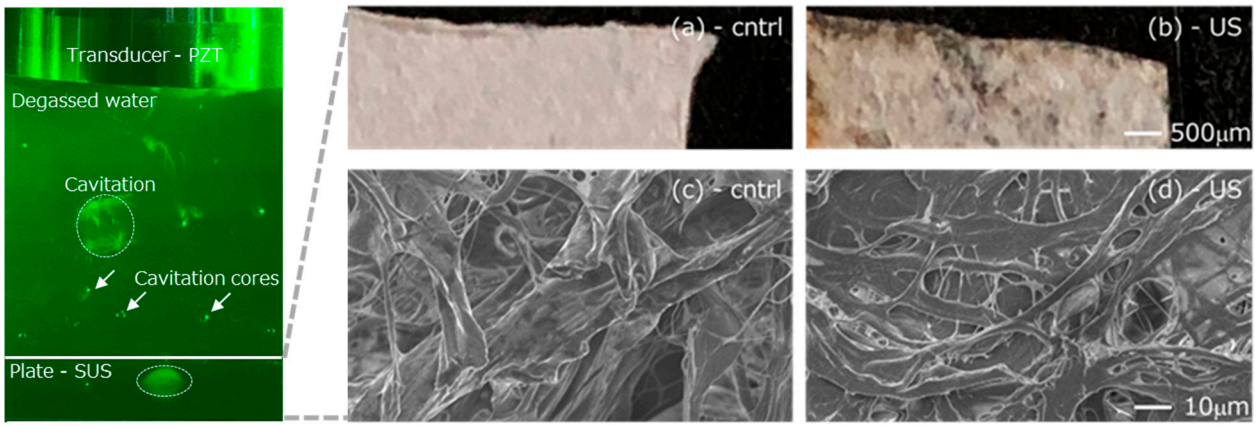
213　収束超音波による線維化組織の柔軟化治療の確立	八木　一平

【目的】線維化はコラーゲンなどの細胞外マトリクスが異常に蓄積する病気であり、いまだ根治療法が存在しない未解決の医療問題である。本研究では非収束性の超音波を使用して非侵襲的な治療法を提案し、生体を模擬した線維性組織が超音波により受ける機械的特性の変化を調査する。

【方法】超音波振動子を金属板と対向させ、その間で定在波を生成した。この金属電極表面にコラーゲン線維性のシートを配置して、その前後の様相の変化および機械的特性の変化を観測した。

【結果】定在波の発生領域ではキャビテーションと呼ばれる大小の気泡が発生し、この膨張収縮および破裂過程で線維性シートに機械的・熱的な負荷がかかることで、シートは大きく減肉し、線維成分は細くなることを確認した。一方、シートの機械的強度を表す破断強度およびヤング率は、超音波照射 40 秒後において 44.6%および 48.2%に減少していることを確認した。以上より、非収束性の超音波照射は対象組織に対してより広範囲で均一な治療を提供することができ、組織の硬さにあたる機械強度を低下させることを示した。

超音波照射域の気泡群、および照射前後のコラーゲンシートの様相（上：明視野、下：電子顕微鏡）



213. 収束超音波による線維化組織の柔軟化治療の確立

八木　一平

東京都立大学 システムデザイン研究科 電子情報システム工学域 マイクロ電気力学研究室

Key words : fibrosis, ultrasound, extracellular matrix, collagen, cavitation

緒　言

線維化はコラーゲンをはじめとする細胞外マトリクスが組織中に異常に蓄積した状態を指す。この線維化とそれに伴う臓器不全は、世界の死亡者数の少なくとも 3 分の 1 を占めている［1］。実質細胞に対するストレスや傷害に応答して間質細胞が増殖し、細胞外マトリクスが生産される。このストレス応答や創傷治癒過程が正しく制御されない場合に、細胞外マトリクスが過剰に蓄積して、実質細胞を含む機能ユニットが欠落するため、臓器不全に至る［2］。

