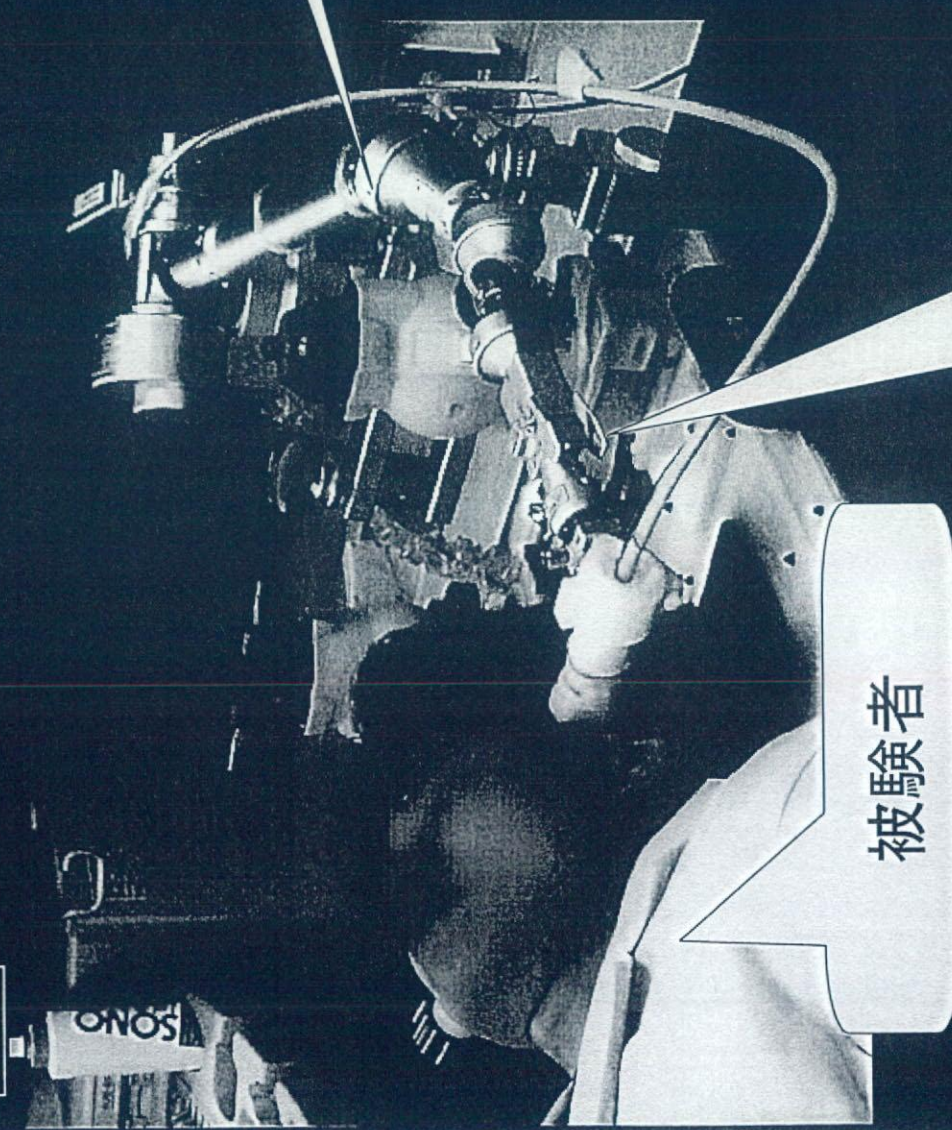


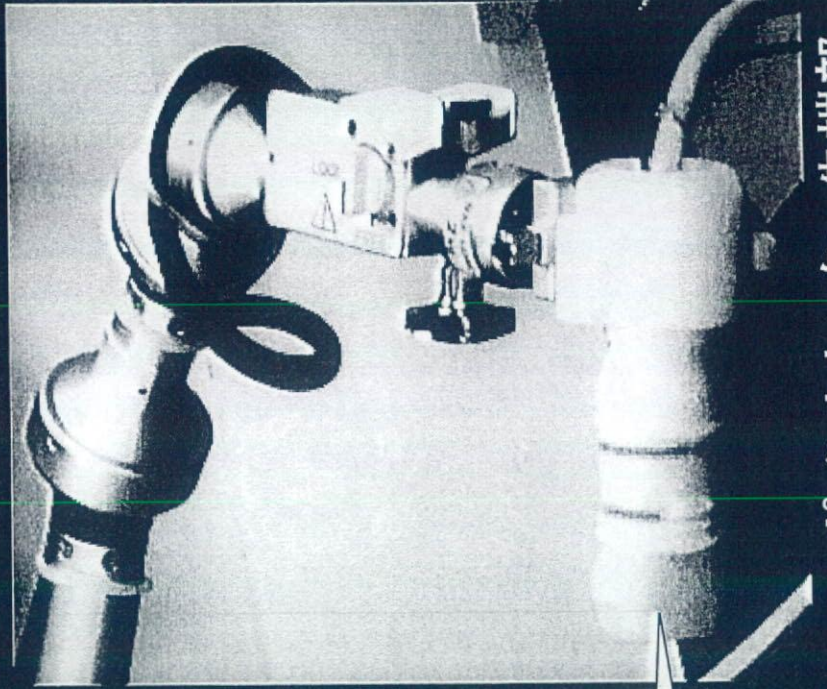
固定具の改良と新提案

図7



被験者

ポイントセッター



ポイントセッター先端部

治療診断複合
プローブ

図8

霊長類(Cynomolgus)急性脳梗塞モデルによる 安全性試験結果1 (US併用再開通例 monf 704)

梗塞状態と画像診断像

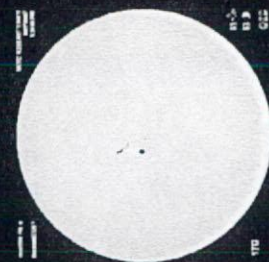
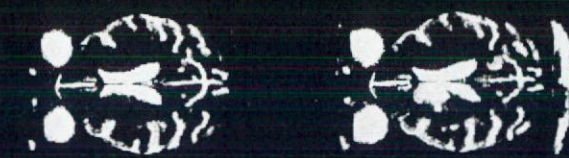
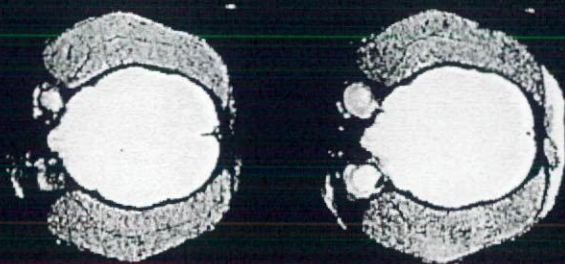
MRI T2*

MRI T2

MRA

CBF
(PET)

Angio



塞栓直後
(治療開始前)

