

また、以上に述べた手段はほとんど一つの血栓から一つのデータしか得られないため、超音波強度と溶解促進率の関係解析には多数回の実験が必要で、実験の効率が悪い。それで、我々は前年度までに市販のウシ血漿から作製した血栓を用いて新しい2D式超音波血栓溶解評価法を開発した。この新方法では、照射前後ごとに一つのシート状血栓から、百個単位の関心領域 (Region of Interest, ROI) から血栓厚さのデータを取得可能で、各領域の血栓厚さ変化と照射強度を対応させることで、超音波照射強度と血栓溶解促進率の関係を効率よく分析できる。しかも、血栓の厚さを分光学的に計測するために、機械的介入の懸念がなく、測定精度も高い。よって、従来法に比べて測定の精度と効率の両者ともに大幅に向上させることができた。

しかし、ウシ血栓の溶解特性は必ずしもヒトと一致しないと考えられる。本研究は臨床とより近いヒト血漿を用いて、安定かつ均一なヒト血漿血栓の作り方を検討した。続いて、ヒト血漿血栓の吸光特徴を分析し、血栓溶解の本質 (フィブリンの分解) を最も反映する検出光波長を見出し、この波長を利用したフィブリン2D定量法を確立した。さらに、この最新技術を利用して、開発中の経頭蓋超音波の多種パラメーターとヒト血栓溶解促進作用との関係を解析した。特に、周波数の影響の解析から、超音波変調を用いたときにも、超音波の血栓溶解促進作用は減弱することがないことを確認した。

B. 研究方法

(1) 血栓セル

超音波照射強度と溶解促進の程度との関係を定量的に解析するため、超音波音場への影響がほとんど生じない血栓セルを開発した。このセルは一对のアルミフレーム (外枠 80mm×80mm、開口部 50mm×50mm) を含んでいる。そのうち

の一つは厚さ1mmでカバーフレームとし、もう一つは厚さ2mmで本体フレームとする。カバーフレームの裏側に厚さ25 μ mのポリプロピレン (PP) フィルムがセルの前壁として貼ってあり、主体フレームの裏側には1mmのシリコンのインサート及び50 μ mのポリスチレン (PS) フィルムが貼ってある。この PS フィルムがセルの後壁とする。蓋フレームと主体フレームを二つのクランプで固定すれば、PPとPSフィルムの間に厚さ3mm、広さ50mm×50mmの血栓溶解空間が得られる。

(2) 血栓作製法

新鮮凍結したヒト血漿 (12250110、) Lot①BJ2592と Lot② BJ3299はそれぞれコージンバイオ株式会社から購入。37℃解凍した後、①はシリンジフィルター (Millex® Syringe Filter Units, PES、0.45 μ m, 33mm) で、②はガラス微繊維フィルター (GF/D: 2.7 μ m, 47mm) でろ過した。

血栓セル本体の上、PPフィルム (40mm×40mm×25 μ m (厚さ)) がシリコンスペーサーと平行棒の支持下で底膜 (PSフィルム) から1.5mmの所にかげられた (図1)。この PPフィルムとPSフィルムの間に血栓形成用混合液を入れ、予定の時間後、PPフィルムを外して、シート状血栓がセル本体のPSフィルム上に作製される。

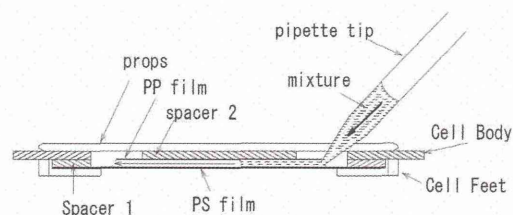


図1 血栓作製法 セル本体とその上にかげたPPフィルムの間に血漿混合液をピペットで注入。

(3) 血栓吸光spectrum及び厚さ測定

血栓吸光度spectrum及び厚さは特注の微小部位マッピング装置(日本分光株式会社)を用いて測定した。(図2)

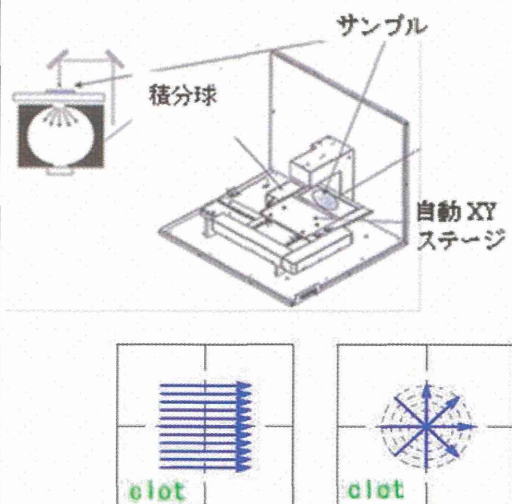


図2 微小部位マッピング装置

図2上部に示す様に分光した光ビーム開口と光センサー(積分球)の間に自動XYステージが設けてある。血栓セル(サンプル)を自動XYステージに乗せ、コンピュータのコントロールで移動させて、その各関心領域(ROI)のspectrum及び吸光度を測定できる。これと事前に測定した検量線と照合すれば、各領域の血栓の厚さが分かる。図2下部に示すように、自動XYステージは必要に応じて格子状スキャンまたは放射状スキャンができる。

(4) 検量線作成

検量線用セル(図3)の上下2層の透明PSシート間に楔状の空間が設けてあり、そこに血栓形成用混合液を入れて、血栓セルと同様な条件(温度、湿度及び時間)で楔状の血栓を作成した。検量線用セルを上記血栓厚さ測定装置に乗せて図2下左に示す様に横方向にスキャンし、各々の厚さの血栓と蒸留水での吸光度測定値の差分をとり、各厚さに対応する血栓吸光度が求められる。

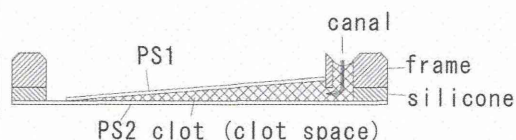


図3 検量線セル構造

(5) 超音波照射

超音波照射台に固定したプローブと血栓セルステージの位置関係と距離はXY及びZステージ(中央精機)で任意に調整可能とし、且つプローブの先端を血栓の中心軸上にしっかりと固定できるようにデザインした(図5)。また、同時に超音波暴露血栓、非暴露血栓を同時に検証できるようにした。超音波照射は、37°Cの水槽内にプローブ先端を水面より2mm程度沈め照射を行った。その際、超音波の反射を防ぐため、水槽底面には10mmの専用超音波吸音材(EUA201A型, EASTEC社)を2枚敷いた。

使用した超音波振動子の音場分布及び血栓セルの音場への影響をAcoustic Intensity Measurement System (AIMS Onda Corporation, Sunnyvale, CA)を用いて測定した。

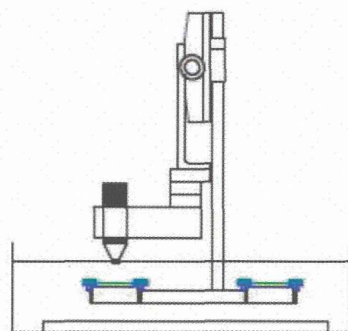


図4 超音波照射装置

(6) 統計学的評価

本実験では、シート状血栓を2個ずつセットで用意し、2個セットの一方を超音波曝露させ、もう一方非曝露のコントロールとした。超音波照射の有効性はDunnett法を用いて検定し、 $p < 0.05$ を有意とした。

C. 結果

(1) ヒト血漿血栓形成の特徴：トロンビンの影響

ウシ血漿と違って、カルシウム添加だけではヒト血漿が凝固しなかった。

ロット①(BJ2592)のヒト血漿は0.45 μ mのPESでろ過後、トロンビンを0.2、0.5、1.0NIHU/ml (最終濃度) 加えたら、10分~2分ぐらいで人血漿血栓が形成できることを試験管で確認した。

