

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金  
基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

# 経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発と 探索的臨床研究

## 総括研究報告書

平成 17 年 3 月

主任研究者 古幡 博

(東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター  
医用エンジニアリング研究室)

## 目 次

I. 総括研究報告書		1
経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発と探索的臨床研究	古幡 博	3
II. 分担研究報告書		21
1. 超音波脳血栓溶解療法の探索的臨床試験の実施と評価	阿部 俊昭	23
2. 経頭蓋超音波脳血栓溶解療法の臨床的安全性に 関する調査研究	井上 聖啓	34
3. 虚血性脳卒中患者に対する経頭蓋超音波 脳血栓溶解装置の適用可能性の評価	峰松 一夫	44
4. 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	佐口 隆之	52
5. 開発装置の臨床適合性評価	石橋 敏寛	57
6. 神経保護薬投与下虚血脳における超音波作用	中野 みどり	61
7. 頭蓋内超音波音場と血栓溶解超音波照射法の検討	梅村 晋一郎 東 隆	76
8. 治療・診断複合システムの開発	窪田 純 佐々木 明	90

# Ⅰ. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
総括研究報告書

経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発と探索的臨床研究

主任研究者 古幡 博 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター  
医用エンジニアリング研究室 室長、教授

研究要旨：（研究目的）前年技術的に完成した「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置」を元に、有効性の確認、音響学的安全性、さらに同装置の超音波条件による医学生物学的安全性を *in vivo* 動物実験で確認することを目的とした。また、探索的臨床研究の展開することを目的とした。（研究方法）【有効性確認】血栓塞栓型モデル（シリンジ活用、狭窄率 95%）を tPA 溶液で充填し、ヒト新鮮血血栓で塞栓状態とし、開発プローブで超音波照射し、再開通時間を観察した。【音響学的安全性】超音波照射法としてバースト波 300KHz、0.72W/cm<sup>2</sup> Ispta、と開発装置の連続波 500KHz、0.72 W/cm<sup>2</sup> Ispta とを音響学的に比較した。キャビテーション発生状況についてはシュリーレン法で確認した。[医学生物学的安全性]血液脳関門、神経保護薬併用についてラット脳塞栓モデルで病理組織学的に評価した。特に開発装置の臨床使用状況を模擬し、健常霊長類（マカカ族）を用いて経頭蓋超音波照射の安全性を病理組織学的に評価した。（結果と考察）（1）有効性：開発装置は tPA 単独の溶解率 63.8% から 91.6% へ増高した。（2）音響学的安全性：Ispta が同じでもバースト波の duty cycle が長いと発生したキャビテーションの可能性が高まり、また、発生したキャビテーションが消失しにくいことをヒト頭蓋骨照射で確認した。（3）医学生物学的安全性：開発装置の最大超音波照射条件で脳梗塞状態が悪化させられないことを組織病理学的、免疫学的に示した。2）梗塞／再灌流モデルにおいて、神経保護薬の薬効を超音波は阻害しなかった。3）健常霊長類の脳に対し、開発装置の超音波条件は何らの損傷を惹起しないことを神経病理学的、免疫学的に明らかとなった。ただし、本脳血栓溶解療法は、血栓溶解剤との併用を前提とした。しかし、tPA の国内承認が得られていないため、探索的臨床研究は実行し得なかった。（結論）経頭蓋超音波脳血栓溶解装置を開発、その有効性、安全性を *in vitro*、*in vivo* 実験で確認し、安全で有効な急性期脳血栓溶解療法になり得ることを確認した。

A. 研究目的

今日の脳血管障害は本邦死因の第 3 位を占め、その 6 割から 7 割は脳梗塞とされている。この脳梗塞すなわち虚血性脳卒中のなかでも、急性虚血性脳

卒中（brain attack）は、その予後がきわめて悪く、重篤な障害を残すことが少なくない。

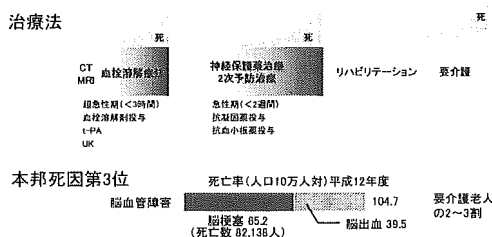
本研究ではその急性脳梗塞発症患者における超急性期治療法として欧

米で一般化しつつある血栓溶解剤（ティッシュプラスミノゲンアクチベーター：Tissue-Plasminogen Activator (t-PA)）投与方法における薬効を増強させる目的で経頭蓋超音波照射を可能とし、血流再開通を加速し、もって脳梗塞治療に寄与することを目的とした。すなわち、経頭蓋超音波脳血栓溶解装置を開発し、これを用いてその超急性期治療に新たな道を開き、脳梗塞治療へ挑戦することとした。

- (1) 血栓溶解用の低周波超音波を血栓部に照射する 2次元標的照射を実現すること
- (2) 治療用超音波照射と診断用超音波照射を同一プローブで行えること
- (3) すなわち治療状態を実時間的に監視する治療診断複合化システムを実現すること。
- (4) その低周波超音波が及ぼす音響学的安全性を確認すること。
- (5) 脳梗塞の病態に関する医学生物学的安全性を確認すること
- (6) 霊長類を用いて本邦の安全性を確認すること

脳梗塞(急性虚血性脳卒中)  
Brain Attack! を治療する

超急性期(発症3時間以内)の治療法の革命  
「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発と探索的臨床研究」



<図 1>

本研究は、基礎的研究成果に基づいて新たな臨床適用装置を開発することを目的するものであり、後述する基礎研究成果をもとに展開された。

本研究開発の具体的目標を次に示す。

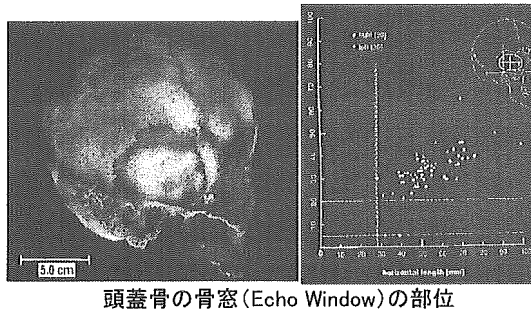
(従来の基礎的研究成果)

