

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mRS0-1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で、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、搬送スタッフを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、血栓を破砕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が開

始された。

これら血管内治療機器の活用は、ホノルルで開催された学会での臨床研究結果報告にて、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、報告がなされた。しかしながら、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』『Trevor』は治療成績の改善に有望視されていたが、再開通のみならず予後改善が実証された旨、臨床研究結果として報告された。

以上から、血管内治療による血栓摘出術も有力な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が拡大している。しかしながら、脳血管内治療は実施可能な医師、施設が未だ限られているうえ、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が高い新薬開発も進められているが、未だ上市には至っていない。その中2004年、V. Alexandrov（米）らは、New England J. Med. に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通率の向上を得ること、ならびに予後が改

善したことを報告した。

一方、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、rt-PA投与中ならびに投与終了後30分の総計90分間に300kHzの超音波を照射する臨床研究を実施した。しかしながらDaffertshoferの臨床トライアルは、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した旨報告している。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、診断装置の通常照射強度の0.72 W/cm²を大きく上回る14~28 W/cm²といった強い超音波が照射された結果、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ことを古幡博が、最新医学 第63巻 第7号:91-102,2008.で考察している。

2008年J.Eggers.らが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、予後改善の有用であることを報告した。超音波照射が普及しない背景として、目的血管検出の難しさ、見出した目的血管に超音波を持続照射の難しさの2つの課題があり、一般治療への適用に至っていない。

そこで本研究は、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26年度の具体的な目標】

基本実験情報をもとに、PMDAと面談を行い、安全性、有効性の立証方法を確認し、開発を推進する。

- (1) 全血血栓にて溶解を加速する超音波有効条件の確立。
 - (2) 溶解を加速する超音波シーケンスの安全性強度限界の見極め。
 - (3) 頭皮/頭蓋の厚み個人差に影響されにくい変調超音波を供給しうる振動子の開発。
 - (4) 振動子を簡便、確実に貼付する装着具の開発(ゲル、固定具)
 - (5) 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
- である。

B. 研究方法

PMDAと開発前相談を実施し、安全性は機器の安定作動による安全性を確立と併せ、生体への安全性をラットで評価。有効性は、In-Vitroで全血血栓を用いて超音波照射での溶解加速を検証することで、基本開発要件を満たすことを確認し、以下を推進した。

1) 全血血栓の超音波溶解加速性評価

脳梗塞による脳組織へのダメージを最小限にするには、治療開始から出来る限り早い段階で血流を再開させることにある。rt-PA単独投与に比べ、超音波を照射することで有意に血栓の溶解が加速できる超音波強度の知見を得ることを目的としてin vitro試験を実施するが、毎回ヒト血栓での評価は困難なため、ブタ血を用いて評価を推進した。ブタ血実験に先立ち、ヒト血でのrt-PA濃度とブタ血でのrt-PA濃度の溶解効果相関を評価し、ブタ血で超音波の有効性基本条件の検討を実施。

1-1) ヒト血でのrt-PA濃度相関評価

血液凝固液(1.25M/L CaCl₂: トロンビン 100 IU/MI: 生理食塩液=1:1:18)とヒト血液を96穴丸底マイクロプレートに20μL:100μLで調整し、37/1時間静置して血栓を形成した。

キュベットに遠心分離して得た血漿を 615 μL と、上記で作製した血栓 1 つを入れた。Blank サンプルとしてキュベットから血漿を 15 μL 採取し、その後 rt-PA 溶液 50 μL を上記キュベットに混注した際、終濃度が 2.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ になるように調製し、以下倍希釈を行い最小 0.0002 $\mu\text{g} / \text{mL}$ まで調製した。血栓と血漿が入ったキュベットにそれぞれ 50 μL 各濃度の rt-PA 溶液を添加した。

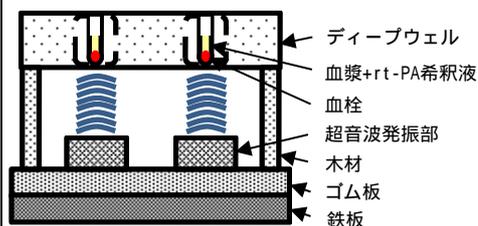
キュベットをシェーカーで攪拌しながら 37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートし、rt-PA 添加後 30 分、60 分、90 分時に血漿を採取し、先の Blank サンプルと共に各サンプルに 35 μL の生理食塩水と 50 μL の 2.0% SDS 溶液をマイクロプレートのウェル内で混注し、吸光度を測定した。90 分時のサンプル採取後、血栓を全て溶解し、生理食塩水で 4 倍に希釈して吸光度を測定し全血栓量を算出した。

