

図 B3-1. 高精度光学的血栓厚測定装置

＜血栓溶解実験用セル材質＞

血栓溶解実験に用いるセルは 0.025mm 厚の PP（ポリプロピレン）製シートを用いて、正方形のシート状血栓が作成できるように製作した。昨年度までは、1.5mm 厚のアクリル板によるセルからコイン状血栓を作成していたが、本年度より PP に変更している。PP シートはアクリル板より超音波の透過性が良く、この素材変更により吸光度測定時の S/N 比を大幅に改善する事に成功している。

＜脱気方法＞

作成した血栓において、キャビテーション（後述）の影響を抑えると共に、超音波の透過性を高める目的から、次の方法を用いてあらかじめ脱気を行った。

脱気する溶液をガラスチューブに入れ、真空ポンプ（DTC-60;アズワン,大阪市）を接続し、チューブ内圧を 10kPa 以下に保つと共に、チューブ底面を振動装置に押し当てて攪拌した。チューブ内圧は圧力計で確認し、以上の状態を 15 分間維持して脱気の完了とした。

B-4.比較群

溶解促進率の算出にあたり、次の 2 群を設定した。

①rt-PA 溶液

上記フィブリン塊の上に 5.8ml の rt-PA 溶液（(3)記載の方法で脱気済）を注入した群。その濃度は 1800IU/ml（約 1.35mg/ml）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。

なお、両群共に処置後 30 分時の血栓厚につい

て比較した。溶解促進率は下の式のように定義した。

$$\text{溶解率} = \left(\frac{\text{US 併用時の溶解量}}{\text{rt-PA 単独適用時の溶解量}} - 1 \right) \times 100$$

上記の式より得られる溶解促進率を、4 種類の周波数ごとに求めた。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 rt-PA の溶解効果が得られることを確認したからである。

C. 研究成果

C-1. 超音波強度と血栓溶解促進率

血栓溶解実験において、超音波出力強度（W/cm²）と溶解促進率（%）の関係を、周波数 400kHz、600kHz、1MHz、2MHz の 4 群において示した（図 C1a～C1d）。その結果、各群とも、図から明らかなように溶解促進率が超音波強度の上昇に従い直線的に増加し、溶解促進率と超音波強度がほぼ比例関係にあることが示された。この時、各群の実験結果に対する回帰直線の相関係数 R は平均 0.989 ± .98 も相と極めて高い値を示した。最も相関係数が高かったのは 400kHz（R=0.996）であった。最も低かったのは 600kHz（R=0.982）で、グラフは僅かながら二次曲線的な折れ線となった。また、各周波数の近似直線の傾きについては、傾きが最も大きかったのは 600MHz（0.56）であった。最も低かったのは 1MHz（0.34）であり、他の周波数と比べ、やや特異的に低値を示した。この低い傾きは 600kHz の傾きに比べ、約 60%を呈するもので、1MHz 近傍に特異的な血栓溶解阻害効果のありえる事が示唆されないとも限らない。しかしながら、本実験では、牛フィブリン塊 1 つで 1 つの結果を出しているため、牛フィブリン塊の製作過程、保存過程の影響を無しとしない。その為、牛フィブリン塊の数を増やした結果をさらに加えて検討することが今後必要である。以上の結果から、上記 4 周波数における溶解促進率は、超音波強度依存性であり、直線的あるいはそれに近い比例関係にあることが明らかとなった。

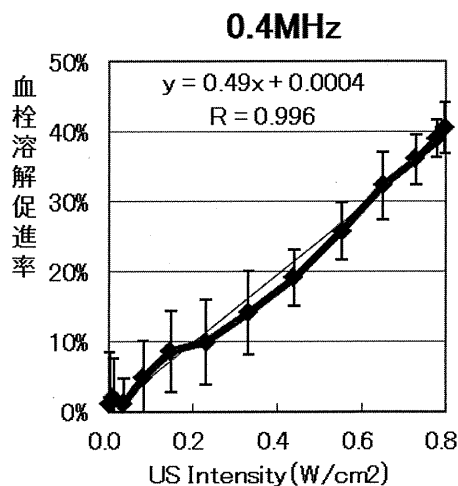


図 C-1a. 超音波強度と溶解促進率 (400kHz)

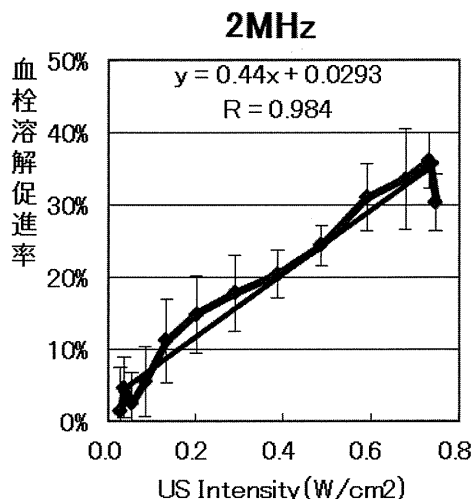


図 C-1d. 超音波強度と溶解促進率 (2MHz)

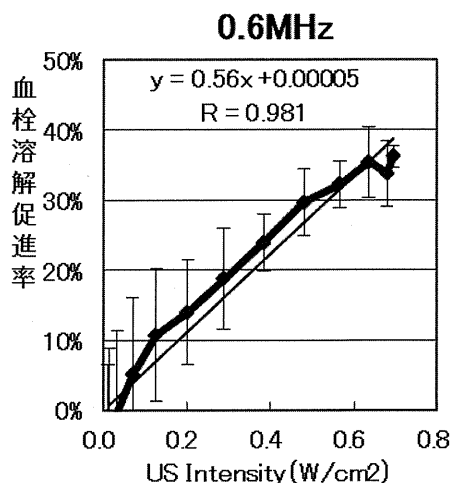


図 C-1b. 超音波強度と溶解促進率 (600kHz)

