

transducer を用いた経頭蓋カラー
ドプラ検査による頭蓋内脳動脈評
価. 第 33 回日本脳卒中学会総会、
京都、2008 年 3 月 20-22 日

I. 知的財産権の出願・登録状況（予
定を含む）

1. 特許取得

特許申請および予定はなかつ
た。

2. 実用新案登録

登録申請および予定はなかつ
た。

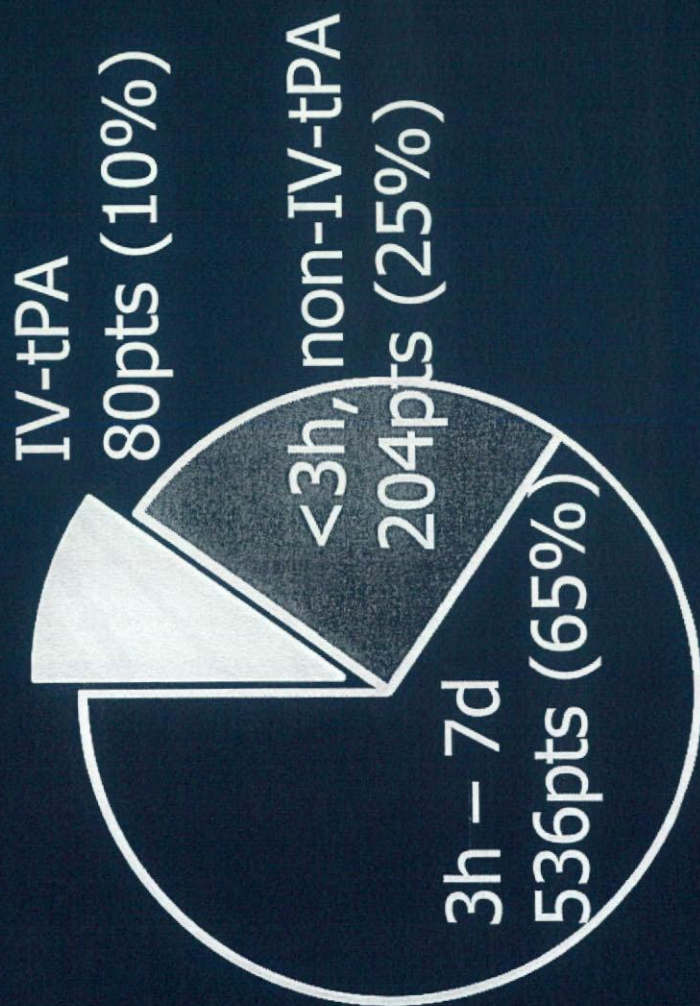
3. その他

特記事項はなかった。

図1. IV-tPA: NCVCでの治療患者

急性期脳梗塞/TIA

Oct '05 - Oct '07



背景因子

年齢	74y
男性	76%
HT	76%
DM	20%
SBP	160±35
DBP	85±19
血糖	133±50
Onset-to-Needle	138 min
心原性塞栓	61%
投与直前NIHSS	13 (4-28)



脳血管内科

図2.

IV-tPA: NIHSSの推移

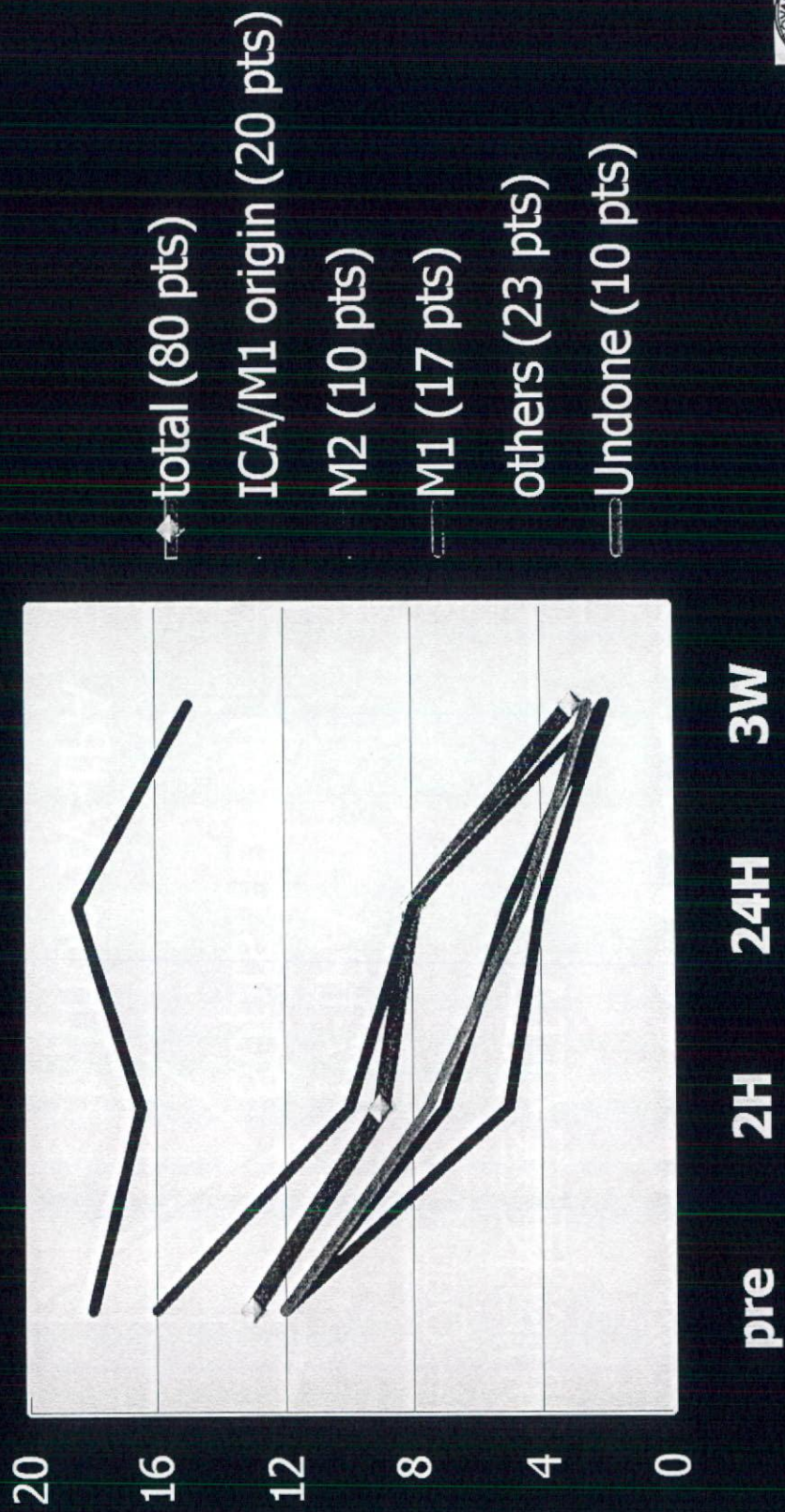


図3.

