

超音波ビームの中心軸がコイン状フィブリン塊の中心を通過することが、本法の高効率測定原理の原則であった。しかし超音波振動子面(直径30mm)と実際の発射面(直径10mm)が並行でないと、超音波ビームは振動子自体の中心軸から傾いた方向にビームを発射することになる。コイン状血栓の中心からずれた位置にビームの中心軸があれば、この光学測定系で用いる中心軸から等距離の8方向の8点は、線対称の同一強度下にあるフィブリン塊のデータではなくなってしまうことになる。従ってビーム中心軸とコインの中心点を一致させる三次元的マニピレーションのできる振動子及び血栓用セルの固定具を設け、軸合わせを行うことが必須となる。本研究ではそのための専用持具を特注開発し、ハイドロホンによってセル内の音場を測定することで、問題回避を試みている。ただし、ハイドロホンは直径1~2mmの口径があり、その精度内という限界がある。

#### (2) 振動子及びセルの一体型固定持具

上述の問題を避けるために、専用の保持具を開発した。しかし、それは振動子とセル間の距離を近距離音場( $D^2/4\lambda$ :  $D$  振動子直径(10mm)、 $\lambda$  波長(3mm))内、または遠距離音場( $D^2/4\lambda$ 以上)の最も振動子に近い空間でない限り、その固定具(保持具)からの超音波反射によって音場分布に歪みが生ずることになる。この点を考慮した持具と音場設定が必要となる。

#### (3) 超音波サイドローブの影響

超音波振動子からの音場分布を測定すると、サイドローブが存在する。このサイドローブが強いと持具や水槽内壁で反射し、測定系に音場を乱し、

測定歪を生じることになりかねない。これを避けるために、必要なビーム以外を吸収できるような吸音材を保持具に貼付しておくことが求められることになる。今回はハイドロホンによる測定からそのサイドローブの影響の少ないことを確認したが、周波数が低くなれば、近距離音場域が短くなり、周波数が高くなれば近距離音場域が長くなるので、サイドローブの影響は大きくなるように考えられる。吸音材の適切な貼付が必要で、我々はソルボセインをその目的に供している。

#### (4) 水槽内多重反射

37°Cの水槽内に保持具ごと沈め実験するが、超音波周波数が低い程減衰が少なく、相当な距離にわたって伝搬する。その影響を回避するため、水槽内面に吸音材(上述)を貼付する必要がある。

#### (5) セル内への気泡混入と汚れ

フィブリン塊を作成する時、その内に気泡が含まれていると、光学特性が大きく変わり、空間的に局所の誤差を大きく生ずる。気泡径は大きくても2mm程度であるので、測定値の径上分布を観測すればすぐ分かるが、これを見過ごすとバラツキの大きなデータとなる。同様にフィブリン塊を作成するセル自体が清潔に洗浄されていないと光学的透過特性にばらつきが生じ、データのばらつきの原因となる。そのため本実験ではフィブリン塊作成直前に、使用セル自体の光学的特性を空のまま測定し、光学的な誤差要因を排除することになっている。

#### (6) 測定点の測定順序

本実験系は2個のセルを用い、対称群と標的群を同時比較している。その

際 rt-PA の溶解効果の半減期を考慮し、コイン状血栓の直径方向測定を行うが、2 個のセルを交互に測定することになっている。さらに、対称群のセルと標的群のセルとの間の移動距離を短くするように、光源のスキャン方法に工夫したスキャン法を採用している。

#### (7) 血漿 (ウシ・プラズマ) の不均一性

ウシ血漿は市販のものを  $\text{CaCl}_2$  で凝固抑制を開放してから実験するが、その血漿のむらを少なくするため、充分攪拌してから血栓形成実験に供するようにしている。ただし、攪拌のし過ぎは逆に凝固因子を刺激することになるので、慎重なゆるい攪拌にとどめている。ただし、その目安となる指標がないため、実験者に依存する恐れがある。それ故、同一条件での実験を 2 人でそれぞれが行う方式で実験を組み立てている。

以上の様な光学測定系を用いる留意点、超音波ビームとセル設定に関する留意点を踏まえ、データは取得された。

### ③ [血栓溶解率比較]

in vivo 動物実験でも超音波併用の有効性が中周波数超音波では容易に示されてきた。またはじめに述べたように診断用の数 MHz 帯超音波でも、極めて有用な成績が示されてきた。そのため、in vitro 実験でその溶解率上昇を他のデータと比較できる程、定量的に検討できた成績は殆どなかった。実際、音場分布の空間的状态が図 3 に示した様な三次元分布であることを考慮すれば、in vitro 実験に用いた血栓の置かれた空間的位置、その血栓の大きさによって、溶解状態は変わり、一律に比較・論ずることは不可能である

ことは明白である。それ故体系的に比較できるような実験結果は極めて少なく、自らそれを実施しない限り、周波数比較も波形比較も強度比較も出来ず、過去も識見と比較することは殆ど無意味なことになると考えられる。その点、本研究では空間強度分布そのものを活用して、結果を得ようとしているもので、その結果は同一の実験系を用いる限り比較に耐え得る成績が得られるものになっている。現状では 500KHz 連続波の成績についてまとめたが、500KHz についても、パルス波、バースト波についての比較データを順次、提示することになる。

その様に比較すべき先行文献もなく、かつまた、500KHz CW という限定的条件下でありながら、得られた結果は極めて重要で、超音波血栓で溶解法の最も本質的な rt-PA 用量低減という臨床課題に相当正確に応えるものとなっている。その第一点は、超音波による溶解率促進率が強度依存的で、臨床適用強度範囲 (約  $0.5 \text{ W/cm}^2$  以下) では強度に対し直線的関係にあることを示したことである。すなわち、強度を上げれば促進率がその値に応じて上昇することを明らかにした。そして、許容可能な  $0.3 \text{ W/cm}^2$  での促進率は 55% 程度と定量的数値を示したことは、正に、必要溶解率を確保するための rt-PA 用量と超音波強度の関係を図 1-1 の如くノモグラフから読み取ることが可能になったということである。今般の  $0.6 \text{ mg/kg}$  による溶解率を達成するには、超音波強度  $0.3 \text{ W/cm}^2$  の条件の下では、rt-PA 用量は  $0.4 \text{ mg/kg}$  で足りることが示されている。今日まで、これ程明確に rt-PA 用量の低減域を示した報告はない。この用量を 3 分の 2 にする関係は欧米での投与量  $0.9 \text{ mg/kg}$  に対する我国の投与量

