

虚血性脳血管障害に対するフェルラ酸誘導体
FAD012 の予防的治療効果に関する基礎研究

浅野 昂志

目次

本論文で使用した略語一覧	4
総論の部	6
緒言	7
第1章 FADの抗酸化活性、細胞保護効果の評価 (<i>in vitro</i>) および 毒性評価 (<i>in vivo</i>)	11
第1節 FADの抗酸化活性およびACE阻害活性を指標にしたスクリーニング	12
第2節 培養細胞を用いたFAD012の毒性および細胞保護効果の評価	18
第3節 FAD012の <i>in vivo</i> における毒性評価.....	21
第4節 本章の小括	23
第2章 一過性脳虚血ラットを用いたFAD012の脳保護効果に関する 検討.....	24
第1節 虚血-再灌流時における脳血流量の評価	25
第2節 FAD012の脳保護効果の検討.....	28
第3節 2次元レーザー血流画像装置を用いたFAD012の脳血流維持作用の解 析	31
第4節 FAD012の脳血流維持作用メカニズムの解析.....	33
第5節 本章の小括	37

第3章 慢性脳低灌流ラットを用いた FAD012 の嚥下反射障害改善効果に関する検討.....	38
第1節 FAD012 の慢性脳低灌流ラットの脳血流量低下に対する効果の評価	39
第2節 2V0 ラットの嚥下反射障害に対する FAD012 の効果の検討.....	45
第3節 虚血による酸化ストレス障害に対する FAD012 の効果の検討	48
第4節 FAD012 の嚥下反射障害改善メカニズムの解析.....	51
第5節 本章の小括	58
第4章 考察	59
総括	68
謝辞	70
実験の部.....	72
方法	73
第1章 FAD の薬理活性評価 (<i>in vitro</i>) および毒性評価 (<i>in vivo</i>) ...	73
第2章 一過性脳虚血ラットを用いた FAD の脳保護効果に関する検討 ...	76
第3章 慢性脳低灌流ラットを用いた FAD012 の嚥下反射障害改善効果に関する 検討	80
引用文献	83

本論文で使用した略語一覧

ACE: angiotensin converting enzyme

Akt: serine/threonine-specific protein kinase, protein kinase B

ALB: albumin

ALP: alkaline phosphatase

ALT: alanine aminotransferase

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxasole propionate

AMY: amylase

AUC: area under the

BBB: blood-brain barrier

BUN: blood urea nitrogen

CBF: cerebral blood flow

CMC: carboxymethyl cellulose

CPG: central pattern generator

Cr: creatinine

DHE: dihydroethidium

DPPH: 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

eNOS: endothelial nitric oxide synthase

FA: ferulic acid; 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid

FAD: ferulic acid derivative

GLU: glucose

GLUB: globulin

H₂O₂: hydrogen peroxide

i. p. : intraperitoneal

MCAO: middle cerebral artery occlusion

MTT: 3(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide

NMDA: N-methyl-D-aspartate

- OH: hydroxy radical
- O₂⁻: superoxide

PC12: pheochromocytoma-12

PSA: topological polar surface area

p. o. : per os

QOL: quality of life

Re: reperfusion

ROS: reactive oxygen species

SD: Sprague Dawley

SP: substance P

TBIL: total bilirubin

TH: tyrosine hydroxylase

TP: total protein

t-PA: tissue plasminogen activator

TTC: 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride

vWF: von Willbrand factor

WHO: world health organization

2VO: ligation of bilateral common carotid arteries

総論の部

緒言

脳卒中は、世界全体における死因の第2位であり、様々な後遺症を引き起こす重大疾患である [1]。2050年における我が国の65歳以上の人口比率は、世界で最も高くなると推測されており [2]、さらなる超高齢化に伴い、脳卒中患者は今後も増加すると考えられている。また脳卒中は、発症後、永続的な後遺症が残ることが多く、介護原因となる頻度が他の疾患と比較して最も多い [3]。脳卒中のおもな後遺症には、認知症や言語障害などの高次脳機能障害、片麻痺などの運動障害、痺れや痛みなどの感覚障害、嚥下障害が挙げられる [4]。なかでも嚥下障害は、栄養状態の悪化や食への興味の低下によって患者のquality of life (QOL) が低下するばかりでなく、誤嚥性肺炎の合併や窒息のリスクが上昇することから、生死に関わる重篤な後遺症である [5-7]。

現在、脳卒中は世界中で2秒に1人の頻度で発症しているとされる [8]。なかでも脳梗塞は、脳卒中死亡者の約6割と大部分を占めている。その発作は、突発的に生じることから、処置の遅れによる死亡率が高く、救命できた場合でも重篤な後遺症を引き起こす。脳梗塞に対する最も有効な治療は、2005年に承認された組織プラスミノゲン活性化因子 (tissue-plasminogen activator: t-PA) を用いた血栓溶解療法による可及的速やかな血流再開処置である [9]。2012年には、t-PAの適応可能時間が脳梗塞発症後3時間以内から4.5時間以内へと拡大したが、それでも実際に適応できる患者は全体の約3%とごくわずかである [10]。他の治療法として、ラジカルスカベンジャーであるエダラボンによる脳保護療法や、アスピリン、アルガトロバンなどによる抗血小板療法などがあるが、これらの薬剤は腎障害や出血などの重大な副作用リスクをもつ [8, 11]。

そこで著者は、このような脳梗塞治療の現状と問題点を踏まえ、脳梗塞既往歴をもつ患者や高血圧、糖尿病などの生活習慣病罹患者をターゲットとし、安全性が高く、発症前からの予防投与によって脳梗塞発作の障害軽減が可能な予防的治療薬の開発が必要であると考えた。この薬物を発作後も継続して投与することによって、後遺症の予防および改善も期待できる。

Fig. 1 に脳虚血障害のメカニズムとその治療法の概要を示す。脳梗塞による虚血障害は、エネルギー代謝障害による不可逆的なネクロシスが生じる虚血中心部と、比較的障害が軽度で可逆的なアポトーシスが生じるペナンプラ領域にわけられる [12]。t-PAを用いた血流の再開は、コア領域の拡大を防ぎ、ペナンプラ領域を救済することから、現状最も有効な治療法である。一方、血液の再灌流は、虚血部位への急激な酸素供給による活性酸素種 (ROS) の産生増大を引き起こし、ペナンプラ領域に酸化ストレスによるアポトーシスを誘発して障害を増悪することが報告されている [13]。これまでの基礎研究は、主にこのペナンプラ領域の救済を治療ターゲットとし、フリーラジカル消去作用 [14] や血管内皮保護作用 [15]、血管拡張作用 [16-17] を有する化合物の有効性を検証したものが多くみられる。また近年では、天然の抗酸化物質を利用した脳保護効果が数多く報告されている [18-19]。

フェルラ酸 (ferulic acid: FA) は、植物全般に含まれる天然のフェノール性化合物の一種であり、毒性が低く、現在、酸化防止剤や認知症の予防を目的としたサプリメントとして用いられている。これまでの基礎研究から、FAは抗酸化作用を介した抗アポトーシス効果 [20-22]、血管内皮保護作用 [23]、血管拡張作用 [24] やアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害作用 [25] による降圧効果をもつことが報告されている。これらの作用は、脳梗塞の予防や発作時の

脳保護に有効であることから、FAは、予防的治療薬のリードとして必要な作用を多面的に兼ね備えていると考えられる。そこで本研究では、FAをリード化合物として、脳梗塞発症前から発症後慢性期までの継続投与が可能な予防的治療効果を有するFA誘導体（ferulic acid derivative: FAD）化合物の創出を目指した。

本研究の第1章では、FAをリード化合物として抗酸化活性や中枢移行性の増強を目的として分子デザインした13種類のFADについて、抗酸化活性を指標に有効な候補化合物のスクリーニングを行い、選定したFAD012について、培養細胞を用いた毒性および細胞保護効果の検討を行った。続いて第2章では、候補化合物の中からFAD012を選定し、脳梗塞急性期モデルとして汎用されているラット中大脳動脈閉塞/再灌流（MCAO/Re）モデルを用い、脳血流量（CBF）や神経症状、脳梗塞巣の形成に対するFAD012の効果について検討を行った。第3章では、慢性期における嚔下障害モデルとして用いられる慢性脳低灌流モデルを用い、虚血による嚔下反射機能障害に対するFAD012の効果を薬理的に検証した。

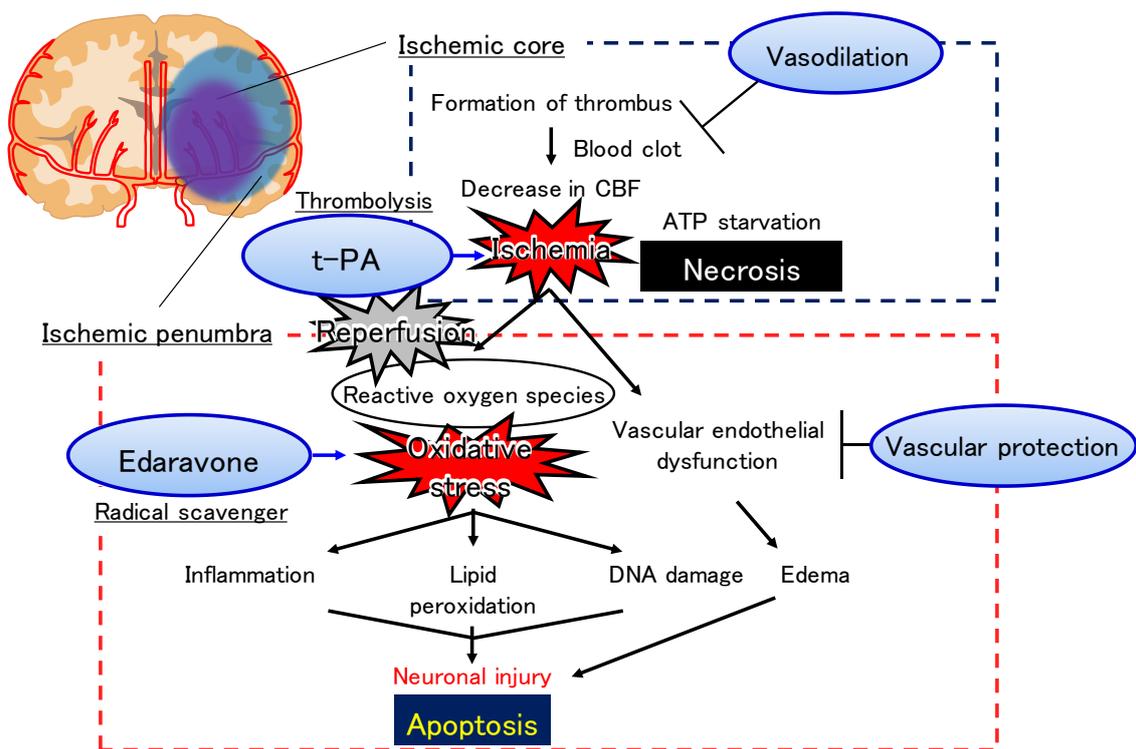


Fig.1 Mechanisms of ischemic brain damage.

第1章 FADの抗酸化活性、細胞保護効果の評価 (*in vitro*) および毒性評価 (*in vivo*)

世界保健機関 (WHO) によると、健康寿命は、日常生活に制限なく健康的に過ごせる期間と定義されており、厚生労働省が推進する健康寿命の延伸を目的とした「健康日本 21 (第2次)」では、生活習慣病に対する対策強化、医療の充実が重点分野とされている [26]。なかでも脳卒中における対策としては、「脳血管疾患の発症の危険因子となる高血圧の改善並びに脂質異常症の減少と、これらの疾患による死亡率の減少等を目標とする」とされている。このような国の政策や国民のセルフメディケーション意識の向上を背景に、近年では、健康の保持増進を目的に用いられている健康食品を応用した代替医療や予防医療への関心が高まっている。

FA は抗酸化作用を有することが知られており、これまで数多くの基礎研究が進められている [27]。アルツハイマー病モデル動物に対する FA の抗酸化作用を介した記憶障害改善効果について、国内外の多数の報告がみられる [28-30]。Nakamura ら (2008) [31] は、アルツハイマー病患者に対する臨床試験により、FA の有効性を国内で初めて実証しており、現在では、FA はアルツハイマー病患者の認知機能改善を目的としたサプリメントとして用いられるようになった。FA は、他にも抗がん作用 [32] や血糖降下作用 [33] など、多岐に渡る薬理活性を有することが報告されている。そのなかでも著者は、とくに抗酸化作用を介した抗アポトーシス効果 [20-22]、血管内皮保護効果 [23]、血管拡張作用 [24]、および ACE 阻害作用 [25] に着目した。

本章では、FA をシード化合物として、抗酸化活性や中枢移行性の向上を目的

として分子デザインした FAD について、*in vitro*における抗酸化活性および ACE 阻害活性を指標に候補化合物を探索した。さらに選定した候補化合物について培養細胞を用いて毒性および細胞保護効果を評価した。また候補化合物の生体に対する予防投与を想定した *in vivo* ラットの長期経口投与による毒性試験を行い、生体内における安全性を検証した。

第 1 節 FAD の抗酸化活性および ACE 阻害活性を指標にしたスクリーニング

脳が虚血状態に陥ると、ROS およびフリーラジカルが産生され、細胞膜リン脂質、蛋白質、DNA などが障害を受け、神経細胞死が引き起こされる。ROS には、スーパーオキシド ($\cdot O_2^-$)、過酸化水素 (H_2O_2) およびヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) が挙げられる。とくに、 $\cdot OH$ は極めて反応性が高いことが知られており、脂質と反応することにより、過酸化脂質を生成する。過酸化脂質は、細胞に傷害を与え、細胞死を引き起こす。脳梗塞急性期には、t-PA などを用いた治療による血流再開により、ROS の産生増大や過剰に生成する過酸化脂質が障害を増悪させることが明らかとなっている [13, 34]。近年では、その治療において、ROS 消去作用や過酸化脂質の産生抑制作用を有する抗酸化物質の応用が試みられている [35]。フリーラジカル消去作用を有するエダラボンは、わが国のみ承認されている脳梗塞急性期における治療薬であり、脳虚血再灌流時に生成される ROS を除去し、酸化ストレスによる細胞障害を防ぐ脳保護薬として用いられている。ビタミン C として知られるアスコルビン酸 (Fig. 2A) は、抗酸化作用をもつが、これには構造上、 $HO-C=C-OH$: エンジオール構造が重要であると考えられている。

アスコルビン酸は、ROS に電子を供与し、自らはラジカルとなるが、共鳴により安定化されることで、ラジカルの連鎖反応を防ぐことができる [36]。またビタミン E である α -トコフェロール (Fig. 2B) は、フェノール性水酸基によってフリーラジカルを捕捉し、自身がラジカルとなって共鳴により安定化される [37]。FA も、フェノール性水酸基によってフリーラジカルに電子を供与することで抗酸化作用を示すと考えられている [20-22, 27]。しかし、FA そのものの抗酸化活性は、さほど強いものではない。そこで、FA をシード化合物にメトキシ基やメチル基、ハロゲンを導入し、抗酸化活性および脂溶性を高め、中枢移行性の向上や薬理作用を強めることを目的に分子デザイン・合成した FAD を本学大学院薬学研究科医薬品化学講座、坂本武史教授より提供していただいた。候補化合物の FAD001~FAD013 の構造式を Fig. 3 に示した。FAD001~FAD005 は、電子供与基であるメトキシ基をベンゼン環の様々な位置に挿入し、電子密度を上げることで抗酸化活性を強め、FAD007~FAD011 は、メトキシ基をハロゲンに変え、脂溶性を高めるようデザインされている。また FAD006 や FAD012 は、メチル基を挿入することにより、電子供与性を維持させつつ、脂溶性を有するようデザインされている。

本節では、各誘導体の抗酸化活性を DPPH ラジカル消去能および過酸化脂質産生抑制能を指標に評価した。さらに ACE 阻害活性を、酵素基質反応を利用して測定した (Table 1)。DPPH ラジカル消去能については、アスコルビン酸と水溶性ビタミン E 誘導体である Trolox (Fig. 2C) の IC_{50} 値は、それぞれ 74.9 μ M、71.4 μ M であり、FA はこれらとほぼ同等の値 (76.6 μ M) を示した。一方、過酸化脂質産生抑制能については、アスコルビン酸の IC_{50} 値は 1850 μ M であり、Trolox の 32.1 μ M と比較して非常に弱かったが、FA は 29.2 μ M であり、Trolox と同等

の効力を示した。アスコルビン酸、TroloxおよびFAの抗酸化活性を基準として、FADの活性を比較評価したところ、FAD007、FAD011 および FAD012 は、DPPH ラジカル消去能、過酸化脂質産生抑制能のどちらについても強い活性が認められた。一方、ACE 阻害活性については、カプトプリル (Fig. 2D) の IC_{50} 値が $0.1 \mu\text{M}$ 以下であったのに対し、FAD には同等の活性を示すものはなく、最も強かった FAD005 でも $33.4 \mu\text{M}$ であった。

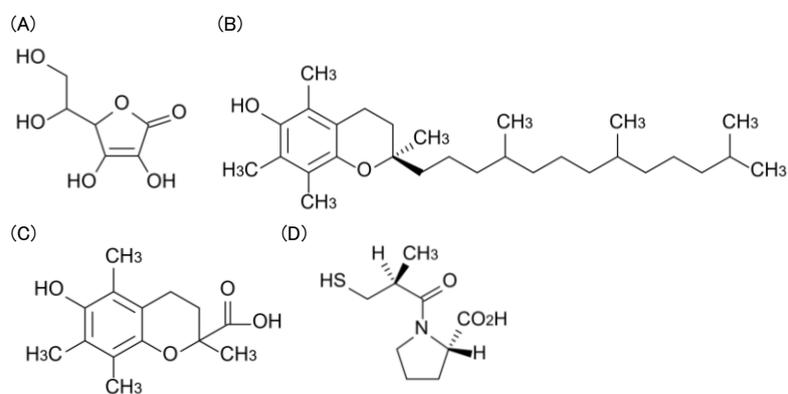
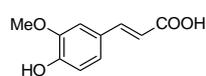
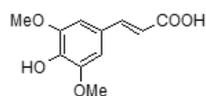


Fig. 2 Structures of ascorbic acid (A), α -tocopherol (B), Trolox (C) and captopril (D).

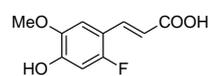
Ferulic acid: FA



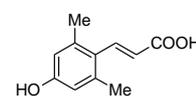
FAD001



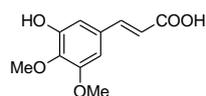
FAD007



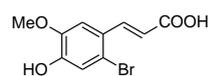
FAD006



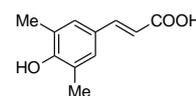
FAD002



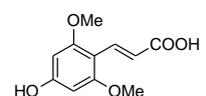
FAD008



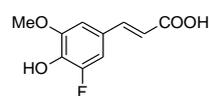
FAD012



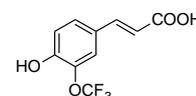
FAD003



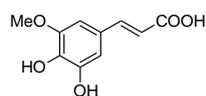
FAD009



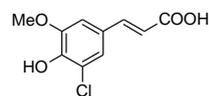
FAD013



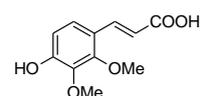
FAD004



FAD010



FAD005



FAD011

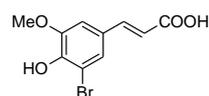


Fig. 3 Structures of FA and FAD001-013.

