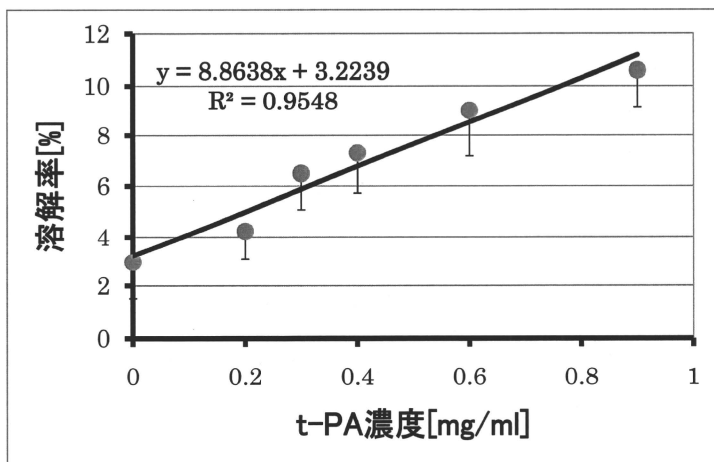
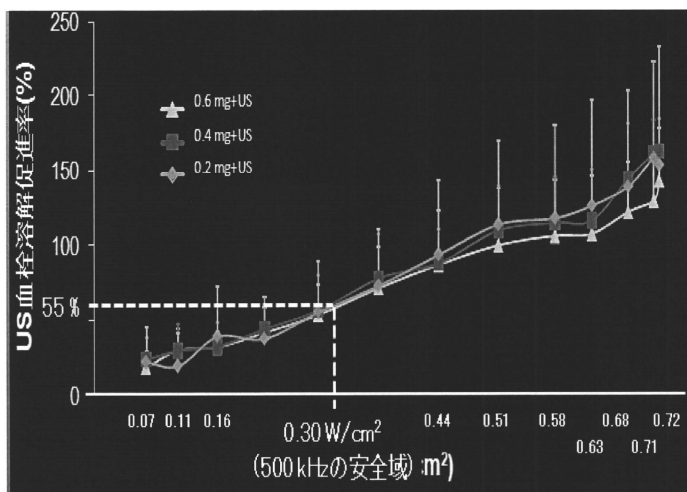


