

#### C-4. 血栓選択型バブルリポソームを製造し得ることを確認した

①血栓への指向性を付与したBL、すなわちRGD-BLを調製し、RGD-BLの活性化血小板結合能およびラット総頸動脈に作製した塩化鉄誘発血栓への結合能を併せて検討した。

①-1、RGD-リポソームの血栓結合能の評価  
血小板は血栓を形成する際に、活性体となりその際にフィブリンと結合するドメインであるGPIIb/IIIaを高発現する。本検討で調製したRGD-リポソームは、このGPIIb/IIIaを特異的に標的としたものであるため、活性化血小板への結合率をFlowcytometry法にて検討することで、RGD-BLの結合能を評価した。その際、対照として、RGDの代わりにシステインを修飾したリポソームを（Cys-リポソーム）を用いた。その結果、Cys-リポソームを処置した群では活性化血小板への結合率は7.1%であったのに対し、RGD-リポソームを処置した群では33.7%となり、Cys-リポソーム処置群と比較し、約5倍もの結合率を示した（図C-8参照）。

#### ①-2、RGD-BLの血栓集積能

RGD-BLの血栓結合能を検討すべく、ラット総頸動脈に塩化鉄誘発血栓を作製し、RGD-BL投与前後の血栓の輝度変化を観察することで評価した。その結果、対照として用いたCys-BLを投与した際にはほとんど血栓造影増強効果を得ることができなかつたのに対し、RGD-BLを投与した群では血栓の輝度上昇が確認された（図C-9参照）。

②本研究においてフッ化リン脂質導入バブルリポソーム（F-BL）に使用したフッ化リン脂質はDPPC1分子中に1原子のフッ素を導入した化合物（F-DPPC）を使用した。そこで、コントロールとして同様の脂質組成でフッ素のないバブルリポソーム（DP-BL）を調製し、比較検討した。すなわち、既存のバブルリポソーム（normal BL）から改善された点を検討するとともに、フッ素原子が入ることによる効果についても検討した

#### ②-1、バブルリポソームの $C_3F_8$ ガス封入量の検討

低出力の超音波照射時のナノ/マイクロバブルの振動は超音波診断に利用されており、出力を上げた時に生じるナノ/マイクロバブルの圧壊は薬物・遺伝子デリバリーや発熱による温熱療法に応用される。ナノ/マイクロバブルの有するこれらの機能はナノ/マイクロバブル中のガスによるものである。このことから、多くのガスを含むバブルリポソームが開発できれば、さらに効率の良い診断・治療システムの構築に大いに貢献できるものと期待される。そこで、フッ化リン脂質導入バブルリポソーム中の $C_3F_8$ ガス封入量を測定した。その結果、normal BLと比較して、F-BLにおいて、 $C_3F_8$ ガス封入量が向上した（図C-10参照）。一方、DP-BLの $C_3F_8$ ガス封入量は変化しなかつた。これらの結果から、フッ化リン脂質の導入により、フッ素化合物である $C_3F_8$ ガスを効率よく封入可能であったと考えられた。

#### ②-2、バブルリポソームの粒子径の測定

現在、本邦において上市されているバブル製剤にはレボピストとソナゾイドがある。これらのマイクロバブルの粒子径は2-4  $\mu\text{m}$ とされており、超音波造影に用いられている。一方、薬物・遺伝子デリバリーへの応用を考えた場合、組織深部まで到達できる、さらに小さなバブル製剤が有利であると考えられる。このような背景のもと、バブルリポソームは0.4-1  $\mu\text{m}$ の新規ナノバブル製剤として開発を進めてきた。そこで、本研究において開発したフッ化リン脂質導入バブルリポソームについて、その粒子径を測定した。その結果、normal BL（ $547.2 \pm 342.7 \text{ nm}$ ）と比較して、F-BLでは粒子径の変化は認められなかつた（ $591.5 \pm 230.3 \text{ nm}$ ）。一方、DP-BLでは粒子径が増加する傾向にあった（ $927.6 \pm 495.2 \text{ nm}$ ）。（図C-11参照）これらの結果から、フッ化リン脂質導入バブルリポソームは既存のバブルリポソームと同程度の粒子径を持ち、サイズの小さなナノバブルであることから、組織深部まで到達可能なバブル製剤になり得るものと期待される。

## ②-3、バブルリポソームによる超音波造影効果

バブルリポソームの機能のひとつに超音波造影効果があり、この効果を利用することで病変部位の超音波診断が可能になると期待される。そこで、超音波診断装置を用いて造影効果を確認した。(図C-12参照)

その結果、normal BL, DP-BL, F-BLの全てのバブルリポソームにおいて同様の超音波造影効果が認められた。このことから、フッ化リン脂質導入バブルリポソームは既存のバブルリポソームと同様に診断と治療を同時に行えるツールになるものと期待される。

## C-5. 貼付け型振動子

次世代TSTの構想をまとめ、最も基本となる貼付け型ソフト振動子の実現可能性を示した。

従来から開発してきた診断画像ナビゲーションによる、塞栓部に対する標的型2次元集束治療ビーム発射方式に用いた基本的治療超音波条件を満たしながら、臨床現場(救急室など)での対応に適した、次世代型TSTの基本構想をまとめた。すなわち次世代型の普及版TSTは、次の特徴を有するものとなった。

- ①塞栓部周辺全域を照射するいわば広角照射式の超音波照射ビームを用いること
- ②その治療ビーム(中周波数)を発射する振動子は、側頭部に張り付けられるようなソフトで柔軟性のある薄型振動子であること
- ③そのソフトで薄型平板の振動子を用いることによって、患者の体動などに影響されず、また治療のために患者を拘束することのないような、いわば患者QOLの極めて高い超音波照射法とすること
- ④頭蓋内における定在波発生を回避するための、振動子駆動用電気系であること
- ⑤その電気系は小型軽量で、救急室内に常時設置できること
- ⑥治療用超音波条件は、従来の音響学的医学生物学的な安全性の条件を満足していること
- ⑦装置は超音波の検査技能や治療技能などの、特殊な超音波固有の知識や技能を医師に求めなくとも臨床使用できること

## ⑧開発システムとしては、rt-PA適用患者ほとんどに適用可能なこと

ただしこの次世代システムでは、超音波診断画像ナビゲーション能力を放棄し、かつ実時間的な血流再開通状態を監視する能力も放棄している。そのため、治療用システムとしては何らかの治療監視能力を別途に求める必要があるものと考えられる。

このような次世代型TSTの基礎となるソフト薄型平板振動子(Soft Thin Flat Transducer, STFT)について検討を行い、次の様な具体的な成果を得た。

- (1) STFTの素材としてはPVDF及び1-3コンポジットPZTで実現でき、500KHzに対し厚さ3mm程度にすることが出来た(図C-13)

薄型振動子として4種類のタイプを製作し、中周波数500KHzを全ての薄型振動子で実現できた。しかし、その厚さは3mm程度でありそれ自体は決して柔軟性の高い紙の様な柔らかさを持つものではなかった。ただし側頭部に張り付けるといった目的のためには側頭部と製作振動子の間に柔軟性のある素材(例えばゼリー状のもの)を挟めば充分頭部に張り付けができると考えられた。それ故、貼付け型として臨床現場で使用することは充分可能と判断している。