IV-tPA: 3M後のmRS

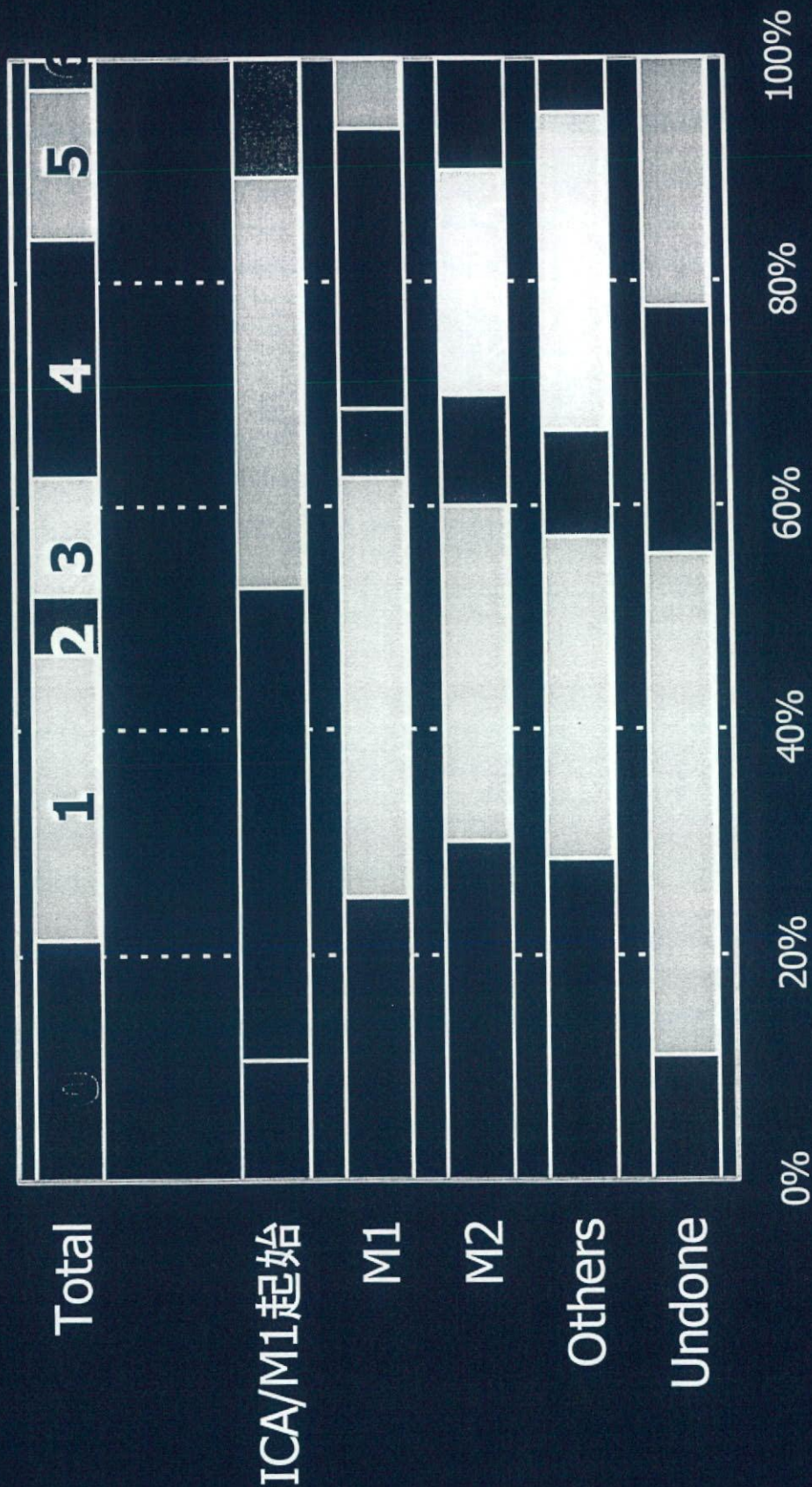


図4. 24h後の症状改善なし (Δ -NIHSS ≤ 4)

	OR	95% CI	P-value
年齢 (+1y)	1.03	0.94 - 1.12	0.562
男性	1.45	0.32 - 7.13	0.633
DM	7.45	1.75 - 39.7	0.010
Creatinine (+1 $\mu\text{mol/L}$)	1.03	1.00 - 1.06	0.052
ALT (+1 U/L)	0.95	0.89 - 1.01	0.117
現在の喫煙歴	3.84	0.94 - 17.2	0.066
心原性脳塞栓症	0.62	0.18 - 2.11	0.440
ICA/M1起始部閉塞	5.84	1.52 - 26.4	0.014



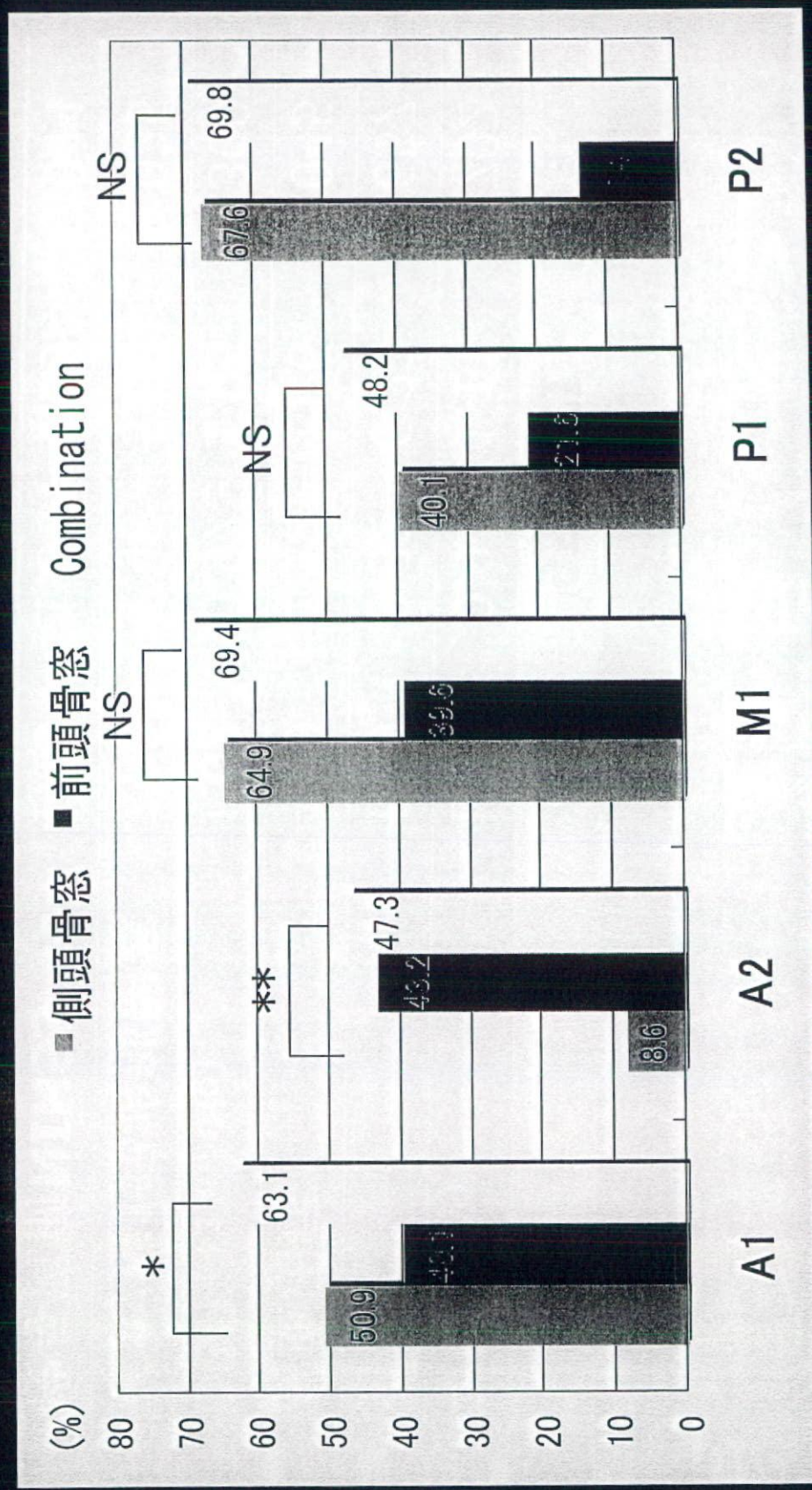
図5.

3M後の予後不良 (mRS \geq 2)

	OR	95% CI	P-value
年齢 (+1y)	1.02	0.94 - 1.11	0.702
男性	1.39	0.32 - 6.22	0.657
高血圧症	4.39	1.12 - 21.6	0.045
DBP (+1 mmHg)	1.02	0.97 - 1.05	0.300
ICA/M1起始部閉塞	7.00	1.48 - 52.0	0.025
投与直前NIHSS	1.13	1.01 - 1.29	0.044



