

り、あるパルス幅の間は強い値となる。Daffertschofer らパルス幅 0.5ms、繰り返し周波数 100Hz、 $I_{spta}=0.7\text{W/S}$ から I_{sppi} を算定すると 14W/cm^2 となる。さらに円形ピストン音源の空間的音響強度は平均値の約 4 倍となるホットスポットが存在するという事実を加味すれば、 I_{sppi} は恐らく 50W/cm^2 を超える状況が脳内に生じていたのではないかと予測され、実際のパルス幅が 0.5ms であったとしても、キャピテーション発生を否定することは困難と考える。

(念のため PW 法ではパルス幅 $1\mu\text{s}$ 以下であり、その条件下で 190W/cm^2 である。) 投入エネルギーとしてパルス幅 $\times I_{sppi}$ を推定すれば、診断装置の場合の約 125 倍のエネルギーを瞬間的に毎秒 100 回脳内に照射したこととなる。(ただし、診断装置は繰り返し周波数が数 kHz であるので、125 分の 1 のエネルギーを毎秒 4 回打ち込む換算となる。)

換言すれば $I_{spta}=0.7\text{W/cm}^2$ という診断装置の安全限界を満足していても、パルス幅のある程度長い BW 法は I_{sppi} が 190W/cm^2 の安全限界以下であってもキャピテーションを惹起するということである。ただし、BW 法の duty cycle が 100% に相当する CW 法では $I_{spta}=I_{sppi}$ となり、本プロジェクトで示した様に有害事象が 500kHz という低周波超音波でも認められないという結果になっている。連続波常状態とパルス波との間の BW 法の生体組織安全性に関する検討が今後必要不可欠と考える。

さて超音波条件と共に、その超音波を照射する対象組織の音響学的脆弱性に配慮すべきであるということを Daffertschofer

らの臨床成績は提示している。特にくも膜下出血は脳内出血とは異なり、恐らくは塞栓部より中枢側の血管破壊によって生じたものと考えられる。これは脳動脈硬化が亢進した血管が超音波に対して弱いのではないかとする仮説を起こさせるものである。加齢、高血圧、糖尿病などによって生じる血管病変に対する超音波の安全性を検討した報告は無いようである。少なくとも診断用超音波は頸動脈をはじめ、全身の血管系に適用されてきた。今回の 300kHzBW の超音波は $I_{spta}=0.7\text{W/cm}^2$ という安全限界内の超音波条件内にもかかわらず、SAH を招いた事実から、今後改めて病的血管に対する低周波超音波 (1MHz 以下) の安全限界を音響強度や波形の観点から研究する必要があることを示している。病理学的に動脈硬化が明かとなっている高血圧性ラット等の小動物を用いた試験ばかりでなく、最終的には病的血管を有する霊長類を用いた安全性評価が求められるのではないかと考えられる。

SAH の様な劇的な出血ではない多くの脳内出血について、Daffertschofer ら超音波による血管拡張が関与しているのではないかと指摘している (私信)。事実 MRI 像の詳細な検討からも彼は読影したとするが、血管拡張効果を報告する動物実験成績は他にもある。Suhkva らは兎大腿筋での pH 変化なども超音波の代謝改善作用とする報告を發表している。脳梗塞状況下での血管系に対する超音波照射は未だ不明の生化学的代謝に係わる作用、例えば細胞死に向かうカスケードのどこかのステージへ及ぼす超音波作用がある様にも思われる。この超音波と虚血状況下の細胞組織学的関係など、微

細に検討すべき問題も少なくないように考えられる。ただ念のため 500kHzCW、0.72 W/cm² という本プロジェクトの超音波条件はラット脳梗塞モデルにおいても組織病理学的にも免疫学的にも悪影響を起さなかったことを付記しておく。

本プロジェクトの臨床応用を推進するには上述のような超音波条件の基礎検討、病的血管に対する安全性評価などが安全上さらに必要であることを明らかにした。

E. 結論

経頭蓋超音波脳血栓溶解療法は TCD などの診断装置を用いた場合には 1PA の再開通率を高め、安全性も担保されているが、低周波バースト波超音波（300kHz、バースト波）を用いた場合には脳出血という高リスクのあることが明かとなった。本プロジェクトの超音波条件（500kHz、連続波）では現在まで副作用を示すいかなる動物実験成果も認められないが、病的血管を含めて、300kHz バースト波と 500kHz 連続波の比較実験などによる検証が必要とされた。また生化学的な超音波の血管への作用や虚血下の脳神経系への作用に関する基礎研究を展開すべきことも明かとなった。

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

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

分担研究者 峰松 一夫 国立循環器病センター 内科脳血管部門部長

研究要旨：近い将来の「経頭蓋超音波血栓溶解装置」の臨床応用の前段階として、血栓溶解療法を巡る諸問題を明確にすることを目的に、血栓溶解療法（特に静注法）と経頭蓋超音波照射に関する内外の文献の批判的検討を行った。

発症 3 時間以内の rt-PA 静注法は、発症 3 ヶ月目の転帰良好例を有意に増加させる。この効果は、発症から治療までの時間が短いほど明らかである。3 時間を越すと効果は期待できず、むしろ症候性頭蓋内出血の増加をもたらす。中大脳動脈閉塞症を対象にした発症 6 時間以内の超選択的血栓溶解療法も、一定の治療効果が認められているが、承認には至っていない。

最近、MR 技術を応用した発症 9 時間までの血栓溶解療法、持続的超音波照射による発症 3 時間以内の rt-PA 静注療法の効果増強などが報告されている。

わが国でも、rt-PA 静注療法に関する治験 J-ACT が実施され、米国と同様の成績が得られている。本薬の国内承認も間近と期待されている。本研究班で開発、前臨床試験が進行している超音波照射装置にも、期待が寄せられる。

峰松一夫，高田達郎，
横田千晶

国立循環器病センター
内科脳血管部門

A. 研究目的

わが国を含む先進諸国において、脳卒中は三大死因の一つであり、要介護性疾患の首位を占める。脳卒中の 7? 8 割は脳梗塞である。高頻度かつ重篤な疾患でもあるにもかかわらず、本疾患の急性期治療への関心はこれまで低かった。本疾患に対する根本的な治療法の欠如、すなわち治療的虚無主義（therapeutic nihilism）が、最大の理由であった。

