

S-9

サル脳梗塞モデル—PET スタディによる薬効評価

梅村 和夫¹⁾, 高松 宏幸²⁾, 塚田 秀夫³⁾

¹⁾浜松医科大学 薬理学教室, ²⁾(財)先端医学薬学研究センター, ³⁾浜松ホトニクス

要約：脳梗塞急性期の治療薬の薬効評価は一般的にはラット脳虚血モデルが用いられている。今までに開発されてきた薬剤はそれらのモデルで有効性が確認されていたが、臨床試験ではあまりよい結果ではなかった。このことから、ラットモデルでの薬効評価に限界があるのではと疑問視されている。そこで今回、よりヒトに近いサルを用いて中大脳動脈を閉塞し脳梗塞モデルの作成を試みた。サル中大脳動脈を一時的に閉塞するモデルと永久に閉塞するモデルを作成しそれらのモデルにおける梗塞進展に違いをポジトロン エミッション トモグラフィ (PET)を用いて評価した。PET スタディでは局所脳血流量、酸素摂取率、酸素消費率を経時的に評価した。さらに、免疫抑制剤であるFK506の脳梗塞への影響を検討した。一時虚血モデルは中大脳動脈を3時間閉塞後再開通させた。永久閉塞モデルは中大脳動脈を8時間閉塞し続けた。再開通後5時間(閉塞後8時間)に脳を取り出し病理学的に梗塞の広がりを検討した。PETで観察した結果から中大脳動脈閉塞中は主に基底核領域の血流量が高度に、また皮質領域は中程度低下していた。永久閉塞モデルでは血流量の変化は中大脳動脈閉塞直後の変化が8時間後まで続いた。閉塞8時間後の酸素消費率の低下していた領域は病理学的検討による梗塞の広がりによく相関した。永久閉塞モデルの梗塞の広がりには主に基底核領域にあり、皮質領域にはほとんどなかった。一方、一時脳虚血モデルでは、血流を再開通すると特に皮質領域で血流量の上昇が見られたが、再開通5時間後には再び血流量の低下が見られた。この低下は多分 No-reflow 現象と思われた。一時脳虚血モデルにおける梗塞の広がりには基底核だけでなく皮質領域まで広がっていた。これは再灌流傷害によるものと考えられた。虚血直後の投与されたFK506は、主に虚血再灌流後の傷害に効果を示した。今回の結果から、サルを用いた脳虚血モデルにおける脳梗塞進展の過程をPETで観察できることが分かった。このモデルを用いた薬剤の効果はヒトの病態への影響を反映するものかどうかは今後の課題である。

キーワード：脳梗塞、PET スタディ、サル虚血モデル、再灌流傷害、FK506

1. はじめに

高齢化社会を迎え動脈硬化による血栓性疾患の増加が予想される。血栓により引き起こされる心筋梗塞と共に脳梗塞の増加が危惧されている。心筋梗塞の治療は救急医療体制も含め精力的に取り組まれている。一方、脳梗塞の治療においては脳卒中治療ユニットは未だ充実しておらず、治療法や治療薬に関してもまだ十分とはいえない。この現状をみると脳梗塞の予防、治療さらにはリハビリテーションにおける施設の充実、治療法の確立、患者への啓蒙は医療側が取り組まなければならない課題である。脳梗塞進展のメカニズムが分子生物学的な見地からも検討され、かなりの部分ま

で解明されてきた。その研究から得られた結果から数種類の脳梗塞急性期の治療薬が開発された。非臨床試験ではかなり期待できる候補品が数多く見いだされたが、臨床試験での結果はあまりよいものではなかった。非臨床試験での結果と臨床試験とのそれとの間のギャップの深さを再認識するものである。非臨床試験での薬効の評価は主にラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて検討されてきた。中大脳動脈を電気凝固して閉塞するモデル¹⁾、フィラメントを内頸動脈から中大脳動脈起始部へ挿入し閉塞するモデル²⁾、中大脳動脈の内皮を光増感反応で傷害することにより血栓を形成させて閉塞するモデル^{3, 4)}がある。これらのモデルはそれぞれ特徴を持っているが、患者における薬効を予測するためにはこれらのモデルでの評価だけでは十分ではないことが、臨床試験の結果から示唆された。

