

(+)-Eburnamenine-14-carboxylic acid  
2-nitroxyethyl ester の神経薬理学的研究

山 田 重 行

## 目 次

緒 論	-----	1
第 1 章 VA-045 の末梢循環及び脳循環改善作用	-----	3
1.1 緒 言	-----	3
1.2 実験材料及び方法	-----	4
1.2.1 動物		
1.2.2 薬物		
1.2.3 測定方法		
1.2.4 統計処理		
1.3 結果	-----	6
1.3.1 末梢循環に対する作用		
1.3.2 脳循環に対する作用		
1.4 考察	-----	9
1.5 小 括	-----	11
1.5.1 末梢循環に対する作用		
1.5.2 脳循環に対する作用		
第 2 章 ウサギ摘出脳底動脈に対する VA-045 の弛緩作用	-----	13
2.1 緒 言	-----	13
2.2 実験材料及び方法	-----	13
2.2.1 動物		
2.2.2 薬物		
2.2.3 Krebs-Henseleit 液		

2.2.4	方法		
2.2.5	統計処理		
2.3	結果	-----	15
2.4	考察	-----	19
2.5	小括	-----	21
第 3 章	VA-045 の脳虚血保護作用	-----	22
3.1	緒言	-----	22
3.2	実験材料及び方法	-----	23
3.2.1	動物		
3.2.2	薬物		
3.2.3	Normobaric hypoxia 法		
3.2.4	Histotoxic anoxia 法		
3.2.5	Complete ischemia 法		
3.2.6	統計処理		
3.3	結果	-----	24
3.3.1	Normobaric hypoxia に対する作用		
3.3.2	Histotoxic anoxia に対する作用		
3.3.3	Complete ischemia に対する作用		
3.4	考察	-----	29
3.5	小括	-----	31

第 4 章	VA-045 の実験的意識障害モデルに対する改善作用	
		----- 32
4.1	緒言	----- 32
4.2	実験材料及び方法	----- 33
4.2.1	動物	
4.2.2	薬物	
4.2.3	ラットの pentobarbital 睡眠に対する作用	
4.2.4	マウスの頭部衝撃に対する作用	
4.2.5	マウスの自発運動量に対する作用	
4.2.6	ラットの脳虚血に対する作用	
4.2.7	受動的回避学習反応に対する作用	
4.2.8	統計処理	
4.3	結果	----- 36
4.3.1	ラットの pentobarbital 睡眠に対する作用	
4.3.2	マウスの頭部衝撃に対する作用	
4.3.3	マウスの自発運動量に対する作用	
4.3.4	ラットの脳虚血による神経障害に対する作用	
4.3.5	ラットの受動的回避学習反応における脳虚血による学習障害に対する作用	
4.4	考察	----- 41
4.5	小括	----- 42
第 5 章	頭部衝撃モデルに対する VA-045 の改善作用	
		----- 43
5.1	緒言	----- 43
5.2	実験材料及び方法	----- 43
5.2.1	動物	

5.2.2	薬物		
5.2.3	頭部衝撃モデル		
5.2.4	神経症状		
5.2.5	受動的回避学習反応		
5.2.6	電気生理学の実験		
5.2.7	統計処理		
5.3	結果	-----	45
5.3.1	病理学的所見		
5.3.2	神経症状に対する作用		
5.3.3	受動的回避学習反応に対する作用		
5.3.4	電気生理学の実験		
5.4	考察	-----	48
5.5	小括	-----	50
第 6 章	老齢ラットにおける頭部衝撃による神経障害 に対する VA-045 の改善作用		
		-----	51
6.1	緒言	-----	51
6.2	実験材料及び方法	-----	51
6.2.1	動物		
6.2.2	薬物		
6.2.3	頭部衝撃モデル		
6.2.4	慢性神経症状		
6.2.5	Beam balance task		
6.2.6	試験条件		
6.2.7	統計処理		
6.3	結果	-----	53
6.3.1	体重に対する作用		

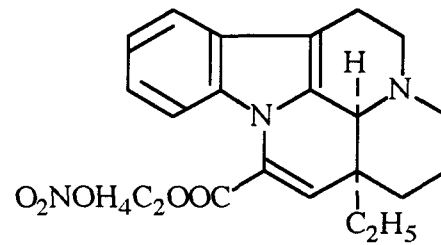
6.3.2	慢性神経障害に対する作用	
6.3.3	Beam balance task に対する作用	
6.4	考察	55
6.5	小括	59
第 7 章	ラットの中樞 noradrenaline 神経系に対する VA-045 の作用	60
7.1	緒言	60
7.2	実験材料及び方法	61
7.2.1	動物	
7.2.2	薬物	
7.2.3	頭部衝撃モデル	
7.2.4	神経学的実験	
7.2.5	N-2-chloroethyl-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP4)処置	
7.2.6	脳内 monoamine 濃度の測定	
7.2.7	脳内微小透析法	
7.2.8	統計処理	
7.3	結果	63
7.3.1	神経症状に対する作用	
7.3.2	ラットの前脳皮質及び青斑核の細胞外 noradrenaline 濃度に対する VA-045 の作用	
7.3.3	Clonidine 灌流時のラットの前脳皮質及び青斑核 の細胞外 noradrenaline 濃度に対する VA-045 の作用	
7.4	考察	69
7.5	小括	71

第 8 章 総括	-----	72
謝 辞	-----	76
掲載雑誌目録	-----	77
文 献	-----	78

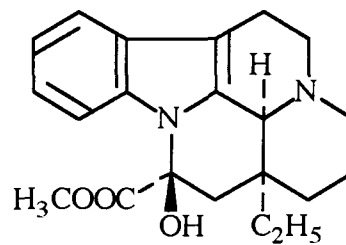
本論文に関連する主な薬物の化学構造

VA-045

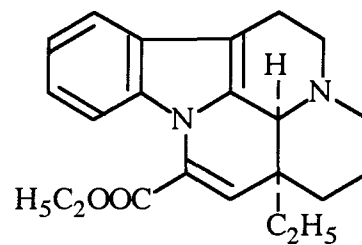
(+)-Eburnamenine-14-carboxylic acid 2-nitroxyethyl ester



