材を選定することが重要である。さらに超音波の減衰、反射を生じないゲル素材であることもさらに重要な要求特性となる。

超音波の反射を抑制するためには、皮膚に接触するゲル素材の音響インピーダンスが皮膚と近似していることが求められる今回は水、皮膚に近似しているといわれ、安全性の高い粘着性シリコンゲル素材を候補とし(表5)、超音波透過性をAIMSを用いて評価した。

表5 評価ゲル一覧

	サイズ形状
1	粘着性シリコンゲル 0.2mm厚
2	粘着性シリコンゲル 0.6mm厚
3	市販超音波用ゲル 『ソナゲル』5mm厚

(1-5-b) 装着具の設計

本研究開発は、貼付型振動子によって頭蓋内に超音波を照射し、rt-PAによる血栓溶解を促進するデバイス開発を目指してきた。しかしながら、臨床現場に確認したところ、対象患者の意識レベルは低いケースが多いため、無意識な挙動をとることが明らかになった。頭部に違和感のある振動子を貼付した場合、貼付した振動部を無意識下に剥離除去する可能性が懸念される。

振動部が剥離された場合も、rt-PAの血栓溶解治療は継続され、rt-PA治療に悪影響は及ぼさないが、眼球上に移動した場合、視力障害を生じる可能性がある。

また、透過性の評価の際にも述べたが、ヒト頭蓋骨に平滑部位は存在しないため、平滑な振動子と装着部間に空気層を挟まずに固定することは困難である。空気層を挟まずに振動子で発生させた超音波を適切に頭部に伝搬させるには、振動子と側頭部の間に柔軟なゲルを配し、軽度な圧力をかけた状態で密着を維持する必要がある。そのため、超音波振動部、側頭部接触ゲル、振動部保持具を一体とした超音波ユニットのデザインを開始した。

(1-6) 駆動装置設計

平成24年度定在波の抑制目的確認のため、変調機能を有する基板試作を行い(図38) 変調信号による定在波抑制効果を確認した。

平成25年度は、臨床において、出力と消費電力、電氣的、機能的な安全性、信頼性の確保を目指した駆動装置設計を着手した。着手に当たり、設計要素の必要事項を調査・検討し、機器の要求仕様を明確にした。



図38 変調超音波出力回路試作機

(2) ラットでの超音波照射安全性評価

臨床に適用するのにあたり、平成26年度は、PMDAと開発前相談を実施し、有効性と安全性の評価を推進した。

有効性は、in-vitroでの全血溶解性評価、ならびに安全性は機器の安定性能の実現を前提にラットを対象としたin-vivo試

験にて安全性立証のうえ治験申請に向け準備を進めた。

(2-1) 全血血栓の超音波溶解加速性評価

脳梗塞による脳組織へのダメージを最小限にするには、治療開始から出来る限り早い段階で血流を再開させることにある。rt-PA単独投与に比べ、超音波を照射することで有意に血栓の溶解が加速できる超音波強度の知見を得ることを目的としてin vitro試験を実施するが、毎回ヒト血栓での評価は困難なため、ブタ血を用いて評価を推進した。ブタ血実験に先立ち、ヒト血でのrt-PA濃度とブタ血でのrt-PA濃度の溶解効果相関を評価し、ブタ血で超音波の有効性基本条件の検討を実施。

1-1) ヒト血でのrt-PA濃度相関評価

血液凝固液(1.25M/L CaCl₂: トロンビン 100 IU/ ML: 生理食塩液 = 1: 1: 18)とヒト血液を96穴丸底マイクロプレートに20μL: 100μLで調整し、37 /1時間静置して血栓を形成した。

キュベットに遠心分離して得た血漿を615 μLと、上記で作製した血栓1つを入れた。Blankサンプルとしてキュベットから血漿を15 μL採取し、その後rt-PA溶液50 μLを上記キュベットに混注した際、終濃度が2.0 μg / mLになるように調製し、以下倍希釈を行い最小0.0002 μg / mLまで調製した。血栓と血漿が入ったキュベットにそれぞれ50 μL各濃度のrt-PA溶液を添加した。

キュベットをシェーカーで攪拌しながら37 でインキュベートし、rt-PA添加後30分、60分、90分時に血漿を採取し、先のBlankサンプルと共に各サンプルに35 μLの生理食塩水と50 μLの2.0% SDS溶液をマイクロプレートのウェル内で混注し、吸光度を測定した。90分時のサンプル採取後、血栓を全て溶解し、生理食塩液で4倍に希釈して吸光度を測定し全血栓量を算出した。

ブタ血での rt-PA 濃度相関評価

ブタ血でヒト血と同方法で rt-PA 濃度を検討した。使用するブタ血は、医療用動物実験を扱う企業から血液を使用する当日に新鮮なブタ静脈血を吸入麻酔下腋窩静脈より採血し、使用直前まで保冷剤にて保冷して使用した。

血栓溶解加速評価試験

96 穴のディーププレートを用い、ウェル内に血漿および上記方法で作製した血栓を入れ、恒温槽内から超音波を照射し、血栓溶解を行った（図 1.）。1 回の試験で 2 群の対象設定と併せ、異なる 2 種の超音波強度を評価した。対照群は rt-PA 投入超音波非照射群と、rt-PA 未投入超音波非照射群を設置し、4 群間で溶解率を比較した（図 2.）。溶解率は rt-PA 濃度検討時と同様の方法で rt-PA 投与後 15 分、30 分、60 分、90 分に測定した。超音波照射時の恒温槽も 37 に設定し、超音波照射は rt-PA 投入と同時に開始し 60 分間照射を行った。照射終了後の 30 分間は 37 に設定したインキュベーターにて静置した。

