ナノまたはマイクロ粒子による集束超音波治療効果の強調

梅村　晋一郎*，吉澤　晋

医工学研究科 ナノ波動医工学講座　教授
工学研究科 電気･通信工学専攻 音波物理工学講座 助教
E-mail: sumemura@ecei.tohoku.ac.jp

要 旨

超音波の生体作用はマイクロバブルにより桁違いに増強され得る．生体組織の超音波吸収がマイクロバブルの導入により増強されることを理論的に予測し，動物実験によって実証した．マイクロバブルを治療標的組織に選択的に送達することができれば，この効果は超音波治療において有用性が大きいと考えられる．

1．はじめに

超音波は，途中の生体組織を伝播したのちに，非表在性の治療目的組織に到達し，それを振動させ，加熱するエネルギーを集束してするのに適切な吸収係数や減衰係数を，ほどほどの波長においてもっている．これは，レーザービームなどの電磁波にはない，非表在性腫瘍の非侵襲的治療に適した特長である．このような治療に原理的に役立つ可能性のある超音波の生体作用を図１に示した．

マイクロバブルが存在すると，その近傍では振動振幅が桁違いに大きくなるので，機械的作用も加熱作用もともに加速される．さらに，マイクロバブルが圧壊するとき，音響化学作用が発生する．

近年，加熱作用は，強力集束超音波（HIFU）による加熱凝固治療法として，臨床的に用いられるようになった．ここでは，マイクロバブルによる生体作用強調の例として，生体組織の超音波加熱のマイクロバブル製剤投与による加速をとりあげる．

2．マイクロバブルによる超音波加熱促進の機序

マイクロバブルが，その共振周波数に近い周波数の超音波の圧力を受けると，その体積が振動し，超音波のエネルギーが熱に変換される．そのメカ

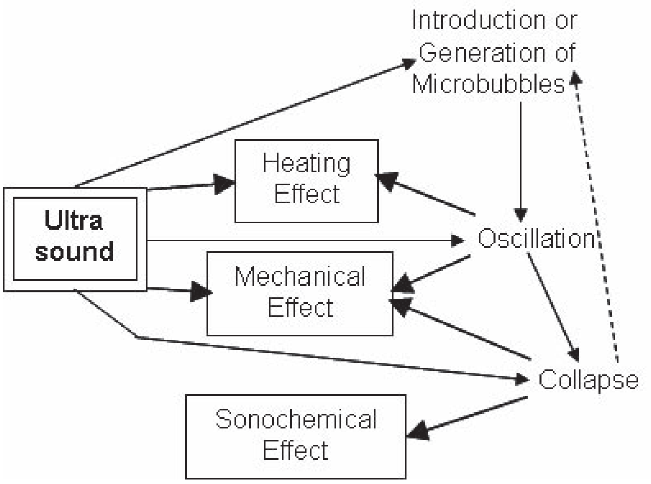


図１．Bioeffects of ultrasound and their enhancement with microbubbles.

ニズムは，(1)液体の粘性と(2)気泡の熱サイクルによるものに分けることができる．メカニズム(1)は，マイクロバブルを囲む液体が，マイクロバブルの体積振動によってずり変形し，その粘性のため熱を発生することによるものである．

一方，メカニズム(2)は，マイクロバブル内部の気体の温度が，マイクロバブルの圧縮にともなって上昇し，膨張にともなって下降することに由来するものである．このとき生ずる気泡内部における熱輸送により，気泡の体積変動と圧力変動の間の位相ずれが生じ，位相差が 180°から外れるために，気泡の体積振動エネルギーの一部が熱に変換される熱サイクルが生まれる．熱を機械的エネルギーに変換する熱機関とは反対の熱サイクルである．

マイクロバブルの圧縮・膨張にともなう温度変化は，気泡に内包される気体の比熱比が大きいほど大きくなる．その結果，熱サイクルによって熱に変換される超音波エネルギーも，内包気体の比熱比が大きいほど大きくなる．空気（比熱比 1.40）を内包するマイクロバブルの超音波圧力下における熱サイクルを比熱比の大きなアルゴン（比

熱比 1.67）と比熱比の小さな 6 フッ化硫黄 SF_6（比熱比 1.09）を内包する気泡と比較して図２に示した．熱機関の場合と同様，気泡体積と内包気体の圧力を横軸・縦軸として熱サイクルをプロットすると，その囲む面積が 1 サイクルに変換される熱エネルギーに等しくなるが，その面積は，アルゴンでは空気の 2 倍近いのに対し，6 フッ化硫黄では，ほとんど無視できるほど小さくなっており，その熱サイクルは等温変化に近い．

