

報の報告と一致した頭蓋内血管検出率であると言える。このように脳血栓溶解療法の対象になると思われる高齢女性の検出率の低さは臨床的に問題であり、その解決法として、BVSの併用が重要となってくる。

血管別での検討では、M1やM2よりもPCAの方が検出率が良かった。日本人においては、側頭骨windowがやや後ろ（耳介）寄りである事が推察される。rt-PAの適応となるのはM1-M2の閉塞例が多く、仮にまったく血管が描出されないC群のみならず、B群のような一部分しか血管が描出されない症例においても、BVSは有用であると言える。

BVSの精度については、マーカの位置は3カ所の距離ができるだけ離れている方が最も誤差は少なかったが、まだ臨床適用に十分な精度とは言えなかった。この原因としては、1. マーカ貼付位置が顔の表情などでずれやすい、2. マーカの大きさや形の問題（BVSソフト上でのマーカの中心部を選択できていない可能性）、3. センサの位置情報を感知する磁場発生装置が周囲からの磁場の影響を受けてしまう可能性、などが考えられた。3については、今まで使用してきた立方体の磁場発生装置ではなく、より周囲からの磁場の影響を受けにくい、フラットパネルタイプのものを使用することとした（図13）。日立メディコでのファントムによる精度試験の後、本年度行ったボランティアでの初期位置合わせ試験と同様の方法で、更に精度が向上するかどうかを検証する予定である。

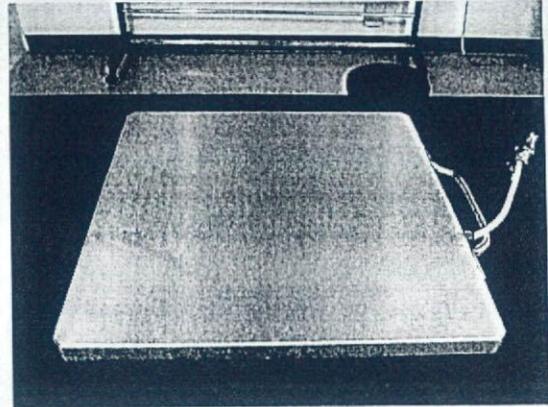


図13. フラットパネルタイプの磁場発生装置

固定具に関しては、昨年度ボランティアで検証したバージョンで、実際の臨床現場で使用した。昨年度の試作品で明らかとなった問題点と同様に、手動よりも頭部への圧迫が弱い為、プローブをもう少し強く押し当てられるような改良が必要であった。また、先述のように比較的windowが後方にある例が多く、その様な場合にはプローブの向きが側頭骨に対してかなり斜めに固定する必要がある、時間を要する原因であった。この為、よりプローブを自由に操作可能で、かつ固定が強い器具として、三鷹光器社製のポイントセッター（図14）をプローブ保持として、4名のボランティアにて使用したが、多関節型になっている為、プローブの動きの自由度が高く、ワンタッチで固定可能で、操作性が向上した。しかし、既製品の為、実際の脳梗塞治療に使用するには、大きさや重量の問題があり、この機構を取り入れ、小型でもう少し簡素化したものに改良していく必要があると思われた。

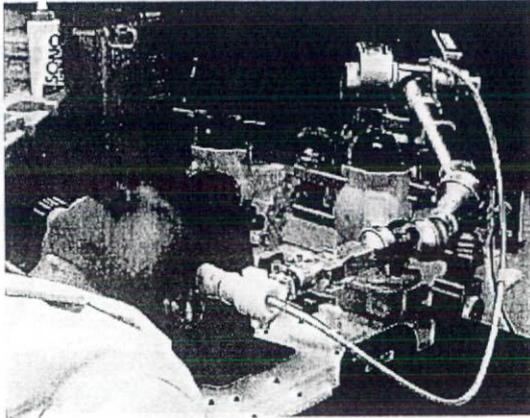


図14. ポイントセッターによるプローブの固定

D. 結論

血栓溶解の治療と血管の閉塞や再開通状態の監視を行える TCT-LoFUT システムは急性期脳梗塞の治療において非常に有効であるが、臨床適用における最大の問題点は、治療の対象となる高齢者での頭蓋内血管検出率の低さである。この問題点を解決する手法として、BVS 技術を併用した MRI 誘導下脳血栓溶解療法を構築した。この技術によりほぼ 100% の症例でこのシステムによる超音波治療が可能となると考えられる。そしてこの治療システムの臨床適用に向け、BVS の精度、頭部固定具に改良を加え、昨年度の成果を更に臨床適応可能な状態まで向上させることができた。

F-1. 引用文献

1) Alexandrov AV, Moliana CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Saqqur M, Demchuk AM, Moye LA, Hill MD, Wojner AW; CLOTBUST Investigators; Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 351(21): 2170-2178, 2004.

- 2) Carlos A. Molina, Marc Ribo, Marta Rubiera, Joan Montaner, Esteban Santamarina, Raquel Delgado-Mederos, Juan F. Arenillas, Rafael Huertas, Francisco Purroy, Pilar Degado, José Alvarez-Sabin : Microbubble Administration Accelerates Clot Lysis During Continuous 2-Mhz Ultrasound Monitoring in Stroke Patients Treated With Intravenous Tissue Plasminogen Activator. *Stroke.* 37 : 425-429, 2006
- 3) Ishibashi T, Akiyama M, Onoue H, Abe T, Furuhashi H: Can transcranial ultrasonication increase recanalization flow with tissue plasminogen activator? *Stroke.* 33(5):1399-1404, 2002.
- 4) Demchuk AM, Burgin WS, Christou I, Felberg RA, Barber PA, Hill MD, Alexandrov AV : Thrombolysis in Brain Ischemia (TIBI) transcranial Doppler flow grades predict clinical severity, early recovery, and mortality in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* 32 ; 89-93, 2001
- 5) 伊藤泰司, 松本昌泰, 半田伸夫, 前田宏明, 鎌田武信. 経頭蓋超音波ドプラ法による内頸または中大脳動脈閉塞性病変の診断-血流検出率の検討と診断基準作成の試み-. *脳卒中.* 14 : 382-388. 1992
- 6) 橋本弘行, 恵谷秀紀, 中真砂士, 木下直和, 額田忠篤. 経頭蓋超音波ドプラ法の側頭骨通過性(側頭骨を介する頭蓋内主要血管血流信号検出率に関する検討-加齢及び性差の超音

波側頭骨通過性に及ぼす影響-. 日本老年医学会雑誌. 29(2) : 119-122, 1992

- 7) Itoh T, Matsumoto M, Handa N, Maeda H, Hougaku H, Hashimoto H, Etani H, Tsukamoto Y, Kamada T : Rate of successful recording of blood flow signals in the middle cerebral artery using transcranial Doppler sonography. Stroke 24 : 1192-1195, 1993
- 8) Halsey JH : Effect of emitted power on waveform intensity in transcranial Doppler. Stroke 21 : 1573-1578, 1990.