(2-2) 超音波安全性評価

自己血栓によるラット脳梗塞モデルにアルテプラゼ（rt-PA）投与下において超音波照射による神経症状及び脳梗塞巣体積を評価し、安全照射条件限界を見極める。

(2-2-a) モデル作製方法

血栓の作製

ラット（Slc:Wistar、雄、8 週齢）から約 2 mL 採血し、採血直後の血液に日本薬局方トロンビン 150 単位及びヒトフィブリノゲン末 40 mg を最終濃度がそれぞれ 5 IU/mL 及び 2 mg/mL になるように血液と混和。混和後、直ちにポリエチレンチューブに充填し、37 に設定したインキュベーター内に 24 時間静置した。使用直前に血栓を 25 mm に切断して使用した。

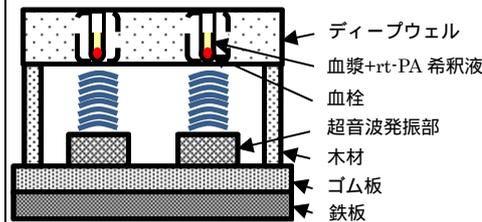
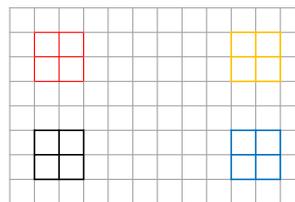


図 3 9 血栓溶解試験 模式図



	rt-PA	超音波照射	超音波強度
赤			強度1
黒		x	
黄	x	x	
青	x		強度2

図 4 0 96穴ディーププレート試験群配置図

血栓による脳梗塞モデルの作製

ラット自己血栓モデルは Z. G. Zhang ら¹⁾ 及び E. Busch ら²⁾ の方法に準じて作製した。小動物実験用簡易吸入麻酔装置を用いて 1.5 ~ 2.0% イソフルラン吸入麻酔下で、ラット（Slc:Wistar、雄、8 週齢）を仰臥位に固定し、頸部正中切開にて外頸動脈を露出し、糸で結紮する。血栓を充填したテフロンチューブを右外頸動脈から右内頸動脈を介して中大脳動脈の起始部まで挿入し、血栓を注入した。血栓注入後、チューブを抜去し、頸部を縫合した。

(2-2-b) 超音波照射

設置方法、ラットを麻酔下にて伏臥位に固定し、頭頂部を剃毛後、ジェルを塗布し振動子（20 mm × H33 mm）を密着させ固定した。

薬剤の投与方法

インフュージョンポンプを用い、翼付き注射針を装着したディスポーザブル注射筒で rt-PA 又は生理食塩液を、伏臥位に固定したラットの尾静脈内に投与。

rt-PA はグルトパ®注 600 万を添付の溶解液で溶解し 600,000 IU/mL (10 mg/mL) に調製した。生理食塩液をそのまま用いた。血栓注入 1.5 時間後から薬剤投与を行った。投与方法は、ヒト臨床と同等に総量の 10% (1 mL/kg) を 1 分間かけて急速投与し、その後残りを 1 時間かけて持続投与 (9 mL/kg/h) した。

超音波照射条件

周波数は 400-600 kHz 変調にて、強度は振動子出力を照射無し、1.4、2.8 W/cm² として連続照射した。超音波の照射は、血栓注入後 1.5 時間から 60 分間実施。

ラット患部に照射した超音波照射強度は、超音波透過率がおよそ 50 % のため、以下の表 6 のとおりである。

表 6 超音波照射強度の推定

発振器の音響強度	1.4 W/cm ²	2.8 W/cm ²
ラット患部音響強度	0.7 W/cm ²	1.4 W/cm ²

(2-2-c) 測定及び評価方法評価項目

脳梗塞抑制作用 : 脳梗塞巣体積

神経症状改善作用 : 神経症状スコア

脳梗塞巣体積の算出

脳梗塞領域は、血栓注入後 24 時間の神経症状評価後に、ソムノペンチル®を 70mg/kg を腹腔内投与して深麻酔をかけ、腹部大静脈より脱血屠殺した。全脳を取り出し、脳底部の血栓の残存の有無を観察。ついで、梗塞中心部の前後に連続した 2 mm 厚の冠状切片を作製し、冠状切片非梗塞領域の赤色と比べ白色である領域を梗塞と定義して画像解析ソフトにより解析した。

各脳切片における脳梗塞巣は柱形であると仮定し、ブロックの合計を脳梗塞体積として算出した。

神経症状の評価

血栓注入後 24 時間に神経症状を評価する。神経症状は、意識レベル、四肢緊張度合、歩行、握力及び痛覚スコアを合算したものをスコアとした。なお、神経症状スコアは W. E. Hoffman らの方法を参照して評価した。

3 , 臨床研究プロトコル

(1) 治験プロトコル案作製

超音波血栓溶解促進療法の臨床プロトコル作成に当たり、最近の rt-PA 静注療法の治療開始可能時間 (therapeutic time window : TTW) に伴う、rt-PA 静注療法対象の増加症例数を予測し、増加症例の臨床的特徴を明らかにすることを目的とした解析を行った。すなわち、2012 年 8 月 31 日になが発症後 3 時間以内から 4.5 時間以内へ延長されることが厚生労働省の薬事・食品衛生審議会で認められた変化に対応したものである。

