

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】第3部門第2区分
【発行日】平成17年5月12日(2005.5.12)

【公表番号】特表2001-501612(P2001-501612A)

【公表日】平成13年2月6日(2001.2.6)

【出願番号】特願平10-515905

【国際特許分類第7版】

A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 31/20
A 6 1 K 31/21
A 6 1 K 38/00
A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 49/00
A 6 1 P 7/02
A 6 1 P 7/06
A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 11/00
C 0 7 K 14/645
C 0 7 K 16/26
C 1 2 P 21/08

【F I】

A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 31/20
A 6 1 K 31/21
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K 49/00 Z
A 6 1 P 7/02
A 6 1 P 7/06
A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 11/00
C 0 7 K 14/645
C 0 7 K 16/26
C 1 2 P 21/08
A 6 1 K 37/02

【手続補正書】

【提出日】平成16年9月24日(2004.9.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】

手続補正書

平成16年9月24日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

特願平10-515905号

2. 補正をする者

名称 ザ・トラスティーズ・オブ・コロンビア・ユニバーシティー・
イン・ザ・シティー・オブ・ニューヨーク

3. 代理人

東京都千代田区霞が関3丁目7番2号

鈴榮特許総合法律事務所内

〒100 電話03(3502)3181 (大代表)

(5847) 弁理士 鈴 江 武 彦



4. 自発補正

5. 補正の対象

明細書

6. 補正の内容

(1) 明細書の97ページ～151ページ (実施例5乃至実施例13)の記載
を別紙の通りに訂正します。

方 式 査
毒 査

実施例 5：P-セレクチン無しの同型接合体マウスは、病巣の脳虚血および再灌流障害に耐性である

中枢神経系での局所虚血再灌流障害を強化する上での好中球（PMNs）の役割は、問題が残る。血管系によって循環しているPMNsを捕捉する際の重要な初期段階は、虚血後の内皮に発現したP-セレクチンによって媒介される。初期および継続的内皮P-セレクチン発現は、ヒトでは中大脳動脈閉塞後の脳微小血管系で記述されてきたが、脳卒中における内皮P-セレクチン発現の発生は、測定されていない。脳卒中におけるP-セレクチンの役割を明確にするために、45分間、中大脳動脈（MCA）閉塞、続いて22時間の再灌流から構成される局所脳虚血および再灌流のマウス・モデルを、P-セレクチンの無い同型接合体（PS-/-）と、野生型の同系統の対照（PS+/+）である2つのグループのマウスに使用した。トリフェニルテトラゾリウムクロリドで染色した、面積計測した一連の切片から脳梗塞容積を計算し、同側半球での梗塞組織の含有率として現した。神経学的成行きは、目隠しされた調査員によって観察される動物行動に基づいた（1：欠陥なし；2：旋回；3：回転；4：静止）。同側の大脳皮質血流（CBF）を、レーザードップラー流量計によって測定し、そして対側性皮質CBFの含有率として現した。PS-/-マウスは、PS+/+対照と比較して梗塞容積で3.8倍の減少を示した（ $7.6 \pm 4.4\%$ 対 $29.2 \pm 10.1\%$ 、 $p < 0.05$ ）。P-セレクチンを欠くマウスでの梗塞容積についてのこの減少は、生存者が改善したことおよび生存者での神経学上の欠損を減少させる方向への傾向によって反映される。PS-/-コホートでの脳虚血症および再灌流後の脳血流を増大させる傾向があった（ $65 \pm 11\%$ 対、対照の $46 \pm 18\%$ 、 $p = NS$ ）ので、これらの研究は、P-セレクチン依存性接着が、大脳の逆流がないことに寄与しうることを示唆する。一緒にして、これらのデータは、脳卒中の病理生理学におけるP-セレクチン発現についての重要な役割に関係し、脳卒中の結果を改善するための新規の薬理学テキストラジェーを示唆する。

実施例 6：P-セレクチン遺伝子の不存在が、再灌流された脳卒中のマウスのモデルでの虚血後大脳の好中球蓄積、再流のないこと、および組織傷害を減少させる

ヒトでの最近の研究は、初期の卒中の発症後の初期の期間の大脳血流 (CBF) の再確立により、神経学上の続発症を減少することを示す。低酸素の内皮によって発現される初期に作用する好中球 (PMN) の接着分子である P-セ렉チン (PS) が、発生する再灌流された卒中において重要な病態生理学上の役割を示す可能性があることが仮定された。45 分間の内腔内中大脳動脈の閉塞、続いて 22 時間の再灌流から構成される一過性の局所脳虚血の マウス・モデルで、一次の研究を行った。このモデルでは、PS 遺伝子 (PS^{-/-}) を発現しないマウスは、野生型対照 (PS^{+/+}) に比較して梗塞容積が小さくなり、神経学的欠損スコアが減少し、そして生存率が改善したことを示す。最近の研究は、さらに、大脳傷害の PS-誘導機構 (類) を明確にするために行われた。手術前に ¹²⁵I 標識抗-PS IgG を付与された PS^{+/+} マウスでは、擬手術動物 (n = 6, p < 0.001) と、または非免疫 IgG を与え、かつ一過性の局所脳虚血および 30 分の再灌流 (n = 4, p < 0.03) に供した動物と比較して、30 分間の再灌流によって同側半球で抗体の蓄積が 216% 多くなることを示した。PS^{+/+} マウスでは、PMNs の蓄積は、局所虚血の開始後の初期に始まり、再灌流の期間を通して持続する (22 時間までの同側/反対側半球の ¹¹¹In-PMN 蓄積の 2 倍の増加、N = 8, p < 0.05)。PS^{-/-} マウスは、22 時間までの同側半球への PMN 蓄積で 25% の減少を示した (n = 7, p < 0.05)。虚血後大脳無再流に対する PS 発現の影響を、脳卒中の進行の間に同側側の CBF を連続して測定することによって調べた。基線、閉塞後、および初期再灌流 CBFs では同一であるが、再灌流 30 分での CBFs は、PS^{+/+} マウス (n = 8, 2.4 倍大きい、p < 0.05) に比較して、PS^{-/-} マウス (n = 5) では明らかに大きかった。この差異は、22 時間の再灌流期間の残りの間維持された。これらのデータは、PMN の動員、虚血後無再流、および発生する脳卒中での組織損傷における PS の重要な初期の役割を支持する。これは、大脳の再灌流傷害における PS の病態生理学上の役割の最初の例示であり、PS の遮断が、再灌流した脳卒中の治療のための治療上の標的を表すかもしれないことを示唆する。

実施例 7 : 一酸化炭素および進行性脳卒中

ヘム異化の毒性副産物である一酸化炭素ガスは、中枢神経系での長期増強および記憶に関与する。しかし、脳でのCO生成についての他の生理学上の役割は、知られていない。ヘムオキシゲナーゼが、炎症症状中に誘導されるので、内因性CO生成が、脳卒中での脳の保護的役割に供しうるかどうかを調べた。局所脳虚血のマウス・モデルでは、ヘムオキシゲナーゼI型は、mRNA（ノーザンブロットにより）およびタンパク質レベル（ウェスタンブロットにより）で導入され、インサイチュウ・ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学によって虚血半球の脳血管内皮に局在化された。直接測定法によるCOの局所生成を虚血領域で観察した。平行した実験では、低酸素環境にさらされたマウスの脳の内皮細胞は、ヘムオキシゲナーゼmRNA、タンパク質およびCO生成の同様の誘導を示した。CO生成が、脳卒中の病態生理学に付随するかどうかを測定するために、スズ・プロトプルフィリン投与によってCO生成を遮断した（減少した局所COレベルの直接測定法によって確認される）。これらの動物は、未処置対照と比較して、梗塞容積が明らかに大きく、神経学的結果が悪く、および死亡率が上昇することを示した。さらに、脳卒中前のCOの投与により、有意な大脳保護を与えた。ヘム異化の同時副産物であるビリベルジンで処置した動物には、この保護は観察されなかったため、これらのデータは、内因性CO生成が本質的に進行性脳卒中において保護的役割を示すことを示唆する。

導入

ヘム中心に強力に結合し、酸素移送を阻害して細胞の呼吸を中毒にする、内因性一酸化炭素（CO）の毒性効果の文献および一般的認識の考慮すべき本文がある。長年の間、COは、ヘム異化に付随する副産物であると考えられたが、脳における最近のデータは、ヘムオキシゲナーゼIIによって別個の神経単位で生成されたCOは、長期増強を調節しうることを示唆する。ラットでは、熱ショックにさらすことは、脳を含めた数種の臓器で32kDaの熱ショックタンパク質（ヘムオキシゲナーゼI）の発現と相関することが証明された。このHSP32導入の生理学的有意性は、目的論的に、ヘムオキシゲナーゼI（HOI）によってCOの化学量論的遊離の結果だとされてきた。ほとんどの実験的研究では、HOI誘導は、細胞の酸素ストレスに付随する標識としてのみ役立つ。腹膜炎のモデル

でのH O Iの抗炎症の役割の最近の確認は、ヘム異化の過程の間に天然の抗酸化剤のビリベルジンが生成する結果だとされた。

最近の研究は、虚血後の脳は多量のCOを発生することを初めて報告している。中大脳動脈が、内腔内縫合によって閉塞された、局所脳虚血症のマウス・モデルを使用して、虚血半球でのH O I生成は、非虚血半球に比較して、際立って増加した。免疫組織化学およびインサイチュウ・ハイブリダイゼーションでは、H O Iの供与源が虚血半球内の内皮細胞に局在化したので、細胞低酸素症のインビトロ・モデルを使用して、マウスの大脳微小血管の内皮細胞でのH O Iメッセージ、タンパク質の誘導および活性を確認した。スズまたは亜鉛プロトポルフィリンIXを使用するCO生成の遮断は、脳梗塞容積および死亡率の増加に関連するのに対して、虚血の直前に動物をCOに曝させると、狭い治療ウインドで有意な用量依存的な脳保護を与えた。ビリベルジン投与は、このモデルでは効果がない。一緒にして、これらのデータは、虚血脳組織が、大量のCOを生じ、その生成が脳保護を与えて、脳卒中の間に破壊される組織の量を制限することを示す。

方法

プロトポルフィリン製造および投与。スズ・プロトポルフィリンIXジクロリド(20mg、ユダ州、ローガン(Logan、UT)のポルフィリン・プロダクツ(Porphyrin Products))、亜鉛プロトポルフィリンIX(17mg、ユダ州、ローガン(Logan、UT)のポルフィリン・プロダクツ(Porphyrin Products))、またはビリベルベルジン(18mg、ユダ州、ローガン(Logan、UT)のポルフィリン・プロダクツ(Porphyrin Products))を、最初に、スルホン酸ジメチル(2mL)に溶解させた。アリコート量のこの溶液(200μL)を、通常の生理食塩水(9.8mL)に添加し、そしてこの混合液を、激しくボルテックスさせて、プロトポルフィリンの 2.7×10^{-4} M溶液を得た。その溶液の容器を、アルミホイルで覆って、プロトポルフィリンの光分解を予防し、そして使用されるまで4℃で保存した。

このプロトポルフィリン溶液(91μL/ポンプ)を微細浸透性ポンプ(番号1003D、カリフォルニア州パロアルト(Palo Alto, CA)のアルザ・コープ、

(Alza Corp.) に充填し、手術の開始の24時間前に、1 cmの背正中線切開を介して麻酔したマウスに皮下に移植した。これらのポンプは、 $0.95 \pm 0.02 \mu\text{L}/\text{時間}$ の比率で薬剤溶液を投与する。手術の時に、内腔内咬合カテーテルの挿入前に、追加の用量のプロトポルフィリン溶液を投与した（0.3 mL、静脈内）。各動物は、その研究の期間を通して、以下の総（注射＋ポンプ）薬剤量：スズ・プロトポルフィリン（0.070 mg）、亜鉛プロトポルフィリン（0.059 mg）、またはビリベルジン（0.061 mg）を受けさせた。

実施例 8：

低酸素または遊離ラジカルは、内皮細胞（EC）表面へのP-セレクトイン（PS）の転位を誘導し、ここで再灌流の間に好中球（PMN）の接着に關与する。ニトロ血管拡張剤が、虚血後の白血球腐骨形成を弱める機構を探索するために、我々は、NO/cGMP経路を刺激することが、低酸素性ヒト臍帯静脈ECsでの表面PS発現を弱めうるかどうかを試験した。低酸素にさらされたECs（4時間 $pO_2 < 20 \text{ Torr}$ ）は、放射性標識抗-PS抗体の特異的結合によって測定され、表面PS発現（ $P < 0.0001$ ）で80%増加するのに平行して、vWF放出（ $p < 0.005$ ）（vWFは、PSで包装される）において50%増加を示した。同様の条件下で、NO供与体の3-モルフォリノシドノニミン（SIN-1、0.1 mM）またはcGMP類似体の8-ブロモ-cGMP（cGMP、10 nM）を添加すると、vWF放出の減少を生じた；対照vWF、 $11 \pm 0.4 \text{ mU/mL}$ ；SIN-1、 $9.1 \pm 0.3 \text{ mU/mL}$ ；cGMP、 $9.7 \pm 0.2 \text{ mU/mL}$ ；SIN-1またはcGMP対対照の両方について $p < 0.005$ 。対照と比較して、SIN-1またはcGMPも、表面PS発現を減少させた（それぞれ40%および48%減少、各々について $p < 0.005$ ）。免疫蛍光接着アッセイを用いて、SIN-1およびcGMPの両方が、低酸素HUV ECsに結合するHL60を減少させた（対照に対して53%および86%減少、各々について $p < 0.05$ ）。フラ-2蛍光の測定は、低酸素が、細胞内カルシウム濃度 $[Ca_i]$ を増加させること、そして増加した $[Ca_i]$ が、cGMPによって遮断されうることを示した。SIN-1またはcGMPはいずれも、ECsがカル

シウム不含の培地に載せられた場合に、P S発現をさらに減少させることができなかった。これらのデータは、NO/c GMP経路の刺激が、E C s中のカルシウム流入を阻害することによってP S発現を阻害し、そして重要な機構としてこの阻害を確認し、それによってニトロ血管拡張剤が、虚血後の組織でPMN結合を減少させる可能性があることを示唆する。