図B-16

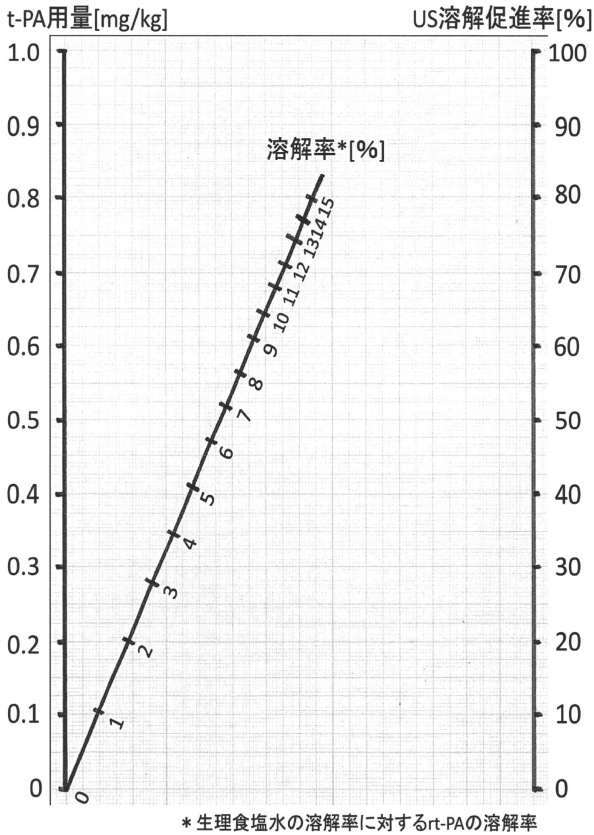


図C-1 t-PA濃度と溶解率

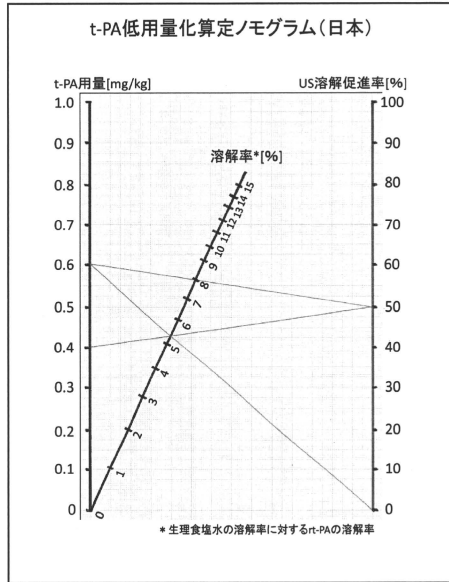


図C-2 超音波溶解促進率

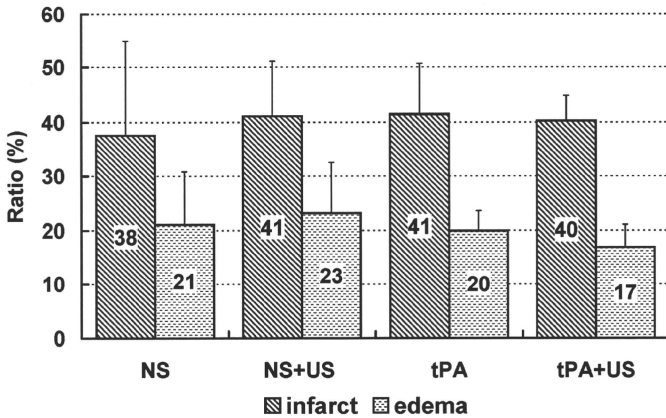
# t-PA低用量化算定ノモグラム



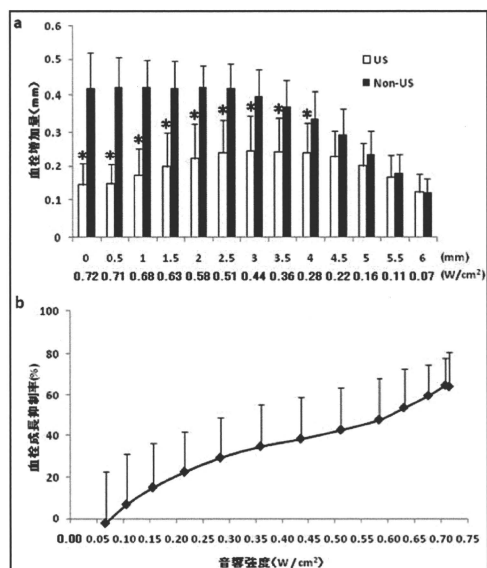
図C-3 ノモグラム



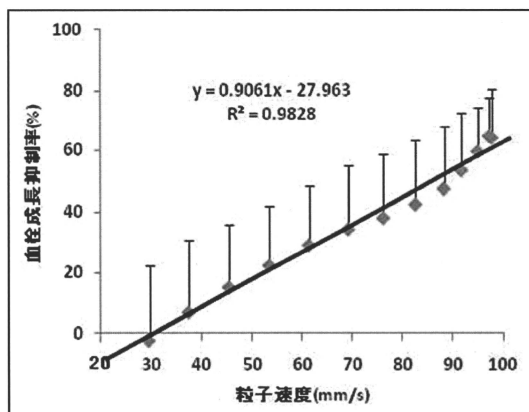
図C-4 ノモグラム (日本)