0.6mg/kg が、その 3 分の 2 に相当している関係と同じである。この両投与量における出血率を比較すると、欧米と我国の間で大きな差の無いことが明らかとなっている。つまり用量を 3 分の 2 にしても副作用としての出血率には大きな差が無かった、ということであり、我国の投与量 0.6mg/kg をその 3 分の 2 に減じて出血率という副作用には大差ないことを示唆しているようにも理解される。しかし、欧米の投与量 0.9mg/kg に比較すれば、その半分以下になることになるので、その出血率の低減化が大いに期待される。このように TST での rt-PA 投与量を 0.4mg/kg にすることがどのような臨床的成績に結びつかは、臨床研究によって初めて明らかになるものと考えられる。もちろん TST が血栓溶解率を加速することは、多くの *in vitro*/*in vivo* 実験を通して明らかになっていることであるので、その加速溶解による神経学的改善の見られることは言うまでもないことと考えている。

この用量低減化がもたらす臨床的意義については、上述の副作用軽減ということばかりでなく、適用時間延長にも関わるのではないかと考える。ECAS II, III では、rt-PA 適用時間を 3 時間から 4.5 時間に延長出来ることを示したが、その主たる要因は、出血率に変わりがなかったという点にあった。4.5 時間にしても出血率に有意な差が無い状態としていることは、rt-PA 用量低減によって出血率が多少とも軽減できるのであれば、その適用時間を 4.5 時間からさらに長い適用時間に延長出来ることも期待されよう。この点も臨床研究において、検討しておきたい課題と考える。

なお、TST を超音波カラードブラ断層法 (TC-CFI) を行った Eggers らの

症候性頭蓋内出血率が 15.7% と高値であったことは、超音波を併用する際の適切な超音波条件の設定の重要性を改めて指摘している。この TC-CFI はパルス法を用いていることは衆知である。この時の機会指数 (Mechanical index :MI) は最大 1.9 まで診断装置として許容されている。このような高い MI 値は、細胞引裂き張力も大きく、またそれによる BBB の破たんや、さらには虚血領域内の出血を招く力学的要因になる。経頭蓋診断法としては、 $0.2 \text{ W/cm}^2$  とするように臨床適用限界が FDA など指導されているが、その値を考慮しても最大 MI 値は約 1.0 になり、水と概ね等しい音響的特性を持つ脳においては、キャビテーションを発生するに十分な値になっていたと考えられる。(診断装置の最大平均出力は  $0.72 \text{ W/cm}^2$  (最大パルス強度  $200 \text{ W/cm}^2$ ) である。頭部適用限界  $0.2 \text{ W/cm}^2$  はその 0.27 倍である。音圧に換算すれば、音圧の 2 乗が強度であるのでこの場合、 $\sqrt{0.277}=0.526$  であるので、その MI 値は  $1.9 \times 0.526=1.0$  となる) それゆえ、Eggers らの臨床成績で高い症候性頭蓋内出血率を示したのは、この点に理由の一端があったと考えられる。さらに、1 時間に及ぶ長時間の連続曝露が、さらにその要因を拡大したと考えられる。これに対し我々の設定している 500KHz 連続波の場合、音響強度  $0.3 \text{ W/cm}^2$  は、その MI 値で 0.222 となる。(MI 値はシングルパルス波について定義されたものである。ここではそのまま計算すると周波数は 0.5MHz で、診断用周波数 2MHz の 4 分の 1 である。また、音響強度は  $0.3 \text{ W/cm}^2$  で、それは診断用装置のパルス強度  $200 \text{ W/cm}^2$  の 0.0015 倍である。それゆえ我々の条件の MI 値 = 音圧/ $\sqrt{\text{周波数}} = \sqrt{0.0015} \times 2 \times \text{診断装置の MI} =$

$0.038 \times 2 \times 0.986 = 0.074$  となる。我々の他の研究において微小気泡を含む場合には連続波の MI 値は、パルス波で計算した MI 値の約 3 倍になることが明らかになっているので、我々の連続波の MI 値は高くても  $0.074 \times 3 = 0.222$  程度となる。) 従って、頭蓋内でのキャビテーションの発生確率は極めて低いと考えられる。ただし、多重反射などによる音圧上昇はその上昇率に比例した MI 値の上昇を招くので多重反射による音圧上昇、及び定在波の回避は根本的な安全条件になることは承知しておかねばならない。

以上の考察を通じ、安全条件を満たすならば、我々の超音波条件をもつ TST は、rt-PA 用量の低減化を臨床現場で確保し得るものと考えられる。そしてその音響強度による溶解率促進率を踏まえ、ノモグラフより期待し得る溶解率を試算しながら、治療戦略を立てることも可能になると考えている。本研究を通じ、限られた超音波条件下での成績ではあるが、臨床研究へ踏み出すための一つの治療戦略的方式が示されたのではないかと考えている。

## E. 結論

経頭蓋的超音波血栓溶解法 (TST) に期待される rt-PA 低用量化に関し、in vitro 実験を通じ次の様な結論を得ることが出来た。

- 1、超音波による促進率 (ただし 500KHz 連続波) は、強度依存적であり、臨床適用上の安全限界範囲 ( $0.3 \text{ W/cm}^2$  以下) では強度に比例して上昇する。
- 2、期待する溶解率と音響強度と rt-PA 用量の関係を示すノモグラフを作成することができ、臨床研究推進のための治療戦略的検討に供しうる。