- (2) 矩形型のSTFTの音場ビームはほぼ理論値と一致し、ビームの広角化と振動子の大きさとの間について実用化の見通しを得た。

振動子としては矩形型、円形型、あるいは楕円型など、側頭骨窓に合う形状が考えられる。実験の結果、矩形型のものでもその一辺が直径に相当する円形振動子が形成する音場ビームに概ね近く、頭蓋内におけるビームの広角化に対して、理論的な予測の立てられることをシュリーレン実験から明らかにした。したがって、MCA主幹領域として頭蓋骨からの距離を設定すれば、それに相当するビームの広角化が行える振動子系を決定することが出来る。しかし、振動子が小さくなれば必要な音響強度を得るために印加電圧を上げねばならず、それに伴う発熱などの問題の発生す

ることが予想された。

- (3) ヒト頭蓋骨を用い定在波の発生すること及びこれを回避する駆動信号のあり得ることをシュリーレン法で確認した。(図C-14,C-15)

頭蓋骨内に振動子を入れ、反対側で反射させた場合の音場をシュリーレン装置で観察した。その結果、基本周波数による定在波の発生を認めた。しかし、振動子を駆動する電気系の周波数をスウィープ(Sweep)することで定在波をある程度抑制可能であることを確認した。完全な定在波(STW)の消失は、スウィープ法では困難であった。しかし、何らかの振動子駆動法を考案すればその定在を回避することが可能であることが示唆された。

以上の如く、TCT-LoFUTに代わる次世代型の新TSTシステムの基本要素となる貼付け型のSTFTの特性製法、及びその駆動信号系に関する根本的実現見通しを得た。これにより実際の臨床現場で使用可能な次世代TSTシステムの完成に向け、具体的な詳細設計及び製造化のための方針を立てることが出来た。従って次年度早期の製品化に向けた交渉を企業と行いその具体化を促進し得る段階となった。

## C-6. 臨床研究に供する対象データとなるAIS群の臨床成績を蓄積することができた

最終年度に実施するTST法の臨床研究における比較対照データとして、22年度においては国立循環器病研究センターでは14例、東京慈恵会医科大学では6例のデータを蓄積することができた。ただし慈恵の6例の内2例はカラードプラ計測が出来ていないため除外し、結果的にAIS患者でrt-PA療法適用例11例及び、AIS患者でrt-PA非適用例6例に関して、しかるべき臨床成績を積みあげた。これらの蓄積結果より次の具体的な成果が得られた。

### C-6-1. rt-PA適用例では再開通率が高く、またその再開通時間がたかだか45分以内で殆どの再開通が生じていた(図C-16)

- (1) 血流再開通率はrt-PA適用群で著しく高かった。

rt-PA適用症例11例中7例(63.6%)において再開通した。一方非適用例では7例中1例(14.3%)で再開通するに留まった。すなわち、rt-PA適用患者における再開通効果の高いことが示めされた。ただし症候性頭蓋内出血が各施設1例ずつあり、18.2%に及んでいた。この割合自体は通常症候性出血5-6%に比べると高いが、適用症例11例と少数例であるので統計学的事とは議論するに及ばない。

(2) rt-PA療法で再開通する場合には15分以内で42.9%、30分以内では71.4%、と早い時間で再開通することが明らかとなった。

rt-PA適用群において、再開通7例の再開通時間は次の様になった。15分で3例、30分で2例、45分で1例、60分で0例、75分で1例であった。一方非rt-PA適用群においての再開通時間は30分で1例であった。各時間での累積を見ると、再開通は30-45分以内に殆どが再開通し始めた。いわば再開通例においては点滴静注60分の内の相当早い時間に再開通が始まるということが明らかとなった。ただし完全再開通状態にいたるまでには30分以上かかることが示唆された。

### C-6-2. 超音波カラードプラ断層法で蝶形骨小翼部を描出できればMCAの描出率は極めて高いことを明らかにした(98%)(図C-17)

- ① B-modeでの描出状態は対側側頭骨でinvisible2%、poor22%、fair32%、good44%、中脳でinvisible33%、poor23%、fair27%、good16%、同側蝶形骨小翼でinvisible14%、poor23%、fair27%、good36%であった。
- ② TCCSでのM1は全体の54%で描出可能で、invisible46%、poor8%、fair7%、good39%であった。
- ③ 対側側頭骨、中脳、蝶形骨小翼の各々がgoodの場合、M1の検出率は86%、90%、98%で正の相関を認めた。構造物とM1の描出状態の関係はSpearman's  $\rho$ において対側側頭骨0.68、中脳0.67、蝶形骨小翼0.79であった。性差で比較した場合、男性の対側側頭骨0.61、中脳0.59、蝶形骨小翼0.71に対し女性の対側側頭骨0.68、中脳0.56、蝶形骨小翼0.82であり、男性で描出良好であった。70歳未満と70歳以上で比



較した場合、70歳未満の対側側頭骨0.60、中脳0.57、蝶形骨小翼0.74に対し70歳以上の対側側頭骨0.71、中脳0.72、蝶形骨小翼0.81であり、若年で描出良好であった。

C-6-3. 最新の単結晶振動子を用いた装置の頭蓋内描出率はその構造物において有意に上昇したが、MCAについては有意な差を認めなかった(表C-2, 3)

①【頭蓋内構造物描出率比較結果】

頭蓋内構造物の描出状態は対側側頭骨で従来型87%、単結晶100% (p<0.01)、中脳で従来型63%、単結晶77% (p<0.01)、蝶形骨小翼で従来型65%、単結晶73% (p<0.01) であり、単結晶プローブで有意に良好であった。

②【MCA描出率の比較結果】

中大脳動脈の描出状態は従来型57%、従来型+前頭骨窓60%、単結晶58%、単結晶+前頭骨窓62%であり、有意差は認めなかった。単結晶+前頭骨窓で性差及び年齢で比較した場合、男性70%、女性38%で男性で有意に良好であり、年齢と検出率は負の相関を認めた (OR(/10歳):0.53(95%CI 0.30-0.89))。

C-6-4. 経頭蓋カラードップラ断層法の超音波プローブを頭部に固定するための患者QOLが高く、かつ操作し易い新型固定具を開発した

従来開発してきたTCT-LoFUT専用の頭部固定具は、臨床現場に適合していなかったため、改めて独自の開発試作を行い、22年度末には新型2号機を完成させた。同頭部固定具は圧縮空気などを用いないため扱いやすく、かつ患者の体動にもある程度対応できる形状のものとなった。その実際の使い勝手について現在臨床的に施行している。(図C-18)

以上、臨床研究に向けて比較対照データの蓄積、治療を行う際のカラードップラ断層法による血流停止状態でのMCA描出法の検討、単結晶型の最新装置の検出特性、更には臨床現場における患者適合性の高い固定具の開発を行い、臨床研究のための基本的臨床成績と技術的課題解決の道筋を得た。

D. 考察

22年度における研究成果は上述の如く次の6件に集約される。

- 1) TST療法はrt-PA投与量を減少させても、現行rt-PA容量のもつ溶解効率と同等の溶解効率を招来することを示した。
- 2) TST療法の安全性は高血圧症例で、かつ非再開通状態においても、安全性が担保される可能性を動物実験によって示唆した。
- 3) 超音波単独照射によっても血栓成長は抑制され、TSTの効果増高に寄与することを示唆した。
- 4) 血栓選択的バブルリポソームの製造効率を高め得ることを確認し、かつ超音波による血栓描出力増高力のあることを明らかにした。
- 5) 次世代TST法としての貼付型ソフト薄型平板振動子の製作に成功し、その実用化の技術的見通しを得た。
- 6) 臨床研究に必須の対照データの蓄積をすると共に、その実施のための技術的・手技的課題について、解決の見通しを得た。

