

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及びヒト血漿血栓を用いて、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、ヒト血漿血栓に対しての超音波促進能を評価した。本研究はさらにヒト全血を用いて、シート状な均一なヒト全血血栓の作製及びその厚さ検出法を確立した。さらに、これらの技術を利用して、超音波パラメーターのヒト全血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、我々はウシ及び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、血漿血栓の溶解特性は必ずしも全血と一致しないと考えられる。本研究はヒト全血を用いて、安定かつ均一なヒト全血血栓の作り方を検討した。続いて、ヒト全血血栓の吸光特徴を分析し、血栓の厚さの安定した測定ができる検出波長を見出した。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各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、超音波強度及びDuty Cycleの影響を検討した。

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。このセルは一對のアルミフレーム (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

抗凝固剤CPDA-1添加したヒト全血 (コード: 12081645) をコージンバイオ株式会社から購入。4℃で保存、採血日から35日以内使用した。

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フィルム間に血栓形成用混合液 (抗凝固剤CPDA-1添加ヒト全血 + 0.4M塩化カルシウム + 20NIHU/ml牛トロンピン、比例18:1:1) を2.3ml入れ、室温5分間後37℃湿気ボックスに入れて30分で成熟させた後、PPフィルムを外して、シート状全血血栓がセル本体のPSフィルム上に作製できた。

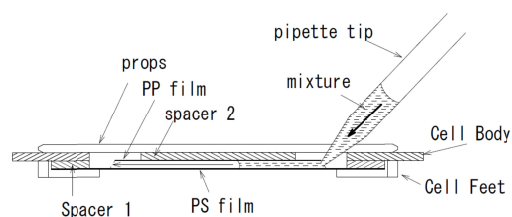


図1 血栓作製法 セル本体とその上にかげたPPフィルムの間にトロンピン添加した血液混合液をピペットで注入。

(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)

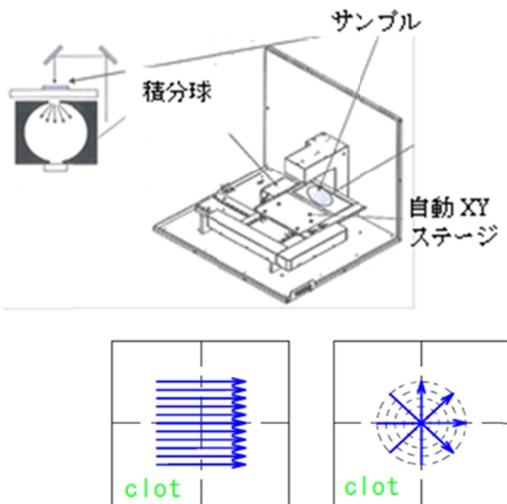


図2 微小部位マッピング装置

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下に示すように、自動XYステージは必要に応じ格子状(検量線セルの場合)または放射状(サンプルセルの場合)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シートの間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、普通の血栓セルと同様な条件下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た。

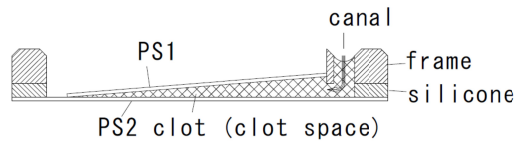


図3 検量線セル構造

(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)で任意に調整可能で、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程度沈めて照射を行った。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。

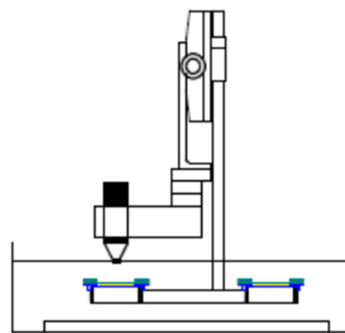


図4 超音波照射装置

(6) 統計学的評価

本研究は、超音波音場の対称性を利用し、セル中心から同じ距離の測定ポイントを1組とした。データはmean ± SDで表示した。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) ヒト全血血栓のスペクトル測定

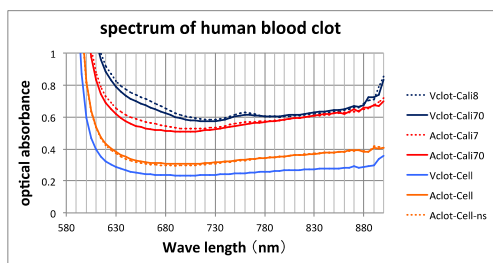


図5 酸素飽和度の全血血栓のスペクトルへの影響

保存バッグから保存血液を約40ml培養瓶に出し、その日にすぐ使うものが酸素飽和度が本来の静脈血液と近く、これから作製した血栓をVClotと表記し、翌日以後に使うものは接触により酸素を含有するので動脈血液と見なし、作った血栓をAClotと表記した。密封性の良いキャリブレーションセルで作ったVClotは760nm所にピークがあるが、血栓溶解セルの中に作ったVClot及びAClot各種はこのピークが消えた。血栓を生食で洗った後も、830nm周辺の変化がほとんどなかった。故に、830nmを測定波長として選んだ。

