

II. 分担研究報告書

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）

分担研究報告書

超音波脳血栓溶解療法の探索的臨床試験の実施と評価

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：開発した経頭蓋超音波脳血栓溶解装置を用いた臨床試験を実施するには、開発装置自体の物理的安全性、その音響学的安全性及び脳虚血再灌流状態に対する安全性が担保されたうえで実施されるべきものである。また、本経頭蓋脳血栓溶解法は血栓溶解剤の効果を増強するものであるため、我国では未承認の血栓溶解剤プラスミノゲンアクチベータ（t-PA）との併用が必須である。本研究期間中に t-PA の承認は下りず、結果的に臨床研究には進みえなかった。しかし、外国と同様に t-PA の国内承認が得られ次第、直ちに倫理委員会の承認を経て、探索的に臨床試験を行えるよう、前臨床試験として霊長類を用いた安全性評価まで終了した。前臨床試験として、脳梗塞発症時に問題となる血液脳関門破綻に出血に関する低周波数超音波作用が無関与であることをラット脳梗塞モデルによって示した。霊長類を用いた試験では、正常例 14 例、経頭蓋超音波照射正常例 9 例、さらに血栓溶解剤 t-PA 投与下経頭蓋超音波照射例 2 例について神経病理学的評価を行い、適用最大超音波照射条件での安全性を確認した。高齢者に多い糖尿病や高血圧及び高脂血症に伴って、動脈硬化が進行した脆弱血管に対して超音波照射の安全性試験を今後要するものの、開発装置を用いた探索的臨床試験に際しての前臨床試験は、この霊長類を用いた研究によって完了したものと考えている。

分担研究者：

窪田 純(株)日立メディコ 技術研究所)

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)

水野聡子
(東京慈恵会医科大学 ME 研究室)

福田隆浩(東京慈恵会医科大学
神経病理学研究室)

佐々木一昭(株)日立製作所 中央研究所)

東 隆 (株)日立製作所 中央研究所)

荻原 誠(株)日立メディコ 技術研究所)

鏑木正志(株)日立メディコ 技術研究所)

清水慶子 (京都大学 霊長類研究所)

大石高生 (京都大学 霊長類研究所)

A. 研究目的

血栓溶解剤による血流再開通率を超音波照射が増高させ、加えて診断用に用いられる経頭蓋超音波ドプラ法(Transcranial Doppler Method:TCD)で、血栓溶解剤投与患者の中大脳動脈血流をモニターしていると、その再開通率が高まるとの臨床成績が報告された。特に2004年11月にはNew England J.にその国際的多施設による臨床成績が報告されるに及び、超急性期脳梗塞患者へのTCDの併用は普及を拡大する勢いである。し

かしながら、TCD の持つ 2MHz 帯のパルス超音波と同様のカラー Doppler 断層法では、頭蓋骨での減衰が少なくなく、経頭蓋的にはその裏付けがないとする in vitro 実験成績が報告されている。診断用超音波による血栓溶解効果の加速を全く否定するものではないが、十分な説明がなされない状況である。

一方、1MHz 以下の低周波超音波では in vitro 実験において数々の有効性を示すデータが発表され、in vitro 実験でも再開通率向上を示す成績が発表されている。低周波超音波は頭蓋骨による減衰も少ないので、頭蓋骨を介した超音波照射が側頭骨窓から可能であり、経頭蓋的脳血栓溶解療法を目指した研究が展開されている。経頭蓋的方法として、100kHz 以下では血栓重量減少率を in vitro 実験で示され、500kHz では再開通率を著しく向上される本研究グループの石橋の報告、さらにはラット脳梗塞モデルを用いた神経学的改善率の向上を同じく我々の佐口が示している。このような基礎研究に加え、ドイツ ハイデルベルグ大の Duffertshofer は 300kHz バースト波による臨床試験を展開したが、14 例中 4 例で梗塞領域外での出血を招来し、その内 1 例は死亡例となった。この臨床成績は、低周波超音波では診断用超音波より厳しい安全上の課題のあることを投げかけた。すなわち、低周波超音波による脳血管系への安全性検証を生物学的に行われねばならないことを意味し、前臨床試験として各種安全性評価を行うと共に、最終的には霊長類による評価が必要となることを物語るものとなった。

本研究では、脳血管系特異的な血液脳関門 (Blood Brain Barrier (BBB)) に対する治療用最大出力条件下での安全性評価を行った。また、開発装置「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置」を霊長類に適用し、その神経病理学的評価を 13 種類の染色法を用い安全性を検討した。すなわち、前臨床試験として行ない得る最高レベルの評価を施行した。この成果を以って探索的臨床研究を展開する予定であったが、使用する血栓溶解剤 Tissue-type plasminogen activator (t-PA) の脳梗塞への適用承認が 16 年度中には下りなかったため、前臨床段階終了を以ってやむなく本研究課題の中止を招来することとなった。

B. 研究方法

B-1 血液脳関門 (BBB) に対する安全性評価の方法

1) 対象

Wistar ラット (雄、体重 252~343g) 21 例

後述する比較群毎に表 1 の割付とした。

表 1. 比較群と各例数

| Group | 超音波照射 | 脳梗塞 |
|---------|-------|-----|
| 1 (n=2) | — | — |
| 2 (n=6) | + | — |
| 3 (n=7) | — | + |
| 4 (n=6) | + | + |

2) 方法

①モデル：ラット右中大脳動脈 (MCA) 虚血再灌流モデル

虚血時間 90 分・再灌流時間 24 時間

②モデル作成法：ラットの外頸動脈より内頸動脈を經由して、MCA にナイロン

糸の先端をシリコンコートした塞栓子を挿入（小泉モデル）

- ③ 超音波照射条件：Frequency 500kHz、Intensity $0.72\text{W}/\text{cm}^2$ 、Intermittent [(2分照射 30秒休止)×4, その後5分休止]×4計60分、虚血開始後30分より照射開始（虚血中照射）
- ④ 評価方法：エバンスブルー（EB）・Hematoxylin-Eosin (H.E.) 染色・免疫染色〔抗アルブミン抗体・抗 GLUT-1 (glucose transporter-1) 抗体〕

B-2 霊長類の脳に対する超音波の安全性評価実験法

1) 対象

- ① ミニブタ（オス：1頭）年齢：不詳 体重：20kg 出生地：日本
- ② ニュージーランド家ウサギ（オス：3羽）年齢：7月例 体重： $3266\pm 164\text{g}$ 出生地：日本カニクイザル成獣10頭（オス：2頭 メス：8頭）年齢：5.8±0.9歳 体重： $4985\pm 1399\text{g}$ 出生地：東南アジア
- ③ アカゲザル成獣2頭（メス：2頭）年齢：18歳 体重： $5300\pm 200\text{g}$ 出生地：日本

①及び②に関しては超音波の及ぼす脳組織への障害を比較するため、骨による減衰のない状況、すなわち、開頭下に超音波照射を行ない positive control とした（①high intensity focused US (HIFU) 3.2MHz , $2\text{kW}/\text{cm}^2$ ②低周波 400kHz 、 $0.70\text{W}/\text{cm}^2$ ）。

③及び④に関しては光顕的組織学的評価のための比較対照群3例を除く9例に対して超音波照射を行なった。

2) 方法

(1) 麻酔法

- ①ブタ：気管内挿管を行い、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を開頭を行い、同日 HIFU 照射を行なった。
- ②ウサギ：チオペンタール $10\text{mg}/\text{kg}$ 静脈内投与後、マスクによりイソフルレン 0.25～2%吸入維持下に、2.5cm 径の開頭を行い、閉創。7日以上飼育の後、同様の麻酔方法により超音波照射実験を行った。
- ③、④霊長類：ケタミン $10\text{mg}/\text{kg}$ 筋肉内注射後、気管内挿管を行いベクロニウム $0.04\text{mg}/\text{kg}/\text{hr}$ 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) 超音波照射方法

