

況や血流再開通状態を実時間的にモニターでき、そのため最適血栓溶解法への道筋が示された。

3. 頭蓋内への超音波投入は定在波の存在を考慮し、これを消失させる技術を活用すべきであることを実験的に示した。
4. 経頭蓋超音波脳血栓溶解療法の安全性を担保する in vitro, in vivo 実験成果をあげることができた。
5. とりわけ、虚血再灌流時、神経保護薬との共存性、さらにはサルによる安全性評価が開始され、探索的臨床研究への地歩が固まった。

以上の成果を元に、最終年度の目標、すなわち、臨床適用へのステップを進めるための安全性、有用性の基盤を構築した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究協力者

馬目 佳信 (東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター DNA 研究所分子細胞生物学研究部長)

清水 純 (東京慈恵会医科大学 脳神経外科, ME 研究室)

#### H. 研究発表

##### ① 論文発表

1. 古幡 博, 中野みどり. 超音波による血栓溶解. 日本音響学会誌. 2003, 59, 9, 577-584
- ② 学会発表
1. Shiogai T, Morisaka A, Takayasu N, Mizuno T, Nakagawa M, Furuhashi H. Optimal transcranial perfusion images for acute ischemic stroke: Comparison

between ultraharmonic, second harmonic, and power harmonic imaging. Bad Salzhausen. July. 2003.

2. Furuhashi H, Saguchi T. Experimental evaluation of transcranial ultrasonic thrombolysis in the acute ischemic stroke. Bad Salzhausen. July. 2003.
3. Shimizu J, Nakano M, Matsuyama H, Saguchi T, Abe T, Furuhashi H. In vivo trial of a newly developed combination 500kHz/2MHz therapy/power M-mode Doppler probe for ultrasound enhancement of t-PA thrombolysis. Bad Salzhausen. July. 2003.

4. 古幡 博. 最新の経頭蓋超音波法による診断・治療の動向. 大阪. 10月. 2003

5. 石橋 敏寛, 佐口 隆之, 清水 純, 中野 みどり, 窪田 純, 秋山 雅彦, 尾上 尚志, 阿部 俊昭, 古幡 博. TC-DFI による頭蓋内血流監視のための頭部用プローブ固定具の開発. つくば. 12月. 2003

6. 清水 純, 中野 みどり, 松山 寛子, 佐口 隆之, 石橋 敏寛, 尾上 尚志, 阿部 俊昭, 古幡 博. 経頭蓋超音波治療・診断併用プローブによる脳血栓溶解療法の実験的検討 -血流再開過程の監視-. つくば. 12月. 2003

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

##### ① 特許取得

特願 2003-344327 「超音波送波器及びこれを用いた超音波音波装置」

##### ② 実用新案登録

なし

##### ③ その他

なし

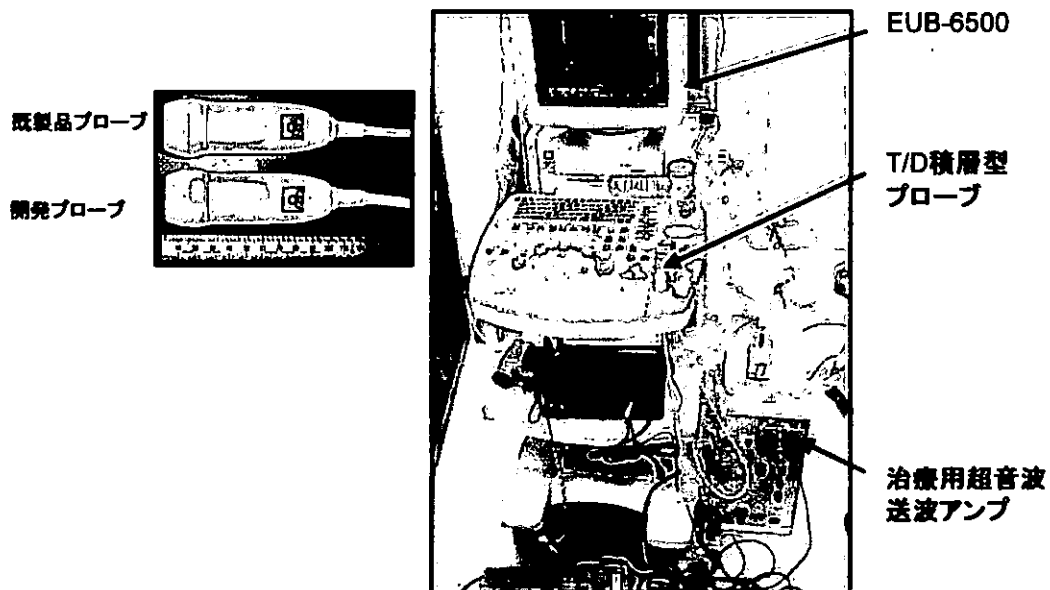


図 12 開発した経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の全景と T/D プローブ(開発)と既製プローブ

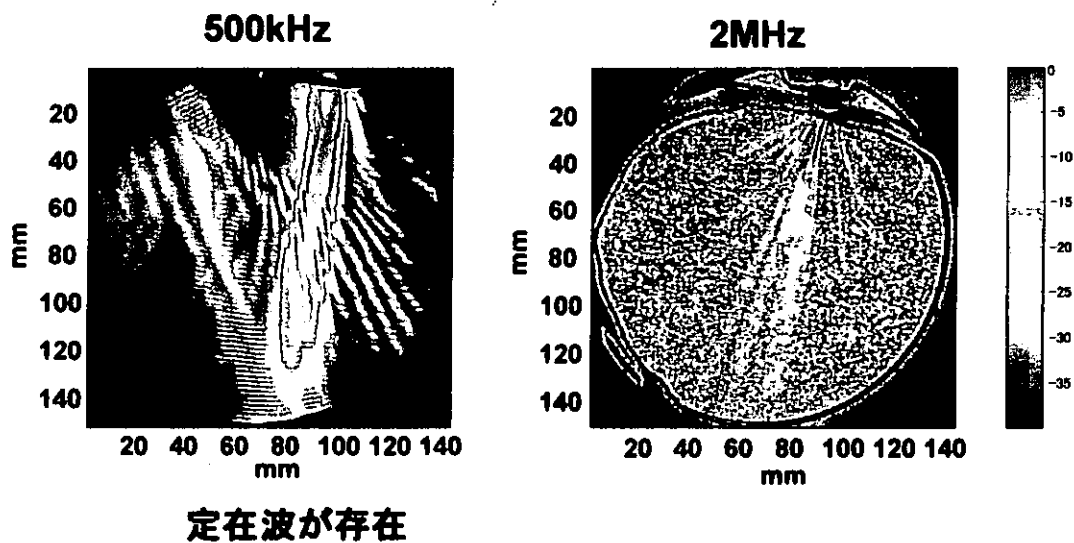
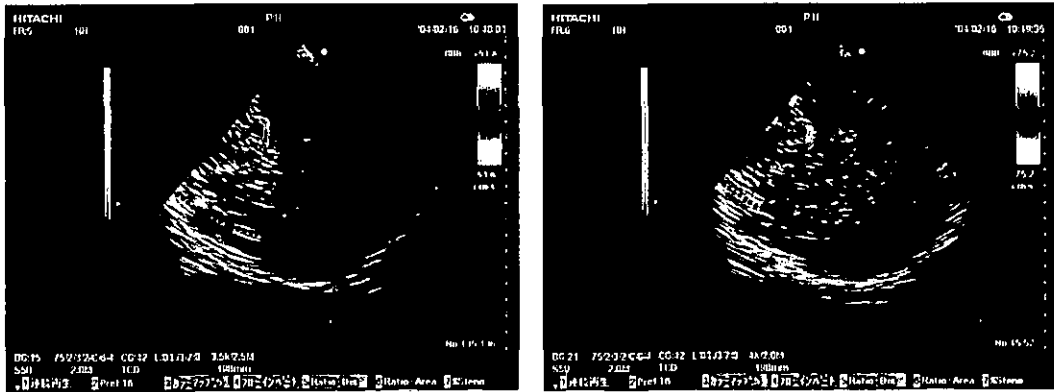


