

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 2 5 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 井口 保之

平成 2 6 ( 2 0 1 4 ) 年 5 月

## 目 次

### I . 総括研究報告

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
---	---

### II . 分担研究報告

1 . 超音波駆動条件の最適化と頭蓋骨透過性の測定----- 井口 保之、小川 武希、横山 昌幸 小松 鉄平、福田 隆浩、齋藤 理	6
2 . 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----- 井口 保之、小川 武希、三村 秀毅 横山 昌幸、幸 敏志、王 作軍	18
3 . ラット急性脳梗塞モデルによるバブルリポソームの有効性安全性評価 丸山 一雄、澤口 能一	25
4 . 超音波血栓溶解補助医療機器の製品化 ----- 川島 裕幸	29
5 . 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 システムの開発新規超音波血栓溶解装置の治験プロトコール大枠の提案 古賀 政利、鈴木理恵子、大山 賢、徳永 敬介 山本 晴子、峰松 一夫	38
6 . MRA/DSAによるrt-PA施行虚血性脳卒中の閉塞血管早期再開通率の検討 鈴木理恵子、古賀 政利、山本 晴子、大山 賢、 徳永 敬介、松木 孝之、豊田 一則、峰松 一夫	41
7 . 経頭蓋カロードプラ法における探触子頭部固定具の開発 ----- 大山 賢、古賀 政利、鈴木 理恵子、山本 晴子、峰松 一夫	46

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	48
----------------------------	----

IV . 研究成果の刊行物・別刷 -----	49
------------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
総括研究報告書

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唯一の強く勧められる治療法として行われているのが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25年度は、in vivo試験を行うための超音波振動子の作製、超音波照射条件の最適化に重点を置いて研究を行った。

**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、唯一の強く勧められる(グレードA)治療法として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。)

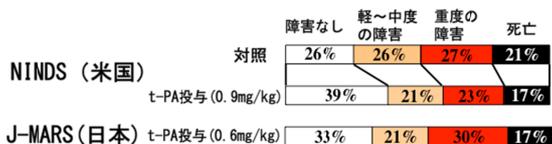


図1 rt-PA療法の臨床効果

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のが重要である。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、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静注療法の治療ウインドウ(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、rt-PAを用いた超急性期脳梗塞治療を一人でも多くの国民に享受できる基盤が整い、医療側の機運は高まりつつある。

新たに超音波照射+rt-PA静注併用療法で血栓溶解が促進されるメカニズムは、以下の通りである。まず脳血管閉塞部位に経頭蓋的超音波照射を実施するとrt-PA分子のフィブリン網目への浸透が促進される。その結果、rt-PA静注療法単独では溶解しえない比較的大きな血栓をより迅速に溶解しうると期待されている。

超音波照射+rt-PA静注併用療法は、これまでに表1に示す2つの代表的な臨床試験が行われたが、いずれも臨床応用には到っていない。

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

臨床応用に至らなかった理由としては、CLOTBUST試験の場合には、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と推測されている。

またTRUMBI試験の場合には、低周波数の超音波に起因するキャビテーション作用と定在波のために予想以上の組織障害を生じたと考えられている。これら過去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

このような背景をもとに本研究では、中周波数超音波を用いて線溶効果を高め（有効性が高い）、脳出血発症リスクを下げる（安全性が高い）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。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を行なう。特に、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ー法での観察を容易にする頭部固定具の開発を推進する。さらに、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。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)バ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。

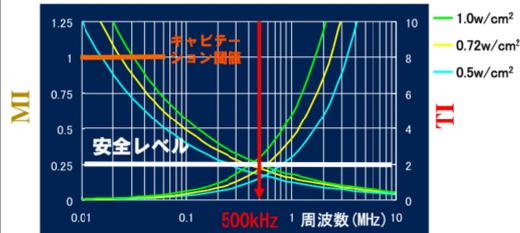


図2 超音波周波数と機械作用、発熱作用との関係

図2に超音波周波数と機械作用 (Mechanical Index: MI) 及発熱作用 (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、図2の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が、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。

### (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。

#### (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で、目的とするデータ収集を行う。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。今回、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を開発することで、目的とする経時的脳血流観察を実現する。

#### (5) バブルリポソーム投与によるさらなる線溶促進

超音波照射による線溶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。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、超音波に回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開発をおこなう。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、村三秀敏、小松鉄平、幸 敏志(田辺三愛製薬(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

各グループの今年度の実施項目を以下の表4にまとめる。各々の項目の研究法は分担研究報告書に記す。

**表4 平成25年度の実施項目**

- 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) in vitro 血栓溶解作用の定量法
- 2, バブルリポソーム  
in vivo での血栓特異性の評価
- 3, 貼付型超音波振動子  
超音波照射システムの作製
- 4, 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)経頭蓋カラードプラ用探触子固定具の開発

## C. 研究結果

ここでは、表4に示した各項目の研究結果を短くまとめる。詳細は各分担研究報告書に記す。

- 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  
超音波の透過率が、骨と皮膚の厚さ、照射超音波周波数に応じて大きく変動することを理論的および実験的に実証し、その変動を抑制し透過率を平準化する手段として周波数変調を提案し、その有効性を実験的に検証した。また、ヒト頭蓋骨の透過率を実測した。

(2) in vitro血栓溶解作用の定量法  
ヒト血漿血栓の超音波溶解促進作用を定量する2D式評価システムを確立し、変調した超音波の促進作用を測定した。

### 2, バブルリポソーム

in vivoでの血栓特異性の評価

ラットin vivo動脈塞栓モデルで、RGD-バブルリポソームでの超音波造影効果を確認した。

### 3, 貼付型超音波振動子

超音波照射システムの作製

変調超音波に対応した振動子、貼付ゲル、駆動装置、装着具からなるシステム作製において、本療法に必要な要件を満たす設計・作製に成功した。今後はさらに高性能化を目指す。

### 4, 臨床研究プロトコル

(1)治験プロトコル案作製

本研究の超音波血栓溶解促進療法の治験プロトコルの大枠を作製した。

(2)ヒストリカルデータ収集

急性期虚血性脳卒中のrt-PA静注療法施行例の早期開通率、症候性頭蓋内出血率、3ヶ月後転帰のヒストリカルデータの更新とまとめを行った。

(3)経頭蓋カラードプラ用探触子固定具の開発

固定具を作製し、患者の装着感と装着に要する時間を調査した。

## D. 考察

超音波振動子の作製、超音波照射条件の最適化に主眼を置いて行った平成25年度はほぼ計画通りに研究が進行した。次年度はin vivo実験によって本療法の超音波照射安全性検証を遂行する予定である。

## E. 結論

(達成度90%と考える)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iguchi Y, Kimura K, Sone K, Miura H, Endo H, Yamagata S, Koide H, Suzuki K, Kimura T, Sakurai M, Mishima N, Yoshii K, Fujisawa H, Ebisutani S, Stroke incidence and usage rate of thrombolysis in a Japanese urban city: the kurashiki stroke registry. J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 2013; 22: 349-57.
- 2) Sakamoto Y, Kimura K, Shibazaki K, Inoue T, Uemura J, Aoki J, Sakai K, Iguchi Y. Early ischaemic diffusion lesion reduction in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator: infrequent, but significantly associated with recanalization. Int J Stroke .2013;8 (5):321-6 .
- 3) Aoki J, Kimura K, Iguchi Y, Sakai K, Sakamoto Y, Terasawa Y, Shibazaki K, Kobayashi K. Two different days of transcranial Doppler examinations should be performed for detection of right-to-left shunt in acute stroke patients . J Neuroimaging. 2013;23(2):175-9 .
- 4) Shimoyama T, Kimura K, Shibazaki K, Yamashita S, Iguchi Y. Maintenance hemodialysis independently increases the risk of early death after acute intracerebral hemorrhage. Cerebrovasc Dis. 2013;36(1):47-54 .

2. 学会発表

井口保之 . 「神経超音波の基礎-手技のコツ伝授」 . 第31回日本神経治療学会 . 東京 , 2013年11月 .

H. 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

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

超音波駆動条件の最適化と頭蓋骨透過性の測定

研究代表者	井口 保之	東京慈恵会医科大学	神経内科 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	横山 昌幸	東京慈恵会医科大学	ME研究室 准教授
研究分担者	小松 鉄平	東京慈恵会医科大学	神経内科 助教
研究分担者	福田 隆浩	東京慈恵会医科大学	神経病理学研究室 講師
研究協力者	齋藤 理	東京慈恵会医科大学	ME研究室 研究員

研究要旨 経頭蓋超音波・血栓溶解剤併用法に基づく治療機器を開発する上で、超音波の頭蓋骨透過率の評価が必要である。超音波の透過率は、干渉効果によって、骨の厚さや皮膚の厚さなどに応じて大きく変動し、個体差がある。本研究では、透過率の変動を明らかにするとともに、変動を抑制し透過率を平準化する手段として周波数変調を提案し、その有効性を実験的に検証した。

A. 研究目的

急性脳梗塞の非侵襲的な治療法として超音波血栓溶解促進療法が注目され、その効果は臨床試験によって示唆されている。しかし、DaffertshoferらによるTRUMBI trialにおいては脳出血が多発し、危険性も懸念されている。有効性と安全性の両面を考慮し、塞栓部における超音波強度を血栓溶解に必要な閾値以上で、かつ生体にダメージを与えないレベルとすることが肝要である。そのため、治療機器開発においては、超音波の頭蓋骨透過率を可能な限り正確に見積もり、照射強度を設定することが大切である。

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」と信じられてきた。一方、超音波が境界面で反射して干渉することで、上記とは異なる透過挙動が起こりえることは一部で報告されているが、超音波による画像診断と超音波血栓溶解療法においては、上記の透過挙動が支配的であると考えられてきた。しかし、超音波の透過率は骨の厚みや皮膚の厚み等により変動しうる。これは、超音波による画像診断と超音波血栓溶解療法においては、上記の超音波が媒質の変位の伝わっていく波動現象であり、反射や干渉等の波動特有の諸性質を示すことからの帰結である。変動が生じる理由は次のように理解される：振動子面から出射された超音波が頭蓋骨を透過する際に、

骨と脳組織との境界で波の一部が反射される。この反射波の一部はさらに骨と皮膚との境界で反射され、再び脳の方に向かう。これらの反射波との干渉により、透過率が変化する。干渉により強め合うか否かは骨の厚みに依存するため、透過率は骨の厚みに応じて変動する。同様に、皮膚の厚みによる変動も生じると推察される。

本研究の第一の目的は個体差による透過率の変動を定量的に明らかにすることによって、従来は考慮されなかった超音波透過変動を解析して、より安全で有効な超音波血栓溶解促進療法の確立を目指す。まず、骨厚や皮膚厚によって超音波の透過率が変動することをn層モデルを用いて予測し、次いで、密度一様な平たい骨ファントム板の透過実験をおこなう。その後、治療対象となる日本人高齢者の頭蓋骨の透過を実測する。

透過率が高すぎれば、脳内の音響強度が大きく、細胞がダメージを受ける危険性が高い。一方、透過率が低く、塞栓部の強度が小さければ、血栓溶解促進効果が損なわれてしまう。そのため、変動は小さい方が望ましい。

透過率の変動を小さくし、個体差を無くす手段として、周波数変調が考えられる。そこで、本研究の第二の目的は、周波数を変調することによって透過率の変動を抑え透過率が平準化されるか否かを実験的に検証することである。

B. 研究方法

まずn層モデルを用いて透過率の変動を計算した後、実験的検証を行った。実験の第一段階で、密度が一樣で平たい骨ファントム板を用い、その後、日本人高齢者のヒト頭蓋骨を用いて実測した。

(1) n層モデルによる透過率の変動計算  
平面波がn層を透過するモデルを簡潔に記述する。このモデルを用いると透過率の変動が評価でき、実験計画の立案や結果の解釈に役立った。

図1のように層が並んでおり、第0層から平面波が入射した場合、各層の境界において、波の一部は反射し、残りは透過する。この反射と透過の割合は音圧と粒子速度が連続という条件から定まる。



図1 層を伝播する平面波

第m層における入射波の音圧振幅を $A_m$ 、反射波の音圧振幅を $B_m$ とすれば、超音波は $A_m e^{i(\omega t - k_m x)} + B_m e^{i(\omega t + k_m x)}$ と表現される(図1参照)。 $A_0$ が入射波の振幅で、 $A_f$ が透過波の振幅である。

各境界に対して行列 $T_{m+1 m}$ を

$$T_{m+1 m} = \begin{pmatrix} \frac{Z_m + Z_{m+1}}{2Z_m} & \frac{Z_m - Z_{m+1}}{2Z_m} \\ \frac{Z_m - Z_{m+1}}{2Z_m} & \frac{Z_m + Z_{m+1}}{2Z_m} \end{pmatrix},$$

$(m = 0, \dots, n),$

と定義し、

各層内に対して行列 $D_m$ を

$$D_m = \begin{pmatrix} e^{-ik_m d_m} & 0 \\ 0 & e^{-ik_m d_m} \end{pmatrix},$$

$(m = 0, \dots, n),$  と定

義すれば、入射波と透過波との間に

$$\begin{pmatrix} A_f \\ 0 \end{pmatrix} = M \begin{pmatrix} A_0 \\ B_0 \end{pmatrix},$$

の関係が成立する。ここで、

$$M = \begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} \\ M_{21} & M_{22} \end{pmatrix} \equiv$$

$T_{fn} D_n T_{n-1 n} D_{n-1} \dots D_2 T_{21} D_1 T_{10}$ である。エ

ネルギー透過率 は

$$\tau = \frac{Z_0}{Z_f} \left| \frac{\det(M)}{M_{22}} \right|^2$$

で求められる。

なお、媒質による吸収は運動量を $k \rightarrow k - i\alpha$ のように複素化によって扱った。

(2) 骨ファントム板を用いた透過率の変動測定と周波数変調による平準化の検証

変調方式は、一定時間(例えば10 $\mu$ 秒)毎に周波数を切り替えるようなものとした。このとき周波数は予め定めた上限周波数と下限周波数の間の範囲内でランダムに選択されるようにした。この方式は周波数ランダム選択法(Periodic Selection of Random Frequency: PSRF)と名付けられた。波形の一例を図2に示す。