- ①ブタ：超音波の持つ thermal effect の影響を観察するための positive control として、ブタ開頭モデルにおける 3.2MHz 、 $2\text{kW}/\text{cm}^2$ での HIFU 照射（数秒）を6箇所行なった。
- ②ウサギ：低周波・低出力超音波による脳組織への障害（主に cavitation による biological effect）を観察するため、Vykhodtseva -Hynynen らのウサギ開頭モデルを作成し専用の超音波プローブを用いて 400kHz 、 $0.72\text{W}/\text{cm}^2$ の15分間連続照射例3羽、7日飼育例を用いた。
- ③、④霊長類：「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置」により新たに開発した積層型プ

ローブにより右側頭部から同側中大脳動脈領域に対して超音波照射を行なう。照射方法は、新たに開発した T-ビーム・D-ビーム共用の積層型プローブを用い、強度 $0.72\text{W}/\text{cm}^2$ の血栓溶解治療用 490kHz 超音波 (T-ビーム) を 2 分間照射した後、強度 $0.20\text{W}/\text{cm}^2$ の診断用 2MHz 超音波 (D-ビーム) により血流状態を Doppler ソノグラムで 30 秒間監視する。T-ビーム・D-ビームの間歇照射を交互に 4 回行なった後、5 分間 T-ビーム照射を休止し D-ビームで中大脳動脈血流を監視する。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意識状態、四肢麻痺の有無を確認した後、飼育管理を行なう。高齢アカゲザル 2 頭に関しては、alteplase $0.9\text{mg}/\text{kg}$ 静脈内投与下に超音波照射を行ない、翌日に MRI 撮影 (T1, T2 強調画像) を行い出血性合併症の有無を確認した。

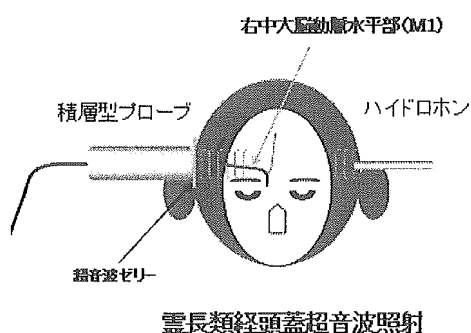


図 1. 霊長類経頭蓋超音波照射方法

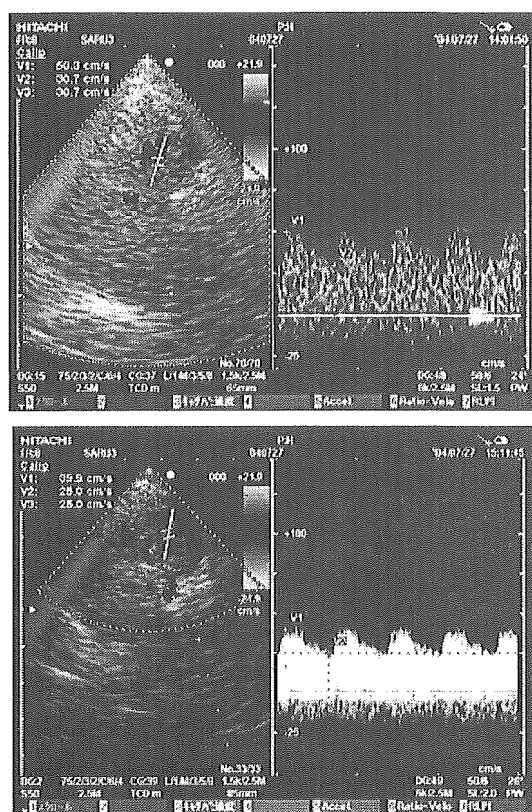


図 2. カニクイザル MCA TC-CF1

3) 検体摘出方法

- ①ブタ：4 時間後、塩化カリウム静脈内投与による安楽殺の後、脳組織を摘出した。
- ②ウサギ、③、④霊長類：1 日後もしくは 7 日後、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②③もしくは心尖部④より 10%ホルマリン灌流固定を行い、脳組織を摘出し神経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。

4) 神経病理組織学的評価方法

- 光顕：①H. E. 染色②Kluver-Barrera 染色
③Bodian 染色
免疫光顕：④抗 APP 抗体 (22C11, Chemicon)
⑤RCA-1 抗体⑥aB-crystallin⑦Hsp (heat shock protein) 32 (H0) ⑧Hsp40 ⑨Hsp60 ⑩Hsp70 ⑪Hsp90 ⑫

TUNEL (apoptosis) ⑬ COX2 照)
 (cyclooxygenase-2)

これら 13 種類すべての染色を、①②③④
 全検体に対して行い、比較した。

C. 結果

C-1 BBB に対する実験結果

[非梗塞群]

超音波照射 (US) + / 脳梗塞 (CI) - 群において、照射領域を含め血管外へのエバンスブルーの流出はみられなかった。H. E. 染色にて異常所見を認めず、アルブミン染色は陰性であった。GLUT-1 染色ではコントロール群と比較し有意な差を認めず、GLUT-1 極性の変化はみられなかった。正常組織において、超音波作用による BBB の障害はみられなかった。

[梗塞群]

US - / CI + 群、US + / CI + 群の両者において、梗塞領域へのエバンスブルーの流出がみられた。H. E. 染色では、エバンスブルーの流出がみられた領域において神経細胞は好酸性に萎縮し、周囲には浮腫性変化を認め、多核白血球が出現し、梗塞後 24 時間の所見に合致した。アルブミン染色では梗塞領域において抗アルブミン抗体陽性所見を呈し、これらの領域での BBB の破綻を示した。GLUT-1 染色では、非梗塞領域と比較し、梗塞領域において血管内皮細胞の血管側 (内側) 優位に染色増強を示し、GLUT-1 極性の内側への移動、即ち、BBB 損傷によるトランスポーター発現量の変化を示した。しかしながら、超音波照射の有無による明らかな差は認めず、梗塞巣においても超音波作用による BBB の障害はみられなかった。(図 3 参