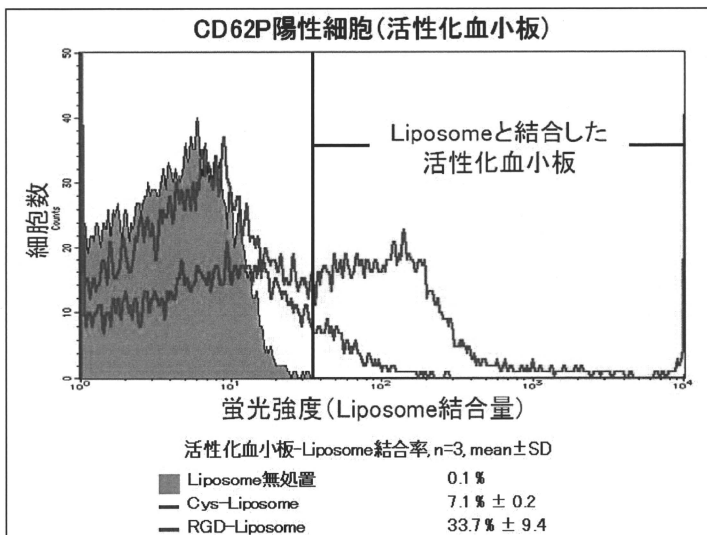
図C-5. 脳梗塞率、脳浮腫率ともに4群間に統計学的有意差はなかった。



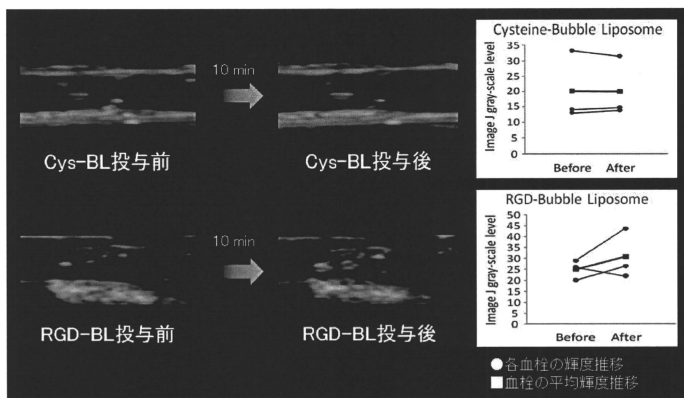
図C-6 超音波照射による血栓成長抑制



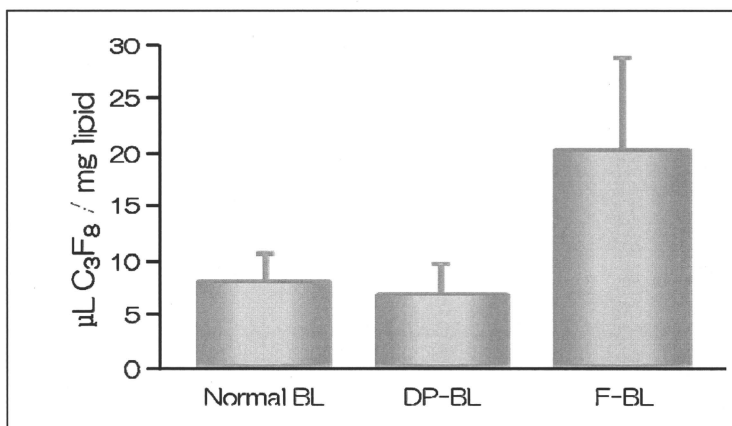
図C-7 粒子速度依存的な血栓成長抑制



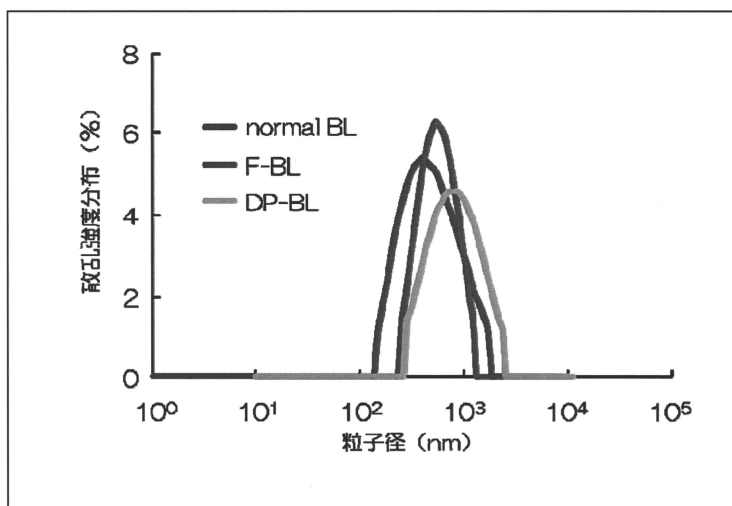
図C-8 RGD-リポソームの血栓結合能(カラー画像掲載ありP156)



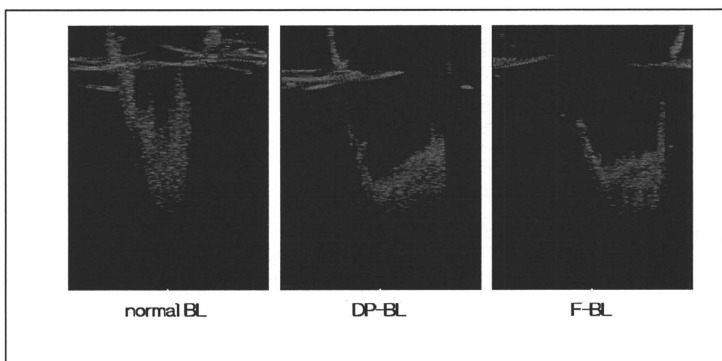
図C-9 RGD-BLの血栓造影増強効果



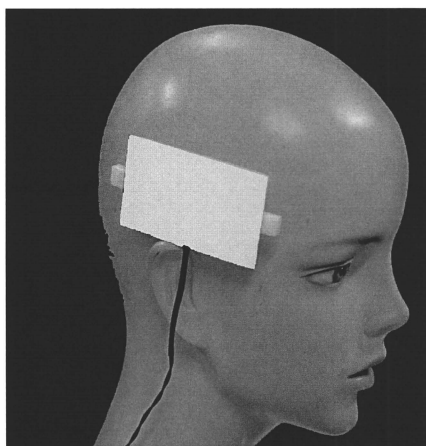
図C-10 バブルリポソーム中のC<sub>3</sub>F<sub>8</sub>ガス封入量



図C-11 バブルリポソームの粒子径分布 (カラー画像掲載ありP156)

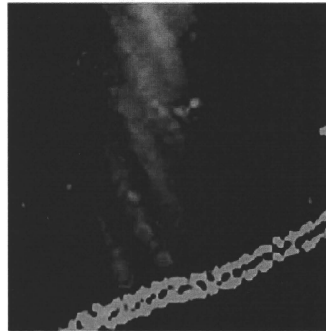
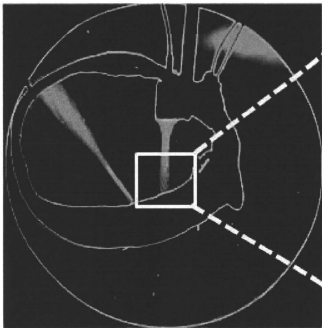