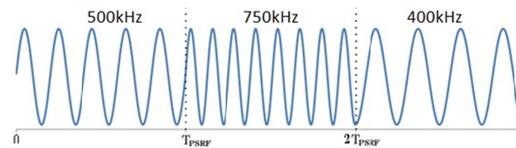


図2 PSRF変調方式の波形の一例

実験装置の概略を図3に示す。ランダムな周波数のデータをUSBメモリーに格納し、そのデータを基に信号生成器Signal Generator (AFG3102; Tektronix, OR, USA)が変調波信号を出力した。信号は増幅器AMP (HSA4101; NF Co, 横浜, 日本)によって増幅された後、振動子transducerに入力された。振動子から出力された超音波は骨ファントム板を透過した後、ニードル型ハイドロホン(ONDA HNC-0400)によって観測された。

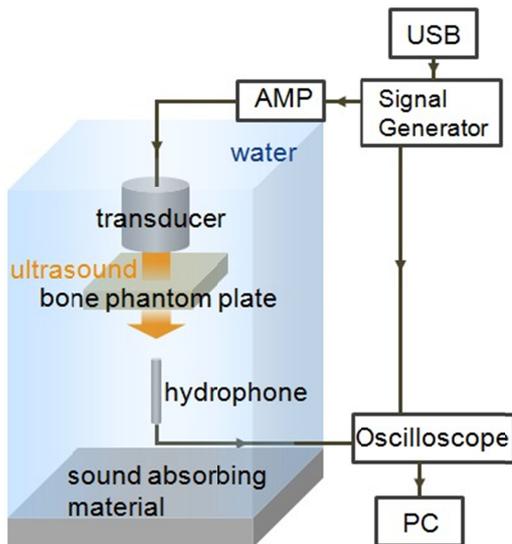


図3 実験系

本実験に用いた振動子を図4に示す。振動子は上田日本無線株式会社製によって作成されたものであり、振動子面は直径24mmの円板で、周波数帯域は357-665kHz (6dBダウン)となっている。



図4 実験に用いた振動子

実験に用いた骨ファントム板を図5に示す。音速は2884m/s、密度は1664 kg/m<sup>3</sup>、吸収率は4.02 dB/cm/MHzであり、ヒト頭蓋骨を模したパラメーターとなっている。

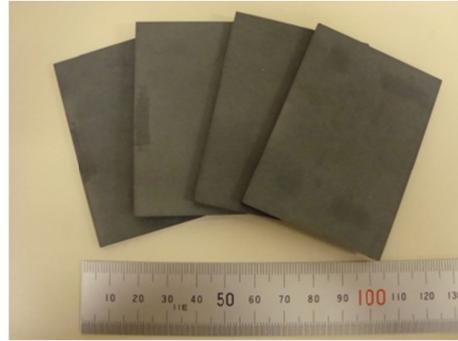


図5 実験に用いた骨ファントム板

大きさは5cm×7cm、厚さは0.6mmから4.4mmまで0.2mm間隔で計20枚用いた。実測とMRI画像によればヒトの側頭骨の厚みはこの範囲内で十分にカバーできている。

図6にハイドロフオンを示す。このハイドロフオンの先端は0.4mmであり、0.25MHzから10MHzの範囲まで測定可能である。



図6 実験に用いたハイドロフオン

図7に実際の実験風景を示す

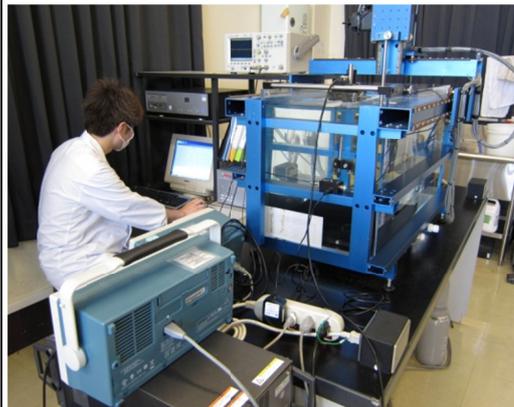


図7 音場分布測定シーン

骨ファントム板と振動子との距離（これは皮膚厚に相当する）を変えながら透過超音波強度の測定をおこない、500kHz正弦波と変調波駆動とを比較した。

また、骨ファントム板の厚さを変化させながら透過超音波強度を、500kHz正弦波と変調波駆動とで比較した。

### (3) ヒト頭蓋骨の透過率測定

治療対象となる日本人高齢者の頭蓋骨の超音波透過率の測定をおこなった。頭蓋骨は慈恵会医科大学解剖学講座に保管されている献体を拝借した。用いた3体の頭蓋骨は次の通りである。

No. 4737...66歳、男性

No. 13.....56歳、男性

No. 4759...72歳、男性

それぞれの画像を図8, 9, 10に示す。本実験では図のように頭部がカットされているものを使用した。



図8 頭蓋骨4737



図9 頭蓋骨13



図10 頭蓋骨4759

ヒト頭蓋骨の超音波透過率の測定をおこなうためには頭蓋骨固定具が必要であり、市川工業株式会社に依頼し作成した。頭蓋骨固定具を図11, 12, 13に示す。図13が頭蓋骨を固定する治具であり、頭蓋骨は3点で保持される。頭蓋骨と接する箇所は、柔らかい素材でできており、頭蓋骨に傷がつかないように配慮されている。図14が振動子を保持する部分である。振動子保持部はステージに取り付けられ、X,Y,Zの3方向の平行移動と、2つの角度方向に微調整が可能となっている。

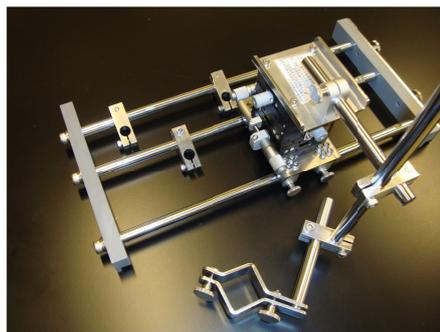


図11 頭蓋骨固定具

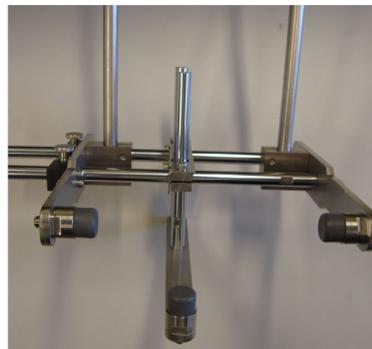


図12 頭蓋骨保持部

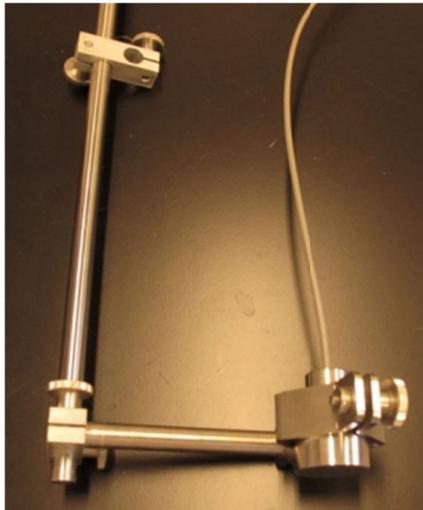


図 1 3 振動子保持部

頭蓋骨のプラスチックモデルを固定した様子を図 1 4 , 1 5 に示す。振動子は側頭骨ウィンドウの位置に合わせて配置する。振動子は上田日本無線社製の直径24mmの円形振動子 ( 357-665kHz ) を用いた。

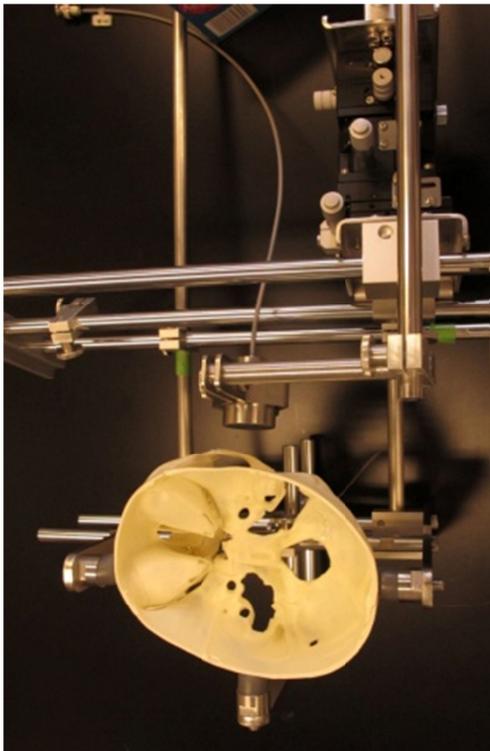


図 1 4 頭蓋骨のプラスチックモデルを固定した様子

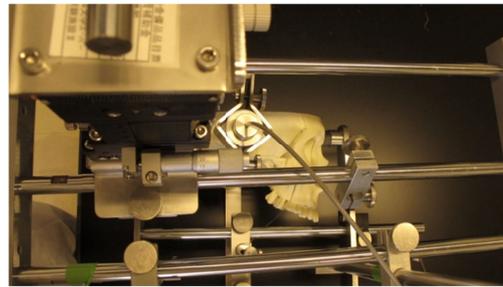


図 1 5 頭蓋骨のプラスチックモデルを固定した様子 ( 側頭部 )

頭蓋骨透過後の音響強度分布の測定は次のようにおこなった。まず、振動子の中心を通り、振動子面に垂直な軸(以後、Z軸)に沿って、ハイドロフォンを動かしながら音響強度を測定した(図 1 6 )。

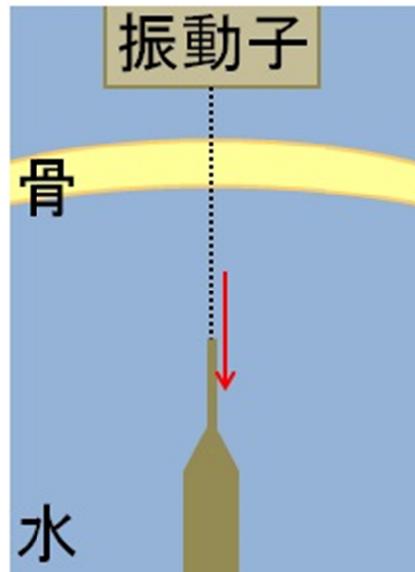


図 1 6 Z 軸方向の音響強度分布測定

3点選び(図17)、それぞれのZの値に対して、ビームに垂直な面上の2次元プロットを取得した(図18)。測定の様子を図19に示す

駆動方式は、400kHz正弦波、500kHz正弦波、600kHz正弦波、PSRF(500±100kHz, 10μ秒)とし、これらの比較を行った。

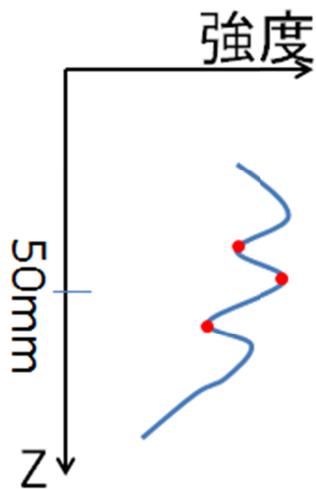


図17 Z=50mm付近の3つの極値

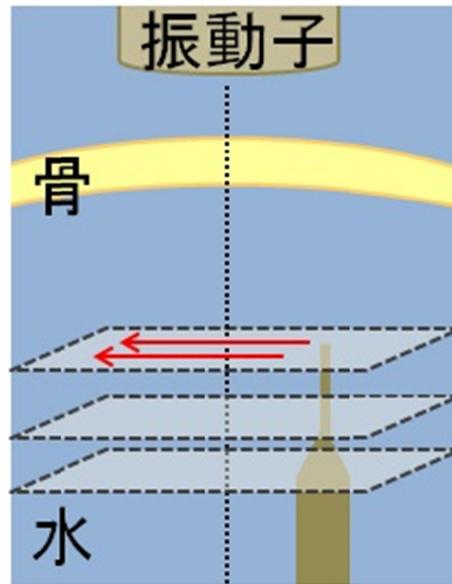


図18 Z=50mm付近の3つのZの値それぞれで2次元プロット

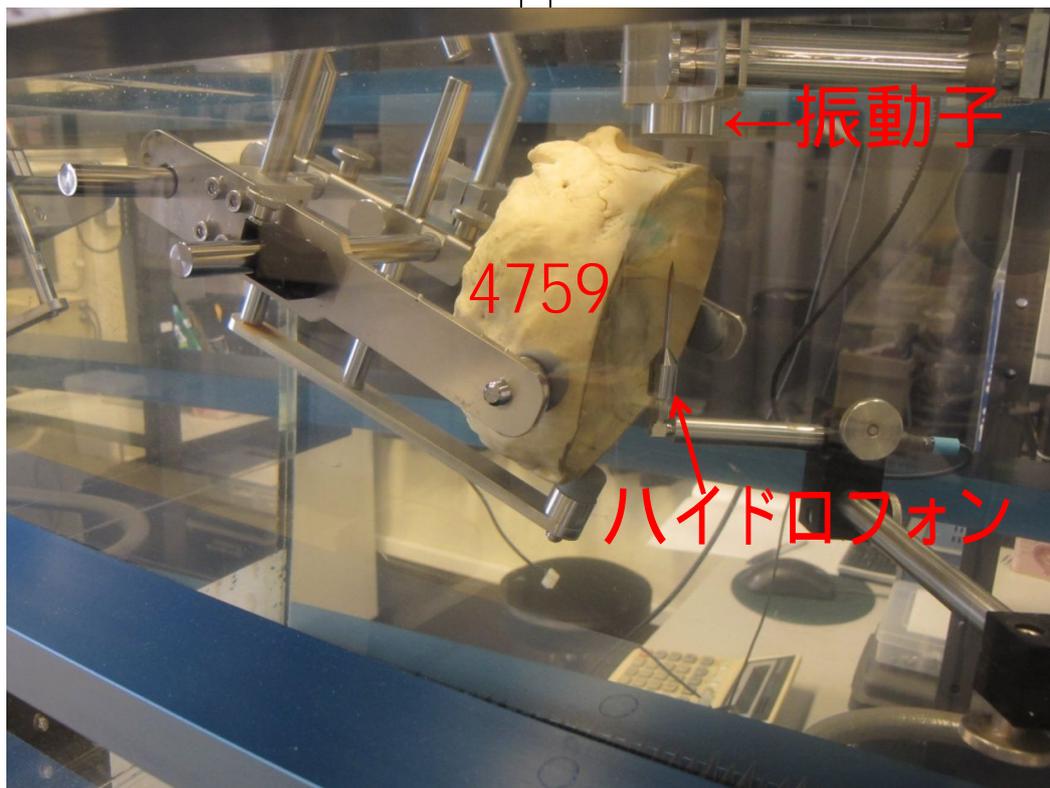


図19 頭蓋骨測定の様子

### C. 研究成果

#### (1) n層モデルによる透過率の変動評価

水中に配置された骨の透過率を計算した結果を図20に示す。パラメータは周波数を500kHz、水の密度を998kg/m<sup>3</sup>、水の音速を1483 m/s、骨の密度を1664 kg/m<sup>3</sup>、骨の音速を2884m/s、骨の吸収率を4.02dB/MHz/cmとした(骨ファントム板の値を使用)。なお、水と軟組織の音響特性はほぼ等しく、水中は脳内や皮膚の良きモデルとみなせる。骨中の超音波の半波長に相当する3mm間隔で透過率のピークがあることが分かる。

