

C. 研究結果

C-1. 結果 1

対象患者は110例(男性75例、女性35例、平均年齢 68 ± 13.9 歳)で、疾患は脳梗塞99例(アテローム血栓性脳梗塞53例、心原性脳塞栓症28例、ラクナ梗塞14例、その他4例)、一過性脳虚血発作3例、脳出血2例、その他の疾患6例であった。

M1、M2、PCAの検出状態で分類したA群は49.1%(54/110例;男性47例、女性7例、平均年齢 62.9 ± 13.7 歳)、B群は21.8%(24/110例;男性17例、女性7例、平均年齢 69.2 ± 13.7 歳)、C群は29.1%(32/110例;男性10例、女性22例、平均年齢 75.8 ± 10.8 歳)であった(表1)。A群に比べ、C群では男性よりも女性が多く、平均年齢も高かった。また、B群の詳細な血管の描出状態は表1に示した。

更に年代別、男女別に分けた解析では、男女共に年齢の上昇と共にC群の数は増えるが、男性ではその傾向はあまり強くなく、一方女性では50歳代以降加齢と共にC群の数は増え、逆に80歳代以上ではA群は0であった(図7)。

A群でMRIが施行された52例において、TC-CFIにて得られた所見とMRAの所見が一致していたのは88.5%(46/52例; TC-CFI・MRA共に異常なし35例、TC-CFI・MRA共にMCAやPCAに狭窄や閉塞所見あり11例)であった。両者の所見が異なった6例の内、TC-CFIで得られた異常所見がMRAでは認められなかったのが4例、逆にMRAで得られた異常所見がTC-CFIでは認められなかったのが2例であった。

C-2. 結果 2.

方法 a. パターン 1:①②③では、超音波像とMRI像が全く合わなかった(手動での調整も困難)。パターン 2:①④⑥では、MRI像を画面の左右方向に5mm以上移動させる必要があった(図8)。

方法 b. 位置合わせを3回繰り返し行い、3回とも完全な一致はなく、1回目2mm、2回目5mm、3回目1mmの誤差であった(図9)。

C-3. 結果 3.

Ver.平成18年度aで5名、bで6名の被検者にて検証を行い、上記bの6名の内5名でcの検証を行った。Ver.平成17年度からの変更で、プローブ保持部の小型化により装着時間が大幅に短縮された(8~50分→10分以内)。しかし、概ね60分間持続して血流波形は捉えられるものの、マニュアルでプローブを使用した際に比べ、頭部への圧迫が弱かった。この為、bとcは主にプローブ保持部分の操作性、固定性の強化を行った。b→cでは同一被検者で検証を行ったが、時間経過と共に描出が不良となることは改善されたが、プローブの前後方向の調整がまだ弱く、全体的に手動に比べ描出がやや不良であった(固定具に装着したプローブを手で少し押すと血管描出が更に改善した)。

D. 考察

日本人におけるTCDによる中大脳動脈の検出率は過去の報告では60~80%で6)7)8)、欧米人に比べ低い9)。伊藤ら8)は対象全体のMCA血流速検出率は77.1%(920/1194血管)、両側MCA血流速検出率は70.9%(423/597例)、検出率は年齢と共に減少し、特に70歳以上の女性では17.0%と報告し、橋本ら7)は、左右どちらか少なくとも一方のMCA、ACA、あるいはPCAの血流信号検出可能者は71%(299/423例)で、女性は20歳代に比し50歳以降に有意の検出率の低下を認めた、と報告している。対象となる患者の年齢、性別の構成が異なる為単純な比較はできないが、伊藤らの報告を本報告での両側M1あるいはM2検出率とすると58.2%(64/110例)、橋本らの報告を本報告でのA群+B群とすると70.1%(78/110)となる。伊藤らの報告と比べると検出率がやや

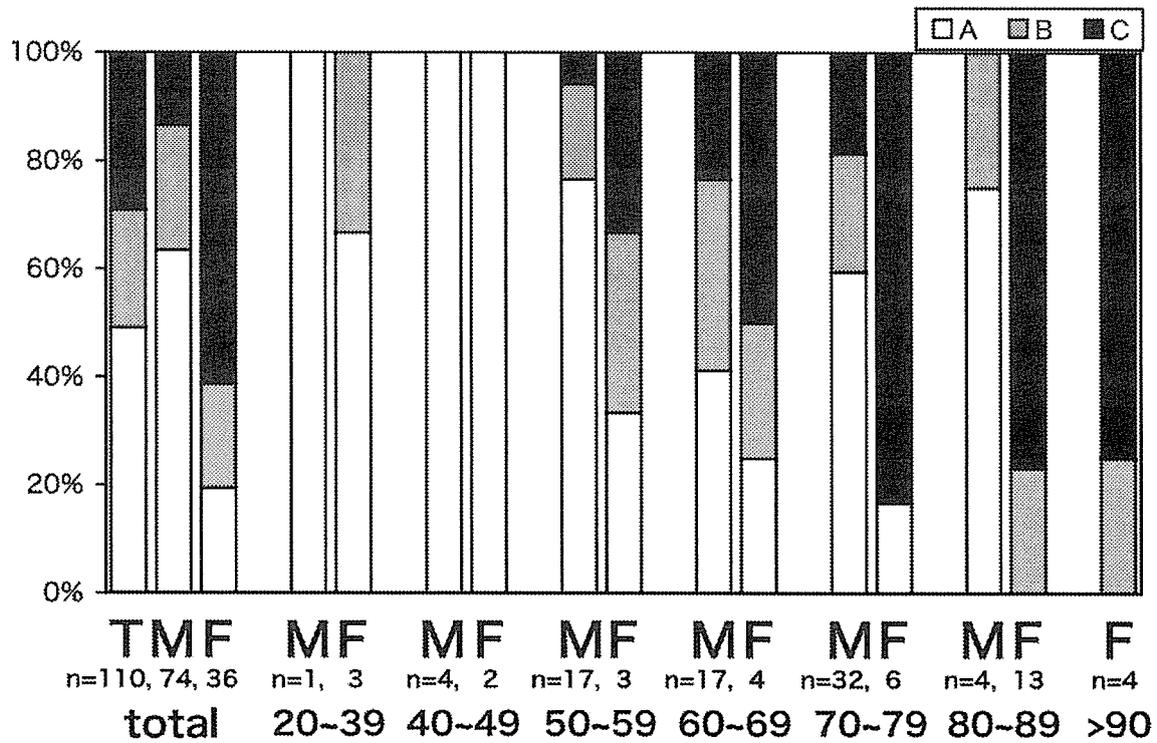


図 7. 各年代・男女別検出率
(A、B、C 群の比率)

