

虚血性脳障害に対するカルシウム拮抗剤の効果 に関する実験的研究

滋賀医科大学脳神経外科学講座（指導：半田譲二教授）

木 戸 岡 実

〔原稿受付：昭和61年11月25日〕

Effects of Calcium Antagonist on Ischemic Cell Injury of the Rat Brain

MINORU KIDOOKA

Department of Neurosurgery, Shiga University of Medical Science
(Director: Prof. Dr. JYOJI HANDA)

Using an experimental model of global ischemia of the brain in rats, effects of a dihydropyridine Ca^{++} antagonist nicardipine on liberation of free fatty acids (FFAs) were studied, and compared with those of pentobarbital (PB), an established brain protecting agent. In rats of control group in which the distilled water (5 ml/kg) was intraperitoneally given 15 minutes prior to decapitation, FFAs showed a rapid progressive increase for a whole experimental period of up to 60 minutes without reaching a plateau. Such a rapid increase in FFAs was inhibited, though partially, by an intraperitoneal injection of either nicardipine (1 mg/kg) or PB (60 mg/kg) 15 minutes prior to decapitation. With the dosages used in this study, nicardipine was less effective than PB, but its effect was more marked in the early than the late phase of FFA liberation and for unsaturated FFAs.

Using the same model of global ischemia, effects of a dihydropyridine Ca^{++} agonist YC-170 and nicardipine on FFAs at 10 minutes postdecapitation were studied. An intraperitoneal injection 15 minutes prior to decapitation of YC-170 (3 mg/kg) significantly enhanced, and that of nicardipine (1 mg/kg) reduced, the accumulation of FFAs. Pretreatment with nicardipine (15 minutes prior to an injection of YC-170) negated the effect of YC-170 on FFAs, suggesting the competitive action of YC-170 and nicardipine on dihydropyridine binding sites in vivo.

Using a radioreceptor assay, nicardipine levels in the rat brain following an intraperitoneal injection was measured. Fifteen minutes after a 1 mg/kg dose, the level of nicardipine was 15.85 ng/g in the rat brain and 34.14 ng/ml in the plasma, indicating that the sufficient amount

Key words: Cerebral ischemia, Calcium antagonist, Calcium agonist, Free fatty acids, Radioreceptor assay.

索引語：脳虚血，カルシウム拮抗剤，カルシウム刺激剤，遊離脂肪酸，ラジオレセプターアッセイ。

Present address: Department of Neurosurgery, Shiga University of Medical Science, Ohtsu, Shiga-Ken, 520-21, Japan.

of drug to mediate a pharmacologic effect accumulates in the brain.

Role of Ca^{++} in the ischemic brain cell damage and the possible therapeutic effect of Ca^{++} antagonist against cerebral ischemia were discussed.

緒 言

破裂脳動脈瘤患者においては脳血管攣縮が予後決定上きわめて重要な因子であり、その原因究明及び治療が課題となっている。これと関連して脳血管拡張作用をもつカルシウム拮抗剤が動物実験で脳動脈攣縮を防止ないし解除し、また臨床的にも有用であるとする報告があるが、最近この臨床効果は脳動脈攣縮の解除にあるのではなく、脳虚血時の脳保護作用によるのではないかともいわれるに至った^{1,2,11,13,16,19,24,32}。

一方最近、虚血性脳障害におけるカルシウムの役割が注目されており³⁰、この点からもカルシウム拮抗剤の脳保護作用の可能性は十分想定される¹⁶。さらに、脳虚血に際し脳内遊離脂肪酸 (FFA) が急速に増加蓄積することが知られており³、これは各種薬剤の脳保護作用の一つの指標として利用されている^{27,28}。たとえば、ペントバルビタール (PB) に見られる虚血脳での FFA 増加に対する抑制作用が、この薬剤の脳保護作用の一つの根拠とされ、カルシウム拮抗剤のうち nifedipine も PB とほぼ同等かこれよりやや強く FFA 増加を抑制したと報告されている²⁹。

以上より、カルシウム拮抗剤のうち従来われわれが破裂脳動脈瘤患者に使用してきた nicardipine を選んで、その虚血性脳障害に対する効果を脳内 FFA 測定を中心に検討する目的で、ラットを用いて、

I. 断頭虚血モデルにおける脳内遊離脂肪酸増加に対するカルシウム拮抗剤 nicardipine の効果と、先に脳保護物質として知られている PB の同様の効果との比較検討、

II. 断頭虚血モデルにおける脳内遊離脂肪酸増加に対するカルシウム刺激剤 VC-170 の作用およびこれと nicardipine との相互作用の検討、

III. ラジオレセプターアッセイを用いた腹腔内投与後の脳内 nicardipine 濃度測定 of 三点について実験を行なった。

実験 I. 断頭虚血モデルにおける脳内遊離脂肪酸増加に対するカルシウム拮抗剤 nicardipine の効果

材料および方法

雄性ウイスター系ラット、体重 220-300 g を用いた。各種薬剤を腹腔内投与し、15分後に断頭、1, 10, 30, 60分後の全脳 FFA を測定した。用いた薬剤と用量は、nicardipine $\# 1 \text{ mg/kg}$ および PB 60 mg/kg であり、対照として蒸留水 5 ml/kg を投与した。脳内 FFA 測定は、Shiu らの方法に準じた²⁷。虚血1分の群は、断頭後直ちに脳を摘出し、正確に1分後に液体窒素 (-196°C) につけ、凍結した。他の群では、断頭後直ちに生理的食塩水を浸したスポンジの上に頭部をのせてラップフィルムで覆い、 37°C の恒温槽で保温した後、脳を摘出し、断頭後正確に10, 30, 60分で液体窒素につけ、凍結した。非虚血脳 (0分虚血) としては、蒸留水 5 ml/kg を投与15分後に断頭、直ちに頭部全体を液体窒素につけ、その後低温室 (0°C) で摘出した脳を用いた。

凍結した脳を秤量し、20倍量のクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 混液中で予め氷冷したテフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし全脂質を抽出した⁸⁾。この際、ヘプタデカン酸 ($17:0$) 500 nmole を内部標準として加えた。抽出液からガラス繊維フィルター (東洋濾紙, GA 100) を用いた吸引濾過で組織残渣を除き、 0.1% NaCl で1回、メタノール-生理的食塩水 (1:1, v/v) 混液で2回洗浄後、 40°C 恒温水槽中で窒素気流下に溶媒を蒸発乾固した。得られた脂質画分をクロロホルム $500 \mu\text{l}$ で溶解し、このうち $150 \mu\text{l}$ を濃縮ゾーン付きシリカゲル G プレート (ワットマン社, LK-5) にスポットし、ヘプタン-無水ジエチルエーテル-氷酢酸 ($70:30:1.5$, by vol.) を展開溶媒として展開し、脂質を分離した。(Snyder and Blank の変法)³⁰。脂質の検出にはヨード噴霧を行ない、FFA に相当する層をプレートからかきとり、 3 ml のクロロホルム-酢酸 ($99:1$, v/v) 混液中に溶解した。

$1,000 \times \text{g}$ で5分間遠沈しシリカゲルを沈降させ上清を得、この操作をさらに2回繰り返して、上清を合計し、蒸留水 2 ml を加え洗浄、上清を除去し、硫酸ソーダを加え吸引濾過で結晶を除去し、クロロホルム層を 40°C 恒温水槽中で窒素気流下に溶媒を蒸発乾固し

