

局所脳虚血に対する薬物の脳保護作用に関する実験的研究

Part 2: ラット局所脳虚血に対するカルシウム拮抗剤の治療効果

滋賀医科大学脳神経外科

椎 野 顯 彦

〔原稿受付：平成元年6月5日〕

Experimental Studies on Pharmacologic Protection of the Brain against Focal Ischemia. 2. Effects of KB-2796 and Nicardipine on Focal Brain Ischemia in Rats.

AKIHIKO SHIINO

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

Abstract

It has been proposed that calcium overload triggers neuronal cell damage in the acute stage of cerebral ischemia. In this study, the effects of calcium antagonists, KB-2796 and nicardipine, on neurologic deficits and size of the infarction were studied in the rat middle cerebral artery (MCA) occlusion model. Neurologic deficits were evaluated from 1 to 24 hours after occlusion of the MCA, using a grading system of Bederson et al. At 24 hours post-occlusion, the brain was removed, sliced coronally, and stained with triphenyltetrazolium chloride. Size of the infarction was measured by computerized image analysis system.

KB-2796 (10 mg/kg) or nicardipine (1 mg/kg) was intraperitoneally administered immediately after occlusion of the MCA. In the KB-2796-treated group, the neurologic deficits were much improved and the size of infarction was significantly smaller, but in the nicardipine-treated group improvement was modest and did not reach the level of statistical significance. The neurologic improvement was observed in the group where KB-2796 was given at 3 hours post-occlusion but the size of infarction was unchanged.

The results in the present study seem to indicate that the calcium antagonists could improve

Key words: calcium antagonist, focal brain ischemia, brain protection, nicardipine, KB-2796.

索引用語：カルシウム拮抗剤，局所脳虚血，脳保護，ニカルジピン，KB-2796

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

focal cerebral ischemia when administered in early stage of ischemia, and that such effect is more significant with KB-2796 probably because of its higher selectivity to the cerebral vessels.

は じ め に

虚血性脳血管障害は臨床上きわめて重要な疾患の1つであり、これまで数多くの基礎的・臨床的研究がなされてきたが、今日なおその治療法は未解決な問題として残されている。近年、虚血性の脳組織障害に細胞内カルシウムの蓄積が重要な役割を担っているとの考えから^{2,3,4,5,11,17,18,21,22,24)}、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持たれ、種々検討されているが、その有効性に関してもまだ統一された見解は得られるにいたっていない。

我々も、すでに、ラット断頭虚血モデルにおける脳の遊離脂肪酸、特にアラキドン酸の生成がカルシウム拮抗剤の前投与によりつよく抑制され、反対にカルシウム刺激剤の前投与により促進されることを確かめた^{14,15,16,19)}。またネコの中大脳動脈閉塞モデルを用いた実験で、カルシウム拮抗剤の虚血作成前投与が虚血時の体性感覚誘発電位 (somatosensory evoked potential) や局所脳血流量 (regional cerebral blood flow) を改善することをみとめた⁹⁾。これらの結果は、カルシウム拮抗剤の予防的投与が虚血性脳障害の発生の防止、いわゆる“brain protection against ischemia”に有効であることを示唆するものであった。

しかしながら虚血発症前の薬剤の投与は、クモ膜下出血に伴う脳血管攣縮や脳動脈瘤手術、その他特殊な症例において開頭術中一時的血流遮断を行なうなど、限られた場合のみ可能であり、その適応はごく狭い範囲に限られるという大きな欠点がある。そこで今回は臨床の場で直面することがより多い、脳虚血発生後の投与によるカルシウム拮抗剤の有効性につき、dihydropyridine 系カルシウム拮抗剤として nicardipine を、diphenylalkylamine 系カルシウム拮抗剤として KB-2796 を選び、検討した。

方 法

中大脳動脈の閉塞、神経症状の評価と梗塞巣の観察
雄性 Sprague-Dawley (SD) rat, 体重 330~440 g を使用した。麻酔はハロセンによる吸入麻酔 (導入 4%, 維持 1.5%, 100% O₂) とし、中大脳動脈閉塞は、既に報告した branch model とした²⁰⁾。即ち、手術用顕微

