

【原著】

脳卒中易発症高血圧自然発症ラットの生存期間に対する
ベラプロストおよびシロスタゾール投与の影響

松下映夫、田中竜介

独立行政法人 水産大学校 食品科学科

(受付：平成 23 年 3 月 9 日)

(受理：平成 23 年 3 月 23 日)

要 旨

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の生存期間に対するベラプロストとシロスタゾール投与の影響を検討した。ベラプロスト投与群 (200 μ g/kg/日) では、有意な SHRSP の生存期間延長効果が確認された。シロスタゾール投与群 (200 mg/kg/日) では有意差はないものの生存期間の短縮傾向が見られた。病理組織学的評価では、脳および心臓において明らかな差異は認められなかったが、腎臓では対照群に軽度から重度の糸球体硬化、尿細管変性、尿円柱、炎症性細胞浸潤および動脈炎等の病理スコアの増加が認められたのに対し、ベラプロスト投与群では統計的に有意な動脈炎スコアの減少と、さらに糸球体硬化スコアの減少傾向が認められた。一方、シロスタゾール投与群では、有意ではないもののすべての病理スコアで増加傾向が認められた。以上より、シロスタゾールとベラプロストでは、SHRSP の生存期間に対する影響に違いがあることが確認され、これらの薬剤の腎保護作用の差が関係していると推察された。

キーワード：脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP)、生存期間、ベラプロスト、シロスタゾール、腎保護作用

序 文

シロスタゾールは、cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 分解酵素である phosphodiesterase (PDE) を阻害することにより細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、血小板凝集抑制作用と血管拡張作用を併せ持つ薬剤であり¹⁾、臨床的には血小板凝集塊を原因とする慢性動脈閉塞症における間歇性跛行や脳梗塞発症後の再発抑制の治療に用いられている。一方で、シロスタゾールは、脳卒中を自然発症するモデルラットである脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat / Izumo : SHRSP) において、その生存期間を有意に短縮させることが示されているが²⁾、その原因は未だ必ずしも明らかにされていない。

プロスタグランジン I₂ (PGI₂) は主として血管内皮細胞で産生され、PGI₂ 受容体を刺激する

ことにより細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、その結果、血小板凝集抑制作用や末梢血管拡張作用、血管内皮細胞保護作用等を発揮する生理活性物質である^{3,4)}。ベラプロストは、PGI₂ の不安定性を改善し、経口投与可能とした PGI₂ 誘導体であり、慢性動脈閉塞症だけでなく肺動脈性肺高血圧症の治療薬として広く臨床で用いられている。ベラプロストは、SHRSP においてシロスタゾールとは異なり生存期間を有意に延長する作用を有することが報告されている⁵⁾。

以上のことから、cAMP の上昇をもたらすことによって血小板凝集抑制作用を示す両薬剤が必ずしも SHRSP の生存期間において同様の挙動を示さず、むしろ逆方向の作用を有する可能性が推察される。しかしながら、両薬剤の影響の検討は、シロスタゾールは混餌投与であるのに対し、ベラプロストは強制経口投与であるな

ど、同一条件下で比較・検討したものではない。そこで本研究では、両薬剤を同一の実験条件で比較し、SHRSP の生存期間に対する影響を確認するとともに、両薬剤の効果に差異があった場合にはその原因の解明を試みた。

実験材料と方法

1. 使用動物

雄性 SHRSP (5 週齢、日本エスエルシー) を購入して実験に供した。飼料は SP 用飼料 (船橋農場) を与え、自由摂餌、自由飲水下で飼育した。薬物投与開始直前 (7 週齢時) に tail-cuff 法 (BP-98、ソフトロン) により血圧を測定して収縮期血圧が 150 mmHg 以上の個体を選抜し、8 週齢より実験に使用した。なお、本研究における動物実験は、「独立行政法人水産大学校動物実験委員会」の管理のもとに「独立行政法人水産大学校動物実験規程」を遵守し適正に実施した。

2. 被験薬

ベラプロストは、ドルナー錠 (東レ) から抽出したものを蒸留水に溶解し 50 μ g/mL 溶液を調製し、投与薬液とした。シロスタゾールは、プレタール錠 100 (大塚製薬) より抽出したものを 0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液に 50 mg/mL となるよう懸濁し、投与薬液とした。