実施例 9：第 I X a 因子 i

第 I X 因子は、ヒトおよび他の哺乳類に存在する凝固因子であり、そして凝固経路の重要な部分である。凝固の正常な反応図式では、第 I X 因子は、第 X I a 因子または組織因子/V I I 複合体のいずれかによってその活性形態である第 I X a 因子に活性化される。その後、第 I X a 因子は、血栓を導く第 X 因子を活性化して、凝固カスケードの最終部分を引起こすことができる。第 X 因子は、2つの経路、外因性（V I I a /組織因子を介して）または内因性経路（第 I X a 因子を介して）のいずれかの内の1つによって活性化されうるので、我々は、第 I X a 因子を阻害することで、いくつかの形態止血の減退を引き起こす可能性があるが、組織傷害の無損傷に対応して止血したままにするという仮説を立てた。言換えれば、いくつかの型の凝固の遮断を引き起こしうるが、しかし、過剰のまたは歓迎されない出血を引き起こす可能性はない。第 I X a i 因子は、化学的に修飾されてさらに第 I X a 因子（したがって、天然の第 I X a 因子と競合できる）に類似するが、その活性を欠く第 I X 因子である。これは、凝固の正常な第 I X a 因子依存的な経路を「壊滅」または競合阻害を引き起こしうる。第 I X a 因子は、内皮および血小板、そしておそらく他の部位に結合するので、第 I X a 因子の活性を遮断することは、第 I X a 因子の結合に干渉する薬剤を投与することによって（または第 I X 因子の活性化に干渉することによって）も可能でありうる。

脳卒中および他の虚血性疾患では、存在する血栓を溶かすことによって誘導される臨床的利益がありえるが、潜在的に破壊的な出血の合併症もある。本実験では、大脳虚血および再灌流（脳卒中）のマウスモデルを使用した。マウスは、手術直前に300 μ g / kgの第 I X a i 因子の静脈内大量瞬時投与を受けた。脳卒中は、右中大脳動脈の内膜内閉塞によって創り出された。脳卒中の結果が24時間後に測定された時に、第 I X a i 因子を受けた動物は、同じ手術を行ったが、

第 I X a i 因子を受けなかった対照と比較して梗塞容積が小さくなり、脳灌流が改善され、神経学上の欠損は少なくなり、そして死亡率が減少した。第 I X a i 因子動物は、見掛けの脳内出血から開放されていることも記述された。対称的に、脳内出血は、第 I X a i 因子を受けていない対照動物で時折記述された。

表 I I

	対照		実験		
	平均	sd	平均	sd	開始時
体重	26.91	3.21	25.25	2.49	0.14
ドップラー	0.96	0.24	1.04	0.35	0.52
閉塞ドップラー1	0.18	0.07	0.16	0.08	0.60
閉塞ドップラー2	0.40	0.22	0.43	0.20	0.68
再灌流ドップラー	0.55	0.42	0.53	0.30	0.89
サックドップラー	0.38	0.25	0.75	0.31	0.02
等級	2.22	0.67	1.67	0.49	
I / C 比	1.18	0.20	1.08		
梗塞容積	21.16	25.14	3.47	12.03	0.0452
カウント	11		16		

実施例 10 : P-セ렉チン遺伝子を発現するマウスでの大脳傷害の悪化 : 脳卒中を治療するための新たな標的としての P-セ렉チン遮断薬の同定

要約 :

最近、発症する脳卒中の治療に効果のないスターク治療がある。P-セ렉チンは、インビトロで低酸素症の内皮細胞によって迅速に発現されるが、脳卒中での P-セ렉チン発現の機能上の意義は、未捜査のままである。P-セ렉チン発現の病態生理学上の結果を確認し、そして脳卒中を治療するための強力な新規アプローチ法として P-セ렉チン遮断薬を同定するために、局所大脳虚血および再灌流のマウスモデルを使用して、実験を行った。虚血後の大脳皮質での初期 P-セ렉チン発現は、免疫組織化学による同側の脳微細血管内皮細胞に局在化された P-セ렉チン発現を増加を伴って、放射性標識の抗-マウス P-セ렉チン I g Gの特異的蓄積によって示された。脳卒中で P-セ렉チン発現が増加することの機能上の意義を試験するために計画された実験で、P-セ렉チン遺伝子 (P S + / +) を発現するマウスの虚血皮質での好中球の蓄積は、同型接合

体のP-セレクトリン無しのマウス (P S-/-) でのものより際立って多いことが示された。好中球流入の減少は、P S-/-マウスでの大きな虚血後の大脳再流 (レーザードップラーによって測定した) を伴った。さらに、P S-/-マウスは、P S+/+マウス (88%対44%、 $p < 0.05$) と比較して梗塞容積がより小さいこと (5倍減少、 $p < 0.05$) そして生存率が改善されることを示した。マウスP-セレクトリンに向けられたモノクローナル抗体を用いたP S+/+マウスでのP-セレクトリンの機能的遮断により、対照と比較して初期の再流および脳卒中の結果も改善し、遮断抗体が中大脳動脈の閉塞後に投与された時ですえも脳梗塞容積を減少が確認された。これらのデータは、脳卒中でのP-セレクトリンの病態生理学的役割を示す最初のもので、そしてP-セレクトリン遮断が、脳卒中を治療するための新規な治療標的を表しうることを示唆する。

導入：

虚血性脳卒中は、今日、米国での第三の死因を構成する¹。ごく最近まで、発症する脳卒中での脳組織損傷を減少させる直接的治療はなかった。NINDS² およびECASS³ rt-PA³⁺急性脳卒中研究は、初期再灌流⁴の潜在的な治療利益があることを示唆したが、急性虚血性脳卒中⁵のストレプトキナーゼ処置に続いて観察される死亡率が増加することは、進行性脳卒中に現時点で明かに効果的な治療法はないというありのままの事実を強調する。脳卒中の治療のための最近の医療品に効果のないこのことは、多数の革新的なアプローチ法⁶を導いたが、rt-PA以外、医療領域に達したものはない。進行性脳卒中の潜在的な安全性および効き目のある治療を確認するために、我々は、動員された好中球の有害な役割に焦点を当てた。再灌流脳卒中のマウスモデルでの最近の研究は、脳卒中前の好中球 (PMNs) の枯渇は、脳組織傷害を最小限にし、そして機能上の転帰を改善することを示した⁷。特異的細胞接着分子、ICAM-1を欠くマウスは、同様に保護される⁷。予め形成された保存部位⁸から低酸素の内皮表面に迅速に転移することができる分子のP-セレクトリンは、ICAM-1-を媒介した好中球停止状態を促進する好中球ローリング⁹の重要な初期メディエーターである。P-セレクトリンは、霊長類の脳卒中¹⁰で発現されるが、脳卒中でのP-セレクトリン発現の機能上の意義は知られていないままである。

脳卒中でのP-セレクチンの病態生理学上の役割を捜すために、我々は、野生型マウスおよびP-セレクチン遺伝子⁹のヌルの同型接合体であるマウスの両方、そして機能的に遮断するP-セレクチン抗体を投与するストラテジーを利用して、局所大脳虚血および再灌流¹¹のマウスモデルを使用した。これらの研究で、我々は、中大脳動脈閉塞後のP-セレクチン発現が、再灌流後の大脳の再流の減少および脳卒中後の結果の悪化に関連しているのみならず、P-セレクチン遮断が、有意な程度の虚血後の大脳保護を与えることを確認する。これらの研究は、脳卒中でのP-セレクチン発現の病態生理学上の役割の最初の例示を表し、そして抗-P-セレクチンストラテジーが、再灌流脳卒中を治療するのに有用であることを立証しうる刺激的な可能性を示唆する。

方法：

マウス： J1胚幹細胞中での遺伝子ターゲッティングによって、C57BL/6芽細胞に注入して生殖細胞系の伝達を得て、そして戻し交雑させてP-セレクチンヌルの同型接合体マウス (PS-/-) を得ることにより、先に報告⁹されたとおりに作製したトランスジェニックP-セレクチン欠損マウスで、実験を行った。C57BL/6Jマウスとの戻し交雑の第三世代から得たPS-/-または野生型 (PS+/+) の従兄弟関係のマウスを用いて実験を行った。動物は、7から12週の年齢であり、実験期間中25-36グラムの間の重量であった。脳血管の解剖のバリエーションが、マウスでの実験的脳卒中に対する罹病率に差異を生じることが報告されている¹²ので、インク/カーボンブラック染色を行って、PS-/-およびPS+/+マウスの両方でのウィリス (Willis) の循環の血管パターンを可視化させた。これらの実験は、代脳循環の血管パターンに総体的な解剖学上の差異がないことを示した。

一過性中大脳動脈閉塞： マウスを麻酔 (10 mg/cc ケタミンおよび0.5 mg/cc キシラジンの0.3 cc、腹腔内) し、そして直腸の温度制御操作表面 (イエロー・スプリングス・インストルメンツ、インク。 (Yellow Springs Instruments, Inc.)、オハイオ州、イエロー・スプリングス (Yellow Springs, OH)) 上に仰臥で位置決めした。動物の中心温度は、手術中にそして手術後に90分間は37 ± 1 °Cに維持した。首の正中線の切開を、手術中の顕微鏡 (16-

25×ズーム、ニューヨーク州ソルンウッド(Thornwood, NY)のツェズ (Zeiss) 下で右の頸動脈鞘を露出するように造った。共通の頸動脈鞘動脈は、4-0シルクで単離し、そして後頭部の、翼突口蓋の、そして外部の頸動脈をそれぞれ分離して、分割した。外部頸動脈断端を介して13mmの加熱平滑化5-0ナイロン縫合を前進させることによって、中大脳動脈閉塞(MCAO)を完了した。閉塞縫合を行った後、外部の頸動脈断端を焼灼し、そして傷を塞いだ。45分後、閉塞している縫合を解いて、再灌流を確保した。これらの手段は、先に詳細に記載されている¹¹。

大脳皮質の血流の測定：先に記述されるとおり¹³、レーザードップラー (ニュージャージー州ピスケイタウェイ (Piscataway, NJ) のペリメド・インク. (Perimed Inc.)) を使用して大脳血流のX線像測定を行った。0.7mmの直線レーザードップラープローブ (モデル番号 PF303、ニュージャージー州ピスケイタウェイ (Piscataway, NJ) のペリメド・インク. (Perimed Inc.)) および先に公表された標識点 (プレグマに後方2mm、正中線の各側面に6mm) を用いて、示されるとおり、麻酔直後に、中大脳動脈の閉塞の1分後と10分後、並びに再灌流の30分、300分、および22時間後、相対的な大脳血流測定を行った。データは、非虚血半球と比較した虚血のドップラー信号強度の比として表される。この方法では、組織1グラム当たりの脳血流を定量されないが、正確に明確にされた解剖学的標識でのレーザードップラー流測定法を使用することにより、時間中に連続して同一動物での大脳血流を比較する手段として役立つ。手術手段は、相対的な大脳血流の50%以上の減少が内腔内閉塞縫合の配置後に直ちに観察される場合、技術的に適切であると考えられた。これらの方法は、先の研究で使用された^{7, 11}。

125 I-標識タンパク質および¹¹¹ In-標識マウスの好中球の製造および投与

放射性ヨウ化抗体を、以下のとおり製造した。モノクローナルのラット抗マウス P-セレクトリン IgG (クローン (Clone) RB40.34、カリフォルニア州サンディエゴのファルミンゲン社 (Pharmingen Co.))¹⁴ および非免疫ラット IgG (ミズーリー州セントルイス (St. Louis,

MO) のシグマ・ケミカル社 (Sigma Chemical Co.) を、エンチモビーズ (カリフォルニア州ヘラクレス (Hercules, CA) のバイオーラッド (Bio-Rad)) を用いてラクトペルオキシダーゼ法¹⁵によって¹²⁵I で放射性標識した。放射性標識 PMNs を、以下の方法で製造した。野生型マウスから得たクエン酸化血液を、NaCl (0.9%) で1:1に希釈し、続いてフィコール・ハイパック (Ficoll-Hypaque) (ニュージャージー州ピスケイタウェイ (Piscataway, NJ) のファルマシア (Pharmacia)) で勾配超遠心分離を行った。残りの赤血球の低張性溶解 (蒸留 H₂O に20秒露出し、続いて1.8% NaCl で再構成させた) に続いて、PMNs を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁させた。好中球 ($5-7.5 \times 10^6$) を、 $100 \mu\text{Ci}$ の¹¹¹インジウムオキシシン (ニューヨーク州ポルトワシントン (Port Washington) のアマシャム・メジフィジックス (Amersham Medipysics)) でPBSに懸濁させ、そして15分間、37℃で穏やかに曝気させた。PBSで洗浄した後、PMNs を、穏やかにペレット化し ($450 \times g$)、そして 1.0×10^6 細胞/mLの最終濃度までPBSに再懸濁した。

梗塞容積の計算：神経学的な検査の後、マウスを麻酔し、そして最終的な大脳血流測定を得た。断頭によってヒューマン (Humane) の安楽死が行われ、そして脳を取除き、そして1mm薄片に切るためにマウス脳マトリックス (ミシガン州ワレン (Warren, MI) のアクチベイショナル・システムズ社 (Activational Systems Inc.)) に載せた。薄片を、0.9%リン酸緩衝生理食塩水中の2%の2, 3, 5-トリフェニル-2H-テトラゾリウムクロリド (TTC、ミズーリー州セントルイス (St. Louis, MO) のシグマ・ケミカル社 (Sigma Chemical Co.)) に浸し、30分間、37℃でインキュベートし、そして10%ホルマリン¹⁶の中に置いた。梗塞した脳を、未染色組織の領域として可視化させた。梗塞容積を、面積計で測定した一連の画分から計算し、そして同側の半球での梗塞の含有率として表された。梗塞容積を計算する方法は、我々のグループ^{7, 11}および他者^{16, 17}によって先に使用され、上記記載されている脳卒中の結果のその他の機能的指数と相互に関連した。
未標識抗体、放射性標識 PMNs、および放射性標識抗体の投与：未標識抗体が

