

09.

治療

年表（治療）

1957年	岡益尚	岡益尚，横井浩，奥村堯：強力集束超音波による定位脳手術に成功（超音波を脳の手術に応用した世界最初の試み）。（JSUM 40周年から引用）
1997年	東芝メディカル	世界初の高エネルギー焦点式超音波法（HIFU）を使った前立腺肥大症治療装置の輸入販売を開始。（JSUM 40周年から引用）
1998年	帝人株式会社	超音波骨折治療器「セーフス TM（SAFHS®*1）」発売 米国では1994年10月のFDA（食品・医薬品管理庁）の承認取得 「難治性骨御超音波治療法」が健康保険に新規収載
2000年	ヨーロッパ	Ablatherm® HIFU 前立腺癌の治療法として強力集束超音波治療法が CE mark を取得 EDAP 社
2004年	米国	子宮筋腫の治療法として強力集束超音波治療法が FDA 認可 発売 ExAblate 2000 HIFU と MRI Insightec 社 Ultrasound-Enhanced Systemic Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke（N Engl J Med 発表）経頭蓋超音波血栓溶解療法臨床例を発表
2006年	米国	脳梗塞および末梢血管血栓治療 超音波血栓溶解用カテーテルを発売（EKOS Corporation）
2011年	ヨーロッパ	肺塞栓症治療 超音波血栓溶解用カテーテル CE mark を取得（EKOS Corporation）

09.

治療

超音波による治療

立花 克郎

(福岡大学医学部医学科解剖学講座)

梅村 晋一郎

(東北大学医工学研究科)

はじめに

1950年代初めの岡益尚らによる世界的にも先駆的な研究に続く1960年代、当学会が設立された当時の超音波治療に関する研究は、当学会発表演題の10～20%を占めていた。しかし、1980年代初めには、皆無に近くまで減少していた。これは、1970年代に素晴らしく立ち上がった超音波診断に注目が移ったためと見るのが一般的であるが、黎明期の医用超音波イメージング技術は、診断手段としては立ち上がったものの、超音波治療のような非観血的治療が必要とするガイド手段としては発達が不十分であったためと見ることもできる。その後1980年代後半から、超音波による治療は、温熱療法や音響化学療法や血栓溶解療法として、少数のグループにより研究が続けられていた。そして、岡らと同時期に米国においてFryらより先駆的に研究されていた集束強力超音波による加熱凝固治療が、1990年代後半になって超音波イメージガイド下に復活し、ようやく集束超音波治療の臨床的普及が始まった。

超音波の安全域と作用域

超音波のエネルギーは、分子レベルでは小さい。図1には、それを他の物理的医用モダリティと比較した。超音波の分子レベルでのエネルギーは、

1つのフォトンが化学結合を切断し得るのに比べて桁違いに小さく、蛋白を変性させるために水素結合を切断するにも、1桁以上小さい。従って、超音波により生体に不可逆変化を起こすには、そのエネルギーを時間的に蓄積または空間的に集積するメカニズムが必要である。時間的に蓄積するメカニズムとしても最も一般的なのは熱である。また、マイクロ気泡は、超音波のエネルギーを時間的に蓄積するだけでなく空間的に集積する。すなわち、マイクロ気泡は、水の超音波振動変位をその近傍において桁違いに拡大し、超音波のエネルギーをその体積振動に蓄える。

強力超音波により生成されたものか、注射などにより生体中に導入されたものかにかかわらず、マイクロ気泡の効果に着目し、超音波治療に用い

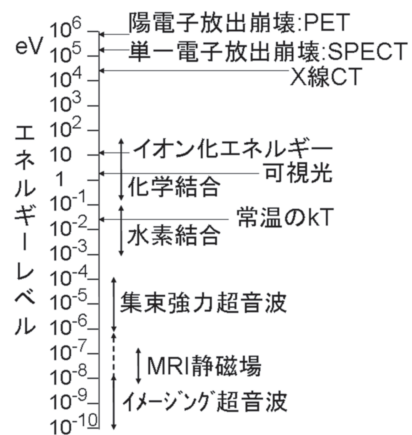


図1 医用超音波のエネルギーレベル

得る超音波の生体作用を図2に示した。超音波の機械的振動は、生体組織に吸収され熱に変換される。これら機械的作用も加熱作用も、マイクロ気泡による振動振幅の拡大により増幅され、前者は、マイクロ気泡による血栓溶解促進などに、後者は、キャビテーションによる集束超音波加熱の促進などへの利用が研究されている。さらに、マイクロ気泡が圧壊すると、著しく大きなエネルギーが放出される。それを機械的エネルギーとして利用するのがソノポレーション (sonoporation) やヒストトリプシー (histotripsy) であり、化学的エネルギーとして利用するのが音響化学療法 (sonodynamic therapy) である。

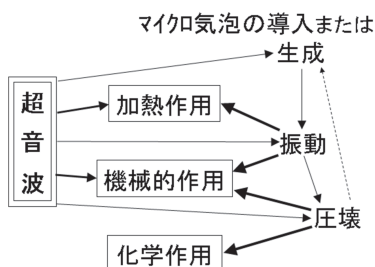


図2 超音波の生体作用

超音波エネルギーを時間的に蓄積するこのようなメカニズムのために、生体に不可逆的な作用を及ぼす超音波強度は、図3のように、照射持続時間が短いほど大きくなり、照射持続時間が長いほど小さくなる。生体に不可逆的な作用を及ぼすか否かのこのthresholdより右上が超音波治療の作用域であり、その左下が超音波診断の安全域である。