ポジトロン エミッション トモグラフィ(PET)は脳血流や脳代謝の変化を経時的に検討することでできる手段の1つである。脳内のある部分の血流や代謝の経時的な変化を観察できることは脳梗塞へ進展していく過程を研究するためには大変有用であり、さらには神経保護薬の薬効評価にも大いに役立つと思われる。PET を用いた脳梗塞の病態生理的な研究は今までの多くのものが行われており^{5, 6)}、動物脳梗塞モデルにおける PET スタディは脳虚血急性期の病態を解明するのに大変有用である。今までに、サルあるいはネコにおける脳虚血モデルにおいて、脳虚血あるいは虚血再灌流の脳血流や脳代謝への影響を研究した報告はいくつかあるが、神経保護薬の薬効評価を PET を用いて検討した研究はほとんどない。

そこで今回は、動物の中ではラットよりヒトに近いと思われるサルを用いて、脳梗塞へ進展していく過程を PET により経時的に検討することを目的にした。まず、サルの中大脳動脈を永久閉塞するモデルと一時閉塞後に再開通させるモデルを用いてそれぞれのモデルにおける局所脳血流量や脳代謝の変化を経時的に観察し、それぞれのモデルの特徴を検討した。さらに、このモデルにおけるFK506 の効果を検討し、サル脳虚血モデルにおいて PET スタディで薬効評価が可能かどうかを検討した。FK506 は免疫抑制薬として開発された薬剤である。最近の研究で培養神経細胞や局所脳虚血モデルにおいて神経細胞保護作用が報告されている。この作用メカニズムに関しては未だはっきりしていないが、NO 産生抑制⁷⁾、ライアノジン・IP3 受容体複合体抑制⁸⁾、好中球ラジカル産生抑制⁹⁾、抗アポトーシス作用¹⁰⁾ が関与していることが報告されている。

2. 方法

2-1 動物モデル作成

カニクイザルを用いて実験を行った。高松ら⁶⁾ が報告した方法で行った。気管挿管しイソフルレン麻酔をし人工呼吸下にて実験を行った。経眼窩的に頭蓋底をドリルで削り右の中大脳動脈を明視下においた。硬膜を切開し中大脳動脈の血流を遮断するためにクリップをかけた。永久閉塞モデルではそのクリップはそのままとした。一時虚血モデルではクリップは閉塞後3時間に取り除き血流を再開通させた。

2-2 PET スタディ

PET スタディは解像度は 2.6 mm の浜松ホトニクス社製の SHR7700 で行った。1頭において4回測定した。永久閉塞モデルでは1：中大脳動脈を閉塞する前、2：閉塞後2時間、3：閉塞後4時間、4：閉塞後6時間である。一方、一時閉塞モデル(閉塞後3時間に再開通)では1：中大脳動脈を閉塞する前、2：閉塞後2時間、3：再開通直後、4：再開通後3時間である。PET スタディで評価した項目は局所脳血流量、酸素摂取率、酸素消費率である。局所脳血流量、酸素摂取率、酸素消費率是对応する健常側の値と比較して算出した。

2-3 FK506 の投与

FK506 は 0.25 ml/kg で調整した薬液を 0.1 mg/kg 投与した。FK506 の脳梗塞への効果は一時閉塞モデルを用いて検討した。FK506 は中大脳動脈閉塞直後に静脈内へボラスにて投与された。

2-4 病理組織作成

中大脳動脈閉塞後 8 時間にペントバルビタール麻酔下に脳を 10% フォルマリンで経心臓的に灌流固定した。脳を取り出し 12 枚の 2 ミリ厚の横断面の切片を作りパラフィン包埋した。そこから 10 マイクロの切片を切り出しヘマトキシリンエオジン染色をした。染色した切片を用いて脳梗塞の面積を算出した。