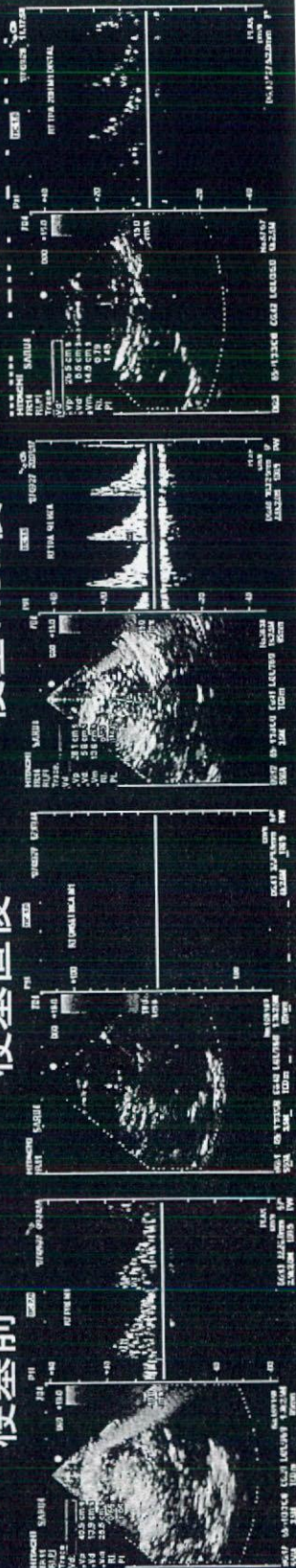
梗塞24h後

梗塞24h後

梗塞7.5h後

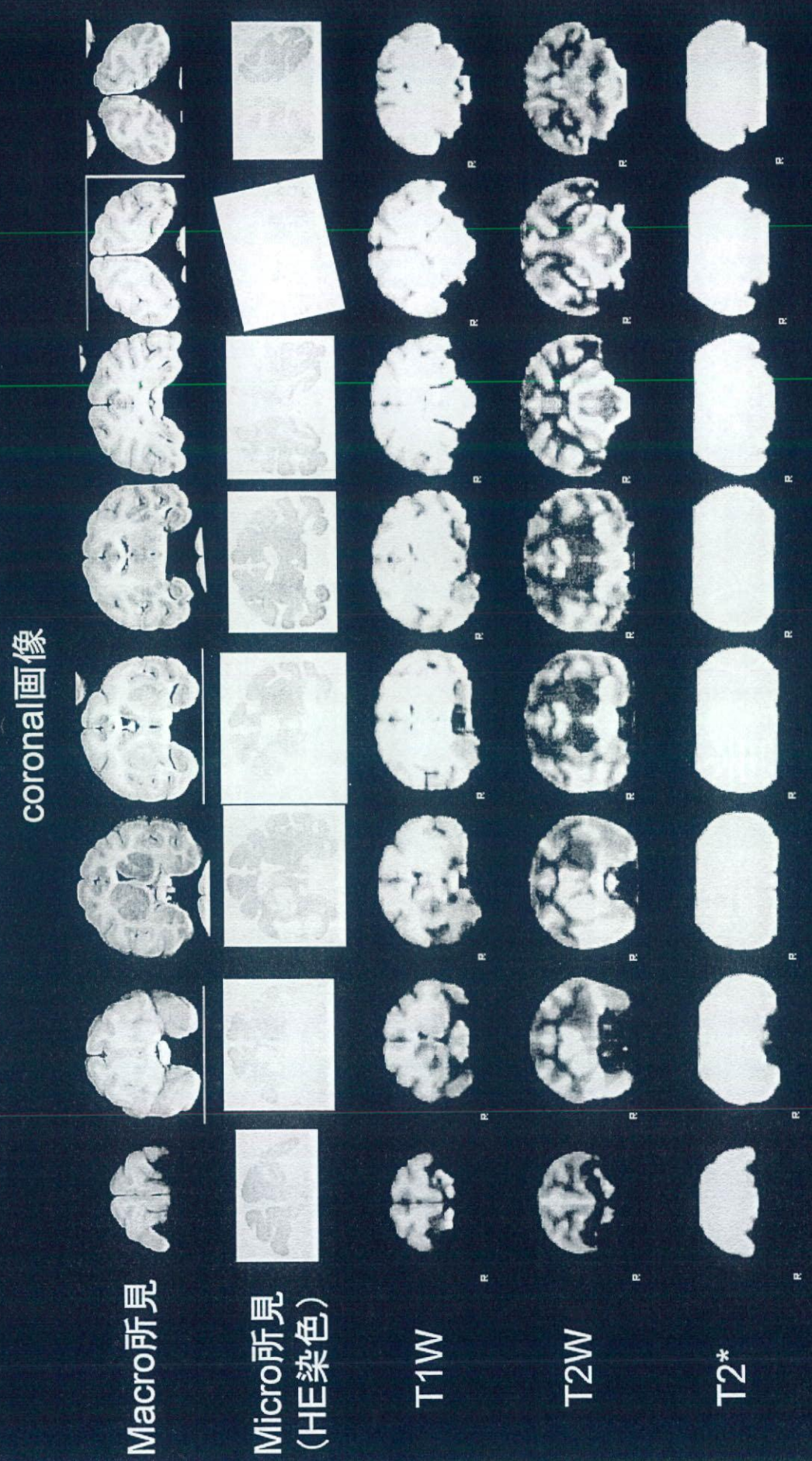
梗塞直後

梗塞前



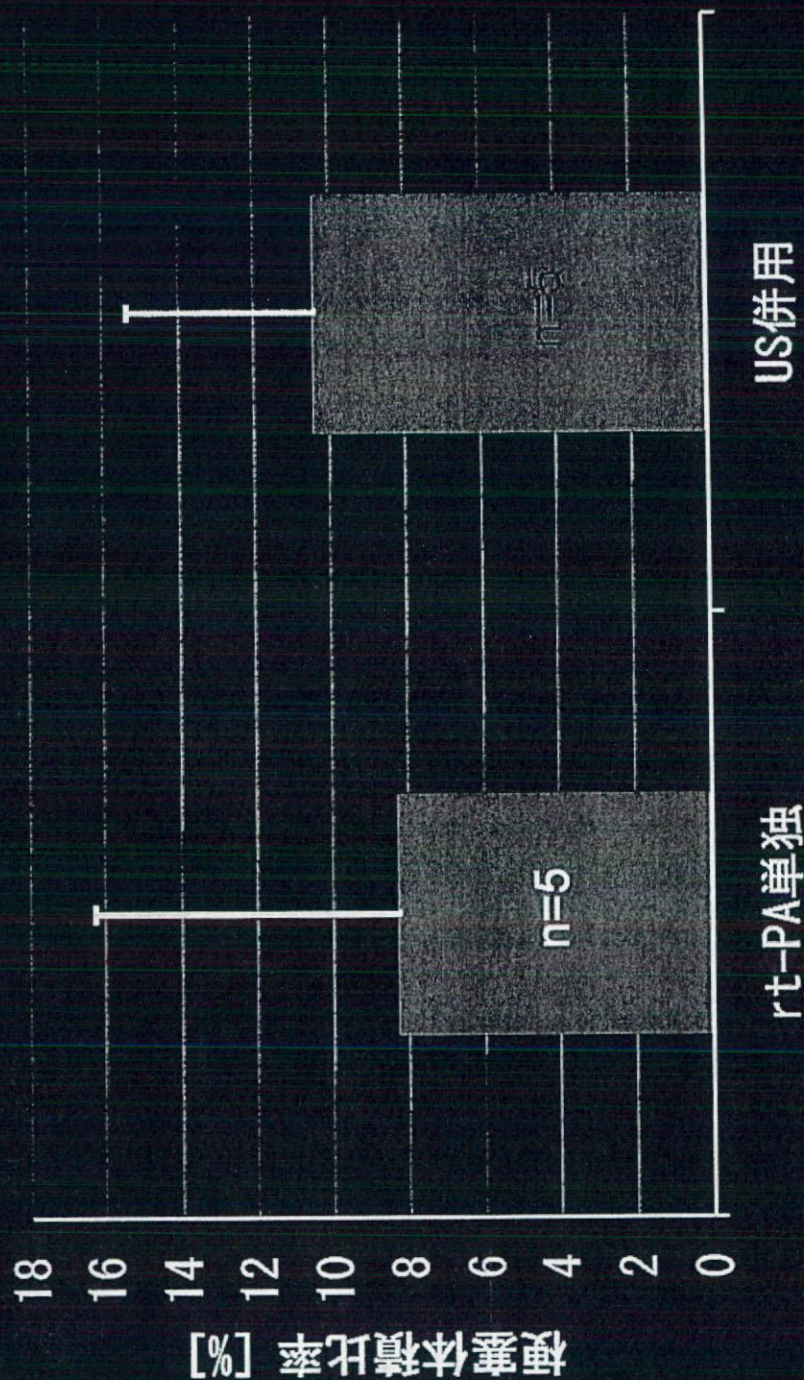
USによる
診断

図9 霊長類(Cynomolgus)急性脳梗塞モデルによる
安全性試験結果2 (US併用再開通例 monf 704)



結果 (1)

T2Wより算出した両側半球における
梗塞体積比率の比較



結果 (4)