3. 群分けおよび薬物投与

ラットは、7 週齢時の収縮期血圧ならびに体重に基づき均等になるように、対照群 (蒸留水投与)、ベラプロスト投与群 (200 μ g/kg/日) およびシロスタゾール投与群 (200 mg/kg/日) の 3 群に群分けした。ラットは、8 週齢よりベラプロスト投与薬液あるいはシロスタゾール投与薬液を 1 日 2 回 (午前、午後)、強制経口投与した。投与容量は 2 mL/kg とし、午前、午後の投与間隔は 6 時間以上とした。

4. 生存期間観察試験

1 群あたり 24 ~ 27 匹のラットを用いて、生

存期間観察試験を実施した。生存観察は薬物投与時に併せて行った。生存期間は、死亡個体の発見日を死亡日として日単位で解析した。生存期間観察試験は、対照群の生存率が 20% 以下になるまで継続した。

5. 病理組織学的評価試験

1 群あたり 15 匹のラットを用いて、病理組織学的評価試験を実施した。ラットは、14 週齢時にエーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈から放血致死させ、脳、心臓および腎臓を採取した。摘出した臓器は、10% リン酸緩衝中性ホルマリン液に浸漬した後、パラフィン包埋した。作製した薄切切片について Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い鏡検した。鏡検の結果は、各評価項目について、異常なし; スコア 0、軽度の障害; スコア 1、中等度の障害; スコア 2、重度の障害; スコア 3、の 4 段階でスコア化した。

6. データ解析

統計解析には SAS System Version 8.2 (SAS 前臨床パッケージ Ver. 5.0、SAS Institute) を使用した。生存期間の解析は、死亡をイベントとして Kaplan-Meier 法ログランク検定を行った。病理組織学的評価については、Dunnett 型多重比較検定 (ジョイントランキング法) を行った。

結果

1. 生存期間観察試験

生存期間観察試験は、対照群の生存率が 20% 以下となった投与開始 25 週時 (ラット週齢: 33 週齢) で終了し、その時点で生存していた個体は打ち切り例として扱った。各群のラットの生存分布関数曲線を図 1 に示した。最終的な死亡例はそれぞれ、対照群: 24 例中 20 例、ベラプロスト投与群: 24 例中 10 例およびシロスタゾール投与群: 27 例中 24 例であった。平均寿命はそれぞれ、対照群: 21.5 週齢、ベラプロスト投与群: 24.7 週齢およびシロスタゾール投与群: 17.8 週齢であった。ベラプロスト投与群のラットは、対照群に比べて統計的に有意に生存期間が延長していた ($P < 0.005$)。シロスタゾー

ル投与群ではベラプロスト投与群で示された生存期間延長は認められず、逆に有意ではないものの生存期間は対照群に対して短縮傾向にあった。

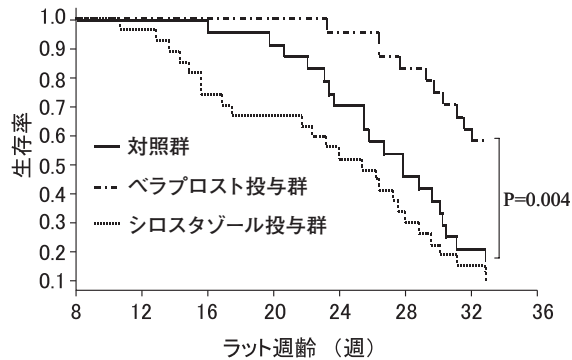


図 1 SHRSP の生存期間に対するベラプロストおよびシロスタゾール投与の影響

1 群あたり 24 ~ 27 匹の 8 週齢 SHRSP を用い、対照群 (蒸留水投与) の生存率が 20 % 未満となるまでベラプロスト (200 μ g/kg) またはシロスタゾール (200 mg/kg) を 1 日 2 回、強制経口投与した。対照群とベラプロスト投与群の間に有意差がみとめられた (ログランク検定; $P=0.004$)。