図C-12 バブルリポソームの超音波造影効果

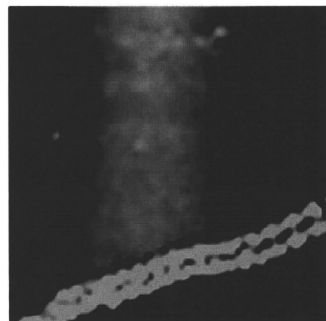
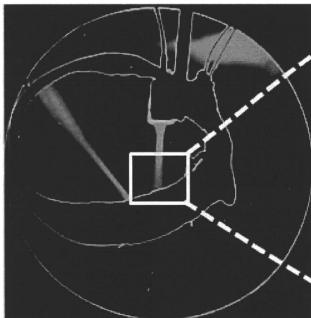


図C-13. 血栓成長抑制用の張付型ソフト振動子の考案例





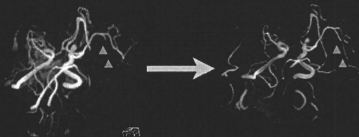
図C-14 ヒト頭蓋骨内面での超音波が形成する定在波の例  
 矩形10×10振動子 駆動条件500KHz連続波固定  
 頭蓋骨内面近傍に強い定在波の存在を認めた



図C-15 ヒト頭蓋骨内面での超音波が形成する定在波の例  
 矩形10×10振動子 駆動条件500KHzを中心に  
 $\pm 200\text{KHz}$ のSWEEP変調  
 頭蓋骨内面近傍で定在波が存在する。  
 図C-15に比べその強度は弱まっている傾向を示したが、完全消失にはならなかった。

## 症例1：52歳男性

	pre	15min	30min	45min	60min
M1					
TIBI	3	3	5	5	5
M2	測定不可	測定不可	測定不可		
NIHSS	2	1	1	1	0



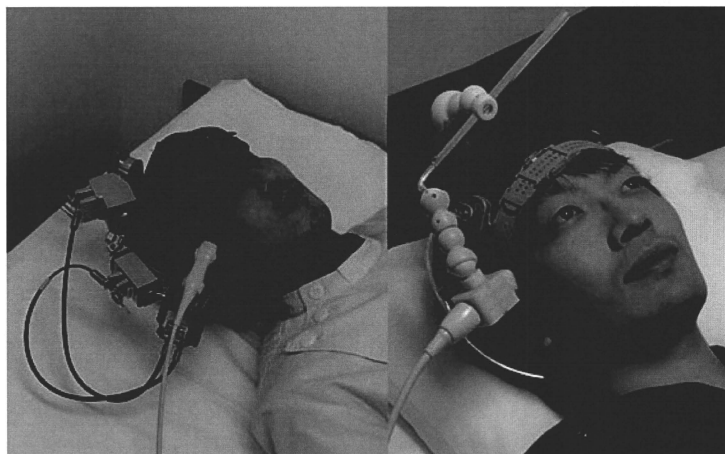
図C-16 症例1の所見・MRAとモニタリング波形

## 構造物とM1描出の関係

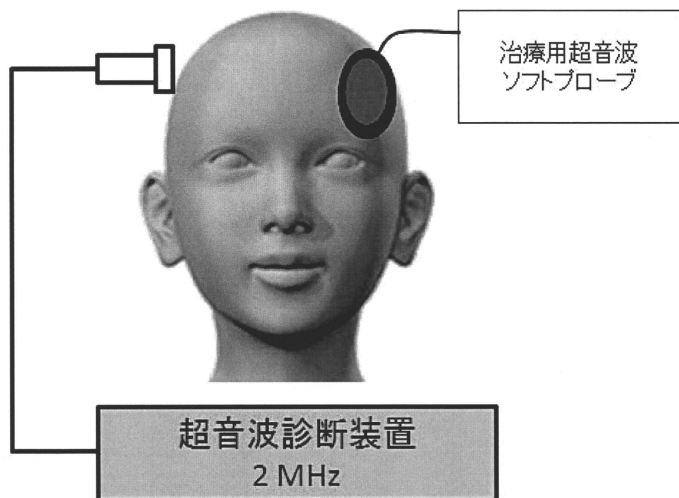
		M1detectability				Spearman's $\rho$	p
		INVISIBLE	POOR	FAIR	GOOD		
Contralateral temporal bone	invisible (3 TBWs)	3	0	0	0	0.68	p<0.0001
	poor (29 TBWs)	28	0	1	0		
	fair (42 TBWs)	22	8	3	9		
	good (58 TBWs)	8	3	5	42		
Midbrain	invisible (44 TBWs)	37	5	1	1	0.67	p<0.0001
	poor (31 TBWs)	16	3	3	9		
	fair (36 TBWs)	6	2	4	24		
	good (21 TBWs)	2	1	1	17		
Lesser sphenoid wing	invisible (19 TBWs)	19	0	0	0	0.79	p<0.0001
	poor (30 TBWs)	27	2	1	0		
	fair (35 TBWs)	14	6	4	11		
	good (48 TBWs)	1	3	4	40		

Values are represented by number of temporal bone windows.

