

2010/5010 A

**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**

**低侵襲的低周波超音波脳血栓溶解法の効果増高
に関する臨床応用基盤研究**

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 古幡 博

平成23（2011）年 5月

**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**

**低侵襲的低周波超音波脳血栓溶解法の効果増高
に関する臨床応用基盤研究**

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 古幡 博

平成23（2011）年 5月

はじめに

本研究報告書は、平成 20 年 11 月よりスタートした「先端医療開発特区」すなわちスーパー特区を推進する目的で、平成 21 年 11 月に採択された厚生労働省科学研究費補助金による研究課題「低侵襲的低周波超音波脳血栓溶解法の効果増高に関する臨床応用基盤研究」の 22 年度の報告書である。われわれのスーパー特区課題は「急性脳梗塞早期系統的治療」のための分野横断的診断治療統合化低侵襲システムの開発」で、内外に高率に発症する脳血管障害の中でも虚血性脳卒中に対する低侵襲治療法をもって治療し、その社会復帰率向上を目指すものである。系統的とは、発症から病院での治療開始まで、また超急性期そして急性期（発症から 10 日程度）の三期間に、それぞれ固有の治療方法とそのための迅速診断を行うことを意味している。特に、脳卒中は、脳全体への血液循環に係る、いわばそのライフラインの損傷が途絶状態であり、これを救急救命的に救済し、霊長類である人間の最も中枢的活動を回復・再生させることを主題としている。その意味でも、内外にない超先進的技術開発を我国発の成果として示し、早急な臨床実現こそがその真の目的となっている。

22 年度の研究遂行上、次の特記すべき事態が発生した。上記スーパー特区（略称：急性脳梗塞治療特区）の、系統的治療の第二期（超急性期）においてメインとなる血栓溶解技術、すなわち、経頭蓋的超音波照射を行って現行の血栓溶解剤静注療法の効果増強を狙う、経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の実用化開発を進めてきた企業が完全撤退するという、突発的イベントが発生した。撤退の根本的理由は、業績不振、開発装置の販売ビジネスの不採算性、不具合発生時のリスクとその波及効果の甚大さなどであった。開発技術は次の様な世界をリードする内容であり、同企業は技術的には成功していたので、プロジェクトの融資元（JST）に全額返済し撤退したものである。超音波血栓溶解技術としての特徴は、経頭蓋的に塞栓部位を超音波で画像診断し、同画像の誘導下に塞栓部に向けた治療用（血栓溶解用）超音波を標的照射することを実現する第一のポイントである。この診断治療統合化を一つの同一超音波プローブで実現する新技術開発にも成功し、また治療過程の実時間モニターも可能にしており、内外にない革新的技術となっている。この撤退に対し、本研究グループは、急遽その後継装置開発を開始した。ただし後継機というよりも、元々次世代型の普及装置として計画されていたものを前倒し開発するというものである。この次世代経頭蓋超音波脳血栓溶解装置は、患者の体動に左右されず、患者拘束率も低く、臨床現場での医師の負担も軽く、超音波操作の特殊技能を要さないもので、極めて使い勝手の良い装置を用意したものとなっている。開発中止となった技術の欠

点を解決し、血栓溶解剤静注療法適用患者全員に適用可能な新技術開発となっている。それを22年度下半期から開始したが、実用化の見通しも立ちつつある現状が、本報告に示されている。

言うまでもなく、その様な経頭蓋超音波脳血栓溶解法の真の狙いである血栓溶解剤の低用量化、治療開始までの時間の延長化という所期の目的が達成されつつあることも本報告書に記されている。また新次世代装置を用いる臨床研究を最終年度には実施するが、それに向けての比較対照治療成績を国立循環器病研究センター、及び東京慈恵会医科大学で蓄積し、分析された結果も報告されている。

以上、本年度の研究成果報告には、注目すべき遂行上の変化はあったが、その所期の目的達成の準備は整い、23年度最終年度に向けて予定通り進行し得る状況となっている。またこれによりスーパー特区急性期脳梗塞治療特区の目標に向けても、遅滞なく進行し得る見通しが得られたことになる。ただし、スーパー特区としての研究推進用の研究費は、誠に不十分と言わざるを得ず、「特区」の掛け声だけに終わることのないよう努力し続ける我々自身の過剰な負担に悲鳴を上げていることも事実である。関係府省の支援の手厚いことを願うところ、切なるものがある。

平成23年3月
研究代表者 古幡 博

目 次

I. 総括研究報告

- 低侵襲的低周波超音波脳血栓溶解法の効果増高に関する臨床応用基盤研究 ---- 1
古幡 博

II. 分担研究報告

1. 中周波数超音波血栓溶解法の効果増高 ----- 47
—in vitro 実験による定量評価—
古幡 博, 澤口 能一, 王 作軍, 持尾 聰一郎, 浦島 充佳
2. 中周波数経頭蓋超音波脳血栓溶解法の安全性に関する検討 ----- 65
—自然発症高血圧ラット中大脳動脈持続閉塞時における超音波に対する安全性—
古幡 博, 王 作軍, 羽野 寛, 鈴木 正章, 福田 隆浩
3. 中周波数経頭蓋超音波脳血栓溶解法の安全性に関する検討 ----- 73
—サル急性脳梗塞モデル実験に於ける polyubiquitination とオートファジー—
福田 隆浩
4. 超音波血栓成長抑制効果の研究 ----- 77
—塞栓成長抑制・再閉塞予防の可能性—
金本 光一, 古幡 博, 澤口 能一, 王 作軍, 小川 武希
5. 経頭蓋超音波脳血栓溶解法の新広域照射量貼付振動子システムの開発 ----- 87
—in vitro 実験による定在波回避特性の検討—
古幡 博
6. バブルリポソーム併用超音波血栓溶解療法の研究 -----105
丸山 一雄, 澤口 能一

7. 低侵襲的低周波超音波脳血栓溶解法の臨床導入に向けた研究 -----	113
古賀 政利, 山本 晴子, 峰松 一夫	
8. 低侵襲的低周波超音波脳血栓溶解法の臨床導入に向けた研究 : 急性期脳梗塞症例における経頭蓋カラードプラB-mode画像と 中大脳動脈水平部検出率の関係 -----	122
鈴木 理恵子, 古賀 政利, 山本 晴子, 峰松 一夫	
9. 単結晶プローブと前頭骨窓を用いた経頭蓋カラードプラによる 中大脳動脈検出率改善の検討 -----	132
鈴木 理恵子, 古賀 政利, 山本 晴子, 峰松 一夫	
10. 経頭蓋カラードプラ探触子頭部固定具の開発 -----	141
鈴木 理恵子, 古賀 政利, 山本 晴子, 峰松 一夫	
11. 経頭蓋超音波併用脳血栓溶解法の再開通時間評価に関する研究 -----	149
小川 武希, 持尾 聰一郎, 三村 秀毅	
(カラー画像掲載) -----	156
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	160
IV. 研究成果の刊行物・印刷 -----	161

