Combination of a free radical scavenger and heparin reduces cerebral hemorrhage after heparin treatment in a rabbit middle cerebral artery occlusion model

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第　３９１号	学位授与年月日	平成１５年　３月２６日
氏　　名	赵　　冰　樵		
論文題目	Combination of a free radical scavenger and heparin reduces cerebral hemorrhage after heparin treatment in a rabbit middle cerebral artery occlusion model (ウサギ中大脳動脈血栓モデルにおいてヘパリン投与による脳出血をフリーラジカルスカベンジャーが抑制する)		

博士(医学)　赵　　冰　樵

論文題目

Combination of a free radical scavenger and heparin reduces cerebral hemorrhage after heparin treatment in a rabbit middle cerebral artery occlusion model
(ウサギ中大脳動脈血栓モデルにおいてヘパリン投与による脳出血をフリーラジカルスカベンジャーが抑制する)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

脳梗塞急性期の治療薬として抗血栓薬が用いられるが、抗血栓作用を強く発揮するために、高用量投与すると脳出血という副作用により症状が悪化することが報告されている。しかし、ヘパリン投与に伴う脳出血のメカニズムはほとんど解明されておらず、臨床での使用の際には脳出血を予知することは不可能である。

報告によると、微小血管からの出血時には、MMPs(matrix metalloproteinases)が増加し、血管構築を破壊することにより、血管透過性が増加し、出血すると考えられている。最近、脳虚血再灌流後にMMPsが増加し、血液脳関門を障害することにより脳内出血が生じることが報告されている。また、SOD(superoxide dismutase)遺伝子過剰マウスでは脳外傷後のMMPsの産生を抑制できることもわかってきた。

脳梗塞の治療薬として広く使用されているヘパリンは抗血栓作用により脳出血を誘発することが問題とされている。そこで、我々はヘパリンによる脳出血を評価できる動物病態モデルの開発を試みた。さらに、ヘパリンによる脳出血がどのようなメカニズムで起こるかを検討する目的でフリーラジカルスカベンジャーであるEPC-K1を併用して、脳出血が抑制できるかどうかも検討した。

〔材料ならびに方法〕

日本白色種のウサギをイソフルレンと70%笑気／30%酸素の混合ガスで麻酔した。麻酔導入後、ウサギの左眼窩骨に歯科用ドリルで約6から8 mmの楕円形の窓をあけた。10mg/kgのローズベンガルを静脈内投与すると同時に、硬膜の上より中大脳動脈に0.17W/cm²(540nm)の光を照射し、血栓性の中大脳動脈閉塞モデルを作製した。ウサギの血圧は大腿動脈にカニューレを挿入し圧トランスジューサーで測定し、中大脳動脈の血流は超音波Doppler血流計を用いて、中大脳動脈閉塞後1時間まで観察した。

実験プロトコールは、生理食塩水あるいはヘパリンを中大脳動脈閉塞後3時間から24時間まで静脈内へ持続投与した。生理食塩水を投与した群をコントロールとした。EPC-K1を中大脳動脈閉塞後3時間(ヘパリンと同時投与)と6時間に静脈内に投与した。

薬物投与前、2時間後及び24時間後にクエン酸の入ったシリンジにて採血し、自動凝固装置KC4Aにて aPTT(activated partial thromboplastin time)を測定した。

48時間後に神経症候(斜頸、前肢麻痺、後肢麻痺、正向反射、姿勢保持)を評価した。続いて、麻酔下に脳を取り出し、厚さ1 mmの連続スライスを切り出し、脳出血の評価のために写真撮影をした。さらに、脳梗塞面積を評価する目的でTTC(triphenyltetrazolium chloride)で染色した。脳出血と脳梗塞の面積をコンピューター解析(NIHシステム)により測定した。

〔結果〕

ヘパリン群、ヘパリンとEPC-K1併用群では、aPTTは24時間後にコントロール群と比べ約3倍延長した。中大脳動脈は観察期間中(閉塞後1時間)に、ほとんどの動物で自然再開通が見られたが、ヘパリン投与により再開通率や再開通までの時間は影響されなかった。

中大脳動脈閉塞3時間後から投与されたヘパリンは顕著に脳出血を誘導し、脳梗塞巣を拡大した。また、神経症候もコントロール群と比べ悪化した。

ヘパリンとEPC-K1併用投与はヘパリンによる脳出血を75%抑制した。脳梗塞においてはコントロール群と比べ57.2%、ヘパリン群と比べ63.2%縮小した。また、神経症候もコントロール群及びヘパリン群と比べ改善した。

EPC-K1の単独投与は脳梗塞を29.1%縮小したが、神経症候の改善は見られなかった。

〔考察〕

今回の研究では、ウサギ中大脳動脈血栓モデルにおいてヘパリン投与により脳出血が引き起こされることを確認した。また、この脳出血は神経症候の増悪や梗塞巣の拡大をおこした。

閉塞後3時間からのヘパリン投与による脳出血をフリーラジカルスカベンジャーが抑制したことは、フリーラジカルがヘパリン投与による脳出血に関与していることを示唆するものである。

