

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32717

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12679

研究課題名（和文）脳梗塞の再発予防法開発のための非侵襲的超音波を用いた基礎的検討

研究課題名（英文）Development of a method to prevent recurrence of cerebral infarction with noninvasive ultrasound

研究代表者

澤口 能一（SAWAGUCHI, Yoshikazu）

桐蔭横浜大学・医用工学部・講師

研究者番号：20735477

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、まず超音波による血栓形成抑制メカニズムを解明するために、超音波を当てた血栓と非照射の血栓で分子生物学的にどのような違いがあるか検討した。その結果、超音波を照射することでフィブリンに影響を及ぼすことがわかり、またフィブリンにこのような影響を及ぼしうる因子を推定するに至った。

次に、ウサギを用いた研究において、超音波により血栓の形成を抑制することができるか検証を行ったところ、超音波を照射するだけで顕著に血栓の形成を抑制できることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、超音波による血栓形成抑制メカニズムの一端を解明することができたものの、起こりうる副作用や新たな治療法の開発に役立てるために、さらに詳細なメカニズムについて検討していく必要がある。一方で、非侵襲的な超音波を照射するだけで、ウサギに発生する血栓の形成を抑制できることが明らかとなった。これは、これまでの実験的な血栓に対する抑制効果ではなく、生体内の血栓をも超音波が抑制する可能性を示すものであり、血管閉塞性疾患をもつすべての患者へ応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the molecular biological differences between thrombi exposed to ultrasound and thrombi not exposed to ultrasound, in order to elucidate the mechanism by which ultrasound inhibits thrombus formation. As a result, we found that fibrin is affected by the irradiation of ultrasonic waves, and we have deduced the factors that can have such an effect on fibrin.

In a study using rabbits, it was verified whether or not thrombus formation could be suppressed by ultrasound, and it was found that thrombus formation could be significantly suppressed simply by irradiating ultrasound.

研究分野：医用工学

キーワード：血栓 超音波 血管閉塞予防

1. 研究開始当初の背景

本邦において脳血管疾患(約6割が脳梗塞)は、原因別死亡率の第4位を占める疾患であり、長寿化や高齢化社会に伴い、今後も患者数の増加が予測されている。また、WHOの“The top 10 causes of death”では脳卒中は第2位を占めており、この10年間増加を続けている。一方で、脳梗塞治療は近年急速に進展しており、死亡者数は減少している。その理由として、脳梗塞治療ガイドラインの改訂により急性脳梗塞の第一選択療法であり、かつ唯一の承認薬であるrt-PA(プラスミノゲンアクチベータ)による血栓溶解療法の適用時間の延長、血栓回収デバイスによる血管内治療の追加が挙げられる。このように脳梗塞治療を受ける患者数は増加しているが、その一方で、脳梗塞の再発予防対策については解決すべき問題が残されている。

現状、脳梗塞の再発予防には、患者の症状、状態により様々な抗血栓薬が適宜使い分けられている。しかしながら、脳梗塞を発症する患者は高齢かつ複数の基礎疾患をもつことが多く、薬の多剤併用による副作用リスクがベネフィットを上回ってしまうため、脳梗塞の再発を予防しきれないことも少なくない。また、急性脳梗塞の第一選択療法であるrt-PA療法の実施後は、24時間以内の血管再開塞率が14% - 34%と非常に高い(Zinkstokら Lancet, 2012)にもかかわらず、この期間に抗血栓薬を投与すると脳出血率が顕著に上昇する。このため、再開塞予防を目的とした抗血栓薬の投与が一切認められておらず、治療の上で大きな問題となっている。一方、血栓回収デバイスを用いた場合も、血管から血栓を直接的に引き抜くことで血管内皮細胞が傷害される。この血管内皮の傷害は血栓を誘発し、血管を再開塞させる要因となる。また、急性脳梗塞治療に血栓回収デバイスを用いる際はrt-PAの併用が原則であることから、やはり脳梗塞治療後24時間以内の血管再開塞に対する予防手段がない状況である。加えて、令和元年10月にrt-PAの診療報酬加算の条件緩和が協議(中央社会保険医療協議会)され、今後、最低でも200施設程度が新たにrt-PA療法の診療報酬を算定できる体制になるとが見込まれているため、今後はさらにrt-PA療法を受ける患者の増加が見込まれる。

そのため、これまで不十分もしくは全く対処法が存在しなかった状況における脳梗塞の再発を予防するための、これまでとは全く異なるアプローチでの新たな予防法の確立が急務であった。

2. 研究の目的

本研究課題に取り組むまでに、*in vitro*で構築した“血栓成長モデル”(血管の再開塞血栓モデル)を用いて超音波が血栓の形成を抑制することを見出していた。この超音波による血栓形成抑制効果の重要な点として、使用した超音波の出力はFDA(food and drug administration)において、人体に対して非侵襲的な出力上限値とされる 0.72 W/cm^2 以下であった点である。すなわち、この結果は非侵襲的な超音波を照射するだけで血栓形成の抑制が可能であることを示していた。そこで、本研究課題では、これまで用いてきたヒト血漿のみで作製した血栓成長モデルをさらに発展させ、生体内の血栓をより再現した“血小板含有血栓成長モデル”を用いて血栓形成抑制効果の検証およびメカニズムの解析を行うと共に、*in vivo*の実験系において血管閉塞予防効果を評価することに研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 血栓成長モデルとは、血漿を凝固させる際に使用する塩化カルシウム溶液およびトロンピンを過量に加えてフィブリン塊(血栓)を作製し、そこへ血漿を注ぐと血栓から徐々に血液凝固因子であるカルシウムイオンおよびトロンピンが放出されることで血栓周囲の血漿が徐々に凝固することで血栓が増大するモデルである。このモデルを元に、血小板含有血栓成長モデルの構築を試みた。採血したヒト血液から遠心分離によりPRP(血小板含有血漿)および血漿を調製した。このPRPと血漿を任意の比率で混合し、PRPの含有率が0, 5, 10, 25, 50, 100%の血小板含有血栓成長モデルを作製した。このPRPの含有率が異なる血栓成長モデルの血栓成長量を比較し、再現性が得られるか検証した。

