

実験的ウサギ脳血管攣縮における tropolone 誘導体、U88999E の有効性

高橋州平、Neal F. Kassell*, 戸島雅彦、Douglas A. Dougherty*
Kevin S. Lee*

Effect of Tropolone Derivative, U88999E on Experimental Cerebral Vasospasm in Rabbits

Shuhei TAKAHASHI M.D., Neal F. Kassell M.D., Masahiko TOSHIMA M.D., Douglas A. Dougherty B.A.,
Kevin S. Lee Ph.D.

Department of Neurosurgery, Nakamura Memorial Hospital, Sapporo Japan and

*Department of Neurological Surgery, University of Virginia Health Sciences Center, Charlottesville, Virginia, USA.

Abstract : U88999E, 7- [4- (4,4' difluorobenzhydryl) piperazino -1- methyl] -4- isopropyl -2- methoxy -2,4,6- cycloheptatrien -1- one hydrochloride, is a recently - developed tropolone derivative which inhibits lipid peroxidation and calcium entry. The effects of U88999E on basilar artery tone were examined in two model systems: 1) an in vitro preparation of arterial rings which measures isometric tension and, 2) an in vivo model of cerebral vasospasm measuring arterial diameter. U88999E elicited a dose - dependent relaxation of precontracted arterial rings maintained in vitro. Ring preparations were precontracted with elevated potassium (KCl; 40 mmol/L), uridine triphosphate (UTP; 10^{-3} mol/L); or endothelin - 1 (ET-1; 10^{-8} mol/L); U88999E reversed these constrictions across a concentration range of 10^{-8} to 10^{-5} mol/L. The potency of U88999E for relaxing precontracted vessels was slightly less than that observed for flunarizine or diltiazem. A dose - dependent, relaxing effect of U88999E on KCl - induced contractions was observed in the presence of calcium concentrations ranging from 0.03 to 20 mmol/L. Intravenous injections of U88999E inhibited vasospasm of basilar arteries following subarachnoid hemorrhage in a dose - dependent manner. Animals receiving intraperitoneal injections of U88999E also exhibited a tendency for reduced vasospasm; however, this effect did not achieve statistical significance. These findings suggest that U88999E may be useful in the prevention of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage.

Key words :

- Calcium antagonist
- Cerebral vasospasm
- Lipid peroxidation
- Rabbit
- Subarachnoid hemorrhage
- U88999E

1. はじめに

破裂脳動脈瘤のくも膜下出血 (SAH) による脳血管攣縮は術後の神経脱落症状や死亡の原因として重要である^{10) 15) 16) 32)}。病理組織学的には脳血管攣縮は酸素フリーラジカルの生成と脂質過酸化に強く関連している。スーパーオキサイドアニオンラジカルは Haber - Weiss 反応に

よって脂質過酸化を引き起こし^{1) 23)} 過酸化脂質は脳動脈の収縮と形態学的損傷を引き起こすと考えられている¹⁷⁾²⁴⁾。この機序で重要なことは、くも膜下出血の患者では脳血管攣縮の程度が脳脊髄液中の過酸化脂質の濃度と相関することである^{1) 23) 33)}。

これらの所見は抗過酸化物質とフリーラジカスカベンジャーがくも膜下出血によって引き起こる血管攣縮の

治療に有効であることを示唆している。この方法による治療の可能性は近年のいくつかの実験によって支持されている¹¹⁾¹⁸⁾。鉄依存性脂質過酸化の阻害剤である21-aminosteroid (tirilazad mesylate) は霊長類¹³⁾¹⁴⁾²⁵⁾やウサギ³¹⁾³⁷⁾のくも膜下出血のモデルで脳血管攣縮を抑制することが知られている。これらの結果はより強力な脂質過酸化の阻害剤の開発を促している。U88999E、7-[4-(4,4'-difluorobenzhydryl) piperazino-1-methyl]-4-isopropyl-2-methoxy-2,4,6-cycloheptatrien-1-one, hydrochloride は最近開発された tropolone 誘導体で脂質過酸化阻害作用を持ち、その作用は tirilazad mesylate より強力で、更にフルナリジンに類似したカルシウム拮抗作用を有している (M. Kuniyama, unpublished results, Upjohn Laboratories, Tsukuba, Japan)。今回の研究は脳底動脈の張力とくも膜下出血後の脳血管攣縮の発生に対する効果を確かめるために行われた。

2. 対象および方法

1) 脳底動脈リングを用いた in vitro における張力測定

体重2.9から3.6 kgの成熟雄 New Zealand white rabbit を用い、ketamine (40 mg/kg) と xylazine (8 mg/kg) の混合液を筋注して麻酔を行い、大腿動脈より脱血死させた。脳底動脈を付けたまま脳を取り出し、クレブス液 (mmol/L: NaCl 120; KCl 4.5; MgSO₄ 1.0; NaHCO₃ 27.0; KH₂PO₄ 1.0; CaCl₂ 2.5; and dextrose 10.0) に満たされた血管剝離用の容器に置いた。脳底動脈を顕微鏡下に剝離し、3 mmの長さの動脈リングとなるよう4つの segment に切った。

各々の動脈リングを2本のL型のステンレススチール製の棒にて懸垂し、10mlのクレブス液で満たされたマグナス管の中に入れ、95% O₂と5% CO₂の混合ガスで通気してpHを7.4から7.5の間に設定した。等尺張力測定はGrass FT. 03 forced displacement transducer (Grass Instrument, Co., Quincy, Massachusetts) と Soltec 3418 chart recorder (Soltec Corp., San Fernando, California) を用いて記録した。血管試料は薬物投与前に90分間37℃にて平衡状態にし、静止張力を400 mgに設定した。各々の標本が適切な収縮力を有していることを確認するため、まず初めに40 mmol/L KClにて収縮を確認し、この操作を二度繰り返した。弛緩反応を見るために、動脈を40 mmol/L KCl, 10⁻³ mol/L uridine 5'-triphosphate