従来、根本的治療法のなかった脳梗塞である

が、1995 年に発症 3 時間以内の recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) 静注による血栓溶解療法の優れた転帰改善効果が証明されたことにより (1)、脳梗塞は治療可能な緊急疾患、すなわち brain attack と認識されるようになった。本薬は、北米、欧州を中心に世界 40 カ国以上で承認されている。残念ながらわが国では、未承認であるが、2004 年に公表されたわが国初の「脳卒中治療ガイドライン」では、行うことが強く勧められるグレード A に位置づけられている (2)。また、国内承認申請を目的にした臨床試験 Japan Alteplase Clinical Trial (J-ACT) が昨春終了し (3)、現在承認申請中である。近い将来に、本薬も国内で使用可能になると期待されている。

欧米では rt-PA の臨床応用から 8 年が経過し

ているが、市中病院での使用率は全脳梗塞の1.6～2.7%、大学病院などの教育病院ですら4.1～6.3%に止まっているという(4)。これは、①治療可能時間が3時間と限られ、発症から2時間以内に医療機関を受診しない限り治療適応となり難いこと、②副作用として症候性頭蓋内出血があり、ハイリスクの患者では発症3時間以内でも除外せざるを得ないことなどが理由である。こうした現状を打破すべく、様々な努力がなされている。

血栓溶解療法実施患者に対し経頭蓋的に超音波を照射すれば、血栓溶解効率が上昇し、より優れた治療効果が得られることが示唆されている。本研究班では、わが国初の「経頭蓋超音波血栓溶解装置」を開発し、これを臨床応用することを目的とした。しかしながら、米国での成功報告(5)もある一方で、欧州での開発失敗の学会報告もあり、臨床応用には十分な前臨床評価が不可欠であると判断された。また、前提となるrt-PA使用もわが国では未承認である。既に本研究班では、サルを用いた安全性評価もなされ、臨床応用直前の段階であるが、実際の臨床応用という初期の目的には到達していない。

本分担研究では、近い将来の「経頭蓋超音波血栓溶解装置」の臨床応用の前段階として、血栓溶解療法を巡る諸問題を明確にすることである。

B. 研究方法

血栓溶解療法(特に静注法)と経頭蓋超音波照射に関する内外の文献を、批判的に検討する。

C. 研究結果

1. 脳梗塞超急性期治療の理論的根拠

虚血早期には脳機能障害の生じる血流値と不可逆的脳損傷を生じる血流値との間に乖離がある。この血流域に相当する脳組織は、機能障害はあるものの、早期血行再開により回復しうる可逆的損傷領域である。こうした可逆的虚血領域を虚血性ペナンプラ(ischemic penumbra)と呼ぶ(6)。臨床例でも、早期血行再開により重篤な大脳半球症候が劇的に改善しうることが経験されている(spectacular shrinking deficit)(7)。早期血行再開の促進と、それによる転帰改善を目的としたのが血栓溶解療法である。

2. 血栓溶解療法

1) 静注法

1960～70年代には、streptokinase (SK), urokinase (UK) といった第一世代の血栓溶解薬を用いた臨床試験が実施された。しかし、症候改善は得られず、むしろ頭蓋内出血発生は著しく高率であった。欧米では、虚血性脳血管障害に対する血栓溶解療法はむしろ禁忌とされた。

1980年代に入り、recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) など、血栓親和性の高い第二世代血栓溶解薬が開発された。急性心筋梗塞(急性冠動脈閉塞)に対する本薬の治療効果が大規模 randomized controlled trial

(RCT)で確認され、虚血性脳血管障害に対しても、その臨床応用が模索されることとなった。

表1に、虚血性脳血管障害に対する血栓溶解療法の主なRCTの概要を示す。第一世代血栓溶解薬のSKを用いたRCT、発症3時間以降の症例も対象に含むrt-PAのRCTでは、確実な治療効果が証明されなかった。また、いずれのRCTでも、血栓溶解薬は症候性頭蓋内出血を2?10倍増加させた。唯一、NINDS rt-PA Stroke

Study において、発症 3 時間以内の rt-PA 静注が発症 3 カ月目の転帰を有意に改善させた (1)。

本薬は、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) により「唯一の急性期脳卒中治療薬」として承認された (1996 年)。以後カナダ、ドイツなど、世界 40 ヶ国以上で、rt-PA の臨床使用が許可されている。これに伴い、欧米の脳卒中関連専門医学会は、NINDS Study プロトコルに準拠した治療ガイドラインを公表している (8)。なお米国での市販後臨床調査では、ガイドライン遵守違反 (特に発症 3 時間以降の投与) が、転帰の悪化要因となることが示されている (9)。

脳梗塞全体を対象とする限り、その治療可能時間は 3 時間以内に限られ、かつ治療時間が遅れるほど効果は期待し難くなる (10)。しかしながら、たとえ 3 時間以内でも虚血が重篤であれば逆効果となる場合もあり、3 時間を越しても虚血性ペナンプラが存在する場合には治療効果は期待できる可能性がある。最近、発症 9 時間以内で、かつ MR 検査で diffusion-perfusion mismatch が検出された患者を対象に新しい血栓溶解薬 desmoteplase の効果を調べる第二相 RCT が実施され、良好な成績が報告された (11)。MR 上の diffusion-perfusion mismatch は、いわゆる虚血性ペナンプラ領域を描出できるものと考えられている。本試験については、より本格的な第三相 RCT が開始されることが公表されている。

2) 局所動注法

マイクロカテーテルを用いた頭蓋内動脈局所での血栓破砕ならびに血栓溶解薬投与により、血栓溶解効率の向上と出血性合併症の減少が期待される。また血管撮影による血栓溶解効果モニタリングも可能である。一方で、実施可能な施設が限られること、治療開始までに一定

の時間を要することなどが問題である。1999 年、動注法に関する RCT である PROACT II Study が実施され、発症 6 時間以内の急性中大脳動脈閉塞症に対する prourokinase 動注法の有効性が示された (表 1) (12)。ただし、FDA は本療法を承認していない。

3) 血栓溶解療法に関するわが国の現状と今後の展開

国内で承認された急性期治療薬は多いが、欧米水準の大規模 RCT で効果が実証されたものは皆無といえる。表 2 に、血栓溶解療法に関するわが国のガイドラインを示す (2)。最大の問題は、国内ガイドラインでもグレード A とされた rt-PA が国内未承認というねじれ現象の存在である。