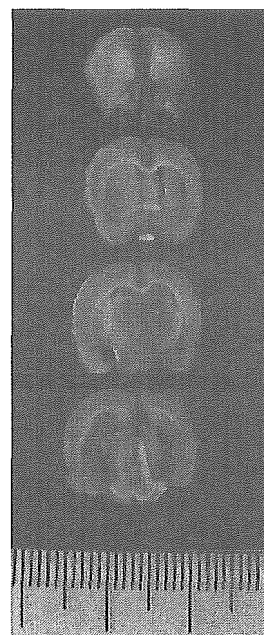


図 3a ラット脳梗塞モデルに対する超音波作用の BBB におけるエバンスブルー (EB) による評価

抗Albumin抗体

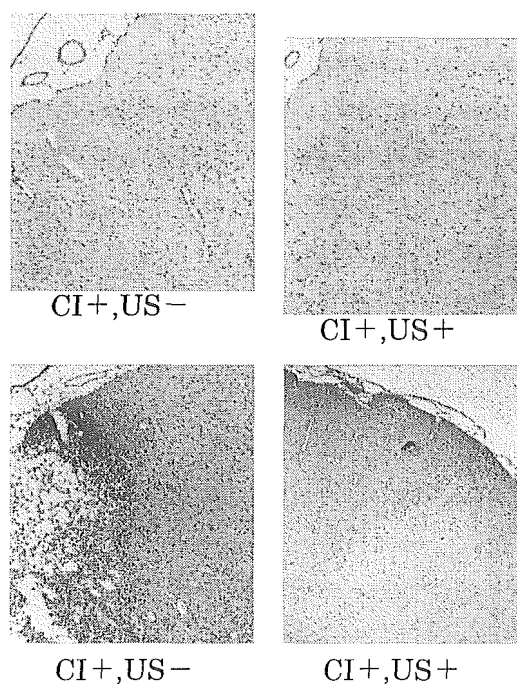


図 3b ラット脳梗塞モデルに対する超音波作用の BBB に関する免疫染色による評

価

C-2 霊長類の結果

① ブタ開頭下 HIFU 照射試験

大脳皮質に表面を底部とする楔状浮腫性変化・染色性低下・虚血性変化を認めた。最深部は皮質表面より 20mm(正中より 15mm 外側の矢状断剖面であった。クモ膜下および血管周囲には多核白血球を中心とした炎症細胞浸潤(Hsp32 陽性マクロファージも存在)を認めた。皮質神経細胞には虚血性変化を認め、皮質の中に APP 陽性軸索が存在。GFAP 陽性の clasmatodendrosis を病変部分子層に多数認めた。深部白質病変では、小出血が多発。APP 陽性の軸索腫張を認めた。RCA-1 陽性で Hsp32 陽性のミクログリアが軽度増生。反応性星状膠細胞の増生は未だ認められなかった。Active caspase 3 陽性の細胞は認められず、 α B-crystallin, Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 の overexpression は認められなかった。

② ウサギ開頭下低周波超音波照射試験

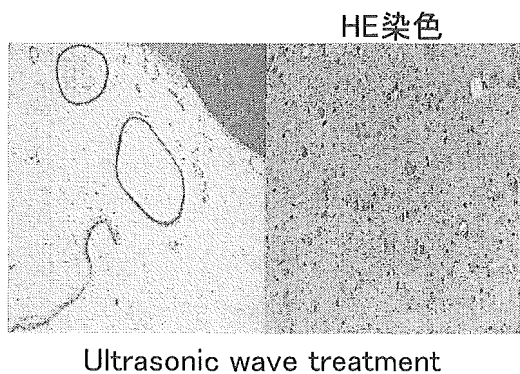
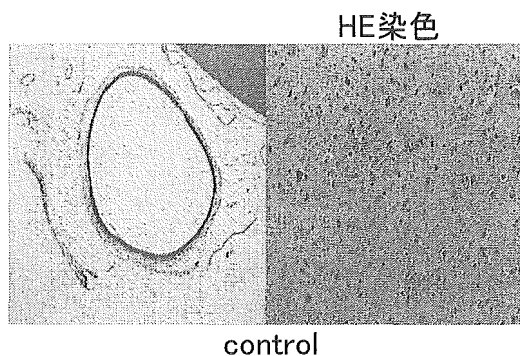
大脳皮質に表面を底部とする楔状浮腫性変化・染色性低下・虚血性変化を認めた。またクモ膜下および血管周囲には単核球を中心とした炎症細胞浸潤(Hsp32 陽性ミクログリア・マクロファージも存在)を認めた。皮質神経細胞には虚血性変化を認め、皮質の中に APP 陽性軸索が存在。GFAP 陽性反応性星状膠細胞増加を皮質および白質に認めた。皮質および白質病変では、ヘモジデリン沈着を認めた。APP 陽性の軸索腫張を認めた。RCA-1 陽性で Hsp32 陽性のミクログリアが軽度増生し

ていた。 α B-crystallin 陽性反応性星状膠細胞の増生を皮質および白質に認めた。Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 の overexpression は認められなかった。

③ 若年カニクイザル超音波照射試験

超音波を照射しない control case として、麻酔後 1 日飼育例(control 群) 3 例。超音波照射例は、1 日飼育例(D1 群) 4 例、7 日飼育例(D7 群) 3 例。計 10 例のカニクイザルで実験を行なった。

初期 1 例においてプローブの発熱による右照射側側頭部皮膚凝固壊死を認めたため、以後の実験では水冷回路などによりプローブの発熱を制御する改良を加えた。また US D7 群の 1 例の照射反対側上側頭回表面に陳旧性外傷病変を認めた。神経細胞変性像および脱落像、DNA 断片化細胞の存在、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(α B-crystallin, Hsp27, Hsp32, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90) 陽性細胞などに関して病理組織学的に検索したが、Control 群、D1 群、D7 群間に明らかな差を認めなかった。(図 4)



化、腫張、腫瘍を認めなかった。
組織学的には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。

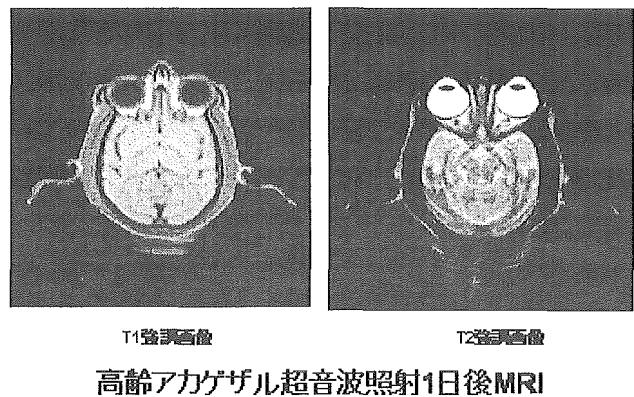


図4 霊長類の脳(カニクイザル若年)における超音波照射の無害性結果の例

図5. 高齢ザル t-PA 投与下 US 照射後 MRI

④高齢アカゲザル超音波照射試験
更に過酷試験として、カニクイザルより大脳の大きい高齢アカゲザル 2 頭に対して alteplase 0.9mg/kg 静脈内投与下に同様の条件で超音波照射を行ない 7 日間飼育した (t-PA D7 群)。
超音波照射後に神経学的脱落徴候を認めなかった。また翌日の MRI では (図5)、出血性病変を認めず、2 例共に大脳皮質は保たれ、白質髄鞘も保持され、標的となった中大脳動脈にも組織学的変化を認めなかった。

③④霊長類神経病理学的所見のまとめ
肉眼的に明かな出血、軟化、腫張、腫瘍を認めず、剖面所見でも明かな出血、軟

D. 考察

脳神経系に関する前臨床試験に重視される BBB への低周波超音波照射の影響を in vivo ラット脳梗塞モデルで評価した結果、脳梗塞に伴う BBB の破壊状況をその超音波が増加させないことを神経病理学的に明らかにした。また、前臨床動物実験の最終段階として極めて重要な霊長類を用いた評価においては開発装置自体による最大出力条件でも神経病理学的有害が否定された。ここでは BBB と霊長類個々に考察する。

D-1 BBB に関する考察

脳毛細血管内皮細胞は密着結合で連結しており、内皮細胞の間隙を介した透過はほとんどみられない。従って BBB の透

過とは内皮細胞を介した経細胞的輸送である。脳毛細血管内皮細胞膜には GLUT-1 (glucose transporter-1) が発現しており、BBB の血液側および脳側細胞膜の両側に発現し、血液中の D-グルコースを脳細胞間液中へ運ぶ。GLUT-1 と各種疾患との関係については、てんかん、アルツハイマー病患者の脳において GLUT-1 の発現が低下しているとの報告がある。脳へのグルコース供給路の障害によりてんかんや記憶システムの低下が惹起される可能性が示唆されている。

また、脳卒中モデル動物の SHRSP (stroke-prone spontaneously hypertensive rats) では、脳毛細血管内皮細胞の密着結合が緩くなっており、その際の GLUT-1 の発現量が血液側と脳側でほぼ等しくなっている。コントロールモデル動物における GLUT-1 の発現量が、脳側：血液側で 7:3 と脳側に多いことから、脳梗塞により GLUT-1 の極性が血液側に偏位してみられることが示唆される。