井 修、窪田 純、古幡 博:Brain Virtual Sonography を用いた MRI 誘導下超音波脳血栓溶解療法の画像精度-健常ボランティアでの検証-. 第26回日本脳神経超音波学会. July 2007

- 2) Mitsumura H., Inoue K., Furuhashi H.; Diagnostic accuracy of transcranial color flow imaging against magnetic resonance angiography in Japanese patients with ischemic stroke.; International Stroke Conference 2008; Feb 2008.

F-2. 関連研究発表

1. 論文発表

三村秀毅、井上聖啓、古幡 博：脳梗塞における頭蓋外内頸動脈と中大脳動脈の超音波による循環動態評価 -Pulsatility Index の比較を中心に-。Neulosoology19 (3) : 150-153, 2006

2. 学会発表

- 1) 三村秀毅、井上聖啓、荻原誠、荒

1. 知的財産権の出願・登録状況

- (ア) 特許取得
なし
- (イ) 実用新案登録
なし
- (ウ) その他
なし

2. マスコミ関連

なし。

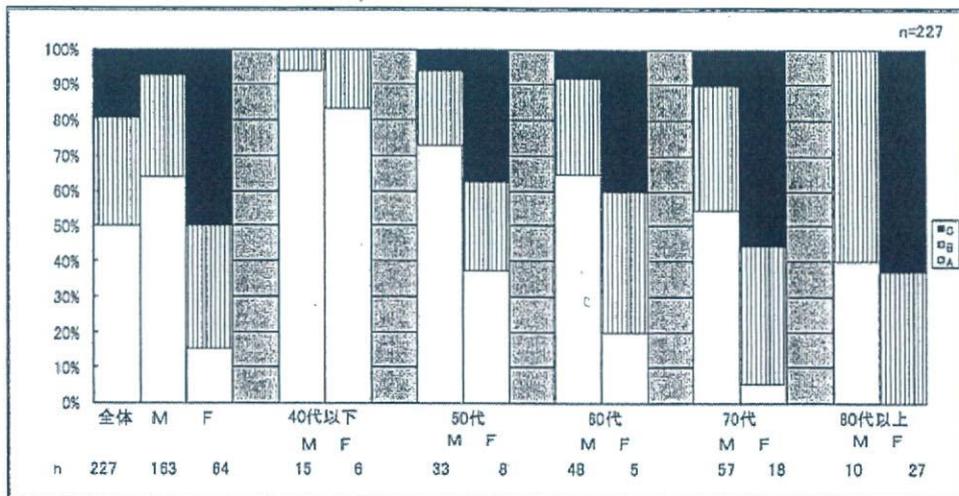


図 8. TC-CFI による年代別, 男女別頭蓋内血管描出状態

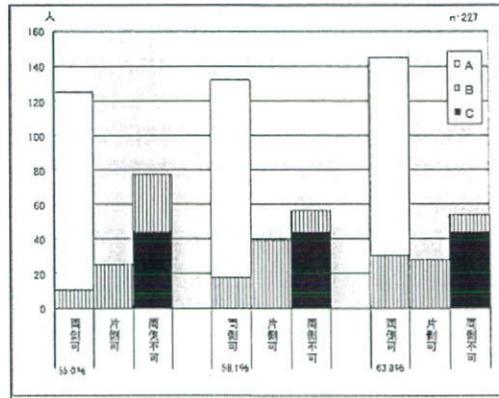


図 9. TC-CFI による血管別検出状態

厚生労働省科学研究費補助金(身体機能解析・補助・代替機器開発研究事業)
分担研究報告書

救急医療における急性脳梗塞の治療

分担研究者 小川武希 東京慈恵会医科大学救急医学講座主任教授

研究要旨

急性脳梗塞に対する血栓溶解剤(rt-PA)の使用が承認され、超急性期の脳梗塞患者について、良い治療成績が報告されている。しかし血栓溶解剤の適用は、発症から3時間以内という、限られた短い時間に行われなければならない、こうした治療法が広く普及し、日常化するための課題として、発症から治療までの時間を、関連する各分野でいかに短くできるか、があげられる。その課題と対策について、内外の文献資料・活動報告などから検討する。

A. 研究目的

急性虚血性脳卒中(Acute Ischemic Stroke)に対する血栓溶解剤 rt-PA が国内承認されその使用実績が上がるに伴い、救急医療体制の重要性があらためて見直されている。

rt-PA の適用により、急性脳梗塞における神経障害の程度を抑え転帰を改善できる可能性が高まったが、rt-PA の適用は発症後3時間に限定されていることから、このタイムウインドウにいかにして多くの該当患者に適切な治療ができるかが、重要となるからである。

rt-PA の治療により、血流再開通が早ければ早いほどその予後が良好となることから、本研究開発による経頭蓋超音波血栓溶解法が血栓溶解効果を促進し、再開通時間が短くなることが期待されているが、発症後3時間以内の治療という時間制約は容易には解消されないとと思われる。その意味で、早期発見、救急搬送体制、医療機関内救急体制等、あらゆる場面での救急に対する課題が存在する。

そこで、rt-PA が国内より早くから使用されていた米国での課題取り組み状況などを参考に、我が国における課題とその解決の

方向を検討する。

B. 研究方法

急性脳梗塞の救急治療に関わる課題とその解決策を検討するために、主として米国で発表されている急性脳梗塞治療に関する各種ガイドライン、論文、教育資料等を文献考察的に検討する。

C. 研究結果

(1)治療までの時間

血栓溶解療法は、急性脳梗塞における神経障害の程度をおさえ転帰を改善するが、その治療法を適用できる時間は限られている。脳卒中の治療においては、発症から、治療までの時間の短縮が重要で、関連する要素の頭文字を取った、7つのD がキーワードとなる。(図 1)

(a)救急部到着から治療までの時間

NINDS(National Institute of Neurological Disorders and Stroke)は、1996年の National Symposium on Rapid Identification and Treatment of Acute Stroke で、救急部に対する時間軸の管理目標として 救急部に着いてからの時間を指標に、患者の全身状態の

評価までを10分、脳卒中治療チームに伝達されるまで15分、CT(MRI)スキャン開始まで25分、CT診断完了まで45分、(血栓溶解)治療開始までの時間を60分としている。(図2、3)