た。得られた FFA をジアゾメタン 40 μ l によりメチルエステル化し、窒素気流下に反応液を乾固後へプタン 100 μ l で再構成し、このうち 2 μ l についてガスクロマトグラフ (Hewlett Packard model 5830A) を用いて FFA を分析した。カラムは Shinchrom E-71 5% 80/100 mesh (1.8 m $\times$ 1.8 mm i.d.), カラム温度は 190°C $\sim$ 240°C; 10°C/min, キャリヤガスはヘリウム (20 ml/min) を用いた。主なピークは、パルミチン酸 (16:0), ステアリン酸 (18:0), オレイン酸 (18:1), アラキドン酸 (20:4) であり, アラキドン酸以外の FFA は内部標準として加えたヘプタデカン酸 (17:0) とのピーク面積比 (peak area measurement), アラキドン酸はピーク高さ比 (peak height measurement) から, 標準物質を用いた検量線の直線回帰式より 16:0, 18:0, 18:1, 20:4 の値を計算し, これらの合計を総遊離脂肪

酸量 (total FFA) とした。統計学的処理は Student *t*-test を用い, P 値が 0.05 以下を有意とした。

結 果

結果は, Table 1 および Figure 1 に示した (Table 1) (Fig. 1)。

対照群では虚血早期より各 FFA (パルミチン酸, ステアリン酸, オレイン酸, アラキドン酸) は, 程度の差が多少あるもののプラトーに達することなく, 急激に増加蓄積し続けた。虚血 1 分と比較すると, 10 分後上記の各 FFA はそれぞれ, 約 2.3, 1.7, 1.5, 1.5 倍, 30 分後には 3.8, 2.6, 2.9, 2.1 倍, 60 分後には 5.7, 3.6, 4.5, 2.9 倍に増加した。標本採取上の差があるので単純には比較できないが, 0 分虚血を非虚血群とすると, これに対し各 FFA は 1 分虚血ではそれぞれ

Table 1. Effects of intraperitoneal pentobarbital and nicardipine on free fatty acid liberation in the ischemic brain of rats

Ischemia time (min)	Group	No. of Animals	Free fatty acid ^a									
			Palmitic acid (16:0)		Stearic acid (18:0)		Oleic acid (18:1)		Arachidonic acid (20:4)		Total	
0	C	4	60.8±15.34		94.8±23.53		105.6±19.34		105.6±28.30		366.8±86.04	
1	C	7	109.5	13.02	225.3	8.70	125.2	10.03	376.1	12.27	836.1	30.54
	PB	7	58.6	8.79	124.6	9.06	81.7	9.29	184.8	22.02	449.6	44.19
			***		***		***		***		***	
	NIC	7	75.1	13.58	190.3	12.26	81.2	7.74	295.8	22.44	642.5	55.39
			**		**		***		***		**	
10	C	5	247.7	5.15	375.0	9.81	190.7	9.98	580.6	13.7	1394.0	37.4
	PB	5	210.6	9.07	329.0	15.67	160.4	12.17	507.0	21.5	1170.3	42.9
			***		***		***		***		***	
	NIC	5	237.0	5.35	356.5	9.45	169.8	7.71	525.8	17.9	1289.2	38.5
			NS		NS		NS		**		*	
30	C	7	411.4	14.27	591.3	6.29	356.3	8.92	780.3	11.16	2139.2	25.3
	PB	7	326.5	12.28	487.6	8.50	287.7	23.36	629.4	9.90	1702.6	29.39
			***		***		***		**		***	
	NIC	7	435.7	13.81	561.5	12.32	331.0	10.88	729.9	28.15	2058.1	52.59
			NS		*		*		NS		NS	
60	C	7	622.2	13.44	816.9	36.68	559.9	33.11	1103.0	51.23	3102.0	121.4
	PB	7	511.5	10.32	682.8	16.51	417.2	16.38	784.1	23.48	2395.6	40.98
			***		***		***		***		***	
	NIC	7	626.9	7.55	875.1	9.79	493.1	21.07	846.8	58.78	2751.9	75.74
			NS		NS		NS		***		***	

^a: nmol/g, mean $\pm$ S.E.M., C: control, PB: pentobarbital, NIC: nicardipine, FFA: free fatty acid. ***: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$, *: $p < 0.10$, NS: no statistical significance, when compared to the control for each.

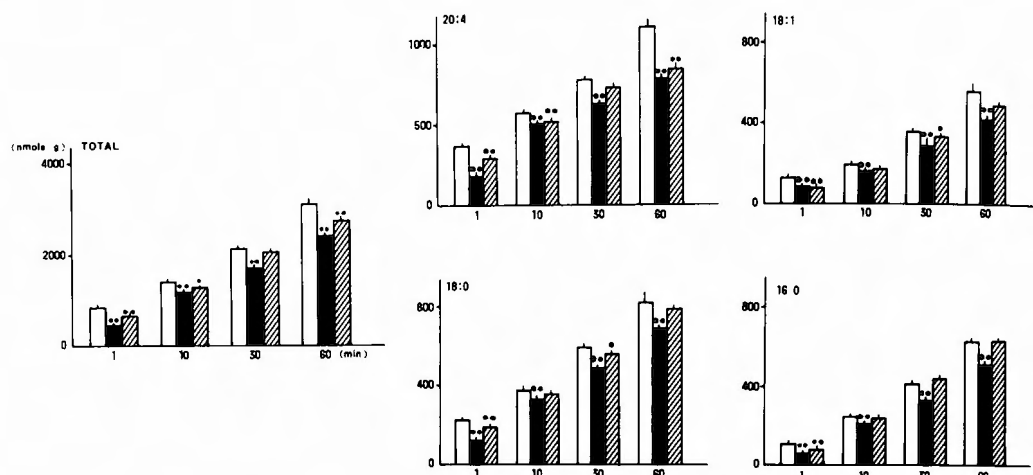


Fig. 1. Effects of intraperitoneal pentobarbital and nicardipine on the free fatty acid liberation in the ischemic brain of rats. Vertical bars represent the mean and 1 S.E.M.. White bar: control, dark bar: pentobarbital-treated group, shaded bar: nicardipine-treated group. Total: total free fatty acids, 20:4: arachidonic acid, 18:1 oleic acid, 18:0: stearic acid, 16:0: palmitic acid. *: $p < 0.10$, **: $p < 0.05$, when compared to the control for each.

約1.8, 2.4, 1.2, 3.6倍, 10分虚血では, 4.1, 4.0, 1.8, 5.5倍に増加した。つまり, 非虚血群に対し虚血1分までの超早期ではアラキドン酸 (3.6倍), ついでステアリン酸 (2.4倍) の増加が著しく, 虚血10分までの早期では, アラキドン酸を筆頭にオレイン酸以外のFFAで増加がみられ, その後虚血時間に対しほぼ直線的に, 60分後約9から10倍になるまで増加し続けた。オレイン酸も増加し続けたものの, 60分後で約5倍にとどまった (Fig. 2)。

この増加に対しPBは全ての虚血時間において全てのFFAの増加を著明に抑制した。この抑制の程度は対照群に対して虚血1分で35-50%と最も強く, 10分以降では15-30%とほぼ一定であった (Table 2)。一方, nicardipineはPBと同様全般的にFFA増加抑制効果を示したが, その効果は用いた投与量の範囲内ではPBに比しやや弱く, 虚血1分では20-35%の抑制, 他の虚血時間ではパルミチン酸以外の三者で約10%の抑制にとどまった。即ち nicardipineは虚血1分では全てのFFAの増加を有意に抑制したが, 他の虚血時間では平均値は対照群に比して低値で抑制傾向を示すものの, 必ずしも全てのFFAで統計学的有意差を得るには至らなかった。総FFA量でみると, 1分および60分虚血で, nicardipineは統計学的に有意な増加抑制を示した。