(UTP) または10⁻⁸ mol/L endothelin-1 (ET-1)にて収縮させた。収縮が安定した後、用量反応曲線を得るためにU88999E (10⁻⁸ から10⁻⁵ mol/L)を累積的に投与した。各々の濃度のU88999Eを投与する際、弛緩反応が平衡状態になったのを確認した後、次の濃度の薬剤を投与した。この実験の最後には10⁻⁴ mol/L papaverineを投与し、U88999Eによって得られた弛緩反応は、10⁻⁴ mol/L papaverineによって得られた最大弛緩反応の百分率にて表示した。

代表的カルシウム拮抗剤である flunarizine, verapamil, nifedipine, diltiazem と nicardipine の弛緩反応をU88999Eと同様に調べた。脳底動脈を40 mmol/L KClにて収縮させ、収縮が安定した後、flunarizine (10⁻⁹-10⁻⁵ mol/L), verapamil (10⁻⁹-10⁻⁶ mol/L), nifedipine (10⁻¹⁰-10⁻⁷ mol/L), diltiazem (10⁻⁸-10⁻⁵ mol/L) または nicardipine (10⁻¹¹-10⁻⁸ mol/L)を累積的に投与し、用量反応曲線を得た。この実験の最後には10⁻⁴ mol/L papaverineを投与し、各カルシウム拮抗剤によって得られた弛緩反応は10⁻⁴ mol/L papaverineによって得られた最大弛緩反応の百分率にて表示した。

高濃度カリウム溶液による収縮に対するU88999Eの効果は、0.03から20 mmol/LのCaCl₂の存在下で調べた。これらの実験では、カルシウムの沈澱を防ぐためにクレブス液の代わりにHEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 溶液を用いて、100% O₂にて通気した。動脈リングは0.5 mmol/L EGTA (ethyleneglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid) を含むCa²⁺-free HEPES溶液中に10分間おき、次にK⁺-rich (60 mmol/L), Ca²⁺-free HEPES溶液に20分間おいた。ここでU88999Eを投与しない状態でCaCl₂の用量反応曲線を得るために0.03から20 mmol/LのCaCl₂を累積的に投与した。最大収縮を得た後、HEPES溶液にてよく洗浄し、30分間平衡状態を保った。以後、3×10⁻⁷ または1×10⁻⁶ mol/LのU88999Eの存在下で同様の実験を行った。但し、U88999EはCaCl₂を投与開始する15分前に加えた。

Flunarizine, verapamil, nifedipine, diltiazem, nicardipine, endothelin-1, uridine 5'-triphosphate, EGTA, HEPES と papaverine は Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA) より入手した。これらの薬剤のほとんどは蒸留水にて溶解して貯蔵用の溶液を作成した。マグナス管内に加える最終投与量は0.1 ml以下とした。

Nifedipine (10^{-2} mol/L)と flunarizine (10^{-2} mol/L)は初めに95%エタノールに溶解し、遮光して保存した。これらの薬剤投与におけるマグヌス管内のクレブス液中でのエタノールの最高濃度は0.1%以下になるようにした。U88999Eは Upjohn Laboratories - Tsukuba, Japan より供給して頂いた。

大部分の実験は上記の如くクレブス液中で行った。HEPES 溶液を用いた実験では、クレブス液中の27 mmol/L NaHCO_3 と1.0 mmol/L KH_2PO_4 の代わりに10 mmol/L HEPESを使用した。 Ca^{2+} - free HEPES 溶液は HEPES 溶液より CaCl_2 を除いて作成した。 K^+ - rich, Ca^{2+} - free HEPES 溶液は Ca^{2+} - free HEPES 溶液と等モル価となるように NaCl を減らし、 KCl が60 mmol/L KCl となるよう作成した。クレブス液を除くこれらの溶液は NaOH にて37℃の下で pH を7.4に調整してから用いた。

2)SAH 後の脳底動脈径の測定

実験動物の準備および方法

体重3.1から3.7kgまでの120匹の成熟雄 New Zealand white rabbit を無作為に9から13匹ずつ9群に分けた (Table 1)。Control 群は SAH のない正常なウサギとした。他の8群では SAH を作成し、48時間後に灌流固定した。SAH 群は以下の如くである。a) untreated 群は

SAH があり、薬剤投与を受けていない。b) U88999E の腹腔内投与を受けた群は2群あり、1.0 mg/kg (Low IP 群; n=11)ないしは3.0 mg/kg (High IP 群; n=10)を投与した。U88999E の腹腔内投与は SAH 作成の12時間前に開始し、12時間毎に合計6回の投与を行った。c) 静脈内投与群は2つのシリーズに分けた。“Series 1”は0.3 mg/kg (Low IV-1 群; n=13), 1.0 mg/kg (Med IV-1 群; n=11)または3.0 mg/kg (High IV-1 群; n=10)の U88999E を SAH 作成の8時間前に投与開始し、8時間毎に合計8回の投与を行った。最終投与は灌流固定の30分前に行った。“Series 2”は1.0 mg/kg (Med IV-2 群; n=9)または3.0 mg/kg (High IV-2 群; n=10)の U88999E を SAH 作成の8時間前に投与開始し、8時間毎に合計7回の投与を行った。最終投与は灌流固定の8時間前に行った。全ての投与において、U88999E は5% glucose 溶液に溶解し、使用前は遮光して4℃で保存した。

