

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

低周波超音波併用血栓溶解法の前臨床試験  
——in vitro 実験系による有効超音波 vs rt-PA用量の探索——

研究分担者	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
	金本 光一	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 准教授
	幸 敏志	田辺三菱製薬株式会社 研究本部 薬理研究所薬理1A グループマネジャー
研究協力者	王 作軍	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 研究員
	白石 貢一	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 助教

## 研究要旨

血栓溶解剤rt-PAと超音波照射とを併用する経頭蓋超音波脳血栓溶解法の最適条件を探索する第一歩として、in vitro 血栓溶解実験でその最適値（有効な範囲）領域を探索することとした。しかしrt-PA用量及び超音波条件の変化範囲が極めて広く、膨大な実験量となるので、新たに光学式フィブリン塊減少率測定法を考案し、その予備実験でウサギ血液のフィブリン塊を用いて、超音波強度変化実験回数を軽減させ得ることを確認した。

この実験成績を活用し、さらに高精度な分光光度計を活用する光学式溶解率測定システムを設計・製作した。この新測定システムの基本性能も確認した。

次年度からの膨大な実験量に供し得る高効率光学式血栓溶解測定システムを整備することができた。

### A. 研究目的

急性脳梗塞（AIS）患者の治療第一選択技術とされる血栓溶解剤（rt-PA）静注療法を超音波照射によってその溶解効率を高め、再開通時間の短縮を計ることは、AIS患者の神経学的予後に大きく貢献するものと期待されている。既に診断用の経頭蓋ドプラ法（TCD）や経頭蓋カラー・ドプラ断層法（TCCSあるいはTC-CFI）などを用い、極めて良好な臨床成績が報告されている。それらの診断的超音波は周波数約2MHzの高周波数パルス波を使用しているものである。これに対し、1MHzより低い中周波数あるいは低周波数超音波を用いた方がさらに溶解率の高いことがin vitro /in vivo 実験で明らかにされてきたが、未だ有効な臨床適用低周波数超音波装置は開発されていない。

唯一の臨床試験であるドイツのTRUMBI trialは著しい出血率の向上を招き中止となった。その原因は使用した超音波周波数300kHz、波型バースト波による高音響強度、頭蓋内多重反射と実在波の存在などの超音波条件の不適切さにあったとされている。この音響学的不具合を改善すると共に、動物実験で成功していたものが臨床試験で失敗となった医学生物学問題点も解決した、新たな経頭蓋超音波脳血栓溶解法が本研究代表者によって提案され、現在その実用機開発が行なわれている。

しかし、それとてもrt-PA用量・用法は従来法のままとしており出血等の副作用低減化に向けた検討は不十分である。また、多様な条件を選択し得る超音波についても、周波数、波形（パルス波、バースト波ある

いは連続波)、音響強度、曝露時間を幅広く再検討する必要がある。

すなわち経頭蓋超音波血栓溶解法(Transcranial Sono-thrombolysis: TST)の最適化にはin vitro 実験段階から見直す必要があった。ここではその効率的、客観的かつ高精度な溶解率測定法を確立しておくことがその第一歩と考え、新規提案を行った。この提案の有効性を確認するために、次の良好な臨床成績とin vitro 実験では未検証な事実とのギャップを埋める実験を通して、新提案の妥当性を検証することとした。その超音波条件とは診断用の2MHzパルス法で、上述の如く良好な成績を示しながら、今日までin vitro 実験ではその超音波条件の溶解効果増高を示す報告はなかった。

そしてその結果を踏まえ、分光計を活用した高精度光学式血栓溶解測定システムの開発を行うこととした。

## B. 研究方法

### B-1.ウサギ血液によるフィブリン塊を用いた光学的溶解法の原理的確認

ウサギ血液を採取し、遠心分離した血漿を図1のコイン状容器内に静置し、トロンビン注入によって血栓化を行った。容器は、上・下の円形状の板で素材はほぼ透明の光を通過させるものであると同時に超音波も透過し易い材質のものとした。選択したのはポリカーボネートの薄板である。また実験では光源として緑色光を用い、赤色物質の吸収を高める形で、フィブリン塊の厚みと透過光量の関係を図2のように求めた。

図3に、使用した2MHz TCD装置より発せられる超音波ビームの音場分布を示した。使用したTCD装置は米国のSpencer Tech.のPMD-100で、その臨床的超音波プローブそのものの音場をAIMSで三次元的に測定した。図は三次元分布から長軸像と短軸像(プローブ表面から約50mmの断面)。比較例として、フィブリン塊を生理食塩水中に静止した場合、rt-PA溶液中に置いた場合、そのrt-PA溶液中のフィブリン塊に超音波(2MHzパルス波)を曝露した場合の三例について比較した。

### B-2.高精度光学式血栓溶解測定システムの設計・製作

ウサギ血漿を用いたフィブリン塊の溶解実験はC-1(後述)で示すように良好な結果であったので、より高精度な測定系を分光光度計(日本分光社製)を元に仕様変更を特注し製作した。ただしスキャン方式は図4の如くした。このマッピング装置の原理を図5に示した。

また、同装置の[フィブリン塊の厚み]vs.[透過光量]の関係を、ウサギ血栓と同様の方法で作成し、実際上の校正曲線を求めた。

## C. 研究結果

### C-1.ウサギフィブリン塊を用いた光学式血栓溶解測定法の原理的確認結果

図6に生食(PS)、rt-PA溶液単独、そしてrt-PAと超音波の併用の各々の結果を示した。上段は処置前(治療前)で、下段は介入後(治療後)の透過光量写真である。同図左側の超音波併用結果は、その中心部分がやや赤味が薄く、フィブリンの厚みが減少していることを予想させている。

コイン状フィブリン塊の空間的分布を図7に示した。コインの中心から0.5mm間隔で光量を測り、その光量から厚みに換算した結果である。超音波強度はコインの中心から環状に同一強度となるので、幾何学的な位置から放射状の8方向の値を読み、加算平均した結果である。Controlに比し、rt-PA溶液中ではその溶解作用によってフィブリンの厚さは薄くなるが、空間的にはほぼ一様均一である。これに対し超音波を併用した場合には、中心部の減少が大きい分布となっていた。

その時の音場分布を重ね合わせた結果を図8に示した。上段の音響強度分布( $W/cm^2$ )と下段の音圧分布(MPa)を示した。フィブリン塊の厚み減少率から算出した溶解率の変化は音圧と類似した分布の様相を呈した。この図から空間的音場状態と溶解率の関係にまとめた結果を図9に示した。曲線はLog特性を示した。改めて注目すべきは、1回の照射実験で図9のような[音圧 vs 溶解率]や[音響強度 vs 溶解率]の関係曲線が得られることで、実験の効率化が明らかとなった。

## C-2.高精度光学式血栓溶解測定システム

開発したシステムの全景を写真1に示した。元々の装置を一部改良し、光量測定のマッピング方式の変更とそれに適合するフィブリン塊容器を設計製作した結果である。この装置の有する[フィブリンの厚み vs 透過光量]の関係を図10に示した。その処理時間は約2分未満で、極めて高速に実験結果を得ることが可能である。それゆえ補正する幅も少なく済むとも考えられた。

## D.考察

最適TSTの条件探索の第一段階で行うin vitro 実験系に関し、その高効率化の手法を上述の如く開発した。その方法の有用性を従来TCDのin vitro 実験では実証されていなかった血栓溶解効果増高結果で示すことを試みた。図7はTCDを用いてもその強度分布に応じて溶解率増高を示すことができたことから、従前に報告されていたどの方法よりも精度良く溶解率変化を測定し得ることを示すものとなった。しかも、頭部診断用に許容し得る音響強度 $0.2\text{W}/\text{cm}^2$ の効果増強の行えることを図9は示し、かつその強度依存性をも示すものとなった。

加えて、一回の曝露実験で図9のような[強度 vs 溶解率]曲線を得ることができるので、波形と周波数を変えて一回実験するだけで、波形と周波数に関する一条件の強度依存溶解曲線が得られることになる。

なお、臨床的には平均の音響強度 $0.2\text{W}/\text{cm}^2$ がその許容限界である。PMD-100もそのFDAの要求を遵守している。図9の中ではその4倍程度の値を示す結果も得られているが、それはビーム内の空間分布によるもので、最強点では平均値の約4倍程度になるからである。

このようなウサギフィブリン塊を用いて、我々は高精度かつ高速の新システムを開発した。処理速度も速く、かつ空間精度も充分に取れるので、今後円滑な実験の展開が考えられる。

なお、rt-PAの半減期は6分程度である。この半減期に対し、開発システムでは2分程度でコイン状の8方向の値を全て測定し終わることができる。rt-PAの用量問題を考える際には、

この2分間のrt-PAの溶解効果が問題になるのではないかと考えられる。我々のマッピング方式では2つのセルを置き、ほぼ交互に測定するので、隣り合う連続測定間の時間差は15秒以内になるものと予測されるので(図4参照)、用量低減化実験の精度も十分確保されるものと考えている。

## E. 結論

TSTの最適化を計るためのin vitro 実験系に供する高精度光学式血栓溶解測定システムの開発に成功した。またその処理速度、測定精度が今後の膨大な実験量に適する能力のあることをも示すことができた。