図C-17



図C-18 頭部固定具試作機1号機(右)と2号機(左)



図D-1 貼付型ソフトUS振動子を用いる  
次世代経頭蓋超音波脳血栓溶解システムの概念図

表C-1. 脳内出血

Table 2. Intracerebral Hemorrhage

Groups	Macroscopic Hemorrhage Rate (%)				Microscopic Hemorrhage Area ( $\times 10^2$ )			
	Near	Middle	Far	Sum	Near	Middle	Far	
NS (n=8)	0	0	0	0	35±78	103±76	81±81	21
NS+US (n=10)	0	10	0	10	111±192	148±276	186±187	44
tPA (n=11)	0	9	0	9	160±361	116±378	116±143	39
tPA+US (n=11)	0	0	0	0	160±179	87±235	175±247	36

表C-2.

頭蓋内構造物			
	従来型	単結晶	p値
対側側頭骨	87%	100%	<0.01*
中脳	63%	77%	0.005*
蝶形骨小翼	65%	73%	0.006*

McNemar検定、\*p<0.05

表C-3.

中大脳動脈検出率		
	検出率	p値
従来型	57%	—
従来型+FBW	60%	0.25
単結晶	58%	0.31
単結晶+FBW	62%	0.21

全て従来型との比較 (McNemar検定)

表D-1. 新開発TST法と従前のTST法の比較

比較項目	TCT-LoFUT (旧)	次世代TST
《技術》		
標的性	有	やや有
診断画像	有	無
画像誘導	有	無
実時間監視	可	ドブラ (検討中)
STW回避	可	可
《臨床現場の操作》		
プローブ固定	要	要
プローブ保持	要	不要
患者拘束	要	無
《適用対照》		
t-PA適用患者	約10%	ほぼ全員

## Ⅱ. 分担研究報告書

中周波数超音波血栓溶解法の効果増高  
—in vitro 実験による定量評価—

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
研究協力者	澤口 能一	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 研究員
	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
研究分担者	持尾 聡一郎	東京慈恵会医科大学内科学講座 神経内科学 教授
	浦島 充佳	東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター 分子疫学研究室 准教授

研究要旨

従来から経頭蓋超音波脳血栓溶解法(Transcranial Sonothrombolysis: TST)として、中周波数 500kHz 連続波を中心にした有効性の追求と動物実験による安全性の確認を行ってきた。しかしながら、in vivo 実験成績の著しい効果上昇に目を捕らわれ、その効果増強に関する定量的な増強率評価が充分には行われていなかった。TST の臨床応用として、血栓溶解剤の用量減少化(副作用軽減のため)も研究目標に挙げられているので、それに先立ってここでは超音波による溶解率上昇に関する[超音波強度と溶解率増強]また[rt-PA 用量と TST 溶解率]の関係について実験的に評価した。実験は昨年度開発した高精度光学的血栓厚測定装置を用い、円形コイン状のウシフィブリン塊を rt-PA 溶液及び同状態に中周波数 500kHz を 30 分照射する方式で、その血栓の厚さの変化から超音波による溶解促進率(照射後の値(mm)-非照射の値(mm)/非照射の値(mm))を求めた。その結果、(1)溶解促進率は rt-PA 濃度に依存しないこと(2)同促進率は音響強度に非線形ながら比例的関係のあること(3)rt-PA 固有の血栓溶解率( $\angle$ 濃度(mg/kg)の t-PA(mm)/ $\angle$ t-PA(0 mg/kg(mm)))は rt-PA 濃度に比例すること(4)溶解促進率と rt-PA 固有の溶解率及び t-PA 濃度という三者の間には簡単なノモグラムが作れること(5)同ノモグラムを用いることによって、我国の現行 rt-PA 投与量 0.6mg/kg に相当する溶解率は 500kHz 連続波超音波を用いるとその約 2/3、すなわち 0.4mg/kg 投与でも同等となること等が明らかとなった。従って、経頭蓋的に 500kHz 連続波超音波を照射可能であれば、rt-PA 用量の低減化が可能となり、効果は同等でしかも出血などの副作用軽減の道が開かれるものと推測された。なお、超音波条件の最適化という観点では、その周波数波形の選択、また in vivo 動物実験での溶解状態確認という研究が今後求められるところとなっている。

## A. 研究の目的

急性脳梗塞 (Acute Ischemic Stroke: AIS) 患者の超急性期 (発症 3 時間以内) 治療法として、血栓溶解剤 rt-PA (recombinant tissue type Plasminogen Activator) の静脈療法が広く使われている。しかし、3 時間以内に治療開始にすることの時間的制約が大きいこと、また適応できてもその再開通率は 30~40% (施設による) であること、その副作用としての症候性出血が 3~6% であること、3 ヶ月後の死亡例が 1~2% であること等、臨床現場においては大きな問題を抱えている。その解決策として、適応時間が延長され 4、5 時間に欧米では認められつつある。また、用量についても欧米では 0.9mg/kg であるものを我国では 0.6mg/kg と低減しており、それでも欧米並みの再開通率を得ている。さらに、用量減少の研究は米国 SPDTRIAS でも検討され、治験が開始されている。同治験では rt-PA 治療中の MCA 血流を TCD (Transcranial Doppler) 法で監視し、血流再開通が十分に得られたならば、rt-PA の点滴静注を中止することで全体用量を低減化させようとするものである (ただし、抗凝固薬 Argatroban との併用)。未だ結果は報告されていないが、副作用軽減に向けた一つの取組である。

