

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 井口 保之

平成 27 (2015) 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 . 9.4TMR I によるラット脳梗塞モデルの解析 ----- 6 横山 昌幸、王 作軍、白石 貢一	6
2 . 超音波駆動条件の最適化と頭蓋骨超音波透過性の測定 ----- 13 井口 保之、小川 武希、横山 昌幸、三村 秀毅 小松 鉄平、小松 鉄平、福田 隆浩、齋藤 理、芝 浩史	13
3 . 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 ----- 26 井口 保之、小川 武希、三村 秀毅 横山 昌幸、幸 敏志、王 作軍	26
4 . 超音波血栓溶解補助医療機器の製品化 ----- 34 川島 裕幸	34
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ルの提案 ----- 42 古賀 政利、鈴木理恵子、大山 賢、徳永 敬介 山本 晴子、峰松 一夫	42
6 . rt-PA 静注による閉塞血管早期再開通率の検討: 虚血性脳卒中に対する 新規超音波血栓溶解装置開発の対照データ ----- 65 鈴木理恵子、古賀 政利、大山 賢、徳永 敬介、 松木 孝之、山本 晴子、豊田 一則、峰松 一夫	65
7 . 経頭蓋カラードブラ法における探触子頭部固定具の開発 ----- 70 大山 賢、古賀 政利、鈴木 理恵子、山本 晴子、峰松 一夫	70
8 . 血栓選択的RGDバブルリポソームの開発 凍結乾燥製剤化に関する実験 ----- 72 丸山 一雄、澤口 能一	72

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 76	76
-------------------------------	----

IV . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 78	78
---------------------------	----

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26年度は、ラットを用いた超音波照射安全性評価、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、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。このような今年背景の下、超音波照射によってrt-PAの血栓溶解を積極的に促進する本治療法の開発に対する期待は益々高まっていると言える。

超音波血栓溶解促進療法において最も重要なことは、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

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(2MHz)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いため、血栓の患部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、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、照射した低周波数(300kHz)の超音波に起因するキャピ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。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。

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法での観察を容易にする頭部固定具の開発を推進する。

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。

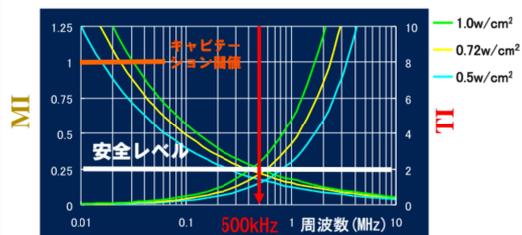


図2 超音波周波数と機械作用、発熱作用との関係

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、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見える波動である。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。

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」が常識と考えられてきた。一方、我々はモデル計算してみると周波数、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する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な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。本研究は、同装置のプロブを頭部に容易、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。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、塞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(田辺三徳製薬(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26年度の実施項目

- 1, 超音波の効果と安全性
 - (1)MRIによる脳中大動脈塞栓状態の解析
 - (2)超音波頭蓋骨透過率の測定とその超音波透過率変動の超音波変調による平準化
 - (3) in vitro 血栓溶解作用の定量法
- 2, 貼付型超音波振動子
超音波血栓溶解補助医療機器の製品化
- 3, 臨床研究プロトコル
 - (1)治験プロトコル案作製
 - (2)rt-PA治療のヒストリカルデータ解析
 - (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
in vivo での血栓特異性の評価

C. 研究結果

ここでは、表4に示した各項目の研究結果をごく短くまとめる。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)MRIによる脳中大動脈塞栓状態の解析
従来は一つの脳梗塞モデルとされてきたラット中大動脈塞栓法が、完全塞栓と不完全塞栓の場合に分けられることが、9.4T MRI測定により明らかとなった。

(2)超音波頭蓋骨透過率測定とその超音波透過率変動の超音波変調による平準化
前年度に実証した骨ファントムプレートと同様にヒト頭蓋骨の場合にも、超音波透過率に大きな変動があることを明らかにし、その変動が超音波変調により抑制できることを実証した。

(3)in vitro血栓溶解作用の定量法
ヒト全血から作製した血栓での測定法を確立し、0.3 W/cm²照射強度でも明確な血栓溶解促進作用が測定できた。

2, 貼付型超音波振動子

超音波血栓溶解補助医療機器の製品化

(1)全血血栓の超音波溶解加速性評価

0.5 W/cm²超音波照射群において有意な血栓溶解加速効果を確認した。

(2)超音波安全性評価

ラットでの超音波照射安全性評価法を確立し、最大強度2.8 W/cm²照射まで、著名な障害性を観察しなかった。

(3)超音波振動子設計

インピーダンスマッチング法を用いることで、必要な発信性能の振動子を得ることができた。

(4)超音波振動子装着具設計

超音波減衰の少ない装着用ゲルを選定した。

(5)超音波駆動装置設計

安全性と有効性の要求事項を考慮して設計仕様の詳細設計に着手した。

3, 臨床研究プロトコル

(1) 治験プロトコル案作製

治験プロトコル案を作製した。この案に

基づいて新規超音波血栓溶解装置の臨床治験が計画される予定である。

(2)ヒストリカルデータ解析

急性期虚血性脳卒中に対するrt-PA静注療法を施行した384例について、早期再開通率、症候性頭蓋内出血発生率と3ヵ月後転帰を解析した。

(3)経頭蓋カロードプラ用探触子固定具の開発

TCCSに用いる探触子頭部固定具を開発した。この固定具は今後商品化を目指していく方針である。

4, バブルリポソーム

(1) バブルリポソームの作製

目的とした血栓に対する特異リガンドを結合したバブルリポソームが作製された。

(2)in vitro, in vivoでの血栓特異性の評価

in vitro, in vivo両方で血栓特異的結合が確認された。

D. 考察

臨床試験の開始するための技術的・臨床的な基盤を確立することを目指した平成26年度はほぼ計画通りに研究が進行した。今後はこの確立した基盤に沿って臨床試験開始に向かって進んでゆく。

E. 結論

(達成度90%と考える)

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

9.4MRIによるラット脳梗塞モデルの解析

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
研究協力者	王 作軍	東京慈恵会医科大学	ME研究部	研究員
研究協力者	白石 貢一	東京慈恵会医科大学	ME研究部	講師

研究要旨 経頭蓋超音波血栓溶解促進療法の研究で、超音波照射の安全性を評価する場合にラットでナイロン糸を中大脳動脈に塞栓させるモデルを用いている。従来は塞栓後に麻痺症状を観察して、モデル作製の成否を判断していたが、塞栓の程度による脳梗塞症状の軽重が含まれることはある程度避け得ないことと考えられてきた。本研究では高磁場MRI装置による観察を行うことで、塞栓状態が分類でき、ばらつきの少ない脳梗塞モデルでの安全性評価が可能となった。

A. 研究目的

本研究の経頭蓋超音波血栓溶解促進療法の開発では、超音波照射が安全に行えるかを評価することが大変重要な項目である。通常の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。

超音波照射によって出血が促進されずに安全であることを評価するには、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。

B. 研究方法

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)と一緒に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の結紮系で固定後、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創する。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

C. 研究成果

(1) MR Angiographyによる栓系による中大脳動脈塞栓状態の観察

ナイロン糸による塞栓手術の終了後20分~30分後に(手術後に、MRI用ベットに固定し、プローブチューニング等の撮像準備にこの程度の時間を要する)MR Angiographyで約4分間の撮像を行ったところ、塞栓の様子が明瞭に判別することができた。判別された類型を以下に記す。

まず、糸が深く入りすぎて前大脳動脈までの血流を遮断してしまった例を図1に示す。

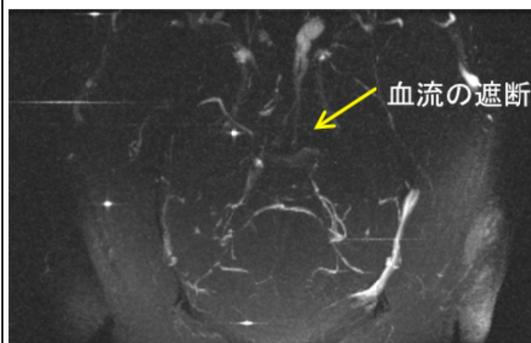
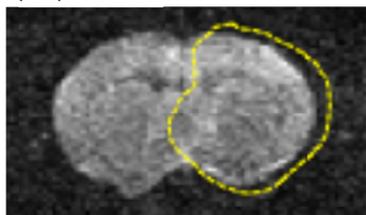


図1 糸が深く入りすぎってしまったMR Angiography像

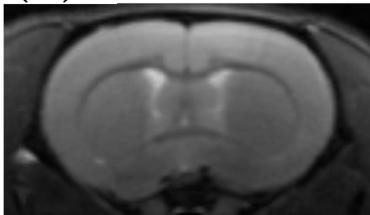
このナイロン栓子による脳梗塞モデルの手技では、挿入する糸の長さはある程度決まっているものの、手技を行う者が指に感じる抵抗感によって中大脳動脈の塞栓を推定する方法である。よって、ラットの個体毎に異なる血管形状によっては挿入の深さおよび挿入の方向(全く異なる血管系に入ってしまうこともある)、さらには脳動脈を穿刺してしまい脳出血に結びつくことが起き得る。同程度の体重のラットの場合には挿入長さは17.5mm~18.5mmであったのに対し、図1場合では19.5mmであり、この時だけ1cm長く挿入されたこととなった。(それだけ他のラットに比べて挿入に伴う抵抗感が少なかったことになる。)図1では、中大脳動脈のみではなく、前大脳動脈

まで閉塞していることが判明した。このラットは1日の観察期間が完了する前に手術後数時間で死亡した。このラットの他の撮像法での画像を図2に示す。

(A)



(B)



(C)

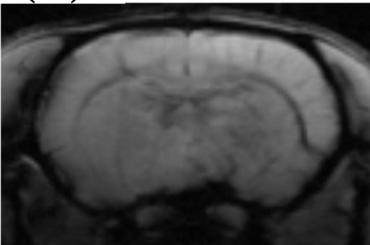


図2 糸が深く入りすぎてしまったラットのMR画像(A)Diffusion画像、(B)T2強調画像、T2*強調画像

最も早期から脳梗塞症状を診断可能なDiffusion像では、黄色点線で囲った梗塞半球に明確な拡散性の減少の様子がみられ、血管閉塞から30～40分という早期にもかかわらず、明確な脳梗塞症状が確認できる。脳梗塞後期の病状が画像化される(B)のT2強調画像においても、この時点では病状は観察されていない。一方、(C)のT2*強調画像では、手術によって脳出血が起きていないことを確認していて、このラットの死亡原因が脳出血ではなく、重篤な脳梗塞症状によることが、確認された。

以上のように、前大脳動脈の閉塞を伴って非常に重篤な脳梗塞となる場合を、このMRI撮像によって排除することができた。この格別に重症となった例の排除はMRI撮像なしにはなし得ない。また、閉塞早期でのT2*画像によって脳内出血が確認された例もあった。このような早期の出血は脳梗塞の影響によって生じたのではなく、ナイロン糸挿入によって物理的に穿刺されたものと考えられる。以上のように、前大脳動脈の閉塞や手術操作で生じた脳出血によって、評価対象から外す例は40例のうち4例であったが、精度の高い安全性評価実験には、これらが除外できることは大きな意義がある。

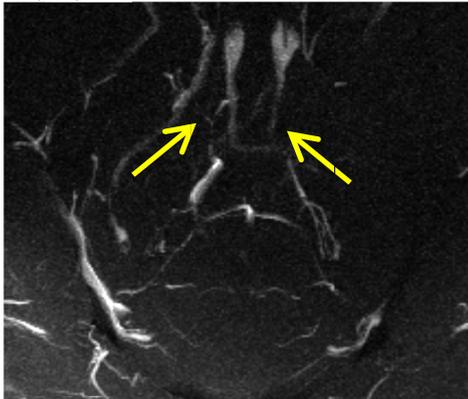
図3には中大脳動脈のみを完全に閉塞した成功例を示す。正常側の脳左半球では、黄色矢印に沿って中大脳動脈の血流がはっきりと観察されるが、梗塞側である脳右半球では、中大脳動脈の血流がなく、完全に閉塞していることがわかる。



図3 中大脳動脈完全閉塞例のAngiography像(No. KS3623)

次に、不完全閉塞の例を図4に示す。いずれも正常の左半球側の血流よりは減少しているものの、血流が右半球側には観察されて、不完全閉塞と判定した。この不完全閉塞の3例にも違いがあり、(C)では、かなり正常に近い血流があるのに対し、(B)ではわずかに血流が確認できる程度である。

(A)



(B)

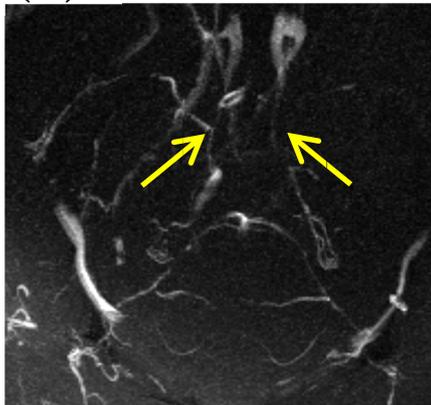


図4 中大脳動脈完全閉塞例の
Angiography像 A: KS3520, B:KS3527

次に、1時間から3時間までの閉塞時間での、MR Angiographyで測定した閉塞状態と24時間後の生存・死亡の結果を表1にまとめる。

この表の結果からは、血管の閉塞が完全であるか、不完全であるかによってラットの予後(24時間後の生存と死亡)が規定されていることがわかる。2時間以上完全に閉塞してから再開通すると、例外なく24時間以内に死亡しているのに対し、不完全閉塞の3例では2時間閉塞でも全例が生存していた。1時間の短い閉塞時間では、完全閉塞の場合でも2例が全例生存していた。

MRIで観察した脳梗塞症状の進行具合も完全閉塞と不完全閉塞では明確な差

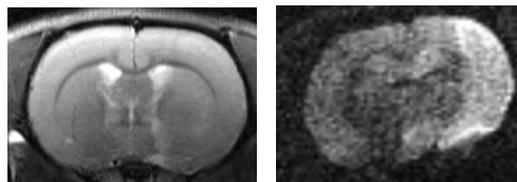
を示した。図5には2時間完全閉塞の場合

表1 ラット脳梗塞モデルにおける閉塞状態と予後の関係

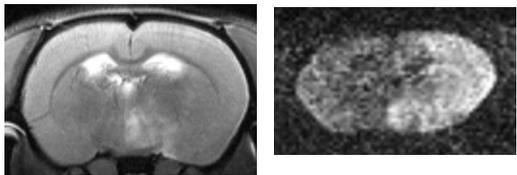
No.	体重 (g)	閉塞時間	閉塞状態	24時間後の状態*
KS3520	284	3 h	完全	X
KS3527	268	3 h	完全	X
KS3530	276	3h	完全	X
KS3604	277	2 h	完全	X
KS3614	278	2 h	完全	X
KS3616	278	2 h	完全	X
KS3532	298	2 h	不完全	○
KS3537	261	2 h	不完全	○
KS3539	283	2 h	不完全	○
KS3534	303	1 h	完全	○
KS3623	299	1h	完全	○
KS3610	254	1 h	不完全	○
KS3619	274	1 h	不完全	○

* x : 死亡、○ : 生存

(A)



(B)



(C)

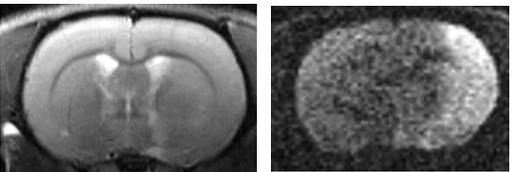


図5 2時間完全閉塞例 撮像は再開通後1時間 A:KS3616, B:KS3604, C:KS3614 各々左がT2強調、右がDiffusion画像

合のT2強調画像（左）とDiffusion画像（右）を示す。Diffusion画像では、この撮像法の性質から像が歪んでいるが、脳虚血による水分子の拡散低下が白い領域でコントラスト高く表現されている。一方、T2強調画像では、正常の左半球と著しい違いは、再開通後1時間では見られない。脳梗塞の早期では、Diffusion画像が脳虚血病態を最も良く表現するという従来知見を確認することとなった。よって、以後にはDiffusion画像のみを提示して比較する。図6には図5と同じく2時間完全閉塞の場合の時間経過をDiffusion画像で示している。2時間閉塞時においても、完全閉塞の場合にはすでに右半球には広範にわたって白い領域が観られる。その後の再開通後1時間には、白い領域がさらに線条体と皮質の両方に広がると共に、コントラストが高くなっていて、病態の進行が見て取れる。

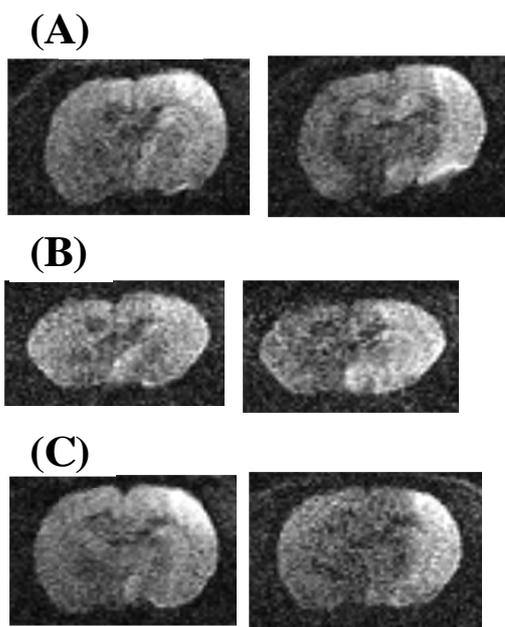


図6 2時間完全閉塞例のDiffusion画像
時間経過 A:KS3616, B:KS3604,
C:KS3614 各々左が2時間閉塞後（再開通直前）、右が再開通1時間後

次に、不完全閉塞の場合のMRI画像を図7に示す。完全閉塞の場合と異なり、病態の進行と広がりとは個体によって異なる。重症度はA>B>Cの順番になっていて最も重症度の高いAでは図6の完全閉塞の場合に近い画像であるのに対し、B,Cでは白い領域は狭く、そしてそのコントラストも低い。これらの3例の閉塞直後のAngiography像から血流の太さを推定すると以下のようなになった。尚、すべての場合で正常の左半球での中大脳脈の太さは0.28mmであった。

A(KS3532):0.14 mm
B(KS3532):0.14 mm
C(KS3532):0.22 mm

この結果と図7の画像を比べてみると、血流が最も太く観察されたCの場合に脳梗塞症状が最も軽いものであった。よって不完全閉塞の場合でも、MR Angiographyによって脳梗塞症状の軽重を予想することができる。

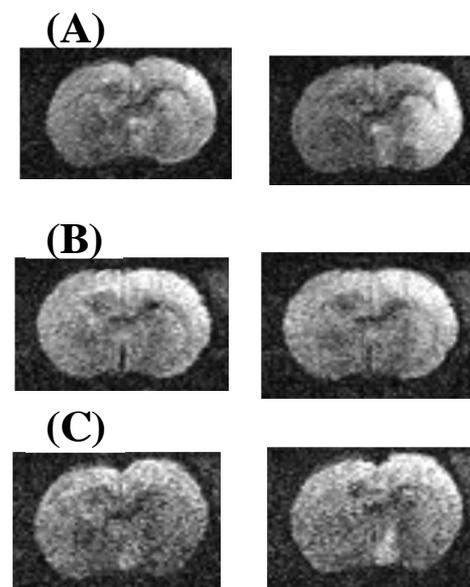


図7 2時間不完全閉塞例のDiffusion画像
時間経過 A:KS3532, B:KS3537,
C:KS3539 各々左が2時間閉塞後（再開通直前）、右が再開通1時間後

D. 考察

急性期脳梗塞の動物モデルとしてラット中大脳動脈をナイロン糸で塞栓する小泉モデルは広く使用されてきた。閉塞する時間と抜糸による血流開通の有無の条件設定によって、軽度から重篤にわたる様々な程度の脳梗塞モデルが作製できる。しかし、条件を一つに固定してもある程度の症状の軽重の幅があることは避けられなかった。また、症状の軽重に違いが生じる原因が、個体毎の虚血に対する抵抗性の違いであるのか、閉塞状態の違いによるものかは不明であった。また、このように症状の軽重に幅があると、様々な評価実験において有意差を得るためには、多数のラットを1群に使用する必要がある。そこで、同じ手技を施した動物でも、症状の軽重で分類できれば、実験の精度は高まり、用いる動物の数も少なくすることが可能である。

本研究のMRI観察によって明らかになったことは、

(1) 糸が深く入りすぎて前大脳動脈閉塞になる場合や、血管穿刺による脳出血など、頻度は高くないにしても正常ではない脳梗塞モデルとなった例の混入を避けられる。これは術者が中大脳動脈閉塞の技術に熟達しようとも避け得ない混入である。10匹に1匹程度としてもその混入を避けられることは精度の高い実験を行う上で大変有意義である。

(2) 中大脳動脈が成功裏に塞栓された例においても、血管が完全に塞栓された場合と部分閉塞に留まる場合があることが判明した。ラット中大脳動脈塞栓は4-0あるいはより太い3-0のナイロン糸で実施される。今回は太い方の3-0糸であっても、部分閉塞になる例がほぼ半分の例であったことが判明した。

閉塞が完全か不完全かによって脳梗塞症状の進行度合いと予後(24時間後の生死)が大きく異なっていた。従来は中大脳動脈閉塞の一群として扱ってきた完全閉塞と部分閉塞を、各々異なる群として分類することでさらに高精度の脳梗塞モデルを用いた実験が可能になると考えられる。

(3) 今回の2時間以上中大脳動脈完全閉塞となったラットは全例が再開通後24時間以内に死亡している。この事実はこれまでの小泉モデル脳梗塞ラットの報告と異なる。(3時間閉塞以下の再開通モデルではほとんど死亡例は出現しないとの報告)これは、今回の実験において閉塞開始から再開通後3時間まで連続に麻酔下に置いたことが原因と考えられる。通常の小泉モデルでは、閉塞手術完了後はすぐに覚醒させて症状(手足麻痺や、旋回歩行など)によってモデル作製の成否を確認し、再開通のための抜糸の直前に再麻酔を施す。本実験では、MRI画像による症状進行の過程を観察したために麻酔継続が必須であった。閉塞と再開通の2回の手術以外の時は小泉法では覚醒を維持することが、今回の実験と大きく異なっている。この閉塞時間の予後への影響の違いを踏まえた上で、小泉モデル作製の後に、MRI Angiography像でモデル作製の成否と完全・部分閉塞を診断することは大きな意義があると確信する。また、MRI測定を行うには、本実験のように麻酔を継続する場合と閉塞後にMRI撮像を行ってから覚醒させる場合が考えられる。後者の場合では、MRI測定のための準備と撮像に20分ほどの麻酔時間が余分に必要となるのみであるので、従来の小泉法と余り変化の無い条件(閉塞時間が症状と予後に及ぼす影響において)での検討が可能となる。