超音波診断用に最近開発された造影剤を構成する安定化マイクロバブルは，すべて，6 フッ化硫黄やパーフロロカーボンなど多原子分子ガスを内包している．本研究の実験において使用された Optison^{TM} も，そのような新世代の超音波造影剤であり，パーフロロカーボンを内包している．パーフロロカーボンは，6 フッ化硫黄以上に気体分子の内部自由度が大きく，その比熱比は 1 にさらに近い．従って，内包気体がパーフロロカーボンの場合には，その熱サイクルは等温変化にきわめて近く，メカニズム(2)により発生する熱はメカニズム(1)により発生する熱に対して無視できる．

図３には，内包気体がパーフロロカーボンである場合を想定し，等温過程において，マイクロバブル１個が熱に変換する超音波パワーを数値計算して，気泡体積あたりの値を気泡半径に対してプロットした．超音波強度は，1 mW/cm^2 から 1 W/cm^2 まで 2 倍ずつ等比級数的に増加させた．超音波強度が 1 mW/cm^2 のときには，共振気泡半径は 1 つで，マイクロバブルの応答はほぼ線形とみなすことができるのに対し，超音波強度が 1 W/cm^2 に近くなると，非線形的な応答が現れ，1/2 や 1/3 の共振気泡半径も出現している．安定化マイクロバブルの半径には 2 倍程度の分布があるのが通常であるが，この非線形的な応答の恩恵により，マイクロバブルの多くが超音波のエネルギーを熱に変換することに貢献できると考えられる．これらの結果から，生体組織 1 mm^3 あたり 10 個程度 のマイクロバブルが存在すれば，生体組織の超音波吸収が倍増すると予測される．

３． 実験方法

動物実験は，周波数 3 MHz，焦点距離 30 mm，口径 40 mm×20 mm の経直腸的前立腺治療用に設計された HIFU トランスデューサを用いて行った．トランスデューサは，共振周波数 3.2 MHz，口径 40 mm x 20 mm の半径 35 mm の球面曲率をもつ

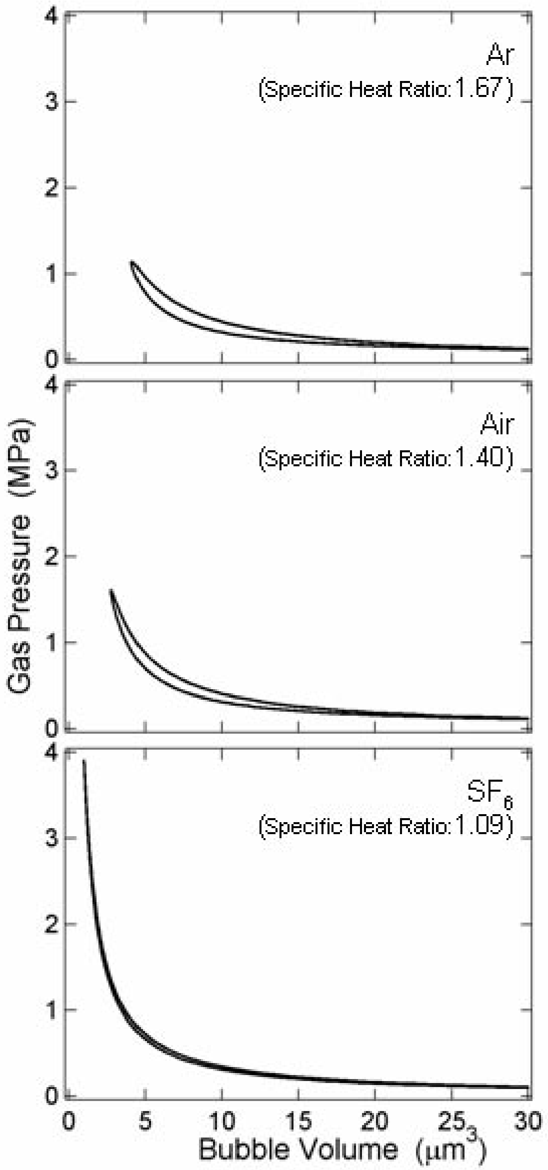


図２．Thermal cycle of resonant microbubbles containing different gas species subjected to ultrasonic pressure at 2 MHz and 0.5 MPa (peak).

PZT セラミック（富士セラミックス）により構成されている．電極は２分割されているので，１つの素子の面積は 40 mm x 10 mm である．トランスデューサは，図４に示すようにアルミ合金のハウジングに接着されており，ハウジングには，周波数 6.5 MHz，曲率半径 10 mm のイメージング用小型コンベックス・アレイ・プローブ EUP-F331（日立メディコ）が組み込まれている．イメージ・プローブと HIFU トランスデューサとの相対的位置関係は，in vivo 実験の前に調整した．

