

## S-7

## 新しい中大脳動脈血栓モデルにおける各種抗血栓薬の評価

梅村 和夫

浜松医科大学薬理学教室

## 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、抗凝固薬、血栓溶解薬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あるいはAMPA/kainate受容体拮抗薬やグルタミン酸遊離抑制薬、また抗酸化剤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ヒトの病態により近い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たが、まだまだ十分満足すべきものは得られてはいない。よく使用される脳梗塞モデルとしては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や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や、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や頸動脈から中大脳動脈へ血栓糸を挿入し脳虚血を作成するモデル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る脳血栓症とがある。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、脳虚血を作成するモデルがない。そこで我々は、光増感反応を応用し、光を中大脳動脈に照射することにより、血栓を希望した部位に作ることができる、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(1, 2)。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、さらに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(3,4)。

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。

### 3. 中大脳動脈血栓モデル

1%ハロセンと約30%酸素の混合ガスにて麻酔をし、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、皮膚を翻転し、側頭筋を一部切開し眼窩外側壁に沿って側頭下窩へ進んだ。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できた。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硬膜を通して中大脳動脈の上に置いた。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。組織学的にこの白色血栓は血小板豊富な血栓であった。中大脳動脈閉塞後24時間に脳を取りだし、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。

### 4. 抗血小板薬

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効果を評価した。抗血小板薬としてトロンボキサン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経験した(5)。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(Fig.1)。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ンや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。

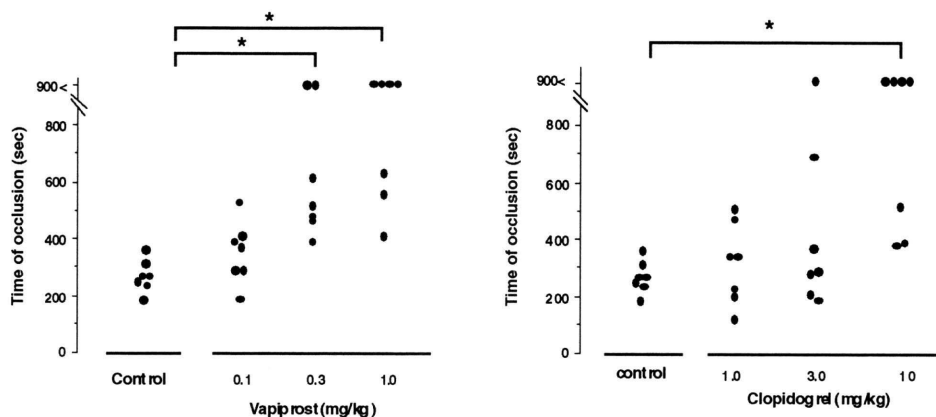


Fig.1 Effects of thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonist, vapiprost and ADP-induced platelet aggregation inhibitor, clopidogrel on the middle cerebral artery thrombosis. Vapiprost was administered intravenously 10 min before rose bengal injection and clopidogrel was administered intravenously 2 h before rose bengal injection.

## 5. 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、その他血管内皮や平滑筋への作用を抑制する。まず、中大脳動脈血栓形成への効果を検討した(5)。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(Fig.2)。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、この結果から、トロンビンは血小板凝集を抑制することで閉塞時間を延長している可能性がある。