3、音響強度  $0.3 \text{ W/cm}^2$  では、それによる溶解促進率が 55% となり、rt-PA 用量としては現行用量 我国では  $0.6 \text{ mg/kg}$ 、欧米では  $0.9 \text{ mg/kg}$  の 3 分の 2 の用量、即ち  $0.4 \text{ mg/kg}$ 、あるいは  $0.6 \text{ mg/kg}$  に低用量化しても十分な溶解効率の得られることが示唆される。

ただし、上記の結論は 500KHz 連続波という条件に対する結論であり、他の超音波条件の比較検討を行い、さらに有用な最適値の存在し得る可能性については、今後パラメータを変えて検討をする必要がある。

以上の実験的事実に基づく成果は、さらに今後の研究展開について、次の様な指針を与えるものである。

- 1、rt-PA 低用量化に対する日本と欧米での用量差がどの様な安全上の差異、あるいは有効性の差異につながったか詳細な比較検討を加え、TST の適用条件を選定する。
- 2、rt-PA 投与方法として Alteprase の場合は 10%Bolus、90%点滴静注とされているが、低用量化は点滴静注の時間短縮という形で行い、米国治療 HIPOTRIAS との比較のできる形にする。
- 3、TST の超音波条件として臨床研究では音響強度を含む超音波条件の適用範囲を検討出来る様なプロトコルを含めるものとする。

本年度の成果を踏まえ、次年度の臨床研究に向けた、さらに詳細かつ低量的な基礎実験を一層加速し、信頼性の高いデータを積み重ねておくことが極めて重要であると考えている。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

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

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

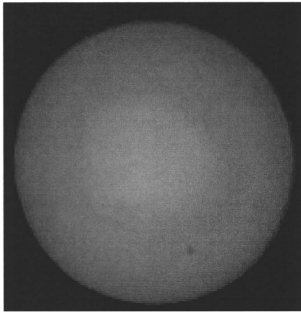
なし

2. 実用新案登録

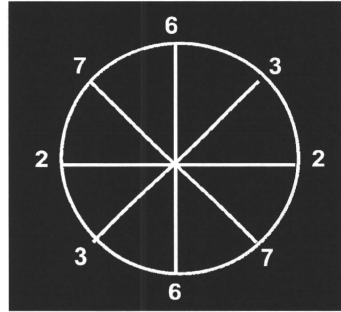
なし

3. その他

なし



コイン状血栓



マッピング測定方向  
US強度毎に8点のデータを作成可能

図1. 中心から等距離の音場は等しい  
光学的血栓厚測定法の原理  
(同一強度で8点の値を一度に測定)

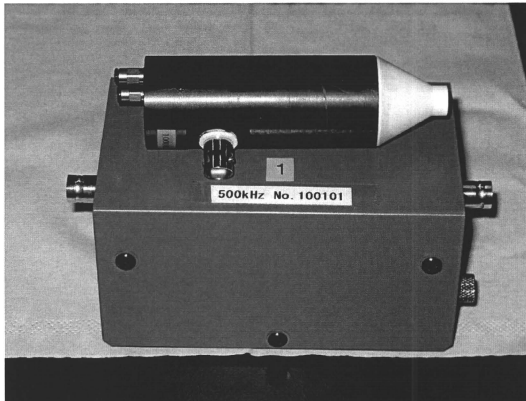


図2. 使用した超音波振動子  
500KHz、10Φ 先端10mm、振動子30nm

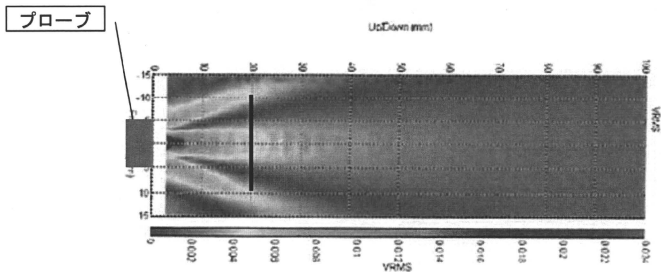


図 3. 超音波音場分布  
(AIMS による測定結果、長軸像と短軸像)

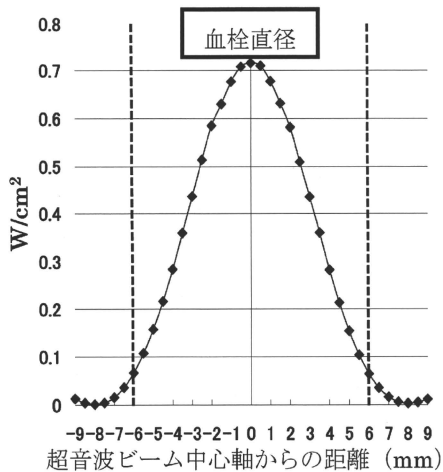


図 4. 超音波音場分布  
(500KHZ、振動子表面から 28mm)

