

201408006B (1/2)

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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

平成24年～26年度 総合研究報告書

第1分冊 (1 / 2)

研究代表者 井口 保之

平成27 (2015) 年 5月

複写

様式A (10)

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書

平成 27年 5月 26日

厚生労働大臣 殿

住 所: フリカ ナ イグチ ヤスユキ
研究者 氏 名 井口 保之 印
(所属研究機関 東京慈恵会医科大学)

平成 24年度から実施した厚生労働科学研究費補助金 (医療機器開発推進研究事業) に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 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 (H24-医療機器一般-006)

国庫補助金精算所要額 : 金 112,359,000円也 (※研究期間の総額を記載すること。)

(うち間接経費 25,929,000円)

1. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書 (別添3のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添4のとおり)
5. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況 (総合研究報告書の中に書式に従って記入すること。)

目 次

I. 総合研究報告

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

井口 保之 ----- 1

(資料) 新規超音波血栓溶解装置の治験プロトコール (仮) ----- 76

(以下は第2分冊に収録)

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 96

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 100

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総合研究報告書

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

研究代表者 井口 保之 東京慈恵会医科大学 教授

研究要旨 超急性期脳梗塞に対して強く勧められる治療法として広く行われているのが rt-PA 静注療法である。本研究はこの rt-PA 静注療法の有効性と安全性を飛躍的に高めるための超音波照射併用療法を開発する。この開発は、中周波数超音波照射、定在波抑制、貼付型超音波振動子、バブルリポソームの技術を組み合わせることで、より効果が高く安全な線溶療法を確立する。さらに、臨床のヒストリカルデータを精密に収集・解析することで、より少人数・短期間の臨床試験を可能とする。平成 24 年度～26 年度の 3 年間の研究期間を通して、超音波照射装置開発、超音波照射最適化のための定在波・透過率測定と変調による最適化、in vitro 超音波血栓溶解促進能測定法の開発、ヒト頭蓋骨超音波透過率測定、変調による超音波透過率変動の抑制、臨床試験の対照となる rt-PA 治療ヒストリカルデータ解析、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、バブルリポソームの性能測定、そして超音波による超急性期脳梗塞血栓溶解促進療法の臨床試験プロトコール構築などを遂行した。以上の遂行により、臨床試験に進む、技術的および臨床的基盤が確立した。

A. 研究目的

本研究の目的は、貼付型振動子を使用した新規超音波併用 rt-PA 脳血栓溶解技術開発である。

脳梗塞は、本邦死因の第 4 位を占める脳血管障害の 6 割を占め、かつ要介護老人の 4 割を占める。年間約 20 万人近い脳梗塞発症患者に対し、強く勧められる(グレード A) 治療法として一般に行われているのは組織プラスミノゲンアクチベーター (rt-PA) 静注療法である。偽薬と rt-PA 静注療法を比較した研究では、図 1 に示す様に治療後の予後は改善する。(本邦で行われた J-MARS テストで rt-PA 投与量を NINDS テストより少ないにもかかわらず、NINDS テストと同様に転帰良好例の比率が高かった。)



図 1 rt-PA 静注療法の臨床効果

血栓溶解を促進しながら rt-PA 静注療法実施患者の 4-7%に起こりうる脳出血発症率を下げる事が重要である。そのために rt-PA 静注療法の適用は、発症からの経過時間、年齢、

重症度などの厳しい制限がある。ひとたび脳出血を併発した場合には、転帰は著しく悪化する。

以上より rt-PA 静注療法の有効性のみならず安全性をもさらに高めることが喫緊の課題である。本邦では、2012 年 9 月より rt-PA 静注療法の治療ウィンドウ(発症から投与までに許される時間)が、3 時間から 4 時間半に延長された。また、2014 年には、rt-PA 投与と血管内治療による血栓除去を組み合わせた治療法が、rt-PA 単独治療に比べて有意な予後改善効果を示すことが、オランダのグループから発表された。その発表に続き、現在までこの組み合わせ治療が、rt-PA 単独治療に比べて優れていることが 4 つの臨床試験で報告された。この組み合わせ治療が、血管内治療が実施できる医療機関では日本の標準治療となる日も近い。現在、脳卒中の救急の現場では、よりよき予後に向かって積極的に治療を成してゆく機運が大いなる高まりを見せている。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、より多くの医療機関でより多くの患者に対して急性期脳梗塞治療を施行する点からは

