

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：32425

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19208

研究課題名(和文)非侵襲的超音波による血管閉塞性疾患治療後の血管再開塞予防法開発の基礎検討

研究課題名(英文)Basis examination for development of prevention of vascular occlusion by non-invasive ultrasound

研究代表者

澤口 能一 (Sawaguchi, Yoshikazu)

日本薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20735477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞を血栓溶解薬を用いて治療した場合、24時間以内に2割前後の患者で再発することが報告されている。また、この24時間に抗凝固薬などを用いて再発予防をすると脳出血の副作用発現率が顕著に増加することから、これらの薬物の使用は認められていない。そこで、薬物を一切必要としない超音波による再発予防法の開発を試みた。

脳梗塞の再発には、溶解した血栓の再成長が主要因の一つであるため、超音波により血栓の成長を抑制できるか否か検討を行った。その結果、超音波を照射するだけで血栓の成長を抑制できただけでなく、人体に非侵襲的であるとされている超音波出力よりも低い出力で顕著に血栓の成長を抑制できることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Reocclusion occurred after various recanalization therapies. In particular, reocclusion was frequently observed immediately after t-PA treatment. This is a fatal problem, because anticoagulant therapy is prohibited within 24 hours after tPA treatment. We report the thrombus growth control effect of ultrasound in vitro.

The thrombus growth was significantly suppressed in ultrasound group compared with non-ultrasound group. Moreover, the anti-thrombus growth effect was enhanced in an intensity dependent way. In this study, we showed that the US which is non-invasive and low intensity (0.72 W) would control the growth of thrombus. This method may improve the safety and simplify the clinical secondary prevention procedure for stroke reocclusion.

研究分野：医用工学

キーワード：脳梗塞 再開塞 予防 非侵襲的超音波

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳梗塞、心筋梗塞の治療にはカテーテルによる血栓の吸引・抜去、ステント留置による血管拡張術、rt-PA による血流再開通法が施行され、著効を示している。しかし、いずれの療法においても血栓の再成長による血管の再開塞が発症し、治療が成功したにも関わらず、亡くなってしまう患者が決して少なくない。

(2) この再開塞に対するアプローチとしては、10年以上前より国内外で抗血栓薬・抗凝固薬の併用などによる再開塞予防が数多く検討されており、今日ではアスピリンとクロピドグレルの二剤を併用することで血管の再開塞をコントロールできることが報告されている (Daemen ら Lancet, 369, 667-678, 2007)。しかし、薬物の併用だけでは十分に再開塞が予防しきれないのもまた事実である。特に、rt-PA を用いた血流再開通療法が著効した患者においては、治療後 24 時間以内に 14% - 34% の高確率で血管の再開塞を発症するにもかかわらず、抗凝固薬などの使用により頭蓋内症候性出血の頻度が顕著に高くなることが報告されていることから (Zinkstok ら Lancet, 2012) また脳梗塞治療ガイドラインにおいても rt-PA 治療後 24 時間以内の抗凝固薬の使用は一切認められていない。そのため、一刻も早い新規血管再開塞予防法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

(1) 心筋梗塞、脳梗塞は、いずれも血栓形成が関与する血管閉塞が原因となる疾患である。これらの疾患の治療には、ステント留置術や血栓溶解薬であるプラスミノゲンアクチベータ (rt-PA) による血流再開通治療が施行されている。しかし、いずれの療法においても血流再開通後の血栓再成長による血管閉塞が致命的な問題となっている。そのため、本研究では、この血管再開塞の問題に対し、手術や医薬品を全く必要としない非侵襲的超音波のみを使用した新規血管再開塞予防法の開発を目的とする。

(2) 過去の研究で、非侵襲的超音波による“血栓成長抑制効果”を見出した。そこで、超音波による血管再開塞予防の最適化を行うべく、*in vitro* および *in vivo* にて様々な超音波照射条件下で血栓成長抑制効果の評価を行い、血管再開塞抑制に対する至適な超音波照射条件を見出す。

3. 研究の方法

(1) 独自に開発したウシ血漿を用いた血栓成長モデルを用いて、血栓成長抑制効果に至適な超音波照射条件を明らかとする。

(2) ウシだけでなくヒト血漿を用いた血栓成長モデルを構築し、ウシ血栓成長モデルで見出した超音波による血栓成長抑制の超音波至適条件をヒト血栓成長モデルで確認する。

4. 研究成果

(1) ウシ血栓成長モデルによる血栓成長抑制効果の再検証

2011 年にウシ血栓成長モデルを用いて、非侵襲的超音波による血栓成長抑制効果を世界で初めて報告した。しかし、この報告では実験環境における超音波が乱反射することで、実験結果に影響を及ぼすほどのホットスポットが生じた可能性が推察されていた。本研究では、超音波による血栓成長抑制効果の音響強度 (出力) 的閾値についても明らかにすることで、臨床における超音波の運用法を確立していく目的があった。