Table 1 Antioxidative activities and ACE inhibitory activity of FADs.

n=3-6 Sample	Mw	DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀) (μM)	Lipid peroxidation inhibition (IC ₅₀) (μM)	ACE inhibition (IC ₅₀) (μM)
FA	194.18	76.6±10.6	29.2	1355.2
Trolox	250.29	71.4	32.1	-
Vitamin C	176.12	74.9	1850	-
Captopril	217.29	-	-	>0.1
FAD001	224.21	65.5	24.9	2334.1
FAD002	224.21	357	341	>1000
FAD003	224.21	62.2	32.1	2224.5
FAD004	210.21	48.5	121	129.8
FAD005	224.21	679	53.7	33.4
FAD006	192.21	1370	223	418.1
FAD007	212.17	69.5	24.4	378.3
FAD008	273.08	116	38.5	501.4
FAD009	212.17	75.7	21.9	278.1
FAD010	228.62	73.3	20.4	301.2
FAD011	273.08	68.7	19.9	879.5
FAD012	192.21	65.2	23.6	152.0
FAD013	248.15	>30200	268	128.7

さらに、FADの分子量、化学構造をもとに、血液脳関門（BBB）通過のしやすさを理論的に算出した。分子量は、450以下であればBBBでの受動的な浸透が期待できるとされている[37]。また、オクタノール・水分配係数の常用対数値 clogP は、脂溶性の度合いを示しており、topological polar surface area (PSA) は、極性を帯びている分子の表面積として、薬物輸送の予測に使用されるパラメータである。既存の中枢神経系の薬物の多くは、clogPが2付近、PSAは70以下

であることが報告されている [38]。これらの値を算出したところ、FAD のほとんどが BBB 通過に適していたが、抗酸化活性が強かった FAD007、FAD011、FAD012 の中で、 $1.5 < \text{clogP} < 2.5$ 、および $\text{PSA} < 60$ の両条件を満たす化合物は、FAD012 のみであった (Table 2)。以上の結果に基づき、FAD012 を選定し、培養細胞を用いた毒性および細胞保護効果を検討することとした。

Table 2 Structural profiles of theoretical blood-brain barrier permeability of FADs.

	MW	cLogP	PSA (\AA^2)
FA	194.18	1.42	66.76
FAD001	224.21	1.20	70
FAD002	224.21	1.10	86.99
FAD003	224.21	1.70	76
FAD004	210.21	0.88	86.99
FAD005	224.21	1.10	76
FAD006	192.21	2.57	57.53
FAD007	212.17	1.79	66.76
FAD008	273.08	2.51	66.76
FAD009	212.17	1.59	66.76
FAD010	228.62	2.03	66.76
FAD011	273.08	2.23	66.76
FAD012	192.21	2.47	57.53
FAD013	248.15	2.53	66.76

第 2 節 培養細胞を用いた FAD012 の毒性および細胞保護効果の評価

前節において選定した FAD012 について、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞を用いて細胞毒性を評価した。細胞を 2 日間培養し、FAD012 または FA (0.001~3000 μM) を添加した。24 時間培養後、細胞中の ATP 量を指標に細胞生存率を求めた。その結果、FA を添加した細胞では、1000 μM の高濃度においても細胞生存率に影響はみられなかった。FAD012 も FA と同様に、細胞生存率に影響しなかった (Fig. 4)。このことから、FAD012 の細胞に対する毒性は、FA と同等に低いことが明らかとなった。

続いて、酸化ストレス障害に対する FAD012 の細胞保護効果について評価した。 H_2O_2 を培地に添加することによって、虚血時における酸化ストレス障害を培養細胞において擬似的に再現した。PC12 細胞に FAD012 または FA (0.001~1000 μM) を添加し、1 時間後に H_2O_2 を添加し、さらに 4 時間後に MTT assay にて細胞生存率を評価した。 H_2O_2 処置により、細胞生存率は 60%以下に低下したのに対し、FAD012 を添加した場合の細胞生存率は約 80%と、FA を処置した場合よりも高い生存率を示した (Fig. 5)。以上の結果から、FAD012 は、培養細胞に対して、毒性が低く、かつ、酸化ストレス障害による細胞死抑制効果が FA よりも強いことが明らかになった。

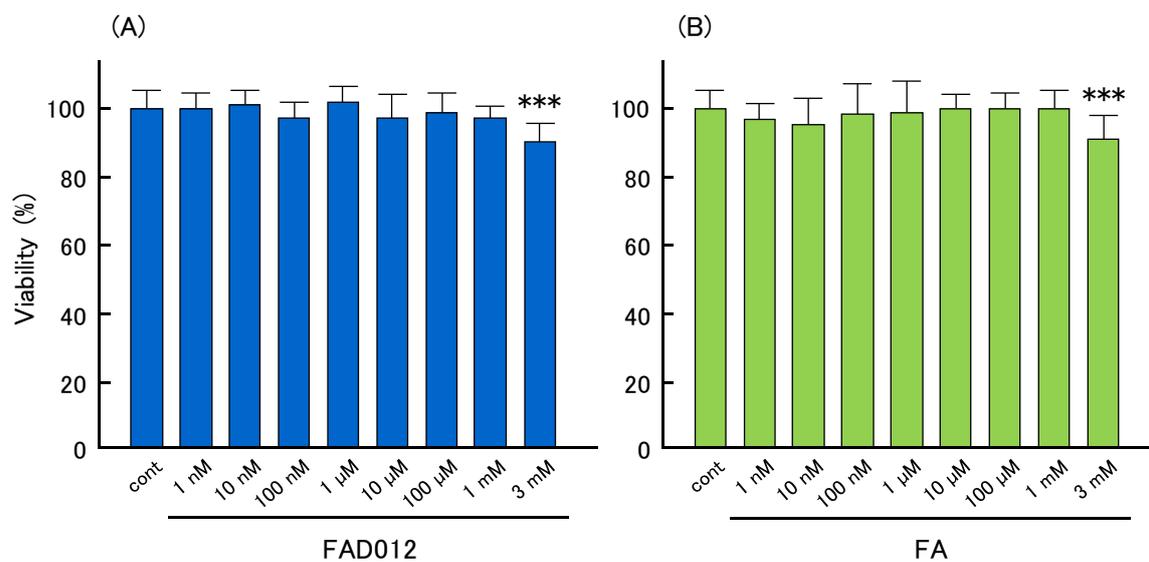


Fig. 4 Cytotoxicity of FAD012 on PC12 cells. PC12 cells were plated and grown for 2 days in culture medium. For assessment of cytotoxicity, cells were treated with FAD012 or FA for 24 h. The viabilities of cells were determined using ATP method. *** $P < 0.001$ compared with control.

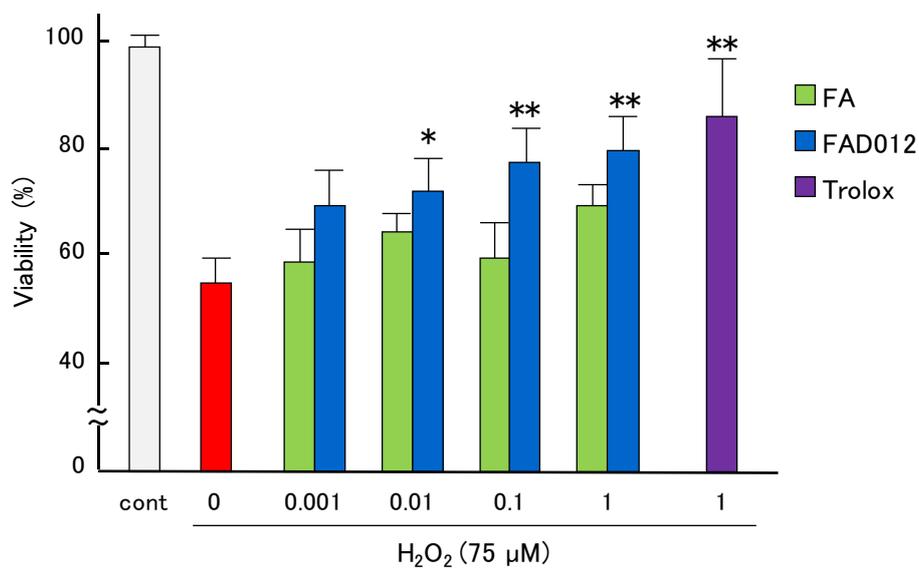


Fig. 5 Protective effects of FAD against oxidative stress on PC12 cells. PC12 cells were plated and grown for 2 days in culture medium. For assessment of cytoprotective activity, cells were treated with FAD012 or FA 1 h prior to induction of oxidative stress by H₂O₂ (70 μM, 4 h). The viabilities of cells were determined using MTT method. *, ** P < 0.05, 0.01 compared with H₂O₂ (n=5-6).

第3節 FAD012 の *in vivo* における毒性評価

培養細胞において、FAD012 の低毒性および有効性が確認できたため、さらに、FAD012 の予防投与を想定し、ラットを用いて FAD012 の長期経口投与による *in vivo* 毒性試験を行った。11 週齢の雄性 Sprague Dawley (SD) ラットに FAD012 (50 mg/kg) または溶媒である 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) を 10 週間、連日経口投与した後、血液を採取して生化学検査を行った (Table 3)。主に肝臓、胆嚢および脾臓の障害の指標であるアルブミン (ALB)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アミラーゼ (AMY)、総ビリルビン (TBIL) および総タンパク (TP) について評価した結果、FAD012 群では、CMC を投与した Vehicle 群と比較して、ALP のみ上昇傾向を示した。肝臓などの臓器毒性がある場合、ALP とともに TBIL などの上昇がみられるが、これらの値にも変化はみられなかった。腎障害の指標である血中ビリルビン (BUN) やクレアチニン (Cr) についても差はみられず、電解質異常もみられなかった。以上のことから、FAD012 の長期経口投与によるラットの臓器毒性は少ないと考えられる。

Table 3 Blood chemical analysis in rats with long-term oral administration of FAD012.

	Vehicle	FAD012 (50 mg/kg)
Relative Body Weights (%)	156±4.6	144±0.6
Inspection Item		
albumin (ALB)	4.8±0.2	5.4±0.1
alkaline phosphatase (ALP)	184±14.7	294.6±62.9
alanine aminotransferase (ALT)	52.5±0.4	67.3±21.0
amylase (AMY)	857.5±75.5	992.6±129.3
total bilirubin (TBIL)	0.3	0.3
blood urea nitrogen (BUN)	23±0.8	18±0.6
phosphorus (P)	6.05±0.3	6.7±0.3
creatinine (Cr)	0.55±0.1	0.4±0.1
glucose (GLU)	198.5±11.8	154.6±5.3
total protein (TP)	7.55±0.2	7.8±0.4
globulin (GLUB)	2.7±0.1	2.4±0.2
Na ⁺	141	139.3±1.8
K ⁺	6.05	6.2±0.2
Ca ²⁺	10.6	10.3±0.1

第4節 本章の小括

1. FA をシード化合物とした FAD13 種類について DPPH ラジカル消去能、過酸化脂質産生抑制能、および ACE 阻害活性を指標にしたスクリーニングを行った結果、FAD012 はアスコルビン酸、Trolox および FA よりも強い抗酸化活性を示した。
2. BBB 通過の指標となる分子量、cLogP、PSA を算出した結果、FAD012 は、理論的に BBB 通過に適した構造であることが示された。
3. 培養細胞を用いて毒性評価を行った結果、FAD012 は FA と同様に細胞毒性が低いことが確認された。
4. FAD012 は、 H_2O_2 による酸化ストレス障害に対して、FA よりも強い細胞保護効果を示した。
5. 予防的投与を想定した FAD012 のラット慢性経口投与による毒性試験の結果、FAD012 は、生体内においても毒性が低いことが確認された。

以上、本章の *in vitro* 評価の結果より、FAD012 は、低毒性であり、かつ FA よりも強い細胞保護効果を有することが明らかとなった。さらに、FAD012 のラットにおける生体内毒性を評価した結果、長期的な予防投与が可能であることが示された。

第 2 章 一過性脳虚血ラットを用いた FAD012 の脳保護効果に関する検討

ヒトにおける脳梗塞の約 7 割は、中大脳動脈の閉塞によるものである。とくに動脈起始部の閉塞は、梗塞が広範囲に及び、重度の運動障害、意識障害や言語障害をもたらし、一命を取り留めた場合にも、大部分の患者に後遺症が残存し、生活に支障をきたさないほど劇的に回復することはごく稀である [5]。正常な脳では、大脳皮質における脳血流量 (CBF) は約 70 mL/100 g/min であるが、脳が虚血状態に陥り、6 mL/100 g/min 以下まで低下すると、細胞にネクローシスが起る。しかし、CBF が 6-15 mL/100 g/min の脳組織では、神経細胞の興奮 (活動電位の発生) は停止しているが、膜電位を維持するための細胞膜機能は保たれており、Astrup ら (1977) [39] は、このような組織をペナンプラ領域とする概念を提唱した。ペナンプラ領域は、時間経過とともにアポトーシスが生じて梗塞巣が形成されるが、早期の血流再開などにより救済が可能である組織と定義され [40]、治療の主なターゲットとなっている。実際、脳梗塞急性期における t-PA による血流再開処置は、発症後なるべく早く実施するほど早期の血流再開が期待でき、効果が高いことが報告されている [41]。しかし、t-PA の治療可能時間は、発症後 4.5 時間以内と限られており、突発的に起こる脳梗塞発作に迅速に対応することが困難である場合が多く、実際に適応できる患者は全体の約 3%とごくわずかである [10]。このような背景から、t-PA に代わる効果的な治療薬を見出すべく、研究が活発に行われているが、近年では、NXY-059 がエダラボンに代わる新規抗酸化薬として期待されたが、臨床試験から効果が確認されず、開発が中止された。またアストロサイトの活性を抑制する ONO-2506 も臨床試験により有効性は示されなかった。このように現在の脳梗塞治療にお

ける新規脳保護薬の開発は滞っている状況であり、新たな化合物の開発が期待されている [8]。1986年に、Koizumiら [42] によって、MCAO/Re 処置による一過性脳虚血ラットが中大脳動脈起始部の閉塞による虚血障害および血流再開に伴う再灌流障害を再現した脳梗塞急性期モデルとして有用であることが示され、現在、このモデルが基礎研究で汎用されている。そこで、本章では、前章で選定した FAD012 の脳梗塞急性期における予防的治療効果を検証するため、MCAO/Re 処置ラットを用いて、薬理的検討を行った。

第1節 虚血-再灌流時における脳血流量の評価

実験デザインを Fig. 6 に示した。11 週齢雄性 SD ラットに FAD012 (10 または 30 mg/kg) を 1 週間経口投与した後、MCAO/Re 処置を施した。比較対照として、FA (10 または 30 mg/kg) または溶媒である 0.5% CMC を投与し、同様の処置を行った。まず、MCAO/Re 処置によって大脳皮質表層における CBF を、レーザードップラー式血流計を用いて経時的に測定した。その結果、CMC を投与した Vehicle 群では、CBF は MCAO 処置によって 57.5% まで低下し、2 時間の MCAO 処置中に 49.4% まで徐々に低下した。その後の Re 処置により、CBF の完全な回復がみられた。FA (30 mg/kg) 群の CBF は、MCAO 処置直後において 58.3%、処置 2 時間後では 48.4% と、Vehicle 群と同様の推移を示した。一方、FAD012 (30 mg/kg) 群では、MCAO 処置直後の CBF は 64.3% であり、Vehicle 群と比較して CBF の減少が抑制された。また FAD012 の CBF 低下抑制作用は、2 時間の MCAO 処置中、持続した (Fig. 7A)。MCAO 処置中の CBF 値から算出した総血流量 (AUC) は、FAD012 (30 mg/kg)

群では、Vehicle 群と比較して統計学的に有意な高値を示した。FA 群は Vehicle 群と差はなかった (Fig. 7B)。

Animal: SD rats (11 week, ♂)

Group	Treatment	Operation
① Sham	0.5% carboxymethyl cellulose (p.o.)	Sham
② Vehicle		Middle cerebral artery occlusion and reperfusion (MCAO/Re)
③ FAD	FAD012 (10 or 30 mg/kg, p.o.)	
④ FA	FA (10 or 30 mg/kg, p.o.)	

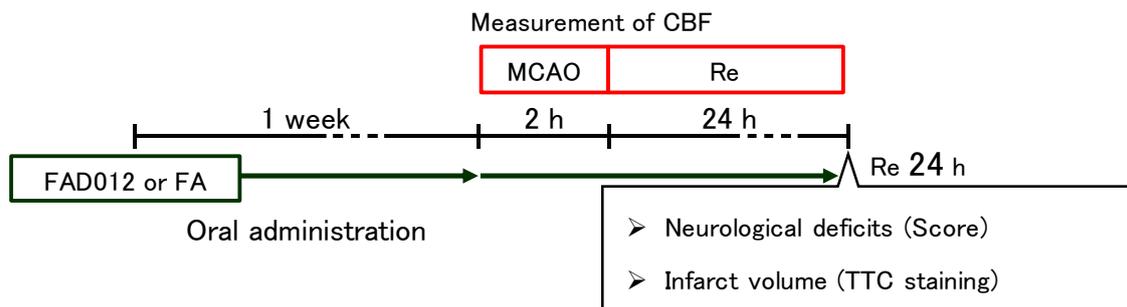


Fig. 6 Experimental protocol of *in vivo* study to evaluate cerebroprotective effects of FAD012 using MCAO/Re rats.

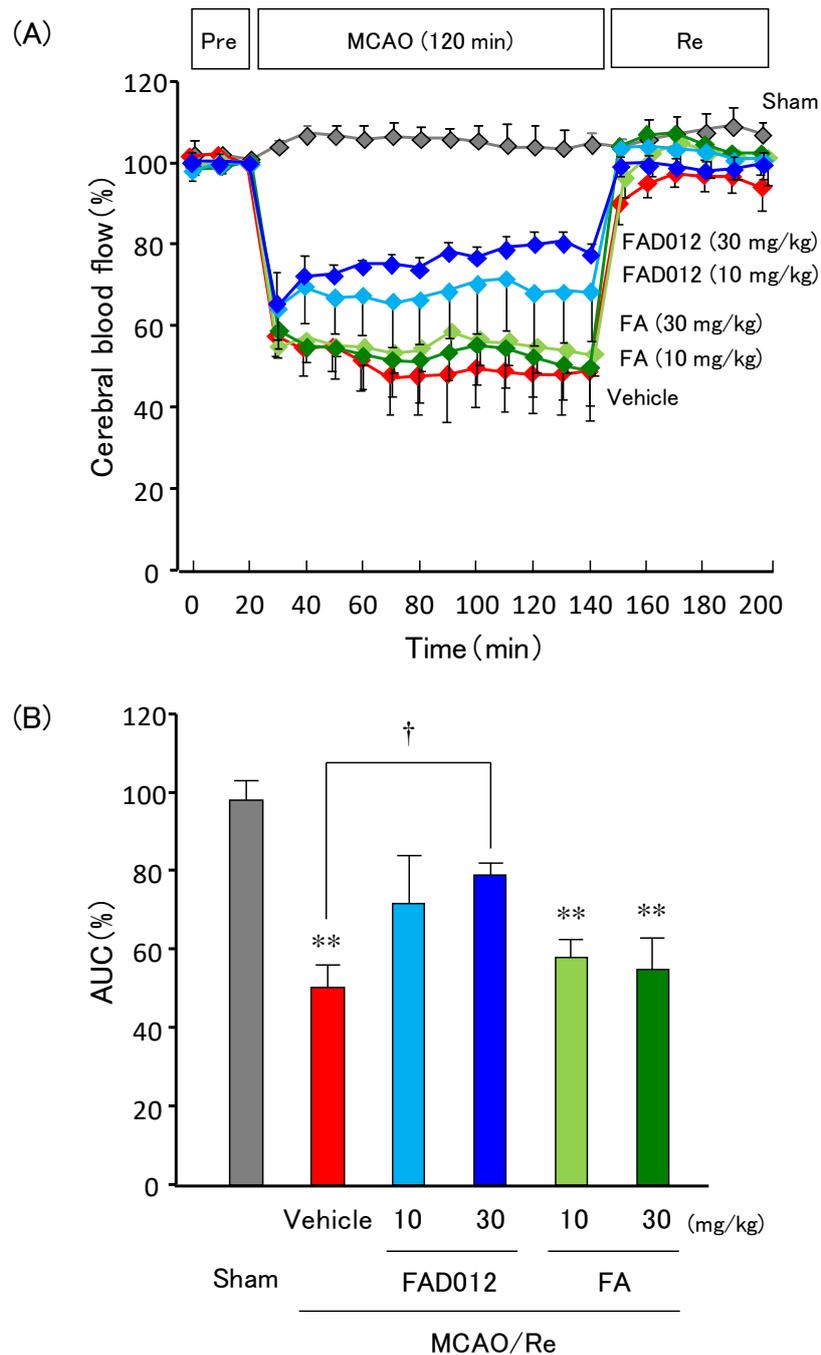


Fig. 7 Effects of oral administration of FAD012 on temporal change in cerebral blood flow (CBF) in MCAO/Re rats. CBF was measured in cerebral cortex supplied by the middle cerebral artery using a laser Doppler flowmetry. Values of CBF represented by means of pre-MCAO (A). The area under the curve (AUC) for CBF was determined in each group (B). The data are represented as means \pm S. E. M. ; n=4-5 in each group. ** P < 0.01 vs Sham, † P < 0.05 vs Vehicle.

