

- 1、急性脳梗塞発症直後からの血栓成長抑制
- 2、心筋梗塞発症直後からの血栓成長抑制
- 3、深部静脈血栓症等の発症直後からの血栓成長抑制
- 4、各種血管形成術後の再開塞予防の為の血栓成長抑制、さらには狭心症や一過性脳虚血性発作（TIA）などに対しても（その主原因と考えられる塞栓状態に対して）、予防的に超音波単独による経胸的、あるいは経頭蓋的照射による介入法が考えられる。

その臨床的実用化のためには、臨床現場の状況と整合性の高い超音波振動子の開発が不可欠である。すなわち、患者の体動に対しても影響されない超音波照射法であり、かつ、救急車内でも使えるような（医師でなくても適切に超音波振動子を固定できるような）仕様法の簡便な超音波照射法が求められよう。その一例として我々が考案している例を図 6. に示す。図は急性脳梗塞患者に対し、頭部曲率に合うような柔らかな素材のプリフッ化ビニルデン（PVDF）を用いて、実現しようとするもので、現在検討中の振動子である。この様な薄く柔らかな振動子であれば、患者側頭部にヘッドバンド等で固定したりあるいは粘着性の材料で表面に張り付けたりすることができ、恐らく救急車内でもまた病院救急部などでも容易に活用し得ると考えられる。未だその音場特性等実用化に向けた検討は不可欠であるが、一つの実現可能性のある振動子系として、考案中である。この様な振動子を用いれば、血栓成長抑制作用により血栓成長それ自体を発症直後のままに抑え込むことが出来、血栓サイズを小さい状態に留められよう。それにより血栓溶解時間の短縮にも繋がり、結果的に治療開始時間の延長を招来することになると考えている。

C. 結論

本年度の研究において、超音波それだけを用いる血栓成長抑制効果を *in vitro* 実験によって定量的に示した。しかもその超音波条件は中周波数 500KHz 連続波で、その強度は $72\text{mw}/\text{cm}^2$ 以上であれば抑制効果が表れ得るとするものである。この超音波血栓抑制効果を活用すれば、血栓自体のサイズを発症初期のサイズに留めておける可能性があり、実用化に向けた現実的超音波照射法の検討を開始することができた。この発見的成果は、治療開始時間短縮という所期の目的ばかりでなく、再三強調したように各種 PTA 手法における再開塞問題にたいする予防的手段としても活用することが示唆される。

さらには超音波を照射するだけという非常にシンプルな方法で血栓成長を抑制し得ることは、新たな超音波予防技術の道を開く可能性を含んでいる。例えば一過性脳虚血性発作や狭心症などへの救急的救済手段にも用いられるものと考えられる。

本年度の成果はその意味で本研究の所期の目的を達成したばかりでなく、幅広い虚血性疾患に対する新たな治療戦略に加えられる内容を含んでいる。虚血性疾患患者の予後における、2次予防に貢献する新規療法となることを期待する。

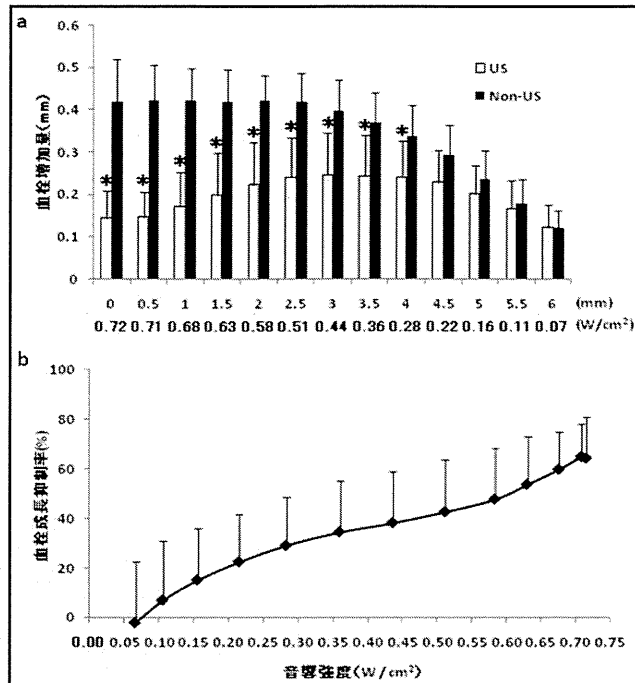


図3 超音波照射による血栓成長抑制

500 kHz の超音波を 30 分間照射し，血栓の成長が抑制できるか否かを検討した．超音波照射前後での血栓増高量 (mm) をグラフ縦軸，グラフ横軸上段には血栓中心からの距離，下段にはハイドロホンプローブで測定した音響強度を示した (a)．また，各音響強度における血栓成長抑制率について示した (b)．なお，血栓成長抑制率は Fig. 4a の血栓増高量 (mm) の結果より，次式を用いて算出した “(ΔNon-US - ΔUS) /