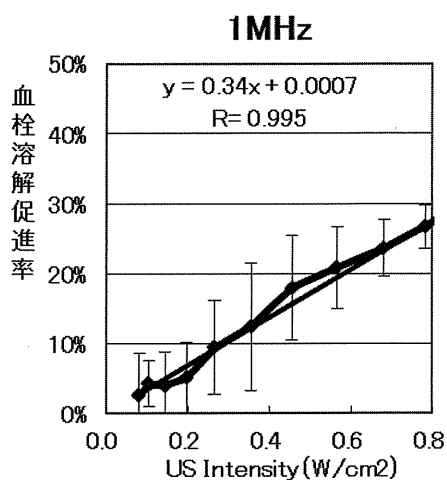


図 C-1c. 超音波強度と溶解促進率 (1MHz)

C-2. 溶解促進率と周波数の関係

C-1 で得られた結果をもとに、図 C-2 に溶解促進率と周波数の関係を示した。ここでは超音波強度 0.1W/cm²、0.3 W/cm²、0.5 W/cm² の3群について、それぞれの溶解促進率と周波数の関係を比較した。その結果、超音波強度ごとの溶解促進率の平均値は、0.1W/cm²、0.3 W/cm²、0.5 W/cm² の各群について、それぞれ 5.3±1.6%、14.5±2.9%、23.6±4.5%となった。図から明らかのように、周波数と溶解促進率から得られるプロットは超音波強度が高くなるほど高い位置となり、各群間の差は一定であった。このことから、超音波強度が高くなるほど溶解促進率が比例的に増加することがここでも示された。周波数依存特性は、図から明らかのごとく、各強度において、1MHz では、やや特異的に低地を示すが、これをあえて除いてみると、溶解促進率には周波数依存性の無い事が示唆される。しかし1MHz の超音波では、C-1 でも述べた通り、溶解促進率が低く、超音波周波数に対し、特異的に阻害効果の存在し得るような傾向が示された。すなわち、溶解促進率は周波数に依存しない傾向を示すが、1MHz 近傍の超音波の場合には、何らかの特異的な阻害傾向の存在する事が考えられた。

以上の成果は、適用牛フィブリン塊の例数が少ない為、統計学的に優位なことは未だ言えないが、rt-PA による血栓溶解効果は併用す

る超音波により、その強度依存的に上昇する事が明らかとなった。一方、この血栓溶解効果には、超音波の周波数に依存しない傾向が認められた。但し、周波数 1MHz 近傍では、溶解促進率の低下が認められた。

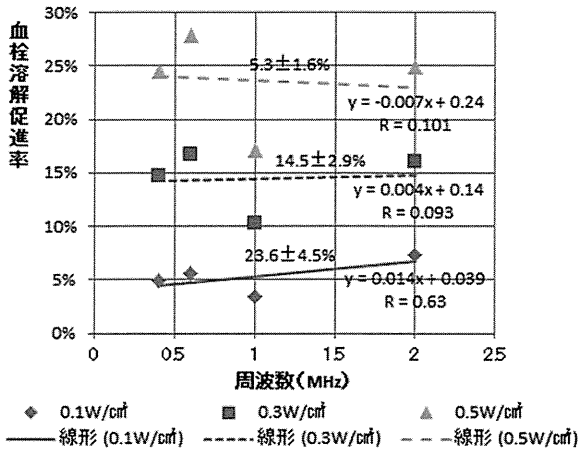


図 C-2. 溶解促進率と周波数の関係

D. 考察

上述の通り、我々は本年度の実験によって、超音波周波数と血栓溶解効果の関連について、血栓溶解効果が超音波周波数に影響しないということを初めて明らかにした。後述する通り、この成果は経頭蓋的超音波脳血栓溶解装置の臨床実現を達成する上で極めて重要な知見である。以下、我々のこれまでの成果を踏まえ、本研究の結果について考察する。

前年度、我々は rt-PA 単体の血栓溶解効果について、rt-PA 濃度依存的な直線的比例関係を示した。また、500kHz の中周波数超音波を用いて、超音波強度と溶解促進率の関係について、若干非線型ではあるものの、その比例関係を導いた。そして、それらの結果を元に rt-PA 濃度、溶解促進率、溶解率（生理食塩水の溶解率に対する rt-PA の溶解率）の 3 要素からなるノモグラムを作成し、臨床上安全な強度である 0.3W/cm² の超音波を使用した時、超音波非照射時と比べ、rt-PA の用量を 2/3 に減らしても同等の血栓溶解効果を得られることを示した。

これに対し本年度では、実験精度を向上させた事で、超音波強度と溶解性に、ほぼ直線的な比例関係があることを見出した。また、

超音波周波数と血栓溶解効果の関係について検証し、血栓溶解は周波数に依存しない事を示した。以下に、これらの成果について詳しく述べる。

D-1-1. 超音波強度と血栓溶解促進率の関係

C-1 で述べた通り、本実験により、我々はこの周波数においても超音波強度と溶解促進率がおおむね直線的な比例関係にある事を明らかにした。前年度の我々の報告では両者の関係について非線形な比例関係を示したが、その報告の中でも述べた通り、当時の実験系は実験精度の面で課題を残しており、溶解曲線の非線形性は実験誤差によりもたらされた可能性が否定できなかった。そこで、本研究では、上述のように血栓作成用セルの材質および形状を改善したことで吸光度 S/N 比を大幅に改善する事に成功した。今回得られた、超音波強度と溶解促進率の直線的比例関係を示す実験結果は、その高性能なセルによりもたらされたものであり、より信頼性の高い成果であると考えられる。

以上のように、本研究により超音波強度と血栓溶解促進率の比例的関係が示されたが、血栓溶解促進率に関するさらなる検証として、今後、超音波の分子作用としての粒子速度 (V) と血栓溶解促進率の関係についても明らかにする必要がある。超音波により血栓が溶解する現象に関しては、超音波強度よりも粒子速度の方がより直接的な要素であると言えるからである。C-1 で述べたように、600kHz の条件では相関係数 R は 0.981 と高かったものの、グラフは僅かながら二次曲線的な折れ線を描き、完全な直線的比例関係は認められなかった。このグラフに対し、粒子速度と溶解促進率の関係を示したグラフでは、さらなる直線的関係が現れると期待される。直線性に関するデータを得ることは、臨床適用の際の超音波条件をより高精度に決定する上で欠かせぬ事項である。

D-1-2. 超音波周波数と血栓溶解効果の関係

C-2 において、我々は 3 つの異なる超音波強度 (0.1・0.3・0.5W/cm²) について、周波数を 400kHz、600kHz、1MHz、2MHz にした時のそれぞれの溶解促進率を示した。

