

ヒト全血からの血栓は、抗凝固剤CPDA-1添加したヒト全血（コード：12081645）から作製した。（コージンバイオ株式会社から購入）購入後は4℃で保存、採血日から35日以内使用した。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牛トロンビン、加えた容積比率は18:1:1）2.3mlを作製して、血栓セル内に注入し、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フィルム上に作製した。

(3) MRIによる脳梗塞モデルの分類

本研究の経頭蓋超音波血栓溶解促進療法の開発では、in vivoでの超音波照射安全性評価が大変重要な項目である。通常健康なラットでの超音波照射実験も一定の意味はあるが、脳梗塞モデルラットを用いて虚血による様々な生体応答が惹起された状態で超音波照射によって脳出血が促進することの有無を知ることが適切と考えられる。この脳梗塞モデルとして比較的良く確立された方法は、ナイロン糸をラット中大脳動脈（MCA）に塞栓させるモデル（小泉モデル）である。ほぼ一定の長さの糸を術者の手の感覚により挿入するのであるが、塞栓の程度には差があると考えられる（MCA血流の完全・部分閉塞、他動脈の閉塞の有無など）が、閉塞後のラットの状態（脚の麻痺や、旋回挙動）で判断するのみであるのが常法である。特に塞栓時間が長い（例えば3時間）と、予後（生存や脳出血等）に大きく差が出やすいことを我々も経験している。

この評価するには、ばらつきの少ない評価法であることが大変望ましい。そこで、最新鋭の高磁場動物用MRI装置によって、塞栓状態の精密な観察を行うと共に、ラットの予後との相関を求めることとした。高磁場MRI装置では、微細な生体情報が得

られると共に、測定に要する時間が短縮されるために、従来は測定時間の長さ故に脳梗塞モデルでの超音波照射実験にMRI測定実施が不可能であった場合でも、測定が可能となることが考えられる。本研究が目的とする脳梗塞モデルラットでの超音波照射実験において、どのようなスケジュールならばMRI測定を繰り返すことが可能になるかの検討も行った。

Wistar雄ラット（体重254g～303g）を用い、ナイロン糸で中大脳動脈を閉塞する小泉法を基にし、抜糸による再開通操作を迅速に行うために、Memezawa法を改良した方法を用いた。すなわち、ポリエチレンチューブPE10で作ったシースとその内側に挿入された3-0ナイロン糸を血管にいれることで、内側のナイロン糸の抜糸をスムーズにする。再開通時には、再び手術面を開ける必要なく、体外に露出したシースを保持して内側のナイロン糸を引けば良い。

イソフルラン吸入麻酔下で、ラットを保温パッド上に仰臥位で固定後、頸部に正中切開を加え、右側の総頸動脈（CCA）、外頸動脈（ECA）、内頸動脈（ICA）及び翼突口蓋動脈（PPA）を露出し、CCAをその分岐部より3mm近位処で結紮し、ECAとPPAをもそれぞれの根底部で結紮する。ICA末梢側に杉田クリップを掛け、CCA分岐部に4-0絹糸を緩く縛り、その直前1mmに穴を開いて、PE10で作ったシース（長さ50mm）とその中に挿入された3-0ナイロン糸（長さ68mm）を一緒にICA内へ入れてからCCA分岐部の絹糸を軽く縛り、ICA部のクリップを外し、シースをICA内6mmまで送り、CCAの結紮糸で固定後、その中のナイロン糸をさらに13mmを進め、前大脳動脈内まで送ってから閉鎖する。こうすることで、ナイロン糸は中大脳動脈（MCA）の入口を塞ぎ、その支配領域への血流は遮断される。再開通時にはシース末端を

ピンセットで掴んで、ナイロン糸の末端をもう一つのピンセットで掴み、10mm位抜いて、MCAの再開通が開創なしに簡単にできる。

塞栓作業の直後に、高分子ミセル型のMRI造影剤 (0.033 mmol Gd/kg) を尾静脈から投与してから、9.4TMRI装置 (Bruker社製 BioSpec 94/20USR型) にラット脳用のコイル (Model No.: 1P T10324V3) を装着してMRI撮像 (Angiography, DWI, T1, T2, T2*) を行った。麻酔下で規定の時間 (1~3時間) 塞栓を続けた後に、ナイロン糸を抜糸して3時間MRI撮像を継続した後に、麻酔から覚醒させて、血管閉塞24時間後に状態観察を行った。