(2) ヒト血栓厚さ検量線

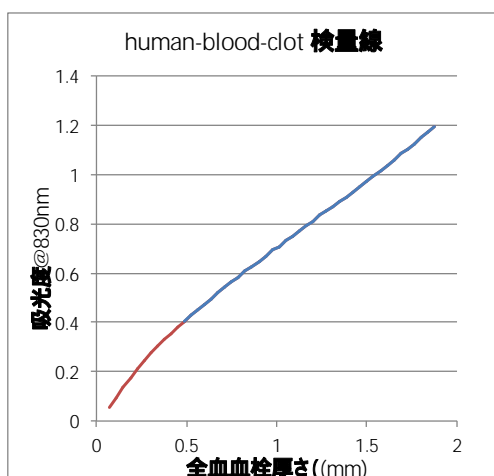


図6 キャリブレーション@830nm

全血血栓の830nmでの吸光度全体としては规律的な単調増加関数であり、その吸光度は0.4まで（赤色で表示）放物線状に上昇し、その後、ほぼ直線的に上昇する特徴がある。

(3) 超音波強度と全血血栓溶解促進能の関係（1時間溶解実験）

まず、超音波照射を行わない、rt-PA処理のみのコントロールの結果を図7Aに示す。図中の赤線はrt-PA処理前、青線はt-PA処理後のそれぞれ血栓厚さを示す。実線と点線は、4方向の測定値を示している。緑線は、rt-PA処理前後の厚さの差、つまりrt-PA溶解の深度を示す。黒線は溶解深度の平均値である。以下の議論は主に黒線に挙動に注目して行う。

図7Aのコントロールでは、黒線は水平であり、溶解深度がどの測定ポイントにおいても同一であることを確認した。

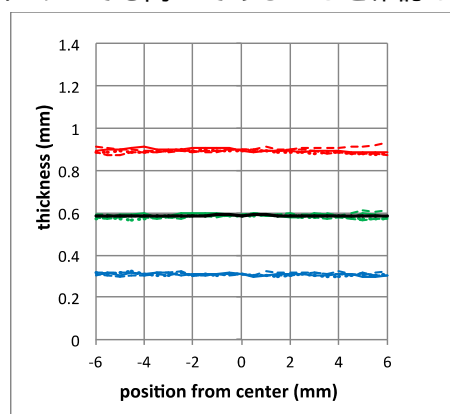


図7A 超音波なし

次に中心位置での強度が $8\text{W}/\text{cm}^2$ の大変強力な超音波照射を行うと図7Bに示す様に、黒線が凹の形となり、超音波強度が強い箇所で血栓溶解深度が浅いという奇妙な結果となった。

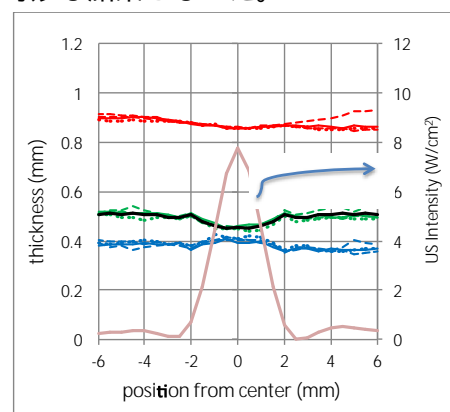


図7B $\sim 8\text{W}/\text{cm}^2$ 強い超音波照射の場合

次に、超音波強度を $5\text{W}/\text{cm}^2$ (図7C)、 $1.7\text{W}/\text{cm}^2$ (図7D)と弱くしてゆくと、黒線は凸状になり、超音波照射による血栓溶解促進が観察されるようになった。また、図7Cでは、黒線は全体としては凸状ではあるが、中央部分の超音波強度が強い箇所の黒線は水平であり、図7D以下のすべての場合で、照射超音波強度とよく対応した、滑らかな凸型になっていることと対照的である。これらのことから $3\text{W}/\text{cm}^2$ 以上の大変強力な超音波照射領域では、溶解した血栓の再吸着などの副次的な現象が起きていて、本研究での血栓溶解促進作用の測定には適さないことがわかった。なおこのような、強力超音波照射での奇妙な現象は、血漿血栓の倍には起こらずに、 $5\text{W}/\text{cm}^2$ の超音波強度領域まで、「照射超音波強度が大きいほど、血栓溶解促進作用は大きい」挙動が観察された。

