

博士論文

新規低侵襲がん治療用の  
音響キャビテーションの効率的生成に関する研究

川畑 健一

# 目次

第1章	緒論	1
1.1	本研究の概要と既往の研究	1
1.1.1	超音波の生体作用	1
1.1.2	非熱的作用（キャビテーション作用）	3
1.1.3	音響化学治療	8
1.1.4	ターゲティングを必要としない超音波治療	12
1.2	本研究の目的と論文の構成	13
1.2.1	本研究の目的	13
1.2.2	論文の構成	15
第2章	気泡振動に関する理論的検討	17
2.1	気泡の運動方程式	17
2.1.1	キャビテーションプロセスにおける気泡運動の重要性	17
2.1.2	気泡運動方程式 (Rayleigh-Plesset equation)	17
2.2	キャビテーションにおける気泡の成長（整流拡散）	19
2.3	キャビテーションにおける気泡の共振	26
第3章	キャビテーション生成を効率的に行う超音波照射方法	31
3.1	第二高調波重畳法(SHS)の提案および理論的考察	31
3.1.1	SHS の提案	31
3.1.2	SHS の理論的検討	31
3.2	キャビテーション化学作用を生じる実験系に関する検討	37
3.2.1	現状の実験系について	37
3.2.2	新規超音波照射手法の提案	38
3.2.3	実験方法	44
3.2.4	結果	47
3.2.5	考察	50
3.3	第二高調波重畳法(SHS)によるキャビテーション化学作用の促進	53
3.3.1	実験方法	53
3.3.2	結果	57
3.3.3	考察	61
3.4	第二高調波重畳法(SHS)の機序解明	62
3.4.1	はじめに	62
3.4.2	実験方法	64
3.4.3	結果	67

3.4.4	考察	79
3.5	高調波重畳法の相対位相差非依存化	83
3.5.1	はじめに	83
3.5.2	実験方法	84
3.5.3	結果	87
3.5.4	考察	91
第4章	キャビテーション閾値を低下させる化学物質	93
4.1	界面活性剤を用いるアプローチ	93
4.1.1	界面活性剤による整流拡散の促進	93
4.1.2	界面活性剤のキャビテーションおよび化学作用への影響	93
4.2	気泡安定化剤を用いるアプローチ	98
第5章	提案手法による生体中でのキャビテーション生成	112
5.1	はじめに	112
5.2	実験方法	112
5.2.1	試薬類	112
5.2.2	超音波トランスデューサ	112
5.2.3	マウス肝臓の操作	112
5.2.4	照射方法	113
5.2.5	照射対象からの音響信号の測定	116
5.2.6	組織内ローズベンガル濃度の測定	117
5.3	結果	118
5.3.1	マウス肝臓内および水中におけるキサントゲン系色素の効果	118
5.3.2	体内でのキャビテーション閾値低下効果の投与 dose 依存性	118
5.3.3	キャビテーション閾値低下効果の色素投与後時間依存性	118
5.4	考察	118
5.5	まとめ	120
第6章	結論	121
参考文献		122
謝辞		130
成果発表、受賞、特許		132

## List of Figures

Fig.1. 1 超音波照射により生成する生体作用 .....	1
Fig.1. 2 音響キャビテーションの強度閾値の周波数依存性.....	4
Fig.1. 3 音響キャビテーションによる機械的作用の一例 .....	5
Fig.1. 4 音響キャビテーションにより化学作用が生成する機序の説明.....	7
Fig.1. 5 音響化学反応と他の反応との比較.....	7
Fig.1. 6 音響発光(SL)の発生と音圧との関係 .....	8
Fig.1. 7 担癌マウスを用いた音響化学治療の効果検証 (薬剤：色素増感剤) .....	10
Fig.1. 8 Sonodynamic effect が発現する機序 .....	10
Fig.1. 9 音響化学治療(SDT)の概念 .....	11
Fig.1. 10 典型的な音響化学治療の実験のセットアップ (定在波の使用) .....	11
Fig.1. 11 Liquid biopsy の概要 .....	13
Fig.1. 12 一般的超音波治療と本研究の最終目標とする治療方式 .....	14
Fig.1. 13 本論文の構成.....	16
Fig. 2. 1 キャビテーションのプロセス .....	18
Fig. 2. 2 気泡運動の理論式.....	18
Fig. 2. 3 気泡の非線形振動の例 .....	20
Fig. 2. 4 気泡振動の実測と理論値とを比較した例 .....	21
Fig. 2. 5 整流拡散を考える上で想定している状況 .....	22
Fig. 2. 6 圧力変動による気体分子の拡散の変化 .....	23
Fig. 2. 7 圧力変動による気泡径変化を考慮した気体分子の拡散の変化.....	23
Fig. 2. 8 整流拡散を求めるのに必要な式 .....	24
Fig. 2. 9 整流拡散の理論と実測との関係の例 .....	24
Fig. 2. 10 整流拡散による気泡径増大の例 .....	25
Fig. 2. 11 気泡サイズの違いによる同一音響条件での振動の違いを示す例 .....	25
Fig. 2. 12 気泡サイズの違いによる同一音響条件での気泡振動における周波数成分の違い.....	26
Fig. 2. 13 気泡振動による各周波成分の信号強度の音響強度に対する依存性.....	29
Fig. 2. 14 大振幅超音波を用いた際の気泡振動の例 .....	30
Fig. 3.1. 1 気泡振動における高調波の生成 .....	33
Fig. 3.1. 2 第二高調波重畳(SHS)の実現例 .....	34
Fig. 3.1. 3 SHS の効果の理論検討で用いられた波形一覧 .....	35
Fig. 3.1. 4 SHS と単独周波照射での整流拡散の違い.....	35
Fig. 3.1. 5 SHS の波形の違いによる整流拡散の効果の変化.....	36

Fig. 3.2. 1 定在波でキャビテーションが生じる機序 .....	39
Fig. 3.2. 2 キャビテーションの作用が生じるまでのプロセス .....	40
Fig. 3.2. 3 キャビテーションの作用が生じるまでのプロセスの定在波による促進....	40
Fig. 3.2. 4 定在波条件で化学作用を生じるために必要なセットアップ .....	41
Fig. 3.2. 5 容器を回転する場合の超音波の on/off による化学反応の促進.....	42
Fig. 3.2. 6 アレイ型超音波照射装置の例.....	42
Fig. 3.2. 7 spiral 音場.....	43
Fig. 3.2. 8 spiral 音場により得られる焦点面音響強度分布 .....	43
Fig. 3.2. 9 実験に用いたアレイ型トランスデューサ .....	45
Fig. 3.2. 10 実験に用いた超音波照射系 .....	45
Fig. 3.2. 11 超音波化学作用の評価系 .....	46
Fig. 3.2. 12 実験手順.....	47
Fig. 3.2. 13 超音波照射時間と化学反応収量との関係 .....	48
Fig. 3.2. 14 spiral 音場の周期的切替が化学反応速度に及ぼす効果(1) .....	48
Fig. 3.2. 15 spiral 音場の周期的切替が化学反応速度に及ぼす効果(2) .....	49
Fig. 3.2. 16 spiral 音場の周期的切替が化学反応速度に及ぼす効果(3) .....	49
Fig. 3.2. 17 spiral 音場の周期的切替が化学反応速度に及ぼす効果(4) .....	50
Fig. 3.2. 18 spiral 音場の切替時の超音波波形の変化 .....	52
Fig. 3.3. 1 アレイ型トランスデューサを用いた高調波重畳 .....	54
Fig. 3.3. 2 トランスデューサおよび超音波照射系.....	55
Fig. 3.3. 3 焦点における基本波および高調波の強度分布.....	56
Fig. 3.3. 4 酸化反応速度の基本波と高調波の強度変化に対する依存性 .....	57
Fig. 3.3. 5 酸化反応速度の高調波と基本波との比率に対する依存性.....	59
Fig. 3.3. 6 高調波重畳による反応閾値の低下.....	59
Fig. 3.3. 7 高調波重畳と spiral 音場との比較.....	60
Fig. 3.3. 8 反応速度の音場の周期的切り替えに対する依存性.....	60
Fig. 3.4. 1 高調波重畳の機序解明用の実験系の構築.....	62
Fig. 3.4. 2 超音波照射系.....	63
Fig. 3.4. 3 照射実験手順.....	64
Fig. 3.4. 4 平面波超音波トランスデューサによる音響強度分布 .....	65
Fig. 3.4. 5 入力電圧の相対位相差と出力超音波の相対位相差の関係 .....	66
Fig. 3.4. 6 反応容器中心位置からの距離と相対位相差との関係 .....	68
Fig. 3.4. 7 反応容器による超音波透過度の違い .....	69

Fig. 3.4. 8	キャビテーション生成および化学作用の計測	70
Fig. 3.4. 9	キャビテーション生成時の音響信号	71
Fig. 3.4. 10	実験に用いた相対位相差一覧	72
Fig. 3.4. 11	ヨウ素酸化反応収率の照射時間依存性	73
Fig. 3.4. 12	高調波重畳による酸化反応速度および分調波強度の基本波割合への依存性	74
Fig. 3.4. 13	高調波重畳による酸化反応速度および分調波強度の超音波強度依存性	75
Fig. 3.4. 14	高調波重畳における酸化反応速度および分調波強度の相対位相差依存性	76
Fig. 3.4. 15	高調波重畳法に用いる超音波波形	77
Fig. 3.4. 16	高調波重畳における酸化反応速度および分調波強度の活性酸素消去剤添加効果	77
Fig. 3.4. 17	高調波重畳による酸化反応速度および分調波強度のパルス照射切り替え周期依存性	78
Fig. 3.4. 18	高調波重畳による整流拡散の相対位相差依存性	80
Fig. 3.4. 19	気泡径の違いによる整流拡散の違い	80
Fig. 3.4. 20	高調波重畳法の機序に関する考察	81
Fig. 3.5. 1	体内の複雑さを示す図	83
Fig. 3.5. 2	高調波重畳法を位相差非依存にするためのアプローチ	84
Fig. 3.5. 3	本検討における位相差のシフト	85
Fig. 3.5. 4	実験系	86
Fig. 3.5. 5	実験手順	87
Fig. 3.5. 6	位相差シフトを行わない場合の高調波重畳による分調波強度	88
Fig. 3.5. 7	位相差シフトを用いる高調波重畳による分調波強度(シフト周期依存性 shift pitch = 1, 1/2 $\pi$ )	88
Fig. 3.5. 8	位相差シフトを用いる高調波重畳による分調波強度(シフト周期依存性 shift pitch = 1/8, 1/16, 1/32 $\pi$ )	89
Fig. 3.5. 9	位相差シフトを用いる高調波重畳による分調波強度(シフト間隔依存性)	90
Fig. 3.5. 10	位相差シフトにおける分調波強度のシフト方向の影響(シフト周期依存性)	91
Fig. 3.5. 11	位相差シフトを行わない場合の高調波重畳で超音波 on/off を行った場合の分調波強度(シフト間隔依存性)	91
Fig. 4. 1	界面活性剤による整流拡散の促進	94
Fig. 4. 2	界面活性剤のキャビテーション促進効果を調べる実験系	94
Fig. 4. 3	界面活性剤添加がキャビテーションに及ぼす影響	95

Fig. 4. 4	界面活性剤による共振気泡の振動の変化	96
Fig. 4. 5	界面活性剤による気泡振動時の周波数成分の変化	96
Fig. 4. 6	界面活性剤がキャビテーションに及ぼすと思われる効果	97
Fig. 4. 7	気泡安定化剤の概念	97
Fig. 4. 8	気泡安定化剤がキャビテーションに及ぼすと考えられる効果	99
Fig. 4. 9	生体に使用可能な色素増感剤およびその用途	99
Fig. 4. 10	気泡安定化剤としての特性の評価	100
Fig. 4. 11	キサンテン系色素(RB)の気泡安定化効果	101
Fig. 4. 12	キサンテン系増感剤のキャビテーション生成能の測定系	103
Fig. 4. 13	キャビテーション生成能の測定手順	104
Fig. 4. 14	ローズベンガルによる超音波照射時の分調波生成およびキャビテーション 閾値低下	104
Fig. 4. 15	実験に用いたキサンテン系増感剤の構造	105
Fig. 4. 16	キサンテン系増感剤による表面張力および粘度の低下	106
Fig. 4. 17	キサンテン系増感剤による泡沫保持	106
Fig. 4. 18	分調波生成の増感剤濃度依存性	107
Fig. 4. 19	ヨウ素酸化反応の増感剤濃度依存性	108
Fig. 4. 20	分調波強度の超音波強度依存性	109
Fig. 4. 21	ヨウ素酸化反応の超音波強度依存性	110
Fig. 4. 22	キサンテン系増感剤によるキャビテーション閾値の低下	111
Fig. 5. 1	マウス肝臓における高調波重畳の効果	113
Fig. 5. 2	マウス肝臓における高調波重畳の効果(相対位相差依存性)	114
Fig. 5. 3	マウス肝臓への超音波照射用セッティング	114
Fig. 5. 4	マウス肝臓へ超音波を照射した際の組織変化および音響信号	115
Fig. 5. 5	マウス肝臓で生じるキャビテーションの強度閾値のローズベンガル濃度依存 性	116
Fig. 5. 6	マウス肝臓で生じるキャビテーションの強度閾値のローズベンガル投与後時 間依存性	116
Fig. 5. 7	マウス肝臓で生じるキャビテーション閾値のキサンテン系色素による低下効 果	117

## 第1章 緒論

本研究では、超音波を用いた新規がん低侵襲治療の実現に向けた要素技術の開発を行った。最終的な目標は、画像診断装置などによる腫瘍部位の精密なターゲティングを必要とせず、かつ正常組織にはダメージを与えることなく腫瘍組織のみを治療することが可能ながん治療法の開発である。現在、超音波を用いたこのような治療法は実現できていない。本研究においては、まず、音響キャビテーションおよびその化学作用を従来よりも低強度の超音波で生成するための超音波照射方法ならびに化学物質に関する基礎検討を行った。さらに、得られた結果を元に、新規な超音波照射方法と化学物質との組み合わせによる生体効果の検証を行った。この検証は、マウス肝臓内でのキャビテーション閾値低下を指標とした。

### 1.1 本研究の概要と既往の研究

#### 1.1.1 超音波の生体作用

本研究は、超音波を用いたがん治療に関するものである。超音波を生体に照射した際に生じる作用に関して Fig. 1.1 にまとめた。本研究では、主に非熱的作用のキャビテーション作用の中の化学的作用に着目している。化学的作用と他の作用との比較も重要であると考えられるため、各作用に関して以下順に説明する。

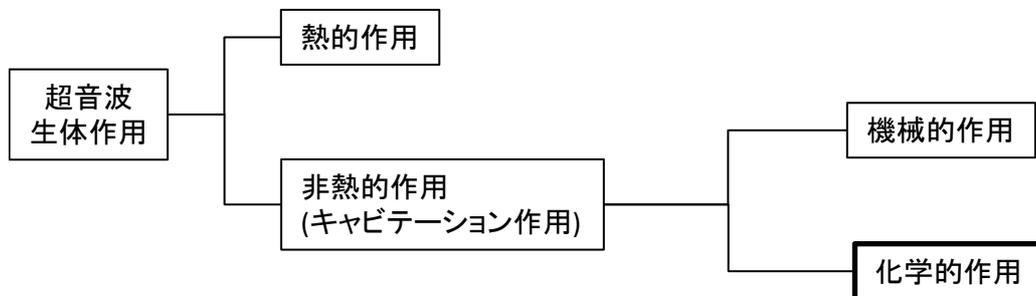


Fig.1.1 超音波照射により生成する生体作用

#### (1) 熱的作用

超音波が生体に照射されると、体内を通過した距離に依存して音響強度が減衰する[1]。この減衰は主に散乱減衰と吸収減衰により生じている。散乱は、超音波が当初の進行方向から向きが変化するものであり、散乱前後で音響エネルギーは変化しない。これに対し、吸収は生体組織との相互作用で音響エネルギーが熱エネルギーに変化するものである。つまり、生体により超音波が吸収されると熱作用が生じる。このような音響エネルギーの吸収減衰は、生体に限らず媒体を通過する際に広く見られる現象であり、一般に、

$$p = p_0^{-ax} \quad (1.1)$$

の形で表現される。ここで、 $p_0$ は初期音圧、 $p$ は距離 $x$ 通過後の音圧、 $a$ が媒質に固有の定数である。このように、吸収減衰は距離に対して指数的に生じる。なお、医療分野で用いられる MHz 周波数帯域においては、吸収減衰率は周波数にほぼ比例することが知られている。このため、式(1.1)中の $a$ の対数値を使い、dB/(MHz・cm)という単位を用いて超音波の吸収減衰特性を表すことが多い。特に軟部組織に対しては、0.6 dB/(MHz・cm)近辺の値が広く用いられている。

超音波は、体外に置かれた複数の音源から体内の特定部位に向かって照射を行うことで、波の重ね合わせの原理を用いてその部位にエネルギーを収束させることができる。このため、前記のような超音波の熱的作用を対象（患部）のみで生成することが可能である。このような、目的の部位のみを加温する治療法として、1990年代まで主流であったハイパーサーミア[2-4]およびそれ以降に主流になった加熱凝固治療[5-9]がある。両者とも、主にがんの治療に用いられている。以下、両者について説明する。

### ハイパーサーミア

ハイパーサーミアは、がん細胞が正常細胞に比べて耐熱性が低いことを利用している。43℃程度の、正常細胞ならば耐えられるががん細胞は死滅してしまう温度に患部を設定することでがんを治療するものである。通常、治療は対象組織を43℃程度に数10分間暴露することで行われる。患部の局所的な加温に超音波を使用する超音波ハイパーサーミアが複数のメーカーにより実用化されている。がん治療の中では患者への身体的負担の軽い治療法であると共に、加温による免疫系の活性化が期待されることもあり、一部の医療機関で臨床的に用いられている。ただし、保険適用は放射線治療との併用時のみ認められているという状況である。ハイパーサーミア単独での抗腫瘍効果は一般に顕著ではない（治療効果に関する患者依存性が極めて高い）。このため、治療が完了したかどうかのモニタリングは容易でない。温度監視はMRI等により可能ではあるが、治療直後に組織変化が見られるわけではなく超音波照射が十分行われたかどうかはわからないからである。

なお、ここで述べた患部温度を局所的に上昇させる手法は、局所ハイパーサーミアと呼ばれることもある。これは、全身の温度を上昇させるハイパーサーミアが存在するためである。この全身ハイパーサーミアでは生体安全性がより問題となるため、一般に体温上昇を41℃以下に設定することが多い。このような41℃程度への加温には10W/cm<sup>2</sup>オーダーの音響強度が必要となる。ただし、超音波による全身の均一的な加熱は困難であり、超音波を用いた全身ハイパーサーミアの実施は技術的に困難である。

### 加熱凝固治療

前述のように、ハイパーサーミアの研究開発は主に1980-90年代に広く行われ、その後研究開発の主体は加熱凝固治療に移行していった。ハイパーサーミアが43℃程度（全身ハイパーサーミアでは41℃程度）の比較的マイルドな温度での治療なのに対し、加熱凝固治療では、30秒程度以下の短い時間で55~60℃以上のタンパク凝固温度に治療対象を加温し

て治療効果を得ることを特徴とする。短時間での治療は、温度分布をシャープにし、収束超音波の焦点のみで治療効果を得ることを可能にする。このため、ハイパーサーミアに比べて、熱作用の及ぶ範囲が治療前に予測可能という利点を有する。ただし、タンパク凝固温度は腫瘍組織と正常組織とでほとんど違いがないため、どの部位を治療するか計画を画像診断装置などを用いて事前に厳密に設定する必要がある。この計画が正確でないと正常組織へのダメージが懸念されるからである。ただし、熱作用のおよぶ範囲が予測可能であることから、患部のターゲティングを精密に行うことができれば、確実に治療効果を得ることが可能である。現在、加熱凝固治療のがん治療への適用は、乳房、前立腺、肝臓、膵臓などにおいて臨床的に行われている。また、良性疾患としては、子宮筋腫、前立腺肥大が薬事承認を得ている。

以上、超音波の熱的作用について述べた。マイルドな強度で長時間加熱するハイパーサーミアと高強度で短時間加熱する加熱凝固治療が存在する。前者はターゲティングについて後者ほど厳密である必要はないが、効果の確実性を担保する手法が存在しない。後者は、ターゲティングが有効に行われないと正常組織にダメージを与える恐れがあり、高度な画像診断技術が要求される。特に腹部領域など体動が問題となる領域では、いまだ実験的な治療に留まっている。

Fig. 1.1 に示すように、超音波の生体作用としては、ここで述べた熱的作用に加え、非熱的作用が知られている。その中でキャビテーション現象により生成する作用が特に治療応用に重要であると考えられており、本研究でもその活用を念頭に置いている。次節にて詳細を述べる。なお、次節に述べるキャビテーションは、その生成時に本節で述べた熱的作用に影響を与えることが知られている[10, 11]が、このようなキャビテーションの熱的な作用はもっぱら本研究において取り扱う超音波強度よりも高い強度域にて顕著に見られるものであり、本論文では取り扱わないものとする。

### 1.1.2 非熱的作用（キャビテーション作用）

超音波の非熱的作用はもっぱらキャビテーション[12-16]による作用である。キャビテーションは、キャビティすなわち空洞を生じる現象であり、液体中での急速な圧力変動により生じる。音波により生じるキャビテーションが音響キャビテーションであるが、ここでは超音波に限定して話を進める。以下音響キャビテーションの特徴について述べる。なお、キャビテーションの源である気泡の非線形振動については、次章にて詳細に検討を行う。

超音波は粗密波であり、正圧と負圧とが交互に媒質を伝わる。負圧は媒質分子同士の距離を大きくし、正圧は逆に小さくする。したがって一定以上の振幅をもつ負圧が媒質に伝わると、媒質分子が存在しない領域が生成され、空洞化が生じる。空洞化が生じると、その領域の近傍にある凝結した状態の溶存ガスが空洞内に移動し、気泡が生成する。これがキャビテーションである。キャビテーションの効果は、このようにして生成した気泡が、

超音波正圧により破壊（圧壊）される際に生じるものである。超音波正圧による破壊は、気泡が超音波で共振する際に最も起こりやすいため、一般に気泡生成、気泡成長、共振、圧壊というプロセスを経ると考えられる。この音響キャビテーションは超音波強度に対して閾値を持つ現象であり、また、超音波周波数により閾値が変化する。Fig. 1.2 に示すように、キャビテーションの音響強度閾値は、周波数が高いほど高く [17]、医療に用いられる MHz 帯でキャビテーションを生じるには、 $1\text{kW/cm}^2$  程度あるいはそれを超える強度が必要になる。なお、キャビテーションの効果を十分に活用するには、閾値よりも高い強度を用いる必要があるため、 $1\text{kW/cm}^2$  よりもさらに高い音響強度が求められることになる。

キャビテーションによる作用は、この気泡の圧壊時に生成する作用のことである。気泡圧壊により生じる機械的な作用と、二次的に生成する化学的な作用とに分けられる。

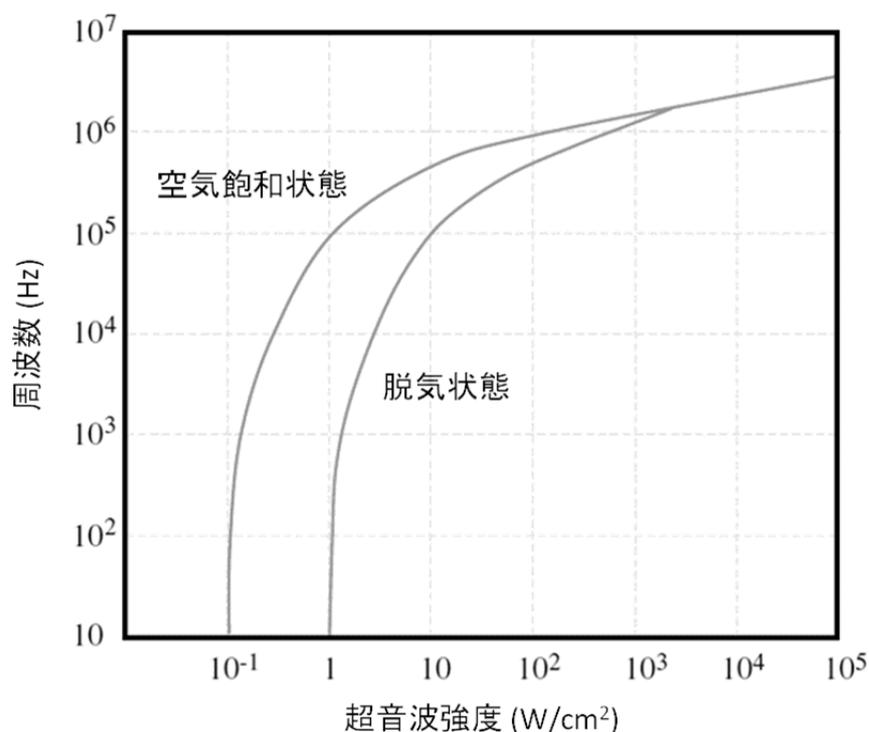
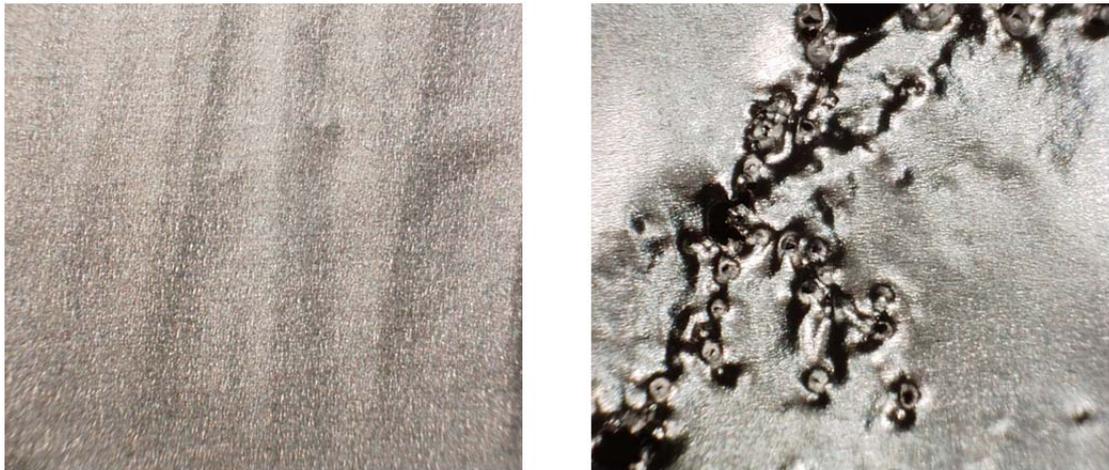


Fig.1. 2 音響キャビテーションの強度閾値の周波数依存性  
(Mason ら [17])

#### (1) 機械的な作用

キャビテーションの機械的な作用は、気泡圧壊により流体的な変動が生じて発生するものであり、音響流あるいは衝撃波などの形で生成することが知られている [17]。Fig. 1.3 は、アルミフォイルを超音波洗浄機に入れる前後の画像であり、気泡圧壊時の衝撃波によりアルミフォイルにクレーター状のダメージが多数生じていることがわかる。



(a) 照射前

(b) 照射後

1 mm

Fig.1. 3 音響キャビテーションによる機械的作用の一例  
(アルミ фольドへのダメージ)

従来、このようなキャビテーションの機械的な作用は、結石破砕などの一部の例を除くと、医療分野においては避けるべきものとして扱われてきた。その理由は、上で述べたようにキャビテーション生成には  $1\text{kW}/\text{cm}^2$  以上の高い強度が必要とされ、かつ、生成した際の効果の程度と範囲が予測困難であるからである[15, 18]。例えば、超音波診断装置において、安全性の観点から Thermal Index(TI)と Mechanical Index (MI)という二つの指標を満たした状態で超音波を照射する必要があるが、MI は生体中でキャビテーションを生じないためのものである[19]。また、先に述べた加熱凝固治療においては、治療中にキャビテーションが発生することがある。治療部位以外でキャビテーションが生成すると、部位選択的な治療の妨げになる恐れがある。このため、加熱凝固治療装置では、超音波診断などでのリアルタイム監視によってキャビテーション生成をモニタリングし、キャビテーション発生と同時に治療用超音波を停止するようなプロトコルを採用している装置も存在する[20]。

キャビテーションには機械的作用以外に化学的な作用が存在する[21-23]。これは、気泡の圧壊時に気泡内が高温高压状態になって、気泡近傍に特異的な反応場を形成することによる。本研究においては、この化学的な作用により腫瘍治療効果を得ることを目的としている。次節にてさらに詳細に説明する。

## (2)キャビテーションにより生成する化学的作用

音響キャビテーションにより化学的作用が生じることは、1929年に Schmitt らにより最初の報告がなされ[24]、以降研究が進んだ。特に 1980-90 年代に Henglein が中心となって

放射線化学との対比がなされつつ広く研究が進められ[21, 22]、音響化学(sonochemistry)という分野を形成するようになった。それと同時期に、Suslickらにより超音波照射によって化学作用が生成する機序の解明も進んでいる[25]。Figure 1.4はSuslickが提唱したホットスポット説の説明図である。ホットスポット説においては、超音波照射により気泡核が生成し、照射時間に従って気泡核が成長し、最終的に圧壊する。この圧壊の際に数1000度の温度と数100気圧のホットスポットが出現し、このホットスポットが特異的な反応場となって音響化学反応が生成するとしている。1980年代の論争を経て音響化学反応の機序としてコンセンサスを得ている。このホットスポットは、マイクロ秒以下で急速に消滅することが特徴である。他の反応との比較をFig. 1.5に示す。音響化学により生成する反応場は、他の反応に比べて短時間で高温高压を呈する場であることがわかる。さて、このように音響化学反応の生成には高温高压が必要となることから、キャビテーションプロセスで気泡が生成して圧壊するだけでは不十分である。特定の要件を満たされている必要がある。ひとつは、キャビテーション気泡中のガス分子が多原子分子でないことである。もうひとつは照射する超音波の強度が高すぎないことである。

まず、ガス分子の種類についてであるが、運動自由度が関与する。ここで言う自由度は比熱比すなわち定圧比熱と定積比熱との比として表現されるものである。一般に、多原子分子は単原子分子に比べてこの比熱比が低い。これは、単原子分子では運動の自由度が移動のみであるのに対し、多原子分子ではさらに結合の伸縮や回転が加わるためである。多原子分子では、加えられたエネルギーは分子内の原子同士の結合の伸縮や回転のエネルギーとして使われ、散逸してしまうことを意味している。このことから、多原子分子からなる気泡がキャビテーションの過程で圧壊する際には、単分子原子であれば温度上昇に使われるであろうエネルギーの一部が分子内の原子同士の結合の伸縮や回転に使われることになる。従って、多原子分子では単原子分子よりもキャビテーション気泡の温度上昇は低くなる。このことにより、多原子分子、例えば炭酸ガスや超音波造影剤として用いられるパーフルオロカーボンがキャビテーション気泡内に存在する場合には、キャビテーション気泡圧壊時の気泡内の温度上昇が抑えられ、キャビテーションが生じて化学反応場として機能しにくい[26]。このため、キャビテーションで化学作用を生成するには、多原子分子を含まないガス分子を用いてキャビテーションを生成する必要がある。

次に、照射する超音波の強度に関して説明する。Fig. 1.6は、音響化学反応が生成する際に見られる発光現象(ソノルミネッセンス(SL))での実験結果[27]であり、超音波強度(音圧)が高すぎると、安定して発光現象が生じないことを示すものである。横軸が超音波の圧力を、縦軸が系内に導入されたArの濃度をそれぞれ示してある。この検討では、Arは気泡核的に導入しており、音圧およびAr濃度を上昇させることはいずれも気泡生成を促進にする効果を有する。本図において、音圧あるいはAr濃度が低すぎるとSLが見られず、またいずれかが高すぎるとSLが不安定になることが示されている。適切な範囲の音圧あるいは気泡核の数の存在が、安定したSL生成に必要とされることがわかる。音圧が低い時に

はキャビテーションそのものが生成せず効果が見られないことは想像に難くない。逆に音圧が高すぎる時には、キャビテーションのプロセス中の圧壊の段階において対称性良く気泡が潰れることができなくなり、高温のホットスポットが生成されなくなると考えられる。Figure 1.6 は音響発光に関する結果であるが、音響発光と音響化学反応とはほぼ同様の機序により生成する。したがって、音響化学反応においても同様の結果が予想され、音響化学反応を生成可能なキャビテーションを生じるには適切な強度域の音響強度が必要とされると考えられる。

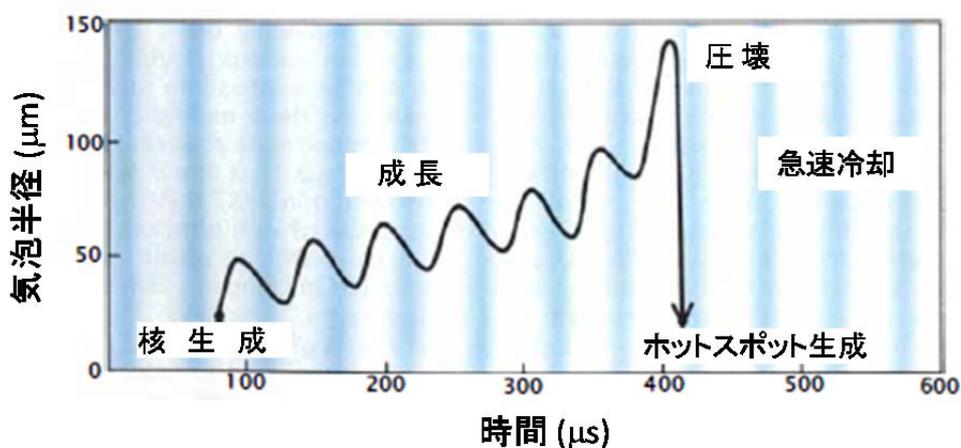


Fig.1. 4 音響キャビテーションにより化学作用が生成する機序の説明  
(ホットスポット説 Suslick[25])

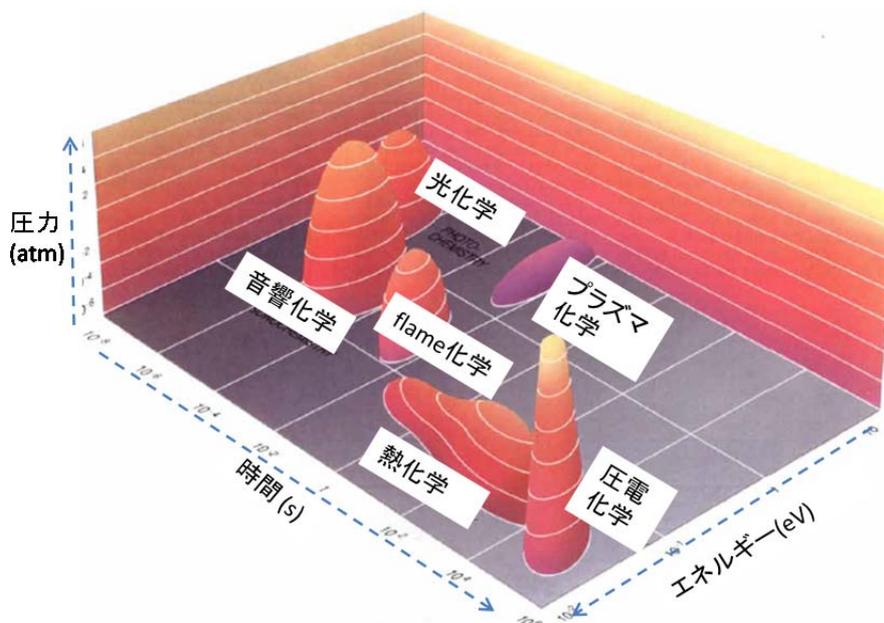


Fig.1. 5 音響化学反応と他の反応との比較  
(Suslick[25])

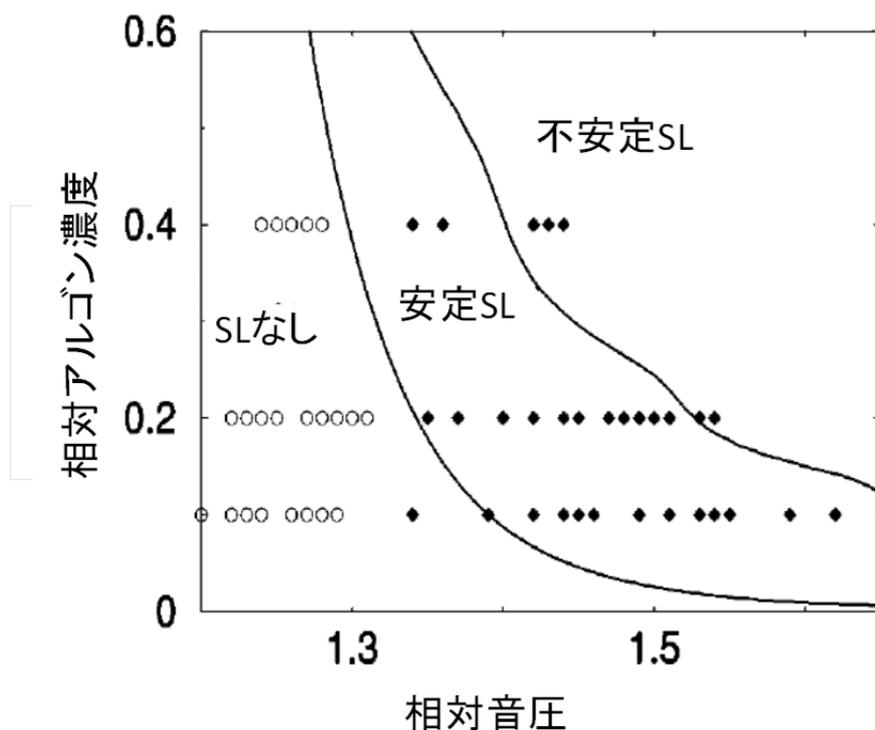


Fig.1. 6 音響発光(SL)の発生と音圧との関係  
(Brenner ら[27])

### 1.1.3 音響化学治療

前述の音響化学反応すなわちキャビテーションによる化学的作用は、有機合成[28]あるいは高分子分解[29, 30]などを中心に研究が進んできたものである。この音響化学反応をがん治療に応用しようという試みが、1985年頃から(株)日立製作所と東邦大学との共同研究で始まった。当初、抗がん剤投与と弱強度の連続波超音波との組み合わせに関する検討が行われた。がん担持ラットを用いた実験で、アントラサイクリン系抗がん剤であるアドリアマイシン投与と超音波照射とを組み合わせると、各処置単独群よりも著明な抗腫瘍効果が得られることがわかった[31]。ただ、この実験では、用いられた薬物が抗がん剤であることから、薬剤単体でも抗腫瘍効果が得られており、超音波と薬剤の効果が足し合わさっているのか、相乗的な作用が働いているのかが不明であった。このため、続く検討では、薬剤を抗がん剤から単体では生体作用のほとんどないポルフィリン系色素増感剤に変更して行われた。本系における検討により、がんの音響化学治療(Sonodynamic therapy (SDT))の概念が確立した[32]。Figure 1.7 に、がん担持マウスを用いた実験結果の一例を示す。薬剤単独ではまったく腫瘍増殖抑制効果が得られていないのに対し、超音波+薬剤群では超音波単独に比べて有意に抑制効果が得られている。超音波照射により薬剤が「活性化」して薬剤単独では生じない抗腫瘍効果を生じたと考えられる。音響化学治療の研究においては、

このようにまず *in vivo* にて効果の検証が先行して行われた。続いて、治療効果の機序に関する知見を得るための *in vitro* での検証が行われた[33, 34]。薬剤がどのような「活性化」を受けているのかに関する知見を得るためである。用いている薬剤が色素増感剤であり、色素増感剤と光照射とを組み合わせた光線力学療法(Photodynamic Therapy (PDT))が検討のベースとなっている。*In vitro* での検討にて、PDTにおける検討結果と同じく、SDTにおいても一重項酸素やスーパーオキシドといった抗腫瘍効果を持つ活性酸素を消去する薬剤(ラジカル消去剤)を添加することで超音波+薬剤の相乗効果が見られなくなることがわかった。このような結果を受けて、Fig. 1.8 に示すような **Sonodynamic Effect** の機序が考えられた。また、この **Sonodynamic Effect** を用いた低侵襲がん治療である SDT の概念が提唱された (Figure 1.9 参照)。SDT においては、まず腫瘍集積性の音響化学物質を投与し、続いて音響化学物質が十分に集積するタイミングで超音波照射を行い腫瘍部位の音響化学物質を活性化し、活性酸素を生成することで治療効果を得る。前節にて説明した加熱凝固治療のような熱的作用を用いる治療に比べた SDT の特長は、薬剤の腫瘍選択性と超音波の収束性を用いる、いわゆるダブルターゲティング[35]を行えることにある。薬剤と超音波の両者が合わさった部位のみで治療効果が得られると期待される。

このような、熱的作用に比べて腫瘍への選択性に優れると考えられる SDT であるが、従来、生体効果に関する検討はもっぱら定在波を用いた実験系にて行われている (Figure 1.10 参照)。キャビテーションの生体作用に関する研究の中で、定在波条件で超音波照射を行うことにより非定在波(≒進行波)条件での超音波照射に比べて作用発現に必要な超音波強度が著しく低下することがわかっている。このため、定在波を用いる系は基礎検討としては非常に有益であり、広く用いられている。ただし、定在波を用いた治療は、体内で任意の部位に定在波を生成することは困難であることから実用化は難しいと考えられる。このため、治療部位に限定の少ない SDT を実現するには非定在波条件で超音波照射を行うことが必要である。しかしながら、非定在波条件で SDT を行うには非常に問題となる事象が存在する。それは、生体組織中で安定したキャビテーション生成を行うには、加熱凝固作用が見られる程度以上の超音波強度が必要ということである。このため、SDT の実用化には、キャビテーションを生体中で低い音響強度で生成する手法が必須となる。

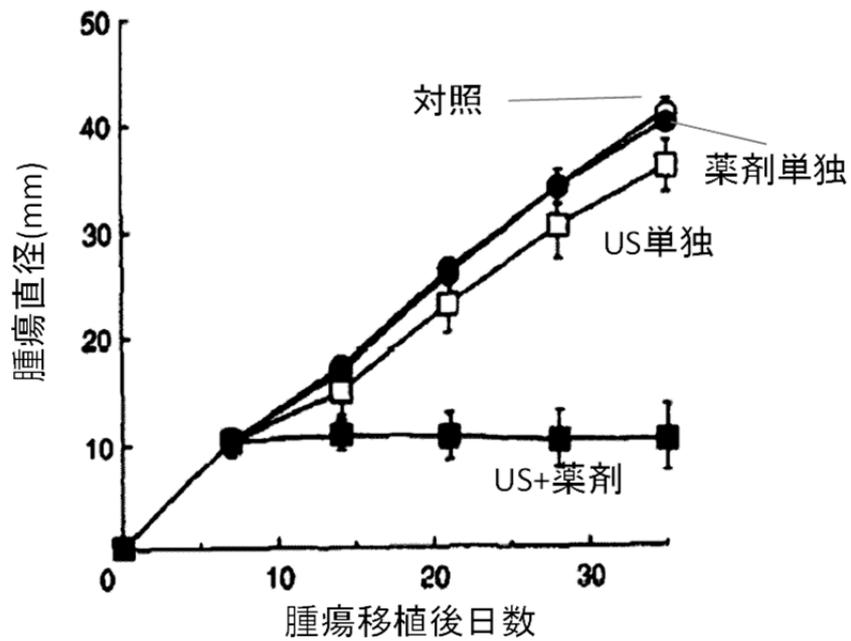


Fig.1. 7 担癌マウスを用いた音響化学治療の効果検証 (薬剤：色素増感剤)  
(Umemura ら [32])

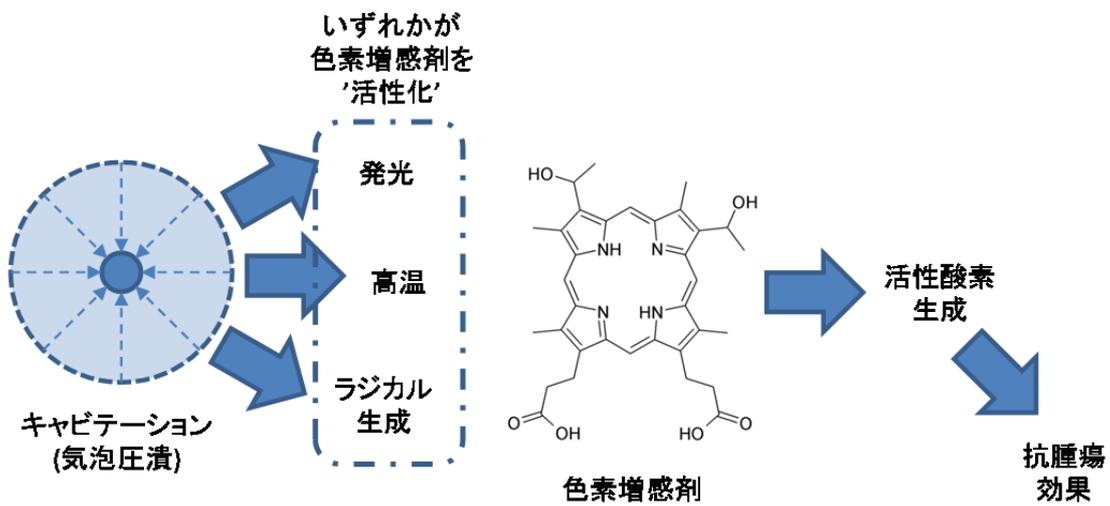


Fig.1. 8 Sonodynamic effect が発現する機序

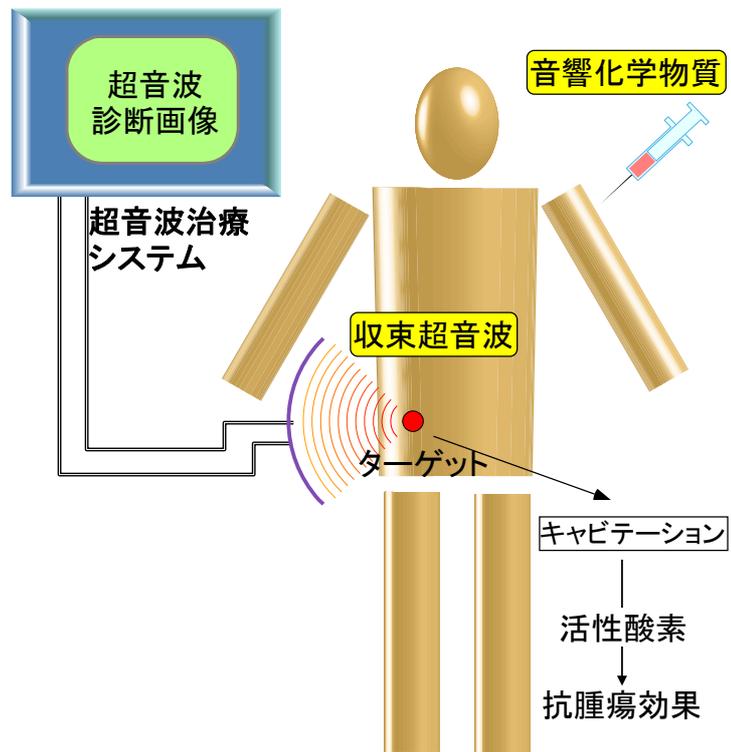


Fig.1. 9 音響化学治療(SDT)の概念

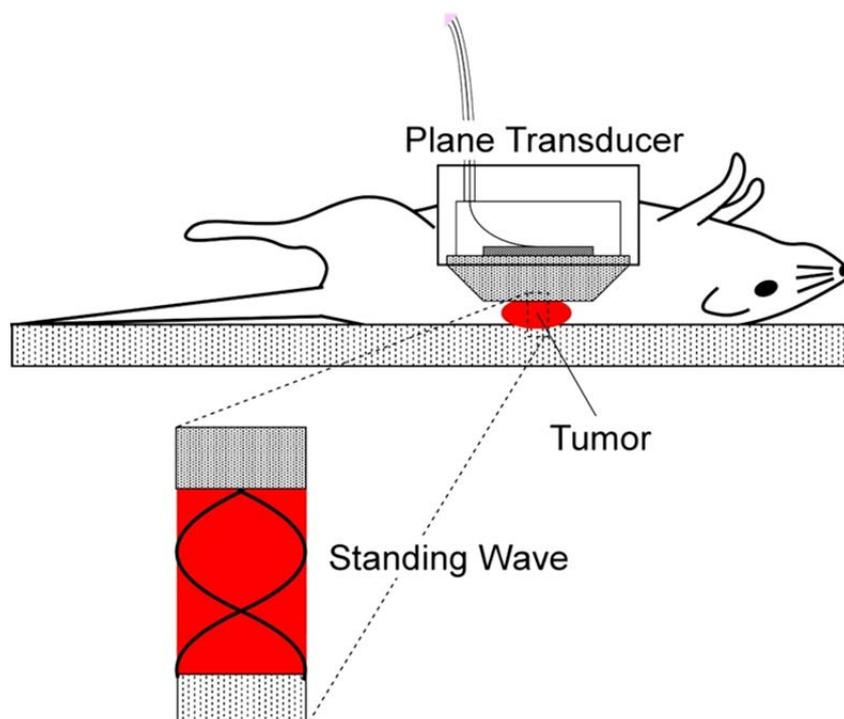


Fig.1. 10 典型的な音響化学治療の実験のセットアップ (定在波の使用)

#### 1.1.4 ターゲティングを必要としない超音波治療

前節にて述べたように、非定在波条件でありながら音響キャビテーションを低下させる手法は SDT の実現上極めて重要である。このような手法を用いて低い音響強度で SDT の治療効果を得ることができれば、従来治療が困難であった、画像診断装置などで輪郭が不明瞭な腫瘍の低侵襲治療が可能になると考えられる。以下その重要性について述べる。

腫瘍の診断は血液検査など体液を体外で検査する手法と画像診断により体内をスキャンして行う手法との二種類に分かれる。前者の方が低費用でありかつ医師の手間が少ないため、一般に前者によりスクリーニングを行い、がんであることが疑われる場合に画像診断に移行するといったプロセスを経ることが多い。技術の進展により、検査も画像診断もその精度が上がってきており、早期の段階でのがん発見率が向上してきている。

しかしながら、このような検査・診断法の進展により新たな問題が生じている。それは、「経過観察」状態の患者の増加である。早期で発見されすぎて、侵襲的な確定診断あるいは侵襲的な治療ができない患者が増えてきている。医師による医療行為は、常にリスクベネフィットバランスを考慮して行われている。診断や治療などの行為によりもたらされるであろう患者ベネフィットと、可能性として存在するリスクとを考えあわせ、ベネフィットが上回った時だけ医療行為が行われる。現状では、超早期のがんについて非侵襲的に確定診断する手法は確立していない。また、治療に関しても同様である。例えば、乳がん検診によって直径 2-3mm の腫瘍が発見されることが多くなってきたが、多くの場合バイオプシー等の侵襲的確定検査も手術治療もリスクの方が高いため、結果的に経過観察の状態が続くことになる。

がんの検出（がんが存在するかどうか）に関しては、このような状況が好転する可能性が見えてきている。それは、Liquid biopsy と呼ばれる血液検査によりがんを検出する手法の発展によるものである[36]。Figure 1.11 に Liquid biopsy の概要を示す。最近の研究により、がん組織を形成する細胞は従来想定されていたよりも早い段階で血中に漏れだすことがわかってきた。このようながん細胞を CTC(circulating tumor cell)と呼ぶ。血液検査により CTC を検出することができれば、がんの状態を従来のがんマーカーよりも早期の段階で調べることができると期待されている。Figure 1.11 は現在検討されている 3 種類の手法を示しており、それぞれについて活発に研究開発が行われている。なお、2014 年 10 月段階で唯一米国食品医薬品局(FDA)より認可を受けた機器として CellSearch®がある。CellSearch®では直接 CTC を検出する Figure 1.11 の a の手法を用いている[37]。