1-2) ブタ血での rt-PA 濃度相関評価

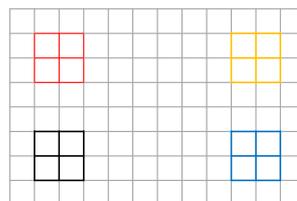
ブタ血でヒト血と同方法で rt-PA 濃度を検討した。使用するブタ血は、医療用動物実験を扱う企業から血液を使用する当日に新鮮なブタ静脈血を吸入麻酔下腋窩静脈より採血し、使用直前まで保冷剤にて保冷して使用した。

1-3) 血栓溶解加速評価試験

96 穴のディーププレートを用い、ウェル内に血漿および上記方法で作製した血栓を入れ、恒温槽内から超音波を照射し、血栓溶解を行った (図 1.)。1 回の試験で 2 群の対象設定と併せ、異なる 2 種の超音波強度を評価した。対照群は rt-PA 投入超音波非照射群と、rt-PA 未投入超音波非照射群を設置し、4 群間で溶解率を比較した (図 2.)。溶解率は rt-PA 濃度検討時と同様の方法で rt-PA 投与後 15 分、30 分、60 分、90 分に測定した。超音波照射時の恒温槽も 37 $^{\circ}\text{C}$ に設定し、超音波照射は rt-PA 投入と同時に開始し 60 分間照射を行った。照射終了後の 30 分間は 37 $^{\circ}\text{C}$ に設定したインキュベーターにて静置した。



【図1：血栓溶解試験 模式図】



	rt-PA	超音波照射	超音波強度
赤			強度1
黒		×	
黄	×	×	
青	×		強度2

【図2：96穴ディーププレート試験群配置図】

2) 超音波安全性評価

自己血栓によるラット脳梗塞モデルにアルテプラゼ (rt-PA) 投与下において超音波照射による神経症状及び脳梗塞巣体積を評価し、安全照射条件限界を見極める。

2-1) モデル作製方法

血栓の作製

ラット (Slc:Wistar、雄、8週齢) から約 2 mL 採血し、採血直後の血液に日本薬局方トロンビン 150 単位及びヒトフィブリノゲン末 40 mg を最終濃度がそれぞれ 5 IU/mL 及び 2 mg/mL になるように血液と混和。混和後、直ちにポリエチレンチューブに充填し、37 $^{\circ}\text{C}$ に設定したインキュベーター内に 24 時間静置した。使用直前に血栓を 25 mm に切断して使用した。

血栓による脳梗塞モデルの作製

ラット自己血栓モデルは Z. G. Zhang¹⁾ 及び E. Busch²⁾ の方法に準じて作製した。小動物実験用簡易吸入麻酔装置を用いて 1.5 ~ 2.0% イソフルラン吸入麻酔下で、ラット (Slc:Wistar、雄、8週齢) を仰臥位に固定し、頸部正中切開

にて外頸動脈を露出し、糸で結紮する。血栓を充填したテフロンチューブを右外頸動脈から右内頸動脈を介して中大脳動脈の起始部まで挿入し、血栓を注入した。血栓注入後、チューブを抜去し、頸部を縫合した。

2-2) 超音波照射

設置方法、ラットを麻酔下にて伏臥位に固定し、頭頂部を剃毛後、ジェルを塗布し振動子 (20 mm × H33 mm) を密着させ固定した。

薬剤の投与方法

インフュージョンポンプを用い、翼付き注射針を装着したディスプレイ注射筒でrt-PA又は生理食塩液を、伏臥位に固定したラットの尾静脈内に投与。rt-PAはグルトパ®注600万を添付の溶解液で溶解し600,000 IU/mL (10 mg/mL) に調製した。生理食塩液をそのまま用いた。血栓注入1.5時間後から薬剤投与を行った。投与方法は、ヒト臨床と同等に総量の10% (1 mL/kg) を1分間かけて急速投与し、その後残りを1時間かけて持続投与 (9 mL/kg/h) した。