Vincamine

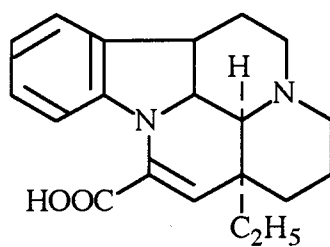


Vinpocetine

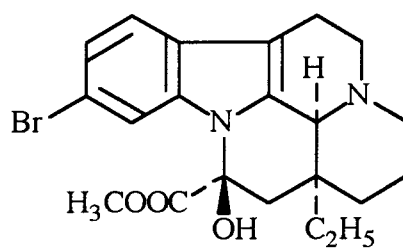




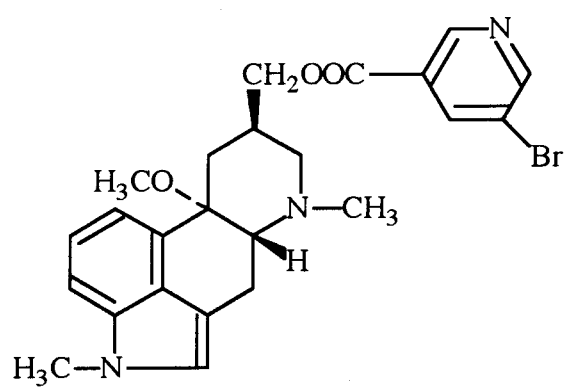
### Apovincaminic acid



### Brovincamine

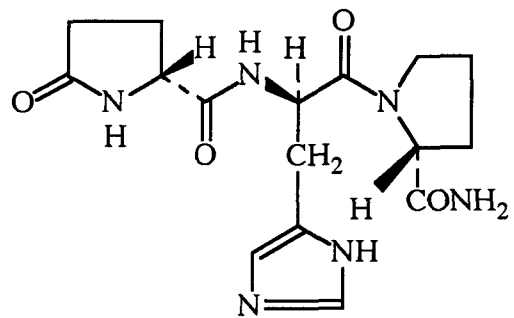


### Nicergoline



**TRH**

**Thyrotropin-releasing hormone**



## 緒 論

意識障害をきたす主な疾患は脳循環障害，多量の睡眠剤及びアルコールの服用，一酸化炭素中毒，糖尿病性昏睡，尿素症昏睡及び肝性昏睡等の代謝性障害に起因するものと脳出血，脳炎，脳梗塞，脳腫瘍及び脳外傷等に起因する器質性脳疾患の2つに大きく分類されている．中でも，頭部外傷及び脳血管障害を伴う意識障害は患者の予後に及ぼす影響が大きく，治療の対象として重要な疾患であり，その患者数は年々増加している．

意識障害発生の急性期は原因（原疾患）に対する治療が優先される．急性期に救命処置をほどこされ，生命の危機を脱すると意識障害は軽減してくる．脳損傷が意識中枢に関係なければ意識は清明となり，社会復帰が可能となるが，意識障害が完全に回復せず，失禁，意欲低下，周囲への無関心，発語が少ないなどの症状を残して，遷延した時（遷延性意識障害）は社会復帰が困難な場合が多い．このような症状に対して，従来の脳代謝賦活剤及び脳循環改善剤が用いられているが，必ずしも十分な効果は期待できない．

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) は下垂体から thyroid-stimulating hormone (TSH) や prolactin (PRL) を分泌させるホルモン作用とは別に，自発運動量増加作用<sup>1, 2, 3)</sup>，麻酔短縮作用<sup>4, 5, 6, 7)</sup>，脳波賦活作用<sup>8, 9)</sup>など，中枢神経系に対して賦活的に働くことが明らかになってきた．

また，TRH 誘導体は実験的な頭部衝撃昏睡マウス<sup>10, 11)</sup>，頭部衝撃ラット<sup>12)</sup>，脳虚血ラット<sup>13, 14)</sup>，後部視床下部破壊ネコ<sup>5, 15)</sup>及び脳幹圧迫ネコ<sup>16)</sup>などの意識障害動物モデルにおいて，意識障害改善作用が認められている．

TRH は，臨床においても下垂体 TSH 分泌機能検査薬としての使用に加え，遷延性意識障害や脊髄小脳変性症の治療に繁用されている．しかし，TRH は血中や脳内でその分解酵素である thyroliberinase や TRH deamidase によって速やかに不活性化され<sup>17, 18, 19)</sup>，中枢作用発現よりも低用量で内分泌作用を示すなど，遷延性意識障害治療薬としての欠点を有している．

TRH 及び TRH 誘導体はいずれも本質的には内因性の TRH 様作用を有しているのが現状であり，TRH 様の副作用がなく，正常状態では全く中枢興奮作用を発現せず，脳障害時の機能低下のみを回復させる意識障害改善作用を有する化合物の開発が望まれている．

Vinpocetine は Vinca minor L. (キョウチクトウ科，ヒメツルニチニチ草) から抽出されたアルカロイド (Vincamine) の誘導体である．

Vinpocetine は選択的脳血流量増加作用<sup>20, 21, 22)</sup>, glucose の脳内取り込みの促進, 脳内アミンの代謝回転の促進, 脳虚血時の脳内 lactate 増加抑制作用及び adenosine triphosphate (ATP) 含量増加作用<sup>23)</sup>などの脳代謝改善作用ならびに脳虚血保護作用<sup>23)</sup>を有し, 臨床的には脳梗塞後遺症, 脳出血後遺症及び脳動脈硬化症に伴う症状の改善に対して有用性が認められている.

そこで, Vincamine の薬理作用に注目し, apovincaminic acid の新規誘導体の合成研究を行った結果, 脳循環改善作用が vinpocetine より優れている VA-045 [(+)-eburnamenine-14-carboxylic acid 2-nitroxyethylester] を見出した.

VA-045 は vinpocetine と同様, 脳循環改善作用及び脳保護作用を有し, さらに頭部外傷後の意識障害モデルにも有効であり, 治療効果が期待できる化合物である. そこで本研究では apovincaminic acid の誘導体である VA-045 の薬理学的特徴を明確にすることを目的として, 脳循環に対する作用, 脳保護作用及び実験的意識障害モデルに対する作用を検討し, 併せて作用機序の検討も行った.

## 第 1 章 VA-045 の末梢循環及び脳循環改善作用

### 1.1 緒言

臨床において、外傷性及び虚血性脳損傷による神経障害の大きな原因が局所の脳血流量の減少によることが報告されている<sup>24)</sup>。また、ラットの外傷性脳損傷モデルにおいて損傷初期はすべての部位での脳血流量の減少と外傷部位での持続的な脳血流量の減少が報告されており<sup>25)</sup>、脳循環の改善が外傷性及び虚血性脳損傷の神経障害予防に重要な役割をしていると考えられている。

Vinpocetine は vincamine acid の誘導体の 1 つで、現在、脳梗塞後遺症や脳出血後遺症の治療薬として広く用いられており、特に脳血管に選択性が高く、脳血管拡張作用による脳血流増加作用を有することが知られている<sup>21, 22)</sup>。

VA-045 は vinpocetine と同様に若齢ラット及び老齢ラットの脳血流量を増加させ<sup>26)</sup>、イヌの摘出血管を用いた場合、大腿動脈と比較して、脳底動脈血管を選択的に拡張させることが報告されている<sup>27)</sup>。

本章では、循環動態に対する VA-045 の作用をイヌを用いて詳細に検討した。対照薬には vinpocetine, apovincaminic acid, brovincamine 及び nicergoline を用いた。

## 1.2 実験材料及び方法

### 1.2.1 動物

体重 8～12 kg の雌雄のビーグル犬（東洋ビーグル）を用いた．

動物は実験を開始する前，少なくとも 1 週間は室温  $22 \pm 2$  °C，湿度  $55 \pm 15$  % で 6:00 AM ～ 6:00 PM 照明の明暗サイクルの部屋で個別飼育し，飼料（DS，オリエンタル酵母）は 1 日 1 回の制限給餌（300 g）としたが，水は自由に摂取させた．

### 1.2.2 薬物

VA-045（大正製薬），vinpocetine（武田薬品工業）及び apovincaminic acid（大正製薬）は 10 % アスコルビン酸溶液に溶解した．