I . 総括研究報告書

低侵襲的低周波超音波脳血栓溶解法の効果増高に関する臨床応用基盤研究

研究代表者 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（ME）研究室 教授

研究要旨

急性脳梗塞（AIS）患者の超急性期（発症3時間（最近では4.5時間）以内）の治療の第一選択、血栓溶解剤（rt-PA）静注療法に併用し、経頭蓋的に中周波数500KHzの超音波を照射することで溶解効率の増高を実現し、引いては副作用軽減のためのrt-PA用量減少と治療開始時間の更なる延長を目的とした。

次の5つの方法で研究を実施した。（1）超音波条件（500KHz、連続波）を用い、牛フィブリン塊を基本に、rt-PA用量超音波強度、高精度光学式溶解率測定装置を用いて探索した。（2）高血圧自然発症ラット（SHR）の脳梗塞モデルを用い超音波照射に対する安全性（出血率、浮腫率、梗塞率）を評価した。（3）血栓選択的バブルリポソームを作成し、その有効性をラット頸動脈血栓モデルで検証した。（4）超音波照射のみによって惹起される血栓成長抑制率を高精度光学的血栓溶解測定装置で検討した。（5）臨床研究に供する比較対照臨床成績として血栓溶解適用時の超音波画像診断による再開通状態などの成績を国立循環器病研究センター及び東京慈恵会医科大学で蓄積した。

（1）血栓溶解療法ではrt-PA用量を現行の2/3に減らしてもその溶解率は同等となることが示された。その超音波による溶解率促進効果は、強度依存的であり、rt-PA用量に依存しなかった。従って各種用量及び超音波強度パラメータとする溶解率予測の為のノモグラフを作成することができ、欧米での用量適用時に対しても用量減少効果を予測し得た。（2）適用超音波は高血圧状態の患者に対してもrt-PA治療における出血率を超えることはなく、その安全性が示された。ただし非再開通状態での確認であったので、出血率の高い再開通モデルでの検討が必要である。（3）血栓標的型バブルリポソームを投与した場合、血栓選択的に超音波輝度が上昇し、治療用超音波照射によって溶解率増高が示唆された。（4）超音波照射だけでも血栓成長抑制効果が強度依存的に生ずることを定量的に示した。同効果は超音波の粒子速度に比例し、その閾値を明らかにした。（5）21例の臨床成績を蓄積し、血流再開通状態の評価データを得、比較検討の基礎を築いた。なお（6）貼付け型超音波振動子による次世代経頭蓋超音波血栓溶解法に関する新技術開発の基礎的基盤を構築した。

経頭蓋超音波脳血栓溶解法に関する所期の目的を達成した。次世代の新経頭蓋超音波法に関する技術開発及び臨床研究に対する準備が整えられた。

研究分担者

峰松一夫	国立循環器病研究センター 副院長	福田隆浩	東京慈恵会医科大学 神経病理学研究室 講師
山本晴子	国立循環器病研究センター 先進医療・治験推進部 部長	三村秀毅	東京慈恵会医科大学 神経内科学講座 助教
古賀政利	国立循環器病研究センター 脳卒中集中治療科 医師	丸山一雄	帝京大学 薬学部 教授
小川武希	東京慈恵会医科大学 救急医学講座 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 グループマネージャー
持尾聰一郎	東京慈恵会医科大学 神経内科学講座 教授		
羽野 寛	東京慈恵会医科大学 病理学講座 教授		
金本光一	東京慈恵会医科大学 ME研究室 准教授		
浦島充佳	東京慈恵会医科大学 分子疫学研究室 准教授		
鈴木正章	東京慈恵会医科大学 病理学講座 准教授		

研究協力者

王 作軍	東京慈恵会医科大学 ME研究室 研究員
澤口能一	東京慈恵会医科大学 ME研究室 研究員

A. 研究目的

急性虚血性脳卒中 (AIS) の超急性期 (発症後3時間以内) (臨床では4.5時間以内) における血栓溶解剤rt-PAの静注療法は、その治療における第一選択である。この血栓溶解法のAIS患者への適用率は数%に留まり、未だに年間4000例程度である。その再開通率は施設にもよるが30~50%程度で、3ヶ月後の良好転帰も3割から5割である。しかし治療時の症候性出血率は3.3~7.3%、3ヶ月後の死亡率は1~2割である。そのため再開通率の向上、適用開始時間の延長、用量依存的な副作用を軽減するための低用量化は臨床現場の強い要望である。そのため、現状ではMRI画像診断を基礎にした適用開始時間延長に係る新薬Desmotepraseの治験が行われている。また米国SPOTRIASでは用量減少のための再開通時

を経頭蓋超音波ドプラ法 (TCD) で監視し、再開通確認後はalteprase投与を停止することによって適用量の低減化を計る治験が行われている。これらの新薬や用量低減化方策とは別に、低侵襲的な経頭蓋超音波照射による溶解加速、溶解率向上、再開通時間短縮の臨床成績が既に報告されている。なお、血管内治療法として各種のものが登場している。それらは臨床的に静注法後の適用、あるいは静注法では効果の低い内頸動部分や3時間後の適用などに活用されるものである。そして脳外科医による特別施設内でのみ適用可能な装置であるため、AIS患者の極めて僅かな症例のみしか実際には適用されないと考えられる。AIS患者の第一選択としてのrt-PA静注療法が第一治療選択であることは未だに変わらない現状である。

(1) 経頭蓋超音波血栓溶解法 (Transcranial Sonothrombolysis : TST) の問題と新開発の必要性

超音波単独作用ではなく、血栓溶解剤投与に超音波照射を併用することで、溶解加速が生じ、溶解率向上、溶解時間短縮などのメリットが中周波数帯 (1MHz以下100KHz以上) で生ずることは、1980年代からin vivo 動物実験で本研究代表者などによって明らかにされてきた。このわが国から発信された方法は、中周波数より高い周波数を用いる診断用超音波によっても有効なことが臨床成績として報告されるに及び、広く注目されるものとなった。その臨床成績結果を図A-1に示した。用いた診断用超音波装置は経頭蓋超音波ドプラ法 (TCD) と経頭蓋超音波ドプラ断層装置 (TC-CFI、又はTCCS) で、いずれも再開通率の向上、再開通時間の短縮が示され、3ヶ月後の転帰について、mRS 0または1と評価される状態が増加し、再開通の迅速化が神経予後に良好なことが示されている。特にTC-CFIを用いた場合の改善が著しいが、それはビームの標的性が高い (すなわちサンプルボリュームを小さくして、血栓部における音圧を高められるためと考えられる。ただし、その場合の症候性出血率は15.7%と高値で、通常の症候性出血率 (上述の) の2~3倍生じている結果となっている。従って、再開通と共にTC-CFIの場合は照射を停止する様な使用上の注意を十分に払わなければならないことになる。

