エンドセリン受容体拮抗薬 RO 61-1790 の抗脳虚血作用 —高血圧ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いた検討—

菅野 秀宣¹⁾ 新井 一¹⁾ 佐藤 潔¹⁾Richard M. McCarron, Ph.D.²⁾ Maria Spatz, M.D., Ph.D.³⁾

要旨：今回、我々はエンドセリン受容体拮抗薬 RO 61-1790 (Hoffman La Roche, Switzerland) が、ラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて脳梗塞発生にどのような影響をおよぼすかを検討し、その抗虚血作用について検証を試みた。中大脳動脈閉塞モデルにおいて、RO 61-1790 を動脈閉塞 5 分前と 5 時間後に 2 回投与した実験動物群と、動脈閉塞 5 分前、5 および 8 時間後に 3 回投与した実験動物群を用意、24 時間後の脳梗塞容積を測定し、各々の群で生理的食塩水を投与した動物と比較した。2 回投与では有意差を認めなかったが、3 回投与では、RO 61-1790 が脳梗塞容積を有意に縮小せしめる結果となった。エンドセリン受容体拮抗薬 RO 61-1790 は脳梗塞の発生・進展を抑制するように作用するが、このような効果を得るためには、脳虚血後の頻回なる薬物の投与が必要である。

Key words: endothelin receptor antagonist, ischemia, middle cerebral artery occlusion, spontaneous hypertensive rat

(脳卒中 24:208—215, 2002)

はじめに

脳血流量減少の程度とその持続時間が、脳梗塞の発生を左右する主要因であることは周知の事実である。しかし、ひとたび脳梗塞巣が発生すると、サイトカインや接着分子による免疫反応¹⁾あるいは種々の血管調節因子²⁾が関与する諸反応が、病巣のさらなる進行・増大に大きく係わってくると推測されている。強力な血管収縮因子であるエンドセリン 1 (ET-1) は³⁾、脳微小循環の調節に重要な役割を果たしているが、それ以外にも白血球接着⁴⁾、血栓形成⁵⁾、脳血管閥門の破綻^{6,7)}など様々な反応に関与することが近年明らかになった。さらには、エンドセリン受容体にはエンドセリン

A 受容体 (ET_A) とエンドセリン B 受容体 (ET_B) が中枢神経系に存在し、血管経の調節に関与していると考えられる。ET_A は主に血管平滑筋に存在し、血管収縮を惹起するが、ET_B は血管内皮に存在し血管拡張に作用すると言われている。しかしながら、その作用は用量により種々の変化が生じることも報告されてきており、血管経および血流の調節においては複雑な調節系が考えられている^{8,9)}。このような最近の知見をふまえて、脳虚血における ET-1 およびその受容体の果たす役割について基礎的^{10)~12)}あるいは臨床的¹³⁾¹⁴⁾な研究も数多くなされるようになった。これらの研究の目指すところは、上述の ET-1 が関与する様々な反応を、ET-1 受容体阻害剤によって抑制し、脳虚血病巣すなわち脳梗塞の発生を防止しようとするものである。しかし実際のところは、ET-1 受容体阻害剤の抗脳虚血作用を支持する報告がある一方で、必ずしも期待通りの結果が得られなかったとする報告も散見されるといった状況である¹⁵⁾。そしてその背景には、ET-1 受容体阻害剤の脳血管閥門通過性が充分ではない、薬物投与のタイミングが適切でない、あるいは各々の受容体に対する親

¹⁾順天堂大学脳神経外科

²⁾Resuscitative Medicine Department, Naval Medical Research Center, Bethesda, Maryland, USA

³⁾Stroke Branch, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA

(2002 年 2 月 21 日受付, 2002 年 6 月 21 日受理)