鏡下に、経眼窩的に infratemporal fossa に到達後、中大脳動脈が嗅索と交叉する部位を露出し、これを嗅索の外側縁で閉塞、さらにその分枝である嗅索枝の閉塞を加えた。麻痺の程度を Bederson らの方法¹⁾に従い Grade 0~3 に分類 (grade 0; no observable deficit, grade 2; decreased resistance to lateral push, grade 3; circling), 中大脳動脈を閉塞後、1, 2, 3, 6, 12, 24時間目に神経症状を観察、記録した。

24時間後、断頭し、脳を速やかに摘出し、bregma の前後で連続した厚さ 2 mm の冠状断切片を作製した。この切片を 2% triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) 溶液に浸け、37°C で40分間保温した。染色した脳切片を写真に撮り、各冠状断面ごとに computerized analysis system (NEXUS 68410, Kashiwagi Research) を用いて梗塞巣の半球あたりの面積 (%) を計測した。なお、神経症状は 2 名でくり返し観察した。

薬剤の投与

KB-2796 (1-[bis (4-fluorophenyl) methyl]-4-(2,3,4-trimethoxybenzyl) piperazine dihydrochloride) は 5% アラビアゴム溶液に溶解して 2 mg/ml の濃度に調整し、10 mg/kg を腹腔内に投与した。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) も同様に 5% アラビアゴムに溶解して 0.2 mg/ml とし、1 mg/kg を腹腔内に投与した。KB-2796 投与群は、投薬の時期により中大脳動脈閉塞直後の投与 (group 1), 閉塞から 1 時間後の投与 (group 2), 3 時間後の投与 (group 3) の 3 群に分類した。Nicardipine は閉塞直後にのみ投与した。Control 群 (中大脳動脈を閉塞し、溶媒のみを投与した群)、または Sham 群 (麻酔、開頭術のみで中大脳動脈を閉塞していない群) には同量の溶媒のみを手術直後に投与した。

脳局所血流量の測定

中大脳動脈を閉塞してから 1 時間後の脳局所血流量 (LCBF) をオートラジオグラフィー法により測定した。治療群として KB-2796, 1 mg/kg を中大脳動脈閉塞直後に投与した。また、溶媒のみを投与して control 群 (n=5) とした。前群と同様にラットの中大脳動脈を閉塞後、完全に覚醒させた状態で、右股静脈から

^{14}C -iodoantipyrine $50\ \mu\text{Ci}$ (1 ml) を1分間で注入した。また同時に右股動脈から3秒間隔で動脈血を採血し、経時的に動脈血 RI 濃度を計測した。注入終了と同時に断頭し、脳を摘出して液体窒素・フロン中で凍結した。凍結脳より $20\ \mu\text{m}$ の切片を作製し、 ^{14}C スタンダードと共に X 線フィルムに感光させた。デンストメーターで脳の各部位の濃度を測定し、スタンダードカーブから脳の局所血流量を計測した (MCID, Imaging Research Inc.)。

統計処理は Mann-Whitney U test あるいは Student t-test を施行した。

結 果

神経症状の推移: control 群は中大脳動脈閉塞直後より強度の麻痺が出現し (mean=3.0), その後3時間は回復することなく持続した。閉塞6時間目からやや回復傾向を示し, 12~24時間後には中等度の麻痺 (mean=2.0) となった。

薬物を中大脳動脈閉塞直後に投与した群のうち, KB-2796 投与群は閉塞1時間で既に control 群に比べ有意な麻痺の改善が認められ (mean=1.7), 6時間以降は麻痺はほぼ完全に回復した。Nicardipine 投与では, control 群に比べ麻痺の回復は良かったが統計学的な有意差は得られなかった (図1)。

KB-2796 投与群のうち, 1時間後投与群において

は, 投与後の麻痺の回復が control 群に比べ早く, 24時間後にはほぼ完全に回復した。3時間後投与群も同様に, 投与後の麻痺の回復が早く24時間後には軽度の麻痺を残すのみとなった (図3)。Sham 群は麻痺を含め経過中明らかな神経脱落症状を認めなかった。