脳血栓に対する血栓溶解剤の有効性を超音波が増強することは従来より基礎的研究が展開されてきた。とりわけ、本研究開発の基礎となった研究開発は、次の点にある。

1) 頭蓋骨透過性

頭蓋骨における超音波の元帥は 45DD/cm/MHz 程度とされている。したがって、頭蓋骨の厚さとその超音波周波数によって超音波の頭蓋内到達度は変化する。すなわち、頭蓋骨の薄い部分であれば減衰は少なく、また周波数が低ければその減衰は少ない。ヒト頭蓋骨においては、図 2のごとく、側頭骨部分は薄く、日本人においては上下径 30 数ミリメートル、前後径 55 数ミリメートル程度の骨厚 2 ミリ前後の部分があり、これを超音波減衰の少ない場所として骨窓(エコーウインドウ)と称されている。すなわち、この骨窓部分を用いた経頭蓋的超音波診断法が今日まで開発されてきてい

る。本開発においても、同部位からの超音波照射を前提とした。



頭蓋骨の骨窓(Echo Window)の部位

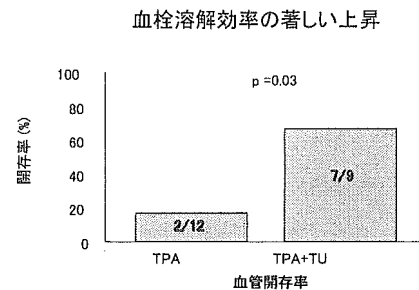
<図 2>

また、周波数的には 1MHz 以下の低周波超音波を用いればその減衰はきわめて少ないものとなる。たとえば、1MHz を骨窓に照射した場合には、頭蓋内超音波強度は照射強度のマイナス 9 dB 程度となり、500kHz の場合には -4.5dB 程度になると予想される。100kHz 程度では、-0.9dB となる。本開発においては、周波数 500kHz を用いることとした。

## 2) 経頭蓋的血栓溶解効果の確認

ヒト新鮮血を用いた血栓に対し、血栓溶解剤の効果を超音波は増強する。このことを 500kHz の低周波超音波を用い、われわれは、ウサギ股動脈塞栓モデルに対し、ヒト頭蓋骨を用いた経頭蓋的照射によっても血栓溶解効果が増強することを確認した。(図 3)。すなわち、ウサギ股動脈塞栓部に対し 500kHz 超音波をインターミット照射した結果、再開通率が 5 倍程度となった。換言すれば経頭蓋的に 500kHz 超音波を照射することによって、脳血栓の溶解を加速し、その開通率を著し

く改善するものと考えられた (Stroke ; 1399-1404:2002)。



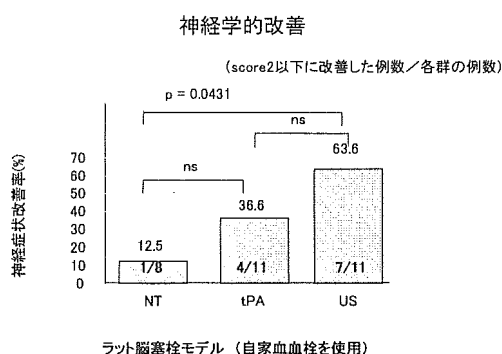
ラビット股動脈塞栓モデルへのヒト頭蓋骨を介した超音波照射

(Stroke; 1399-1404: 2002)

<図 3>

## 3) 経頭蓋超音波照射による神経学的改善の確認

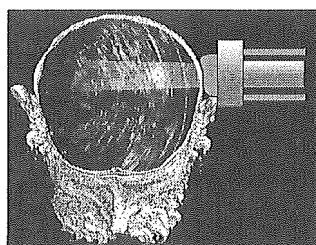
経頭蓋的な超音波照射を併用する血栓溶解療法が再開通率向上という効果をもたらすが、その結果として神経学的改善が行われるかどうかについてラット脳梗塞モデルを用いて実験的に検証した。モデルは自家血血栓を外頸動脈からカテーテル的に挿入し、中大脳動脈に留置する MCO モデルを用いた。塞栓完成時に覚醒させて神経学的評価を行い、そののち再び麻酔下にて超音波併用血栓溶解療法を施した。その 24 時間後に再び神経学的評価を行い、神経学的な改善度をスコア評価した。その結果、併用法の有意な改善効果が認められた (Stroke; 投稿中) (図 4)。



<図4>

#### 4) 経頭蓋超音波照射法の特許

このような経頭蓋的超音波照射法の有効性をもとに、ヒトに適用可能な経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の基本形を特許申請した(図5)。本研究開発は、この特許をもとにより臨床的な実用機を開発することを目的とした。



特許申請の内容  
低周波超音波(<1MHz)  
経頭蓋照射法(低侵襲法)

<図5>

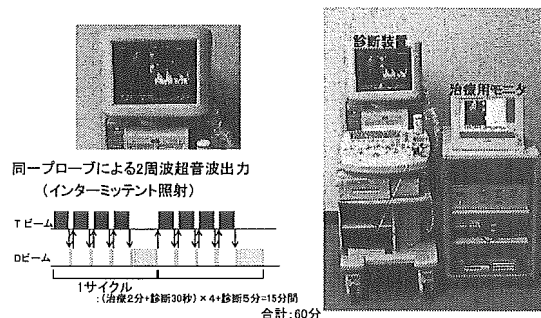
(目的)

#### ① 経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発とその有効性評価

基礎的研究成果に基づき、われわれは次のような構成をなす新たな経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発を目的とした。図6に示すように、治療用の超音波照射と診断用の超音波照射を

交互に行う装置を開発し、治療状態を監視しながら治療できる装置とすることとした。治療用超音波の条件は次の形とするものとした。

#### 開発した「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置」の基本構想



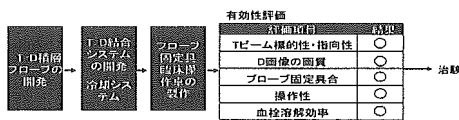
<図6>

- 超音波周波数: 490kHz
- 音響強度: 0.72W/cm<sup>2</sup> (この値は診断用超音波装置の最大限界値)
- 照射法: インターミット照射
- 波形: 連続波

なお、インターミット照射は2分間照射し、30秒間休止することを4回繰り返し、その後5分間休止する(計15分)。再びこの照射法を繰り返し、4回繰り返した段階で治療を停止する。すなわち、全体で60分の治療過程であり、実照射時間は32分とした。この治療用ビーム(Tビーム)の休止している間に診断用超音波を照射し、画像情報を得ることとした。この画像診断用超音波は2MHzのカラードップラー断層装置として現在市販されているものを用いることとした。この市販機と開発する治療器を一体的に使用するためには、その超音波発射部であるプローブについて次の工