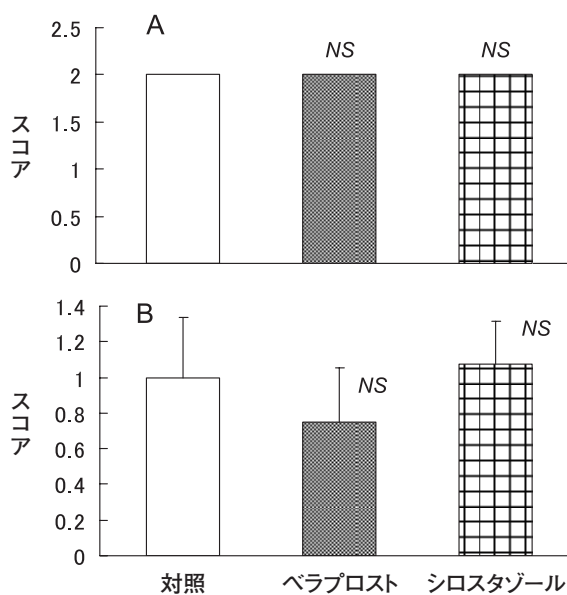


図 2 SHRSP の脳組織の病理組織評価スコア
8 週齢 SHRSP を用い、蒸留水 (対照)、ベラプロスト (200 μ g/kg) またはシロスタゾール (200 mg/kg) を 1 日 2 回、6 週間強制経口投与した後、脳組織を採取し病理組織学的評価を実施した。病変の項目毎に、悪化の程度を 0、1、2、3 の 4 段階でスコア化し、各群の平均値と標準誤差を求めた (パネル A; 空胞化、パネル B; 軟化)。対照群 10 例、ベラプロスト投与群 12 例およびシロスタゾール投与群 13 例。NS は対照群との有意差が無いことを示す。

2. 病理組織学的評価試験

剖検時 (14 週齢) までの死亡例は、対照群: 15 例中 5 例、ベラプロスト投与群: 15 例中 3 例、および、シロスタゾール投与群: 15 例中 2 例であった。脳組織において、対照群では髄質の空胞化および脳軟化が観察された (図 2)。また、心臓においては、対照群では動脈炎、炎症性細胞浸潤および心筋の変性・壊死が認められた (図 3)。これらの組織では、対照群と両薬剤の投与群間で明らかな差異は認められなかった (図 2、3)。腎臓については、対照群では、図 4A の組織写真に典型例を示したように、全例で糸球体硬化、尿細管変性、尿細管内円柱、炎症性細胞浸潤および動脈炎などの病変が認めら

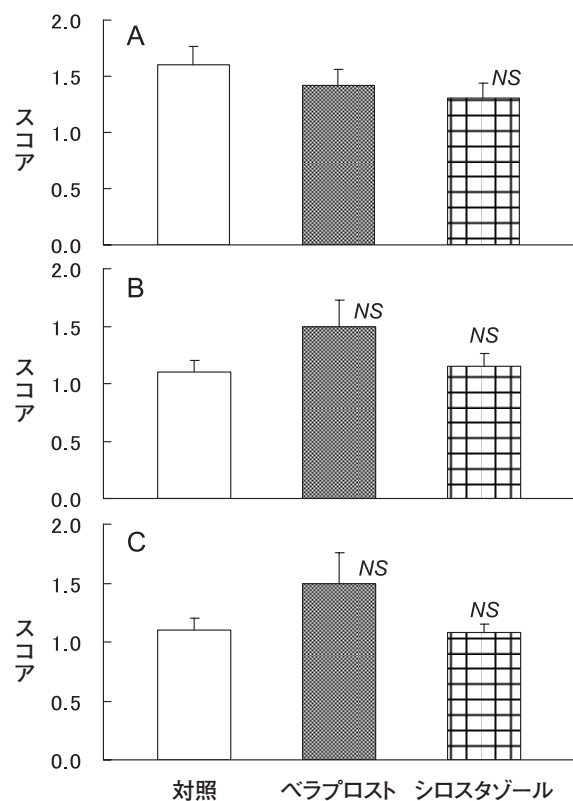


図 3 SHRSP の心臓の病理組織評価スコア
8 週齢 SHRSP を用い、蒸留水 (対照)、ベラプロスト (200 μ g/kg) またはシロスタゾール (200 mg/kg) を 1 日 2 回、6 週間強制経口投与した後、心臓を採取し病理組織学的評価を実施した。病変の項目毎に、悪化の程度を 0、1、2、3 の 4 段階でスコア化し、各群の平均値と標準誤差を求めた (パネル A; 動脈炎、パネル B; 炎症性細胞浸潤、パネル C; 心筋変性・壊死)。対照群 10 例、ベラプロスト投与群 12 例およびシロスタゾール投与群 13 例。NS は対照群との有意差が無いことを示す。