しかしながら、1996年の時点で平均的にこの時間目標が達成されていたわけではなく、同じシンポジウムのなかで、実態として時間の平均値が、おおよそ次のように紹介されている。医師の診察を受けるまで 平均28分(救急車で来院した場合は20分、一般の車で来院した場合の平均は48分)、脳卒中患者が神経科医の診察を受けるまでの時間は123分、CTスキャンを受けるまでの時間は平均100分、この時間は、地域や、病院の規模などであまり大きな変化は無いとされている。

ただし、脳卒中チームを立ち上げた場合には、治療までの時間は大幅に短縮され、教育病院の場合で、139分が、50分になっている。(治療開始までの時間)

(b)発症から救急部までの時間

急性脳梗塞の治療では、救急部に到着してからの時間を短縮するだけでなく、発症から、救急部に到着するまでの時間も重要である。同じシンポジウムで、発症から6時間以内に救急部に来院した脳卒中患者の、発症から、病院到着までの平均時間は、115分で、これは救急車で来院したか、一般の車で来たかについての差は、みられない。

国内における類似のデータは、渉猟した範囲では見あたらなかったが、消防白書によれば、救急自動車による収容所要時間(救急事故または急病の覚知から、医療機関等に収容するまでに要した時間)は、全救急出動の平均値で32.0分である(平成18年データ)。前救急患者のうち、30分未満の収容割合は54%、60分未満では、94.7%と、ほぼ全数が、1時間以内に収容されている。悪化する交通事情等を考慮すれば、この時

間を大幅に短縮することは、かなり困難であると思われる。すると、問題は、発症した脳梗塞患者自身、あるいはその周辺にいる人が、脳梗塞を疑ってすぐに救急隊に出動を要請し、短い時間に適切な医療機関に搬送されるか、ということになる。

(2)時間短縮のための教育、訓練 その他の試作

(a)市民に対する教育活動

アメリカにおいては、市民に対する脳梗塞の知識普及活動が広く行われている。

NIH (National Institute of Health) はNINDSを通して、市民向けの脳卒中に関する教育資料を発行して、脳卒中とはどんな病気か、とか、どのような症状が現れるか、と脳卒中が疑われたら、すぐ救急車を呼びなさいといった知識の普及に努めている。また、多くの脳卒中センターが、それぞれ独自の市民向け冊子などを用意して知識の普及に努めている。市民は、こうした教育に協力する自分が勤務する企業を通して、また、直接インターネット等から、こうした冊子や、情報を容易に入手できる。こうした知識の普及にともなう、発症から、医療機関収容までの時間を短くすることが可能となりうる。

(b)病院前救急に関わる要員(救急隊員等)の教育訓練

救急搬送の患者に脳卒中が疑われる場合、呼吸・循環のサポート、必要に応じた酸素投与など、救命救急のための処置の他に、適当な観察評価により脳卒中兆候があるかどうか、またその程度はどうかなどを判断して医療機関に伝達する等の一連の行動をとることは、血栓溶解療法の治療効果を高める上で重要なことである。救急隊に対する教育訓練と共に、こうした行動のガイドラインや脳卒中評価ツールなどが用意されている。

AHAの救急ガイドラインの第9部 成人脳卒中に、「脳卒中認識の標準的な訓練により、パラメデックは、61~66%の感度で、脳卒

中患者を同定できる。脳卒中評価ツールを使う訓練を行った後には、脳卒中患者を同定する感度は、87%から97%に向上する。それゆえ全てのパラメドックと救急隊員は、CPSS(The Cincinnati Prehospital Stroke Scale) , LAPSS(Los Angeles Prehospital Stroke Screen)といった有効性が認められた簡略版の病院外スクリーニングツールを使って、脳卒中を認識する訓練を行うべきであると書かれている。

こうした流れの中で国内でも脳卒中病院前救護(PSLS:Prehospital Stroke Life Support)が日本臨床救急医学会、日本救急医学会、および日本神経救急学会共同の脳卒中病院前救護ガイドライン検討委員会(PSLS 委員会)の下で策定され、これに基づいた教育訓練が行われている。(図4)

(c)救急部門での教育訓練と時間短縮
急性虚血性脳梗塞にrt-PAを用いた、血栓溶解療法を行うために、日本脳卒中学会の実施する“tPA 適正使用のための講習会”の受講が求められている。こうした講習の他、患者本人や家族による症状の早期発見から、専門医による決定的治療のあいだを、よどみなく橋渡しのできる医療者の育成を目的とした、ISLSコース(Immediate Stroke Life Support)が開発され実施されている。(図5)
こうした教育訓練により脳卒中の診療の標準化が図られ、適切な治療と、時間の迅速化が期待されている。(図6)

救急部門は、多種の疾患、外傷の患者の治療を行う必要があるため、業務の標準化が難しいことも考えられ、脳卒中に特化した業務手順などを策定する必要もありうる。従って、こうした教育訓練によるだけでなく、ストローク(ケア)ユニットの設置・活動が業務の標準課を可能にし、結果としてアメリカのシンポジウムでも報告されているように、トータルの診療時間の短縮を来し、脳梗塞治療に効果的に働く。国内においても、脳卒中治療の

ガイドラインにストローク(ケア)ユニットの有効性があげられている。ストロークケアユニットは、救急搬送の収容医療機関をはっきりさせる意味においても有効であり、必要な地域に存在することで、患者の収容時間を短縮するのにも役立つ。

D. 考察

急性脳梗塞の血栓溶解療法は、有効であるが、治療適用には時間の制約があり、これ乗り越えて効果的な治療とするために、脳卒中の連鎖に示す7Dのあらゆる場面での時間短縮が求められる。NINDSの時間目標は、rt-PAの使用適用時間3時間という共通の制約を考えれば、国内においても、同等の時間目標とすることが必要である。病院内救急部門においては、脳卒中を念頭に置いた業務手順の策定が望まれ、血栓溶解効果の高い、本研究開発に基づく経頭蓋超音波血栓溶解装置の装備が、血流再開通までの時間を短縮し、神経障害などの軽減に更に大きな役割を果たすものと思われ、早期の実用化が期待される。また、脳卒中治療の業務標準化促進するためにもストローク(ケア)ユニットなどの整備が望まれる。またストロークケアユニットの設置は、救急搬送の収容医療機関を明確にすることから、必要な地域ごとに設置することにより、脳梗塞治療の効果が高まるものと期待される。こうしたことがらは、ストロークケアユニットなどを含む一定の条件を備えた急性期脳梗塞治療施設に、診療報酬の加筋を認めた、中央薬事審議会などの方向に沿ったものと思われる。

E. 結論

血栓溶解療法に必要な、診療の時間短縮は、米国においては、ガイドラインの整備、これに基づく教育訓練、および市民教育など、知識の普及と業務の標準化をすすめることで、脳梗塞発症から、治療開始までの時間が大幅に短縮され、血栓溶解療法の効果を高めている。

