

脳虚血急性期におけるカルシウム拮抗剤の効果 ——ラット中大脳動脈閉塞時のニルバジピン, ニカルジピンの 有効性について——

滋賀医科大学脳神経外科

椎野 顯彦, 松田 昌之, 半田 譲二

滋賀医科大学分子神経生物学研究センター

森川 茂広, 木戸 千絵, 犬伏 俊郎

藤沢薬品工業開発研究所

進 照 夫

〔原稿受付：平成2年9月11日〕

Ca⁺⁺ Antagonist and Acute Brain Ischemia: Effects of Nilvadipine and Nicardipine on Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats

AKIHIKO SHIINO¹, MASAYUKI MATSUDA¹, JYOJI HANDA¹, SHIGEHIRO MORIKAWA²,
CHIE KIDO², TOSHIROU INUBUSHI² and TERUO SUSUMU³

Department of Neurosurgery¹ and the Molecular Neurobiology Research Center², Shiga University of Medical Science, Ohtsu, and the Product Development Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co.³, Osaka.

Effects of calcium antagonists, Nicardipine and Nilvadipine, on neurologic deficits and size of infarct were studied in the rat middle cerebral artery (MCA) occlusion model. Each drug was administered immediately after induction of ischemia, and neurologic grade was evaluated 1 to 24 hours after MCA occlusion. At 24 hours post-occlusion, size of the infarct was compared with that of the control group. In addition, evolution of cerebral infarction was studied at 6 hours and 12 hours post-occlusion by magnetic resonance imaging (MRI).

In the Nilvadipine-treated group, neurologic deficits improved more rapidly and the size of infarct was significantly smaller than in the Nicardipine-treated group. MRI showed a progressive extension of cortical infarct in the untreated rat, whereas the infarct size remained unchanged in the Nilvadipine-treated rat. These results suggest the potential therapeutic usefulness of calcium antagonist for acute cerebral ischemia.

Key words: Nilvadipine, Nicardipine, Ca⁺⁺ antagonist, Brain ischemia, Magnetic resonance imaging.

索引語：ニルバジピン, ニカルジピン, Ca⁺⁺ 拮抗剤, 脳虚血, MRI

Present address: Department of Neurosurgery, Shiga University of Medical Science, Seta, Ohtsu, 520-21 Shiga-ken

はじめに

虚血の初期に生じるカルシウムの細胞内蓄積がその後の細胞障害に密接に関与している²¹⁾ との考えから、虚血性脳障害の治療薬としてカルシウム拮抗剤が注目されている。われわれも、従来、脳虚血時のカルシウム拮抗剤の有用性について検討してきたが、ラット断頭虚血時の脳内遊離脂肪酸生成抑制作用^{11-13,17)}、ネコの局所脳虚血時の体性感覚誘発電位や局所脳血流量の改善作用^{7,8)}、さらにラット中大脳動脈閉塞時の梗塞巣縮小効果^{9,19)}などが認められた。

今回は、既に脳循環改善剤として使用されているNicardipine と、同じ dihydropyridine 系のカルシウム

拮抗剤である Nilvadipine を用いて、ラットの局所脳虚血急性期における有用性を検討した。

方 法

実験 I：雄性 Sprague-Dawley (SD) rat, 体重 310~400 g を使用した。麻酔はハロセン吸入麻酔とし、中大脳動脈は本幹を嗅索の外側縁で閉塞し、かつこの付近で分枝する嗅索枝の閉塞を加える branch model¹⁸⁾ とした。中大脳動脈閉塞から 1, 2, 3, 6, 12, 24 時間後に神経症状を観察し、Bederson ら¹⁾の方法に準じて麻痺の程度を grade 0~3 の 4 段階に分類した (grade 0; 欠落症状を認めない, grade 1; 前肢屈曲, grade 2; 側方からの圧迫に抗し難い, grade 3; 円周運動を認める)。

Table 1 Time course of neurologic scores.