BBB 透過の指標としては、すでにエバンズブルー、アルブミンを始め、種々の物質が報告されている。GLUT-1 は BBB の本態である脳毛細血管内皮細胞に存在することから、BBB のマーカーと考えられ、さらに脳梗塞などにより BBB が破綻した結果 GLUT-1 の極性が変化することから、病理組織学的な BBB の検討が可能であると考えられる。

超音波照射による BBB 開放の閾値に関しては、山口らのラット in vivo でのエバンズブルーによる評価にて、1MHz 周波数で 40-50W/cm² の間に BBB 開放 (損傷) の閾値があると報告している。超音波に

よる組織損傷としては高強度超音波照射による神経細胞変性、組織浮腫、空胞形成、出血などが報告され、BBB に関しても色素を用いた評価法や、電顕写真にてその損傷が示されている。今回ラット脳への 500kHz、0.72 W/cm² 超音波照射にて BBB 損傷を病理組織学的に検討したが、梗塞群、非梗塞群の両者において、超音波照射の有無による明らかな差を認めず、その安全性が示唆された。

D-2 霊長類実験の考察

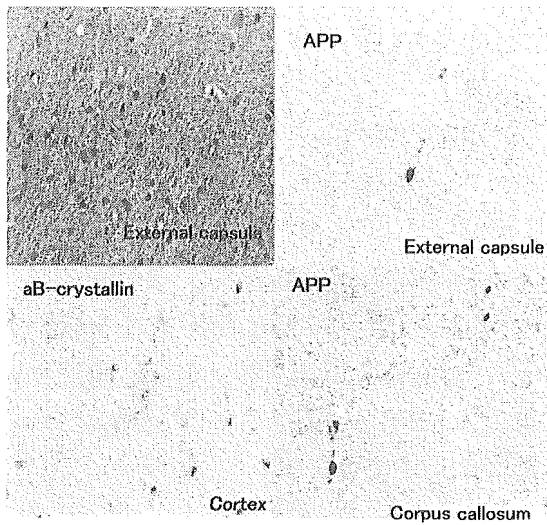
Vykhodtseva らは、主に cavitation 作用が脳組織へ及ぼす生体作用として、局所出血、組織破壊、致命的巨大出血および血液脳関門の破綻を挙げている。

我々の行なったブタ HIFU 照射脳、ウサギ低周波 US 照射脳の観察により、kHz 帯の超音波照射により起こりうると予測された脳組織への障害は、以下の 3 段階に分けられる。

軽度：白質に軸索断裂を認め APP 陽性軸索とその反応として aB-crystallin 陽性星状膠細胞が出現。

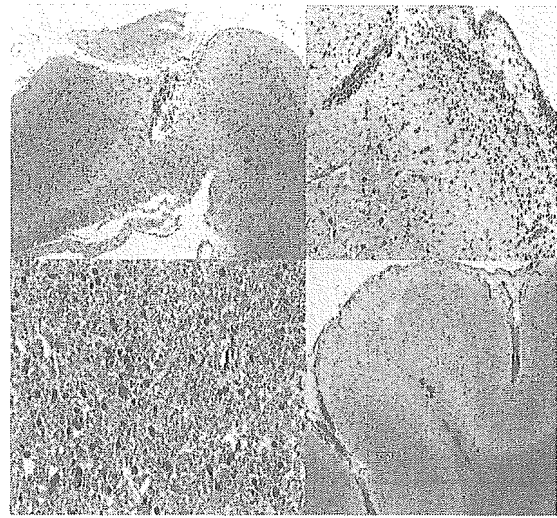
中等度：軸索断裂に加え血管の断裂 (出血) が出現。Hsp32 陽性の microglia/macrophages の浸潤と aB-crystallin 陽性反応性星状膠細胞増生。急性期には星状膠細胞の clasmatodendrosis。

重度：大脳皮質表層に最も強い外傷性病変 (二次性血管障害) の出現と軸索断裂・出血。Hsp32 陽性の microglia / macrophages の浸潤と aB-crystallin 陽性反応性星状膠細胞増生。急性期には星状膠細胞の clasmatodendrosis。



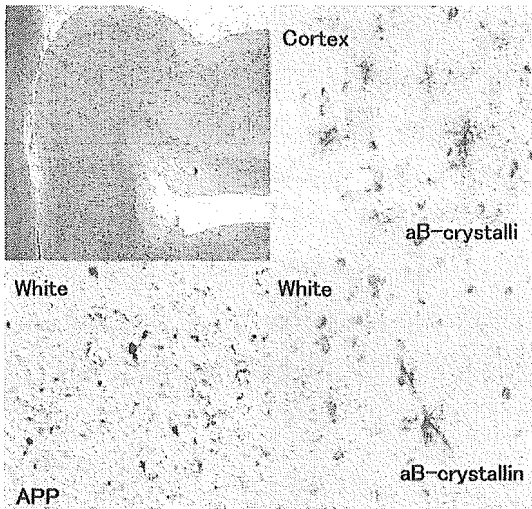
軽度

白質に軸索断裂出現APP陽性軸索 α
B-crystallin陽性星状膠細胞



重度

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 α B-crystallin陽性反応性星状膠細胞増生。急性期には星状膠細胞のclasmatodendrosis



中等度

軸索断裂、血管の断裂(出血)。Hsp32陽性の microglia/macrophages の浸潤 α B-crystallin陽性反応性星状膠細胞増生。急性期に星状膠細胞のclasmatodendrosis

図6 強力超音波照射による脳障害(ブタ、ウサギ)の程度分類

これらは、瀰漫性軸索損傷のような外傷性の病理組織変化に類似しており、炎症細胞の出現など thermal effect の強い HIFU 照射ブタ脳組織との比較で、低周波超音波の持つ cavitation 作用による変化が主体と考えられた。

Daffertshofer らの THROMBI study の出血例では、皮質枝、穿通枝の破綻によると思われる脳内出血の他に、虚血野以外の健常脳表部にくも膜下出血を認めた。ウサギ開頭モデルにおける病理組織学的変化と併せると、これらは低周波超音波

の cavitation 作用が及ぼす外傷性変化に
拠るものと考えられる。

我々の行なった霊長類における超音波照
射実験では、初期 1 例で、低周波超音波
を発する際のプローブの発熱による、接
触部皮膚の 2 度熱傷を認めたが、水冷装
置の装着など、プローブの冷却法の工学
的改良を加えた結果、以後の症例では熱
傷を認めなかった。この熱傷例も含めい
ずれの症例においても健常な脳組織に組
織学的障害を認めず、高齢ザルにおいて
t-PA を使用した際にも、出血性変化を認
めなかった。この事は、本装置の臨床使
用において安全性を示す重要なデータで
ある。

以上により、探索的臨床研究を開発す
るための前臨床試験は整った。しかし、
超急性期脳血栓溶解法として用いられる
ウロキナーゼ (UK) だけであり、その脳
梗塞への適用に際しては静注法では用量
依存的副作用に対する疑問がある。その
ため静注薬として諸外国で承認されてい
る t-PA (alteplase) の国内承認を前提と
して本探索的臨床研究は計画されて来た。
しかしながら、16 年度内に国内承認は得
られなかった。このため本開発装置を臨
床適用することは倫理委員会の承認も得
がたいものと考え、実施し得なかった。
開発装置自体の安全性は実証されたので、
例えば、UK の動注法へ適用することも充
分考えられる。しかし動注法は現在厚労
科研による他施設臨床試験 (Melt Japan)
として展開中のため、本開発装置との併
用は困難である。

