

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01372

研究課題名(和文) 血流が完全に止まった急性期脳梗塞も治療可能な、新規超音波血栓溶解治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a New Sonothrombolytic Treatment for Acute Ischemic Stroke with a Complete Occlusion of Cerebral Artery

研究代表者

王 作軍 (Wang, Zuojun)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：10758080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は超音波音場中のMBの動きをシミュレーションし、完全閉塞した脳動脈に対しても早く再開通させられる新しい超音波血栓溶解治療法を考案した。

超音波の透過性と光学的透明性を併せ持ち、目標への超音波照射強度及び模擬血管内の疑似血液の血流量を精密的にコントロールできる、新しいin vitro中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルを開発した。さらに、マイクロバブルのサイズの測定に関して、ミー散乱理論に基づいて、新しい光学的精密測定方法を考案し、完成した。

これから、関連する研究成果の論文投稿と同時に、急性期脳梗塞患者の新しい治療法の基礎的理論の完成を目指して行く。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性期脳梗塞患者の死亡率及び障害率が非常に高いが、その根本的治療は血管を閉塞した血栓の除去である。しかし、患者は血栓溶解治療薬rt-PAの投与を受けても、さらに経頭蓋超音波照射ないし超音波増強剤マイクロバブル(MB)の投与を加えても、半分近くは閉塞血管が再開通しない。

本研究は完全閉塞した脳動脈に対しても早く再開通させられることの実現へ一歩前進した。

研究成果の概要(英文)：The applicant simulated the movement of MB in the ultrasonic sound field and devised a new ultrasonic thrombolytic treatment that may be used to re-open the brain arteries even completely obstructed by a thrombotic clot.

We have developed a new in vitro middle cerebral artery occlusion (MCAO) model that combines ultrasonic permeability and optical transparency to precisely control the intensity of ultrasonic irradiation to the target and the flow of pseudo-blood in the simulated blood vessels. In addition, a new optical precision measurement method was devised and completed based on the Mie's scattering theory for measuring the size of microbubbles.

We will publish papers on related research results and complete the basic theory of the new treatments for patients with acute cerebral infarction.

研究分野：超音波医学

キーワード：急性期脳梗塞 血栓溶解治療 超音波治療

### 1. 研究開始当初の背景

急性期脳梗塞(AIS)は本邦ないし世界において大量の患者の死亡または身体障害を引き起こす最もリスクの高い疾患の一つである。しかし、現在唯一確立された AIS の治療法は、発症後 4.5 時間以内の治療開始が必要な recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA)の静脈投与であるが、この治療が行われても、障害無しの予後の患者はわずか 3 割程度にとどまる。もっと有効な治療法の開発が強く求められている。

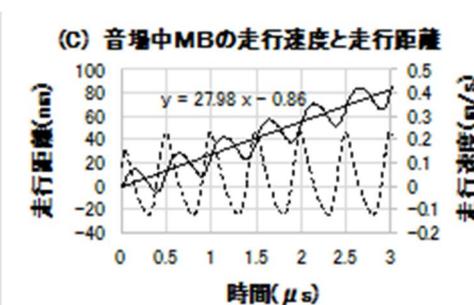
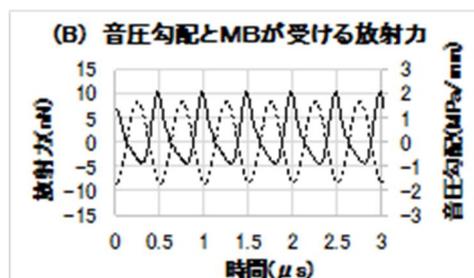
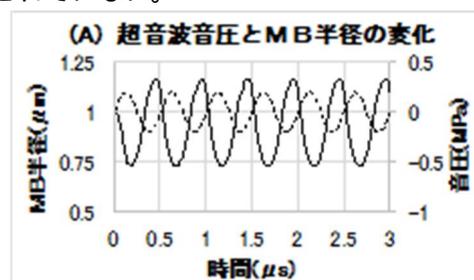
この有効性向上のため、超音波照射が研究されてきた。1976 年に Trübestein らは高強度超音波が速やかに血栓を破壊できることを報告していた。しかし、高強度超音波は無侵襲的な経頭蓋応用が困難で、脳血管ないし脳組織への損傷リスクが極めて高い。その後、立花 (1992)、古幡ら(1994)が in vitro 実験で低強度超音波が血栓溶解を促進することを確認した。動物実験を通じて、経頭蓋低強度超音波血栓溶解促進治療の in vivo での安全性も我々が確認した(佐口ら、王ら)。この療法の世界初の臨床試験は 2004 年に Alexandrov らによって行われた。血流検査用 2MHz の診断超音波を用い、AIS 患者の rt-PA 静脈投与による閉塞血管の再開通率を 30%から 49%に高めることに成功したが、それでも半数以上の患者では再開通が得られなかった。その後、診断用超音波 + マイクロバブル(MB) + rt-PA の臨床試験(2006)が行われた。その照射 2 時間後の血管の完全再開通率は 54.5%に上昇したが、依然として半数近くの患者は照射 2 時間後も完全な再開通がされずに、理想的治療とは程遠い。