(2) *in vivo*の実験系で超音波の血管閉塞予防効果を評価するために、ウサギの大腿動脈にバルーンカテーテルで血管内皮を擦過損傷させ、心臓側からの血流を1時間遮断することで血管を閉塞させるモデルを用いた。この血管が血栓で閉塞するまでの1時間の間、超音波を連続的に照射し、血管の閉塞を予防できるか検討を行った。

なお、本研究課題の全ての検討において超音波の照射条件は、500 kHz、連続波、最大音響強度 0.72 W/cm^2 で統一した。

4. 研究成果

(1) 超音波による血栓形成抑制効果のメカニズムを解析するべく、血小板含有血栓成長モデルの構築に取り組んだ。その結果、PRPをわずかでも含有させると、血漿のみを凝固させた場合

と比較して、血栓の形状がいびつなる、凝固の際に血清と思われる浸出液が多く出るなど、凝固させる時点で問題点が見つかったが、PRP含有率5%の場合のみ、血漿のみを凝固させたときとほぼ同じように凝固する物が多かった。しかし、いずれも血栓を成長させた際には、血栓成長量はばらつきが大きく、再現性を得ることはできなかった。この原因を探るべく、各PRP含有量の血栓を凍結切片およびHE染色によりフィブリンの網目構造を観察したが、PRP含有量が増えるほどフィブリン繊維が細くなるような傾向が観察され、これが凝固させた際の血栓の形態や成長に影響を及ぼした可能性が推察された。

血小板含有血栓成長モデルはばらつきが非常に大きく、実験系を確立することが困難であったため、従来の血栓成長モデルで解析可能な範囲で超音波による血栓形成抑制メカニズムを検証することとした。実験方法としては、超音波を照射した血栓および血漿成分をウエスタンブロット法などを用いて分子生物学的にメカニズムの解析を行った。その結果、超音波が血液凝固因子に影響することで血栓の増大を抑制していることを示唆するデータが得られ、引き続き詳細なメカニズム解析を進めている。

(2) 超音波による血管閉塞予防効果を検証するために、ウサギ大腿動脈血管閉塞モデルを用いて検討を行った。しかし、こちらもウサギの個体差の影響のためか、大腿動脈に血栓を誘発すること自体は成功したものの、形成する血栓の量などのばらつきが大きく、生体内で効果を評価することは困難であった。そのため、実験系を大幅に改修し、ウサギ大腿動脈と総頸動脈に留置針のカニューレーションを行い、ビニールチューブで接続した。この際、ビニールチューブにはY字コネクターで分岐を作り、分岐した先にそれぞれ血栓誘発部位を作製した。また、脱血はチューブポンプで大腿動脈側から行い、総頸動脈側に送血した。その結果、再現性良く血栓を形成させることができ、動物の個体差の影響を受けないモデルの開発に成功した。このモデルの血栓部位の超音波を照射することで血栓形成抑制効果を評価した結果、超音波による血栓誘発部位に形成する血栓重量が減少する結果を得た(論文投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Sawaguchi Yoshikazu, Yamamoto Hiroyuki, Itou Souma, Tachibana Ken, Ohnuma Kentaro, Kamada Yusuke, Nakajima Takanori | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Proposal of an in vitro thrombus-growth model for evaluating anticoagulants | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics | 6. 最初と最後の頁 135 ~ 138 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/ddt.2022.01040 | 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 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuta Tanaka, Yoshikazu Sawaguchi |
| 2. 発表標題 Development of an in vitro stent thrombosis model for research on prevention of stent thrombosis |
| 3. 学会等名 16th TOIN International Symposium on Biomedical Engineering（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 澤口能一、山本博之 |
| 2. 発表標題 抗凝固薬を評価するための新規in vitro血栓成長モデルの構築 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 澤口能一、清水歩未、王 作軍、大沼健太郎、山本博之、中田典夫 |
| 2. 発表標題 超音波による血管閉塞予防法の開発 |
| 3. 学会等名 第16回 次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Saya Ohno, Yoshikazu Sawaguchi |
| 2. 発表標題 Application of vascular occlusion preventive effect applying ultrasound and using in vitro blood vessel occlusion model |
| 3. 学会等名 17th TOIN International Symposium on Biomedical Engineering (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大野沙耶、澤口能一 |
| 2. 発表標題 in vitro血管閉塞モデルを用いた非侵襲的超音波による血管閉塞予防法の評価 |
| 3. 学会等名 日本動物学会 第75回 関東支部大会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|-----------|--|---------------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 山本 博之 (Yamamoto Hiroyuki) (10433210) | 日本薬科大学・薬学部・准教授 (32425) | |

| | 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 |
|-----------|--|---|----|
| 研究 協力者 | 大沼 健太郎 (Ohnuma Kentaro) (50527992) | 桐蔭横浜大学・医用工学部 生命医工学科・講師 (32717) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|