この解析は、2011 年 1 月から 2012 年 8 月 31 日までに国立循環器病研究センターに発症 7 日以内に入院した急性期脳梗塞患者を対象とした。発症 3 時間以内に rt-PA 静注療法を受けた症例を 3 時間治療群、発症 3.5 時間以内に来院し rt-PA 静注療法を受けていないもののうち適応外項目がなく National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) スコア > 4 の患者を 4.5 時間適応群、発症 2-3.5 時間で来院し rt-PA 静注療法を受けていないもののうち適応外項目もしくは NIHSS スコア 4 を有する患者を 4.5 時間除外群とした。来院・治療開始時間は 60 分と仮定した。予測される増加率は、(4.5 時間適応群 / 3 時間治療群) × 100% から計算した。また、年間の予測増加数を計算した。3 時間治療群と 4.5 時間適応群を比較し、4.5 時間適応群の特徴を調べた。

さらに、4.5時間除外群では除外となった理由とその頻度を調べた。また、TTW 延長後の2012年9月から12月までにrt-PA 静注療法を受けた患者のうち実際にTTW 延長によって増加した(来院-治療時間60分と仮定し発症2時間以降に来院し4.5時間以内に治療を受けた)患者の割合を調べた。

この結果を踏まえて、現在開発中の新規超音波血栓溶解装置の臨床導入に向けて、現在までの開発状況、虚血性脳卒中の急性期治療の現状を踏まえて、プロトコル案を作成した。また、他に考慮した背景は以下の4項目である。

現在開発中の新規超音波血栓溶解装置は治療用の約500kHz超音波を患側の側頭部からrt-PA静注療法中に60分間照射する仕様となる予定である。しかし、血管閉塞部位を評価する診断およびモニター機能は搭載しない。

2012年8月31日に改定されたrt-PA静注療法適正指針では発症から治療開始までの時間が3時間から4.5時間以内まで延長された。

発症8時間以内のrt-PA静注療法適応外もしくは無効例に対して血栓回収装置による血管内治療が可能である。

これまでCLOTBUST試験、TRUMBIなどの臨床試験が行われ、現在CLOTBUST-ER試験が進行中である。

上記背景を参考に新規超音波血栓溶解装置の治験プロトコルを提案する。

また、本研究は患者の個人情報や患者から採取された資料を使用しない研究である。

参加(依頼)施設候補は以下の通りである。

- 国立循環器病研究センター
- 東京慈恵会医科大学
- 日本医科大学(木村和美先生)
- 広南病院(古井英介先生)
- 神戸市立医療センター中央市民病院(藤堂謙一先生)

- 聖マリアンナ医科大学(長谷川泰弘先生)
- 熊本赤十字病院(寺崎修司先生)
- 製鐵記念八幡病院(藤本茂先生)
- 国立病院機構九州医療センター(桑城貴弘先生)
- 京都第二赤十字病院(永金義成先生)
- おさか脳神経外科病院(大山英郎先生)
- 福井大学(山村修先生)

(2) ヒストリカルデータ収集

今回、開発の際に参照するデータの収集を目的として、急性期虚血性脳卒中に対するrt-PA静注療法例において、超音波照射を併用しない場合の早期再開通率、症候性頭蓋内出血率と3カ月後転帰を調べた。

本研究計画は、国立循環器病研究センター倫理委員会の承認を受けた。

対象は2005年10月から2013年4月までに当院でrt-PA静注療法を施行した384例である。前向きに収集したデータベースを用いて、後ろ向きに検討した。検討項目は、患者背景、脳梗塞病型、MRAもしくは脳血管造影検査(digital subtraction angiography; DSA)による血管閉塞部位を、内頸動脈(internal carotid artery; ICA)、中大脳動脈(middle cerebral artery; MCA)、前大脳動脈(anterior cerebral artery; ACA)、後大脳動脈(posterior cerebral artery; PCA)、椎骨脳底動脈(vertebro-basilar artery; VB)系、閉塞血管なし、評価不能に分類した。主幹動脈(ICA, MCA, ACA, PCA)に閉塞があり、発症2時間以内にMRAもしくはDSAで再開通の評価を行った症例のrt-PA投与2時間以内、24時間以内の再開通の有無を調べた。2時間以内に再開通の評価は行ったが、24時間以内には評価しなかった症例は、2時間以内の再開通の有無で24時間以内の再開通の有無に代用した。

発症 36 時間以内の National Institutes of Health Stroke Scale(NIHSS)スコア 4 以上の増悪を伴う頭蓋内出血を症候性頭蓋内出血と定義した。転帰は 3 カ月後の modified Rankin Scale(mRS)スコアで評価し、mRS 0-1 を転帰良好、mRS 0-2 を日常生活自立とした。また、安全性指標の 1 つとして 3 カ月後死亡 (mRS 6) を評価した。なお、rt-PA 投与後 24 時間以内に別の部位に脳梗塞を再発した症例は 24 時間以内の再開通の評価から除外した。また、rt-PA 静注療法後に閉塞血管に対して経皮経管の脳血栓回収用機器(Merci リトリバー、PENUMBRA システム)を使用した症例は、24 時間以内の再開通の評価と症候性頭蓋内出血、3 ヶ月後の転帰の評価から除外した。

再開通の評価は MRA では modified Mori grade を用い(Mori E, et al. Stroke 2010), DSA では Thrombolysis in Cerebral Infarction 分類 (TICI) grade を用いた (Tomsick S, et al. Am J Neuroradiol 2008)。MRA と DSA とを併用した評価は、Yoshimura ら (Yoshimura S, et al. J stroke Cerebrovasc Dis 2014) の報告を参考に、grade 0: MRA で modified Mori grade 0, DSA で TICI 0, grade 1: MRA で modified Mori grade 1, DSA で TICI 1, grade 2: MRA で modified Mori grade 2, DSA で TICI 2A, grade 3: MRA で modified Mori grade 3, DSA で TICI 2B, 3 という分類を使用した。modified Mori grade 2 以上、もしくは、TICI 2A 以上、MRA と DSA を併用した評価では grade 2 以上を再開通ありとした。