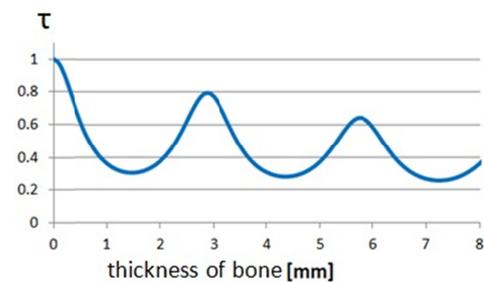


図20 骨ファントム板透過率の厚さ依存性

骨の厚みを変え、透過率を計算した結果を図21に示す。ここでは、骨の吸収は13dB/cm/MHzとした(NCRP推奨の値)。500kHz近傍では透過率が変動しており、薄い方が必ずしも通るわけではないことが分かる。一方、周波数が高い領域では、吸収が大きいため、薄い方が通る。また、高い周波数領域では、透過率の変動が小さくなる。これは吸収効果が大きく、多重反射した波の成分が小さく、干渉効果が小さいためである

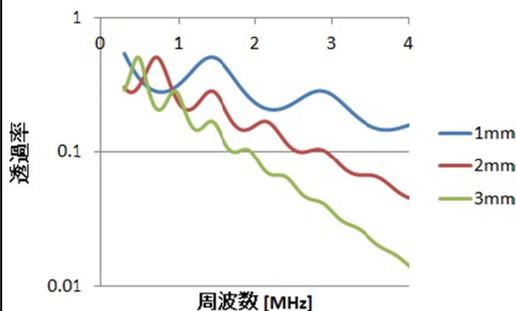


図21 透過率の周波数依存性

振動子と骨ファントム板との距離を変えて透過率を計算した結果を図22に示す。パラメータは図20と同じである。振動子と骨板との間の水の層の厚さが1.5mm(水中の波長の半分)の間隔で周期的な変動を示している。

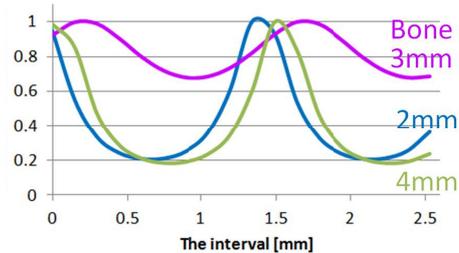


図22 透過率の皮膚厚依存性

#### (2) 骨ファントム板を用いた透過率の変動測定と周波数変調による平準化の検証

振動子と骨ファントム板との距離(皮膚厚に相当)を変えて透過率をハイドロフォンで測定した実験結果を図23に示す。ハイドロフォンと骨ファントム板との距離は60mmとした。周期が約1.5mm間隔であること、厚さが3mmの板は2mmと4mmに比べて変動が小さめになっていること等、モデルの予測と矛盾しない測定結果となった。

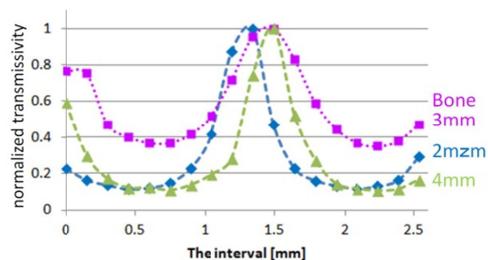


図23 透過率の振動子-骨ファントム板間距離依存性

振動子と骨ファントム板との間隔を変化させて透過率を測定した結果を図24に示す。骨ファントム板の厚さは2.0mmのものを用いた。500kHz正弦波の場合に、透過率の大きな変動が見られるのに対し、変調波PSRF(500±100kHz, 1μ秒切替)

の場合には、透過率の変動が正弦波に比べて小さく、透過率が平準化されていることが分かる。

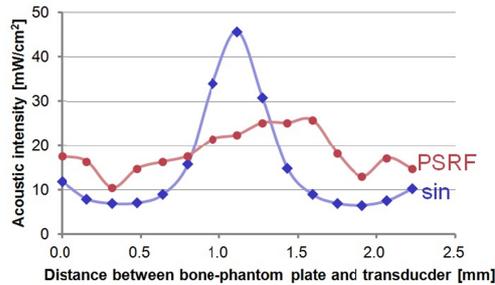


図24 振動子と骨ファントム板との距離を変化させた場合の透過率の比較

骨板の厚さによる透過率の変動を測定した結果を図25に示す。振動子と骨との距離は12mmとした。500kHz正弦波の場合に、周期が約3mmの変動が見られる。正弦波の場合の最大は26.2mW/cm<sup>2</sup>、最小は4.4mW/cm<sup>2</sup>であり、その比は6.0である。PSRF(500±50kHz)の場合には、比は4.1(最大:31.7mW/cm<sup>2</sup>、最小:7.7mW/cm<sup>2</sup>)であり、PSRF(500±100kHz)の場合には、比は3.3(最大:29.3mW/cm<sup>2</sup>、最小:9.0mW/cm<sup>2</sup>)となった。偏差を大きくするほど、最大最小比が小さくなり、透過率が平準化されることが定量的に示された。

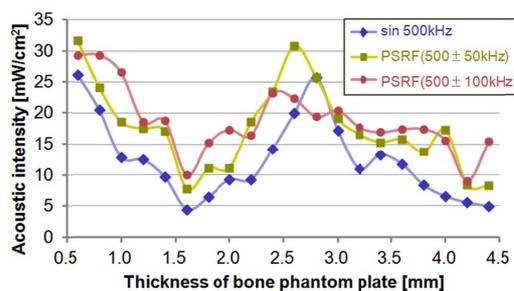


図25 骨板の厚さを変化させた場合の透過率の比較

### (3) ヒト頭蓋骨の透過率測定

測定結果の一例(頭蓋骨4737左)を示す。図26は500kHz正弦波駆動時のZ軸方向の音響強度分布である。50mm付近の極値はZ=48.6mm, 49.6mm, 50.9mmにある。

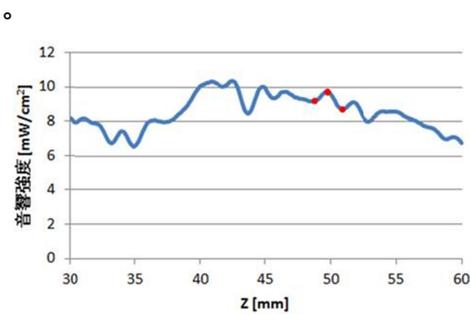


図26 Z軸方向の音響強度分布の測定結果

3つの極値それぞれの位置で、2次元分布を測定した結果が図27, 28, 29である。

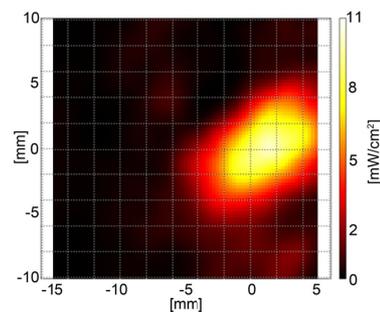


図27 Z=48.6mmにおける2次元プロット

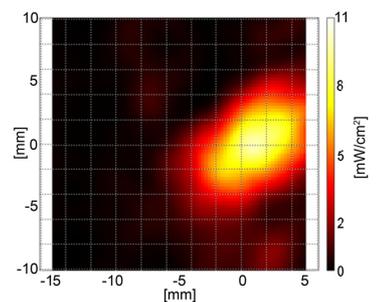


図28 Z=49.6mmにおける2次元プロット

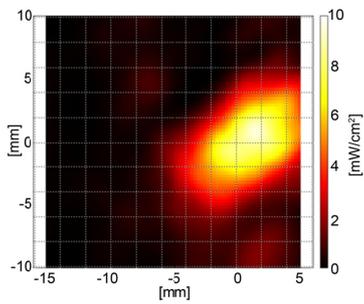


図 2 9 Z=50.9mmにおける2次元プロット

上の3つの2次元プロットにおいて、座標(0,0)の位置が振動子の中心であり、各図の左方向が頭頂方向、各図の上方向が前頭方向である。3つの図を比較すると、分布に大きな差異は見られない。骨無しの場合には、51.2mW/cm<sup>2</sup>であり、透過率は約21%となっている。強度の中心は、振動子の中心から2mmほど逸れている。

400kHz, Z=50.6mmの測定結果を図30に示す。骨無しの場合には、56.9mW/cm<sup>2</sup>であり、約14%が透過している。

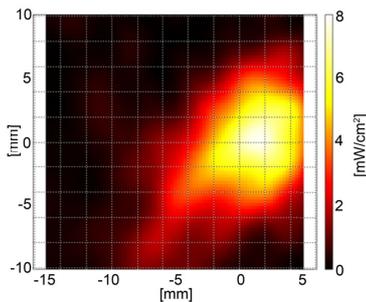


図 3 0 400kHz, Z=50.6mmの2次元プロット

600kHz, Z=50.0mmの測定結果を図31に示す。骨無しの場合には41.4mW/cm<sup>2</sup>であり、透過率は約24%となった

周波数の異なる分布を比較すると、低周波数ほど、分布が広いことが見て取れる。また、透過率の値も周波数によって変動している。

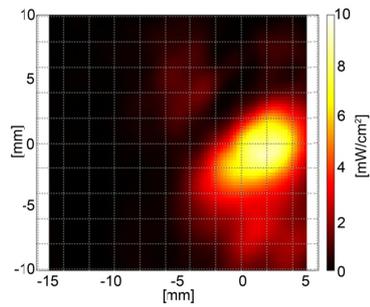


図 3 1 600kHz, Z=50.0mmにおける2次元プロット

PSRF(500±100kHz, 10μ秒)、Z=50.6mmの結果を図32に示す。骨無しの場合には47.4mW/cm<sup>2</sup>であり、約15%が透過している。変調時の透過率は、400kHz、500kHz、600kHzの透過率の変動範囲の間にある。

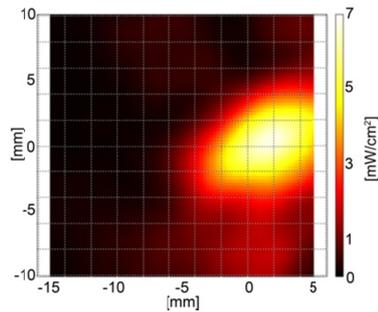


図 3 2 PSRF(500±100kHz, 10μ秒), Z=50.6mmの2次元プロット

測定結果を表1にまとめた。表側のは、骨上の異なる場所を測定したことを意味する。透過率には個体差があることが分かる。また、周波数によって透過率が異なるが、変調をかけると透過率が平準化されていることも見て取れる。透過率の平均は15%程度となっている。

表 1 透過率のまとめ

骨	400kHz	500kHz	600kHz	PSRF
4737(左)①	14%	21%	24%	15%
②	12%	14%	13%	14%
③	14%	12%	19%	14%
13(左)①	21%	19%	21%	19%
②	28%	19%	33%	19%
③	28%	19%	33%	22%
4759(左)①	7%	7%	6%	7%
②	12%	7%	5%	8%
③	24%	8%	6%	15%

#### D. 考察

ヒト頭蓋骨透過率の測定結果の表1を見ると、周波数が高くなるにつれ透過率が増加する場合も減少する場合もある。このことに関して、n層モデルを用いて計算した結果を図33に示す。骨の厚さが2.0mmであれば、400kHzから600kHzの範囲では周波数とともに透過率が増加するが、一方で、骨の厚さが1.0mmであれば、透過率は減少傾向となる。

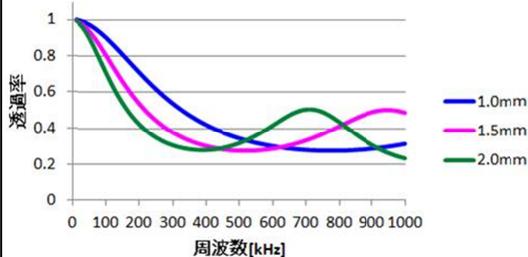


図33 厚さによる周波数依存性の違い

密度一様で平らな骨板を透過する場合、モデルによれば20%以上通ることが期待されるが、実際のヒト頭蓋骨では10%未満のことがある(表1)。この原因としては、骨内部の密度不均一性によって散乱が起こり透過成分が減ること、吸収率の値が計算に使用した値よりも大きい可能性があること等が考えられる。今後、さらなる考察を深めていく必要がある。

頭蓋骨透過後の超音波ビームの分布について考察をしてみたい。波の伝播に関して物理学では次のようなフェルマーの最短経路の原理が知られている。『超音波があるA点から出てB点を通るとする。A点とB点を結ぶ無数の経路の中で、実際に超音波が辿った経路はA点からB点に到達する時間が最小のものとなっている』。例えば、ある音速の速い媒質(砂色)から音速の遅い媒質(水色)に超音波が入射する場合を考える(図34)。この場合、超音波が辿る経路はTのようなものとなる。図34の経路F2では音速の速い砂色媒質よりも音速の遅い水色媒質中を移動する距離が長い、経路Tでは、遅い水色の媒質中を移動する距離が短く