国内においても、こうし多方向の取り組みが種々行われているが、こうした活動がいつそう活発になることで、脳梗塞の血栓溶解療法の効果がより高まると思われる。

本研究に基づく経頭蓋超音波血栓溶解装置の実用化により、血栓溶解までの時間短縮が図れれば、神経障害などの後遺症の軽減が期待でき、より高い治療効果が期待される。

以上、米国の文献、資料を参照して、救急における急性脳梗塞の治療に関する課題と解決の方向をまとめた。

参考文献

1. Proceeding of a Natinal Symposium on Rapid Identification and Treatment of Acute Stroke NINDS:Dec, 12-13, 1996
2. AHA ECC guideline Part.9 Adult Stroke
3. AHA/ASA Guideline Guidelines for the Early Management of Adults With Ischemic Stroke
DOI:10.116/strokeaha.107.181486
4. Stroke Awareness Information about stroke from the Stanford Stroke enter

5. Stroke :hope Through Research NINDS

6. 脳卒中治療ガイドライン2004 脳卒中合同ガイドライン委員会 日本脳卒中学会、日本脳神経外科学会、日本神経学会、二品神経治療学会、日本リハビリテーション医学会

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1 脳卒中における 7Ds [AHA G2000]

病院前

- ① DETECTION 発見
- ② DISPATCH 救急車出動
- ③ DELIVERY 患者搬送
- ④ DOOR 患者到着 [救急室]

救急室

- ⑤ DATA 情報(CT, CBC, EKG etc)
- ⑥ DECISION 治療方針の決定
- ⑦ DRUGS 薬剤投与

NINDS-Recommended SROKE Evaluation Targets for Potential Fibrinolytic Candidates*

	Time Target
Door to doctor	10 Minutes
Door to CT completion	25 Minutes
Door to CT read	45 Minutes
Door to treatment	60 Minutes
Access to neurological expertise*	15 Minutes
Access to neurosurgical expertise*	2 Hours
Admission to monitored bed	3 Hours

**By phone or in person*

図2 NINDS の時間管理目標

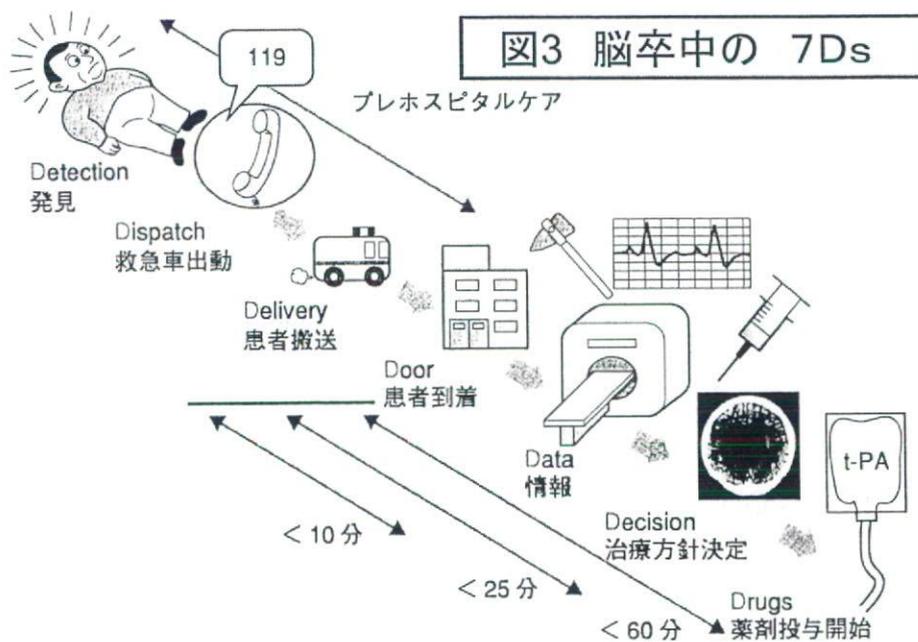


図4 PSLS :

**Prehospital Stroke Life Support
脳卒中病院前の救護**

日本臨床救急医学会
日本救急医学会
日本神経救急学会
共同

脳卒中病院前救護ガイドライン検討委員会
(PSLS 委員会)

脳卒中に対する病院前救護の体系化・標準化

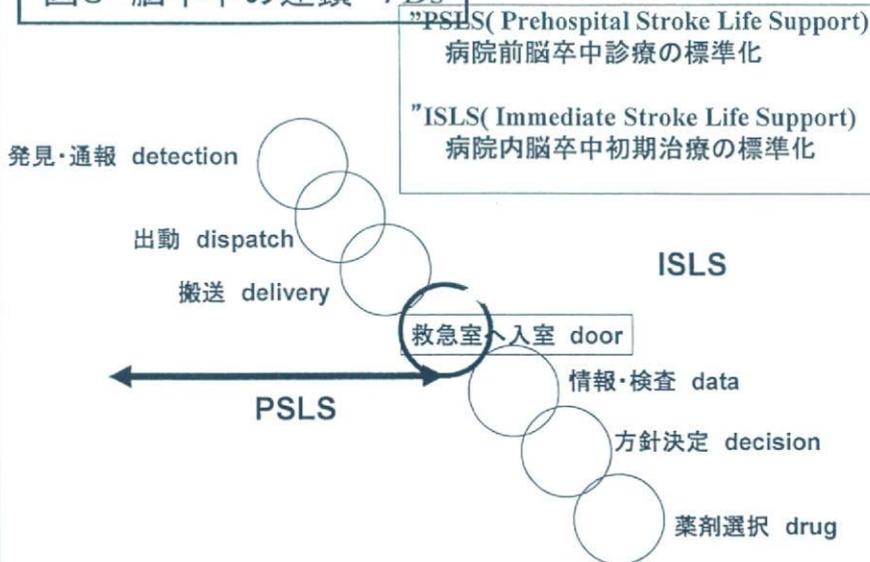
図5 ISLS : Immediate Stroke Life Support

脳卒中初期診療に対する一定の手順にもとづいて、
模擬患者や人形を用いたシミュレーション研修を通じて、

脳卒中初期診療に必要なスキルを身につける
トレーニングコース

このコースは、脳卒中専門医による治療に至るまでの脳卒中
初期診療についてのシミュレーション研修であり、日本脳卒
中学会の実施する”t-PA適正使用のための講習会”には該当
しません。

図6 脳卒中の連鎖 7Ds



分担研究報告書

研究課題：脳卒中易発性高血圧自然発症モデルラット脳における音響学的安全性の神経病理学的検討

分担研究者；福田隆浩（東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター
神経科学研究部神経病理学研究室講師）