HIFU トランスデューサの２素子を互いに反対の位相にて駆動すると集束された超音波ビームが２本にスプリットする．このスプリット・ビーム

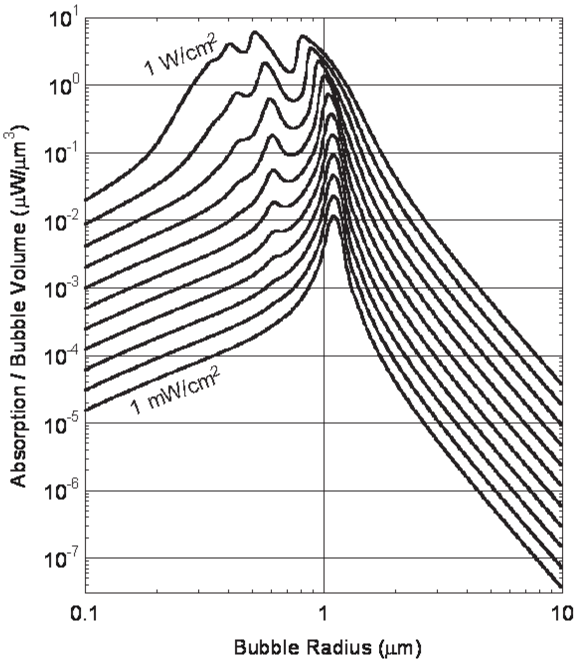


図３．Ultrasonic abosorption by microbubble at 3 MHz, theoretically predicted by numerically solving the Rayleigh-Plesset equation. Ultrasonic intensity is varied as a parameter from 1 mW/cm^2 to 1 W/cm^2 in a geometric series.

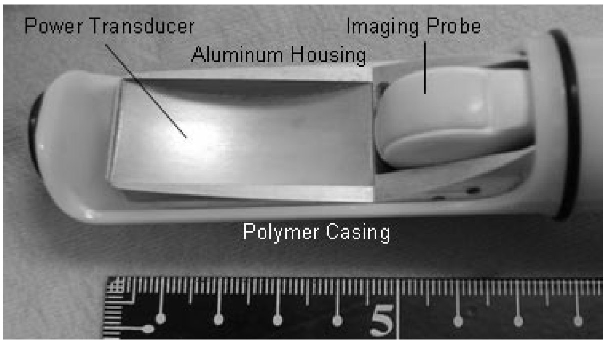


図４．HIFU transducer at 3.2 MHz used in *in vivo* experiment.

を用いると，通常の単一ビームと比較して，空間的ピークの音圧を抑制でき，マイクロバブルを過剰に破壊したり，生体組織を不可逆的に変化させることを防ぐことができるので，in vivo 実験には，このビームを用いた．図５には，in vivo 実験に用いた集束音場のシュリーレン像を示す．

HIFU トランスデューサからの超音波出力は，脱気水中にて中空アルミ板の受ける超音波輻射圧を計測することにより，駆動電圧に対して較正した．集束超音波ビームの音圧分布は，脱気水中にて直径 0.5 mm のニードルハイドロフォン（Imotec）を

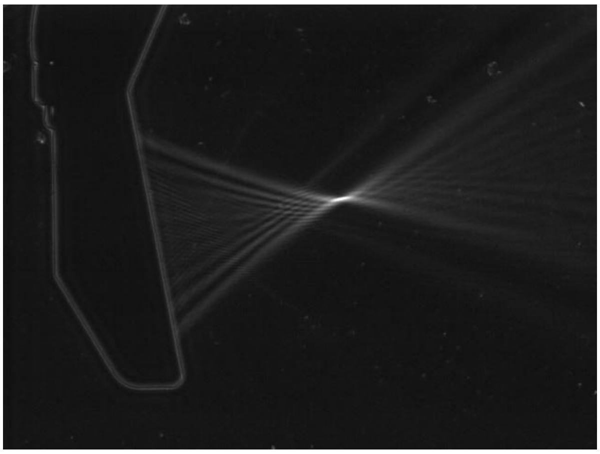


図５．Focal ultrasonic field of the HIFU transducer at 3.2 MHz.

用いて，ハイドロフォンが破壊されない低い音圧にて計測した．In vivo 実験における超音波強度は，この計測結果から，電気入力と超音波出力の線形性を仮定し，駆動電圧の自乗に比例するものとして求めた．ここで，生体組織中を数 mm 伝播する間の超音波減衰は無視した．

ヒトアルブミンを重合させた微小な球殻にパーフルトレン C_3F_8 を内包させた安定化マイクロバブルを生理食塩水に懸濁した超音波造影剤 Optison^{TM}（Amersham Health）を実験に用いた．その濃度，粒径分布，マイクロバブルの総体積は，pH 7.4 のリン酸緩衝液で 200 倍に希釈後，Coulter Multisizer III （Beckman Coulter）に口径 30 μm のオリフィス管を取り付けたものを用いて計測した．

図６に示すように，麻酔したラット（雌 SD ラット，体重 250 g）の腹壁を小さく切開し，その切開口を通して，腹腔より，脱気した 33℃の生理的食塩水中へ，左腎臓を引き出した．内径 0.5 mm，外径 0.8mm のポリエチレン管のカニューレを頚静脈に留置し，それを通して Optison を 0.2 ml/kg 注射した．