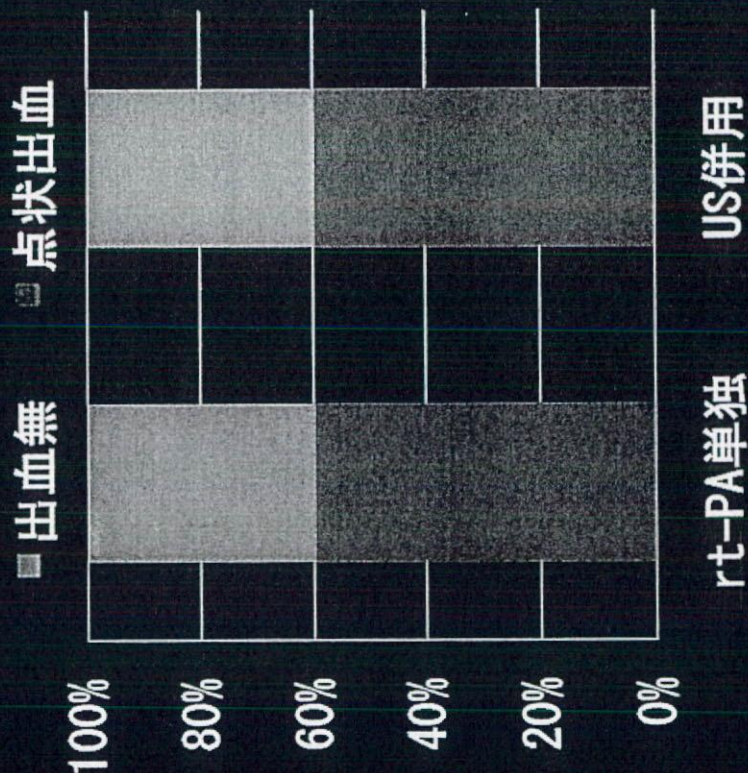
カニクイザル急性脳梗塞モデルによる治療結果と
病理組織学的所見

治療法	MRA M1 再開通評価 塞栓24時間後	病理肉眼的出血	病理光顕的出血
rt-PA 単独	再開通有	点状出血	血管周囲の小出血
rt-PA 単独	再開通無	点状出血	血管周囲の小出血
rt-PA 単独	血流認めず	出血無	出血認めず
rt-PA 単独	再開通有	点状出血	血管周囲の小出血
rt-PA 単独	再開通有	出血無	出血認めず
US併用	再開通無	点状出血	血管周囲の小出血
US併用	再開通有	点状出血	血管周囲の小出血
US併用	再開通無	出血無	血管周囲の小出血
US併用	再開通有	出血無	血管周囲の小出血
US併用	血流認めず	点状出血	血管周囲の小出血

图11

結果 (5)

病理肉眼的出血の有無



病理光顕的出血の有無

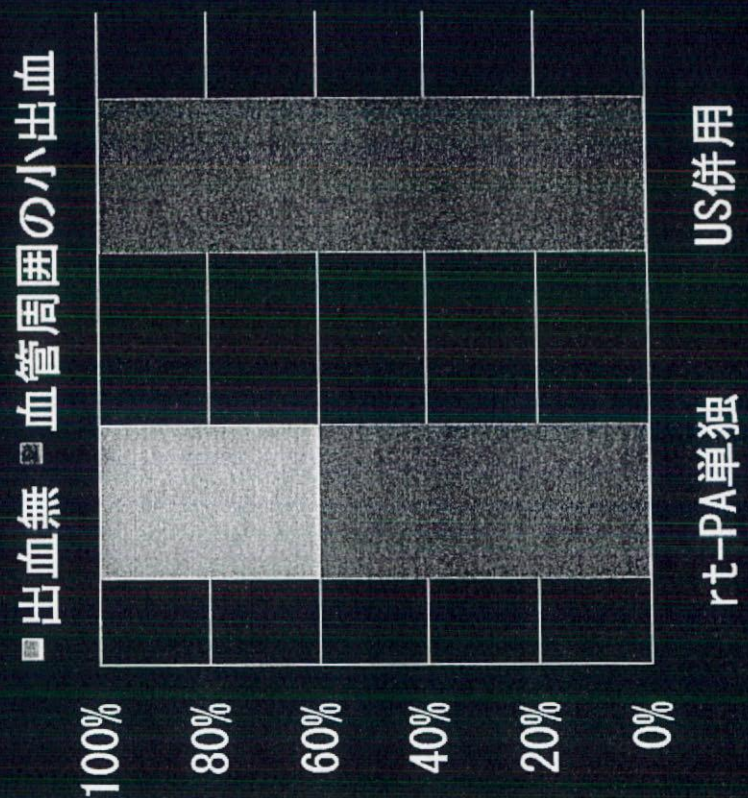
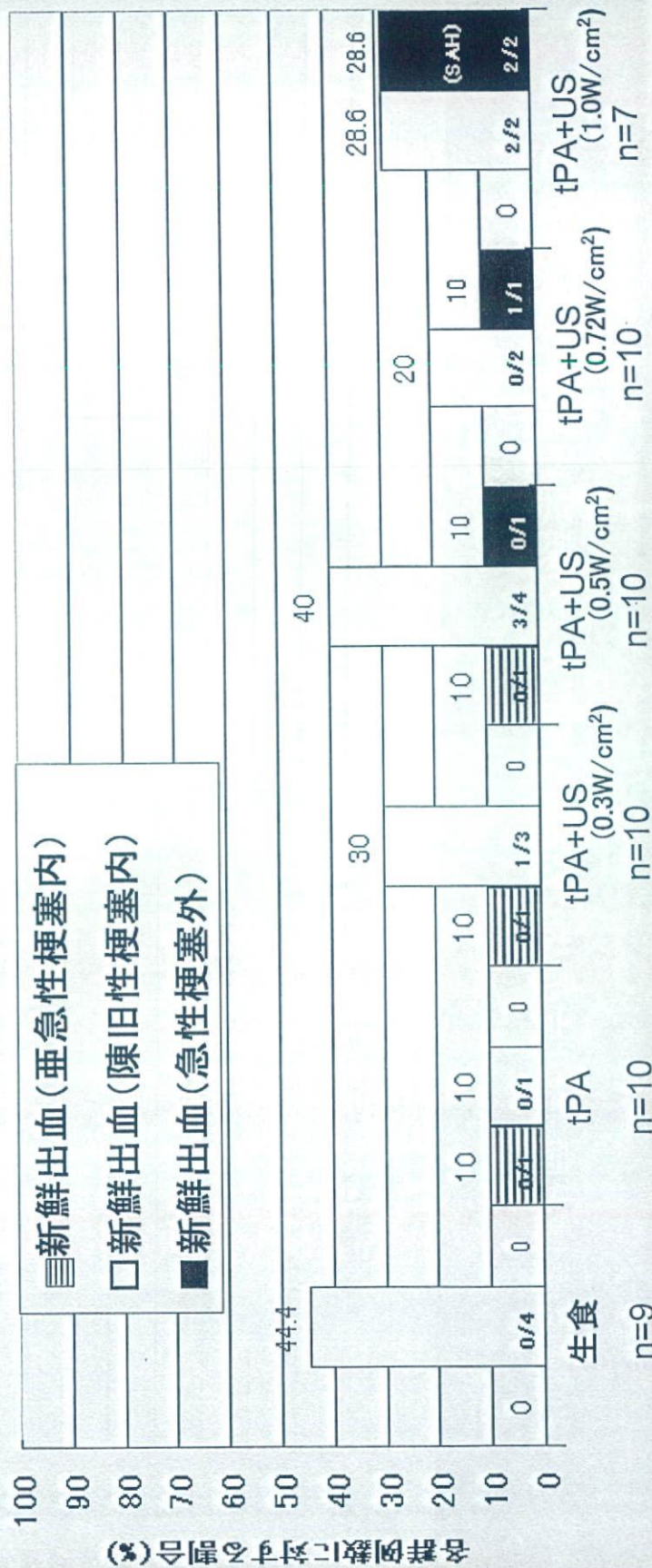