主幹動脈閉塞患者の閉塞血管部位(ICA, M1, M2)と MRA, DSA の併用による再開通率、症候性頭蓋内出血、転帰の関係についてカイ 2 乗検定を用いて検討した。

(3) 経頭蓋カラードブラ用探触子固定具の開発

経頭蓋ドブラ法(TCD)の探触子頭部固定具は市販されているが、経頭蓋カラードブラ法(TCCS)の探触子固定具は市販されていない。この探触子はより大型で重く固定が難しい。今回、有限会社アンリミット・ジャパンと共同でTCCSに用いる探触子頭部固定具を開発した。

頭部固定型の頭部固定具の試作機を我々の要望に沿ってアンリミット・ジャパン側が作成した。実際に患者に使用し、有用性について評価した。

対象は平成25年7月から平成27年3月までの当院に入院した患者を対象とした。TCCSで側頭骨窓から脳血管の観察が可能な患者で、固定具を使用し頭蓋内血流が安定して観察可能か、脳梗塞の原因となる微小栓子シグナル(microembolic signal: MES)の検出が可能か、血管同定までの時間と頭部装着感等をTCDの頭部固定具と比較し、それぞれについて検討した。

4. バブルリポソーム

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ティング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。バブルリポソームの最大の特徴はその粒径がナノサイズ(500nm程度)と小さいことである。

表7に示す様に、マイクロバブルを併用することで、ヒトでの急性期脳梗塞の血流再開率がrt-PA単独や、rt-PA+超音波併用に比べて顕著に向上することが報告されている。

表7 超音波、マイクロバブル併用による血栓溶解促進効果

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

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

粒径が約3 μ mの μ バブルに比べて、圧倒的に粒径の小さなバブルリポソームは、血栓部位への到達性と、血栓の網目構造ないでの高い浸透性において優れていて、マイクロバブルよりも高い治療効果が期待される。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、ターゲティング分子として、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。

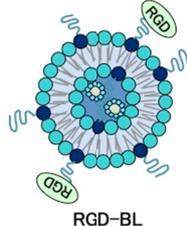


図4-1 RGD-BL 模式図

(1) バブルリポソーム(BL)の調整

脂質組成を DSPE: DSPE-PEG(2k)-OMe: DSPE-PEG(3k)-Mal:cholesterol = 64: 1: 5: 30 (モル比) とし、総脂質量 100 μ mol 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(CGGe(RGDfK))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(CGGe(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。

C₃F₈ ガス封入量の測定は、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 μ L 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。

粒子径の測定は、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。

(2) in vitro 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 \times 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。

(3) in vivo 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

間に 40 %の第二塩化鉄をしみ込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 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。

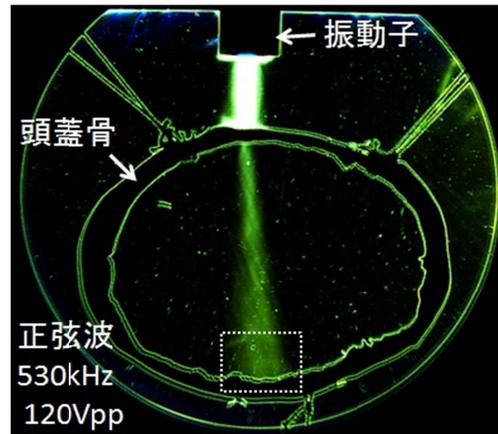
C. 研究結果

1. 超音波の効果と安全性

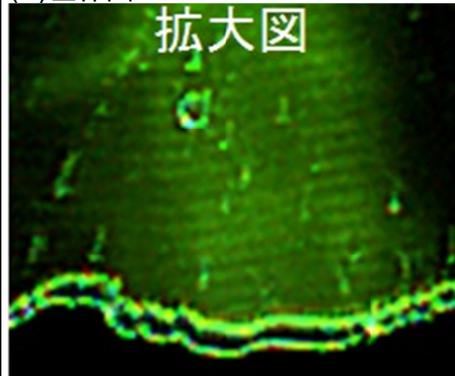
(1) 超音波駆動条件の最適化と頭蓋骨透過性の測定

(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、ビームが通りやす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ており、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。

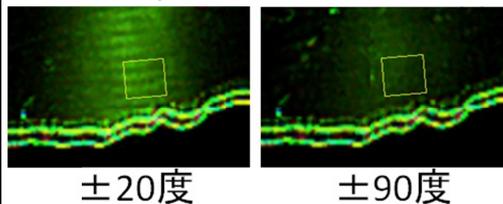


図44 PMNによる定在波抑制 左図は位相角度を ± 20 度とした場合。右図は ± 90 度とした場合。振動子は上田日本無線社製の 24×24 mmの正方形。振動子のピークは535kHz、-6dBダウンの帯域は337-655kHz。印加電圧は55Vpp、周波数は500kHzとした。

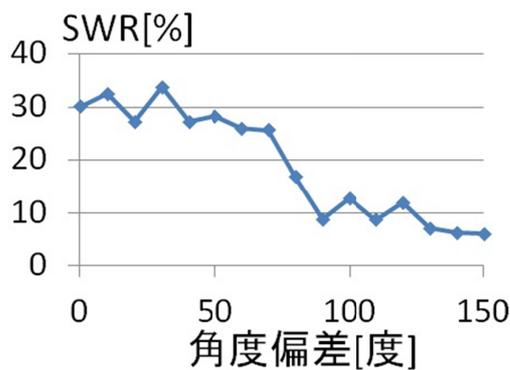
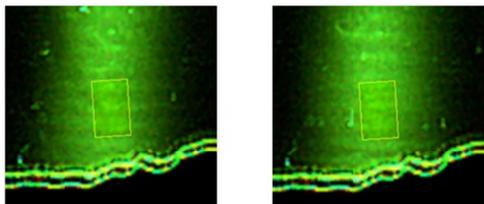