E. 結論

経頭蓋超音波血栓溶解促進療法で超音波照射の安全性評価を行うために、ラットを用いた中大脳動脈閉塞の小泉モデルは大変有用な実験方法である。従来は、ナイロン糸による中大脳動脈閉塞閉塞の成否は歩行障害の程度等の症状での判断のみによっていた。9.4T MRI装置を用いた撮像は、従来に混入することが避けられなかった、前大脳動脈閉塞や挿入系血管穿刺による脳出血を除外できるのみならず、従来はモデル作製成功の一群とした例も血管の完全と不完全閉塞に分類できることが示された。

以上より、中大脳動脈閉塞ラットモデルの実験には、高磁場MRIによる観察が極めて有用であることが実証された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 白石貢一, 王作軍, 青木伊知男, 國領大介, 横山昌幸、「急性脳梗塞t-PA治療における出血リスクの定量的評価」第9回日本分子イメージング学会・学術総会 2014年5月大阪
- 2) 白石貢一, 王作軍, 青木伊知男, 國領大介, 横山昌幸、「急性脳梗塞再開通後のMRI造影剤を用いた血管透過性評価」第30回日本DDS学会 2014年7月東京
- 3) 白石貢一, 王作軍, 青木伊知男, 國領大介, 横山昌幸、「急性脳梗塞の診断・治療に向けたDDS製剤の開発」日本薬学会第135年会 2015年3月神戸

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

超音波駆動条件の最適化と頭蓋骨超音波透過性の測定

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研究部	准教授
研究分担者	三村 秀毅	東京慈恵会医科大学	神経内科	助教
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研究部	研究員
研究協力者	芝 浩史	東京慈恵会医科大学	ME研究部	研究員

研究要旨 経頭蓋超音波・血栓溶解剤併用法を併用した超音波血栓溶解促進療法に使用する治療機器の開発には、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、個体差があると考えられる。前年度には、骨ファントムモデルおよびヒト頭蓋骨標本で超音波透過率が大きく変動することを報告した。今年度の研究では、超音波照射の各種条件による透過率の変動を定量的に明らかにするとともに、周波数変調による透過率変動の平準化を評価した。

A. 研究目的

超急性期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 trial¹⁾においては脳出血が多発して臨床試験が途中で中断する事態となった。このことから、超音波照射の生体に対する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求められる。そのため、治療機器開発では、超音波の頭蓋骨透過率を可能な限り正確に見積り、照射強度を設定することが重要である。

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」事が常識と考えられてきた。一方で、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得ることは一部で報告²⁾されている。しかし、もし頭蓋骨超音波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。理論的には、波の干渉現象から超音波の透過率は骨の厚みや皮膚の厚み等により変動することは容易に理解される。変動が生じる過程は次のようなものである。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、再び脳の方向に向かう。これらの反射波との干渉により、超音波透過率が変化する。干渉により強め合うか否かは骨の厚みに依存するため、超音波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理解される。

本研究の第一の目的は、個人差による超音波透過率変動を定量的に明らかにすることで、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。

前年度には、厚さや超音波吸収率などヒト頭蓋骨として適切なパラメーターを用いると、500kHz周辺の中周波数超音波の透過率が相当大きく変動することを、n層モデルを用いて予測した。また、この予測に基づいて、骨ファントム平板を

用いて、骨厚と皮膚厚に相当するプローブと骨ファントム平板の距離によって変動することを観察した。また、ヒト頭蓋骨においても小さいながら超音波透過率が変動することを見いだした。しかしながら、このヒト頭蓋骨の測定においては、数少ない測定点で試したに過ぎず、臨床で実施するはずの超音波透過率を最大にする照射位置・角度の最適化は行っていなかった。今回は、この最適化過程を行って3体の頭蓋骨についてこめかみ部の複数点の測定を実施する。この実施によって、中周波数超音波のヒト頭蓋骨における超音波透過率の臨床上の指標値を得ることを目的とした。

上記で測定する超音波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、塞栓部の音響強度が小さければ、血栓溶解促進効果が損なわれてしまう。そのため、透過率変動は小さい方が望ましい。超音波透過率の変動を小さくし、個体差を無くす手段として、我々は周波数変調が有効ではないかと仮定した。本研究の第二の目的は、周波数を変調することによって超音波透過率の変動を抑え、超音波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。前年度には、骨ファントム平板での厚さと皮膚厚変化に対する超音波透過率変動を周波数変調によって顕著に減少させることを報告した。今年度は、ヒト頭蓋骨での超音波透過率変動を周波数変調によってどの程度減少させられるかを検討すると共に、骨ファントム平板を用いた超音波透過挙動の周波数依存性と周波数変調との関係を解析する。以上の検討を通して、この周波数変調方法が超音波血栓溶解療法において、必須の技術であるかを判定する。

- 1) M. Daffertshofer, et al., Stroke 36 (2005) 1441-1446.
- 2) P.J. White, et al., Phys. Med. Biol. 51 (2006) 2293-2305.

B. 研究方法

(1) n層モデルによる透過率の変動計算

前年に用いたと同じ、平面波がn層を透過するモデルを以下のように記述した。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。 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、

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

$T_{fn} D_n T_{n-1} D_{n-1} \cdots D_2 T_{21} D_1 T_{10}$ 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、周波数ランダム選択法 (Periodic Selection of Random Frequency: PSRF) を用いた。一定時間 (例えば 10μ 秒) 毎に周波数を切り替えるもので、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 (AFG3102; Tektronix, OR, USA) が変調波信号を出力した。波形の一例を図 2 に示す。

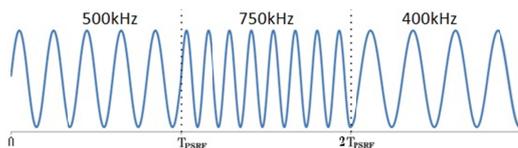


図 2 PSRF変調方式の波形の一例

実験装置システムを図 3 に示す。信号は増幅器 (HSA4101; NF Co, 横浜, 日本) によって増幅された後、超音波プローブに入力された。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) によって観測した。超音波プローブ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、その振動子面は直径 24mm の円板で、周波数帯域は 357-665kHz (6dB ダウン) である。

実験に用いた骨ファントム板を図 4 に示す。このファントム板の音速は 2884m/s、密度は 1664 kg/m^3 、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。大きさは $5\text{cm} \times 7\text{cm}$ 、厚さは 0.6mm から 4.4mm まで様々な厚さのものを 0.2mm 間隔で計 20 枚用意した。400kHz, 500kHz, 600kHz 正弦波と $500\text{kHz} \pm 100 \text{ kHz}$ の周波数変調超音波 (PSRF) とを比較して透過超音波を測定した。また、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行った。同様の測定をヒト頭蓋骨片 (サイズ: $3.5 \text{ cm} \times 8.0 \text{ cm}$ 、Ets du Docteur Auzoux (Paris, France) から購入) を用いて行った。

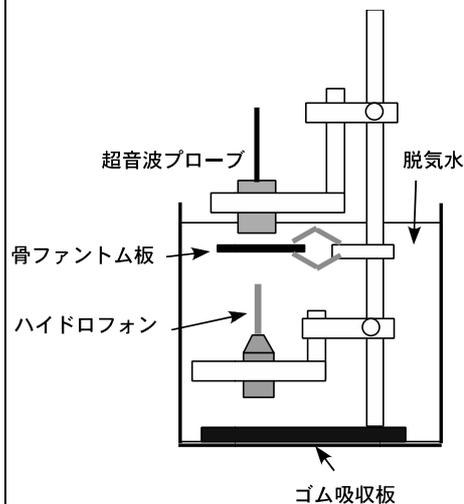


図 3 ファントム透過超音波測定装置

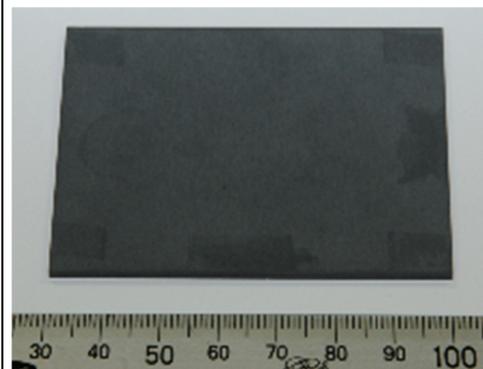


図 4 骨ファントム平板

(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行った。頭蓋骨は東京慈恵会医科大学慈恵会医科大学解剖学講座に保管されている献体を用いた。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

本実験では図5のように頭部がカットされているものを使用した。



図5 頭蓋骨No.4737

ヒト頭蓋骨の超音波透過率の測定を行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6に示す。頭蓋骨は3点で保持され、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6 頭蓋骨固定具

実際の透過率測定の様子を図7に示す。



図7 超音波透過率測定の様子

測定ポイントの見出し方

前年度の検討により、完全な平らな骨ファントム板の場合と異なり、頭蓋骨透過実験の場合には、超音波が屈折してプローブを向けた方向に直進しない場合がある。つまり、超音波プローブ中心とハイドロフォン中心を結ぶ線（中心軸）から超音波の照射強度中心がずれる場合である。中心軸に対して直角方向の2次元にハイドロフォンを走査させて、超音波強度の2次元マップを作成する。図8に一例を示す。図8では、超音波プローブの中心線（グレーの線の交差点）から、ハイドロフォンによる測定強度の最強の点が5mm以上ずれている。超音波プローブの照射位置をハイドロフォンが観測する超音波強度の最も強い位置に移動して、この交差点と最強点のずれを小さくする。この作業を繰り返して、観測される超音波の最強な点が、中心軸から2mm以内に収まるようにする。図9には、超音波プローブの中心線からのずれのほとんどない例である。上記の作業を行う出発点として、臨床におけるカラードップラーでの経験から頭蓋骨のこめかみ部に片側に3点候補点を挙げて、この3点から上記の作業をして、選んだ点を測定ポイントとした。左右両側の測定を行うと一つの頭蓋骨あたり6点の測定点があることになるが、2つの出発点から1つの測定点に収束したり、頭蓋骨切断面の延長上に測定ポイントがある挙動などを取ることもあり、6箇所未満の測定ポイントとなった頭蓋

骨もあった。各測定ポイント毎に上下2mmずらした4点を加えて測定した。

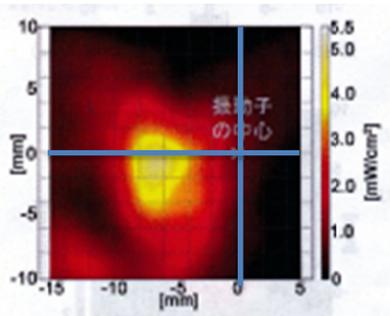


図8 超音波透過率測定の様子
(屈折による超音波の中心のずれは5mm以上ある)

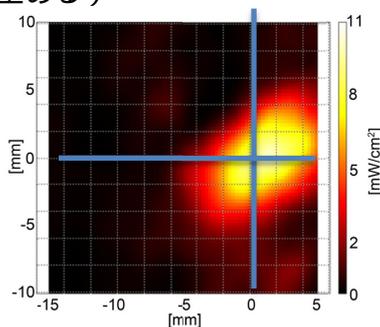


図9 超音波透過率測定の様子
(屈折による超音波の中心のずれは2mm以内に収まっている)

超音波プローブからハイドロフォンまでの距離は50mmに固定した。これは、上記のようにして測定ポイントを決定した後、50mmから距離を前後してその強度変化を観察したところ、図10に示す様にその変化が小さかったからである。

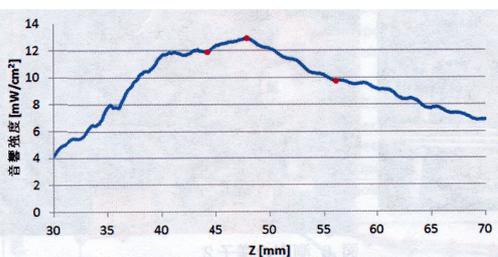


図10 超音波プローブとハイドロフォンの距離(z)を変えたときの音響強度変化(500kHzでの照射)

C. 研究成果

(1) 超音波の周波数による超音波透過率変動

周波数変調による頭蓋骨と超音波透過率変動の平準化の妥当性検証のために、周波数を変えた場合の超音波透過率を理論計算と実測の両面から求めた。

図11には計算から求めた超音波透過率を示す。(A)は無限遠からの超音波照射の場合であり、(B)は超音波プローブを骨に近づけて、プローブの振動子表面と骨の間の距離を皮膚と見なすモデルの透過率である。

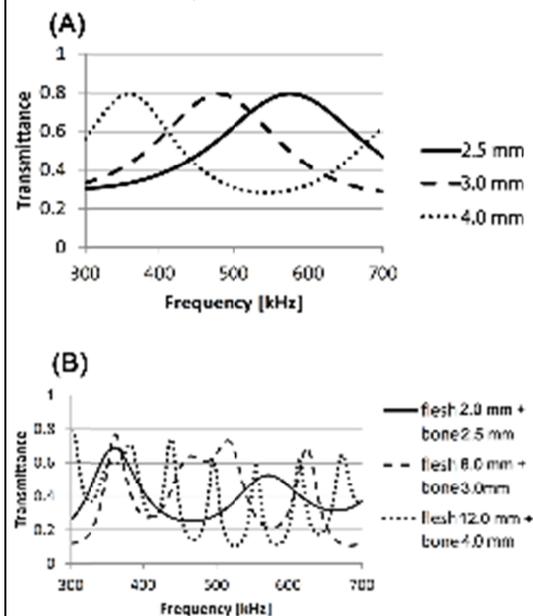


図11 計算から求めた周波数による超音波透過率変動

(A)無限遠からの超音波照射の場合 骨厚は2.5mm, 3.0mm, 4.0mm

(B)皮膚に超音波プローブを接した場合 (プローブと骨の間の距離が皮膚厚(flesh)となる) - : 皮膚2.0mm, 骨2.5mm、-- : 皮膚6.0mm, 骨3.0mm、... : 皮膚12.0mm, 骨4.0mm

図11(A)から、骨の厚さによって超音波透過率が極大となる超音波周波数が異なっていること、骨が厚い方の透過率が低くなっていない場合があることがわかる。

図11(B)を見ると、皮膚厚と骨厚によって超音波透過率変動の周期が複雑に変わることがわかる。骨ファントムの実測の結果を図12に示す。

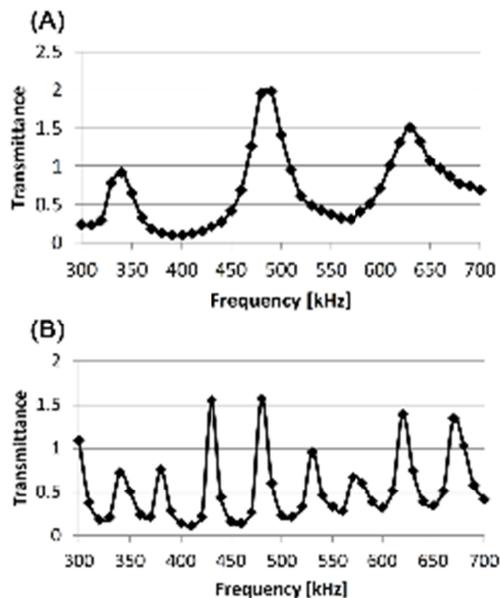


図12 周波数による超音波透過率変動実測値 骨ファントム厚2.0mmを用いる
(A)皮膚厚相当距離1.3mmの場合
(B)皮膚厚相当距離12.0mmの場合

実測においても計算から導かれた大きな超音波透過率変動が観察された。(A)の皮膚厚に相当する超音波プローブと骨ファントムの距離が1.3mmの場合、最大と最小の透過率の比は10倍以上となり、現代日本人のこめかみ部の皮膚厚の平均値12mmを模した(B)でも比は約8倍と大きなものとなった。最大の超音波透過率が骨ファントムのない場合の1よりも大きな値を取ることがあった。これは、反射した超音波が超音波プローブ内部で共鳴を起こした結果、もたらされたものと考えられる。このように大きな超音波透過率変動は、単一の周波数の超音波が干渉した結果であるので、干渉を乱すのに異なる周波数を混ぜる変調は、この超音波透過率変動を小さくする有効な方法であると言える。

ここで、本研究で観測された超音波透過率変動と、従来認識された超音波透過率変動現象を比較して、本研究が提起する超音波透過率変動の重要性を明確にしてみたい。これまでに、頭蓋骨の超音波透過率変動が周期的に変動し得ることは知られていたが、それが超音波を用いる診断と治療に大きな影響を示す程には大きくないと考えられてきた。図13(A)の点線に示すように、Whiteらは周波数によって超音波透過率の周期的変動はあるものの、周波数が大きくなるにつれて超音波透過率が減少する挙動が大きい計算結果を示した。一方、我々の計算値では周波数増大に伴う超音波透過率減少挙動は無い。この差をもたらす最も大きな原因は、我々がこめかみ部での照射を考慮した骨厚2.0mmを用いているのに対し、Whiteらは頭蓋の平均的な厚さの7.1mmを用いていることによる。

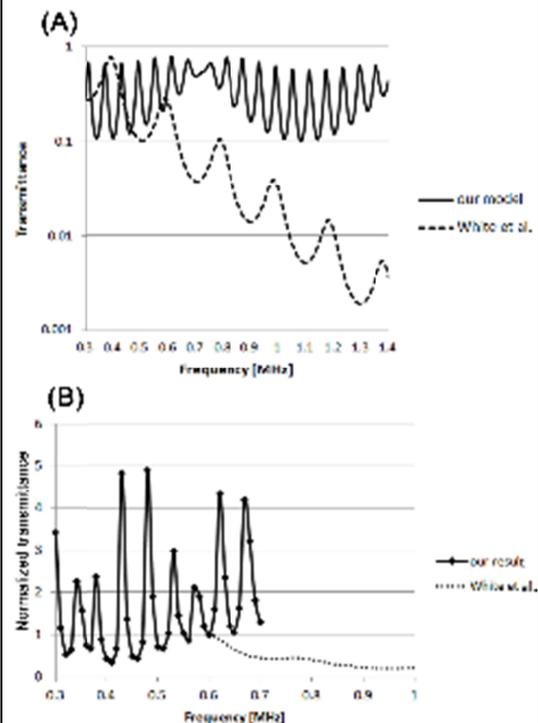


図13 頭蓋骨透過率変動に関する過去の報告との比較。(A)計算値(B)実測値
参照した文献はP.J. White, et al., Phys. Med. Biol. 51 (2006) 2293–2305

図13(B)は実測値比較である。Whiteらは頭蓋骨に対し600kHz以上の周波数のみを測定し、超音波透過率の周期的変動は観測されなかった。一方、我々の骨ファントムを用いた結果では300kHz～700kHzの範囲で周波数増大による超音波透過率の減少は無く、大きな周期的変動のみが観察された。測定の重なっている周波数は600～700kHzのみであるが、両者の超音波透過率挙動の違いは明らかである。また、図13(B)でのデータは、本研究は単純な構造の骨ファントムにおける結果であり、Whiteらの結果はヒト頭蓋骨の結果であるが、以上のことより、「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」との従来の認識は、少なくとも500kHz周辺の中周波数超音波を骨厚が薄いこめかみ部分に照射する際には改めることが、必要に思われる。この「必要に思われる」という表現が「必要である」に変わるのには、単純な平板構造の骨ファントムでは無く、ヒト頭蓋骨において大きな超音波透過率変動が示されたときであり、以下の(3)で実施する。

(2)皮膚厚変化による超音波透過率変動

昨年度に、皮膚厚に相当するプローブとファントム間の距離を変化させると超音波透過率が大きく変動し、その変動が周波数変調超音波を用いることで顕著に小さくなることを報告したが、そのプローブとファントム間の距離は0～2.2mmの間の変化に限られていた。今年度は、現代日本人のこめかみ部の皮膚厚の平均値12mm周辺を検討すると共に、理論計算と比較した。500kHzの場合の計算結果を図14に、実測の結果を図15に示す。比較すると、計算の結果と実測の結果は、超音波透過率の極大極小を示す距離、超音波透過率の絶対値、変動周期のすべてにおいて極めて高い一致をみている。

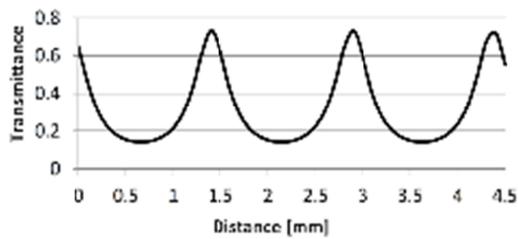


図14 皮膚厚相当距離を変化させた場合の超音波透過率の計算値。(骨厚：2mm、周波数：500kHz)

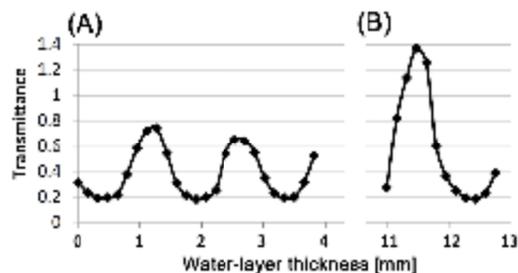


図15 皮膚厚相当距離を変化させた場合の超音波透過率の実測値。(骨厚：2mm、周波数：500kHz) (A)皮膚厚相当距離4mm未満、(B)皮膚厚相当距離12mm周辺以上の実験結果から、本研究で用いた計算法と骨ファントムによる実験が共に、有効かつ適切な方法であることが実証された。また、12mm付近の図15(B)では、プローブ内部の共鳴によって超音波透過率が1を越えてはいる点を除いては、図15(A)と類似性が極めて高く、同じ周期の変動を示した。皮膚厚は骨厚と主に、患者毎に異なるパラメーターであり、この値の違いによる超音波透過率変動は、臨床的に大きな重要性を有することをこの結果は示す。

この骨ファントムの結果を踏まえて、ヒト頭蓋骨片を用いて同様の実験を行った。結果を図16に示す。500kHzの正弦波を照射した実線のプロットでは、骨ファントムでの超音波透過率変動に比べると小さめではあるが、それでも2倍以上の超音波透過率変動が観察された。この実験では、皮膚厚に相当する距離は日本人の