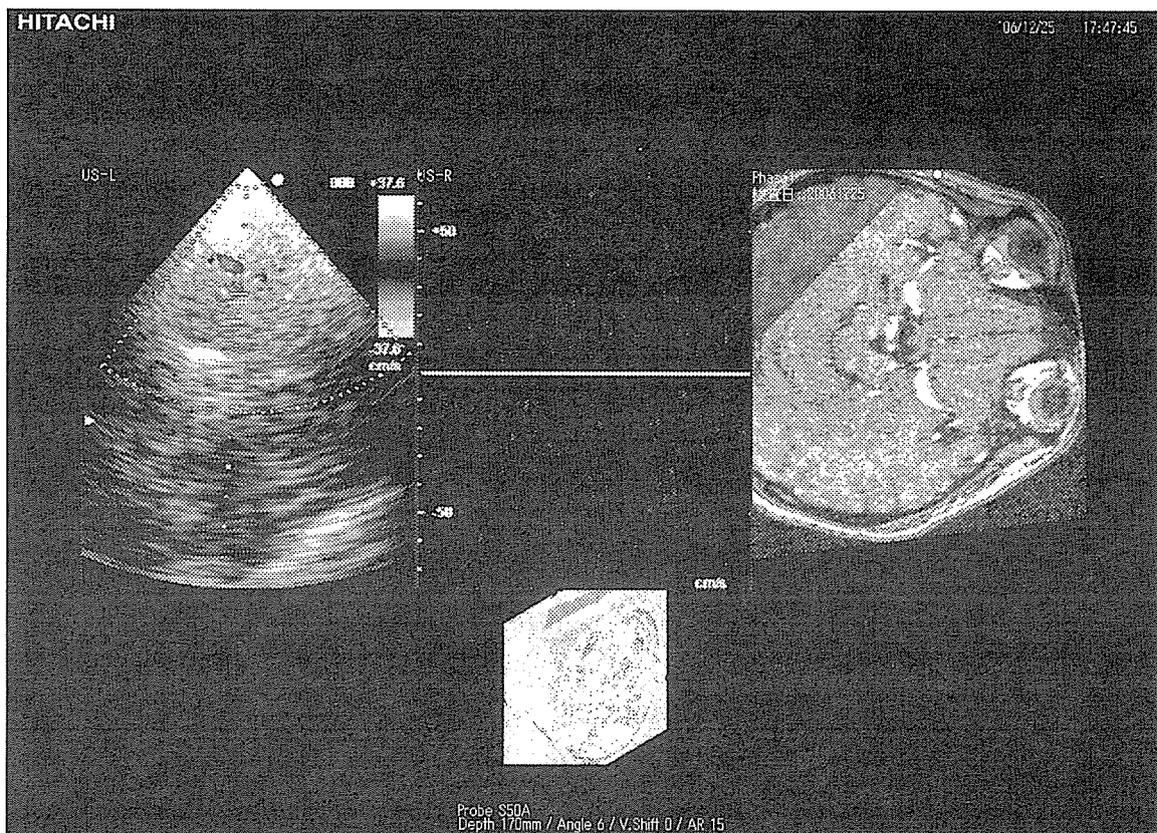


図 8. パターン 2 の結果

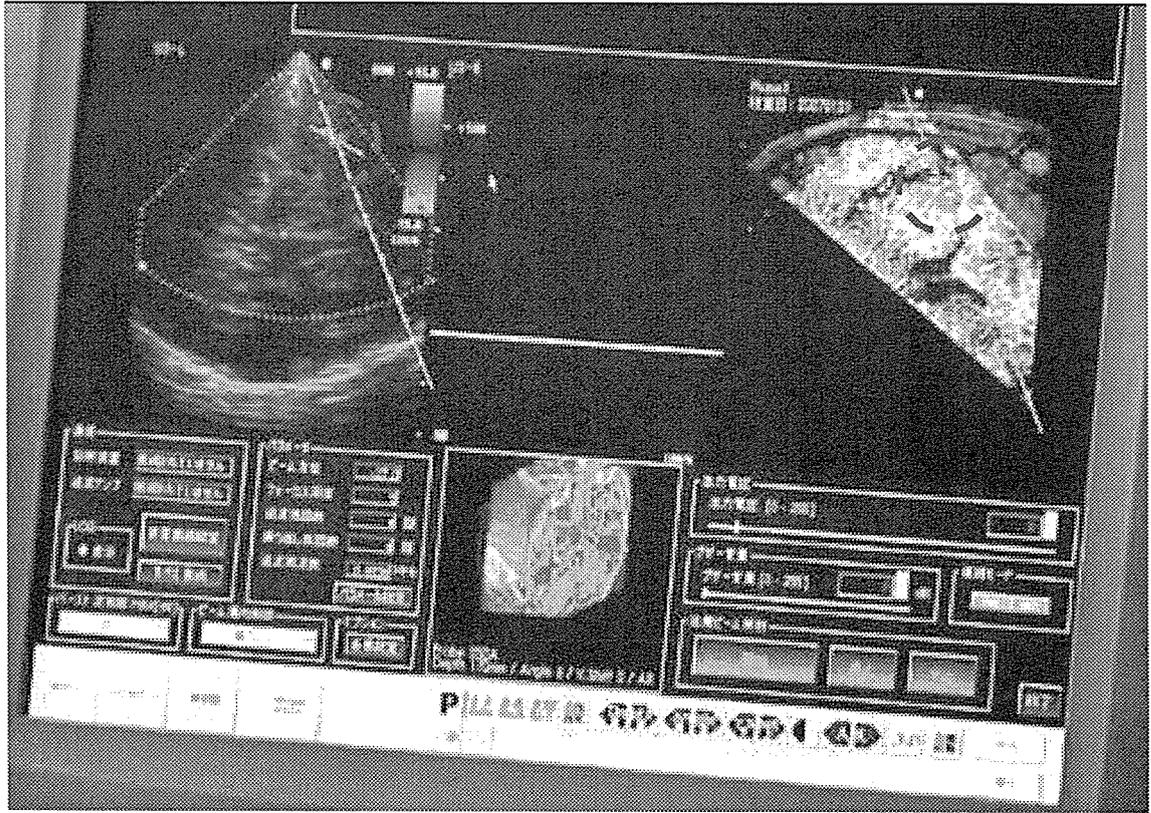


図9. 3回目の結果(誤差1mm)

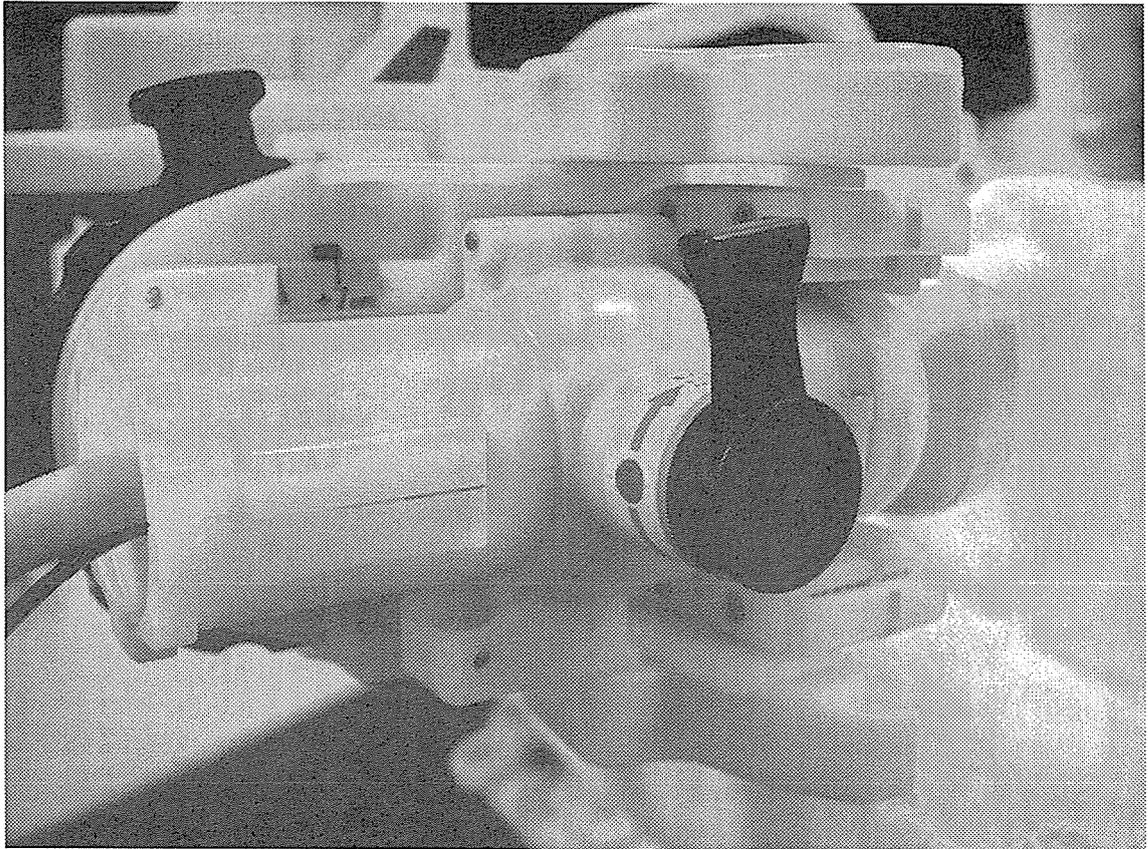


図10. Ver.18 年度 c のプローブ保持部分

	M1	M2	PCA	Number of patients
A	○	○	○	54 (M 47, F 7) / 49.1%
B total				24(M 17, F 7) / 21.8%
B-1	○	○	△	2 (M 2, F 0) / 1.8%
B-2	○	△	○	5 (M 4, F 1) / 4.5%
B-3	○	×	○	1 (M 0, F 1) / 0.9%
B-4	△	○	○	1 (M 1, F 0) / 0.9%
B-5	△	△	○	2 (M 2, F 0) / 1.8%
B-6	△	△	△	2 (M 1, F 1) / 1.8%
B-7	△	×	×	1 (M 1, F 0) / 0.9%
B-8	×	○	○	1 (M 1, F 0) / 0.9%
B-9	×	○	△	1 (M 1, F 0) / 0.9%
B-10	×	△	△	2 (M 1, F 1) / 1.8%
B-11	×	△	×	2 (M 1, F 1) / 1.8%
B-12	×	×	△	4 (M 2, F 2) / 3.6%
C	×	×	×	32 (M 11, F 21) / 29.1%

表 1. TC-CFI による頭蓋内血管描出状態

低い、本報告の対象の方が女性の比率が高いこと、若年者が少ないことが影響したと考えられ、年齢と共に特に女性での検出率が低下することを含め、概ね既報の報告と一致した結果と言える。B 群の中には超音波造影剤の使用により頭蓋内血管の描出状態が良好となる症例があると思われるが、いずれにせよ、種々の疾患の診断、治療の対象になるとされる高齢女性の検出率の低さは臨床的に解決すべき問題である。