各FFAでは, nicardipineは, アラキドン酸, オレ

イン酸といった不飽和脂肪酸に対し抑制効果をつよく示した。特にアラキドン酸でみると, 30分虚血を除き, 1分, 10分, 60分虚血で統計学的に有意な増加抑制を示した。PBは軽度アラキドン酸増加抑制が強い傾向があったほか, 全FFAをほぼ一様に著明に抑制した。

考 察

本実験で対照群での虚血脳内のFFAは, Shiuらも指摘しているように, 虚血早期よりプラトーに達することなく急激に増加蓄積し続けた²⁷⁾。各測定値を過去の報告者の測定値に比較すると, アラキドン酸で約2倍高値を示しているものの, 他のFFAについてはほぼ一致していた。虚血時間に対する各FFAの変化をShiuらは虚血30分以内のearly phaseとそれ以降のlate phaseに分けてFFA増加に少なくとも2つのメカニズムを想定し, PBとnifedipineが両phaseに有効なのに対して, 他のカルシウム拮抗剤 (D-600, flunarizine, cinnarizine, lidoflazine) はearly phaseにのみ有効だったとしている²⁹⁾。また, ステアリン酸とアラキドン酸, パルミチン酸とオレイン酸の増加の時間的経過について, 前者は10分までに急激に増加し, その後60分まではほぼ直線的に増加するのに対し, 後者は虚血初期から虚血60分までずっとほぼ直線的に増加するといった差があることを強調している。今回の実験結果はほぼこれと一致していたが, 彼らがearly

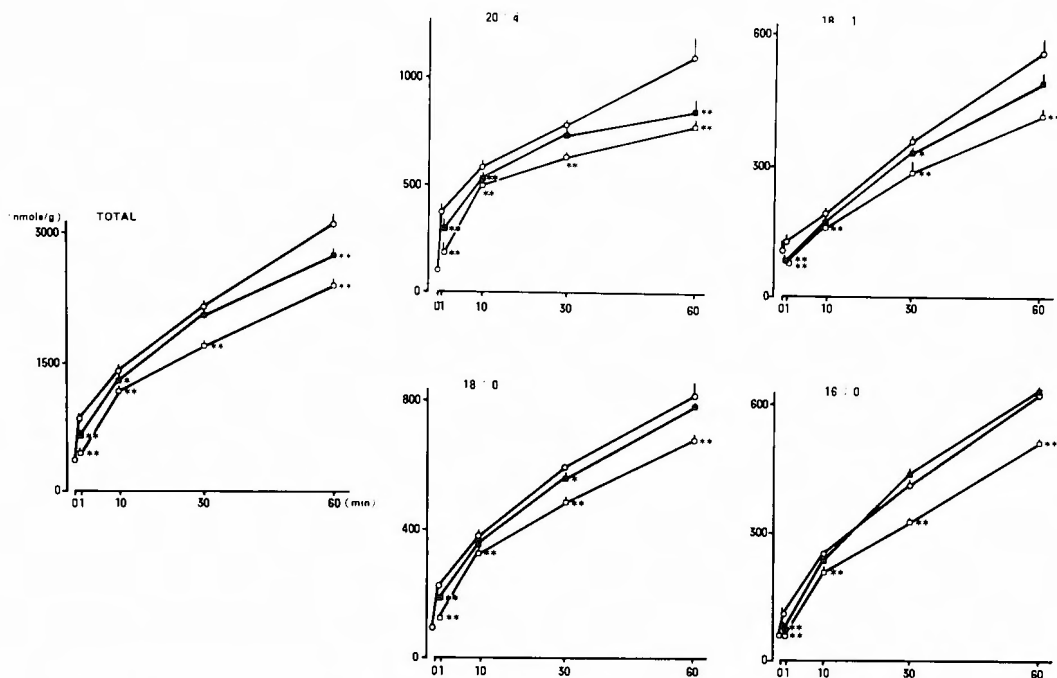


Fig. 2. Changes in the free fatty acids at 0, 1, 10, 30 and 60 minutes postdecapitation. Symbols and vertical bars represent the mean and 1 S.E.M.. White circle: control, dark square: nicardipine-treated group, white square: pentobarbital-treated group. See legend to Figure 1 for other details.

phase でステアリン酸とアラキドン酸の急激な増加を認めたのに対し今回の測定では、この両者にパルミチン酸を加えた三者に early phase での急激な増加の傾向が認められた。

PB による FFA 増加抑制についてはすでにいくつかの報告がある。Yoshida らは、PB はアラキドン酸

には有効でなかったとし³⁶⁾、Hattori らは、ステアリン酸とオレイン酸には有効でなかったとした¹⁴⁾。また Shiu らは虚血時間が長くなるほど PB の効果が大きくなるとした点などで今回の結果と異なるが、全虚血時間を通して著明な抑制を示したということでは一致している²⁷⁾。

Table 2. Effects of intraperitoneal pentobarbital and nicardipine on free fatty acid liberation in the ischemic brain of rats

Ischemia time (min)	Group	Free fatty acid ^a				Total
		Palmitic acid (16:0)	Stearic acid (18:0)	Oleic acid (18:1)	Arachidonic acid (20:4)	
1	PB	53.5	55.3	65.3	49.1	53.8
	NIC	68.6	84.5	64.9	78.6	76.8
10	PB	85.0	87.7	84.1	87.3	84.0
	NIC	95.7	95.1	89.0	90.6	92.5
30	PB	79.4	82.5	80.7	80.7	79.6
	NIC	105.9	95.0	92.9	93.5	96.2
60	PB	82.2	83.6	74.5	71.1	77.2
	NIC	100.8	96.1	88.1	76.8	88.7

^a: per cent to the average of control group. PB: pentobarbital, NIC: nicardipine.

これに比し, nicardipine の効果は PB のそれに比しやや弱かったが, アラキドン酸では30分虚血以外で統計学的に有意な増加抑制を示し, 総 FFA 量もほぼ同様の傾向であり虚血性脳障害に対する保護効果の可能性を示唆した. PB と nicardipine の効果の差は, 断頭時ラットが, 前者では十分な麻酔状態にあり脳代謝がうまく抑制されているのに対し, 後者では覚醒状態にあることも影響していると思われる. FFA 増加に対する各種カルシウム拮抗剤の効果について検討して, Shiu らは2, 3のカルシウム拮抗剤が early phase に有効なことを報告している²⁹⁾. 今回使用した nicardipine も同様に虚血早期に効果的であり, しかもその効果は Shiu らの用いた D-600, flunarizine より強力であったか, nifedipine には及ばなかった. また, Shiu らの結果では, D-600 はステアリン酸を虚血4, 10, 30分で抑制し, 虚血10分ではパルミチン酸とアラキドン酸を抑制した以外はほとんど効果なく, flunarizine は cinnarizine, lidoflazine と同様総 FFA, パルミチン酸, オレイン酸とアラキドン酸にはあまり抑制を示さず, ただステアリン酸に対して有効であったが, nicardipine は不飽和脂肪酸に対し抑制効果を示した. このような各 FFA に対する各種脳保護物質の抑制効果の差は, 単に薬物の種類の差だけでなく, 同じ薬剤

を用いても例えば PB の結果にもみられるように報告者間で差があり, 脳虚血の負荷の方法, 脳採取法, 薬物の投与経路や投与量などの実験方法に影響された可能性もあると思われる. nicardipine も他のカルシウム拮抗剤と同様全身循環及び脳循環に対する薬理作用を有する. 今回の実験では, 脳虚血モデルの選択に際し, これら循環系への影響をできるだけ少なくし, 代謝面での効果を比較するため断頭による虚血モデルを使い nicardipine が虚血脳における FFA 産生を効果的に抑制することを認めたが, 今後至適投与経路, 投与量などについての検討とともに, より臨床例に近い不完全虚血後再灌流などの実験モデルを用いて, 血圧や脳血流量などのカルシウム拮抗剤による影響とあわせての検討が必要である.