さらに、血栓溶解効果を加速増高させる経頭蓋超音波併用血栓溶解療法 (Transcranial Sonothrombolysis: TST) が注目されている。超音波を併用する血栓溶解加速は我国での *in vivo* 実験、*in vitro* 実験に端を発し、診断用の超音波 (数 MHz 帯) でも有効であることが臨床でも明らかになっている。

事実、Alexandrov は TCD 照射をし続けることで AIS 患者における治療開始

2 時間後の再開通率が 29% から 39% 程度に上昇し、その 3 ヶ月後の神経学的改善には統計学的有意差はないものの、11% 上昇したことを *New England J.* に GLOBUST study として報告している。また、経頭蓋カラードプラ断層法 (TCCS、あるいは TC-CFI) を適用した場合には、治療開始後 20 分~40 分間に 60% の再開通率を認め、3 ヶ月後の神経学的改善は 23% に有意に上昇したことを Eggers らは *Stroke* に報告している。いずれも診断用の数 MHz 帯の超音波によって招来した好成绩であるが、さらに *in vitro/in vivo* 実験では診断用超音波による成績以上の溶解効率が期待されてきた。しかしながら、300 kHz TST による臨床成績は 93% に及ぶ頭蓋内出血を招来し、SAH や死亡例を含む結果となっており、その治験 (TRUNBI trial phase-II) は中止となった。超音波による IV rt-PA 効果増強には適切な超音波条件を選定しなければならないことを示す。一種の警鐘となった。

我々は TST の超音波条件として、500kHz、連続波、インターミット照射を提唱し、*in vitro/in vivo* 実験を通じて、その有効性と安全性に関する基礎データを積み上げた。またその実用化に向けて新技術開発を行い、本年度上半期までは診断・治療統合化システムとして、診断画像誘導型標的脳血栓溶解法の開発に取り組んできた。しかし、AIS 患者に対する診断用画像検出率が日本人高齢者では 60% と低いこと、その抽出には熟練した超音波検査技能者が必要なこと、そのため実際の AIS 患者の多くても 10% 程度にしかな適用できないことなどの理由で、製品化のビジネスモデルが成立し難い状況となった。しかし、治療用の超音波条件など技術的、また医学生物学的問



題は存在していないので、救急現場にマッチした新技術開発を行い、第2の実用化案が検討されている。この第2次実用化案においても、TSTとして使用するrt-PA用量低減化の問題はそのまま残され、低用量化の指標をin vitro実験で把握しておくことは必須の課題となっている。

本研究では、「TST(500kHz、連続波を使用)はrt-PAの低用量化ができる」という仮説を実証することを第一の目的とした。また、その用量低減率の目標は30~50%とした。その実証のため、昨年度開発した、血栓の光透過量が血栓の厚さに依存することを活用する高精度光学的血栓厚測定装置を用い、TST法の血栓溶解効果を定量表示し、同時に用いた超音波強度条件との関係を探索し、超音波による血栓溶解促進率(rt-PA単独使用時の溶解率に対する上昇率)を明らかにすることとした。なお、実験結果から汎用性のあるモノグラムをrt-PA投与量、超音波溶解促進率、溶解率(rt-PA単独)の三者の関係について作成し、rt-PA用量と超音波強度を設定すれば溶解率を求められるという一般法を提示することとした。

## B. 研究方法

超音波による血栓溶解加速の程度は、昨年度開発した高精度光学的血栓厚測定法を用いた。以下に、同法の原理と測定手技、使用超音波音場、血栓例として使用したウシ・フィブリン塊作成についての基本を述べる。

### (1) 高精度光学的血栓厚測定法

既に血栓の通過光量と血栓の厚さに関する校正曲線については報告済みである。厚さ5mmまでの間は殆ど直

線的比例関係にある。実験では後述するウシ・フィブリン塊を円形コイン状に作成し、その厚さを通過光量から測定することとした。その際、本法の基本は、

- ①超音波ビームの中心軸が円形コイン状フィブリン塊の中心を通るようにビームとコイン状血栓が設定されていること
- ②超音波ビームが中心軸に対し軸対称であること
- ③実験は対照例と治療例との、それぞれ1個ずつのフィブリン円形コイン塊を用意し、両者の時間差がないよう、交互に測定する方式とすること、

以上の3点である。つまり、原理的にはビームの軸対称性を活用し、8方向の半径上の音場強度分布は全て等しいという条件を使っている(図1参照)。実験は8方向の半径上の点の透過光量を0.5mmステップで測定するが、中心から等距離の値、8個の値は全て、同じ強度の時の値で、逆に言えば同一強度に対する8個の値を一度に得ることができることになる。そして、半径上の音響強度の分布に従い、その最大値と最小値の間の強度変化に対する血栓厚変化を得ることが可能となる。強いて言えば、コイン状血栓の半径6mmの内、0.5mm間隔で13点の測定ができるので、強度変化13レベルについて同時測定できることになる。