Liquid biopsy あるいは同等の手法により超早期でがんが発見されるようになると、低侵襲治療の重要度が非常に増すと考えられる。超早期のがんは転移を起こしている可能性が低く、局所治療が有効であるからである。しかしながら、超早期でのがん発見は新たな問題へと結びつく可能性が高い。それは、超早期の腫瘍組織は境界が不明瞭であることによる。低侵襲治療は画像診断装置により腫瘍の輪郭を明らかにして、マージンを設定して治療部位を決定する。輪郭が不明瞭であると、治療に支障をきたすのである。例えば、小結

節境界不明瞭型肝細胞がん[38]と呼ばれる境界確認が困難な腫瘍が知られている。このような腫瘍では、従来の低侵襲治療は適用が極めて困難である。Liquid biopsy などの腫瘍発見技術の進展が、このままでは患者 QOL の向上につながらない恐れがある。SDT を低い超音波強度で行えるようになると、このような患者に適用可能な低侵襲治療が可能になると考えられる、本研究では、このような画像診断装置により境界が明瞭に画像化されない腫瘍を低侵襲に治療可能な治療法を目指すものである。

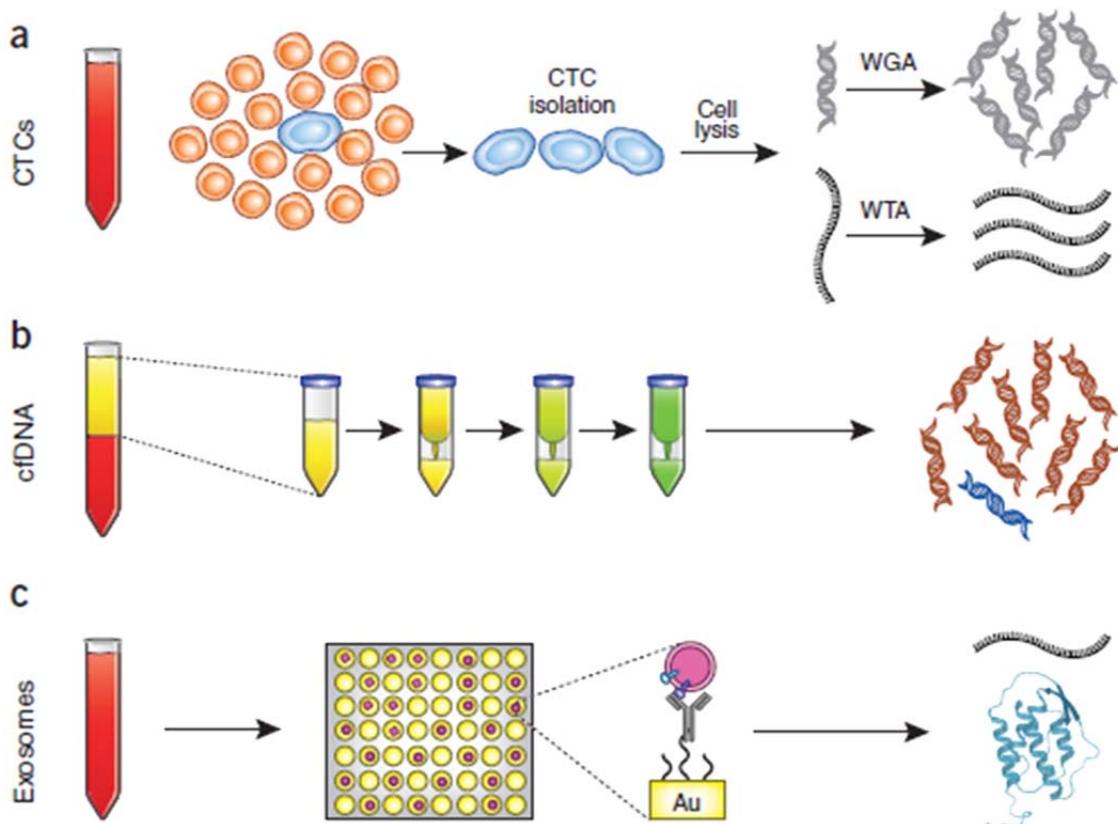


Fig.1. 11 Liquid biopsy の概要  
(Park ら[36])

## 1.2 本研究の目的と論文の構成

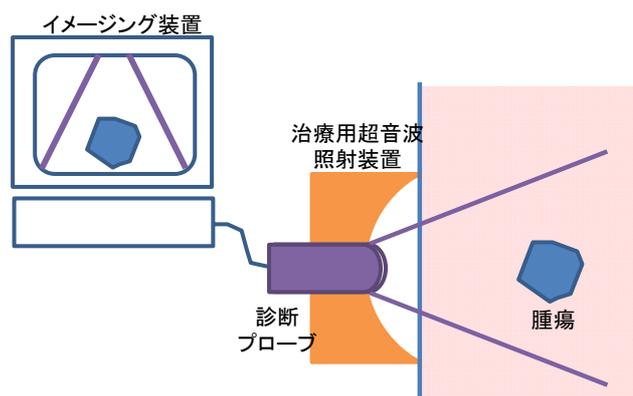
### 1.2.1 本研究の目的

本研究の目的は、前述の SDT に関し、その実用化上の問題点である、キャビテーション生成に必要な閾値を低下する手法を得ることにある。この目的を達成するため、キャビテーション生成を効率よく行うための超音波照射方法、およびキャビテーション生成閾値を低下させる化学物質の探索と評価を行う。

このような超音波照射手法と化学物質それぞれでキャビテーション閾値を低下させる手法を得ることができれば、SDT の有用性は大きく高まると考えられる。仮に音響的手段のみでキャビテーション生成の効率化を達成したとしても、もしもターゲティングに支障が

あつて正常組織に超音波の焦点が合つてしまえば、正常組織でキャビテーションが生じてしまうことになり、安全性に関して他の超音波治療法に比べてさほど有利になるとは考えられない。これに対し、腫瘍集積性であつてかつキャビテーション閾値を低下させることのできる物質があれば、ターゲティングに支障があつて正常組織を狙つて超音波が照射された場合にはキャビテーションは生じないため、安全性に関して極めて有利な治療法となる。さらにこの考えを発展させると、Fig. 1.12 に示すような、従来の超音波治療と異なり画像診断装置などのターゲティングを必要としない新規な超音波治療手法に結びつく。このような治療法は、前述の画像診断装置で輪郭が確認できない超早期の腫瘍の治療に適していると考えられる。これらの腫瘍は現在有効な治療法がないため、非常に必要性が高い。特に、今後の Liquid biopsy の発展等により、腫瘍がその輪郭がよくわからない状態で発見される場合が増えることが想定されるため、今後さらに重要性が高まると考えられる。このような治療法を開発することが本研究の最終目標である。

(a) 従来の超音波治療(例えばHIFU治療)



あらかじめ、腫瘍をターゲティングして治療

(b) 本研究が目標とする超音波治療

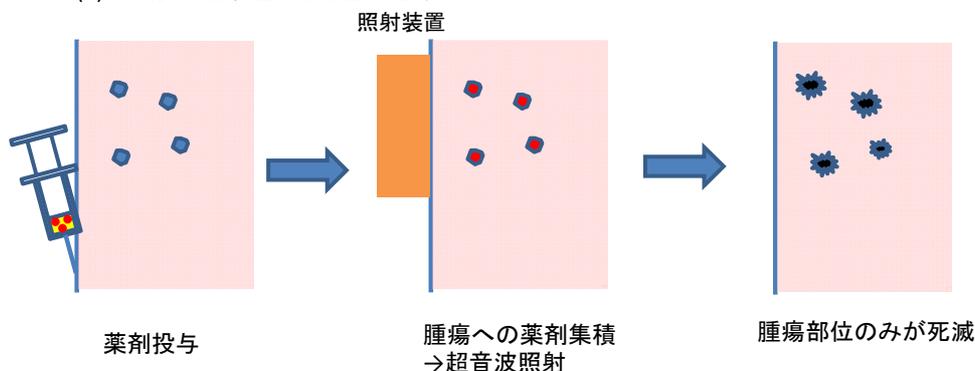


Fig.1. 12 一般的超音波治療と本研究の最終目標とする治療方式

なお、目標とする治療法の実現には、前述のように音響キャビテーションを低強度で生じるための超音波照射法および化学物質の検討が必要となり、本研究においては、これら二つの要素技術の基礎検討を行うことを目的としている。なお、新規治療法の実現には、これらの要素技術に加えて、治療効果のモニタリング手法が必要となるが、本研究では取り扱わないものとする。

### 1.2.2 論文の構成

本論文の構成を Fig. 1.13 に示す。

第1章「緒論」では、既往の研究を概観しながら、本研究の概要を述べる。

第2章「気泡振動に関する理論的検討」では、キャビテーションの源である気泡の振動に関する理論的な考察を行う。

第3章「キャビテーション生成を効率的に行う超音波照射方法」では、基本波にその倍の周波数成分（第二高調波）を重畳する超音波照射手法（第二高調波重畳法）について、理論的な考察を行った上で、実験的にそのキャビテーション生成に及ぼす効果を調べる。

第4章「キャビテーション閾値を低下させる化学物質」では、水中での化学活性キャビテーション生成が水溶性有機化合物の存在によりどのような影響を受けるかを検討する。さらに、化学活性キャビテーション生成に必要な化学構造を有し、かつ、色素増感剤としての特性を有するキサンテン系色素増感剤について化学活性キャビテーション生成効率を検討する。

第5章「提案手法による生体中でのキャビテーション生成」では、第2章および第3章で検討した音響キャビテーションを効率的に生成するための新規手法が実際に生体中で効果を発揮するかどうかをマウス動物実験にて検討する。

第6章「結論」では、本研究で得られた成果をまとめ、結論を述べる。

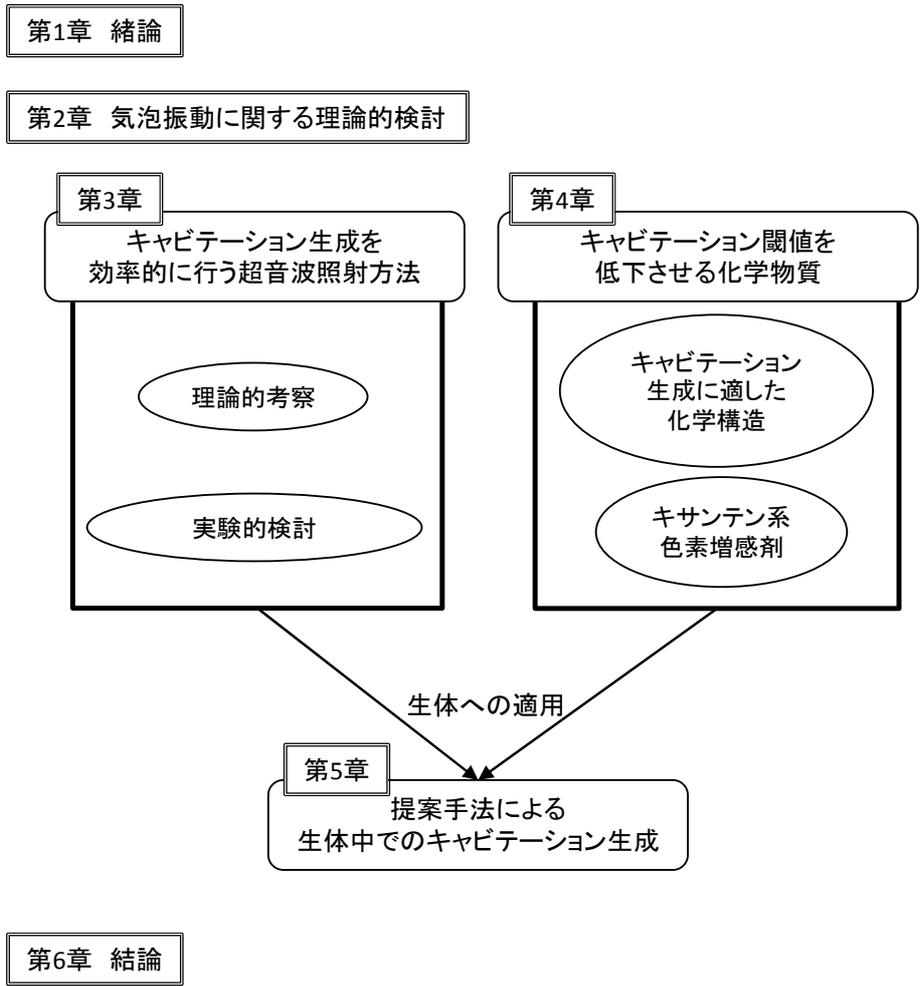


Fig.1. 13 本論文の構成

## 第2章 気泡振動に関する理論的検討

本研究で目標としている新規超音波低侵襲治療の実現のため、音響キャビテーションを従来よりも低強度で生成するための手法（超音波照射方法および化学物質添加）について実験的検討を行うに当たり、まずキャビテーションの元となる気泡振動について運動方程式に基づいた数値解析を行った。なお本章においては、この数値解析を理論的検討と呼ぶこととする。

### 2.1 気泡の運動方程式

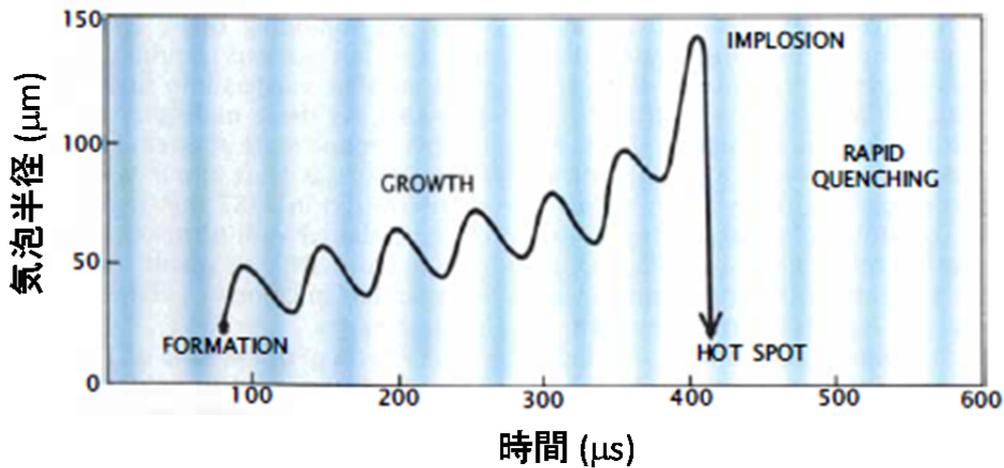
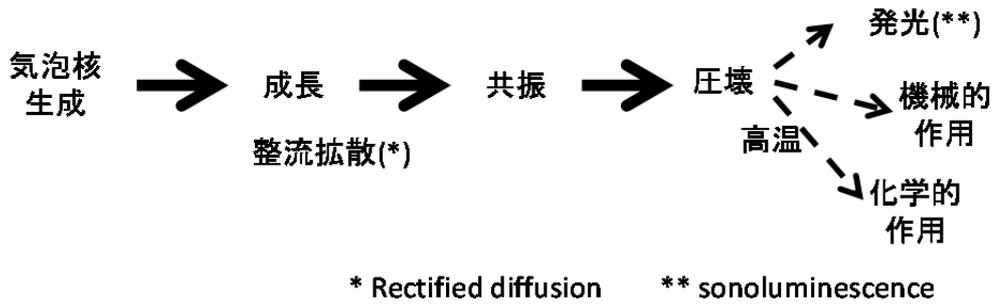
#### 2.1.1 キャビテーションプロセスにおける気泡運動の重要性

Figure 2.1 は、キャビテーションによる作用が生成するまでの過程を示したものである[13, 25]。キャビテーションプロセスは、まず超音波照射により気泡核が生成することで始まる。この気泡核が更なる超音波照射によって成長する。気泡が成長し、用いられた超音波で共振するサイズに達すると、共振によりサイズが一気に大きくなり、その直後に圧壊する。この圧壊は気泡近傍の媒質中に急激な圧力変動を及ぼす。この圧力変動により、衝撃波やジェット生成といった機械的作用が生じる。また、この圧壊は断熱圧縮的に生じることから、圧壊した気泡の温度は数千度以上に上昇する。この温度上昇により黒体放射的に発光が観察される (sonoluminescence) [39]。さらに、1章にて述べたように、条件が適切であれば化学反応 (sonochemical reaction) が生じる[22, 25, 26]。以上のように、キャビテーションによる効果が生成するには、気泡の運動が深くかかわっている。この気泡の運動に関しては理論的な検討が進んでおり、次節以降にその詳細を説明する。

#### 2.1.2 気泡運動方程式 (Rayleigh-Plesset equation)

気泡の振動は、気泡の球対称性、および媒質の非圧縮、非粘性を仮定し、かつ重力が無視できるとした場合、Fig. 2.2 に記載する Rayleigh-Plesset(RP)の式[40]に従う。この RP 式は、流体の運動量を記述する基本方程式である Navier-Stokes equations から導出される[41]ものである。また、気体と媒質それぞれのエネルギー保存からも導出可能である[41, 42]。RP 式は、一般的な解析解は存在しないため、特殊解を除いて数値計算で解くことになる。

RP 式からわかる気泡振動のもっとも基本的な特性は、振動における気泡径の増大と縮小とが非線形であることである[42]。Fig. 2.3 に、 $0.1\mu\text{m}$  の初期半径の気泡に  $1\text{MHz}$  の周波数で  $0.15\text{MPa}$  の圧力振幅を有する連続波超音波を照射した際の気泡振動計算結果を示す。計算は Matlab®上の気泡振動解析ソフトウェア(Bubblesim)を用いて実行した。初期半径、周波数、音圧振幅以外のパラメータは Bubblesim の標準値を用いた。線形振動（超音波の圧力に比例して気泡径が変化する場合）を仮定した場合の結果も合わせて示してある。Fig. 2.3(b)と 2.3(c)とを比較することで、気泡は膨張しやすく圧縮されにくいことがわかる。この傾向は超音波の圧力振幅が非常に大きい場合を除いて一般的に成り立つ。直感



K. S. Suslick; Science (1990)

Fig. 2.1 キャビテーションのプロセス

$$R \ddot{R} + \frac{3}{2} \dot{R}^2 = \frac{1}{\rho_0} \left( \left( p_0 + \frac{2\sigma}{R_0} - p_v \right) \left( \frac{R_0}{R} \right)^{3\kappa} + p_v - \frac{2\sigma}{R} - \frac{4\eta \dot{R}}{R} - p_0 - P(t) \right)$$

- |          |      |          |             |
|----------|------|----------|-------------|
| $R$      | 気泡半径 | $p_v$    | 蒸気圧         |
| $\rho_0$ | 液体密度 | $\kappa$ | Polytrope指数 |
| $p_0$    | 液体圧力 | $\eta$   | 粘度          |
| $\sigma$ | 表面張力 | $P(t)$   | 超音波による圧力    |

Fig. 2.2 気泡運動の理論式 (Rayleigh-Plesset 式)

的には、膨張時は気体分子同士の距離が離れるのに対して圧縮時は気泡間距離が短くなるため、圧縮の程度が大きくなると気体分子間の相互作用が無視できなくなり圧縮に抗するためと理解できる。

RP 式の妥当性については、超音波を照射中の気泡径の時間変化を直接光学的に観察することで直接的に評価可能である。Figure 2.4 に、周波数 30kHz の超音波を音圧振幅 0.1MPa の条件で照射した際の気泡径の変化を観察した結果と RP 式により計算された結果とを示す[39] (実線が RP 式による理論値、プロットが実測値)。両者はよい一致を見せており RP 式の妥当性を示していると考えられる。なお、超音波を医用に用いる際には、Fig. 2.4 よりも高い周波数(~1MHz)がもっぱら用いられる[16, 42]が、そのような高い周波数での気泡の振動を十分な時間分解能で光学観察するには特殊な装置が必要であり、ほとんど検討されていない。

## 2.2 キャビテーションにおける気泡の成長（整流拡散）

Figure 2.1 に示すキャビテーションの過程における、気泡核が発生した後に気泡が成長するプロセスにおいては、整流拡散 (rectified diffusion) [43-50]と呼ばれる現象が深くかかわっていると考えられている。整流拡散は気泡が超音波照射下で徐々に成長する現象であり、最初にこの現象に関する記述が見られるのは Harvey により 1944 年に発表された論文中[51]である。以降、研究が進み理論的な考察およびその実験的な検証が行われてきた。特に Crum による review[47]にて整流拡散の詳細が述べられている。

以下に、整流拡散が生じる機序について説明を行う。まず、整流拡散が生じる条件として、1) 溶媒中に非凝縮性の気体分子（酸素、窒素など）が溶存している、2) 気泡界面を介した気体分子の拡散で系の動的エネルギー平衡が保たれているという二つを仮定する。このような状態で、Fig. 2.5 のように溶媒中の溶存気体分子が気泡表面を介して出入りして動的な平衡が保たれていると考えるのである。

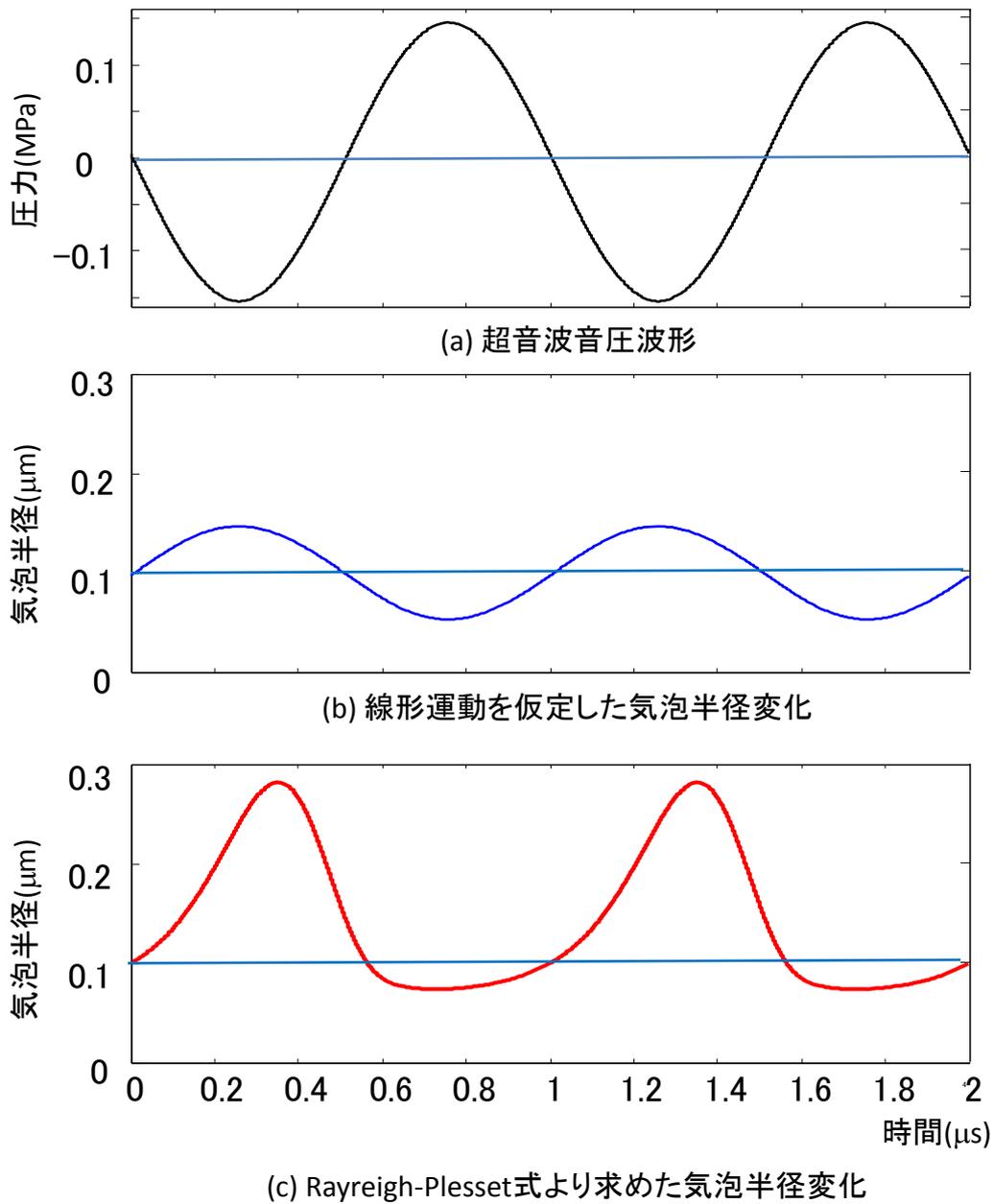


Fig. 2. 3 気泡の非線形振動の例

このような仮定のもと、疎密波である超音波を系に照射する。Henry の法則「揮発性の溶質を含む希薄溶液が気相と平衡にあるときには、気相内の溶質の分圧は溶液中の濃度に比例する」[52]の別表現である「気体の溶解度は圧力に比例する」により、超音波の負圧が到達した際には気体の溶解度は低下し、超音波の正圧が到達した際には気体の溶解度は上昇することになる。このことから、Fig. 2.5 に示すように初期状態（超音波照射なし）で気泡内への溶存気体の拡散（流入）と気泡外への溶存気体の拡散（流出）とが釣り合っていたとすると、負圧が到達した際には流入量が増え、正圧が到達した際には、流出量が増える

ことになる。ここで、2.1にて説明したように、超音波照射による気泡径の変化が拡大時と縮小時で非対照であることを考え合わせると実際には Fig. 2.6 (線形での振動) で考えたよりも負圧が到達した際にはより気泡径が大きく、正圧が到達した際には気泡径は負圧による拡大よりも顕著でないことになる(Fig. 2.7)。ここでさらに、1) 気体分子の拡散は気泡界面を介して行われる、および2) 気泡表面積が大きいほど単位時間あたりの気体分子移動量が多い、を考え合わせると、負圧到達時の気体流入の方が、正圧到達時の気体流出よりも多いことがわかる。すなわち、時間が経過するにつれて、気泡内に気体分子が蓄積されることになる。気体分子数が多くなることにより、結果的に気泡の直径は超音波照射時間が長じるに従って大きくなるのである。整流拡散は主にこのような機序により生成する[50]。

整流拡散により気泡の成長を計算するには、Fig. 2.8に示すように超音波照射による気泡サイズの変化を Reyleigh-Plesset 方程式より計算し、流入する気泡の量を気体分子の拡散に関する Fick の第二法則[53]により計算する。そして、気体の状態方程式[54]

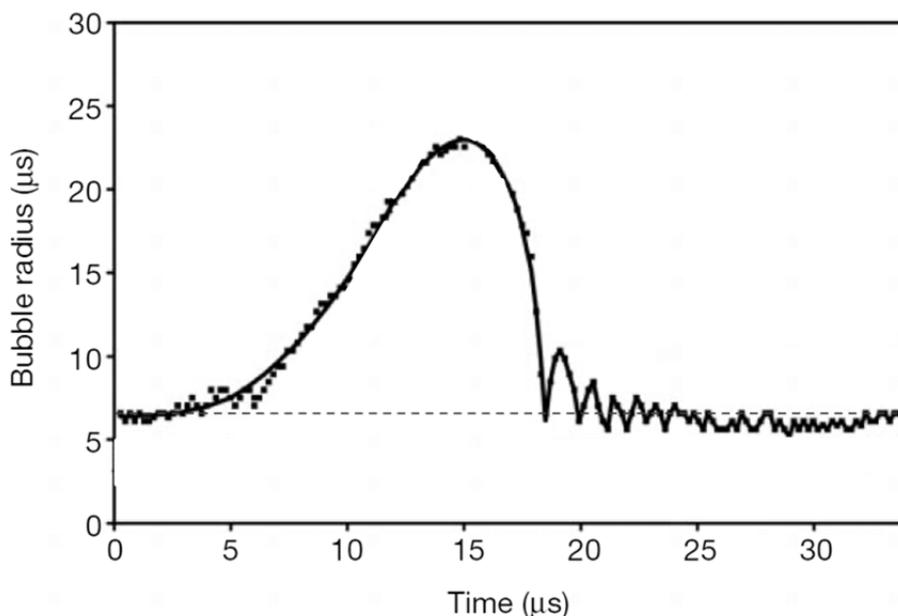


Fig. 2. 4 気泡振動の実測と理論値とを比較した例  
(Suslick ら[39]より)

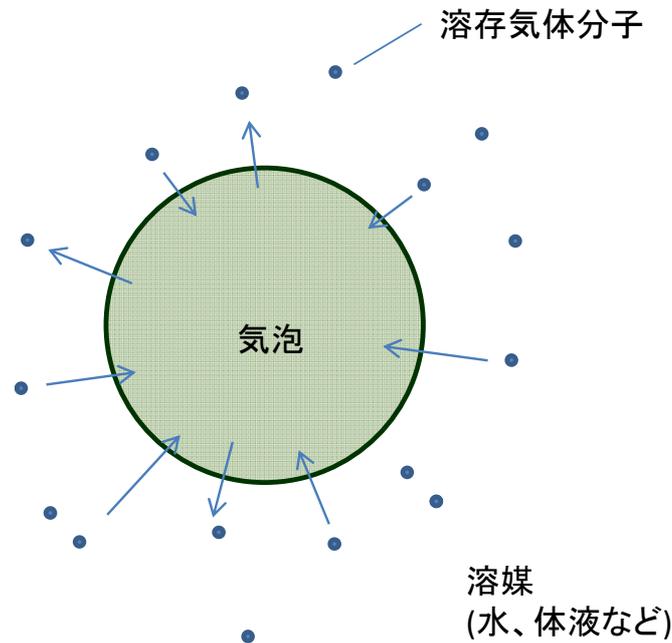


Fig. 2.5 整流拡散を考える上で想定している状況

から、圧力一定で気泡濃度が変化した際の体積を計算することで求めることができる。

Fig. 2.9 に、Crum らによって行われた[50]、超音波の音圧振幅を変化させながら計測された超音波照射時の気泡径の変化の実測値とそれに対応する計算値との比較を行った結果を示す。両者はよい一致を見せており、超音波照射時に気泡径が増大する機序として整流拡散が大きく寄与していることを示している。また、Fig. 2.10 に、実測された気泡径の例[43]を示す。図中左から右に超音波照射時間が経過しており振動しながら徐々にサイズが増大する様子がわかる。

なお、ここで述べた整流拡散は一般に、用いる超音波強度（音圧振幅）が小さい場合に数十秒オーダーで徐々に気泡径が増大していく現象を指す。

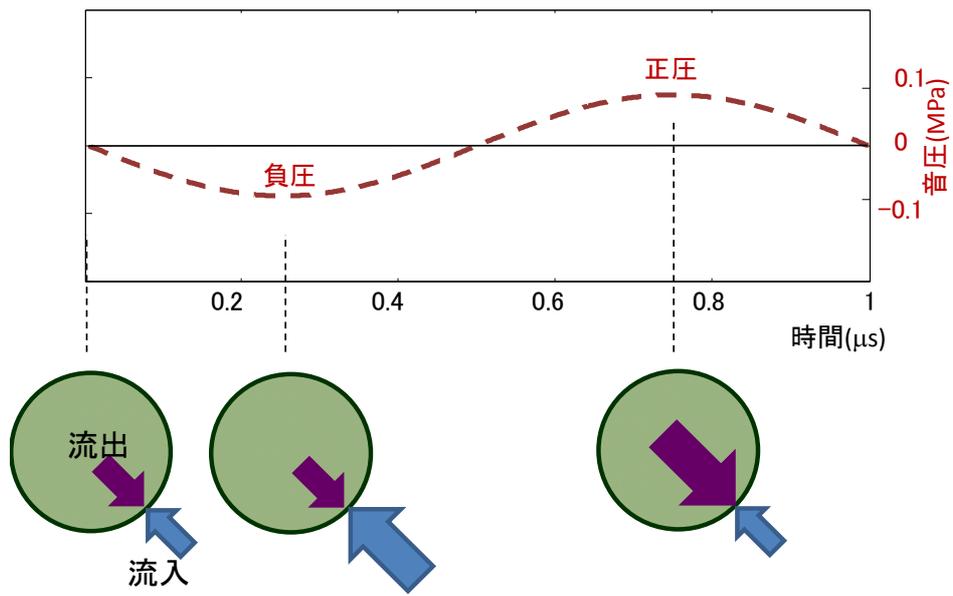


Fig. 2. 6 圧力変動による気体分子の拡散の変化

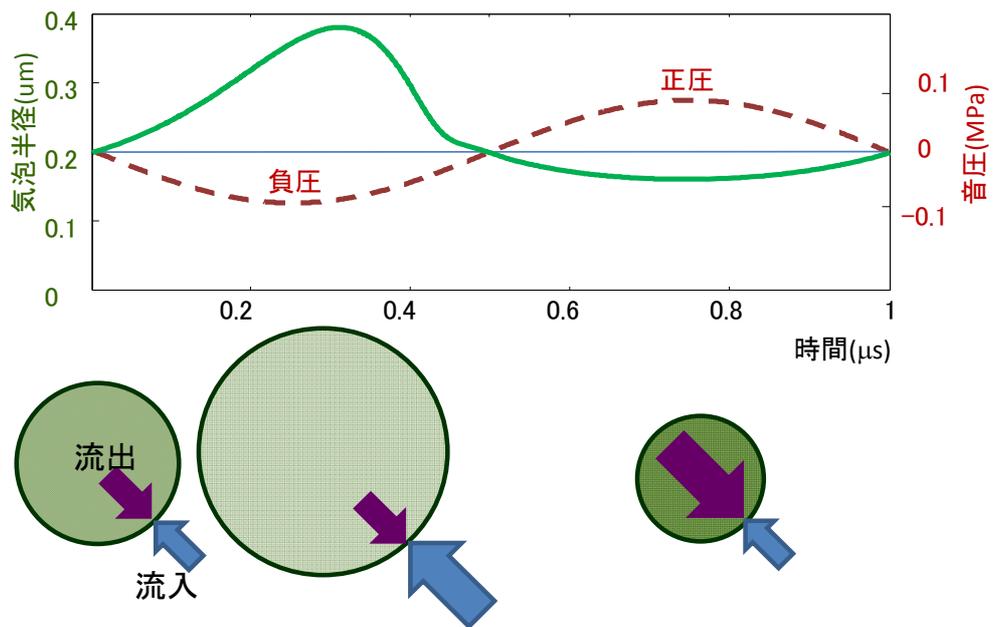


Fig. 2. 7 圧力変動による気泡径変化を考慮した気体分子の拡散の変化

1. 超音波照射時の気泡サイズ

Rayleigh-Plessetの気泡運動方程式

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2} \dot{R}^2 + \frac{1}{\rho} \{ P_0 [1 - (R_0/R)^3 \eta] - P_A \cos \omega t + \rho R_0 \omega_0 b \dot{R} \} = 0$$

2. 気体分子の拡散

Fickの物質拡散に関する第二法則

$$\frac{dC}{dt} = \frac{\partial C}{\partial t} + v \cdot \nabla C = D \nabla^2 C,$$

3. 気体の状態方程式

Fig. 2. 8 整流拡散を求めるのに必要な式

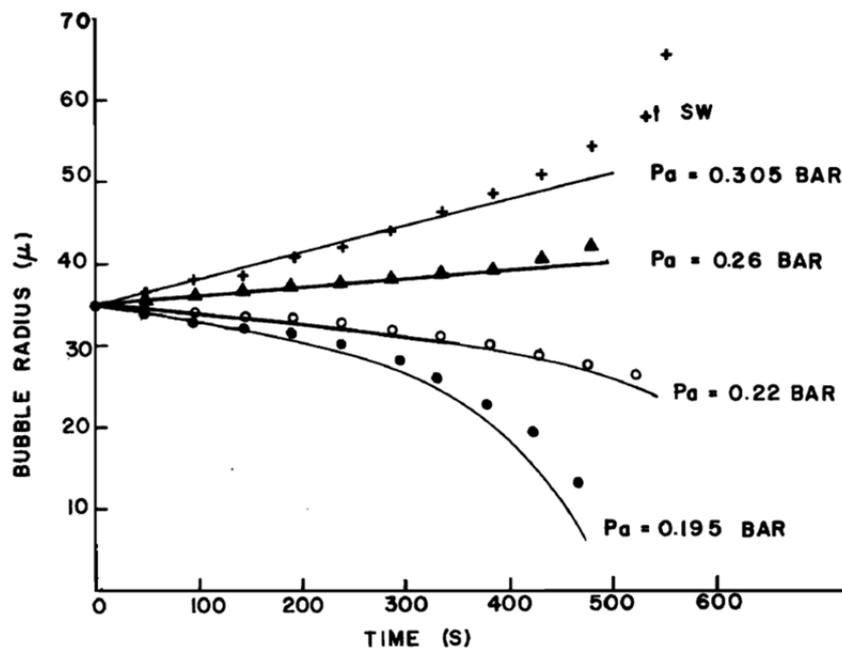


Fig. 2. 9 整流拡散の理論と実測との関係の例 (Crum ら[50])

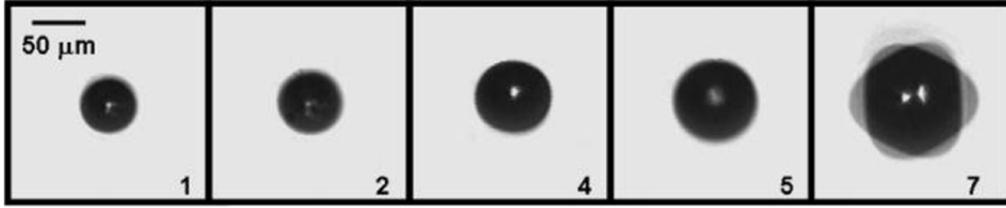


Fig. 2.10 整流拡散による気泡径増大の例  
(Lee ら[43])

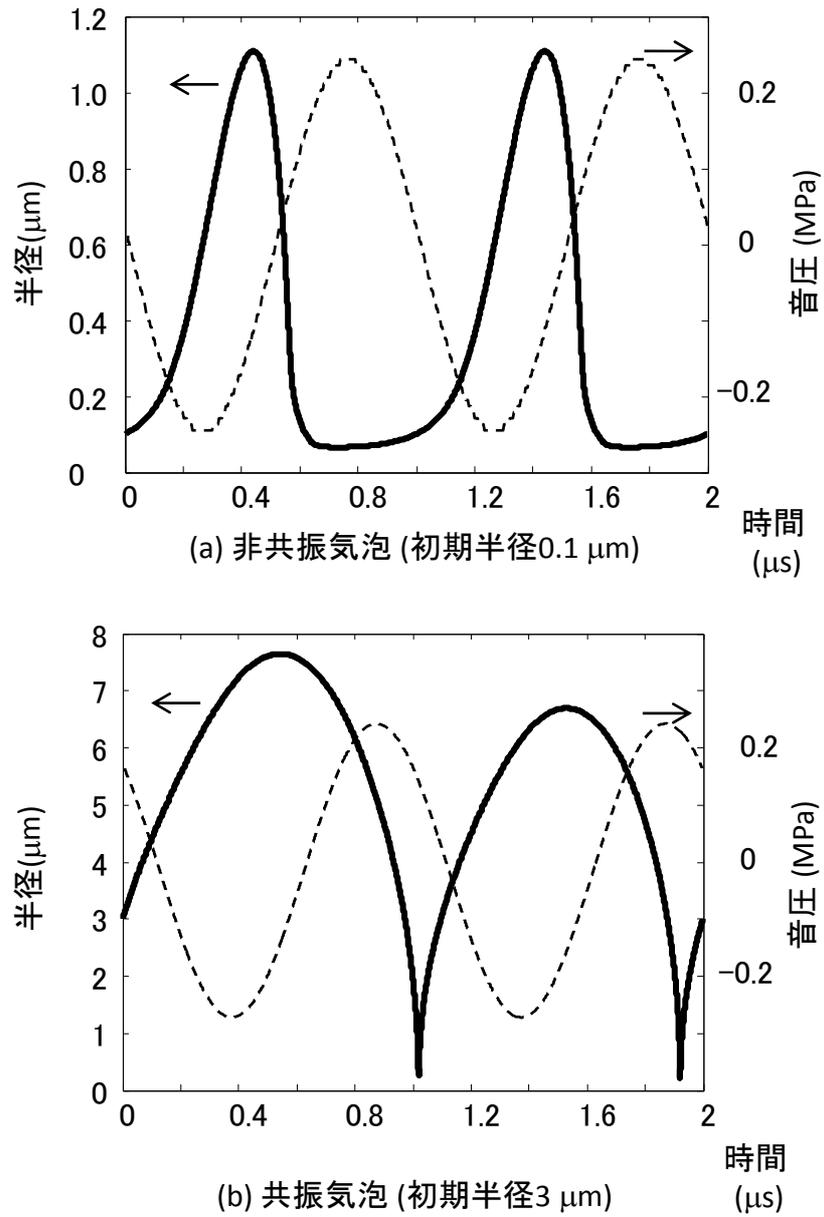


Fig. 2.11 気泡サイズの違いによる同一音響条件での振動の違いを示す例

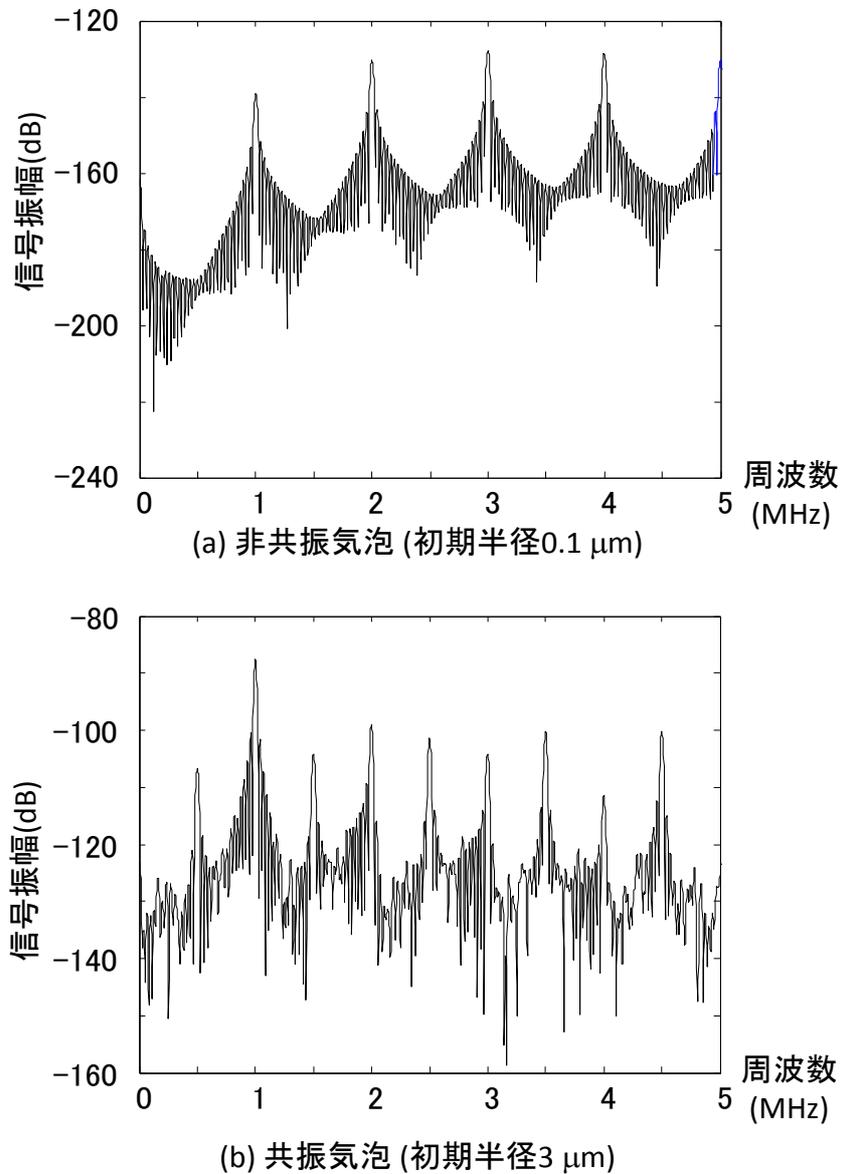


Fig. 2. 12 気泡サイズの違いによる同一音響条件での気泡振動における周波数成分の違い

### 2.3 キャビテーションにおける気泡の共振

2.2節で述べたように超音波照射による気泡のサイズ増大が進むと、用いている周波数に応じた共振気泡サイズ[55]に達する。共振気泡サイズ付近まで気泡サイズが大きくなると、Fig. 2.3に示したような振動とは異なる激しい振動が見られるようになる。表面張力が無視できる場合、共振気泡サイズ（直径）は用いる超音波の周波数に逆比例し、また 1MHz の超音波に対して約  $3\mu\text{m}$  であることが Rayleigh-Plesset 式から導かれる[55]。

Figure.2.11 に、周波数 1MHz で音圧振幅が 0.25MPa の条件において非共振気泡(0.1 $\mu\text{m}$ )と共振気泡(3 $\mu\text{m}$ )それぞれ二周期の正弦波で照射した際の振動を Rayleigh-Plesset 式によ

り計算した結果を示す。また、それぞれの振動の周波数解析を行った結果を Fig. 2.12 に示す。これらの計算も Fig. 2.3 に示す結果と同様 Matlab 上で Bubblesim を用いて行った。まず、非共振気泡を振動させた場合には、これまで述べたとおり気泡は圧縮されにくく膨張しやすいことがわかる。また、周波数成分の解析によれば、照射した基本波である 1MHz 成分に加えて、2、3、4 倍の高調波成分が生成していることがわかる。このように非線形振動が生じていることになる。また、二周期の正弦波入力に対し、各周期で同一の振動が生じている。これに対し、共振気泡の場合には、生じる現象が異なっている。まず、圧縮時に急峻に圧縮されその直後にリバウンドする形の振動を行う点が非共振気泡と異なっている。さらに、二周期の正弦波に対して各周期で異なる振動が生じている。このような非共振気泡と異なる振動の周波数成分を解析においても顕著な差として見られる。非共振気泡とは異なり、照射した基本波である 1 MHz の半分の周波数の分調波成分 (0.5MHz) およびその高調波成分である 3/2, 5/2, 7/2 ...MHz の成分が確認される[56-59]。また、非共振気泡同様、基本波の 2、3、4 倍の高調波成分も観察されている。入力正弦波の各周期に対する異なった振動が分調波生成となって表れていると考えられる。

さて、このように共振気泡においては高調波と分調波が生成する。これら非線形成分の入力正弦波の強度に対する依存性を調べた結果を Fig. 2.13 に示す。基本波(1MHz)、高調波(2MHz)、および 0.5 次および 1.5 次の分調波(0.5 および 1.5MHz)をそれぞれ 1~50W/cm<sup>2</sup> まで強度を変化させた正弦波を入力して求めた結果である。まず、基本波は音響強度に対してほぼ線形に増大していることがわかる。これに対して、高調波は、音響強度が大きくなるに従い、いったん値が大きくなるものの、10W/cm<sup>2</sup> で小さくなり、それ以上の強度で再び値が大きくなるものの、35W/cm<sup>2</sup> にてプラトーに達する。0.5MHz の分調波については、基本波、高調波いずれとも異なる傾向を示すことが分かった。まず、分調波の生成は閾値を有し、一定以上の強度以下では生成しないことがわかる (この場合 7.5w/cm<sup>2</sup>) またそれ以降は概ね音響強度の上昇に伴って増大することがわかる。また、0.5 次と 1.5 次とでほぼ同じ値を示すことが分かった。これらの結果より、キャビテーションによる非線形振動の指標として分調波の強度を用いることとした。本研究以外でも実験的検討においても分調波強度を指標にする例は多く見られ、キャビテーションの激しさの指標として用いられている[59]。

Figure 2.14 は、共振気泡に対して大きな音圧振幅(0.9MPa)を与えた時の気泡振動を計算したものである。二周期の正弦波を与えているが、二周期目で気泡半径がほぼ 0 まで小さくなっている。Rayleigh-Plesset 式では気泡の振動を連続的なものとして取り扱うため、圧壊は生じないが、実際にこのような激しい気泡半径減少が生じた場合には、圧壊を生じてその結果衝撃波の生成あるいは化学作用の生成[21, 22]が生じるものと考えられる。

以上のように、キャビテーションの各過程は気泡振動を基礎としており、これら気泡振動のなかで特に気泡成長を促進することが効率的なキャビテーション効果生成につながると考えられる。それは、気泡核が生成しても、成長して圧壊しないと効果が生成しないた

めである。共振気泡サイズまで気泡核を成長させることができれば、共振により圧壊およびその後のキャビテーション作用生成まで進むものと期待される。

次章以降にて、気泡核成長に関与する整流拡散を促進する手法として、入力正弦波にその倍の周波数成分（第二高調波）を重畳して照射する手法（第二高調波重畳法）に関する実験的効果検証を行うが、まず本章にて説明した気泡振動プロセスをベースに理論的な検討について説明する。

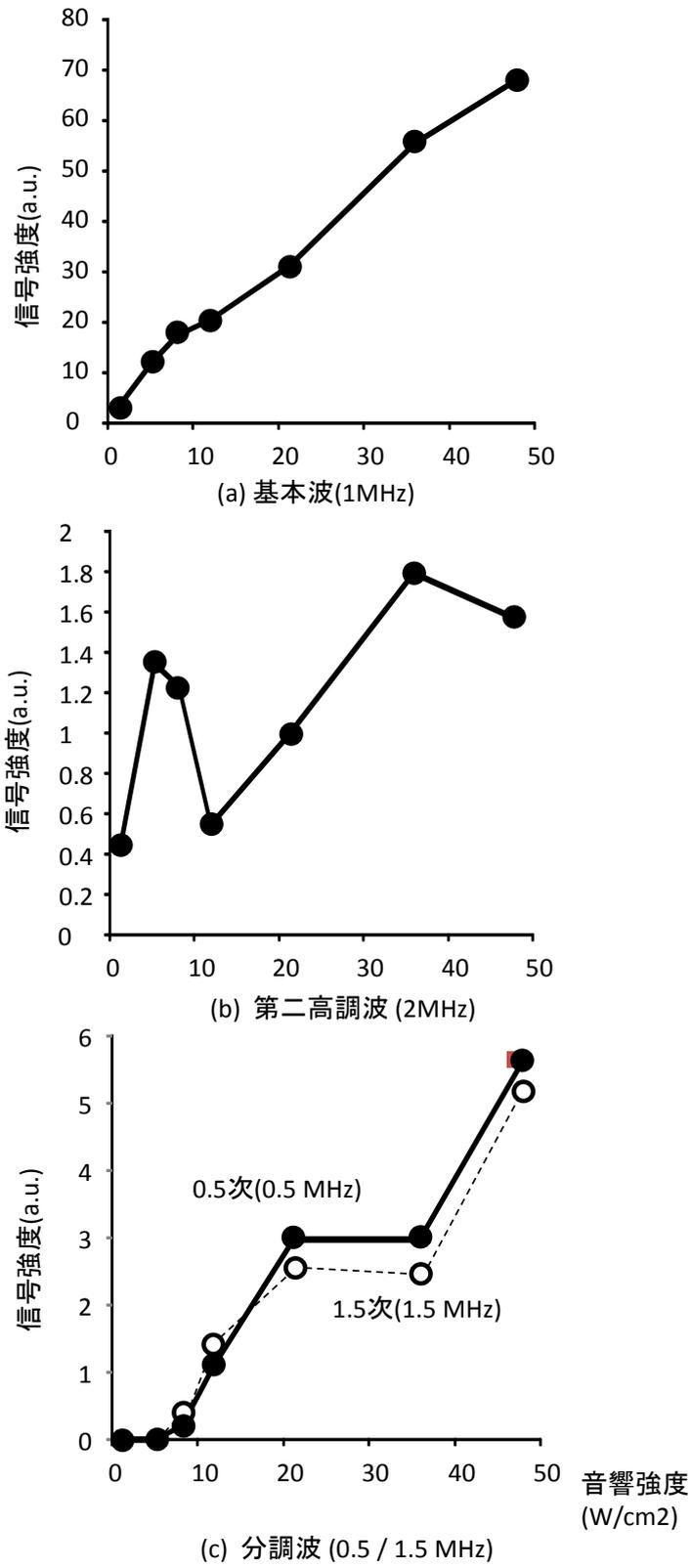


Fig. 2. 13 気泡振動による各周波成分の信号強度の音響強度に対する依存性

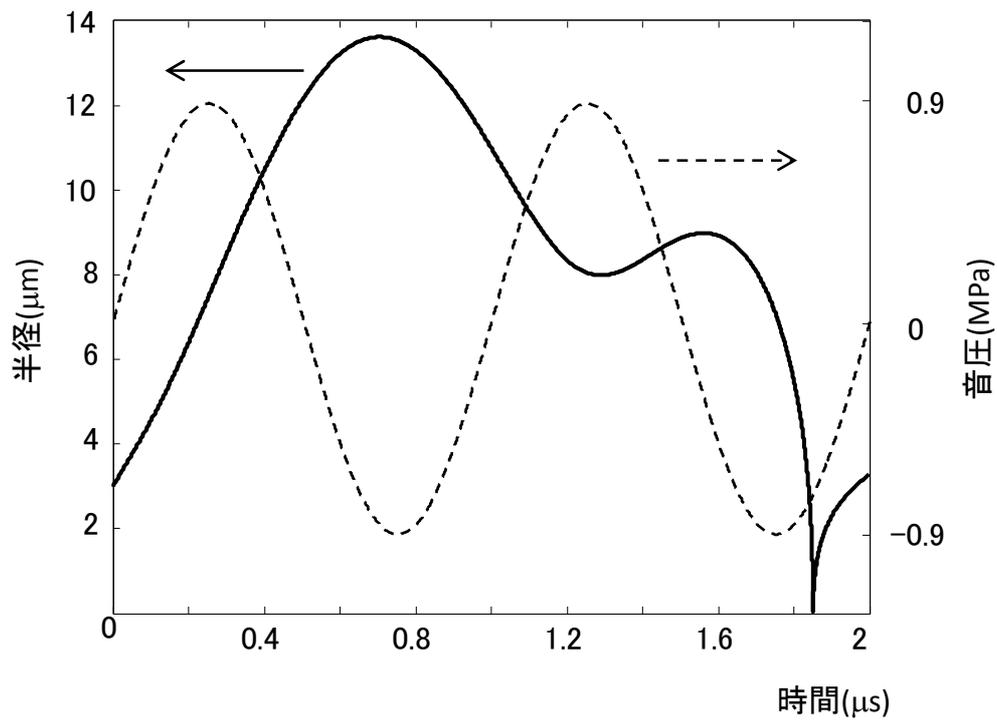


Fig. 2. 14 大振幅超音波を用いた際の気泡振動の例

## 第3章 キャビテーション生成を効率的に行う超音波照射方法

本研究で目標としている新規超音波低侵襲治療の実現のため、音響キャビテーションを従来よりも低強度で生成するための手法のうち、超音波照射方法の工夫によりキャビテーション生成を効率化する手法について検討を行った。