実験 II 断頭虚血モデルにおける脳内遊離脂肪酸増加に対するカルシウム刺激剤 YC-170 の作用およびこれとカルシウム拮抗剤 nicardipine との相互作用

材料および方法

雄性ウイスター系ラット, 体重 220-300 g を用いた. ラットを以下の4群に分け, 各種薬剤を腹腔内投与し, 断頭した.

Table 3. Effects of intraperitoneal YC-170, and combined nicardipine and YC-170, on free fatty acid liberation in the ischemic brain of rats

Group	No. of animals	Free fatty acid ^a				
		Palmitic acid (16:0)	Stearic acid (18:1)	Oleic acid (18:1)	Arachidonic acid (20:4)	Total
1	5	248.6±3.27	418.7±8.08	192.5±11.6	526.7±12.9	1386.4±27.8
2	5	206.0±3.43	367.6±4.39	142.7±5.33	459.3±8.14	1175.7±20.1
		**	**	**	**	**
3	10	214.2±4.10	365.4±4.24	156.9±5.81	499.4±24.1	1233.2±25.1
4	8	228.7±7.51	384.0±9.42	158.4±6.35	501.0±22.4	1272.1±28.3
		NS	NS	NS	NS	NS
5	5	237.0±5.35	356.5±9.45	169.8±7.71	525.8±17.9	1289.2±38.5
6	5	247.7±5.15	375.0±9.81	190.7±9.98	580.6±13.7	1394.0±37.4
		NS	NS	NS	**	*

^a: nmol/g, mean±S.E.M.. Group1: YC-170 (3 mg/kg) i.p., 15 minutes prior to decapitation, Group 2: Control to group 1, vehicle of YC-170 (5 ml/kg) i.p., 15 minutes prior to decapitation, Group 3: Nicardipine (1 mg/kg) i.p., 30 minutes prior to decapitation, followed by YC-170 (3 mg/kg) i.p. 15 minutes later, Group 4: Control to group 3, distilled water (5 ml/kg) i.p., 30 minutes prior to decapitation, followed by vehicle of YC-170 (5 ml/kg) i.p. 15 minutes later, Group 5: nicardipine (1 mg/kg) i.p., 15 minutes prior to decapitation, Group 6: Control to group 5, distilled water (5 ml/kg) i.p., 15 minutes prior to decapitation.

** : p<0.05, * : p<0.10, NS: no statistical significance, compared to the control for each.

第1群; YC-170 3 mg/kg を断頭15分前に投与した。YC-170 は、溶媒 (エタノール-1N HCl-蒸留水, 20:4:76, by vol.) で 10 mg/ml となるよう溶解しておき、投与直前に生理的食塩水で 1 mg/ml 溶液を調製して用いた (5匹)。

第2群; 第1群の対照として、上記溶媒を生理的食塩水で10倍希釈した液 5 ml/kg を断頭15分前に投与した (5匹)。

第3群; 蒸留水に溶解した nicardipine (1 mg/ml 溶液) 1 mg/kg を断頭30分前に、その後さらに YC-170 3 mg/kg を断頭15分前に投与した (10匹)。

第4群; 第3群の対照として、蒸留水 5 ml/kg を断頭30分前に、その後さらに第2群と同じ溶液 5 ml/kg を断頭15分前に投与した (8匹)。

断頭後直ちに、生理的食塩水を浸したスポンジの上に頭部をのせ、ラップフィルムで覆い、37°C の恒温槽

で9分間保温し、素早く脳を摘出し正確に断頭10分後に液体窒素につけ、凍結した。脂質の抽出法及び分離法、FFA 定量法、統計学的処理は、実験 I と同様である。

結 果

カルシウム刺激剤 YC-170 を投与した第1群では、第2群に対し、ステアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸、アラキドン酸、総 FFA とも有意な高値を示した (それぞれ $p < 0.05$) (Table 3)。

一方、YC-170 を投与する15分前に nicardipine を投与した第3群では、対照である第4群と比較して、各 FFA も総 FFA 量も、有意差はみられなかった。

さらに、それぞれの対照群の FFA 量に対する比を百分率で表わすと、nicardipine はアラキドン酸及び総 FFA 産生それぞれ約9.4%, 7.5%抑制した。これに

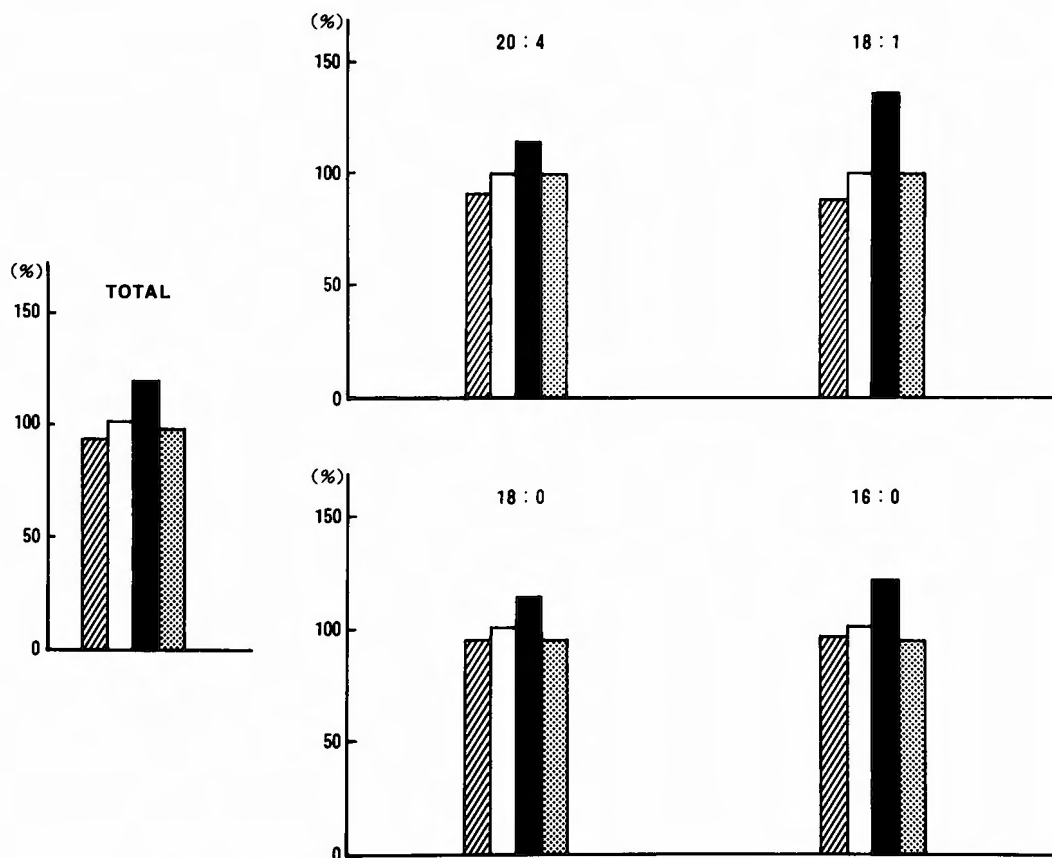


Fig. 3. Effects of nicardipine, YC-170 and combined nicardipine and YC-170 on the free fatty acid liberation in the ischemic brain at 10 minutes postdecapitation. White bar: control, shaded bar: nicardipine-treated group, dark bar: YC-170-treated group, dotted bar: combined nicardipine- and YC-170-treated group.