研究協力者；水野聡子（東京女子医科大学神経内科助手）

小島依子（東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター ME 研究室研究員）

日向真子（東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター ME 研究室研究員）

研究要旨

今回、高血圧に伴う脳血管障害疾患のよい病態モデルである脳卒中易発性高血圧ラット（Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat, SHRSP）における低周波数超音波照射の安全限界を、病理組織学的に明らかにした。対象とした SHRSP および Wistar rat に種々の条件の低周波数超音波を照射し組織学的に検索した。皮質壊死が SHRSP の周波数 500kHz、強度 1.5 W/cm² 群と周波数 268kHz、強度 34-42W/cm² 群の超音波照射部位直下の脳皮質に存在。一方、Wistar rat には組織学的変化を認めず、低周波数超音波照射による SHRSP ラットの易傷害性が明らかとなった。Heat shock protein 70 (hsp70) 陽性細胞が、SHRSP の周波数 500kHz、強度 0.72 W/cm² 群 4.5%、周波数 500kHz、強度 1.0 W/cm² 群 8.0%、周波数 500kHz、強度 1.5 W/cm² 群 14.3%、周波数 297kHz、強度 0.7 W/cm² 群 13.0%、周波数 268kHz、強度 34-42 W/cm² 群 52.6% の症例に存在。強度が低ければ、中枢神経系組織への低周波数超音波の影響は低いことが示唆された。

目的

急性虚血性脳血管障害の治療の最終目標は閉塞血管の再開通である。組換え組織プラスミノゲンアクチベーター (rtPA) は有用であるが、効果は緩やかで再開通は不完全であり、副作用としての出血がある^{1 2 3 4}。また、使用できる症例は、発症から3時間以内という制限があり、自ずと適応症例数が少なくなる。それ故、rtPAの使用制限を改善させ、副作用の発症を押さえる補助的付加治療が必要とされている。超音波療法は、全身性の出血危険度が低く、照射部位に効果特異的であることから、補助的付加治療法として近年注目されている。しかし、高周波超音波 (2Mhz) では血栓融解効果は不十分であり、低周波数超音波 (1Mhz 未満) の経頭蓋照射では、頭蓋内出血や局所温度上昇、直接的組織障害などの問題が指摘されている^{5 6}。

これら低周波数超音波を用いた t-PA 併用脳血栓溶解法の医学生物学的危険因子の一つとして、脳梗塞症例が一般には中高年で、その脳血管系が動脈硬化等により脆弱化している可能性が考えられる。今回対象とする、脳卒中易発

性高血圧ラット (Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat, SHRSP) は、高血圧に伴う脳血管障害疾患のよい病態モデルとして使用されている。本研究の目的は、そのような病的原因や加齢に伴って動脈硬化が進行した脳における超音波照射に対する安全限界を、病理組織学的評価を持って明らかにすることである。特に、タンパク質分子が正しいフォールディングをして機能を獲得するのを助ける分子シャペロンである熱ショックタンパク質 (heat shock protein: hsp) の動態を、経頭蓋超音波照射脳において免疫組織化学的に検索し、細胞レベルでの低周波数超音波照射による中枢神経系へ与える影響を評価した。

対象と方法

SHRSP (雄、20-25 週齢) および Wistar rat (WR、雄、20-25 週齢) を対象とした。超音波条件は、正常対照群を Group 0 群 (SHRSP 26 頭、W 5 頭) とし、周波数 500kHz, 強度 0.5W/cm², continuous wave (CW)、照射時間 60 分を Group 1 群 (SHRSP 31 頭、W 10 頭)、周波数 500kHz, 強度 0.72W/cm²,

CW、照射時間60分をGroup 2群 (SHRSP 37頭)、周波数500kHz、強度1.0W/cm²、CW、照射時間60分をGroup 3群 (SHRSP 32頭)、周波数500kHz、強度1.5W/cm²、CW、照射時間60分をGroup 4群 (SHRSP 33頭、W 12頭)、周波数297kHz、強度0.7W/cm² (MI=0.3)、バースト波 (5% duty cycle, 100Hz PRF) 90分をGroup 5群 (SHRSP 30頭)、周波数268kHz、強度34-42W/cm² (MI=2.0)、バースト波 (10% duty cycle, 100Hz PRF) 60分をGroup 6群 (SHRSP 16頭、W 16頭) とした (Table 1)。CW照射群では、2分間超音波照射と30秒間の休止を4回繰り返した後5分間の休止を1クールとし、4クール行った。バースト波ではTRUMBI trialにおける超音波条件を模擬し、直径3mmの円形ピストン型プローブ4個をダイヤモンド状に側頭部表面に配し、患部に向け2個ずつの組み合わせで、順次4セット照射する方式で、1組の2個のプローブからは、周波数約300kHz、Burst Waveが発射され、pulse duration 0.5ms, pulse repetition frequency 100Hz、duty cycle 5%で、患部側のMCA

を焦点として発射された。これが順次4組から発射され、主要領域ではpulse durationが2msになり、duty cycleは20%になる。エーテル麻酔下、ラット右側頭蓋に照射24時間後に麻酔下経心的4%パラフォルムアルデヒド (PFA) 灌流固定を行い、脳を摘出した。4%PFAにて後固定し、パラフィン包埋後、3 μ m厚の組織切片において組織学的検索を行った。脳梗塞および脳出血の部位および性状を観察し、各超音波条件群の比較を行う。また、一次抗体 (4 $^{\circ}$ C、12時間) として、 α B-crystallin (X1000, clone: 1B6.1-3G4, Stressgen, BC, Canada), hsp27 (X500, clone: G3.1, Stressgen, BC, Canada), hsp32 (X500, Stressgen, BC, Canada), hsp40 (X1000, Stressgen, BC, Canada), hsp60 (X1000, clone: LK-1, Stressgen, BC, Canada), hsp70 (X1000, clone: C92F3A-5, Stressgen, BC, Canada), hsp90 (X1000, clone: 16F1, Stressgen, BC, Canada) に対する抗体および抗cox-2抗体 (X1000, Alexis Biochemicals, CA, USA)、抗Glut1抗体 (X1000, Chemicon International Inc, CA, USA) を用