頭蓋内血管の検出が困難な要因として、(a)測定部の骨の厚さ:超音波は骨にて減衰してしまうため、測定部の骨の厚さが厚ければ検出は困難となる。(b)年齢・性別:加齢と共に側頭骨厚は厚くなり、またその傾向は女性の方が強い 10)。(c)人種による差:白人男性 ≤ 日本人男性 ≤ 白人女性 ≤ 黒人男性 ≤ 日本人女性 ≤ 黒人女性の順に徐々に側頭

骨厚が厚くなる 7)9)。(d)流速の低下:血流速度が遅い場合、ドプラ信号は低い周波数となり、低周波数成分の処理が不良のため検出しにくくなる 11)。などの要因が考えられている。(a)(b)(c)はいずれも側頭骨の厚さが要因であり、CT の bone window で側頭骨の鱗状骨の厚さが 5mm 以上の場合 12)、また側頭骨の厚さが 2.7mm 以上でかつ性状が不均一である場合 13)、TCD での血管検出率が悪いという報告などからも、側頭骨の厚さが検出率に最も関係していると言える。

本研究においても、C 群の大部分で B モード像で対側の側頭骨や中脳の構造などがほとんど見えず、側頭骨の厚さが検出率の低い要因として最も考えられる。しかし、ある程度 B モードで頭蓋内の構造が確認できるが血流信号が検出できない例もあり、このような症例では流速の低下などの側頭骨の厚

さ以外の要因が考えられた。また、B 群の中では、片側の M2 のみが検出不能が 5 例(表 1 の B-2)、片側の PCA のみが検出可能が 4 例(表の B-12)であり、temporal window が比較的良好でも一部検出不能であったり、また非常に狭い window で一部の血管のみが検出可能であったりすることから、window に対する血管の走行なども検出率に関係する可能性が考えられた。

本研究では、TC-CFI と MRA の所見の一致度は 88.5%と良好な結果であった。両者の所見が異なった 6 例で、TC-CFI で得られた異常所見が MRA では認められなかった 4 例は、いずれも MCA あるいは PCA の狭窄を over diagnosis していた。この要因としては、血管の走行に対して角度補正が正確に行えず血流速度が高くなってしまい狭窄と判断した可能性が考えられた。逆に MRA で得られた異常所見が TC-CFI では認められなかった 2 例は、M2 の軽度狭窄、PCA の狭窄を TC-CFI で捉えることができなかつたものである。これらは MRA で比較的末梢部位に病変があり flow pattern に影響が出ず、診断に至らなかった可能性が考えられた。前者は技術的な要因と考えられる為、検者の技術の習得や経験で解決可能と考えられ、主幹動脈の末梢の軽度の病変でなければ、TC-CFI は頭蓋内血管の異常所見を MRI と同等に診断可能であり、またベッドサイドで簡便に繰り返し無侵襲に検査できるという点が MRA より優れていると思われた。

しかし、この結果はあくまでも temporal window 良好な例に限ってであり、約 30%の temporal window 不良例の存在は常に考えねばならず、特に急性期虚血性脳卒中の治療対象となる高齢者の検出率の低さは改めて我々の開発している BVS の重要性を知らしめる結果であった。

BVS の精度については、マーカ-の位置は 3 カ所の距離ができるだけ離れている方

が誤差は少なかったが、市販のスキンマーカ-に手動でプローブの位置合わせを行うと、既にこの時点で数 mm の誤差が生じる可能性があり、また検者によるばらつきも予想された。当研究班で開発したアタッチメントとマーカ-の使用により、5mm 以上から数 mm 程度の誤差に改善されたが、完全な一致はなかった。今後はこのアタッチメントの改良、マーカ-の貼付位置の検証、複数の被検者による個体差の検証などを重点に行い、その後脳梗塞患者での検証を行っていく予定である。

固定具に関しては、実際の治療の現場では、超音波の操作以外に、神経所見の診察、その他バイタルサインの測定など、種々の作業が並行して行われる為、できるだけ小型化が望まれる。この為、アームを左右に回転できる機構をなくすことにより小型化し、安定感も増す必要があると考えられた。また、本年度の試作品では全て手動よりも頭部への圧迫が弱い為、プローブをもう少し強く押し当てられるようにプローブの前後の移動距離を増やし、また、移動スピードも上げるよう今後改良していくこととした。実際の患者の中には意識障害があり、何度も治療中に動いてしまう可能性がある。この為、体動に対応するため、固定具自体をスライド式に動かせるようにしたり、BVS の併用を考慮に入れた磁場発生器を置くスペースの作成も今後の課題と考えられた。

E. 結論

TC-CFI により MRA と同等に頭蓋内の血管の狭窄・閉塞部位を捉えることが可能であり、血栓溶解の治療と血管の閉塞や再開通状態の監視を行える TCT-LoFUT システムは急性期脳梗塞の治療において非常に有効である。しかし臨床適用における最大の問題点は、治療の対象となる高齢女性における血管検出率の低さであるが、BVS により

100%このシステムによる超音波治療が可能となると考えられる。そして、BVS の独自開発のアタッチメントによる精度の向上、頭部固定具の改良により、臨床適応可能な体制がほぼ整った。

引用文献

- 1) Alexandrov AV, Moliana CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Saqqur M, Demchuk AM, Moya LA, Hill MD, Wojner AW: CLOTBUST Investigators; Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 351(21): 2170-2178, 2004.
- 2) Aaslid R, Markwalder TM, Nornes H: Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. *J. Neurosurg.* 57: 769-774, 1982.
- 3) Carlos A. Molina, Marc Ribo, Marta Rubiera, Joan Montaner, Esteban Santamarina, Raquel Delgado-Mederos, Juan F. Arenillas, Rafael Huertas, Francisco Purroy, Pilar Degado, José Alvarez-Sabín: Microbubble Administration Accelerates Clot Lysis During Continuous 2-Mhz Ultrasound Monitoring in Stroke Patients Treated With Intravenous Tissue Plasminogen Activator. *Stroke.* 37: 425-429, 2006
- 4) Ishibashi T, Akiyama M, Onoue H, Abe T, Furuhashi H: Can transcranial ultrasonication increase recanalization flow with tissue plasminogen activator? *Stroke.* 33(5): 1399-1404, 2002.
- 5) Demchuk AM, Burgin WS, Christou I, Felberg RA, Barber PA, Hill MD, Alexandrov AV: Thrombolysis in Brain Ischemia (TIBI) transcranial Doppler flow grades predict clinical severity, early recovery, and mortality in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* 32: 89-93, 2001
- 6) 伊藤泰司, 松本昌泰, 半田伸夫, 前田宏明, 鎌田武信: 経頭蓋超音波ドプラ法による内頸または中大脳動脈閉塞性病変の診断—血流検出率の検討と診断基準作成の試み—, *脳卒中* 14: 382-388, 1992
- 7) 橋本弘行, 恵谷秀紀, 中真砂士, 木下直和, 額田忠篤: 経頭蓋超音波ドプラ法の側頭骨通過性(側頭骨を介する頭蓋内主要血管血流信号検出率に関する検討—加齢及び性差の超音波側頭骨通過性に及ぼす影響—, *日本老年医学会雑誌* 29(2): 119-122, 1992.
- 8) Itoh T, Matsumoto M, Handa N, Maeda H, Hougaku H, Hashimoto H, Etani H, Tsukamoto Y, Kamada T: Rate of successful recording of blood flow signals in the middle cerebral artery using transcranial Doppler sonography. *Stroke* 24: 1192-1195, 1993.
- 9) Halsey JH: Effect of emitted power on waveform intensity in transcranial Doppler. *Stroke* 21: 1573-1578, 1990.
- 10) 皆藤美實: 日本人頭蓋骨の厚さについて, *慈医誌* 95: 503-513, 1980.
- 11) 永井秀政, 高家幹夫, 森竹浩三: 経頭蓋超音波ドプラ法の血流検出能に関する臨床的検討, *Neurosonology* 7: 18-23, 1994.
- 12) Jarquin-Valdiva AA, McCartney J, Palestrant D, Johnston SC, Gress D: The Thickness of the Temporal Squama and its Implication for Transcranial Sonography. *J Neuroimaging* 14: 139-142, 2004.
- 13) Kwon J-H, Kim JS, Kang D-W, Bae K-S, Kwon SU: The Thickness and Texture of Temporal Bone in Brain CT Predict Acoustic Window Failure of Transcranial Doppler. *J Neuroimaging* 16: 347-352, 2006.