0.2NIHU/mlトロンビンでは図5左のように、不均一になったが、図5右のように0.5NIHU/ml以上のトロンビン添加ならば、不均一性も少なかった。

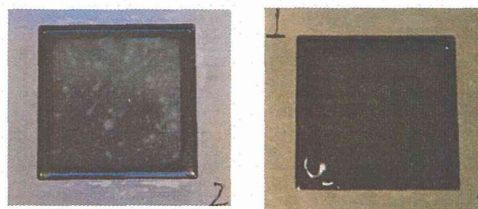


図5 トロンビンの影響

左はトロンビン0.2NIHU/ml添加、右は同0.5NIHU/ml添加で作った血栓。

ロット①が使い切った後に購入したロット②(BJ3299)のヒト血漿は0.45 μ mのPESでろ過、トロンビンを0.5 NIHU/ml (最終濃度) 加えた後、血栓が形成できたが、粒だらけの不均一な血栓となった。

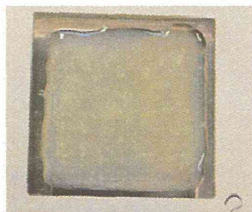


図6 0.45 μ mPESろ過したヒト血漿(ロット②)を既存のトロンビン添加で作った血栓トロンビンの部分的失活可能性を考慮して、トロンビンを新規作成して、その濃度の血栓への影響を検討した。



図7 トロンビンの影響

0.45 μ mろ過ヒト血漿(ロット②)で作った血栓。左からトロンビン添加濃度は0.5、0.9、1.5NIHU/ml

図7より、新規調整トロンビンで0.5NIHU/ml以上添加すれば、不均一性が減少し、1.5NIHU/ml以上はほぼ均一の血栓ができた。血漿のロット毎にトロンビン濃度を調整して、均一な血栓が得られることがわかった。

(2) ろ過方法の改良

従来、用いた0.45 μ mのPESではフィルターの根詰まりの程度が大きく、ろ過の再現性が不確かであった。そこで、47mmのGF/D濾紙(ポアサイズ2.7 μ m)を装着したステリフィル無菌ろ過システム(メルクミリポアXX1104700)を用いて陰圧をかけてヒト血漿をろ過した。スムーズにろ過されて、不溶物を全部除去したことを確認した後、小分けして-30°Cに凍結保存した。新たな方法でろ過保存した血漿を用いて作った血栓は、トロンビン0.5NIHU/ml添加によって、皆ほぼ均一にできた。

(3) ヒト血漿血栓の吸光spectrum

図8は検量線セルを用いて、その中間位置、つまり血栓厚さ1.5mmの地点で測ったヒト血栓各時間点の吸光spectrumである。上は全幅図、下は拡大図。赤線はセルの吸光を除いた100分間できた血栓の純吸光spectrumである。300nmの近く(296nm)に最大吸収ピーク、410nmの近くに小さいピークがあった。尚、作製開始から70分以後はspectrum重なっている。

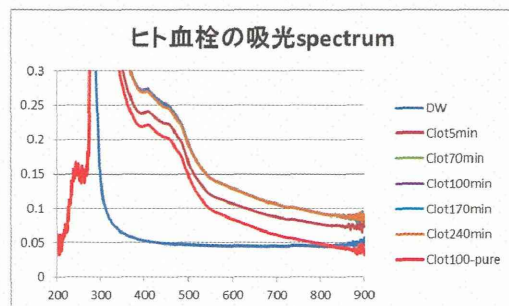
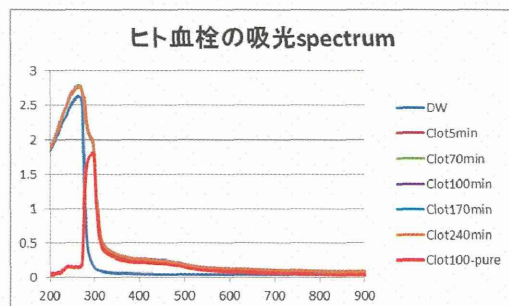


図8. ヒト血栓の吸光spectrum

この結果から、血栓厚さの検出波長は300nm付近、あるいは410nm付近が良さそうだが、実際の血栓セルを用いて、その中に作った血栓を37℃TTBS (0.1%TWEEN-20mMTRIS-buffered-saline, PH7.5) に2時間漬けた前後のspectrumの変化量を調べた結果は図9に示すように、550nm以上は少し増えたが、510nm以下で減少傾向が明確であった。特に300nm付近に顕著な減少が現れた。410nmの近くの減少は300nm程には大きくないが、減少が明確であった。これらの減少は、血栓中のタンパク質が水溶液に溶け出したためと考えられた。また、TTBSを入れずに、37℃飽和湿度環境下においた場合(図中では「密閉」と記述)でも、タンパク質変性に基づくと考えられる吸光度の減少があった。

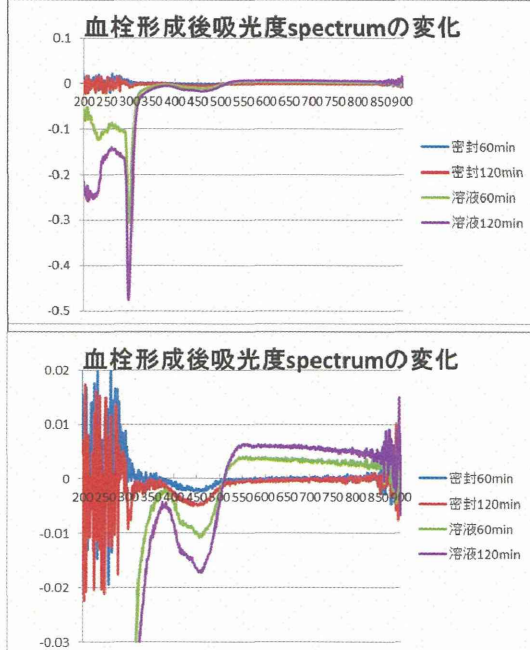


図9. ヒト血栓形成後の吸光spectrum変化
上は全幅図、下は拡大図

以上より、時間経過による吸光度減少のない560nmを血栓厚さの測定波長に選定した。560nmではタンパク質分子の吸収ではなく、血栓の濁度による測定となる。TTBS溶液中560nm以上での吸光度のわずかの増加の原因はまだ不明だが、TTBS溶液とフィブリンの相互作用に

よると推定され、その血栓構造及び血栓溶解特性への影響は今後さらに解明する必要があると考えられる。

(4) ヒト血栓厚さ検量線

図10は検量線セルに作ったヒト血栓に対して、検出光波長560nm(band width 10nm)に置いて得られた検量線である。わずかに2次的な要素を含んだ線であるが、ほぼ1次線形な検量線であった。この2次的要素の発生原因は以下と推測される：560nmの付近の光強度の減衰はフィブリンの濁度が起因する光散乱が主要原因で、光センサーに到着できる光の量はフィブリンの位置にも関係している。すなわち、同じフィブリンでも、その位置が遠ければ遠いほど、光センサーに入る光量が少なくなることが考えられる。一方、血栓が厚くなるにつれて、フィブリンの平均位置も少しセンサーから遠くなるので、このような2次的項目が発生したと推定した。