夫をすることとした。同一プローブ内に診断用 2MHz の振動子配列と、治療用超音波振動子配列とを積層させ、このプローブひとつで治療と診断を切り替えて使用することを目標とした。以下にはその開発プロセスに沿って図 7 に従って述べる。

システム開発と有効性評価



<図 7>

開発の特徴は以下のとおりである。

- (1) 同一プローブからの治療診断超音波ビームの発射
- (2) 治療診断超音波の統一的制御
- (3) プローブの頭部固定具の開発
- (4) 開発装置の有効性の評価

② 低周波超音波の音響学的安全性評価

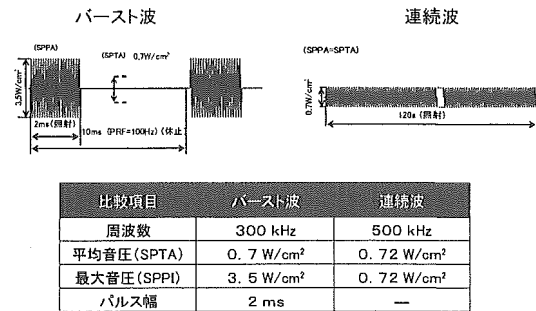
本開発においては、有効性と安全性の観点からその超音波条件を次のように定めた。すなわち、超音波による生体への影響の基本作用にはキャビテーション、熱作用、微小循環、機械的微小振動の 4 つの作用があるが、本開発においては中枢神経細胞に対する損傷の危険を極力抑制する意味で、キャビテーションと温熱作用についてある安全限界を定めた。これは生体組織における超音波の両作用が図 8 に示すような関係にあることを考慮し

たためである。すなわち、キャビテーションは周波数が低くなればなるほど一定音圧であっても発生しやすい傾向がある。組織内でキャビテーションが発生すれば、細胞引き裂き張力が働き、細胞死を招来することは明らかであり、そのためキャビテーション発生抑制にかかわる次の条件を定めた。一般にキャビテーションはメカニカル・インデックス (MI) = 1.0 のときに水中で発生するので、ここでは 4 倍の安全係数をかけ、MI=0.25 をその安全限界と設定した。生体組織内ではキャビテーション発生の限界値が MI=1.0 より相当高値であるので、われわれの設定値は安全係数の 10 倍以上を見込んだことになると考えた。一方、温熱効果についても頭蓋内における温度上昇はいくら高くても 2℃未満であることが要求されよう。生体組織内の温度上昇を示す指標としてサーマルインデックス (TI) が定義されており、TI=1.0 は組織内における 1℃の温度上昇を意味している。それゆえ、ここでは TI=2.0 をもって安全限界と定めた。図 8 における限界直線はこの両者を満たす値を示すものである。図から明らかなように、周波数範囲 500kHz 周辺に扱いやすい音響強度の適正領域が存在している。本開発ではその中心周波数 490kHz の治療用超音波ビームを条件とした。以上のような生体組織における MI 値および TI 値をもって安全限界を定めたが、前述した Duffert Schofer の臨床成績はこの安全限界の近傍の条件で不具合が発生した。すなわち、脳梗塞領域以外のいわば正常脳組織領域



において出血をした。それゆえ、我々の設定した条件に比しどのような音響学的問題を有するか明瞭にする必要があった。彼らの超音波条件と我々の超音波条件の関係を図9に示した。図から明らかなように、彼らの超音波照射条件は周波数 300kHz、バースト波で、その繰り返し周波数 100Hz、また、そのデューティーサイクルは 20% であった。それゆえ、バースト波の波高は図のように 3.5W/cm<sup>2</sup> に達していた。このときのメカニカル・インデックスは 1 を超えており、キャピテーションを発生しうる状況にあったと理論的に予想された。ここでは Duffert Schofer らが採用した超音波条件と我々の条件とを比較するような形で音響学的安全性を検討し、我々の方式を用いることによって安全な経頭蓋超音波法を確立しうることを示した。

超音波条件の比較



<図9>

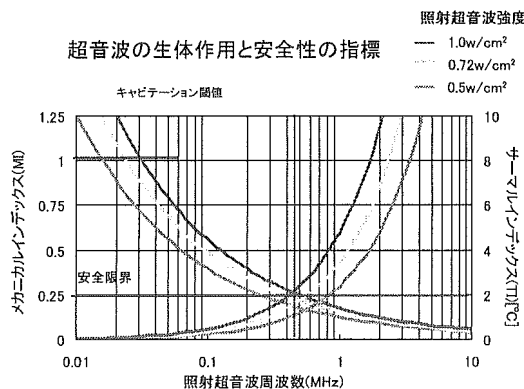
### ③ 脳梗塞状態に対する医学生物学的安全性評価

経頭蓋超音波脳血栓溶解療法としての有効性は、さまざまに示されてきたが、臨床適用する場合にはこの方法の安全性を確認する必要がある。実際、前述したように、Duffert Schofer らの臨床成績は低周波超音波照射に関する一種の警鐘であり、これに対応しうる音響学的安全性は第三章で述べたとおりである。

一方、医学生物学的意味では、低周波超音波に関する安全性を確認することはきわめて重要で、我々の予定している超音波照射条件についてもその検討をすることは必須の要件と考える。

ここでは、図10に示すように、次の諸条件下での安全性を検証した。まず超音波条件は、本開発で予定している最大出力条件とし、動物モデルとしては、正常状態、脳梗塞状態、再還流状態の3群での比較を基本とした。安全性評価の医学生物学的な対象として、

#### (1) 脳梗塞領域への影響



<図8>

- (2) 血液脳関門 (BBB) への影響
  - (3) 神経保護薬との併用時の影響
  - (4) 霊長類への影響
- について注目した研究を行った。

医学生物学的安全性評価

正常状態, 脳梗塞状態 US +, US - 超音波条件 最大条件 : 0.72 W/cm <sup>2</sup> 490 kHz, 連続波 インターミittent照射	安全性評価				
	正常	梗塞	再灌流	モデル動物	
→	MRUによる 脳梗塞領域評価	○	○	○	ラット
	BBB	○	○	○	ラット
	神経保護薬	○	○	○	ラット
	大型動物評価	○	-	-	霊長類

<図 10>

B. 研究方法

① 経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発とその有効性評価

①-1. T/D 積層プローブの開発

同一プローブ内に治療用振動子配列と診断用振動子配列を積層することによって治療診断を同一プローブで行うことを目的としていた。そのためにコンピュータシミュレーションによって積層型振動子配列において T ビームの指向性および D ビームの分解能が維持されるかどうかを検証することとした。