投与される実験については、2つの異なる抗体型の内の1つを使用した；遮断モノクローナルラット抗マウスP-セレクトリンIgG（クローン（Clone）RB40.34、カリフォルニア州サンディエゴのファルミンゲン社（Pharmingen Co.））^{14, 18, 19}または非免疫ラットIgG（ミズーリー州セントルイス（St. Louis, MO）のシグマ・ケミカル社（Sigma Chemical Co.））のいずれか。0.1%ウシ血清アルブミンを含有する0.2mLリン酸緩衝生理食塩水中30 μ gとして抗体を製造し、その後、中大脳動脈閉塞の10分前に陰茎静脈に投与した。別個の実験で、放射性標識抗体（0.15mL、 2.6×10^5 cpm/ μ L）を、中大脳動脈閉塞の10分前に静脈に注射した。第三組の実験では、100 μ L注射（放射性標識PMNsを、0.15mLの総量まで生理学的食塩水と混合した； 3×10^6 cpm/ μ L）時に、放射性標識PMNsを、中大脳動脈閉塞の10分前に静脈に注射した。未標識抗体を投与した実験では、脳血流、梗塞容積および死亡率を決定するために上に記載された方法を用いて、測定を行った時をテキストに示してある。放射性標識抗体または放射性標識PMNsのいずれかを投与したそれらの実験については、マウスを指定の時点で犠牲にし、そして脳を直ちに取出し、そして同側（後部虚血性）および対側半球に分割した。放射性標識抗体または好中球の沈澱が測定され、そして同側／対側のcpmとして表現される。

免疫組織化学：脳を、中大脳動脈閉塞後1時間で取出し、10%ホルマリンで固定し、パラフィン埋設し、そして免疫組織化学のために薄片に切り分けた。切片をアフィニティー精製ポリクローナルラビット抗ヒトP-セレクトリン抗体（1：25希釈、カリフォルニア州サンディエゴのファルミンゲン社（Pharmingen Co.））で染色し、そして一次抗体結合の部位を、エキストラアビジンペルオキシダーゼ（ExtrAvidin peroxidase）（ミズーリー州セントルイス（St. Louis, MO）のシグマ・ケミカル社（Sigma Chemical Co.））で検出したビオチン-接合ヒツジ抗ウサギIgG（1：20）を用いて可視化した。

データ解析：脳血流、梗塞容積、および¹¹¹In-PMN沈澱を、対になっていない変化量についてスチューデントt-試験を用いて比較した。2つのグループ

(実験対擬)の間の基線および最終(30分)抗体沈澱の間の目立った差異について試験するために二元ANOVAを行った。グループ内の差異(基線対30分の時点)を評価するために、対になっていない変化量についてのスチューデントt試験を行った。グループ間のいくつかの差異を、Chi-平方統計学でコンテンジェンシイ解析を使用して試験した。量は、統計学的に意義のあると考えられる p 値 <0.05 と一緒に、平均 \pm SEMとして表される。

結果:

マウスの脳卒中でのP-セ렉チン発現: P-セ렉チンが、活性化内皮細胞²⁰への白血球接着の初期段階を媒介するので、我々は、再灌流脳卒中のマウスのモデルでの初期の脳のP-セ렉チン発現を試験した。手術前に¹²⁵I-標識ラットモノクローナル抗-マウスP-セ렉チンIgGを与えたマウスは、擬操作の動物($p<0.001$ 、図31A)と比較して、再灌流の30分において、21.6%の抗体の蓄積の増加を示した。再灌流された半球でのこの程度の抗体沈澱が、非特異的蓄積よりむしろP-セ렉チン発現に依ったことを示すために、¹²⁵I-標識ラット非免疫IgGを与えた同じ処理をした動物で比較を行った。これらの実験は、非免疫IgG($p<0.025$ 、図31A)よりも有意に多くの抗-P-セ렉チンIgG蓄積があることを示し、P-セ렉チンが再灌流の30分以内に脳で発現されることを示唆する。P-セ렉チンについて免疫染色された脳組織の薄片の試験は、P-セ렉チン発現が、同側の大脳脂質での微小血管内皮細胞に一次的に局在化していることを示す(図31B)。

マウスの脳卒中における好中球蓄積: PMN流入が脳卒中後に起こる間の時間経過を詳細に描写するために、¹¹¹In-標識PMN蓄積を、MCAOの前、MCAOの直後、および10分後に、そして再灌流の30分、300分および22時間目に野生型(P S +/+)マウスで測定した。P S +/+ マウスでは、PMNsの蓄積は、局所虚血の開始後の初期に始まり、そして再灌流の期間中継続する(図31C)。この虚血後の好中球蓄積におけるP-セ렉チンの役割を確認するために、P-セ렉チン遺伝子(P S -/-)ヌルの同型接合体であるマウスを使用して、実験を行った。P S -/- マウスでは、中大脳動脈閉塞および再灌流後のPMN蓄積が有意に減少することを示した(図31B)。

脳血管逆流なしのP-セレクチンの役割：P S-/-マウスでのPMN蓄積の減少が、流入の再確立後の大脳血流を改善する結果になるかどうかを決定するために、相対的C B Fの一連の測定をP S+/+およびP S-/-マウスの両方でレーザードップラーによって得た。虚血の開始前（図32、点a）に、相対的な大脳血流は、グループ間でほとんど同一であった。中大脳動脈閉塞（図32、点b）は、両方のグループにおける大脳血流中の、ほとんど同じ減少に関連した。虚血45分で内腔内閉塞縫合（図32、点c）を中止する直前に、大脳血流は、わずかに上昇したが、ベースラインの流入と比較して有意に抑制されたままであった。再灌流を開始するために閉塞縫合（図32、点d）を中止する直前に、両グループでの大脳血流は、比較しうる程度（P S-/-およびP S+/+マウスでの基線の60%）に増加した。閉塞前のレベルに達する再灌流後の大脳血流の即座の不全は、大脳血管無再流²¹の特徴であり、その後再灌流後の大脳血流が減少し、遅延された虚血後の大脳低灌流²²を示す。再灌流の30分（図32、点e）までに、2つのグループの動物の間の大脳血流は異なり、P S-/-動物では、P S+/+対照（ $p < 0.05$ ）（図32、点f）よりも有意に多くの相対的脳血流を示す。この相違は、遅延された虚血後の大脳低灌流における有意な差異を反映し、そして22時間の観察期間の間持続した。

脳卒中転帰：P-セレクチン発現の機能上の意義を、P S-/-マウスでの脳卒中転帰の指数をP S+/+マウスでのものと比較することによって試験した。P S-/-マウスは、P-セレクチン+/+対照（図33A）と比較して、梗塞容積（ $p < 0.01$ ）での77%減少に基づいて、局所大脳虚血および再灌流の効果から有意に保護された。梗塞容積のこの減少は、P S-/-動物での生存が増加を伴った（ $p < 0.05$ 、図33B）。

P-セレクチン遮断の効果：欠失突然変異したマウスを使用して、脳卒中におけるP-セレクチン発現の機能上の役割を観察した後、P-セレクチンの製薬学上の遮断が、P S+/+マウスの脳卒中の結果を改善できるかどうかを測定するための実験を行った。手術直前に機能的に遮断するモノクローナルラット抗マウスP-セレクチン抗体（クローンR B 4 0. 3 4^{14, 18, 19}）または非免疫対照ラットI g Gを投与するストラテジーを用いて、中大脳動脈閉塞の直前に遮断抗

体を受けたマウスでは、30分までに後期再灌流血流を改善させたこと、並びに脳梗塞容積を減少させ、対照に比較して死亡率が減少する傾向が観察された（図34、最も左の6つの棒線）。脳卒中の新しい治療法としてP-セレクチン遮断のストラテジーの潜在的な臨床関連性を増大するために、対照または遮断抗体のいずれかを中大脳動脈の内腔内閉塞後に与える追試を行った（ほとんどの患者が、脳卒中の発症後に存在するので）。これらの研究では、梗塞容積の有意な減少が、脳血流が改善される傾向と同様に観察された（図34、最も右の6つの棒線）。

検討：

脳卒中の一次予防の近年における実質的な進歩にもかかわらず¹、進行性脳卒中を治療する治療的別法は、極端に制限されたままである。rt-PAでの虚血性脳卒中の治療後の死亡率が減少することを示している昨秋の2つの際立った治験の出版物^{2, 3}は、脳卒中の治療での血栓治療の新時代の先駆者と考えられた⁴が、その熱意は、ストレプトキナーゼで治療した虚血性脳卒中を示す患者に示される出血性形質転換および死亡率が上昇したことによって幾分減退した⁵。これらの多岐にわたる治験は、新規で安全な療法が、進行性脳卒中を治療するために開発されることをいままでよりいっそう重大にする。虚血後の脳への血流の回復は、初期治療介入の新たな機会を供するが、再灌流は、両刃の剣である。細胞毒潜在性の好中球^{2, 3}が示されると、虚血後脳組織への好中球流入が、実験的脳卒中に後にさらなる損傷および結果の悪化を引き起こし得る^{7, 24-27}ということには驚かされない。局所大脳虚血および再灌流のマウス・モデルを用いて、我々は、最近、脳卒中に続く22時間に、好中球蓄積における細胞接着分子ICAM-1の重要な貢献的役割を確認した⁷。しかし、大脳血管内皮ICAM-1発現の増大は、時間を要するデノボ（新規）の転写および翻訳事象を必要とする。対称的に、好中球接着の最も初期段階を媒介する膜伸縮糖タンパクであるP-セレクチンは、虚血内皮細胞表面に迅速に発現されるように予め形成された保存プールから移動されるのであろう^{8, 28}。脳卒中の血栓治療の臨床治験では、潜在的な利益に対して狭い時間枠（脳卒中の発症の最初の数時間以内）を示す^{2, 3, 5}ので、これは、PMN接着の最も早期に干渉するように設計されたストラテジーが、ヒトの脳卒中で理論的な利益のあるものである可能性がある。これらの治験は、初期

治療の介入を表す多数の患者を生じるにちががなく、それにより医療的に血管を移植された領域での再灌流傷害の問題と取組む必要が増す。さらに、それらは、脳卒中の病原に対する個々の接着分子の貢献を理解する緊急の必要を強調する。

虚血および再灌流の他のモデルでのP-セ렉チンの役割を記述する文献の考慮しうる本文^{8, 29-32}を考慮すると、脳卒中でのP-セ렉チンの役割については驚くほどほとんど知られていない。接着分子の必要性は、研究の血管床と症状の間で変化するので、大脳血管でのP-セ렉チンの特定の役割についての知識は重要である。例えば、腸移植のモデル³³で、抗-P-セ렉チン抗体は、再灌流傷害を減少させなかった一方で、抗-CD11/CD18抗体は減少した。P-セ렉チン遮断は、ラットの腸間膜の虚血および再灌流モデルでのPMN接着およびアルブミン漏れを減少させるのに効果的でなかったが、ICAM-1の遮断は有効であった³⁴。ラットの後足の虚血/再灌流モデルでは、PMN接着のためのセ렉チンの必要性は、肺および脚の筋肉血管床の間で異なった³¹。

我々の知識に関して、虚血脳でP-セ렉チン発現が増加されることを記述する唯一の公表された研究は、P-セ렉チン発現が、レンズ核線状体の微小血管系で増大されたという霊長類の脳卒中の組織病理学上の説明である¹⁰。最近の研究は、P-セ렉チン発現が、再灌流脳卒中のマウス・モデルにおける虚血後大脳の好中球蓄積、無再流、および組織損傷に寄与するかどうかを研究することを企てた。マウスでの局所大脳虚血および再灌流の最近確立されたモデルを用いて、P-セ렉チン発現は、虚血領域での内皮免疫染色が増加し、そして放射性標識抗体の沈澱が増加することによって示された。後者の技術では、虚血半球内の抗体沈澱は、各動物での非虚血半球でのものに正常化されて、注射容量または分配の量での潜在的要因を最小限にすることだけでなく、様々な抗体を与えられた動物の間の比較を可能にした。虚血性皮質での内皮バリアー機能の崩壊は、非選択的抗体の沈澱を増大させるので、類似の実験が、対照ラットIgGで行われた。これらのデータは、P-セ렉チンに結合する抗体が、対照抗体と比較して加速した速度で沈澱することを示し、それにより局所P-セ렉チン発現が、再灌流組織で増大されたことを示唆する。マウスモデルでのこのデータは、P-セ렉チン発現が、脳卒中のヒト・モデルで報告されたこととに対応し、虚血イベント

後の1時間以内に増加される。虚血後のゾーンにPMNsを動員する上でのP-セレクチン発現の役割は、¹¹¹I n-標識PMNsの蓄積を測定したストラテジーを用いて明かにされた。我々は、22時間までに、虚血半球でPMN蓄積を上昇することを先に報告したが⁷、最近の時間経過のデータは、PMNの蓄積が、虚血の発症直後に開始することを示す。P-セレクチン遺伝子を発現しないことは、PMN蓄積が減少されたことに関連し、それにより虚血後大脳のPMN動員にP-セレクチンが関与することを示唆する。しかし、P-セレクチン無しの動物は、22時間までに並みの（対照より少なくはあるが）好中球蓄積を示した。このデータは、P-セレクチンが虚血後大脳のPMN動員の原因となる唯一のエフェクター機構ではなく、そしてICAM-1も虚血後のPMN接着に関与するという我々の先のデータ⁷と一致することを示す。さらに、このデータは、P-セレクチン欠乏マウスでのチオグリコレートの腹腔内点滴注入が、PMN動員の（不在でなく）遅延を引起こした⁹。

再灌流が失敗した理由を確認する重大な必要性のために、最近の研究では、適切な灌流圧が回復するにもかかわらず、血流が再灌流の間に減少する現象である遅延された虚血後大脳の低灌流におけるP-セレクチンの役割が試験された^{21、22}。虚血症の心臓のモデルでは、無再流は、再灌流後時が経過したときに悪化し³⁵、それにより、進行性微小循環血栓症、血管運動の機能不全、およびPMN動員のような、動員されたエフェクター機構の重要な役割を示唆する。P-セレクチンおよびICAM-1-依存性接着反応³⁶とPMNキャピラリープラギング³⁷との両方が、虚血後の無再流に関与する他のモデルで示された。脳では、PMNsは、虚血後大脳の無再流^{38、39}関与するが、P-セレクチンの役割は、先に解明されていなかった。

最近の研究は、虚血後大脳血管の無再流の存在、時間経過、およびP-セレクチン依存性を立証するために、比較的非侵襲性の技術（レーザードップラー）を使用して、相対的な大脳血流の一連の測定法を得る。糸通し手段それ自身が、血管損傷およびその後の脳梗塞の原因でないことを示すために、45分の非閉塞期間の間に、ナイロン縫合を内部頸動脈に通す、擬虚血症実験を行った（n = 10）。これらの実験で、45分の期間中にレーザードップラーによる灌流の減少がない