また、診断用装置を用いながら、その効果をさらに高めるために超音波造影剤sonovue (マイクロバブル) を15分間隔で注入する、薬剤、マイクロバブル、超音波の三位一体型の方法が実施され、その完全再開通率の向上も報告されている。ただし、米国ではIMAREX社のマイクロバブルを使用した結果、出血を招来し、死亡例の生じたこともあり、その三位一体型の活用法には患者の血圧を低く抑える等の臨床手技が求められている。このマイクロバブルによる出血率の上昇は、バブル崩壊がもたらす局所の破壊力はHIFU (強力集束超音波法) が用いる数KW/cm²と同等であると考えられており、高血圧下では血液脳関門 (BBB) の破綻が拡大し、rt-PAの毒性が増強

し易いため症候性出血に結びつくと考えられる。マイクロバブルの活用は診断用が本来の目的であるが、それと診断用超音波の統合的併用を血栓溶解に用いることの危険性が示唆されている。

一方診断用超音波に代わる中周波数超音波を用いた場合の臨床試験 (TRUNBI Phase II) では再開通率の上昇は認めず、逆に頭蓋内等の出血が著しく高いものとなり、また死亡例1例を含む状態を以って治験中止となった報告がある。その原因は、使用した超音波条件が、300KHzバースト波、(DUTY cycle実質20%) 平均音響強度0.7W/cm²、ピーク音響強度28W/cm²、パルス長300cm、でその音響学的医学生物学的安全性が担保されていなかった為である。この問題点を解決する新たなTST法として代表者らは、経頭蓋超音波画像誘導による塞栓部への標的治療ビーム照射装置すなわちTCT-LoFUTの開発を行ってきた。21年度末には治験開始直前の段階まで同装置について技術的には成功していたが、次の理由によって製造メーカーが撤退し、本プロジェクトで用いるべきTST装置を失うこととなった。その為TCT-LoFUTに続く次世代TST法を急遽開発し、本研究の所期の目的を達成すべく実用化のための基礎検討が行われている。TCT-LoFUTの製品化が中断した理由は、技術的には経頭蓋断層像の検出率が日本人では低いこと、その操作には熟練を要すること、積層型診断治療統合化プローブの患者頭部への固定が容易でないこと、患者が動いた場合には再固定しなければならないこと等、臨床現場との整合性が低かったことがあげられる。また、経営的な意味ではrt-PA適用患者に対する超音波法の適用率が低くなり、適用例数が少ないこと、開発経費及び製造コストが高くなること、潜在的にrt-PA適用患者の死亡率が上述の如く高く、機械メーカーでは不安なこと等などであった。このような問題を解決すべく次世代型のTST法の開発が急遽スタートしている。その狙いは、少なくともその操作には超音波に関する特別な技能を要せず、多くの医師が容易に使うことができ、また患者の体動等にも影響されない方式とし、結果的にrt-PA治療対象患者全員に適用可能とすることである。この新TST法は世界初の我国から

発信する新技術になるものである。

(2) 必要性和期待される効果

上述のTSTの現状と問題点を克服し、真に脳血栓溶解加速を実現し、さらに用量減少、そして適用開始時間の延長がTSTによって実現できれば、次の様な実臨床上の効果が期待できる。

- ① 早期再開通のもたらす3ヶ月後の神経学的改善の向上
- ② 用量減少が惹起する、脳内出血などの副作用軽減
- ③ 適用時間延長がもたらす対象患者数の増加。現在のrt-PA適用率がAIS患者の数%であるものを10~30%に増えるものと期待される。
- ④ さらに、国内で整備されつつあるStroke Care Unit (SCU) での治療戦略に加えられ、そのSCUとしての具体的効果向上に寄与する。
- ⑤ 脳卒中治療に要する一般医療費は2兆円を超えるが、このTSTによる早期再開通率の向上は社会復帰率を高め、医療費の軽減や社会的活性化に大きく貢献する。
- ⑥ このTST技術は我国発、世界初の中周波数超音波治療であり、世界に向けて発信される新医療技術になる。
- ⑦ 超音波治療技術の観点からは、超音波DDS、超音波遺伝子導入などの、今日 in vitro/ in vivo実験で示されている有効性を臨床現場へ展開する時の足掛かりとなる。すなわち、脳血栓溶解の成功は他の治療法における超音波活用の布石として注目され、超音波治療産業の勃興に大きく貢献する。

(3) 目的と具体的目標

本プロジェクトの目的は次の3つの臨床研究の実現とそれによる脳梗塞治療の新たな道を開くことである。

- ① 中周波数超音波を用いたTST装置による再開通率向上の臨床研究
 - ② 同新TST法によるrt-PA用量減少に関する臨床研究
 - ③ 同新TST法による治療開始時間延長に関する臨床研究
- を3年間のゴールとし、22年度においては具体

的に、次の目標を実現することを目的とする。

- ① TST法の超音波条件とrt-PA用量の最適化を、in vitro実験によって見出すこと
 - ② TSTの安全性に関し、ラット脳梗塞モデルの高血圧状態を模擬し得るラットで実現し、出血率、浮腫率について評価すること
 - ③ TSTの溶解率向上のための血栓選択性の高いバブルリポソームを製作し、その有効性を動物実験で確認すること
 - ④ TST法として、より普及型で患者QOLの高い貼付け型ソフト振動子を用いる次世代技術開発を実施すること
 - ⑤ 臨床研究のための比較対照データとして、現行rt-PA静注療法に関する臨床成績を集積すること
- を実行することとした。

なお、④は本来の研究計画には含まれていなかった内容であった。TST法としては、経頭蓋超音波脳血栓溶解法の中でも、診断治療統合化方式として、経頭蓋超音波画像によって塞栓部を探索し、同部位に向けて血栓溶解目的のための治療用超音波ビームを二次元標的照射する装置開発をJSTプロジェクトの中で行い、それによる臨床試験を22年度、本年度で開始する予定となっていた。しかし開発製造企業が突然撤退したため、それに代わる装置開発を独自に行わなければならないこととなった。その際、企業が撤退した理由が、採算のビジネスモデルが、同開発装置では作れないと判断したことが大きな理由であったので、ここでは元々次世代装置と考えていた新方式の普及型装置開発を前倒しして開発することにしたものである。製品としての特徴は後述するが、rt-PA静注療法適用患者にはほぼ全員に適用可能な普及型の装置となるようなビジネスモデルとした。その新規開発を上述のように目的として、新たに追加することとなったためである。