図 14 経頭蓋超音波照射が惹起する頭蓋内定在波の存在を示すシュリーレン法の結果  
(2MHz では定在波は立たないが 500kHz では生ずる)

(健康成人例 (29y.o. F))

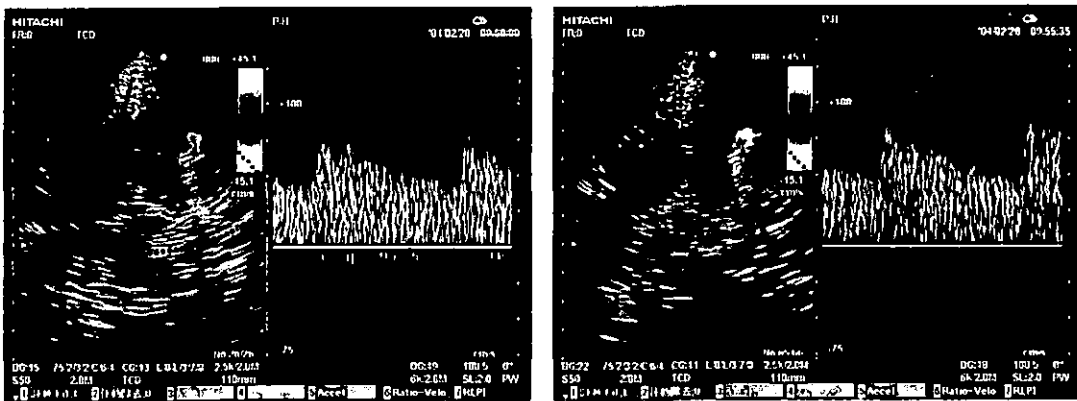


既製品プローブによるBモード像

積層型T/DプローブによるBモード像

図 16 T/D プローブと既存プローブによるヒト脳血流ドプラ波形観察の比較

(健康成人例 (29y.o. F))



既製品プローブによるTC-CFI

積層型T/DプローブによるTC-CFI

図 17 ヒト中大脳動脈血流波形の比較(TC-CFIによる)