なぜ超音波ないしその増強剤 MB を加えても、多数の患者において、血管の再開通は実現しないのか。その根本的な原因は、これらの患者では血栓が血流を止めたために、治療主役の rt-PA がなかなか血栓に到達・浸入できない故と考えられている(Saqqur ら 2009)。しかし、このような状況に対して有効な対処法はまだ何も報告されていない。

申請者はこの根本的な問題を解決すべく、MB が受ける超音波放射力を利用して、rt-PA を血栓の中へ長距離輸送できないかと、まず数値シミュレーション研究を始めた。右図はリン脂質膜を有する医療用 MB モデル(Marmottant 2005)を用いてシミュレーションした結果である。図(A)中、破線は超音波(2MHz,0.2MPa)音圧(P)、実線はMB 半径(r)である。MB は超音波を受けて、その半径が周期的に増減する。ここで、音圧の変化に対して、半径の変化が時間的に遅れることが重要である。図(B)中、破線は音圧勾配 P を、実線は MB に働く放射力の瞬時値 ( $= -MB \text{ 体積} \times \text{音圧勾配} = -4/3 r^3 P$ )を示す。上述したように、半径 r の変化が音圧に対して遅れを生じることから、放射力は図(B)に示すように非対称な形となり、時間的に積分すると、超音波の伝播方向に正の値と示す。

図(C)で、破線は MB の走行速度の瞬時値、実線は MB の走行距離及びその線形近似を示す。MB は前記非対称な放射力を受けて、粘性抵抗のある血漿の中を振動しながら、超音波の伝播方向に沿って走行してゆき、その平均走行速度はなんと 28 mm/s という大きな値となった!

このシミュレーションは、診断用の弱い超音波(2MHz、0.2MPa)でも、MB を素早く輸送できることを示した。この我々の予想をも遥かに超える、MB の驚異的に速い走行を薬物送達に利用できれば、その価値が大きい。血流が完全に停止し、現状では rt-PA が血栓に到達できない場合、適切な超音波照射が rt-PA を含んだ MB を速く血栓に到達・浸入させて、血栓溶解を素早く完了させることが期待できる。



### 2. 研究の目的

本研究はこのシミュレーションでの MB の走行を最大にする超音波条件(周波数、音圧、パルス長さ、パルス繰り返し周波数(PRF)など)を求めるとともに、MB を用いた in vitro 実験を実施して、シミュレーションとの対応を解析する。この研究によって、AIS の再開通率を劇的に高める新規超音波血栓溶解促進療法の科学的、技術的基盤を構築する。

### 3. 研究の方法

#### (1) in vitro 中大脳動脈閉塞モデルの作製

渡會ら(2011)の方法を参考に、超音波透過性に優れたポリエチレングリコール(PEG)で in vitro 中大脳動脈閉塞(MCAO)モデル(Phantom)を作製する。中大脳動脈(MCA)に相当する分岐流路の起始部にその流路より若干太い、弾性力のある全血血栓、又は血漿血栓を挿入して、MCA 内の血流を完全に遮断する。

このモデルにおいては、rt-PA + MB を含んだ血液を持続的に「内頸動脈」(ICA)から注入しても、各種血栓で完全に閉塞した MCA が3時間以上再開通できないことを確認しておく。