Table 1 Physiological data of the animals

			MABP (mmHg)	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	PH	Hb	TMT
Ave. Physiology at delivery (n=57)			135.4±21.9	112.6±14.3	43.4±3.2	7.37±0.03	16.4±1.0	36.6±0.6
Vehicle (n=20)			Pre 126.0±19.0	109.2±16.1	44.0±2.7	7.37±0.03	16.3±1.2	36.7±0.5
			Post 121.0±11.8	109.1±14.7	43.0±3.0	7.36±0.02	15.8±1.3	36.6±0.5
RO 61-1790	2 times (n=11)	Pre	133.2±22.8	109.8±14.8	43.3±2.6	7.38±0.02	16.4±0.8	36.6±0.8
		Post	118.7±15.8*	99.8±4.6	41.1±4.4	7.36±0.03	15.1±1.8	36.5±0.8
	3 times (n=11)	Pre	137.5±24.2	122.3±13.6	43.8±3.8	7.33±0.02	17.2±0.4	36.3±0.4
		Post	117.4±15.2*	115.8±14.0	43.8±2.4	7.32±0.04	16.6±0.7	36.2±0.5

Each parameters are presented as mean±S.D. Some animals were examined to obtain the average physiological data at each time delivery. Number was follow, n=57 (average physiology at delivery), n=20 (vehicle), n=11 (RO 61-1790, 2 times injection), and n=11 (RO 61-1790, 3 times injection). Mean Arterial Blood Pressure (MABP) reduction ratio between treated group (RO 61-1790) and vehicle had a significant difference by 13.7%. P-value was 0.03. Other parameters were not changed significantly among groups.

*: Presented, as p value was less than 0.05.

和性の違いといった問題点が存在すると考えられており、さらに ET-1 は神経細胞や神経膠細胞にも直接作用する可能性があり¹⁶⁾、これが状況をさらに複雑なものにしている。今回、我々はエンドセリン受容体拮抗薬 RO 61-1790 (Hoffman La Roche, Switzerland) が、高血圧ラット (SHR) 中大脳動脈閉塞モデルにおいて脳梗塞発生にどのような影響をおよぼすのかを検討した。RO 61-1790 は脳血管関門を通過し得る微小分子量物質であり、ET_B に比べ ET_A に対して 1,000 倍の親和性を有するとされている。すなわち、この薬物を脳虚血急性期に実験動物に投与し、24 時間後の脳梗塞容積を測定、RO 61-1790 の抗脳虚血作用を検証するとともに、脳梗塞巣の成立に ET-1 およびその受容体がどのように関与するのかを考察した。

方 法

生後 3 カ月、体重 250~300g の雄 SHR を Taconic Farm (USA) より得て今回の実験に使用した。配送された実験動物の生理学的パラメータを得るため、配送毎無作為に数匹ずつの動物を抽出し、70% 笑気・30% 酸素・1% ハロセンを自発呼吸下で吸入させた麻酔のもと平均血圧 (MABP)、動脈血酸素分圧 (PaO₂)、動脈血二酸化炭素分圧 (PaCO₂)、PH、ヘモグロビン値 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、側頭筋温 (TMT)、直腸温を測定した。合計 57 匹より得られた各々の値は 135.4±21.9 mmHg, 112.6±14.3 mmHg, 43.4±3.2 mmHg, 7.37±0.03, 16.4±1.0 g/dl, 48.1±3.0%, 36.6

±0.6°C, 37.6±0.5°C (Table 1) であり、上記の標準偏差値を越える生理学パラメータを示したものは実験より除外した。同様の麻酔下のもと、Tamura ら¹⁷⁾の方法を若干変更し開頭を行った。我々は以前に RO 61-1790 を使用し SHR 中大脳動脈閉塞モデルで 4 時間後の脳梗塞の縮小と梗塞周囲の微小循環の改善を報告しているが¹⁸⁾、今回はその追加実験であり、同様の条件の下モデルを作成している。すなわち Tamura らのモデルよりも末梢部で中大脳動脈を凝固処置している。手術操作は、顕微鏡下 (Zeiss, Germany) に動物の左側頭部に骨窓を設け、硬膜を開放した後に左中大脳動脈末梢部を露出し、これを嗅索と下大脳静脈の間で凝固・切断した。実験中、動物の側頭筋温と直腸温を持続測定し、ヒーティングパッド (American Pharmaseal Company, K-Module, Model K-20) を用いて、直腸温が 36°C~38°C になるようにした。実験に先立ち、右大腿動脈に PE-50 ポリエチレンチューブを挿入して動脈ラインを確保、持続血液測定 (Digi-Med Blood Pressure Analyzer, Model 190) と実験中の動脈採血に用いた。動脈採血は中大脳動脈閉塞の前後に 2 回行い、pH, PaCO₂, Hb, Ht を測定した (CIBA-Corning, 288 Blood Gas System)。また、薬物注入用に右外頸静脈より PE-50 ポリエチレンチューブを挿入、その先端を上大静脈に保持したが、この静脈カテーテルのもう一方の断端は、皮下を通し頭頂部に固定し 2 回目、3 回目の薬物注入を無麻酔で行えるようにした。中大脳動脈の切断 5 分前に、動物に 10mg/kg の RO 61-1790