第 2 節 FAD012 の脳保護効果の検討

FAD012 の脳保護効果を検討するため、Re 処置 24 時間後のラットの神経症状を神経学的欠損スコアにより評価した (Fig. 8)。Vehicle 群の神経学的欠損スコアは、 8.6 ± 1.3 であったのに対し、FAD012 (30 mg/kg) 群では 3.6 ± 2.3 であり、有意な神経症状の改善がみられた。Re 処置 24 時間後の脳梗塞巣形成の度合いを TTC 染色によって評価したところ、Vehicle 群のラットでは、bregma +4 mm から -4 mm までの広範囲に梗塞巣の形成がみられ、特に大脳皮質から線条体の障害が顕著であった。一方、FAD012 群では、梗塞巣は線条体の一部のみに限局し、大脳皮質においては梗塞の形成はほとんどみられなかった。Vehicle 群の脳梗塞巣体積は、 $29.5 \pm 2.3\%$ であったのに対して、FAD012 群では $6.3 \pm 3.5\%$ であり、梗塞巣体積が有意に抑制された (Fig. 9)。FA 群では、皮質領域の梗塞形成の抑制はみられなかった。前節も含め、得られた結果を総合すると、FAD012 の予防投与は、MCA 閉塞時に CBF を維持することにより、大脳皮質を中心としたペナンブラ領域の虚血状態を軽減し、脳梗塞巣の形成および神経症状の発現を抑制したと考えられる。

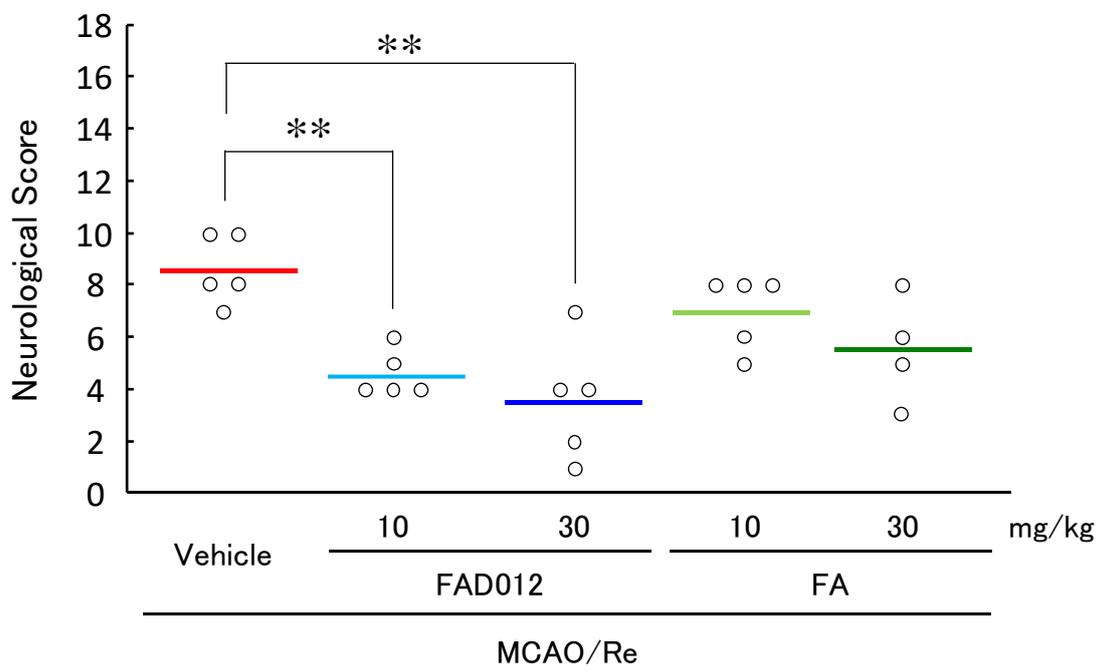


Fig. 8 Effects of FAD012 on neurological deficits induced by MCAO/Re in rats. Neurological deficits were evaluated using an 18-point scale at 24 h of reperfusion after MCAO. The data are represented as means \pm S.E.M. ; n=4-5 in each group. ** P < 0.01 vs Vehicle.

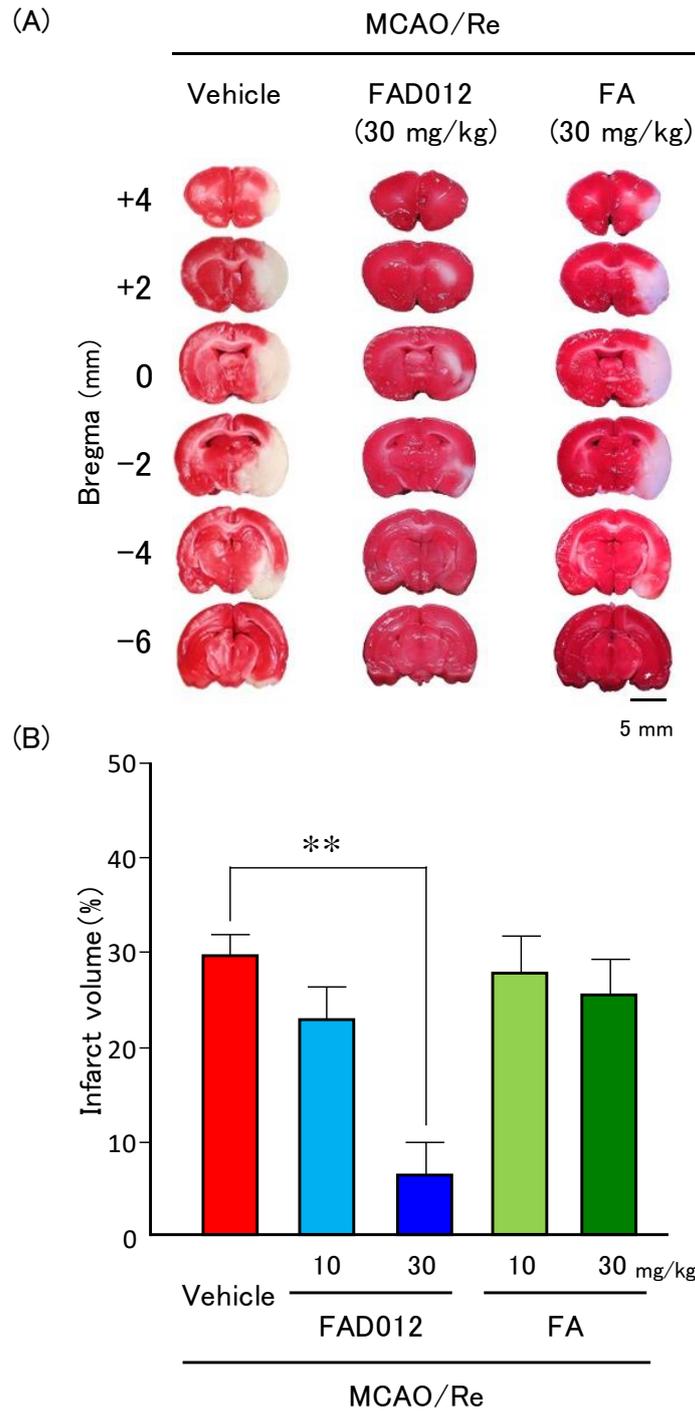


Fig. 9 Infarction inhibitory effects of FAD012 in MCAO/Re rats. Representative photographs of TTC staining of coronal brain sections of each groups at 24 h of reperfusion (A). Infarct volume in ischemic hemispheres (B). The data are represented as means \pm S. E. M. ; n=4-5 in each group. ** P < 0.01 vs Vehicle.

第3節 2次元レーザー血流画像装置を用いた FAD012 の脳血流維持作用の解析

FAD012 の CBF 維持作用について、2次元レーザー血流画像装置を用いて詳細に検証した。ラットの頭蓋骨に骨窓を作製し、大脳皮質表層を露出させ、MCAO 処置前後の CBF の変化を画像化した。MCAO 処置前の CBF 画像において、MCA 灌流域の主幹動脈は血流量が多いため赤色に、周辺の細動脈は血流量が少なく、黄色から緑色の色調となった (Fig. 10A)。MCAO 処置前の画像については、Vehicle 群と FAD012 群の間に差はみられなかった。MCAO 処置後の CBF 画像は、Vehicle 群では、MCA 主幹動脈を中心に赤色から青色に変化し、広範囲にわたって CBF の減少が確認された。一方、FAD012 群では、MCAO 処置中の 120 分間、主幹動脈および周辺の細動脈は黄色～赤色に保たれ CBF が継続して維持された (Fig. 10B)。CBF を数値化したところ、虚血前の CBF の絶対値は、Vehicle 群および FAD012 群の両群に差はみられなかった (Fig. 10C)。また、MCAO 処置後の CBF 値を、虚血前を 100%とした割合でグラフ化したところ、Vehicle 群の梗塞領域では、MCAO 処置により CBF が約 60%まで低下したのに対し、FAD012 群では 70-80%に維持され、Vehicle 群と比較して CBF の減少が有意に抑制された (Fig. 10D)。また、統計学的な差は認められなかったが、FAD012 群では、Vehicle 群と比較して、非梗塞領域においても CBF の増加傾向がみられた。

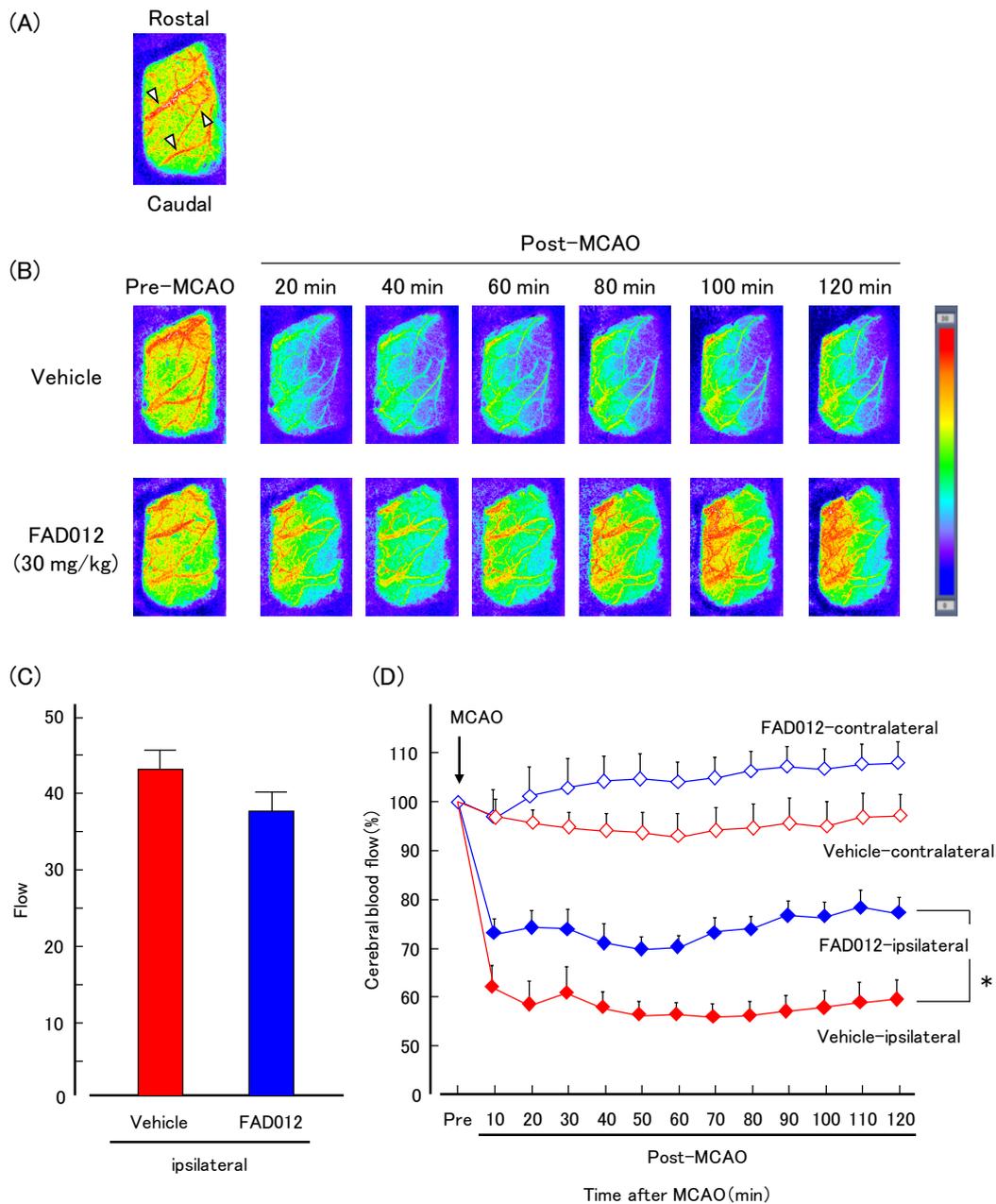
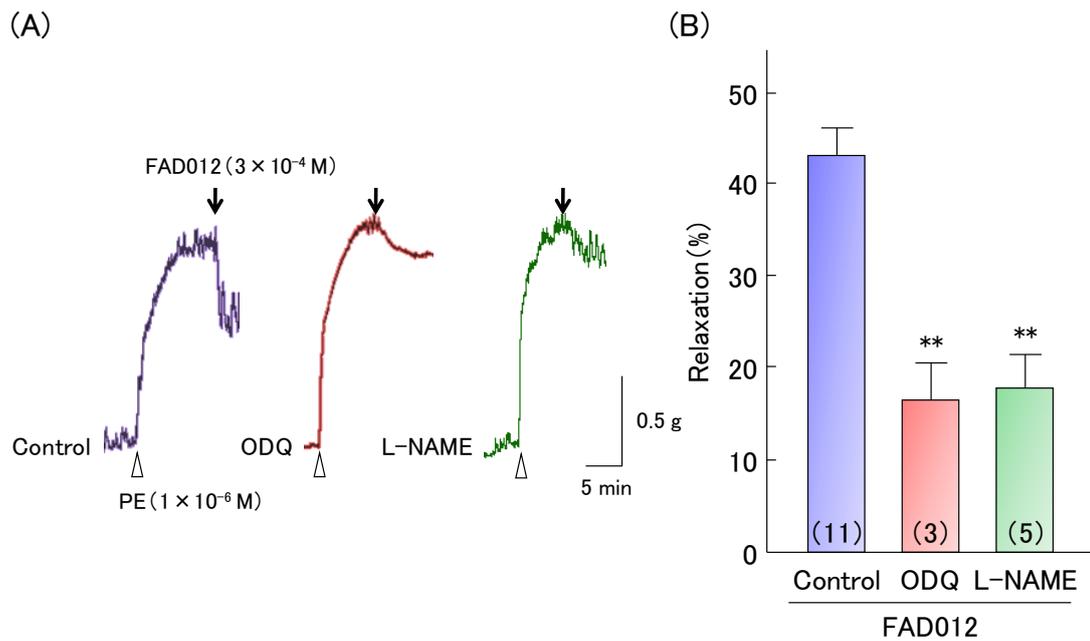


Fig. 10 Effects of oral administration of FAD012 on temporal change in CBF after MCAO. CBF was measured in the cerebral cortex supplied by MCA using a laser Doppler flowmetry. Representative images of CBF at the indicated time points pre and post MCAO in Vehicle and FAD012-treated groups (B). Absolute values of CBF before MCAO in Vehicle and FAD012-treated groups (C). Temporal changes of CBF in Vehicle and FAD012-treated rats after MCAO. Values of CBF were represented relative to pre-MCAO corresponding to each groups (D). The data are represented as means \pm S. E. M. ; n=4-5 in each group. ** P <0.01 vs Vehicle-ipsilateral.

第4節 FAD012の脳血流量維持作用メカニズムの解析

前節までの結果を踏まえ、虚血時におけるFAD012のCBF維持作用メカニズムを検討した。FAD012は、正常時の大脳皮質のCBFには影響せず、虚血状態において特異的にCBF維持作用を発揮することから、低酸素状態に応答して脳血流量を増加させるものと推察された。脳循環は、種々の脳血管作用メディエータを介して調節されるが、血管拡張にはたらくものとして、ガス性のメディエータである一酸化炭素(CO)や一酸化窒素(NO)が挙げられる。これらは、どちらも血管平滑筋可溶性グアニル酸シクラーゼをターゲットとし、細胞内シグナルであるcGMP上昇を介してcGMP依存性キナーゼを活性化し、平滑筋細胞内のCa²⁺濃度を減少させることで血管拡張作用を示す。しかしCOの血管拡張作用は、NOのわずか1%の強さしかなく、比較的弱いことが報告されている[43]。NOは、NO合成酵素(NOS)によって酸素とL-arginineから産生され、血管拡張を惹起する。一方、Kohら(2012)[23]は、FAがMCAO/Reモデルラットの大脳皮質において、MCAO処置24時間後の血管内皮依存型NOS(eNOS)の減少を抑制することを明らかにしている。また、著者の所属講座の先行研究(平成29年度本学薬学部薬学科卒業研究 金沢敏男)において、マウス胸部大動脈標本に、NOS阻害薬であるN⁶-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)およびグアニル酸シクラーゼ阻害薬1h-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one(ODQ)を前投与し、FAD012の作用を評価した結果、これらの阻害剤によって、FAD012の血管拡張作用が消失することが明らかにされている(Supplemental fig. 1)。これらのことから、FAD012の血管拡張反応には、NO合成経路が関与していることが考えられる。そこで、本節では、FAD012のCBF維持作用がeNOSの発現を介

する可能性について、大脳皮質における eNOS 発現量の組織学的評価によって、検証することとした。FAD012 による CBF 維持が確認された MCAO 処置 120 分後の大脳皮質切片を作製し、eNOS と血管内皮マーカーである von Willebrand factor (vWF) の各抗体を用いた二重染色を行った。結果を Fig. 11 に示す。Vehicle 群では、梗塞領域において、血管内皮に局在する eNOS の発現が顕著に低下したが、FAD012 群では梗塞領域の eNOS 発現が維持された (Fig. 11A)。一方、vWF の発現には、両群で差が認められなかったことから、Vehicle 群における eNOS 発現の低下は、内皮細胞の壊死によるものではないと考えられた。蛍光強度をグラフ化した結果、FAD012 群では、Vehicle 群と比較して、梗塞領域における eNOS 発現量の減少が非梗塞領域と同レベルまで有意に抑制された (Fig. 11B)。これらの結果から、FAD012 の虚血時における CBF 維持作用には eNOS 発現量低下の抑制が関与する可能性が示された。



Supplemental fig. 1 Dilative mechanism of FAD012 in mouse aorta. Representative recordings of FAD012-induced vasodilations on phenylephrine (1 × 10⁻⁶ M)-contractions in mouse aortic segment pretreated with ODQ or L-NAME (A). Values of vasodilation caused by FAD012 were represented relative to those of phenylephrine-contractions (B). The data are represented as means ± S.E.M.; n=3-11 in each group. ** P < 0.01 vs Control.

