

Evaluation of a Brain Imaging System with Combined Parallel Hole and Pinhole Collimation

Qiu Huang, Tsutomu Zeniya, Yoshiyuki Hirano, Hiroyuki Kudo, Hidehiro Iida, and Grant T. Gullberg

Abstract—This work evaluates the brain imaging system designed by the Department of Investigative Radiology at the National Cardiovascular Research Center- Research Institute in Osaka, Japan. As presented at the IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference at Knoxville, TN in 2010, the high resolution single photon emission computed tomography (SPECT) imager was developed for obtaining high resolution brain scans for various imaging diagnostic applications. The system was mounted with one large field of view detector imaging the whole brain and multiple smaller field of view high resolution detectors imaging small regions of the brain. The large field of view detector provides images without truncation that localize areas of particular diagnostic interest and provide support information for the reconstruction of high resolution regions of interest (ROIs) from high resolution truncated projections obtained with the small field of view detectors. At the IEEE conference, the authors suggested a geometry which achieved high resolution reconstruction of the brain with a small pinhole aperture. The work presented in this paper simulates the camera with larger pinholes and shows that the camera has accurate quantitation and fine resolution for the interior reconstruction problem.

I. INTRODUCTION

SPECT plays an active role in brain imaging. For example, in clinical evaluation for diagnosing brain autoregulatory abnormalities, cerebral blood flow (CBF) and cerebral vascular reactivity (CVR) is quantified in a single session using a split dose administration of ^{123}I -iodo-amphetamine (IMP); one at rest and one during Diamox challenge. In addition, to evaluate neuronal damage due to ischemia and to provide prognostic value for surgical outcomes, Iodine-123-iomazenil (Iomazenil) is used to image the binding to benzodiazepine receptors prior to carotid endoarterectomy. To better quantify the brain function, the Department of Investigative Radiology at the National Cardiovascular Research Center - Research Institute in Osaka, Japan is designing

a high resolution single photon emission computed tomography (SPECT) imager as shown in Fig. 1 for obtaining high resolution brain images. The camera consists of one large field of view detector imaging the whole brain and multiple smaller field of view high resolution detectors imaging small regions of the brain. The observed intrinsic spatial resolution of the large FOV detector in the x and y-direction are 3.5 mm and 3.1 mm, respectively. The intrinsic spatial resolution of the small FOV detector in the x and y-direction and the energy resolution are 2.3 mm, 2.4 mm, and 6.1 %, respectively [1].

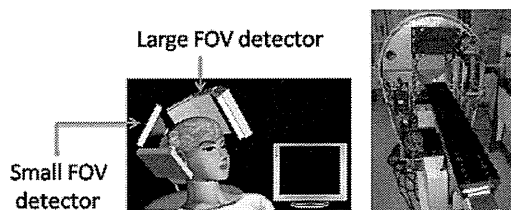


Figure 1. Camera with large field of view detector for imaging whole brain and smaller field of view detectors for imaging ROIs (left), and the prototype system (right).

The large field of view detector provides images without truncation that localize areas of particular diagnostic interest and provides support information for the reconstruction of high resolution regions of interest (ROIs) from high resolution truncated projections obtained with the small field of view detectors. The work presented in this paper provides simulations which show that the camera improves the quantitation for the interior reconstruction problem with a few multiple pinhole collimated detectors.

The pinhole collimator is able to achieve higher geometric resolution than a parallel-hole collimator. In addition, at a small object-to-detector distance, sensitivity of pinholes can be higher than that of the parallel-hole collimator [2]. However, the advantage is guaranteed at the expense of a smaller field of view, which results in truncated projections. The reconstruction of these projections involves determining the solution to the interior problem in local tomography. The interior problem in medical imaging refers to the

Manuscript received November 21, 2010. This work was supported by NIH under Grant No.R01EB00121, by the Director, Office of Science, Office of Biological and Environmental Research of the US Department of Energy under contract DE-AC02-05CH11231, by the Grant for Translational Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW), Japan, and by the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (SRFDP), China, Grant No. 20100073120003.

Q. Huang is with the Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China (e-mail: huangjone@yahoo.com).

T. Zeniya, Y. Hirano and H. Iida are with the National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan.

H. Kudo is with University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.

G. T. Gullberg is with the Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA USA.

situation where the region-of-interest (ROI) is totally contained within the object. For instance, in SPECT, the interior problem happens when the projections passing through the region outside the ROI are truncated due to a small field-of-view detector or a short detector-to-object distance in the case of converging collimation. The interior problem has been studied for some time [3]. Recently, it was proven that the solution is unique and stable in computed tomography (CT) if a small region in the ROI is known *a priori* [4-9]. In this paper, the SPECT interior reconstruction problem is solved using an iterative algorithm as presented in [10].

To further increase the sensitivity of the system, the small FOV detector is mounted with multiple pinhole collimators. The pinhole apertures are chosen to be 2mm instead of 0.5mm in the previous work [10]. Stationary small FOV detectors are simulated to acquire data assuming the region of interest is at the center of the brain or at the posterior region of the brain.

The paper is organized as follows: Section II shows the method we used to simulate the combined parallel-hole and pinhole collimated imager and the algorithm to reconstruct the pinhole data. The result of a numerical simulation is presented in Section III where comparisons are made to illustrate the resolution and quantification of the camera. Then the conclusion is given in Section IV.

II. METHODS

We performed a simulation study using the digital XCAT brain phantom [11]. The phantom was stored in a 3-dimensional volume with each voxel being $(2\text{mm})^3$. One slice of the phantom is shown in Fig. 2.

The large field of view parallel-hole collimated detector was simulated to revolve around the brain and acquire data every 5 degrees over half a circle. The detector bin was 0.28 cm along the transversal direction and 0.2 cm along the axial direction. Poisson noise was manually added to the data to give a noise level such that the total counts of each slice summed to 10^7 . The filtered backprojection algorithm was applied to the simulated projection data to reconstruct a volumetric image. Fig. 3 gives an example of one slice of the reconstructed low resolution parallel data. The image was interpolated and smoothed and was later used as the initial image and as prior information in the reconstruction of the pinhole data. A mask image was also generated according to the reconstructed image from data acquired with large FOV parallel-hole collimated detectors, which was later used in the iterative reconstruction of data for the small FOV pinhole collimated detectors.



Fig. 2. The original XCAT phantom.

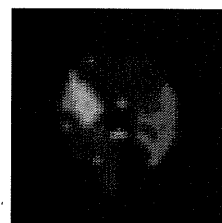


Fig. 3. The reconstructed image from parallel-hole projection data.

The pinhole collimator is shown in Fig. 4. It had a circular aperture with a radius of 2 mm and a knife edge with an opening angle of $\pi/3$.

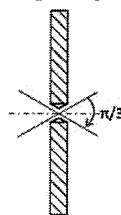


Fig. 4. The pinhole collimator. The pinhole is a circular aperture with a radius of 2mm and a knife edge with an opening angle of $\pi/3$.

In each small FOV detector, 3×3 pinholes were attached all focusing to common point, which could be the center of rotation though the detectors are stationary during data acquisitions. The view of the pinhole plane is shown in Fig. 5(a). Each pinhole is separated from the other by 5.5 mm both in the horizontal and vertical directions. The side view in Fig. 5(b) shows the geometry simulated in this work, which gives a magnification factor of 1.

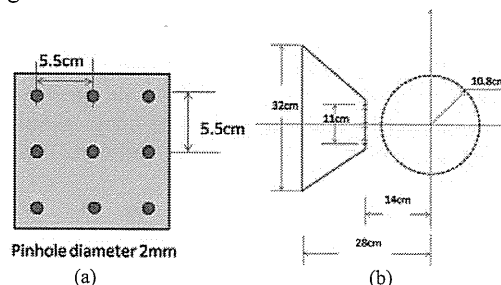


Fig. 5. Side view and top view of the multiple pinhole collimator. The plane with 3×3 pinholes (a), The side view of one detector head with the multiple pinhole collimation.

The small FOV detectors used a 2×2 H8500 PMT block for each pinhole. The $10 \times 10 \text{ cm}^2$ blocks were connected with a 1cm septa in between to avoid overlap between projections through adjacent pinholes. The detector plane is illustrated in Fig. 6. The 2D detector plane had an area of $32 \times 32 \text{ cm}^2$.

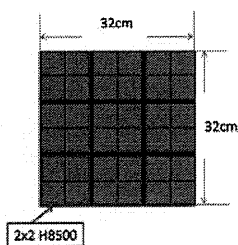


Fig. 6. The detector plane for a 3×3 pinhole collimator. Each pinhole is mounted with a 2×2 H8500 PMT block.

Four small FOV detectors were then localized close to the object as shown in Fig. 7. The FOV is then a sphere with a radius of 5mm. In other words, the projections were truncated. One view is shown in Fig. 8. In the figure, the detector bin is 2 mm.

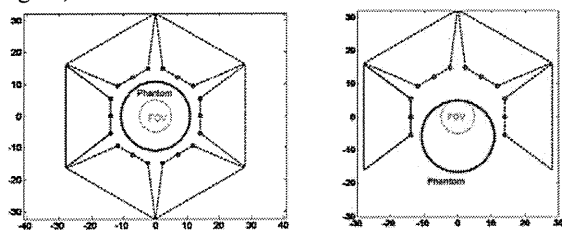


Fig. 7. The two geometries simulated in this work.

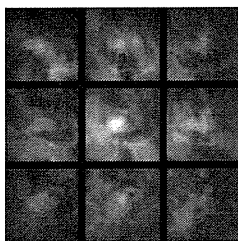


Fig. 8. The projection at one view of the 6 views for the geometry on the left shown in Fig. 7.

The reconstruction algorithm was developed to maximize *a posteriori* probability of the image given the simulated projections. Details could be found in [10].

III. RESULTS

There are two geometries simulated in this work for the small FOV detectors: first one with 6 detector heads and the second with 4 detector heads, as shown in Fig. 7. In addition to the XCAT phantom, a point source phantom was also used to evaluate the system resolution.

The study with the XCAT phantom is shown in Fig. 9. The reconstructed images are from the geometry with 6 and 4 projection views, respectively. Profiles are plotted in Fig. 10 to show that the two geometries both improve the details in the reconstructed images over that obtained with the parallel-hole collimated detector. For the geometry with 6 views, the FOV is located at the center of the brain. While for the geometry with 4 views, the

FOV is located at the posterior region of the brain. Both FOVs were reconstructed with higher resolution compared to the reconstruction shown in Fig. 3. Another comparison was performed with the point source phantom.