れた。ベラプロスト投与群では、これらの病変が軽減されており (図 4B)、実際に、動脈炎スコアにおいて対照群に比して統計的に有意な減

少 ($P=0.007$) が、そして糸球体硬化スコアにおいて減少傾向 ($P=0.061$) が認められた (図 5)。一方、シロスタゾール投与群では、組織写真に

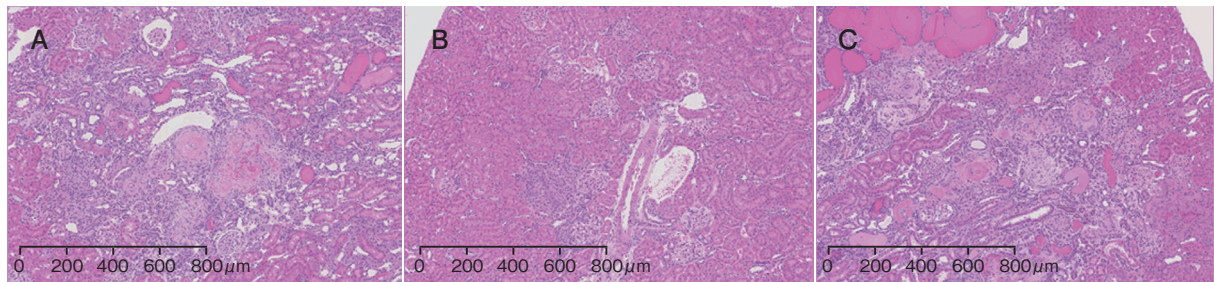


図 4 SHRSP の腎組織像

8 週齢 SHRSP を用い、蒸留水 (対照)、ベラプロスト ($200 \mu\text{g}/\text{kg}$) またはシロスタゾール ($200 \text{mg}/\text{kg}$) を 1 日 2 回、6 週間強制経口投与した後、腎臓組織を採取し病理標本 (HE 染色) を作製した。対照群 (パネル A)、ベラプロスト投与群 (パネル B) およびシロスタゾール投与群 (パネル C) の腎皮質の典型的な組織像を示す。