図3 超音波の安全域と作用域

る。照射持続時間がある程度以上長くなった場合にthresholdが照射持続時間に依存しなくなる理由を、超音波エネルギーが熱として生体に蓄えられる場合について説明すると、超音波により発生する熱と血流などにより持ち去られる熱とが均衡して定常状態に至るので、不可逆的作用を及ぼす超音波強度が照射持続時間によらず一定となるためである。

集束強力超音波治療

超音波は、生体組織中を伝播して到達した非表在性の治療標的組織に、それを加熱するエネルギーを集束するために適切な減衰係数と吸収係数をもっている。これは、可視光に近い波長の電磁波にはない特長である。この特長を生かし、治療標的組織に強度 1 kW/cm^2 程度の超音波を集束して、それを数秒間で加熱凝固するのが、集束強力超音波 (HIFU: High Intensity Focused Ultrasound) 療法である。超音波により発生する熱が血流により持ち去られる以前の短い時間に加熱凝固してしまうので、超音波強度と吸収係数から温度上昇を予測しやすいのが、この方法の特長である。現在、臨床的に普及しているこの方法について、少し具体的に説明する。

図4は、経直腸的前立腺治療のために開発された周波数3.2MHz、焦点距離30mmのHIFUトランスデューサによる集束音場のシュリーレン像である。超音波が極めてシャープに集束しているこ

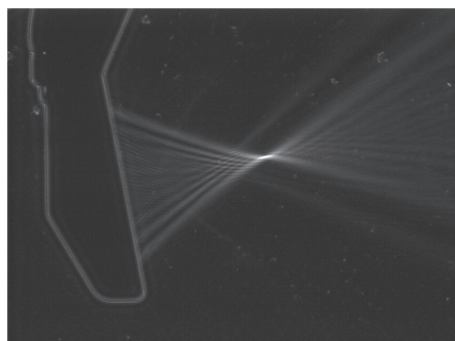


図4 経直腸的前立腺治療用 HIFU 音場

とがわかる。図5は、この集束超音波を生体に照射したときに生体組織中に形成される温度分布を、数値計算シミュレーションにより求めた結果である。各々の最高温度で規格化して表示した。照射時間4 sでは、超音波焦点によく対応するコンパクトな高温域が形成されており、HIFU治療の特長である優れた幾何学的選択性が実現されている。これに対し、照射時間300 sでは、生体の熱伝導による温度分布の鈍化が著しく、もはや上記の特長は失われている。

図6は、照射時間4 sの場合について、焦点と体表の中間点の温度変化を焦点の温度変化と比較したものである。縦軸は、前者について10倍拡大した。焦点の温度は、超音波照射停止後、急速に低下しているのに対し、中間点の温度低下は、はるかに穏やかである。焦点からは熱伝導により熱拡散するのに対し、中間点からの熱輸送は、

ほぼ血流冷却のみによるためである。HIFU療法では、図4のようなフォーカスを、治療標的組織中を走査させながら超音波を照射し、図5中4 sの高温域に対応する組織凝固域を順次形成していくわけである。しかし、これを休止時間なしに続けると、図6に示した効果のため、中間点に熱が蓄積し、HIFU治療の特長である優れた幾何学的選択性が失われてしまう。そこで、治療標的外組織を副作用から守るためには、数秒間のHIFU照射の間に十分な休止時間すなわち冷却時間が必要となる。HIFU療法のスループットは、このために著しく制限されており、解決すべき問題となっている。筆者らは、超音波周波数を下げずに焦点を広げることによりこの問題を緩和できるスプリット・フォーカス法を考案し、その有効性を実証している。

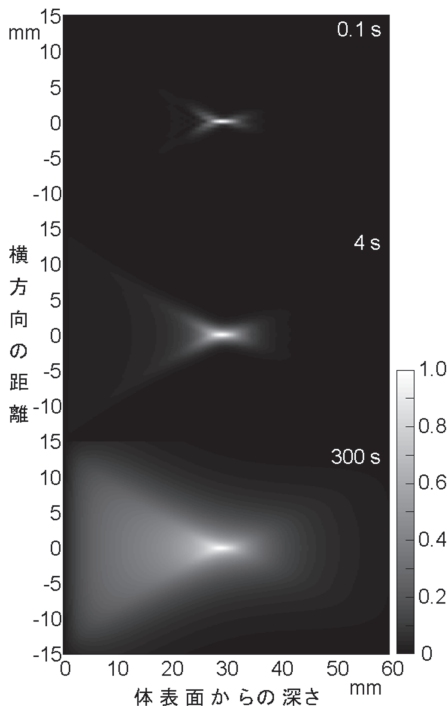


図5 経直腸的前立腺治療用 HIFU音場によって形成される温度分布

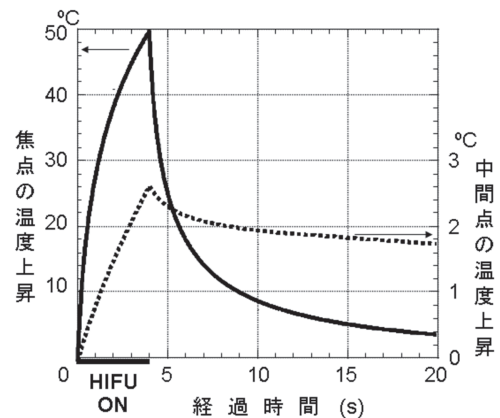


図6 焦点と中間点の温度変化

09.