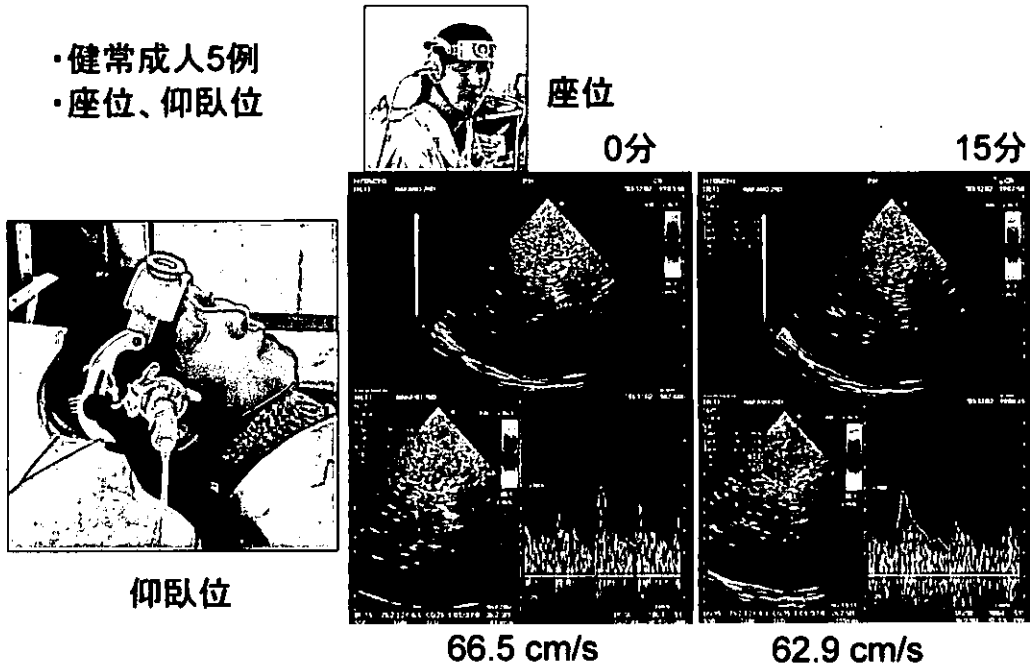


図 18 プローブ固定具を用いて TC-CFI 像を捕捉した。症例 5 例。  
座位、臥位、立位など変えても安定に固定されていた。

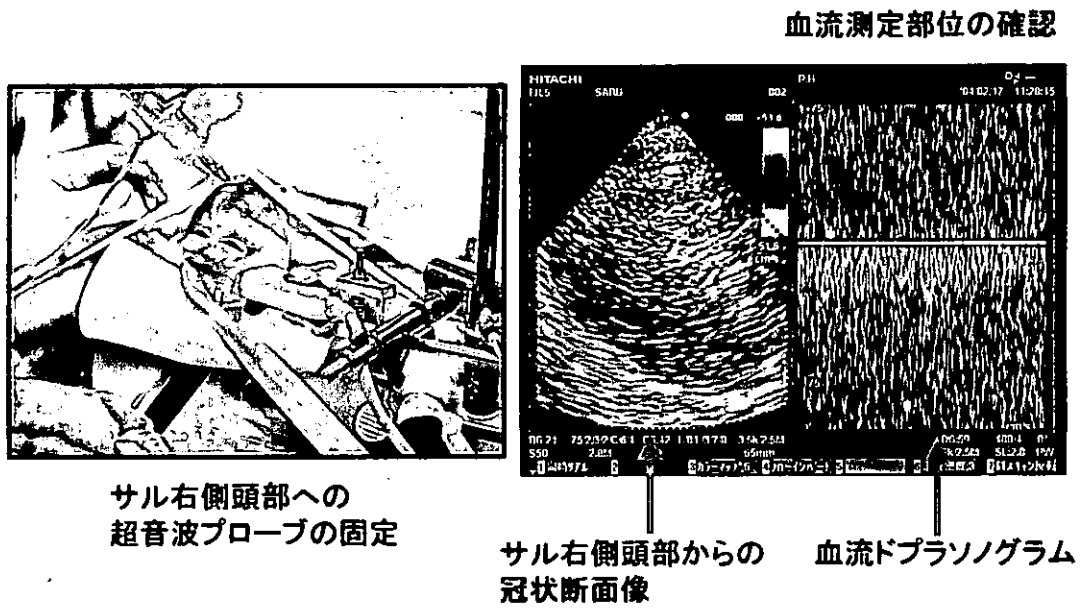


図 19 サル右側頭部での D ビームによる TC-CFI と脳内血流測定例

## Ⅱ. 分担研究報告書

## 分担研究報告書

研究課題：動物実験による超音波脳血栓溶解療法の前臨床試験

分担研究者：阿部 俊昭（東京慈恵会医科大学 脳神経外科・教授）

### 研究要旨

「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置」の前臨床試験として、有効性と安全性の二面から動物実験により評価を行う。まずウサギ大腿動脈血栓モデルで超音波併用血栓溶解療法の効果とその溶解過程を評価する。その上でヒトに近い霊長類であるサルの正常脳組織に対する経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の安全性を評価する。これらの結果を踏まえ、前臨床試験最終段階として、平成16年度にサル脳梗塞モデルを作成し、虚血脳組織に対する本装置の安全性を評価する。この結果を、平成16年度に行なう経頭蓋超音波脳血栓溶解装置を用いた探索的臨床研究の基礎的データとする

（研究協力者）清水 純（東京慈恵会医科大学 脳神経外科、ME 研究室）

### A.研究目的

脳塞栓症に対する発症3時間以内の組織プラスミノゲンアクチベーター（t-PA）の経静脈的投与の有効性は認められている（本邦未承認）。Texas大学のAlexandrovらは、経頭蓋超音波ドプラ法（Transcranial Doppler法：TCD）を用いてt-PAによる血栓溶解効果を監視することにより、TCD監視をしない場合に比べ再開通率が良いことを臨床例で示した。しかし、TCDの超音波周波数2MHzかつ出力0.2W/cm<sup>2</sup> sptaではTCD併用による血栓溶解効果の増強が基礎実験で証明されておらず、そのメカニズムは不明である。

我々は、かねてより頭蓋骨透過性の良い500kHz近傍の低周波数および低出力超音波を用いる脳血栓溶解療法を開発してきた。ウサギ大腿動脈血栓モデルにより490kHz、0.8W/cm<sup>2</sup> 経頭蓋骨（頭蓋骨透過時0.13W/cm<sup>2</sup>）の条件で有効性を示した。平成14年度の前臨床試験として、ラット中

大脳動脈閉塞モデルにより、490kHz、0.8W/cm<sup>2</sup> 経頭蓋骨の条件で、経頭蓋的超音波照射の脳神経組織に対する安全性を示した。

一方、米国Walnuts社はラット動物実験の成功をふまえて開発した経頭蓋超音波血栓溶解装置を用いて、平成14年5月にはpreliminaryな経頭蓋超音波脳血栓溶解の前臨床試験を始めていた（Mannheim大学神経内科 Daffertshoferなど）。平成15年7月ドイツで開催された第10回脳神経超音波国際会議（10<sup>th</sup> Neurosonology Research Group（NSRG）meeting）においてDaffertshoferより、初めて統計学的結果、不具合例について発表があり、300kHz、0.5W/cm<sup>2</sup>の経頭蓋超音波照射により、14例中5例で脳内出血（うち死亡例1例）を認め、超音波の影響が大きいという結果となり、治験は中止された、との事実が述べられた。

これらの世界的な経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発状況を踏まえ、開発した「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置」の前臨床試験を行うにあたり、平成 15 年度は、以下の 2 つの実験を実施した。

### その 1. ウサギ大腿動脈血栓モデルによる治療・診断併用超音波照射血栓溶解実験

### その 2. サル正常脳組織に対する経頭蓋超音波照射装置の安全性試験

なお、これらの実験は、東京慈恵会医科大学動物実験委員会の倫理的審査・承認の許に行っている。

### その 1. ウサギ大腿動脈血栓モデルによる治療・診断併用超音波照射血栓溶解実験

## B 研究方法

### B-1 対象

3000 g 以上（平均体重：3147±40 g）の New Zealand White rabbit、雄 13 羽の両側大腿動脈（13 例、計 26 側）を用いた。大腿動脈血栓モデルは Ishibashi の報告した狭窄型トロンビン血栓を両側に作成した（図 1）。両側に作成した理由は、同一個体で、超音波照射を行った場合と行わなかった場合を比較することを目的とする。血栓の作成は右側から左側の順に行い、全て右側に超音波照射を行った。

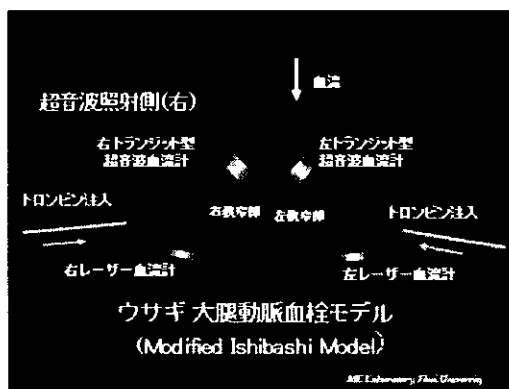


図 1. ウサギ大腿動脈血栓モデル

### B-2 実験方法

#### (1) 麻酔法

チオペンタール 20mg/kg 静脈内注射後、気管切開を行い、インフルレン 0.5～2% 吸入維持で全身麻酔下に動物に対する苦痛を取り除いた状況で実験を行なう。麻酔中は観血的血圧（上腕動脈）、直腸温をモニターする。

#### (2) 超音波照射

開発した治療・診断併用プローブにより、血栓溶解治療用 500 kHz (T-ビーム) を照射すると共に、診断用 2 MHz 超音波 (D-ビーム) を用い血流監視を行った。右側の血栓に対し、超音波コンビネーションプローブを血流方向に対して 30～45 度に固定した。初回 t-PA (Monteplase) 1.2mg を頸静脈より投与し超音波照射を開始した。照射方法は、強度 0.03W/cm<sup>2</sup> の D-ビームにより血流を 30 秒間監視し、専用の発信機より強度 0.16W/cm<sup>2</sup> の T-ビームを 2 分間照射した。血流状態は Doppler ソノグラムで監視し続けた。D-ビーム・T-ビームの