梗塞面積: 梗塞面積は各群とも bregma で最大で, 一般に bregma の前方2mm ではばらつきが大であった。梗塞面積を bregma の断面で比較すると, control 群 (mean=21.7±8.5%) に比べ KB-2796 直後投与群 (mean=4.8±2.8%), KB-2796 1時間後投与群 (mean=5.4±6.7%) において有意な梗塞面積の縮小が認められた。KB-2796 3時間後投与群 (mean=18.5±5.8%) においては, 梗塞面積の縮小は有意でなかった (図2, 4)。Nicardipine の直後投与群 (mean=14.6±16.1%) は control 群に比べ梗塞面積は縮小傾向を示したが, 統計学的に有意な差ではなかった (図2)。Sham 群においては, 梗塞巣は全く認められなかった。

局所脳血流量: 中大脳動脈の閉塞から1時間後の局所脳血流量は, 閉塞側の大脳皮質部に広範な血流低下が認められた。コントロール群において, 対側皮質に比べ統計学的に有意な血流低下が認められた領域は, frontal cortex, sensorimotor cortex, parietal cortex, auditory cortex, visual cortex と広範囲であった (図5; transient zone)。KB-2796 を中大脳動脈の閉塞直

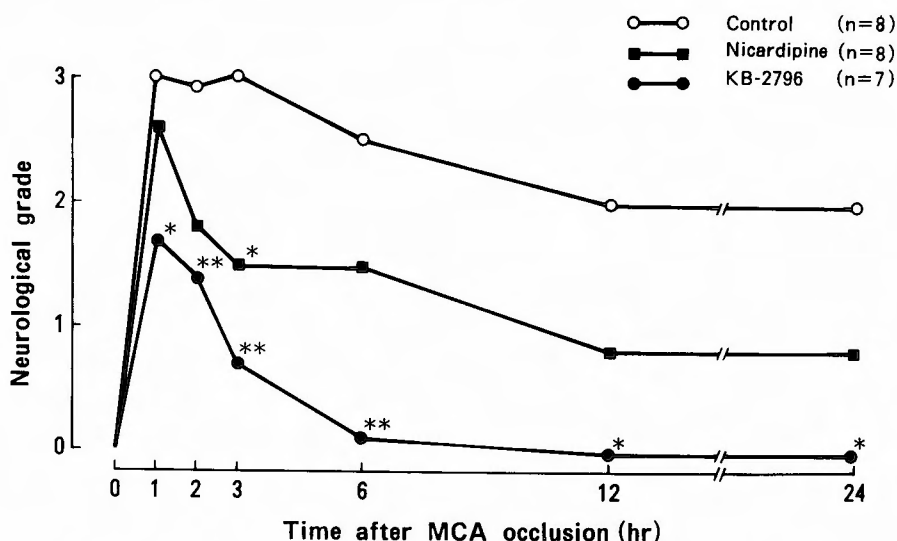


Fig. 1. Time course of neurologic grades after occlusion of the MCA. Each drug was given immediately after occlusion. *: $p < 0.05$, and **: $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test) compared to the control group.