次年度以降に必要となる基本実験系の準備を整えることができ、前臨床試験データを積み上げる基盤を形成することができた。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし。
2. 学会発表  
なし。

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

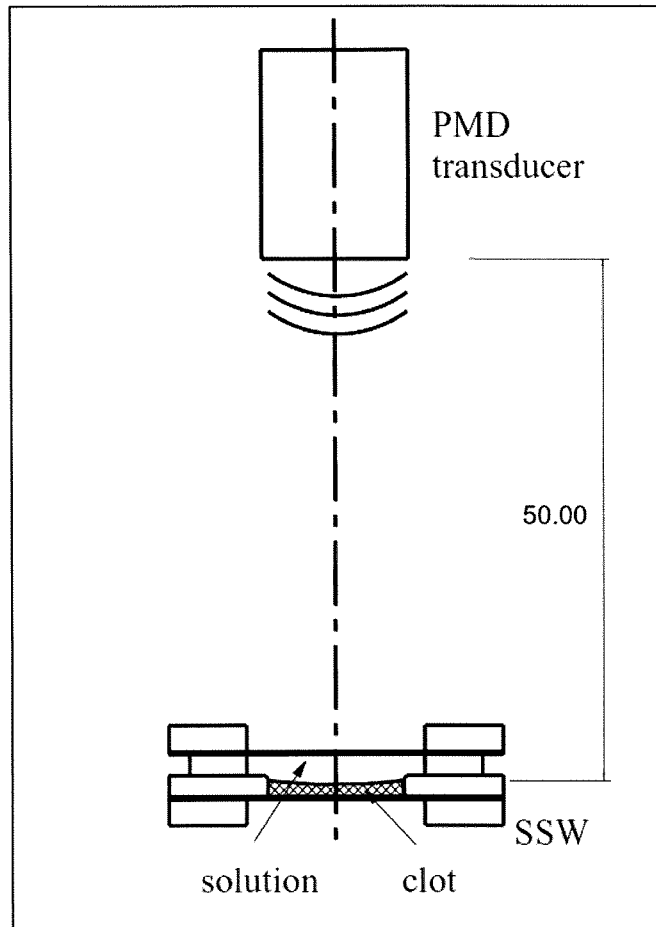


図1 フィブリン塊を入れるセル（特注）  
と超音波ビームの関係

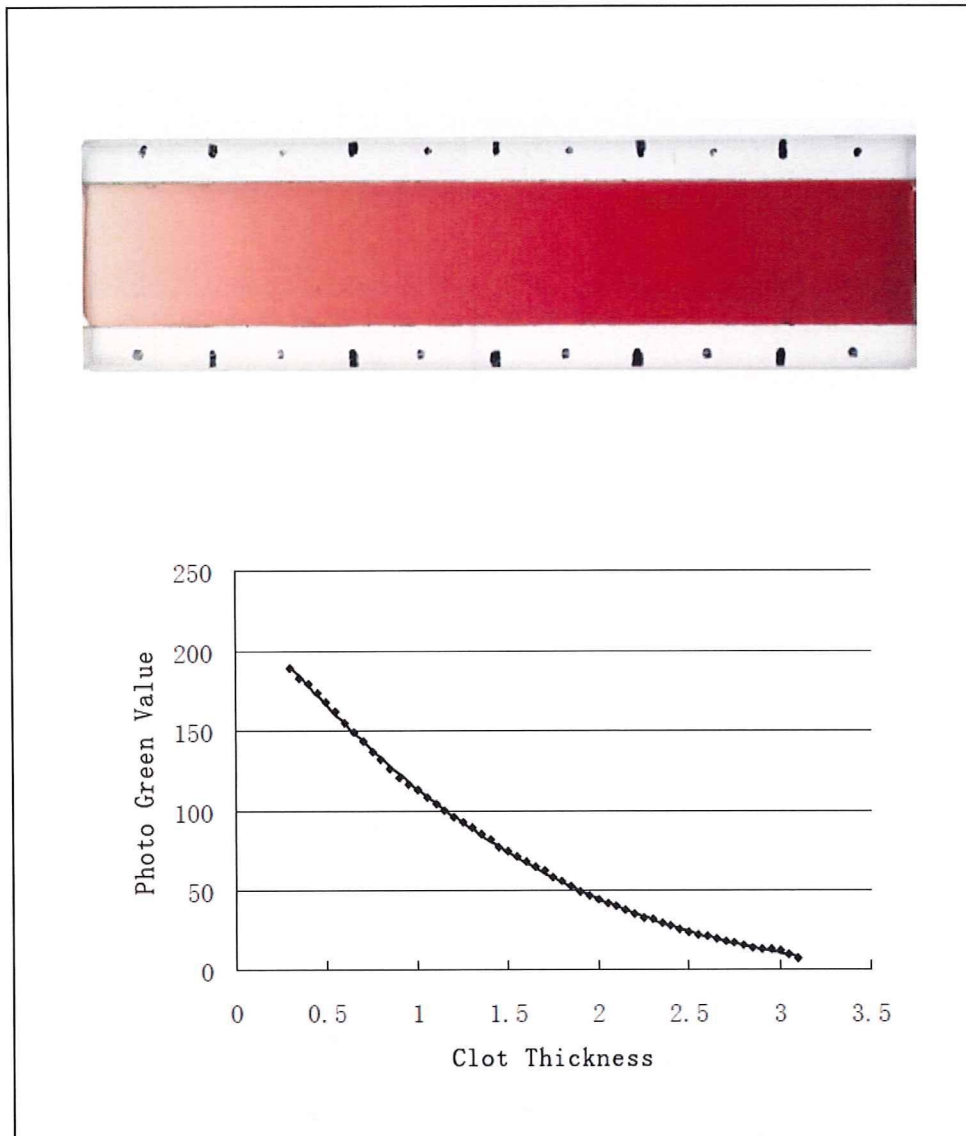


図2 フィブリン塊の厚みと透過光量の関係（使用光源は緑色）  
※赤いほどフィブリン塊は厚く、薄いほど緑色に近づく

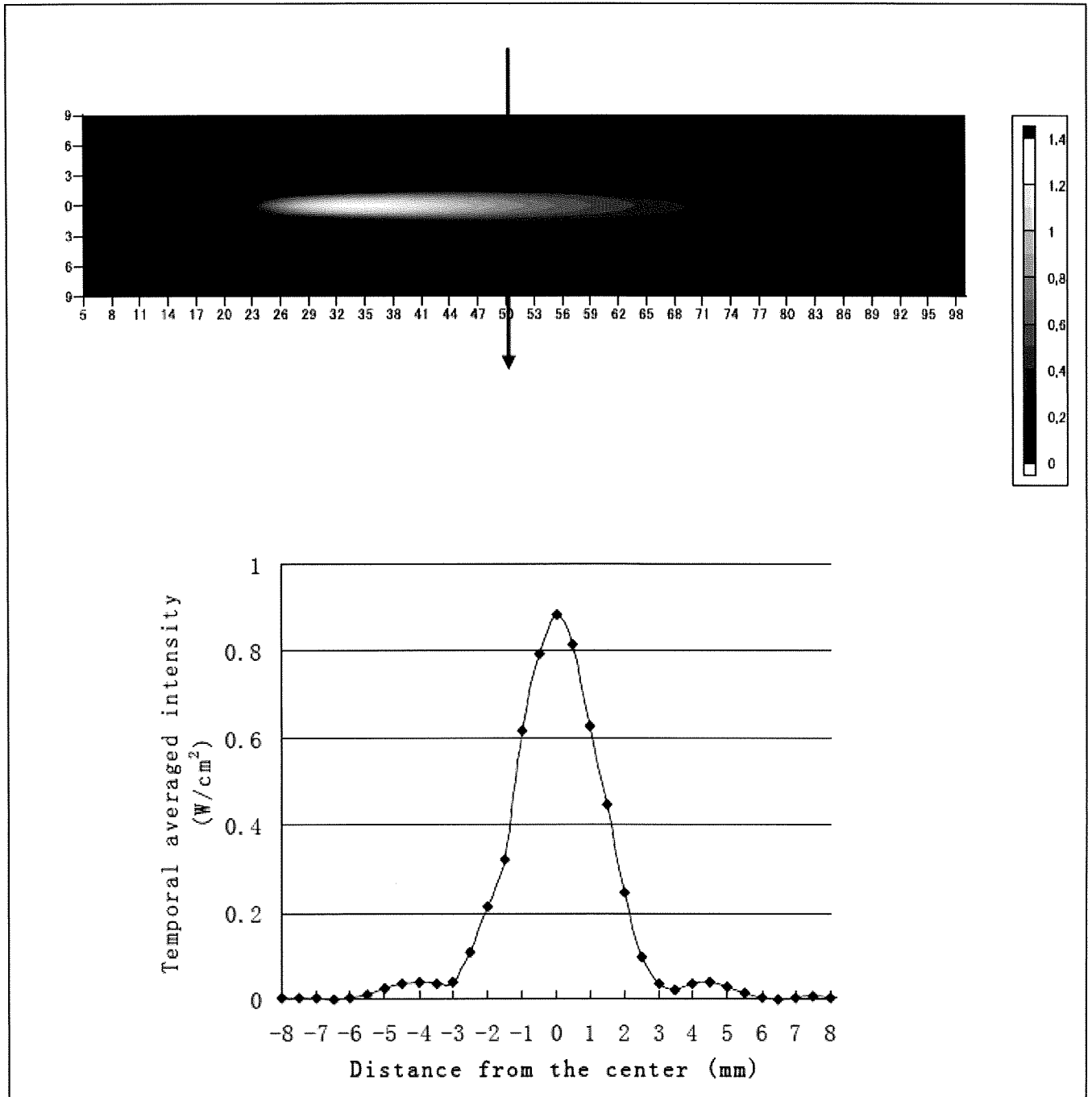


図3 超音波ビームの音場分布の長軸断面状態とマークのつけた短軸断面分布（下段）