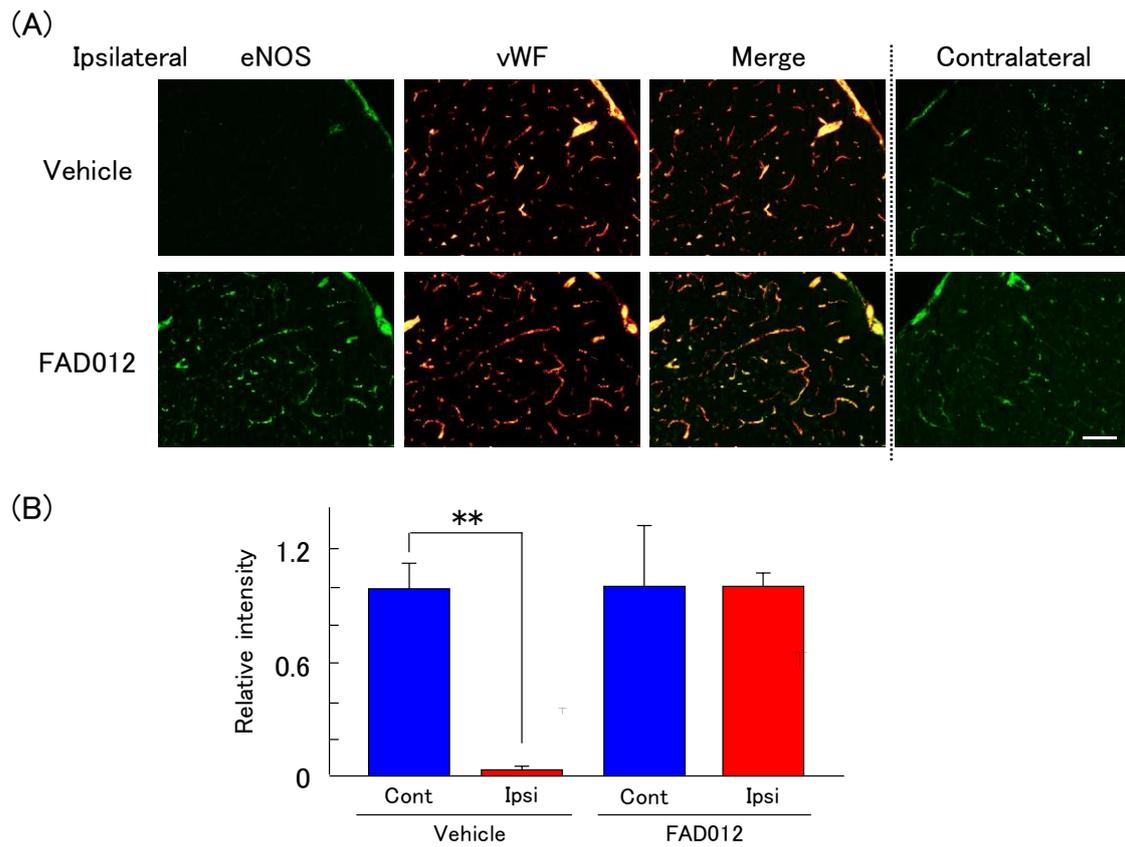


Fig. 11 Double immunostaining of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (green) and von Willbrand factor (vWF) (red) in the cortex 2 hr after MCAO (A). scale bar = 100 μ m; Fluorescence intensity of eNOS was quantified using imaging software focused in the relevant areas (B). The data are represented as means \pm S.E.M. ; n=4 in each group. ** P < 0.01 vs Vehicle-contralateral.

第5節 本章の小括

1. MCAO/Re 処置モデルを用いて、脳梗塞急性期における脳障害に対する FAD012 の予防的投与による効果を FA と比較検討した。
2. FAD012 は、MCAO による CBF の減少を抑制した。この効果は、同用量の FA には認められなかった。
3. FAD012 は、MCAO/Re による神経症状を FA よりも強く抑制した。
4. FAD012 は、脳梗塞巣の形成を FA よりも強く抑制した。
5. 2次元レーザー血流画像装置による検証の結果、FAD012 は、正常時の CBF には影響せず、MCAO 時の MCA 主幹動脈およびその周辺の細動脈の血流量を維持することが明らかとなった。
6. FAD012 は、大脳皮質血管内皮において、MCAO による eNOS 発現の低下を抑制した。

以上のことから、FAD012 は、虚血時の eNOS 発現の低下を抑制することにより、CBF を維持し、脳梗塞巣の形成を抑制し、神経症状を軽減することが示唆された。

第3章 慢性脳低灌流ラットを用いた FAD012 の嚥下反射障害改善効果に関する 検討

脳梗塞の慢性期における後遺症として、認知症、失語などの高次脳機能障害、片麻痺などの運動障害、痺れ、痛みなどの感覚障害、嚥下障害などが高頻度に生じる [44]。Martino ら (2005) [45] の報告によれば、脳梗塞患者の 29-67% に嚥下障害がみられ、ときに致死的な誤嚥性肺炎を合併する原因となる。Schmidt ら (1988) [46] は、誤嚥性肺炎を発症後、1 年以内に 20%以上の患者が死亡していると報告している。このように脳梗塞による嚥下障害は、後遺症のなかでもとくに重篤であるが、現在、有効な予防・治療薬は存在せず、その対策の強化が急務である。

反射性の嚥下は、咽喉頭粘膜に分布する上喉頭神経および舌咽神経の感覚入力によって延髄の中樞パターン発生器 (CPG) が駆動し、惹起される。CPG には、嚥下関連筋にパターン化された一連の収縮を発現する神経回路が存在しており、嚥下運動の出力生成に関与しているとされる [47]。大脳基底核における黒質-線条体神経系は、嚥下反射を惹起するトリガー領域の一部として重要な役割を果たしており、大脳基底核が責任病巣となる脳梗塞による嚥下障害の治療ターゲットとなりうると考えられている [48]。一方、嚥下反射には、局所におけるトリガー物質として咽喉頭領域の知覚神経終末から放出されるサブスタンス P (SP) が重要である [49]。嚥下障害では、黒質-線条体系におけるドパミン産生・貯蔵が低下し、これにより咽喉頭 SP が減少することが報告されている [50]。Kajii ら (2002) [51] は、両側総頸動脈を永久結紮することにより作製した慢性脳低灌流ラットが、上記の病態メカニズムに起因した嚥下障害を引き起こす

障害モデルとして有用であることを報告している。そこで、本章では、両側総頸動脈永久結紮（2V0）処置を施した慢性脳低灌流ラットにおける嚔下反射機能障害に対する FAD012 の効果についての薬理学的検討を行った。

第 1 節 FAD012 の慢性脳低灌流ラットの脳血流量低下に対する効果の評価

実験デザインを Fig. 13 に示した。FAD012（3 または 10 mg/kg）、FA（3 または 10 mg/kg）、対照として 0.5% CMC を 2V0 処置の一週間前から連日経口投与した。麻酔下、ラットに 2V0 処置を行い、処置後 2 週間の生存率を評価した。その結果、Vehicle 群のラットは、2V0 処置後 24 時間以内に約 30%が虚血によって死亡し、2 週間後の生存率は、約 65%であった。FA（10, 30 mg/kg）を投与したラットも同様の死亡率であった。一方、FAD012 群のラットは、2V0 処置 24 時間後では 90%以上が生存しており、2 週間後も約 85%と、高い生存率がみられた (Fig. 14)。

続いて、2V0 処置前後の CBF を評価した。ラット頭蓋骨の bregma から前方 1、3 mm および後方 3、5 mm、それぞれ左右 1.5 mm の計 8 か所の大脳皮質表層における CBF を、レーザードップラー式血流計を用いて、2V0 処置前から 2 週間後まで継続して測定した。Fig. 15A のグラフは、虚血前の CBF を 100%とした両半球の CBF の平均を示すが、Vehicle 群の CBF は、測定したすべての部位において、2V0 処置直後に約 50%まで減少した。FA 群においても同様の結果となった。一方、FAD012 群では、2V0 処置直後の CBF の減少が有意に抑制された。この効果は、2V0 処置 2 週間後まで継続してみられた。さらに、2V0 処置前から処置 2 週間後

までの総 CBF 値を算出したところ、Vehicle 群では、すべての部位で総 CBF 値が約 70%まで減少したのに対して、FAD012 群では、総 CBF 値の減少が有意に抑制された (Fig. 15B)。第 2 章において、FAD012 は虚血後急性期の CBF の低下を抑制することを実証したが、本節の結果から、FAD012 の継続投与は 2V0 による全脳の慢性的な CBF 低下に対しても抑制効果を示し、長期にわたって CBF を維持することが明らかになった。

Animal: SD rats (11 week, ♂)

Group	Treatment	Operation
① Sham	0.5% carboxymethyl cellulose (p.o.)	Sham
② Vehicle		Ligation of bilateral common carotid arteries (2VO)
③ FAD	FAD012 (3 or 10 mg/kg, p.o.)	
④ FA	FA (10 mg/kg, p.o.)	

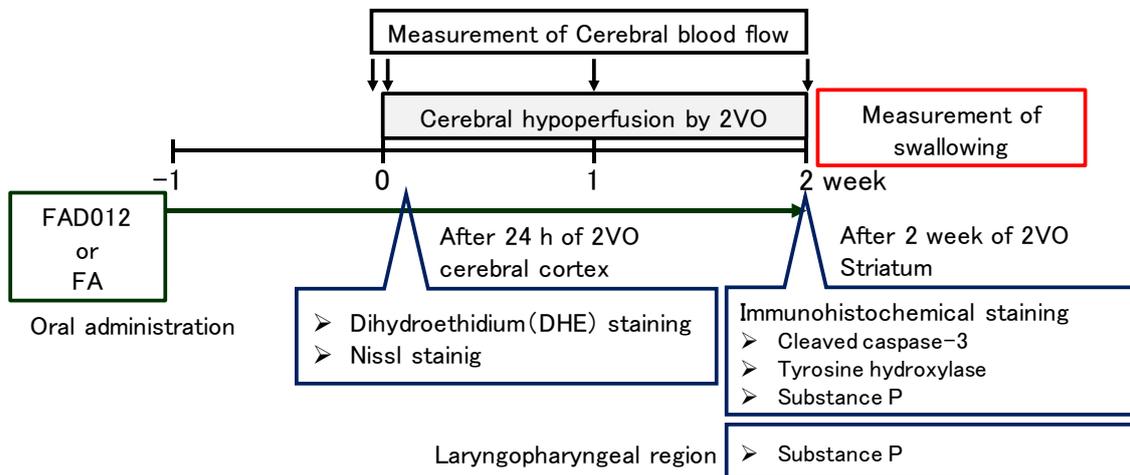


Fig. 13 Experimental protocol of *in vivo* study to evaluate cerebroprotective effects of FAD012 using 2VO rats.

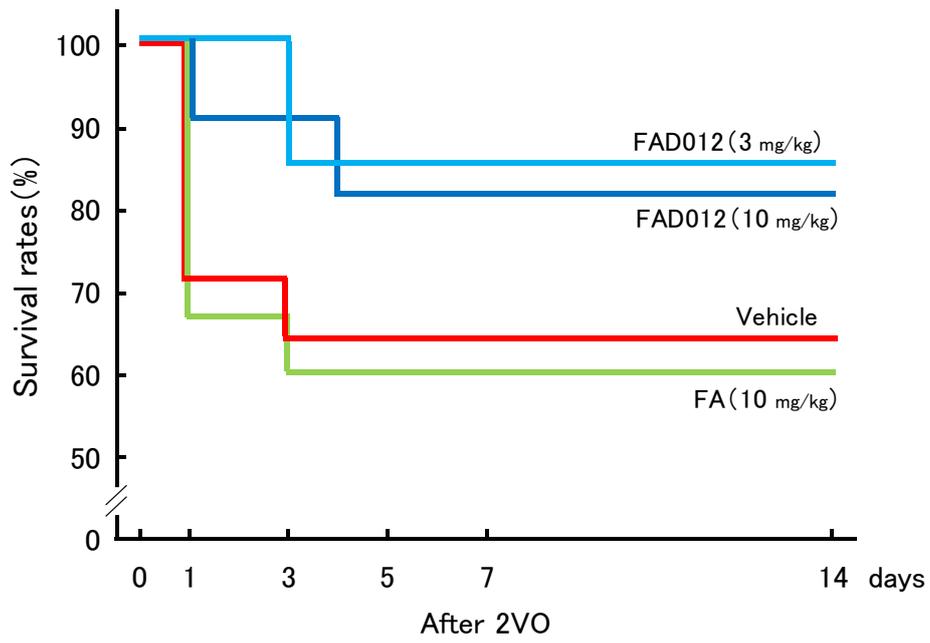


Fig. 14 Survival rates of each group at 14 days of ligation of bilateral common carotid arteries (2VO).

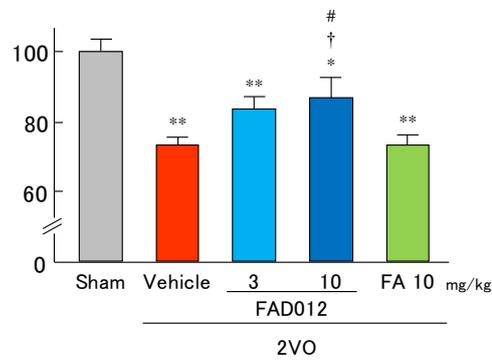
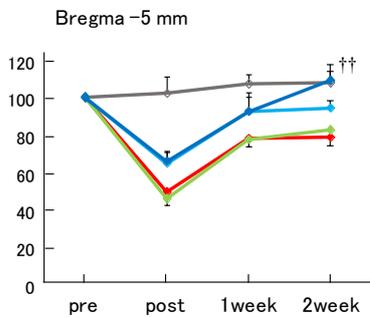
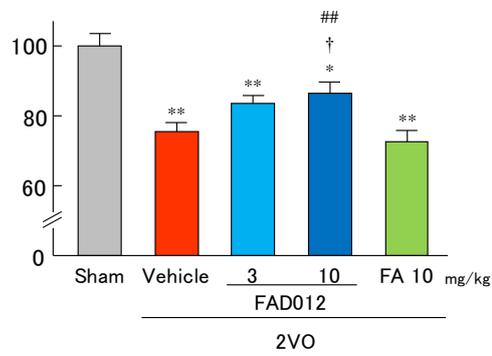
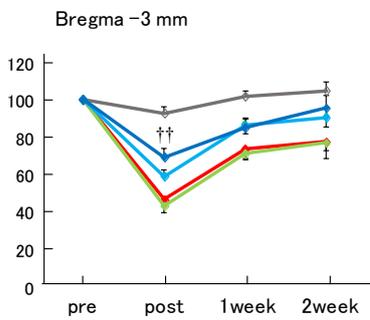
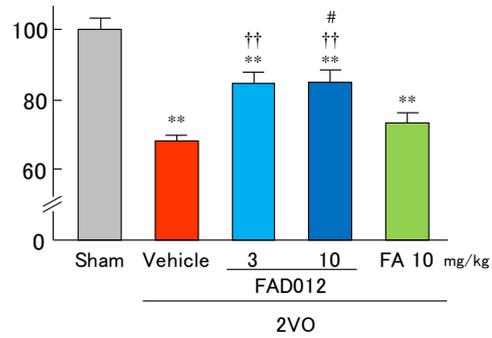
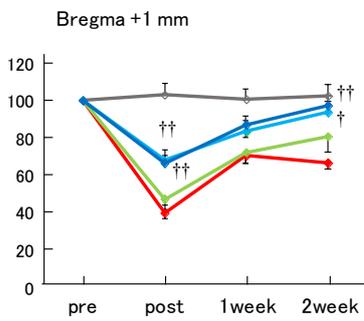
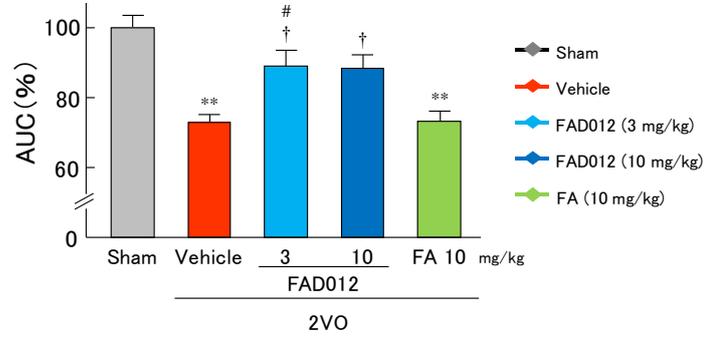
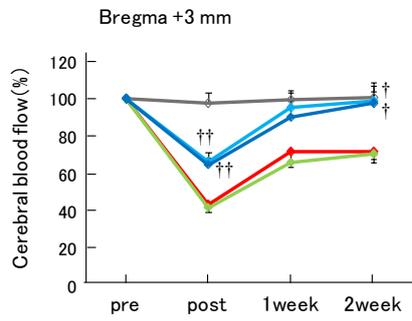


Fig. 15 Effects of chronic treatment with FAD012 on temporal change in CBF in 2VO rats. Surficial blood flow at four rostrocaudal levels in the cortex (+3.0, +1.0, -3.0, and -5.0 mm rostrocaudal and 3.0 mm lateral from bregma) was sequentially measured before (Pre) and immediately, 7 and 14 days after (Post) 2VO using flowmetry (A); Values of CBF are represented by means of both hemispheres' measurements. The area under the curve (AUC) for CBF was determined in each group (B). The data are represented \pm S. E. M. ; n = 6-9 in each group. * ** P < 0.05, 0.01 compared with the sham-operated vehicle group. † P < 0.05 compared with the 2VO-vehicle group.

第2節 2V0 ラットの嚔下反射障害に対する FAD012 の効果の検討

2V0 処置から2週間後に、麻酔下、ラットの喉頭蓋近傍に水またはクエン酸を刺激液として注入し、誘発される嚔下反射を顎舌骨筋の筋電図にて測定し、各刺激液注入から45秒間の嚔下反射の回数および刺激液注入から嚔下が起こるまでの潜時を嚔下反射機能の指標として評価した。その結果、Vehicleのみを投与したラットでは、2V0 処置によって嚔下の潜時が延長し、回数が減少した (Fig. 16A)。一方、FAD012 を投与したラットでは、Sham 処置のラットと同程度の嚔下反射がみられた。嚔下反射の回数 (Fig. 16B) および潜時 (Fig. 16C) をそれぞれグラフで示した。Vehicle 群では、Sham 群と比較し、各刺激液によって誘発される嚔下回数が有意に減少した。一方、FAD012 群では Vehicle 群と比較し、嚔下回数が有意に増加し、Sham 群と同程度の嚔下反射が認められた。また Vehicle 群では、Sham 群と比較し、嚔下反射潜時の有意な増加がみられた。これに対して、FAD012 群は、Vehicle 群と比較して、反射潜時が有意に減少した。FA 群では、嚔下反射障害に対する効果は認められなかった。以上の結果から、FAD012 の予防投与は、慢性脳低灌流状態の CBF を長期的に維持し、虚血後の後遺症である嚔下障害を予防・改善したと考えられる。

