

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12523

研究課題名(和文)超音波照射によるがん組織内NO誘導を利用した新規放射線効果増強法の開発

研究課題名(英文)New combination therapy against solid tumor.

研究代表者

横山 昌幸 (Masayuki, Yokoyama)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：20220577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は計画当初から大きく方向性を変えての実施となった。固形がんや脳梗塞の超音波治療で、治療部位が受ける超音波強度は最も重要なパラメーターである。本研究では超音波の干渉現象によって、治療部位が受ける超音波強度が皮膚厚や生体の形状の些細な違いによって大きく周期的に変動することを、理論、モデル、及び生体サンプルで実証した。さらに、この有害な超音波強度変動を超音波変調技術によって顕著に抑制できることを実証した。これまで見過ごされてきたこの変動現象の解明と、超音波変調による変動の抑制は、安全で効果の高い超音波治療実現に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Transmittance of ultrasound intensity through living body is the most important factor for safe and effective therapies by the use of ultrasound. We found substantial fluctuation in the transmittance due to interference phenomena of ultrasound. We obtained good agreements of the fluctuation between theoretical calculation and experimental measurements both with a phantom model and human samples. Furthermore, this fluctuation was successfully reduced by the use of modulated ultrasound. These findings can greatly contribute to advances of safe and effective ultrasound therapies.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：超音波照射 固形がん 超音波強度 生体透過率 超音波変調

### 1. 研究開始当初の背景

本研究の当初の目的は、一酸化窒素の産生誘導という新規な機構による超音波照射と X 線照射との併用がん治療法の動物レベルでの確立である。図 1 に示すように、超音波照射によってがん虚血部位内に一酸化窒素(NO)を産生させ、この NO を X 線照射の radiosensitizer として利用することで、通常の放射線療法では、組織酸素濃度が低く X 線照射によってもがん細胞を十分に傷害し得ない虚血領域でも十分な障害作用を及ぼす新規超音波一放射線併用療法が得られる。これは従来の放射線単独治療では不可能であった、虚血領域を含めたがん組織全体を死滅させる、革新的ながん根治療法となり得る。

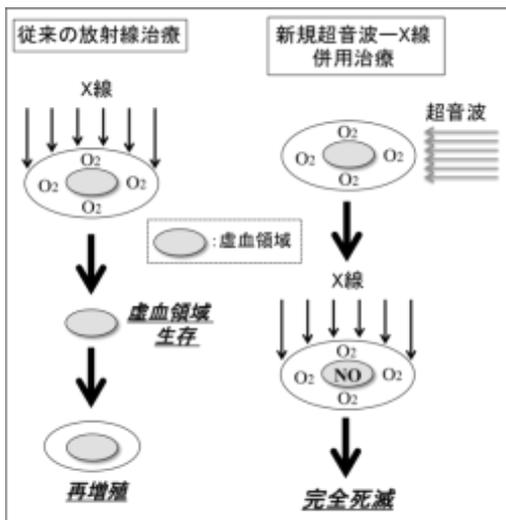


図1 新規併用療法と従来の放射線療法との比較

### 2. 研究の目的

本研究は計画当初から大きく方向性を変えての実施となった。この研究では、癌部位が受ける超音波強度は最も重要なパラメーターである。超音波透過率を測定しているときに、骨表面および超音波プローブの表面で反射した複数の超音波が干渉することで、ミリ単位の位置の違いで照射超音波強度が数倍以上にも変動（人工骨モデルの場合）することを見いだした。この干渉作用には超音波振動子の振動面及び振動子内部構造の反射も関係するため、皮膚付近の固形がんの場合でも影響が考えられる。そこで、癌治療を含めた超音波照射の安全な実施のために、干渉による超音波強度変動を理論的、実験的に解析した。さらにヒト頭蓋骨で同様な測定をしたところ、予想に反して(形状が複雑な頭蓋骨の場合には、大きな変動は観察されないであろうというのが予想であった)大きな変動が観察された。この大きな変動は従来、予想も実証もされていなかったことと、生体の超音波透過率はがん治療のみではなく、急性期脳梗塞治療など医療の広い用途で重要なパラメーターであることから、透過率を複数の頭蓋骨と測定ポイントで測定し、生体での変動挙動を正確に求めることが必要と判断した。この理由に

