

原 著

## 微小循環モデルにおけるシロスタゾールと GPIIb/IIIa 阻害薬の 血液レオロジーに及ぼす影響

東京女子医科大学医学部神経内科学

キムラ ユミ ウチヤマシナイチロウ  
木村 友美・内山真一郎

(受理 平成 25 年 12 月 19 日)

### Effect of Cilostazol and Three Platelet Glycoprotein (GP) IIb/IIIa Receptor Antagonists for Hemorheology in Microcirculation Model

Yumi KIMURA and Shinichiro UCHIYAMA

Department of Neurology, Tokyo Women's Medical University School of Medicine

Cilostazol is used clinically as an inhibitor of platelet aggregation, and it has been shown to exhibit anti-inflammatory effects on monocytes and adhesion molecules in the vascular endothelium in several reports. Three platelet glycoprotein (GP) IIb/IIIa receptor antagonists have been approved as adjunctive therapy for decreasing ischemic complications of percutaneous coronary interventions and/or unstable angina. In this study, we used tirofiban, which has been reported to improve recanalization in a middle cerebral artery occlusion model. Furthermore, interest has been expressed in the combined use of cilostazol and GP IIb/IIIa receptor antagonists for treatment of patients with acute ischemic stroke. Here we investigated the effects of cilostazol and the GPIIb/IIIa receptor antagonists FK419 and tirofiban on blood flow through a parallel array of microchannels *in vitro*. We measured the activity of leukocytes and platelets in whole blood samples collected from healthy subjects that were stimulated by adenosine 5'-diphosphate (ADP), platelet activating factor (PAF), and N-formyl-methionyl-leucil-phenylalanine (FMLP). The results showed that cilostazol, FK419, and tirofiban all significantly improved whole blood flow that was decreased by ADP, PAF, and FMLP. ADP activates platelet aggregation, FMLP activates leukocyte aggregation, and PAF activates aggregation of both. Therefore, our results suggest that cilostazol, FK419, and tirofiban inhibit not only platelet aggregation but also leukocyte aggregation.

**Key Words:** cilostazol, GPIIb/IIIa inhibitor, hemorheology, microcirculation model

### 緒 言

虚血性脳血管障害の二次予防や急性期治療のための抗血小板薬として phosphodiesterase type 3 阻害薬 (PDE 阻害薬) と血小板膜糖蛋白 IIb/IIIa 阻害薬 (GP IIb/IIIa 阻害薬) が注目されている。

シロスタゾールは, cyclic adenosine monophosphate (AMP) に特異的な phosphodiesterase (PDE) type 3 を可逆的に阻害する<sup>1)2)</sup>PDE 阻害薬であり, PDE 阻害薬の特徴として抗血小板作用を有する<sup>2)~5)</sup>以外に, 血管拡張作用<sup>6)7)</sup>, 抗動脈硬化作用<sup>6)~8)</sup>, 内皮機能改善作用<sup>9)~11)</sup>, 抗炎症作用<sup>12)13)</sup>等の多面的作用を有することが知られているが, 白血球に対しても

様々な報告がある。白血球におけるケモカインや基質溶解蛋白の発現を減少させたり, 細胞内 cyclic AMP 濃度を上昇させることで, 抗炎症作用を発揮する。さらに, formyl-methionyl-leucil-phenylalanine (FMLP) により活性化されたヒト臍帯静脈内皮細胞に対する好中球の接着を抑制したり, 好中球と血小板の相互作用を抑制することで, 炎症を抑え, 動脈硬化や心血管疾患を予防する, P-selectin や intercellular adhesion molecule-1 などの細胞接着因子発現抑制により, 白血球と血管内皮の相互作用を抑制したり, 可溶性接着分子と血小板由来 microparticles を抑制し, 神経保護作用や臓器保護作用を発揮する,

白血球の接着因子 (Mac-1) を阻害することで、白血球の血管壁への浸潤を抑制し、冠動脈ステント挿入後の再狭窄を防ぐ、などの報告がある。

GP IIb/IIIa 阻害薬は、これまでに知られた、あらゆる血小板受容体アゴニストによる血小板凝集の最終共通経路である GP IIb/IIIa へのフィブリノゲンの結合を阻害する強力な抗血小板薬であるが<sup>14)</sup>、血小板と白血球の相互作用に關与する接着因子 (Mac-1) や組織因子を抑制することにより、血小板凝集や血管壁への白血球の浸潤を阻害し、血小板と白血球の活性化と相互作用を減少させ、抗炎症作用を發揮し、血栓の伸長、器質化を抑制するなどの報告がある。

微小循環モデル (MC-FAN) は菊地ら<sup>15)16)</sup>が開発した半導体微細加工技術 (集積回路製作技術) を用いてシリコン単結晶基板表面に加工した微細な溝 (マイクロチャンネル) のアレイを毛細血管モデルとして用いる方法である。多数の溝を切ったシリコン基板表面に対して光学研磨加工したガラス基板を圧着させ、加工した溝をそのまま流路とする。本装置は全血中の赤血球変形能、白血球粘着能、血小板凝集能を信頼性、再現性、定量性をもって測定することが可能であり、流路を通過する細胞の全挙動をガラス基板を通して直接顕微鏡観察することが可能である<sup>17)18)</sup>。

