

表3 テント上脳出血に対する主要な外科的治療成績(無作為化比較試験)

試験	治療法	患者数 (人)	死亡または6カ月後の disabled(%)	試験結果と特徴
McKissock <sup>2)</sup>	血腫除去術	89	99	有意差なし, CT以前
	最善の内科治療	91	89	
Juvela <sup>3)</sup>	血腫除去術	26	96	有意差なし, 早期手術
	最善の内科治療	26	81	
Batjer <sup>4)</sup>	血腫除去術	8	75	有意差なし
	頭蓋内圧モニター	4	100	
	最善の内科治療	9	78	
Auer <sup>5)</sup>	内視鏡的血腫除去	50	74*	皮質下出血のみ有意
	最善の内科治療	50	90	

\*: p &lt; 0.05

も両群間の血腫部位の違いがみられ, 内科治療群に視床出血が多かった。このように, RCTの報告では外科的治療の有用性はあきらかに証明されていない。

## 2. Nonrandomized Trial

後ろ向きの検討が多く報告されているが, そのエビデンスレベルは低い。しかし, ガイドラインの推奨部分はこれらの結果を多く取り入れている。被殻出血については, 1990年に行われた, 金谷<sup>8)</sup>の7,010例の集計がある。発症後3カ月後の死亡率, 機能予後が比較され, 手術療法は重症例の救命を目的とする時のみ有用であることが示された。開頭血腫除去術と定位脳手術では, 救命に差がなかった。後藤ら<sup>9)</sup>の報告も, 神経学的所見が中等度, 血腫量が31 ml以上でかつ血腫による圧迫所見が高度な被殻出血では, 外科的治療により生命予後を改善するとしている。視床出血についても, 556例の検討で手術治療は重症例における救命効果しかなく, 機能予後は改善しなかった<sup>10)</sup>。脳室ドレナージも重症例の生命予後を改善したが機能予後は改善しなかった。小脳出血については血腫の大きいもの(最大径3 cm以上)で進行性のもの, 脳幹を圧迫し水頭症を合併しているものは, 手術適応があると報告<sup>11)</sup>が多い。

## 3. Keio Cooperative Study<sup>12, 13)</sup>

被殻出血に対する血腫吸引術の有用性を明らかにする目的で, 慶應義塾大学神経内科および関連病院に入院した被殻出血患者を対象に, 入院時の重症度別に内科治療群(126例, 平均59歳)と血腫吸引術群(81例, 平均59歳)の退院時(平均32日)の治療成績を比較検討した。重症度はJapan Stroke Scale (JSS)を用い, fair (-0.38 < JSS < 9.03), moderate (9.04 < JSS < 18.45), severe (18.45 < JSS < 27.86)の3段階に分類した。退院時の機能予後は良好(完全回復, 介助不要), 不良(要介助, 寝たきり), 死亡の3段階とした。結果を表4に示す。重症例では吸引術群で有意に生命予後

を改善したが, Barthel Indexによる機能予後の改善は認めなかった。

## 4. Surgical Trial in Intracerebral Haemorrhage (STICH)<sup>14)</sup>

国際的多施設研究(27カ国, 89施設)で, 発症24時間以内の早期手術を行った群と早期に内科的治療を行った群での比較試験で, 1,033例を対象とした。テント上脳出血で脳外科医が外科的治療の適応かどうか判断に迷うような症例を無作為に2群に割り付けた。1次エンドポイントは, 6カ月後の死亡率とGOS(Glasgow Outcome Scale), 2次エンドポイントはmodified Rankin Scale, Barthel Indexであった。手術方法は, 開頭血腫除去術が多く, 血腫吸引術は少なかった。その結果, 早期外科治療群の予後良好群は23.8%で初期内科治療群の26.1%に比較して有意差を認めなかった。手術率は各国により2~74%と大きく異なり, 手術適応に対する考えの違いが浮き彫りにされた。この試験は, テント上脳出血の手術適応の優劣を決める試験として世界的に期待されていたが, 今回も明らかな手術の有効性が示されなかった。

## III. ガイドラインに対するコメント

高血圧性脳出血の外科的治療の適応については, ガイドラインで示されたように血腫部位別に推奨されている。しかし, その多くがグレードC1, グレードDである。エビデンスレベルの高いRCTのデータが少ないのに加え, そのRCTのデータも外科的治療の有効性を示さなかったことによる。最近報告されたSTICH研究も外科的治療の有効性が示されなかった。したがって, ガイドラインで参考にされたデータは, 本邦での非ランダム化試験と, American Heart Association, Stroke Councilのガイドライン<sup>15)</sup>である。現時点においては, 外科的治療は, 中等症・重症での救命目的といえる。特に, 被殻出血, 皮質下出血, 小脳

表4 被殻出血に対する血腫吸引術と内科的治療の比較(Keio Cooperative Study)<sup>12,13)</sup>  
 <入院時重症度別>

		軽症(-0.38 < JSS < 9.13)			
		介助なし	要介助	死亡	Barthel Index
内科群(N = 31)		25(80.6%)	5(16.1)	1(3.2)	83.7 ± 27.6
吸引群(N = 6)		3(50.0)	2(33.3)	1(16.7)	70.0 ± 27.6
		中等症(9.04 < JSS < 18.45)			
		介助なし	要介助	死亡	Barthel Index
内科群(N = 64)		19(29.7%)	41(64.2)	4(6.3)	46.6 ± 37.6
吸引群(N = 59)		20(33.9)	35(59.4)	4(6.8)	45.9 ± 30.5
		重症(18.46 < JSS < 27.86)			
		介助なし	要介助	死亡	Barthel Index
内科群(N = 31)		1(3.2%)	5(16.2)	25(80.6)	24.9 ± 22.4
吸引群(N = 16)		0	10(62.6)	6(37.5)*	20.7 ± 22.4

\* : p < 0.01

出血は外科的治療の適応となる場合が多い。STICH研究でも示されたように、高血圧性脳出血に対する外科的治療の適用は各国、各施設で大きく異なっているのが現状である。

外科的手術方法も近年 minimally invasive surgery が広く普及してきた。神経内視鏡的血腫除去術<sup>5)</sup>、CT fluoroscopy 血腫除去術<sup>16)</sup>、MRI-guided stereotactic aspiration<sup>17)</sup>、超音波誘導定位脳手術<sup>18)</sup>などである。これらの方法についてその有用性が期待されているが、エビデンスは十分でない。しかし、内科医にとっては救命率の高い外科的治療に頼らざるを得ない症例が存在し、重症脳出血に直面した場合常に心を痛める問題である。生命予後は改善するが、要介助あるいは植物状態の患者が増加する可能性があり、これらの問題をどのように受け止めることができるかである。突然発症し、外科的治療を受けるか否かの選択を迫られる家族の状況を考えると、単なる医学的な見地のみでなく、倫理的問題、生命の尊厳、家族の価値観など多くの問題が関与してくる。脳出血の外科的治療の可否は、未だ最も判断に迷う課題である。

高血圧以外の原因による脳出血の治療については、脳動静脈奇形、硬膜動静脈奇形、海綿状血管腫、静脈性血管腫、脳静脈閉塞症における出血、Willis 動脈輪閉塞症(もやもや病)における脳出血、脳腫瘍に合併した脳出血、抗凝固・抗血小板・血栓溶解療法に伴う脳出血(急性期)、腎不全患者の脳出血の9つの項目が取り上げられている。このうち、脳動静脈奇形、硬膜動静脈奇形、海綿状血管腫、静脈性血管腫、脳腫瘍に合併した脳出血は、脳神経外科で扱われることが多い。出血により脳ヘルニアをきたすような重症例では、血腫除去術を考慮するが、原疾患に対しての処置(外科的切除、塞栓術、放射線治療など)はそれぞれ異なる。

内科医は、脳静脈閉塞症における出血、抗凝固・抗血小板・血栓溶解療法に伴う脳出血(急性期)、腎不全患者の脳出血をしばしば経験する。脳静脈および静脈洞閉塞症に伴う脳出血では、抗凝固療法などの効果がみられず、出血性梗塞により脳ヘルニアをきたした例に限り緊急外減圧術を考慮する(グレードC2)。抗凝固・抗血小板・血栓溶解療法に伴う脳出血は、血栓溶解療法が本邦でも認可された場合、特に重要となる。抗凝固療法(ワルファリン)中に発症した脳出血では、抗凝固療法を直ちに中止すべきであり、さらにビタミンK(グレードC1)またはプロトロンビン複合体(第IX因子複合体)の使用が推奨される(グレードB)。血栓溶解療法に合併した脳出血に対しては、血栓溶解薬や抗血栓薬を速やかに中止し、血液製剤やプロタミンなどで補正することが勧められる(グレードC1)。さらに外科的な血腫除去については、出血傾向の補正後に、機能予後を考慮して慎重に検討する(グレードC1)。腎不全患者に起こった脳出血では、発症後血腫の拡大が起こりやすく、透析方法の検討およびヘパリン製剤の使用や血液透析濾過も代替手段となりうる(グレードC1)。被殻出血における血腫除去術の適応は、非透析例と同様に考えてもよい(グレードC1)。

### おわりに

「脳卒中治療ガイドライン2004」で示された脳出血の外科的治療の適応の項目について紹介し、内科医の立場から解説した。RCTが少なく、推奨グレードはC1が多いが、日常臨床で大いに役立つ内容である。Minimally invasive surgery も普及しつつあり、これらの治療法の有用性を証明する綿密な大規模試験が望まれる。