図 4 5 PMNの場合のSWR SWRを算出するときのROIは図 6 中に黄色の枠で示した

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。



10 μ 秒, 500 \pm 50kHz
20 μ 秒, 500 \pm 100kHz

図 4 6 PSRFによる定在波抑制 左図は周波数の範囲を500 \pm 50kHzとし、周波数の切替を10 μ 秒毎におこなった場合。右図は周波数の範囲を500 \pm 100kHzとし、周波数の切替を20 μ 秒でおこなった場合。用いた頭蓋骨、振動子は図10のものと同じ。

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。

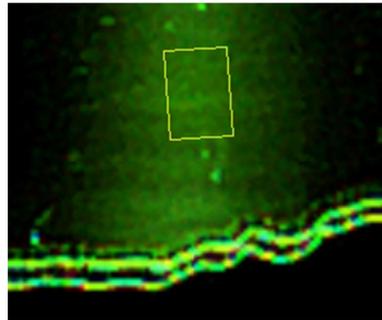


図 4 7 RSBICによる定在波抑制 用いた頭蓋骨と振動子は図11、図13と同じ。印加電圧は80Vpp。雑音の帯域は50-200kHzとした。

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 30mm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 55mm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。

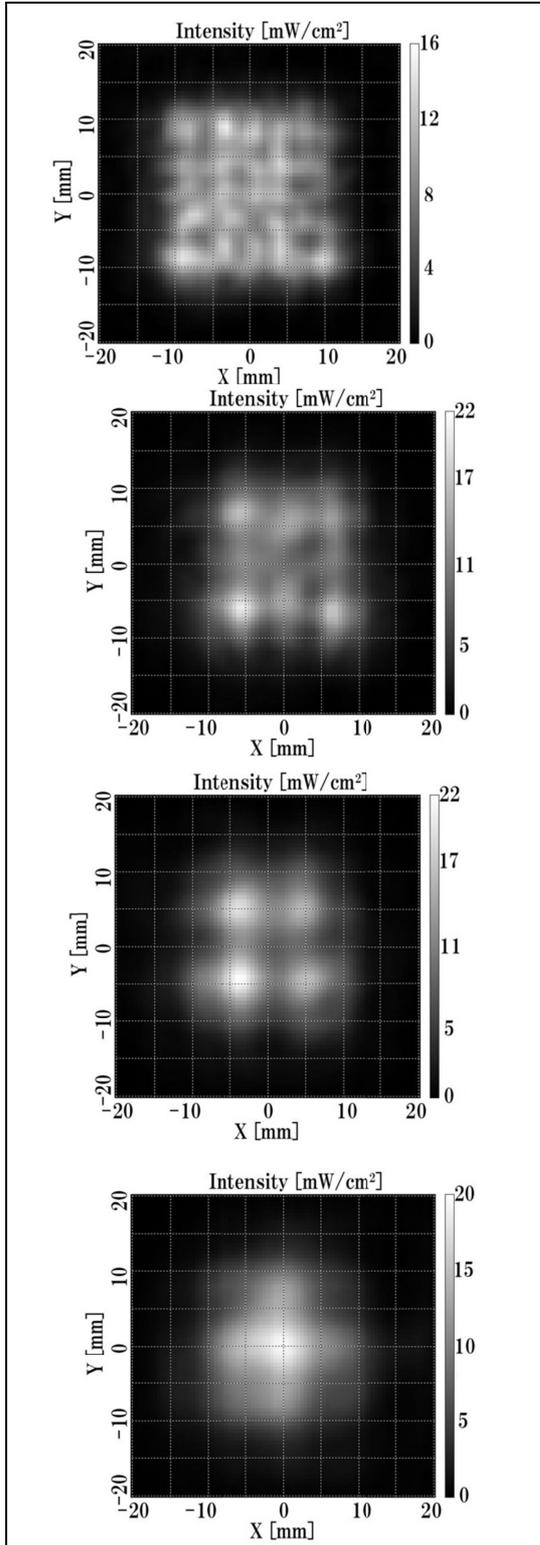
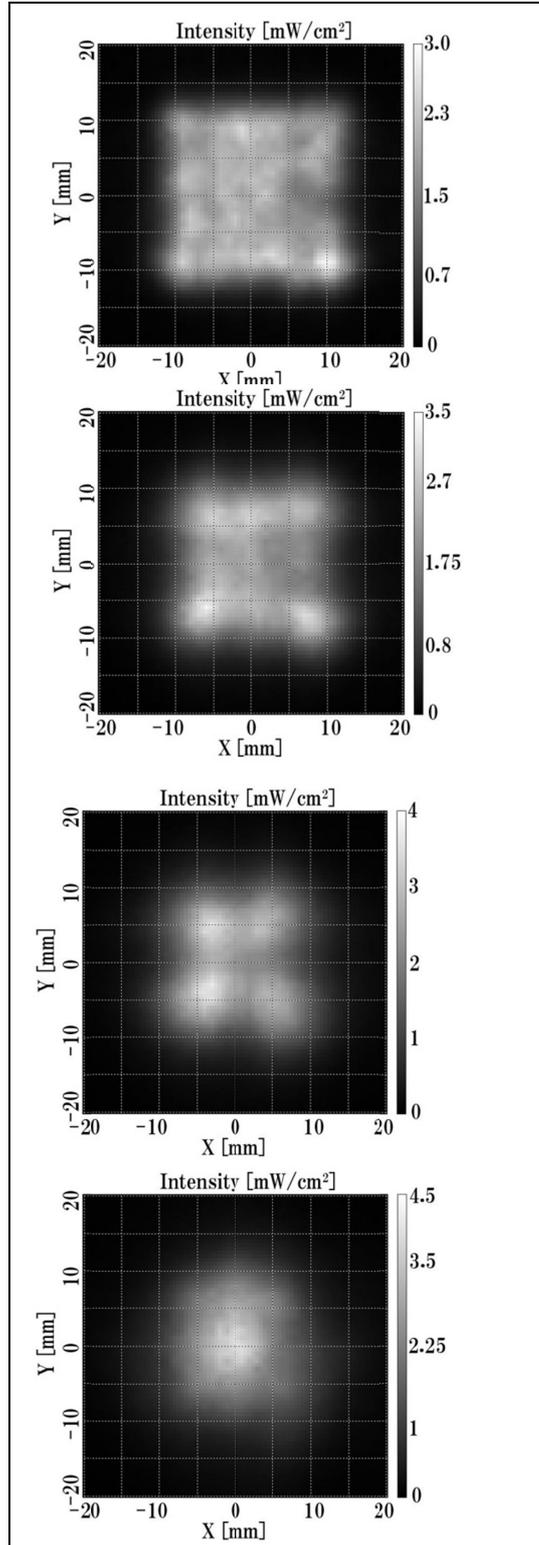