その結果に基づき、実際に積層型プローブを設計・製作した。

1) T ビーム指向性の検証実験法

T ビームは±45度の範囲で、精度1.5度をもって標的照射可能であることをシュリーレン法で検証した。シュリーレン法は水中に発射された超音

波がわずかな密度差を水中に生じさせるので、これを光の透過法で検証する方法である。本実験では、開発プローブの指向性および焦点効果を確認した。

2) D ビームの画像分解の検証実験法  
積層法プローブを用いても十分な分解能があるか否かをすでに市販されている同種のプローブによる画像比較をもって有効性を評価した。その比較法は、ファントムを用いた B モード画像比較および健常成人 5 例を対象とした経頭蓋的断層像およびカラー Doppler 血流画像の比較をもって行った。

①-2. T/D 複合化システムの実験的検証

診断装置の基本信号を参照しながら治療ビームを発射する制御方式とし、インターミittent照射による T ビーム照射休止時に D ビームが発射され、画像が得られることをファントムを用いて検証した。

①-3. 頭部へのプローブ固定具の設計製造

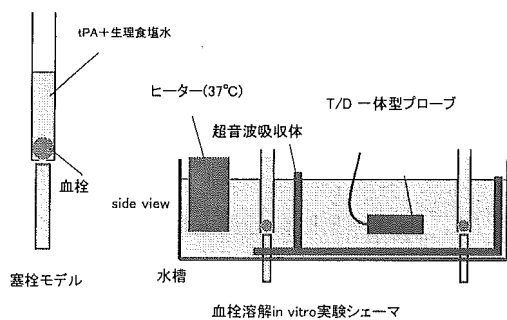
開発装置による超音波プローブは、患者頭部に 60 分間安定に固定し続けることが要求される。そのため、プローブを手持ちするのではなく、機械的に安定保持させることが必要となった。このため、頭部固定具を次の 2 つの方式で設計・製造・検証した。

①ヘッドギアタイプ:患者が座位または仰臥位であっても測定できるような、ヘッドギアのようなタイプ。

②枕型:患者が仰臥位でベッドに安静にいることを想定し(場合によっては、筋弛緩剤投与による)、ベッドと一体化した枕型のプローブ保持装置を作り、そこに患者の頭部を固定する枕型のタイプ。

このような保持法について健常成人5例によってそのプローブの安定性を評価した。評価はカラードプラー断層像のぶれやズレによって評価した。

①-4.in vitro 実験による有効性評価  
ヒト新鮮血を用いて血栓を作成し、これを tPA 溶液を充填した内径 9mm のディスポーザブル注射器に入れ、図 11 の実験構成により塞栓状態を作り、血流再開通を模擬した。この狭窄率は 95%強で、狭窄部となる注射針装着部での超音波強度が再開通率に關与する構成とした。4本の塞栓状態を作り、そのうち 1本に開発した装置からの超音波ビームを暴露し、再開通率および再開通時間を測定した。その結果を統計学的に比較検証し、有効性を評価した。



<図 11>

## ② 低周波超音波の音響学的安全性評価

図 9 に示したバースト波を発生する装置と我々の連続波インターミット照射を行う方法とを比較する超音波プローブおよび駆動装置を用意して次の実験を行った。

### ②-1. 頭蓋内定在波の発生実験

ヒト頭蓋骨を水平断で切断し、リング状のスライス標本を作製した。これを水中に沈め骨窓より超音波を照射し、そのときに生ずる頭蓋内反射状態をシュリーレン法で検証した。その際ビーム方向を変え、反射波の状況を確認した。また、2MHz のプローブを用いて、その場合の低在波の発生状態を調べた。

### ②-2. バースト波によるキャビテーション発生実験

バースト波超音波を経頭蓋的に発射させ、反対側の頭蓋骨内面で反射を生じさせる状況を作り、そのときのキャビテーションを観察した。特にバースト波のデューティーサイクルを一定にしたままで、パルス持続時間を変化させたときのキャビテーション発生の差異を観察した。

### ②-3. 定在波によるキャビテーションの発生実験

定在波によって頭蓋内でキャビテーションが発生することをシュリーレン法で確認した。

## ②-4. 定在波による脳神経細胞への影響

マウス脳のスライスを作り、器官培養モデルを用意し、この脳培養スライスを定在波のキャビテーション群の集まる部位に置いたときの細胞死数を調べた。細胞死の数は PI 染色により確認し、デスコントロールと比較した。定在波を発生させるために、ここでは反射ファントムを作って実験した。この反射ファントムの反射面からの距離を指標にして、定在波の腹の部分に脳スライス標本を置いた。

## ③ 脳梗塞状態に対する医学生物学的安全性評価

### 1) 脳梗塞領域への影響

ラットの脳梗塞モデルをナイロン糸による MCA 塞栓法で実現した。塞栓子は、外頸動脈より MCA に向けて挿入し、MCA への分岐部に留置することによって MCA を作ることにした。その際、レーザ血流計を用いて、経頭蓋的に MCA 支配下の血流状態を監視し、血流量がある程度現象する状況をもって MCAO モデルの完成とした。この状態で超音波を照射し、脳梗塞領域の拡大が生ずるかどうかを検討した。梗塞領域の評価は塞栓直後と塞栓子抜去後 24 時間時の MRI 評価で行った。なお、この MRI を用いた実験は、ドイツとの共同研究として行われた。

### 2) 血液脳関門への影響

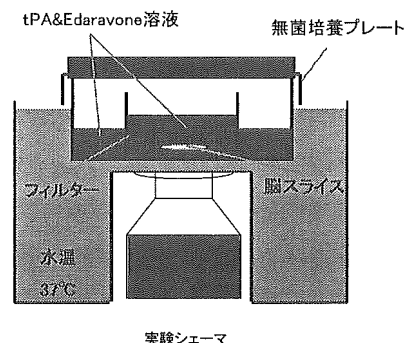
ラット脳梗塞モデル全 21 例を用いて、上述のような小泉モデルで作成した。虚血時間を 90 分とし、その後にエバ

ンスブルーによる評価および免疫染色（アルブミンおよび GLUT 1）により BBB の破綻状況を調査した。

### 3) 神経保護薬との併用時の影響

#### (in vitro 実験方法)

マウス脳スライス標本を作製し、その器官培養モデルを用いて低酸素状態化での超音波照射の及ぼす影響を検討した。5%O<sub>2</sub> 状態下で 1 時間スライス標本を留置し、その直後に神経保護薬エダラボン (6 μM) を投与した。評価はスライス脳の死細胞数で行うこととし、死細胞状態は PI 染色で確認した。同観察は 7 日間にわたり行った。