ここで注目すべき事は、各群とも周波数ご

との溶解促進率に大きな変化が無かった事である。この結果は、溶解促進率が周波数に依存しない事を示唆するものであり、以前の我々の報告(2007, Ultrasound Med Biol)や Behrens 等の報告(2001, Ultrasound Med Biol)で示された実験結果に反するものである。今回のような結果をもたらした主な要因として、我々は、後述する通り、キャビテーションによる影響を防ぐ工夫を施した事、すなわち実験精度を向上させた事をここでも挙げる。今回の、溶解促進率が周波数に依存しない事を示す実験結果は、500kHz 前後の中周波数帯域が、診断用メガヘルツ帯と比較して同等の血栓溶解効果を持っている事を示すものである。後に述べるように、この成果は、最適な溶解効率の有効性と医学生物学的な安全性等を担保する周波数条件を見出す上で欠かせぬ重要な知見である。

D-2-1. 実験方法の改善

本成績において、周波数依存特性が著明に見られなかった事は、従来の *in vivo* 動物実験における中周波数超音波の血栓溶解効果の優位性を否定するものである。このような、周波数依存性の無い超音波による溶解促進率の上昇は、その実験方法に起因する事が少なからずあったものと考えられる。ここでまず、溶解促進率に影響する要素に rt-PA 濃度が含まれない事について述べておく。

前年度、我々は、臨床適用規準をベースに、rt-PA 濃度 0.2~0.9mg/kg の範囲で実験を行った。それに対し本年度では、測定時の S/N 比向上を優先する考えから、1.35mg/kg (1800IU) にあえて濃度を引き上げて実験を行っている。その理由は、昨年度報告した通り、超音波併用による rt-PA 血栓溶解効果の促進効果は、rt-PA 濃度に依存しないからである。したがって、今回の、溶解促進率に関する測定結果は rt-PA 濃度とは関係が無いと言える。

但し、本年度の実験においては、血栓溶解法に関する実験方法に従前の方法と異なる点がある。以下、この点について少しく述べる。

本実験で改善した事は、血栓作成時に用いる血漿の脱気方法である。超音波照射実験を行う際に血栓の脱気が不十分であると、超音

波により血栓内に気泡が瞬間的に発生・消失を繰り返す可能性が高い。そのとき生ずる局所のキャビテーションは微小ながら強力な周囲組織に対する破壊効果を招く為、フィブリンネットの断裂や周囲の rt-PA 溶液循環に影響を与えると考えられる。すなわち、フィブリンネットに対する溶解効率を向上させる結果となり、最小化されたフィブリンに対し rt-PA 溶液がその効果を発揮しやすくし、結果的に溶解率上昇を招くと考えられる。それゆえ、脱気が不十分であると、それを核にしてキャビテーションの増殖が起こり、溶解効率は益々増強されると考えられる。その事が従来の中周波数における溶解率増高の一因ではなかったかと考えている。なぜなら、同じ音圧であっても、周波数が低ければ低いほど、細胞引き裂き聴力は増し、Mechanical Index 値は増加し、結果的にキャビテーションを発生し易いという傾向が超音波本来の性質にあるからである。この、周波数が低い程キャビテーションを発生し易いという特性が、脱気不十分な溶液の中では相乗的に作用すると考えられ、それが従来の基礎研究成果に大きく関与していたのではないかと考えられる。本実験では、この点を回避する為に、出来る限り脱気を徹底して行うようにした。その事が、結果的に、周波数依存性の無い溶解効果特性というもの(図 C-2)に示されたと考えられる。ここで改めて B(3)で述べた脱気方法について強調しておきたい。この方法は脱気を完全に行う事を目的に設計したものであり、シリンジ等を用いた比較的簡素な方法と比べ遥かに強力だけでなく、一定の圧力で繰り返す事が出来る。この強力かつ安定的な脱気方法は、今回の我々が行った周波数別の溶解実験において、キャビテーション発生リスクを最小化するという意味で、その信頼性を大きく担保する役割を持つものである。

以上の方法により、我々は今回、超音波自体の血栓溶解促進効果を高精度に測定する事に成功した。但し、超音波照射時における脱気率と溶解効果の関係については未検証である為、今後検証していく必要がある。

E. 結論

本年度は、昨年度に引き続き、超音波併用

による血栓溶解効果促進に関する基礎的データを積み上げ、その臨床応用に対する基本的超音波条件の選択に関する次のような結論を得た。

(1) 血栓溶解効果増高評価法としての測定手技を改善し、その制度を一層高めた。ポイントは、牛フィブリン塊を用いる光学的な溶解率測定法に供する試料の脱気を徹底的に行う事を新たに追加し、試料に存在する微小気泡を出来る限り除去した状態で、超音波条件と周波数依存性について明らかにした。この技術的改良が、昨年度とは異なる成績を示す原因とはなかったが、本年度の成績こそは、実用化に向けての正確な指針を示すものとなった。すなわち、(2) 超音波による溶解効果の促進率(rt-PA 単独投与時の溶解率からの上昇率)は、超音波の強度にほぼ依存し、比例的に上昇することを昨年と同様に明らかとした。ただし、その上昇率は、昨年度 500kHz に比べ、本年度の4周波数(400kHz、600kHz、1MHz、2MHz)においては低値を示し、促進率の上昇は昨年の報告 55%の約 1/3 程度に留まった。(3) 4周波数(400kHz、600kHz、1MHz、2MHz)における溶解率の促進は1MHzを除けばほぼ均一で、周波数依存の低い傾向を示すものであった。ただし、1MHzではその促進率は他の周波数における最大上昇率に比べ、約 60%に留まっており、1MHz近傍における特異的な溶解率抑制という周波数依存特性の存在を示唆するものとなった。