間歇照射を専用のスイッチング回路を通して行い、交互に4回行なった後、5分間T-ビームを休止しD-ビームで血流を監視した。この15分間を1セットとして4セット、計60分間の超音波照射を行なった。血栓末梢側にレーザー血流計を装着し、再開通状態を定量的に評価した(図2)。

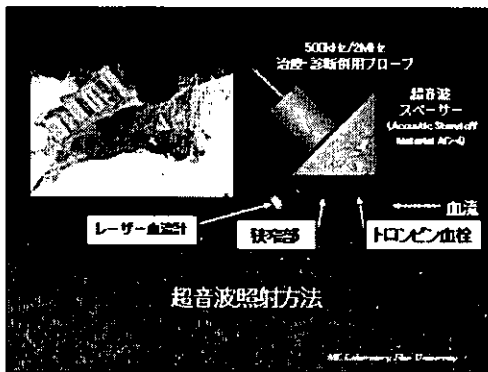
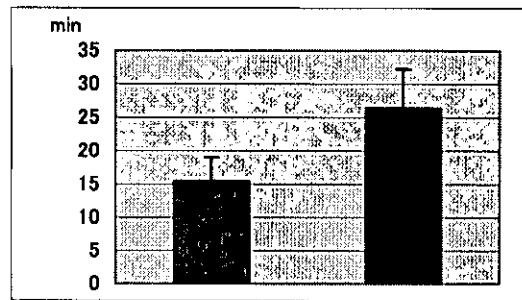


図2. 超音波照射方法

### C 結果

13例中、右照射側で5例(38.4%)、左非照射側で4例(30.1%)で血流の再開通を認めた。血流再開時間を比較すると、右超音波照射側  $16 \pm 3$  分、左非照射側  $26 \pm 6$  分と超音波照射側で血栓溶解効果の加速傾向を認めた(図3)。血栓溶解の認められた例で Doppler 血流ソノグラムの記録例を図2に示した。血栓溶解の進行に伴い①血流の無い状態から②心拍に伴う小さい spike pattern が出現した後、③血流の再開を示す flow pattern (→) が出現した。更に溶解が進むと④振幅の大きい spike pattern を示し完全再開通の状態となった(図4)。



US(+)  
 $16 \pm 3$  分

US(-)  
 $26 \pm 6$  分

図3. 血栓溶解時間比較

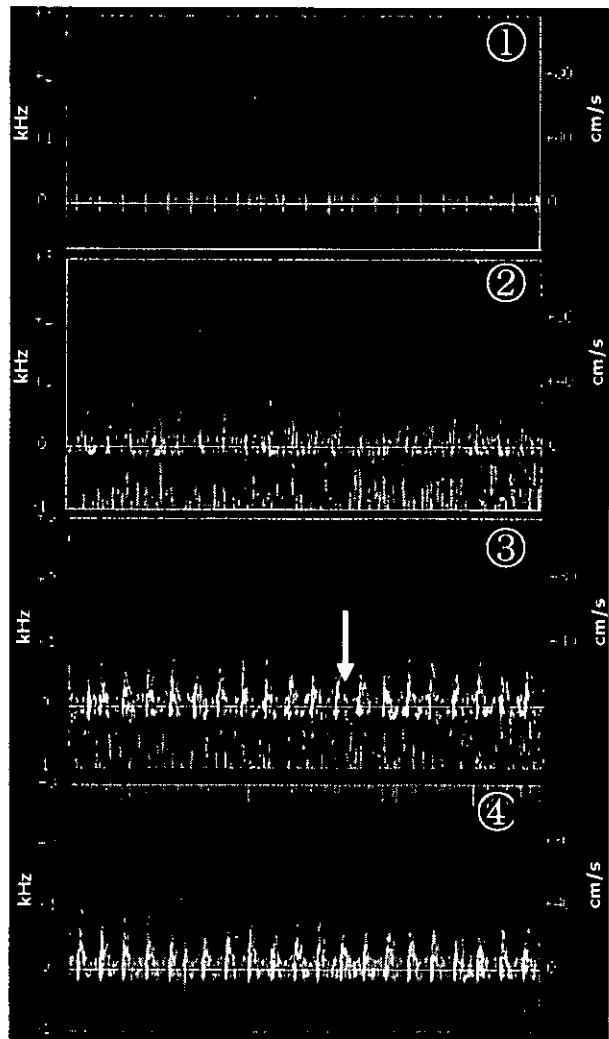


図4. 血栓溶解過程  
Doppler 血流ソノグラム



#### D. 考察

開発した治療・診断併用超音波プローブを用いることにより、血流監視により完全再開通を確認した時点で、T-ビームを停止させることができる。従って必要最小限の超音波照射による安全な治療が可能である。Akiyama らの報告によればヒト頭蓋骨の500kHz 超音波の透過性は2 MHz 超音波の約4倍である。超音波による血栓破壊能力は、超音波 mechanical index (MI) に依存しており、その音響強度が同一であれば、500kHz における MI 値は、2MHz の場合の約2倍であり TCD(2MHz)単独法に比べ、500kHz を用いた低周波併用法の溶解率は、超音波の骨透過性、高い MI 値であることを踏まえれば、臨床例においても高値を示すものと考えられる(図5)。

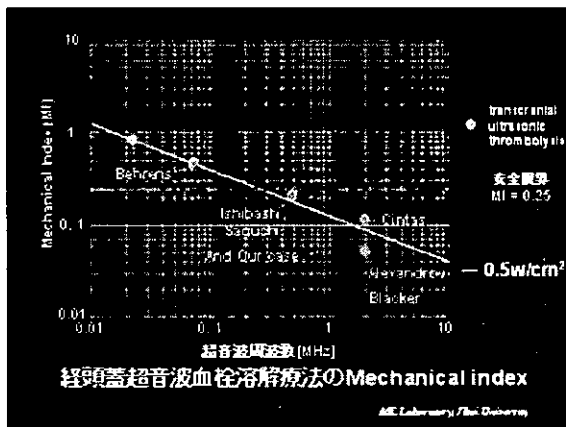


図5. 経頭蓋超音波血栓溶解療法の Mechanical Index

#### E. 結論

治療・診断併用超音波照射法は、血栓溶解療法を行なうと同時に、Doppler ソノグラムによる溶解過程の観察が可能である。超急性期脳血栓溶解療法において極めて有用な臨床手法と成り得るものと期待される。

#### References

Akiyama M, Ishibashi T, Yamada T, Furuhashi H. Low-frequency ultrasound penetrates the cranium and enhances thrombolysis in vitro. *Neurosurgery*. 1998;43:828-832.