なお、探索的臨床研究としては、MCA
血栓塞栓症を主たる対象とすることと考

えていた。しかし、出来れば病型別に本
超音波併用法の有効性を評価し、心原性
脳卒中ばかりでなく、アテローム性脳卒
中への有効性などに対する有効性をも検
討評価すべきであろうと考えた。近い将
来探索的臨床研究を展開する場合には、
四病型全てに対する適用可能性を検討す
るようなプロトコルを立案し、本法の適
用限界を明らかとするような臨床試験を
企画すべきと考える。

なおまた、低周波超音波を用いた超急
性期脳血栓溶解法を臨床的に試みて、14
例中 4 例の梗塞領域外での出血を引き起
こし、4 例中 1 例は死亡例となった臨床成
績を踏まえ、その原因解明を行った残り
に臨床試験を展開すべきである。その際、
本開発装置の超音波条件と周波数の上で
は近い条件であるにもかかわらず、本研
究においては霊長類においてその正常脳
組織で有害事象が神経病理学的に生じて
いなかったのに対し、Duffertshofer らは
正常組織内での出血が生じたのか、この
点を解明することは必須の課題になるも
のと考える。

E. 結論

「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置」の開発
を以って、臨床適用するに際し、最も必
要とされるヒト脳梗塞状態における血液
脳関門 (BBB) への超音波作用の影響をラ
ット脳梗塞モデルで評価し、また、正常
脳組織への超音波作用をヒトに最も近い
霊長類健常個体の脳へ開発装置自体を用
いて *in vivo* 実験的に評価した。実験結
果とその考察から、脳梗塞状態下で生じ
る BBB の障害を開発装置に用いた低周波

数超音波の経頭蓋照射条件は神経病理的には増高させないことを確認した。またヒトに適用する形の開発プローブ及び装置自体が健常霊長類の脳組織に神経病理学的には無害であることを確認した。前臨床試験の最終評価法において開発した「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置」は、臨床適用可能な状態となった。

しかし、本開発装置は血栓溶解剤との併用を大前提とするものである。今日まで、血栓溶解剤として想定した t-PA が国内承認を得られなかった為、探索的臨床研究を推進するための倫理委員会承認申請には至らなかった。その承認が得られた時点で、倫理委員会への申請する条件は十分に整えられた。

References

1. Daffertshofer et al. 4th ISTU, Kyoto, September 18-20, 2004, abstract
2. Hynynen K et al. *Ultrasound Med. Biol.* 24(2);275-283, 1998.
3. Ishibashi T et al. *Stroke* 33:1399-1404; 2002
4. Kito G et al. *J Neurosci Methods* 105;45-53, 2001
5. Vykhodtseva NI et al. *J. Neuropath. Psychiatr. USSR* 26;1810-1815;1976.

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

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）
分担研究報告書

経頭蓋超音波血栓溶解療法の臨床的安全性に関する調査研究

分担研究者 井上聖啓 東京慈恵会医科大学神経内科教授

研究要旨：急性虚血性脳卒中患者における超急性期治療法である脳血栓溶解療法の効果増強手段として、経頭蓋超音波照射法が提唱されている。経頭蓋超音波照射法には、診断用の超音波法、すなわち経頭蓋ドプラ法（TCD）や経頭蓋カラー・ドプラ診断法（TC-CFI）を用いる方法と、低周波数超音波（1MHz以下）を用いる方法がある。前者は元来診断装置であるので臨床的安全性は問題なく、欧米では血栓溶解剤 t-PA との併用で有効性を示す臨床成績が示されている。一方、低周波超音波を用いた場合については、動物実験において有効性、安全性が示されてきたが、300kHz、バースト波を用いたドイツでの先駆的臨床試験では14例中13例に出血例を認めその内4例は梗塞領域外での出血であり内1例は死亡する結果であった。この成績は低周波超音波が血栓溶解効果にいかにも優れていても、臨床適用には問題を呈するものであった。具体的調査の結果、同バースト波はパルス持続時間が2ms以上で、そのパルスは14W/cm²であった。そのため、音響学的キャビテーションが頭蓋内に発生してしまったと考えられた。また、低周波超音波は頭蓋骨における減衰が少ないため、頭蓋骨内面で反射を繰り返す、反射面近傍では定在波の発生も予測された。この二つの音響学的作用が不要な出血を招来したものと考えられた。また、脳梗塞患者は中高齢者であると共に糖尿病などの合併症、更には動脈硬化が進行し、血管自体が脆弱であったことも否定出来なかった。この点については今後実験的検証を要するものと考えられる。臨床的安全性を追求した結果、新たな音響学的問題点を経頭蓋超音波脳血栓溶解療法に見出したが、これを解決出来れば、臨床適用に際しての安全上の問題は解決し得ると考えられる。

A. 研究目的

血栓溶解剤 recombinant tissue Plasminogen Activator (t-PA) を投与された急性脳梗塞患者の中脳動脈血流を経頭蓋超音波ドプラ法（Transcranial Doppler Method: TCD）で、監視していれば、血流再開通率が增高すると臨床成績が2002年、テキサス大、Alexandrov によって発表された。さらに2004年には彼等による‘International Clot Buster Study’の

臨床成績が再開通率を50%程度に向上させる成績を New England Journal に発表した。また TCD 以外にも経頭蓋カラー・ドプラ診断装置を用い、マイクロバブルとの併用成績もトゥールーズ大学病院グループから発表された(2004年)。これらはいずれも診断用超音波装置の超音波が血栓溶解剤の効果を増強することに起因すると考えられている。これらの場合の安全性はその超音波が診断用であり、最大平均音響強度 0.72W/cm²

以下で、周波数 2MHz 以上であれば安全であると FDA が承認している。

しかしながらその一方、従来からの in vitro 実験や in vivo 動物実験では溶解効果が診断用超音波より高いとされている低周波数 (1MHz 以下) の超音波では臨床適用された例がなかった。唯一ドイツ Duffertshofer らによる臨床試験はあったが、その結果は 14 例中 13 例に出血例を認めその内 4 例は梗塞領域外での出血であり内 1 例は死亡する結果であった。そのため、Duffertshofer らはその臨床試験を中止した。この様な低周波数超音波の臨床成績では我々が開発して来た経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の臨床適用にも問題がある可能性が高いと考えさせられる。それ故次の点を具体的に調査することとし、臨床適用に際しての安全上の問題を明らかにした。

- (1) Duffertshofer らの経頭蓋超音波照射条件は何か。
- (2) その条件は頭蓋内正常組織に損傷を起すか。
- (3) またその条件は高齢・脆弱血管によって異なる作用となるか。

これらについて文献的及び研究者訪問、さらには Duffertshofer を招聘してその討議を通して、条件を詳かにすることとした。

B. 方法

臨床的な意味で経頭蓋超音波脳血栓溶解療法は既に実施されていたので、その中から 1MHzms 以下の低周波数超音波を用いた経頭蓋照射法の文献に絞った検討を行った。

B-1 臨床成績に基づく分析

急性虚血性脳卒中への適用例は、ドイツのハイデルベルグ大学の Manheim 病院の Prof.