超音波照射条件

周波数は400-600 kHz変調にて、強度は振動子出力を照射無し、1.4、2.8 W/cm²として連続照射した。超音波の照射は、血栓注入後1.5時間から60分間実施。

ラット患部に照射した超音波照射強度は、超音波透過率がおよそ50%のため、以下の表1のとおりである。

発振器の音響強度	1.4 W/cm ²	2.8 W/cm ²
ラット患部音響強度	0.7 W/cm ²	1.4 W/cm ²

【表1】

2-3) 測定及び評価方法評価項目

脳梗塞抑制作用 : 脳梗塞巣体積
神経症状改善作用 : 神経症状スコア

脳梗塞巣体積の算出

脳梗塞領域は、血栓注入後24時間の神経症状評価後に、ソムノペンチル®を70mg/kgを腹腔内投与して深麻酔をかけ、腹部大静脈より脱血屠殺した。全脳を取り出し、脳底部の血栓の残存の有無を観察。ついで、梗塞中心部の前後に連続した2mm厚の冠状切片を作製し、冠状切片非梗塞領域の赤色と比べ白色である領域を梗塞と定義して画像解析ソフトにより解析した。各脳切片における脳梗塞巣は柱形であると仮定し、ブロックの合計を脳梗塞体積として算出した。

神経症状の評価

血栓注入後24時間に神経症状を評価する。神経症状は、意識レベル、四肢緊張度合、歩行、握力及び痛覚スコアを合算したものをスコアとした。なお、神経症状スコアはW. E. Hoffmanらの方法を参照して評価した。(資料未添付)

3) 超音波振動子設計

頭蓋内で局所的に音響強度が高まるホットスポットや定在波を抑制、ならびに頭蓋骨や皮膚の厚みの個人差による透過率のばらつき低減を目的とし、400~600kHzの周波数範囲でランダムに周波数を選択する周波数変調を採用した。しかし一般製品では、400~600kHzの広帯域をカバーする振動子が存在せず、必要領域を出力する振動子開発を着手した。

4) 超音波振動子装着具設計

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、簡便な装着性を有するか確認を行い、設計に反映した。位置決めと安定性の両立をさせる設計の目的をつけ、具体的に量産を行うための製造プロセスを構築し、製造方法を含めたデザインの手直しを進めた。ゲル加工を含め、製造プロセスを検討した。ゲル選定にあたっては、透過率が重要であり、AIMS音響強度測定システ

ム並びにハイドロホン（Onda社製）を用いて振動面から70mmの断面の音響強度を基準として処方を選定した。振動子にゲル装着の際は、ゲルを気泡を混入しないように超音波振動子に真空密着させて音響強度を測定した。

5) 超音波駆動装置設計

超音波要求仕様を確定させ、臨床で使用する駆動装置の設計を開始する。

C. 研究結果

1) 全血血栓の超音波溶解加速性評価

1-1) ヒト血での rt-PA 濃度相関評価

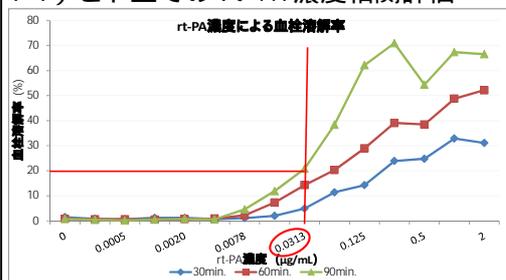


図3. rt-PA 濃度と血栓溶解率（ヒト血）

rt-PA による溶解率が高い濃度は超音波による溶解加速効果の判定が困難なため、0.0313 $\mu\text{g} / \text{mL}$ をヒト血使用の in vitro 試験での濃度とした。

1-2) ブタ血での rt-PA 濃度相関評価

ブタ血で、ヒト血モデル0.0313 $\mu\text{g} / \text{mL}$ とほぼ同等の溶解率を示した3.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ を in vitro 試験での濃度とした。また、ヒト臨床濃度の1.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ であり、ブタ実験濃度は12.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ とした。