Alexandrov AV, Demchuk AM, Felberg RA, Christou I, Barber PA, Burgins WS, Malkoff M, Wojner AW, Grotta JC. High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tPA infusion when continuously monitored with 2MHz transcranial Doppler monitoring. *Stroke*. 2000;31:610-614.

Ishibashi T, Akiyama M, Onoue H, Abe T, Furuhashi H. Can transcranial ultrasonication increase recanalization flow with tissue plasminogen activator? *Stroke*. 2002;33:1399-1404

The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 1995;333:1581-1587.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

① 論文発表

なし

② 学会発表

1. Shimizu J, Nakano M, Matsuyama H, Saguchi T, Abe T, Furuhata H, Moehring MA, Voie AH, Spencer MP: In Vivo Trial of a Newly Developed Combination 500kHz/2MHz Therapy/Power M-mode Doppler Probe for Ultrasound Enhancement of t-PA Thrombolysis. (10th meeting of the Neurosonology Research Group of the World Federation of Neurology. Bad-Salzhausen, Germany, July 5, 2003)

2. 清水 純、中野みどり、松山寛子、佐口隆之、石橋敏寛、尾上尚志、阿部俊昭、古幡 博, Moehring MA, Voie AH, Spencer MP, 「経頭蓋超音波治療・診断併用プローブによる脳血栓溶解療法の実験的検討-血流再開通過程の監視-」(第六回日本栓子検出と治療学会, 2003年12月、つくば)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### その2 サル正常脳組織に対する経頭蓋的超音波照射装置の安全性試験

### B 研究方法

#### B-1 対象

本年度は、2～4kg台のカニクイザル6例(オス3例、メス3例)に対して実験を行

った。病理組織学的評価のための比較対照群3例、超音波照射群3例である。

#### B-2 方法

##### (1) 麻酔法

ケタミン 10mg/kg 筋肉内注射後、気管内挿管を行いベクロニウム 0.04 mg/kg/hr 静脈内投与、イソフルレン 0.25～2%吸入維持で人工呼吸下全身麻酔の状態とし、動物に対する苦痛を取り除いた状況で実験を行なう。麻酔中は、心電図、観血的血圧(大腿動脈)、直腸温および呼気二酸化炭素濃度をモニターする。

##### (2) 超音波照射

開発した「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置」により右側頭部より中大脳動脈領域に対して超音波照射を行なう(写真1)。照射方法は、新たに開発したT・D・D共用の積層型プローブを用い、強度 0.5W/cm<sup>2</sup>の血栓溶解治療用500kHz超音波(T・D)を2分間照射した後、強度 0.2W/cm<sup>2</sup>の診断用2MHz超音波(D)により血流状態をDopplerソノグラムで30秒間監視する。T・Dの間歇照射を交互に4回行なった後、5分間T照射を休止しDで中大脳動脈血流を監視する(図6)。この15分間を1セットとして4セット、計60分間の超音波照射を行なう。超音波照射終了後麻酔覚醒を行い四肢麻痺の状態を判定した後、飼育管理を行なう。24時間後、再度神経学的評価を行なった後、バルビタール麻酔下に頸動脈より10%ホルマリン灌流固定を行い、脳組織を摘出する。脳組織の病理組織学的検討

を行い超音波照射の影響について検討する。



写真1. サル経頭蓋超音波照射

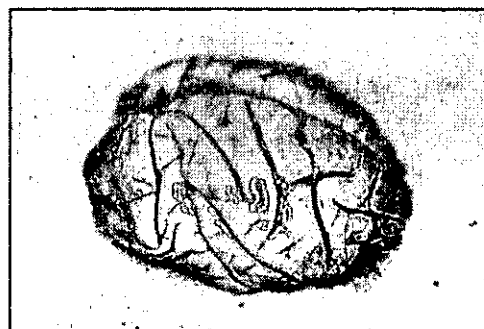


写真2. 摘出脳組織

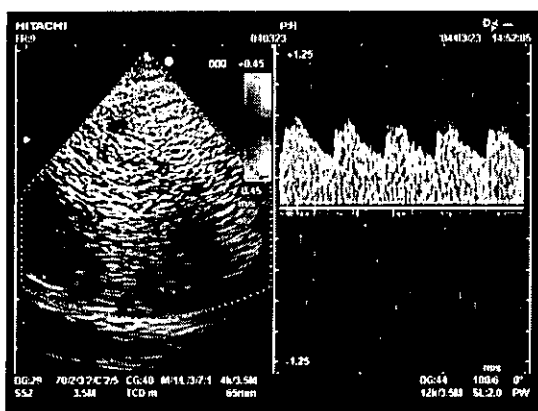


図6. カニクイザル中大脳動脈血流  
Doppler ソノグラム

### C. 結果

超音波照射を行った3例のうち、1例は麻酔覚醒・抜管後、呼吸不全で死亡した。24時間生存し得た2例については、明らかな神経学的脱落症状を認めなかった。摘出脳を観察すると、3例共に脳表面・脳内ともに、出血・変性などの肉眼的変化は認められなかった(写真2)。また、24時間生存し得た2例のうち、病理組織学的評価が完了した1例に関しては出血性病変、変性・壊死、軸索の腫脹、多核白血球の遊走等の病的変化は認められなかった。

### D. 考察

例数が少ないため、評価は時期尚早である。しかしながら開発した「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置」を用いた積層型プローブによる低周波超音波照射により、脳内出血などの重篤な合併症は認められなかった。より安全かつ有効な照射条件を得るためには、更に例数を重ねる必要がある。今後正常例、合計7頭に対して超音波照射実験を行い、適切な照射条件の検討と病理組織学的安全性評価を行う。この結果を元に、脆弱な虚血脳に対する安全性の評価を行うため、平成16年度にサル脳梗塞モデルを作成し実験を行う。

### E. 結論

重篤かつ致命的な合併症である脳内出血を回避するために、ヒトに近い霊長類であるサルの正常脳組織に対する経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の安全性評価を充分に行う必要がある。

### References

Kito G, Nishimura A, Susumu T, Nagai R, Kuge Y, Yokota C, Minematsu K. Experimental thromboembolic stroke in

105:2001:45-53.

Kuge Y, Yokota C, Tagaya M, Hasegawa Y, Nishimura A, Kito G, Tamaki N, Hashimoto N, Yamaguchi T, Minematsu K. Serial Changes in Cerebral Blood Flow and Flow-Metabolism Uncoupling in Primates With Acute Thromboembolic Stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:2001:202-210.

