

Cilostazol decreases duration of spreading
depolarization and spreading ischemia after
aneurysmal subarachnoid hemorrhage

(シロスタゾールはくも膜下出血による

Spreading depolarization 及び Spreading ischemia の
持続時間を減少させる)

氏名 杉本 至健

所属 山口大学大学院医学系研究科

システム統御医学系専攻 脳神経外科学分野

令和2年 1月

目 次

1. 要旨	1
2. 研究の背景および目的	2
3. 方法	3
4. 結果	6
5. 考察	8
6. 結語	10
7. 参考文献	17

要旨

くも膜下出血後の脳血管攣縮は、遅発性脳虚血 (Delayed cerebral ischemia ; DCI) の原因と考えられてきた。しかしながら、脳血管攣縮の治療のみでは DCI の改善にはつながらず、Spreading depolarization (SD) なども関与しているといわれている。近年、DCI および神経学的転帰に対するシロスタゾールの効果が報告されている。そこで我々はシロスタゾールの DCI への効果を SD の測定とともに検討した。

くも膜下出血発症後、開頭クリッピング術を施行した 50 症例をシロスタゾール群 (200mg/日、n=23) と対照群 (n=27) に無作為割付した。全症例に対し硬膜下電極を留置し発症 15 日目まで皮質脳波を記録し SD を検知した。シロスタゾールの効果は DCI、脳血管攣縮の発生率を指標とし、SD の出現数と SD に伴う Spreading depression の持続時間についても検討した。SD による循環障害 (Spreading ischemia) に対するシロスタゾールの効果はラット SAH モデルの研究で補完した。

DCI はシロスタゾール群で低頻度であったが、統計学的有意差を認めなかった (13.0 % vs 40.0%、 $p = 0.084$)。脳血管攣縮の発生率は両群間で差を認めなかった。SD の出現数はシロスタゾール群で少なかったが有意差を認めなかった。Spreading depression の累計時間はシロスタゾール群で有意に短かかった (22.2 vs 30.2 分、 $p = 0.043$)。ラットでは、シロスタゾールは Spreading ischemia を有意に短縮した (35.2 ± 7.2 vs $5.0 \pm 9.2\%$ 、 $p = 0.020$)。SD は損傷脳では Spreading ischemia を引き起こす。シロスタゾールによる Spreading ischemia の抑制は、DCI を制御する有望な治療法である可能性がある。

研究の背景および目的

遅発性脳虚血 (Delayed cerebral ischemia ; DCI) は動脈瘤破裂によるくも膜下出血患者の予後を左右する主要な病態の一つである。DCI の主因は遅発性の脳主幹動脈の攣縮 (脳血管攣縮) と考えられてきた。^{1,2} しかしながら、クラゾセンタンなどの薬剤で脳血管攣縮を抑制しても DCI の抑制や神経学的転帰の改善に至らなかった。^{3,4} この結果は DCI の脳血管攣縮以外の原因として、微小血栓⁵、末梢血管の狭窄^{6,7}、Spreading depolarization (SD) および SD による微小循環障害 (Spreading ischemia)^{8,9} が注目されることにつながった。

SD は大脳皮質において毎分 2~6mm 程度の速度で伝播する脱分極の波である。その特徴は不完全なイオン勾配の破綻、神経細胞の脱分極の持続、電気活動の消失、神経細胞の腫脹、樹状突起のゆがみである⁸。脳波では低周波数帯域 (0.05Hz 以下) あるいは DC (直流) 帯域で認められる著明な陰性電位であるが¹⁰、皮質脳波の高周波数帯域 (0.5~45Hz) での減衰としても捉えられ、これを Spreading depression (拡張性抑制) という¹¹。Spreading depression は脱分極の持続に伴い活動電位を発生できないことに起因する。SD は神経細胞への種々の有害刺激や病態、すなわちカリウム、グルタミン酸、ナトリウムポンプ阻害剤、てんかん重積、低酸素、低血糖、脳虚血などで誘発され、周囲の脳組織へ伝播する⁸。SD 進展部位の脳血流は様々に局所変化する。正常な脳組織に SD が到達すると血流増加反応 (Spreading hyperemia) を来す。しかしながら、くも膜下出血後の状態 (一酸化窒素 (NO) の低下と細胞外カリウム (K⁺) 濃度の上昇がある場合) に SD が到達すると正常とは逆の Neurovascular Coupling を来し、血管が収縮し脳血流は低下するとされる。この現象はくも膜下出血患者において急性期および遅発性脳虚血の時期に認められ、Spreading ischemia と呼ばれる^{8,9}。Spreading ischemia により SD の回復が遅延するため、Spreading ischemia の電気生理学的所見は Spreading depression の延長となる。Spreading ischemia は (1) 細胞内カルシウム濃度の上昇 (2) グルタミン酸放出、そして (3) 神経細胞の浮腫を起こし、神経細胞は壊死する。

近年、脳主幹動脈の攣縮を認めない DCI が報告されている¹²。これらの症例では DCI のない症例と比較して SD が多く出現していた。これらの結果は SD の制御が DCI 予防となる可能性を示唆するが、その手段はいまだ確立されていない⁸。

ホスホジエステラーゼ 3 の阻害剤であるシロスタゾールは、脳血管攣縮、DCI を抑制すると考えられている¹³。しかしながら、二重盲検ランダム化比較試験では脳血管攣縮を抑制しないままで DCI および転帰不良を減少させた¹⁴。この結果は、シロスタゾールによる cyclic AMP 増加・NO 産生作用を介する微小循環改善作用や¹⁵⁻¹⁷、SD 抑制作用の可能性を示唆する。

我々はシロスタゾールが SD の出現を抑制し、Spreading depression、Spreading ischemia

を短縮することにより、神経細胞への悪影響を軽減するのではないかと仮説を立てた。そこで、くも膜下出血後の患者においてシロスタゾールの有無による DCI、脳血管攣縮および SD の出現頻度を評価した。さらにシロスタゾールの Spreading ischemia に対する影響をラット SAH モデルで評価した^{18,19}。

方法

本研究は山口大学病院の倫理委員会の承認を受け、2013 年 2 月から 2016 年 4 月まで、当科で破裂動脈瘤に対する開頭クリッピング術を施行した患者に行われた無作為割付け、オープンラベル試験である (UMIN 000008225)。研究参加の同意は患者の法定代理人より書面で得た。

対象

対象は脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血にて山口大学医学部附属病院に入院し、発症後 72 時間以内に動脈瘤の開頭クリッピング術を施行予定の 20 歳以上の患者。くも膜下出血の診断は CT 撮影で行われた。くも膜下出血の分布と量は Fisher 分類 1、2、3 with/without 脳内血腫／脳室内出血で評価した。除外基準は抗血小板剤あるいは抗凝固薬の内服、バイパス術併用が必要な患者、消化管出血、妊娠、うっ血性心不全の患者、シロスタゾールに対し過敏症の既往歴のある患者、妊娠または妊娠している可能性のある婦人とした。

無作為化

患者は無作為にシロスタゾール群、非投与群に割り付けられた。無作為化は封筒法で行われた。シロスタゾールはくも膜下出血発症 96 時間後から 12 日間、100 mg 1 日 2 回経口あるいは胃管より投与した。

標準治療

両群とも 14 日間標準的な術後治療を受けた。循環血液量減少を避け、塩酸ファスジル 30 mg を 1 日 2 回投与された²⁰。抗てんかん薬はてんかん発作がない限り投与されなかった。DCI と診断された場合は標準的な救援治療が行われた (下記参照)。救援治療は人為的高血圧、塩酸ファスジルの動注、経皮血管形成術とした。