B. 研究方法

上記の目的を達成するために以下の5項目にわたる具体的な研究方法を立案し、その計画に従って実施した。

B-1. TSTにおける用量依存的血栓溶解率に関するin vitro実験

従来から血栓溶解に関し、rt-PA用量依存的にその溶解率は増し、かつ超音波を加えることで溶解率がさらに促進することは周知である。しかしながら、rt-PA用量と使用超音波条件との関係について論文間で比較出来る様な統一的なモデル実験系がなく、各論文の結果は極めて限定された超音波条件下でのみ比較可能という限界があった。特に超音波条件に関してはその超音波振動子が固有周波数を持つために、周波数比較をするには多数の振動子を用意せねばならず、また振動子が形成する超音波ビームは周波数依存的に近距離音場や遠距離音場のパターンが異なるという複雑な問題をふくんでいる。つまり平均音響強度が同一であっても実際に血栓に照射させる部位での空間的な音響強度が投入電力あるいは平均音響強度では、判定できないという問題があるためである。それゆえ、本実験では実験効率が高く一度に多数の超音波条件、特に多数の音響強度変化に対し多数の実験値を得られる方法を新規に考案し、それを用いた。

1) 高精度光学的血栓厚測定法 (図B-1, B-4)

(1)原理

コイン状の血栓を形成した場合、その透過光量と血栓厚が比例することは、すでに我々は実験的に明らかにしている。すなわち、光の周波数を固定すれば、そのコイン状局所の厚さを透過量から算定できることを報告してきた。一方、超音波ビームはその振動子が円形の場合、空間的に近距離音場と遠距離音場が極めて正確に理論計算できる。特に、遠距離音場においては空間的に円錐状にビームが広がり、その強度分布は中心軸に対して点対象となることが理論的実験的に明らかとなっている。そこでコイン状血栓をこの遠距離音場の中心軸上に垂直に置けば、コイン状血栓に投入される空間的な音響強度分布が理論的実験的に決定できることになる。換言すればコイン状血栓を中心にその円周上の音響強度は、等しい強度になる。すなわち、半径 r の距離の全ての点 (すなわち円周状の点) は同一音響強度にさらされ、その点

での透過光量を集めれば(すなわち円周状の測定点を集めれば)、同一音響強度を掛けた場合の血栓の厚さを集めた点の数だけ測定できることになる。この様な考え方から我々はコイン状血栓の空間的な厚さとして中心から半径方向に透過光量を自動的に測定できる光学式測定系を開発した。その半径方向の分解能は0.5mmであり、半径方向としては、8方向を選定可能とした。すなわちこの光学的透過光量測定法を用いれば、コイン状血栓の中心から8方向の空間的な厚さを自動的に読み取ることが出来、その同一円周状の8点を平均すれば、その値は同一超音波強度に対する8個の血栓の厚さデータとなる。そして、中心からの距離によって音響強度が異なることを考え合わせれば、半径方向に異なる音響強度分布に対応する8点のデータが1度に得られることになる。仮に0.5mm間隔で半径方向に10点を測定できるようにすれば、各強度毎に8点、強度変化10点のデータ、すなわち80ポイントのデータを1度に測定可能となる。(図B-2)

(2)測定法

装置としてはコイン状血栓として直径15mmのものを作成した。容器(セル)はポリカーボネイト(PC)で製作した、コイン状容器を用いた。PCを選定した理由はその厚さを0.5mm程度に薄くすることができ、かつ光も透過させることが出来ると同時に超音波も透過させることが出来るからである。したがって、一度に測定できるデータ数は、半径方向に0.5mm間隔でかつ8方向の半径を選択すれば、中心点と辺縁部の3mm程度を除けば、192点のデータを一度に測定できる方式とした。また超音波曝露条件とその対照となる非曝露群とをほぼ同時に測定するため、血栓を2個同時に作りその両者を光学的に交互に測定できる方式とした。これはrt-PAの溶解に関する死活の半減期が約6分程度であるため、光学測定を極めて高速に行わねばならず、しかもrt-PA用量に逡巡させながらほぼ同時に測定しなければならないためで、実際は2分~3分で全データを取

り込むことが可能なシステムにした。

なお、セルのホルダーは超音波ビーム、特にそのサイドローブなどの影響の少ない形に設計した。また、超音波ビームの中心軸に垂直になるようにコイン状血栓の中心が来るように空間的にXYZの3方向に調整可能な指示具とした。

2) 超音波照射装置

超音波振動子は、圧電素子PZTを用いた。直径30mmの円形振動子の先端にホーン状のABS樹脂を加工した振動部を設け、先端の円柱部を直径10mmにした。すなわち振動子系10φによる超音波発射系とした。中心周波数500KHzの場合には近距離音場は、8.3mm未満となる。その値以上に振動子表面から離れた領域が、遠距離音場となる。実験はこのような遠距離音場内で実施した。

ただし、現在500KHzについて基本的な成績を積み上げることとした。

超音波照射時間については、予備実験を行い15分30分45分60分の4群について比較検討した。その結果照射時間30分で充分有意な超音波による促進効果を認めため、本実験は照射時間30分をもって比較検討を行うこととした。

3) 血栓作製法

実験では、ウシフィブリンを用い、コイン状血栓を作成した。ウシ血漿を超純水10mlで溶解し、溶解後瓶内を陰圧にし、冷蔵庫で1時間放置した。ウシ血漿540 μ lと250mMのCaCl₂60 μ lを混合し、湿潤させた容器に洗浄したセルをセットし、混合したウシ血漿を270 μ l注いだ。その後、37度に設定したインキュベータ内に20分間静置した。

4) rt-PA用量と血栓溶解

上述のウシフィブリン塊をコイン状に作成し、これについてrt-PA用量を0から0.9mg/kgの濃度に変え、その血栓溶解量を測定した。測定は上述の高精度光学的血栓厚測定装置を用いた。なお、rt-PA用量としては我国における用量0.6mg/kg、及び欧米における0.9mg/kg

を必ず含めると共に、rt-PA用量0として生理食塩水のみによる実験を加えることとした。

5) 超音波による溶解促進率の定義

上述の各rt-PA用量による溶解状態を対照群とし、超音波を曝露した場合の溶解量を超音波群として測定した。超音波による溶解率の上昇群を次の様に定義し、超音波溶解促進率とした。

- ・超音波溶解促進率=(超音波照射時の溶解率) / (非超音波照射時の溶解率)
- ・溶解率=(rt-PA投与時の血栓厚) / (PS投与時の血栓厚) PS:生理食塩水

6) 統計学的処理

有意差は2群間比較で行い、信頼度95%以上を以って有意な差があるものと検定した。

B-2. TST適用開始時間延長に関わる安全性の検討—中大脳動脈閉塞モデル(MCAOモデル)におけるTSTの安全性—

B-2-1 高血圧自然発症ラット(SHR)を用いたAISモデルにおける経頭蓋的超音波曝露の安全性評価実験 (図B-3)

