

- Hossmann K-A (1971) Cortical steady potential, impedance and excitability changes during and after total ischemia of cat brain. *Exp Neurol* 32:163-75
- Inoue K, Tomita M, Fukuuchi Y, Tanahashi T, Kobari M, Takao M, Takeda H, Yokoyama M (2003) Dynamic observation of oxygenation-induced contraction of and transient fiber-network formation/disassembly in cultured human brain microvascular endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:821-8
- Kloner RA, Ganote CE, Whalen DA, Jennings RB (1974) Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells: II. Fine structure during the first few minutes of reflow. *Am J Pathol* 74:399-422
- Leão AAP, Morrison RS (1945) Proportion of spreading cortical depression. *J Neurophysiol* 8:33-45
- Marshall WH (1959) Spreading cortical depression of Leão. *Physiol Rev* 39:239-79
- Mori K, Miyazaki M, Iwase H, Maeda M (2002) Temporal profile of changes in brain tissue extracellular space and extracellular ion (Na(+), K(+)) concentrations after cerebral ischemia and the effects of mild cerebral hypothermia. *J Neurotrauma* 19:1261-70
- Nagasawa M, Tasaka M, Tomita M (1986) Coupled transport of water and ions through membranes as a possible cause of cytotoxic edema. *Neurosci Lett* 66:19-24
- Newman EA (1986) High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science* 233:453-4
- Nielsen AN, Fabricius M, Lauritzen M (2000) Scanning laser-Doppler flowmetry of rat cerebral circulation during cortical spreading depression. *J Vasc Res* 37:513-22
- Schiszler I, Tomita M, Fukuuchi Y, Tanahashi N, Inoue K (2000) New optical method for analyzing cortical blood flow heterogeneity in small animals: validation of the method. *Am J Physiol* 279:H1291-H8
- Tomita M (2005) Increased intracranial pressure and brain edema. In: *Pathology & genetics. Cerebrovascular diseases* (Kalimo H, ed), Basel, Switzerland: ISN Neuropath Press, in press
- Tomita M, Fukuuchi Y, Tanahashi N, Kobari M, Tomita Y, Ohtomo M (2001) Heterogeneity of 'microflow' changes within a cortical area as small as an LDF probe [abstract]. *J Cereb Blood Flow Metab* 21(Suppl 1):S228
- Tomita M, Gotoh F (1982) Which circulates faster through the cerebral microcirculatory system, red cells or plasma? *Stroke* 13:722
- Tomita M, Gotoh F, Amano T, Tanahashi N, Kobari M, Shinohara T, Mihara B (1983) Transfer function through regional cerebral cortex evaluated by a photoelectric method. *Am J Physiol* 245:H385-H98
- Tomita M, Gotoh F (1992) Cascade of cell swelling (cytotoxic edema): thermodynamic potential discharge of brain cells following membrane injury. *Am J Physiol* 262:H603-H10
- Tomita M, Gotoh F, Amano T, Tanahashi N, Tanaka K (1980) 'Low perfusion hyperemia' following middle cerebral arterial occlusion in cats of different age groups. *Stroke* 11:629-36
- Tomita M, Gotoh F, Sato T, Amano T, Tanahashi N, Tanaka K, Yamamoto M (1978) Photoelectric method for estimating hemodynamic changes in regional cerebral tissue. *Am J Physiol* 235:H56-H63
- Tomita M, Kanno K, Hamel E (2002) *Brain activation and CBF control, International Congress Series 1235*. Amsterdam: Elsevier Science, BV
- Tomita Y, Tomita M, Schiszler I, Amano T, Tanahashi N, Kobari M, Takeda H, Ohtomo M, Fukuuchi Y (2002) Repetitive concentric wave-ring spread of oligemia/hyperemia in the sensorimotor cortex accompanying K<sup>+</sup>-induced spreading depression in rats and cats. *Neurosci Lett* 322:157-60
- Van Harreveld A. (1958) Changes in the diameter of apical dendrites during spreading depression. *Am J Physiol* 192:457-63
- Van Harreveld A, Ochs S (1957) Electrical and vascular concomitants of spreading depression. *Am J Physiol* 189:156-66
- Van Harreveld A, Schade JP (1959) Chloride movements in cerebral cortex after circulatory arrest and during spreading depression. *J Cell Comp Physiol* 54:65-84
- Van Harreveld A, Stamm JS (1952) Vascular concomitants of spreading cortical depression. *J Neurophysiol* 15:487-96

## **Intramicrovascular behavior of platelets in rat brain observed by high speed laser confocal fluorescent microscopy**

Norio TANAHASHI, Hidetaka TAKEDA Takasi OSADA, Kouichi OHKI, Miyuki UNEKAWA, Minoru TOMITA, and Norihiro SUZUIKI

Department of Neurology, School of Medicine, Keio University, Tokyo 160-8582, Japan

### **Introduction**

Although abundant data of in vitro platelet observation have been accumulated, in situ studies in the brain microvasculature especially in the intraparenchymal vessels have not yet been investigated because of methodological difficulties. The purpose of this study is to present platelet behavior in microvasculature of the anesthetized rat cerebral cortex, measured with a high-speed laser-scanning confocal fluorescence microscope and image analysis system.

### **Material and Methods**

Wister rats anesthetized with urethane were fixed with a head holder. A skull window was opened in the temporo-parietal region and a glass cover slip was placed over it. A femoral artery and a femoral vein were catheterized for blood pressure monitoring and injection of tracers, respectively. After removal of the dura, fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (70 kDa) and carboxylfluorescein succinimidylester (CFSE) were intravenously injected to visualize microvasculature and to label platelets, respectively. CFSE-labeled platelets were detected with a laser-scanning confocal fluorescence microscope and obtained images were analyzed with MATLAB and our own software KEIO-IS2 to visualize platelet flow tracking in the microvasculature in the living rat cerebral cortex. The program exploits the light intensity difference between the dark background and the light platelets in the visual field of microscope to detect the platelets automatically.

### **Results and Discussion**

Platelets in circulating blood became visible as bright particles in the intraparenchymal microvessels. In the pial veins, platelets were seen flowing slow along endothelial cell walls (rolling) with a standard video camera of 30 frames per sec (Figure 1) and platelet thrombus were occasionally formed probably due to CFSE toxicity itself. In the pial arteries/arterioles, flowing platelets were detected only at a high speed laser confocal fluorescent microscopy (125-1000 frames per sec) (Figure 2). Unlike our expectation, platelets flow mixed in the circulating blood not preferentially in the peripheral layer. Transient touch to endothelial cells and detachment ("Touch and go" phenomenon) of platelets was occasionally observed in the pial arteries (Figure 3). In the capillaries, flowing platelets were by no means stationary. The platelet tracks were automatically numbered and the platelet velocities were calculated automatically by the computer. Figure 4 shows platelet tracks in arteries. Images were obtained at frame rate of 250

frames/s and shutter speed of 1/250/s.

The velocities were  $2.72 \pm 0.52$  mm/sec for an arteriole,  $0.75 \pm 0.3$  mm/sec for single capillaries and  $0.21 \pm 0.07$  mm/sec for venules, respectively. The high speed laser confocal fluorescent microscopy is a promising tool for investigating hemodynamic changes at the vessel wall; formation of platelet clots and their resolution with therapeutic agents.



Fig.1. Platelets were flowing along endothelial cell walls (rolling)

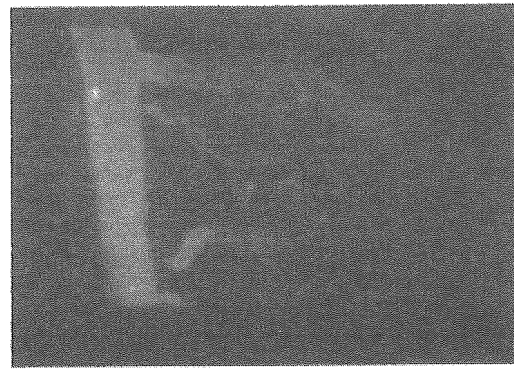


Fig2. Flowing platelets were detected only at a high speed Laser confocal fluorescent microscopy (125-1000 frames per sec)

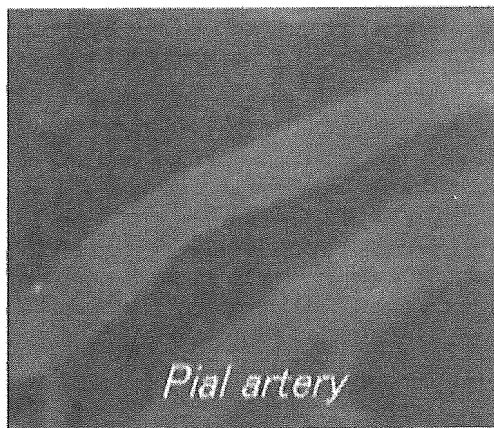


Fig.3. Transient touch to endothelial cells and detachment ("Touch and go" phenomenon) of platelets was occasionally observed in the pial arteries.

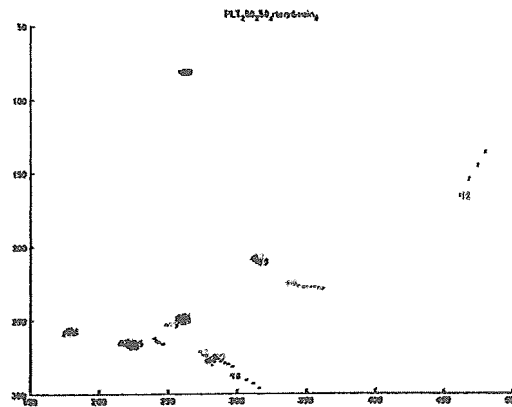


Fig 4. Platelet traces in pial arteries, capillaries and pial veins during 10 sec. Images were obtained at frame rate of 250 frames/s and shutter speed of 1/250 s.

