

表3 IRT項目反応理論によるWHOQOL-OLDの質問構成妥当性

領域	Facet	質問番号	識別力
高齢者特有のものとして加えられたもの(40項目)	感覚能力 (6項目・30点満点)	F25.1	0.209
		F25.2	0.206
		F25.3	0.184
		F25.4	0.214
		F25.5	0.170
		F25.6	0.121
	威厳 (6項目・30点満点)	F26.1	0.554
		F26.2	0.402
		F26.3	0.422
		F26.32 (26.4)	0.477
		F26.5	0.120
		F26.6	0.461
	現在・過去・未来の活動性 (7項目・35点満点)	F27.1	0.429
		F27.2	0.522
		F27.3	0.501
		F27.4	0.220
		F27.5	0.544
		F27.6	0.531
		F27.7	0.374
	時間の使い方 (7項目・35点満点)	F28.1	0.448
		F28.2	0.485
		F28.3	0.490
		F28.4	0.405
		F28.5	0.294
F28.6		0.415	
F28.7		0.436	
社会参加 (6項目・30点満点)	F29.1	0.524	
	F29.2	0.388	
	F29.3	0.332	
	F29.4	0.389	
	F29.5	0.351	
	F29.6	0.486	
死と死にいくこと (8項目・40点満点)	F30.1	0.183	
	F30.2	0.489	
	F30.3	0.559	
	F30.4	0.604	
	F30.5	0.571	
	F30.52 (30.8)	-0.255	
	F30.6	0.388	
	F30.7	0.108	

注：カッコ内の質問番号は質問票での番号を示す。

いう結果であった。さらに、5段階の順序尺度の回答肢が妥当かどうかを検討する困難度パラメータの解析では、答えにくい項目は「感覚能力」で6項目中0項目、「威厳」で6項目中1項目、「現

表4 領域(高齢者特有のものとして加えられたもの)と各Facetとの相関分析結果

Facet	相関係数
F25 (感覚能力)	0.81
F26 (威厳)	0.74
F27 (現在・過去・未来の活動性)	0.82
F28 (時間の使い方)	0.78
F29 (社会参加)	0.78
F30 (死と死にいくこと)	0.58

在・過去・未来の活動性」で7項目中0項目、「時間の使い方」で7項目中1項目、「社会参加」で6項目中2項目のみであったが、「死と死にいくこと」では7項目中5項目が多かった。加えて、高齢者領域の全体での得点と下位項目内得点との相関分析の結果(表4)、「感覚能力」「威厳」「現在・過去・未来の活動性」「時間の使い方」「社会参加」の5つの項目については相関係数0.74以上の強い相関がみられた。

### Ⅲ. 考 察

QOLは生活のすべての側面—身体的、心理的、社会的、スピリチュアルな領域—から構成されると考えられる。とくに高齢期は、健康、社会的地位、財産、身近な人びとなどさまざまな喪失を体験する一方で、新しいライフスタイルの構築をする時期でもあり、高齢者のQOLを測定するにはこうした高齢者の特性を考慮しなくてはならない。Lawton<sup>4,5)</sup>は高齢者の行動を理解するには、健康を損なうことによる苦痛や障害を評価するだけでなく、友人との関係や意義のある時間の活用といったポジティブな側面を考慮すべきだと述べている。WHOQOL-OLD調査票でも高齢者のQOLを測定するのに適切な項目として、「感覚能力」「威厳」「現在・過去・未来の活動性」「時間の使い方」「社会参加」があることがわかり、一般人口とは違う側面からの評価が必要であることが示唆された。

また、QOLに影響を与える因子として就労状況や家族との同居の有無、主観的健康感、感覚機能の重要性、社会参加などがあげられた。わが国

では諸外国に比べて就業意欲や就業率が高く、65歳以上ではさらに顕著に高くなっており、高齢者の就業を希望する理由として経済的理由だけでなく、健康や生きがい、社会参加のためと回答した割合が高かったことが報告されており<sup>3)</sup>、今回の調査はこうしたわが国の特徴を反映するものと考えられた。

今後、このデータをエジンバラ大学に送付し、23か国のデータをすべて収集し、信頼性と妥当性に加え、より識別力の高い質問項目によって構成された高齢者を対象としたQOL調査票を作成し、さらにフィールド調査の解析を実施する予定である。超高齢社会である日本において、高齢者がよりよく生きるために必要な環境要因や信念・態度についても調査することが、高齢者のQOLを高めるためには非常に重要な課題であると思われる。

#### 文 献

- 1) Department of Mental Health. WHOQOL and Spirituality : Religiousness and Personal Beliefs (SRPB) Report on the WHO Consultation. WHO/MSA/MHP/98, 2 (2000).
- 2) Division of Mental Health and Prevention of Substance Abuse, World Health Organization : WHOQOL Measuring Quality of Life. WHO (MSA/MNH/PSF97.4), Geneva (1997).
- 3) 厚生省：厚生白書 (平成12年版). 86-87, ぎょうせい, 東京 (2000).
- 4) Lawton PM : Quality of life in chronic illness. *Gerontology*, 45 : 181-183 (1999).
- 5) Lawton PM : Health, valuation of life, and the wish to live. *Gerontology*, 39 : 406-416 (1999).
- 6) 田崎美弥子, 中根允文 : WHO の QOL. 診断と治療, 83 (12) : 2183-2198 (1995).
- 7) 田崎美弥子, 中根允文 : WHOQOL 短縮版調査票概説書および調査票. 金子書房, 東京 (1997).
- 8) WHOQOL group (Development of the World Health Organization) : WHOQOL-BREF Quality of Life assessment. *Psychol Med*, 28 : 24-28 (1998).
- 9) WHOQOL-OLD Group : <http://www.ecdel.org.au/scienceandtech/FP5/WHOQOL-OLD.htm> (2002).
- 10) World Health Organization : WHOQOL Study Protocol (MNH/PSF/93.3), WHO, Geneva (1993).

## QOL of the elderly in Japan

— The results of the survey using the Japanese preliminary WHOQOL-OLD Instrument —

Miyako Tazaki \*<sup>1</sup>, Yaeko Ishii \*<sup>2</sup>, Yoshinori Ebihara \*<sup>3</sup>, Hideki Origasa \*<sup>4</sup>, Michiyo Takayama \*<sup>3</sup>,  
Nobuyoshi Hirose \*<sup>3</sup>, Tatsuyuki Kakuma \*<sup>5</sup>, Yoshiro Kato \*<sup>6</sup>, Midori Kuniyoshi \*<sup>7</sup>,  
Jung Won Lee \*<sup>8</sup>, Chika Suzuki \*<sup>9</sup>, Emiko Hasegawa \*<sup>10</sup>, Miwa Fujii \*<sup>11</sup>, Keiko Hatada \*<sup>12</sup>,  
Masami Matsuda \*<sup>13</sup>

\* 1 *Department of Science, Tokyo University of Science*

\* 2 *Department of Nursing, Tokyo Womens' Medical University*

\* 3 *Department of Geriatric Medicine, School of Medicine, Keio University*

\* 4 *School of Medicine, Division of Biostatistics, Toyama Medical and Pharmaceutical University*

\* 5 *The Japanese Red Cross Kyushu International College of Nursing*

\* 6 *Daiwa Village National Health Insurance Medical Clinic*

\* 7 *School of Health Science, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus*

\* 8 *Kansai University of Welfare Science*

\* 9 *The Japanese Red Cross Toyota College of Nursing*

\* 10 *Faculty of Human Welfare, Seigakuin University*

\* 11 *School of Sociology and Social Work, Kansei Gakuin University*

\* 12 *Department of Psychiatry, Michinoo Hospital*

\* 13 *Faculty of Nursing, University of Shizuoka*

In order to explore how the elderly people live a healthy and enjoyable life, the WHO and EU have initiated an international collaborative research to develop the WHOQOL-OLD questionnaire in the world, in which a group has participated from Japan since 2000. For the pilot survey, 410 elderly people (182 males, 228 females) more than 60 years old were recruited to answer the questionnaires from Tokyo, Shizuoka, Nagasaki, Hiroshima, Kobe, and Fukuoka. Among the social background factors, three factors were found to influence the overall QOL scores : sex, marital status and current job. For the important questions, it was found that factors related to physical health were regarded as more important than others. For the responses to the WHOQOL-OLD preliminary questions, the questions of "leisure time" and "home environments" had higher scores. Based on the results of the analysis of the Item Response Theory, most of the questions in the WHOQOL-OLD preliminary questionnaire revealed a high discriminating power except for the question "death and dying." Based on the results of the preliminary survey, the WHOQOL-OLD questionnaire was compiled.