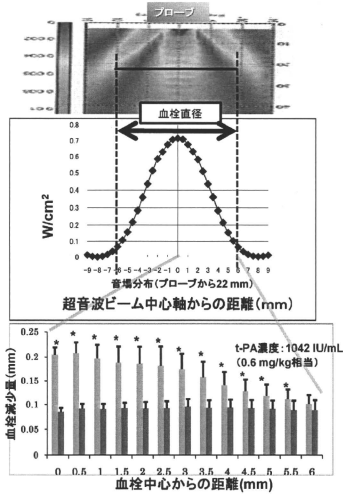


図 5. 実験系の全体像

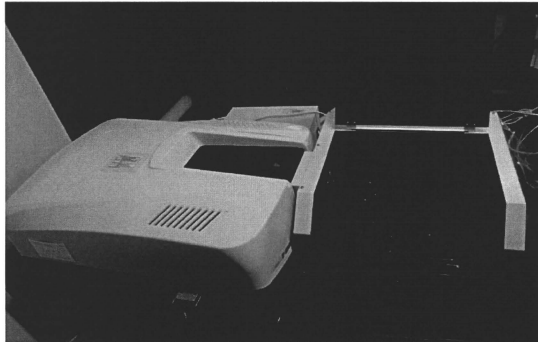


図 6. 高精度光学的血栓厚測定装置の全景



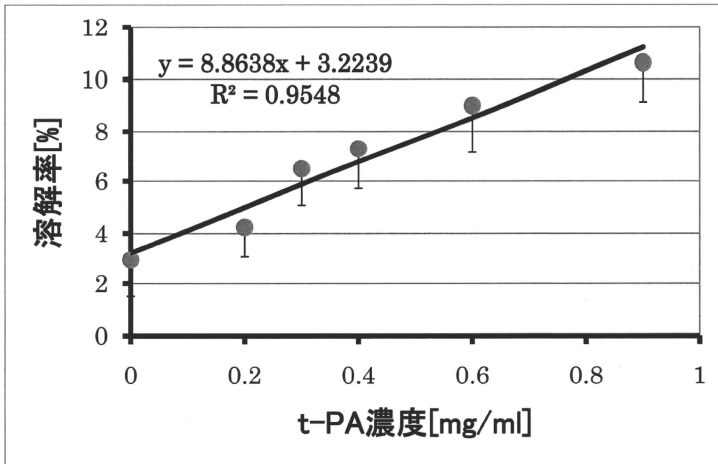


図7. rt-PA 濃度と溶解率

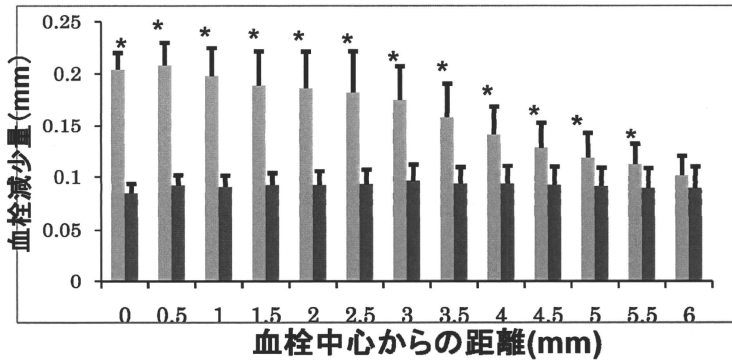
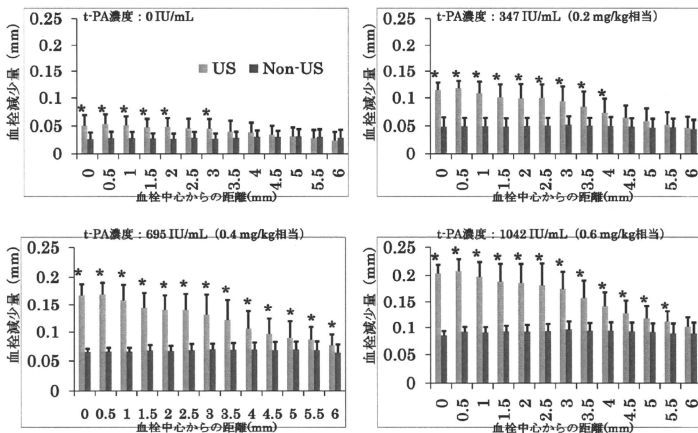


図8. 血栓溶解率の比較



n = 5, mean  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$  compared with Non-US (student t-test)

図9. 同一超音波条件下における血栓溶解率のrt-PA用量による変化  
(rt-PA用量:0, 0.2, 0.4, 0.6mg/kg)