生体内の血小板凝集は、外的因子として血中に放出された adenosine 5'-diphosphate (ADP) により一次凝集を起こし、さらには血小板自身から放出された ADP により二次凝集を起こす<sup>19)</sup>。血小板膜の ADP 受容体には、P2Y1, P2Y12 の二つのサブタイプが存在し、P2Y1 は、血小板の形態変化など早期の血小板凝集に關与し<sup>20)</sup>、P2Y12 は、凝集の増幅機構、血小板からの顆粒放出に關与する<sup>21)</sup>。

血小板活性化因子 (PAF) は白血球、血小板、血管内皮細胞など様々な細胞による特異的な刺激に应答して産生される強力な脂質活性化メディエーターであり、血小板と好中球の両者を活性化することにより血栓形成に關与することが知られている<sup>22)</sup>。

白血球遊走因子である FMLP は、好中球細胞膜の G タンパク質共役型の受容体に結合すると、様々なシグナルと活性化し、生物活性を發現することが知られており、ラット腹腔好中球を FMLP で刺激すると活性酸素産生と遊走が誘導され、好中球の Akt リン酸化が促進する<sup>23)</sup>。

今回我々は、血小板、白血球、血小板/白血球活性

化剤として、それぞれ ADP, FMLP, PAF を用い、微小循環モデル MC-FAN での全血通過速度を計測し、抗血小板薬であるシロスタゾールと GP IIb/IIIa 阻害薬である FK419 および tirofiban の in vitro における血液レオロジーに及ぼす影響、微小循環改善効果を検討した。

#### 対象および方法

①健康人 17 名 (男性 5 名, 女性 12 名, 年齢 25~40 歳, 平均 30 歳) より血液 9 対 3.8% クエン酸ナトリウム 1 の容積比でプラスチックチューブ内に肘静脈より採取した全血にシロスタゾール 1~40 $\mu$ M を添加し, 37 $^{\circ}$ C で 4 分間インキュベーションした。

②健康人 20 名 (男性 8 名, 女性 12 名, 年齢 24~41 歳, 平均 30 歳) より同様に採血した全血に FK419 10~1,000nM を添加し, 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベーションした。

③健康人 15 名 (男性 7 名, 女性 8 名, 年齢 25~38 歳, 平均 29 歳) より同様に採取した全血に tirofiban 10~1,000nM を添加し, 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベーションした。

①, ②, ③ に各々 ADP (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA) 1 $\mu$ M, PAF (Avanti Polarlipids, Inc., Alabaster, USA) 0.1 $\mu$ M または FMLP (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA) 1 $\mu$ M を添加し 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベーション後, マイクロチャンネルアレイ Bloody 6-7 (チャンネル巾 7 $\mu$ m, 長さ 30 $\mu$ m, 深さ 4.5 $\mu$ m, 8,736 本並列; 日立原町電子工業) と MC-FAN (サンツリ機工) を用いて 20cm 水柱圧を加え, 100 $\mu$ l の全血通過時間を測定し, 毎秒当たりの通過容積を通過速度として算定した (Fig. 1)。

シロスタゾールの対照として N,N-dimethylformamide を, FK419 と tirofiban の対照として Hepes Tyrode's buffer を添加し同様に測定した。薬剤添加検体と対照溶液添加検体の全血通過速度 (平均値  $\pm$  標準偏差  $\mu$ l/sec) を paired t-test により解析した。

なお, 本研究は東京女子医科大学倫理委員会の承認済である (承認番号 2935)。

#### 結果

##### 1. シロスタゾールの効果

ADP 添加時の全血通過速度は, 対照群  $1.27 \pm 1.11 \mu$ l/sec に比し, シロスタゾール 10 $\mu$ M 添加群  $1.96 \pm 1.23 \mu$ l/sec ( $p=0.028$ ), 40 $\mu$ M 添加群  $1.94 \pm 1.21 \mu$ l/sec ( $p=0.010$ ) と有意に速かった。シロスタゾール 1 $\mu$ M 添加群  $1.16 \pm 1.18 \mu$ l/sec ( $p=0.6858$ ), 5 $\mu$ M 添加群

