

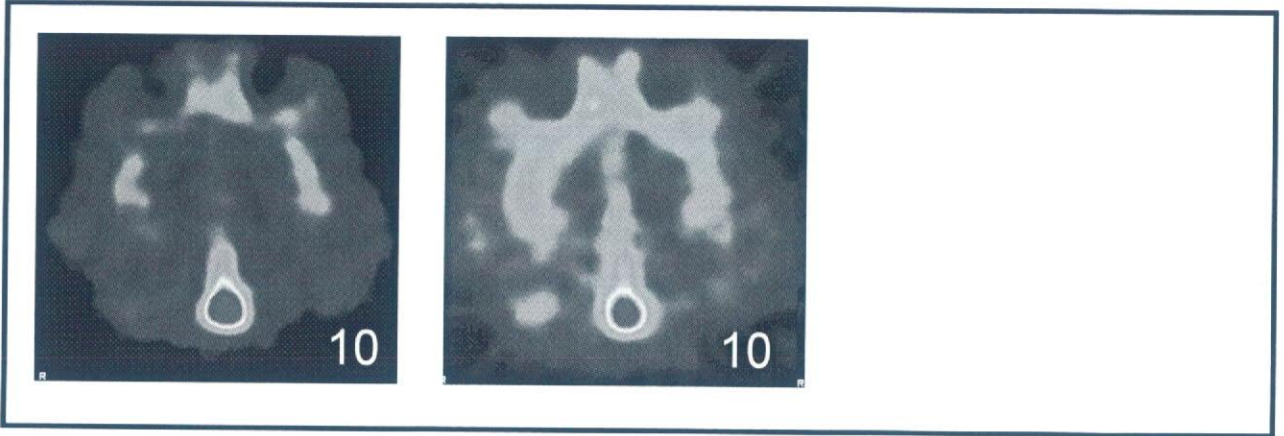
708

pre

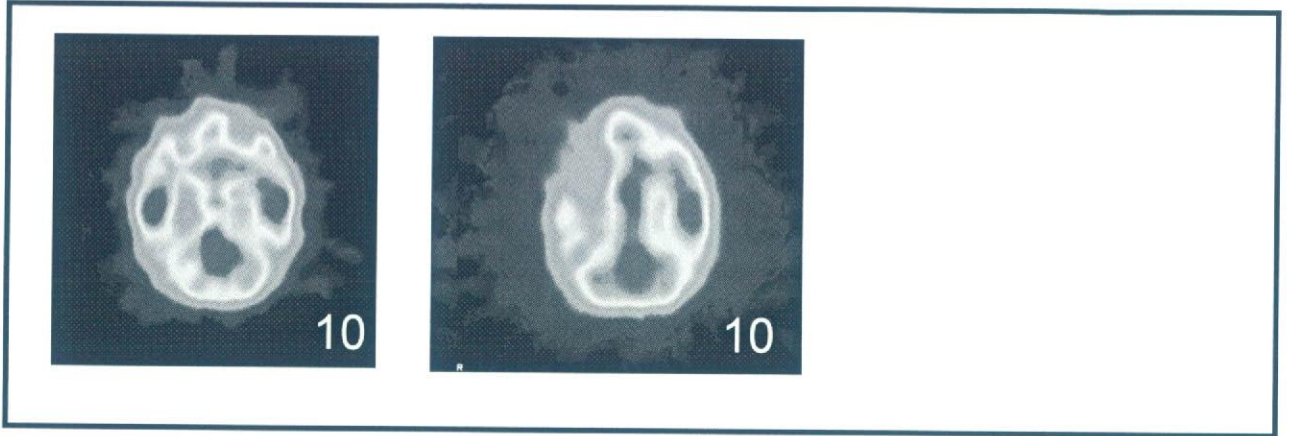
Post embolization

24hrs after embolization

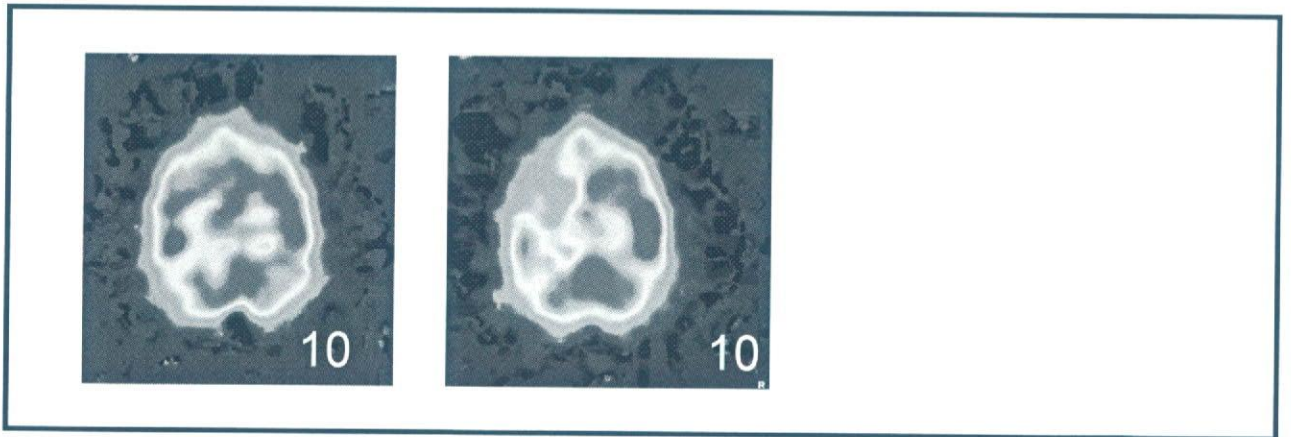
CBV



CBF

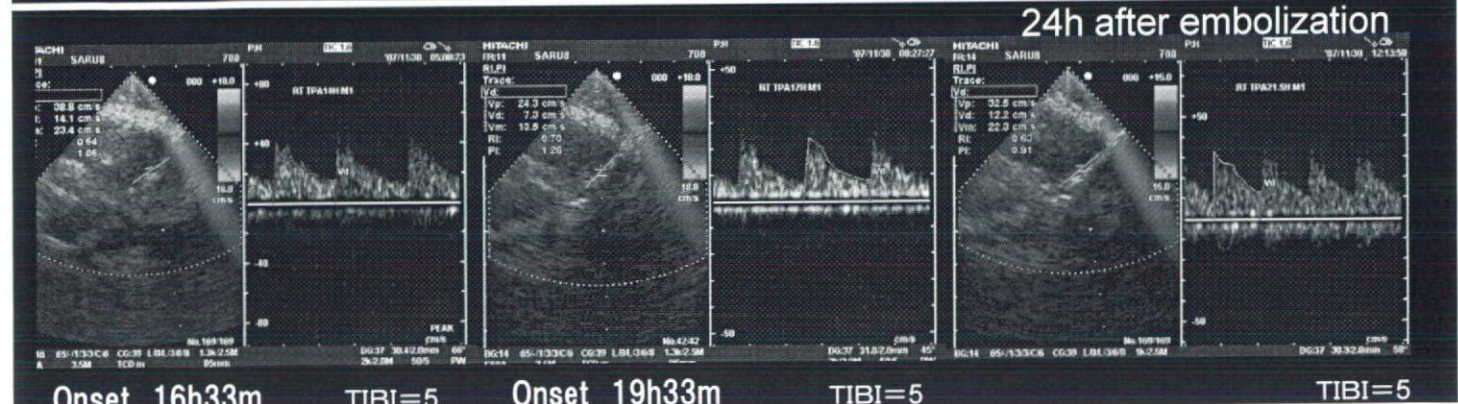
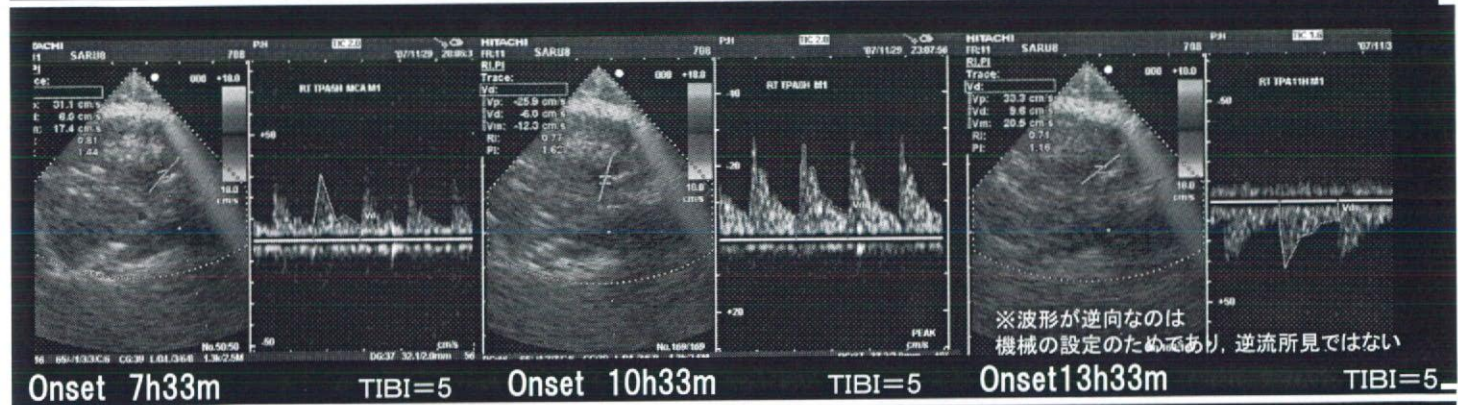
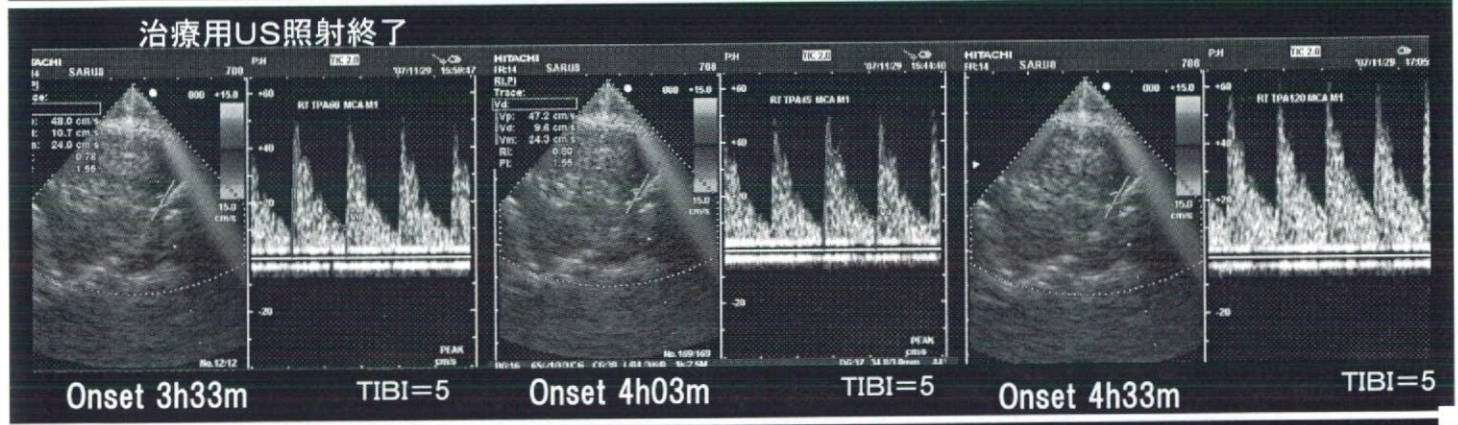
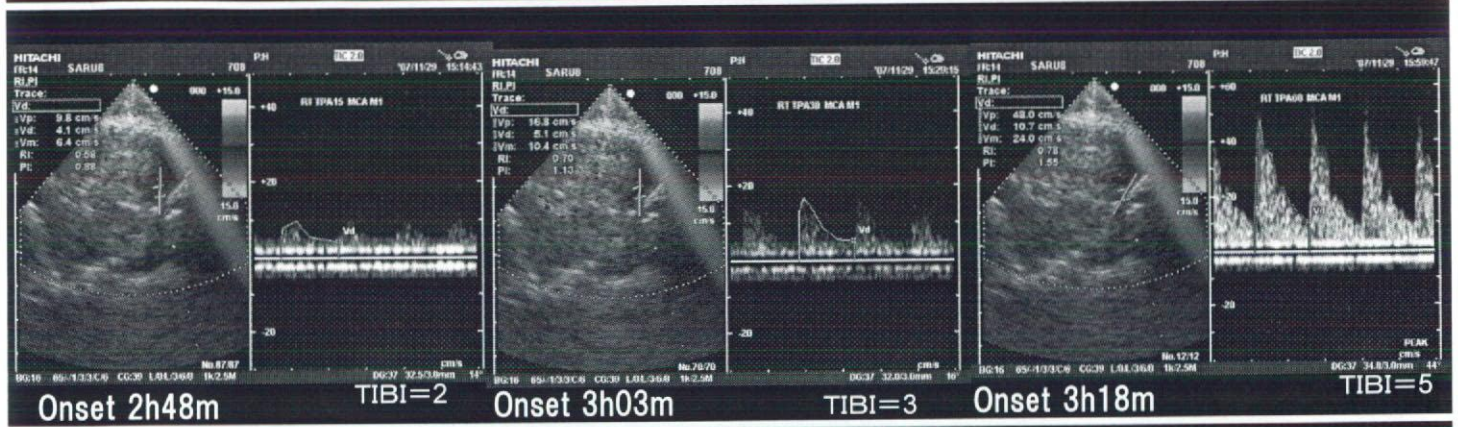
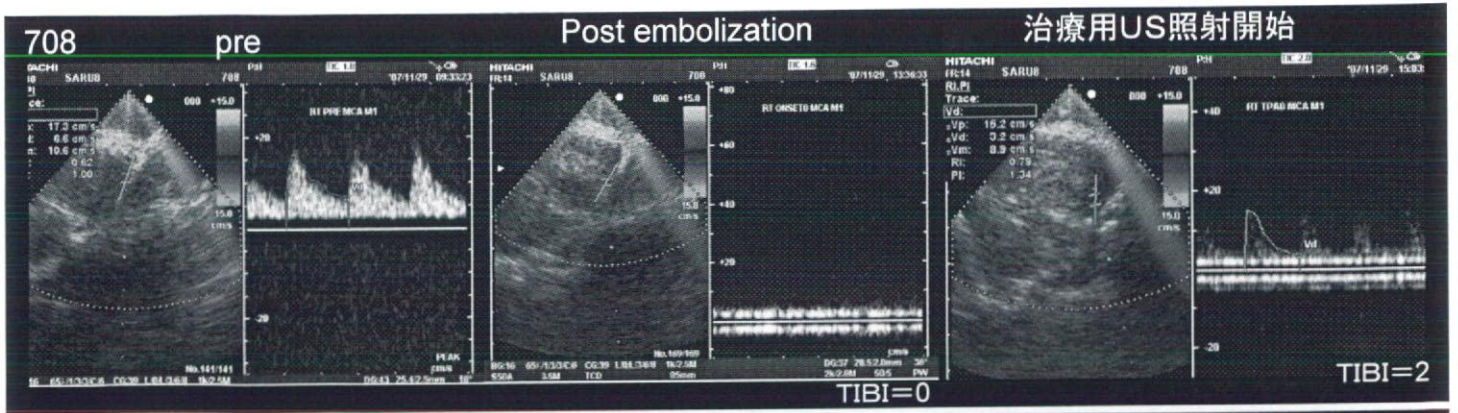