Table 2 Data of the infarct volume, infarction ratio, Swanson's correction(%) and cerebral edema on each group

		Infarct volume (mm ³)	Infarction ratio (%)	Swanson's correction (%)	Edema (%)
Vehicle	2 times	174.8±20.5	40.7±4.3	31.8±4.4	19.1±4.4
	3 times	178.4±19.8	40.3±4.2	30.4±5.6	17.1±3.0
RO 60—1790	2 times	165.2±20.7	39.0±4.3	29.0±3.9	18.9±5.1
	3 times	147.5±18.9*	34.2±4.1*	24.5±4.9*	16.2±4.0

2 times injection of RO 61—1790 did not ameliorate against ischemic insult. However, 3 times injection reduced the infarct volume and infarction ratio statistically. RO 61—1790 did not influence on the cerebral edema.

*: Presented as p value less than 0.05.

を静脈内投与したが、対照動物には薬物と同量の生理食塩水を注入した。薬物を静脈内に投与した後に、凝固防止を目的にカテーテル内に 10U/ml, 200μl のヘパリン溶液を注入した。

中大脳動脈閉塞後 4 時間での脳梗塞範囲の測定実験において、RO 61-1790 は有意に脳梗塞巣を縮小させたが¹⁸⁾、今回の予備実験として行った 24 時間後の測定ではコントロール群に比べ統計学的に有意な結果は得られなかった。そのため、中大脳動脈閉塞後 4 時間以上の時点で更に脳梗塞が進展している可能性が考えられた。Wu らは¹⁹⁾脳梗塞後の ET-1 mRNA の発現が 6 時間後に上昇していると報告していることより、4 時間以上 6 時間以内で再投与を行えば効果を発現出来る可能性があると考え、2 回目の投与を 5 時間の時点で行っている。Wu らの同様の報告ではさらに、ET-1 mRNA の発現は 12 時間後急上昇している。そのため、その前に投与を追加することで効果を修飾出来るのではないかと、また先のデータから投与より少なくとも 4 時間は薬の効果が期待できるため、8 時間の時点で再投与をする群も考慮に入れることにした。そして、実験動物に、中大脳動脈閉塞後 5 時間の時点で 5mg/kg の RO 61-1790 を静脈内投与したものと、さらにそれに追加して中大脳動脈閉塞後 8 時間の時点でも同量の RO 61-1790 を静脈内投与した 2 群を設けた。すなわち、前者では中大脳動脈切断の前後に合計 2 回、後者では 3 回の薬物の投与が行われたことになる。尚、対照動物では、薬物と同量の生理食塩水が同じ回数静脈内に注入された。合計 42 匹の SHR を使用、対照 2 回・3 回投与群、RO 61-1790 2 回・3 回投与群は、各々 10 匹、10 匹、11 匹、11 匹である。