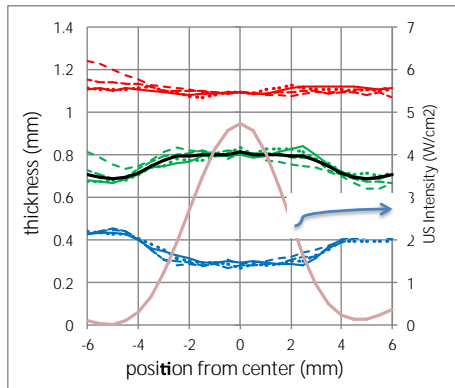


図7C $\sim 5\text{W}/\text{cm}^2$ の超音波 (照射中心での増強率 = 18.3%)

図7Dと図7Eにはそれぞれ、中心の照射強度が $1.7\text{W}/\text{cm}^2$ と $1.1\text{W}/\text{cm}^2$ で、これらの強度範囲内では血漿と同様に「照射超音波強度が大きいほど、血栓溶解促進作用は大きい」挙動が観察された。

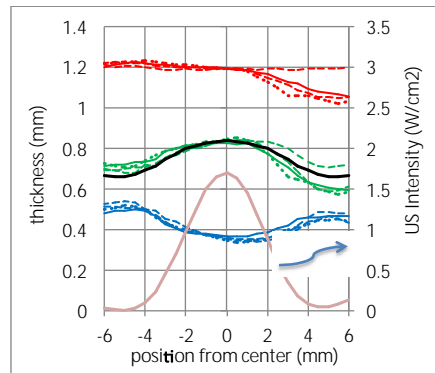


図7D $\sim 1.7\text{W}/\text{cm}^2$ の超音波
増強率 $\sim 26.4\%$ 、 $\sim 5\text{W}/\text{cm}^2$ より高かった

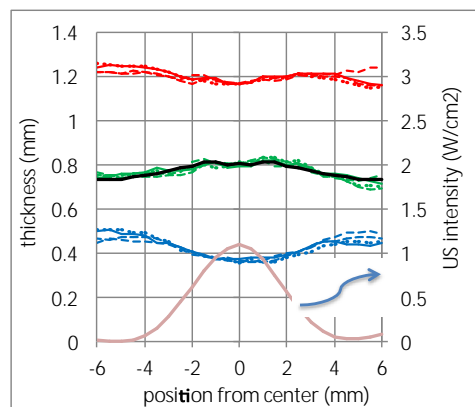


図7E $\sim 1.1\text{W}/\text{cm}^2$ の超音波
増強率 $\sim 9.6\%$ 、かなり落ちた。

(4) 超音波DutyCycleのヒト全血血栓溶解増強効果への影響

超音波の熱発生副作用を抑えようとして、そのDuty Cycleを低くするアプローチがよくなされてきたが、Duty Cycleの超音波血栓溶解促進能への影響は未だ論争中である。本研究は超音波の熱作用を決める要因のその時間平均強度を一定($0.76\text{W}/\text{cm}^2$)にして、Duty Cycleの影響を検討した。

図8AはDuty Cycleが100%の連続波での測定結果であるが、約37.8%の促進効果が見られた。この結果は図7と大分違うが、これは血液ロットの影響と考えられる。図7で使った血液のロットはBJ4948だったが、それは使用期限が切られたので、これ以下の実験は

新しい血液ロットBJ5091を使った。

図8A～Dに示したように、Duty Cycleを100%から10%に低くにするにつれて、その血栓溶解促進作用が約38%から14%へ減っていくことを示した。

時間平均強度が同じなので、Duty Cycleが低いほどピーク強度が高くなり、組織等への機械破壊作用指数(MI)も高くなり、出血などのリスクも高くなるはずであるが、かえってその血栓溶解促進作用が弱くなることはDuty Cycleの低いバースト波などは超音波血栓溶解療法に向いていない可能性を示唆した。臨床試験TRUMBIはDuty Cycle 5%のバースト超音波を使ったことがその失敗(沢山の頭蓋内出血が発生)の重要原因の一つであることを改めて示した。