脳出血にMMPsの関与が報告されていることから、ヘパリンによる脳出血においてフリーラジカルとMMPsの関連性を今後検討していく必要がある。

〔結論〕

ウサギ脳出血モデルにおいて、フリーラジカルスカベンジャーがヘパリンによる脳出血を抑制した。

論文審査の結果の要旨

脳梗塞の治療薬として広く使用されているヘパリンは脳出血を誘発することが問題とされているがその詳細な機構は不明である。申請者等はヘパリンによる脳出血を評価できる動物病態モデルを開発し、その機構の解明を試みた。

脳梗塞急性期のヘパリン投与に伴う脳出血のメカニズムはほとんど解明されておらず、臨床での使用の際には脳出血を予知することは不可能である。虚血後の再灌流とフリーラジカルの産生が重要であるという最近の報告を基に、申請者等は梗塞後に自然再灌流し出血も認められるモデルを開発し、ヘパリンとフリーラジカルスカベンジャーであるEPC-K1を検討して、脳梗塞後に認められるヘパリン依存性脳出血の機構を検討した。

実験には日本白色種のウサギを用いた。全身麻酔導入後、左眼窩骨に8 mm大の窓を開けた後、10mg/kgのローズベンガルを静脈内投与し、硬膜外より中大脳動脈に0.17W/cm²(540nm)の光を照射することにより血栓性の中大脳動脈閉塞モデルを作製した。中大脳動脈の血流は超音波Doppler血流計を用いて、中大脳動脈閉塞後1時間まで観察した。中大脳動脈閉塞3時間後から24時間までヘパリン(ヘパリン群)あるいは生理的食塩水(コントロール群)を静脈内へ持続投与した。またEPC-K1を中大脳動脈閉塞3時間後(ヘパリンと同時投与：ヘパリンEPC-K1併用群)と6時間後に静脈内に投与した。薬物投与前、2時

間後及び24時間後に活性化トロンボプラスチン時間(aPTT)を測定した。48時間後に神経症候(斜頸、前肢麻痺、後肢麻痺、正向反射、姿勢保持)を評価した後、麻酔下に脳を取り出し、厚さ1 mmの連続スライスを切り出し、脳出血と脳梗塞の面積を測定した。脳梗塞部位はtriphenyltetrazolium chloride(TTC)染色により確認した。

これより以下の結果を得た。ヘパリン群、ヘパリンEPC-K1併用群共に、24時間後のaPTTはコントロール群に比べ約3倍延長した。中大脳動脈は観察期間中(閉塞後1時間)にほとんどの動物で自然再開通が見られ、その後閉塞、再開通を繰り返した(Cyclic Flow)。閉塞から自然再開通までの時間、及び全再開通時間は3群間において差は認められなかった。ヘパリン群ではコントロール群と比べ、脳出血巣、脳梗塞巣共に有意に大きく、また神経症候も有意に悪化していた。ヘパリンEPC-K1併用群では、ヘパリン群に比し脳出血巣は75%、また脳梗塞巣は63.2%小さく、また、神経症候も有意に良好であった。またコントロール群と比べ、脳梗塞巣も小さく(57.2%)、神経症状も有意に良好であった。EPC-K1の単独投与では脳梗塞を29.1%縮小したが、神経症候の改善は見られなかった。

以上、今回用いたウサギ中大脳動脈血栓モデルでは、ヘパリン投与により脳出血を認め、EPC-K1がこれを抑制したことにより、フリーラジカルがヘパリン投与に伴う脳出血に関わると結論している。また早期にヘパリン治療を開始すると脳出血が少ないという申請者等の別の実験結果(副論文)も踏まえ、脳梗塞後の早期のヘパリン治療とフリーラジカルスカベンジャーの併用が、梗塞巣の拡大と出血の予防、更には神経症状の増悪予防に効果があるとしている。

審査委員会では、申請者等が確立した良好な脳梗塞モデルを用いて脳梗塞治療におけるヘパリンの利点と欠点を明らかにすると共に、新規な治療方法の可能性を示したことが、高く評価された。

以上の申請者の研究内容について審査委員会では以下のような質問および議論があった。

1) 本モデルでcyclic flow reductionを来す機序
2) cyclic flow reduction後に脳出血を来す機序
3) 血流モニター(光照射開始後1時間)終了後のcyclic flowの有無とヘパリンの影響の有無
4) ヘパリン投与開始時期を3時間後に設定した理由
5) ヘパリン投与により脳出血を来す理由
6) 梗塞範囲の評価の妥当性
7) 梗塞巣の大きさと出血の頻度の関係
8) EPCK1は脳血液関門を通過するか
9) EPCK1の半減期と効果的な投与方法
10) ヘパリンとEPCK1の併用によりコントロールよりも梗塞巣が小さくなる機序
11) 大脳皮質と基底核での梗塞後出血発現頻度の相違とその理由
12) フリーラジカルの脳出血における役割
13) トロンビンの脳浮腫発生における役割

これらの質問に対し、申請者の解答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　浦 野 哲 盟
副査　佐 藤 康 二　副査　山 本 清 二