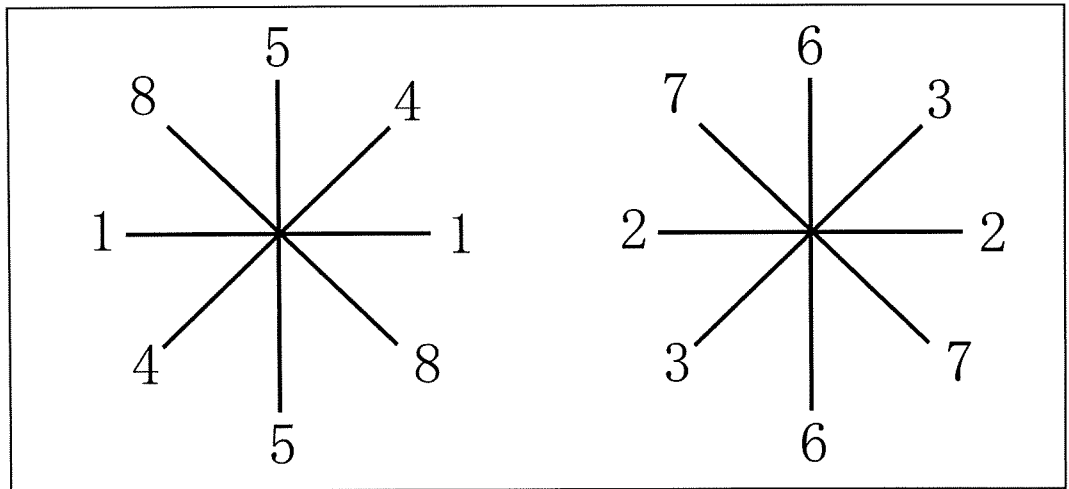
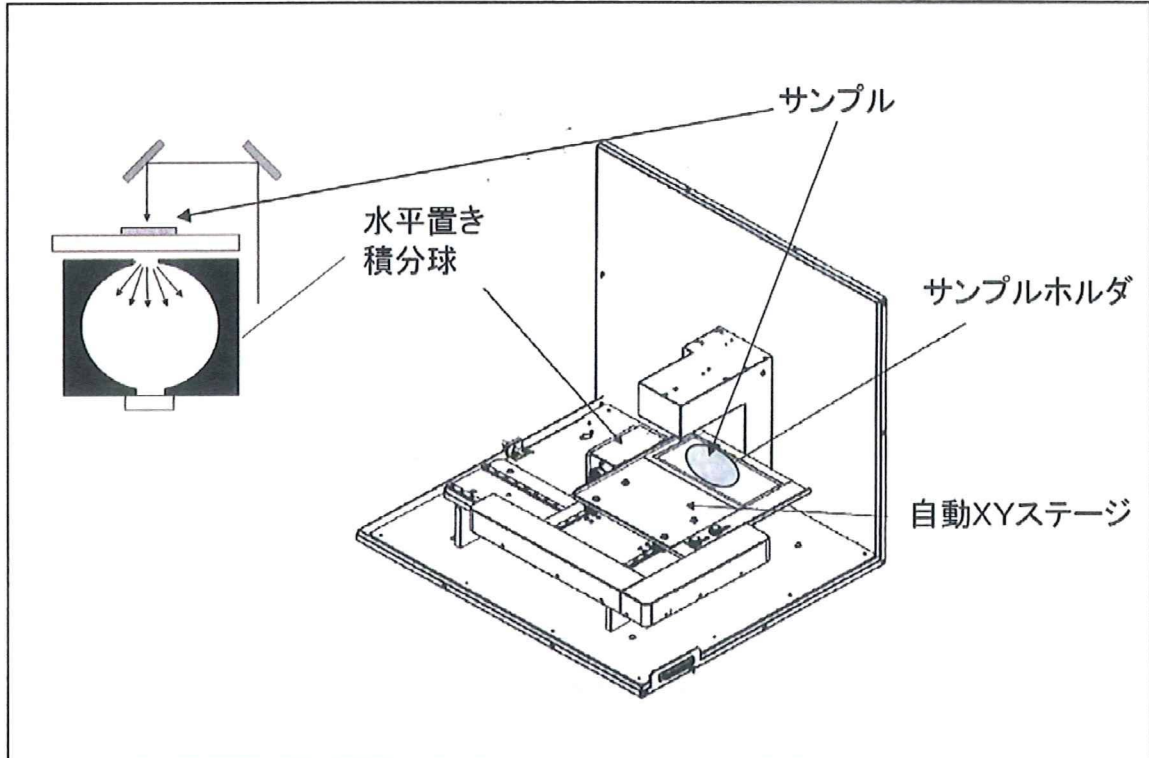


図4 分光光度計のスキャン方式

# 微小部位高速マッピング測定 UV/VIS装置



<b>仕様</b>	
本体	: V-650 (高速取込仕様)
測定	: 透過のみ (反射測定なし)
波長範囲	: 400~600nm
検出器	: 積分球 (PMT搭載)
サンプル移動	: XY自動制御
移動距離	: X 50mm、Y 30mm
ステージ位置精度	: 0.1mm (X軸、Y軸)
試料	: バイオサンプル (厚み0.5~2mm程度)
サンプル設置	: 水平置き
サンプル固定	: 未定。セルの仕様によって別途決定
アパーチャ	: $\phi 0.5\text{mm}$ (サンプル面での光束サイズ)
測定プログラム	: 固定波長マッピング測定 : スペクトル測定