図12

rt-PA投与下のSHR/SPにおける超音波(500kHz,CW,インターミッテント照射追加
分)強度と出血率の関係-照射領域切片の病理組織学的所見から

2008/2/23 TSHR087迄



注) 棒グラフ内の分類は分母は分母が出血所見のあった例数、分子がその内大出血と認められた例数

図13

— 照射領域と同一切片の内の非照射側(左)の病理組織学的所見から —

2008/2/23 TSHR087注

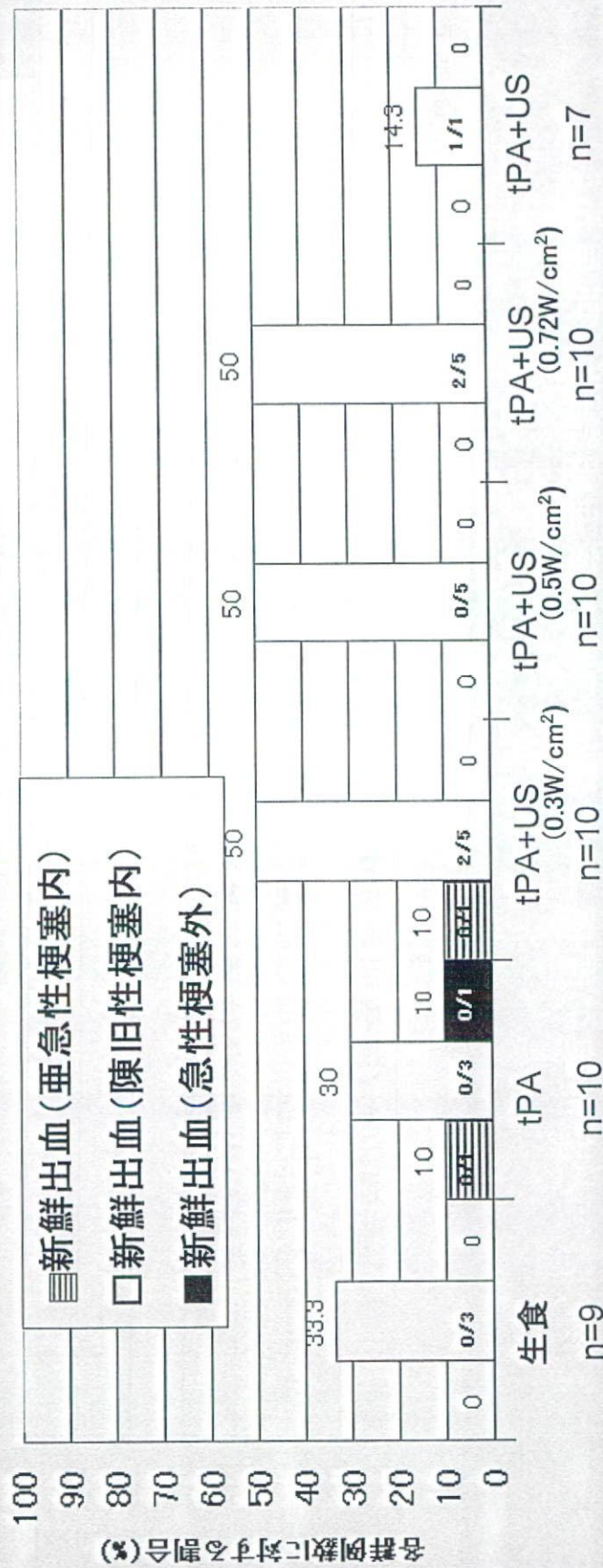


图14

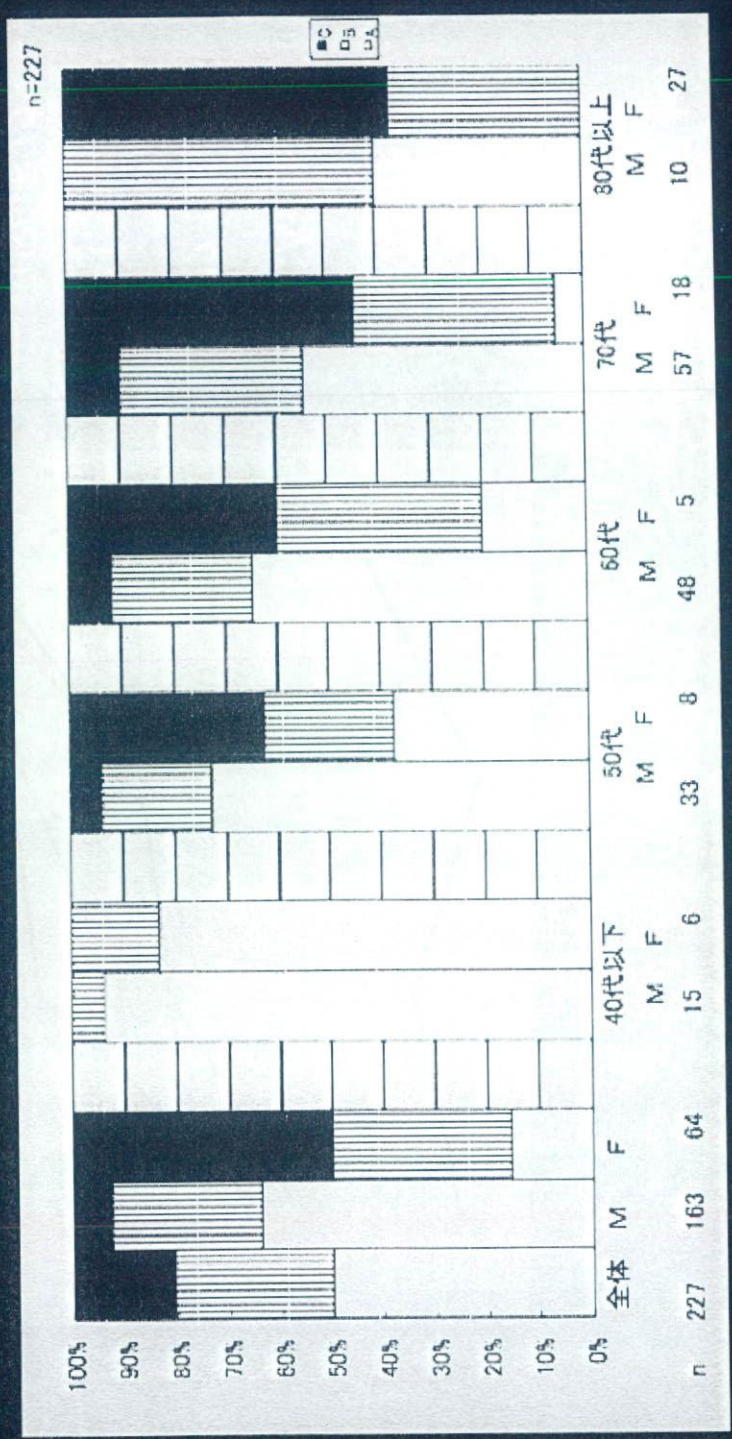


図15

rt-PA静注療法後のNIHSSの経時変化

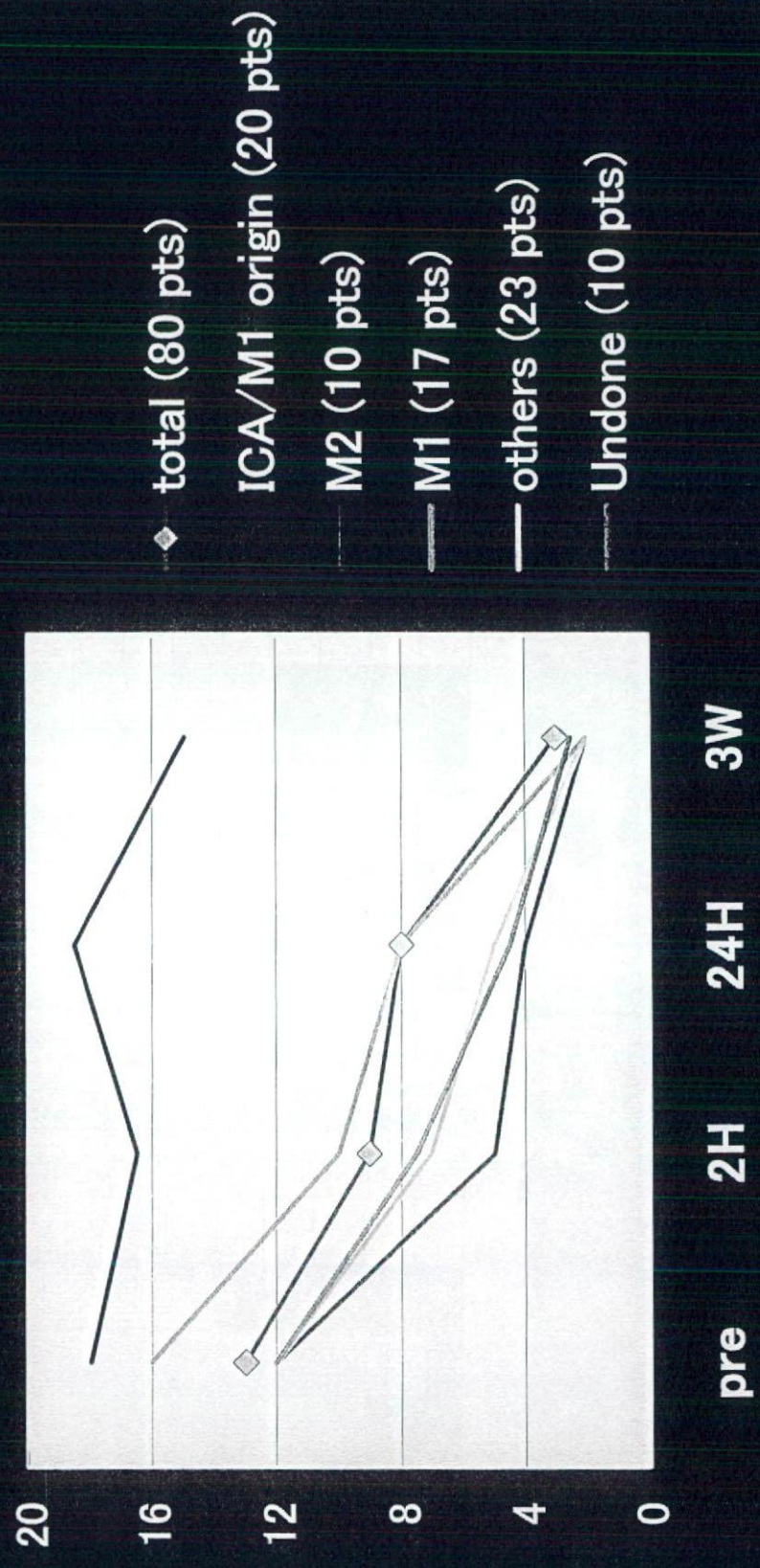
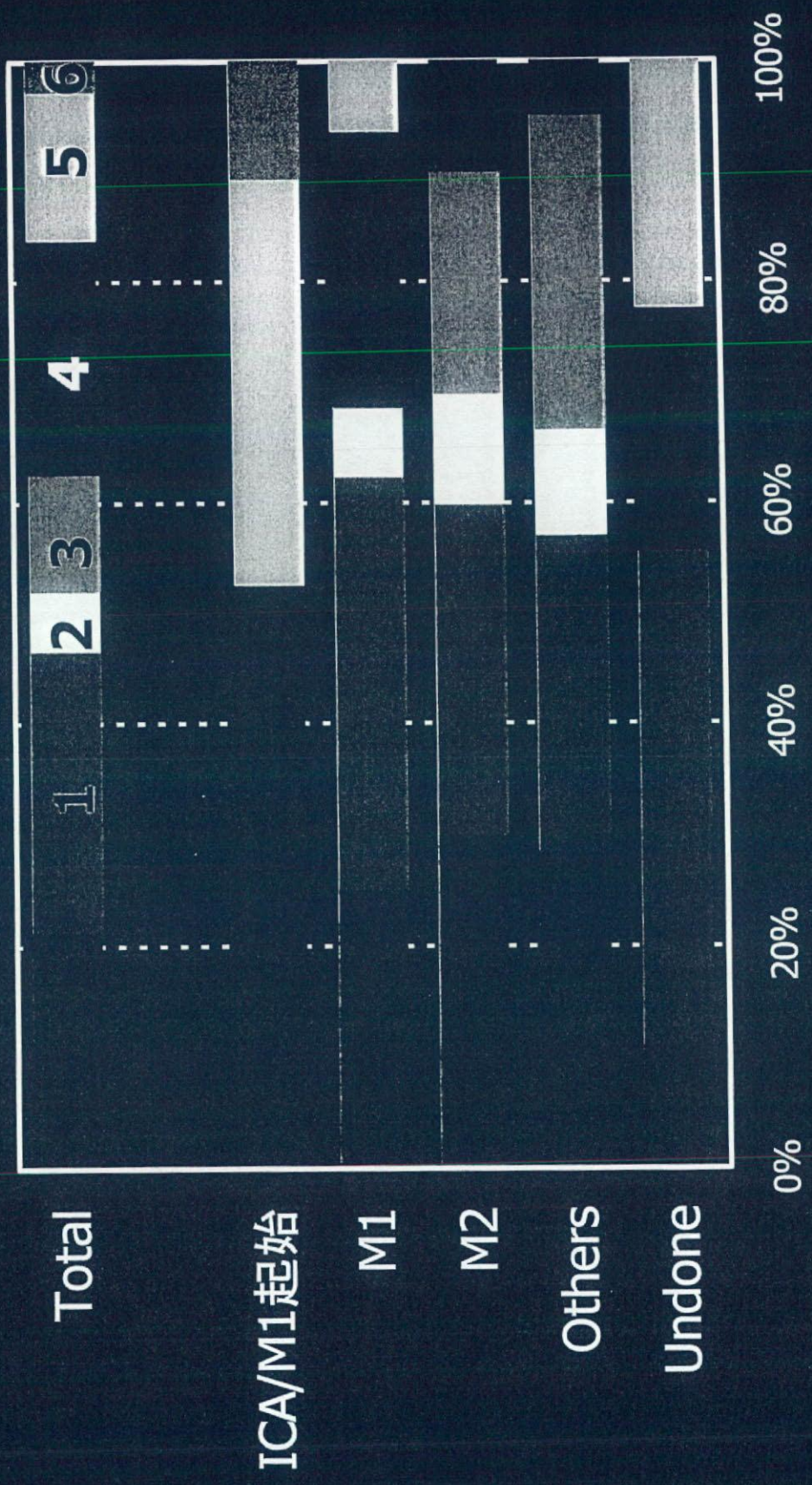


図16

rt-PA静注療法後、3ヶ月での神経学的評価結果



II. 分担研究報告

厚生労働省科学研究補助金(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

統合化システム全体系の音響生物学的な技術評価

分担研究者 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教授

研究協力者:

飯田 秀博 国立循環器病センター研究所 放射線医学部部長	銭谷 平 東京慈恵会医科大学医用エン ジニアリング研究室
渡部浩司 国立循環器病センター研究所放 射線医学部室長	日向 真子 東京慈恵会医科大学医用エン ジニアリング研究室
林 拓也 国立循環器病センター研究所放 射線医学部室長	荒井 あゆみ 東京慈恵会医科大学医用エ ンジニアリング研究室
寺本 昇 国立循環器病センター研究所放 射線医学部	小島 依子 東京慈恵会医科大学医用エン ジニアリング研究室