## 文 献

- 1) 脳卒中合同ガイドライン委員会：脳卒中治療ガイドライン 2004, 興和印刷, 2004年3月3日発行
- 2) McKissock W, Richardson A, Taylor J : Primary intracerebral hemorrhage : a controlled trial of surgical and conservative treatment in 180 unselected cases. *Lancet* 2 : 222-226, 1961
- 3) Juvela S, Heiskanen A, Poranen A, Valtonen S, Kuurne T, Kaste M, Troupp H : The treatment of spontaneous intracerebral hemorrhage : a prospective randomized trial of surgical and conservative treatment. *J Neurosurg* 70 : 755-758, 1989
- 4) Batjer HH, Reisch JS, Allen BC, Plaizier LJ, Su CJ : Failure of surgery to improve outcome in hypertensive putaminal hemorrhage : a prospective randomized trial. *Arch Neurol* 47 : 1103-1106, 1990
- 5) Auer L, Deinsberger W, Niederkorn K, Gell G, Kleinert R, Schneider G, Holzer P, Bone G, Mokry M, Korner : Endoscopic surgery versus medical treatment for spontaneous intracerebral hematoma : a randomized study. *J Neurosurg* 70 : 530-535, 1989
- 6) Morgenstern LB, Frankowski RF, Shedden P, Pasteur W, Grotta JC : Surgical treatment for intracerebral hemorrhage (STICH) : a single-center, randomized clinical trial. *Neurology* 51 : 1359-1363, 1998
- 7) Zuccarello M, Brott T, Derex L, Kothari R, Sauerbeck L, Tew J, Van Loveren H, Yeh HS, Tomsick T, Pancioli A, Khoury J, Broderick J : Early surgical treatment for supratentorial intracerebral hemorrhage : a randomized feasibility study. *Stroke* 30 : 1833-1839, 1999
- 8) 金谷春之 : 高血圧性脳出血の治療の現況 : 全国調査の成績より. *脳卒中* 12 : 493-500, 1990
- 9) 後藤文男, 福内靖男 : 脳血管障害の治療と予後に関する多施設共同研究. 第1報. 被殻出血脳卒中 12 : 493-500, 1990
- 10) 後藤文男, 福内靖男 : 脳血管障害の治療と予後に関する多施設共同研究. 第2報. 視床出血. *脳卒中* 12 : 493-500, 1990
- 11) 後藤文男, 福内靖男 : 脳血管障害の治療と予後に関する多施設共同研究. 第3報. 小脳出血. *脳卒中* 14 : 487-494, 1992
- 12) 棚橋紀夫, 福内靖男 : 高血圧性脳出血の治療の現状—慶應脳血管障害共同研究. *脳卒中* 18 : 483-487, 1996
- 13) Tanahashi N, Terayama Y : How to manage patients with putaminal hemorrhage. In "Brain Hemorrhage 2002", eds Ogawa A, et al. *Neuron Pub, Tokyo*, pp 59-68, 2002
- 14) Mendelow AD, Gregson BA : The international surgical trial in intracerebral haemorrhage : international variations, 5th World Stroke Congress, June 23-26, 2004, Vancouver
- 15) Broderick JP, Adams Jr HP, Barsan W, Feinberg W, Feldmann E, Grotta J, Kase C, Krieger D, Mayberg M, Tilly B, Zabramski JM, Zuccarello M : Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage : a statement for healthcare professionals from a special writing group of the stroke council, American Heart Association. *Stroke* 30 : 905-915, 1999
- 16) 神野哲夫, 野々村一彦, 片田和弘 : 高圧酸素投与による手術適応決定と CT fluoroscopy を中心とした minimally invasive surgery による高血圧性脳出血の治療法の開発. *脳卒中* 18 : 498-502, 1996
- 17) Tyler D, Mandybur G : International MRI-guided stereotactic aspiration of acute/subacute intracerebral hematomas. *Stereotact Funct Neurosurg* 72 : 129-135, 1999
- 18) Iwamoto N, Kusaka M, Tsurutani T, Kameda H, Ito H : Ultrasound imaging for stereotactic evaluation of hypertension-associated intracerebral hematomas with aqua-stream and aspiration. *Stereotact Funct Neurosurg* 60 : 194-204, 1993

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

## 医療におけるヒューマンエラー

なぜ間違える どう防ぐ

河野龍太郎

●B5 頁184 2004年  
 定価2,940円(本体2,800円+税5%)  
 [ISBN4-260-33358-9]

「人間」を知らない限り、医療事故は減らない。「医療システム」を変えない限り、事故はなくせない。本書では、事故の捉え方、分析手法、対策の立案までを、ヒューマンファクター工学の観点からわかりやすく解説した。この1冊で、事故の見方、考え方が変わる！

# TIA/脳梗塞の再発予防

棚橋 紀夫

## ポイント

- ▶ TIA/脳梗塞の再発予防には、危険因子の発見・管理が重要である。
- ▶ 危険因子としては、高血圧・喫煙・心疾患・糖尿病・高脂血症・飲酒・運動不足・肥満などがある。
- ▶ 臨床病型(アテローム血栓性・心原性など)に応じた抗血栓療法が必要である。
- ▶ アテローム血栓性脳梗塞・ラクナ梗塞には抗血小板療法、心原性脳塞栓症には抗凝固療法が適応となる。

## 一過性脳虚血発作(TIA)の再発予防

一過性脳虚血発作(transient ischemic attack: TIA)とは、1990年のアメリカ国立神経疾患・脳卒中研究所による脳卒中の分類第3版(NINDS-III)<sup>1)</sup>によれば、通常単一の脳血管灌流領域(左右頸動脈、椎骨脳底動脈領域)における局所神経症状を呈する短時間の発作で、脳虚血以外の原因が考えにくいものである。

発症機序として、微小塞栓説、血行力学説、脳血管攣縮説などが、提唱されてきた。現在は、超音波ドプラ法などの検討から、その大部分はartery to arteryによる微小塞栓によるものとする考えが支配的であるが、血行動態異常によるものや心原性塞栓、血液学的異常によるものなどが少なからず存在する。TIAはすべてのタイプの脳梗塞の前兆であるが、原因(サブタイプ)によりその頻度は異なっている。最近の研究ではTIAはアテローム血栓性梗塞の25~50%に前駆するが、心原性塞栓では11~30%、ラクナ梗塞では11~14%にしか認められない。凝固亢進状態、動脈解離、血管炎、薬物などの原因ではさらに少ない。

TIAの再発予防を米国脳卒中協会のガイドライン<sup>2-4)</sup>を中心に述べる。

### 1. 危険因子の発見・管理

TIAの既往のある患者の脳梗塞予防のアプローチには、脳梗塞危険因子を同定することと是正することがある。是正不能な脳梗塞危険因子としては、年齢、性、人種、遺伝がある。一方、是正可能な危険因子としては、高血圧、心臓病(特に心房細動)、糖尿病、高コレステロール血症、喫煙、アルコール多飲、運動不足がある。表1に米国における危険因子の管理ガイドラインを示す。

### 2. TIAの内科的治療

#### 1) アテローム血栓性TIA

動脈硬化が原因と思われるTIAでは、まず抗血小板薬が使用される。アスピリンはシクロオキシゲナーゼ(COX)阻害薬であり、血小板内のCOX-1をアセチル化して非可逆的に阻害しトロ

表1 危険因子の管理ガイドライン(文献4より)

危険因子	治療管理目標
高血圧	SBP<140 mmHg, DBP<90 mmHg 臓器障害がある場合 SBP<135 mmHg, DBP<85 mmHg
喫煙	禁煙
心疾患	冠疾患・不整脈・心不全・心臓弁膜症の治療
糖尿病	血糖<126 mg/dl
高脂血症	LDL<100 mg/dl, HDL>35 mg/dl TC<200 mg/dl, TG<200 mg/dl
飲酒	節酒(アルコール30g/日以下)
運動不足	適度な運動30~60分/週3~4回以上
体重	<標準体重の120%, 食事療法・運動

たなはし のりお：慶應義塾大学医学部神経内科 ☎160-8582 東京都新宿区信濃町35

ンボキサンA<sub>2</sub>産生を抑える。メタアナリシス(ATT)<sup>9)</sup>の成績からは75~150 mg/日が推奨される。アスピリンはしばしば胃腸障害があるが、腸溶錠では胃腸障害が少ない。アスピリンに代わる抗血小板薬としてはチクロピジンがある。チクロピジンはADP受容体(P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>)拮抗薬で、本邦では200 mg/日が用いられる。アスピリンよりも効果が強いが、下痢、肝障害、発疹などの副作用以外に、顆粒球減少症、血栓性血小板減少性紫斑病などの重篤な副作用が稀に生じるため、使用開始後2カ月間は血液検査が必須である。欧米では、チクロピジンと同じチエノピリジン系薬剤で副作用の少ないクロピドグレルが認可されている。さらに、欧米ではアスピリン50 mg/日と徐放性ジピリダモール(phosphodiesterase 阻害薬)400 mg/日の併用がTIAに有効であるとする報告がなされ、選択肢の一つである。抗凝固療法は、アテローム血栓性TIA患者の治療としては、短期および長期治療のいずれにおいても、常に推奨されるものではない。しかし、抗血小板療法を行っているにもかかわらず症状が持続している患者に対して行われることがある。この場合、目標とするプロトロンビン時間INR(international normalized ratio)は3.0未満にするべきである。

## 2) 心原性塞栓によるTIA

心原性塞栓によると考えられるTIA症例では、できるだけ早期にヘパリンあるいはワルファリンによる抗凝固療法を開始する必要がある。また、血行力学的機序によるcrescendo TIAでも低流速での凝固系の亢進が関与していると考えられるため、抗凝固療法の適応となる。ヘパリン使用中は活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を1.5~2倍になるように調節する。ヘパリンを1~2週間使用後ワルファリンに切り替えるが、凝固因子の半減期が数日に及ぶため、INRが2.0~3.0に達するまで通常4~5日の重複期間を設ける。アスピリンは経口抗凝固療法が禁忌である患者に推奨される。

## 3. 外科的治療

### 1) 頭蓋外頸動脈病変

#### (1) 70~99%狭窄

過去2年以内にTIAを1回以上きたした場合、抗血小板薬に対する反応の有無にかかわらず、内頸動脈内膜剝離術の適応がある。

#### (2) 50~69%狭窄

内膜剝離術が考慮されるべきである。しかし、手術による絶対的利益は、より高度狭窄を有する患者よりも少なく、女性や、網膜症状を伴うTIA患者でも少ない。脳梗塞のリスクや手術の合併症に影響を与える臨床的要因を考慮すべきである。

#### (3) <50%狭窄

手術適応がなく、抗血小板療法が推奨される。

### 2) 血管内治療

頸動脈内膜剝離術と比較した血管形成術およびステント留置術の効果を評価する試験が行われている。

### 3) バイパス手術

TIA患者には頭蓋内-頭蓋内バイパス術は推奨されない。血行力学的な障害があり、内科的治療に反応しない内頸動脈系の虚血症状を有する患者サブグループでは、バイパス手術により利益が得られる可能性がある。これらの患者における手術の役割を明らかにするためには、今後治験を行うことが必要である。モヤモヤ病患者では頭蓋外-頭蓋内バイパス術が有効である可能性がある。

## 脳梗塞の再発予防

脳梗塞の再発は、年間5~10%であり、再発により機能予後が悪化する。再発によりParkinson症候群、脳血管性痴呆、仮性球麻痺による嚥下障害などが生じやすくなる。再発予防には、危険因子の発見・是正、臨床病型(アテローム血栓性脳梗塞、ラクナ梗塞、心原性脳塞栓症、その他)に応じた治療がある。

### 1. 危険因子の発見・是正

TIAに準じる。

## 2. 臨床病型に応じた再発予防

### 1) アテローム血栓性脳梗塞

抗血小板薬が適応となる。最も有効な抗血小板薬はアスピリン75~150 mg/日、チクロピジン200 mg/日、シロスタゾール200 mg/日である。頸動脈内膜剝離術の適応はTIAとほぼ同様である。内頸動脈高度狭窄(70%以上)で周術期合併症が少ない場合は、頸動脈内膜剝離術の適応となる。50~69%狭窄の場合はリスクの程度により頸動脈内膜剝離術を考慮する。50%未満は適応なし。

### 2) ラクナ梗塞

抗血小板療法はアテローム血栓性脳梗塞に準じる。特に血圧管理を同時に厳重に行うことが重要である。

### 3) 心原性脳塞栓症

心原性脳塞栓症の再発予防は抗凝固薬ワルファリンが第一選択薬であり、ワルファリンの禁忌の患者のみアスピリンなどの抗血小板薬を投与する。弁膜症を伴わない心房細動(non valvular atrial fibrillation: NVAf)の場合は、INR 2.0~3.0、リウマチ性心臓病、拡張型心筋症などの器質的心疾患を有する症例にはINR 2.0~3.0、心臓弁膜症の場合は、INR 3.0~4.0が推奨される。わが国の70歳以上のNVAfのある脳梗塞またはTIAでは、