図5 改良した高精度血栓溶解測定システムの原理



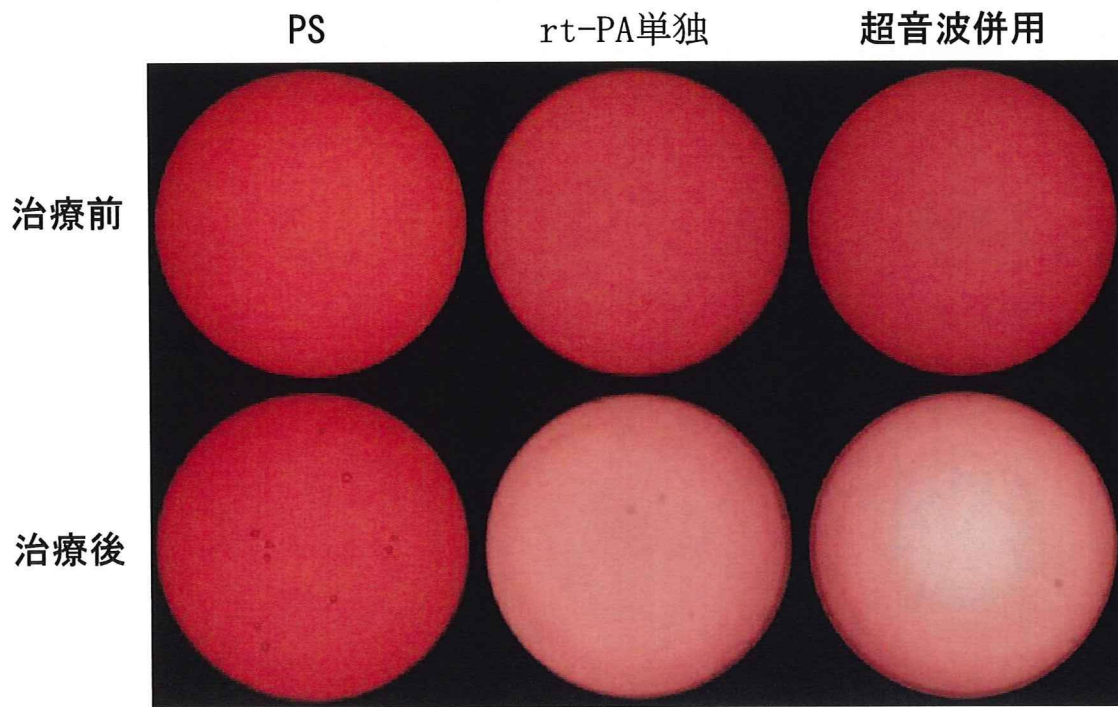


図6 ウサギ血栓の透過光量写真

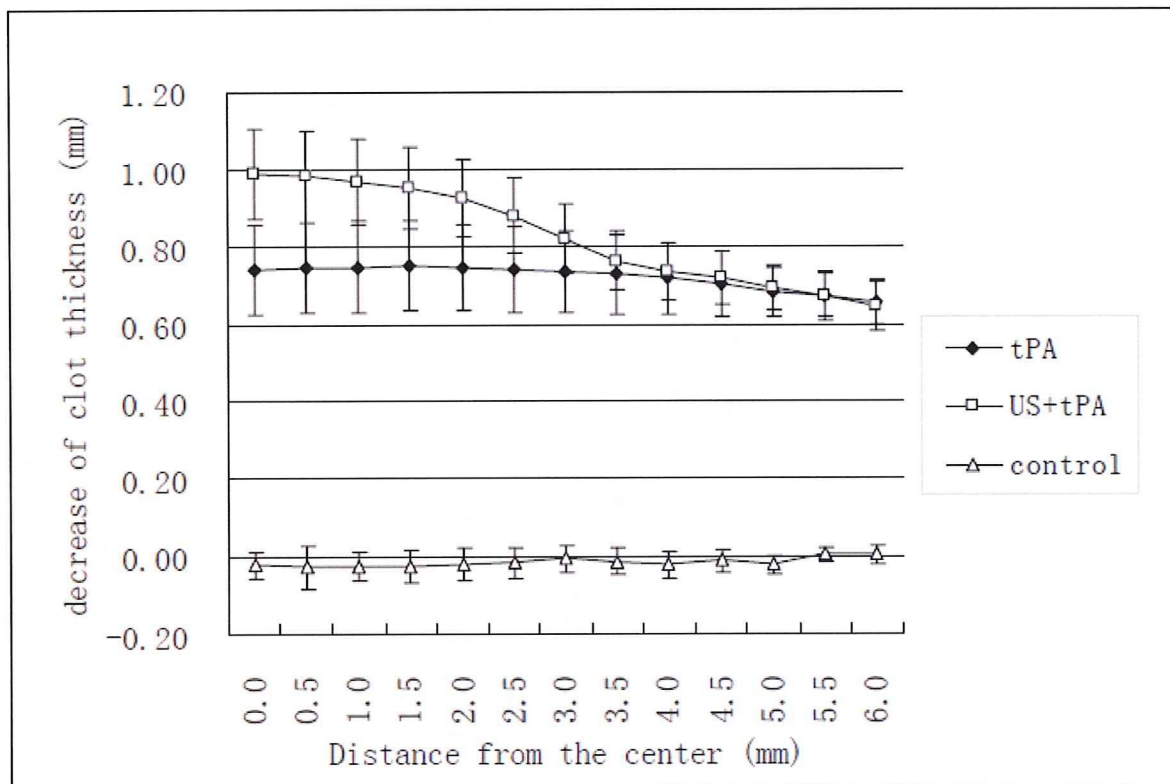


図7 フィブリンの厚みの空間分布

〔中心軸から0.5mm間隔で測定した結果 (ControlはPS群) . 〕  
 分散は中心を通る8方向の各値の分散である。

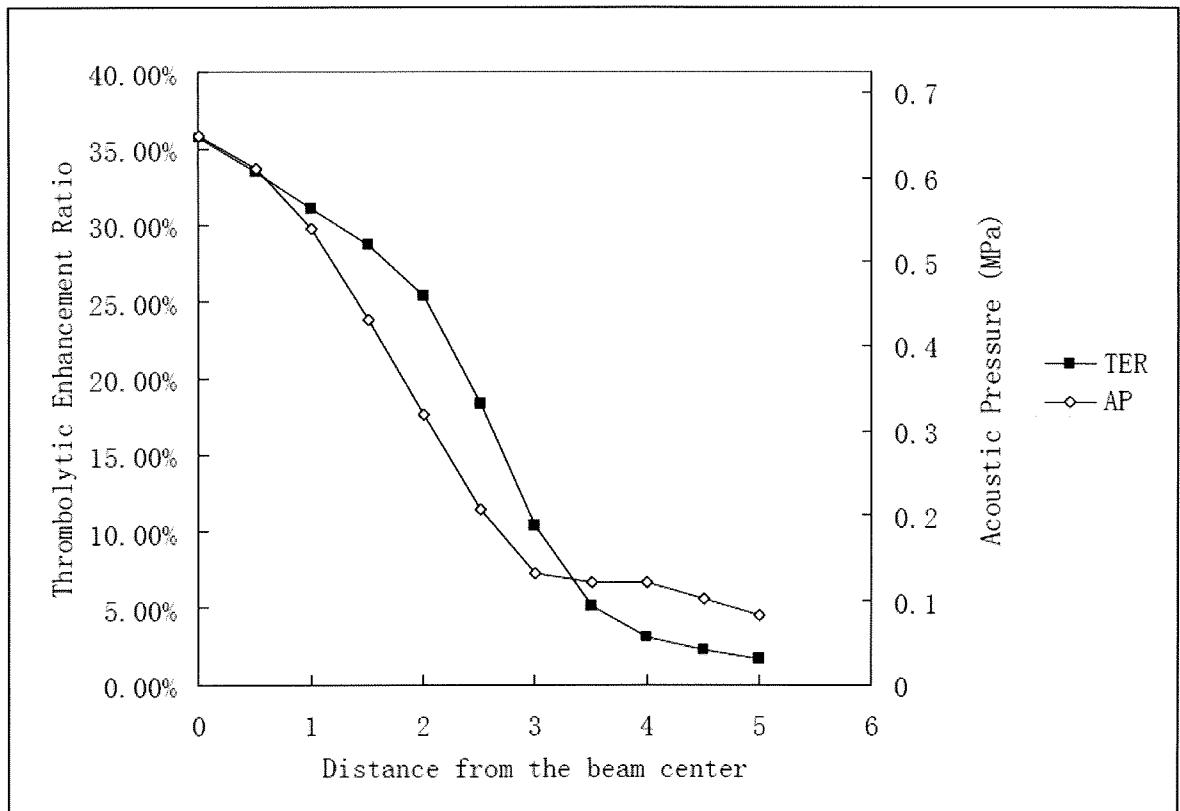
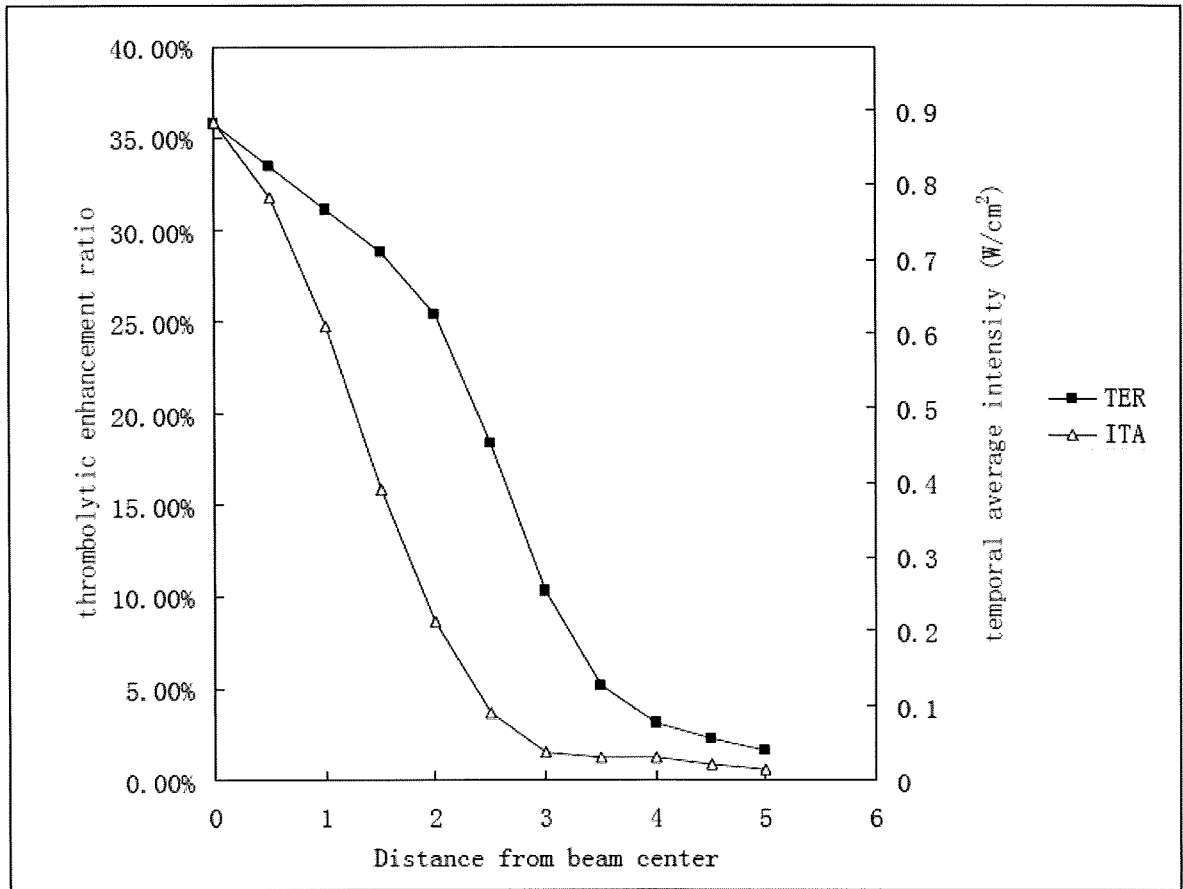