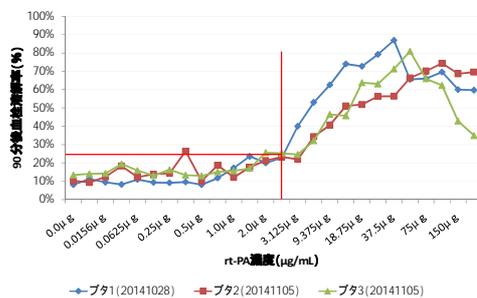


図4. rt-PA 濃度と血栓溶解率（ブタ血）

1-3) 血栓溶解加速評価試験

0.3、0.7、1.0 W / cm^2 の強度で照射し、溶解率を比較した。

(rt-PA濃度ヒト0.0313 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 相当)

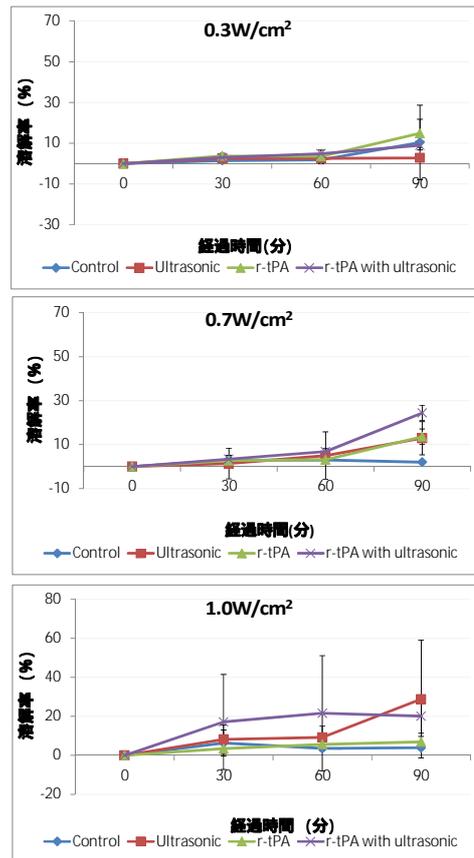


図5. 超音波強度と溶解率

1.0wにおいて加速性を認めたが、測定値のバラつきが大きく有意差は見いだせなかった。1振動子の超音波振動子で4ウェル（血栓）に同時照射していたが、バラつき解消のため1振動子につき1ウェル（血栓）のみの照射とし、ウェルごとの照射むらを抑制した。

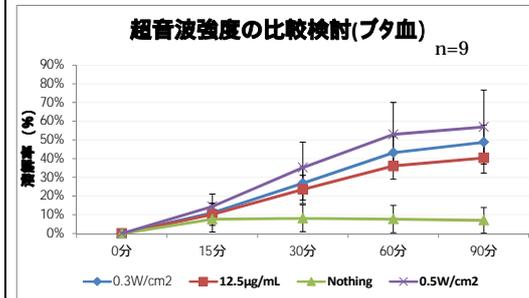


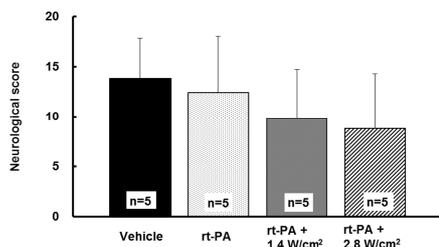
図6. 超音波強度による溶解率の比較（ブタ血）

ブタ血を用いた超音波強度2種（0.3および0.5 W / cm²）の検討結果、図6. に示すように0.3 W / cm²群ではrt-PA単独投与群と溶解率に差は見られなかったが、0.5 W / cm²群においてはrt-PA単独投与群よりも照射後30分以降で $p < 0.05$ と有意に溶解率が高いことを確認した。

2) 超音波安全性評価

血栓注入後24時間の脳摘出後の脳底部観察で、媒体群では1例、rt-PA群では3例、rt-PA + 1.4 W/cm²群では1例、及びrt-PA + 2.8 W/cm²群では2例において中大脳動脈の起始部及び脳底部に血栓の残存を認めた。一方、超音波照射による脳底部出血の助長、頭部皮膚及び脳に対する傷害は認められなかった。

