

霊長類全血血栓を用いた超音波血栓溶解療法における 最小有効音響強度の検証

銭谷 平¹ 南沢 享² 古幡 博¹

¹ 東京慈恵会医科大学医用エンジニアリング研究室

² 東京慈恵会医科大学細胞生理学講座

(受付 平成 24 年 10 月 16 日)

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE MINIMUM EFFECTIVE ACOUSTIC INTENSITY OF SONOTHROMBOLYSIS WITH WHOLE-BLOOD CLOTS OF PRIMATES.

Taira ZENITANI¹, Susumu MINAMISAWA², and Hiroshi FURUHATA¹

¹Medical Engineering Laboratory, Research Center for Medical Science, The Jikei University School of Medicine.

²Department of Cell Physiology, The Jikei University School of Medicine.

Purpose: To quantitatively verify the effectiveness of transcranial sonothrombolysis with whole-blood clots of primates in in vitro experiments.

Methods: By adding fibrinogen and thrombin to the whole blood of primates, thrombi were prepared in 1mm diameter tube. These thrombi were encapsulated in a container filled with physiological saline (control) or recombinant tissue-plasminogen activator (rt-PA) at a concentration of 4350 IU/ml at 37°C. The ultrasound (US) conditions were set to a continuous wave of 500 kHz and an exposure time of 60 minutes. Acoustic intensity varied from 1 to 488 mW/cm². Thrombus weight was measured before and after sonication. The rate of reduction in clot weight after sonication was determined as: weight before encapsulation - weight after US radiation/ weight before encapsulation. Reductions in clot weight were compared between rt-PA and rt-PA + US (n = 5) by means of Williams' multiple comparison test.

Results: The rate of reduction in clot weight after sonication was significantly greater with rt-PA (45.4% ± 5.1%) than with physiological saline (34.1% ± 2.1%; p<0.05; Mann-Whitney U-test). Furthermore, the rate of reduction was significantly greater with rt-PA + 18mW/cm² US (57.8% ± 2.8%) than with rt-PA + 1mW/cm² US (46.7% ± 1.2%; p<0.05). Finally, the reduction rate with rt-PA + US in the range from 18 to 488 mW/cm² was significantly greater than that with rt-PA alone (p<0.05).

Conclusions: We found that the minimum effective acoustic intensity of in vitro sonothrombolysis for whole-blood clots of primates was 18 mW/cm² with a continuous wave of 500 kHz as a US condition.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2013;128:35-40)

Key words: ultrasound, thrombolysis, acute stroke, cerebral infarct, transcranial doppler,

I. 緒 言

現在、脳血管疾患は本邦死因の第4位を占め、その6割近くが脳梗塞とされている。その超急性期治療法として、わが国でも、血栓溶解剤である組み換え組織プラスミノゲン活性化因子 (rt-

PA : recombinant tissue-plasminogen activator) による経静脈的血栓溶解療法の有効性が証明され、平成17年から保険診療が可能となっている。rt-PAによる血栓溶解療法の効果を良くするためには発症3時間以内の薬剤投与が不可欠であり、脳梗塞急性期の治療は時間との戦いでもある。

rt-PA 投与治療における薬効を増加させ、その投与量を減少させるため、経頭蓋超音波照射を行う超音波血栓溶解法が検討され、血流再開通までの時間を短縮することが期待されていた¹⁾⁻³⁾。

しかし、ラットによる動物実験で安全性が確認されていたにもかかわらず、臨床試験 TRUMBI trial⁴⁾ では、梗塞領域以外に出血を生ずる症例がみられるという予想外の結果であった。このことは我々に超音波血栓溶解法の生物学的安全性の再検証と音響学的最適化の必要性を投げかけるものであった。