CM  
RO2



OEF 腦 酸素攝取率  
CBV 腦 血液量  
CBF 血流值  
CMR02 腦 酸素代謝量









病理肉眼



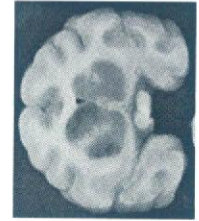
0



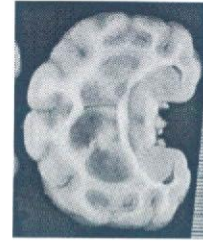
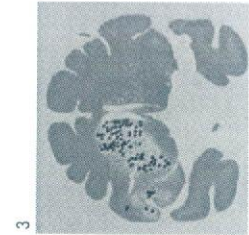
病理光顯



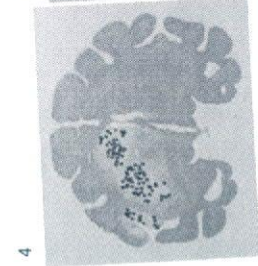
2



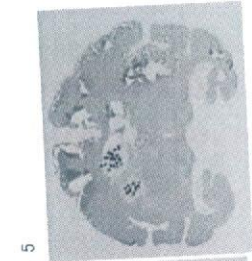
3



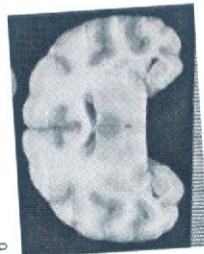
4



5

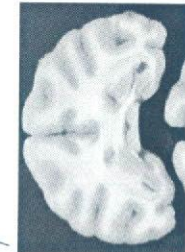


6



病理肉眼

7



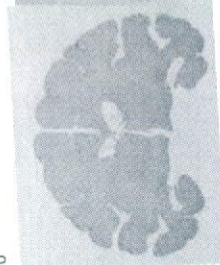
8



9



0



病理光顯

1



2



3

monf709 0

1

2

3

4

5

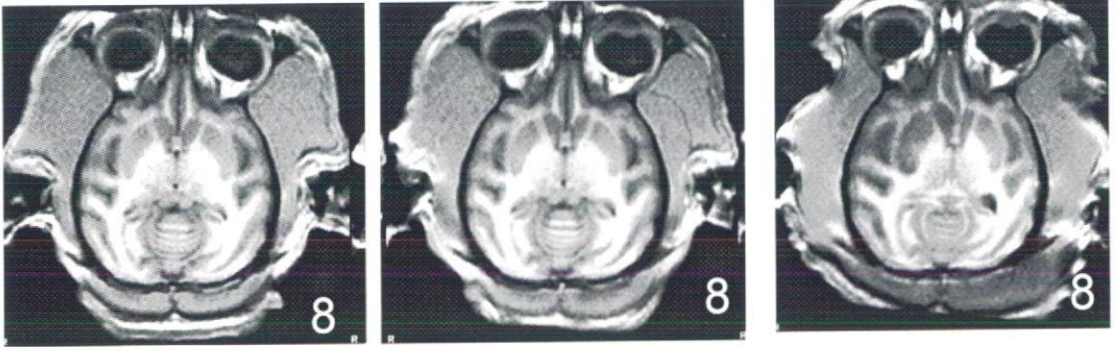
709

pre

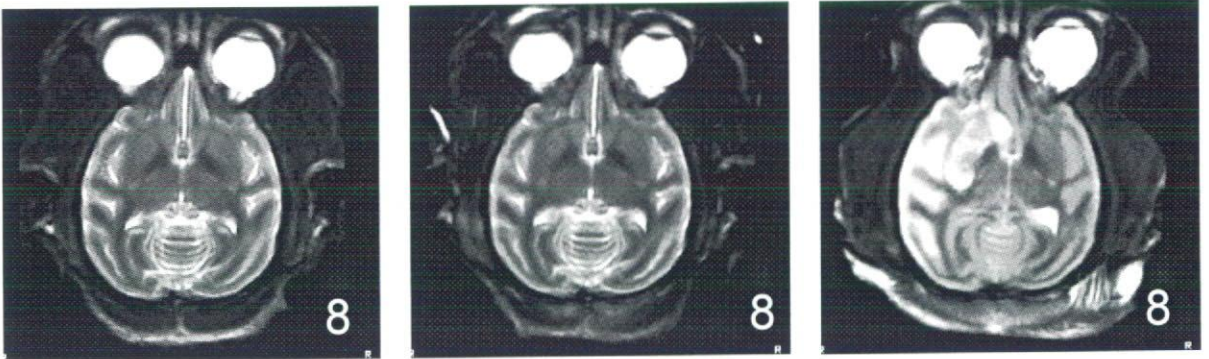