電気生理学的モニタリングと解析

閉頭の際に 6 極の白金電極 (SD-6P; Ad-TechMedical Instrument Corporation, Racine, WI) の前頭葉脳表へ留置した²¹。電極 1 から 5 (1cm 間隔) は NicoletOne (0.016–45Hz)

脳波計 (CareFusion, Yorba Linda, CA)に単極接続した。それぞれ電極のリファレンスは頭皮に刺入した針電極 (Disposable Subdermal Needle Electrode; Nihon Koden, Tokyo, Japan) とした。6 番目の電極はアース端子として利用した。皮質脳波は Chart-8 software (ADInstruments, Bella Vista, New South Wales, Australia) で解析した。隣接する電極に 2~6mm/分で伝播する緩徐電位変動 (0.05Hz 未満) を SD とした。典型的には、SD は電氣的に正常な組織では皮質脳波 (0.5~45Hz) の抑制の伝播を生じる。これを Spreading depression (拡延性抑制) と呼ぶ。一方、電氣的に不活化された脳組織に伝播する SD を Isoelectric SD とした。SD の国際共同研究グループである COSBID (Co-Operative Studies on Brain Injury Depolarizations) の推奨に従い、SD の出現数 (Number of SDs per recording day)、Spreading depression の累計持続時間 (total depression duration per recording day (TDDD)) を検討した²²。個々の患者における 1 日あたりの SD の出現数の最大値 (Peak number of SDs per recording day) および peak TDDD (PTDDD) は脳波記録期間中の最大値とした。

臨床的評価と放射線学的評価

DCI は新規局所神経症状あるいは Glasgow Coma Scale (GCS) で 2 点以上の意識レベル低下あるいは CT/MRI における新規脳梗塞と定義した。水頭症や電解質異常、鎮静薬の影響などを除外した。臨床転帰は発症 6 か月後の extended Glasgow Outcome Scale (eGOS) で評価し 5-8 点を Favorable、1-4 点を Poor とした。遅発性脳虚血による新規脳梗塞の診断は CT または磁気共鳴映像法 (MRI) で確定した。脳血管攣縮の評価のため DSA あるいは CTA を発症 9±2 日および DCI 症状出現時は DSA を行い、入院時の脳血管造影検査 (DSA) かつ/あるいは CT 血管造影 (CTA) と比較した。

脳血管攣縮の程度の評価は両側内頸動脈 (C1)、中大脳動脈 (M1、M2)、前大脳動脈 (A1) の 8 か所の径を CTA あるいは DSA で評価された。血管狭小化の比率は入院時と同じモダリティで評価した。脳血管攣縮の重症度は none or mild (<33%)、moderate (33-66%)、severe (>66%) の 3 グループに分類した⁴。

これらの臨床的評価と画像評価はすべて患者に関与しない 2 名によって行われた。

エンドポイント

主要評価項目を DCI の出現とした。副次的評価項目は CT/MRI における新規脳梗塞²³、脳血管攣縮の程度、発症 6 か月後の eGOS、Number of SDs per recording day、Peak number of SDs per recording day、Isoelectric SD の出現、1 回あたりの spreading depression の長さ、TDDD、PTDDD とした²²。全ての有害事象が記録された。

統計分析

サンプルサイズの計算は試験開始時に入手可能であった唯一のランダム化試験の結果を用いて行った²⁴。この試験では対照群の40%およびシロスタゾール投与群の13%が症候性脳血管攣縮と診断された。これをもとに両側検定、検出力80%、有意水準5%でサンプルサイズは各群47名と推定された。データは平均±標準偏差あるいは割合(%)で示した。SD (Spreading depolarization) の分布は正規分布より逸脱するため、中央値および四分位範囲で示した。群間比較はスチューデントのt検定、マンホイットニーU検定、ピアソンカイ二乗検定、フィッシャーの正確確率検定で行い、両側検定でP<0.05を有意とした。治療効果は年齢調整し重回帰分析あるいはロジスティック回帰分析で判定した。検定はSPSS version 19.0 (IBM, Armonk, NY)を使用した。

動物実験

動物

動物実験は山口大学医学部の動物使用施設委員会です承された計画書 (No. 51-040) を元に行われた。オス Sprague-Dawley ラット (n = 18, 340–400g) を用いた。

手術方法および Spreading ischemia モデルの作成

ウレタン麻酔下に行った (1.1g/kg/5ml、腹腔内投与)²⁵。麻酔深度は tail pinching で行い、必要時は 1ml 追加投与した。直腸温は熱電対 (RET-2; Physitemp Instruments, Clifton, NJ) でモニターし加温パッドで 37.5 ± 0.5°C に維持した。左の大腿動脈より動脈血圧を測定し、血液サンプルを得た。動脈血ガス分析を手術直後と 2 回目の SD 後 (実験計画の項参照) の 2 回行った。頭蓋窓と穿頭孔をそれぞれ 1 つ設けた (Fig 1)。手術処理後に頭蓋窓の皮質に生理的な人工脳脊髄液 (ACSF) を 30 分灌流した¹⁸。SD は Ataya らの方法を用いて誘発した²⁶。2mm の綿球を 1M の塩化カリウム (KCl) に浸し穿頭孔の皮質に置いた。KCl による SD 誘発後直ちに穿頭孔を生理食塩水で洗浄した。実験終了後、KCl 静注し安楽死させた。

データ記録

KCl で誘発した SD は Figure 1 に示すように評価した。直流電位と皮質脳波は差動増幅器を用いて増幅した (Model 4002 EX1; Dagan, Minneapolis, MN)。体温、血圧、脳波を含むデータはデジタル化し (PowerLab; ADInstruments) 保存した。脳血流量 (CBF) 変化は頭蓋窓から laser speckle flowgraphy を用いて 1 Hz で記録した (OZ-2; Omegawave, Tokyo, Japan)。

実験計画

生理的 ACSF の灌流による CBF の回復後に、NO 合成酵素阻害剤である L-NG-

nitroarginine methyl ester (L-NAME、Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD) 1mM および K^+ 20mM を含む ACSF ($[K^+]_{ACSF}$: Na^+ 135 mM, Ca^{2+} 1.5 mM, Mg^{2+} 1.2 mM, HCO_3^- 24.5 mM, Cl^- 135 mM, glucose 3.7 mM, urea 6.7 mM) を灌流し^{18, 19, 27}、くも膜下出血後の脳脊髄液の再現とした¹⁸。60 分間灌流した。穿頭孔において KCl で SD を誘発し、頭蓋窓に伝播した SD による CBF 変化と直流電位変化を測定した (First SD)。60 分後にシロスタゾール (n=9, 100 mg/kg/5ml; Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan) あるいは溶媒のみ (n=9, 2% gum Arabic 5 ml/kg) を経口投与した¹⁵。ラットにおいてシロスタゾールの血中濃度は 120 分で最高となるため¹⁵、First SD の 180 分後に 2 回目の SD 誘発を行い (Second SD)、First SD と比較した (Fig. 2A)。

データ解析と統計分析

データ解析は LabChart software (LabChart 8; ADInstruments) で行った。先行論文と同様に、SD 誘発前の CBF (CBF level before SD (%))、SD による CBF の最低値 (CBF hypoperfusion (%))、SD による CBF の最高値 (CBF hyperperfusion (%))、SD による虚血時間 (duration of hypoperfusion (min))、直流電位の陰性変化時間 (duration of negative DC shift (min)) を検討した (Fig. 2B)¹⁹。データは平均値±標準偏差あるいは標準誤差で示す。群間比較はスチューデントの t 検定で行った。P<0.05 を有意とした。検定には SPSS version 19.0 (IBM, Armonk, NY) を使用した。