これらの個々の成果について最終目標であるTSTの臨床適用に向けての考察を述べる。

D-1. TSTによるrt-PA投与量低減化に関する考察

本年度はin vitro実験によってrt-PA容量を減少させても超音波によってその増高効果を高めることが出来ることを示し、TST療法においては現行rt-PA容量の2/3に低減化しても、現行用量の持つ溶解効率の得られることをあきらかにしている。この時の超音波条件は500KHz連続波であり、またその音響強度は従来から示唆してきた0.3W/cm<sup>2</sup>という臨床適用限界値に近い条件で得られたものであった。従って、超音波強度を弱くすればrt-PA投与量を増やさねば現行治療法の持つ効果と同等にすることはできない。この超音波強度の持つ溶解促進率とrt-PA容量の関係について、予測し得るノモグラフを本報告では示している。これをもとに適切な溶解率促進率を得るに足る超音波条件を見出し、かつその時のrt-PA容量を決定すればAIS患者の病態に応じた適切な治療が可能となる。rt-PA容量の低減化は、もともとそのrt-PAがもつ毒性を軽減するこ

とが目的であった。その実現可能性をここに明らかにし、かつその臨床実現に適したパラメータの決定法を示したことになる。

しかしながら、超音波条件については更に周波数、波形、強度など様々な条件についてのin vitro実験を行い、その最適化を見出しておく方がより臨床現場の要求に合うものとなるだろう。今回我々は一つの条件についてのみ結論を得、かつその有効性を示したが、多様な超音波条件の下でその最適値をさらに集束させる必要があると考える。そのためにも21年度に開発した高精度光学式血栓厚測定装置は極めて有効なものとなるはずである。

またこの様な容量減少化の可能性をもつTST療法については、動物実験によってrt-PA容量の低減化を確認する。ヒトの組織の組換え方式によるrt-PAは、種の異なる動物に対して有効か否か、必ずしも明確ではない。動物実験によるrt-PA低用量化に関する実験をおこなわねば、臨床に持ち込むことは極めて困難なことになる。そのため容量依存的な血栓溶解効果に関する動物血液を用いた基礎研究が、場合によっては今後必要になるものと考えられる。現にラットでは、10倍濃度のrt-PAを用いることで多くの論文はその有効性を実証してきている。この10倍濃度を変化させた時の溶解率の変化をin vivo動物実験で確認した報告は少ない。われわれの超音波条件に対する溶解効率増高効果を確認するには、容量依存性のある動物実験モデルを用いた検討が必須の課題となる。ただし中周波数を用いたTST療法に関する臨床成績は、存在しないので、まず中周波数によるTST法の有効性と安全性を現行rt-PA容量の下で得ることが第1義的な臨床研究課題になるものと考えられる。用量低減化はその次の課題と考えている。

## D-2. TST法の安全性に関する考察

TST療法としては既に診断用超音波を用いた有効性が臨床ではAlexandrovやMolinaらによって、さらにはEggersらによって報告されている。しかしながら中周波数帯域、すなわち100KHz-1MHzの周波数帯については、わずかに300KHzバースト波を用いた失敗したTRUNBI治療が報告されているのみである。このTRUNBI治療の失敗に対し、その後音響

学的問題点や医学生物学の問題点が指摘され、今日では音響学的問題は解決されている。また医学生物学的にも我々の手によってしかるべき音響強度の選択を以って、安全であることをSHR/SP高週令モデルにおいて実証してきている。そのような問題点を解決し得る超音波条件として、我々は500KHz連続波0.3W/cm<sup>2</sup>以下の音響強度、そしてintermittent照射が適することを数々の動物実験等で示してきた。しかし、その条件であってもTRUNBI治療の出血率増高が非再開通状態で多かったことについては、我々も明解な対比データを示していなかった。本報告では、TST療法を適用した場合の非再開通状態においても、中周波数超音波条件がrt-PA療法のもつ出血率や浮腫率などの副作用の影響をそれ以上にはしないこと、すなわち同等性を示した。

しかしながら、出血率は本報告で用いた完全閉塞型のpermanent MCAOモデルよりもrt-PA投与による自家血栓再開通状態の方が高いことが知られている。それゆえ、自家血栓再開通モデルに対する中周波数TSTの安全性に関する実験がさらに必要になると考えられる。すでにWISTER Ratの自家血栓モデルについては佐口らがその安全性を示している。しかしながらSHRのような高血圧自然発症ラットについてはその報告は内外にない。それゆえ我々の手によって自家血栓再開通モデルを用い、中周波数TSTの安全性を追加的に検証する必要があるものと考えられる。

なお免疫組織化学的な意味で、以前に行ったカニクイザルAISモデルにおける再検討を試みた。その結果、われわれのTST条件は、ユビキチン・プロテアソーム系及びオートファジー・リソソーム系によっても有害性を認めなかった。しかし、カニクイザルAISモデルの摘出脳は梗塞後24時間後の成績であり、神経学的には遅発性あるいは遅効性の副作用がないと断言することは出来ない。それゆえ24時間経過以後の長時間生存状態における免疫組織化学的評価が必要になる可能性を残している。

### D-3. 超音波血栓成長抑制効果に関する考察

TSTの適用開始時間延長には、TSTの効果増強とともにその対照となる血栓自体の大きさを抑え込み続けるという手段も考えられる。すなわちAIS発症当初から実際の治療開始までの間にも血栓は血管内で成長し続けると考えられる。この成長を極力抑制し、初期段階の小さな血栓状態に維持することができればそれだけTST効果も早く表れ、再開通時間も短縮することができると考えられる。その様に考えると、発症直後から血栓成長を抑制するような適切な薬物あるいは物理的手段の活用も注目すべき血栓溶解促進効果の一助であり、かつ適用開始時間延長の可能性も含んでいると考えることも出来よう。すでに超音波が血栓成長を抑制することは吉澤らによって報告されている。吉澤らは犬両側股動脈に血栓を形成させる実験モデルにおいて一側に超音波を当て続けると他側には血栓が100%できるにもかかわらず、約85%以上の例で血栓ができないことを報告している。この事実をもとにin vitro実験において本報告では定量的に超音波による抑制効果を確認した。すなわち血液学的な意味での薬剤を全く用いず、超音波だけで血栓の形成されないことを、ある超音波条件下では実現し得ることを示したものである。

この超音波による血栓抑制効果は、AIS発症直後から経頭蓋的に超音波曝露をし続けることによって血栓の成長を抑制させることができることを示唆している。実際の臨床では、明らかにAISであることをtelemedicineなどによって患者と患者の状態を病院側で判断した上で超音波曝露を開始しなければならないが、血栓成長抑制を全く物理的な手段で実現することはある意味でその適用範囲を拡大し得るものと考えられる。すなわち経口薬や静注薬のもつ有効性と有害性ととの妥協によって成り立つ、安全な有効性という一種の潜在的毒性を含む薬物とは異なる物理エネルギーによってのみ実施し得る点は、病態の悪化や加速化を回避し得る手法として注目に値するものとする。今後その適用可能性に関するin vitro/ in vivo実験の追加的検討を行うことによってその見通しが得られるものとする。

なお超音波単独による血栓成長抑制効果自

体は、本研究におけるAIS治療に限らず、血管開存術後の再開塞予防や、あるいは薬物併用が困難な術後の塞栓回避のためなどに用いることができるが、それらの展開可能性については別の研究と考え、ここでは割愛する。