Nicergoline（田辺製薬）は 1/40 M の酒石酸で溶解し，pH 5 ～ 6 に調製した． Brovincamine（Sandoz）は生理食塩液に溶解した．

投与液量は 0.2 ml/kg とし，上記の薬物を大腿静脈に挿入したカニューレより投与した．

### 1.2.3 測定方法

イヌを pentobarbital-Na（30 mg/kg, i.v. 及び 5 mg/kg/hr, i.v. の持続注入）で麻酔し，背位に固定した．固定後，気管カニューレを挿入し，人工呼吸器（SN-480-3，シナノ製作所）を用い，以下の実験を行った．

#### 1) 血圧及び心拍数の測定

血圧は大腿動脈に挿入したポリエチレンカニューレに接続した圧トランスジューサー（TP-300T，日本光電）を介して歪み圧力用アンプ（AP-601G，日本光電）で測定し，レコーダ（WT-645G，日本光電）に記録した．心拍数は血圧の圧波を瞬時心拍計（AT-601G，日本光電）に誘導し，レコーダ（WT-645G，日本光電）に記録した．

## 2) 椎骨動脈, 総頸動脈及び大腿動脈血流量の測定

血流量は椎骨動脈, 総頸動脈及び大腿動脈に装着したプローブ (FG 型, 日本光電) を介して電磁血流計 (MFV-1200, 日本光電) で測定し, 2 台のレコーダ (VP-6621A, ナショナル製または SS-250F, SECONIC) に記録した.

## 3) 大脳皮質血流量の測定

頭蓋骨を露出させ, Lim et al.<sup>28)</sup> の脳図譜に従って, 小孔から一侧の大脳皮質 (シルビウス上回) 血流量をプローブ (OP 型, アドバンス) を介してレーザー組織血流計 (ALF2100, アドバンス) で測定し, レコーダ (SS-250F, SECONIC) に記録した.

### 1.2.4 統計処理

薬物投与前値を 100 % とした時の薬物投与後 10 分間の最大変化時の割合 (%) を算出し, 平均と標準誤差 (mean  $\pm$  S.E.M.) で示した.

媒体群と薬物群との比較は, 一元配置分散分析後, Dunnett 検定を用いた. また, 危険率 5 % 以下で差がみられる場合を統計学的に有意差ありとした.

### 1.3 結果

#### 1.3.1 末梢循環に対する作用

10 % アスコルビン酸溶液の静脈内投与では、血圧、心拍数、総頸動脈血流量、椎骨動脈血流量及び大腿動脈血流量に影響はなかった。

VA-045 (0.03, 0.1 及び 0.3 mg/kg) の静脈内投与は、用量依存的に血圧及び心拍数を減少させ、椎骨動脈血流量を増加させたが、総頸動脈血流量及び大腿動脈血流量には影響しなかった (Table 1-1 及び 1-2) 。

Vinpocetine (0.03, 0.1 及び 0.3 mg/kg) の静脈内投与は、血圧と総頸動脈血流量、椎骨動脈血流量及び大腿動脈血流量に影響はなかったが (Table 1-1 及び 1-2) , 0.3 mg/kg 投与では心拍数を有意に減少させた (Table 1-1) 。

Apovincaminic acid (0.3, 1.0 及び 3.0 mg/kg) の静脈内投与は、用量依存的に心拍数を減少させた (Table 1-1) 。 また、3.0 mg/kg 投与では椎骨動脈血流量を有意に増加させた (Table 1-2) 。

Nicergoline (0.01, 0.03 及び 0.1 mg/kg) の静脈内投与は、用量依存的に血圧を低下させた (Table 1-1) 。 しかし、心拍数と総頸動脈血流量、椎骨動脈血流量及び大腿動脈血流量には影響しなかった (Table 1-1 及び 1-2) 。

Brovincamine (0.3, 1.0 及び 3.0 mg/kg) の静脈内投与は、椎骨動脈血流量を用量依存的に増加させ、総頸動脈血流量を用量依存的に減少させた (Table 1-2) 。 しかし、血圧、心拍数及び大腿動脈血流量には影響しなかった (Table 1-1 及び 1-2) 。



Table 1-1

Effects of VA-045, vinpocetine, apovincaminic acid, brovincamine and nicergoline on mean blood pressure (MP) and heart rate (HR) in anesthetized dogs

Drug	Dose mg/kg i.v.	% of pretreatment		HR
		MP		
10 % ascorbic acid	—	101.6 ± 0.9		100.3 ± 0.7
VA-045	0.03	99.3 ± 0.8		99.5 ± 0.6
	0.1	96.3 ± 1.6	*	95.7 ± 2.2
	0.3	91.1 ± 1.6	**	87.6 ± 3.4 **
Vinpocetine	0.03	100.1 ± 0.9		99.6 ± 0.6
	0.1	99.6 ± 1.9		98.4 ± 0.3
	0.3	99.5 ± 1.8		97.7 ± 0.7 *
Apovincaminic acid	0.3	98.2 ± 1.3		99.4 ± 1.5
	1.0	94.0 ± 3.1		85.0 ± 2.3 **
	3.0	91.8 ± 5.2		77.5 ± 4.5 **
Saline	—	98.9 ± 0.7		101.7 ± 0.9
Brovincamine	0.3	99.2 ± 0.7		99.1 ± 0.6
	1.0	99.1 ± 0.4		97.7 ± 1.9
	3.0	98.6 ± 1.6		97.2 ± 3.7
Nicergoline	0.01	94.8 ± 1.9		102.8 ± 0.8
	0.03	84.1 ± 1.7	##	102.9 ± 1.0
	0.1	79.5 ± 2.5	##	103.0 ± 1.9

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 vs. 10 % ascorbic acid (Dunnett's test).

## p < 0.01 vs. saline (Dunnett's test).

Each value represents the mean ± S.E.M. (n=5).

Table 1-2

Effects of VA-045, vinpocetine, apovincaminic acid, brovincamine and nicergoline on ventral arterial blood flow (VBF), femoral arterial blood flow (FBF) and carotid blood flow (CBF) in anesthetized dogs

Drug	Dose mg/kg i.v.	% of pretreatment					
		VBF		FBF		CBF	
10 % ascorbic acid	—	102.9 ± 1.2		103.5 ± 2.3		100.9 ± 0.5	
VA-045	0.03	107.0 ± 2.7		106.2 ± 2.5		102.0 ± 0.7	
	0.1	123.4 ± 4.7		112.4 ± 9.5		102.8 ± 2.4	
	0.3	137.3 ± 10.9 **		100.6 ± 4.9		97.0 ± 7.6	
Vinpocetine	0.03	101.5 ± 1.5		102.8 ± 1.5		102.4 ± 0.5	
	0.1	102.1 ± 3.4		107.1 ± 1.1		101.7 ± 1.0	
	0.3	104.0 ± 3.3		108.8 ± 2.0		103.0 ± 1.7	
Apovincaminic acid	0.3	108.6 ± 2.6		102.9 ± 2.7		100.5 ± 0.2	
	1.0	106.5 ± 4.8		99.1 ± 12.0		90.2 ± 6.4	
	3.0	149.7 ± 10.5 **		117.6 ± 9.8		105.6 ± 10.5	
Saline	—	102.6 ± 1.6		99.0 ± 0.9		100.5 ± 0.3	
Brovincamine	0.3	106.5 ± 1.7		104.4 ± 0.9		101.1 ± 0.7	
	1.0	123.8 ± 3.1 #		101.9 ± 2.5		98.3 ± 2.2	
	3.0	151.8 ± 8.3 ##		97.9 ± 3.8		91.5 ± 3.7 #	
Nicergoline	0.01	101.4 ± 1.4		103.7 ± 1.4		100.2 ± 1.2	
	0.03	100.1 ± 2.8		110.5 ± 4.3		107.6 ± 4.4	
	0.1	100.1 ± 7.0		110.2 ± 7.0		106.5 ± 8.5	

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 vs. 10 % ascorbic acid (Dunnett's test).