中大脳動脈切断後 24 時間の時点で動物を断頭、脳を

摘出しこれを冷却、rodent brain matrix (Rat Brain Slicer, Medical Agent Co Ltd) を用いて 2mm 厚、8 枚の冠状脳切片を作成した。脳切片は 2% 2, 3, 5-triphenyltetrazolium-chloride monohydrate (TTC) (Sigma, USA) により 37℃ で 30 分間処理した後に、4% paraformaldehyde を用いて固定した²⁰⁾。各脳切片の梗塞巣の面積を NIH イメージ (NIH image version 1.61) を用いて計測、これに基づいて脳梗塞巣の容積を算出した。ただし、脳梗塞容積の算出にあたっては、以下の補正式を用いて脳浮腫の影響を排除した。すなわち、%脳浮腫を $\{[(\text{病側半球の容積}) - (\text{対側半球の容積})] / (\text{対側半球の容積})\} \times 100$ の数式で求め、次いでこの %脳浮腫を用いて、補正脳梗塞容積 (mm³) を $(\text{実測脳梗塞容積}) \times \{100 / (100 + \% \text{脳浮腫})\}$ によって求めた。さらに、脳梗塞比率を、以下の Swanson の計算式²¹⁾、すなわち $\%I = 100 \times \{(V_c - V_l) / V_c\}$ (%I: 梗塞に陥った灰白質の比率、V_c: 対側半球の容積、V_l: 病側半球の正常灰白質の容積) に従って算出した。Swanson の計算式で得られる脳梗塞比率は、脳浮腫が梗塞巣に限定されていることを前提としているため、更に、 $\%I = 100 \times \{(\text{実側脳梗塞容積}) / (\text{病側半球の容積})\}$ でも求めた。得られたデータの平均値と標準偏差を求め、中大脳動脈閉塞後の梗塞容積について RO 61-1790 2 回投与及び 3 回投与群において ANOVA を用い、さらに Scheffe の方法で post hoc test を行い、実験動物と対照動物の結果を比較検討した。また、実験中の生理学的パラメータについても、paired t-test を用いて実験動物と対照動物を比較した。尚、p 値が 0.05 以下の場合に、統計学的有意差があるものと判断した。

Fig. 1 Cerebral infarct volume on each group.

Three times injection of RO 61-1790 reduced the infarct volume significantly. However, two times injection did not influence on the reduction of cerebral infarct volume.

*Presented as p value was less than 0.05.

Fig. 2 Infarction ratio on each group.

Three times injection of RO 61-1790 reduced the infarction ratio significantly. However, two times injection did not influence on the reduction of infarction ratio. See the formula into the method section.

*Presented as p value was less than 0.05.

結 果

RO 61-1790 の生理学的パラメータに対する影響

中大脳動脈閉塞前後の実験動物と今回使用した動物と同時期に配送された SHR の生理学的パラメータを Table 1 に示す。MABP を除く他のパラメータには、RO 61-1790 投与の影響は認められなかった。MABP に関しては、対照群に比べ RO 61-1790 投与群でその値が 13.7% 低下していた。そして、この MABP の低下は、統計学的にも有意なものであった。今回の実験において、実験動物の脳梗塞後 24 時間以内での死亡例は認めていない。

脳梗塞容積、脳梗塞率、脳浮腫

RO 61-1790 の 2 回投与実験では、対照動物群の脳梗塞容積が $174.8 \pm 20.5 \text{ mm}^3$ であるのに対して、薬物投与群のそれは $165.2 \pm 20.7 \text{ mm}^3$ であった。一方、3 回投与実験での脳梗塞容積は、対照動物群 $178.4 \pm 19.8 \text{ mm}^3$ 、薬物投与群 $147.5 \pm 18.9 \text{ mm}^3$ であった (Table 2, Fig. 1)。ANOVA による統計処理の結果、2 回投与群では対照群に比べ縮小傾向はあるものの統計学的有意差を得ていない。しかしながら、3 回投与実験では、RO 61-1790 が脳梗塞容積を有意に縮小せしめる結果となった ($p = 0.0205$)。病側半球容積に占める実測脳梗塞容積