### 3.1 第二高調波重畳法(SHS)の提案および理論的考察

#### 3.1.1 SHS の提案

前章で述べたように、音響キャビテーションのプロセスには気泡振動が大きく関与しており、特に生成した気泡核の成長には整流拡散が重要であると考えられている。この整流拡散を効率的に生じる超音波照射方法について検討することとした。Fig.3.1.1 に示すように気泡振動は非線形運動であり、照射した周波数成分（基本波）の倍の周波数成分（第二高調波）が含まれることが特徴である。この事実から、以下の仮定を行った。「振動に際して生成する第二高調波をあらかじめ照射する基本波に重畳することにより、効率的な整流拡散が生じて、結果としてキャビテーションが効率的に生成するのではないか」と。以降、第二高調波重畳法（SHS）[60-65]と呼ぶこの手法は、例えば Fig.3.1.2 のように超音波照射装置を二つのパーツに分け、それぞれから基本波と第二高調波とを照射し、焦点領域にて重ね合わせることで実現可能である[63]。Figure 3.1.1 に示すように高調波は第二高調波以外に第3、第4、と高次の高調波を生成する。このため、第二高調波以外の周波成分を重畳することも考えられるが、1章で述べたように超音波は周波数に応じた減衰を生じ、この減衰が3倍高調波以上では大きすぎて体内で同程度の焦点領域を形成することが非常に困難である。このため、重畳するのは第二高調波のみとした。

#### 3.1.2 SHS の理論的検討

SHS によりキャビテーション生成・作用が効率的に生じるかどうかの実験的検討を行う前に、これまでに行われてきた理論的検討について説明する。SHS を行った際にキャビテーションの作用が効率的に生じるかどうかは実験的な検討が必要であるが、キャビテーションプロセスに影響を与えるかどうかは理論的検討が可能である。SHS が整流拡散に及ぼす効果については、複数の波を重ね合わせて照射する手法の一種としていくつか検討が行われている。それら先行研究の中から、本節では吉澤らによって行われた検討を用いて SHS が整流拡散に及ぼす効果について説明する。

吉澤らの検討においては、気泡モデルとして松本モデル（溶媒圧縮性、気泡界面での熱および物質移動等を考慮したもの）を用い、整流拡散の評価は気相と液相それぞれでエネルギー方程式を解くことによって行っている。20 $\mu$ s の時間超音波を照射し、その際の気泡内ガス質量の相対的变化を整流拡散の大きさの指標としている。なお、超音波照射の条件

は、基本波の周波数が 1MHz、気泡初期半径が 0.2-5 $\mu\text{m}$ 、音圧振幅が 100-141 kPa となっている。また、基本波と第二高調波とは相対位相差を変えて重畳しており、Fig. 3.3 に示すように基本波と第二高調波の相対位相差を変化させた波形を作成し、それぞれについて効果の検証を行っている。なお、Fig. 3.1.3 中の相対位相差は

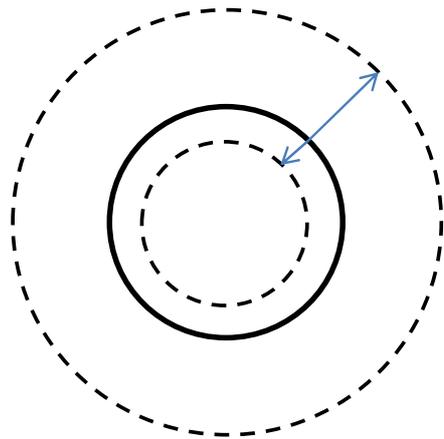
$$\sin(2\omega t) + \sin(2(2\omega)t - \theta)$$

で示される $\theta$ に相当する。なお、 $\omega$ は基本波の角速度を表す。

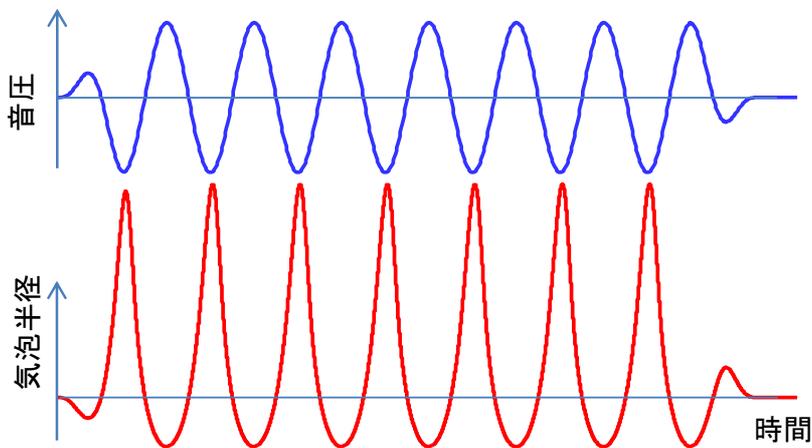
続いて計算結果の説明を行う。Fig. 3.1.4 は、単周波照射と SHS とで整流拡散に変化があるかどうかを調べたものであり、横軸は初期気泡半径、縦軸は気泡内気体の増減を示している。縦軸の値が大きいほど、整流拡散の効果が大きいことになる。単周波照射と SHS との音響強度を同じにするために、単周波では 141kPa の振幅音圧を与え、SHS では各周波 100kPa 同士を重畳して計算を行っている。また、SHS を行うのに用いた波形は Fig. 3.1.3 中の相対位相差  $3\pi/2$  の波形である。得られた結果は、点線で示される単周波照射に比べて、SHS を用いた場合には気泡径が 1.3 $\mu\text{m}$  よりも小さい場合に気泡内気体がより多くなっていることが示されている。すなわち、このような小さな気泡に対しては SHS を用いて整流拡散の効率化が示唆されたことになる。

吉澤らは、さらに SHS を行う場合の波形による効果の違いについても検討を行っている。Figure 3.1.5 に検討結果を示す。縦軸・横軸ともに Fig. 3.1.4 と同じであり、縦軸の値が大きいほど整流拡散による気泡径増大が著しいことになる。得られた結果は、初期半径約 1 $\mu\text{m}$  以下の微小な気泡については、SHS の波形の違いが影響を与え、相対位相差  $3\pi/2$  の負圧を強調した波形が相対位相差  $\pi/2$  の正圧を強調した波形よりも有意に高い整流拡散効果を示すことがわかった。なお、それ以外の波形は両者の中間の値を示すこともわかった。

以上の吉澤らの検討によれば、SHS は整流拡散を効率的に行うことが可能と考えられた。ここで行われている理論検討は、単一気泡に関するものであり、またキャビテーションプロセスの中で整流拡散のみを考慮しており、キャビテーションにより得られる作用そのものについて計算しているわけではない。実際には、気泡は複数存在し、かつそのサイズ分布は不均一である。さらに整流拡散はプロセスの一部であり、トータルで化学作用というキャビテーションの効果で評価することで初めて今回目的とするキャビテーション作用の効率化についての議論が可能となる。現在、このような検討を理論的に行うのは困難であり、次節以降に述べるように実験的検討を行った。



気泡は膨張しやすく圧縮しにくい



Simulation  
Rayleigh Preset  
周波数: 0.5 MHz  
強度: 40 W/cm<sup>2</sup>  
媒質: 水中

周波数解析

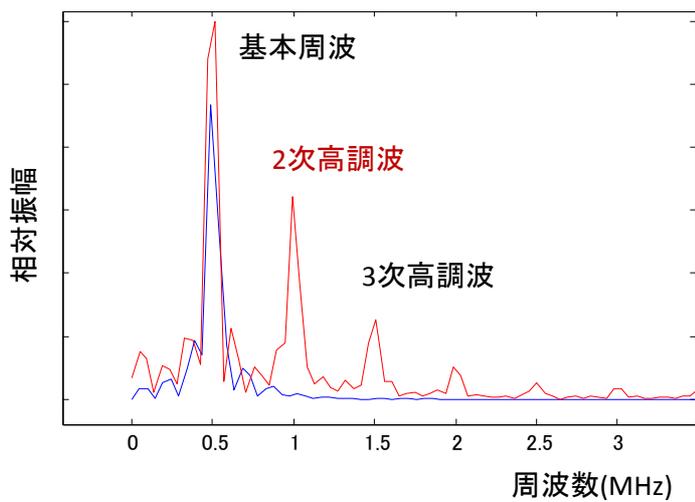


Fig. 3.1. 1 気泡振動における高調波の生成

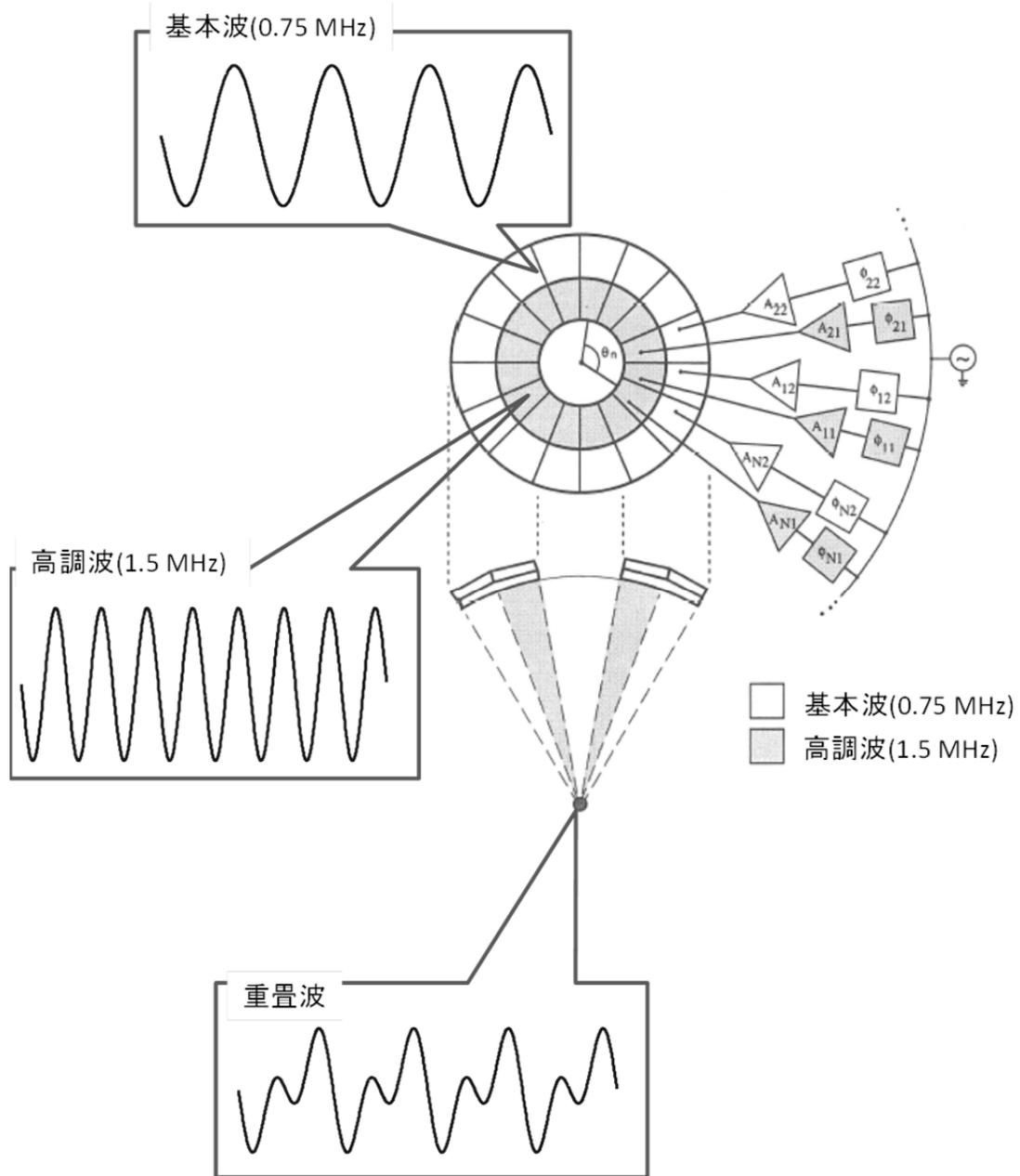


Fig. 3.1. 2 第二高調波重畳(SHS)の実現例

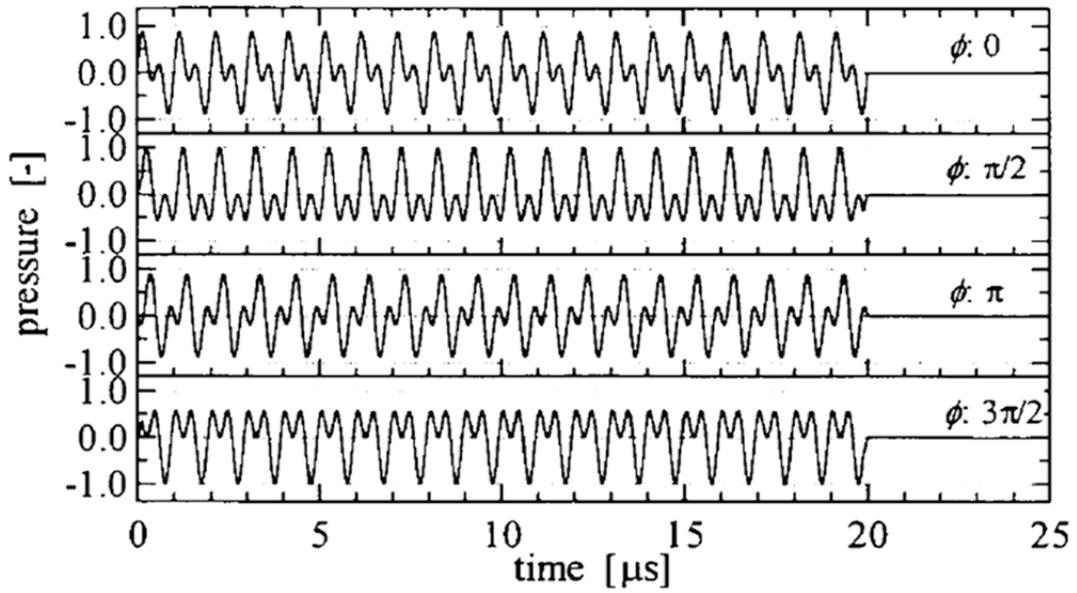


Fig. 3.1. 3 SHS の効果の理論検討で用いられた波形一覧  
(吉澤ら[44])

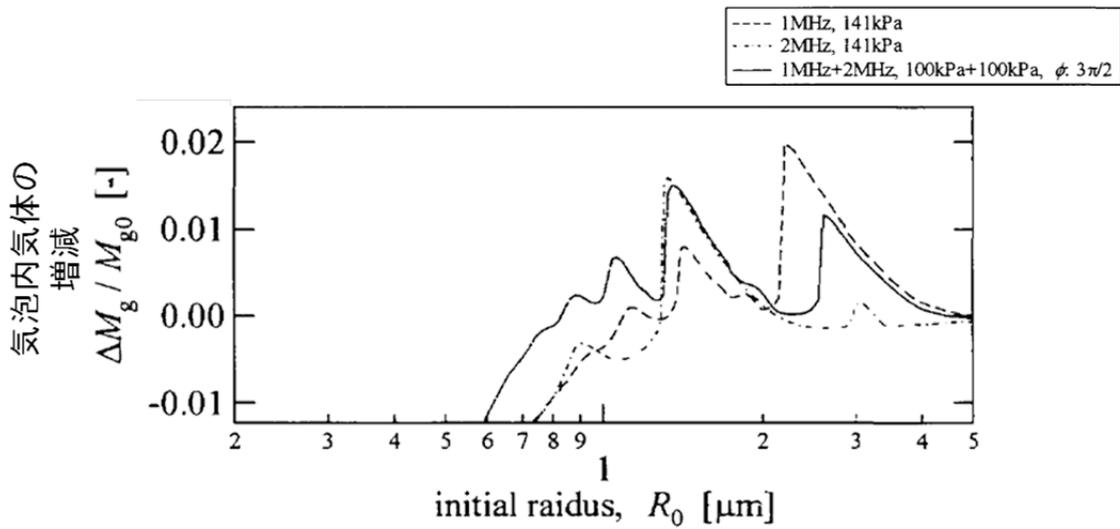


Fig. 3.1. 4 SHS と単独周波照射での整流拡散の違い  
(吉澤ら[44])

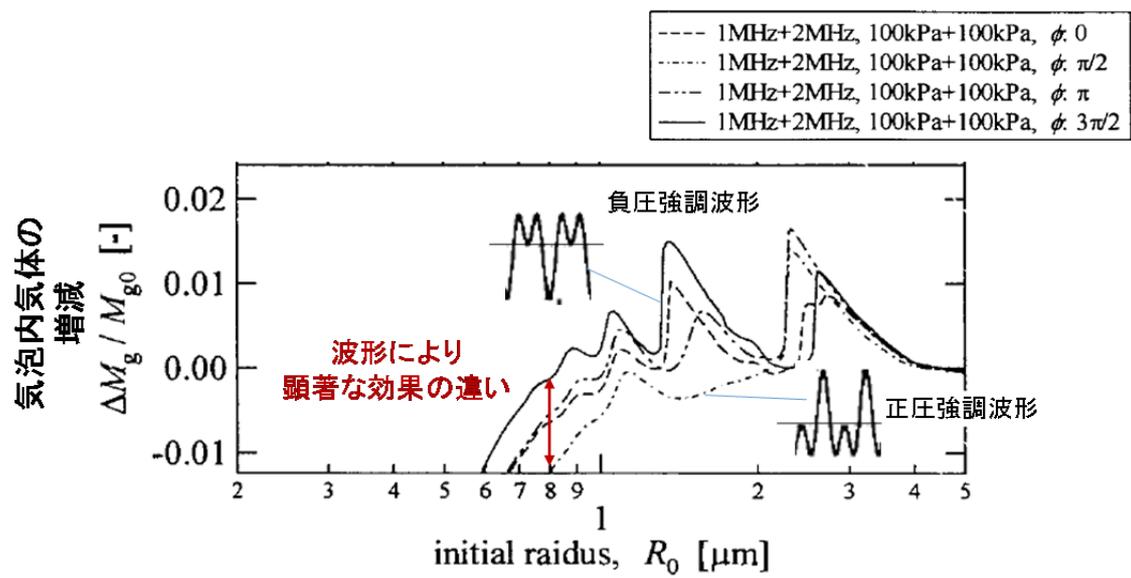


Fig. 3.1. 5 SHS の波形の違いによる整流拡散の効果の変化  
(吉澤ら[44])

## 3.2 キャビテーション化学作用を生じる実験系に関する検討

### 3.2.1 現状の実験系について

前節で述べたように、本研究ではキャビテーション生成および化学効果を効率的に生じる手法について検討し、そのためのアプローチとして第二高調波重畳法(SHS)の効果について実験的に調べる。本節では、そのような実験的検討を行う上での現状の実験系に関する課題を明らかにし、その解決に向けた手法を提案する。

本研究では、生体に投与して安全な強度域での超音波照射を想定している。このような強度域を検討するに当たり、全身ハイパーサーミアを参考とした。1章で述べたように、ハイパーサーミアには局所と全身とがあり、後者は言葉の通り全身を加温する手法である。患部以外も加温されることから、安全性が特に問題となる。この全身ハイパーサーミアにおいては、臨床上温度設定を約 41°C とすることが多い。この温度で 30 分間程度加温を行う。このことと、音響化学治療の基礎検討において患部一カ所への超音波照射は 5 分程度以下で治療効果が得られることから、温度上昇で体温が 41°C を超えない超音波強度であれば、本研究で想定している安全な超音波照射であると考えられた。米国食品医薬品局(FDA)の Sonesson 氏が公開している High intensity focused ultrasound simulator を用いて生体熱伝達方程式により超音波照射による生体温度上昇の検討を行った結果、1MHz 帯において超音波強度が数 10W/cm<sup>2</sup> 以下であればこのような条件を満たすことがわかった(例えば、周波数 1MHz で深さ 2cm の部位については、20W/cm<sup>2</sup> 程度の強度以下)。1章で述べたように、全身ハイパーサーミアは超音波を用いて行うことは困難であり、超音波によるハイパーサーミアは局所的に温度を上昇させるため、より高い強度を用いる。また加熱凝固治療も 1kW/cm<sup>2</sup> 以上の強度が必要である。さらに機械的作用や化学的作用を得るのに必要なキャビテーションを確実に生成するには、加熱凝固治療以上の音響強度が必要である。このように、超音波の生体作用を用いる治療法では本研究で目的としている弱い強度の超音波照射では効果を得ることができない。しかしながら、例外として「定在波を用いた」キャビテーションによる化学的作用[13, 66-70]のみが、安全域と思われる超音波強度で生じることが可能であることがわかっている。このような、定在波を用いた場合に見られる、極めて低強度でのキャビテーション生成を参考とし、定在波なしで、定在波条件と同じように低強度で化学活性キャビテーションを生成する手法を見出すことができれば、前節で述べた SHS とは異なるアプローチでキャビテーション生成を効率化できる可能性がある。場合によってはそのような新規手法と SHS とを組み合わせることも考えられる。なお、定在波を用いて治療を行うことができればそのような工夫なしに低強度で超音波治療が可能と考えられる。しかしながら、体内の任意の場所に定在波を発生させることは非常に難したため、進行波の条件で治療を行わざるを得ない(新規手法が必要である)。

まず定在波でキャビテーションが低強度で生成する機序について考察する。Figure 3.2.1 に示すように、定在波条件では、生体あるいは溶液中に存在すると考えられる気泡核(図中 nano bubble と記載)が放射圧により音圧の腹に集まること知られており[66-72]、こ

れが定在波条件で効率よくキャビテーションが生成する機序とされている。すなわち、気泡核から共振までの気泡成長プロセスが効率的に行えるのである(Fig. 3.2.2)。前節において、気泡成長のプロセスとして整流拡散の説明を行ったが、定在波ではこの整流拡散に加えて気泡合体により気泡成長が行われるのである。定在波条件で非常に低強度でキャビテーション生成が行われるということは、定在波条件では気泡同士の合体が主となって気泡成長が進行すると考えられる。

さて、Fig. 3.2.3に記載したように、このように合体が主たる機序であるとき、問題となるのは合体が進みすぎて共振サイズを超えてしまうことである。共振サイズを超えた気泡は、超音波の反射体としての働きしか持たず、キャビテーション生成上は有益ではないからである。では、実際に定在波を用いてキャビテーション化学作用を生じる時にこのような気泡サイズが大きくなりすぎることは問題になっていないのであろうか。否、極めて重大な問題となっている。それを示すのが Fig. 3.2.4 である。定在波を用いた化学活性キャビテーション生成には、図に示すいずれかの手法を使うことが必須となっている。それは、超音波照射を水面に向かって行い、気液界面を利用すること[73, 74]と、水面に平行に超音波照射を行い、反応溶液を回転する[66, 68]というものである。いずれにおいても定在波の腹に存在する気泡に **agitation** を行っていることになる。後者の場合には自明であるが、前者においても気液界面は自由界面であり、腹の位置が時間的に変化するため同様の効果を有すると考えられる。さて、ここで後者の容器回転系の実験系を用いた化学反応生成において興味深い知見が得られている。それは、適切な長さでパルス照射を行うと化学反応の効率化が行えるというものである(Fig. 3.2.5)。3ms 程度の長さのパルス長が最適であるとされている[22]。10W/cm<sup>2</sup> 程度の超音波を用いた場合、気泡が共振気泡程度に成長するのにその程度の時間が必要と考察されている。このため、気泡核から気泡が成長して大きくなりすぎる前に超音波パルスを **off** にしてまた気泡核から成長を再度生じることにより効率的に化学活性キャビテーションを生じるのである。

### 3.2.2 新規超音波照射手法の提案

本節においては、この現象に着目し、容器回転および **on/off** により生じる現象を容器回転なしに生じることを目標として検討を行った。気液界面も、容器回転も用いずに化学活性キャビテーションを生じることが可能となれば、生体内の任意の部位で発生することが可能であると考えられたからである。

このため、新規に **agitation** 手法を考案する必要がある。このベースとしたものが Fig.3.2.6 に示すような球面を円周方向に区切った複数の圧電素子からなるアレイ型の超音波照射装置を用いて形成可能な **spiral** 音場である[75]。アレイ型装置では、**Spiral** 音場について Fig. 3.2.7 を用いて説明する。アレイ型の超音波照射装置においては、各素子に独立の振幅と位相を与えられるよう構成されている。通常の収束音波を形成する際には、焦点位置に対して同じ位相で到達するように各素子の位相を設定する。したがって、幾何学的

焦点位置に収束させる場合にはかつ圧電素子に同じ位相の波形を入力することになる。これに対して、**spiral** 音場では、円周方向に位相差を与えた形で超音波を照射する。円周方向に一周すると元の位相差に戻るよう設定する。原点となる位置から円周方向に $\Theta$ ずれた素子には $\Theta$ 分の位相差を与えることになる。このようにして生成される **spiral** 音場は、同一位相を持つ破面が周方向にねじれ、木ネジのような形状をとることになる。このため、**spiral** 音場と称する。**Spiral** 音場の焦点面上での強度分布を Fig. 3.2.8 に示す。通常収束音場と異なり、幾何学的焦点には零点となり、ピークは存在しない。その代わりに幾何学焦点近傍にドーナツ状に強度の大きい領域が生成されることになる。なお、Fig. 3.2.9 から明らかのように、**spiral** 音場の形成にあたって位相差の与え方が時計回りと反時計回りの二つが考えられる。本節においては、時計回りと反時計回りとを交互に行うことの効果を検討する。つまり、Fig. 3.2.7 における容器の回転を **spiral** 音場に、同図における on/off をスパイラル音場の向きの切り替えにそれぞれ置き換えることが可能かどうかを調べる。

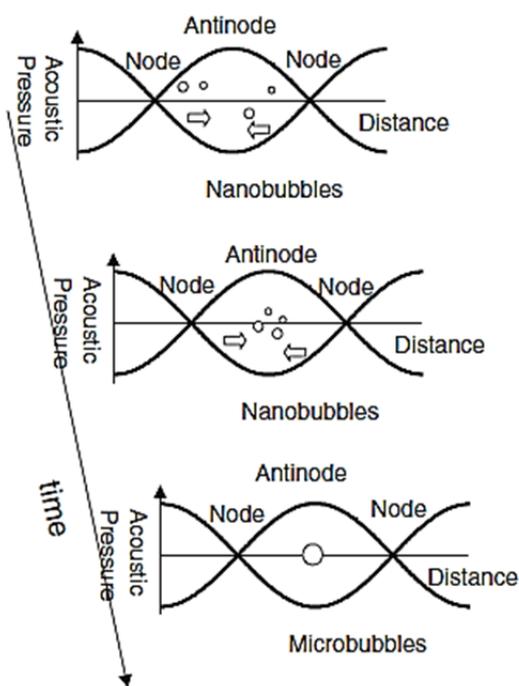


Fig. 3.2. 1 定在波でキャビテーションが生じる機序  
(Azuma ら[72])

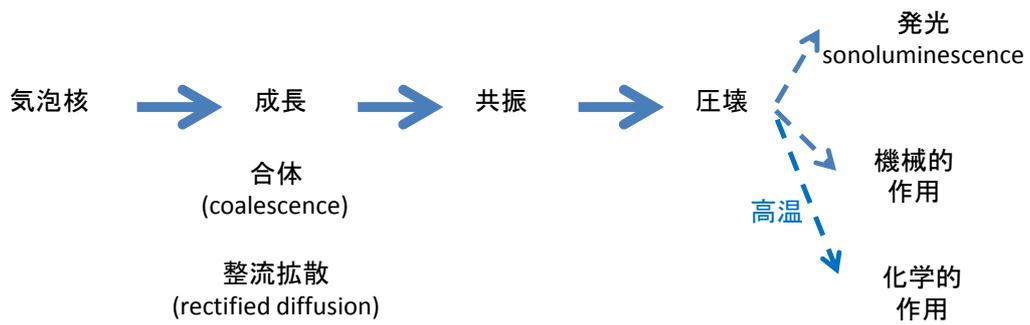


Fig. 3.2. 2 キャビテーションの作用が生じるまでのプロセス

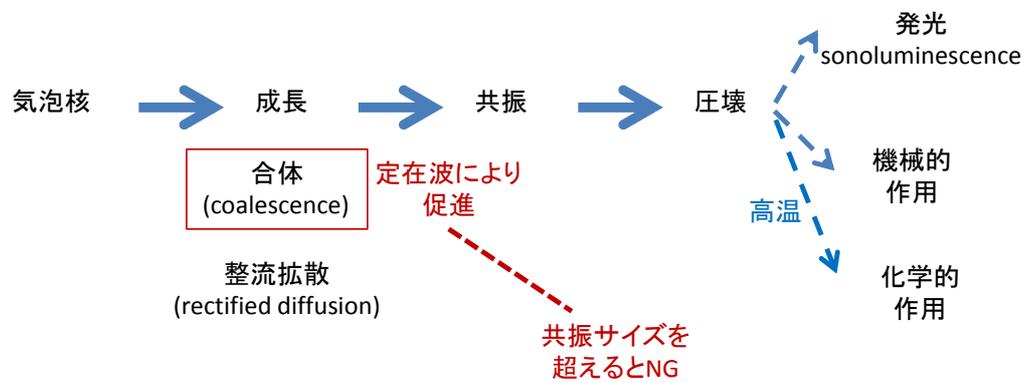
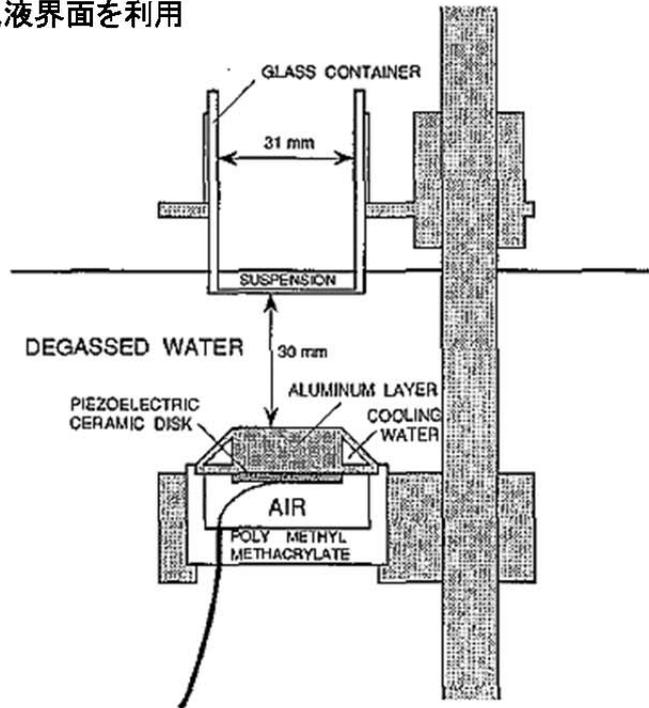


Fig. 3.2. 3 キャビテーションの作用が生じるまでのプロセスの定在波による促進

a. 気液界面を利用



b. 反応容器を回転

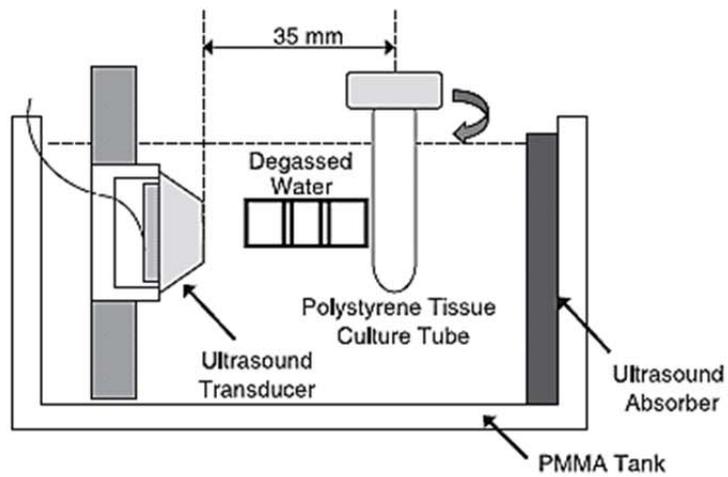


Fig. 3.2. 4 定在波条件で化学作用を生じるために必要なセットアップ  
(Yumita ら[74]および Sacks ら[67])

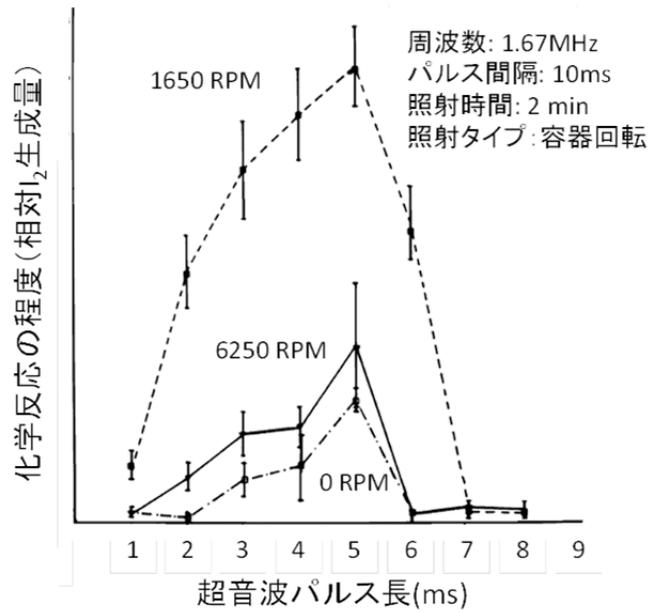


Fig. 3.2. 5 容器を回転する場合の超音波の on/off による化学反応の促進 (Sacks ら[67])

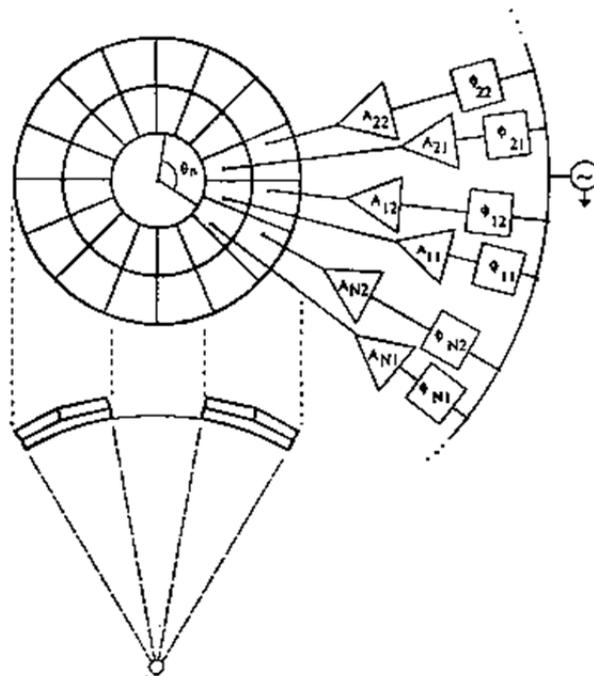
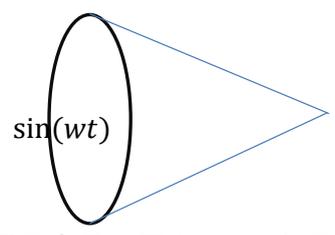


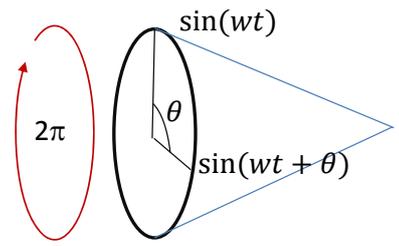
Fig. 3.2. 6 アレイ型超音波照射装置の例 (Kawabata ら[76])

通常収束音場



各圧電素子に同じ位相の波形を入力

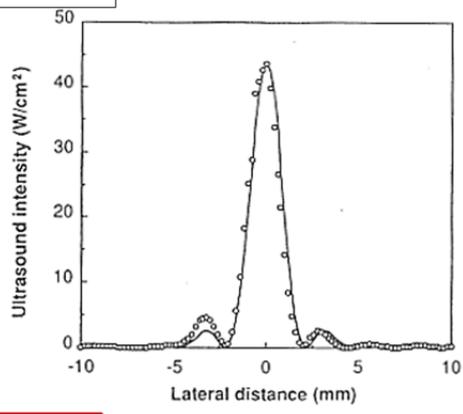
Spiral音場



一周して2πの位相差が生じるよう波形を入力

Fig. 3.2. 7 spiral 音場

通常収束音場



Spiral音場

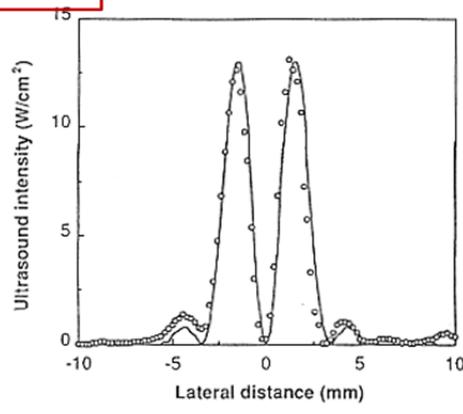


Fig. 3.2. 8 spiral 音場により得られる焦点面音響強度分布 (Kawabata ら[76])

### 3.2.3 実験方法

超音波照射源 (トランスデューサ) : 直径 120mm、焦点距離 120mm の 2トラック 32 チャンネルのアレイ型で、周波数が 0.75 MHz のものを使用した。圧電素子は富士セラミクスより購入した (C-21)。(Fig. 3.2.10 参照)

超音波照射系 : Figure 3.2.10 に実験に用いた照射系の構成を示す。パソコンで制御されたチャンネル数分の正弦波発生回路が MOS FFT 方式の駆動回路につながっており、Fig. 2.1.11 に示す超音波トランスデューサの各素子にあらかじめ設定された振幅と初期位相の正弦波を与える。超音波トランスデューサはアクリル製の水槽に保持されている。また、水槽の逆側は、超音波が反射することを防止するために、40 度の角度をつけてある。水槽内部には脱気水が満たされており、また、ホルダーを用いて内径 12mm のポリスチレン製試験管 (コーニング、培養チューブ 430172 コーティングなし) が反応容器として用いられる。

化学活性キャビテーションの評価 : Figure 3.2.11 に示すよう、超音波トランスデューサの焦点位置に配置した反応溶液中に超音波を照射した。キャビテーション生成の評価は、化学反応の進行を定量することで行った。用いた反応は、Fig. 3.2.11 に示すヨウ素イオンの酸化反応である。ヨウ素酸化反応は感度が高く、また、反応生成物である三ヨウ化物イオンに由来する 350nm の吸光度を測定することで簡便に反応量が測定できることから、超音波の化学作用を調べる際に広く用いられている[66, 77-79]。さらに、ヨウ素イオンの酸化反応を用いる場合、炭素-ハロゲン結合を有する化合物を共存させることにより反応が促進されることがわかっている。歴史的には四塩化炭素が用いられてきたが、毒性および水に対する溶解度が低いことに鑑み、今回は抱水クロラールを用いることとした。また、ヨウ素イオンの酸化反応は、生成した三ヨウ化物をヨウ素でんぷん反応により紫色に呈色させて行う手法も知られているが、予備検討において、超音波照射時間に対する線形性が不良であったため、今回は三ヨウ化物を直接定量することとした。なお、ヨウ素の酸化反応以外には、Fricke 反応(鉄二価イオンの酸化)[80]が用いられることもあるが、感度が低い。

実験手順 : 今回の実験手順を Fig. 3.2.12 に示す。特に 3. における分光度の測定は誤差を最少にするために、超音波照射から測定までの時間が同じになるよう注意して行った。

音場計測 : 超音波音場の測定には PVDF ニードル型ハイドロフォン (Medicotechnisk institute 社製、直径 0.6mm) を用いて行った。

音響パワ計測 : 今回の検討において、通常収束音場と spiral 音場の効果を比較する際の超音波の強さに関する指標として超音波強度は不適切であると思われたため、超音波パワを

指標とすることとした。このパワ測定は放射圧を用いる剛球法と呼ばれるものである[81, 82]。今回は、剛球でなく、板を用いて測定を行った[65]。

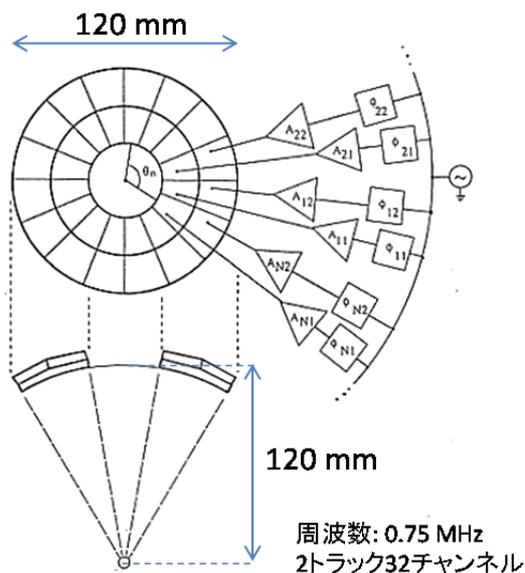


Fig. 3.2. 9 実験に用いたアレイ型トランスデューサ  
(Kawabata ら[76])

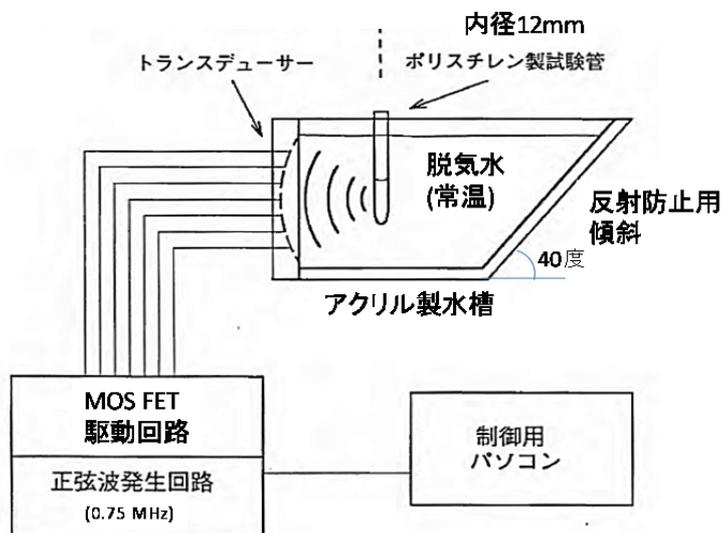
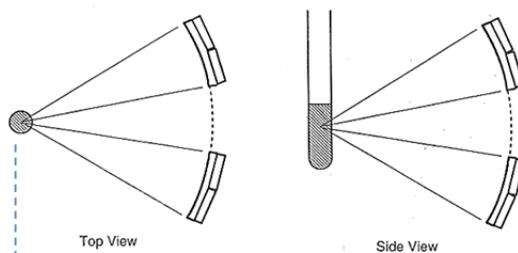


Fig. 3.2. 10 実験に用いた超音波照射系

粘度調整および計測：今回、spiral 音場の切り替えの効果を調べる上で、粘性が重要なパラメータである場合、生体への適用が困難であると考えられたため、反応溶液をリン酸緩衝液と血液中の粘度に調整した溶液それぞれを用いた実験を行った。粘度の調整には、アガ

コースを用いた。粘度の計測は、回転粘度計(芝浦機械、Vismetron)を用いて行った。

### a. 超音波照射配置



CA-CAVの計測  
⇒ 化学反応の進行速度



### b. 超音波照射による $\text{I}_3^-$ の生成

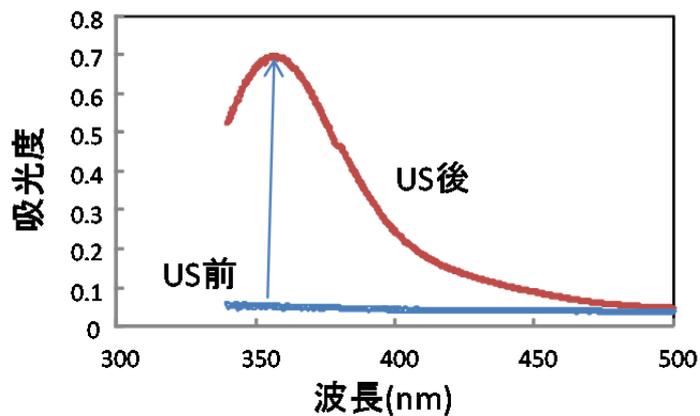


Fig. 3.2. 11 超音波化学作用の評価系

## 実験手順

1. 0.1 MKI(反応基質)+0.1M抱水クロラール(反応促進剤)を含む水溶液 4mlを反応容器に入れ水槽内に配置する
2. 超音波照射条件を設定し、所定時間(標準1分間)超音波を照射
3. 直ちに反応容器を1cm光学セルに移し替え、分光光度計にて350nm 近辺の吸光度を測定する
4. あらかじめ測定しておいた対照溶液および校正曲線より、超音波照射により生成した $I_3^-$ の量を算出する

Fig. 3.2. 12 実験手順

### 3.2.4 結果

Figure 3.2.13 に、切り替え周期 10ms の spiral 音場によるヨウ素酸化反応の収量を照射時間を変えながら測定した結果を示す。超音波パワーは 18W であり今回用いた最大値となっている。図から明らかなように、超音波照射時間最大 (900 秒) まで、照射時間が長くなるのに対応して、直線的に反応収量が増加している。この結果より、本系における反応速度が 0 次とみなせることがわかる。これは、貴質濃度(0.1M)が最大反応量に比べて非常に高いためである。以降反応速度の算出はいずれも 0 次反応を仮定して行っている。

Figure 3.2.15 に spiral 音場切り替えを切り替え周期を変更して行った際の反応速度を計測した結果を示す。超音波強度は 18W である。切り替え周期が 1~10ms の間の場合に反応速度はそれ以外の切り替え周期の場合に比べて著しく高いことがわかる。なお、図中単純収束音場を on/off した際の結果も合わせて示してある。spiral 音場に比べて反応速度が全般に低く、かつ特定の周期で最適化されることもないことがわかる。なお、spiral 音場と単純収束音場は音響パワを同じして比較しているため、ピーク音響強度は前者の方が約 3 倍小さいことになる。

Figure 3.2.15 に spiral 音場(切り替えあり/なし)および単純収束音場による化学反応速度の超音波パワ依存性を示す。それぞれ音響パワ 10W までは音響強度に対して線形に反応速度が上昇している。ただし、spiral 音場を切り替えた場合には、10W 以上の音響パワで若干飽和する現象が見られた。また、反応が生じるパワ閾値については差が見られない。

Figure 3.2.16 に水中および粘度を血液と同等に設定した溶液それぞれで spiral 音場の切り替え周期を変化させた際の反応速度の変化を調べた結果を示す。図中明らかなように、両者の結果はほぼ同じであり、粘度による最適切り替え周期の違いは見られなかった。

Figure 3.2.17 に、超音波の幾何学焦点を反応容器の中心から移動して超音波を照射した場合の反応速度の変化を spiral 音場(切り替えあり)および通常収束音場について調べた結果を示す。Spiral 音場および通常収束音場いずれも、容器中心からずらした位置で照射し

た方が反応速度は高かった。最適位置はそれぞれ 6 および 4mm であった。また、いずれも容器中心位置で照射した場合に比べて最適位置では反応速度が約 2 倍に上昇していることがわかった。

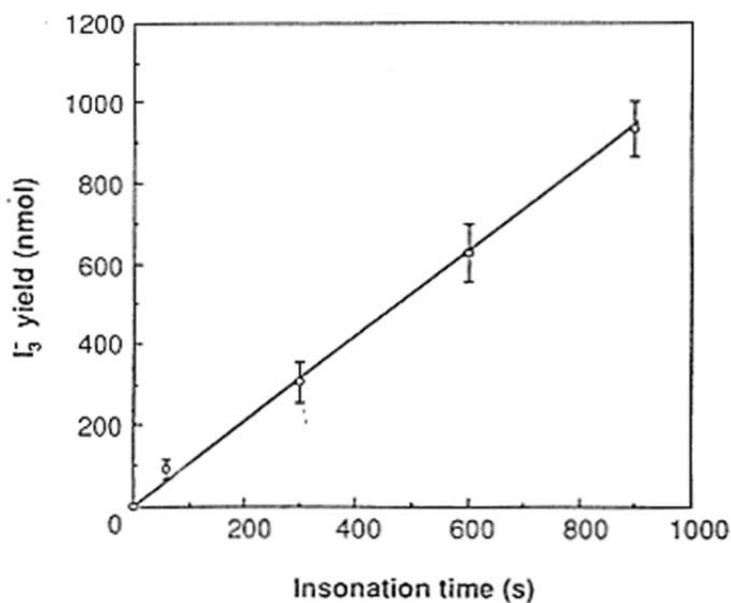


Fig. 3.2. 13 超音波照射時間と化学反応収量との関係 (Kawabata ら[76])