図6. 各骨窓からの頭蓋内血管検出率比較



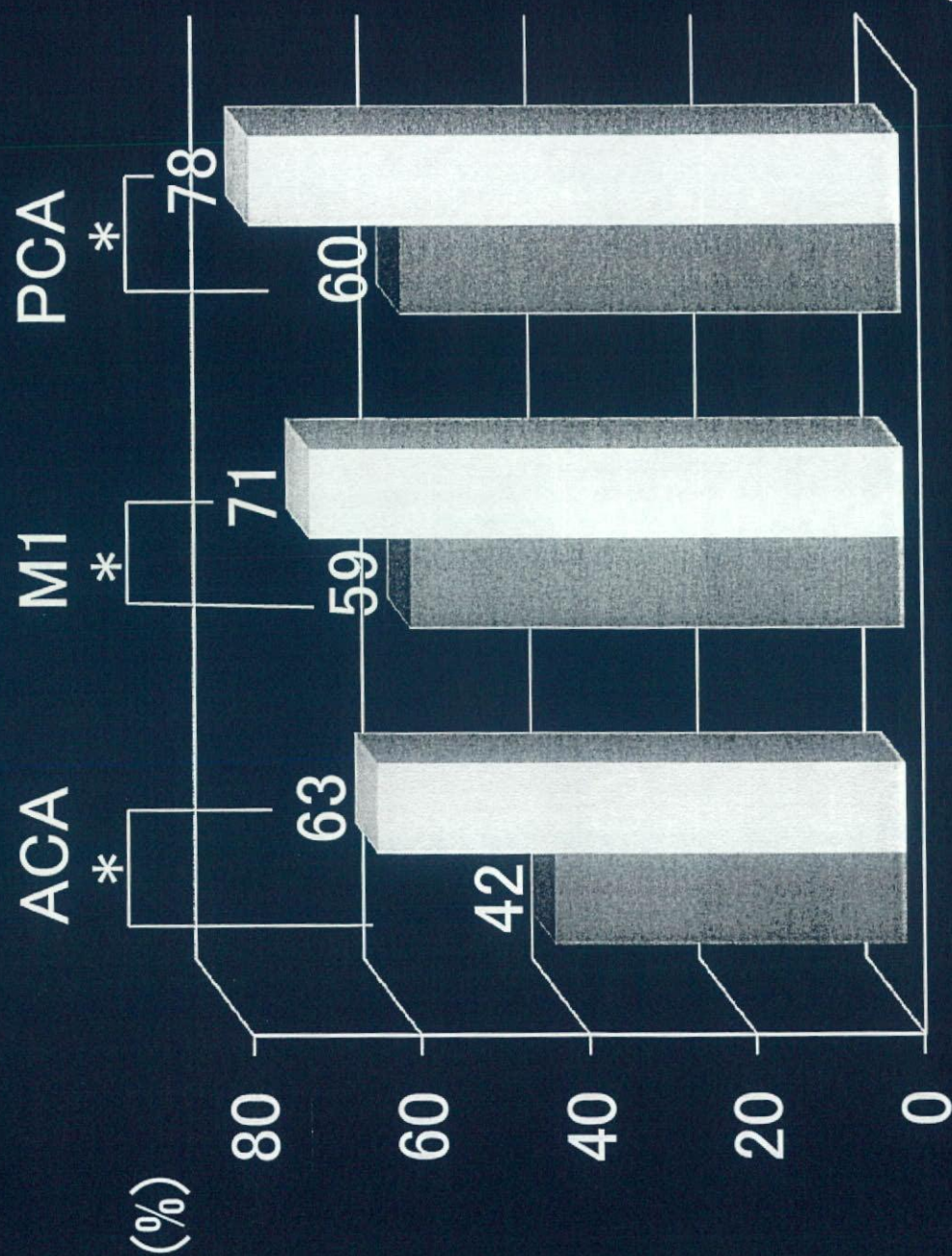
Combination:側頭骨窓もしくは前頭骨窓のいずれか

X² test
 * : P<0.05
 ** : P<0.0001



図7.

PWCT法と従来法の比較



* χ^2 test $p < 0.05$

■ 従来法 ■ PWCT法

n=120 n=100



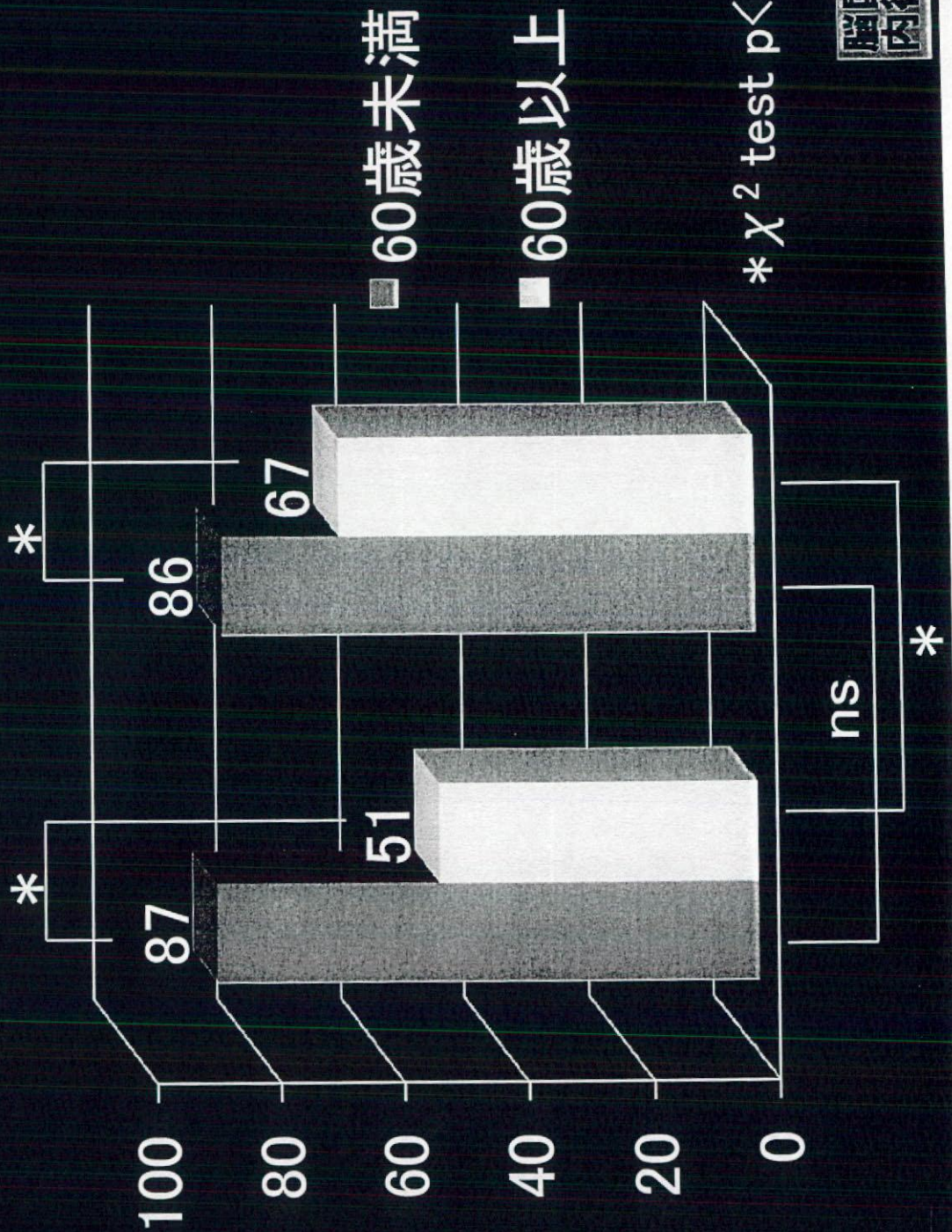
内循
国

図8.

年齢別のM1検出率の比較

従来法
n=120

PWCT法
n=100



霊長類動物での自家血血栓脳梗塞モデルによる超音波治療効果の評価

分担研究者

飯田秀博(国立循環器病センター研究所放射線医学部)

概要：霊長類動物における自家血血栓脳梗塞モデルにおいて超音波治療の評価を行った。評価項目は安全性（脳内出血）および有効性（脳梗塞体積）とした。5匹のカニクイザルを使用し全身麻酔下において脳梗塞モデルを作成し、rt-PA投与と同時に低周波連続超音波療法(LoFUT)を行いPET, MRIを用いた脳機能画像を得た。超音波の刺激条件はサルの頭蓋骨厚を考慮しヒトでのエネルギー条件と相同となるよう調整した。比較対照群として5匹の動物にrt-PA投与のみを行った。出血はMRIによるT2*強調画像により評価し梗塞巣の体積、虚血巣の体積をMRIによるT2強調画像およびPETによる脳血流・酸素代謝画像により評価した。T2*強調画像による点状出血と考えられる信号低下部位を、関心群(rt-PA+LoFUT併用治療)で3例、対照群(rt-PA単独治療)で2例に観察し明らかな有意差を認めなかった。点状出血部位は何れもPETで見る虚血巣内に限局し、虚血巣外の出血はいずれの個体にも見られなかった。また組織を圧迫するような実質性脳内出血も何れの個体にも見られなかった。梗塞巣の大きさは、絶対値とともに虚血巣に対する大きさの比により検討したが両群間には有意な差は見られなかった。超音波治療法に明らかな出血転化の促進作用は見られなかった。

研究協力者

林 拓也、寺本昇、渡部浩司(国立循環器病センター研究所放射線医学部)、佐藤博(同研究所先進診断機器開発室)

A. 研究目的

現在国際的に認められた脳梗塞の治療法はt-PAによる血栓溶解療法のみに限られる。しかしこのt-PAの使用条件に適応した症例は実際の急性期脳梗塞患者の10%以下にすぎず汎用性に乏しく、t-PAの適応を拡大できるように症例選択法の開発やt-PA治療法の改善は重要な課題である。経頭蓋超音波治療はt-PAと組み合わせて行う手法でt-PAの血栓溶解作用を増幅させる作用があると考えられておりt-PAの有効性、汎用性の向上に寄与することが期待される。