# p < 0.05, ## p < 0.01 vs. saline (Dunnett's test).

Each value represents the mean ± S.E.M. (n=5).

### 1.3.2 脳循環に対する作用

10 % アスコルビン酸溶液の静脈内投与では、血圧、心拍数及び大脳皮質血流量に変化はなかった。

VA-045 (0.03, 0.1, 0.3 及び 1.0 mg/kg) の静脈内投与では血圧及び心拍数に変化はなかったが (Table 1-3) , 大脳皮質血流量を用量依存的に増加させた (Table 1-3) .

Vinpocetine (0.03, 0.1, 0.3 及び 1.0 mg/kg) の静脈内投与では大脳皮質血流量、血圧及び心拍数に変化はなかった (Table 1-3) .

Apovincaminic acid (0.3, 1.0 及び 3.0 mg/kg) の静脈内投与では大脳皮質血流量及び血圧に変化はなかったが、3.0 mg/kg 投与で心拍数を有意に減少させた (Table 1-3) .

Brovincamine 1.0 及び 3.0 mg/kg の静脈内投与で大脳皮質血流量を有意に増加させたが、3 mg/kg 投与では血圧を有意に低下させた。

Nicergoline (0.01, 0.03 及び 0.1 mg/kg) の静脈内投与では大脳皮質血流量及び心拍数に変化はなかったが、0.03 及び 0.1 mg/kg 投与で血圧を有意に低下させた (Table 1-3) .

Table 1-3

Effects of VA-045, vinpocetine, apovincaminic acid, brovincamine and nicergoline on mean blood pressure (MP), cerebral cortical blood flow (CerBF) and heart rate (HR) in anesthetized dogs

Drug	Dose mg/kg i.v.	% of pretreatment		
		MP	CerBF	HR
10 % ascorbic acid	—	98.4 ± 1.2	102.7 ± 0.7	103.1 ± 2.8
VA-045	0.03	98.6 ± 1.4	102.2 ± 1.7	101.6 ± 1.4
	0.1	97.9 ± 0.9	104.7 ± 1.6	101.4 ± 4.4
	0.3	95.7 ± 2.5	111.9 ± 2.4	102.3 ± 4.1
	1.0	94.9 ± 6.2	130.6 ± 6.3 **	101.8 ± 4.1
Vinpocetine	0.03	97.9 ± 1.1	105.3 ± 2.2	100.8 ± 1.2
	0.1	97.1 ± 1.9	107.8 ± 3.1	96.1 ± 2.8
	0.3	96.4 ± 3.1	110.7 ± 4.1	98.8 ± 2.6
	1.0	100.2 ± 3.7	119.7 ± 8.5	96.1 ± 2.8
Apovincaminic acid	0.3	100.0 ± 1.5	104.5 ± 1.0	97.7 ± 4.2
	1.0	98.8 ± 2.3	103.0 ± 2.0	88.5 ± 3.3
	3.0	102.3 ± 6.6	103.3 ± 4.2	81.5 ± 6.1 **
Saline	—	99.6 ± 1.0	100.1 ± 0.8	101.3 ± 0.9
Brovincamine	0.3	99.5 ± 1.2	102.8 ± 0.6	100.9 ± 2.5
	1.0	96.8 ± 1.5	103.3 ± 1.1 #	100.9 ± 2.5
	3.0	93.6 ± 1.9 #	105.4 ± 0.9 ##	98.2 ± 3.0
Nicergoline	0.01	94.2 ± 1.8	101.0 ± 3.0	98.9 ± 1.9
	0.03	88.4 ± 3.5 #	101.1 ± 2.8	99.1 ± 1.7
	0.1	83.4 ± 4.4 ##	101.7 ± 3.4	97.3 ± 1.5

\*\* p < 0.01 vs. 10 % ascorbic acid (Dunnett's test).

# p < 0.05, ## p < 0.01 vs. saline (Dunnett's test).

Each value represents the mean ± S.E.M. (n=5).

## 1.4 考察

本研究から、VA-045 は今回用いた対照薬物より椎骨動脈及び大脳皮質動脈に対して選択的な血管拡張作用を有することが明らかとなった。

VA-045 は大腿動脈血流量及び総頸動脈血流量に影響せず、椎骨動脈血流量を用量依存的に増加させた。また、血圧に影響することなく、大脳皮質血流量を用量依存的に増加させた。Miyata et al.<sup>27)</sup> は、VA-045 がラット摘出血管において拡張作用を有し、この作用は脳底動脈に選択的であり、末梢動脈に対しては作用しないことを報告している。本研究の結果は Miyata et al.<sup>27)</sup> の *in vitro* の結果と一致するものであった。

Vinpocetine (0.03 及び 1.0 mg/kg) の静脈内投与では、血圧と椎骨動脈、大腿動脈、総頸動脈及び大脳皮質血流量に影響はなかった。この結果は Karpati and Szporny<sup>29)</sup> が報告した  $\alpha$ -chloralose と urethane で麻酔した雑犬を用いた結果と異なっている。彼らは vinpocetine (0.2 及び 0.5 mg/kg) の静脈内投与で脳血管抵抗の減少に伴う脳血流量の増加を示すと報告した。

この相違の原因はイヌの種類（ビーグル犬と雑犬）及び麻酔条件の違い（pentobarbital 麻酔と  $\alpha$ -chloralose + urethane 麻酔）など、実験条件の相違に起因しているかもしれない。また、Okuyama et al.<sup>26)</sup> は、halothane 麻酔、gallamine 不動化条件で、vinpocetine がラット脳血流量に影響しないことを報告していることから vinpocetine は VA-045 のような明確な脳循環改善作用を示さない可能性も考えられる。

Apovincaminic acid は血圧を低下させ、椎骨動脈血流量の増加作用を示したが、その増加作用強度は VA-045 の約 1/10 であった。

また、apovincaminic acid が VA-045 の主要な代謝産物であることから、VA-045 の椎骨動脈及び大脳皮質血流量の増加作用は VA-045 の未変化体によるものと思われる。

Brovincamine は椎骨動脈血流量及び大脳皮質血流量を用量依存的に増加させた。Brovincamine は冠状動脈及び脳血管に対して血管拡張作用を有することが報告されており<sup>30)</sup>、本研究の結果と一致するものであった。また、brovincamine は VA-045 より椎骨動脈血流量を増加させたが、大脳皮質血流量については VA-045 に比べ増加作用は弱いものであった。