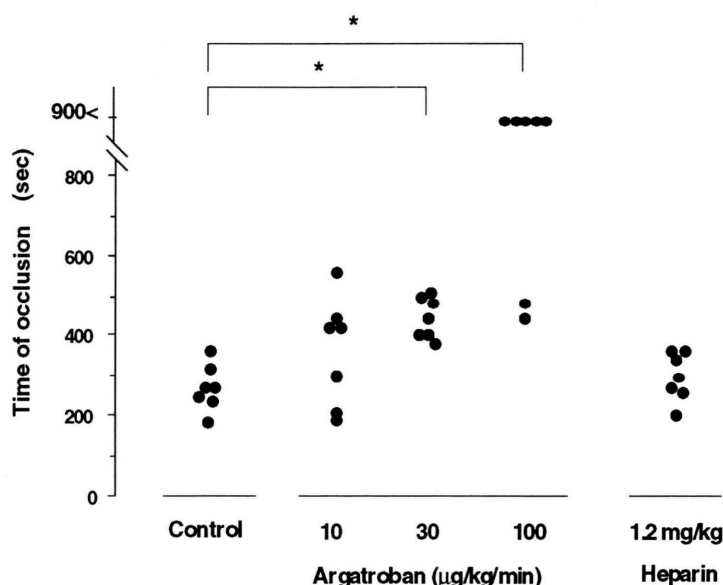


Fig.2 Effects of selective thrombin inhibitor, argatroban and heparin on the middle cerebral artery thrombosis. Argatroban was administered intravenously as a contineous infusion, starting 10 min before rose bengal injection and heparin was administered intravenously 10 min before rose bengal injection.

## 6. 血栓溶解藥

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検討した(6)。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時間後に脳を取りだし、脳梗塞の面積を測定した。また、トロンボキサンの血栓溶解ある

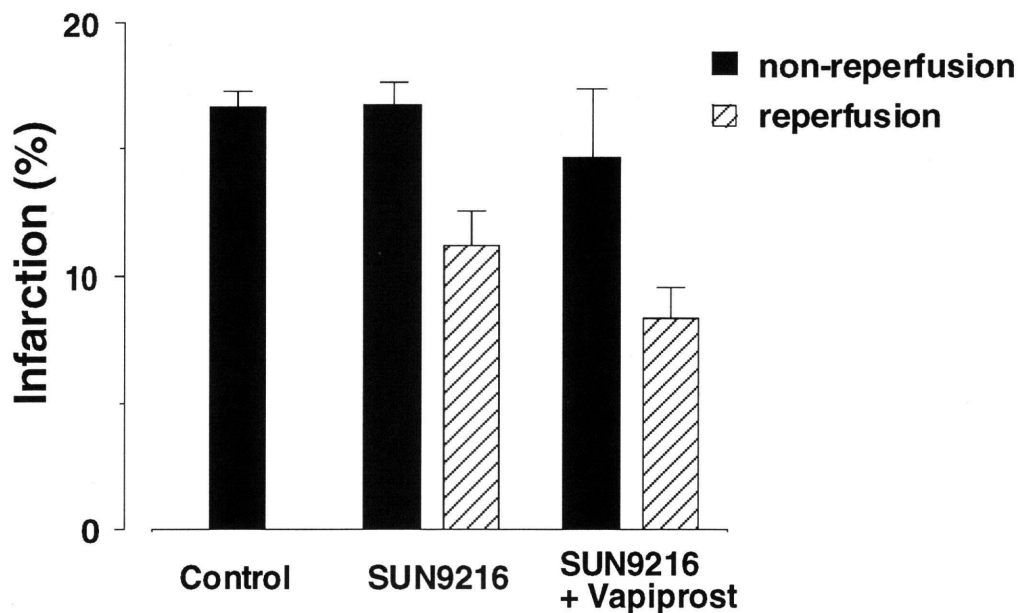


Fig3.Effect of a combination of SUN9216, a modified tissue-type plasminogen activator and vapiprost, a thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonist.