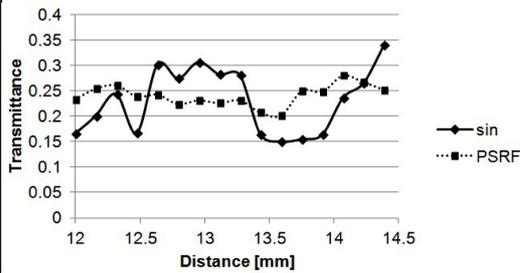


図16 ヒト頭蓋骨の骨片での透過率変動平均的な値の範囲で行っている。また、超音波透過率変動挙動もファントムの場合のように高度に規則的なものではなかった。骨の複雑な形状により、超音波が散乱・屈折する影響と考えられる。一方、周波数変調(PSRF, $500 \pm 100\text{kHz}$)をかけると、骨ファントムの場合と同様に顕著に超音波透過率変動が小さくなった。

以上のヒト頭蓋骨片を用いた実験結果から、ヒト頭蓋骨での超音波透過率測定を行うに当たり次の事柄が考察された。

- ・多数の測定点のデータを集積すること
- ・超音波が屈折しないで直進する測定点を探すこと
- ・測定点の選び方をシステム化すること
(再現性のある測定点選択法の確立)

以上の事柄を踏まえてヒト頭蓋骨標本による測定を行った。

(3) ヒト頭蓋骨の超音波透過率測定

ヒト頭蓋骨のデータを蓄積するに当たり、これまで余り注意を払っていなかったバースト波の照射条件について検討を加えた。

超音波照射には連続波とバースト波の2種類の方式があり、血栓溶解性能、発熱、生体に対する障害作用などを検討して、選択させるがこれまでの慈恵医大の研究・開発では連続波で行われてきた。よって、今後より良き方式としてバースト波が選ばれる可能性はあるものの、連続波での結果が基準となることには疑いは無い。一方、ハイドロフォンによる超音波強度の測定は、バースト波で行われる。ハイドロフォンはその構造上、

極めて脆弱であるために、連続波の測定を続けることが難しいためである。

また、周波数変調では500kHzの5周期分の10 μs 毎に周波数切り替えをする条件を中心的に検討しているが、その中で1 μs 毎の周波数切り替えの場合に比べて、超音波透過率変動挙動の周期性が低いことが観察された。この観察事項は、バースト波の場合に、超音波発信が安定しない状態があることを示唆した。そこで、オシロスコープによる波形観察と、ハイドロフォンによる超音波強度測定を組み合わせ、観測条件の最適化を実行すると共に、連続波とバースト波の差異について検討を加えることとした。

図17に500kHzのバースト波のオシロスコープ像を示す。左からの時間経過を見ると、発信初期の赤い矢印時間帯では強度が安定していないことがわかる。一定時間が経過した青色矢印の領域になると強度が安定する。ハイドロフォンでの測定条件にPhaseがある。バースト波の発信からどのくらい遅れて受信を開始するかを規定する。10 $^\circ$ で10 μs の遅れとなる。これは500kHzでは5波長分に相当する。表現法はマイナスを伴い、-10 $^\circ$ で5波長遅れての受信開始、-60 $^\circ$ で30波長遅れての受信開始を意味する。

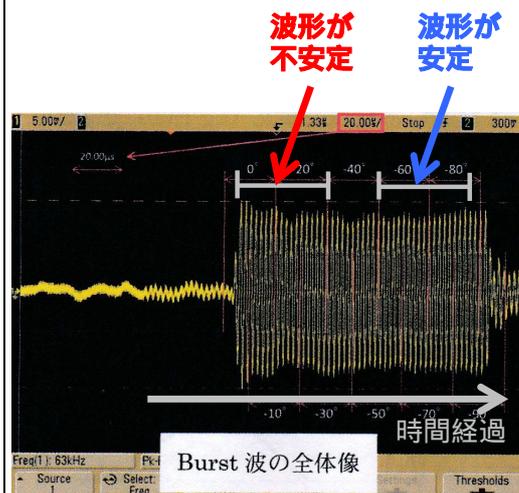


図17 500kHz超音波のオシロスコープ像

このPhaseを-10°から-80°まで変えて、頭蓋骨での超音波透過率を皮膚厚相当の距離を変えて測定し、連続波の場合と比べたのが図18である。-10°から-30°までの遅れが小さい条件では、超音波透過率変動が連続波に比べて著しく小さくなっている。これは、不安定な超音波発信が原因である。Phaseを-40°から-80°に設定すれば、超音波透過率変動挙動は安定し、連続波に近いものとなる。(連続波の-10と-80°とは完全に重なっている)この結果から、パースト波の観測のPhaseを-50°よりマイナス側に設定することで、安定な測定が得られ、その結果は連続波の結果と見なすことができることが判明した。以降の頭蓋骨の測定は、すべてこのPhase条件を満たすことで安定な結果を得ることができた。

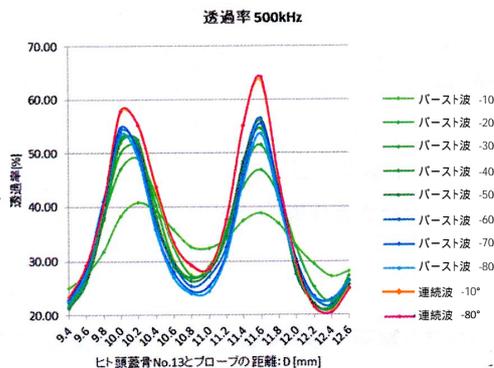


図18 観測Phaseの角度を変えた場合の超音波透過率の挙動

測定ポイントの設定

井口のカラー Doppler の臨床的経験から頭蓋骨こめかみ部に測定候補点を3点設定した。この候補点から、B. 研究方法の(3)に記述した方法で、骨による屈折の影響のない、測定ポイントを設定した。一例としてNo.13の右側の場合を図19に示す。青色のR1'~R3'が候補点で、赤色のR1~R3がそこから導き出された測定ポイントである。

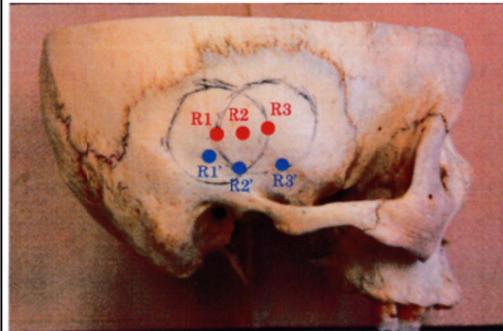


図19 測定ポイントの設定(No.13頭蓋骨)青色が候補点で、赤色が測定ポイント

候補点から測定ポイントまでの距離は以下のようになっている。

- ・ R1' -R1: 7mm
- ・ R2' -R2: 11mm
- ・ R3' -R3: 14mm

この測定ポイントを探す過程は、臨床でカラー Doppler の超音波プローブを動かしながら最も信号が強く出る点を探す過程と同じように考えられるが、用いる周波数が異なるので現段階では確定的ではない。

図20に示す様に、この各測定ポイント(中心の赤色の丸)から上下に2mmずらした点の4点(白抜きの点)を含めて5点で測定を行った。すなわち、一つの頭蓋骨の片側で3x5=15点の測定を行った。2つの出発点から1つの測定点に収束したり、頭蓋骨切断面の延長上に測定ポイントがある挙動などを取ることもあり、一つの頭蓋骨の片側で15点よりも少ない数の測定となることもあった。

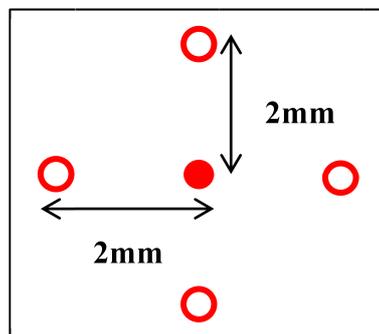


図20 測定点の設定

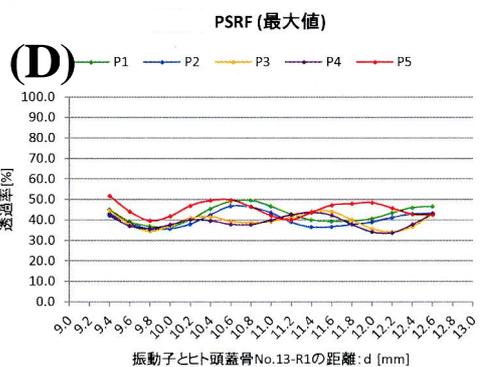
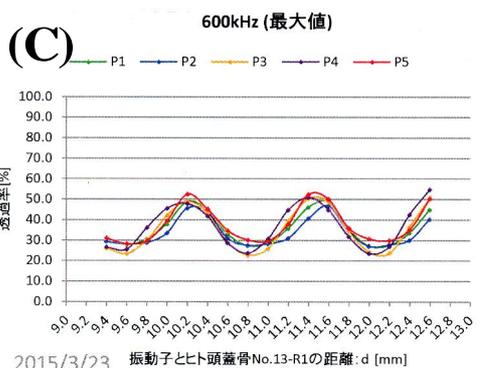
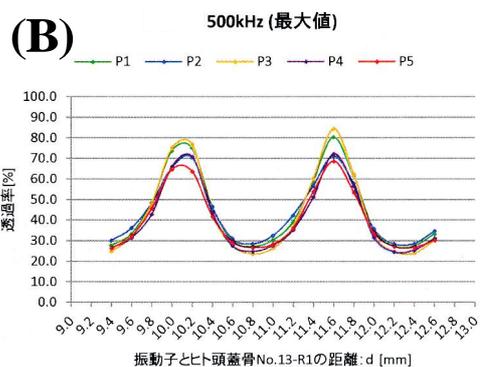
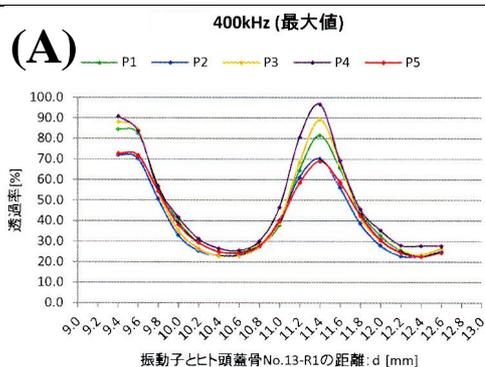


図21 皮膚厚による超音波透過率の変動
(頭蓋骨No.13、R1測定ポイント)
(A)400kHz正弦波、(B)500kHz正弦波、
(C)600kHz正弦波、(D)500 ± 100kHzの周
波数変調波(PSRF)

頭蓋骨超音波透過率の変動

上記の過程を経て設定した測定点につ
いて、

- (1)皮膚厚に相当する超音波プローブ表面
と骨表面の距離を11.0mmから前後2.0mmで
変化させる、
- (2)400kHz, 500kHz, 600kHzの正弦波と500
± 100kHzの周波数変調波を比較する
の検討を行った。

(超音波は10 μsのバースト波) No.13の
頭蓋骨のR1測定ポイントの結果を図21に示
す。P1は中心の測定ポイントであり、P2～
P5はP1から上下左右に2.0mm離れた測定点
である。

- (a)頭蓋骨においても相当大きな超音波透
過率変動が観察された。400kHzでは最
大で3.8倍もの強度差があった。
- (b)一つの測定ポイント(P1)の周辺の4つの
測定点(P2～P5)では似た変動を示した
。正弦波の(A)～(C)では超音波透過率
の極大や極小を示す皮膚相当距離はど
の点でもほぼ同じであった。極大の超
音波透過率に差があるものの、大きな
変動を示すことにおいてはどの点も同
じであった。

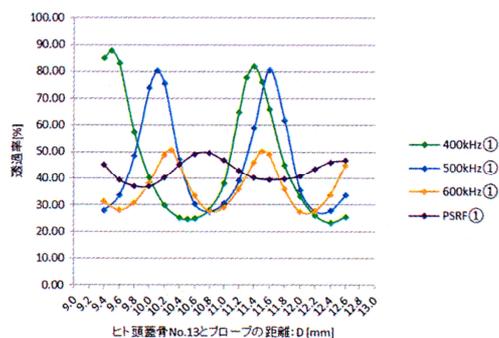


図22 超音波種類による超音波透過率変
動の比較(頭蓋骨No.13、R1測定ポイント
, P1測定点)
(緑)400kHz正弦波、(青)500kHz正弦波、
(黄)600kHz正弦波、(紫)500 ± 100kHzの周
波数変調波(PSRF)

2mm離れた5つの点の測定を行った意味は、臨床においては常に最適な点から照射位置がずれる可能性を考慮したことである。以上の結果は、頭蓋骨超音波透過率の変動が、超音波プローブの極めて特殊で狭い範囲の場所に設置された希な場合に起きる現象ではなく、常時起こる現象であることを示している。

(c) 超音波透過率変動の大きさは400kHz > 500kHz > 600kHz > PSRF変調波となっている。図22には測定点P1における各超音波の変動を比較した。超音波透過率が極大や極小になる距離が周波数によって異なっていることがわかる。次に、比較的観察された変動が小さかったNo. 13頭蓋骨のL2 (=L3, 2つの候補点からの選択過程で1点に収束した)の超音波透過率変動を図23に示す。

- ・先のR1に比べて全体的に超音波透過率は低めであり、変動も小さい。
- ・周波数の比較では、600kHzが最も超音波透過率変動が大きい点がR1と異なっている。
- ・400kHz, 500kHz, 600kHzの正弦波に比べてPSRF変調波が最も超音波透過率変動が小さいことはR1と共通している。

以上の図21～図23で代表例を示した超音波透過率透過率の変動をまとめたのが表1 (No.13)と表2 (No. 4737とNo. 4759)である。

各測定ポイント (No. 13のL1など) 毎に5つの測定点があるが、表にはその5点の中で最大超音波透過率と最小超音波透過率の比が最も大きかった1点を選んでいる。超音波照射の有効性と安全性という観点からは、この比が大きい場合に注意を払う必要があるからである。また、平均値は最大と最小の平均ではなく、表記した測定点のすべての超音波透過率の平均である。比は、表記した最大値と最小値の比である。

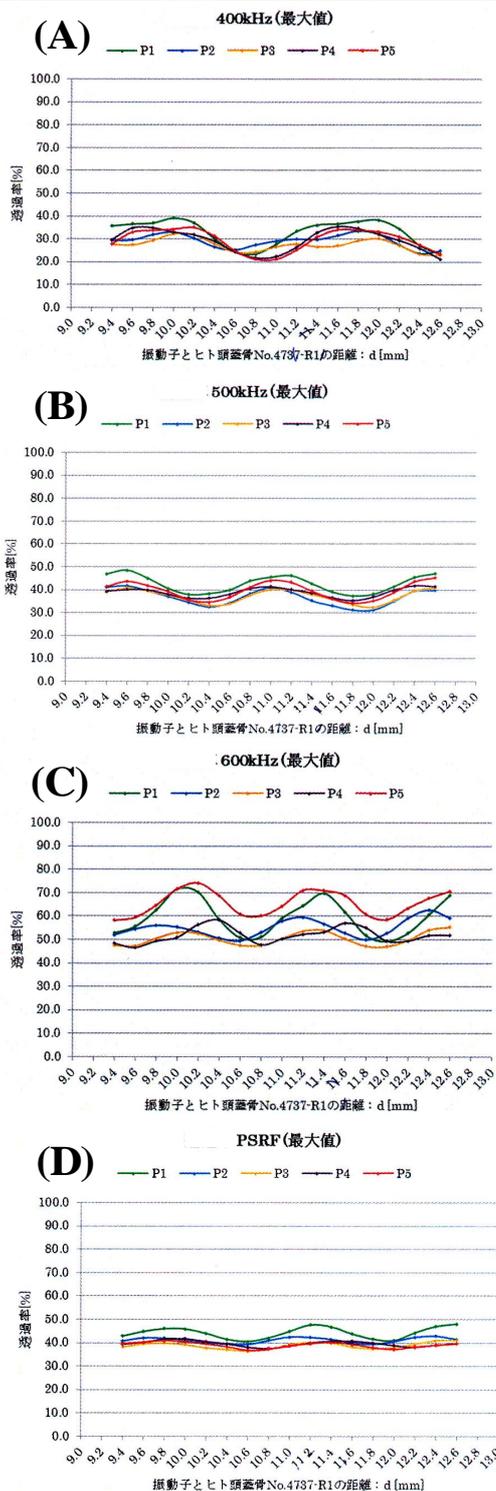


図23 皮膚厚による超音波透過率の変動 (頭蓋骨No.4737、R1測定ポイント)
(A)400kHz正弦波、(B)500kHz正弦波、
(C)600kHz正弦波、(D)500 ± 100kHzの周波数変調波 (PSRF)

表1 No.13頭蓋骨の超音波透過率変動

頭蓋骨		No. 13				
測定ポイント		R1	R2	R3	L1	L2
400kHz	最大値	96.8%	63.6%	57.0%	90.2%	38.0%
	最小値	22.7%	23.8%	27.8%	21.4%	19.8%
	平均値	44.8%	40.9%	39.4%	40.9%	28.8%
	比	4.26	2.67	2.05	4.21	1.92
500kHz	最大値	84.5%	64.4%	34.8%	61.8%	31.0%
	最小値	23.7%	27.3%	19.6%	24.6%	16.9%
	平均値	42.6%	42.6%	26.6%	38.7%	21.8%
	比	3.57	2.36	1.78	2.51	1.83
600kHz	最大値	54.7%	60.8%	32.9%	67.4%	37.8%
	最小値	22.8%	25.0%	19.0%	37.4%	15.6%
	平均値	36.0%	43.2%	25.9%	52.5%	25.6%
	比	2.40	2.43	1.73	1.80	2.42
PSRF	最大値	51.7%	57.6%	35.9%	51.8%	35.6%
	最小値	33.8%	31.5%	26.1%	34.2%	20.4%
	平均値	41.4%	44.7%	30.9%	41.7%	27.6%
	比	1.53	1.83	1.38	1.51	1.75

注) L3はL2と同一の測定ポイントに収束した。

表2 No.4737とNo.4759頭蓋骨の超音波透過率変動

頭蓋骨		No. 4737			No. 4759			
測定ポイント		R1	R3	L2	R1	R2	R3	L1
400kHz	最大値	39.1%	7.8%	37.8%	33.9%	27.9%	17.4%	62.4%
	最小値	21.2%	2.8%	24.3%	9.5%	17.8%	12.4%	39.6%
	平均値	29.7%	4.7%	31.3%	17.5%	22.4%	15.3%	45.7%
	比	1.84	2.79	1.56	3.57	1.57	1.40	1.58
500kHz	最大値	48.5%	3.0%	50.7%	25.9%	15.4%	19.5%	42.2%
	最小値	31.3%	0.8%	27.2%	5.1%	8.9%	12.7%	27.3%
	平均値	39.0%	1.6%	38.1%	12.0%	12.0%	16.9%	35.3%
	比	1.55	3.75	1.86	5.08	1.73	1.54	1.55
600kHz	最大値	74.1%	2.2%	57.6%	14.1%	10.6%	12.3%	36.4%
	最小値	46.5%	0.6%	33.9%	6.9%	6.1%	7.4%	17.2%
	平均値	56.4%	1.3%	45.8%	10.0%	8.9%	9.7%	24.5%
	比	1.59	3.67	1.70	2.04	1.74	1.66	2.13
PSRF	最大値	48.2%	2.6%	47.3%	19.4%	12.3%	24.4%	51.3%
	最小値	36.4%	0.7%	29.0%	9.4%	9.6%	16.9%	36.6%
	平均値	40.6%	1.6%	37.6%	12.8%	11.2%	19.6%	44.3%
	比	1.32	3.71	1.63	2.06	1.28	1.44	1.40

注) No. 4737のR2はR1と同一の測定ポイントに収束した。No. 4737のL1は切断頭蓋骨の範囲に測定ポイントが得られなかった。No. 4737のL3はL2と同一の測定ポイントに収束した。No. 4759のL2とL3は未測定。

表1と表2の合計12の測定ポイントの平均値と比の平均と標準偏差をまとめたのが表3である。

表3 頭蓋骨の超音波透過率変動の比較

	透過率	比
400 kHz	35.1 ± 13.8 %	2.45 ± 1.05
500 kHz	31.5 ± 14.9 %	2.43 ± 1.13
600 kHz	38.4 ± 24.6 %	2.11 ± 0.58
PSRF	36.5 ± 18.0 %	1.74 ± 0.66

注) 値は平均 ± 標準偏差で表示

表3では、PSRF変調とすることにより超音波透過率の比(最大値と最小値の比)が正弦波のどの周波数の場合よりも小さくなっていった。500 ± 100 kHzのPSRFの中心周波数である500kHzの正弦波と対応するt-検定で比べるとp<0.05と有意に最大と最小超音波強度比が減少したことがわかる。周波数変調超音波を用いれば、頭蓋骨を透過して脳組織に照射される超音波強度の変動を小さくし、より安全で有効な超音波血栓溶解促進療法の実現に結びつくといえる。次に、超音波透過率と照射部位の骨厚との比較を試みた。骨厚は、狭い部分の厚みを計測できるマイクロメーターを用いたが、首尾良くマイクロメーターを挿入して計測できたのは5点であった。以下のその数値を表4にグラフを図24に示す。

表4 骨厚と超音波透過率の関係

測定ポイント	骨厚(mm)	平均超音波透過率(%) ^{注1)}
No.13 L1	1.77	34.2
No.13 L2	1.37	20.4
No.4737 R1	1.13	40.6
No.4737 R3	1.94	1.6
No.4737 L2	2.12	37.6

注1) PSRFの平均値

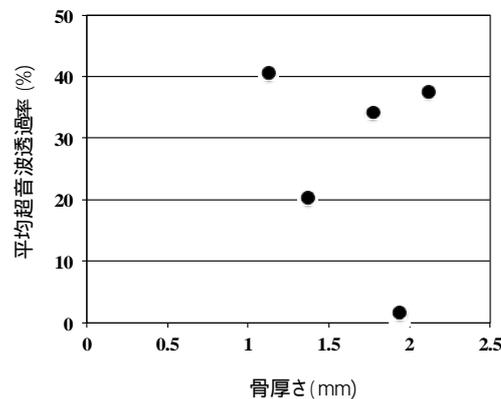


図24 骨厚さと超音波透過率の関係

図24を見るとプロット数は少ないものの、骨の厚さと超音波透過率の相関は無いように見える。尚、平均超音波透過率としては PSRFの平均値を用いた。表1及び表2から見て取れるようにPSRFの値が各測定ポイントの全般的な超音波透過率の大小を良く表現しているからである。

この結果からも従来は「常識」と考えられた「超音波透過率は骨が厚くなるほど小さくなる」ということが正しくなく、周波数や皮膚厚などによって変動する要素の方が支配的であり、安全で有効な超音波照射を実現するためにはより重要な要素であると言える。

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モデル実験を行い、ヒト頭蓋骨の実測をおこなった。そして、超音波透過率の変動することと、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、超音波透過率が平均35%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重要な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。

超音波血栓溶解促進療法に用いる経頭蓋超音波において、変調駆動は、当初は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、超音波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: *Ultrasonics* 59 (2015) 94-101.

