

受賞者講演

新しい脳虚血モデルによる治療薬の薬理作用と メカニズム解明

梅村 和夫

1. はじめに

近年、高齢化社会と共に脳梗塞、心筋梗塞など血栓症疾患の増加は著しい。その治療薬あるいは予防薬の開発は緊急の課題である。最近、脳虚血による脳神経細胞障害の機序が少しずつ解明され、作用機序の異なるいろいろな治療薬・予防薬の開発が精力的に行われている。循環障害においては、抗血小板薬(1~4)、抗凝固薬(5)、血栓溶解薬(6)などが開発されており、神経細胞保護としてはグルタミン酸の受容体である NMDA (7~9)あるいは AMPA 受容体拮抗薬(10~12)やグルタミン酸遊離抑制薬(13~16)、また抗酸化剤(17, 18)などが開発されている。さらには、新規の作用機序を持った薬物も開発されている。これらの薬物はまず動物レベルで脳梗塞進展に対して予防あるいは治療効果が検討され、ヒトでの効果が期待できるような場合、初めてヒトでの試験へと進むこととなる。そのためには、ヒトの病態を反映した動物モデルが必要となる。そのモデルでの効果からヒトでの効果を予測するわけである。現在まで数多くの病態モデルが作られてきたが、まだまだ十分満足すべきものは得られてはいない。

現在までに開発され、よく使用される脳梗塞モデルとしては

- 1) 頸動脈および椎骨動脈を結紮して作成する全脳虚血モデル(19, 20)
- 2) 局所脳虚血モデルとして中大脳動脈を結紮あるいは焼灼し血流を遮断して作成するモデル(21~23)
- 3) 血餅あるいはトロンビンを頸動脈から注入すること

による局所脳虚血モデル(24)

4) 頸動脈から中大脳動脈へ塞栓糸を挿入し脳虚血を作成するモデル(25)

などが報告されている。これらのモデルには一長一短があり、目的に合わせてモデルを選択する必要がある。現在、脳梗塞の原因としては血栓が心臓あるいは頸動脈から飛んで中大脳動脈に詰まる脳塞栓症と動脈硬化などの原因により中大脳動脈が閉塞する脳血栓症がある。しかし、今までに報告されているどのモデルにおいても中大脳動脈が血栓にて閉塞されるモデルがない。そこで我々は、今までに報告してきた光増感反応を応用した血栓作成法を中大脳動脈に適応することで、新しい中大脳動脈血栓モデルの作成を試みた。

2. 血栓形成の原理

我々の血栓モデルは光増感反応を応用したものである。540 nm の波長の緑色光をローズベンガルに照射すると、ローズベンガルが励起状態になり、そのエネルギーを酸素に移すことで活性酸素種が生成される。この生成された活性酸素種はほとんどが一重項酸素である(26, 27)。細胞膜の脂質中に局在する高度不飽和脂肪酸は活性酸素種により過酸化脂質になり、直接的あるいは間接的に生体膜に障害を引き起こす。つまり、ローズベンガルを静脈内に投与し、選択的、局所的に緑色光を照射し、局所の血管内に発生した活性酸素種が、血管内皮細胞を傷害し、内皮下組織が露出することで血小板が活性化される。さらに、活性化血小板が傷害された血管表面に粘着・凝集し、血小板豊富な血栓が形成される(28, 29)。このことは Saniabadi ら(28)の検討で明らかにされている。つまり、モルモット大腿動脈に緑色光を照射し、静脈内へローズベンガルを投与した。その時に、照射した部位に局所的に一重項酸素が発生し、それが血管内皮細胞を

傷害する。その部位に血小板が多数粘着・凝集している像を走査型電子顕微鏡で確認している。さらに、一重項酸素の補足剤であるシステインを静脈内へ投与しておく。走査電顕での検討では血管内皮傷害は認められず、血小板の粘着・凝集は見られなかった。このことから、緑色光とローズベンガルとの光増感反応により産生された一重項酸素が血管内皮を傷害したことが確認された。

我々はこの光増感反応を利用して作成した血栓モデルを PIT (Photochemically Induced Thrombosis) モデルと呼んでいる。

PIT モデルの特徴は以下の通りである。

- 1) 簡便である
- 2) 再現性がよい
- 3) 短時間(数分)で血栓形成が可能である
- 4) 細い血管から太い血管まで適用可能である
- 5) 静脈・動脈両者に血栓形成が可能である
- 6) 小動物(マウス)から大動物(イヌ・サル)まで応用が可能である
- 7) 血栓溶解薬で再開通できる
- 8) 再開通後、血管内皮肥厚ができる
- 9) 骨の下の血管にも血栓作成が可能である

次に、現在までに開発した各種 PIT モデルを以下に示す。

- 1) 大腿動脈血栓モデル(マウス, ラット, モルモット, ウサギ, ネコ, イヌ) (30, 31)
- 2) 中大脳動脈血栓モデル(ラット, モルモット, サル) (16, 32)
- 3) 冠動脈血栓モデル(ラット, イヌ) (33, 34)
- 4) 内耳微小循環障害モデル(ラット, モルモット) (35)
- 5) 前下小脳動脈血栓モデル(ラット) (36)
- 6) 血管肥厚モデル(マウス, ラット, モルモット) (37~39)

これらモデルの中で、今回は中大脳動脈血栓モデルを紹介する。

3. 中大脳動脈血栓モデル

まず、ラット中大脳動脈を血栓で閉塞できるかどうかを検討した。Wistar 系雄性ラットを1%ハロセンと約30%酸素の混合ガスにて麻酔し、自発呼吸で実験を行った。ローズベンガルを投与するためのカニューレを大腿