MRI Angiographyの撮像パラメーターは以下にまとめる通りである。

- TR/TE = 15.0/3.4ms
- FOV = 2.14cm x 3.30cm
- Slice thickness = 6 mm
- 解像度 = 0.01cm/pixel
- Time = 3.43 s
- 積算 = 1回

2. 貼付型超音波振動子システムの作製

超急性期脳梗塞患者に対する超音波血栓溶解促進療法を普及させるためには、より簡便にかつ確実に有効な超音波照射を実施できる貼付型超音波振動子は、大変有意義である。また、2014年に、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示された現在では、貼付型は新たな意義を持つことになる。それは、医療機関に救急搬送されて診断、そしてrt-PA投与を行った後、血流が再開されない事態で血管内治療が行える他施設へ搬送される場合である。搬送の際もrt-PA投与による血流再開治療は継続することから、今回我々が目指す医療機器が救急車など搬送車両内での使用できることに意義が見いだせるのである。

以上より、簡便かつ確実に装着可能であり、定在波、ホットスポットの発生を回避し、適切な超音波を簡便に照射可能なポータブル医療機器の実現を平成33年の上市を目指し開発を推進している。

本研究期間は、平成24年度、AIMS (Acoustic Intensity Measurement System) にて振動子の素材、面形状による超音波周波数特性、音響強度分布の把握。シュリーレンにて変調システムの定在波、ホットスポット回避効果を検討した。

平成25年度は、頭蓋透過の個人差を把握し、個人差緩和を実現する超音波条件、振動子、装着具の開発を進めた。

平成26年度は、PMDAと面談を行い、安全性と有効性の評価に向けて機器設計を進めた。

(1) 超音波照射システムの作製

(1-1) 振動子設計

振動子は、材料、構造設計により同電圧の広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。振動子は大きく分類すると、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ため、特定領域では低電圧で、超音波を発振することができる圧電素子 (以下ハイQ材) 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) がある。ハイQ材は特定領域のみを活用する場合、駆動装置の電気エネルギーが低レベルで済むものの、特定周波数領域を外れた超音波を発信させる場合は、非常に高い電気エネルギーが求められるため、目的領域が限定されている場合に適した素材である (図35)。

一方、ローQ材は全周波数帯域的に高めの電気エネルギーが求められるが、広い周波数帯域で超音波を安定的に発信することができるため、広い周波数帯域での超音波振動を求められる時には適している素材である(図36)。

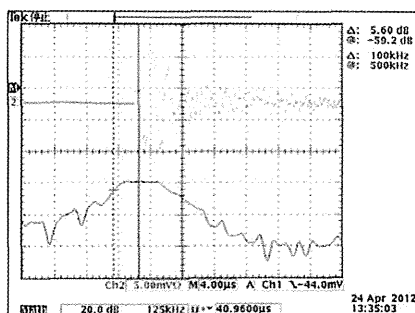


図35 ハイQ材(人工セラミックス)
横軸に周波数、縦軸に音響強度を表す。限られた周波数領域で音響強度が高まっている。

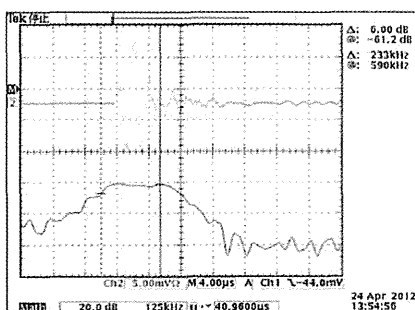


図36 ローQ材
(多孔質人工セラミックス)

ハイQ材、ローQ材は、今回の医療機器開発における周波数帯域で血栓溶解を加速する音響強度と、キャビテーション回避の変調方式を検討の後、駆動に必要な電気エネルギーを考慮して選定を行う。

(1-2) 変調条件による定在波抑制

目的の項に書いたとおり、300kHzとrt-PAの組合で実施されたDaffertshoferらの臨床研究は、高率の脳出血によって中断を余儀なくされた。古幡らは、Daffertshoferらの超音波条件を解析したところ、安全とされているメカニカルイン