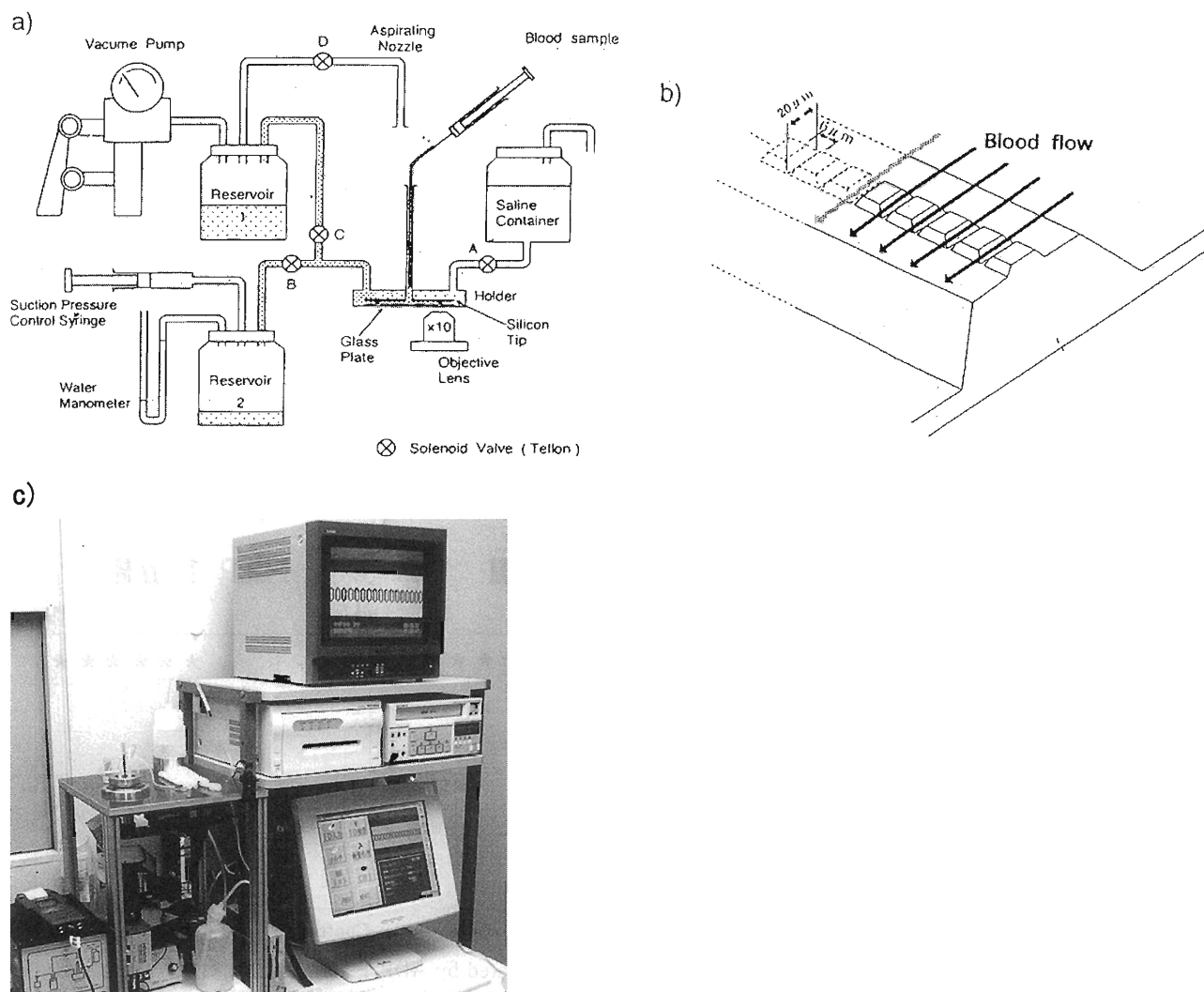


Fig. 1 Diagram of the microcirculation measuring apparatus

- a) Technical drawing of the components of the microcirculation model (MC-FAN).  
 b) Layout of the microchannels in a single-crystal silicon substrate.  
 c) Photograph of the entire apparatus.

$1.33 \pm 1.23 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=0.8205$ ) では対照群と有意差を認めなかった (Fig. 2).

PAF 添加時の全血通過速度は、対照群  $0.88 \pm 1.17 \mu\text{l}/\text{sec}$  に比し、シロスタゾール  $10 \mu\text{M}$  添加群  $2.11 \pm 1.07 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=0.0056$ ),  $20 \mu\text{M}$  添加群  $2.46 \pm 0.65 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=0.0003$ ),  $40 \mu\text{M}$  添加群  $2.47 \pm 0.77 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=0.0001$ ) と有意に速かった。シロスタゾール  $1 \mu\text{M}$  添加群  $1.40 \pm 1.35 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=0.2106$ ),  $5 \mu\text{M}$  添加群  $1.44 \pm 1.35 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=0.1818$ ) では対照群と有意差を認めなかった (Fig. 2).

FMLP 添加時の全血通過時間は、対照群  $1.40 \pm 0.90 \mu\text{l}/\text{sec}$  に比し、シロスタゾール  $10 \mu\text{M}$  添加群  $2.04 \pm 0.96 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=0.0099$ ),  $20 \mu\text{M}$  添加群  $2.17 \pm 0.87 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=0.0038$ ),  $40 \mu\text{M}$  添加群  $2.47 \pm 0.77 \mu\text{l}/\text{sec}$

( $p=0.001$ ) と有意に速かった。シロスタゾール  $1 \mu\text{M}$  添加群  $1.60 \pm 1.13 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=0.4972$ ),  $5 \mu\text{M}$  添加群  $1.90 \pm 0.99 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=0.0698$ ) では対照群と有意差を認めなかった (Fig. 2).