2. 学会発表

- 1) Osamu Saito, Zuojun Wang, Hidetaka Mitsumura, Takeki Ogawa, Yasuyuki Iguchi, Masayuki Yokoyama: Equalization of transcranial ultrasound Transmissivity by random modulation: 19th meeting of European Society of Neurosonology and Cerebral Hemodynamics. 2015年5月ローマ(イタリア)
- 2) 横山 昌幸、齋藤 理、王 作軍、小川 武希、三村 秀毅、井口 保之、「超音波頭蓋骨透過率の大きな変動と変調による平準化」第40回日本脳卒中学会総会 2015年3月広島

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及びヒト血漿血栓を用いて、測定精度が高い効率的な2D式超音波血栓溶解評価システムを開発し、ヒト血漿血栓に対しての超音波促進能を評価した。本研究はさらにヒト全血を用いて、シート状な均一なヒト全血血栓の作製及びその厚さ検出法を確立した。さらに、これらの技術を利用して、超音波パラメーターのヒト全血血栓溶解促進作用に及ぼす影響を解析した。

A. 研究背景と目的

WHOの統計データによると、世界で毎年およそ1500万人が新規に脳卒中に罹り、その中、500万人が死亡、500万人が身体に障害が残る。脳卒中のおよそ67 - 87%が虚血型で、病因はほとんど血栓に由来する。血栓で閉塞した重要血管の再開通の可否及び再開通までの経過時間が急性期脳梗塞患者の予後のカギである。急性期脳梗塞患者に対して、現在まで、FDA、欧州、及び日本で許可されている唯一の血栓溶解治療薬はrecombinant tissue plasminogen activator (rt-PA)であるが、その治療効果はいまだに十分とは言えない。例えば、再開通率は内頸動脈閉塞に対してわずか10%で、大脳中動脈閉塞の場合でも30%位に留まっている。しかも、rt-PAの投与によって脳内出血のリスクは有意に増大している。

このrt-PAの血栓溶解治療効果を高める医療として期待されているのが、超音波照射を併用することによるrt-PA血栓溶解促進技術である。In vitro、in

vivo動物実験で、超音波照射が血栓溶解を促進させることが実証されていて、一部臨床試験においても脳血管再開通率の向上が観察されている。ただし、照射する超音波にはパラメーター（周波数、強度、波形、パルス長さ、duty cycle、ビーム太さなど）が多くて、現時点でも血栓溶解促進に最適な超音波条件は判明していない。

現在、超音波血栓溶解促進作用の評価法として血栓重量法、アイソトープ法、FDP法、顕微測量法などがあり、各々利点もあるが、問題点もある。例えば、最も常用されている重量法では、重量を測定する前後に血栓を移動する際の機械的介入、付着した水分の除去など人為的誤差が大きい。しかも血栓重量の変化率は血栓の形、大きさ、表面積などに依存し、違う形の血栓同士の比較は難しい。さらに、血栓表面の各部分が受ける超音波照射強度は通常異なるから、超音波強度と溶解促進率の間の正確な関係は把握しにくい。

また、以上に述べた手段はほとんど一つの血栓から一つのデータしか得られないため、超音波強度と溶解促進率の関係解析には多数回の実験が必要で、実験の効率が悪い。それで、我々はウシ及び血漿から作製した血栓を用いて新しい2D式超音波血栓溶解評価法を開発した。この新方法では、照射前後ごとに一つのシート状血栓から、百個単位の関心領域 (Region of Interest, ROI) から血栓厚さのデータを取得可能で、各領域の血栓厚さ変化と照射強度を対応させることで、超音波照射強度と血栓溶解促進率の関係を効率よく分析できる。しかも、血栓の厚さを分光学的に計測するために、機械的介入の懸念がなく、測定精度も高い。よって、従来法に比べて測定の精度と効率の両者ともに大幅に向上させることができた。

しかし、血漿血栓の溶解特性は必ずしも全血と一致しないと考えられる。本研究はヒト全血を用いて、安定かつ均一なヒト全血血栓の作り方を検討した。続いて、ヒト全血血栓の吸光特徴を分析し、血栓の厚さの安定した測定ができる検出波長を見出した。さらに、この最新技術を利用して、開発中の経頭蓋超音波の各種パラメーターとヒト血栓溶解促進作用との関係を解析した。特に、超音波強度及びDuty Cycleの影響を検討した。

B. 研究方法

(1) 血栓セル

超音波照射強度と溶解促進の程度との関係を定量的に解析するため、超音波音場への影響がほとんど生じない血栓セルを開発した。このセルは一对のアルミフレーム (外枠 80mm×80mm、開口部 50mm×50mm) を含んでいる。そのうち

の一つは厚さ1mmでカバーフレームとし、もう一つは厚さ2mmで本体フレームとする。カバーフレームの裏側に厚さ25 μ mのポリプロピレン (PP) フィルムがセルの前壁として貼ってあり、主体フレームの裏側には1mmのシリコンのインサート及び50 μ mのポリスチレン (PS) フィルムが貼ってある。この PS フィルムがセルの後壁とする。蓋フレームと主体フレームを二つのクランプで固定すれば、PPとPSフィルムの間に厚さ3mm、広さ50mm×50mmの血栓溶解空間が得られる。

(2) 血栓作製法

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

血栓セル本体の上、PPフィルム (40mm×40mm×25 μ m (厚さ)) がシリコンスペーサーと平行棒の支持下で底膜 (PSフィルム) から1.5mmの所にかげられた (図1)。この PPフィルムとPSフィルム間に血栓形成用混合液 (抗凝固剤CPDA-1添加ヒト全血 + 0.4M塩化カルシウム + 20NIHU/ml牛トロンピン、比例18:1:1) を2.3ml入れ、室温5分間後37 $^{\circ}$ C湿気ボックスに入れて30分で成熟させた後、PPフィルムを外して、シート状全血血栓がセル本体のPSフィルム上に作製できた。

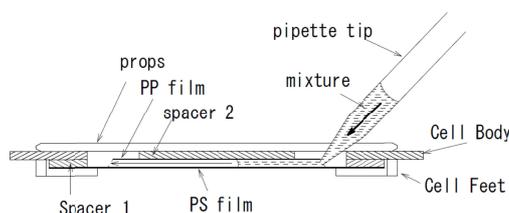


図1 血栓作製法 セル本体とその上にかげたPPフィルムの間にトロンピン添加した血液混合液をピペットで注入。

(3) 血栓吸光spectrum及び厚さ測定
 血栓吸光度spectrum及び厚さは微小部位マッピング装置(日本分光株式会社)を用いて測定した。(図2)

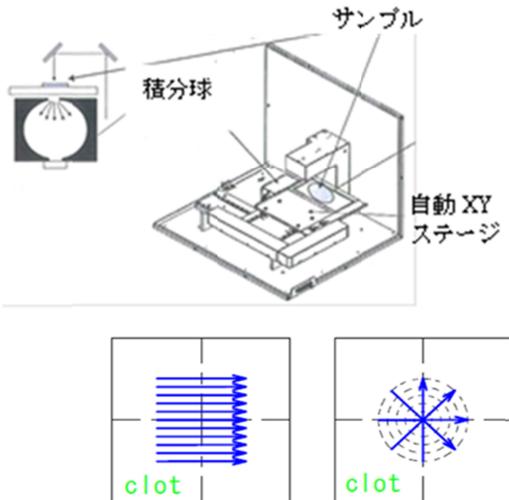


図2 微小部位マッピング装置

図2上に示す様に分光した光ビーム開口と光センサー(積分球)の間に自動XYステージが設けてある。血栓セル(サンプル)を自動XYステージに乗せ、コンピュータのコントロールで移動させて、その各関心領域(ROI)のspectrum及び吸光度を測定できる。これと事前に測定した検量線と照合すれば、各領域の血栓の厚さが分かる。図2下に示すように、自動XYステージは必要に応じ格子状(検量線セルの場合)または放射状(サンプルセルの場合)スキャンができる。

(4) 検量線作成

検量線用セル(図3)の上下2層の透明PSシートの間楔状の空間が設けてあり、そこに血栓形成用混合液を入れて、普通の血栓セルと同様な条件下で楔状の血栓を作成した。検量線用セルを上記血栓厚さ測定装置に乗せて図2下左に示す様に横方向にスキャンし、各々の厚さの血栓と蒸留水での吸光度測定値の差分をとり、各厚さに対応する血栓吸光度が求められた。

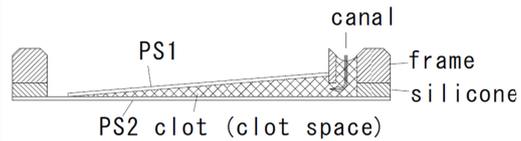


図3 検量線セル構造

(5) 超音波照射

超音波照射台に固定したプローブと血栓セルステージの位置関係と距離はXY及びZステージ(中央精機)で任意に調整可能で、且つプローブの先端を血栓の中心軸上にしっかりと固定できるようにデザインした(図5)。また、同時に超音波暴露血栓、非暴露血栓を同時に検証できるようにした。超音波照射は、37℃の水槽内にプローブ先端を水面より2mm程度沈めて照射を行った。その際、超音波の反射を防ぐため、水槽底面には10mmの専用超音波吸音材(EUA201A型, EASTEC社)を2枚敷いた。

使用した超音波振動子の音場分布及び血栓セルの音場への影響をAcoustic Intensity Measurement System (AIMS Onda Corporation, Sunnyvale, CA)を用いて測定した。

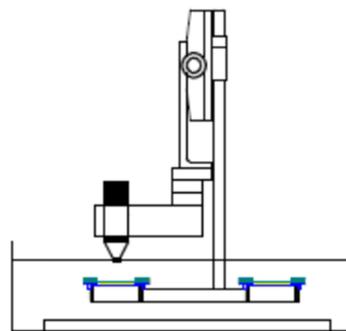


図4 超音波照射装置

(6) 統計学的評価

本研究は、超音波音場の対称性を利用し、セル中心から同じ距離の測定ポイントを1組とした。データはmean ± SDで表示した。超音波照射の有効性はDunnett法を用いて検定し、 $p < 0.05$ を有意とした。

C. 結果

(1) ヒト全血血栓のスペクトル測定

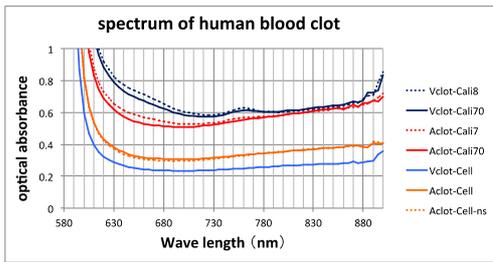


図5 酸素飽和度の全血血栓のスペクトルへの影響

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

(2) ヒト血栓厚さ検量線

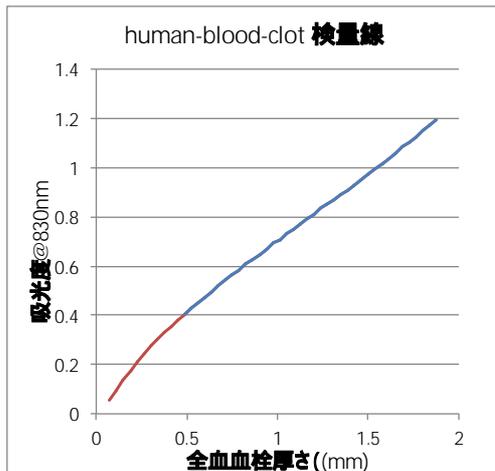


図6 キャリブレーション@830nm

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

(3) 超音波強度と全血血栓溶解促進能の関係（1時間溶解実験）

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

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

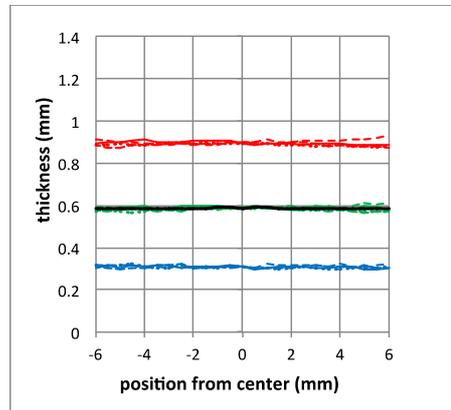


図7A 超音波なし

次に中心位置での強度が8W/cm²の大変強力な超音波照射を行うと図7Bに示す様に、黒線が凹の形となり、超音波強度が強い箇所では血栓溶解深度が浅いという奇妙な結果となった。

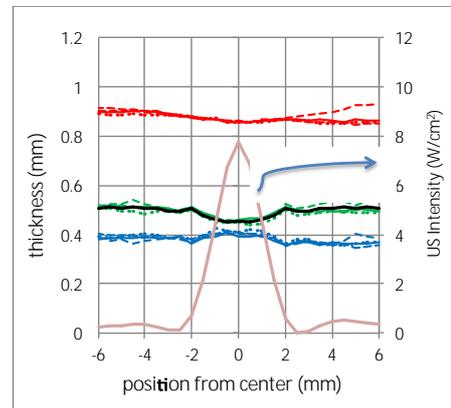


図7B ~8W/cm²強い超音波照射の場合

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

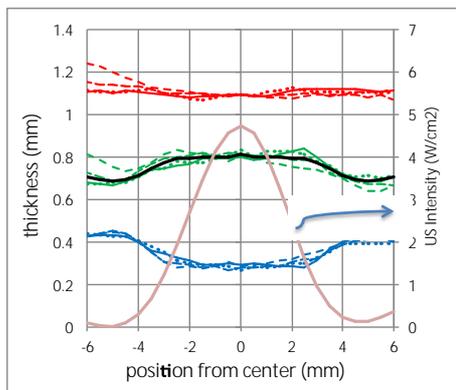


図7C $\sim 5\text{W}/\text{cm}^2$ の超音波 (照射中心での増強率 = 18.3%)

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

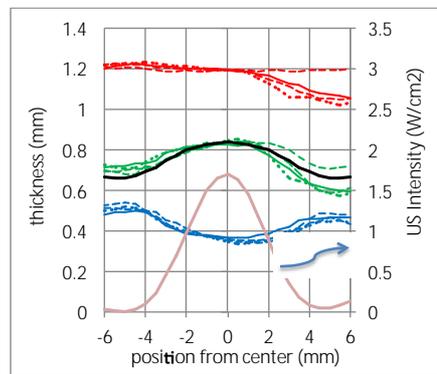


図7D $\sim 1.7\text{W}/\text{cm}^2$ の超音波
増強率 $\sim 26.4\%$ 、 $\sim 5\text{W}/\text{cm}^2$ より高かった

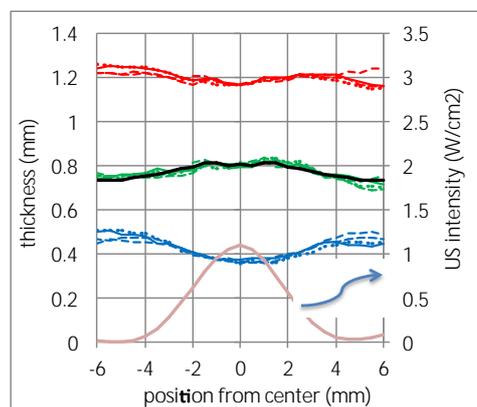


図7E $\sim 1.1\text{W}/\text{cm}^2$ の超音波
増強率 $\sim 9.6\%$ 、かなり落ちた。

(4) 超音波DutyCycleのヒト全血血栓溶解増強効果への影響

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

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

新しい血液ロットBJ5091を使った。

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

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

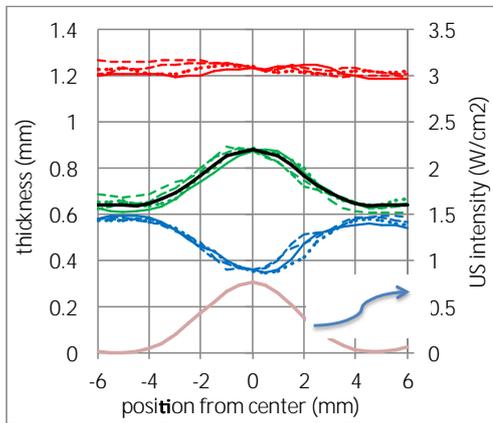


図8A Duty100% 増強率37.8%

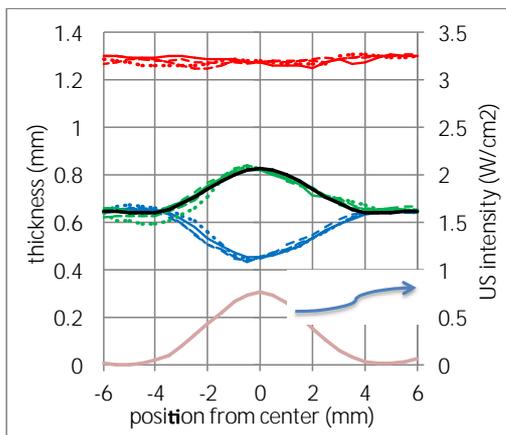


図8B Duty50% 増強率28.5%

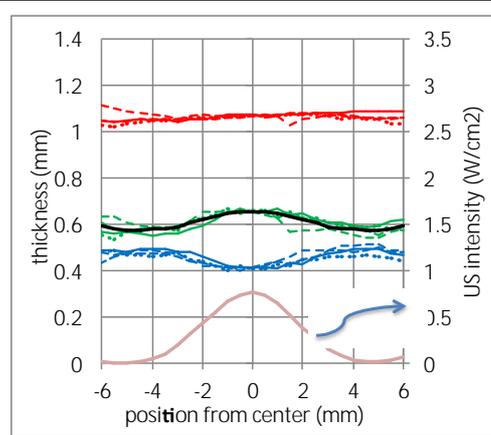


図8C Duty25% 増強率14.3%

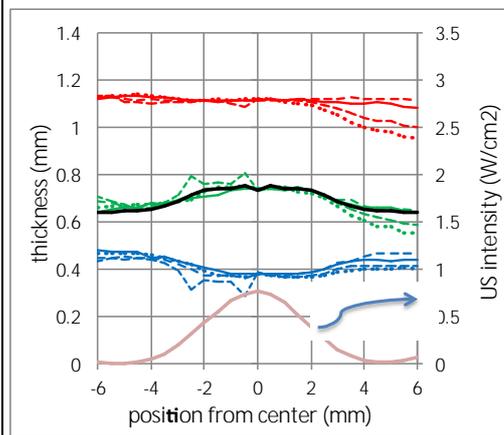


図8D Duty10% 増強率14.0%

(5) 連続波超音波各強度の比較 (30分間照射実験)

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

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

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

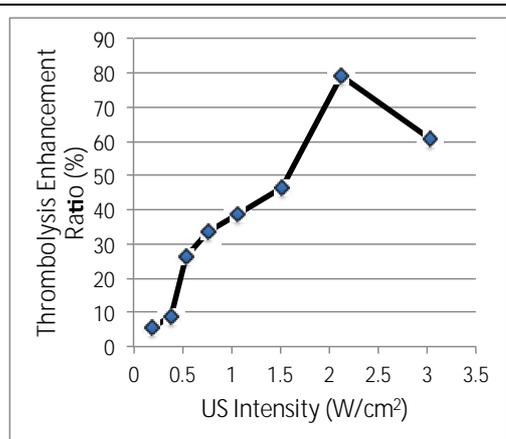


図9 連続波超音波各強度比較実験

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

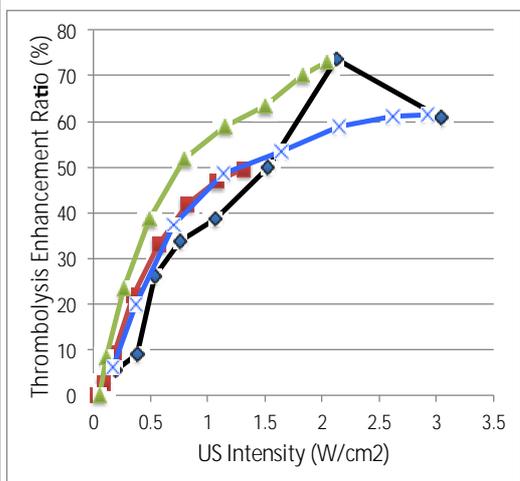


図10. 血栓溶解増強率中央部測定値と周辺部測定値の比較

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

D. 考察

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

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

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

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

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

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

超音波血栓溶解補助医療機器の製品化

研究分担者 株式会社カネカ 川島裕幸

研究要旨

塞栓性脳梗塞の治療にあたり、発症から4.5時間以内の非出血性梗塞であれば、rt-PA投与治療が施行される。しかし、rt-PA治療による予後良好例率は30%程度にとどまる。一方、rt-PA投与による予後良好率は、診断用超音波を併用することで向上することがアレキサンドロフらによって報告された。本研究は、2018年度に超音波の血流再開の改善効果を誰もが簡便に享受しうる補助医療機器の製品化を目指す。

A. 研究目的

急性脳梗塞の治療にあたり、発症から4.5時間以内であり、MRI、CTなどで出血がない梗塞性脳卒中を確認した場合、血栓溶解目的にrt-PAの静脈投与は第一治療選択となっている。しかしながら、rt-PA治療の予後成績であるmRS0-1の割合は、残念ながら30%程度にとどまっている。また、予後状態は血流再開までに要する時間が大きく影響することから、再開通率を向上させることは重要で、血管に損傷を与えずに短時間で血流再開を実現することは、患者の予後にとり極めて高い要求事項となる。さらに、予後の改善率向上は、患者のみならず、患者周辺の介護の担い手、そして医療経済の面からも求められていることから、搬送スタッフを含めた現場医療スタッフらは、1分でも早い血流再開を得るため、早期治療開始を実現すべく、体制整備、緊急対応スキルの向上に取り組んでいる。

rt-PA投与が薬事承認を受ける以前の医療現場では、早期血流再開、ならびに再開通率の向上させる方法として、医師判断により塞栓部血栓にマイクロカテーテルなどを用いてウロキナーゼ等の血栓溶解薬を直接血栓塞栓部位に投与する方法の他、脳血管拡張用バルーンを塞栓部位に進めた後、血栓を破砕する方法が取られていた。2010年には、血栓を掻き出し回収するデバイスの『Merci』が承認取得され使用されている他、2012年に血管内で血栓を粉碎しながら吸引除去する『Penumbra』が承認を受け臨床使用が開

始された。

これら血管内治療機器の活用は、ホノルルで開催された学会での臨床研究結果報告にて、インターベンションによる再開通率の改善は認められたものの、出血の増長傾向や、最終目的である予後改善においては未だ改善に有効な結果が得られていない旨、報告がなされた。しかしながら、2014年新たに承認されたステント様メッシュの血栓回収用血管内治療デバイス『ソリティア』『Trevor』は治療成績の改善に有望視されていたが、再開通のみならず予後改善が実証された旨、臨床研究結果として報告された。