デックス1を超える3.54の条件で臨床研究が実施されたことを指摘している。

(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))

我々も目指している簡便に頭蓋内血栓塞栓部に超音波を照射する医療機器の開発は、頭蓋骨の超音波透過が必要であり、透過性に優れる低周波におけるメカニカルインデックスと発熱課題サーマルインデックスのバランスを鑑み、500kHz付近の中周波数帯域の超音波を照射することを選択した。しかしながら、中周波数帯域の単一周波数の使用は、連続、断続照射にかかわらず、キャビテーションの発生可能性が高まり、局所的に高い物理的ストレスがかかるため安全に照射することが難しい。適用患者の安全確保に当たり、キャビテーションの原因となる定在波の発生回避は重要な開発目的となる。定在波回避の方法として、我々は超音波変調が有効な方法と考え、RSBIC、PMN、PSRF 各変調を行える駆動装置を試作し、変調による定在波抑制効果の検証を実施した。

(1-3) ファントムによる評価

超音波を頭蓋内に照射する場合、頭蓋骨は超音波を透過しにくく、超音波音響強度の低下を招く。これは、頭蓋内の血流確認などの際、超音波診断装置ではしばしば画像が得られないことから一般に知られている。

今回開発の医療機器は、超音波による拡散効果で静脈投与されたrt-PAを塞栓原因の血栓に到達させ、さらに血栓の中へ拡散させる効果により血栓溶解を促進させる。本開発の医療機器の効果を得るには超音波が頭蓋骨を透過後に安全かつ有効な音響強度となるような設計が求められる。本医療機器は、従来の診断装置と異なり、簡便な操作性を目指すため、

貼付操作のみの適用で、皮膚を含めた頭部表面から超音波が目的部位に到達する設計をする必要がある。そのため、音響特性を皮膚、頭蓋骨に模した図37に示すファントムを作成し、振動子、変調による透過特性を評価し、入力音響強度の設計基礎情報を収集する。さらに骨の厚みが異なるファントムを作成し、骨厚みによる音響強度透過の影響を評価する。



図37 皮膚／骨ファントム：白い部分

(1-4) 振動子の周波数特性改善

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。

(1-5) 装着システム設計

(1-5-a) 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(表5)、超音波透過性をAIMSを用いて評価した。

表5 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

(1-5-b) 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。

(1-6) 駆動装置設計

平成24年度定在波の抑制目的確認のため、変調機能を有する基板試作を行い(図38)、変調信号による定在波抑制効果を確認した。

平成25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38 変調超音波出力回路試作機

(2) ラットでの超音波照射安全性評価

臨床に適用するのにあたり、平成26年度は、PMDAと開発前相談を実施し、有効性と安全性の評価を推進した。有効性は、in-vitroでの全血溶解性評価、ならびに安全性は機器の安定性能の実現を前提にラットを対象としたin-vivo試

験にて安全性立証のうえ治験申請に向け準備を進めた。

(2-1) 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/ Ml : 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°C/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 μg/mLになるように調製し、以下倍希釈を行い最小0.0002 μg/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°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、生理食塩液で4倍に希釈して吸光度を測定し全血栓量を算出した。

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。

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℃ 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℃ に設定したインキュベーターにて静置した。

(2-2) 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ーゼ (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。

(2-2-a) モデル作製方法

① 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℃ 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。

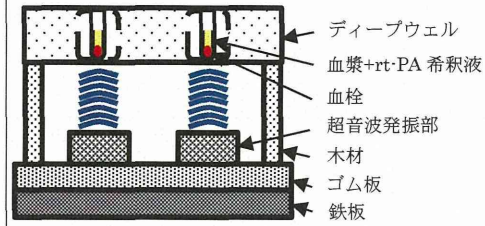
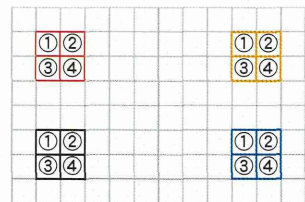


図 3 9 血栓溶解試験 模式図



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

図 4 0 96穴ディーププレート試験群配置図

② 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. Zhang ら¹⁾ 及び E. Busch ら²⁾ 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-b) 超音波照射

① 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 (φ20 mm × H33 mm) を密着させ固定した。

② 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ポーザブル注射筒で 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。