### D-4. 血栓選択的バブルリポソームの開発に関する考察

リポソームへRGDペプチドを修飾したことにより活性化血小板への結合率がCysを修飾したときの約5倍に上昇し、また、*in vivo*の血栓においてもCys-BLを投与した際には血栓造影増強効果が得られなかったのに対し、RGD-BLを投与した際には血栓の輝度上昇が観察されたことから、このRGD-BLは血栓の血小板に結合し、血栓内部に保持されたことが示唆された。

フッ化リン脂質導入バブルリポソームは既存のバブルリポソームと同様の粒子径および造影効果を有しながら、2倍以上の $C_3F_8$ ガスを封入可能であった。このように多くのガスを封入可能であったのは、導入したフッ化リン脂質がリポソーム中の水相とガスのフルオラス相の間で界面活性剤として作用したためと考えられる。今回調製したフッ化リン脂質導入バブルリポソームの脂質組成は、半分のリン脂質にわずかに1原子のみのフッ素原子を持つ。これにより、ガス封入量の向上が認められたことから、バブル製剤の外殻にフルオラス相と水相間の界面活性剤を用いるコンセプトが証明されたと考えられる。今後は脂質組成のみならず、様々なフッ化リン脂質を用いて検討することで、さらに効率よく超音波造影ガスを封入可能なバブル製剤になるものと期待される。

バブルリポソームの問題点のひとつに、ガスの封入操作後の粒子径コントロールが困難であることが挙げられる。図C-11の結果で、DP-BLが約1  $\mu\text{m}$ の粒子径を示したことから、リポソームの構成脂質を変化させることでバブルリポソーム粒子径がコントロールできる可能性が示唆された。この結果は、診断と治療を同時に行う上で最適な粒子径さえ設定できれば、それに合わせてバブル粒子径をコントロールできるという有益な基礎的情報になるものと考えられる。

しかし残念ながら、我国においてはバブルリポソーム自体の製造メーカーがなく、その臨床適用への道のりは遠いと考えられる。米国にはリポソームの製造メーカーがあり、リポソームと抗がん剤を結合する新DDSの臨床試験が行われている。既にPhase-Ⅱbに及んでおり、近い将来臨床現場に登場するものと予想される。この米国でのリポソームDDS試験は、本研究分担者丸山らが展開しているもので、その成果を以って逆輸入的にバブルリポソームの実用化の道が開かれなるとも限らないと考えられる。実用化に向けては様々な道筋が存在すると予想されるが、本研究におけるバブルリポソームの推進は、将来の血栓溶解加速に大きな期待を寄せざるを得ないものとなっている。

#### D-5. 次世代TSTに関する考察 (図D-1)

画像ナビゲーション型標的治療ビーム発射方式に替わる、新たな次世代TSTを急遽開発しつつある。この次世代TST法は、表D-1に示すような特徴を有しているものである。これに供する貼付け型ソフト薄型平板振動子の製作に成功し、また定在波回避の可能性を示した。しかし、その実用化にはなお次の様な問題があることが示唆される。

##### (1) 振動子からの発熱

PVDFを用いた場合には電気音響変換効率が低いため、エネルギーロスが生じ、振動子自体が発熱する可能性が高い。また高電圧でなければPVDFを駆動することが出来ないため、駆動装置自体が大掛かりなものにならないとも限らない。実用化に際しては発熱、及び駆動系の容量に関する十分な検討が求められる。他方、1-3コンポジットを用いた場合には変換効率が高く、低電気容量でも充分駆動可能となる。このメリットをいかした開発を考えることも重要と考えている。

##### (2) 側頭骨へ張り付けるための振動子の柔軟性

中周波数500KHzを実現するPVDF振動子は、薄い振動子を何枚も重ねるため、結果的に堅く厚さも3mm近いものとなった。また1-3コンポジットも500KHzのために3mm程度の厚さを要し、決して紙の様に柔軟性のある振動子と言い得るものにはならなかった。し

かし、平板な振動子であるために振動子と側頭骨の間に適切な柔軟剤(ただし超音波の透過率の良い材料)を用いれば、側頭部表面にそれらの薄型平板振動子を張り付けることも可能である。あるいはバンドで頭に帽子の如く固定することも可能であろう。その意味では必ずしも薄型平板振動子が柔らかであること自体は問題にならないとも考えられる。材料の改善と実際の臨床現場での使い勝手との間に今後trade-offを計ることも重要でないかと考える。

##### (3) 定在波の回避

TRUNBI試験の失敗の原因の一つには、頭蓋内に強力な定在波が発生したという音響的問題のあったことが、古幡を始め多くの研究者によって指摘されてきている。われわれの中周波数500KHz連続波を用いる場合にもこの定在波の問題は解決しなければならない根本的問題の一つである。今回我々はSweep法をもってその定在波回避の可能性を示すことができた。しかし、さらに完全な定在波消失のためには駆動信号系としてランダム変調などの別途の振動子駆動信号系を考案しなければならないものと考えている。最終年度前半におけるもっとも重要な音響技術的課題で、この成功なしに臨床研究へのステップはあり得ないものと考えている。

##### (4) 駆動系の小型化

救急医療の現場やSCUでrt-PAが投与されるのであるから、その超音波駆動系は極力小型である必要がある。駆動回路として単純シンプルなものを我々は検討中であるが、未だその全体システムとしての形状、重量などは決定しかねている。これらについても実用化に向けた基礎検討が必要になるものと考えている。

#### D-6. 臨床研究のための事前準備状態に関する考察

昨年度からAIS患者に対するrt-PA療法適用患者における再開通状態を、超音波カラープラ法によって測定し、最終年度に行われる臨床研究のための比較対照データとすべくヒストリカルデータの積み上げを行ってきた。未だ18例にとどまるが、その結果からは再開通率の向上、再開通時間の短縮化などのrt-PAなどの有用性が認められつつある。現在得ら

れているデータに関しては次の2つの特徴がある。

### (1) 症候性頭蓋内出血の出現

rt-PA療法を施行した際の症候性頭蓋内出血率は、我国で5.8%であるが、今回例数が少ないとはいえ20%近い値を示した。この症候性出血率を抑制することがTSTにも期待される。ただしカラードプラ断層法を用い、血栓溶解加速を試みたEggersらの行った治験では15.7%の症候性出血を招き、その超音波条件に関する問題が投げかけられている。経頭蓋超音波ドプラ法という診断装置ではあっても、長時間(約60分)連続にビームを照射し続けることは想定外であり、その為出血率が増加してしまったものとも考えられる。適切な超音波条件の選定それ自体が、中周波数TSTにはさらに注意深く求められるものとなる。

### (2) 再開通率及び再開通時間の状態

rt-PA療法における再開通率は、従来40-50%であった。勿論施設によってその成績は異なるが、比較データとなる再開通率及び再開通までの時間について本研究によって得られた成績は、現在のところEggersらが報告している再開通開始時間、再開通率と極めて類似している。それゆえ我々の行う新TST法による臨床研究の対照比較データとして、我々の成績ばかりでなくEggersらの成績も参考データとして活用し得る可能性が高い。ちなみにEggersらの成績では、rt-PA単独例では60分の間に10-20%の低値であったが、カラードプラ断層法を併用した場合には30数%-60%と高値となっている。ヒストリカルデータとしての再開通率は現在、我々の成績は既にrt-PA単独治療においても50数%に達し、Eggersらの診断用超音波併用TST法とほぼ同等の効果を示すものとなっている。