治療

音響化学治療

梅村 晋一郎

(東北大学医工学研究科)

音響化学治療は、腫瘍などの患部に集積して、その超音波に対する感受性を高める薬物を、患部に対する超音波照射に組み合わせて用いる治療法である。1980年代末から1990年代にかけて、弓田と筆者らは、様々な化学物質を探索した結果、図1に示したように、ポルフィリン系のある種の物質が、超音波照射により生じた音響キャビテーションの効果により活性化して、音響化学的抗腫瘍効果を示すことを発見し、この療法を提案した。

この実験では、音響キャビテーションを発生させやすくするために、定在波の発生する条件で超音波照射 (2MHz) を行っているが、化学物質単独の殺細胞効果が無視できる濃度において、超音波の殺細胞効果を、ヘマトポルフィリン (図中右上) は約2倍、ガリウム・ポルフィリン錯体 (図中右下) は、1桁ちかくも増幅している。これらポルフィリンと超音波の相乗効果は、

(i) 活性酸素の寿命が長くなる重水中で倍増する
(ii) ヒスチジンなど活性酸素消去剤により減少する
(iii) 溶存空気を窒素置換した水溶液中では消滅することなどから、音響キャビテーションにより活性化したポルフィリンが発生する活性酸素の作用により生じていると考えられる。

さらに、図中右下のガリウム・ポルフィリン錯体には、側鎖のアルキル基の長さを最適化するこ

とによって腫瘍集積性が与えられている。従って、音響キャビテーションを患部に集束した超音波により局所的に生成することができれば、集束超音波の幾何学的選択性と腫瘍集積性音響化学活性物質の分子的选择性との相乗効果による高い選択性が期待できる。定在波をうまく集束できる位置に患部があるとは限らないので、高い幾何学的選択性を実現するためには、定在波音場に依存することなく進行波音場においても音響化学的に有効なキャビテーションを効率的に導くことのできる超音波照射法が必要である。筆者らは、基本波にその2倍の周波数の第2高調波を重畳することにより正負非対称な音圧波形を生成して効率的にキャビテーションを発生させる第2高調波重畳法を考案し、その有効性を実証している。

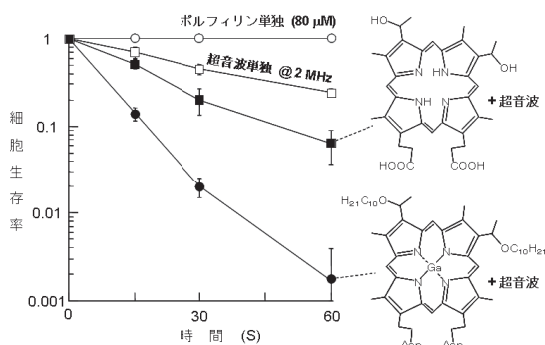


図1 音響化学的抗腫瘍活性をもつ物質

09.

治療

超音波の生体作用

近藤 隆

(富山大学 大学院医学薬学研究部 放射線基礎医学講座)

日本超音波医学会の50周年記念に際して、超音波の生体作用について概説する。この50年の生体作用の研究の発展もあり、理学療法等の利用に限定されていた超音波の治療応用が拡大・普及し、分子医学的立場でも臨床応用が検討される時代になったといえる。

産婦人科領域での診断用超音波の利用に関して、安全性の観点から、多くの生体作用に関する検討が行われてきた。多くは、細胞遺伝学的研究で染色体異常や姉妹染色分体交換、さらに発癌研究としてトランスフォーメーションについて行われたが、否定的知見が殆どである。その後も、ヒトへの適用性を考慮する必要があるが、実験動物であるマウスやラットを用いて、肺組織における出血や発生期における神経細胞の移動の阻害等、注視すべき知見が報告されている。

一定強度の連続波およびバースト波の超音波は古くから理学療法に使用されており、同様の超音波を創傷治癒等他疾患の治療に応用しようとする試みもされた。1970年代後半になると、癌組織が熱に弱いとの現象を利用したハイパーサーミアが注目され、超音波は加温装置として利用され、多くの機器開発が行われた。これらの装置は超音波の熱作用を利用し、患部を40～44℃の温度で一定時間維持するよう設計されている。

超音波の化学作用も古くから知られていたが、1980年代になると、この領域はソノケミストリーと称され、超音波によるフリーラジカル生成の機構が解明された。ここで利用された技術を利用して診断用超音波を模した音響条件でフリーラジカ

ル生成も認められ、安全性の観点から注目された。1980年後半には、光増感作用を有する薬剤と超音波の併用が高い抗腫瘍効果を示すことが報告され、Photo-dynamic therapy（光力学的治療）に対して、Sono-dynamic therapy（音響化学療法）と呼ばれ、多くの超音波増感剤の探索研究が行われた。本療法は深部の癌治療の一様式として期待され、現在も研究が続いている。

超音波と抗癌剤の併用による高い癌治療効果を期待して、主に、*in vitro*の研究が多くなされた。超音波と薬剤との相互作用には細胞・組織内への薬物取り込みの増加、担体からの薬物放出、薬物代謝を活性化、薬物自体を活性化等多くの機構が関与するが、臨床への応用はまだ道半ばである。一方、インシュリン等の薬物の経皮吸収の促進については、超音波は有用な手段であろう。さらに、超音波は血栓溶解剤の効果を促進することが報告され、超音波の単独および薬剤併用に適応する頭蓋外超音波照射用装置やカテーテルの先端に超音波振動子を装着した装置等の開発が行われている。