(4) 臨床におけるヒト頭蓋骨を介した血栓溶解法を実現する際には、超音波の頭蓋骨における減衰特性を考慮する必要がある。一般に頭蓋骨における減衰特性は周波数の上昇に対して反比例的であり、周波数が低ければ低いほど透過率が良い事になる。それゆえ、上記(3)に述べたように、中周波数数百キロヘルツ(400kHz、500kHz、600kHz)を採用すれば、頭蓋骨における超音波減衰は少なく、溶解効率は十分有効な音響強度を確保し得る事になる。すなわち、診断用メガヘルツ帯の溶解効率よりも、頭蓋骨の減衰率の低い分だけ、有利に作用する事となる。(5) 上述のような、本 in vitro 実験成績から、音響強度依存の周波数依存性(頭蓋骨の減衰を考慮)な経頭蓋超音波脳血栓溶解法の臨床実現とその

有効性が一段と明瞭となった。したがって、実用機開発としては、脳組織に対する安全性の確保しやすい高周波特性(温熱特性のみとなる)と共に、頭蓋骨透過率の良い低周波数超音波との trade-off の領域として、数百キロヘルツが最適な溶解効率の有効性と医学生物学的な安全性等を担保し得る周波数条件となる。

以上、本基礎研究は、臨床機開発における根本的な超音波条件として、まず第一に、従来からの中周波数領域、とりわけ、500kHzを中心とする周波数帯域の活用が有用である事を示した。また、音響強度依存的な溶解率上昇特性を踏まえて患者の病態に適応した照射強度制御能力を持たせる事が第二の重要機能である事を明瞭にした。この二条件を満足する臨床機こそは、経頭蓋的超音波脳血栓溶解装置の臨床実現を達成する基本条件と言う事が出来る。本結論は、最終年度に得られた画期的な提言であり、実用機に向けての本質的な開発要素を決定する事に成功した。これは、直ちに臨床機に活用し得る成果と考えられる。

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事が出来た。

1. 超音波による促進率(但し 500kHz 連続波)は、強度依存性であり、臨床適用上の安全限界範囲(0.3 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事が出来、臨床研究推進の為の治療戦略的検討に供し得る。

3. 音響強度 0.3 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 0.6mg/kg 、欧米では 0.9mg/kg)の 2/3 の用量、即ち 0.4mg/kg 、あるいは 0.6mg/kg に低用量化しても十分な溶解効率の得られる事が示唆される。

但し、上記の結論は 500kHz 連続波という一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繋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 Alteplase 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、米国治験 HIPOTRIAS と比較の出来る形にする。

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事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

- Zuojun Wang, Takahiro Fukuda Takashi Azuma Hiroshi Furuhata. Safety of Low-Frequency Transcranial Ultrasound in Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in Spontaneously Hypertensive Rats: Cerebrovascular Diseases, 33, 23-29, 2012
- Yoshikazu SAWAGUCHI, Zuojun WANG, Hiroshi Furuhata:Ultrasound control of the growth of thrombus -Potential for the embolus growth suppression & the reocclusion prevention-, Jpn J Med Ultrasonics Vol.38 No.4, 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

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

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

バブルリポソーム併用超音波血栓溶解療法の研究

研究分担者 丸山一雄 帝京大学薬学部・教授

研究要旨

血栓溶解療法において、tPA に超音波およびマイクロバブルを併用することで血流再開通率が大幅に上昇することが報告されており、このメカニズムには、超音波、マイクロバブルが血栓のフィブリンネットワークを強力に振動させることによる作用であると考えられている。このことから、血流再開通率を向上させる方法として、我々が独自に開発したバブルリポソームの応用を考えた。そこで、活性化血小板上に高発現する GP IIb/IIIa 分子と特異的に結合する RGD ペプチドをリポソーム表面に修飾した血栓標的型バブルリポソームを新規に開発し、in vitro において、血栓結合性に関する基礎検討を行った。その結果、RGD-バブルリポソームは活性化血小板に結合し、超音波診断装置で造影することが出来た。

A. 研究目的

虚血性疾患の治療では、t-PA、超音波、マイクロバブルの三者併用時に血流再開通率が最高値を示す。そのメカニズムは、血栓を形成しているフィブリンの網目構造が超音波の振動作用と超音波によるバブルの振動作用によって開口し、t-PA の血栓浸潤を促進させるためである。その際、バブルを血栓に集積させることが出来れば、より効率的に血栓溶解を促進できると推察される。ここで、パーフルオロプロパンを内封した超音波造影剤であるバブルリポソームの血栓への集積を高めるため、ターゲティング分子（RGD）で修飾した新規造影剤を開発し、その有効性について検討した。本検討では、血栓に高発現する GPIIb/IIIa 分子と高親和性を持つ RGD ペプチドを修飾した RGD-バブルリポソームの開発を行った。

B. 研究方法

1. RGD-バブルリポソームの調製

脂質組成を DSPC: DSPE-PEG-Mal: cholesterol = 12.5: 5.1: 3 (mg) とし、クロロホルム 4 mL に溶解させ、ジイソプロピルエーテル 4 mL と PBS 4 mL を加え、バス型ソニケーターで攪拌した。その後、エバポレーターを用いて逆相蒸発法によりリポソームを調製した。これを凍結融解し、エクストルージョン法により粒子径

を 100-200 nm とした。ここに、1 mg の CGGGRGDF を添加し室温で 2 時間反応させた。

DSPC: 1,2-distearoyl-sn-glycero-phosphatidyl
choline

DSPE-PEG-Mal: 1,2-distearoyl-sn-glycero-
3-phosphatidylethanolamine-methoxypolyethyleneglycol maleimide

RGD (CGGGRGDF): cysteine-glycine-glycine-
glycine-arginine-glycine-aspartic acid-
phenylalanine

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

2. C₃F₈ ガス封入量の測定

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

3. 粒子径の測定

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

4. RGD-バブルリポソームによる超音波造影効果

PBS が5 mL 入ったゴムチューブを脱気した水中に入れ、超音波診断装置(9 MHz)を用いて観察した。

5. 血小板結合活性

ADP で血小板の活性化を行い、血小板の活性化を血小板活性化マーカーであるCD62P 抗体を用いて確認および選定を行った。選定した活性化血小板に蛍光色素を内封したRGD-バブルリポソームが結合するかをフローサイトメトリーで検討した。また、試験管内に血栓を形成させ、RGD-バブルリポソームと一定時間接触させた後、洗浄して超音波造影によって結合性を検討した。