超音波血栓溶解法の安全性を確保するためには、超音波の周波数、波形、そして音響強度の3因子について音響学的最適化を再検証することが重要である。音響強度については、強度が強いほど、溶解効率が高い傾向を示すことが知られている⁵⁾⁻⁸⁾ が、それにとまってMIは高値を示し、キャビテーションなどの好ましくない反応を惹起して、細胞や組織に損傷を与える危険性が增大する。そこで安全性を考慮して音響強度の低出力化を図りつつ、血栓溶解効率を下げない音響強度の閾値（血栓溶解最小音響強度）が重要になるが、これについては十分に検討されてこなかった。

以上のような背景のもとに、超音波血栓溶解療

法における血栓溶解最小有効音響強度を探る実験的研究を行った。

II. 対象と方法

超音波発生装置は東京慈恵会医科大学と日立メディコ株式会社が共同開発したTCT-LoFUT System (Fig. 1A) を用いた。超音波プローブは、振動素子アレイを積層とすることにより、プローブ背面側のトランスデューサー配列からは500 kHzの連続波を発生する治療用ビーム（Tビーム）と、プローブ表面側のトランスデューサー配列からは2 MHzの診断用ビーム（Dビーム）とを交互に照射するものである。これにより、単一のプローブで、Dビームによる再開通監視を行いながら、二次元的に方位制御された集束Tビーム（SLC-D150P 溝尻光学工業所 Japanにより撮影）により標的部位に超音波を暴露させることが可能となる（Fig. 1B）。本研究では、2分間Tビーム照射、30秒Dビーム照射を4回繰り返した後、5分間Dビーム照射を行うことを1セットとし、4セット照射を行った後に血栓溶解率の測定を行った。

1. 音響強度分布

AIMS (Acoustic Intensity Measurement System

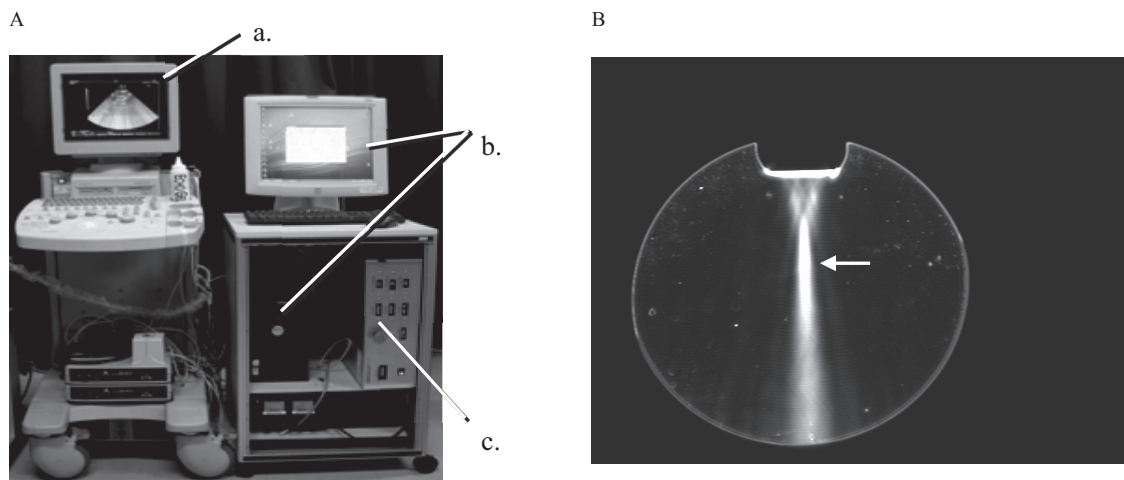


Fig. 1. A: The novel TCT-LoFUT system. (a) conventional diagnostic and monitoring unit using a 2-MHz pulse waveform (PW), based on the commercialized diagnostic equipment, EUB-6500. (b) thrombolysis unit using 500-kHz CW (c) automatic control unit connecting alternatively (a) or (b) to a new probe. B: The therapeutic beam recorded by Schlieren photography. The focal direction could be selected two-dimensionally $\pm 45^\circ$ in steps of 1.5° , and the focal point could be changed by 9 steps in the range from 20 mm to 30 mm from the surface of probe (arrows).