**Key words** : QOL, WHOQOL, the elderly, the Japanese elderly, WHOQOL-OLD

## 2. 臨床試験のための生物統計学

折 笠 秀 樹\*

### 1. はじめに

臨床試験に関係する統計専門家向けというよりも、それ以外の非専門家向けに統計学の素養について話を進めるつもりである。最初に、「臨床試験のための統計的原則」というICH統計ガイドラインを提示した(Table 1)。これは統計専門家にとってのバイブル的ガイドラインであるが、Table 1に示した前文は非専門家においても読んでおくとよい。なぜ統計学を臨床試験の実施に使うかという、それには2つの理由がある。1つは結果の偏りを最小にすることである。分かりやすく言うと、間違った結果を出さないようにしてくれるということである。2つ目は精度を最大にすることである。これは、できるだけ少数例で結論が得られるように工夫してくれるということである。

今回は4つのパートで論じる。1つ目は研究デザインの基礎的事項、2つ目は臨床試験と統計学、3つ目は事例による臨床試験論文の読み方、そして最後にBayes流アプローチについて紹介したい。

### 2. 研究デザインの基礎

統計学の最重要概念に無作為化(randomization)がある。無作為とは作為がないという意味ではなく、確率を用いるという意味である。したがって、確率化と呼んだほうが適切であるが、慣習上無作為化と呼ぶことにする。無作為化というと、多少統計学を学んだ人は無作為抽出を思い出す。確かに、母集団から標本を選ぶときにそれを実施するが、臨床試験では同じ無作為化ではあるが、無作為割付がそれよりも重要になる。こちらは、得られた標本を無作為に比較群へ振り分けるという作業である。臨床試験では適格基準を設けて、それに適合したら患者から同意の得られる限り、連続的に登録することが原則になっている。無作為抽出を実施することはほとんどない。この無作為割

Table 1 臨床試験のための統計的原則  
(ICH-E9ガイドライン)

- ICHにおける合意に基づき、臨床試験における統計的原則について記載したものであり、臨床試験から得られる結果の偏りを最小にし、精度を最大にすることを目標としている。
- 特に、計画段階から試験統計家が参加すること、治験実施計画書の作成に当たっては解析方法等について妥当性も含め事前明記すること等が強調されており、多施設共同試験における施設の捉え方及び施設当たりの症例数の設定に関する考え方、総合評価変数を用いる際の留意点等についても記載されている。
- また、検証的位置づけの試験を行う際の有意水準(第一種の過誤)については従来明確にされていなかったが、規制上の観点から、本ガイドラインの施行に伴い、原則として片側仮説を検証する場合は2.5%、両側仮説の場合は5%とするこ

付をすると、比較が公平になるのである。そのことを難しい言葉で、内部妥当性(internal validity)あるいは比較可能性(comparability)と呼んでいる。標本の内部で、群ごとの比較が妥当になるという意味である。ついでに言うと、無作為抽出を行うと外部妥当性(external validity)が高まる。それは、標本での結果が外部の母集団にまで妥当な結果となることを保証するものである。

研究デザインにはいろいろな種類が知られている。大別するとTable 2に示した4つになるのではないだろうか。この中で臨床試験というのは、言うまでもなく介入研究に相当する。介入研究の最もシンプルなデザインは、前後比較法というものである。よいと思われる治療法があれば、それを全員の患者に試してもらい、開始する前と後で比較するものである。これは他の治療法と比較しておらず、もしかすると自然によくなったかもしれないという懸念が残るデザインである。介入研究でも比較試験の形にするほうが信憑性は

Key words : research design, biostatistics, clinical trials, Bayesian

\* 富山医科薬科大学医学部臨床統計学 〒930-0194 富山市杉谷 2630

Table 2 研究デザインの種類

・介入研究
RCT (無作為化比較試験)
前後比較試験
・観察研究
Cohort 研究 (追跡調査)
Case-control 研究 (症例対照調査)
Cross-sectional 研究 (断面調査)
・統合研究
メタアナリシスとも言う。文献調査に基づく定量的分析
・質的研究

折笠. 臨床研究デザイン 1995.  
折笠. 日本薬剤師会雑誌 2000 ; 52 : 985-92.

Table 3 RCT の利点・欠点

・利点
比較性 (公平性) が保てること
次にどちらが当たるかは予測できない
シンプルな統計解析
・欠点
確率的に割り当てられること
得られるのはすべて平均的結果である
実施が厳密で困難
・審査委員会の承認
・文書同意が得られにくい

増すのである。比較群への振分けを無作為に行ったのが、無作為化比較試験 (RCT) というデザインである。RCT は臨床試験の王様とも言われる研究デザインであるが、もちろん欠点もある。Table 3 に示したように、得られる結果は一個人に当てはまるものではなく、平均的患者のためのものである。さらに、経験者は分かると思うが、RCT の実施には理解を得にくい。その患者に合った治療を選択したくなるからである。

無作為化と同じくらい重要な概念が盲検化 (blinding, masking) である。二重盲検というのは、どちらの治療法かを医療関係者も患者も知らないように工夫したデザインである。薬であれば、本物の薬と外見・味を似せたプラセボという薬成分の入っていない薬を作り、どちらかが分からないようにさせる。

エンドポイント (評価項目) の設定も臨床試験では重要なポイントとなる。死亡をエンドポイントにするのか、それともホルモン治療などではマーカーの再燃をエンドポイントにするのか、試験目的によって選択すべきである。

Table 4 統計学のポイント

1. 比較アーム
2. デザイン型
3. 確率割付法
4. エンドポイント
5. 効果指標
6. 統計解析法 <= 狭義
7. 症例数の設定
8. 中間解析

### 3. 臨床試験と統計学

統計学のポイントを Table 4 に示した。これを見ると、試験計画のほぼすべてにわたって統計専門家のインプットが必要であることが分かっていただけだと思う。ここでは非専門家でも知っておいたらよい範囲の話をする。

比較臨床試験において、比較アームの設定の際、優越性の試験なのか非劣性 (卑近な言い方をすると同等性) の試験なのかを明らかにする必要がある。用量を振る場合には、固定とするのか、それとも漸増 (順に上げていく) を許すのかも考えたい。さらに、無作為割付を伴う場合、それを行う前に試用期間 (run-in period, screening period) を設けるか否かもポイントである。RCT の場合には割付法の選択も重要なことであるが、その際変法として置換ブロック、層化、動的割付などの使い分けも知っておくとよいだろう。施設内で症例数をバランスさせたいときには置換ブロック、リスクが 2 倍以上の予後因子があれば層化、そのような予後因子が 3 つ以上もあれば動的割付を考える。

エンドポイントの設定においては、もし検証的試験 (有意差をつける試験) であれば、目的が達成できるようなエンドポイントの設定も大切になる。たとえば、総生存率 (total survival) の代わりに無疾病生存率 (disease-free survival) に変えることも考える。また、QOL や疼痛など主観的なものになると、質問票や VAS という物差で測るという手段もある。効果指標は絶対と相対があり、臨床試験では相対がおもに使われる。代表例が Table 5 に示したように、相対変化率やハザード比などである。数値例を Table 6 に示した。RRR と書いたのが相対リスク減少率であり、もし相対リスク (RR) が 0.7 であれば、RRR は 30% となる。Table 6 の下段は体重などの連続データのときの効果指標を示した。同様に、絶対リスク減少率 (ARR) と RRR が計算できる。

Table 5 効果指標

・絶対 vs 相対	
・相対の場合	
相対変化率 (Relative change : %Change)	← 連続
オッズ比 } ←	二値
リスク比 } ←	
ハザード比 ←	Time to event
・絶対の場合	
変化量 (Change)	← 連続
比率の差, NNT	← 二値

統計解析 (statistical analysis) あるいは統計学的考察 (statistical considerations) というセクションは極めて専門的になるので、通常は統計専門家が執筆する箇所である。その中でも基本的に知っていたほうがよいことを3つだけ述べておく。1つはITT (intention-to-treat) という解析対象の定義である。ITTというのはRCTで重要となるものであり、無作為割付された患者の1例も除外せず解析対象とするものである。たとえ、術後の病理所見でステージが除外基準に抵触したとしても解析除外しない。ちょっと考えるとおかしいと思うのだが、無作為割付をする理由を考え直してもらいたい。それは、割付時において比較群を類似化させるということであった。せっかく類似化させたのに、その後いろいろな理由をつけて除外してしまうとそれが崩れる。もちろん、第2相のように比較試験でなければ、そのような症例は解析除外しても一向に差し支えない。むしろ、そのように除外するのが通例である。こちらの取扱い方がPPS (per protocol set) を呼ばれるものであり、プロトコルに抵触した症例は解析除外するという考え方である。2つ目は、症例数はどのようにして決めるかについてである。比較試験で検証的試験を想定する。症例数というのは結果が有意となる可能性を確保するように、統計学的手法で決めている。仮説が正しいとき有意となる可能性を80%以上とするのが通例である。この80%という数値のことを検出力 (power) と呼んでいる。最後に、重篤な疾患、あるいは長期にわたる臨床試験では、途中で解析を試みる可能性がある。それについて記載するのが中間解析という事項である。中間解析は安易に行うべきではない。中間解析を行うならデータモニタリング委員会 (効果安全性委員会とも言う) を設けて、さらに統計学的に多重性調整を行う必要がある。中間で同様の比較検討を繰り返せば偶然に

Table 6 数値例

・二値の例			
	イベント	正常	計
A群	5	95	100
C群	7	93	100
オッズ比 = $5 \div 95 / 7 \div 93 = 0.70$		RRR = 30%	
リスク比 = $5 \div 100 / 7 \div 100 = 0.71$		ARR = 2% (=7-5)	
RRR : relative risk reduction			
ARR : absolute risk reduction			
・連続の例			
	Befbre	After	Change %Change
A群	80 kg	68 kg	12 kg 15%
B群	77 kg	67 kg	10 kg 13%
ARR = 2 kg, RRR = 20% (=2/10) (from change data)			
ARR = 2%, RRR = 15% (=2/13) (from %change data)			
Afterだけのデータから, ARR = 1 kg, RRR = 1.5% (=1/68)			