Hennerici を中心に行われていた。それ故、その中心的役割を果たした Dr. Daffertshofer を日本に招聘し (推薦事業による)、その成果を詳細に分析検討することとした。

B-2 音響学的な安全性の検討

臨床成績は Walnut 社製の超音波システムを用いていた。その超音波条件を詳細に検討し、実際にその超音波プローブを取り寄せ音場特性をシュリーレン法で測定した。その際、ヒト頭蓋骨を用いて頭蓋内の音場特性を測定することとした。なお、頭蓋骨は水中に沈め、水中での特性を調べその結果に基づいて生体内を予測することとした。

C. 結果

C-1 文献的検証及び研究者訪問による確認

文献的に明らかな経頭蓋超音波脳血栓溶解法の臨床成績は表 1 の通りである。

表 1 経頭蓋超音波脳血栓溶解法の臨床報告例

| | | |
|----------|-------------|------------------|
| | TCD | : Alexandrov |
| 診断装置 | (一次元) | (1999, 2004) |
| (2MHz) | TC-CFI(二次元) | : Cintas, Seidel |
| | カラードブラ断層 | (2002, 2005) |
| 治療装置 | 一次元 | : Daffertschofer |
| (< 1MHz) | | (2004) |
| | 二次元 | |

1) 診断装置による安全性

上段の診断装置 TCD や TC-CFI はその装置自体の安全性は FDA や厚労省によって診断用

超音波装置として承認済のものであるので安全上の問題はないと考えられる。Alexandrov らの成績は t-PA 単独での再開通率は 30%であったが、TCD で塞栓部血流状態を監視していると 49%に向上したというものであった。著しい改善データであるが、数ヵ月後神経学的臨床評価では t-PA 単独と (t-PA+TCD) 群間に必ずしも有意差を認めていなかった。

一方低周波超音波 300KHz を用いた脳血栓溶解法を適用した臨床成績は Daffertshofer によるもののみであった。

2) 臨床不具合報告

Daffertshofer らその超音波条件は図-1 の通りであり、現在開発中の我々の条件 500KHz、インターミット照射とは次の 1 点を別とすれば殆ど同じ条件であった。違いは、彼らはバースト波を用い、その duty cycle 5%のため pulse duration 0.5ms で、その高周波パルスの強度 spacial peak pulse average (SPPa) が $14\text{W}/\text{cm}^2$ に及んでいたということである。ただし、頭部に適用する振動子は図-2 に示すように、直径 30mm の円形振動子 4 本をダイヤモンド型に配列し、その表面温度上昇を抑えるため水流式の冷却システムを用いていた。そのため、4 本の振動子を順次照射し、頭部へのパルス持続時間が 0.5ms の 4 倍、即ち 2ms となることを考慮し、duty cycle 20%と考えられる。またその SPPa は最大 $14\text{W}/\text{cm}^2$ であった。臨床試験は既に中止され、プローブを含む超音波条件は正確に分からなかったため、 $0.5\text{ms}14\text{W}/\text{cm}^2$ と $2\text{ms}14\text{W}/\text{cm}^2$ の 2 条件を常に踏まえることとした。臨床成績の結果を図-3 に示した。t-PA 単独投与群と超音波照射併用群にそれぞれ出血例を生じ、その

割合は t-PA 単独群では 12 例中 5 例、US 照射群では 14 例中 13 例であった。極めて高率の頭蓋内出血を招いたばかりでなく、超音波併用例は塞栓領域外で、くも膜下出血 (SAH) を生じたりする大出血例 5 例中 1 例は死亡した。しかも血流再開通率は両群に大差なく、臨床試験は中止となった。改めて低周波バースト波超音波照射の危険が明らかとなった。本研究開発では、このような出血例の原因解明と実証成績を持たない状態で、臨床へ進むことは出来ないものと考えられた。

図1 超音波条件の比較

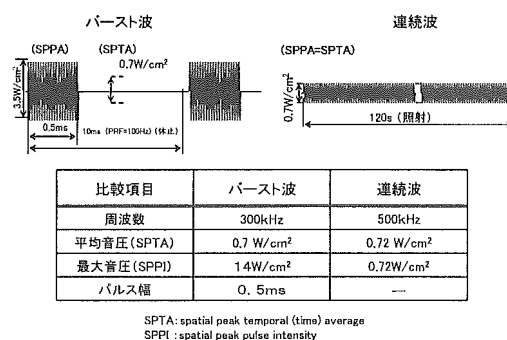
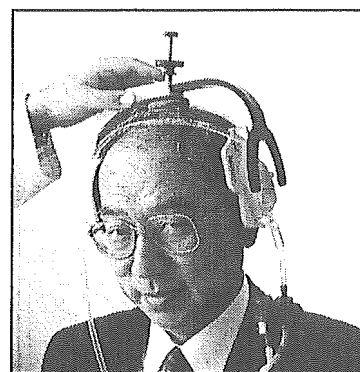
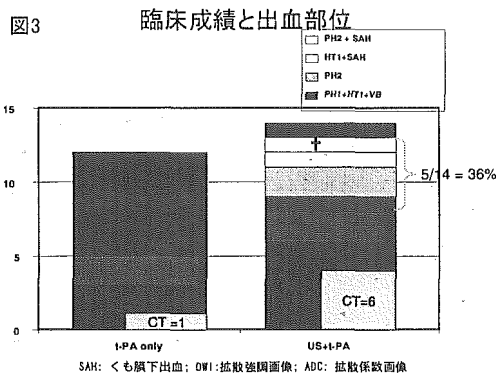


図2





C-2 音響学的な安全性検討結果

1) 音響学的不具合発生の解析結果

超急性期超音波脳血栓溶解治療を施した場合の、急性虚血性脳卒中 (AIS) の出血事例が 90% を超えた理由のうち、音響学的条件によるものは次の 6 項目に及ぶと考えられた。

(1) 低周波数超音波による細胞引き裂き張力の増大

診断装置と同様に Mechanical Index (MI) を活用すれば、 $MI=1.0$ は水中でキャビテーションの発生する条件である。生体組織内ではその数倍と考えられるが、MI には次の関係式が存在する。

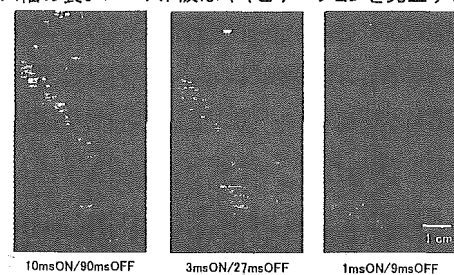
$$MI = (\text{引き裂き張力}) / \sqrt{\text{周波数}}$$

すなわち、細胞膜自体の破壊張力が周波数に依存しない一定値とすれば周波数が低いほど、MI 値は高くなる (ただし、周波数は MHz 単位で計算する)。従って、Daffertshofer の使用した条件 $MI = (\text{引き裂き張力}) / \sqrt{\text{周波数}}$ は虚血下で弱った細胞膜を更に損傷させる可能性を含んでいた。なお、MI は診断用パルス超音波で、しかも MHz 以上を前提としたものであるので厳密な意味ではバースト波に適用可能か分からない。

(2) バースト波のパルス幅が長いこと 0.5ms のパルス幅を 4 個の振動子から順次

発射して、各ビームが重なっていれば、生体内でのパルス幅は 2ms に達する。1ms 以上では水中でキャビテーションの発生することが知られているので、彼らの 4 個の振動子を用いた方式はキャビテーションを発生する危険を含んでいた。図 4 にはパルス幅を次第に短くするとキャビテーションの発生しないことを示した。図 4 に東らによる実験成績を示したが、それによればパルス幅を 1ms 以下にすればキャビテーションの発生しないことを示している。図 3 では 1 例死亡を示したに過ぎないが、彼等のパルス幅の長さが局所空間的に (ビームの重なったところなどで) 重畳していると見なせるような状況が生じていたなら、キャビテーションによる細胞膜損傷を招来しかねなかったと考えられる。キャビテーションが発生すれば、虚血下の血管内皮や健常領域でも内皮の脆弱となっていた部分では出血の原因になったと考えられる。