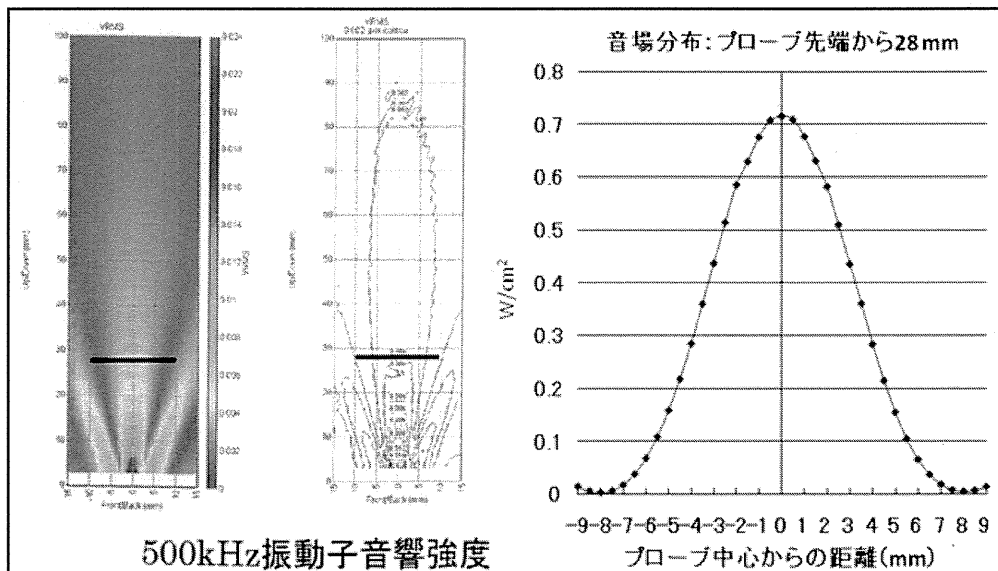


図4 超音波強度および音場分布データ

音響強度測定装置 AIMS で 500 kHz の超音波プローブの水中における音響強度を測定し，またプローブから 28 mm 地点の音場分布を示した．

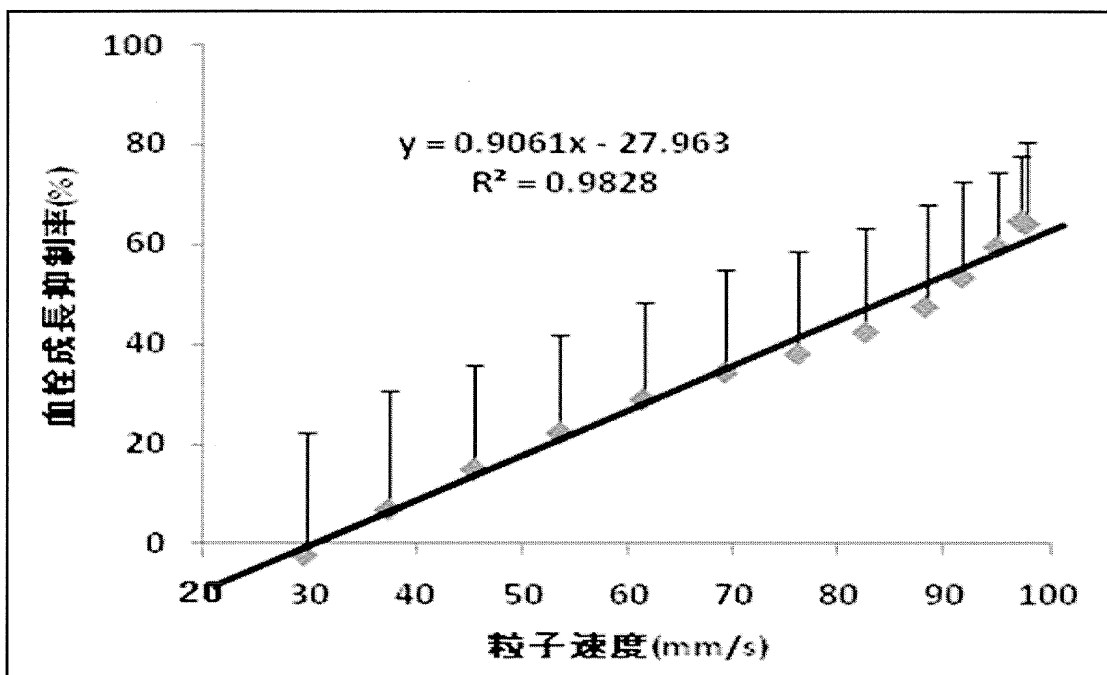


図5 粒子速度依存的な血栓成長抑制

Fig. 4bの結果をもとに、横軸を音響強度より算出した粒子速度に変換して解析した。また、結果の散布図より得られる近似直線ならびに近似式、決定係数（R2）を算出した。

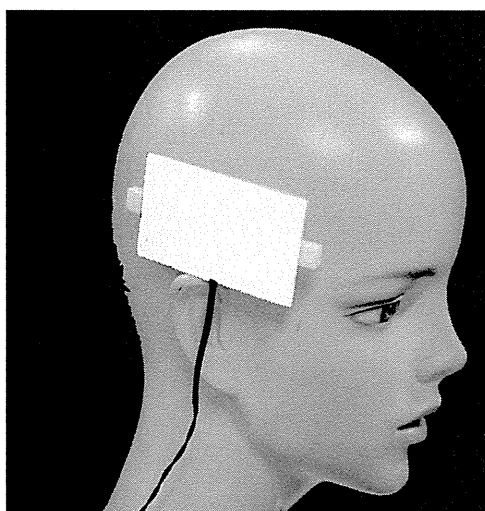


図6 血栓成長抑制用の張付型ソフト振動子の考案例

血栓溶解治療を開始する前の、救急車内、あるいは病院内で塞栓部位における血栓成長を抑制する為の簡便で使いやすい振動子として極めて薄い貼り付け型の振動子が必要で、これを実現する例としてPVDFのような素材を用いた振動子を考案した。

実用化に関しては今後の検討課題であるが、可能性の一例として紹介する。（振動子サイズ60mm×30mm）

第 11 章

結論

第11章 結論

本年度の研究成果をまとめると、単一振動子による新たなPSUSTの開発に成功し、次世代型の経頭蓋超音波脳血栓溶解療法の技術的課題（音響学的安全性、有効性）を解決した。そして、画期的な治験として、超音波による血栓溶解効果には、周波数依存性があまりないこと、単に超音波強度依存性であることを中周波数帯から高周波数帯の領域で示した。臨床的には、この次世代経頭蓋脳血栓溶解療法の治験に供する比較臨床成績として、国立循環器病研究センター、および東京慈恵会医科大学において、現行rt-PA静注療法の持つ再開通時間、再開通時に関する臨床成績を蓄積、分析する事が出来た。さらに救急医療における超急性期治療の迅速化を高品質にする為に、遠隔医療画像診断・治療補助システムによる活用可能性を明らかにした。

以上新たな経頭蓋超音波脳血栓溶解療法の臨床応用に関し、世界を凌駕する成果を上げる事が出来、本研究は急性脳梗塞治療に対する飛躍的な貢献をする結果となった。その詳細について、以下に各分担研究者がまとめた結論を列記する。

11-1. 血栓溶解用超音波音場強度分布の測定

本年度は最終年度として急性脳梗塞患者の側頭部に貼付可能な貼付型ソフト超音波振動子を開発し、その音場分布が頭蓋内における空間的ホットスポットや、コールドスポットを抑制し得る事を示した。そのビーム空間内の均一化に対する評価指標を新たに導入し、雑音変調方式として逆相位相、ランダム切換方式が最も有効なビーム均一化作用のある事を明らかにした。

この本年度の成果は、急性脳梗塞患者超急性期治療に供し得る、極めて簡便性の高いものであることを明らかとした。恐らく血栓溶解剤rt-PA投与患者であれば、全ての患者にこの貼付型ソフト振動子を適用する事が出来、そして溶解率の向上、ひいては3ヶ月後の神経学的予後の著しい改善をもたらすものと期待される。

11-2. 中周波超音波併用血栓溶解療法における雑音変調を用いた定在波抑制効果の比較研究

定在波抑制法に関する本研究において、はじめに、多重反射によって現れる SWR の最大値は一回反射の SWR で見積もられることを示した。この理論に基づき、一回反射により生じる定在波抑制効果を、3種の振動子駆動信号ランダム変調方式、FMN、PSRF、RSBIC、に対して（これらのうち後ろの二つは新方式）、500kHz 条件下で、シュリーレン像を基に比較した。平坦な板およびヒト頭蓋骨内面の反射条件の下、シュリーレン像の SWR の最小値はRSBICによって得られた。

定在波を抑制することによって、経頭蓋超音波血栓溶解法における脳出血を避けることができ、安全性が確保される。

11-3. 経頭蓋超音波照射法による頭蓋内多重反射の影響

多重反射の SWR は一回反射の SWR 以下であるため、一回反射についての SWR を評価すれば十分である。

ヒト頭蓋骨の反射率には、個人差があるがおよそ 0.6 ぐらいである。この時、腹の位置の振幅は最大で入射波の 2.5 倍になることが判明した。増大率の上限が求められたことは経頭蓋超音波照射療法を安全に行う上で重要な進展である。

11-4. 中周波数超音波血栓溶解法の効果増高

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 kHz (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、溶解効率是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 MHz 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、音響強度依存的周波数依存的 (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 kHz 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、強度依存的であり、臨床適用上の安全限界範囲(0.3 W/cm² 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/cm² 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。