Post embolization

24hrs after embolization

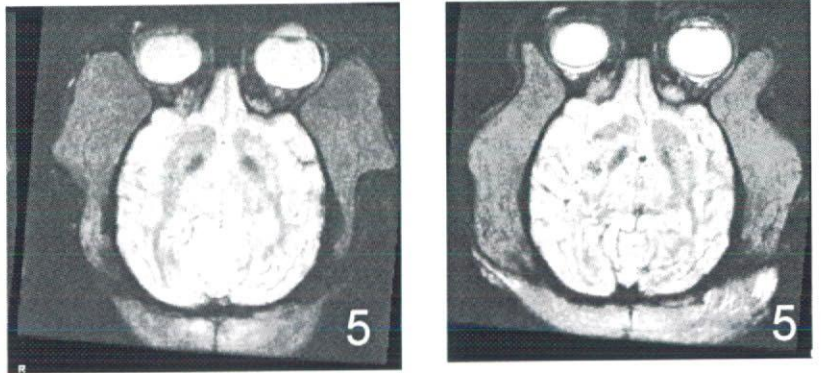
T1



T2



T2\*





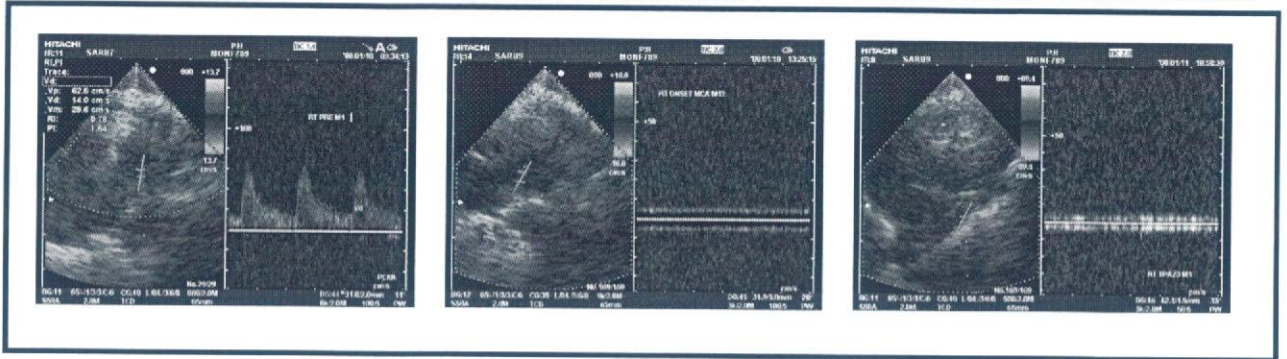
709

pre

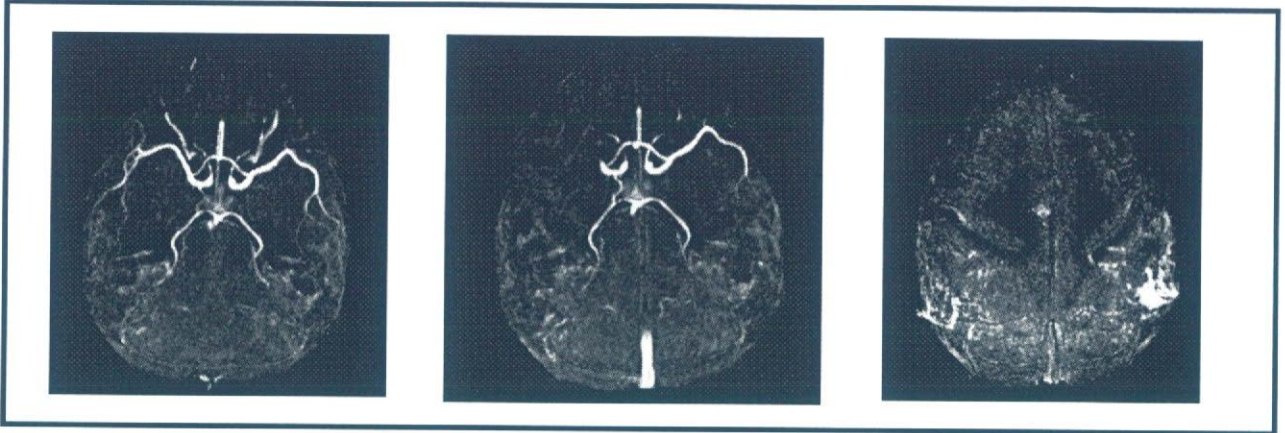
Post embolization

24hrs after embolization

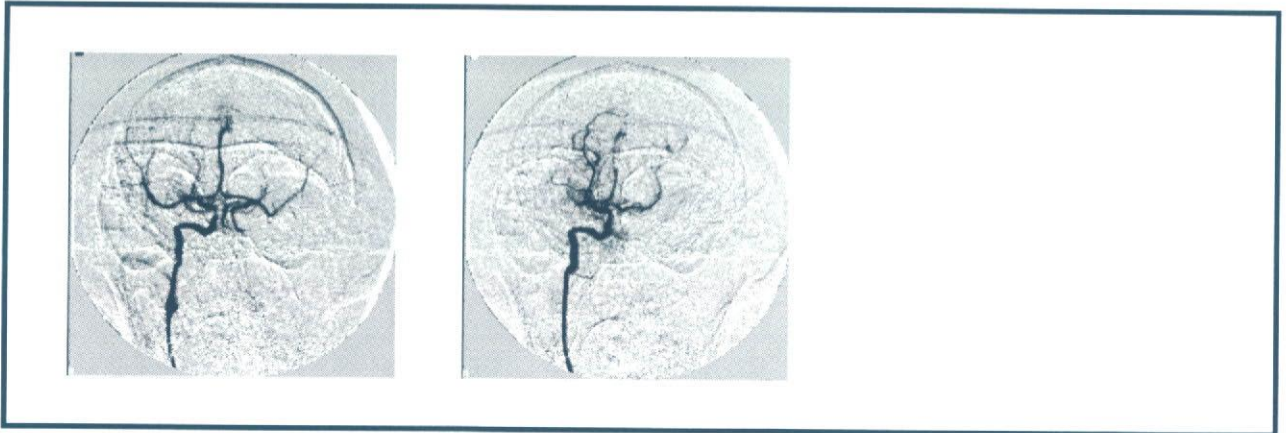
US



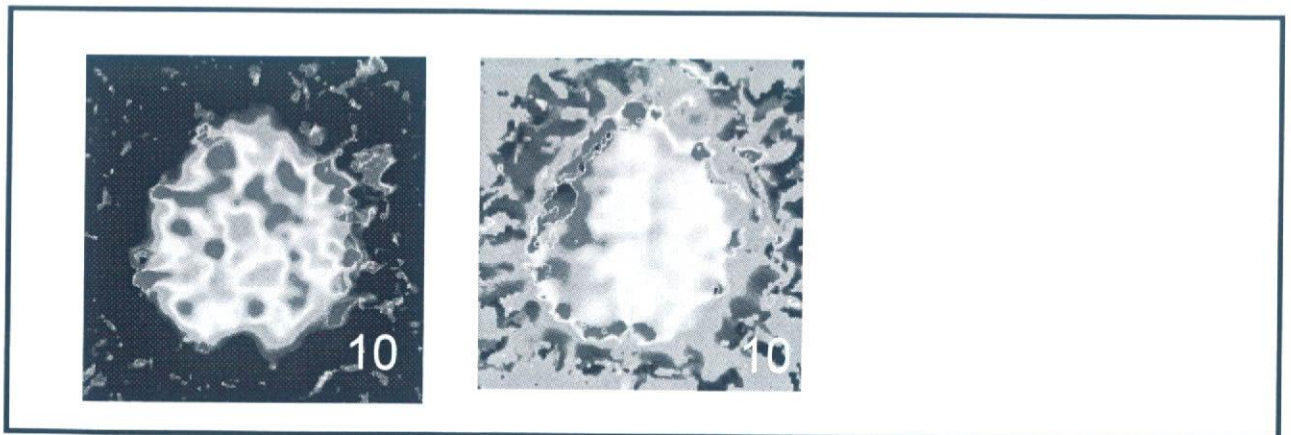
MRA



angio



OEF



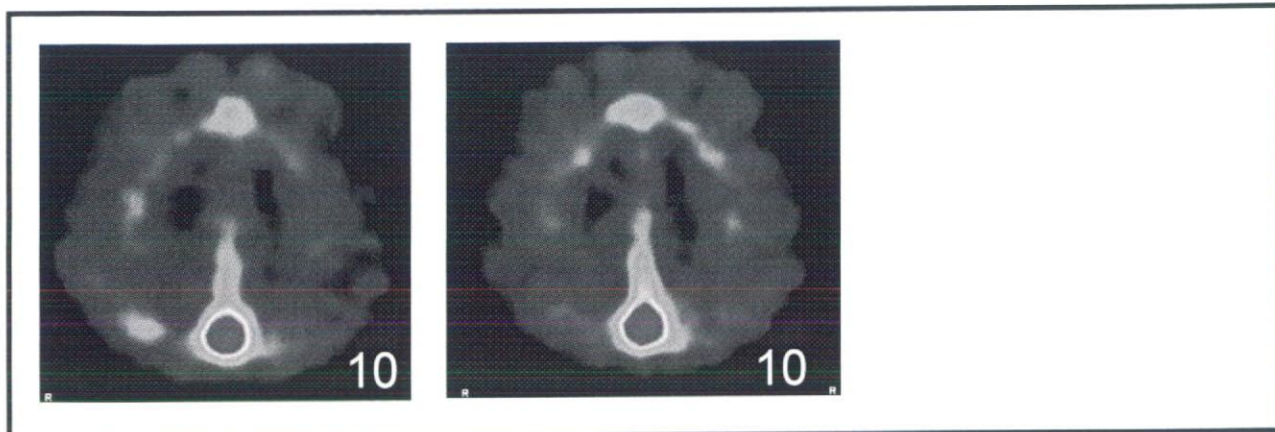
709

pre

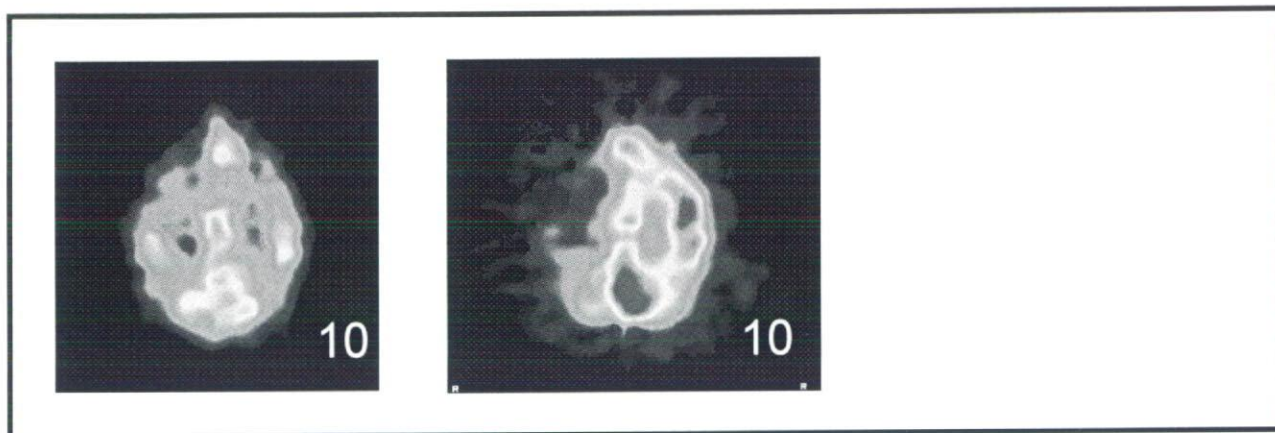
Post embolization

24hrs after embolization

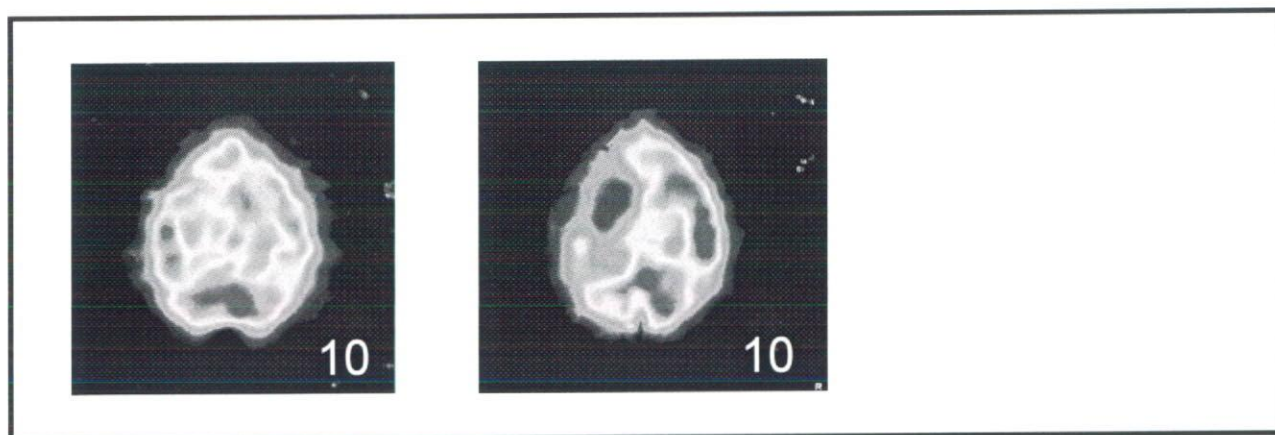
CBV



CBF

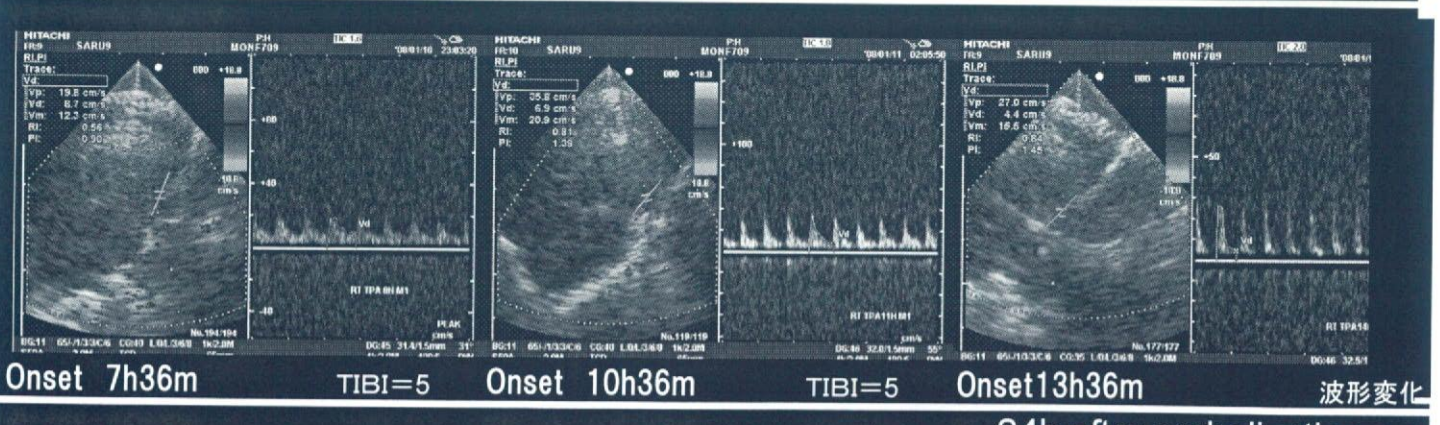
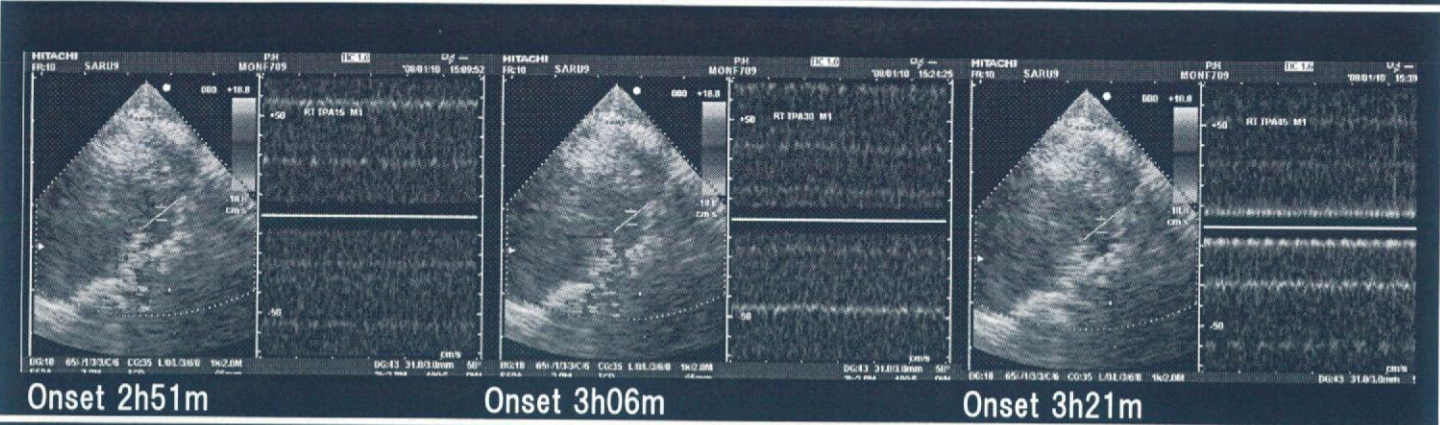