より、超音波の生体透過率の変動挙動解析に大きく研究の方向を変えることとなった。

### 3. 研究の方法

#### (1) 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

超音波プローブは上田日本無線株式会社製でその振動子面は直径 24mm の円板であり、400kHz,500kHz,600kHz 正弦波と 500kHz±100 kHz の周波数変調超音波とを比較して透過超音波を測定した。骨ファントム板を透過した超音波は後、ニードル型ハイドロホンによって測定した。変調方式は、周波数ランダム選択法 (Periodic Selection of Random Frequency: PSRF) を用いた。実験装置システムの概略を図 2 に示す。

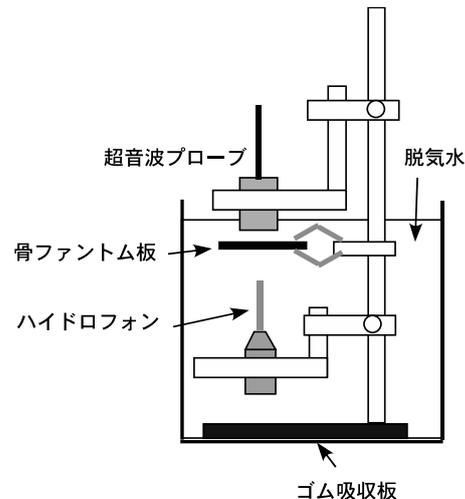


図2 ファントム透過超音波測定装置

#### (2) ヒト頭蓋骨の超音波透過率測定

頭蓋骨は東京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

本実験では図3のように頭頂部がカットされているもので頭蓋骨の一番薄い部分であるこめかみ部位で測定を行った。測定装置は骨の保定器具が異なるものの、図2と基本的に同じ仕組みを用いた。



図3 頭蓋骨 No. 13

#### 4. 研究成果

##### (1) 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

まず、周波数による透過率の変動を理論と骨ファントムの実測で比較した。計算は平面波が  $n$  層を透過する単純なモデルを用いた。図4には(A)計算から求めた超音波透過率を(B)実測した透過率を示す。計算では、設定する骨と皮膚の厚さによって振幅と周期が異なるものの、どの場合も透過率は周期的に大きく変動する。(B)に示した実測でも、同様な大きな変動が観察された。また、透過率が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。これは、振動子内部での干渉現象も重要であることを示す。

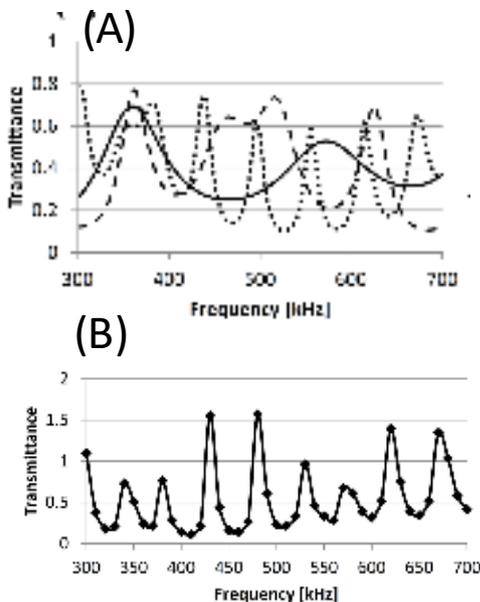


図4 周波数による超音波透過率変動  
(A)計算による透過率—:皮膚 2.0mm,骨 2.5mm、  
- -:皮膚 6.0mm,骨 3.0mm、...:皮膚 12.0mm,骨  
4.0mm(B)実測透過率 皮膚 12.0mm,骨 2.0mm