従って、brovincamine の脳血管に対する選択性は VA-045 に比べると低いと思われる。

Nicergoline は椎骨動脈血流量及び大脳皮質血流量に影響せずに血圧を低下させた。Shintomi et al.<sup>31)</sup> はネコを用いた場合、nicergoline の静脈内投与では脳血流量に影響することなく、血圧を低下させること

を報告しており、本研究の結果と一致するものであった。

さらに、nicergoline の adrenaline  $\alpha_1$  受容体遮断作用は phentolamine より強力であることが報告されている<sup>32)</sup>。従って、イヌの脳循環に対しては nicergoline の adrenaline  $\alpha_1$  受容体遮断作用は関与していないと考えられる。

VA-045 の化学構造は  $\text{Ca}^{2+}$  calmoduline 依存性の cyclic nucleotides phosphodiesterase (PDE) 阻害剤である vinpocetine と構造が類似している<sup>33)</sup>。また、cyclic nucleotides PDE 活性に対する VA-045 の影響が vinpocetine と同様であることが報告されている<sup>27)</sup>。このことから、VA-045 による大脳皮質血流量及び椎骨動脈血流量の増加は、vinpocetine と同様、血管平滑筋の PDE 活性の抑制に関与している可能性が考えられる。しかし、本研究では VA-045 0.3 mg/kg の静脈内投与で椎骨動脈血流量を、また、1.0 mg/kg の静脈内投与で大脳皮質血流量の有意な増加が認められたが、vinpocetine は 1.0 mg/kg の静脈内投与でも大脳皮質血流量に影響は認められなかった。以上、VA-045 の脳循環改善作用は血管平滑筋の PDE 活性の抑制作用だけでは説明できないと考えられる。

## 1.5 小括

### 1.5.1 末梢循環に対する作用

1. VA-045 の静脈内投与は，用量依存的に血圧及び心拍数を減少させ，椎骨動脈血流量を増加させたが，総頸動脈及び大腿動脈血流量を変化させなかった．
2. Vinpocetine の静脈内投与は，血圧と総頸動脈，椎骨動脈及び大腿動脈血流量を変化させなかったが，0.3 mg/kg の静脈内投与では心拍数を有意に減少させた．
3. Apovincaminic acid の静脈内投与は，用量依存的に心拍数を減少させた． また，3 mg/kg の静脈内投与では椎骨動脈血流量を有意に増加させた．
4. Nicergoline の静脈内投与は，用量依存的に血圧を低下させた．しかし，心拍数と総頸動脈，椎骨動脈及び大腿動脈血流量を変化させなかった．
5. Brovincamine の静脈内投与は，椎骨動脈血流量を用量依存的に増加させ，総頸動脈血流量を用量依存的に減少させた．しかし，血圧，心拍数及び大腿動脈血流量を変化させなかった．

### 1.5.2 脳循環に対する作用

1. VA-045 の静脈内投与では，血圧及び心拍数に変化はなかったが， 大脳皮質血流量は用量依存的に増加させた．
2. Vinpocetine の静脈内投与では，大脳皮質血流量，血圧及び心拍数に変化はなかった．
3. Apovincaminic acid の静脈内投与では，大脳皮質血流量及び血圧に変化はなかったが，心拍数は有意に減少させた．
4. Brovincamine の静脈内投与では，大脳皮質血流量を有意に増加させたが，血圧は有意に低下させた．
5. Nicergoline の静脈内投与では，大脳皮質血流量及び心拍数に変化はなかったが，血圧は有意に低下させた．

## 第2章 ウサギ摘出脳底動脈に対する VA-045 の弛緩作用

### 2.1 緒言

VA-045 は若齢及び老齢ラットの脳血流量を増加させ<sup>26)</sup>, *in vitro* 試験においてイヌの脳血管を選択的に拡張させることが報告されている<sup>27)</sup>. また, 第1章において VA-045 は選択的にイヌの椎骨動脈及び脳血管を拡張させ, 血流量を増加させる作用を有していることを報告した.

VA-045 の血管拡張作用の作用機序に関しては血管平滑筋の phosphodiesterase (PDE) 活性の抑制に起因している可能性が示唆されている<sup>27)</sup> が詳細は不明である.

本研究では, ウサギの摘出脳底動脈を用いて, VA-045 の血管平滑筋弛緩作用の作用機序を各種イオンチャネルの関与を含め検討した.

### 2.2 実験材料及び方法

#### 2.2.1 動物

体重 1.8 ~ 2.1 kg (11 週齢) の日本白色 (JW) 系雄性ウサギを使用した.

動物は実験を開始する前に少なくとも 3 日間は 8:00 AM ~ 8:00 PM 照明の明暗サイクルの部屋で飼育し, 飼料 (RC4, オリエンタル酵母) 及び水を自由に摂取させた.

#### 2.2.2 薬物

VA-045 (大正製薬), histamine (Sigma), 非選択的  $K^+$  conductance 遮断薬の tetraethylammonium: TEA (Sigma) 及び 4-aminopyridine (Sigma)<sup>34)</sup>,  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャネル遮断薬の charybdotoxin (Sigma) 及び apamin (Sigma)<sup>35, 36, 37)</sup>, adenosine triphosphate (ATP) 感受性  $K^+$  チャネル遮断薬の glybenclamide (Sigma)<sup>38, 39)</sup> を使用した.

#### 2.2.3 Krebs-Henseleit 液

NaCl: 118.0 mM, KCl: 4.7 mM,  $NaHCO_3$ : 25.0 mM,  $CaCl_2$ : 1.9 mM,  $NaH_2PO_4$ : 1.2 mM,  $MgSO_4$ : 1.2 mM, Glucose: 11.0 mM の組成の Krebs-Henseleit 液を使用した.

#### 2.2.4 方法

ウサギを pentobarbital-Na (30 mg/kg, i.v.) で麻酔し、総頸動脈を切断し、放血致死させた。脳を取り出し、脳底動脈を摘出後、95 %  $O_2$  + 5 %  $CO_2$  混合ガス通気下の Krebs-Henseleit 液内に入れた。Krebs-Henseleit 液内で摘出した脳底動脈を顕微鏡下で長さ 3 mm のリング標本を作製した。リング標本を Magnus 管 (10 ml 容, Krebs-Henseleit 液の設定温度: 37°C) に懸垂し、95 %  $O_2$  + 5 %  $CO_2$  混合ガス通気下で 1 g の張力を負荷し、60 ~ 90 分間安定させた。安定後、脳底動脈を histamine ( $10^{-6}M$ )、histamine ( $10^{-6}M$ ) + 15 mM KCl, 30 mM KCl 及び 60 mM KCl で収縮させた。収縮が安定した後、VA-045 ( $10^{-9} \sim 10^{-5}M$ ) を累積的に添加した。

VA-045 による弛緩反応は histamine ( $10^{-6}M$ )、histamine ( $10^{-6}M$ ) + 15 mM KCl, 30 mM KCl 及び 60 mM KCl による収縮を 100 % としたときの減少を % で表示した。

#### 2.2.5 統計処理

すべてのデータは平均とその標準誤差 (mean  $\pm$  S.E.M.) で示した。有意差検定は一元配置分散分析後、Student's t- 検定を用いた。また、危険率 5 % 以下で差がみられる場合を統計的に有意差ありとした。



## 2.3 結果

VA-045 ( $10^{-9} \sim 10^{-5} \text{M}$ ) は histamine ( $10^{-6} \text{M}$ ), histamine ( $10^{-6} \text{M}$ ) + 15 mM KCl, 30 mM KCl 及び 60 mM KCl による脳底動脈の収縮を濃度依存的に弛緩させた (Fig.2-1). しかし, 高濃度の KCl による収縮に対する VA-045 弛緩作用の発現には VA-045 の高濃度を必要とした.