< 図 12 >

#### (in vivo 実験方法)

ラットの脳梗塞再灌流モデルを小泉モデルで実施した。脳虚血状態は、レーザ血流計で確認し、60 分虚血後塞栓子を抜去するとともに、エダラボン (3mg/kg) を静注した。再灌流時にエダラボンを投入したのは薬効が再灌流時にもっともよく保護効果を示すことが明らかだったためである。その 7 日後に脳を取り出し、2mm 間隔のスライスを作成し、梗塞体積を求め、比

較した。比較群はすべて脳梗塞状態であり、エダラボン単独投与群、超音波単独照射群、および超音波・エダラボン併用群、および対照群の4群で行った。

#### 4) 霊長類への影響

対象は霊長類カニクイザル 12 頭、うち 3 例を非照射例、9 例を超音波照射例とした。サルを麻酔下におき、経頭蓋的に開発した超音波プローブをあて、MCA 血流を観測した後、治療用ビームを発射した。インターミット照射により 60 分間暴露し、その後覚醒させて神経学的症状を観察した。照射群のうち 7 例については 7 日後に脳を取り出し、他は翌日 24 時間後に脳を取り出した。いずれも図 13 に示す神経病理組織学的検査を行い、超音波による有害性を検討した。なお、ポジティブ・コントロールデータを得るために、ブタやラビットを用いてその脳に強力な超音波をあて、同標本を用いて同様の神経病理学的評価を行った。

#### 霊長類を用いた安全性評価

対象:カニクイザル 12頭

比較群:正常3例、超音波照射群9例

神経学的評価:24時間後、7日後

神経病理組織学的評価方法:

光 顕 : H.E.染色、Kluver-Barrera染色、Bodian染色  
免疫光顕 : 抗APP抗体(22C11,Chemicon)、RCA-1抗体、  
α B crystallium、Hsp(heatshock protein)32(HO)、  
Hsp40、Hsp60、Hsp70、Hsp90、  
TUNEL(apoptosis)、COX2(cyclooxygenase-2)

<図 13>

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は実施施設での実

験動物委員会の承認を得、その倫理規定を遵守して行われた。また探索的臨床研究においては各施設の倫理委員会の承認を得、患者へのインフォームドコンセントを徹底し、同意を得られたものについて行うこととした。

#### C. 研究結果

##### ① 経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発とその有効性評価

##### ①-1. T/D 積層プローブの特性

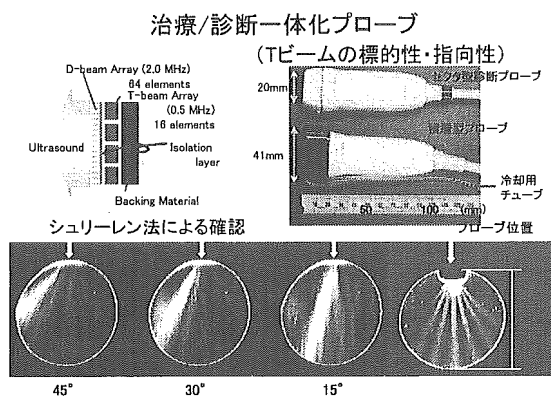
1) コンピュータシミュレーション結果によって、積層方式でも目的とする T ビームおよび D ビームの強度および分解能が得られる見込みを得た。

2) 同結果に基づき、実際に積層型プローブを設計・製作した。図 14 のごとく、超音波プローブの表面に 2 MHz の振動子配列 (64 素子) を置き、その背面に T ビーム用振動子配列 (16 素子) を置き、全体として図上段のようなプローブとした。図から明らかのように、このプローブの形状は、市販の死んだ尿超音波プローブ H-50 とほぼ同等とすることができた。

3) シュリーレン法によって確認された T ビームの指向性の例を図 14~15 に示した。設計どおり、+-45 度の範囲で低周波超音波ビームを標的方向に発射することができた。

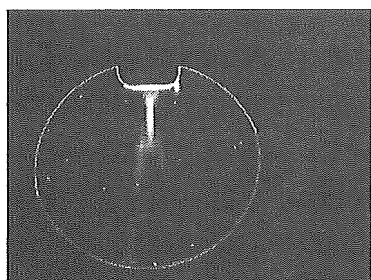
4) また、開発した装置の D ビームによる画像診断特性の結果は、ファントム実験においてほぼ同等であることを示した。また、ヒト健常例による成績でも、図 16 に示すように、市販装置とほぼ同等の良好な画像および血

流ドップラー信号を得ることができた。



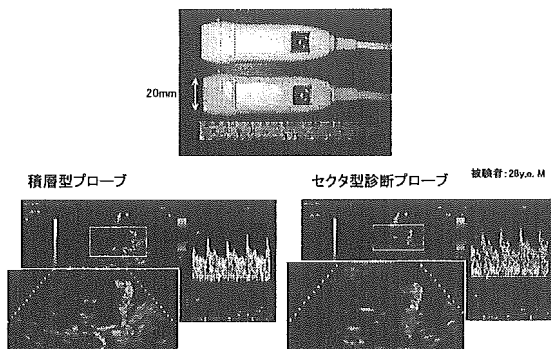
<図 14>

Tビームの標的スキャン



<図 15>

治療/診断一体型プローブ（診断像）



<図 16>

①-2. T/D 複合化システムの実験的検

証結果

開発装置は上述のように T ビーム、B ビームそれぞれ初期の目的を達成する成績を示した。これは診断装置と結合した治療用システムを含む全システムが良好に作動した結果であり、その全体像を図 17 に示す。なお、制御システムがインターミット照射における照射・休止の時間設定および超音波照射強度の任意の設定が可能であり、そのことを示す操作画面も開発された。

治療システムの全体像



<図 17>

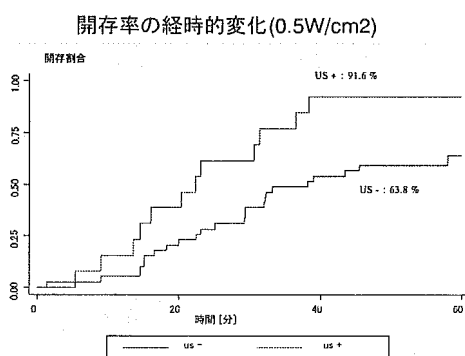
①-3. 頭部へのプローブ固定具

図 17 に示すように、2 種類のプローブ固定具を開発した。頭部固定に際しての被験者の痛み、圧迫感などについてそれぞれ意見を聴取した。その結果を踏まえ、再三固定具の微細な加工や変更を重ね、最終的に全員がおおむね満足する固定具とすることができた。