500KHz、CW、低音響強度(<0.35W/cm²)そして60分間のintermittent照射というUS条件に関しては、WR、及びカニクイザルによるAISモデル(自家血血栓によるMCAOモデル)で、その安全性は確認されてきた。またSHR/SP高週令動物モデル(高血圧、脳卒中易発症モデル)で、上記US条件の安全性を確認した。しかし前述の様にTRUNBI治験では、非再開通状態が多数となったUS照射群での出血率が高かったことを踏まえると、高血圧状態(脳梗塞発症率の高い状態)で、非再開通という完全MCAOモデルでのTSTの安全性検証が急がれている。ここではpermanent MCAOをSHRに作り、その状態でのTST照射に対する出血率、梗塞率、浮腫率を比較した。

1) US条件

500KHz、CW、0.35W/cm²、60分間

照射、振動子口径5Φ円形(PZT)を使用。この500KHzビームの頭蓋内での状態をシュリーレン法で確認した。その結果、頭蓋内から発射されたビームは、空間的に三つに分けられた音響状態となり、入口部(近距離音場)、中間部、脳低部(スタンディングwave(STW)が発生している部)で、特に出血について注目した。ただし、入口部から10mm進行した部位では音圧で1/4~1/5に、従って強度では1/16~1/25に減弱しており、STWは存在するものの、その音響的な作用を惹起する能力は必ずしも高くはないと考えられた。

2) MCAOモデル作成

SHR11~12週を用い、Koizumiモデルを作成した。外頸動脈よりナイロン系の先端にシリコン栓子をつけ、約13~16mm逆行性にMCA根幹部に挿入した。MCAOモデル作成後、覚醒させ、スコア3以上の状態のラットを、MCAO完成状態のモデルとして採用した。3以下のものは未完成状態とし、実験には用いないこととした。

また塞栓後3時間後に再麻酔し、介入行為を行い、その後再び覚醒させ、神経状態の評価を行った。さらに24時間後に灌流し、脳摘出を行い、病理標本化作業に供した。包埋後、2mm間隔で脳を切り、各切片をHE染色後、病理組織学的評価を行った。

3) 比較群

次の四群の比較を①出血状態②塞栓容積③浮腫容積について比較、②と③は三次元的に立体計算し③は左右半球の容積で算出した。

PS群：生食(PS)をrt-PA溶液と同量(3ml)注入した群

US群：PS尾静注と共に、経頭蓋的に上述のUS照射を行った群

t-PA群：rt-PA溶液(濃度はヒト適用量の10倍)3mlを尾静注した群

US+rt-PA群：t-PA群に経頭蓋的US照射を行った各群約10例となるように割付けた

B-2-2 サルAISモデルに対するTSTの安全性に関する免疫組織化学的評価

ユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系は不要な細胞内物質や異常な蛋白質、凝集物の主要な分解系として機能しており、前者はユビキチン自身のリジン48(K48)を介したポリユビキチン化がプロテアソームに認識され特異的タンパク質の分解へと働く。後者はリジン63(K63)を介したポリユビキチン化がp62に認識され、オートファゴソームへ取り込まれ、ライソソームと融合し、非特異的分解・リサイクルが行われる。数年前に行ったサルAISモデルにおける超音波曝露実験の摘出標本についてここでは次の免疫組織学的検討を試みた。すなわち、右内頸動脈(あるいは中大脳動脈)塞栓術を行った後、組織型プラスミノゲン活性化因子(rt-PA)のみで治療した群(5頭)と、rt-PAと超音波照射群(5頭)において、脳塞栓によるユビキチン化および超音波照射による影響を免疫組織化学的に検索した。

B-2-3 血栓成長抑制効果とそれによる適用開始時間延長実験

既に中周波数超音波照射が、血栓形成を抑制することは、イヌ両側股動脈塞栓形成法(バルーンによる内皮擦過法)において、一側照射、他側非照射の比較実験で、実証されている。しかし、その抑制効果についての超音波条件は、200KHz、0.25Wの1条件下での結果で、強度についても周波数についても波形についても定量的な検討は行われていなかった。本実験では、周波数500KHzを用い、その超音波強度依存性に関する定量的実験を行った。なお抑制効果の判定にはB-1に述べた高精度光学的血栓厚測定装置を用いた。

1) 血栓成長抑制率の算出

ウシフィブリンを用いた血栓を作成し、その上にウシの血漿を静置しておくと、血栓が成長してくる。この状態に対し、超音波を曝露していると、血栓の成長が抑制されることになる。それ故実験は、ウシ血漿を追加注入した時のコイン状血栓の厚さとウシ血漿を注入した状態で超音波を照射し

た場合のコイン状血栓の成長度合い、即ち血栓厚を測定し、両者を比較することとした。血栓抑制率は次の様に定義した。

抑制率「%」 = $\frac{\{(\text{非超音波照射時の血栓厚}) - (\text{照射時の血栓厚})\}}{(\text{非照射時の血栓厚})} \times 100$

2) 血栓成長監視時間の決定

予備実験として血栓の抑制効果を見るために、15分30分45分の3つの曝露時間を設け、その抑制率を比較した。その結果、抑制効果が30分でも充分明らかとなったので、この実験系としては照射時間30分を基準に比較検討した。

3) 統計学的評価

コイン状血栓の中心から等距離の8データについて平均的分散を求め、それと同部位のUS照射時の血栓厚を求め、両者の間の同形学的有意差を平均値の差の検定によっておこなった。

B-3. 血栓選択的バブルリポソーム製作に関する実験法

①-1) バブルリポソームの調整

脂質組成をDSPC: DSPE-PEG(2k)-OMe: D SPE-PEG(3k)-Mal:cholesterol = 64: 1: 5: 30 (モル比) とし、脂質100 μmol をクロロホルム4 mLに溶解させ、ジイソプロピルエーテル4 mLとPBS 4 mLを加え、バス型ソニケーターで攪拌した。その後、エバポレーターを用いて逆相蒸発法によりリポソームを調製した。これを凍結融解し、エクストルージョン法により粒子径を100-200 nmに調整した。調製したリポソームを二等分し、一方には12.5 mmolのRGDペプチド(c(RGDfK)ggc)溶液を加え、もう一方には12.5 mmolのシステイン(Cys)溶液を加え、4°Cで一晩反応させた。各種リポソームを1 mg/mLとなるようにPBSで希釈し、このリポソーム懸濁液2 mLを5 mLバイアル瓶に入れた。 C_3F_8 ガス7.5 mLで置換・加圧し、バス型ソニケーターで5分間超音波照射することでバブルリポソームとした。