#### (2) 血栓形態の観察及び MB の動きの確認方法

高周波数超音波は高い空間分解能があり、且つ MB を破壊しにくいことが既に分かっている(Yeh & Su, 2008)ので、7MHz 以上の高周波数超音波リニアプローブ(Probe)を用い、MCA を中心に一定時間ごとに必要なエコー画像を撮り、MCA 内の血栓形態を経時的に観察するとともに、血栓及びその周辺の血液の中の MB の有無及びその動きを確認する。

#### (3) MB を輸送するための最適な超音波照射条件の検討

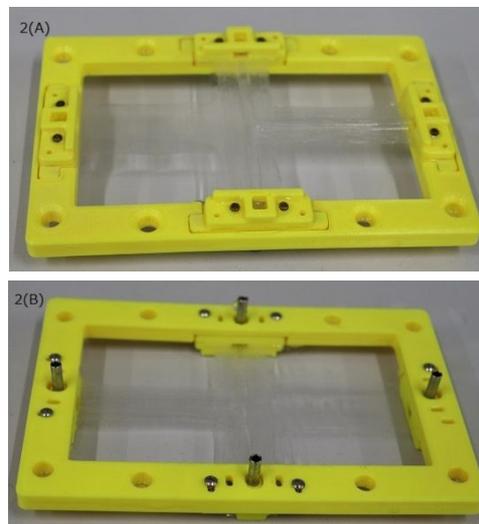
前記高周波数 Probe でのモニタリングの下に、トランスデューサ 1 (Tr1)を用い、MCA の起始部に向けて超音波を照射し、ICA から注入した市販の MB(ソナゾイド)を主流路から MCA の中へ移動させて、血液中及び各種血栓(全血血栓、血漿血栓)の中に MB を安定的かつ効率的に走行させる最適な照射条件(周波数、音圧、パルス長さ、PRF 等)を見出す。

### 4. 研究成果

(1) 薬が血管の外へ漏れない、全く新しい in vitro 中大脳動脈閉塞(MCAO)モデル及び超音波照射システムを開発した。

従来方法に沿ってポリエチレングリコール(PEG)を用いて MCAO モデルを作成する計画であったが、PEG で作った血管モデルは超音波透過性が優れているが、形成された血管壁が弱くて、その血管内面に水を遮断する膜も付いていないので、実験中に応用された tPA 等の薬が血管の外へ浸透してしまい、薬を用いた in vitro 実験においての血管モデルとしての利用は不適切である。

それで、申請者は 40 $\mu$ m 位の薄い透明プラスチックフィルムを血管膜として利用し、全く新しい in vitro MCAO モデルを開発した。この新しいモデルは、優れた超音波透過性と光学的透明性を併せ持つ以外、特に血液中に混注された薬が血管の外へ漏れないので、本研究にもっと相応しく応用できる以外、将来は他の研究へも広く転用できると考えられる。(図 2(A)は申請者が開発した一つの MCAO モデルの表面で、(B)はその裏面である。)



(2) 光学顕微鏡下のマイクロバブルの画像形成をシミュレーションし、その規律性を把握し、正確のサイズ測定を可能にした。

マイクロバブルのサイズがその機械的作用及び造影性に最も影響する重要なパラメータで、光学顕微鏡がそのサイズ及び形状を直感的に把握できる非常に重要な手段である。しかし、光学顕微鏡下のマイクロバブルの画像の形成機序が実に非常に複雑で、少しの焦点ずれだけで、全く違う画像になる癖があり、誤った測定データになってしまう可能性が高い(左図は一例のマイクロバブルに対して撮った顕微鏡画像(対物 20x)で、上から 5 $\mu$ m ずつ距離をずらしてその画像をとっていた)。



それで、申請者は微粒子が光に対するミーの散乱理論及びフーリエ光学理論を用いて、光学顕微鏡下のマイクロバブルの画像形成の機序をパソコンでシミュレーションし、その規律性を理論的に解明し、光学顕微鏡での正確のマイクロバブルのサイズの測定を可能にした。