### (3) 早期再開通がもたらすmRS改善の可能性

多くの臨床成績は再開通時間が早ければ早い程、3ヶ月後の予後を示すmRS評価の良いことを報告している。多くの報告は欧米での0.9mg/kgの場合の成績であるが、我国における0.6mg/kgの容量においてもその改善効果の充分あることがJACT-IIや木村らによって報告されている。それ故、我々の新TST法は、まず我国における0.6mg/kgを基準に臨床研究

されるべきと考える。

### (4) MCA描出率、単結晶プローブによる画像診断及び頭部固定具の新開発

AIS患者に対するTST治療を行う際に、超音波カラードプラ断層法による標的部位の探索が必須であった。それはその画像によるナビゲーションにより治療ビームを打つ必要があったからである。そのためカラードプラによるMCA探索能力が蝶径骨小翼部の描出が最も適していること、またできれば単結晶型のカラードプラ断層法であれば頭蓋内構造物の描出率が高いので、臨床的には極めて有用であること、さらには改良した頭部固定具を用いれば患者QOLが高く有用な治療効果を上げ得ることを示唆してきた。しかし、この画像ナビゲーションによる標的治療の実用が断たれた現在、これらの研究成果は治療時の監視用超音波装置に用いることに限定されることになろう。これらの研究成果を踏まえ、新たな次世代TST施行時の監視用手技、あるいは固定具として活用可能なものとする。

## E. 結論

平成22年度の所期の目的を達成し、次の結論を得ることが出来た。なお研究期間の間に予定していた経頭蓋超音波脳血管装置(TCT-LoFUT)の開発企業がJSTプロジェクトであったにもかかわらず撤退したことにより、大幅な計画及び方法の変更が求められた。しかしながら当初の開発機器(TCT-LoFUT)に代わる新たな次世代技術開発に見通しを得たお蔭で、所期の目的を達成することが出来、23年度に続くしかるべき基盤を得ることが出来た。

- ① 血栓溶解剤rt-PAの投与量低減化に関し、経頭蓋超音波(中周波数500KHz、低出力0.3W/cm<sup>2</sup>、連続波)を併用すれば現行投与量(0.6mg/kg日本、0.9mg/kg欧米)の2/3に低減化出来る事をin vitro実験で明らかにした。この低減化傾向は強度依存的であり約0.03W/cm<sup>2</sup>以上であればその効果の得られることも同様に明らかにした。
- ② 経頭蓋超音波照射療法において、再開通しない状態のAIS患者において、その超音波条件は、脳組織に対する副作用(出血率、



浮腫率、梗塞率)をrt-PA単独投与治療時の副作用以上には増悪化しないことを動物実験によって明らかにした。この傾向を高血圧ラットで病理組織学的に明らかにするとともに、カニクイザルAISモデルにおける、ユビキチン等の免疫組織化学的評価によっても明らかとなった。

- ③ AIS患者超急性期治療開始時間を延長する一助として、薬物を用いない超音波単独照射が血栓成長を抑制することを明らかにし、少なくとも約0.07W/cm<sup>2</sup>以上であれば、有効であることをin vitro実験を通じて明らかにした。
- ④ 超音波脳血栓溶解療法の効果増強に係るDDS法として、血栓選択的バブルリポソーム開発を施行し、in vitro実験によって選択能力を高める得ること、またin vivo動物血栓モデル実験によって集積率を高め得ることを確認した。さらに、バブルリポソームの製法として、フッ素を活用する手法を見出し、高効率に関する基礎データを得たので、実用化への具体的見通しを得た。
- ⑤ 既開発中であった標的型脳血栓溶解法に代わる新たな次世代型経頭蓋超音波脳血栓溶解法の開発に見通しを得た。非標的型で、救急室等で容易に使用可能なソフト薄型平板振動子を用いる新システムは、定在波発生問題を回避する新たな振動子駆動信号法を活用し、究極的にはrt-PA適用患者全員にも適用可能な見通しを得た。
- ⑥ そのような経頭蓋超音波脳血栓溶解法の臨床研究に際し、必須となるヒストリカルデータとして、AIS患者に対するrt-PA療法施行データ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集積した。これにより次世代システム適用時の比較対象データが整いつつある。

以上の様な具体的成果を踏まえた、本年度の結論は、次年度早期に新たな普及型経頭蓋超音波脳血栓溶解装置の開発を加速するに十分な基礎データを得たこととなり、これをもとに臨床研究として、AIS患者における経頭蓋超音波血栓溶解療法の有効性を評価し得る見通しを得ることができた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Kyosen SO, Iizuka S, Kobayashi H, Kimura T, Fukuda T, Shen J, Shimada Y, Ida H, Eto Y, Ohashi T. Neonatal gene transfer using lentiviral vector for murine Pompe disease: long-term expression and glycogen reduction. *Gene Ther.* 2010 Apr;17(4):521-30.
- Fukuda T, Akiyama N, Ikegami M, Takahashi H, Sasaki A, Oka H, Komori T, Tanaka Y, Nakazato Y, Akimoto J, Tanaka M, Okada Y, Saito S. Expression of hydroxyindole-O-methyltransferase enzyme in the human central nervous system and in pineal parenchymal cell tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010 May;69(5):498-510.
- 古賀政利. 経頭蓋超音波検査の現状と今後の展望: 超急性期脳梗塞の経頭蓋超音波検査. *超音波医学* 2010;3:265-271.
- 古賀政利、峰松一夫. 実地医家のための脳卒中診療の新しい展開. 脳梗塞急性期治療の新しい展開. *Medical Practice* 2011;28:580-589.
- Koga M, Toyoda K, Nakashima T, Hyun B H, Uehara T, Yokota C, Nagatuka K, Naritomi H, Minematsu K: Carotid duplex ultrasonography can predict outcome of intravenous alteplase therapy for hyperacute stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 20:24-29, 2011.

### 2. 学会発表

- 古幡博: 「特別講演」次世代脳神経超音波治療への挑戦的展望, 第20回京都脳神経・脈管超音波セミナー, 京都, 2011年4月
- 松果体実質細胞腫瘍の腫瘍マーカー その3 第41回日本神経病理学会 2010年04月 東京
- Fabry病knockoutマウスの神経病理 第41回日本神経病理学会 2010年04月 東京
- 澤口能一: 16<sup>th</sup> Meeting of the European Society of Neurosonology and Cerebral Hemodynamics, Munich, Germany May 2011
- 古賀政利、遠藤薫、鈴木理恵子、前田巨一郎、佐藤和明、石上晃子、窪田純、古