静脈に挿入した。左眼窩側縁に沿って皮膚を切開し、側頭筋を一部切開し眼窩外側壁に沿って側頭下窩を開いた。手術用顕微鏡下に頭蓋底を歯科用ドリルにて約3mmの楕円形の窓を削開した。窓の中に中大脳動脈が硬膜を通して観察された。中大脳動脈の血流は超音波ドップラー血流計にて測定した。ペンタイプのプローベを中大脳動脈の上に置いた。このとき、硬膜は切開せずにその上に置いた。緑色光を中大脳動脈に照射し、ローズベンガル(20 mg/kg)を静脈内に投与した。

投与後数分で中大脳動脈は白色血栓にて完全閉塞した。光学顕微鏡で観察すると血管内は血小板と思われる均一に染色される物質で充満していた。走査型電顕で観察すると血小板豊富な血栓で充満していた。つまり、血管内皮細胞が傷害され血小板が活性化され、血栓を形成することが中大脳動脈でも同様に観察できた。

中大脳動脈閉塞後24時間に脳を取り出し、1mm厚の横断スライスを作成し、トリフェニールテトラゾリウムクロライド(TTC)にて染色し、脳梗塞の面積を測定した。脳梗塞は皮質、線条体に広がり中大脳動脈支配領域が梗塞になっていた。脳梗塞面積の個体間のばらつきも少なく、安定した脳梗塞を作成できた。

また、経時的にラットの行動を観察していくと、中大脳動脈閉塞後7日間程度は麻痺が観察できる。ラットの尻尾をもって持ち上げると、ラットは体を右へ大きくねじる。また、右回転に歩行し、体の側面から押してやると右側へ倒れやすい。これは、右側の麻痺を見ているものと思われる。しかし、14日後にはそれらの麻痺も代償機能により観察しづらくなっていく。

このように、中大脳動脈が血小板豊富な血栓にて閉塞し、その支配領域が虚血に陥り脳梗塞へ進展するモデルが確立できた。このモデルでは梗塞領域の機能が低下することで、麻痺が観察できる。また、このモデルの特徴は田村モデルと異なり、硬膜をあげずに中大脳動脈を閉塞可能で、脳実質への侵襲が少ない。さらに、閉塞が血栓によるものなので抗血栓薬の評価には適しているし、現在のところ、抗血栓薬を評価できるモデルはこれしかない。我々のモデルはこのような特徴を有しており、脳虚血後に脳梗塞へと進展していくメカニズム解明や抗血栓薬および脳保護薬の評価にも適したものである。

4. 抗血栓薬の血栓形成予防効果

1) 抗血小板薬

メカニズムの違う抗血小板薬の効果を検討し、中大脳動脈血栓形成に重要な因子を考察した。血栓形成への影

響は、抗血小板薬をローズベンガルを投与する前に投与し、中大脳動脈の血流が停止するまでの時間を指標として評価した。抗血小板薬としてトロンボキサ₂ 受容体拮抗薬であるバビプロスト、ADP 凝集阻害薬であるクロピドグレルと血小板膜 glycoprotein IIb/IIIa 受容体阻害薬である蛇毒のトリフラビンを評価した(40)。バビプロストはローズベンガル投与10分前に、クロピドグレルは2時間前に、トリフラビンは5分前に静脈内に投与した。どの薬物においても用量依存的に中大脳動脈における血栓形成を延長した(図1a)。それらの効果は *ex vivo* における血小板凝集抑制とほぼ相関している。この結果から、我々のモデルにおいて中大脳動脈血栓形成にはトロンボキサ₂ や ADP などの血小板凝集惹起物質が重要な役割をしていることが示唆された。また、血管の因子の関与も重要であるが、セロトニン拮抗薬やミオシン軽鎖キナーゼ阻害薬は血栓形成時間を延長しなかった。大腿動脈と中大脳動脈での薬物の効果の違いは、大腿動脈に比べ中大脳動脈でのクロピドグレルの効果が強い傾向があり、またセロトニン拮抗薬は大腿動脈血栓形成を延長することから、部位での血栓形成の違いがあると思われる。このことから、血栓形成のメカニズム解明や薬物の評価は病態を考慮し部位の選択も重要となる。

2) 選択的トロンビン阻害薬であるアルガトロバン

アルガトロバンはトロンビンと結合することでフィブリノーゲンからフィブリンへの変換を阻害したり、トロンビン刺激による血小板凝集を抑制したり、トロンビン刺激による血管平滑筋収縮を抑制する。中大脳動脈血栓形成への効果を検討した(40)。アルガトロバンをローズベンガル投与10分前より静脈内へ持続投与した。アルガトロバンは用量依存的に閉塞時間を延長した(図1b)。しかし、ヘパリンをローズベンガル投与10分前に静脈内へ投与しても閉塞時間は延長しなかった。我々のモデルにおいては中大脳動脈の血栓形成には血小板が大きな役割をしているが、トロンビンによる血小板凝集も重要な因子と考えられる。さらに、凝固系の関与も重要と思われる。しかし、ヘパリンが十分な延長効果を発揮できなかった理由として、ヘパリンとアルガトロバンの分子量や荷電の違いで、血栓内の活性化した血小板膜表面でのプロトロンビンから変換したトロンビンを十分阻害できないことで、ヘパリンが閉塞時間を延長できなかったと考えられる。

5. 血栓溶解薬

次に、このモデルの特徴の一つである中大脳動脈が血栓にて閉塞されていることから、血栓溶解薬の評価が可能である。さらに、血栓を溶解することが脳梗塞進展にどのような影響を与えるかを検討できる唯一のモデルである。このような理由で、中大脳動脈閉塞後に血栓溶解薬で血栓を溶解することが脳梗塞の進展にどのような影響を与えるかを検討した(33)。