図4
パルス幅の長いバースト波はキャビテーションを発生する



pulse duration の短縮に伴い気泡の生成が確認できなくなる

(3) 頭蓋内での定在波の存在によるキャビテーションの発生や発したキャビテーションの持続化の影響

低周波超音波 300KHz を頭蓋外から発射させた場合、頭蓋骨を透過する際減衰するが、300KHz ではその減衰率が小さいため、脳内

にはある程度強い超音波のまま伝搬する。2MHzTCD等 비해 300KHz 超音波では約 8 倍強い超音波があると考えられる。(頭蓋骨での減衰率を 45dB/MHz/cmとし、骨厚 2mm として計算した場合)。その結果、頭蓋内では投与された超音波が反対側の頭蓋骨内面で反射し、それが戻ってきて頭蓋骨内面で再反射することを繰り返し約 2-3m もの距離に及んでしまうと推定される。この反射が、定在波を生じさせることになる。実際に Daffertshofer らのプローブの 1 本を用いて頭蓋内音場分布を測定した例を図 5 に示す。図に示す様に反射点近傍では定在波の発生(帯状に輝度の高い部分)が観察された。すなわちキャビテーションが発生しやすい状況が生じていた。この定在波の発生は単にキャビテーションの発生を促すばかりでなく、発生したキャビテーションを空間的にトラップする現象をも招来する。脳内ではキャビテーションが発生した時、その空泡に向かって細胞内液や周囲細胞からの細胞液の浸潤などの現象が生ずるものと想像される。

図5-1

Conditions
 1) input electric voltage for driving probe: 10 Vpp
 2) Angle between beam direction and temporal bone surface: 90°

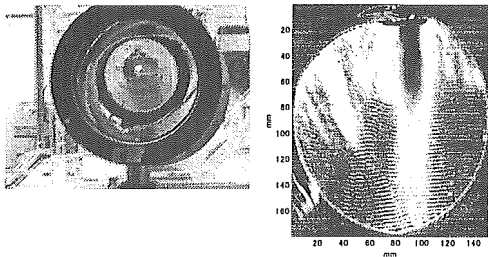


図5-2

Conditions
 1) input electric voltage for driving probe: 10 Vpp
 2) Angle between beam direction and temporal bone surface: 80°

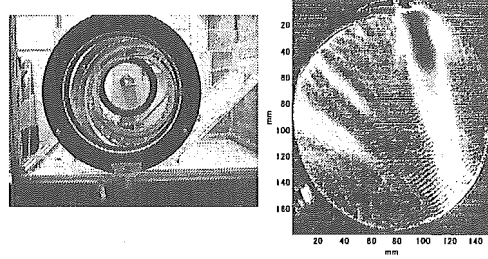


図5-3

Conditions
 1) input electric voltage for driving probe: 10 Vpp
 2) Angle between beam direction and temporal bone surface: 100°

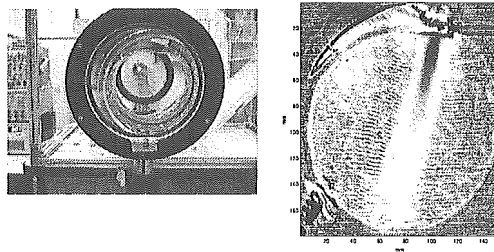


図5-4

Conditions
 1) input electric voltage for driving probe: 10 Vpp
 2) Angle between beam direction and temporal bone surface: 120°

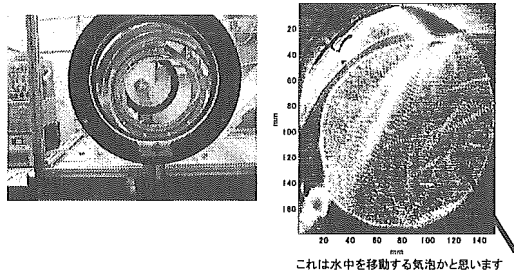


図5-5

Conditions
 1) input electric voltage for driving probe: 20 Vpp
 2) Angle between beam direction and temporal bone surface: 60°

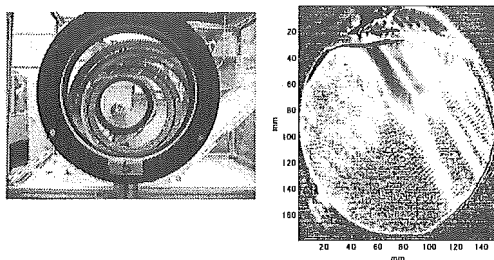
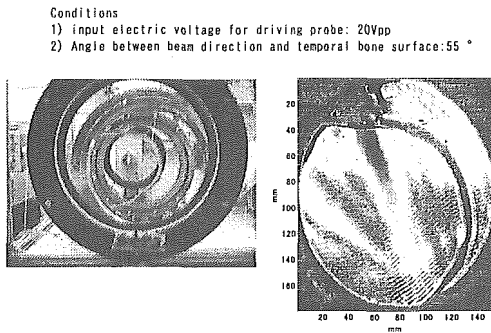


図5-6



(4) パースト波のパルス音圧が高すぎる
 5%の duty cycle では $14\text{W}/\text{cm}^2$ 、また 20%
 の duty cycle では $3.5\text{W}/\text{cm}^2$ にそのパルス
 音圧強度が達したものと考えられる。この
 値は必ずしも強いものではない。Special
 peak pulse average (SPPa) は診断装置の
 場合、許容値は $190\text{W}/\text{cm}^2$ で、その SPPa で損
 傷ないとされている。パルスの幅が非常に
 短く、およそ $0.5\mu\text{s}$ 以下と想像されること
 によるものと考えられる。しかし、パース
 ト波では SPPa に関する安全指標は示され
 ていない。SPPa 値で MI を計算すれば、 0.5ms 、
 $14\text{W}/\text{cm}^2$ の時、 $\text{MI} = (\text{引き裂き張力}) / \sqrt{\text{周波数}}$
 であり、 2ms $3.5\text{W}/\text{cm}^2$ の時 MI 値 = (引
 き裂き張力) / $\sqrt{\text{周波数}}$ になる。いずれも水
 中ではキャビテーションになる可能性のあ
 る値と考えられる。

(5) 照射ビーム方向の不明確な状況は塞
 栓部照射確率を下げている

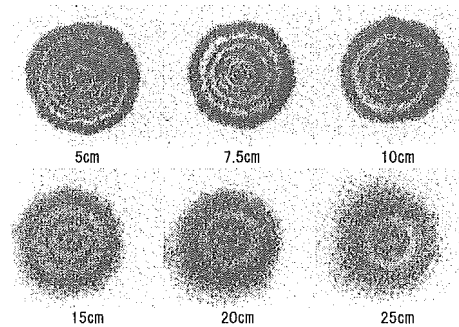
実際に 4 個のプローブを頭部に固定する
 に際し、XCT や MRI 像で塞栓部を診断した
 後、同標的部に向けては頭部外形から予想
 してビームを固定したことになっていた。
 彼らのそのような方法は標的部に 4 ビーム
 が全て重なることも可能であるが、ずれた
 方向にビームが走っていることも考えられ

る。ビーム方向の標的性を担保する手技を
 持ち合わせていなかったことは、不必要な
 部分にビームが照射され、また頭蓋内に定
 在波を不用意に発生し続ける結果を招いた
 と考えられる。