神経症状スコアに対するrt PA及び超音波照射の効果を図7に示した。神経症状評価において、未処置群は、自己血栓注入後24時間に意識レベルの低下、左後肢の麻痺が認められた（13.8±4.0）。rt PA群は、未処置群に比較して神経症状は同程度であり、スコアは12.4±5.6であった。超音波照射併用では、未処置群に比較して1.4 W/cm²群、及び2.8 W/cm²群の神経症状スコアはそれぞれ9.8±4.9及び8.8±5.5と低値（軽症）であった。



【図7：超音波併用による神経症状】

脳梗塞巣体積に対するrt PA及び超音波照射の効果を図8に、TTC染色した梗塞巣の一例を図9/10/11に示した。なお、死亡の場合、死亡時刻が不明確であり梗塞状態との相関が不明であることから、

死亡例を除外した。未処置群では血栓注入後24時間に502.5±187.4 mm³と脳梗塞巣の伸展が認められた。rt-PA群の梗塞巣体積は、279.3±205.9 mm³と未処置群に比較し、低値を示した。また、超音波 + 1.4 W/cm²群は330.1±100.5 mm³、+ 2.8 W/cm²群の梗塞巣体積は197.4±153.4 mm³はrt-PA群と同等であった。

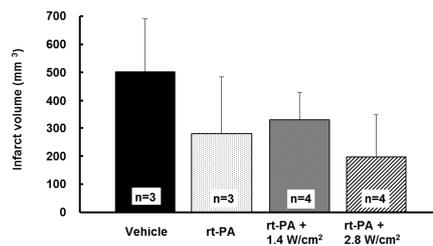


図8. 超音波照射と梗塞巣体積

自己血栓による脳梗塞モデル作製後24時間以内における死亡動物数は、媒体群及びrt-PA群では各2例、rt-PA + 1.4 W/cm²群及びrt-PA + 2.8 W/cm²群では各1例であった。

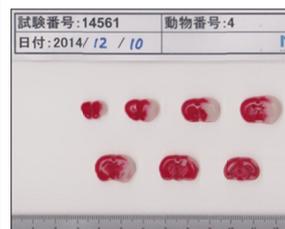


図9. 未処置群例

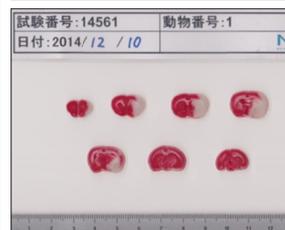


図10. rt-PA群例



図11. 2.8w/cm²群例

3) 超音波振動子設計

変調における反応性から、多孔質人工セラミックスを選択したが、周波数変調の際の周波数による音響強度の変動を均一化するため、400～600kHzの範囲での周波数特性が極力平坦になるような発振部の開発を行った。

周波数特性が平坦とならない要因は、振動子のインピーダンス特性が平坦となっていないことであり、インピーダンスマッチング法を検討した。ここでは電気的専門手法になるため詳細は割愛するが、図12にインピーダンスマッチング無の場合と、マッチングとしてインダクタ：22μH、キャパシタ：1970pFとして均一化した周波数特性を示す。