11-5. 超音波脳血栓溶解効果を加速するか

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。

11-6. 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

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。

11-7. 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

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。

11-8. 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

急性期脳梗塞に対する tPA 静注療法時に、TCCS 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、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頻度や時期を評価した。

11-9. 経頭蓋超音波併用脳血栓溶解法の再開通時間評価に関する研究

経時的な経頭蓋超音波モニタリングは、rt-PA 投与による再開通時間をリアルタイムに捉えるのみならず、再開通しなかった場合の追加治療の判定、特殊な病態の診断と治療効果判定などに有用であり、様々な脳卒中診療の臨床に役立つ手法である。

11-10. 救急医療における経頭蓋超音波併用療法の有効性

我々が開発した遠隔診断・治療補助システムにより、患者の診断・治療が迅速に行われることで、治療できる患者を少しでも増やし、また、誤診予防の改善や現在のたらい回しの問題に少しでも役立てることができるのではないかと考えている。

さらに、脳卒中の患者を 1 人でも多く救うことで、国全体の医療費の軽減などにつながり、7 医療全体がクオリティの高い方向へ進む可能性があり、脳卒中医療のめざましい発展に寄与できることを期待するとともに、今後の救急医療体制の充実化への実現性を十分に持つシステムであると考えている。

本研究開発による貼付型ソフト超音波振動子を用いる次世代経頭蓋超音波脳血栓溶解法は、rt-PA 適用患者の殆どに適用可能で、しかもその際、超音波に関する特殊技能を要さず、どの医師も安全に施行する事が出来るものである。特に近い将来、脳卒中基本対策法等が

制定され、臓器別本邦死因の第 1 位を占める脳卒中疾患に対する基本治療技術の一つとして、本法がその中核的役割を演ずるものになると期待される。

第 12 章

関連報告等

第 12 章 関連報告等

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|----------------------------|----------------|-----------|------|
| JUN SHIMIZU, TAKAHIRO FUKUDA, TOSHIAKI ABE, MOTOAKOTO OGIHARA, JUN KUBOTA, AKIRA SASAKI, TAKASHI AZUMA, KAZUAKI SASAKI, KEIKO SHIMIZU, TAKAO OISHI, SHIN-ICHIRO MEMURA, and HIROSHI FURUHATA. | ULTRASOUND SAFETY WITH MIDFREQUENCY TRANSCRANIAL SONOTHROMBOLYSIS: PRELIMINARY STUDY ON NORMAL <i>MACACA MONKEY</i> BRAIN | Ultrasound in Med.& Biol., | Vol.38 No.6 | 1040-1050 | 2012 |
| Zuojun Wang, Takahiro Fukuda, Takashi Azuma, Hiroshi Furu-hata. | 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 Furu-hata | Ultrasound control of the growth of thrombus -Potential for the embolus growth suppression & the reocclusion prevention- | Jpn J Med Ultrasonics | Vol.38 No.5 | 549-555 | 2011 |
| Koga M, Toyoda K, Nakashima T, Hyung 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 |
| 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. | Cerebrovascular Diseases | 33 | 272-279 | 2011 |

| | | | | | |
|---|---|--------------------------|------------------|-----------|-------------------|
| Suzuki R, Koga M, Toyoda K, Uemura M, Nagasawa H, Yakushiji Y, Moriwaki | Identification of internal carotid artery dissection by transoral carotid ultrasonography. | Cerebrovasc Dis | 33 | 369-377 | 2012 |
| 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 | 68 | 258-259 | 2011 |
| 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 | 28 | 580-589 | 2011 |
| 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 | 32 | 9-17 | 2011 |
| Suzuki R, Osaki M, Endo K, Amano T, Minematsu K, Toyoda K | Common carotid artery dissection caused by a frontal thrust in Kendo (Japanese swordsmanship) | Circulation | 125 | e617-e619 | 2012 |
| Mitsumura H, Yogo M, Sengoku R, Furuhata H, Mochio S. | Evaluation of Very Early Recanalization After tPA Administration Monitoring by Transcranial Color-Coded Sonography. | Perspectives in Medicine | <i>in press</i> | | |
| Takao H, Murayama Y, Ishibashi T, Karagiozov KL, Abe T. | A new support system using a mobile device (smartphone) for diagnostic image display and treatment of stroke. | Stroke. 2012 | Jan;43(1) | 236-9 | Epub 2011 Oct 13. |
| 古幡 博 | 超音波診断装置の安全性の確保 | 臨床画像 | Vol.27, No.4 増刊号 | 6-9 | 2011 |
| 古幡 博 | 次世代超音波血栓溶解療法への展望—現状から未来へ | 医学のあゆみ | Vol.238, No.2 | 189-195 | 2011 |

● *Original Contribution*

ULTRASOUND SAFETY WITH MIDFREQUENCY TRANSCRANIAL SONOTHROMBOLYSIS: PRELIMINARY STUDY ON NORMAL MACACA MONKEY BRAIN

JUN SHIMIZU,^{*‡} TAKAHIRO FUKUDA,[†] TOSHIAKI ABE,[‡] MAKOTO OGIHARA,[§] JUN KUBOTA,[§] AKIRA SASAKI,[§] TAKASHI AZUMA,[¶] KAZUAKI SASAKI,^{||} KEIKO SHIMIZU,[#] TAKAO OISHI,^{**} SHIN-ICHIRO UMEMURA,^{††} and HIROSHI FURUHATA^{*}

^{*}Medical Engineering Laboratory; [†]Division of Neuropathology, Department of Neuroscience, Research Center for Medical Sciences; [‡]Department of Neurosurgery, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan; [§]Hitachi Medical Corporation, Tokyo, Japan; [¶]Central Research Laboratory, Hitachi Ltd. Tokyo, Japan; ^{||}Department of Veterinary Medicine, Tokyo University of Agriculture and Technology Tokyo, Japan; [#]Department of Zoology, Faculty of Science, Okayama University of Science, Okayama, Japan; ^{**}Department of Cellular and Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University, Aichi, Japan; and ^{††}Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University, Miyagi, Japan

(Received 25 July 2011; revised 5 December 2011; in final form 12 February 2012)

Abstract—We investigated the safety of transcranial-targeting midfrequency (0.1 to 1 MHz) ultrasonic thrombolysis for acute ischemic stroke. We applied a new therapeutic and imaging transducer to healthy *Macaca* monkey brains *via* sonication of the ipsilateral middle cerebral artery through an acoustic temporal window. Young adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) were assigned to a group without sonication (control), a group maintained for 1 d after sonication (C1) and a group maintained for 7 d after sonication (C7; $n = 3$ for each). Two elder rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) were ultrasonicated under transvenous injection of the recombinant tissue plasminogen activator alteplase (0.9 mg/kg), and maintained for 7 d (R). An automatic switching circuit alternately operated a therapeutic ultrasound beam (T-beam) generator for thrombolysis (frequency = 490 kHz; intensity = 0.72 W/cm²) and a diagnostic color-flow imaging ultrasound beam (D-beam; frequency = 2.5 MHz; intensity = 0.20 W/cm²). A 15-min protocol, comprising four repeats of a sequence of 120-s T-beam activation followed by 30-s D-beam activation and then 5-min T-beam deactivation together with D-beam activation, was repeated four times over 60 min. After confirmation of neurologic deficits, the brains were removed and investigated histologically and immunohistochemically. Three skull samples were subjected to 494-kHz continuous waveform ultrasound, the transcranial intensity was measured and the mechanical index was calculated. None of the monkeys showed neurologic deficits after ultrasonication. The transskull ultrasound intensity rate was $48 \pm 12\%$. The intracranial mechanical index value was 0.15. The novel system did not cause tissue damage in the primate brain and no cavitation effect was detected intracranially. (E-mail: jun-sh@jikei.ac.jp) © 2012 World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology.