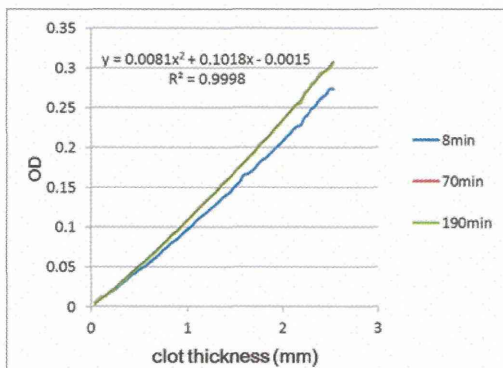


図10. ヒト血漿血栓の560nm検量線

(5) ヒト血漿血栓に対する超音波の血栓溶解促進作用

前項目で確立したヒト血栓厚さの新規測定法を用いて、開発中の超音波照射によるrt-PA血栓溶解促進作用とそのパラメーターの関係を解析した。図11は測定結果の一つの典型例である。上はrt-PAだけで、下は超音波照射を併用した(本例は500kHz超音波で、中心最大強度は0.7W/cm²であった)。

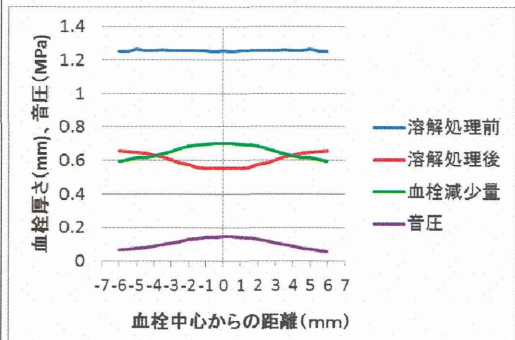
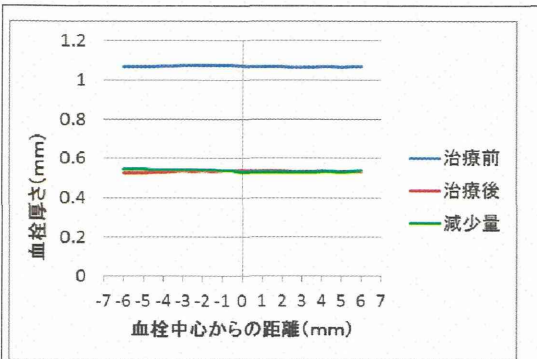


図11 超音波ヒト血栓溶解測定例

ウシ血漿血栓と同様、診断レベルの低い強度の超音波でも、その強度（又は、音圧）に依存して、血栓溶解作用が増強されたことがはっきり示された。

次に4種類超音波周波数（400kHz、500kHz、600kHz及び500kHz±100kHz変調波）のそれぞれ2種の強度、2つの照射時間での血栓溶解増強作用を検証した（図12）。rt-PAのみでは、血栓減少量が直径12mmの検査範囲内にほぼ平らであったので、超音波照射効果の分析は、超音波照射の増強効果は以下の式で求めた

$$\text{増強率} = (Dc - Db) / Db \times 100\%$$

ただし、Dcは血栓の中心部の血栓厚さ減少量、Dbは検測範囲周辺、つまり中心から6mm所の平均血栓減少量である。

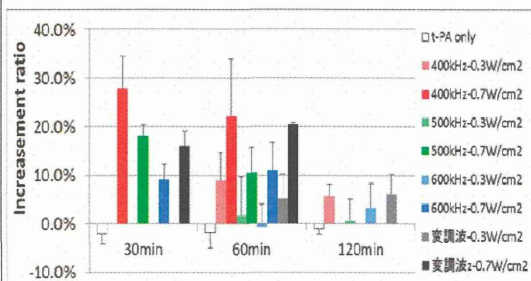


図12 ヒト血栓における各種超音波の血栓溶解増強効果

0.7 W/cm²の各種超音波の各時点すべてで統計学有意な血栓溶解増強効果が示した（各群皆p<0.001）。また、0.3 W/cm²の場合でも、400kHz超音波と変調波超音波が統計的に有意な（p<0.05）血栓溶解増強効果を示した。

D. 考察

ウシ血漿と違って、ヒト血漿血栓を作製する場合は、カルシウム添加のみでは不十分であり、血漿ロット毎に最適化したトロンビンの添加が必要であった。また、ろ過方法にも注意する必要があった。従来常用していた0.45μmフィルターより2.7μmのフィルターが血漿の凝固特性への影響が少ないと考えられ、最適濃度のトロンビン添加を実行し、2.7μmのフィルターを使用すれば、再現性良く均一なヒト血漿血栓を得ることができた。

ヒト血漿血栓の吸収ピークは300nm周辺及び410nm周辺にあるが、両者特に前者は、血栓溶解剤のない溶液中にも溶け出したと考えられ、吸光度が顕著に減少した。このように、血栓に含まれるタンパク質の分子吸光を用いれば、高感度を得るのに有利であるが、正確な血栓厚の変化を測定できない。そこで、多少の感度を犠牲にしても、560nmの血栓の濁度に基づく吸光度変化を測定する方法をとった。560nmの吸光度と血栓厚さは、ほぼ1次直線に近い対応関係にあり、再現性良く、ヒト血漿血栓の膜厚を正確に測定することに成功した。

以上の560nm検出光を利用して、開発中の超音波の低い強度（診断レベル）での血栓溶解増強作用を明確に測定することができた。また、超音波血栓溶解促進治療用としてメリットの多い変調波は、構成する代表的な3つの周波数のサイン波の中間程度の血栓溶解促進作用があることが判明した。単一周波数のサイン波超音波において、頭蓋骨及び骨モデルファントムの透過性が、骨厚・皮膚厚・周波数によって大きく変動し、この変動は安全で有効な血栓溶解促進作用にとって好ましくない。これに対し、変調波によってこの変動を顕著に小さくできることがわかっている。

今回、変調波にすることによって、血栓溶解促進作用が減ることがないことが判明したことが重要であり、今後、本研究で変調超音波を用いて行くことに、血栓溶解能の点からは問題がないことが確認されたといえる。

E. 結論

ヒト血漿血栓を用いての超音波血栓溶解促進作用を正確に定量する方法を開発した。超音波血栓溶解促進療法で、頭蓋骨の透過性の点から好ましいと考えられる400～600kHzの変調波は、構成する周波数のサイン波と同程度の血栓溶解促進作用があることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 王 作軍、齊藤 理、三村秀毅、井口保之、小川武希、横山昌幸「超音波溶解促進作用の新しい測定法：様々な種類の血栓の測定を可能にする改良」第16回 日本栓子検出と治療学会2013年10月12日

G. 知的財産権の出願・登録状況

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（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

ラット急性脳梗塞モデルによるバブルリポソームの有効性安全性評価

研究分担者 丸山 一雄 帝京大学薬学部 教授
研究協力者 澤口 能一 帝京大学薬学部 研究員

研究要旨 我々が独自に開発したバブルリポソームは超音波診断のみならず、ターゲティング分子を修飾することで特異的な薬物・遺伝子デリバリーにも応用可能である。このように様々な機能を有するバブルリポソームは疾病の診断から治療まで包括的に行うことのできる優れたツールになり得る。前年度の成果を基に、バブルリポソームの膜表面に血栓（活性化血小板）特異的結合能を有するRGDペプチドを修飾（RGD-BL）し、活性化血小板および血栓への結合能を、ラット大腿動脈電気刺激誘発血栓モデルで評価した。その結果、RGD-BLは血栓に結合し、超音波診断装置下で血栓造影が可能であることが示された。

A. 研究目的

虚血性疾患の治療では、表1に示す様に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した臨床研究がある。三者併用による再開通率の向上のメカニズムは、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。

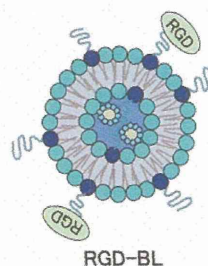
・脳梗塞治療における血流再開通率	
t-PA単独	23.9%
t-PA + TCD(経頭蓋超音波ドブラ)	40.8%
t-PA + TCD + マイクロバブル	54.5%

Reference・・・Molina CA et al. stroke, 2006.