	Neurologic grade					
	1 hr	2 hr	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr
Control (n=9)	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	2.4±0.3	1.9±0.4
Nilvadipine (n=7)	2.6±0.4	2.3±0.4*	1.1±0.5	0.6±0.3**	0.0±0.0**	0.0±0.0**
Nicardipine (n=7)	3.0±0.0	2.9±0.1	2.6±0.3	2.3±0.5	0.7±0.2	0.6±0.2

Mean ± SD
* : p<0.05 ** : p<0.01
(Dunnett's type multiple comparisons)

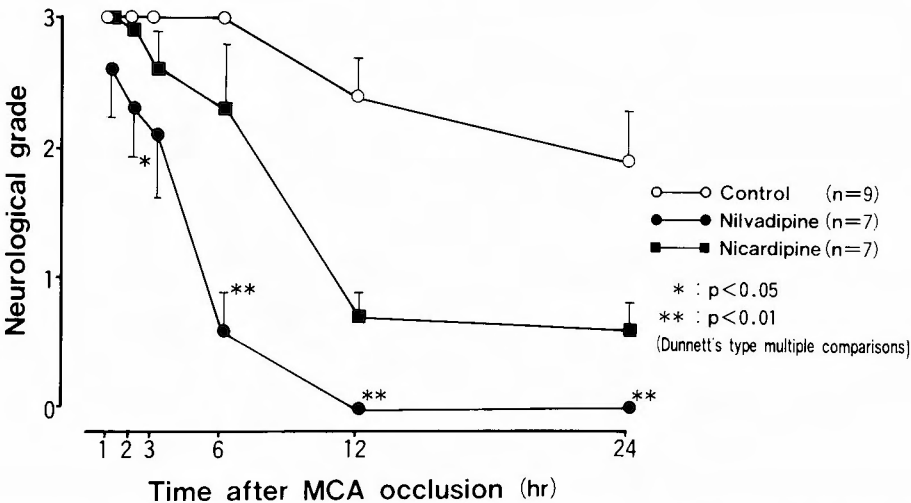


Fig. 1 Time course of neurologic grades. Each drug was given immediately after middle cerebral artery (MCA) occlusion.

24時間後に脳を剔出して bregma のレベルおよびその前後に 2 mm 毎の冠状断切片を作製し、これを2% triphenyltetrazolium chloride (TTC) 液に浸け、37°C で30分間保温した。染色した脳切片を写真にとり、各冠状断面ごとに planimeter (Nexus 68410, Kashiwagi Research) で半球当りの皮質部の梗塞巣の面積比を計測した。

実験Ⅱ：CSI (2T, General Electric) を用いて、中大脳動脈閉塞から6時間および12時間後に magnetic resonance imaging (MRI) を施行した。ラット頭部イメージング用に直径 5 cm のヘルムホルツ型コイルを作製し、ハロセン麻酔下に撮像した。撮像条件は、FOV を 40 mm, matrix を 256×256, T₁ 強調画像は T_R/T_E 500/28 msec, T₂ 強調画像は T_R/T_E 2000/80 msec で

Table 2 Size of infarction at 24 hours post-occlusion. B+2: Coronal slice at 2 mm anterior to the bregma, B: Coronal slice at the bregma, B-2: Coronal slice at 2 mm posterior to the bregma, B-4: Coronal slice at 4 mm posterior to the bregma.

		Size of Infarction (%)			
		B+2	B	B-2	B-4
Control	(n=9)	18.9 ± 5.6	16.9 ± 2.9	9.6 ± 2.8	2.4 ± 1.5
Nilvadipine	(n=7)	9.2 ± 3.5	4.1 ± 1.4 **	1.0 ± 0.5*	0.0 ± 0.0
Nicardipine	(n=7)	22.6 ± 5.6	13.5 ± 3.0	4.4 ± 2.6	0.5 ± 0.5

mean ± SD
* : p<0.05 ** : p<0.01
(Dunnett's type multiple comparisons)