図8 コイン状フィブリン塊の厚さの空間分布と超音波の強度 ( $W/cm^2$ ) (上段) および音圧 (MPa) の空間分布 (下段)

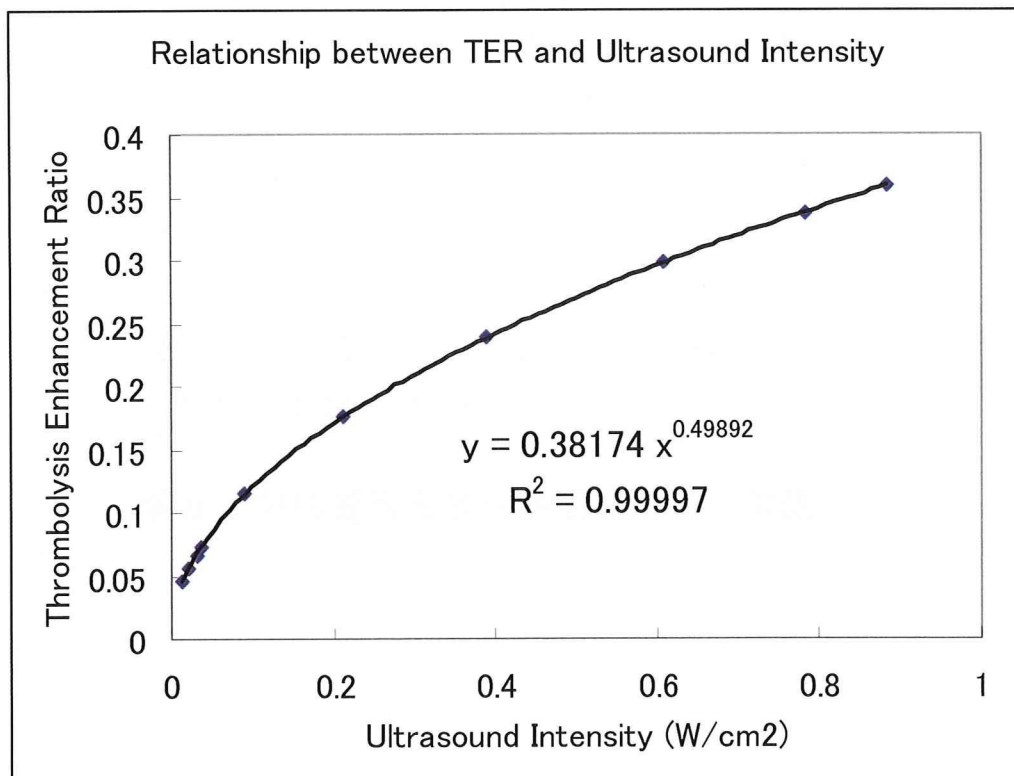
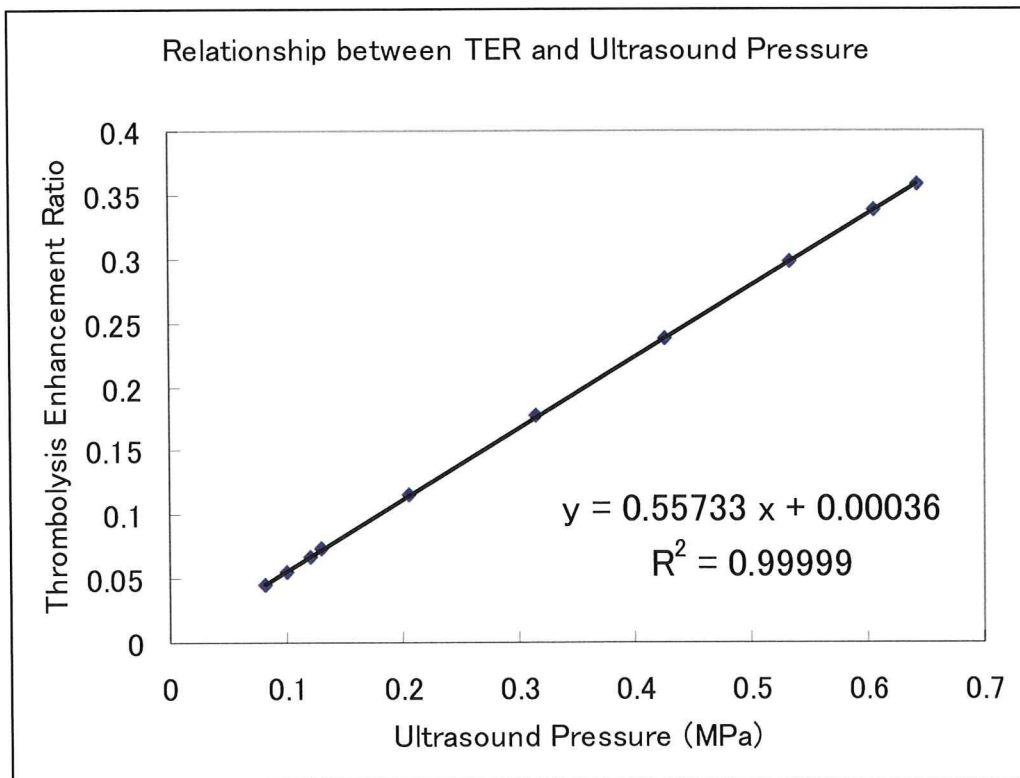


図9 超音波強度 (W/cm<sup>2</sup>) とフィブリン溶解の関係 (上段) および音圧 (MPa) と溶解率の関係 (下段)