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挙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。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。また、実測では全く変動は観測されなかった。(P. J. White, et al., Phys. Med. Biol. 51 (2006) 2293-2305) 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、White らは頭蓋骨に対し 600kHz 以上の周波数を測定したのに対し、我々は 300kHz~700kHz の周波数を用いたことである。以上のことより、「超音波の骨透過は、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」との従来の認識は、少なくとも 500kHz 周辺の中周波数超音波を骨厚が薄い部分に照射する際には改める必要がある。

次に超音波周波数を 500kHz に固定して膚厚を変えた際の変動を求めた。骨厚を 2.0mm として皮膚厚を変えた計算の結果を図5に、実測の結果を図6に示す。両図を比較すると、超音波透過率の極大極小を示す距離、超音波透過率の絶対値、変動周期のすべてにおいて極めて高い一致をみた。また、図6Bには日本人のこめかみ部の平均皮膚厚である 12mm 付近の結果を示している。この場合でも大きな周期的変動が観測された。

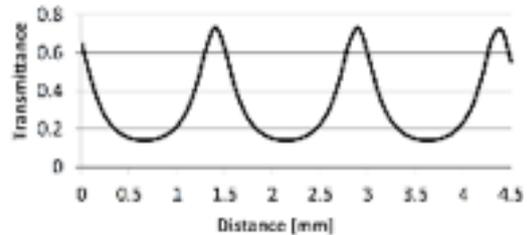


図5 皮膚厚を変化させた場合の超音波透過率の計算値 (骨厚:2mm、周波数:500kHz)

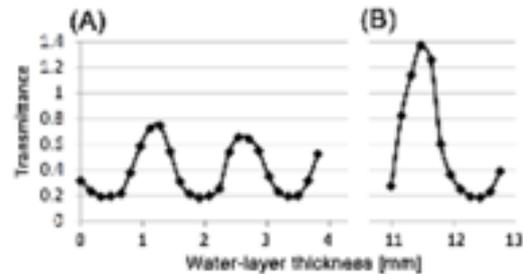


図6 皮膚厚を変化させた場合の超音波透過率の実測値 (骨厚:2mm、周波数:500kHz)  
(A)皮膚厚 4mm 未満、(B)皮膚厚 12mm 周辺

この結果は、周波数を固定して照射した場合でも、個人差のある皮膚厚によって透過する超音波強度が何倍にも変わり得ることを意味する。このような大きな変動は、超音波の安全で効果的な照射に対して大きな問題となる。そこで、この変動を小さくするために変調した超音波照射を試みた。皮膚厚を変化させた場合の透過率の実測値を図7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, 1 μ 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。よって、超音波透過率変動を抑制するためには PSRF 方式の超音波変動が効果的であることが分かった。

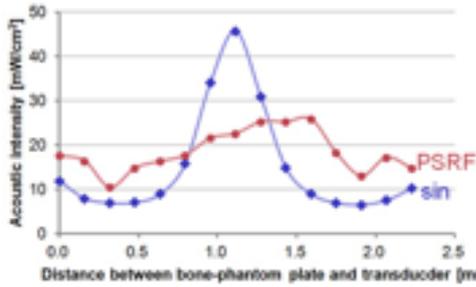


図7 皮膚厚を変化させた場合の透過率の正弦波と変調波の比較

### (2) ヒト頭蓋骨の超音波透過率測定

頭蓋骨は複雑かつ湾曲した構造であることが前項の骨ファントム板とは大きく異なる事柄である。よって、照射超音波が屈折して、超音波振動子の真下に位置したハイドロフォンでは正しく超音波が測定しない場合が考えられた。そこで、超音波が屈折せずに正しく測定できるポイントを探ることとした。慈恵医大神経内科の井口保之教授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、振動子直下に超音波強度の極大がくるような位置 (R1~R3) を探索したところ、最初の候補点 (R1' ~R3') からかなりのずれが見られた。一例として頭蓋骨 No. 13 の右側の場合に候補点から測定点までの距離は以下ようになっていた。