今回実験に使用した組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)はSUN9216で、これは天然型tPAから、finger domain と growth factor domain が除かれ、さらに117番目糖鎖を置換した構造を有しており、血中消失半減期と活性は天然型tPAに比べ延長し、強くなっている。静脈内 bolus 投与でも血栓にて閉塞した血管を再開通できると報告されている。

SUN9216 を中大脳動脈閉塞後30分に静脈内に bolus 投与した。SUN9216 を投与後に中大脳動脈が再開通したかどうかを手術用顕微鏡下に60分間観察した。さらに24時間後に脳を取り出し、脳梗塞の面積を測定した。また、トロンボキサ₂ の血栓溶解あるいは血栓溶解後の脳梗塞への影響を検討する目的でトロンボキサ₂ 拮抗薬であるバビプロストを血栓溶解薬と併用した。

SUN9216 は投与後30分以内に中大脳動脈を19例中6例再開通した。24時間後の梗塞面積は観察期間中に再開通した6例では有意に縮小していたが、再開通できなかったものでは梗塞面積は縮小しなかった(図2)。さらに、再開通するまでの時間と梗塞面積との間にはよい相関が見られた(図3)。バビプロストを併用した群では再開通率が上昇し、再開通するまでの時間が短縮した。しかし、24時間後の梗塞面積においては、観察期間中に再開通したものは縮小したが、再開通しなかったものでは縮小しなかった(図3)。再開通するまでの時間と梗塞面積はよい相関がみられたが、SUN9216 単独投与群とその傾きは同程度であった(図3)。つまり、バビプロスト併用群は再開通時間を短縮することで梗塞面積をより縮小できたと考えられる。我々のモデルではバビプロストの併用が中大脳動脈が血栓溶解薬にて再開通したときに、より末梢の循環を改善して脳梗塞の進展を抑制しなかった。

次に、脳梗塞急性期に脳内のエンドセリン濃度が上昇したという報告がある。このエンドセリンが血管攣縮などにより循環障害を増悪していることが考えられる。そ

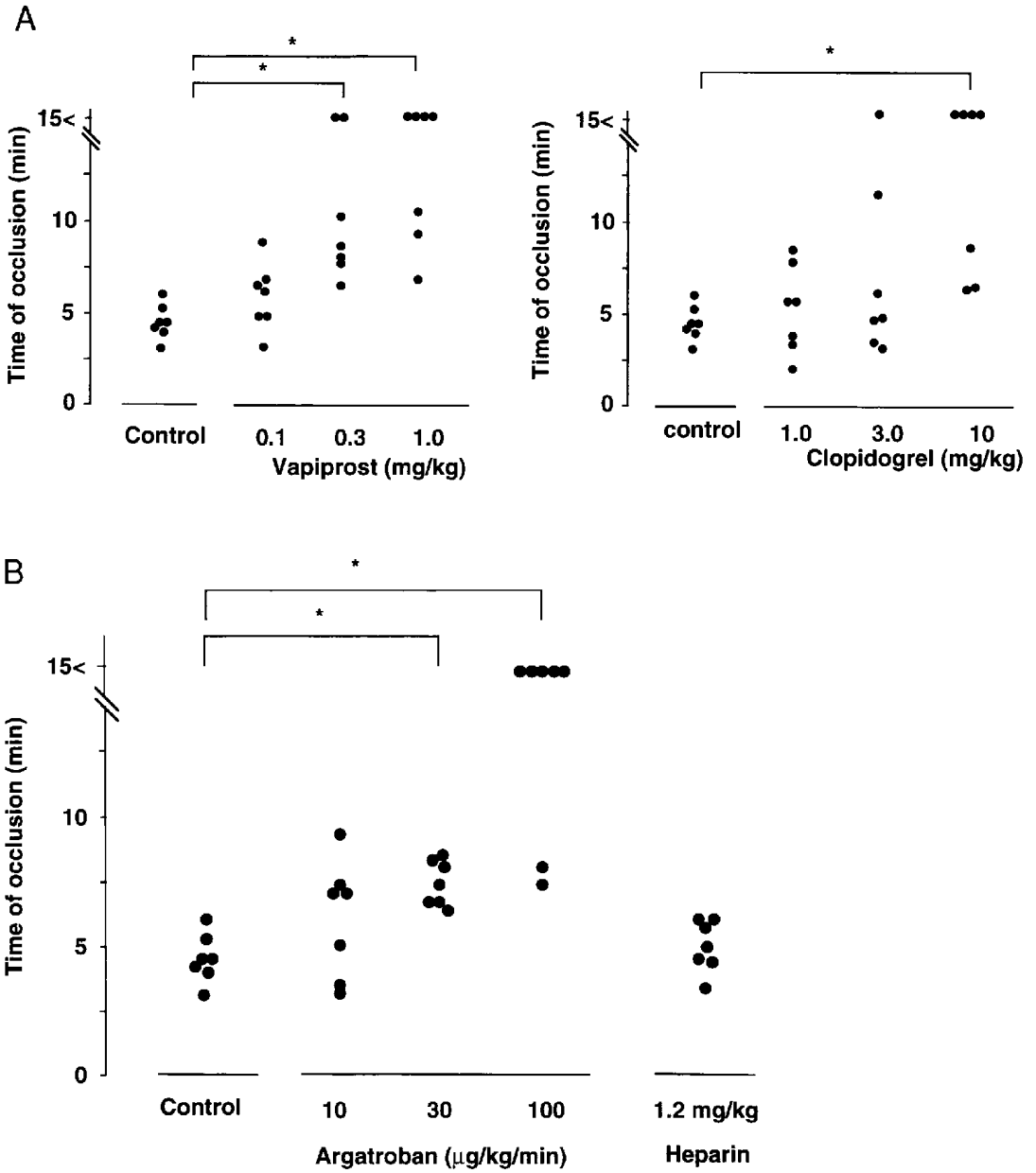


Fig. 1 A: Effects of thromboxane A₂ receptor antagonist, vapiprost, and an ADP-induced platelet aggregation inhibitor, clopidogrel; B: effects of a selective thrombin inhibitor, argatroban, and heparin on middle cerebral artery thrombosis. Vapiprost and heparin were administered intravenously 10 min before rose bengal injection; clopidogrel was administered intravenously 2 hr before rose bengal injection; and argatroban was administered intravenously as a continuous infusion, starting 10 min before rose bengal injection. *P<0.05 vs. control.