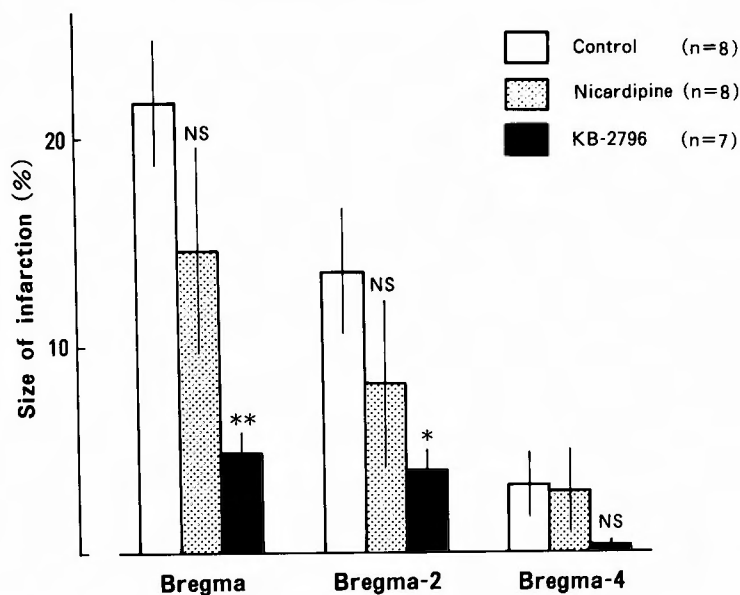


Fig. 2. Effects of nicardipine and KB-2796 on the size of infarction. Both groups were treated immediately after the occlusion of the MCA. Abscissa shows position of the coronal slices of the brain. *Bregma*: Slice at the bregma, *Bregma-2*: Slice at 2 mm posterior to the bregma, *Bregma-4*: Slice at 4 mm posterior to the bregma. *: $p < 0.05$, and **: $p < 0.01$ (Student t-test), compared to the control group. Each value is presented as a mean $\pm$ S.D..

後に投与することにより、このうち auditory cortex を除く全領域において血流増加が認められ、これはコントロール群に比し統計学的に有意であった (図5)。

考 察

KB-2796 は化学構造上 flunarizine と同じ diphenyl alkylamine を共有するカルシウム拮抗剤である。この

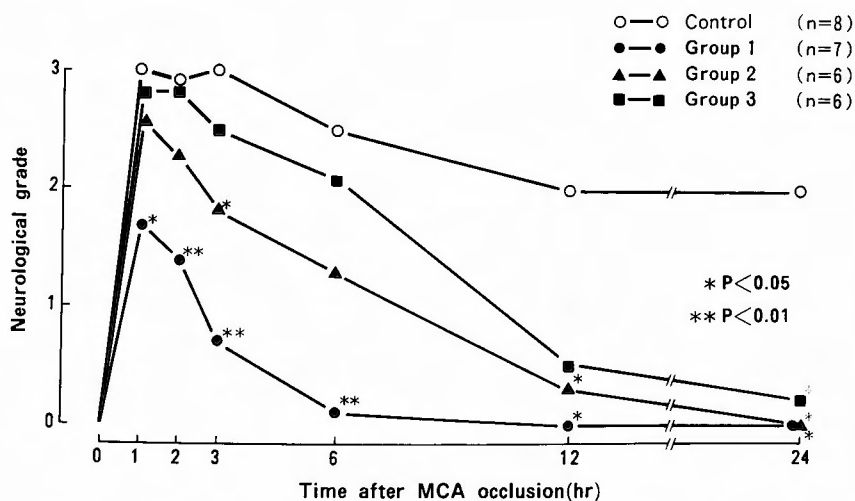


Fig. 3. Time course of neurologic scores in the KB-2796-treated groups. Drug was given immediately, 1 hour, or 3 hours, after occlusion of the MCA, in the group 1, 2, or 3, respectively.

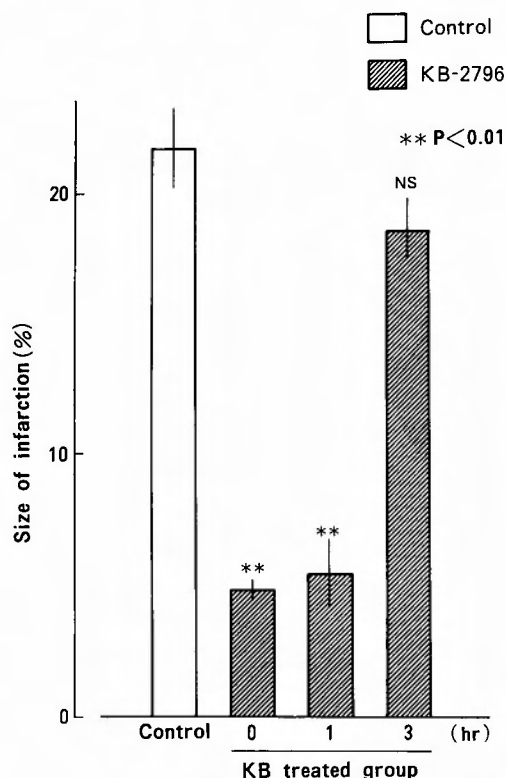


Fig. 4. Size of infarction in the control and KB-2796-treated groups. Each value is presented as mean $\pm$ S.E.M. in the slice at the bregma. Drug was given immediately after (0), 1 hour after (1), or 3 hours after (3), occlusion of the MCA.