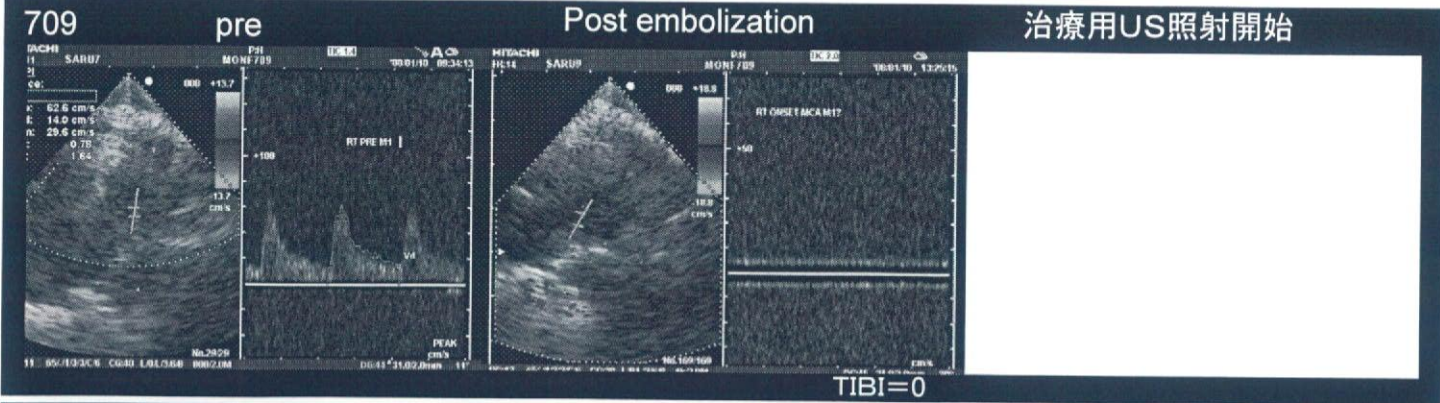


CM  
RO2



**OEF** 脳酸素摂取率  
**CBV** 脳血液量  
**CBF** 血流値  
**CMRO2** 脳酸素代謝量

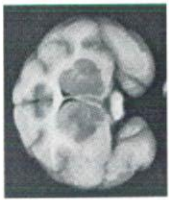




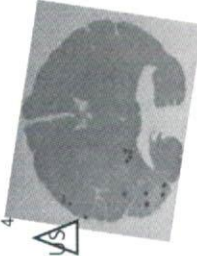
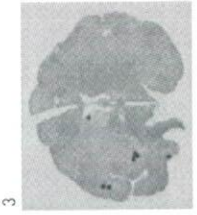




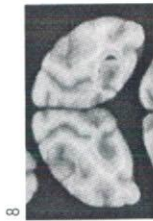
病理肉眼



病理光顯



病理肉眼



病理光顯



8

9

mon710 0

1

2

3

4

5



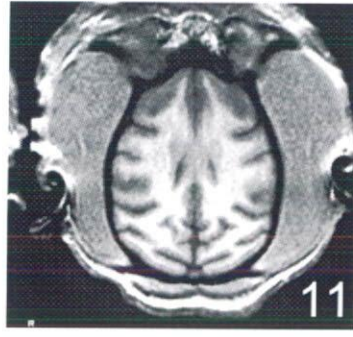
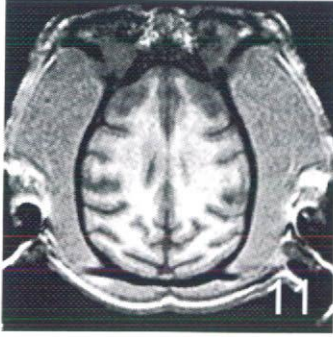
710

pre

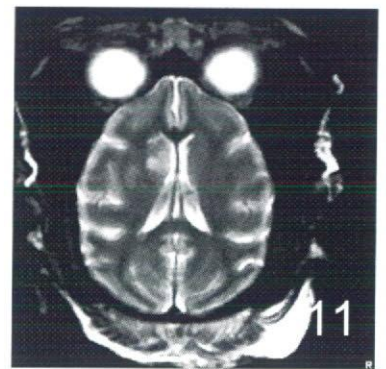
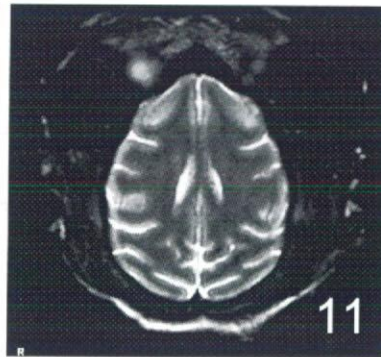
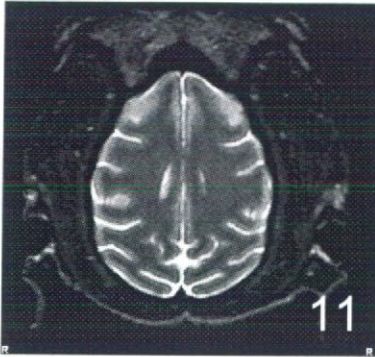
Post embolization