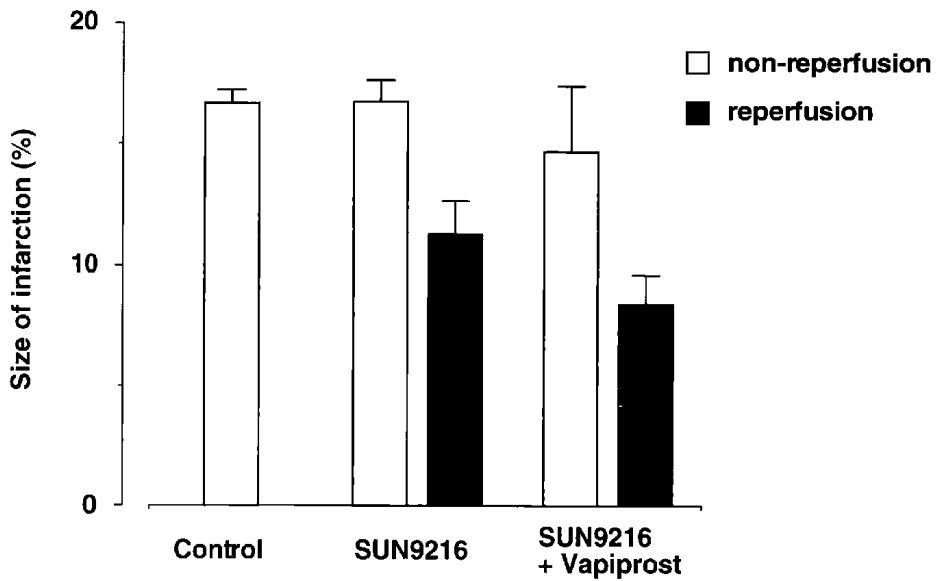


Fig. 2 Effect of a combination of SUN9216, a modified tissue-type plasminogen activator, and vapiprost, a thromboxane A_2 -receptor antagonist.

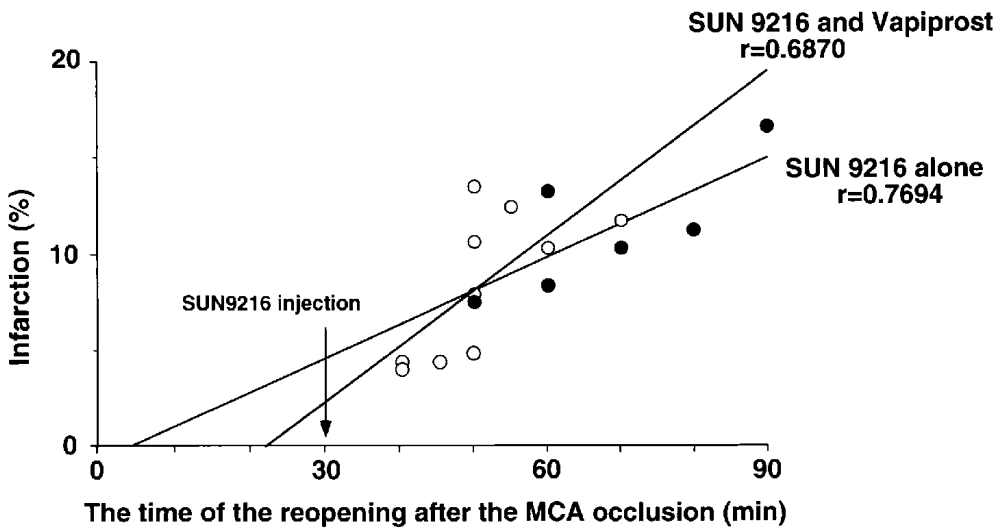


Fig. 3 Correlation between the time to reopening and the size of cerebral infarction in animals treated with SUN9216, a modified tissue-type plasminogen activator, alone and in combination with vapiprost, a thromboxane A_2 -receptor antagonist.

ここで、我々のモデルでエンドセリンが虚血後どのような経過で変化するか測定し、さらに血栓溶解薬と併用することで血栓溶解後の循環改善が期待できないか検討した(41)。我々のモデルでは脳内のエンドセリンは中大脳動脈閉塞後3時間をピークに上昇した。そこで、中大脳動脈閉塞後30分から血栓溶解薬とエンドセリンET_A受容体阻害薬であるFR139317を同時に投与し、24時間後の脳梗塞の面積を測定した。エンドセリン拮抗薬を併用することで血栓溶解時間の短縮や溶解率の増加はみられなかった。これから、エンドセリンは血栓溶解にはあまり関与していないことが示唆された。また、24時間後の梗塞面積は血栓溶解薬投与後60分間血栓が溶解したかどうかを観察していたが、溶解できた群では24時間後の梗塞面積は有意に縮小したが、開通できなかった群では梗塞面積の縮小はみられなかった。さらに、エンドセリン拮抗薬の併用によりさらなる梗塞面積の縮小はみられなかった。これらより、エンドセリンはET_A受容体を介した血管攣縮などの循環障害の増悪といった因子としてはあまり関与していないことが示唆された。