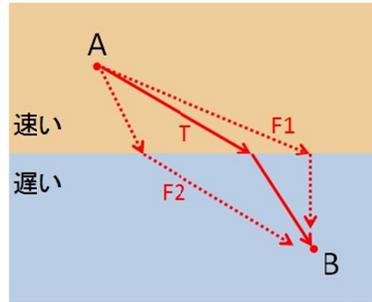


図34 フェルマーの原理

なりB点に速く到達することができる。さらに、A点とB点を直線で結ぶよりも、経路Tのほうが短い時間で到達できることも理解される。そして、屈折が生じた際、どの方向を向くかの判断ができるであろう。この原理からの重要な帰結として、『超音波の経路は音速のみで定まり、密度等にはよらないこと』が理解される。

ある媒質(音速 $c_1$ )から音速の異なる媒質(音速 $c_2$ )に入射するとき、入射角を $\theta_1$ 、屈折角を $\theta_2$ とすると、

$$\frac{\sin\theta_1}{\sin\theta_2} = \frac{c_1}{c_2}$$

という関係が成り立つ(図35)。これはスネルの法則と呼ばれる。

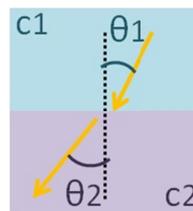


図35 スネルの法則

このスネルの法則を利用して、頭蓋骨を透過時にビームの進行方向がどの程度、変化するかを見積もることができる。図36のように骨の厚さが変化しており、入射面と出射面のなす角度が $\alpha$ とする。このとき、進行方向の変化する角度は約 $\alpha/2$ となる(骨と軟組織の音速比を2:1とし、 $\alpha$ は小さいとした)。 $\alpha$ が8度であれば、進行方向変化は4度程度となる。骨の厚み違いや曲率により、ビームの進行方向が数十度を

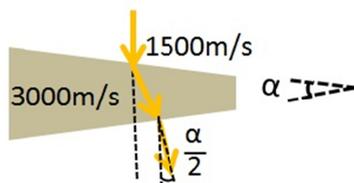


図36 骨透過時の屈折

超える大角度になることはないであろう。実際、測定結果(図28等)を見るとZ=50mm付近において、およそ中心位置が2~3mmずれており、屈折の角度は2から3度程度である。

フェルマーの原理やスネルの法則から屈折は音速のみで定まり、特に周波数にはよらない。したがって、変調をかけて周波数が変化しても、超音波の進行方向は変わらないこととなる。実際、図32と図29を見比べてみると、強度中心位置は、正弦波の場合とほぼ一致している。この事実から得られる、治療機器を設計する上で役立つ知見は、『正弦波で当たっていれば変調をかけてもなお当る』ということであろう。

塞栓部に超音波ビームが当たることは極めて重要である。屈折により2mmずれることも考慮すると、やはりビーム幅の広さが重要であろう。(ただし、ビーム幅は10mm程度であり、屈折による2mm移動は相対的に小さく、屈折により照射部が大きく変更されるわけではない)。ビーム幅を広げる案として、前々年に、音響レンズを用いることが検討されたことがあった。しかし、振動子近傍での強度が強くなり近距離領域のホットスポット問題が悪化すると理由で棄却された。ビーム幅を広げるために、もしも、振動子を大きくすれば、焦点位置が振動子面から遠ざかり、塞栓部がコールドスポットに入り、血栓溶解効果が失われてしまうだろう。ビーム幅を広げる一案として、周波数を低くすることが検討に値する。測定結果の図28, 30, 31を見比べると、周波数が低いほどビーム幅が広いことが

分かる。周波数を100kHz下げると、屈折による2mm移動を補って余りある。周波数を下げる他の利点として、骨による吸収が減ること(したがって透過率向上、発熱抑制)、振動子を大きくできること(焦点位置と塞栓部との関係)が挙げられる。しかし、周波数を下げれば、キャビテーションによる機械的作用の危険性が増す。『キャビテーションには閾値があり、閾値を超えると有害作用が生じるが、閾値を越えない範囲であれば強度によらず有害作用は生じない』という事実を考慮すれば、キャビテーションの閾値未満で可能な限り周波数を低くすることもひとつの検討手段と思われる。このようなことも踏まえて、キャビテーションに関するリスク評価が今後の研究課題のひとつとなるであろう

#### E. 結論

経頭蓋超音波透過率に関して骨ファントム板を用いた実験をおこない、ヒト頭蓋骨の実測をおこなった。そして、透過率が変動することと、周波数変調による平準化が可能なが定量的に示された。また、透過率が15%程度との知見が得られ、この値は今後の治療機器開発を設計する上でのひとつの指標となるであろう。

今後、頭蓋骨の測定箇所を臨床で使用するポイントに絞ってさらなるデータ取得を続け、多数の頭蓋骨の測定が計画されている。

経頭蓋超音波治療において、変調駆動は、はじめ定在波抑制のために導入されたが、その他に、コールド・ホットスポット解消効果、透過率平準化効果があることが判明した。変調駆動方式を積極的に利用した治療機器は、海外を含めてこれまでになく、本研究の成果は前例のない斬新な治療機器に結実するであろう。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Osamu Saito, Zuojun Wang, Hidetaka Mitsumura, Takeki Ogawa,

Yasuyuki Iguchi, Masayuki Yokoyama:  
Substantial fluctuation of  
acoustic intensity transmittance  
through a bone-phantom plate and  
its equalization by modulation of  
ultrasound frequency:  
Ultrasound in Medicine and Biology  
submitted

2. 学会発表

- 1) 齋藤 理、井口 保之、小川 武  
希、横山 昌幸、「超音波のヒト頭蓋  
骨片透過における直進性検証」(ポス  
ター)、130回 成医会総会 東京慈恵  
会医科大学、2013年10月
- 2) 齋藤 理、王 作軍、三村 秀毅、  
井口 保之、小川 武希、横山 昌  
幸、「超音波のヒト頭蓋骨片透過にお  
ける直進性検証」(口頭発表)第16回  
日本栓子検出と治療学会2013年10月
- 3) Osamu Saito, Zuojun Wang,  
Hidetaka Mitsumura, Takeki Ogawa,  
Yasuyuki Iguchi, Masayuki  
Yokoyama:  
Equalization of transcranial  
ultrasound Transmissivity bt  
random modulation  
(poster)  
19 th meeting of European Society  
of Neurosonology and Cerebral  
Hemodynamics  
2014 June

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

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 $\mu$ 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 $\mu$ 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<sup>®</sup> Syringe Filter Units, PES, 0.45 $\mu$ m, 33mm)で、はガラス微繊維フィルター(GF/D: 2.7 $\mu$ m, 47mm)でろ過した。

血栓セル本体の上、PPフィルム(40mm×40mm×25 $\mu$ 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の所にかけて(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。

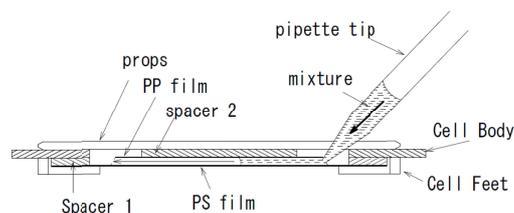


図1 血栓作製法 セル本体とその上にかけたPPフィルムの間に血漿混合液をピペットで注入。

### (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)

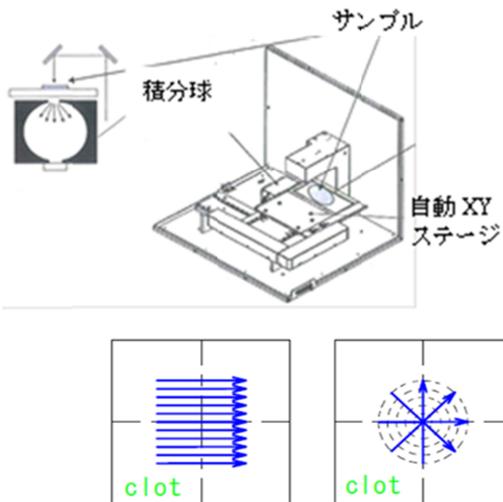


図2 微小部位マッピング装置

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。

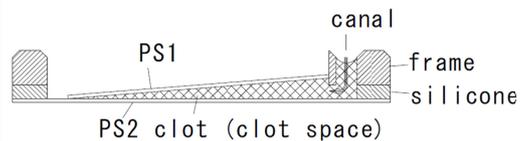


図3 検量線セル構造

### (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。

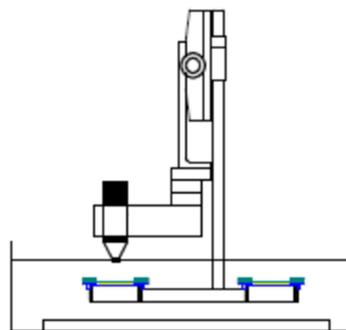


図4 超音波照射装置

### (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  $\mu$ 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。

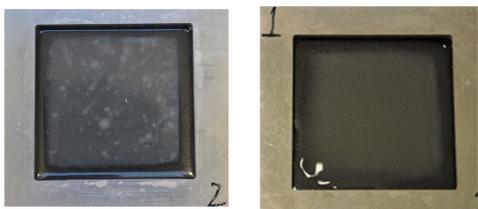


図5 トロンビンの影響

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 $\mu$ 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。

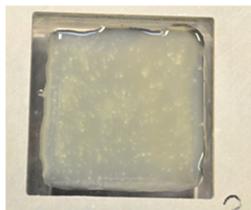


図6 0.45  $\mu$ mPESろ過したヒト血漿(ロット )を既存のトロンビン添加で作った血栓トロンビンの部分的失活可能性を考えて、トロンビンを新規作成して、その濃度の血栓への影響を検討した。

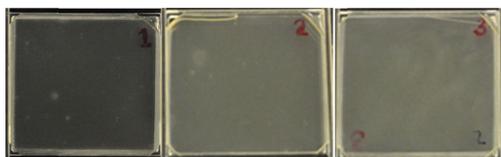


図7 トロンビンの影響

0.45  $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

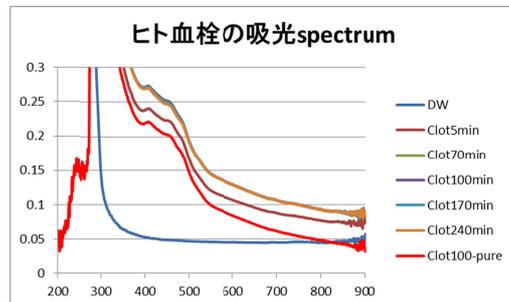
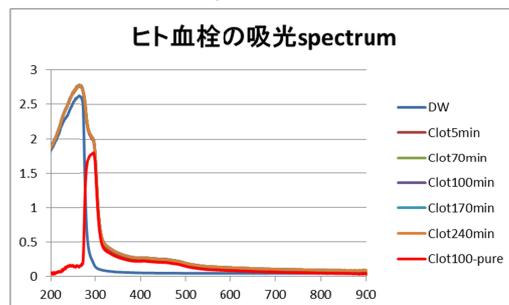


図8. ヒト血栓の吸光spectrum

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。

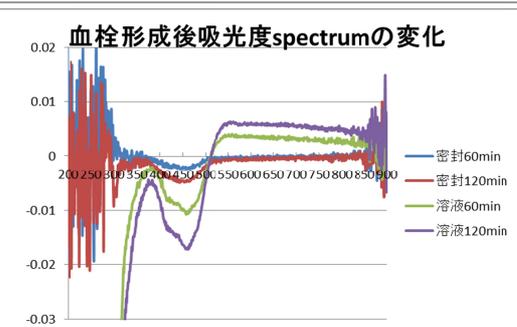
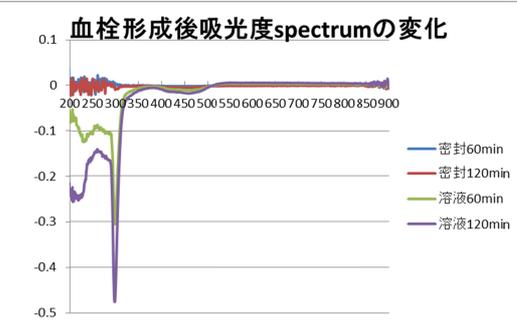


図9. ヒト血栓形成後の吸光spectrum変化  
上は全幅図、下は拡大図

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。

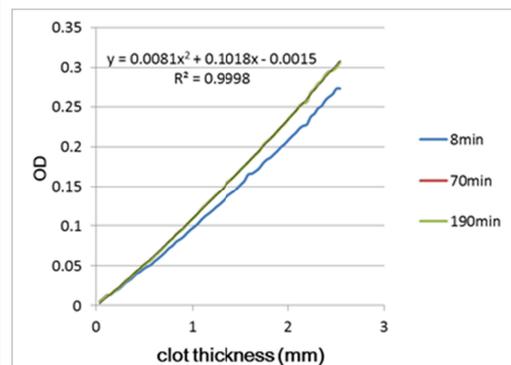


図10. ヒト血漿血栓の560nm検量線

#### (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/cm<sup>2</sup>であった)。

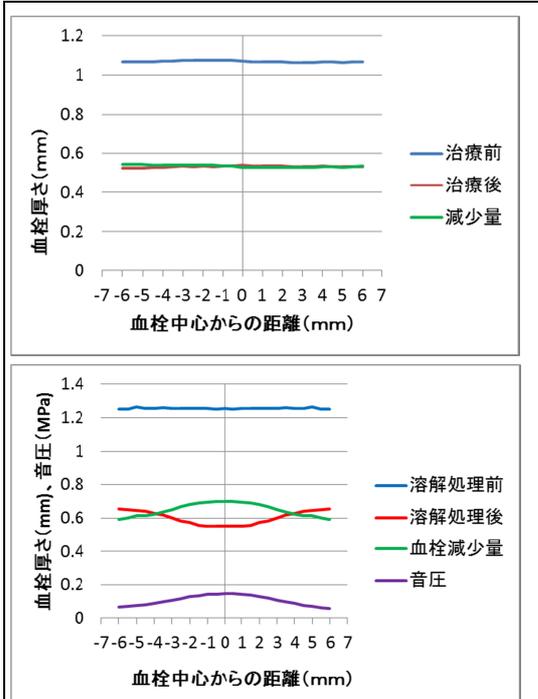


図11 超音波ヒト血栓溶解測定例

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。

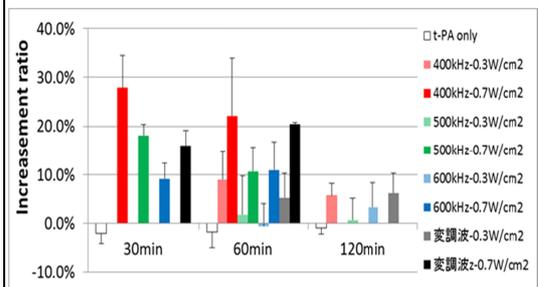


図12 ヒト血栓における各種超音波の血栓溶解増強効果

0.7 W/cm<sup>2</sup>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/cm<sup>2</sup>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、最適濃度のトロンビン添加を実行し、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