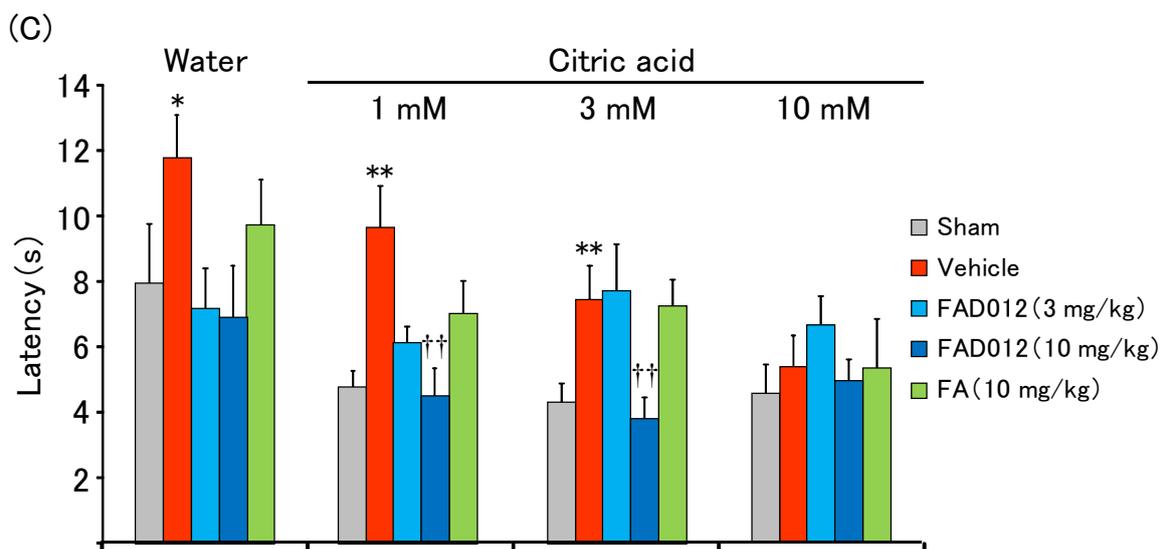
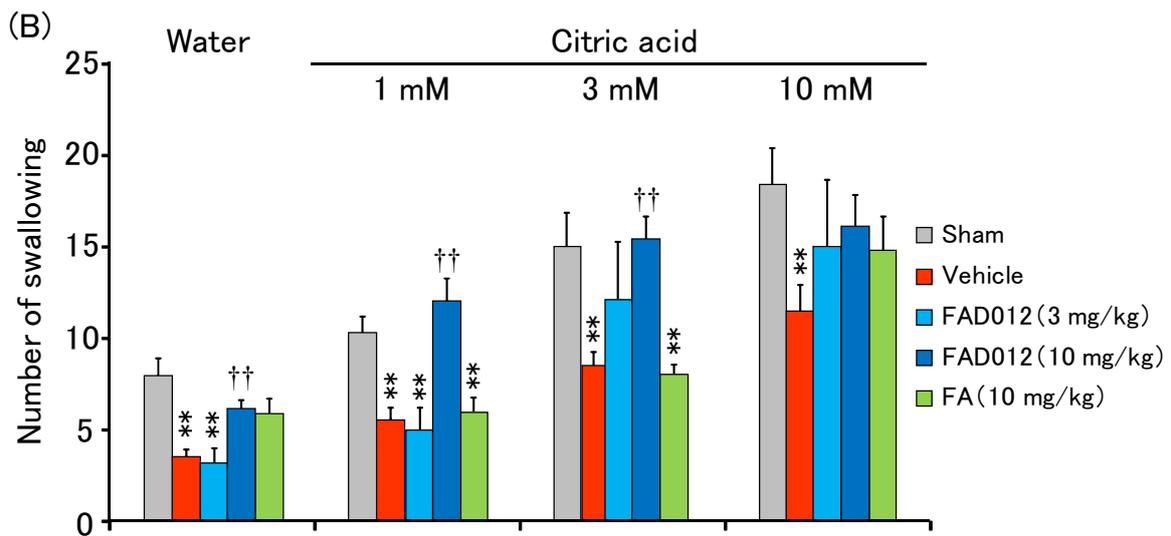
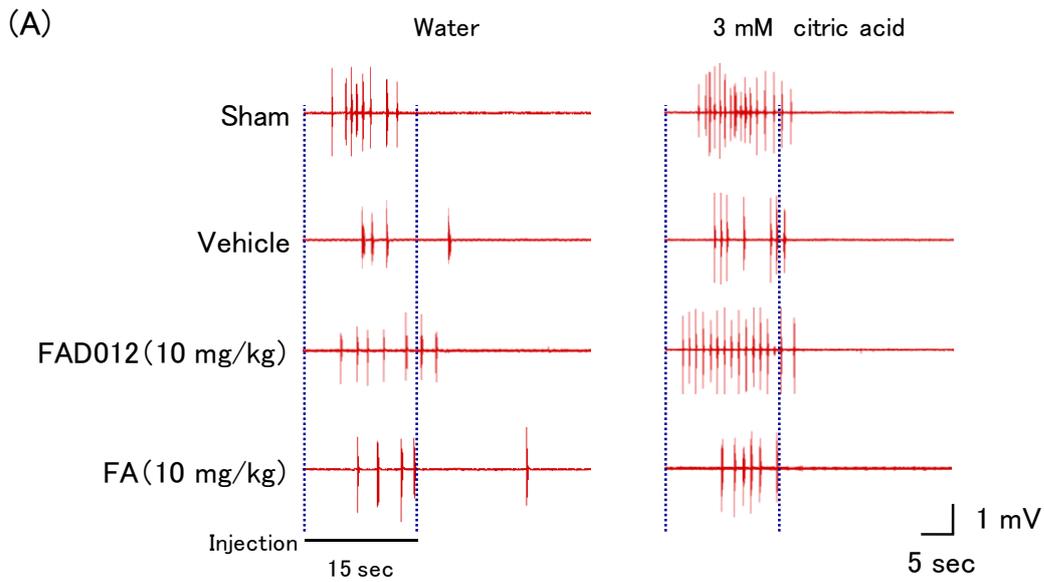


Fig.16 Effects of chronic treatment with FAD012 on swallowing reflex in 2VO rats. Typical mylohyoid Electromyogram activity with swallowing reflex elicited by distilled water or citric acid (1-10 mM) in each group at 14 days post-2VO (A); Effects of FAD012 on the mean number of swallowing events (B) and latency for the first swallowing response (C) in each group. The data are represented as means \pm S.E.M. ; n=5-11 in each group. *, ** P <0.05, 0.01 vs. sham, †† P <0.01 vs. Vehicle.

第3節 虚血による酸化ストレス障害に対するFAD012の効果の検討

次に、FAD012による脳組織の酸化ストレス障害抑制効果について検討した。2VO処置24時間後の大脳皮質における酸化ストレス障害を、活性酸素の一種である $O_2^{\cdot-}$ 産生量を指標に、dihydroethidium (DHE)染色によって組織学的に評価した。その結果、Vehicle群では、2VO処置によって、組織中の $O_2^{\cdot-}$ 産生の増大がみられたのに対して、FAD012群では $O_2^{\cdot-}$ 産生が確認されなかった (Fig. 17A)。DHEの蛍光強度を数値化した結果、FAD012群では、Vehicle群と比較して、 $O_2^{\cdot-}$ 産生が有意に抑制されたことが明らかになった (Fig. 17B)。

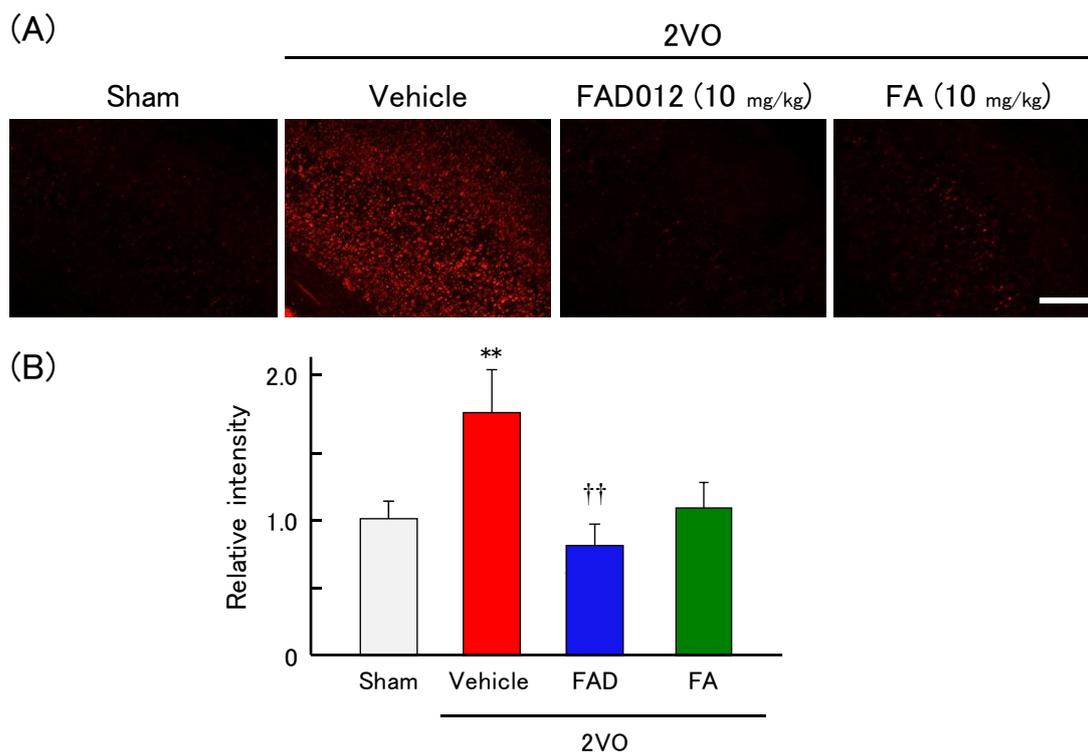


Fig. 17 Effects of FAD012 on cerebral cortical oxidative stress after 2VO. Representative results of dihydroethidium (DHE) staining for superoxide production at 24 h post-2VO in the cerebral cortex from rats in each group (A), scale bar = 50 μ m; Fluorescence intensity of oxidized DHE was quantified using imaging software focused in the relevant areas (B). The values of fluorescence intensity of each group are represented as means \pm S. E. M. ; n=5-8 in each group. ** P < 0.01 vs. sham, †† P < 0.01 vs. Vehicle.

さらに、神経細胞死によって引き起こされる核の凝集を大脳皮質の Nissl 染色によって評価した。Vehicle 群の大脳皮質では、核の凝集が多数みられたのに対して、FAD012 群では、ほとんど確認されなかった (Fig. 18A)。凝集した核を持つ細胞数を数値化したところ、FAD012 群では、Vehicle 群と比較して 2VO による細胞死が有意に抑制されたことが明らかになった (Fig. 18B)。

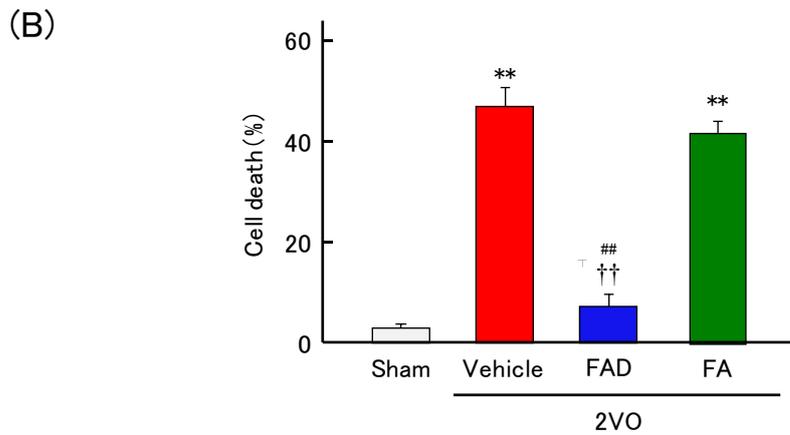
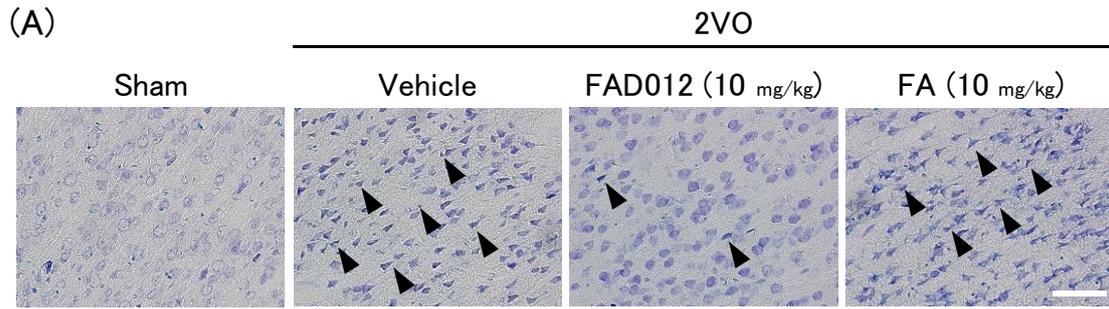


Fig. 18 Effects of FAD012 on cerebral cortical cell death after 2VO. Representative results of Nissl staining for neuronal cell loss at 24 h post-2VO in the cerebral cortex from rats in each group (A), scale bar = 60 μ m; the values of cell death of each group are represented as means \pm S. E. M. ; n=5-8 in each group (B). ** P < 0.01 vs. sham, †† P < 0.01 vs. Vehicle, ## P < 0.01 vs. FA.

第4節 FAD012の嚙下反射障害改善メカニズムの解析

FAD012の嚙下反射機能改善メカニズムについて、組織学的に検討した。まず、嚙下反射に重要な線条体の障害度を評価するために、2V0処置2週間後の線条体におけるアポトーシス関連蛋白 caspase-3の活性化を免疫染色によって調べた (Figs. 19A&B)。Vehicleラットの線条体において、活性化カスパーゼ陽性細胞の増加がみられたことから、2V0処置によって嚙下反射機能の低下が認められたラットでは、線条体においてアポトーシス様の細胞死が生じていることが明らかになった。一方、FAD012を投与したラットでは、これが顕著に抑制された (Fig. 19A)。活性化カスパーゼ陽性細胞数をカウントし、数値化した結果、FAD012群では、Vehicle群と比較して2V0によるアポトーシス細胞死を有意に抑制したことが明らかとなった (Fig. 19B)。このことから、FAD012は、慢性脳低灌流による線条体の障害を抑制していることが示唆された。

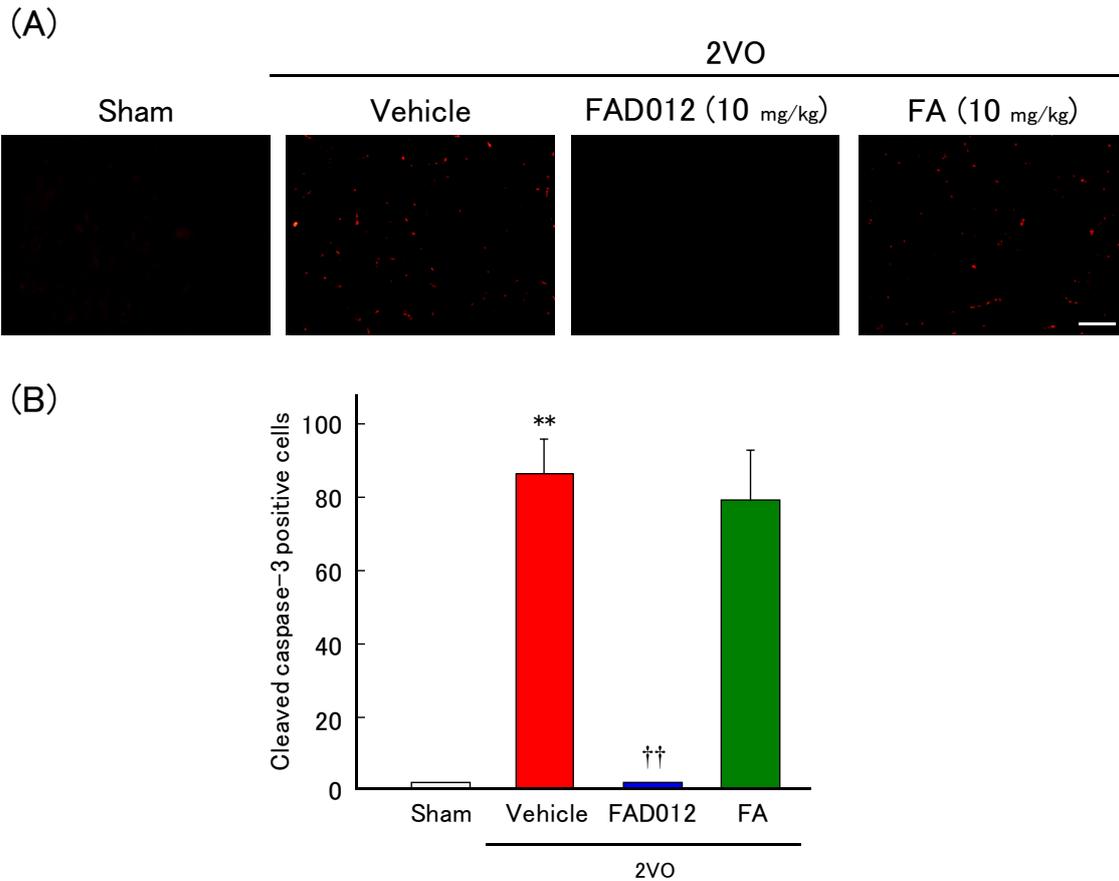


Fig. 19 Effects of chronic treatment with FAD012 on apoptotic cell death in the striatum after 2VO. Representative microphotographs of cleaved caspase-3 immunostaining at 14 days post-2VO in the striatum from rats in each group (A), scale bar = 100 μ m; Quantification of the number of cleaved caspase-3 positive cells was achieved by cell counting in the relevant areas of the rat brains in each group (B). The data are represented as means \pm S.E.M. from 3-5 rats in each group. ** $P < 0.01$ compared with the sham group. †† $P < 0.01$ compared with the 2VO group.

線条体におけるドパミン神経系の障害を評価するため、ドパミンの合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) の免疫染色を行った。その結果、Vehicle 群では、Sham 群と比較し、TH 発現の低下が認められた。一方、FAD012 群では、

TH発現の低下が抑制され、この効果はFA群と比較して顕著であった(Fig. 20A)。Sham群のTH発現量を100%とした割合でグラフ化した結果、FAD012群では、Vehicle群と比較して2VOによるTH発現の低下を有意に抑制した(Fig. 20B)。

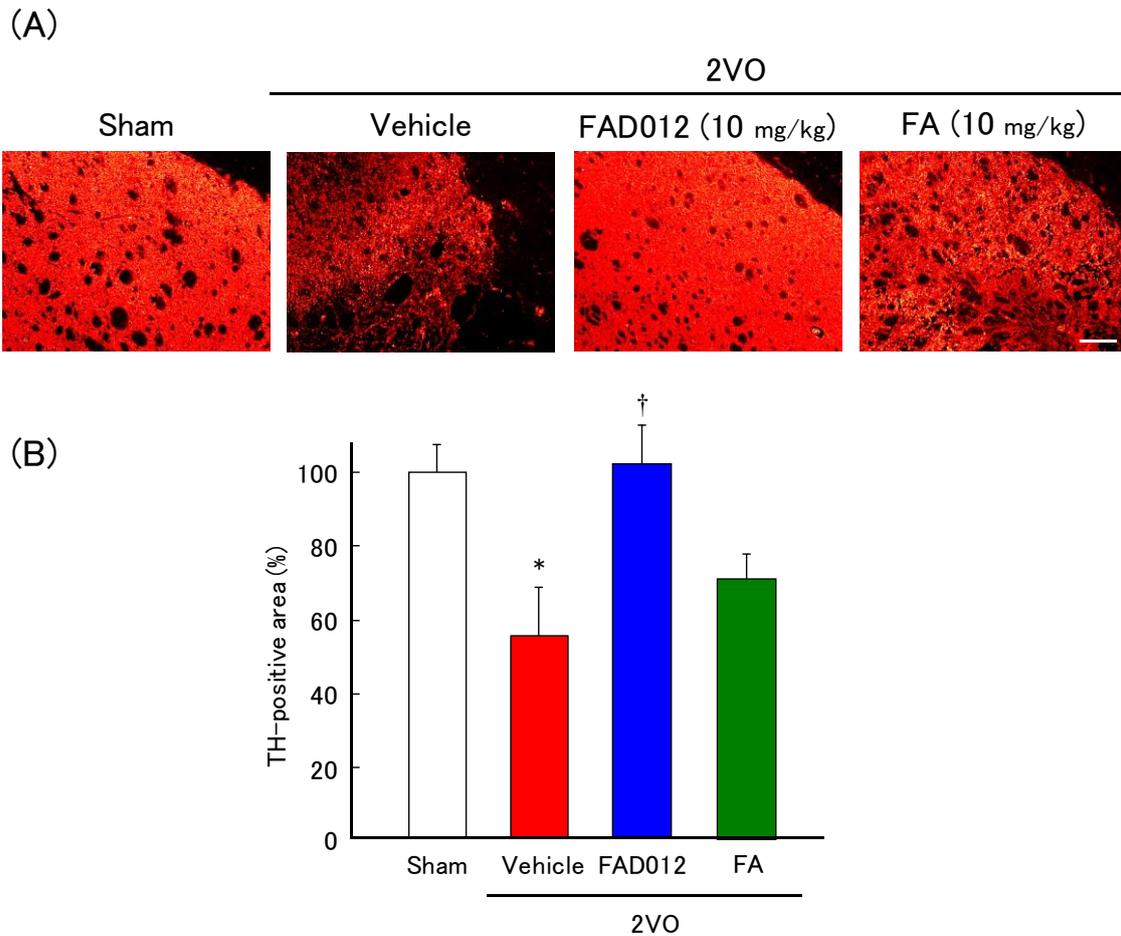


Fig. 20 Effects of chronic treatment with FAD012 on expression of tyrosine hydroxylase (TH) in the striatum of 2VO rats. Representative microphotographs of TH immunostaining at 14 days post-2VO in the striatum from rats in each group (A). Scale bar: 50 μ m. Quantification of the immunofluorescence was achieved in the relevant areas for rats from each group (B). The data are represented as means \pm S.E.M. from 3-5 rats in each group. * $P < 0.05$ compared with the sham group. † $P < 0.05$ compared with the 2VO group.