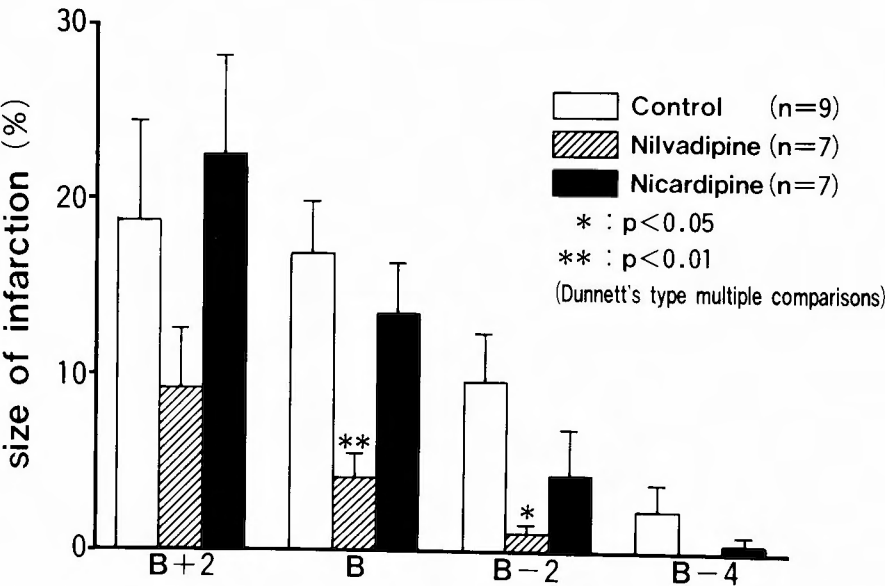


Fig. 2 Size of infarction 24 hours after middle cerebral artery occlusion (mean+SE). Abscissa shows position of the coronal slice of brain. Bregma+2: Slice at 2 mm anterior to the bregma, Bregma: Slice at the bregma, Bregma-2: Slice at 2 mm posterior to the bregma, Bregma-4: Slice at 4 mm posterior to the bregma.

行なった。MRI 施行後、虚血作製24時間後に脳を剔出し、冠状断切片を TTC で染色し、MR 画像と比較した。

薬物の調整・投与：Nicardipine (Sigma, Lot No. 106F-0539), および Nilvadipine (藤沢薬品工業, Lot No. 505145P) を polyethylene glycol 400 に溶解し、それぞれ 1.0 mg/kg, 0.32 mg/kg を中大脳動脈閉塞直後に腹腔内に投与した。対照群には溶媒のみを投与した。薬物の調製は実験者と別人が行ない、投与から神経症状の観察、梗塞面積の計測まで盲検法で行なった。Nicardipine および Nilvadipine の投与量は予備実験²³⁾や文献を参考にして、それぞれの薬物の至適量と考えられる量とした。MRI は、Nilvadipine および溶媒のみの中大脳動脈閉塞直後投与ラットのみにつき施行し

た。

統計処理：結果は mean±SE で示し、有意差検定は Dunnett 型の多重比較法を用いた。図表には $p < 0.05$ を「*」で、 $p < 0.01$ を「**」で示した。

結 果

神経症状の推移 (表 1, 図 1) 対照群は虚血作製から6時間後まで重度の麻痺が持続し (mean score=3.0), 12時間以降は回復傾向を示し, 24時間後には中等度の麻痺 (mean score=1.9) となった。

カルシウム拮抗剤を投与した群は、対照群よりも麻痺の改善傾向が強かった。両者のなかでは Nilvadipine 投与群の麻痺の回復がより著明で、6時間後にはすでに著しい回復を示し、24時間後には麻痺

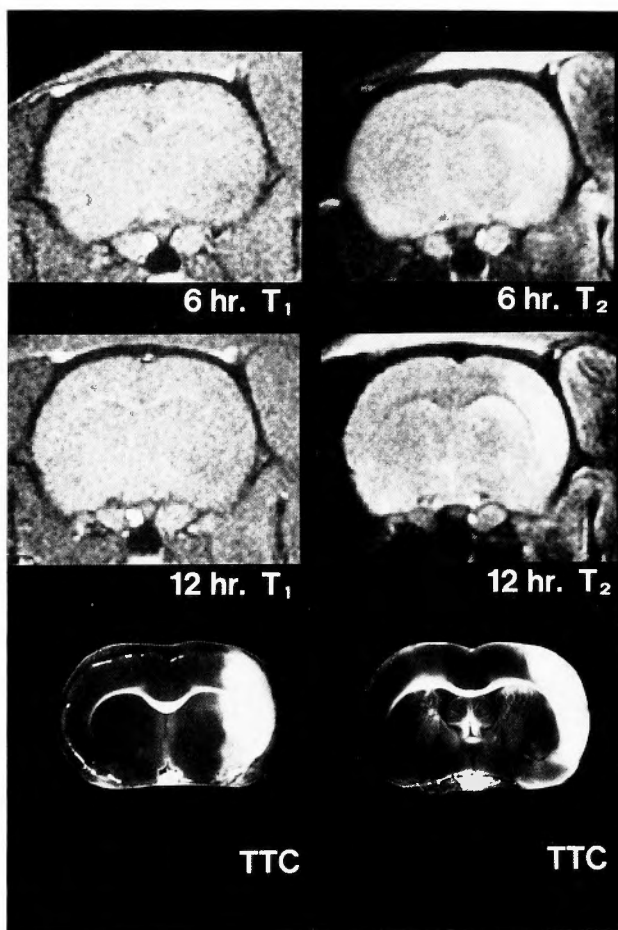


Fig. 3 Magnetic resonance imaging of brain of the untreated rat 6 hours (upper) and 12 hours (middle) post-occlusion. TTC-stained coronal slice at 24 hours post-occlusion is shown for comparison (lower).