## 2. FK419 の効果

ADP 添加時の全血通過速度は、対照群  $0.46 \pm 0.68 \mu\text{l}/\text{sec}$  に比し、FK419  $10 \text{nM}$  添加群  $1.50 \pm 1.59 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=0.0025$ ),  $30 \text{nM}$  添加群  $2.29 \pm 1.18 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=2.1 \times 10^{-7}$ ),  $100 \text{nM}$  添加群  $3.18 \pm 0.54 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=4.7 \times 10^{-13}$ ),  $300 \text{nM}$  添加群  $3.28 \pm 0.39 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=1.4 \times 10^{-14}$ ),  $1,000 \text{nM}$  添加群  $3.30 \pm 0.41 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=5.5 \times 10^{-14}$ ) であり、いずれも対照群に比し有意に速かった (Fig. 3).

PAF 添加時の全血通過速度は、対照群  $0.97 \pm 1.32$

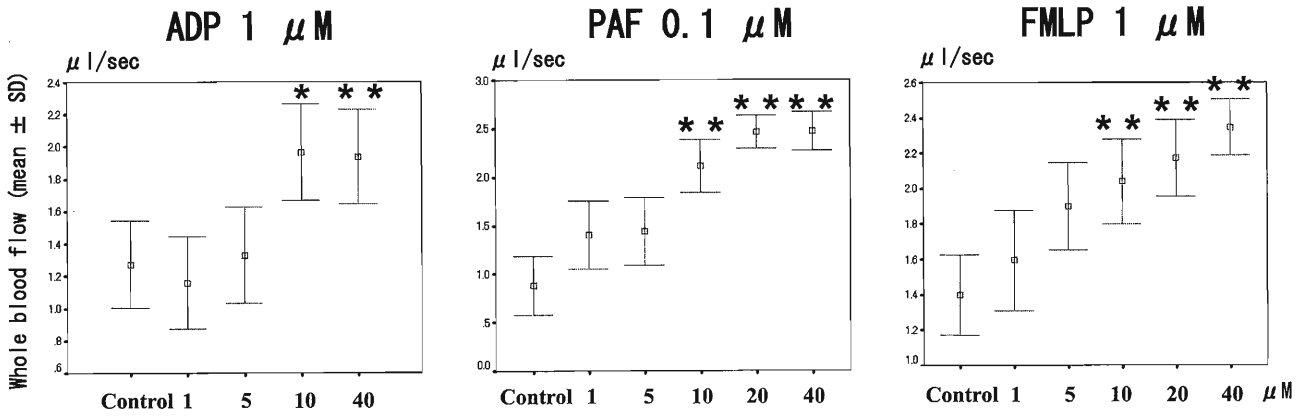


Fig. 2 Effects of cilostazol on the flow of blood stimulated by ADP, PAF, and FMLP  
Cilostazol improved whole blood flow inhibited by ADP, PAF, and FMLP.  
\*, \*\*Significant difference from control, \*p<0.05, \*\*p<0.01 (paired t-test).

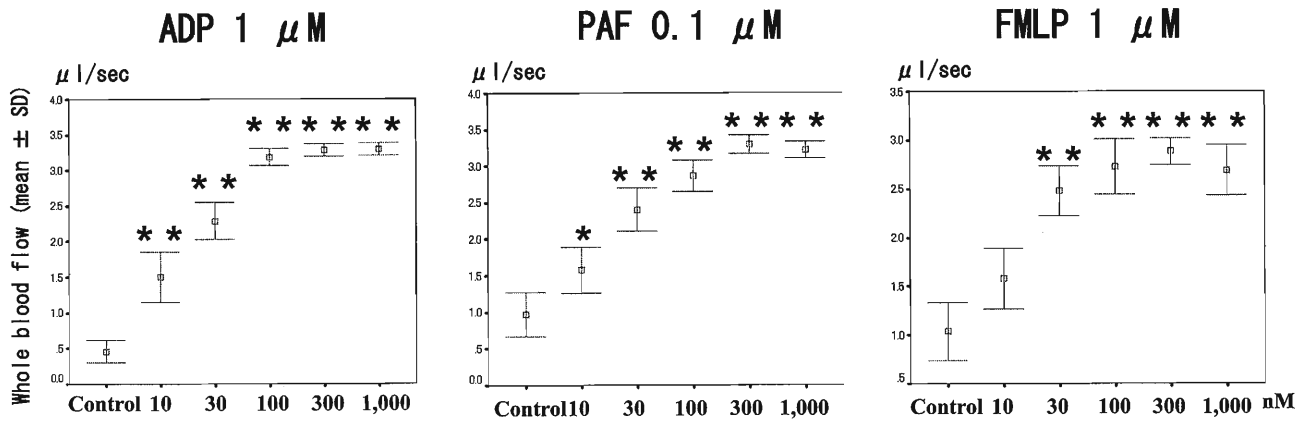


Fig. 3 Effects of FK419 on the flow of blood stimulated by ADP, PAF, and FMLP  
FK419 improved whole blood flow inhibited by ADP, PAF, and FMLP.  
\*, \*\*Significant difference from control, \*p<0.05, \*\*p<0.01 (paired t-test).