急性期脳梗塞の全国多施設共同前向き登録調査 (主任研究者：山口武典) では、前向き登録 16,922 例中 3% に大量 UK または rt-PA 投与が行われていた (13)。多変量解析の結果、急性期の血栓溶解薬投与は転帰良好 (modified Rankin Scale, mRS 0? 2) と有意に関連した。このうち、一定の基準を満たす UK 局所動注群の退院時転帰は、性、年齢、発症から入院までの時間、入院時 National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) スコアをマッチさせた対照群に比べ、有意に良好であった (表 3) (14)。この成績を受け、発症 6 時間以内の中大脳動脈塞栓症に対する UK 局所動注法の RCT が 2002 年 1 月より開始され、現在進行中である (MELT Japan, 主任研究者：小川彰)。その概要は、ホームページ上に公開されているので、参照されたい

(<http://melt.umin.ac.jp>)。

2002 年? 2003 年、わが国の脳血管障害診療現場における rt-PA 静注療法の意義を明らかにすることを目的として、alteplase を用いた単一

用量オープン・ラベル多施設共同臨床試験
Japan Alteplase Clinical

Trial (J-ACT) が実施された。本試験は承認申請を目的とした第 III 相試験である。対象選択基準、方法は基本的には NINDS 試験のそれに準拠しているが、Alteplase 用量が 0.6 mg/kg と NINDS 試験の 0.9 mg/kg より低く、症例選択基準の一部に若干の変更が加えられている。本試験成績の概要は、既に 2004 年の日本脳卒中学会・脳卒中外科学会合同シンポジウム（名古屋市）にて報告された（3）。投与症例数は 103 例で、その背景諸因子は NINDS 試験の患者背景因子とほぼ同等であった。発症 3 ヶ月目の mRS スコア 0, 1 の転帰良好例の頻度は 37% と NINDS 試験の実薬群の 39% とほぼ同じで、死亡率はむしろ低かった（10% 対 17%）。発症 36 時間以内の症候性頭蓋内出血の頻度は 5.8% で、NINDS 試験の 6.4% より若干低かった。

現在、J-ACT の結果に基づいて承認申請が行われ、薬事審査が実施されているところである。もし本薬が承認されることになれば、わが国の超急性期脳卒中診療現場に大きなインパクトを与えるものと期待される。

3. 血栓溶解療法と経頭蓋超音波照射法

閉塞した中大脳動脈をターゲットにした経頭蓋ドプラ検査中に、rt-PA による血栓溶解効率が上昇することが臨床観察により示唆されてきた。これは、血栓が rt-PA に暴露するのを超音波が促進するためと考えられている。最近、中大脳動脈閉塞による急性虚血性脳卒中を起こし、かつ rt-PA 投与を行った患者を対象に、2 MHz の継続的経頭蓋超音波ドプラの持続照射群と非照射対照群に無作為に分け、その治療効果を見る試験が実施された。患者数は 126 例で、継続的超音波照射群では rt-PA 投与 2 時間以内の完全再開通または顕著な臨床的回復を示した患者が非照射群に比べ有意に高率で

あった（49% 対 30%）（5）。発症 3 カ月の時点での転帰良好例（modified Rankin Scale スコア 0~1）も、42% 対 29% と前者で多い傾向にあった（ $p=0.02$ ）。症候性頭蓋内出血の頻度には有意の群間差はなかったという。

一方、欧州でも、より大出力の継続的経頭蓋超音波持続照射を併用した血栓溶解療法が試みられた。残念ながら、症候性頭蓋内出血の頻度が予想以上に高率で、試験は中止に追い込まれたという（論文未発表）。

D. 考察と結論

以上、虚血性脳血管障害超急性期血栓溶解療法に関する国内外の現状について概説した。1996 年の米国における rt-PA 承認をきっかけとして、海外主要国は既に脳卒中超急性期治療の時代を迎えている。一方、我が国では「超急性期治療」は未だ概念的なレベルに止まっている。この失われた 10 年をいかにして取り戻すかが、脳卒中急性期診療に従事する我々にとって、重い課題となっている。

幸いに、わが国でも rt-PA 承認も間近との観測がある。その際には、本研究班で臨床応用直前のレベルに達した「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置」の臨床応用も可能となるであろう。ただし、本装置には血栓溶解効率の向上のみならず症候性頭蓋内出血の頻度増加の危険性もありうる。より低用量の rt-PA 投与と併用したり、ペナンブラ検出に有用とされる最新の MR 診断法を利用することにより、本装置を用いた血栓溶解療法の効果・安全性を最大のものとする努力が必要になるであろう。

E. 文献

1. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group: Tissue

- plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 333: 1581-1587, 1995
2. 篠原幸人、吉本高志、福内靖男、他（編）：
脳卒中治療ガイドライン、協和企画、東京、
2004
 3. 峰松一夫、山口武典、端和夫、他：発症3
時間以内の虚血性脳血管障害に対する
GMK-527（アルテプラーゼ）静注療法臨床
試験の結果。脳卒中（印刷中）
 4. Kaste M: Thrombolysis: What more dose it
take? *Stroke* 36:200-202, 2005
 5. Akeandrov AV, Molina CA, Grotta JC, et al:
Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for
acute ischemic stroke. *N Engl J Med*
351:2170-2178, 2005
 6. Astrup J, Siesjo BK, Symon L: Thresholds in
cerebral ischemia – the ischemic penumbra.
Stroke 12:723-725, 1981
 7. Minematsu K, Yamaguchi T, Omae T:
‘Spectacular shrinking deficit’: A rapid recovery
from a major hemispheric syndrome by
migration of an embolus. *Neurology*
42:157-162, 1992
 8. Adams HP, Jr., Brott TG, Furlan AJ, et al:
Guidelines for thrombolytic therapy for acute
stroke: A supplement to the guidelines for the
management of patients with acute ischemic
stroke. A statement for healthcare professionals
from a special writing group of the Stroke
Council, American Heart Association. *Stroke*
27:1711-1718, 1996
 9. Katzan IL, Furlan AJ, Lloyd LE, et al: Use of
tissue-type plasminogen activator for acute
ischemic stroke: The Cleveland area experience.
JAMA 283:1151-1158, 2000
 10. Hacke W, Donnan G, Fieschi C, et al:
Association of outcome with early stroke
treatment: pooled analysis of ATLANTIS,
ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet*
363:768-774, 2004
 11. Hacke W, Albers G, Al-Rawi Y, et al: The
desmoteplase in acute ischemic stroke trial
(DIAS): A phase II MRI-based 9-hour window
acute stroke thrombolysis trial with intravenous
desmoteplase. *Stroke* 36:66-73, 2005
 12. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, et al:
Intra-arterial prourokinase for acute ischemic
stroke. *JAMA* 282:2003-2011, 1999
 13. Kimura K, Kazui S, Minematsu K, et al:
Analysis of 16,922 patients with acute ischemic
stroke and transient ischemic attack in Japan. A
hospital-based prospective registration study.
Cerebrovasc Dis 18:47-56, 2004
- Inoue T, Kimura K, Minematsu K, et al: A
case-control study of intra-arterial urokinase
thrombolysis in acute cardioembolic stroke.
Cerebrovasc Dis 19: 225-228, 2005