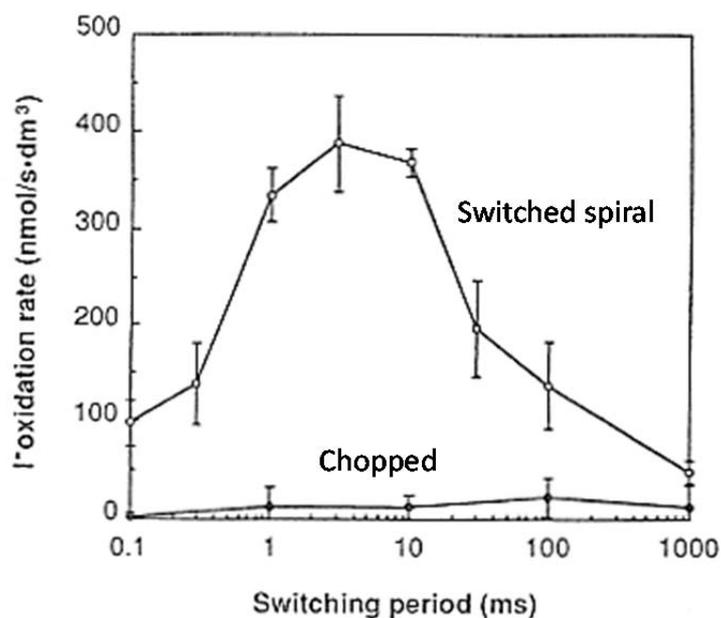


Fig. 3.2. 14 spiral 音場の周期的切替が化学反応速度に及ぼす効果(1) (切替周期依存性)(Kawabata ら[76])

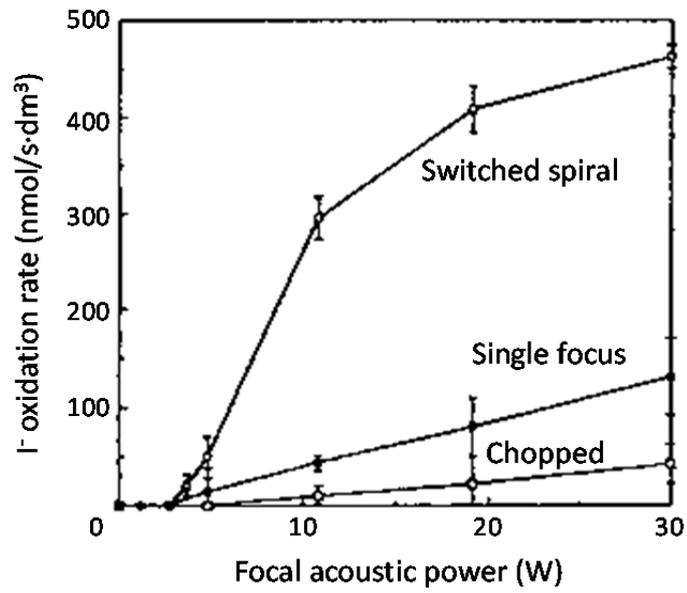


Fig. 3.2. 15 spiral 音場の周期的切替が化学反応速度に及ぼす効果(2)  
(超音波パワ依存性)(Kawabata ら[76])

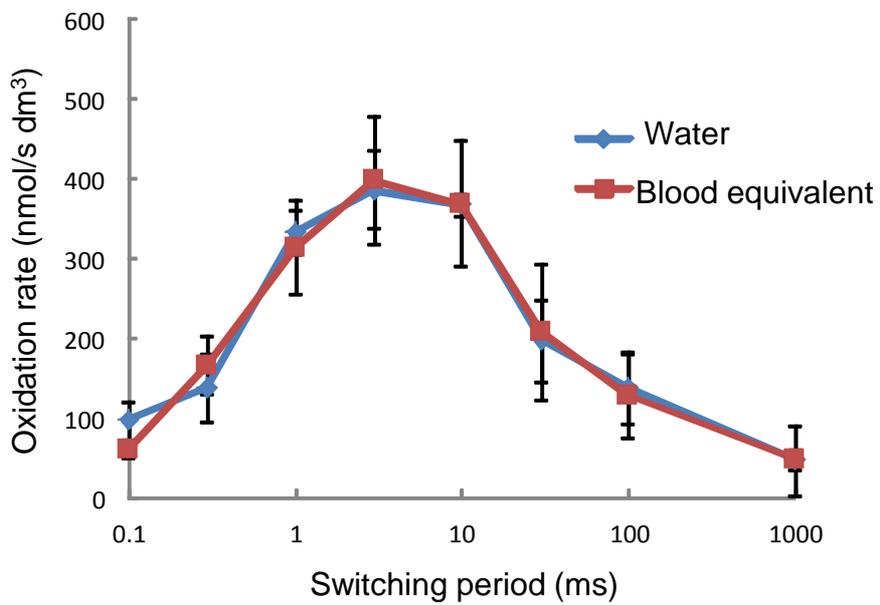


Fig. 3.2. 16 spiral 音場の周期的切替が化学反応速度に及ぼす効果(3)  
(粘度の影響)(Kawabata ら[76]より)

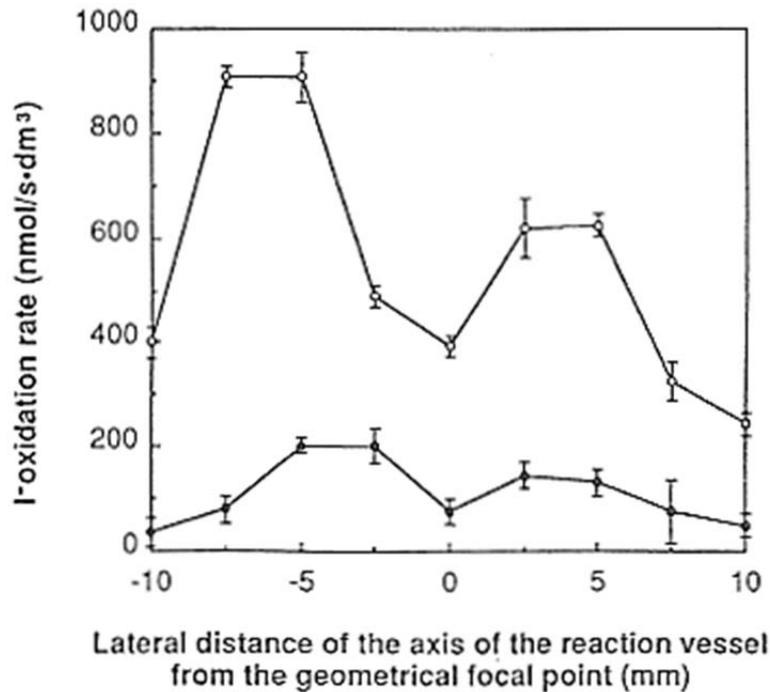


Fig. 3.2. 17 spiral 音場の周期的切替が化学反応速度に及ぼす効果(4)  
(焦点と容器位置との関係)(Kawabata ら[76])

### 3.2.5 考察

まず、気液界面を用いることなく、また反応容器を回転することなく化学反応を生じるキャビテーションを生成することができたことは極めて重要である。超音波の化学作用を用いたがん治療を検討する上で、初めて生体の任意の部位で作用を生じる可能性が示唆されたことになる。調べた範囲では、気液界面も反応溶液回転も用いることなく高効率にキャビテーションを生成した例はない。予備検討において、反応溶液の温度上昇が 300 秒の照射で 2°C 以下であることを確認しており、熱的な要素は排除してよく、純粋にキャビテーションが効率よく生成しているものと考えられる。

今回の spiral 音場の方向切換による効果は、最適周期がこれまでの容器回転系における on/off 最適周期と同程度であることから、機序も同じではないかと推察される。すなわち、気泡核の合体が促進されており、かつ適切な(気泡が大きくなりすぎない)時間で agitation が加えられることにより共振気泡程度のサイズで気泡サイズがリセットされるという機序である。

また、粘度を変化させた場合でも spiral 音場切り替えの最適周期が変化しないという実験結果が得られたことから、今回得られた効果が汎用的であることが予想される。化学反

応ではなく細胞（赤血球）を対象にして今回と同様の検討を行い、最適周期はまったく同じであることがわかっている[76]。

**spiral** 音場でキャビテーションが促進される機序に関して、気泡の合体以外の整流拡散が促進されている可能性は低い。Figure 3.2.17 に **spiral** 音場を切り替える際の超音波波形を示す。入力波形では切り替え時に高調波成分が加わり、この成分により気泡の振動状態が影響を受け結果として整流拡散が変化する可能性を予想させる。しかしながら、今回用いた圧電素子は **Q** 値が高く[83]高周波成分を照射することはない。実際にハイドロフォンで測定した超音波波形では、若干振幅が小さくなるのみであり、変化はほとんどない。このような微小な変化で整流拡散が影響を受けることはないと考えられる。

今回得られた、**spiral** 音場の生体適用に関しては、超音波照射源が特定の形状である必要があることと超音波を収束させる必要があることが課題である。トランスデューサの周方向に位相を変化させる必要があるためである。このような制限があるため、装置構成が複雑になるのは避けられず、たとえ低い超音波強度を用いて治療が可能であったとしても、位相制御を行うため装置構成としては従来の治療装置とほとんど変わらないことも予想される。

また、Fig. 3.2.17 に示された結果は、**spiral** 音場の効果が反応容器との相互作用により生じている[67]ことを示唆しており、この点も実用上の懸念となりうる。生体中では特定の形状の構造を仮定した超音波照射は困難であり、**spiral** 音場の効果が対象に異なる可能性があるからである。

実用性についての議論は難しいが、**spiral** 音場は従来容器を回転するあるいは気液界面への超音波照射が必要であったキャビテーションの化学作用生成をそのような特殊な制限なしに行える新規な超音波照射手法として貴重である。次節以降検討する SHS の reference として用いることとする。

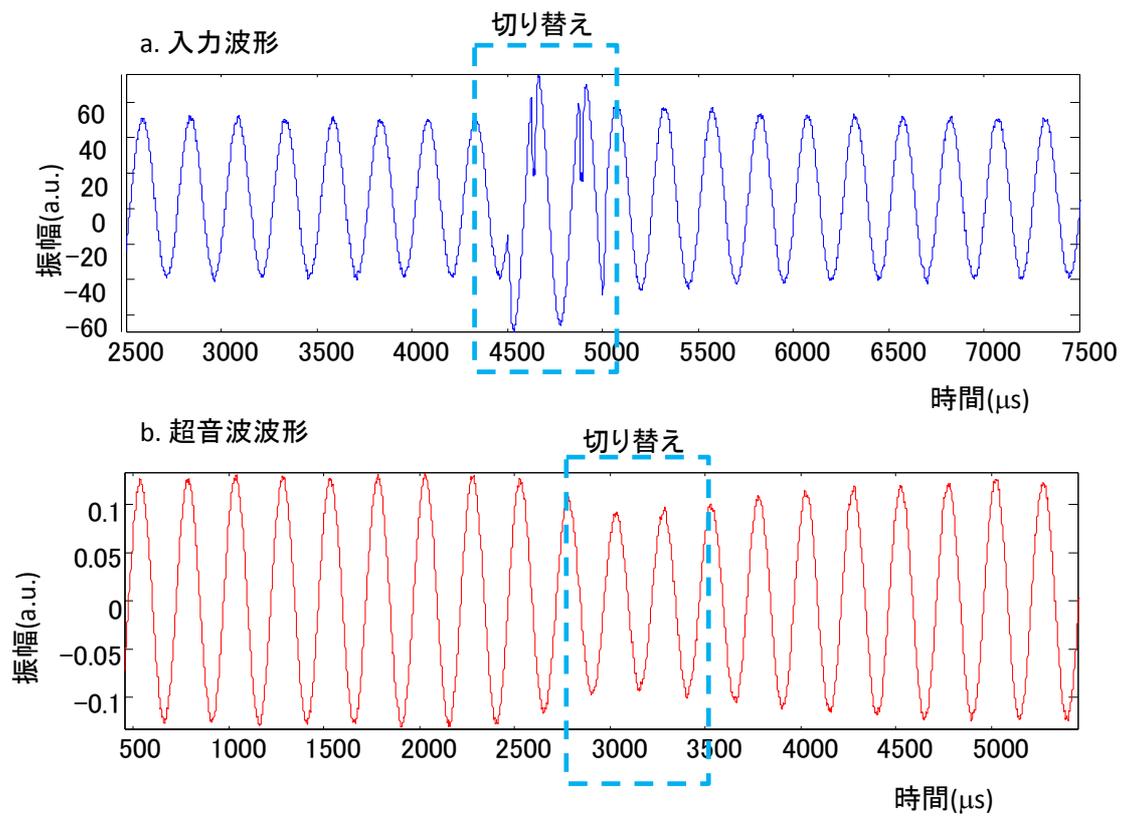


Fig. 3.2. 18 spiral 音場の切替時の超音波波形の変化

### 3.3 第二高調波重畳法(SHS)によるキャビテーション化学作用の促進

前節にて、キャビテーションプロセス中の成長特に気泡同士の合体を促進すると思われる spiral 音場の切り替えの効果が明らかになった。この spiral 音場を適時 reference としつつ、3.1 節にて理論的考察を行った第二高調波重畳法がキャビテーションの化学作用を効率的に生成するかどうかを実験的に検討することとした。

本検討においては、Fig. 3.3.1 に示すように、アレイ型トランスデューサにトラック別に基本波と高調波とを照射するよう構成することで焦点部位にて各超音波が重畳されるような構成を取ることにした。また、前章の spiral 音場との効果の比較を行うため、できるだけ実験条件は同一とすることにした。このため、化学活性キャビテーションを計測する方式をヨウ素イオンの酸化とすることと超音波の強さの指標として音響パワーを用いた。

#### 3.3.1 実験方法

超音波照射源 (トランスデューサ) : 直径 120mm、焦点距離 120mm の 2 トラック 32 チャンネルのアレイ型で、外側のトラックには周波数 0.75 MHz のものを、内側のトラックには周波数 1.5 MHz をそれぞれ使用した。圧電素子は富士セラミクスより購入した (C-21)。(Figure 3.3.2 参照)

超音波照射系 : Figure 3.3.2 に実験に用いた照射系の構成を示す。パソコンで制御されたチャンネル数分の正弦波発生回路が MOS FFT 方式の駆動回路につながっており、Fig.3.3.2 に示す超音波トランスデューサの各素子にあらかじめ設定された振幅と初期位相の正弦波を与える。超音波トランスデューサはアクリル製の水槽に保持されている。また、水槽の逆側は、超音波が反射することを防止するために、40 度の角度をつけてある。水槽内部には脱気水が満たされており、また、ホルダーを用いて内径 12mm のポリスチレン製試験管 (コーニング、培養チューブ 430172 コーティングなし) が反応容器として用いられる。

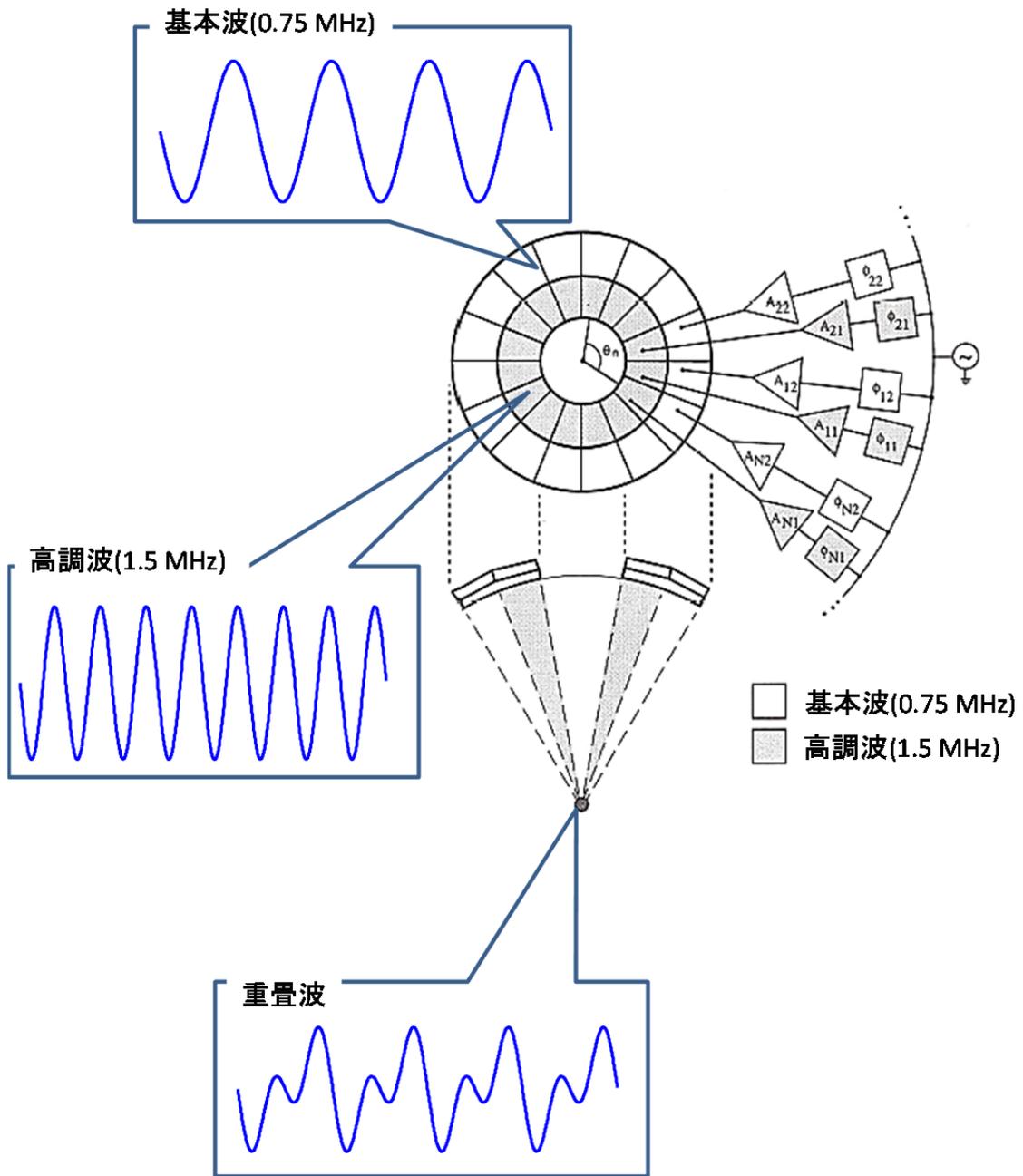
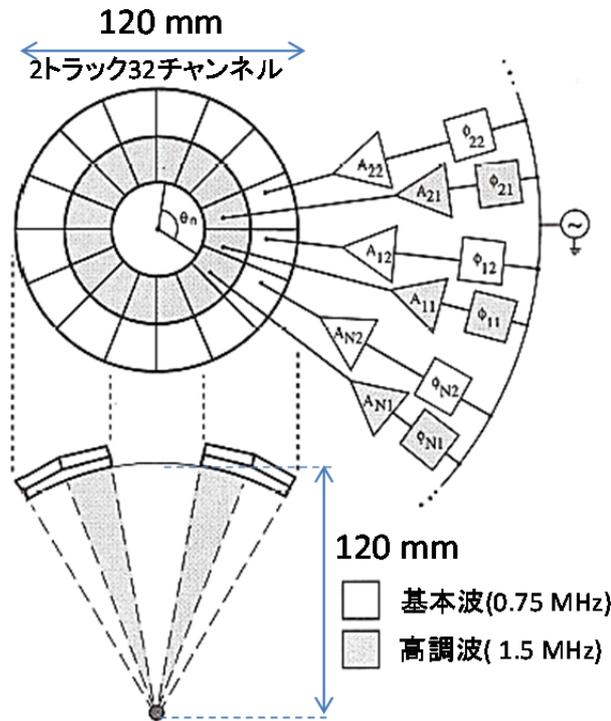


Fig. 3.3. 1 アレイ型トランスデューサを用いた高調波重畳

a. トランスデューサ



b. 照射系

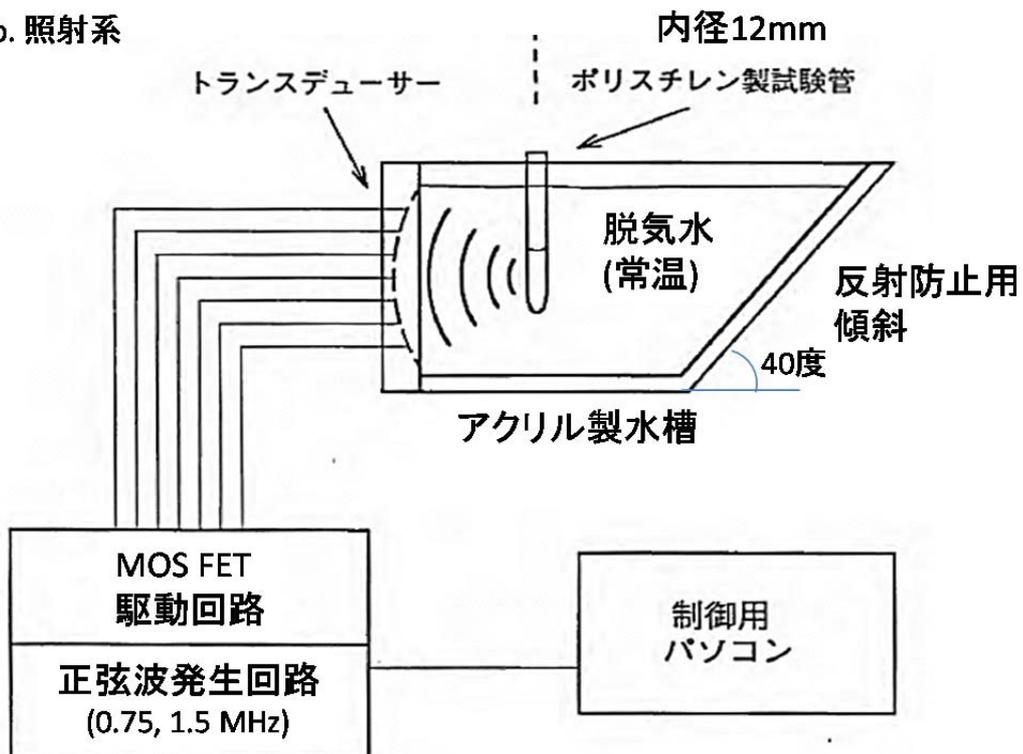


Fig. 3.3.2 トランスデューサおよび超音波照射系

化学活性キャビテーションの評価：Figure 3.2.12 に示すよう、超音波トランスデューサの焦点位置に配置した反応溶液中に超音波を照射した。キャビテーション生成の評価は、化学反応の進行を定量することで行った。用いた反応は、Fig. 3.2.12 に示すヨウ素イオンの酸化反応である。ヨウ素酸化反応は感度が高く、また、反応生成物である三ヨウ化物イオンに由来する 350nm の吸光度を測定することで簡便に反応量が測定できることから、超音波の化学作用を調べる際に広く用いられている。さらに、ヨウ素イオンの酸化反応を用いる場合、炭素ハロゲン結合を有する化合物を共存させることにより反応が促進されることがわかっている。歴史的には四塩化炭素が用いられてきたが、毒性および水に対する溶解度が低いことに鑑み、今回は抱水クロラールを用いることとした。また、ヨウ素イオンの酸化反応は、生成した三ヨウ化物をヨウ素でんぷん反応により紫色に呈色させて行う手法も知られているが、予備検討において、超音波照射時間に対する線形性が不良であったため、今回は三ヨウ化物を直接定量することとした。

実験手順：今回の実験手順は Fig. 3.2.13 に示すとおりである。特に 3. における分光度の測定は誤差を最少にするために、超音波照射から測定までの時間が同じになるよう注意して行った。

音場計測：超音波音場の測定には PVDF ニードル型ハイドロフォン（Medicotechnisk institute 社製、直径 0.6mm）を用いて行った。

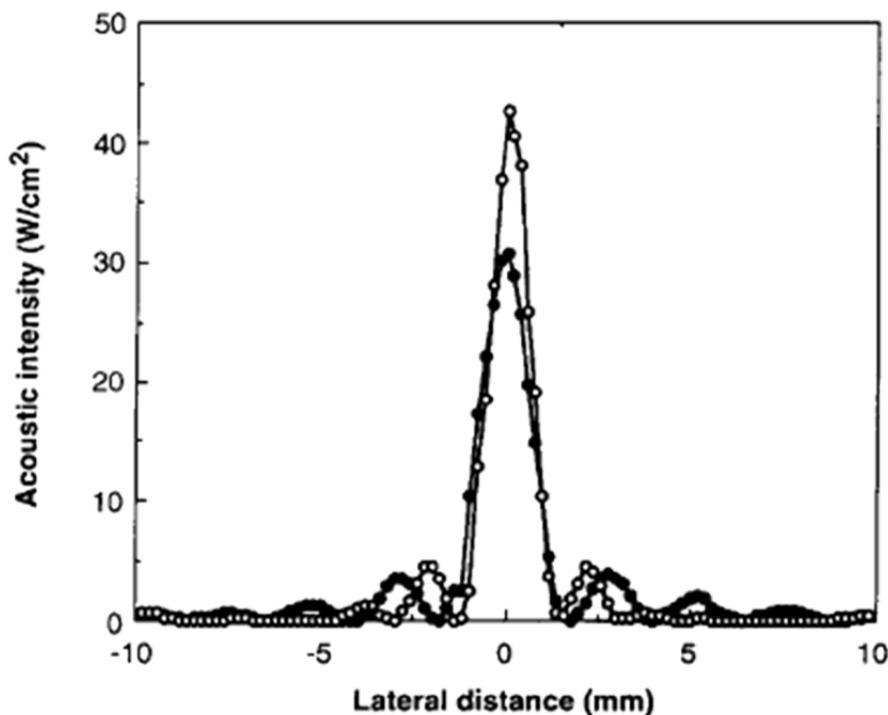


Fig. 3.3. 3 焦点における基本波および高調波の強度分布  
(Kawabata ら[63])

音響パワ計測：今回の検討において、通常収束音場と spiral 音場の効果を比較する際の超音波の強さに関する指標としては超音波強度は不適切であると思われたため、超音波パワを指標とすることとした。このパワ測定は放射圧を用いる剛球法と呼ばれるものである。今回は、剛球でなく、板を用いて測定を行った。

### 3.3.2 結果

Figure 3.3.3に今回用いたアレイ型トランスデューサの0.75 MHzおよび1.5MHzの角周波数の焦点面における音響強度の分布を示す。ほぼ同じ焦点幅であることがわかる。このため、両波の重畳は問題ないと思われる。

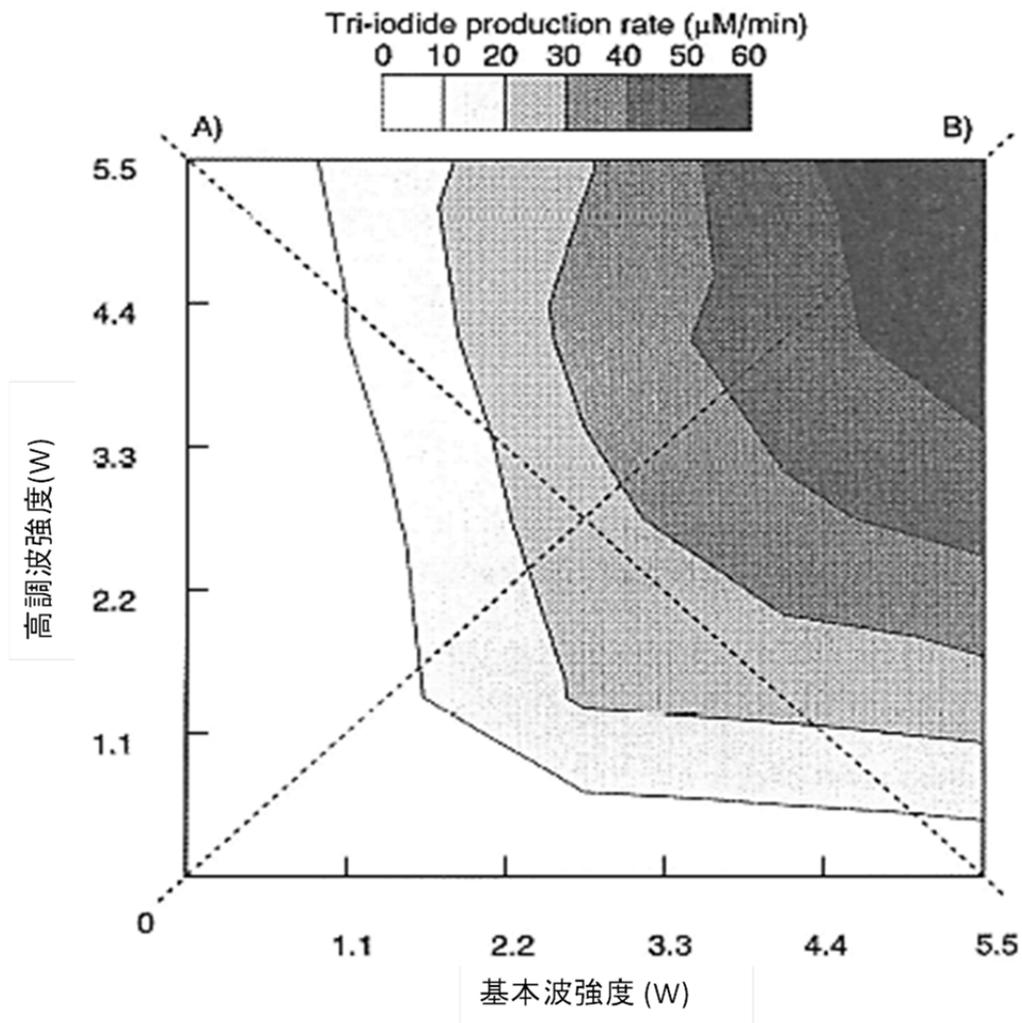


Fig. 3.3. 4 酸化反応速度の基本波と高調波の強度変化に対する依存性 (Kawabata ら[63])

Figure 3.3.4 に、基本波と第二高調波をそれぞれ強度を変えて超音波を照射し、ヨウ素酸化反応の反応速度を計測した結果を二次元等高線マップとして表示する。図中、基本波と高調波それぞれ単独ではほとんど反応が生じていない。なお、高調波に関しては、予備検討で図の最大強度の3倍まで強度を上げても反応は進行しないことがわかっている。この図においては、A)で示される線よりも等高線が下に凸であるときに基本波・高調波の重畳効果ありとみなせるので、重畳効果は見られることが確認できる。

Figure 3.3.5 に、Fig.3.2.5 の A)に相当する、トータルの音響パワーが同一で音響パワー中の基本波の割合を変化させた場合の反応速度の違いを示す。横軸が0すなわち高調波のみのときには反応の閾値以下であり、また100%の基本波のみの時も、反応速度は有意に両波を重畳した場合に比べて小さい。重畳時には両波が1:1で行われたときに最も反応速度が高いことがわかる。

Figure 3.3.6 に Fig.3.3.4 の B)に相当する、高調波重畳を行った際の反応速度の音響パワー依存性を基本波単独および高調波単独と合わせて示す。高調波単独では、今回実験を行った強度域ではまったく反応は生じていない。基本波単独および重畳ではそれぞれ強度に対して線形に反応速度が上昇している。さらに、重畳した際には反応が生じる閾値が停会していることがわかる。基本波単独の約1/2以下となっている。

Figure 3.3.7 に Fig.3.3.6 の結果に前節の spiral 音場の結果を追記して表示する。今回の重畳法が、spiral 音場よりも効率が約2倍程度高く、また、反応が生じる閾値も1/2程度に低下していることがわかる。

Figure 3.3.8 に、各種切り替え照射を行った際の反応速度の変化を示す。黒丸は高調波重畳を行い1:1の duty 比で on/off を行った際の結果である。切り替え時間が長いほど反応速度が長くなる傾向が得られた。白丸は、基本波と高調波とを交互に照射した際の結果である。前章の spiral 音場の切り替えのように3ms程度に最適値が存在することがわかった。黒四角と白四角は基本波および高調波をそれぞれ1:1の duty 比で on/off した際の結果である。基本波に関してはほぼ高調波重畳と同じ結果であり、切り替え周期が長い場合に高い反応速度が得られた。高調波単独はまったく反応が生じていない。

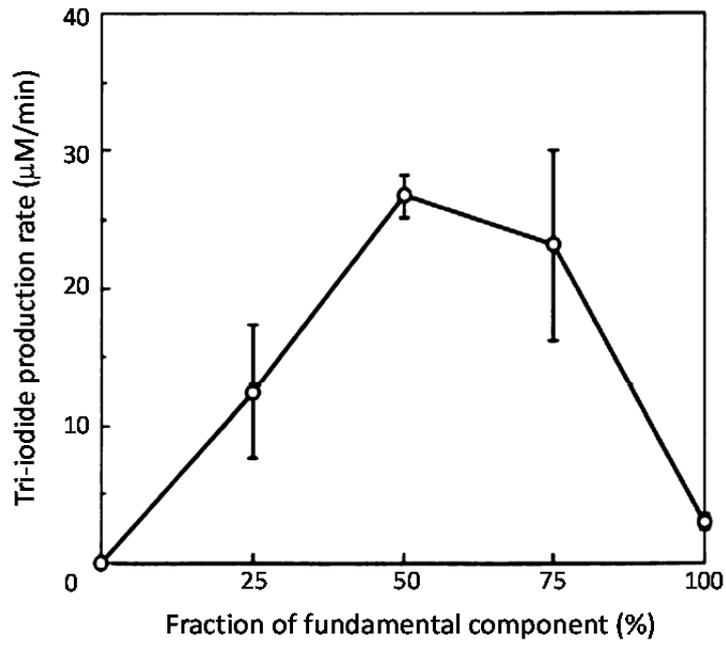


Fig. 3.3.5 酸化反応速度の高調波と基本波との比率に対する依存性  
(Kawabata ら [63])

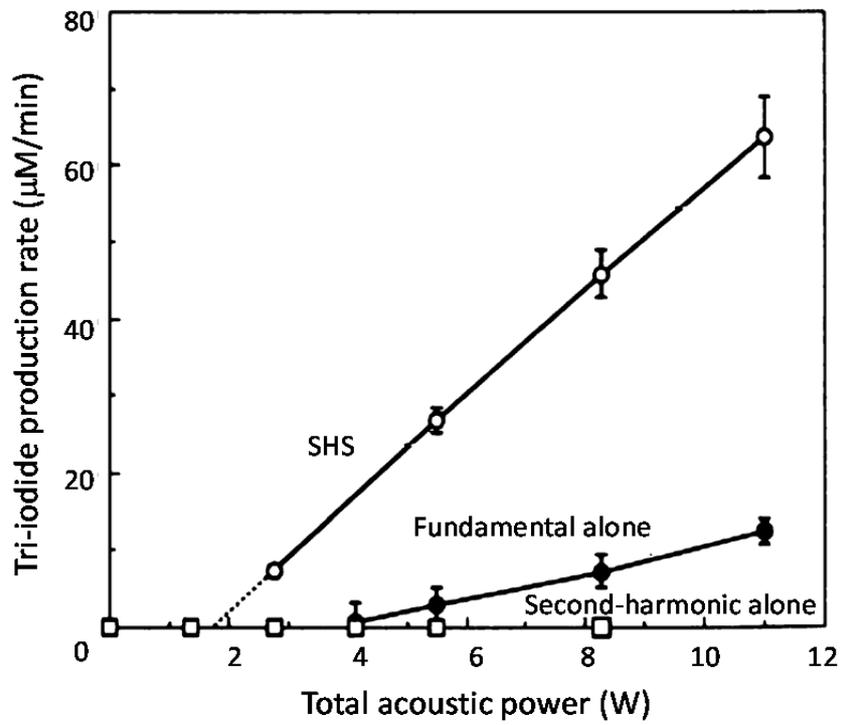


Fig. 3.3.6 高調波重畳による反応閾値の低下  
(Kawabata ら [63])

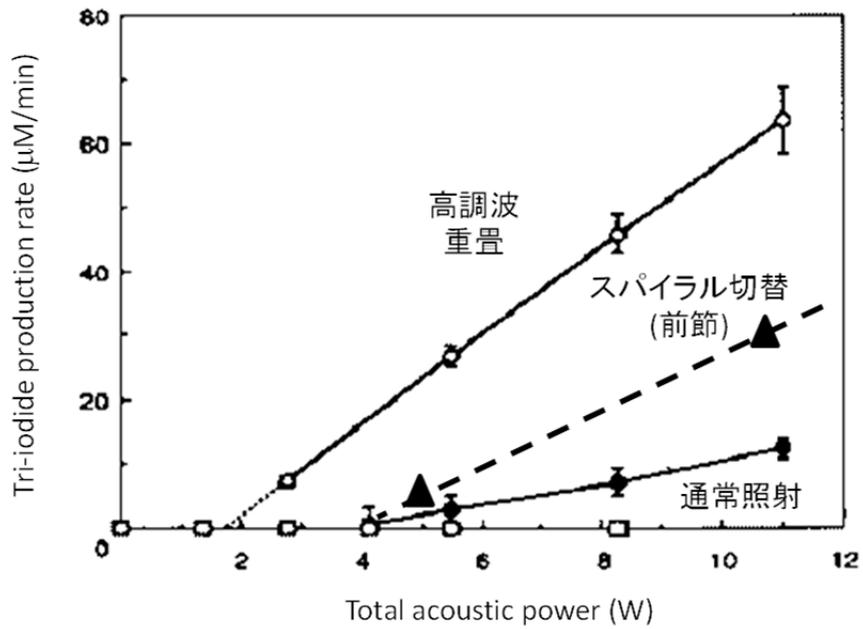


Fig. 3.3. 7 高調波重畳と spiral 音場との比較  
(Kawabata ら [63])

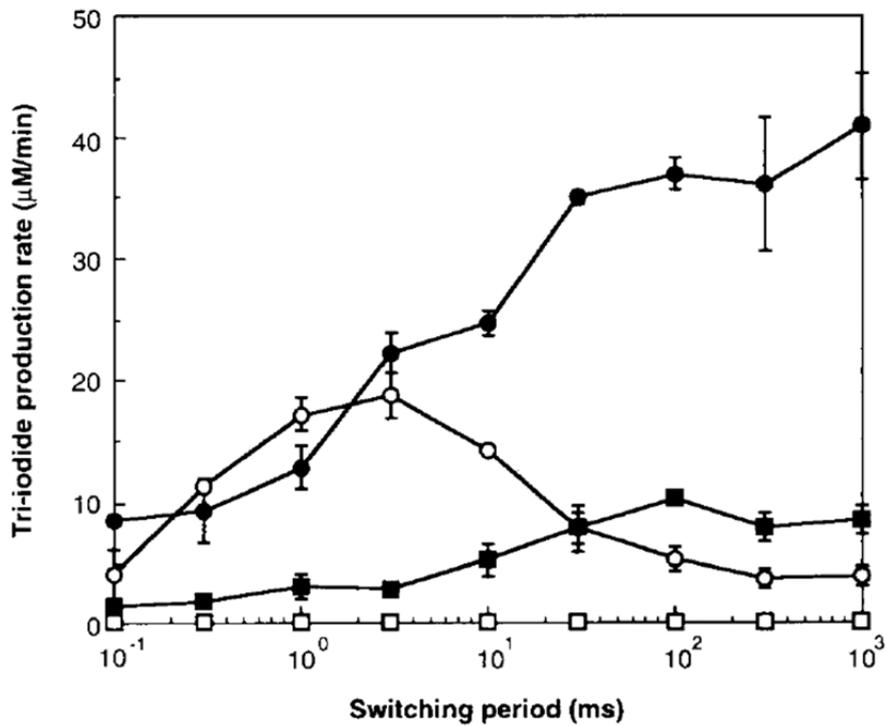


Fig. 3.3. 8 反応速度の音場の周期的切り替えに対する依存性  
(Kawabata ら [63])

### 3.3.3 考察

前節の spiral 音場切り替えに続いて、本節で検討した高調波重畳法も化学活性キャビテーションを効率化できることが明らかになった。特に、前節と異なり、キャビテーション生成に必要な音響強度（パワ）の低下効果が得られたことは重要である。本研究で最終目的とするターゲティングを必要としない超音波治療の実現に向けて重要な知見である。さらに、反応速度そのものも高調波重畳の方が spiral 音場を用いる場合よりも高いため、有望である。

Figure 3.3.8 で示す結果より、高調波重畳による反応速度向上の機序は、spiral 音場とは異なると想定される。前節で見られた切り替え周期 3ms 付近が最適値となることはなく、逆にそれ以上の長い周期での切り替えでないと効果が発揮されてない。連続的な照射が必要であることがわかる。次節で検討するが、機序については、より詳細な検討を行うため実験系の変更が必要である。興味深いのは、基本波と高調波とを交互に照射すると、前節の spiral 音場のように 3ms 程度に最適値を有することである。同じ高調波を活用しながら重畳すると長い時間の照射が必要で、交互に照射すると短い(~3ms)時間の照射が効率よく反応を生じることになる。絶対的な反応速度の向上が連続波での高調波重畳の 1/3 程度と小さいため、このままでは実用性は低いと思われるが、両方の効果を同時にさせるようなシナシナがある、さらなる効率的なキャビテーション生成に結びつく可能性がある。

### 3.4 第二高調波重畳法(SHS)の機序解明

#### 3.4.1 はじめに

前節で検討したように、第二高調波重畳法(SHS)は 3.2 節で検討した spiral 音場を用いる手法よりも化学活性キャビテーションを生成する効率が高く、かつキャビテーション閾値低下効果も有することがわかった。よって、SHS は本研究の最終目標である、ターゲティングを必要としない超音波治療法用の照射手法として有望である。このため、より詳細に、特に SHS のキャビテーション効率向上の機序に関する知見を得るための検討を行うこととした。機序の検討には、基本波と高調波との相対位相差の影響を調べることが不可欠である[44]。このような検討を行うのにあたり、前節の実験系においては、1) 収束音場を用いていること、2) 定在波を生じる反応容器を用いている[67]ことが問題である。1)は、方位方向に関して同一位相差を保てる距離が短いことが問題である。Fig. 3.3.3 に示されるように、焦点幅は約 2mm であり、その範囲内ではしか同一位相を保つことができない。このような微小幅では、化学反応を十分な量生成することは困難である。また、2)は用いた反応容器がプラスチックの試験管であり、ガラス等に較べると超音波透過性は高いものの、照射された超音波の 10%程度は反射することがわかっている。このため、定在波が立つことや容器内で相対位相差が変化することが問題となる。

- ①平面波トランスデューサの使用
- ②音響的に透明な反応容器の使用
- ③キャビテーションの音響的計測

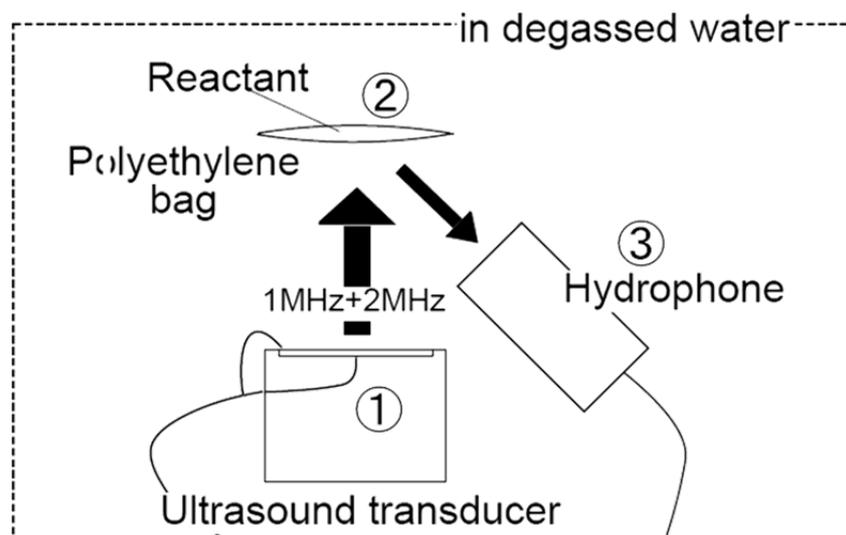


Fig. 3.4. 1 高調波重畳の機序解明用の実験系の構築  
(Kawabata ら[62])

このような前節での実験系の問題を解決すべく Fig. 3.4.1 に示すよう実験系に 3 点変更を加えることとした。まずは、①平面型トランスデューサの使用である。これにより方位

方向で同一位相差である部位を前節の実験系よりも広くすることが可能である。そして②反応容器として、音響的に透明な容器を使用することである。今回は、厚さ 0.03mm のポリエチレンフィルムを用いることとした。そして、③キャビテーションの音響的な計測である。①、②に示す変更により、容器からの干渉なしにサンプルからの音響信号を得ることが可能となった。このことを利用して、水中マイクロフォン（ハイドロフォン）を用いて直接音響的なキャビテーション観測[56, 59]を行うこととした。(Fig. 3.4.2 参照)

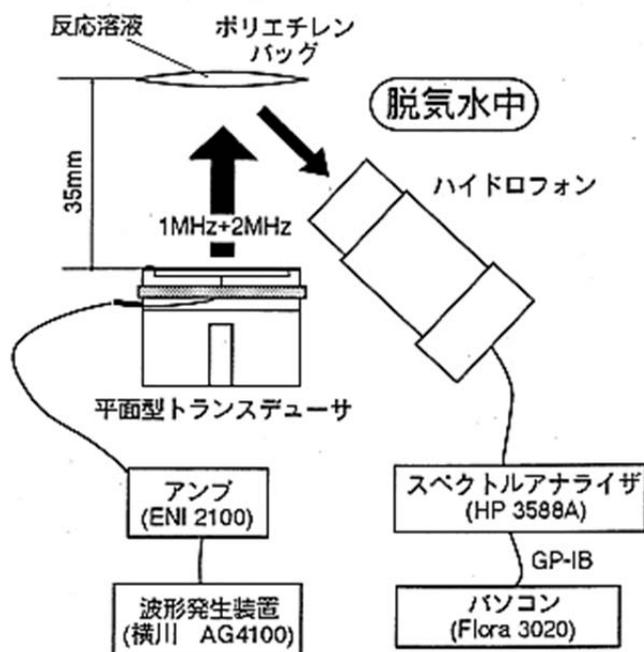


Fig. 3.4.2 超音波照射系

Fig. 3.4.1 に示すような実験系の工夫により、特に基本波と高調波との相対位相差に関する知見を得ることを目的とした実験を行った。また、音響的な指標と化学的な指標が独立して得られていることを確認するために、キャビテーションによる化学反応を阻害することが知られている物質[62]を添加してその効果を調べるという検討も行った。さらに、前節で検討した、高調波重畳法におけるパルス照射の効果および基本波と高調波との周期的切

り替えの効果についても調べた。

### 3.4.2 実験方法

#### 超音波照射源（トランスデューサ）：

直径 24mm で 1.03 および 2.06 MHz に共振するよう設計された PZT 圧電素子(富士セラミクス)を用いた。

#### 超音波照射系：

Fig. 3.4.2 に実験に用いた照射系の構成を示す。任意波形発生装置(横川電気 AG4100)にて基本波と高調波とを重畳した波形を生成し、アンプ(ENI 2100)により増幅して脱気水中に固定した上記トランスデューサに入力した。トランスデューサから 35mm の距離の位置に、ポリエチレンフィルムで作られた反応容器（縦×横：約 25×30mm）を固定して超音波を照射した。反応溶液からの音響信号を収束型ハイドロフォン（直径：11mm、焦点距離：80mm 東レテクノ製）を用いて計測した。ハイドロフォンで検出した信号はスペクトルアナライザ(HP 3588A)に 1 秒ごとに取り込まれ、GP-IB を介してコンピュータに保存された。

1. 0.1 MKI(反応基質)+0.1M抱水クロラール(反応促進剤)を含む水溶液2mlをポチエチレンバッグに入れ水槽内に配置する
2. 超音波照射条件を設定し、所定時間(標準1分間)超音波を照射（照射中毎秒ハイドロフォン信号をスペクトルアナライザで取得し、GP-IBを介してパソコンに取り込む）
3. 照射後直ちに反応容器を1cm光学セルに移し替え、分光光度計にて350nm近辺の吸光度を測定する
4. あらかじめ測定しておいた対照溶液および校正曲線より、超音波照射により生成した $I_3^-$ の量を算出する
5. ハイドロフォンより得られた信号を時間平均し、1.5MHzにおける値を分調波強度とする

Fig. 3.4. 3 照射実験手順

#### キャビテーションにより生成する化学作用の評価：

超音波トランスデューサから 35mm 離れた位置に固定した反応容器に超音波を照射した。キャビテーション生成の化学的評価は、化学反応の進行を定量することで行った。用いた反応は、Fig. 3.2.12 に示すヨウ素イオンの酸化反応である。ヨウ素酸化反応は感度が高く、また、反応生成物である三ヨウ化物イオンに由来する 350nm の吸光度を測定することで簡単に反応量が測定できることから、超音波の化学作用を調べる際に広く用いられている[84]。

さらに、ヨウ素イオンの酸化反応を用いる場合、炭素ハロゲン結合を有する化合物を共存させることにより反応が促進されることがわかっている。歴史的には四塩化炭素が用いられてきた[85]が、毒性および水に対する溶解度が低いことに鑑み、今回は抱水クロラール[76]を用いることとした。また、ヨウ素イオンの酸化反応は、生成した三ヨウ化物をヨウ素でんぷん反応により紫色に呈色させて行う手法も知られているが、予備検討において、超音波照射時間に対する線形性が不良であったため、今回は三ヨウ化物を直接定量することとした。

#### 実験手順：

今回の実験手順を Fig. 3.4.3 に示す。特に 3. における分光度の測定は誤差を最少にするために、超音波照射から測定までの時間が同じになるよう注意して行った。

#### 音場計測：

超音波音場の測定には PVDF ニードル型ハイドロフォン (Imotec 社製、直径 0.5mm) を用いて行った。

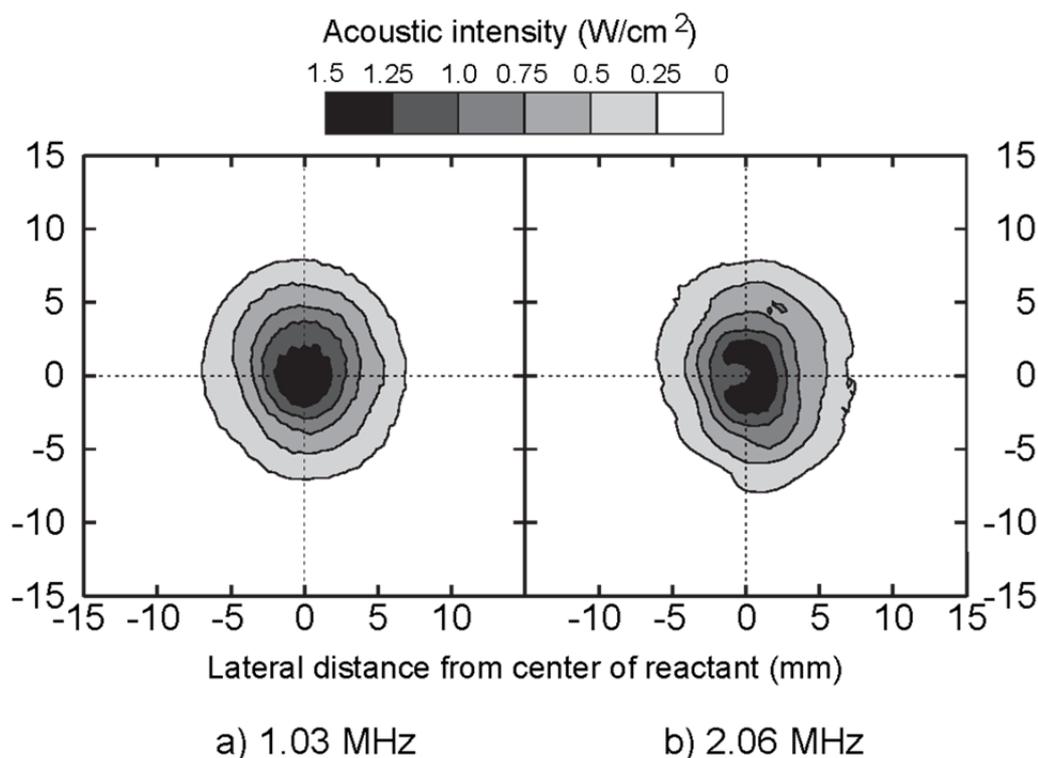


Fig. 3.4. 4 平面波超音波トランスデューサによる音響強度分布  
(Kawabata ら[62])