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

このことは、最適な位置を見いださないと正確な透過率の測定ができないことを意味する。従来、頭蓋骨での透過率変動が報告されていないのは、本研究で行ったような「測定位置探し」を行っていなかったためと考えられる。その最適な位置での測定によって、安全で効果的な超音波照射を脅かす透過率変動が明らかになるのである。頭蓋骨の片側について求めた3箇所の測定点それぞれについて、図8に示すように2mmずつ離れた4点を含めて5ポイントの測定を行う。

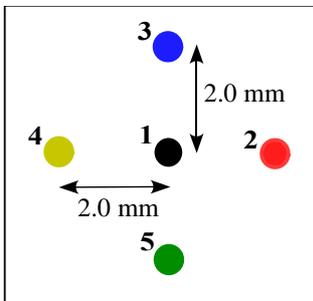


図8 測定を行った5点

この5点について皮膚厚を変えた際の超音波透過率の結果を図9と図10に示す。図9は比較の変動が大きかった測定点、図10は変動が小さかった測定点の結果をそれぞれ示す。

図9に示すように、頭蓋骨においても相当大的な超音波透過率変動が観察された。

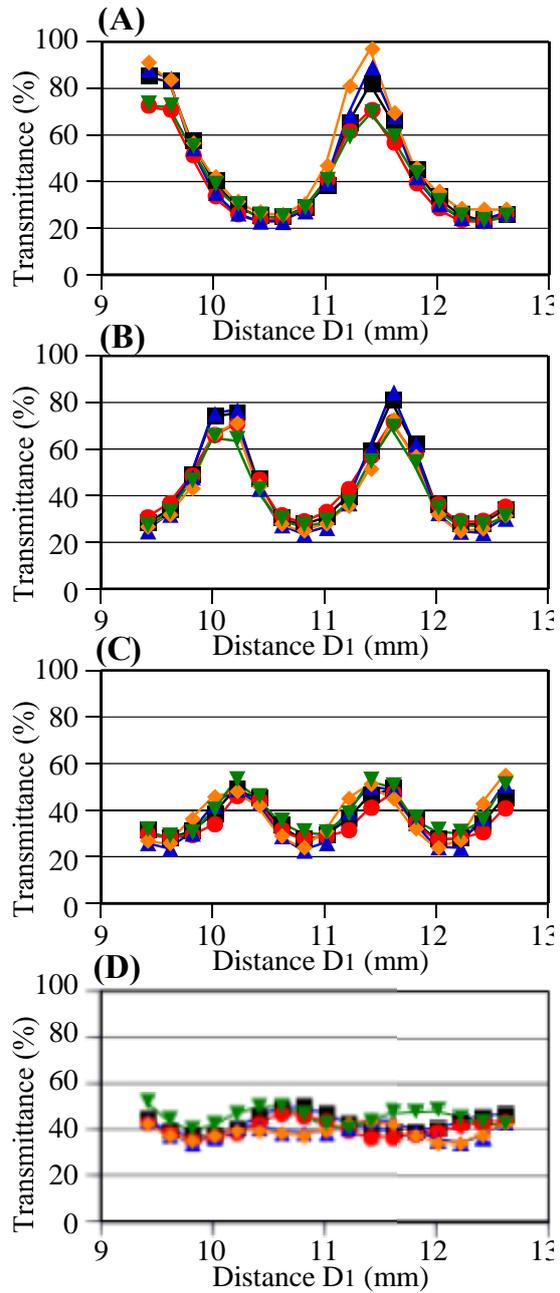


図9 皮膚厚による超音波透過率の変動 (変動の大きな測定点)

(A)400kHz 正弦波、(B)500kHz 正弦波、(C)600kHz 正弦波、(D)500±100kHz の周波数変調波(PSRF) プロットの色は図8に準ずる

400kHz では最大で3.8倍もの強度差があった。また、一つのポイント(P1)の周辺の4つの測定点(P2~P5)では似た変動を示した。正弦波の(A)~(C)では超音波透過率の極大や極小を示す皮膚相当距離はと、極大の超音波透過率に差があるものの、大きな変動を示すことにおいてはどの点も同じであった。