Key Words: Primates, Safety, Transcranial, Sonothrombolysis, Midfrequency, Ultrasound.

INTRODUCTION

Transcranial sonothrombolysis (TST) with diagnostic equipment of MHz frequency ultrasound (US) (Alexandrov et al. 2004; Eggers et al. 2003, 2009; Molina et al. 2006) and low-frequency US of <1 MHz in laboratory studies are clinically expected to become the next generation of therapeutic technologies for acute

ischemic stroke (AIS) (Behrens et al. 2001; Ishibashi et al. 2002; Nedelmann et al. 2005; Saguchi et al. 2008; Suchkova et al. 2002; Wang et al. 2008; Zenitani et al. 2008). However, the Transcranial Low-Frequency Ultrasound Mediated Thrombolysis in Brain Ischemia (TRUMBI) Study phase II trial using 300-kHz burst waveform US (BW-US) reported a high incidence of intracerebral hemorrhage (ICH) with clinical worsening, although the acoustic safety condition might have mostly satisfied the requirement to US diagnostic equipment by the Food and Drug Administration (Daffertshofer et al. 2005). ICH often occurred by rupture of a microaneurysm

Address correspondence to: Jun Shimizu, M.D., Medical Engineering Laboratory, Research Center for Medical Sciences, Jikei University School of Medicine, Address: 3-25-8, Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan. E-mail: jun-sh@jikei.ac.jp

at major or minor vessels, and hemorrhagic transformation is the breakdown of microcirculation of the ischemic area (Barnett *et al.* 1998). However, even using recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA), the most noteworthy point of the hemorrhagic complication in the TRUMBI trial is that the ICH occurred in a location other than the ischemic area. From a bioengineering viewpoint, acoustic experimental analyses of the human cranium had already elucidated the theoretical causes of these intracranial adverse effects (Azuma *et al.* 2005). The main theoretical causes were intracranial multireflection of midfrequency (0.1 to 1 MHz) US, overlapping of US intensity and establishment of standing waves that progressively result in microbubble generation, which causes brain damage. In particular, the instantaneous BW-US intensity in the TRUMBI trial was strong enough to cause brain damage because the mechanical index (MI) was high enough to induce cavitation in the brain (Azuma *et al.* 2005; Baron *et al.* 2009; Saguchi *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008).

To completely avoid the adverse effects of this unsuitable BW-US condition used by the TRUMBI trial, Saguchi *et al.* (2008) suggested another safe midfrequency US condition for a novel TST: 490 kHz continuous-waveform US (CW-US). With this condition, they noted an obvious neurologic improvement in the rat AIS model. By using this US condition, we developed a transcranial-targeting, low-frequency ultrasonic thrombolysis system (TCT-LoFUT) combining therapeutic and diagnostic functions (Azuma *et al.* 2010). In this system, a single probe can transcranially emit both the therapeutic beam for sonothrombolysis and the diagnostic beam for monitoring of recanalization in the target region. Ogihara *et al.* (2006) had already demonstrated that the TCT-LoFUT driving at 500 kHz CW-US could accelerate rt-PA efficacy for dissolving human clots *in vitro*.

Because of greater similarities with human brains, safety evaluation in nonhuman primates is a very important intermediate step toward clinical applications (Deffeux *et al.* 2010). We applied the TCT-LoFUT to the brains of macaque monkeys to determine its safety for clinical use, because these acoustic adverse effects in the human brain can be more accurately reproduced in the larger nonhuman primate brain than in smaller mammalian brains. This paper is the first to describe the preclinical safety examination results of TCT-LoFUT in the normal brain of cynomolgus monkeys without rt-PA. In addition, the TCT-LoFUT was applied to the normal brain of older rhesus monkeys in combination with rt-PA as a model of the elderly human brain.

From a bioengineering standpoint, to mimic the intracranial environment in humans and to minimize the number of animals used in research, the intracranial US intensity of TCT-LoFUT was measured after the US

beam had penetrated the cranium of the monkeys. Our results highlight the safety limits for therapeutic US in clinical applications using a new MI concept (Umemura 2004).

SUBJECTS AND METHODS

The experimental animal protocol was approved by the animal research committees of Jikei University School of Medicine (Tokyo, Japan), the Mitsubishi Chemical Safety Institute (Ibaraki, Japan) and the Primate Research Institute of Kyoto University (Aichi, Japan).

Nine young adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*; 2 males and 7 females; mean age \pm standard deviation 5.9 ± 0.9 y; mean weight \pm standard deviation 4.3 ± 1.5 kg) were examined at the Mitsubishi Chemical Safety Institute and Hamuri Co. (Ibaraki, Japan).

Two middle-aged female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*; both 18 years old; weight = 5.1 and 5.5 kg, respectively) were examined at the Primate Research Institute of Kyoto University.

US system

The TCT-LoFUT probe, of which the beam-supply surface for sector scanning had sides of either 19 mm in long axis and 14 mm in short axis square (unlike the circular cylinder-type transducer), was connected to the two components of a therapeutic unit and a diagnostic unit (Fig. 1).

The therapeutic unit produced a T-beam with 490-kHz CW-US, and a spatial peak temporal average intensity (I_{SPTA}) of 0.72 W/cm^2 that measured and calculated the thermal index (TI) at a focal point in the monkey brain was 8.1×10^{-4} . Sound pressure waveform on the focus was sine wave, peak-to-peak pressure was 0.252 MPa, peak rarefactional pressure was 0.105 MPa (in monkey cranium), variable focus length was 20–60 mm and there was no apodization.

Transcranial US beam forms through monkey and human temporal bone at 490 kHz CW-US by the Schlieren method as shown in Figure 2 (US-250SL; Mizojiri-Kougaku, Tokyo, Japan).

The EUB-6500 diagnostic unit (Hitachi Medical Corporation, Tokyo, Japan) produced a D-beam with a 2.5-MHz pulse Doppler for the duplex image and an I_{SPTA} of 0.20 W/cm^2 .