以上から、血管内治療による血栓摘出術も有力な治療選択肢として加わり、rt-PA投与後、もしくは投与不可判断症例のために血流再開不可であった場合は、血流再開に血管内治療のコンバイン治療が拡大している。しかしながら、脳血管内治療は実施可能な医師、施設が未だ限られているうえ、治療開始までの時間を要することから、全国で発生しうる脳卒中患者の一次救急は、依然rt-PAの静脈投与治療が第一選択となっている。

rt-PAより血栓溶解効果を改善が高い新薬開発も進められているが、未だ上市には至っていない。その中2004年、V. Alexandrov（米）らは、New England J. Med. にrt-PAの血栓溶解治療の際、診断用超音波を併用照射することでrt-PAの血栓溶解効果を高め、rt-PA投与開始から15分以降の観察時間で血流再開通率の向上を得ること、ならびに予後が改

善したことを報告した。

一方、2005年、Daffertshofer (独) らが、超音波の効果を高めるべく頭蓋骨を透過しやすく、また確実に照射できることを目的に、rt-PA投与中ならびに投与終了後30分の総計90分間に300kHzの超音波を照射する臨床研究を実施した。しかしながらDaffertshoferの臨床トライアルは、26例を計画するも14例時点において5例(35.7%)の患者に症候性出血を発症、さらには死亡例も経験したことから、臨床研究は途中で中止した旨報告している。この報告は、超音波を照射することのみに主眼を置いたため、診断装置の通常照射強度の0.72 W/cm²を大きく上回る14~28 W/cm²といった強い超音波が照射された結果、キャビテーションが発生し、脳実質、血管に傷害を発生させたことを古幡博が、最新医学 第63巻 第7号:91-102,2008.で考察している。

2008年J.Eggers.らがStrokeに診断用超音波を経頭蓋骨照射併用することで、投与開始から15分以降60分までの血流再開率が改善することを報告している。特筆すべきは、24時間後の血流再開率は超音波の照射有無による差異は見いだせなかったものの、診断用超音波照射群の予後が著しく改善していることである。V. Alexandrov (米) の報告と併せEggers.が再び超音波照射併用によるrt-PAの早期血栓溶解が、予後改善の有用であることを報告した。超音波照射が普及しない背景として、目的血管検出の難しさ、見出した目的血管に超音波を持続照射の難しさの2つの課題があり、一般治療への適用に至っていない。

そこで本研究は、梗塞性脳卒中患者の側頭部に超音波振動子を高度な技術を要せず貼付装着することで簡便に超音波を中大脳動脈起始部周辺血管に照射し、rt-PAの血栓溶解を促進させ、患者予後を改善する補助医療機器の開発を目指す。

【平成26年度の具体的な目標】

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

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

である。

B. 研究方法

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

1) 全血血栓の超音波溶解加速性評価

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

1-1) ヒト血でのrt-PA濃度相関評価

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

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

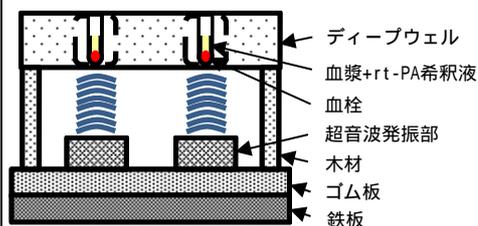
キュベットをシェーカーで攪拌しながら 37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートし、rt-PA 添加後 30 分、60 分、90 分時に血漿を採取し、先の Blank サンプルと共に各サンプルに 35 μL の生理食塩水と 50 μL の 2.0% SDS 溶液をマイクロプレートのウェル内で混注し、吸光度を測定した。90 分時のサンプル採取後、血栓を全て溶解し、生理食塩水で 4 倍に希釈して吸光度を測定し全血栓量を算出した。

1-2) ブタ血での rt-PA 濃度相関評価

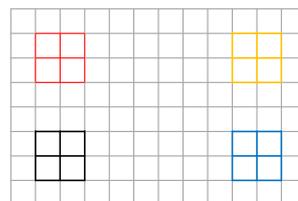
ブタ血でヒト血と同方法で rt-PA 濃度を検討した。使用するブタ血は、医療用動物実験を扱う企業から血液を使用する当日に新鮮なブタ静脈血を吸入麻酔下腋窩静脈より採血し、使用直前まで保冷剤にて保冷して使用した。

1-3) 血栓溶解加速評価試験

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



【図1：血栓溶解試験 模式図】



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

【図2：96穴ディーププレート試験群配置図】

2) 超音波安全性評価

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

2-1) モデル作製方法

血栓の作製

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

血栓による脳梗塞モデルの作製

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

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

2-2) 超音波照射

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

薬剤の投与方法

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

超音波照射条件

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

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

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

【表1】

2-3) 測定及び評価方法評価項目

脳梗塞抑制作用 : 脳梗塞巣体積
 神経症状改善作用 : 神経症状スコア

脳梗塞巣体積の算出

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

神経症状の評価

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

3) 超音波振動子設計

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

4) 超音波振動子装着具設計

装着具の設計装着具は、救急現場において簡便に振動子装着位置を特定でき、さらに簡便な手順で装着可能であることが求められる。基本デザインを現場医師、スタッフらと検討作業を進め、簡便な装着性を有するか確認を行い、設計に反映した。位置決めと安定性の両立をさせる設計の目的をつけ、具体的に量産を行うための製造プロセスを構築し、製造方法を含めたデザインの手直しを進めた。ゲル加工を含め、製造プロセスを検討した。ゲル選定にあたっては、透過率が重要であり、AIMS音響強度測定システ

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

5) 超音波駆動装置設計

超音波要求仕様を確定させ、臨床で使用する駆動装置の設計を開始する。

C. 研究結果

1) 全血血栓の超音波溶解加速性評価

1-1) ヒト血での rt-PA 濃度相関評価

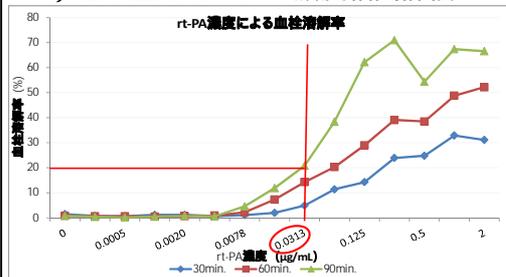


図3. rt-PA 濃度と血栓溶解率（ヒト血）

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

1-2) ブタ血での rt-PA 濃度相関評価

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

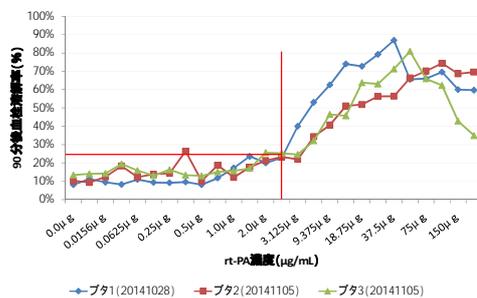


図4. rt-PA 濃度と血栓溶解率（ブタ血）

1-3) 血栓溶解加速評価試験

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

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

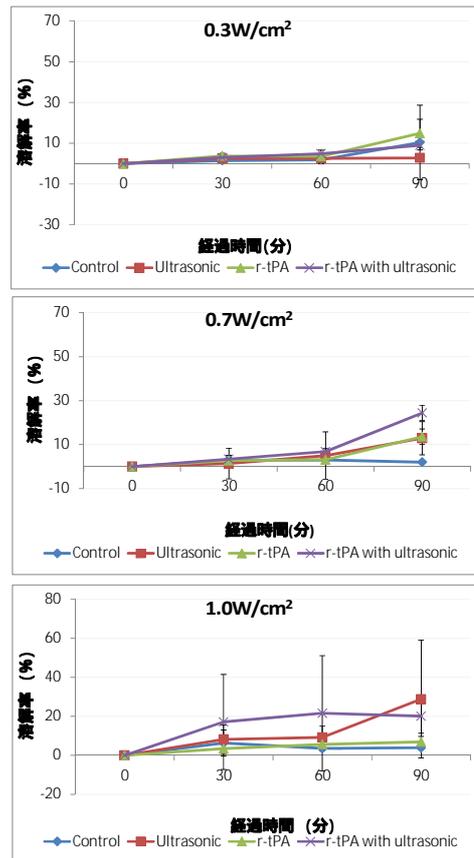


図5. 超音波強度と溶解率

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

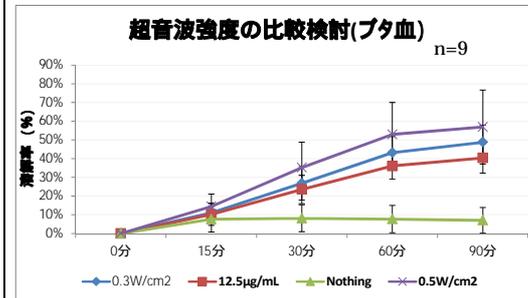


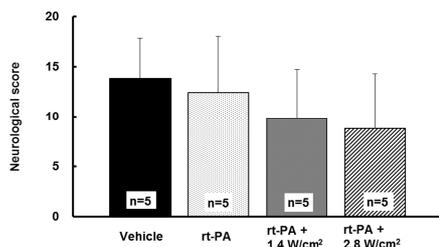
図6. 超音波強度による溶解率の比較（ブタ血）

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

2) 超音波安全性評価

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

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



【図7：超音波併用による神経症状】

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

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

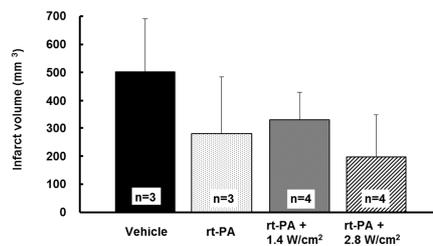


図8. 超音波照射と梗塞巣体積

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

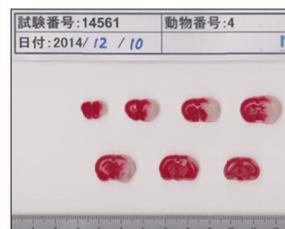


図9. 未処置群例

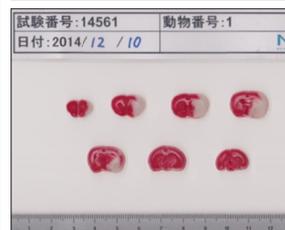


図10. rt-PA群例



図11. 2.8w/cm²群例

3) 超音波振動子設計

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

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

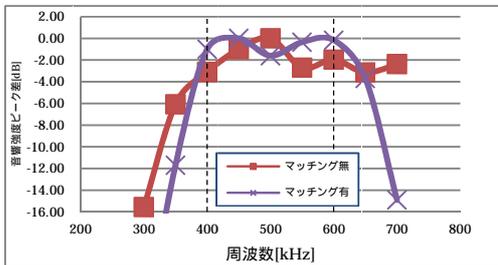


図12. 振動子音響強度特性

4) 超音波振動子装着具設計

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

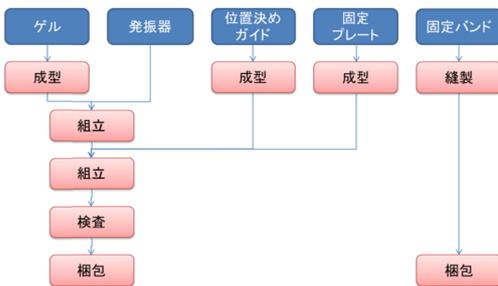


図13.(上)工程

図14.(左) 装着モデル

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

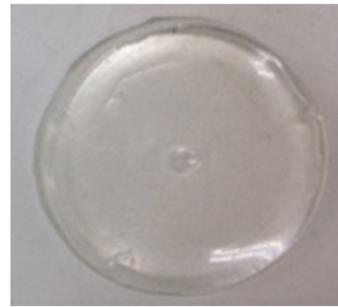


図15. 評価用ゲル

透過率は、測定結果を図16に示す。

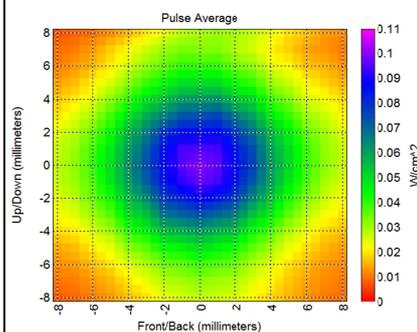


図16-1. ゲルなし音響強度

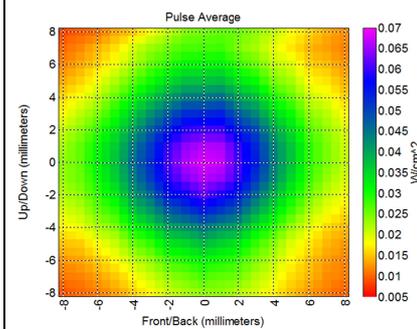


図16-2 ゲルA (試作例 / 減衰あり)

試作ゲルにより、強度が低下した例A。

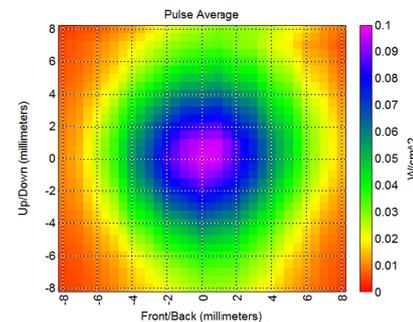


図16-3 ゲルB

ゲルBは、音響強度減衰がほぼ認めず、採用とした。

5) 超音波駆動装置設計

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

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

D. 考察

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

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

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

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 吉村壮平、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、昨年提案した治験プロトコル大枠に基づきプロトコルを提案する。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。登録予定症例数を30例に設定した。当施設で収集した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、昨年提案した治験プロトコル大枠に基づいたプロトコル案を作成した。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。

参加（依頼）施設候補

- 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）

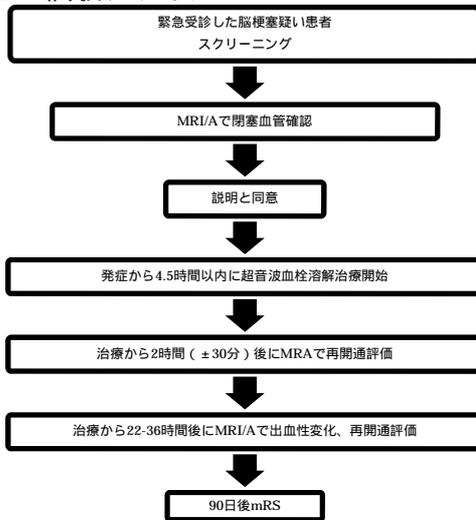
C. 治験プロトコル案

治験プロトコル案を別紙(P45～P64)に示す。以下にその主な内容を示す。

1. 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

2. 試験デザイン



3. 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
- 本人または代諾者から事前に文書による承諾書取得

4. 患者除外基準

- 適正治療指針第二版での適応外
- 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

5. 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)

6. 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

7. 症例数

30例

8. 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

9. ロードマップ案

栓溶解法の対象患者も同程度の割合で増加するであろう。

- 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
2014年3月
- プロトコル案作成
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、昨年提案した新規装置の治験プロトコル大枠に基づいてプロトコルを提案した。

最近、内頸動脈や中大脳動脈近位部閉塞のある脳梗塞患者ではrt-PA静注療法後に経皮経管的血栓回収機器を使用した血管内治療を加えることにより転帰が改善することが示されたことを背景に記載した。超音波血栓溶解療法は血管内治療に比べ人員的・設備的な医療経済面のメリットが期待され、このような簡便な治療法が確立することが期待されている。

ヒストリカルコントロールに比べて症候性頭蓋内出血が増加せず、早期再開通率が改善することを示すために登録予定数を30例に設定した。

E . 結論

本研究班で作成したプロトコル案に基づいて今後開発される新規超音波血栓溶解装置の臨床治験が計画される予定である。

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;9:1045-1051.
- 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;36:260-265.
- 3 . 鈴木理恵子, 古賀政利, 山本晴子, 大山賢, 徳永敬介, 松木孝之, 長束一行, 豊田一則, 峰松一夫. rt-PA 静注による閉塞血管早期再開通率の検討: 虚血性脳卒中に対する新規超音波血栓溶解装置開発の対照データ. Neurosonology 2015、印刷中

2.学会発表

1. 古賀政利 . 脳梗塞における超音波血栓溶解の up-to-date . (シンポジウム) 第 33 回日本脳神経超音波学会、岩手、2014 年 6 月
2. 大山賢、鈴木理恵子、天野達雄、古賀政利、佐藤徹、高橋淳、峰松一夫、豊田一則 . 頸動脈ステント留置術前後における経口腔頸部血管超音波検査の評価 . 第 33 回日本脳神経超音波学会、岩手、2014 年 6 月

3. Koga M, Sato K, Ishibashi-Ueda H, Tanaka K, Suzuki R, Sumita Y, Minematsu K, Toyoda K. Aortic atherosclerosis evaluation of resected specimen using 3-dimensional ultrasonography. 9th World Stroke Congress, Istanbul, Turkey, Oct 2014
4. 古賀 政利 . Next generation thrombolytic therapies for acute ischemic stroke: desmoteplase, tenecteplase (シンポジウム) , THAWS and sonothrombolysis. 第 40 回日本脳卒中学会総会、広島、2015 年 3 月
5. 古賀政利 . 脳梗塞急性期治療 (rt-PA 静注療法) (教育講演) . 第 40 回日本脳卒中学会総会、広島、2015 年 3 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

新規超音波血栓溶解装置の治験プロトコール（仮）

Clinialtrials.gov.No.:

UMIN-CTR No.:

2015年3月20日作成 1.2.版

治験実施計画書

新規超音波血栓溶解装置の治験プロトコール（仮）

治験依頼者	株式会社カネカ 〒530-8288 大阪市北区中之島2-3-18 中之島フェスティバルタワー
治験調整委員会	<p style="text-align: center;">()</p> <p>所属 連絡先</p> <p>× × × × 所属 連絡先</p> <p>所属 連絡先</p> <p style="text-align: right;">: 治験調整委員会代表</p>
治験実施医療機関	<p>独立行政法人国立循環器病研究センター 脳血管内科、脳神経内科、脳卒中集中治療科 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5 - 7 - 1</p> <p>東京慈恵会医科大学附属病院 神経内科 〒105-8471 東京都港区西新橋3-19-18</p>
治験装置提供者	株式会社カネカ 〒530-8288 大阪市北区中之島2-3-18 中之島フェスティバルタワー
作成日	Version 1.0 平成26年4月10日作成
改訂日	Version 1.2 平成27年3月20日作成

< 概要 >

目的	新規超音波血栓溶解装置（仮）を用い、超急性期虚血性脳卒中患者における血栓溶解療法との併用治療の安全性及び有効性を評価する。
治験機器	*****
治験デザイン	多施設共同、単一治療群、オープンラベル試験
対象患者	rt-PA（アルテプラゼ）静注療法を受ける虚血性脳卒中患者
選択基準	<ol style="list-style-type: none"> 1. 年齢20歳以上 2. 性別：男女とも 3. 虚血性脳卒中による神経症候を呈する 4. National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) score 5-25 5. 発症前mRS 0-1 6. 頭部MRAにて中大脳動脈（MCA）、前大脳動脈（ACA）、後大脳動脈（PCA）閉塞 7. 発症4.5時間以内に治療開始可能 8. 超音波側頭骨窓の有無を問わない 9. 本人または代諾者から事前に文書による承諾が得られた患者
除外基準	<ol style="list-style-type: none"> 1. rt-PA（アルテプラゼ）静注療法適正治療指針第二版での適応外 2. MRI検査不能の患者 3. 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 4. 妊婦、授乳中の患者、妊娠している可能性のある患者 5. 余命6カ月未満と予測される末期の疾患を有する患者 6. その他、試験担当医師が不相当と判断する患者
実施手順	新規超音波血栓溶解装置（仮）を用いて、標準照射方式で合計60分間照射する。新規超音波血栓溶解装置（仮）による治療の開始時に、rt-PAを投与する。併用禁止すべき医薬品及び治療は特にない。
スケジュール	登録時：患者背景、発症前内服薬、発症前mRS、頭部MRI/A、治療前NIHSS、バイタルサイン、採血；治療後120分：NIHSS、頭部MRI/A、バイタルサイン、有害事象；22-36時間：NIHSS、頭部MRI/A、バイタルサイン、採血、有害事象；7-14日もしくは退院時：内服薬、NIHSS、頭部CT、バイタルサイン、有害事象、90日：mRS（盲検評価）
主要評価項目	<p>安全性評価項目</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 症候性頭蓋内出血率（主要評価項目）：症候性頭蓋内出血は、出血に関連し、NIHSSが4ポイント以上悪化し、頭部CTにて梗塞領域の少なくとも1/3以上を占めるmass effectを伴う出血とする。（症候性頭蓋内出血の定義はJ-ACTの定義を使用） 2) 3ヶ月以内の死亡 <p>有効性評価項目</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 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）
副次的評価項目	<p>有効性評価項目</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 22-36時間後のMRA上の再開通率（modified Mori Grade 2-3） 2) 90日後のmRS 0-1の割合 3) 90日後のmRS 0-2の割合 4) NIHSSスコアの経時的推移
目標被験者数	30例
実施予定期間	2016年4月から2017年3月

目次

1	試験の背景	50
2	試験の目的	51
3	治験機器の概要	51
4	対象患者	51
4.1	選択基準	51
4.2	除外基準	51
4.3	選定・除外基準設定の根拠	51
5	試験の方法	52
5.1	試験のデザイン	52
5.2	試験のアウトライン	52
5.3	治験機器による治療（治療機器完成後に「標準照射方式」を別の項に追加する。）	52
5.4	併用療法	52
5.5	併用禁止・制限薬及び治療	53
5.6	治験機器の管理・交入手順（治療機器完成後に別途SOPを作成する。）	53
5.7	症例登録方法	53
6	観察および検査項目	53
7	被験者数と統計解析（要検討）	54
7.1	被験者数及びその設定根拠	54
7.2	評価項目	54
7.2.1	安全性評価項目	54
7.2.2	有効性評価項目	54
7.3	解析対象集団（FAS、PPS、安全性解析対象集団など解析対象集団の規定を作成する。）	54
7.4	解析方法	55
8	有害事象と不具合	55
8.1	有害事象及び不具合の定義	55
8.2	有害事象の報告	56
8.3	治験機器の不具合の報告	56
8.4	重篤な有害事象及び重篤な健康被害の恐れのある不具合の報告	57
9	独立安全性評価委員会	57
10	実施計画書からの逸脱の取扱い	57
10.1	緊急時の治験実施計画書からの逸脱又は変更	57
10.2	治験実施計画書からの逸脱または変更時の記録の作成	57
10.3	治験実施計画書の改訂	57
11	治験の終了、中止、中断	57