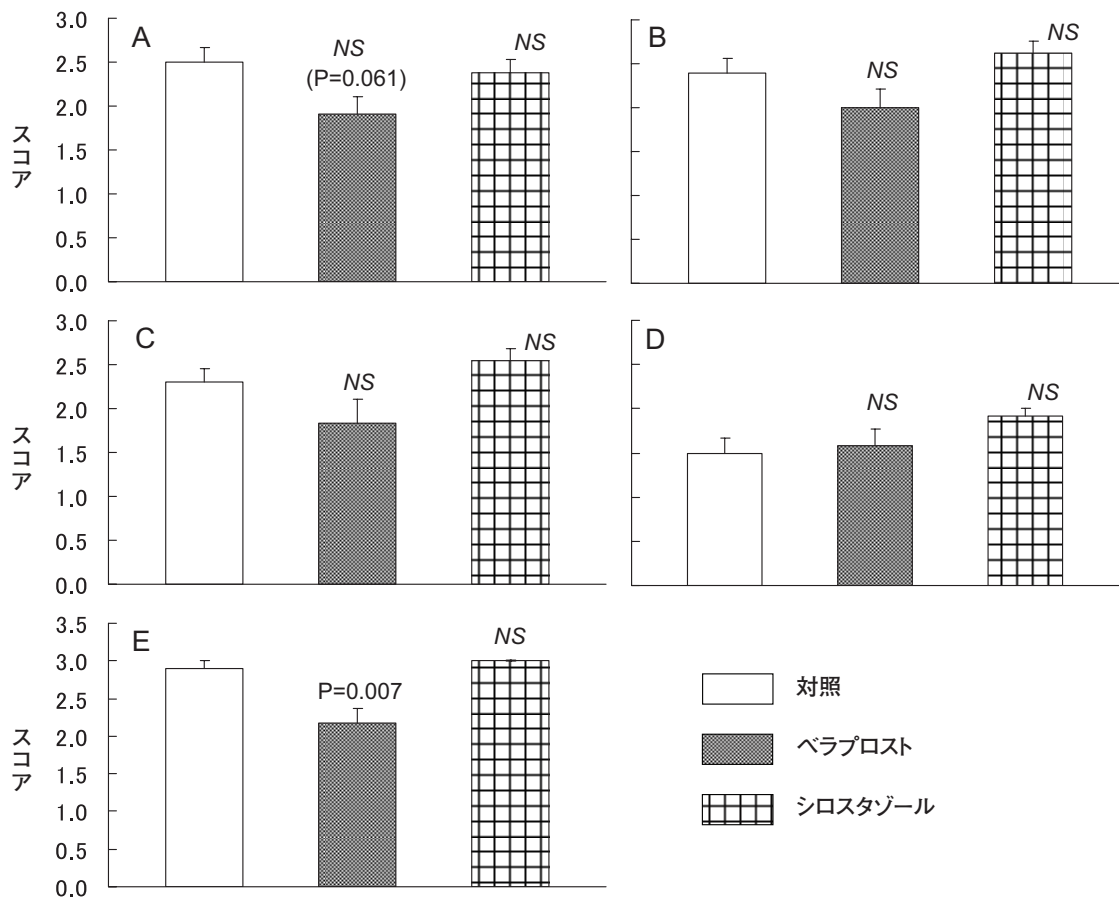


図 5 SHRSP の腎組織の病理組織評価スコア

8 週齢 SHRSP を用い、蒸留水 (対照)、ベラプロスト ($200 \mu\text{g}/\text{kg}$) またはシロスタゾール ($200 \text{mg}/\text{kg}$) を 1 日 2 回、6 週間強制経口投与した後、腎臓を採取し病理組織学的評価を実施した。病変の項目毎に、悪化の程度を 0、1、2、3 の 4 段階でスコア化し、各群の平均値と標準誤差を求めた (パネル A: 糸球体硬化、パネル B: 尿細管変性、パネル C: 尿細管内円柱、パネル D: 炎症性細胞浸潤、パネル E: 動脈炎)。対照群 10 例、ベラプロスト投与群 12 例およびシロスタゾール投与群 13 例。動脈炎 (パネル E) において、対照群とベラプロスト投与群の間に有意差がみとめられた ($P=0.007$)。NS は対照群との有意差が無いことを示す。なお、糸球体硬化 (パネル A) において、対照群とベラプロスト投与群の間に抑制傾向が認められた ($P=0.061$)。

おける病変はむしろ増悪する方向であり (図 4C)、各項目の病変スコアについても対照群と同等から増加傾向が認められた (図 5)。

考 察

慢性動脈閉塞症においては、高血圧症や糖尿病、高脂血症を基礎疾患に有している患者が多いことはよく知られており、治療薬の選択にはこれらの疾患を十分に考慮してなされるべきである。したがって、慢性動脈閉塞症治療に頻用される種々の血小板凝集抑制薬についても、これらの基礎疾患の病態自体に対する影響をそれぞれ明らかにすることは重要である。本研究で用いた SHRSP は、本態性高血圧モデルである Spontaneously Hypertensive Rat から分離、確立された系統であり、脳卒中のモデルラットであると同時に、心臓や腎臓などにも高血圧性二次病変を併発する悪性高血圧症のモデルラットとしても広く認められている。SHRSP の生存日数に対する血小板凝集抑制薬の効果については、慢性動脈閉塞症治療薬の中でも同じく cAMP を上昇させるベラプロストとシロスタゾールで相反する結果^{2,5)}が示されているが、同一条件下で両薬剤を比較した知見はみあたらない。そこで本研究では、両者の効果を直接比較した。

SHRSP の生存期間は、ベラプロスト投与群では対照群に比べて有意に延長していたのに対し、シロスタゾール投与群では短縮される傾向が認められた。この結果は、両薬剤の効果をそれぞれ別々に検討した既報^{2,5)}の結果をほぼ再現するものであった。

SHRSP ではしばしば脳梗塞と同時に脳出血が観察されることはよく知られている。しかしながら、シロスタゾール投与群における生存期間短縮傾向に本薬物による脳出血の発症助長が関与するかについては、脳の病理組織像での評価結果を見るかぎり、明らかな病変の差異は認められず、関与の可能性は低いと思われる。また、シロスタゾールは SHRSP の心仕事量を増加させることが知られているが⁶⁾、心臓についても病理組織像での評価では、脳組織と同様に病変の差はなく、シロスタゾール投与による心臓の