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

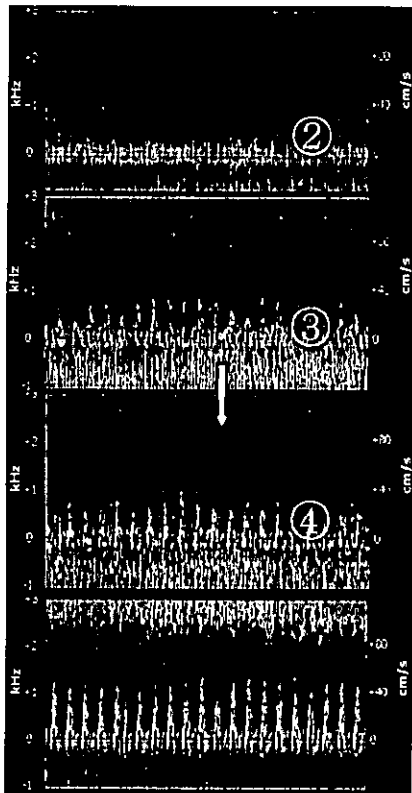


図4. 血栓溶解過程  
Doppler 血流ソノグラム

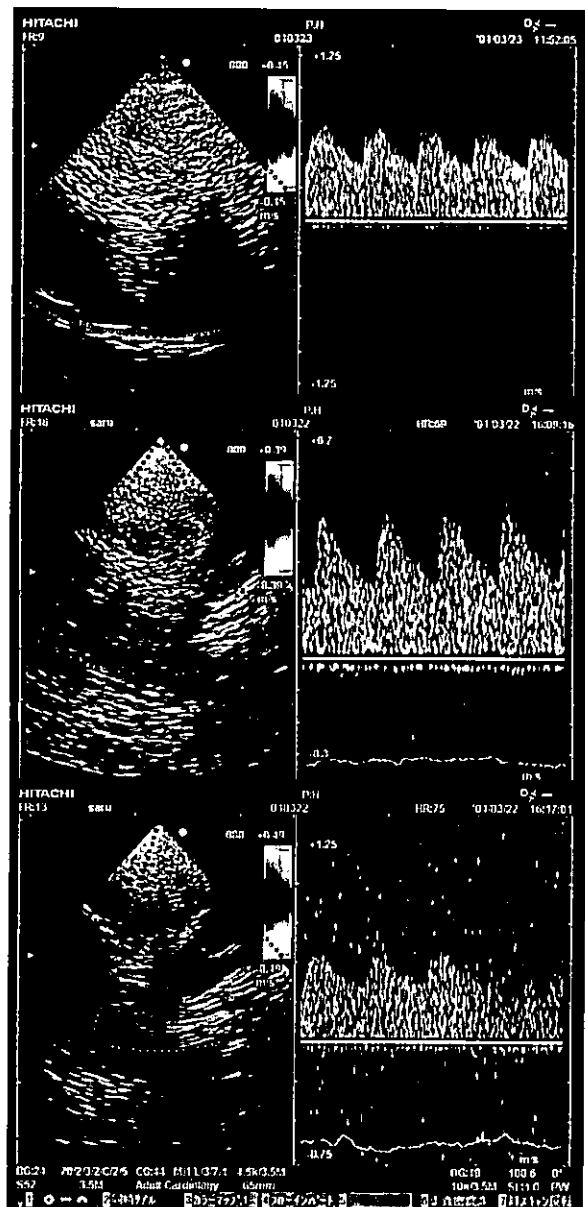


図6. カニクイザル中大脳動脈血流  
Doppler ソノグラム



写真1. サル経頭蓋超音波照射

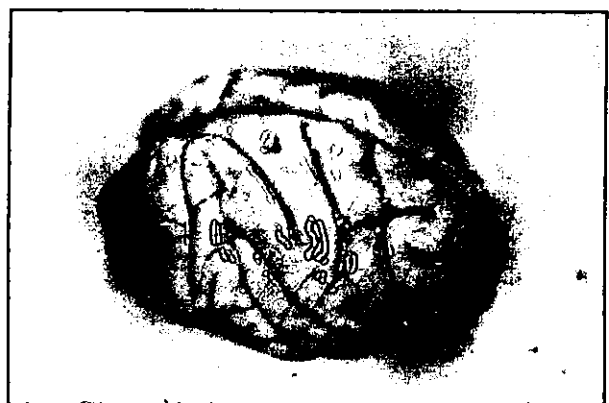


写真2. 摘出脳組織

## 脳梗塞再灌流動物モデルによる超音波照射の有効性と安全性評価

分担研究者：佐口隆之 東京慈恵会医科大学 脳神経外科

研究要旨 虚血脳に対する治療用超音波照射の安全性を、ラット脳梗塞モデルを用いて検討した。虚血状態の脳に超音波を照射した後、動物用 MRI を用いた画像解析と照射前後の神経学的所見を解析することにより、本研究で用いた超音波条件の安全性を評価した。

### A. 研究目的

中大脳動脈閉塞(MCAO)に対し、組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA) 静注後に診断用超音波 (2MHz、 $0.2\text{W}/\text{cm}^2$ ) を用い、中大脳動脈 (MCA) の血流を連続モニターすることで神経学的予後の改善が期待できるというデータが報告されている。<sup>1</sup>しかし、超音波の連続照射が虚血後および再還流時の脳に対して安全であるという事実を、実験的手法を用いて証明した報告は未だ無い。また、脳梗塞の治療後の大きな合併症として再還流に伴う出血性梗塞の問題がある。この頻度が、超音波照射によって増すかどうかという問題は極めて重要な検討課題である。

我々は、より頭蓋骨透過性に優れ、かつ血栓溶解を促進する 500kHz、 $0.8\text{W}/\text{cm}^2$  の治療用超音波の安全性を、ラット右 MCAO 後の再還流モデルで検討した。

### B. 研究方法

本研究は、ドイツ、バッド・ノーハイムのカークホッフ・クリニック、とマックス・プランク・インスティテュートの研究室にて行った。研究方法および動物の麻酔、鎮痛等の配慮は上記施設の倫理委員会の承認を得た上で行った。雄の Wistar 系ラット 22 匹を用いた。脳梗塞モデルは、外科用ナイロン糸の先端をシリコンラバーでコーティングした塞栓子を用いるモデルを使用した。これは、多くの脳虚血の研究で使用されていて、広く認められているモデルである。<sup>2,3</sup> イソフルレンの吸入麻酔による全身麻酔下で手術を行った。頸部正中切開を施し、右総頸動脈、内頸動脈および外頸動脈を露出させ、右外頸動脈の断端から逆行性に右内頸動脈内に上記の塞栓子を右 MCA の起始部に留置させ右 MCA 領域の脳梗塞モデルを作成した。

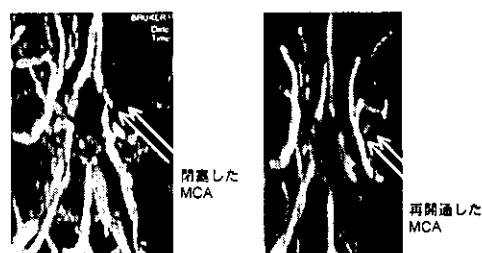
右 MCAO 80 分後に、神経学的評価を行った。この評価法もラットの虚血モデルの評価としては、広く認められているものである。評価は 5 段階のスコアで行った。score 0: 神経学的脱落症状無し; score1: ホルネル症候群; score2: 右前肢の不全片麻痺; score3: 左側へ偏る歩行; score4: 左側への回転運動である。<sup>2,3</sup> 今回の検討では、全例 score3 ないしは score4 を呈し、明らかな片麻痺を呈していた。