表1 血栓溶解療法に関する主な大規模臨床試験の概要

試 験	症例数	投与開始	用 量	結 果	頭蓋内出血
1. t-PA 静注法*					
JTSG (日本)	98	< 6 時間	20 MU	有効?	不変
NINDS (米国)	624	< 3 時間	0.9 mg/kg	有効	増加
ECASS-I (欧州)	620	< 6 時間	1.1 mg/kg	無効**	増加
ECASS-II (欧州)	800	< 6 時間	0.9 mg/kg	無効***	増加
ATLANTIS (米国) 579	3?	5 時間	0.9 mg/kg	無効	?
2. SK 静注法					
ASK (Australia)	340	< 4 時間	150 万 U	有害	増加
MAST-I (Italy)	622	< 6 時間	150 万 U	有害	増加
MAST-E (欧州)	270	< 6 時間	150 万 U	有害	増加
3. proUK 局所動注法					
PROACT-II (米国)	180	< 6 時間	9 mg	有効	増加

* JTSG (日本) では duteplase、他は alteplase を使用

** 選択基準違反 (109 例) を除くと有効性あり

*** 転帰の一部項目で有効性あり

表2 我が国の脳卒中治療ガイドライン（2004年）における血栓溶解療法（静注法、動注法）の位置付け（文献2）

静脈内投与

1. 組織プラスミノゲンアクチベーター（t-PA、保険適応外）の静脈内投与は、経験を積んだ専門医師が適切な設備を有する施設で、適応基準（脳梗塞発症3時間以内、CTで早期虚血所見がないかまたは軽微、など）を十分に満たす場合については、脳梗塞急性期の治療法として有効性が期待される（グレードA）。ただし、上記の条件を満たさない場合、予後を悪化させる可能性があるため、その使用は専門的施設で行われるべきである。
2. 低用量（60,000単位/日）ウロキナーゼの点滴静脈内投与は、急性期（5日以内）の脳血栓症の治療法として行うことを考慮してもよいが、十分な科学的根拠はない（グレードC1）。
3. ストレプトキナーゼ（保険適応外）の静脈内投与は、脳梗塞の急性期に行わないように勧められる（グレードD）。

動脈内投与

1. 神経脱落症候を有する中大脳動脈塞栓性閉塞においては、来院時の症状が軽症から中等症で、CT上梗塞巣を認めず、発症から6時間以内に治療開始が可能な症例に対しては経動脈的な選択的局所血栓溶解療法が推奨される（グレードB）。
2. しかし、上記の条件下であっても総頸動脈あるいは内頸動脈などからの血栓溶解薬の動注は推奨されない（グレードC2）。また、シングルフォトンエミッションCT（SPECT）などで残存血流量が35%未満の症例においては、頸動脈的血栓溶解薬の投与は推奨されない（グレードD）。

推奨のグレード

A：行うように強く勧められる、B：行うように勧められる、C1：行うように考慮しても良いが、十分な科学的根拠がない、C2：科学的根拠がないので、勧められない、D：行わないよう勧められる。

表3 超急性期 UK 局所動注療法に関する case-control study (文献 14 より)

	対照群 (n=182)	治療群 (n=91)	p
男性 (%)	74	74	n.s.
平均年齢 (歳)	64.8	64.5	n.s.
入院時 NIHSS スコア	14.5	14.5	n.s.
発症? 治療 (時間)	-	3.4±1.3	
UK 使用量 (万単位)	-	39±20	
入院期間 (日)	42±42	46±41	n.s.
退院時 mRS≤2 (%)	34.1	50.5	0.012
入院中死亡 (%)	13.2	11.0	n.s.

mRS: modified Rankin Scale, n.s.: not significant

全国前向き登録調査 (J-MUSIC) のデータから一定の基準 (片側性内頸動脈系の心原性脳塞栓症、入院まで 4.5 時間以内、20? 75 歳、入院時 NIHSS スコアが 5 点以上 22 点以下など) を満たす UK 局所動注実施例と背景 (性、年齢、入院時期、入院時 NIHSS スコア) をマッチさせた非実施対照例を選び比較した。その結果、退院時転帰は治療群で有意に良好であった。

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

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 脳梗塞に対する治療用超音波照射の安全性と有効性について、ラット脳梗塞モデルを用いて検討した。脳梗塞再還流モデルに経頭蓋超音波を照射した後の脳梗塞体積の差と神経学的所見により超音波照射の安全性を検討し、脳血栓モデルにおいて、血栓溶解効果、脳梗塞体積の減少効果、神経学的所見の差を検討した。

A. 研究目的

脳梗塞に対する、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、0.2W/cm²) を用い、中大脳動脈 (MCA) の血流を連続モニターすることで血流再開までの時間が短縮されるという報告¹がなされて、現在、脳梗塞治療における経頭蓋超音波は非常に注目を集めている。また、脳梗塞治療後の大きな合併症として、再還流後の出血性合併症の問題がある。経頭蓋超音波照射によって出血性合併症の頻度が増すかどうかは極めて重要な問題である。これまでに、我々は、頭蓋骨の透過性が診断用超音波よりも優れているより低周波数の経頭蓋超音波照射（治療用超音波）について研究を重ねてきたが、本稿では、治療用超音波の安全性と有効性を、2種類のラット脳梗塞モデル、すなわち、ラ