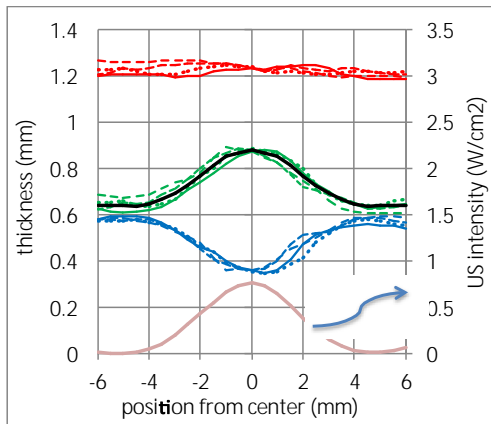


図8A Duty100% 増強率37.8%

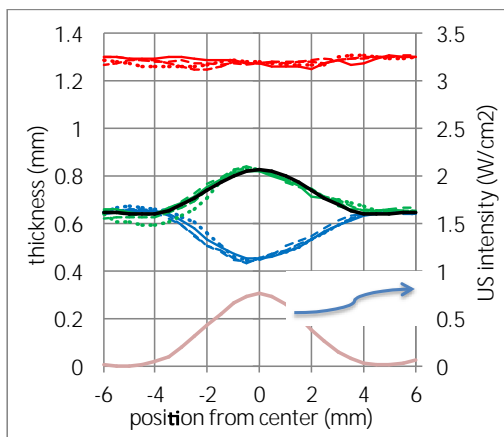


図8B Duty50% 増強率28.5%

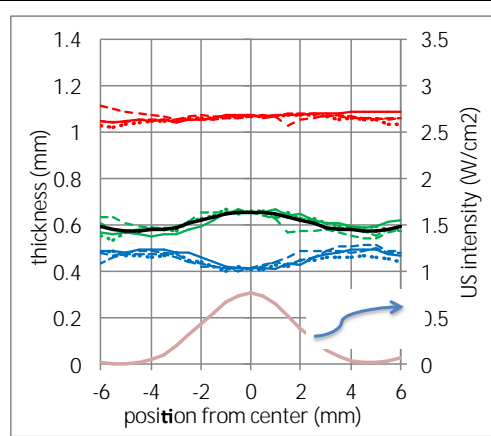


図8C Duty25% 増強率14.3%

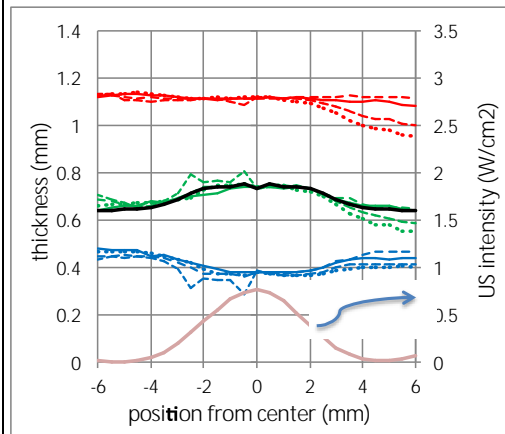


図8D Duty10% 増強率14.0%

(5) 連続波超音波各強度の比較 (30分間照射実験)

連続波超音波は最小の機械破壊リスクと最大の血栓溶解促進能が持ち合せるというメリットが示唆されたので、新しい血栓ロットを用いてもっと短い時間帯(30分間)での連続波超音波の各強度の比較実験を細かく行った。

結果は図9に示したように、0.4W/cm²未満の各強度は1割以下の増強率を示したが、0.4~0.5W/cm²の間増強率が急に上昇し、約2.5割に達した後、又緩やかに上昇し、約2W/cm²付近にピーク値になり、3W/cm²以上になるとかえって落ちてしまった。