μl/sec に比し, FK419 10nM 添加群 1.58 ± 1.36μl/sec (p = 0.011), 30nM 添加群 2.40 ± 1.29μl/sec (p = 0.0002), 100nM 添加群 2.86 ± 0.94μl/sec (p = 7.8 × 10<sup>-6</sup>), 300nM 添加群 3.29 ± 0.57μl/sec (p = 4.1 × 10<sup>-6</sup>), 1,000nM 添加群 3.22 ± 0.48μl/sec (p = 1.1 × 10<sup>-7</sup>) であり, いずれも対照群に比し有意に速かった (Fig. 3).

FMLP 添加時の全血通過速度は, 対照群 1.04 ± 1.24μl/sec に比し, FK419 30nM 添加群 2.48 ± 1.05 μl/sec (p = 0.0001), 100nM 添加群 2.72 ± 1.16μl/sec (p = 5.7 × 10<sup>-5</sup>), 300nM 添加群 2.88 ± 0.57μl/sec (p = 2.3 × 10<sup>-5</sup>), 1,000nM 添加群 2.69 ± 1.08μl/sec (p = 2.4 × 10<sup>-5</sup>) であり, いずれも対照群に比し有意に速かった. 10nM 添加群 1.58 ± 1.29μl/sec (p = 0.062) では対照群と有意差を認めなかった (Fig. 3).

### 3. Tirofiban の効果

ADP 添加時の全血通過速度は, 対照群 0.28 ± 0.42

μl/sec に比し, tirofiban 10nM 添加群 1.95 ± 1.19μl/sec (p = 8.1 × 10<sup>-5</sup>), 30nM 添加群 2.46 ± 1.23μl/sec (p = 9.3 × 10<sup>-6</sup>), 100nM 添加群 3.25 ± 0.51μl/sec (p = 9.2 × 10<sup>-10</sup>), 300nM 添加群 3.25 ± 0.63μl/sec (p = 2.1 × 10<sup>-9</sup>), 1,000nM 添加群 3.25 ± 0.67μl/sec (p = 5.4 × 10<sup>-10</sup>) であり, いずれも対照群に比し有意に速かった (Fig. 4).

PAF 添加時の全血通過速度は, 対照群 0.33 ± 0.68 μl/sec に比し, tirofiban 10nM 添加群 1.61 ± 1.40μl/sec (p = 0.0027), 30nM 添加群 2.30 ± 1.30μl/sec (p = 5.5 × 10<sup>-5</sup>), 100nM 添加群 3.27 ± 0.43μl/sec (p = 3.0 × 10<sup>-10</sup>), 300nM 添加群 3.15 ± 0.45μl/sec (p = 1.0 × 10<sup>-9</sup>), 1,000nM 添加群 3.17 ± 0.59μl/sec (p = 3.1 × 10<sup>-11</sup>) であり, いずれも対照群に比し有意に速かった (Fig. 4).

FMLP 添加時の全血通過速度は, 対照群 0.25 ± 0.28μl/sec に比し, tirofiban 10nM 添加群 0.79 ± 1.00

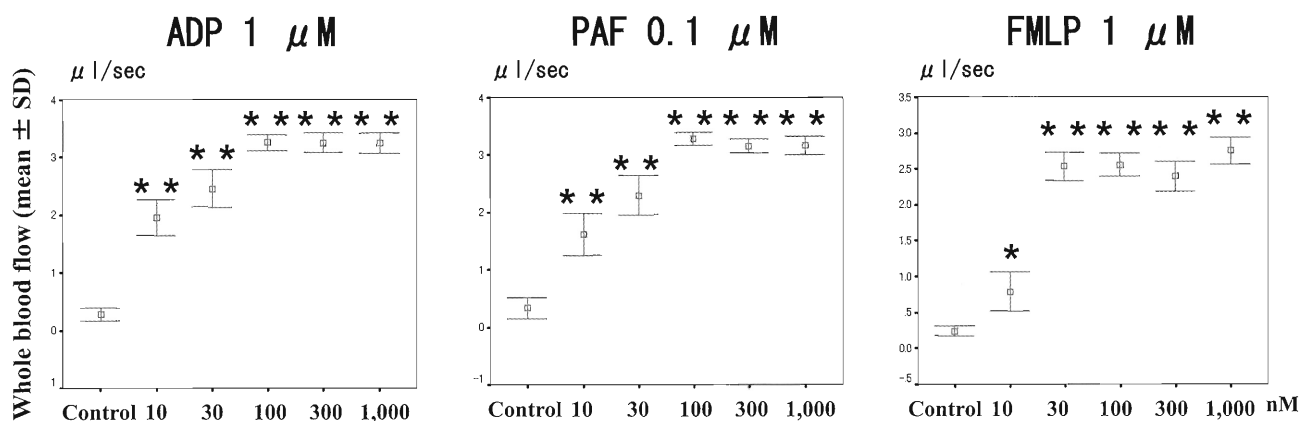


Fig. 4 Effects of tirofiban on the flow of blood stimulated by ADP, PAF, and FMLP  
Tirofiban improved whole blood flow inhibited by ADP, PAF, and FMLP