- 幡博、山本晴子、峰松一夫。低侵襲的低周波超音波脳血栓溶解法の臨床治験に向けたヒストリカルデータ収集。第29回日本脳神経超音波学会、岡山、2010年7月
- ・ 古賀 政利、峰松 一夫。経頭蓋超音波と血栓溶解療法（シンポジウム）。第29回日本脳神経超音波学会、岡山、2010年7月
  - ・ 鈴木理恵子、古賀政利、虎谷直美、生野雄二、鳥居孝子、仁木均、梅嵩有砂、向井智哉、長束一行、豊田一則、峰松一夫。急性期脳出血患者の下肢間欠的空気圧迫法使用下での深部静脈血栓症発現の検討。第29回日本脳神経超音波学会、岡山、2010年7月
  - ・ 天野達雄、古賀政利、豊田一則、鈴木理恵子、濱中正嗣、小仲 邦、峰松一夫。一過性全健忘患者における経食道心エコー検査所見。第29回日本脳神経超音波学会、岡山、2010年7月
  - ・ 古賀政利、井上泰輝、豊田一則、峰松一夫。心房細動合併脳梗塞患者においてCHADS<sub>2</sub>スコアは転帰と関連する。第13回日本栓子検出と治療学会、福岡、2010年11月
  - ・ 三好正浩、古賀政利、豊田一則、峰松一夫。当院における小脳梗塞の実態。第13回日本栓子検出と治療学会、福岡、2010年11月
  - ・ 祢津智久、有廣昇司、古賀政利、天野達雄、鈴木理恵子、斎藤こずえ、豊田一則、峰松一夫。虚血性脳血管障害患者における大動脈弓部複合粥腫病変と脂質に関する検討。第13回日本栓子検出と治療学会、福岡、2010年11月
  - ・ 遠藤薫、古賀政利、佐藤和明、石上晃子、豊田一則、峰松一夫。単結晶プローブと前頭骨窓を用いた経頭蓋カラードブラによる中大脳動脈の検出。第13回日本栓子検出と治療学会、福岡、2010年11月
  - ・ 福田真弓、古賀政利、三好正浩、豊田一則、長束一行、峰松一夫。rt-PA静注療法中の脳梗塞再発に関する検討。第13回日本栓子検出と治療学会、福岡、2010年11月
  - ・ 鈴木理恵子、古賀政利、森真由美、豊田一則、峰松一夫。急性期脳梗塞症例における、経頭蓋カラードブラB-mode画像と中大脳動脈水平部検出率の関係。第12回日本栓子検出と治療学会、大阪、2009年10月
  - ・ Rieko Suzuki, Masatoshi Koga, Mayumi Mori, Kazunori Toyoda, Kazuo Minematsu. Visualization of the lesser sphenoid wing on B-mode affects detectability of the middle cerebral artery by transcranial color-coded sonography. European stroke conference, Spain, 2010.5
  - ・ 遠藤 薫、古賀政利、佐藤和明、石上晃子、鈴木理恵子、豊田一則、峰松一夫。単結晶プローブと前頭骨窓を用いた経頭蓋カラードブラによる中大脳動脈検出率改善の検討。第13回日本栓子検出と治療学会、2010年11月19-20日、福岡
  - ・ 三村秀毅、荒井あゆみ、作田健一、下山隆、仙石鎌平、古幡 博、持尾聰一郎。tPA静注療法による早期再開通をTC-CFIとMRAで確認し得た中大脳動脈閉塞の2例。第13回日本栓子検出と治療学会（エンボラス学会）。福岡、11月、2010
  - ・ 三村秀毅、下山 隆、余郷麻希子、古幡 博、持尾聰一郎。アルテプラゼ静注療法における経時的超音波モニタリングの有用性。第51回日本神経学会総会。東京、5月、2010
  - ・ 三村秀毅、下山 隆、余郷麻希子、荒井あゆみ、古幡 博、持尾聰一郎。脳血栓溶解療法における超音波を用いた脳循環リアルタイムモニタリング評価。第35回日本脳卒中学会総会、盛岡、4月、2010

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

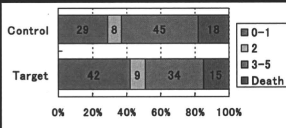
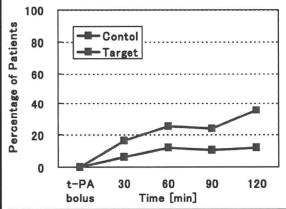
- 1.特許取得  
1件
- 2.実用新案登録  
なし
- 3.その他  
なし

# US診断装置を用いる脳血栓溶解治療

**TCD**

完全再開通率

Andrei V. Alexandrov, New England J of Med, 2004

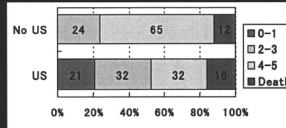
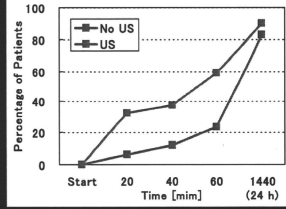


[0-1] 13%増加

**TC-CFI**

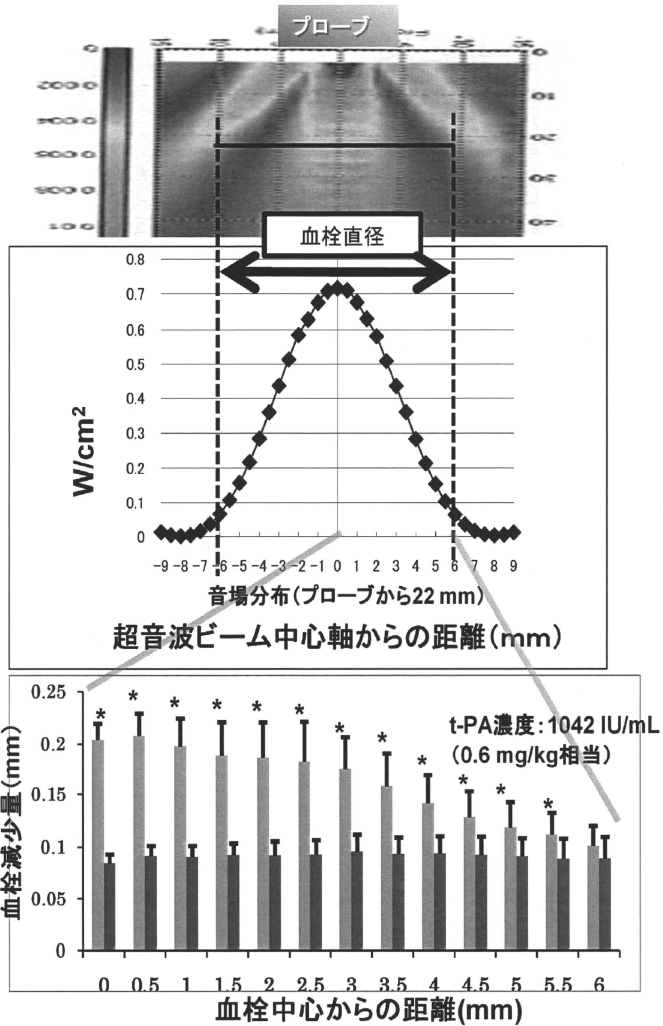
再開通率(部分再開通率含む)

Eggers J., Stroke, 2008

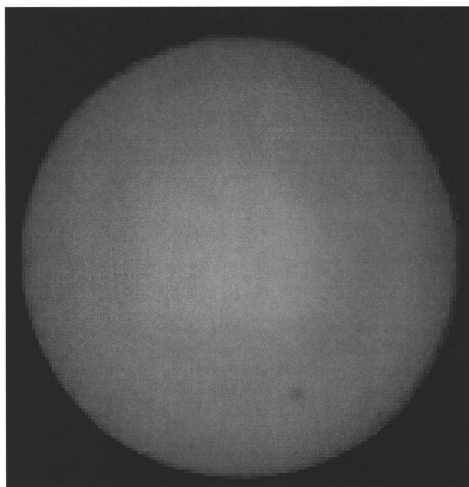


[0-1] 21%増加

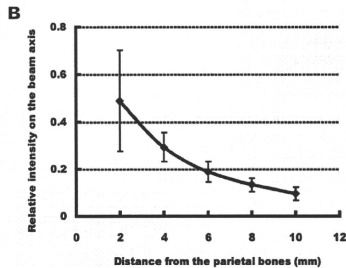
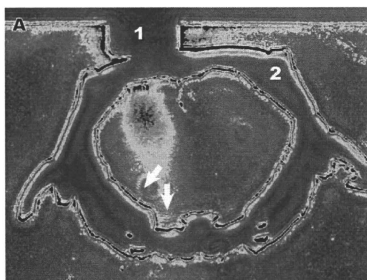
図A-1 血流再開通率の比較