、rt-PA の静脈投与治療をより安全により効果的に施行することの重要性は少しも減じていない。超音波血栓溶解促進療法において最重要な医療技術は、有効で安全な超音波照射である。この超音波照射+rt-PA 静注併用療法で血栓溶解が促進される主要なメカニズムは、経頭蓋的超音波照射によって rt-PA 分子のフィブリン網目への浸透が促進されることである。当然、その浸透促進作用は超音波強度が大きければその作用は強くなるが、強い超音波照射による生体への障害が懸念されることとなる。

これまでに、超音波血栓溶解促進療法の臨床試験は数件実施されたが、未だ認可に到った例は無い。それらのうちで代表的な臨床試験の2つを表1にまとめ、有効性と安全性について述べてみたい。

表1 過去に行われた超音波照射・rt-PA併用療法の臨床試験

1. CLOTBUST 試験(2004年) 2MHzの超音波
・血流再開率の有意な増加は得られたが、3ヶ月後の臨床症状では有意な改善が見られなかった (P=0.20)
2. TRUMBI 試験(2005年) 300kHzの超音波
・症候性出血が36%発生して、試験中止

周波数 2MHz の超音波を用いた CLOTBUST 試験では、血流再開率の有意な増加が観察されたが、臨床のエンドポイントである、3ヶ月後の臨床症状では有意な改善が得られなかった。この理由としては、用いた超音波の周波数が高く、高周波数のため頭蓋骨による超音波の減衰が大きいため、患部の血栓に実際に届く超音波強度が低すぎたためと推測されている。

一方、周波数 300kHz の超音波を用いた TRUMBI 試験の場合には、非常に大きな割合の症候性脳出血が起こって、臨床試験は途中で中断する事態となった。この出血の理由としては、①照射した低周波数 (300kHz) の超音波に起因するキャビテーション作用と②定在波のために、予想以上の組織障害を生じたと推察されている。この2つの臨床試験から抽出される教訓は次の通りである。

- 1, 照射超音波の周波数選択が重要であること
- 2, 新たに臨床試験を行うためには、定在波問題を克服するための技術開発が必須となること

このような背景の下に本研究では、頭蓋骨透過性の高い中周波数超音波を用いて溶解促進効果が大きく (有効性が高い)、定在波抑制技術によって脳出血発症リスクを下げる (安全性が高い) ことができる超音波照射+rt-PA静注併用療法を開発する。さらに新たに貼付型超音波振動子を開発し、高度な手技を要せずに適切な超音波照射を可能とすることで、超音波照射+rt-PA静注併用療法のさらなる普及を目指す。また、次世代の技術としてバブルリポソームによる超音波照射効果の増強技術開発も合わせて研究する。気体を界面活性剤で安定化したマイクロバブルは、超音波照射による血栓溶解作用を大きく増幅できるものとして注目されている。事実、CLOTBUST試験の後を継ぐ臨床試験ではマイクロバブル投与を併用するプロトコルで進められている。これらのマイクロバブルは直径が3 μ m程度のものであるが、本研究で用いるのは直径が500nm程度のバブルリポソームである。血流を通して血栓部位に到達する点においても、血栓の網目構造をより深いまで浸透する点においても、より小さな粒径は大いに有利である。本研究では、バブルリポソーム投与の無いプロトコルでの臨床試験を目指す。現在の最先端の臨床試験の技術を越えたバブルリポソーム併用の可能性を次世代の医療技術として研究してゆく。

一方、臨床サイドでは、臨床試験の際に必須となる超急性期脳梗塞のヒストリカルデータの臨床的蓄積と解析を行なう。この解析により、超音波によるrt-PA血栓溶解促進療法において、rt-PA単独治療群の対照を置くこと無く臨床試験の実施を可能とし

、より少数・短期間の臨床試験を可能とする。また、rt-PA静注療法の経過観察には閉塞血管の血流再開通現象を経時的に観察することが重要である。評価に使用する経頭蓋カラードプラ法での観察を容易にする頭部固定具の開発を推進する。実際の臨床試験プロトコルにおいて、経頭蓋カラードプラ法計測を必須の施行項目としてするかどうかは、計測にかかる手間と時間の問題もあり、判断の難しいところである。しかしながら、急性脳梗塞の病態計測の大変有力な方法である経頭蓋カラードプラ法の臨床使用を容易にする頭部固定具の開発は、大変大きな意義を有する。