して有意となることもあるが、多重性調整を行うことによりそうした誤りを避けることができる。

#### 4. 臨床試験論文の読み方

3年ほど前にRCT論文を書くときのチェックリストが公開された。それはCONSORT声明と呼ばれるものである (JAMA 2001; 285:1987-91)。RCT論文の読み方では5つのポイントを理解してほしい。1つ目は、試験の質を流れ図 (flow chart) から読み取る。2つ目は、患者背景の表で関心ある患者層とどれだけ似ているかを読む。3番目に主要な結果を読む。その際、抗がん剤などでは相対リスク (詳しくはハザード比) の大きさとその信頼区間を読む。第4には層別解析の結果がよくあるので、関心の患者層に近いところの数値を読む。最後に副作用の発現頻度についての表があるので、そこで高い頻度の副作用はないかを読む。

NNT (number needed to treat) という指標がEBMの中でよく取り上げられるようになった。それは相対リスクなどと違って絶対指標である。WOSCOPS研究 (N Engl J Med 1995; 333:1301-7) という高脂血症での計算例をFig. 1に示した。1年当りNNTが1,000人ということは、1,000人にstatinを投与して1人のイベントが余計に救えるという治療効果を示す。言い換えると、高脂血症の患者が年に10万人いたとすると、その人たちにstatinを投与することで年に100人をイベント発症から救える勘定になる。

抗がん剤の臨床評価ガイドラインが欧州から出た

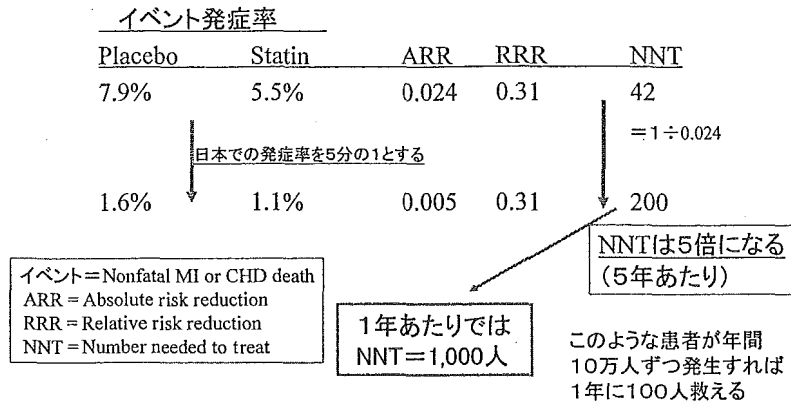


Fig. 1 NNT を求めてみよう (WOSCOPS)

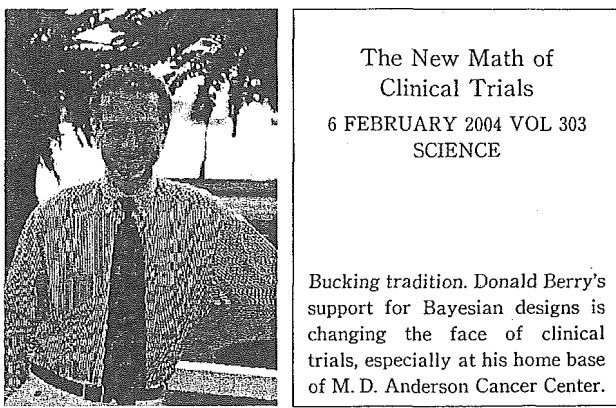


Fig. 2 Bayes 流の臨床応用

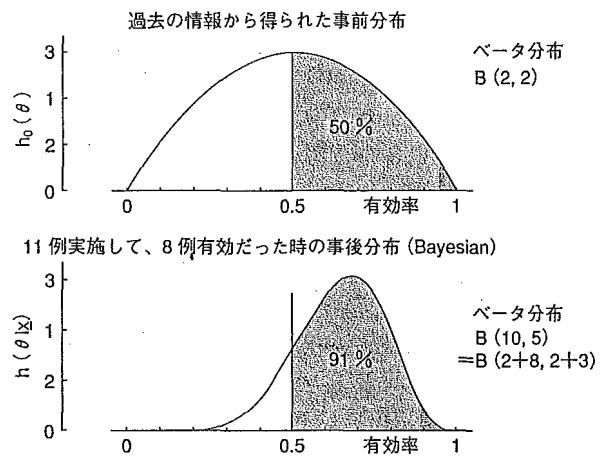


Fig. 3 Bayes 流適用に関する仮想例

(Note for Guidance on Evaluation of Anticancer Medicinal Products in Man: ホームページから PDF ファイルを入手するには, [www.tga.gov.au/docs/pdf/euguide/ewp/020595enrev1.pdf](http://www.tga.gov.au/docs/pdf/euguide/ewp/020595enrev1.pdf)). ここに Phase 1, Phase 2, Phase 3 の計画で考慮する点が述べられているのでぜひ一読されたい。抗がん剤の臨床試験として、新規の乳がん治療薬であるアロマトーゼ阻害薬 (exemestane) に関する RCT の読み方を示した (N Engl J Med 2004; 350: 1081-92)。ランダム化には施設層化したうえで置換ブロック法を用いた。プライマリーエンドポイントは無疾病生存率とし、セカンドグリーを総生存率とした。3年後の無疾病生存率に関する群間差を3.6%と仮定して、必要な症例数を設定した。中間解析には O'Brien-Fleming 型の多重性調整をした。対照群である tamoxifen 群に対する exemestane 群の調整済みハザード比は0.67であったから、33%リスク減少であった。その95%信頼区間も18~44%であったので、統計学に有意な効果が示されていた。

### 5. Bayes 流アプローチ

最後に、少し系統の違う話をする。統計学では通常 Neyman-Pearson 流の方法で推論をし、 $p$  値を計算する。しかし、そうではない Bayes 流のアプローチというのが存在する。それが臨床試験で使われたことの紹介である。Fig. 2 に示したように、雑誌 Science にそのことが紹介された (Science 2004; 303: 784-6)。Bayes 流とは過去の情報 (データ) も加味して、現在のデータをドッキングして意思決定する立場を取る。その際、事前情報に恣意が入るといふ嫌疑、想定するモデルの選択にも恣意が入り、得られた  $p$  値はバイアスがかかっているといふ嫌疑があった。しかし、希少疾患や医療機器の領域では Bayes 流が主流になりつつある。

簡単な例を示す。1群のみの臨床試験を考える。中止基準として2つ設定した。有効率50%以上の可能性が90%を超えたら有効として中止し、有効率70%以上の可能性が10%未満になったら無効として中止

するというものである。事前分布として、有効率 50% のベータ分布を仮定した (Fig. 3 の上段)。11 例に試したところ 8 例に有効例をみた。事後分布を計算すると Fig. 3 の下段のようになり、有効率 50% 以上の可能性が 90% を超えたので中止となった。ちなみに、10 例試した段階では 7 例有効例だったので、その確率は 86.7% で中止されなかった。次の 1 例が有効になったので、その段階で試験が中止され、その治療薬は有効という結論に至った。このように逐次的判断が可能となる方法である。

## 6. おわりに

比較臨床試験において統計学は、より少ない症例数で正しい結論を得るために必須である。統計学には解

析のみならず計画という側面があり、それも大変重要である。そこで大切となる概念について説明をした。また、臨床試験論文で注視する 5 つのポイントについても例示をした。最後に、少し変わった Bayes 流アプローチによる臨床試験の仮想例を紹介した。

## 文 献

- 1) 折笠秀樹. 臨床研究デザイン. 東京: 真興交易医書出版部, 1995.
- 2) 舟喜光一, 津谷喜一郎 (訳). ランダム化比較試験. 東京: じほう, 2004.
- 3) Friedman LM, Furberg CD, DeMets DL. *Fundamentals of Clinical Trials, 3rd ed.* New York: Springer-Verlag, 1998.
- 4) Crowley J (ed). *Handbook of Statistics in Clinical Oncology.* New York: Marcel Dekker, 2001.



# メタボリックシンドロームと脳卒中

## メタボリックシンドロームの介入試験

折笠秀樹

ORIGASA Hideki  
富山大学医学部統計情報科学

メタボリックシンドロームという多重リスクを有した病態が今注目を集めている。このメタボリックシンドロームを対象とした介入試験の現状について、主としてエンドポイントとして何を取り上げているかという観点から述べる。とくに、バイオマーカー開発の重要性を唱える。また、メタボリックシンドロームの最大要因と思われる肥満にターゲットを当てた介入試験を、今後どのように計画したらよいかを考察する。

### Key Words

エンドポイント、バイオマーカー、ランダム化比較試験、肥満ガイドライン、EBM

### はじめに

1990年代から Syndrome X, 死の四重奏, 内臓脂肪症候群などいわれていたが、最近になってメタボリックシンドロームという用語が汎用的に使われるようになってきた。本稿ではメタボリックシンドロームの介入試験について、これまでにおこなわれてきた研究例を紹介しつつ、これから介入試験を計画するときに求められる事項は何かを考えてみたい。

た。さらには、国際糖尿病協会 (IDF) が 2004 年にメタボリックシンドロームの基準を発表し、2005 年になって日本の 8 学会による統一基準が発表された。これらの基準の対比を表①にまとめた。要するに肥満症、高血圧症、高脂血症、糖尿病などがあわさった病態を指している。高脂血症でも従来の LDL-コレステロール (LDL-C) ではなく、トリグリセリド (TG) (中性脂肪) と HDL-コレステロール (HDL-C) の取り上げられている点が注目される。

### 1 | メタボリックシンドロームの診断基準

メタボリックシンドロームの診断基準はまず WHO (世界保健機関) が 1999 年に提示し、2001 年には米国の脂質教育プログラムである NCEP-ATP III 基準が出され