①-2) RGD-リポソームの活性化血小板結合能の確認

ラットより採血した血液4.5 mLに3.2%のクエン酸溶液0.5 mLを添加し、0.2 mMのADP溶液を500 μL 添加し、血小板の活性化を行った。そこへ、血小板の活性化マーカーであるCD62Pに対する蛍光色素(PerCP)修飾抗体を添加し、室温にて30分間反応後、蛍光色素(DiO)を内封したRGD-リポソームを500 μL 添加し、Flowcytometry法にて、活性化血小板へのRGD-リポソームの結合能について解析した。

①-3) RGD-BLの血栓結合能の評価

イソフルラン麻酔科でラットの総頸動脈を剥離後、総頸動脈の下部にパラフィルムを敷き、総頸動脈とパラフィルム間に40%の第二塩化鉄をしみ込ませたろ紙を挟み込み、10分間刺激することで総頸動脈に塩化鉄誘発血栓を作製した。血栓作製後、塩化第二鉄のろ紙を除去、生理食塩水で3回洗浄し、10分間放置した。血栓を小動物用超音波画像診断機(VEVO 2100)でモニタリングしながら、尾静脈よりRGD-BLを投与し、10分後にRGD-BLの投与前後での血栓の輝度変化を画像解析ソフト(Image J)で解析した。

②-1、フッ化リン脂質導入リポソームの調製

脂質組成をDSPC: DSPE-PEG(2k)-OMe: F-D PPC = 44: 6: 50 (モル比) とし、脂質100 μmol をクロロホルム4 mLに溶解させ、ジイソプロピルエーテル4 mLとPBS 4 mLを加え、バス型ソニケーターで攪拌した。その後、エバポレーターを用いて逆相蒸発法によりリポソームを調製した。これを凍結融解し、エクストルージョン法により粒子径を100-200 nmとした。なお、コントロールとして通常のリポソームの脂質組成(DSPC: DSPE-PEG(2k)-OMe = 94:6 (モル比))のリポソームとフッ化リン脂質導入リポソームと同様の脂質組成でフッ素原子を含まないリポソーム(DSPC: DSPE-PEG(2k)-OMe: DPPC = 44: 6: 50 (モル比))も同様に調製した。
DSPC: 1,2-distearoyl-sn-glycero-phosp

hatidylcholine
DSPE-PEG(2k)-OMe: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-methoxypolyethyleneglycol
F-DPPC: Phosphocholine, 1-palmitoyl-2-(16-Fluoropalmitoyl)-sn-Glycero-3-DPPC: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylCholine

②-2、バブルリポソームの調製

各種リポソームを1 mg/mLとなるようにPBSで希釈し、このリポソーム懸濁液2 mLを5 mLバイアル瓶に入れた。C₃F₈ガス7.5 mLで置換・加圧し、バス型ソニケーターで5分間超音波照射することでバブルリポソームとした。

②-3、C₃F₈ガス封入量の測定

バブルリポソームの入ったバイアル瓶を開封し、常圧とした後に、ガスタイシリンジを用いてバブルリポソームを採取した。このバブルリポソーム500 μLを測定用のバイアル瓶に移し、ガスクロマトグラフによりC₃F₈ガス封入量を測定した。

②-4、粒子径の測定

バブルリポソームの入ったバイアル瓶を開封し、常圧とした後に、PBSで100希釈した。このバブルリポソーム懸濁液の粒子径を動的光散乱法により測定した。

②-5、バブルリポソームによる超音波造影効果

PBS5 mLの入ったゴムチューブを脱気した水中に入れ、超音波診断装置(9 MHz)を用いて観察した。

B-4. 次世代TST法に供する貼付型ソフト超音波振動子の開発に関する実験

TSTに用いる臨床用装置としてJSTプロジェクトで完成していた「経頭蓋超音波脳血栓溶解装置(TCT-LoFUT)の治験直前にその製造メーカーである日立メディコが撤退した。その為本研究プロジェクトの前提

であったTCT-LoFUTを用いる治験(平成22年度)をもとにした23年度(最終年度)の用量減少研究や適用開始時間延長の研究という臨床研究への足掛かりが突然消失した。そのため本プロジェクトにおいては、急遽TCT-LoFUTに引続く次世代型TST技術開発をスタートさせた。この次世代TSTは、次の様な特徴を有している。

- ①患者頭部表面に貼付可能なソフト振動子(薄型、平板型)であること
- ②経頭蓋超音波ドプラ画像によるナビゲーションを用いないこと
- ③塞栓部に向けて、ナビゲーションによる標的性を活用しないこと
- ④標的性を持たせず、非焦点化した広角超音波照射法を用いる事
- ⑤日本人の様な頭蓋骨(側頭骨)の厚い場合でも透過性の高い中周波数超音波を用いる事
- ⑥従来集積してきた安全性データ(周波数500KHz、CW、低音圧、インターミット照射に関するin vitro/ in vivo動物実験での評価データ)を活用し得ること
- ⑦頭蓋内での音響学的不具合を回避し得ること(定在波の除去など)
- ⑧開発期間が短く、臨床研究に入り易いこと

この次世代技術が完成した場合にはrt-PA適用患者ほぼ全員に適用できる装置になると予想するものである。そのため、次の様な具体的なソフト薄型平板US振動子(STFUT)の試作を行い、その音場特性をシュリーレン法によって確認した。特に⑦の実現課題として重要な定在波の除去の可能性を中心に追及した。

1) STFUTの試作

振動子が柔らかく、フレキシブルで頭部の局面にフィットするような振動子を開発する為に、2つの素材を検討した。1つはポリフッ化ビニルデン(PVDF)、他の1つは1-3コンポジット振動子である。前者は高周波超音波に対しては極めて薄く柔らかいことが特徴で、電極(薄膜)の堅さに左右されるほどであることが特徴的な素材である。ただしその音響インピーダンスは高く

駆動電圧は高くなければならないという扱いにくさがある。ただし、音響-電気変換効率が高く、比較的弱い超音波の検出には優れていると言われている。後者の1-3コンポジット振動子は、PZTの片面をダイスでカットして作るもので、ほぼPZTの音響的特性を維持し、かつ薄型にする可能性が高いものである。両方の素材を用い図B-5に示すような振動子を作成した。

図中ABは、直径30mmの先端にABS樹脂を加工しそれぞれ口径5mm、口径10mmの振動面を作ったものである。この振動子はPZTが持つ固有の特性を評価する基本振動子である。

図中Cは、1-3コンポジットの正方形振動子で、10mm×10mmのもので、その中心周波数は500KHzである。

図中Dは、PVDFによる平板状の矩形振動子30mm×60mmのものである。中心周波数は500KHzに設定されている。このサイズはヒト側頭骨における薄い部分の面積が日本人の場合33mm×56mm程度であることを踏まえ、そのエコーウィンドウ全体にこの振動子から発射されるビームが投入されるように設計されたものである。