コラーゲンは生体内で最も割合の多いタンパク質であり、細胞外基質として細胞や組織を物理的に支えるとともに、接着した細胞に生化学的な刺激を与える。生体内の各組織はそれぞれ特有の硬さを持つが、線維化が起こるとコラーゲンの異常な蓄積によって正常な組織と比べて硬くなる［3］。例えば、肺・肝臓では、正常な組織の硬さ（ヤング率）は 0.5～1 kPa だが、線維化を起こした組織は 25～100 kPa になる［4］。また、癌組織も癌の進行にともない線維化を起こして硬化することが知られている。

これまで病態解析により各種の知見が蓄積されているが、いまだ線維化の発症メカニズムは不明な点が多く残されている。さらに、世界的に抗線維化薬の開発競争が繰り広げられているものの、根本的な治療薬は開発されていない［5］。進行後は、外科的介入以外に根本的な治療法がない、未解決の医療問題である。したがって、外科的治療と同様の非侵襲的な治療戦略が強く望まれている。その 1 つが、超音波を利用した方法である。

超音波治療は、その作用機序において 2 つの方法に分類される。一つ目は生理的反応を誘発する方法であり、Low Intensity Pulsed Ultra Sound（LIPUS）、および Extracorporeal Shock Wave Therapy（ESWT）がすでに臨床応用されている。LIPUS は骨折、軟部組織の損傷、拘縮・瘢痕組織の回復促進などに利用されている。ESWT は足底筋膜炎、股関節痛、近位ハムストリング腱傷害において有効性が示されている。継続的に臨床とメカニズムを結びつける研究が進められているが、これらの作用機序に関する研究は十分とは言えない［6］。

2 つ目は、高強度の超音波による熱およびキャビテーションを介して、病変組織を物理的に破壊する方法である。特に、高強度収束超音波（HIFU）は空間的な精度が高く、低侵襲的であるため、注目を集めている。Muratore らは、牛アキレス腱の *ex vivo* 動物モデルに対して、5.25 MHz の連続正弦波を 0.23～2.6 kW/cm^2 の強度で与えることにより、タンパク質変性および細胞溶解を起こしたと結論づけた［7］。Yeh らは高強度の集束超音波を用いることで、豚の腱と靭帯の引張剛性が低下することを示した［8］。また、Khandare らはラットのアキレス腱を FUS に暴露した際のヤング率は変化せず、Stiffness のみ低下することを報告した。また、組織染色により、その変化は熱的な変化によりもたらされたと結論づけている［9］。以上より、これまでに HIFU は線維性組織の機械的強度を低下させる効果を示してきた。一方、線維症の治療シーンを考えると、いくつかの課題が想定される。

線維化病変は対象組織の広範囲に現れる。一方、HIFU の一般的な治療範囲は数百マイクロ立方メートルからミリ立方メートルオーダーと小さい。そのため、その治療時間は長くなる。また、がん組織の破壊と異なり、線維化病変はその機能を維持しながら機械的強度を下げる事が求められる。従って、HIFU の収束点における損傷を広範囲に広げることには課題が残されており、より広範囲に同時的に治療する超音波の照射方法が求められている。

我々は、非収束性の超音波により緻密な線維性組織の硬さが緩和することができるという仮説を立てた。これを検証するために、線維性材料に対する平面波を照射した。出力強度を一定に保ちながら、照射時間を変えることで照射エネ

ルギーを変化させた。このとき、超音波照射の前後における機械的特性および組織様相の変化を確認した。

方　法

1. 超音波発生装置

ボルト締めランジュバン型振動子（Honda Electric、HEC-45402）を用いて、超音波キャビテーションを発生させた。振動子の先端は円筒形状であり、その振動面は直径 45 mm、中心周波数 40 kHz であった。壁面の影響を受けない十分な大きさの水槽に 23±1℃の蒸留水を入れ、溶存酸素濃度の初期値を 4.2 mg/L となるように調整した。