ONDA Co. CA USA) とハイドロホン (HNC-0400 ONDA Co. CA USA) を用いて, Tビームを超音波プローブ表面より 28 mm の位置に集束させた時の音場分布を測定した (Fig. 2A). 血栓を封入する容器は長さ 10 mm の円柱形でその直径は 10 mm のアクリル容器 (厚さ 0.5 mm) を用いた. アクリル容器の中心が超音波プローブ表面より 28 mm の位置になるよう設置し, その背面 (ビーム入射口の反対側) を除去してハイドロホンで実測した. 容器内の平均音響強度は容器内 12 点の加算平均値を使用した. その平均音響強度を 488, 313, 148, 55, 18, 1 mW/cm² に設定した. rt-PA 投与に加え, 照射音響強度 1 mW/cm² を rt-PA+US1 群, 18 mW/cm² を rt-PA+US18 群, 55 mW/cm² を rt-PA+US55 群, 148 mW/cm² を rt-PA+US148 群, 313 mW/cm² を rt-PA+US313 群, 488 mW/cm² を rt-PA+US488 群とした. 血栓を封入した容器をプローブ表面から 28 mm の位置に置き, Dビームにて血栓位置を確認後, 前述の超音波音響強度条件で Tビーム照射を行った (Fig.

2B).

2. 血栓作製

本研究で用いる血栓は 0.096 ml のサル全血にフィブリノーゲン (40 mg/ml) 0.012 ml と トロンビン (100 IU/ml) 0.012 ml を混合し, 内径 1 mm のチューブ内に注入して作成した. この血栓をフィルター上に取り出し, 不用溶液を除去した後, 生理食塩水と rt-PA (alteplase) 500 IU/ml で満たされた容器内に封入した (Fig. 3). 血栓封入後, 容器内圧を圧力計 (DG-100-102GP COPAL Electronics Japan) で計測しつつ, シリンジでゆっくりと加圧し, 150 mmHg に保った. また, 容器は 37°C に維持した. 血栓溶解効果は血栓重量減少率を算出し評価した. 容器内封入前と超音波照射後に, 化学天秤 (AB104-S METTLER TOLEDO international Inc. Japan) (最小表示 0.1 mg) を用いて, 血栓重量を測定した. その際, 血栓周囲の水分を除去するため, 格子間 50 μm のフィルター (PET51-HC TANAKA SANJIRO Co. Ltd. Japan) を通して浸み出す水分を吸収紙 (Kimwipe wiper