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

ラット急性脳梗塞モデルによるバブルリポソームの有効性安全性評価

研究分担者 丸山 一雄 帝京大学薬学部 教授  
 研究協力者 澤口 能一 帝京大学薬学部 研究員

**研究要旨** 我々が独自に開発したバブルリポソームは超音波診断のみならず、ターゲティング分子を修飾することで特異的な薬物・遺伝子デリバリーにも応用可能である。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。前年度の成果を基に、バブルリポソームの膜表面に血栓（活性化血小板）特異的結合能を有するRGDペプチドを修飾（RGD-BL）し、活性化血小板および血栓への結合能を、ラット大腿動脈電気刺激誘発血栓モデルで評価した。その結果、RGD-BLは血栓に結合し、超音波診断装置下で血栓造影が可能であることが示された。

A. 研究目的

虚血性疾患の治療では、表1に示す様にt-PA、超音波、マイクロバブルの三者併用時に血流再開通率が最高値を示した臨床研究がある。三者併用による再開通率の向上のメカニズムは、血栓を形成しているフィブリンの網目構造が超音波の振動作用と超音波によるバブルの振動作用によって開口し、t-PAの血栓浸潤を促進させるためである。その際、バブルを血栓に集積させることが出来れば、より効率的に血栓溶解を促進できると推察される。

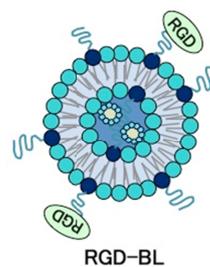
・脳梗塞治療における血流再開通率	
t-PA単独	23.9%
t-PA + TCD(経頭蓋超音波ドプラ)	40.8%
t-PA + TCD + マイクロバブル	54.5%

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

表1 超音波、マイクロバブル併用による血栓溶解促進効果

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。図1に示す血栓標的型バブルリポソームを作製し、ラットに電気刺激誘発血栓を作製して結合性と超音波造影の評価を行った。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。



- フォスファチジルコリン: DSPC
- フォスファチジルエタノールアミン: DSPE
- 〰 ポリエチレングリコール: PEG
- RGD α(RGDfK)CGG: オクタペプチド

図1 RGD-BL模式図

## B. 研究方法

### (1) BLの調製

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  $\mu\text{mol}$  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 晩で一晚反応させた。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。C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>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。

### (2) C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>ガス封入量の測定

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  $\mu\text{L}$ 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C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>ガス封入量を測定した。

### (3) 粒子径の測定

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。

### (4) 電気刺激誘発血栓の作製

ラット大腿動脈の心臓側および抹消側を針金を挟み結紮し、血管の3/4程度をせん断。血管の切り口より陽極に繋いだ直径0.3 mmの針金を3~5 mm程度挿入し、陰極側の針金を皮膚に接触させ10分放置。針金を抜去後、血管の切り口より1 mm程度心臓側で結紮し、電気刺激以前に結紮しておいた心臓側の糸を切り、血流を再開通させる。

### (5) RGD-BLの血栓集積の評価

小動物用超音波画像診断装置 (VEV02100) にて閉塞動脈であることを確認後、バブルリポソーム投与前と投与後の血栓を撮像し、血栓の輝度をImage Jにて解析。Dose: 1 mg/mL, 500 mL

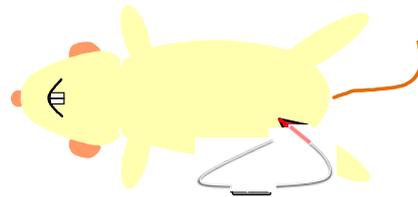


図2 電気刺激誘発血栓作製法

## C. 研究結果

### (1) バブルリポソームのC<sub>3</sub>F<sub>8</sub>ガス封入量の検討

バブルリポソーム中のC<sub>3</sub>F<sub>8</sub>ガス封入量をガスクロマトグラフィーで測定した。その結果、バブルリポソームのガス保持量は11.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、RGD修飾バブルリポソームのガス保持量は10.8  $\mu\text{L}/\text{mL}$ となった。C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>ガス封入量はペプチド修飾の有無にかかわらず同程度であり、バブルリポソームのガス保持量はRGDペプチド修飾に影響を受けないことが示唆された。

## (2) バブルリポソームの粒子径の測定

バブルリポソームの粒子径を動的光散乱法を用いて測定した。その結果、BL ( $591.5 \pm 230.3$  nm)、DGR-BL ( $647.2 \pm 342.7$  nm)、RGD-BL ( $613.8 \pm 107.5$  nm) となり、粒子径の変化は認められなかった。これらの結果から、バブルリポソームの平均粒子径はオリゴペプチド修飾による影響をほとんど受けないことが示唆された。

## (3) RGD-BLによる血栓造影効果

RGD-BLの血栓結合能を検討すべく、ラット大腿動脈に電気刺激誘発血栓を作製し、RGD-BL投与前後の血栓の輝度変化を超音波造影装置モニタリング下で観察することで評価した。その結果、図3に示す様にRGD-BLを投与した群では血栓の輝度上昇が確認された。

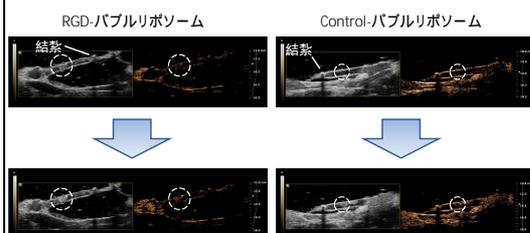


図3 バブルリポソームによる  
in vivo造影

## D. 考察

前年度の結果より、リポソームへRGDペプチドを修飾したことにより、RGD-BLへ活性化血小板結合能を付与出来たことがフローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析により確認された。また、バブル化する際に超音波照射を行ってもRGDペプチドの活性は失われないことも確認され、製剤の高い安定性も示唆された。

電気刺激誘発血栓に対してRGD-BL投与すると、血栓の輝度上昇が確認された。輝度の上昇は血栓にバブルリポソームが結合したことが推察され、RGD-BLがin vivoでも機能することが確認出来た。今後検討数の追加、および投与量を変化させることで詳細に最適な血栓造影条件・超音波血栓溶解条件について検討していく予定である。

## E. 結論

BLにRGDペプチドを修飾することで、活性化血小板への結合能の付与が可能であり、ラット大腿動脈に電気刺激誘発で作製した血栓に集積することが確認された。このRGD-BLは超音波診断機での血栓の検出を容易にさせるだけでなく、脳梗塞の際に超音波と併用することでt-PAによる血栓溶解作用の促進にも利用できる可能性が期待された。

また、今後はRGDペプチドのみならず、血栓を標的可能な抗体などのターゲティング分子を修飾したバブルについても検討していくことで、超音波血栓溶解療法に最適な血栓標的型バブルを開発する予定である

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

## 2. 学会発表

- 1) Yoshikazu Sawaguchi, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Daiki Omata, Hitoshi Uruha, Mutsumi Seki, Kohsuke Hagisawa, Kazuo Maruyama, 16th World Neurosonology Meeting, 2013.10.17-20, Sofia, Bulgaria, Development of thrombus-targeting bubble liposome for diagnostic and tPA thrombolysis acceleration

2) 澤口能一、鈴木 亮、小田雄介、小  
俣大樹、宇留賀仁史、関むつみ、萩  
沢康介、丸山一雄、第57回日本薬学  
会関東支部会、2013, 10, 26, 東京、  
血栓標的型パブルリポソームを用いた  
血栓 *in vivo*イメージング

H . 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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mR0-1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ながら、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砕しながら吸引除去する

『Penumbra』が承認を受け臨床使用を開始された。

しかしながら、ホノルルショック（ホノルルで開催された学会での臨床研究結果報告）に代表されるように、脳卒中関連の各専門学会において、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、報告がなされている。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』が治療成績の改善に有望視されており、今後の臨床研究によって、予後改善に有用性が実証されることに期待が高まる。

以上のように、血管内治療による血栓摘出術も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も求められ、臨床研究が始まっている。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するためデスモプラゼなど新薬の開発も進められているが、未だ上市の目途は立っていない。その中、V.Alexandrov（米）ら

によって2004年New England J. Med. にて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率の向上を得ること、ならびに予後が改善されたことを確認し、報告している。

その後、V.Alexandrov（米）らの報告を受け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、300kHzの超音波をrt-PA投与中ならびに投与終了後30分の総計90分間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生、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された。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、診断装置の安全基準 $0.72 \text{ W/cm}^2$ を大きく上回る $14 \sim 28 \text{ W/cm}^2$ といった過度に強い超音波が照射された結果、定在波などにより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古幡博が、最新医学 第63巻 第7号:91-102,2008.で考察している。

その後、2008年Eggers.らがJ,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、予後改善の有用性を報告している。超音波照射が普及しない背景として、目的血管検出難易度の高さ、見出した目的血管に超音波を持続照射するという双方において課題があり、一般治療には至っていない。

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25年度の具体的な目標】

- (1) 超音波の頭皮/頭蓋厚みによる超音波透過性の確認。
- (2) 頭蓋内に安全に超音波を照射・供給する超音波周波数を実現する振動子の設計
- (3) 振動子を簡便、確実に貼付する装着具の開発（ゲル、固定具）
- (4) 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
- (5) 安全性確立に向け動物評価用小型振動子の設計開発（報告省略）

である。

上記(4)に示した、ポータブルな駆動装置の開発目的は、先に示した脳梗塞治療の一つである血管内治療のコンバイン治療が今後浸透することが予想される。病院内での移動はもとより、さらには病院地域連携システムの確立も進められており、血管内治療が行えない病院から血管内治療が実施可能な病院への救急車による搬送する際に、搬送中の車内でも超音波の照射を継続しうるシステムとして開発することは重要な課題となる。

#### B. 研究方法

- (1) 骨厚み傾斜ファントムによる超音波透過特性評価

超音波を頭蓋内に照射する際、頭蓋骨を超音波が透過しにくいことは、2012年慈恵大が保有するヒト頭蓋骨を用いて確認した。さらに、超音波透過障壁である頭蓋骨は、平滑、かつ厚みが均等な部位は存在せず、頭蓋骨内外に凹凸がある、不均一な厚み構造を有している。

骨厚み変化による超音波透過性の影響の確認は、頭蓋内超音波分布を把握し、超音波出力の設計にあたっての基礎情報収集として重要である。不均一な骨厚みは設計を複雑にするため、音響特性を骨

厚み 1～5mm / 7cm (幅5cmは均一厚み) に傾斜させたファントム (図1) を作成し、30×50mmのポーラスセラミックス製振動子のファントム無ピーク音響強度を0.03 W/cm<sup>2</sup>に設定した周波数400～700kHzの固定、ならびに変調周波数による透過特性を評価した。



図1：骨厚み1～5mm傾斜ファントム

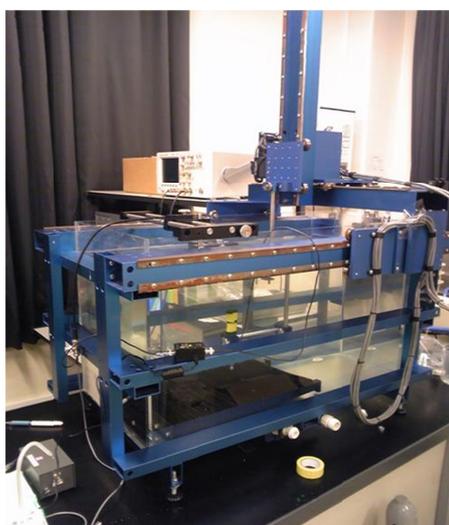


図2 音響強度測定装置  
(東京慈恵会医科大学保有)

## (2) 振動子の周波数特性改善

振動子は、材料、構造設計により同電圧の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。2012年、フィルム状超音波振動子、セラミックス製振動子などの検討の結果、フィルム状振動子は溶解に必要な出力を実現することが難しく、セラミックス製振動子の検討を進めた。セラミックス製振動子においても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圧電素子

(以下ハイQ材 (図3-1)) 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 (図3-2)) について検討の結果、変調を活用時の適合性からローQ材を選択した。

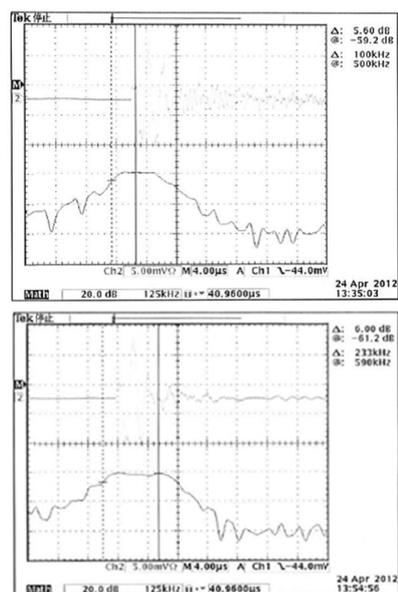


図3-1 (上) ハイQ材 (人工セラミックス) 3-2 (下) (多孔質人工セラミックス) 各周波数特性

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。

### (3) 装着システム設計

#### (3-1) 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、超音波透過性をAIMSを用いて評価した。

表1 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

#### (3-2) 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す

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。

### (4) 駆動装置設計

平成24年度には、定在波の抑制を目的とし、変調による抑制効果を確認のため、変調機能を有する基板試作を行い(図4)、変調信号による定在波抑制効果を確認した。

今年度は、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4 変調超音波出力回路試作機

【設計要求項目】

1. 販売国、地域、使用・輸送環境
2. 適用法規、規格、ガイドライン
3. 用途、使用方法
4. 求められる機能、形態（含表示）  
構成要素（ソフトウェア含む）
5. 電気・機械的安全性、信頼性
6. 出荷形態（滅菌要否）
7. その他要求事項