#### 音響パワ計測：

今回の検討において、上記ハイドロフォンによる測定結果を検証する目的で超音波パワ

を計測した。このパワ測定は放射圧を用いる剛球法と呼ばれるもの[65]である。今回は、剛球でなく、板[30, 65]を用いて測定を行った。

#### キャビテーションによる化学作用の抑制実験：

今回、キャビテーションの計測を音響的手法と化学的手法の二種類の方法を用いて行うこととした。両者が独立した現象をとらえていることを確認するためキャビテーションにより生成する化学作用を抑制する実験を行った。今回化学作用の計測は、OH ラジカルによるヨウ素イオンの酸化を用いている。t-BuOH は、効率的に OH ラジカルを補足し、化学的に安定なラジカルを作ることがわかっており OH ラジカル補足剤と呼ばれている。今回行った音響的な計測は、化学作用が生成する前の気泡の圧壊に由来する信号を計測しているはずであり、ラジカル補足剤を共存させた状態では、音響的計測指標はそのままで化学的指標のみが変化するかどうかを検討することとした。

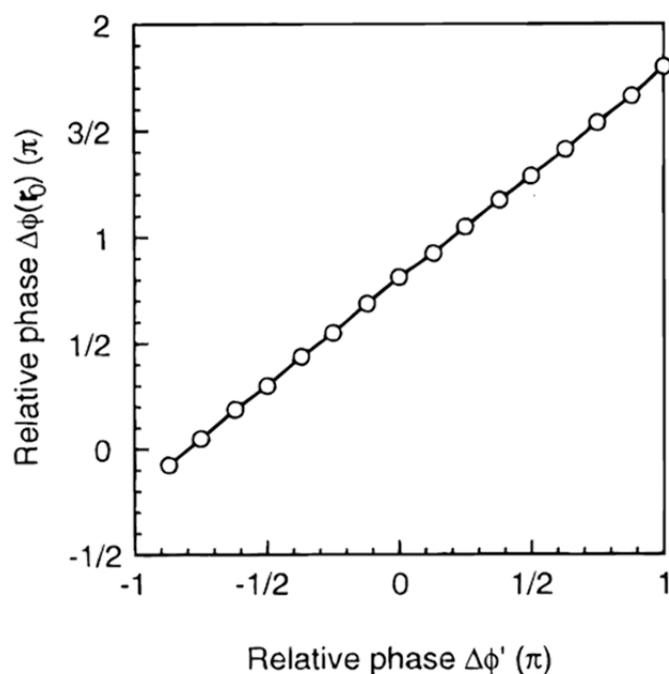


Fig. 3.4. 5 入力電圧の相対位相差と出力超音波の相対位相差の関係  
(Kawabata ら[62])

#### ハイドロフォン波形からの相対位相差算出：

今回、ひとつのトランスデューサから基本波と高調波とを同時に照射する構成を取っており、その相対位相差の効果を検討する。相対位相差の算出は、以下の通り行った。上記音場計測に用いたハイドロフォンで波形を取得し、さらにデジタルオシロスコープ (HP 54504A サンプルング周波数 200MHz) にてデジタルデータとして保存する。得られたデータを ASCII データとしてグラフ作成ソフト gnuplot にて読み込む。gnuplot に内蔵され

ている gnufit にて

$$A \sin(Bx + C) + D \sin(2(Bx + C) + D) + E$$

の A~E の変数を有する関数としてフィッティングを行う。得られた結果を元波形と重畳して表示し明らかな誤りでないことを確認した上で、得られた D を相対位相差とした。

### 3.4.3 結果

Fig. 3.4.4 にハイドロフォンで計測した平面波トランスデューサの音響強度分布を示す。測定位置は、トランスデューサから 35mm 離れた、反応容器であるポリエチレンフィルム袋の中心部に相当する。超音波は 1MHz、2MHz それぞれ直径約 10mm 程度の領域に分布していることがわかる。

Fig. 3.4.5 に、波形発生器で生成した高調波と基本波との相対位相差と、実際にトランスデューサから出力された波形における相対位相差とを比較した結果である。測定位置は、トランスデューサから 35mm 離れた、反応容器であるポリエチレンフィルム袋の中心部に相当する。両者の間には線形の関係が成り立つことがわかる。

Fig. 3.4.6 に、反応容器中心位置から方位方向および深さ方向に位置を変化させた時の相対位相差の違いを計測した結果を示す。それぞれのグラフにおいて点線で挟んだ領域は、反応容器中心位置からの相対位相差のずれが  $0.05\pi$  以下となる領域である。この結果をもとに、反応容器の厚みは 2mm 以下となるよう設定した。

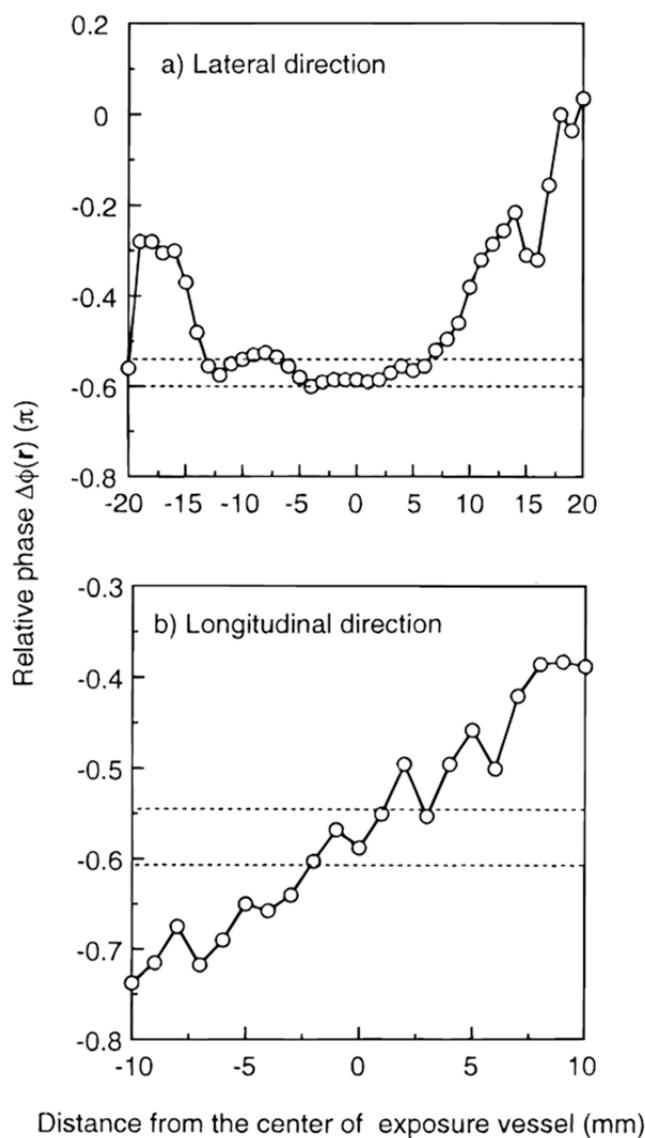


Fig. 3.4. 6 反応容器中心位置からの距離と相対位相差との関係  
(Kawabata ら[62])

Fig. 3.4.7 に、今回反応容器とした用いたポリエチレンフィルムの超音波透過性を、前節で用いたポリスチレン試験管および一般的に超音波化学作用を得るために用いられるガラス容器と合わせて示す。測定は常温で行い、反応容器中心部に相当する 35mm 離れた位置にハイドロフォンを設置し、各容器は約 2mm 離れた状態で測定した。なお、ポリスチレン試験管はあらかじめドリルでハイドロフォンが入るサイズの穴をあけて、その穴にハイドロフォンを挿入した状態で計測した。

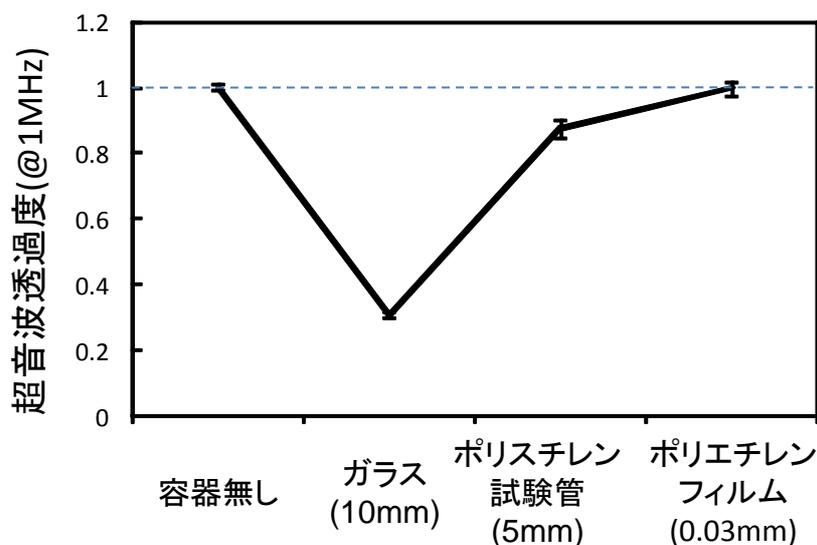


Fig. 3.4. 7 反応容器による超音波透過度の違い

Fig. 3.4.8 に、今回用いたキャビテーション指標計測に関する二つの手法の違いを示す。分調波計測は気泡が成長して圧壊した際に得られる音響信号を、ヨウ素の酸化反応の計測は、気泡圧壊後にOHラジカルが生成し、そのラジカルによる反応で生じるものと考えられる。また、Fig. 3.4.9 に超音波照射を行ってヨウ素の酸化反応が生じる時に典型的な、収束ハイドロフォンで得られる音響スペクトルを示す。高調波のみならず、分調波が生成していることがわかる。これまでの先行研究よりこの分調波がキャビテーション生成の指標として有用である[59]ことがわかっていることから、今回の検討においても分調波の大きさを指標とすることとした。なお、第 2 章における気泡振動の解析においても、分調波はキャビテーションの指標として高調波よりも有用であることを示した。下図に、分調波の超音波照射時の時間変化を示す。このように超音波照射中変化するため、時間平均値を指標として用いることとした。なお、図中縦軸は dB 表示してあるが、平均化は絶対値を用いて行っている。

Fig. 3.4.10 に、今回用いた基本波と高調波の相対位相差、および重畳波形を示す。相対位相差を変化させるピッチは  $0.125\pi$  である。Fig. 2.3.7 に示すように今回は容器内の相対位相差が  $0.05\pi$  以下になるように設定してあり、 $0.125\pi$  ずつでの変化は十分大きいと考えた。

Fig. 3.4.11 に、今回使用した最大超音波強度で照射を行ったときの酸化反応の収量の照射時間依存性を示す。ほぼ超音波照射時間に比例して反応量が変化しており、本実験系においても酸化反応はゼロ次で進行するものとして扱うことが可能であると考えられた。

Fig. 3.4.12 に、基本波と高調波の合計音響強度を固定した上で、両者の比率を変化させて重畳した際の化学反応速度および分調波の強度をそれぞれ示す。グラフ中には、合計強度を変化させた二種類の結果が示されている。まず a) の酸化反応については、合計強度に

かかわらず基本波と高調波とを 1:1 で重畳した際に最も高い値を示すことがわかった。今回用いた反応容器はほぼ超音波の反射が生じないため、反応性は低い。このため、基本波単独および高調波単独では、まったく反応が生じない。これに対して、最適比率で重畳した場合には、有意に反応が生じており、反応に必要な音響強度が低下していることがわかる。b)の分調波強度も反応速度とほぼ同じ傾向を示し、基本波と高調波とを 1:1 で重畳したときに最も強い信号が得られている。この結果から、高調波重畳は、キャビテーションそのものを生じやすくし、その結果として化学作用が促進されていると考えられた。なお、分調波の強度の方が酸化反応に比べて誤差が大きいこともわかった。

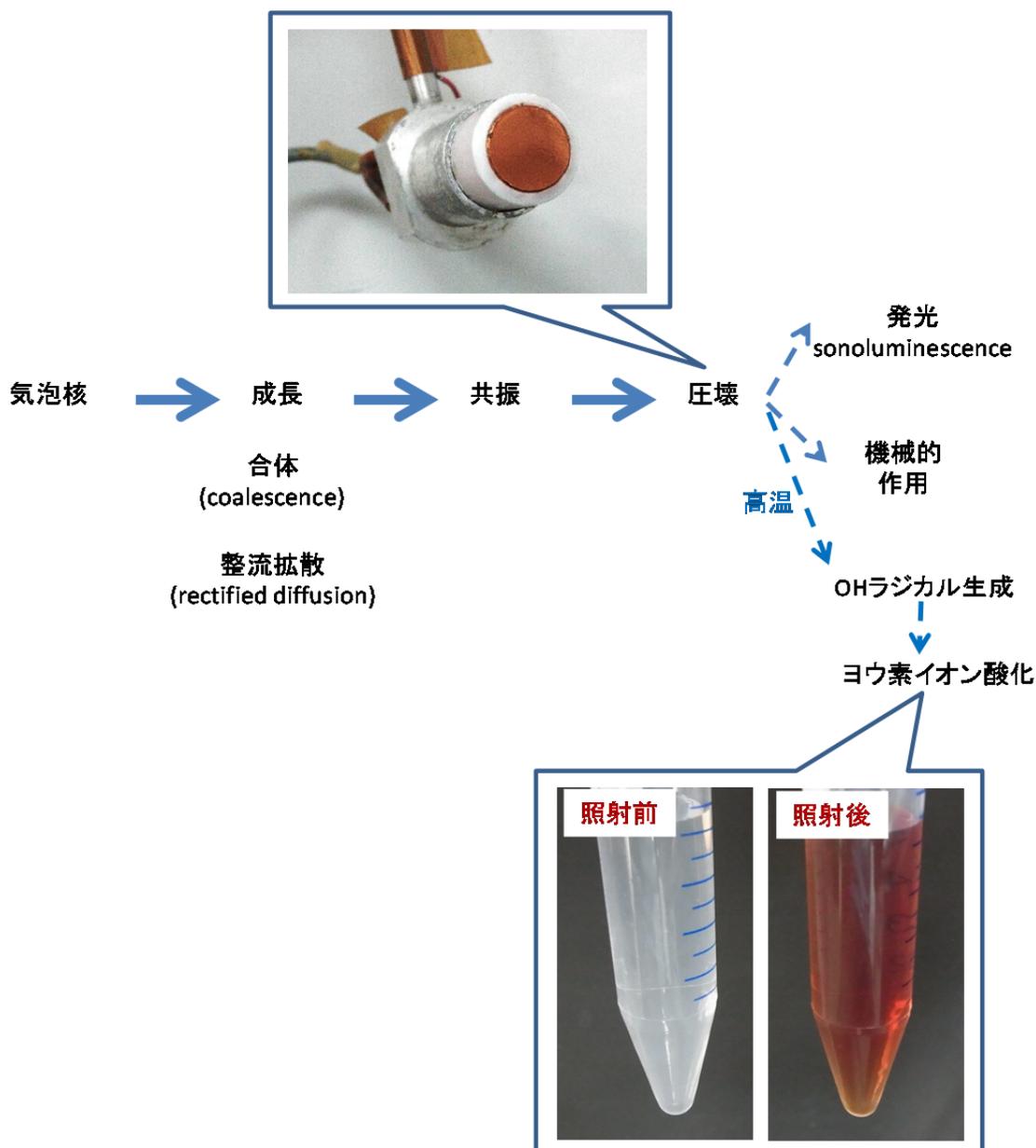
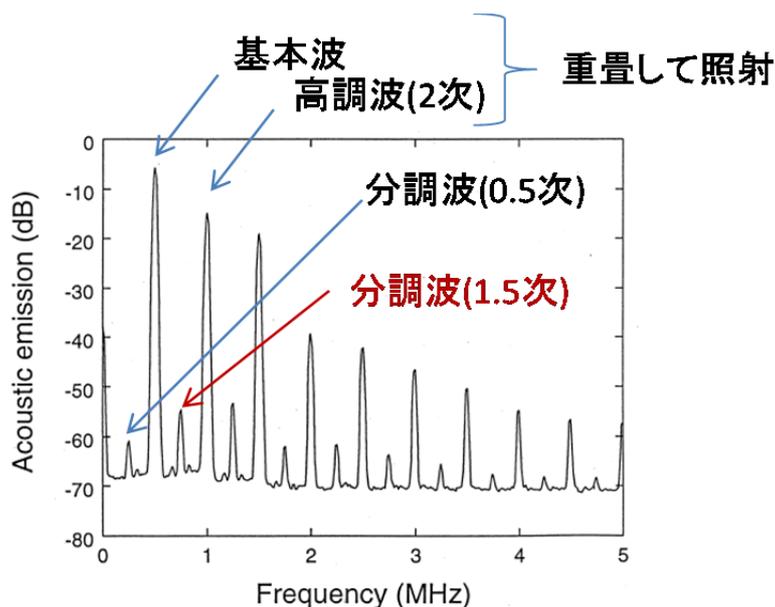
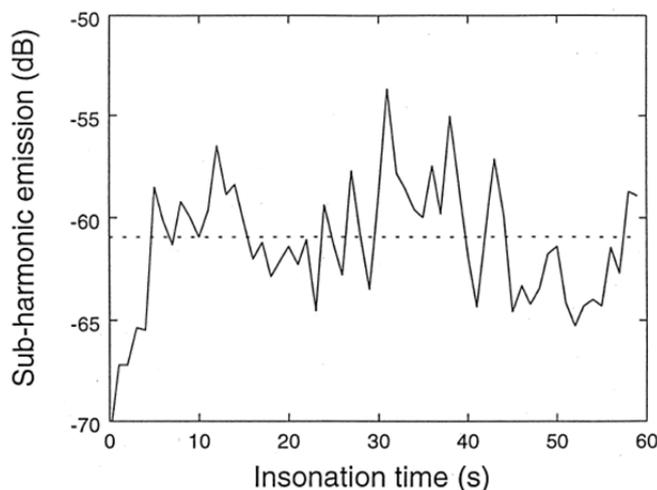


Fig. 3.4. 8 キャビテーション生成および化学作用の計測

Fig. 3.4.13 に、最適な比率で重畳を行った際の酸化反応速度と分調波強度それぞれの合計超音波強度に対する依存性を調べた結果を示す。a)と b)との比較により、化学作用が生じ始める強度で分調波生成が確認されることがわかった。ただし、a)においては、超音波強度が大きくなるにしたがってほぼ線形的に反応速度が上がっていくのに対し、分調波強度は2 から  $7\text{W}/\text{cm}^2$  まではほぼ一定のままで推移し、 $9\text{W}/\text{cm}^2$  で始めて高い値を示すことがわかった。



**分調波(1.5次)強度の時間平均値を指標とする**



**Fig. 3.4.9** キャビテーション生成時の音響信号

Fig. 3.4.14 に、Fig. 3.4.10 に示した相対位相差を用いて、化学反応速度および分調波強度の位相差依存性を調べた結果を示す。Fig. 3.4.12 と同様に、異なる超音波強度を用いた結果を示してある。a)の酸化反応速度は、音響強度によらず、 $1/2\pi$  から  $\pi$  の範囲の波形の

際に高い値を示し、それ以外では反応は生じないことがわかる。最適な位相差は  $0.795\pi$  であった。b)の分調波強度も a)とほぼ同様の傾向を示した。  $1/2\pi$  から  $\pi$  の間の位相差で分調波生成を認めた。最適な位相差はやはり  $0.795\pi$  であった。

Fig. 3.4.15 に、Fig. 3.4.14 にてもっとも効果の高かった  $0.795\pi$  およびその逆位相でまったく化学反応および分調波を生成しなかった  $1.787\pi$  の超音波波形を示す。前者は超音波が正圧から負圧に転じる際の圧力差が大きく、後者は逆である。

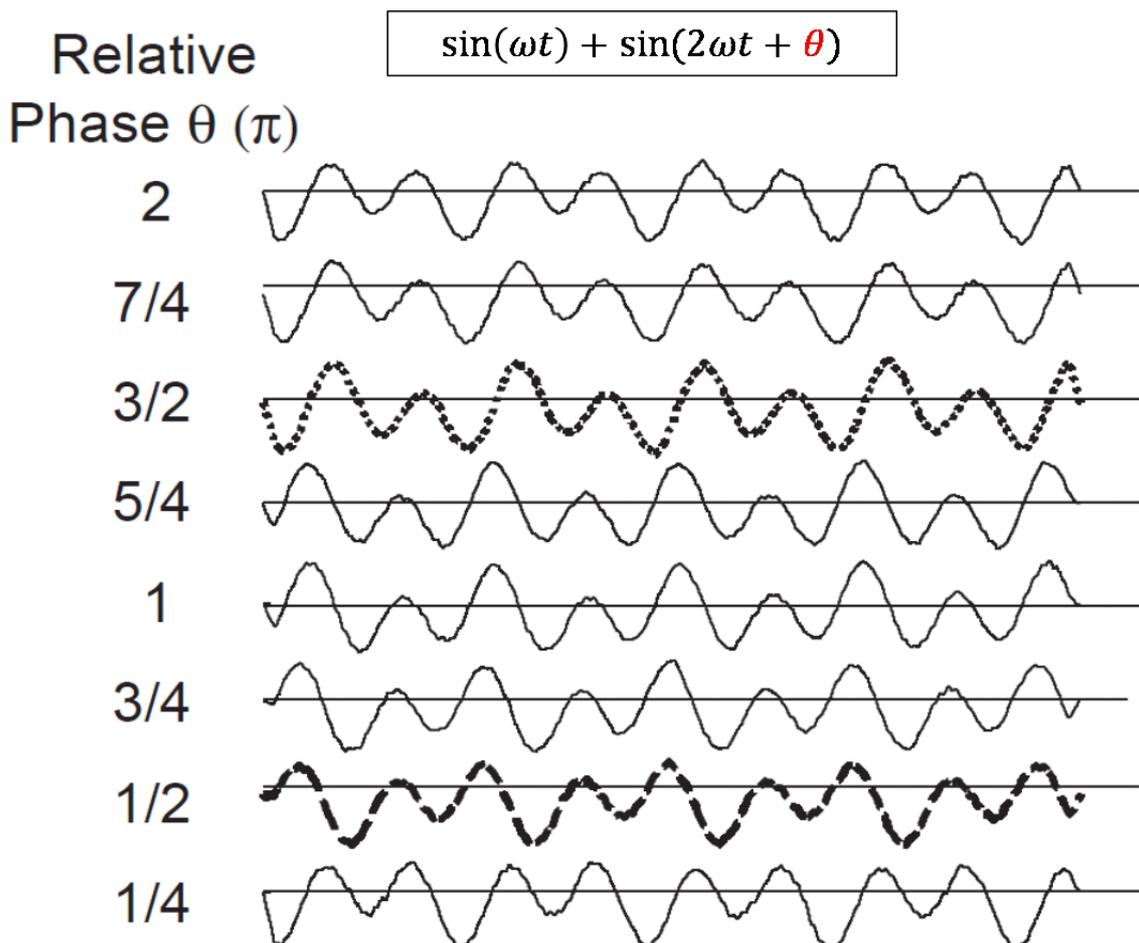


Fig. 3.4. 10 実験に用いた相対位相差一覧  
(Kawabata ら[62])

Fig. 3.4.16 に化学反応を抑制する試薬を共存させた際の分調波強度および化学反応速度の変化を示す。抑制剤としては  $t\text{-BuOH}$ [29]を用いている。 $t\text{-BuOH}$  の濃度が上昇するにしたがって、黒丸で示す化学反応速度は低下するのに対し、分調波強度はほとんど変化しないことがわかる。この結果より、Fig. 3.4.2 に示すように分調波強度は化学作用が生じるまえの段階のキャビテーションプロセスに関係していることが確認できた。

Fig. 3.4.17 に、基本波と高調波とを重畳した上で on/off した際と、基本波と高調波とを

交互に照射した際それぞれについて、切り替え周期に対する酸化反応速度および分調波強度の依存性を示す。まず、重量 on/off については、酸化反応も分調波もそれぞれ 1 秒よりも短い周期を用いた場合にはまったく効果がみられないことがわかった。また、交互照射については、酸化反応も分調波生成もまったく確認できなかった。

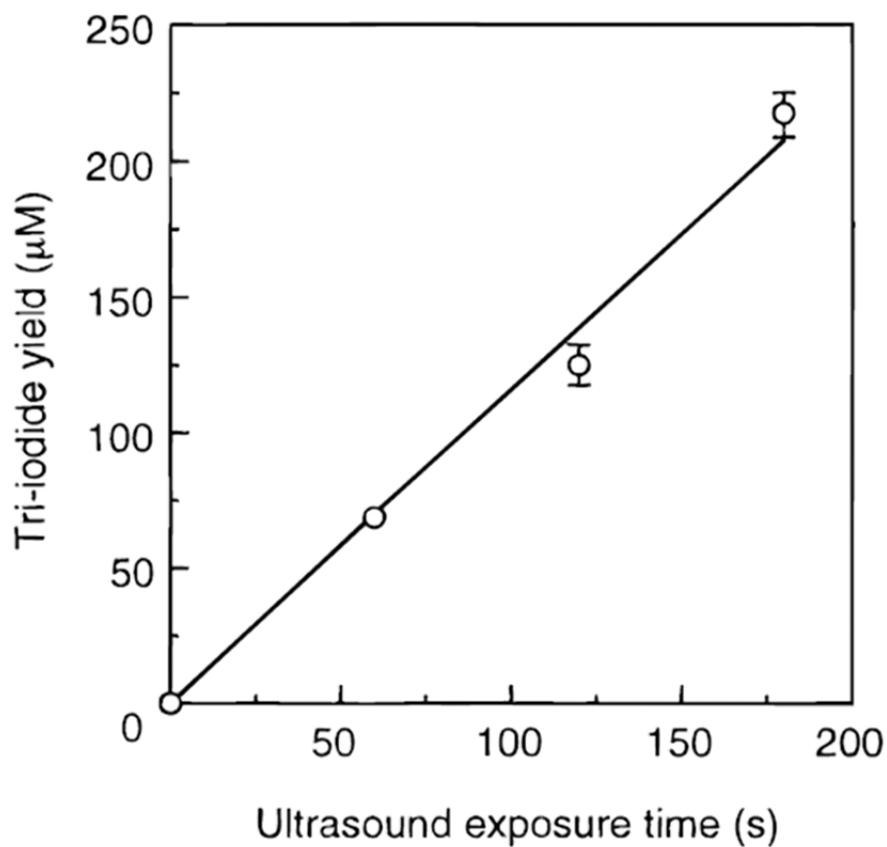
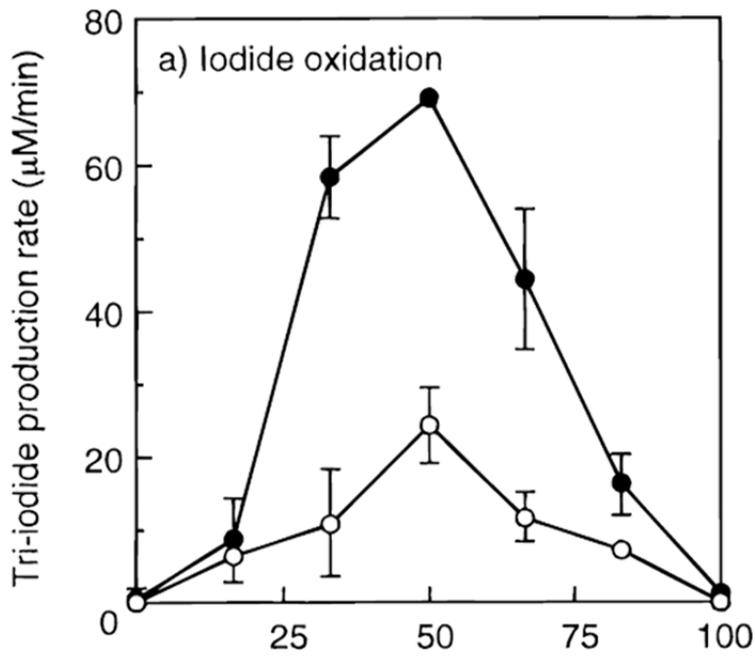
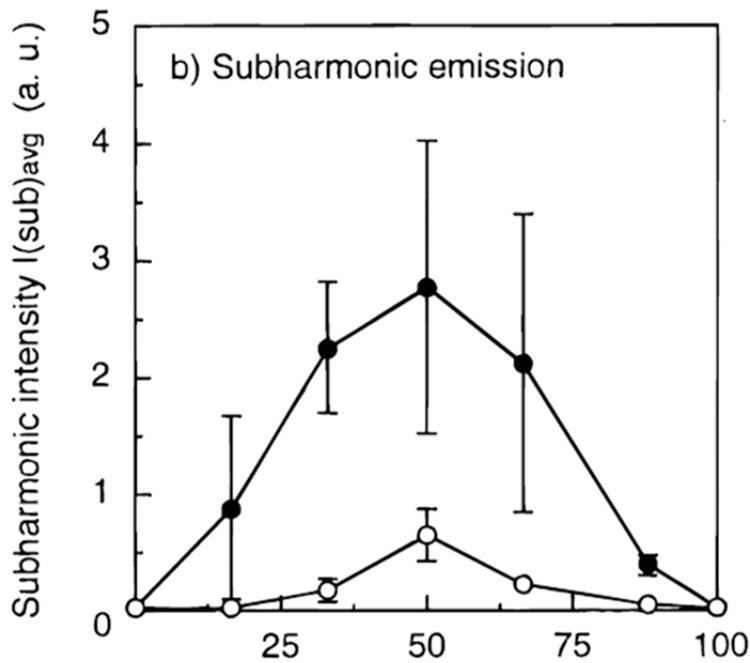


Fig. 3.4. 11 ヨウ素酸化反応収率の照射時間依存性  
(Kawabata ら[62])



Percentage of 1 MHz-ultrasound in total acoustic intensity



Percentage of 1 MHz-ultrasound in total acoustic intensity

Fig. 3.4. 12 高調波重畳による酸化反応速度および分調波強度の基本波割合への依存性 (Kawabata ら[62])

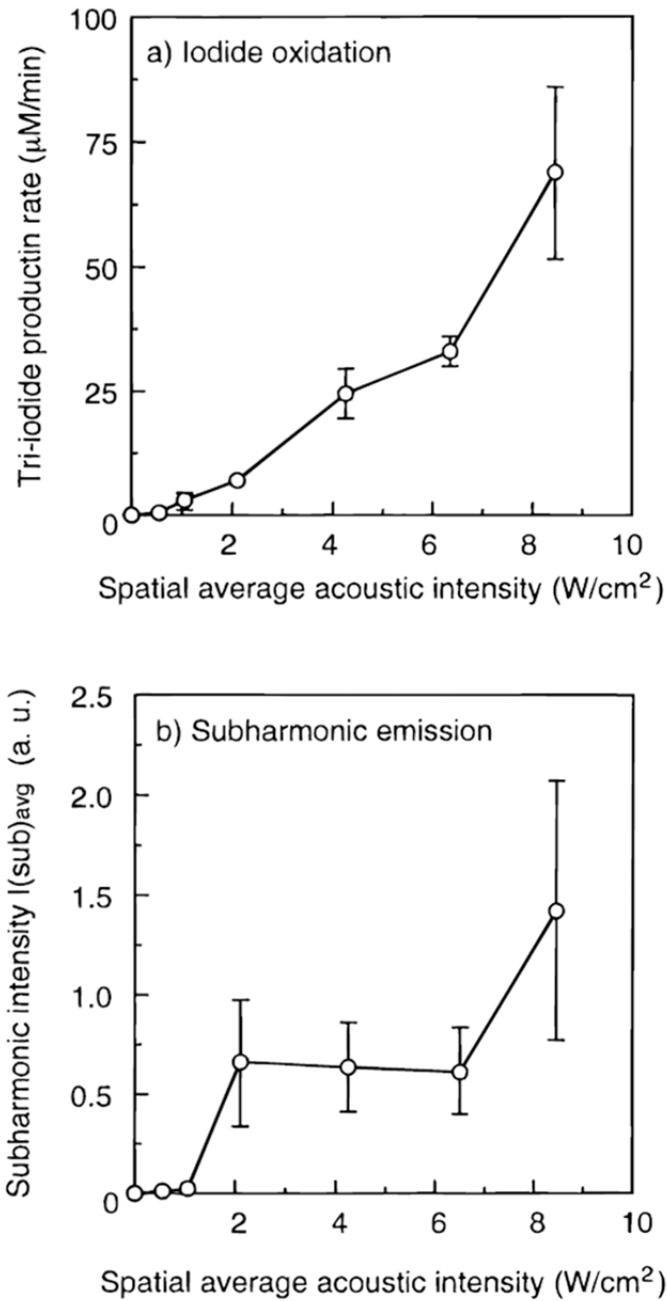


Fig. 3.4. 13 高調波重畳による酸化反応速度および分調波強度の超音波強度依存性 (Kawabata ら[62])

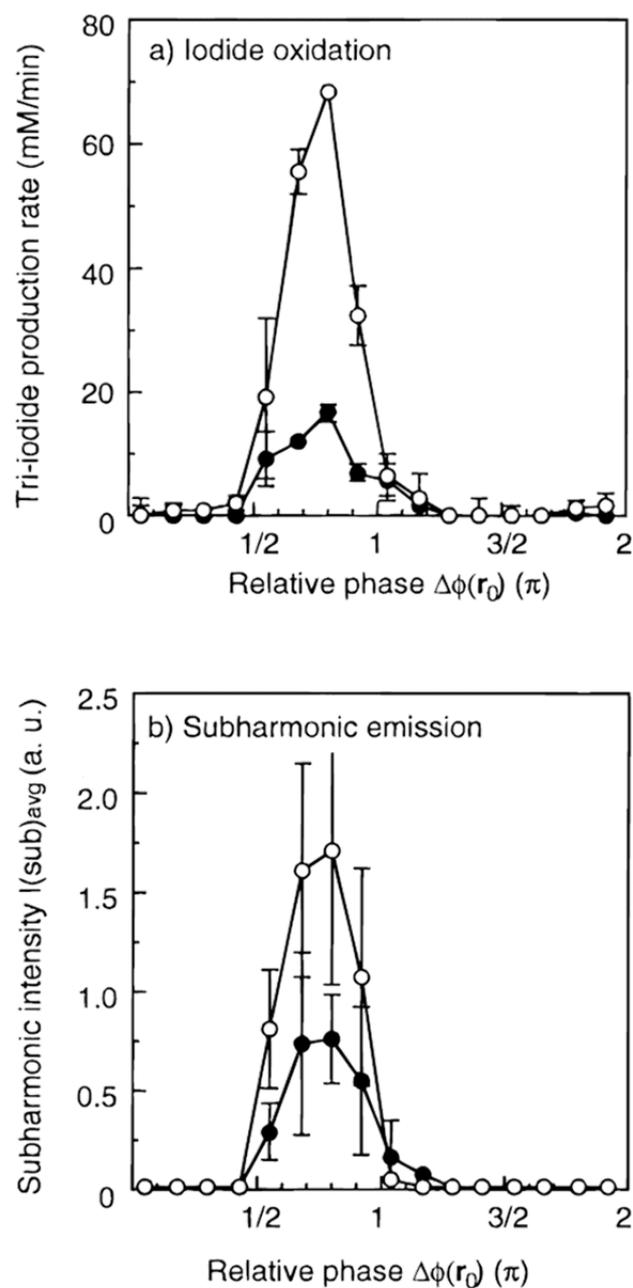


Fig. 3.4. 14 高調波重畳における酸化反応速度および分調波強度の相対位相差依存性 (Kawabata ら [62])

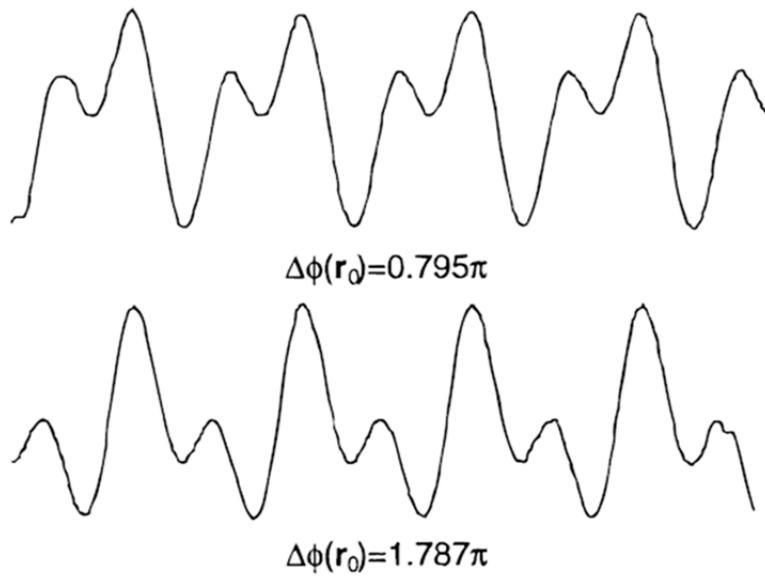


Fig. 3.4. 15 高調波重畳法に用いる超音波波形  
(Kawabata ら [62])

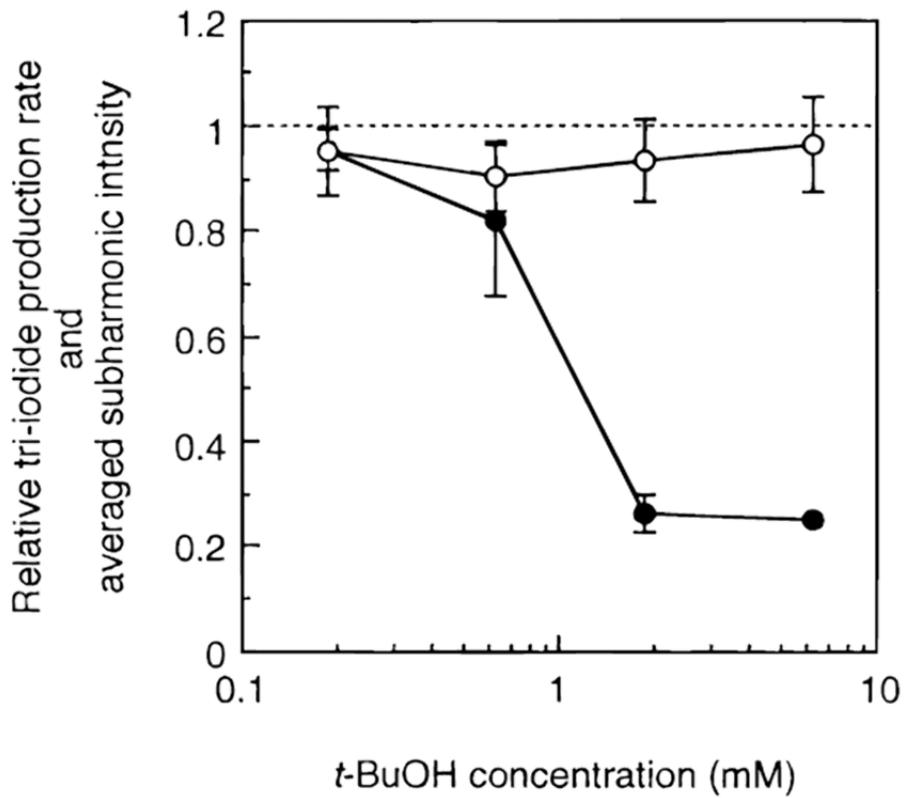


Fig. 3.4. 16 高調波重畳における酸化反応速度および分調波強度の活性酸素消去剤添加効果  
(Kawabata ら [62])

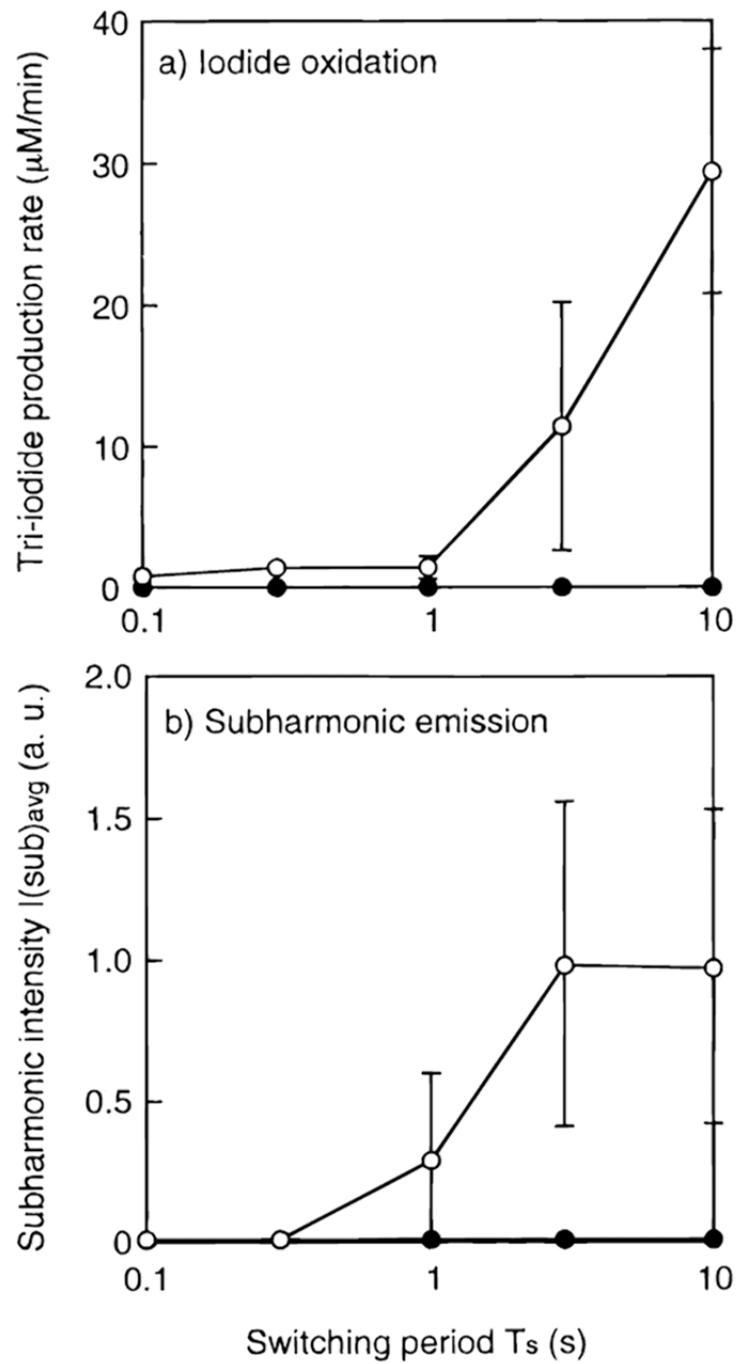


Fig. 3.4. 17 高調波重畳による酸化反応速度および分調波強度のパルス照射切り替え周期依存性  
(Kawabata ら[62])

#### 3.4.4 考察

今回、SHS が化学作用促進に効果的である機序を調べるために基本波と高調波の相対位相差の影響を調べる実験を行った。その結果、Fig. 3.4.14 に示すように強い位相差依存性を示すことが分かった。元々高調波の重畳は整流拡散を促進させる目的[44]で行ったものであり、得られた位相差依存性は、3.1 節にて予測された理論検討とほぼ同じ傾向を示すものであった。単一気泡を用いた気泡での理論検討と、分布を有する実際の実験とで同じ傾向が得られたことは、SHS が整流拡散に関する効果が複数気泡が存在する場合においても支配的であることを示唆するものである。このような相対位相差に関する考察の一助として、3.1 節で述べた吉澤らの結果以外の理論検討を用いて考察を行う。ここで用いるのは、梅村らによって行われた、気泡の振動を複数の仮定のもとに無次元化した系において、気泡振動における気泡表面積の変化が整流拡散に比例するとして計算したもの[65]である。計算結果の一例を Fig. 3.4.18 に示す。本図は、図中基本波・高調波双方がゼロ値の部位からどの程度強度を上げると整流拡散が生じるかを計算し、等高線表示したものである。図中白丸を付けた部位は黒丸に比べて音響強度が約 1/3 で同等の整流拡散を生じることになる。白丸と黒丸部位の波形を Fig. 3.4.15 と比較するとそれぞれ  $0.795\pi$  および  $1.787\pi$  の波形に近い形であることがわかる。この計算結果も 3.1 節の吉澤らの検討結果と傾向は同じであった。Figure 3.4.18 の結果は今回実験的検討で得られた結果よりも位相差による効果の違いが顕著でなく、整流拡散以外の要因も無視できないと考えられた。なお、Fig. 3.4.19 に示すように整流拡散は初期気泡径が小さい場合には効果が小さく、気泡の再溶解が生じる。SHS はこのような再溶解を防ぐ効果があるのではないかと考えられる。したがって、Fig. 3.4.20 に示すように、低強度での超音波照射では、再溶解が主たる要因で気泡成長が起こらない状況の時に、整流拡散の促進により成長を促すことで低い超音波強度で気泡圧壊および化学作用発現まで進める効果を有するのではないかと考えられる。

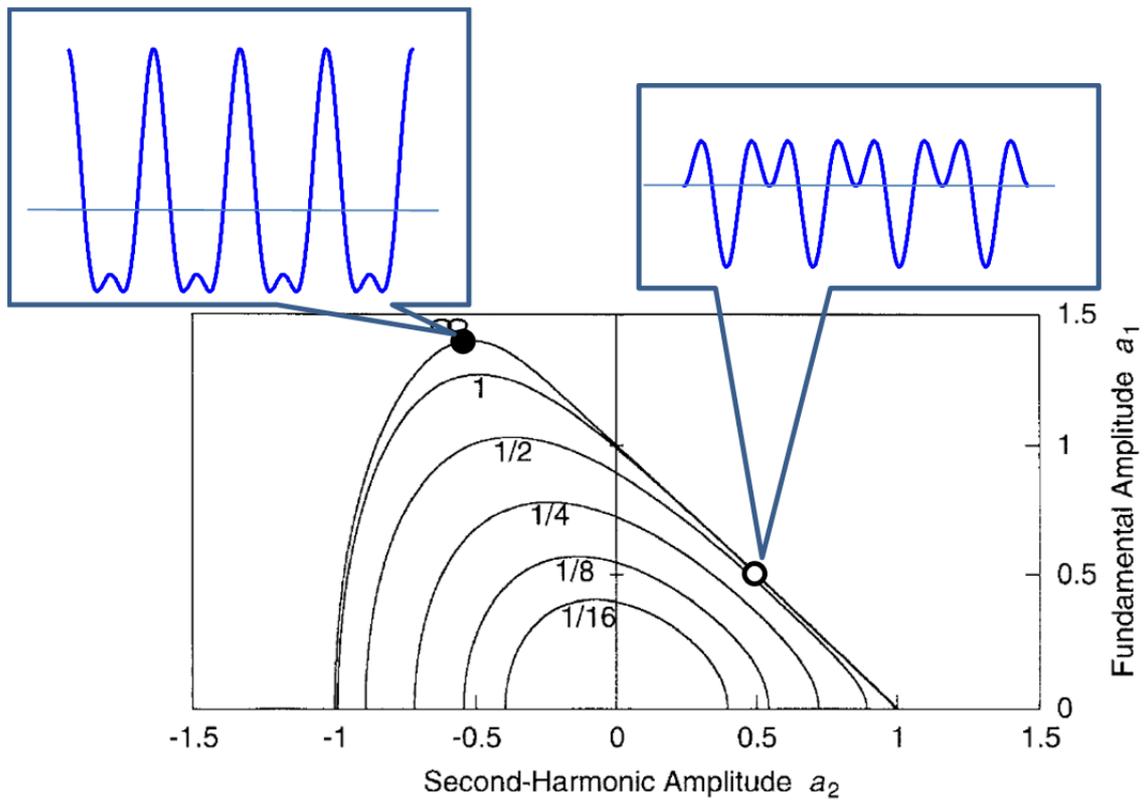


Fig. 3.4. 18 高調波重畳による整流拡散の相対位相差依存性  
(Umemura ら[65])

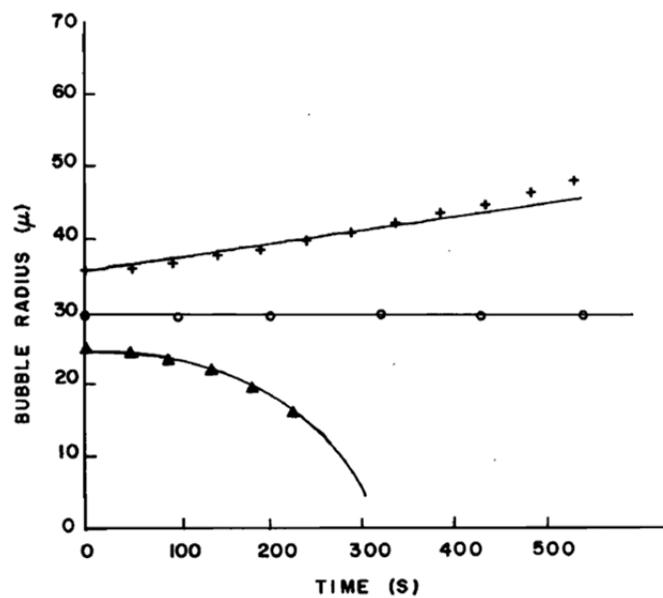


Fig. 3.4. 19 気泡径の違いによる整流拡散の違い  
(Crum ら[50])

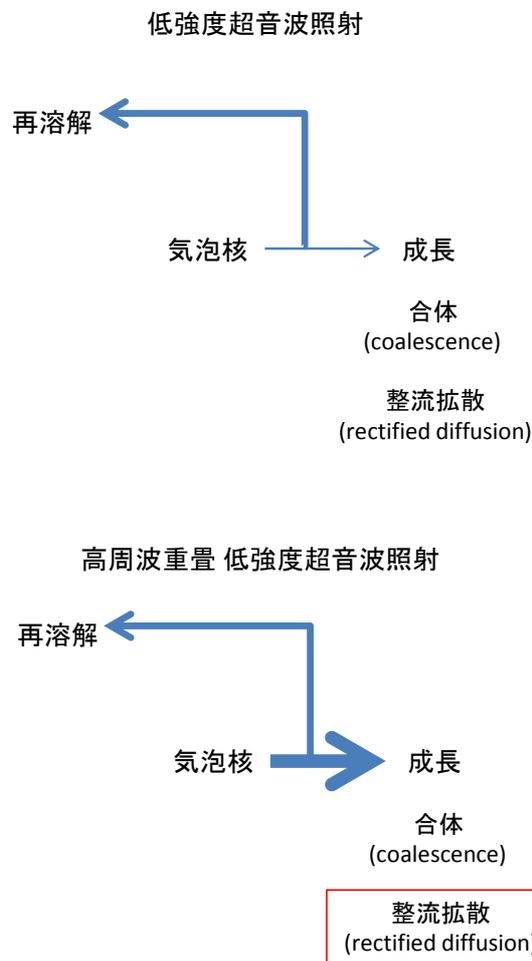


Fig. 3.4. 20 高調波重畳法の機序に関する考察

本検討結果において、分調波強度をキャビテーションの激しさの指標として用いた。ほとんどの場合、酸化反応の進行速度と分調波強度とは相関を示した。しかしながら、唯一、超音波強度依存性に関する結果においてのみ、分調波強度が酸化反応と異なる傾向を示した (Fig. 3.4.3) 強度上昇とともに、酸化反応速度は上昇したのに対し、分調波強度はほぼ一定であった。このような結果の解釈としては、超音波強度が低い場合には、温度が高く化学作用を生成可能な気泡圧壊と温度低く化学作用を生成できない気泡圧壊とが混ざっており、分調波強度からはそれが判断できないというものである。実際、今回の検討において、 $2\text{W}/\text{cm}^2$ において実験を行ったのは Fig. 3.4.13 に示す結果のみである。それ以外では  $4\text{W}/\text{cm}^2$  以上の音響強度を用いている。閾値近傍での実験については注意を有するものと考えられる。