### 2 | メタボリックシンドロームの介入研究

臨床研究は大別して、観察研究と介入研究に分けられる<sup>1)</sup>(表②)。そのなかでも最も evidence (証拠) 水準が最も高いとされるのがランダム化比較試験 (RCT) であ

表① メタボリックシンドローム基準の比較

必須事項	必須事項	必須事項	必須事項
糖尿病 または IGT またはインスリン抵抗性	なし	ウエスト周囲径** ≥85 cm (男性) ≥90 cm (女性)	ウエスト周囲径 ≥85 cm (男性) ≥90 cm (女性)
以下のうち 2 つ以上を満たす	以下のうち 3 つ以上を満たす	以下のうち 2 つ以上を満たす	以下のうち 2 つ以上を満たす
1. BMI>30 または ウエスト/ヒップ比>0.9 (男性) >0.85 (女性)	1. 空腹時血糖≥110 mg/dl 2. TG≥150 mg/dl 3. HDL-C<40 mg/dl (男性) <50 mg/dl (女性)	1. TG>150 mg/dl 2. HDL-C<40 mg/dl (男性) <50 mg/dl (女性)	1. TG≥150 mg/dl, または HDL-C<40 mg/dl 2. 血圧≥130/85 mmHg 3. 空腹時血糖≥110 mg/dl
2. TG≥150 mg/dl, または HDL-C<35 mg/dl (男性) <39 mg/dl (女性)	4. 血圧≥130/85 mmHg, または降圧薬服用中	3. 血圧≥130/85 mmHg 4. 空腹時血糖≥100 mg/dl	
3. 血圧≥140/90 mmHg, または降圧薬服用中	5. ウエスト周囲径 >102 cm (男性) > 88 cm (女性)		
4. 尿中アルブミン排泄量≥20 μg/min			

\*IDF: 国際糖尿病協会, \*\*ウエストの閾値は民族によって異なる。上には日本人の値を示した。

†World Health Organization: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus, Geneva, World Health Organization, 1999

††Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 285: 2486-2497, 2001

†††International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.

††††メタボリックシンドローム診断基準検討委員会: メタボリックシンドロームの定義と診断基準. 日本内科学会誌 94: 794-809, 2005

る。表②の RCT も CCT も同時対照群を伴う比較試験であるが、比較群の背景を類似させるという内部妥当性 (internal validity) が高い点で、RCT のほうが CCT よりも優れる。この RCT のことを、本稿では介入試験として扱うことにする。RCT というとは通常はパラレル比較デザインを思い浮かべるが、個人内比較をおこなうクロスオーバー法というデザインもある。しかしながら、本稿ではパラレル比較デザインに絞って考えてみたい。

メタボリックシンドロームへの介入試験とはいっても、メタボリックシンドロームを対象とした試験もあるし、エンドポイント (評価項目) をメタボリックシンドロームの発症とした試験もある。メタボリックシンドロームを対象とした試験では、エンドポイントを心筋梗塞や脳梗塞など真のエンドポイントとしたもの、メタボリックシンドローム診断基準の構成要素である臨床パラメータである肥満度 (体重, ウエスト周囲径, BMI など), 脂質代謝 (TG, HDL-C など), 血圧値, 糖代謝 (空腹時血糖, インスリン抵抗性など) をエンドポイントとしたもの、さらにはバイオマーカーといわれる血管内皮機能, 炎症マーカー, 酸化ストレス, 脂肪細胞などをエンドポイントとしたものがある (表③)。

### 3 バイオマーカーとは

バイオマーカーとは臨床的にまだ直結していないが、おそらく臨床的事象と関係ある指標となるような検査値のことである。真のエンドポイントと強く相関してくれば、それは代替エンドポイントとして新薬審査などで承認の際に有用である。たとえば、メタボリックシンドローム患者にとっての真のエンドポイントは心臓死, 心筋梗塞, 脳梗塞, 糖尿病などであろう。ここで、高脂血症を適応に取るための臨床試験を考えてみよう。高脂血症にとって重大な臨床的事象とは心筋梗塞のことである。心筋梗塞の発症を抑えることを証明すれば一番よいが、それは大変なことである。そこで、心筋梗塞の代用として LDL-C 値が承認審査に現在用いられている。なぜ LDL-C で代用できるかといえば、LDL-C が高くなるに従って心筋梗塞の発症リスクも高くなるという因果関係が十分既知となっているからである。このように真のエンドポイントとの関連が確立されているものを、既知の (known) バイオマーカーという。HDL-C が低くなると心筋梗塞の発症につながると考えれば、HDL-C もバイオマーカーと捕らえることができる。しかしながら、HDL-C はまだ心筋梗塞に対する既知のバイオマーカー

としては確立していない。もちろん、HDL-C と心筋梗塞の因果関係が周知の事実となれば、HDL-C も代替エンドポイントとして使えることになる。

妥当なバイオマーカー (valid biomarker) には、既知の (known)、ほぼ確実の (probable)、そして検討中の (exploratory) の3段階があるとされている。高脂血症における LDL-C、高血圧症における血圧値は既知のバイオマーカーである。ほぼ確実のバイオマーカーとは、因果関係がほぼ確かと思われているものを指す。高脂血症でいえば HDL-C がその候補かもしれない。検討中のバイオマーカーとは、まだ因果関係は不明だが、これから仮説形成を通じて開発していこうとするものである。表

③にあげた血管内皮機能、炎症マーカー、酸化ストレス、脂肪細胞などはこの水準にあると思われる。

バイオマーカーとして確立するための要件は何であろうか。第一には、それが陽性あるいは高値 (または低値) なら臨床的事象の割合が有意に上がるという疫学データがあることである。つづいて、陽性になる人が人口のどれくらいを占めているか (有病率: prevalence) がわかっていることがあげられる。

バイオマーカーでの証明に要する介入試験の期間は1~3 ヶ月と思われる。また、必要症例数も数十~百例で十分のことが多い。しかし、臨床パラメータになると試験期間は3 ヶ月~1 年に延び、必要症例数も数百例のこ

表② 介入試験の分類

RCT* (ランダム化比較試験)	同時対照があり、確率割付をする 次はどちらの群に当るかを予測できない 個人差を超えた差が見出せる 個人差を無視し個人内比較ができる すぐに反応する介入でないが無理である
<ul style="list-style-type: none"> <li>{ 並列比較</li> <li>{ クロスオーバー法</li> </ul>	
CCT** (比較臨床試験)	同時対照はあるが、確率割付はしない 内部妥当性で RCT より少し劣る
前後比較試験 (自己対照試験)	同時対照はなく、個人内で比較する 先入観の入る可能性がある

\*RCT: Randomized Controlled Trial. \*\*CCT: Controlled Clinical Trial

表③ メタボリックシンドロームの介入試験におけるエンドポイントの分類

バイオマーカー	1~3 ヶ月	数十~百例
<ul style="list-style-type: none"> <li>遺伝子 (APO A1 など)</li> <li>血管内皮機能 (FMD など)</li> <li>炎症マーカー (hs-CRP など)</li> <li>酸化ストレス (E-SOD activity など)</li> <li>脂肪細胞 (アディポネクチンなど)</li> </ul>		
臨床パラメータ	3 ヶ月~1 年	数百例
<ul style="list-style-type: none"> <li>肥満度 (BMI, ウエスト周囲径など)</li> <li>脂質代謝 (TG, HDL-C など)</li> <li>血圧値 (収縮期, 拡張期)</li> <li>糖代謝 (空腹時血糖, HOMA-R など)</li> </ul>		
真のエンドポイント	数年以上	千例以上
<ul style="list-style-type: none"> <li>QOL</li> <li>糖尿病</li> <li>心筋梗塞</li> <li>脳梗塞</li> <li>死亡</li> </ul>		

表④ バイオマーカーの用途とその理由

選定基準	poor metabolizer を除外して検出力を高める
層化割付	リスク要因で前層別することで検出力を高める
用量反応関係の把握	concept に直結しているため証明しやすい
レスポンスの監視	効いたかどうかを検査値ですぐに分かる
副作用の予測	マーカーにより個人別の効きやすさが分かる
至適用量の決定	反応性の違いが分かるので個人に最適な用量が選べる

とが多い。最後に真のエンドポイントになると試験期間は数年以上、症例数も千例以上必要となる(表③)。

現在のところでは、バイオマーカーを代替エンドポイントとして用いるよりも、バイオマーカーでスクリーニングをかけ、それで陽性(レスポンド)なら比較臨床試験をおこなう。陰性であれば、用量を変えて臨床試験をするといった使い方が多いようである。あるいは、バイオマーカーによって POC (proof of concept) スタディをまずおこない、第3相試験で臨床パラメータである代替エンドポイントで検証的試験をする。すなわち、バイオマーカーを変化させるような薬剤を開発し、それを小規模の試験で検証し、つぎにバイオマーカーが変化すると臨床パラメータの脂質・糖代謝パラメータが変化することを検証するというステップを取るほうが多いかもしれない。その他の用途については表④を参照されたい。

#### 4 | メタボリックシンドローム対象の RCT

メタボリックシンドロームを対象とする介入試験(RCT)は多数報告されている。そうはいうものの、“metabolic syndrome”と“randomized controlled trials”で掛け合わせて MEDLINE 検索すると 100 件弱しか選定されない。このなかから一部を紹介しよう。