表1 超音波、マイクロバブル併用による血栓溶解促進効果

バブルリポソームはパーフルオロプロパンを内封した超音波造影効果を有する小胞であり、超音波出力や周波数をコントロールすることにより、超音波診断のみならず、薬物・遺伝子デリバリー、発熱による温熱療法にも応用可能なツールである。さらにバブルリポソームには様々なターゲティング分子を容易に修飾可能であるため、標的組織・部位特異的

な診断・治療が可能になると期待される。このように様々な機能を有するバブルリポソームは疾病の診断から治療まで包括的に行うことのできる優れたツールになり得る。図1に示す血栓標的型バブルリポソームを作製し、ラットに電気刺激誘発血栓を作製して結合性と超音波造影の評価を行った。本検討では、バブルリポソーム（BL）へ血栓集積能を付与すべく、ターゲティング分子として、血栓（活性化血小板）に高発現するGPIIb/IIIa分子と高親和性を持つ環状化RGDペプチドを用いた。







-  フォスファチジルコリン: DSPC
-  フォスファチジルエタノールアミン: DSPE
-  ポリエチレングリコール: PEG
-  RGD α(RGD)κ(CGG)オクタペプチド

図1 RGD-BL模式図

B. 研究方法

(1) BLの調製

脂質組成をDSPC: DSPE-PEG(2k)-OMe: DSPE-PEG(3k)-Mal:cholesterol = 64: 1: 5: 30 (モル比) とし、総脂質量100 μmol をクロロホルム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エマルジョン化を行った。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。これを凍結融解を3回繰り返した後、エクストルージョン法により粒子径を100-200 nmに調整した。

調製したリポソームを二等分し、一方には12.5 mmolのRGDペプチド(CGGc(RGDfK))溶液を加え、もう一方には12.5 mmolのコントロールペプチド(CGGc(DGRfK))溶液を加え、静かに攪拌しながら4°Cで一晩反応させた。各種リポソームを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バブルリポソームとした。

(2) C₃F₈ガス封入量の測定

BL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BLを採取した。このバブルリポソーム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

BLの入ったバイアル瓶をバイアルオープナーで静かに開封し、常圧とした後に、PBSで100倍希釈した。このBL懸濁液の粒子径を動的光散乱法により測定した。

(4) 電気刺激誘発血栓の作製

ラット大腿動脈の心臓側および抹消側を針金を挟み結紮し、血管の3/4程度をせん断。血管の切り口より陽極に繋いだ直径0.3 mmの針金を3~5 mm程度挿入し、陰極側の針金を皮膚に接触させ10分放置。針金を抜去後、血管の切り口より1 mm程度心臓側で結紮し、電気刺激以前に結紮しておいた心臓側の糸を切り、血流を再開通させる。

(5) RGD-BLの血栓集積の評価

小動物用超音波画像診断装置 (VEVO2100) にて閉塞動脈であることを確認後、バブルリポソーム投与前と投与後の血栓を撮像し、血栓の輝度をImage Jにて解析。Dose: 1 mg/mL, 500 μL

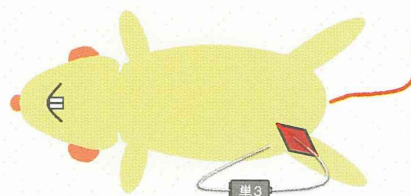


図2 電気刺激誘発血栓作製法

C. 研究結果

(1) バブルリポソームのC₃F₈ガス封入量の検討

バブルリポソーム中のC₃F₈ガス封入量をガスクロマトグラフィーで測定した。その結果、バブルリポソームのガス保持量は11.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、RGD修飾バブルリポソームのガス保持量は10.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ となった。C₃F₈ガス封入量はペプチド修飾の有無にかかわらず同程度であり、バブルリポソームのガス保持量はRGDペプチド修飾に影響を受けないことが示唆された。

(2) バブルリポソームの粒子径の測定

バブルリポソームの粒子径を動的光散乱法を用いて測定した。その結果、BL (591.5±230.3 nm)、DGR-BL (647.2±342.7 nm)、RGD-BL (613.8±107.5 nm) となり、粒子径の変化は認められなかった。これらの結果から、バブルリポソームの平均粒子径はオリゴペプチド修飾による影響をほとんど受けないことが示唆された。

(3) RGD-BLによる血栓造影効果

RGD-BLの血栓結合能を検討すべく、ラット大腿動脈に電気刺激誘発血栓を作製し、RGD-BL投与前後の血栓の輝度変化を超音波造影装置モニタリング下で観察することで評価した。その結果、図3に示す様にRGD-BLを投与した群では血栓の輝度上昇が確認された。

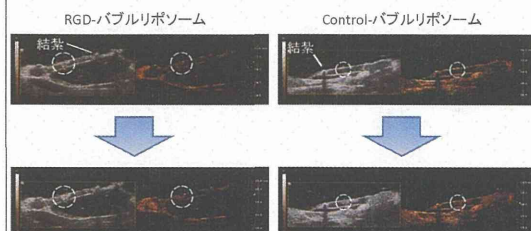


図3 バブルリポソームによる
in vivo造影

D. 考察

前年度の結果より、リポソームへRGDペプチドを修飾したことにより、RGD-BLへ活性化血小板結合能を付与出来たことがフローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析により確認された。また、バブル化する際に超音波照射を行ってもRGDペプチドの活性は失われないことも確認され、製剤の高い安定性も示唆された。

電気刺激誘発血栓に対してRGD-BL投与すると、血栓の輝度上昇が確認された。輝度の上昇は血栓にバブルリポソームが結合したことが推察され、RGD-BLがin vivoでも機能することが確認出来た。今後検討数の追加、および投与量を変化させることで詳細に最適な血栓造影条件・超音波血栓溶解条件について検討していく予定である。

E. 結論

BLにRGDペプチドを修飾することで、活性化血小板への結合能の付与が可能であり、ラット大腿動脈に電気刺激誘発で作製した血栓に集積することが確認された。このRGD-BLは超音波診断機での血栓の検出を容易にさせるだけでなく、脳梗塞の際に超音波と併用することでt-PAによる血栓溶解作用の促進にも利用できる可能性が期待された。

また、今後はRGDペプチドのみならず、血栓を標的可能な抗体などのターゲティング分子を修飾したバブルについても検討していくことで、超音波血栓溶解療法に最適な血栓標的型バブルを開発する予定である

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Yoshikazu Sawaguchi, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Daiki Omata, Hitoshi Uruha, Mutsumi Seki, Kohsuke Hagisawa, Kazuo Maruyama, 16th World Neurosonology Meeting, 2013. 10. 17-20, Sofia, Bulgaria, Development of thrombus-targeting bubble liposome for diagnostic and tPA thrombolysis acceleration

2) 澤口能一、鈴木 亮、小田雄介、小
侯大樹、宇留賀仁史、関むつみ、萩
沢康介、丸山一雄、第57回日本薬学
会関東支部会、2013、10、26、東京、
血栓標的型バブルリポソームを用いた
血栓 *in vivo*イメージング

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

超音波血栓溶解補助医療機器の製品化

研究分担者 株式会社カネカ 川島裕幸

研究要旨

塞栓性脳梗塞の治療にあたり、発症から4.5時間以内の非出血性梗塞であれば、rt-PA投与治療が施行される。しかし、rt-PA治療による予後良好例率は30%程度にとどまる。一方、rt-PA投与による予後良好率は、診断用超音波を併用することで向上することがアレキサンドロフらによって報告された。本研究は、2018年度に超音波の血流再開の改善効果を誰もが簡便に享受しうる補助医療機器の製品化を目指す。