G. 研究発表

1. 論文発表

三村秀毅, 井上聖啓, 古幡 博: 脳梗塞における頭蓋外内頸動脈と中大脳動脈の超音波による循環動態評価-Pulsatility Index の比較を中心に-, Neurosonology (掲載予定)

2. 学会発表

1) Mitsumura H., Inoue K., Furuhashi H.: Hemodynamic relationship between extracranial internal Carotid Artery and Middle Cerebral Artery in Cerebral Infarction by Ultrasound. European Society of Neurosonology and Cerebral Hemodynamics: May 2006.

2) 三村秀毅, 井上聖啓, 古幡 博: 脳梗塞における頭蓋外内頸動脈と中大脳動脈の超音波による循環動態評価-Pulsatility Index の比較を中心に-, 第 25 回日本脳神経超音波学会: May 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許申請及び予定はなかった。

2. 実用新案登録

登録申請及び予定はなかった。

3. その他

特記事項はなかった。

厚生労働科学研究費補助金(身体機能解析・補助・代替機器開発研究事業)
分担研究報告書

経頭蓋超音波血栓溶解療法に関する臨床研究

分担研究者 峰松 一夫 国立循環器病センター脳血管部門部長
研究協力者 中島 隆宏 国立循環器病センター内科脳血管部門
豊田 一則 国立循環器病センター内科脳血管部門

研究要旨

2005年10月11日、遺伝子組み換え組織型プラスミノゲンアクティベーター(recombinant tissue-type plasminogen activator, rt-PA)のアルテプラゼの発症3時間以内の脳梗塞への適応拡大が承認された。米国に遅れること約10年である。昨年我々は、承認後20週間の発症3時間以内緊急受診137例中16例(12%)に対するアルテプラゼ静注療法の使用経験について報告した。今回は、適応拡大承認より1年間に国立循環器病センター内科脳血管部門でアルテプラゼ静注療法を実施した40例について、有効性、安全性に関する評価を行った。これらは、同期間内の急性期虚血性脳血管障害入院410例の約10%に相当した。発症から治療開始までは140分(中央値)であった。患者の性別は男32例、年齢は54~94歳(中央値75歳)で、NIHSSスコアは治療開始前13点(中央値)から24時間後の8点、3週間後3点へと改善した。mRSスコア0,1の転帰良好例は3週間目15例(38%)、3ヶ月目19例(38%)と良好であった。36時間以内の症候性頭蓋内出血は2例(5%)に認められた。死亡例はなかった。以上、当センターにおけるアルテプラゼ静注療法の初期1年間の治療成績は、過去の欧米での臨床試験や市販後登録調査の結果と比較しても良好であった。しかしながら、治療例の半数以上は何らかの後遺障害を有しており、また一旦治療効果が認められた患者でも再悪化する例がみられた。

全国的な評価は、承認日から2.5年間3,000例以上の使用成績調査(全例調査)の結果を待つ必要があるが、既に承認後15ヶ月間で国内推定使用例数は約4,400例に達しているという。一方で、世界的には次世代急性期治療への模索が始まっているが、本研究班の取り組む「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置」は、最も期待されるアプローチの一つである。

A. 研究目的

過去10年間にわたり、世界の脳卒中急性期治療の現場は大きく様変わりしてきた。米国では、遺伝子組み換え組織型プラスミノゲンアクティベーター(recombinant tissue-type plasminogen activator, rt-PA)による発症3時間以内の血栓溶解療法の優れた転帰改善効果が、NINDS rt-PA Stroke Study(以下、NINDS試験)によって1995年

に報告された¹⁾。本療法は、レベルIのエビデンスに位置づけられ、翌1996年には米国で、その後2003年までにカナダ、EC諸国でも承認され、現在では世界40カ国以上で承認済みとなっている^{2,3)}。

わが国でも、承認申請を目的とした単一用量(0.6 mg/kg)のアルテプラゼを用いた多施設共同第Ⅲ相試験 Japan Alteplase Clinical Trial (J-ACT) が2002~2003年に実

施された4,5)。本試験では、約1年間で103症例にアルテプラゼが投与された。患者背景はNINDS試験のそれにほぼ一致した。安全性の主要評価項目である「発症36時間以内の症候性頭蓋内出血」は5.8%(NINDS実薬群では6.4%)、有効性の主要評価項目である「発症3ヵ月後の転帰良好例(mRSスコア0,1)の頻度」は37%(NINDS実薬群では39%)であった(図1)。いずれも、治験開始前に設定した有効性、安全性の基準値を完全にクリアしていた。

2004年5月に本療法の承認申請が行われ、1年以上にわたる審査の後、2005年10月11日に発症3時間以内の脳梗塞への適応拡大が承認された。承認直後に、日本脳卒中学会より「適正治療指針」が公表され6)、10月～翌年3月にかけて全国各都道府県で指針講習会がのべ148回実施され、受講者総数は8,32名と、国内では空前絶後の事態となった。

本研究の目的は、アルテプラゼ静注療法の市販後1年間の当施設における治療成績を検討し、将来に計画されている経頭蓋超音波脳血栓溶解療法に向けて、解決すべき臨床的課題を明らかにすることである。

B. 研究方法

承認後1年間(平成17年10月11日～平成18年10月10日)に当センター内科脳血管部門を発症3時間以内に緊急受診した脳血管障害またはその疑い例の内訳、同じく発症3時間以内に緊急受診した脳梗塞例におけるアルテプラゼ静注療法の実施率、非実施例の内容等を分析した。

次いで、アルテプラゼ静注療法を実施した40例のアルテプラゼ静注までの時間経過、臨床像、治療成績を分析した。

(倫理面への配慮)本研究は特定の患者の治療を前提とせずに、ある疾病の治療方

法等を検討するため、研究者等が所属する医療機関内の当該疾病を有する患者の診療録等診療情報を収集・集計し、各患者の個人情報匿名化した上で、分析加工された結果のみを報告する行為である。これは、疫学研究に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省)、臨床研究に関する倫理指針(厚生労働省)の対象外である。

C. 研究結果

国立循環器病センター内科脳血管部門における承認後1年間の発症3時間以内緊急受診は285例であった。うち脳梗塞は132例(46%)と最も高頻度で、次いで脳出血(30%)、てんかんの順であった。アルテプラゼ静注療法は40例(14%)に実施された。これは、同一期間中の発症7日以内入院脳梗塞(410例)の約10%に相当した(図2)。アルテプラゼ静注療法が行われなかった脳梗塞のうち軽症、軽症化を理由とするものが53%と最も多く、次いで小脳広汎梗塞や3ヵ月以内の脳梗塞既往などの禁忌事項該当例の順であった。

アルテプラゼ静注療法を実施した全40例の発症から病院到着までの時間(中央値)は58分(20～115分)で、病院到着から治療開始までは77分(50～139分)であった。その結果、発症から治療開始までは140分(90～175分)であった。

40例の患者の年齢は54～94(中央値75)歳であった。神経学的重症度を表すNIHSSスコアは、治療開始前の4～26(中央値13)点から24時間後の0～24(中央値8)点、3週間後の0～25点(中央値3)良好例は、3週間後15例(38%)、3ヵ月後点へと改善した。mRSスコア0,1の転帰19例(48%)と極めて良好であった。3ヶ月以内の死亡例は皆無であった。36時間以内の症候性頭蓋内出血は2例にのみ認められた(図3)。

一方、治療前の血管閉塞部位が内頸動

図1 わが国のt-PA静注血栓溶解療法 Japan Alteplase Clinical Trial, J-ACT

- ✓ 103例 (22施設)を登録
- ✓ t-PA治療群のみのオープン試験
- ✓ 投与量0.6 mg/kg B.W.: 欧米の2/3
- ✓ 心原性脳塞栓症が多い (78%)>NINDS (45%)

3Mo後のmRS	0-1:障害なし	2-3:軽~中等度	4-5:高度障害	死亡
NINDS 偽薬	26	25	27	21
NINDS t-PA	39	21	23	17
J-ACT	37	20	33	10

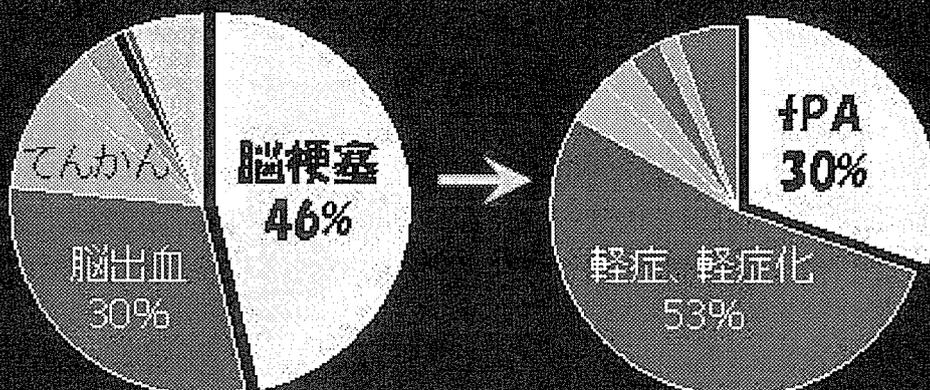
Yamaguchi T, Mori E, Minematsu K, et al for
the J-ACT Group:
Stroke 2006;37:1810-5