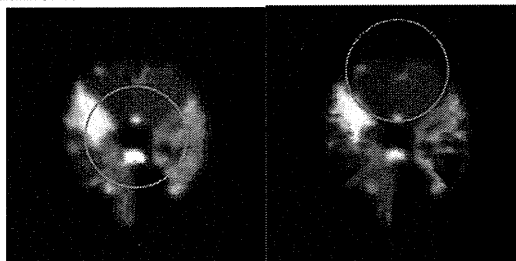


Fig. 9. Reconstructed image of the XCAT brain phantom from pinhole data for the interior problem and for limited angular sampling. MAP estimate with regularization is applied, for the geometry with 6 views (left) and for the geometry with 4 views (right). The circle on the image indicates the FOV.

In the simulation, the pinhole data were acquired with truncation, resulting in reconstructing an interior problem. Efforts should be made to correct for the effect of this problem. In this work, we used the low resolution image obtained by the large field of view detector first as the initial estimate in the iterative reconstruction of the pinhole data. Also, the low resolution image provided a priori information and a mask for the reconstruction of the interior problem. The prior information was used to calculate the L2 norm distance from the reconstructed image to compose the penalty term in addition to the total variation regularization. The image quality within the FOV, which was the central part of the brain for the geometry with 6 views and the posterior region of the brain for the geometry with 4 views, was improved.

The vertical and horizontal profiles crossing the FOV are shown in Fig. 10. From the profiles we see that the details of the image are more distinct by reconstructing both parallel-hole projection data and pinhole projection data; for instance, the details indicated by the arrows in Fig. 10.

The study with point source phantom is shown in Fig. 11 for the geometry with 6 views. In the reconstruction, no prior information was used, however the total variation regularization was used in the iteration. The image shows that the resolution of the system is fairly good. Although with the truncation problem, the quantification is degraded.

Profiles for the three points labeled in Fig. 11 with the three arrows are drawn in Fig. 12. The dash lines (red) indicate the original phantom, and the solid lines (blue) are for the reconstructed images. The profiles imply high resolution for the system, however, with degradation of

quantitation for points off the FOV, for example, points 1 and 3.

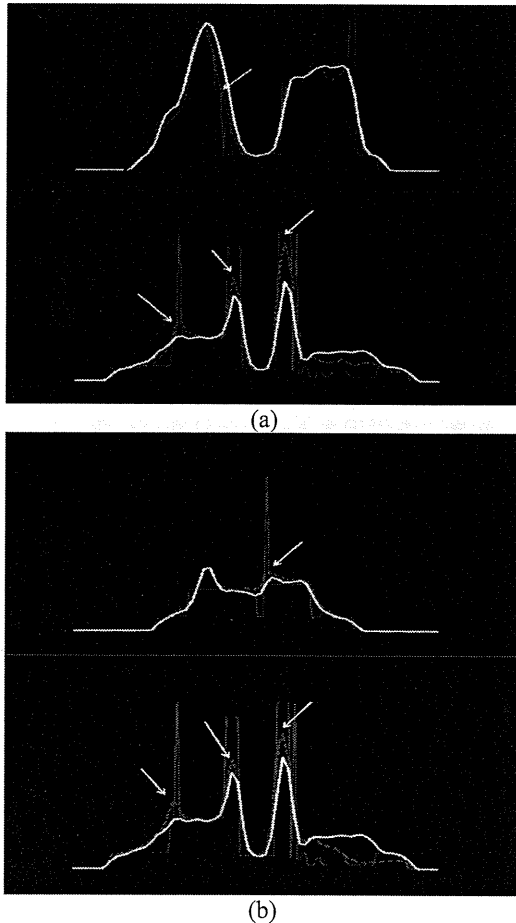


Fig. 10. Horizontal and vertical profiles crossing the center of the FOV for the geometry with 6 views (a) and for the geometry with 4 views (b). The purple solid line (thin) indicates the original phantom. The yellow dot-dash line is for the reconstructed image (Fig. 3.) from parallel-hole collimated data. While the red solid line (thick) is for the reconstructed image in Fig. 9.

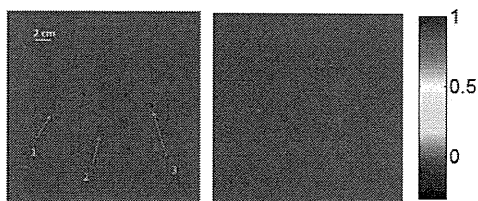


Fig. 11. Point source phantom (left) and the reconstructed image of the point source phantom for the geometry with 6 views (right).

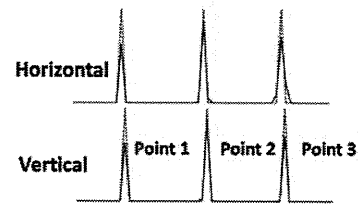


Fig. 11. The horizontal and vertical profiles for lines passing through the three points indicated in Fig. 11.

IV. CONCLUSION

The combination of a large field of view parallel-hole collimated detector and smaller field of view high resolution pinhole detectors improves the quantitation in simulated brain imaging. It makes use of the high sensitivity of the pinhole collimator while compensates for the degradation in the reconstructed image due to the interior reconstruction problem caused by the small field of view of the pinhole collimator. This work will be verified through phantom imaging studies.

REFERENCES

- [1] Y. Hirano, T. Zeniya, and H. Iida, "Development of a high resolution and quantitative SPECT for the human brain," *IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference*, Knoxville, TN, 2010.
- [2] R. J. Jaszczak, J. Li, H. Wang, M. R. Zalutsky, and R. E. Coleman, "Pinhole collimation for ultra-high-resolution, small-field-of-view SPECT," *Phys. Med. Biol.*, vol. 39, pp. 425-437, 1994.
- [3] F. Natterer, *The Mathematics of Computerized Tomography* (SIAM), 1986.
- [4] G. Wang, Y. Ye and H. Yu, "General VOI/ROI reconstruction methods and systems using a truncated Hilbert transform," Patent disclosure submitted to Virginia Tech. Intellectual Properties on May 15 2007.
- [5] Y. Ye, H. Yu, and G. Wang, "Exact interior reconstruction with cone-beam CT," *Int. J. Biomed. Imaging*, Article ID. 10693, 2007.
- [6] Y. Ye, H. Yu, Y. We and G. Wang, "A general local reconstruction approach based on a truncated Hilbert transform," *Int. J. Biomed. Imaging*, Article ID. 63634, 2007.
- [7] Y. Ye, H. Yu, and G. Wang, "Exact interior reconstruction from truncated limited-angle projection data," *Int. J. Biomed. Imaging*, Article ID. 427987, 2008.
- [8] M. Courdurier, F. Noo, M. Defrise and H. Kudo, "Solving the interior problem of computed tomography using a priori knowledge," *Inverse Problems*, vol. 24, pp. 065001, 2008.
- [9] H. Kudo, M. Courdurier, F. Noo, and M. Defrise, "Tiny a priori knowledge solves the interior problem in computed tomography," *Phys. Med. Bio.*, vol. 53, pp. 2207-2231, 2008.
- [10] Q. Huang, T. Zeniya, H. Kudo, H. Iida, and G. T. Gullberg, "High resolution brain imaging with combined parallel hole and pinhole collimation," *IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference*, Knoxville, TN, 2010.
- [11] W. P. Segars and B. M. W. Tsui, "MCAT to XCAT: the evaluation of 4-D computerized phantoms for imaging research," *Proceedings of the IEEE*, vol. 97, No. 12, 2009.

次世代超音波血栓溶解療法への展望

—現状から近未来へ

Prospect of sonothrombolysis for the next generation of ultrasonic therapy from the present time to the near future



古幡 博

Hiroshi FURUHATA

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

◎脳梗塞や心筋梗塞の超急性期血栓溶解療法として、超音波を併用する新治療技術が台頭している。本稿ではそのメカニズムの概略を説明し、超音波を併用することによって著しい再開通率の向上、再開通時間短縮の可能性のあることをまず紹介する。この効果は診断用の超音波(MHz帯)でも有効で、脳梗塞に対するTCDやTCCSなどによる臨床成績も発表され、さらにはマイクロバブル(MB)を併用することによる溶解加速をも臨床成績で報告されている。しかし、診断用超音波よりも低い周波数帯による超音波の血栓溶解加速はさらに有効である。そのためには安全性に関する基礎的データの蓄積が求められている。そして、その中周波数帯の超音波を用いれば標的性・臨床的な簡便性が得られ、まさに救急現場における次世代血栓溶解療法として超音波治療のあらたな道が開かれるものと期待されている。本稿ではそのような次世代型の超音波血栓溶解療法の可能性を含む近未来的超音波治療法について述べる。



血栓溶解, 超音波治療, 安全性, マイクロバブル(MB), 経頭蓋超音波照射

わが国の死因の第2位を占める心臓疾患および第3位を占める脳血管障害のうち、5割以上を占めるのは心筋梗塞や脳梗塞の虚血性疾患である。いずれも救急的救済を要する病態変化の急激なものである。そのため、direct PTCAのようなintervention技術が心筋梗塞では広く使われている。しかし、脳血管系の場合は血管走行が複雑で、蛇行が激しいため、いまだにintervention技術は限定的であり、発症3時間以内の急性期では血栓溶解剤rt-PA(recombinant tissue plasminogen activator)の静注療法が治療の第一選択とされている。とりわけ脳細胞では虚血に対する耐性が心筋細胞よりも低いため、根治的なangioplasty手法ではないが、救急現場ではt-PA静注療法が適用されている。もちろん心筋梗塞の場合でも、アメリカのような広大な地で、PTCAのできる専門病院まで

距離がある場合は、t-PA静注療法が応急的に使用される確率は低くない。そして、いずれの梗塞も細胞死を回避するために、再開通が早ければ早いほど予後が良好であることは周知であろう。

この時間勝負という意味で、血栓溶解剤投与とともに、超音波照射を併用することで、その薬効を高め、再開通までの時間短縮、再開通率の向上、さらには副作用のある血栓溶解剤の用量低減化を狙う薬物併用超音波治療法の代表例のひとつが超音波血栓溶解法である。本稿では血栓への薬物浸透を高める超音波治療の現況と、脳血栓に対する近未来的新治療法の展望を述べる。