続いて、線条体における SP 発現量を免疫染色によって評価した (Fig. 21)。その結果、Vehicle 群では、Sham 群と比較し、SP 発現の低下が認められたのに対して、FAD012 群では SP 発現が維持され、この効果は FA 群よりも顕著であった。

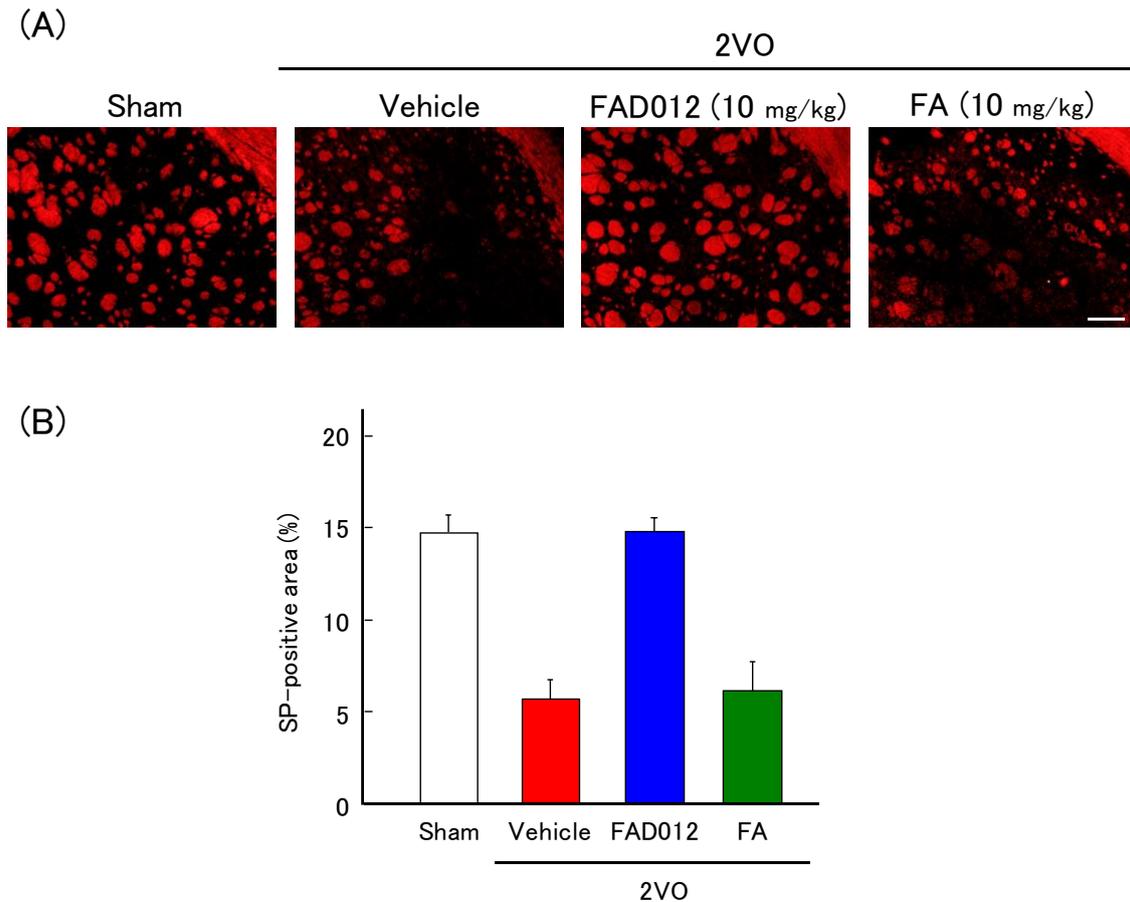


Fig. 21 Effects of chronic pretreatment with FAD012 on expression of substance P (SP) in the striatum after 2VO. Representative microphotographs of SP immunostaining at 14 days post-2VO in the striatum of rats from each group (A), scale bar = 500 μ m; Quantification of the immunofluorescence was achieved in the relevant brain areas from rats in each group (B).

Fig. 22 に、咽喉頭における SP の免疫染色の結果を示した。染色画像は赤枠で示したラットの咽喉頭領域の染色結果の典型例である。Vehicle 群では、Sham 群と比較し、背側部位における SP 発現が顕著に低下したが、一方、FAD012 群では SP 発現の低下が抑制された。FA 群では、Vehicle 群と同程度の SP 発現低下がみられた (Fig. 22A)。SP の蛍光強度を数値化した結果、FAD012 群では、Vehicle 群と比較して、2VO による咽頭 SP 発現を有意に抑制したことが明らかになった (Fig. 22B)。

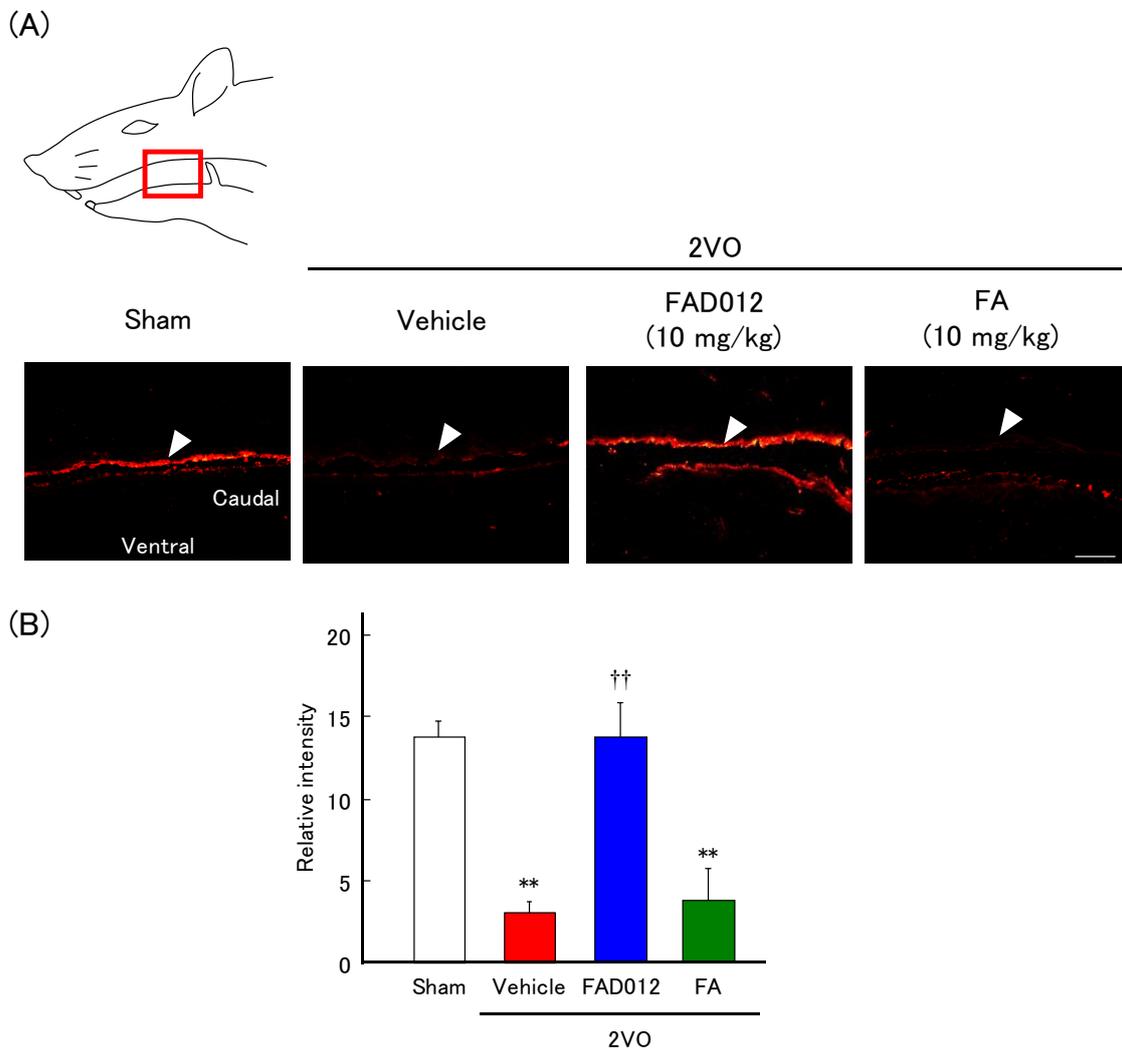


Fig. 22 Effects of chronic pretreatment with FAD012 on expression of SP in the laryngopharyngeal region after 2VO. Representative microphotographs of SP immunostaining at 14 days post-2VO in the laryngopharyngeal region (corresponding to the area surrounded by the red frame in the upper illustration) from rats in each group (A), arrowheads point out the dorsal mucous membranes, scale bar = 100 μ m; Quantification of immunofluorescence was achieved for the relevant regions from rats in each group (B). The data are represented as means \pm S.E.M. from 3-5 rats in each group. ** $p < 0.01$ compared with the sham group. †† $p < 0.01$ compared with the 2VO group.

以上のことから、FAD012 は慢性脳低灌流ラットの線条体において、 $O_2^{\cdot -}$ 産生の増大およびアポトーシス様細胞死を抑制するとともに、嚥下反射のトリガー物質である咽喉頭の SP の減少を抑制していることが明らかになった。

第5節 本章の小括

1. FAD012 の慢性期における後遺症軽減効果を検証するため、嚥下障害モデルである2V0ラットを用いて、CBFおよび嚥下反射機能の評価を行った。
2. FAD012 は、2V0によるラットの死亡率を低下させた。
3. FAD012 は、2V0によるCBFの減少を、その投与期間中において継続的に抑制した。
4. FAD012 は、2V0による大脳皮質の $O_2^{\cdot-}$ 産生および神経細胞死を抑制した。
5. FAD012 は、2V0による嚥下反射潜時の延長および嚥下回数の減少を抑制した。
6. FAD012 は、2V0による線条体のアポトーシス様細胞死を抑制し、THおよびSP発現量の減少を抑制した。
7. FAD012 は、2V0による咽喉頭粘膜のSP発現量の減少を抑制した。

以上のことから、FAD012の予防投与は、慢性脳低灌流ラットの嚥下反射機能障害を軽減し、その機序には、嚥下反射に重要な黒質線条体ドパミン-SP神経系の保護を介した咽喉頭SP量の維持が関与していることが示唆された。

第4章 考察

本研究の第1章では、FAをシード化合物として、合成した13種類のFADについて、抗酸化活性およびACE阻害活性を指標にスクリーニングした。その結果、ACE阻害活性が強いものはなかったものの、DPPHラジカル消去能および過酸化脂質産生抑制能のどちらも強いFAD012を見出した。 α -トコフェロールやFAの抗酸化活性は、フェノール性水酸基によるものであり[52]、FAD012もこれらと同様にフェノール性水酸基が抗酸化の活性部位であると考えられる。さらにFAD012は、FAの芳香環のメトキシ基をメチル基に置換した化学構造を有し、フェノール性水酸基に電子供与性を維持させつつ脂溶性を有するよう分子デザインされており、脂溶性の α -トコフェロールと同様、生体膜などの疎水性部分に分布し、FAよりも効率よくラジカル消去および過酸化脂質産生を抑制できると考えられる。

中枢神経系薬の創薬では、候補化合物が脳内に移行し、効果を発揮するために、BBBの通過が重要な鍵となる。そこで、候補化合物の分子量、 $clogP$ およびPSAからBBB通過のしやすさを理論的に算出した結果、FAD012は他のFADと比較し、最も適した値を示した。

PC12細胞を用いた*in vitro*実験系において、FAD012は H_2O_2 処置後の細胞生存率を上昇させ、FAよりも強い細胞保護効果を示した。一過性脳虚血では、低酸素状態とその後の再灌流による急激な酸素供給に伴ってROSの産生が増大し、酸化ストレス障害による細胞死が引き起こされる。PC12細胞における H_2O_2 処置は、虚血による酸化ストレス状態を擬似的に再現している。 H_2O_2 は、細胞膜や細胞内小器官を構成する生体膜を通過し、 Fe^{2+} などの還元型の金属イオンと反応し

て・OHを生じる [53]。・OHは、反応性が非常に高く、強力な酸化作用により酸化ストレスを増大させ、細胞膜の脂質酸化やDNA損傷を引き起こす [54]。FAD012は、自身の抗酸化作用によってラジカルを消去し、DNAや細胞膜の酸化ストレス障害から細胞を保護したと考えられる。

FAD012のPC12細胞に対する毒性は、FAと同等に低く、またラットに高用量(50 mg/kg)を10週間の長期にわたって経口投与した場合においても、臓器毒性はみられなかった。FAの急性毒性については、これまでにラットを用いて検討されており、単回経口投与のLD₅₀は、雄で2445 mg/kg、雌では2113 mg/kgであることが報告されている [55]。また、粉末飼料にFAを混合し、13週間投与した亜慢性毒性試験では、平均摂取量430 mg/dayにおいて、脱毛や体重増加の抑制、ALB、ALPおよびAMYの増加が観察されている [56]。これらの知見と本研究におけるFAD012の有効量(<30 mg/kg)を踏まえると、FAD012の長期投与による毒性はほとんどないと考えられる。しかし、FAD012の変異原性や癌原性については未検討であり、今後、調査する必要がある。

第2章では、一過性脳虚血モデルとして汎用されているMCAO/Reラットを用いて、CBFや神経症状、脳梗塞巣形成に対するFAD012の効果を検討した。その結果、FAD012の予防投与は、MCAOによるCBFの減少を抑制し、Re処置24時間後における神経症状を軽減し、脳梗塞巣形成を抑制することが明らかになった。そこで、FAD012の虚血時におけるCBF維持作用を、2次元レーザー血流画像装置を用いて、詳細に検証した。まず、MCAO処置前のCBFを評価したところ、FAD012を投与したラットのCBFは、Vehicleのみを投与したラットと同等の値を示した。一方、MCAO処置後のCBFを評価した結果、FAD012は、MCAO時の大脳皮質におけるMCA主幹動脈およびその周辺の細動脈灌流域

の CBF を広範囲に維持することが明らかとなった。FAD012 を投与したラットでは、とくに大脳皮質における脳梗塞巣の形成が顕著に抑制されたことから、FAD012 は、脳虚血によるペナンプラ領域である大脳皮質の CBF を維持することで、脳梗塞巣の形成を抑え、神経症状を軽減したと考えられる (Fig. 23)。

脳虚血後の CBF 維持に関わる因子として、血管リモデリング、毛細血管の動脈化、血管新生による側副血行路の発達などがある [57]。これまでの基礎研究から、アストロサイトの活性化 [58] や血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を介した血管新生 [59] による脳保護効果が報告されている。しかし、本実験結果から、FAD012 は、正常時の CBF には影響せず、虚血時において CBF 維持にはたらくことから、FAD012 の CBF 維持作用には、虚血前の慢性的な作用による脳血管新生や側副血行路の発達等は関与しておらず、虚血時特異的な血管拡張作用が寄与していると考えられる。第 3 章にて検討した、FAD012 による 2VO 処置後の CBF 維持作用についても同様のことが言える。FAD012 は、2VO ラットにおいても CBF 維持作用を示したが、2VO 処置直前の CBF には FAD012 投与の影響がみられなかったことから、2VO 処置直後の CBF 低下の抑制は、低酸素状態に応答した血管拡張作用によるものと考えられる。2VO 処置後の 2 週間において、FAD012 群のみならず、Vehicle 群においても CBF の緩やかな回復がみられたが、これは血管のリモデリングや新生によって生じた可能性が考えられる。

そこで、虚血による低酸素状態に応答して血管拡張作用を示すガスメディエーターである NO の関与について検証した。MCAO 処置後の大脳皮質における eNOS の発現量を免疫組織学的に評価した結果、FAD012 は、虚血後の大脳皮質の血管内皮に局在する eNOS 発現量の低下を抑制していることが明らかとなった。Huang ら (1995) [60] は、eNOS ノックアウトマウスにおいて、虚血時の CBF の低下に

よって梗塞巣が拡大し、障害が増悪することを報告している。また、ヒトの血管内皮を低酸素下で培養すると、Rho キナーゼ活性の上昇、eNOS mRNA 発現および NOS 活性の低下が生じることが報告されている [61]。また、Rho キナーゼ阻害薬であるファスジルは、虚血による Rho キナーゼの活性化を阻害し、eNOS をアップレギュレーションすることによって、血管拡張作用を示すことが報告されている [62]。一方、Rho キナーゼを介する経路とは別に、PI3K-Akt シグナル経路を介した eNOS の活性化によって脳保護効果を示す薬物も報告されている [15]。

近年では、血管拡張作用を示すメディエータとして、NO 以外に CO や H₂S など注目されている。これまで CO の血管拡張作用は、生理的に NO のわずか 1%ほどであり、脳血管拡張作用も弱いとされていた [43]。しかし、Morikawa ら (2011) の報告 [63] によれば、神経細胞や血管内皮細胞に存在する CO は、H₂S 合成酵素 cystathionine β -synthase (CBS) を阻害して H₂S の生成を抑制するはたらきをもち、低酸素時には CO 濃度の低下に伴い、CBS の抑制が解除され、H₂S が増加することによって血管拡張作用が現れるとされている。

臓器を短時間虚血に暴露することにより、虚血耐性をもたせ、虚血時および再灌流時の障害を軽減する虚血性プレコンディショニング効果が脳をはじめ、心臓、腎臓や肝臓など様々な臓器で確認されている [64]。さらにラット海馬スライスを用いた *in vitro* 実験により、虚血プレコンディショニング効果は、NO S 阻害薬存在下において消失すること [65]、eNOS ノックアウトマウスの局所脳虚血モデルにおいても虚血プレコンディショニング効果が消失することが報告されている [66]。近年では、虚血発作前から、あらかじめ薬剤を投与することにより、同様の効果をもたらす薬理的プレコンディショニング効果が注目さ

れている [64]。吸入麻酔薬であるイソフルランは、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 型および α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxasole propionate (AMPA) 型グルタミン酸受容体拮抗作用を有しており、イソフルランによるプレコンディショニングが虚血時のグルタミン酸過剰放出による NMDA および AMPA を介した神経毒性を軽減することが報告されている [67]。

本研究において、FAD012 による虚血時の eNOS 発現量維持作用が Rho キナーゼの阻害または PI3K-Akt 経路の活性化のいずれを介するか、あるいはこれらとは異なる経路によるのかについては明らかにできなかった。今後、FAD012 の eNOS 発現の維持メカニズムやその他の血管拡張因子の関与、および FAD012 による薬理的プレコンディショニング効果について、さらに詳細に検討する必要がある。

第 3 章では、脳梗塞慢性期における嚔下障害モデルとして、2V0 処置により作製した慢性脳低灌流ラットを用いて、嚔下反射障害に対する FAD012 の効果を検証した。その結果、FAD012 は、2V0 処置後の CBF を長期にわたって維持し、2V0 処置 2 週間後までのラットの生存率を上昇させた。FAD012 は、2V0 処置後の ROS 産生量を減少させ、アポトーシス細胞死を抑制した。一方、FA も ROS 産生を抑制する傾向を示した。FA は、ROS を直接除去するほか、ヘムオキシゲナーゼ、スーパーオキシドジスムターゼおよびカタラーゼなどの抗酸化酵素を誘導するなど、複数の抗酸化応答を活性化することが報告されている [68]。さらに FA の抗酸化作用は、脳虚血だけでなく、アルツハイマー病およびパーキンソン病動物モデルにおける神経障害も改善し得ることが報告されている [27]。本研究では、予防的治療薬としての可能性を検証する目的で、FAD012 および FA の投与量を比較的低用量の 10 mg/kg として検討したため、FA の明らかな有効性は実証

できなかったが、著者らは、FA を 30 mg/kg の用量で予防投与した場合には、2V0 ラットの脳障害の抑制効果がみられ、嚥下反射障害が軽減されることを報告している [69]。ただし、FA の CBF 維持作用は顕著ではなく、FA の脳保護効果は主として抗酸化作用によるものと考えられる。一方、FAD012 の予防的治療効果については、抗酸化作用よりも CBF 維持作用の寄与が大きいと考えられる。