Fig. 1 のように、振動子の振動面から垂直方向に約 1 波長分である 37 mm 離してステンレス製の反射板を設置した。その目的は、振動子と反射板の間で定在波を発生させ、キャビテーションを確実に発生させるためである。高電圧増幅器（NF Corporation、HAS4052）から電気的マッチング回路を経由して、40 kHz の連続した正弦波波形により超音波振動を発生させた。

キャビテーションの発生を確認するために、532 nm の緑色レーザー光を反射鏡で拡大し、振動子と金属板の全域に対して水平方向から照射した。このレーザーに対して直角に CCD カメラ（D5000、Nikon）を配置することで、水平方向からキャビテーション気泡の界面における散乱光を撮影した。

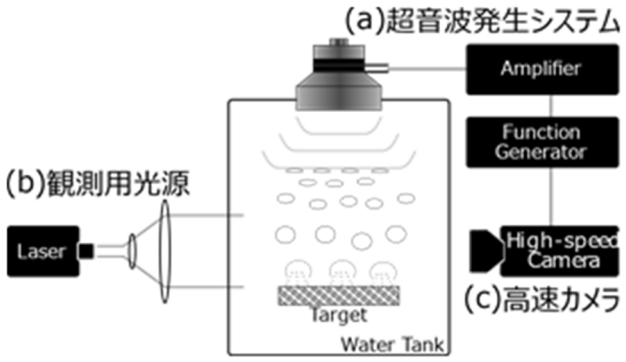


Fig. 1.　Ultrasonic generator and observation system

2. コラーゲンシートの観測

牛皮膚由来のコラーゲンシート（厚さ 1 mm）を使用し、50 mm×10 mm に切断したサンプルを用意した。サンプル間のばらつきを最小限にするため、シート内の裁断方向を一定とした。裁断時の熱負荷を抑えるため、手動の裁断機を使用した。実験で使用したサンプルはすべて、脱気水に 30 分間含水した後に使用した。

明視野像を CCD カメラ（D5000、Nikon）により撮影した。SEM 観察には、2.5%グルタルアルデヒドで 48 時間固定した後、蒸留水で洗浄し、濃度の異なる一連のエタノールで脱水し、t-ブチルアルコール凍結乾燥法で乾燥させた。乾燥した資料を金属製プレートに取付け、金でコーティングした後、走査型電子顕微鏡（JSM-7100F、日本電子）により最終倍率 1,000 で顕微鏡写真を作製した。

3. 引張試験

組織の引張強度を調べるために、50 mm×10 mm に切断したサンプルを用いて、Tensile tester（MCT-1150、A&D Company）によりヤング率を測定した。引張試験機は、ロードセルに連結したサンプルに加わる力を徐々に増加させるピストンを用いて、準静的な変形下におけるサンプルの剛性を測定するものである。組織の垂直方向の変位と加えられた力を測定することで、応力と歪みを測定し、サンプルのヤング率を計算することが出来る。コラーゲン組織は線形弾性体ではないが、線形領域の平均的なヤング率を推定した。一貫した測定結果が得られるように、各実験条件で 6 個のサンプルを分析した。組織サンプルはヤング率測定の直前まで水に浸された。各サンプルのヤング率測定は 1 分以内に終了したので、組織の脱水は無視できる。

結　果

1.　キャビテーション発生

超音波の照射により、振動子と反射板の間でキャビテーションによる気泡が観測された（Fig. 2）。脱気水中に、およそ 10 mm の比較的大きな気泡と、1 mm 以下の小さな気泡が複数、連続的に生成している様子が観察された。大きな気泡には、その上下 2 層に渡り、散乱光の強い放射状の領域が観測された。反射板の表面または近傍に置いても、大小の気泡が発生しており、反射板上に設置されたサンプルの近傍でも、キャビテーション気泡が発生する事が推測される。