### (2) 超音波ビームの音場分布

従来から様々なin vitro/in vivo実験を通じて血栓溶解の有効性と安全性の確認されている超音波として、  
周波数：500kHz  
波形：連続波  
その振動子としては図2のような形状で、

先端直径：10mm  
材 質：ABS  
振 動 子：PZT (30mm)  
冷 却 法：空冷式  
最大出力：4W/cm<sup>2</sup>

を用いた。同振動子の音場分布を図3に示した。また、AIMSを用いて実測した例が図4であるが、軸対称性が示されている。実験は遠距離音場内で行うこととした(注：遠距離音場は  $D^2/4\lambda$  (D:直径 10mm、 $\lambda$ :波長 約 3mm)より遠方の音場領域)

### (3) ウシ・フィブリン塊の作成

実験ではウシフィブリンを用い、コイン状血栓を作成。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。ウシ血漿 540 $\mu$ lと 250mMのCaCl<sub>2</sub> 60 $\mu$ 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 $\mu$ 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。その際、セル自体の透過光量を事前に測定し、光量を左右する様な汚れの無いことを確認した。血栓完成後、その厚さを光学測定装置で測定し、そこでも気泡の混入など光量の透過性を乱すものがないことを確認した。ただし測定は、上述の8点間全てについて行った。

### (4) 比較群

次の2群を設定した。

#### ①rt-PA 溶液

上記フィブリン塊の上に 0.5ml の rt-PA 溶液を注入した群。その濃度は 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.9mg/kg に相当するものを選定した。

#### ②超音波 (US) 照射群

上記 rt-PA 溶液と同じ濃度のセルに US 照射を行った群。強度は図5参照。

なお、両群共に処置後 30 分時の血栓厚について比較した。いずれも照射後の値から非照射後の値を引き、その差を非照射後の値で除して溶解率を定義した。

$$\text{溶解率} = \frac{[\text{照射後の厚さ}] - [\text{非照射の厚さ}]}{\text{非照射の厚}} \times 100$$

30 分後の値で比較した理由は、事前に 15 分、30 分、60 分の値を比較した結果、30 分経過すれば十分に t-PA の溶解効果の得られることを確認したからである。

## C. 研究成果

血栓溶解実験による

- ①rt-PA 濃度と溶解率の関係
- ②超音波強度と溶解率の関係  
(超音波溶解促進率の強度依存性)
- ③超音波併用法のノモグラム  
についてまとめる

### C-1 rt-PA 濃度と溶解率

rt-PA 濃度を変化させた時の溶解率を図7に示した。上述の装置を用いたので、一つの円形コイン状血栓に対し、一度に8点×(異なる半径8方向)×12点(各半径上の測定点数)=96点に中心点を加えた97点の平均値と標準偏差である。濃度0はrt-PAを授与していない生理食塩水中の結果である。この実験結果に対する回帰直線は

$$\begin{aligned} \text{線は } y &= 8.8638 \times + 3.2239 \\ R^2 &= 0.9548 \end{aligned}$$

となった。極めて高い相関係数 R を示し、溶解率は rt-PA 濃度依存的で、そ

の濃度に対し、直線的比例関係のあることが、本実験系が示す事で明らかとなった。なお、0.6mg/kg は我国の投与量、0.9mg/kg は欧米の投与量である。

## C-2 超音波強度と溶解率

(超音波溶解促進率の強度依存性)

図8に rt-PA 濃度 0.6mg/kg の時の溶解量(血栓厚の減少量)と 500KHz 超音波を照射した場合の同減少量の比較結果を示した。縦軸は血栓の減少量であり、横軸はコイン状血栓の中心からの距離で示した。同時にその横軸の下段には、同距離の位置における音響強度を示した。中心に近い程溶解率は高く、辺縁にいく程低下している傾向を示した。これは音響強度依存による結果と解釈される。また、t-PA 濃度を変えた場合の結果を図9に示した。用量 0.0, 2.0, 4.0, 0.6mg/kg と変えた場合、その用量依存的に溶解量の上昇傾向が示された。この結果を横軸強度のグラフに書き直したものを図10に示した。極めて注目すべきことは、そのパターンが rt-PA 濃度を変えても殆ど変わらない相似形になっていたことである。すなわち、この rt-PA 単独投与時の溶解率に対する US 併用時の溶解率の比を、超音波による溶解促進率と定義すれば、図11の様な一つのグラフにまとめられる。rt-PA 濃度自体に依存する溶解率は異なるが、超音波による促進率は、その音響強度が一定ならば、促進率は一定値となることを示した。ただし、その促進率は強度依存的であり、強ければ強い程、促進率は上昇する傾向を示すものとなった。[促進率 vs 強度]の関係は線形的特性ではない。しかし、その音響強度 0.5W/cm<sup>2</sup> 以下の範囲ではゆるやかな直線性が示され、強度に比例する促進