右 MCAO 90 分後に、右 MCA 起始部に留置した塞栓子を引き抜くことで、右中大脳動脈領域の再還流をさせた。引き続き 60 分間の間欠的経頭蓋超音波照射を行った群と行わなかった群の 2 群に動物モデルを分けた。超音波照射は、イソフルレンの吸入麻酔による全身麻酔下で行った。超音波照射は頭皮を切開し、頭蓋骨を露出させた状態で右冠状縫合を確認し、超音波プローブの前縁を右冠状縫合に合わせるように設置した。また、超音波照射を行わなかった群においても頭皮の切開を施し、60 分間の全身麻酔を行った。

右 MCAO 240 分後に、前述の神経学的評価を行った。今回の検討では、MRI を用いて虚血脳に対する超音波照射の影響を検討した。MRI の撮影は、イソフルレンの吸入麻酔による全身麻酔下で行った。

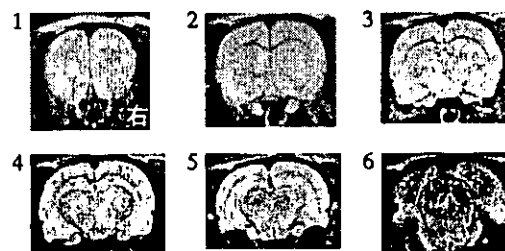
まず MRA を施行し、右 MCA が開通していることを確認した。全例において、右 MCA が開通していることを確認した。(図 1)

図 1 MRA による MCA 再開通の確認



次に、拡散強調画像 (DWI) と T2 強調画像 (T2WI) を、吻側より 2mm 間隔で計 6 回のイメージをそれぞれのラットで撮影した。ここで、右中大脳動脈領域に脳虚血が生じていることを確認した。(図 2)

図 2 MRI による脳梗塞部位の確認



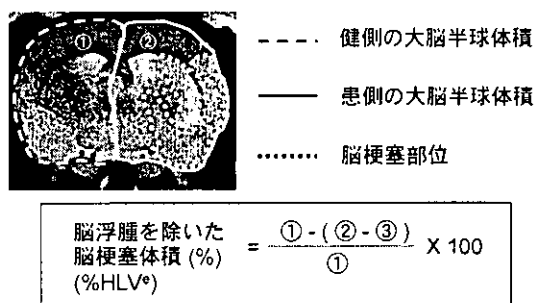
全例において、脳虚血が生じていることを確認した。右 MCAO 24 時間後に再び DWI と T2WI の MRI を施行した。神経学的評価は、右 MCAO 90

分、240分、および24時間後の計3回行った。

今回の検討では、経頭蓋超音波照射に伴い、脳浮腫及び脳梗塞体積の程度、T2緩和時間(T2rt)の延長に差が生じるかを検討した。脳浮腫及び脳梗塞の体積の計測法は、Gerrietsらが報告した方法により、MRIで得られた画像をコンピュータに取り込んだ後に計算する手法を用いた。<sup>4</sup>

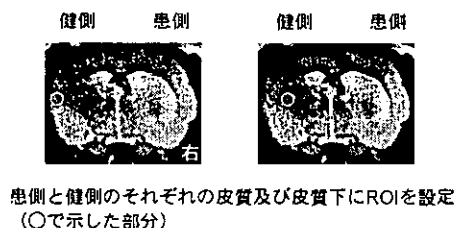
(図3)

図3 脳梗塞体積の計算方法



また、T2緩和時間(T2rt)の延長に関する検討は、MRI撮影時に画面上でROI(region of interest)を設定し、また、神経学的予後への影響があるかどうかを検討した。(図4)

図4 T2緩和時間延長の比較検討法



### C. 研究結果

#### 脳梗塞の体積

脳梗塞の体積に関しては、2群間で有意差を認めなかった。(図5)

図5

超音波照射群と非照射群間の脳梗塞体積の比較

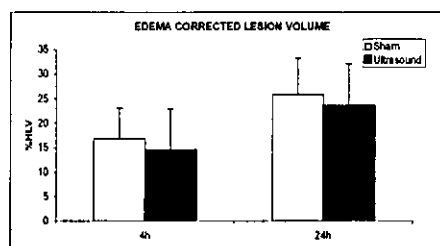


図5において、白の棒グラフが超音波非照射群を、黒の棒グラフが超音波照射群を表している。また、左側のグラフは、MCAO4時間後、右側のグラフはMCAO24時間後の脳梗塞体積を表している。超音波照射群において、脳梗塞の体積が増加するというよりはむしろ減少しているような印象を受けるが、2群間に統計学的



有意差は認めなかった。

### 脳浮腫の体積

脳梗塞の体積を検討した方法と同様にして脳浮腫の程度を 2 群間で検討した。結果を図 6 に示す。

図 6

超音波照射群と非照射群間の脳浮腫の体積の比較

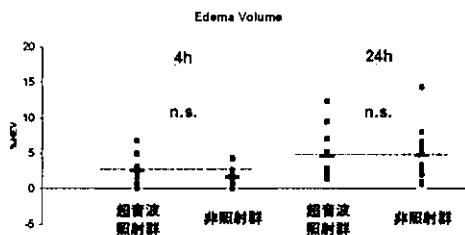


図 6 において、左の 2 本のグラフが MCAO4 時間後の脳浮腫体積、右側 2 本のグラフが MCAO24 時間後の脳浮腫体積を表している。MCAO 4 時間後の脳浮腫が、超音波照射群で若干強いように伺えたが、統計学的な有意差は認めなかった。

### T2 緩和時間の延長に関して

T2 緩和時間の延長は 2 群間で有意差を認めなかった。(図 7)

図 7

超音波照射群と非照射群間の T2 緩和時間の比較

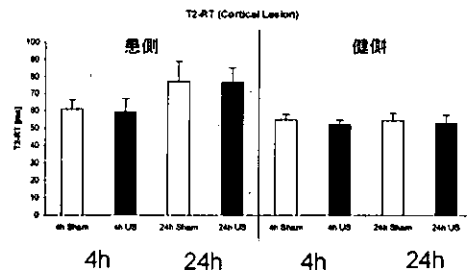


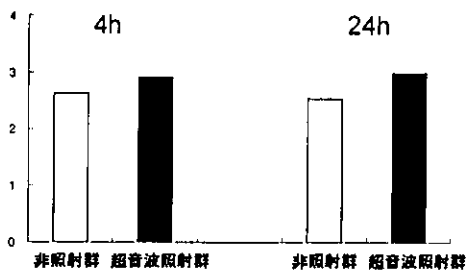
図 7 において、白の棒グラフが超音波非照射群を、黒の棒グラフが超音波照射群を表している。患側のグラフでは、MCAO4 時間後と比較して、MCAO24 時間後の T2 緩和時間の延長は延長している。しかし、超音波照射群は非照射群と比較しても T2 緩和時間は延長していない。健側に置いても同様の所見であり、2 群間に有意差を認めなかった。