超音波による遺伝子導入は1986年に初めて報告された。当時は超音波loadingと呼ばれ、数十kHzの超音波を用いた事例であったが、後に、副作用の少ない遺伝子導入法として多くの注目を浴びるようになった。現在では、Electroporation（電気穿孔）に対して、Sonoporation（超音波穿孔、あるいは音響穿孔）と呼ばれ、専用の超音波機器も販売されている。当初、単独では遺伝子導入効率が低かったが、マイクロバブルを併用するこ

とにより、導入効率と安定性の改善が認められた。

多くの実験室に細菌破壊・分散・乳化等の目的に超音波細胞破碎器が設置されているため、超音波は細胞を機械的に壊すものと認識されているが、細胞膜破壊を伴わない遺伝子制御された細胞死（プログラム細胞死）であるアポトーシスを誘発することが、2000年に集束バースト超音波で報告されて以来、多様な音響条件、即ち理学療法の強度や低出力バースト波でもアポトーシスを誘発することが報告された。さらにマイクロバブルの併用によりアポトーシスが增強されることが判明した。最近では、同様のプログラム細胞死に分類される超音波誘発オートファジーも報告された。これらの知見より、超音波が細胞内遺伝子発現に影響しプログラム細胞死を誘発することは確かであろう。

超音波が細胞膜および細胞内小器官の膜構造に影響することは十分考えられる。DNAへの影響について細胞照射によりDNA塩基損傷を報告する例もあるが、多くはDNA一本鎖切断の誘発に関する論文である。DNAの水溶液に超音波を照射した *in vitro* の研究では、DNA一本鎖切断生成より低い強度でDNA二本鎖切断が誘発されるが、細胞内でのDNA二本鎖切断の生成は長年不明であった。DNA二本鎖切断の修復に関係するリン酸化ヒストンH2AXを調べる手法が普及し、最近、定在波発生条件の低強度バースト波超音波がDNA二本鎖切断を引き起こし、これはキャビテーションの機械的作用であることが判明した。今後、DNA二本鎖切断の修復への影響の検討が必要となる。

ヒトの遺伝子解析が終了した現在、全ての遺伝子の機能と相互作用を時間的・空間的に解析することが求められる。DNAマイクロアレイは、ガラス等の基板上にDNAを高密度にスタンプまたは合成したもので、一度に数万個の遺伝子発現を解析できることからポストゲノム研究における網羅的遺伝子発現解析の非常に有用な技術である。さらに、バイオインフォマティクスを用いること

により膨大な遺伝子発現情報から遺伝子の機能や遺伝子間の相互作用等を解析することが可能となってきた。我々は、超音波照射細胞に初めてこの技術を応用し、超音波による発現変化遺伝子の網羅的解析を試みた。本手法は、細胞種間の応答やマイクロバブルを併用した場合の遺伝子発現の相違を比較する上で極めて有用である。さらに、遺伝子発現を超音波で制御する研究報告もあり、今後、遺伝子科学と超音波医学の融合と発展が望まれる。

骨に一定の機械的ストレスを付加すると骨成長を促すことが知られ、LIPUS（Low Intensity Pulsed Ultrasound）による骨折治療への応用と発展した。LIPUSは超音波周波数：1.5 MHz、バースト（パルス）幅：200 m秒、パルス繰り返し周波数：1.0 kHz、超音波強度：30 mW/cm²の特定の照射条件を用いるが、本邦でも難治性骨折から新鮮骨折にも適用対象が拡大し、骨折治療に大きく貢献している。最近では軟部組織の治療に有効との報告もあり、今後の整形外科学・スポーツ医学での利用が進むと思われる。

HIFU（High Intensity Focused Ultrasound）は超音波を利用し、からだの深部にある病巣を治療する方法で、装置は単一あるいは複数の超音波振動子と体部に密着させるための脱気水をいれたプラスチックの袋部分（ボラス）から構成されている。超音波は集束性に優れているので、音響レンズや多数の振動子を凹面状に配置することにより、その焦点にピンポイントで高いエネルギーを集中することができる。これを利用して、正常の組織を温存して目的の病巣を熱的に破壊することが可能である。但し、一定以上の高い強度の超音波照射では組織中でもキャビテーションが発生する。キャビテーションは熱の発生や組織破壊にはプラスに働くが、生成した気泡は超音波の伝搬を妨げる。また、HIFUの臨床上の問題点は治療時間が長いことで、気泡の制御や広い範囲を短時間で治療する技術が望まれる。HIFUの開発は1950年代に遡るが、前立腺肥大や子宮筋腫など良性病

変を対象に機器開発が進んできた。最近では癌腫や肉腫等の悪性病変も対象となり、特に前立腺癌や乳癌が適用となるが肝臓癌、腎臓癌、膵臓癌への応用も進んでいる。さらに、HIFUは脳-血液

関門の一時的開口、止血への利用、頭蓋内の血栓溶解等に応用される等、非侵襲的治療として今後の発展が期待される。

09.