比においても同様に、対照群 2 回投与、3 回投与各々は、 40.7 ± 4.3 、 $40.3 \pm 4.2\%$ であるのに対し RO 61-1790 群では、 $39.0 \pm 4.3\%$ 、 $34.2 \pm 4.1\%$ となり、3 回投与群でやはり有意に脳梗塞比率を縮小させた ($p = 0.0366$)。また、Swanson の補正式によって得られた脳梗塞率は、RO 61-1790 3 回投与群は $24.5 \pm 4.9\%$ であったのに対し、対照動物群では 2 回、3 回投与それぞれが、 $31.8 \pm 4.4\%$ 、 $30.4 \pm 5.6\%$ であり、両者間に統計学的有意差を認めた ($p = 0.047$)。一方、2 回投与群では、上記のどの計測においても対照群に対し有意差は得られなかった (Table 2, Fig. 2, Fig. 3)。脳浮腫に関しては、RO 61-1790 3 回投与群の脳浮腫率 (%) は 16.2 ± 4.0 、対照動物群では 17.1 ± 3.0 、2 回投与群では各々 18.9 ± 5.1 、 19.1 ± 4.4 となり、これらに統計学的有意差は認めなかった。

考 察

ET-1 は強力な血管収縮作用を有する血管調節物質の一つであり³⁾、ET-1 の作用を抑制させることによって、くも膜下出血後の血管攣縮を防止し、二次的な脳虚血の発生を阻止しようとする試みがなされている²²⁾。また、血管攣縮とは別の機序で ET-1 が脳虚血病巣の成立に関与する可能性も指摘されており、その際

Fig. 3 %Infarction calculated by Swanson's correction on each group.

On Swanson's correction, the reduction of cerebral infarction was also confirmed in three times RO 61-1790 injection group. See the formula into the method section.

*Presented, as p value was less than 0.05.

Fig. 4 Cerebral edema on each group.

There was no significant change on the effect of cerebral edema after focal ischemia by RO 61-1790.

ET-1 が果たす役割について、基礎的^{(10)~(12)}あるいは臨床的^{(13)~(14)}な研究が数多くなされてきている。Barone らは、局所脳虚血モデルを用いた実験で、ET-1 の作用を抑制することにより脳梗塞の範囲を減少させたと報告し^{(10)~(11)}、また、Patel らは、エンドセリン受容体の拮抗薬が、脳虚血後の脳血流量を増加せしめたとする実験結果を示した⁽¹²⁾。今回の我々の検討でも、RO 61-1790 3 回投与群では脳梗塞の発生・進展が抑制されており、Barone らの報告と同様の結果を得ることができた。しかし一方、RO 61-1790 2 回投与群では、充分な脳梗塞抑制作用は得られなかった。RO 61-1790 の生物学的半減期は、10mg/kg をラットに注入した場合には 0.8 時間とされおり⁽²²⁾、今回の RO 61-1790 2 回投与群では充分な薬理作用を発揮することができなかった可能性はある。さらには、Wu ら⁽¹⁹⁾の報告でも ET-1 mRNA は脳虚血発生後 6 時間より上昇し始め、12 時間までの時間で急激に上昇している。よって、我々の実験系では 5 時間後に ET-1 の作用が増強された可能性がある。虚血後 8 時間の投与で効果が顕性化しているのは、そのような ET-1 産生のメカニズムを反映しているのかもしれない。したがって、RO 61-1790 の抗脳虚血作用を期待するには、脳虚血発生の後一定期間、

継続的に薬物を投与する必要があるものと思われた。Matsuo ら⁽²³⁾はラット再灌流モデルで、ET_A 受容体拮抗薬を持続静注し、脳浮腫の軽減、脳梗塞の縮小を報告している。しかしながら、我々と同じ薬剤を使用した Bhardwaj ら⁽¹⁵⁾の報告では、RO 61-1790 は脳梗塞巣を縮小することは出来なかったし、また死亡率も高率となっている。我々の実験系との違いは、動物種の違い、再灌流モデルであること、RO 61-1790 の持続投与であるということであろう。また、Matsuo らと Bhardwaj らの違いは、Matsuo らの使用した S-0139 は純粋な ET_A 受容体拮抗薬であるのに対し、RO 61-1790 は親和性において 1:1,000 ではあるが ET_B 受容体拮抗作用を合わせ持つ。ET_B 受容体拮抗作用は非常に弱いものと思われるが、持続注入を行うことで、顕性化して行く可能性が考えられる。我々の実験系では、微量の 2 回もしくは 3 回投与のため、ET_B 受容体拮抗作用が表面にでていない可能性がある。Bhardwaj らの実験系で、脳浮腫の増強、さらには死亡率も 6 時間持続投与に比べ 24 時間持続投与群で増加しているのは、ET_B 受容体拮抗を介する脳浮腫増強のメカニズムが存在する可能性があるのかもしれない。ET_B は内皮細胞に主に存在し、血管拡張に作用するとされるが、それらを微弱とはいえ持続的に拮抗させることによって脳梗塞を増加させるのではないか。Barone らが脳梗塞阻止に有効であったと報告した SB 234551 は ET_A 受容体拮