近年、実際に超音波治療法が脳梗塞治療に有効であるかの検討は臨床試験が複数行われておりそのうち幾つかの例では有効性が示唆されている。一方、独国で行われた非ランダム化前向き臨床試験(TRUBMI trial, Daffertshofer et al Stroke 2005)では脳内出血を誘発する可能性が示唆されたため本試験

が中断となり超音波治療の安全性向上のため照射条件(周波数、バースト or 連続性照射等)の改善の必要性が生じた。

古幡らは従来と異なる低周波、低音圧、連続波の刺激条件による超音波照射が脳組織への影響が少ないことを見出し小動物での実験においてその評価を進めてきた。脳卒中研究の分野では出来る限り臨床に近い状況で前臨床試験を行うことが推奨されヒトに近い霊長類動物での研究が重要視されている(Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, Stroke 1999)。国立循環器病センターではすでに霊長類動物の自家血血栓脳虚血モデルの作成(Kito et al. J Neurosci Methods, 2001)、脳虚血の評価法(迅速脳血流酸素代謝測定法, Kudomi et al, J Cereb Blood Flow Metab, 2005)の開発を行ってきた。

本分担研究では、循環器病センターにおける霊長類動物脳梗塞モデル評価系にて古幡らの低周波連続超音波治療法の安全性や有効性につき評価することを目的とした。

B. 研究方法

本研究のプライマリーエンドポイントを出血の

有無(T2*もしくは病理検索による)、セカンダリーエンドポイントとして梗塞巣の大きさ(絶対値、全脳比、虚血巣比)を設定した。10匹のカニクイザル(すべて雄性、体重 5-6kg)を用い自家血血栓塞栓による脳梗塞モデルを作成後、試験群(5匹)は超音波治療法と tPA 静注(US+tPA 群)、比較対照群(5匹)には tPA 静注のみ(tPA 群)を行った。本実験は、国立循環器病センター研究所実験動物委員会の承認を受けたうえで行った。

動物はケタミンとキシラジンにより麻酔導入後、プロポフォールと塩酸ベクロニウムによる持続静注による十分な麻酔下にて実験を行った。脳梗塞作成と治療実験の前までに MRI 装置(GE 3Tesla Signal Excite HD)を用い T1 強調画像、T2 強調画像、脳血管画像を撮像した。また実験前日に静脈より血液を採血した後、フィブリンとトロンピンを混入したのち PE チューブ内に注入し 24 時間 32 度培養器内に静置し血栓を作成した。

脳梗塞作成日には麻酔導入後、PET 装置(PCA-2000A)を用いて迅速脳血流酸素代謝測定(Kudomi et al, *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005)を行ったのち、血管撮影装置(GE, OEC9800)を用いた脳血管造影下にて 4F カテーテルを右内頸動脈に留置し右中大脳動脈が閉塞するまで上記で作成した血栓を注入した。血管閉塞直後から 30 分間の間に再度 PET による脳血流酸素代謝測定を行った。

また MRI 撮像を血管閉塞から 2 時間後、24 時間後に行い T1, T2, T2*強調画像、脳血管画像を撮像した。その間十分な持続麻酔により動物を管理した。また梗塞作成後から 1 時間毎に 21 時間後まで収縮期血圧、拡張期血圧、心拍数、直腸温を記録した。

脳血流酸素代謝の定量画像を PET データと動脈血中放射能濃度からを作成した。前後の PET 画像と他の全ての MRI 画像間は位置合わせを行った。また位置合わせを行った後に PET 定量画像(脳血流、脳酸素代謝、

酸素摂取率、脳血液量)を作成した。またこれらの画像の各画素値を予測子として当施設のもつ一般化線形モデルによるロジスティック回帰・脳梗塞予測式を用いた梗塞予測確率マップを作成し(図1)、確率 0.5 以上の領域を虚血巣としてその分布と体積を評価した。梗塞巣は 24 時間後の T2 強調画像を用いて信号強度の高い脳実質の部位の輪郭を抽出した。また出血巣の検出には、24 時間後の T2*強調画像を用い神経放射線科医の診断により出血を疑う T2*強調信号低下部位を同定した。出血巣の有無、出血があった場合にはその部位と虚血巣分布との関連性、梗塞巣の体積、梗塞巣の全脳体積比、虚血巣に対する梗塞体積比を両群間で比較した。

また各個体で梗塞予測能を算出し群間で比較することで梗塞予測に対する実梗塞形成の違いを両群間で比較できる。例えばある治療によって予測よりも小さな梗塞が出来た場合にはこの個体の予測能が低くなることになる。治療操作が異なる 2 群間でこの梗塞の予測能を比較することで治療操作の影響を推測できる。予測能の評価には梗塞予測確率と最終の梗塞画像を用いて受信者操作特性(ROC)解析を行った

解析には以下のソフトウェアを使用した:画像間の位置あわせには FSL(Functional MRI Software Library, Oxford University)、一般化線形モデリング・予測式の作成と ROC 解析には R(<http://www.r-project.org/>)、画像計算に pybld

(<http://homepage2.nifty.com/peco/pybld/pybld.html>)を用いた。

C. 研究成果

出血を疑う所見は試験群で 5 例中 3 例、比較対照群において 5 例中 2 例でありカイ二乗検定で有意差はなかった($p=0.5$)。また出血を疑う所見の部位は試験群では、基底核(2例)と前頭葉皮質(1例)、比較対照群では基底核(2例)と基底核部に多かった。ま

たこれらの部位はいずれも PET により予測された虚血領域の中に存在し虚血部以外の部位で出血を疑う所見は見られなかった(図1)。

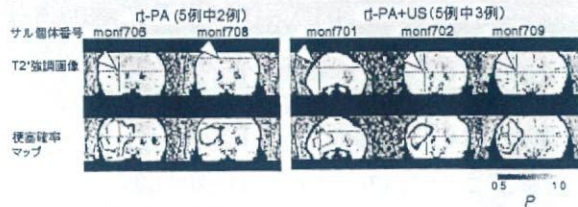


図1. T2*強調画像による出血を疑う所見を見た部位と虚血部位との関係(脳冠状断)。上段に T2*強調画像、下段に T2*強調画像上に重ねあわせした梗塞予測マップ(確率 0.5 以上)を示す。T2*強調画像上の出血(矢頭)は何れも梗塞予測マップ内に位置し、周辺組織への圧迫所見なく点状出血が疑われた。左側に対照群(tPA)の2例、右側に試験群(tPA+US)の3例を示す。

梗塞の体積は、T2 強調画像で見た結果、両群で差は見られなかった(Student T 検定、 $T_9=0.45$, $p=0.7$, 図2)。PET で評価する虚血巣(虚血確率 0.5 以上の部位)の体積、虚血巣に対する梗塞巣の比も両群で有意差が見られなかった(Student T 検定、 $T_9=0.56$, $p=0.58$, $T=1.7$, $p=0.11$)。また梗塞の分布は、両群とも右中大脳動脈領域の皮質下領域の梗塞巣に分布が多かったが両群間に明らかな差は認めなかった(図4)。

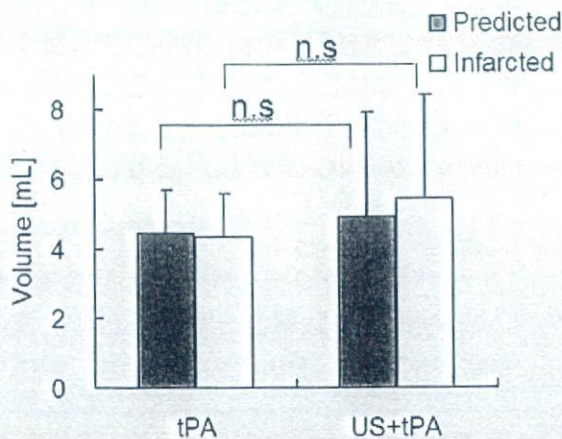


図2. 梗塞予測 (Predicted)と梗塞

(Infarcted)の体積。それぞれ両群間に有意差を認めなかった。B)

また梗塞巣予測能については ROC 解析による ROC カーブ下の面積(AUC)、最大特異度+感度カットオフ値について両群間で比較をしたが、予測能に有意な差を認めなかった(図4)。両群とも同程度の予測能で梗塞が形成されたということを示し、治療操作の違いによって梗塞形成確率に変化がなかったことを示す。