榛沢 和彦 新潟大学医学部第二外科助教	窪田 純 (株)日立メディコ 応用機器開発 室主管技師
福田 隆浩 東京慈恵会医科大学総合医科 学研究センター、神経科学研究部神経病 理学研究室講師	荻原 誠 (株)日立メディコ 応用機器開発 室 企画員
三村 秀毅 東京慈恵会医科大学医用エン ジニアリング研究室	

研究要旨 開発してきた経頭蓋超音波脳血栓溶解装置(Transcranial targeting low-frequency ultrasonic thrombolysis system(TCT-LoFUT))の音響学的安全性については既に小動物で十分な検討を積み上げてきた。19年度はその集積を元に、最終年度課題として、霊長類を用いた急性脳虚血モデルで装置自体による安全性評価を行い、前臨床試験をしめくくることとした。カニクイザル10頭の中大脳動脈の自家血血栓塞栓モデルを作成し、半数を rt-PA 静注療法に充て、残り半数を rt-PA 静注療法に加え開発した TCT-LoFUT を適用した。虚血時間平均2.5時間を設定し、虚血前、直後、及び治療開始前に US、Angio、PET、MRI 検査を科学的要求に合致するように行い、塞栓後24時間にも、MRI 及び US 検査を行った。なお、US は治療後も15分間隔で2時間、3時間間隔で24時間まで経頭蓋的にカラードプラ及びドプラモードで中大脳動脈を中心に関し・評価した。24時間後、灌流固定後脳摘出を施行し HE 染色にて頭蓋内出血状態を神経病理学的に評価した。rt-PA 単独静注法では5例中3例が、また TCT-LoFUT 併用法では5例中2例が再開通した。また梗塞領域は両群間にバラツキが大きいものの統計学的有意差はなかった。出血状態は T2*強調評価及び肉眼病理所見、さらに顕微鏡的病理所見を総合すると、前例において小出血が僅かに