ット脳血栓モデル【研究1】とラット脳梗塞再還流モデル【研究2】で検討したので、ここに報告する。

B. 研究方法

【研究1】

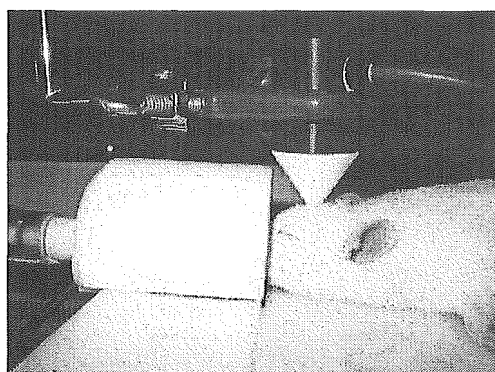
雄の Wistar 系ラット 55 匹を用いた。脳血栓モデルは、Zhang らが、報告している方法²に準じて、自家血血栓を右中大脳動脈起始部に注入する方法で作製した。

脳梗塞モデル作製後 180 分後に、以下に示す 5 段階スコアを用いた神経学的評価を行った。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。² 本研究では、score3 ないしは score4 を呈したモデルを検討対象とした。

動物群は3群に分け、その内訳は以下に示す通りである；1) control (未治療群) 14例 2) TPA:t-PA投与群 20例 3) US:経頭蓋超音波照射併用群 21例。

超音波プローブは頭皮を切開し、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。(図1)

図1



超音波照射は、2分の連続照射の後に30秒の休止をおくパターンを4回行い、5分間の休止の後に、同様の照射パターンを合計4回、60分間の間欠的経頭蓋超音波照射を行った。未治療群およびt-PA単独投与群においても頭皮の切開を施し、イソフルレンの吸入麻酔(2%、0.5L/分/空気)による60分間の全身麻酔を行った。

前述の神経学的評価後、治療群であるTPAおよびUS群には、尾静脈よりt-PA(montepase)1.2mgを投与した。脳梗塞モデル作製24時間後に、前述の神経学的評価を再度行い、score2、score1、score0を呈したモデルを神経学的改善例とした。また、神経学的改善例の例数を各群の例数で除した百分率を「神経学的改善率」とした。引

き続いて、脳を摘出し、頭蓋底の右MCA分岐部の残存血栓の有無を確認した。血栓残存が無い、すなわち血栓溶解を認めた例数を各群の例数で除した百分率を「血栓溶解率」とした。その後、脳を厚さ2mmの7個の冠状段切片にし、それぞれの尾側端面のH-E染色標本を作製した。健側面積に対する患側の脳梗塞の面積の百分率を求めて積分し、「脳梗塞体積率」を計算した。

【研究2】

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^{3,4}。塞栓子を右MCAの起始部を閉塞させ、右MCA領域の脳梗塞モデルを作成した。右中大脳動脈閉塞(MCAO)80分後に、研究1と同様の神経学的評価を行った。score3ないしはscore4を呈した例を対象とした。

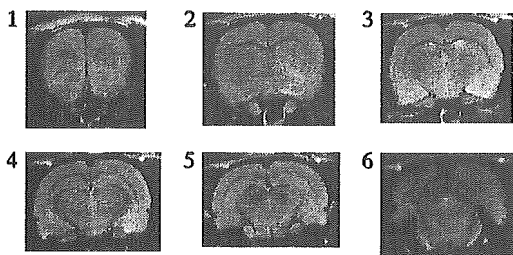
右MCAO90分後に、右MCA起始部に留置した塞栓子を引き抜くことで、右MCA領域の再還流をさせた。引き続き研究1と同様に60分間の間欠的経頭蓋超音波照射を行った群(11例)と行わなかった群(11例)の2群に動物モデルを分けた。

右MCAO240分後に、前述の神経学的評価を行った。後に、MRIを用いて、虚血再還流後の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。

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

イメージを撮影し、右 MCA 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



右 MCAO 24 時間後に再び DWI と T2WI の MRI を施行し、脳梗塞体積の計算と出血性合併症の出現の有無を検討した。神経学的評価は、右 MCAO 90 分、240 分、および 24 時間後の合計 3 回行った。

研究 2 では、経頭蓋超音波照射に伴う神経学的予後の差、脳浮腫及び脳梗塞体積の程度に差が生じるかどうか、および出血性合併症の出現に差があるかを検討した。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。⁵

C. 研究結果

【研究 1】

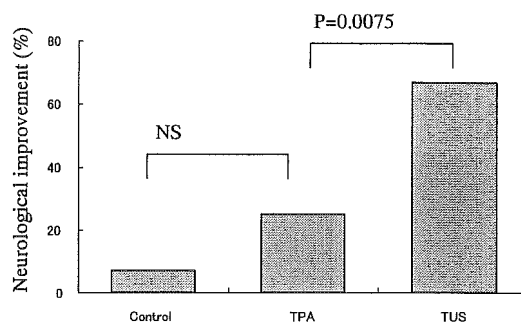
本研究では、神経学的改善度、血栓溶解率、脳梗塞体積率の 3 点を検討項目とした。

1) 神経学的改善率

control 群で 14 例中 1 例 (7.14%)、TPA 群

で 20 例中 5 例 (25%)、US 群で 21 例中 14 例 (66.7%) に神経学的改善を認めた。US 群は、TPA 群と比較して、有意に神経学的改善を認めた。(図 3)

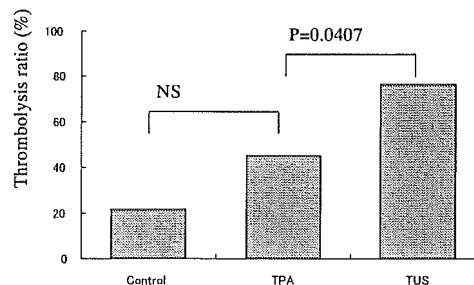
図 3



2) 血栓溶解率

control 群で 14 例中 3 例 (21.4%)、TPA 群で 20 例中 9 例 (45%)、US 群で 21 例中 16 例 (76.2%) に右 MCA 分岐部の血栓溶解を認めた。US 群は、TPA 群と比較して、有意な血栓溶解率を認めた。(図 4)