①-4. in vitro 実験による有効性評価結果

開発装置を用いて行った有効性の結果を図 18 に示した。図から明らかのように、60 分後の開通率はコントロ

ール群 63.8%、超音波照射群 91.6%となり、両群間には優位な差があった。この結果は超音波照射強度が  $0.05\text{W}/\text{cm}^2$  での結果であり、この値は採用したモデルのボトルネックとなる注射針装着部における超音波強度である。すなわち、この微弱な超音波強度の低周波超音波 500kHz、インターミittent照射でも血流再開通率が十分得られることを実証するものである。



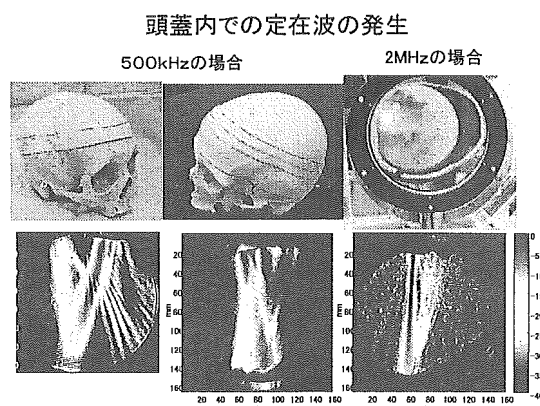
<図 18>

## ② 低周波超音波の音響学的安全性評価

### ②-1. 経頭蓋超音波照射による頭蓋内定在波

図 19 に頭蓋骨を介して照射された超音波による定在波の例を示す。図の上段は頭蓋骨とそのスライスを水槽内に入れ、シュリーレン実験をしているシーンであり、下段はシュリーレン法によって得られたビームが頭蓋内で多重反射している状況である。図から明らかなように、500kHz の低周波を照射した場合には、入射側に対する反対側での反射がおき、それが全体とし

て 2～3 回の反射を繰り返す状況が明らかとなった。頭蓋内はこのような反射の繰り返しにより思わぬ方向に超音波ビームが到達しているものと予想された。しかもその反射波は入射波と重なり定在波を発生していることが明らかとなった。この定在波の音響強度はシュリーレン法によっては測定できなかったが、その輝度から理論値に近い音圧増強効果のあることが示唆された。なお、2MHz を用いた場合には、反対側に超音波が到達する時点で相当減弱しており、反射波の存在が確認できなかった。

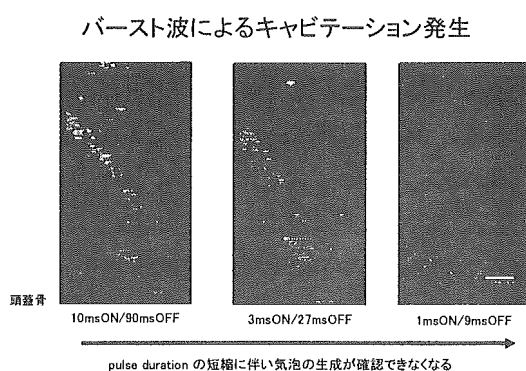


<図 19>

### ②-2. バースト波によるキャビテーションの発生

上述のように、頭蓋内では定在波が発生した。バースト波によっても定在波はもちろん発生し、音響強度が強い分だけ発生率は高いものと考えられた。実際にバースト波による定在波も存在した。この定在波によってキャビテーションを招く恐れがあるが、キャビテーションは 1ms 以上の持続時間がないとキャビテーションとして形成されないことが知られている。図 20

は、定在波が強く発生するように反射波の方向と入射波の方向とを重ねた場合の例で、このときのキャビテーション発生状況を示している。図から明らかのように、デューティーサイクル20%であっても、パルス持続時間が短くなるにしたがって定在波によるキャビテーションの発生は軽減された(図20右端参照)。このことから、本実験でのバースト波条件を調整することにより、場合によってはキャビテーションを発生させないバースト波照射法の可能性が示唆された。

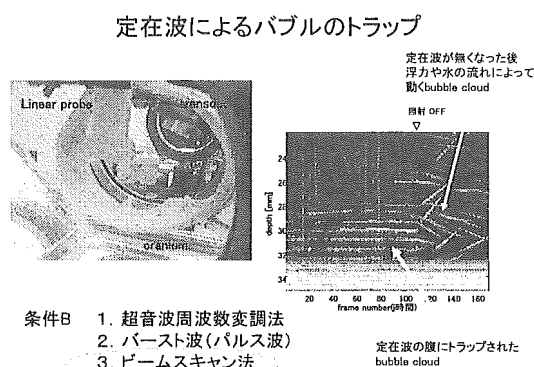


<図20>

### ②-3. 定在波によるキャビテーションの補足

定在波によってキャビテーションが発生する可能性があったが、定在波は同時に発生したキャビテーションを補足する効果ももっていた。図21は、シュリーレン法によって確認されたキャビテーションの補足効果を示すものである。トラップされたキャビテーション群が超音波照射を停止することで持続的にその周辺にキャビテーションが拡散していく様子を撮影したものである。このことから、仮に

頭蓋内にキャビテーションが発生した場合には定在波によってキャビテーション群として増強され、かつ、発生したキャビテーションは単純に消失することなく浮遊し続けること、また、このキャビテーションバブルに超音波を照射すると、診断レベルの超音波でもこのバブルを破壊し、バブル破壊に伴い極所的な温度上昇や細胞破壊を招く恐れのあることが明らかとなった。それゆえ、本開発における治療・診断併用法においては、治療ビームによる定在波の発生がまったくないように設計されることが要求されることが明らかとなった。



<図21>

### ②-4. マウス脳培養スライスへの影響

PI染色による脳神経系の死細胞数を光学顕微鏡で検査した結果、定在波の腹の部分、すなわちもっとも音圧の高い領域にスライスを置いてもそれによる死細胞数の増加はみられなかった。すなわち、本開発における治療用超音波条件が最大の状況でも神経細胞には無害であることを確認した。