A novel feature of the TCT-LoFUT probe was the actualization of dual-frequency US production from the same footprint. The probe consisted of laminated array transducers for providing T-beams and D-beams: 16 elements (T-array) for thrombolysis with a 490-kHz CW-US condition positioned in front of 64 elements (D-array) for color flow imaging (CFI) with a 2.5-MHz pulsed-waveform US (PW-US) condition (Azuma *et al.* 2010). The dual-frequency US beams were driven by

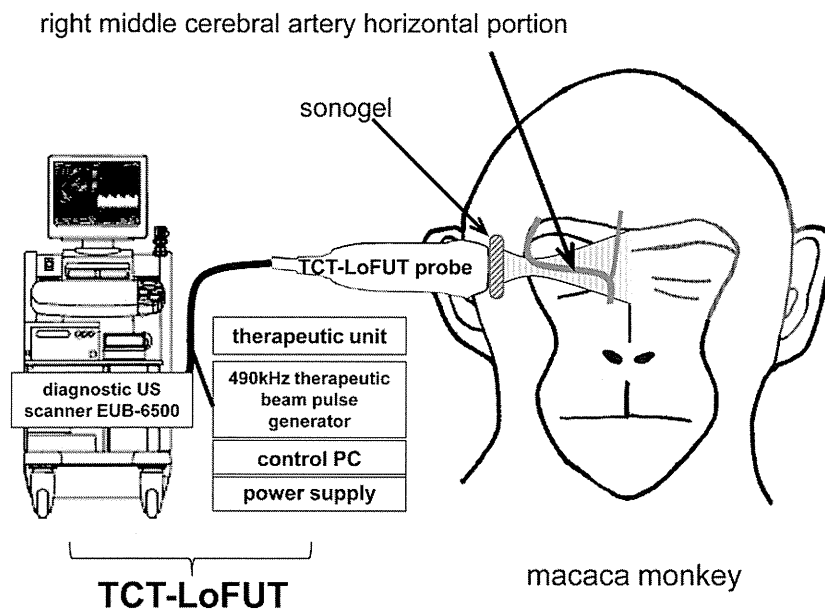


Fig. 1. Schematic representation of ultrasonication with the TCT-LoFUT. US beams were directed to the ipsilateral MCA through a temporal window.

the alternate operation of an automatic switching circuit set in the therapeutic unit.

Sonication methods

The TCT-LoFUT probe was fixed to each monkey's head with a manufactured frame. The T-beam was sonicated to a targeted on the right middle cerebral artery (MCA) by navigation of D-beam CFI captured through the same acoustic temporal window (Fig. 3).

The alternation of T-beams and D-beams was achieved as follows. The intermittent time course of the T-beam was as described in previous studies (Ishibashi et al. 2002; Saguchi et al. 2008). A cycle with 120 s of intermittent T-beam activation alternating with 30 s of D-beam activation was repeated four times (10 min total); then the D-beam was activated for 5 min. This 15-min cycle protocol was repeated four times over a period of 60 min.

Experimental groups

Nine cynomolgus monkeys were divided into three groups: the control group, the C1 group and the C7 group. In the control group, the animals received no sonication and were maintained for 1 d ($n = 3$). In the C1 group, the animals were maintained for 1 d after sonication to estimate the early damage ($n = 3$). In the C7 group, the animals were maintained for 7 d after sonication to estimate the later damage ($n = 3$). In addition, two rhesus monkeys were sonicated after intravenous injection of alteplase (0.9 mg/kg) and maintained for 7 d after sonication (the R group).

Animal setup and neurologic evaluation

All monkeys were anesthetized by intramuscular injection of ketamine hydrochloride (10 mg/kg), and those in the R group also received xylazine hydrochloride (1 mg/kg).

Anesthesia was maintained by transtracheal isoflurane (0.25 to 1.0%) *via* 4-mm cuffed endotracheal tubes. Intravenous injection of vecuronium bromide (0.04 mg/kg/h) was used for immobilization, and mechanical ventilation was established (SN-480-3; Sinano, Tokyo, Japan). Mean (\pm standard deviation) electrocardiographic heart rate (180.8 ± 23.9 /min), femoral arterial blood pressure through a PE100 tube ($121.9 \pm 9.5/89.7 \pm 8.0$ mm Hg) and end-tidal carbon dioxide ($36.8 \pm 3.3\%$) were measured (BSM-2301, AP-641G and Pocket Care; Nihon Koden, Tokyo, Japan). Animals were placed in the supine position on a temperature-controlled plate and normothermic condition was maintained by measuring core body temperature (mean \pm standard deviation $37.5 \pm 1.0^\circ\text{C}$) with a digital rectal thermometer (AW-601H and AW-650H; Nihon Koden). The animals were awakened from general anesthesia after immobilization *via* intravenous injection of atropine sulfate (0.03 mg/kg) and neostigmine methylsulfate (0.07 mg/kg).

Neurologic evaluation after anesthesia was carried out with a neurological grading scale in primates including consciousness, respiration, cranial nerves, motor/sensory systems and behavior (Steen et al. 1985). After animals were fully recovered, they were returned to their own cages with free access to water and food.