ことに基づいて、糸通しは、非閉塞性であることが示された。その後、脳を収集し、そしてTTCで24時間染色したとき、脳梗塞の証拠を示すものはなかった。したがって、我々は、糸通し手段それ自体が、我々の主要な結果の変量に影響を及ぼすのに十分な損傷を誘発しないと結論づけることができる。相対的な大脳血流を実験動物において明らかな中大脳動脈閉塞後に調査したときに、我々は、P-セレクチン無しおよび対照の動物が、実際に同じ程度の虚血症にかかったこと（両方で中大脳動脈閉塞後の相対的な大脳血流がインティアル (i n t i a l) の4.5倍低下した）を観察した。しかし、閉塞縫合がその場に残っているにもかかわらず、閉塞後の最初の10分では相対的な大脳血流に僅かな増加があった。このことは、我々が一貫して行った実験的観察であり、幾つかの可能な説明がありそうである。虚血性領域で開口するある程度の側軸索流でありそうである。別の筋道の通った説明は、数分以内に適度に解消する、閉塞カテーテル先端の領域にある当初の血管痙攣の要素がありうることである。マウスの血管系が小さなサイズであるために、これらの説明の両方が可能であるが、我々は、我々のモデルに確信をもってその機構を同定できない。我々が、対照および実験動物の両方に同じ程度の流れの補充を観察する限り、これらのデータは、P-セレクチンが、再灌流脳卒中での大脳組織傷害の重要なメディエーターであるという我々の主要な結論を変えさせない。

内膜内閉塞縫合の除去に続いて、血流の即時の回復は、P-セレクチン+/+および-/-動物の両方で同じであった。流れのレベルが基線に決して戻らなかった（反応性充血と共に見られうるようなオーバーシュートもなかった）という事実は、虚血時期の重篤度および期間による可能性があり、それは、非セレクチン依存性機構によって引き起こされる血栓または好中球動員のような虚血後大脳血管の無再流の他の機構を動員するように思われる。後者の時点で試験されるときでさえ（閉塞縫合を解いた後30分から22時間までのような）、P-セレクチン-/-動物での大脳血流に僅かな減少があることを示すことは興味深い。22時間までの大脳血流におけるこの後期の（限定されるが）減少は、同じ期間をかけたP S -/-動物で観察された適度なPMNの動員と一致し、再度これにより、P S -/-動物での（I C A M - 1のような）他の流れを制限するエフェクター

機構の動員を示唆する。

P-セレクチン発現の機能上の効果は、最近の一連の研究から明らかである。P-セレクチン遺伝子を発現できない動物（または機能的に遮断する抗-P-セレクチン抗体で処置したPS+/+動物）は、対照と比較して、梗塞が小さく、生存が改善されていることを示す。これらのデータが、脳卒中でのICAM-1発現のための破壊的な役割を示す先に公表されたデータと一緒に考慮されると⁷、虚血後大脳脂質にPMNsを動員する複数の手段があること、および各々の遮断が、ヒトでの脳卒中の結果を改善する強力なストラテジーを表すことが徐々に明らかになる。脳卒中に続く神経の死の前進する波先を停止させる上で時期的に適切な再灌流の重要さの我々の最近の認識を考慮すると、その初期段階でのPMN接着に干渉することは、病的状態および死亡率を減少させる魅力的な別法であるように見える。事実、抗-接着分子のストラテジーは、これら自体の正確さ（すなわち、血栓崩壊に不適当な患者を含め）に有益であるのみならず、血栓崩壊介入⁴⁰の機会の窓を広げうる。最近の一連の研究は、再灌流された脳卒中に効果をもたらす組織生理学上の機構を我々が理解するのに貢献する。これらの研究は、PMN蓄積を減少する再灌流環境を最適にする進行性脳卒中のための治療法の臨床治験の必要性を示唆する。

資料：

参考文献

trials of therapies for evolving stroke which optimize the reperfusion milieu to reduce PMN accumulation.

References:

1. Bronner LL, Kanter DS, Manson JE: Primary prevention of stroke. N Engl J Med 1995;333(21):1392-1400
2. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group : Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. N Engl J Med 1995;333:1581-1587
3. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH, Hennerici M, for the ECASS Study Group : Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. JAMA 1995;274(13):1017-1025
4. del Zoppo GJ: Acute stroke - on the threshold of a therapy. N Engl J Med 1995;333(13):1632-1633
5. Hommel M, Cornu C, Boutitie F, Boissel JP, The MultiCenter Acute Stroke Trial - Europe Study Group : Thrombolytic therapy with streptokinase in acute ischemic stroke. N Engl J Med 1996;335:145-150
6. Baringa M: Finding new drugs to treat stroke. Science 1996;272:664-666
7. Connolly ESJr, Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos J-C, Pinsky DJ: Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. J Clin Invest 1996;97:209-216
8. Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, Oz MC, Wagner DD, Mayadas TN, Johnson RC, Hynes RO, Heath M, Lawson CA, Stern DM:

Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. J Clin Invest 1996;97:493-500

9. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD: Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in p-selectin deficient mice. Cell 1993;74(3):541-554

10. Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, del Zoppo GJ: P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. Stroke 1994;25:202-211

11. Connolly ES Jr, Winfree CJ, Stern DM, Solomon RA, Pinsky DJ: Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. Neurosurg 1996;38(3):523-532

12. Barone FC, Knudsen DJ, Nelson AH, Feuerstein GZ, Willette RN: Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy. J Cereb Blood Flow Metab 1993;13:683-692

13. Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Bulsinelli W: Continuous measurement of cerebral blood flow by laser-doppler flowmetry in a rat stroke model. J Cereb Blood Flow Metab 1989;9:589-596

14. Ley K, Bullard DC, Arbones ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, Beaudet AL: Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. J Exp Med 1995;181:669-675

15. David GS, Reisfeld RA: Protein iodination with solid state lactoperoxidase. Biochem 1974;13:1014-1021

16. Bederson JB, Pitts LH, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM: Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction

in rats. Stroke 1986;17:1304-1308

17. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA: Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. Science 1994;265:1883-1885

18. Bösse R, Vestweber D: Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. Eur J Immunol 1994;24:3019-3024

19. Kunkel EJ, Jung U, Bullard DC, Norman KE, Wolitzky BA, Vestweber D, Beaudet AL, Ley K: Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and ICAM-1. J Exp Med 1996;183:57-65

20. Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. Nature 1990;346:425-434

21. Ames AI, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G: Cerebral ischemia II: the no reflow-phenomenon. Am J Pathol 1968;52:437-447

22. Levy DE, Van Uitert RL, Pike CL: Delayed postischemic hypoperfusion: a potentially damaging consequence of stroke. Neurology 1979;29:1245-1252

23. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. N Engl J Med 1989;320(6):365-376

24. Hallenbeck JM, Dutka AJ, Tanishima T, Kochanek PM, Kumaroo KK, Thompson CB, Obrenovitch TP, Contreras TJ: Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. Stroke 1986;17:246-253

25. Kochanek PM, Hallenbeck JM: Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. Stroke 1992;23(9):1367-1379

26. Dutka AJ, Kochanek PM, Hallenbeck JM: Influence of granulocytopenia on canine cerebral ischemia induced by air embolism. Stroke 1989;20:390-395
27. Bednar MM, Raymond S, McAuliffe T, Lodge PA, Gross CE: The role of neutrophils and platelets in a rabbit model of thromboembolic stroke. Stroke 1991;22(1):44-50
28. Geng J-G, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP: Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. Nature 1990;343:757-760
29. Weyrich AS, Ma X-L, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM: In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. J Clin Invest 1993;91:2620-2629
30. Winn RK, Liggitt D, Vedder NB, Paulson JC, Harlan JM: Anti-P-selectin monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear. J Clin Invest 1993;92:2042-2047
31. Seekamp A, Till GO, Mulligan MS, Paulson JC, Anderson DC, Miyasaka M, Ward PA: Role of selectins in local and remote tissue injury following ischemia and reperfusion. Am J Pathol 1994;144:592-598
32. Kubes P, Jutila M, Payne D: Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. J Clin Invest 1995;95:2510-2519
33. Slocum MM, Granger DN: Early mucosal and microvascular changes in feline intestinal transplants. Gastroenterology 1993;105:1761-1768
34. Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, Rusche JR, Granger DN: Molecular determinants of

reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. Circ Res 1994;74:336-343

35. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB: The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. J Clin Invest 1974;54:1496-1508

36. Jerome SN, Dore M, Paulson JC, Smith CW, Korthuis RJ: P-selectin and ICAM-1-dependent adherence reactions: role in the genesis of postischemic no-reflow. Am J Physiol 1994;266:H1316-H1321

37. Engler RL, Schmid-Schonbein GW, Pavelec RS: Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. Am J Pathol 1983;111:98-111

38. Mori E, del Zoppo GJ, Chambers JD, Copeland BR, Arfors KE: Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. Stroke 1992;23:712-718

39. Groggaard B, Schurer L, Gerdin B, Arfors KE: Delayed hypoperfusion after incomplete forebrain ischemia in the rat: the role of polymorphonuclear leukocytes. J Cereb Blood Flow Metab 1989;9:500-505

40. Bowes MP, Rothlein R, Fagan SC, Zivin JA: Monoclonal antibodies preventing leukocyte activation, reduce experimental neurological injury, and enhance efficacy of thrombolytic therapy. Neurology 1995;45:815-819

実施例 11：虚血性疾患を治療するための一酸化炭素の使用－肺虚血症での一酸化炭素の保護的効果の例

当初の本出願で、我々は、一酸化炭素の内因性の生成または外因性の一酸化炭素の投与が、引き続く虚血傷害に対して脳を保護する上で有益であることを示すデータを明らかにした。虚血性疾患を治療する上で一酸化炭素を使用する別の例として、我々は、ラットに一酸化炭素を投与して、移植のために肺保存を改善するその効果を試験した（このことは、肺がレシピエントから取出されるので、虚血性疾患に類似する；肺が提供者からレシピエントに移される期間中、血流での干渉がある。）。

肺保存における一酸化炭素の影響を試験する方法：

保存溶液を作るために使用した材料

全ての実施例について、塩基保存溶液は、改質ユーローコリンズ（Euro-Collins）（EC）溶液（ $\text{Na}^+ 10 \text{ mEq/L}$ 、 $\text{K}^+ 1.5 \text{ mEq/L}$ 、 $\text{Cl}^- 15 \text{ mEq/L}$ 、 $\text{HPO}_4^{2-} 8.5 \text{ mEq/L}$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^- 1.5 \text{ mEq/L}$ 、 $\text{HCO}_3^- 10 \text{ mEq/L}$ ）から構成された。

肺回収、保存および移植

同系交配の雄のルイスラット（250–300グラム）を、ジ・アメリカン・アカデミー・フォー・アクレディテーション・オブ・ラボラトリー・アニマル・ケア（AAALAC）によって規定された指針にしたがって、コロンビア大学（Columbia University）でのインサイチュウチューショナル・アニマル・ケア・アンド・ユーズ・コミッティー（the Institutional Animal Care and Use Committee）によって承認されたプロトコルにしたがって全実験に使用した。肺移植実験を、以下の方法で行った。ドナーラットに500単位のヘパリンを静脈内に投与し、そして肺動脈（PA）を、20 mmHgの一定圧で、30 mL容量の4℃保存溶液で洗い流した。肺がこの方法で保存されるとき、注入された洗浄溶液のほとんどは、肺のドナーに形成された左の動脈孔から、並びに横断面に続く肺静脈から外に出る。

その後、左肺を回収し、カフを各血管断端に載せ、シリンダーを気管支に挿入し、肺を、PA洗浄溶液と一致した4℃の保存溶液中で6時間浸水させた。性別

／株／サイズの適合したラットを、麻酔し、挿管し、そしてげっ歯類用換気装置（マサチューセッツ州サウスナチック（South Natick）のハーバード・アパレイタス（Harvard Apparatus））を用いて100%O₂で換気した。正常位の左の肺の移植を、全ての吻口のための迅速なカフ技術を用い、5分未満に維持された温和な虚血時間で、左開胸を通して行った。移植肺に血流および通気を再確立させながら、臍帯のクロスクリップを解放した。その後、係蹄を、右PAの周りに通し、そしてミラーのカテーテル（2F；テキサス州ヒューストン（Houston, TX）のミラー・インストルメンツ（Millar Instruments））を、主要なPAおよび左房（LA）に導入した。ドップラー流プローブ（ニューヨーク州イサカ（Ithaca, NY）のトランソニックス（Transonics））を、主要なPAの周りに置いた。

肺移植片機能の測定

マックラボ（MacLab）およびマッキントッシュ（Macintosh）IIci コンピューターを使用して、オンラインの血行動態のモニタリングを達成した。測定した血行動態のパラメーターとしては、LAおよびPA圧力（mmHg）、およびPA流（mL／分）が挙げられる。モデルABL-2気体分析機（デンマーク国コペンハーゲン（Copenhagen, Denmark）のラジオメーター（Radiometer））を用いて、100%O₂の吸息の間中、動脈内の酸素圧（pO₂, mmHg）を測定した。（平均値PA圧力－LA圧力）／平均血PA流としてPVRsを計算し、そしてmmHg／mL／分として表された。ベースライン測定の後、生来の右PAを繋げ、そして30分での安楽死の時まで（またはレシピエントの死まで）5分毎に一連の測定をした。

一酸化炭素の投与

手術前の規定時間（4、8または12時間）に、ラットを、釣鐘型のジャーに入れ、そして一酸化炭素を、様々の濃度（0.01%、0.03%または0.1%）で投与し、残りの気体混合物は、室内の空気から構成される。（それを動物の快適な湿度にするために、投与前に気体を水のジャーを通過させた。）露出の開始に続く規定の時間に、ラットを麻酔し、そして肺を上述のとおり回収した。これらの提供者の肺を、連続肺移植試験に使用した。

結果および検討：

これらの実験の結果は、未処理の対照と比較して、肺回収前の一酸化炭素の吸入は、移植後の肺の際立った保護を供する。この保護は、（１）一酸化炭素一前処理ドナーの肺のレシピエントにおける動脈の酸素付加が改善されること、（２）一酸化炭素一前処理ドナーの肺を使用することで、肺動脈の血流が増加される（肺の血管の抵抗が減らされる）こと、および（３）対照と比較して一酸化炭素一前処理ドナーの肺のレシピエントの生存が改善されることによって立証される。一酸化炭素の有益な効果は、用量依存性であり、すなわち、最善の保護は、０．１％の用量で見られ、中程度の保護は、０．０３％用量で見られ、そして最小限の保護は、０．０１％用量で見られた。より長い暴露は、より大きな保護を供するよう見える点で、一酸化炭素の利益的効果はまた時間的依存である。一緒に、これらのデータは、一酸化炭素は、別の虚血性疾患（肺虚血症）で保護できることを示し、そしてその結果が、同様に他の虚血性疾患に一般化しうることを示唆する。