③ 脳梗塞状態に対する医学生物学的安全性評価

1) 脳梗塞領域への影響

図 22 は、梗塞領域を健常側の面積で除した梗塞率を出し、4 時間ごと 24 時間後の結果をグラフに示したものである。その結果から明らかなように、超音波照射の有無にかかわらず、梗塞領域は一定に存在し、経頭蓋的超音波照射が脳梗塞領域を拡大することのないことを確認した。

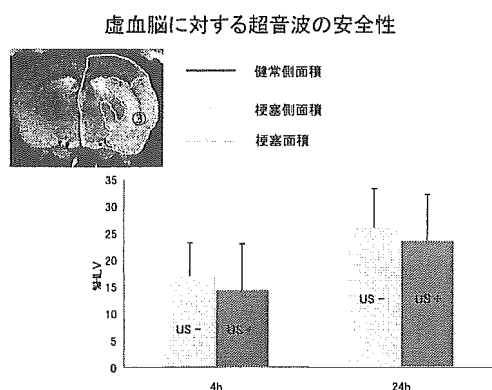


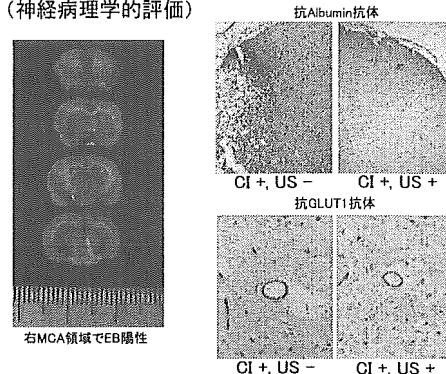
図 22

2) 血液脳関門への影響

図 23 に結果の典型例を示す。脳梗塞により血液脳関門が破綻していることをエバンスブルーで確認した例を同図左に示した。エバンスブルーの評価では、超音波の照射により血液脳関門破壊領域が拡大することにはなかった。また、免疫染色による結果の典型例を同図右に示した。アルブミン染色においても、GLUT1 染色においても、BBB の破綻が超音波照射によって増強されることはないことが示された。すなわち、開発した低周波超音波照射の最大条件によって血液脳関門の破壊が増強されることは脳梗塞状態にお

いて認められなかった。

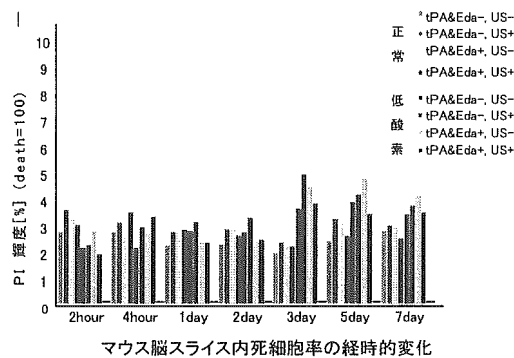
ラット脳梗塞モデルを用いたBBBへの超音波作用 (神経病理学的評価)



<図 23>

3) 神経保護薬との併用時の影響 (in vitro 実験方法)

図 24 に示すように、7 日間にわたり死細胞数は徐々に増加するが、各群間に有意差を認めなかった。エダラボン投与による神経保護効果を低周波超音波が阻害しないことを明らかとした。



マウス脳スライス内死細胞率の経時的変化

(n > 4, bar = S.D.)

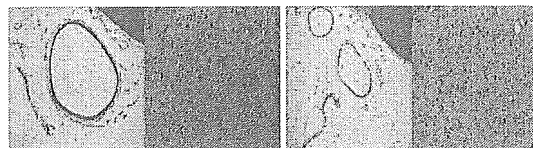
<図 24>

(in vivo 実験成績)

神経保護薬投与下の脳梗塞領域を図 25 に示す。図から明らかなように、全群間に有意差はなく、超音波照射を行っても、神経保護薬の薬効を阻害しないことが明らかとなった。

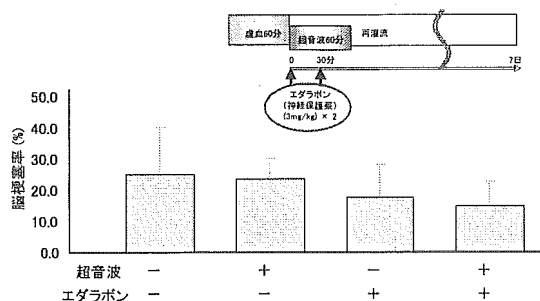
霊長類健常脳に対する安全性の神経病理学的結論

- 1) 肉眼的に明らかな出血、軟化、腫脹、腫瘍を認めない。
- 2) 剖面所見でも明らかな出血、軟化、腫脹、腫瘍を認めない
- 3) 神経細胞変性像および脱落像、反応性ミクログリアや反応性星状膠細胞の出現、髄鞘脱落、軸索断裂、APP陽性軸索の出現、熱ショック蛋白(αB-crystallin, Hsp27, Hsp32, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90)陽性細胞などを認めなかった。



<図 27>

神経保護薬投与下虚血脳における超音波作用(in vivo実験)

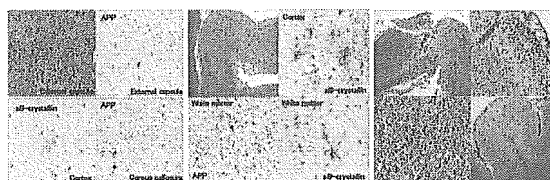


<図 25>

4) 霊長類への影響

(1) 図 26 にブタおよびラビットによって得られたポジティブ・コントロールの神経病理学的所見を示す。すなわち、超音波による障害は、軽度・中等度・重度に大別された。

Positive Control (ラビット、ブタの脳へ強力US照射)



軽度	中等度	重度
白質に軸索断裂出現APP陽性軸索 αB-crystallin陽性星状膠細胞	軸索断裂、血管の断裂(出血)。Hsp32陽性の microglia/macrophagesの浸潤 αB-crystallin陽性反応性星状膠細胞増生。急性期に星状膠細胞のclassmatodendrosis	大脳皮質表層に強い外傷性病変(二次性血管障害) 軸索断裂・出血。Hsp32陽性の microglia/macrophagesの浸潤 αB-crystallin陽性反応性星状膠細胞増生。急性期には星状膠細胞のclassmatodendrosis

<図 26>

(2) カニクイザルについては、図 27 に示すように、神経病理・組織学的に有意な障害のないことが実証された。すなわち、経頭蓋超音波脳血栓溶解装置を用いた経頭蓋的超音波照射が正常脳組織に対してはまったく無害であることを実証した。