	Frequency (kHz)	Wave	Duty cycle (%)	PRF (Hz)	Time (min)	Isppa (W/cm ²)	Ispta (W/cm ²)	MI	Numbers of SHRSP	Case number of hemorrhage		Case number of hemorrhage/ case number of infarction		
										Right	Left	Right	Left	
SHRSP	Group 0	489.6	C	100	-	60	0	0.000	26	3(11.2%)	2(7.7%)	10/14(71.4%)	17/18(94.4%)	
	Group 1	489.6	C	100	-	60	0.02	0.02	0.035	31	3(9.7%)	2(6.5%)	22/27(81.5%)	19/24(79.2%)
	Group 2	489.6	C	100	-	60	0.03	0.03	0.042	37	3(8.1%)	3(8.1%)	8/9(88.9%)	12/13(92.3%)
	Group 3	489.6	C	100	-	60	0.04	0.04	0.050	32	3(9.4%)	2(6.3%)	11/19(57.9%)	10/19(52.6%)
	Group 4	489.6	C	100	-	60	0.06	0.06	0.061	33	1(3.0%)	0(0%)	9/12(75.0%)	12/16(75.0%)
	Group 5	297.3	B	5	100	90	2.8	0.14	0.535	30	0(0%)	0(0%)	19/23(82.6%)	22/25(88.0%)
WRSP	Group 6	268.4	B	10	100	60	1.4	0.14	0.400	16	1(6.25%)	1(6.25%)	9/11(81.8%)	16/16(100%)
	Group 0	489.6	C	100	-	60	0	0	0.000	5	0(0%)	0(0%)	0/0	0/0
	Group 1	489.6	C	100	-	60	0.02	0.02	0.035	10	0(0%)	0(0%)	0/0	0/0
WRSP	Group 2	489.6	C	100	-	60	0.06	0.06	0.061	12	0(0%)	0(0%)	0/0	0/0
	Group 3	268.4	B	10	100	60	1.4	0.14	0.400	16	0(0%)	0(0%)	0/0	0/0

い、二次抗体（室温、1時間）には biotinylated anti-mouse IgG antibody (X500, vector lab. CA, USA), biotinylated anti-rabbit IgG antibody (X500, vector lab. CA, USA), biotinylated anti-rat IgG antibody (X500, vector lab. CA, USA) を使用し、ABC 法 (X500, 室温、1時間、ABC elute: vector lab. CA, USA) による免疫組織化学染色を行い、病変を観察・比較検討した。抗原賦活法として、0.01M クエン酸バッファーにおけるオートクレーブ処理 (121°C、10分) を行った。陰性コントロールとして、一次抗体を 5% ウシ血清アルブミン、0.01% Tween20、0.01M リン酸バッファー (pH7.4) に置き換え、免疫組織化学染色を行った。

結果

SHRSP ラットの脳梗塞発症率は週齢 20 (n=28) 71.4%、週齢 21

(n=25) 76.0%、週齢 22 (n=26) 69.2%、週齢 23 (n=24) 66.7%、週齢 24 (n=45) 64.4%、週齢 25 (n=44) 61.4%、脳出血発症率は週齢 20 (n=28) 53.6%、週齢 21 (n=25) 76.0%、週齢 22 (n=26) 65.2%、週齢 23 (n=24) 58.3%、週齢 24 (n=45) 55.6%、週齢 25 (n=44) 54.5% と週齢による有意差はなかった。

梗塞の発症頻度は右大脳半球で 56.2%、左大脳半球で 61.0%、出血に関しても右大脳半球で 44.6%、左大脳半球で 51.0% と有意差はなかった。各群において出血の頻度を比較すると、SHRSP Group 1 群にて右大脳半球の 81.8% で、左大脳半球の 57.6% と比較し高かった。同群では、梗塞発症率が右大脳半球 84.8% と左大脳半球 72.7% であり、他の群のそれらは右大脳半球 55.8% (29-100%) と左大脳半球 61.2% (43-85%) に比べ高かった。