梗塞領域内に認められた。いずれも臨床上症候性出血に相当する出血状態とは考えられないものであった。この出血状態に関し、rt-PA 単独静注療法群と TCT-LoFUT 併用群との間に際を認めなかった。

すなわち、TCT-LoFUT の最大音響出力条件においても、従来の rt-PA 静注療法以上に出血状態を憎悪させないことを確認した。ただし、実験中の脳温が、塞栓直前及び MRI 検査中に低下したことによる脳保護的効果、またその直後正常温に急速に戻したことによる脳負荷効果などに関する追検討を行い、実験系としての評価を要するものと考えられる。しかしながら全例で小出血にとどまり、他の病理学的悪影響が認められないこと等を総合し、開発した TCT-LoFUT は、音響学的にも医学生物学的にも、適切な条件下では充分安全であることが示された。以上から低侵襲性、照射ビームの標的性、治療状態の実時間監視能力、そしてその安全性等々の特徴を持つ TCT-LoFUT の臨床応用への道が開かれた。

A. 研究目的

急性脳梗塞患者(AIS)に対する低周波数超音波(LFUS)を用い、ドイツで経頭蓋 US 併用脳血栓溶解療法の臨床試験(TRUMBI Trial Phase-2)が実施された。しかし、その副作用として頭蓋内出血増加が観察され、経頭蓋低周波超音波が脳内出血の誘因となる可能性が示唆された。さらに音響学的条件設定の不備、及び急性脳梗塞患者の背景因子としての脳動脈硬化亢進状態に対する安全性検討不足にあることが、当施設の基礎実験及び脳卒中易発症高血圧自然発生ラットを用いた実験で検証された。我々はこの不具合事象の原因を神経超音波学的に解明し、安全で有効な超音波条件を小動物等を用いて明らかにするため、この条件を満足するように設計した新たな経頭蓋超音波脳血栓溶解法(TCT-LoFUT)を開発しつつある。その安全性については健康状態の霊長類(カニクイザル)で既に確認済みである。

今回、現在開発中のこの TCT-LoFUT 法の前臨床研究として、ヒトに近似した脳形態・血管構築を有する霊長類(カニクイザル)による急性脳梗塞モデルを用い、

TCT-LoFUT 適用後の脳内出血率評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) 対象

カニクイザル(雄、体重 6kg 前後、年齢 9 才前後):t-PA+TCT-LoFUT 群: 5 例

Control(t-PA 単独)群: 5 例

2) 方法

全体の実験プロセスを図 1 に示した。

(1) 麻酔方法

カニクイザルを塩酸ケタミン 20mg/kg+キシラジン 2mg/kg の混液により前麻酔後、咽喉に 8%キシロカインスプレーを噴霧し、刺激に対する反射を消失させ、4~5Fr のカフ付き気管チューブを気管に挿管し、気道を確保した。次いで、25cm エクステンションチューブを取り付けた 22G 留置針外筒を右前肢副臍側皮静脈、左側後肢伏在静脈および、腹側正中尾動脈に留置した。また、左大腿動脈に 5Fr シースを挿入・留置し、脳血管造影ならびに塞栓物(自家血血栓)注入カテーテル挿入用に使用した。血管確保後、動物は Siemens-CTI PET 装置のベッド上に固定し、人工呼吸器(Drager, Inc,

Lubeck, Germany)により、酸素 25:窒素 75%の割合で、Stroke volume 15~20mL/kg/Stroke, Stroke 数 8~15/min の呼吸維持をした。持続麻酔はプロポフォール(4mg/kg/hr)+臭化ベクロニウム(0.05mg/kg/hr)により行った。

麻酔中は直腸温、観血的血圧、心電図、心拍数、呼気二酸化炭素濃度、及び動脈血ガスをモニターした。

(2) 血栓作製

フィブリン溶液、トロンビン溶液の作製にペリプラストPコンビセットを用い、 ϕ 0.7mmの延長チューブ(トップエクステンションチューブ)内で作製し、長さ30mmの注入用血栓を作製した。

(3) 血管造影

予め大腿動脈に挿入・留置しておいたシース(5Fr)を介して4Frの血管造影カテーテル(外カテ)を内頸動脈まで誘導した後、造影剤(第一製薬:オムニパーク300)を用いて血栓物注入側の脳血管走行像を確認した。次いで、カテーテル先端部1.2Frのマイクロカテーテル(内カテ)を外カテ内に通して、中大脳動脈(MCA)遠位部(頭頂枝)に誘導。誘導完了後、血栓注入前および直後に血管造影撮影を行った。

(4) PET および MRI 撮像

PET 撮像は、血栓注入前、注入直後の2回実施した。PET 撮像は、迅速脳血流-脳酸素代謝連続測定法(DARG法)を用いた(Kudomi et al. JCBFM.2005)。PET 撮像に先進医工学センターSiemens-CTI PET装置を用いた。MRI 撮像は、T1強調、T2、T2*強調画像を脳梗塞作製後のt-PAおよびt-PA+TUS前と脳梗塞作製後24時間後に

行った。撮像には、先進医工学センターMRI装置(磁場強度3T)を用いた。

(5) 超音波照射

血栓注入後2時間半(前後30分)経過後より、t-PA(アルテプラゼ)0.6mg/kg, 10% bolus, 90%静注60分点滴を行った。その点滴開始と同時に、TC-CFIにて同定された血栓塞栓部位に対し、経頭蓋超音波装置(TCT-LoFUT)を用いて、超音波照射を標準照射方式((2分US+30秒休止)×4+5分休止)×4(合計60分)で施行した。超音波条件は連続波, 500kHz, 0.5W/cm²とした。

(6) 検体摘出方法

動物は、モデル作製24時間後(MRI撮像後)深麻酔下に放血致死させ、下行大動脈を遮断後に灌流用留置針を左心室に留置した。リン酸緩衝液(pH7.4)約3.0Lにより脳の残存血液を灌流洗浄した後、引き続き10%中性緩衝ホルマリン液約3.0Lにより灌流固定を行った。その後、全脳を摘出し、20%中性緩衝ホルマリン液に浸漬させた。

(7) 神経病理組織学的評価方法

HE染色による出血性変化、ミクログリアの状態および梗塞面積を病理組織学的に評価した。

C. 結果

C-1 Vital data

各個体(monf701~710)の直腸温、収縮期・拡張期血圧、SpO₂、PaO₂、PaCO₂の麻酔後から血栓24時間後までの変化を図2~7に示した。

体温低下は麻酔直後およびRI撮像中に認められた(図2)。体温低下の著しい時間帯にお

いては、加温ジェルで体表を覆うなどして対応したが、個体毎に体温低下の程度に差が見られ、34℃台まで低下する個体も見られた。

血圧の変化は個体 monf707 において onset12 時間後より著明に低下が見られた。Sp O₂、PaO₂、PaCO₂ に関しては、個体間の明らかな差異は認めなかった(図 3、4)。

C-2 経時的頭部画像

図 8 は各個体の塞栓前、塞栓後、塞栓後 24 時間後の TC-CFI、T1WI、T2WI、T2*WI、MR angiogram、Angiogram、PET 画像、および病理ミクロ、マクロ写真である。TC-CFI は、US 治療中は 15 分間隔で、その後は 3 時間間隔で記録した。

C-2 M1 再開通の有無と病理組織学的出血所見

MRA による塞栓 24 時間後の M1 再開通評価では rt-PA 単独群で再開通有り 3 例、無し 1 例、血流を認めず 1 例、超音波併用群で再開通有り 2 例、無し 2 例、血流を認めず 2 例であった(表 1)。血流を認めない例については、塞栓後 24 時間後において、血圧が保てず、全脳虚血になっているものと考えられた。