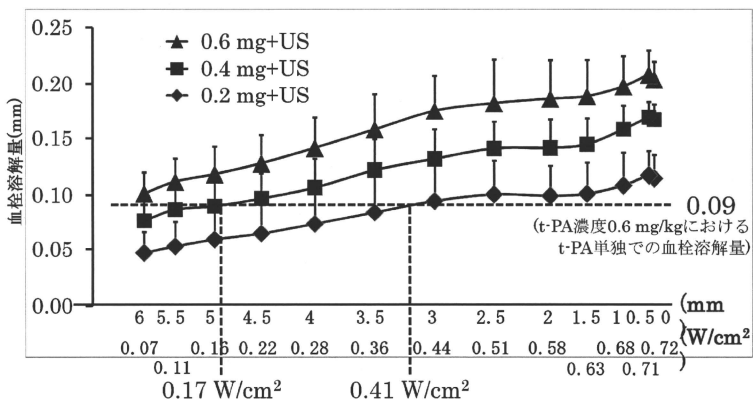


図10. 超音波併用時の血栓溶解率と音場強度の関係

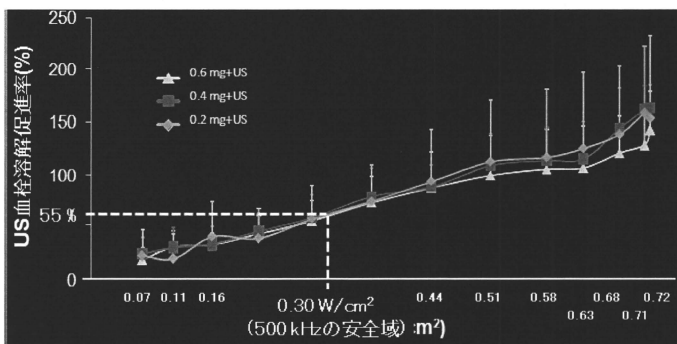


図 1.1. 超音波溶解促進率

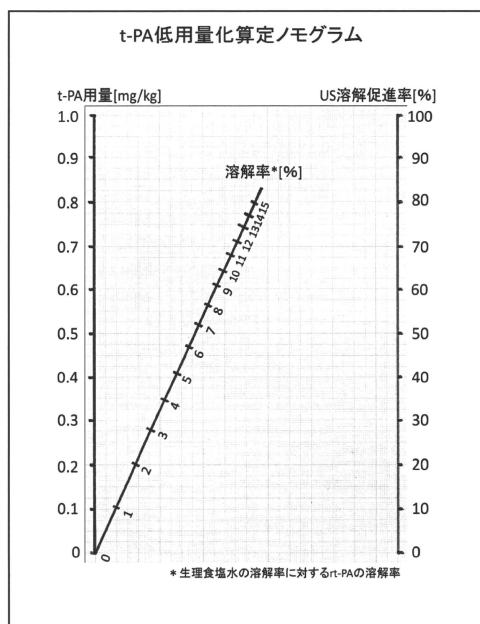


図 1.2. ノモグラム

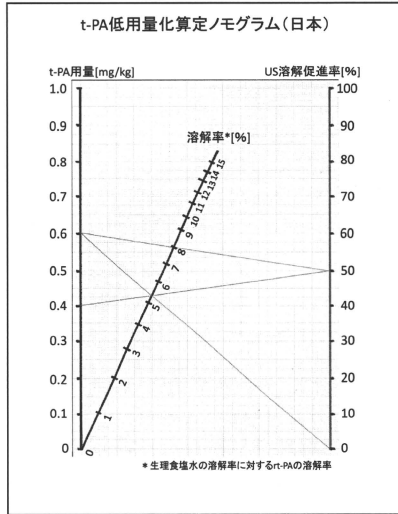


図13. ノモグラム(日本)

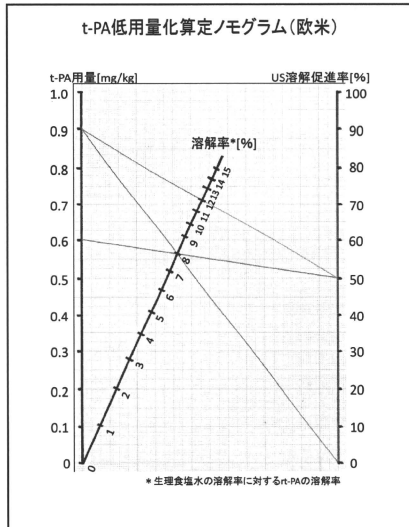


図14. ノモグラム(欧米)

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

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  
—高血圧自然発症ラット中大脳動脈持続閉塞モデルの超音波に対する安全性—

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	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	羽野 寛	東京慈恵会医科大学 病理学講座 教授
	鈴木 正章	東京慈恵会医科大学 病理学講座 准教授
	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

研究要旨

急性脳梗塞（AIS）患者に対する血栓溶解剤 rt-PA 治療開始までの時間を延長することは、患者救済率の向上に結び付く超急性期治療の重要な課題である。適用時間を3時間と限定される最も大きな理由は、3時間後の治療では出血率の増大を招くとされたためであるが、近年の臨床結果は、出血率上昇は4.5時間まで優位でない事を報告し、既に欧米では適用開始時間4.5時間が一般的になりつつある。我々が推進中の経頭蓋超音波脳血栓溶解法（中周波数500kHz、連続波）は、再開通率を向上させ、溶解速度を加速すると共に、rt-PA用量の低減化の可能性が示唆されており、用量減少に伴う出血率の軽減をもたらし、ひいては適用開始時間延長を招来する可能性を含んでいる。この用量軽減化を推進する一方で超音波による安全性に関する基礎データには、未だ不十分な一面がある。即ち虚血時間が延長した状態の脳組織に対し超音波自体が悪影響を惹起する可能性についての検討が十分にされていなかった。それでは用量減少化が実現できても、脳組織への超音波による損傷が大きければ経頭蓋超音波脳血栓溶解療法による適用開始時間延長は困難となる。それゆえ、本研究では治療開始までの虚血時間を延長させた場合の脳組織の超音波に対する安全性を検討することとした。特にAIS発症患者に多く見られる脳動脈硬化亢進状態を模擬し得る高血圧自然発症ラット（SHR）を用いて検討した。実験はSHRを用い、AISモデルを作成し、その状態での超音波による副作用として出血率、浮腫及び梗塞領域を検討した。本年度は治療開始までの時間を3時間とし、かつ非再開通状態（Permanent MCAOモデル）において、次の4群間で比較した。【1）生食（NS）群（n=8）：MCAO後3時間にプラセボとして生食を静注した；2）NS+LFTUS群（n=10）：生食投与と同時にLFTUS（480.4kHz、連続波、強度0.3W/cm<sup>2</sup>）を1時間照射；3）rt-PA群（n=11）：生食の代わりに、rt-PA（10mg/kg）を1時間かけ

て静注；4) rt-PA+LFTUS 群(n=11)：rt-PA 投与と LFTUS 照射】に分け、治療後 24 時間に神経学的変化を評価した。その後、脳を取り出し組織検査を行った。実験の結果、この 4 群間において神経学的状態、梗塞率、浮腫率及び出血性変化に有意差は認められなかった。従って、超音波血栓溶解治療は、少なくとも治療開始 3 時間状態においても虚血脳に対し、悪影響を増加させることはないものと結論された。つまり rt-PA 治療によっても再開通しなかった虚血脳に対し、本超音波条件は悪影響を増加させることのないことが明らかとなった。この第 1 ステップをもとに適用開始時間を延長した場合の同様の非再開通例、更には出血率を増す再開通例について超音波の副作用を検討する足掛かりとなった。

## A. 研究の目的

急性虚血性脳卒中 (AIS) 治療における経頭蓋超音波の血栓溶解増強効果は、脳卒中研究者から多大な関心が寄せられている<sup>1-3</sup>。低周波数超音波は、他の周波数の超音波条件と比較し、血栓溶解効果がより高く<sup>4-7</sup>、頭蓋骨の透過性も良い<sup>8-10</sup>。一方、低周波数経頭蓋超音波 (LFTUS) を用いた TRUMBI 試験では、LFTUS を受けた AIS 患者に高率に症候性頭蓋内出血が合併した<sup>11</sup>。このような出血性合併症の原因として、脳内の強度依存効果<sup>12</sup>や血液脳関門の破壊など、複数要因の関与がいくつかの研究で示唆されている<sup>12-15</sup>。