2V0 処置ラットでは、水および低濃度（1 または 3 mM）のクエン酸刺激によって誘発される嚥下反射が顕著に減弱することが確認された。咽喉頭領域の機械的もしくは化学的な刺激によって誘発される感覚入力、延髄 CPG の活動を介し、反射的に嚥下を誘発する [69]。10 mM の高濃度クエン酸刺激は、2V0 処置ラットにおいても Sham 処置ラットと同等の嚥下反射を誘発することから、2V0 処置による CPG への影響はなく、嚥下反射障害は脳基底核病変に起因しているものと考えられる。

これまでに、脳基底核における黒質線条体ドパミン-SP 神経機構の障害と嚥下障害の関連性が明らかにされている。臨床において、ドパミン神経に障害をもたらすパーキンソン病患者が嚥下障害を呈し、ドパミン作動性神経系を賦活するパーキンソン病治療薬のアマンタジン、嚥下反射機能を改善することが示されている [71]。また、黒質線条体の SP 遺伝子発現と咽喉頭粘膜の SP 含量が相関していることが報告されている [72-73]。

本研究において、FAD012 の継続投与は、2V0 処置による嚥下反射の潜時の延長および嚥下回数の低下を抑制し、嚥下障害を改善した。さらに線条体ドパミン神経系の障害を組織学的に検討した結果、FAD012 は、2V0 による線条体 TH および SP の発現の低下を抑制した。嚥下反射に直接関与する咽喉頭領域の SP 発現を組織学的に検証した結果、FAD012 は、2V0 による咽喉頭粘膜上皮における

SP 発現の減少を抑制することを明らかにした。黒質線条体 DA-SP 神経機構の機能不全を有する脳梗塞患者においても、咽頭における SP 量が低下していることが報告されており [54-55]、このことから、本実験モデルは、大脳基底核の障害に起因した脳梗塞慢性期の嚥下障害を再現しており、FAD012 は、嚥下反射に重要なドパミン-SP 神経機構の保護を介して嚥下反射機能を改善したと考えられる。これまでに、既存の ACE 阻害薬であるペリンドプリルやホスホジエステラーゼⅢ阻害薬であるシロスタゾールが、2V0 処置ラットにおいて、ドパミン-SP 神経機構の保護を介して嚥下障害を軽減することが報告されており [74-75]、これらの先行研究は、本研究結果を支持する。以上の結果を総合すると、FAD012 は、既存の嚥下障害改善薬とは異なり、虚血時からの長期的な CBF 維持を介して黒質線条体ドパミン-SP 神経機構を保護することで、咽頭 SP の減少を抑制し、嚥下反射障害を軽減したと考えられる (Fig. 24)。

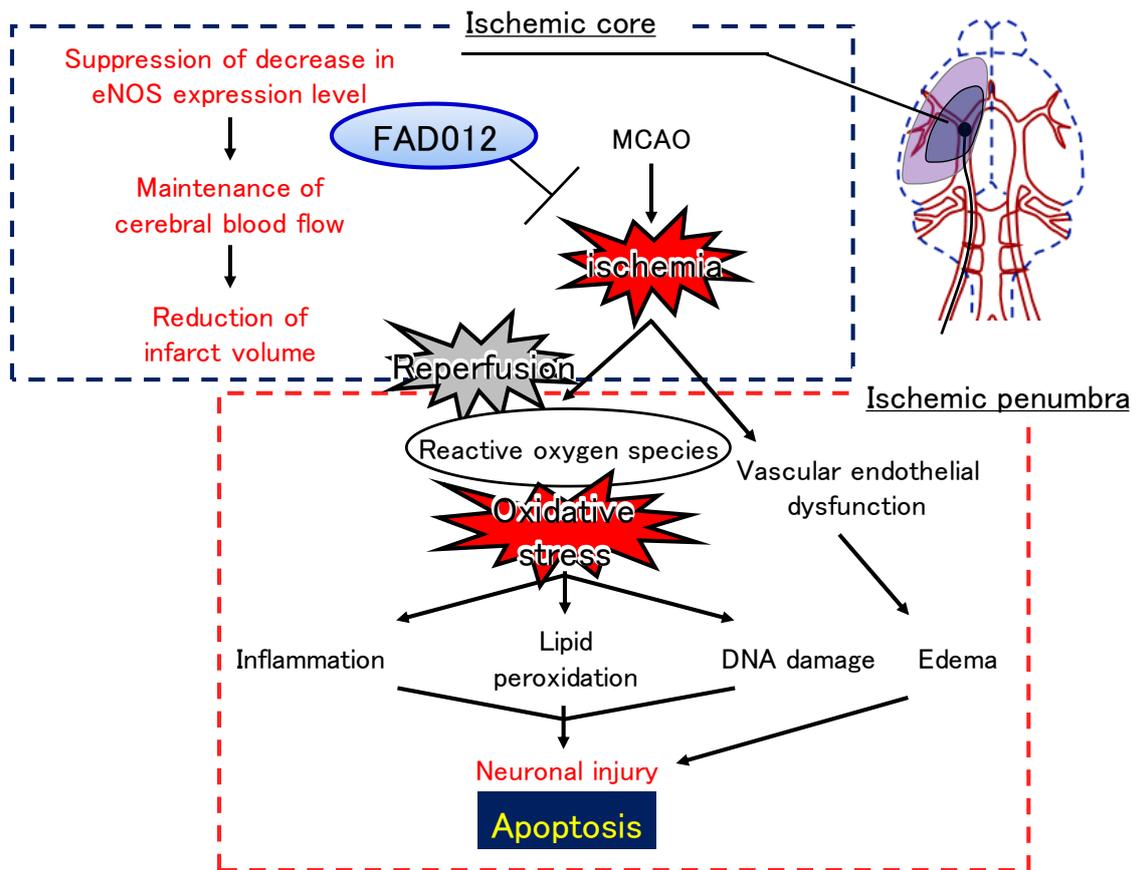


Fig. 23 Effects of FAD012 in the acute phase of cerebral ischemia.

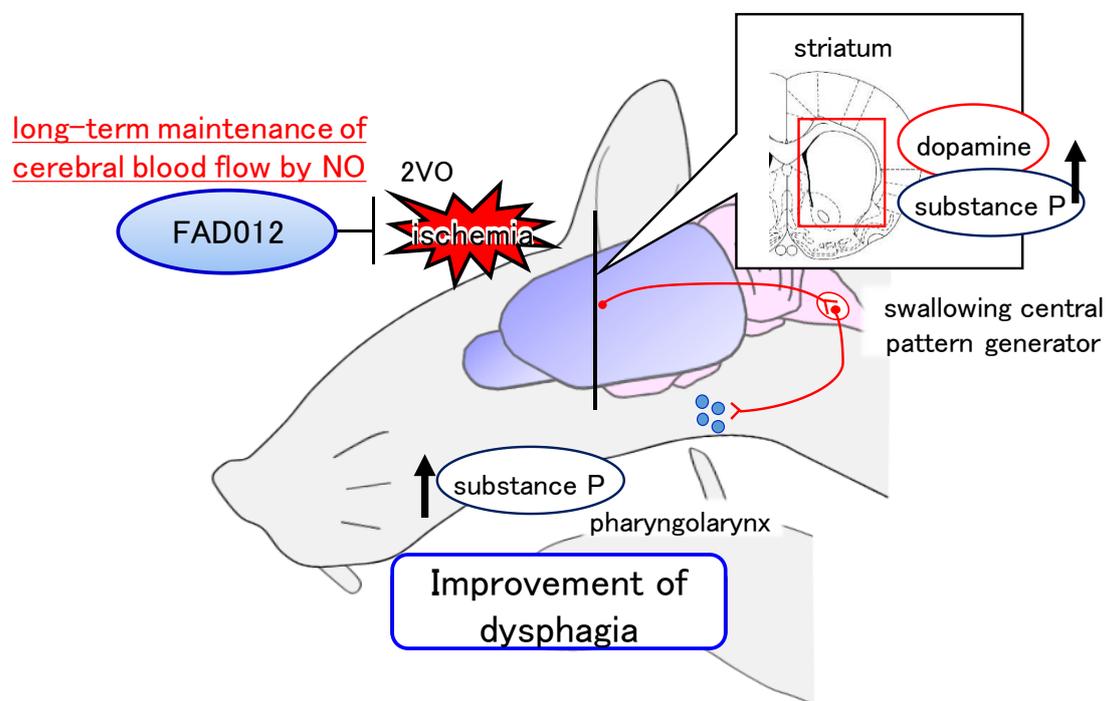


Fig.24 Effects of FAD012 in the chronic phase of cerebral ischemia.

総括

本研究では、FA をシード化合物として合成した FAD を抗酸化活性および ACE 阻害活性を指標にスクリーニングした。FAD012 を選定し、培養細胞を用いた *in vitro* 実験系による毒性および細胞保護効果を検討した。また、*in vivo* ラットの長期経口投与による毒性試験を行った。脳梗塞急性期モデルとして汎用されているラット MCAO/Re モデルを用い、CBF や神経症状、脳梗塞巣形成に対する FAD012 の効果について検討を行った。そして、慢性期における嚥下障害モデルとして用いられる慢性脳低灌流ラットを用い、虚血による嚥下反射機能障害に対する FAD012 の効果を検証した。

本研究において、以下の諸点を明らかにすることができた。

1. スクリーニングの結果、アスコルビン酸、Trolox および FA よりも強い抗酸化活性を示し、理論上、良好な中枢移行性が期待できる FAD012 を見出した。培養細胞を用いた *in vitro* 実験系において、FAD012 は、FA と同等に毒性が低く、酸化ストレス障害に対して、FA よりも強い細胞保護効果を示した。さらに、*in vivo* ラットの長期経口投与による毒性試験においても毒性が低いことが確認された。
2. FAD012 の予防投与は、ラットの脳梗塞急性期において、虚血時の eNOS 発現量低下を抑制し、CBF を維持した。これにより、血流が維持された大脳皮質を中心としたペナンプラ領域の梗塞拡大を抑制し、脳梗塞巣の縮小および神経症状を軽減した。
3. 慢性期における FAD012 の継続投与は、虚血時からの長期的な CBF 維持を介

して黒質線条体ドパミン-SP 神経機構を保護し、咽喉頭 SP の減少を抑制することによって嚥下反射障害を軽減した。

以上、本研究は、脳梗塞治療において、FAD012 が、既存の薬にはない新たな予防的治療薬としての可能性をもつ化合物であることを示した。

謝辞

本研究に際して、素晴らしい研究テーマを与えていただくと共に終始ご懇篤なるご指導並びにご鞭撻を賜りました 城西大学大学院薬学研究科 薬品作用学講座 岡崎 真理 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、フェルラ酸誘導体の分子デザイン、合成およびサンプルを供与していただきました 城西大学大学院薬学研究科 医薬品化学講座 坂本 武史 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導並びにご鞭撻を賜りました 城西大学大学院薬学研究科 生体防御学講座 日比野 康英 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するにあたって、ご指導並びにご助言を賜りました 城西大学大学院薬学研究科 衛生化学講座 工藤 なをみ 教授、同大学院薬学研究科 生物有機化学講座 杉田 義昭 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の審査並びに貴重なご意見を賜りました 城西大学大学院薬学研究科 生理学講座 加園 恵三 教授、同大学院薬学研究科 皮膚生理学講座 徳留 嘉寛 教授、並びに同大学院薬学研究科 病態解析学講座 小林 順 教授に深甚なる謝意を表します。

実験遂行するにあたり、終始有益なご助言をいただきました城西大学薬学部薬学科 薬品作用学研究室 松崎 広和 助手、医薬品化学研究室 玄 美燕 助手ならびに同大学薬学部医療栄養学科 生体防御学研究室 神内 伸也 准教授、岩田 直洋 助手 に深甚なる謝意を表します。

最後に、城西大学大学院薬学研究科 医薬品化学講座 大学院生 加藤 洋介 学士、林 浩輔 学士、同大学薬学部薬学科 薬品作用学研究室ならびに同大学薬学部医療栄養学科 生体防御学研究室の皆様のご協力の下に本研究を遂行できましたことを感謝致します。

実験の部

方法

第1章 FADの薬理活性評価 (*in vitro*) および毒性評価 (*in vivo*)

DPPH ラジカル消去能の測定

1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (和光純薬工業、大阪) は、525 nm 付近に最大吸収を持ち、特有の紫色をもつラジカルであり、化合物がもつ抗酸化作用により DPPH ラジカルが捕捉されることで退色する。吸光度の低下を指標に抗酸化活性を評価した。0.2 mg/mL DPPH 溶液に FAD 候補化合物またはアスコルビン酸 (和光純薬工業、大阪)、Trolox (和光純薬工業、大阪)、FA (Sigma-Aldrich, st., Louis, MO, USA) を混合し、25°Cの温浴で 30 分間反応させた後、525 nm の吸光度を測定した。抗酸化活性の強さを 50% 抑制濃度 (IC₅₀) で比較した。

過酸化脂質産生抑制能の測定

過酸化脂質生成物であるマロンジアルデヒドとチオバルビツール酸の反応により、生成される赤色縮合体の蛍光強度を指標に抗酸化活性を評価した。リノール酸 (5 mg/mL) (和光純薬工業、大阪) と FAD を混合し 80°C、60 分間反応させた。ブチルヒドロキソトルエン (20 mM) (和光純薬工業、大阪) により自動酸化を停止し、8%ラウリル硫酸ナトリウム (和光純薬工業、大阪)、水、0.67% チオバルビツール酸 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を加え、95°C、15 分加熱した後、氷冷し反応を止めた。酢酸エチル (和光純薬工業、大阪) を加え、2,000 rpm で 10 分間遠心した後、上清の蛍光強度を蛍光光度計により測定した。抗酸化活性の強さを IC₅₀ で比較した。

培養細胞

細胞は、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞 (HS 研究資源バンク、大阪) を用いた。細胞は、poly-D-lysine でコートした 100 mm dish に播種し、10% 非働化馬血清 (HS, Biological Industries Ltd., Cromwell, CT, USA)、5% 非働化牛胎児血清アルブミン (FBS, Biological Industries Ltd., Cromwell, CT, USA)、24 mM NaHCO₃ (和光純薬工業、大阪)、Antibiotic-Antimycotic 100 unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 0.25 µg/mL amphotericin B (サーモフィッシャーサイエンティフィック、東京) を添加した RPMI1640 培地 (GIBCO; サーマフィッシャーサイエンティフィック、東京) で、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

細胞毒性試験

細胞内の存在する ATP は、酵素であるルシフェラーゼなどと反応させることにより発光する。この発光量は ATP 量が多いほど発光量が増す。この原理を利用して、培養した PC12 細胞に、FAD (0.001 µM~3000 µM) を添加し、2 日間培養した後、ATP 試薬 (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay; Promega, Fitchburg, WI, USA) を加え、発光量を指標に、細胞中の ATP 量を求め、細胞毒性を評価した。

細胞生存率の評価

培養した PC12 細胞に、FAD (0.001 µM~3000 µM) を添加した。1 時間後、擬似的酸化ストレスとして 200 µM H₂O₂ (和光純薬工業、大阪) を加え、さらに 4 時間インキュベートした。

3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (和光純薬工業、大阪) を添加した。Dimethyl sulfoxide (和光純薬工業、大阪) を添加し、10 分間、マイクロミキサーで溶解させ、540 nm と 630 nm の吸光度をマルチラベルプレートリーダー (1420 ARV0sx, Wallac; パーキンエルマー、ジャパン、神奈川) を用いて測定した。

実験動物

Sprague-Dawley 系雄性ラット (10 週齢, 日本エスエルシー、静岡) を温度 $23 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、照度サイクル 12 時間 (明期: 7:00~19:00) の環境下、固形飼料 CE-2 (日本クレア、東京) および水を自由に摂取させ飼育した。1 週間の予備飼育後、ラットに FAD012 (50 mg/kg)、もしくは溶媒である 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) (和光純薬工業、大阪) を 10 週間、連日経口投与した。すべての動物実験は、総理府の「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」に従うとともに、本研究計画の動物実験委員会による審査結果に基づいた学長承認を得て「城西大学動物実験規定」に従って実施した。

長期投与による生体内毒性評価

11 週齢雄性 SD ラットに FAD012 (50 mg/kg) を 10 週間、連日経口投与した。採血した後、血清を採取し、動物用臨床化学分析装置ベトスキャン (マルチローター II; ABAXIS, Union city, CA, USA) を用いて測定した。

統計処理

データは、平均値 \pm 標準誤差として表示し、統計学的有意差は、一元分散分

析 (ANOVA) 後、Tukey-Kramer 法の多重比較により解析した。群内の比較は、paired t-test を用いた。検定における有意水準は 5%とした。

第 2 章 一過性脳虚血ラットを用いた FAD の脳保護効果に関する検討

実験動物

実験動物の飼育は、第 1 章と同様に行った。雄性 SD ラット (11 週齢) を擬似手術 (Sham) 群、0.5% CMC 投与 : Vehicle 群、10 mg/kg FAD012 投与 : FAD012 (10) 群、30 mg/kg FAD012 投与 : FAD012 (30) 群 10 mg/kg FA 投与 : FA (10) 群およびの 30 mg/kg FA 投与 : FA (30) 群の計 6 群に分けた。それぞれの薬物は、MCAO/Re 処置の 1 週間前から連日経口投与した。

中大脳動脈閉塞/再灌流 (MCAO/Re) モデルの作製

ラットをイソフルラン (マイラン製薬、東京) 麻酔下 (導入 : 5%、維持 : 1.5-2.0%)、仰臥位に固定後、頸部を正中切開し、右総頸動脈から内頸動脈分岐部を露出し、それぞれ結紮した。さらに内頸動脈翼口蓋枝を結紮した。4-0 外科用ナイロン糸 (ケイセイ医科工業、東京) の先端を熱して丸めた塞栓糸を右総頸動脈から内頸動脈を経て中大脳動脈起始部まで挿入し、血管を閉塞した。MCAO 処置 120 分後に塞栓糸を引き抜くことにより、血流を再開させ再灌流した。擬似処置 (Sham) 群には血管の剥離のみを行った。

レーザードップラー式血流計を用いた脳血流量の測定

麻酔下、ラット頭蓋骨を露出させ、右側頭骨における中大脳動脈灌流域に血流測定用のプローブを留置し、レーザードップラー式血流計 ATBF-LC1 (ユニー

クメディカル、東京) により、大脳皮質表層における CBF を測定した。CBF は、MCAO 処置 20 分前から、Re 処置 60 分後までの計 200 分間、経時的に測定した。MCAO 処置による CBF の変化は、MCAO 処置直前の CBF を 100% とした割合で求めた。

2次元レーザー血流画像装置を用いた脳血流量の測定

麻酔下、ラット頭蓋骨を露出させ、開頭した。2次元レーザー血流画像装置 OZ-2 (オメガウェーブ、東京) を用いて、MCAO 処置前から処置後 120 分間、bregma 0 mm から後方 4.5 mm の範囲における CBF を測定した。

神経症状スコアの測定

Re 処置 24 時間後に、以下の評価基準に基づき、神経症状を最大 18 点でスコア化した。運動機能試験 (前肢もしくは後肢の屈曲、各 1 点)、行動試験 (直進歩行不可 : 1 点、片側への回転 : 2 点、片側への転倒 : 3 点)、感覚試験 (視覚もしくは触覚異常、前肢の麻痺、後肢の麻痺、各 1 点)、バランス試験 (1 肢が平均台から落ちる : 2 点、2 肢が落ちるもしくは 90 秒以内に身体が落下する : 3 点、60 秒以内に身体が落下する : 4 点、40 秒以内に身体が落下する : 5 点、20 秒以内に身体が落下する : 6 点)、反射、行動異常 (耳、眼への刺激に反応しない、または音に反応しない、各 1 点)

脳梗塞巣体積の測定

Re 処置 24 時間後にラットを屠殺して脳組織を摘出し、ステンレス製ブレインマトリックス (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) を用いて、2 mm 厚の脳切片を作製した。梗塞体積を評価するため、2% 2, 3, 5-ト

リフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む PBS 中で脳切片を 37°C、6 分間インキュベートした。TTC 染色した切片を 4% パラホルムアルデヒド (和光純薬工業、大阪) で 24 時間、浸漬固定し、デジタルカメラ (SH-1; オリンパス、東京) により染色画像を撮影した。切片中の白色部分を梗塞領域として画像解析ソフト (Image J; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて各切片の吻側および尾側の両面の梗塞面積を計測し、体積を算出した。各切片の体積を合計し、脳梗塞体積を評価した。