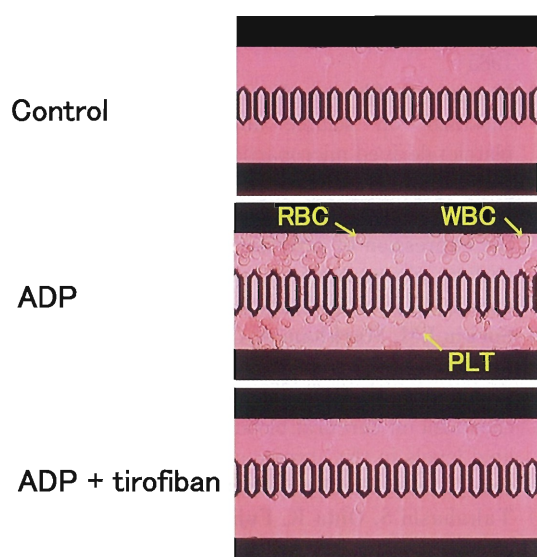


Fig. 5 Blood cell flow through microchannels  
Leukocyte and platelet activities were measured in whole blood.  
Tirofiban significantly improved whole blood flow in the presence of ADP.  
RBC: erythrocyte, WBC: leukocyte, PLT: platelet.

μl/sec ( $p=0.032$ ), 30nM 添加群  $2.54 \pm 0.71 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=1.4 \times 10^{-8}$ ), 100nM 添加群  $2.56 \pm 0.58 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=5.9 \times 10^{-9}$ ), 300nM 添加群  $2.40 \pm 0.78 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=2.0 \times 10^{-7}$ ), 1,000nM 添加群  $2.75 \pm 0.66 \mu\text{l}/\text{sec}$  ( $p=3.9 \times 10^{-9}$ )であり、いずれも対照群に比し有意に速かった (Fig. 4).

また、MC-FAN 付属の走査顕微鏡により、ADP 添加時は血小板凝集塊、PAF 添加時は血小板と白血球の凝集塊、FMLP 添加時には白血球凝集塊が形成されてマイクロチャンネルの血流が滞り、シロスタゾール、FK419, tirofiban 添加群ではこれらの凝集塊

がほとんどみられず血流が通過する様子が観察された (Fig. 5).

### 考 察

急性脳虚血において、完全虚血巣周辺のペナンプラと呼ばれる可逆的血流低下部位の微小循環障害には、血小板、白血球、赤血球、傷害された血管内皮の相互作用が中心的役割を担っている。これらの血液細胞と血管壁細胞の crosstalk には、フリーラジカル、カルシウム、トロンボキサン  $A_2$  やロイコトリエンなどのエイコサノイド、ADP, PAF, サイトカイン、セクレチンファミリーやインテグリンなどの接着分子、補体、一酸化窒素、エンドセリン、トロンビンを始めとする各種凝固線溶因子などがケミカルメディエーターとして関与している。これらの多くは、血球で産生されたり、血球同士や、血球と内皮との相互作用に関与して血小板や白血球を活性化し、内皮細胞傷害を促進して、ペナンプラでの微小循環障害を惹起し梗塞巣を拡大して神経症状を悪化させる<sup>24)~30)</sup>。

抗血小板薬は血小板の活性化や、血小板と他の血球や内皮との相互作用を抑制してペナンプラでの微小循環障害を改善する効果が期待される。

シロスタゾールは発症後 1~6 ヶ月の脳梗塞 1,095 例を対象とするランダム化比較試験 (Cilostazol Stroke Prevention Study : CSPS) において、有意な脳梗塞再発予防効果が示された<sup>31)</sup> ことから、日本では、これまでに慢性動脈閉塞症に対する保険適応に加え、2003 年より心原性脳塞栓症を除く脳梗塞発症後の再発抑制という効能・効果が承認され、脳卒中治療ガイドライン 2004<sup>32)</sup>、脳卒中治療ガイドライン 2009<sup>33)</sup>でも脳梗塞慢性期の非心原性脳梗塞の再発予

防のための抗血小板薬として推奨されている。

現在、海外では多くの GP IIb/IIIa 阻害薬が急性冠症候群やそのインターベンション後の治療薬として用いられているが、そのうちのひとつである tirofiban は、非ペプチド系低分子量阻害薬として開発され、GP IIb/IIIa に結合する接着蛋白の分子内の RGD ペプチドの立体構造を認識するようデザインされた低分子化合物であり、投与によりすみやかに効果が発現し、中止とともにその効果が消失する<sup>34)</sup>。急性冠症候群の保存療法として行われた臨床試験 Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM), PRISM-PLUS では、tirofiban は、毒蛇から抽出された eptifibatid や abciximab と比べ、冠血管イベントの相対リスクを有意に減少させた<sup>35)36)</sup>。発症 48 時間以内の脳梗塞急性期患者 260 例を対象として tirofiban のランダム化プラセボコントロール前向きオープンラベル試験 (The SaTIS Trial) が行われ、1 週間後、5 ヶ月後の神経学的、機能予後は両群で差がなかったが、実薬群の脳出血合併率はプラセボ群と変わらず、5 ヶ月後の実薬群の死亡率はプラセボ群より明らかに少なかった<sup>37)</sup>。

