

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

ヒト血栓の作り方及び超音波血栓溶解促進効果の定量評価研究

研究代表者 井口 保之 東京慈恵会医科大学 神経内科学 教授
研究分担者 小川 武希 東京慈恵会医科大学 救急医学 教授
研究分担者 三村 秀毅 東京慈恵会医科大学 神経内科学 助教
研究分担者 横山 昌幸 東京慈恵会医科大学 ME研究部 准教授
研究分担者 幸 敏志 田辺三菱製薬株式会社 マネジャー
研究協力者 王 作軍 東京慈恵会医科大学 ME研究部 研究員

研究要旨 超音波血栓溶解促進療法の急性期脳梗塞への早期臨床応用が期待されている。ただし、超音波照射条件にはパラメーターが多く、現状の評価方法は精度と効率が不十分で、最適な超音波条件は判明していない。われわれはすでに牛血漿血栓を用いて、測定精度が高い効率的な2D式超音波血栓溶解評価システムを開発した。本研究は臨床により近いヒト血漿を用いて、均一なヒト血漿血栓の作製を検討した。続いて、ヒト血漿血栓の吸光及び濁度特徴を分析し、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、2D定量法を確立した。さらに、この技術を利用して、超音波周波数と変調波がヒト血漿血栓溶解促進作用に及ぼす影響を解析した。

A. 研究背景と目的

WHOの統計データによると、世界で毎年およそ1500万人が新規に脳卒中に罹り、その中、500万人が死亡、500万人が身体に障害が残る。脳卒中のおよそ67-87%が虚血型で、病因はほとんど血栓に由来する。血栓で閉塞した重要血管の再開通の可否及び再開通までの経過時間が急性期脳梗塞患者の予後のカギである。急性期脳梗塞患者に対して、現在まで、FDA、欧州、及び日本で許可されている唯一の血栓溶解治療薬はrecombinant tissue plasminogen activator (rt-PA)であるが、その治療効果はいまだに十分とは言えない。例えば、再開通率は内頸動脈閉塞に対してわずか10%で、大脳中動脈閉塞の場合でも30%位に留まっている。しかも、rt-PAの投与によって脳内出血のリスクは有意に増大している。

このrt-PAの血栓溶解治療効果を高める医療として期待されているのが、超音波照射を併用することによるrt-PA血栓溶解促進技術である。In vitro、in

vivo動物実験で、超音波照射が血栓溶解を促進させることが実証されていて、一部臨床試験においても脳血管再開通率の向上が観察されている。ただし、照射する超音波にはパラメーター（周波数、強度、波形、パルス長さ、duty cycle、ビーム太さなど）が多くて、現時点でも血栓溶解促進に最適な超音波条件は判明していない。

現在、超音波血栓溶解促進作用の評価法として血栓重量法、アイソトープ法、FDP法、顕微測量法などがあり、各々利点もあるが、問題点もある。例えば、最も常用されている重量法では、重量を測定する前後に血栓を移動する際の機械的介入、付着した水分の除去など人為的誤差が大きい。しかも血栓重量の変化率は血栓の形、大きさ、表面積などに依存し、違う形の血栓同士の比較は難しい。さらに、血栓表面の各部分が受ける超音波照射強度は通常異なるから、超音波強度と溶解促進率の間の正確な関係は把握しにくい。

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、) Lot BJ2592と Lot BJ3299はそれぞれコージンバイオ株式会社から購入。37 $^{\circ}$ Cで解凍した後、はシリンジフィルター(Millex[®] Syringe Filter Units, PES, 0.45 μ m, 33mm)で、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。

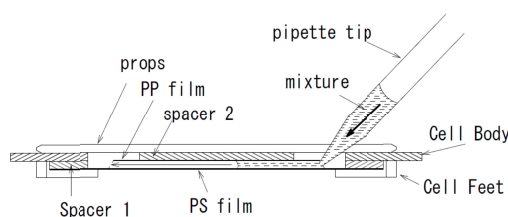


図1 血栓作製法 セル本体とその上にかげたPPフィルムの間に血漿混合液をピペットで注入。

(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)