結果

患者集団

Consolidated Standards of Reporting Trials guidelines に従ったフロー図を示す (Figure 3)。2013 年 2 月から 2016 年 4 月までにくも膜下出血で当院に入院し、クリッピング術を施行した 74 名のうち 50 名が試験対象となり同意を得た。方法に示したサンプルサイズに到達しなかった。これら 50 名の患者はランダムにシロスタゾール群 (n=23) および非投与群 (n=27) に割り付けされた。シロスタゾール群において脱落はなかったが、非投与群の 2 名で深部静脈血栓症および門脈血栓症のため抗凝固薬を開始し、脱落となった。以上より臨床的評価と放射線学的評価は 48 例 (シロスタゾール群 n=23, 非投与群 n=25) で行われた。皮質脳波の解析はアーチファクト混入による解析不能 4 例 (シロスタゾール群 n=1, 非投与群 n=3) を除く 44 例で行われた。患者背景を Table 1 に示す。年齢について 2 群間で有意差を認めたため (56.5 ± 13.4 vs. 64.8 ± 12.1 , difference 8.2 95% CI 0.8 to 15.6, $P=0.029$) 以降の効果判定は年齢調整した重回帰分析あるいはロジスティック回帰分析で判定された。

臨床症状および画像所見におけるシロスタゾールの有効性評価

Table 2 に結果を示す。13 例が DCI と診断された。これらのうち 4 例は失語で、1 例は新規片麻痺を生じた。4 例は GCS 低下で DCI と診断された。4 例が CT/MRI による新規脳梗塞のため DCI と診断された。単変量解析にて DCI はシロスタゾール群で有意に少なかった (13.0% vs. 40.0%, $P=0.036$)。しかしながら、年齢調整後は有意差に到達しなかった (odds ratio 0.266, 95% CI 0.059 to 1.192, $P=0.084$)。新規脳梗塞は 2 群間で有意差を認めなかった (8.7% vs. 24.0%, odds ratio 0.303, 95% CI 0.050 to 1.820, $P=0.192$)。脳血管攣縮評価のための DSA あるいは CTA は平均発症 8.9 日目に行われた。脳血管攣縮の程度に有意差を認めなかった (odds ratio 1.278, 95% CI 0.307 to 5.317, $P=0.736$, Table 2)。発症 6 か月後の eGOS による転帰良好はシロスタゾール群で多い傾向があったが (17 例, 74% vs 14 例, 56%)、有意差を認めなかった (odds ratio 1.437, 95% CI 0.376 to 5.483, $P=0.596$)。両群間で死亡率に差は認めなかった。シロスタゾール群の 1 例が DCI により死亡した。

皮質脳波におけるシロスタゾールの効果

シロスタゾール群の 22 例中 14 例 (63.6%) で SD を認め、全 6338.5 時間の記録期間中に 145 回の SD を認めた。非投与群の 22 例中 15 例 (68.2%) で SD を認め、全 6243.8 時間の記録期間中に 451.2 回の SD を認めた。TDDD はシロスタゾール群で有意に短縮した (22.2 min (IQR 0, 54.8) vs. 30.2 min (IQR 0, 279.8), $\beta = -251.905$, 95% CI -488.458 to -15.356, $P=0.043$)。Isoelectric SD は非投与群のみで認めた (0 例 vs. 4 例 18 isoelectric SD, $\beta = -0.916$, 95% CI -1.746 to -0.085, $P=0.037$)。SD の出現数 (Number of SDs per recording day)、1 日あたりの SD の出現数の最大値 (Peak number of SDs per recording day)、PTDDD および 1 回あたりの spreading depression の長さはシロスタゾール群で低値の傾向があったが統計学的有意差を認めなかった (Table 2, および Fig. 4)。

シロスタゾールの安全性

有害事象はシロスタゾール群の 9 例、非投与群の 7 例で認めた。肺炎をシロスタゾール群の 3 例、非投与群の 2 例で認めた。軽度肝酵素上昇をシロスタゾール群の 2 例、非投与群の 1 例で認めた。尿路感染症をシロスタゾール群の 1 例、非投与群の 2 例で認めた。せん妄を両群 1 例ずつ認めた。下痢をシロスタゾール群の 1 例で認めた。繰り返す発熱をシロスタゾール群の 1 例で認めた。皮疹を非投与群の 1 例で認めた。シロスタゾール群で出血合併症はなく、シロスタゾールの中止を必要とする有害事象はなかった。

ラット皮質脳波および脳血流におけるシロスタゾールの効果

手術直後と Second SD 後の生理学的パラメーターを Table 3 に示す。2 点において両群間でこれらの変数に有意差を認めなかった。

L-NAME 1mM および K⁺20mM を含む ACSF により CBF はシロスタゾール群 (n=9) で 94±8.5%に低下し、溶媒群 (n=9) で 90±9.3%に低下した (CBF level before SD, difference -3.1, 95% CI -12.1 to 5.9)。穿頭孔において KCl で SD を誘発すると、SD は頭蓋窓に伝播した。SD は急峻な CBF 低下を来し、シロスタゾール群で 58±7.0%に、溶媒群で 54±9.0%に低下した (CBF hypoperfusion (%) difference -3.9, 95% CI -12.0 to 4.1)。虚血時間 (duration of hypoperfusion) はシロスタゾール群で 134.3±10.8 秒に、溶媒群で 98.3±9.1 であった (difference -36.0, 95% CI -66.01 to -5.987, P=0.02, Fig. 5H)。虚血後に血流上昇が続き (CBF hyperperfusion)、シロスタゾール群で 109±7.6%に、溶媒群で 111±6.0%に上昇した (difference 1.9, 95% CI -4.923 to 8.723)。直流電位の陰性変化時間 (duration of negative DC shift (min)) はシロスタゾール群で 3.8±0.7 分 (n=6)、溶媒群で 2.7±1.3 分 (n=6) であった (difference -1.1, 95% CI -2.4 to 0.3)。これらは典型的な Spreading ischemia であった (Fig. 5A 左)。First SD 後も L-NAME 1mM および K⁺ 20mM を含む ACSF の灌流を継続した。シロスタゾール (n=9, 100 mg/kg/5ml; Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan) あるいは溶媒のみ (n=9, 2% gum Arabic 5 ml/kg) を経口投与した。結果を Figure 5 に示す。First SD と Second SD における Spreading ischemia 持続時間の短縮率はシロスタゾール群で有意に大きかった (mean ± s.e.m, 35.2±7.2% vs 5.0±9.2%, difference -30.2, 95% CI -55.1 to -5.3, P=0.020)。アーチファクトのためシロスタゾール群の 3 例、溶媒群の 3 例で直流電位変化を評価できなかった。直流電位の陰性変化時間 (duration of negative DC shift (min)) の短縮率はシロスタゾール群で大きかったがわずかに有意差に至らなかった (19.4±11.3% vs -17.8±12.9%, difference -37.2, 95% CI -75.4 to 0.9, P=0.055)。直流電位を測定可能であった 12 実験において、直流電位の陰性変化時間の長さ と spreading ischemia の長さ に先行論文と同様に正の相関関係を認めた (rs=0.6573, 95% CI 0.115 to 0.8978, P=0.023)^{9, 28, 29}。

考察

シロスタゾールは TDDD を短縮し、Isoelectric SD の出現数を減少させた。更に動物モデルでは、シロスタゾールは Spreading ischemia の長さを短縮した。渉猟しうる限りでは、本研究が SD に対する初めての前向きランダム化試験である。シロスタゾール群では DCI が少ない傾向にあったが、統計学的に有意ではなかった。

SD には有害なもの と 無害なもの があり、前者において^{8, 30-34}、Spreading ischemia は重要である。Spreading ischemia は SD と共に発生し、SD の再分極を遅延させ、持続する SD が Spreading ischemia を持続させるという悪循環を形成するためである。これにより、(1) 細胞内カルシウム濃度の上昇 (2) グルタミン酸放出、そして (3) 神経細