Fig. 3.4.17 に示す、重畳状態での超音波 on/off に関する傾向は、前節で検討した反応容器としてポリスチレン試験管を用いた場合とほぼ同じであった。この結果から、試験管の

系においても、高調波重畳法は定在波に固有の現象は生じていないのではないかと考えらえる。これに対し、基本波と高調波との交互切り替えは、今回まったく効果が見られず、前節の試験管の系と結果が異なった。この交互切り替えは、定在波がある場合のみ生じる現象ではないかと考えられる。

### 3.5 高調波重畳法の相対位相差非依存化

#### 3.5.1 はじめに

前節までに検討した通り、高調波重畳法は、定在波がほとんど存在しない状態で整流拡散の促進を含む機序により化学活性キャビテーションを生じるための超音波強度を低下する効果が確認された。しかしながら、その効果は両波の重畳時の相対的な位相差に依存する。このような依存性は、任意の部位でのキャビテーション生成を行う必要がある治療応用上は問題となりうる。Fig. 3.5.1 に示すように体内には複雑な構造が存在し、事前に治療する部位での相対位相差を設定することは困難であるからである。また、事前に相対位相差を設定する手法が実現できたとしても、治療部位がターゲティングできない場合には、広い範囲に超音波を照射する必要があり、各部位に最適な位相差で超音波照射を行うことは治療時間の観点から現実的ではない。このような問題に対応するため、本節では、高調波重畳法を相対位相差に対して非依存的に効果を生じるための検討を行う。

#### 体内構造は複雑であり、特定の部位に 所望の位相差で超音波を照射することは困難

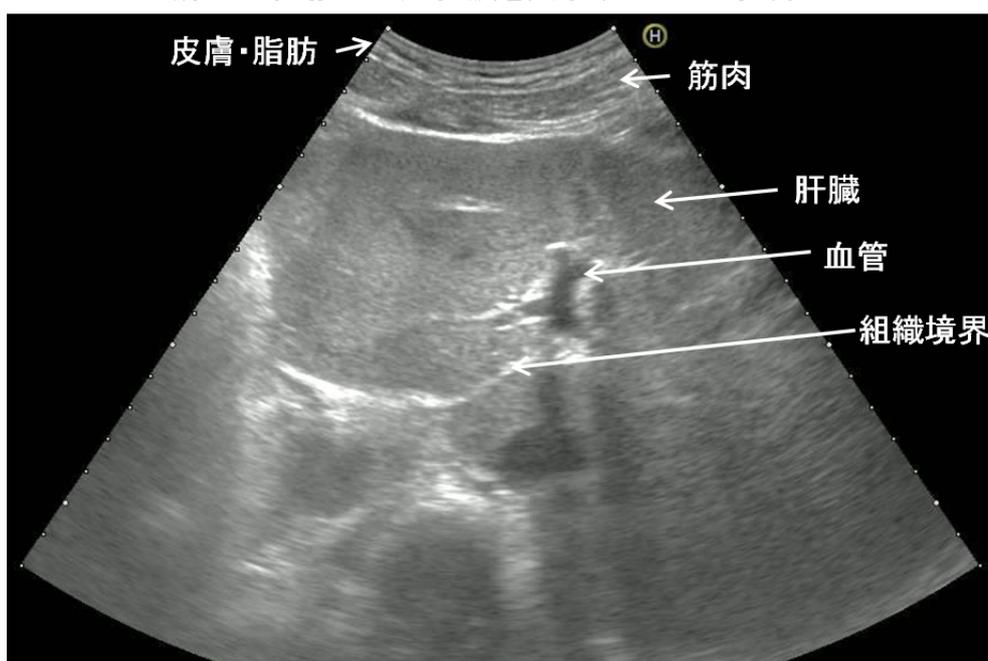


Fig. 3.5. 1 体内の複雑さを示す図

Fig. 3.5.2 に、今回行ったアプローチの概略を示す。キャビテーション生成に適する位相差と適さない位相差が混在しているため、周期的に位相差をずらしていけば、最適な相対位相差ほどの効率化は望めなくても、まったく効果が得られないという事態は防止できるのではないかとこのものである。有効な位相差シフトの周期を調べるのが本検討の目的である。

なお、前回までの検討より、分調波計測による音響的なキャビテーション計測手法は酸化反応速度との相関性が高いことが示されていることから、今回はこの分調波計測のみで検討を行った。

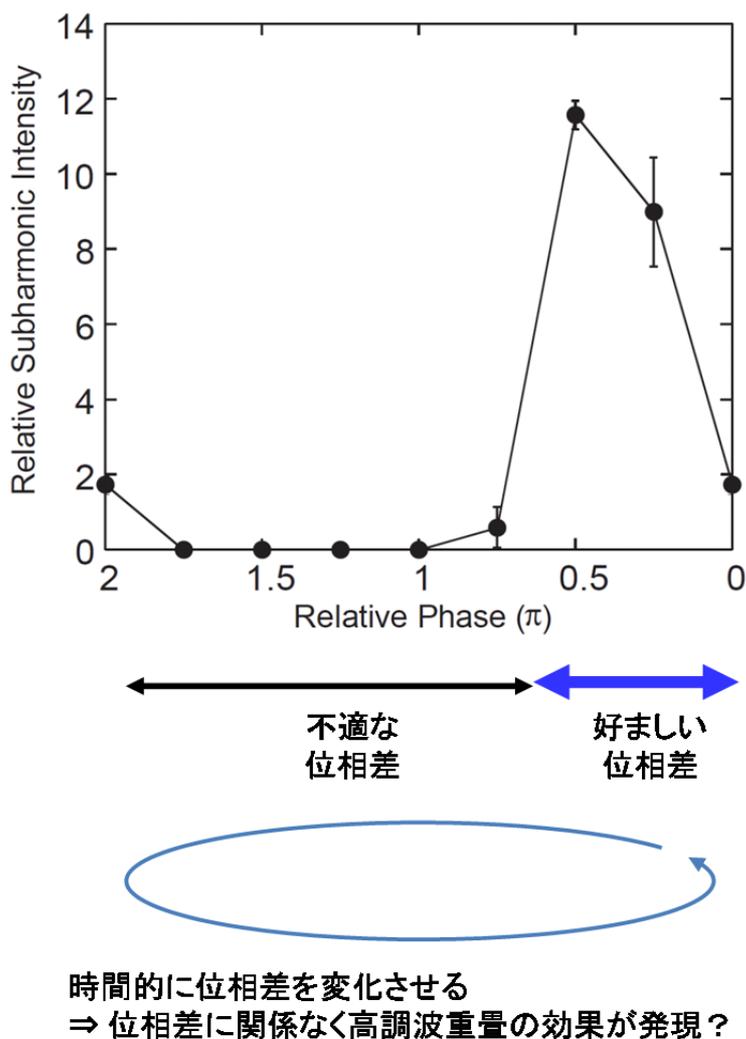


Fig. 3.5.2 高調波重畳法を位相差非依存にするためのアプローチ (Kawabata ら[61])

また、予備検討において、エタノールが定在波の存在しない状態での超音波照射でキャビテーション生成に必要な超音波強度を低下させることがわかったため、エタノールを0.1Mの濃度で添加して実験を行った。

### 3.5.2 実験方法

Fig. 3.5.3 に、今回行った相対位相差シフトの手順を示す。今回の実験系においては、相対位相差が  $1/2\pi$  の時に最も重畳の効果が高く、 $3/2\pi$  の際に最も低い。位相差シフトは、

$3/2\pi$ を起点として、ピッチを設定してそこから相対位相差を小さくなる方向にシフトするというものである。用いたピッチは  $1, 1/2, 1/8, 1/16, 1/32\pi$  となっている。シフトのパラメータとしては、特定の位相差から次の位相差に移動するまでの時間（シフト間隔）およびシフトの結果最初の相対位相差まで戻るまでの時間（シフト周期）とがある。今回は、後者のシフト周期をパラメータとして検討を行った。

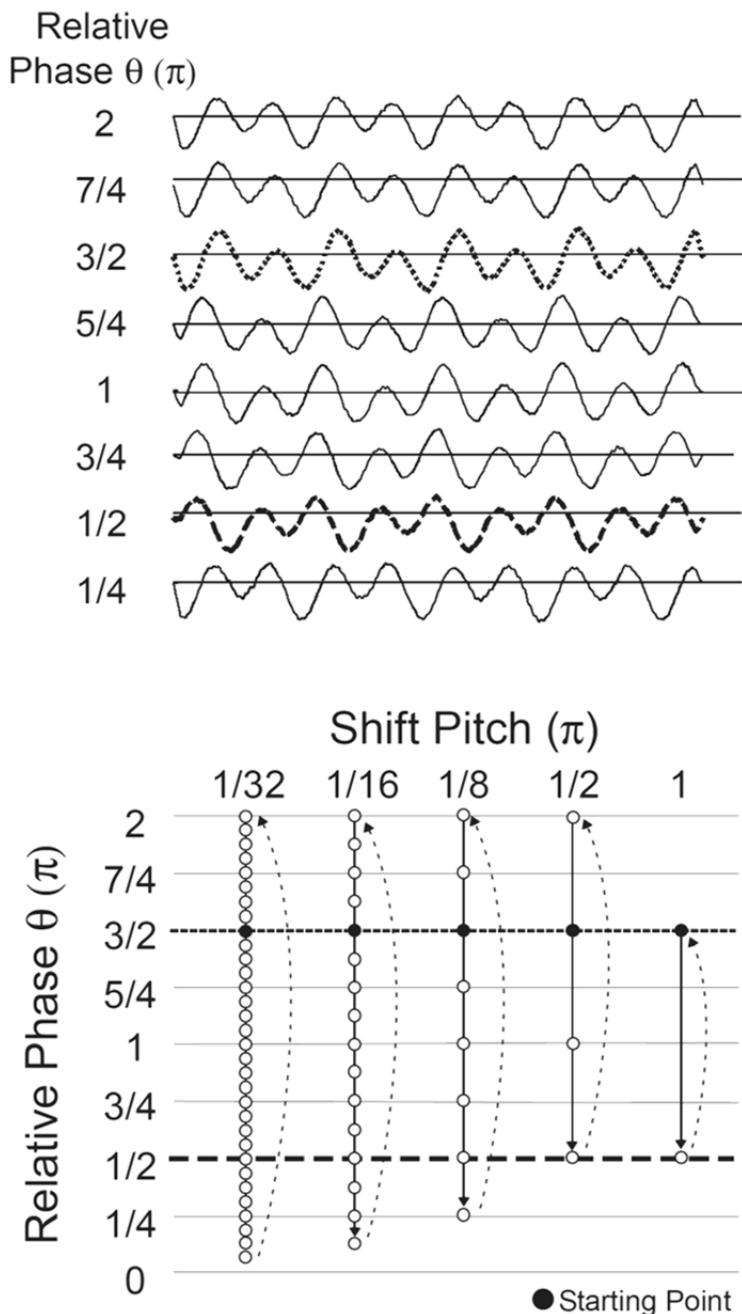


Fig. 3.5. 3本検討における位相差のシフト  
(Kawabata ら[61])

超音波照射源（トランスデューサ）：

直径 24mm で 1.03 および 2.06 MHz に共振するよう設計された PZT 圧電素子(富士セラミクス)を用いた。

超音波照射系：

Fig. 3.5.4 に実験に用いた照射系の構成を示す。任意波形発生装置(横川電気 AG4100)にて基本波と高調波とを重畳した波形を生成し、アンプ(ENI 2100)により増幅して脱気水中に固定した上記トランスデューサに入力した。トランスデューサから 35mm の距離の位置に、ポリエチレンフィルムで作られた反応容器（縦×横：約 25×30mm）を固定して超音波を照射した。反応溶液からの音響信号を収束型マイクロフォン（直径:11mm、焦点距離:80mm 東レテクノ製）を用いて計測した。マイクロフォンで検出した信号はスペクトルアナライザ(HP 3588A)に 1 秒ごとに取り込まれ、GP-IB を介してコンピュータに保存された。

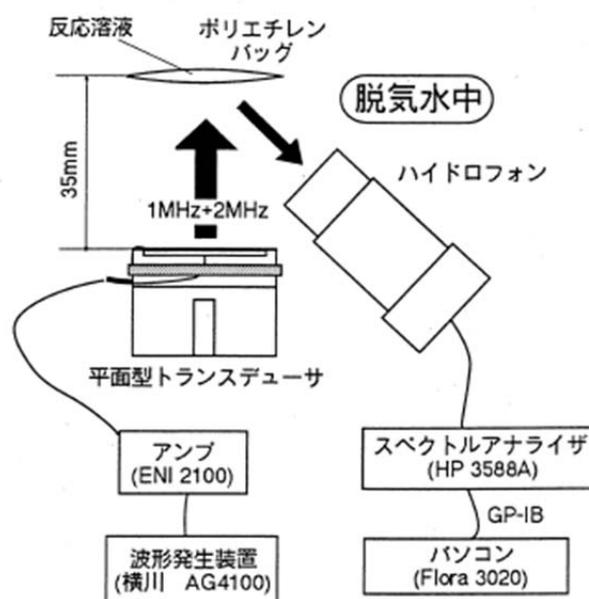


Fig. 3.5. 4 実験系

## 実験手順：

今回の実験手順を Fig. 3.5.5 に示す。

1. 0.1 M EtOH水溶液2mlをポチエチレンバッグに入れ水槽内に配置する
2. 超音波照射条件を設定し、所定時間(標準1分間)超音波を照射（照射中毎秒ハイドロフォン信号をスペクトルアナライザで取得し、GP-IBを介してパソコンに取り込む）
3. ハイドロフォンより得られた信号を時間平均し、1.5MHzにおける値を分調波強度とする

Fig. 3.5.5 実験手順

### 3.5.3 結果

Fig. 3.5.6 に、以降の検討にてベースとする位相差シフトを行わない通常の高調波重畳を行った際の分調波の強度の相対位相差依存性を示す。

Fig. 3.5.7 に、ピッチ $\pi$ および  $1/2\pi$  で位相差シフトを行った際の分調波強度のシフト周期依存性を示す。図中青い線で示してあるのは、Fig. 3.5.6 において最適な相対位相差の場合に得られた分調波強度の値を示すものである。シフトピッチ $\pi$ 、 $1/2\pi$  いずれにおいても、シフト周期が 100ms 以下では分調波生成は見られない。また 100ms 以上では、分調波生成は確認できるものの、位相差シフトを行わない場合の最大値よりの  $1/4$  以下の低い値しか得られないことがわかる。

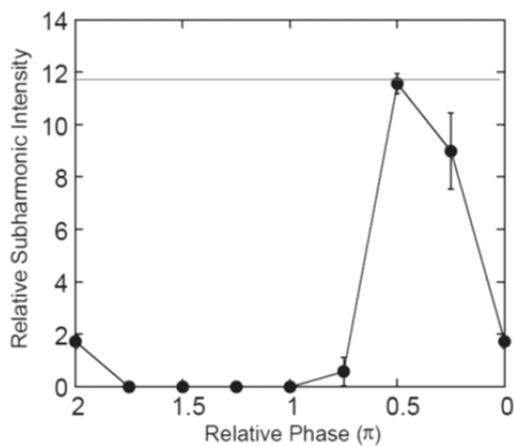
Fig. 3.5.8 に、ピッチ  $1/8$ ,  $1/16$ ,  $1/32\pi$  で位相差シフトを行った際の分調波強度のシフト周期依存性を示す。図中青い線で示してあるのは、Fig. 3.5.7 と同じく、想定される最大の分調波強度である。Fig. 3.4.7 と同じく 100ms 以下の周期では分調波が見られないものの、いずれのピッチにおいても概ね 100ms 以上の周期で位相差シフトを行った場合には青線で示される想定される最大の分調波強度が得られることが分かった。なお、特に  $1/8\pi$  と  $1/32\pi$  における結果の比較で顕著なように、100ms における分調波強度がピッチ依存となっている。

Fig. 3.5.9 に、Fig. 3.5.7 および 3.5.8 に示した結果をシフト周期でなく、シフト間隔を横軸に設定したものを示す。Fig. 3.5.7 で得られた結果は、シフト間隔が 100ms 以上で分調波が観測されることを意味していたことになる。また、Fig. 3.5.8 で得られた結果は、シフト間隔が 10ms 以上で分調波が観測されることを意味していたことになる。

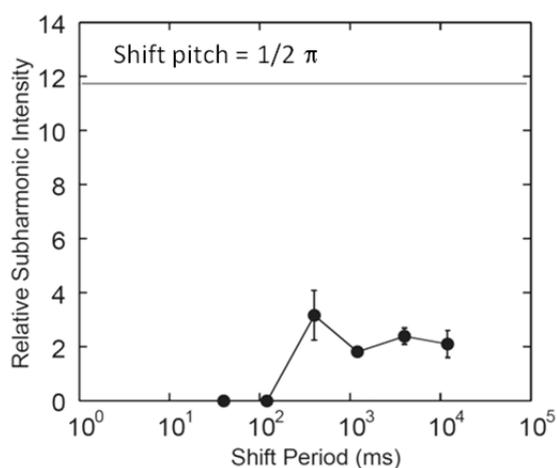
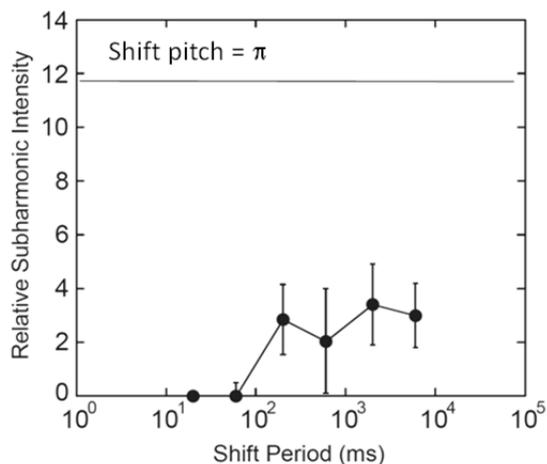
Fig. 3.5.10 に、位相差シフトの向きが分調波強度に及ぼす効果について調べた結果を示す。シフトピッチは  $1/16\pi$  である。位相差シフトの向きは全く影響を及ぼさないことが明らかである。

Fig. 3.5.11 に、位相差シフトを行わず、Fig. 3.5.6 における最適位相差で超音波 on/off を行った際の分調波強度の on/off 周期依存性を調べた結果を示す。周期を 10ms としたときのみ、わずかに分調波生成が認められ、それ以外の周期では、まったくキャビテーション

は生じないことがわかった。



**Fig. 3.5. 6** 位相差シフトを行わない場合の高調波重畳による分調波強度 (Kawabata ら[61])



**Fig. 3.5. 7** 位相差シフトを用いる高調波重畳による分調波強度(シフト周期依存性 shift pitch = 1, 1/2  $\pi$ ) (Kawabata ら[61])

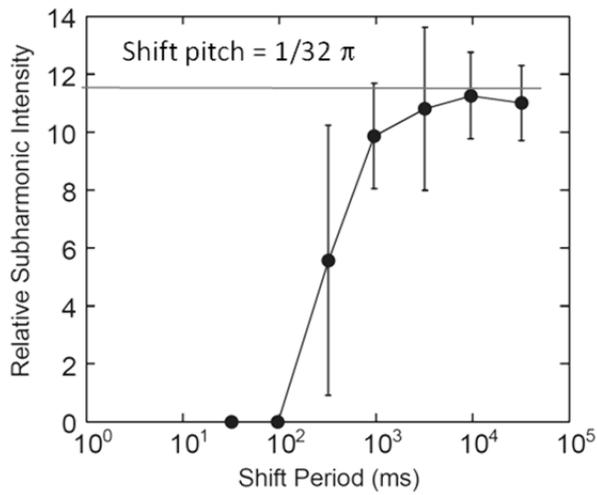
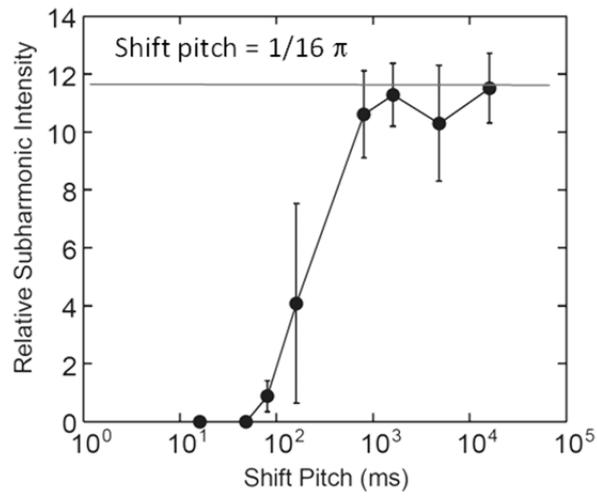
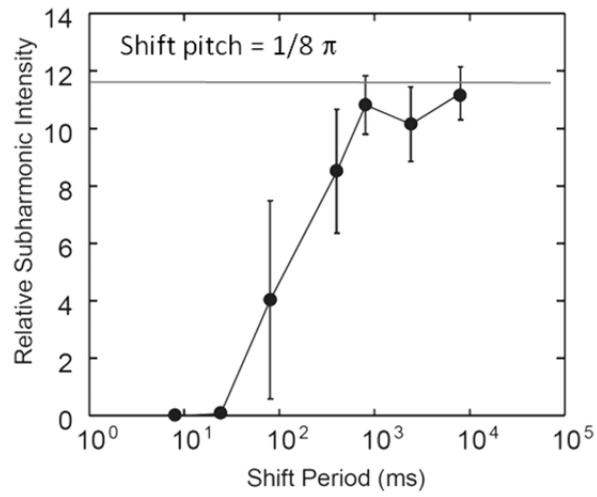
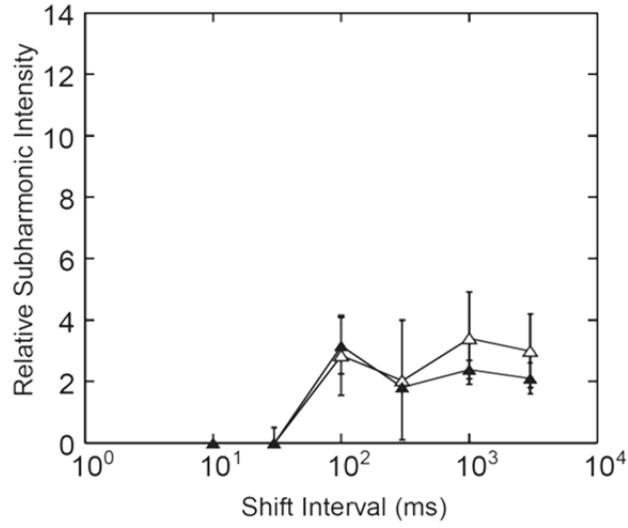
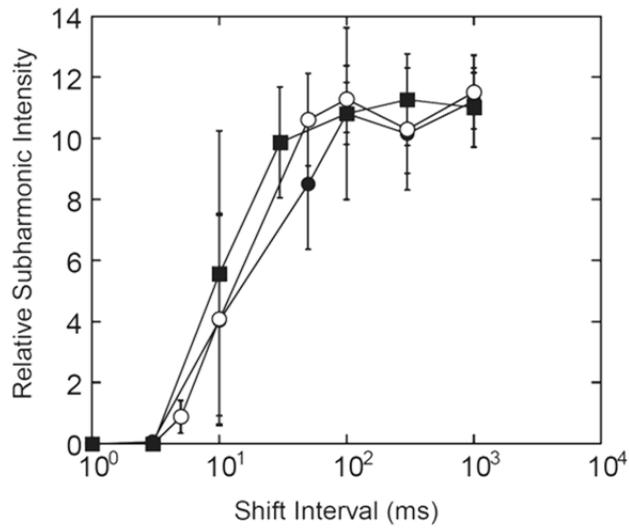


Fig. 3.5. 8 位相差シフトを用いる高調波重畳による分調波強度(シフト周期依存性 shift pitch =  $1/8, 1/16, 1/32 \pi$ ) (Kawabata ら[61])

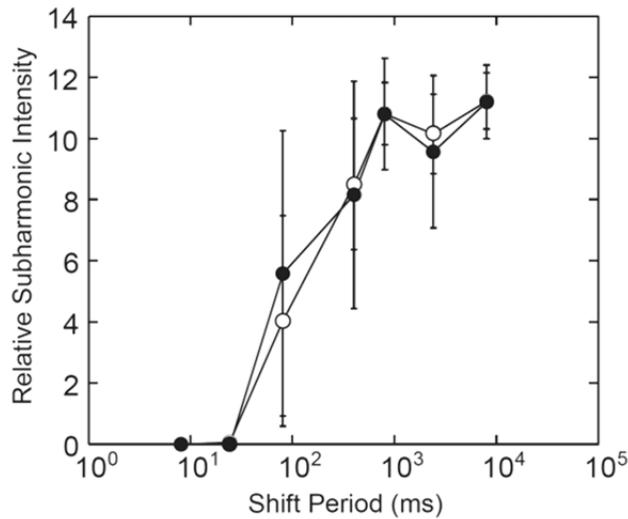


a) Shift pitch = 1, 1/2π

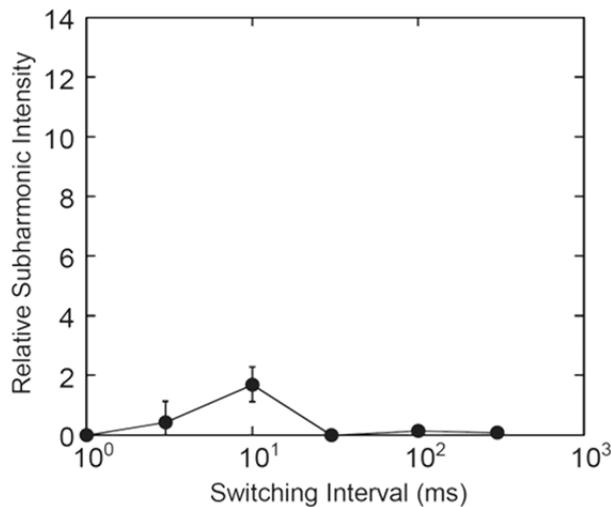


b) Shift pitch = 1/8, 1/16, 1/32π

**Fig. 3.5. 9 位相差シフトを用いる高調波重畳による分調波強度(シフト間隔依存性)  
(Kawabata ら[61])**



**Fig. 3.5. 10 位相差シフトにおける分調波強度のシフト方向の影響(シフト周期依存性)**  
(Kawabata ら[61])



**Fig. 3.5. 11 位相差シフトを行わない場合の高調波重畳で超音波 on/off を行った場合の分調波強度(シフト間隔依存性)**  
(Kawabata ら[61])

### 3.5.4 考察

今回行った位相差シフトという手法により、適切な周期を用いることで重畳時の相対位相差に関する依存性がなくなり、かつ最適な相対位相差での分調波生成と同程度の分調波強度が得られることがわかった。この結果は、高調波重畳を用いた新規治療システムを考える上で大変重要な知見といえる。治療効率と安全性の面で優れた治療法を開発する上で大変有利である。

得られた結果は、位相差シフトを行う際のシフト周期ではなく、シフト間隔すなわち同一の位相差で照射する時間がキーパラメータであるというものである。そしてそのシフト間隔は 10ms 以上であることが求められる。このような時間間隔は、キャビテーション気泡が生成して圧壊するまでに必要とされている時間と同程度の長さ[21]である。このような結果が得られた機序として考えられるのは、最適な位相差で留まっている時間が気泡成長に必要な時間以上であると、気泡が十分生成されることでその以降の最適でない位相差での気泡振動が影響を受けるというものである。例えば、気泡群を通過する際に超音波の位相差が変化し、数多くある気泡中のいずれかには最適な位相で超音波が照射されることでその気泡が顕著にキャビテーションを生じるというものである。ただし、このような機序が働いているとすると、粘性など気泡の寿命に関する物理特性が深く関与する可能性があるため、今後検討の必要がある。

また、得られた結果の活用法として、位相差シフトをそのままおこなうのではなく、うなりを活用することも考えられる。すなわち、1.03MHz と 2.06MHz を用いるのではなく、例えば 1.03MHz と 2.05999MHz とを重畳することによりうなりを活用して位相差シフトと同様の効果を得るというものである。

## 第4章 キャビテーション閾値を低下させる化学物質

前章までに、キャビテーション生成を効率良く生じる超音波照射方法について検討し、第二高調波重畳法(SHS)が有望であるとの結果を得た。本研究は超音波照射方法と化学物質との組み合わせによりターゲットのみで選択的なキャビテーション生成を行うことを目標としている。本章では、SHS と組み合わせて用いるためのキャビテーション閾値を低下させる化学物質に関する検討を行う。

### 4.1 界面活性剤を用いるアプローチ

#### 4.1.1 ;界面活性剤による整流拡散の促進

従来の研究においては、本研究で求められるキャビテーション閾値を低下させるような化学物質に関する知見はほとんど得られていない。そもそも、3.3 節あるいは3.4 節で用いたようなほぼ完全に超音波を透過する反応容器でキャビテーションあるいはキャビテーション化学作用を生じさせるという試みもほとんど行われていない（通常は、逆に反射が大きい容器あるいは気液界面を用いた定在波条件が用いられる[66, 68]）。このような状況において、キャビテーション閾値を低下させる化学物質に関する検討を始めるに当たり、界面活性剤を用いた先行研究に注目した。Fig. 4.1 は Lee らによる整流拡散における界面活性剤の効果[43]を示したものである。整流拡散は第2章で説明したように気泡核の成長プロセスであり[47]、この促進はキャビテーション作用をより低強度で得るために重要である。Fig. 4.1 によれば界面活性剤（SDS ドデシル硫酸ナトリウム – 代表的な陰イオン性界面活性剤）の濃度が高まるにつれ整流拡散の程度が大きくなっている。これは、界面活性剤が気泡表面に吸着し、表面張力を低下させることによって気泡の収縮を抑制していることによると考えられる[43]。この実験結果より、界面活性剤を用いることにより整流拡散が促進され、結果的にキャビテーションの化学作用も促進されるのではないかと考えられた。この仮説を検証するため、第3章と同様の実験系を用いて検証を行った。

#### 4.1.2 界面活性剤のキャビテーションおよび化学作用への影響

第3章で用いた超音波をほぼ完全に透過する反応容器を再度用いて、分調波測定によりキャビテーション生成を、ヨウ素酸化反応測定により化学作用を計測する実験系により界面活性剤がキャビテーションおよび化学作用生成に及ぼす影響を調べた。

試薬類:界面活性剤として SDS（和光純薬、電気泳動用）を用いた。反応溶液中に濃度を変化させた SDS を、またヨウ化カリウムおよび抱水クロラルそれぞれを 0.1M となるよう調整して反応容器に封入した。

実験系:Fig. 4.2 に示す実験系を用いた。平面型トランスデューサを用い、基本波となる周波数 1MHz にその第二高調波(2MHz)を重畳する第二高調波重畳法で厚さ 0.03mm のポリエチレン容器内に封入された 2ml の汎用溶液に超音波を 10W/cm<sup>2</sup>の強度で 60 秒照射し、その間ハイドロフォンで 1.5MHz の分調波強度を 1 秒毎に計測した。また、反応後のヨウ素

イオンの酸化を光学的に計測した。分調波強度およびヨウ素イオンの酸化の計測は、3.3で行ったのと同じ操作である。

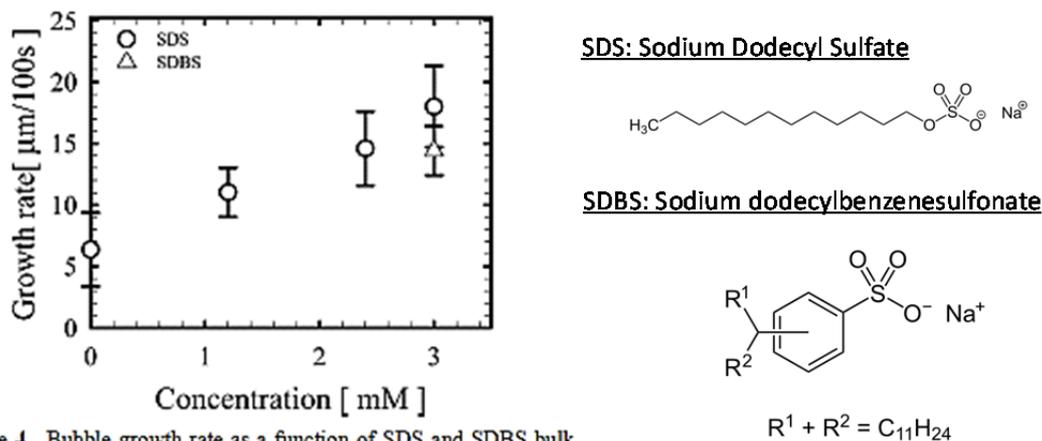


Figure 4. Bubble growth rate as a function of SDS and SDBS bulk concentrations for a 40 μm bubble at an acoustic pressure of 0.22 ± 0.03 bar.

Fig. 4. 1 界面活性剤による整流拡散の促進 (Lee ら[43])

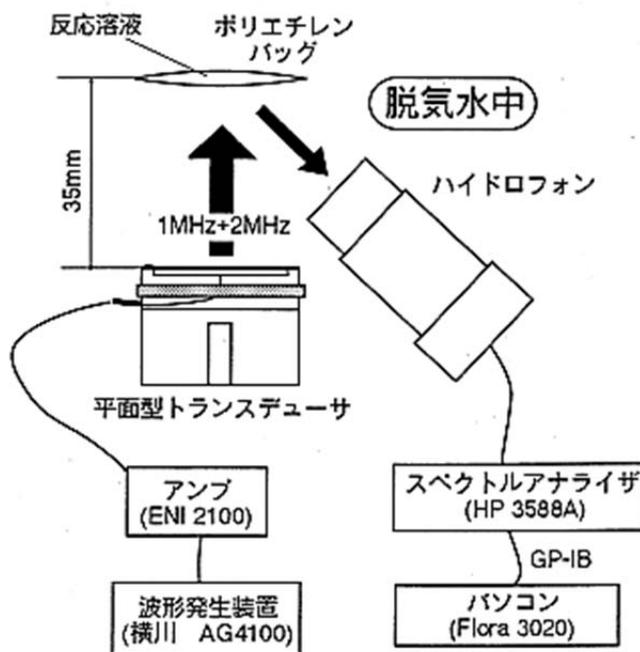


Fig. 4. 2 界面活性剤のキャビテーション促進効果を調べる実験系

結果:分調波生成および化学作用生成に関する SDS の影響を調べた結果を Fig. 4.3 に示す。SDS は分調波も化学作用もいずれも抑制する効果があることがわかった。100μM よりも高い濃度においては、分調波生成もヨウ素酸化反応もまったく観察されていない。SDS の臨

界ミセル濃度は約 10mM [86]であることから界面活性剤としては極めて低い濃度でキャビテーション生成を抑制する効果があることがわかる。

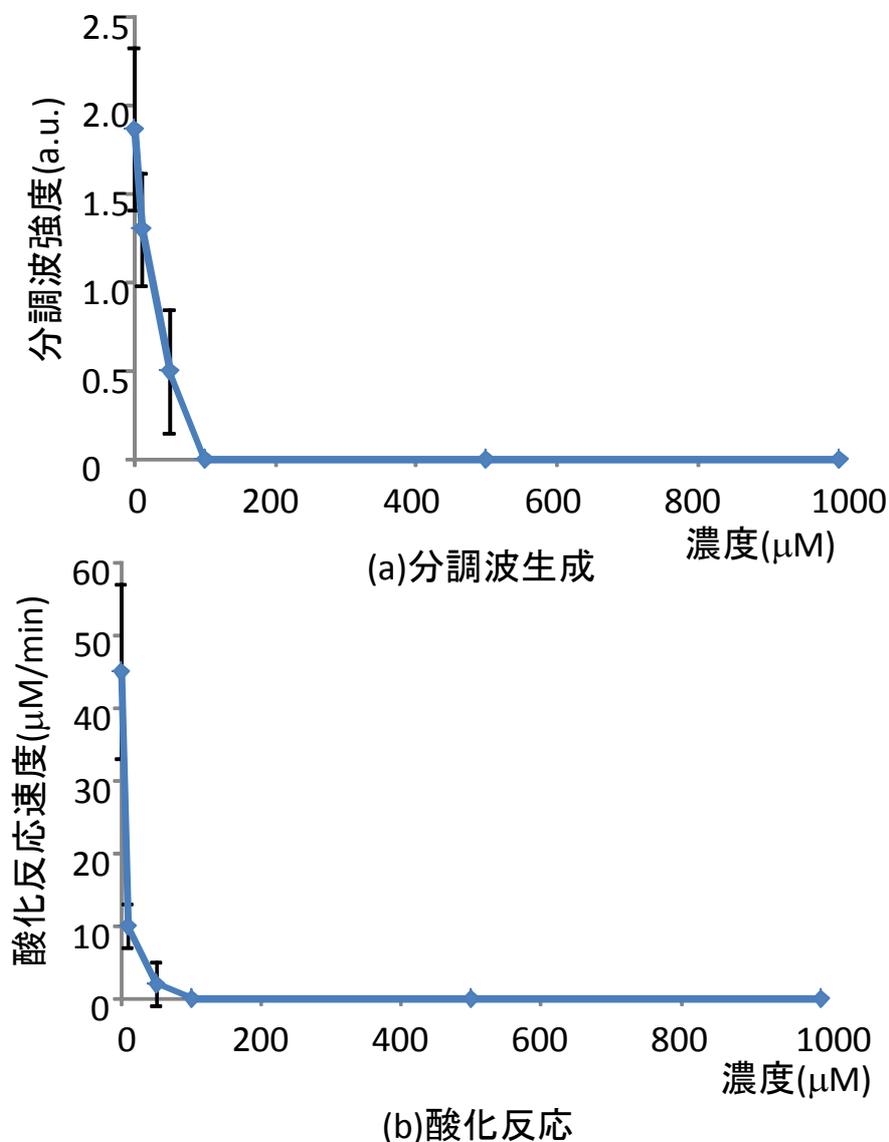


Fig. 4.3 界面活性剤添加がキャビテーションに及ぼす影響

考察：整流拡散を促進する効果を有する SDS がキャビテーション生成には抑制的に働くという結果が得られた原因については、表面張力低下効果により、界面活性剤が吸着した状態では気泡が圧壊できないのではないかと考えられる[86]。すなわち、気泡径を増大させるには効果的であっても、圧壊という気泡径を小さくするプロセスにおいては逆にマイナスに働いてしまうのではないかと考えられた。この考察が気泡振動的に確かかどうかを調べるため、気泡運動の計算を行った。SDS そのものではないが、同じく界面活性剤であるリン脂質は、地診断用の造影剤として広く用いられるためそのパラメータが調べられて

おり、リン脂質が吸着した状態での気泡運動を計算することが可能となっている[87]。第2章と同様に Matlab 上の Bubblesim にて 1MHz, 0.9MPa の圧力振幅の条件で

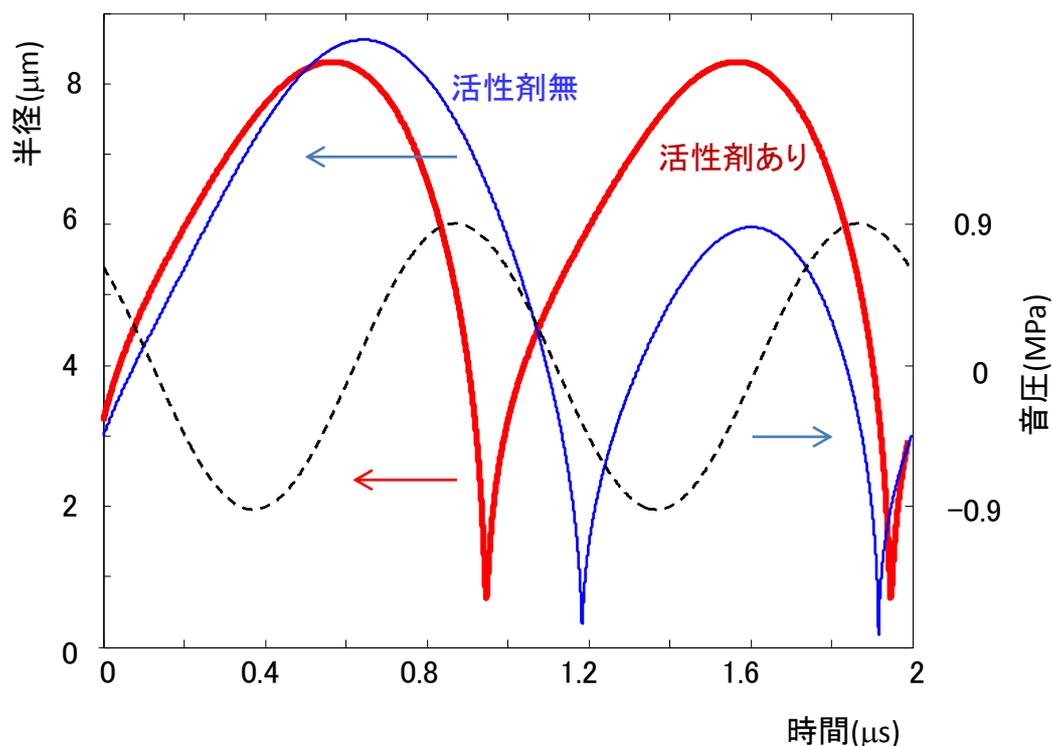


Fig. 4.4 界面活性剤による共振気泡の振動の変化

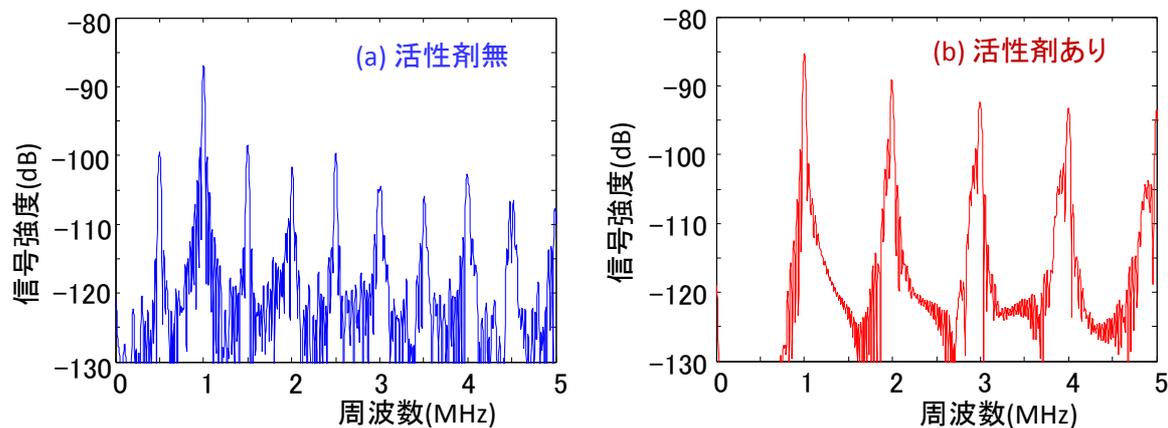
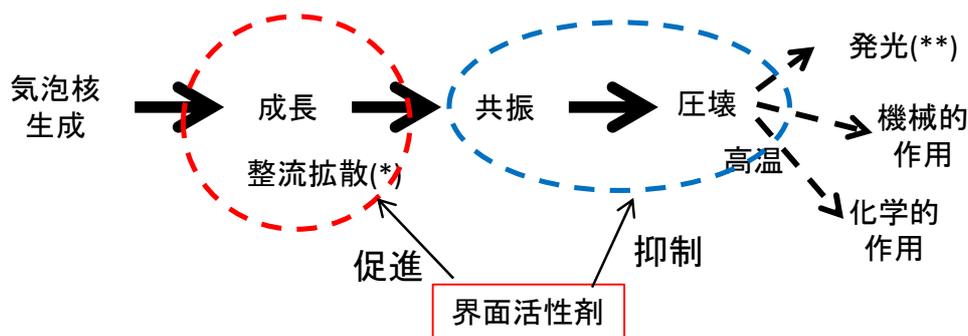


Fig. 4.5 界面活性剤による気泡振動時の周波数成分の変化

リン脂質有り無しの場合について気泡運動を計算した結果を Fig. 4.4 に示す。図中青線が表面活性剤が吸着していないフリー状態の気泡で、赤線がリン脂質が外側に吸着した気泡の結果をそれぞれ示している。また、黒点線で示されているのは、音圧の変化である。Figure 4.5 に界面活性剤ありなしそれぞれの場合について得られた、気泡振動時の周波数成分を示す。

界面活性剤により分調波生成が抑えられ高調波のみが生成していることがわかる。つまり、界面活性剤により圧壊が生じていないことになる。この計算結果より、表面張力低下がキャビテーションの効率的生成を抑制する要因となることが示唆された。Figure 4.6 に、キャビテーションプロセスにおいて、界面活性剤添加により生じていると考えられる現象を示す。成長は促進するものの、そのあとの共振と圧壊において抑制的に働くものと考えられた。



\* Rectified diffusion    \*\* sonoluminescence

Fig. 4.6 界面活性剤がキャビテーションに及ぼすと思われる効果

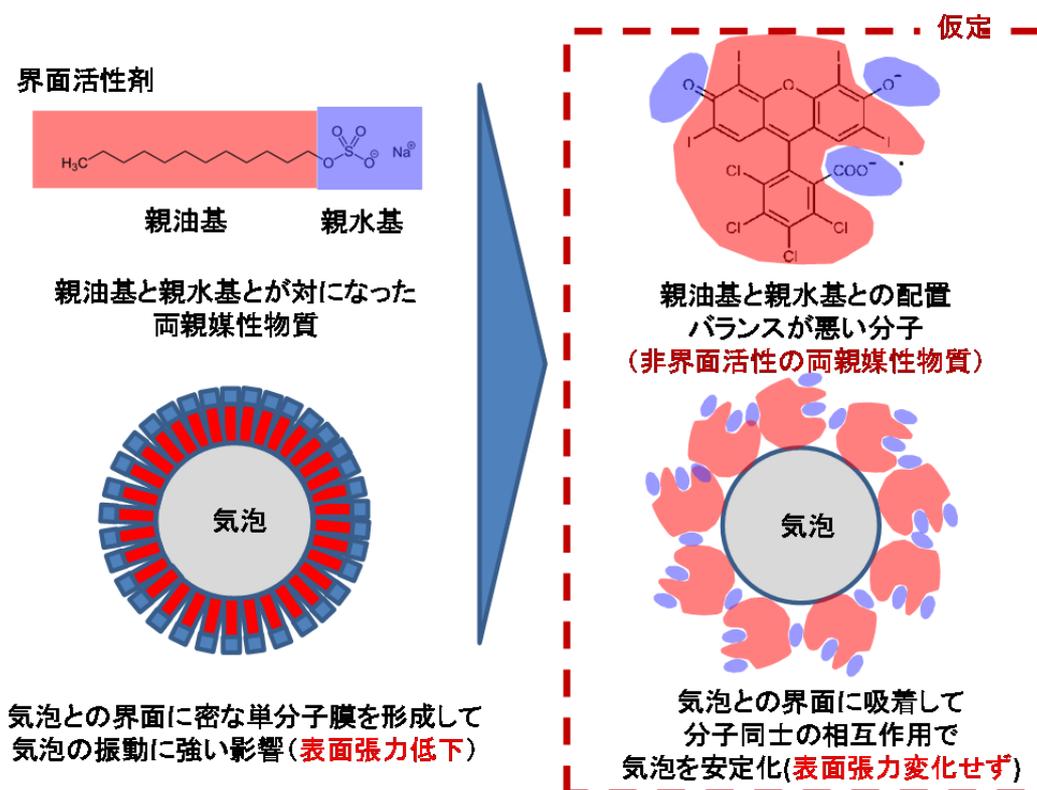


Fig. 4.7 気泡安定化剤の概念

## 4.2 気泡安定化剤を用いるアプローチ

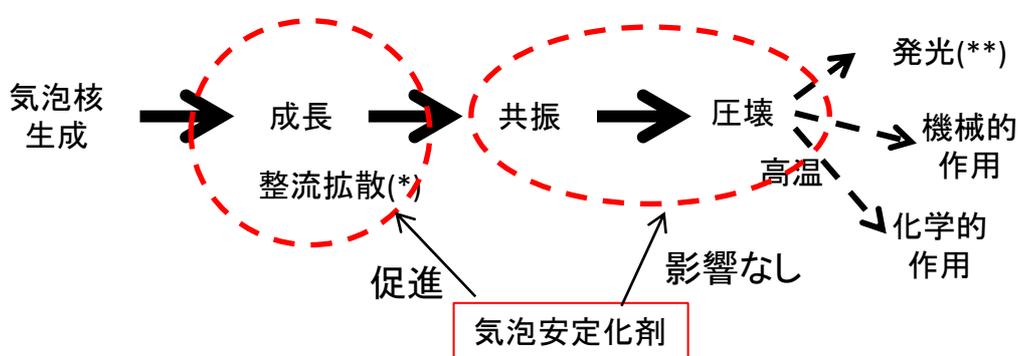
前節にて得られた結果より、界面活性剤はキャビテーションの効率化に適さないことが示唆されたため、異なるアプローチが必要となった。ここで、一般に界面活性剤は両親媒性物質の中で、特に親油基と親水基とが対になった構造を有するものであることに着目した。界面活性剤は、このような構造によって気泡との界面に密な単分子膜を形成し、そのために気泡の振動に強い影響を及ぼしていると考えられる。このため、両親媒性物質の中で、界面活性剤のように親油基と親水基とが対になっているのではなく、親油基と親水基それぞれが分子内に存在するものの構造上バランスが悪い分子を用いると界面活性剤と異なる傾向を示すのではないかと考えられた。こういった非界面活性剤である両親媒性の物質を用いることにより、気泡との界面に吸着はするが、密な単分子膜は形成できず、ただ分子同士の相互作用によって気泡を安定化するのではないかと考えられた。このような物質では、密な単分子膜を形成しないことで表面張力を低下させる効果が低いものの、気泡の安定化は行うという特性を有するのではないかと考えた（気泡安定化剤）。Figure 4.7に概念を示す。このような物質を用いることにより Fig.4.8 に示すように、整流拡散の促進と成長した気泡の共振・圧壊に影響を与えないことが達成できるのではないかと考えた。このような状況が達成できればキャビテーションの化学作用が効率的に生成することが期待される。

こういった非界面活性剂的な両親媒性物質を探索する上で、色紙増感剤の中から探すこととした。これは、色素増感剤は、キャビテーションによる活性酸素生成を促進する可能性があることから、色相増感剤を用いることによりキャビテーションの効率的な生成と自らが生成したキャビテーションにより活性酸素生成を促進するという二つの働きを持たせることができるのではないかと期待されたためである。

ここで、現在生体に適用可能な色素増感剤としては、光線力学治療用に用いられているポルフィリン系色素増感剤[88-92]とメラノーマ治療用に用いられているキサンテン系色素[93, 94]があげられる。Figure 4.9 に示すように、ポルフィリン系色素増感剤は赤色で示す親油基と親水基とがそれぞれ分かれて存在しており、かつ水溶性が低い物質が多いことから今回の非界面活性剂的両親媒性物質とは言えない。これに対し、キサンテン系色素増感剤は、図に示すようにベースとして親油基が存在しその周りに親水基が分かれて点在するという構造を有する。親水基が点在するため界面活性剤としての効果は低いが一般にキサンテン系色素は水溶性が高く目的とする特性を有していると考えられた。このため、今回キサンテン系色素増感剤が目的とする特性を有するかどうかを調べることとした。

検討する特性としては、1) 表面張力を低下する効果（通常界面活性剤の特性として最も重要とされている効果）と2) 気泡を安定化する効果があげられる。1) に関してはリング法と呼ばれる水の表面張力を低下させる能力を測定する手法で計測し（Fig.4.10 参照）水の表面張力を低下させる割合を指標とすることとした。2) に関しては直接測定するこ