大脳皮質における eNOS の免疫染色

血管拡張に関与する eNOS の発現量を評価するため、MCAO 処置 120 分後にラットを屠殺し、大脳皮質を採取し凍結した。クリオスタット (CM3050S, Leica, Bensheim, Germany) を用いて厚さ 10 μm の冠状切片を作製した。メタノール (和光純薬工業、大阪) で 1 分間固定し、ブロッキング剤 (ブロックエース、DS ファーマバイオメディカル、大阪) で 2 時間処置し、1 次抗体 NOS3 antibody (1 : 100; Santa cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) と vWF antibody (1 : 200; abcam, Burlingame, CA, USA) を 4°C でオーバーナイトし、2 次抗体 Cy3 で標識された secondary antibody (1 : 100; Chemicon International, Billerica, MA, USA) と FITC で標識された secondary antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) をそれぞれ室温で 2 時間、反応させて二重染色した。80% グリセリンで封入した後、システム生物顕微鏡 (BX53; オリンパス、東京) で観察した。eNOS は、解析ソフト MetaMorph (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いて、Cy3 および FITC の蛍光強度の割合から発現量を算出した。

統計処理

データは、平均値±標準誤差として表示し、統計学的有意差は、一元分散分析 (ANOVA) 後、Tukey-Kramer 法の多重比較により解析した。群内の比較は、paired t-test を用いた。検定における有意水準は 5%とした。

第3章 慢性脳低灌流ラットを用いた FAD012 の嚥下反射障害改善効果に関する 検討

実験動物

実験動物の飼育は、第1章と同様に行った。雄性 SD ラット（11 週齢）を擬似手術（Sham）群、Vehicle 群、3 mg/kg FAD012 投与：FAD012（3）群、10 mg/kg FAD012 投与：FAD012（10）群および 10 mg/kg FA 投与：FA（10）群の計 5 群に分けた。FAD012 および FA は、0.5% CMC で溶解し、ラットに 2VO 処置の 1 週間前から 2 週間後までの計 3 週間、連日経口投与した。

両側総頸動脈永久結紮（2VO）モデルの作製

ラットをイソフルラン麻酔下（導入：5%、維持：1.5-2.0%）、仰臥位に固定後、頸部を正中切開し、右総頸動脈を永久結紮した。5 分後に左総頸動脈を結紮し、2VO モデルを作製した。また Sham 群には、総頸動脈結紮以外を同様に処置した。

脳血流量の測定

麻酔下、ラット頭蓋骨を露出させ、bregma から前方に 3、1 mm、後方に 3、5 mm、左右 1.5 mm の位置における大脳皮質表層の CBF をレーザードップラー式血流計 ATBF-LC1（ユニークメディカル、東京）により測定した。CBF の測定は、2VO 処置前後、処置後 1、2 週間の時点で、経時的に測定した。

嚥下反射機能の測定

2VO 処置 2 週間後、ラットをウレタン（和光純薬工業、大阪）麻酔下（1.0 g/kg、

i. p.)、頸部を正中切開し、唾液分泌の影響による嚥下反射を除くため、耳下腺、舌下腺を含む唾液腺を電気メス (Geiger Medical Technologies, Council Bluffs, IA, USA) にて焼灼した。呼吸維持のため、気管挿管を行い、注入した刺激液を取り除くためのカニューレを食道に挿入した。刺激液注入用チューブを咽頭口部の咽頭蓋近傍に挿入し、刺激液として水またはクエン酸 (和光純薬工業、大阪) (1、3 または 10 mM) を、シリンジポンプを用いて注入し (3.3 $\mu\text{l}/\text{sec}$ 、50 μl 、15 s)、嚥下反射を誘発した。嚥下時が誘発されるまでの潜時、および刺激液注入から 45 秒間の嚥下回数を顎舌骨筋に挿した双極ステンレスワイヤー電極を介して、筋電図にて記録した。筋電図は、増幅器 (MEG-5100、日本光電、東京) を介して、PowerLab (AD Instruments, Castle Hill, Australia) を用いて記録した。

大脳皮質における dihydroethidium (DHE) 染色

2VO 処置 24 時間後の大脳皮質における $\cdot\text{O}_2^-$ の産生を DHE 染色によって評価した。DHE (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Sigma-Aldrich, St., Louis, MO, USA) を 10 mM PBS で溶解し、37°C、30 分間インキュベートした。染色後、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X700; キーエンス、大阪) を用いて観察した。

線条体における cleaved caspase-3、チロシンヒドロキシラーゼおよびサブスタンス P 免疫染色

2VO 処置 2 週間後、ラットを屠殺し、線条体を採取し凍結した。クリオスタットを用いて厚さ 30 μm の冠状切片を作製し、正常ヤギ血清 (S-1000, Vector Laboratories, Youngstown, OH, USA) で 1 時間、室温でブロッキングした。1

次抗体として、anti-cleaved caspase-3 rabbit monoclonal antibody (1 : 100 ; #9664, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、anti-TH antibody (1 : 1000; AB152, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) または anti-SP antibody (1:6000; 20064, ImmunoStar, Wisconsin, USA) を用いて、それぞれ一晩インキュベートした。0.3%PBST で洗浄した後、Cy3 で標識された goat anti-rabbit IgG (H + L) labelled (1:100; life technologies, DriveRockville, MD, USA) で1時間、室温で反応させた。免疫蛍光は、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X700; キーエンス、大阪) を用いて観察した。

統計処理

データは、平均値±標準誤差として表示し、統計学的有意差は、一元分散分析 (ANOVA) 後、Tukey-Kramer 法の多重比較により解析した。群内の比較は、paired t-test を用いた。検定における有意水準は5%とした。

引用文献

1. Donnan, G. A., Fisher, M., Macleod, M., Davis, S. M., Stroke. Lancet. 2008, 371, 1612-1623.
2. World Population Prospects, the 2015 Revision
3. 厚生労働省 平成 25 年国民生活基礎調査の概況
4. 医学書院 脳卒中ビジュアルテキスト第 4 版
5. Jauch, E. C., Saver, J. L., Adams, H. P., Bruno, A., Connors, J. J., Demaerschalk, B. M., et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke. A guideline for healthcare professionals from the american heart association/American stroke association. Stroke. 2013, 44, 870-947.
6. Martino, R., Foley, N., Bhogal, S., Diamant, N., Speechley, M., Teasell, R., Dysphagia after stroke: incidence, diagnosis, and pulmonary complications. Stroke. 2005, 36, 2756-2763.
7. Mann, G., Hankey, G. J., Cameron, D., Swallowing function after stroke: prognosis and prognostic factors at 6 months. Stroke. 1999, 30, 744-748.
8. 日本脳卒中学会、脳卒中ガイドライン委員会（編）脳卒中治療ガイドライン 2015
9. David, S., Warner., Huaxin, Sheng., Ines, Batinic-Haberle., Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. 2004.
10. Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., et al. Thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after acute ischemic stroke. N. Engl. J. Med. 2008, 359,

1317-1329.

11. The International Stroke Trial (IST) a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischemic stroke. International Stroke Trial Collaborative Group. *Lancet*. 1977, 349, 1569-1581.
12. 田中耕太郎 脳組織虚血性傷害メカニズムに基づく治療戦略 脳卒中診療 Update 改訂第2版 最新医学社. 2010, 252-262.
13. Chna, P.H., Role of antioxidant in ischemic brain damage. *Stroke*. 1966, 27, 1124-1129.
14. Abe, K., Yuki, S., Kogure, K., Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. *Stroke*, 1988, 19, 480-485.
15. Yan, S., Chen, L., Wei, X., Cheng, L., Kong, L., Liu, X., Zhang, X., Liu, H., Tetramethylpyrazine analogue CXC195 ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via PI3K/Akt signaling. *Neurochem. Res.* 2015, 40, 3, 446-454.
16. Wang, S., Li, M., Guo, Y., Li, C., Wu, L., Zhou, XF., An, D., Li, S., Luo, H., Pu, L. Effects of Panax notoginseng ginsenoside Rb1 on abnormal hippocampal microenvironment in rats. *J. Ethnopharmacol.* 2017, 202, 138-146.
17. Ma, B., Li, M., Ma, T., Liu, GT., Zhang, J., Neuroprotective effects of compound FLZ in an ischemic model mediated by improving cerebral

- blood flow and enhancing Hsp27 expression. *Brain. Res.* 2016, 1644, 288–295.
18. Yadav, A., Sunkaria, A., Singhal, N., Sandhir, R. Resveratrol loaded solid lipid nanoparticles attenuate mitochondrial oxidative stress in vascular dementia by activating Nrf2/HO-1 pathway. *Neurochem. Int.* 2018, 112, 239–254.
 19. Wicha, P., Tocharus, J., Janyou, A., Jittiwat, J., Changtam, C., Suksamrarn, A., Tocharus, C., Hexahydrocurcumin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury, attenuates inflammation, and improves antioxidant defenses in a rat stroke model. *PLoS One.* 2017, 12, e0189211.
 20. Cheng, C.Y., Tang, N.Y., Kao, S.T., Hsieh, C.L., Ferulic acid administered at various time points protects against cerebral infarction by activating p38 MAPK/p90RSK/CREB/Bcl-2 anti-apoptotic signaling in the subacute phase of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *PLoS One.* 2016, 5, e0155748.
 21. Cheng, C.Y., Su, S.Y., Tang, N.Y., Ho, T.Y., Chiang, S.Y., Hsieh, C.L., Ferulic acid provides neuroprotection against oxidative stress-related apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting ICAM-1 mRNA expression in rats. *Brain Res.* 2008 13, 136–150.
 22. Cheng, C.Y., Ho, T.Y., Lee, E.J., Su, S.Y., Tang, N.Y., Hsieh, C.L., Ferulic acid reduces cerebral infarct through its antioxidative and anti-inflammatory effects following transient focal cerebral ischemia

- in rats. *Am. J. Chin. Med.* 2008, 6, 1105-1119.
23. Koh, P.O., Ferulic acid modulates nitric oxide synthase expression in focal cerebral ischemia. *Lab. Anim. Res.*, 2012, 4, 273-278.
24. Fukuda, T., Kuroda, T., Kono, M., Hyoguchi, M., Tanaka, M., Matsui, T., Augmentation of ferulic acid-induced vasorelaxation with aging and its structure importance in thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 2015, 10, 1113-1117.
25. Ardiansyah, Ohsaki, Y., Shirakawa, H., Koseki, T., Komai, M., Novel effects of a single administration of ferulic acid on the regulation of blood pressure and the hepatic lipid metabolic profile in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* 2008 56, 2825-2830.
26. 厚生労働省 健康日本 21 (第 2 次) の推進に関する参考資料 2012.
27. Mancuso, C., Santangelo, R., Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem. Toxicol.* 2014, 65, 185-195.
28. Jin, Y., Yan, E.Z., Li, X.M., Fan, Y., Zhao, Y.J., Liu, Z., Liu, W.Z., Neuroprotective effect of sodium ferulate and signal transduction mechanisms in the aged rat hippocampus. *Acta. Pharmacol. Sin.* 2008, 29, 1399-1408.
29. Yan, J.J., Cho, J.Y., Kim, H.S., Kim, K.L., Jung, J.S., Huh, S.O., Suh, H.W., Kim, Y.H., Song, D.K., Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Br. J. Pharmacol.* 2001, 133, 89-96.

30. Yan, J. J., Jung, J. S., Kim, T. K., Hasan, A., Hong, C. W., Nam, J. S., Song, D. K., Protective effects of ferulic acid in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Biol. Pharm. Bull.* 2013, 36, 140-143.
31. 中村重信ら Ferulic acid と garden angelica 根抽出物製剤 ANM176TM がアルツハイマー病患者の認知機能に及ぼす影響 *Geriatric. Med.* 2008, 46, 1511-1519
32. Baskaran, N., Manoharan, S., Balakrishnan, S., Pugalendhi, P.. Chemopreventive potential of ferulic acid in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague-Dawley rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2010, 637(1-3), 22-29.
33. Prabhakar, P. K., Prasad, R., Ali, S., Doble, M., Synergistic interaction of ferulic acid with commercial hypoglycemic drugs in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytomedicine.* 2013, 20, 488-494.
34. Dirnagl, U., Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012, 1268, 21-25.
35. 神谷 達司、阿部 康二 t-PA 時代の脳保護療法-Neurovascular unit 保護と血管内皮保護 *臨床神経* 2011, 51, 305-315.
36. Hatanaka, M., Takahashi, K., Nakamura, S., Mashino, T., Preparation and antioxidant activity of alpha-pyridoin and its derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 15, 6763-6770.
37. Mensch, J., Oyarzabal, J., Mackie, C., Augustijns, P., In vivo, in

- vitro and in silico methods for small molecule transfer across the BBB. *J. Pharm. Sci.* 2009, 98, 4429-4468.
38. Pajouhesh, H., Lenz, G.R., Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx.* 2005, 4, 541-553.
39. Astrup, J., Symon, L., Branston, N.M., Lassen, N.A., Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke.* 1977, 8, 51-57.
40. Donnan, G.A., Baron, J.C., Davis, S.M., et al, The ischemic penumbra. In. Donnan, G.A., Baron, J.C., Davis, S.M., Sharp, F.R., Overview, definition, and criteria, New York, Informa. Healthcare. USA, 2007.
41. Cohen, D.L. et al. Post-stroke dysphagia: A review and design considerations for future trials. *Int. J. Stroke*, 2016, 11, 399-411.
42. 小泉仁一, 吉田洋二, 中沢貞二, 大根田玄寿: 虚血性脳浮腫の実験研究第1報 ラットを用いた血流再開可能な脳梗塞モデル 脳卒中 1986, 8, 1-8.
43. 盛田俊介 CO と血管病態 血管医学. 2004, 5, 237-242.
44. David, L., Cohen, et al. Post-stroke dysphagia: A review and design considerations for future trials. *Int. J. Stroke.* 2016, 11, 399-411.
45. Martino, R., Foley, N., Bhogal, S., Diamant, N., Speechley, M., Teasell, R., Dysphagia after stroke: incidence, diagnosis, and pulmonary complications. *Stroke.* 2005, 36, 2756-2763.
46. Schmidt, E.V., Smirnov, V.E., Ryabova, V.S., Results of the seven-year prospective study of stroke patients. *Stroke.* 1988, 19, 942-949.
47. Ertekin, C., Aydogdu, I., Neurophysiology of swallowing. *Clin.*

- Neurophysiol. 2003, 114, 2226-2244.
48. Cruz-Sanchez, F.F., Cardozo, A., Castejon, C., Tolosa, E., Rossi, M.L., Aging and the nigro-striatal pathway. *J. Neural Transm. Suppl.* 1997, 51, 9-25.
 49. Graybiel, A.M. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1990, 13, 244-254.
 50. Kobayashi, H.; Nakagawa, T.; Sekizawa, K.; Arai, H.; Sasaki, H. Levodopa and swallowing reflex. *Lancet* 1996, 348, 1320-1321.
 51. Kajii, Y.; Shingai, T.; Kitagawa, J.; Takahashi, Y.; Taguchi, Y.; Noda, T.; Yamada, Y. Sour taste stimulation facilitates reflex swallowing from the pharynx and larynx in the rat. *Physiol. Behav.* 2002, 77, 321-325.
 52. 中村 成夫 活性酸素と抗酸化物質の化学 日医大医会誌 2013, 9, 164-169.
 53. Witztum, J.L., Steinberg, D., Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 1991, 88, 1785—1792.
 54. European Union Risk Assessment Report hydrogen peroxide CAS No: 7722-84-1 2nd Priority List, Volume 38, 2003.
 55. Siesjö, B.K., Zhao, Q., Pahlmark, K., Siesjö, P., Katsura, K., Folbergrová, J., Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. *Ann. Thorac. Surg.* 1955, 59, 1316-1320.
 56. 多田幸恵ら 天然添加物フェルラ酸のラットにおける急性経口毒性 東京衛研年報 1999, 50, 311—313.

57. 多田幸恵ら 天然添加物フェルラ酸の F344 ラットにおける亜慢性毒性試験
東京衛研年報 2001, 52, 272-278.
58. Chen, J., Zhang, Z.G., Li, Y., Wang, L., Xu, Y.X., Gautam, S.C., Lu, M., Zhu, Z., Chopp, M., Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ. Res.* 2003, 92, 692-699.
59. Kubota, Y., Hirashima, M., Kishi, K., Stewart, C.L., Suda, T. Leukemia inhibitory factor regulates microvessel density by modulating oxygen-dependent VEGF expression in mice. *J. Clin. Invest.* 2008, 118, 2393-2403.
60. Ma, Y., Zhang, Y., Zhao, T., Jiang, Y.R., Vascular endothelial growth factor in plasma and vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy patients after intravitreal injection of bevacizumab. *Am. J. Ophthalmol.* 2012, 153, 307-313.
61. Huang, Z., Huang, P.L., Ma, J., Meng, W., Ayata, C., Fishman, M.C., Moskowitz, M.A., Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1996, 16, 981-987.
62. Satoh, S., Yamamoto, Y., Toshima, Y. et al. Fasudil, a protein kinase inhibitor, prevents the development of endothelial injury and neutrophil infiltration in a two-haemorrhage canine subarachnoid model. *J. Clin. Neurosci.*, 1999, 6, 394-399.
63. Nakamura, T., Kajimura, M., Morikawa, T., Hattori, K., Ishikawa, M.,

- Yukutake, Y., Uchiyama, S., Suematsu, M., Acute CO₂-independent vasodilatation of penetrating and pre-capillary arterioles in mouse cerebral parenchyma upon hypoxia revealed by a thinned-skull window method. *Acta. Physiol.* 2011, 203, 187-196.
64. Thushara, Vijayakumar N., Sangwan, A., Sharma, B., Majid, A., Rajanikant, GK.; Cerebral Ischemic Preconditioning: the Road So Far... *Mol. Neurobiol.* 2016, 53, 2579-2593.
65. Centeno, JM., Orti, M., Salom, JB., Sick, TJ., Pérez-Pinzón, MA.; Nitric oxide is involved in anoxic preconditioning neuroprotection in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1999, 836, 62-9.
66. Atochin, DN., Clark, J., Demchenko, IT., Moskowitz, MA., Huang, PL.; Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases. *Stroke.* 2003, 34, 1299-1303.
67. Kitano, H., Kirsch, JR., Hurn, PD., Murphy, SJ.; Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007, 27, 1108-1128.
68. Kanski, J.; Aksenova, M.; Stoyanova, A.; Butterfield, D.A. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: Structure-activity studies. *J. Nutr. Biochem.* 2002, 13, 273-281.
69. Asano, T., Matsuzaki, H., Iwata, N., Xuan, M., Kamiuchi, S., Hibino, Y., Sakamoto, T., Okazaki, M., Protective effects of ferulic acid

- against chronic cerebral hypoperfusion-induced swallowing dysfunction in rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, E550.
70. Cruz-Sanchez, F.F. ; Cardozo, A. ; Castejon, C. ; Tolosa, E. ; Rossi, M.L. Aging and the nigro-striatal pathway. *J. Neural Transm. Suppl.* 1997, 51, 9-25.
71. Kobayashi, H. ; Nakagawa, T. ; Sekizawa, K. ; Arai, H. ; Sasaki, H. Levodopa and swallowing reflex. *Lancet.* 1996, 348, 1320-1321.
72. Sivam, S.P. ; Cox, J. Postnatal administration of D1 dopamine agonist reverses neonatal dopaminergic lesion-induced changes in striatal enkephalin and substance P systems. *Brain Res.* 2006, 1073-1074, 159-163.
73. Jia, Y.X. ; Sekizawa, K. ; Ohruji, T. ; Nakayama, K. ; Sasaki, H. Dopamine D1 receptor antagonist inhibits swallowing reflex in guinea pigs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1998, 274, R76-R80.
74. Abe, A. ; Nishiyama, Y. ; Hagiwara, H. ; Okubo, S. ; Ueda, M. ; Katsura, K. ; Katayama, Y. Administration of cilostazol, an antiplatelet, to patients with acute-stage cerebral infarction and its effects on plasma substance P level and latent time of swallowing reflex. *J. Nippon. Med. Sch.* 2013, 80, 50-56.
75. Ikeda, J. ; Kojima, N. ; Saeki, K. ; Ishihara, M. ; Takayama, M. Perindopril increases the swallowing reflex by inhibiting substance P degradation and tyrosine hydroxylase activation in a rat model of dysphagia. *Eur. J. Pharmacol.* 2015, 746, 126-131.