胞の浮腫が持続する。動物実験においてこの現象単独で皮質壊死を来しうる³⁵。動物実験で得られる CBF および直流電位変化と同様の現象がくも膜下出血後の患者でも同定されており、臨床的関連が示唆されている^{9,36}。

SD 発生後の神経細胞の再分極の遅延は自発的脳活動の回復の遅延と関連する。ある前向き多施設研究ではくも膜下出血患者の 72%で SD を認めた²¹。この研究では脳波の抑制時間 (Spreading depression の長さ) 10 分以上が臨床転帰不良と関連していた。また 60 分以上の Spreading depression を認めた患者はすべて遅発性脳梗塞を来していた²¹。同様に別の試験でも SD に伴う脳波抑制の長い症例 (High TDDD) では、くも膜下出血後の転帰不良と関連していた³⁷。さらに、SD は電氣的に不活化された脳組織でも発生しうる。不活化は先行する SD によるものや局所のエネルギー欠乏に由来しておこる^{22,38}。電氣的に不活化組織で発生する SD は Isoelectric SD と呼ばれ、頭部外傷の多施設研究において予後不良の予測因子であった³⁸。従って、本研究においてシロスタゾールが TDDD を短縮し Isoelectric SD を抑制したことはこれらの先行研究の結果に合致する。

Spreading ischemia を Spreading hyperemia に戻す治療法は有益であると考えられている。SD の過程、細胞内カルシウム上昇、グルタミン酸放出、そして神経細胞の浮腫が終了するためである。一方で、SD をすべて抑制することが有益であるかどうかは不明である。過去の後ろ向き調査研究で NMDA 受容体アンタゴニストは SD を抑制したが³⁹、脳卒中や頭部外傷患者において NMDA 受容体アンタゴニストは臨床転帰を改善しなかった⁴⁰⁻⁴²。脳循環代謝が障害されていない正常な脳組織を伝播する SD は、プレコンディショニング作用や、再生・可塑性の促進作用を持ち、有益である可能性も示唆されている^{43,44}。虚血巣周囲の正常な組織での SD の有益性は、虚血巣での SD の悪影響よりも大きい可能性がある。加えて、SD の薬剤感受性は代謝障害のある組織より障害のない組織で高く、抑制されやすい⁴⁰。

NO は強力な血管拡張作用を持つ。実験的あるいは臨床的くも膜下出血後の NO の低下は、ヘモグロビン、内因性の NOS インヒビター、NO 作動性神経の変性、内皮型 NO 合成酵素の低下、活性酸素が関与している可能性がある^{45,46}。Spreading ischemia は NO の低下時に発生する^{8,18}。従って、過去に動物実験において NO ドナーである S-ニトロソ-N-アセチル-DL-ペニシラミン (SNAP) の局所投与で示されたように、NO の供給は Spreading ischemia を Spreading hyperemia に戻す可能性がある¹⁹。しかしながら臨床的に NO の全身投与は血圧低下を来すため実現可能性は低い⁴⁷。血圧低下による脳灌流圧 (CPP) の低下は Spreading ischemia を増悪させる可能性がある²⁵。シロスタゾールは cAMP/PKA、および PI3K/Akt を介して内皮型 NO 合成酵素をリン酸化し、NO 産生を増加させるが^{15,48}、本研究において血圧低下は認めなかった。加えて、シロスタゾールは cAMP 上昇による血管拡張作用¹⁷およびアデノシン再取り込み阻害作用

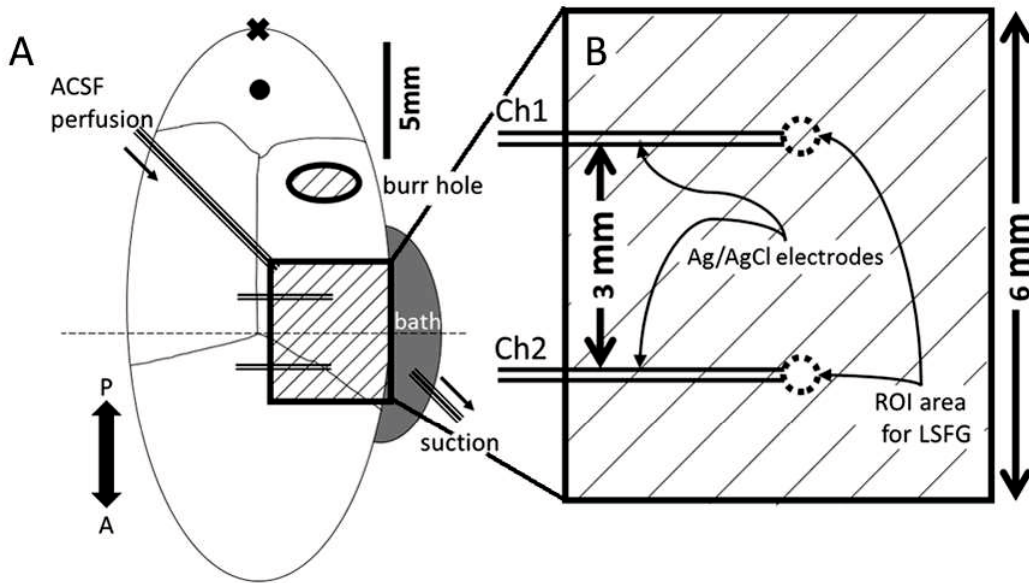
⁴⁹により Spreading ischemia を減弱する可能性がある。過去の報告では cAMP 上昇作用のある塩酸パペリンおよびアデノシンは Spreading ischemia を抑制した^{19, 50}。さらに、シロスタゾールはホスホジエステラーゼ 3 に加えて、cGMP を代謝するホスホジエステラーゼ 5 も阻害する^{51, 52}。くも膜下出血後は NO 低下のため血管拡張作用のある cGMP も低下している⁵³。シロスタゾールによる cGMP レベルの回復は、部分的に Spreading ischemia に拮抗する可能性がある。これらの仮説と一致して、我々の動物モデルでは Spreading ischemia の持続時間が短縮された。臨床においてシロスタゾールが TDDD を短縮したことの一つの説明となる可能性がある。

本研究においていくつかの限界が存在する。第一に、臨床試験において皮質脳波記録と同時に CBF 測定を行うことができなかった。CBF 評価は Spreading ischemia の直接評価を可能とする。また、我々の脳梗塞評価は CT で行ったが MRI よりも感度に劣る。全ての患者は塩酸ファスジル静注を受けたが、本薬剤は日本のみで承認されている。動物実験においてシロスタゾール群で First SD による Spreading ischemia が溶媒群よりも長かった。これはシロスタゾール群の血圧が低かったことによると考える²⁹。しかしながら、シロスタゾールは Spreading ischemia を有意に短縮した。最後に、我々の検討では先行研究のシロスタゾールの DCI に対する抑制効果を追認できなかった。抑制傾向を得たが統計学的有意差に至らず、予定サンプルサイズに至らなかったためと考える。我々の結果はシロスタゾールの DCI および SD に対するさらなる大規模研究を求める。