器質的変化は認められなかった。さらに、心不全や心肥大などの心室負荷条件下で分泌される brain natriuretic peptide のレベルにも差がなかった (未発表データ) ことを考え併せると、シロスタゾールの生存期間短縮傾向に、心血管イベントが関与している可能性も低いものと思われる。一方、腎臓については、病理組織像での評価において、ベラプロスト投与群で病変を改善し、シロスタゾール投与群で対照群と同等かむしろ悪化傾向が観察され、腎組織の病変に対する両薬剤の効果は生存期間に対する効果とパラレルな結果となった。したがって、今回用いた SHRSP の病態進行あるいは死因の一部に腎臓の機能的あるいは器質的変化が関連している可能性が考えられた。腎臓の病変が SHRSP の生存期間の短縮に関係することとしては、卵巣摘 SHRSP の生存期間に対するエストロゲン投与の短縮効果などに腎の微小血管障害を介していることを Stier ら⁷⁾が報告している。なお、シロスタゾールを投与した SHRSP の腎病理組織像は対照群とほぼ差がないことを示した報告²⁾と本研究の結果には若干の違いがあるが、用いた SHRSP の亜系、投与方法、観察期間等の相違に起因したものかもしれない。

ベラプロストは、抗糸球体基底膜抗血清誘発腎炎モデルラットにおいて、尿中への蛋白漏出や血清クレアチニン上昇を抑制し、また、糖尿病自然発症ラットにおいても蛋白尿や血中尿素窒素の上昇を抑制するなど、腎機能改善作用を有していることが種々報告されている⁸⁻¹⁰⁾。さらに、ベラプロストならびに PGI₂ は Monocyte Chemotactic Protein-1 や intercellular adhesion molecule-1 の抑制による抗炎症作用を有しており^{3,4,8,9)}、また、ベラプロストは種々の刺激によって惹起される血管内皮細胞障害を抑制することが報告されている^{11,12)}。上記の腎機能改善作用の一部には、この様な抗炎症作用に加え、糸球体内皮細胞や傍尿細管毛細血管の内皮細胞保護を介した腎血流の保持が関連すると考えられている。SHRSP では、高血圧による細動脈のフィブリノイド壊死や半月体形成により腎は慢性的な虚血状態に陥っているが、ベラプロス

トは SHRSF の腎血行動態を保持あるいは改善することによりその虚血状態を改善している可能性が考えられる。実際、ベラプロストおよび PGI₂ は腎血流量を増加させる作用^{13,14)}を有している。したがって、本研究におけるベラプロストの腎病理組織像の改善には、本薬剤の有する多面的薬理作用が相まって発揮されたものと思われる。

一方、シロスタゾールにおいても抗炎症作用¹⁵⁾や内皮保護作用¹⁶⁾を示すことが報告されており、両薬剤は共通する薬理作用を多数有している。さらにシロスタゾールはベラプロスト同様、糖尿病自然発症ラットにおいてアルブミン尿を抑制することも報告されている¹⁷⁾。本研究では、SHRSF において、少なくとも病理組織的にはシロスタゾールの腎保護作用が発揮されなかったことは、この病態モデルが有する固有の腎病態によるのか否かは今後明らかにしていく必要がある。なお、腎臓に対する作用に関連したシロスタゾールとベラプロストとの相違点としては、シロスタゾールでは麻酔イヌにおいて、腎動脈血流量に影響しない(動脈内投与)か、ベラプロストでは用量依存的に減少させる(静脈内投与)ことが示されており²⁾、このような腎血行動態における両薬剤の効果の違いが反映されているのかもしれない。

本研究では、cAMP を上昇させるという共通点のある 2 種類の血小板凝集抑制薬であるベラプロストおよびシロスタゾールの SHRSF における生存期間への影響を同一条件下で評価したところ、BPS では有意に生存期間を延長したがシロスタゾールは短縮する傾向にあった。この違いには、両薬剤の腎に対する作用の違いが寄与しているものと考えられた。