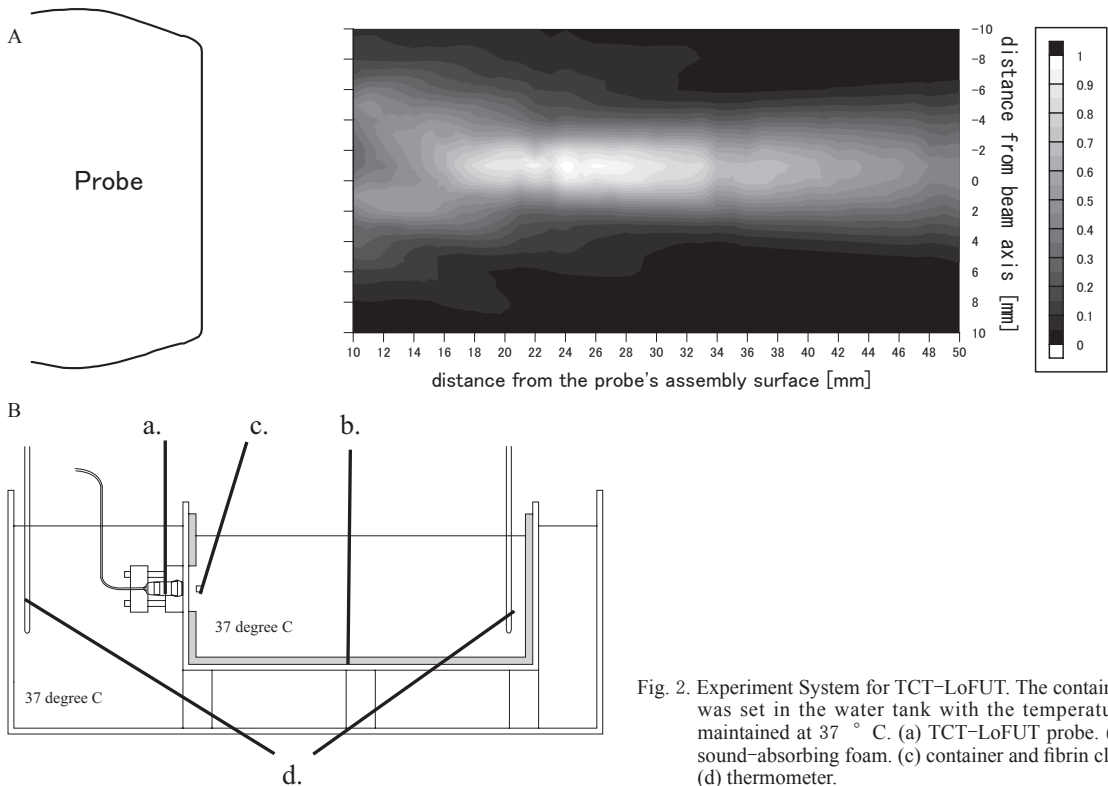


Fig. 2. Experiment System for TCT-LoFUT. The container was set in the water tank with the temperature maintained at 37 ° C. (a) TCT-LoFUT probe. (b) sound-absorbing foam. (c) container and fibrin clot. (d) thermometer.

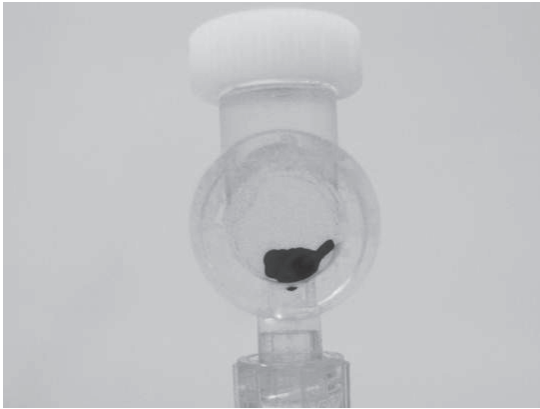


Fig. 3. Photo of whole blood clots of primates

S-200 Nippon Paper Crexia Co. Ltd. Japan) で吸収させた。重量減少率 (%) は $100 \times (\text{容器内封入前重量} - \text{超音波照射後重量}) / \text{容器内封入前重量}$ によって求めた。rt-PA 群と rt-PA+US1 群から 488 群との血栓重量減少率 ($n=5$) の比較は Williams の多重比較検定を用いて統計学的解析を行った。なお、本研究は東京慈恵会医科大学動物実験委員会にて動物実験の審査承認を得ている。(番号: 19-026)

III. 結 果

Tビームの焦点はプローブ表面より 23 mm から 29 mm の部位に認められた (Fig. 1 (B))。その焦点部位に設置した容器内の内側辺縁における音響強度分布は、焦点に比して音響強度の 20% から 40% の減衰を認めた。

超音波照射後の血栓重量減少率では、対照群は $34.1 \pm 2.1\%$ であったのに対し、rt-PA 群では $45.4 \pm 5.1\%$ と有意に高値を示した (Mann-Whitney の U 検定 $p < 0.05$) (Fig. 4 (A))。US 暴露の結果では rt-PA 群と比して rt-PA+US1 群は有意差を認めなかった ($p > 0.05$) が、rt-PA+US18 群は有意差を認めた ($p < 0.05$) (Williams の多重比較検定) (Fig. 4 (A))。rt-PA+US18 群から 488 群は音響強度依存的に血栓重量減少率の漸増傾向を認めた (Fig. 4A, 4B)。