図 4

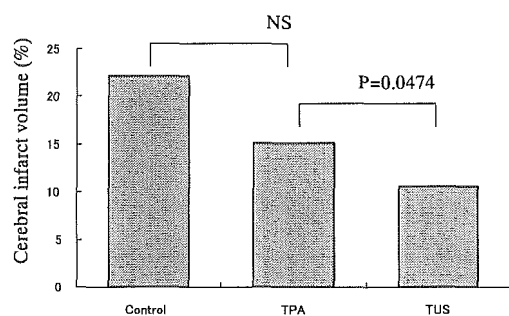


3) 脳梗塞体積率

control 群の平均体積率は 22.1%、TPA 群の平均体積率は 15.1%、US 群の平均体積率は 10.6%であった。US 群は、TPA 群と比較

して、有意な脳梗塞体積の減少を認めた。
(図5)

図5



【研究2】

神経学的予後、脳梗塞体積に関しては、2群間で有意差を認めなかった。また、MRI上出血性合併症の出現は認めなかった。

D. 考察

今回の研究では、2種類のラット脳梗塞モデルを用い、経頭蓋超音波照射の安全性と有効性について検討し、経頭蓋超音波照射が脳梗塞ラットの予後に影響を与えずに治療効果をもたらしたことを示した。

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。^{6,7,8}

脳梗塞の治療において、発症から治療開始までの時間、虚血の程度は極めて重要で、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ためである。これらは、脳梗塞治療における大きな問題である。

それ故、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。

我々の超音波照射条件（490kHz、0.8W/cm²）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は報告した。⁹

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による画像診断と神経学的予後に有意差が無く、出血性の合併症を認めなかったことより、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、t-PA静注による脳梗塞の治療中に、診断用超音波（2MHz、0.2W/cm²）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一方で、*in vitro* の検討で、診断用超音波の血栓溶解効果は無いと結論づける報告もある。

¹⁰

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、低周波数で、診断機器レベルの限界値（0.72W/cm²）の出力を用いている。この超音波照射条件で、脳梗塞再還流モデルで脳梗塞の体積と神経学的な予後で有意差を認めなかったことは、この超音波照射条件が安全であるといえる。また、脳血栓モデルでt-PA単独投与に経頭蓋超音波を併用した群で、有意に神経学的改善度が得られ、血

栓溶解率の増加と脳梗塞体積の減少が得られたことは、490kHz、0.8W/cm²の低周波数、低出力経頭蓋超音波の安全性と有効性を同時に示したといえる。これらの結果は、今後の超音波併用血栓溶解療法の応用にあたり、重要な結果である。

E. 結論

490kHz、0.8W/cm²の低周波数、低出力経頭蓋超音波照射は、ラット脳梗塞モデルを用いた検討で、その安全性と有効性が確認された。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. Saguchi T, Gerriets T, Walberer M, Bachmann G, Kaps M, Furuhata H. Therapeutic ultrasound in a rat middle cerebral artery stroke model –A safety study- 9th meeting of the European society of neurosonology and cerebral hemodynamics 8th-11th May 2004 Wetzlar, Germany

2. 佐口隆之、Gerriets T, Walberer M, Bachmann G, Kaps M、古幡 博「ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける再還流時の治療用超音波照射 -動物

用 MRI による安全性の検討-」(第 23 回日本脳神経超音波学会、2004 年 6 月、福岡)

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. *N Engl J Med.* 2004;351:2170-2178.
2. Zhang et al. *Brain Research.* 1997;766:83-92
3. Koizumi et al. *Jpn J Stroke* 1986; 8:1-8
4. Longa et al. *Stroke* 1989; 1,
5. Gerriets et al. *Stroke.* 2004;35:566-571
6. Behrens et al. *Ultrasound Med Biol.* 1999;25:269-273
7. Nedelmann et al. *J Ultrasound Med.* 2002;21:649-656
8. Suchkova et al. *Ultrasound Med Biol.* 2002;28:377-382
9. Ishibashi et al. *Stroke.*2002;33:1399-1404
10. Pfaffenberger et al. *Stroke.* 2005;36:124-128

経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発と探索的臨床研究

分担研究課題名：開発装置の臨床適合性評価

分担研究者 石橋敏寛

＜研究要旨＞

経頭蓋的超音波照射による血栓溶解療法を臨床使用するにあたり、装置の性能はもとより高い操作性と安全性が要求されると予想される。本研究では、より確実な照射条件を設定するための超音波プローベ固定具（頭部固定具）および、装置の操作画面アプリケーションの開発を行い、実際の臨床の現場を想定した操作性の確認を行った。

A. 研究目的

脳梗塞急性期における新治療用「経頭蓋超音波血栓溶解装置」の臨床的使用において、装置操作性の向上、および臨床適合性の評価を目的とする。第一に経頭蓋的超音波照射の際に使用する、超音波プローベを固定するための頭部固定具の開発を行い、その固定性の評価を施行する。第二に治療用超音波照射時における血栓溶解部位の視認性の向上、治療用超音波照射の際の安全性の確保を目的に、現在までの診断装置画面に加え、新たに治療用操作アプリケーションの開発を目的とする。(図1)

B. 研究方法

B-1: 頭部固定具の開発

1) ヘッドバンド型頭部固定具

超音波照射用プローベを頭部に安定して固定するための装具の開発。頭部固定具はプローベ固定部とそれを頭部に保持するための頭部固定部位とに大別される。体動などにより超音波照射部位がず

れることが予想されるため、プローベと頭部の間をマジックテープにより固定を行った。健常者6名に対して、ヘッドバンドでプローベを固定後に立位、坐位、臥位と体位を変え、連続15分間の持続モニタリングを行った。

2) 枕型頭部固定具 (図2)

超音波照射による血栓溶解療法は臥位にて施行されると想定している。そのため枕型の頭部固定具にプローベ固定具を装着し、強固な頭部固定に対する不快感を軽減する事を目的として開発された。B-2: 治療用装置における、操作アプリケーションの開発

誤照射などの不具合をなくすために、治療用超音波が発信されている際には、それが明らかになるような表示方法を採用した。また診断用画面と別途にモニターを設けることにより、誤操作を未然に防ぐことを目的としている。さらに、治療の途中経過が判別できるよう治療用画面下端に治療経過モニター画面を併設した。

C. 研究結果および考察

B-1: 頭部固定具

1) ヘッドバンド式頭部固定具 (図2)