C-3 梗塞体積比率の比較

T2WI より算出した両側半球における梗塞部体積比率の比較では、rt-PA 単独群と超音波併用群の間に差異を認めなかった(図 9)。

C-2 前額断における MRI 画像及び病理肉

眼的所見

前額断における T2WI における梗塞部位と、前額断における病理肉眼的所見での出血部位が一致しており、その他の部位における明らかな出血は認めなかった。(図 10、11)

C-4 病理組織学的評価

出血が見られた例では血管周囲に局限された出血(図 12)と、虚血領域脳実質に多発する小出血(図 13)が認められた。これらは梗塞領域に局限しており、rt-PA 単独群と、超音波併用群の両群で同様に認められた。mass effect を伴うような出血例は両群とも存在せず、梗塞部位内の微小出血のみを認めた。病理肉眼所見では両群に差異を認めなかったが(図 14)、病理光顕標本での観察では有意差は認めないものの、超音波併用群でその増高を認めた(図 15)。

D. 考察

超音波併用群では微小出血の増高傾向は認めしたが、有意ではなかった。また、出血率は、rt-PA 単独群、超音波併用群ともに臨床の CT 検査で想定される場合よりも高い値を示した。これは出血の有無を検出力の高い T2*WI や病理組織などで検索したためと考えられた。また、今回の実験では mass effect を伴うような出血例は両群とも認めず、梗塞部位内の微小出血のみを認めた。

サルに特注バルーンを用いて 2 時間、中大脳動脈を閉塞させ、その 3 時間後の MRI によってその梗塞を確認した報告がある (Huanmin Gao, Journal of Stroke and

pp202-208, 2006)。その特注バルーンによる MCA 塞栓中の尾状核の血流モニタリングでは、尾状核血流が 40~60%まで減少し、モデル完成後、バルーン縮小 3 時間後の T2WI 像で梗塞巣が確認でき、MRA で再開通していることが確認されたと報告されている。今回、我々は血流の評価に M1 部の TC-CFI を施行し、MCA 閉塞領域の評価に angio、MRA、TC-CFI を、梗塞領域の評価に 24 時間後 MRI を施行して、その評価を行った。

今回使用した rt-PA アルテプラゼ グルトパ注の日本における市販後 24 ヶ月における副作用報告では全副作用報告 1278 例中、頭蓋内出血を認めたものが 958 例で、これは全体の 75%になる。またそのうち症候性出血が 276 例と頭蓋内出血を認めた症例の 29%を占める。臨床において既に使用されている rt-PA の副作用として報告された 4 分の 3 で出血を認めている。

今回の実験において病理学的検索で全症例に微小出血が認められたのは、rt-PA の作用の結果であると考えられた。

E. 結論

霊長類急性脳梗塞モデルにおける rt-PA に併用した連続波 500kHz、0.5W/cm²、intermittent 照射 60 分による経頭蓋超音波脳血栓溶解法は明らかな出血の誘因と考えられなかった。また、出血例では梗塞巣内微小出血に留まり症候性出血に相当する出血塊は認めなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

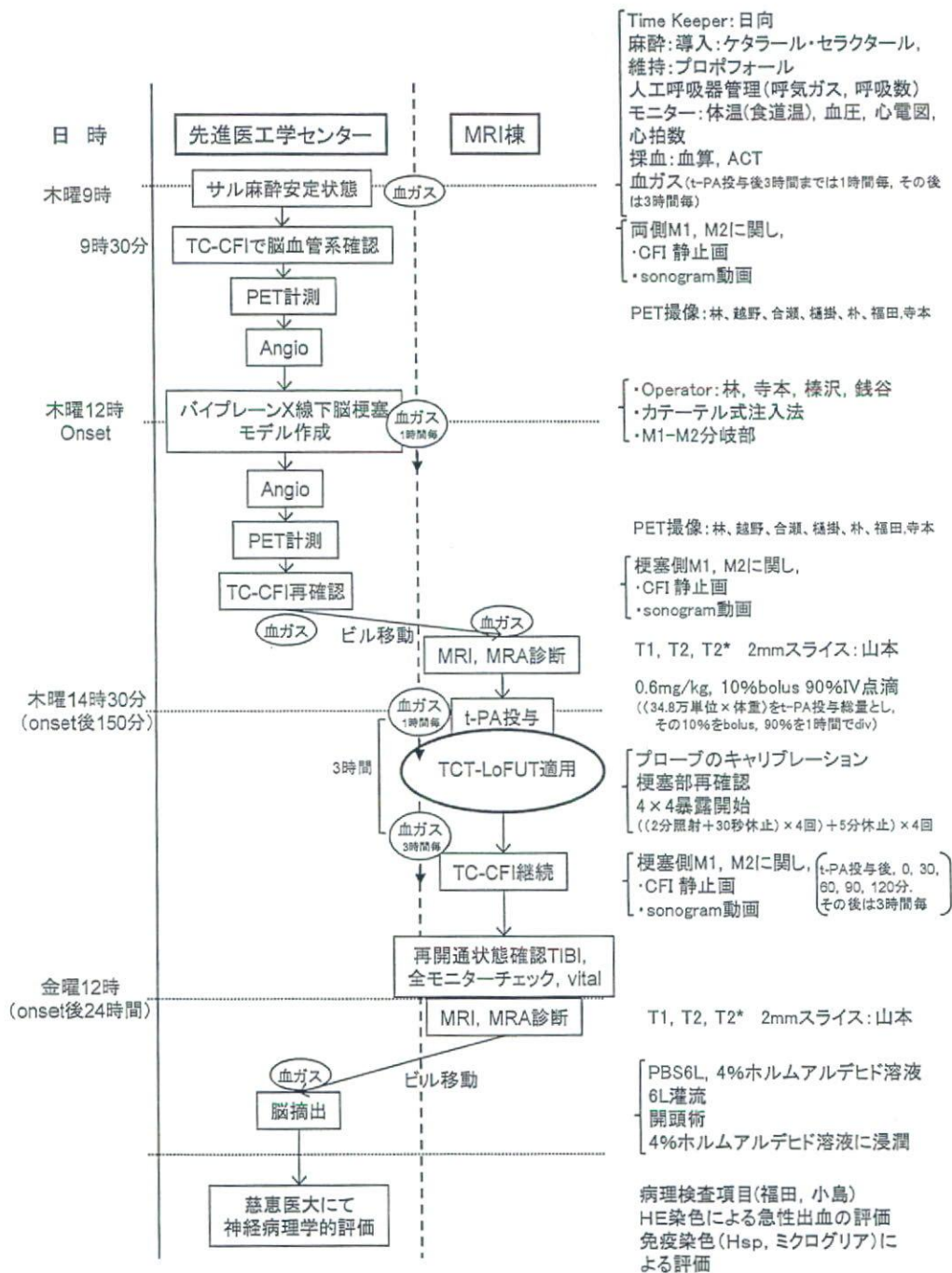


図1 急性脳梗塞モデル実験プロセス

表1 rt-PA単独群とUS併用群のM1再開通の有無と病理組織学的出血所見

個体NO.	治療法	MRA M1 再開通評価 塞栓24時間後	病理肉眼的出血	病理光顕的出血
705	rt-PA 単独	再開通有	点状出血	血管周囲の小出血
706	rt-PA 単独	再開通無	点状出血	血管周囲の小出血
707	rt-PA 単独	血流認めず	出血無	出血認めず
708	rt-PA 単独	再開通有	点状出血	血管周囲の小出血
710	rt-PA 単独	再開通有	出血無	出血認めず
701	US併用	再開通無	点状出血	血管周囲の小出血
702	US併用	再開通有	点状出血	血管周囲の小出血
703	US併用	再開通無	出血無	血管周囲の小出血
704	US併用	再開通有	出血無	血管周囲の小出血
709	US併用	血流認めず	点状出血	血管周囲の小出血