IV. 考 察

超音波血栓溶解療法 (連続波, 500-kHz) におけるサル全血血栓の血栓溶解最小有効音響強度は 18 mW/cm^2 であることが示された。これまで、音響強度が高値である程、血栓溶解率が高値となるとの報告はあった^{5) 6) 10)} が、最小有効音響強度を求める研究はなかった。本研究によって、少なくとも *in vitro* においてはその有効閾値が極めて低

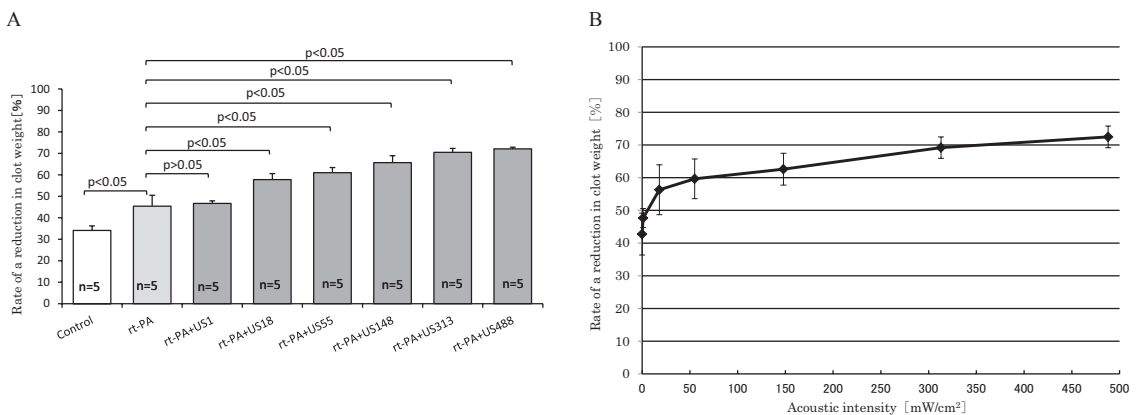


Fig. 4. A: Comparison of the rate of a reduction in clot weight under various treatments. physiological saline (Control), rt-PA alone, rt-PA + US 1 mW/cm^2 (rt-PA + US1), rt-PA + US 18 mW/cm^2 (rt-PA + US18), rt-PA + US 55 mW/cm^2 (rt-PA + US55), rt-PA + US 148 mW/cm^2 (rt-PA + US148) + US 313 mW/cm^2 (rt-PA + US313) + US 488 mW/cm^2 (rt-PA + US488)). There was a significant difference between control group and rt-PA group. Although there was significant difference between rt-PA + US1 group and rt-PA + US18 group, there was no significant difference between rt-PA group and rt-PA + US1 group.

B: The relation of acoustic intensity and clot weight decrease rate in rt-PA solution

い値であることを確認した。

今日、高周波帯を用いる診断用のパルス装置では、アメリカ食品医薬品局（FDA; Food and Drug Administration）によって、音響強度の基準が設定されている。その安全限界としては最大空間時間平均強度（Spatial Peak Temporal Average intensity: I_{SPTA} ） 0.72 W/cm^2 、最大空間ピークパルス強度（Spatial Peak Pulse Average intensity: I_{SPPA} ） 190 W/cm^2 と設定されている。しかし、超音波治療に関しては規程がまだ設定されておらず、その装置に対しては強度に関する安全限界と有効閾値の範囲は明確にされてこなかった。よって超音波血栓溶解法についてはその有効性と安全性の間の均衡を保つことが問題となる。