図 4 8 2次元音場分布 500kHz正弦波
とRSBIC(キャリア500kHz、雑音帯域
50-200kHz)の比較



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48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49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。

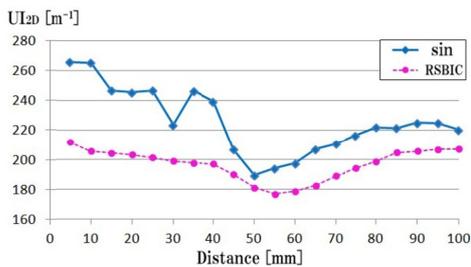


図49 振動子面からの距離と2次元ユニフォーミティ・インデックスの関係

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50に示す。算出は、図48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。

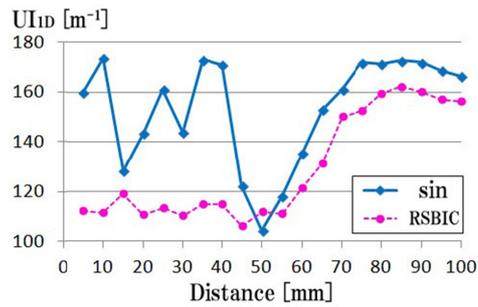


図50 振動子面からの距離と1次元ユニフォーミティ・インデックスの関係

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51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。

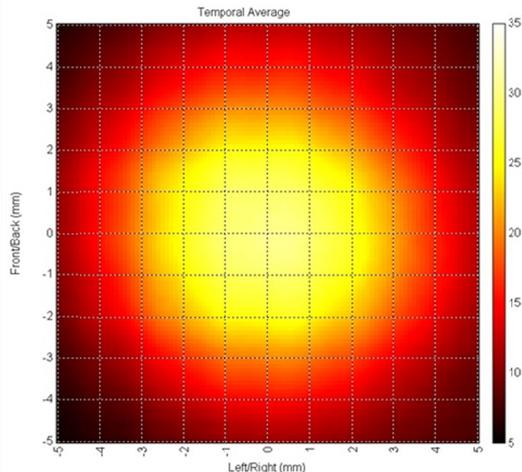


図51 骨無しの場合の2次元音場分布 500kHz 15Vpp、振動子面からの距離は50mm。縦と横の単位はmm。ステップ間隔は縦・横共に0.2mm。カラーバーの単位はmW/cm²

骨を透過した後の2次元分布の一例を図52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。

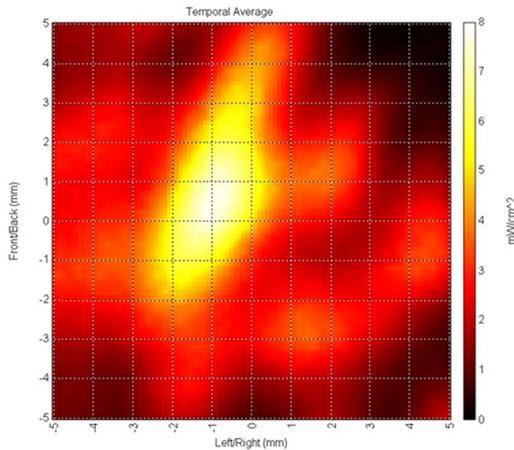


図 5 2 骨を透過後の超音波の 2 次元音場分布 1 縦と横の単位はmm。ステップ間隔は縦・横共に0.2mm。カラーバーの単位はmW/cm2

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。

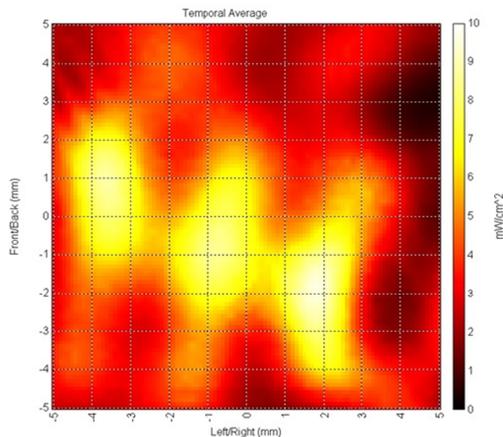


図 5 3 骨を透過後の超音波の 2 次元音場分布 2 縦と横の単位はmm。ステップ間隔は縦・横共に0.2mm。カラーバーの単位はmW/cm

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。)