本研究の特長を表2にまとめる

表2 本研究が開発する超音波rt-PA血栓溶解療法の特長

- (1)効果と安全性に優れた500kHzの中周波数超音波を使用
- (2)定在波回避技術を開発
- (3)ソフトな貼付型超音波振動子による簡便な装着
- (4)豊富な臨床データに基づいた治験プロトコル作製
- (5)パブルリポソーム投与による更なる加速効果

これらの特長を順番にここで解説する。

(1) 500kHzの中周波数超音波を使用

照射超音波の周波数が低いほど、rt-PA分子の浸透性増加に寄与する機械作用は高くなるが、同時に細胞や組織への障害作用も高まってゆく。一方、周波数が高いほど細胞・組織障害の副作用は小さくなるが、発熱作用による副作用は大きくなる。また、高周波数ほど頭蓋骨や脳組織の透過性が低く、十分な超音波強度を脳梗塞部位に到達させるためには、より大きな超音波強度を加える必要がある。そのため高強度超音波に

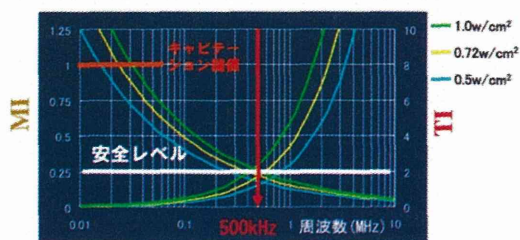


図2 超音波周波数と機械作用、発熱作用との関係

よって生じる発熱が組織を障害するリスクが高まる。図2に機械作用 (Mechanical Index: MI) および発熱作用 (Thermal Index: TI) の関係を示す。MI と TI をどのレベルで治療に最適と見なすかは、必ずしも一致した見解はないが、白線のように設定した場合には、500kHz が最も安全に超音波照射できる周波数となる。本研究においては他の周波数と比較した場合の超音波特性に注意を払いつつ、500kHz を用いた超音波照射を行うことに本研究の独自性と優れた点がある。

(2) 定在波回避技術を開発

定在波とは、反射した超音波が干渉することで、波形が進行せず一定の場所で振動しているようにみえる波動である。この定在波の強度が高まった部位で組織障害が発生する懸念がある。前述した TRUMBI試験での予想を遙かに上まわる高頻度の脳出血の原因が定在波であると臨床試験で確定することは不可能である。一方でその強い疑いがある限り、新たな臨床試験実施には、定在波抑制技術が必須のこととなるのは疑いないところである。

本研究においては照射する超音波に変調を加えることで、超音波振動の規則性に基づく定在波発生を抑制しようという戦略である。この戦略は本研究グループの世界に誇るオリジナリティーである。また、本研究中に超音波のその干渉作用により、頭蓋骨透過率が患者毎に大きく変動する可能性について検討を行い、その変動を小さくして (平準化して) より有効で安全な超音波血栓溶解促進療法の構築を目指す。従来、超音波の頭蓋骨透過は「周波数が大きいほど小さくなり、また骨が厚くなるほど小さくなる」ことが常識と考えられてきた。一方、我々がモデル計算をしてみると周波数、皮膚の厚さの微妙な違いによって、頭蓋骨透過率は大きく変動することが予想された。

もし頭蓋骨透過率の変動が従来考えられてきた以上に大きなものであるならば、超音波血栓溶解促進療法において、その有効性と安全性に対する重要な因子が従来では見逃されてきたこととなる。この変動を平準化する技術としても変調超音波は有効と考えられる。

よって、変調超音波技術を用いることで、有効性と安全性に関して従来から重要と考えられてきた問題解決に加えて、従来見過ごされてきた問題の解決を計る点において、本研究の先進性がある。

(3) 貼付型超音波振動子

本研究が対象とする超急性期脳梗塞は救急搬送で病院に到着する患者が主たる対象となるので、超急性期脳梗塞に対しての経験と技術が豊富な医療スタッフが常に対処できるとは限らない。よって、より簡便にかつ確実に有効な超音波照射を実施できる医療機器開発は、この医療技術をより広範囲に普及させるためには最重要と言える。特に、患者の体動に対する適応性を超音波医療機器に付与することが鍵となる。本研究で開発する貼付型超音波振動子は、高度な超音波操作手技を要さず、rt-PA静注と同時に側頭部表面に貼付するだけで、血栓溶解加速が実現するという、極めて簡便かつ有効な医療機器となる。本研究の開始当初は、柔軟性のあるソフト素材の超音波振動子を目指したが、要求する発信性能が得られなかったために、従来のハードな素材を用い、皮膚接着用のゲルを工夫することで目的の貼付型という要件は満たすことに成功した。