超音波血栓溶解法のメカニズム

血栓溶解剤の効果増強に超音波が有効であることを示したのは、立花らや古幡らによる*in vivo*実

験が最初であった¹⁾。立花らはラット下肢末梢血栓モデルを作成し、これにウロキナーゼを静注しながら同下肢を超音波洗浄機に浸すことで、再開通率の向上の生じることを示した。一方、著者らは彼らとはまったく独立にイヌ両側股動脈に対し同末梢からバルーンカテーテル(PTCA 用)を挿入し、擦過による内皮損傷を与え、抜去後2時間血流途絶して血栓を形成させた。これを用い、TPA 静注下に一側にのみ超音波(200KHz 連続波)を照射する実験を行った。その結果は、再開通時間が t-PA 投与で超音波非照射群では 60~70 分であったものが、超音波併用群では 15 分程度に短縮するというものであった^{2,3)}(図 1)。さらに、イヌ心筋梗塞モデルにおいても、同様の超音波条件で血流再開通の早まることを示した⁴⁾。日本におけるこのような成果に刺激され、欧米でも超音波併用法の有効性を探る研究が勃興し、数多くの論文が発表されてきた。

そして今日、そのメカニズムとしては図 2 のようなものが考えられている。すなわち、超音波のもつ 5 つの作用(バブル発生、キャビテーション、発熱、振動、流動)のなかで、微小振動と流動がおもな作用であることが認められている。分子レベルでみたときの粒子速度とその微小流動が t-PA の血栓表面に触れさせる確率を高め、血栓内への浸透を補助し、また、血栓の分解産物(FDP)を血栓外へ流出させる作用が中心である。

注目すべきことは、HIFU などのように、数 kW/cm² という強力超音波を連続波あるいはバースト波によって焦点化することでもたらされるキャビテーションによるバブル発生、また強力な発熱作用による細胞破壊や壊死・凝固などの作用をまったく用いていない点である。また、マイクロバブル(MB)併用によって局所的な HIFU 効果を惹起する数 W/cm²~数十 W/cm² の mild HIFU(MIFU と略)よりもさらに弱い強度でも有効な作用(low intensity focused ultrasound: LIFU, または low intensity low frequency defocused ultrasound: L²DFU)を活用する点である。

診断用超音波で血栓溶解は加速するか

上述のように弱い強度の超音波でも有効である

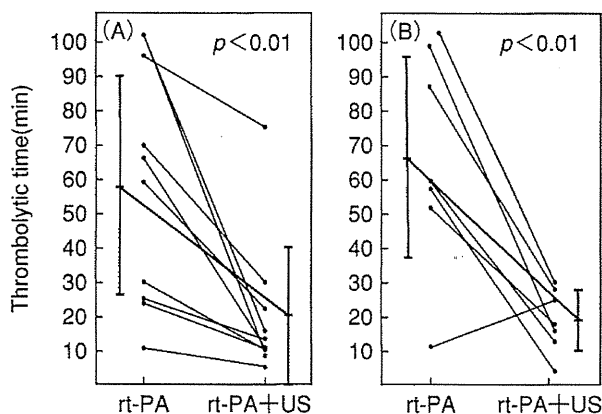


図 1 超音波照射は血流再開通時間を1/4に短縮させる(イヌ股動脈血栓実験)
A: 経皮的照射例³⁾, B: 直接照射例²⁾。

というのであれば、診断用の超音波でも有効なのではないかと考えられる。事実、脳梗塞患者で t-PA 治療中に、その再開通状態を実時間監視する目的で、transcranial doppler(TCD; 2 MHz, パルス法, ドプラ法, 断層画像なし⁵⁾)でモニターしていると、モニターされている患者の再開通率のほうが高いことを Alexandrov が発見した⁶⁾。そして国際治験として t-PA 静注療法と、同法に TCD を適用する方法とを比較した結果を、『N. Engl. J. Med.』に発表した。同治験は CLOTBUST と名づけられており、その結果は 2 時間後の再開通が約 30% のものが、併用法では 39% に上昇し、3 カ月後の神経症状[mRS, 0 または 1 (ほとんど通常的生活レベル)]は約 11% 上昇するというものであった(図 3-A)。この再開通率の向上はカラードプラ療法でも確認されている。Eggers らは、再開通は 20 分、あるいは 40 分で急上昇し、その急速な再開通が神経予後の評価(mRS, 0 または 1)23% を超え、著しい改善を認めたことを報告している⁷⁾(図 3-B)。ただし、出血率が 15.7% あり、この値は t-PA 静注法の 5~6% の 3 倍相当の副作用増加を意味している。このリスクの予防法に関してはいまだ明らかになっていない。

マイクロバブル併用法はさらに溶解効率を高める

上述の TCD による US 照射に加え、MB を静注すると、急性脳梗塞患者における t-PA 静注療法の再開通率をいっそう高めるといふ臨床成績を

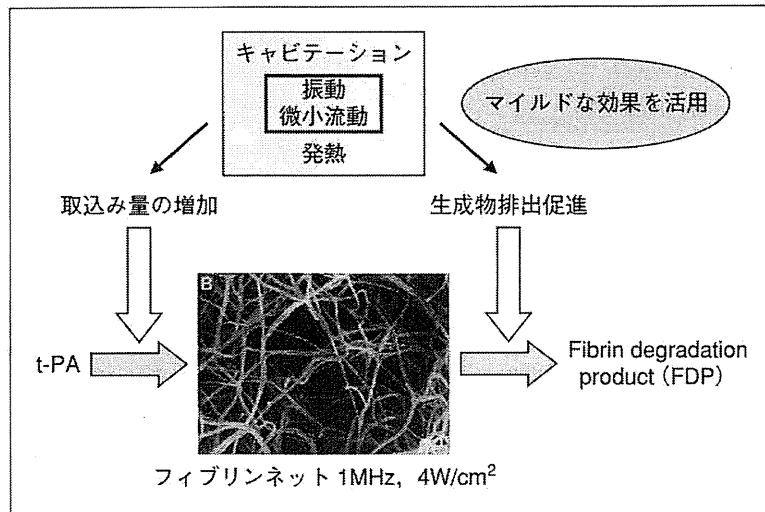


図 2 超音波併用血栓溶解のメカニズム

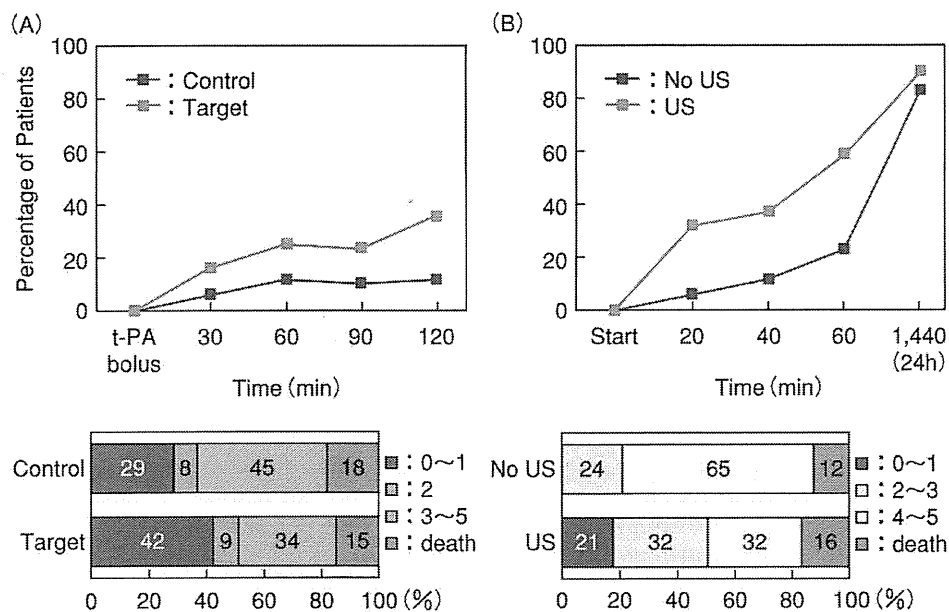


図 3 US診断装置を用いる脳血栓溶解治療
A: TCD⁶⁾, B: TC-CFI⁷⁾.

Molina らが報告している⁸⁾。使用 MB は sonovue で、ヨーロッパでは臨床適用承認が得られているが、アメリカや日本では承認されていない。彼らの方法は TCD による US 照射中に、15 分間隔で MB を静注するというもので、TCD は再開通血流監視を同時に行うために活用されている。Molina らの成績は、MB を用いると完全再開通率は 41% から 54% に増加したが、部分再開通率を含めれば全体としては MB を用いることによる増加は認められないというものであった。換言すれば部分再開通状態が減るということで、MB を用いれば再

開通状態は良好になると示唆されよう。

しかし、MB と US を併用することが安全な血栓溶解法になりうるかという点、臨床成績は良好であったがかならずしもつねに安全とはいえないリスクを示唆する次のような臨床成績のあることも追記しておかねばならない。

MB として Imarex 社の MB185 を使用した場合、適用した脳梗塞患者に出血死が生じ、同試験 TUCSON trial が一時中断となった。その出血の理由は血圧制御に問題があったからと報告されている。現状では TUCSON trial がヨーロッパ中心に継

続されており、その臨床試験のまとめが待たれている。

標的治療への展開

—血栓集束ビームと血栓標的BL薬剤^{9,10)}

血栓溶解剤 t-PA は血栓親和性の高い薬物として、UK などの溶解剤を越えた発展を遂げてきた。しかし、さらに血栓選択性のよい治療法として超音波ビームを血栓に集束的に当てる方法や、前述のバブルリポソーム(BL)の表面に、血栓に集結しやすいRGDをつけたBLをもってBLの集積度を高める技術開発が行われている。ここでは世界的にも注目されている著者らの取組みを紹介する。

1. 診断画像誘導型超音波標的システム

これは超音波断層像に従って塞栓部位に向けて治療用の超音波ビームを発射するシステムで、t-PAの血栓内への浸透とFDPの血栓外への放出を加速する新システムである。とくに急性脳梗塞では虚血に対する脳細胞が脆弱であるため、このシステムの適用意義が高く、その実用化研究が著者らによって推進されてきている。ただし、頭蓋骨を通りやすく、低出力でも引き裂き張力の大きな中周波数帯(100KHz~1MHz)に関する医学生物学的な安全性データがあまりないため、安全性に関する基礎研究が非常に重視され、その基礎データのしかも脳虚血下での影響、リスクを事前検討することが求められている。