D. 考察

① 経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発とその有効性評価

開発した経頭蓋超音波脳血栓溶解装置は初期の目的を達成し、治療下においても従来の診断装置の精度と等しい精度で治療状態を実時間的に監視可能であり、かつ標的部での塞栓については優位な再開通率増高をきわめて微弱な超音波強度でも実現しうることを示した。今日、経頭蓋超音波血栓溶解療法として、診断用の経頭蓋ドップラー法 (Transcranial Doppler; TCD) や経頭蓋カラードップラー断層法 (Transcranial color flow imaging; CFI) などによる診断装置を用いた有効性が臨床的に示されている。それらの診断装置は 2MHz のパルス波を使用している。TCD を用いた臨床成績では、IPTA 投与単独例での血流再開通率が 30%程度であるのに対し、50%程度に再開通率が達した。また、TCCFI によってもその有効性が示唆されてきた。しかしながら、1MHz 以下の低周波超音波を用いた血栓溶解療法の臨床的有用性は次に述べる成績

以外に報告されていなかった。低周波超音波を用いた脳血栓溶解療法の臨床成績としては、Duffert Schofer による成績のみが報告されていた。彼らの成績は 14 例中 4 例において梗塞領域以外での出血を認め、うち 1 例は死亡例となるものであった。その原因については未だ明快な科学的解明はなされていなかったが、後述するように、その主原因のひとつは、用いた超音波ビームの特性によるものと考えられた。したがって、本開発装置を臨床応用する場合には、彼らの臨床失敗例を回避する適切な実験成績と安全性確保の手法を採用する必要があるものと考えられる。

## ② 低周波超音波の音響学的安全性評価

バースト波および連続波による音響学的安全性の問題点を明らかにし、条件によっては平均音圧が同じであっても頭蓋内においてはキャビテーションの発生しうることを実験的に示した。その結果によれば、Duffert Schofer が用いた超音波バースト条件は頭蓋内の反射により定在波を発生し、梗塞領域以外でのキャビテーションの発生が示唆された。本実験は、水中での実験結果であり、生体組織においては水に比べてキャビテーションなどは発生しにくいものと予想される。しかしながら、この水中での実験成績は生体組織内で起こりうるキャビテーション発生の状況を推測させるものである。

## ③ 脳梗塞状態に対する医学生物学的

## 安全性評価

経頭蓋超音波照射がもたらす医学生物学的問題はほとんどないことを、MRI による脳梗塞領域の評価、BBB の破綻状態、神経保護薬との併用状態、および霊長類（健常例）への暴露実験をとおして確認した。我々の経頭蓋超音波脳血栓溶解装置がもつ最大出力条件においても、正常組織および脳梗塞組織、さらには再灌流状態において、なんらの有害事象を招かないものと考えられる。しかしながら、Duffert Schofer の臨床成績が示す高齢者における正常組織での出血問題については必ずしも十分こたえられる結果を我々は得ていない。ここで行った動物実験は、健常成獣による成績であり、糖尿病、高血圧、動脈硬化などによって脆弱化した血管に対しての安全性は検討されていないからである。今後脆弱化した血管に対する本超音波照射法の無害性を実証することが必要と考えている。このような動物実験をとおしてから臨床応用へ展開できるものと考えられる。

## E. 結論

### ① 経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発とその有効性評価

開発装置はその機能・性能において臨床適用可能な能力を有するものであることを確認した。

### ② 低周波超音波の音響学的安全性評価

低周波超音波による経頭蓋照射法の場合には、頭蓋内における多重反射お

よびそれによる定在波の発生、また、その定在波によるキャビテーションの発生、さらにはキャビテーションの補足効果などを考慮しなければならないことが明らかとなった。本開発で我々が用いている超音波条件では、キャビテーションのような組織破壊的状况が頭蓋内においても生じないことを明らかにした。

### ③ 脳梗塞状態に対する医学生物学的安全性評価

開発した経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の最大超音波照射条件が、医学生物学的に概ね無害であることを示した。

(今後の展望)

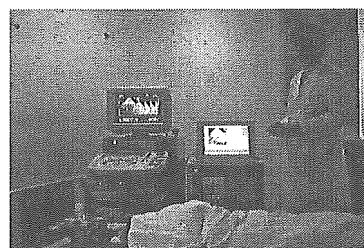
3年間にわたる本研究事業の結果、ヒトに適用できる経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発に成功した。図 28 に開発装置の全容を示す。当初の課題であった治療と診断を一体化した超音波システムの開発に成功し、特にその治療診断併用プローブの同一化は、臨床適用上きわめて有効であると考えられた。また、音響学および医学生物学的安全性を確認し、その臨床応用を待つばかりの状態に概ね至っていた。

しかしながら、これを臨床応用するには、血栓溶解剤 (tPA) の国内承認を得る必要がある。現在、その承認の得られることを待ち、倫理委員会に提出する資料を用意している。tPA の国内承認と承認後の審査成績を待つて本開発装置による臨床応用に進みたいと考えている。

本研究開発による探索的臨床研究へ

の展開はできなかったが、次のような派生効果があることを言及しておきたい。図 29 に示すように、本法は脳梗塞患者の超急性期治療に貢献し、同死亡者数や要介護老人数の軽減に結びつくものと期待される。さらに、他の虚血臓器への適用も可能であり、治療診断併用プローブの活用範囲はきわめて広いものと考えられる。また当然であるが、本法は一種の超音波による DDS であり、このような手法が薬物やマイクロバブル、ナノバブルとの併用によってさらに多くの DDS への道が開かれるものと期待されている。このような超音波の治療領域への活用は、新たな超音波医療産業の拡大にも寄与するものと考えている。

完成装置による治療過程



< 図 28 >

### 成果のまとめ II

- 派生効果
- (1) 脳梗塞患者数の(同死亡者数や要介護老人数)の軽減  
 家族・介護人の負担軽減  
 医療費(255円/年)からの軽減  
 3大死因の死亡率(人口10万人対)平成12年度 238.7  
 悪性新生物 117.7  
 心疾患 104.7  
 脳血管疾患 104.7  
 脳梗塞 65.2 (死亡数 62,136人) 虚血性心疾患 56.3
  - (2) 他の虚血臓器への適用(治療・診断一体化プローブと装置)  
 心筋梗塞、脳部静脈血栓など
  - (3) 新DDS技術への応用  
 血栓溶解剤 + US (構造的性と診断能力)  
 ↓  
 リガンドなどによる標的性薬剤 + US  
 マイクロバブル等の非標的薬剤

< 図 29 >