薬の薬理学的作用の特長は、nicardipine に比べ脳血管に対する選択性が高く、作用の持続時間も長いことであるとされ、また flunarizine よりも強い脳循環改善作用を持つと言われている^{10,12,13}。一方、nicardipine は nifedipine や nimodipine と同じ dihydropyridine 系のカルシウム拮抗剤で、現在脳循環改善薬として広く臨床に使われている。我々もすでに、これら2系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検討してきたが、今回は臨床と比較的遭遇する機会の多い局所脳虚血後の投与におけるこれらの薬剤の効果を、ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて検討した。

虚血作成前の投与でなく、虚血作成後に薬剤を投与した今回の実験では、KB-2796 が中大脳動脈閉塞直後、さらには閉塞から1時間後に投与した群において、

統計学的に有意な神経症状の改善、ならびに梗塞面積の縮小効果を示した。この実験結果は、局所脳虚血に際して、すくなくともある種のカルシウム拮抗剤が、虚血後の投与においてもなお有用であることを示すものである⁶⁾。

脳梗塞に対するカルシウム拮抗剤の効果として、まず脳血管拡張作用に基づく脳虚血部の循環改善が考えられる。脳虚血急性期における脳血管拡張剤の投与では、虚血部周辺の血管拡張による steal phenomenon の発生の有無が問題にされているが、今回のオートラジオグラフィーによる局所脳血流量の結果では、中大脳動脈閉塞直後に KB-2796 を投与することにより、少なくとも閉塞から1時間後において、虚血部の明らかな循環改善効果が認められ、steal phenomenon による逆説的な血流低下はみられなかった (図5)。

脳血流改善作用の他、脳梗塞に対するカルシウム拮抗剤の効果として、カルシウム拮抗剤自体のもつ、虚血脳に対する脳保護作用が最近特に注目されている。虚血のごく初期においては、細胞内の ATP の減少とともに、アラキドン酸代謝産物や過酸化脂質が生成され脳の組織障害がさらに進行するとされるが、こうした一連の悪循環は、細胞内へのカルシウムの蓄積が引き金となると考えられている²¹⁾。虚血により細胞膜が脱分極を起こすと、細胞外カルシウムが細胞内へ流入し細胞内のカルシウム濃度が増加する。細胞内カルシウム濃度の増加は、phospholipase を活性化して膜の脂肪分解を惹起し、遊離脂肪酸、特にアラキドン酸の生成を促し、種々の eicosanoids が産生され脳組織障害が進行する。もしこの説が正しいのであれば、虚血前あるいはそのごく初期にカルシウム拮抗剤を投与することにより、こうした悪循環に基づく細胞障害を防ぐことが理論的に可能である⁷⁾。虚血前投与により、nicardipine や KB-2796 がラット断頭後の遊離脂肪酸生成を抑制することや^{14,15,16)}、神経細胞の低酸素負荷に対する保護作用⁸⁾、また局所脳グルコース利用率を改善する事実²³⁾などは、これらの薬物の脳保護作用を支持するものと考えられる。今回の実験の範囲内で KB-2796 の作用機序を結論することは不可能であるが、先の実験結果^{8,9,10,11,12,13,14)}とあわせて考察すると、KB-2796 による麻痺の改善及び梗塞巣の縮小効果は、脳循環改善作用及び脳保護作用の双方によるものと推測される。なお、本実験で KB-2796 を虚血3時間後に投与した群において、梗塞面積に著明な縮小がみられなかったのに神経機能の回復が良好であったが、こ