健常者6名に対する持続モニタリングの検討の結果、6名中5名において、良好な持続モニタリングが可能であった。血流監視が負荷であった1名に関しては、temporal bone windowはあるものの、プローベ固定部とbone windowの位置の調節が不可能なため、持続モニタリングが不可能であった。また持続モニタリング可能であった5名においては、頭部固定具の装着感に関する不快感、プローベ固定と側頭骨平面の関係において、超音波入射角の微調整が効かず、限局された範囲でのモニタリングになる、などの問題点が指摘された。

2) 枕型頭部固定具 (図3)

従来のヘッドバンド式に比べ枕型の頭部固定具は遜色ない超音波照射を施行し得た。そのメリットとして、1) 体動などにより照射プローベがはずれた場合にも、頭部の位置を変更するだけで、再照射が速やかに再開できる。2) 強固な頭部固定の際に生じた、頭部の不快感がすくなく、痛みなどを生じにくい、などが挙げられた。また今後の改良点として、微細なねじ調節が円滑に施行できるようなデザインの工夫、またプローベ固定具と、側頭部の水平面の角度が、合致していないため、一部プローベが頭皮から浮くような状態になりやすいので、頭部固定具の設置角度の変更が必要と考えられた。(図4)

B-2: 治療用装置における、操作アプリケーションの開発

診断画面を治療装置に併設したモニターに転送し(図5)、さらに治療用超音波が照射されている間は、それに伴い照射範囲が視認できるように、超

音波ビーム方向の画像を負荷した(図6)。さらに、インターミット照射の経過時間が判別可能な経時的モニタリング画面を併設した。これにより、治療時間の把握が容易になり、途中で照射を休止した場合などにも、その後の照射時間の把握が可能になった。また詳細な超音波照射条件の設定は、通常の画面のその次の階層に移すことにより、初心者でも扱いやすい操作画面表示を可能にした(図7)。