抗薬であるし、同じ文献中の SB 209670 は ET_A 受容体拮抗薬であると同時に ET_B 受容体拮抗薬でもある。彼らは持続投与を行っているが、やはり ET_B 拮抗作用のある SB 209670 には効果がなかったと報告している¹⁰⁾。さらには Petel らの実験系も ET_A 受容体拮抗薬を使用したものである。 ET_B 受容体のアゴニストを使用した実験¹²⁾においても、持続投与または過量投与で血管拡張から血管収縮に作用が変化するなど、その反応は複雑な機序が考えられる。脳虚血後の脳浮腫、脳梗塞の進展において ET_B 受容体の関与する反応に対しても今後さらなる研究が必要になると思われる。Wu や Matsuo らの報告でも ET-1 は虚血後約 6 時間より上昇し始め、24~72 時間は持続する様である。今回の我々の実験系を考え合わせても、その ET-1 の上昇してくるだろう前に ET-1 特に ET_A 受容体を介した反応を阻止することが必要と考えた。Dawson ら¹⁸⁾の報告で我々が先に示したように、虚血発症 4 時間以内にも ET-1 の作用する反応があることも示唆される。これらの事象を考えると、虚血発症後比較的早期に起こる ET-1 の作用と約 6 時間後より惹起される作用が併存していることが推察される。

生理的な状況下では ET-1 が脳血管の緊張を大きく変動せしめることはないが²¹⁾、脳虚血状態では ET-1 の生成と放出が増幅されるため²⁴⁾²⁵⁾、その脳血管収縮作用が顕性化すると考えられている¹²⁾。局所脳虚血病巣において、このような ET-1 の脳血管収縮作用が特に問題となるのは所謂 penumbra 領域であり、これは取りも直さず脳梗塞治療のターゲットになる部位である。Dawson らはラット中大脳動脈永久閉塞モデルを用いて、Penumbra に相当する脳梗塞周囲の微小循環の変化を観察し、RO 61-1790 の投与により同部の微小循環が改善することを報告した¹⁸⁾。今回の実験系では、penumbra 領域の血流動態を改善させ、結果として脳梗塞の範囲を縮小せしめたものと推察される。

今回の実験では、RO 61-1790 は脳虚血にともなって発生する脳浮腫に対して何ら影響を及ぼすことはなかったが、これは Barone らの報告¹¹⁾でも同様の結果であった。Spatz らは、砂ネズミ一過性脳虚血モデルを用いて、 ET_A 受容体拮抗薬が BBB の破綻を阻止し、脳浮腫の発生を抑制するとの実験結果を報告した⁶⁾。また、Matsuo らもラット中大脳動脈再灌流モデルで脳浮腫の軽減を報告している²³⁾。エンドセリン受容体拮抗薬の抗脳浮腫作用に関しては、これを検証する脳虚血実験モデル、すなわち脳血流再灌流モデルが永続的な脳

血流遮断かにより、その結果が異なる可能性があるということ、さらには ET_B 受容体を阻害しているかによっても結果に違いがでてくる可能性があることに留意すべきである。