治療

2004年： 超音波血栓溶解療法

立花 克郎

(福岡大学医学部医学科解剖学講座)

はじめに

近年、超音波治療に関する基礎・臨床研究は世界的に盛り上がっている。しかし、50年の本学会の歴史の中でこの分野が常に最先端の研究と見なされていたわけではない。薬物と超音波を併用する新しい“超音波治療”の試みが本学会で最初に報告された1990年前後は“超音波画像診断”の全盛時代であった。一方、強力集束超音波治療（HIFU）は1950-60年代の古い“実用化が難しい”技術と受け止める会員が少なくなかった。超音波は極めて安全で、生体に何ら変化を起こさないことが常識とされた時代に、低強度超音波（ $0.5\text{--}1.0\text{W}/\text{cm}^2$ ）を治療目的に使った実験結果を初めて学会で報告するのは勇気が要った。人工血栓（フィブリン血栓）を試験管内に作り、血栓溶解剤（ウロキナーゼ）を添加した後に試験管を超音波洗浄器水槽に浸したところ、コントロールに比べて明らかに血栓溶解速度が亢進することが解った（図1）。この単純明解な実験結果をもって、なかなか学会内で認められない時期がしばらくあったが、外国からも同様な実験結果が一流学会誌に次々と発表されると状況は徐々に変化していった。

カテーテル型超音波治療装置

今までに超音波による血管治療、血栓破碎、血栓溶解の装置開発はいくつかなされてきたが、80年代に超音波カテーテル型の血管治療装置が登場

した。初めて臨床で実用化されたのはワイヤー（針金）式超音波発振カテーテルである。20-50KHzのピストン運動するガイドワイヤー先端で血栓や石灰化した血管狭窄部位を機械的に破壊・削る、“Ultrasound Angioplasty”として米国で商品化された。主に冠動脈の狭窄部位に適応されたが、ステントの登場で消えていった。一方、血栓溶解剤と低強度超音波の併用療法の研究は国内で全く別の発想で進められていた。温熱作用でもなく、破碎的用途でもない、低エネルギー超音波と血栓溶解剤（ウロキナーゼ、組織型プラスミノゲン・アクチベータ:tPA）の組み合わせはそれまでにない発想であった。血栓溶解剤は超音波によって血栓内に数倍の早さで浸透・拡散し、血栓の完全溶解に要する時間が対象群の5分の1まで短縮され、薬物投与量も10分の1に減らせることが報告された。この時の超音波強度は極めて低く、超音波単独群では血栓の物理的破壊は全く認められなかった。一方、超音波で血栓のフィブリン繊維構築が一時的に伸展され、繊維間にスペースができるので薬物がより浸透しやすくなったと考えられる。また、超音波の照射方向で血栓溶解率が変化することも観測され、超音波音圧により薬物が血栓内へ押し込まれる“薬物移動”現象も発見された。その後、血管内超音波診断カテーテル（IVUS）の技術をベースに開発された新しい治療用カテーテルは、発振素子が先端に装着した構造となった。血栓の近距離からの薬物投与と同時に超音波照射を行う治療法で、米国で脳梗塞、肺塞栓、下肢の深部静脈血栓を対象にいくつかの臨床試験が

開始された（治験名：IMS-II, ATTRACT, DUET, ULTIMA）。米国における急性脳梗塞患者に超音波発振マイクロカテーテル（2.5F, MicroLysUS infusion catheter, EKOS Corp, 米国）が2001年に初めて臨床応用され、日本の技術が米国で実践された形となった。現在、臨床治験は継続されており、発症後6時間以内の脳梗塞患者に対し、動脈局所tPA投与と同時に超音波照射し、その後の神経学的所見（modified NIH stroke scale）の評価では著明な改善症例が報告されている。過去の薬物単独局所投与の大規模治験（PROACT II）と比較しても超音波の併用で高い再開通率を得ている。

マイクロバブルと超音波治療

超音波エネルギーによる様々な組織への薬物透過促進メカニズムはまだ完全には解明されていないが、キャビテーション発生が深く関与していると考えられている。超音波で発生する微小気泡（直径1–10 μ m）の複雑な物理運動は血栓や血管壁表面での薬物浸透促進効果をもたらす。一方、超音波造影剤（マイクロバブル）の存在下でキャビテーションの発生閾値が低下することが知られていたが、1995年に初めて超音波造影剤と血栓溶解剤（ウロキナーゼ）を混合した超音波血栓溶解実験

が行われた。薬物と造影剤を混合した群はコントロール群に比べ有意に血栓溶解率が高かった。マイクロバブルがキャビテーションの核となり、ウロキナーゼの拡散をよりいっそう増幅した。超音波で崩壊したマイクロバブル周囲で発生した液体ジェット流が薬物の移動に深く関与するが、この発見はその後のソノポレーション（超音波穿孔法）概念の確立に大いに役立った。現在までにソノポレーション研究を軸として、薬物の効果を最大限に発揮させる様々な超音波装置や治療法が数多く報告されてきた。超音波治療用カテーテルを始め、経頭蓋ドブラを用いた急性脳梗塞治療、超音波造影剤（マイクロバブル・ナノバブル）を利用した血管治療や周囲組織への遺伝子導入、インスリンの経皮吸収、抗癌剤投与、分子診断治療など多岐にわたる。これらの超音波治療の技術進歩は目覚ましく、薬物をいかに目的部位まで持っていく（carrier）、超音波で薬物を局所放出（release）するかが、新しいバブル製剤の開発のポイントとなっている。このようなマイクロバブルに関連した治療装置・薬剤の加工技術もまだまだ発展途上である。いずれにしても、世界の超音波治療研究分野の発展に日本は大きく貢献してきたことは間違いなく、今後も本学会発の技術がますます世界へと羽ばたけばと願っている。