A. 研究目的

急性脳梗塞の治療にあたり、発症から4.5時間以内であり、MRI、CTなどで出血がない梗塞性脳卒中を確認した場合、血栓溶解目的にrt-PAの静脈投与は第一治療選択となっている。しかしながら、rt-PA治療の予後成績であるmR0-1の割合は、残念ながら30%程度にとどまっている。また、予後状態は血流再開までに要する時間が大きく影響することから、再開通率を向上させることは重要ながら、血管に損傷を与えずに短時間で血流再開を実現することは、患者の予後にとり極めて高い要求事項となる。さらに、予後の改善率向上は、患者のみならず、患者周辺の介護の担い手、そして医療経済の面からも求められていることから、搬送スタッフ含めた現場医療スタッフらは、1分でも早い血流再開を得るため、早期治療開始を実現すべく、体制整備、緊急対応スキルの向上に取り組んでいる。

rt-PA投与が薬事承認を受ける以前の医療現場では、早期血流再開、ならびに再開通率の向上させる方法として、医師判断により塞栓部血栓にマイクロカテーテルなどを用いてウロキナーゼ等の血栓溶解薬を直接血栓塞栓部位に投与する方法の他、脳血管拡張用バルーンを塞栓部位に進めた後、血栓を破碎する方法が取られていた。2010年には、血栓を掻き出し回収するデバイスの『Merci』が承認取得され使用されている他、2012年に血管内で血栓を粉碎しながら吸引除去する

『Penumbra』が承認を受け臨床使用を開始された。

しかしながら、ホノルルショック（ホノルルで開催された学会での臨床研究結果報告）に代表されるように、脳卒中関連の各専門学会において、インターベンションによる再開通率の改善は認められたものの、出血の増長傾向や、最終目的である予後改善においては未だ改善に有効な結果が得られていない旨、報告がなされている。2014年、新たに承認されたステント様メッシュの血栓回収用血管内治療デバイス『ソリティア』『Trevo』が治療成績の改善に有望視されており、今後の臨床研究によって、予後改善に有用性が実証されることに期待が高まる。

以上のように、血管内治療による血栓摘出術も治療選択肢として加わり、rt-PA投与後、もしくは投与不可判断症例のために血流再開不可であった場合は、血流再開に血管内治療のコンバイン治療も求められ、臨床研究が始まっている。しかしながら、脳血管内治療は実施可能な医師、施設が限られているうえ、治療開始までの時間を要することから、全国で発生しうる脳卒中患者の一次救急は、依然rt-PAの静脈投与治療が第一選択となっている。

rt-PAより血栓溶解効果を改善するためデスモプラーゼなど新薬の開発も進められているが、未だ上市の目途は立っていない。その中、V. Alexandrov（米）ら

によって2004年New England J. Med. にてrt-PAの血栓溶解治療の際、診断用超音波を併用照射することでrt-PAの血栓溶解効果を高め、rt-PA投与開始から15分以降の観察時間で血流再開率の向上を得ること、ならびに予後が改善されたことを確認し、報告している。

その後、V.Alexandrov (米)らの報告を受け2005年、Daffertshofer (独)らが、超音波の効果を高めるべく頭蓋骨を透過しやすく、また確実に照射できることを目的に、300kHzの超音波をrt-PA投与中ならびに投与終了後30分の総計90分間照射する臨床研究を実施した。しかしながらDaffertshoferの臨床トリアルは、26例を計画するも14例時点において5例 (35.7%)の患者に症候性出血を発症、さらには死亡例も経験したことから、臨床研究は途中で中止された。この報告は、超音波を照射することのみに主眼を置いたため、診断装置の安全基準 0.72 W/cm^2 を大きく上回る $14\sim 28 \text{ W/cm}^2$ といった過度に強い超音波が照射された結果、定在波などによりキャビテーションが発生し、脳実質、血管に傷害を発生させたと古幡博が、最新医学 第63巻 第7号:91-102, 2008. で考察している。

その後、2008年Eggers.らがJ, Stroke に診断用超音波を経頭蓋骨照射併用することで、投与開始から15分以降60分までの血流再開率が改善することを報告している。特筆すべきは、24時間後の血流再開率は超音波の照射有無による差異は見いだせなかったものの、診断用超音波照射群の予後が著しく改善していることである。V.Alexandrov (米)の報告と併せEggers.が再び超音波照射併用によるrt-PAの早期血栓溶解が、予後改善の有用性を報告している。超音波照射が普及しない背景として、目的血管検出難易度の高さ、見出した目的血管に超音波を持続照射するという双方において課題があり、一般治療には至っていない。

本研究は、梗塞性脳卒中患者の側頭部に超音波振動子を高度な技術を要せず貼付装着することで簡便に超音波を中大

脳動脈起始部周辺血管に照射し、rt-PAの血栓溶解を促進させ、患者予後を改善する補助医療機器の開発を目指す。

【平成25年度の具体的な目標】

- (1) 超音波の頭皮/頭蓋厚みによる超音波透過性の確認。
- (2) 頭蓋内に安全に超音波を照射・供給する超音波周波数を実現する振動子の設計
- (3) 振動子を簡便、確実に貼付する装着具の開発 (ゲル、固定具)
- (4) 適切な変調を有する超音波駆動信号を供給するポータブルな駆動装置の開発
- (5) 安全性確立に向け動物評価用小型振動子の設計開発 (報告省略)

である。

上記(4)に示した、ポータブルな駆動装置の開発目的は、先に示した脳梗塞治療の一つである血管内治療のコンバイン治療が今後浸透することが予想される。病院内での移動はもとより、さらには病院地域連携システムの確立も進められており、血管内治療が行えない病院から血管内治療が実施可能な病院への救急車による搬送する際に、搬送中の車内でも超音波の照射を継続しうるシステムとして開発することは重要な課題となる。

B. 研究方法

(1) 骨厚み傾斜ファントムによる超音波透過特性評価

超音波を頭蓋内に照射する際、頭蓋骨を超音波が透過しにくいことは、2012年慈恵大が保有するヒト頭蓋骨を用いて確認した。さらに、超音波透過障壁である頭蓋骨は、平滑、かつ厚みが均等な部位は存在せず、頭蓋骨内外に凹凸がある、不均一な厚み構造を有している。

骨厚み変化による超音波透過性の影響の確認は、頭蓋内超音波分布を把握し、超音波出力の設計にあたっての基礎情報収集として重要である。不均一な骨厚みは設計を複雑にするため、音響特性を骨

厚み 1~5mm/7cm (幅5cmは均一厚み) に傾斜させたファントム (図1) を作成し、30×50mmのポーラスセラミックス製振動子のファントム無ピーク音響強度を0.03 W/cm²に設定した周波数400~700kHzの固定、ならびに変調周波数による透過特性を評価した。

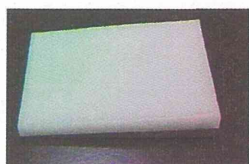


図1：骨厚み1~5mm傾斜ファントム

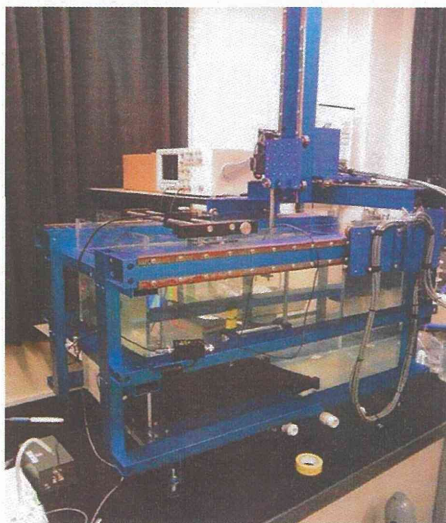


図2 音響強度測定装置
(東京慈恵会医科大学保有)

(2) 振動子の周波数特性改善

振動子は、材料、構造設計により同電圧の周波数帯域信号を入力した場合でも、振動子特性により出力される周波数帯域が異なる。2012年、フィルム状超音波振動子、セラミックス製振動子などの検討の結果、フィルム状振動子は溶解に必要な出力を実現することが難しく、セラミックス製振動子の検討を進めた。セラミックス製振動子においても狭い特定周波数域において電気エネルギーのロスが少なく効率よく振動する圧電素子