(Key words: platelets, confocal fluorescent microscopy, brain),



## T280M and V249I polymorphisms of fractalkine receptor CX3CR1 and ischemic cerebrovascular disease

Hidenori Hattori<sup>a,\*</sup>, Daisuke Ito<sup>a</sup>, Norio Tanahashi<sup>a</sup>, Mitsuru Murata<sup>b</sup>, Ikuo Saito<sup>c</sup>,  
Kiyooki Watanabe<sup>d</sup>, Norihiro Suzuki<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departments of Neurology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>b</sup> Departments of Hematology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>c</sup> The Health Center, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>d</sup> Laboratory Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Received 14 September 2004; received in revised form 13 October 2004; accepted 14 October 2004

### Abstract

The contribution to atherosclerosis of two CX3CR1 single nucleotide polymorphisms, V249I and T280M has been recently reported. The atherosclerosis of intracranial vessels is thought to be the major pathological mechanism of ischemic stroke. In this study, we investigated the risk of ischemic stroke associated with fractalkine receptor CX3CR1 polymorphisms.

We investigated the T280M and V249I mutations in the CX3CR1 gene in 235 Japanese patients with ischemic cerebrovascular disease (CVD) and 306 age- and sex-matched healthy controls. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism were used for genotyping.

There was no significant difference in both polymorphisms between patients with ischemic CVD and controls (VV versus II + VI,  $p=0.83$ ; TT versus MM + TM,  $p=0.66$ ). The I and M allele frequencies were not significantly different between CVD patients and controls: odds ratio (OR) = 0.89 (95% confidence interval (CI) = 0.50–1.60,  $p=0.70$ ) and OR = 1.19 (95% CI = 0.71–2.00,  $p=0.51$ ), respectively. We found eight of nine possible combined genotypes, including a new haplotype V249-M280, in Japanese.

Our results show that these CX3CR1 gene polymorphisms are not associated with an increased risk for ischemic CVD in the Japanese population.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Ischemic stroke; Atherosclerosis; Polymorphism; CX3CR1; Fractalkine

In 2001, Moatti et al. [12] reported that the I249 allele of the CX3CR1 gene had the ability to reduce the risk of coronary artery disease. Two CX3CR1 single nucleotide polymorphisms, V249I and T280M, are located in the coding sequence, and a recent study demonstrated that I249-M280 homozygotes have lower fractalkine binding affinity on primary peripheral blood mononuclear cells (PBMC) compared with V249-T280 homozygotes [3]. These results prompted researchers to examine the correlation between these alleles and the pathogenesis of atherosclerotic disease.

Imai et al. [7] identified a novel seven-transmembrane receptor for fractalkine, which is expressed mainly on NK cells and monocytes, and partly on T cells, and named it CX3CR1. Fractalkine, a CX3C motif protein, is a transmembrane, mucin/chemokine hybrid molecule, which is induced on activated primary endothelial cells [1]. Fractalkine is captured on the cell surface of inflammatory factor-activated leukocytes, so interaction between fractalkine and CX3CR1 may contribute to atherogenesis, which consists of inflammation, adhesion between leukocytes and the endothelium, and leukocyte migration into the endothelium [4].

Some studies have examined the correlation between these polymorphisms and atherosclerotic disease, but no study has focused on the association between these polymorphisms

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 5363 3788; fax: +81 3 3353 1272.  
E-mail address: [hhattori@sc.itc.keio.ac.jp](mailto:hhattori@sc.itc.keio.ac.jp) (H. Hattori).

and stroke. The primary aim of this study was to determine whether these CX3CR1 single nucleotide polymorphisms are associated with cerebrovascular disease.

We analyzed 235 unrelated Japanese patients with ischemic cerebrovascular disease (CVD) and 306 age- and sex-matched controls. All CVD patients had attended the outpatient clinic of Keio University Hospital, Tokyo for regular follow-up examinations. We selected CVD patients aged  $\leq 70$  years at the onset of CVD. On the basis of the Classification of Cerebrovascular Diseases III report from the committee established by the National Institute of Neurological Disorders and Stroke, CVD patients diagnosed with atherothrombotic infarction, lacunar infarction, or transient ischemic attack (TIA) were enrolled in this study. Those with cardioembolic cerebral infarction or cerebral hemorrhage were excluded. Controls were patients who had had regular check-ups. Those with a clinical history of cerebrovascular disease, myocardial infarction, or peripheral vascular disease were excluded. Written informed consent was obtained from all subjects after a full explanation of the study and a guarantee of total confidentiality. Brain CT and/or MRI was performed on all patients with CVD. Hypertension, hypercholesterolemia, and smoking were defined as described previously [8].

To analyze the T280M and V249I polymorphisms of CX3CR1, polymerase chain reaction (PCR) was carried out as described previously [8]. Briefly, amplification of a 307 bp fragment of the CX3CR1 gene was performed with the 5' primer 5'-GCTACTTCAGAATCATCCAG-3' and 3' primer 5'-AGGCATTTCCCATACAGGTG-3'. PCR consisted of 1 cycle of 15 min at 80 °C and 4.5 min at 94 °C, 44 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 50 °C, and 1 min at 72 °C, followed by 7 min at 72 °C in a Gene Amp PCR system 2400 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA). The PCR product (5  $\mu$ l) was cleaved with 20 U BsmBI restriction enzyme (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) or with 20 U Psp1406I restriction enzyme (Takara Shuzo, Ohtu, Shiga, Japan). To analyze the T280M polymorphism, BsmBI digestion of the PCR product yielded bands of 126, 106, and 75 bp in TT homozygotes, 181 and 126 bp in MM homozygotes, and all bands in heterozygotes. For the V249I polymorphism, Psp1406I digestion of the PCR product yielded bands of 192, and 115 bp in VV homozygotes, 307 bp in II homozygotes, and all bands in heterozygotes.

The differences in genotype frequencies and other risk factors were analyzed by  $\chi^2$  test. Mean age and allele frequencies in the two groups were compared by Student's *t*-test. Multiple logistic regression methods were used to control for possible confounding factors. All statistical analyses were performed using Statview software (ver 5.0 for Windows, SAS Institute, CA, USA).

The 235 CVD patients and 306 controls were well matched in terms of age and sex (Table 1). The risk factors hypertension, diabetes mellitus, and smoking were significantly more common in CVD patients than in controls ( $p < 0.001$ ). The frequencies of the V249I and T280M poly-

Table 1  
Clinical characteristics of CVD patients and controls

	Controls	CVD patients	<i>p</i> <sup>a</sup>
	( <i>n</i> = 306)	( <i>n</i> = 235)	
Male (%)	77.5	77.9	NS <sup>b</sup>
Age, mean $\pm$ S.D., years	58.6 $\pm$ 4.3	58.3 $\pm$ 7.8	NS <sup>b</sup>
Hypertension (%)	25.1	56.2	<0.001
Hypercholesterolemia (%)	33.0	38.6	0.177
Diabetes mellitus (%)	6.54	25.8	<0.001
Smoking (%)	37.6	53.3	<0.001
Body mass index	5.19	9.02	0.737
>27.3 kg/m <sup>2</sup> (%)			
Family history (%)	24.2	29.3	0.298

<sup>a</sup>  $\chi^2$  test was used to compare values of all parameters in CVD patients and controls, except for age, which was compared by Student's *t*-test.

<sup>b</sup> Not significant.

morphisms showed no deviation from Hardy–Weinberg equilibrium: V249I ( $p = 0.59$ ) and T280M ( $p = 0.59$ ), respectively.

The I and M allele frequencies were not significantly different between CVD patients and controls: 4.3% versus 4.7%, odds ratio (OR) = 0.89 (95% confidence interval (CI) = 0.50–1.60,  $p = 0.70$ ) and 6.2% versus 5.2%, OR = 1.19 (95% CI = 0.71–2.00,  $p = 0.51$ ), respectively (Table 2). There was also no deviation in the frequency of carriers (II + VI and MM + TM) between CVD patients and controls: 7.7% versus 8.2%, OR = 0.93 (95% CI = 0.49–1.76,  $p = 0.83$ ) and 10.6% versus 9.5%, OR = 1.14 (95% CI = 0.65–2.00,  $p = 0.66$ ), respectively. Eight of the nine possible combined genotypes were observed in our population (Table 3). The frequency of the VV–TT combined genotype in the three groups of CVD patients, the AT, the lacunar and the TIA group, was 88.4, 86.6, and 95.8, respectively, but there was no statistic difference in the frequency between these subgroups of CVD patients and controls.

There were no carriers (II + VI) of the I allele in TIA patients with the V249I genotype. In contrast, there was no significant deviation of genotype between stroke subtypes and controls. In logistic regression analysis, sex, age, hypertension, hypercholesterolemia, diabetes mellitus, current smoking, body mass index, family history of stroke and CX3CR1 genotypes (VV versus VI + II or TT versus TM + MM) were included as independent variables. This analysis revealed that presence of the I allele or M allele was independent of these acquired risk factors.

The present study examined the relation between CVD and two CX3CR1 single nucleotide polymorphisms. There was no significant difference in T280M and V249I polymorphisms between patients with CVD and controls.

In two animal studies on atherogenesis, CX3CR1<sup>-/-</sup> Apolipoprotein E<sup>-/-</sup> (ApoE) double knockout mice given a western diet showed a reduction in macrophage infiltration in the vessel wall and decreased size of atherosclerotic lesions compared with CX3CR1<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> littermates [2,10]. These results indicate that CX3CR1 may play a critical role in the first step of atherogenesis;

Table 2  
Genotype and allele frequencies of V249I and T280M polymorphisms of CX3CR1 gene in CVD patients and controls

Genotype	CVD patients (n=235)	AT (n=69)	Lacunar (n=142)	TIA (n=24)	Controls (n=306)
II+VI (%)	7.7 (18)	8.7 (6)	8.5 (12)	0.0 (0)	8.2 (25)
VV (%)	92.3 (217)	91.3 (63)	91.5 (130)	100.0 (24)	91.8 (281)
<i>p</i> <sup>a</sup>	0.828	0.886	0.920	0.145	–
MM+TM (%)	10.6 (25)	8.7 (6)	12.7 (18)	4.2 (1)	9.5 (29)
TT (%)	89.4 (210)	91.3 (63)	87.3 (124)	95.8 (23)	90.5 (277)
<i>p</i> <sup>a</sup>	0.655	0.840	0.304	0.384	–
I (%)	4.3	5.1	4.6	0.0	4.7
V (%)	95.7	94.9	95.4	100.0	95.3
<i>p</i> <sup>a</sup>	0.705	0.868	0.916	0.123	–
M (%)	6.2	5.8	7.0	2.1	5.2
T (%)	93.8	94.2	93.0	97.9	94.8
<i>p</i> <sup>a</sup>	0.506	0.788	0.280	0.336	–

Number of subjects (X).