脳底動脈における VA-045 による弛緩作用に対する各種  $\text{K}^+$  チャネル遮断薬の影響を検討した. 4 種の  $\text{K}^+$  チャネル遮断薬併用処置 (10 mM TEA,  $10^{-6} \text{M}$  4-aminopyridine,  $10^{-6} \text{M}$  charybdotoxin,  $10^{-6} \text{M}$  glybenclamide),  $10^{-6} \text{M}$  4-aminopyridine 単独処置あるいは  $10^{-7} \text{M}$  apamin 単独処置では VA-045 による弛緩反応の用量-反応曲線は histamine ( $10^{-6} \text{M}$ ) によって収縮を維持させた場合とほぼ同程度であり著変はなかった (Fig.2-2).

また, 等張性の high  $\text{K}^+$  (30 mM) による脳底動脈の収縮に対する VA-045 の弛緩作用は methylene blue ( $10^{-5} \text{M}$ ) でも影響されなかった (Fig.2-3).

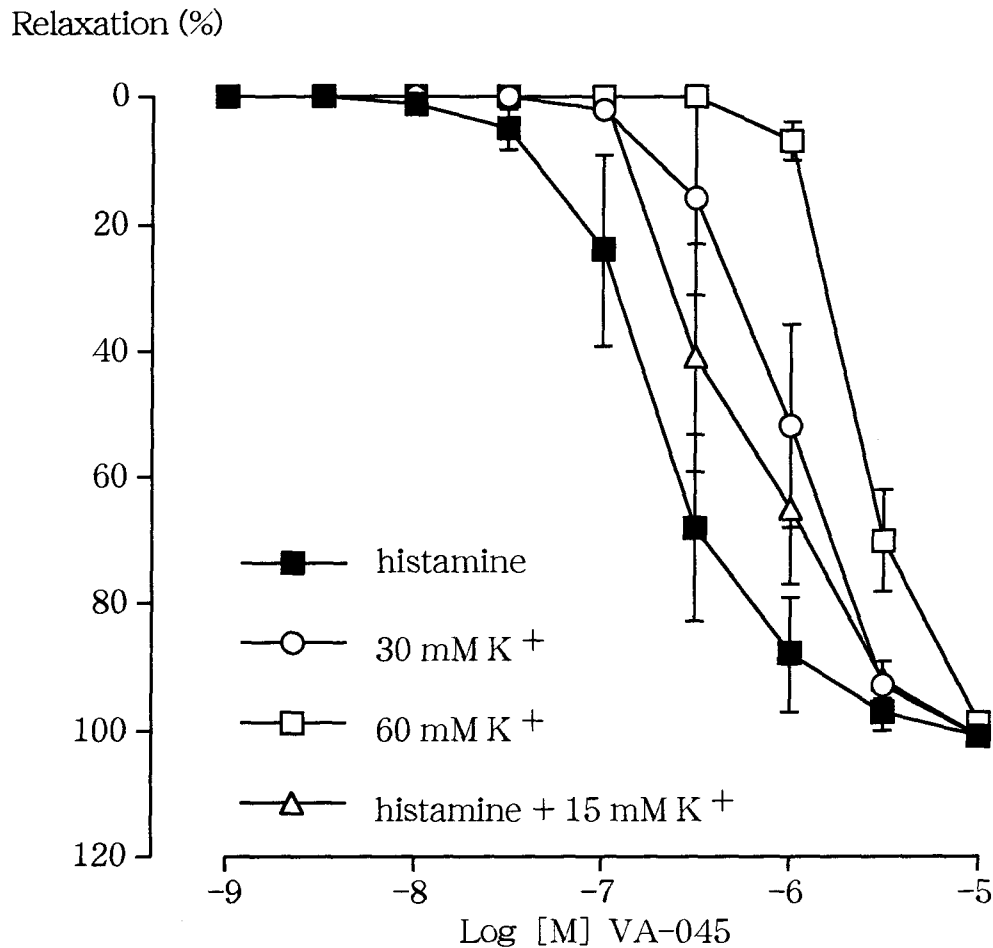


Fig. 2-1 Effect of VA-045 on histamine, 30 or 60 mM KCl and histamine + 15 mM KCl-induced contraction of the basilar artery. Rings of the basilar artery were contracted with histamine ( $10^{-6}$  M), histamine ( $10^{-6}$  M) with 15 mM KCl or isotonic high K<sup>+</sup> (30 or 60 mM KCl).

When the contractions reached a plateau, VA-045 was added cumulatively to the bath.

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 preparations.