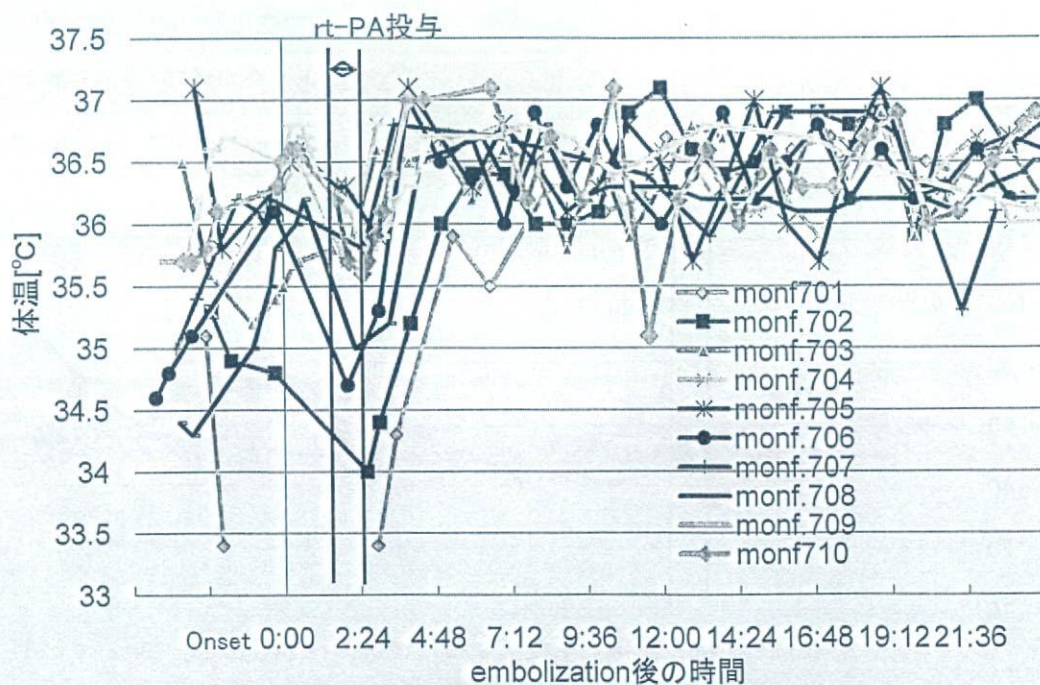


図2 モデル作製時から24時間の直腸温変化

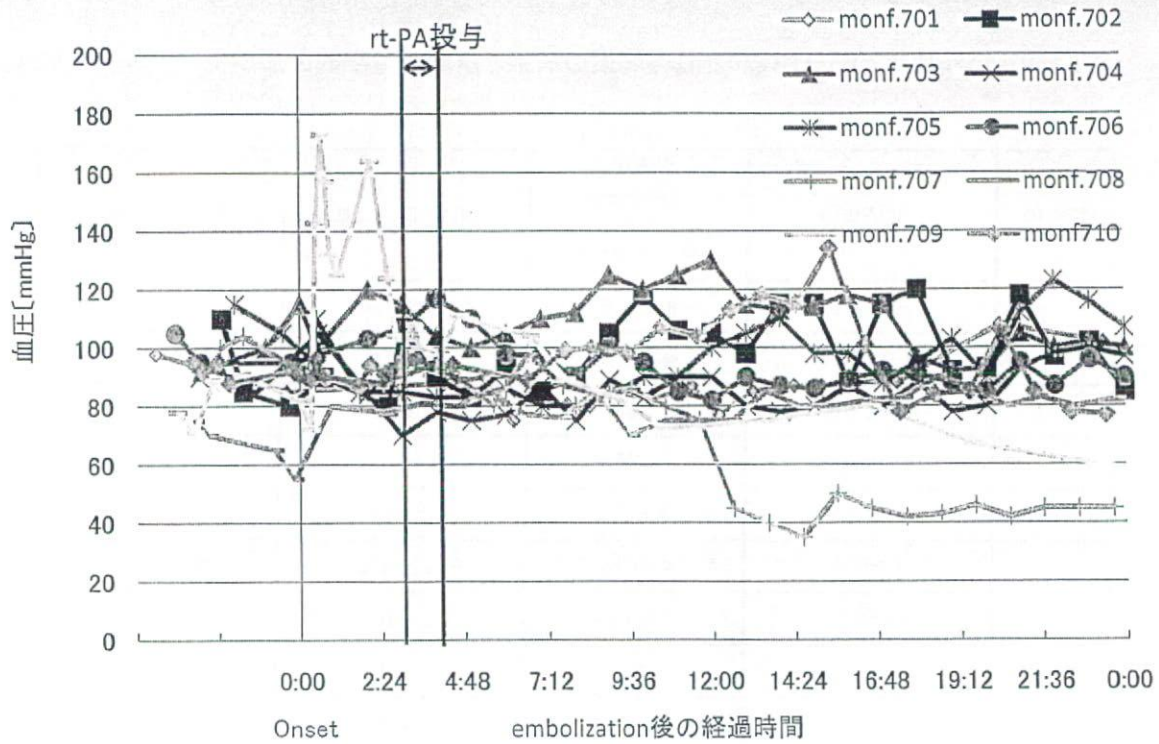


図3 収縮期血圧の経時的変化

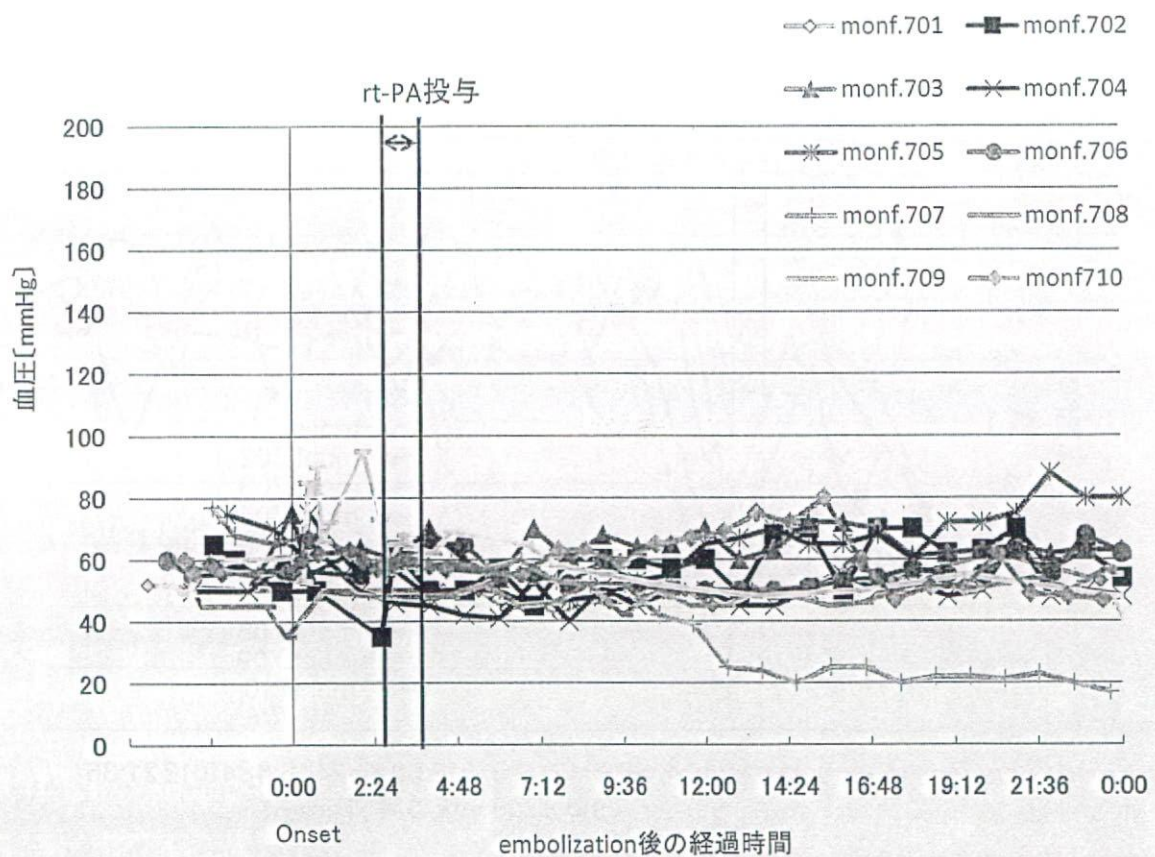


図4 拡張期血圧の経時的変化