超音波照射による熱電対と生体組織との摩擦に起因する発熱を防ぐため，非常に細い熱電対を用い，これを腎臓の超音波焦点位置に刺入した．この直径 0.25 mm のクロメル・アルメル熱電対（助川電気工業）は，酸化マグネシウムの微粉末を満たした厚さ 0.05 mm のステンレス壁でつくられた鞘に収められている．その軸方向の熱伝導は，直径 0.9 mm の生体組織と同程度であると見積もられる．

HIFU トランスデューサに対するラットの相対的位置は，超音波の焦点位置において熱電対の感度が最大になるように決定した．まず，超音波プロ

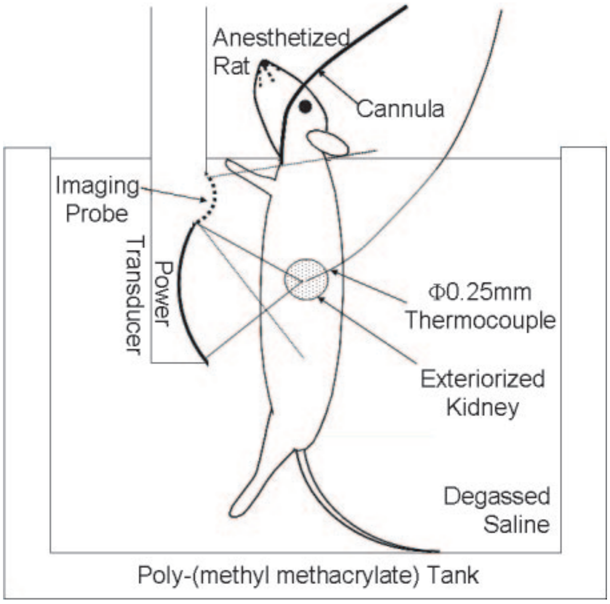


図６． Experimental setup of HIFU exposure.

ーブにより得た B モード断層像によりおおまかに位置決めをし，次に，低い一定強度で超音波照射を行い，超音波照射による温度上昇が最大となる位置を求めた．

In vivo 超音波加熱実験における超音波照射強度は，超音波単独では加熱凝固が起きないよう HIFU としては低い数百 W/cm^{2}の強度を選んだ．

病理観察のためのラット腎組織は，一連の超音波照射の直後に摘出し，10%ホルマリンにて固定の後，ヘマトキシリン・エオシンにて染色した．病理組織への機械的損傷を防ぐため，この群の腎組織については，熱電対を刺入しなかった．従って，位置決めは，超音波 B モード断層像のみにより行った．

実験結果の再現性を確かめるため，同じ実験を 3 匹のラットについて行った．実験動物は，日本学術会議提案のガイドラインに従って，取り扱った．

４． 実験結果

一連の HIFU 照射実験に先立ち，実験に使用する安定化マイクロバブル製剤 Optison の粒径分布を測定した． その結果を図７に示す．粒子数に着目すると，半径 0.6 μm 付近と 1.6 μm 付近の両方にピークが見えるが，それらの体積に着目すると半径 3.2 μm 付近を中心とする１つのなだらかなピークをもつことがわかった．Optison 中のマイクロバブルの総体積は 2.2%であることがわかった．

図８には，同じ超音波強度 290 W/cm^2 における同じ照射時間 10 s の HIFU 照射による同じ腎組織の温度を Optison 投与の前後 3 回の照射についてプロットした．Optison の投与は横軸上時刻 0 にて行った．また，図９には，これらの温度上昇曲線を，時間軸を拡大して重ねることによって比較した．Optison 投与直後の HIFU 照射では，投与直前の照射に比べて 4～5 倍もの温度上昇を得ることができた．

図 10 には，Optison 投与後，一定の時間間隔 5 min をおいて同じ超音波強度・同じ照射時間にて HIFU 照射を繰り返し行ったときの同じ腎組織の温度をプロットした．繰り返し照射によっても腎組織が不可逆的ダメージを受けないよう，超音波強度を，さらに 150 W/cm^2 まで落として照射した．

さらに，図 10 の結果から毎回の HIFU 照射による温度上昇のピーク値を求め，Optison 投与後に経過した時間の関数として，図 11 にプロットした．

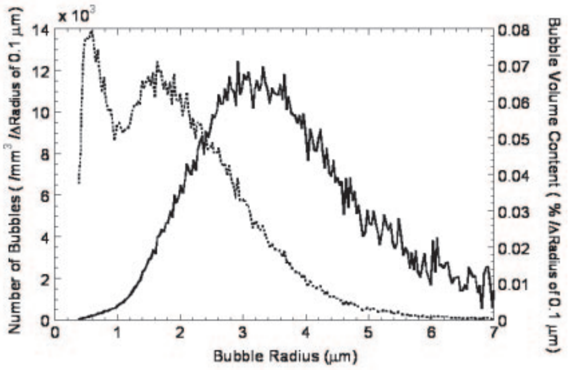


図７． Size distribution of Optison (dotted line) and distribution in volume content (solid line). It was measured using a Coulter Multisizer III instrument (Beckman Coulter, Fullerton, CA), fitted with an orifice tube of 30 μm aperture after diluted with phosphate buffer saline, pH 7.4, by 200 times.