すでに、さまざまな動物モデル(脳塞栓モデルや高血圧ラット、さらには霊長類脳梗塞モデル)による安全性評価がこの周波数帯で行われ、臨床適用への地ならしが進められている。しかし、この断層像(2MHz)を経頭蓋的に得る確率が高齢者では低く、約60%程度になり、塞栓部を描出することが困難なことが多い。そのためこの方式の患者への適用確率はt-PA適応患者の約半分以下となる。さらに、患者の体動などによって頭部へのプローブ固定状態が変われば、そのつど設定し直さなければならない、という臨床現場での使用上の問題を含んでいる。そのような問題の解決策として著者らは張り付け型の振動子をあらたに開発中である¹¹⁾。しかし、張り付け型振動子では標的性

を失うことになる。つまり臨床現場での操作の簡便性を実現することが、一方では標的性の欠落という課題を招いている。

2. 血栓選択的BLの開発

それでは溶解率を高めるBLに血栓選択性を高め、これに無指向性の適切なUSビームを照射すれば標的性が維持されることになろう。丸山らが開発したBLに血小板固有のリガンドを付与したBL開発が、現在あらたに進められている。すでに*in vitro*実験でRGDつきBLの有効性を確認し、さらに*in vivo*ラット頸動脈血栓モデルでも同BLの集積率向上を確認している。この標的性と上述の無指向性US振動子を併用することで、標的治療への道が開かれるのではないかと期待される。

安全性の検討が課題

いままでの経頭蓋超音波血栓溶解療法をはじめとする、超音波血栓溶解療法はその有効性を強力に示唆するものであった。しかし、実際の臨床適応では診断用超音波装置を用いても、Eggersらの報告にみるように、出血率が増すというあらたな問題を招来していることも事実である。さらには300KHzの中周波数を用いた経頭蓋超音波血栓溶解法の臨床試験(TRUMBI-phase II)では90%を超す出血率を招き、そのうち1例は死亡し、結果的に同試験は中止となった¹²⁾という報告がある。しかもその症例中には梗塞領域内での出血ではなく、くも膜下出血や梗塞領域外の出血などがあり、t-PA固有の問題とは考えにくい超音波由来の障害性が指摘されている。

このような事実を踏まえ、中周波数帯超音波の臨床適応ではとくに、①音響学的安全性の検討、また、②医学生物学的安全性の検討を根本的に見直すことが要求されている。この2つの課題に対し内外の研究者が挑戦しさまざまに有益な結論を導いている。著者らはいち早くこの問題を解明して基本データを提供しているので、その一端を紹介しておく。

1. 音響学的安全性の視点から

TRUMBI試験の失敗は、頭蓋骨内で生じる音場の状態を十分理解していないことによって生じた

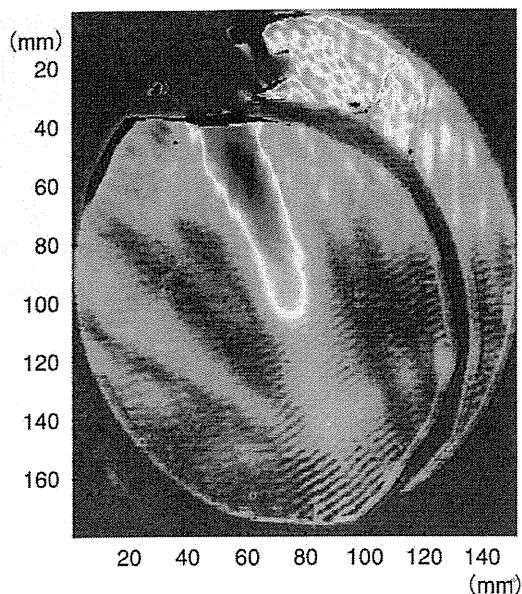


図 4 頭蓋内での多重反射と定在波の発生

と考えられる。中周波数超音波は減衰率が低く、頭蓋骨内で何度も反射を繰り返す。したがって、投入された超音波と反対側の頭蓋骨内面で反射された超音波が重なり合うことも、また思わぬところで(梗塞領域外で)多重反射したりビームが重なり合ったりすると考えられる(図 4)。

この重なりは音圧を増高させ、しかも空間的に同一の場所の局所音圧を高め続けることとなり、局所の高温度化、あるいはキャビテーションを発生させることとなる。その結果、脳細胞や血液脳関門(BBB)の損傷を惹起させ出血を誘発することに結びつく。この超音波ビームのつくりだす頭蓋内音場の状態は梗塞領域などにかかわりなく、どこにでも生じ、とくに頭蓋骨内面近くでは強い定在波が生じ^{13,14)}、くも膜下出血などに結びつくものと考えられる。

TRUMBI 治験失敗のもうひとつの大きな原因は、バースト波を十分理解しないで使用したことにある。バースト波は短い時間超音波を発射するが、その後は休止するという繰り返し照射法である。その平均音圧(1 周期全体の平均値)を弱く設定しても、300KHz の超音波を発射している時間の中で1 周期分のエネルギーを放射することとなり、パルス発射時間が短ければ短いほどその間の強度は高いものとなる。TRUMBI の場合は平均強度 $0.7W/cm^2$ であったが、300KHz の超音波の出ている

ときは $14W/cm^2$ で、さらに円形状の振動子の形状では中心で $28W/cm^2$ となっていると考えられる。さらに、その 300KHz の短い発射中の時間は 0.5 m 秒とたしかに短い、音速を約 1,500 m/sec と考えると、この発射時間の間、0.75 m、すなわち頭蓋骨内を 75 cm も進むこととなり、すくなくとも 3 回~4 回は頭蓋内で反射していたことになる。 $28W/cm^2$ が倍の $56W/cm^2$ あるいは 3 倍の $84W/cm^2$ になる瞬間があり、それも上述のように頭蓋内の同一部位に繰り返し発生していたものと考えられる。水中では約 $1W/cm^2$ でキャビテーションが発生するので、数十 W/cm^2 という強い超音波強度ではキャビテーションを局所に発生させ、細胞破壊、BBB 破綻が生じるのもいわば必然であったと考えることができる。

こうした頭蓋内音場を踏まえた安全な波形(パルス、バースト波、連続波)、周波数、強度、そして照射時間を考慮した安全性の探索を行い、最適化を図ることが必須である。

2. 医学生物学的安全性の視点から

急性虚血性脳卒中(AIS)患者の脳組織は塞栓されているために十分な酸素補給が行えず、きわめて苦しい酸欠状態にある。そのような状態の脳組織に超音波を照射した場合の安全性については十分に検討されていない。とくに中周波数帯の超音波の作用は未検討である。またさらに、t-PA 自体が BBB に対する毒性を有しており、虚血後の再灌流状態(虚血中の微小血流で末梢側へ流れる場合も含め)では、BBB の破綻による出血を招来しやすくしている。そのような危険な状態下にある BBB に超音波が安全かどうか、出血率を高めないかどうかはかならずしも明らかではなかった。またさらに AIS 患者は、その背景リスクとして高血圧や、脳動脈硬化の亢進状態があげられる。そのようなリスク因子に対し中周波数超音波はどのように影響を与えることになるのか、十分に検討された報告はなかった。

著者らは AIS 状態の高血圧自然発症ラット(SHR)やさらに脳卒中易発症ラット(SHR/SP)の高週齢を用いた病理組織学的・免疫化学的検討を行い、つぎのような結果を得ている。すなわち、強度では $0.3W/cm^2$ 以下、波形は連続波、照射はイ

ンターミット法(2分照射, 30秒休止)であれば, 60分照射しつづけても AIS 患者の脳は安全に保たれる, という条件を見出している。

次世代経頭蓋脳血栓溶解法への道標として

上述までの現状と次世代に向けた基礎研究の成果を踏まえると, AIS 患者に対する超音波脳血栓溶解法への期待が膨らんでこよう。ここに著者らの研究状況と世界の動向に鑑みた, 次世代治療のひとつのイメージを述べておきたい。

1. 頭部貼付型US振動子¹⁵⁾

救急救命的現場を想定すると, 医師, 看護師, 技師などへの負担の少ない治療法が求められる。これは, 初期治療開始時には 15 分間隔で神経症状評価をしなければならない現状を考え合わせれば必須の要件である。この現場の要求を満足させるには患者体動に影響されにくい形, すなわち患者の体動とともに動くことのできる患者頭部への貼付型振動子が有効と考えられる。すでにその着想の一部が公表されているのも¹¹⁾, その技術的実現性が見通しが得られつつあるからである。すくなくとも柔軟性素材である PVDF(ポリフッ化ビニルデン)を用い, 周波数を診断用 US の下限近くに設定できれば, 実用化の道は開かれる(図 5)。

ただし, 技術的可能性は安全性の確保と有効性向上に担保されねばならないので, その検討が今後の課題となろう。現在の形では血流再開通状態を監視する能力がないこと, また血栓塞栓部に対する標的性のないことが大きな問題となる可能性を含んでいる。

2. 標的照射可能な方式

虚血下の脳細胞に不要な超音波を照射することは極力避けねばならない。血栓標的性については, US ビーム集束性と併用薬剤の血栓選択性をもって実現しようとする基礎検討内容を前述した。後者の血栓選択的な RGD-BL と t-PA 結合法の課題は近々実現されるものとして, 丸山らの研究に期待するところ大なるものがある。問題はその製造であり, リポソームメーカー自体が国内にないからである。アメリカからの輸入になるかもしれないが, その実現性には期待が寄せられる。