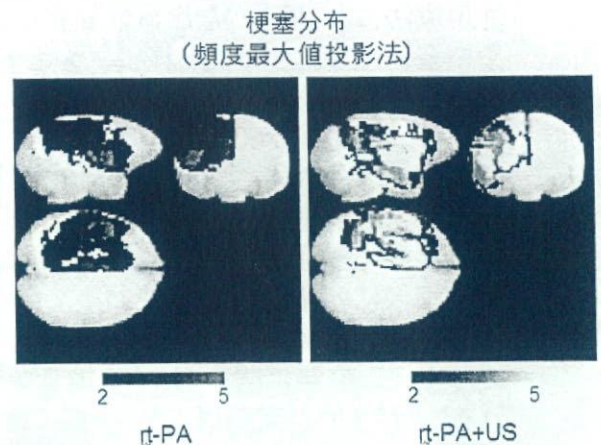


図3. 梗塞部位のヒストグラムの最大値表示。試験群(rt-PA)、試験群(rt-PA+US)ともに梗塞分布に変動は見られるが両群ともに中大脳動脈域とくに皮質下領域を中心とする梗塞を認め群間に大きな差は見られない。

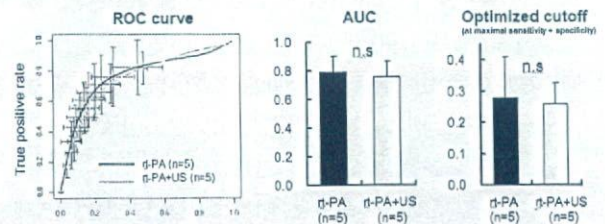


図4. 梗塞予測法の診断能。左)ROC 曲線。中)AUC、右)最大特異度+感度カットオフ値。何れも両群間に差は見られなかった。

なお実験経過中の動物の心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧、直腸温は、群を要因とする反復測定分散分析を行ったところ時間経

過に対する群の作用(反復測定と群の交互作用)は心拍数のみ統計学的有意差を認めた(心拍数 $F_{21,126}=1.7$, $p=0.03$)が、その他の項目は有意差を認めず(拡張期血圧 $F_{21,126}=0.2$, $p=1.0$ 、拡張期血圧 $F_{21,126}=0.36$, $p=1.0$ 、直腸温: $F_{21,126}=0.81$, $p=0.7$)、両群間に生理学的状態の大差はないと考えた。

D. 考察

今回の霊長類動物脳梗塞モデル 10 匹での検討では、低周波連続超音波と tPA 注入併用療法による明らかな出血性転化の促進や梗塞体積の縮小は見られなかった。MRI の T2*強調画像で出血所見を伴った個体の比率は、試験群で 60%、比較対照群で 40% であり少ない観察数であるが有意な差は認めなかった。比較対照群においても比較的高い出血率を呈していたがこれは MRI T2*強調画像により出血の検出を行ったためと考えられる。通常急性期脳梗塞の臨床診断では出血の有無に関しては CT 検査が使われることが多いが高磁場 MRI 装置であれば出血の検出率は CT を上回ると考えられている。実際、TRUMBI 試験でも MRI による T2*強調画像が出血の検出に使われており、比較対照群(tPA 治療)において今回の検討と同じく約 40%の割合(12 例中 5 例)で出血を疑う症例が見られた。

一方 TRUMBI 試験の試験群では 14 例中 13 例(約 90%)で出血巣を疑う症例があったが、今回の霊長類動物での検討では 60%(5 例中 3 例)と比較的少ない傾向であった。(同じ霊長類、同じ出血検出法での検討ということで統計処理を行うと)TRUMBI 試験と今回の試験の超音波群出血率に差がある傾向を示した(カイ二乗検定、 $p=0.1$)。さらに出血の内訳を見ると点状出血は TRUMBI 試験で 14 例中 9 例(群全体の約 60%)、現検討では 5 例中 3 例(群全体の 60%)で比率に大差がなかったのに対し、実質性出血が前者で 4 例(同約 30%)、今回の試験は一例も発

生しなかった(カイ二乗検定 $p=0.16$)。また TRUMBI 試験で点状出血をきたした症例は試験群・対照群ともすべて無症候性であった。今回の試験が TRUMBI 試験と同率の点状出血を呈したにも関わらず実質性出血を見なかったこと、臨床的に問題となる症候性出血の多くは実質性出血と考えられること、を考慮すると、今回の刺激条件が比較的安全性の高いものであることを示唆する重要な成果と考えられる。

今回、当施設の梗塞予測確率マップ作成法を初めて応用し、虚血巣を画像化したことで出血巣との空間分布上の関連性が明らかになった。今回の検討では両群いずれの出血も梗塞確率 0.5 以上の虚血巣領域内に位置した。病理学的には梗塞巣内に点状出血を見ることは tPA の投与と関係なく、脳梗塞の急性期～亜急性期の一般所見として知られる。出血の部位の点から見ても今回対照・試験両群でほぼ同比率の虚血巣内点状出血があったのは、通常脳梗塞で生じる出血性変化の範囲内とも考えられる。これに対し TRUMBI 試験では、虚血巣外に実質性(かつ症候性の)出血を生じた症例が存在したのと対照的である。

また脳梗塞の体積には両群間で有意差はなく超音波併用治療群でより縮小化する傾向も見られなかった。今回用いた梗塞モデルにおける梗塞巣の変動が比較的大きいことを考慮すると陰性結果は観察数が少ないことに依ると想定される。今後の研究の進展や周辺状況にも依るが、少なくとも霊長類動物実験で有効性を示すより再現性高いモデルの開発やより多くの観察数が必要と思われる。

E. 結論

少ない観察数であるが今回の霊長類動物による検討は、低周波、低音圧、連続波の超音波照射療法に明らかな出血転化の増幅作用がないことを示唆した。有効性の観察にはより再現性高い方法の選択が必要と考えられ

た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文、総説

1. Kudomi N, Watabe H, Hayashi T, Iida H. Separation of input function for rapid measurement of quantitative CMRO2 and CBF in a single PET scan with a dual tracer administration method. *Phys Med Biol* 52(7):1893-1908, 2007
2. Shimamura M, Sato N, Sata M, Kurinami H, Takeuchi D, Wakayama K, Hayashi T, Iida H, Morishita R. Delayed Postischemic Treatment With Fluvastatin Improved Cognitive Impairment After Stroke in Rats. *Stroke* 38(12):3251-3258, 2007
3. 佐藤 博司, 稲垣 正司, 林 拓也, 飯田 秀博. 目でみるページ・検査-diffusion MRI-. *CARDIAC PRACTICE*:201-204, 2007
4. 飯田 秀博, 渡部 浩司, 赤松 哲哉, 中澤 真弓, 松原 圭亮, 竹内 朝子, 岩田 倫明, 林 拓也, 横田 千晶, 福島 和人, 福本 真司. SPECTを使った脳機能画像の定量化と標準化. *脳神経外科ジャーナル* 16 (10):742-752, 2007
5. 林 拓也. ヒトの脳皮質基底核連絡線維. *Clinical Neuroscience* 25 (1):28-33, 2007
6. 林 拓也. 脳基底核と皮質の神経線維結合—拡散強調画像による検討. *臨床神経学* 47(11), 838-840
7. Iida Hidehiro, Eberl Stefan, Kim Kyeong-Min, Tamura Yoshikazu, Ono Yukihiko, Nakazawa Mayumi, Sohlberg Antti, Zeniya Tsutomu, Hayashi Takuya, Watabe Hiroshi.

Absolute quantitation of myocardial blood flow with 201Tl and dynamic SPECT in canine: optimisation and validation of kinetic modelling. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.*, 2008

2. 書籍

なし

3. 学会発表

1. 林 拓也. 脳皮質・基底核間の線維連絡拡散テンソル・拡散神経束追跡法(DT法)による解明. *日本神経学会*, 名古屋, 2007 16-May
2. Iida H, Kudomi N, Hayashi T, Inomata T, Miyake Y, Ohota Y, Teramoto N, Koshino K, Piao R. Adequacy of dual administration of 15O2 and H215O for rapid and accurate assessment of CBF and CMRO2. *Brain07/BrainPET07*, Osaka, Japan, 2007 20-24 May
3. Koshino K, Watabe H, Yamamoto A, Sato H, Ose T, Hikake M, Teramoto N, Hayashi T, Iida H. APPLICATION OF HARDWARE-BASED MULTIMODAL REGISTRATION SYSTEM TO FUSION OF PET AND MRI IMAGES. *Brain07/BrainPET07*, Osaka, Japan., 2007 20-24 May
4. Watabe H, Hayashi T, Ohta Y, Teramoto N, Miyake Y, Kurokawa M, Yamamoto A, Ose Y, Ikoma Y, Iida H. DEVELOPMENT OF REFERENCE TISSUE METHOD FOR MULTIPLE INJECTIONS OF [C-11]RACLOPRIDE. *Brain and BrainPET'07*, Osaka., 2007
5. Zeniya T, Watabe H, Ose T, Hayashi T, Teramoto N, Myojin K, Taguchi A, Sato H, Yamamoto A, Sohlberg A, Inomata T, Iida H. Absolute quantitation of regional cerebral blood flow in mouse using 123I-iodoamphetamine and pinhole SPECT. *Brain'07 & BrainPET'07*, Osaka., 2007