C. 研究結果

1. RGD-バブルリポソームの粒子径と超音波造影効果

平均粒子径は 591.5 ± 230.3 nmであった。

In vitro において、超音波診断装置を用いて測定すると、白色の輝度が上昇し、造影効果のあることが確認された。

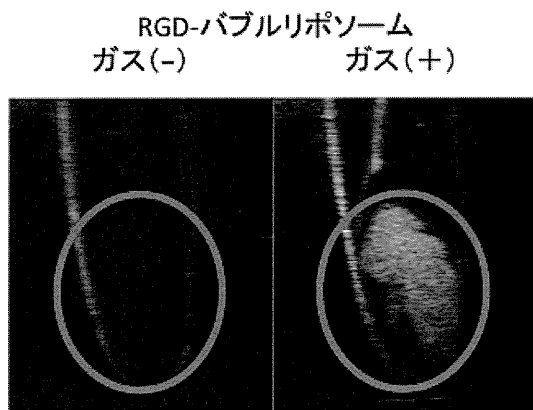


Fig. 1 RGD-バブルリポソームの超音波造影効果

2. RGD-バブルリポソームの活性化血小板結合能

RGD 未修飾のバブルリポソームの血小板結合率は7.1%

RGD-バブルリポソームの血小板結合率は33.7%となり、RGD-バブルリポソームが顕著に活性化血小板に結合することが確認された。(Fig. 2)

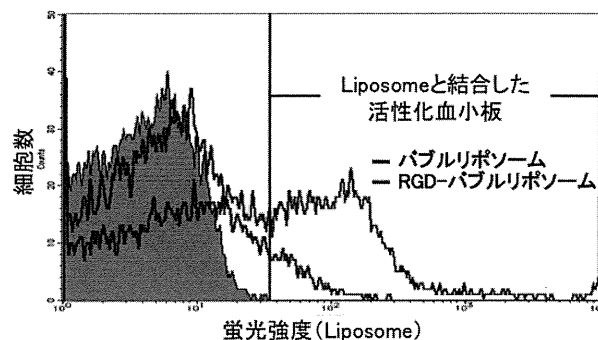


Fig. 2 RGD-バブルリポソームの血小板に対する結合性

RGD-バブルリポソームは、Fig. 3 に示すように血栓に結合し、超音波造影によって確認することが出来た。白い輝度が、RGD-バブルリポソームが血栓に結合していることを示している。現在、治療用超音波による血栓破壊について検討中である。

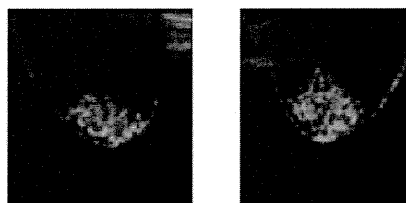


Fig. 3 RGD-バブルリポソームの試験管内血栓に対する結合性と超音波造影

D. 考察

RGD-バブルリポソームの調製法を確立することが出来た。RGD-バブルリポソームは活性化血小板に結合し、造影効果も認められた。これによって、通常の診断用超音波装置で血栓を可視化するための、血栓をターゲットィングする分子標的性バブル製剤を開発することが出来た。本研究では実施できなかったが、RGD-バブルリポソームの静脈内投与、動脈血栓の造影が可能になると考えられる。RGD-バブルリポソームを用いて通常の診断用超音波装置で血栓を可視化しつつ、低周波超音波照射を組み合わせ、診断と同時に行なう非侵襲的

血栓破碎治療が可能と考えられ、次へのステップに重要な知見を得ることが出来た。

□RGD-バブルリポソームを用いれば、冠動脈血栓のみならず、脳血管内血栓についても血栓の描出と破碎が可能と考えられる。また、非侵襲的診断・治療の構築のためには、診断用超音波の描出能改善と治療用超音波の一体化が必要であると考ええる。

□

E. 結論

活性化血小板上に高発現するGP IIb/IIIa 分子と特異的に結合するRGD ペプチドをリポソーム表面に修飾した血栓標的型バブルリポソーム (RGD-バブルリポソーム)を開発した。In vitro において、血栓結合性に関する基礎検討を行った結果、RGD-バブルリポソームは活性化血小板に結合し、造影能を有していた。治療用超音波による血栓破壊については、現在検討中である。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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

経頭蓋カラードプラ法における探触子頭部固定具の開発

研究協力者 遠藤 薫 国立循環器病研究センター 脳血管内科 医師
研究分担者 古賀 政利 国立循環器病研究センター脳卒中集中治療科医長
研究協力者 鈴木理恵子 国立循環器病研究センター脳血管内科医師
研究分担者 山本 晴子 国立循環器病センター先進医療・治験推進部部長
研究分担者 峰松 一夫 国立循環器病研究センター副院長

研究要旨

目的：超急性期脳梗塞に対する超音波血栓溶解法を施行する上で、実際の照射またはモニタリングのため、探触子を一定時間頭部に固定する必要がある。現在、経頭蓋カラードプラ探触子頭部固定具はその固定の難しさから市販されていないため、有限会社アンリミット・ジャパンと共同で開発を試みた。過去に頭部固定型およびベッド固定型の双方より開発を行っていたが、ベッド固定型は機器が大型であり、また、血栓溶解療法を必要とする患者は急性期脳梗塞による意識障害に伴い従命困難、長時間の安静が困難であるため頭部固定型の方針とした。2010年4月に作成された試作機を基に2011年3月に試作2号機が完成した。主な改良点は①スプリングを用いた頭部密着機構、②ダイヤル式ヘッドバンドによるヘルメットの頭部固定、③3関節アームによるワイヤー式のロック機構(特許申請中)、④スナップフィット型のホルダーによる探触子のアームへの固定であり、実用に値するものとなった。今後、さらなる改良を行い、臨床に応用していく方針である。

A. 研究目的

超急性期脳梗塞に対する超音波血栓溶解法を施行する上で、実際の照射またはモニタリングのため、探触子を一定時間頭部に固定する必要がある。現在、経頭蓋カラードプラの探触子頭部固定具は市販されているが、カラードプラ探触子はより大型であり固定困難であることから頭部固定具は市販されていない。今回我々は有限会社アンリミット・ジャパンと共同で経頭蓋カラードプラ探触子頭部固定具の開発を試みた。