INR 1.5~2.1が推奨される。出血性合併症は2.6を超えると急増する。人工弁のある患者ではINR 2.0~3.0以下にならぬようにコントロールする。塞栓源が不明な場合は、抗血小板療法を行う。

## 文献

- 1) The National Institute of Neurological Disorders and Stroke: Classification of cerebrovascular diseases III. Stroke 21: 637-676, 1990
- 2) Feinberg WM, et al: Guideline for the management of transient ischemic attacks. From the Ad Hoc Committee on guideline for the management of transient ischemic attacks of the stroke council of the American Heart Association. Stroke 25: 1320-1335, 1994
- 3) Albers GW, et al: Supplement to the guidelines for the management of transient ischemic attacks. A statement from the Ad Hoc Committee on Guidelines for the management of transient ischemic attacks, stroke council, American Heart Association. Stroke 30: 2502-2511, 1999
- 4) Wolf PA, et al: Preventing ischemic stroke in patients with prior stroke and transient ischemic attack. A statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. Stroke 30: 1991-1994, 1999
- 5) Antithrombotic Trialists' Collaboration: Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. BMJ 324: 71-86, 2002

## 虚血性脳血管障害と関係する遺伝子多型解析

石井啓子\*1 村田 満\*2 小口修司\*3 竹下栄子\*4  
伊東大介\*5 棚橋紀夫\*6 福内靖男\*7 斉藤郁夫\*8  
池田康夫\*9 渡辺清明\*10

### Genetic Risk Factors for Ischemic Cerebrovascular Disease —Analysis on Fifteen Candidate Prothrombotic Gene Polymorphisms in the Japanese Population—

*Keiko ISHII*\*1, *Mitsuru MURATA*, MD\*2, *Shuji OGUCHI*\*3, *Eiko TAKESHITA*\*4,  
*Daisuke ITO*, MD\*5, *Norio TANAHASHI*, MD\*6, *Yasuo FUKUUCHI*, MD\*7,  
*Ikuo SAITOU*, MD\*8, *Yasuo IKEDA*, MD\*9 and *Kiyoaki WATANABE*, MD\*10

Accumulating evidence suggests that several polymorphisms in factors regulating blood coagulation, platelet function, and lipid metabolism are relevant for susceptibility to ischemic cerebrovascular diseases (CVD). The present study analyzed 15 genetic polymorphisms possibly associated with atherosclerosis and thrombosis in a case-control study involving a total of 200 genetically unrelated Japanese patients with ischemic CVD (mean age  $58.3 \pm 7.6$ y) and 281 age- and gender-matched control subjects ( $59.0 \pm 4.1$ y). Control subjects were randomly selected from unrelated donors with no history of documented CVD or any type of cardiovascular disease with normal resting electrocardiograms. Among the factors genotyped, two factors, platelet glycoprotein (GP) Ib $\alpha$  (Thr145Met) and NADPH oxidase p22phox (His72Tyr), were significantly associated with CVD after adjustment for acquired risk factors including hypertension, diabetes mellitus, hyperlipidemia, and smoking. For those with age <60y, 10.6% of the CVD patients and 2.9% of the control subjects had both of the two risk genotypes (GPIb $\alpha$  145Met and p22phox 72Tyr,  $p < 0.05$ ). The mean onset-age of CVD was  $58.6 \pm 7.7$ y for those having no or only one risk genotype, while  $53.3 \pm 5.5$ y for those having both of the risk genotypes ( $p < 0.05$ ). Thus, GPIb $\alpha$  145Met and p22phox 72 Tyr are the genetic factors associated with the risk of ischemic CVD in the Japanese. Carrying both of the two mutations might be associated with developing CVD at a younger age.

[Rinsho Byori 52 : 22~27, 2004]

\*1Departments of Laboratory Medicine, Keio University, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582

【Key Words】CVD(脳血管障害), genetic polymorphism(遺伝的多型), candidate gene approach(候補遺伝子アプローチ)

受付 2003 年 10 月 16 日・受理 2004 年 1 月 15 日

\*1~4,10 慶應義塾大学医学部中央臨床検査部, \*2,5~7,9 同 内科, \*8 同 保健管理センター(〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35)

虚血性脳血管障害 (Cerebrovascular Disease, 以下 CVD) は多因子病であり, 環境因子とともに複数の多型遺伝子が複雑に絡み合っ て易罹病性を決定すると考えられる<sup>1)~5)</sup>。すなわち, 血液凝固, 血小板機能, 脂質代謝などの遺伝子多型が CVD 発症の機序に大きく関わっていると考えられる。血液凝固 V 因子<sup>506</sup>Arg/Gln (Leiden 変異) は, APC レジスタンスの一つの原因であり, 静脈血栓症や一部で動脈血栓症との関係が明らかにされている<sup>6)</sup>。また, プロトロンビン 20210A 変異も, 静脈血栓症や冠状動脈疾患 (coronary artery disease, 以下 CAD) との関係が欧米で報告されている<sup>7)</sup>。しかしながら, この2つの変異は日本人では認められていないことから, CVD 発症には別の遺伝子多型が関与している可能性が考えられる。我々は既に日本人を対象とした検討で, Platelet glycoprotein (GP)Ib $\alpha$  または NADPH oxidase p22phox の遺伝子多型の中で CVD 発症のリスクをもつ遺伝子型のあることを報告した<sup>8)9)</sup>。一方, Lipopolysaccharide receptor CD14 のプロモーター領域の遺伝子多型は, CVD 発症のリスクにはならないことも報告した<sup>10)</sup>。今回は, これら研究とほぼ同一の集団を対象とし, CVD と関係する可能性のある15種類の遺伝子多型頻度を CVD 患者と健常人について比較検討し, リスク型遺伝子を複数個合わせ持つ CVD 患者の特徴を包括的に解析することを目

的とした。

## I. 研究方法

### A. 対象者

対象は CVD 患者 200 例であり, 内訳はアテローム血栓性脳梗塞 52 例, ラクナ梗塞 126 例, Transient Ischemic Attack (以下 TIA) 22 例である。すべての患者について脳の CT スキャンまたは MRI を行い, NINDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke) による診断基準に基づいて分類した。コントロールは慶応大学教職員の健康診断受診者 281 名である。CVD 患者, コントロール群ともに, すべて書面によるインフォームドコンセントを得た。解析対象の背景を Table 1 に示す。CVD 患者の年齢については採血時ではなく発症時の年齢である。収縮期血圧 140mmHg, 拡張期血圧 90mmHg 以上, 又は降圧剤服用中の患者を高血圧症, 総コレステロール 220mg/dl, トリグリセライド 150mg/dl 以上, または薬物治療中の患者を高脂血症, また空腹時血糖 140mg/dl 以上または治療中を糖尿病ありとした。なお, 本研究は 15 の遺伝子多型を対象とした包括的研究であるが, その対象となった患者とコントロールは既に報告した個別の遺伝子多型研究<sup>8)~10)</sup>と大部分同一である。

Table 1 Clinical characteristics of CVD patients and control subjects

		CVD (n=200)	control (n=281)	p*
Age	(y)	58.3 $\pm$ 7.6	59.0 $\pm$ 4.1	NS
Male	(%)	78.5	76.2	NS
Smoking	(%)	53.1	27.0	<0.0001
Hypertension	(%)	57.3	30.0	<0.0001
Hyperlipidemia	(%)	64.3	35.7	<0.0001
Diabetes mellitus	(%)	26.7	9.6	<0.0001
BMI	(kg/m <sup>2</sup> )	23.8 $\pm$ 2.6	22.9 $\pm$ 2.7	0.0016
Total cholesterol	(mg/dl)	206.7 $\pm$ 42.4	205.4 $\pm$ 29.6	NS
Triglycerides	(mg/dl)	168.7 $\pm$ 84.6	119.9 $\pm$ 105.5	<0.0001
HDL cholesterol	(mg/dl)	48.6 $\pm$ 17.8	56.8 $\pm$ 15.0	<0.0001
Glucose	(mg/dl)	108.1 $\pm$ 35.0	99.6 $\pm$ 14.0	0.0004

Data were shown as mean  $\pm$  SD. BMI: body mass index.

\* $\chi^2$  tests were used to compare the CVD patients and the controls for the frequencies of Male, Smoking, Hypertension, Hyperlipidemia and Diabetes mellitus.

Age, BMI, Total cholesterol, Triglycerides, HDL cholesterol and Glucose were compared with the use of the Student t test.



B. 解析対象遺伝子多型

解析した 15 の遺伝子は以下のとおりである。

1. Fibrinogen  $\beta$  chain (Fib  $\beta$  ; G-455A),
2. Coagulation factor XII (F-XII ; C46T),
3. Plasminogen activator Inhibitor-1 (PAI-1 ; promoter, 4G/5G),
4. Platelet glycoprotein 1b $\alpha$  (GP1b $\alpha$  ; Thr145Met),
5. Atrial natriuretic peptide (ANP ; G664A),
6. Nitric-oxide synthase (NOS ; 4repeat/5repeat),
7. Angiotensin-converting enzyme (ACE ; insertion /deletion),
8. Serotonin receptor 5HT2A (T102C),
9. Apolipoprotein E (APO-E ;  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4),
10. Cholesterylester transfer protein (CETP ; TaqI genotype of intron 1),
11. Paraoxonase (PON ; Gln192Arg),
12. Methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR ; C677T),
13. NADPH oxidase p22phox (His72Tyr),
14. Monocyte CD14 antigen (promotor C-260T),
15. Mitochondrial DNA 5178 (m-5178 ; C5178A)

1 から 3 の遺伝子は血液凝固, 4 は血小板機能に関連する, 5 から 8 は血圧調節, 9, 10 は脂質代謝,

11 から 14 は血管の細胞障害に関わる因子であり, 15 は機序不明であるが我々の予備検討で血圧との関連が示唆された因子である。

C. 多型解析方法

CVD 患者とコントロール群それぞれの全血を用い, 直接 PCR 法<sup>11)</sup>にて各遺伝子を増幅後, 制限酵素切断によって遺伝子型を決定した。

D. 統計解析方法

各分析データの平均値の比較には Student t test による t 検定を, 各分析データの出現頻度の比較には  $\chi$  二乗検定を行い, いずれも危険率 0.05 以下を有意とした。これらすべての統計解析は, Statview (version 5.0 for Windows ; SAS Institute) にて行った。

II. 結 果

(1) 解析した CVD 患者とコントロール群の臨床背景を Table 1 に示した。両群間で年齢, 男女比に有意差は認めなかった。しかし喫煙, 高血圧, 高脂血症, 糖尿病合併, BMI, トリグリセライド, HDL コレステロール, 血糖値については CVD 患者とコントロール群で有意差を認めた。