また、これらの LFTUS の副作用は、特殊な生物学的条件に依存する可能性がある。我々は、正常血圧 Wistar ラットの中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルにおいて、490kHz の LFTUS が有効かつ安全である、ということを既に報告しているが<sup>16</sup>、AIS 患者の半分以上は高血圧を有しており<sup>17</sup>、高血圧状態が出血性合併症に関与している可能性もある。それゆえ、本研究では、高血圧ラット (SHR) MCAO モデルを用い、高血圧状態下での LFTUS の安全性を検証することを目的とした。

## B. 研究方法

すべての動物実験の手順は、東京慈恵会医科大学動物実験委員会のガイドラインを遵守して行った。12 週齢の雄性 SHR を 45 匹使用した。梗塞モデル作成及び超音波治療中には、イソフルラン吸入麻酔を使用した (導入時 4.8%、梗塞モデル作成中 2.5%、治療中 1-2%)。実験中の直腸温度は、温度調節装置 (BWT-100, BRC 社) を用いて  $37.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  に維持した。

### (1) 梗塞モデル作成方法

MCAO は小泉らのモデルを改訂した方法で作成した<sup>18</sup>。まず、手術顕微鏡下で頸部正中切開を行った後、右総頸動脈、内頸動脈及び、外頸動脈を露出した。その後、外頸動脈と後頭動脈を 4-0 絹糸で結紮した。内頸動脈 (ICA) を杉田式脳動脈瘤クリップで一時的に遮断し、総頸動脈 (CCA) を分岐前 3mm の部位で絹糸にて結紮した。CCA 分岐前 1mm の部位に小さな穴を開け、2-0 ナイロン糸を CCA から ICA に挿入した。杉田クリップを取り除いた後、ナイロン糸を分岐部から 18-20mm 程度進め、MCA の起始部を閉塞した。その後、頸部切開口を縫合し、麻酔を終了した。

## (2) 神経学的評価と体重測定

Menzies らのスケール<sup>19</sup>(0=異常なし; 1=対側前肢屈曲, 2=尾を引いたとき対側前肢の握力低下; 3=全方向に動くが、尾を引いたときだけ対側へ回転; 4=持続的に対側へ回転)を用いて、梗塞作成前、超音波治療前、及び治療24時間後での神経学的評価を行った。梗塞作成前0点で、治療前3点あるいは4点の動物を本研究に用いた。また、上述の時点において、動物の体重も測定した。

## (3) 治療群の分類

上述の条件に適合した、実験に使用する動物40匹を無作為に以下に示す4群に分類した; 1) 生食[NS]群(n=8): MCAO後3時間にプラセボとして生食を尾静脈から静注(10 ml/kg; 10% ボーラス、残りを60分間以上かけて点滴); 2) NS+LFTUS群(n=10): 生食投与と同時にLFTUSを1時間照射; 3) rt-PA群(n=11): rt-PA(1 mg/ml, 10 mg/kg)を10% ボーラス、残りを60分間かけて点滴; 4) rt-PA+LFTUS群(n=11): rt-PA投与とLFTUS照射を併用。人rt-PAのラットに対しての効果は、人に対する効果の最大1/10であり<sup>20,21</sup>、ラットにおける10 mg/kgのrt-PA用量は、AIS患者での一般的な治療用量(0.9 mg/kg)に相当する。

## (4) 超音波システムと照射方法

本研究で使用する超音波システムについては、既に報告した通りである<sup>16</sup>。超音波トランスデューサーは動物実験のための特注品であり、表面は平らな径5mmの円形で、共振周波数480.4 kHzである。このトランスデューサーは、特注のマッチング回路とパワーアンプを介し、特注の信号発生器により駆動する。固定器具を用いて、

トランスデューサーをラットの頭皮の右側(正中線から3mm、bregmaから後1mm)に固定した。超音波の透過性を良くするため、トランスデューサーの固定前に固定部の頭皮表面を脱毛し、超音波ゼリーを塗布した。超音波の照射条件は、周波数480.4 kHz、空間平均強度( $I_{SA}$ )0.3 W/cm<sup>2</sup>とした。この条件での空間最大強度は約1.2 W/cm<sup>2</sup>で、機械指数(MI)は0.28、頭蓋骨温度指数(TIC)は2.9である。超音波出力は、各治療群の実験前後に超音波パワーメーターで確認した。

頭蓋内の超音波ビームは、予備実験としてシュリーレン法及びハイドロホン法(有効径0.2mm)にて確認した(図1)。

組織温度上昇を予防するため、LFTUSを前述の通り、間歇的に照射した<sup>16</sup>。具体的には、2分間連続波を照射し30秒休止をとるパターンを10分間に4回繰り返した後、クーリングのために5分間休止をとるという照射方式1クールとし、60分間で4クール繰り返した。

## (5) 脳の摘出

治療24時間後の神経学的評価をした後、ラットを100 mg/kg ペントバルビタールの腹腔内注射で深麻酔し、50mlのヘパリン化生食(5 U/ml)と50mlの10%ホルマリン緩衝液を心臓経由で還流した後、脳を挿入したナイロン糸に沿って注意深く頭蓋内から摘出した。挿入した糸の位置、くも膜下出血(SAH)などの存在の可能性を含めた脳と頭蓋内異常を記録するために、脳表と頭蓋内の写真を撮影した。

## (6) 脳梗塞と脳浮腫率

各々の脳を2mmスライスで冠状断し、6つの切片(前極から2-14mmの位置)