Esposito ら<sup>2)</sup>は NCEP-ATP III 基準で診断されたメタボリックシンドローム患者 180 名を対象として、地中海風食事を摂取する群と通常の食事を摂取する群を比較した。追跡期間は 2 年間である。エンドポイントとしては、肥満度(体重、BMI など)やインスリン抵抗性(HOMA-R)などの臨床パラメータに加え、血圧・血小板凝集などの血管内皮機能、高感度 C 反応性蛋白 (high sensitive C reactive protein : hs-CRP)、インターロイキン (interleukin : IL)-6, 7, 18 など炎症マーカーなどのバイオ

マーカーへの変化を調べた。

Solra ら<sup>3)</sup>は同じく NCEP-ATP III 基準によりメタボリックシンドローム患者 58 名を対象にして、irbesartan 150 mg/日 (14 名)、同 300 mg/日 (15 名)、irbesartan+脂肪酸 (15 名)、プラセボ (14 名)ヘランダムに割り付けた。4 週間投与の後、エンドポイントとしては血管内皮機能(超音波法による w-mediated vasodilation, FMD など)と炎症マーカー (IL-6, 8-isoprostane level, PAI-1 level)を調べた。

Khan ら<sup>4)</sup>はメタボリックシンドローム患者 40 名を対象にして、ACE 阻害薬 quinapril 200 mg/日とプラセボを比較した。4 週間の投与の後、エンドポイントとして 8-isoprostane, E-SOD activity, lag time to LDL oxidation などの酸化ストレスのマーカーを調べた。

CHES 試験<sup>5)</sup>では高脂血症 917 名を対象としていたが、その人たちは NCEP-ATP II (後に IIIへ移行)でさらに分類された。二重盲検法で 24 週の試験期間により、80 mg/日シンバスタチンと 80 mg/日アトルバスタチンが比較された。プライマリーエンドポイントは 6~12 週における HDL-C のベースラインからの%変化であった。セカンダリーエンドポイントとしては 6~12 週および 18~24 週における apolipoprotein A-1 の%変化であった。その他に、アディポネクチンなど脂肪細胞を検討している試験<sup>6)</sup>もあった。

基本的に考えると、メタボリックシンドロームが表①のように多数のリスク要因で定義されているため、メタボリックシンドロームを対象とした介入試験のエンドポイントとして、それらのリスク要因を考えるのが最も単純である。すなわち、ウエスト周囲径や BMI などの肥満度、TG や HDL-C などの脂質代謝、インスリン抵抗性や空腹時血糖などの糖代謝、そして血圧値などである。上に示してきたように多くの介入試験はバイオマーカー

をエンドポイントに設定していたが、一部の試験ではこのようなりスク要因をエンドポイントに設定していた。これらの臨床パラメータが変化するために必要な期間は、バイオマーカーが変化する期間よりも一般的には長くなる。表④に示したが、3ヵ月から1年くらいは必要であろう。さらに進んで、心筋梗塞や脳梗塞、さらには心臓死といった真のエンドポイントを用いた介入試験はほとんどなかったが、そのなかで2つだけ紹介したい。

フィブラート系薬剤（ベザフィブラート）とプラセボを比較した BIP (Bezafibrate Infarction Prevention) 試験はすでに報告されているが、そのサブ解析の結果<sup>7)</sup>をみよう。メタボリックシンドロームを対象にした BIP 試験データのサブ解析である。BIP 試験では、フィブラート系薬剤が心筋梗塞を抑制するというデータを出していた。1,470 名のメタボリックシンドローム患者を NCEP-ATP III 基準よりピックアップし、その後の心筋梗塞発症率を比較したところ、やはりベザフィブラートのほうがプラセボにくらべ有意に心筋梗塞を抑制していた。平均追跡 6.2 年での結果である。また、それぞれのリスク要因である HDL-C、TG、BMI などにおいては、1 年ですでにベザフィブラート群が改善していた。

DPP (Diabetes Prevention Program) 試験のサブ解析<sup>8)</sup>でも、NCEP-ATP III 基準を用いて 1,711 名のメタボリックシンドローム患者をピックアップした。メトホルミン 850 mg 1 日 2 回、生活習慣強化介入 (7%の体重減量と週 150 分の運動義務)、プラセボの 3 群比較である。開始時にすでに 1,711 名 (53%) がメタボリックシンドロームであった。3 年後にはプラセボ群でメタボリックシンドローム割合が 51%、メトホルミン群でメタボリックシンドローム割合が 45%、生活習慣強化介入群でメタボリックシンドローム割合が 34%にまで減少していたという研究である。DPP 試験のプライマリーエンドポイントは糖尿病の発症であるが、その結果はここには示されていない。

## 5 | メタボリックシンドロームをエンドポイントとした介入試験

最後に紹介した DPP 試験はサブ解析では、対象をメタボリックシンドロームに絞り、メタボリックシンドロームからの離脱をエンドポイントにもしていた。

ALPINE (Antihypertensive Treatment and Lipid Profile in a North of Sweden Efficacy Evaluation) 研究<sup>9)</sup>は 392 名の高血圧患者を対象にして、サイアザイド系利尿薬と A II 受容体拮抗薬 (ARB) であるカンデサルタンを 1 年間比較した。ランダム割り付けはしているが、どちらの群かはわかるオープン (非盲検) 試験である。エンドポイントは糖・脂質代謝、血圧値、さらに糖尿病の発症、QOL などであった。メタボリックシンドロームの定義は WHO 基準を準拠し、肥満の基準としては BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>を用いていた。

RIO-Europe (Rimonabant in Obesity-Europe) 研究<sup>10)</sup>では rimonabant の影響をみている。BMI が 30 kg/m<sup>2</sup>以上、あるいは BMI が 27 kg/m<sup>2</sup>以上で高脂血症あるいは高血圧症の患者、全部で 1,507 名が対象になった。二重盲検法により、プラセボ、5 mg rimonabant、20 mg rimonabant 1 日 1 回の 3 群がパラレルに比較された。さらに、すべての群に軽いカロリー減食も与えた。プライマリーエンドポイントはベースラインから 1 年後の体重変化量とした。さらに、5%あるいは 10%以上体重減少した割合も指標としてみた。セカンダリーエンドポイントにはウエスト周囲径、TG、HDL-C、メタボリックシンドローム割合 (prevalence) などを取り上げていた。

## 6 | 肥満ガイドライン

メタボリックシンドローム診断基準をみると (表④)、肥満 (ウエスト周囲径、BMI、体重などから) というのが最も重要な位置づけになっていることがわかる。米国の新薬審査機関である米国食品医薬品局 (FDA) は、肥満治療薬の臨床評価ガイドライン<sup>11)</sup>を出した。その例をみながら、最後に肥満者を対象にした介入試験の計画を立案するとき、考えておくべきことを整理しておく。

用量反応試験 (おもに後期第 2 相試験) では最低 3 用量でおこない、プラセボ対照 (placebo-controlled) がよいとされる。しかも、食事・運動・行動変容・タバコや飲酒など生活習慣の変化については、比較群で似させることが重要になる。肥満については BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>が選択基準の目安としてあげられ、目安として 200 名を 3~6 ヶ月追跡するのがよいと書かれている。

第 3 相試験になると、もう少し長い試験期間が求められる。ガイドラインには目安として、約 1,500 名を 12 ヶ

月追跡するとある。そのうち 200~500 名は 24 ヶ月までみることを要望している。また、2 年目についてはオープンラベルでおこなうのもよいとある。肥満の基準ももう少し低いほうへ設定し、より広い層の患者を含める。一例では BMI>27 kg/m<sup>2</sup>として、高血圧・高脂血症・糖代謝異常・心疾患・睡眠障害・その他肥満関連症状を併発している患者を対象にするのもよい。さらに、このような肥満者においては生活習慣の改善だけで解消されることも多いため、6 週間程度の Run-in period (試用期間)を設け、そこではプラセボを投与するというデザインもよいだろう。

エンドポイントとしては、まず肥満であるから体重減少が考えられる。体重 5%減をレスポンスと定義し response rate をみることもよいだろう。効いたかどうかの判定が容易になるためである。ウエスト/ヒップ比やウエスト周囲径もよいエンドポイントだろうと書かれている。また、これらの直接的項目だけでなく、もっと真のエンドポイントへ接近するような設定も可能である。たとえば、糖尿病の発症、OA (骨関節炎)、心筋梗塞、TIA/脳梗塞など肥満起因の合併症もよいエンドポイントになるだろう。これらに加えて表④に示した臨床パラメータ、つまり血圧低下、インスリン抵抗性改善、TG 低下、HDL-C 上昇など、メタボリックシンドロームの構成要因をセカンダリーエンドポイントに設定することが重要である。どれを取り上げるかは薬剤の特徴に依存する。その他のエンドポイントとして、QOL も考える余地があろう。肥満によるストレスも多いからである。

## おわりに

メタボリックシンドロームの介入試験はこれからであり、とくに肥満プラス関連合併症として何かを有した患者を対象にした介入試験が今後求められるだろう。いろいろな水準のエンドポイントを的確に設定し、それに適合した症例数および試験期間を選択することが重要になるだろう。検討中のバイオマーカーの開発による開発スピードの短縮化も重要度を増してくるだろう。