前者の US ビーム集束性に関しては HIFU を用

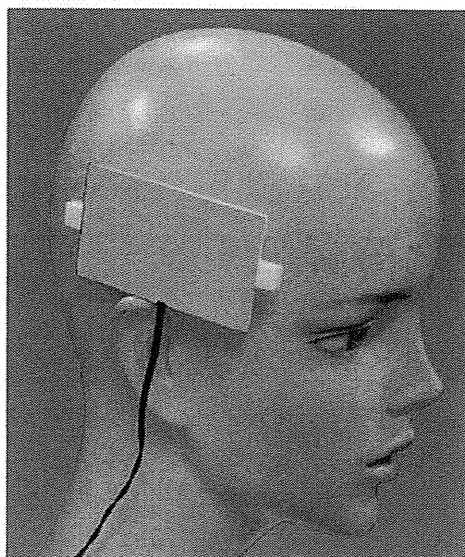


図 5 PVFによる貼付型振動子の例

い, かつ頭蓋骨の形状や厚さを考慮することで標的性は維持される。すなわち, XCT 像をもとに頭蓋骨の情報を得, それを踏まえた超音波ビームが発射できれば, 血栓標的が実現可能ではないかと考えられる。それゆえ, XCT 補正を念頭においた HIFU や MIFU の研究が欧米で進展しているのも事実で, おおいに期待される。

3. 高度な安全性確保

脳は霊長類を霊長類たらしめるもっとも重要な臓器であるがゆえに, その一部損傷が大きな医学的・社会的問題となることは当然であろう。したがって, 超音波伝搬経路内の脳組織の安全性確保はきわめて重大な課題である。虚血脳を守るはずの治療が副作用で脳に障害を惹起するなどということは論外である。

この観点から, 次世代治療技術は病的脳に対する安全確保と, しかるべき安全性に関する基礎データを有するものでなければならない。脳は, 循環と代謝という生化学的活動, 脳生理学的な神経伝達, さらに高次脳機能・精神活動へと連動する大組織である。その根底をなすライフライン救済が重要であることは当然であるが, その救済的治療技術が生命という, 複雑精緻な代謝, 神経活動, 精神活動などに悪影響を与えることがあってはならない。

その意味で, 超音波脳血栓溶解法は脳について多くの安全性情報を得ることによって他の各種超

音波脳治療法に関する礎を築くという研究課題をも含んでいる。この方面の Regulatory Science としての基礎データをいまこそ蓄積すべき段階ではないかと考えられる。

おわりに

本稿では、経頭蓋超音波脳血栓溶解法の次世代の展開の可能性を述べた。超音波治療技術としては脳神経系への DDS 制御や遺伝子治療¹⁶⁾などの展開がさまざま考えられ、ここでは割愛したが、すでに著者もその成果の一部を報告している。近い将来、神経保護、神経蘇生、再生、機能補助、さらには精神活動制御にも超音波が活用されるのではないかと想像するのは、愚かな夢物語であろうか。脳の不老化、脳死の回避などに関する基礎的研究と手を組んだ超音波新治療技術に、若い方々の参加を願わずにはいられない。

文献

- 1) 立花俊郎, 古賀悦子: ウロキナーゼのブースターとしての超音波応用. *血液と脈管*, **12**: 450-453, 1981.
- 2) Kudo, S.: Thrombolysis with ultrasound effect. *Tokyo Jikeikai Medical Journal*, **101**: 1005-1012, 1989.
- 3) 浜野研司: 経皮的超音波照射併用による血栓溶解療法の有用性に関する研究. *東京慈恵会医科大学雑誌*, **106**: 533-542, 1991.
- 4) 関口博仁: 超音波照射併用による新しい血栓溶解療法. *東京慈恵会医科大学雑誌*, **109**: 863-871, 1994.
- 5) Aaslid, R. et al.: Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. *J. Neurosurg.*, **57**: 769-774, 1982.
- 6) Alexandrov, A. V. et al.: Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.*, **351**: 2170-2178, 2004.
- 7) Eggers, J. et al.: Sonothrombolysis with transcranial color-coded sonography and recombinant tissue-type plasminogen activator in acute middle cerebral artery main stem occlusion: Results from a randomized study. *Stroke*, **39**: 1470-1475, 2008.
- 8) Carlos, A. et al.: Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke*, **34**: 425-429, 2006.
- 9) 古幡 博: 医用画像ハンドブック. オーム社, 2010, pp.1158-1168.
- 10) 古幡 博: 超音波による血栓溶解. *最新医学*, **63**: 92-104, 2008.
- 11) 佐口隆之・他: 超音波による血栓溶解. *日本内科学会雑誌*, **98**: 1320-1324, 2009.
- 12) Daffertshofer, M. et al.: Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia: increased risk of hemorrhage with combined ultrasound and tissue plasminogen activator: results of a phase II clinical trial. *Stroke*, **36**: 1441-1446, 2005.
- 13) Baron, C. et al.: Simulation of intracranial acoustic fields in clinical trials of sonothrombolysis. *Ultrasound Med. Biol.*, **35**: 1148-1158, 2009.
- 14) Azuma, T. et al.: Bubble generation by standing wave in water surrounded by cranium with transcranial ultrasonic beam. *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44**: 4625-4630, 2005.
- 15) Saguchi, T. et al.: Effective and safe conditions of low-frequency transcranial ultrasonic thrombolysis for acute ischemic stroke: neurologic and histologic evaluation in a rat middle cerebral artery stroke model. *Stroke*, **39**: 1007-1011, 2008.
- 16) Manome, Y. et al.: Application of therapeutic insonation to malignant glioma cells and facilitation by echo-contrast microbubbles of levovist. *Anticancer Res.*, **29**: 235-242, 2009.

* * *

脳梗塞慢性期治療とアストロサイト—神経再生への挑戦

安井 麻里子 田口 明彦

はじめに

従来、脳梗塞慢性期におけるアストロサイトの増殖は、脳梗塞周囲におけるグリオシスの主因であり、その増殖や活性化は神経機能再生の観点からも抑制すべきであると考えられてきた。しかし、近年アストロサイトが血管内皮細胞と神経細胞を介し、微小循環や代謝調節、シナプス機能などにも重要な役割を果たすことが明らかにされ、神経細胞、血管内皮細胞およびアストロサイトを一つの機能単位ととらえた Neurovascular Unit という概念が提唱されるとともに、その生理的および病理的意義の解明が進んでいる。本稿では、脳梗塞後の神経再生における Neurovascular Unit の役割について概説するとともに、現在国立循環器病研究センターで進めている、Neurovascular Unit の再生を目指した細胞治療の現状を報告する。

神経再生療法としての神経幹細胞移植

米国においては脳梗塞慢性期患者に対して、神経幹細胞の局所移植による脳梗塞再生療法の臨床試験が実施されてきた。1998年よりピッツバーグ大学においてヒト奇形癌細胞由来の神経幹細胞が実施されてきたが、コントロール群に比して有意な神経機能の向上を示すことができなかった。また1999年よりハーバード大学において、胎児ブタ由来神経幹細胞を使った臨床試験が行われ、慢性期脳梗塞患者の基底核に局所ブタ神経幹細胞移植が行われたが、有意な機能改善を示した患者はおらず、また局所神経幹細胞移植後に脳静脈血栓症を発症した患者が発生したため、臨床試験は中止となった。基礎研究レベルでも神経細胞への分化能を有する神経幹細胞移植実験が広く行われているが、臨床試験へと発展させるだけの十分な治療効果が確認されておらず、神経幹細胞だけに注目した再生医療の限界が示唆されている。

脳血管障害とアストロサイト

脳血管障害時には血管内皮細胞が障害されるとともに、アストロサイトのエンドフィートが血管内皮より離脱し、血液脳関門が破綻することが知られている。また、

やすい まりこ 国立循環器病研究センター/脳神経内科
たぐち あきひこ 同 免疫制御研究室室長
1284

脳梗塞慢性期においては脳梗塞周囲でアストロサイトが過剰に増殖し、神経の回復や発育を妨げるグリオシスを引き起こす一方、物理的なバリアとして炎症反応の広がりを抑制していると考えられている。しかし、近年アストロサイトにはこのような物理的な神経組織保護作用だけでなく Neurovascular Unit の主要構成細胞として、脳微小循環・脳神経代謝調節やシナプス機能の維持・再生にも重要な役割を果たしていることが明らかにされており、Neurovascular Unit を構成する細胞群のコントロールによる治療法開発が進められてきた。

神経機能再生を目標とした Neurovascular Unit の再生

脳梗塞後には内因性神経幹細胞が脳梗塞周囲へ動員・誘導されるが、微小血管網を中心とした幹細胞ニッチが脳梗塞周囲に存在しないため、誘導された神経幹細胞はほと

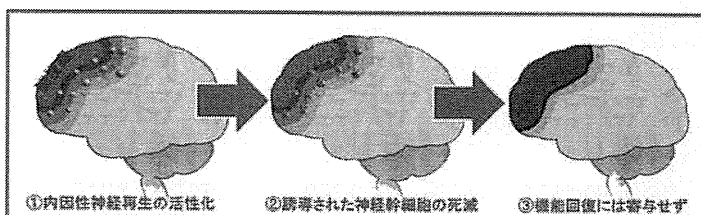


図1 脳梗塞後の内因性神経幹細胞の誘導

① 脳梗塞後には内因性の神経再生が活性化され、脳梗塞周囲に神経幹細胞が動員されるものの、② 微小血管網を中心とした幹細胞ニッチが脳梗塞周囲に存在しないため動員されてきた神経幹細胞は生着することができず、③ 神経機能回復にも寄与できない。

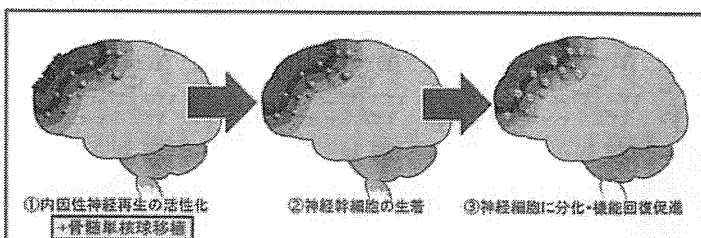


図2 血管再生による神経再生促進のメカニズム

① 脳梗塞周囲に神経幹細胞が動員される時期に骨髄単核球細胞を投与することにより、② 脳梗塞周囲領域において血管再生が誘導され、神経幹細胞の生着に不可欠な幹細胞ニッチを形成し、③ 再生血管上で生着・成熟した神経幹細胞が神経機能回復を促進する。