対し YC-170 はこれらをそれぞれ約14.7%, 17.9%増強したが、この増強作用は, nicardipine を前投与することで消失した (Fig. 3).

考 察

最近、薬理学的スクリーニングの過程でいくつかのカルシウム刺激剤が発見され^{26,33)}、カルシウムチャンネル機構やカルシウム拮抗剤の薬理学的研究の有用な手段として利用されている^{5,20,22)}。YC-170 も dihydropyridine 系カルシウム拮抗剤の誘導体の検索中に、たまたま発見されたカルシウム刺激剤である³³⁾。実験Ⅰにおいて虚血脳での FFA 増加へのカルシウムの関与がつよく示唆された。そこで、カルシウムの関与の一つの裏付けとして、カルシウム刺激剤 YC-170 を用いた実験Ⅱを行い、また、カルシウム拮抗剤 nicardipine を前投与し、これとの相互作用について検討した。

断頭による完全10分間虚血モデルを用いた今回の結果では、YC-170 は全ての FFA についてつよい脳内 FFA 増加増強作用を示した。従来カルシウム刺激剤を用いた実験は主に心血管系で行なわれており、脳神経領域におけるカルシウム刺激剤の研究はきわめて少なく、それも *in vitro* の研究がほとんどである^{5,20,22)}。今回の結果は、脳虚血時の脳細胞内カルシウム過負荷が細胞障害を増悪するという仮説を支持するデータを *in vivo* で示した。

in vitro では、カルシウムチャンネルに対し, nicardipine と YC-170 は競合的拮抗を示すとされている。今回の *in vivo* における nicardipine 前投与の結果(第3群と第4群)は、YC-170 の虚血脳における FFA 増加増強作用が nicardipine により消失することを示した。これは、dihydropyridine 系薬剤結合部位へ nicardipine が先に結合し、後から投与した同じく dihydropyridine 系薬剤である YC-170 の結合を阻害し、YC-170 による細胞内カルシウム過負荷を防いだ可能性を示すものと思われる。脳内の dihydropyridine 系薬剤結合部位とカルシウムチャンネルとの関係は必ずしも明確でなく、また平滑筋や心筋と異なり、脳細胞でのカルシウムチャンネルに対する dihydropyridine 系カルシウム拮抗剤の作用の有無についても必ずしも意見の一致はみられていない^{22,23)}。しかし、最近 Kendall らは、ラットの脳スライスを使った実験で、カリウムによる脱分極性イノシトールリン脂質の破壊増強反応が、dihydropyridine 系カルシウム拮

抗剤 (PN-200-110) で立体特異的に抑制され、逆に dihydropyridine 系カルシウム刺激剤 (BAY-K-8644) で促進されることより、脳でも機能的な電位依存性カルシウムチャンネルが存在し、dihydropyridine 系カルシウム拮抗剤及び刺激剤が dihydropyridine 系薬剤結合部位を介して電位依存性カルシウムチャンネルに影響を与えたことを示している²⁰⁾。今回の結果は、間接的ではあるが、脳でも *in vivo* でカルシウムチャンネルに対して dihydropyridine 系薬剤結合部位を介して dihydropyridine 系カルシウム拮抗剤と刺激剤が影響を与えることを示した。

実験Ⅲ. ラジオレセプターアッセイを用いた腹腔内投与後の脳内 nicardipine 濃度測定

材料および方法

雄性ウイスター系ラット、体重 220-240 g を用いた。生理的食塩水に溶解した nicardipine 1 mg/kg を腹腔内投与し、15分後に断頭、直ちに大脳半球を摘出して左右半球に分け、その1側半球を測定に供した(5匹)。同時に、軀幹より血液(混合血)を採取、4°C で3時間保存後30分間 900 × g で遠沈し、2 ml の血清を得た(3匹)。対照群として、生理的食塩水を 1 ml/kg 腹腔内投与し、同様の処理を行なった(4匹)。摘出脳は、4倍量のメタノール-0.1 N HCl (9:1, v/v) でテフロンホモジナイザーを用いホモジナイズ後、4°C、900 × g で15分間遠沈し、上清 2 ml をロータリーエバポレーターを用い、38°C 減圧下で乾固した。これを 40 μl メタノール、360 μl 0.1% アスコルビン酸で溶解し、4°C、900 × g で遠沈し、上清を反応に用いた。(methanol extract)

結合反応用膜標本は以下のように作成した。別群の雄性ウイスター系ラット(7-9週齢)を断頭し、大脳半球を摘出、0.85% NaCl 溶液中に氷冷し、9倍量の 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.7 液中でテフロンホモジナイザーを用いホモジナイズした。ついで、4°C 900 × g で10分間遠沈し、その上清をさらに 18,000 × g で20分間遠沈して得られた沈渣をトリス緩衝液(50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.7)で2度洗い、-80°C で保存し、用事解凍して、実験に使用した(この膜の $K_d=0.378$ nM, $B_{max}=144.6$ fmol/g)。

³H-nitrendipine (193.1 dpm/fmol, 1 μCi/μl) は、米国 New England Nuclear 社より購入したものを使用

した。検量線用 nicardipine は、10%メタノール0.1%アスコルビン酸 (the diluent) で溶解し、0.2 mM 液を、2, 6, 20, 60 nM 液になるよう順次希釈して使用した。

結合実験は、Gould らの方法に従った⁹⁾。Ca を含んだ緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1.25 mM CaCl₂, pH 7.7) 7 ml に結合反応用膜標本 (蛋白濃度 25.4 mg/ml) 2 ml を溶かし、うち 100 μ l と、Ca を含んだ緩衝液 4.5 ml に 3Ci/ μ l を溶かした ³H-nitrendipine 50 μ l を、Ca を含んだ緩衝液 800 μ l 中で 50 μ l の以下の試料と 25°C の暗所で60分間インキュベートした。試料とは、

- a) the diluent,
- b) 検量線用 nicardipine,
- c) 測定すべき脳抽出液 (methanol extract),
- d) 5 倍希釈した血清

のいずれかである。この後、上記反応液をワットマン GF/B フィルターで吸引濾過し、フィルターを 4 ml の氷冷したトリス緩衝液で 4 回吸引しながら洗浄した。このフィルターの 10 ml Bray シンチレーター中での放射能を液体シンチレーションカウンター (PACARD TRICARB 4640) で測定した。試料 a) のカウントより全結合量を出した。0.2 mM nicardipine 存在下のカウントから非特異的結合量を求め、特異的結合量