一方、変動が小さかった測定点の結果の図10では、図9の場合に比べて全体的に超音波透過率は低めであり、変動も小さい。また、周波数の比較では、600kHzが最も超音波透過率変動が大きい点が異なっている。

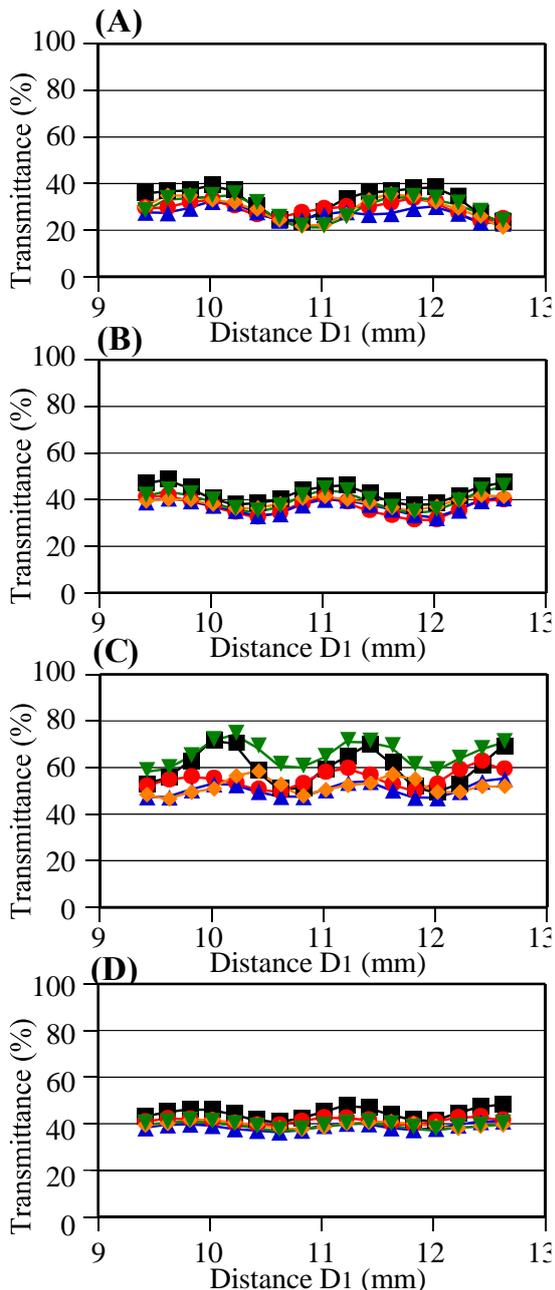


図10 皮膚厚による超音波透過率の変動  
(変動の小さな測定点)

(A)400kHz 正弦波、(B)500kHz 正弦波、(C)600kHz 正弦波、(D)500±100kHz の周波数変調波(PSRF)  
プロットの色は図8に準ずる

しかし図9の場合と共通するのは400kHz, 500kHz, 600kHz の正弦波に比べてPSRF 変調波が最も超音波透過率変動が小さいことである。

図11には1つの測定点における透過率を比較した。ある皮膚厚に注目すると、透過率および変動の状態(極大化、極小点か)は周波数によって異なっている。変調超音波ではどの周波数よりも変動の幅が小さくなっている。また、診断用に使う2MHz超音波では周期的変動はなるものの、その変動幅は小さいものであった。

65の測定ポイントの変動を平均したのが表1である。(3つ頭蓋骨 x 両側 x 3測定点 x 5 = 90 であるが、同一の測定点に収束したり、端から出てしまったりで測定点を設定できたのは13点となった。一つの測定点当たり5点測定をしたので総計は65ポイントでの測定となる)

表1 頭蓋骨の変動率

超音波	透過率 (平均±SD)	変動倍率 (平均±SD)
400kHz 正弦波	32.2±16.5%	1.75±0.77
500kHz 正弦波	27.7±14.8%	1.58±0.50
600kHz 正弦波	27.3±18.2%	1.43±0.27
400-600 kHz PSRF変調	30.6±14.6%	1.19±0.12