率上昇傾向が認められた。経頭蓋的超音波照射による in vitro ラット安全性実験では 0.35 W/cm<sup>2</sup> が一つの安全性限界の目安であったので、頭蓋内では 0.3 W/cm<sup>2</sup> 程度に減衰していたと考えれば、約 0.3 W/cm<sup>2</sup> が安全限界と解釈される。これを踏まえると、臨床的限界値として 0.3 W/cm<sup>2</sup> を適用した時その超音波による促進率は、約 55%となるものと予測される(図11参照)。この直線関係を活用し超音波強度を設定すれば、その促進率が予測できる。そして、その促進率を用いれば、rt-PA 濃度を下げても、通常の投与量濃度 0.6mg/kg に相当する溶解率が得られることになる。

この事実は超音波血栓溶解法の有効性を定量的に示すものであり、臨床応用のための具体的超音波条件と期待する溶解率の関係を提示する極めて重要な成果である。

## C-3 超音波血栓溶解ノモグラム

上述の結果を、in vitro/ in vivo 実験に活用したり、臨床応用の際の音響強度や溶解率を予測するのに有用な、計算用ノモグラムを作成した。このノモグラムには図8、図11の関係を踏まえたもので、図12にそのノモグラムを示す。このノモグラムを用いれば、我国の rt-PA 使用量 0.6mg/kg の時の溶解率約 9%であるものが、溶解促進率 50%程度となる 0.3 W/cm<sup>2</sup> を用いれば、約 13%程度上昇し、欧米での投与量 0.9mg/kg に相当する効果の生ずることが読み取れる。また我国の 0.6mg/kg の溶解率相当の効果を超音波併用で上げるには、強度 0.3W/cm<sup>2</sup> (すなわち 50%促進率)とすれば、濃度 0.38mg/kg で必要な溶解率の得られることが読み取れる。すなわち通常の投与量の3分の2の値で充分な

効果になることが示されている。

ノモグラム化することで、超音波強度と rt-PA 用量の関係が容易に求められるので、両者の条件を検討し、rt-PA 用量の低用量化、ひいては副作用の軽減に活用することが可能になった。幅広い活用の基礎データになると考える。

以上、実験的な本基礎研究は、TST による rt-PA の低用量化に対する具体的かつ臨床適用にも有効な指針を供する成果をもたらす結果となった。

#### D. 考察

本研究によって、上述の如く、血栓溶解剤 Alteplase の濃度と溶解率の関係を定量評価できたことから、超音波による効果も同一血栓モデルに対する促進率の関係の形で、定量評価が行えた。そして、その超音波併用による促進は、rt-PA 濃度に依存しないこと、促進率は超音波強度にのみ依存すること、安全限界を含む ( $0.3\text{W}/\text{cm}^2$ ) 音響強度  $0.5\text{W}/\text{cm}^2$  以下では直線的比例関係にあること、その結果一つのノモグラムとして多方面に活用できる“用量—超音波促進率(強度)—溶解率”の関係を推定計算できる方式を実現し得たこと、それに基づき現行 rt-PA 容量(濃度  $0.6\text{mg}/\text{kg}$ )の 3 分の 2 の値、即  $0.4\text{mg}/\text{kg}$  で、同等の溶解率を超音波併用によって招来し得る事を明らかにした。この様な成果は、経頭蓋的超音波脳血栓溶解法 (TST) の有効性の定量表示がもたらした結果で、今後様々な条件の選択を行う上で、その基礎となるものと考えられる。この広汎な活用の展開が考えられる理由は次の点にある。

#### ①[高精度光学的血栓厚測定法の意義]

従来多くの in vitro/ in vivo 実験によるその有効性が報告されてきた。しかし、各実験者は 2~3 の超音波条件について比較し、中・低周波数の有用性を示すにとどまり、超音波条件としての周波数、波形、強度、照射時間の基本四パラメータについて、幅広く比較し、体系的にその音響学的有効性を論ずることは出来ていなかった。それは、血栓のモデル自体が個々別々で、四パラメータ設定には超音波振動子自体を多数必要とし、個々の条件の実験にも膨大な経緯と時間を要したからである。これに対し、本実験に用いる光学測定装置は、強度については 1~2 回の実験で必要な音響強度範囲のデータを充分に得ることが可能だからである。今回は  $500\text{KHz}$ 、連続波という、従来から我々が推進してきた条件についてのみ示したが、他のパラメータを変えた検討をすることは容易で、一種の大海戦術的展開で体系化の道が拓かれるものと考えている。我々の次の段階は、波形(パルス、バースト波)と時間であるが、既に時間については本実験で示した 30 分で充分であることを明らかにしている。今後我々は幅広い条件下で、しかるべき検討を展開する予定で、そのために本光学システムは不可欠な装置となっている。

#### ②[測定系の誤差要因]

この光学測定系には、次の誤差要因が存在する特徴性があり、実験結果図 7—図 11 には少なからぬ影響を与えたと考えている。そのため、図 11 に示される促進率曲線の非線形性も、それらの要因によらないとも限らないと考えている。

(1) 音場の中心軸と血栓の中止とのずれ