6. 核磁気共鳴装置 (MRI) を使用した脳梗塞の評価

今までの脳梗塞の評価法としては脳を取り出し組織学的に染色し梗塞の面積を測定していた。この方法では一頭で一度しか評価ができない。脳梗塞の病態は経時的に変化していくので、できることなら一頭を経時的に観察したい。このような目的から、*in vivo*の状態を経時的に脳梗塞の病態を追跡できる観察方法を検討した。近年、エレクトロニクスが進歩し、MRIによる生体での脳の観察が可能となった。この方法を動物モデルに応用してみた。

まず、中大脳動脈を血栓にて閉塞し脳梗塞を作成する。24時間後にペントバルビタール麻酔下にMRI画像を撮影した。図4aは前頭部より後方へ、3mmのところを中心に作成した脳の横断像である。梗塞の部位が高信号領域としてみられる。図4bは同じ動物の同じ位置のスライスでのTTC染色による梗塞の広がりを示したものであるが、MRIでの高信号域の面積の方がTTC染色での梗塞面積に比べ、やや大きいように思われる。それは、脳梗塞巣の周囲に浮腫があり、MRIでの高信号域は梗塞巣の周囲の浮腫を含んだ像となり大きく見える。このように、*in vivo*の状態で梗塞面積など解剖学的な病態の変化は観察可能であるが、現在のところ、機能的な変化はこのMRIでは十分観察できるとはいえない。

機能的な変化を追えるものとしてはポジトロンエミッションCT (PET)がある。PETはいろいろな核種を投与し、血流、酸素摂取量、酸素消費量やグルコース代謝などの変化を経時的に追うことが可能である。

このMRIを使用して、抗酸化剤であるU74006Fの脳梗塞抑制作用を検討した(42)。ラット中大脳動脈を血栓にて閉塞直後にU74006Fを静脈内へ投与した。24時間後に梗塞面積をMRIにて観察した。その後、脳を取り出し、脳における脂質過酸化レベル、遊離アラキドン酸濃度を測定した。U74006Fは24時間後の脳梗塞面積を縮小し、脂質過酸化および遊離アラキドン酸レベルを低下させた。このことから、U74006Fは抗酸化作用により脂質過酸化を抑制することで脳梗塞面積を縮小したと考えられる。また、この方法により同一個体で梗塞面積といろいろなパラメーターを評価できることは大変有用と思われる。

7. グルタミン酸による神経細胞障害に対する保護薬

グルタミン酸は培養神経細胞において細胞障害を引き起こす。グルタミン酸の受容体は大きく2つに分類され、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA)と α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole (AMPA)受容体である。NMDA受容体が刺激されるとCa²⁺の細胞内への過剰流入がおり、続いて細胞内でいろいろな反応が始まり、神経細胞死となる。AMPA受容体が刺激されるとNa⁺が細胞内へ流入し、引き続きCa²⁺が流入し同様な反応が起こると言われている。

今回実験に使用したものはグルタミン酸の遊離抑制薬であるMS-153 [(*R*)-(-)-5-methyl-1-nicotinoyl-2-pyrazoline)とAMPA受容体拮抗薬であるYM90K [6-(1H-imidazol-1-yl)-7-nitro-2,3(1H,4H)-quinoxalinedione monohydrochloride]である。

我々はマイクロダイアリス法を使用し、脳虚血辺縁部にプローベを挿入し、その部位でのグルタミン酸を高速液体クロマトグラフで測定した。中大脳動脈を閉塞すると虚血辺縁部のグルタミン酸濃度は上昇する。このグルタミン酸濃度の上昇が脳梗塞進展において重要であるという報告は多い(43~49)。MS-153を中大脳動脈閉塞後から静脈内へ持続投与すると、グルタミン酸濃度の上昇を抑制し、24時間後の脳梗塞面積を用量依存的に縮小した(16)。また、中大脳動脈閉塞2時間後からMS-153を持続投与した時でも、24時間後の脳梗塞の面積を縮小した。このことから、中大脳動脈閉塞2時