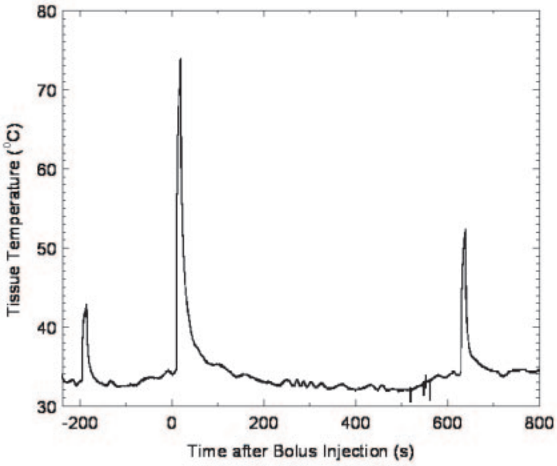


図８． Murine kidney tissue temperature with HIFU exposure at 290 W/cm^2 before and after intravenous injection of Optison (0.2 ml/kg) at time 0.

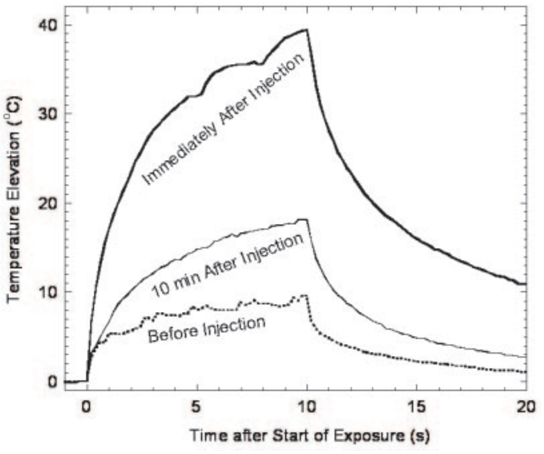


図９．Tissue temperature elevation with HIFU with/without Optison.

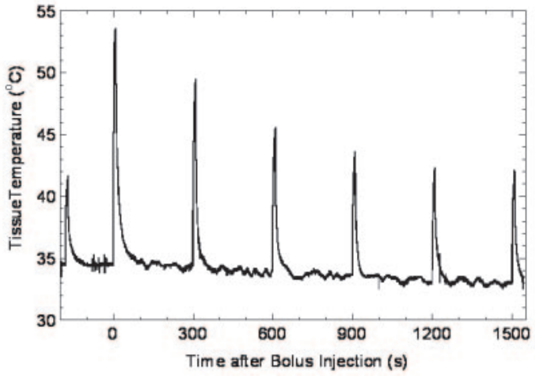


図 10．Murine kidney tissue temperature with HIFU exposure at 150 W/cm^2 before and after intravenous injection of Optison (0.2 ml/kg) at time 0.

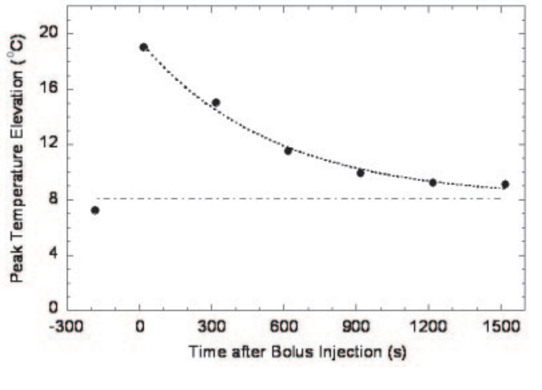
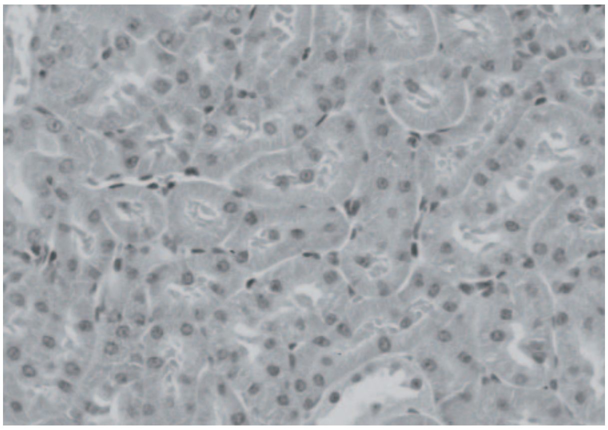
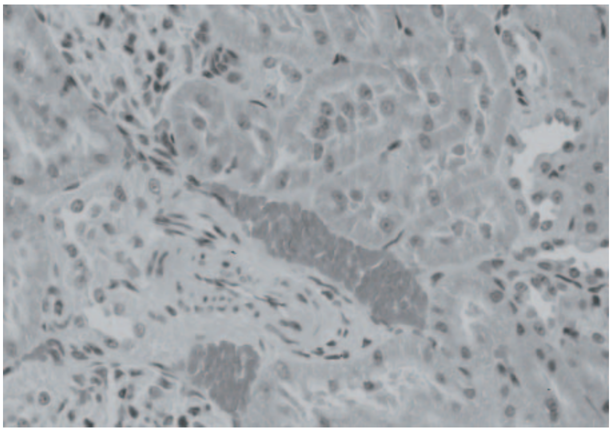