(2) 15 の遺伝子多型それぞれの出現頻度を, 対象症例全体の中で解析が出来た患者数について, CVD 患者とコントロール群で比較をした (Table 2)。コン

Table 2 Genotype frequencies of the fifteen polymorphisms in CVD patients and control subjects

	genotype	CVD (n=200)			control (n=281)			p*	
1	Fib- $\beta$	H1/H1, H1/H2, H2/H2	152	41	4	158	49	4	0.8406
2	F <sup>2</sup> XII	cc, ct, tt	24	92	83	25	124	110	0.7028
3	PAI-1	4G/4G, 4G/5G, 5G/5G	83	95	20	97	128	32	0.5742
4	GP1b $\alpha$	Met/Met, Thr/Met, Thr/Thr	2	51	147	4	49	228	0.0956
		Met/Met + Thr/Met, Thr/Thr	53	147	53	228	0.0464		
5	ANP	aa, ag, gg	0	26	138	0	8	65	0.3210
6	NOS	a/a, a/b, b/b	5	31	149	2	31	106	0.3593
7	ACE	D/D, I/D, I/I	34	76	89	32	98	129	0.3070
8	5HT2A	cc, ct, tt	46	100	53	54	145	75	0.6654
9	APO-E	$\epsilon$ 2, $\epsilon$ 3, $\epsilon$ 4	18	140	40	6	133	33	0.0801
		with $\epsilon$ 2, without $\epsilon$ 2	18	180	6	166	0.0291		
10	CETP	B1/B1, B1/B2, B2/B2	64	100	31	84	134	41	0.9950
11	PON	Arg/Arg, Gln/Arg, Gln/Gln	77	100	23	99	128	32	0.9614
12	MTHFR	cc, ct, tt	65	96	39	80	128	48	0.9438
13	p22phox	tt, ct, cc	2	39	159	2	34	245	0.0760
		tt + ct, cc	41	159	36	245	0.0234		
14	CD14	cc, ct, tt	49	102	49	64	142	75	0.8310
15	m-5178	a allele, c allele	78	122	54	85	0.9776		

\* $\chi^2$  tests were used to compare genotype frequencies between controls and all CVD patients.

トロール群, CVD 患者群で遺伝子型出現頻度に差がみられ,  $\chi^2$  乗検定で危険率  $p$  が 0.1 以下だったのは GPIIb $\alpha$  ( $p=0.0956$ ), APO-E ( $p=0.0801$ ), p22phox ( $p=0.0760$ ) の 3 遺伝子のみであった。すなわち, GPIIb $\alpha$  ではメチオニン (Met), APO-E では E2 アリル ( $\epsilon 2$ ), p22phox では t アリルを有するタイプが CVD 患者では高率にみられた。さらに, 3 つの遺伝子を, リスク型遺伝子を持つグループと持たないグループの 2 群とし分割表分析し,  $\chi^2$  乗検定を行ったところ, そのオッズ比は GPIIb $\alpha$  では 1.55 ( $p=0.0464$ ), APO-E では 2.77 ( $p=0.0291$ ), p22phox では 1.75 ( $p=0.0234$ ) であり, CVD 患者でこれらリスク型遺伝子を持つ者が有意に多かった。他の 12 遺伝子については今回の解析ではコントロール群との間に出現頻度の有意差は認められなかった。

(3) 次に, それぞれの CVD 患者がもつリスク型遺伝子数を解析し, リスク型遺伝子数が CVD の発症や病態とどのような関連があるかを検討した

(Table 3)。ただし, 今回の検討では関連のみられた 3 つの遺伝子多型すべてがリスク型であるという例は CVD 群, コントロール群のなかで 1 例もなく, また, APO-E は例数が少ないために解析の対象から除外し, GPIIb $\alpha$  と p22phox のリスク型遺伝子の組み合わせについて解析を加えた。GPIIb $\alpha$  が Met を有するタイプ, p22phox が t アリルを有するタイプ, すなわちリスク型遺伝子を 2 つ有する者はすべての CVD 患者で 11 例 (5.5%), どちらか一方のリスク型遺伝子を有する者はすべての CVD 患者で 72 例 (36.0%) であり, コントロール群とは危険率 0.0120 でその出現頻度に有意差を認めた。CVD の病態別でもラクナ梗塞, TIA で危険率 0.05 以下の有意差を認めたが, 解析した例数が少ないため, 病態別による詳細な検討は出来なかった。

(4) CVD 患者でリスク型遺伝子をもつ患者の, コントロール群に対するオッズ比を表わした (Table 4)。すべての CVD 患者とすべてのコントロール群

Table 3 Number of "risk genotypes" present in each individual

	n	number of risk genotypes in each subject*			p**
		2	1	0	
All CVD patients	200	11 (5.5)	72 (36.0)	117 (58.5)	0.0120
Atherothrombotic	52	3	17	32	0.2609
Lacunar	126	7	44	75	0.0488
TIA	22	1	11	10	0.0465
Controls	281	7 (2.5)	75 (26.7)	199 (70.8)	

(%)

\*number of risk genotypes

2: GPIIb $\alpha$  genotype is Met/Met or Met/Thr and p22phox genotype is tt or ct.

1: GPIIb $\alpha$  genotype is Met/Met or Met/Thr, or p22phox genotype is tt or ct.

0: GPIIb $\alpha$  genotype is Thr/Thr and p22phox genotype is cc.

\*\* $\chi^2$  tests were used to compare the number of risk factors between controls and each subgroup of CVD patients (2 × 3 contingency table).

Table 4 Odds ratios for the risk genotypes in CVD patients vs controls

	Subtype	Odds ratio
all CVD patients vs all controls (n=200 vs 281)	2 risk genotypes	2.67
	1 risk genotype	1.63
	0 risk genotype	1.00
patients (age < 60) vs controls (age < 60) (n=104 vs 138)	2 risk genotypes	4.68
	1 risk genotype	1.58
	0 risk genotype	1.00
	Hypertension	4.90
	Smoking	4.22

との比較ではリスク型を2つ有する者で2.67, 1つ有する者で1.63であったが, 60歳未満の患者とコントロールに限って解析すると, リスク型遺伝子を2つ有する者はそのオッズ比が4.68と有意に高く, 同様に60歳未満で解析して求めた高血圧(4.90)の次に高く, 喫煙(4.22)よりも高いオッズ比であった。表には示さないが, 60歳未満で, リスク型遺伝子を2つ持つ者はCVD患者で10.6%であるのに対し, コントロール群では2.9%のみであった( $p < 0.05$ )。

(5) リスク型遺伝子を2つ有する者と, 1つあるいは1つも持たない者との比較をし, 分割表分析あるいは分散分析から危険率  $p$  を表わした (Table 5)。その結果, 性別や喫煙, 高血圧, 高脂血症, 糖尿病の有無や生化学データに大きな有意差はみられなかった。しかし, 平均発症年齢で約5歳の差を認め, 危険率 0.0254 でリスク型遺伝子を2つ有する者の発症年齢が有意に若いことが解析の結果から判明した。

### III. 考 察

血栓症の遺伝的危険因子については欧米から多数報告されているが, 代表的な遺伝子多型である Factor V Leiden, プロトロンビン 20210A, 血液凝固 XIII 因子<sup>34</sup>Leu/Val, 血小板 GPIIb/IIIa<sup>33</sup>Leu/Pro は日本人では存在しないか極めて稀である<sup>12)</sup>。また我が国からは, 候補遺伝子アプローチを用いた大規模な研究が, 心筋梗塞に関して報告されている<sup>13)</sup>が, 脳血管障害については不明な点も多く, 検討報告は少ない。今回, 我々は動脈硬化や動脈血栓症と関連が深いとされている15項目についての遺伝子多型解析を行ったところ, GPIb $\alpha$ , APO-E, p22phox の3つの遺伝子でCVD患者とコントロールとの間に出現頻度の有意差を認めた。GPIb $\alpha$  と p22phox に関しては, CVD患者でリスク型遺伝子の出現頻度が高いという報告が既になされているが<sup>8,9)</sup>, 注目すべきは, GPIb $\alpha$ , p22phox 遺伝子のどちらもリスク型遺伝子を持つ者は, コントロール群に比し有意に多く認められ, 特に60歳未満のCVD患者で, リスク型遺伝

Table 5 Clinical characteristics of CVD patients in relation to number of risk genotypes

		number of risk genotypes*		p**
		2 (n=11)	1 or 0 (n=189)	
Onset age	(y)	53.3±5.5	58.6±7.7	0.0254
Male	(%)	72.7	78.8	0.6316
Smoking	(%)	44.4	53.5	0.5946
Hypertension	(%)	60.0	57.1	0.8587
Hyperlipidemia	(%)	50.0	64.5	0.4563
Diabetes mellitus	(%)	30.0	26.4	0.8048
BMI	(kg/m <sup>2</sup> )	23.3±2.3	23.9±2.7	0.5897
Total cholesterol	(mg/dl)	221.5±38.8	205.8±42.6	0.2368
Triglycerides	(mg/dl)	229.2±115.4	165.8±82.3	0.0731
HDL cholesterol	(mg/dl)	63±0	48.4±17.9	0.4201
Glucose	(mg/dl)	110.9±29.0	107.9±35.5	0.8045
CETP	( $\mu$ g/ml)	2.56±1.08	2.42±0.66	0.5619
PAI-1	(ng/ml)	8.59±5.84	11.98±12.73	0.4042
tHcy	(ng/ml)	12.04±3.80	10.87±3.97	0.3624

Data were shown as mean  $\pm$  SD. BMI: body mass index. CETP: cholesteryl ester transfer protein. PAI-1: plasminogen activator inhibitor 1. tHcy: total homocystein.

\*number of risk genotypes

2: GPIb $\alpha$  genotype is Met/Met or Met/Thr and p22phox genotype is tt or ct.

1: GPIb $\alpha$  genotype is Met/Met or Met/Thr, or p22phox genotype is tt or ct.

0: GPIb $\alpha$  genotype is Thr/Thr and p22phox genotype is cc.

\*\* $\chi^2$  tests were used to compare the values for 2 risk genotypes and 1 or 0 risk genotypes for Male, Smoking, Hypertension, Hyperlipidemia and Diabetes mellitus. Age, BMI, Total cholesterol, Triglycerides, HDL cholesterol, Glucose, CETP, PAI-1 and tHcy were compared with the use of the Student t test.