文 献

- 1) 高橋健三: 慢性動脈閉塞症治療薬の基礎. 日本薬理学雑誌 **130**: 393-397 2007
- 2) 大塚製薬: Cilostazol 米国 FDA 承認申請資料
- 3) Moncada S, Gryglewski R, et.al.: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**: 663-665 1976
- 4) Wise H: Multiple signalling options for prostacyclin. *Acta Pharmacol Sin* **24**: 625-630 2003
- 5) Hirano T, Yamori Y, et.al.: The effects of beraprost Na, a stable prostacyclin analog, on animal models of stroke. *Mol Chem Neuropathol* **17**: 91-102 1992
- 6) Shintani S, Watanabe K, et.al.: General pharmacological properties of cilostazol, a new antithrombotic drug. Part II: Effect on the peripheral organs. *Arzneimittel- forschung* **35**: 1163-1172 1985
- 7) Stier CT Jr, Chander PN, et.al.: Estrogen promotes microvascular pathology in female stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **28**: E232-239 2003
- 8) Yamada M, Sasaki R, et.al.: Amelioration by beraprost sodium, a prostacyclin analogue, of established renal dysfunction in rat glomerulonephritis model. *Eur J Pharmacol* **449**: 167-176 2002
- 9) Kushiro M, Shikata K, et.al.: Therapeutic effects of prostacyclin analog on crescentic glomerulonephritis of rat. *Kidney Int.* **53**: 1314-1320 1998
- 10) Watanabe M, Nakashima H, et.al.: Amelioration of diabetic nephropathy in OLETF rats by prostaglandin I(2) analog, beraprost sodium. *Am J Nephrol* **30**: 1-11 2009
- 11) Sakai A, Yajima M, et.al.: Cytoprotective effect of TRK-100, a prostacyclin analogue, against chemical injuries in cultured human vascular endothelial cells. *Life Sci* **47**: 711-719 1990
- 12) Kainoh M, Nishio S, et.al.: Cytoprotective action of beraprost sodium against peroxide-induced damage in vascular endothelial cells.

- Pharmacology **45**: 61-70 1992
- 13) 西尾伸太郎、松浦博敏、他：麻酔犬の心血管系に対する PGI₂ 誘導体、beraprost sodium (TRK-100) の作用. 日本薬理学雑誌 **94**: 351-361 1989
- 14) Nielsen CB, Bech JN, et.al. : Effects of prostacyclin on renal haemodynamics, renal tubular function and vasoactive hormones in healthy humans : a placebo-controlled dose-response study. Br J Clin Pharmacol **44**: 472-476 1997
- 15) Wang F, Li M, et.al. : Intervention with cilostazol attenuates renal inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sci **83**: 828-835 2008
- 16) Matsumoto T, Noguchi E, et.al. : Cilostazol improves endothelial dysfunction by increasing endothelium- derived hyperpolarizing factor response in mesenteric arteries from type 2 diabetic rats. Eur J Pharmacol **599**: 102-119 2008
- 17) Tohma T, Shimabukuro M, et.al. : Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, reduces microalbuminuria in the insulin- resistant Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat. Metabolism **53**: 1405-1410 2004

連絡先：松下映夫
独立行政法人水産大学校食品科学科食品機能学講座
山口県下関市永田本町 2-7-1 (〒 759-6595)
TEL: 0832-86-5111
E-mail: matsushita@fish-u.ac.jp

Effects of beraprost and cilostazol treatments on the survival time of stroke-prone spontaneously hypertensive rats

Teruo MATSUSHITA, Ryusuke TANAKA

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University

Summary

Effects of beraprost sodium (BPS) and cilostazol treatments on the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) were examined. The treatment with BPS (200 μ g/kg/day) significantly prolonged the survival time of the SHRSP. The treatment with cilostazol (200 mg/kg/day) showed a tendency to shorten the survival time of the SHRSP, although the effect was not significant. Histological evaluation revealed that lesion degrees, such as the score of inflammation of arteries in the kidneys of the SHRSP were significantly reduced and ameliorated by the BPS treatment, but not by the cilostazol treatment, although such differences between the BPS and cilostazol treatments were not clear in the brain or heart of the SHRSP. The present study confirmed the differential effects of BPS and cilostazol on the survival time of SHRSP, and such differences might be explained in part by the difference of protective effects on the renal lesion in SHRSP between BPS and cilostazol.

(Med Biol **155**: 286-293 2011)

Key words: stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP), survival time, beraprost, cilostazol, renal cytoprotection

Correspondence address: Teruo MATSUSHITA
Department of Food Science and Technology, National Fisheries University
2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan
Tel: 083-286-5111,
E-mail: matsushita@fish-u.ac.jp