24hrs after embolization

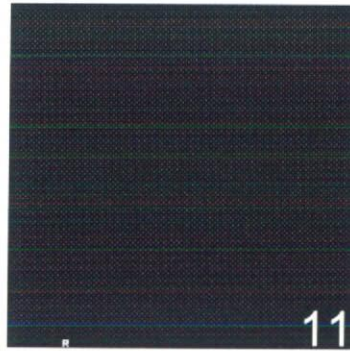
T1



T2



T2\*





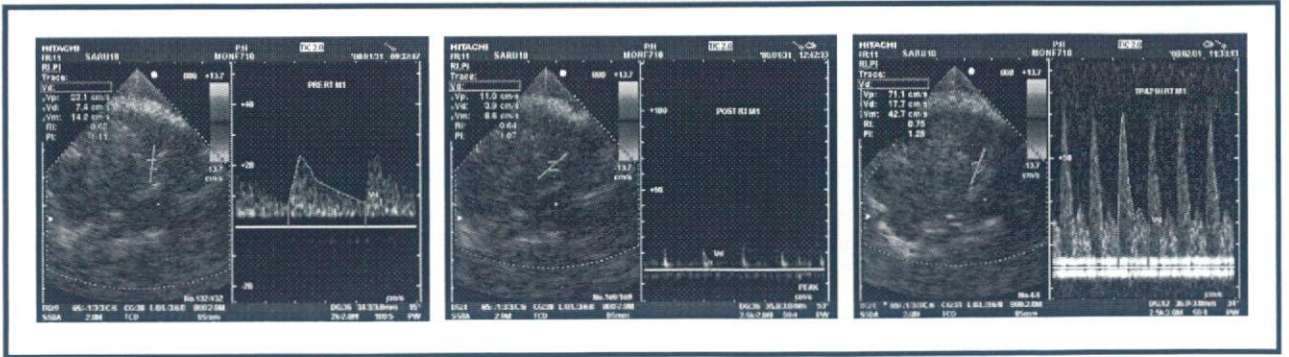
710

pre

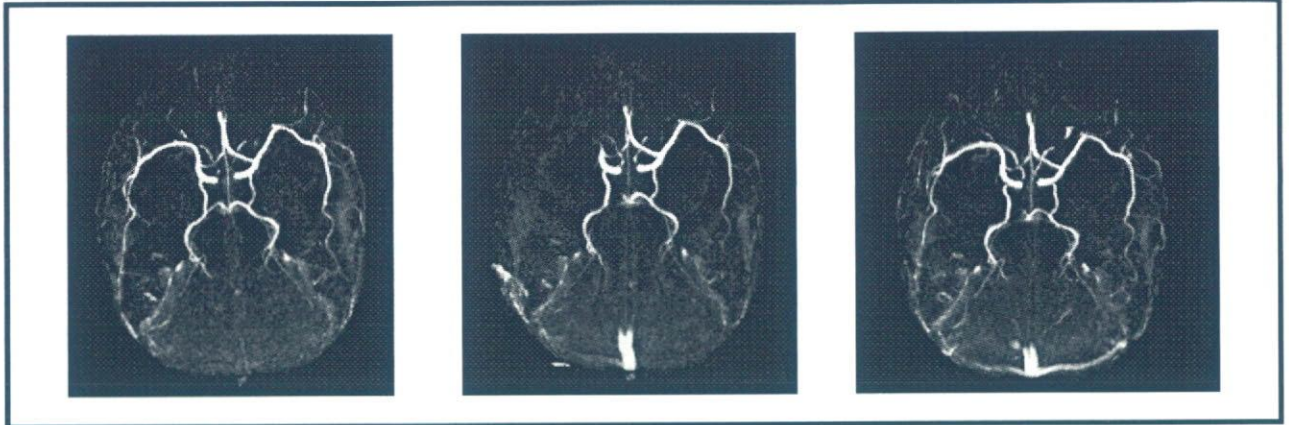
Post embolization

24hrs after embolization

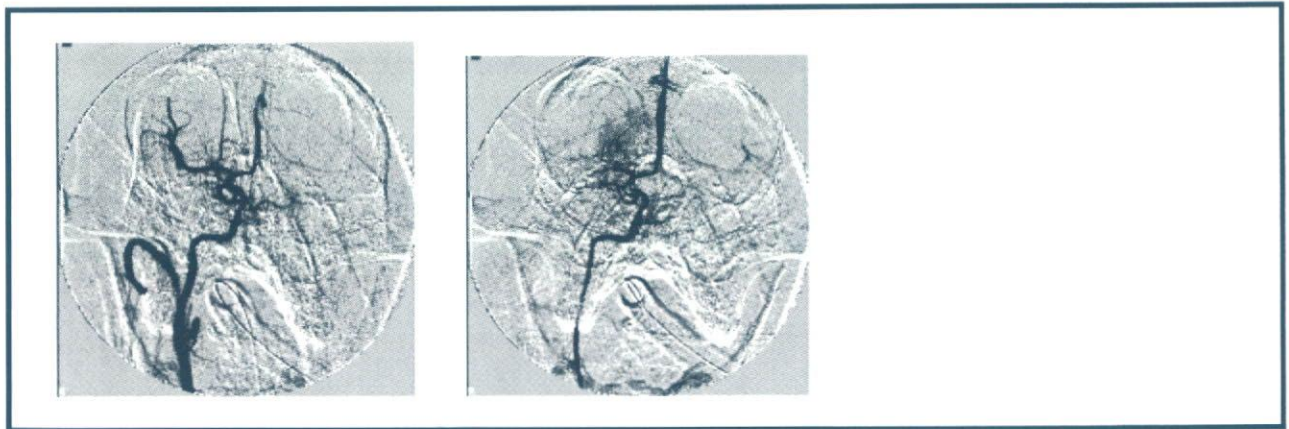
US



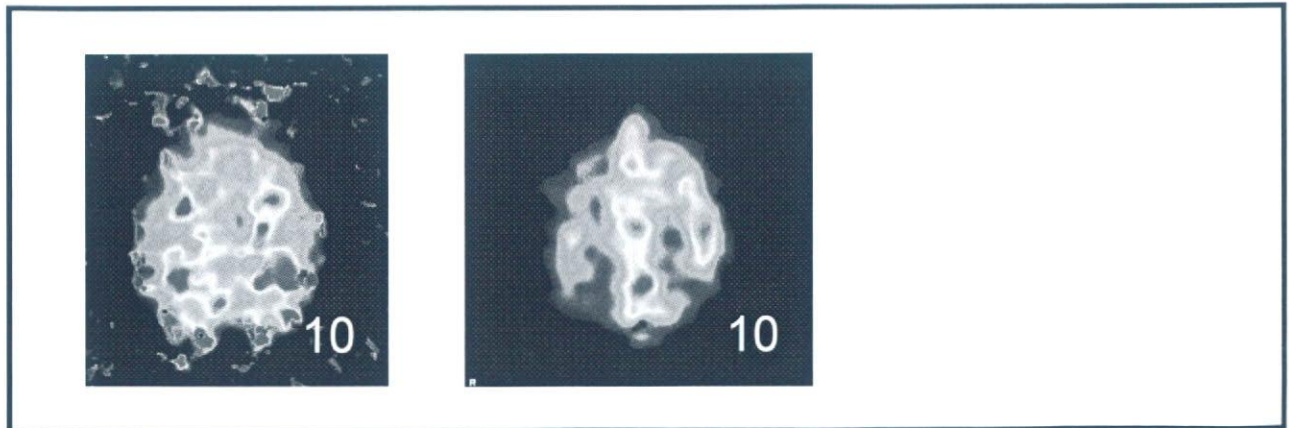
MRA



angio



OEF





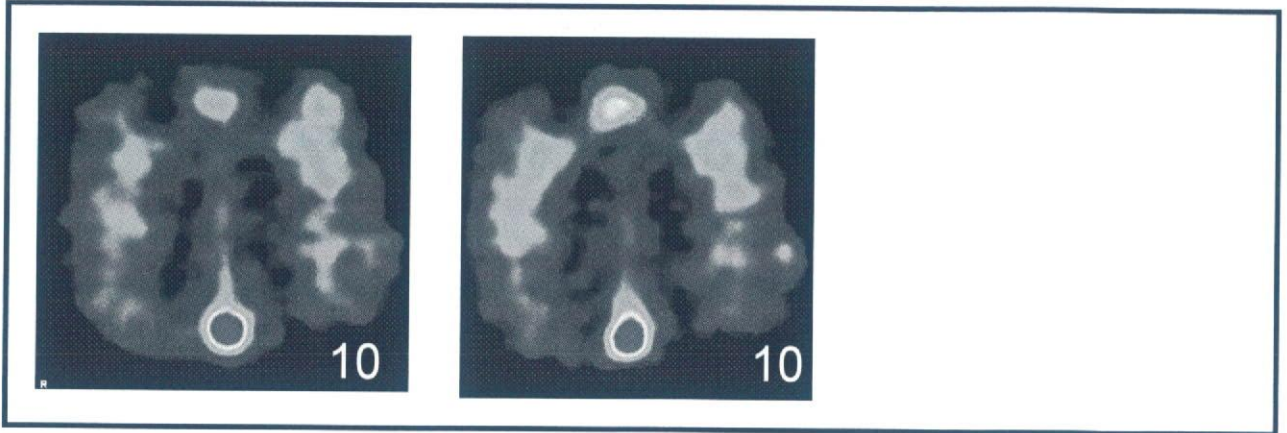
710

pre

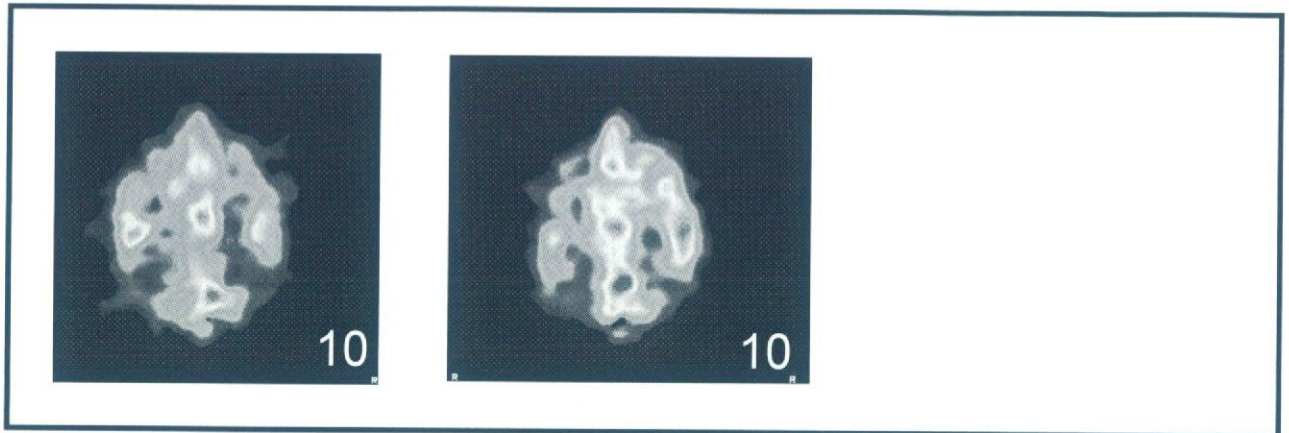
Post embolization

24hrs after embolization

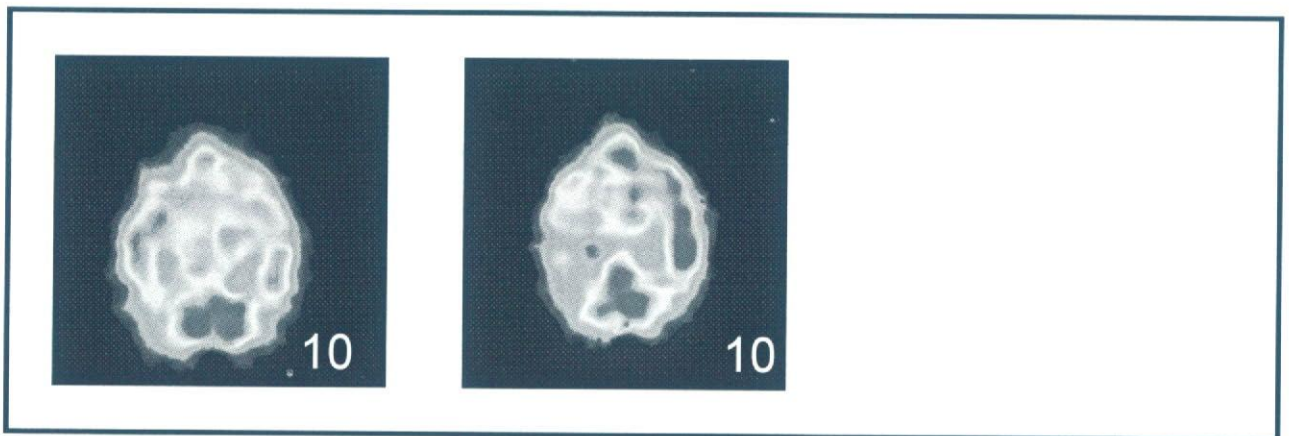
CBV



CBF



CM  