子を2つ有する者のオッズ比は4.68と高値になった点である。これは危険因子となる多型が複数存在すると、CVDの発症リスクが著増する可能性を示している。さらに興味深いのは、CVD患者に限って解析すると、リスク型遺伝子を2つ有する者は、1つあるいは持たない者に対し、その発症年齢が平均で約5歳早期であるという点である。これは、CVDと関連する遺伝子多型の中で、リスク型遺伝子を同時に2つ以上有することは、より早期の発症をもたらす可能性のあることを示唆している。今後、これら遺伝子多型のCVD発症に対する関与を大規模前向き研究で実証することが望まれる。

#### 文 献

- 1) Di Minn G, Ggradone E, Margaglione M. Clinical relevance of polymorphic markers of arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 462-6.
- 2) Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359: 641-4.
- 3) Murata M, Kawano K, Matsubara Y, Ishikawa K, Watanabe K, Ikeda Y. Genetic polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1998; 24: 245-50.
- 4) Green F, Humphries S. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Bailliere's Clinical Haematology* 1994; 7: 675-92.
- 5) Cambien F, Poirier O, Mallet C, Tiret L. Coronary heart disease and genetics in epidemiologist's view. *Mol Med Today* 1997; 3: 197-203.
- 6) Zama T, Murata M, Ono F, Watanabe K, Watanabe R, Moriki T, et al. Low prevalence of activated protein C resistance and coagulation factor V Arg506 to Gln mutation among Japanese patients with various forms of thrombosis and normal individuals. *Int J Hematol* 1996; 65: 71-8.
- 7) Isshiki I, Murata M, Watanabe R, Matsubara Y, Kawano K, Aoki N, et al. Frequencies of prothrombin 20210 G→A mutation may be different among races—studies on Japanese populations with various forms of thrombotic disorders and healthy subjects. *Blood Coag Fibrinolysis* 1998; 9: 105-6.
- 8) Sonoda A, Murata M, Ito D, Tanahashi N, Ohta A, Tada Y, et al. Association between platelet glycoprotein Iba genotype and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2000; 31: 493-7.
- 9) Ito D, Murata M, Watanabe K, Yoshida T, Saito I, Tanahashi N, et al. C242T polymorphism of NAD-Phoxidase p22PHOX gene and ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population. *Stroke* 2000; 31: 936-9.
- 10) Ito D, Murata M, Tanahashi N, Sato H, Sonoda A, Saito I, et al. Polymorphism in the promoter of lipopolysaccharide receptor CD14 and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2000; 31: 2661-4.
- 11) Nishimura N, Nakayama T, Tonoike H, Kato S. Direct polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 674-80.
- 12) Murata M. Genetic polymorphisms associated with thrombotic disorders in the Japanese population. *Fibrinolysis and Proteolysis* 2000; 14: 155-64.
- 13) Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 2002; 347: 1916-23.

# Circulating CD34-Positive Cells Provide an Index of Cerebrovascular Function

Akihiko Taguchi, MD; Tomohiro Matsuyama, MD; Hiroshi Moriwaki, MD; Takuya Hayashi, MD; Kohei Hayashida, MD; Kazuyuki Nagatsuka, MD; Kenichi Todo, MD; Katsushi Mori; David M. Stern, MD; Toshihiro Soma, MD; Hiroaki Naritomi, MD

**Background**—Increasing evidence points to a role for circulating endothelial progenitor cells, including populations of CD34- and CD133-positive cells present in peripheral blood, in maintenance of the vasculature and neovascularization. Immature populations, including CD34-positive cells, have been shown to contribute to vascular homeostasis, not only as a pool of endothelial progenitor cells but also as a source of growth/angiogenesis factors at ischemic loci. We hypothesized that diminished numbers of circulating immature cells might impair such physiological and reparative processes, potentially contributing to cerebrovascular dysfunction.

**Methods and Results**—The level of circulating immature cells, CD34-, CD133-, CD117-, and CD135-positive cells, in patients with a history of atherothrombotic cerebral ischemic events was analyzed to assess possible correlations with the degree of carotid atherosclerosis and number of cerebral infarctions. There was a strong inverse correlation between numbers of circulating CD34- and CD133-positive cells and cerebral infarction. In contrast, there was no correlation between the degree of atherosclerosis and populations of circulating immature cells. Analysis of patients with cerebral artery occlusion revealed a significant positive correlation between circulating CD34- and CD133-positive cells and regional blood flow in areas of chronic hypoperfusion.

**Conclusions**—These results suggest a possible contribution of circulating CD34- and CD133-positive cells in maintenance of the cerebral circulation in settings of ischemic stress. Our data demonstrate the utility of a simple and precise method to quantify circulating CD34-positive cells, the latter providing a marker of cerebrovascular function. (*Circulation*. 2004;109:2972-2975.)

**Key Words:** cerebral infarction ■ cerebral ischemia ■ antigens, CD34 ■ stem cells

Although it had traditionally been assumed that replacement of damaged endothelium resulted only from outgrowth of preexisting vasculature, recent studies have identified endothelial progenitor cells (EPCs) that appear to contribute to vascular homeostasis and repair.<sup>1</sup> Clinical trials to assess the therapeutic potential of bone marrow-derived mononuclear cells, a rich source of immature cells including EPCs, in hind-limb<sup>2,3</sup> and cardiac ischemia<sup>4</sup> have been initiated and have, thus far, provided promising results. Furthermore, immature cells, including CD34-positive (CD34<sup>+</sup>) cells, have been shown to contribute to maintenance of the vasculature, not only as a pool of EPCs but also as the source of growth/angiogenesis factors.<sup>5</sup> Bone marrow-derived immature cells have also been shown to participate in neovascularization of ischemic brain after experimental stroke.<sup>6</sup> On the basis of these results, we hypothesized that levels of circulating immature cells might be proportional to

the resilience of the cerebral circulation to ischemic stress; ie, lower numbers of circulating immature cells might be associated with cerebral ischemia and infarction.

### Methods

The institutional review board of the National Cardiovascular Center approved this study. All subjects provided informed consent. Circulating CD34<sup>+</sup> cells in 50  $\mu$ L of peripheral blood were quantified according to the manufacturer's protocol (ProCOUNT, Becton Dickinson Biosciences). To minimize intersample variation for measurements of CD34<sup>+</sup> cells, several methods were used: A nucleic acid dye was added as a threshold reagent; a no-wash technique was performed to eliminate cell loss, and reverse pipetting was used; an internal reference particle was added for determination of absolute cell numbers; and an isotype control, matched for the concentration of anti-CD34 antibody and fluorochrome-to-protein ratio, was included. All measurements were performed in triplicate (Figure 1A, control; Figure 1B, CD34). To quantify other stem cell populations (besides CD34<sup>+</sup> cells), immature mononuclear cells were enriched

Received December 8, 2003; de novo received April 12, 2004; accepted May 11, 2004.

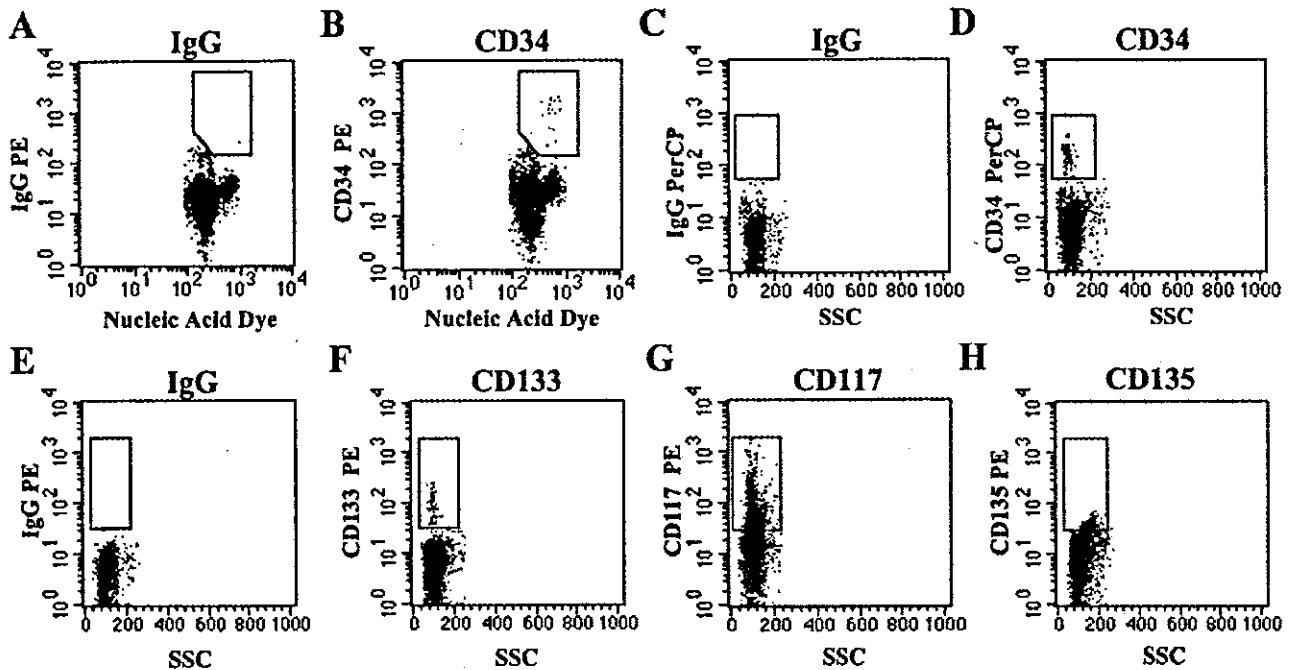
From the Departments of Cerebrovascular Disease (A.T., H.M., K.N., K.T., H.N.), Radiology and Nuclear Medicine (T.H., K.H.), and Clinical Physiology (K.M.), National Cardiovascular Center, Osaka, Japan; Department of Internal Medicine (T.M.), Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan; Dean's Office (D.M.S.), Medical College of Georgia, Augusta, Ga; and Department of Hematology (T.S.), Osaka Minami National Hospital, Osaka, Japan.

Correspondence to Akihiko Taguchi, Department of Cerebrovascular Disease, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka, 565-8565 Japan. E-mail ataguchi@res.nccv.go.jp

© 2004 American Heart Association, Inc.

*Circulation* is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/01.CIR.0000133311.25587.DE



**Figure 1.** Quantification of circulating immature cells in patients with stroke. Nucleic acid dye versus CD34 PE dot plot was gated on lymphocytes and CD45 dim leukocytes. A, Results with an isotype-matched control antibody. B, Results with anti-CD34 antibody. Enriched immature mononuclear cells were double stained with PerCP-conjugated CD34 antibody (D) and PE-conjugated CD133 (F), CD117 (G), or CD135 (H) antibody. The number of cells in a region including brightly stained cells was counted. C and E, Staining with isotype nonimmune control antibody.

from 2 mL of peripheral blood by antibody-mediated depletion of mature cells according to the manufacturer's protocol (StemCell Technologies) using depletion cocktail, including antibodies to CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, and CD66b. Enriched immature mononuclear cells were double-stained with peridinin chlorophyll protein (PerCP)-conjugated CD34 antibody (Figure 1D) and phycoerythrin (PE)-conjugated CD133 (Figure 1F), CD117 (Figure 1G), or CD135 (Figure 1H) antibody. The number of cells in a region including brightly stained cells was counted, and immature cells were quantified using CD34<sup>+</sup> cells as an internal control. The cumulative intra-assay coefficient of variation was 14%, 13%, 14%, and 15%, with CD34<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, and CD135<sup>+</sup> cell measurements, respectively, from 5 stroke patients.