を作成した。その後、3 $\mu$ mの薄切り標本を用意し、HE染色を行った。染色した標本をフラットヘッドスキャナー(ES-8500, Seiko Epson Corp, Japan)にて、3200DPIの解像度でスキャンした。スキャンした画像をPhotoshopソフトで以下の様な方法で分析した。まず、各切片の梗塞と両側半球の領域を手動で辺縁をトレースし面積を計算した。容積は、6つの切片それぞれの梗塞面積と厚さを積算して求めた。同様の手法で、左右両半球の容積も求めた。脳浮腫容積は、両側の半球容積の差から計算した。続いて、梗塞容積から脳浮腫容積を引いて正確な梗塞容積を求めた。正確な梗塞容積と脳浮腫容積を半球容積で割って、梗塞率と脳浮腫率を計算した。

#### (7) 脳内出血の測定

LFTUSは、頭頂骨に近い部位は強度が強く、対側は定在波が生じるという、異なった音場特性を持つ(図1)。ゆえに、頭蓋内出血を近位、中間位、遠位という3つの異なった位置に分けて評価した(各距離はそれぞれ脳の前後距離の1/3ずつ)。

出血を肉眼的出血と顕微鏡的出血に分類した。肉眼的出血の定義はHE染色標本において肉眼でも見える出血で、その面積によって4段階に分けた(1: < 0.8 mm<sup>2</sup>; 2: 0.8-3.1 mm<sup>2</sup>; 3: 3.1-7.1 mm<sup>2</sup>; 4: > 7.1 mm<sup>2</sup>)<sup>22</sup>。顕微鏡的出血は、顕微鏡でしか認められない血管外の赤血球の存在と定義した<sup>23</sup>。顕微鏡的出血領域はNikon生物顕微鏡(Eclipse 800-i)の20倍対物レンズで撮ったデジタル顕微鏡写真で測定し、各距離での面積を合計し、全半球の出血を計算した。

#### (8) 統計学的分析

定性データ(神経学スコア、死亡率、くも膜下出血率、及び肉眼的出血率を含む)はFisher's exact testで検定した。定量データ(体重、脳梗塞率、脳浮腫率及び顕微鏡的出血面積)は、1-way ANOVAで分析した。 $p < 0.05$ を統計学的有意な差とした。

### C. 研究成果

#### C-1 死亡率、神経学スコア、及び体重の変化

治療後24時間以内の死亡は1例だけで、NS群に認められた。このラットは視床下部梗塞と重篤な脳浮腫率(28.4%)であった。4群間に死亡率の差は認められなかった( $p=0.26$ )。神経学スコアは、ほぼ全動物で治療前が4、治療24時間後は3になった(表1)。神経学スコア及び体重の変化には4群間に有意な差は認められなかった。

#### C-2 ナイロン糸の位置とくも膜下出血

ナイロン糸は全て動物の右前大脳動脈に挿入されていた。くも膜下出血はrt-PA群に1例だけ生じた。くも膜下出血発生率には4群間に有意な差は認められなかった( $p=0.45$ )。

#### C-3 脳梗塞と脳浮腫容積

4群の脳梗塞率は最大40%で、脳浮腫率は最大20%であった(図2)。脳梗塞率と脳浮腫率には4群間に有意な差は認められなかった( $p=0.9$ 及び $p=0.45$ )。

#### C-4 脳内出血

肉眼的出血は2例(1例はNS+US群、1例はrt-PA群)に認められ、全て「中間位」にあり、grade 1(面積は0.8 mm<sup>2</sup>未満)であった(表2)。肉眼的出血は



4 群間に有意な差は認められなかった。顕微鏡的出血の結果も表2に示しているが、同様に4群間に有意な差は認められなかった。

#### D. 考察

この研究では、神経学スコア、脳梗塞と脳浮腫率、脳出血を含むすべての評価項目において、4群間に有意な差は認められなかった。特筆すべきは、rt-PA+ LFTUS 治療群が、上述の項目全てで悪化傾向を少しも示さなかったことである。この結果は、LFTUS 併用治療が永久 MCAO の高血圧動物においても安全であることを示唆している。

最近の大型国際臨床研究が示したように、半分以上の AIS 患者は高血圧の既往がある<sup>17</sup>。それゆえ、rt-PA の治療効果を含め、AISに関する多くの実験研究では SHR の一時的 MCAO モデルを使用されてきた<sup>24</sup>。しかしながら、rt-PA の治療結果として、非再開通も決して少なくない。加えて、TRUMBI 試験では、LFTUS 治療群は再開通率は低く、症候性出血を高率に伴った。<sup>11</sup> それゆえ、この実験では SHR の永久 MCAO モデルを使って LFTUS の安全性を検証した。

本研究は、SHR において、永久 MCAO 発生3時間後でも LFTUS を用いた超音波血栓溶解治療が安全だということを示唆した。LFTUS の安全性は、以下のいくつかの要素が関連していると考ええる。第一に、我々が使った LFTUS の機械指数(MI)が低いことである。実際、連続波で空間平均強度 0.3 W/cm<sup>2</sup>、空間最大強度は約 1.2 W/cm<sup>2</sup> になり、MI は 0.28 しかなかった。この様に、MI 値は生物に影響する閾値 (MI=0.5) より低く維持されており、TRUMBI 試験 (MI=1.2) 及び Schneider らの動物実験よりさらに低かった<sup>16</sup>。第二に、我々

が使用した LFTUS のビーム開口はわずか 20 mm<sup>2</sup> で、コントロールしやすいものである。一方、TRUMBI 試験<sup>11</sup> で使った超音波のビーム全開口は約 2,830 mm<sup>2</sup> で、普通の臨床用 TCD の開口 (=150 mm<sup>2</sup>) より約 18 倍も大きかった。尚、Schneider ら<sup>12</sup> 及び Reuter ら<sup>15</sup> の動物実験中に使用した超音波のビーム開口は約 350 mm<sup>2</sup> で、本研究の約 17.5 倍だった。これらの大きなトランスデューサーは過大な量のエネルギーを頭蓋内に送り、反対側の頭蓋内に危険な定在波も増幅しやすい<sup>7,26</sup>。第三に、我々の LFTUS の周波数 (=500 kHz) は他の LFTUS 研究 (例えば TRUMBI 試験の 300 kHz、Schneider らの 20 kHz) より高いことである。極端に低い周波数は、同じ Isp でも MI を上昇させる<sup>25</sup> と同時に伝播距離も長くなり、頭蓋内の多重反射やひどい干渉を起こしやすくする。