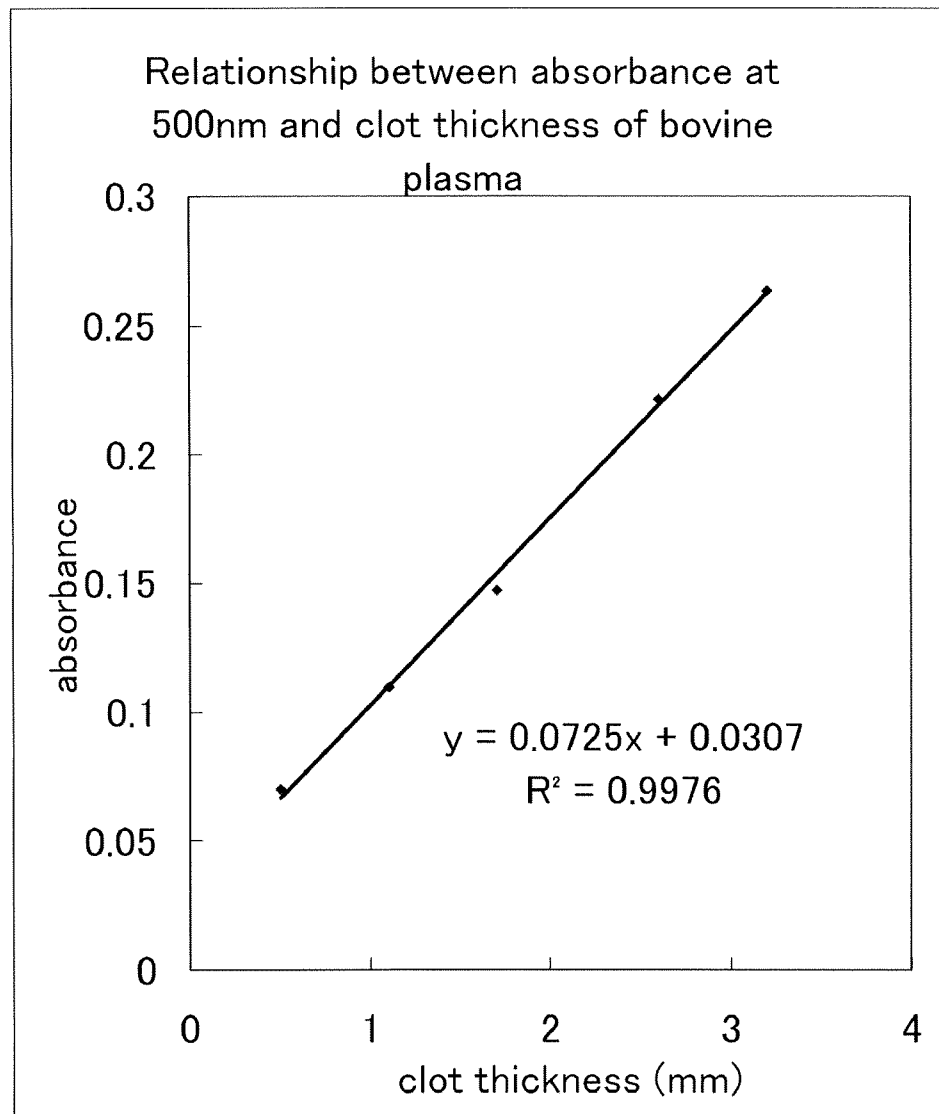


図10 血栓の厚みと光透過量の校正曲線

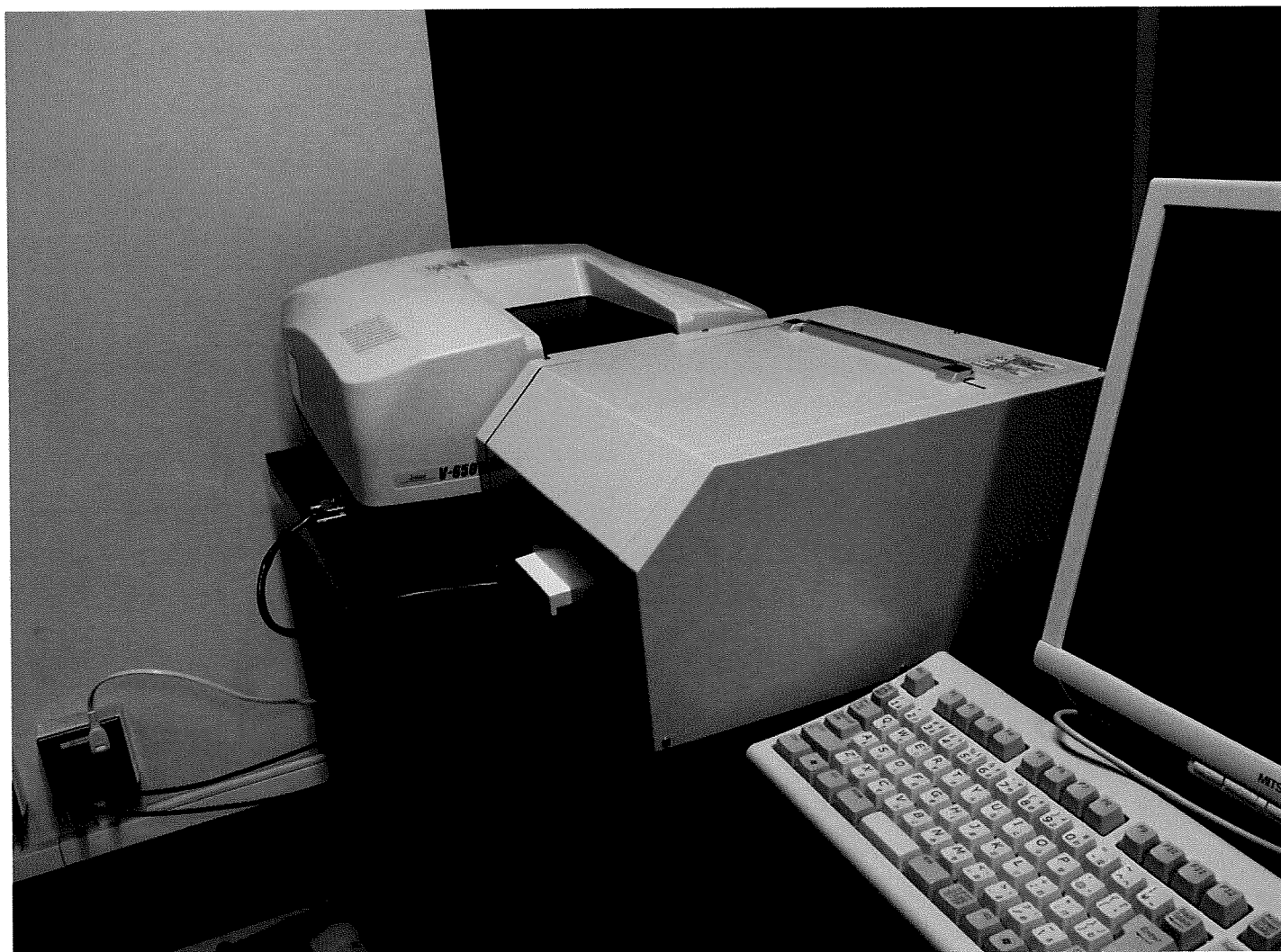


写真1 開発した高精度光学式血栓溶解測定システムの全景

血栓溶解用超音波音場強度分布の測定

研究分担者 金本 光一 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 准教授

研究要旨

経頭蓋超音波血栓溶解法において、血栓溶解剤の濃度を低くしても、血栓溶解効率を維持・向上するための最適超音波条件を求めることを研究目的としている。内外で研究され報告された、主な超音波条件をカバーし、それらを含めた超音波条件殻、さいてきなものを求めたい。そのために、診断用超音波とは違う低周波数から診断用周波数までを含む多種類の振動子を用意した。

これらから出力される超音波音響強度を測定して、振動子による超音波音場を計測した。これにより血栓溶解実験により最適超音波条件を探る実験システムの準備を整えた。

A. 研究目的

急性期脳梗塞治療として、血栓溶解剤 rt-PA 静注による血栓溶解療法が普及し始め、治療におおきな成果をもたらしてきている。血栓溶解剤適用時に血栓部分に適当な超音波を照射することで、血栓溶解効率が向上することが、内外の研究で明らかになっている。急性脳梗塞治療時に経頭蓋的に超音波を照射して、血栓溶解率と血栓溶解速度を速めることにより、脳梗塞治療の効果を高め、予後の改善に資するための「経頭蓋超音波血栓溶解装置」が本研究の研究代表者である古幡により研究・開発され、今後の治験を経て臨床の場に持ち込まれようとしている。

血栓溶解剤 rt-PA は、極めて効果的な薬剤であるけれども、副作用として出血率の増大をもたらすことも知られていて、出血率はその使用濃度に依存するといわれている。

超音波照射によって、rt-PA の血栓溶解効率が上がることから、超音波を照射することによって、rt-PA の濃度を低くしても、通常濃度と同程度あるいはそれ以上の溶解効率を期待できる。

現在開発中の経頭蓋超音波血栓溶解療法では、rt-PA の濃度は変えず、溶解効率の向上を目的としている。使用する超音波は、溶解効率の向上と、安全性の観点から、500kHz 連続波としている。

血栓溶解剤の濃度を低めた条件で、血栓溶解効率を維持向上するための最適超音波条件（周波数、波形、超音波強度、超音波照射時間）は、まだ検討されていない。

最適超音波条件をもとめるために、様々な周波数の超音波振動子を用い実験を行う事になるが、これらの超音波振動子により照射される超音波音場の分布を測定して、今後の実験に備える。

B. 研究方法

血栓溶解剤と超音波の併用に関しては、内外で多くの研究があり、そこで用いられてきた周波数や、波形は様々である。例えば Siegel 等は、40kHz の非常に低い周波数の超音波を用いた研究を発表しているし、Eggers らは診断用カラー Doppler 装置 (1.8MHz) を用いた研究を発表している。

そこで、これらの研究のおもだった周波数を含む超音波振動子として、40kHz, 60kHz, 100kHz ~ 1000kHz まで 100kHz きざみ計 10 種、1.5MHz、2MHz、2.5MHz 合計 15 種類の平面振動子を用意した。

この各振動子について、NTR 社の AIMS (Acoustic Intensity Measurement System) により 1mm ピッチで音場を 3 次元的に走査し、音響強度の 3 次元分布を測定した。図 1 に、AIMS 測定装置を示す。

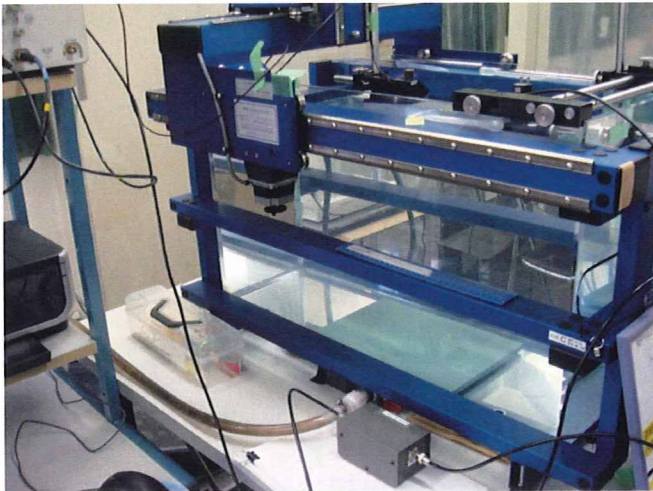


図1 AIMS音場測定装置

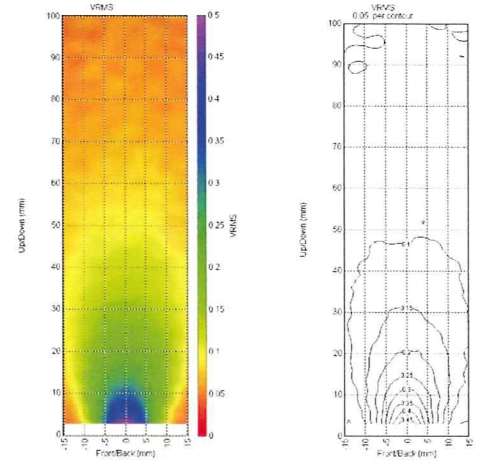


図4 200kHz振動子 音響強度

### C. 研究結果

各振動子について、振動子表面の中心を原点として、各軸1mmピッチ間隔で各点の音響強度を測定した。100kHz,200kHz,500kHz,1MHzの振動子の測定結果を例として示す。