RO2



**OEF** 腦 酸素攝取率  
**CBV** 腦 血液量  
**CBF** 血流值  
**CMRO2** 腦 酸素代謝量

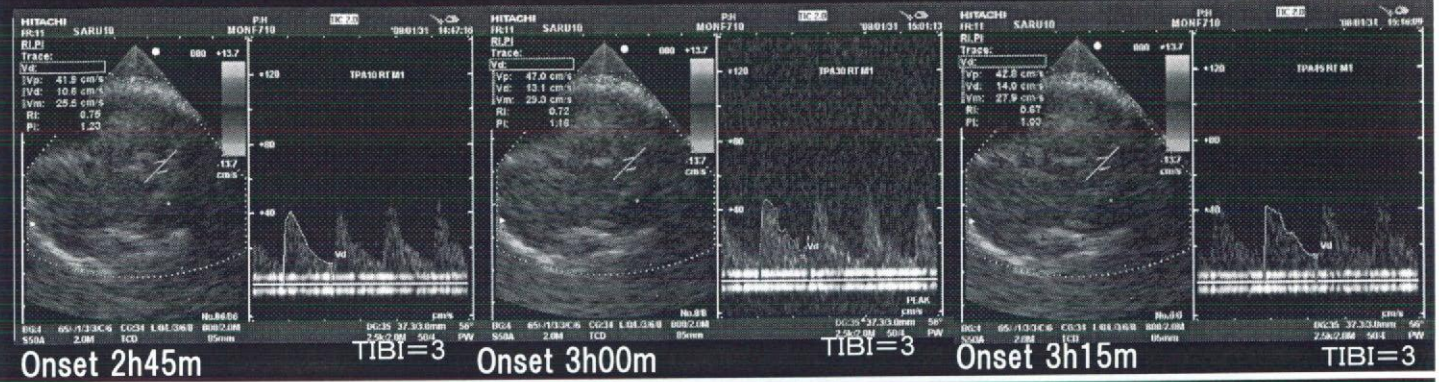


710

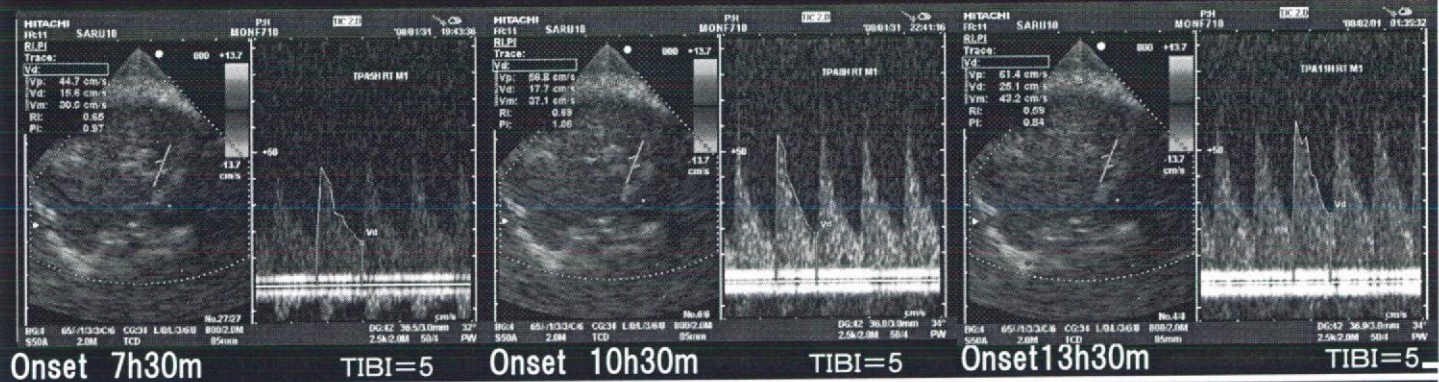
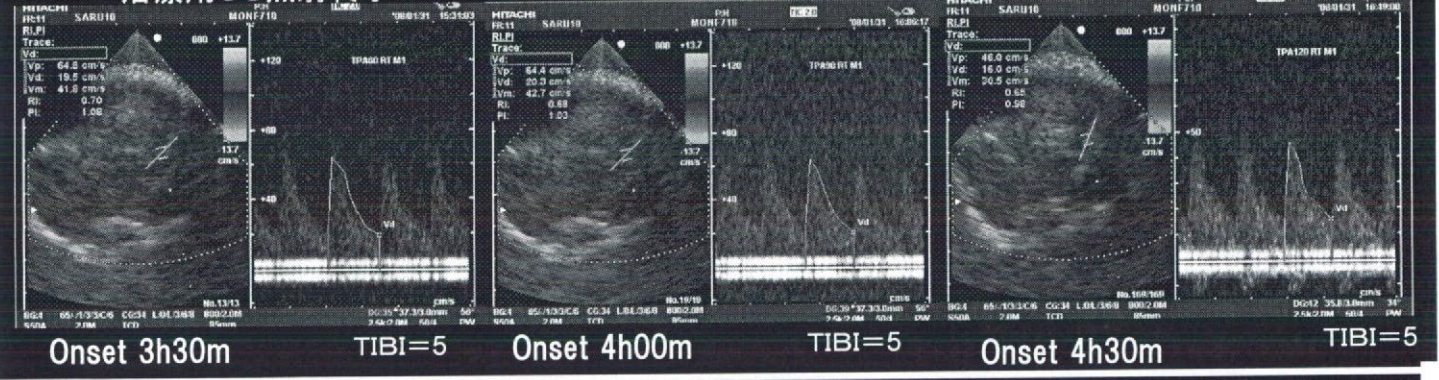
pre

Post embolization

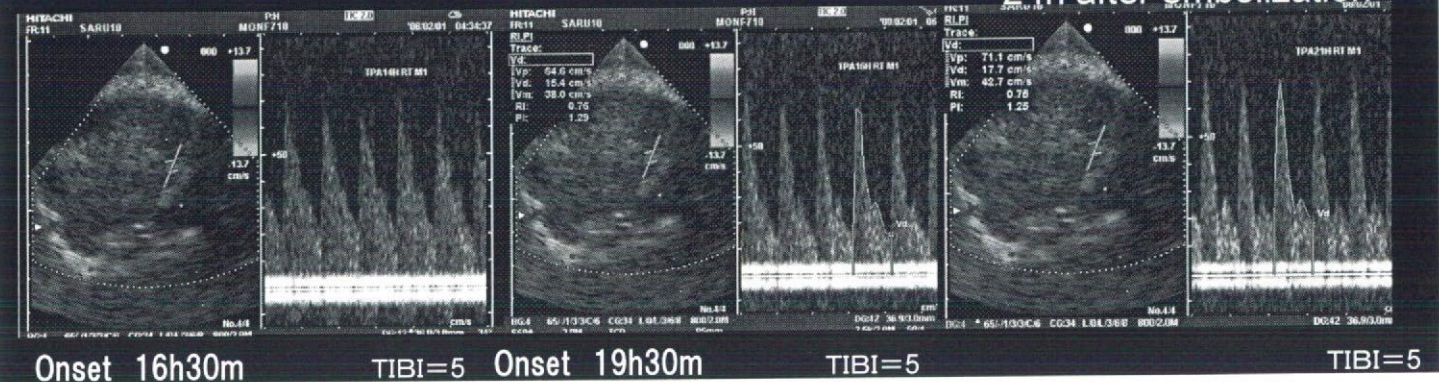
治療用US照射開始



治療用US照射終了



24h after embolization





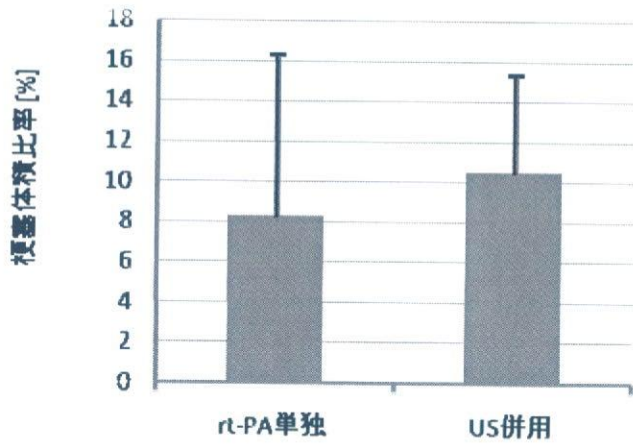


図9 T2Wより算出した両側半球における梗塞体積比率の比較

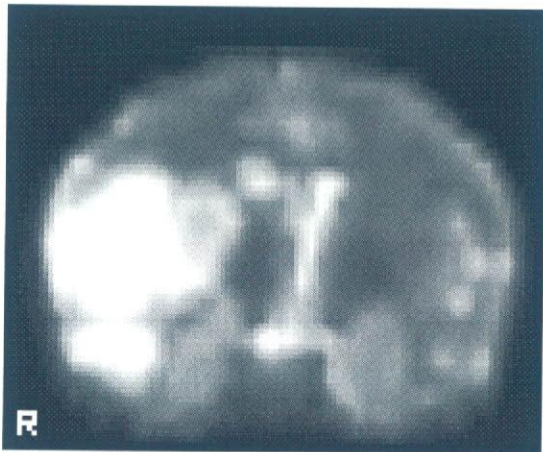


図10 T2強調画像(前額断)における梗塞領域の評価

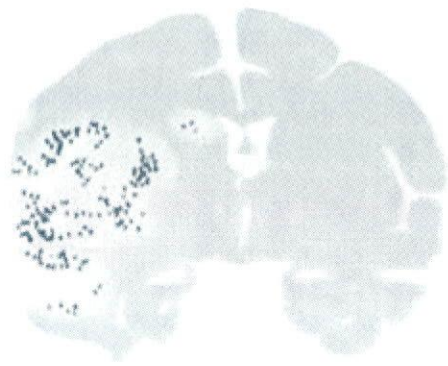


図11 病理所見(HE染色)(点は小出血を認める部位)