### 神経学的予後

図 8 に神経学的予後のグラフを示す。縦軸は神経学的所見をとった際の score を表す。左側の 2 本のグラフは MCAO4 時間後、右側の 2 本のグラフは MCAO24 時間後の各群の神経学的所見の平均値を示す。各時間において、2 群間に神経学的所見の score の平均値に有意差は認めなかった。

図 8

超音波照射群と非照射群間の神経学的予後の比較



#### D. 考察

超音波を併用すると、血栓溶解が促進されることは、*in vitro* および *in vivo* の研究結果が、これまでに数多く報告されている。<sup>5,6,7</sup>

脳梗塞の治療において、より早い時期に閉塞した血管の再開通が達成できれば、神経学的予後の改善が期待できる。しかし、虚血により脆弱となった神経組織に血流の再開が生じると、出血性の合併症を来す可能性があることは、臨床における大きな問題である。

血栓溶解を促進させる目的で併用する超音波によって、出血性合併症が惹起されるようでは、t-PA を用いた脳梗塞の治療に併用することはできない。

Behrens らは、超音波照射によって、脳血管関門 (BBB) が開放され、血管透過性が亢進することを示唆する

報告をした。<sup>8</sup> しかし、我々の超音波照射条件よりもさらに低い周波数を用いており、超音波による機械的作用が浮腫を増強させ、出血を助長するといった悪影響を及ぼす可能性は否定できない。

我々の超音波照射条件 (500kHz、0.8W/cm<sup>2</sup>) は、生体組織に対しての十分な安全性を考慮している。我々の以前の検討で、この超音波照射条件が血栓溶解に有効であることを証明した。<sup>9</sup>

今回の我々の研究では、虚血後の脳、特に再還流が生じた脳に対する超音波照射の影響について、MRI による画像診断上の変化の有無を検討した。結果として、超音波照射による画像上の変化の有意差は認めず、また、神経学的な予後に有意差が無かったことから、我々の超音波照射条件を併用した血栓溶解療法は、安全に行うことができるものと考えられる。

臨床において、MCAO に対し、t-PA 静注による脳梗塞の治療中に、診断用超音波 (2MHz、0.2W/cm<sup>2</sup>) で血流を連続モニターすることで神経学的予後の改善が期待できると報告がある。<sup>1</sup>

しかし、我々の超音波照射条件は、診断機器の超音波よりも頭蓋骨の透過性が良いより低い周波数で、診断

機器レベルの限界値の出力を用いている。その照射条件で、in vivo で客観的な画像診断と神経学的な予後に有意差を認めなかったことは、今後の超音波併用血栓溶解療法の応用に大きな意味がある。

#### E. 結論

我々が提唱する治療用超音波は、客観的な画像診断においても、神経学的予後においても安全であることが証明された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 佐口隆之、中野みどり、中川清隆、石橋敏寛、清水純、尾上尚志、阿部俊昭、古幡 博「虚血時及び再灌流後のラット脳組織に対する経頭蓋超音波照射の安全性」(第 22 回日本脳神経超音波学会、2003 年 4 月、大阪)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### 本文中の参考文献一覧

1. Alexandrov et al. *Stroke*. 2000;31:610-614
2. Koizumi et al. *Jpn J Stroke* 1986; 8:1-8
3. Longa et al. *Stroke* 1989; 1,
4. Gerriets et al. *Stroke*. 2004;35:566-571
5. Behrens et al. *Ultrasound Med Biol*. 1999;25:269-273
6. Nedelmann et al. *J Ultrasound Med*. 2002;21:649-656
7. Suchkova et al. *Ultrasound Med Biol*. 2002;28:377-382
8. Behrens et al. *Ultrasound Med Biol*. 2001;27:1683-1689
9. Ishibashi et al. *Stroke*.2002;33:1399-1404

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

分担研究報告書

含気製剤による血栓溶解加速法の有効性の評価

分担研究者 石橋 敏寛（東京慈恵会医科大学 脳神経外科）

〔研究要旨〕

2つのin vivo実験を施行することで、超音波照射併用に血栓溶解療法の有効性を検討した。新たに治療用および診断用の両者を併用可能なコンビネーションプローブを開発し本実験に使用した。第1段階として、末梢動脈塞栓モデルを用いて、血栓溶解剤（tPA）に超音波照射を併用することにより再開通率及び、再開通血流の状態を検討した。その結果、超音波照射を併用することにより約4倍の再開通率を得ることが可能であることが確認された。また再開通を認めた場合血流は元の血流の約40%まで回復することが可能であり、血栓溶解剤単独投与に比べ約4倍の血流回復を得ることが出来た。また適切な照射条件の設定が必要である重要性が示唆される所見を得た。また本研究の発展として、さらに血栓溶解効果を増強すべく、含気性製剤を用いた、超音波照射併用の血栓破碎を検討した。

（研究協力者）清水 純：東京慈恵会医科大学 脳神経外科

〔研究目的〕

脳梗塞は本邦死因の第2位を占める脳血管障害のなかでも重大な疾患であり、欧米では近年Brain attack という名のもと、その治療法、治療薬の開発は急速な展開を示している。現在脳血栓塞栓症に対してはurokinase, t-PAを用いた血栓溶解療法が行われている。但し副作用として頭蓋内出血が問題になることが多い。さらに上記薬剤を使用できるgolden timeは3時間ともいわれ使用に関して制限がある。そこで我々は生体に対して侵襲度の少ない超音波を利用し、低周波数の超音波照射が血栓溶解を促すことを研究してきた。今回提唱するのは、近年脳神経超音波領域で注目をされている超音波造影剤を用いた血栓

破碎療法である。含気製剤は微小気泡を発生することで、超音波に対し反射波を生じることにより増強効果を発現する薬剤である。現在は診断用の造影剤として利用されているが、近年の研究によると、この微小気泡に対し、強い超音波を照射した場合、微小気泡が破裂する際の衝撃により血栓を破碎する作用があることが報告されている。

脳塞栓症の急性期において本効果が認められた場合、経頭蓋的超音波を用いた塞栓症の部位診断とともに、超急性期に血栓破壊が可能となり、脳梗塞治療に対する有益性は大きいと考えられる。本研究の目的は、臨床応用を前提として、in vivo 家兎大腿動脈閉塞モデルを用い超音波造影剤（含気製剤）併用によ