0289-0585/11/¥500/論文/JCOPY

んど生着せず、機能回復にも貢献できないことが知られている¹⁾(図1)。ヒト脳において、グリア細胞は神経細胞の10倍程度存在するが、アストロサイトは神経細胞を物理的に支持しているだけでなく、グルコース代謝物であるピルビン酸や乳酸などのエネルギー基質を神経細胞に供給するとともに、神経幹細胞の遊走・分化・成熟・シナプス形成過程にも関与していることが明らかにされてきた。また、脳微小循環の制御においてもアストロサイトは神経細胞の活性化を感知しエンドフィートを紹介して微小循環を調節していることが明らかにされており、神経再生・神経機能再生においてもアストロサイト・血管内皮細胞を中心とした血液脳関門の再生が重要であるとわれわれは考え、基礎的研究を行ってきた。その結果、① 脳梗塞後の造血系幹細胞の血管内投与は幹細胞ニッチとなり得る血管再生を促進すること、② 脳梗塞後の血管再生が内因性神経幹細胞の生着に必須であること、③ 造血系幹細胞投与による脳梗塞後の血管再生は、脳神経組織および脳神経機能の再生を

もたらすこと、を明らかにしてきた²⁾(図2)。また、造血系幹細胞投与により再生された微小血管網においても、炎症系細胞の脳実質内への浸潤や血液内に存在するタンパクの漏出などは認められておらず、アストロサイトに裏打ちされた血液脳関門が再生していると考えている。

これらの知見を基に、国立循環器病研究センターでは脳梗塞亜急性期における Neurovascular Unit の再生を目的とした細胞治療に関するプロトコルを作成し、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」による認可を受けた後、臨床試験を開始している。その概略を図3に示す。2010年8月に6症例の低用量治療群が終了し、低用量群終了後に独立症例委員会(委員長:大阪大学医学部附属病院臨床試験部 山本洋一准教授)を開催した。それぞれの症例における問題の検討を行い、細胞治療プロトコルや細胞治療に伴う有害事象に関して特に問題となるものがないとの判断で、現在高用量群のエントリー患者における臨床試験を継続している。細胞治療の治療効果に関しては、入院時・細胞治療時における神経機能予後の予想よりかなり良好な経過をたどった症例や、細胞治療後に明らかに脳循環・脳代謝が改善した症例などがあるが、統計学的な検討に関しては、全12症例終了時に臨床研究グループとは独立した臨床統計家(兵庫医科大学医学部 大門貴志講師)により解析を進めていく予定である。

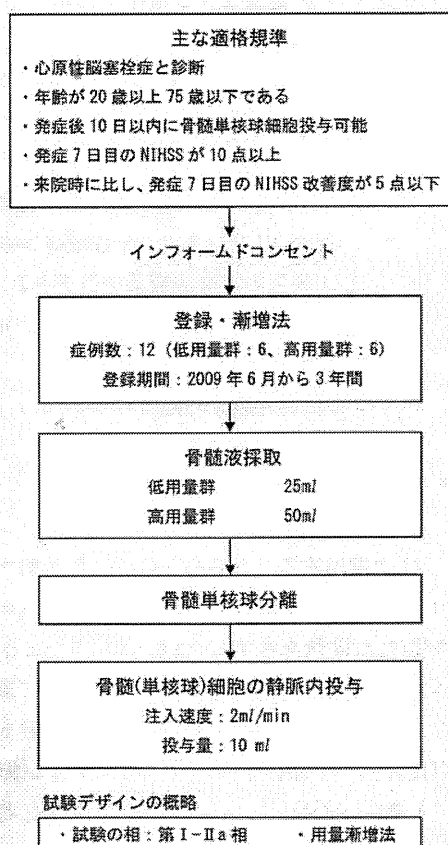


図3 自己骨髄細胞を用いた細胞治療の概略
試験の相としては第I-IIa相試験に該当し、安全性および有効性の検証を行っている。

Neurovascular Unit の再生の今後の展望

脳梗塞後の機能回復は慢性期には困難であると考えられてきたが、慢性期脳梗塞患者におけるリハビリテーションの有用性が報告されていることから、ヒト脳においても十分な可塑性が存在している可能性が示唆されている。今や「一度失われた脳機能は二度と回復しない」のではなく、失われた脳神経機能の再生も可能であるとわれわれは考えている。国立循環器病研究センターでは、神経幹細胞、血管内皮細胞およびアストロサイトから構成される Neurovascular Unit の再生を起点とした神経機能再生治療の確立にむけた基礎研究を継続して実施しており、現在の自己骨髄単核球移植による細胞治療を、さらに有効でより普遍的な治療法へと発展させるための挑戦を続けている。

文献

- 1) Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature Med.* 2002; 8: 963-70.
- 2) Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest.* 2004; 114: 330-8.

特集1

神経系におけるiPS細胞 iPS細胞の活用も含めた神経機能修復の現状と将来

脳梗塞患者に対する自己骨髄幹細胞治療 を用いた臨床試験

たぐちあきひこ 国立循環器病研究センター再生医療部 (〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1)
田口明彦 E-mail: taguchi@ri.ncvc.go.jp

SUMMARY

我々は胎生期の神経再生や成体カナリアにおいて、神経幹細胞の移動や分化・成熟は血管新生と平行してプログラムされていることに着目し、血管再生と神経再生に焦点をあてて研究を行ってきた。その結果、脳梗塞後の血管再生が神経幹細胞の動員を促進するだけでなく、その生着および成熟に必須であり、さらに脳梗塞後の血管再生が脳神経機能の著明な改善をもたらすことを明らかにしてきた。これらの知見を起点とし、国立循環器病研究センターではマウスおよびカニクイザルを用いた前臨床試験を行い、それらの成果を基に2009年より重症脳梗塞患者を対象とした自己骨髄幹細胞を用いた細胞治療の臨床試験を開始している。

▶ はじめに

わが国は高齢化社会を迎えており、それに伴う身体障害者の急激な増加は深刻な社会問題である。平成20年度の厚生労働白書によると、要介護3以上のほぼ全介助が必要な患者数は169万人であり、そのうちの約1/3に相当する55万人は脳血管障害が原因疾患とされている。しかし、脳梗塞に対する確立された治療法は、現状では発症3時間以内における血栓溶解療法のみであり、治療可能期間の長い新規治療法の開発が切望されている。

自己骨髄単核球細胞を用いた細胞治療は、四肢虚血患者や心筋梗塞患者を対象とした臨床試験においては、血管再生を介したその治療効果が報告され、他の虚血性疾患への適応の拡大が示唆されている。本稿では、我々が実施してきた脳梗塞に対する細胞治療に関する前臨床試験での結果、臨床試験の現状およびその将来像に関して紹介する。

▶ I. 脳梗塞に対する細胞治療の前臨床試験

①再現性の高い脳梗塞モデルの作成

既存の脳梗塞動物モデル(永久閉塞モデル)は、脳梗塞サイズの再現性が低く、脳梗塞後の長期生存率も低いため、一過性脳虚血モデルが汎用されてき

KEY WORDS

神経再生
血管再生
脳梗塞
細胞治療
幹細胞

た。しかし一過性脳虚血による遅発性神経細胞死 (apoptosis) が主体の神経障害と、重度の虚血による神経細胞死 (necrosis) は本質的に全く異なる病態であり、一過性脳虚血モデルで著効を示した多くの薬剤も脳梗塞患者における臨床試験ではほとんど無効であった。そこで我々は、再現性および生存率の高い脳梗塞モデルの作成を試み、CB-17 マウスおよび SCID マウスにおいて中大脳動脈 M1 遠位部を直視下で焼灼・切断することにより、長期生存率がほぼ 100% かつ中大脳動脈灌流領域の皮質部位に常に一定の脳梗塞を生じる非常に再現性の高い脳梗塞モデルができることを発見・報告した¹⁾(図 1)。

②骨髄幹細胞移植の治療効果

脳梗塞作成 48 時間後のマウスに対し、骨髄幹細胞 (造血系幹細胞) を尾静脈より単回投与し、血管再生の促進効果、内因性の神経再生促進効果、脳組織再生効果および神経機能再生効果に関して検討を行った。その結果、①脳梗塞後の造血系幹細胞投与は梗塞周囲における血管再生を促進する、②脳梗塞後の血管再生は内因性の神経再生を誘導し、かつその生着に必須である、③造血系幹細胞投与による脳梗塞後の血管再生は、脳神経組織の再生を誘導する、④脳梗塞後の血管再生による脳組織再生は脳機能の再生をもたらす、

ことを世界に先駆けて明らかにしてきた^{2,3)}。さらに、造血系幹細胞を骨髄から動員する作用のある G-CSF の投与においては、予想とは逆に脳萎縮や神経機能が低下することを明らかにした⁴⁾。

また、治療時期に関する検討では、脳梗塞後 2, 4, 7, 10 日および 14 日後の造血系幹細胞投与において、脳梗塞巣の減少および行動の改善を認めたが、脳梗塞後 1 日および 21 日後においてはこれらの改善効果を認めなかった。これらの結果は内因性の神経幹細胞の動員など組織修復機構が活性化されている時期においては細胞投与による効果が期待できるものの、脳梗塞発生直後や脳梗塞慢性期においては細胞治療による効果がほとんど期待できないことを示している。

③霊長類脳梗塞モデルにおける検討

超選択的カテーテルを用いて脳梗塞モデルを作成し (カニクイザル：合計 5 匹)、脳梗塞作成 7 日後に自己骨髄単核球細胞を静脈より投与した。投与骨髄単核球の体内分布を検討するため、骨髄単核球細胞を FDG でラベルし、細胞投与 3 時間目における FDG 陽性細胞の分布を観察した。投与された細胞群は脾臓に多くの集積がみられるものの、肺にはほとんど集積が見られなかった。また一部は頭部における集積も観察された。さらに、骨髄単核球投与前後における末梢血中