11.1	治験の終了.....	57
11.2	治験全体の中止、中断.....	57
11.3	実施医療機関での中止または中断.....	57
11.4	被験者の中止.....	58
12	治験の倫理的及び科学的実施.....	58
13	被験者に説明し同意を得る方法.....	58
14	原資料等の直接閲覧.....	58
15	治験の品質管理及び品質保証.....	58
16	記録等の保存.....	58
	実施医療機関においては、医療機関の長が定める記録保存責任者により、被験者の同意に関する記録、本治療に関係する診療記録・検査データ・治験審査委員会議事録・治験契約書・記録用紙を、下記の期間、保存する。.....	58
	・再審査の指定を受けた場合(承認後から再審査終了までの期間が超5年)、再審査が終了するまでの期間	58
	・再審査の指定を受けても再審査終了までに5年を要しない場合及び再審査の指定を受けない場合、承認(認証)後5年間.....	58
17	金銭の支払い及び補償.....	59
18	試験実施期間.....	59
19	参考文献.....	59
	【別紙1】治験実施体制.....	61

新規超音波血栓溶解装置の治験プロトコール（仮） 試験実施計画書

1 試験の背景

脳卒中はわが国の死因としては第4位であるが、要介護患者の第1位を占めており、重篤な後遺症を抱え、介護のために様々な社会的資源が投入されている。超高齢社会を迎え、脳卒中患者は増加の一途をたどり、それとともに後遺症を抱えた患者の介護問題はさらに社会的に重大となると予想されている。脳卒中全体の大多数を占めるのは虚血性脳卒中であるが、いったん罹患した患者の機能予後を著しく改善することが可能な治療は、発症4.5時間以内に実施されるrt-PAを用いた超急性期血栓溶解療法である。しかし、rt-PAを投与された虚血性脳卒中患者のうち、半数は中等度以上の機能障害が残存する(1)。この理由の一つに、rt-PAの効果が十分に発揮されず血栓が溶解されない、もしくは溶解不十分なためと考えられている。また、脳卒中発症後、血栓溶解が早期に起これば起こるほど、患者の予後はよいことが知られている(2)。すなわち、血栓溶解を早期に起こすために、rt-PAの効果を可能な限り早く、そして十分に発揮させる補助療法の開発により、現状を打開し、超急性期血栓溶解療法の有用性を更に引き上げることができると考えられる。近年、閉塞部位の血栓を血管内から回収する経皮経管的脳血栓回収機器が開発され、発症8時間以内の虚血性脳卒中患者に使用することが可能である。最近の無作為割付試験で近位部頭蓋内血管閉塞のある患者でrt-PA静注後に経皮経管的脳血栓回収機器を使用した血管内治療の追加が有効であることが示され(3-5)、今後は急性期脳梗塞に対する血管内治療に対応する医療システムの構築が行われるであろう。しかしながら、国内全ての地域で24時間365日このようなシステムに対応出来る人員や医療施設を整備するには時間を要する可能性がある。また医療経済面からより少人数で簡便に行える治療法の確立が期待される。

動物実験モデルより、rt-PA投与下で血栓部位に超音波を照射すると、血栓溶解が著明に促進されることが明らかにされた(6, 7)。さらに、超急性期虚血性脳卒中患者において、rt-PA投与下で経頭蓋ドプラ検査により頭蓋内の閉塞血管を長時間モニタリングしていると、rt-PA投与のみよりも明らかに高い頻度で血栓溶解が得られ、患者の転帰を改善させる可能性が示唆されている(8)。経頭蓋ドプラ検査とは違い、カラードプラ画像上にリアルタイムで頭蓋内血管を描出できる経頭蓋カラードプラ検査（Transcranial Color Coded Sonography: TCCS）とrt-PAの併用でも血管の再開通率が改善し、また、閉塞血管がより早期に再開通する傾向がみられた(9)。経頭蓋ドプラ検査を用いてrt-PA投与後の血栓溶解時間を観察した研究では、早期再開通と予後良好の関連性がみられており(10)、これらの結果を総合すると、rt-PA治療に超音波照射を加えてより早期の再開通をはかることで、rt-PA投与の有効性がさらに高まり予後が改善する可能性が示唆される。しかしその一方、診断用の超音波ではなく、治療用に改良された経頭蓋超音波機器を用いた臨床試験において、頭蓋内出血が多発したとの報告もなされている(11)。Alexandrovらは、簡便に多方向から2MHzの超音波を経頭蓋的に照射可能な新規装置を開発し、この効果と安全性を調べるために2013年5月より830例を目標に無作為化割付試験CLOTBUST-ER（ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01098981）を開始している。

本治験で使用する新規超音波血栓溶解装置（仮）は、東京慈恵会医科大学総合医科学センター医用エンジニアリング研究室の古幡博教授が、株式会社カネカと共同研究を行い開発した装置である。新規超音波血栓溶解装置（仮）は、rt-PA投与下で人間に使用した際に起こりえる頭蓋内出血の危険性を回避するため、超音波の出力や出力波形を改良することで、血栓溶解促進効果を保ちつつ安全性に問題なく使用できることが、**等を用いた前臨床試験においてほぼ確認されている。特に先述の、出血率が増加した臨床試験で用いられた治療用経頭蓋超音波機器の音響学的及び病的動脈硬化血管に対する超音波の影響という医学生物学的問題点を解明し、新規超音波血栓溶解装置（仮）ではそのような条件下でも安全である事を確認中である。しかし、人間での使用は今まで行われていないため、安全性について慎重に検討しながら治験を進める計画としている。

なお、経頭蓋超音波検査は頭蓋内脳動脈の狭窄や閉塞性病変の検出に有用であり、日常診療の中ではベッドサイドで実施されている。治験の主な対象は、中大脳動脈近位部に閉塞を有する患者となることが予想されるが、rt-PAの超急性期虚血性脳卒中における市販後臨床試験であるthe Japan Alteplase Clinical Trial II（J-ACT）において、MRAで一側中大脳動脈近位部閉塞患者を対象としたところ、国内15施設で1年半の症例登録期間中に、わずか58例しか登録できなかった(12)。これらの状況から推測するに、本治験の対象となる被験者数を短期間に多数例登録することは困難であることが予測されている。そのため、本治験では、実施可能な範囲で、安全性と有効性の検討を行うことを目的とした。

2 試験の目的

新規超音波血栓溶解装置（仮）を用い、超急性期虚血性脳卒中患者における血栓溶解療法との併用治療の安全性及び有効性を評価する。

3 治験機器の概要

操作方法

使用方法

有効性

安全性

4 対象患者

4.1 選択基準

1. 年齢20歳以上
2. 性別：男女とも
3. 虚血性脳卒中による神経症候を呈する
4. National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) score 5-25
5. 発症前mRS 0-1
6. 頭部MRAにて中大脳動脈（MCA）、前大脳動脈（ACA）、後大脳動脈（PCA）閉塞
7. 発症4.5時間以内にrt-PAによる血栓溶解療法が開始可能
8. 超音波側頭骨窓の有無を問わない
9. 本人または代諾者から事前に文書による承諾が得られた患者

4.2 除外基準

1. rt-PA（アルテプラゼ）静注療法適正治療指針第二版での適応外
2. MRI検査不能の患者
3. 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
4. 妊婦、授乳中の患者、妊娠している可能性のある患者
5. 余命6ヵ月未満と予測される末期の疾患を有する患者
6. 血栓溶解療法中の安静保持困難が予想される患者
7. その他、試験担当医師が不適当と判断する患者

4.3 選定・除外基準設定の根拠

選択基準

1および9は倫理的配慮から設定。2-8は、本治験機器による治療対象として適格な被験者を選定するため、および被験者の安全性を考慮して設定。

除外基準

1-2は、本治験の試験計画を実施できない者を除外するために設定。3-7は、倫理的配慮ならびに有効性・安全性の評価が困難な者を除外するために設定。

参考：rt-PA（アルテプラゼ）静注療法適正治療指針第二版における禁忌

既往歴

- 非外傷性頭蓋内出血既往
- 1ヵ月以内の脳梗塞（一過性脳虚血発作は含まない）
- 3ヵ月以内の重篤な頭部脊髄の外傷あるいは手術
- 21日以内の消化管あるいは尿路出血
- 14日以内の大手術あるいは頭部以外の重篤な外傷
- 治療薬の過敏症

臨床所見

くも膜下出血(疑)
急性大動脈解離の合併
出血の合併 (頭蓋内, 消化管, 尿路, 後腹膜, 喀血)
収縮期血圧 (適切な降圧療法後も185mmHg以上)
拡張期血圧 (適切な降圧療法後も110mmHg以上)
重篤な肝障害
急性膵炎

血液所見

血糖異常 (< 50mg/dl, または > 400mg/dl)
血小板 $100,000/\text{mm}^3$ 以下

血液所見、抗凝固療法中ないし凝固異常症において

PT-INR > 1.7
aPTTの延長 (前値の1.5倍 [目安として約40秒] を超える)

CT/MRI所見

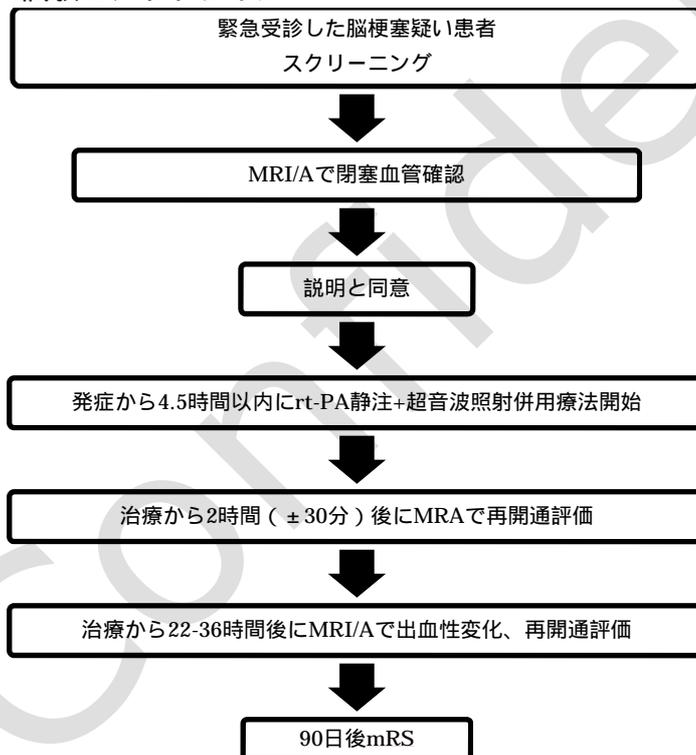
広汎な早期虚血性変化
圧排所見 (正中構造偏位)

5 試験の方法

5.1 試験のデザイン

多施設共同、単一治療群、オープンラベル試験

5.2 試験のアウトライン



5.3 治療機器による治療 (治療機器完成後に「標準照射方式」を別の項に追加する。)

- 1) 新規超音波血栓溶解装置 (仮) を用いて、標準照射方式で合計60分間照射する。
- 2) 音響強度は、***波***kHzで***W/cm²とする。
標準照射方式: *****

5.4 併用療法

- ・ 新規超音波血栓溶解装置 (仮) による治療の開始と同時に、rt-PA静注療法を実施する。投与方法は、rt-PAの添付文書による。

5.5 併用禁止・制限薬及び治療

- 併用禁止すべき医薬品及び治療は特にない。
- rt-PAに関する併用禁止薬及び治療は、添付文書及び日本脳卒中学会のrt-PA（アルテプラゼ）静注療法適正治療指針第二版を遵守する。

5.6 治験機器の管理・交付手順（治療機器完成後に別途SOPを作成する。）

治験機器は、第三者を介在せずに、直接実施医療機関に交付する。

実施医療機関毎の治験機器の交付(出荷、受領、返却)の記録(数量、年月日)を行い、治験機器管理グループが書類を保管する。

実施医療機関での治験機器の管理に関する手順書(取扱書を含む)を作成し、実施医療機関の長に交付する。当該手順書には治験機器の受領、使用方法、その他の取扱い方法、保管、管理、保守点検並びに治験依頼者への返却、及びその他の処分が、必要に応じ据付、再使用のための準備又は点検が、適切で確実に行われるために必要な指示を記載する。

5.7 症例登録方法

- MRI/MRA以外の情報から発症4.5時間以内の虚血性脳卒中中でrt-PA投与が可能かつ対象血管に閉塞が疑われる患者があれば、仮登録し、患者又は代諾者より治験参加の同意を得る。
- MRI/MRAにて適応が判定されれば、本登録し、新規超音波血栓溶解装置（仮）による治療を開始する。
- 仮登録：MRI/MRA所見以外の登録基準を満たす場合に、（作成予定の）WEB登録システム上で仮登録を行う。
- 本登録：治験参加の同意を取得し、MRI/MRA所見が登録基準を満たし満たす場合に、（作成予定の）WEB登録システム上で本登録を行う。
- 被験者登録票に必要事項を記載し、本登録後、速やかに治験事務局に送付する。
- 最初の3例を登録した後、14日後の評価が独立データモニタリング委員会で行われ、登録再開が指示されるまで、新規患者の登録を中断する。

6 観察および検査項目

- 患者背景：性別、年齢、生年月日、身長、体重、合併症、既往歴など
- 治療前：NIHSS（*）、発症前mRS（*）、頭部MRI(DWI-ASPECTS)（#）、MRA上の閉塞血管（#）、採血(WBC, RBC, Hb, Hct, Plt, AST, ALT, T-Bil, 血糖, CK, BUN, Cr, Na, K, APTT, PT-INR, D-Dimer)、血圧
- 治療開始後：
 - NIHSS（*）（ ）； 60分後、120分後、24-36時間後
 - MRA； 120±30分後、22-36時間後（#）
 - 頭部CT； 24-36時間後
 - 頭部MRI； 24-36時間後（T2*, FLAIR, DWI, MRA）（#）
 - 採血； 24-36時間後(WBC, RBC, Hb, Hct, Plt, AST, ALT, T-Bil, 血糖, CK, BUN, Cr, Na, K, APTT, PT-INR, D-Dimer)
 - 血圧； 60分後、120分後、24-36時間後
 - 有害事象
- 7-14日後； NIHSS（*）、頭部MRA（#）、血圧、有害事象
- 90日後； mRS（*）、有害事象

（ ） 新規超音波血栓溶解装置（仮）による治療中は原則としてNIHSS評価を行わない。これは、NIHSS評価時の被験者の体動により照射部位がずれる可能性があるためである。新規超音波血栓溶解装置（仮）による治療中は治験責任/分担医師が被験者の状態を継続的に観察し、変動があればNIHSS評価を含めて適切な対応をとることで、被験者の安全を担保する。

(*) mRS、NIHSSの評価は、事前にトレーニングを行い、認証を受けた評価者が行う。

(#) 画像の評価は、独立した評価者が行う。

時期	発症前	治療前	60分	120分	24-36時間	7-14日もしくは退院時	90±14日
同意取得		○					

患者背景の確認		○					
内服薬	○					○	
新規装置治療		←	→				
NIHSS		○	○	○	○	○	
mRS	○						○
頭部 CT		(○)			○	○	
頭部 MRI a		○		ob	oc		
採血 d		○			○		
血圧		○	○	○	○	○	
有害事象の観察		←					→

a : T2*、 FLAIR、 DWI、 MRA

b: ±30 分

c: 22-36 時間

d: WBC、 RBC、 Hb、 Hct、 Plt、 AST、 ALT、 T-Bil、 血糖、 CK、 BUN、 Cr、 Na、 K、 APTT、 PT-INR、 D-Dimer

7 被験者数と統計解析（要検討）

7.1 被験者数及びその設定根拠

目標被験者数：30 例

【目標被験者数の設定根拠】

- 国内で実施されたJ-ACT II研究(12)では、1年半の期間に58名の対象者を登録したことが報告されている。本研究の対象者の多くは、J-ACT II研究の対象であったMCA閉塞例であることが予想される。本研究に提供可能な治験機器が**台、研究期間が*年、同意率を考慮すると年間1施設で**例程度が見込まれる。以上の理由から実施可能性を考慮して、目標被験者数を**例に設定した。
- 国立循環器病研究センターのコントロールデータ(13)から計算すると、安全性評価ではP0：80%、P1：95%と設定すると、目標症例数25で、36時間以内出血が2例以内なら安全である。有効性評価で2時間後の再開通率に関し、P0：45%、P1：65%と設定した場合、目標数29例で17例以上再開通すれば、有効である。したがって、目標症例数を30例に設定した。

7.2 評価項目

7.2.1 安全性評価項目

- 3) 症候性頭蓋内出血率（主要評価項目）：症候性出血は、出血に関連し、NIHSSが4ポイント以上悪化し、頭部CTにて梗塞領域の少なくとも1/3以上を占めるmass effectを伴う出血とする。（症候性頭蓋内出血の定義はJ-ACTの定義を使用）
- 4) 3ヶ月以内の死亡

7.2.2 有効性評価項目

- 1) 主要評価項目
 - 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）
- 2) 副次的評価項目
 - 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

7.3 解析対象集団（FAS、PPS、安全性解析対象集団など解析対象集団の規定を作成する。）

治験手技が実施されたすべての被験者の集団。そのうち、最初の3例を初期安全性評価の対象とする。

7.4 解析方法

本研究では、超音波の併用による治療の安全性および有効性の検討を目的としているが、実施可能性の点から特定の仮説を検証するための症例数を設定することは不可能である。特に対象者の制約により対照を置くことは困難であるため、過去の研究結果を参照にし、結果を集計し解釈を行う。安全性に関しては、出血率を主要評価項目とし、国内外の tPA 治療及び市販後臨床試験で報告されている 36 時間以内の症候性頭蓋内出血の発生頻度（下表参照）(13-18)に比べて、併用療法のそれが極端に高くないかを調べる。有効性に関しては、超音波を用いない過去の研究では 24 時間後の再開通率は 69%（J-ACT II）であり、併用による 24 時間後の再開通率は同程度がみこまれる。併用療法により期待できる効果は、より速い時間でこれを達成することであるため、主要評価項目を治療開始 120 分後の再開通率とする。また、対象者数は多くはないので、登録されたすべての症例について、個々の対象者の評価項目の記述を行う。

本試験にかかわる統計解析法及び集計方法の詳細については、別途に作成する統計解析計画書に詳述する。統計解析計画書はデータ固定前までに最終的に確定する。

《症候性頭蓋内出血の発生頻度の検討》

本研究の予定症例数は**例と少ないため、症候性頭蓋内出血が**例でも生じれば、観測されたデータから推定する出血率は***%であるので、既存の研究の出血率より高くなる。しかし、この値が極端に大きいかどうかは、全体の例数が少ないことに起因する誤差的な変動とともに考慮すべきであることから、過去の研究の出血率を参照に、真の出血率が参考にする値程度であれば、何例出血する可能性があるかを検討した。

試験	治療開始からの時間	対象	確認方法	発生率(%) [95%信頼区間]
[1] NINDS rt-PA trial (14)	36 時間以内	全ての神経症候増悪を伴う	CT	6.4 [4.0~9.7]
[2] CLOTBUST Investigators (15)	24 時間以内	NIHSS 値 4 点以上悪化	CT / MRI	9.3 [6.4~12.9]
[3] SITS-MOST (16)	36 時間以内	NIHSS 値 4 点以上悪化 parenchymal type	CT	1.7 [1.4~2.0]
[4] J-ACT (17)	24 時間以内	明らかな神経症候増悪 または NIHSS4 点以上悪化	CT	5.8 [2.2~12.3]
[5] SAMURAI rt-PA Registry (18)	36 時間以内	NIHSS 値 4 点以上悪化 parenchymal type	CT	1.2 [0.5~2.4]
[6] NCVV 単施設 (n=232) (13)	36 時間以内	NIHSS 値 4 点以上悪化 parenchymal type	CT	3.4 [1.1~5.8]

8 有害事象と不具合

8.1 有害事象及び不具合の定義

有害事象：

試験中に生じたあらゆる好ましくない医療上の事象。また、被験者のみならず、試験機器の取扱いにより試験責任医師、試験協力者等に生じたあらゆる好ましくない医療上の事象も有害事象に含むものとする。但し、試験中に重症度の悪化や発生頻度の増加がみられる場合を除き、被験者の基礎疾患は有害事象としない。

不具合：

不具合とは、破損、作動不良等広く品質、安全性、性能等に関する試験機器の具合がよくないことをいい、設計、交付、保管、使用のいずれの段階によるものであるかを問わない。

重篤な有害事象及び不具合：

下記の事象を示す：

- 1) 死亡
- 2) 死亡につながるおそれのあるもの
- 3) 治療のために病院又は診療所への入院又は入院期間の延長が必要とされるもの

- 4) 障害
- 5) 障害につながるおそれのあるもの
- 6) 1から5に掲げる症例に準じて重篤であるもの
- 7) 後世代における先天性の疾病又は異常

死亡は、特定の有害事象の転帰として記録し、死亡そのものを有害事象としては記録しない。

機器の不良やその他の機器の問題が発生したが健康被害がない場合は、症例報告書の記載の手引きに従い、機器不具合として症例報告書に記録する。もし、機器不具合やその他の機器の問題から有害事象が認められた場合は、機器不具合に加えて有害事象として症例報告書に記録する。

なお、「入院」には、治験前より予定していた療法又は検査を治験中に実施することのみを目的とした入院（予定手術や検査等）は含まない。（但し、その入院中に新たに発生したものは有害事象として取扱う。）

また、重篤な不具合は現実に死亡、障害等が発生していなくても、発生し得ることが予想される場合を含む。

8.2 有害事象の報告

本治験の有害事象の定義は以下の通りである。

有害事象：本治験機器との因果関係の有無にかかわらず、本治験機器の使用時に被験者、使用者その他の者に生じた全ての好ましくないまたは意図しない疾病または障害並びにその徴候（臨床検査値の異常を含む）をいう。但し、被験者以外の者に生じたものについては、本治験機器の使用による影響と疑われるものに限る。

重篤な有害事象：下記の事象を示す

1. 死亡
2. 死亡につながるおそれのある症例
3. 治療のために病院または診療所への入院または入院期間の延長が必要とされる症例
4. 障害
5. 障害につながるおそれのある症例
6. 1から5に掲げる症例に準じて重篤である症例
7. 後世代における先天性の疾病または異常

治験責任医師又は分担医師は治験中に発現した各有害事象に対して、治験機器との関連性、重篤性、予測可能性を評価し、確認する。

また、予測可能性について、当該事象等の発生、あるいは発生数、発生頻度、発生条件等の発生傾向が本治験機器の治験機器概要書から予測できないものを「未知」、予測できるものを「既知」とする。