Atherosclerosis in the common and internal carotid arteries was analyzed by ultrasonography to determine plaque score as described previously.<sup>7</sup> Cerebral infarcts (diameter >5 mm) were counted independently by a neurologist blinded to other parameters under study (number of circulating CD34<sup>+</sup>, etc) using T1-weighted, T2-weighted, and fluid-attenuated inversion-recovery MRI obtained with a 1.5-Tesla MRI scanner. The diagnosis of hypoperfusion was made angiographically. Regional cerebral blood flow (CBF), cerebral blood volume, oxygen extraction fraction (OEF), and cerebral metabolic rate of oxygen (CMRO<sub>2</sub>) were quantified by conventional steady-state <sup>15</sup>O PET using a PET scanner (Shimadzu) as described.<sup>8</sup> Cerebrovascular function was evaluated in patients with chronic hypoperfusion caused by major cerebral artery (carotid artery or M1 portion of the middle cerebral artery) occlusion or severe stenoses (>90%) without a major stroke. Twelve patients with 15 major arterial occlusions or stenoses had PET examinations.

To investigate the mobilization of immature cells after acute cerebral infarction, peripheral blood was quantified at 6 hours and 3, 7, 14, and 30 days after the onset of stroke. The episodes of acute cerebral infarction were confirmed by the diffusion image of brain MRI. Age-matched volunteers who had no history of cerebrovascular diseases and no neuronal deficiency were enrolled as controls (mean age, 67±4 years). Test-retest intraclass correlations were 0.88, 0.75, 0.86, and 0.86 for CD34, CD133, CD117, and CD135,

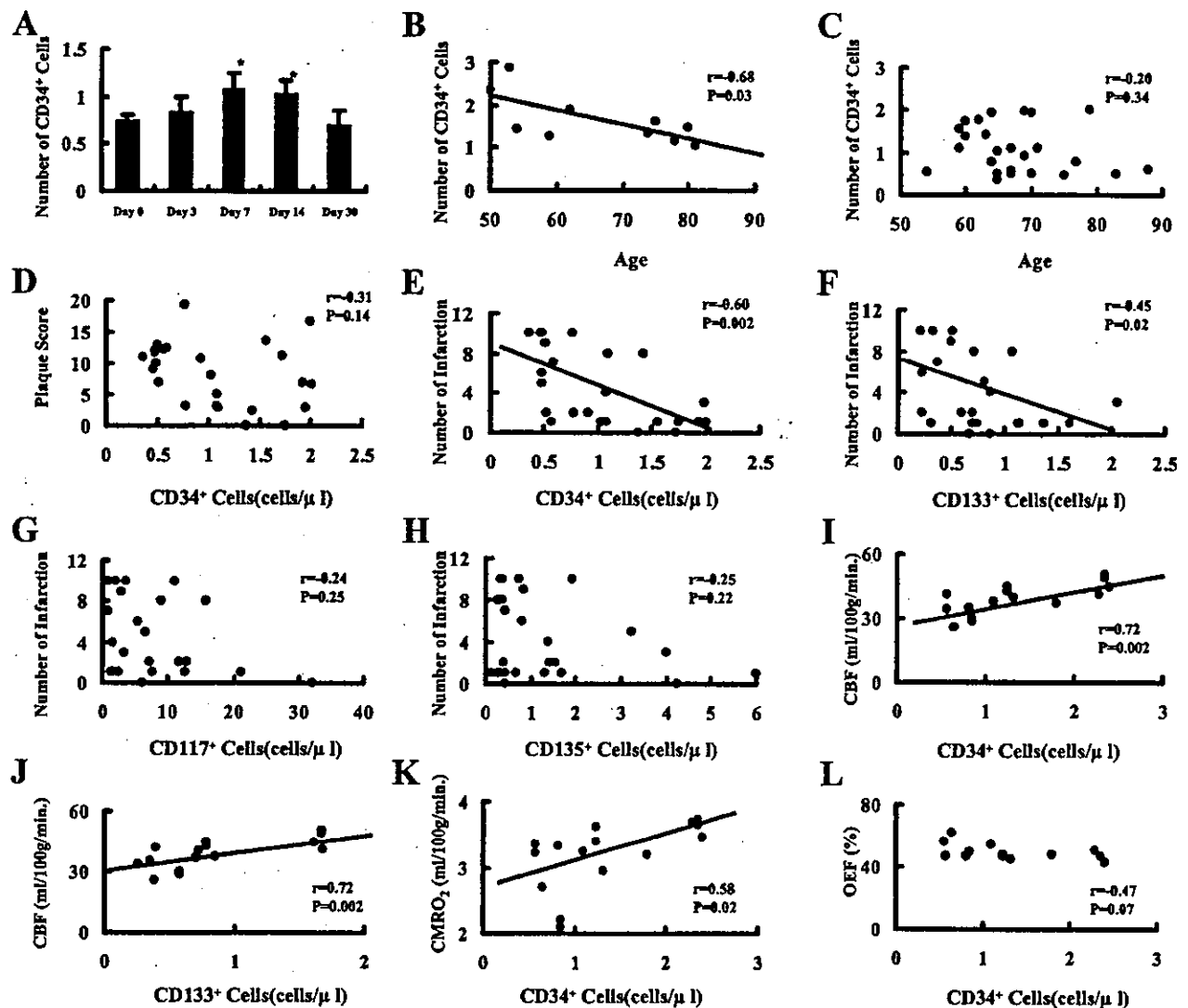
respectively, obtained from 5 volunteers tested twice with an interval of at least 10 days between samples.

Univariate correlations were performed using Pearson's correlation coefficient and Spearman's correlation coefficient. Statistical comparisons among groups were determined using analysis of variance. Individual comparisons were performed using Student's *t* test. In all experiments, mean±SE is reported.

## Results

First, we investigated mobilization of immature cells after acute cerebral infarction (n=5), focusing on CD34<sup>+</sup> cells. The level of CD34<sup>+</sup> cells gradually increased to day 7 and remained significantly above the prestroke baseline on days 7 and 14, returning to baseline levels by day 30 (Figure 2A). On the basis of these data, we enrolled 25 patients with a history of atherothrombotic cerebral ischemic events, excluding those who had suffered cerebrovascular or cardiovascular acute ischemic episodes in the 30 days before study, as well as premenopausal females. In this group (>30 days after stroke), no correlation was observed between the interval after stroke and the level of circulating CD34<sup>+</sup> cells ( $r=0.009$ ,  $P=0.97$ ). Characteristics of this group included mean age of 68±2 years, 20 men and 5 women, 23 patients receiving antiplatelet therapy, 11 patients receiving antihypertensive therapy, 6 patients receiving therapy for hyperlipidemia, 5 patients receiving therapy for diabetes mellitus (DM), and 16 patients with a current or past history of smoking.

Several factors were found to influence the number of circulating CD34<sup>+</sup> cells. Statistical analysis revealed a significant decrease in circulating CD34<sup>+</sup> cells in patients with DM ( $0.5±0.1$ ; non-DM,  $1.2±0.1$  cells/μL;  $P=0.01$ ). In contrast,



**Figure 2.** Levels of circulating CD34<sup>+</sup> cells and stroke. Circulating CD34<sup>+</sup> cells increased after the onset of stroke and peaked on day 7. A significant increase in circulating CD34<sup>+</sup> cells was observed on days 7 and 14 (A). A decrease of circulating CD34<sup>+</sup> cells was observed with aging in the control group (B), but no such correlation was observed in the stroke patient group (C). No correlation was observed between the number of circulating CD34<sup>+</sup> cells and the degree of arteriosclerosis in major cerebral arteries (D). However, there was a correlation between cerebral infarctions and circulating CD34<sup>+</sup> (E) and CD133<sup>+</sup> cells (F). In contrast, there was no correlation between cerebral infarction and CD117<sup>+</sup> (G) or CD135<sup>+</sup> cells (H). Correlation between circulating CD34<sup>+</sup> (I) and CD133<sup>+</sup> (J) cells and CBF in areas of chronic hypoperfusion was observed. Lower levels of circulating CD34<sup>+</sup> cells were correlated with a decrease in CMRO<sub>2</sub> (K) but not with a change in OEF (L). \* $P < 0.05$  compared with day 0 (based on 2-way ANOVA).

no change was observed in patients with hypertension ( $P=0.61$ ), with hyperlipidemia ( $P=0.81$ ), with smoking ( $P=0.64$ ), or based on gender ( $P=0.36$ ). In addition, treatment with HMG-CoA reductase inhibitors ( $P=0.81$ ), compared with patients without hyperlipidemia, did not impact the number of CD34<sup>+</sup> cells. In the control patient group, a decrease of circulating CD34<sup>+</sup> cells was observed with aging (Figure 2B), although this was not observed in the patient group (Figure 2C). Comparing baseline levels of circulating CD34<sup>+</sup> cells, there was a significant decrease in the patient group compared with age-matched controls (stroke,  $1.1 \pm 0.1$ ; control,  $1.6 \pm 0.2$  cells/ $\mu$ L;  $P=0.02$ ).

We sought a possible correlation between circulating immature cells and the degree of arteriosclerosis of the common and

internal carotid arteries in the patients with atherothrombotic cerebral ischemic events. However, there was no significant correlation between arteriosclerosis and circulating CD34<sup>+</sup> (Figure 2D). This result was not surprising, because multiple risk factors and cell types contribute to progression of vascular lesions in major arteries. In contrast, because disruption of vascular homeostasis and repair are associated with cerebral infarction, we reasoned that a history of cerebral infarction might correlate with circulating immature cells. A strong correlation was observed between the number of infarcts and the absolute number of circulating CD34<sup>+</sup> cells (Figure 2E) and CD133<sup>+</sup> cells (Figure 2F). However, no significant correlation with regard to cerebral infarcts was observed with circulating CD117<sup>+</sup> cells (Figure 2G) and CD135<sup>+</sup> cells (Figure 2H).

In view of the critical role of endothelium in maintaining CBF, we evaluated cerebrovascular function in patients with chronic hypoperfusion. Direct correlations were observed between CBF (in the chronically hypoperfused area) and circulating CD34<sup>+</sup> cells (Figure 2I) and CD133<sup>+</sup> cells (Figure 2J). In addition, lower numbers of circulating CD34<sup>+</sup> cells (Figure 2K) correlated with diminished CMRO<sub>2</sub>, although there was no significant increase in the OEF (Figure 2L). These observations suggest a contribution of CD34<sup>+</sup> cells in homeostasis and repair of the cerebral circulation and maintenance of brain metabolism. No correlation was observed with the above parameters of vascular function and circulating CD117<sup>+</sup> and CD135<sup>+</sup> cells. Measurement of angiogenic growth factors in patient plasma, vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, hemopoietic growth factor, and insulin-like growth factor-1 also demonstrated no correlation with indices of cerebrovascular function or the number of CD34<sup>+</sup> cells (not shown).

### Discussion

We have found that circulating immature cell populations, especially CD34<sup>+</sup> and CD133<sup>+</sup> cells, are associated with maintenance and repair of the cerebral vasculature. In our study, we used a simple and precise method to count the absolute number of circulating CD34<sup>+</sup> cells in a small sample of peripheral blood. Our results indicate that the level of CD34<sup>+</sup> cells serves as an index/marker for cerebrovascular function. Analysis of CD133<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, and CD135<sup>+</sup> cells, which identify other populations of immature cells, demonstrated that only CD133<sup>+</sup> cells correlated with cerebrovascular function in a manner paralleling CD34<sup>+</sup> cells.