<sup>a</sup>  $\chi^2$  tests were used to compare genotype and allele frequencies between controls and all CVD patients and between controls and individual groups of CVD patients. AT: atherothrombotic infarction, Lacunar: lacunar infarction, TIA: transient ischemic attack.

that is, interaction between vascular endothelial cells and macrophages.

In two human studies on the association between these two polymorphisms and coronary artery disease, the I allele had the capability to reduce the risk of coronary artery disease [11,12]. In contrast there was no association with peripheral artery disease of Fontaine stage IIa or greater in white healthy controls [6]. Our study failed to reveal an association between ischemic stroke and two CX3CR1 single nucleotide polymorphisms. The frequency of the two single nucleotide polymorphisms, V249I and T280M, (4.7 and 5.2%) in the Japanese population was significantly lower than that in the Caucasian population (25.7 and 13.5%, respectively) [3]. We cannot exclude the possibility that the difference in frequency of these single nucleotide polymorphisms between Caucasian and Japanese people may have influenced our results. The relevance of these polymorphisms should be investigated in other populations and by prospective and family studies. On the other hand, recent Italian study on the association between the two polymorphisms and internal carotid artery (ICA) occlusive disease showed the presence of the M280 haplotype reduced risk of ICA occlusive disease and the I249 haplotype was associated with increased stability of carotid

plaques [5]. This study, suggested the two polymorphisms were associated with extracranial atherosclerosis. The first step of atherosclerosis, the fatty streak formation, developed in intracranial arterial wall significantly later than in extracranial arterial wall in rabbits [9]. The mean age of our enrolled subjects was about 10 years younger than the mean age of the Italian study's subjects [5]. Our protocol cannot exclude contribution of extracranial atherosclerosis, i.e., artery to artery embolism, and these factors may have influenced our results. Nevertheless, our findings strongly suggest that the T280M and V249I polymorphisms in the CX3CR1 gene may have less effect on the occurrence of CVD than on coronary artery disease or ICA occlusive disease.

Our other important finding is the detection of single nucleotide polymorphisms of the CX3CR1 gene in the Japanese population, and a new haplotype, V249-M280. A previous report documented that these polymorphisms were found only in a white population, but not in Vietnamese or West Africans [3]. Therefore, the I and M alleles had been thought to be unique to Caucasians. The frequency of the combined genotype VV–TT in the Japanese population was high, 88.1 and 90.5% in CVD patients and in controls, respectively, while the other combinations appeared to have very low frequencies. These findings suggest that the V249-T280 haplotype has a high proportion of the nine possible combined genotypes in Asians, including Japanese. In addition, only six of the nine possible combined genotypes were reported in the white population [3,6,11,12], and only three haplotypes, V249-T280, I249-T280, and I249-M280, of the four possible haplotypes have been detected. In this study, we identified eight combined genotypes including VV+TM and VV+MM, demonstrating the presence of a new haplotype, V249-M280, is present in Japanese.

In conclusion, this study revealed no association between both polymorphisms in the CX3CR1 gene and ischemic cerebrovascular disease. Although further studies are needed to evaluate whether CX3CR1 may play a role in the pathogenesis of CVD, our results indicate that CX3CR1 gene polymor-

Table 3  
Combined genotype frequencies of V249I and T280M polymorphisms of CX3CR1 gene in CVD patients and controls

Combined genotype	V249I	T280M	CVD patients % (n=235)	Controls % (n=306)
1	VV	TT	88.1 (207)	90.5 (277)
2	VV	TM	4.3 (10)	1.0 (3)
3	VV	MM	0.0 (0)	0.3 (1)
4	VI	TT	1.3 (3)	0.0 (0)
5	VI	TM	4.7 (11)	6.9 (21)
6	VI	MM	0.9 (2)	0.0 (0)
7	II	TT	0.0 (0)	0.0 (0)
8	II	TM	0.0 (0)	0.7 (2)
9	II	MM	0.9 (2)	0.7 (2)

Number of subjects (X).

phisms may have less effect on the occurrence of ischemic CVD.

#### Acknowledgment

This study was supported by a Grant-in-aid for scientific research No. H13-genome-006 from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

#### References

- [1] J.F. Bazan, K.B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D.R. Greaves, A. Zlotnik, T.J. Schall, A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif, *Nature* 385 (1997) 640–644.
- [2] C. Combadiere, S. Pottiaux, J.L. Gao, B. Esposito, S. Casanova, E.J. Lee, P. Debre, A. Tedgui, P.M. Murphy, Z. Mallat, Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice, *Circulation* 107 (2003) 1009–1013.
- [3] S. Faure, L. Meyer, D. Costagliola, C. Vaneensberghe, E. Genin, B. Autran, J.F. Delfraissy, D.H. McDermott, P.M. Murphy, P. Debre, I. Theodorou, C. Combadiere, Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1, *Science* (2000) 287.
- [4] A.M. Fong, L.A. Robinson, D.A. Steeber, T.F. Tedder, O. Yoshie, T. Imai, D.D. Patel, Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow, *J. Exp. Med.* 188 (1998) 1413–1419.
- [5] G. Giorgio, M.L. Biondi, O. Turri, E. Guagnellini, R. Scorza, Internal carotid artery occlusive disease and polymorphisms of fractalkine receptor CX3CR1: a genetic risk factor, *Stroke* 35 (2004) 1276–1279.
- [6] A. Gugl, W. Renner, G. Seinos, M. Brodmann, E. Pabst, T.C. Wascher, B. Paulweber, B. Iglseder, E. Pilger, Two polymorphisms in the fractalkine receptor CX3CR1 are not associated with peripheral arterial disease, *Atherosclerosis* 166 (2003) 339–343.
- [7] T. Imai, K. Hieshima, C. Haskell, M. Baba, M. Nagira, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, H. Nomiyama, T.J. Schall, O. Yoshie, Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion, *Cell* 91 (1997) 521–530.
- [8] D. Ito, M. Murata, N. Tanahashi, H. Sato, A. Sonoda, I. Saito, K. Watanabe, Y. Fukuuchi, Polymorphism in the promoter of lipopolysaccharide receptor CD14 and ischemic cerebrovascular disease, *Stroke* 31 (2000) 2661–2664.
- [9] K. Kanamaru, S. Waga, H. Tochio, K. Nagatani, The effect of atherosclerosis on endothelium-dependent relaxation in the aorta and intracranial arteries of rabbits, *J. Neurosurg.* 70 (1989) 793–798.
- [10] P. Lesnik, C.A. Haskell, I.F. Charo, Decreased atherosclerosis in CX3CR1<sup>-/-</sup> mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 333–340.
- [11] D.H. McDermott, J.P. Halcox, W.H. Schenke, M.A. Waclawiw, M.N. Merrell, N. Epstein, A.A. Quyyumi, P.M. Murphy, Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis, *Circ. Res.* 89 (2001) 401–407.
- [12] D. Moatti, S. Faure, F. Fumeron, M.L.-W. Amara, P. Seknadji, D.H. McDermott, P. Debre, M.C. Aumont, P.M. Murphy, D. de Prost, C. Combadiere, Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease, *Blood* (2001) 97.

## Diagnosis procedure combinationの展開と脳卒中\*

棚橋 紀夫\*\*

**Key Words** : diagnosis procedure combination (DPC), per-diem payments, fees for service, stroke, cerebral infarction

### はじめに

2003年より特定機能病院を中心に、DPC (diagnosis procedure combination) が導入され、診断群分類を用いた入院医療の包括評価が導入された。しかし、このDPCには問題点も多く、DPCの精緻化が必要であることは、診療者側および厚生労働省側も共に認識しており、毎年改正が行われている。本稿では、脳血管障害の中で最も頻度の高い脳梗塞をとりあげ、DPCの現状、今後の問題点を述べる。

### I. 脳梗塞のDPCの実際

Fig. 1に脳梗塞患者のDPCのチャートを示す。Table 1に脳梗塞をさらに細分化するために必要な項目の一覧を示す。要約すると、脳梗塞患者が入院した場合、意識レベルがJCS (Japan Coma Scale) で30点未満、30点以上かの2群に分けられる。次いでそれぞれ群で手術の有無で細分化される。手術の種類としては、脳血管内手術等 (脳血管内手術、動脈形成術・吻合術、減圧開頭術、選択的脳血栓・塞栓溶解術、頭蓋内血腫除去術)、頭蓋内の動脈内血栓摘出術、動脈形成術、経皮的脳血管形成術などがある。さらに手術なし群では処置2 (人工呼吸、リハビリテーション、中心静脈注射) の有無、さらに副傷病 (嚥下困難、胃腸

出血、肛門および直腸の疾患、脳内出血、心不全、脳梗塞、尿路感染症、水頭症、血管攣縮、神経因性膀胱、糖尿病、脳塞栓、下肢深部静脈血栓症、多臓器不全、肝機能障害、腎機能障害、下垂体機能不全、尿崩症、髄液漏、呼吸不全、脳浮腫、髄膜炎、播種性血管内凝固症候群、その他の敗血症、てんかん、意識障害、本態性高血圧症、2次性高血圧症、肺炎) があるかないかにより細分類される。手術あり群ではまず手術の種類により分類し、処置1 (気管切開術、胃ろう増設術、胃ろう閉鎖術) の有無、処置2の有無、副傷病の有無などにより細分される。その結果、各診断群分類の点数表がTable 2に示されるように決められている。

### II. 診断群分類別包括評価における診断群分類の見直しについて

2003年4月より、特定機能病院等において診断群分類別包括評価が実施され、2004年4月からは民間病院等においても試行的適応が実施されたが、その過程で多くの問題点が指摘されてきた。たとえば、高額な医薬品や医療機器を使用するために包括評価と出来高とによる評価の乖離が明らかに大きく、かつ、件数が相当数あると認められるものについて、診断群分類包括評価を見直

\* Application of Diagnosis Procedure Combination to Japanese Stroke Patient.