治験責任医師又は分担医師は、さらに各有害事象と治験機器との関連性を、「関連なし」、「関連の可能性を否定できない」の分類を用いて評価する。

最後に各有害事象の転帰を、「死亡」、「未回復」、「後遺症あり」、「軽快」、「回復」、「不明」の分類を用いて評価する。

発現した有害事象はすべて、症例報告書に記録する。治験責任医師又は分担医師は、全有害事象について、症例報告書内の「有害事象名」、「重篤度」、「発現日」、有害事象と治験機器、手技及び抗血小板薬等との「関連性」、機器関連の未知の重篤な有害事象の評価、「処置」、「転帰」、有害事象が軽快した場合には「転帰日」、該当する場合には「死亡日」を含めてすべて必ず記録する。

8.3 治験機器の不具合の報告

治験責任医師又は分担医師は治験機器の不具合に対して、重篤性、予測可能性を評価し、確認する。発現した不具合はすべて、症例報告書に記載する。

8.4 重篤な有害事象及び重篤な健康被害の恐れのある不具合の報告

重篤な有害事象及び重篤な健康被害のおそれがある不具合が発現した場合は、治験責任医師は実施医療機関の長に報告するとともに、治験依頼者に通知する。

9 独立安全性評価委員会

はじめの3例の結果が得られた時点で独立データモニタリング委員会により継続可能かどうかを審議し、その結果をもとに継続か中止かを決定する。詳細は、【別紙1】治験実施体制に記載する。

10 実施計画書からの逸脱の取扱い

10.1 緊急時の治験実施計画書からの逸脱又は変更

治験責任医師又は分担医師は、治験審査委員会の事前の審査に基づく文書による承認を得ることなく、治験実施計画書からの逸脱又は変更を行わない。但し、以下の場合はその限りではない。

- 1) 治験責任医師又は分担医師は、被験者の緊急の危険を回避するためのものである等、医療上やむを得ない事情がある場合、治験審査委員会の事前の承認なしに治験実施計画書からの逸脱又は変更を行うことができる。
- 2) その際には、治験責任医師は、逸脱又は変更の内容及び理由並びに治験実施計画書の改訂が適切な場合、その案を可能な限り早急に実施医療機関の長及び実施医療機関の長を経由して治験審査委員会に提出してその承認を文書で得なければならない。

10.2 治験実施計画書からの逸脱または変更時の記録の作成

治験責任医師又は分担医師は、治験実施計画書から逸脱又は変更した行為をすべて記録する。治験責任医師は、その理由などを説明した記録を作成の上、実施医療機関の長に提出し、その写しを保存する。

治験責任医師は、治験の実施に重大な影響を与える又は被験者への危険性を増大させるような治験のあらゆる変更について、実施医療機関の長及び治験審査委員会にすみやかに文書にて報告する。

10.3 治験実施計画書の改訂

治験実施計画書を改訂する場合、治験依頼者は、治験実施計画書改訂版の内容について治験実施医療機関の長の承認を得る。治験依頼者は治験実施計画書改訂版、及び改訂にともない症例報告書、同意説明文書等が改訂された場合、それらの資料も含めすみやかに治験審査委員会に提出し、承認を得なければならない。

11 治験の終了、中止、中断

11.1 治験の終了

治験が終了した場合、治験責任医師は実施医療機関の長に治験が終了した旨を報告する。

11.2 治験全体の中止、中断

治験依頼者は、以下のいずれかの項目に該当する場合、本治験全体を中止又は中断する。

- 1) 被験者の安全性確保など、倫理上あるいは医療上やむを得ない事情が発生した場合
- 2) 本治験機器を開発する科学的妥当性が失われた場合
- 3) 開発方針に変更があった場合

11.3 実施医療機関での中止または中断

治験責任医師又は実施医療機関の長は、以下のいずれかの項目に該当する場合、当該実施医療機関における治験を中止又は中断する。

- 1) 治験責任又は分担医師又は実施医療機関による重大又は継続した不遵守が発見された場合
- 2) 実施医療機関の治験審査委員会が実施中の治験の継続審査等において、治験の中止又は中断の決定を下した場合
- 3) 治験責任医師の異動により、治験の継続が不可能な場合
- 4) 選択基準に適合する被験者が見込めなくなった場合

- 5) 当該医療機関が治験を適切に実施するために求められる要件を満たさなくなった場合
- 6) 治験責任医師が治験を中止又は中断した場合
- 7) 安全性評価委員会が本治験の中止を勧告した場合

11.4 被験者の中止

以下のいずれかに該当する被験者は、本治験を中止する。

- 1) 治験開始後に、被験者が治験参加の撤回を申し出た場合
- 2) 治験責任医師又は分担医師が、被験者が治験実施計画を遵守できないと判断した場合
- 3) 除外基準に抵触することが判明した場合
- 4) その他、治験責任医師又は分担医師が治験を中止するべきと判断した場合

なお、治験を中止した被験者において、重篤な有害事象もしくは治験機器との関連の可能性を否定できない有害事象が認められた場合は、可能な限りその後の調査を行う。

12 治験の倫理的及び科学的実施

「医療機器の臨床試験の実施に関する基準」(厚生労働省令36号平成17年3月23日)を遵守し、被験者の人権、安全及び福祉の保護の下に、治験の科学的な質と信頼性を確保する。

13 被験者に説明し同意を得る方法

- 治験審査委員会で承認の得られた同意説明文書を患者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、患者の自由意思による同意を文書で得る。
- 患者の同意に影響を及ぼすと考えられる有効性や安全性等の情報が得られたときや、患者の同意に影響を及ぼすような実施計画等の変更が行われるときは、速やかに患者に情報提供し、試験等に参加するか否かについて患者の意思を予め確認するとともに、事前に治験審査委員会の承認を得て同意説明文書等の改訂を行い、患者の再同意を得る。
- 意識レベル、あるいは失語等の症状により患者自身が治験に関する説明を理解し同意することが困難な場合、家族等、患者の意思を推測可能な代諾者から同意を得る。

14 原資料等の直接閲覧

- 治験責任(分担)医師および実施医療機関は、治験依頼者によるモニタリングと監査、治験審査委員会の調査、および規制当局の査察を受け入れ、治験に関連する全ての原資料への直接閲覧に応じる。
- 全ての原資料は、治験依頼者のモニタリングと監査、治験審査委員会の調査、および規制当局の査察のために、閲覧可能な状態でなければならない。
- 治験依頼者のモニタリング担当者および監査担当者は、全ての症例報告書、同意文書を調査することができる

15 治験の品質管理及び品質保証

治験依頼者は、モニターおよび監査担当者を指名し、モニタリングおよび監査を行わせる。モニター及び監査担当者は、それぞれ職務の実施に必要な科学的知識を有するものなければならない。モニター及び監査担当者は、治験に関連する診療記録、治験責任(分担)医師の治験に関連する資料、同意文書、症例報告書等、治験の品質管理及び品質保証に必要な文書を閲覧することができる。

16 記録等の保存

実施医療機関においては、医療機関の長が定める記録保存責任者により、被験者の同意に関する記録、本治療に係る診療記録・検査データ・治験審査委員会議事録・治験契約書・記録用紙を、下記の期間、保存する。

- 再審査の指定を受けた場合(承認後から再審査終了までの期間が超5年)、再審査が終了するまでの期間
- 再審査の指定を受けても再審査終了までに5年を要しない場合及び再審査の指定を受けない場合、承認

(認証)後5年間

17 金銭の支払い及び補償

本治験に起因する健康被害が発生した場合、その解決に要した費用は、治験依頼者が負担する。ただし、当該健康被害が治験実施計画書、GCP省令などから著しく逸脱して実施したことにより生じた場合、また、被験者、治験担当医師、医療機関の故意もしくは重大な過失により生じた場合は、この限りではない。

18 試験実施期間

平成28年4月1日から平成29年6月30日（登録締切__平成29年3月31日）

19 参考文献

1. Hacke W, Donnan G, Fieschi C, et al. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* 2004;363(9411):768-74.
2. Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* 2010;375(9727):1695-703.
3. Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2015;372(1):11-20.
4. Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, et al. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med* 2015;372(11):1019-30.
5. Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, et al. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med* 2015;372(11):1009-18.
6. Ishibashi T, Akiyama M, Onoue H, Abe T, Furuhashi H. Can transcranial ultrasonication increase recanalization flow with tissue plasminogen activator? *Stroke* 2002;33(5):1399-404.
7. Saguchi T, Onoue H, Urashima M, Ishibashi T, Abe T, Furuhashi H. Effective and safe conditions of low-frequency transcranial ultrasonic thrombolysis for acute ischemic stroke: neurologic and histologic evaluation in a rat middle cerebral artery stroke model. *Stroke* 2008;39(3):1007-11.
8. Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, et al. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *New Engl J Med* 2004;351(21):2170-8.
9. Eggers J, Konig IR, Koch B, Handler G, Seidel G. Sonothrombolysis with transcranial color-coded sonography and recombinant tissue-type plasminogen activator in acute middle cerebral artery main stem occlusion: results from a randomized study. *Stroke* 2008;39(5):1470-5.
10. Alexandrov AV, Burgin WS, Demchuk AM, El-Mitwalli A, Grotta JC. Speed of intracranial clot lysis with intravenous tissue plasminogen activator therapy: sonographic classification and short-term improvement. *Circulation* 2001;103(24):2897-902.
11. Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P, et al. 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. *Stroke* 2005;36(7):1441-6.

12. Mori E, Minematsu K, Nakagawara J, Yamaguchi T, Sasaki M, Hirano T. Effects of 0.6 mg/kg intravenous alteplase on vascular and clinical outcomes in middle cerebral artery occlusion: Japan Alteplase Clinical Trial II (J-ACT II). *Stroke* 2010;41(3):461-5.

13. 鈴木理恵子, 古賀政利, 山本晴子, et al. rt-PA 静注による閉塞血管早期再開通率の検討: 虚血性脳卒中に対する新規超音波血栓溶解装置開発の対照データ. *Neurosonology* 2015;28:1-5.

14. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 1995;333(24):1581-7.

15. Saqqur M, Uchino K, Demchuk AM, et al. Site of arterial occlusion identified by transcranial Doppler predicts the response to intravenous thrombolysis for stroke. *Stroke* 2007;38(3):948-54.

16. Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, et al. Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet* 2007;369(9558):275-82.

17. Yamaguchi T, Mori E, Minematsu K, et al. Alteplase at 0.6 mg/kg for acute ischemic stroke within 3 hours of onset: Japan Alteplase Clinical Trial (J-ACT). *Stroke* 2006;37(7):1810-5.

18. Toyoda K, Koga M, Naganuma M, et al. Routine use of intravenous low-dose recombinant tissue plasminogen activator in Japanese patients: general outcomes and prognostic factors from the SAMURAI register. *Stroke* 2009;40(11):3591-5.

【別紙 1】治験実施体制

1. 治験依頼者

株式会社カネカ
〒530-8288 大阪市北区中之島2-3-18
中之島フェスティバルタワー

2. 治験調整委員会

()

所属
連絡先

× × × ×
所属
連絡先

所属
連絡先

: 治験調整委員会代表

[役割]

主に以下の内容について治験実施医療機関間の調整を行うが、手順の詳細は、別途作成予定の手順書に規定する。

- 治験実施計画書の内容の細目について治験実施医療機関間の調整
- 治験中に生じた治験実施計画書の解釈上の疑義の調整
- 判定委員会の会議における治験責任医師又は分担医師の意見の調整
- 必要に応じて治験実施計画書等の作成及び改訂に関する助言
- 国内・海外安全性情報（不具合情報を含む）の既知・未知、重篤度、因果関係、PMDA 報告対照可否の分類及び必要に応じて PMDA への対応

3. 治験調整委員会事務局

事務局:

[役割]

治験調整委員会の指示のもと、治験調整委員会が実施する業務の支援を行う。

4. 安全性評価委員会

所属

連絡先

所属

連絡先

所属

連絡先

[役割]

独立安全性評価委員会は、治験責任医師及び分担医師から独立した組織であり、「独立安全性評価委員会手順書」に従い、客観的に安全性に関する評価を行う。最初の3例が実施され、14日後の評価が行われた後、速やかに委員会を開催し、治験依頼者に治験の継続・中止・中断を提言する。また、定期的に***より報告される有害事象の内容、発現頻度等を評価し、治験依頼者に治験実施計画書の変更、治験の継続・中止・中断を提言する。ただし、症候性頭蓋内出血が**例発現した場合は、一旦症例組み入れを中断した上で、委員会を開催し、治験依頼者に治験の継続・中止を提言する。なお、手順の詳細は、別途予定の手順書に規定する。

5. 画像評価委員

所属

連絡先

[役割]

治療前、治療後 120 ± 30 分、治療後 22-36 時間に撮影された頭部 MRI および MRA における脳梗塞領域、閉塞血管、閉塞血管の再開通、治療後 22-36 時間に撮影された頭部 CT 上の頭蓋内出血の判定を行うものとする。

なお、詳細については、別途作成予定の手順書に規定する。

6. 生物統計 / 解析アドバイザー

所属

連絡先

[役割]

統計学の専門家として、治験計画、実施、データの取扱い、解析、評価に関して統計学的見地から助言を行う。

7. 開発業務委託機関

本治験では、以下の開発業務委託期間（以下、CRO とする）に業務を委託する。各 CRO は、当該契約書に規定された責務を負うものとする。

7.1 モニタリング

[役割]

モニタリング業務を行う。

7.2 データマネジメント

[役割]

データマネジメント業務を行う。

7.3 統計・解析

濱崎俊光

国立循環器病研究センター 先進医療・治験推進部 DM/統計室

[役割]

統計解析業務を行う。

7.4 監査

[役割]

監査業務を行う。

8. その他

[役割]

Confidential

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

rt-PA 静注による閉塞血管早期再開通率の検討：虚血性脳卒中に対する新規超音波血栓溶解装置開発の対照データ

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
分担研修者	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 われわれは、低侵襲的低周波超音波装置による急性期血栓溶解療法を開発している。装置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静注療法時の早期再開通率（rt-PA静注後2時間，24時間以内），発症後36時間以内の症候性頭蓋内出血発生率と3ヵ月後転帰を調べた。いずれも、低周波超音波照射は行っていない。対象は384例で、閉塞血管は内頸動脈（ICA）63例（16%），前大脳動脈（ACA）5例（1%），中大脳動脈（MCA）水平部（M1）120例（31%），島部（M2）61例（16%），後大脳動脈（PCA）14例（4%），その他121例（32%）であった。MRAと脳血管造影検査（DSA）とを併用した評価では、M1閉塞の再開通率は2時間以内39.5%，24時間以内58.6%であった。M2閉塞で各々69.2%，90.0%，ICA閉塞で各々23.1%，45.5%，MCA閉塞患者全体で各々46.4%，66.7%，ICA，ACA，MCA，PCA閉塞患者全体で各々37.2%，57.4%であった。ICA，ACA，MCA，PCA閉塞患者のうち8例（3.4%）に症候性頭蓋内出血が出現し、3ヶ月後の転帰良好[modified Rankin Scale (mRS) 0-1]は33.8%，日常生活自立(mRS 0-2)は43.6%であった。

A. 研究目的

わが国では、東京慈恵会医科大学，国立循環器病研究センター，株式会社カネカが共同で、500kHz 前後の変調超音波の安全性と有効性を確認する前臨床研究を実施中であり、さらに本技術を搭載した新規超音波血栓溶解装置の開発および臨床導入を計画している。

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。

B. 研究方法

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ヵ月後死亡 (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 リトリーバー、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。

C. 研究結果

384 例中、男性は 243 例(63.2%)、年齢は 74 ± 13 歳であった。臨床病型は、心原性脳塞栓症 248 例 (64.6%)、アテローム血栓性脳梗塞 48 例(12.5%)、ラクナ梗塞 4 例(1.0%)であった。危険因子として、高血圧 259 例(67.5%)、心房細動 204 例 (53.1%)、脂質異常症 136 例(35.4%)、糖尿病を 78 例(20.3%)に認めた。治療前の閉塞血管は、ICA 63例(16.4%)、MCA水平部 (M1)120 例(31.3%)、島部(M2)61 例 (15.9%)、ACA 5 例(1.3%)、PCA 14 例 (3.6%)、VB系 12 例(3.1%)、閉塞血管なし 78 例(20.3%)、評価不能 27 例(7.0%)、その他 4 例(1.0%)であった。血管内治療が施行されたのは 37 例で、閉塞血管は ICA 15 例、M1 14 例、M2 2 例、椎骨動脈

(vertebral artery; VA)1 例、脳底動脈 (basilar artery; BA) 5 例であった。

rt-PA 投与前にMRAにより閉塞血管を評価した症例は 352 例(全体の91.7%)で、発症からMRAまでの時間は 103 ± 40 分であった。そのうち、主幹動脈(ICA, MCA, ACA, PCA)閉塞を認めた 263 例(MRA評価全体の74.7%)を対象として検討したところ、rt-PA投与後、2 時間以内にMRAで再開通の有無を確認した症例は 71 例で、rt-PA投与からフォローアップのMRAまでの時間は 68 ± 21 分であった。rt-PA投与後、2 時間以内にDSAで再開通の有無を確認した症例は 31 例で、rt-PAからDSAの穿刺までの時間は 82 ± 30 分であった。16 例が 2 時間以内にMRA, DSAともに施行されており、発症 2 時間以内にMRAもしくは、DSAで再開通の有無が確認できた症例は合計 86 例(主幹動脈閉塞の32.7%)であった。

24 時間以内の評価は、血管内治療を施行した 31 例と脳梗塞を再発した M2 閉塞の 1 例を除外した 54 例(主幹動脈閉塞の20.5%)で行った。54例中rt-PA投与後 24 時間以内にMRAの評価を行った症例は 7 例で、rt-PAからMRAまでの時間の中央値は 21 時間 57 分、DSAで評価を行った症例は 3 例で、rt-PA投与からDSA穿刺までの時間の中央値 24 時間 58 分であった。24 時間以内のMRAの評価の 47 例、MRAとDSAを併用した評価の 44 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を代用した。

MRA, MRAとDSAの併用による 2 時間以内の再開通をTable 1に示す。MRAを用いた評価では、ICA閉塞の再開通率は 25.0%、M1閉塞 44.7%、M2 閉塞 69.2%、ACA閉塞 0%、PCA閉塞 0%、MCA(M1 + M2)閉塞 51.0%、主幹動脈(ICA, ACA, MCA, PCA)閉塞 42.3%であった。MRAとDSAを併用した評価では、それぞれ、23.1%、39.5%、69.2%、0%、0%、46.4%、37.2%であった。閉塞部位毎に再開通率を比較すると、MRAとDSAを併用した評価では、ICAの再開通率に比べて、M1の再開通率は有意差なく($p=0.160$)、M2の再開通率が高かった($p=0.005$)。

24時間以内の再開通をTable 2 に示す。MRAを用いた評価では、ICA閉塞の再開通率は36.4%、M1閉塞55.2%、M2閉塞90.0%、ACA閉塞0%、PCA閉塞0%、MCA(M1+M2)閉塞64.1%、主幹動脈(ICA、ACA、MCA、PCA)閉塞53.7%であった。MRAとDSAを併用した評価では、それぞれ、45.5%、58.6%、90.0%、0%、0%、66.7%、57.4%であった。閉塞部位毎に再開通率を比較すると、MRAとDSAを併用した評価では、ICAの再開通率に比べ、M1の再開通率は有意差なく($p=0.455$)、M2の再開通率が高かった($p=0.031$)。

症候性頭蓋内出血は血管内治療を施行された37例を除外した347例で検討した(Fig.1)。全体では8例(2.3%)であり、ICA閉塞で2例、M1閉塞で3例、M2閉塞で3例認められた。ICA閉塞の4.2%(2例/48例)、M1閉塞の2.8%(3例/106例)、M2閉塞の5.1%(3例/59例)、ICA、ACA、MCA、PCA閉塞患者の3.4%(8例/232例)、ACA、MCA、PCA閉塞患者の3.3%(6例/184例)であった。ICA、M1、M2の閉塞血管別では、症候性頭蓋内出血の発生率に有意差は認めなかった(ICAと比較した、M1、M2の発生率は各々 $p=0.647$ 、 $p=1.000$)。

3カ月後のmRSを、血管内治療を施行された37例と、転帰を確認できなかった10例を除外した337例で検討した。転帰良好(mRS 0-1)は全体の38.6%(130例/337例)、ICA、ACA、MCA、PCA閉塞患者の33.8%(76例/225例)、ACA、MCA、PCA閉塞患者の38.3%(69例/180例)、日常生活自立(mRS 0-2)は全体の50.1%(169例/337例)、ICA、ACA、MCA、PCA閉塞患者の43.6%(98例/225例)、ACA、MCA、PCA閉塞患者の48.9%(88例/180例)であった(Fig.2)。閉塞血管別では、転帰良好(mRS 0-1)はICA 15.6%(7例/45例)、M1 34.0%(35例/103例)、M2 40.7%(24例/59例)、閉塞血管なし 53.3%(40例/75例)であり、ICA閉塞はそれ以外に比較して転帰良好が少なかった($p<0.001$)、日常生活自立(mRS 0-2)はICA 22.2%(10例/45例)、M1 44.7%(46例/103例)、M2 49.2%(29例/59例)、閉塞血管なし 69.3%(52例/75例)であり、ICA閉塞はそれ以外に比較して日常生活自立が少なかった($p<0.001$)。

Table 1 Recanalization rates within 2 hours after the initiation of rt-PA

MRA (modified Mori grade)	Patients(%)				
	0	1	2	3	Total
ICA	9(56.3)	3(1918.8)	3(18.8)	1(6.3)	16
M1	20(52.6)	1(2.6)	12(31.6)	5(13.2)	38
M2	4(30.8)	0(0)	5(38.5)	4(30.8)	13
ACA	1(100.0)	0(0)	0(0)	0(0)	1
PCA	2(66.7)	1(33.3)	0(0)	0(0)	3
Total	36	5	20	10	71

MRA,DSA (modified Mori grade, TICl)

MRA,DSA (modified Mori grade, TICl)	Patients (%)				
	0	1	2	3	Total
ICA	17(65.4)	3(11.5)	5(19.2)	1(3.8)	26
M1	24(55.8)	2(4.7)	10(23.3)	7(16.3)	43
M2	4(30.8)	0(0)	5(38.5)	4(30.8)	13
ACA	1(100.0)	0(0)	0(0)	0(0)	1
PCA	2(66.7)	1(33.3)	0(0)	0(0)	3
Total	48	6	20	12	86

Table 2 Recanalization rates within 24 hours after the initiation of rt-PA

MRA (modified Mori grade)	Patients(%)				
	0	1	2	3	Total
ICA	3(27.3)	4(36.4)	2(18.2)	2(18.2)	11
M1	13(44.8)	0(0)	9(31.0)	7(24.1)	29
M2	1(10.0)	0(0)	5(50.0)	4(40.0)	10
ACA	1(100.0)	0(0)	0(0)	0(0)	1
PCA	2(66.7)	1(33.3)	0(0)	0(0)	3
Total	20	5	16	13	54