(4) 豊富な臨床データに基づいた治療プロトコル作製

臨床試験において有効性を実証する最も望ましい方法はランダムスクリーニングによるコントロール群との比較で

ある。しかし超急性期脳梗塞治療現場において患者・家族に、短時間でランダムスクリーニングの複雑な仕組みを理解して同意を得ることは困難だけでなく治療そのものの遅滞を招きかねない。また臨床試験の対象となる rt-PA 静注療法単独対象例は、急性期脳梗塞例の 5%、超急性期脳梗塞の 15%と少なく、さらに 2 群に分けての臨床試験実施は、登録症例数の充足、試験期間の設定からも非現実的である。対して、比較群を含まない臨床試験ではこれらの問題点が解消できる。この場合には、コントロール群として過去の臨床データを用いて、本臨床試験の結果と比較をするために、コントロール群として解析に足りうる精密なヒストリカルデータ収集が重要となる。本研究では、臨床試験実施予定の国立循環器病研究センターにおいて、このデータ収集を行うと共に、それを用いた臨床試験のプロトコルを作製する。

rt-PA の血栓溶解作用の最も直接的な観察事項は、血流の再開通である。神経症状の改善、転帰等は、血栓溶解以外の様々な要因が複雑に絡みあうために、臨床研究において治療の有効性を統計学的に証明するにはより多くの登録症例数が必要となる。MR angiography を用いた過去の研究では、早期再開通と転帰の関連性は高く、再開通現象評価は極めて重要である。本研究においては、MR angiography と比較しより簡便かつ非侵襲的な経頭蓋カラードブラ (TCCS) を用いて脳血流再開通現象を経時的に観察することを重視して研究開発を行う。しかし、従来の TCCS 装置では脳血流が観測可能な位置と角度に長時間固定することは不可能であった。本研究は、同装置のプローブを頭部に容易、かつ確実に固定する用具の開発も実行する。

(5) バブルリポソーム投与によるさらなる血栓溶解促進

超音波照射による血栓溶解促進をさらに加速するために、マイクロバブルを投与する研究・開発が進められている。例えば、CLOTBUST試験の後を継ぐ臨床試験ではマイクロバブル投与を併用するプロトコルで進められている。超音波照射により、マイクロバブルは血栓近傍で振動及び破裂し、rt-PAのフィブリン網目構造への浸透を亢進させる。従来この目的に用いられるマイクロバブルは、超音波造影剤である直径3 μm 程度のミクロンサイズのエマルジョンである。マイクロバブルのサイズが小さくなればなるほど、血流を通じての血栓部位へのアクセス、およびフィブリン網目構造内へ侵入が容易となる。しかしながら、従来、超音波に応答するパーフルオロプロパンを、ミクロン以下のサイズの粒子に封入する技術は存在しなかった。分担研究者（丸山一雄）は、封入するキャリアーをリポソームとすることで、パーフルオロプロパンを封入したナノサイズのナノバブルを得ることに成功した。本研究では、超音波照射、rt-PA投与、ナノバブル投与の3つの併用技術を次世代の脳梗塞血栓溶解医療技術としての開発のための基礎研究を実行する。すなわち、バブルリポソーム開発研究は、超音波照射+rt-PA静注併用療法が認可された後にその効果を高める医療技術としての研究であり、基礎研究段階から多面的に評価し、研究成果を蓄積する。

B. 研究方法

本研究は大きく4つのグループに分け、表3に示すようにそれぞれの役割を分担している。

表3 研究組織の構成

- | |
|-----------------------------------------------------------------------------|
| 1, 東京慈恵会医科大学：超音波の効果と安全性
井口保之、小川武希、横山昌幸、福田隆浩村 三秀毅
小松鉄平、幸 敏志（田辺三菱製薬（株）） |
| 2, 帝京大学：バブルリポソーム
丸山一雄 |
| 3, (株)カネカ：貼付型超音波振動子
川島裕幸 |
| 4, 国立循環器病センター：臨床研究プロトコル
峰松一夫、山本晴子、古賀政利 |