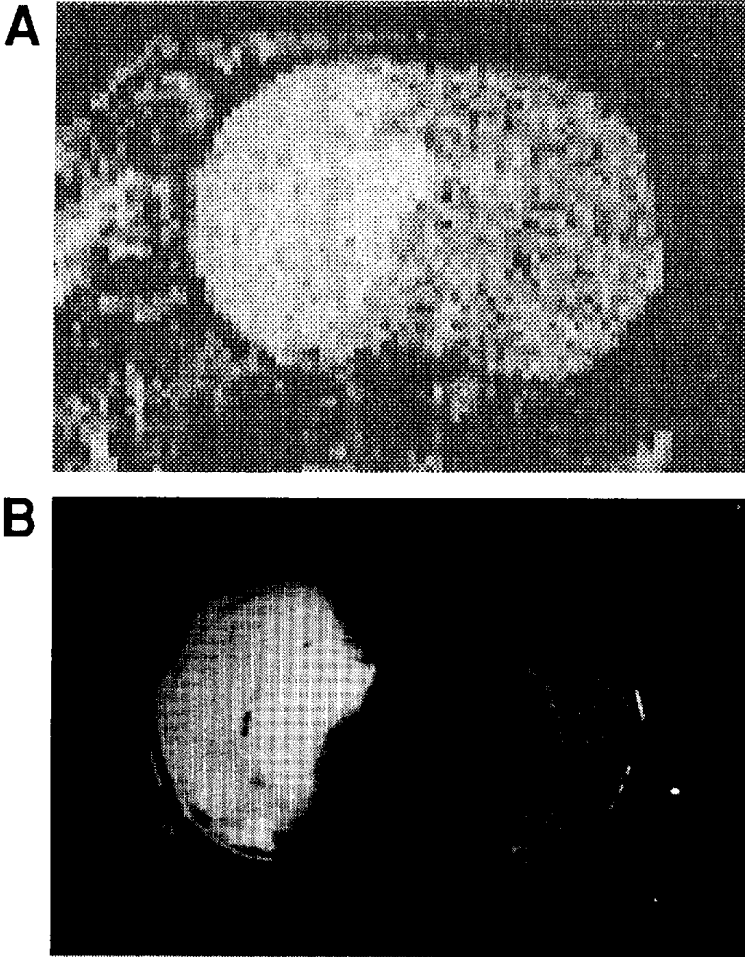


Fig. 4 A: A typical magnetic resonance image of cerebral infarction 24 hr after occlusion of the middle cerebral artery. This slice was imaged at 3 mm from the frontal lobe with a 3-mm thickness. Spin-echo sequence SE (2000/60), 256×256 pixels. B: A typical infarct area stained by triphenyltetrazolium chloride in the same section.

間後投与においても脳梗塞を縮小できることから、虚血後に速やかに上昇してくるグルタミン酸の脳梗塞進展に対する役割が重要でないことが示唆されるが、今後の課題と考えている。

NMDA拮抗薬は培養神経細胞におけるグルタミン酸刺激に対する細胞死を抑制するという報告が多くある。一方、AMPA拮抗薬も同様に細胞死を抑制する。しかし、NMDA拮抗薬はグルタミン酸を添加した直後に存在させないと細胞死を抑制できないが、AMPA拮抗薬

は少し時間がたってから存在させることで細胞死を抑制できる。このことから、グルタミン酸による神経細胞死に対する時間的役割が違うことが示唆される。我々は、AMPA拮抗薬であるYM90Kを4時間静脈内持続投与したが、その投与開始時点を中大脳動脈閉塞直後、1時間、2時間、3時間後といった4群で行った。24時間後の梗塞面積は2時間後から始めた群までは有意に縮小した。3時間後から開始した群においても有意ではないが梗塞面積を縮小した。NMDA拮抗薬は中大脳動脈

閉塞直後に投与しなければ梗塞を縮小できないという報告がある。今回の結果は、*in vivo*においてもNMDA受容体とAMPA受容体の役割の違いを示すもので、AMPA受容体の役割は脳梗塞超急性期というより亜急性期に重要な役割をしていることが示唆された。

また、自然発症高血圧ラットの中大脳動脈を同様に血栓で閉塞すると正常血圧ラットに比べ、特に皮質部位の梗塞面積が大きくなる。これは、中大脳動脈閉塞により虚血周辺部は側副血行路から酸素が供給されることとなる。この時、高血圧ラットでは血圧の上昇による脳血管抵抗の増加が起り、酸素供給が十分おこなわれず虚血中心部が拡大することとなる。高血圧あるいは正常血圧ラットの虚血周辺部にマイクロダイアリスのプローブを挿入し局所グルタミン酸濃度を測定した。グルタミン酸濃度は虚血後、徐々に上昇し、ベースラインの約40倍となり、グルタミン酸濃度はその後180分まで高いレベルで維持された。また、虚血中心部でのグルタミン酸濃度の上昇は2群間で差はなかった。このことから、高血圧および正常血圧ラットでの虚血周辺部および中心部でのグルタミン酸濃度の上昇はほぼ同程度であり、高血圧ラットが虚血によるグルタミン酸放出において、より感受性が高いことはなかった。また、YM90Kを両群に投与して、効果を検討した。YM90Kは両群とも同程度の梗塞面積の縮小効果がみられた。このことから、高血圧ラットでは側副血行路の低下により虚血中心部領域が広がるが、虚血周辺部でのグルタミン酸濃度の上昇は同程度であり、AMPA受容体を介した神経細胞死へと陥る。そのためにAMPA受容体拮抗薬であるYM90Kは正常血圧ラットだけでなく高血圧ラットにおいても虚血周辺部を救うことができ同程度の脳梗塞縮小効果が確認された。

8. おわりに

ここ数年、脳梗塞の進展に関与する因子が徐々に明らかになりつつある。今回紹介したものはそのうちのごく一部であるが、それぞれの因子がどのように絡み合っているかが今後興味深いところである。しかし、これらを検討していくにあたって、より臨床の病態に近いモデルでの検討が重要となってくる。そこで、今後もよりよいモデルの開発が望まれるところである。

文 献

1) Antiplatelet Trialists' Collaboration: Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet

therapy. I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Br Med J* **308**, 81-106 (1994)