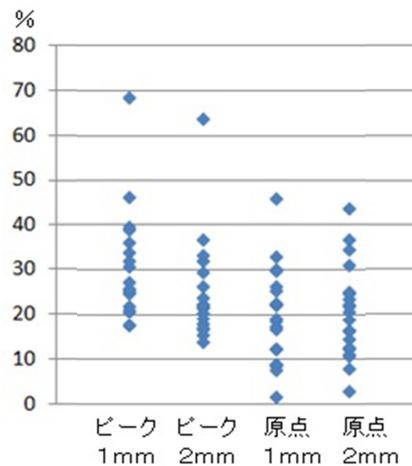


図 5 4 透過率の散布図

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53に示す。パラメータは周波数を500kHz、水の密度を998kg/m³、水の音速を1483m/s、骨の密度を1664kg/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。

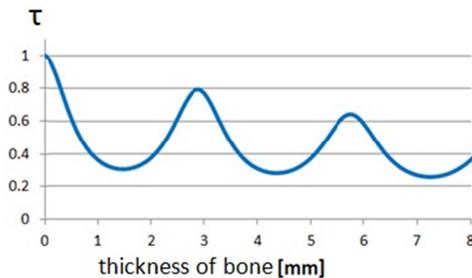


図53 骨ファントム板透過率の厚さ依存性

骨の厚みを変え、透過率を計算した結果を図54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。

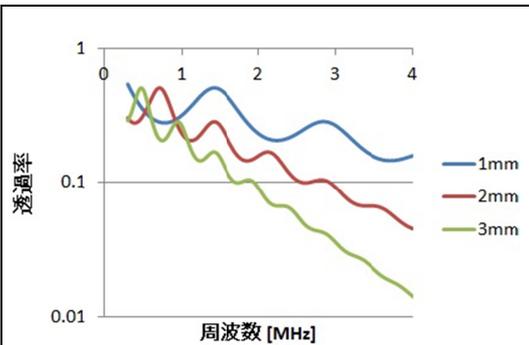


図54 透過率の周波数依存性

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55に示す。パラメータは図20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。

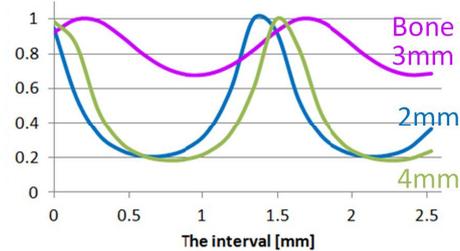


図55 透過率の皮膚厚依存性

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56に示す。

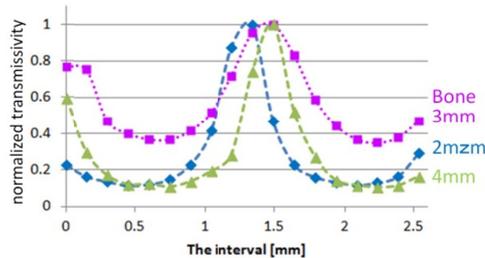


図56 透過率の振動子-骨ファントム板間距離依存性

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。

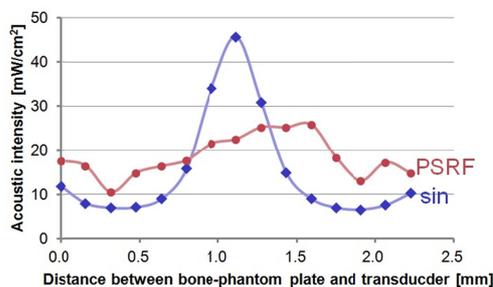


図57 振動子と骨ファントム板との距離を変化させた場合の透過率の比較

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。

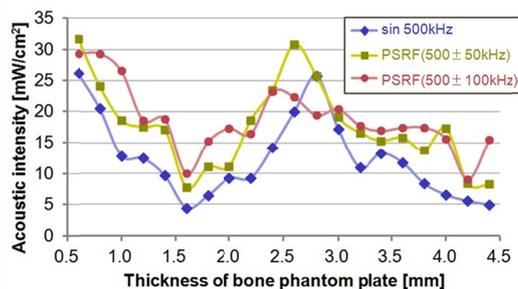


図58 骨板の厚さを変化させた場合の透過率の比較

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

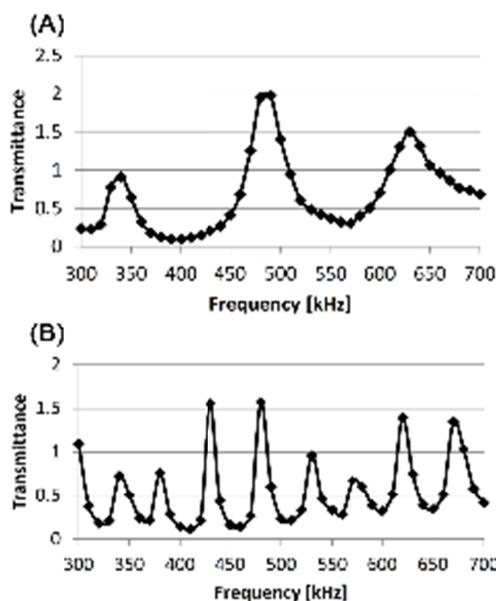


図59 周波数による超音波透過率変動実測値 骨ファントム厚2.0mmを用いる
(A)皮膚厚相当距離1.3mmの場合
(B)皮膚厚相当距離12.0mmの場合
実測においても計算から導かれた大きな超音波透過率変動が観察された。(A)の皮膚厚に相当する超音波プローブと骨ファントムの距離が1.3mmの場合、最大と最小の透過率の比は10倍以上となり、現代日本人のこめかみ部の皮膚厚の平均値12mmを模した(B)でも比は約8倍と大きなものとなった。