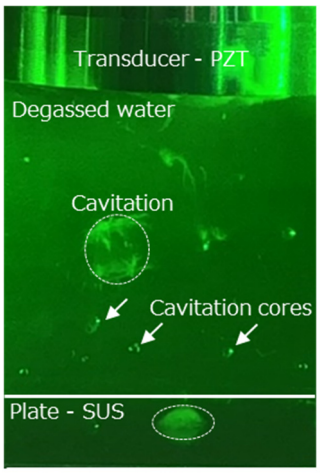


Fig. 2. Side view of the ultrasound irradiated area.
Scattered light from a green laser captured by a cavitation bubble in degassed water.

2.　サンプル外観の変化

超音波照射によりコラーゲンシートの外観や表面の様相は変化した（Fig. 3）。いずれのサンプルも脱気水に 5 分間浸した後、超音波照射群のみ 2 分間の超音波照射を行い、サンプルを乾燥した上で観察した。Fig.3（a）および（b）は、それぞれ超音波照射前および後の明視野画像である。超音波照射後のサンプルは、一様に減肉し薄くなっており、部分的に背景色（黒）が透過するほど薄くなった。Fig.3（c）および（d）は、超音波照射前および後の電子顕微鏡画像である。超音波照射前の Fig.3（c）には、帯状の線維が隙間をとって折り重なっている。一方、照射後の Fig.3（d）には、線維の幅が細くなり、密に堆積している様子がわかる。

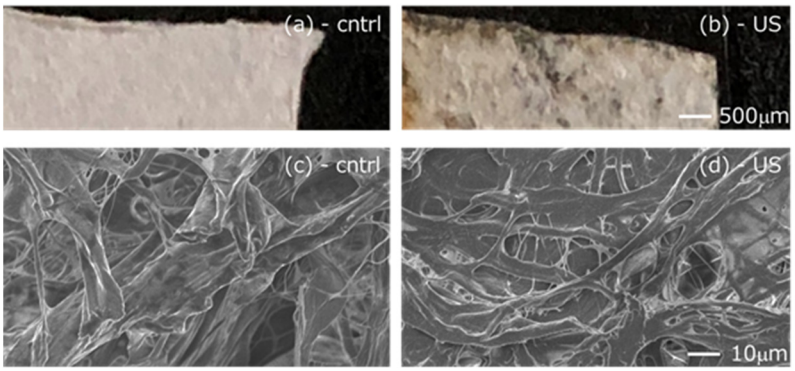


Fig. 3. Appearance of the collagen sheet before and after ultrasound irradiation.
(a), (b) bright field images, (c), (d) electron microscopy images. The control group (a) and (c) was immersed in degassed water, as was the ultrasonically irradiated group (b) and (d), and then dried and observed. The ultrasound irradiation time was 120 seconds.

3. 機械的特性の変化

超音波の照射時間に対するコラーゲンシートの機械的特性を示す。Fig.4 は、引張試験による歪み - 応力特性を表す。未照射のサンプルは非線形な区間と、その後の線形な区間に別れた。非線形な領域は、フィブリルの巨視的なクリンプ構造が取り除かれることや、コラーゲン繊維の間隙が引き伸ばされることに起因する。一方、線形領域では、コラーゲン三重らせんの伸び、およびコラーゲン同士の結合が滑ることによる構造変化によって現れることが知られている[10]。ここでは、結合組織の一般的な材料特性として用いられるこの線形領域の傾きをヤング率として用いた。また、材料が非可逆的な破壊・断裂する強度として、各サンプルが最大応力を示す点を破断点と定義した。超音波を照射した群は、Strain が 15%以下の非線形な領域では Control と概ね一致した。一方、15%以上の領域では傾きが減少し、破断点の応力値が減少する事が確認された。