3. 結果

3-1 永久閉塞モデルと一時閉塞モデル

永久閉塞モデルでは中大脳動脈支配領域の脳血流量の低下が見られた。特に、基底核領域の低下が強かった。その低下は閉塞 6 時間後まで持続した。一方、酸素摂取率の上昇は血流の低下領域に見られ、その上昇は持続した。しかし、もっとも上昇した領域は皮質であった。酸素消費率は基底核領域で低下した。病理学的検討では梗塞の広がり基底核領域を中心として見られ、皮質領域にはあまり見られなかった。酸素消費率の低下と病理学的検討による梗塞の広がりによく相関した。

一時閉塞モデルにおける閉塞後 3 時間後、再開通直後の虚血で低下した領域の脳血流量は逆に上昇を見せた。しかし、再開通後 3 時間には再び血流は低下した。酸素摂取率は虚血中には上昇が見られたが、再開通直後には低下しその後も低下したままであった。酸素消費率は虚血中は低下したが、再開通後いったん少し回復したが再び低下した。皮質領域に低下が強かった。病理学的検討による梗塞に広がり永久閉塞モデルとは異なり皮質領域まで広がっていた。この広がり酸素消費率の低下とよい相関が得られた。

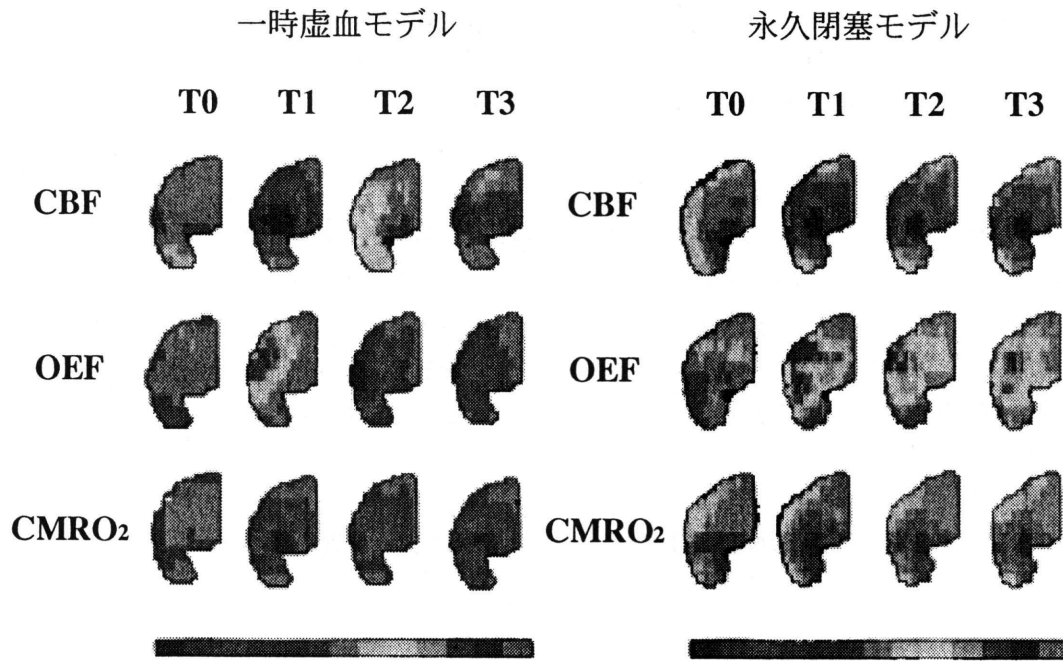
3-2 FK506 の脳梗塞縮小効果

虚血直後に投与された FK506 は虚血中の脳血流量および再開通後の血流量の一過性の上昇への影響はほとんど見られなかった。FK506 は虚血中及び再開通後の酸素消費率の低下を抑制した。再開通後の低下抑制作用がより強かった。病理学的検討では FK506 は皮質領域に見られた梗塞の広がりを抑制した。