- 20-24 May
6. 林 拓也. 線条体と大脳皮質の線維連絡—サルとヒトの対応. 第31回関東臨床神経生理研究会, 東京, 2007 26 May
 7. Hayashi T, Ko Ji Hyum, Strafella A, Pike B, Dagher A. A role of dorsolateral prefrontal cortex in drug-cue induced neural response - A combined fMRI/rTMS study. 13th Annual Meeting of Human Brain Mapping, Chicago, USA, 2007 10-14 Jun
 8. Yamauchi M, Hayashi T, Yamamoto A, Sato H, Iida H. Neural mechanism of melody perception: An fMRI study. 13th Annual Meeting of Human Brain Mapping, Chicago, USA, 2007 10-14 Jun
 9. 銭谷 勉, 渡部 浩司, 猪股 亨, 青井利行, キム キョンミン, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, Sohlberg Antti, 久保 敦子, 林 拓也, 工藤 博幸, 増野 博幸, 山本 誠一, 中澤 真弓, 山道 芳彦, 飯田 秀博. ピンホールSPECTを用いた小動物イメージング. ジョイントセミナー, 国立循環器病センター研究所新館講堂, 2007 10 July
 10. 飯田 秀博, 林 拓也, 渡部 浩司, 三宅 義徳, 寺本 昇, 永沼 雅基, 横田 千晶, 上原 敏志, 森脇 博, 武信 洋平, 成富 博章, 峰松 一夫. 15Oガスを用いた迅速PET定量法. 第23回BFIC, 神戸ポートピアホテル, 2007 22 Sep
 11. 佐藤 博司, 林 拓也, 川畑 義彦, 中島 巖, 圓見 純一郎, 山本 明秀, 飯田 秀博. 小型高信号雑音化8ch Phased Array Coilの開発. 第35回日本磁気共鳴医学大会, 神戸ポートピアホテル, 2007 27-29 Sep 2007
 12. 越野 一博, 渡部 浩司, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, 山本 明秀, 樋掛 正明, 福田 肇, 大田 洋一郎, 佐藤 博司, 林 拓也, 飯田 秀博. 光学式マルチモダリティ画像位置合わせシステムの動物実験における有効性. 第47回日本核医学会学術総会, 仙台国際センター, 2007 4-6 Nov
 13. 岩西 雄大, 渡部 浩司, 林 拓也, 湊小太郎, 飯田 秀博. DARG法における残存15O-CO放射能の影響評価と検査時間短縮に関する研究. 第47回日本核医学会学術総会, 仙台国際センター, 2007 4-6 Nov
 14. 銭谷 勉, 渡部 浩司, 林 拓也, 合瀬 恭幸, 明神 和紀, 田口 明彦, 寺本 昇, 猪股 亨, 山道 芳弘, 飯田 秀博. ピンホールSPECTと123I-IMPを用いたマウス局所脳血流定量測定. 第47回日本核医学会学術総会, 仙台国際センター, 2007 4-6 Nov
 15. 林 拓也. PET研究の実際-神経科学・病態把握から治療開発まで. 理研分子イメージングセミナー, 神戸, 2007 19-Dec
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金

(医療機器開発推進研究事業：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

サル脳梗塞モデルの作製と血液凝血学的検討に関する研究

分担研究者	寺本 昇	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
研究協力者	飯田秀博	国立循環器病センター研究所	放射線医学部部長
研究協力者	渡部浩司	国立循環器病センター研究所	放射線医学部室長
研究協力者	林 拓也	国立循環器病センター研究所	放射線医学部室長
研究協力者	越野一博	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
研究協力者	合瀬恭幸	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
研究協力者	山本明秀	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
研究協力者	樋掛正明	国立循環器病センター研究所	放射線医学部
研究協力者	福田 肇	国立循環器病センター研究所	放射線医学部

研究要旨：

経頭蓋超音波脳血栓溶解療法は、急性期脳梗塞においてtPA等の血栓溶解剤との併用により、その溶解性が高まるということで治療法として期待されている。しかしながら、海外において同様の経頭蓋US併用脳血栓溶解療法の臨床試験で、頭蓋内出血の増加が観察され、本溶解療法においてもその危険性が危惧される。

今回、経頭蓋超音波脳血栓溶解療法(TCT-LoFUT)の安全性試験実施のため、カニクイザルを用いて本治療法の適応領域であるM1-M2自家血栓塞栓脳梗塞モデルの作製とその塞栓物として使用する自家血栓塞栓の作製について検討・実施した。

塞栓物は、自家凝血塊を用い、注入した際、自己溶出による再開通を防ぐ目的で、溶出性の低い、強固な凝血塊の作成・検討を行った。その結果、血液にフィブリン溶液0.1 mL (40 mg/mL)、トロンビン溶液0.1 mL (100 IU/mL)を加えて計1 mLとして均一に混合することで良好な凝血塊の作成が可能であると思われた。

急性脳梗塞モデルの作製は、8~11才齢の雄性カニクイザル10頭(体重 6.7 ± 0.5 kg)を用い、被験群(tPA+TCT-LoFUT併用)5例、対照群(tPA単独)5例の2群構成で行った。モデル作製の具体的な手法は、当研究室で開発した低侵襲的方法により高解像度脳血管撮影装置撮像下に4Frの脳血管撮影用カテーテルを左大腿動脈に留置した5Frシースより導入、右内頸動脈(r-ICA)遠位部にカテーテル先端を誘導し、直径約1mm、長さ3cm~5cmの長軸凝血塊をM1の閉塞が確認されるまで適宜注入した。

結果、血管閉塞領域はMRA画像から得られた血液凝血塊注入後の塞栓部位は、被験群ではr-M1 proximal~M1部 3例、r-ICA terminal~M1部 1例、r-M2,1-M1,ACA部 1例であった。また、対照群ではr-M1 proximal ~M1 3例、r-ICA terminal~M1部2例であった。また、血管閉塞による虚血状態の確認を、閉塞直後のPET画像より確認した結果、程度の差はあるものの全例で閉塞部のr-MCA領域で虚血の程度を反映するといわれているCBFおよびCMRO₂の明らかな低下が観察された。また、24時間後のT2強調MRI撮像においても全例にr-M1領域を主とする梗塞が観察され、MRI画像で得られた梗塞層のサイズは、塞栓直後のPET定量画像で得られた体積と全例ほぼ同程度の結果であった。

なお、被験群および対照群の梗塞の大きさの比較を行った結果、有意な差は認められなかった。

以上のことから、本モデル作製法は今回の実験手法において塞栓部のバラツキおよび梗塞の程度に差は認められたものの全例に梗塞が認められ、病態モデルに対する経頭蓋超音波脳血栓溶解療法(TCT-LoFUT)の出血の誘発に対する安全性試験の目的は、達成できたものと考えられる。

A. 研究目的

経頭蓋超音波脳血栓溶解療法は、中大脳動脈主幹部閉塞による急性期脳梗塞を対象として、tPA等の血栓溶解剤との併用により、その溶解性が高まるということで治療法として期待されている。しかしながら、海外において同様の経頭蓋US併用脳血栓溶解療法の臨床試験で、頭蓋内出血の増加が観察され、本溶解療法においてもその危険性が危惧される。古幡らはこの不具合事象の原因を神経超音波学的に解明し、安全で有効な超音波条件について小動物等を用いて検討を行い安全性の高い新たな経頭蓋超音波脳血栓溶解法(TCT-LoFUT)の開発を進めてきた。これまで本治療法の安全性については健康の霊長類(カニクイザル)を用いての検証を終了している。

そこで今回、本治療法の急性期脳梗塞病態における出血の可能性に対する安全性を確認する目的で、カニクイザルを用いて本治療法の適応領域である右側中大脳動脈主幹部(r-M1)の自家血塞栓脳梗塞モデルの作製とその塞栓物として使用する自家血塞栓の作製について検討・実施した。

B. 研究方法

1) 塞栓物の作製

塞栓物は、臨床病態を反映させるために自家血凝血塊を用いた。自家血凝血塊は血管内に注入した際、自己溶出による再開通を防ぐ目的で、溶出性の低い、強固な凝血塊の作成・検討を行った。