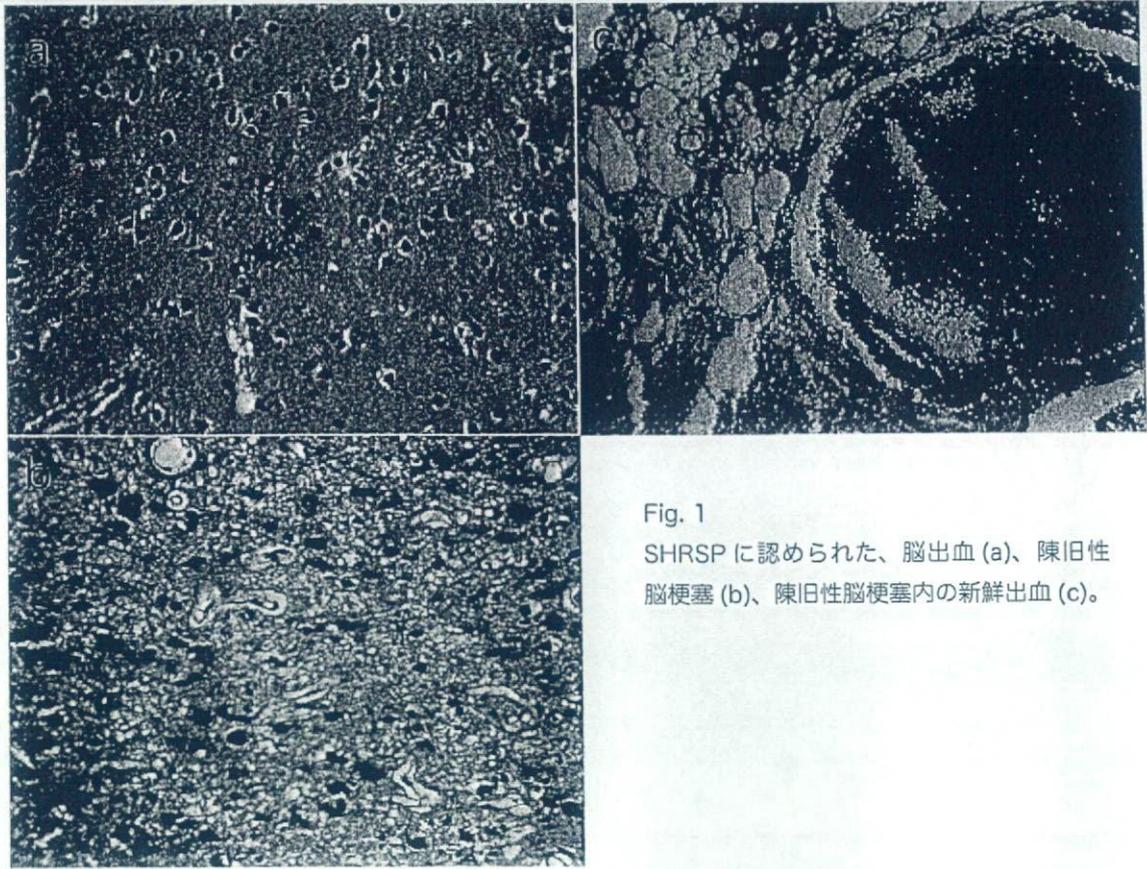


Fig. 1
SHRSP に認められた、脳出血 (a)、陳旧性
脳梗塞 (b)、陳旧性脳梗塞内の新鮮出血 (c)。

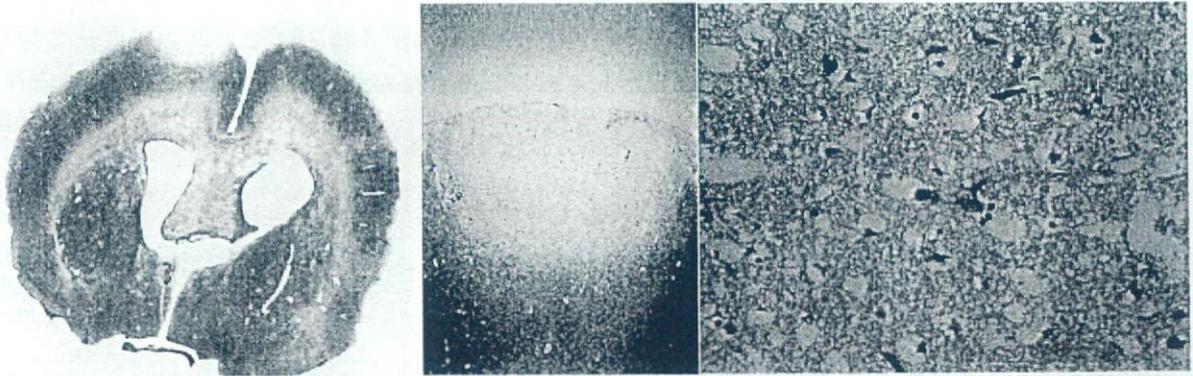


Fig. 2 SHRSP Group6 群に認められた右大脳半球表層の皮質壊死。左の HE 染色では染色性が低下し、腫大している。右の光顕像では細胞周囲腔の拡大と浮腫・染色性低下・出血・好中球浸潤を認めた。

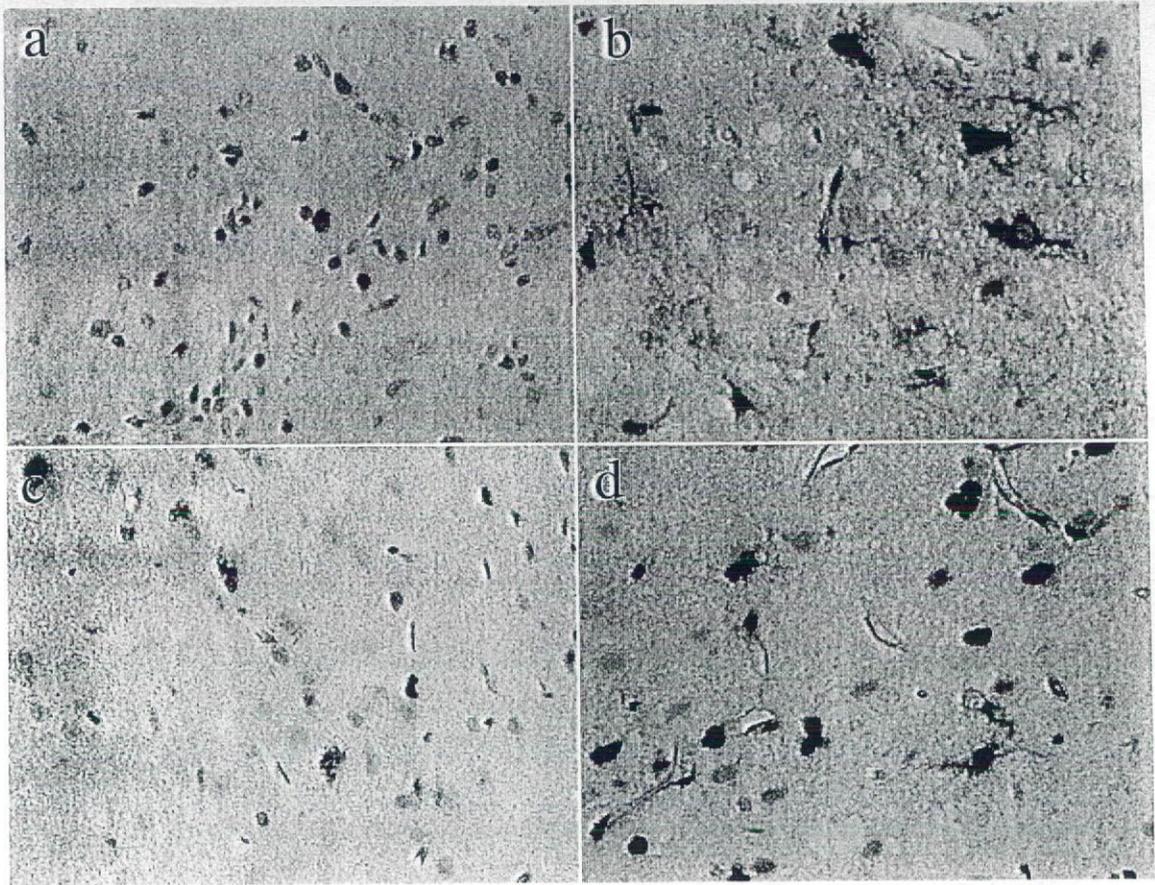


Fig. 3 SHRSP group 6群(d)では皮質壊死と正常組織との境界領域に、heat shock protein 70(hsp70)陽性の神経細胞、星状膠細胞、ミクログリアが多数存在した。SHRSP group 5群(c)およびSHRSP group 4群(b)では、皮質壊死の存在はないものの、hsp70陽性細胞は存在し、その局在は、右大脳半球皮質浅層の神経細胞、星状膠細胞、ミクログリアに認められた。SHRSP group 3群(a)では極少数のhsp70陽性細胞を認めた。hsp70免疫染色(X1000)。

皮質壊死 (Fig. 2) が SHRSP group 4 群の 33 例中 2 例 (6.1%)、SHRSP group 6 群の 16 例中 7 例 (43.8%) に存在した。いずれも右大脳半球皮質表層に浮腫・染色性低下・出血・好中球浸潤を組織学的に認めた。免疫組織化学的には、皮質壊死と正常組織との境界領域に、hsp70 (Fig. 3) および hsp40 陽性の神経細胞、星状膠細胞、ミクログリアが存在した。皮質壊死のない症例にも hsp70 陽性細胞は存在し、その局在は、右大脳半球皮質浅層の神経細胞、星状膠細胞、ミクログリアに認められた。各群において hsp70 陽性細胞症例数と陽性細胞数を比較すると、SHRSP group 0 群では 26 例中 0 例 (0%) と細胞数 0、SHRSP group 1 群では 25 例中 0 例 (0%) と細胞数 0、SHRSP group 2 群 22 例中 1 例 (4.5%) と細胞数 2.0 ± 0.0 、SHRSP group 3 群では 25 例中 2 例 (8.0%) と細胞数 8.0 ± 8.5 、SHRSP group 4 群では 21 例中 3 例 (14.3%) と細胞数 152.3 ± 63.4 、SHRSP group 5 群では 46 例中 6 例 (13.0%) と細胞数 37.2 ± 42.3 、SHRSP group 6 群では 19 例中 10 例 (52.6%) と細胞数 87.7 ± 88.1 であった。各群にお