以上、今回検討した RO 61-1790 すなわちエンドセリン受容体拮抗薬は、過去に報告のあるその他の薬剤と同様に、臨床の場合においても脳虚血の治療薬となり得る可能性が示唆された。また、わずかに存在する ET_B 受容体拮抗作用が効果判定を複雑にする可能性もあると考えられる。Bhardwaj らのネコ中大脳動脈再灌流モデルの結果と Matsuo らのラット中大脳動脈再灌流モデルの結果をも勘案すると、脳血流再開後に起こる脳障害に対しても、 ET_B 受容体を介する反応を今後考慮に入れていく必要があるだろう。永久閉塞に対しては脳梗塞周囲の救済が、虚血後再灌流に対しては postischemic hypoperfusion の改善がエンドセリン受容体拮抗薬の果たしうる役割であると考えられる。また、今回の実験でも明かなように、RO 61-1790 には体血圧を低下せしめる作用があり、これは本薬物の臨床応用を考えた場合に注意しなくてはならない点である。RO 61-1790 を含めたエンドセリン受容体拮抗薬が、脳梗塞治療薬として臨床応用されるよう、今後の研究成果の蓄積が待たれるところである。

文 献

- 1) del Zoppo GJ, Hallenbeck JM: Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res* 98: 73-81, 2000
- 2) Faraci FM, Heistad DD: Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev* 78: 53-97, 1998
- 3) Kuwaki T, Kurihara H, Cao WH, et al: Physiological role of brain endothelin in the central autonomic control: from neuron to knockout mouse. *Prog Neurobiol* 51: 545-579, 1997
- 4) Hofman FM, Chen P, Jeyaseelan R, et al: Endothelin-1 induces production of the neutrophil chemotactic factor interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells. *Blood* 92: 3064-3072, 1998
- 5) Halim A, Kanayama N, el Maradny E, et al: Coagulation in vivo microcirculation and in vitro caused by endothelin-1. *Thromb Res* 72: 203-209, 1993
- 6) Spatz M, Stanimirovic D, McCarron RM: Endothelin as a mediator of blood-brain barrier function. In Greenwood J, Begley DJ and Segal MB

- (eds). New concepts of a blood-brain barrier, New York, Plenum Press, 1995, pp 47—61
- 7) Miller RD, Monsul NT, Vender JR, et al : NMDA- and endothelin-1-induced increases in blood-brain barrier permeability quantitated with Lucifer yellow. *J Neurol Sci* 136 : 37—40, 1996
 - 8) Touzani O, Galbraith S, Siegl P, et al : Endothelin-B receptors in cerebral resistance arterioles and their functional significance after focal cerebral ischemia in cats. *J Cereb Blood Flow Metab* 17 : 1157—1165, 1997
 - 9) Kobari M, Fukuuchi Y, Tomita M, et al : Constriction/dilatation of the cerebral microvessels by intravascular endothelin-1 in cats. *J Cereb Blood Flow Metab* 14 : 64—69, 1997
 - 10) Barone FC, Ohlstein EH, Hunter AJ, et al : Selective antagonism of endothelin-A-receptors improves outcome in both head trauma and focal stroke in rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 36 (Suppl 1) : S357—S361, 2000
 - 11) Barone FC, White RF, Elliott JD, et al : The endothelin receptor antagonist SB 217242 reduces cerebral focal ischemic brain injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 26 (Suppl) : S404—S407, 1995
 - 12) Patel TR, Galbraith S, Graham DI, et al : Endothelin receptor antagonist increases cerebral perfusion and reduces ischaemic damage in feline focal cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 : 950—958, 1996
 - 13) Franceschini R, Gandolfo C, Cataldi A, et al : Twenty-four-hour endothelin-1 secretory pattern in stroke patients. *Biomed Pharmacother* 55 : 272—276, 2001
 - 14) Lampl Y, Fleminger G, Gilad R, et al : Endothelin in cerebrospinal fluid and plasma of patients in the early stage of ischemic stroke. *Stroke* 28 : 1951—1955, 1997
 - 15) Bhardwaj A, Wu Y, Hurn PD, et al : Administration of selective endothelin receptor type A antagonist Ro 61—1790 does not improve outcome in focal cerebral ischemia in cat. *J Cereb Blood Flow Metab* 20 : 499—504, 2000
 - 16) Hama H, Kasuya Y, Sakurai T, et al : Role of endothelin-1 in astrocyte responses after acute brain damage. *J Neurosci Res* 47 : 590—602, 1997
 - 17) Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al : 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
 - 18) Dawson DA, Sugano H, McCarron RM, et al : Endothelin receptor antagonist preserves microvascular perfusion and reduces ischemic brain damage following permanent focal ischemia. *Neurochem Res* 24 : 1499—1505, 1999
 - 19) Wu W, Kuang P, Li Z. : Changes of endothelin-1 gene expression in rat brains during ischemia and ischemic reperfusion. *Chin Med Sci J* 11 : 228—231, 1996
 - 20) Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, et al : Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17 : 1304—1308, 1986
 - 21) Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, et al : A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 10 : 290—293, 1990
 - 22) Roux S, Breu V, Giller T, et al : Ro 61—1790, a new hydrosoluble endothelin antagonist : general pharmacology and effects on experimental cerebral vasospasm. *J Pharmacol Exp Ther* 283 : 1110—1118, 1997
 - 23) Matsuo Y, Mihara Si, Ninomiya M, et al : Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 32 : 2143—2148, 2001
 - 24) Barone FC, Globus MY, Price WJ, et al : Endothelin levels increase in rat focal and global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 14 : 337—342, 1994
 - 25) Bian LG, Zhang TX, Zhao WG, et al : Increased endothelin-1 in the rabbit model of middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett* 174 : 47—50, 1994