Cerebrovascular Division
National Cardiovascular Center



図2 IV-tPAの割合 '05/10/11~'06/10/10

- ✓ 発症<3hの緊急受診285例中 132例(46%)が脳梗塞
- ✓ 脳梗塞132例中40例 (30%)にtPA治療

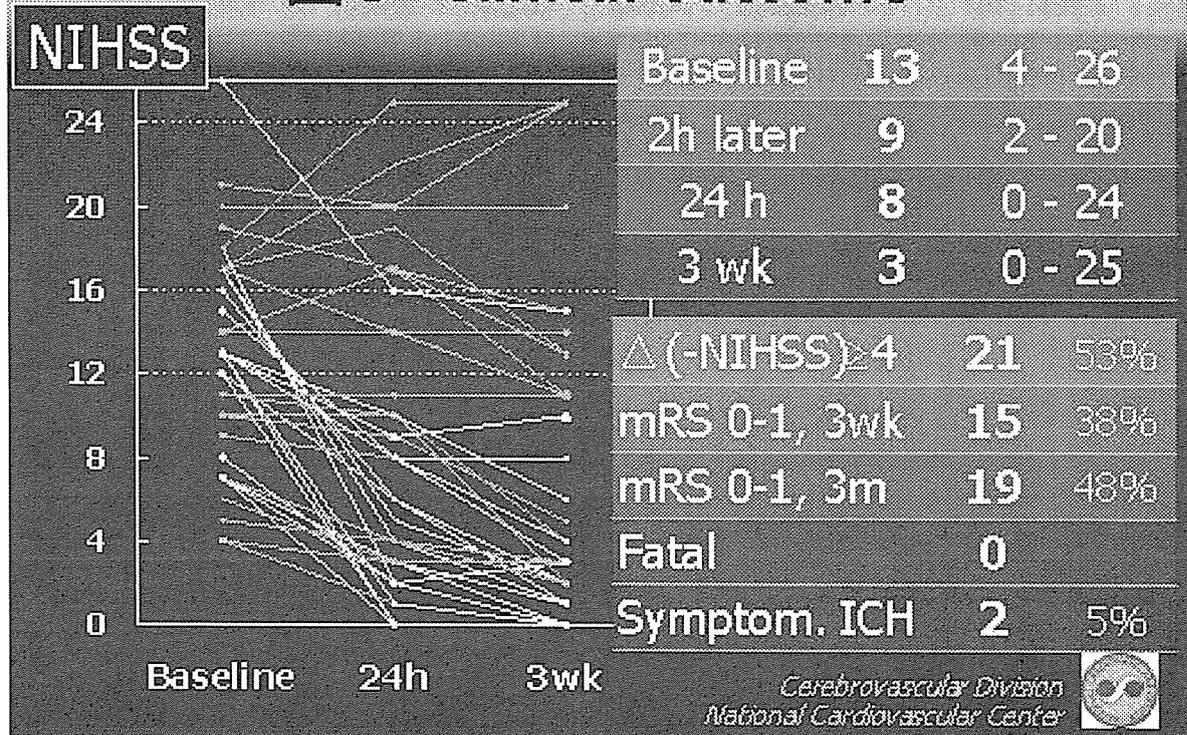


発症7日以内の脳梗塞410例の10%にtPA

Cerebrovascular Division
National Cardiovascular Center



図3 Clinical outcome



脈であった7例中2例のみ(28%)、心原性脳梗塞以外の病型8例中2例(25%)のみが、3ヵ月後の mRS スコア 0,1 と転帰良好であった。すなわち、これらの症例に対するアルテプラゼ静注療法の効果は必ずしも十分ではないと判断された。

D. 考察

適応拡大承認後1年間の当センターにおけるアルテプラゼ治療実施率は、3時間以内受診例の14%、発症7日以内入院の脳梗塞症例の10%で、欧米での平均的実施率(脳梗塞の3~5%)よりかなり高率であった。これは、救急隊とのホットライン体制を承認以前より構築していたこと、治験(J-ACT)参加や局所血栓溶解療法に関する医師主導型臨床試験 MELT-Japan 参加などにより、超急性期血栓溶解療法に関する十分な経験があったこと、承認時に院内体制の再構築を図ったこと、当センターを中心として適正

治療指針(日本脳卒中学会)が作成されたこと、承認後2度にわたる救急隊員向け講習会を開催したことなどが理由と思われる。

発症から治療開始までの時間は中央値で140分と比較的早かった。しかしながら、病院到着から治療開始までは中央値で77分、最長139分を要した。米国のガイドラインは、病院到着後60分以内の治療開始を目標とすることを勧告しており、最近では45分以内という目標が掲げられている。改善すべき点は少なくないと思われる。

治療成績はかなり良好であった。発症後3ヶ月目での転帰良好例(mRS スコア 0~1)が48%に達したことは、NINDSやJ-ACTのデータ(発症後3ヵ月での転帰良好例が37~39%)と比べ、勝るとも劣らないものである。一方で、内頸動脈閉塞や心原性脳塞栓症以外の病型に対する本療法の効果は必ずしも満足できるものではなかった。前者では血栓の総体積が大きく、また側副血行が不十分

なことが多いこと等が原因と考えられた。後者は、動脈硬化性病変に対する本療法の限界を意味するものと思われる。0.6 mg/kg という世界標準用量の2/3の用量の妥当性や、何らかの追加治療の必要性を検討すべきかもしれない。

本薬の適応拡大承認にあたって、幾つかの条件が課せられた。そのうちの一つに、「効能追加の承認日から2.5年間(登録期間は2年間、調査期間には3ヶ月後の機能予後調査を含む)、3,000例以上の使用成績調査(全例調査)」がある。平成17年10月11日～19年1月10日までの15ヶ月間の国内推定使用例数は約4,400例と報告されており、最終的には6,000例を越える使用成績調査結果がまとまるものと思われる。また、本療法による血管再開通率を検討する市販後臨床試験J-ACT IIも開始された。本薬のわが国の医療現場における意義は、数年以内にかなり明確になるであろう。

わが国ではrt-PA静注療法の臨床応用が始まったばかりであるが、世界的には次世代急性期治療への模索が始まっている。経頭蓋超音波照射の併用、次世代rt-PA製剤と先進画像診断法とを組み合わせた発症3～9時間目の血栓溶解薬静注療法、マイクロカテーテルを用いたrt-PA局所動注療法、薬剤を用いない機械的血行再開療法などの試みがこれに該当し、一部では有望な成績も報告され始めている⁷⁾。本研究班が取り組んでいる経頭蓋超音波脳血栓溶解装置は、最も期待されるアプローチの一つである。

E. 結論

わが国におけるアルテプラゼ静注療法承認後1年間の時点での国立循環器病センターでの治療実施例40例の治療成績は極めて良好であった。

引用文献

- 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* 1995; 333:1581-1587.
- 2) Adams H, Adams R, del Zoppo G, et al: Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke. 2005 guidelines update. A scientific statement from the Stroke Council of the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 36: 916-923 2005.
- 3) Hacke W, Kaste M, Bogousslavsky J, et al: European Stroke Initiative Recommendations for Stroke Management-update 2003. *Cerebrovasc Dis.* 16: 311-337 2003.
- 4) 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(アルテプラゼ)静注療法臨床試験の結果, *脳卒中* 26: 603-606 2004.
- 5) Yamaguchi T, Mori E, Minematsu K, et al: Alteplase at 0.6 mg/kg for acute ischemic stroke within 3 hours of onset: Japan Alteplase Clinical Trial. *Stroke* 37: 1810-1815 2006.
- 6) 日本脳卒中学会医療向上・社会保険委員会 rt-PA(アルテプラゼ)静注療法指針部会: rt-PA(アルテプラゼ)静注療法適正治療指針 2005年10月. *脳卒中* 27: 327-354 2005.
- 7) 峰松一夫: 臨床医学の展望 2007-診断および治療上の進歩-: 神経病学-血管系を中心に- *日医新報* No.4322: 53-58 2007.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi T, Mori E, Minematsu K, et al: Alteplase at 0.6 mg/kg for acute ischemic stroke within 3 hours of onset:

Japan Alteplase Clinical Trial. Stroke 37: 1810-1815 2006.