C. 研究結果

(1) 骨厚み傾斜ファントムによる  
超音波透過特性評価

超音波音響強度は骨厚みに比例せず、周波数により個別の透過強度分布を示した。PSRF(Periodic Selection of Random Frequency)変調は、骨厚み傾斜ファントム透過後もホットスポット生じず、音場全体において平均化した音響強度分布を示した。

a) ファントム無し

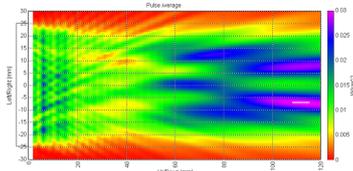


図5-1 30×50（縦軸）振動子  
超音波音響強度分布  
（分布図右出力スケール：0.03w / cm<sup>2</sup>）

b) 400kHz超音波

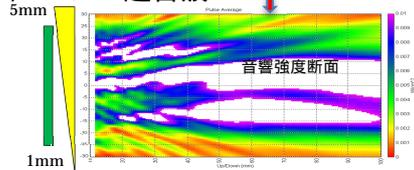


図5-2 骨厚み傾斜ファントム透過音響分布  
分布図右出力スケール：0.01w / cm<sup>2</sup>  
分布図左：緑 / 振動子位置、  
黄色 / 骨傾斜厚み位置  
（以下スケール、同位置につき略）

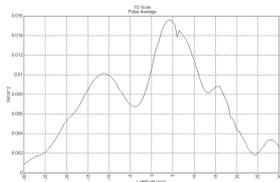


図5-3 振動子面から6.5cm部音響強度分布

c) 500kHz超音波

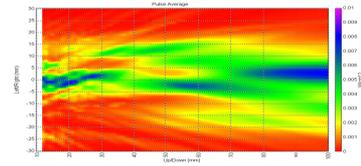


図5-4 骨厚み傾斜ファントム透過音響分布

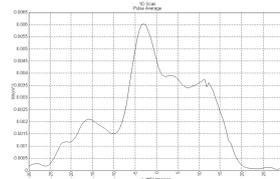


図5-5 振動子面から6.5cm部音響強度分布

d) 600kHz超音波

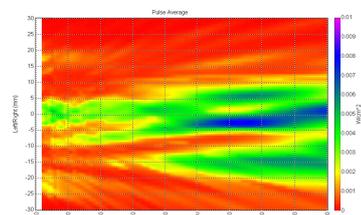


図5-6 骨厚み傾斜ファントム透過音響分布

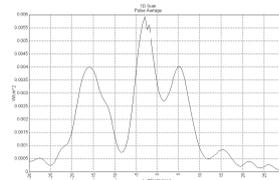


図5-7 振動子面から6.5cm部音響強度分布

e) PSRF400-600kHz帯域 超音波

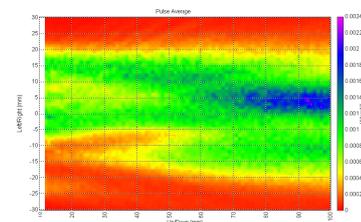


図5-8 骨厚み傾斜ファントム透過音響分布

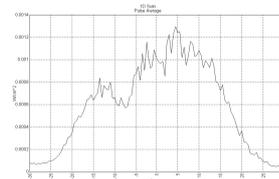


図5-9 振動子面から6.5cm部音響強度分布

(2) 振動子の周波数特性改善

骨厚み傾斜ファントムモデルでの超音波透過性評価においてもPSRF変調は、周波数固定超音波よりも照射領域に均等な透過性を示した。

400～600kHzの周波数の近距離限界点を6cm付近として活用すべく、26mm角サイズ振動子とし、組成、成型条件、構成部材、構造等を調整し、広帯域の振動子设计了。

設計規格と試作結果を下記に示す図6に示す。

タイプ	設計規格[kHz]	結果[kHz]	判定
	(Low / High)		
A-1	350 / 750	335 / 753	
A-2		335 / <u>723</u>	×
B-1	330 / 770	<u>333</u> / 783	×
B-2		<u>345</u> / 778	×
C-1	390 / 910	353 / 920	
C-2		355 / 910	

下線斜字は規格外

500±100kHz超の変調に当たり現振動子出力範囲では、330kHz以下の低周波出力対応設計は難しいが、350～700kHzの設計は安定しており、PSRF変調に対応する設計は確立した。

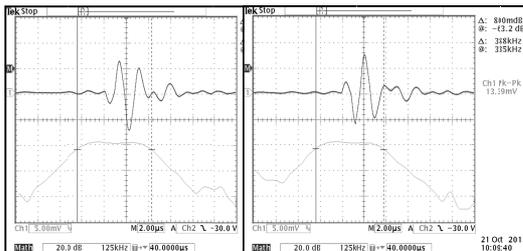


図6-1：A-1(左)、A-2振動子周波数特性

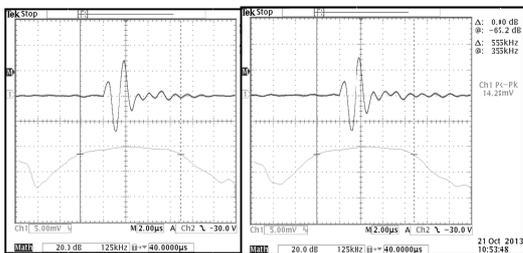


図6-2：C-1(左)、C-2振動子周波数特性

(3) 装着システム設計

(3-1) 皮膚接触ゲルの透過性評価

500kHzにて柔軟シリコンゲルの透過性をゲル無、ならびに市販超音波ゲル(ソナゲル：タキロン社製)と音響強度分布変化を測定した。ゲルは、簡便装着を目的としているため強度と粘着性を有するシリコン粘着性ゲルを検討した。シリコン粘着性ゲルは200µm、600µmを用意し、厚みによる超音波透過性への影響を評価した。測定条件は、ゲル無し脱気水37℃水中条件において、超音波近距離限界点音響強度30 w/cm<sup>2</sup>を標準条件とした。標準条件において、市販ゲルは厚み5mmにおいてもの近距離限界点の超音波透過性は20 w/cm<sup>2</sup>(67%)有していた。一方、評価ゲルは200µmにおいて26 w/cm<sup>2</sup>(87%)、600µmでは23 w/cm<sup>2</sup>(77%)となり厚みによる減衰度が高くなることを確認した。(図7)

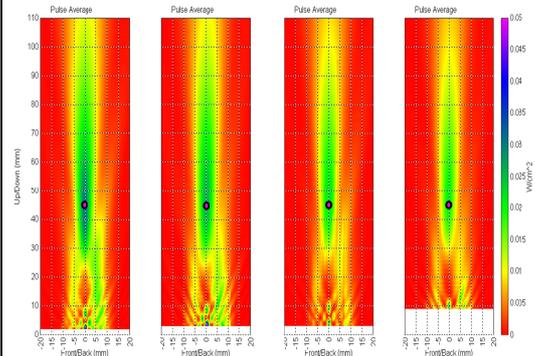


図7 ゲル透過音響分布

(左から)ゲル未装着 / シリコン粘着ゲル厚：0.2mm / 同ゲル厚：0.6mm / ソナゲル厚：5mm

実臨床での装着状態を考慮し、側頭部の凹凸曲面でも空気層となる隙間なく装着する場合、5mm以上の厚みが必要となる。今回評価したシリコン粘着性ゲルを採用した場合、減衰率が高く、装着部の凹凸により皮膚面到達時の音響強度に差異が生じやすいことが想定される。粘着性のシリコンゲルによる貼付型超音波血栓溶加速デバイスの構造は断念し、透過性の高いゲルを採用する超音波ユニット(装着具式)の検討とした。

(3-2) 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て簡便な装着性を有するか？確認を行い、基礎設計を作成した。第一世代は装着部位をこめかみ部に設定し、耳孔から位置を特定する方法を採択した。

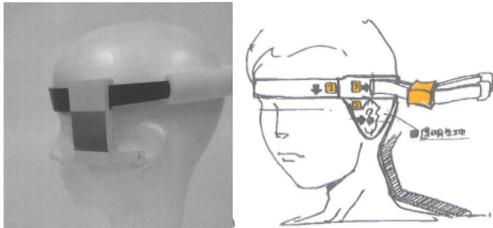


図8-1 第一世代構想試作

第一世代は患者が寝たままの装着に煩雑である指摘を受け、第二世代は寝たまま装着可能な設計を進めた。



図8-2 第二世代試作

第二世代は装着性は優れるものの意識がない患者が簡便に離脱させてしまうことが可能なため、安定化と装着性を再度設計を見直し、位置決めと安定性の両立の第三世代で設計の目途をつけた。

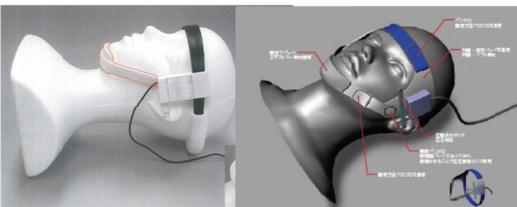


図8-3 第三世代試作

基本構想は確立でき、振動部の最終仕様を確定後に超音波ユニットの最終設計を行う。

(4) 駆動装置設計

要求仕様項目について以下を設計要素を確定した。(詳細項目は割愛)

1. 販売国、地域、輸送環境：  
当研究開発の対象国は日本とする。
2. 適用法規、規格、ガイドライン：  
薬事法：施行規則、QMS省令、医療機器基準を含む
3. 用途、使用方法：  
rt-PA適用患者  
目標部位：中大脳動脈起始部、  
取扱者：医師看護師等医療スタッフ  
使用環境：病院内、救急車内  
ユーザビリティ規格：IEC62366
4. 求められる機能、形態(含表示)
  - \* 構成要素(ソフトウェア含む)
  - \* 駆動装置と超音波ユニットは独立
    - 血栓溶解に求められる超音波を安定出力すること。
    - 異常出力監視含む安全監視機能
    - 照射稼働時間計測機能を内蔵し、自動停止機能を保有。
    - 表示検討事項を設計検討結果例として以下に示す。

Hazardous Situation	監視機能	表示 (異常時表示) 電源オン表示 準備完了表示 超音波出力オン表示
接続異常	接続監視	
電池異常	電圧監視	
電池残量不足	残量監視	残量表示
CPU異常	CPU監視	
回路電圧異常	電圧監視	
振幅異常	振幅監視	
周波数異常	周波数監視	
変調異常	変調監視(?)	
過電流	電流監視	
発振部過熱	温度監視	
FAN回転	FAN回転監視	
治療時間不明		治療時間表示

#### D . 考察

平成25年度は、フィージビリティの結果を受け、実臨床使用を想定した開発を着手した。

安全性、有効性の視点から頭蓋骨透過後の超音波特性の把握にあたり、骨モデル層の厚みに傾斜を持たせたファントムを用いて評価し、PSRF変調の有用性を確認した。超音波の透過性は、高い周波数側、および傾斜の厚み増加に従い超音波の減衰が生じると予想したが、骨の厚みによる透過減衰の比例傾向は示さず、各周波数それぞれに透過性のパターンを示した。400kHzは厚みによる影響を受けにくく、振動子照射面全般の超音波が概ね均等に透過した。500、600kHzは音響強度分布にひずみを観察したが、概ね振動子の中心部で良好な透過を認めた。一方、傾斜骨厚みファントムによるPSRF変調周波数による透過後の超音波音場は、ファントム無し同様にホットスポットを生じず均等な音場形成を示した。また、音場の均質性も高めており、照射領域の確保に有効な手段を示唆した。

変調の有用性は定在波抑制含め、音場の均質化から重要であるが、500kHz用の一般的なローQ材の振動子の対応音域を計測したところ有効活用領域は320～620kHzであり、帯域のバラツキを考慮した場合、高周波側の出力が不十分になることが懸念された。低周波成分のみの出力の場合、定在波の発生懸念が高まり、安全性の低下につながるため、高周波側の安定出力確保に向けた専用振動子設計を行った。設計にあたり、低周波変調領域の拡大は、安全性の低下につながる可能性から400kHz出力を保証のため350kHz以上の出力確保とした振動子設計を行った。400～600kHz帯域を出力保証するにあたり、量産公差を考慮した周波数帯域をコントロールする技術は概ね確立した。また、今後の最適化の過程でさらなる帯域拡大の要求可能性を視野に400～800kHzの設計も並行して実施し、450～

800kHzの周波数帯を有する振動子の基本生産技術も確立した。周波数対応は可能としたが、広帯域における活用は出力効率が低く、熱発生に繋る。今後は、上記設計手法を用いて、血栓溶解特性の最適化に併せ、高効率出力振動子の設計を計画する。

粘着性、保持視点から設計したゲルの超音波透過性は、厚みを持たせた成型技術が未確立のため、技術確立に先駆け薄層段階で超音波透過性を確認した。ゲルによる超音波の透過性は減衰率が高く十分な密着を得るための、5mm厚レベルのゲル成型技術の確立は断念した。一方、超音波透過性に優れるシリコン半固形ゲルは物理強度が低く、単独での装着維持は困難である。rt-PAの治療中超音波照射を継続するには、装着予定の側頭部に振動子を密着させ、なおかつ患者の無意識な体動で脱落しないレベルの保持性の両立が必須である。今回は、一素材で両立することは難しく、密着と保持は、それぞれゲルと装着具にて機能分担し、超音波ユニットを構成することとした。

#### E . 結論

頭蓋骨透過においても変調はホットスポット回避、音場平均化に有用である。今後の製品化実現に向け、変調仕様に応じた振動子を開発し、簡便かつ安定した装着が可能な超音波ユニットの開発を進める。

#### 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

< 参考文献 >

1) Daffertshofer

Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia: increased risk of hemorrhage with combined ultrasound and tissue plasminogen activator: results of a phase II clinical trial.36.1441-1446 ( 2005 )

2) 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)