図 11．Peak tissue temperature elevation during each ultrasonic exposure plotted against time after bolus injection of 0.2 ml/kg Optison. A least-squares fit monoexponential curve (dotted line) and its final value (dotted broken line) are also shown.

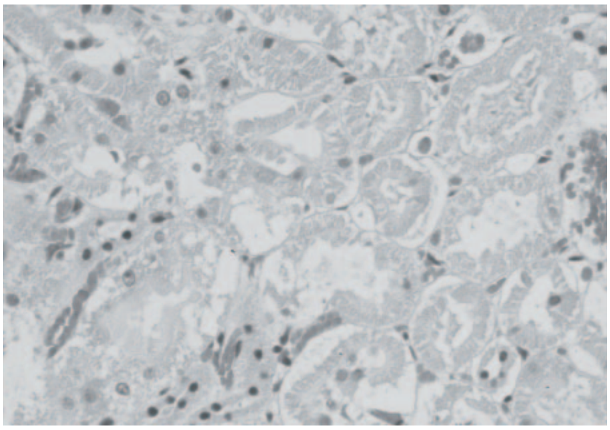
図中の点線は，指数関数を最小二乗フィットした結果である．約 9 min の時定数をもって，Optison 投与前の温度上昇ピーク値にほぼ漸近していく結果が得られた．



(a) After seven-time ultrasonic exposure alone at 290 W/cm^2.



(b) After seven-time ultrasonic exposure with Optison™ at 150 W/cm^2.



(c) After one-time ultrasonic exposure with Optison™ at 290 W/cm^2.

図 12．Typical histology of the renal tissue after each series of ultrasonic exposure.

図 12 は，それぞれの条件において超音波照射した後のラット腎組織の病理組織像である．第 2 回目の超音波照射実験（図 10 および 11）と同様，

Optison 投与後に強度 150 W/cm^2 にて 10 s 間 7 回超音波照射した組織（b）には赤血球の漏出がところどころに観察された．また，第 1 回目の超音波照射実験（図８および９）と同様に，Optison 投与後に強度 290 W/cm^2 にて 10 s 間 1 回超音波照射した組織（c）には尿細管の凝固壊死があちらこちらに観察された．超音波照射単独，Optison 投与なしの病理組織には，第 1 回目の強度 290 W/cm^2 にて第 2 回目の間隔で 10 s 間 7 回超音波照射した場合においても，組織の損傷は観察されなかった．

５．考 察

実験に用いた Optison の投与量 0.2 ml/kg は，通常の超音波診断に用いられる臨床的投与量より１桁近く多いが，安全性の確かめられた臨床的に用い得る投与量の範囲内である．このような範囲の投与量においても，投与なしの場合の 4〜5 倍という顕著な超音波加熱の増幅効果が得られた点は，この種のアプローチの潜在的可能性の高さを示している．

Optison など超音波造影用安定化マイクロバブルに内包されたガスは，肺循環におけるガス交換により対外へ排出される．Optison 同様パーフロロカーボンを内包する超音波造影用安定化マイクロバブルについて，呼気のガスクロマトグラフィーをもとに測定した結果によれば， その体外への排出の時定数はヒトにおいて 5 min 強と見積もられている．図 11 より得られた約 9 min という時定数は，種差等を考えたとき，Optison の体外への排出に対応すると考えるのが妥当ある．この実験結果からも，観察された超音波加熱の増幅は，Optison の血中濃度に比例するものであるという仮説が，強く支持される．

上記のように実験により確かめられた安定化マイクロバブルによる超音波加熱の増幅効果は，その大きさの桁が，数値計算により理論的に予測されたバブル１個あたりの発熱と一致する．