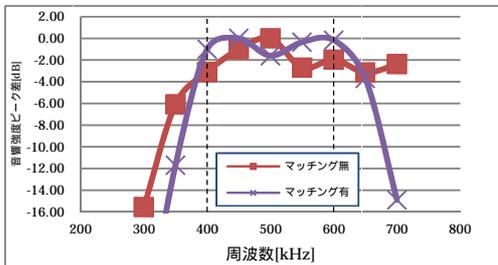


図12. 振動子音響強度特性

4) 超音波振動子装着具設計

慈恵医大病院、国立循環器病研究センターのスタッフにヒアリングし、製造方法を考慮して第3回試作を行った。

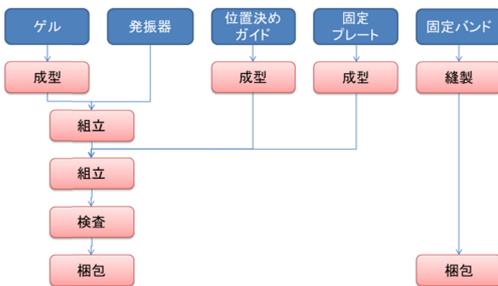


図13.(上)工程

図14.(左) 装着モデル

また、頭部に接触するゲルについて検討を行い、基本処方ならびに超音波に適した加工条件を確立した。

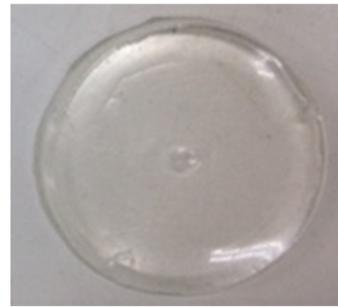


図15. 評価用ゲル

透過率は、測定結果を図16に示す。

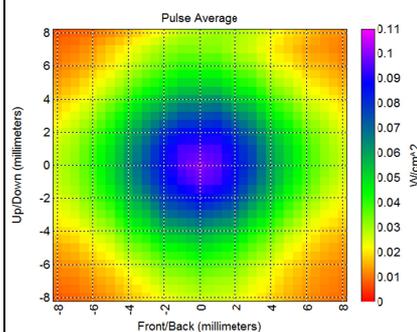


図16-1. ゲルなし音響強度

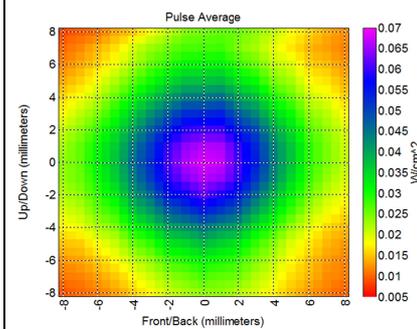


図16-2 ゲルA (試作例 / 減衰あり)

試作ゲルにより、強度が低下した例A。

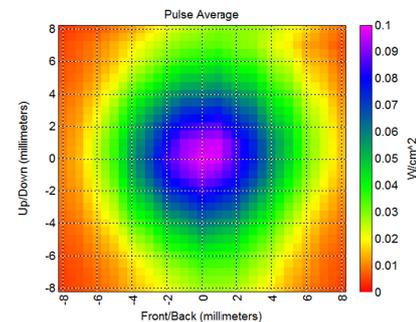


図16-3 ゲルB

ゲルBは、音響強度減衰がほぼ認めず、採用とした。

5) 超音波駆動装置設計

平成25年度は、本デバイスの安全性と有効性に対して求められる要求事項を明確にし、医療機器の品質マネジメントシステム (ISO13485)、さらにリスクマネジメント (ISO14971) を考慮して設計仕様の詳細設計に着手した。本来、26年度中に1号試作を終了する予定であったが、PMDA相談の際、製薬メーカーとの連携指示を受け、対応に5か月を要し、平成27年度に、基本試作と臨床機試作を実現すべく設計を進めている。

そのため、駆動装置開発は具体的アウトプットはないものの、rt-PA静注開始後に血管内治療を施術できる施設への搬送 (ドリップ・アンド・シップ) 中の使用にも対応することを想定した、救急車搭載機器に要求されるEMC規制などの法規制、さらには、バッテリー駆動に対応するため、バッテリー (充電型リチウムイオン電池) 搭載機器に要求される安全規格を整理し、設計仕様への反映を推進している。

D. 考察

超音波照射によるrt-PAのもつ血栓の溶解効果を加速する効果は、 $0.5\text{w}/\text{cm}^2$ で実現することが本年度確認できた。安全性も有効性が得られた約3倍強度において出血、梗塞、そして神経組織への悪影響が見られず超音波の基本的な特性での有効性と安全性を有することも確認できた。

しかしながら、機器設計は装置、振動子伴に未確立であり、有効性もブタ血評価であり、安全性も少数ラットでの評価にとどまっている。平成26年度末で、本事業は終了するが、カネカは独自に本開発を継続する。最終機器仕様を決定し、超音波ワースト条件でヒト全血における血栓溶解への有効性、ラットおよびサルにおいて安全性評価を重ね、平成33年治験を経て製品化を目指す。

E. 結論

400-600kHzで周波数変調した $0.5\text{w}/\text{cm}^2$ の音響強度の超音波は、rt-PAに併用することで、安全に血栓の溶解効果を増強し得ることを認めた。

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

I. 参考文献

1. Z. G. Zhang, R. L. Zhang, Q. Jiang, S. B. K. Raman, L. Cantwell, and M. Chopp, A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 17: 123-135, 1997.
2. Elmar Busch, Karsten Kruger, Konstantin-Alexander Hossmann, Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Research* 778: 16-24, 1997