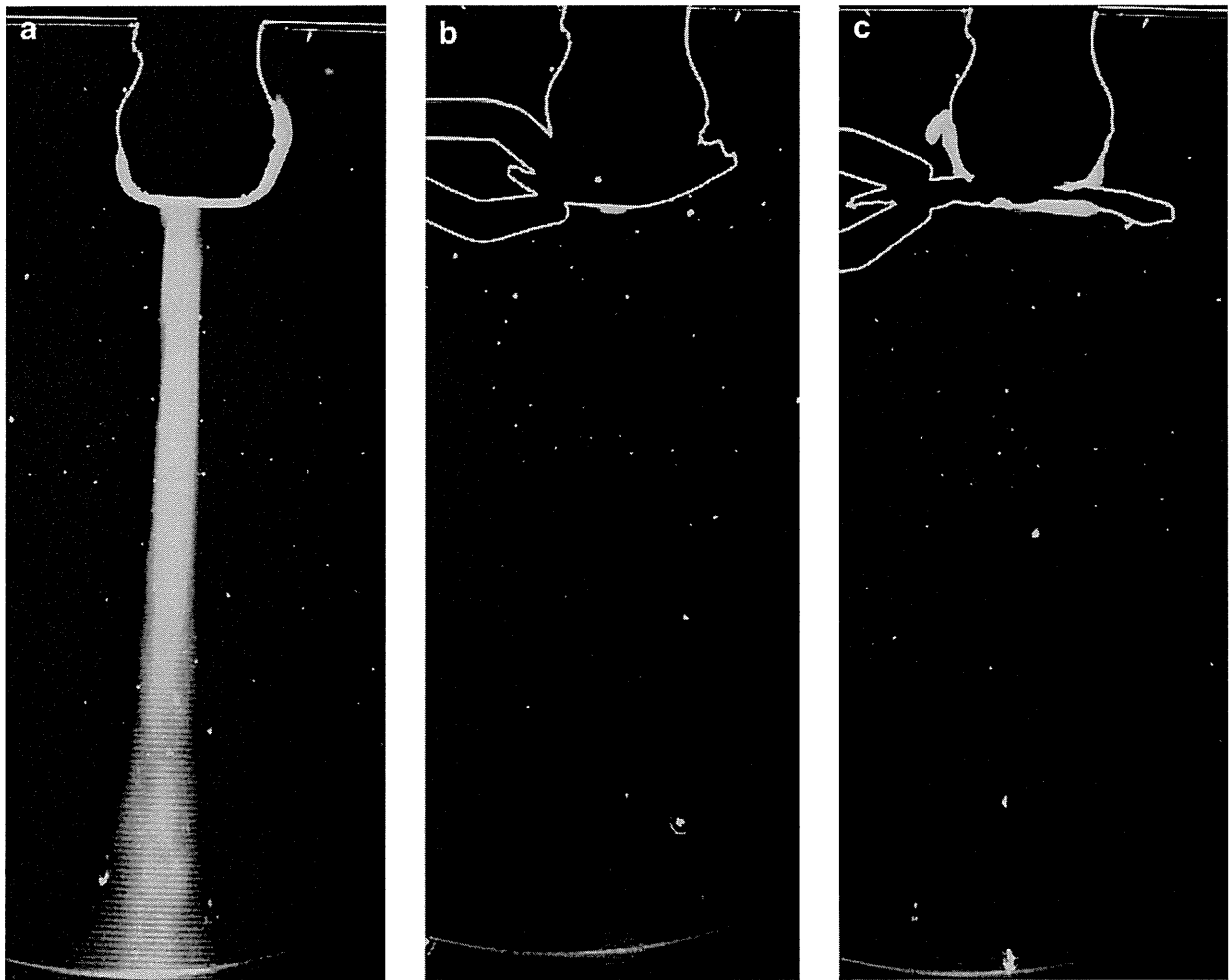


Fig. 2. Transcranial US beam form at 490-kHz CW-US by the Schlieren method. (a) Without temporal bone (beam focus length 6.0 cm); (b) through the monkey temporal bone (thickness 1.73 mm, beam focus length 3.0 cm); (c) through the human temporal bone (thickness 2.42 mm, beam focus length 6.0 cm).

Animal preparation after sonication

Animals were euthanized *via* intravenous pentobarbital (20 mg/kg) anesthesia after 24 h for the control and C1 groups, and after 7 d for the C7 group. Animals in the R group were euthanized *via* intravenous pentobarbital (20 mg/kg) and intramuscular ketamine (10 mg/kg) anesthesia after 7 d. The arterial system was perfused with isotonic saline through the bilateral common carotid arteries in the cynomolgus monkeys and through the cardiac apex in the rhesus monkeys. The brain was then perfused with 10% neutral phosphate-buffered formalin.

Histological evaluations

All brains in the control, C1, C7 and R groups were removed and post-fixed by immersion in the same fixative solution for 10 d. Cerebral hemispheres were examined by light microscopy and immunohistochemistry as described in a previous paper (Fukuda *et al.* 2005). As shown in semimacro photographs of Berlin blue in

Figures 4–6, planes were cut for each hemisphere in the sagittal direction, and 6-mm-thick sections were prepared. Paraffin sections (thickness 6 μ m) were stained with hematoxylin and eosin (HE), periodic acid-Schiff (PAS), Klüver-Barrera, Berlin-blue and Bodian silver impregnation. Immunohistochemical staining was done using antibodies against phosphorylated neurofilament (SMI31; 1:5000; Sternburger Monoclonals Inc., Baltimore, MA, USA), glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:5000; Dako, Glostrup, Denmark), Alzheimer precursor protein A4 (APP; 22C11; 1:20,000; Chemicon, Temecula, CA, USA), active caspase 3 (1:1,000, Promega, WI, USA), α B-crystallin (1B6.1-3G4; 1:10,000; StressGen, Victoria, BC, Canada), heat-shock protein 27 (Hsp27; G3.1; 1:1,000; StressGen), Hsp32 (StressGen), Hsp40 (KA2A5.6; NeoMarkers), Hsp60 (LK-1; 1:1,000; StressGen), Hsp70 (C92F3A-5; 1:1,000; StressGen) and Hsp90 (16F1; 1:1,000; StressGen). Histochemical identification of microglia was performed using biotinylated ricinus

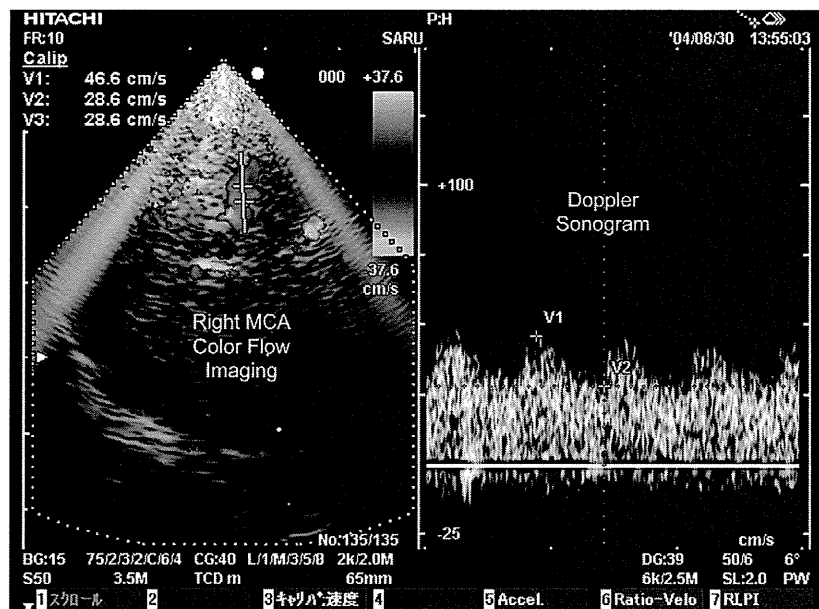


Fig. 3. Color-flow imaging and Doppler sonogram of the horizontal portion of the right MCA of a cynomolgus monkey produced by monitoring with the TCT-LoFUT probe (diagnostic pulsed waveform US beam 2.5 MHz).

communis agglutinin I (RCA-I; 1:10,000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Negative control sections were incubated without the primary antibodies.

Transcranial US intensity measurement

Using the TCT-LoFUT probe, three temporal bone samples obtained from the two cynomolgus monkeys were each sonicated five times. A pulse generator with a power supply manufactured by the Hitachi Medical Corporation provided 494-kHz CW-US with an I_{SPTA} of 0.70 W/cm^2 . A hydrophone system (HGL-400 and AH-2010; Onda, Sunnyvale, CA, USA) measured the transcranial US penetrating intensity.

The standard MI might not be appropriate for estimating the mechanical effects of long bursts of US, because a resonant microbubble can store the ultrasonic energy of a longer burst, which is significantly more than that of a short pulse, and release it in collapse (Umemura 2004). The MI was originally defined based on the calculation of the energy releasable from a microbubble inertial cavitation produced by an extremely short pulse (Holland et al. 1989). The maximum acoustic energy that can be stored by a microbubble was calculated, which is transiently expanded in a half ultrasonic cycle of negative pressure and released when it collapses. However, a resonant microbubble can store the acoustic energy of an ultrasonic cycle multiplied by the Q-value if the ultrasonic burst is sufficiently long. The Q value of the resonance is typically 5–7 for a microbubble that is 1–10 μm in radius (Leighton 1994; Prosperetti 1977). Therefore, an effective MI for a long ultrasonic burst in

a frequency range in the order of 1 MHz should be approximately three to four times greater than the standard MI. The effective MI (eMI), which is defined as three times the number as the MI, is therefore used in the current paper.

RESULTS

Neurologic findings

All scores for monkeys, including the control group, in neurologic deficit were 0 after anesthesia and before euthanasia. In fact, there were no neurologic deficits by CW-US in the C1, C7 or R groups.