全ての動物に対し ketamine (40 mg/kg)と xylazine (8 mg/kg)の混合液の筋肉内投与にて麻酔した後、気管内挿管し、pancuronium bromide を control 群には0.3 mg/kg、他の8群には0.03 mg/kg 静脈内投与して筋弛緩させ、Harvard rodent respirator (Model 683, Harvard Apparatus Co., South Natick, Massachusetts, USA)で人工呼吸させた。各々の動物の中心耳動脈を確保し、自家血を採取した。Control 群の動物では、動脈血圧を持続

Table 1
Design of Groups

Group	Description
Control	Controls without SAH ^a
Untreated	SAH without treatment
Intraperitoneal Injection	SAH and intraperitoneal administration of U88999E every 12 hours, starting 12 hours prior to induction of SAH, for a total of six doses
Low IP	Low dose (1.0 mg/kg)
High IP	High dose (3.0 mg/kg)
Intravenous Injection - 1	SAH and intravenous administration of U88999E every 8 hours, starting 8 hours prior to induction of SAH, for a total of eight doses
Low IV-1	Low dose (0.3 mg/kg)
Med IV-1	Medium dose (1.0 mg/kg)
High IV-1	High dose (3.0 mg/kg)
Intravenous Injection - 2	SAH and intravenous administration of U88999E every 8 hours, starting 8 hours prior to induction of SAH, for a total of seven doses
Med IV-2	Medium dose (1.0 mg/kg)
High IV-2	High dose (3.0 mg/kg)

^a SAH, subarachnoid hemorrhage.

的にモニターし、動脈血ガス分圧を blood gas analyzer (Model 278, Ciba - Corning Diagnostics Corp., Medfield, Massachusetts)にて定期的に測定した。動脈血 pO_2 と pCO_2 が生理的状态に維持されていることを確かめた後、Control 群の動物を灌流固定した。他の 8 群の動物には経皮的に 23-gauge butterfly needle を大後頭孔に挿入し、中心耳動脈より採取したヘパリンを加えていない 5 ml の自家血を 10 秒以上かけて注入し SAH を作成した。その後、重力にて脳底槽に血液が溜まるように 15 分間動物の頭位を下げた。動物の自発呼吸が回復した時点で人工呼吸器をはずし、完全に覚醒した後に抜管し、ケージに戻した。この実験では SAH を作成した日を Day 0 とした。

灌流固定

全群の動物に対し灌流固定を行った。SAH 後の Day 2 に前述と同様に動物を再度麻酔し、気管内挿管下に人工呼吸し、pancuronium bromide (0.3 mg/kg) の静脈内投与にて筋弛緩させた。動脈血圧を記録するために中心耳動脈を確保し、この動脈ラインを三方活栓を通して圧トランスデューサーに接続した。動脈血ガス分圧を測定し、動脈血中の pO_2 と pCO_2 が生理的範囲になるように人工呼吸を調節した。麻酔下でこれらのパラメーターが満たされた後、胸部を開け、そしてカニュレを左心室に留置した。その直後に右心耳を開放し、下行大動脈をクランプした。引き続き 37°C の下で pH を 7.4 に調整した 300 ml の Hanks' balanced salt solution (HBSS, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) で心循環器系を洗い流した後、500 ml の 1% paraformaldehyde と 1.5% glutaraldehyde fixative を含む HBSS (37°C 下で pH 7.4) を灌流させ固定した。全群において灌流は 75 mmHg の圧で行った。灌流固定後、脳を摘出し、同じ固定液の入った容器の中に入れ、 4°C にて一晩保存した。不完全なくも膜下血腫を呈するものや脳血管奇形を有する動物はこの時点で本研究の対象より除外した。

包埋

固定後、脳底動脈を注意深く剝離し、近位側 1/3 の部位で 2 mm の長さ に切った血管標本を作成した。この血管標本を 0.1 mol/L phosphate buffer にて数回洗浄し、室温下で 1 時間 1% osmium tetroxide を含む 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.4) にて固定し、そして phos-

phate buffer で再度洗浄した。更に ethylalcohol solutions と propylene oxide にて脱水した。標本を propylene oxide と Epon 812 embedding medium の混合液の中に入れ一晩置いた。翌日、組織は 100% Epon 812 内に包埋され、48 時間 60°C の下で重合させた。脳底動脈を Reichert Ultracut E ultramicrotome を用いて $0.5 \mu\text{m}$ の厚さに切り、スライドの上に乗せ、そして顕微鏡用に toluidine blue で染色した。

血管径の測定

各々の動物より得られた血管標本より任意に 5 つのセクションを選び、IBAS Image Analysis System (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany) を用いて血管径を測定した。血管内の直径は内弾性板の円周の長さ と内弾性板によって囲まれる領域の面積より算出した。各 5 つのセクションに対し、この測定を 3 回ずつ行った。結局、各脳底動脈の直径は 15 回の測定の平均値として算出した。

3) 統計学的分析

等尺張力測定の実験ではデータは mean \pm standard error of the mean (SEM) で表示した。 Ca^{2+} -free 溶液中の U88999E によって得られた弛緩反応の用量反応曲線の統計学的分析は analysis of variance (ANOVA) の general linear models を用いて行った。 IC_{50} (50% の阻害作用を引き起こす薬剤濃度) は用量反応曲線より算出した。

血管径の測定実験ではデータは mean \pm standard error of the mean (SEM) で表示し、analysis of variance (ANOVA) の後、多重比較として Tukey's test を用いた。血液ガス分圧、体重と平均動脈圧の値の評価は同様に analysis of variance (ANOVA) にて解析した。P の値が 0.05 未満の際に統計学的有意であると判断した。