結語

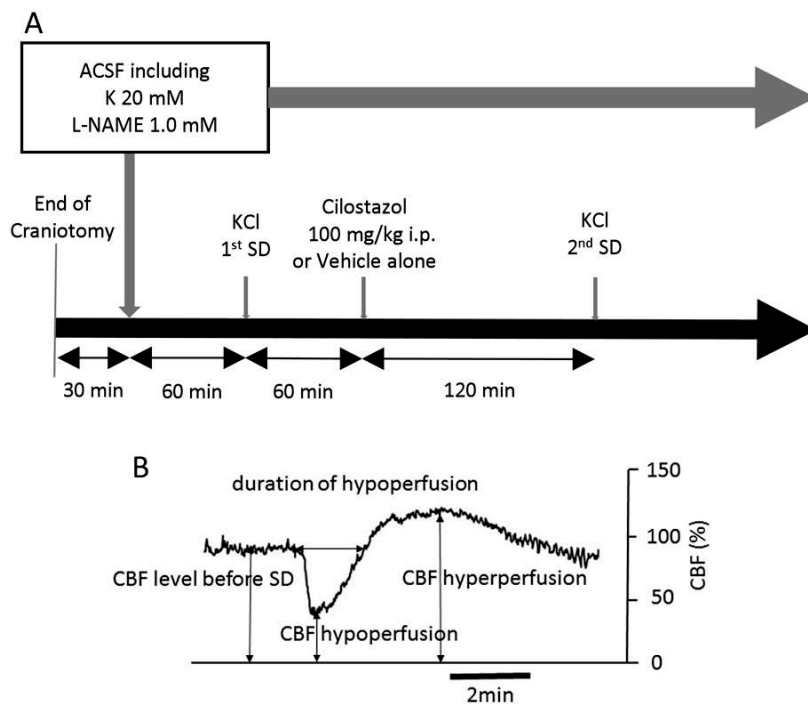
シロスタゾールのくも膜下出血患者における DCI の抑制効果を検討した。本研究は SD をターゲットとした初めての前向き試験である。脳血管攣縮の程度に差は認めなかった一方で、DCI に対する抑制傾向を認めたが、さらなる検討を要する。皮質脳波の検討でシロスタゾールは TDDD を短縮し、Isoelectric SD の出現を抑制した。動物実験結果は Spreading ischemia の抑制作用を示唆した。我々の結果はシロスタゾールがくも膜下出血後の DCI に対する有望な予防薬候補であることを支持する。⁵⁴

Figure.1



実験準備（シエーマ）（A）シエーマは頭蓋窓（bregma より 1.0-5.0 mm lateral, 1.5 mm anterior, 3.0 mm posterior の範囲）、穿頭孔（bregma より 4.0mm lateral, 7.0 mm posterior で径 4mm）皮質脳波電極、ACSF 灌流用のチューブを示す。2 本の銀/塩化銀電極を脳表に留置した。頸部皮下に基準電極を留置した。頭蓋窓はカバースリップで覆い ACSF を灌流した。頭蓋窓の CBF 測定を Laser speckle を用いて行った。穿頭孔で KCl 刺激を行った。（B）局所 CBF 測定のための ROI を電極先端に確保した。

Figure.2



実験計画 (A) 生理的 ACSF の灌流による CBF の回復後に、L-NG-nitroarginine methyl ester (L-NAME) 1mM および K⁺20mM を含む ACSF を 60 分間灌流した。穿頭孔において KCl で SD を誘発し、頭蓋窓に伝播した SD による CBF 変化と直流電位変化を測定した (First SD)。60 分後にシロスタゾール (100 mg/kg/5ml) あるいは溶媒 (2% gum Arabic 5 ml/kg) を経口投与した。120 分後に 2 回目の SD 誘発を行い (Second SD)、CBF 変化と直流電位変化を First SD と比較した。(B) 検討した SD による CBF 変化の項目。

Figure.3

患者選別のフロー図

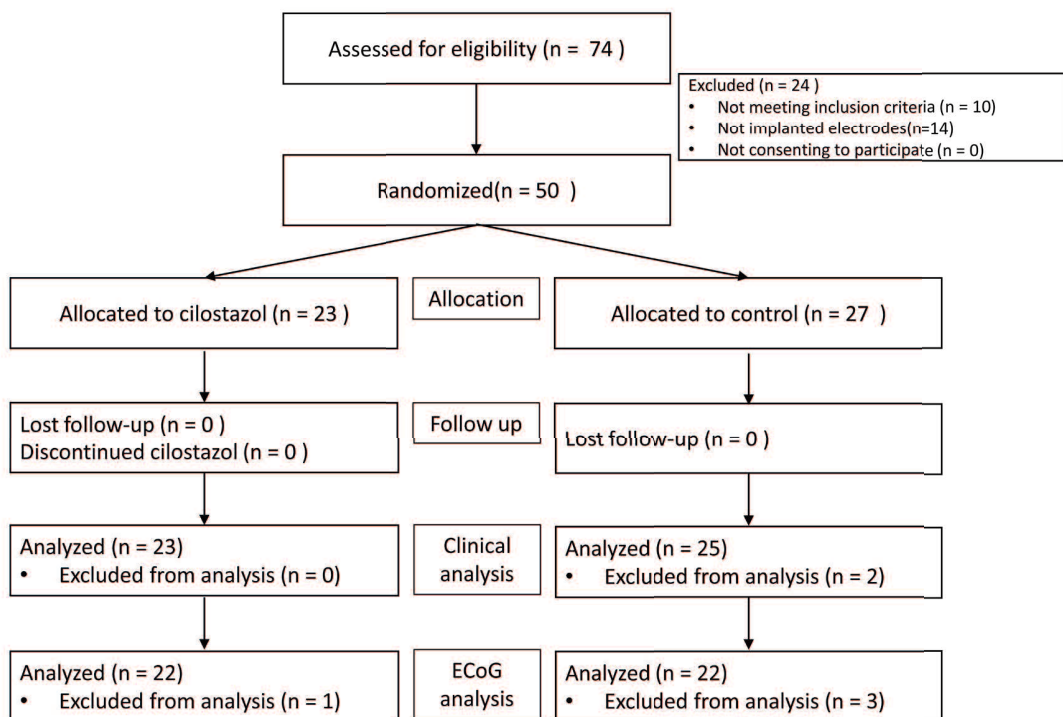
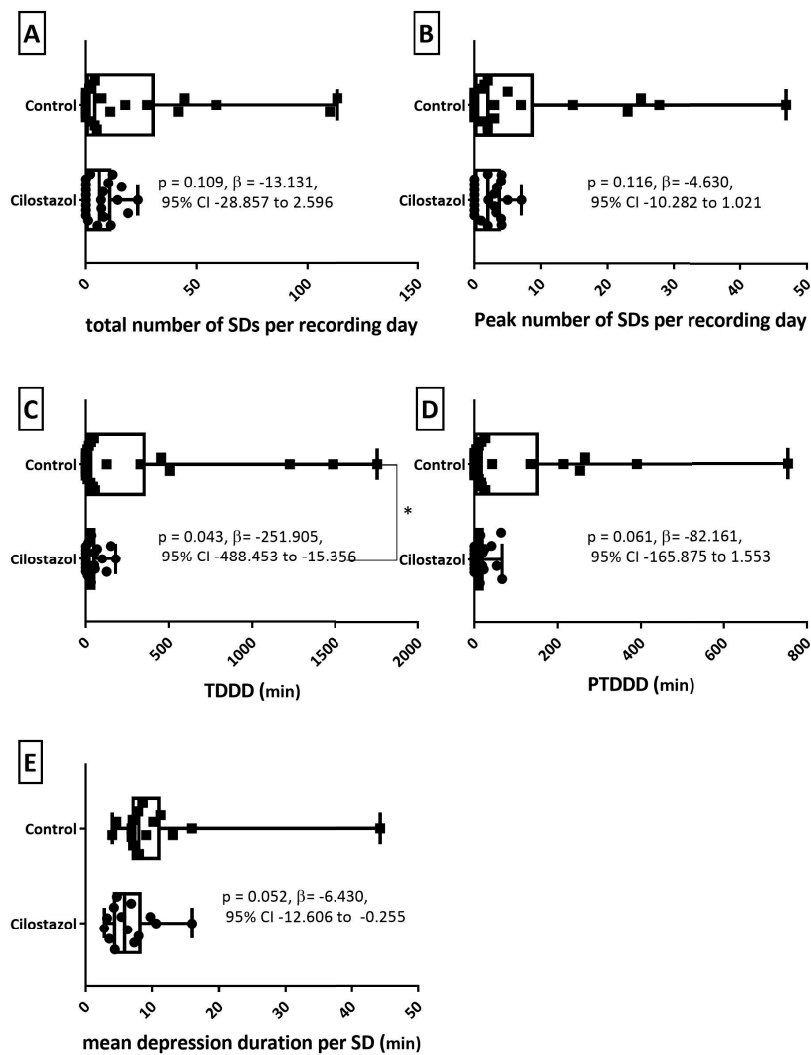