理論予測によれば，図３に示されているように，1 W/cm^2 という HIFU とは呼べない程度の比較的低い超音波強度においても，すでに非線形効果が顕著にあらわれており，そのため，バブル体積あたりの超音波による発熱に着目するとき，それがバブル半径について，基本振動に対応するものだけでなく，いくつものピークを持つようになっている．安定化マイクロバブル製剤の粒径は，一般に，単分散と呼べるものではなく，図７に示されているような比較的ブロードな分布をもつ．このような粒径分布に対して，それぞれの粒径のバブルを，その基本振動において励振して発熱させるとすれば，励振する超音波周波数を掃引するなど工夫する必要が生ずる．ところが，幸いなことに，現実のマイクロバブルは，非線形振動のために，図３にみられるような広い分布をもつ発熱特性を持っているので，そのような工夫をするまでもなく，単一の超音波周波数でも充分な発熱効果を発生したものと考えられる．

以上は，本報告で述べた理論的予測と実験結果を矛盾なく結び付けて説明しようとする立場に立った考察であるが，これとはいささか異なる解釈にもとづく考察について以下に記す．

液体中のマイクロバブルは，たとえ単独に存在したとしても，その表面張力のために内圧が高いので，短時間のうちに消滅してしまう．そこで，その表面張力に打ち勝って，マイクロバブルを安定化させるために，表面張力を低下させる界面活性剤や，気体分子や液体分子の透過に抵抗するシェルが用いられる．実験に使用した Optison の場合には，血清蛋白の主成分であるアルブミンを球面の籠状に重合させたシェルが用いられている．このアルブミン・シェルは，HIFU レベルの高い音圧には耐えられないので，超音波加熱増強効果を発生する時点では，すでにシェルは壊れ，シェルなしのバブルとなっていると考えるのが自然である．図３の理論的予測も，このような考えに基づき，シェルなしのバブルについて数値計算した結果である．

さて，シェルが壊れると，それを構成していた重合アルブミンは，音響キャビテーションを生ずるときの核として働くようになる可能性がある．このとき音響キャビテーションにより生じたバブルに内包されるガスは，Optison に内包されていたパーフロロカーボンだけでなく，血中にもともと含まれる窒素・酸素や水蒸気である可能性もある．後者の場合，気体の比熱比を 1 と近似するは，いささか乱暴にすぎ，図２を用いて説明したような熱サイクルによる発熱も考慮に入れる必要を生ずるため，理論的予測も，図３とはやや異なる結果を与えるものと考えられる．

この説に立つ場合，超音波加熱を増強するのに働くのは，Optison に内包されていたガスそのものよりむしろ，Optison を内包されていたアルブミン・シェルが壊れたものなので，図 11 に示された結果の解釈も異なるものになる．すなわち，アルブミン・シェルを構成していた重合アルブミンが，体内を循環するうち肝臓において処理され重合が

解かれて，キャビテーション核として働かなくなる時定数が，観察された約 9 min という時定数であると解釈するわけである．

本報告では，前者の解釈の立場をとるが，後者の解釈の是非は，次のような実験をすることによって確かめることができると考えられる．すなわち，Optison を陰圧に引くことにより，パーフロロカーボンを抜き取ってアルブミン・シェルを壊してから，動物に投与したのちに超音波照射する実験を行い，図７－11 に示されたような結果が得られるかどうかを確かめればよい．

さらに，前者・後者の間の中間的な解釈として，次のような説も考えられる．Optison に内包されていたパーフロロカーボンは水に対して難溶性なので，Optison のシェル崩壊後のシェルなしのパーフロロカーボン・マイクロバブルが音響キャビテーションの核として働き，血中にもともと含まれる窒素・酸素や水蒸気が，超音波によって体積振動するマイクロバブルに吸い出され，超音波加熱の増強に寄与するという説である．この場合，図 11 において観察された時定数の解釈は，前者とかわらず，実験によって前者との違いを明らかにするのは困難である．しかし，この説によれば，バブル内に窒素・酸素や水蒸気も無視できない程度含まれる可能性があるので，図２を用いて説明したような熱サイクルによる発熱も考慮に入れる必要を生じ，図３とはやや異なる理論的予測をしなければならない可能性が強い．

６．結論と展望

臨床的にも使用し得る範囲の投与量の安定化マイクロバブル製剤投与により，超音波照射による生体組織の加熱を顕著に増幅できることを，理論的に予測するとともに，動物実験により実証することができた．

しかしながら，生体組織の超音波吸収は，超音波散乱とならび，生体を伝播する超音波の減衰メカニズムの 1 つであるから，マイクロバブルが全身にわたって似たような濃度で分布していたのでは，焦域まで伝播する途中の組織における超音波減衰が同時に増えてしまい，得られた増幅効果がほとんど打ち消されてしまう恐れがある．伝播における超音波減衰を増やさずに，焦域における充分な増幅効果を得るには，マイクロバブルの濃度を，図 11 に示すように治療目的組織において周囲の組織に比べて選択的に上げる工夫が必要である．