図1：治療用超音波照射風景

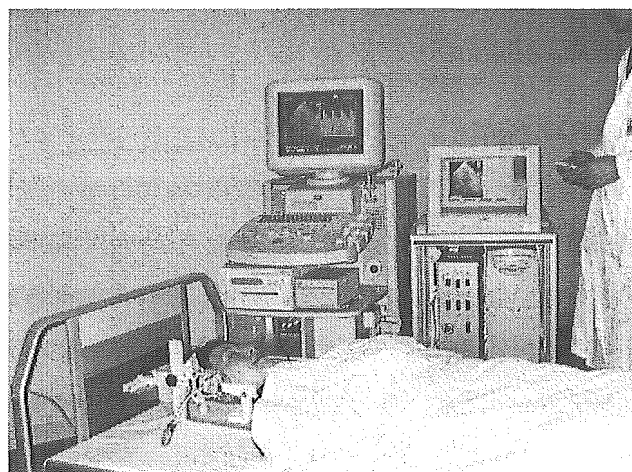


図2 ヘッドバンド式頭部固定具による持続モニタリング

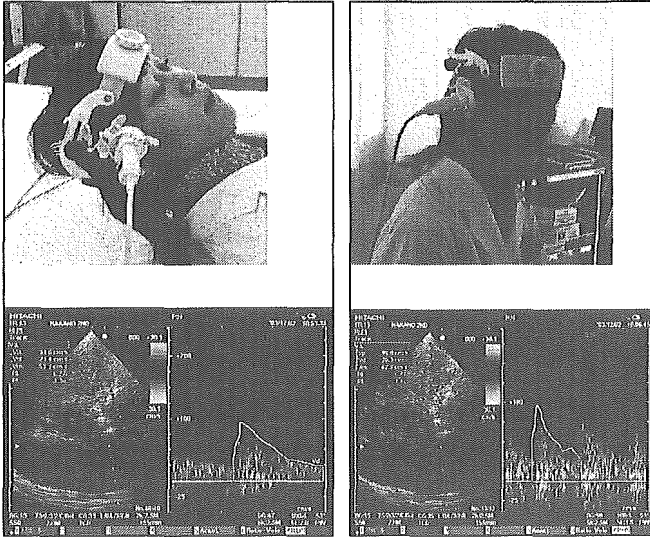


図2左：臥位での持続モニタリング風景

図2右：坐位での持続モニタリング風景

体位を変更しても持続モニタリングが可能であった。

図3：枕型頭部固定具

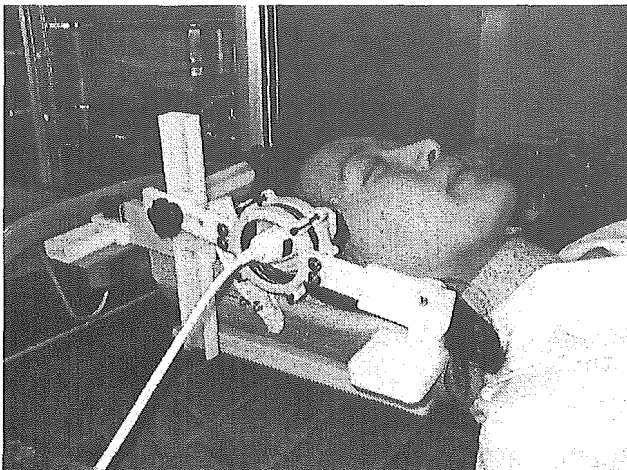


図4：プローベ固定部

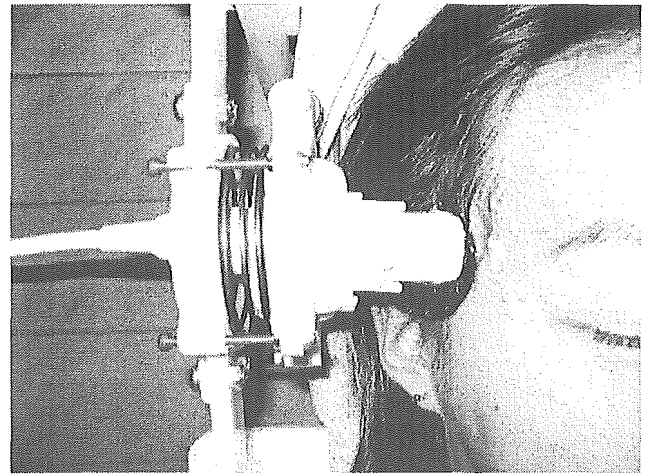


図5：治療用操作画面

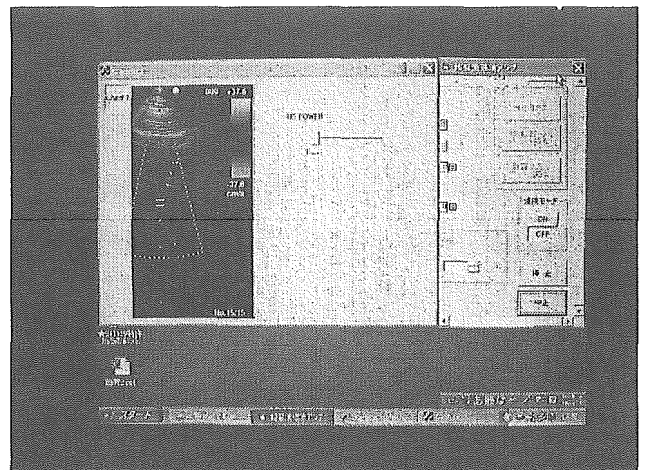


図6：治療用超音波照射視認画面

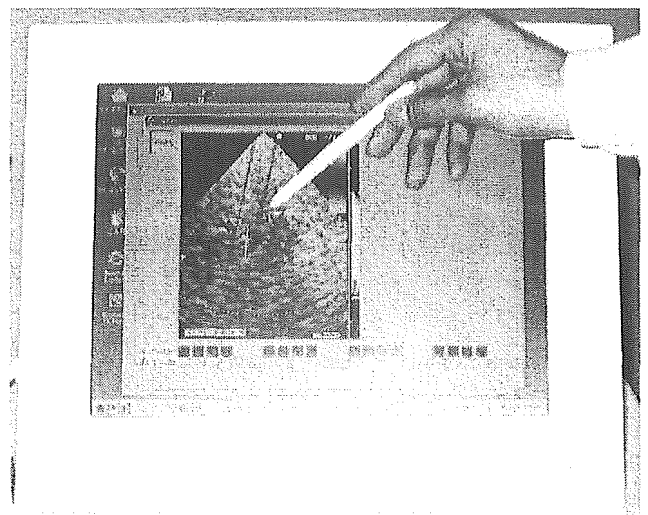
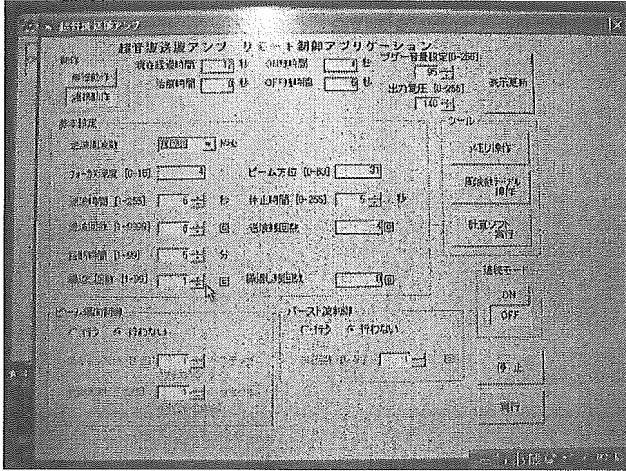


図7：超音波照射条件設定画面



E. 結論

本臨床適合性の評価では、経頭蓋的超音波照射の臨床使用を想定し、頭部固定具の評価と装置操作性の評価を行った。その結果、若干の改善が必要であるが現時点での装置を使用し、経頭蓋的超音波照射による血栓溶解療法が十分かつ効果的、安全に施行し得ると考えられた。

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

研究課題：神経保護薬投与下虚血脳における超音波作用

分担研究者：中野 みどり（東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センターME 研究室）

研究要旨

急性虚血性脳卒中治療の超急性期における第一選択は血栓溶解剤の投与と共に、神経保護薬（エダラボン）投与である。この様な現行の臨床治療法に併用し、経頭蓋的に超音波照射して、脳血栓溶解を加速する経頭蓋超音波併用脳血栓溶解法を適用する場合には、超音波照射条件が神経保護薬の薬効に及ぼす影響を事前に評価する必要がある。特に血栓溶解加速に用いる超音波が 500KHz という通常の診断用超音波周波数（1MHz 以上）に比較して低い周波数領域については、未だに安全情報が必ずしも充分でない現状を考え合わせれば十分な安全性評価を行っておく必要がある。ここでは *in vitro* 実験、*in vivo* 実験を通じ、超音波の脳組織に対する影響を神経保護薬投与下で評価した。*in vitro* 実験はマウス脳スライスの器官培養標本（脳スライスは生きている状態）を低酸素下（濃度 5%）に置き、血栓溶解剤（t-PA）やエダラボン投与条件下で、超音波照射し、その後死細胞数を 7 日間に亘って観察評価した。その結果、低周波超音波照射が、t-PA やエダラボンの薬効を阻害しないことを確認した。更に神経系細胞を用いた評価でもその無害性を示すことが出来た。*in vivo* 実験はラット脳梗塞モデルを作成し、虚血 60 分後に再還流状態とし、その直後に系図外的超音波照射を行うと共に、エダラボンを静注投与を行い、その薬効評価を 7 日後に摘出した脳の梗塞領域容積で行った。その結果、エダラボンの薬効を軽減させる状況は認められなかった。500KHz 低周波超音波最大出力 $0.72\text{W}/\text{cm}^2$ （診断用超音波装置の場合の最大出力と一致）そして、連続波形 60 分照射に対し、神経保護薬の効果が抑制されることのないことを確認した。

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 医学研究所分子細胞生物学研究部）
中山尚人（東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センターME 研究室）

A. 研究目的

臨床現場で開発予定の経頭蓋超音波脳血栓溶解装置を急性脳卒中患者に適用する状況を踏まえると、次の現行治療法を考慮し

た薬物治療に対する超音波作用の影響の程度を検討しておく必要がある。即ち現行の急性脳梗塞患者の超急性期（発症後 3～6 時間以内）では血栓溶解剤（ウロキナーゼあるいは tissue plasminogen Activator (t-PA) (未承認だが 17 年度中には承認可能性が高い)) が投薬され、また発症後 72 時間以内では神経保護薬エダラボン (edaravone) が投与されている。経頭蓋超音波脳血栓溶解装置は経頭蓋超音波照射