この結果は強度0.5~2W/cm²の連続波超音波は血栓溶解促進に最も適切であることを示した。

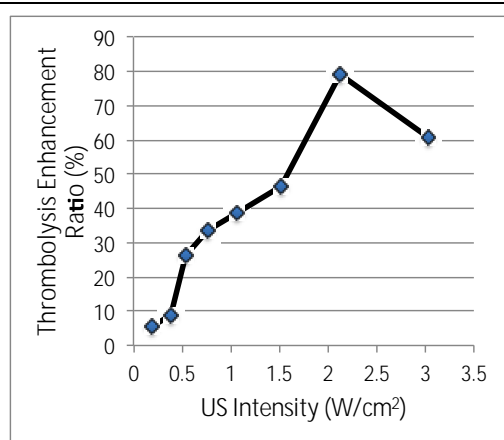


図9 連続波超音波各強度比較実験

また、超音波血栓溶解促進能の評価手段として、血栓周辺部の検出結果と中央部を比較した結果を図9に示す。

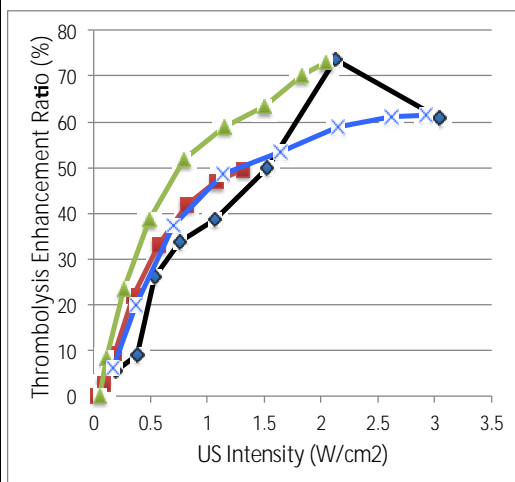


図10. 血栓溶解増強率中央部測定値と周辺部測定値の比較

図10に示したように、血栓周辺部の血栓溶解増強率は同強度の中央部の測定値はよく一致していることを示した。この結果は、一つの血栓だけでもその周辺部の沢山の測定結果を利用すれば、一定強度以下の各強度の超音波とそれぞれの血栓溶解促進能との対応関係を十分に分析できることを示した。

D. 考察

本研究はヒト全血血栓に対しての高精度、高効率な超音波血栓溶解増強能測定法を確立し、その特徴も検討した。

図5に示したように、血漿と違って、全血は赤血球（ヘモグロビン）があり、光波長600nm以下では、大きすぎる光吸収があり、測定が難しい。800nm周辺では十分な光が透過でき、測定が可能と考えられる。酸素飽和度の低い血液では760nmの処に小さな吸収ピークがあるが、このピークは酸素飽和度が高くなると消失するので、ヘモグロビン及び血栓の定量測定に向いていない。我々は830nm付近には酸素飽和度に左右されにくく、適度な吸収もあることを見付、830nmを血栓厚さの定量指標として採用した。

楔型の血栓を用いて、830nmでの血栓厚さと吸光度の関係（検量線）を検討した。全体としては规律的な単調増加関数であるが、その吸光度は0.4まで（赤色で表示）放物線状に上昇し、その後、ほぼ直線的に上昇する特徴がある。

830nmの検出光を利用して、500kHzの中周波数超音波の全血血栓溶解増強作用の特徴を検討した。ヒト血漿血栓と違って、2W/cm²位までの超音波の血栓溶解促進能は強度又は音響強度に依存して上昇するが、3W/cm²位以上になると、促進作用がかえてだんだん少なくなり、さらに強度が高くなれば、その作用は完全に血栓溶解阻害作用に逆転した。（図7B）

時間平均強度を一定にして、超音波のDuty Cycleだけを変換して、その影響を調べたが、連続波の促進能が一番大きいことが分かった。時間平均強度を一定にしたら、熱作用が一定になり、Duty Cycleを低くすれば瞬間強度、音圧が高くなり、機械指数（MI）が高くなり、血管及び組織への破壊作用のリスクも高くなるが、血栓溶解促進能も減っていくことはDuty Cycleの小さいパルス波（PW）より連続波（CW）が最も適切な治療手段と示唆した。

血栓溶解増強能の血栓中央部での測定値と周辺部での測定値を比較したが、後者は前者とよく一致していることを示した。この事実から、一つの血栓だけを用いての測定も相当な程度で超音波強度とその促進能の関係を分析できる。

E. 結論

ヒト血漿及びの超音波血栓溶解促進能の高精度、高効率in vitro定量評価方法を確立した。全血血栓に対して超音波の血栓溶解促進能が一定の強度（凡そ2W/cm²位）までは強度依存的に促進能が上昇するが、それ以上になると、促進能がかえて減っていく。時間平均強度が同じの超音波として、リスクの指標の機械指数が最も低い連続波がかえて最も高い促進能があり、超音波血栓溶解治療に最も適切ということを示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 王 作軍、広瀬秀夫、斉藤 理、三村秀毅、井口保之、小川武希、横山昌幸「正弦波及び変調波超音波血栓溶解促進作用の比較」第17回 日本栓子検出と治療学会2014年10月5日
- 2) 王 作軍、広瀬秀夫、斉藤 理、小川武希、小松鉄平、三村秀毅、井口保之、横山昌幸「超音波血栓溶解促進能の新規 in vitro 測定法」Stroke2015 (第40回日本脳卒中学会総会、第44回脳卒中の外科学会学術集会、第31回スパズム・シンポジウム)2015年3月27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