実施例 12：マウスでの脳内出血を客観的に定量するための分光光度ヘモグロビンアッセイの使用

要約

背景および目的 虚血性脳卒中を治療する新規抗凝固剤または血栓溶解法を開発する上で非常に興味深い。しかし、現時点で、これらの薬剤の出血潜在力を正確に評価する手段は限られている。最近の研究は、マウスモデルでの脳内出血の程度を正確に定量する方法を開発および確認するために計画された。方法 マウスモデルでは、脳内出血（ICH）を、コラゲナーゼ B のみ（ 6×10^{-6} 単位、 $n = 5$ ）またはコラゲナーゼ B に続く静脈組織プラスミノゲン活性化剤（rt-PA、 0.1 mg/kg 、 $n = 6$ ）の定位的に実質内注入によって導入した。対照は、生理食塩水（ $n = 5$ ）の定位的注入を伴う擬手術または未処理動物（ $n = 5$ ）のいずれかから構成される。ICH は、（１）皮質薄片での最大の出血半径に基づいたスケールによって格付けされ、そして（２）均質化マウス脳の化学的に還元した抽出物中のシアノメテモグロビンを測定する分光光度アッセイによって定量した。この分光光度アッセイは、別々のコホートの均質化脳に加えた既知量のヘモグロビンまたは自己の血液を使用して確認された。このアッセイを使

用して、局所中大脳動脈閉塞／再灌流後の出血の程度を、閉塞後に高用量 I V r t - P A (10 mg / kg、n = 11) で処理したマウスおよび脳卒中にはかけられたが、生理学的食塩水で処理されたマウス (n = 9) で定量した。結果 新鮮な全脳組織均質物に添加された既知量のヘモグロビンまたは自己の血液は、シアノメテモグロブリン (それぞれ $r = 1.00$ および 0.98) の吸収ピークで添加された量および OD の間に線状関係を示した。実験的に誘導された ICH を定量するために、インビボでの研究を行ったとき、コラゲナーゼ B の脳内注入を受ける動物は、生理食塩水注入対照より明かに高い OD s (2.1 倍増加、 $p = 0.05$) を示した。脳卒中 (卒中) の中大脳動脈閉塞および再灌流では、再灌流後の r t - P A の投与は、生理学的食塩水溶液を受けた動物 ($p < 0.001$) と比較して 1.8 倍まで OD を増大させた。ICH (視覚的スコアおよび OD) を測定する 2 つの方法を比較した場合、直線的な相互関連があった ($r = 0.88$)。追加の実験は、生存能力のある脳組織を染色するのに一般的に使用されるトリフェニルテトラゾリウムが、ICH の分光光度計定量に干渉しないことを示した。結論 これらのデータは、分光光度計アッセイが、マウス ICH を正確にそして信頼性のあるように定量することを示す。この新規な方法は、脳卒中を治療する新規抗凝固剤または血栓崩壊 ストラテジー の出血の危険を客観的に評価する助けをし、そして他の形態の脳内出血の定量化を促進できる。

導入

虚血性脳卒中は、急性脳卒中の症状の最大限の大半の原因である。したがって、血流を脳の虚血領域に迅速にそして効果的に再保存できる ストラテジー を計画する上で膨大な利益がある。ヘパリンは、初期脳卒中 (T I A s) ³ に有効でありうるが、脳卒中の急性期の間のその使用は、高度の病的状態および脳内出血に関連しうる¹⁻⁴。同様に、1960年代当初は、急性脳卒中についてのストレプトキナーゼ治験でのつまらない結果のために、ここ30年間、急性脳卒中を血栓崩壊するのに臨床医を嫌がらせた^{5, 6}。この嫌気は、ストレプトキナーゼが、死亡率および脳内出血の危険を増大させることに関連した最近の治験によって確認された⁷。他方では、r t - P A で処置される急性脳卒中を示す患者の サブセッ ト が、症状発症の最初の3時間以内に処置される場合に長期病的状態を減少させ

ることを示し⁹⁻¹¹、進行中の脳卒中を治療するのに組換え体組織型プラスミノーゲン活性化剤 (r t - P A) を使用することは、さらなる信頼を示した⁸。そうであっても、同じ薬剤 (r t - P A) を使用する他の治験は、利益を示すのに失敗するか、または過剰に高い比率の ICH を有した^{9, 12-15}。

臨床データのこの混乱する難局は、迅速な再灌流に達する改善されたストラテジーを確認する緊急の必要性を強調する。この目的に向けて、脳卒中での適時の再灌流の潜在的利益が、脳内出血が増加する危険に対して客観的に評価されうる実験モデルを確認するのは避けられない。臨床的脳卒中のための血栓崩壊療法のほとんどの動物研究で、脳内出血の危険は、定量的に測定されるよりむしろ概算されてきた¹⁶⁻²⁴。最近の研究は、急性脳卒中のための新たな抗凝固剤または血栓崩壊治療の潜在的な危険を評価するために、マウスのモデルでの脳内出血の程度を正確に定量する方法を開発および確認することが計画された。

材料および方法

実験動物

本研究で、雄の C 5 7 B L / 6 J マウスを、ジャクソン・ラボラトリーズ (Jackson Laboratories) (メイン州バー・ハーバー (Bar Harbor, ME)) から購入し、そして 8 から 10 週齢 (22 - 32 g) の間で使用した。研究所で公認されたプロトコルにしたがって、全方法を行い、そしてジ・アメリカン・アカデミー・フォー・アクレディテーション・オブ・ラボラトリー・アニマル・ケア (AAALAC) によって提供された指針に従った。

脳内出血についての分光光度アッセイ

以下の実験方法にかけられた脳のヘモグロビン含有率を、以下のとおり分光光度アッセイを使用して定量した。全脳組織を、新たに安楽死された対照または実験動物から得、そして各脳を以下のとおり個々に処理した。蒸留水 (250 μ l) を、各脳に添加し、つづいて 30 秒間均質化し (ニューヨーク州ウエストバリー (Westbury, NY) のブリンクマン・インストルメンツ社 (Brinkman Instruments, Inc.))、1 分間プラスの超音波発生装置 (ペンシルベニア州カレッジビル (Collegeville, PA) のスミスクライン・コーポレーション (SmithKline Corporation)) で氷上で超音波処理し、そして 30 分間 13,000 r p m で遠

心分離した（イリノイ州ディアフィールド（Deerfield, IL）のバクスター・サイエンティフィック・プロダクツ（Baxter Scientific Products））。ヘモグロビン含有上清を収集した後、 $80\mu\text{l}$ のドラッキンの試薬（Drabkin's reagent）（ミズーリー州セントルイス（St. Louis, MO）のシグマ・ダイアグノスチックス（Sigma Diagnostics）から購入； $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 200\text{mg/L}$ 、 $\text{KCN} 50\text{mg/L}$ 、 $\text{NaHCO}_3 1\text{g/L}$ 、 $\text{pH} 8.6^{25}$ ）を、 $20\mu\text{l}$ のアリコート量に添加し、そして15分間静置させた。この反応は、ヘモグロビンを、 540nm に吸収ピークを示し、そしてその後、その濃度は、 550nm 波長での溶液の光学的密度によって評価することができる²⁶、シアノメテモグロビンに変換する。これらの手段に続く測定吸収が、ヘモグロビンの量に影響を及ぼすことを確認するために、既知量のウシの赤血球ヘモグロビン（ミズーリー州セントルイス（St. Louis, MO）のシグマ（Sigma））を、各脳組織アッセイと一緒に類似の方法を使用して分析した。追加の測定法として、血液を、安楽死に続く心臓穿刺によって対照マウスから得た。その後、この血液の増加アリコート量を、未処理マウスから得た新たに均質化した脳組織に添加して、標準吸収曲線を作成した。

コラゲナーゼ誘導脳内出血

マウスの脳内出血を誘導するための一般的手段は、ラットで先に記述された方法²⁷から適合させた。ケタミン（ 10mg/ml ）およびキシラジン（ 0.5mg/ml ） 0.35ml の腹膜内注射で安楽死させた後、マウスを、定位の頭部枠にうつむいて位置決めした。頭蓋冠を、ナジオンから上部うなじの線まで正中線の頭皮切開によって露出させ、そしてその後、皮膚を、横に開創した。可変の高速ドリル（ウィスコンシン州ラシーン（Racine, WI）のドレメル（Dremel））を用いて、 1.0mm ボール穴をブレグマの後方 2.0mm 、そして正中線の右 2.0mm に造った。単独の22ゲージの血管カテーテルの針を、定位的誘導装置を用いて、右副皮質／脳幹神経節（座標： 2.0mm 後方、 2.0mm 横）に挿入した。針を、プラスチック製管によって、微小注入シリンジに密着させ、そして溶液を、4分間、1分当たり $0.25\mu\text{l}$ の速度で注入ポンプ（インディアナ州ウエスト・ラファイエット（West Lafayette, IN）のバイオアナリティカル・システムズ（Bioanalytical Systems））を用いて脳に注入した。動物は、（1）

1 μ l の正常な生理食塩溶液中の 0.024 μ g コラゲナーゼ B (ドイツ国マンハイム (Mannheim, Germany) のベルリンガー・マンハイム (Boehringer Mannheim)) (コラゲナーゼ) ; (2) 1 μ l の正常な生理食塩溶液のみ (擬) ; (3) 未処理 (対照) ; または (4) 上述のとおり、しかしすぐに続いて、陰茎背静脈注入によって投与される組換えヒト組織プラスミノゲン活性化剤 (カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ (South San Francisco) のジェネンティック社 (Genentech Inc.)、0.2 ml の正常な生理食塩溶液中 1 mg / kg) を投与して定位的に誘導されたコラゲナーゼ B の注入 (コラゲナーゼ + r t - PA) のいずれかを受けた。コラゲナーゼ、擬性、およびコラゲナーゼ + r t - PA のグループで、定位的な針を、注入に続いて直に取除き、そして切開を手術用ステイプルで閉じた。脳組織を、迅速な麻酔下の断頭の直後に回収した。

マウスの局所脳虚血症モデルでの止血変換

先に詳細に記述された方法^{28, 29}を用いて、一過性の右中大脳動脈閉塞によって、局所脳虚血を動物に引き起こした。簡潔に、加熱平滑 12 または 13 mm 5-0 または 6-0 ゲージのナイロン縫合を、中大脳動脈のレベルまで右内部頸動脈に通した。45 分後、閉塞縫合を、取除いて、灌流を再確立した。閉塞縫合の除去の直後に、動物は、静脈の組織プラスミノゲン活性化剤 (0.2 ml の通常の生理食塩溶液中 10 mg / kg、脳卒中 + r t - PA) または陰茎背静脈注射によって与えられた通常の生理食塩溶液 (脳卒中 + 生理食塩水) のいずれかを受けさせた。24 時間で、脳組織を、迅速な麻酔下の断頭直後に回収した。非梗塞脳組織^{28, 30}から得た梗塞物を区別するのに共通に使用される、2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド (TTC) の効果を評価するために、非操作 (対照) 脳を、半分に分割し、0.9%リン酸緩衝生理食塩水中の 2% TTC (ミズーリー州セントルイス (St. Louis, MO) のシグマ・ケミカル社 (Sigma Chemical Company)) に浸漬して漬け、37°C で 30 分間インキュベートし、そしてその後、分光光度ヘモグロビンアッセイについて上で記述されたとおりに製造した。各脳の他の半分を、同じ期間、生理食塩水に浸漬し、そしてその後、分光光度ヘモグロビンアッセイについて上で記述された手段にかけられた。

定量的脳内出血アッセイの確認

ICHの程度を、盲検観察者によって最初に視覚的に格付けした。マウスでの脳内出血の視覚的格付けのために、その手段（コラゲナーゼ誘導止血またはMCA閉塞）に続いて24時間の時点まで生存したマウスから得た脳を、マウスの脳マトリックス（ミシガン州ワーレン（Warren, MI）のアクティベイショナル・システムズ社（Activational Systems Inc.））に載せて、1mmの一連の皮質薄片を得た。薄片を、盲検観察者によって検査し、そして脳に、薄片のいずれにも見られる最大限の出血半径に基づいた等級スケールから ICH スコアを付与した [ICHスコア0、出血なし；1、<1mm；2、1－2mm；3、>2－3mm；4、>3mm]。その後、各脳から得た切片を保存し、均質化し、そしてその後分光光度ヘモグロビンアッセイについて上で記述された手段に従って処理した。

統計学

示された相関係数でピアソン直線相関を用いて、視覚的に測定した ICH スコアおよび ICH の分光光度測定の間対比を行った。所定の処置（コラゲナーゼ、擬、脳卒中など）が、分光光度または視覚的格付けした ICH のいずれかで際立った効果を示したかを確認するために、独立両側検定を用いて、比較を行った。非パラメーター性データ（視覚的 ICH スコア）については、マンローホイットニー試験を使用して、非パラメーター分析を行った。値は、統計学的に有意であると考えられる $p < 0.05$ で、平均値 \pm SEM として示される。

結果

分光光度ヘモグロビンアッセイ

分光光度ヘモグロビンアッセイの信頼性および再現性を測定するために、当初の研究を行った。最初の組の実験で、先に公表された手段にしたがって、既知量のヘモグロビンシアノメテモグロビンに変換し、そしてODを測定した [図 3 5 A]²⁶。第二の組の実験では、既知量の自己の血液を、上述のとおり試験片をさらなる処理と一緒に、固定量の新たな脳組織均質化物に添加した。これらのデータは、550nmでのシアノメテモグロビン含有上清の光学密度が、添加血液の量と直線的な相関関係があったことを示した [図 3 5 B]。これらのデータ

は、平均値の比較的小さな標準誤差によって測定されたとおり、素晴らしい再現性とともに、厳密な直線的な相関関係（図35Aおよび35Bについて、それぞれ $r = 1.00$ および 0.98 ）を示す。TTC（非梗塞脳細胞から梗塞物を区別するのに一般に使用される^{28, 30}）が、分光光度ヘモグロビンアッセイに影響を及ぼさないことを確認するために、非操作（対照）脳を半分に分割し、その半分が標準TTC染色手段にかけられ、そして半分が対照として生理食塩水で処理された。これらのデータ（図35B、実線と破線を比較）は、TTCでの脳組織の前処理は、分光光度ヘモグロビンアッセイに影響を及ぼさないことを示す。