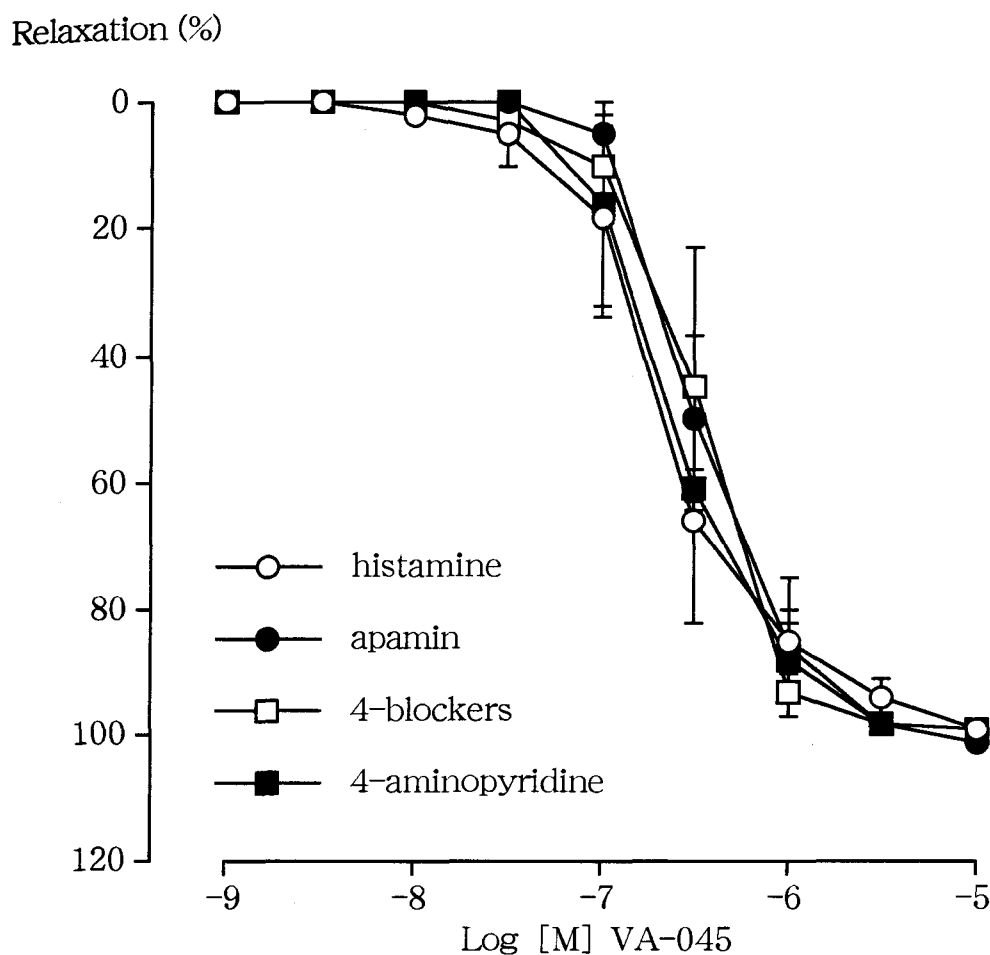


Fig. 2-2 Effects of apamine, 4-aminopyridine or potassium channel blockers on VA-045-induced relaxation of the basilar artery.

After rings of the basilar artery were treated with  $10^{-7}$  M apamin,  $10^{-6}$  M 4-aminopyridine, or four potassium channel blockers (10 mM TEA,  $10^{-6}$  M 4-aminopyridine,  $10^{-6}$  M charybdotoxin and  $10^{-6}$  M glybenclamide), the tonus of the artery was raised by  $10^{-6}$  M histamine.

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 preparations.

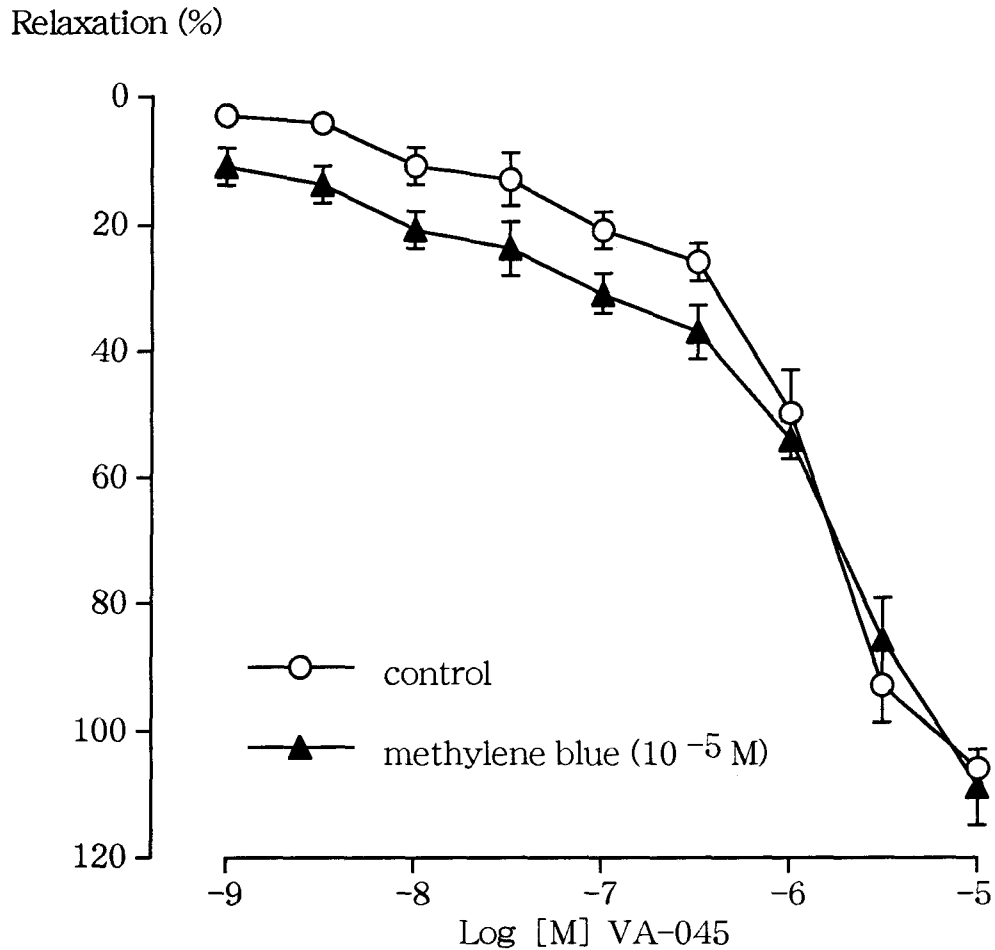


Fig. 2-3 Concentration-response curves for VA-045-induced relaxation of the basilar artery contracted with isotonic high  $K^+$  (30 mM).

After the basilar artery was treated with methylene blue ( $10^{-5}$  M) for 20 min, the tonus of the artery was raised by isotonic high  $K^+$  (30 mM).

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 preparations.

## 2.4 考察

第1章で VA-045 は大腿動脈血流量及び総頸動脈血流量を変化させずに椎骨動脈血流量を用量依存的に増加させ、血圧に影響を及ぼすことなく大脳皮質血流量を用量依存的に増加させることを報告した。

本研究ではウサギ脳底動脈の histamine, histamine + KCl 及び KCl による血管攣縮に対しても VA-045 が弛緩作用を発現し、この VA-045 による血管弛緩作用は脱分極した血管については減弱することが明らかとなった。すなわち、VA-045 は histamine による脳底動脈の収縮を濃度依存的に弛緩させた。しかし、histamine による脳底動脈の収縮に対する VA-045 の弛緩作用は等張性  $K^+$  (15 mM) を併用した場合、より高濃度を必要とした。また、VA-045 の等張性  $K^+$  (30 mM または 65 mM) による収縮に対する弛緩作用の発現には histamine による収縮に対する弛緩作用の発現より高濃度を必要とした。従って、 $K^+$  conductance の増加の程度が VA-045 の弛緩作用の強弱と関係することが示唆された。

次に、VA-045 による弛緩反応に対する5つのタイプの  $K^+$  チャネル遮断薬 (TEA: 非選択的な  $K^+$  conductance 遮断薬, 4-aminopyridine: 非選択的な  $K^+$  conductance 遮断薬, charybdotoxin:  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャネル遮断薬, apamin:  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャネル遮断薬, glybenclamide: ATP 感受性  $K^+$  チャネル遮断薬) の影響を検討した。

Histamine による脳底動脈の収縮に対する VA-045 の弛緩作用に対してこれらの  $K^+$  チャネル遮断薬は影響しなかった。Harata et al.<sup>40)</sup> は、中枢神経系の細胞における VA-045 の  $K^+$  conductance の増加は、 $K^+$  チャネル遮断薬の薬理的性質と異なることを報告しており、本研究の結果と一致するものであった。また、Harata et al.<sup>40)</sup> は中枢神経細胞を用いたパッチクランプ法で検討した場合、VA-045 による  $K^+$  conductance の増加は、glybenclamide, apamin, charybdotoxin 及び  $Ba^{2+}$  処置では影響を受けず、さらに、 $Ca^{2+}$  や他のセカンドメッセンジャーを介することなく、 $K^+$  チャネルを直接活性化することを報告している。