とが困難なため、泡沫すなわち液体の上部にできる気泡の安定性を指標とすることとした。15mlの容量のポリスチレン遠沈管に測定対象の溶液を5ml入れ、振とう機(Taitec社SR-2S)で1分間振とうした後に生成した泡沫が消滅するまでの時間を計測しその長さをその溶液の気泡安定性の指標とした(Fig. 4.11)。このような手法でキサンテン系色素であるフルオレセイン(FS)とローズベンガル(RB)そして対照として界面活性剤であるSDSについて表面張力低下と気泡安定性を調べた結果を Fig. 4.12 に示す。FSは表面張力を低下することもなく、また気泡の安定化能力もないことがわかる。これに対し、RBでは、表面張力低下はFSと同等でありSDSの約1/5であるが、気泡安定化能力はSDSの約1.4倍高いことから目的とする界面活性能力は低い気泡安定化能力が高い物質であると考えられた。



\* Rectified diffusion    \*\* sonoluminescence

Fig. 4.8 気泡安定化剤がキャビテーションに及ぼすと考えられる効果

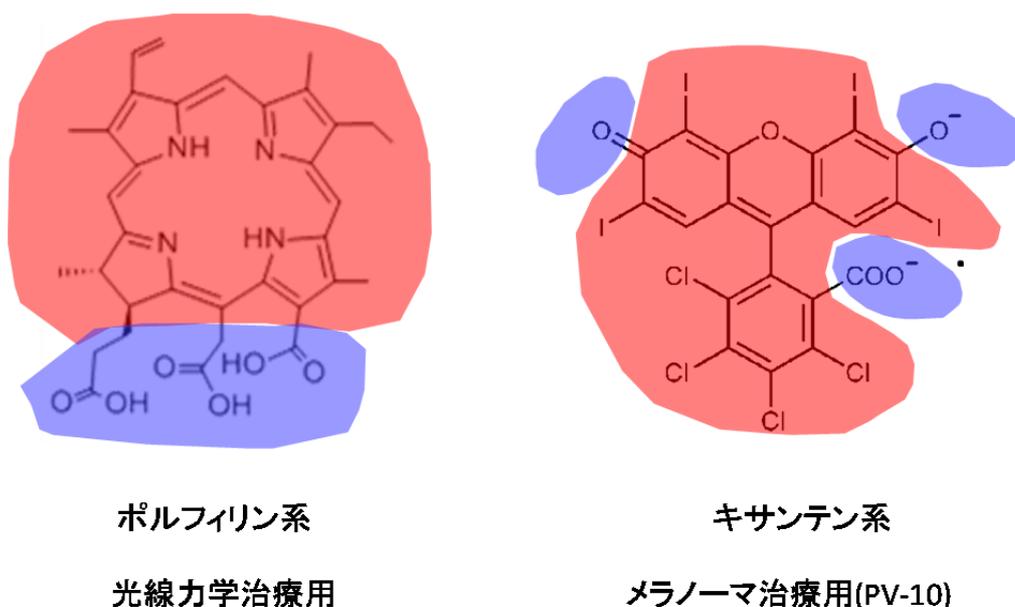
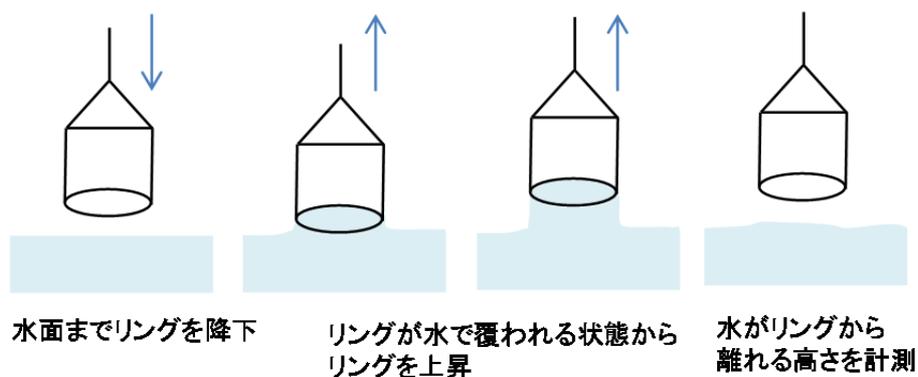


Fig. 4.9 生体に使用可能な色素増感剤およびその用途

### (1) 表面張力低下 リング法により測定



### (2) 気泡安定性

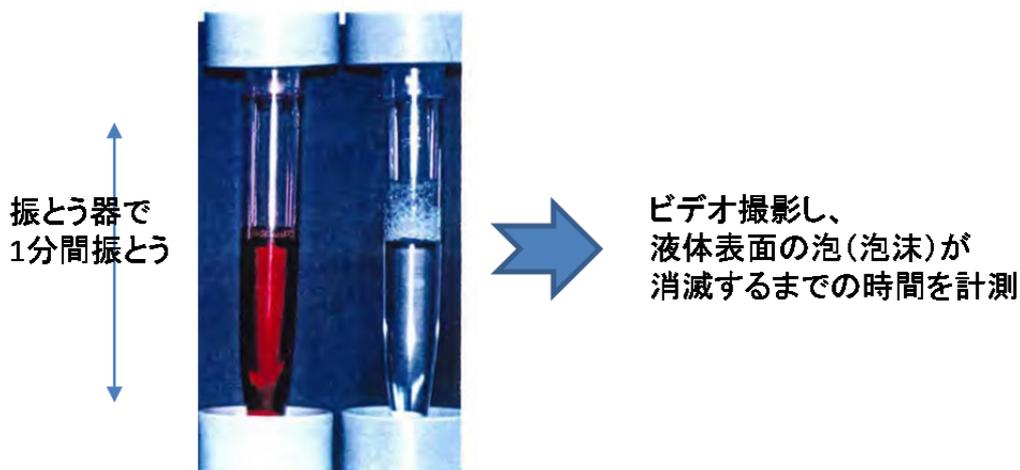
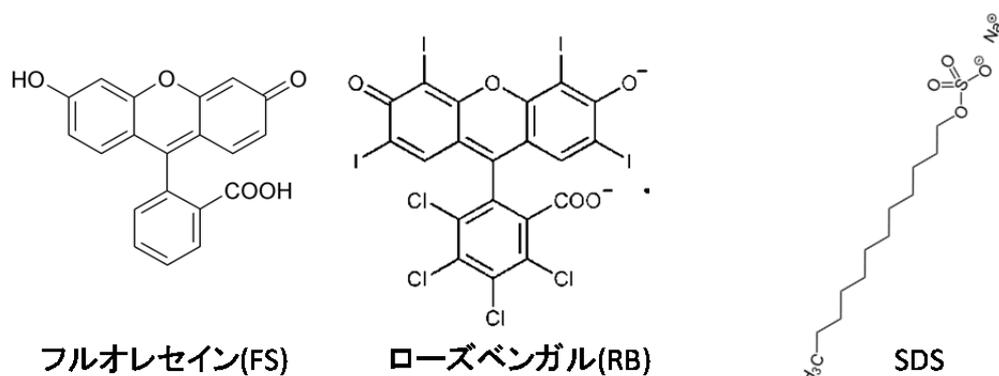


Fig. 4.10 気泡安定化剤としての特性の評価

この実験結果に基づき、キサンテン系色素によるキャビテーション閾値の低下効果を調べることにした。実験系と実験手順をそれぞれ Figs. 4.13 と 4.14 にそれぞれ示す。基本的にこれまで行ってきた超音波透過性の高い容器での分調波生成とヨウ素酸化反応計測である。ただし、これまでの実験で用いてきた抱水クロラルを用いないことが、これまでの検討と異なっている。まず実験結果のうち分調波生成について Fig. 4.14 に示す。超音波強度を  $0\text{--}10\text{W/cm}^2$  まで変化させているが、FS と SDS はまったく分調波生成ができないのに対し、RB のみ約  $3\text{W/cm}^2$  以上で分調波が生成していることがわかる。RB が有意にキャビテーション閾値を低下することがわかった。なお、図が煩雑になるため記載していないが、対照としてリン酸緩衝液を用いた場合も  $10\text{W/cm}^2$  以下では分調波生成はまったく見られないことがわかっている。なお、本系で用いている超音波トランスデューサは構造上照射可能な音響強度が約  $15\text{W/cm}^2$  以下に限定されるが、その範囲内でリン酸緩衝液に超音波を照

射してもまったく分調波生成は見られない。



	FS	RB	SDS
気泡保持時間(s)	<1	394	253
表面張力低下率(%)	2	4	21

Fig. 4.11 キサンテン系色素(RB)の気泡安定化効果

Fig. 4.14 に示す結果に基づき、他のキサンテン系色素増感剤についても同様に界面活性作用と気泡（泡沫）安定化作用をと調べることにした。Fig. 4.15 に今回調べたキサンテン系色素増感剤の構造式を示す。基本骨格は同一で、ハロゲン原子の種類が異なる。まず、Fig. 4.16 に表面張力に関する結果を示す。合わせて、粘度測定した結果も示してある。いずれの化合物においても、水の表面張力低下は 4~8%の範囲であり、極端に違いはなかった。最も表面張力低下効果が高い化合物はフロキシシン B(PB)であった。また最も効果が低かったのは FS であった。続いて、気泡安定能力を測定した結果を Fig. 4.18 に示す。こちらは FS と EY とがまったく気泡を安定化しないことがわかり、それ以外は EB, PB, RB でほぼ同程度、TCF がやや効果が低いものの気泡安定化能力を示すことがわかった。以上の結果から、EB, PB, RB においてキャビテーション閾値の低下が顕著に見られ、TCF ではやや効果が低いこと、また FS と EY では低下効果が見られないことが予想された。Fig. 4.18 ~21 に、各化合物の分調波強度とヨウ素酸化反応速度を測定した結果を示す。全体的な傾向として、分調波生成とヨウ素酸化反応生成は指揮増感剤濃度と超音波強度に対して同様の傾向を示した。まず増感剤の濃度依存性を Fig. 4.19 および 4.20 に示す。超音波強度を 10W/cm<sup>2</sup> に固定して、増感剤濃度を 10~100μM まで変化させた結果である。分調波とヨウ素酸化反応両者において各化合物の傾向はほぼ一致している。まず、FS と EY では濃度を 100μM まで上昇してもまったく効果が見られなかった。TCF では、分調波生成は 50μM 以上、酸化反応は 75μM 以上で観察された。EB, PB, RB については、分調波生成はいずれ

の化合物においても 20 $\mu$ M 以上で観察された。これに対して、酸化反応は概ね 50 $\mu$ M 以上で観察されることがわかった。続いて Fig. 4.20 および 4.21 に示される強度依存性についてであるが、この図に示される結果は増感剤濃度を 100 $\mu$ M に固定し、超音波強度を 0～10W/cm<sup>2</sup> まで変化させて得られたものである。強度依存性についても、先の増感剤濃度依存性と同じく分調波生成と酸化反応とはほぼ同じ傾向を示した。まず FS と EY とは、10W/cm<sup>2</sup> まで上昇させても分調波も酸化反応も生じることはなかった。TCF については約 7W/cm<sup>2</sup> 以上で分調波と酸化反応が生じることがわかった。EB については、5W/cm<sup>2</sup> 以上で分調波と酸化反応が生じている。また、PB と RB については、3W/cm<sup>2</sup> 以上で分調波と酸化反応が生じている。以上 Fig. 4.20 および 4.21 の結果を Fig. 4.22 にまとめる。Fig. 4.22 と Fig.4.17 との比較により、気泡安定化能力がキャビテーション低下と相関していることが示唆される。

以上得られた結果よりキャビテーションおよびキャビテーション化学作用を生じる音響強度閾値を低下する物質として、気泡を安定化しかつ強い界面活性作用を有しないキサンテン系色素増感剤が有効であることがわかった。特に、この効果は 100 $\mu$ M で生じることから生体への適用が十分可能であると考えられた。これまでに生体で効果が検証されている音響化学活性物質は *in vitro* の実験では概ね 100  $\mu$ M 程度の濃度で効果を発現することがわかっているからである。なお、今回観察された、キサンテン系色素増感剤により生じた酸化反応であるが、これは増感剤がキャビテーションを生じ、さらに音響化学物質として働くことで二重に効果を発揮していると期待される。ただし、色素増感剤なしでは生成しない活性酸素種の検出[69, 71, 95, 96]など今後より詳細な検証によりキサンテン系色素が音響化学物質として働いていることを確認する必要があると思われる。また、今回の実験系は SHS を用いていることから、最終的に SHS と組み合わせて用いる物質として特に問題無いと考えられる。

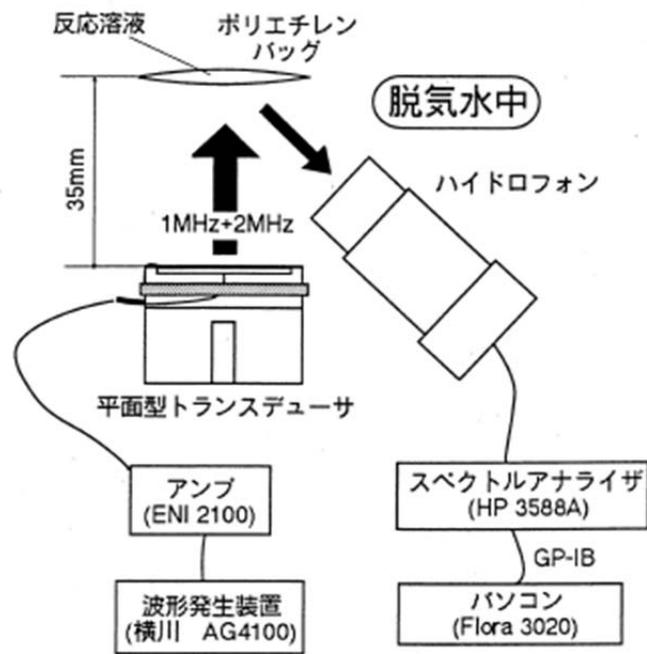


Fig. 4.12 キサンテン系増感剤のキャビテーション生成能の測定系

1. サンプル(色素増感剤+KI)溶液2mlをポリエチレンバッグに入れ水槽内に配置する
2. 超音波照射条件を設定し、所定時間(標準1分間)超音波を照射 (照射中毎秒ハイドロフォン信号をスペクトルアナライザで取得し、GP-IBを介してパソコンに取り込む)
3. 照射後直ちに反応容器を1cm光学セルに移し替え、分光光度計にて350nm近辺の吸光度を測定する)
4. あらかじめ測定しておいた対照溶液および校正曲線より、超音波照射により生成した $I_3^-$ の量を算出する
5. ハイドロフォンより得られた信号を時間平均し、1.5MHzにおける値を分調波強度とする

Fig. 4. 13 キャビテーション生成能の測定手順

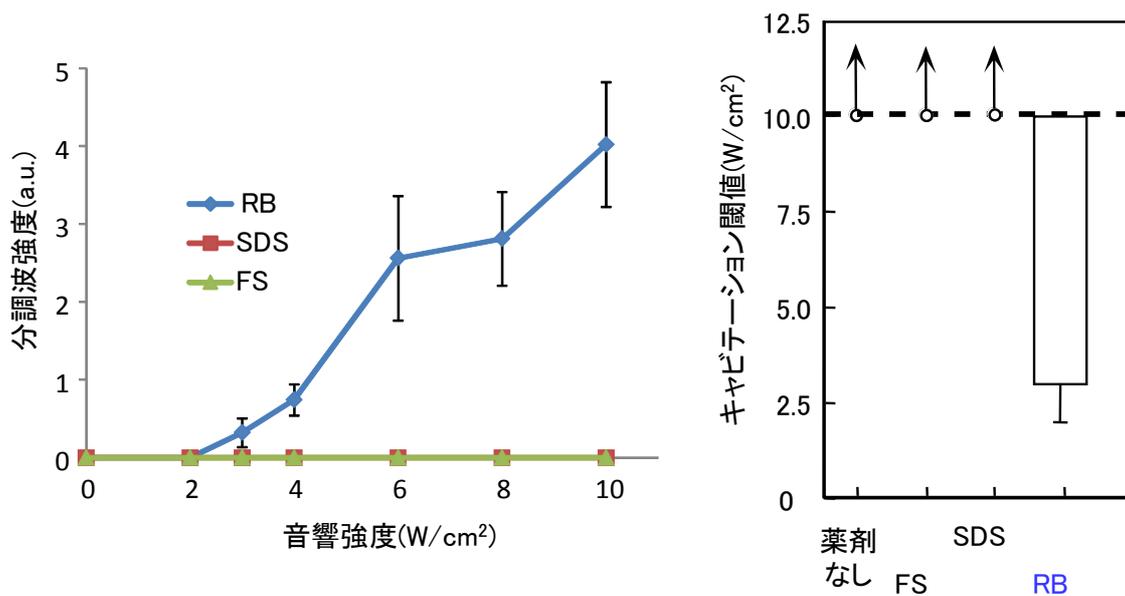


Fig. 4. 14 ローズベンガルによる超音波照射時の分調波生成およびキャビテーション閾値低下

R	R'	Compound
H	H	fluorescein (FS)
Cl	H	tetrachlorofluorescein (TCF)
Br	H	eosin Y (EY)
I	H	erythrosin B (EB)
Br	Cl	phloxin B (PB)
I	Cl	rose bengal (RB)

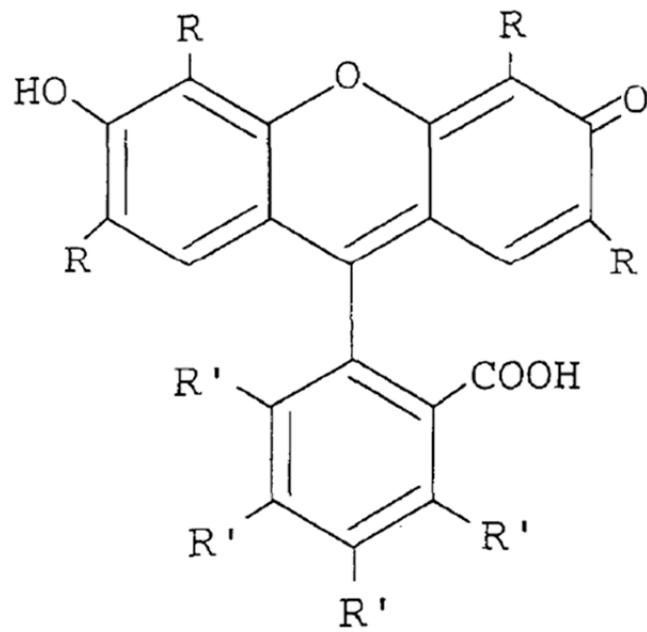


Fig. 4. 15 実験に用いたキサンテン系増感剤の構造  
(Kawabata ら[97])

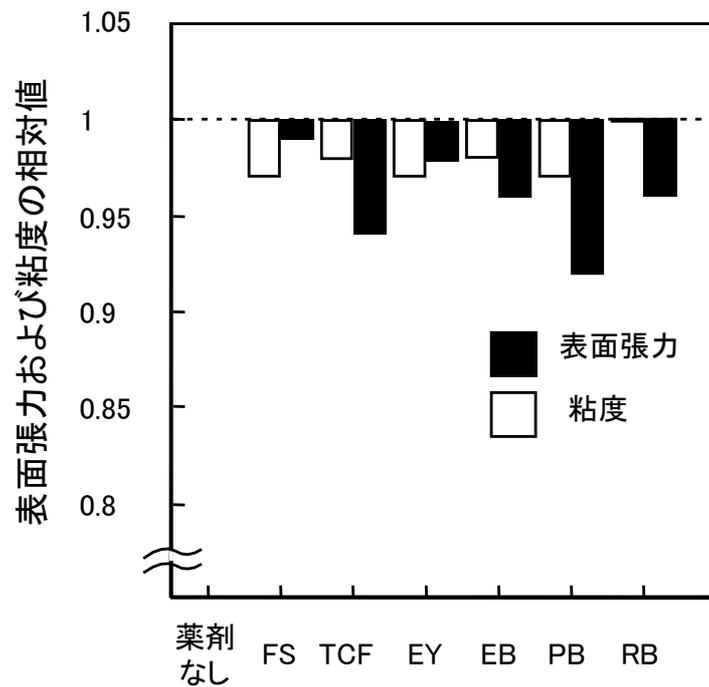


Fig. 4.16 キサンテン系増感剤による表面張力および粘度の低下  
(Kawabata ら[97]より)

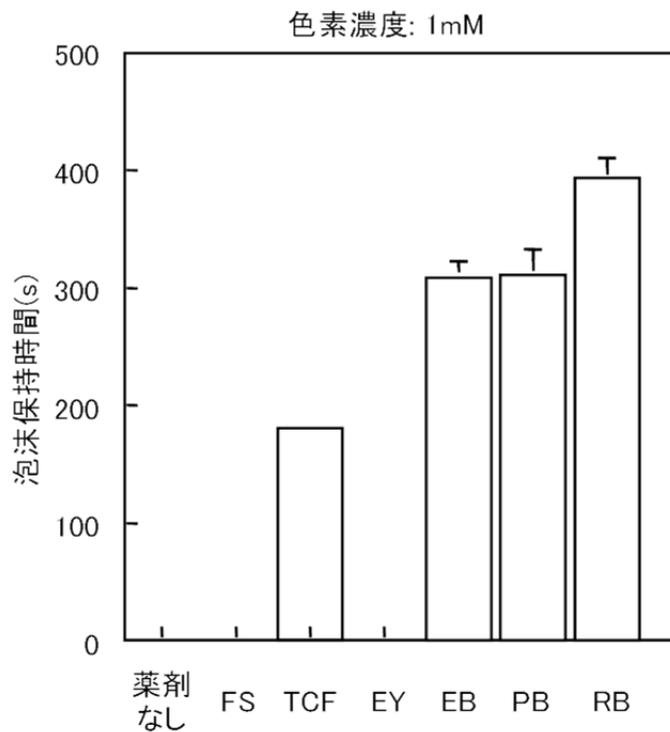


Fig. 4.17 キサンテン系増感剤による泡沫保持  
(Kawabata ら[97]より)

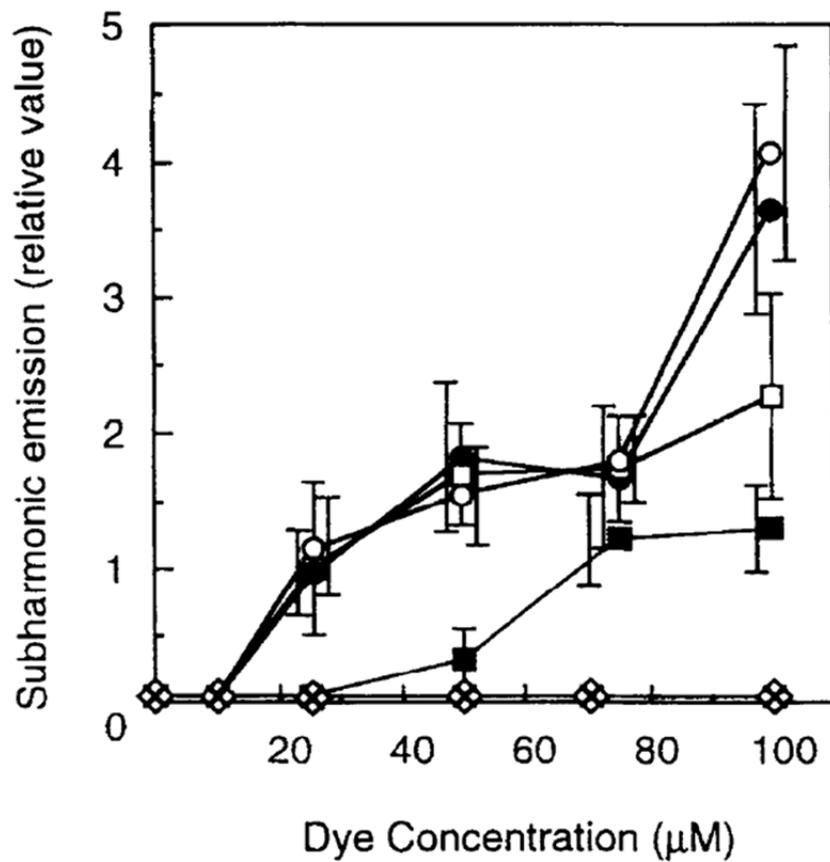


Fig. 3. Dependence of subharmonic intensity in xanthene dye solutions on dye concentration when total acoustic intensity = 10 W/cm<sup>2</sup>. RB (○); PB (●); EB (□); TCF (■); EY (◇); FS (×).

Fig. 4. 18 分調波生成の増感剤濃度依存性  
(Kawabata ら[97])

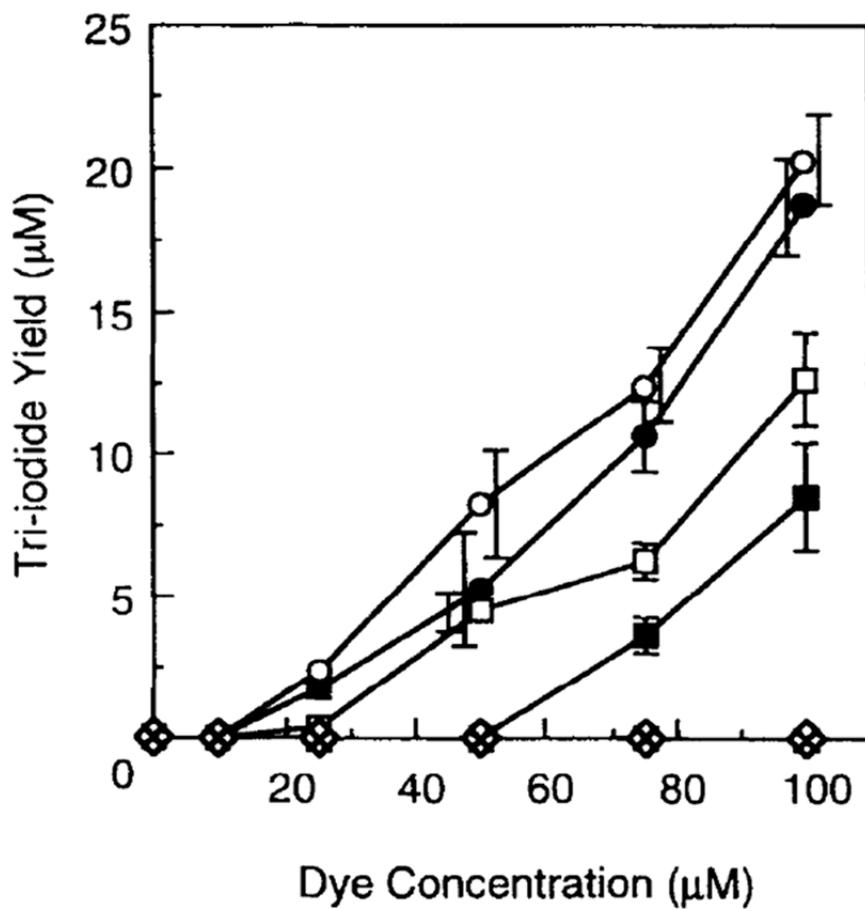


Fig. 4. Dependence of tri-iodide yield in xanthene dye solutions on dye concentration when total acoustic intensity = 10 W/cm<sup>2</sup>. RB (○); PB (●); EB (□); TCF (■); EY (◇); FS (×).

Fig. 4. 19 ヨウ素酸化反応の増感剤濃度依存性  
(Kawabata ら[97])

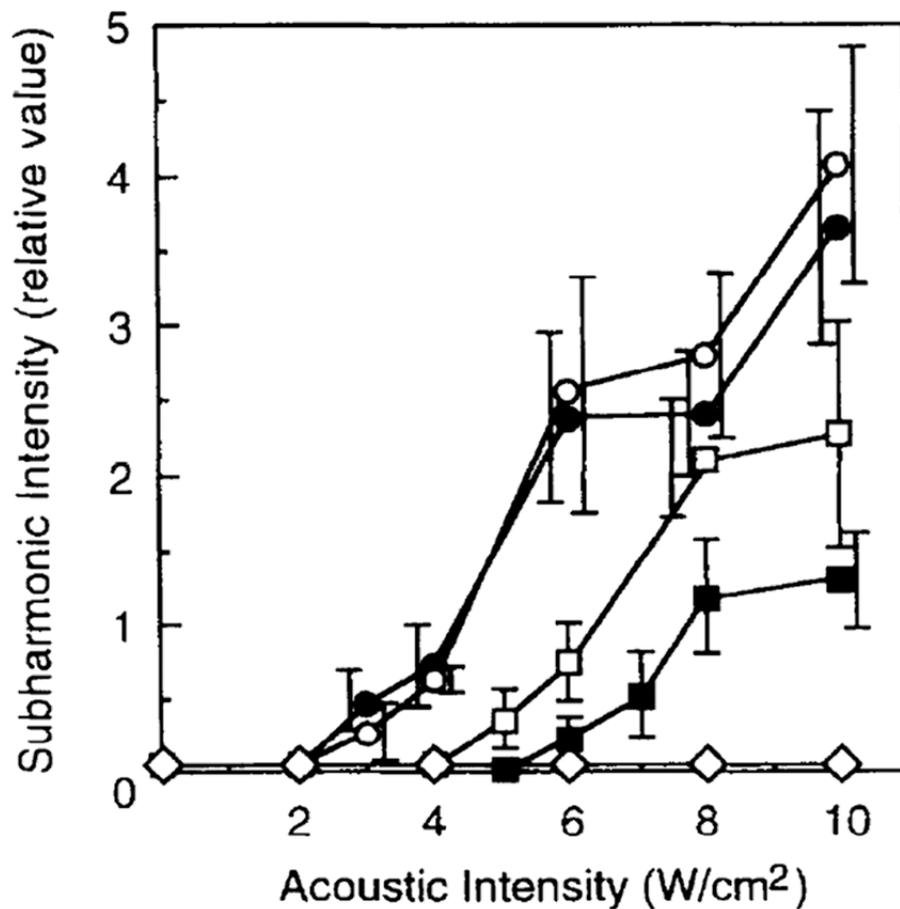


Fig. 5. Dependence of subharmonic intensity in xanthene dye solutions on acoustic intensity when dye concentration = 100  $\mu$ M. RB (○); PB (●); EB (□); TCF (■).

Fig. 4. 20 分調波強度の超音波強度依存性  
(Kawabata ら[97])

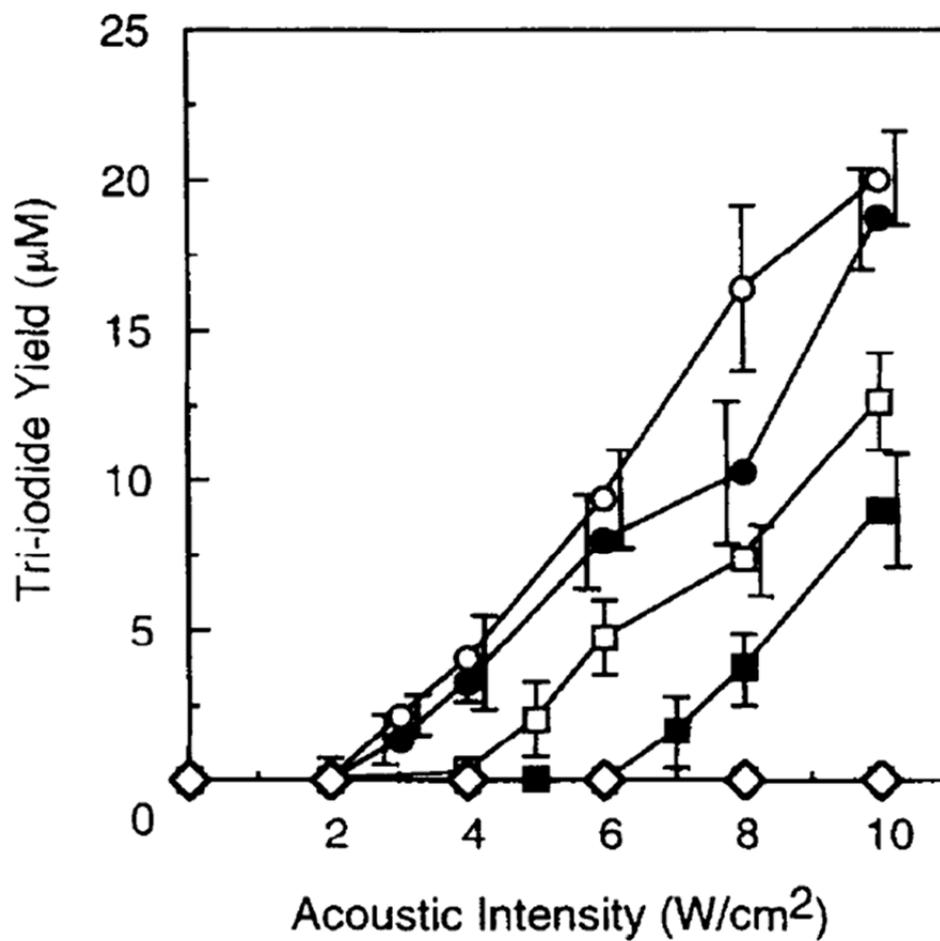


Fig. 6. Dependence of tri-iodide yield in xanthene dye solutions on acoustic intensity when dye concentration = 100 μM. RB (○); PB (●); EB (□); TCF (■).

Fig. 4. 21 ヨウ素酸化反応の超音波強度依存性  
(Kawabata ら[97])

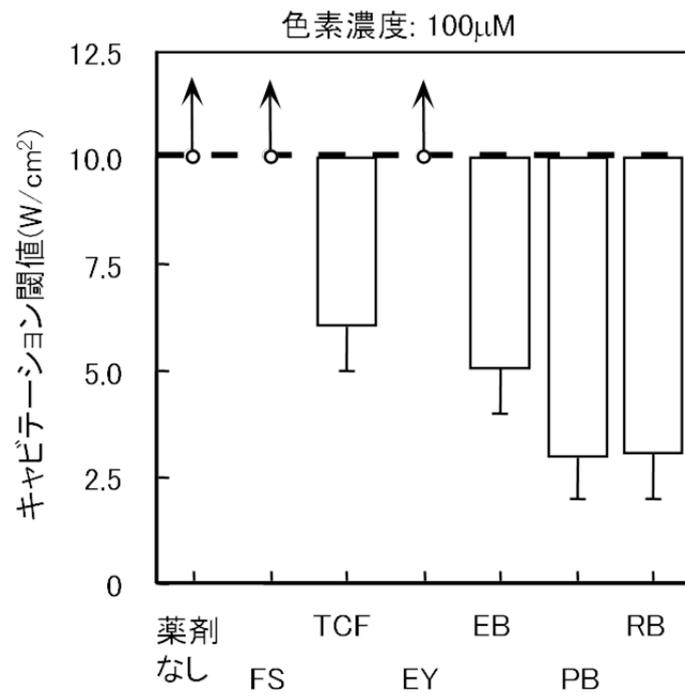


Fig. 4. 22 キサンテン系増感剤によるキャビテーション閾値の低下  
(Kawabata ら[97]より)

## 第5章 提案手法による生体中でのキャビテーション生成

### 5.1 はじめに

前章にて明らかになったキサンテン系色素増感剤によるキャビテーション生成および化学作用の促進効果は、1mM以下の低濃度で得られることが分かった。このため、生体中에서도同様の現象を起こせることが十分考えられた。このことから、本章では、生体中で実際にキサンテン系色素がキャビテーション閾値を低下させるかどうかを調べた。なお、生体中での化学作用の測定は困難であることから、今回の検証においては、ハイドロファンによる分調波生成の観察と肉眼所見によるダメージの有無を指標とした。また、血管が豊富で薬物濃度を高めやすい肝臓を対象とした。なお、本検討の前段階として、第二高調波重畳法(SHS)の肝臓における効果も調べてあり、SHSが生体で有効であり、かつ相対位相差依存性があることも確認してある。(Fig. 5.1 および Fig. 5.2 参照)。また、別途がん細胞懸濁液への超音波照射において、キサンテン系色素増感剤の存在により活性酸素生成および殺細胞効果が促進されることがわかっている[74]。

### 5.2 実験方法

#### 5.2.1 試薬類

前章で水中での実験に用いたキサンテン系色素は、フルオレセイン(FS)、テトラクロロフルオレセイン(TCF)、エオシン Y(EY)、エリトロシン B(EB)、ローズベンガル(RB)であり、今回これらについてマウス肝臓での効果を調べた。前章中 Fig. 4.15 に、これらの化合物の化学式を示してある。

#### 5.2.2 超音波トランスデューサ

今回用いた超音波トランスデューサは、SHSを適用可能なものである。0.5 MHz および 1 MHz に共振周波数を持つ PZT 素子各 16 個を、外径および曲率半径 10cm の球面上に 16 セクタ 2 トラック(内トラック:1 MHz, 外トラック:0.5 MHz)となるよう配置してある。幾何学的な焦点距離が 10cm の収束型である。0.5MHz と 1MHz の各周波が、幾何学的焦点で重なり合うように設計されている。

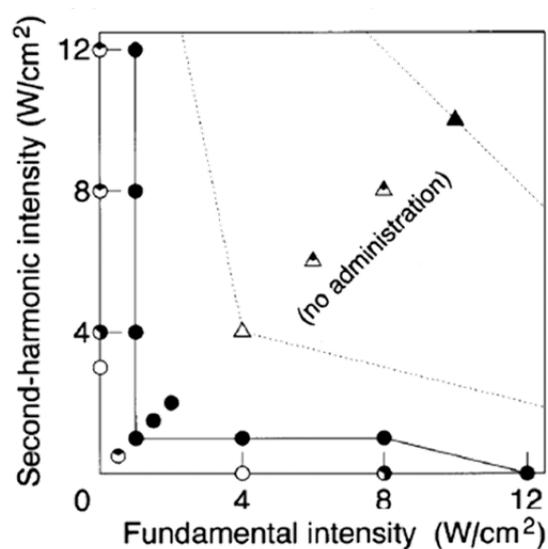
#### 5.2.3 マウス肝臓の操作

ddy マウス(雄、5 週令)をペントバルビタールナトリウム(50mg/kg)の腹腔内投与(i.p.)により麻酔する。キサンテン系色素増感剤を 50mg/kg の dose で静脈投与したのち、マウスを保定し、腹部正中切開により肝臓(外側左葉)を傷つけずに露出する。糸付き縫合針を用いて露出した肝臓をなるべく体側から遠ざけるように固定する。Fig. 5.3 に示すように、脱気生理食塩水(温度:39°C)を満たした水槽中の超音波トランスデューサの幾何学的焦点位置に、露出した肝臓が配置されるようにマウスを保持し、肝臓の中央部に超音波を照射した。な

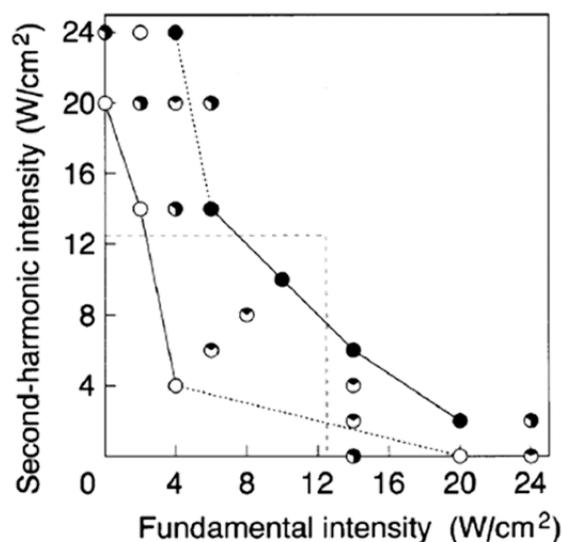
お、本研究における動物実験は(株)日立製作所基礎研究所の動物実験倫理指針に従って行われたものである。

#### 5.2.4 照射方法

基本波(0.5MHz)と第2高調波(1.0MHz)を音響強度比で1:1になるよう照射した。スポット状の組織ダメージが肉眼的に観察される超音波強度を調べ、また同時に次項に示すように音響的な方法でキャビテーションの生成を測定した。ダメージが見られ、かつ音響的にキャビテーションの生成が確認された最小の強度をキャビテーション閾値とした。照射時間は最大3分とし、水槽の外から肉眼的に組織ダメージを示す出血斑が確認された場合は、その場で照射を終了した。



(a) Administration of erythrosine



(b) No administration

Fig. 5.1 マウス肝臓における高調波重畳の効果

(Umemura ら[64])

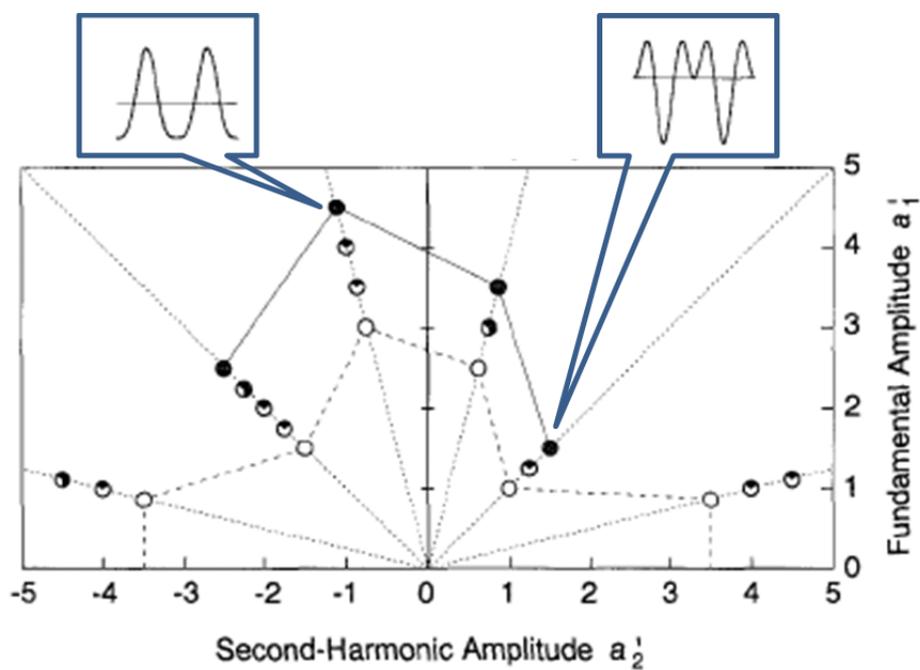


Fig. 5.2 マウス肝臓における高調波重畳の効果(相対位相差依存性)  
(Umemura ら[64]より)

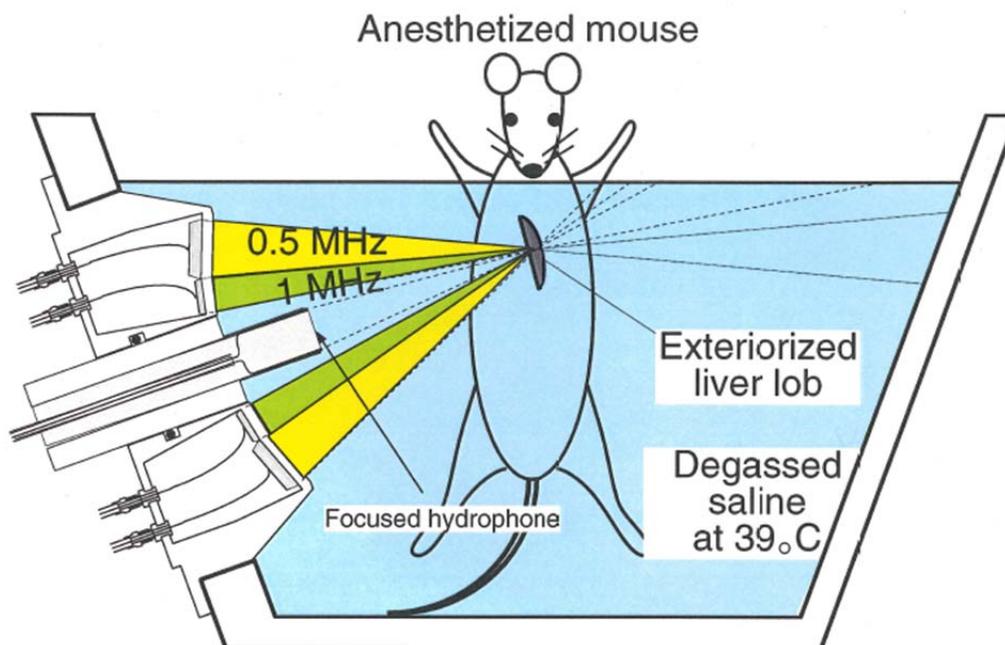
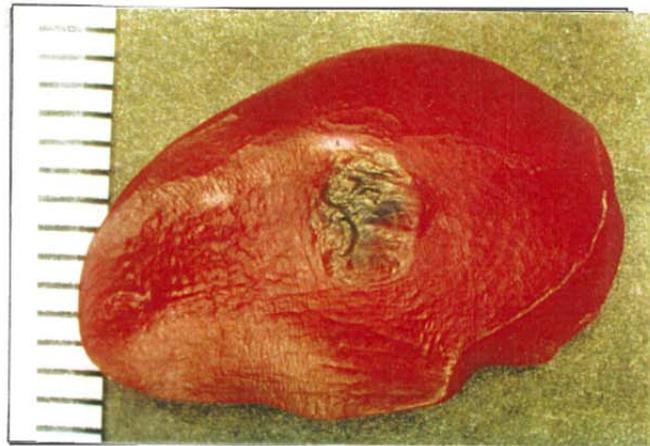
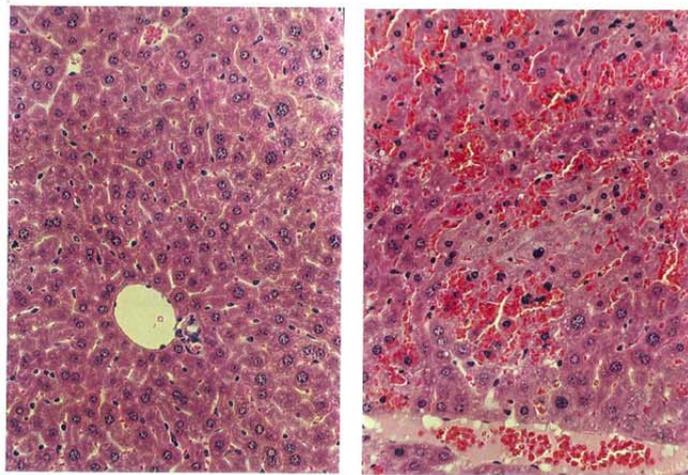


Fig. 5.3 マウス肝臓への超音波照射用セッティング

(Umemura ら[64]より)



Scale in mm



照射なし

照射後

肝臓の組織変化

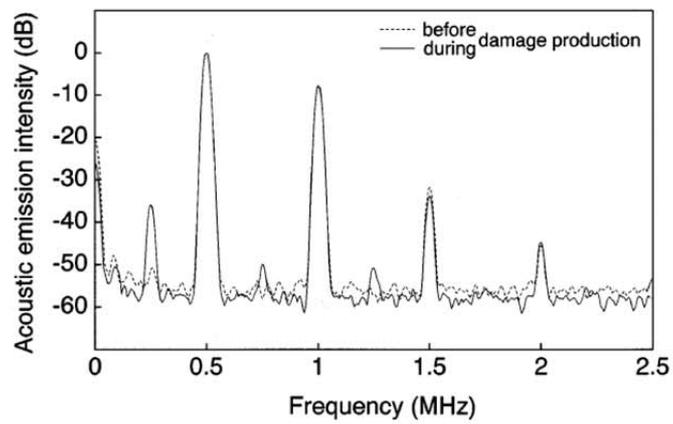


Fig. 5. 4 マウス肝臓へ超音波を照射した際の組織変化および音響信号

(Umemura ら[64]より)

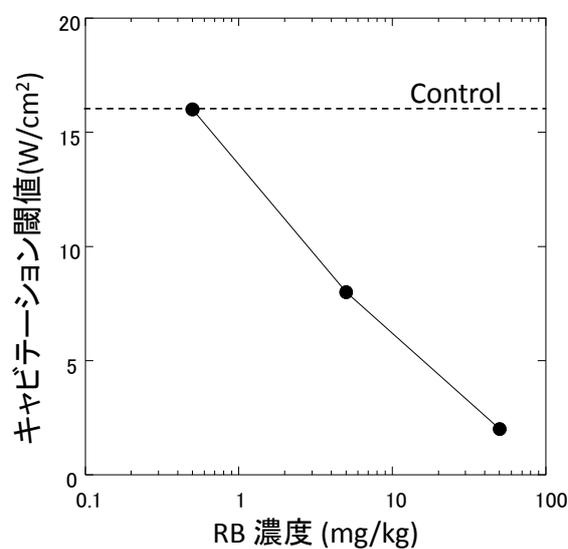


Fig. 5.5 マウス肝臓で生じるキャビテーションの強度閾値のローズベンガル濃度依存性

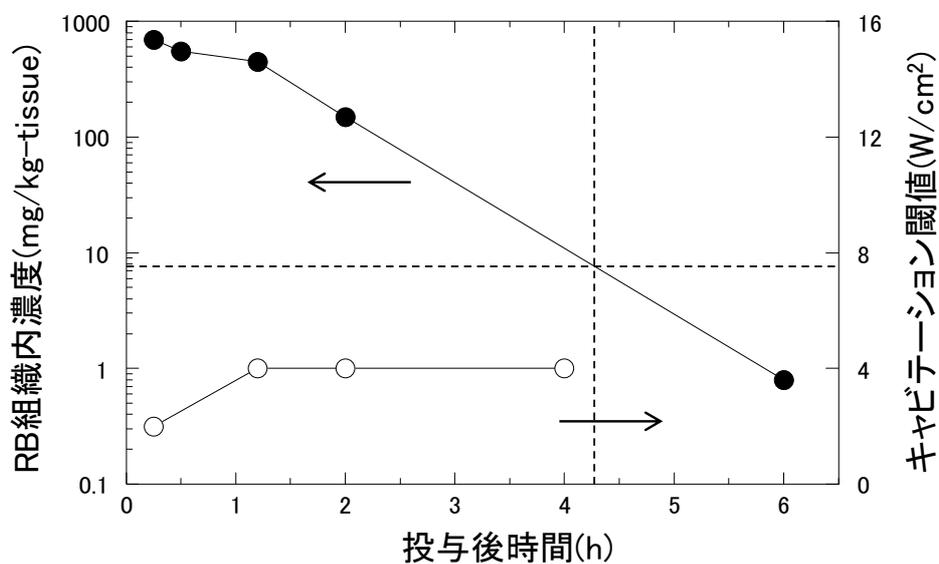


Fig. 5.6 マウス肝臓で生じるキャビテーションの強度閾値のローズベンガル投与後時間依存性

### 5.2.5 照射対象からの音響信号の測定

肝臓の組織ダメージを観察する際に、超音波照射中に肝臓でキャビテーションが生じて

いることを確認するため、肝臓からの分調波の生成を測定した。収束超音波トランスデューサーの中央部に、高分子圧電体を使った収束型ハイドロフォン(有効直径 11mm、焦点距離 80mm、東レテクノ製)を配置し、超音波照射中に肝臓から得られる音響信号を検出した。ハイドロフォンにより得られた信号をスペクトルアナライザ(HP-3588A)で処理し、周波数スペクトルを得た。スペクトルアナライザのモニター上で 1.5 次の分調波成分(1.5MHz)が有意に生成した場合に、キャビテーションが生成したと判定した。

### 5.2.6 組織内ローズベンガル濃度の測定

マウス組織(肝臓)内のローズベンガル(RB)の濃度は以下のように測定した。マウス微静脈より RB を 1mg/kg の dose で投与し、その後一定時間後(10, 30, 60, 120, 360 分)後にマウスを安楽死させる。その後速やかに肝臓組織を取り出し、組織 0.1mg をホモジネート処理する。その後メタノール 5ml にてタンパク変性と RB 抽出を行い[98]、遠心分離の後上澄成分の蛍光測定(日立 F-4500, ex: 547nm, em: 574 nm)により RB の濃度を算出した。既知濃度の RB 溶液より得られた校正曲線を元に組織内 RB 濃度を算出した。