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

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  
新規超音波血栓溶解装置の治験プロトコル大枠の提案

研究分担者 古賀 政利 国立循環器病研究センター脳卒中集中治療科医長  
研究協力者 鈴木理恵子、大山賢、徳永敬介 同脳血管内科医師  
研究分担者 山本 晴子 同先進医療・治験推進部部長  
研究分担者 峰松 一夫 同副院長

研究要旨

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、同装置の開発状況、虚血性脳卒中の急性期治療の現状を踏まえて、近い将来予定している治験プロトコル大枠を提案した。治験デザインは、単一治療群、オープンラベル、ヒストリカルデータ対照試験とした。発症4.5時間以内の頭部MRAで脳主幹動脈閉塞を確認した虚血性脳卒中患者を登録する。主な除外基準はアルテプラゼ（rt-PA）静注療法適正治療指針の適応外である。安全性の主要評価項目は、治療開始から22-36時間の頭部CTで確認されたNIHSS4点以上増悪する症候性頭蓋内出血、発症90病日後の死亡、有効性の主要評価項目は、治療開始から120±30分後のMRA上の再開通（modified Mori Grade 2-3）率とする。現在当施設で収集しているヒストリカルデータなどを対照データとして安全性および有効性の評価を行う。独立安全性評価委員会を設置し安全性のモニターを行う。

A. 研究目的

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、近い将来予定している治験プロトコルの案を作成した。

B. 方法

考慮した背景 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。2012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。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。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大枠を提案する。（倫理面への配慮）

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。

C. 治験プロトコル大枠案

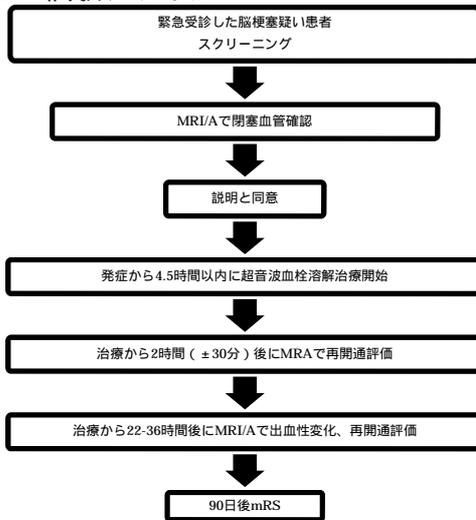
1. 参加（依頼）施設候補

- 国立循環器病研究センター
- 慈恵会医科大学
- 川崎医科大学（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）
- 梶川病院（向井智哉先生）

2. 研究デザイン

- 単一治療群
- オープンラベル
- ヒストリカルデータと比較

### 3. 試験デザイン



### 4. 患者登録基準

- 年齢20歳以上
- 脳梗塞による神経症候を呈する
- NIHSS 5-25
- 発症前mRS 0-1
- MRAでM1-M2, A1-A2, P1-P2閉塞, (ICA閉塞)
- 発症4.5時間以内に治療可能
- 書面による本人または代諾者の同意
- 超音波側頭骨窓の有無は問わない

### 5. 患者除外基準

- 適正治療指針での適応外
- MRI検査不能の患者
- 試験期間中に頭部・頸部の手術や血管内治療を予定している患者
- 妊婦、授乳中の患者、妊娠している可能性のある患者
- 余命6ヵ月未満と予測される末期の疾患を有する患者
- その他、試験担当医師が不相当と判断する患者

### 6. 主要評価項目

#### 安全性評価項目

- 36時間以内のNIHSS4点以上増悪するCT上の症候性頭蓋内出血
- 90日後の死亡

#### 有効性評価項目

- 治療開始から2時間(±30分)後のMRA上の再開通率(modified Mori Grade 2-3)

### 7. 副次評価項目

- 22-36時間後のMRA上の再開通率(modified Mori Grade 2-3)
- 90日後のmRS 0-1の割合
- 90日後のmRS 0-2の割合
- NIHSSスコアの経時的推移

### 8. 症例数

国内で実施されたJ-ACT II研究では、1年半で58名の対象者を登録している。本研究の対象の多くは、J-ACT II研究で対象であった中大脳動脈閉塞患者である。提供を受けることが可能な装置の台数、研究期間、同意率などを考慮して実施可能な症例数を統計専門家に相談する。

### 9. 安全性評価基準

- 独立安全性評価委員会を設置
- 安全性評価の手順書を別途作成
- 委員会は報告を受けた有害事象、不具合と治験装置との因果関係の妥当性及び治験継続の適否、治験実施計画改訂の要否等について審議および評価し、提言する

### 10. ロードマップ案

- 新規超音波血栓溶解装置概要の確定  
2013年10月
- プロトコル大枠の確定  
2013年12月
- プロトコル案作成  
2014年3月
- プロトコル確定  
2015年3月

### D. 考察

新規超音波血栓溶解装置の開発状況、虚血性脳卒中の急性期治療の現状およびこれまで行われてきた様々な臨床試験を考慮して、新規装置の治験プロトコル案を作成した。この案をたたき台として、班員、研究協力者および外部の専門家からの意見を収集し2015年3月頃に治験プロトコルを確定する予定である。

## F . 研究発表

### 1.論文発表

- 1 . Tanaka K, Koga M, Sato K, Suzuki R, Minematsu K, Toyoda K. Three-dimensional analysis of the left atrial appendage for detecting paroxysmal atrial fibrillation in acute ischemic stroke. Int J Stroke. 2014, Epub ahead of print
- 2 . 田中 弘二, 古賀 政利, 大山 賢, 徳永 敬介, 佐藤 和明, 鈴木 理恵子, 峰松 一夫, 豊田 一則. リアルタイム3次元経食道心臓超音波検査を用いた急性期虚血性脳血管障害における左心耳の3次元評価. 脳卒中 2014年、印刷中

### 2.学会発表

1. 鈴木理恵子, 古賀政利, 田中弘二, 坂本悠記, 徳永敬介, 大山賢, 山本晴子, 豊田一則, 峰松一夫. MRA, 脳血管造影, 経頭蓋カラードプラによる rt-PA 静注療法施行時の閉塞血管と再開通率の検討. 第 32 回日本脳超音波学会総会、徳島、2013 年 6 月
2. 大山賢, 古賀政利, 遠藤薫, 鈴木理恵子, 山本晴子, 豊田一則, 峰松一夫. 経頭蓋カラードプラ法における探触子固定具の開発第 2 報~改良型の報告~. 第 32 回日本脳超音波学会総会、徳島、2013 年 6 月
3. 黒沼由香, 古賀政利, 徳永敬介, 滝沢歩武, 宮下光太郎, 伊庭裕, 豊田一則. 頸動脈エコーで rt-PA 静注療法を直前に回避し緊急人工血管置換術により経過が良好であった急性大動脈解離を有する脳梗塞の 1 例. 第 32 回日本脳超音波学会総会、徳島、2013 年 6 月

4. 下村怜、鈴木理恵子、古賀政利、斉藤こずえ、山上宏、長束一行、豊田一則、峰松一夫. 頸動脈エコーの記録—私の頸動脈エコー検査所見用紙—. 第 32 回日本脳超音波学会総会、徳島、2013 年 6 月
5. 田中弘二, 古賀政利, 佐藤和明, 鈴木理恵子, 峰松一夫, 豊田一則. リアルタイム 3D 経食道心臓超音波検査を用いた左心耳体積および駆出率の測定による急性期脳卒中における発作性心房細動の予測. 第 32 回日本脳超音波学会総会、徳島、2013 年 6 月
6. 徳永敬介, 古賀政利, 大山賢, 田中弘二, 佐藤和明, 鈴木理恵子, 豊田一則. 急性期脳梗塞患者におけるリアルタイム 3D 経食道心エコーを用いた大動脈弓部動脈硬化進行度の評価とその関連因子. 第 32 回日本脳超音波学会総会、徳島、2013 年 6 月
7. 奥村幸祐、古賀政利、河野友裕、坂本悠記、小林潤平、鈴木理恵子、湊谷謙司、長束一行、豊田一則. 緊急頸部血管エコーで rt-PA 静注療法を回避し緊急人工血管置換術により経過が良好であった急性大動脈解離を有する脳梗塞の 3 例. 第 12 回日本頸部脳血管治療学会、東京、2013 年 6 月

## 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

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

MRA/DSAによるrt-PA施行虚血性脳卒中中の閉塞血管早期再開通率の検討

研究協力者	鈴木 理恵子	国立循環器病研究センター脳血管内科医師
研究分担者	古賀 政利	国立循環器病研究センター脳卒中集中治療科医長
研究分担者	山本 晴子	国立循環器病センター先進医療・治験推進部部长
研究協力者	大山 賢	国立循環器病研究センター脳血管内科医師
研究協力者	徳永 敬介	国立循環器病研究センター脳血管内科医師
研究協力者	松木 孝之	国立循環器病研究センター脳血管内科医師
研究協力者	豊田 一則	国立循環器病研究センター脳血管内科部長
研究分担者	峰松 一夫	国立循環器病研究センター副院長

研究要旨

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、同装置の開発状況、虚血性脳卒中中の急性期治療の現状を踏まえて、近い将来予定している治験プロトコール大枠を提案した。治験デザインは、単一治療群、オープンラベル、ヒストリカルデータ対照試験とした。発症4.5時間以内の頭部MRAで脳主幹動脈閉塞を確認した虚血性脳卒中患者を登録する。主な除外基準はアルテプラゼ（rt-PA）静注療法適正治療指針の適応外である。安全性の主要評価項目は、治療開始から22-36時間の頭部CTで確認されたNIHSS4点以上増悪する症候性頭蓋内出血、発症90病日後の死亡、有効性の主要評価項目は、治療開始から120±30分後のMRA上の再開通（modified Mori Grade 2-3）率とする。現在当施設で収集しているヒストリカルデータなどを対照データとして安全性および有効性の評価を行う。独立安全性評価委員会を設置し安全性のモニターを行う。

A. 研究目的

我々は、慈恵会医大グループと共同で低侵襲的低周波超音波装置を用いた急性期血栓溶解療法の臨床試験を計画している。当該試験計画策定に必要な対照データ収集を目的として、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ヶ月後転帰を調べ、データの更新を行った

B. 方法

対象は平成17年10月から平成25年4月までの当院rt-PA静注療法施行の384例である。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（DSA）による血管閉塞部位（内頸動脈（ICA）、前大脳動脈（ACA）、中大脳動脈（MCA）、後大脳動脈（PCA）、椎骨脳底動脈（VB）系、閉塞血管なし、評価不能）、主幹動脈（ICA、ACA、MCA、PCA）に閉塞があり発症2時間以内にMRAもしくはDSAで再開通の評価をおこなった症例の2時間後、24時間後の再開通の有無を調べた。発症36時間以内のNational Institutes

of Health Stroke Scale（NIHSS）4点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、転帰は3ヶ月後の日常生活自立度 [modified Rankin Scale（mRS）] で評価し、mRS0-1を転帰良好、mRS0-2を日常生活自立とした。なお、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時間後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は除外した。また、3ヶ月後の転帰が確認できなかった症例も3ヶ月後のmRSの評価からは除外した。

MRAの再開通の評価にはModified Mori gradeを使用し、Grade2以上の場合に再開通ありとした。DSAの再開通の評価にはThrombolysis in Cerebral Infarction 分類を使用し、Grade2以上の場合に再開通ありとした。

MRAとDSAを併用した評価として、grade0：MRAでmodified Mori grade0、DSAでTIC10、grade1：MRAでmodified Mori grade1、DSAでTIC11、

grade 2 : MRAでmodified Mori grade2 , DSAでTICI2A , grade3 : MRAでmodified Mori grade3 , DSAでTICI2B , 3という分類を作成し使用した(図1) .

図1 再開通の評価

- ・MRA: modified Mori grade 0,1,2,3
- ・DSA: TICI 0,1,2A,2B,3
- ・MRAとDSAを合わせた評価
  - grade0: MRAでmodified Mori grade 0, DSAでTICI 0
  - grade1: MRAでmodified Mori grade 1, DSAでTICI 1
  - grade2: MRAでmodified Mori grade 2, DSAでTICI 2A
  - grade3: MRAでmodified Mori grade 3, DSAでTICI 2B,3

(倫理面への配慮)

ヒストリカルデータの収集に関する研究は、国立循環器病研究センターの倫理委員会で承認を受けた。

### C. 研究結果

患者背景を表1にまとめる。患者は384例、平均年齢は74±13歳であった。男性が63%、既往症は高血圧67%、糖尿病20%、脂質代謝異常35%、心房細動53%であった。臨床病型はラクナ梗塞1%、アテローム血栓性脳梗塞13%、心原性脳塞栓65%、その他の脳梗塞が22%であった。治療前の閉塞血管は内頸動脈(ICA)63例(16%)、前大脳動脈5例(1%)、中大脳動脈(MCA) M1 120例(31%)、M2 61例(16%)、後大脳動脈14例(4%)、椎骨脳底動脈12例(3%)、閉塞血管なし78例(20%)、評価不能29例(8%)、その他2例(1%)であった。血管内治療が施行されたのは34例であり、閉塞血管はICA15例、M1 12例、M2 1例、椎骨脳底動脈6例であった。

表1 患者背景(n=384)

年齢	74 ± 13歳	閉塞血管	
男性	63%	ICA	16%
高血圧	67%	ACA	1%
糖尿病	20%	MCA	
脂質代謝異常	35%	M1	31%
心房細動	53%	M2	16%
臨床病型		PCA	4%
ラクナ	1%	椎骨脳底動脈	3%
アテローム血栓性	13%	閉塞血管なし	20%
心原性	65%	評価不能	8%
その他	22%	その他	1%

M1, M2, ICA, ACA, PCA閉塞のMRA, DSA, MRAとDSAの併用による再開通の評価を表に示す(表2) .