いて、頭蓋内音響強度 I_{spta} の高い群ほど hsp70 陽性細胞症例数と hsp70 陽性細胞数は増加する傾向が見られた。SHRSP の 489.6kHz CW 照射群である Group 1-4 において、hsp70 陽性細胞症例率 (y) と頭蓋内音響強度 $I_{spta}(x)$ の相関は、 $y=352.86x-6.46$ (correlation coefficients, 1.00 $p=0.0049$ by t test) の一次関数式にほぼ一致し、hsp70 陽性細胞の出現する頭蓋内音響強度 I_{spta} の閾値は、 $0.018W/cm^2$ と推測される。hsp70 陽性細胞数 (y) と頭蓋内音響強度 $I_{spta}(x)$ の相関は、 $y=e(144.84x-3.68)$ (correlation coefficients, 0.99 $p=0.0095$ by t test) の指数関数式にほぼ一致した。

α B-crystallin, hsp27, hsp32, hsp60, hsp90 に対する抗体および抗 cox-2 抗体、抗 Glut1 抗体による免疫組織化学的検索では、各群において差を認めなかった。

Wistar ラット群では、いずれの超音波条件でも、組織学的変化を認めなかった。

考察

SHRSP は週齢 25 週以上であれば、ほぼ全例が脳梗塞あるいは脳

出血などの脳血管障害を発症し、寿命がほぼ40週齢と短命なラット種である⁷⁻⁹。今回対象としたSHRSP20週齢群、21週齢群、22週齢群、23週齢群、24週齢群、25週齢群の間に、脳梗塞発症率の有意な差は認められず、また、梗塞および出血の発症頻度は右大脳半球と左大脳半球で有意差はなかった。20-25週齢においては、週齢の差による脳血管障害の発生率の差を考慮する必要がないことを示している。

超音波条件を変えた各群において出血の頻度を比較すると、SHRSP group 1群にて右大脳半球に有意に出血が多かった理由の詳細は不明であるが、この群は他の群と比較し梗塞発症率が高く、また、梗塞が存在すれば梗塞内出血の合併が多いことが影響している可能性がある。

強度が0.5～数W/cm²の低周波数超音波照射により酵素的血栓融解を亢進させることが知られている。また、超音波は、rtPAの効果を最大20%増加させ、再開通率を30%から90%に増加させる。ラット塞栓モデルでは、rtPAのみの治療法に比べ0.6W/cm²の低周波数超音波併用により梗塞範

囲を減少させることが報告されている⁶。補助的付加治療法として低周波数超音波照射が近年注目されている所以である。一方、副作用に関しては、強度が1W/cm²までの超音波照射では、脳内出血や細胞障害、血管脳関門障害などの副作用は無いと考えられていたが¹⁰、その後、経頭蓋低周波(20kHz、持続波、20分、強度0.5-2.6W/cm²)照射によりWistarラット脳に浮腫を、経頭蓋低周波(20kHz、持続波、20分、強度1.1-2.6W/cm²)照射によりWistarラット脳に脳実質壊死を引き起こすことが報告された¹¹。今回の我々の結果では、皮質壊死がSHRSP group 4群とgroup 6群の超音波照射部位直下の大脳皮質に存在した。一方、Wistarラットには組織学的変化を認めず、低周波数超音波照射によるSHRSPラットの易傷害性が明らかとなった。SHRSPラットでは、高血圧による血管障害性中枢神経病変が存在することから、超音波照射による影響を受けやすいことが示唆される。ここで注目すべきは、皮質壊死が出現した群は周波数268kHz、強度34-42W/cm²(MI=2.0)、バースト波(10% duty cycle, 100Hz PRF)60分

を SHRSP group 6 群と周波数 500kHz, 強度 1.5W/cm², CW, 照射時間 60 分を SHRSP group 4 であり、mechanical index の低い、group 1, group 2, group 3, group 5 群には出現していない点である。これは、同じ低周波でも、条件の異なる超音波照射により、効果・副作用の程度が異なることを示している。そこで我々は、超音波の中枢神経系への影響をより詳細に判定するために分子シャペロンである hsp に注目をした。hsp の中で、分子量 70 ~ 80kD のグループを総称して hsp70 と呼ぶ。細胞の細胞質と核に存在するこれら分子シャペロンは、hsp40 と協同で、虚血、炎症などの細胞 stress 下での変性蛋白の凝集を防ぐと共にサイトカインの生合成などにも関係している。また、蛋白質生合成や、細胞内各オルガネラへの蛋白質輸送、エンドサイトーシス、アポトーシス抑制においても重要な役割を持っている¹²。通常、hsp70 は中枢神経系には免疫組織化学的に同定はされないが、今回、低周波数超音波照射 24 時間後の検索において、照射部位直下の脳皮質に hsp70 陽性細胞が存在する症例が存在した。皮質壊死の存在す

る症例では、皮質壊死と実質との境界部分に多数の hsp70 陽性細胞が存在し、一般組織学的検索では明らかな異常を認めていない症例においても、脳皮質浅層に hsp70 陽性細胞が存在した。これは、低周波数超音波により、中枢神経系の細胞に何かしらのストレスが加わっていることを示している。これまでの報告では、細胞壊死やアポトーシスを低周波数超音波の影響の指標としていたが^{10, 11}、hsp70 の検索により、壊死やアポトーシスに至る前段階での細胞への影響の有無を知ることが出来る。今回の結果では、hsp70 陽性細胞が、SHRSP group 2 群 4.5%、SHRSP group 3 群 8.3%、SHRSP group 4 群 12.5%、SHRSP group 5 群 18.5%、SHRSP group 6 群 68.8% の SHRSP 症例に存在した。SHRSP group 2 群、SHRSP group 3 群では、脳皮質浅層に少数の hsp70 陽性細胞が存在し、SHRSP group 4 群、SHRSP group 5 群そして SHRSP group 6 群の順に、hsp70 陽性細胞数が増加し、広範囲に分布した。これらことから、低周波数超音波において、その強度と hsp70 陽性細胞出現との間に相関があることが示