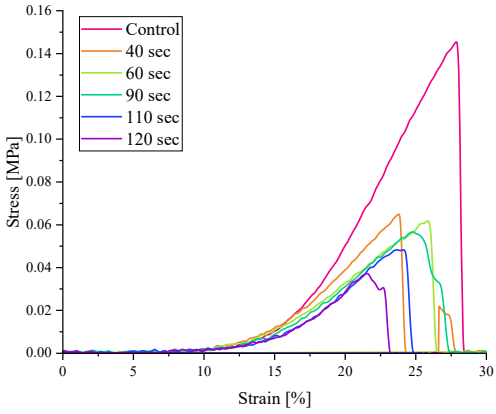


Fig. 4. Mechanical properties of collagen sheets following ultrasound irradiation

Fig. 5 (a) および (b) は、それぞれ超音波の照射時間に対するヤング率および破断強度を示す。いずれも 40 秒の照射により Control に対して、それぞれ 44.6%および 48.2%減少した。その後、超音波の照射時間により減少傾向を示す。照射時間 110 秒以降のコラーゲンシートは、材料がもろくなり、十分な強度を維持できないため、ヤング率と破断強度はともにばらつきが大きい傾向になった。

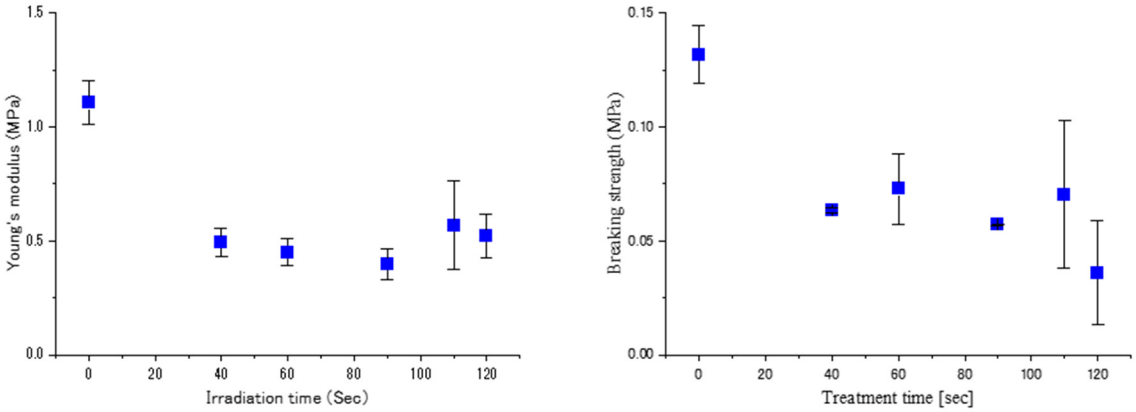


Fig. 5. Changes in the mechanical properties of collagen sheets with ultrasonic exposure time.
(a) Young's modulus and (b) breaking strength.

考　察

本研究では、非収束性の超音波により線維性組織の硬さが緩和する事が可能であるという仮説を検証した。我々の知る限りでは、非収束性の超音波が高密度な線維性組織の機械的強度に与える影響を評価した報告は初めてである。

非収束性の超音波によるコラーゲン束の変化のメカニズムは明らかになっていない。しかし、いくつかの事実から。キャビテーションを介した作用が変化のプロセスを支配していると考えられる。第一に、本研究の超音波による温度上昇は、タンパク質の不可逆的な変化をもたらすには小さすぎる。第二に、この研究で選択した音響パラメータは、キャビテーション効果によるコラーゲン抽出に用いるものと類似している。

非収束性超音波は、HIFU に対して、より広範囲を均一に処理する可能性がある。HIFU により均一化（ホモジネート）された組織は、原理的に超音波の焦点領域に限定され、一般的には $1\,mm^3$～$1\,cm^3$程度であることが多い。これに対して、非収束性の平面波の反応領域は超音波素子の面積により任意に変更することができる。Fig.3 に示したコラーゲンシートのように、局所的というよりは広範囲を均一に変化させる。これは、線維化された臓器や筋腱組織のように大面積の治療対象に適している可能性がある。