## ●引用文献●

- 1) 折笠秀樹：臨床研究デザイン，真興交易医書出版部，東京，1995
- 2) Esposito K *et al*：Effect of Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome：a randomized trial. *JAMA* 292：1440-1446, 2004
- 3) Sola S *et al*：Irbesartan and lipoic acid improve endothelial function and reduce markers of inflammation in the metabolic syndrome：results of the Irbesartan and Lipoic Acid in Endothelial Dysfunction (ISLAND) study. *Circulation* 111：343-348, 2005
- 4) Khan BV *et al*：Quinapril, an ACE inhibitor, reduces markers of oxidative stress in the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 27：1712-1715, 2004
- 5) Ballantyne CM *et al*：Effect on high-density lipoprotein cholesterol of maximum dose simvastatin and atorvastatin in patients with hypercholesterolemia：results of the Comparative HDL Efficacy and Safety Study (CHESS). *Am Heart J* 146：862-869, 2003
- 6) Herrmann BL *et al*：Effects of a combination of rhGH and metformin on adiponectin levels in patients with metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 37：49-52, 2005
- 7) Tenenbaum A *et al*：Bezafibrate for the secondary prevention of myocardial infarction in patients with metabolic syndrome. *Arch Intern Med* 165：1154-1160, 2005
- 8) Orchard TJ *et al*：The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome：The Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann Intern Med* 142：611-619, 2005
- 9) Lindholm LH *et al*：Metabolic outcome during 1 year in newly detected hypertensives：results of the Antihypertensive Treatment and Lipid Profile in a North of Sweden Efficacy Evaluation (ALPINE study). *J Hypertens* 21：1563-1574, 2003
- 10) Van Gall LF *et al*：Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients：1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 365：1389-1397, 2005
- 11) Food and Drug Administration Division of Metabolic and Endocrine Drug Products：Guidance for the clinical evaluation of weight-control drugs. 1996

## おりがさ・ひでき

折笠秀樹 富山大学医学部統計情報科学教授

1956 年、大阪生まれ。

1978 年、東京理科大学卒業後、NTT 東日本関東病院 (旧関東通信病院) を経て、米国ノースキャロライナ大学・公衆衛生学大学院へ留学。1988 年にバイオ統計学で博士号を取得して帰国後、エーザイ株式会社・自治医科大学を経て、1994 年 10 月より現職。専門は、臨床統計学 (臨床試験計画、QOL 評価、メタアナリシスなど)。臨床統計学の必要性和専門家の人数を拡充することが夢。

## Trigeminal neuralgia due to pontine infarction

Osamu Iizuka, MD; Yoshiyuki Hosokai, BS; and Etsuro Mori, MD, Sendai, Japan

An 85-year-old man with diabetes mellitus suddenly developed dysesthesia over the left side of the face, which persisted for a few months and then disappeared. Two years later, he experienced intermittent lancinating pain in the territory of the maxillary branch of the left trigeminal nerve triggered by brushing teeth and chewing. Neurologic examination disclosed slightly diminished superficial sensation in the territory of the maxillary branch of the left trigeminal nerve. MRI revealed a tiny wedge-shaped lesion in the pontine base consistent with an old infarction, which has affected the intramedullary portion of the left trigeminal root (figure). Pontine infarction is believed to cause trigeminal neuralgia,<sup>1,2</sup> and this case documents a clear relationship between the trigeminal root entry zone lesion and trigeminal neuralgia.

Copyright © 2006 by AAN Enterprises, Inc.



Figure. T2-weighted MRI superimposed on a three-dimensional constructive interference in the steady state image revealing a tiny wedge-shaped lesion in the pontine base consistent with an old infarction (white arrow), which has affected the intramedullary portion of the left trigeminal root. Black arrow indicates the left trigeminal nerve.

Disclosure: The authors report no conflicts of interest.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Osamu Iizuka, Department of Behavioral Neurology and Cognitive Neuroscience, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1, Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan; e-mail: oiizuka@mail.tains.tohoku.ac.jp

1. Balestrino M, Leandri M. Trigeminal neuralgia in pontine ischaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62:297-298.
2. Kim JS, Kang JH, Lee MC. Trigeminal neuralgia after pontine infarction. *Neurology* 1998;51:1511-1512.

# Initial oligemia with capillary flow stop followed by hyperemia during K<sup>+</sup>-induced cortical spreading depression in rats

Minoru Tomita<sup>1</sup>, Istvan Schiszler<sup>1</sup>, Yutaka Tomita<sup>2</sup>, Norio Tanahashi<sup>1</sup>, Hidetaka Takeda<sup>1</sup>, Takashi Osada<sup>1</sup> and Norihiro Suzuki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Laboratoire de Biologie et Physiologie Moléculaire du Vaisseau, Paris, France

Local cerebral blood volume (CBV) and capillary flow changes in regions of depolarizing neurons during K<sup>+</sup>-induced cortical spreading depression (CSD) in the cerebral cortex of  $\alpha$ -chloralose-urethane-anesthetized rats were examined employing a transillumination (550 nm) video system. Capillary flow was calculated as the reciprocal of mean transit times of blood in pixels of 40  $\mu$ m  $\times$  40  $\mu$ m, each of which contains a few capillaries. Potassium microinjection into the cortex evoked repetitive wave-ring spreads of oligemia at a speed of ca.  $2.33 \pm 0.48$  mm/min. During the spread of CSD, tracer (either saline or carbon black) was injected into the internal carotid artery. Colocated with the oligemic wave, we detected capillary flow stop as evidenced by disappearance of the hemodilution curves. At any location in the region of interest within the cerebral cortex, we observed cyclic changes of capillary flow stop/hyperperfusion in synchrony with oligemia/hyperemia fluctuations. The initial flow stop and oligemia were ascribed to capillary compression by astroglial cell swelling, presumably at the pericapillary endfeet, since the oligemia occurred before larger vessel changes. We conclude that local depolarizing neurons can decrease adjacent capillary flow directly and immediately, most likely via astroglial cell swelling, and that the flow stop triggers upstream arteriolar dilatation for capillary hyperperfusion.

*Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* (2005) 25, 742–747. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600074

Published online 23 February 2005

**Keywords:** astroglial swelling; blood transit; hemodilution curve; light transmission image through the cortex; neurovascular coupling; wave-ring spread of oligemia

## Introduction

The relationship between neuronal functional changes and blood flow changes, and the mechanisms involved, remains unknown (Tomita *et al*, 2002). Cortical spreading depression (CSD) could provide a good experimental model to examine the relationship between neuronal depolarization and flow changes. Although there have been abundant reports on vascular changes and flow changes during CSD in the literature (Back *et al*, 1994; Dreier *et al*, 2001; Duckrow, 1993; Dunn *et al*,

2001; Fabricius *et al*, 1995; Hansen and Lauritzen, 1984; Leão and Morrison, 1945; Marshall, 1959; Nielsen *et al*, 2000; Van Harreveld and Stamm, 1952), the findings were rather inconsistent, especially with respect to early local flow changes.

This communication describes a comprehensive examination of capillary flow changes in the cerebral cortex during K<sup>+</sup>-induced CSD (neuronal depolarization) by employing a new optical method with a high spatial resolution which has recently been developed by us (Schiszler *et al*, 2000).

## Materials and methods

Experiments were performed on 10 Sprague–Dawley rats under  $\alpha$ -chloralose-urethane anesthesia. The optical method employed here was as reported elsewhere (Schiszler *et al*, 2000). A transillumination technique was applied, despite possible damage arising from optical fiber insertion into the brain tissue, because any changes in the light

Correspondence: Dr Minoru Tomita, Department of Neurology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan. E-mail: mtomita@sc.itc.keio.ac.jp  
This study was supported by a research grant from the New Energy and Industrial Technology Development Organization, and funds from the Mihara Award received by M.T. for his stroke research activity in 2001.

Received 7 June 2004; revised 30 September 2004; accepted 21 October 2004; published online 23 February 2005



transmission (LT) at  $\lambda = 550 \pm 10$  nm, one of the isobestic points of hemoglobin, are attributable to changes in cerebral blood volume (CBV) (Tomita M *et al*, 1978). Images of the brain surface in a 2 mm  $\times$  2 mm region of interest (ROI) were focused with a Nikon lens and monitored with a silicon intensified target (SIT) camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). The transilluminated cortical images were continuously recorded on videotape at 30 frames/s (30 Hz) or fed into a personal computer through a Scion LG-3 frame grabber card (Scion Corporation, MD, USA) with 512<sup>2</sup> pixels at various acquisition rates (0.5 to 15 Hz). The acquired images in the Scion frame grabber card were automatically scaled logarithmically in topographical brightness to 8-bit images, and displayed as pictures on the 256 gray scale. Frame-by-frame subtraction between two pictures at 0.5-sec intervals was performed to visualize clearly the wave-ring image because of the CBV changes and arteriolar diametric changes during CSD.