は完全に消失し (mean score=0.0), 対照群に比べ統計学的に有意であった. Nicardipine 投与群では, 24時間後にも麻痺は軽度ながら残存し (mean score=0.6), 統計学的に有意な差は得られなかった.

梗塞面積 (表2, 図2): Nilvadipine 投与群では, bregma および bregma の後2mm の冠状断切片で, 梗塞面積が対照群より小さく, 統計学的に有意であった. Nicardipine 投与群の梗塞面積も縮小傾向を示したが, 統計学的に有意な差ではなかった.

MRI: 治療, 非治療ラットとも虚血作製から6時間後の MRI において, 被殻外側の穿通枝領域及び中大脳動脈支配域の大脳皮質に虚血巣を認めた (図3, 4). 非治療ラットでは, 治療ラットよりも皮質部虚血巣の範囲が大きく, 12時間後さらに虚血域の拡大が

認められた (図3). 治療ラットにおいては, 6時間後と12時間後で虚血巣の範囲に変化はなかった (図4). MRI における12時間後の虚血巣の範囲と24時間後に TTC 染色で認められた梗塞巣の範囲とはほぼ一致した (図3, 4). 虚血巣は T_2 強調画像で高信号領域, T_1 強調画像で低信号領域として描出され, 虚血作製から6時間後よりも12時間後において正常域との差がさらに明らかとなった.

考 察

虚血性脳血管障害は治療困難な疾患の1つであるが, これは虚血発生後短期間で脳組織の変化が不可逆的になり, 治療法としての有効な手段がないためで, このことから脳虚血急性期における積極的な治療が重

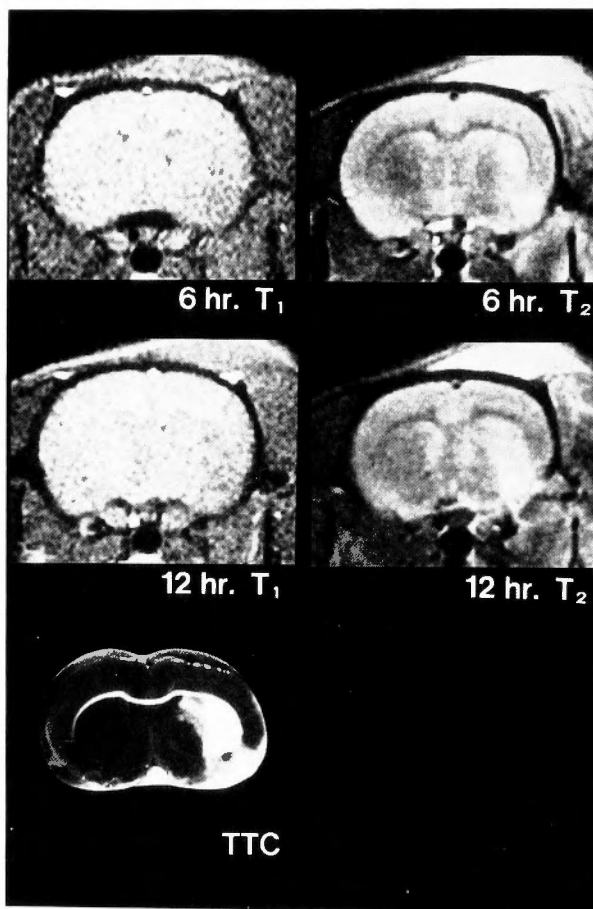


Fig. 4 Magnetic resonance imaging of brain of the Nilvadipine-treated rat at 6 hours (upper) and 12 hours (middle) post-occlusion. TTC-stained coronal slice at 24 hours post-occlusion is shown for comparison (lower).