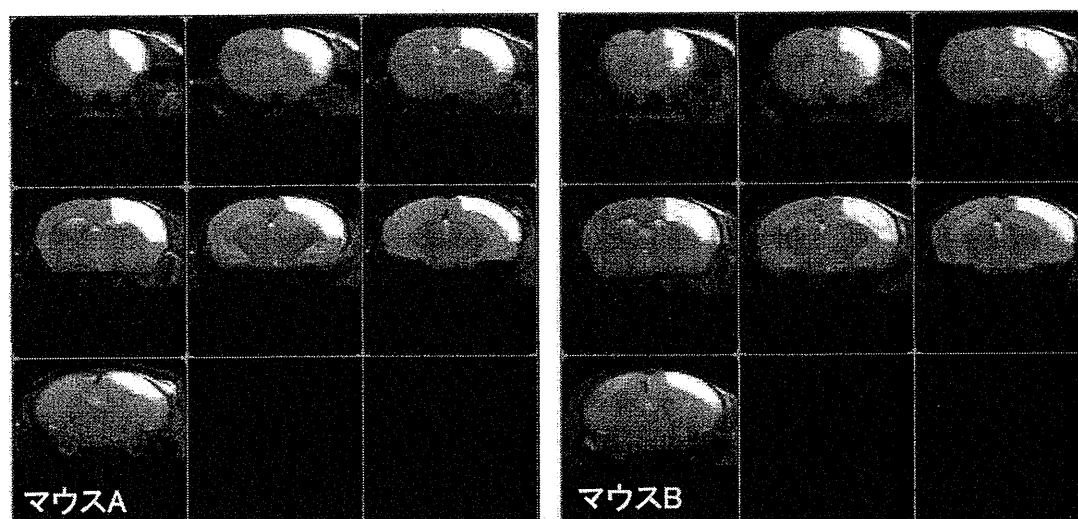


図 1 再現性および長期生存率の非常に高い脳梗塞モデルマウスの確立

CB-17 マウス (あるいは SCID マウス) の中大脳動脈 M1 遠位部を直視下に焼灼・切断することにより、非常に再現性が高くかつ長期生存率もほぼ 100% 上となる脳梗塞モデルを確立した。MRI による個体間の評価においても、中大脳動脈皮質灌流領域の全く同じ部位に脳梗塞が誘導されることが観察される (文献 1) より引用・改変)。

CD34 陽性細胞数の定量的評価では、細胞投与1時間後においても末梢血中 CD34 陽性細胞数の約 2.5 倍の増加が観察された。脳梗塞後の経時的神経学的評価においては、細胞投与後に順調な機能回復が観察され、また細胞投与に伴う神経症状の悪化や脳出血は認められなかった。

④脳梗塞患者における神経再生に関する病理的検討

脳梗塞患者における神経再生に関する病理的検討を行い、神経再生のピークはそれぞれ脳梗塞数日から2～3週間後であり、マウスにおける脳梗塞後の再生過程と類似していることを明らかにした⁵⁾(図2)。これらの所見は、ヒトにおいても脳梗塞急性期-亜急性期において内因性神経幹細胞誘導が起こることを示して

おり、ヒトにおける血管再生療法の可能性を示す重要な所見であると考えている。

II. 脳梗塞患者に対する細胞治療の臨床試験

自己骨髄単核球を用いた微小血管再生・組織修復促進を目的とした治療法は、四肢虚血性疾患で有効であるだけでなく^{6,7)}(図3)、虚血性心疾患においても欧州での二重盲検試験において、すでにその有効が報告されている⁸⁾。国立循環器病研究センターでは、国内外での細胞治療に関する臨床試験の知見、および我々が得た前臨床試験でのデータを基に、脳梗塞患者に対する細胞医療に関するプロトコルを作成し、厚生労働

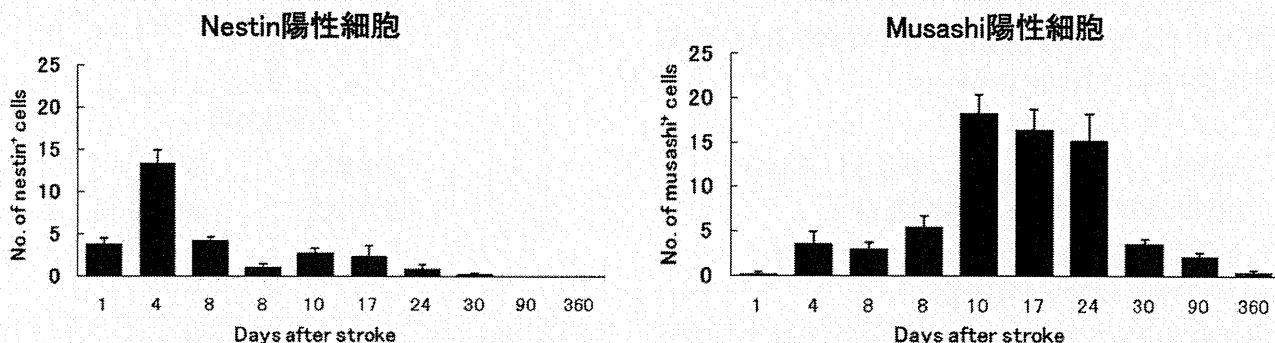


図2 脳梗塞患者における神経再生

心原性脳塞栓症患者における脳梗塞周囲部病理切片の検討では、脳梗塞発症数日後に Nestin 陽性細胞、および約 10～20 日後に Musashi 陽性細胞出現のピークが観察された(文献5)より引用)。

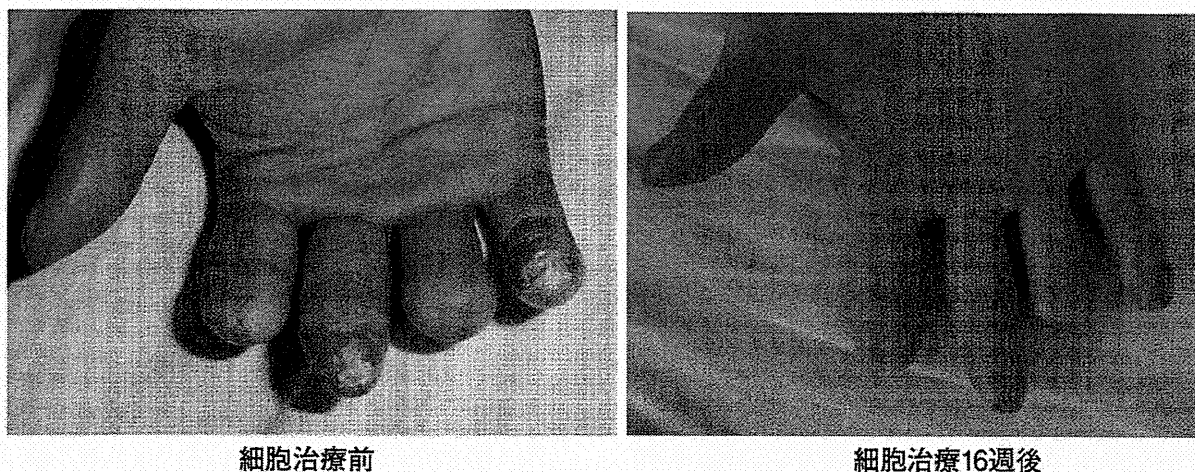


図3 細胞治療による手指の虚血性潰瘍の治癒

極めて難治性の潰瘍が細胞治療後約4週間でほぼ消失し、その後も良好な経過をたどり移植16週後には完全に治癒した(文献6)より引用)。

省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」による認可を受けた後、平成 21 年臨床試験を開始している。プロトコルの概略を図 4 に示す。

①選択基準および除外基準

＜主な選択規準＞

- ・心原性脳塞栓症と診断されている。
- ・年齢が 20 歳以上 75 歳以下である。
- ・発症後 7 日目の時点で NIHSS が 10 点以上である。
- ・来院時に比し、発症 7 日後の NIHSS 改善度が 5 点以下である。
- ・発症後 10 日以内に骨髄単核球細胞採取が可能である。

本臨床試験では重症の心原性脳塞栓症症例で、かつ脳梗塞後 1 週間後においても神経機能回復が十分でなく極めて不良な予後が予測される患者群のみを対象としており、今回の臨床試験においてはその安全性に関する検討を中心に行っている。

②プライマリエンドポイント

- ・脳梗塞 7 日後と比し投与 1 ヶ月後における NIHSS 悪化症例の頻度（安全性）
- ・脳梗塞 7 日後と細胞投与 1 ヶ月後における NIHSS の改善度（有効性）

今回の臨床試験においては対照群としてコントロール群を設定せず、国立循環器病研究センター脳卒中内科データベースに含まれる症例で、本臨床試験の適格基準に合致する患者群を対照データとして用いる。

③臨床試験の現況

平成 22 年 8 月に 6 症例の低用量治療群が終了したが、第 1 症例、第 2 症例および低用量群終了後に独立症例委員会（委員長：大阪大学医学部附属病院臨床試験部 山本洋一 准教授）を開催し、それぞれの症例における問題の検討を行った。その結果、細胞治療プロトコルや細胞治療に伴う有害事象に関して、特に問題となるものがないとの判断で、現在高用量群のエントリー患者の募集を開始している。細胞治療の治療効果に関しては、入院時における神経機能予後の予想よりかなり良好な経過をたどった症例や、細胞治療後に明らかに脳循環・脳代謝が改善した症例などがあるが、統計学的な治療効果の検討に関しては、全 12 症例終了時に外部の臨床統計家（兵庫医科大学医学部 大門貴志 講師）により解析を進めていく予定である。

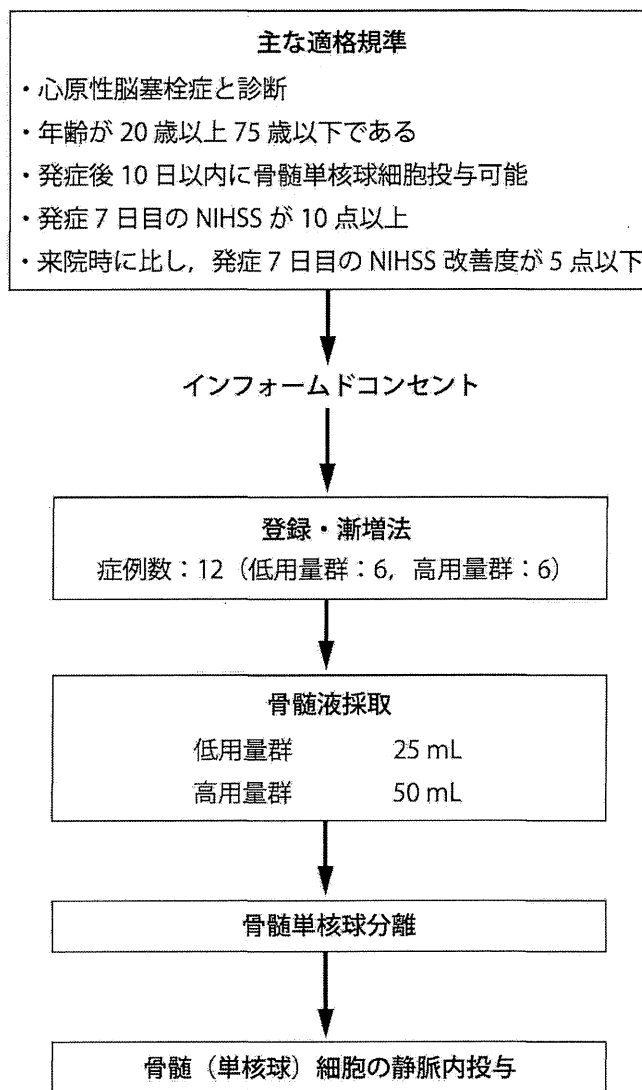


図 4 細胞治療の臨床試験の概略

重症心原性脳塞栓症患者を対象に、発症 7～10 日後に骨髄細胞を採取し、造血系幹細胞が含まれる単核球分画の分離後静脈内投与を行う。2010 年 8 月に低用量群を終了した。