\*\* 埼玉医科大学内科学神経内科部門 Norio TANAHASHI : Department of Neurology, Saitama Medical School



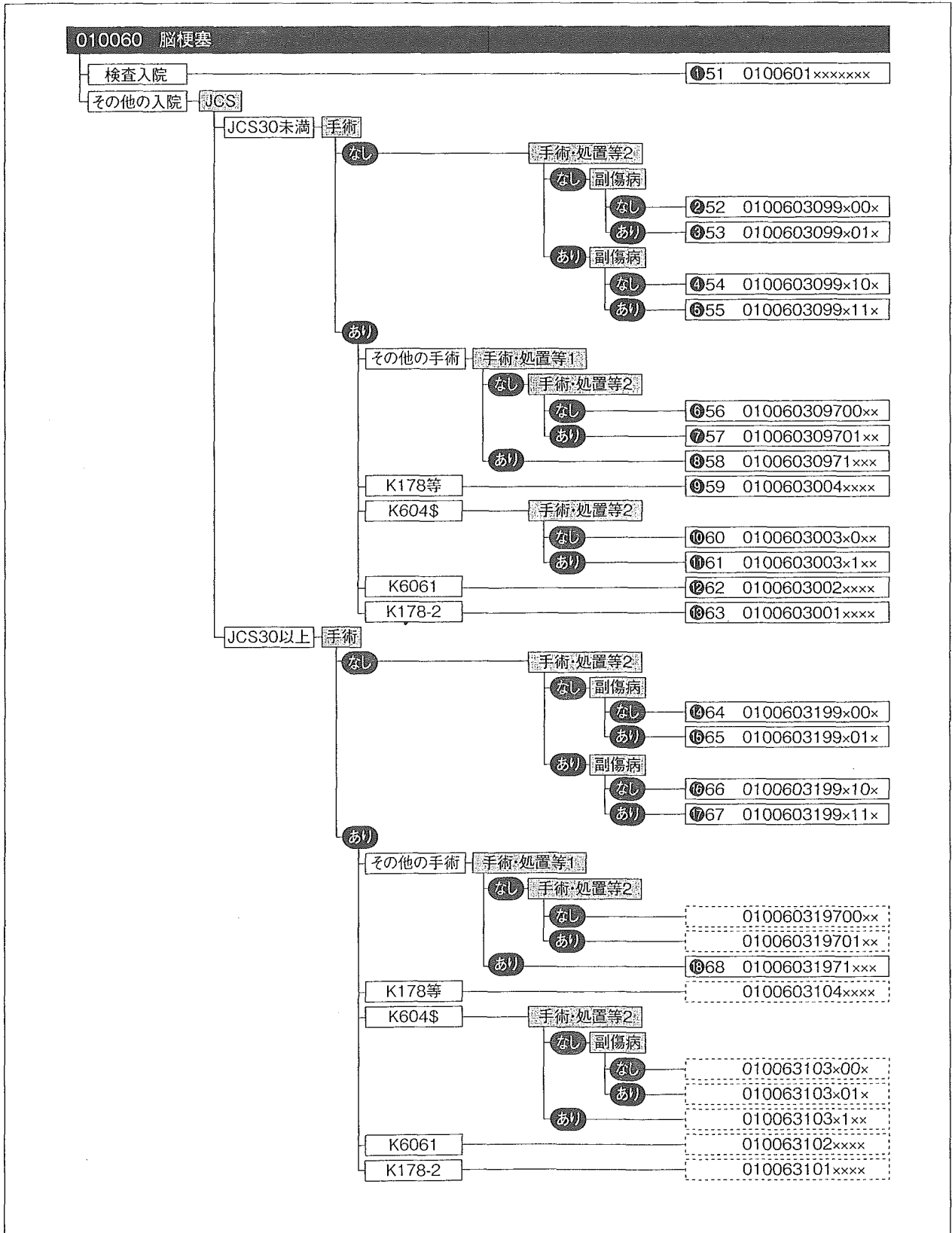


Fig.1 脳梗塞のDPCチャート

**Table 1** 細分類に必要な手術, 手術・処置1, 手術・処置2, 副傷病の内容

手術	
手術なし	
【その他の手術あり】	
その他のKコード	
【K178等】	
K149	減圧開頭術
K1643	頭蓋内血腫除去術(開頭して行うもの)脳内のもの
K178	脳血管内手術
K178-3\$	選択的脳血栓・血栓溶解術
K6065	動脈形成術, 吻合術 その他の動脈
【K604\$】	
K604\$	動脈血栓内膜摘出術
【K6061】	
K6061	動脈形成術, 吻合術 頭蓋内動脈
【K178-2】	
K178-2	経皮的脳血管形成術
手術・処置等1	
K386	気管切開術
K664	胃瘻造設術(経皮的内視鏡下胃瘻造設術を含む)
K665	胃瘻閉鎖術
手術・処置等2	
G005	中心静脈注射
J045\$	人工呼吸
	リハビリテーション
副傷病	
A41\$	その他の肺血症
D65	播種性血管内凝固症候群
E10\$	インスリン依存性糖尿病
E11\$	インスリン非依存性糖尿病
E12\$	栄養障害に関連する糖尿病
E13\$	その他の明示された糖尿病
E14\$	詳細不明の糖尿病
E230	下垂体機能不全
E232	尿崩症
G03\$	髄膜炎
G40\$	てんかん
G459	血管攣縮
G91\$	水頭症
G936	脳浮腫
G960	髄液漏
110	本態性(原発性<一次性>)高血圧(症)
115\$	二次性<続発性>高血圧(症)
150\$	心不全
161\$	脳内出血
163\$	脳梗塞
166\$	脳血栓
1802	下肢深部静脈血栓症
J10\$	肺炎
J11\$	肺炎
J12\$	肺炎
J13\$	肺炎
J14\$	肺炎
J15\$	肺炎
J16\$	肺炎
J17\$	肺炎
J18\$	肺炎
J96\$	呼吸不全
K629	肛門及び直腸の疾患, 詳細不明
K769	肝機能障害
K922	胃腸出血, 詳細不明
K289	腎機能障害
N31\$	神経因性膀胱(機能障害), 他に分類されないもの
N390	尿路感染症
R13	えん(嚥)下障害
R402	意識障害
R688	多臓器不全

**Table 2** 診断群分類点数表

	診断群分類点数表					
	入院期間		点数(点)			特定入院期間(日)
	A日	B日	入院期間A日未満	A日以上B日未満	入院期間B日以上	
① 51	4	8	4,817	3,718	3,160	16
② 52	6	12	3,993	3,038	2,582	23
③ 53	8	16	3,847	2,906	2,470	29
④ 54	14	28	3,655	2,736	2,326	56
⑤ 55	15	29	3,588	2,652	2,254	56
⑥ 56	13	25	3,449	2,550	2,168	49
⑦ 57	26	52	3,112	2,316	1,969	97
⑧ 58	25	54	3,578	2,725	2,316	121
⑨ 59	15	35	3,728	2,901	2,466	84
⑩ 60	15	29	3,511	2,595	2,206	50
⑪ 61	21	41	3,712	2,743	2,332	80
⑫ 62	13	26	3,266	2,447	2,080	43
⑬ 63	11	21	3,930	2,905	2,469	41
⑭ 64	3	14	4,138	3,500	2,975	35
⑮ 65	5	17	4,489	3,709	3,153	46
⑯ 66	8	22	4,432	3,565	3,030	49
⑰ 67	13	33	4,435	3,509	2,983	74
⑱ 68	23	52	4,312	3,323	2,825	109

し, 高額な医薬品や医療機器を使用したか否かにかかわらず, 出来高による評価を行うことに一部変更があった。脳梗塞においては, 脳保護薬である edaravone 使用時の包括評価と出来高とによる評価の乖離を2003, 4年のデータに基づき分析が行われた<sup>1)</sup>。その結果をTable 3に示す。入院時のJCS 30未満の症例でedaravone使用時の出来高点数が高いことが示された。JCS 30以上の症例でも同様の傾向は見られたが, 症例数がJCS 30未満の症例よりも圧倒的に少なかった。すなわち, 脳梗塞急性期においては, edaravoneを使用すると現行の診断群分類別包括評価では病院は赤字になる可能性が指摘された。edaravoneが認可され一般にその使用が増加しつつある段階での

Table 3 脳梗塞患者診断群分類別のedaravone使用の有無による包括評価と出来高評価の比較 (平成15年, 16年の特定機能病院のデータより)