3. 結 果

1) 脳底動脈リングを用いた in vitro における等尺張力測定

KCl, UTP または ET-1 による収縮に対する U88999E の弛緩作用

U88999E (10^{-8} mol/L から 10^{-5} mol/L) は 40 mmol/L KCl, 10^{-3} mol/L UTP または 10^{-8} mol/L ET-1 によるウ

サギ脳底動脈の収縮に対して用量依存性の弛緩作用を示した (Fig. 1)。U88999E による弛緩作用の IC_{50} 値はそれぞれ 1.8×10^{-7} mol/L (KCl), 3.7×10^{-7} mol/L (UTP), そして 4.2×10^{-7} mol/L (ET-1) であった。

40 mmol/L KCl による収縮に対する U88999E と代表的カルシウム拮抗剤の弛緩作用

40 mmol/L KCl による脳底動脈の収縮に対する U88999E

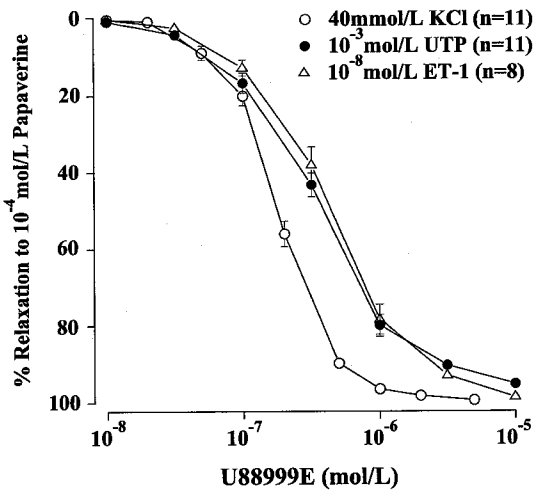


Fig. 1 Effect of U88999E on 40 mmol/L KCl, 10^{-3} mol/L UTP and 10^{-8} mol/L ET-1 induced contraction of rabbit basilar artery. The relaxation effect of U88999E was measured as described in the text. Data are expressed as a percentage of the relaxation induced by 10^{-4} mol/L papaverine. Vertical bars indicate mean \pm standard errors of the mean. The number of experiments is indicated in parentheses.

と各種カルシウム拮抗剤の弛緩作用の用量反応曲線を Fig. 2 に示した。カルシウム拮抗剤の IC_{50} 値はそれぞれ flunarizine (9.6×10^{-8} mol/L), verapamil (4.5×10^{-8} mol/L), nifedipine (5.3×10^{-9} mol/L), diltiazem (9.6×10^{-8} mol/L) そして nicardipine (8.2×10^{-10} mol/L) であった。U88999E の IC_{50} 値は 1.87×10^{-7} mol/L であり、この値は flunarizine や diltiazem よりほんの僅かに弛緩作用が弱いことを示している。

KCl による収縮に対する U88999E の弛緩作用：カルシウム依存性について

K^+ -rich (60 mmol/L), Ca^{2+} -free HEPES 溶液に20分間さらした脳底動脈リングに、0.03 mmol/L から 20 mmol/L の $CaCl_2$ を累積的に投与し用量依存性の収縮が

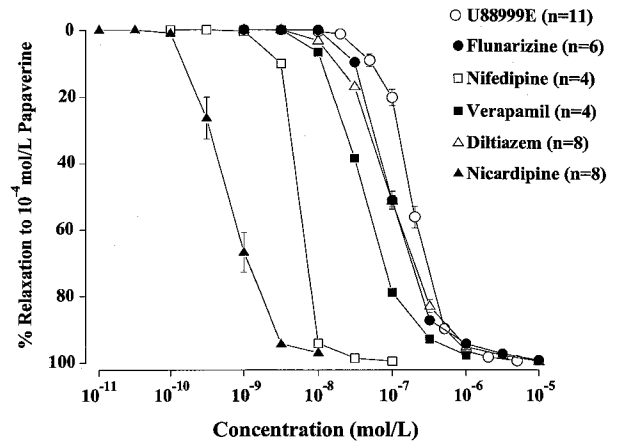


Fig. 2 Effects of U88999E and various calcium antagonists on 40 mmol/L KCl-induced contraction of rabbit basilar artery. The inhibitory effects of U88999E and various calcium antagonists were measured as described in the text. Data are expressed as a percentage of the relaxation induced by 10^{-4} mol/L papaverine. Vertical bars indicate mean \pm standard errors of the mean. The number of experiments is indicated in parentheses.

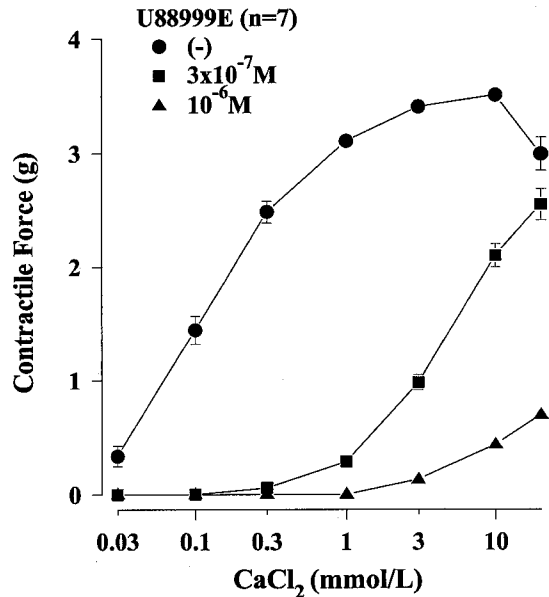


Fig. 3 Effect of U88999E on 0.03 to 20 mmol/L $CaCl_2$ -induced contraction in K^+ -rich, Ca^{2+} -free HEPES solution in control and U88999E incubated rings of rabbit basilar artery. Contractile force (g) was induced by $CaCl_2$ in control (circles) and 3×10^{-7} mol/L (squares) or 1×10^{-6} mol/L (triangles) U88999E incubated rings as described in the text. Vertical bars indicate mean \pm standard errors of the mean. The number of experiments is indicated in parentheses.