視されている。虚血時の細胞内カルシウムの蓄積がその後の一連の細胞障害の契機になるとの考え^{2-6,10,14,16,21,22,25}から、虚血性脳障害の治療薬としてカルシウム拮抗剤に大きな期待がかけられているが、カルシウム拮抗剤には血管拡張作用による脳循環改善作用も期待でき、脳血管への選択性も注目されている。

虚血に伴うエネルギーの枯渇により細胞内にカルシウムが過度に蓄積すると、phospholipase などの酵素反応が無秩序に引き起こされる結果、細胞障害が加速度的に進行すると考えられる。この虚血初期の細胞内カルシウムの蓄積を抑制することにより、神経細胞の不可逆的な変化を抑えることが、すくなくとも理論的には可能である。このような神経細胞保護の目的でカルシウム拮抗剤を使用する際には、虚血発生後できるだけ早期に使用することが望ましい。しかし一方では脳虚血急性期のカルシウム拮抗剤の使用に関しては、脳循環自動調節能の障害や全身血圧の低下に伴う脳血流量の低下、非虚血域の血管拡張に伴う steal phenomenon、脳血液関門の破綻による浮腫の増悪、などが、問題点として指摘されている。

カルシウム拮抗剤のうち本邦で脳循環改善薬として認められているものに、Nicardipine, Flunarizine, Cinnarizine があり、いずれもカルシウム拮抗剤を代表する薬物である。化学構造式から、Nicardipine は dihydropyridine 系、Flunarizine と Cinnarizine はともに piperazine 系として分類されているが、今回使用した Nilvadipine と Nicardipine はいずれも Nimodipine と同じ dihydropyridine 系のカルシウム拮抗剤で、これらのカルシウム拮抗剤については以前から脳虚血に対する応用の基礎的・臨床的研究が行なわれている。

我々も既にこれらのカルシウム拮抗剤の脳循環改善作用や脳保護作用について報告してきたが^{6-9,11-13,17,19}、今回はラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて、局所脳虚血急性期における Nicardipine 及び Nilvadipine の効果を検討した。その結果、虚血作製後の投与でもこれらのカルシウム拮抗剤には神経症状の回復を促進し、梗塞巣を縮小する効果のあることが明らかとなった。

MRI において、非治療ラットでは虚血作製後6時間から12時間後にかけて虚血巣の範囲が拡大したのに対し、治療ラットでは6時間後と12時間後で虚血巣の範囲に変化はなく、カルシウム拮抗剤による脳梗塞の進行抑制が示唆された。われわれは以前にラット中大脳動脈閉塞時の麻痺の程度と大脳皮質部梗塞巣の大き

さを比較したが、梗塞巣が内包に及ばない限り、虚血作製24時間後における麻痺の程度と大脳皮質部梗塞巣の大きさはほぼ相関した^{15,18}。今回の成績では MRI で認められた大脳皮質部虚血域の範囲と麻痺の程度は一致しなかったが、この理由の1つとして脳虚血急性期、特に虚血から12時間以内における神経細胞の機能的障害域、いわゆる“ischemic penumbra”の存在が考えられる。非治療ラットで、虚血作製後6時間から12時間後にかけて麻痺の程度に変化がなかったのに、MRI では病巣部の拡大が認められたが、これは6時間目における虚血域の範囲が MRI で確認された病巣部の範囲よりも実際はより広範囲であったためと考える。虚血初期の MRI における信号強度の変化は主に細胞内浮腫によるものである。以前の実験成績で、ラット中大脳動脈閉塞後、病巣が信号強度の差として認められるのは虚血作製から4時間以降であったことから²⁰、比較的軽度の虚血域は6時間目には未だ鮮明な信号強度の差を示して検出され難いことが予想される。Nilvadipine は脳血管への選択性が高く、脳血流量を容量依存性に増加させる²⁴。また、その作用の強さは Nicardipine とほぼ同程度であるが、作用時間は Nicardipine よりも長いといわれている²⁴。Nilvadipine の投与によりラット中大脳動脈閉塞時にみられる患側半球における ATP の減少および乳酸の増加は抑制され、さらに虚血域における脳血流量の増加が認められている²⁴。この様に本剤は脳虚血に際しては、脳保護作用および脳血流改善作用の2つの点からの治療効果が期待されるが、今回の実験結果は、こうした成績をさらに裏付ける。

中大脳動脈閉塞後の神経症状回復の程度や24時間後の梗塞巣縮小効果は Nicardipine に比べ Nilvadipine でより顕著であった。この理由として、投与後の作用の持続時間や脳血管への選択性、脳血液関門透過性の差などが考えられるが、薬物の投与法や投与の間隔などの問題も残されており今回の実験のみで一概に結論を下すことはできない。しかしながら、今回の実験結果は、少なくともある種のカルシウム拮抗剤が虚血発生後の投与でも神経症状の改善や梗塞面積の縮小効果をもつことを示しており、従来血管拡張剤の使用に異論があった脳虚血急性期においても、カルシウム拮抗剤の有用性を示唆するものと思われる。