#### E. 結論

我々は、既に正常血圧ラットの MCAO モデルにおいて、我々が使用している LFTUS の安全性と有効性を示した。本研究は、続いて SHR の永久 MCAO モデルにおいてもこの LFTUS の安全性を証明した。一方、重篤な脳出血は一般的に再開通時に発生しやすいことが知られており、今後の課題として、高血圧動物の再開通モデルにおける LFTUS の安全性研究も必要である。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

表 1. 神経学スコアと体重の変化

Table 1. Neurologic Score and Change in Body Weight

Group	Neurologic Score			Body Weight (gram)			
	Just	24-hours	Change	Baseline	Just before	24-hours	Change
	before	after			treatment	after	
	treatment	treatment				treatment	
NS(n=8)	3.9±0.4	3.3±0.4	-0.5±1.4	306.7±12.6	294.9±10.9	266.2±6.5	-28.7±6.6
NS+US(n=10)	4.0±0.0	3.0±0.0	-1.0±0.0	309.3±8.6	298.2±8.0	267.2±8.5	-31.0±4.9
tPA(n=11)	4.0±0.0	3.0±0.0	-1.0±0.0	303.2±5.1	290.7±6.3	260.7±7.6	-30.5±3.4
tPA+US(n=11)	3.8±0.4	3.0±0.0	-0.8±0.4	310.3±10.5	297.9±8.6	265.5±7.7	-32.4±5.3
p=	0.27	0.20	0.09	0.3	0.16	0.21	0.54

表 2. 脳内出血

Table 2. Intracerebral Hemorrhage

Groups	Macroscopic Hemorrhage Rate (%)				Microscopic Hemorrhage Area ( $\times 10^3 \mu$ )			
	Near	Middle	Far	Sum	Near	Middle	Far	S
NS (n=8)	0	0	0	0	35±78	103±76	81±81	219
NS+US (n=10)	0	10	0	10	111±192	148±276	186±187	445
tPA (n=11)	0	9	0	9	160±361	116±378	116±143	392
tPA+US (n=11)	0	0	0	0	160±179	87±235	175±247	368
p=	1.00	0.84	1.00	0.84	0.73	0.75	0.61	0.65

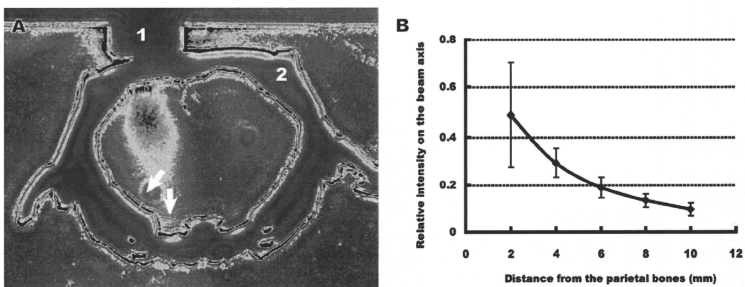


図1. A. シュリーレン法で見た頭蓋内超音波音場。“1”はLFTUSプローブで、“2”はラット頭蓋骨を示す。LFTUSプローブはラット頭蓋骨の頭頂骨側に置いた。図内の矢印は頭蓋反対側付近の縞模様の定在波を示す。B. ラット頭頂骨を透過した後のLFTUSの相対的強度 (n=8)。

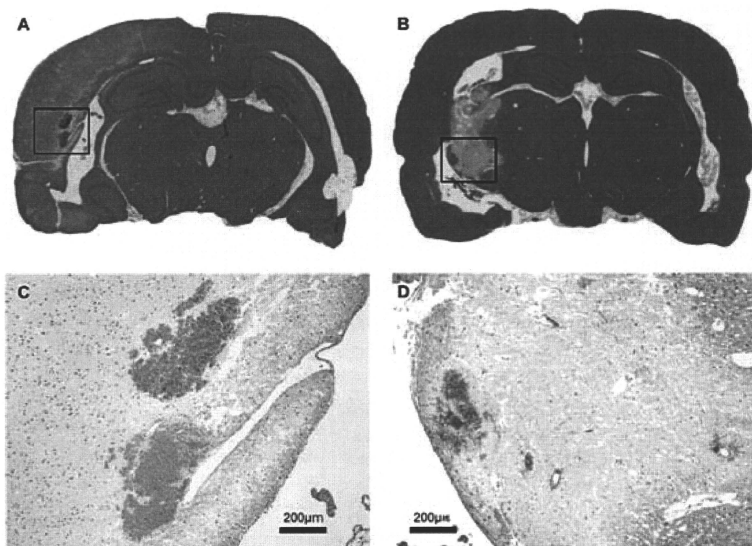


図2. 40例の動物のうち2例に認められた肉眼的出血の写真。1例はrt-PA群(A)、もう1例はNS+US(B)に認めた。

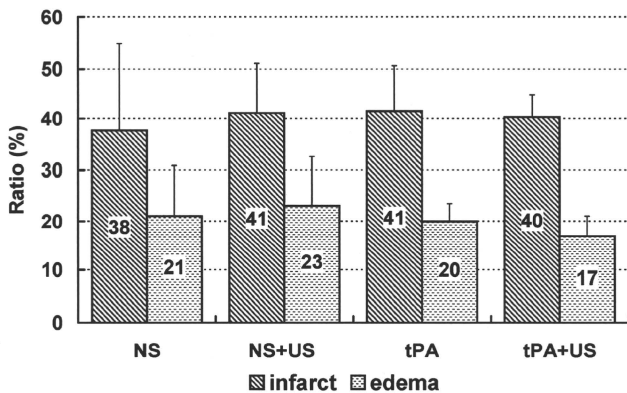


図3. 脳梗塞率、脳浮腫率ともに4群間に統計学的有意差はなかった。