Patients with diabetes displayed a significant reduction in the number of circulating CD34<sup>+</sup> cells. In view of the microvascular dysfunction that is characteristic of diabetes, this may not be surprising. Similarly, decreased circulating CD34<sup>+</sup> cells with increasing age in healthy individuals may be associated with limited vascular renewal in older individuals. It was also of interest to note no change between levels of CD34<sup>+</sup> cells in patients taking HMG-CoA reductase inhibitors. The latter results might reflect the positive effect

of such drugs countering the negative effect of hyperlipidemia on circulating CD34<sup>+</sup> cells. Such conclusions, of course, are at best tentative, because in this first report we have identified associations rather than proved a cause-effect relationship.

These observations suggest that diminished numbers of CD34<sup>+</sup> and CD133<sup>+</sup> cells impact maintenance and repair of cerebral vasculature. Precise measurement of circulating CD34<sup>+</sup> cells provides a marker for cerebrovascular function in the setting of ischemic stress.

### Acknowledgments

This work was supported by the Uehara, Takeda, Terumo Medical Foundations and KAKENHI (15590785). The sponsors of the study had no role in study design, data collection, data analysis, interpretation, or writing of the report.

### References

- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.
- Taguchi A, Ohtani M, Soma T, et al. Therapeutic angiogenesis by autologous bone-marrow transplantation in a general hospital setting. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003;25:276-278.
- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:427-435.
- Hamano K, Nishida M, Hirata K, et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J*. 2001;65:845-847.
- Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34<sup>+</sup> cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*. 2001;97:3075-3085.
- Beck H, Voswinckel R, Wagner S, et al. Participation of bone marrow-derived cells in long-term repair processes after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:709-717.
- Sasaki T, Watanabe M, Nagai Y, et al. Association of plasma homocysteine concentration with atherosclerotic carotid plaques and lacunar infarction. *Stroke*. 2002;33:1493-1496.
- Hirano T, Minematsu K, Hasegawa Y, et al. Acetazolamide reactivity on <sup>123</sup>I-IMP single photon emission computed tomography in patients with major cerebral artery occlusive disease: correlation with positron emission tomography parameters. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14:763-770.



原 著

## 卵円孔開存を有する脳塞栓症患者の再発に関する研究 ～超音波診断による深部静脈血栓との関連から～

永野 恵子 大坪 亮一 矢坂 正弘 梶本 勝文  
大江 洋史 長束 一行 成富 博章

要旨：発症3カ月以内の卵円孔開存を有する脳塞栓症63例に下肢静脈エコーをおこない、深部静脈血栓症(DVT)の有無と治療薬、再発との関連を検討した。DVTを26例にみとめた。2次予防としてワルファリンまたは抗血小板薬が投与された。平均14.6カ月の観察期間中63例中6例に再発をみとめた。DVT陽性の3例は、全例ワルファリンが投与されていたが、再発時INRは1.7未満であり、2例に心房中隔瘤の合併があった。DVT陰性3例は、全例大動脈粥状硬化病変を合併していた。DVT陽性、とくに心房中隔瘤合併例では厳密なワルファリンコントロールが必要なこと、DVT陰性例では動脈硬化の関与が少なくないことが示唆された。

(臨床神経, 44:7-13, 2004)

Key words: 奇異性脳塞栓症, 右左シャント, 卵円孔開存, 静脈エコー, 深部静脈血栓症

### はじめに

卵円孔開存(patent foramen ovale:PFO)などの右左シャントによる奇異性脳塞栓症は、これまで原因不明とされてきた脳梗塞や若年者脳梗塞の原因の1つとして、近年注目されている。原因不明の脳梗塞患者のうちPFOは約半数にみられ、若年者脳梗塞でおよそ3割がPFOによる奇異性脳塞栓症とされている<sup>1)2)</sup>。また、全脳塞栓症のうちPFOを介する奇異性脳塞栓症は、1.8~12.8%と報告されている<sup>3)4)</sup>。

しかし、PFOは健常人でも約2~3割にみとめられ、PFOを有する脳梗塞症例においても、その発生機序は必ずしも奇異性塞栓とはかぎらない<sup>5)</sup>。奇異性塞栓症の栓子形成部位は主として静脈系であるが、静脈系の評価をもふくめた検討がなされている報告は少ない。そこで今回われわれは、PFOを有する脳塞栓症例において、深部静脈血栓症(deep vein thrombosis:DVT)の有無と、治療薬、再発との関連について検討をおこなったので報告する。

### 対象と方法

対象は1999年6月から2001年12月の期間に当院に入院した、発症3カ月以内の塞栓性機序の虚血性脳血管障害患者のうち、PFOが確認され、下肢静脈エコーによりDVTの有無を評価しえた連続63例である(男性40例、女性23例、平均年齢63±12歳、脳梗塞49例、一過性脳虚血発作14例)。

対象患者の選択は、以下のようにおこなった。すなわち、①

経食道心エコー図(transesophageal echocardiography:TEE)でPFOの存在が確認されること、②症候の突発完成、頭部CTあるいはMRI上辺縁が明瞭な皮質を含んだ梗塞巣や出血性梗塞、血管撮影上栓子陰影、再開通現象など、塞栓性機序が推測されること、③頭頸部動脈の50%以上の狭窄性病変、塞栓源性心疾患が除外できること、以上の3項目を満たすものを対象とした。①~③の項目を満たす塞栓性機序の虚血性脳血管障害64例中、下肢静脈エコーを施行しえたのは63例であった。RI venographyでDVTが評価された1例は、下肢静脈エコーを施行できなかった。

TEEは、アロカ社製Pro Sound SSD 5500(5MHz multiplane探触子)をもちい、右左シャント性疾患、心房中隔瘤(atrial septal aneurysm:ASA)、心内血栓、モヤモヤエコー、胸部大動脈動脈硬化性病変の有無を評価した。PFOの診断は神田らの報告に準じておこなった<sup>6)</sup>。すなわち、①はじめにValsalva負荷をかけ、その解除直後の左房を観察した。②次に3方活栓でつないだ2本の注射器をもちい、生食9mlと空気1mlを攪拌し空気のマイクロバブルを作成し、Valsalva負荷をかけ、この状態でマイクロバブルを混じた生食を肘静脈から静注し、右房内がバブルで満たされた直後に負荷を解除して左房を観察した。PFOの判定は②の左房内粒状エコーが3心拍以内に出現し、その個数や輝度が①より勝るばあいを陽性とした。

下肢静脈エコーは、東芝社製Power Vision(7.5MHz linear探触子)をもちい、大腿静脈は仰臥位、膝窩静脈は腹臥位あるいは坐位、下腿以下(前脛骨静脈、後脛骨静脈、腓骨静脈、ヒラメ静脈、腓腹静脈)は坐位で観察した。血栓は、血栓エコー

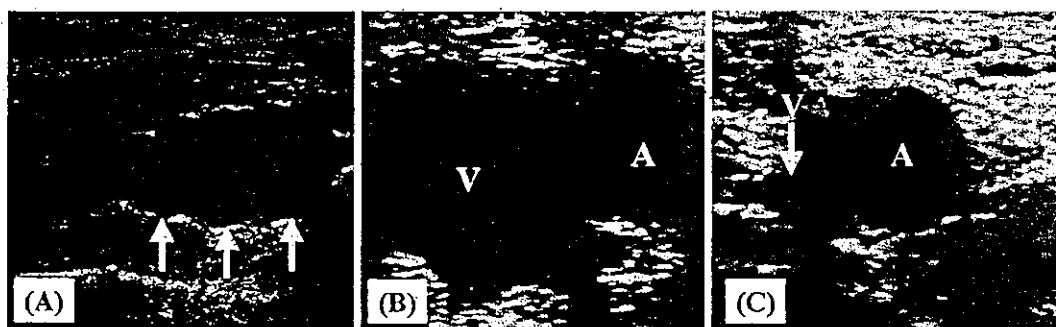


Fig. 1 Ultrasound detection of deep vein thrombosis

(A) : A thrombus is detected in the soleal vein as echogenic material locating within the lumen of the vein.

(B)-(C) : The vein is scanned with compression technique. The compressibility of vein is assessed by pressing on the vein with the transducer probe. Results are judged to be either noncompressible or fully compressible. The lack of compressibility indicates the presence of deep vein thrombosis (B). Compressible vein without residual lumen indicates the absence of deep vein thrombosis (C).

A, artery; V, vein

の存在か、探触子で静脈を圧迫して静脈内の非圧縮部分の存在から診断した (Fig. 1)。

頭頸部動脈、心疾患の評価には、以下の検査をもちいた。頭頸部超音波検査、脳血管撮影またはMRAで頭蓋内外血管の評価をおこない、経胸壁心エコーと12誘導心電図、長時間心電図モニタリングを72時間以上おこなった。これらの検査により、頭頸部動脈の50%以上の狭窄性病変、塞栓源性心疾患(心房細動、心弁膜症、心筋症、人工弁、心室瘤を有する心筋梗塞、急性心筋梗塞)を有するばあい、対象から除外した。

二次予防としては、抗血小板薬(アスピリン、チクロピジン、シロスタゾール)、ワルファリンが使用された。使用薬剤の種類、および投与量については、各主治医が設定した。追跡調査として、2002年3月に診療録の確認、または電話による聞き取り調査を全例におこない、症候性虚血性脳血管障害の再発を来したか否かを判定した。

DVT陽性と陰性例間で、平均年齢、性別、高血圧症、糖尿病、高脂血症の有無、ASA合併、大動脈弓部粥腫病変の有無、入院時 thrombin-antithrombin III complex (TAT)、D-dimer、antithrombin III (ATIII) 値、入院時 National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS)、退院時 modified Rankin Scale (m-RS)を比較検討した。次に二次予防薬剤と虚血性脳血管障害再発との関連について検討をおこなった。

統計学的検討では、性別、高血圧症、糖尿病、高脂血症、ASA合併、大動脈弓部粥腫病変の有無の比較には $\chi^2$  testを、平均年齢、TAT、D-dimer、ATIII、入院時 NIHSS、退院時 m-RSの比較には、Mann-Whitney U testをもちい、それぞれ危険率5%未満をもって有意とした。

## 結 果

### 1. 下肢静脈エコー所見

入院から検査日までの期間は4~114日で、中央値は14日

Table 1 Localization of venous thrombosis in 26 stroke patients with patent foramen ovale

Localization	No. of patients	(%)
Femoral vein	1	(4%)
Popliteal vein	1	(4%)
Peroneal vein	5	(19%)
Posterior tibial vein	2	(8%)
Muscular vein	17	(65%)
Soleal vein	16	(61%)
Sural vein	1	(4%)