得られた (Fig. 3)。U88999E (3×10^{-7} mol/L と 1×10^{-6} mol/L) は CaCl_2 による収縮を用量依存性に阻害した。この効果は統計学的に有意であった (ANOVA, $P < 0.0001$)。

2) SAH 後の脳底動脈径の測定

U88999E の平均動脈圧と動脈血ガス分圧に対する効果

Table 2 に灌流固定時の全群の動物における生理的測定値を示した。体重と動脈血ガス分圧は全群間で有意な差はなかった。平均動脈圧値については High IV-1 群と High IV-2 群では control 群と untreated 群に比べ有意に低下していた ($P < 0.05$; Table 2)。巣症状 (例えば hemiparesis など) を呈した動物は実験完了前に脱血死さ

せた。

SAH と U88999E の脳底動脈に対する効果：質的観察

灌流固定後、厚い血腫が主要脳動脈周囲の脳底部に観察されたのは SAH を作成した動物 110 匹中 85 匹であった (77.3%)。全体的にみると、SAH を作成した動物の脳底動脈は軽度から重度の収縮を呈していた。光顕上、untreated 群 (SAH のみ) の脳底動脈は重度の内径の狭窄と内弾性板の著明な波状を呈していた。U88999E の投与を受けた群の脳底動脈はあらゆる程度の収縮と内弾性板の波状を示した (Table 3)。IP 群の脳底動脈のおおよそ半分は中等度収縮と内弾性板の波状を認めた。Low IV-1 群の半数以上では軽度の収縮と波状を認めたが、High IV-1 群の大部分は波状がなく、正常な構造を

Table 2
Summary of Physiological Parameters^a

Group ^b	n	Body Weight (kg)	MABP ^c (mmHg)	pH	PCO ₂ (mmHg)	PO ₂ (mmHg)
Control	10	3.42±0.05	88.6±3.1	7.50±0.01	41.3±0.6	115.1±8.3
Untreated	11	3.39±0.05	89.6±2.4	7.49±0.02	39.4±1.0	122.9±5.2
Low IP	11	3.51±0.04	75.5±5.1	7.47±0.01	39.7±0.8	124.3±6.7
High IP	10	3.56±0.03	82.5±3.7	7.48±0.01	39.4±0.8	126.4±4.0
Low IV-1	13	3.41±0.05	84.5±2.6	7.46±0.01	41.4±0.8	125.7±5.7
Med IV-1	11	3.42±0.05	76.9±3.1	7.46±0.01	40.1±0.7	125.0±3.4
High IV-1	10	3.44±0.04	55.4±3.9 ^d	7.46±0.01	41.0±0.8	134.6±11.2
Med IV-2	9	3.34±0.02	82.3±2.2	7.51±0.02	40.9±0.8	130.3±4.1
High IV-2	10	3.39±0.03	62.5±3.6 ^d	7.47±0.01	41.1±0.8	118.9±5.1

^a Data are expressed as mean±SEM.

^b See Table 1 for a definition of each group.

^c MABP, mean arterial blood pressure.

^d $P < 0.05$, compared with the control or untreated groups.

Table 3
Morphometric Values of Rabbit Basilar Artery

Group ^a	n	Diameter ^b (μm)	Reduction ^c (%)
Control	10	654±23	
Untreated	11	348±21	47
Low IP	11	392±35	40
High IP	10	410±39	37
Low IV-1	13	411±30	37
Med IV-1	11	440±22	33
High IV-1	10	506±28 ^d	23
Med IV-2	9	498±49 ^d	24
High IV-2	10	510±38 ^d	22

^a See Table 1 for a definition of each group.

^b Data are expressed as mean±SEM.

^c Data are expressed as the percentage of reduction of the control values.

^d $P < 0.05$, compared with the untreated group.

呈していた。IV-2 群の脳底動脈は軽度の収縮を示したものがあつたが、ほとんどの動物では拡張しており内弾性板の波状を認めなかつた。control 群の動物の脳底動脈では収縮を認めず、内弾性板は波状も呈していなかつた。

SAH 後の脳底動脈の攣縮に対する U88999E の効果：量的観察

全群の脳底動脈の平均直径は Table 3 に示した。SAH を受けた全ての群では control 群に比べ直径は小さくなつていた。Control 群の脳底動脈の平均直径は $654 \pm 23 \mu\text{m}$ であつた。Untreated 群 (SAHのみ) では脳底動脈の直径は47%の縮小 ($348 \pm 21 \mu\text{m}$) を示した。U88999E の腹腔内投与を受けた動物の脳底動脈は僅かに収縮は弱かつた。Low IP 群では40%の収縮 ($392 \pm 35 \mu\text{m}$) を、High IP 群では37%の収縮 ($410 \pm 39 \mu\text{m}$) を示した。しかしながら、これらの効果は untreated 群に対して統計学的に有意な差を示さなかつた。

一方、U88999E の静脈内投与を受けた群では SAH の脳底動脈の収縮の程度は軽度であつた (Table 3)。この効果は高濃度の U88999E 投与群で著明であり、High IV-1 群、Med IV-2 群と High IV-2 群では統計学的有