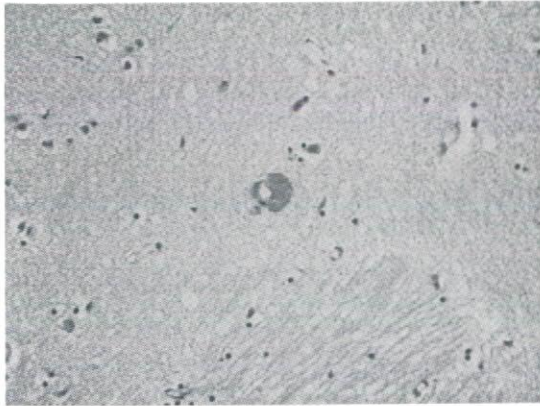


図12 血管周囲の出血

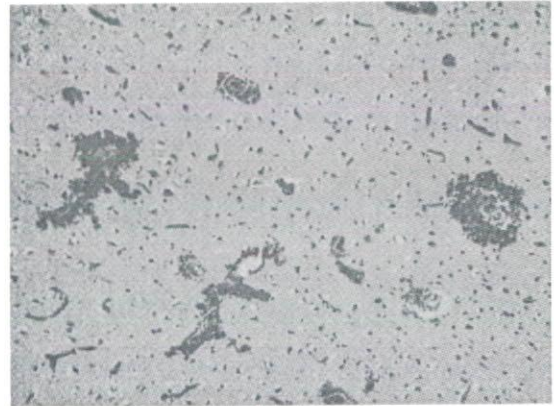


図13 虚血領域脳実質に多発する小出血

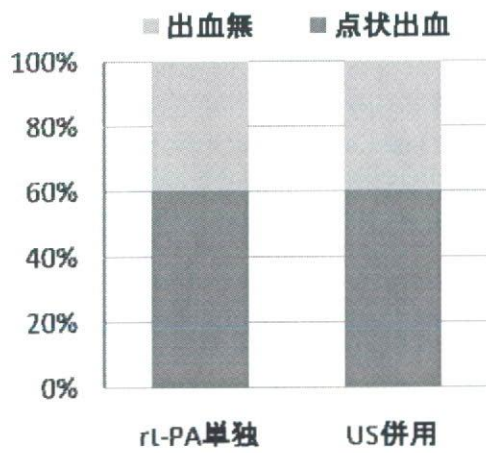


図14 病理肉眼的出血の有無

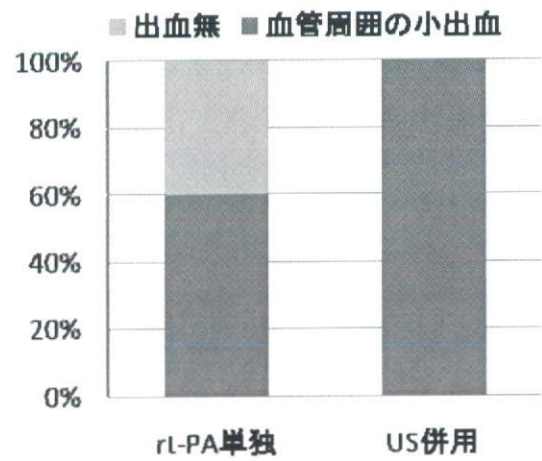


図15 病理光顕的出血の有無



厚生労働科学研究費補助金  
(医療機器開発推進研究事業: 身体機能解析・補助・代替機器開発研究事業)  
分担 総合研究報告書

霊長類動物での自家血血栓脳梗塞モデルによる超音波治療効果の評価

分担研究者	飯田 秀博	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
研究協力者	林 拓也	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
	寺本 昇	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
	渡部 浩司	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
	佐藤 博	国立循環器病センター研究所	先進診断機器開発室

研究要旨:

霊長類動物における自家血血栓脳梗塞モデルにおいて超音波治療の評価を行った。評価項目は安全性(脳内出血)および有効性(脳梗塞体積)とした。5匹のカニクイザルを使用し全身麻酔下において脳梗塞モデルを作成し、rt-PA投与と同時に低周波連続超音波療法(LoFUT)を行いPET, MRIを用いた脳機能画像を得た。超音波の刺激条件はサル頭蓋骨厚を考慮しヒトでのエネルギー条件と相同となるよう調整した。比較対照群として5匹の動物にrt-PA投与のみを行った。出血はMRIによるT2\*強調画像により評価し梗塞巣の体積、虚血巣の体積をMRIによるT2強調画像およびPETによる脳血流・酸素代謝画像により評価した。T2\*強調画像による点状出血と考えられる信号低下部位を、関心群(rt-PA+LoFUT併用治療)で3例、対照群(rt-PA単独治療)で2例に観察し明らかな有意差を認めなかった。点状出血部位は何れもPETで見る虚血巣内に局限し、虚血巣外の出血はいずれの個体にも見られなかった。また組織を圧迫するような実質性脳内出血も何れの個体にも見られなかった。梗塞巣の大きさは、絶対値とともに虚血巣に対する大きさの比により検討したが両群間には有意な差は見られなかった。超音波治療法に明らかな出血転化の促進作用は見られなかった。

A. 研究目的

現在国際的に認められた脳梗塞の治療法はt-PAによる血栓溶解療法のみに限られる。しかしこのt-PAの使用条件に適応した症例は実際の急性期脳梗塞患者の10%以下にすぎず汎用性に乏しく、t-PAの適応を拡大できるような症例選択法の開発やt-PA治療法の改善は重要な課題である。経頭蓋超音波治療はt-PAと組み合わせる手法でt-PAの血栓溶解作用を増幅させる作用があると考えられておりt-PAの有効性、汎用性の向上に寄与す

ることが期待される。

近年、実際に超音波治療法が脳梗塞治療に有効であるかの検討は臨床試験が複数行われておりそのうち幾つかの例では有効性が示唆されている。一方、独国で行われた非ランダム化前向き臨床試験(TRUBMI trial, Daffertshofer et al Stroke 2005)では脳内出血を誘発する可能性が示唆されたため本試験が中断となり超音波治療の安全性向上のため照射条件(周波数、バースト or 連続性照射等)の改善の必要性が生じた。



古幡らは従来と異なる低周波、低音圧、連続波の刺激条件による超音波照射が脳組織への影響が少ないことを見出し小動物での実験においてその評価を進めてきた。脳卒中研究の分野では出来る限り臨床に近い状況で前臨床試験を行うことが推奨されヒトに近い霊長類動物での研究が重要視されている(Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, *Stroke* 1999)。国立循環器病センターではすでに霊長類動物の自家血血栓脳虚血モデルの作成(Kito et al. *J Neurosci Methods*, 2001)、脳虚血の評価法(迅速脳血流酸素代謝測定法、Kudomi et al, *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005)の開発を行ってきた。

本分担研究では、循環器病センターにおける霊長類動物脳梗塞モデル評価系にて古幡らの低周波連続超音波治療法の安全性や有効性につき評価することを目的とした。

## B. 研究方法

本研究のプライマリーエンドポイントを出血の有無(T2\*もしくは病理検索による)、セカンダリーエンドポイントとして梗塞巣の大きさ(絶対値、全脳比、虚血巣比)を設定した。10匹のカニクイザル(すべて雄性、体重 5-6kg)を用い自家血血栓塞栓による脳梗塞モデルを作成後、試験群(5匹)は超音波治療法とtPA 静注(US+tPA 群)、比較対照群(5匹)にはtPA 静注のみ(tPA 群)を行った。本実験は、国立循環器病センター研究所実験動物委員会の承認を受けたうえでを行った。

動物はケタミンとキシラジンにより麻酔導入後、プロポフォールと塩酸ベクロニウムによる持続静注による十分な麻酔下にて実験を行った。脳梗塞作成と治療実験の前までにMRI装置(GE 3Tesla Signal Excite HD)を用いT1強調画像、T2 強調画像、脳血管画像を撮像した。また実験前日に静脈より血液を採血した後、フィブリンとトロンビンを混入したのちPEチューブ内に注入し24時間32度培養器内に静置し血栓を作成した。

脳梗塞作成日には麻酔導入後、PET装置(PCA-2000A)を用いて迅速脳血流酸素代謝

測定(Kudomi et al, *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005)を行ったのち、血管撮影装置(GE, OEC9800)を用いた脳血管造影下にて4Fカテーテルを右内頸動脈に留置し右中大脳動脈が閉塞するまで上記で作成した血栓を注入した。血管閉塞直後から30分間の間に再度PETによる脳血流酸素代謝測定を行った。

またMRI撮像を血管閉塞から2時間後、24時間後に行いT1, T2, T2\*強調画像、脳血管画像を撮像した。その間十分な持続麻酔により動物を管理した。また梗塞作成後から1時間毎に21時間後まで収縮期血圧、拡張期血圧、心拍数、直腸温を記録した。

脳血流酸素代謝の定量画像をPETデータと動脈血中放射能濃度からを作成した。前後のPET画像と他の全てのMRI画像間は位置合わせを行った。また位置合わせを行った後にPET定量画像(脳血流、脳酸素代謝、酸素摂取率、脳血液量)を作成した。またこれらの画像の各画素値を予測子として当施設のもつ一般化線形モデルによるロジスティック回帰・脳梗塞予測式を用いた梗塞予測確率マップを作成し(図1)、確率0.5以上の領域を虚血巣としてその分布と体積を評価した。梗塞巣は24時間後のT2強調画像を用いて信号強度の高い脳実質の部位の輪郭を抽出した。また出血巣の検出には、24時間後のT2\*強調画像を用い神経放射線科医の診断により出血を疑うT2\*強調信号低下部位を同定した。出血巣の有無、出血があった場合にはその部位と虚血巣分布との関連性、梗塞巣の体積、梗塞巣の全脳体積比、虚血巣に対する梗塞体積比を両群間で比較した。

また各個体で梗塞予測能を算出し群間で比較することで梗塞予測に対する実梗塞形成の違いを両群間で比較できる。例えばある治療によって予測よりも小さな梗塞が出来た場合にはこの個体の予測能が低くなることになる。治療操作が異なる2群間でこの梗塞の予測能を比較することで治療操作の影響を推測できる。予測能の評価には梗塞予測確率と最終の梗塞画像を用いて受信者操作特性(ROC)解析を



行った

解析には以下のソフトウェアを使用した: 画像間の位置あわせには FSL(Functional MRI Software Library, Oxford University)、一般化線形モデリング・予測式の作成と ROC 解析には R (<http://www.r-project.org/>)、画像計算に pybld (<http://homepage2.nifty.com/peco/pybld/pybld.html>)を用いた。

### C. 研究成果

出血を疑う所見は試験群で 5 例中 3 例、比較対照群において 5 例中 2 例でありカイニ乗検定で有意差はなかった( $p=0.5$ )。また出血を疑う所見の部位は試験群では、基底核(2 例)と前頭葉皮質(1 例)、比較対照群では基底核(2 例)と基底核部に多かった。またこれらの部位はいずれも PET により予測された虚血領域の中に存在し虚血部以外の部位で出血を疑う所見は見られなかった(図 1)。

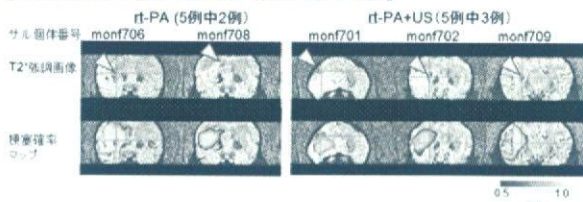


図 1. T2\*強調画像による出血を疑う所見を見た部位と虚血部位との関係(脳冠状断)。上段に T2\*強調画像、下段に T2\*強調画像上に重ねあわせした梗塞予測マップ(確率 0.5 以上)を示す。T2\*強調画像上の出血(矢頭)は何れも梗塞予測マップ内に位置し、周辺組織への圧迫所見なく点状出血が疑われた。左側に対照群(tPA)の2例、右側に試験群(tPA+US)の3例を示す。