- 2) Antiplatelet Trialists' Collaboration: Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy. II: Maintenance of vascular graft or arterial potency by antiplatelet therapy. *Br Med J* **308**, 159-168 (1994)
- 3) Gent M, Blakely JA, Easton JD, Ellis DJ, Hachinski VC, Harbison JW, Panak E, Roberts RS, Sicurella J and Turpie AG: The Canadian American Ticlopidine Study (CATS) in thromboembolic stroke. *Lancet* **I**, 1215-1220 (1989)
- 4) Hass WK, Easton JD, Adams HP Jr, Pryse-Phillips W, Molony BA, Anderson S and Kamm B: A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. *N Engl J Med* **321**, 501-507 (1989)
- 5) 田崎義昭, 小林祥泰, 東儀英夫, 大友英一, 後藤文男, 荒木五郎, 小玉隆一, 神田直, 伊藤栄一, 澤田徹, 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* **161**, 887-907 (1992)
- 6) Friedman HS: Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* **333**, 1581-1587 (1995)
- 7) Simon RP, Swan JH, Griffiths T and Meldrum BS: Blockade of *N*-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* **226**, 850-852 (1984)
- 8) Simon RP and Shiraishi K: *N*-methyl-D-aspartate antagonist reduces stroke size and regional glucose metabolism. *Ann Neurol* **27**, 606-611 (1990)
- 9) Gill R, Andline P, Hillered L, Persson L and Hagberg H: The effect of MK-801 on cortical spreading depression in the penumbral zone following focal ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **12**, 371-379 (1992)
- 10) Gill R, Nordholm L and Lodge D: The neuroprotective actions of 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline (NBQX) in a rat focal ischaemic model. *Brain Res* **580**, 35-43 (1992)
- 11) Bullock R, Graham DI, Swanson S and McCulloch J: Neuroprotective effect of the AMPA receptor antagonist LY-293558 in focal cerebral ischemia in the cat. *J Cereb Blood Flow Metab* **14**, 466-471 (1994)
- 12) Yatsugi S, Takahashi S, Kawasaki-Yatsugi S, Koshiya K, Sakamoto S, Uematsu D and Shimizu-Sasamata M: Neuroprotective effect of YM90K, a novel AMPA/kainate receptor antagonist, in

- focal cerebral ischemia in cats. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**, 959-966 (1996)
- 13) Smith SE, Lekieffre D, Sowinski P and Meldrum BS: Cerebroprotective effect of BW619C89 after focal or global cerebral ischaemia in the rat. *Neuroreport* **4**, 1339-1342 (1993)
 - 14) Lekieffre D and Meldrum BS: The pyrimidine-derivative, BW1003C87, protects CA1 and striatal neurons following transient severe forebrain ischaemia in rats. A microdialysis and histological study. *Neuroscience* **56**, 93-99 (1993)
 - 15) Arvin B, Lekieffre D, Graham JL, Moncada C, Chapman AG and Meldrum BS: Effect of the non-NMDA receptor antagonist GYKI52466 on the microdialysate and tissue concentrations of amino acids following transient forebrain ischaemia. *J Neurochem* **62**, 1458-1467 (1994)
 - 16) Umemura K, Gemba T, Mizuno A and Nakashima M: Inhibitory effect of MS-153 on elevated brain glutamate level induced by the rat middle cerebral artery occlusion. *Stroke* **27**, 1624-1628 (1996)
 - 17) Watanabe T, Yuki S, Egawa M and Nishi H: Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. *J Pharmacol Exp Ther* **268**, 1597-1604 (1994)
 - 18) Clark WM, Hazel JS and Coull BM: Lazaroids. CNS pharmacology and current research. *Drugs* **50**, 971-983 (1995)
 - 19) de Garavilla L, Babbs CF and Tacker WA: An experimental circulatory arrest model in the rat to evaluate calcium antagonists in cerebral resuscitation. *Am J Emerg Med* **2**, 321-326 (1984)
 - 20) Ljunggren B, Schutz H and Siesjo BK: Changes in energy state and acid-base parameters of the rat brain during complete compression ischemia. *Brain Res* **73**, 277-289 (1974)
 - 21) Tamura A, Graham DI, McCulloch J and Teasdale GM: Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **1**, 53-60 (1981)
 - 22) Tamura A, Graham DI, McCulloch J and Teasdale GM: Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [¹⁴C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **1**, 61-69 (1981)
 - 23) Coyle P: Middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Stroke* **13**, 855-859 (1982)
 - 24) Kudo M, Aoyama A, Ichimori S and Fukunaga N: An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* **13**, 505-508 (1982)
 - 25) 小泉仁一, 吉田洋三, 中沢貞二, 大根田玄寿: 虚血脳浮腫の実験的研究. 第1報 ラットを用いた血流再開可能な脳梗塞モデル. *脳卒中* **8**, 1-8 (1986)
 - 26) Saniabadi AR: Photosensitisers and Photochemical Reactions. A Novel Photochemical Model for Thrombosis Research and Evaluation of Antithrombotic and Thrombolytic Agents, Edited by Nakashima M, pp 1-19, Churchill Livingstone (1994)
 - 27) Lee PC and Rodgers MAJ: Laser flash photokinetic studies of rose bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotides and DNA. *Photochem Photobiol* **45**, 79-86 (1987)
 - 28) Saniabadi AR, Umemura K, Matsumoto S, Sakuma S and Nakashima M: Arterial thrombosis initiated by photochemical reaction: a consequence or vessel wall injury. *Thromb Haemost* **73**, 868-872 (1995)
 - 29) Watson WD, Dietrich WD, Busto R, Watchel MS and Ginsberg MD: Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* **17**, 497-504 (1985)
 - 30) Matsuno H, Uematsu T, Nagashima S and Nakashima M: Photochemically induced thrombosis model in rat femoral artery and evaluation of effects of heparin and tissue-type plasminogen activator with use of this model. *J Pharmacol Methods* **25**, 303-317 (1991)
 - 31) Nishiyama H, Umemura K, Saniabadi AR, Takiguchi Y, Uematsu T and Nakashima M: Enhancement of thrombolytic efficacy of tissue-type plasminogen activator by adjuvants: studies with a photochemically induced thrombosis model in the guinea pig femoral artery. *Eur J Pharmacol* **264**, 191-198 (1994)
 - 32) Umemura K, Wada K, Uematsu T and Nakashima M: Evaluation of the combination of tissue type plasminogen activator, SUN9216, and a thromboxane A₂ receptor antagonist, vapiprost in rat middle cerebral artery thrombosis model. *Stroke* **24**, 1077-1081 (1993)
 - 33) Hirata Y, Umemura K, Uematsu T and Nakashima M: An experimental myocardial infarction model in the rat and its properties. *Jpn J Pharmacol* **67**, 51-57 (1995)
 - 34) Umemura K, Ishiye S, Araki S and Nakashima M: A canine coronary artery thrombosis model: An application of the photochemically induced thrombosis. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **330**, 13-24 (1995)
 - 35) Umemura K, Kohno Y, Asai Y, Uematsu T and Nakashima M: Effect of a calcium entry blocker, nilvadipine, on hearing disturbances and equilibrium dysfunction caused by microcirculatory