(以下ハイQ材 (図3-1)) と、同じ音響強度を出力する際にハイQ材に比較し高い電気エネルギーが求められるものの広い周波数帯域の出力に対応する圧電素子 (以下ローQ材 (図3-2)) について検討の結果、変調を活用時の適合性からローQ材を選択した。

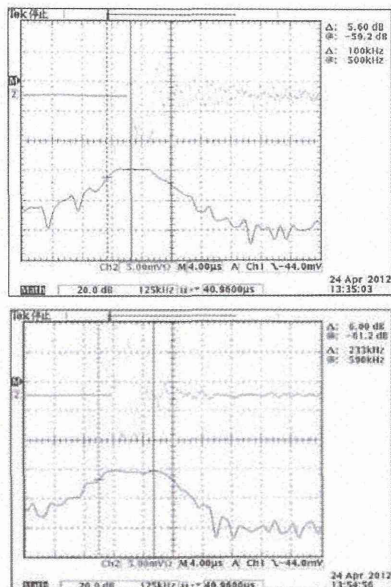


図3-1 (上) ハイQ材 (人工セラミックス) 3-2 (下) (多孔質人工セラミックス) 各周波数特性

変調活用は、平成24年度の検討により傷害の原因となる局所的に強い音響強度を生じる定在波、ホットスポットの発生回避にあたり、変調超音波が有用であることを見出したことによる。この変調領域は500kHz±100超kHzを計画しているが、一般的に活用されている500kHzローQ材のピーク周波数帯域は、320~620kHzであり、振動子の周波数特性にバラツキが生じた場合、広帯域での超音波が照射されない懸念が残る。定在波、ホットスポットの回避は、安全特性の確保に向けて重要事項であるため、400~600kHzを確実に照射する振動子の設計を行った。

(3) 装着システム設計

(3-1) 皮膚接触ゲルの透過性評価

超音波を頭蓋内のターゲット部位に照射するためには、空気層は伝搬障壁となる。通常超音波診断では、皮膚と超音波診断プローブの間に空気層が入らないように、接触部に粘性液状ゼリーを厚く塗布し、空気の抱き込みが無いことを超音波診断画像で確認しながら実施する。本研究開発の医療機器は、装着時に画像診断により超音波遮断の原因となる空気層の有無は確認しない。さらに、側頭部の剃毛作業は簡略化できないものの、より迅速な治療開始のために、超音波振動部に半固形ゲルを装備し、剃毛・装着位置を確認の後、速やかかつ確実に空気層の抱込みを起こさない装着を実現する。

この半固形ゲルは、振動子の装着部位として頭蓋骨の厚みが薄い側頭部前方を計画しているが、装着部位は概して凹凸のある側頭部への装着のため、凹凸を有する皮膚の接点となるため、密着が得られる柔軟性を有するゲル素材を選定することが重要である。さらに超音波の減衰、反射を生じないゲル素材であることもさらに重要な要求特性となる。

超音波の反射を抑制するためには、皮膚に接触するゲル素材の音響インピーダンスが皮膚と近似していることが求められる。今回は水、皮膚に近似しているといわれ、安全性の高い粘着性シリコンゲル素材を候補とし、超音波透過性をAIMSを用いて評価した。

表1 評価ゲル一覧

	サイズ形状
1	粘着性シリコンゲル 0.2mm厚
2	粘着性シリコンゲル 0.6mm厚
3	市販超音波用ゲル 『ソナゲル』5mm厚

(3-2) 装着具の設計

本研究開発は、貼付型振動子によって頭蓋内に超音波を照射し、rt-PAによる血栓溶解を促進するデバイス開発を目指

してきた。しかしながら、臨床現場に確認したところ、対象患者の意識レベルは低いケースが多いため、無意識な挙動をとることが明らかになった。頭部に違和感のある振動子を貼付した場合、貼付した振動部を無意識下に剥離除去する可能性が懸念される。振動部が剥離された場合も、rt-PAの血栓溶解治療は継続され、rt-PA治療に悪影響は及ぼさないが、眼球上に移動した場合、視力障害を生じる可能性がある。

また、透過性の評価の際にも述べたが、ヒト頭蓋骨に平滑部位は存在しないため、平滑な振動子と装着部間に空気層を挟まずに固定することは困難である。空気層を挟まずに振動子で発生させた超音波を適切に頭部に伝搬させるには、振動子と側頭部の間に柔軟なゲルを配し、軽度な圧力をかけた状態で密着を維持する必要がある。そのため、超音波振動部、側頭部接触ゲル、振動部保持具を一体とした超音波ユニットのデザインを開始した。

(4) 駆動装置設計

平成24年度には、定在波の抑制を目的とし、変調による抑制効果を確認のため、変調機能を有する基板試作を行い(図4)、変調信号による定在波抑制効果を確認した。

今年度は、臨床において、出力と消費電力、電氣的、機能的安全性、信頼性の確保を目指した駆動装置設計を着手した。着手に当たり、設計要素の必要事項を調査・検討し、機器の要求仕様を明確にした。

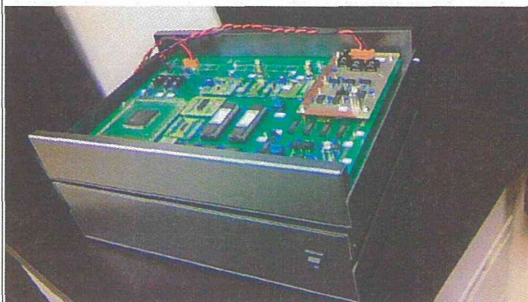


図4 変調超音波出力回路試作機

【設計要求項目】

1. 販売国、地域、使用・輸送環境
2. 適用法規、規格、ガイドライン
3. 用途、使用方法
4. 求められる機能、形態（含表示）
構成要素（ソフトウェア含む）
5. 電気・機械的安全性、信頼性
6. 出荷形態（滅菌要否）
7. その他要求事項

C. 研究結果

(1) 骨厚み傾斜ファントムによる
超音波透過特性評価

超音波音響強度は骨厚みに比例せず、周波数により個別の透過強度分布を示した。PSRF (Periodic Selection of Random Frequency) 変調は、骨厚み傾斜ファントム透過後もホットスポット生じず、音場全体において平均化した音響強度分布を示した。

a) ファントム無し

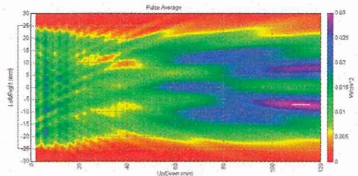


図5-1 30×50（縦軸）振動子
超音波音響強度分布
（分布図右出力スケール：0.03w/cm²）

b) 400kHz超音波

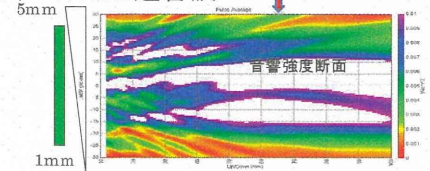


図5-2 骨厚み傾斜ファントム透過音響分布
※ 分布図右出力スケール：0.01w/cm²
※ 分布図左：緑□／振動子位置、
黄色△／骨傾斜厚み位置
（以下スケール、同位置につき略）