この方法が、ICHを検出できるかどうかを決めるために、実質内のコラゲナーゼ注入または中大脳動脈閉塞／再灌流の2つの別々の手段によって起されるマウスの脳内出血でアッセイを行った。最初的手段では、血管壁を弱めてICHを促進する（コラゲナーゼグループ）ために、コラゲナーゼBを、パール穴を通して局所注入として使用した。ICHの性質および程度をさらに増大させるために、その手段に続いてrt-PAの迅速な投与を行って、類似の手段を行った（コラゲナーゼ+rt-PAグループ）。パール穴を開けるが、生理学的食塩水の点滴注入を共に含む擬操作（擬）、および未処理グループ（対照）の2つの対照症状も含まれる。これらの実験は、擬処理動物または正常対照と比較してコラゲナーゼ注入が、分光光度アッセイ（特に、コラゲナーゼ+rt-PAで）によって検出された脳内血液の量を増加させることを示した〔図36A〕。

第二そしておそらくそれ以上のICHを誘導する臨床的に同類の方法では、脳卒中は、中大脳動脈の一過性内膜内閉塞、続いて再灌流によって作り出される。さらに、我々は、血栓崩壊剤の投与によって、出血変換の性質を増大させることを試みた。正常な生理的食塩溶液を受けたもの、または内腔内の閉塞縫合を切除した直後に静脈内のrt-PAを受けたものの2つのグループを研究した。これらのデータは、脳卒中に続いて繊維素溶解剤を添加すると、分光光度ヘモグロビンアッセイによって検出されるICHの量が増加することを示す〔図36B〕。基線吸収が、対照／未処理動物より脳卒中にかけた動物でのほうが低いことに注目するのは興味深い〔図36Aおよび36B〕。どのように残りの血管内血液が、分光光度ヘモグロビンアッセイに影響を及ぼしうるかをさらに調べるために、脳

回収のための動物の断頭の直前に、生理学的食塩水の頭部灌流を行った（左心室を介して投与された）実験を行った。脳回収の前に心臓の生理食塩水の灌流を受けた対照動物（ $n=5$ ）で、組織標品および分光光度ヘモグロビンアッセイに続く平均値の光学密度は、 0.25 ± 0.3 だった（これは、手術なしまたは擬似手術（ $n=10$ 、OD 0.34 ± 0.05 、 $p=0.05$ 対心臓灌流対照）のいずれかにかけた非心臓灌流動物に見られる光学密度より低い。）。一方では、脳卒中に続いて、心臓の生理食塩水の灌流が行われるかどうかをO.D.での差異がなかった（心臓の生理食塩水の灌流なしの脳卒中については 0.15 ± 0.04 、 $n=5$ ；心臓の生理食塩水の灌流を伴う脳卒中については 0.15 ± 0.03 、 $P=NS$ ）。生理食塩水を灌流し、脳卒中に罹っている動物を、生理食塩水を灌流し、脳卒中に罹っていない動物と比較したとき、分光光度ヘモグロビンアッセイに伴われてODで明らかな減少があった。これらのデータは、脳卒中に罹っている動物が、虚血症に伴う同側のMCA領域での血液の総量を減少させる結果として、検出された脳内血液が少ないことを示すことを示唆する。

視覚的ICHスコア

分光光度ヘモグロビンアッセイをさらに確認するために、我々は、文献³¹⁻³⁵で伝統的に使用されてきた出血サイズの形状評価についてそれを比較した。我々は、盲検観察者が、最大出血半径に基づいて、一連の脳薄片でのICHの程度を格付けする、視覚的格付けシステム（0-4）を開発した。分光光度ヘモグロビンアッセイの実行直前に撮られた脳の写真でこの視覚的評価を行い[図37]、その結果、2つの技術を同じ試験片で相互に関係させことができた。いかなる介入もかけてられていない対照と比較すると、擬局所注入を受ける動物（すなわち、バール穴+生理食塩水）は、視覚的ICHスコアにわずかな増加のみを示す[図38A]。しかし、コラゲナーゼのみまたはコラゲナーゼ+rt-PAのいずれかを、注入物に添加したとき、視覚的ICHスコアを、明かに増加させた[図38A]。脳卒中モデルで、rt-PAは、同様に、視覚的ICHスコアについて増加を生じた[図38B]。データをプロットして、ICHを定量するのに視覚的ICHスコアと分光光度技術の間の関係を示したとき、線状の関係は、示唆されたが（ $r=0.88$ ）、しかし、出血の程度が小さくて（0または1の

視覚的 ICH スコア) 、この関係は、維持しなかった [図 39] 。

検討

最近、ある種の静脈内血栓崩壊剤 (rt-PA) を用いた、脳卒中の初期介入は、徴候発症の 3 時間以内に始められる場合に、有益でありうる事が明らかになってきた^{9, 10}。しかし、この狭い治療窓の外側に血栓崩壊剤を投与すると、痛烈な ICH の受入れがたく高い発生率を生じうる (ストレプトキナーゼ対プラセボ、10 日目の死亡率 34.0% 対 18.2%、 $p=0.002$ 、6 ヶ月の死亡率 73% 対 59%、 $p=0.06$)⁷。したがって、出血変換の危険が低いことと関連する 灌流の回復のためのいっそう最適な薬剤同定することの臨床的緊急性が残っている。凝固または繊維素溶解機構に干渉する新たな 薬剤 を適切に研究するために、ICH の マイナス面の危険を定量する客観的平均を示すことが必要である。実験の文献では、放射線学上の造影手段³²⁻³⁷によるか、または死後の脳組織における出血の量の視覚的概算³¹⁻³⁵によって ICH の定量を行った。これらの手段は、研究下での条件によって、有用さが制限されたものである。例えば、洗練された装置の必要性によって強いられた論理的拘束に加えて、ほとんどの放射線学上の造影技術は、マウス のモデルでの限定された有用さのものであり、それは、凝固または繊維素溶解系を研究するための潜在的に強力な道具であるトランスジェニックマウスの評価でのそれらの使用を排除しうる。ICH の視覚的概算は、事実上主観的であり、そして我々自身のデータが示すとおり、少ない程度の ICH を検出するのに比較的感受性が低い可能性がある。さらに、出血範囲が、疎らであるかまたは多重巣状である場合、放射線学上あるいは視覚的技術のいずれも、ICH の正確な定量を可能にしない。実験動物での ICH を定量する客観的方法を開発および確認する最近の研究を行った。ヘモグロビンをシアノメテモグロビンに変換することに基づいたヘモグロビンの定量のための分光光度アッセイを利用することは、先に報告された^{26, 31}。しかし、最善の我々の知識では、脳において、隣接する脳組織から疑う余地のない血餅を取除いた後にそのサイズを測定するのは、ラットで使用されるのみであった³¹。我々が記述しそして確認する分光光度アッセイは、マウスと同じくらい小さな動物に使用することができ、それは、現在入手可能な多くのトランスジェニックマウス株 (特に、血栓または繊維

素崩壊カスケードで改変を伴うもの)の使用を促進する。さらに、この分光光度アッセイは、疎らなまたは多重の局所出血がある場合でさえICHの定量を可能にし、それは、さもないと定または単離が困難である。最終的に、リー (Lee) の研究と対称的に、我々は、既知量のヘモグロビンおよび脳組織と混合された自己の血液を使用して、再現性および信頼性についての我々の研究を確認した³¹。脳卒中試験に使用される手術手段が、血液ヘモグロビン濃度を明かに変化させなかった(データは示されず)ので、分光光度ヘモグロビンアッセイは、ヘモグロビン濃度が、出血の時に知られている場合、脳内出血の容積を推定するのに使用されうる。

臨床的ICHに関連がある可能性がある状況についてその分光光度ヘモグロビンアッセイを開発および確認するために、我々は、2つの異なる方法：(1) コラゲナーゼの脳内注射 (血管壁を弱め、動脈瘤と共に、あるいは外傷を伴って生じるとき)、および(2)脳卒中のモデルで脳内出血を作り出した。両方の例で、コホートの動物も、ICHのスペクトルの上限でそのモデルを確認するために、rt-PAを受けた。マウスでのICHについての確立されたゴールドスタンダードな測定法はないので、我々の分光光度測定法を、視覚的格付けによって独立に評価されるものと、ICHサイズについて比較した。最終的に、脳の梗塞容積を定量するために脳をトリフェニルテトラゾリウムクロリド(TTC)で染色する、脳卒中の実験的モデルとしてこのアッセイがさらにいっそう有用であることを立証するために、MCA閉塞/再灌流にかけられた動物の脳を、保存および均質化の前にTTCで染色して、TTC染色手段それ自身が、分光光度ヘモグロビンアッセイによってICHを定量する能力に干渉しないことを立証した。これらのデータ(図1B)は、連続的に使用される(最初にTTC染色、続いて均質化、そして分光光度ヘモグロビンアッセイ)場合、その2つの手段の間に何も検出可能な交差干渉はないことを示す。

ICHを検出するその能力に加えて、最近の研究は、この技術が、脳の回収後の残りの血管内血液の量の指標を示しうることも示す。頭部の生理食塩水灌流の手段は、脳卒中にかけられた脳の中のシアノメテモグロビンの光学密度を変化させず、それにより血管内の血液の量が比較的固定され、そしてその手段によっ

て洗い流せないことが示唆される。しかし、別な方法で未処理であった対照動物では、生理食塩水灌流処理は、約30%までシアノメテモグロビンの光学密度を低下させるようである。我々の実験は、この差異の理由を供しないが、脳卒中後に、閉塞の領域に血管収縮／血管閉塞の要素があり、生理食塩水灌流技術がさらなる残りの血管内の血液を洗い流すのに効果を低めることを推測するものもいる。さらに、脳卒中後の血管収縮または実験的に誘導された脳内出血の要素が本当にあれば、これは、血管内の血液保存を減少させ、そしてこのため、対照および脳卒中／ICH脳が比較される場合に（ある種の血管外血液が、後者のグループに存在する場合さえ）、光学密度の総体的低下の原因となる。

脳内出血を測定するための分光光学的技術の数種の技術的態様も、記述に値する。現在の実験として、540nm付近を中心とするシアノメテモグロビンについての広範な吸収ピークがあるが、我々は、550nmでのシアノメテモグロビンの吸収を測定した。これを行う理由は、多くの光学光度計が、前設定フィルターによって波長性能が固定されており、そして550nmは、一般に使用される波長（特に、ELISAプレート読取り機で）ためである。おそらく540nmでの吸収の測定は、わずかに高い光学密度測定を生じたが、シアノメテモグロビンの吸収ピークは、この領域で広がっており、そしてそのために、550nmは、フェリーまたはフェロシアニド（551nmおよび540nmでのシアノメテモグロビンの吸光度係数は、フェリーまたはフェロシアニドの41倍低い吸光度係数と比較して、それぞれ11.5および11.1である³⁸⁾）の吸収を直す必要なく使用しうる。連続波長の分光光度計を使用する研究（540nmでODを測定するのに使用された）および別々のスペクトルのELISAプレート読取り機（550nmでのODを測定するのに使用される）では、同様の結果を示した。後者の技術は、簡便であり、手段の処理量を増加させ、そして我々にサンプル量を最小限にさせるので、我々は、「結果」のセクションで示された研究として後者の技術を使用することを選択した。

分光光度アッセイを用いるときに考慮されるべきある種の潜在力のある他の技術的考慮がある。我々は、分光光度手段が、梗塞容積分析のための一連の脳薄片をTTC染色と連結して使用できることを示したが、その組織は、その後に均質

化され、そして抽出しなければならず、組織構築物を破壊し、そしてさらなる組織学上の特徴付けが不可能になる。脳外の血液が、脳回収のあいだ故意でなく関与する場合、この技術が、ICHの程度を過大評価しうることが可能であるか、または残余の硬膜外、硬膜下、またはくも膜下の血液が、脳取出しの過程を通して廃棄される頭蓋冠に接着したままになる場合、その技術は、ICHの程度を過少評価するかもしれない。

測定技術の性質のために、所定の波長での光が、固定長の経路にそって吸収されるので、均質化した脳上清の混乱を生じるあらゆるものは、OD読取りを増加する可能性がある。これは、脂質、異常なプラズマタンパク質、および赤血球ストローマを含みうる。実際に、一次的実験では、我々は、遠心分離が不十分であり、そしてある種の脂質層が、このアッセイに関与したときODsが偽って上昇されることが分かった。遊離ビリジンは、シアノメテモグロビンの吸収スペクトルを変えさせることができ、そしてドラッキンの試薬³⁹とも反応する他のヘモクロゲンの能力がある。しかし、我々の知識では、これらの反応は、脳内血液／出血の測定と明らかな範囲に干渉しない。

要するに、最近のデータは、どのくらい簡便で、そして安価なヘモグロビンの分光光度アッセイが、ICHを定量する有用な方法を提供できるかを例示する。この技術は、脳卒中の治療のために新たに開発された血栓崩壊または抗凝固剤治療の出血潜在性を評価するのに特に有用であることを証明する。

資料：

参照文献

1. Slivka A, Levy D: Natural history of progressive ischemic stroke in a population treated with heparin. Stroke 1990;21:1657-1662
2. Babikian VL, Kase CS, Pessin MS, Norrving B, Gorelick PB: Intracerebral hemorrhage in stroke patients anticoagulated with heparin. Stroke 1989;20:1500-1503
3. Ramirez-Lassepas M, Quinones MR, Nino HH: Treatment of acute ischemic stroke. Open trial with continuous intravenous heparinization. Arch Neurol 1986;43:386-390
4. Duke RJ, Bloch RF, Turpie AG, Trebilcock R, Bayer N: Intravenous heparin for the prevention of stroke progression in acute partial stable stroke. Annals of Internal Medicine 1986;105:825-828
5. Meyer JS, Gilroy J, Barnhart MI, Johnson JF: Therapeutic

thrombolysis in cerebral thromboembolism. Neurology 1963;13:927-937

6. Meyer JS, Gilroy J, Barnhart MI, Johnson JF: Anticoagulants plus streptokinase therapy in progressive stroke. JAMA 1964;189:373

7. Hommel M, Cornu C, Boutitie F, Boissel JP, The MultiCenter Acute Stroke Trial - Europe Study Group : Thrombolytic therapy with streptokinase in acute ischemic stroke. N Engl J Med 1996;335:145-150