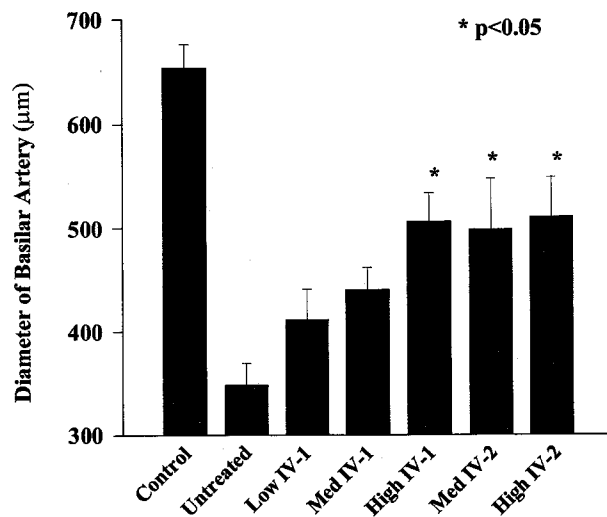


Fig. 4 Diameters of basilar artery for the control, untreated, and intravenous administration groups in the morphometric study. The diameters of basilar artery were measured as described in the text. The abbreviations of the groups are indicated as described in the table 1. Vertical bars indicate mean \pm standard errors of the mean. *, $P < 0.05$ as compared with the untreated group.

意差を認めた ($P < 0.05$; Fig. 4)。Med IV-2 では平均動脈圧と脳底動脈の直径に相関関係はなかつたが、High IV-1 と High IV-2 群では有意に血圧の低い動物の脳底動脈の直径は小さい傾向にあつた。

4. 考 察

SAH 後の脳血管攣縮の病因はまだ論議の余地が残っている。酸素フリーラジカル形成と脂質過酸化が血管病理学と密接な関係にあることは、脳血管攣縮のメカニズムに重要な役割を果たしている可能性を示している¹¹⁾¹⁸⁾。佐野らの仮説では、くも膜下血腫の溶解は鉄、ヘモグロビン減成産物やアラキドン酸の酸化的異化作用によって触媒される酸素フリーラジカル反応によって、結果的に過酸化脂質を供給するとしている²²⁾。この仮説はいくつかの実験的根拠によって支持されている。まず第一に、インキュベートされた赤血球の上清中の過酸化物質の量は上清の血管収縮力と相関する。第二に、脳脊髄液中と動脈壁中の過酸化脂質の濃度は SAH 後に相当量増加する²¹⁾。第三に、水過酸化脂質である 15-hydroperoxyarachidonic acid (15-HPAA) の脳槽内注入は SAH 後にみられる血管攣縮を模擬している²⁴⁾。最後に、過酸化脂質の生成を直後または間接的に減少させる治療は脳血流の増加を促進し、SAH 後の脳血管攣縮を軽減させる²⁶⁾³⁰⁾。総合すると、これらの事実はくも膜下血腫中の赤血球の溶解によって引き起こされる脂質過酸化が脳血管攣縮の進行に関係するという仮説を支持している。

それゆえに抗過酸化活性を持つ物質は脳血管攣縮の治療に有望と考えられる。抗過酸化活性を持つ lazaroid 物質である tirilazad mesylate が治療的效果を有しているとする報告がいくつも見られる⁸⁾⁹⁾¹³⁾¹⁴⁾²⁵⁾³¹⁾³⁶⁾³⁷⁾。今回の研究では tirilazad mesylate とは違う構造をした脂質過酸化阻害剤である tropolone 誘導体、U88999E もまた SAH 後の脳血管攣縮を軽減することを示している。脂質過酸化阻害作用としての U88999E の効果は tirilazad mesylate よりさらに強力である (malondialdehyde assay by thiobarbituric acid test, Upjohn Laboratories, Tsukuba, Japan)。それゆえに脳血管攣縮における U88999E の効果は脂質過酸化阻害作用が重要な部分を占めるようである。これらの知見は脳血管攣縮に対して脂質過酸化を主眼にした治療が有効であることを支持し、また U88999E がこの点に関しては有効と考えられることを示している。

U88999E が脳血管攣縮を軽減するメカニズムは少なくとも2つ考えられる。第一は上述したように脂質過酸化阻害作用である。第二はカルシウム阻害作用である。U88999E の化学構造式は二つの機能的部位、つまり脂質過酸化を阻害する tropolone 環とおそらくカルシウム阻害作用としての活性を持つ flunarizine に類似した部分よりなっている。したがって U88999E のカルシウム阻害作用を発揮する部位もまた脳血管攣縮の軽減に貢献しているかもしれない。等尺張力測定実験では U88999E (10^{-8} から 10^{-5} mol/L) は KCl, UTP および ET-1 によるウサギ脳底動脈の収縮を阻害した。この U88999E の血管拡張作用は flunarizine や diltiazem より僅かに弱かっただけである。

これらの結果はカルシウム阻害作用が U88999E の抗攣縮作用の一部分を占めている可能性を示している。しかしながら、脳血管攣縮の治療薬としてのカルシウム拮抗剤の投与は議論のあるところである。Nimodipine や nifedipine あるいは nicardipine のようなカルシウム拮抗剤は犬^{28) 29) 35)} や猿^{4) 5) 19)} やウサギ²⁰⁾ のくも膜下出血モデルの脳血管攣縮を予防しないことが示されている。これらの結果とは反対に flunarizine によって予防効果を得たとする報告もある⁷⁾。Flunarizine は脳動脈に対して高い親和性を有し²⁾、nimodipine より強い脳保護作用を発揮する³⁴⁾。Van Nueten と Janssens は flunarizine は血圧の低下を来さず、心筋に対する作用を欠くため盗血現象を引き起こすことなく脳血管攣縮の予防に有効であることを示した²⁷⁾。近年、Fujita らは flunarizine がくも膜下出血の患者において脳血管攣縮による重症な神経学的脱落症状の発生を減少させると報告している⁷⁾。血管攣縮に対する flunarizine の作用は細胞内の貯蔵カルシウムの放出の阻害に加え、細胞外カルシウムの細胞内への流入を阻害するためと考えられる¹²⁾。U88999E は flunarizine に類似したカルシウム拮抗剤であり、カルシウムのオーバーロードを軽減すると同様な機序で作用している可能性がある。この作用が本研究で述べたように U88999E による血管攣縮の改善に貢献したと考えられる。