- disorders of the rat inner ear. *Eur J Pharmacol* **239**, 17-21 (1993)
- 36) Asai Y, Umemura K, Kohno Y, Uematsu T and Nakashima M: An animal model of hearing disturbance due to the inner ear ischemia: photochemically induced thrombotic occlusion of the rat anterior inferior cerebellar artery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **250**, 292-296 (1993)
- 37) Hirata Y, Umemura K, Kondoh K, Uematsu T and Nakashima M: Experimental intimal thickening studies using the photochemically induced thrombosis model in the guinea-pig femoral artery. *Atherosclerosis* **107**, 117-124 (1994)
- 38) Kikuchi S, Umemura K, Kondo K and Nakashima M: Tranilast, an anti-allergic drug, suppresses intimal hyperplasia after photochemically-induced endothelial injury in the spontaneously hypertensive rat. *Eur J Pharmacol* **295**, 221-227 (1996)
- 39) Umemura K, Nishiyama H, Kikuchi S, Kondo K and Nakashima M: Inhibitory effect of a novel orally active GP II b/III a inhibitor, SC-54684A on intimal thickening in the guinea pig femoral artery. *Thromb Haemost* **79**, 799-806 (1996)
- 40) Umemura K, Kawai H, Ishihara H and Nakashima M: Inhibitory effect of clopidogrel, vapirost and argatroban in the middle cerebral artery thrombosis in the rat. *Jpn J Pharmacol* **67**, 253-258 (1995)
- 41) Umemura K, Toshima Y and Nakashima M: Thrombolytic efficacy of a modified tissue-type plasminogen activator, SUN9216, in the rat middle cerebral artery thrombosis model. *Eur J Pharmacol* **262**, 27-31 (1994)
- 42) Umemura K, Wada K, Uematsu T, Mizuno A and Nakashima M: Effect of 21-aminosteroid lipid peroxidation inhibitor, U74006F in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Eur J Pharmacol* **251**, 69-74 (1994)
- 43) Benveniste H, Drejer J, Schousboe A and Diemer NH: Elevation of the extracellular concentration of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* **43**, 1369-1374 (1984)
- 44) Hagberg H, Anderson P, Lacarewicz J, Jacobson I, Butcher S and Sandberg M: Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purine in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem* **49**, 227-231 (1987)
- 45) Choi DW: Glutamate neurotoxicity and diseases in the nervous system. *Neuron* **1**, 623-634 (1988)
- 46) Hillered L, Hallstrom A, Segersvard S, Persson L and Ungerstedt U: Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. *J Cereb Blood Flow Metab* **9**, 607-616 (1989)
- 47) Butcher SP, Bullock R, Graham DI and McCulloch J: Correlation between amino acid release and neuropathologic outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion. *Stroke* **21**, 1727-1733 (1990)
- 48) Tsuyuki YU, Araki H, Yae T and Otomo S: Changes in the extracellular concentrations of amino acids in the rat striatum during transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* **62**, 1074-1078 (1994)
- 49) Wahl F, Obrenovitch TP, Hardy AM, Plotkine M, Boulu R and Symon L: Extracellular glutamate during focal cerebral ischaemia in rats: time course and calcium dependency. *J Neurochem* **63**, 1003-1011 (1994)

Abstract—A novel photochemical model of the middle cerebral artery for thrombosis research and evaluation of anti-thrombotic agents. Kazuo UMEMURA (Department of Pharmacology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-31, Japan).

Folia Pharmacol. Jpn. **109**, 175~185 (1997)

We have established a novel thrombosis model of the middle cerebral artery (MCA). The thrombotic occlusion of the MCA was induced by the photochemical reaction between Rose Bengal and green light, which causes endothelial injury followed by platelet adhesion, aggregation and formation of a platelet and fibrin-rich thrombus at the site of the photochemical reaction. With this model, we have investigated the effects of anti-thrombotic agents, thrombolytic agents and neuroprotective agents. In our model, ADP, thromboxane A₂ (TXA₂) and thrombin play a key role in thrombus formation of the MCA. Tissue-type plasminogen activator (tPA) could cause an opening of the thrombotic MCA occlusion and reduced the size of the cerebral infarction. Furthermore, a TXA₂ antagonist enhanced the thrombolytic efficacy of tPA. MS-153 ((R)-(-)-5-methyl-1-nicotinoyl-2-pyrazoline), a glutamate release inhibitor and YM90K [6-(1H-imidazol-1-yl)-7-nitro-2,3(1H, 4H)-quinoxalinedione monohydrochloride], an α -amino-3hydroxy-5methyl-4-isoxazole (AMPA) antagonist reduced the cerebral infarction 24 hr after the MCA occlusion. This model is very useful for investigating the mechanisms of anti-thrombotic and neuroprotective agents and evaluating the effects of these agents.

著者プロフィール

梅村 和夫 (うめむら かずお)

◇浜松医科大学薬理学講座 助教授 医学博士。◇1984年浜松医科大学卒業, '91年浜松医科大学大学院医学研究科博士課程修了, '91年浜松医科大学薬理学講座助手, '94年浜松医科大学薬理学講座助教授。◇研究テーマ:脳虚血に関わる因子の薬理的説明, 血管内膜肥厚のメカニズム説明。