4. 考察

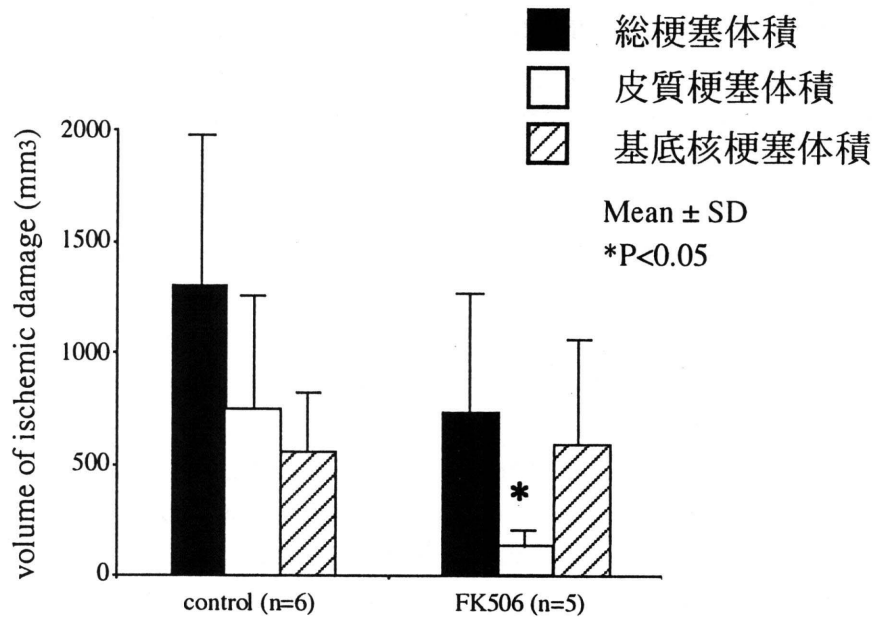
今回の実験では永久閉塞モデル及び一時閉塞モデルにおける局所脳血流量の変化や局所酸素代謝の変化を経時的に観察することができた。この変化が脳梗塞進展に関わっていることを推察できた。酸素消費率は神経細胞の活動を反映しているといわれており、今回の実験においても酸素消費率の低下した領域は病理学的検討における梗塞の広がりによく相関していた。一時閉塞モデルにおける酸素消費率の低下した領域は虚血中は基底核領域であったが、再開通後に低下領域は皮質領域へと拡大していった。この結果を考えると、基底核領域は虚血中心で虚血早期から神経細胞に障害が及んでおり、再開通することによる虚血・再灌流傷害は皮質部におこり梗塞が皮質へと広がったことが考えられる。PET スタディによって経時的な梗塞の進展過程を観察できることは病態の解明や薬物の作用メカニズムを解析するのに大変有用となる。

典型的な PET 画像



T0: 中大脳動脈閉塞前 T1: 閉塞後 2 時間
 T2: 再開通直後 (一時虚血モデル) 閉塞後 4 時間 (永久閉塞モデル)
 T3: 再開通後 3 時間 (一時虚血モデル) 閉塞後 6 時間 (永久閉塞モデル)

病理組織学的検討による FK506 の梗塞縮小効果



FK506 は病理学的検討にて皮質領域の梗塞の広がりを抑制した。FK506 は虚血中および再開通後の酸素消費率の低下を抑制した。また、その低下抑制作用は再開通後の方が強かった。このことから、FK506 の梗塞縮小効果は虚血・再灌流傷害に対しての保護作用が大きく関与していることが示唆された。このことから PET スタディによって in vivo における FK506 の作用メカニズムが示唆され、薬効評価において PET スタディは大変有用な手段の1つと思われた。

5. 終わりに

今回の実験では PET スタディによって脳梗塞進展の過程が検討できることを示した。PET スタディは薬剤の in vivo における作用メカニズムの解明に大変有用な手段の1つと思われる。サル脳虚血モデルにおける病態がヒトの病態に近いかどうかは明確ではない。ラットモデルにおける薬効評価に限界があるのではといわれてきている現状では、よりヒトに近い種であるサルを用いたモデルにおける病態解明や薬効評価の検討はヒトへの予測をよりよくするために検討しておかなければならないと思う。