Abstract

Anti-cerebral ischemic effect of endothelin receptor antagonist, RO 61-1790

**—Study with permanent middle cerebral artery occlusion
model in spontaneously hypertensive rats—**

Hidegori Sugano, M.D.¹⁾, Hajime Arai, M.D.¹⁾, Kiyoshi Sato, M.D.¹⁾,
Richard M. McCarron, Ph.D.²⁾ and Maria Spatz, M.D., Ph.D.³⁾

¹⁾Department of Neurosurgery, Juntendo University

²⁾Resuscitative Medicine Department, Naval Medical Research Center, Bethesda, Maryland, USA

³⁾Stroke Branch, National Institute of Neurological Disorders and Stroke,
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

It was shown previously that endothelin (ET) receptor antagonist (RO 61-1790) reversed the post-ischemic hypoperfusion and significantly increased the cerebral perfusion after transient ischemia and focal ischemia [4-h middle cerebral artery occlusion (MCAO)], respectively. The aim of the present study was to determine whether additional or repeated treatment with RO 61-1790 would reduce tissue injury in spontaneously hypertensive rats subjected to 24-h MCAO. RO 61-1790 (affinity for ET_A receptor approximately 1000-fold higher than for ET_B receptor) was a gift from Hoffmann-LaRoche Ltd. (Basel, Switzerland). Animals were injected twice with 10 mg/kg RO 61-1790 (5 min before MCAO and 5 h later) or 3 times with 10 mg/kg RO 61-1790 (5 min before MCAO) and 5 mg/kg RO 61-1790 (5 h and 8 h later). Animals injected with vehicle (saline) at identical time intervals served as controls. Ischemic lesion volume was assessed on the basis of 2% 2, 3, 5-triphenyltetrazolium-chloride monohydrate (TTC) staining using an image analyzer (NIH Image). There were no significant differences in cerebral infarct volume between the animals injected twice with RO 61-1790 and the respective controls ($165.2 \pm 22.2 \text{ mm}^3$ vs. $174.8 \pm 20.5 \text{ mm}^3$, respectively). However, the infarct volumes in the animals injected 3 times with RO 61-1790 ($147.5 \pm 18.9 \text{ mm}^3$) were significantly decreased as compared to the controls ($178.4 \pm 12.1 \text{ mm}^3$). These findings indicate that treatment with the ET_A antagonist, RO 61-1790, can ameliorate the cerebral infarct volume induced by MCAO. This effect is dependent upon the time and dose of RO 61-1790 treatment.

(Jpn J Stroke, 24 : 208—215, 2002)