B. 研究方法

頭部固定型の頭部固定具の試作機を我々の要望に沿ってアンリミット・ジャパン側が作成し、実際に試用しながら改善を試みた。

(倫理面への配慮)

患者への使用またはサンプル採取は一切行っておらず、必要ないと考えられた。

C. 研究結果およびD. 考察

過去に頭部固定型およびベッド固定型の双方より開発を行っていたが、ベッド固定型は固定具が大型であり、また、血栓溶解療

法を必要とする患者は急性期脳梗塞による意識障害に伴い従命困難、長時間の安静が困難であるため頭部固定型の方針とした。2010年4月に最初の試作機を作成した。探触子は重いため頭頂部より吊り下げ式を採用し、ボールジョイント3か所にて可動性を確保した。本試作機では固定性は比較的良好であったが、画像の良好な描出のためには側頭部に探触子を押し付ける必要があり、仕様の調整が必要と考えられた。また、アームが固く、スムーズに動かす使用が必要と考えられた。2011年3月に試作2号機が完成した。改良点は①スプリングを用いた頭部密着機構、②ダイヤル式ヘッドバンドによるヘルメットの頭部固定、③3関節アームによるワイヤー式のロック機構(特許申請中)、④スナップフィット型のホルダーによる探触子のアームへの固定であり、自在なコントロールを可能とした。

E. 結論

頭部固定具の方針としてベッド上固定型よりも頭部固定型の方がより長時間の安定性を確保できると考えられ、試作機を開発した。実用に耐えうる固定具が完成し、今後臨床応用を進めていく。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1、遠藤 薫、古賀政利、佐藤和明、鈴木理恵子、山本晴子、豊田一則、古幡 博、峰松一夫
経頭蓋カラードプラ法における探触子頭部固定具の開発. 第14回日本栓子検出と治療学会、2011年11月19-20日、仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働省科学研究費補助金医療技術実用化総合事業
低侵襲的低周波超音波脳血栓溶解法の
効果増高に関する臨床応用基盤研究

経頭蓋カラードプラ法における探触子頭部固定具の開発

遠藤 薫¹⁾、古賀政利²⁾、佐藤和明¹⁾、鈴木理恵子¹⁾
山本晴子³⁾、豊田一則¹⁾、古幡 博⁴⁾、峰松一夫¹⁾

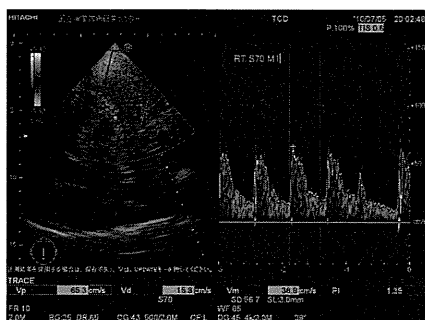
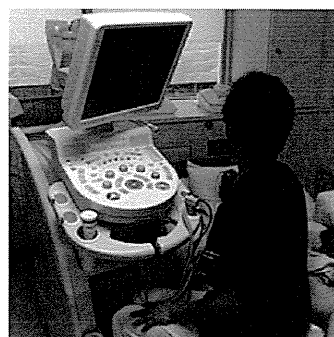
国立循環器病研究センター

1)脳血管内科、2)脳卒中集中治療科、3)先進医療・治験推進部
東京慈恵医科大学

4)総合医科学研究センター医用エンジニアリング研究室

背景

経頭蓋カラードプラ法(TCCS)は
ベッドサイドにて頭蓋内主幹
脳動脈の血行動態を評価できる

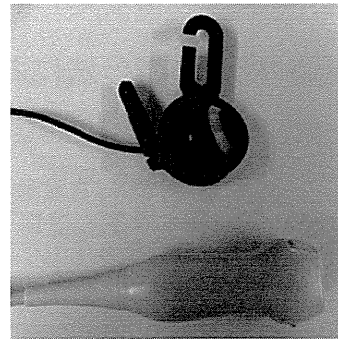


経頭蓋ドプラ(TCD)と比して
血管の解剖学的位置も
視認でき、より簡便に
目標血管を同定できる

背景

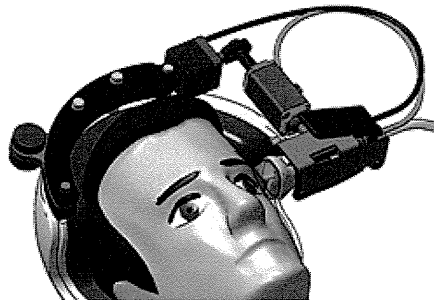
TCCSで用いられるセクタ型探触子はTCD探触子と比して大きく重い

⇒急性期脳梗塞における閉塞血管の再開通評価のような一定時間のモニタリングにおいても現状では用手的に施行されている



目的

- TCCS用セクタ探触子の頭部固定具の新規開発を試みる



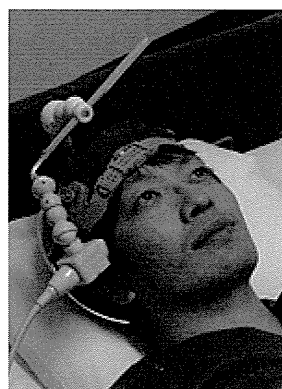
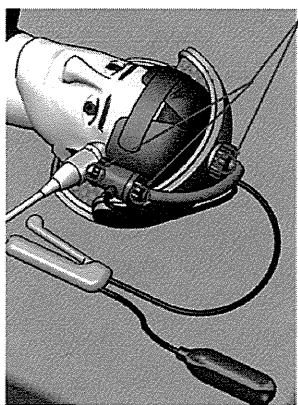
方法: ベッド固定型か、頭部固定型か?