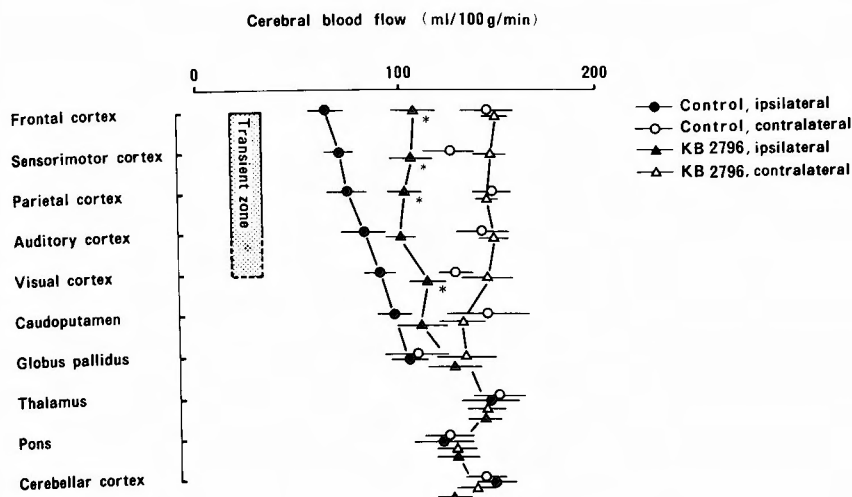


Fig. 5. Local cerebral blood flow (LCBF) at 1 hour after the occlusion of the MCA in rats. The area, where the LCBF was relatively reduced as compared with the contralateral cerebral cortex in the control group, is illustrated as a "transient zone" in this figure. Each value is a mean $\pm$ S.E.M. *: $p < 0.05$ (Student t-test) compared to the control group.

の理由については明らかでない。梗塞巣周囲の、いわゆる penumbra を含めた虚血領域における神経機能の回復が control 群と治療群で異なることが推測される。また今回、神経症状の観察が盲検法でなかった点も問題として残される。

今回の実験において、局所脳虚血に対する治療効果は nicardipine よりも KB-2796 においてより優れた結果であったが、その理由の1つとして脳血管に対する選択性の差や作用の持続時間の差があると思われる。脳虚血の治療としてカルシウム拮抗剤を使用する上で、脳血管に対する選択性は今後も考慮すべきであり、さらに脳保護作用を期待する以上血液脳関門透過性も重要と思われる。今回我々は入手し得た2種類のカルシウム拮抗剤につき検討したが、NMDA blocker や free radical scavenger, opioid agonist などとの比較や併用なども検討されるべきである。

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 ^{45}C accumulation in rat dentate hilus. *J Cereb Blood Flow Metabol* 8: 713-719, 1988.
- 3) Deshpande JK, Siesjö BK, Wieloch T: Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 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) Germano IM, Bartkowski HM, Cassel ME, et al: The therapeutic value of nimodipine in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 67: 81-87, 1987.
- 7) 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, in the press.
- 8) Hara H, Ozaki A, Yoshidomi M, et al: Protective effect of KB-2796, a new cerebral vasodilator, on cerebral hypoxia and ischemia. *Japan J Pharmacol* 46: 134, 1988.
- 9) 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.
- 10) 原田研吾, 中洲庸子, 松田昌之, 他: 1-[bis (4-fluorophenyl) methyl]-4-(2, 3, 4-trimethoxy-

- benzyl) 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
- 11) Hossmann 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.
 - 12) Iwamoto T, Morita T, Ito K, et al: Calcium antagonistic action of KB-2796, a new cerebral vasodilator. *Japan J Pharmacol* 46: 188, 1988.
 - 13) Kanazawa T, Morita T, Harada K, et al: Selective effect of KB-2796, a new calcium antagonist, on cerebral circulation in anesthetized dogs. *Japan J Pharmacol* 43: 98, 1987.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) Kidooka M, Matsuda M, Handa J: Ca^{2+} antagonist and protection of the brain against ischemia. *Surg Neurol* 28: 437-440, 1987.
 - 17) Meldrum BS: Metabolic factors during prolonged seizures and their relation to nerve cell death. *Adv Neurol* 34: 261-275, 1983.
 - 18) 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.
 - 19) 椎野顯彦, 木戸岡実, 半田譲二: 脳虚血とカルシウムチャンネル—虚血脳に対する YC 170 の効果—, 脳卒中 10: 306-308, 1988.
 - 20) 椎野顯彦: 局所脳虚血に対する薬物の脳保護作用に関する実験的研究. Part 1, レット局所脳虚血モデルの基礎的検討—, 日外宝 58:431-437, 1989.
 - 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) Yamashita A, Hayashi A, Ozaki A, et al: Effect of KB-2796 upon local cerebral glucose utilization in the rat brain. *Japan J Pharmacol* 43: 98, 1987.
 - 24) Yanagihara T, McCall JT: Ionic shifts in cerebral ischemia. *Life Sci* 30: 1921-1925, 1982