図中Eは、1-3コンポジットを用い、正方形（一辺30mm）の振動子をCH2並べたものである。その中心周波数は500KHzである。なおこのEと同形の振動子をPVDFでも作成した。その中心周波数も500KHzとした。

図中Fは、直径50mmのPVDF振動子でその中心周波数は2.5MHzである。極めて薄く臨床現場でも扱いやすい印象であった。

2) 各振動子の音場分布

各振動子についてはAIMSを用い、音場分布を測定した。その音場分布の代表例を図B-6に示した。1辺30mmの正方形振動子（PVDF）のもので、ビーム形状はプローブ表面から離れるにつれて円形となり、概ね直径30mmの円形ピストン音場からの分布に近いものとなっていた。他の振動子についても同様で、詳細は分担研究報告書に整理されている。

3) シュリーレンによる定在波の測定

シュリーレン装置を用い、反射板による

定在波の測定を行った。図B-7は東京慈恵会医科大学内の「スーパー特区共同利用実験施設Ⅱ」に設置された大型シュリーレン装置である。レンズ直径は25mmで、ヒト頭蓋骨を入れてもそのデータを充分に得ることが出来た。実験では定在波を確認するために反射板を水槽内に沈め、定在波を観察した。その定在波を消去させるために周波数変調法としてSweep変調法を採用し、ヒト頭蓋骨内面での反射による定在波の状況を観察した。

B-5. 急性脳梗塞患者におけるrt-PA 静注療法適用時の超音波画像診断評価の検討

TSTシステムが完成し、臨床研究を行う場合に必要となる対照データを蓄積しておく必要がある。そのため国立循環器病研究センター脳内科、及び東京慈恵会医科大学救急部、神経内科でそのデータを蓄積することとした。

B-5-1 AIS患者のrt-PA治療成績の蓄積

1) 対照 (図B-8)

AISを発症しrt-PA静注療法適用患者の内、条件1：経頭蓋的カラードプラー断層像（TC-CFI、またはTCCS）が側頭骨より描出でき、また、条件2：24時間以内にMRA撮像が出来た例を対象とした。言うまでもなくrt-PA静注療法の適用条件は満足している例である。国立循環器病研究センターでは14例、（ただしrt-PA適用例7例、条件1と2を満たす非適用例7例）、慈恵医科大学では6例（rt-PA適用例）。

2) 方法

方法1. 超音波及びMRA測定 (図B-9)

条件1のTC-CFIは、日立メディコ製のEUB8500もしくは7500を国立循環器病センターが、HD8500を慈恵医科大学が使用した。経頭蓋的に次の2点の捕捉できることを基本条件として行った。

①蝶形骨小翼部、及び②中脳の両者が同一平面内に捉えられることをMCAのM1またはM2を捕捉し得る必要条件とした。また、TC-CFIは、再開通状態を15分間隔で測定

するのに用いた。その際、再開通の状態をAlexandrovが定義したTIBI分類（図B-10）（Thrombolysis in Brain Ischemia）の5段階評価で行った。

また一方、MRAも再開通状態を評価するのに用い、その再開通状態を評価した。

方法2. 検査項目

rt-PA静注療法の基本条件の一つNIHSSを治療前に測定し、その適用条件の満たしていることを確認の上治療は開始した。

B-5-2 AIS患者における経頭蓋カラードップラ断層法によるMCA検出率の検討

Retrospectiveに国立循環器病研究センターでのAIS患者のTC-CFI検査結果を整理し、MACの検出率と反対側頭蓋骨中脳描出率、蝶形骨小翼部描出率の相関性について比較検討を行った。

1) 対照

2009年1月～2009年7月に虚血性脳卒中の診断で入院し、MRAでM1閉塞がない患者（66例、132骨窓、132血管）を対象とした（女性23例、46血管、35%。）平均年齢は71±12歳であった。

2) 方法

方法1. 超音波測定

MRA撮像後24時間以内に日立メディコ製EUB8500を用いてTCCSを施行した。

方法2. 検討項目（図B-11, B-12）

①B-modeで対側側頭骨、中脳、同側蝶形骨小翼を評価し、4段階（invisible,poor,fair,good）に分類した。

②カラードプラでM1の描出状態を評価し、4段階（invisible,poor,fair,good）に分類した。

③ ①及び②の関係を比較検討した。

以上の判定は2人の医師で行った。

B-5-3 単結晶振動子を用いた経頭蓋カラードップラ断層装置の高齢者における頭蓋内描出率

日立メディコ製Preirusを用いて高齢者

における頭蓋内描出率を従前の方式と比較した従来の装置としては日立メディコ製EUB7500を用いた。

1) 対照

2010年7月1日～7月30日に入院した脳梗塞例のうち、MRAで中大脳動脈開存を確認後、24時間以内に経頭蓋カラードプラを施行し得た連続30例（男性22例、69±11歳）を対象とした。

2) 方法

方法1. 超音波測定

超音波装置はPreirusを使用し、単結晶プローブ(S70)及び従来型プローブ(S50A)を用いて、側頭骨窓もしくは前頭骨窓から、頭蓋内構造物と中大脳動脈血流の検出率を比較した。（図B-13）

方法2. 検討項目（図B-14）

①頭蓋内構造物は側頭骨窓における対側側頭骨、中脳、同側蝶形骨小翼の検出の可否を評価した。

②同側中大脳動脈血流はM1の流速測定の可否を評価した。

以上の判定は2名以上の検査者で評価した。

B-5-4 臨床適用型の超音波プローブ頭部固定具の開発

AIS患者のMCA血流再開通状態などを長時間に監視し、また治療用のビームを標的部に正確に当てるためには、超音波プローブを頭部に長時間固定しておく必要がある。現行の固定具は大がかりであるばかりでなく患者の動きに対しての追従性が悪く、患者が動くたびに医師が再固定しなければならないという問題があった。これに対し新たなプローブ固定具を開発し、その有用性をボランティアや患者によって検証した。

1) 開発経緯

2009年11月20日に固定具の構想案を話し合い、2010年4月に最初の試作機を作製した。探触子は吊り下げ式を採用し、ボールジョイント3箇所でも動性を確保した。圧縮空気や油圧式を検討していたが、簡便性の

観点からワイヤー式を採用した。

2) 改良点

開発した頭部固定具を用いヒトへの適合性を実際に調べた。新頭部固定具は有限会社アンリミット・ジャパンに特注開発したものである。

開発した2号機の改良点は図B-15, B-16を参照

C. 研究成果

経頭蓋超音波脳血栓溶解療法に関する所期の目的に対し、次の様な具体的な成果を上げる事が出来た。この1年の間に臨床研究用に用いるための経頭蓋超音波脳血栓溶解装置(TCT-LoFUT)の開発企業が撤退するという大きな想定外の課題に直面したが、臨床研究に関する基盤的研究は着実に進める事が出来、また臨床研究に用いるための装置については急遽新たな技術開発を行い、その次世代型に向けた新展開の見通しを得ることもできた。