梗塞の体積は、T2 強調画像で見た結果、両群で差は見られなかった(Student T 検定、 $T_0=0.45$ ,  $p=0.7$ , 図 2)。PET で評価する虚血巣(虚血確率 0.5 以上の部位)の体積、虚血巣に対する梗塞巣の比も両群で有意差が見られなかった(Student T 検定、 $T_9=0.56$ ,  $p=0.58$ ,  $T=1.7$ ,  $p=0.11$ )。また梗塞の分布は、両群とも

右中大脳動脈領域の皮質下領域の梗塞巣に分布が多かったが両群間に明らかな差は認めなかった(図 4)。

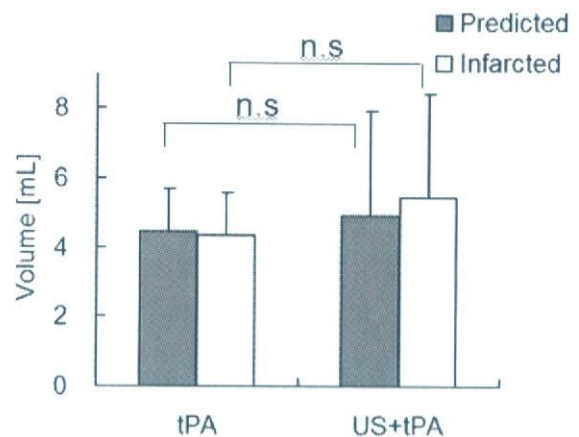


図 2. 梗塞予測 (Predicted) と梗塞 (Infarcted) の体積。それぞれ両群間に有意差を認めなかった。B)

また梗塞巣予測能については ROC 解析による ROC カーブ下の面積(AUC)、最大特異度+感度カットオフ値について両群間で比較をしたが、予測能に有意な差を認めなかった(図 4)。両群とも同程度の予測能で梗塞が形成されたということを示し、治療操作の違いによって梗塞形成確率に変化がなかったことを示す。

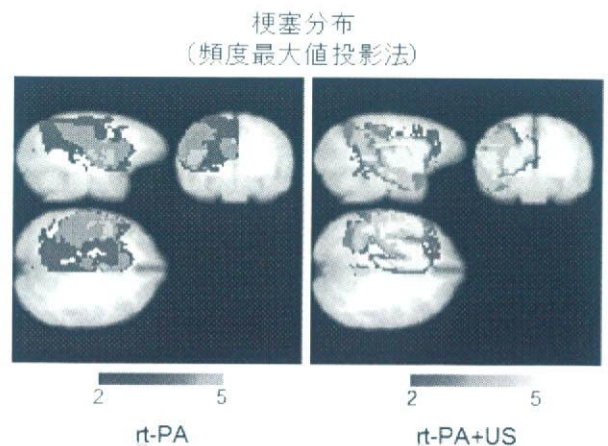


図 3. 梗塞部位のヒストグラムの最大値表示。試験群(rt-PA)、試験群(rt-PA+US)ともに梗塞分布に変動は見られるが両群ともに中大脳動脈域とくに皮質下領域を中心とする梗塞を認め群間に大きな差は見られない。



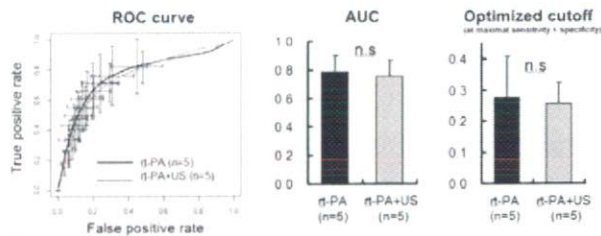


図 4. 梗塞予測法の診断能。左)ROC 曲線。中)AUC、右)最大特異度+感度カットオフ値。何れも両群間に差は見られなかった。

なお実験経過中の動物の心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧、直腸温は、群を要因とする反復測定分散分析を行ったところ時間経過に対する群の作用(反復測定と群の交互作用)は心拍数のみ統計学的有意差を認めた(心拍数  $F_{21,126}=1.7$ ,  $p=0.03$ )が、その他の項目は有意差を認めず(拡張期血圧  $F_{21,126}=0.2$ ,  $p=1.0$ 、拡張期血圧  $F_{21,126}=0.36$ ,  $p=1.0$ 、直腸温:  $F_{21,126}=0.81$ ,  $p=0.7$ )、両群間に生理学的状態の大差はないと考えた。

#### D. 考察

今回の霊長類動物脳梗塞モデル 10 匹での検討では、低周波連続超音波と tPA 注入併用療法による明らかな出血性転化の促進や梗塞体積の縮小は見られなかった。MRI の T2\*強調画像で出血所見を伴った個体の比率は、試験群で 60%、比較対照群で 40%であり少ない観察数であるが有意な差は認めなかった。比較対照群においても比較的高い出血率を呈していたがこれは MRI T2\*強調画像により出血の検出を行ったためと考えられる。通常急性期脳梗塞の臨床診断では出血の有無に関しては CT 検査が使われることが多いが高磁場 MRI 装置であれば出血の検出率は CT を上回ると考えられている。実際、TRUMBI 試験でも MRI による T2\*強調画像が出血の検出に使われており、比較対照群(tPA 治療)において今回の検討と同じく約 40%の割合(12 例中 5 例)で出血を疑う症例が見られた。

一方 TRUMBI 試験の試験群では 14 例中 13 例(約 90%)で出血巣を疑う症例があったが、今回の霊長類動物での検討では 60%(5 例中 3 例)と比較的少ない傾向であった。(同じ霊長類、同じ出血検出法での検討ということで統計処理を行うと)TRUMBI 試験と今回の試験の超音波群出血率に差がある傾向を示した(カイ二乗検定、 $p=0.1$ )。さらに出血の内訳を見ると点状出血は TRUMBI 試験で 14 例中 9 例(群全体の約 60%)、現検討では 5 例中 3 例(群全体の 60%)で比率に大差がなかったのに対し、実質性出血が前者で 4 例(同約 30%)、今回の試験は一例も発生しなかった(カイ二乗検定  $p=0.16$ )。また TRUMBI 試験で点状出血をきたした症例は試験群・対照群ともすべて無症候性であった。今回の試験が TRUMBI 試験と同率の点状出血を呈したにも関わらず実質性出血を見なかったこと、臨床的に問題となる症候性出血の多くは実質性出血と考えられること、を考慮すると、今回の刺激条件が比較的安全性の高いものであることを示唆する重要な成果と考えられる。

今回、当施設の梗塞予測確率マップ作成法を初めて応用し、虚血巣を画像化したことで出血巣との空間分布上の関連性が明らかになった。今回の検討では両群いずれの出血も梗塞確率 0.5 以上の虚血巣領域内に位置した。病理学的には梗塞巣内に点状出血を見ることは tPA の投与と関係なく、脳梗塞の急性期～亜急性期の一般所見として知られる。出血の部位の点から見ても今回対照・試験両群でほぼ同比率の虚血巣内点状出血があったのは、通常脳梗塞で生じる出血性変化の範囲内とも考えられる。これに対し TRUMBI 試験では、虚血巣外に実質性(かつ症候性の)出血を生じた症例が存在したのと対照的である。

また脳梗塞の体積には両群間で有意差はなく超音波併用治療群でより縮小化する傾向も見られなかった。今回用いた梗塞モデルにおける梗塞巣の変動が比較的大きいことを考慮すると陰性結果は観察数が少ないことに依ると想定される。今後の研究の進展や周辺の状態



況にも依るが、少なくとも霊長類動物実験で有効性を示すより再現性高いモデルの開発やより多くの観察数が必要と思われる。

#### E. 結論

少ない観察数であるが今回の霊長類動物による検討は、低周波、低音圧、連続波の超音波照射療法に明らかな出血転化の増幅作用がないことを示唆した。有効性の観察にはより再現性高い方法の選択が必要と考えられた。



厚生労働科学研究費補助金  
(医療機器開発推進研究事業:身体機能解析・補助・代替機器開発研究事業)  
分担 総合研究報告書

サル脳梗塞モデルの作製と血液凝血学的検討に関する研究

分担研究者	寺本 昇	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
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
	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
	林 拓也	国立循環器病センター研究所	放射線医学部室長
	越野 一博	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
	合瀬 恭幸	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
	山本 明秀	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
	樋掛 正明	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
	福田 肇	国立循環器病センター研究所	放射線医学部

研究要旨:

経頭蓋超音波脳血栓溶解療法は、急性期脳梗塞においてtPA等の血栓溶解剤との併用により、その溶解性が高まるということで治療法として期待されている。しかしながら、海外において同様の経頭蓋US併用脳血栓溶解療法の臨床試験で、頭蓋内出血の増加が観察され、本溶解療法においてもその危険性が危惧される。

今回、経頭蓋超音波脳血栓溶解療法(TCT-LoFUT)の安全性試験実施のため、カニクイザルを用いて本治療法の適応領域であるM1-M2自家血塞栓脳梗塞モデルの作製とその塞栓物として使用する自家血塞栓の作製について検討・実施した。

塞栓物は、自家血凝血塊を用い、注入した際、自己溶出による再開通を防ぐ目的で、溶出性の低い、強固な凝血塊の作成・検討を行った。その結果、血液にフィブリン溶液0.1 mL(40 mg/mL)、トロンビン溶液0.1 mL(100 IU/mL)を加えて計1 mLとして均一に混合することで良好な凝血塊の作成が可能であると思われた。

急性脳梗塞モデルの作製は、8~11才齢の雄性カニクイザル10頭(体重 $6.7 \pm 0.5$ kg)を用い、被験群(tPA+TCT-LoFUT併用)5例、対照群(tPA単独)5例の2群構成で行った。モデル作製の具体的な手法は、当研究室で開発した低侵襲的方法により高解像度脳血管撮影装置撮像下に4Frの脳血管撮影用カテーテルを左大腿動脈に留置した5Frシースより導入、右内頸動脈(r-ICA)遠位部にカテーテル先端を誘導し、直径約1mm、長さ3cm~5cmの長軸凝血塊をM1の閉塞が確認されるまで適宜注入した。

結果、血管閉塞領域はMRA画像から得られた血液凝血塊注入後の塞栓部位は、被験群ではr-M1 proximal~M1部 3例、r-ICA terminal~M1部 1例、r-M2,l-M1,ACA部 1例であった。また、対照群ではr-M1 proximal ~M1 3例、r-ICA terminal~M1部2例であった。また、血管閉塞による虚血状態の確認を、閉塞直後のPET画像より確認した結果、程度の差はあるものの全例で閉塞部のr-MCA領域で虚血の程度を反映するといわれているCBFおよびCMRO<sub>2</sub>の明らかな低下が観察された。また、24時間後のT2強調MRI撮像においても全例にr-M1領域を主とする梗塞が観察され、MRI画像で得られた梗塞層のサイズは、塞栓直後のPET定量画像で得られた体積と全例ほぼ同程度の