診断群分類番号	診断群分類名称	年度	edaravone使用													
			無し						有り						合計	
			件数	在院 日数 (日)	包括範囲出 来高点数 (点)	1日あたり 包括範囲 出来高点数 (点)	件数	在院 日数 (日)	包括範囲出 来高点数 (点)	1日あたり 包括範囲 出来高点数 (点)	件数	在院 日数 (日)	包括範囲 出来高点数 (点)	1日あたり 包括範囲 出来高点数 (点)		
0100601xxxxxx	脳梗塞 (検査入院)	15	734	6.50	24,528.37	4,503.94	9	11.56	42,837.49	3,913.08	743	6.56	24,750.15	4,496.78		
0100603099x00x	脳梗塞 (JCS30未満) 手術なし 手術・処 置等2なし 副傷病なし	16	732	6.14	23,621.22	4,459.98	8	10.88	42,623.25	4,256.31	740	6.19	23,826.64	4,457.78		
0100603099x01x	脳梗塞 (JCS30未満) 手術なし 手術・処 置等2なし 副傷病あり	15	524	10.11	31,736.89	3,357.26	160	11.83	48,560.77	4,408.67	684	10.51	35,672.30	3,603.20		
0100603099x10x	脳梗塞 (JCS30未満) 手術なし 手術・処 置等2なし 副傷病なし	16	443	10.63	32,438.71	3,300.85	156	12.59	50,306.71	4,269.49	599	11.06	37,092.15	3,553.11		
0100603099x11x	脳梗塞 (JCS30未満) 手術なし 手術・処 置等2なし 副傷病あり	15	734	13.87	42,218.20	3,228.56	255	16.24	63,519.82	4,168.11	989	14.48	47,710.53	3,470.81		
010060309700xx	脳梗塞 (JCS30未満) 手術なし 手術・処 置等1なし 手術・処置2なし	16	782	13.22	39,672.17	3,164.23	284	15.23	57,181.75	4,016.75	1,066	13.76	44,337.01	3,391.36		
010060309701xx	脳梗塞 (JCS30未満) 手術なし 手術・処 置等1なし 手術・処置2あり	15	203	24.51	66,222.80	2,931.00	189	28.26	93,551.55	3,731.13	392	26.32	79,399.16	3,316.78		
010060309701xx	脳梗塞 (JCS30未満) 手術なし 手術・処 置等1なし 手術・処置2あり	16	157	23.72	62,752.66	2,842.70	157	23.94	82,762.42	3,739.47	314	23.83	72,757.54	3,291.09		
01006030971xxx	脳梗塞 (JCS30未満) その他の手術あり 手術・処置等1なし 手術・処置2あり	15	523	27.13	72,610.73	2,857.78	456	28.87	95,773.12	3,639.14	979	27.94	83,399.34	3,221.72		
01006030971xxx	脳梗塞 (JCS30未満) その他の手術あり 手術・処置等1あり	16	557	26.11	68,415.46	2,819.59	507	28.69	93,064.62	3,581.48	1,064	27.34	80,160.88	3,162.64		
01006030004xxx	脳梗塞 (JCS30未満) 脳血管内手術等	15	53	22.32	58,939.75	2,703.16	18	32.44	109,032.61	3,465.13	71	24.89	71,639.35	2,896.33		
0100603003x0xx	脳梗塞 (JCS30未満) 動脈血栓内膜摘出 術 手術・処置等2なし	15	24	44.75	107,223.72	2,614.60	17	59.18	168,168.32	2,948.64	41	50.73	132,493.43	2,753.10		
0100603003x1xx	脳梗塞 (JCS30未満) 動脈血栓内膜摘出 術 手術・処置等2あり	16	28	29.43	85,917.79	3,023.24	35	41.14	126,045.26	3,431.20	63	35.94	108,210.83	3,249.88		
0100603003x2xxx	脳梗塞 (JCS30未満) 動脈血栓内膜摘出 術 手術・処置等2あり	15	28	26.96	82,543.45	3,085.64	3	38.00	112,213.65	3,095.56	31	28.03	85,414.76	3,086.60		
0100603003x3xxx	脳梗塞 (JCS30未満) 動脈血栓内膜摘出 術 手術・処置等2あり	16	27	23.63	71,211.74	3,126.07	6	27.00	89,938.00	3,346.05	33	24.24	74,616.52	3,166.07		
0100603002xxxx	脳梗塞 (JCS30未満) 動脈血栓内膜摘出 術 手術・処置等2あり	15	32	37.97	121,247.84	3,251.70	10	45.10	145,129.20	3,366.56	42	39.67	126,933.88	3,279.04		
0100603001xxxx	脳梗塞 (JCS30未満) 経皮的脳血管形成 術	16	41	29.34	90,441.78	3,177.05	10	27.70	94,099.40	3,551.77	51	29.02	91,158.96	3,250.52		
0100603199x00x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2なし 副傷病なし	15	104	23.41	63,722.80	2,787.19	22	27.27	91,905.59	3,388.83	126	24.09	68,626.15	2,892.24		
0100603199x01x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2なし 副傷病あり	16	115	25.27	69,488.48	2,783.32	20	31.10	98,946.25	3,227.73	135	26.13	73,852.59	2,849.16		
0100603199x10x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2あり 副傷病なし	15	78	16.76	53,637.23	3,396.13	23	27.26	106,277.99	4,210.37	101	19.15	65,624.73	3,591.55		
0100603199x11x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2あり 副傷病あり	16	117	16.67	51,118.33	3,114.33	38	26.63	85,387.16	3,395.84	155	19.11	59,519.72	3,183.35		
0100603199x12x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2あり 副傷病なし	15	10	11.00	28,061.07	3,302.83	9	12.33	42,686.73	4,486.77	19	11.63	34,989.02	3,863.64		
0100603199x13x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2あり 副傷病なし	16	9	15.89	61,013.22	3,932.81	5	24.40	82,246.00	4,034.40	14	18.93	68,596.36	3,969.10		
0100603199x14x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2あり 副傷病なし	15	14	18.14	51,482.00	3,060.33	22	13.00	54,690.18	5,054.99	36	15.00	53,442.55	4,279.29		
0100603199x15x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2あり 副傷病なし	16	15	8.87	25,516.53	3,368.51	17	21.24	70,350.53	5,149.03	32	15.44	49,334.49	4,314.41		
0100603199x16x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2あり 副傷病なし	15	8	15.83	38,720.24	2,977.69	17	22.35	79,426.36	4,539.50	23	20.65	68,807.37	4,132.07		
0100603199x17x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2あり 副傷病なし	16	5	22.40	56,674.60	5,417.11	12	23.58	88,923.92	4,503.29	17	23.24	79,438.82	4,772.06		
0100603199x18x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2あり 副傷病なし	15	26	25.65	77,532.26	3,596.46	84	34.00	118,183.44	4,474.88	110	32.03	108,574.98	4,267.25		
0100603199x19x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2あり 副傷病なし	16	18	25.44	74,884.67	3,843.32	50	30.62	99,293.88	4,036.90	68	29.25	92,832.62	3,985.66		
0100603199x20x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2あり 副傷病なし	15	8	51.63	161,015.17	3,368.37	14	52.93	174,452.52	4,138.83	22	52.45	169,566.21	3,858.67		
0100603199x21x	脳梗塞 (JCS30以上) 手術なし 手術・処 置等2あり 副傷病なし	16	4	30.00	94,512.75	3,093.35	14	48.79	166,312.64	3,796.58	18	44.61	150,357.11	3,640.31		

調査結果をもとに脳梗塞患者での診断群分類別包括評価がなされたため、edaravoneのような高額医薬品を使用した場合の包括評価と出来高による評価に乖離が生じたものと考えられる。今後認可された組織プラスミノゲンアクチベータも同様な問題が生じる可能性がある。医薬品のみでなく、核医学検査（SPECT、PETなど）を用いた場合も包括評価では特別考慮されていないことが指摘されている。

2005年7月より脳梗塞患者でJCS 30点未満では出来高による評価とし、次期診療報酬見直しにおいて、適切な分類になるよう見直すこととなった。

### III. 脳血管障害患者での診断群分類別包括評価に関する問題点

脳梗塞やくも膜下出血などの患者は入院初期に診断・治療のための費用が高む。特に入院1週間以内が顕著である。しかし、早期に退院する患者も多い。このような早期退院患者では、入院中の費用は出来高払いで算定した点数にくらべ、包括評価の点数が大きく下回ることになる。現在でも包括点数は入院早期ほど点数が高いが、さらにこの支払い方法を検討する必要があると指摘されている。さらに、現在重症度はJCS30点未満、30点以上に2分割されているが、さらに重症度を細分化する必要性の有無も注目された。入院時併発症、入院後続発症も医療費に大きく関連する。脳卒中患

者では高齢者が多いため、入院時併発症が多い。さらに重症例では肺炎などの合併症も多く、重症肺炎では医療費も嵩むなどの点が指摘されている。さらに、同じような意識レベルであっても痴呆などのある場合は看護に多くの人手を要する。したがって、介護の要素も含め、重症度のなかに痴呆度を加えるなどの意見もある。

診断群分類別包括評価は、新しい治療法の導入・検査手段の導入などに対しては早急に対応しなければ、出来高払いでの算定点数と差が生じるため、医療の現状に即した迅速な対応が求められる。

#### おわりに

脳梗塞におけるDPCの実際とその問題点について論じた。DPCが導入されて以来すでに2年以上経過したが、脳血管障害のようにその経過が多種多様で合併症・併発症の多い疾患における問題点も次第に明らかになりつつある。また、DPC全体の問題として新しい治療法・診断技術の進歩に対する対応が迅速になされなければならないことが痛感された。本稿が脳梗塞患者のDPC理解の一助となれば幸いである。

#### 文 献

- 1) 厚生労働省配布資料：診断群分類包括評価における診断群分類の見直しについて。中医協 総-1-1 平成17年6月8日

【脳梗塞の治療—急性期治療の進歩】

# 抗血栓療法

柵橋紀夫\*

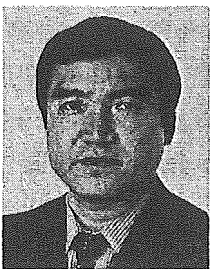
キーワード◎ 脳梗塞 抗血小板療法 抗凝固療法 アスピリン

## はじめに

脳梗塞急性期の抗血栓療法は、広義には血栓溶解療法、抗凝固療法、抗血小板療法に大別される。血栓溶解療法は次稿で紹介されるので、抗凝固療法、抗血小板療法について解説する。いずれの治療も発症後の時間、重症度、臨床病型などを参考にして選択される。各治療法それぞれ therapeutic time window (治療可能時間域) があるが、抗凝固療法は 48 時間以内、抗血小板療法は 48～120 時間以内であり、血栓溶解療法 (静注療法) の 3 時間以内、局所線溶療法の 6 時間以内と比べると長く、適応となる症例が多い。