そのため、できる限りホットスポットが生じない環境で研究を行う必要があった。そこで、実験環境を超音波の反射が生じにくい、もしくは反射しても実験結果に影響が及ぶにくい環境を構築することで再度検討を行った。

また、2011 年の血栓成長モデルはアクリル容器を用いて作製したが、アクリルは比較的超音波の反射を起こしがたい素材ではあるが、さらに超音波の反射が生じにくい天然ゴムを使用した実験系を新たに構築することで、2 つの実験系から超音波による血栓成長抑制効果について再検証を行なった。

なお、超音波の非侵襲的音響強度について Food and Drug Administration (FDA) および日本工業規格 (JIS) は、 0.72 W/cm^2 を限界強度として定めているため、本研究における検討では、最高音響強度を 0.72 W/cm^2 に調整した超音波を照射して検討を行った。

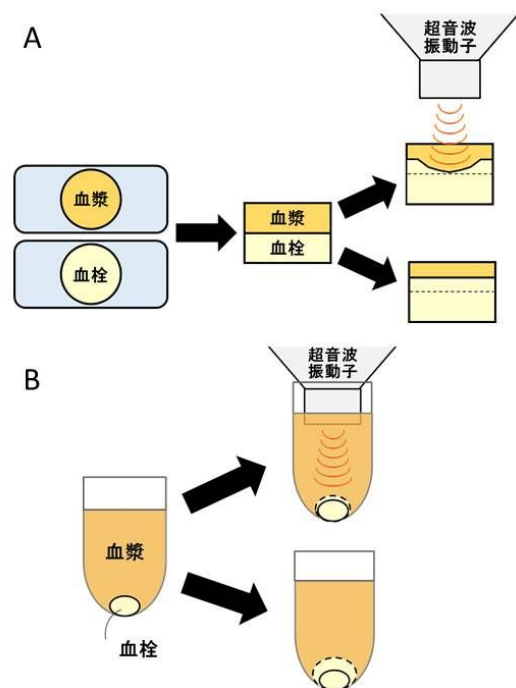


図1 血栓成長モデル概念図

今回の研究で使用した2つの血栓成長モデルを図示した。血栓内部には血液凝固因子が含

まれるため、血栓と血漿が接触すると、血栓内部の血液凝固因子が徐々に放出され、血漿が凝固することで血栓が成長する。A:従来のアクリル容器を使用した血栓成長モデル。B:新たに構築した超音波の反射が生じにくい天然ゴムを用いた血栓成長モデル。

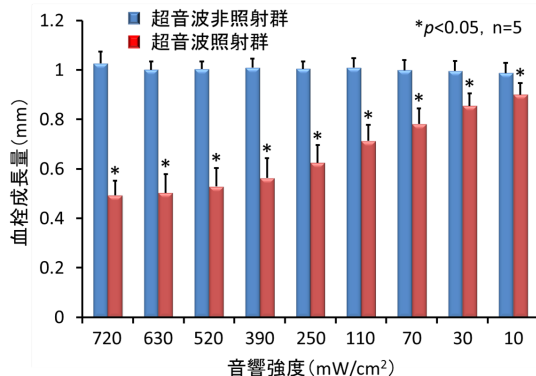


図2 アクリル容器を用いた血栓成長抑制効果の再検討

ウシ血漿を用いて作製した血栓成長モデルを37℃の水浴に2つ(1セット)静置し、30分間血栓を成長させた。その間、一方の血栓成長モデルには非侵襲的超音波を照射した。血栓成長量は、実験前後で血栓の吸光度を測定し、吸光度より血栓の厚さに換算することで算出した。

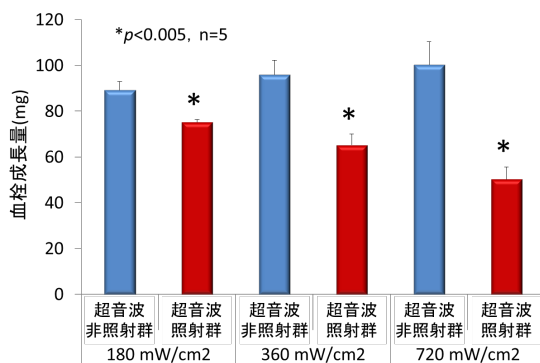


図3 天然ゴム容器を用いた血栓成長抑制効果

ウシ血漿を用いて作製した血栓成長モデルを37℃の水浴に2つ(1セット)静置し、30分間血栓を成長させた。その間、一方の血栓成長モデルには非侵襲的超音波を照射した。血栓成長量は、実験前後で血栓重量を測定し、算出した。