各グループの実施項目を以下の表4にまとめる。

表4 研究開発実施項目

- | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1, 超音波の効果と安全性
(1) 超音波駆動条件の最適化と頭蓋骨透過性の測定
(2) <i>in vitro</i> 血栓溶解作用の定量法
(3) MRIによる脳梗塞モデルの分類 |
| 2, 貼付型超音波振動子
(1) 超音波照射システムの作製
(2) ラットでの超音波照射安全性評価* |
| 3, 臨床研究プロトコル
(1) 治験プロトコル案作製
(2) ヒストリカルデータ収集
(3) 経頭蓋カラードブラ用探触子固定具の開発 |
| 4, バブルリポソーム
<i>In vitro</i> , <i>in vivo</i> での血栓特異性, 血栓溶解性能の評価 |

- 1, 超音波の効果と安全性
- (1) 超音波駆動条件の最適化と頭蓋骨透過性の測定
- (1-a) 雑音変調方式による定在波抑制
- 定在波とは、波形が進行せず一定の場所でも振動しているように見える波動のことである。定在波は、ある一方向に向かう進行波と、壁で反射した波とが重なりあうことによって発生する。音圧の時間的変動が大きいところは腹、小さい所は節と呼ばれる。この様子を、図1に示した。定在波を抑制するとは、腹と節を緩

和し、時間的な平均音圧分布が空間的に滑らかになるようにすることである。

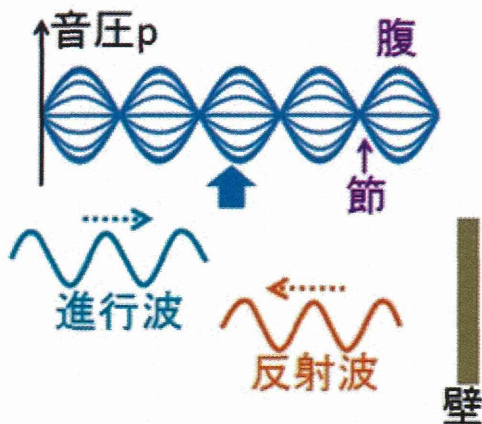


図1 定在波の発生

定在波を抑制するための雑音変調方式として本研究では、以下の方式を従来の正弦波駆動の場合と比較した。

(i) 雑音位相変調

(Phase modulation by noise: PMN)

送信周波数を 500kHz に固定するがその位相を全くランダムに振る方式。時間 t におけるシグナル $s(t)$ は、振幅を A 、周波数を f 、位相角度を $\phi(t)$ とすると

$$s(t) = A \sin(2\pi ft + \phi(t))$$

と表される。

この式において $\phi(t)$ が時間的にランダムに変動する。この位相角度の振り幅を $\pm 150^\circ$ 程度まで変化させて比較検討した。

(ii) 周波数ランダム選択法 (Periodic selection of random frequency: PSRF)

一定時間 (例えば 10 マイクロ秒) 毎に周波数を切り替える方式。周波数は予め定めた上限周波数と下限周波数の間の値がランダムに選択される。

(iii) 逆相信号雑音スイッチング方式 (Random switching of both inverse carrier: RSBIC)

180° 位相の異なる 500kHz の単一周波数波形を 2 種類用意し、両者をランダムに切り替える方式。位相反転のタイミングは雑音のゼロクロスタイミングとする。

以下に上述の 3 種の雑音変調方式の波形の一例を示す。

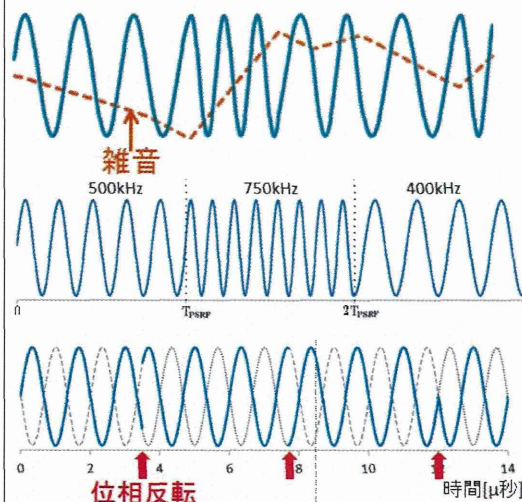


図2 雑音変調方式の波形

(図の上から PMN, PSRF, RSBIC の各方式)

定在波の発生の様子はシュリーレン法によって観察した。全体の実験装置概略図を図3に示す。信号生成器 (AFG3102; Tektronix, OR, USA) は 500kHz 正弦波に限らず、PMN を発生させることができる。波は増幅器 (HSA4101; NF Co, 横浜, 日本) によって増大され、振動子に入力された。駆動波はオシロスコープ (TDS3012; Tektronix, OR, USA) を用いて観測された。振動子は水槽の中に配置され、鉛直下方に超音波が出力された。