表2 MCA M1閉塞(n=120)

MRAでの再開通率(modified Mori grade)					
	0	1	2	3	合計
2時間	19	1	13	5	38
24時間	18	1	12	7	38

DSAでの再開通率(TICI)						
	0	1	2A	2B	3	合計
2時間	12	1	0	2	1	16
24時間	12	1	0	2	1	16

MRA, DSAでの再開通率(modified Mori grade, TICI)					
	0	1	2	3	合計
2時間	24	2	11	6	43
24時間	20	2	11	8	41

※血管内治療が施行された患者は24時間後の評価から除外

MRAとDSAを併用した評価では、M1閉塞の再開通率は2時間以内が40%、24時間以内が46%であり(表2)、M2閉塞の再開通率はそれぞれ、71%、71%(表3)、ICA閉塞の再開通率はそれぞれ23%、32%であった(表4)。

表3 MCA M2閉塞(n=61)

MRAでの再開通率(modified Mori grade)					
	0	1	2	3	合計
2時間	4	0	6	4	14
24時間	4	0	6	4	14

DSAでの再開通率(TICI)						
	0	1	2A	2B	3	合計
2時間	1	0	0	0	0	1
24時間	1	0	0	0	0	1

MRA, DSAでの再開通率(modified Mori grade, TICI)					
	0	1	2	3	合計
2時間	4	0	6	4	14
24時間	4	0	6	4	14

※血管内治療が施行された患者は24時間後の評価から除外

表4 ICA閉塞(n=63)

MRAでの再開通率(modified Mori grade)					
	0	1	2	3	合計
2時間	9	3	3	1	16
24時間	6	4	3	2	15

DSAでの再開通率(TICI)						
	0	1	2A	2B	3	合計
2時間	12	0	2	0	0	14
24時間	12	0	2	0	0	14

MRA, DSAでの再開通率(modified Mori grade, TICI)					
	0	1	2	3	合計
2時間	17	3	5	1	26
24時間	11	4	5	2	22

※血管内治療が施行された患者は24時間後の評価から除外

M1, M2閉塞を合わせたMCA閉塞患者の再開通率はそれぞれ47%, 53%, ICA, ACA, MCA, PCA閉塞患者の再開通率はそれぞれ38%, 49% (表5), ACA, MCA, PCA閉塞患者の再開通の評価では, それぞれ44%, 48%であった (表6)。

表5 ICA,ACA,MCA,PCA (n=263)

MRAでの再開通率(modified Mori grade)					
	0	1	2	3	合計
2時間	36	5	22	10	73
24時間	32	6	21	13	72

DSAでの再開通率(TICI)						
	0	1	2A	2B	3	合計
2時間	25	1	2	2	1	31

MRA,DSAでの再開通率(modified Mori grade,TICI)					
	0	1	2	3	合計
2時間	48	7	22	11	88
24時間	39	8	24	16	82

※血管内治療が施行された患者は24時間後の評価から除外

表6 ACA,MCA,PCA (n=200)

MRAでの再開通率(modified Mori grade)					
	0	1	2	3	合計
2時間	27	2	19	9	57
24時間	26	2	18	11	57

DSAでの再開通率(TICI)						
	0	1	2A	2B	3	合計
2時間	13	1	0	2	1	17

MRA,DSAでの再開通率(modified Mori grade,TICI)					
	0	1	2	3	合計
2時間	31	4	18	9	62
24時間	27	4	18	11	60

※血管内治療が施行された患者は24時間後の評価から除外

症候性頭蓋内出血は全体では8例(2.3%)であり, M1閉塞の2.8%, M2閉塞の5.0%, ICA閉塞の4.2%, ICA, ACA, MCA, PCA閉塞患者の3.4%, ACA, MCA, PCA閉塞患者の3.2%であった(図2)。

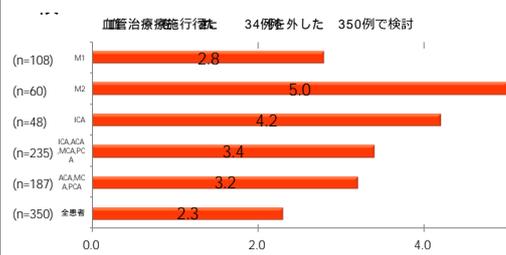


図2 症性出血  
(発症36時間以内, NIHSS4点以上の増悪)

3ヶ月後の日常生活完全自立は, 血管内治療を施行された34例と, 転帰を確認できなかった10例を除外した340例では, 転帰良好(mRS, 0-1)は全体で38%, ICA, ACA, MCA, PCA閉塞患者で33%, ACA, MCA, PCA閉塞患者で37%, 日常生活自立(mRS, 0-2)は全体で50%, ICA, ACA, MCA, PCA閉塞患者で43%, ACA, MCA, PCA閉塞患者で48%であった(図3)。

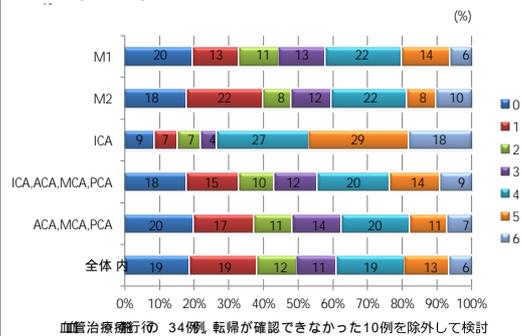


図3 3ヶ月後mRS

#### D. 考察

現在計画中である超音波血栓溶解療法の対照データ収集を行い, データを更新した. MRA, DSAを用いたM1閉塞の再開通率は, 2時間後47%, 24時間後50%, M2閉塞の再開通はいずれも71%, ICA閉塞の再開通率は各々23%, 32%, MCA (M1, M2)閉塞患者の再開通率は各々47%, 53%, ICA, ACA, MCA, PCA閉塞患者の再開通率は38%, 49%, ACA, MCA, PCA閉塞患者の再開通率は44%, 48%であった.

過去にrt-PA投与後に閉塞血管の再開通を評価している研究がいくつか報告されている。

現在までに、rt-PA静注療法後の再開通の評価は、rt-PA投与量は0.6mg/kg、0.9mg/kgの2種類の報告があり、TCD、CTA、MRA、DSAといった異なる評価手段を用いており、評価のタイミングも様々であった。今回我々はMRA、DSAの所見のみを用いて検討を行った。TCDやTCCSを除外した理由は、日本人ではTCDやTCCSにおいて側頭骨窓が不良であり、血流が流れていても頭蓋内血管が描出されない可能性が高いためである。

今回の結果のうちM1とM2を合わせた24時間後の再開通率を、本邦から報告されているJ-ACTの再開通率である69%（40例/58例）やKimuraら再開通率80.9%（34例/42例）と比較すると、24時間後の再開通率がやや低い傾向があった。MCA閉塞患者に占めるM1閉塞、M2閉塞の患者数の比率は今回の検討、過去の報告とも2対1であった。J-ACTやKimuraらの報告と今回の我々のMRAとDSAを合わせた再開通率の結果を合わせると、M1、M2閉塞患者の24時間後の再開通率は66%と計算された。

今回は、PCAやACAの再開通率も含めて検討した点が過去の報告と比べ新しい点である。CTのみでrt-PA静注療法を施行する施設も多く、閉塞血管の評価を行わずに新規超音波血栓溶解装置を使用することを想定し、PCAやACA閉塞を含めた検討を行った。

症候性頭蓋内出血は欧州の市販後調査であるSITS-MOSTの1.7%、本邦の市販後調査であるJ-MARS研究の3.5%、10施設の市販後調査であるSAMURAI rt-PA登録研究の1.3%と同様の結果であった。3ヶ月後の日常生活完全自立も、SITS-MOSTの39%、J-MARSの39%、SAMURAI rt-PA登録研究の33%と同様の結果であった（図4）。

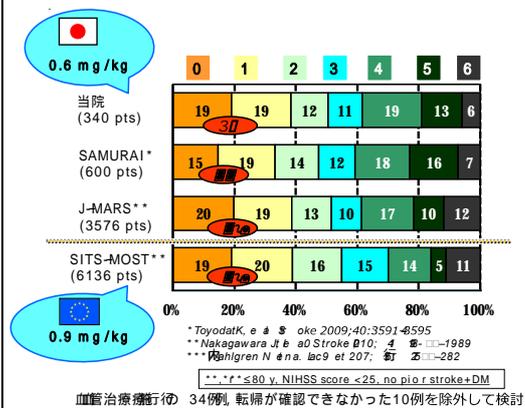


図4 3ヶ月後のmRS

今回、24時間後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において、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を使用した症例は除外した。また、3ヶ月後の転帰が確認できなかった症例も3ヶ月後のmRSの評価からは除外した。これは、今回の検討がrt-PA静注療法がもたらす再開通率や転帰のみを評価することが目的であったためであるが、血管内治療を受ける機会が多いICA閉塞やM1起始部閉塞患者はrt-PA静注療法のみでは24時間後も血管が閉塞していた可能性があり、24時間後の再開通率のデータの取扱いには注意が必要であろう。

我々の研究にはいくつかの問題点がある。1つ目は一部後ろ向き観察研究であること。2つ目MRAやDSAの検査のタイミングが決まっておらず、症例によって検査の施行時間に多少幅があったことがあげられる。

#### E．結論

急性期脳梗塞に対するrt-PA静注療法時に，MRA，DSAによる血管閉塞や再開通など頭蓋内血管の経時的観察を行い，超音波血栓溶解療法を併用しない場合の閉塞血管再開通頻度や時期を評価し，データの更新を行った．これらのデータを基に，新規超音波血栓溶解装置の治験プロトコールの策定を行う．

#### F．研究発表

1.論文発表  
なし

2.学会発表

- 1, 鈴木理恵子，古賀政利，田中弘二，坂本悠記，徳永敬介，大山賢，山本晴子，豊田一則，峰松一夫．MRA，脳血管造影，経頭蓋カラードブラによるrt-PA静注療法施行時の閉塞血管と再開通率の検討．第32回日本脳神経超音波学会，徳島，2013年6月

#### G．知的財産権の出願・登録状況 ( 予定を含む． )

1.特許取得  
なし

2.実用新案登録  
なし

3.その他  
なし

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

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

研究協力者	大山 賢	国立循環器病研究センター脳血管内科医師
研究分担者	古賀 政利	国立循環器病研究センター脳卒中集中治療科医長
研究協力者	鈴木理恵子	国立循環器病研究センター脳血管内科医師
研究分担者	山本 晴子	国立循環器病センター先進医療・治験推進部部長
研究分担者	峰松 一夫	国立循環器病研究センター副院長

研究要旨

固定の難しさ故に市販品が存在しない経頭蓋カラードプラ法用の探触子頭部固定具を、有限会社アンリミット・ジャパンと共同で開発した。ヘルメット型の頭部固定装置の試作型1号、2号を改良し、3号を完成させた。患者を対象とした臨床試験では、実用に耐えうる成績を上げている。今後は、臨床での評価を継続し、商品化を目指していく方針である。

A. 研究目的

経頭蓋ドプラー (TCD)装置用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 (TCCS)装置用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、固定が難しいためと考えられる。今回、有限会社アンリミット・ジャパンと共同で、TCCS装置用の探触子頭部固定具を開発した。

B. 方法

アンリミット・ジャパンと共同で開発した頭部固定具の試作型3号機を、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26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、奇異性脳塞栓症の原因となる右左シャントの判定が可能か否か、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。

(倫理面への配慮)

本研究は、侵襲性が極めて低い検査であるが、研究実施前に国立循環器病研究センター倫理委員会の承認を得た。被験者のインフォームド・コンセントを得た上で検査を行った。

C. 研究結果

対象期間中に10例(男性9例、 $59.7 \pm 21.3$ 歳)の患者に検査を行った。

全ての症例で15～30分間の安定した固定が可能で、右左シャントを含む検査が1人で可能であった。

患者1例で右左シャントの判定が可能であり、9例が「装着感が大変良い」と回答した。

TCCS用探触子頭部固定具と、TCD用探触子頭部固定具で血管を同定するまでの時間を10例で比較した。TCCS用探触子では2分30秒 $\pm$ 5分50秒(平均値 $\pm$ SD)、TCD用探触子では11分10秒 $\pm$ 10分30秒( $p=0.0037$ )であり、TCCS用探触子頭部固定具は有意に血管同定までの時間が有意に短かった(図)。

頭部固定具によるTCCS用セクタ型探触子と、TCD探触子の血管を同定するまでの時間を比較(10例)。



頭部固定具は有意に血管同定までの時間が短かった

#### D．考察

今回開発したTCCS用探触子頭部固定具は、TCCSで血管を視認しながらその同定ができるため、TCD用探触子頭部固定具に比べ短時間で血管同定が可能であった。頭部装着感や、固定の保持性、安定性も優れていた。今後は症例を蓄積し、MESの検出力がTCDと同等であれば、TCDの代替の検査法として、今後、探触子頭部固定具を用いたTCCSが普及する可能性がある。

また、経食道心エコーで右左シャントを確認するには数人が必要であるが、TCCS用頭部固定具による右左シャントの検査であれば1人で可能であり、検査に割ける人数が少ない場合に有用かもしれない。

今後、MRAや脳血管造影検査で血管閉塞が診断された急性期脳卒中患者に対し、TCCS用探触子頭部固定具により閉塞血管の再開通の評価ができれば、ベッドサイドで簡易にできる検査として有用であると考えられる。

#### E．結論

TCCS用探触子頭部固定具を開発した。更に臨床応用を重ねたい。今後は、商標の取得、意匠の出願等を行い、商品化を支援したい。

#### F．健康危険情報

なし

#### G．研究発表

なし

#### H．知的財産権の出願・登録状況

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iguchi Y, Kimura K, Sone K, Miura H, Endo H, Yamagata S, Koide H, Suzuki K, Kimura T, Sakurai M, Mishima N, Yoshii K, Fujisawa H, Ebisutani S	Stroke incidence and usage rate of thrombolysis in a Japanese urban city: the kurashiki stroke registry.	J. Stroke Cerebrovasc. Dis.	22	349-57	2013
Sakamoto Y, Kimura K, Shibazaki K, Inoue T, Uemura J, Aoki J, Sakai K, Iguchi Y.	Early ischaemic diffusion lesion reduction in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator: infrequent, but significantly associated with recanalization.	Int. J. Stroke	8	321-6	2013
Aoki J, Kimura K, Iguchi Y, Sakai K, Sakamoto Y, Terasawa Y, Shibazaki K, Kobayashi K.	Two different days of transcranial Doppler examinations should be performed for detection of right-to-left shunt in acute stroke patients.	J. Neuroimaging	23	175-9	2013
Shimoyama T, Kimura K, Shibazaki K, Yamashita S, Iguchi Y.	Maintenance hemodialysis independently increases the risk of early death after acute intracerebral hemorrhage.	Cerebrovasc. Dis.	36	47-54	2013