8. Wardlaw JM, Warlow CP: Thrombolysis in acute ischemic stroke: does it work? Stroke 1992;23:1826-1839

9. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group : Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. N Engl J Med 1995;333:1581-1587

10. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH, Hennerici M, for the ECASS Study Group : Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. J A M A 1995;274(13):1017-1025

11. Trouillas P, Nighoghossian N, Gatenet JC, Riche G, Neuschwander P, Froment JC, Turjman F, Jin JX, Malicier D, Fournier G, Gabry AL, Ledoux X, Derex L, Berthezene Y, Adeleine P, Xie J, Ffrench P, Dechavanne M: Open trial of intravenous tissue plasminogen activator in acute carotid territory stroke. Stroke 1996;27:882-890

12. Haley EC, Jr., Levy DE, Brott TG, Sheppard GL, Wong MC, Kongable GL, Torner JC, Marler JR: Urgent therapy for stroke. Part II. Pilot study of tissue plasminogen activator administered 91-180 minutes from onset. Stroke 1992;23:641-645

13. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH, et al : Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). JAMA 1995;274:1017-1025
14. Brott TG, Haley EC, Jr., Levy DE, Barsan W, Broderick J, Sheppard GL, Spilker J, Kongable GL, Massey S, Reed R, et al : Urgent therapy for stroke. Part I. Pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 minutes. Stroke 1992;23:632-640
15. del Zoppo GJ, Poeck K, Pessin MS, Wolpert SM, Furlan AJ, Ferbert A, Alberts MJ, Zivin JA, Wechsler L, Busse O, et al : Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. Annals of Neurology 1992;32:78-86
16. de Courten-Myers GM, Kleinholz M, Holm P, DeVoe G, Schmitt G, Wagner KR, Myers RE: Hemorrhagic infarct conversion in experimental stroke. Ann Emerg Med 1992;21:120-126
17. Overgaard K, Sereghy T, Pedersen H, Boysen G: Neuroprotection with NBQX and thrombolysis with rt-PA in rat embolic stroke. Neurological Research 1993;15:344-349
18. Overgaard K, Sereghy T, Boysen G, Pedersen H, Diemer NH: Reduction of infarct volume by thrombolysis with rt-PA in an embolic rat stroke model. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation 1993;53:383-393
19. Benes V, Zabramski JM, Boston M, Puca A, Spetzler RF: Effect of intra-arterial tissue plasminogen activator and urokinase on autologous arterial emboli in the cerebral circulation of rabbits. Stroke 1990;21:1594-1599
20. Overgaard K, Sereghy T, Pedersen H, Boysen G: Effect of delayed thrombolysis with rt-PA in a rat embolic stroke model.

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 1994;14:472-477

21. Lyden PD, Zivin JA, Clark WA, Madden K, Sasse KC, Mazzarella VA, Terry RD, Press GA: Tissue plasminogen activator-mediated thrombolysis of cerebral emboli and its effect on hemorrhagic infarction in rabbits. Neurology 1989;39:703-708

22. Kochanek PM, Dutka AJ, Kumaroo KK, Hallenbeck JM: Effects of prostacyclin, indomethacin, and heparin on cerebral blood flow and platelet adhesion after multifocal ischemia of canine brain. Stroke 1988;19:693-699

23. Slivka A, Pulsinelli W: Hemorrhagic complications of thrombolytic therapy in experimental stroke. Stroke 1987;18:1148-1156

24. Lyden PD, Zivin JA, Soll M, Sitzler M, Rothrock JF, Alksne J: Intracerebral hemorrhage after experimental embolic infarction. Anticoagulation. Arch Neurol 1987;44:848-850

25. Van Kampen EJ, Zijlstra WG: Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobincyanide method. Clin Chim Acta 1961;6:538-544

26. Van Kampen EJ, Zijlstra WG: Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobincyanide method. Clin Chim Acta 1961;6:538

27. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfield M: Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. Stroke 1990;21:801-807

28. Connolly ES Jr, Winfree CJ, Stern DM, Solomon RA, Pinsky DJ: Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. Neurosurg 1996;38(3):523-532

29. Connolly ES Jr, Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos J-C, Pinsky DJ: Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. J Clin Invest 1996;97:209-216
30. Bederson JB, Pitts LH, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM: Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. Stroke 1986;17:1304-1308
31. Lee KR, Colon GP, Betz AL, Keep RF, Kim S, Hoff JT: Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin. J Neurosurg 1996;84:91-96
32. Del Bigio MR, Yan HJ, Buist R, Peeling J: Experimental intracerebral hemorrhage in rats: magnetic resonance imaging and histopathological correlates. Stroke 1996;27:2312-2320
33. Qian L, Nagaoka T, Ohno K, Tominaga B, Nariai T, Hirakawa K, Kuroiwa T, Takakuda K, Miyairi H: Magnetic resonance imaging and pathologic studies on lateral fluid percussion injury as a model of focal brain injury in rats. Bulletin of Tokyo Medical & Dental University 1996;43:53-66
34. Brown MS, Kornfeld M, Mun-Bryce S, Sibbitt RR, Rosenberg GA: Comparison of magnetic resonance imaging and histology in collagenase-induced hemorrhage in the rat. Journal of Neuroimaging 1995;5:23-33
35. Thulborn KR, Sorensen AG, Kowall NW, McKee A, Lai A, McKinstry RC, Moore J, Rosen BR, Brady TJ: The role of ferritin and hemosiderin in the MR appearance of cerebral hemorrhage: a histopathologic biochemical study in rats. American Journal of Neuroradiology 1990;11:291-297
36. Elger B, Seega J, Brendel R: Magnetic resonance imaging study

on the effect of levemopamil on the size of intracerebral hemorrhage in rats. Stroke 1994;25:1836-1841

37. Weingarten K, Zimmerman RD, Deo-Narine V, Markisz J, Cahill PT, Deck MD: MR imaging of acute intracranial hemorrhage: findings on sequential spin-echo and gradient-echo images in a dog model. American Journal of Neuroradiology 1991;12:457-467

38. Drabkin DL, Austin JH: Spectrophotometric studies: II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulphemoglobin. J Biol Chem 1935;112:51-65

39. Drabkin DL, Austin JH: Spectrophotometric studies. IV. Hemochromogens. J Biol Chem 1935;112:89-104

実施例 13：活性部位遮断第 I X a 因子は、脳内出血を増大させることなく、マウスの脳卒中で微小血管血栓および脳傷害を制限する

要約

脳卒中治療における臨床上のジレンマは、血管開通性を回復する薬剤が、脳内出血の危険を増大させることである。その活性部位をダンジル化することによって精製第 I X a 因子から形成される活性部位遮断第 I X a 因子 (I X a i) は、因子 X 活性複合体への第 I X a 因子の集合を阻害する天然の第 I X a 因子と競合する。第 I X a i 因子で予め処理したときに、局所大脳虚血および再灌流にかけられたマウスは、微小血管フィブリンおよび血小板沈澱が減少し、大脳灌流が増大し、そして媒体で処理した対照より脳梗塞がかなり小さいことを示した。第 I X a i 因子を媒介した脳保護は、用量依存性であって、治療的に有効な用量で脳内出血と関連せず、そして第 I X a i 因子が脳虚血症の発症後に投与されたときでさえ見られた。第 I X a i 因子の投与は、脳内出血の危険を増すことなしに進行中の脳卒中を治療する新たなストラテジーを表す。

導入

虚血性脳への血流のタイムリーな再確立は、急性脳卒中ための最近の治療凡例を表す¹⁻³。最適条件下で付与されたときでさえ血栓崩壊剤の投与は、それらの望ましい臨床結果に達しえない。灌流は、しばしば虚血前レベル（虚血後の低灌流）へ回復できないことから、虚血性傷害は、元の閉塞によって単独では生じないが、微小循環の不全の要素もあることが示唆される。さらに、急性脳卒中の血栓崩壊は、脳内出血 (ICH) の危険の増加に関連することから¹⁻⁴、ICH の危険を増大させることなく、再灌流を促進できる新たな薬剤を同定する明らかな必要性があるままであることが示される。

虚血事象に続いて、血管壁は、その静止性、抗接着性、抗血栓性の状態から、白血球接着および血栓形成を促進する状態に改変される。急性脳卒中では、I C A M-1⁵および P-セ렉チン⁶のような同側の微小血管系で発現された接着レセプターによる白血球の活発な動員は、虚血後の低灌流を強化する。しかし、これらの遺伝子の各々のマウスの欠失突然変異体での実験は、それらの不在でさえ、虚血後の脳血流 (C B F) は、基線に部分的にのみ戻ることを示し、それに

より、虚血後の大脳血管の無再流の原因となるさらなる機構の存在が示唆される。
この可能性を捜査するために、第一組の実験は、局所血栓が、脳卒中での微小血管系（一次閉塞の部位に遠位な）のレベルで生じるという仮説を試験するために計画された。

脳卒中での微小血栓の酷い結果を評価するために、第二の組の実験は、凝固の固有な経路の選択的遮断が、微小血管の血栓を制限でき、それにより脳卒中の脳を保護するという仮説を試験した。凝固の固有な経路の選択的阻害のストラテジーは、それが、血管内血栓の第一の原因であるので選択された。ヘパリン、ヒルジン、および繊維素溶解剤が、フィブリンの形成を阻害するか、または溶解を促進することで凝固の最終共通経路を干渉し、そしてしたがって、ICHの性質を増大させる。我々は、IXa/VIIa/X活性化複合体の構築の選択的遮断薬が、血管内血栓を制限するための新規な機構を提供し、一方で、小さな血管が脆く、そして破壊に供され得る脳組織または隣接領域では重大であろう、凝固の外因性／組織因子経路による細胞外止血の機構を保存しているのであろうと仮説した。我々は、ICHの増加を伴わずに脳卒中の結果を改善するであろうという仮説を試験するために、IXa因子の競合的阻害剤（活性部位が遮断されたIXa、またはIXai）を脳卒中に供したマウスに与える新たなストラテジーを使用した。

方法

マウスの脳卒中モデル：先に報告されるとおり⁷、一過性の局所大脳虚血を、中大動脈の内膜内閉塞（45分）および再灌流（22時間）によってマウスに誘導した。相対的脳血流（CBF）の一連の測定を、レーザードップラー流量計⁷を介して、そしてトリフェニルテトラゾリウムクロリド（TTC）染色連続脳薄片の面積計の／容積分析⁷によって測定される閉塞量（同側の半球の含有率（%））を記録した。

¹¹¹インジウム血小板研究：血小板蓄積を、¹¹¹インジウム標識血小板を使用し、測定し、回収し、そして先に記述したとおり製造した⁸。手術直前に、静脈でマウスに 5×10^6 の¹¹¹インジウム標識血小板を付与した。沈澱を、同側のcpm／対側のcpmとすることによって24時間後に定量した。

フィブリン免疫ブロッティング／免疫染色：フィブリンの蓄積を、最近記述され

そして確認された免疫ブロッティング／免疫染色手段⁹を使用して、（十分にヘパリン付けした動物を）犠牲にすることに続いて測定した。フィブリンは、厳密に不溶性であるので、プラスミン消化によって脳組織抽出を製造し、その後電気泳動のための標準SDS-ポリアクリルアミドゲルにかけ、続いてポリクローナル・ウサギの抗-ヒト抗体を使用する免疫ブロッティングにかけて、フィブリノーゲンとの交差反応性が比較的少なく、¹⁰マウスのフィブリンを検出できる架橋フィブリンに存在するガンマーガンマ鎖二量体を調製した。フィブリン蓄積を、同側対側側の比として報告した。追加の実験で、脳を、パラフィンに埋設させ、薄片に切り、そして同じ抗-フィブリン抗体を使用して免疫染色した。

分光光度ヘモグロビンアッセイおよび可視化ICHスコア：ICHを、我々が開発しそして確認した分光光度計基礎のアッセイ^{11、12}によって定量した。簡潔には、マウスの脳を、均質化し、超音波処理し、遠心分離し、そして上清中のメテモグロビンを（ドラッキンの試薬（Drabkin's reagent）を用いて）シアノメテモグロビンに変換し、その濃度は、既知量のヘモグロビンで生じた標準曲線に対して550nmでのO. D. を測定することによって評価した。薄片のうちのいずれかに見られる最大出血半径に基づいて、盲検観察員によって1mmの連続皮質薄片でICHの視覚的格付けを行った [ICH格付け、0、出血なし；1、< 1mm；2、1-2mm；3、> 2-3；4、> 3mm]。

第IXa i 因子の製造¹³：第IXa i 因子を、ダンシル-gl u -g l y -a r g -クロロメチルケトンを用いて、第IXa 因子上の活性部位ヒスチジン残基を選択的に修飾することによって調製した。プロプレックスを、第IX因子に対する固定化カルシウム依存性モノクローナル抗体を含む分取カラムにかけた。カラムを洗浄し、EDTA-含有緩衝液で溶出し、そしてその後、（SDS-PAGEでの単独バンドとして確認される）溶出物中の第IX因子を、（CaCl₂の存在下でインキュベートする）第IXa 因子をかけることによって活性化した。精製第IXa 因子を、100倍モル過剰のダンシル-gl u -g l y -a r g -クロロメチルケトンと反応させ、そして混合物を塩析させた。前凝固剤活性を欠いている最終産物（IXa i）は、SDS-PAGE上でIXaと同様に移動する。その後、この材料（第IXa i 因子）を、濾過（0.2 μm）およびDET

o x i-ゲルカラム上でのクロマトグラフィー後の試験に使用して、あらゆる微量の内毒素混入物を取除いた（サンプルアリコート量中の、検出可能なリポポリサッカライドがない）。続いて、I X a i を、使用の時間まで、 -80°C でアリコート量に凍結した。I X a i を使用した実験のために、示した時間に、そして示した用量で単独の静脈ボラスとして付与した。