Neuropathologic findings in the control group

RCA-I histochemistry revealed ramified microglia, but no rod cells or reactive microglia, in the central nervous system. GFAP immunohistochemistry identified fibrillary astrocytes, but no reactive astrocytes, in the brain. No immunoreactivity was detected against active caspase 3, APP, Hsp27, Hsp32, Hsp70 and Hsp90. Glial cells (astrocytes and oligodendrocytes) immunoreactive for αB -crystallin were observed in the central nervous system of the control group along with Hsp40-immunoreactive neurons and Hsp60-immunoreactive neurons (Fig. 5).

Neuropathologic findings in the C1 and C7 groups

There was no macroscopic evidence of bleeding, necrosis or swelling on the surface or in cross sections of the sonicated brains compared with the brains from the control group. Microscopically, there was no

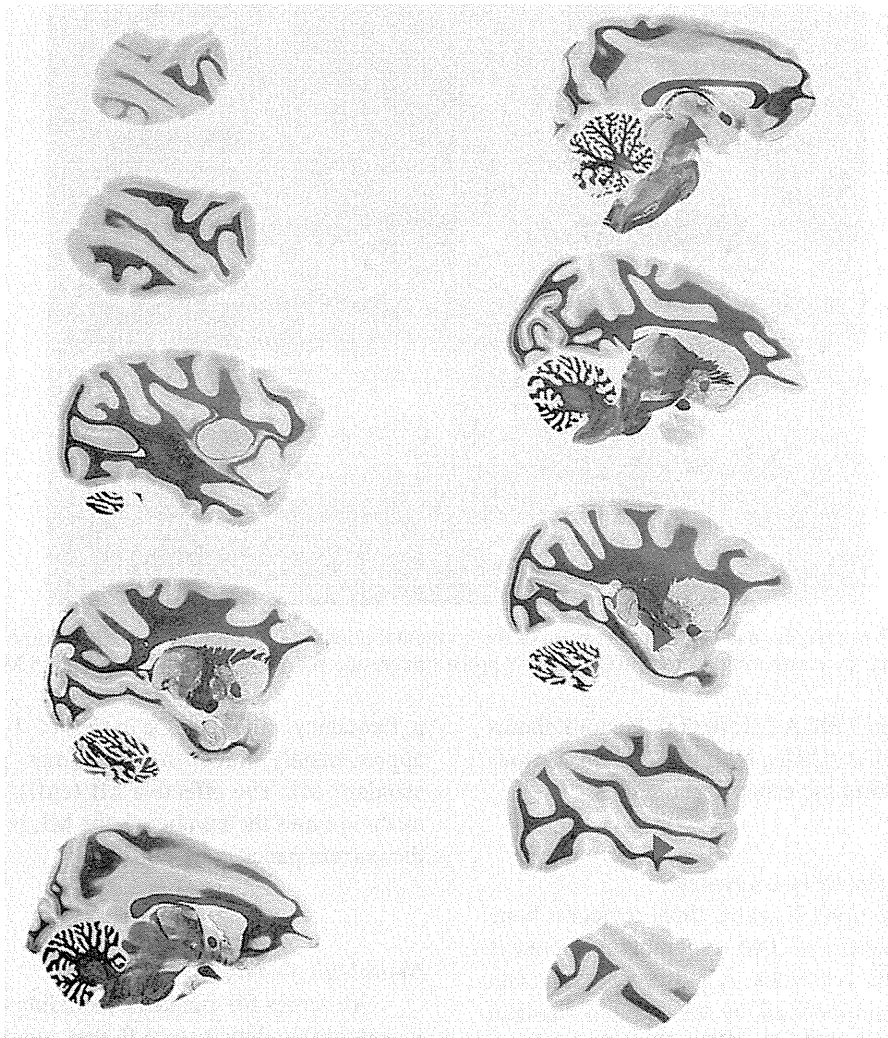


Fig. 4. Semimacro photograph of Berlin blue staining. Brain was cut into 6-mm-thick sections in the sagittal plane. Arrows (►) showing the tract of US beam.

histologic damage (such as demyelination, axonal degeneration, necrosis and hemorrhagic or edematous change) in HE, PAS, Berlin blue and Bodian silver staining, and no vessel wall damage to the targeted MCA (Fig. 6). The neurons, dendrites, axons, oligodendrocytes, myelin and vascular system were well preserved. The astrocytes and microglia did not change in number or structure. No APP-immunoreactive axons, apoptosis or active caspase-3-immunoreactive cells were observed. Compared with the brains from control monkeys, there was no over-expression of HSPs (α B-crystallin, Hsp 27, Hsp32, Hsp40, Hsp60, Hsp70 and Hsp90) in any of the monkey brains exposed to US (Fig. 5).

Neuropathologic findings in the R group

No macroscopic tissue damage was observed in animals from the R group. Similar to the C1 and C7 groups, no microscopic histologic damage (such as

necrosis and hemorrhagic or edematous change) and no vessel wall damage were observed in the targeted MCA. There were no pathologic findings in the neurons, dendrites, axons, oligodendrocytes, myelin or vascular system (Fig. 5).

Transcranial US penetration intensity and eMI value

The average temporal bone thickness of the three cynomolgus monkey skulls was 1.72 mm. The mean (\pm standard deviation) US penetration ratio through the temporal bone was $48 \pm 12\%$ (Table 1). Using this ratio, the calculated intracranial MI value was 0.14, and the intracranial eMI value was 0.42.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first report demonstrating that midfrequency CW-US emitted from