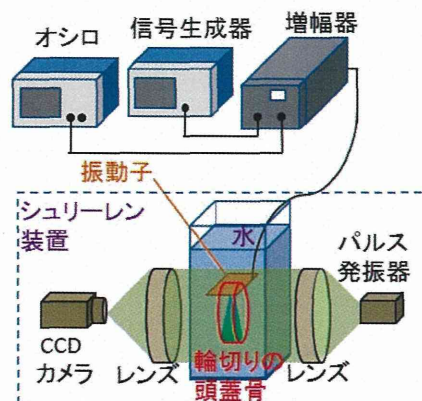


図3 実験系の概略図

水槽の中には、輪切りにされた頭蓋骨が固定された。頭蓋骨は輸入会社 (General

science corporation, Tokyo, Japan)を通じて、会社(ETS DU DOCTEUR AUZOUX, Paris, France)から購入した。ヒト頭蓋骨を用いる本実験は慈恵会医科大学内の倫理委員会(IRB)に承認され、本実験のすべての手続きは倫理委員会の規則に則っておこなわれた。頭蓋骨は右と左の両方の側頭骨ウィンドウを含むように、4~6cm幅でカットした。頭蓋骨の側頭部の外側に向けて照射された超音波は頭蓋骨を透過して、頭蓋内に入り、その後、頭蓋骨内壁で反射した波と、進行波とが重なりあって、定在波が発生するようにした。なお、水と脳内の音速はほぼ等しく(~1500m/s)、(したがって波長もほぼ等しく 500kHz で約 3mm)、水中は脳内の良きモデルとみなせる。

超音波を可視化するには、シュリーレン装置(US-250SL; 溝尻光学, 東京, 日本)を用いた。図4の下部に示されているように、装置はパルス発振器、2枚のレンズ、水槽、CCDカメラから構成されている。パルス発振器から発射された光は、1枚目のレンズ、水槽、2枚目のレンズを順に通過し、CCDカメラで検出される。シュリーレン装置は水中に生じた密度差を検出する。定在波が発生したとき、シュリーレン画像上で、腹は明るい領域として、節は暗い領域として観測される。

定在波抑制効果を定量化するために、シュリーレン画像の輝度に基づくStanding Wave Ratio (SWR)を導入した。最初に、シュリーレン画像上で、定在波を幾つか含むような興味領域 (ROI)を決めた。ROIは長方形の領域とし、長方形の一辺は定在波の明線に平行であるようにとった。次にROIの輝度をフリーソフトImageJを用いて決定した。輝度は定在波の明線に平行な方向に沿って平均した。SWRは輝度から次式により計算した。

$(SWR) = ((\text{音圧の平均極大値}) - (\text{音圧の平均極小値})) / ((\text{音圧の平均}))$

この定義より、SWRの値が小さいほど、波の強弱の差が小さく、定在波が抑制されていることになる。

本実験では、AIMSを用いて3次元的な音場分布を測定した。定在波の実験に用いた貼付型振動子(中心周波数500kHz、1-3コンポジットPZT)を図4に示す。

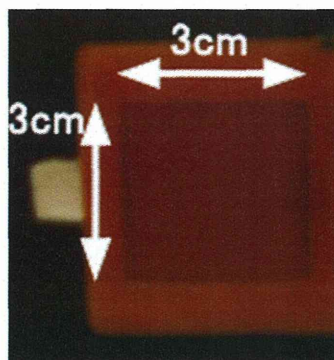


図4 貼付型超音波振動子
30×30mm、厚さ6mm

使用したハイドロホンを図5に示す。ハイドロホンの先端部には、口径0.5mmの振動子が装着されており、その周波数感度は0.25MHzから10MHzである。このハイドロホンを空間的に走査し、音場分布を測定した。3次元の座標(X, Y, Z)の原点を振動子面の中心に取り、Z軸を振動子の中心軸に沿って、ビームの進行方向に取り、XYは振動子面と平行な面とした。Zの値を変えながら、XY平面の音場分布を1mm間隔で測定した。



図5 AIMSで使用したハイドロホン
型名ONDA HNC-0400

図6に実際の実験風景を示す。500kHzの正弦波駆動の場合と雑音変調方式の場合の音場分布を比較した。

変調による定在波抑制の効果を定量化するために、新たに指標を考案した。