③ 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 6 のとおりである。

表 6 超音波照射強度の推定

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

(2-2-c) 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

① 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 2 mm 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。

② 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。

3. 臨床研究プロトコル

(1) 治験プロトコル案作製

超音波血栓溶解促進療法の臨床プロトコル作成に当たり、最近の rt-PA 静注療法の治療開始可能時間 (therapeutic time window : TTW) に伴う、rt-PA 静注療法対象の増加症例数を予測し、増加症例の臨床的特徴を明らかにすることを目的とした解析を行った。すなわち、2012 年 8 月 31 日にが発症後 3 時間以内から 4.5 時間以内へ延長されることが厚生労働省の薬事・食品衛生審議会で認められた変化に対応したものである。

この解析は、2011 年 1 月から 2012 年 8 月 31 日までに国立循環器病研究センターに発症 7 日以内に入院した急性期脳梗塞患者を対象とした。発症 3 時間以内に rt-PA 静注療法を受けた症例を 3 時間治療群、発症 3.5 時間以内に来院し rt-PA 静注療法を受けていないもののうち適応外項目がなく National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) スコア > 4 の患者を 4.5 時間適応群、発症 2-3.5 時間で来院し rt-PA 静注療法を受けていないもののうち適応外項目もしくが NIHSS スコア ≤ 4 を有する患者を 4.5 時間除外群とした。来院・治療開始時間は 60 分と仮定した。予測される増加率は、(4.5 時間適応群/3 時間治療群) × 100% から計算した。また、年間の予測増加数を計算した。3 時間治療群と 4.5 時間適応群を比較し、4.5 時間適応群の特徴を調べた。

さらに、4.5時間除外群では除外となった理由とその頻度を調べた。また、TTW延長後の2012年9月から12月までにrt-PA静注療法を受けた患者のうち実際にTTW延長によって増加した(来院-治療時間60分と仮定し発症2時間以降に来院し4.5時間以内に治療を受けた)患者の割合を調べた。

この結果を踏まえて、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、プロトコル案を作成した。また、他に考慮した背景は以下の4項目である。

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ルを提案する。

また、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。

参加(依頼)施設候補は以下の通りである。

- 国立循環器病研究センター
- 東京慈恵会医科大学
- 日本医科大学(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)

(2) ヒストリカルデータ収集

今回、開発の際に参照するデータの収集を目的として、急性期虚血性脳卒中に対するrt-PA静注療法例において、超音波照射を併用しない場合の早期再開通率、症候性頭蓋内出血率と3カ月後転帰を調べた。

本研究計画は、国立循環器病研究センター倫理委員会の承認を受けた。

対象は2005年10月から2013年4月までに当院でrt-PA静注療法を施行した384例である。前向きに収集したデータベースを用いて、後ろ向きに検討した。検討項目は、患者背景、脳梗塞病型、MRAもしくは脳血管造影検査(digital subtraction angiography; DSA)による血管閉塞部位を、内頸動脈(internal carotid artery; ICA)、中大脳動脈(middle cerebral artery; MCA)、前大脳動脈(anterior cerebral artery; ACA)、後大脳動脈(posterior cerebral artery; PCA)、椎骨脳底動脈(vertebro-basilar artery; VB)系、閉塞血管なし、評価不能に分類した。主幹動脈(ICA, MCA, ACA, PCA)に閉塞があり、発症2時間以内にMRAもしくはDSAで再開通の評価を行った症例のrt-PA投与2時間以内、24時間以内の再開通の有無を調べた。2時間以内には再開通の評価は行ったが、24時間以内には評価しなかった症例は、2時間以内の再開通の有無で24時間以内の再開通の有無に代用した。

発症 36 時間以内の National Institutes of Health Stroke Scale(NIHSS)スコア 4 以上の増悪を伴う頭蓋内出血を症候性頭蓋内出血と定義した。転帰は 3 カ月後の modified Rankin Scale(mRS)スコアで評価し、mRS 0-1 を転帰良好、mRS 0-2 を日常生活自立とした。また、安全性指標の 1 つとして 3 ヶ月後死亡 (mRS 6) を評価した。なお、rt-PA 投与後 24 時間以内に別の部位に脳梗塞を再発した症例は 24 時間以内の再開通の評価から除外した。また、rt-PA 静注療法後に閉塞血管に対して経皮経管的脳血栓回収用機器(Merci リトリバー、PENUMBRA システム)を使用した症例は、24 時間以内の再開通の評価と症候性頭蓋内出血、3 ヶ月後の転帰の評価から除外した。