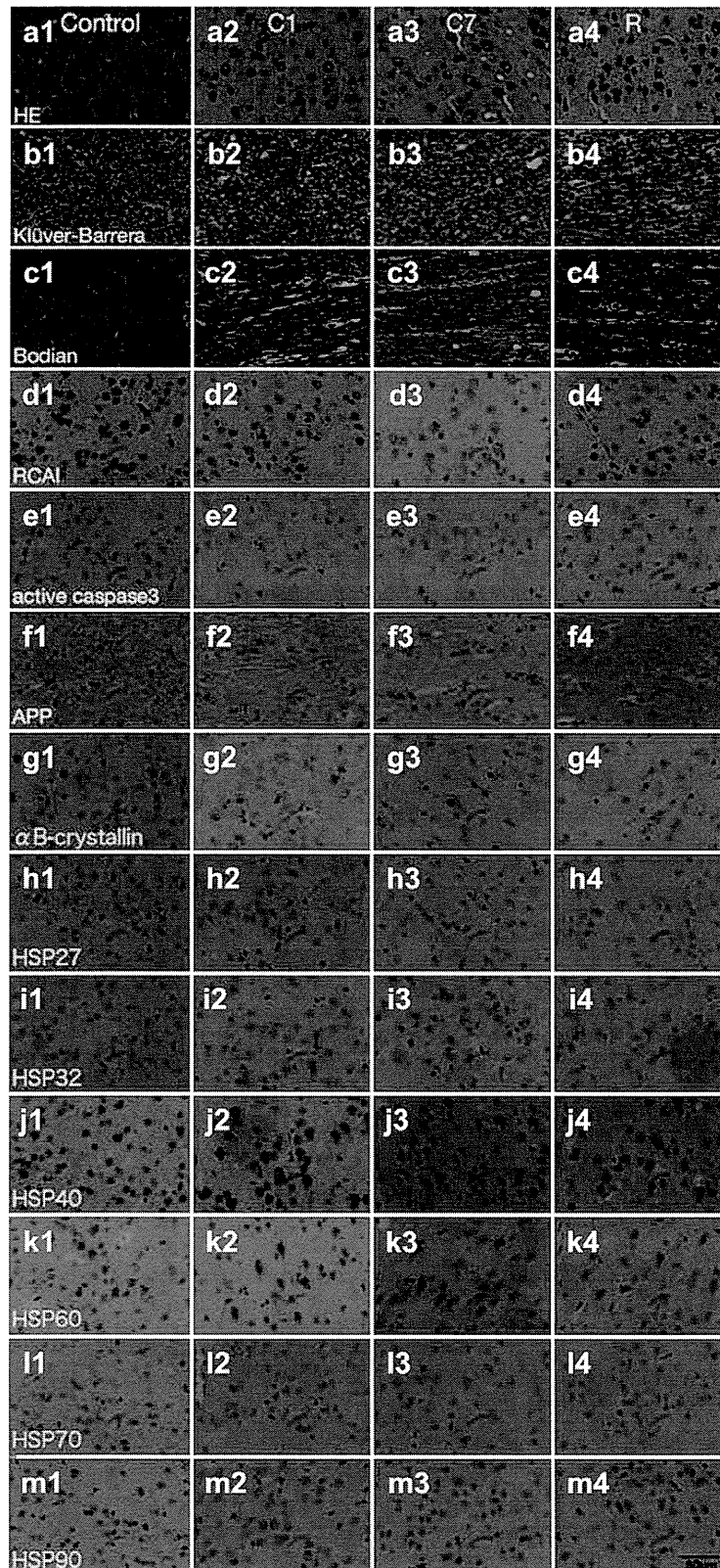


Fig. 5. Typical microphotograms of sonicated brain tissue. There was no evidence of damage in any case. Hsp overexpression was not observed in the ultrasonicated brains. (a) HE staining, (b) Klüver-Barrera, (c) Bodian, (d) RCA-I, (e) active caspase 3, (f) APP, (g) α B-crystallin, (h) Hsp27, (i) Hsp32, (j) Hsp40, (k) Hsp60, (l) Hsp70, (m) Hsp90. 1, Control group; 2, C1 group; 3, C7 group; 4, R group.

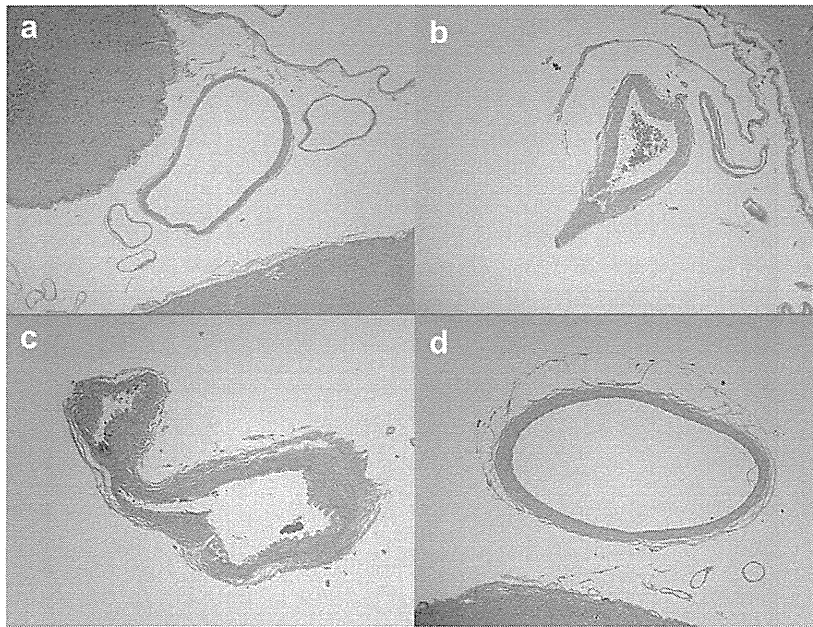


Fig. 6. Photomicrographs of targeted right MCA (HE staining). There was no vessel wall damage in any group. (a) control; (b) C1; (c) C7; (d) R.

a TCT-LoFUT has no adverse effects histologically, including immunochemically, on the healthy primate brain. Histologic evidence supports the safety of the intracranial acoustic condition, even when there is intracranial multireflection, standing waves and cavitation induced by transcranial CW-US.

The US beam distribution of the TCT-LoFUT is theoretically demonstrated in Figure 7. The peak of the spatial intensity curve on the beam axis corresponded to 0.72 W/cm^2 measured in water (Azuma *et al.* 2005).

The system was designed for use with a MI <0.25 and a TI <2.0 to minimize the biologic adverse effects, according to the American Institute of Ultrasound in Medicine report on regulating the threshold values of MI and TI for diagnostic US (Barnett *et al.* 2000; AIUM 2000).

In the TRUMBI clinical trial using BW-US with a midfrequency of 300 kHz, 13 of 14 AIS patients showed intracranial hemorrhage after treatment with alteplase plus transcranial sonication (Daffertshofer *et al.* 2005). The BW-US conditions were as follows: I_{SPTA} 0.70 W/cm^2 , pulse-repetition frequency 100 Hz, pulse duration 0.5 ms and four circular transducers each with a diameter of 30 mm. The clinical causes of these hemorrhages were reported to be disruptions of small vessels in the subarachnoid space caused by vasodilatation and opening of the blood-brain barrier (BBB) by midfrequency US. Reinhard *et al.* (2006) had also suggested that abnormal permeability of human primary BBB disruption by the same BW-US condition might

induce gadolinium extravasation at the cortical surface in magnetic resonance imaging.

The possible risk caused by US can be established on the basis of five parameters: a high I_{SPPA} , multireflection, cavitation, standing waves and a large eMI value.

First, the I_{SPPA} was calculated as 14.0 W/cm^2 in the midfrequency US condition with an I_{SPTA} of 0.70 W/cm^2 and a 5% duty cycle (DC), which corresponded to 0.5-ms sonication (75 cm in pulse length) during a 10-ms repetition time period (Wang *et al.* 2008).

Second, the intracranial multireflections of the LFUS beam from the four transducers at the beam crossing area, the pulse duration became 2.0 ms, which corresponds to 300 cm in the pulse length. Therefore the BW-US in this pulse length can cause reflections 15 times in 20 cm of cranium diameter. The multireflections increased the intracranial acoustic intensity several-fold (Wang *et al.* 2008). The actual I_{SPPA} could reach values $>28.0 \text{ W/cm}^2$, which were at least double the calculated value (14.0 W/cm^2).

Table 1. Intracranial eMI value in monkey brain at 494 kHz calculated using the measured transcranial US penetrating ratio

| | Thickness (mm) | US penetrating ratio (%) \pm SD | Intracranial MI | Intracranial eMI |
|---------|----------------|-----------------------------------|-----------------|------------------|
| Skull 1 | 1.49 | 61 ± 2 | 0.16 | 0.48 |
| Skull 2 | 1.73 | 43 ± 8 | 0.14 | 0.42 |
| Skull 3 | 1.94 | 41 ± 12 | 0.13 | 0.39 |
| Average | 1.72 | 48 ± 12 | 0.14 | 0.42 |