今回の実験では 3.0 mg/kg の U88999E の静脈内投与が有意な血圧低下を引き起こした。IV-1 群では動脈血圧は U88999E の最終投与後に有意に低下した。IV-1 群では薬剤の最終投与は灌流固定の30分前に行われた。そこで我々は灌流固定時の血圧低下への関与を最小限に

するために、薬剤の最終投与を灌流固定の8時間前に行う別の実験群 (IV-2 群) を組んだ。しかしながら、これらの群でも脳血管攣縮の有意な軽減が認められたものの、有意な血圧低下もきたした。カルシウム拮抗剤の投与による血圧の低下は脳血管攣縮の治療に使用する際に重要な問題である。これらの薬剤による autoregulation の障害は血管拡張を期待する治療の障壁となってしまう^{3) 29)}。Fitch らは sodium nitroprusside の脳血管への効果は直接的な脳血管拡張、つまり動脈血圧の低下と autoregulation のメカニズムの障害の程度との総和の結果で決まるとしている⁶⁾。投与する薬剤により血圧や脳血流は異なるため⁶⁾、それらの関係を明確にするために更なる研究が重要である。

5. 結 論

Tropolone 誘導体である U88999E は実験的ウサギくも膜下出血後の脳底動脈の攣縮を減少させた。1.0 から 3.0 mg/kg の U88999E の静脈内投与は脳血管攣縮を用量依存的に軽減した。この薬剤は二つの機能、つまり脂質過酸化阻害作用とカルシウム拮抗作用を有しているが、脳血管攣縮に対するメカニズムを明確にするために更に研究が必要である。しかしながら、本研究の所見より U88999E のような薬剤はくも膜下出血後の脳血管攣縮の改善に対し、治療的効果を有していると考えられる。

本研究の内容は Neurosurgery (32: 281-288, 1993) に発表した論文の日本語訳である。本研究の要旨は、Second World Congress of Stroke (1992年9月8日-12日、Washington DC, USA)、The 3rd International Workshop on Cerebrovascular Surgery (1992年10月17日-19日、東京)、Congress of Neurological Surgeons Annual Meeting (1992年10月31日-11月5日、Washington DC, USA)、第30回日本脳神経外科学会北海道地方会 (1993年3月13日、旭川)、第18回日本脳卒中学会総会 (1993年4月22日-23日、東京)、において発表した。

稿を終えるにあたり、英文論文を御校閲いただいた Sarah B. Hudson, B. S. と岐阜大学脳神経外科の竹中勝信先生ならびに実験に直接協力していただいた Ms. Mana Amirjalali に深謝いたします。