実際には、カニクイザルをケタミン20mg/kgおよびキシラジン2mg/kgの混液筋肉内注射による前麻酔下に正中尾動脈より動脈血を3mL採取し、血液そのもの、フィブリン液加血液、トロンビン液加血液およびフィブリン液加血液+トロンビン液加血液の混液の4条件の血液を調整・準備し、それぞれ所定のチューブ内に封入した。

なお、フィブリンおよびトロンビン液の濃度は、それぞれ40mg/mL、100IU/mLにとし、血液4に対し1の割合でそれぞれ2mLのシリンジにて混液調整した。また、フィブリン液加血液+トロンビン液加血液の混液は、フィブリン液加血液シリンジとトロンビン液加血液シリンジ

を専用固定器にセットして同スピードでチューブ内に注入し、封入した。各調整血液を封入したチューブは、37°Cの温度保温装置内で静置させた。そして、静置して3時間後に各凝血塊の程度を直径、均一性、壊れ易さおよび血液溶出について検討を行った。

2) 脳梗塞モデルの作製

モデルの作製には、8~11才齢の雄性カニクイザル10頭(体重 6.7 ± 0.5 kg)を用い、被験群(tPA+TCT-LoFUT併用)5例、対照群(tPA単独)5例の2群構成で行った。

モデル作製のための処置として、カニクイザルをケタミン20mg/kg+キシラジン2mg/kgの混液の筋肉内投与による前麻酔後、咽喉に8%キシロカインスプレーを噴霧し、気管挿管の際の刺激に対する反射を消失させた後、5Frのカフ付き気管チューブを挿管し、気道を確保した。次いで、予め三方活栓と25cmエクステンションチューブを取り付けた22G留置針外筒を右前肢副臍側皮静脈、左側後肢伏在静脈および、腹側正中尾動脈に留置した。確保した静脈および動脈は、それぞれプロポフォル(4mg/kg/hr)+臭化ベクロニウム(0.05mg/kg/hr)による持続麻酔用、PET撮像の際のRI標識化合物投与用および、血圧・心拍数モニターと血ガス測定用の採血用に使用した。また、左大腿動脈に5Frシースを挿入・留置し、血中放射能濃度モニターのための動脈血持続採血用および、脳血管造影ならびに塞栓物(自家血血栓)注入カテーテル挿入用に使用した。血管確保後、動物は、PET装置(ECAT ACCEL)のベッド上に固定し、人工呼吸器(Drager, Inc, Lubeck, Germany)により、酸素25:窒素75%の割合で、Stroke volume 15~20mL/kg/Stroke, Stroke数 8~15/minで呼吸維持・管理を行った。血圧・心拍数の測定は、大腿動脈または腹側正中尾動脈に留置されたカテーテルの他端に圧トランスデューサー(日本光電社製:ライフキッドDX360)に接続し、血圧測定用アンプ(日本光電社製:AP-601G)および心拍数カウンター(日本光電社製:AT-601G)を用いて行った。また、体温確認・管理の目的で直腸温の測定を体温ヘッドアンプ(日本光電社製:AW-601

H) に体温プローブ接続して行った。

脳梗塞モデルの作製は、脳血管撮影装置撮像下に4Frの脳血管撮影用カテーテルを左大腿動脈に留置した5Frシースより導入、右内頸動脈 (r-ICA) 遠位部にカテーテル先端を誘導・留置した。次いで、予め24時間前に作成した直径約1mm、長さ3~5cmの長軸凝血塊に整形しカテーテルに充填した後、適量の造影剤にて遠位部内頸動脈を介してr-M1に注入した。注入は、血管造影においてr-M1の閉塞が確認されるまで適宜注入した。

塞栓状態の確認は、血液凝血塊の注入前、注入直後の2回のPET (ポジトロン断層撮影) 撮像によって行った。

PET撮像は、ECAT ACCELを用い、迅速脳血流・脳酸素代謝連続測定法 (DARG法) によって行った。(Kudomi et al. JCBFM.2005)。具体的には、放射能吸収補正用の15分間のトランスミッションスキャン、脳血液量 (CBV) 画像を得るための $C^{15}O$ 吸入後の4分間エミッション撮像、および $^{15}O_2$ および $^{15}O \cdot H_2O$ 投与による脳血流 (CBF)、脳酸素代謝 ($CMRO_2$)、脳酸素摂取率 (OEF) 画像を得るための6分間のPETエミッション撮像の3つの画像収集を行った。PETエミッション撮像中は動脈入力時間放射能曲線 (TAC) を得るため、予め左大腿動脈に留置しておいた5Fr径のシースを介して、PET撮像中の動脈血液を持続的に吸引し放射能検出器により放射エネルギーを測定した。また、全血と血漿の放射線能をWell カウンターで測定した。

また、各個体の梗塞の程度は3T-MRI装置を用い、塞栓後24時間目のT2強調画像を指標に評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては実験に供する動物の数を最小限にとどめると共に、外科的手術や生体材料採取などに際して実験動物に苦痛を与えないなど、国立循環器病センター動物実験指針を遵守し研究を行った。

C. 研究結果

1) 塞栓物の作製自家血を用いた塞栓物の検討を血液そのもの、フィブリン加

血液、トロンビン液加血液およびフィブリン液加血液とトロンビン液加血液の混液の4条件における各血液凝血塊の状態を比較した。その結果、血液単独では凝血塊形成は可能であるが溶出性が高く脆い状態であった。また、フィブリン加およびトロンビン加においても溶出、細く不均一、脆く柔らかい等の傾向が認められた。一方、フィブリン+トロンビン加血液では凝血塊の状態は、チューブ径に依存した太さであり、均一性も高く強固であった (図1)。よって、梗塞モデル作製にはトロンビン加血液による凝血塊を用いることとした。

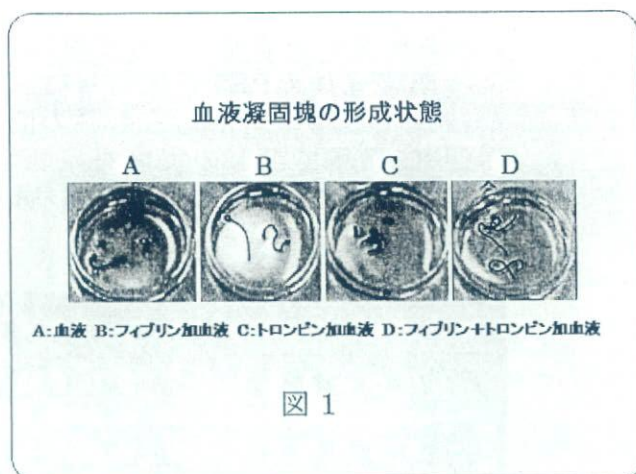


図 1

凝血塊の形状としては、M1部の閉塞を確実に行うことを考えて、直径約1mm、長さ30~50mmに設定した。

2) 急性脳梗塞モデルの作製

モデル作製を対照群 (tPA単独) 5例、被験群 (tPA+TCT-LoFUT併用) 5例の計10頭に対し行った。モデル作製前における各群のMRA画像から算出したMCA - proximalの血管径 (mean \pm S. D) は、それぞれ 1.1 ± 0.23 mm、 1.1 ± 0.17 mmであった。また、モデル作製時、血管造影でMCA領域が消失するまでの血液凝血塊の注入本数は、対照群では5例中3例で2本、5例中1例で各1本および5例中1例で5本を必要とした。被験群では、5例中2例で1本、5例中2例で3本および5例中1例で4本を必要とした。

MRA画像から得られた血液凝血塊注入後の塞栓部位は、被験群ではr-M1 proximal ~ M1部 3例、r-ICA terminal ~ M1部 1例、r-M2, l-M1, ACA部 1例であった。また、対照群ではr-M1 proximal ~ M1 3例、

r-ICA terminal~M1部2例であった。
(図2)。

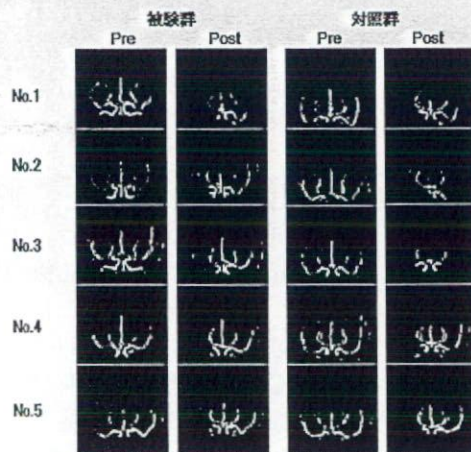


図2：モデル作製後のMRA画像

これら閉塞による虚血の程度をDARG法による閉塞直後のPET画像より確認を行った結果、程度の差はあるものの閉塞部の右側MCA領域で虚血の程度を反映するといわれているCBFおよびCMRO₂の明らかな低下が確認された(図3)。