は各試料の結合量から非特異的結合量を差し引いて求めた。また、試料 b) のカウントから standard curve を作成した。

測定は 1 匹のラットについて少なくとも 2 試料を用い、2 回測定した。logit-log 直線回帰の方法により値を求めた⁹⁾。

結 果

今回のラット脳の膜標本を用いた standard curve は Figure 4 のごとくで、logit-log 直線回帰の方法で求めた近似式は $F(X) = 6082 - 5150 / (1 + 0.2436/X)$ となった。この standard curve を用い、nicardipine の脳内及び血清濃度を測定した (Table 4)。nicardipine 1 mg/kg 腹腔内投与15分後の脳内 nicardipine 濃度は、 15.85 ± 1.51 ng/g、このとき血清中 nicardipine は、 34.14 ± 4.63 ng/ml(g)、血清濃度に対する脳内濃度の比は $43.12 \pm 3.77\%$ であった。これに對し対照としての生理的食塩水投与群では脳内 nicardipine 濃度は 0.35 ± 0.13 ng/g、血清中は 0 ng/ml(g) であった。

考 察

腹腔内に投与した nicardipine の脳内移行を確かめるためこの実験を行なった。

近年カルシウムチャンネルを標識する目的で ³H-

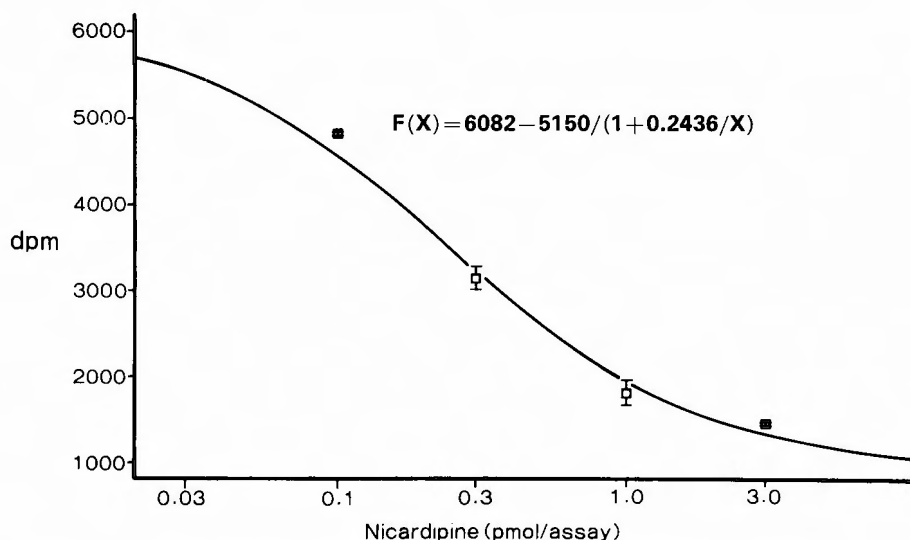


Fig. 4. Standard curve showing relative binding of ³H-nitrendipine correlated with the concentration of unlabeled nicardipine. Dilutions of stock nicardipine were prepared in diluent to give concentrations of 2, 6, 20 and 60 nM in the final incubation. Data given are the means of triplicate assays performed in a single experiment. Each experiment was duplicated.

Table 4. Nicardipine concentration in the brain and serum of rats measured by radioreceptor assay

Material given	Nicardipine concentration ^a		
	Brain (ng/g)	Serum (ng/ml)	Brain/Serum (%)
Nicardipine	15.86 ± 1.51 (5)	34.14 ± 4.63 (3)	43.12 ± 3.77 (3)
Normal saline	0.35 ± 0.13 (4)	0 (4)	—

^a: mean ± S.E.M.. Either nicardipine 1 mg/kg or normal saline 1 ml/kg was given intraperitoneally 15 minutes prior to decapitation. Concentrations of nicardipine were determined from the standard curve in Figure 4. For each sample assays of a single experiment were performed in duplicate, and each experiment was performed twice. Numbers in parentheses indicate number of rats.

nitrendipine, ³H-nimodipine などが用いられ、カルシウムチャンネルには nicardipine, nimodipine, nifedipine などの dihydropyridine 系薬剤の結合部位があるとされている。一方, radioreceptor assay は、簡便で感受性の高い測定法であり、³H-nitrendipine, ³H-nimodipine などのリガンドを利用して、カルシウム拮抗剤の血中濃度測定に用いられている¹⁰⁾。例えば nimodipine では、10-100 nM (4-40 ng/ml) が測定でき、parent drug と active metabolites だけを測定している。今回この方法を脳内濃度測定に応用した。

nicardipine の ³H-nitrendipine に対する K_i 値は、約 0.9 nM といわれている^{34,35)}。また、砂ネズミの脳の膜標本において、nimodipine の結合部位の最大数 (B_{max}) は、12 nmol/kg = 12 pmol/g と報告されている¹⁵⁾。従って、今回得られた脳内 nicardipine 濃度約 31.8 pmol/g、すなわち 15.9 ng/g は結合部位の最大数の約 3 倍であり、K_i 値と比較し薬理効果を期待するのに十分な量である。ただ、脳内血液からの持ち込みにより脳内濃度値が見かけ上高くなっている可能性があるが、その影響を差し引いても十分であると考えられる。また、平行して行なった成猫を用いた脱血後の脳内濃度測定においても、ほぼ同様の結果 (10-18 ng/g) が得られており、血液からの持ち込みは大きな意義を持たないと考える。

ラットにおける nicardipine 投与後の血清濃度については、ガスクロマトグラフィーなどによる化学定量法で 0.1 mg/kg 静脈内投与10分後、約 50 ng/ml という報告がある¹⁷⁾。今回の血清濃度 34.14 ± 4.63 ng/ml(g) は 1 mg/kg 腹腔内投与の成績であり、単純には比較できないが、妥当な結果であった。

血清濃度に対する脳内濃度の比は、約43%であった。

脳内濃度が血清濃度に対し低く、これは血清から脳への移行自体がこの程度であったとも考えられるが、反面 nicardipine は脂溶性が高いことを考え合わせると、脳内濃度がみかけ上低値を示している可能性がある。その一つの理由として、測定に供した methanol extract に至るまでの抽出過程での損失があり得る。なぜなら、nicardipine は蛋白質と結合しやすく、これが抽出過程で沈殿層に入っている可能性がある。

dihydropyridine 系薬剤結合部位 そのものに対する nicardipine の影響については現在さらに実験中であるが、この結合部位への ³H-nitrendipine 結合の親和性に抑制的に作用するようである。今回使用した膜については、ニューロンの、主にシナプトゾームとされているが、今後、各種病態時、例えば虚血時の膜に対してカルシウム拮抗剤がどのように作用するのか、また、Creba らの報告にあるように⁵⁾、薬剤が十分量存在することを証明するだけでなく、あわせて機能的効果を詳しくみる実験が必要であると思われる。

総 括

神経放射線診断、麻酔及び術前術後の患者管理の進歩、手術用顕微鏡下に行うマイクロサージェリーの器具の改良と手技などの向上により、近年破裂脳動脈瘤の治療成績は飛躍的に向上した。今日、十分な設備と熟練した手技によれば、超重症例を除き、破裂後24-48時間以内の急性期においても90%以上の例で動脈瘤柄の閉塞を安全に行なうことができる。

一方、手術の有無に拘らず、脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血例でしばしば見られる脳動脈攣縮は今日なおその発生原因が明らかでなく、したがって確実な治療法を欠き、破裂脳動脈瘤患者の生死及び機能予後を