2) Minematsu K: Recent advance in acute stroke management. International

3) Congress Series, 1290: 25-29 2006

4) 佐藤祥一郎, 高田達郎, 豊田一則, 峰松一夫: CTではなく、MRIで硬膜下血腫を診断しアルテプラゼ静注療法を断念した1例. 脳卒中 28: 408-410 2006.

5) 高田達郎, 永野恵子, 成富博章, 峰松一夫: 中大脳動脈塞栓症に対する局所線溶療法における経時的NIHSSおよびJSS評価の意義. 脳卒中 28: 367-372 2006.

6) 中島隆宏, 豊田一則, 峰松一夫: 発症3時間以内の来院患者への救急対応の現状: 脳梗塞アルテプラゼ静注療法に備えて. 脳卒中 28: 658-660 2006.

2. 学会発表

1) Minematsu K: Alteplase therapy for acute ischemic stroke in Japan: One-year experience after the marketing. 3rd Japanese-Korean Joint Stroke Conference, Jeju, Korea, Nov. 25-26 2006

2) Minematsu K: Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke in Japan. Tiantan International Stroke Conference 2006, Beijing International Convention Center, Beijing, china, June 16-18 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許申請および予定はなかった。

2. 実用新案登録

登録申請および予定はなかった。

3. その他

特記事項はなかった。

厚生労働科学研究費補助金(身体機能解析・補助・代替機器開発研究事業)
分担研究報告書

脳血管障害モデル動物における音響学的安全性の神経病理学的検討

分担研究者 福田 隆浩 東京慈恵会医科大学神経病理学講座講師
研究協力者 水野 聡子 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター
ME 研究室助手 東京女子医科大学神経内科助手
小島 依子 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター
ME 研究室
日向 真子 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

今回、高血圧に伴う脳血管障害疾患のよい病態モデルである脳卒中易発性高血圧ラット(Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat, SHRSP)における低周波数超音波照射の安全限界を、病理組織学的に明らかにした。対象とした SHRSP および Wistar rat に種々の条件の低周波数超音波を照射し組織学的に検索した。皮質壊死が SHRSP の周波数 500kHz、強度 1.5 W/cm² 群と周波数 268kHz、強度 34-42W/cm² 群の超音波照射部位直下の脳皮質に存在。一方、Wistar rat には組織学的変化を認めず、低周波数超音波照射による SHRSP ラットの易傷害性が明らかとなった。Heat shock protein 70 (hsp70)陽性細胞が、SHRSP の周波数 500kHz、強度 0.72 W/cm² 群 4.5%、周波数 500kHz、強度 1.0 W/cm² 群 8.0%、周波数 500kHz、強度 1.5 W/cm² 群 14.3%、周波数 297kHz、強度 0.7 W/cm² 群 13.0%、周波数 268kHz、強度 34-42 W/cm² 群 52.6%の症例に存在。強度が低ければ、中枢神経系組織への低周波数超音波の影響は低いことが示唆された。

A. 研究目的

急性虚血性脳血管障害の治療の最終目標は閉塞血管の再開通である。組換え組織プラスミノゲンアクチベーター(rtPA)は有用であるが、効果は緩やかで再開通は不完全であり、副作用としての出血がある^{1 2 3 4}。また、使用できる症例は、発症から3時間以内という制限があり、自ずと適応症例数が少なくなる。それ故、rtPA の使用制限を改善させ、副作用の発症を押さえる補助的付加治療が必要とされている。超音波療法は、全身性の出血危険度が低く、照射部位に効果特異的であることから、補助的付加治療法とし

て近年注目されている。しかし、高周波超音波(2Mhz)では血栓融解効果は不十分であり、低周波数超音波(1Mhz 未満)の経頭蓋照射では、頭蓋内出血や局所温度上昇、直接的組織障害などの問題が指摘されている^{5 6}。これら低周波数超音波を用いた t-PA 併用脳血栓溶解法の医学生物学的危険因子の一つとして、脳梗塞症例が一般には中高年で、その脳血管系が動脈硬化等により脆弱化している可能性が考えられる。今回対象とする、脳卒中易発性高血圧ラット(Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat, SHRSP)は、高血圧に伴う脳血管障害

疾患のよい病態モデルとして使用されている。本研究の目的は、そのような病的原因や加齢に伴って動脈硬化が進行した脳における超音波照射に対する安全限界を、病理組織学的評価を持って明らかにすることである。特に、タンパク質分子が正しいフォールディングをして機能を獲得するのを助ける分子シャペロンである熱ショックタンパク質 (heat shock protein: hsp)の動態を、経頭蓋超音波照射脳において免疫組織化学的に検索し、細胞レベルでの低周波数超音波照射による中枢神経系へ与える影響を評価した。

B. 対象と方法

SHRSP(雄、20-25 週齢)および Wistar rat (W、雄、20-25 週齢)を対象とした。超音波条件は、正常対照群を US000 群(SHRSP 29 頭、W 6 頭)とし、周波数 500kHz, 強度 0.5W/cm², continuous wave (CW)、照射時間 60 分を US050 群(SHRSP 33 頭、W 10 頭)、周波数 500kHz, 強度 0.72W/cm², CW、照射時間

60 分を US072 群(SHRSP 40 頭)、周波数 500kHz, 強度 1.0W/cm², CW、照射時間 60 分を US100 群(SHRSP 34 頭)、周波数 500kHz, 強度 1.5W/cm², CW、照射時間 60 分を US150 群(SHRSP 38 頭、W 11 頭)、周波数 297kHz, 強度 0.7W/cm² (MI=0.3)、バースト波 (5% duty cycle, 100Hz PRF) 90 分を TRUMBI 1 群(SHRSP 53 頭、W 16 頭)、周波数 268kHz, 強度 34-42W/cm² (MI=2.0), バースト波(10% duty cycle, 100Hz PRF) 60 分を TRUMBI 2 群(SHRSP 23 頭、W 19 頭)とした (Table 1)。エーテル麻酔下、ラット右側頭蓋

に照射 24 時間後に麻酔下経心的 4%パラフォルムアルデヒド(PFA)灌流固定を行い、脳を摘出した。4%PFAにて後固定し、パラフィン包埋後、3 μm 厚の組織切片において組織学的検索を行った。脳梗塞および脳出血の部位および性状を観察し、各超音波条件群の比較を行う。また、一次抗体 (4°C、12 時間)として、α B-crystallin (X1000, clone: 1B6.1-3G4, Stressgen, BC, Canada), hsp27 (X500, clone: G3.1, Stressgen, BC, Canada), hsp32 (X500, Stressgen, BC, Canada), hsp40 (X1000, Stressgen, BC, Canada), hsp60 (X1000, clone: LK-1, Stressgen, BC, Canada), hsp70 (X1000, clone: C92F3A-5, Stressgen, BC, Canada), hsp90 (X1000, clone: 16F1, Stressgen, BC, Canada)に対する抗体および抗 cox-2 抗体 (X1000, Alexis Biochemicals, CA, USA)、抗 Glut1 抗体(X1000, Chemicon International Inc, CA, USA) を用い、二次抗体 (室温、1 時間)には biotinylated anti-mouse IgG antibody (X500, vector lab. CA, USA), biotinylated anti-rabbit IgG antibody (X500, vector lab. CA, USA), biotinylated anti-rat IgG antibody (X500, vector lab. CA, USA) を使用し、ABC 法 (X500, 室温、1 時間、ABC elete: vector lab. CA, USA)による免疫組織化学染色を行い、病変を観察・比較検討した。抗原賦活法として、0.01M クエン酸バッファーにおけるオートクレーブ処理(121°C、10 分)を行った。陰性コントロールとして、一次抗体を 5%ウシ血清アルブミン、0.01%Tween20、0.01M リン酸バッファー(pH7.4)に置き換え、免疫組織化学染色を行った。

Table1

Group	周波数	duty cycle	PRF	Isp _{ppa} (W/cm ²)	Isp _{pta} (W/cm ²)	time	Wave	頭数		皮質壊死発現例		hsp70陽性細胞出現例	
								SHR	W	SHR	W	SHR	W
US000	500kHz	100%		0	0	60min	Continuous	29	6	0/29(0%)	0/5(0%)	0/26(0%)	0/5(0%)
US050	500kHz	100%		0.13	0.13	60min	Continuous	33	10	0/33(0%)	0/10(0%)	0/25(0%)	0/10(0%)
US072	500kHz	100%				60min	Continuous	37	-	0/37(0%)	-	1/22(5%)	-
US100	500kHz	100%				60min	Continuous	34	-	0/34(0%)	-	2/25(8%)	-
US150	500kHz	100%				60min	Continuous	38	9	2/38(5%)	0/9(0%)	3/21(14%)	0/9(0%)
TRUMBI1	268kHz	5%	100Hz	2.8	0.14	90min	Burst	58	11	0/58(0%)	0/11(0%)	6/46(13%)	0/11(0%)
TRUMBI2	268kHz	10%	100Hz	1.4	0.14	60min	Burst	20	19	8/20(40%)	0/19(0%)	10/19(53%)	0/12(0%)