After a 1-h period to allow for recovery from the stress of optical-fiber insertion, K<sup>+</sup> solution (a few  $\mu$ L, 500 mmol/L) was microinjected at a depth of ca. 1 mm into the cortical parenchyma at the center of the ROI through a glass micropipette (originally constructed for intracellular injection). During continuous video-recording of the ROI after CSD induction, 25  $\mu$ L of saline (a negative blood indicator) in 6 rats and diluted carbon black solution in 2 rats was injected as a spike into the internal carotid artery via a catheter inserted into the external carotid artery. The principle and assumptions underlying the measurements of flow in a 'pixel' (100 averaged Scion pixels) were as follows. A pixel of 40  $\mu$ m  $\times$  40  $\mu$ m should contain only a few capillaries, since average intercapillary distance is 22  $\mu$ m when calculated from the rat cortical microvasculature moulded in a Mercocast (MT, unpublished observation). The mean transit time (MTT) calculated from the hemodilution curve represents the reciprocal velocity of blood passing through the capillaries in the pixel. The hemodilution curves for all the individual pixels of a 50  $\times$  50 matrix in the ROI were analyzed with Matlab software (The MathWorks, Inc., Natick, USA) to evaluate the MTTs by employing a customized algorithm of the area/height of hemodilution curves ( $MTT = \int t \Delta LT(t) dt / \int \Delta LT(t) dt$ , where  $\Delta LT$  is the light transmission change in a pixel). The reciprocal mean transit time (1/MTT) was taken to represent the capillary flow (either transit of red blood cells (RBC) when saline is used or plasma transit when carbon black is used), which was arranged in appropriate coordinates to construct a two-dimensional (2-D) flow map with the aid of our own software, KEIO-IS1. The 2-D flow map so constructed had a resolution of 625 flow values/mm<sup>2</sup>, which is ca. 500-fold higher spatial resolution than that of conventional laser-Doppler flowmetry. We noticed that near-zero flow values thus calculated were either incorrectly estimated by the software, which automatically included small baseline fluctuations into the height for MTT calculation, or were uncalculated because zero was divided by zero ( $0(t \Delta LT(t)) / 0(\Delta LT(t))$ ) with no build-up of hemodilution curve. In the latter case, the capillary flow must be 0, whereas the computer automatically yielded a certain

**Table 1** Parameters in early flow changes

Parameters	$v$ (mm/s)	$T_{1/2}$ (s)	$T_k$ (1/s)	$T_i$ (s)	$Flow_l$ (%)	$Flow_h$ (%)
Rat 1	3.2	0.75	0.94	9.5	5	160
Rat 2	2.5	0.88	0.78	8.2	60	240
Rat 3	2.2	1.09	0.64	7.5	5	200
Rat 4	1.8	1.07	0.65	4.2	60	250
Rat 5	2.1	0.46	1.51	6.8	20	210
Rat 6	2.2	2.11	0.33	8.1	40	230
Mean	2.33	1.06	0.81	7.4	31.6*	215.0*
$\pm$ s.d.	0.48	0.56	0.40	1.8	25.4	32.7

$v$  = speed of CSD,  $T_{1/2}$  = the half-decrease time of capillary flow decrease,  $T_k$  = the time constant,  $T_i$  = oligemic period,  $Flow_l$  = the lowest flow, and  $Flow_h$  = the highest flow in the hyperemic period. \*Changes were statistically significant ( $P < 0.05$ ) when compared to control values.

value based on noise. To avoid further artificial error, no correction was made to the values in Table 1.

Rapid changes in capillary flow at the very beginning of neuronal depolarization were examined as follows. Since a 2-D map during CSD depicts a series of changes from 'no flow' to subsequent hyperperfusion in a panoramic view, a plot profile of capillary flow changes along a line passing through the injection site could broadly be concomitant with CSD propagation towards the periphery. The conversion of the distance/time scale was made by using the speed of individual CSDs in mm/sec (CSD velocity ( $v$ )). Thus, determined parameters were the time constant of initial flow decrease ( $T_k$  in 1/s) calculated from the half-decrease time ( $T_{1/2}$  in secs) assuming an exponential decay, the oligemic duration ( $T_i$  in secs), the relative change in low flow level ( $F_l$  in %), and the subsequent hyperemic level ( $F_h$  in %). These changes were examined for statistical significance using the nonparametric Wilcoxon signed rank test. No correction was made for overestimation of  $F_l$  due to baseline noise as mentioned above.

## Results

### General Description of Cortical Spreading Depression

As described in our previous report (Tomita Y *et al*, 2002), K<sup>+</sup> injection into the cerebral cortex produced, after a latency of several minutes, a concentric light wave-ring spread as shown in subtraction pictures (Figures 1A to 1C). The K<sup>+</sup> injection immediately created a dark spot of ca. 100  $\mu$ m in diameter, which was hardly visible to the naked eye, at the site of injection. The spot changed its shape polymorphically with time and sometimes seemed to be 'boiling'. After a period of several seconds to a couple of minutes, a corona-like white projection at the edge of the dark spot started to appear and fused into a concentric ring of increased LT. As shown, the ring gradually increased in diameter, propagating peripherally, like the ripples evoked by a stone dropped into a pond. This was

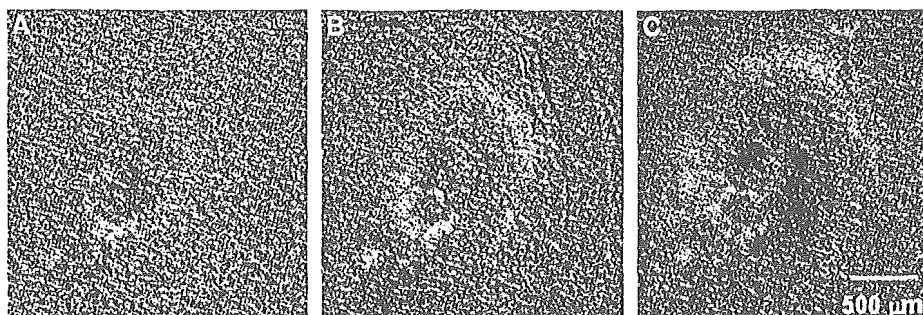


Figure 1 Frame-by-frame subtraction pictures at intervals of 0.5 sec to show wave-ring spread of light transparency (a decrease of CBV) at a speed of 3 mm/min. Vascular diametric changes of small vessels are seen at 8 secs after CSD induction.

followed by a wide dark band, forming an expanding doughnut shape. The presence of pial vessels did not influence the wave-ring propagation. A few minutes after the first sequence, a second sequence of wave-ring spreading from the same 'boiling' center started. The individual expanding concentric rings were slightly different in width and darkness, but the expansion was concentric with respect to the area stimulated by  $K^+$  injection. The dynamic wave-ring spread was repeated at intervals of 2 to 5 mins for more than 30 mins in 3 rats. The spread speed was  $2.33 \pm 0.48$  mm/min (mean  $\pm$  s.d.). Since the cortex was transilluminated by light at a wavelength of 550 nm, the spreading light ring was considered to be due to a blood volume decrease (oligemia), followed by a wide, dark band of blood volume increase (hyperemia). Approximately  $>5$  secs after the CSD induction, there appeared thread-like structures of presumably arteriolar diametric changes (constriction or dilatation) during a period within the 0.5-sec frame interval, as seen in the frame-by-frame subtraction picture B of Figure 1. It should be noted that the arteriolar changes occurred after, not before, the tissue oligemia had started. In three other rats, the spread was abortive: the dark band appeared, but gradually subsided, and finally disappeared. We failed to produce CSD in two rats because of bleeding and inappropriate  $K^+$  injection, and to measure MTT in two rats because of failure of catheter insertion into the external carotid artery.

During passage of the wave-ring spread, no bulge or dent of the brain surface was observed by employing reflected light.

### Capillary Flow Changes with Cortical Spreading Depression

Saline injection into the internal carotid artery yielded 2500 hemodilution curves in the ROI of the rat brain. All hemodilution curves are included in Figure 2, where continuous LT traces (the intensities of the transmitted light through the cortical tissue layer) were recorded from 2500 pixels during the first CSD spread. There were five arrays

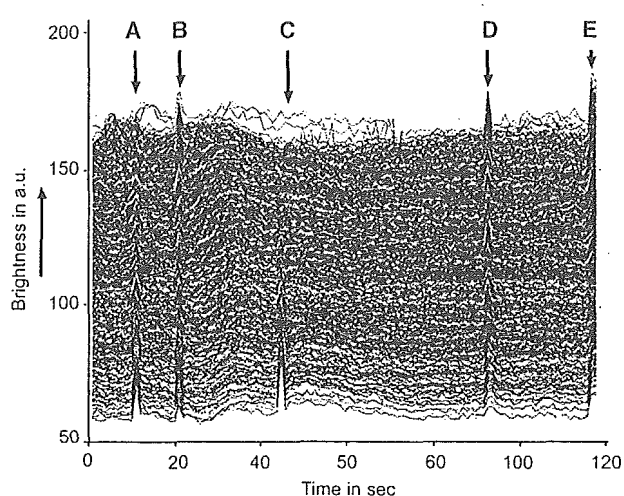


Figure 2 Records of 2500 LT traces at pixels containing a few capillaries in the cerebral cortex for 120 secs. Upward direction is brighter. Baselines fluctuate because of irregular RBC transits. Note that hemodilution curve buildups are not uniform, depending on oligemic wave passage. Intracarotid saline injections were made five times at (A)–(E). Capillary flow stop is indicated by the absence of hemodilution curves in the upper part at the first (A) and third (C) injections, but reappeared at the second (B), fourth (D), and fifth (E) injections.

of sharp waves (hemodilution curves A, B, C, D, and E) induced by the saline injections. The height of the curves reflects the amount of saline and therefore the blood distributed to the area at that moment (Tomita M *et al*, 1983). The distribution displayed a tremendous variability at different locations and different moments during the CSD spread, contrasting with the rather even distribution under control conditions. At the time points indicated by arrows A and C in Figure 2, the upper part of the traces reveals no buildup of hemodilution curves, implying that blood was not supplied to the area where the light wave with CSD was just passing. This implies that capillary perfusion was halted in the area at that moment. However, at the following moments, for example, at times B, D, and E, the same area began to