III. 脳梗塞患者に対する細胞治療の今後の展望

現在我々が推進している臨床試験の主眼は、重症脳梗塞患者群における安全性の検証であるが、今回の研究（Phase1/2a 臨床試験）によりそれを実証することができると考えている。また、本治療法は脳梗塞周辺領域における内因性神経機能修復機構の活性化を目的としているため、その治療機序から神経障害がより軽

度の患者群において、さらに強い治療効果が期待できると考えており、現在、治療対象群を拡大した多施設共同臨床試験（Phase2b 試験）に向けたプロトコールを作成中である。さらに国立循環器病研究センターでは、セルプロセッシングセンターが不要で、かつ操作が非常に簡単な細胞治療用骨髄単核球精製デバイス開発を行っており（特願 2010-175056）、このようなデバイスの臨床試験も並行して行っていくことにより、脳梗塞・循環器疾患に対する骨髄単核球細胞を用いた治療法を、より効果的で、より普遍的な細胞治療として全国・世界に普及させていくことができると考えている。

参考文献

- 1) Taguchi A, et al : A reproducible and simple model of permanent cerebral ischemia in CB-17 and SCID mice. *J Exp Stroke Transl Med* 3 : 28-33, 2010.
- 2) Taguchi A, et al : Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 114 : 330-338, 2004.
- 3) Nakano-Doi A, et al : Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. *Stem Cells* 28 : 1292-1302, 2010.
- 4) Taguchi A, et al : Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model. *Eur J Neurosci* 26 : 126-133, 2007.
- 5) Nakayama D, et al : Injury-induced neural stem/progenitor cells in post-stroke human cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 31 : 90-98, 2010.
- 6) Taguchi A, et al : Therapeutic angiogenesis by autologous bone-marrow transplantation in a general hospital setting. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 25 : 276-278, 2003.
- 7) Tateishi Y, et al : Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 10 : 427-435, 2002.
- 8) Schächinger V, et al : Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 27 : 2775-2783, 2006.

胎児期水頭症 診断と治療ガイドライン 改訂2版

編集 胎児期水頭症ガイドライン編集委員会

胎児期水頭症の診断に関わる最新の知見、治療方針などをまとめた国内唯一のガイドライン。胎児の将来と家族の支援に携わる医療者にとって、正確な診療情報を伝える際にも役立つ1冊。

A5判・268頁・定価4,410円(本体4,200円+税5%) ISBN978-4-7653-1455-8



株式会社金芳堂

京都市左京区鹿ヶ谷西寺ノ前町 34 番地 〒606-8425
Tel 075-751-1111 Fax 075-751-6858

E-mail (営業部) : eigyo@kinpodo-pub.co.jp
<http://www.kinpodo-pub.co.jp/>

心原性脳梗塞患者に対する 自己骨髄単核球を用いた細胞治療

Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for stroke patients



田口 明彦

Akihiko Taguchi

独立行政法人国立循環器病研究センター再生医療部

Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center

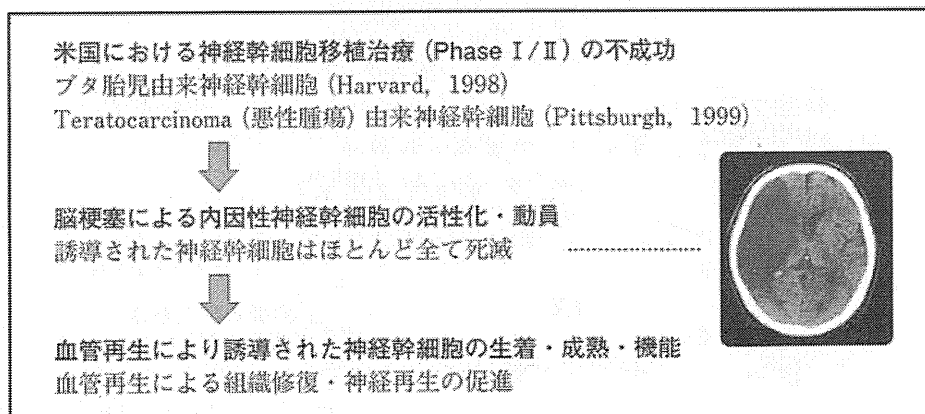
1. 脳梗塞の治療ターゲットは血管

我々は、脳梗塞の治療ターゲットは血管であると考えて実験をしてきました (Fig. 1). Harvard 大学ではブタ胎児由来の神経幹細胞移植が行われ、あるいはPittsburgh 大学ではteratocarcinoma (悪性腫瘍) 由来の神経幹細胞移植が行われてきましたが、効果がないことが報告されています。また、基礎研究においても神経幹細胞移植のみではほとんど機能回復が得られないことが知られています。そこで、我々は内因性神経幹細胞の活性化とその利用が脳梗塞治療に一番有効である可能性が高いと考え、研究を行ってきました。脳梗塞後に内因性に誘導された神経幹細胞は、神経組織

修復を促進し神経機能を向上させることを目的に誘導された神経幹細胞ですので、それを使えばきっとよくなるだろうというのが我々の出発点でした。

しかし、誘導された神経幹細胞はほとんど全てが絶滅してしまい、機能回復には貢献しないことが海外の報告からも明らかにされており、そこで、誘導された神経幹細胞をどうやって生着・成熟させ、機能させるかが課題になりました。我々が注目したのは胎生期の神経発生です。神経幹細胞の新生においては、新生血管上で分化して成熟して機能するということが報告されてきました。また、ソングバードが春になるたびにさえずるのは、毎年、神経再生が起こっているからですが、その神経再生においても、再生神経幹細胞が、新生血管

Fig. 1 脳梗塞後の細胞治療のターゲットは血管



上で生着して分化し機能することがわかってきました。このような知見より、脳梗塞後に血管を誘導してやれば、内因性に誘導された神経幹細胞がうまく生着して成熟し、機能するはずだと考えたのです。

2. バージャー病での骨髄単核球投入例で血管新生

それでは、ヒトではどうすれば微小血管の誘導ができるのでしょうか。私が国立大阪南病院にいた時の患者で、バージャー病のため非常に強い虚血症状があり、手指の切断が不可避であると考えられた方がいらっしゃいました。こうした症例に対しては、骨髄細胞を採取し、その中の単核球を分離して患肢に筋注するという治療法が2000年頃から始まってきていました。この患者に自己骨髄単核球を用いた治療法を実施したところ、移植前は治る見込みがなく切断が不可避であると考えていたのが、移植4週間後には少なくとも虚血の痛みがなくなってきました。その後、外来のフォローを続けると、16週後にはほとんど潰瘍がなくなりました。ですので、少なくとも骨髄の単核球細胞を移植すると、ヒトにおいても血管新生が起こり、虚血が治ることがわかってきたのです。さらに、この患者の血管造影を見ると、移植前は

全く手指の血管が造影されませんでした。移植3カ月後には映るようになっており、皮膚灌流圧も経皮的酸素分圧もかなり上昇しています。つまり、骨髄単核球細胞をうまく使えば末梢循環が改善することは、ヒトにおいても明らかであると我々は考えました。

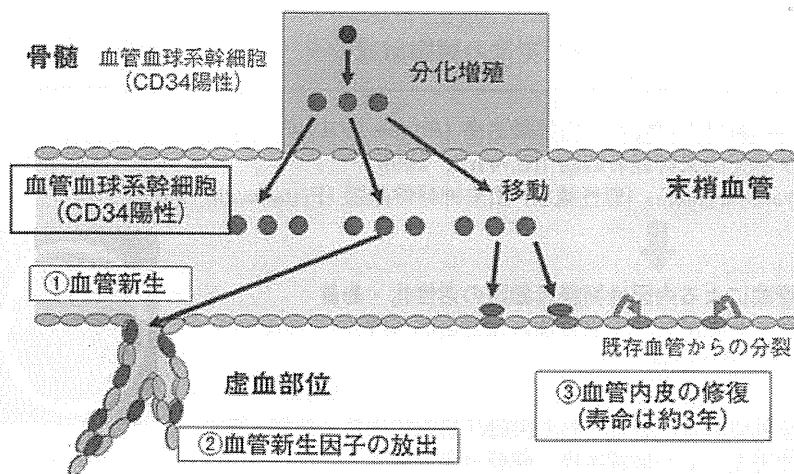
では、どのようなメカニズムでそうなるのでしょうか (Fig. 2)。骨髄中には血管血球系の幹細胞や造血性の幹細胞があって末梢血誘導をしており、虚血部位で血管内皮細胞になったり、あるいは血管新生因子を出したりします。また、通常の血管内皮細胞の寿命は大体3年ですが、こういう細胞は血管内皮細胞に分化したり傷害された微小循環を修復する機能があることがわかっていましたので、こうした細胞をうまく使えば、きっと脳にも血管ができるだろうと考えました。

そこでまず、このような治療法が本当に脳梗塞に効くのかどうかに関し、動物モデルを使って検討してみました。

3. モデルマウスで再評価

まず、我々は再現性の非常に高い脳梗塞モデルを確立しました。脳梗塞の治療薬はいろいろな薬剤の臨床試験が行われましたが、ほとんど全ての薬剤は無効でした。その最大の理由として、確立

Fig. 2 血管血球系幹細胞と血管のメンテナンス



田口明彦, *Clin Neurosci*, 2009.