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

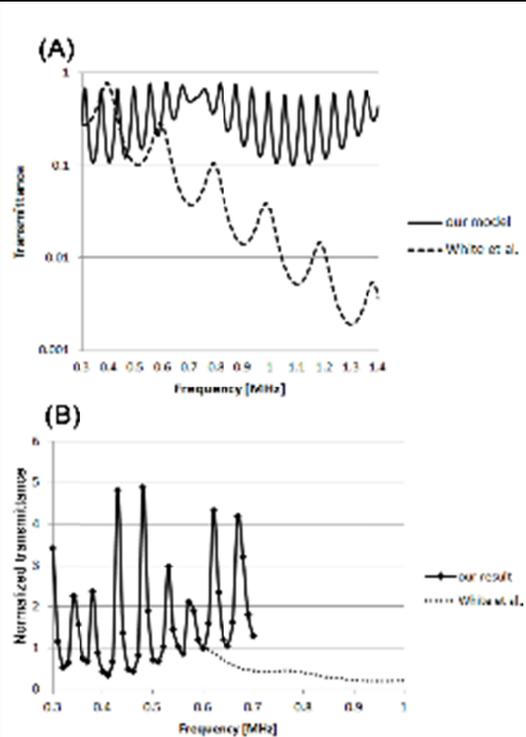


図60 頭蓋骨透過率変動に関する過去の報告との比較。(A)計算値(B)実測値
参照した文献はP.J. White, et al., Phys. Med. Biol. 51 (2006) 2293–2305

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6-1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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ で5波長遅れての受信開始、-60 $^{\circ}$ で30波長遅れての受信開始を意味する。

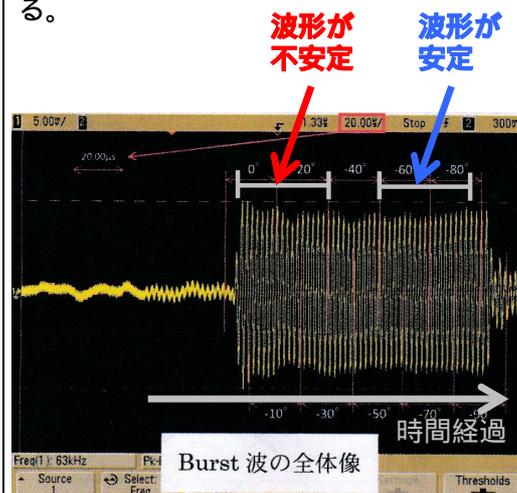


図6-1 500kHz超音波のオシロスコープ像
このPhaseを-10 $^{\circ}$ から-80 $^{\circ}$ まで変えて、頭蓋骨での超音波透過率を皮膚厚相当の距離を変えて測定し、連続波の場合と比べたのが図6-2である。

-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。

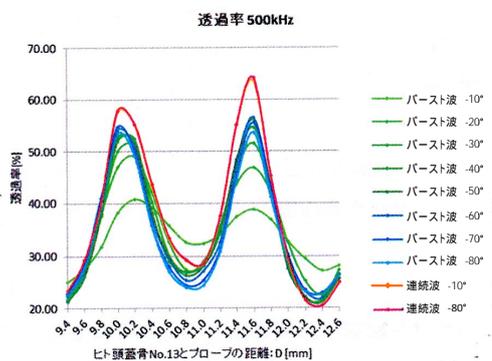


図 6 2 観測 Phase の角度を変えた場合の超音波透過率の挙動

測定ポイントの設定

井口のカラードップラー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 6 3 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。候補点から測定ポイントまでの距離は以下のようにになっている。

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

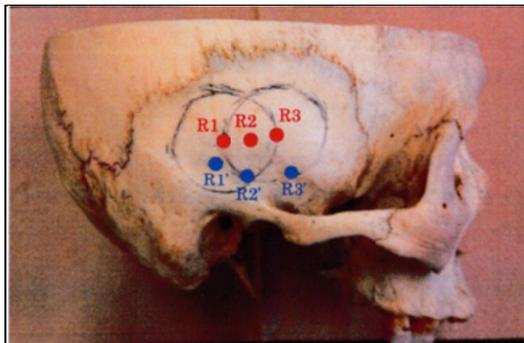


図 6 3 測定ポイントの設定 (No. 13 頭蓋骨) 青色が候補点で、赤色が測定ポイント
図 19 測定ポイントの設定 (No. 13 頭蓋骨) 青色が候補点で、赤色が測定ポイント

この測定ポイントを探す過程は、臨床でカラードップラー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 6 4 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 3x5=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。

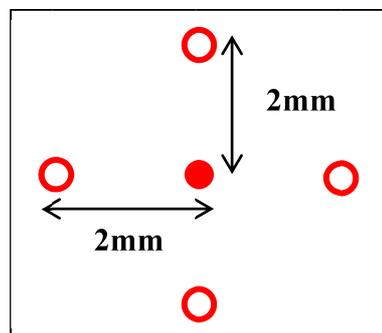


図 6 4 測定点の設定