C. 研究結果

SHRSP ラットの脳梗塞発症率は週齢 20 (n=28) 71.4%、週齢 21 (n=25) 76.0%、週齢 22 (n=26) 69.2%、週齢 23 (n=24) 66.7%、週齢 24 (n=45) 64.4%、週齢 25 (n=44) 61.4%、脳出血発症率は週齢 20 (n=28) 53.6%、週齢 21 (n=25) 76.0%、週齢 22 (n=26) 65.2%、週齢 23 (n=24) 58.3%、週齢 24 (n=45) 55.6%、週齢 25 (n=44) 54.5%と週齢による有意差はなかった。

梗塞の発症頻度は右大脳半球で 56.2%、左大脳半球で 61.0%、出血に関しても右大脳半球で 44.6%、左大脳半球で 51.0%と有意差はなかった。各群において出血の頻度を比較すると、US050 群にて右大脳半球の 81.8%で、左大脳半球の 57.6%と比較し高かった。US050 群では、梗塞発症率が右大脳半球 84.8%と左大脳半球 72.7%であり、他の群のそれらは右大脳半球 55.8% (29-100%)と左大脳半球 61.2% (43-85%)に比べ高かった。皮質壊死(Fig. 1)が US150 群の 38 例中 2 例 (5.3%)、TRUMBI2 群の 20 例中 8 例 (40%)に

存在した。いずれも右大脳半球皮質表層に浮腫・染色性低下・出血・好中球浸潤を組織学的に認めた。免疫組織化学的には、皮質壊死と正常組織との境界領域に、hsp70 (Fig. 2)および hsp40 陽性の神経細胞、星状膠細胞、ミクログリアが存在した。皮質壊死のない症例にも hsp70 陽性細胞は存在し、その局在は、右大脳半球皮質浅層の神経細胞、星状膠細胞、ミクログリアに認められた。各群において hsp70 陽性細胞症例数を比較すると、US000 群 26 例中 0 例 (0%)、US050 群 25 例中 0 例 (0%)、US072 群 22 例中 1 例 (4.5%)、US100 群 25 例中 2 例 (8.0%)、US150 群 21 例中 3 例 (14.3%)、TRUMBI1 群 46 例中 6 例 (13.0%)、TRUMBI2 群 19 例中 10 例 (52.6%)であった。

α B-crystallin, hsp27, hsp32, hsp60, hsp90 に対する抗体および抗 cox-2 抗体、抗 Glut1 抗体による免疫組織化学的検索では、各群において差を認めなかった。

Wistar ラット群では、いずれの超音波条件でも、組織学的変化を認めなかった。

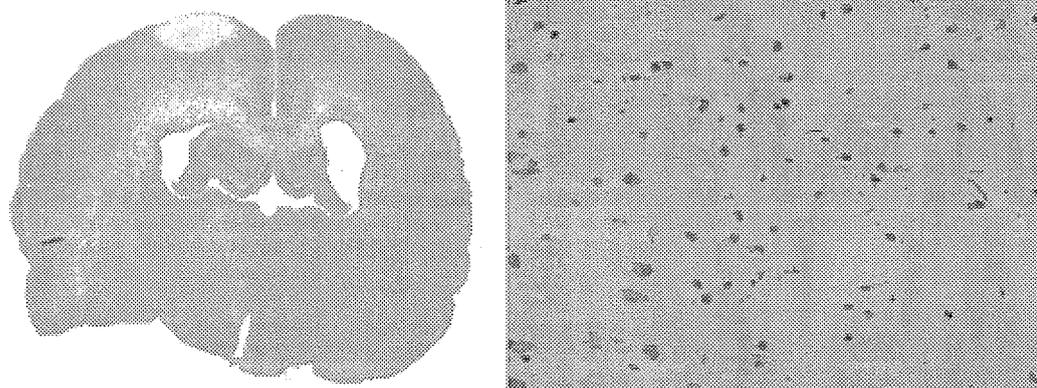


Fig. 1 TRUMBI 2 群に認められた右大脳半球表層の皮質壊死。左の HE 染色では染色性が低下し、腫大している。右の光顕像では細胞周囲腔の広大と浮腫・染色性低下・出血・好中球浸潤を認めた。

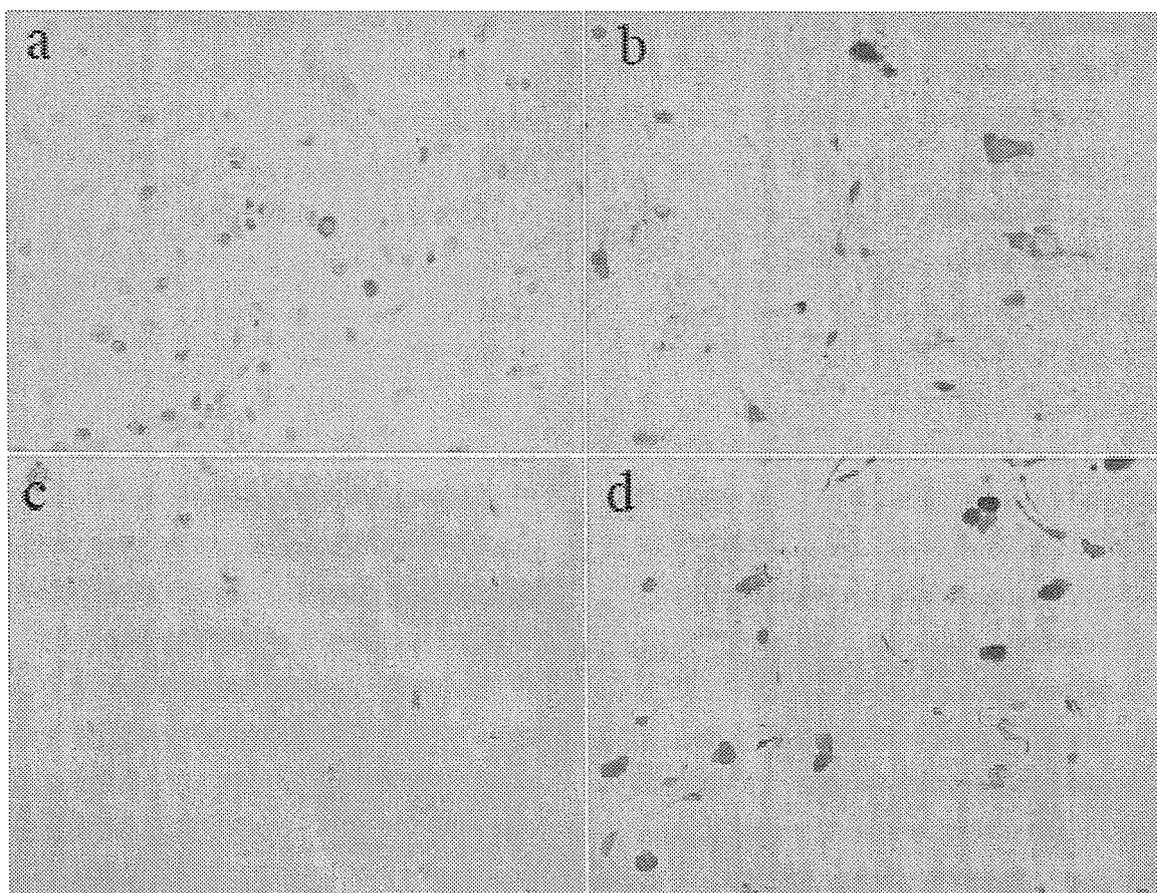


Fig. 2 TRUMBI 2 群(b)では皮質壊死と正常組織との境界領域に、heat shock protein 70 (hsp70)要請の神経細胞、星状膠細胞、ミクログリアが多数存在した。TRUMBI 1 群(c)および US 150 群(b)では、皮質壊死の存在はないものの、hsp70 陽性細胞は存在し、その局在は、右大脳半球皮質浅層の神経細胞、星状膠細胞、ミクログリアに認められた。US 072 群(a)では極少数の hsp70 陽性細胞を認めた。Hsp70 免疫染色(×1000)。

D. 考察

SHRSP は週齢 25 週以上であれば、ほぼ全例が脳梗塞あるいは脳出血などの脳血管障害を発症し、寿命がほぼ 40 週齢と短命なラット種である 7-9。今回対象とした SHRSP20 週齢群、21 週齢群、22 週齢群、23 週齢群、24 週齢群、25 週齢群の間に、脳梗塞発症率の有意な差は認められず、また、梗塞および出血の発症頻度は右大脳半球と左大脳半球で有意差はなかった。20-25 週齢においては、週齢の差による脳血管障害