本検討により、非侵襲的な音響強度の超音波を照射するだけで血栓成長抑制効果を得ることができることが明らかとなった。

図2の結果より、その血栓成長抑制作用は非常に微弱な音響強度より発現することが示唆された。また図3の超音波の反射を低減させた実験系においても図2の結果同様わずかな音響強度から血栓成長抑制効果を示すことができると示唆された。本データから血栓成長抑制効果を得ることができる超音波の音響強度を試算すると、図2の結果ではほぼ0 W/cm²と算出することができ、図3の結果では約100 W/cm²と算出された。2つの実験系による超音波の音響強度の閾値の違いについては、図2は血栓成長量を“厚さ”という1次元的评价であるのに対し、図3の結果では“重さ”という3次元的评价を行ったことによる違いであると考えられる。すなわち、血管内の血栓の体積を減少させるために必要となる超音波の音響強度的閾値はおおよそ100 W/cm²となるのではないかと推察された。

(2) ヒト血栓成長モデル

ウシ血漿を用いた血栓成長モデルにおいて、超音波による血栓成長抑制効果が明らかとなったが、ヒトの血栓でも同様の効果を得ることができるのかを検証した。評価系としては図1Bの天然ゴムを用いたヒト血栓成長モデルを構築した。

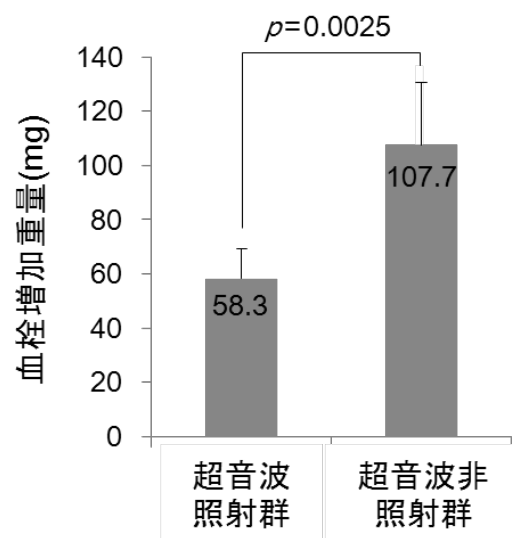


図4 ヒト血栓成長モデルにおける血栓成長抑制効果

ヒト血漿を用いて作製した血栓成長モデルを37℃の水浴に2つ(1セット)静置し、30分間血栓を成長させた。その間、一方の血栓成長モデルには非侵襲的超音波を照射した。血栓成長量は、実験前後で血栓重量を測定し、算出した。

本検討により、ヒト血栓でも超音波により血栓成長を抑制できることが明らかとなった。

(3) 総括

本研究により、超音波によりウシ血栓のみならずヒト血栓の成長を抑制できることが示唆された。また、血栓成長抑制効果は音響強度に依存して大きくなり、またその閾値も非侵襲的音響強度の限界値である 0.72 よりも非常に小さな値となったため、臨床上でも超音波による血管閉塞予防は安全に運用できることが推察された。

しかし、本検討は生体内環境を完全に再現したものではないため、今後は動物の血管閉塞モデルを構築すると共に、超音波による血管閉塞抑制効果について詳細に検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Yoshikazu Sawaguchi, Zuojun Wang, Souma Itou, Ran Kikuchi, Hiroyuki Yamamoto, Ken Tachibana, Takanori Nakajima, Norio Nakata., Basis examination for development of prevention of vascular occlusion by ultrasound., Neurosonology, 30(1), 2017. (in press)

Yoshikazu Sawaguchi, Zuojun Wang. Ultrasound acceleration of rt-PA thrombolysis depends on acoustic intensity., Biol. Pharm. Bull., 40(1), 97-103, 2017.
DOI: 10.1248/bpb.b16-00702

〔学会発表〕(計6件)

澤口能一, 王 作軍, 中田典生, 超音波による血管再閉塞二次予防の開発, 第18回日本栓子検出と治療学会, 宇都宮, 9月(2015).

伊藤創馬, 王 作軍, 中田典生, 澤口能一, 超音波による血栓成長抑制効果の基礎検討, 日本薬学会第136年会 横浜 3月(2016).

Sawaguchi Y., Wang Z., Itou S., Morimoto K., Nakajima T., Nakata N., Development of secondary prevention of cerebral infarction with ultrasound, 21th Meeting of The European Society of Neurosonology and Cerebral Hemodynamics, Budapest, May(2016).

伊藤創馬, 王 作軍, 菊池 蘭, 中田典夫, 澤口能一, 梗塞予防を目的とした超音波による血栓成長抑制効果の検討, 第60回日本薬学会関東支部会, 東京, 9月(2016)

澤口能一, 王 作軍, 伊藤創馬, 菊池 蘭, 中島孝則, 中田典生, 超音波の血栓成長抑

制作用による血管再閉塞予防法の開発, 第19回日本栓子検出と治療学会, 神戸, 10月(2016).

菊池 蘭, 伊藤創馬, 王 作軍, 山本博之, 立花 研, 中島孝則, 中田典生, 澤口能一, 非侵襲的超音波による脳血管再閉塞予防法の検討, 日本薬学会第137年会, 仙台, 3月(2017).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤口 能一 (SAWAGUCHI, Yoshikazu)
日本薬科大学・臨床薬学分野・助教
研究者番号: 20735477