MRA,DSA (modified Mori grade, TICl)

MRA,DSA (modified Mori grade, TICl)	Patients(%)				
	0	1	2	3	Total
ICA	2(18.2)	4(36.4)	3(27.3)	2(18.2)	11
M1	12(41.1)	0(0)	8(27.6)	9(31.0)	29
M2	1(10.0)	0(0)	5(50.0)	4(40.0)	10
ACA	1(100.0)	0(0)	0(0)	0(0)	1
PCA	2(66.7)	1(33.3)	0(0)	0(0)	3
Total	18	5	16	15	54

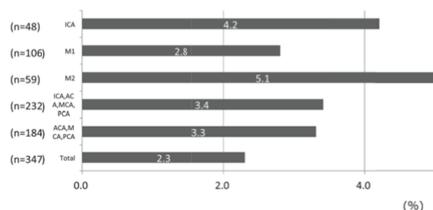


Fig.1 Symptomatic intracerebral hemorrhage within the initial 36 hours
a deterioration in NIHSS score ≥ 4 from baseline

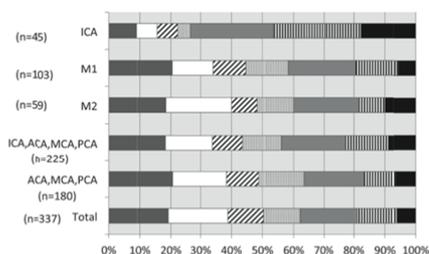


Fig. 2 Modified Rankin Scale at 3 months by different sites of occlusion

死亡(mRS 6)は、全体の 6.2%(21 例/337 例)、ICA、ACA、MCA、PCA 閉塞患者の 8.9%(20 例/225 例)、ACA、MCA、PCA 閉塞患者の 6.7%(12 例/180 例)であった。閉塞血管別では、ICA 17.8%(8 例/45 例)、M1 5.8%(6 例/103 例)、M2 10.2%(6 例/59 例)であり、ICA閉塞はそれ以外に比較して死亡が多かった(p<0.001)。

D. 考察

新規超音波血栓溶解装置の臨床開発時に参照するデータの収集を行った。

現在までのrt-PA静注療法後の再開通の評価は、アルテプラゼ投与量は 0.6mg/kg、0.9mg/kg の 2 種類での報告があり、また再開通の評価は経頭蓋超音波ドプラ法(transcranial Doppler ultrasonography; TCD)、CTA、MRA、DSAといった多様な手段が使用され、評価のタイミングもさまざまであった(Saqqur M, et al. Stroke 2007, Bhatia R, et al. Stroke 2010, Lee KY, et al. Stroke 2007, Kimura K, et al. Eur Neurol 2009, Kimura K et al. J Neurol Sci 2008, 青木ら. 臨神経2010)。今回われわれは、0.6mg/kg のrt-PA静注療法を施行された患者を対象に、MRA、DSAの所見のみを用いて検討を行った。TCDや経頭蓋カラードプラ法(transcranial color-coded sonography; TCCS)を除外した理由は、日本人ではTCDやTCCSに必要な側頭骨窓が良好な症例が少なく、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(Suzuki R, et al. Cerebrovasc Dis 2012)。本研究は、低侵襲的低周波超音波装置による急性期血栓溶解療法開発のための参照データの収集が目的であり、本装置の治療対象となると予測されるICA、MCA、ACA、PCA閉塞もしくはは

MCA、ACA、PCA閉塞をまとめた検討を追加した。

現在までに報告されているrt-PA投与後の閉塞血管の再開通率について結果を示す。

Bhatiaら(Bhatia R, et al. Stroke 2010)は、CTAでICA、M1、M2 閉塞が示された 388 例を対象に、rt-PA(0.9mg/kg)静注療法開始後 120 分までに施行したTCD、もしくは、血管内治療目的で施行したDSAで再開通の評価を行った。再開通をTCDで thrombolysis in brain ischemia(TIBI)3-5、DSAで thrombolysis in myocardial ischemia(TIMI)2-3 と定義したとき、ICA終末部の再開通率は 4.4%(1 例 /24 例)であり、M1 は 32.3%(21 例 /65 例)、M2 は 30.8%(4 例 /13 例)、BA は 4.0%(1 例 /25 例)であった。Leeら(Lee KY, et al. Stroke 2007)は、アルテプラゼ(0.9mg/kg)投与後、中央値 120 分(60-365 分)に DSA を行い、TICI 2 以上を再開通ありとして評価している。入院時にCTAで主幹動脈閉塞を認めた 31 例のうち、ICAもしくは、M1 閉塞の再開通は 12.5%(2 例 /16 例)、M2 以遠閉塞 27.3%(3 例 /11 例)、BA閉塞 50.0%(2 例 /4 例)であった。われわれの研究とこれらの報告を比べると、アルテプラゼ0.9mg/kgを使用している点、CTAを用いて入院時の閉塞血管の評価をしている点、一部TCDで再開通率の評価をしている点が異なっていた。アルテプラゼの投与量が違うため、再開通率を今回の結果と直接比較することは困難であるが、近位側脳主幹動脈の再開通率が低い点は今回の結果と同様であった。

MRAを用いてMCA(M1、41 例;M2、17 例)閉塞患者のアルテプラゼ(0.6mg/kg)投与後の再開通を前向きに観察した Japan Alteplase Clinical Trial II(J- ACT II)(Mori E, et al. Stroke 2010)の報告では、MCA閉塞患者の 6 時間後の再開通率は 51.7% であり、24 時間後の再開通率は 69.0% であった。Kimuraら(Kimura K, et al. Eur Neurol 2009)は、ICA、MCA閉塞のある 64 例の患者にアルテプラゼ(0.6mg/kg)投与後MRA を用いて再開通の評価を行い、42 例の MCA閉塞(M1、30 例;M2、12 例)のうち、1 時間後の早期再開通は 52.3%(完全再開通 19.0%、部分再開通 33.3%)、

24 時間後では 80.9%(各々 47.6% , 33.3%) , ICA 閉塞の 22 例では1 間後 31.8%(各々 4.5% , 27.3%) , 24 時間後 51.9%(各々 14.3% , 47.6%)に再開通を認め、ICAで再開通率が低いことを示している。J-ACT II , Kimuraらの報告とわれわれの研究を比較すると、われわれの研究では画像の評価にMRAに加えてDSAも用いている点、少数ではあるがACAやPCAの閉塞症例に関して検討している点が異なっている。今回の研究に、ACAやPCA閉塞患者も含めたのは、CTのみでrt-PA静注療法を施行する施設も多く、閉塞血管の評価なしに新規超音波血栓溶解装置を使用することも想定したためである。今回の検討では、ACAやPCA閉塞患者は、24 時間以内にMRAやDSAを施行する症例が少なく、合計で 4 例が検討できたのみであり、4 例とも 24 時間後まで再開通は認めないという結果であった。ACA、PCA閉塞の検討に関しては、症例数が少なかったため、更なる症例の蓄積と検討が必要であろう。また、われわれの研究では、rt-PA投与後 2 回目の再開通評価は、24 時間後には全例では行われておらず、24 時間後に再開通を評価しなかった症例は、2 時間後の再開通の有無で 24 時間後の再開通の有無を代用している。

われわれの結果のうち M1 と M2 を合わせたMRAでの 24 時間後の再開通率 64.1%(25 例 /39 例)を、本邦から報告されている J-ACT II(Mori E, et al. Stroke 2010)の再開通率である 69.0% (40 例/58 例)や Kimuraら(Kimura K, et al. Eur Neurol 2009)の再開通率 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かった。これらの国内報告と今回の結果とを合わせると、M1、M2 閉塞患者の 24 時間後の再開通率は 71.2% と計算された。

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%(Wahlgren N et al. Lancet 2007) , 本邦の市販後調査であるJ-MARS研究の3.5%(Nakagawara J, et al. Stroke 2010)と同様の結果であった。3 カ月後の転帰良好も、SITS-MOSTの 38.9% , J-MARS の 33.1% , SAMURAI rt-PA 登録研究の 33.2% と同様であった。

われわれの研究にはいくつかの問題点がある。1 つ目は後ろ向き観察研究であること、2 つ目はMRAやDSAの検査のタイミングにバラツキがあり、症例によって検査の施行時間に差があった。また、24 時間後の再開通の評価と症候性頭蓋内出血、3 カ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。このため症例選択にバイアスが生じ、rt-PA静注療法がもたらす再開通率や転帰が過大評価された可能性がある。

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を評価した。これらのデータを新規超音波血栓溶解装置開発の際の歴史対照として役立てたい。

F . 研究発表

1. 論文発表

1, 鈴木理恵子, 古賀政利, 山本晴子, 大山賢, 徳永敬介, 松木孝之, 長束一行, 豊田一則, 峰松一夫. rt-PA静注療法による閉塞血管早期再開通率の検討: 虚血性脳卒中に対する新規超音波血栓溶解装置開発の対照データ. Neurosonology 28 (1): 1-5, 2015

2. 学会発表

なし

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

経頭蓋カロ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・治験推進部部长
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 経頭蓋カロードプラ法に用いる探触子頭部固定具はその固定の難しさから市販されておらず、有限会社アンリミット・ジャパンと共同で開発した。頭部を固定するヘルメット型を採用し、いくつかの試作を経て、現在商品化を目指している。今後は臨床応用に向けて、前向きに研究を行い、最終的には商品化を目指していく方針である。

A．研究目的

経頭蓋ドプラー法(TCD)の探触子頭部固定具は市販されているが、経頭蓋カロードプラ法(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。

B．研究方法

アンリミット・ジャパン側が開発した頭部固定具を、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27年3月までの当院に入院した患者を対象とした。昨年去年に引き続いて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。

(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、事前に倫理委員会への承認を得ており、被験者のインフォームド・コンセントを受けた上で検査を行った。

C．研究結果

TCCS用探触子頭部固定具と、TCD用探触子頭部固定具の血管を同定するまでの時間を20例の患者で比較した。TCCS用探触子では4分13秒±15分47秒(平均値±SD)、TCD用探触子では10分12秒±11分31秒(p=0.0009)であり、症例を増やしても、TCCS用探触子頭部固定具は有意に血管同定までの時間が短かった。また、TCD用探触子頭部固定具では体動で位置がずれる事が多く、再固定にも時間がかかったが、TCCS用探触子頭部固定具は体動によるずれが少なく、再固定も容易であった。頭部の装着感に関しては、TCD用探触子頭部固定具では長時間の装着で不快感を訴える患者が数例いたが、TCCS用探触子頭部固定具では、不快感の訴えは無かった。

D. 考察

前回の報告では、我々がアンリミット・ジャパンと共同で開発したTCCS用探触子固定具が、TCD用探触子固定具と比較し短時間での固定が可能であったことを少数例で確認したが、今回更に症例数を増やし、TCCS用探触子頭部固定具が血管同定までの時間が有意に短いことが確認できた。また、TCCS用探触子固定具の方が、血管の位置がずれた場合に再固定が容易であり、頭部装着感も優れており、TCCS用探触子が使用可能な超音波装置の普及率を考慮すると、今後TCDの代替の検査と考える。

また、経食道心エコーの代替の検査として、TCCS用頭部固定具による右左シャントの検査が検査者1人で可能なことや、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、閉塞血管の再開通の評価ができる可能性もあり、TCCS用探触子頭部固定具の更なる有用性が確立可能と考える。

E. 結論

TCCS用探触子頭部固定具を開発した。今後は前向きに臨床応用を重ね、商品化を進めていく予定である。

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

血栓選択的RGDバブルリポソームの開発 凍結乾燥製剤化に関する実験

研究分担者 丸山 一雄 帝京大学 教授

研究要旨 我々は、独自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環状化RGDペプチドを修飾したRGD-バブルリポソーム（RGD-BL）を開発した。RGD-バブルリポソームは活性化血小板結合能を有し、超音波診断装置下で血栓造影能を有することが示された。そこで、RGD-バブルリポソームの実用化を考慮して、その凍結乾燥製剤化について検討した。RGD-バブルリポソームは凍結乾燥前後において、粒子径、パーフルオロプロパン含量、HUVEC細胞に対する結合性に大きな差異が認められず、長期保存可能な凍結乾燥製剤化を確立した。

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。前年度までに、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ペプチドを付与した環状化RGD-バブルリポソームを調製し（図1）、血栓集積能、血栓溶解能を評価した。その結果、RGD-バブルリポソームは超音波診断装置下で血栓造影能を有することが示されたが、調製後の安定性に欠くことが問題となった。そこで、RGD-バブルリポソームの実用化を考えると、調製してから使用までの保存安定が重要であり、凍結乾燥製剤化が必須条件であると考え、本研究を遂行した。

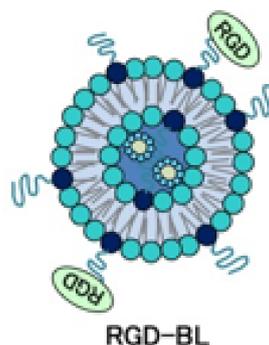


図1 RGD-バブルリポソームの模式図

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 μmol 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(RGD fK)) 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(DGR fK)) 溶液を加え、静かに攪拌しながら 4 晩で一晩反応させた。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。

(2) パーフルオロプロパン (C₃F₈) ガス封入量の測定

バブルリポソーム (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 μL を測定用のバイアル瓶に移し、ガスクロマトグラフ (SHIMADZU GCMS-QP2010 +HS-20) により C₃F₈ 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) RGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤化と復水処理

RGD-バブルリポソーム懸濁液を 9% スクロースで希釈して 1 mg/mL とし、2 mL をバイアル瓶に入れた。その後、バイアル瓶内の気相部分をパーフルオロプロパン

7.5 mL で置換し、キャップした。さらにパーフルオロプロパン 10 mL で加圧し、バス型ソニケーターを用いて超音波照射した。その後、バイアル瓶のキャップを開け、液体窒素を用いて凍結した。このバイアル瓶を凍結乾燥器 (EYLA FDU-1100, DR C-1100) にセットし、凍結乾燥した後に、パーフルオロプロパンで常圧にし、さらに 7.5 mL のパーフルオロプロパンで加圧した。調製した凍結乾燥 RGD 修飾バブルリポソームを室温にて長期保存した。

使用直前に超純水 2 mL を加え攪拌することで復水した。

(5) HUVEC 細胞との結合実験

DiO 標識 RGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤を腹水処理後、HUVEC 細胞との結合性を、4、15 分間接触させてフローサイトメトリーで評価した。

C. 研究結果

(1) RGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤化と復水処理

RGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤化を 9% スクロースの溶媒のもとで行った結果、図 2 に示すようなケーキ状の凍結乾燥製剤が調製できた。9% スクロース以外の溶媒のものとは、凍結乾燥製剤化は困難であった。超純水を添加し、かるく振盪するだけで、凍結乾燥前の状態に戻ったので、パーフルオロプロパンガスの再封入を、造



図 2 RGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤の形態と凍結乾燥前と復水処理後の形態の比較

影装置で確認したところ、図3のように、凍結乾燥前と同様の輝度を持つ超音波像を得ることができた。

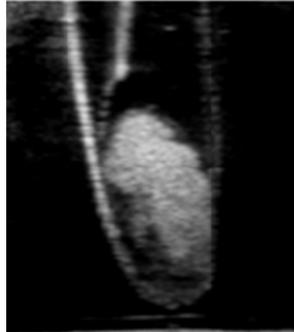


図3 復水処理後の凍結乾燥RGD-バブルリポソームの超音波造影能

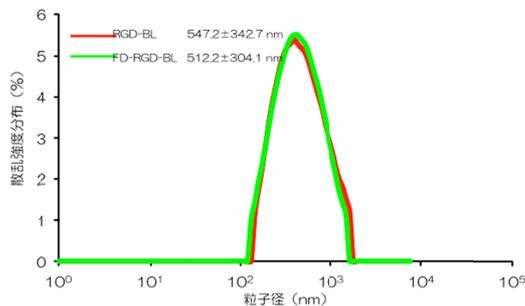


図4 凍結乾燥製剤化前後における粒子径の変化

図4に示すように、凍結乾燥前後における粒子径(=520nm)に大きな差異は無かった。したがって、RGD-バブルリポソームは9%スクロースの存在下で凍結乾燥ができ、長期間の保存が可能となった。

(2) 凍結乾燥RGD-バブルリポソーム製剤のパーフルオロプロパン保持量

復水した凍結乾燥RGD-バブルリポソーム500 μLをガスクロマトグラフィ用バイアル瓶に入れ、ゴム栓・アルミキャップで密封した後、超音波洗浄槽を用いて1分間超音波照射し、バブルを完全に崩壊させ、ガスクロマトグラフによりパーフルオロプロパンガスを封入量を測定した。

復水処理しても、図5に示すように、7 μL/mg lipidの封入量が得られ、ほぼ凍結乾燥前に戻ることが認められた。

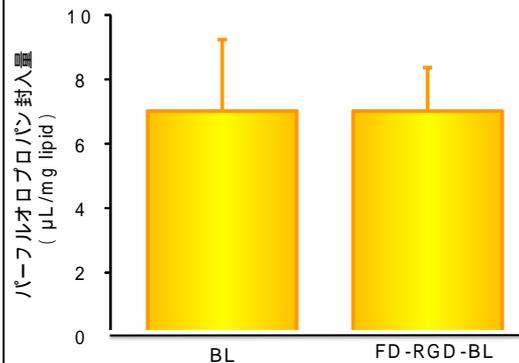


図5 凍結乾燥前と後における封入パーフルオロプロパン量の比較

(3) 凍結乾燥RGD-バブルリポソーム製剤のHUVEC細胞との結合性実験

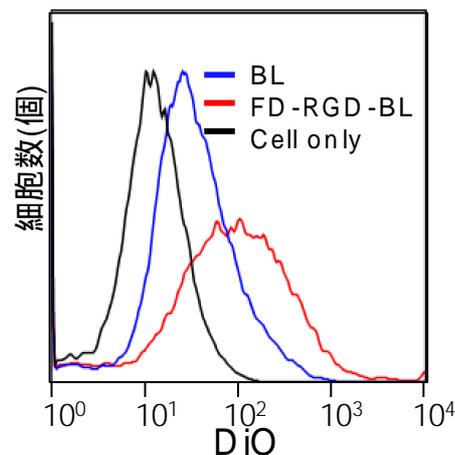


図6 HUVEC細胞との結合性実験

DiO標識RGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤を腹水処理後、HUVEC細胞との結合性を評価したところ、図6.に示すように凍結乾燥前と同様な結合性が見られ、凍結乾燥による影響は見られなかった。

D. 考察

9%スクロースの溶媒下で調製されたRGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤化において、9%スクロースは膜保護作用を有し、腹水処理をしても元の状態に戻すことができた。このような凍結乾燥操作は、リポソーム製剤でも多用されている方法で、他にトレハロースもRGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤化に用いることができると考えられる。凍結乾燥状態のバブルリポソームの形態について興味あるが、電顕等で調べる必要があり、本研究では遂行出来なかった。SONAZOIDも凍結乾燥製剤と供給されているが、RGD-バブルリポソームと同様の凍結乾燥形態をしていると考えられる。凍結乾燥製剤化によって、長期間の保存が可能となり、また、純水の添加と振盪だけで凍結乾燥前の状態に完全に戻ることから、実用化に一步前進したと言える。

E. 結論

RGD-バブルリポソームは凍結乾燥前後において、粒子径、パーフルオロプロパン含量、HUVEC細胞に対する結合性に大きな差異が認められず、長期保存可能な凍結乾燥製剤化を確立できた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kohsuke Hagiwara, Toshihiko Nishioka, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Yasuhiro Nishida, Kiyoshi Iida, Huai Luo, Robert J. Siegel. Thrombus targeted perfluorocarbon containing liposomal bubbles for enhancement of ultrasonic thrombolysis - in vitro and in vivo study - J. Thrombosis and Haemostasis. 11, 1565-1573, 2013
- 2) Nobuhito Hamano, Yoichi Negishi, Kyohei Takatori, Yoko Endo-Takahashi,

Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Takuro Niidome, Yukihiko Aramaki.

Combination of Bubble liposomes and high-intensity focused ultrasound (HIFU) enhanced antitumor effect by tumor ablation.

Biological & Pharmaceutical Bulletin 37(1), 174-177, 2014.

- 3) Ren Koda, Jun Koido, Naoto Hosaka, Shinya Onogi, Takashi Mochizuki, Kohji Masuda, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama.

Evaluation of active control of Bubble liposomes in a bifurcated flow under various ultrasound conditions.

Advanced Biomedical Engineering 3, 21-28, 2014

2. 学会発表

- 1) 小田雄介, 鈴木亮, 小俣大樹, 根岸洋一, 川上茂, 樋口ゆり子, 橋田充, 丸山一雄
日本薬学会第134年会、2014, 3, 27
凍結乾燥バブルリポソームの開発と特性評価
- 2) 丸山一雄
第17回日本栓子検出と治療学会、2014, 10, 04
バブルリポソームによる超音波セラノスティクス
- 3) Daiki Omata, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Johan Unga, Mutsumi Seki, Hitoshi Uruga, Yoichi Negishi, Kazuo Maruyama
Focused Ultrasound 2014 Int. Symposium 2014, 10, 13
Brain Targeted Gene Delivery by Combining Bubble Liposomes and Ultrasound

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
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	9	1045-1051	2014
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	36	260-265	2014
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.	Ultrasonics	59	94-101	2015
鈴木理恵子, 古賀政利, 山本晴子, 大山賢, 徳永敬介, 松木孝之, 長束一行, 豊田一則, 峰松一夫.	rt-PA静注による閉塞血管早期再開通率の検討: 虚血性脳卒中に対する新規超音波血栓溶解装置開発の対照データ.	Neurosonology	28	1-5,	2015
Kohsuke Hagisawa, Toshihiko Nishioka, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Yasuhiro Nishida, Kiyoshi Iida, Huai Luo, Robert J. Siegel	Thrombus targeted perfluorocarbon containing liposomal bubbles for enhancement of ultrasonic thrombolysis - in vitro and in vivo study -	J. Thrombosis and Haemostasis	11	1565-1573	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nobuhito Hamano, Yoichi Negishi, Kyohei Takatori, Yoko Endo-Takahashi, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Takuro Niidome, Yukihiko Aramaki	Combination of Bubble Liposomes and high-intensity focused ultrasound (HIFU) enhanced antitumor effect by tumor ablation.	Biological & Pharmaceutical Bulletin	37	174-177	2014
Ren Koda, Jun Koido, Naoto Hosaka, Shinya Onogi, Takashi Mochizuki, Kohji Masuda, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama	Evaluation of active control of Bubble liposomes in a bifurcated flow under various ultrasound conditions.	Advanced Biomedical Engineering	3	21-28	2014