FK419 は、注射可能な非ペプチドの抗血小板薬であり、フィブリンゲンの  $\alpha$  鎖において RGD ペプチド配列の  $\beta$ -turn 構造を基礎としている<sup>38)</sup>。光化学処理による中大脳動脈閉塞モデルを用いた研究において、FK419 は用量依存性に中大脳動脈閉塞時間を減少させて再開通を改善し、ADP 依存性血小板凝集を阻害する量で、持続的再灌流と cyclic flow reduction を改善させた<sup>39)</sup>。

本研究において、シロスタゾール、FK419、tirofiban はいずれも ADP、PAF、FMLP により障害された微小循環モデルの血液流動性を改善した。

ADP は血小板のみを活性化し、PAF は血小板と白血球の両方を活性化するが、FMLP は血小板を活性化せず白血球のみを活性化するため、シロスタゾール、FK419、tirofiban には、抗血小板作用のみならず、白血球の活性化を直接抑制するか、白血球と血小板の相互作用を抑制する作用を有する可能性が示唆された。

これらの結果より、シロスタゾールや GP IIb/IIIa 阻害薬は抗血小板作用のみならず、抗白血球作用により虚血性脳血管障害の病態を改善する効果が期待されることから、今後、これらの薬剤は脳梗塞急性期への適応を検討する価値があると考えられる。

## 結 論

1. シロスタゾール、FK419、tirofiban は、ADP、PAF、FMLP による血小板と白血球の活性化による微小循環障害を改善すると考えられた。
2. これらの薬剤は抗血小板作用のみならず、抗白血球作用を有する可能性が示唆された。

開示すべき利益相反状態はない。

## 文 献

- 1) Umekawa H, Tanaka T, Kimura Y et al: Purification of cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase from human platelets using new-inhibitor sepharose chromatography. *Biochem Pharmacol* **33**: 3339-3344, 1984
- 2) Kimura Y, Tani T, Kanbe T et al: Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittelforschung* **35**: 1144-1149, 1985
- 3) Nomura S, Shouzu A, Omoto S et al: Effect of cilostazol on soluble adhesion molecules and platelet-derived microparticles in patients with diabetes. *Thromb Haemost* **80**: 388-392, 1998
- 4) Inoue T, Sohma R, Morooka S: Cilostazol inhibits the expression of activation-dependent membrane surface glycoprotein on the surface of platelets stimulated in vitro. *Thromb Res* **93**: 137-143, 1999
- 5) Sorkin EM, Markham A: Cilostazol. *Drugs* **14**: 63-71, 1999
- 6) Mochizuki Y, Oishi M, Mizutani T: Effect of cilostazol on cerebral blood flow, P300, and serum lipid levels in the chronic stage of cerebral infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis* **10**: 63-69, 2001
- 7) Takahashi S, Oida K, Fujiwara R et al: Effect of cilostazol, a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, on the proliferation of rat aortic smooth muscle cells in culture. *J Cardiovasc Pharmacol* **20**: 900-906, 1992
- 8) Mizutani M, Okuda Y, Yamashita K: Effect of cilostazol on the production of platelet-derived growth factor in cultured human vascular endothelial cells. *Biochem Mol Med* **57**: 156-158, 1996
- 9) Aoki M, Morishita R, Hayashi S et al: Inhibition of neointimal formation after balloon injury by cilostazol, accompanied by improvement of endothelial dysfunction and induction of hepatocyte growth factor in rat diabetes model. *Dabetologia* **44**: 1034-1042, 2001
- 10) Nakamura T, Houchi H, Minami A et al: Endothelial-dependent relaxation by cilostazol, phosphodiesterase inhibitor, on rat thoracic aorta. *Life Sci* **69**: 1709-1715, 2001
- 11) Kim KY, Shin HK, Choi JM et al: Inhibition of lipopolysaccharide-induced apoptosis by cilostazol in human umbilical vein endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **300**: 709-715, 2002
- 12) Nishio Y, Kashiwagi A, Takahara N et al: Cilostazol, a cAMP phosphodiesterase inhibitor, attenuates the production of monocyte chemoattractant