図B-1 実験系の全体像



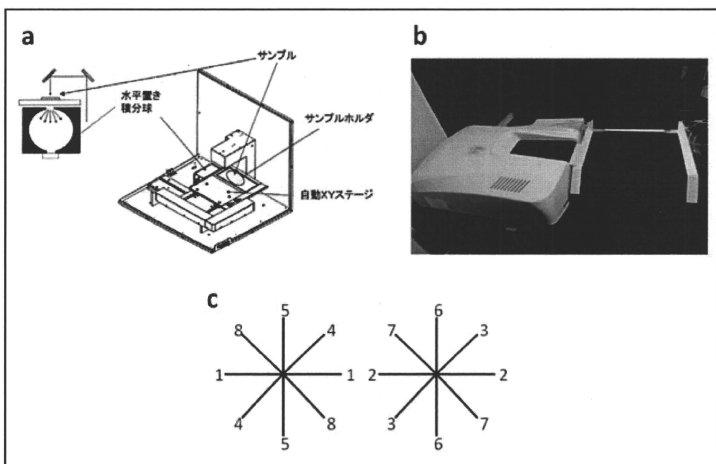
図B-2 コイン状血栓



図B-3 A：シュリーレン法で見た頭蓋内超音波音場。“1”はLFTUSプローブで、“2”はラット頭蓋骨を示す。LFTUSプローブはラット頭蓋骨の頭頂骨側に置いた。図内の矢印は頭蓋反対側付近の縞模様の定在波を示す。

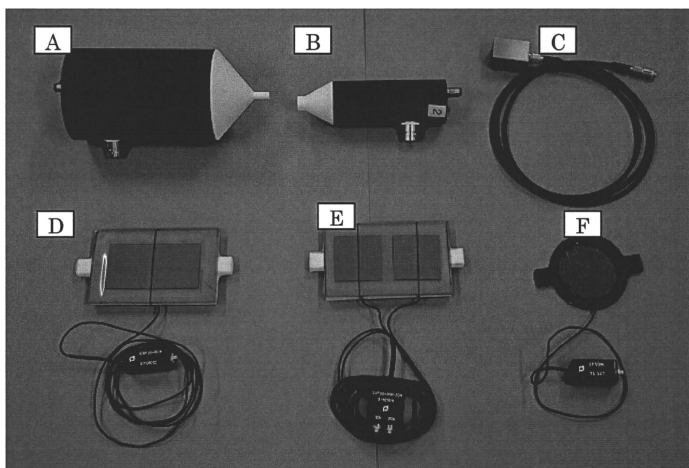
B：ラット頭頂骨を透過した後のLFTUSの相対的強度（n=8）。



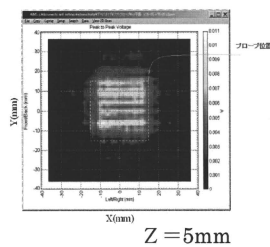
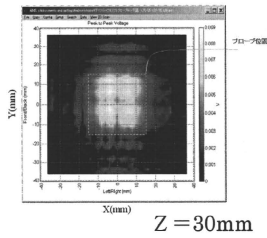
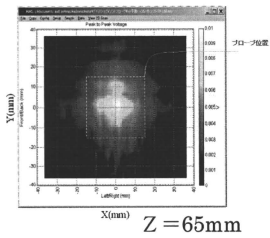
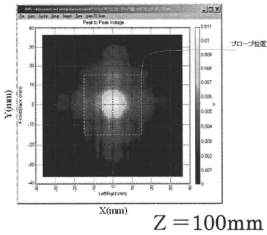
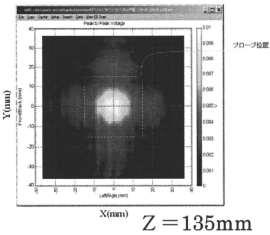
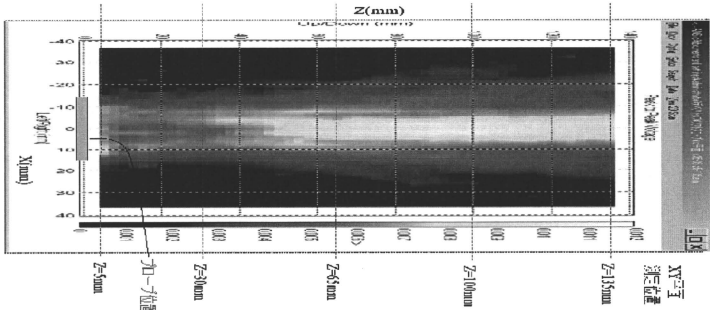


図B-4 血栓成長抑制の光学的評価

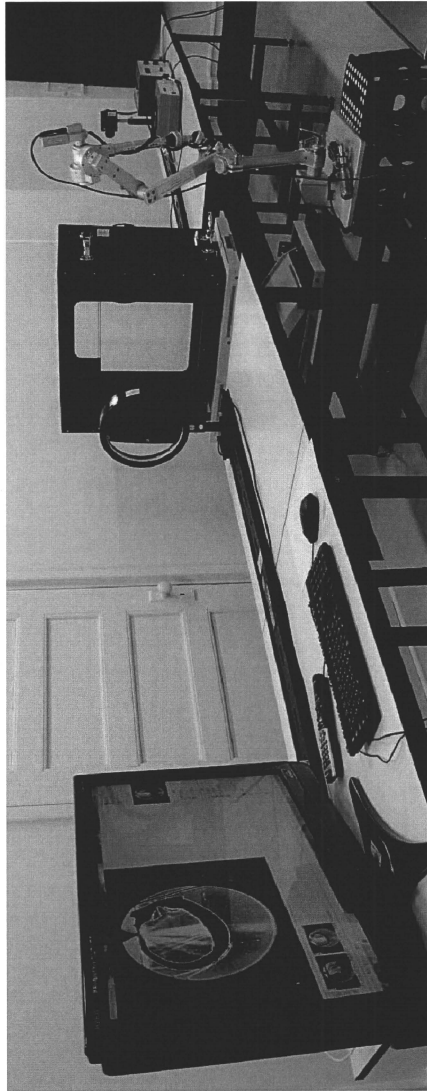
吸光度計装置原理を示した (a) . 次に吸光度計装置 (日本分光 : 特注品) の写真を示した (b) . 吸光度計による血栓2個同時測定のための測定方向を示した . 血栓は各測定方向ごとに0.5 mm間隔で25点を測定し , 血栓一つあたり計100点の吸光度を測定した (c) .