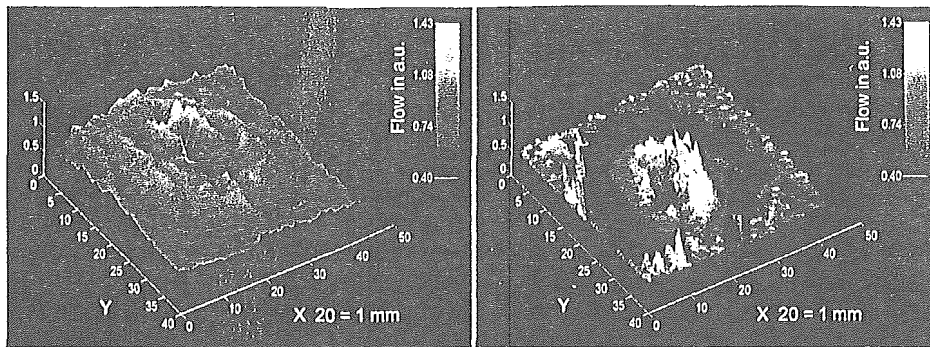


Figure 3 Three-dimensional capillary flow maps in the ROI reconstructed from 2500 capillary flow values (reciprocal MTTs) which were calculated from hemodilution curves after intracarotid saline injection (left) and diluted carbon black injection (right) during CSD. Note the wave-ring shape of capillary flow changes. The ordinate is blood flow in arbitrary units (a.u.). Note that flows obtained from carbon black dilution curves are lower than those from saline because of the slowness of plasma (carbon black) transit compared with RBC (saline; negative indicator of RBC) transit, resulting in a lower tissue hematocrit of ca. 66%.

receive blood supply. Such on-and-off tidal capillary flow changes with CSD in time and space were seen at any spot in the surrounding cerebral cortex. The appearance of hemodilution curves and the level of the baseline brightness were fairly well correlated, except for a certain refractory period. Figure 3 (left) depicts the 2-D capillary flow map, where the wavefront of a low flow ring showing a decrease is mostly colocalized at the light ring area of oligemia. The low flow band was followed by a high flow band with a more than two-fold increase in capillary flow with high CBV. Figure 3 (right) shows a 2-D capillary flow map based on carbon black dye dilution curves, which exhibits more clearly a low-flow (dark) ring followed by a high-flow (hyperemic) band. The average flow values in Figure 3 (right) were lower than those of Figure 3 (left) due to the low tissue hematocrit (flow values obtained by using carbon black (plasma indicator) were ca. 66% lower than those obtained by saline (RBC (negative) indicator) (Tomita and Gotoh, 1982).

#### Plot Profile of Capillary Flow and Other Parameters

Plot profiles of capillary flow varied greatly, not only with 2-D capillary flow maps obtained successively in the same rat, but even with line angles in the same flow map. Figure 4 represents the plot profile (time courses) of capillary flow along a line passing through the injection site obtained from six cases studied with saline injection. Calculated parameters are presented in Table 1. As shown, capillary flow immediately decreased in all six cases ( $P < 0.05$ ). The average change was from the control (100%) to  $31.6\% \pm 25.4\%$ . Subsequently, capillary flow increased markedly in all six cases ( $P < 0.05$ ) to  $215.0\% \pm 32.7\%$ . If we consider the fact that no dilution curves built up at the lowest point, the flow values must have reached practically 0% (flow stop), even though the computer yielded higher values.

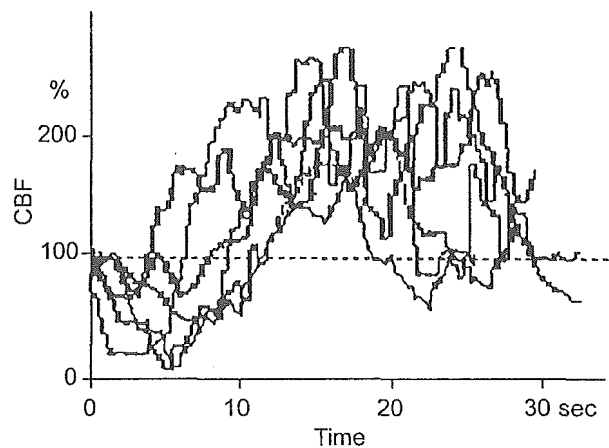


Figure 4 Capillary flow changes on a horizontal line passing through the site of  $K^+$ -injection are shown. As can be seen, an initial decrease in capillary flow occurred in all six cases ( $P < 0.05$ ), followed by marked hyperperfusion ( $P < 0.05$ ).

#### Discussion

The essential point of this paper is to show the presence of a moving wave-ring of initial transient oligemic and low (or no) flow in the cerebral cortex during CSD. These oligemic rings appeared to be independent of the locations of arterial arborization or microcirculatory units. Such rapid initial capillary flow changes might have been overlooked in the literature because of the poor spatial resolution of the conventional methods so far employed to study flow. For example, the most commonly used laser Doppler flowmeter, having a probe of 1 mm in diameter, measures only average flow values within the sensitive surface area (one-quarter of the 2-D capillary flow map shown in Figure 3). The laser Doppler flowmeter would miss the subtle local flow changes that we observed, owing to averaging within the area, yielding a variety of changes

depending on the location of the probe: an increase, a decrease, or even no change (Tomita M *et al*, 2001). One may consider that the capillary flow stop could be secondary to upstream arteriolar constriction, as suggested by van Harreveld and Ochs (1957). However, contrary to their proposal of vascular origin, we consider that the oligemic changes were neuronal in origin for the following reasons. (1) Arteriolar changes occurred >5 secs after the onset of tissue oligemia (Figure 1B); (2) the speed of flow decrease to capillary flow stop (time constant of 0.81/s) could not be explained by the upstream arteriolar constriction; (3) the ring distribution of oligemia cannot be explained by arteriolar flow supply; and (4) the oligemic area is narrower than the reported size (500  $\mu$ m in diameter) of the microcirculatory unit. According to our experience, capillary flow does not stop immediately after arterial occlusion, presumably due to residual vasomotion in the microvascular network. The vasomotion (to-and-fro movements) of RBC in capillaries would persist at least for 20 secs. Our data suggest the change in capillary flow is more directly associated with neuronal inactivation. Among many possibilities, capillary flow redistribution in the microvascular network would occur from time to time due to partial capillary flow resistance changes. We speculate that resistance of individual capillaries in the oligemic region is increased by astroglial swelling coupled with neuronal depolarization. In particular, the pericapillary endfeet processes of astroglial cells would swell and compress embracing capillaries rapidly. Newman (1986) reported that a large fraction of the total cell conductance of astroglial cells for ions is localized at the endfeet processes. This may assist rapid perivascular astroglial swelling. Van Harreveld and Schade (1959) noted that sodium and chloride ions moved from the intercellular space to cellular components during CSD. Van Harreveld (1958) recognized a 30% swelling of apical dendrites of glial cells during CSD. The cell swelling was reported to be explosive when conditions were appropriate, as seen in heart muscle cells (Kloner *et al*, 1974), as well as in brain cells (Hossmann, 1971) under conditions of severe membrane depolarization and sufficient environmental fluid. Mori *et al* (2002) recently confirmed that the extracellular space started to decrease at 34 secs after global ischemia and reached half-maximum change at 123 secs. The immediate water shift is due to anomalous osmosis, involving the movement of water into cells coupled with the flow of sodium ions across the cell membrane (Nagasawa *et al*, 1986; Tomita and Gotoh, 1992; Tomita, 2005, in press). The rapid CBV decrease with ischemia may occur reciprocally with astroglial swelling. When a middle cerebral artery was occluded in cats, we observed a rapid CBV decrease from 6.3 to 5.2 vol% at 20 secs after the occlusion (Tomita *et al*, 1980), a time which coincides with the time of EEG disappearance

(neuronal depolarization). If the astroglial-swelling scenario is correct, the resultant 'cuff' compression of capillaries by swollen astroglial endfeet could be so rapid that RBC flow through the capillaries would be virtually halted. The slightest decrease of the capillary lumen would be sufficient to increase flow resistance steeply owing to the inverse Fåhræus-Lindqvist effect (Chien, 1972). Flowing RBC would start to escape the resistant channels toward nearby less-resistant channels in the capillary networks. This might be called a kind of 'steal' event from capillaries with higher resistance to surrounding capillaries with lower resistance. Nevertheless, the possibilities of direct contraction of vascular endothelial cells constituting capillaries (Inoue *et al*, 2003) in response to a rapid signal from depolarizing neurons, and hemorheological events of 'plasma skimming' at capillary branches remain to be excluded.

After the oligemic period of approximately 5 to 8 secs, the local tissue underwent hyperemia and hyperperfusion due to arteriolar dilatation, in agreement with previous reports. Many regulatory mechanisms due to arteriolar responses to tissue oligemia through multimodal feedback routes would begin to operate at this point.

## Acknowledgements

We thank Professor William I Rosenblum and Professor Konstantin-Alexander Hossmann for their critical reading of the manuscript and helpful suggestions.

## References

- Back T, Kohno K, Hossmann KA (1994) Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:12-9
- Chien S (1972) Present state of blood rheology. In: *Hemodilution* (Messmer K, Schmid-Schonbein H, eds), Basel: Karger S, 1-45
- Dreier JP, Petzold G, Tille K, Lindauer U, Arnold G, Heinemann U, Einhäupl KM, Dirnagl U (2001) Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. *J Physiol* 531:515-26
- Duckrow RB (1993) A brief hypoperfusion precedes spreading depression if nitric oxide synthesis is inhibited. *Brain Res* 618:190-5
- Dunn AK, Bolay H, Moskowitz MA, Boas DA (2001) Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:195-201
- Fabricius M, Akgoren N, Lauritzen M (1995) Arginine-nitric oxide pathway and cerebrovascular regulation in cortical spreading depression. *Am J Physiol* 269:H23-H9
- Hansen AJ, Lauritzen M (1984) The role of spreading depression in acute brain disorders. *Ann Acad Bras Cienc* 56:457-79