尚、本研究の一部は Upjohn Company の助成と KSL に対する NIH grant #30671 によるものである。

文 献

- 1) Asano T, Tanishima T, Sasaki T, Sano K : Possible participation of free radical reactions initiated by clot lysis in the pathogenesis of vasospasm after subarachnoid hemorrhage, in Wilkings RH (ed) : Cerebral Arterial Spasm. Baltimore, Williams & Wilkins Co, 1980, pp 190-201.
- 2) Bian K, Toda N : Vasodilator actions of flunarizine in isolated dog cerebral and extracerebral arteries. *Japan J Pharmacol* 49 : 83-94, 1989.
- 3) Boisvert DP, Overton TR, Weir B, Grace MG : Cerebral arterial responses to induced hypertension following subarachnoid hemorrhage in the monkey. *J Neurosurg* 49 : 75-83, 1978.
- 4) Espinosa F, Weir B, Overton T, Castor W, Grace M, Boisvert D : A randomized placebo-controlled double blind trial of nimodipine after SAH in monkeys : Part 1. Clinical and radiological findings. *J Neurosurg* 60 : 1167-1175, 1984.
- 5) Espinosa F, Weir B, Shnitka T, Overton T, Boisvert D : A randomized placebo-controlled double-blind trial of nimodipine after SAH in monkeys : Part 2. Pathological findings. *J Neurosurg* 60 : 1176-1185, 1984.
- 6) Fitch W, Pickard JD, Tamura A, Graham DI : Effects of hypotension induced with sodium nitroprusside on the cerebral circulation before, and one week after, the subarachnoid injection of blood. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51 : 88-93, 1988.
- 7) Fujita S, Kawaguchi T, Shose Y, Urui S : Flunarizine treatment in poor-grade aneurysm patients. *Acta Neurochir (Wien)* 103 : 11-17, 1990.
- 8) Gaetani P, Marzatico F, Lombardi D, Adinolfi D, Baena RR : Effect of high-dose methylprednisolone and U74006F on eicosanoid synthesis after subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* 22 : 215-220, 1991.
- 9) Hall ED, Travis MA : Effects of the nonglucocorticoid 21-aminosteroid U74006F on acute cerebral hypoperfusion following experimental subarachnoid hemorrhage. *Exp Neurol* 102 : 244-248, 1988.
- 10) Heros RC, Zervas NT, Varsos V : Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage : An Update. *Ann Neurol* 14 : 599-608, 1983.
- 11) Ikeda Y, Long DM : The molecular basis of brain injury and brain edema : The role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 27 : 1-11, 1990.
- 12) Itoh T, Satoh S, Ishimatsu T, Fujiwara T, Kanmura Y : Mechanisms of flunarizine-induced vasodilation in the rabbit mesenteric artery. *Cir Res* 61 : 446-454, 1987.
- 13) Kanamaru K, Weir BKA, Findlay JM, Grace M, Macdonald RL : A dosage study of the effect of the 21 - amino-steroid U74006F on chronic cerebral vasospasm in a primate model. *Neurosurgery* 27 : 29-38, 1990.
- 14) Kanamaru K, Weir BKA, Simpson I, Witbeck T, Grace M : Effect of 21-aminosteroid U-74006F on lipid peroxidation in subarachnoid clot. *J Neurosurg* 74 : 454-459, 1991.
- 15) Kassell NF, Sasaki T, Colohan ART, Nazar G : Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 16 : 562-572, 1985.
- 16) Kassell NF, Torner JC, Haley EC Jr, Jane JA, Adams HP, Kongable GL : The international cooperative study on the timing of aneurysm surgery. Part 1 : Overall management results. *J Neurosurg* 73 : 18-36, 1990.
- 17) Koide T, Neichi T, Takato M, Matsushita H, Sugioka K, Nakano M, Hata S : Possible mechanisms of 15 - hydroperoxyarachidonic acid - induced contraction of the canine basilar artery in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 221 : 481-488, 1982.
- 18) Macdonald RL, Weir BKA : A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 22 : 971-982, 1991.
- 19) Nosko M, Weir B, Krueger C, Cook D, Norris S, Overton T, Boisvert D : Nimodipine and chronic vasospasm in monkeys : Part 1. Clinical and radiological findings. *Neurosurgery* 16 : 129-136, 1985.
- 20) Pasqualin A, Vollmer DG, Marron JA, Tsukahara T, Kassell NF, Torner JC : The effect of nicardipine on vasospasm in rabbit basilar artery after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 29 : 183-188, 1991.
- 21) Sakaki S, Ohta S, Nakamura H, Takeda S : Free radical reaction and biological defense mechanism in the pathogenesis of prolonged vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 8 : 1-8, 1988.
- 22) Sano K, Asano T, Tanishima T, Sasaki T : Lipid peroxidation as a cause of cerebral vasospasm. *Neurol Res* 2 : 253-272, 1980.
- 23) Sasaki T, Tanishima T, Asano T, Mayanagi Y, Sano K : Significance of lipid peroxidation in the genesis of chronic vasospasm following rupture of an intracranial aneurysm. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 28 : 536-540, 1979.
- 24) Sasaki T, Wakai S, Asano T, Watanabe T, Kirino T, Sano K : The effect of a lipid hydroperoxide of arachidonic acid on the canine basilar artery : An experimental study on cerebral vasospasm. *J Neurosurg* 54 : 357-365, 1981.
- 25) Steinke DE, Weir BKA, Findlay JM, Tanabe T, Grace M, Krushelnycky BW : A trial of the 21-aminosteroid U74006F in a primate model of chronic cerebral vasospasm. *Neurosurgery* 24 : 179-186, 1989.

- 26) Travis MA, Hall ED : The effects of chronic two-fold dietary vitamin E supplementation on subarachnoid hemorrhage-induced brain hypoperfusion. *Brain Res* 418 : 366-370, 1987.
- 27) Van Nueten JM, Janssens WJ : Cerebral antivasoconstrictive effects of flunarizine. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 460 : 42-49, 1988.
- 28) Varsos VG, Liszczak TM, Han DH, Kistler JP, Vielma J, Black PM, Heros RC, Zervas NT : Delayed cerebral vasospasm is not reversible by aminophylline, nifedipine, or papaverine in a two-hemorrhage canine model. *J Neurosurg* 58 : 11-17, 1983.
- 29) Voldby B, Enevoldsen EM, Jensen FT : Cerebrovascular reactivity in patients with ruptured intracranial aneurysms. *J Neurosurg* 62 : 59-67, 1985.
- 30) Vollmer DG, Hongo K, Ogawa H, Tsukahara T, Kassell NF : A study of the effectiveness of the iron-chelating agent deferoxamine as vasospasm prophylaxis in a rabbit model of subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 28 : 27-32, 1991.
- 31) Vollmer DG, Kassell NF, Hongo K, Ogawa H, Tsukahara T : Effect of the nongluocorticoid 21-aminosteroid U74006F on experimental cerebral vasospasm. *Surg Neurol* 31 : 190-194, 1989.
- 32) Wilkins RH : Attempts at prevention or treatment of intracranial arterial spasm : An update. *Neurosurgery* 18 : 808-825, 1986.
- 33) Watanabe T, Sasaki T, Asano T, Takakura K, Sano K, Fuchinoue T, Watanabe K, Yoshimura S, Abe K : Changes in glutathione peroxidase and lipid peroxides in cerebrospinal fluid and serum after subarachnoid hemorrhage : With special reference to the occurrence of cerebral vasospasm. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 28 : 645-649, 1988.
- 34) Wauquier A, Ashton D, Clincke G, Fransen J : Calcium entry blockers as cerebral protecting agents : Comparative activity in tests of hypoxia and hyperexcitability. *Japan J Pharmacol* 38 : 1 - 7 , 1985.
- 35) Zabramski J, Spetzler RF, Bonstelle C : Chronic cerebral vasospasm : Effect of calcium antagonists. *Neurosurgery* 18 : 129-135, 1986.
- 36) Zuccarello M, Anderson DK : Protective effect of a 21 - aminosteroid on the blood-brain barrier following subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* 20 : 367-371, 1989.
- 37) Zuccarello M, Marsch JT, Schmitt G, Woodward J, Anderson DK : Effect of the 21-aminosteroid U-74006F on cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 71 : 98-104, 1989.