Figure.4

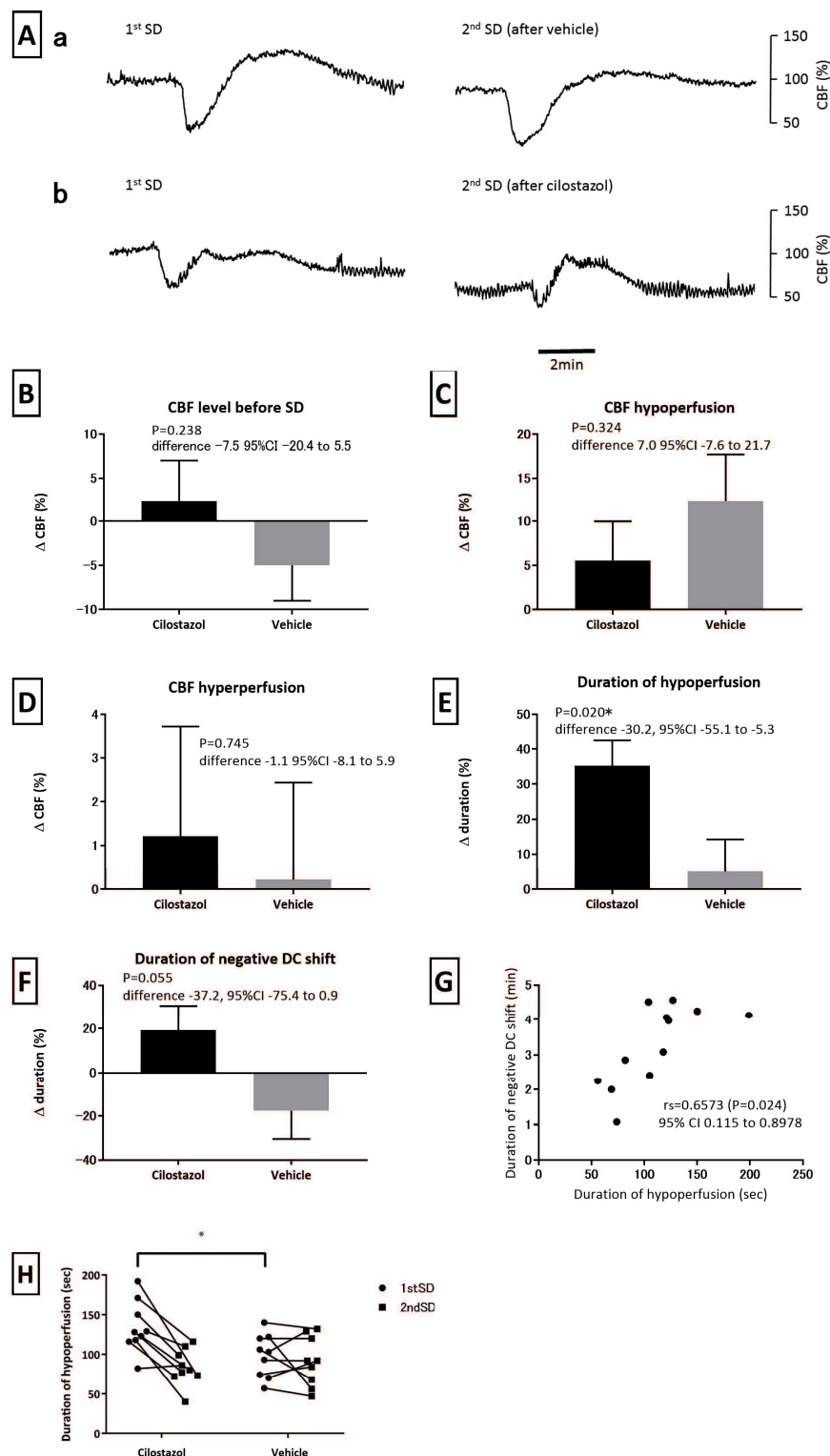


シロスタゾールの Spreading depolarization (SD) に対する効果。(A) SD の出現数 (Total number of SDs per recording day)、(B) 1 日あたりの SD の出現数の最大値 (Peak number of SDs per recording day)、(D) PTDDD、(E) 1 回あたりの spreading depression の長さに 2 群間で有意差を認めなかった。しかしながら (C) TDDD はシロスタゾール群で有意に短縮していた。

SD= spreading depolarization; TDDD= total depression duration per recording day; PTDDD= peak total depression duration per recording day.

箱ひげ図は最大値、最小値に加え四分位範囲を示す。統計学的検定は年齢調整し重回帰分析で行い、 $P < 0.05$ を有意とした (*).

Figure.5



ラットくも膜下出血モデルでシロスタゾールは Spreading ischemia を短縮した。(A) SD による CBF 変化。(Aa) 溶媒群 (Ab) シロスタゾール群。1 回目の SD と 2 回目の SD 誘発における (B) SD 誘発前の CBF (C) SD による CBF の最低値 (D) SD に

よる CBF の最高値の変化割合は 2 群間で有意差を認めなかった。しかしながら (E) SD による虚血時間の変化割合はシロスタゾール群で有意に大きかった。(F) 直流電位の陰性変化時間の変化割合はシロスタゾール群で大きかったが有意差を認めなかった。(G) 直流電位の陰性変化時間と spreading ischemia の長さの間に相関関係を認めた。(H) SD による虚血時間の変化を示す。CBF = cerebral blood flow; DC = direct current; SD = spreading depolarization. データは平均値 ± 標準誤差を示し、群間比較はスチューデントの t 検定で行った。P < 0.05 を有意とした (*)。

Table 1.

患者背景を示す。括弧内は割合を示す。P < 0.05 を有意とした (*)。

TABLE 1. Characteristics of Patients				
Item	Cilostazol	Control	Difference (95% CI)	p
Number	23	25		
Age, yr, mean ± SD	56.5 ± 13.4	64.8 ± 12.1	8.2 (0.8 to 15.6)	0.029 ^a
Sex, F	15 (65)	19 (76)	-0.130 (-0.439 to 0.178)	0.529
WFNS grade				0.925
I	11 (48)	11 (44)	-0.038 (-0.322 to 0.245)	
II	4 (17)	5 (20)	0.043 (-0.318 to 0.403)	
III	3 (13)	2 (8)	-0.135 (-0.589 to 0.320)	
IV	2 (9)	4 (16)	0.167 (-0.240 to 0.573)	
V	3 (13)	3 (12)	-0.024 (-0.451 to 0.404)	
Fisher CT grade				0.487
2	3 (13)	1 (4)	-0.295 (-0.745 to 0.154)	
3	15 (65)	16 (64)	-0.013 (-0.309 to 0.282)	
3+IVH	2 (9)	5 (20)	0.226 (-0.141 to 0.594)	
3+ICH	0 (0)	1 (4)	0.489 (0.346 to 0.632)	
3+IVH+ICH	3 (13)	2 (8)	-0.135 (-0.589 to 0.320)	
Aneurysm location				0.480
ACA	6 (26)	10 (40)	0.156 (-0.137 to 0.450)	
ICA	6 (26)	7 (28)	0.024 (-0.293 to 0.342)	
MCA	11 (48)	8 (32)	-0.165 (-0.450 to 0.120)	
Rescue therapy				
Induced hypertension	0 (0)	3 (12)	0.511 (0.365 to 0.657)	0.235
Endovascular infusion of fasudil	3 (13)	5 (20)	0.125 (-0.245 to 0.495)	0.703
Balloon PTA	1 (4)	2 (8)	0.156 (-0.398 to 0.709)	1.00

Figures in parentheses indicate percentage unless otherwise indicated. All p values are for comparisons between the two groups.
^ap < 0.05 was accepted as significant.
 ACA = anterior cerebral artery; CI = confidence interval; CT = computed tomography; F = female; ICA = internal cerebral artery; ICH = intracerebral hemorrhage; IVH = intraventricular hemorrhage; MCA = middle cerebral artery; PTA = percutaneous transluminal angioplasty; SD = standard deviation; WFNS = World Federation of Neurosurgical Societies.