尚、申請者は上記シミュレーションにおいて必要なパラメータを正確に設定するため、顕微鏡の対物レンズの光の伝番関数を測定できる光学システムをも新規開発した。

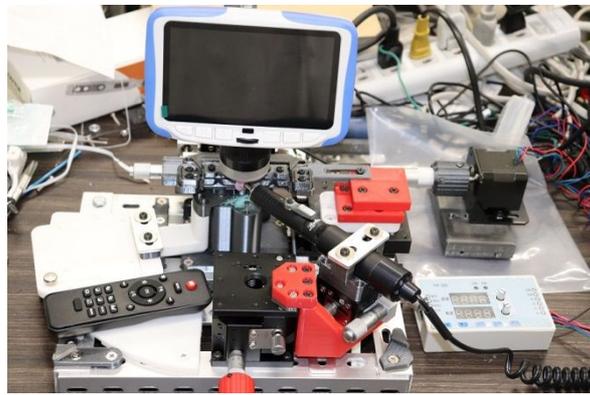
#### (3) 動物 MCAO モデル用塞栓子の改良

Koizumi 氏(1986)がシリコーンコーティングされた縫合糸(ナイロン単糸)を用いて、ラットの脳中大動脈の閉塞及び再開通を簡単にコントロールできる小動物 MCAO モデルを創立した以来、このようなモデルが Longa 氏ら(1989)、Spratt 氏ら(2006)、Bouley 氏ら(2007)等の改良

により、今広く応用されている。しかし、のばらつきによって、適当なサイズの栓子の挿入が失敗してしまうケースが良くある。

それで、申請者がナイロン単系の塞栓子の新しい構造を考案し、その加工機を開発した。この新規開発した塞栓子がシリコンのコーティングよりも十分な変形が可能で、将来の動物実験に応用すれば、相当狭い頸動脈孔をも通せることが可能で、動物実験において十分の梗塞効果をより簡単に達成できる。左図は新規開発したナイロン単系加工機の一部である。

動物の頭蓋骨を通過する頸動脈孔のサイズ及び形状



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wang Zuojun, Sawaguchi Yoshikazu, Hirose Hideo, Ohara Kazumasa, Sakamoto Shinichiro, Mitsumura Hidetaka, Ogawa Takeki, Iguchi Yasuyuki, Yokoyama Masayuki	4. 巻 36
2. 論文標題 An In Vitro Assay for Sonothrombolysis Based on the Spectrophotometric Measurement of Clot Thickness	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Ultrasound in Medicine	6. 最初と最後の頁 681 ~ 698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7863/ultra.15.11018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wang Zuojun, Komatsu Teppei, Mitsumura Hidetaka, Nakata Norio, Ogawa Takeki, Iguchi Yasuyuki, Yokoyama Masayuki	4. 巻 77
2. 論文標題 An uncovered risk factor of sonothrombolysis: Substantial fluctuation of ultrasound transmittance through the human skull	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ultrasonics	6. 最初と最後の頁 168 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultras.2017.02.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shiraishi Kouichi, Wang Zuojun, Kokuryo Daisuke, Aoki Ichio, Yokoyama Masayuki	4. 巻 253
2. 論文標題 A polymeric micelle magnetic resonance imaging (MRI) contrast agent reveals blood?brain barrier (BBB) permeability for macromolecules in cerebral ischemia-reperfusion injury	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 165 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2017.03.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sawaguchi Yoshikazu, Wang Zuojun	4. 巻 40
2. 論文標題 Ultrasound Acceleration of rt-PA Thrombolysis Depends on Acoustic Intensity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 97 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b16-00702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 王 作軍、横山昌幸、中田典生、澤口能一	4. 巻 29
2. 論文標題 超音波およびマイクロバブル併用のin vitroにおける血栓溶解増強効果の定量的評価	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 超音波TECHNO	6. 最初と最後の頁 72~77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 N. Nakata, Z. Wang, T. Watanabe T. Ohta, M. Nishioka, H. Ojiri
2. 発表標題 Robotic Process Automation: Go Beyond Artificial Intelligence in the Radiology Department
3. 学会等名 RSNA 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Sawaguchi, Z. Wang, H. Yamamoto, K. Tachibana, T. Nakajima, N. Nakata
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF SECONDARY PREVENTION OF REOCCCLUSION BY ULTRASOUND
3. 学会等名 ESNCH 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshikazu Sawaguchi, Zuojun Wang, Hiroyuki Yamamoto, Ken Tachibana, Takanori Nakajima, Norio Nakata
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF SECONDARY PREVENTION OF REOCCCLUSION BY ULTRASOUND
3. 学会等名 the 23rd Meeting of the European Society of Neurosonology and Cerebral Hemodynamics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白石 貢一、王 作軍、青木 伊知男、横山 昌幸
2. 発表標題 Blood-brain barrier (BBB)の透過性亢進評価と脳神経疾患との関連
3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関