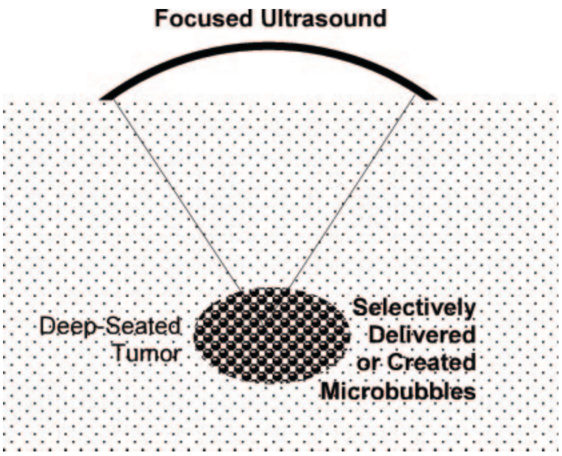


図 13. Selective delivery or creation of microbubbles. Microbubbles should be selectively delivered to or created in the target tissue to fully utilize the observed effect.

物理的刺激により相転移してマイクロバブルに変化するナノ液滴はこの要求に応えられる可能性がある．半径100 nm程度の安定化したパーフロロカーボンのナノ液滴は，EPR 効果により腫瘍組織に集積しやすいが，図14に模式的に示したように，これを超音波照射の刺激により，MHz域の超音波を効率よく吸収する半径１μm程度のマイクロバブルに相変化させることができることが実験により確認されている[2]．このナノ液滴を利用した超音波診断と超音波治療を融合する技術について，現在，研究開発が進められており，今後の発展が大いに期待されるところである．

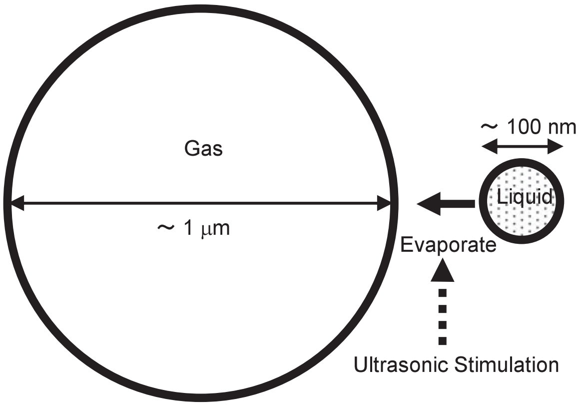


図14. Midrobubble and its precursing nano-particle. A liquid particle approximately 100 nm in radius can be converted with ultrasonic stimulation to a gas bubble approximately 1 μm in radius, which can efficiently convert ultrasonic energy at a frequency in a MHz range into heat.

また，これとは別に，薬物投与によらず，通常のHIFUよりもさらに桁違いに高い強度の超音波パルスを照射することによって，治療標的組織にマイクロバブル雲を形成する手法により，その超音波吸収を局所的に高めることができる可能性が出てきた．この手法における超音波照射シーケンスを図15に模式的に示した．通常のHIFU照射と同程度の超音波強度と照射時間の超音波照射に先立ち，通常のHIFU照射より1桁以上高い音圧，長さ10 μs-10 ms の超音波パルスを照射するものである．この種の超音波照射により，生体組織を機械的に破壊するのに有効なマイクロバブル雲を形成できることが，最近，報告されている[3].

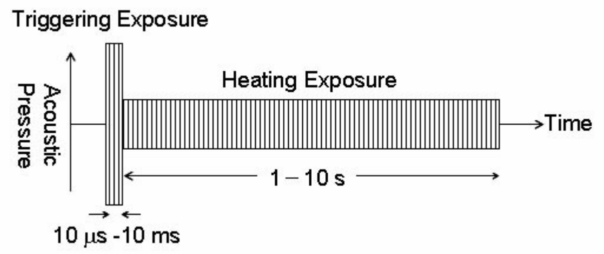


図 15. “Triggered HIFU” sequence. In prior to the heating ultrasonic exposure with both intensity level and duration similar to ordinal HIFU exposure, an extremely-high-inteisity ultrasonic pulse is exposed to create a bubble cloud in the target tissue.

謝 辞

共同研究者である日立製作所中央研究所の川畑健一氏および東京農工大学獣医学科の佐々木一昭准教授には，特に，実験において多大な協力を頂いた．ここに感謝の意を表する． また，本研究の一部は，NEDO プロジェクトによるものである．

文 献

[1] Umemura S, Kawabata K, and Sasaki K. Acceleration of ultrasonic tissue heating by microbubble agent. *IEEE Trans. Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* **52**, 1690-1698, 2005.
[2] Kawabata K, Sugita N, Yoshikawa H, Azuma T, and Umemura S. Nanoparticles with Multiple Perfluorocarbons for Controllable Ultrasonically Induced Phase Shifting. *Jpn J Appl Phys* **44**, 4448-4852, 2005.
[3] Xu Z, Fowlkes JB, Rothman ED, Levin AM, and Cain CA. Controlled ultrasound tissue erosion: the role of dynamic interaction between insonation and microbubble activity. *J Acoust Soc Am* **117**, 424-435, 2005.