結果

マウス・モデルで脳卒中を作るために、縫合を、脳血管系に導入し、その結果、それが右中大脳動脈のオリフィスを閉塞し、範囲を定められた領域を虚血させた。45分の期間の閉塞後、縫合を解くことによって、脳卒中の再灌流モデルを造り出す。そのように処理されたマウスは、局所神経の欠損並びに明快な脳梗塞の領域を示す。閉塞縫合は、主要な血管の支流（中大脳動脈）を超えて進まないので、このモデルは、中断した血流の時期に応答して脳の微小血管系内に起こる「下流」事象を調査する素晴らしい機会を提供する。このモデルを使用して、微小血管血栓の役割を以下のとおり調査した。血小板リッチな血栓病巣が、虚血脳半球内に生じることを示すために、内膜内閉塞縫合の導入直前に ^{111}In インジウム標識血小板を、マウスに投与して、大脳虚血および再灌流の確認時期の間のそれらの沈澱を追跡した。脳卒中を造る手術手段にかけられていない動物では、予測されたとおり、血小板の存在は、右および左の半球の間でおよそ等しかった〔図40A、左の棒線〕。しかし、動物を、脳卒中にかけた（そして、連続実験の対照へのベヒクルのみを受けた）とき、放射性標識血小板は、反対側（非虚血）半球での沈澱が非常に少ないのと比較して、虚血（同側の）半球で優先的に蓄積した〔図40A、中央の棒線〕。これらのデータは、虚血領域での血小板リッチな血栓の発生を支持する。第I X a i 因子を、動物に投与するとき、内膜内閉塞縫合の導入前に同側の半球での放射性標識血小板の蓄積に著しい減少があった〔図40A、右の棒線〕。

別の系での証拠も、脳卒中における微小血管の血栓の発生を支持する。このデータは、架橋フィブリンのガンマーガンマ鎖二量体上のネオエピトープに対して向けられた抗体を使用して、フィブリンの免疫検定から生じる。イムノブロットは、局所大脳虚血および再灌流にかけられた、媒体で処理した動物の同側（右）

半球の強度の増加されたバンドを示す[図40B、「媒体」]。脳卒中の前に第IXa i 因子 ($300 \mu\text{g}/\text{kg}$) で処理した動物で、フィブリンの同側の蓄積に明らかな増加はない[図40B、「第IXa i 因子」]。フィブリン蓄積が、血管内フィブリンの沈澱によるものである(非特異的な透過性変化および副内皮マトリックスに対する暴露によるのではなく)ことを示すために、フィブリン免疫染色により、同側の大脳内の微小血管の内膜に増加したフィブリンを局在化させた[図40C]。

第IXa i 因子が、大脳内血栓を制限し、灌流を回復することができるかどうかを調査するために、IXa i を、脳卒中直前にマウスに付与した ($300 \mu\text{g}/\text{kg}$)。これらの実験は、同側の半球における¹¹¹In-血小板蓄積の減少[図41A]並びに免疫染色による血管内フィブリンの証拠の減少の両方を示す。さらに、24時間までにCBFの著しい増加があることから、第IXa i 因子による微小血管の疎らさの回復が示唆される[図41A]。この観察の臨床的関連は、第IXa i 因子が脳の梗塞容積を減少させる能力によって強調される[図41B]。第IXa i 因子のこれらの有益な効果は、用量依存性であり、 $600 \mu\text{g}/\text{kg}$ は、至適用量であった[図41C]。ICHの発症は、脳卒中の状況での抗凝固ストラテジーと重要な関係があるので、ICHを定量する我々の最近確認された分光光度法^{11, 12}を用いて、ICHでのIXa i の効果を測定した。これらのデータは、最低用量(最も効果的なもの)で、ICHの著しい増加はないことを示す[図42A]。試験された最大用量 ($1200 \mu\text{g}/\text{kg}$) で、ICHの増加があり、それは、我々が最近報告もした半定量的な視覚的格付け法によって確認された[図42B]^{11, 12}。

急性脳卒中からの結果の改善に向けられた治療は、臨床症状後に与えられるので、またフィブリンは、脳卒中での当初の虚血事象後にも形成されつづけるので、我々は、IXa i が、脳虚血症の開始補に与えられた場合に効果的でありうるかどうかを試験した。中大脳動脈閉塞(閉塞縫合を除去することに続いて)後に付与されたIXa i は、これが大脳梗塞容積を非常に減少させる能力によって判断され、媒体で処した対照と比較して顕著な脳保護を提供した[図43]。

検討

この研究でのデータは、虚血後大脳の微小血管系内の血管内の血栓形成（血小板およびフィブリンの両方）の明らかな証拠を示す。脳卒中での微小血管の血栓の病態生理学上の関連性は、第IXa因子が微小血管の血栓を減少させ（虚血後のCBFの増加を伴って、血小板およびフィブリン蓄積の両方が減少される）、そして脳卒中の回復を改善する能力によって強調される。第IXa因子は、用量依存的な様式で梗塞容積を減少させるのみならず、脳卒中の発症後に付与されるときでさえも減少するので、第IXa因子のこれらの強力な抗血栓作用は、脳卒中の状況で臨床的に意義があるようである。さらに、臨床的な関連のある用量では、第IXa因子での治療は、ICHの増加を引き起こさず、それにより第IXa因子による第IXa因子／VIIa／X活性化複合体の構築の選択的阻害が、ヒトでの脳卒中治療の魅力的な標的になる。

標的になった抗凝固剤法が、急性脳卒中に対応する上で凝固崩壊剤の最近の使用の魅力的な代替法でありうる理由は、臨床試験でこれらの真偽を確かめることに成功したために、多くの理由がある。論理的には、急性脳卒中のための理想的な治療では、脳内出血の危険を増加させることなく、虚血ゾーンでの微小血管血栓を起こすフィブリン-血小板メッシュの形成を防止するか、または溶解を誘導する。しかし、急性脳卒中の臨床試験で研究されてきた血栓崩壊剤は、脳内出血の危険を一貫して増加してきた¹⁻⁴。脳卒中の発症に続く最初の数時間（＜6）に示されるストレプトキナーゼは、出血形質転換の速度を増加（67%まで）させることに関連し；初期死亡率が増加したが、生存する患者では、残存する能力障害に苦しまなくなる。生存者では、残存する能力障害が減ることを示すが、脳卒中発症の7時間以内（特に3時間以内）の組織型プラスミノゲン活性化剤（tPA）の投与は、初期死亡率を増加させ、そして出血変換の速度を増加（7-20%）させた。改善された抗凝固または血栓崩壊療法を開発するために、脳卒中の幾つかの動物モデルを試験した。これらのモデルは、一般に、凝固血を内部頸動脈へ投与し、続いて血栓崩壊剤を投与することから構成される。ラットでは、脳卒中の2時間以内のtPA投与は、脳血流を改善し、梗塞サイズを77%まで減少させた^{14, 15}。同様のウサギ胚の塞栓脳卒中モデルでは、tPAは、血流を戻し、そして脳内出血の偶発的出現を伴って梗塞サイズを減少させる上で有効で

あった^{16, 17}。しかし、即座の血餅溶解には利点があるが、これらの研究（並びに血栓崩壊剤の臨床治験）は、この治療法に伴って脳内出血の危険が増加することを示す。

通常、虚血性脳卒中は急に発症するので、治療法は、主に、脳の主要な血管支流を閉塞する主要なフィブリン／アテローム血栓の細片を溶解することに向けて標的とした。しかし、最近の研究が例示するとおり、当初の閉塞の部位から下流に生じる微小血管閉塞の重要な成分があり、それは、進行性脳卒中での虚血後の低灌流（無再流）および大脳傷害についての考慮すべき病態生理学上の意義がありそうである。このデータは、微小血栓が、新たな脳梗塞の虚血領域に形態的に局在されたことを先に報告したものと素晴らしく一致している¹⁸。第IXa因子／VIIa／X活性化複合体の構築を阻害する薬剤を使用することにより、血管外止血を害することなく、微小血管内膜に起こる血栓を制限するための新規アプローチ法を示し、その維持はICHを避けるのに重大であろう。最近の研究では、第IXa因子での治療は、ICHを増加することなく、脳卒中の状況で、微小血管の血小板およびフィブリン沈澱を減少させ、虚血後の大脳血流を改善し、そして脳梗塞容積を減少させる。

抗凝固剤としての第IXa因子の性質は、凝固カスケードでの活性化第IX因子の絶対必要な役割から由来する。第IXa因子遮断のストラテジーが、脳卒中の環境で有効であるように思われるのみならず、イヌでの左回旋冠状動脈への電流の初期使用に続いて誘導される進行性冠状閉塞を避けるのに有効であるようにも思われる¹⁹。マウスモデルで、第IXa因子が、活性化された部分的スロンボプラスチン時間（APTT）（224）を長引かせないそれらの研究でのとおり、300 μ g/kgの治療的に有効な用量で第IXa因子を投与することは、後半時間またはAPTTのいずれかを同様に著しく変えない〔それぞれ、IXa因子処理（n=7）のPTおよびAPTT並びにベヒクル処理（n=4）マウスについて13.4 \pm 0.7および79.9 \pm 8.9対12.1 \pm 0.7および70.6 \pm 8.9、P=NS〕。

脳卒中の発症後付与されるIXa因子が、効果的であることを示すデータは、血栓の形成が、進行中の血栓症および進行中の繊維素溶解の過程の間の動的平衡を

表すという別の興味深い仮説を導く。正常の（非虚血）環境下でさえ、この動的平衡は、ヒトで生じることが示された¹⁹。第 I X a i 因子が脳卒中の発症後に投与される時でさえ有効であることを示す最近の研究でのデータは、このストラテジーが、動的平衡を回復して脳虚血症後に血栓症の方へ移行し、いっそう静止した（抗血栓性）血管壁フェノタイプに戻ることを示唆する。

最終的な考察として、血栓溶解が、主要な閉塞血栓を首尾よく取除く場合、および／または抗凝固剤法が、進行性微小循環血栓を制限するのに効果的である場合でさえ、血流は、通常の虚血前レベルに戻ることができない。これは、C B F が第 I X a i 因子（フィブリン／血小板蓄積を限定する）によってかなり改善されるが、C B F は、虚血前レベルにまだ戻らないという最近の研究でのデータによって証明されている。このデータは、脳微小血管内皮細胞による P-セレクトインおよび I C A M-1 発現が、この点に関して特に密接な関係を有し、虚血後の好中球蓄積およびその結果としての微小血管プラグイングを含む、虚血後脳の低灌流の複数のエフェクター機構の存在を支持する^{5, 6}。白血球接着レセプター発現の見地から見たときに、これらの接着レセプターが不在である場合でさえ、C B F レベルは、対照と比較して脳卒中後に改善されるが、虚血前レベルには戻らない。一緒にして、これらのデータは、微小血管血栓症および白血球接着が、虚血後脳の低灌流と一緒に貢献することを示唆する。

要約すると、第 I X a 因子の競合阻害剤、活性部位が遮断された第 I X a 因子の投与は、脳卒中の治療のための新規療法を表す。この療法は、微小循環血栓を減じ、虚血後脳血流を改善し、脳卒中に伴う脳組織傷害を減じるのみならず、I C H の危険を増やすことなしに、脳虚血症の発症後に付与される場合でさえそうできる。この有益な特性および相対的に低いマイナス面の出血形質転換の危険の組合せは、これをヒトの脳卒中でのさらなる試験および潜在的な臨床試験のための非常に魅力的なアプローチ法となる。

参照文献

1. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group : Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. New Engl J Med 1995;333:1581-1587
2. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH, Hennerici M, for the ECASS Study Group : Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. J A M A 1995;274(13):1017-1025
3. del Zoppo GJ: Acute stroke - on the threshold of a therapy. N Engl J Med 1995;333(13):1632-1633
4. Hommel M, Cornu C, Boutitie F, Boissel JP, The MultiCenter Acute Stroke Trial - Europe Study Group : Thrombolytic therapy with streptokinase in acute ischemic stroke. N Engl J Med 1996;335:145-150
5. Connolly ESJr, Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos J-C, Pinsky DJ: Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. J Clin Invest 1996;97:209-216
6. Exacerbation of cerebral injury in mice which express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. Example 10 Hereinabove
7. Connolly ESJr, Winfree CJ, Stern DM, Solomon RA, Pinsky DJ:

Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. Neurosurg 1996;38(3):523-532

8. Naka Y, Chowdhury NC, Liao H, Roy DK, Oz MC, Micheler RE, Pinsky DJ: Enhanced preservation of orthotopically transplanted rat lungs by nitroglycerin but not hydralazine: requirement for graft vascular homeostasis beyond harvest vasodilation. Circ Res 1995;76:900-906

9. Lawson CA, Yan S-D, Yan S-F, Liao H, Chen G, Sobel J, Kisiel W, Stern DM, Pinsky DJ: Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. Journal of Clinical Investigation 1997;99:1729-1738

10. Lahiri B, Koehn JA, Canfield RE, Birken S, Lewis J: Development of an immunoassay for the COOH-terminal region of the gamma chains of human fibrin. Thromb Res 1981;23:103-112

11. Use of a spectrophotometric hemoglobin assay to objectively quantify intracerebral hemorrhage in mice. Example 12 Hereinabove

12. Choudhri TF, Hoh BL, Solomon RA, Connolly ES, Pinsky DJ: Spectrophotometric hemoglobin assay: A new method to quantify experimental murine intracerebral hemorrhage and its potentiation by tissue plasminogen activator. Annual Meeting Joint Section on Cerebrovascular Surgery 1997

13. Benedict CR, Ryan J, Wolitzky B, Ramos R, Gerlach M, Tijburg P, Stern D: Active site-blocked Factor IXa prevents intravascular thrombus formation in the coronary vasculature without inhibiting extravascular coagulation in a canine thrombosis model. J Clin Invest 1991;88:1760-1765

14. Papadopoulos SM, Chandler WF, Salamat MS, Topol EJ, Sackellares JC: Recombinant human tissue-type plasminogen activator therapy in acute thromboembolic stroke. J Neurosurg

1987;67:394-398

15. Overgaard K, Sereghy T, Pedersen H, Boysen G: Neuroprotection with NBQX and thrombolysis with rt-PA in rat embolic stroke. Neurol Res 1993;15:344-349

16. Carter LP, Guthkelch AN, Orozco J, Temeltas O: Influence of tissue plasminogen activator and heparin on cerebral ischemia in a rabbit model. Stroke 1992;23:883-888

17. Phillips DA, Fisher M, Davis MA, Smith TW, Pang RHL: Delayed treatment with a t-PA analogue and streptokinase in a rabbit embolic stroke model. Stroke 1990;21:602-605

18. Heye N, Paetzold C, Steinberg R, Cervos-Navarro J: The topography of microthrombi in ischemic brain infarct. Acta Neurologica Scandinavica 1992;86:450-454

19. Nossel HL: Relative proteolysis of the fibrinogen B beta chain by thrombin and plasmin as a determinant of thrombosis. Nature 1981;291:165-167