以下にそれらの詳細を述べる。

C-1. TST療法におけるrt-PA投与量の低減化の見通しを得た

ウシフィブリン塊を用いたin vitro実験を行い、そのコイン状血栓と超音波ビームの持つ音場分布との関係を活用する高精度光学式血栓厚測定装置による測定結果から次の統計学的有意な結果を認めた。

(1) 溶解量はrt-PAの用量に対し直線的に増加する (図C-1)

rt-PA 用量0~0.9mg/kg(欧米での投与量)の間は、その溶解量において容量依存的な直線関係を認めた。

(2) 超音波による溶解率の促進効果は超音波強度にのみ直線的に依存する (図C-2)

rt-PA投与と共に超音波を併用した場合には、溶解率が增高した。増高量は(1)の如くrt-PA容量に依存するが、超音波の強度上昇に対し直線的に上昇し、その上昇の傾きはどの容量においても一定であった。すなわち、

溶解促進率は超音波の強度に対し直線的に増加した。

(3) 汎用ノモグラフの作成ができる(図C-3)

上述の(1)(2)の結果をもとに、rt-PA容量と照射超音波強度を決定すれば、血栓に際する溶解促進率が容易に推定出来るノモグラフを作成した。このノモグラフによれば、我国における投与量0.6mg/kgの投与量における血栓溶解率は、TST療法については超音波強度0.3W/cm²、そしてrt-PA容量0.4mg/kgで実現出来る事が明らかとなる。すなわちTST療法においてはrt-PA用量を2/3程度に減少させても、今日の我が国におけるrt-PA投与量と同等の効果を招来することが示唆される。(図C-4)

C-2. TST療法のもたらす医学生物学的安全性について基礎データを追加し得た

TSTを適用する場合の安全性については中周波数帯の場合TRUNBI治験において出血例が増大したという事実がある。その出血例の増大は、再開通率が低く、且つ梗塞領域外で多数発生していた。その原因は、音響学的に概ね解決されているが、医学生物学的意味でAIS発症患者に多くみられる高血圧状態、あるいは脳動脈亢進状態についての検討が未だ不十分な状態であった。本研究では次の成果を上げることが具体的にできている。

C-2-1. 高血圧ラットを用いた完全MCAOモデルに対し、TSTを施行してもその出血率、浮腫率、梗塞率は、rt-PA単独投与状態(現行治療法)以上に悪化することはないことが明らかとなった。 (図C-5, 表C-1)

高血圧ラットとして、高血圧自然発症ラット(SHR11~12週令のものを用いた)のこの状態は、すでに血圧が十分に高く、且つ動脈硬化がある程度進行している状態と解釈される。このラットに対しAISモデルとしては、koizumiモデルを用い、その栓子を抜去することなくpermanent状態で経頭蓋的に超音波を曝露している。その結果、生理食塩水投与群、rt-PA単独投与群、超音波単独照射群、超音波及びrt-PA併用群の4群間に出血

率、浮腫率、梗塞率の3パラメータについて統計学的に有意な差を認めなかった。すなわち、TSTを用い、非再開通状態になったとしても、実験に用いた超音波条件は十分に安全性が担保され得る可能性が示唆された。

C-2-2. サル急性脳梗塞モデルに対するTSTの適用は、免疫化学的(ユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系)の異常を惹起しなかった

数年前に行ったカニクイザルAISモデルにおいて、rt-PA療法(5例)とTST療法(5例)を比較検討した際、24時間後にサルの脳を摘出し、標本化しておいた。この標本に対し、新たに免疫組織化学的評価を行った。その結果、rt-PA群においてもTST群においてもユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系には出現せず、超音波による副作用の増大を認めなかった。ただしこの結果は梗塞作成後24時間後の結果である。

C-3. TST療法における適用開始時間延長を支援する新手法になり得る超音波照射による血栓成長抑制効果を見出した

発症3時間以内(欧米では4.5時間以内)がrt-PA静注療法の適用限界時間とされている。この適用時間はその時間以降では出血率が増すというのが、制約条件の最も根本的な理由である。そして再開通までの時間がかかるのも出血率増高に関与している為、TSTはこの再開通時間の短縮効果を以って、適用開始時間を少しでも延長させようと考えている。その血栓溶解効果を高めるには、治療開始までの血栓自体の大きさも、大きく影響する。血栓は時間とともに成長するので、AIS発症当初からrt-PA療法までの間、すなわち家庭から病院に来てCT検査が終わるまでも成長続けることになる。それゆえTST効果を高めるには、血栓自体の成長を抑えておくことも重要で、我々は次の様な超音波による抑制効果のあることを定量的に示した。

(1) 血栓成長は中周波数超音波によって抑制される(図C-6)

前述の高精度光学式血栓厚測定装置を用い、コイン状血栓を作成した後にその上に血漿を静置すると、通常血栓は次第に厚くなっていく。これに超音波を曝露すると血栓の成長が起きにくくなる。その結果を図C-6に示したが、この成長抑制効果は音響強度依存的で、強度が高ければ高い程抑制効果は増し、全体としてS字特性的傾向を示した。図から明らかのように微弱で中周波数超音波を曝露していれば、血栓成長の抑制はかなり抑制出来るものと推測される。データは曝露時間30分の結果である。

(2) 超音波による血栓成長抑制効果は超音波の持つ粒子速度に依存し両者には直線的関係がある(図C-7)

音響強度依存的に超音波による血栓成長は抑制される。この強度を音響粒子速度で表すと、抑制効果と粒子速度の関係は図C-7の如くなる。その閾値は、音響強度で $0.071\text{W}/\text{cm}^2$ 、粒子速度では $30\text{mm}/\text{秒}$ である。すなわち粒子速度 $3\text{cm}/\text{秒}$ 以上の速さの超音波を加えれば、フィブリンの生化学的反応を抑制し得る事を示すことが出来た。今のところこの解析は、水と同様に血漿を扱った結果で、血漿の持つ粘弾性特性を考慮したものではないので、その線形性については今後の課題である。しかし、水と類似の性質の液体であれば、周波数に依存することなく、粒子速度のみで考えることができる。なおこの粒子速度の振れ幅は、約 9.55nm である。この極めて微弱な振れ幅よりも大きくなれば、フィブリンの形成は抑制されることになる。

この様な結果は少なくとも、抗凝固薬や抗血小板薬を用いなくとも超音波単独でも成長抑制効果のあることを示すものである。それゆえAIS患者に対し、薬物療法以外に全く音響物理学的な手段によって血栓の肥大化を抑制させる新たな治療法の道が開かれ得ることを見出した。