であった。63例のうち26例(41%)にDVTをみとめた。血栓の部位は、大腿静脈1例(4%)、膝窩静脈1例(4%)、腓骨静脈5例(19%)、後脛骨静脈2例(8%)、ヒラメ静脈16例(61%)、腓腹静脈1例(4%)であった。26例中24例、92%が下腿に限局していた(Table 1)。大腿静脈に血栓をみとめた1例以外はすべて、下肢の症状はなかった。血栓をみとめた26例中20例にRI venographyを施行しているが、このうちDVTを検出できたのは7例のみであった。

### 2. 患者背景因子 (Table 2)

DVT陽性群は、有意に高齢(平均 $69 \pm 10$ 歳 vs  $60 \pm 12$ 歳,  $p=0.006$ )で、女性が多かった(58% vs 22%,  $p=0.003$ )。高血圧症(77% vs 57%)、糖尿病(31% vs 27%)、高脂血症(50% vs 38%)の有無、ASA合併(31% vs 16%)、大動脈弓部粥腫病変(38% vs 46%)の有無、入院時 NIHSS (中央値1 vs 1)には有意差がみとめられなかった。凝血学的検査では、D-dimerがDVT陽性群で高い傾向にあった( $2.7 \pm 4.3 \mu\text{g/ml}$  vs  $0.8 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$ ,  $p=0.07$ )が、TAT( $5.4 \pm 5.4 \mu\text{g/l}$  vs  $5.3 \pm 10.9 \mu\text{g/l}$ )、ATIII( $94.2 \pm 18.4 \text{mg/dl}$  vs  $95.8 \pm 12.6 \text{mg/dl}$ )値には有意差はなかった。DVT陽性群におけるD-dimer値を血栓検出部位別にみると、筋枝静脈に血栓をみとめた17例中3

Table 2 Clinical characteristics in the patients with and without deep vein thrombosis

	DVT (+) (n = 26)	DVT (-) (n = 37)	p-value
Age, mean $\pm$ SD, y	68.5 $\pm$ 9.9	59.7 $\pm$ 12.4	0.006
Female, n (%)	15 (58)	8 (22)	0.003
Risk factors, n (%)			
Hypertension	20 (77)	21 (57)	n.s.
Diabetes mellitus	8 (31)	10 (27)	n.s.
Hyperlipidemia	13 (50)	14 (38)	n.s.
Atrial septal aneurysm, n (%)	8 (31)	6 (16)	n.s.
Complicated aortic arch lesions, n (%)	10 (38)	17 (46)	n.s.
NIHSS score on admission, median	1	1	n.s.
Blood-coagulation parameters, mean $\pm$ SD			
D-dimer ( $\mu$ g/ml)	2.7 $\pm$ 4.3	0.8 $\pm$ 0.8	0.07
TAT ( $\mu$ g/l)	5.4 $\pm$ 5.4	5.3 $\pm$ 10.9	n.s.
AT III (mg/dl)	94.2 $\pm$ 18.4	95.8 $\pm$ 12.6	n.s.

DVT, deep vein thrombosis; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; TAT, thrombin-antithrombin III complex; AT III, antithrombin III; n.s., not significant

Table 3 Preventive therapy in patients with and without deep vein thrombosis

	DVT (+) (n = 26)	DVT (-) (n = 37)
	No. of patients (%)	No. of patients (%)
Anticoagulat therapy	16 (62)	16 (43)
Antiplatelet therapy	4 (15)	17 (46)
Warfarin and Antiplatelet therapy	6 (23)	4 (10)

DVT, deep vein thrombosis

例(18%), 筋枝静脈より中枢側に血栓をみとめた症例9例中6例(67%)が高値を呈しており, 筋枝静脈より中枢側に血栓をみとめた例は, 筋枝内のみに血栓をみとめた例より有意にD-dimerが高値であった(5.9 $\pm$ 5.9 $\mu$ g/ml vs 0.9 $\pm$ 1.0 $\mu$ g/ml, p=0.01). 退院時m-RSの中央値はいずれも0で, DVTの有無に関係なく転帰が良好のものが多かった。

### 3. 二次予防薬剤

DVT陽性例(26人)の治療は, ワルファリン単独16例(62%), 抗血小板薬単独4例(15%), ワルファリンと抗血小板薬の併用6例(23%)であり, DVT陰性例(37人)では, ワルファリン単独16例(43.2%), 抗血小板薬単独17例(45.9%), 併用4例(10.2%)であった(Table 3).

DVTが見つかった後もワルファリンを使用しなかった理由として, 患者が拒否したものが1例, 虚血性心疾患のため抗血小板薬を中止できず, また併用は出血合併症のリスクがあがると判断されたものが1例, 入院経過中にDVTが自然消失していた例が2例であった。

ワルファリン使用例についてみると, DVT陽性例における退院後追跡期間中の平均INRは, 単独使用時1.93 $\pm$ 0.74, 抗血小板薬との併用時1.93 $\pm$ 0.11であった。DVT陰性例では, ワルファリン単独時1.89 $\pm$ 0.25, 併用時1.70 $\pm$ 0.33であり, DVT陽性例と有意差はなかった。

抗血小板薬については, DVT陽性例では抗血小板薬単独は

アスピリンが2例, アスピリン+チクロピジンが1例, アスピリン+シロスタゾールが1例, ワルファリン併用はアスピリンが4例, チクロピジンが2例であった。DVT陰性例では抗血小板薬単独はアスピリンが13例, チクロピジンが1例, アスピリン+チクロピジンが1例, アスピリン+シロスタゾールが2例, ワルファリン併用はアスピリンが3例, チクロピジンが1例であった。

また, 観察期間中に抗血栓薬の種類が変更されていた症例は, 抗血小板薬からワルファリンに変更された1例のみであった。

### 4. 再発例の検討

再発は63例中6例(10%)にみられた(Table 4)。今回の検討では, 全再発率は7.8%/人・年であった。また, ASAの有無に注目して集計すると, ASA陽性例の14%(14例中2例), 陰性例の8%(49例中4例)に再発がみられていた。

DVT陽性群における再発例は, 2例が脳梗塞, 1例がTIAであった。脳梗塞については2例とも奇異性塞栓症の再発と考えられた。3例とも治療薬はワルファリンであったが, 再発時のINRは全例1.7以下であった。3例のうち, 2例にASAの合併がみられていた。再発後退院時の転帰は, TIAの1例をのぞき, 前回入院時より悪化していた。

DVT陰性群における再発例は, 3例全例が脳梗塞であった。治療薬は1例がワルファリン, 2例が抗血小板薬であっ

Table 4 Clinical characteristics of the patients with recurrent stroke or TIA

	Age/Sex	ASA	Aortic arch lesions	Treatment	INR *	CI/TIA	Topography	m-RS (1st hospitalization → 2nd hospitalization)
DVT (+)								
Case 1	71/F	(+)	(-)	WF	1.56	CI	MCA cortical/subcortical	1 → 4
Case 2	67/M	(+)	(-)	WF	1.39	CI	MCA-PB φ 1.5 cm	0 → 1
Case 3	70/M	(-)	(+)	WF	1.67	TIA		3 → 3
DVT (-)								
Case 4	71/M	(-)	(+)	WF	1.96	CI	PCA? not detected	1 → 1
Case 5	73/M	(-)	(+)	AP		CI	MCA-PB φ 1.0 cm	1 → 1
Case 6	62/M	(-)	(+)	AP		CI	MCA-PB φ 1.0 cm	0 → 1

TIA, transient ischemic attack; ASA, atrial septal aneurysm; INR, international normalized ratios; m-RS, modified Rankin scale; DVT, deep vein thrombosis; WF, warfarin; AP, antiplatelet therapy; CI, cerebral infarct; MCA, middle cerebral artery; MCA-PB, perforating branches of middle cerebral artery; PCA, posterior cerebral artery.

\* INR values at the time of the recurrent events.

Table 5 Frequency of deep vein thrombosis in stroke patients with patent foramen ovale reported by previous workers

References	Prevalence of DVT	Diagnostic strategies	Day of examinations
Ranoux, et al	3%	Venography/venous Doppler	< 4 weeks
Gautier, et al	13%	Venography	2 days—7 months
Stollberger, et al	57%	Venography	1—90 days
Bogousslavsky, et al	5.5%	Venography/venous Doppler	?
Hashimoto, et al	0%	Rivenography	2—23 days
Lethen, et al	9.5%	Venography	1—15 days

DVT, deep vein thrombosis

た。全例 ASA の合併はなく、大動脈弓粥腫病変(4.6mm~7.1 mm) をみとめた。病巣は、2 例が穿通枝小梗塞、1 例は病巣不明で、転帰も良好だった。

## 考 察

本研究では、DVT 検出率は 41% であり、その 92% が下腿、そのうち 71% は末梢の筋肉枝単独に存在した。これまでの報告では、奇異性脳塞栓症における DVT の検出率を 10% 程度とするものが多く、本研究結果の検出率にくらべて低い値を示している (Table 5)<sup>7-11)</sup>。これらの報告は、Rivenography、もしくは静脈造影による検討であり、本研究によって多く発見された末梢の筋肉枝などの血栓の描出が困難であったことがその理由と考えられる。Labropoulos らは、臨床的に DVT がうたがわれる症例において、従来の評価法では偽陰性とされるような血栓が、末梢の筋肉枝単独に存在する例が少なくないことを示し、下肢静脈エコーにより筋肉枝まで評価をおこなう重要性を強調している<sup>12)</sup>。今回われわれがおこなった下肢静脈エコーは、ベッドサイドで簡便に施行することが可能であり、奇異性塞栓症がうたがわれる症例において DVT の評価をおこなうばあいのスクリーニング法として有用と思われた。

本研究では、DVT は高齢者、女性に多くみとめられた。こ

れは従来の報告と一致していた<sup>13)14)</sup>。凝固系では、D-dimer は DVT 陽性例で高い傾向にあったが、TAT、AT III では差はみとめられなかった。DVT の有無のスクリーニングとして、D-dimer がもちいられる報告がみられるが、本研究のように筋枝静脈のみに血栓をみとめた 17 例中 14 例では D-dimer が正常であることから、末梢だけに血栓が存在するばあい、DVT の発見には血液凝固検査のみでは不十分であることが示唆された<sup>15)</sup>。

これまで、奇異性脳塞栓症の二次予防として、抗凝血薬療法、抗血小板療法、外科的治療が報告されている (Table 6)。内科的治療では、DVT を合併するばあいにはワルファリンによる抗凝血薬療法が第一選択とされている。DVT 所見をみとめないばあい、抗凝血薬療法と抗血小板薬のどちらを選択するか、明確な結論はえられていない<sup>8)16)17)</sup>。Orgera らによる二次予防に関する meta-analysis では、ワルファリンは抗血小板療法よりすぐれていたとしている<sup>18)</sup>。Homma らの報告では、ワルファリン群とアスピリン群とで、再発、死亡率に有意差はなかったとしている<sup>19)</sup>。また、ASA 合併例では再発のリスクが高く、抗凝血薬療法を必要とする報告がみられるが、抗血小板薬と差がなかったとする報告もある<sup>19)20)</sup>。外科的治療について、PFO のカテーテル的閉鎖や外科的閉鎖術が有効であったと報告されているが、十分なランダム化比較試験はおこなわれていない<sup>21)~22)</sup>。本研究における、DVT 陽性群での再発例