再開通の評価は MRA では modified Mori grade を用い(Mori E, et al. Stroke 2010),DSA では Thrombolysis in Cerebral Infarction 分類 (TICI)grade を用いた (Tomsick S, et al. Am J Neuroradiol 2008)。MRA と DSA とを併用した評価は、Yoshimura ら(Yoshimura S, et al. J stroke Cerebrovasc Dis 2014)の報告を参考に、grade 0:MRA で modified Mori grade 0, DSA で TICI 0, grade 1: MRA で modified Mori grade 1, DSA で TICI 1, grade 2: MRA で modified Mori grade 2, DSA で TICI 2A, grade 3: MRA で modified Mori grade 3, DSA で TICI 2B, 3 という分類を使用した。modified Mori grade 2 以上、もしくは、TICI 2A 以上、MRA と DSA を併用した評価では grade 2 以上を再開通ありとした。

主幹動脈閉塞患者の閉塞血管部位(ICA, M1, M2)と MRA,DSA の併用による再開通率、症候性頭蓋内出血、転帰の関係についてカイ 2 乗検定を用いて検討した。

(3) 経頭蓋カラードプラ用探触子固定具の開発

経頭蓋ドプラー法 (TCD) の探触子頭部固定具は市販されているが、経頭蓋カラードプラ法 (TCCS) の探触子固定具は市販されていない。この探触子はより大型で重く固定が難しい。今回、有限会社アンリミット・ジャパンと共同で TCCS に用いる探触子頭部固定具を開発した。

頭部固定型の頭部固定具の試作機を我々の要望に沿ってアンリミット・ジャパン側が作成した。実際に患者に使用し、有用性について評価した。

対象は平成25年7月から平成27年3月までの当院に入院した患者を対象とした。TCCSで側頭骨窓から脳血管の観察が可能な患者で、固定具を使用し頭蓋内血流が安定して観察可能か、脳梗塞の原因となる微小栓子シグナル (microembolic signal: MES) の検出が可能か、血管同定までの時間と頭部装着感等を TCD の頭部固定具と比較し、それぞれについて検討した。

4. バブルリポソーム

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。バブルリポソームの最大の特徴はその粒径がナノサイズ (500nm程度) と小さいことである。

表 7 に示す様に、マイクロバブルを併用することで、ヒトでの急性期脳梗塞の血流再開率がrt-PA単独や、rt-PA+超音波併用に比べて顕著に向上することが報告されている。

表 7 超音波、マイクロバブル併用による血栓溶解促進効果

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

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

粒径が約 3 μ m の μ バブルに比べて、圧倒的に粒径の小さなバブルリポソームは、血栓部位への到達性と、血栓の網目構造ないで高い浸透性において優れていて、マイクロバブルよりも高い治療効果が期待される。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。

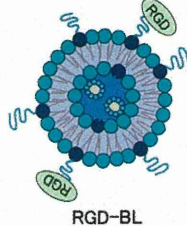


図 4 1 RGD-BL 模式図

(1) バブルリポソーム (BL) の調整

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 μ mol 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 $^{\circ}$ 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。

C₃F₈ ガス封入量の測定は、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 μ L 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。

粒子径の測定は、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。

(2) in vitro 活性化血小板結合能評価

ラット尾静脈より 3.2 % のクエン酸溶液に採血した血液 1 mL を 100 \times g、室温にて 10 分間遠心分離し、その上清 (PRP: platelet rich plasma) を回収した。生理食塩水で PRP を 20 倍に希釈し、ガラスボトムディッシュに播種、1 時間室温で放置した後に ADP 溶液を最終濃度 0.02 mM となるように添加して血小板の活性化を行った。10 分間後、RGD-BL を添加して 5 分間静置した後、生理食塩水で 10 回活性化血小板表面を静かに洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察を行った。

(3) in vivo 血栓結合能評価

イソフルラン麻酔科でラットの総左頸動脈を剥離後、総頸動脈の下部にパラフィルムを敷き、総頸動脈とパラフィルムの