しかし、今回の検証にはいくつかの限界が有り、本研究の知見が *in vivo* の条件に適応できるかどうかは、さらなる調査が必要である。まず、本研究で使用したコラーゲンシートは牛の皮膚から抽出したコラーゲンから精製されたものであり、コラーゲンと超音波の作用メカニズムを理解する上で適している一方、生体内の結合組織とは構造が異なる。さらに、キャビテーションの発生を容易にするために、反射板を用いて超音波の定在波を起こしたが、治療現場において超音波反射体の設置には一定の制限がある事が想定される。また、*ex vivo* 条件では、組織リモデリングの役割を明らかにすることは出来ない。生体内で超音波およびキャビテーションによってもたらされた損傷は、炎症細胞の浸潤と細胞外マトリックスのリモデリングを誘発する可能性がある。つまり、一時的に線維化した組織の柔軟性を回復するが、その後、リモデリングにより過剰な線維成分の蓄積が生じ、再度線維化する可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京都立大学大学院システムデザイン研究科電子情報システム工学科の内田諭および小池一輝である。

文　献

1) Zeisberg M, Kalluri R. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. American Journal of Physiology - Cell Physiology [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 23];304:C216. doi: 10.1152/AJPCELL.00328.2012. Cited: in: : PMID: 23255577.

2) Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis — A Common Pathway to Organ Injury and Failure. New England Journal of Medicine. 2015;372:1138–1149. doi: 10.1056/nejmra1300575. Cited: in: : PMID: 25785971.

3) Tschumperlin DJ, Ligresti G, Hilscher MB, Shah VH. Mechanosensing and fibrosis. The Journal of Clinical Investigation [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 23];128:74–84. doi: 10.1172/JCI93561. Cited: in: : PMID: 0.

4) Santos A, Lagares D. Matrix Stiffness: the Conductor of Organ Fibrosis. Current Rheumatology Reports 2018 20:1 [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 23];20:1–13. doi: 10.1007/S11926-018-0710-Z.

5) Baues M, Dasgupta A, Ehling J, Prakash J, Boor P, Tacke F, Kiessling F, Lammers T. Fibrosis imaging: Current concepts and future directions. Advanced Drug Delivery Reviews. 2017;121:9–26. doi: 10.1016/J.ADDR.2017.10.013.

6) Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A Review of Therapeutic Ultrasound: Biophysical Effects. Physical Therapy [Internet]. 2001 [cited 2021 Aug 23];81:1351–1358. doi: 10.1093/PTJ/81.7.1351.

7) Muratore R, Akabas T, Muratore IB. High-Intensity Focused Ultrasound Ablation of Ex Vivo Bovine Achilles Tendon. Ultrasound in Medicine & Biology. 2008;34:2043–2050. doi: 10.1016/J.ULTRASMEDBIO.2008.05.006.
8) Yeh C-L, Li P-C, Shih W-P, Huang P-S, Kuo P-L. Imaging monitored loosening of dense fibrous tissues using high-intensity pulsed ultrasound. Physics in Medicine & Biology [Internet]. 2013 [cited 2021 Aug 23];58:6779. doi: 10.1088/0031-9155/58/19/6779.
9) Khandare S, Smallcomb M, Klein B, Geary C, Simon JC, Vidt ME. Comparison between dry needling and focused ultrasound on the mechanical properties of the rat Achilles tendon: A pilot study. Journal of Biomechanics. 2021;120:110384. doi: 10.1016/J.JBIOMECH.2021.110384.
10) Sasaki N, Odajima S. Elongation mechanism of collagen fibrils and force-strain relations of tendon at each level of structural hierarchy. J Biomech [Internet]. 1996 [cited 2022 Jan 16];29:1131–1136. doi: 10.1016/0021-9290(96)00024-3. Cited: in: : PMID: 8872269.