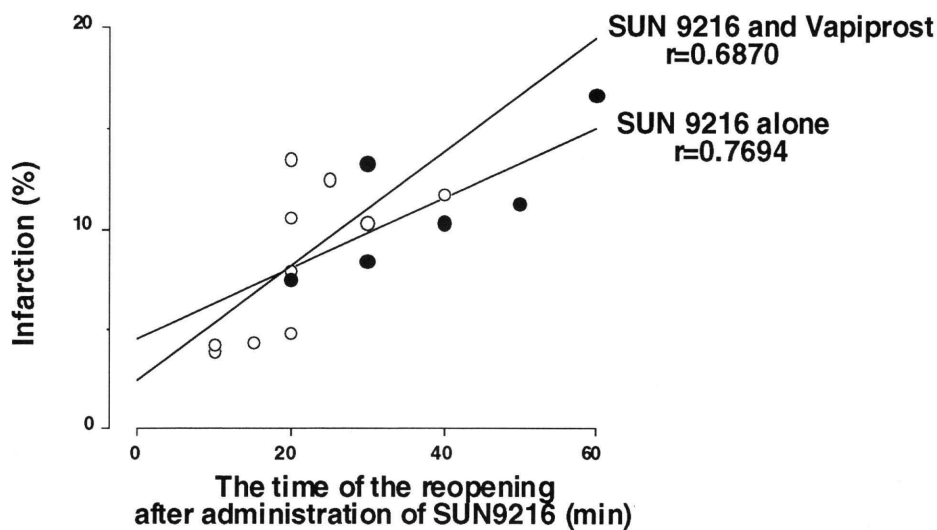


Fig.4 Correlation between the time to reopening and the size of cerebral infarction in animals treated with SUN9216, a modified tissue-type plasminogen activator alone and a combination with vapiprost, a thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonist.

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ン拮抗薬であるバピ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 (Fig. 3)。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 (Fig. 4)。バピ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 (Fig. 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 (Fig. 4)。つまり、バピ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。バピプロストの併用が中大脳動脈を再開通したときに、より末梢の循環を改善して脳梗塞の進展を抑制することはないと思われる。

## 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、NMDAとAPMA/kainate受容体である。NMDA受容体が刺激されるとCaの細胞内への過剰流入がおこり、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/kainate受容体が刺激されるとNaが細胞内へ流入し、引き続きCa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とAMPA/kainate受容体拮抗薬であるYM90Kである。

我々はマイクロダイヤリース法を使用し、脳虚血辺縁部にプローベを挿入し、グルタミン酸を回収し高速液体クロマトグラフで測定した (7)。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。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。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多くの報告がある。一方、AMPA/kainate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/kainate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/kainate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受容体の役割と違いAMPA/kainate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。

## 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. Saniabadi AR. Photosensitisers and photochemical reactions. A novel photochemical model for thrombosis research and evaluation of antithrombotic and thrombolytic agents, Edited by Nakashima M, pp1-19, Churchill Livingstone, 1994
2. Lee PC, Rodgers MAJ. Laser flash photokinetic studies of rose bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotides and DNA. *Photochem. Photobiol.* 1987; 45; 79-86.
3. Saniabadi AR, Umemura K, Matsumoto S, Sakuma S, Nakashima M.: Arterial thrombosis initiated by photochemical reaction: a consequence or vessel wall injury. *Thromb Haemostasis* 1995; 73; 868-872.
4. Watson WD, Dietrich WD, Busto R, Watchel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 1985; 17; 497-504.
5. Umemura K, Kawai H, Ishihara H, Nakashima M. Inhibitory effect of clopidogrel, vaspiprost and argatroban in the middle cerebral artery thrombosis in the rat. *Jpn J Pharmacol* 1995; 67; 253-258.
6. Umemura K, Wada K, Uematsu T, Nakashima M. Evaluation of the combination of tissue type plasminogen activator, SUN9216, and a thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonist, vaspiprost in rat middle cerebral artery thrombosis model. *Stroke* 1993; 24; 1077-1081.
7. Umemura K, Gemba T, Mizuno A, Nakashima M. Inhibitory effect of MS-153 on elevated brain glutamate level induced by the rat middle cerebral artery occlusion. *Stroke* in press

**Abstract-A novel photochemical model 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.* 108, Supp 1, 41P~46P (1996)

In this study, the thrombotic occlusion of the middle cerebral artery (MCA) was induced by 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 photochemical reaction. Using this model, we have investigated effects of anti-thrombotic agents, thrombolytic agents and neuroprotective agents. A thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonist, ADP-induced platelet aggregation inhibitor and a selective thrombin inhibitor-inhibited the MCA thrombogenesis, suggesting that platelets play a key role in MCA thrombosis in this model. A tissue-type plasminogen activator (tPA), administered intravenously 30 min after the MCA occlusion could induce reopening of the thrombotically occluded artery, resulting in reduction of cerebral infarction size 24 h after the tPA administration. A glutamate release inhibitor and AMPA/kainate receptor antagonist, administered after the MCA occlusion reduced the size of cerebral infarction 24 h after the MCA occlusion. Using a microdialysis technique, glutamate concentration in the ischaemic border zone was measured and glutamate release was induced following cerebral ischaemia. This suggests that an increase in glutamate concentration in ischaemic border zone may play a key role in the development of cerebral infarction.