表1では、PSRF 変調とすることにより超音波透過率の比(最大値と最小値の比)が正弦波のどの周波数の場合よりも小さくなっていた。500±100 kHz のPSRFの中心周波数である500kHzの正弦波と対応するt-検定で比べると  $p < 0.05$  と有意に最大と最小超音波強度比が減少した。

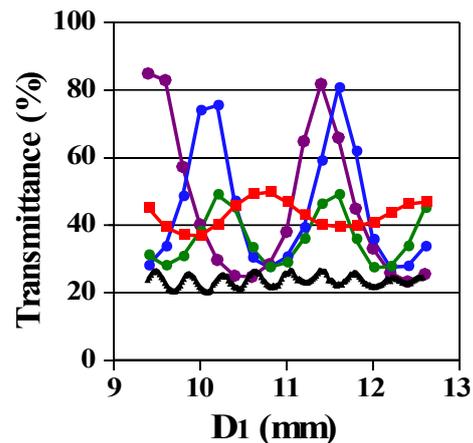


図11 一つの測定点における透過率比較

●: 400kHz, ●: 500kHz, ●: 600kHz  
■: PSRF変調, ●: 2 MHz

以上より、複雑な形状の骨においても超音波透過率の変動が観察された。特に重要なのは、平均値ではなく、偶然に大きな変動のポイントで超音波照射が行われた場合である。そのポイントでは透過率が低くて治療効果が発揮できない、逆に透過率が高すぎて生体には危険な照射となる両方のケースが懸念される。また、その変動は周波数変調超音波を用いれば、小さくすることができた。このことは、PSRF 超音波変調を用いることで透過率変動を小さくし、安全で効果的な超音波治療を可能とすることを意味する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Zuojun Wang, Yoshikazu Sawaguchi, Hideo Hirose, Kazumasa Ohara, Shinichiro Sakamoto, Hidetaka Mitsumura, Takeki Ogawa, Yasuyuki Iguchi, Masayuki Yokoyama, An In Vitro Assay for Sonothrombolysis Based on The Spectrophotometric Measurement of Clot Thickness. the Journal of Ultrasound in Medicine, 36(4):681-698 (2017)

(2) Zuojun Wang, Teppei Komatsu, Hidetaka Mitsumura, Norio Nakata, Takeki Ogawa, Yasuyuki Iguchi, Masayuki Yokoyama, An Uncovered Risk Factor of Sonothrombolysis: Substantial Fluctuation of Ultrasound Transmittance through the Human Skull. Ultrasonics, 77:168-175 (2017)

〔学会発表〕(計3件)

①横山昌幸、斉藤理、王作軍、小川武希、小松鉄平、三村秀毅、井口保之、薬物超音波併用次世代型低侵襲治療装置の開発から得た新たな知見、第34回日本脳神経超音波学会総会、京都、2015年6月5日～6日

②横山昌幸、王作軍、白石貢一 DDSを用いた脳梗塞診断、第31回日本DDS学会学術集会、東京、2015年7月2日～3日

③横山昌幸、斉藤理、王作軍、小松鉄平、三村秀毅、井口保之、小川武希、中田典夫、50kHz周辺中周波数超音波のヒト頭蓋骨に置ける透過率変動とその抑制法、第14回日本超音波治療研究会、高知、2015年11月27日～28日

〔図書〕(計1件)

横山昌幸、王作軍、中田典生、三村秀毅、井口保之、経頭蓋超音波透過率の平準化:安全で有効な超音波血栓溶解促進療法を目指して、超音波 techno 28(3), 24-27 (2016)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 昌幸 (YOKOYAMA, Masayuki)  
東京慈恵会医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20220577

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

白石 貢一 (SHIRAISHI, Koichi)  
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40426284

近藤 隆 (KONDO, Takashi)  
富山大学・大学院医学薬学部・教授  
研究者番号: 40143937

青木 学 (AOKI, Manabu)  
東京慈恵会医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 90246364

杉田 洋一 (SUGITA, Yoichi)  
東京慈恵会医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号: 40130174

(4) 研究協力者 なし