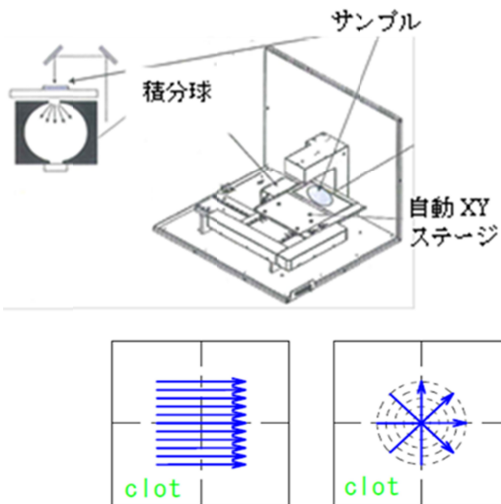


図2 微小部位マッピング装置

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。

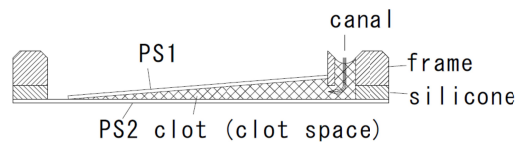


図3 検量線セル構造

(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。

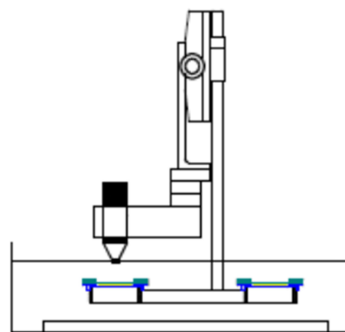


図4 超音波照射装置

(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 (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。

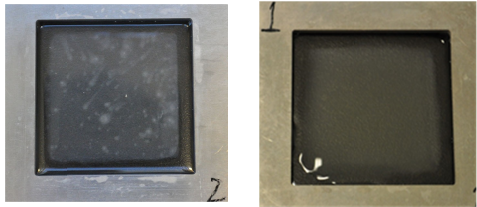


図5 トロンビンの影響

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 が使い切った後に購入したロット (BJ3299)のヒト血漿は0.45 μ mのPESでろ過、トロンビンを0.5NIHU/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。

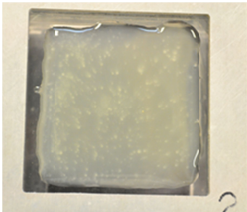


図6 0.45 μ mPESろ過したヒト血漿(ロット)を既存のトロンビン添加で作った血栓トロンビンの部分的失活可能性を考えて、トロンビンを新規作成して、その濃度の血栓への影響を検討した。

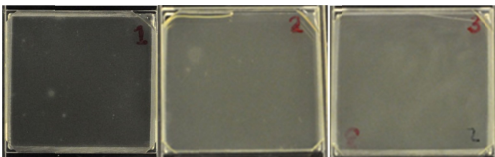


図7 トロンビンの影響

0.45 μ mろ過ヒト血漿(ロット)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0.5NIHunit/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 $^{\circ}$ 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0.5NIHunit/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。

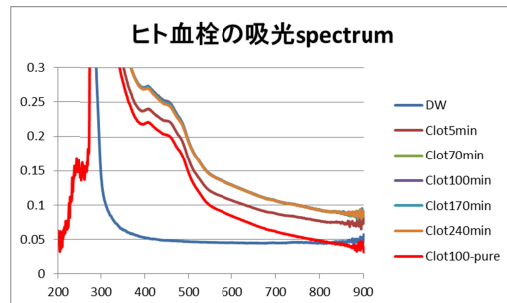
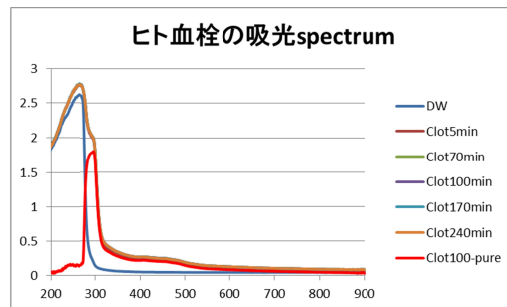