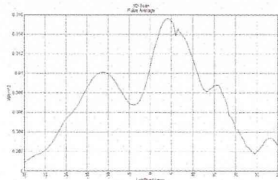


図5-3 振動子面から6.5cm部音響強度分布

c) 500kHz超音波

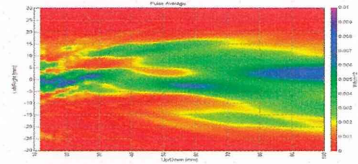


図5-4 骨厚み傾斜ファントム透過音響分布

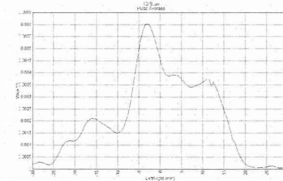


図5-5 振動子面から6.5cm部音響強度分布

d) 600kHz超音波

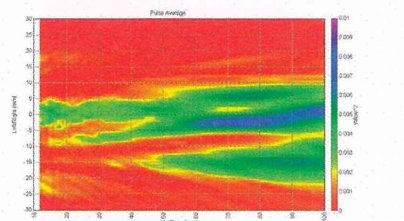


図5-6 骨厚み傾斜ファントム透過音響分布

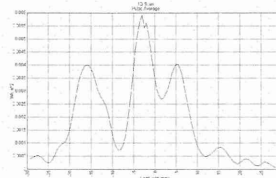


図5-7 振動子面から6.5cm部音響強度分布

e) PSRF400-600kHz帯域 超音波

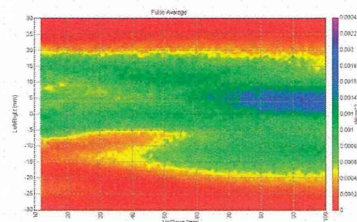


図5-8 骨厚み傾斜ファントム透過音響分布

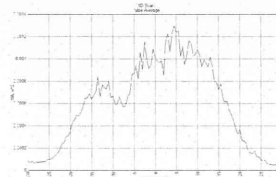


図5-9 振動子面から6.5cm部音響強度分布

(2) 振動子の周波数特性改善

骨厚み傾斜ファントムモデルでの超音波透過性評価においてもPSRF変調は、周波数固定超音波よりも照射領域に均等な透過性を示した。

400~600kHzの周波数の近距離限界点を6cm付近として活用すべく、26mm角サイズ振動子とし、組成、成型条件、構成部材、構造等を調整し、広帯域の振動子を設計した。

設計規格と試作結果を下記に示す図6に示す。

タイプ	設計規格[kHz]	結果[kHz]	判定
A-1	350/750	335/753	○
A-2		335/723	×
B-1	330/770	<u>333</u> /783	×
B-2		<u>345</u> /778	×
C-1	390/910	353/920	○
C-2		355/910	○

※下線斜字は規格外

500±100kHz超の変調に当たり現振動子出力範囲では、330kHz以下の低周波出力対応設計は難しいが、350~700kHzの設計は安定しており、PSRF変調に対応する設計は確立した。

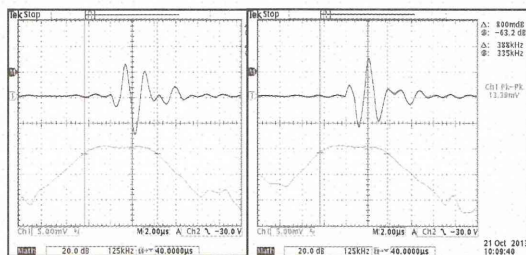


図6-1 : A-1(左)、A-2振動子周波数特性

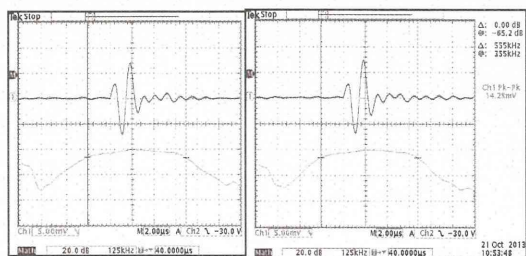


図6-2 : C-1(左)、C-2振動子周波数特性

(3) 装着システム設計

(3-1) 皮膚接触ゲルの透過性評価

500kHzにて柔軟シリコンゲルの透過性をゲル無、ならびに市販超音波ゲル(ソナゲル:タキロン社製)と音響強度分布変化を測定した。ゲルは、簡便装着を目的としているため強度と粘着性を有するシリコン粘着性ゲルを検討した。シリコン粘着性ゲルは200μm、600μmを用意し、厚みによる超音波透過性への影響を評価した。測定条件は、ゲル無し脱気水37℃水中条件において、超音波近距離限界点音響強度30 w/cm²を標準条件とした。標準条件において、市販ゲルは厚み5mmにおいてもの近距離限界点の超音波透過性は20 w/cm² (67%) 有していた。一方、評価ゲルは200μmにおいて26 w/cm² (87%)、600μmでは23 w/cm² (77%) となり厚みによる減衰度が高くなることを確認した。(図7)

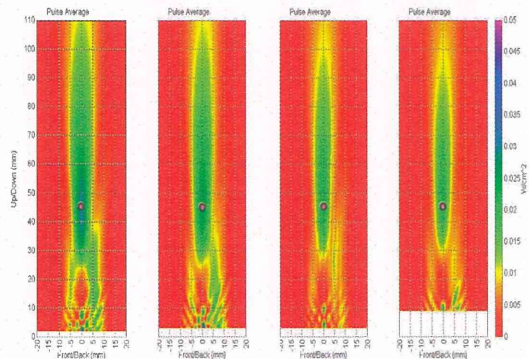


図7 ゲル透過音響分布

(左から)ゲル未装着/シリコン粘着ゲル厚:0.2mm/同ゲル厚:0.6mm/ソナゲル厚:5mm

実臨床での装着状態を考慮し、側頭部の凹凸曲面でも空気層となる隙間なく装着する場合、5mm以上の厚みが必要となる。今回評価したシリコン粘着性ゲルを採用した場合、減衰率が高く、装着部の凹凸により皮膚面到達時の音響強度に差異が生じやすいことが想定される。粘着性のシリコンゲルによる貼付型超音波血栓溶加速デバイスの構造は断念し、透過性の高いゲルを採用する超音波ユニット(装着具式)の検討とした。

(3-2) 装着具の設計

装着具は、救急現場において簡便に振動子装着位置を特定でき、さらに簡便な手順で装着可能であることが求められる。基本デザインを現場医師、スタッフらと検討作業を進めで簡便な装着性を有するか？確認を行い、基礎設計を作成した。第一世代は装着部位をこめかみ部に設定し、耳孔から位置を特定する方法を採択した。

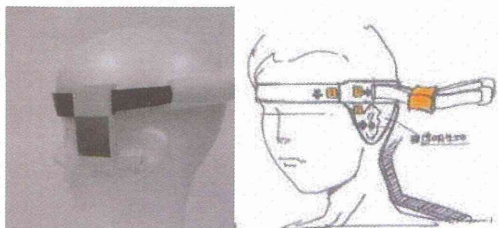


図8-1 第一世代構想試作

第一世代は患者が寝たままの装着に煩雑である指摘を受け、第二世代は寝たまま装着可能な設計を進めた。



図8-2 第二世代試作

第二世代は装着性は優れるものの意識がない患者が簡便に離脱させてしまうことが可能なため、安定化と装着性を再度設計を見直し、位置決めと安定性の両立の第三世代で設計の目途をつけた。

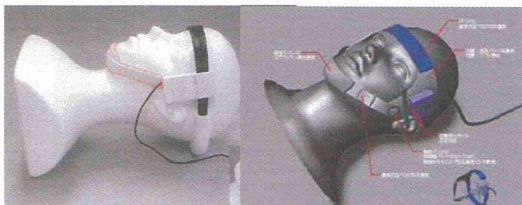


図8-3 第三世代試作

基本構想は確立でき、振動部の最終仕様を確定後に超音波ユニットの最終設計を行う。

(4) 駆動装置設計

要求仕様項目について以下を設計要素を確定した。(詳細項目は割愛)