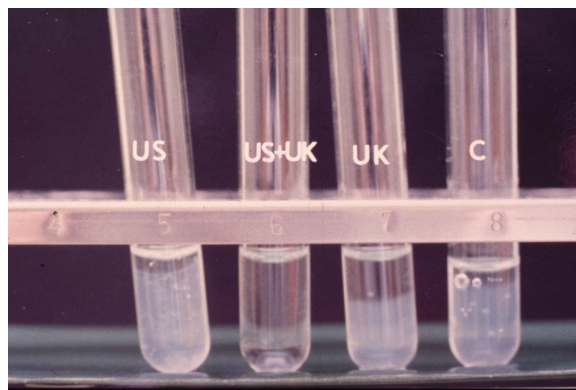


図1 フィブリン人工血栓（US: 超音波, UK: ウロキナーゼ, C: コントロール）。左から2列目の試験管が超音波照射とウロキナーゼ添加を併用したもの。

09.

治療

微小気泡のふるまいの高速観察 (百聞は一見にしかず)

工藤 信樹

(北海道大学大学院情報科学研究科)

はじめに

臨床の分野において、超音波造影剤が大きなインパクトを持って迎えられていたとき、基礎の分野でも気泡は大きな技術的関心を引き起こした。気泡は、治療用超音波の分野でキャビテーションというやっかいなものとして認知はされていたものの、診断装置の超音波照射下で数ミクロンの気泡がどのようなふるまいをするのか、具体的なイメージを持つことは難しかった。

多くの基礎的研究は、まず気泡からの反射波を調べることによって行われ、気泡の運動方程式に基づくシミュレーションと対応づけることにより実際の気泡のふるまいに関する理解が進められた。当初のシミュレーションでは、シェルをもたない気泡が対象とされていたが、現在では、実際の造影剤気泡に近い条件での高度なシミュレーションが可能となっている。それでもやはり、シミュレーションには限界も多く、超音波照射下での気泡のふるまいをありのままに直接観察したいという要求は高い。以下、これを目指して行われてきた気泡の高速観察に関する研究についてまとめ、今後を考える。

高速カメラ

診断装置で使われる超音波の周波数は数MHzであり、1周期は1 μ s以下である。この短い時間内に生じる気泡のふるまいを直接捉えようとすると、当然であるがこれよりも短い周期での観察が

必要となり、1秒間に百万コマの以上の速度での撮影が必要となる。この撮影速度を実現できる高速カメラは数機種に限定される。

造影剤気泡のふるまいの観察に用いられている高速カメラは、ミラー回転方式、電子管方式、CCD方式の3種類に大別される。de Jongは、撮影像の光路を高速に回転するミラーで切り替えることで高速撮影を実現する方式のカメラを自大学で開発し (Brandaris 128)、造影剤の基礎研究で多くの研究成果を公表している。古典的な撮影原理ではあるが、最大2,500万コマ毎秒で128コマを撮影できる。より多くのコマ数を撮影できることは微小気泡の複雑な振動を解明する上で重要な意味を持つ。工藤らは、電子管の一種であるイメージコンバータ管を用いた高速カメラ (Ultramac) で気泡の撮影を行っている。最大2,000万コマ毎秒で24コマを撮影できる。コマ数は少ないが、撮影タイミングを電子的に制御できるので自由度の高い観察が行える。CCDカメラの性能向上は目覚ましい。しかし、一般にCCDの撮影速度は素子から画像データを読み出す速度で制限されるため、撮影速度を向上するには1コマあたりの画素数を減らす必要がある。例外として、CCD素子自体に記憶機能を付加することで、この制限を回避する高速カメラ (HyperVision HPV-2A) が開発されている。最大撮影速度100万コマで100コマの撮影ができる。撮影速度は造影剤気泡の撮影に十分と言えないが、16倍の撮影速度を実現する次機種の開発が進められている。

撮影限界

撮影限界を決めるカメラ以外の条件として、撮像素子の露光量がある。1枚の画像を撮影する際にカメラに入る光量は、露光時間に比例し観察倍率の2乗に反比例する。それゆえ、撮影の高速度化と高倍率化は、いずれも露光量が減少し像が暗くなる方向に作用する。1例として、我々が1,600万コマの速度で撮影する場合、露光時間は40 nsであり、 $60 \times 80 \mu\text{m}^2$ 程度の視野を観察している。これを実現するため、電極入力100 J/shotの強力なアーク放電光を発生する光源を顕微鏡の照明光学系に組み込んでいる。

撮影結果から何が分かるのか

超音波造影剤は、直径や形状、シェルの付き方が異なる多数の気泡の集合体である。これに対し、高速度撮影された気泡のふるまいは、あくまでもその1個の気泡の特性でしかない。それゆえ1つの撮影結果のみで造影剤の全体的な特性を語ることはできず、多くの気泡を観察したり、シミュレーションと対応付けたりすることにより全般的な特

性を推定する必要がある。一方、シミュレーションでは考慮しきれない複雑な現象の把握は、やはり直接観察でしか行うことができない。以下に高速度撮影が有効と考えられた事例を示す。

シェル特性の影響

造影剤気泡が持つシェルは気泡の運動に大きな影響を与えると考えられ、その特性は、シェルを持たない気泡に関するシミュレーションの結果と実気泡に関する高速度撮影の結果を比較することで推定できる。当初、シェル特性は単純な粘弾性体として仮定された。しかし、脂質膜をシェルとする新しい気泡が出現し、気泡の膨張収縮に伴って自在に破断と融合を繰り返す脂質膜が運動特性に与える影響が研究されている。また最近では、収縮時にシェルの座屈により気泡が非球形に収縮することも高速度撮影により明らかにされている。