2009年頃までベッド固定型で開発

- 大掛りな装置、可動に圧縮空気が必要
- 患者の頭部の動きに対応できない

⇒ ヘルメット頭部固定型へ開発を変更
(有)アンリミット・ジャパンと共同開発

ヘルメット試作型1号

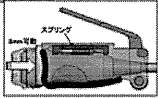


- 頭頂部より吊り下げ式を採用
- ボールジョイント3ヶ所で可動性を確保

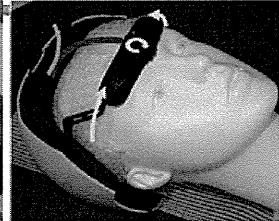
- 実験では固定性は良好
- 良好な描出のために頭部に押し付ける仕様を検討
- アームをスムーズに動かすための仕様を検討

ヘルメット試作型2号

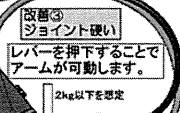
改善①
位置決め後、滑いてしまう
固定後、プローブが離れないように
スプリングでプローブが可動します。
操作するときは少し押し付けるような
動作になります。
押し付けは200g程度を想定。



改善②
固定しにくい
ダイヤル方式で調節の機構を繰り返します。



改善③
ジョイント硬い
レバーを押下することで
アームが可動します。
2kg以下を想定



改善④
プローブ固定がしにくい
プローブはスチーフな材質の
ホルダーに固定します。
(RV5アタッチメントのような物)



結論

- TCCS用セクタ探触子の頭部固定具を開発した
- さらなる改良を行い、臨床に応用していく

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

低侵襲的低周波超音波脳血栓溶解法の臨床導入に向けた体制構築

研究分担者	古賀 政利	国立循環器病研究センター脳卒中集中治療科	医長
研究協力者	鈴木 理恵子	国立循環器病研究センター脳血管内科	医師
研究協力者	遠藤 薫	国立循環器病研究センター脳血管内科	医師
研究分担者	山本 晴子	国立循環器病センター先進医療・治験推進部	部長
研究分担者	峰松 一夫	国立循環器病研究センター	副院長

研究要旨

近年、急性期脳梗塞のrt-PA静注療法時に経頭蓋ドプラー（TCD）や経頭蓋カラードプラー（TCCS）が血栓溶解の促進作用を有する報告が集積されている。一方で、300kHzバースト波超音波装置を用いると出血性合併症が増えることが報告された。古幡らは前臨床研究で500kHz連続波を用いた超音波血栓溶解技術では安全かつ有効に血栓溶解療法を行うことができることを示してきた。我々の施設では、急性期脳梗塞に対して超音波血栓溶解技術の臨床治験を受け入れるために緊急時の迅速な診療体制と、良好な院内連携を構築してきた。

A. 研究目的

1. 急性期脳梗塞における血栓溶解療法の効果を促進することが期待される超音波血栓溶解技術の臨床治験に向け受入可能な体制作りをする。

B. 研究方法

国立循環器病研究センターで超音波血栓溶解技術の臨床治験をスムーズに行えるように、TCDおよびTCCS検査の普及に努める。

超急性期のアルテプラゼ（rt-PA）による血栓溶解療法を行う場合には、可能な限り治療前に閉塞血管の評価を行う。

頭頸部主幹動脈に閉塞を認める場合には血栓溶解療法の治療効果判定のために治療後早期に再開通の有無を評価する。

また、治験推進で必須となる脳血管内科および脳神経内科、看護師、放射線科、臨床検査技師、治験推進部による院内連携体制を構築する。

（倫理面への配慮）

TCCSは日常診療の範囲で行う検査である。患者から採取された試料を用いない研究であり、

被験者からインフォームド・コンセントを受けることを必ずしも要しない。

C. 研究結果

現在、我々の施設に所属する脳血管内科レジデントおよび専門修練医は脳卒中診療を習得するための後期研修を受けており、脳卒中診療の第一線で診察や検査を担当している。各々のレジデントは担当する虚血性脳卒中患者を必ずTCDもしくはTCCS検査で評価し、積極的にTCDやTCCS検査の技術習得に努めている。良好な側頭骨窓がある場合には、中大脳動脈を中心に主幹動脈の閉塞や狭窄の有無を評価している。また、大動脈原性や頸動脈狭窄からのartery to artery塞栓性機序、心臓内の右左シャントからの奇異性脳塞栓症が疑われる場合には微小塞栓（high intensity transient signal/microembolic signal）のモニターやバルサルバ負荷試験を行っている。3年間（専門修練医は2年間）のレジデント期間中、1年次終了時にはTCDおよびTCCS検査技術を習得出来ている。

発症3時間以内に来院する虚血性脳卒中では可能な限り頭部MRI/MRAによる血管閉塞

部位の評価を行っている。原則として来院時収縮期血圧が180mmHg未満の50歳以上の患者では脳出血の可能性が高くなく、頭部CTを施行せずに頭部MRI/MRAのみで評価すること（CTスキップ）により検査時間の短縮に努めている。

TCCS検査で血栓溶解療法開始時に閉塞血管を評価し、評価可能な場合には同療法終了時に再開通の有無を調べている。また、血栓溶解療法後の追加治療として効果の期待出来る経皮経管的脳血栓回収用機器（MERCIRリトリーバー、Penumbraシステム）が使用できるようになったため、平成22年10月からは内頸動脈、中大脳動脈水平部（M1）、中大脳動脈分枝（M2）、椎骨動脈、脳底動脈閉塞がある場合には血栓溶解終了時点（治療開始から約1時間）で再度MRI/MRAによる評価を行い閉塞血管の再開通の有無を評価している。特にM1閉塞例の再開通に関するデータは今後治験を導入するときのヒストリカルデータとして用いる予定である。

超音波血栓溶解技術の治験に関わる脳血管内科、脳神経内科（医師）・脳卒中集中治療室（医師、看護師）、放射線科（医師、技師）、治験推進部研究開発基盤センター（医師・コーディネーター）が協力して治験を行えるよう、スムーズな情報伝達ができる環境を構築中である。今後も治験開始前からの説明会や会議などで連携の強化に努めていく。

D. 考察

当センターにおいてTCDやTCCS検査はレジデントの習得すべき検査技術の一つである。この検査は、超音波血栓溶解技術の臨床治験に必須であり、この体制は治験導入に役立つであろう。治験の対象患者が発症3時間以内の脳梗塞例で、短時間の中で様々な情報や検査データの取得が必要となり、職種間の緊密な連携が必須となる。今後もヒストリカルデータの収集および多職種間の連携構築を進めていく。