- protein-1 in response to tumor necrosis factor- $\alpha$  in vascular endothelial cells. *Horm Metab Res* **29**: 491-495, 1997
- 13) **Otsuki M, Saito H, Xu X**: Cilostazol repress vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription via inhibiting NK- $\kappa$ B binding to its recognition sequence. *Atherosclerosis* **158**: 121-128, 2001
  - 14) **Coller BS**: Anti-GPIIb/IIIa drugs: current strategies and future directions. *Thromb Haemost* **86**: 427-443, 2001
  - 15) **Kikuchi Y, Sato K, Ohki H et al**: Optically accessible microchannels formed in a single-crystal silicon substrate for studies of blood rheology. *Microvasc Res* **44**: 226-240, 1992
  - 16) **Kikuchi Y, Sato K, Mizuguchi Y**: Modified cell-flow microchannels in a single-crystal silicon substrate and flow behavior of blood cells. *Microvasc Res* **47**: 126-139, 1994
  - 17) **Kikuchi Y, Da Q-W, Fujino T**: Variation in red blood cell deformability and possible consequences for oxygen transport to tissue. *Microvasc Res* **47**: 222-231, 1994
  - 18) **Kikuchi Y**: Effect of leukocytes and platelets on blood flow through a parallel array of microchannels: Micro- and macroflow relation and rheological measures of leukocyte and platelet activities. *Microvasc Res* **50**: 288-300, 1995
  - 19) **藤本尚資, 本間佳津子, 石田信彦ほか**: 血小板凝集能検査法に関する検討(第二報). *杏林医会誌* **13**: 157-165, 1982
  - 20) **Fabre JE, Nguyen M, Latour A et al**: Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y<sub>1</sub>-deficient mice. *Nat Med* **5**: 1199-1202, 1999
  - 21) **Herbert JM, Savi P**: P2Y<sub>12</sub>, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. *Semin Vasc Med* **3**: 113-122, 2003
  - 22) **Uchiyama S, Yamazaki M, Maruyama S**: Role of platelet-activating factor in aggregation of leukocytes and platelets in cerebral ischemia. *Lipids* **26**: 1247-1249, 1991
  - 23) **東 幸雄, 柏俣正典**: FMLPで誘導されるラット好中球の活性酸素産生および細胞遊走におけるカルシウム-カルモジュリンの役割. *炎症・再生* **26**: 460-466, 2006
  - 24) **内山真一郎**: 血液凝集異常と脳血管障害. 脳血管障害の病態生理. 脳血管障害. 「最新内科学体系 66」(荒木淑郎・金澤一郎・柴崎 浩ほか編), pp54-64, 中山書店, 東京 (1996)
  - 25) **内山真一郎**: 脳虚血と血小板活性化. 特集 脳循環と脳虚血. *Brain Nerve* **40**: 11-23, 1996
  - 26) **Uchiyama S, Yamazaki M, Hara Y et al**: Alterations of platelet, coagulation, and fibrinolysis markers in patients with acute ischemic stroke. *Semin Thromb Hemost* **23**: 535-541, 1997
  - 27) **内山真一郎, 山崎昌子**: 血小板活性化. 血液凝固亢進のメカニズム. 「脳卒中学」(山口武典・内山真一郎・松本昌泰ほか編), pp172-182, 医学書院, 東京 (1998)
  - 28) **内山真一郎**: 虚血と血小板凝集. 脳と分子生物学. 脳と循環 **3**: 243-249, 1998
  - 29) **Uchiyama S, Nakamura T, Yamazaki M et al**: Platelet activation and antiplatelet therapy in patients with ischemic stroke. *In Advances in Brain Research: Cerebrovascular Disorders and Neurodegeneration* (Satoh K, Suzuki S, Matsunaga M eds), Excerpta Medica International Congress Series 1251. pp57-70, Elsevier Science BV, Amsterdam (2003)
  - 30) **Weksler BB**: Platelet function and antiplatelet therapy in ischemic cerebrovascular disease. *In Stroke: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment*, (2<sup>nd</sup> edition). (Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM et al eds), pp1041-1059, Churchill Livingstone, New York (1998)
  - 31) **Gotoh F, Tohgi H, Hirai S et al**: Cilostazol stroke prevention study. A placebo-controlled double-blind trial for secondary prevention of cerebral infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis* **9**: 147-157, 2000
  - 32) **脳卒中合同ガイドライン委員会**: 「脳卒中治療ガイドライン 2004」, pp78-80, 協和企画, 東京 (2004)
  - 33) **脳卒中合同ガイドライン委員会**: 「脳卒中治療ガイドライン 2009」, pp103-109, 協和企画, 東京 (2009)
  - 34) **Scarborough RM, Naughton MA, Teng W et al**: Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with specificity for glycoprotein IIb/IIIa. *J Biol Chem* **268**: 1066-1073, 1993
  - 35) **The PRISM Study Investigators**: A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Study Investigators. *N Engl J Med* **338**: 1498-1505, 1998
  - 36) **The PRISM-PLUS Study Investigators**: Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms (PRISM-PLUS) Study Investigators. *N Engl J Med* **338**: 1488-1497, 1998
  - 37) **Siebler M, Hennerici MG, Schneider D et al**: Safety of Tirofiban in acute ischemic stroke: The SaTIS Trial. *Stroke* **42**: 2388-2392, 2011
  - 38) **Yamanaka T, Ohkubo M, Kuroda S et al**: Design, synthesis, and structure-activity relationships of potent GP IIb/IIIa antagonists: discovery of FK419. *Bioorg Med Chem* **13**: 4343-4352, 2005
  - 39) **Moriguchi A, Aoki T, Mihara K et al**: Antithrombotic effects of FK419, a novel nonpeptide platelet GP IIb/IIIa antagonists, in a Guinea pig photochemically induced middle cerebral artery thrombosis model: comparison with ozagrel and argatroban. *J Pharmacol Exp Ther* **308**: 1094-1101, 2004