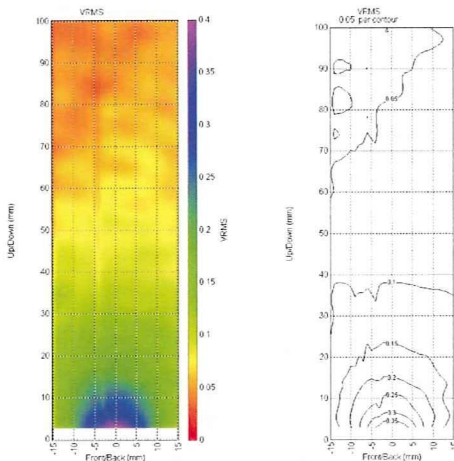


図2 100kHz振動子 音響強度

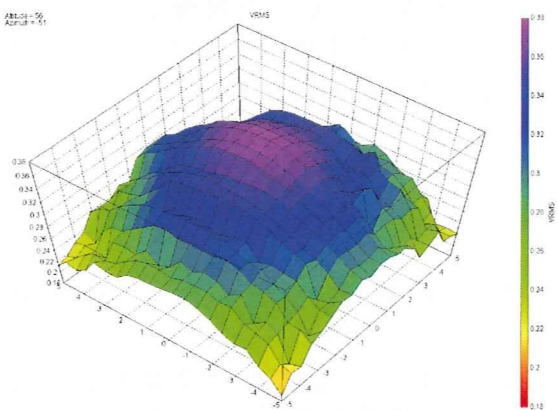


図3 100kHz 音響強度分布図 (深さ3mm)

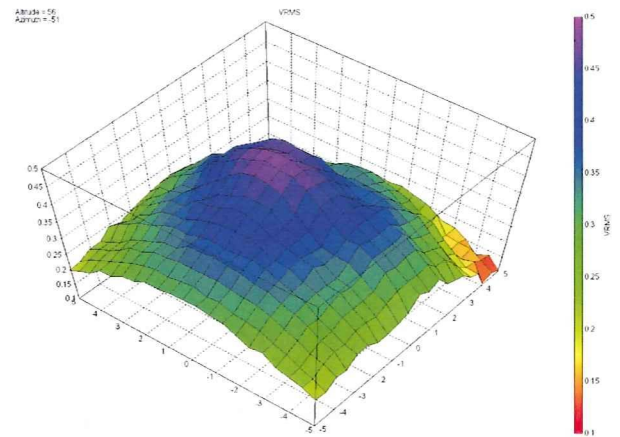


図5 200kHz 音響強度分布図 (深さ3mm)

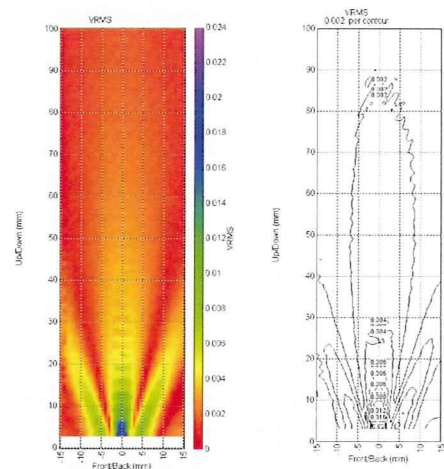


図6 500kHz振動子音響強度

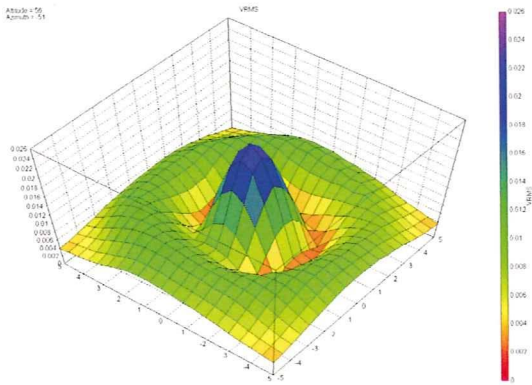


図7 500kHz音響強度分布図(深さ3mm)

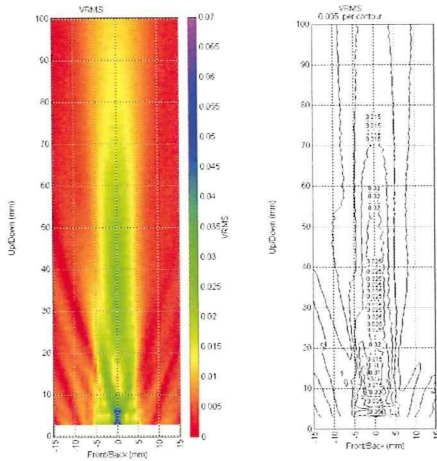


図8 1MHz振動子音響強度

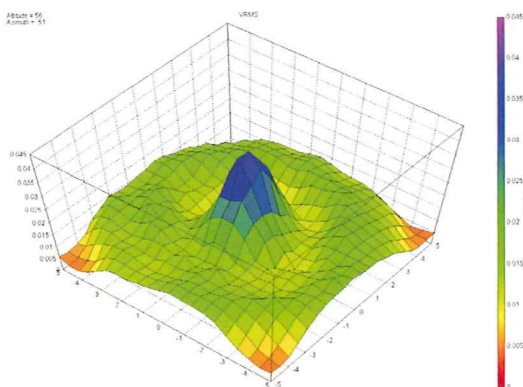


図9 1MHz音響強度分布図(深さ3mm)

#### D. 考察

本年度は、用意した振動子の音響強度を測定した。

円盤状振動子は、振動子からの距離を  $d$  としたとき、振動子の振動面の半径を  $r$ 、発射される超音波の波長を  $\lambda$  としたとき、 $d > 4r^2/\lambda$  のときの音場は遠距離音場となり、音響強度は中心軸上が強く中心軸からの距離に応じて一様に弱くなるのが理論形計算によりもとめられる。また  $d < r^2/\lambda$  の範囲は、近距離音場として知られ、振動子の幅の中で音響強度が一定になり、音波ビームを形成する。

用意した振動子は、 $10\phi$  なので、水中の音速を  $1500\text{m}$  とすると、 $100\text{kHz}$  では振動子からの距離  $1.7\text{mm}$  以下で近距離音場となり、約  $7\text{mm}$  以上で遠距離音場となる。

この距離は例示した周波数でそれぞれ、

周波数	近距離音場限界	遠距離音場開始
100kHz	1.67mm	6.68mm
200kHz	3.33	13.32
500kHz	8.3	33.4
1MHz	16.7	66.8

となる。例示したデータからもこの様子が見える。

周波数ごとに、振動子からの距離を適切に選べば、その距離での音場分布が同心円状に配列するように出来るので、これを用いて血栓溶解効果における超音波の強度の影響を効率的に確認できる。

#### E. 結論

本年度は、血栓溶解効果を維持向上させる最適超音波条件を求めるために必要な、超音波振動子を用意し、この音場分布を測定した。

これにより、次年度の最適超音波条件を検討する準備を整えた。



F. 研究発表

1. 論文発表  
なし.
2. 学会発表  
なし.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし.
2. 実用新案登録  
なし.
3. その他  
なし.

超音波併用療法の神経病理組織学的安全性評価

研究分担者 福田 隆浩 東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター  
神経病理学研究室 講師  
研究分担者 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

研究要旨

低周波超音波（1MHz以下の周波数）経頭蓋的照射に伴う安全性は音響学的問題と医学生物学的問題に大別される。本年度は、後者について、虚血脳の中でも最も出血性変化の大きいと考えられる高血圧自然発症、かつ脳卒中易発症のラット（SHR/SP）を用い、高週齢（20, 24週齢）の場合において、陳旧性脳梗塞の存在する領域を選定した。その高週齢SHR/SPの陳旧性梗塞領域に低周波数約500kHzの超音波を経頭蓋的に曝露した場合の出血率、それも臨床における症候性出血に相当すると考えられる大出血発症率を巨視的に評価した。血栓溶解剤静注に比べ、超音波を併用しても、その大出血の発症率は統計学的に有意な程には変わらなかった。なお、免疫学的評価等については、次年度に検討する。

研究協力者

牧田 未央 東京慈恵会医科大学  
医用エンジニアリング研究室  
王 作軍 東京慈恵会医科大学  
医用エンジニアリング研究室

A. 研究目的

IV rt-PAの再開通率向上と再開通時間短縮の目的で、Transcranial Sonothrombolysis (TST) は研究され、既に診断超音波法 (TCD やTCDS) の長時間連続適用によって、再開通率上昇と再開通時間の短縮効果をもたらし、mRSも極めて良好という臨床成績も報告されている。このTST効果を更に向上させる方法としてin vitro/in vivo実験では低周波数超音波（1MHz以下）を用いた新たなTST技術として、経頭蓋超音波血栓溶解法 (TST-LoFUT) を開発中である。

ただし、低周波数超音波(LUS) を用いて失敗したTRUMBI治験の際の超音波条件とは異なる500kHz連続波インターミット照射法を提案し、すでにJSTプロジェクトによってTCCS診断機能付き標的型装置の開発へ