E. 結論

急性期脳梗塞に対する超音波血栓溶解技術の臨床治験に向けて当センター内の環境調整を行っている。また、治験の安全性および有効性を評価するためのヒストリカルデータを継

続して収集している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. Suzuki R, Koga M, Mori M, Endo K, Toyoda K, Minematsu K. Visibility of the lesser sphenoid wing is an important indicator for detecting the middle cerebral artery on transcranial color-coded sonography. Cerebrovasc Dis 2012;33:272-279
3. Suzuki R, Koga M, Toyoda K, Uemura M, Nagasawa H, Yakushiji Y, Moriwaki H, Yamada N, and Minematsu K. Identification of internal carotid artery dissection by transoral carotid ultrasonography. Cerebrovasc Dis 2012, in press
4. Mori M, Yamamoto H, Koga M, Okatsu H, Shono Y, Toyoda K, Fukuda K, Iihara K, Yamada N, Minematsu K. Hyoid bone compression-induced repetitive occlusion and recanalization of the internal carotid artery in a patient with ipsilateral brain and retinal ischemia. Arch Neurol 2011;68:258-9.
5. 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.
6. 古賀政利、遠藤薫、鈴木理恵子. 経頭蓋超音波による急性期虚血性脳卒中の評価とその治療への応用. 循環器病研究の進歩 2011;32:9-17

2. 学会発表

1. 遠藤薫、佐藤和明、古賀政利、横田千晶、田中弘二、峰松一夫、豊田一則. リアルタイム 3D 経食道超音波検査による可能性大動脈プラークの診断（動画）. 第30回日本脳神経超音波学会総会、長崎、2011年7月
2. 古賀政利. シンポジウム3「血栓溶解療法と超音波診断」rt-PA 静注療法における超音波診断の役割. 第30回日本脳神経超音波学会総会、長崎、2011年7月

3. 鈴木理恵子、古賀政利、遠藤薫、山本晴子、
豊田一則、峰松一夫. シンポジウム3「血
栓溶解療法と超音波診断」rt-PA 静注療法
施行虚血性脳卒中例の血管評価における
経頭蓋カラードプラの有用性. 第30回日
本脳神経超音波学会総会、長崎、2011年7
月
4. 佐藤和明、古賀政利、田中弘二、鈴木理恵
子、長束一行、豊田一則. 3D 経食道超音
波検査を用いた急性期脳梗塞における大
動脈弓部動脈硬化病変の評価. 第14回日
本栓子検出と治療学会、仙台、2011年11
月
5. 遠藤薫、古賀政利、佐藤和明、鈴木理恵子、
山本晴子、豊田一則、古幡博、峰松一夫.
経頭蓋カラードプラ法における探触子頭
部固定具の開発. 第14回日本栓子検出と
治療学会、仙台、2011年11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

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

TCCS/MRAによるrt-PA施行虚血性脳卒中の閉塞血管早期再開通率の検討

研究協力者 鈴木理恵子 国立循環器病研究センター脳血管内科医師
研究分担者 古賀 政利 国立循環器病研究センター脳卒中集中治療科医長
研究協力者 遠藤 薫 国立循環器病研究センター脳血管内科医師
研究分担者 山本 晴子 国立循環器病センター先進医療・治験推進部部长
研究分担者 峰松 一夫 国立循環器病研究センター副院長

研究要旨

経頭蓋カラードプラ（TCCS）は、非侵襲的検査であり、ベットサイドで繰り返し行うことが可能であり、脳梗塞超急性期のアルテプラゼ（tPA）静注療法中に閉塞血管再開通現象をモニターできる唯一の方法である。古幡らにより低侵襲的低周波超音波装置を用いた急性期血栓溶解療法の臨床試験が計画されている。我々は現在計画中的である超音波血栓溶解療法の対照データ収集のため、急性期脳梗塞に対するtPA静注療法例で、TCCS/MRAによる血管閉塞や再開通など頭蓋内血管の経時的観察を行い、TCCSの有用性や、超音波血栓溶解療法を併用しない場合のM1閉塞例における再開通時期や頻度を評価した。TCCSとMRAの再開通率データを合わせると、閉塞血管の再開通はrt-PA静注療法開始から1時間までが33%、2時間までが42%、24時間までが80%、14日までが94%であった。

A. 研究目的

古幡らにより低侵襲的低周波超音波装置を用いた急性期血栓溶解療法の臨床試験が計画されている。今回、我々は現在計画中的である超音波血栓溶解療法の対照データ収集のため、急性期脳梗塞に対するtPA静注療法例で、TCCS/MRAによる血管閉塞や再開通など頭蓋内血管の経時的観察を行い、TCCSの有用性や、超音波血栓溶解療法を併用しない場合の閉塞血管再開通時期や頻度を評価する。

B. 研究方法

対象は平成17年10月から平成24年1月までの当院tPA静注療法施行例のうち、投与前にMRAで血管病変を評価し、TCCSを施行した214例。使用超音波装置は日立メディコ社製のPREIRUSとGE社製のLOGIQ E9とした。検討項目は患者背景、診断名、責任血管（頭部MRA、頸部エコー）、TCCSの結果（閉塞血管診断の可否、再開通モニターの可否など）、MRAでの再開通の評価結果とした。TCCSの再開通の評価にはCOGIFscoreを用い1grade以上の改善がみられる場合に再開通ありとした。MRAの再開通の評価にはModified Mori gradeを使用

し、Grade2以上の場合に再開通ありとした。なお、rt-PA静注療法後に経皮経管的脳血栓回収用機器（Merciリトリーバルシステム、PENUMBRA SYSTEM）を使用した症例は解析から除外した。

（倫理面への配慮）

ヒストリカルデータの収集に関する研究は、国立循環器病研究センターの倫理委員会で承認を受けた。

C. 研究結果

患者は214例、平均年齢は73±13歳であった。男性が68%、既往症は高血圧67%、糖尿病21%、脂質代謝異常36%、心房細動57%であった。臨床病型はラクナ梗塞1%、アテローム血栓性脳梗塞11%、心原性脳塞栓67%、その他の脳梗塞が21%であった。治療前MRA上の閉塞血管はICA39例（18%）、ACA2例（1%）、MCA M1 74例（35%）、M2 29例（14%）、PCA5例（2%）、椎骨脳底動脈系5例（2%）、閉塞血管なし36例（17%）であった。M1閉塞病変患者でTCCSで再開通を評価できた19例では、rt-PA投与開始時のCOGIFで完全閉塞を示した