## I. 抗凝固療法

現在、脳梗塞急性期における効果が検討されている抗凝固薬にはヘパリン (未分画ヘパリン)、低分子ヘパリン、ヘパリノイド、アルガトロバンがある。低分子ヘパリン、ヘパリノイドは脳梗塞治療薬として認可されていない。最もよく使用されるヘパリンは、その有効性が証明されておらず、本邦ではアルガトロバンが期待されている。



\*たなはし・のりお：埼玉医科大学教授 (神経内科)。昭和49年慶應義塾大学医学部卒業。同年慶應義塾大学医学部内科。昭和53年慶應義塾大学医学部助手 (神経内科)。平成元年同講師。平成17年現職。主研究領域/脳血管障害の病態生理、微小循環、血液レオロジー。

## 1. ヘパリン

未分画ヘパリンに関する大規模な試験 International Stroke Trial (IST)<sup>1)</sup> では、発症後 48 時間以内の脳梗塞患者 1 万 9,435 例を対象にし、中等量のヘパリン (1 万 2,500 単位皮下注, 1 日 2 回, 2 週間投与)、少量のヘパリン (5,000 単位皮下注, 1 日 2 回, 2 週間投与)、ヘパリン非投与群で、2 週後と 6 か月後に、死亡、脳卒中の再発、機能予後、出血合併症を調査した。その結果、ヘパリンの有効性は証明されなかった。しかし、IST のヘパリンが無効であるとする結果にもかかわらず、ヘパリンの使用についてはいまだ議論が多い。

血栓溶解療法の適応がない症例で、早期再発の危険が高い心原性脳塞栓症のうち人工弁、心臓内血栓の存在する患者、心臓弁膜症・重症心不全を伴った心房細動患者では、抗凝固療法としてヘパリン [投与量を APTT (activated partial thromboplastin time; 活性化部分トロンボプラスチン時間) で調節] が使用される場合が多い。

米国の Cerebral Embolism Task Force<sup>2,3)</sup> は、心原性脳塞栓症では発症後 2 週間以内の再発率が平均 12% であり、早期抗凝固療法の指針を示している。すなわち、非細菌性心原性塞栓症で発症後 24 時間以後に CT スキャンを撮り、出血性脳梗塞であった場合、および出血性脳梗塞がなくても大梗塞または中等症以上の高血圧 (180/100mmHg 以上) 合併例は、大出血を生じる危険性があるので早期抗凝固療法は避けるべ

きであり、これらの症例では抗凝固療法の開始は発症後少なくとも7日間は見合わせ、follow up CTを施行して開始の有無や時間を決定する。その他の症例ではすぐに抗凝固療法を開始するとする方針である。しかし、最近の疫学研究では心原性脳塞栓症の原因の大部分を占める非弁膜症性心房細動例では、急性期の再発率はより低いことが示されている。

現時点で、急性期脳梗塞後のヘパリンに対して残された適応は、十分なエビデンスはないが、①塞栓の再発リスクの高い心原性脳塞栓（人工弁、心房細動、壁血栓を有する心筋梗塞、左房内血栓）、②凝固異常症（プロテインC欠乏、プロテインS欠乏、活性化プロテインC抵抗性）、③症候性頭蓋外動脈解離、④症候性頭蓋外・頭蓋内動脈狭窄、⑤crescendo TIA（一過性脳虚血発作）または進行性脳梗塞、⑥脳静脈洞血栓症、などである。

## 2. 低分子ヘパリン

低分子ヘパリンは未分画ヘパリンから酵素的・化学的処理によって低分子量（平均5,000）成分だけを抽出したもので、ヘパリンの欠点を除去したものである。ヘパリンと低分子ヘパリンとの抗凝固作用の違いは、構成する糖鎖の長さの違いによって、ヘパリンが凝固因子のうち主にトロンビン（IIa）とXaの両者を阻害するのに対し、低分子ヘパリンはトロンビンに対する阻害作用は乏しく、主にXaを阻害することによって抗凝固作用を発揮する点である。

香港で行われた発症後48時間以内の脳梗塞患者を対象とした低分子ヘパリン（nadroparin calcium; Fraxiparine）の10日間の皮下注療法は、高用量群（4,100抗Xa IU 1日2回皮下注）、低用量群（4,100抗Xa IU 1日1回皮下注）、プラセボ群の3群に分けて行った。6か月後の生命的、機能的予後に用量依存性の効果が認められた<sup>9)</sup>。しかし、ヨーロッパにおいてもほぼ同様のrandomized controlled trial（RCT；無作為化比較試験）、Fraxiparine in Ischaemic Stroke Study

（FISS bis）<sup>9)</sup>が行われたが、高用量群、低用量群、プラセボ群の間に6か月後のpoor outcomeの割合に有意差はみられなかった。

また、心房細動に伴う発症後30時間以内の急性期脳梗塞症例を対象に、低分子ヘパリンであるダルテパリン群（100 IU/kg・1日2回皮下注）と、アスピリン群で14日以内の再発作・症候性/無症候性脳出血の頻度、14日後または3か月後の機能予後を検討した二重盲検試験であるHeparin in Acute Embolic Stroke Trial（HAEST）<sup>6)</sup>では、いずれにおいても両群間に有意差は認められなかった。

## 3. ヘパリノイド

ヘパリノイドはヘパリンに類似したsulfated glycosaminoglycanで、分子量とその作用は低分子ヘパリンに類似している。米国で行われた発症後24時間以内の脳梗塞を対象とした低分子ヘパリノイドORG 10172（danaparoid）7日間静注の臨床試験（Trial of ORG10172 in Acute Stroke Treatment; TOAST）<sup>7)</sup>では、全体としては否定的な結果が示されたが、層別解析ではアテローム血栓性脳梗塞が3か月後の転帰良好およびきわめて良好例が有意に増加し、この病型のみ有効性が示唆された。

## 4. アルガトロバン

さらにわが国では、選択的な抗トロンビン薬であるアルガトロバンが開発され発症48時間以内の脳血栓症（特に皮質梗塞）に有用であり、出血性合併症が少ないことが証明され、1996年4月より認可されている<sup>8)</sup>。脳血栓症急性期（発症後48時間以内）患者62例を対象とした第III相二重盲検比較試験（プラセボ対照）の結果では、投与28日後に全般改善度は改善以上が、アルガトロバン群では66.7%、プラセボ群では22.6%であった。アルガトロバンはヘパリンと異なりトロンビンの活性部位に特異的に結合してトロンビンの作用を阻害する。本剤は7日間（最初の2日間は60mg/日、後の5日間は20mg/日）点滴投与する。

表1 脳梗塞急性期の抗凝固療法の推奨事項

1. 発症 48 時間以内の脳梗塞ではヘパリンを使用することを考慮してもよいが、十分な科学的根拠はない（グレード C1）。
2. 脳梗塞急性期に低分子ヘパリン（保険適応外）、ヘパリノイド（保険適応外）は使用することを考慮してもよいが、十分な科学的根拠はない（グレード C1）。
3. 発症 48 時間以内で病変最大径が 1.5cm を超すような脳梗塞（心原性脳塞栓症を除く）には、選択的トロンビン阻害薬のアルガトロバンが推奨される（グレード B）。

（脳卒中合同ガイドライン委員会：脳卒中治療ガイドライン 2004. 協和企画，東京，2004，39 より引用）

また、本邦で発症後 48 時間以内のアテローム血栓性脳梗塞を対象にアルガトロバンとトロンボキサン A<sub>2</sub> 合成酵素阻害薬オザグレルの RCT が行われたが、1 か月後の全般改善度、神経症候改善度、日常生活動作改善度に有意差は認めなかった<sup>9)</sup>。

Cochrane Stroke Group (CSG) は発症後 2 週間以内の脳梗塞急性期患者における早期抗凝固療法の RCT のメタ分析を行っている<sup>10)</sup>。23,547 例の患者を含む 22 件の RCT が解析対象となり、抗凝固薬は標準的な未分画ヘパリン、低分子ヘパリン、ヘパリノイド、経口抗凝固薬、トロンビン阻害薬が含まれたが、追跡最終時点での死亡または要介助の転帰不良が減少するというエビデンスは得られなかった。

『脳卒中治療ガイドライン 2004』<sup>11)</sup>による抗凝固療法の推奨部分を表 1 に示す。本邦では、いまだ認可されていないが、組織プラスミノゲンアクチベーター（tissue plasminogen activator; t-PA）の静脈内投与が行われた場合は、24 時間以内は抗凝固薬の使用を控えるべきである<sup>12)</sup>。

## II. 抗血小板療法

オザグレルナトリウムとアスピリンが使用可能な薬剤である（表 2）。

表 2 脳梗塞急性期の抗血小板療法の推奨事項

1. オザグレルナトリウム 160mg/ 日の点滴投与は、急性期（発症 5 日以内）の脳血栓症（心原性脳塞栓症を除く脳梗塞）患者の治療法として推奨される（グレード B）。
2. アスピリン 160 ~ 300mg/ 日の経口投与は、発症早期（48 時間以内）の脳梗塞患者の治療法として推奨される（グレード A）。

（脳卒中合同ガイドライン委員会：脳卒中治療ガイドライン 2004. 協和企画，東京，2004，41 より引用）

### 1. 選択的トロンボキサン A<sub>2</sub> 合成酵素阻害薬（オザグレルナトリウム）

脳梗塞の場合、閉塞部位より末梢にも循環障害のために血管内皮障害が出現し、血小板血栓ができ、ついには小血管を閉塞して微小循環をますます悪化させる可能性が動物実験の結果から論じられるようになった。選択的トロンボキサン A<sub>2</sub> 合成酵素阻害薬であるオザグレルナトリウムはこの二次血栓の治療を目的としている。脳梗塞急性期症例で、トロンボキサン A<sub>2</sub> の代謝産物が血清、尿で発症後比較的長期間にわたって増加していることが示されている。このトロンボキサン A<sub>2</sub> は血小板凝集作用のみでなく血管収縮作用を有する。