Table 2.

評価項目の判定

治療効果は年齢調整し重回帰分析あるいはロジスティック回帰分析で判定した。群間

比較し $P < 0.05$ を有意とした (*)。

Item	Univariate Analysis			Age Adjusted			
	Cilostazol, n = 23	Control, n = 25	<i>p</i>	β	Odds Ratio	95% CI	<i>p</i>
DCI	3 (13)	10 (40)	0.036 ^a		0.266	0.059 to 1.192	0.084
New infarction	2 (8.7)	6 (24)	0.249		0.303	0.050 to 1.820	0.192
aVS			0.933		1.278	0.307 to 5.317	0.736
Mild	9 (38)	9 (26)					
Moderate	8 (36)	10 (38)					
Severe	6 (24)	6 (36)					
eGOS after 6 months			0.195		1.437	0.376 to 5.483	0.596
1–4, poor outcome	6 (26)	10 (40)					
5–8, favorable	17 (74)	14 (56)					
ECoG	n = 22	n = 22					
Number of SDs per recording day, median (IQR)	6.1 (0–11.0)	4.1 (0–25.3)	0.549	–13.131		–28.857 to 2.596	0.109
Peak number of SDs per recording day, median (IQR)	2.1 (0–3.9)	2.0 (0–6.5)	0.632	–4.630		–10.282 to 1.021	0.116
TDDD, min, median (IQR)	22.2 (0–54.8)	30.2 (0–279.8)	0.422	–251.905		–488.453 to –15.356	0.043 ^a
PTDDD, min, median (IQR)	10.8 (0–22.0)	16.8 (0–112.4)	0.281	–82.161		–165.875 to 1.553	0.061
Isoelectric SDs	0 (0)	4 (18.2)	0.036 ^a	–0.916		–1.746 to –0.085	0.037 ^a
Depression duration per SD, min, median (IQR)	5.8 (4.3–7.8)	8.0 (7.0–10.7)	0.040 ^a	–6.430		–12.606 to –0.255	0.052

Figures in parentheses indicate percentage unless otherwise indicated. Interquartile range represents the 25th and 75th percentile. All *p* values are for comparisons between the two groups. Because age was significantly different between randomized patient groups, these values were analyzed by multiple regression analysis or logistic regression analysis adjusted for age.

^a $p < 0.05$ was accepted as significant.

aVS = angiographic vasospasm; CI = confidence interval; DCI = delayed cerebral ischemia; ECoG = electrocorticography; eGOS = extended Glasgow Outcome Scale; IQR = interquartile range; PTDDD = peak total depression duration per recording day; SD = spreading depolarization; TDDD = total depression duration per recording day.

Table 3.

生理学的パラメーターの時系列変化。データは平均値±標準偏差を示し、群間比較はスチューデントの *t* 検定で行った。2 点において両群間でこれらの変数に有意差を認めなかった。

TABLE 3. Serial Changes in Physiological Parameters

Sampled Point	Test	Cilostazol	Vehicle	Difference	95% CI	<i>p</i>
Postoperation	HR, bpm	374 ± 41	390 ± 26	15.7	-20.3 to 51.6	0.3681
	MABP, mmHg	80 ± 14	87 ± 9	7.2	-5.1 to 19.5	0.2334
	BT, °C	37.3 ± 0.2	37.3 ± 0.2	-0.0	-0.6 to 0.6	0.9685
	pH	7.43 ± 0.02	7.42 ± 0.02	-0.00	-0.02 to 0.01	0.7799
	PO ₂ , mmHg	84 ± 6	87 ± 10	3.4	-5.1 to 12.0	0.4079
	PCO ₂ , mmHg	40.7 ± 3.4	36.9 ± 7.9	-3.8	-9.9 to 2.3	0.2002
2nd SD	HR, bpm	384 ± 55	387 ± 38	2.4	-47.3 to 52.1	0.9185
	MABP, mmHg	91 ± 17	96 ± 15	4.6	-11.9 to 21.1	0.5614
	BT, °C	37.2 ± 0.1	37.4 ± 0.2	0.1	-0.3 to 0.6	0.4915
	pH	7.43 ± 0.02	7.43 ± 0.05	0.00	-0.03 to 0.04	0.8336
	PO ₂ , mmHg	83 ± 3	83 ± 10	-0.9	-8.3 to 6.5	0.8029
	PCO ₂ , mmHg	37.8 ± 5.5	37.2 ± 7.8	-0.6	-7.3 to 6.2	0.8579

Values are mean ± standard deviation. Systemic variables did not differ between the groups at each sampled point (Student *t* test). The two sampled points correspond to postoperatively and pre-second SD, respectively.
 BT = body temperature; CI = confidence interval; HR = heart rate; MABP = mean arterial blood pressure; PCO₂ = arterial carbon dioxide tension; PO₂ = arterial oxygen tension; SD = spreading depolarization.

REFERENCES

1. Macdonald RL. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nature reviews Neurology*. 2014 Jan;10(1):44-58.
2. Dorsch N. A clinical review of cerebral vasospasm and delayed ischaemia following aneurysm rupture. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2011;110(Pt 1):5-6.
3. Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, et al. Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2). *Lancet neurology*. 2011 Jul;10(7):618-25.
4. Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S, et al. Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2008 Nov;39(11):3015-21.
5. Suzuki S, Suzuki M, Iwabuchi T, Kamata Y. Role of multiple cerebral microthrombosis in symptomatic cerebral vasospasm: with a case report. *Neurosurgery*. 1983 Aug;13(2):199-203.
6. Ohkuma H, Itoh K, Shibata S, Suzuki S. Morphological changes of intraparenchymal

- arterioles after experimental subarachnoid hemorrhage in dogs. *Neurosurgery*. 1997 Jul;41(1):230-5; discussion 5-6.
7. Ohkuma H, Manabe H, Tanaka M, Suzuki S. Impact of cerebral microcirculatory changes on cerebral blood flow during cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2000 Jul;31(7):1621-7.
 8. Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nature medicine*. 2011 Apr;17(4):439-47.
 9. Dreier JP, Major S, Manning A, et al. Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Brain : a journal of neurology*. 2009 Jul;132(Pt 7):1866-81.
 10. Hartings JA, Watanabe T, Bullock MR, et al. Spreading depolarizations have prolonged direct current shifts and are associated with poor outcome in brain trauma. *Brain : a journal of neurology*. 2011 May;134(Pt 5):1529-40.
 11. Leao AA. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of neurophysiology*. 1944;7:359-90.
 12. Woitzik J, Dreier JP, Hecht N, et al. Delayed cerebral ischemia and spreading depolarization in absence of angiographic vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2012 Feb;32(2):203-12.
 13. Niu PP, Yang G, Xing YQ, Guo ZN, Yang Y. Effect of cilostazol in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Sci*. 2014 Jan 15;336(1-2):146-51.
 14. Matsuda N, Naraoka M, Ohkuma H, et al. Effect of Cilostazol on Cerebral Vasospasm and Outcome in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Cerebrovasc Dis*. 2016;42(1-2):97-105.
 15. Ito H, Hashimoto A, Matsumoto Y, Yao H, Miyakoda G. Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, attenuates photothrombotic focal ischemic brain injury in hypertensive rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010 Feb;30(2):343-51.
 16. Suzuki S, Sayama T, Nakamura T, et al. Cilostazol improves outcome after subarachnoid hemorrhage: a preliminary report. *Cerebrovasc Dis*. 2011;32(1):89-93.
 17. Tanaka K, Gotoh F, Fukuuchi Y, et al. Effects of a selective inhibitor of cyclic AMP phosphodiesterase on the pial microcirculation in feline cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1989 May;20(5):668-73.
 18. Dreier JP, Korner K, Ebert N, et al. Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K⁺ is increased in the subarachnoid space. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1998 Sep;18(9):978-90.
 19. Dreier JP, Petzold G, Tille K, et al. Ischaemia triggered by spreading neuronal activation