非等方的なふるまい

シェルを持たない裸の気泡は、表面張力により

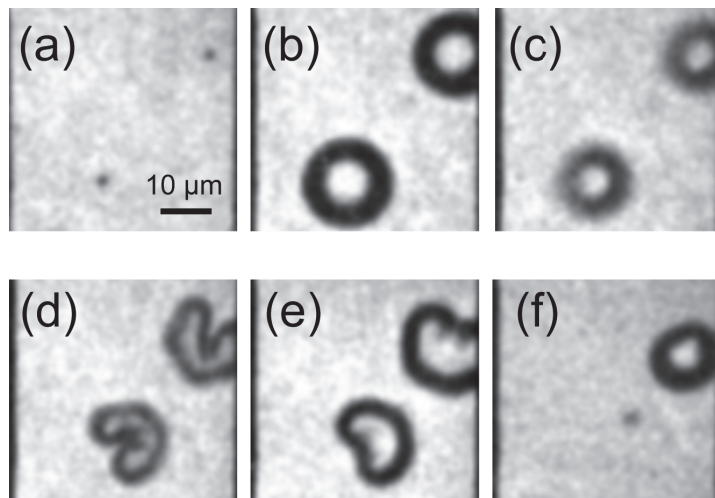


Fig 1. Oscillation of interacting two microbubbles with nonspherical shape.
4 x 10⁶ fps.

球形となる。表面張力の大きさは気泡径に反比例するので、微小気泡の運動に大きな影響を及ぼす。また、数学的な取り扱いの容易さもあって、球形を保つ気泡運動のシミュレーションが広く行われている。しかし、実際の高速度撮影では、振動幅が大きくなるとともに、気泡の非球形な変形や分割が観察される頻度が増加する。非等方的な運動を生じる原因としては、シェルの不均一性、気泡が収縮から反発に転じる際の形状の不安定性、さらには、他の気泡や周囲の物体との相互作用などが考えられる。2つの気泡が同位相で膨張収縮すると、その間には2次のビヤクネス力と呼ばれる力が作用する。その様子を捉えた高速度撮影の1例をFig 1に示す。

細胞への作用

超音波の照射により一時的に膜透過性を向上させ、通常では入らない物質を細胞内に導入する手法をソノポレーション（音響穿孔法）という。本

手法では、一般に連続波もしくは長いバースト波が用いられるが、工藤らは微小気泡を細胞に接触させた状態では、通常ではまったく導入効果を生じない短いパルス超音波でも、気泡付着部位に膜損傷が生じることを世界に先駆けて見出した。この現象の機序を解明する研究でも高速度撮影が活用されており、気泡の非等方的な収縮に伴って発生する微小な流れが膜損傷の原因の一つと考えられている。

まとめ

「百聞は一見にしかず」「Seeing is believing」という言葉にあるように、眼で見ることは物の本質を捉えるための人類の本能的な要求のようである。今後、医用超音波の分野で微小気泡の活用はさらに高度化してということが期待されることから、より複雑な状況にある気泡のふるまいを直に観察する技術の開発は、いましばらく必要とされるものと考えられる。

09.

治療

超音波を利用した遺伝子治療

小玉 哲也

(東北大学大学院医工学研究科)

遺伝子治療の概念は、1928年の形質転換の実験、1952年のDNAの形質転換因子の証明、1953年のDNAの二重らせん構造の解明、1961年の遺伝子コードの解明、そして、1973年の組換えDNA技術の開発という、分子生物学の学問体系の発展とともに生まれたものである。

遺伝子治療では、外来分子であるDNAを安全かつ効率的に標的とする細胞の細胞質に導入し、転写がおこなわれる核までDNAを送達させる遺伝子導入法の開発が必要である¹⁾。

超音波を用いた遺伝子導入法は、非侵襲性と組織標的に優れ、遺伝子導入が繰返し可能であるだけでなく、ウイルスベクター使用で指摘される腫瘍原性や免疫原性を誘起しないという利点がある。超音波が外来分子の導入にはじめて使用されたのは、1986年の20kHzの超音波を使用した蛍光分子の単細胞への導入に関する論文²⁾である。この論文では細胞内のpH計測が目的であったために、超音波がもたらす新しい生体効果がただちに認識されることはなかった。1987年、超音波によってDNAが哺乳類細胞に導入され³⁾、超音波による分子導入の萌芽期がはじまる。

1980年代初頭は体外衝撃波結石破碎術(ESWL)の研究・開発⁴⁾の勃興期であり、ESWLで 사용되는高出力超音波($\geq 1\text{MPa}$)とキャビテーション気泡の発生を利用する薬剤送達や遺伝子治療⁵⁾に期待がもたれた。しかし、分子導入効率が低いために奏効が認められず、現在においても高出力超音波が分子導入に有効であるとは認識されていない。低出力超音波($\leq 1\text{MPa}$)においても分子

導入効率が低いために⁶⁾、導入効率の改善に新たな工夫が必要であった。

ESWLではキャビテーション気泡が発生し、組織損傷を含めさまざまな生体効果が発生する。キャビテーション気泡は気泡核から発生すると考えられており、気泡核である超音波造影剤(マイクロバブル)⁷⁾を使用すれば低出力超音波でもキャビテーションが誘導されるのではないかと判断され、実際にキャビテーション気泡が発生するという報告がなされた⁸⁾。