(6) 円形ピストン音源による超音波音場
 のホットスポットの存在の影響

Daffertshofer らの用いた直径 30mm 円形振
 動子はその形成される音場も複雑な近距離
 音場分布を脳内に投入することになる。図
 6 のようなリング状の極大極小の音圧を形
 成し振動子から 180mm までそのリングの
 数を減らしながら持続する。(D^2/λ
 $= 900/5.0 = 180\text{mm}$ 、 D : 直径、 λ : 波長) すな
 わち、超音波強度分布は側頭部から反対側
 までの間、全てが近距離音場であったと考
 えられた。極大値はビーム断面内の平均値
 の 4 倍に及ぶといわれ、平均 $0.7\text{W}/\text{cm}^2$ でも
 $2.8\text{W}/\text{cm}^2$ に、 $3.5\text{W}/\text{cm}^2$ (パースト波パルス)
 では $14\text{W}/\text{cm}^2$ に、また $14\text{W}/\text{cm}^2$ (パルス幅
 0.5ms の場合) では $56\text{W}/\text{cm}^2$ に及ぶものと算
 定された。パルス持続時間にもよるが、キ
 ャビテーション発生条件は十分に満たされ
 ていると判定された。しかもこの様な近距
 離音場が 4 本頭蓋内に投入され混合音場が
 形成されていたのであるから、一層局的
 な高音圧領域 (ホットスポット) が形成さ
 れ、出血に結びついたものと考えられた。

図6 近距離音場分布
 (周波数7MHz、直径33mm円形ピストン音源の場合)(超音波医学から)

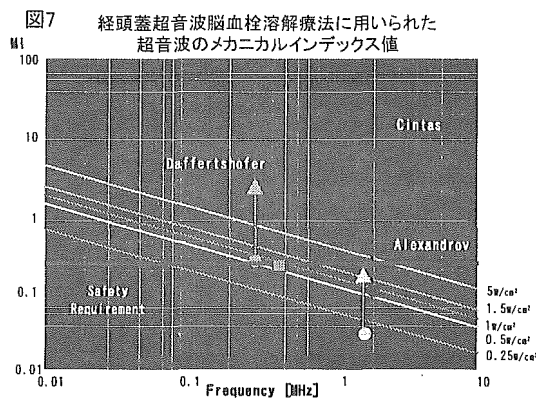


C-3. 医学・生物学的安全性分析結果

Daffertshofer らの臨床成績における出血原因としては、次の点が指摘されるものと考えられた。

(1) 脆弱血管壁に対する超音波照射の影響

急性虚血性脳卒中発生患者の主要原因には高血圧、喫煙、糖尿病などが関与しているとされる。すなわち血液学的な問題と動脈硬化の亢進という問題が関与している。従来、超音波照射が問題とされることは無かった。頸動脈をはじめ全身の血管系の診断に超音波は幅広く活用されてきた。しかし 1MHz 以下の低周波超音波を診断を目的として活用されたことはなく、特に動脈硬化が進み脆弱化した血管へ、MI 値の高い超音波を加えた時の影響を検討した報告はない。このため、AIS 発症患者に対する Daffertshofer らの出血原因の 1つと考えねばならない可能性を含んでいる。



(2) 虚血状態による BBB 破綻状態に対する低周波超音波の影響

AIS 発症後短時間で BBB は破壊される。超急性期においても当然 BBB は破壊された状況、すなわちその tight junction はゆるんでおり、transcellular transportation

だけでなく、内皮細胞間を抜けた物質輸送が生じているとも考えられる。そのような状況に対し、低周波超音波照射は BBB 破壊のカスケードを促進する可能性がある。特に MI 値の高い超音波は BBB 破壊の状態を増悪させることが考えられた。

(3) 超音波による生化学作用の促進

血栓溶解加速を目的とした低周波超音波照射が、血栓溶解高率を高めると共に、筋組織などの生化学的変化をもたらすとする動物実験成績がある。実際に末梢血管拡張を超音波が誘発しているとの報告もある。このことから本低周波バースト波超音波法は 1 時間も持続照射するものであるから、血管拡張を誘発し、破壊しかかっていた BBB を更に破局的な状況へと導いたとする考え方も否定できない。未だ超音波による血管拡張のメカニズムには不明な点も少なくないが、虚血下の脳血管系に対する血管拡張作用が適切な作用とは考え難い。むしろ出血率の亢進に関与した可能性を否定できない。

以上が不具合事象を多数含んだ臨床成績に対する原因究明と分析の結果である。

D. 考察

t-PA などの血栓溶解剤と併用する経頭蓋超音波照射による脳血栓溶解加速法で用いる超音波には Pulse Wave (PW)、Burst Wave (BW)、そして Continuous Wave (CW) の三種類がある。その波形上の相違については図 1 に示した。さらに実際には超音波の基本周波数 (キャリア周波数 f_c)、パルス或いは高周波パルス (バースト波) の繰り返し周波数 f_{rp} 、また BW においてはパルス幅或いは duty cycle (パルス幅/繰り返し

周期)、そしてその音圧などによって様々な条件が存在し、超音波血栓溶解療法といっても一概に論ずることは出来ない。その意味で脳出血を高率(90%以上)に惹起した Daffertschofer らの BW 法も、多様な超音波条件中の一条件に関する結果と放することができる。すなわち、その結果を以て、経頭蓋超音波脳血栓溶解療法が一般的に危険だとか、Alexandrov らの行った TCD (fc=2MHz の BW) は安全でも、1MHz 以下の低周波超音波法は全て危険であると断ずることは出来ない。Daffertschofer らの失敗条件を除外し、安全域を探すことに意義がある。すなわち、東ら(本プロジェクトの分担研究者)が基礎実験で示したように BW におけるパルス幅がキャビテーションを発生する問題の本質的な点で、1ms より短ければキャビテーションが発生しないという条件を見出すことが重要である。この条件を注意深く活用すれば低周波超音波法が in vitro/in vivo 実験で従来多くの研究者によって示されてきたより溶解効果を増強させるという成果を臨床に反映させることに對する意義があると言することができる。強いて言えば、Daffertschofer らはパルス幅 0.5ms と報告しているので、東らの成績からすればキャビテーションを発生しない設計となっていたと考えられる。しかし、彼らの単純な円形ピストン型トランスジューサ(30Φ)から発射される実際の音波パルス幅がその様に短いことを測定したデータは発表されていない。我々は近い将来実際のパルス幅を推定し得る様な基礎検討を行う必要があると考えている。

安全性に係わる基本的超音波条件の一つに音響強度(intensity:W/cm²)がある。超

音波診断装置の場合は、その診断対象部位によって異なるが、装置自体の安全限界として米国 FDA は次の様に定めている。

最大時間空間平均強度(Spatial peak temporal averaged intensity; ispta) =0.72W/cm²

最大空間ピークパルス強度(Spatial peak pulse intensity; sppi) =190W/cm²

これは、510k track3 に示されているものである。ただし、重要なことは、検査者は適応対象臓器の安全限界以下に強度を抑制するか、装置が示すメカニカルインデックス mechanical index (MI) 値及びサーマルインデックス thermal index (TI) 値に注目し、対象臓器内にキャビテーションや体内温度上昇を抑制することに注意しなければならないとしていることである。なおまたこの MI や TI は PW 法を前提としており、BW 法や CW 法にそのまま限界値が適用されないという計算の限界がある。とはいえ、ispta については BW や CW にも適用可能と考えられている。

さて、この MI 値や TI 値が Daffertschofer らの超音波条件で推定してみると図 7 の様になる。まず TI 値(その値 1.0 がそのまま温度上昇分 1.0 になる)は問題にならないことが図から充分予測される。その MI 値も 0.3 程度で、本プロジェクトの安全限界と設定した MI=0.25 を極端に超えるものではない。(我々が 0.25 と設定した理由は、水中では MI=1.0 でキャビテーションを発生するという事実に基づき、その 4 倍の安全領域を設けた。生体組織内では 2~3 倍程度と考えられており、その意味では MI=0.25 は約 10 倍程度の安全を見込んだ値でもある。)しかしながら BW 法では CW 法とは異なる