図B-5 ソフト薄型平板US振動子の試作



図B-6 矩形振動子(30×30) 2ch PVDFの音場分布振動子から発射されるビームの長軸方向の音場分布をAIMSで測定した結果。  
 ビーム横断面の分布：  
 振動子から135、100、65、30、5mmの横断面内音場分布



図B-7 大型シュリーレン装置  
(東京慈恵会医科大学スーパー特区共同利用実験施設Ⅱ)

## 対象

- 前向き観察研究
- 期間: 2008年4月～2010年3月
- 登録条件:
  - 発症12時間以内の急性期脳梗塞患者
  - 性・年齢を問わない
  - MRAで中大脳動脈(M1もしくはM2)閉塞
  - 経頭蓋カラードプラ検査(TCCS)可能
  - rt-PA静注療法の有無を問わない
- 除外条件:
  - 主治医や担当医が適当でないと判断

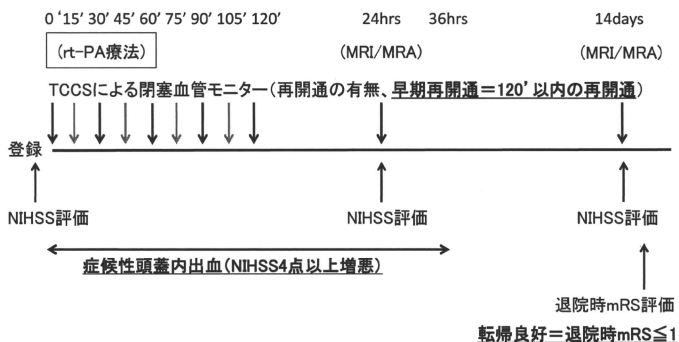
Utsunomiya University  
Graduate School of Medicine



図B-8

## 方法

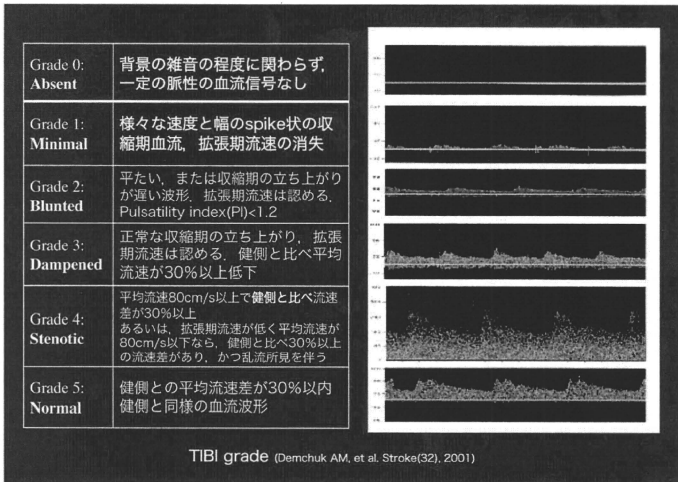
超音波装置: 日立メディコ社製EUB8500+2-2.5MHzセクター探触子



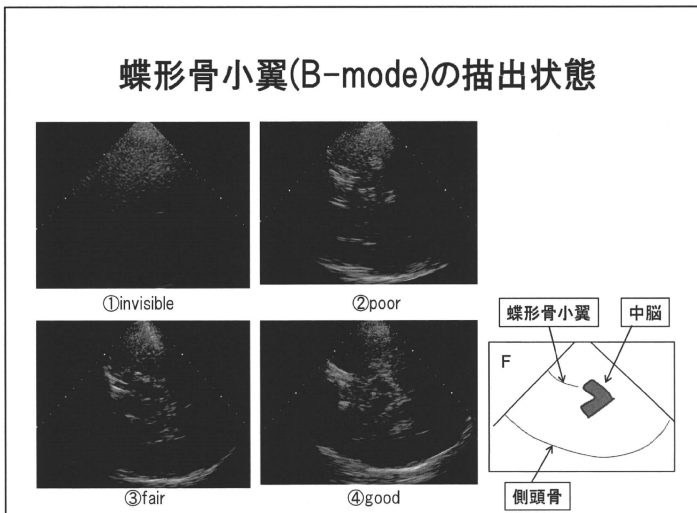
Utsunomiya University  
Graduate School of Medicine



図B-9



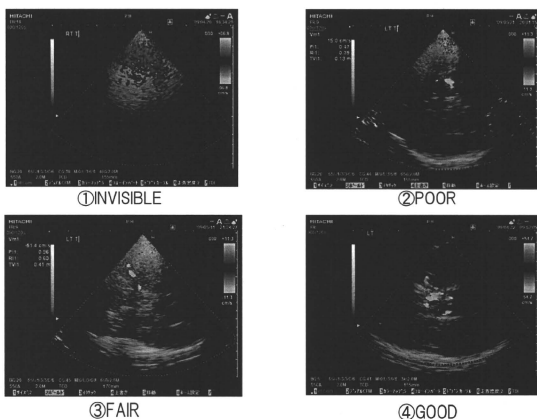
図B-10. TIBI分類



図B-11



## M1の描出状態 (カラー掲載あり P157)



図B-12

## 方法

- 対象: 当院SCUに入院した脳梗塞症例のうち、MRAで中大脳動脈開存を確認後、24時間以内に検査を施行しえた連続30例(男性22例、69±11歳)

- プレイラス(日立メディコ)を使用  
単結晶プローブ(S70)  
従来型プローブ(S50A)にて

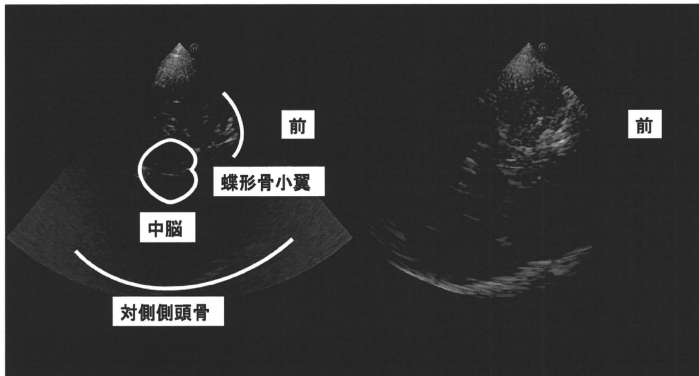
側頭骨窓(TBW)もしくは  
前頭骨窓(FBW)における

頭蓋内構造物  
中大脳動脈(M1)血流の検出率を比較



図B-13

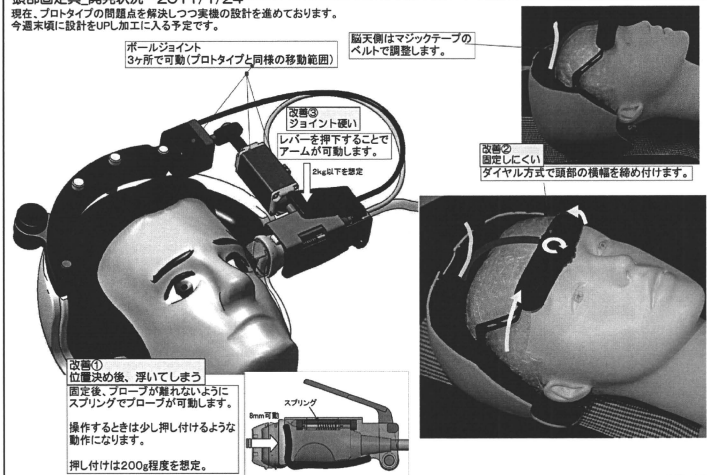
## Bモード (カラー掲載あり P157)



図B-14

### 頭部固定具 開発状況 2011/1/24

現在、プロトタイプの問題点を解決しつつ実際の設計を進めております。  
今週末頃に設計をUPL加工に入る予定です。



図B-15