低出力超音波とマイクロバブルを併用した分子導入法を用いて、1996年、イヌの腎臓へのオリゴヌクレオチドの導入⁹⁾、1998年の細胞株へのレポーター遺伝子の導入¹⁰⁾が報告され、その導入効率が低出力超音波の単独照射よりも相対的に高いことから、低出力超音波とマイクロバブルを用いた分子導入法は“sonoporation”という新しい分子導入法として急速に認識されるようになる。*in vivo*実験系での遺伝子導入実験に限定すれば、遺伝子導入部位は、骨格筋、心筋、腎臓、脊髄、肝臓、角膜、膀胱、椎間板、滑膜、肺、固形腫瘍、歯周組織、膀胱などに拡大していく。また、導入遺伝子も緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子などのレポーター遺伝子から、インターロイキン遺伝子、肝細胞増殖因子(HGF)遺伝子、血管内皮増殖因子(VEGF)遺伝子、siRNA、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSVtk)遺伝子¹¹⁾、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)遺伝子など、臨床応用を念頭にした遺伝子が選択されるように

なる。

一方で、超音波照射条件（音圧、周波数、照射時間、繰返し周波数、デューティサイクル）やマイクロバブルの特性（濃度直径、殻の成分）、あるいはバブルの非線形崩壊で発生する液体ジェット、衝撃波、せん断流などの機械的な作用やフリーラジカルなどの化学的作用が調べられる。

マイクロバブルはもともと造影剤として開発されたが、より病変の過渡的变化の診断能を高めるために、標的分子である ICAM-1, VCAM-1, P-selectin, $\alpha_v\beta_3$ などに対するリガンドを付加した機能性バブルの開発¹²⁾が進行し、同時にこの機能性バブルを用いた遺伝子導入法や、分子導入を目的にした新しいナノ・マイクロバブルの開発が進展する。

遺伝子治療の臨床応用での問題は、腫瘍原性や免疫原性、および遺伝子導入効率の低さであるが、これに加え、遺伝子導入後の遺伝子発現の持続性、治療効果、それにともなう治療計画の立案が極めて重要である。2010年、ナノバブルと超音波を用いた遺伝子導入とPETイメージングによる遺伝子発現が提案され¹³⁾、超音波による遺伝子導入法が臨床的に意義ある手法であることが立証された。

2000年、セラノスティクス（Theranostics = Therapeutics + Diagnostics）という、診断、治療、ガイダンスなどの一連の医療行為を統合し、治療時間の短縮、安全性、効率を図るという概念が提示される。

超音波とナノ・マイクロバブルの併用による遺伝子導入法は、このセラノスティクスの概念に一致するものであるが、1986年以降の超音波による遺伝子導入に関する研究の流れは、遺伝子が導入された対象群が、コントロール群に対して有意的な結果を生み出すかどうかに重点が置かれていた。今後の研究ではbench-to-bed gapを乗り越え、臨床応用に資するだけのセラノスティクスを本遺伝子導入法が有することができるかを実証することが求められる。治療効果を高める方法論のひと

つとして、例えば、癌治療に限定すれば、高い分子導入効率が期待される局所療法が有効な膀胱癌、卵巣癌、肝癌、脳腫瘍、あるいは転移病巣の形成が予想されるセンチネルリンパ節を治療対象に設定する、また遺伝子の導入効率を改善するための高発現・長期プラスミドDNAの開発や、遺伝子デリバリーシステムの開発があげられる。

セラノスティクスに値する超音波による遺伝子導入法の開発を今後期待したい。

文献

- 1) Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? *Science* 1972;175(4025):949-55.
- 2) Fechheimer M, Denny C, Murphy RF, et al. Measurement of cytoplasmic pH in Dictyostelium discoideum by using a new method for introducing macromolecules into living cells. *Eur J Cell Biol* 1986;40(2):242-7.
- 3) Fechheimer M, Boylan JF, Parker S, et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1987;84(23):8463-7.
- 4) Chaussy C. Extracorporeal shock wave lithotripsy. technical concept, experimental research, and clinical application. Karger 1986.
- 5) Delius M, Hofschneider P. Extracorporeal shock waves for gene therapy? *Lancet* 1995;345(8961):1377.
- 6) Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, et al. Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum Gene Ther* 1996;7(11):1339-46.
- 7) Gramiak R, Shah PM, Kramer DH. Ultrasound cardiography: contrast studies in anatomy and function. *Radiology* 1969;92(5):939-48.
- 8) Miller DL, Thomas RM. Ultrasound contrast agents nucleate inertial cavitation in vitro. *Ultrasound Med Biol* 1995;21(8):1059-65.
- 9) Porter TR, Iversen PL, Li S, et al. Interaction of diagnostic ultrasound with synthetic oligonucleotide-labeled perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin microbubbles. *J Ultrasound Med* 1996;15:577-84.
- 10) Bao S, Thrall BD, Miller DL. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol* 1997;23(6):953-9.
- 11) Aoi A, Watanabe Y, Mori S, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy

- using nano/microbubbles and ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2008;34:425–34.
- 12) Unger EC, McCreery T, Sweitzer R, et al. MRX 501: a novel ultrasound contrast agent with therapeutic properties. *Acad Radiol* 1998;5(Suppl1):S247–9.
- 13) Watanabe Y, Horie S, Funaki Y, et al. Delivery of Na/I symporter gene into skeletal muscle using nanobubbles and ultrasound: visualization of gene expression by PET. *J Nucl Med* 2010;51(6):951–8.