図8. ヒト血栓の吸光spectrum

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。

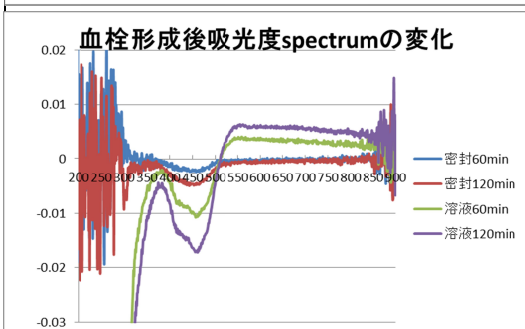
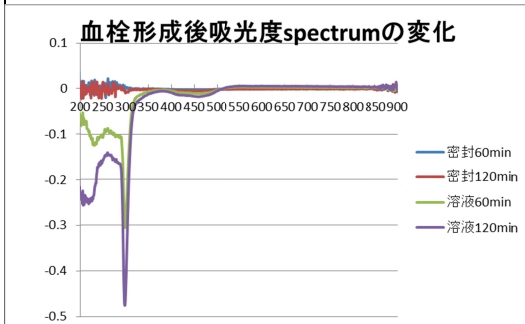


図9. ヒト血栓形成後の吸光spectrum変化
上は全幅図、下は拡大図

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。

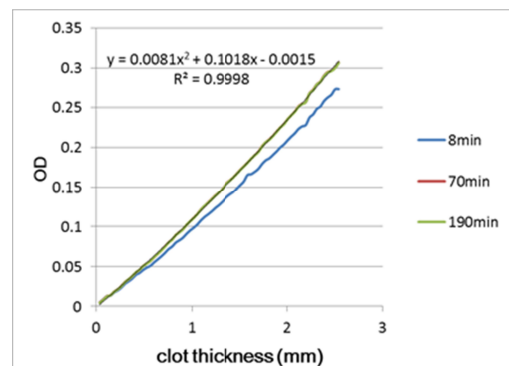


図10. ヒト血漿血栓の560nm検量線

(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)。

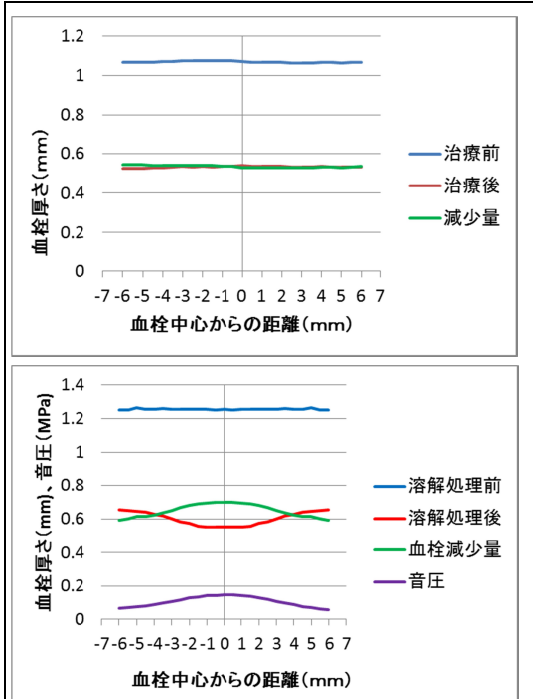


図11 超音波ヒト血栓溶解測定例

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。

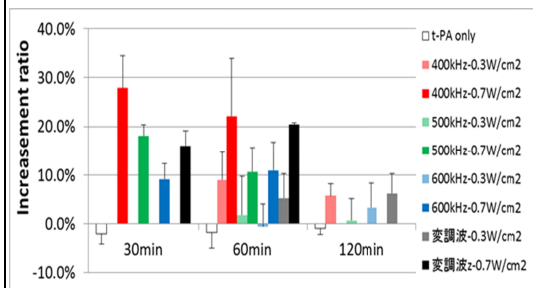


図12 ヒト血栓における各種超音波の血栓溶解増強効果

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、最適濃度のトロンピン添加を実行し、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、斉藤 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