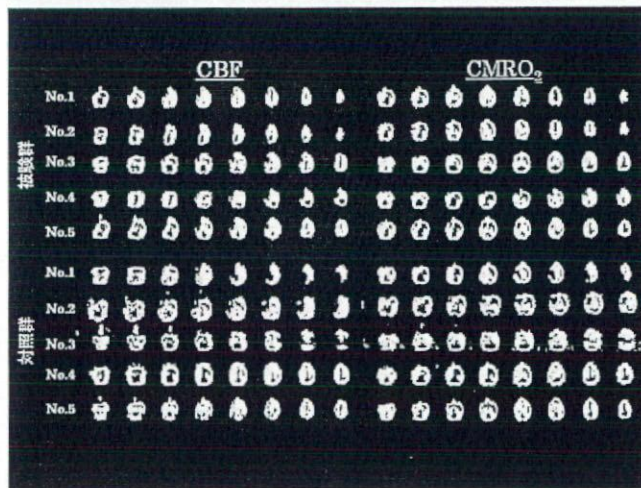


図3：モデル作製直後のPET画像

梗塞発現は、24時間後のT2強調MRI撮像において全例観察され、そのMRI画像で得られた梗塞層のサイズは、塞栓直後のPET定量画像で得られた体積と全例ほぼ同程度の結果であった。また、被験群および対照群における梗塞の大きさの比較においても有意な差は認められなかった。(図4)

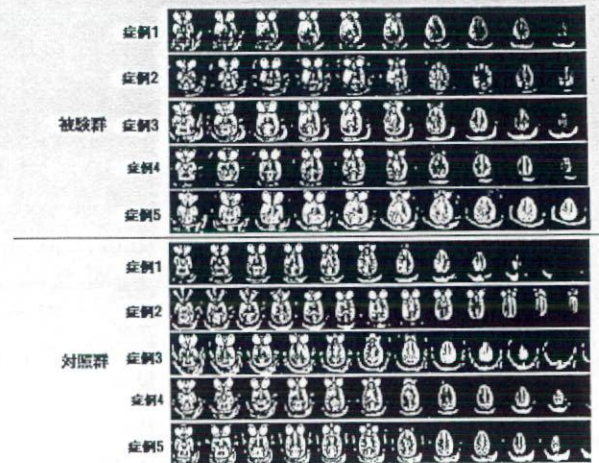


図4：モデル作製24時間後のMRI-T2強調画像

モデル作製前および作製直後の心拍数、血圧(収縮期、拡張期)、直腸温変化は、心拍数で作製直後に増加が認められたが、他の血圧および直腸温においては大きな変化は認められなかった(図5)。

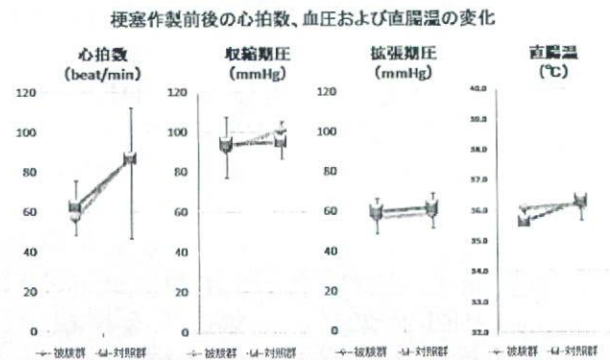


図5：モデル作製前後の心拍数、血圧、直腸温の変化

また、被験群と対照群との比較においても有意な差は認められなかった。さらに、tPA+TCT-LoFUT併用およびtPA単独処置前後の実験経過中における動物の心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧、直腸温について、群を要因とする反復測定分散分析を行ったところ時間経過に対する群の作用(反復測定と群の交互作用)は心拍数のみ統計学的有意差を認めた(心拍数 $F_{21,126}=1.7$, $p=0.03$)が、その他の項目は有意差を認めなかった(拡張期血圧 $F_{21,126}=0.2$, $p=1.0$ 、拡張期血圧 $F_{21,126}=0.36$, $p=1.0$ 、直腸温: $F_{21,126}=0.81$, $p=0.7$)。よって、実験中の生理学的状態に大きな群間差はないと考えられた(図6)。

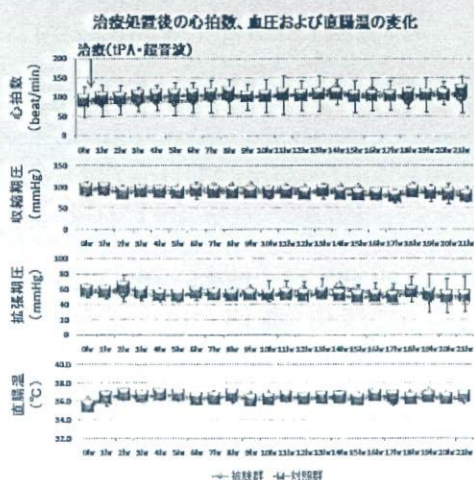


図6: 治療前後の心拍数、血圧、直腸温の変化

D. 考察

脳梗塞モデル作製の際、血管塞栓法としてプラスチックやシリコン粒子を用いた方法が知られているが、塞栓物の材質、血栓溶解療法などの試験には適さない方法である。血栓溶解療法の検討においては、臨床に近似した塞栓の種類を選択、検討する必要があると考えられ、自家血凝血塊を用いた塞栓法は一つの有用な方法と思われる。しかしながら、自家血そのものを用いた凝血塊は塞栓した際、血管内で溶解し、治療前に再開通することが考えられる。

今回、我々は自家血凝血塊の自己溶解による再開通を防ぐ目的で、溶解性の低い凝血塊の作製について検討を行い、フィブリン+トロンビン加血液が検討した条件の中で最も再開通性の低い凝血塊と考えられ、今回のモデル作製の塞栓物として使用した。凝血塊の形状は、直径約1mm、長さ30~50mmの長軸形を用いた。直径の設定は、MRA画像から今回使用したカニクイザルのMCA水平部の血管径を測定したところ 1.1 ± 0.2 mmであり、M1領域を完全閉塞する径としては妥当なものであると考えられた。

モデル作製時の結果として、治療前の再開通はほとんど認められなかったことから血栓溶解療法などの基礎研究に有用と考えられる。

急性脳梗塞モデルの作製方法としては、従来の脳主幹動脈閉塞性動物モデルの作製法は血管圧迫法、血管内塞栓子法の2法に大別される。前者は開頭手術または

眼窩摘出術など侵襲的な方法により目的となる主幹動脈をクリップ、結紮などにより閉塞させるもので、中大脳動脈水平部を閉塞する手法が代表的である。中大脳動脈閉塞モデルは中・大型動物の代表的な虚血モデルとして従来から知られるが、多くは障害部位が脳基底核に限られ、臨床で脳機能障害の原因部位として最も問題になる脳皮質の障害を来すことが少ない。実際、これらモデル動物の行動評価で永続的な麻痺の発現が極めて少ないことも知られている。

一方、血管塞栓法として、プラスチック、シリコン、凝血塊などを血管内に閉塞するモデルも知られるが、目標とする脳主幹動脈に的確に注入し確認するための手法や虚血を評価する手法に欠けていたため、脳虚血部位の分布、病態にバラつきがあり定量的な実験が困難であった。

今回、我々は高解像度脳血管撮影装置を用いた経内科的手法とPETによる病態の画像診断を用いてM1領域を選択的に閉塞することを目的にモデル作製を試みた。結果として、全例でr-M1領域を主とする閉塞を認めた。また、それ以外にICAおよびACAを含む閉塞も少数例に認められ、閉塞部のバラツキが認められた。今回の試験では、治療法の適応がM1~M2領域の閉塞による急性期脳梗塞を対象にしたものであることからモデル作製もM1~M2領域の閉塞を条件とした。閉塞部のバラツキの原因として、今回用いた凝血塊塞栓の形状が直径約1mmと太く、その塞栓を通すには4Frの比較的太いカテーテルを必要とした。結果的にカテーテル先端をMCAまで誘導出来ず、ICA遠位部から塞栓の注入を行ったことから選択性に欠けていた一つの原因と考えられる。

血管閉塞による虚血状態の確認を、閉塞直後のPET画像より確認した結果、程度の差はあるものの全例で閉塞部のr-MCA領域で虚血の程度を反映するといわれているCBFおよびCMRO₂の明らかな低下が観察された。また、24時間後のT2強調MRI撮像においても全例にr-M1領域を主とする梗塞が観察され、MRI画像で得られた梗塞層のサイズは、塞栓直後のPET定量画像で得られた体積と全例ほぼ同程度の結果であった。