発症後 5 日以内の脳血栓症にオザグレルナトリウム 160mg/日点滴静注した本邦での臨床試験で運動麻痺を中心に改善が認められた<sup>13)</sup>。現在、脳血栓症急性期（発症後 5 日以内）に使用されている。血栓溶解療法に比較し出血性合併症の頻度はきわめて少ない。特にラクナ梗塞に、より有効とされている。しかし、海外での臨床試験は行われていない。オザグレルナトリウムは、抗血小板作用以外に血流増加作用があり、本剤の効果にはこの血流増加作用も寄与していると考えられる。Caplan<sup>14)</sup>は、進行性ラクナ梗塞の症例の治療には、血流改善・維持が最も有効であることを指摘している。

### 2. アスピリン

急性期脳梗塞に対して、アスピリンが有効であるかどうかについて 2 つの大規模試験の結

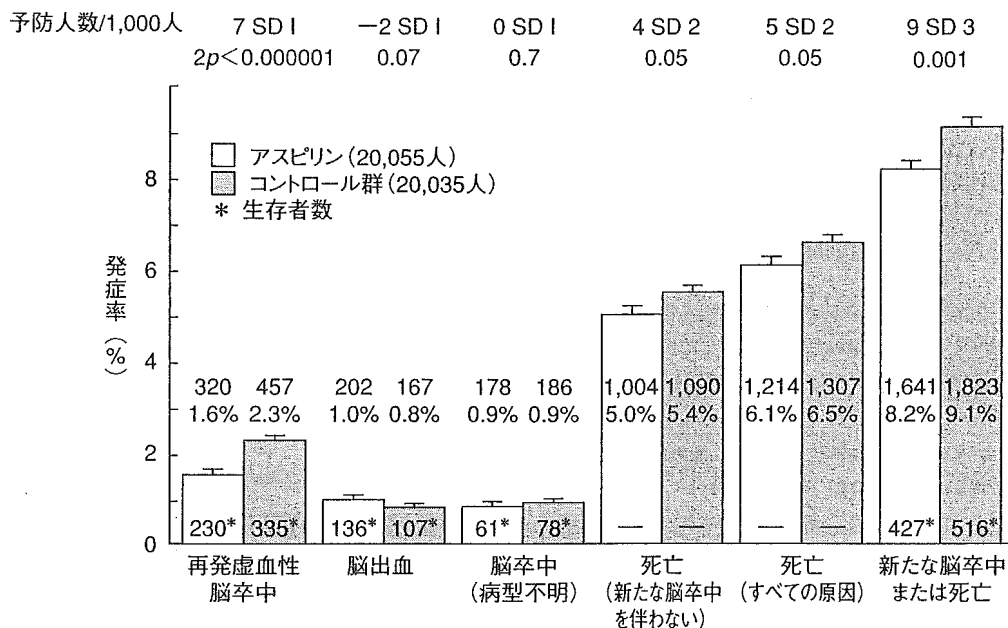


図1 虚血性脳卒中を疑われた患者40,000人に対する早期アスピリン投与の絶対的効果 (CAST, IST), 治療期間中 (CAST4週, IST2週)の結果

(Chen ZM, et al : Stroke 2000 ; 31 : 1240—1249 より引用)

果が相次いで発表された。

発症後48時間以内の急性期虚血性脳血管障害に対するアスピリン300mg/日の効果を検討したIST<sup>1)</sup>の結果では、アスピリンは脳梗塞の発症後14日以内の再発を有意に予防し、出血性脳卒中を増加させなかった。しかし、6か月後の死亡または機能予後は、非投与群と有意差を認めなかった。アスピリンは脳以外の部位の出血性合併症が問題となるが、ヘパリンを併用しなかった群では有意な増加ではなかった。

発症後48時間以内の虚血性脳卒中患者20,000例を対象にアスピリン160mg/日を4週間投与の効果を検討したChinese Acute Stroke Trial (CAST)<sup>16)</sup>の結果では、4週後の死亡もしくは非致命的脳卒中の頻度がアスピリン群では5.3%、プラセボ群では5.9%で有意差を認め、12%の相対危険度の減少を示した。退院時には、死亡もしくは要介助の状態がアスピリン群では30.6%、プラセボ群では31.7%であり、アスピリンが優る傾向があった。一方、出血性合併症(脳出血および輸血を要するような頭蓋以

外の出血)はアスピリン群で増加したがプラセボ群との有意差はみられなかった。

ISTとCASTのメタアナリシスの結果では、図1のごとく虚血性脳卒中の再発、死亡、非致命的脳卒中を有意に抑制するが、出血性合併症を増加させるが有意ではないとする結果であった<sup>16)</sup>。さらにアスピリンの有用性が、年齢、性、意識レベル、心房細動、CT所見、血圧、脳卒中分類、ヘパリン併用などにかかわらず認められた。これらの結果から、Cochrane Databaseでは、虚血性脳卒中の患者では、発症後48時間以内にアスピリン160~300mg/日を経口または経直腸的に投与することにより、早期の出血性合併症のリスクを増すことなく虚血性脳卒中の再発のリスクを減少させ、長期予後を改善させている<sup>17)</sup>。しかしアスピリンの効果はNNT (number needed to treat)が6か月で100<sup>18)</sup>であり、その絶対的効果は十分ではなく、さらに強力な薬剤の登場が期待される。

### 3. 抗GPIIb/IIIa抗体

近年、血小板膜糖蛋白のGPIIb/IIIaに対する



表3 脳梗塞臨床病型別急性期治療と推奨グレード

	アテローム血栓性			ラクナ			心原性		
	発症後			発症後			発症後		
	< 3h	3 ~ 6h	> 6h	< 3h	3 ~ 6h	> 6h	< 3h	3 ~ 6h	> 6h
血栓溶解療法 (t-PA 静注)	A			A			A		
低用量ウロキナーゼ静注	C1	C1	C1	C1	C1	C1			
局所線溶療法 (ウロキナーゼ)	B	B					B	B	
抗凝固療法									
ヘパリン	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
アルガトロバン	B	B	B						
抗血小板療法									
オザグレール	B	B	B	B	B	B			
アスピリン	A	A	A	A	A	A	A	A	A
脳浮腫治療薬									
グリセロール	B	B	B				B	B	B
マンニトール	C1	C1	C1				C1	C1	C1
脳保護薬									
エダラボン	B	B	B	B	B	B	B	B	B
血液希釈療法									
血漿増量薬デキストラン	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
高圧酸素療法	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
低体温療法	C1	C1	C1				C1	C1	C1
開頭外減圧術									
小脳梗塞	C1	C1	C1				C1	C1	C1
一側大脳半球梗塞	B1	B1	B1				B1	B1	B1

各治療法を発症後の時間に応じたグレードと共にすべて列挙した。具体的な治療法の組み合わせは、個々の患者の病態や結果によって異なる。日本では、現在t-PAの静脈内投与の保険適用はない。

モノクローナル抗体 (abciximab) の有用性が検討されつつある<sup>19)</sup>。

表2に『脳卒中治療ガイドライン2004』<sup>14)</sup>による抗血小板療法の推奨部分を示す。抗凝固療法と同様にt-PAの静脈内投与が行われた場合は、24時間以内は抗血小板療法は使用を控えるべきである。

## おわりに

脳梗塞急性期の抗凝固療法、抗血小板療法について解説した。表3に脳梗塞急性期臨床病型別治療法と推奨グレードを示す。抗凝固療法で

は、ヘパリンとアルガトロバン、抗血小板療法では、オザグレールとアスピリンの使い分けが重要である。ヘパリンの適応に関してはいまだ議論があるが、現実には多くの施設で使用されている。どの薬剤を選択すべきか、あるいは併用はどうかなど、薬剤選択に迷う場合がある。本稿が薬剤選択の一助になれば幸いである。

## 文 献

- 1) International Stroke Trial Collaborative Group : The International Stroke Trial (IST) : a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435