超音波血栓溶解療法の安全性に大きな危惧を投げかけた TRUMBI trial で出血を生じる症例が多かったのは、こうしたことが影響していると推測される。TRUMBI Trial では、Burst Wave (BW) を用い、duty cycle 5%、Pulse Duration (PD) 0.5 ms の条件で治療が行われた。この場合、 I_{SPPA} は 14 W/cm^2 となるが、円形ピストン音源の空間的音響強度は平均値の約 2 倍となるホットスポットが存在するため¹¹⁾、水中での MI は 12 となり、キャビテーション発生閾値の 1.0 を超えていた。その結果 TRUMBI Trial ではキャビテーションが発生し、さらに PD が長いために、キャビテーションを持続させやすい状況となっていたと考えられる。

本研究の限界は、経頭蓋による超音波の減衰を考慮していない点と、実際の血栓溶解最小有効音響強度が 1 mW/cm^2 から 18 mW/cm^2 の間にあると考えられる点であり、今回の結果から類推される最小有効音響強度を設定し、さらに有効性と安全性を実証する必要がある。

V. 結 語

超音波を照射する対象組織の音響学的脆弱性に配慮する必要があることを TRUMBI trial の臨床成績は提示しており、US 条件の再検討が必要である。診断用 TCD (2 MHz) を用いた急性脳梗塞における血栓溶解治療は、すでにその有効性が確認されている。これは診断用装置として FDA の条

件を満たしたものであるが、その周波数は高く、波形はパルス波であるため、決して最適条件下での成績ではない。本研究は低周波超音波の安全限界範囲内で、しかも有効閾値がその安全限界より相当低い音響強度で有効なことを示すものである。これを最適化条件へ適用すれば、さらに効率的で安全な臨床適用が可能であることを示唆している。TCT-LoFUT を安全かつ有効に急性血栓性脳梗塞患者に用いるために、そのような病的脳血管状態を踏まえた超音波条件を検討してゆく上で、本論文の最小有効強度の条件が活用されると期待される。

著者の利益相反 (conflict of interest: COI) 開示:

本論文の研究内容に関連して特に申告なし

文 献

- Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, et al. CLOTBUST Investigators. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2004; 351: 2170-8.
- Molina CA, Ribo M, Rubiera M, Montaner J, Santamarina E, Delgado Mederos R, et al. Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke.* 2006; 37: 425-9.
- Eggers J, König IR, Koch B, Händler 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: 1470-5.
- Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P, Sitzer M, Sliwka U, Els T, 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: 1441-6.
- Suchkova V, Carstensen EL, Francis CW. Ultrasound enhancement of fibrinolysis at frequencies of 27 to 100 kHz. *Ultrasound Med Biol.* 2002; 28: 377-82.
- Francis CW, Blinc A, Lee S, Cox C. Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots. *Ultrasound Med Biol.* 1995; 21: 419-24.
- Schäfer S, Kliner S, Klinghammer L, Kaarmann H, Lucic I, Nixdorff U, et al. Influence of ultrasound operating

- parameters on ultrasound-induced thrombolysis in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 2005; 31: 841-7.
- 8) Frenkel V, Oberoi J, Stone MJ, Park M, Deng C, Wood BJ, et al. Pulsed high-intensity focused ultrasound enhances thrombolysis in an in vitro model. *Radiology.* 2006; 239: 86-93.
- 9) Nedelmann M, Eicke BM, Lierke EG, Heimann A, Kempfski O, Hopf HC. Low-frequency ultrasound induces nonenzymatic thrombolysis in vitro. *J Ultrasound Med.* 2002; 21: 649-56.
- 10) Suchkova V, Siddiqi FN, Carstensen EL, Dalecki D, Child S, Francis CW. Enhancement of fibrinolysis with 40-kHz ultrasound. *Circulation.* 1998; 98: 1030-5.
- 11) 実吉純一, 菊池喜充, 能本乙彦監修. 超音波技術便覧新訂版. 東京: 日刊工業新聞社; 1966. p.23-5.