の発生率の差を考慮する必要がないことを示している。

超音波条件を変えた各群において出血の頻度を比較すると、US050 群にて右大脳半球に有意に出血が多かった理由の詳細は不明であるが、この群は他の群と比較し梗塞発症率が高く、また、梗塞が存在すれば梗塞内出血の合併が多いことが影響している可能性がある。

強度が 0.5~数 W/cm² の低周波数超音波照射により酵素的血栓融解を亢進させること

が知られている。また、超音波は、rtPA の効果を最大 20%増加させ、再開通率を 30%から 90%に増加させる。ラット塞栓モデルでは、rtPA のみの治療法に比べ 0.6W/cm² の低周波数超音波併用により梗塞範囲を減少させることが報告されている⁶。補助的付加治療法として低周波数超音波照射が近年注目されている所以である。一方、副作用に関しては、強度が 1W/cm² までの超音波照射では、脳内出血や細胞障害、血管脳関門障害などの副作用は無いと考えられていたが¹⁰、その後、経頭蓋低周波(20kHz、持続波、20 分、強度 0.5-2.6W/cm²)照射により Wistar ラット脳に浮腫を、経頭蓋低周波(20kHz、持続波、20 分、強度 1.1-2.6W/cm²)照射により Wistar ラット脳に脳

実質壊死を引き起こすことが報告された¹¹。今回の我々の結果では、皮質壊死が SHRSP の US150 群と TRUMBI2 群の超音波照射部位直下の脳皮質に存在した。一方、Wistar ラットには組織学的変化を認めず、低周波数超音波照射による SHRSP ラットの易傷害性が明らかとなった。SHRSP ラットでは、高血圧による血管障害性中枢神経病変が存在することから、超音波照射による影響を受けやすいことが示唆される。ここで注目すべきは、皮質壊死が出現した群は周波数 268kHz、強度 34-42W/cm² (MI=2.0)、バースト波(10% duty cycle, 100Hz PRF) 60 分を TRUMBI 2 群と周波数 500kHz、強度 1.5W/cm²、CW、照射時間 60 分を US150 群であり、mechanical index の低い、US050、US072、US100、TRUMBI 1 群には出現していない点である。これは、同じ低周波でも、条件の異なる超音波照射により、効果・副作用の程度が異なることを示している。そこで我々は、超音波の中枢神経系への影響をより詳細に判定するために分子シャペロンである hsp に注目した。hsp の中で、分子量 70 ~80kD のグループを総称して hsp70 と呼ぶ。

細胞の細胞質と核に存在するこれら分子シャペロンは、hsp40 と協同で、虚血、炎症などの細胞 stress 下での変性蛋白の凝集を防ぐと共にサイトカインの生合成などにも関係している。また、蛋白質生合成や、細胞内各オルガネラへの蛋白質輸送、エンドサイトーシス、アポトーシス抑制においても重要な役割を持っている¹²。通常、hsp70 は中枢神経系には免疫組織化学的に同定はされないが、今回、低周波数超音波照射 24 時間後の検索において、照射部位直下の脳皮質に hsp70 陽性細胞が存在する症例が存在した。皮質壊死の存在する症例では、皮質壊死と実質との境界部分に多数の hsp70 陽性細胞が存在し、一般組織学的検索では明らかな異常を認めていない症例においても、脳皮質浅層に hsp70 陽性細胞が存在した。これは、低周波数超音波により、中枢神経系の細胞に何かしらのストレスが加わっていることを示している。これまでの報告では、細胞壊死やアポトーシスを低周波数超音波の影響の指標としていたが¹⁰、¹¹、hsp70 の検索により、壊死やアポトーシスに至る前段階での細胞への影響の有無を知ることが出来る。今回の結果では、hsp70 陽性細胞が、US072 群 4.5%、US100 群 8.0%、US150 群 14.3%、TRUMBI1 群 13.0%、TRUMBI2 群 52.6% の SHRSP 症例に存在した。US072 群、US100 群では、脳皮質浅層に少数の hsp70 陽性細胞が存在し、US150 群、TRUMBI1 群そして TRUMBI2 群の順に、hsp70 陽性細胞数が増加し、広範囲に分布した。これらのことから、低周波数超音波において、その強度と hsp70 陽性細胞出現との間に相関があることが示唆された。したがって、低周波数超音波において、強度が低ければ、中枢神経系への障害は低いことが予想される。

出血や浮腫、細胞壊死などの副作用により、rtPA の付加的治療法としての低周波数

超音波照射療法が危惧されているが、今回の研究により、条件を選択すれば、低周波数超音波照射による副作用の出現をコントロールできることが判明した。今後、副作用無しで rtPA の血栓融解効果を増強させる低周波数超音波照射条件を設定していくことが必要である。

E. 結論

高血圧による血管障害性中枢神経病変が存在する SHRSP ラットでは、超音波照射による影響を受けやすく、hsp70 免疫組織化学的検索が、照射24時間後の超音波障害の指標として有用である。

低周波数超音波において、強度が低ければ、中枢神経系への障害は低いことを明らかとした。

引用文献

- 1) Topcuoglu MA, Saka E, Onal MZ.: Hyperoxia potentiated sonothrombolysis as a method of acute ischemic stroke therapy. *Med Hypotheses*. 66: 59-65 2006.
- 2) Stroick M, Alonso A, Fatar M et al.: Effects of simultaneous application of ultrasound and microbubbles on intracerebral hemorrhage in an animal model. *Ultrasound Med Biol*. 32: 1377-1382 2006.
- 3) Reinhard M, Hetzel A, Kruger S et al.: Blood-brain barrier disruption by low-frequency ultrasound. *Stroke*. 37: 1546-1548 2006.
- 4) Fatar M, Stroick M, Griebel M et al.: Brain temperature during 340-kHz pulsed ultrasound insonation: a safety study for sonothrombolysis. *Stroke*. 37: 1883-1887 2006.
- 5) Eggers J. Acute stroke: therapeutic transcranial color duplex sonography. *Front Neurol Neurosci*. 21: 162-170 2006.

6) Daffertshofer M, Hennerici MG.: Sonothrombolysis: experimental evidence. *Front Neurol Neurosci*. 21: 140-149 2006.

7) Ikeda K, Nara Y, Matumoto C et al.: The region responsible for stroke on chromosome 4 in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 229: 658-662 1996.

8) Yamasaki Y, Yamamoto Y, Senga Y et al.: Decreased cerebral metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) with stroke and its possible improvement by Solcoseryl. *Clin Exp Hypertens A*. 13: 1051-1057 1991.

9) Yamori Y, Horie R, Akiguchi I et al.: Symptomatological classification in the development of stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 46: 274-283 1982.

10) Daffertshofer M, Fatar M.: Therapeutic ultrasound in ischemic stroke treatment: experimental evidence. *Eur J Ultrasound*. 16: 121-130 2002.

11) Schneider F, Gerriets T, Walberer M et al.: Brain edema and intracerebral necrosis caused by transcranial low-frequency 20-kHz ultrasound: a safety study in rats. *Stroke*. 37: 1301-1306 2006.

12) Terada K, Mori M. [Cellular functions of cytosolic Hsp70]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 49: 841-846 2004.

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukuda T, Arai T, Nikaido T, Joki T, Ikeuchi S, Kato M, Kawakami M, Abe T.: A case of chordoid meningioma with allelic loss of 1p36. *Jikeikai Med. J*. 53(1): 37-44 2006.

2) Fukumitsu N, Suzuki M, Fukuda T,

Kiyono Y, Kajiyama S, Saji H.: Reduced 125I-meta-iodobenzylguanidine uptake and norepinephrine transporter density in the hearts of mice with MPTP-induced parkinsonism. Nucl Med Biol. 33: 37-42 2006.

3) Sato S, Chiba T, Nishiyama S, Kakiuchi T, Tsukada H, Hatano T, Fukuda T, Yasoshima Y, Kai N, Kobayashi K, Mizuno Y, Tanaka K, and Hattori N.: Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by in vivo autoradiography. J Neurosci. Res. 84(6): 1350-1357 2006.

4) Kanai H, Marushima H, Kimura N, Iwaki T, Saito M, Maehashi H, Shimizu K, Muto M, Masaki T, Ohkawa K, Yokoyama K, Nakayama M, Harada T, Hano H, Hataba Y, Fukuda T, Nakamura M, Totsuka N, Ishikawa S, Unemura Y, Ishii Y, Yanaga K, Matsuura T.: Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic encephalopathy. Artificial Organs. 2: 148-151 2007.

2. 学会発表

学会発表はなかった。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許申請および予定はなかった。

2. 実用新案登録

登録申請および予定はなかった。

3. その他

特記事項はなかった。