- patients with acute ischaemic stroke. *Lancet* 1997 ; 349 : 1569—1581.
- 2) Cerebral Embolism Task Force : Cardiogenic brain embolism. *Arch Neurol* 1986 ; 43 : 71—84.
  - 3) Cerebral Embolism Task Force : Cardiogenic brain embolism. The second report of the Cerebral Embolism Task Force. *Arch Neurol* 1989 ; 46 : 727—743.
  - 4) Kay R, Wong KS, Yu YL, *et al* : Low-molecular-weight heparin for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995 ; 333 : 1588—1593.
  - 5) Hommel M for The FISS bis Investigators Group : Fraxiparine in Ischaemic Stroke Study (FISS bis). *Cerebrovasc Dis* 1998 ; 8 (Suppl 4) : 19.
  - 6) Berge E, Abdelnoor M, Nakstad PH, *et al* : Low molecular-weight heparin versus aspirin in patients with acute ischaemic stroke and atrial fibrillation : a double-blind randomised study. HAEST Study Group. Heparin in Acute Embolic Stroke Trial. *Lancet* 2000 ; 355 : 1205—1210.
  - 7) The Publication Committee for the Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Investigators : Low molecular weight heparinoid, ORG 10172 (danaparoid), and outcome after acute ischemic stroke : randomized controlled trial. *JAMA* 1998 ; 279 : 1265—1272.
  - 8) 田崎義昭, 小林祥泰, 東儀英夫他 : 脳血栓症急性期に対する抗トロンビン薬 MD-805 の臨床的有用性—プラセボを対照とした多施設二重盲検群間比較試験. *医学のあゆみ* 1992 ; 161 : 887—907.
  - 9) 福内靖男, 東儀英夫, 篠原幸人他 : 脳血栓症急性期における argatroban の効果—sodium ozagrel との比較臨床試験. *神経治療学* 2001 ; 18 (3) : 273—282.
  - 10) Sandercock P, Gubitz G, Counsell C : Anticoagulants for acute ischemic stroke. *Cochrane Database Sys Rev* 2004 ; 2 : CD 000024
  - 11) 脳卒中合同ガイドライン委員会 (篠原幸人, 吉本高志, 福内靖男他) 編 : 脳卒中治療ガイドライン 2004. 協和企画, 東京, 2004.
  - 12) Adams HP Jr, Adams RJ, Brott T, *et al* : Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke : A scientific statement from the stroke council of the American Stroke Association. *Stroke* 2003 ; 34 : 1056—1083.
  - 13) 大友英一, 沓沢尚之, 小暮久也 : 脳血栓症急性期における OKY-046 の臨床的有用性—プラセボを対照とした多施設二重盲検試験. *臨床医薬* 1991 ; 7 : 353—388.
  - 14) Caplan LR : Worsening in ischemic stroke patients : is it time for a new strategy? *Stroke* 2002 ; 33 : 1443—1445.
  - 15) CAST (Chinese Acute Stroke Trial) Collaborative Group : CAST : randomised placebo-controlled trial of early aspirin use in 20,000 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet* 1997 ; 349 : 1641—1649.
  - 16) Chen ZM, Sandercock P, Pan HC, *et al* : Indications for early aspirin use in acute ischemic stroke : A combined analysis of 40000 randomized patients from the chinese acute stroke trial and the international stroke trial. On behalf of the CAST and IST collaborative groups. *Stroke* 2000 ; 31 : 1240—1249.
  - 17) Sandercock P, Gubitz G, Foley P, *et al* : Antiplatelet therapy for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2003 ; (2) : CD 000029.
  - 18) Gorelick PB : Stroke prevention therapy beyond antithrombotics : unifying mechanisms in ischemic stroke pathogenesis and implications for therapy : an invited review. *Stroke* 2002 ; 33 : 862—875.
  - 19) The Abciximab in Ischemic Stroke Investigators : Abciximab in acute ischemic stroke : a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study. *Stroke* 2000 ; 31 : 601—609.

# 心房細動の抗血栓療法の適応とエビデンス

棚橋紀夫

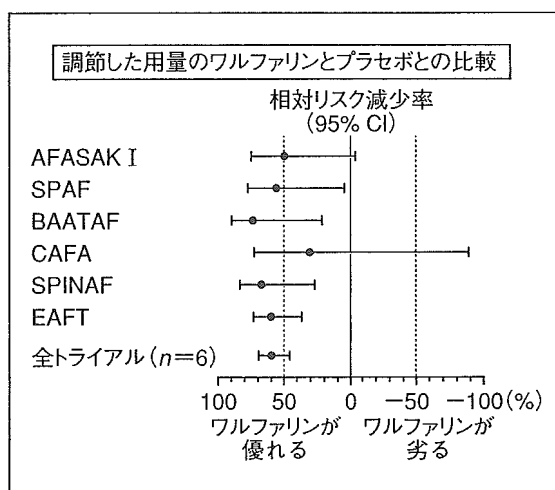
たなはし のりお：埼玉医科大学神経内科

## ● はじめに

心房細動 (atrial fibrillation : AF) は、高齢者ほど高率に認められ、60 歳以上では 2~4% と高率である。AF を有する場合、脳梗塞発症の相対リスクは、非弁膜症性で 5 倍、弁膜症性で 17 倍である<sup>1)</sup>。最近では、リウマチ性心疾患や僧帽弁疾患は減少し、冠動脈疾患、高血圧性心疾患、心筋症などの非弁膜症性 AF (non-valvular atrial fibrillation : NVAF) の頻度が増加している。AF 患者に対する血栓症予防には抗凝固療法、抗血小板療法があるが、これまで欧米を中心に多くの大規模臨床試験が行われてきた。これらの成績を参考に、欧米、本邦でも AF の基礎疾患別、および NVAF ではリスクの有無別の塞栓症予防ガイドラインが示されている。

## ● AF 患者のリスク層別と塞栓症予防の大規模臨床試験

これまでに NVAF 患者を対象に脳卒中予防を目的として行われた抗血栓療法の大規模臨床試験のメタアナリシス<sup>2)</sup>の成績によると、用量調節法によるワルファリン療法は、きわめて有効であり、プラセボに対して 62% (95% 信頼区間 48~72%) の脳卒中予防効果がある。アスピリンはワルファリンよりも劣るが、22% の脳卒中予防効果がある。しかし、アスピリンはワルファリンと直接比較したランダム化比較試験の



メタアナリシスでは、有意に 36%劣っていた (図 1)。表 1 に AF 患者の塞栓症予防のためのリスク層別化<sup>3)</sup>を示す。3つの報告により若干の違いがある。この表 1 に示すように、AF 患者の脳卒中リスクは一律でなく、脳卒中・一過性脳虚血発作の既往、高齢 (75 歳以上)、高血圧、心不全、糖尿病、冠動脈疾患が危険因子となる。これらの危険因子のいずれかを有する AF 患者ではアスピリンの脳卒中予防効果は期待できず、ワルファリンが適応となる。ワルファリンが禁忌、あるいは危険因子のない AF 患者ではアスピリンが適応となる。

本邦では、ワルファリンが AF 患者の塞栓症予防に有効であることを示す無作為化試験はな

い。日本循環器学会研究班による NVAF 患者 1000 例に対するアスピリン 150~200 mg/日の塞栓症予防効果を検討した大規模臨床試験 (Japan Atrial Fibrillation and Stroke Trial: JAST)<sup>4)</sup>では、無投薬群と同等であり、むしろ重篤な出血性合併症の頻度が高率であった。

● AF 患者に対する抗血栓療法 (治療指針・ガイドライン)

表 2 には ACC/AHA/ESC<sup>3)</sup>によるリスクを基盤とした AF 患者の抗血栓療法の指針を示す。

図 2 には、日本循環器学会、日本心臓病学会、日本心電学会、日本心臓ペースング・電気生理

学会合同研究班による心房細動治療ガイドライン<sup>5)</sup>から、AF を有するリウマチ性弁膜症、僧帽弁逸脱症、僧帽弁輪石灰化および人工弁患者における抗血栓療法を、図 3 には NVAF 患者における抗血栓療法を示す。AF の基礎疾患としてリウマチ性弁膜症を有する症例や、AF に僧帽弁逸脱症もしくは僧帽弁輪石灰化を合併する症例、さらに生体弁による弁置換術後の AF 症例では INR 2.0~3.0 でワルファリンをコントロールし、そのコントロールで塞栓症が発症した場合には、アスピリンまたはチクロピジンを加える。機械弁による弁置換術後の症例では INR 2.5~3.5 を目標としたワルファリンが推奨され

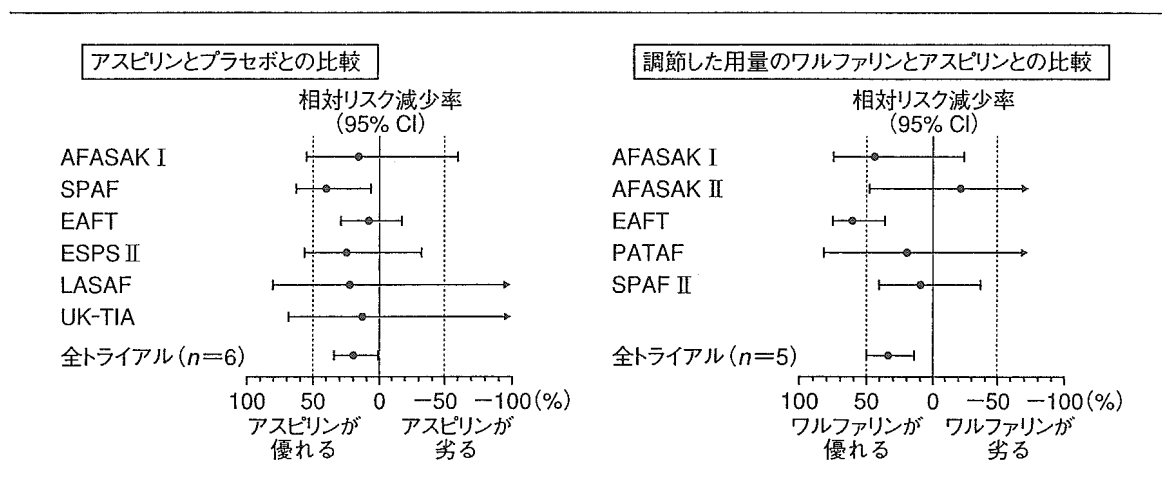


図 1 非弁膜症性心房細動患者における脳卒中 (虚血性および出血性) 予防のための抗血栓療法の比較 (文献 2 より引用)

表 1 心房細動患者の塞栓症一次予防のためのリスク層別化 (文献 3 より)

報告	高リスク	中等度リスク	低リスク
Atrial Fibrillation Investigators*	65 歳以上 高血圧既往 冠動脈疾患 糖尿病		65 歳未満 高リスク因子 (-)
American College of Chest Physicians	76 歳以上 左室機能不全** 2 つ以上の中等度リスク因子	65~75 歳 糖尿病 冠動脈疾患 甲状腺機能亢進症	65 歳未満 リスク因子なし
Stroke Prevention in Atrial Fibrillation	76 歳以上の女性 収縮期血圧 160 mmHg 以上 左室機能不全	高血圧既往 高リスク因子 (-)	高リスク因子 (-) 高血圧既往 (-)

\*高リスクと中等度リスクの区別なし, \*\*二次元エコー検査で中等度から重度の壁運動異常, 心駆出率低下, M-mode 心エコーで 0.25 以下の fractional shortening, 臨床的な心不全