決定する最大の因子となっている。

最近, volume expansion, induced hypertension とともに各種のカルシウム拮抗剤が脳動脈攣縮の治療に用いられている^{1,2)}。in vivo で多くのカルシウム拮抗剤は実験的脳動脈攣縮を抑制する^{13,21)}。臨床的にも, 2, 3 のカルシウム拮抗剤についてその有用性が報告されており, 我々も nicardipine の有用性を認めた¹²⁾。最近これらカルシウム拮抗剤の効果は脳動脈攣縮の発生防止ないし解除よりは, むしろ虚血時のなんらかの脳保護作用にあるのではないかと考えられるに至り²⁴⁾, カルシウム拮抗剤の脳血管, 脳血流への作用だけでなく, 神経機能や代謝面での作用を示す報告も散見される^{11,16,19,32)}。そこで, 本研究では nicardipine の虚血脳での細胞障害に対する有効性を脳内 FFA 測定により検討した。

脳虚血時の FFA 増加のメカニズムについては, その起源が何であり, どのような酵素が関与しているのかなど, 未だ不明な点が多く結論を得るには至っていない。これまでの報告から, 一般にその起源は膜リン脂質とされ, その中でもポリホスホиноシチドの可能性が提唱されている。また, 活性化される酵素としては, これまでホスホリパーゼ A₂ とされていたが, ホスホリパーゼ C, リパーゼとする説もあり³⁷⁾, この点は, これらの酵素のカルシウムイオン依存性との関係で興味深い。即ち, 従来ホスホリパーゼはカルシウムイオン依存性であるとされていたが, Edgar らの報告では, 脳でのホスホリパーゼ A₁, A₂ はカルシウム非依存性であるという⁷⁾。一方, Hirashima らは脳ミクロゾーム分画を用いた実験でホスホリパーゼ C, リパーゼなどは, カルシウムイオンの影響を受けやすいと述べている¹⁸⁾。今回の結果は, 間接的ではあるがカルシウム拮抗剤がリン脂質関連酵素に影響を与えた可能性を示しており, 今後, FFA 増加のメカニズム解明にあたっては虚血脳でのこれらの酵素の動態の詳細な検索が必要である。

虚血脳での神経細胞障害については, 細胞内カルシウム過負荷が重要な引き金となるという Siesjö らの説が有力である³⁰⁾。すなわち虚血に陥ると細胞内カルシウムホメオスタシスの消失と高リン酸化合物の枯渇が生じ, これに伴い電位依存性およびレセプター依存性カルシウムチャンネルを介したカルシウム流入による細胞内カルシウム過負荷, これによるホスホリパーゼ A₂ 活性化による膜の脂肪分解 (lipolysis), さらに非特異的な膜透過性亢進から神経細胞壊死に至ると

する仮説である。今回の実験結果から, カルシウム拮抗剤は虚血脳でのカルシウム負荷を軽減し, 逆にカルシウム刺激剤はこれを増悪する傾向があり, 虚血脳でのカルシウムの関与は dihydropyridine 系薬剤結合部位及びカルシウムチャンネルを介している可能性が示唆された。ただ, はたして虚血時にカルシウムチャンネルがどのような状態にあり, カルシウム拮抗剤が電位依存性およびレセプター依存性カルシウムチャンネルのどちらにどの程度作用するのか, また, 細胞内カルシウム流入に対してのみ効果があるのか, あるいは細胞内小器官からのカルシウム遊離にも影響を及しているのかは今後に残された問題である。いずれにしても, 本実験は使用したカルシウム拮抗剤 nicardipine が臨床で使用される範囲内の投与で脳内に移行し, 完全虚血脳における FFA 増加を抑制することを明らかにし, 虚血脳の細胞障害に対し脳保護作用を有する可能性を示した。

なお, 本実験では薬剤の全身血圧, 脳血流量などに対する影響をできるだけ除外するため, 断頭による完全虚血モデルを使用した。今後, 臨床例により近い不完全虚血, 虚血後灌流再開などの動物モデルでの検討が必要である。さらに, 本実験では脳採取にあたって標本採取法をできるだけ一定にし, 薬物効果を比較することを中心に調べる目的で全脳を用い FFA を測定した。これに関連して, 近年カルシウムチャンネル数の脳内分布に部位差があることが報告されているが²⁵⁾, これと脳の代謝, 機能との関係は明らかではない。また, Bhakoo らは砂ネズミを用い, 前頭葉, 頭頂葉, 後頭葉間で虚血時脳内 FFA 増加に有意差は認めなかったとしているが⁴⁾, カルシウムチャンネルの分布と虚血に対する脳の "selective vulnerability" との関係は興味ある問題であると思われる。

要 旨

1. ラットの断頭による完全虚血モデルを用い, 脳内 FFA を経時的に測定し, カルシウム拮抗剤 nicardipine の脳保護効果を先に脳保護剤として知られている PB と比較して検討した。対照群では, 断頭後脳内 FFA は虚血早期よりプラトーに達することなく, 急激に増加し続けた。本実験での投与量 (1 mg/kg) で nicardipine は PB (60 mg/kg) よりは弱いものの, このような虚血脳内 FFA 増加に対し抑制作用を示し, これは虚血早期に, また, 不飽和脂肪酸に対し強い傾向があった。すなわち全脳 FFA 測定という global

な測定法ではあるが、虚血脳での細胞障害へのカルシウムイオンの関与が示唆された。

2. ついで同じくラット断頭虚血モデルを用い、虚血10分での脳内 FFA を測定し、最近合成されたカルシウム刺激剤 YC-170 の作用及びこれとカルシウム拮抗剤 nicardipine との相互作用を検討した。YC-170 は虚血時の各 FFA 及び総 FFA 量を有意に増加させ、この効果は nicardipine 前投与により消失した。すなわち虚血脳の細胞障害へのカルシウム関与は、dihydropyridine 系薬剤結合部位及びカルシウムチャンネルを介している可能性が示された。

3. 神経細胞に対するカルシウム拮抗剤の作用が一部で証明されており脳内濃度については、nimodipine について Heffez らの報告があるが、nicardipine の脳内移行は確認されていない。そこで簡便かつ感度の高い radioreceptor assay を用いて、nicardipine 1 mg/kg 腹腔内投与15分後の脳における nicardipine を測定し、薬理活性を得るに十分な量の nicardipine (ca. 16 ng/g) が脳細胞に存在することを確認した。同時に血清中には化学定量法での測定結果に相当する量 (ca. 34 ng/g) が存在していた。

4. 以上より、nicardipine は臨床的に用いられる量の投与で薬理作用を示すに十分な量脳細胞に移行し、虚血に陥った脳に対して保護作用を示し、これは dihydropyridine 系薬剤結合部位及びカルシウムチャンネルを介して細胞内カルシウム過負荷を防ぐことによると考えられる。

脚 注

Nicardipine : 2, 6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1, 4-dihydropyridine-3, 5-dicarboxylic acid 3-[2-(n-benzyl-N-methylamino)] ethyl ester 5-methyl ester hydrochloride.

YC-170 : 2-(2-pyridil) ethyl 4-(2-chlorophenyl)-2, 6-dimethyl-5-phenylcarbamoyl-1, 4-dihydropyridine-3-carboxylate.