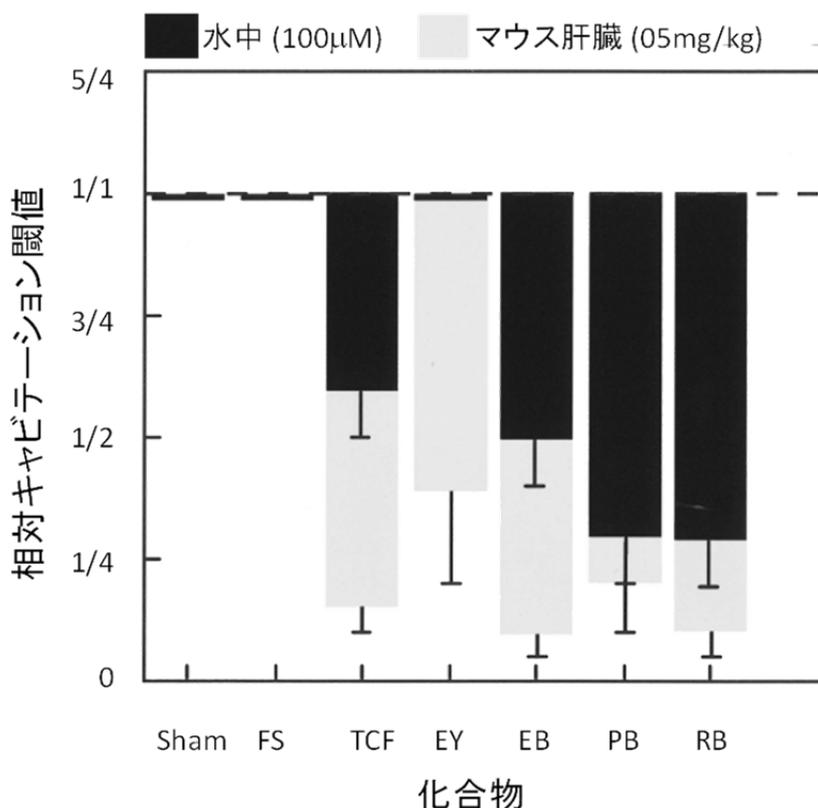


Fig. 5.7 マウス肝臓で生じるキャビテーション閾値のキサンテン系色素による低下効果

## 5.3 結果

### 5.3.1 マウス肝臓内および水中におけるキサントン系色素の効果

Figure 5.7 に、フルオレセイン(FS)、テトラクロロフルオレセイン(TCF)、エオシン Y(EY)、エリスロシン B (EB)、フロキシシン B(PB)、ローズベンガル(RB)(それぞれの構造については Fig. 4.12 に示してある)をマウス肝臓に 50mg/Kg の濃度で投与し、5 分後に超音波を照射した場合のマウス肝臓におけるキャビテーション閾値を、前章に示した水中における結果と併せて示す。EB、RB が最も閾値を低下する能力が高く、それぞれ対照に比べ、閾値を約 1/8 に低下させた。PB が EB、RB に準じている。なお、前章の水中での実験では、PB と RB が最も効果が高く、EB がそれらに準ずる結果であり、水中とマウス肝臓中ではほぼ同様の傾向が見られた。EY に関しては、水中とマウス肝臓中とで傾向が異なり、水中では閾値低下効果が見られないのに対し、マウス肝臓中では、FS を除く他の色素よりも効果が低いながらも、有意に閾値を低下させる効果を示した。

### 5.3.2 体内でのキャビテーション閾値低下効果の投与 dose 依存性

Figure 5.5 に、Fig.5.7 で最も閾値低下効果の高かった RB について、投与 dose を変化させてマウス肝臓に投与し、5 分後に超音波照射を行った場合のキャビテーション閾値を示す。50mg/Kg(Fig. 5.5 における投与量)、5mg/Kg、0.5mg/Kg で実験を行なった。閾値を低下させる効果は投与 dose に強く依存し、0.5mg/Kg 以上の dose でないと効果が見られないことがわかった。

### 5.3.3 キャビテーション閾値低下効果の色素投与後時間依存性

Figure 5.6 に、Fig. 5.7 で最も閾値低下効果の高かった RB を投与量 50mg/Kg で投与し、投与後の時間を変化させて超音波を照射した際の肝臓における RB 濃度およびキャビテーション閾値を測定した結果を示す。黒丸で示す肝臓内 RB 濃度は、投与後急速に減少し、4 時間経過後には初期濃度の約 1/100 になる。これに対し、白丸で示すキャビテーション閾値は、投与時間に対して顕著な変化を示さず、約 4 時間経過した場合でも、閾値低下が見られた。

## 5.4 考察

水中およびマウス肝臓におけるキャビテーション閾値低下効果を比較し、ほぼ同様の傾向であることがわかった。水中で最も効果の高い、RB(ハロゲン化フルオレセイン)は生体においても最も効果が高かった。ハロゲンを持たないフルオレセインはマウス肝臓、水中いずれの系においても低下効果を示さなかったことから、キャビテーション閾値低下には、キサントン色素がハロゲン原子を有していることが重要と考えられる。なお、EY に関しては生体と水中で効果の違いが顕著であり、水中ではまったく効果がなかったのに対し、体内中では他の増感剤とほぼ同等の効果を示すという結果が得られている。この理由に関し

では、溶解（分散）状態の違いが関与していると考えられる。今回の生体での検討では増感剤は静脈投与を行っている。従って、投与直後から血液中のタンパクの約半分を占めるアルブミンに吸着した状態になっていると考えられる。アルブミンがほぼ界面活性剤と考えられることから増感剤の分散はほぼ理想的に行われていると想定される。これに対し、水中への分散では、使用したロットの保存状態等により分散性が良好でない場合も考えられる。より分散性の良好な状態でキャビテーション閾値効果がほとんど増感剤間の違いが見られないことから、生体中での結果がより確からしいと考えられる。つまり前章での増感剤間の効果の違いは、水溶液中での分散状態の違いを表していたものと考えられる。

RBの Maus 肝臓内濃度とキャビテーション閾値低下効果との関係から、Maus 肝臓内においては、色素が生体成分とがなんらかの相互作用を行うことによりキャビテーション閾値が低下していることが考えられる。どのような相互作用がキャビテーション閾値を低下させるのに有効であるかがわかれば、より効果の高い薬剤を得ること、あるいは組織選択性をもたせることができる可能性がある。従来、染色に関する知見[99]しか得られていないため、新規に検討する必要がある。

今後、より詳細な機構の解明のため、*in vitro*、*in vivo* 双方での検討を予定している。

#### 1) *in vitro*

溶液中に生体成分を加えた状態でのキサンテンのキャビテーション閾値低下効果の変化を測定することにより、キサンテンがどのような生体成分と相互作用しているかの情報がわかるものと期待される。使用する生体成分としては、まず血液そのものを考えている。キサンテン系色素の血液中での効果が水中より高い場合には、さらに血液中の個々の成分について検討する。

#### 2) *in vivo*

血中に多量に存在するタンパクは、ほとんどのものがアミノ基あるいはチオール基を有しているが、これらは特定の官能基、例えばヨードアセトアミド基などと共有結合することが知られている。このような官能基を有するキサンテン色素誘導体の Maus 肝臓における効果を調べることにより、タンパクとキサンテン系色素との相互作用がキャビテーション閾値低下に関与するかどうかに関する知見を得る。

このような実験を行ない、生体中でキャビテーション閾値を低下させるのに必要な化学構造あるいは性質について知見を得て、より効果が高く、あるいは組織選択性を有する化合物を探索する指針としたい。

今回用いたキサンテン系色素は水溶性が比較的高く、組織への集積性はあまり望めない。このため、生体への適用においては、従来のように投与後一日程度経過してから超音波を照射するのではなく、投与後すぐに照射するという方法が望ましいと考えられる。このような水溶性の高い薬剤と投与後直後の照射によれば、体外への消失が早い場合、治療後に薬剤が体内に残って悪影響を及ぼす恐れは少ないのではないかと考えられる [88, 89, 100-102]。治療対象によっては、このような水溶性の試薬を用いるメリットがあると思わ

れる。

また、このような水溶性の化合物をそのまま用いる以外に、キサントゲン系色素にアルキル基などの疎水性の官能基を付加した化合物の使用により、疎水性を高めるという方法も考えられる[103-105]。このような疎水性の化合物は、組織への集積性が高いことが期待できる。また、疎水性の程度を変化させた化合物を用いた実験を行うことにより、キャビテーション閾値低下に必要な物質の構造に関する知見も得られるものと期待される。

例えば、アルキル基をつけて疎水性を変化させた時に、アルキル基の長さが最適値を持つならば[106]、先に行ったアルコールでの実験のように最適な疎水-親水のバランスが存在することになる。その場合、さらに最適な疎水-親水のバランスにした場合とアルキル基をつけない元の化合物との効果が著しく異なるという結果が得られたならば、疎水-親水のバランスがキャビテーション閾値低下の支配的要因と考えられる。この場合には、他の色素系例えばポルフィリン系について、異なる長さのアルキル鎖をつけることを試みる。

## 5.5 まとめ

種々のキサントゲン系色素について、マウス肝臓内でキャビテーション閾値を低下させる効果を調べ、閾値低下に必要な構造が水中とほぼ同じであることがわかった。色素を投与してからの時間を変えて閾値の低下を測定した結果、肝臓における色素濃度が減少しても閾値の低下が見られたことから、生体成分と色素との間になんらかの相互作用が働いてキャビテーション閾値を低下させていることが示唆された。

## 第6章 結論

本論文は、今後がんの検診システムの進展により益々増えると思われる超早期の段階で発見されるがんに対応可能な、新規な無侵襲な超音波治療手法の要素技術に関する研究をまとめたものである。

必要とされる要素技術としては、音響キャビテーションの化学作用を低強度で生成する新規な超音波照射方法と、その照射方法と組み合わせて用いることのできる化学物質であってやはりキャビテーションを低強度で生じる能力を有する構造を有するものである。

本研究の結果、前者としては基本波に第二高調波を重畳する手法が、また後者としては非界面活性剤である両親媒性の色素増感剤が有効であることが、試験管レベルでの検討およびマウスを用いた生体内でも確認できた。

今回検討を行わなかった課題として、化学物質を腫瘍に集積させる技術と、キャビテーションを弱い強度の超音波で生じるときにその生成をどうやってモニタリングするかというものが挙げられる。前者については、両親媒性の調製により腫瘍への集積性を向上する手法について検討中であり、すでに生体中で有効であることを確認できている。後者については、近年活発に研究開発が進んでいる高速（～毎秒 1000 フレーム）での超音波撮像技術を活用することによって可能になるのではないかと期待される。

今後、これらの課題に取り組み、ターゲティングを必要としない、境界が不明瞭な腫瘍の治療を可能とする超音波がん治療の確立を目指す。

## 参考文献

- [1] 伊東正安 and 望月剛, "音の物理特性," in *医用音響工学*, ed: 東京電機大学出版社, 2014, pp. 105-128.
- [2] S. Y. Woo, G. C. Rice, D. S. Kapp, and G. M. Hahn, "A predictive assay for human tumor cellular response to hyperthermia using dansyl lysine staining and flow cytometry," *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, vol. 14, pp. 361-365, 1988.
- [3] P. P. Lele, "Local Hyperthermia by Ultrasound for Cancer Therapy," in *Biological Effects of Ultrasound*, W. L. Nyborg, Ed., ed: Churchill Livingstone, 1985, pp. 135-156.
- [4] K. B. Ocheltree, P. J. Benkeser, L. A. Frizzell, and C. A. Cain, "A Stacked Linear Phased Array Applicator for Ultrasonic Hyperthermia," in *IEEE 1984 Ultrasonics Symposium*, 1984, pp. 689-692.
- [5] N. T. Sanghvi, K. Hynynen, and F. L. Lizzi, "New developments in therapeutic ultrasound," *IEEE Eng Med Biol*, vol. 15, pp. 83-92, 1996.
- [6] N. T. Sanghvi, F. J. Fry, R. Bihrlé, R. S. Foster, M. H. Phillips, J. Syrus, *et al.*, "Noninvasive surgery of prostate tissue by high-intensity focused ultrasound," *IEEE T Ultrason Ferr*, vol. 43, pp. 1099-1110, 1996.
- [7] K. Hynynen, A. Chung, T. Fjield, M. Buchanan, D. Daum, V. Colucci, *et al.*, "Feasibility of using ultrasound phased arrays for MRI monitored noninvasive surgery," *IEEE T Ultrason Ferr*, vol. 43, pp. 1043-1053, 1996.
- [8] C. R. Hill and G. R. ter Haar, "Review article: high intensity focused ultrasound--potential for cancer treatment," *Br J Radiol*, vol. 68, pp. 1296-1303, 1995.
- [9] K. Hynynen, A. Darkazanli, E. Unger, and J. F. Schenck, "MRI-guided noninvasive ultrasound surgery," *Med Phys*, vol. 20, pp. 107-115, 1993.
- [10] S. Umemura, S. Yoshizawa, K. Sasaki, and K. Kawabata, "Acceleration of ultrasonic tissue heating by microbubble agent," *J Acoust Soc Am*, vol. 123, p. 3215, 2008.
- [11] S. Umemura, S. Yoshizawa, Y. Matsumoto, K. Sasaki, R. Asami, and K. Kawabata, "Enhancement of ultrasonic heating with microbubbles and their localization in target tissue," in *Proc IEEE Ultrason Symp*, 2009, pp. 93-100.
- [12] A. A. Atchley, L. A. Frizzell, R. E. Apfel, C. K. Holland, S. Madanshetty, and R. A. Roy, "Thresholds for cavitation produced in water by pulsed ultrasound," *Ultrasonics*, vol. 26, pp. 280-5, 1988.
- [13] D. L. Miller, "A review of the ultrasonic bioeffects of microsonation, gas-body activation, and related cavitation-like phenomena," *Ultrasound Med Biol*, vol. 13, pp. 443-470, 1987.
- [14] D. R. Gross, D. L. Miller, and A. R. Williams, "A search for ultrasonic cavitation within the canine cardiovascular system," *Ultrasound Med Biol*, vol. 11, pp. 85-97, 1985.

- [15] G. ter Haar, S. Daniels, K. C. Eastaugh, and C. R. Hill, "Ultrasonically induced cavitation in vivo," *Br J Cancer Suppl*, vol. 5, pp. 151-5, 1982.
- [16] R. E. Apfel, "Acoustic cavitation: a possible consequence of biomedical uses of ultrasound," *Br J Cancer Suppl*, vol. 5, pp. 140-6, 1982.
- [17] T. J. Mason and J. P. Lorimer, "General Principles," in *Applied Sonochemistry: Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*, ed, 2002, pp. 25-72.
- [18] R. O. Illing, J. E. Kennedy, F. Wu, G. R. ter Haar, A. S. Protheroe, P. J. Friend, *et al.*, "The safety and feasibility of extracorporeal high-intensity focused ultrasound (HIFU) for the treatment of liver and kidney tumours in a Western population," *Brit J Cancer*, vol. 93, pp. 890-5, 2005.
- [19] E. Sheiner, I. Shoham-Vardi, X. Pombar, M. J. Hussey, H. T. Strassner, and J. S. Abramowicz, "An Increased Thermal Index Can Be Achieved When Performing Doppler Studies in Obstetric Sonography," *J Ultras Med*, vol. 26, pp. 71-76, 2007.
- [20] 古澤秀実, "乳癌に対する high-intensity focused ultrasound: 局所療法としての MR-guided focused ultrasound surgery," *超音波医学*, vol. 41, pp. 705-715, 2014.
- [21] A. Henglein, "Chemical effects of continuous and pulsed ultrasound in aqueous solutions," *Ultrason Sonochem*, vol. 2, pp. S115-S121, 1995.
- [22] A. Henglein, R. Ulrich, and J. Lilie, "Luminescence and chemical action by pulsed ultrasound," *J Am Chem Soc*, vol. 111, pp. 1974-1979, 1989.
- [23] P. R. Clarke and C. R. Hill, "Physical and Chemical Aspects of Ultrasonic Disruption of Cells," *J Acoust Soc Am*, vol. 47, pp. 649-653, 1970.
- [24] F. O. Schmitt, C. H. Johnson, and A. R. Olson, "OXIDATIONS PROMOTED BY ULTRASONIC RADIATION," *J Am Chem Soc*, vol. 51, pp. 370-375, 1929.
- [25] K. S. Suslick, "Sonochemistry," *Science*, vol. 247, pp. 1439-1445, 1990.
- [26] T. Kondo, M. Kuwabara, F. Sato, and E. Kano, "Influence of dissolved gases on chemical and biological effects of ultrasound," *Ultrasound Med Biol*, vol. 12, pp. 151-155, 1986.
- [27] M. P. Brenner, S. Hilgenfeldt, and D. Lohse, "Single-bubble sonoluminescence," *Rev Mod Phys*, vol. 74, pp. 425-484, 2002.
- [28] J. C. De Souza-Barboza, C. Petrier, and J. L. Luche, "Ultrasound in organic synthesis. 13. Some fundamental aspects of the sonochemical Barbier reaction," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 53, pp. 1212-1218, 1988.
- [29] Y. Nagata, M. Nakagawa, H. Okuno, Y. Mizukoshi, B. Yim, and Y. Maeda, "Sonochemical degradation of chlorophenols in water," *Ultrason Sonochem*, vol. 7, pp. 115-120, 2000.
- [30] Y. Nagata, M. Nakagawa, H. Okuno, Y. Mizukoshi, B. Yim, and Y. Maeda, "Sonochemical degradation of chlorophenols in water," *Ultrason Sonochem*, vol. 7, pp.

- 115-120, 2000.
- [31] N. Yumita, A. Okumura, R. Nishigaki, K. Umemura, and S.-i. Umemura, "The combination treatment of ultrasound and antitumor drugs on Yoshida sarcoma," *Jpn J Hyperthermic Oncol*, vol. 3, pp. 175-82, 1987.
- [32] S. Umemura, N. Yumita, and R. Nishigaki, "Enhancement of ultrasonically induced cell damage by a gallium-porphyrin complex, ATX-70," *Jpn J Cancer Res*, vol. 84, pp. 582-8, 1993.
- [33] N. Yumita, Y. Iwase, K. Nishi, H. Komatsu, K. Takeda, K. Onodera, *et al.*, "Involvement of Reactive Oxygen Species in Sonodynamically Induced Apoptosis Using a Novel Porphyrin Derivative," *Theranostics*, vol. 2, pp. 880-888, 2012.
- [34] N. Yumita, Q. S. Han, I. Kitazumi, and S. Umemura, "Sonodynamically-induced apoptosis, necrosis, and active oxygen generation by mono-l-aspartyl chlorin e6," *Cancer Sci*, vol. 99, pp. 166-72, 2008.
- [35] N. Dand, P. Patel, A. Ayre, and V. Kadam, *Polymeric micelles as a drug carrier for tumor targeting* vol. 4, 2013.
- [36] M. R. Speicher and K. Pantel, "Tumor signatures in the blood," *Nature Biotechnology*, vol. 32, pp. 441-443, 2014.
- [37] S. Park, R. R. Ang, S. P. Duffy, J. Bazov, K. N. Chi, P. C. Black, *et al.*, "Morphological Differences between Circulating Tumor Cells from Prostate Cancer Patients and Cultured Prostate Cancer Cells," *PLoS ONE*, vol. 9, 2014.
- [38] Y. Fujinaga, M. Kadoya, K. Kozaka, R. Shinmura, O. Matsui, T. Takayama, *et al.*, "Prediction of macroscopic findings of hepatocellular carcinoma on hepatobiliary phase of gadolinium-ethoxybenzyl-diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced magnetic resonance imaging: Correlation with pathology," *Hepatology Research*, vol. 43, pp. 488-494, 2013.
- [39] Y. T. Didenko, W. B. McNamara III, and K. S. Suslick, "Molecular emission from single-bubble sonoluminescence," *Nature*, vol. 407, pp. 877-879, 2000.
- [40] M. S. Plesset, "The dynamics of cavitation bubbles," *ASME J Appl Mech*, vol. 16, pp. 228-31, 1917.
- [41] T. G. Leighton, "Derivation of the Rayleigh-Plesset equation in terms of volume," ISVR Technical Report 308, 2007.
- [42] S. Umemura, K. Kawabata, and K. Sasaki, "Utilizing nonlinear behavior of microbubbles in medical ultrasound," *Electron Comm Jpn* 3, vol. 90, pp. 63-9, 2007.
- [43] J. Lee, S. Kentish, and M. Ashokkumar, "Effect of surfactants on the rate of growth of an air bubble by rectified diffusion," *J Phys Chem B*, vol. 109, pp. 14595-14598, 2005.
- [44] 吉澤晋, 高木周, and 松本洋一郎, "超音波音場における微小気泡の成長 : 2周波数重畳法に

- よる Rectified Diffusion の増強効果(流体力学,流体機械)," *日本機械学会論文集 B 編*, vol. 75, pp. 710-717, 2009.
- [45] M. M. Fyrillas, "Dissolution or Growth of Soluble Spherical Oscillating Bubbles," Doctor of Philosophy, UNIVERSITY OF CALIFORNIA IRVINE, 2006.
- [46] A. Eller and H. G. Flynn, "Rectified Diffusion during Nonlinear Pulsations of Cavitation Bubbles," *J Acoust Soc Am*, vol. 37, pp. 493-503, 1965.
- [47] L. A. Crum, "Acoustic Cavitation Series .5. Rectified Diffusion," *Ultrasonics*, vol. 22, pp. 215-223, 1984.
- [48] T. Leong, J. Collis, R. Manasseh, A. Ooi, A. Novell, A. Bouakaz, *et al.*, "The Role of Surfactant Headgroup, Chain Length, and Cavitation Microstreaming on the Growth of Bubbles by Rectified Diffusion," *J Phys Chem C*, vol. 115, pp. 24310-24316, 2011.
- [49] Y. N. Zhang and S. C. Li, "A General Approach for Rectified Mass Diffusion of Gas Bubbles in Liquids Under Acoustic Excitation," *J Heat Trans-T Asme*, vol. 136, 2014.
- [50] L. A. Crum, "Measurements of the growth of air bubbles by rectified diffusion," *J Acoust Soc Am*, vol. 68, pp. 203-211, 1980.
- [51] E. N. Harvey, D. K. Barnes, W. D. McElroy, A. H. Whiteley, D. C. Pease, and K. W. Cooper, "Bubble formation in animals. I. Physical factors," *J Comp Physiol*, vol. 24, pp. 1-22, 1944.
- [52] R. Battino and H. L. Clever, "The Solubility of Gases in Liquids," *Chem Rev*, vol. 66, pp. 395-463, 1966.
- [53] A. Fick, "On liquid diffusion," *J Membrane Sci*, vol. 100, pp. 33-38, 1995.
- [54] J. R. Elliott, S. J. Suresh, and M. D. Donohue, "A simple equation of state for non-spherical and associating molecules," *Ind Eng Chem Res*, vol. 29, pp. 1476-1485, 1990.
- [55] R. I. Nigmatulin, I. S. Akhatov, N. K. Vakhitova, and R. T. Lahey, "On the forced oscillations of a small gas bubble in a spherical liquid-filled flask," *J Fluid Mech*, vol. 414, pp. 47-73, 2000.
- [56] E. Biagi, L. Breschi, E. Vannacci, and L. Masotti, "Subharmonic emissions from microbubbles: effect of the driving pulse shape," *IEEE T Ultrason Ferr*, vol. 53, pp. 2174-82, 2006.
- [57] F. Forsberg, W. T. Shi, and B. B. Goldberg, "Subharmonic imaging of contrast agents," *Ultrasonics*, vol. 38, pp. 93-8, 2000.
- [58] E. Biagi, L. Breschi, and L. Masotti, "Transient subharmonic and ultraharmonic acoustic emission during dissolution of free gas bubbles," *IEEE T Ultrason Ferr*, vol. 52, pp. 1048-54, 2005.
- [59] K. I. Morton, G. R. Ter Haar, I. J. Stratford, and C. R. Hill, "Subharmonic emission as an

- indicator of ultrasonically-induced biological damage," *Ultrasound Med Biol*, vol. 9, pp. 629-33, 1983.
- [60] K. Sasaki, K. Kawabata, N. Yumita, and S. Umemura, "Sonodynamic treatment of murine tumor through second-harmonic superimposition," *Ultrasound Med Biol*, vol. 30, pp. 1233-8, 2004.
- [61] K. Kawabata and S. Umemura, "Effect of Periodic Phase Shift on Acoustic Cavitation Induction with Second-Harmonic Superimposition," *Jpn J Appl Phys*, vol. 42, pp. 3246-50, 2003.
- [62] K. Kawabata and S. Umemura, "Use of Second-Harmonic Superimposition to Induce Chemical Effects of Ultrasound," *J Phys Chem*, vol. 100, pp. 18784-9, 1996.
- [63] K. Kawabata and S. Umemura, "Effect of second-harmonic superimposition on efficient induction of sonochemical effect," *Ultrason Sonochem*, vol. 3, pp. 1-5, 1996.
- [64] S. Umemura, K. Kawabata, and K. Sasaki, "In vitro and in vivo enhancement of sonodynamically active cavitation by second-harmonic superimposition," *J Acoust Soc Am*, vol. 101, pp. 569-77, 1997.
- [65] S. Umemura, K. Kawabata, and K. Sasaki, "Enhancement of sonodynamic tissue damage production by second-harmonic superimposition: theoretical analysis of its mechanism," *IEEE T Ultrason Ferr*, vol. 43, pp. 1054-62, 1996.
- [66] K. Yasuda, K. Matsuura, Y. Asakura, and S. Koda, "Effect of Agitation Condition on Performance of Sonochemical Reaction," *Jpn J Appl Phys*, vol. 48, p. 07GH04, 2009.
- [67] P. G. Sacks, M. W. Miller, and C. C. Church, "The exposure vessel as a factor in ultrasonically-induced mammalian cell lysis—I. A comparison of tube and chamber systems," *Ultrasound Med Biol*, vol. 8, pp. 289-298, 1982.
- [68] A. H. Saad and A. R. Williams, "Possible mechanisms for the agitation - induced enhancement of acoustic cavitation invitro," *J Acoust Soc Am*, vol. 78, pp. 429-434, 1985.
- [69] T. Kondo, C. M. Krishna, and P. Riesz, "Free radical generation by ultrasound in aqueous solutions of DNA constituents," *Free Radic Res Commun*, vol. 6, pp. 109-10, 1989.
- [70] D. L. Miller and A. R. Williams, "Bubble cycling as the explanation of the promotion of ultrasonic cavitation in a rotating tube exposure system," *Ultrasound Med Biol*, vol. 15, pp. 641-8, 1989.
- [71] P. Riesz, T. Kondo, and C. M. Krishna, "Free radical formation by ultrasound in aqueous solutions. A spin trapping study," *Free Radic Res Commun*, vol. 10, pp. 27-35, 1990.
- [72] T. Azuma, K. Kawabata, S. Umemura, M. Ogihara, J. Kubota, A. Sasaki, *et al.*, "Bubble Generation by Standing Wave in Water Surrounded by Cranium with Transcranial Ultrasonic Beam," *Jpn J Appl Phys*, vol. 44, pp. 4625-30, 2005.

- [73] S.-i. Umemura, N. Yumita, and R. Nishigaki, "Enhancement of Ultrasonically Induced Cell Damage by a Gallium-Porphyrin Complex, ATX-70," *Cancer Sci*, vol. 84, pp. 582-588, 1993.
- [74] N. Yumita, K. Kawabata, K. Sasaki, and S. Umemura, "Sonodynamic effect of erythrosin B on sarcoma 180 cells in vitro," *Ultrason Sonochem*, vol. 9, pp. 259-65, 2002.
- [75] S. Umemura and C. A. Cain, "The sector-vortex phased array: acoustic field synthesis for hyperthermia," *IEEE T Ultrason Ferr*, vol. 36, pp. 249-257, 1989.
- [76] K. Kawabata and S. Umemura, "Highly efficient sonochemical reaction with a switched spiral focal field," *Ultrasonics*, vol. 31, pp. 457-62, 1993.
- [77] T. Sivasankar, A. W. Paunikar, and V. S. Moholkar, "Mechanistic approach to enhancement of the yield of a sonochemical reaction," *Aiche J*, vol. 53, pp. 1132-1143, 2007.
- [78] E. Kim, M. Cui, M. Jang, B. Park, Y. Son, and J. Khim, "Investigation of sonochemical activities at a frequency of 334 kHz: the effect of geometric parameters of sonoreactor," *Ultrason Sonochem*, vol. 21, pp. 1504-11, 2014.
- [79] T. Tuziuti, K. Yasui, M. Sivakumar, Y. Iida, and N. Miyoshi, "Correlation between acoustic cavitation noise and yield enhancement of sonochemical reaction by particle addition," *J Phys Chem A*, vol. 109, pp. 4869-72, 2005.
- [80] S. Koda, T. Kimura, T. Kondo, and H. Mitome, "A standard method to calibrate sonochemical efficiency of an individual reaction system," *Ultrason Sonochem*, vol. 10, pp. 149-156, 2003.
- [81] P. G lat and A. Shaw, "Relationship between Acoustic Power and Acoustic Radiation Force on Absorbing and Reflecting Targets for Spherically Focusing Radiators," *Ultrasound Med Biol*, vol. 41, pp. 832-844.
- [82] T. Hasegawa, N. Inoue, and K. Matsuzawa, "A new theory for the radiation from a concave piston source," *J Acoust Soc Am*, vol. 82, pp. 706-708, 1987.
- [83] J. H. Harlow, *Electric Power Transformer Engineering*. CRC Press, 2004.
- [84] S. Merouani, O. Hamdaoui, F. Saoudi, and M. Chiha, "Influence of experimental parameters on sonochemistry dosimetries: KI oxidation, Fricke reaction and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production," *J Hazard Mater*, vol. 178, pp. 1007-1014, 2010.
- [85] A. Weissler, H. W. Cooper, and S. Snyder, "Chemical Effect of Ultrasonic Waves: Oxidation of Potassium Iodide Solution by Carbon Tetrachloride," *J Am Chem Soc*, vol. 72, pp. 1769-1775, 1950.
- [86] J. Lee, S. Kentish, T. J. Matula, and M. Ashokkumar, "Effect of Surfactants on Inertial Cavitation Activity in a Pulsed Acoustic Field," *J Phys Chem B*, vol. 109, pp. 16860-16865, 2005.

- [87] A. H. Mariame, Loreto B. Feril, Jr., K. Nobuki, T. Katsuro, K. Takashi, and R. Peter, "The Sonochemical and Biological Effects of Three Clinically-Used Contrast Agents," *Jpn J Appl Phys*, vol. 49, p. 07HF23, 2010.
- [88] M. Kanai, A. Obana, Y. Gohto, S. Nagata, T. Miki, K. Kaneda, *et al.*, "Long-term effectiveness of photodynamic therapy by using a hydrophilic photosensitizer ATX-S10(Na) against experimental choroidal neovascularization in rats," *Lasers Surg Med*, vol. 26, pp. 48-57, 2000.
- [89] J. Yamamoto, T. Hirano, S. Li, M. Koide, E. Kohno, C. Inenaga, *et al.*, "Selective accumulation and strong photodynamic effects of a new photosensitizer, ATX-S10.Na (II), in experimental malignant glioma," *Int J Oncol*, vol. 27, pp. 1207-13, 2005.
- [90] M. Yamamoto, T. Nagano, I. Okura, K. Arakane, Y. Urano, and K. Matsumoto, "Production of singlet oxygen on irradiation of a photodynamic therapy agent, zinc-coproporphyrin III, with low host toxicity," *Biometals*, vol. 16, pp. 591-7, 2003.
- [91] W. Hiraoka, H. Honda, L. B. Feril, Jr., N. Kudo, and T. Kondo, "Comparison between sonodynamic effect and photodynamic effect with photosensitizers on free radical formation and cell killing," *Ultrason Sonochem*, vol. 13, pp. 535-42, 2006.
- [92] Z. H. Jin, N. Miyoshi, K. Ishiguro, S. Umemura, K. Kawabata, N. Yumita, *et al.*, "Combination effect of photodynamic and sonodynamic therapy on experimental skin squamous cell carcinoma in C3H/HeN mice," *J Dermatol*, vol. 27, pp. 294-306, 2000.
- [93] C. Y. Tan and S. J. Neuhaus, "Novel use of Rose Bengal (PV-10) in two cases of refractory scalp sarcoma," *ANZ journal of surgery*, vol. 83, p. 93, 2013.
- [94] M. I. Ross, "Intralesional therapy with PV-10 (Rose Bengal) for in-transit melanoma," *J Surg Oncol*, vol. 109, pp. 314-9, 2014.
- [95] T. Kondo, J. Gamson, J. B. Mitchell, and P. Riesz, "Free radical formation and cell lysis induced by ultrasound in the presence of different rare gases," *Int J Radiat Biol*, vol. 54, pp. 955-62, 1988.
- [96] T. Kondo, T. Kodaira, and E. Kano, "Free radical formation induced by ultrasound and its effects on strand breaks in DNA of cultured FM3A cells," *Free Radic Res Commun*, vol. 19 Suppl 1, pp. S193-200, 1993.
- [97] K. Kawabata and S. Umemura, "Xanthene dyes for reducing acoustic cavitation threshold in aqueous solution," *Ultrasonics*, vol. 35, pp. 469-74, 1997.
- [98] M. Yao, A. Yaroslavsky, F. P. Henry, R. W. Redmond, and I. E. Kochevar, "Phototoxicity is not associated with photochemical tissue bonding of skin," *Lasers Surg Med*, vol. 42, pp. 123-31, 2010.
- [99] R. Dapson, "Dye-tissue interactions: mechanisms, quantification and bonding parameters for dyes used in biological staining," *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 80,

- pp. 49-72, 2005.
- [100] H. Takahashi, S. Komatsu, M. Ibe, A. Ishida-Yamamoto, S. Nakajima, I. Sakata, *et al.*, "ATX-S10(Na)-PDT shows more potent effect on collagen metabolism of human normal and scleroderma dermal fibroblasts than ALA-PDT," *Arch Dermatol Res*, vol. 298, pp. 257-63, 2006.
- [101] Y. Huang, A. Obana, Y. Gohto, and S. Nakajima, "Comparative study of the phototoxicity of two chrolin type photosensitizers, ATX-S10(Na) and verteporfin, on vascular endothelial and retinal pigment epithelial cells," *Lasers Surg Med*, vol. 34, pp. 216-26, 2004.
- [102] N. Yumita, R. Nishigaki, I. Sakata, S. Nakajima, and S. Umemura, "Sonodynamically induced antitumor effect of 4-formyloximethylidene-3-hydroxy-2-vinyl-deuterio-porphynyl(IX)-6,7-dia spartic acid (ATX-S10)," *Jpn J Cancer Res*, vol. 91, pp. 255-60, 2000.
- [103] Y. S. Kim, V. Rubio, J. Qi, R. Xia, Z. Z. Shi, L. Peterson, *et al.*, "Cancer treatment using an optically inert Rose Bengal derivative combined with pulsed focused ultrasound," *J Control Release*, vol. 156, pp. 315-22, 2011.
- [104] N. Sugita, Y. Iwase, N. Yumita, T. Ikeda, and S. Umemura, "Sonodynamically induced cell damage using rose bengal derivative," *Anticancer Res*, vol. 30, pp. 3361-6, 2010.
- [105] J. J. M. Lamberts, D. R. Schumacher, and D. C. Neckers, "Novel rose bengal derivatives: synthesis and quantum yield studies," *J Am Chem Soc*, vol. 106, pp. 5879-5883, 1984.
- [106] N. Sugita, K. Kawabata, K. Sasaki, I. Sakata, and S. Umemura, "Synthesis of amphiphilic derivatives of rose bengal and their tumor accumulation," *Bioconjugate Chem*, vol. 18, pp. 866-73, 2007.

## 謝辞

本論文を纏めるに当たり、多大なるご指導を頂きました松本洋一郎理事に心から感謝いたします。また、高木周教授、鄭雄一教授、長棟輝教授、ならびに光石衛教授方々より深い指導を頂き誠にありがとうございます。私自身が自分で行った研究の位置づけおよび意味合いに対して十分に理解が及んでいないことに対して気づかせて頂き、大変感謝しております。今回のご指導の過程で、自らの未熟さに気付いたことが最大の収穫だと思っております。

また、東隆現特任准教授には、氏の日立製作所入社以来同僚として研究全般について多岐にわたり共闘できて、大変光栄に思っております。現在も所属の垣根を越えた交流に感謝しております。今回はそれに加え、論文の纏めに関する労まで取っていただき、誠に持って有難きことだと思っております。

本論文に記載の内容は、株式会社日立製作所に入社してほぼ10年の間に行った研究成果を、現在の課題に照らし合わせて構成し直し、さらに新たに検討を加えたものであります。研究を行っている間、また論文としてまとめるにあたり、多くの方々より言葉に尽くせぬご助力・ご助言を賜りました。ここに感謝いたします。

入社以来指導を行って頂いた梅村晋一郎現東北大学教授にはメディカル分野における研究のイロハから教えて頂きました。頑迷な私の指導はさぞ大変だっただろうと今更ながら身が縮む思いをしております。今回論文にまとめた内容は全て梅村先生と共著で発表させて頂いた内容です。研究方向の設定から成果の発表に至るまでご指導いただき、何から何まで誠にお世話になりました。恩師という言葉で全てが語れる気がします。

佐々木一昭現東京農工大学准教授には、氏の獣医としての知識・知恵をふんだんに活用して頂き、生物系の実験を構想から遂行・考察まで行っていただきました。先に述べた東氏と友にかつて日立製作所中央研究所に存在した梅村生体音響研究室の主要メンバーとしてとても頼もしい存在でした。東氏と同じく現在も交流を続けていられることは大変ありがたいと思っております。

吉澤晋現東北大学准教授には、オアフ島のハナウマ湾での出会いから懇意にして頂き、本論文の纏めに関しても何度も相談させて頂きました。大変ありがたく思っております。

弓田長彦現横浜薬科大学准教授には音響化学作用に関して基礎から丁寧にご教授頂き、また研究・実験の遂行に深くご尽力いただきました。ここに感謝いたします。

近藤隆富山大学教授には、超音波生体作用に関し、学会等で、その深い知識を惜しげもなく開示して頂き、医用超音波の興味深さに触れさせていただきました。本論文にまとめた内容にも氏との技術討論により得られた内容が多く含まれております。ありがとうございました。

遠藤信行神奈川大学教授には、日本超音波医学会などの学会で何度も励ましを頂き大変ありがたく思っております。特に、本論文の内容の一部は氏から論文化するよう示唆があり、後押しを受けて論文発表したものです。投稿した際には、本論文にて重要な地位を

占める発表になるとはまったく想像しておりませんでした。

日立製作所中央研究所の医用超音波グループの方がたには、音響に関する基礎的なことから実験遂行に関する内容まで様々なご指導・ご助言、またご尽力をいただきました。神田浩氏、篠村隆一氏、三和祐一氏、鱒沢裕氏、杉田奈巳氏、橋場邦夫氏、山本真理子氏、吉川秀樹氏、田中宏樹氏、浅見玲衣氏、池田貞一郎氏、田中智彦氏、田原麻梨江氏、石原千鶴枝氏、丸岡貴司氏、高野慎太氏、鈴木麻由美氏、広島美咲氏、皆様に御礼申し上げます。

私を育て成長させてくれた家族、友人、知人の方々のお蔭でここまでなんとかやってこれたことを心に刻み、より良い医療の実現に少しでも貢献できるよう精進していきたいと思えます。

## 成果発表、受賞、特許

### ・査読付き主筆論文 (10 件)

- [1] K. Kawabata, T. Maruoka, R. Asami, and R. Ashida, "Acousto-chemical manipulation of drug distribution: In vitro study of new drug delivery system," *Jpn J Appl Phys*, vol. 53, pp. 07KF28 1-6, 2014.
- [2] K. Kawabata, T. Maruoka, R. Asami, and S. Umemura, "Phase Change Nanodroplets and Microbubbles Generated from Them as Sources of Chemically Active Cavitation," *Jpn J Appl Phys*, vol. 50, pp. 07HE06 1-7, 2011.
- [3] K. Kawabata, R. Asami, H. Yoshikawa, T. Azuma, and S. Umemura, "Sustaining Microbubbles Derived from Phase Change Nanodroplet by Low-Amplitude Ultrasound Exposure," *Jpn J Appl Phys*, vol. 49, pp. 07HF20 1-7, 2010.
- [4] K. Kawabata, R. Asami, T. Azuma, and S. Umemura, "Acoustic Response of Microbubbles Derived from Phase-Change Nanodroplet," *Jpn J Appl Phys*, vol. 49, pp. 07HF18 1-9, 2010.
- [5] K. Kawabata, N. Sugita, H. Yoshikawa, T. Azuma, and S. Umemura, "Nanoparticles with Multiple Perfluorocarbons for Controllable Ultrasonically Induced Phase Shifting," *Jpn J Appl Phys*, vol. 44, pp. 4548-52, 2005.
- [6] K. Kawabata and S. Umemura, "Effect of Periodic Phase Shift on Acoustic Cavitation Induction with Second-Harmonic Superimposition," *Jpn J Appl Phys*, vol. 42, pp. 3246-50, 2003.
- [7] K. Kawabata and S. Umemura, "Xanthene dyes for reducing acoustic cavitation threshold in aqueous solution," *Ultrasonics*, vol. 35, pp. 469-74, 1997.
- [8] K. Kawabata and S. Umemura, "Use of Second-Harmonic Superimposition to Induce Chemical Effects of Ultrasound," *J Phys Chem*, vol. 100, pp. 18784-9, 1996.
- [9] K. Kawabata and S. Umemura, "Effect of second-harmonic superimposition on efficient induction of sonochemical effect," *Ultrason Sonochem*, vol. 3, pp. 1-5, 1996.
- [10] K. Kawabata and S. Umemura, "Highly efficient sonochemical reaction with a switched spiral focal field," *Ultrasonics*, vol. 31, pp. 457-62, 1993.

### ・査読付き共著論文 (24 件)

- [1] J. Shimizu, R. Endoh, T. Fukuda, T. Inagaki, H. Hano, R. Asami, *et al.*, "Safety evaluation of superheated perfluorocarbon nanodroplets for novel phase change type neurological therapeutic agents," *Perspect Med*, vol. 1, pp. 25-9, 2012.
- [2] H. Yoshikawa, T. Azuma, and K. Kawabata, "Precise Vascular Visualization in Ultrasonic Power Doppler Imaging with Motion Compensation," *Jpn J Appl Phys*, vol. 49, pp. 07HF13 1-9, 2010.

- [3] R. Asami, T. Ikeda, T. Azuma, S. Umemura, and K. Kawabata, "Acoustic Signal Characterization of Phase Change Nanodroplets in Tissue-Mimicking Phantom Gels," *Jpn J Appl Phys*, vol. 49, pp. 07HF16 1-6, 2010.
- [4] T. Azuma, S. Sonoda, K. Kawabata, and S. Umemura, "High-Amplitude and Long-Burst Pulse Transmission Array Probe for Phase-Change Molecular Imaging," *Jpn J Appl Phys*, vol. 48, pp. 07GK09 1-7, 2009.
- [5] H. Yoshikawa, T. Azuma, K. Sasaki, K. Kawabata, and S. Umemura, "Motion-Compensated Frame-Accumulating Method to Improve Quality of Carotid Artery Images," *Jpn J Appl Phys*, vol. 46, pp. 4834-40, 2007.
- [6] S. Umemura, K. Kawabata, and K. Sasaki, "Utilizing nonlinear behavior of microbubbles in medical ultrasound," *Electron Comm Jpn 3*, vol. 90, pp. 63-9, 2007.
- [7] N. Sugita, K. Kawabata, K. Sasaki, I. Sakata, and S. Umemura, "Synthesis of amphiphilic derivatives of rose bengal and their tumor accumulation," *Bioconjugate Chem*, vol. 18, pp. 866-73, 2007.
- [8] H. Yoshikawa, T. Azuma, K. Sasaki, K. Kawabata, and S. Umemura, "Dynamic and Precise Visualization of Contrast Agent in Blood Vessels with Motion Correction," *Jpn J Appl Phys*, vol. 45, pp. 4754-60, 2006.
- [9] K. Sasaki, M. S. Medan, T. Azuma, K. Kawabata, M. Shimoda, and S. Umemura, "Effect of echo-guided high-intensity focused ultrasound ablation on localized experimental tumors," *J Vet Med Sci*, vol. 68, pp. 1069-74, 2006.
- [10] K. Sasaki, T. Azuma, K. Kawabata, S. Umemura, R. Tanaka, Y. Yamane, *et al.*, "Chronic effect of transrectal split-focus ultrasonic ablation on canine prostatic tissue," *J Vet Med Sci*, vol. 68, pp. 839-45, 2006.
- [11] H. Yoshikawa, T. Azuma, K. Kawabata, Y. Taniguchi, and S. Umemura, "Three-Dimensional Tracking Method of Tissue Motion with Biplane Images," *Jpn J Appl Phys*, vol. 44, pp. 4561-6, 2005.
- [12] S. Umemura, K. Kawabata, and K. Sasaki, "In vivo acceleration of ultrasonic tissue heating by microbubble agent," *IEEE T Ultrason Ferr*, vol. 52, pp. 1690-8, 2005.
- [13] T. Azuma, K. Kawabata, S. Umemura, M. Ogihara, J. Kubota, A. Sasaki, *et al.*, "Bubble Generation by Standing Wave in Water Surrounded by Cranium with Transcranial Ultrasonic Beam," *Jpn J Appl Phys*, vol. 44, pp. 4625-30, 2005.
- [14] K. Sasaki, K. Kawabata, N. Yumita, and S. Umemura, "Sonodynamic treatment of murine tumor through second-harmonic superimposition," *Ultrasound Med Biol*, vol. 30, pp. 1233-8, 2004.
- [15] S. Umemura, K. Kawabata, K. Sasaki, N. Sugita, T. Azuma, N. Yumita, *et al.*, "Sonodynamic application of ultrasound in therapy," *Ultrasound Med Biol*, vol. 29, p.

S41, 2003.

- [16] K. Sasaki, T. Azuma, K. Kawabata, M. Shimoda, E. Kokue, and S. Umemura, "Effect of split-focus approach on producing larger coagulation in swine liver," *Ultrasound Med Biol*, vol. 29, pp. 591-9, 2003.
- [17] N. Yumita, K. Kawabata, K. Sasaki, and S. Umemura, "Sonodynamic effect of erythrosin B on sarcoma 180 cells in vitro," *Ultrason Sonochem*, vol. 9, pp. 259-65, 2002.
- [18] T. Azuma, K. Sasaki, K. Kawabata, A. Osada, H. Itagaki, K. Komura, *et al.*, "Magnetic Resonance Imaging (MRI) Compatible Ultrasound Therapeutic System," *Jpn J Appl Phys*, vol. 41, pp. 3579-84, 2002.
- [19] S. Umemura, K. Kawabata, K. Sasaki, N. Sugita, T. Azuma, and N. Yumita, "[Therapeutic technology utilizing focused ultrasound]," *Igaku Butsuri*, vol. 21, pp. 150-6, 2001.
- [20] K. Hashiba, K. Kawabata, and S. Umemura, "Specific Impedance of Liquids during Ultrasonic Cavitation," *Jpn J Appl Phys*, vol. 40, pp. 4726-9, 2001.
- [21] Z. H. Jin, N. Miyoshi, K. Ishiguro, S. Umemura, K. Kawabata, N. Yumita, *et al.*, "Combination effect of photodynamic and sonodynamic therapy on experimental skin squamous cell carcinoma in C3H/HeN mice," *J Dermatol*, vol. 27, pp. 294-306, 2000.
- [22] S. Umemura, K. Kawabata, and K. Sasaki, "In vitro and in vivo enhancement of sonodynamically active cavitation by second-harmonic superimposition," *J Acoust Soc Am*, vol. 101, pp. 569-77, 1997.
- [23] S. Umemura, K. Kawabata, K. Sasaki, N. Yumita, K. Umemura, and R. Nishigaki, "Recent advances in sonodynamic approach to cancer therapy," *Ultrason Sonochem*, vol. 3, pp. S187-91, 1996.
- [24] S. Umemura, K. Kawabata, and K. Sasaki, "Enhancement of sonodynamic tissue damage production by second-harmonic superimposition: theoretical analysis of its mechanism," *IEEE T Ultrason Ferr*, vol. 43, pp. 1054-62, 1996.

・表彰 (5 件)

- [1] Best Paper Award in 34th Symposium on Ultrasonic Electronics (USE2013), "Acousto-chemical manipulation of drug distribution: In vitro study of new drug delivery system", K. Kawabata, T. Maruoka, R. Asami, and R. Ashida, Dec, 2014.
- [2] Best Poster Award in 8th International Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, "Diagnostic and therapeutic application of phase-shift nano-emulsion, K. Kawabata, A. Yoshizawa, H. Watanabe, T. Azuma, H. Yoshikawa, and S. Umemura\*, Dec, 2006.
- [3] 超音波医学会第 78 回学術集会奨励賞、診断・治療用相変化型超音波造影剤に関する検討、川畑健一、杉田奈巳、東隆、吉川秀樹、吉澤晶子、梅村晋一郎、2005 年 5 月

- [4] Best Poster Award in 6th International Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, “Preliminary study on phase shift colloids with multiple volatile liquids for site-specific contrast imaging”, K. Kawabata, N. Sugita, K. Sasaki, and S. Umemura, Jan, 2004
- [5] Best Poster Award in 1<sup>st</sup> International Kyoto Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, “Agents promoting acoustical generation of micro-bubble for harmonic imaging”, K. Kawabata, K. Sasaki, and S. Umemura, Oct. 1999.

・特許

<筆頭発明の登録済特許（国内：11件）>

- [1] 特許 05653447 号；生体模擬ファントムおよび校正装置；川畑健一 浅見玲衣；登録日 2014.11.28.
- [2] 特許 05161955 号；超音波照射装置；川畑健一；登録日 2012.12.21.
- [3] 特許 04833581 号；薬剤；川畑健一、杉田奈巳、白猪亨、梅村晋一郎；登録日 2011.9.30.
- [4] 特許 04829796 号；超音波造影剤；川畑健一、杉田奈巳、梅村晋一郎；登録日 2011.9.22.
- [5] 特許 04648983 号；超音波診断・治療装置；川畑健一 浅見玲衣；登録日 2010.12.17.
- [6] 特許 04648310 号；生体模擬ファントム及びその製造方法；川畑健一；登録日 2010.12.17.
- [7] 特許 04630127 号；超音波診断治療装置；川畑健一、杉田奈巳、梅村晋一郎；登録日 2010.11.19.
- [8] 特許 04800862 号；ファントム；川畑健一；登録日 2011.8.12.
- [9] 特許 04279328 号；超音波撮像システム；川畑健一；登録日 2009.3.19.
- [10] 特許 03842188 号；超音波治療装置；川畑健一 杉田奈巳 梅村晋一郎 東隆；登録日 2006.8.18.
- [11] 特許 P03816809 号；薬剤、薬剤キャリア、薬剤の製造方法及び腫瘍の治療方法；川畑健一、梅村晋一郎、佐々木一昭；登録日 2006.06.16.

連名国内登録：29件

筆頭国内出願中：9件

<筆頭発明の登録済特許（米国：6件）>

- [1] Patent Number: 8323620, “Ultrasound Contrast Agent”, K. Kawabata, N. Sugita, S. Umemura, Issue Date: .Dec 4 2012.
- [2] Patent Number: 8011826, “Phantom”, K. Kawabata, Issue Date: .Sep 6 2011.
- [3] Patent Number: 7824336, “Ultrasonic apparatus for diagnosis and therapy”, K. Kawabata, N. Sugita, S. Umemura, Issue Date: .Nov 2 2010.

- [4] Patent Number: 07125387, "Ultrasonic apparatus for therapeutical use", K. Kawabata, N. Sugita, S. Umemura, T. Azuma, Issue Data: .Oct 24 2006.
- [5] Patent Number: 7943231, "Organism Simulative Phantom", K. Kawabata, Issue Data: .Oct 24 2006.
- [6] Patent Number: 07074427, "Medicine, carrier for medicine, method of producing medicine, and method of tumor treatment", K. Kawabata, S. Umemura, K. Sasaki , Issue Data: .Jul.11 2006.

連名米国登録 : 15 件

筆頭米国出願中 : 7 件