- is inhibited by vasodilators in rats. *The Journal of physiology*. 2001 Mar 1;531(Pt 2):515-26.
20. Ishihara H, Suzuki M. [Japanese Guidelines for the Management of Stroke 2015: overview of the chapter on Subarachnoid Hemorrhage]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine*. 2016 Apr;74(4):677-80.
 21. Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, et al. Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain : a journal of neurology*. 2006 Dec;129(Pt 12):3224-37.
 22. Dreier JP, Fabricius M, Ayata C, et al. Recording, analysis, and interpretation of spreading depolarizations in neurointensive care: Review and recommendations of the COSBID research group. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2017 May;37(5):1595-625.
 23. Vergouwen MD, Vermeulen M, van Gijn J, et al. Definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as an outcome event in clinical trials and observational studies: proposal of a multidisciplinary research group. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2010 Oct;41(10):2391-5.
 24. Senbokuya N, Kinouchi H, Kanemaru K, et al. Effects of cilostazol on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a multicenter prospective, randomized, open-label blinded end point trial. *Journal of neurosurgery*. 2013 Jan;118(1):121-30.
 25. Sukhotinsky I, Yaseen MA, Sakadzic S, et al. Perfusion pressure-dependent recovery of cortical spreading depression is independent of tissue oxygenation over a wide physiologic range. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010 Jun;30(6):1168-77.
 26. Ayata C, Jin H, Kudo C, Dalkara T, Moskowitz MA. Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Annals of neurology*. 2006 Apr;59(4):652-61.
 27. Costa C, Tozzi A, Rainero I, et al. Cortical spreading depression as a target for anti-migraine agents. *The journal of headache and pain*. 2013;14:62.
 28. Dreier JP WO, Petzold G, Lindauer U, Einhaupl KM, Dirnagl U, editor. Ischemia caused by inverse coupling between neuronal activation and cerebral blood flow in rats. *Brain activation and CBF control; 2002; Amsterdam: Elsevier*.
 29. Sukhotinsky I, Dilekoz E, Moskowitz MA, Ayata C. Hypoxia and hypotension transform the blood flow response to cortical spreading depression from hyperemia into hypoperfusion in the rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2008 Jul;28(7):1369-76.
 30. Hartings JA, Wilson JA, Hinzman JM, et al. Spreading depression in continuous electroencephalography of brain trauma. *Annals of neurology*. 2014 Nov;76(5):681-94.
 31. Helbok R, Schiefecker AJ, Friberg C, et al. Spreading depolarizations in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage: Association with perihematomal edema progression. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016 Jan 01:271678X16651269.
 32. Strong AJ, Fabricius M, Boutelle MG, et al. Spreading and synchronous depressions of

cortical activity in acutely injured human brain. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2002 Dec;33(12):2738-43.

33. Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, et al. Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Annals of neurology*. 2008 Jun;63(6):720-8.

34. Woitzik J, Pinczolits A, Hecht N, et al. Excitotoxicity and metabolic changes in association with infarct progression. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2014 Apr;45(4):1183-5.

35. Dreier JP, Ebert N, Priller J, et al. Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *Journal of neurosurgery*. 2000 Oct;93(4):658-66.

36. Offenhauser N, Windmuller O, Strong AJ, Fuhr S, Dreier JP. The gamut of blood flow responses coupled to spreading depolarization in rat and human brain: from hyperemia to prolonged ischemia. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2011;110(Pt 1):119-24.

37. Dreier JP, Major S, Pannek HW, et al. Spreading convulsions, spreading depolarization and epileptogenesis in human cerebral cortex. *Brain : a journal of neurology*. 2012 Jan;135(Pt 1):259-75.

38. Hartings JA, Bullock MR, Okonkwo DO, et al. Spreading depolarisations and outcome after traumatic brain injury: a prospective observational study. *Lancet neurology*. 2011 Dec;10(12):1058-64.

39. Hertle DN, Dreier JP, Woitzik J, et al. Effect of analgesics and sedatives on the occurrence of spreading depolarizations accompanying acute brain injury. *Brain : a journal of neurology*. 2012 Aug;135(Pt 8):2390-8.

40. Dreier JP, Reiffurth C. The stroke-migraine depolarization continuum. *Neuron*. 2015 May 20;86(4):902-22.

41. Ikonomidou C, Turski L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet neurology*. 2002 Oct;1(6):383-6.

42. Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nature medicine*. 2008 May;14(5):497-500.

43. Matsushima K, Hogan MJ, Hakim AM. Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1996 Mar;16(2):221-6.

44. Yanamoto H, Miyamoto S, Tohnai N, et al. Induced spreading depression activates persistent neurogenesis in the subventricular zone, generating cells with markers for divided and early committed neurons in the caudate putamen and cortex. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005 Jul;36(7):1544-50.

45. Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, et al. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought. *Neurological research*. 2009 Mar;31(2):151-8.

46. Sakowitz OW, Wolfrum S, Sarrafzadeh AS, et al. Relation of cerebral energy metabolism and extracellular nitrite and nitrate concentrations in patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2001 Sep;21(9):1067-76.
47. Terpolilli NA, Moskowitz MA, Plesnila N. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2012 Jul;32(7):1332-46.
48. Hashimoto A, Miyakoda G, Hirose Y, Mori T. Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. *Atherosclerosis*. 2006 Dec;189(2):350-7.
49. Liu Y, Shakur Y, Yoshitake M, Kambayashi Ji J. Cilostazol (pletal): a dual inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 and adenosine uptake. *Cardiovasc Drug Rev*. 2001 Winter;19(4):369-86.
50. Dreier JP, Tille K, Dirnagl U. Partial antagonistic effect of adenosine on inverse coupling between spreading neuronal activation and cerebral blood flow in rats. *Neurocritical care*. 2004;1(1):85-94.
51. Bramer SL, Forbes WP, Mallikaarjun S. Cilostazol pharmacokinetics after single and multiple oral doses in healthy males and patients with intermittent claudication resulting from peripheral arterial disease. *Clin Pharmacokinet*. 1999;37 Suppl 2:1-11.
52. Sudo T, Tachibana K, Toga K, et al. Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochem Pharmacol*. 2000 Feb 15;59(4):347-56.
53. Birk S, Edvinsson L, Olesen J, Kruuse C. Analysis of the effects of phosphodiesterase type 3 and 4 inhibitors in cerebral arteries. *Eur J Pharmacol*. 2004 Apr 5;489(1-2):93-100.
54. Sugimoto K, Nomura S, Shirao S, et al. Cilostazol decreases duration of spreading depolarization and spreading ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Annals of neurology*. 2018 Dec;84(6):873-85.