文 献

- 1) Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al: Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17: 472-476, 1986.
- 2) Benveniste H, Diemer H: Early postischemic ^{14}C accumulation in rat dentate hilus. *J Cereb Blood Flow Metabol* 8: 713-719, 1988.
- 3) Deshpande JK, Siesjö BK, Wielock T: Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metabol* 7: 89-95, 1987.
- 4) Dienel GA: Regional accumulation of calcium in postischemic rat brain. *J Neurochem* 43: 913-925, 1984.
- 5) Farber JL: The role of calcium in cell death. *Life Sci* 29: 1289-1295, 1981.
- 6) Handa J, Kidooka M, Takenaka T: Calcium and free fatty acids in cerebral ischemic cell damage. In: *Cerebral Ischemia and Resuscitation*, Schurr A, Rigor BM, eds, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, pp. 137-149.
- 7) Harada K, Nakasu Y, Matsuda M, et al: Effects of a new Ca^{2+} antagonist, KB-2796, on the regional cerebral blood flow and somatosensory evoked potentials in the ischemic brain in cats. *Surg Neurol* 30: 89-96, 1988.
- 8) 原田研吾, 中洲庸子, 松田昌之, 他: 1-[bis (4-fluorophenyl) methyl]-4-(2, 3, 4-trimethoxybenzyl) piperazine dihydrochloride (KB-2796) の脳局所血流量に対する作用. *薬理と治療* 15: 1499-1506, 1987.
- 9) Harada K, Shiino A, Matsuda M, et al: Effects of a novel calcium antagonist KB-2796, on neurologic outcome and size of experimental cerebral infarction in rats. *Surg Neurol* 32: 16-20, 1989.
- 10) Hossman KA, Paschen W, Csiba L: Relationship between calcium accumulation and recovery of cat brain after prolonged cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metabol* 3: 346-353, 1983.
- 11) Kanazawa T, Kidooka M, Matsuda M, et al: Effects of 1-[bis (4-fluorophenyl) methyl]-4-(2, 3, 4-trimethoxybenzyl) piperazine dihydrochloride, a new synthesized Ca^{2+} blocker KB-2796, on free fatty acid liberation in ischemic brain in rats. *Arch Jpn Chir* 55: 755-761, 1986.
- 12) Kidooka M, Matsuda M, Handa J: Effect of calcium antagonist and agonist on free fatty acid liberation in the ischemic brain of rats. *Surg Neurol* 28: 41-45, 1987.
- 13) Kidooka M, Matsuda M, Handa J: Ca^{2+} antagonist and protection of the brain against ischemia. *Surg Neurol* 28: 437-440, 1987.
- 14) Meldrum BS: Metabolic factors during prolonged seizures and their relation to nerve cell death. *Adv Neurol* 34: 261-275, 1983.
- 15) Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, et al: The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res* 396: 77-96, 1986.
- 16) Rappaport ZH, Young W, Flamm ES: Regional brain calcium changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia. *Stroke* 18: 760-764, 1987.
- 17) 椎野顯彦, 木戸岡実, 半田譲二: 脳虚血とカルシウムチャネル—虚血脳に対する YC 170 の効果一. *脳卒中* 10: 306-308, 1988.
- 18) Shiino A, Harada K, Handa J: Focal brain ischemia model in rats. An experimental study. *Surg Neurol* 31: 203-208, 1989.
- 19) Shiino A, Susumu T, Matsuda M, Handa J: A study of the calcium antagonist on focal cerebral ischemia.—The effects of nilvadipine on middle cerebral artery occlusion in SHR— *Surg Neurol*, in the press.
- 20) 椎野顯彦, 松田昌之, 半田譲二, 森川茂広, 木戸千絵, 犬伏俊郎: 局所脳虚血急性期における MRI—ラット中大脳動脈閉塞モデルによる研究一. 第15回日本磁気共鳴医学会大会 1990年2月16, 17日, 岐阜.
- 21) Siesjö BK: Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metabol* 1: 155-185, 1981.
- 22) Simon RP, Griffiths T, Evans MC, et al: Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: An electron microscopy study in the rat. *J Cereb Blood Flow Metabol* 4: 350-361, 1984.
- 23) Susumu T: unpublished data.
- 24) 上谷利治: FK235 の脳循環改善例としての有効性. *CRR* 860131, 1986.
- 25) Yanagihara T, McCall JT: Ionic shifts in cerebral ischemia. *Life Sci* 30: 1921-1925, 1982.