進んでいる。このTCT-LoFUTの前臨床研究として急性脳梗塞(AIS)の背景因子が及ぼす副作用の検討を行っている。その一つとして高血圧・高齢患者の代表モデルとしてSHR/SPを用いIV rt-PA療法と比較し、出血率が有意に増高しないことを示した。しかし、その中で、陳旧性脳梗塞(old cerebral infarction OCI)内で限定した出血率については検討していなかった。ここでは仮説として「高週齢SHR/SPにおけるOCI内での出血率が採用しているLUS条件では増高しない」を立案し、その妥当性を検討した。なお臨床例における症候性出血に対応すると考えられる大出血を中心に分析した。

B. 研究方法

(1)対象

20週齢と24週齢のSHR/SPを採用した。同動物モデルを選択した理由は、①血圧（収縮期がWRでは150mmHg程度、SHRでは250mmHgそしてSHR/SPでは280～300mmHgと十分に高血圧状態の動物であること、②OCIの発症率が高く、SHR/SP 17w

では15.0%の状態が、20Wでは70%、24Wでは87.5%と高率であることによる。対象を表1にまとめて表示した。

## (2)方法

ラットは1~1.2%のイソフルレン麻酔下に、t-PA溶液(濃度1.0mg/mL)、3.0mLを静注した。その際、10%をbolus注射し、残量を60分間の持続点滴とした。t-PA溶液注入と同時に右頭頂部より、直径5φmmの振動子によって、周波数488.2kHzまたは489.6kHzの連続波超音波を後述するインターミット方式で、経頭蓋的に60分曝露した。その後覚醒させ、24時間後に再麻酔し、ホルマリン灌流による安楽死の後、開頭し、脳摘出を行い、固定後HE染色により神経病理学的にその出血状態を評価した。

## (3)US条件

5φの振動子が形成するUSビームは図1aの様相を呈するものと推測された。図1aはシュリーレン法によってビーム形状を撮影したもので、紙面裏側より先を照射し、その光伝播経路内で音圧により水密度が変わっていると光播時間のずれることから、その歪みの程度を輝度調信号として記録したものである。ここではSHR/SPの頭部矢状断に切断したスライス骨の頭頂側に振動子を置き、撮影した。頭蓋骨部分が厚く見えるのは、ラットの頭蓋骨がやや円錐状に光路方向に断面が小さくなっているため、実際の骨厚は1mm以下であった。音圧の高いのは入口部(頭頂部)と、その直下の反対側(頭蓋骨底部)で、底面部位での音圧上昇は定在波によるものである(東・引用文献)。さらに、三次元的分布を呈するビーム形状をビーム中心軸に直交する断面における最強値を測定すると図1bの如くなり、入口部から深くなると急速に弱まり、深度10mmでは10%程度に減衰する分布となった。超音波影響は主に入口部近傍及びその対側の底面に注目すべきことが示されている。

## (4)病理学的所見

OCIの病理学的所見はヘモジデリンの出現、神経組織の脱落・嚢胞化(ラクナ)およびグリア瘢痕(グリオーシス)の存在で判定した超音波照射後の出血状態は、顕微鏡下で赤血球の見

られるものを小出血、また肉眼的に確認できる状態を大出血として扱った。

病理切片は図2のようにUS入口部を中心に6切片を2mm間隔で作成し、これを左右に分け12切片で分析することとした。上述のUSビーム形状を考慮し、図2中、#0、#1、#2の3片切片をUS曝露領域、他の9切片を非曝露領域としてここでは扱うことにした。定在波の存在し易い、脳底部もUS曝露領域内に含まれている。

## (5)比較群と統計学的評価

出血率は匹数で表すことと、同一個体内に大出血を呈する病理学的所見を有するものは1匹とした。また同一個体内に複数枚に渡って大出血があっても、これは1匹として計算した。図2から明らかなようにUS曝露領域と非曝露領域では切片枚数が1:3となり、非US曝露領域の方が出現率が高くなるので、ここでは各領域毎にt-PA単独投与を基準にして比較した。統計学的判定では95%による信頼値を以て行った。

塞栓では高血圧・高週齢である分、血管脆弱性を高めている可能性が高いので、生理食塩水(PS)とt-PA溶液を同量かつ同様の注入方式で行い、対照群とした。またUS曝露は音響強度0.3W/cm<sup>2</sup>、0.5W/cm<sup>2</sup>、の2強度を設定し、全体として表2に示す様に4群で比較することとした。

## C. 研究結果

### (1)20W、24WにおけるOCI内大出血率

OCIを有するSHR/SP(20Wと24W)PS群における大出血発生率を図3に示した。PS群においても、20W、24Wで大出血の発生を認め、血管の脆弱化が示唆された。t-PA群では両週齢共に50%程度の大出血を招来しており、臨床における5%程度出血率から約10倍程の高出血率状態となった。この状態に対し、2強度のLUSを用いたTSTは20WではUS1 36.4%、US2 10.0%とt-PA単独群よりやや低値を示した。24Wではt-PA単独投与の大出血率よりUS1 88.9%、US2 37.5%と高値を示した。いずれも統計学的に有意では無いが、加齢に伴って超音波に対する脆弱化の傾向のある様に見うけられた。一方、US曝露と非US曝露群では次の結果となった。

## (2) US曝露領域と非US曝露領域の比較

図4にOCIを有するOCIを有するUS曝露領域内での大出血率を示した。20Wでは殆んど大出血状態はどの群にも認められなかったが、0.5W/cm<sup>2</sup>強度のUSで12.5%の発症率を認めた(有意差なし)。24WではPS群で大出血例をわずかに認めるものの、t-PA単独投与群は大出血例がなかった。にもかかわらずUS1、US2の両群で40%を越す大出血率となりLUS照射による出血率増高が示唆された(p=0.205、p=0.470)。

一方、非US曝露領域内では図5の結果を得た。20Wでは図3とほぼ同様の傾向を示した。24Wについても図3とほぼ類似の傾向を示したが、t-PA単独投与でも高率の大出血を認め、図4における0%と対照的な様相を呈した。t-PA単独投与を基準にして、各週齢での大出血率発生をいわば図4と図5を重ねた形で分析すると次の様であった。

20WではUS曝露と非曝露でp=1.0、p=0.67となり、t-PAによる大出血率を変化させるようなUSの影響は認められなかった。24Wではt-PAとUS1の間の信頼度はp=0.2で、この値は危険率5%に対して高値であるため有意とは言えないが、OCIを有する場合のUSの影響がなしとは言えない。非曝露領域でもp=0.15であるので危険率15%であるものの、USの影響が全くないとは言えない状況であった。US曝露群と非US曝露群のこのような比較から、US曝露の有無にかかわらずUSの影響有りとの結果になるので、結論としてはUSの影響はなかったものと判断される。

なおまた、20WのUS曝露領域内の結果を除き、他のどの比較でも音響強度0.5W/cm<sup>2</sup>の方がそれより弱い音響強度0.3W/cm<sup>2</sup>より出血率が低いという傾向を示した。ただし0.3W/cm<sup>2</sup>と0.5W/cm<sup>2</sup>の間に統計学的有意差は殆んど無かった。

## D. 考察

本報告では陳旧性梗塞を有する高週齢SHR/SPを対象にIV rt-PA投与時とさらに経頭蓋的US曝露を追加した場合の陳旧性梗塞部位における出血率比較を行った。その結果、IV rt-PA投与の出血率に比し、US曝露領域内でも非US曝露領域内でも陳旧性梗塞部位からの新鮮出血率に統計学的有意差を認めなかったことを述べた。すなわち非US曝露領域とUS曝露領域では各容量が3:1と異なったため、各領域毎にIV rt-PA単独投与時の出血率を基準に超音波治療用ビーム曝露時の出血率を比較して上述の結果を得た。言うまでもなく、左右対称領域内の分析によってUS曝露と非US曝露の両群間に有意差のないことが示された。

本論文で超音波500kHz、CWを高週齢SHR/SPにインターミット照射した理由は、第一にAIS患者の超急性期第一選択的治療法のIV rt-PAの高効率化を狙う次世代型超音波併用IV rt-PA法の有効性が経頭蓋照射法でも充分期待できることが石橋ら、佐口らによって示され、その臨床応用が期待されていたためである。また第二には、その超音波条件として我々と同様に低周波数の300kHz BWで臨床治験(TRUMBI)した際の失敗原因が、後述するように選択した超音波の音響学的不適切さにあることは明らかにされているが、そののみならず医学的な観点でAIS患者によく見られる脳動脈硬化亢進状態では低周波の超音波に対し脆弱であることに起因していた可能性を完全否定する動物実験成績がなかったからである。そして第三には、診断用超音波装置TCDやTC-CFIとIV rt-PAを併用した場合には、いつも良好な再開通率の向上、MRSの改善が報告されているからである。ただし、TC-CFIでは症候性出血率が15.7%となり、IV rt-PAの症候性出血率約5%の約三倍に達したのに対し、TCD併用では増加しなかったと報告されており、超音波条件による安全性の差異が著しいものであると考えられたからである。さらに低周波数超音波20~50kHzのところでは著しい出血率の増高が報告されており(Needlemanのグループ)、我々の選択している超音波条件の安全性を血管の最も脆弱化すると考えられる動脈硬化亢進時について