本研究は一部文部省科学研究費補助金による。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜りました半田譲二教授に深甚なる感謝を捧げます。

また、YC-170 を提供された山之内製薬株式会社、実験に助言と指導をいただいた滋賀医科大学医学部生化学第一講座野崎光洋教授、群馬大学医学部生化学講座坂公平博士、並びに山之内製薬中央研究所寺井道夫氏、清水 稔氏に深謝します。

References

- 1) Allen GS, Ahn HA, Preziosi TJ, et al : Cerebral arterial spasm—a controlled trial of nimodipine in patients with subarachnoid hemorrhage. *N. Engl J Med* **308**: 619–624, 1983.
- 2) Auer LM : Calcium antagonists for the treatment of cerebral ischemia? In *Cerebral blood flow and metabolism measurement*, edited by Harmann A, Hoyer S., Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag, 1985, pp. 187–197.
- 3) Bazan NG Jr, de Bazan HEP, Kennedy WG, et al : Regional distribution and rate of production of free fatty acids in rat brain. *J Neurochem* **18** : 1387–1393, 1971.
- 4) Bhakoo KK, Crockard HA, Lascelles PT, et al : Regional studies of changes in brain fatty acids following experimental ischemia and reperfusion in the gerbil. *J Neurochem* **43** : 1025–1031, 1984.
- 5) Creba JA, Karobath M : The effect of dihydropyridine calcium agonists and antagonists on neuronal voltage sensitive calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* **134** : 1038–1047, 1986.
- 6) De Lean A, Munson PJ, Rodbard D : Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol* **235** : E97–E102, 1978.
- 7) Edgar AD, Strosznajder J, Horrocks LA : Activation of ethanolamine phospholipase A₂ in brain during ischemia. *J Neurochem* **39** : 1111–1116, 1982.
- 8) Folch J, Lees M, Stanley GHS, et al : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226** : 497–509, 1957.
- 9) Gould RJ, Murphy KMM, Snyder SH, et al : [³H] Nitrendipine-labeled calcium channels discriminate inorganic calcium agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* **79** : 3656–3660, 1982.
- 10) Gould RJ, Murphy KMM, Snyder SH, et al : A simple sensitive radioreceptor assay for calcium antagonist drugs. *Life Sci* **33** : 2665–2672, 1983.
- 11) Grotta J, Spydel J, Pettigrew C, et al : The effect of nicardipine on neuronal function following ischemia. *Stroke* **17** : 213–219, 1986.
- 12) Handa J, Matsuda M, Nakasu Y, et al : Early operation of aneurysmal subarachnoid hemorrhage—use of nicardipine, a calcium channel blocker. *Arch Jpn Chir* **53** : 619–630, 1984.
- 13) Handa J, Yoneda S, Koyama T, et al : Experimental cerebral vasospasm in cats : Modification by a new synthetic vasodilator YC-93. *Surg Neurol* **3** : 195–199, 1975.
- 14) Hattori T, Nishimura Y, Sakai N, et al : Effects of pentobarbital on brain lipid metabolism during global ischemia. *Brain Nerve (Tokyo)* **38** : 585–591, 1986.

- 15) Heffez DS, Nowak TS, Passonneau JV, et al: Nimodipine levels in gerbil brain following parenteral drug administration. *J Neurosurg* **63**: 589-592, 1985.
- 16) Heffez DS, Passonneau JV: Effect of nimodipine on cerebral metabolism during ischemia and recirculation in the mongolian gerbil. *J Cereb Blood Flow Metabol* **5**: 523-528, 1985.
- 17) Higuchi S, Sasaki H, Shiobara Y, et al: Absorption, excretion and metabolism of a new dihydropyridine diester cerebral vasodilator in rats and dogs. *Xenobiotica* **7**: 469-479, 1977.
- 18) Hirashima Y, Moto A, Endo S, et al: The activities of phospholipase A, PI-specific phospholipase C, lipase, lysophospholipase and acyl CoA: Lysophospholipid acyltransferase in ischemic brain microsomal fraction. *Brain Nerve (Tokyo)* **37**: 385-391, 1985.
- 19) Hossman K-A, Paschen W, Csiba L, et al: Relationship between calcium accumulation and recovery of rat brain after prolonged cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metabol* **3**: 346-353, 1983.
- 20) Kendall DA, Nahorski SR: Dihydropyridine calcium channel activators and antagonists influence depolarization-evoked inositol phospholipid hydrolysis in brain. *Eur J Pharmacol* **115**: 31-36, 1985.
- 21) Kobari M, Gotoh F, Tomita M: Calcium antagonists and cerebral circulation. *Jpn J Stroke* **6**: 371-387, 1984.
- 22) Middlemiss DN, Spedding M: A functional correlate for the dihydropyridine binding site in rat brain. *Nature* **314**: 94-96, 1985.
- 23) Miller RJ, Freedman SB: Are dihydropyridine binding sites voltage sensitive calcium channels? *Life Sci* **34**: 1205-1221, 1984.
- 24) Miyaoka M, Ishii S, Sano K: Effect of calcium antagonist, Nicardipine (Perdipine), for early surgery of cerebral aneurysm. Open trial in patients with subarachnoid hemorrhage among 18 neurosurgical institutes. Presented at the 42nd Annual Meeting of Japan Neurosurgical Society, Osaka, October 26-28, 1983.
- 25) Quirion R: Autoradiographic localization of a calcium channel antagonist, [³H] nitrendipine, binding site in rat brain. *Neurosci Lett* **36**: 267-271, 1983.
- 26) Schramm M, Thomas G, Towart R, et al: Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca²⁺ channels. *Nature* **303**: 535-537, 1983.
- 27) Shiu GK, Nemoto EM: Barbiturate attenuation of brain free fatty acid liberation during global ischemia. *J Neurochem* **37**: 1448-1456, 1981.
- 28) Shiu GK, Nemoto EM, Nemmer JP: Dose of thiopental, pentobarbital, and phenytoin for maximal therapeutic effects in cerebral ischemic anoxia. *Crit Care Med* **11**: 452-459, 1983.
- 29) Shiu GK, Nemoto EM, Nemmer JP, et al: Comparative evaluation of barbiturate and Ca⁺⁺ antagonist attenuation of brain free fatty acid liberation during global ischemia. In *Brain protection*, edited by Wiedemann K, Hoyer S, Berlin, Springer, 1983, pp. 45-54.
- 30) Siesjö BK: Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg* **60**: 883-908, 1984.
- 31) Snyder F, Blank ML: Relationships of chain lengths and double bond locations in o-alkyl, o-alk-l-enyl, acyl and fatty alcohol moieties in preputial glands of mice. *Arch Biochem Biophys* **130**: 101-110, 1969.
- 32) Steen PA, Newberg LA, Milde JH, et al: Nimodipine improves cerebral blood flow and neurologic recovery after complete cerebral ischemia in the dog. *J Cereb Blood Flow Metabol* **3**: 38-43, 1983.
- 33) Takenaka T, Maeno H: A new vasoconstrictor 1, 4-dihydropyridine derivative, YC-170. *Jpn J Pharmacol* **32** (suppl): 139 (abstract), 1982.
- 34) Tamazawa K, Arima H, Kojima T, et al: Stereoselectivity of a potent calcium antagonist, 1-benzyl-3-pyrrolidinyl methyl 2, 6-dimethyl-4-(m-nitrophenyl)-1, 4-dihydropyridine-3, 5-dicarboxylate. *J Med Chem*, in press.
- 35) Thayer SA, Welcome M, Chhabra A, et al: Effects of dihydropyridine calcium channel blocking drugs on rat brain muscarinic and α -adrenergic receptors. *Biochem Pharmacol* **34**: 175-180, 1985.
- 36) Yoshida S, Inoh S, Asano T, et al: Brain free fatty acids, edema and mortality in gerbils subjected to transient, bilateral ischemia, and effect of barbiturate anesthesia. *J Neurochem* **40**: 1278-1286, 1983.
- 37) Yoshida S, Ikeda M, Busto R, et al: Cerebral phosphoinositide, triacylglycerol, and energy metabolism in reversible ischemia: origin, and fate of free fatty acids. *J Neurochem* **47**: 744-757, 1986.