この研究の一部は、科学技術振興調整費目標達成型脳科学研究推進制度からの研究費によって実施した。

文献

- 1) Tamura A, Graham D.I., McCulloch J., Teasdale G.M: Focal cerebral ischemia 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)
- 2) Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R: Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**, 84-91 (1989)
- 3) Shimakura A, Kamanaka Y, Ikeda Y, Kondo K, Suzuki Y, Umemura K: Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* **858**, 55-60 (2000)
- 4) Umemura K, Gemba T, Mizuno A, Nakashima M: Inhibitory effect of MS-153 on elevated brain glutamate level induced by rat middle cerebral artery occlusion. *Stroke* **27**, 1624-1628 (1996)
- 5) Touzani O, Young AR, Derlon JM, Beaudouin V, Marchal G, Rioux P, Mézence F, Baron JC, MacKenzie ET: Sequential studies of severely hypometabolic tissue volumes after permanent middle cerebral artery occlusion. A positron emission tomographic investigation in anesthetized baboons. *Stroke* **26**, 2112-2119 (1995)
- 6) Takamatsu H, Tsukada H, Kakiuchi T, Nishiyama S, Noda A, Umemura K: Detection of reperfusion injury using positron emission tomography in a monkey model of cerebral ischemia. *J Nucl. Med* in press (2000)
- 7) Dawson TM, Steiner JP, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH: Immunosuppressant, FK506, enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9808-9812 (1993)
- 8) Chen SRW, Zhang L, MacLennan DH: A symmetrical blockade of the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) by 12 kDa FK506 binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11953-11957 (1994)
- 9) Nishinaka Y, Sugiyama S, Yokota M, Saitoh H, Ozawa T: Protective effect of FK506 on ischemia/reperfusion-induced myocardial damage in canine heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **21**, 448-454

(1993)

- 10) Herr I, Martin-Villalba A, Kurz E, Roncaioli P, Schenkel J, Cifone MG, Debatin KM: FK506 prevents stroke-induced generation of ceramide and apoptosis signaling. *Brain Res* **826**, 210-219 (1999)

Abstract-Investigation for effects of neuroprotective agents in monkey cerebral ischemia using positron emission tomography. Umemura K., Department of Pharmacology, Hamamatsu University School of Medicine, 3600 Handa-cho, Hamamatsu 431-3192, Japan

Folia Pharmacol. Jpn. (Nippon Yakurigaku Zasshi) **116**, Suppl 1, 58P~63P (2000)

We investigated effect of a neuroprotective agent, FK506 in monkey cerebral ischemia using positron emission tomography (PET). The right middle cerebral artery (MCA) of cynomolgus monkeys was occluded for 3 hours or permanently by a transorbital device. Four consecutive PET studies were performed to assess cerebral blood flow (CBF), oxygen extraction fraction (OEF), and the cerebral metabolic rate of oxygen (CMRO₂). For investigating effect of FK506 in transient ischemic model, FK506 was injected just after the MCA occlusion. The extent of necrotic brain damage 8 hours after MCA occlusion was significantly greater in the transient model than in the permanent model. Cortical damage was greater in the transient model. The MCA occlusion decreased CBF and CMRO₂ in deep MCA territory, and increased OEF in the cortex. In the permanent MCA occlusion model, these changes continued throughout the experiment. In the transient model, the reperfusion induced post-ischemic hyperperfusion in the cortex, which showed necrotic damage at the end of the experiment. In this area, OEF and CMRO₂ were decreased by reperfusion. FK506 significantly reduced infarct volume, especially in the cortex. In PET studies, FK506 prevented the reduction of CMRO₂ during ischemia and after reperfusion, which was greater than that during ischemia. The present results suggest that reperfusion may strongly contribute to cortical brain damage. PET studies revealed a peculiar OEF and CMRO₂ decrease in the cortex immediately after reperfusion, which may be an indicator of reperfusion injury, and that reperfusion injury may be caused by excessive hyperperfusion. FK506 has a neuroprotective action, especially in reperfusion injury.

Key words: positron emission tomography, monkey, ischemic model, reperfusion injury, FK506