1. 販売国、地域、輸送環境：
当研究開発の対象国は日本とする。
2. 適用法規、規格、ガイドライン：
薬事法：施行規則、QMS省令、医療機器基準を含む
3. 用途、使用方法：
rt-PA適用患者
目標部位：中大脳動脈起始部、
取扱者：医師看護師等医療スタッフ
使用環境：病院内、救急車内
ユーザビリティ規格：IEC62366
4. 求められる機能、形態(含表示)
 - * 構成要素(ソフトウェア含む)
 - * 駆動装置と超音波ユニットは独立
 - 血栓溶解に求められる超音波を安定出力すること。
 - 異常出力監視含む安全監視機能
 - 照射稼働時間計測機能を内蔵し、自動停止機能を保有。
 - 表示検討事項を設計検討結果例として以下に示す。

Hazardous Situation	監視機能	表示 (異常時表示◇) 電源オン表示 準備完了表示 超音波出力オン表示
接続異常	接続監視	◇
電池異常	電圧監視	◇
電池残量不足	残量監視	残量表示
CPU異常	CPU監視	◇
回路電圧異常	電圧監視	◇
振幅異常	振幅監視	◇
周波数異常	周波数監視	◇
変調異常	変調監視(?)	◇
過電流	電流監視	◇
発振部過熱	温度監視	◇
FAN回転	FAN回転監視	◇
治療時間不明		治療時間表示

D. 考察

平成25年度は、フィージビリティの結果を受け、実臨床使用を想定した開発を着手した。

安全性、有効性の観点から頭蓋骨透過後の超音波特性の把握にあたり、骨モデル層の厚みに傾斜を持たせたファントムを用いて評価し、PSRF変調の有用性を確認した。超音波の透過性は、高い周波数側、および傾斜の厚み増加に従い超音波の減衰が生じると予想したが、骨の厚みによる透過減衰の比例傾向は示さず、各周波数それぞれに透過性のパターンを示した。400kHzは厚みによる影響を受けにくく、振動子照射面全般の超音波が概ね均等に透過した。500、600kHzは音響強度分布にひずみを観察したが、概ね振動子の中心部で良好な透過を認めた。一方、傾斜骨厚みファントムによるPSRF変調周波数による透過後の超音波音場は、ファントム無し同様にホットスポットを生じず均等な音場形成を示した。また、音場の均質性も高めており、照射領域の確保に有効な手段を示唆した。

変調の有用性は定在波抑制含め、音場の均質化から重要であるが、500kHz用の一般的なローQ材の振動子の対応音域を計測したところ有効活用領域は320～620kHzであり、帯域のバラツキを考慮した場合、高周波側の出力が不十分になることが懸念された。低周波成分のみの出力の場合、定在波の発生懸念が高まり、安全性の低下につながるため、高周波側の安定出力確保に向けた専用振動子設計を行った。設計にあたり、低周波変調領域の拡大は、安全性の低下につながる可能性から400kHz出力を保証のため350kHz以上の出力確保とした振動子設計を行った。400～600kHz帯域を出力保証するにあたり、量産公差を考慮した周波数帯域をコントロールする技術は概ね確立した。また、今後の最適化の過程でさらなる帯域拡大の要求可能性を視野に400～800kHzの設計も並行して実施し、450～

800kHzの周波数帯を有する振動子の基本生産技術も確立した。周波数対応は可能としたが、広帯域における活用は出力効率が低く、熱発生に繋る。今後は、上記設計手法を用いて、血栓溶解特性の最適化に併せ、高効率出力振動子の設計を計画する。

粘着性、保持観点から設計したゲルの超音波透過性は、厚みを持たせた成型技術が未確立のため、技術確立に先駆け薄層段階で超音波透過性を確認した。ゲルによる超音波の透過性は減衰率が高く十分な密着を得るための、5mm厚レベルのゲル成型技術の確立は断念した。一方、超音波透過性に優れるシリコン半固形ゲルは物理強度が低く、単独での装着維持は困難である。rt-PAの治療中超音波照射を継続するには、装着予定の側頭部に振動子を密着させ、なおかつ患者の無意識な体動で脱落しないレベルの保持性の両立が必須である。今回は、一素材で両立することは難しく、密着と保持は、それぞれゲルと装着具にて機能分担し、超音波ユニットを構成することとした。

E. 結論

頭蓋骨透過においても変調はホットスポット回避、音場平均化に有用である。今後の製品化実現に向け、変調仕様を適切な振動子を開発し、簡便かつ安定した装着が可能な超音波ユニットの開発を進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

<参考文献>

- 1) Daffertshofer
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.36.1441-1446 (2005)
- 2) 古幡博、特集 脳梗塞急性期治療 - t-pa 静注療法-超音波による血栓溶解、最新医学 63(7) 92-104 (2008)

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

急性脳梗塞治療加速のための薬物超音波併用次世代普及型低侵襲システムの開発
新規超音波血栓溶解装置の治験プロトコール大枠の提案

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、大山賢、徳永敬介 同脳血管内科医師
研究分担者 山本 晴子 同先進医療・治験推進部部长
研究分担者 峰松 一夫 同副院長

研究要旨

現在開発中の新規超音波血栓溶解装置の臨床導入に向けて、同装置の開発状況、虚血性脳卒中の急性期治療の現状を踏まえて、近い将来予定している治験プロトコール大枠を提案した。治験デザインは、単一治療群、オープンラベル、ヒストリカルデータ対照試験とした。発症4.5時間以内の頭部MRAで脳主幹動脈閉塞を確認した虚血性脳卒中患者を登録する。主な除外基準はアルテプラゼ（rt-PA）静注療法適正治療指針の適応外である。安全性の主要評価項目は、治療開始から22-36時間の頭部CTで確認されたNIHSS4点以上増悪する症候性頭蓋内出血、発症90病日後の死亡、有効性の主要評価項目は、治療開始から120±30分後のMRA上の再開通（modified Mori Grade 2-3）率とする。現在当施設で収集しているヒストリカルデータなどを対照データとして安全性および有効性の評価を行う。独立安全性評価委員会を設置し安全性のモニターを行う。

A. 研究目的

現在開発中の新規超音波血栓溶解装置の臨床導入に向けて、現在までの開発状況、虚血性脳卒中の急性期治療の現状を踏まえて、近い将来予定している治験プロトコールの案を作成した。

B. 方法

考慮した背景①現在開発中の新規超音波血栓溶解装置は治療用の約500kHz超音波を患側の側頭部からrt-PA静注療法中に60分間照射する仕様となる予定である。しかし、血管閉塞部位を評価する診断およびモニター機能は搭載しない。②2012年8月31日に改定されたrt-PA静注療法適正指針では発症から治療開始までの時間が3時間から4.5時間以内まで延長された。③発症8時間以内のrt-PA静注療法適応外もしくは無効例に対して血栓回収装置による血管内治療が可能である。④これまでCLOTBUST試験、TRUMBIなどの臨床試験が行われ、現在CLOTBUST-ER試験が進行中である。

上記背景を参考に新規超音波血栓溶解装置の治験プロトコール大枠を提案する。

（倫理面への配慮）

本研究は患者の個人情報や患者から採取された資料を使用しない研究である。

C. 治験プロトコール大枠案

1. 参加（依頼）施設候補

- 国立循環器病研究センター
- 慈恵会医科大学
- 川崎医科大学（木村和美先生）
- 広南病院（古井英介先生）
- 神戸市立医療センター中央市民病院（藤堂謙一先生）
- 聖マリアンナ医科大学（長谷川泰弘先生）
- 熊本赤十字病院（寺崎修司先生）
- 製鐵記念八幡病院（藤本茂先生）
- 国立病院機構九州医療センター（桑城貴弘先生）
- 京都第二赤十字病院（永金義成先生）
- おさか脳神経外科病院（大山英郎先生）
- 福井大学（山村修先生）
- 梶川病院（向井智哉先生）

2. 研究デザイン

- 単一治療群
- オープンラベル
- ヒストリカルデータと比較