一方、VA-045 はイヌの脳底動脈に対して拡張作用を示し、この作用は末梢血管では発現せず、選択的に脳底動脈に発現することが報告されている<sup>27)</sup>。また、Miyata et al.<sup>27)</sup> は脳底動脈に対する VA-045 の血管拡張作用は cyclic guanosine monophosphate (cyclic GMP) を介した経路よりむしろ cyclic adenosine monophosphate (cyclic AMP) を介した経路によると結論づけている。

本研究でも Miyata et al.<sup>27)</sup> の報告と一致して血管拡張作用は guanylate cyclase の特異的拮抗薬である methylene blue で影響されなかった。このことから、VA-045 の弛緩作用は、cyclic GMP 経路を介さずに発現するものと考えられる。

また、本研究では VA-045 は等張性 high  $K^+$  (65 mM) により脱分極させた脳底動脈については、軽度な弛緩作用を示すのみであった。従って、VA-045 の血管拡張作用は cyclic AMP 経路を介したものと思われる。

以上の成績より、VA-045 は PDE 阻害作用による cyclic AMP 蓄積作用以外に  $K$  イオンの透過性を上げ、膜を過分極させる作用があることが示唆された。

## 2.5 小括

1. VA-045 はウサギ摘出脳底動脈の histamine, histamine + KCl 及び KCl による脳底動脈の収縮を濃度依存的に弛緩させた。  
しかし、高濃度の KCl による収縮に対する弛緩作用の発現には、VA-045 の高濃度を必要とした。
2. 脳底動脈における VA-045 による弛緩作用に対する各種  $K^+$  チャネル遮断薬の影響を検討した。4 種類の  $K^+$  チャネル遮断薬 (TEA, 4-aminopyridine, charybdotoxin, glybenclamide) 併用処置, 4-aminopyridine 単独処置あるいは apamin 単独処置では、VA-045 による弛緩反応の用量-反応曲線は histamine によって収縮を維持させた場合とほぼ同程度であり著変はなかった。
3. 等張性の high  $K^+$  による脳底動脈の収縮に対する VA-045 の弛緩作用は methylene blue 処置では影響されなかった。
4. VA-045 は  $K^+$  チャネルを直接活性化して作用を発現し、その他の  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャネル, TEA 感受性  $K^+$  チャネル及び ATP 感受性  $K^+$  チャネルには関与しないことが明らかとなった。  
さらに、VA-045 は cyclic GMP を介した経路よりむしろ cyclic AMP を介して脳底動脈を弛緩させることが示唆された。

### 第3章 VA-045 の脳虚血保護作用

#### 3.1 緒言

実験動物や人間において脳内酸素濃度の減少は、脳機能障害を誘発することが報告されている<sup>41, 42)</sup>。酸素濃度の減少に伴う脳機能低下を抑制する脳保護薬は頭部外傷や脳血管障害患者の治療にも用いられている。

Vinpocetine はヒメツルニチニチ草から抽出されるアルカロイド (vincamine) の誘導体であり、選択的脳血流量増加作用、脳内酸素消費量の増加、glucose の脳内取り込み促進、脳内アミンの代謝回転の促進及び脳虚血時の脳内乳酸増加抑制、adenosine triphosphate (ATP) 含量増加作用などの脳代謝改善作用及び脳虚血保護作用を有し、臨床的にも脳梗塞後遺症、脳出血後遺症及び脳動脈硬化症に伴う症状の改善に対して有用性が認められている。

VA-045 は vinpocetine と同様に vincamine の誘導体であり、化学構造も vinpocetine<sup>33)</sup> と類似している<sup>43)</sup>。第1章では、VA-045 はイヌにおいて vinpocetine より強力な椎骨動脈血流量及び大脳皮質血流量の増加作用を有することを、また、第2章では、ウサギにおいても脳血管弛緩作用を有することを明らかにした。

本章では、VA-045 の脳代謝改善作用及び脳虚血保護作用の可能性を検討した。Vinpocetine は脳循環改善作用を有するが、意識障害改善作用はない。そこで、現在、意識障害改善作用を有するといわれている TRH を対照薬として使用した。TRH は視床下部ホルモンであり、ホルモン作用とは別に自発運動量増加作用、麻酔短縮作用及び脳波賦活作用など中枢神経系に対し賦活的に働くことが報告されている<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9)</sup>。



## 3.2 実験材料及び方法

### 3.2.1 動物

体重約 30 g の ICR 系雄性マウス（日本チャールス・リバー）を使用した。動物は実験を開始する前に少なくとも 7 日間は室温  $22 \pm 2$  °C、湿度  $55 \pm 15$  % で 6:00 AM ~ 6:00 PM 照明の明暗サイクルの部屋で飼育し、飼料（CRF-1、オリエンタル酵母）及び水は自由に摂取させた。

### 3.2.2 薬物

VA-045（大正製薬）は 2.5 % アスコルビン酸溶液に溶解した。Thyrotropin-releasing hormone 酒石酸塩（TRH）（Sigma）は生理食塩液に溶解した。

### 3.2.3 Normobaric hypoxia 法

Normobaric hypoxia はマウスをプラスチックチャンバーに入れ 96 %  $N_2$  + 4 %  $O_2$  の混合ガスを 10 ml/min の流量でチャンバー内空気と置換することにより発現させた。Normobaric hypoxia による生存時間は低酸素状態のスタートから呼吸停止までの時間を指標とした。

VA-045 及び TRH は normobaric hypoxia の開始 10 分前に静脈内投与した。また、10 分前投与で作用が認められた場合には前投与時間を 30, 60 及び 120 分として VA-045 及び TRH の作用持続時間の検討も合わせて行った。

### 3.2.4 Histotoxic anoxia 法

Histotoxic anoxia は KCN 4 mg/kg を 0.1 ml/10 sec の速度で静脈内投与することにより発現させた。Histotoxic anoxia による生存時間は KCN 投与終了から呼吸停止までの時間を指標とした。

VA-045 及び TRH は KCN 投与 10 分前に静脈内投与した。また、10 分前投与で作用が認められた場合には前投与時間を 30, 60 及び 120 分として VA-045 及び TRH の作用持続時間の検討も合わせて行った。

### 3.2.5 Complete ischemia 法

脳虚血は瞬間的にマウスを断頭することにより発現させた。評価は、断頭と最後の gasping の間の時間 (gaspig duration) を指標とした。VA-045 及び TRH は断頭 10 分前に静脈内投与した。また、10 分前投与で作用が認められた場合には前投与時間を 30, 60 及び 120 分として VA-045 及び TRH の作用持続時間の検討も合わせて行った。

### 3.2.6 統計処理

すべてのデータは、平均値±標準誤差 (mean±S.E.M.) で示した。

検定は、分散比の F 検定後、分散が等しい場合には Student's t- 検定を、不等分散の場合には Aspin-Welch's t- 検定を行った。また、危険率 5 % 以下で差がみられる場合を統計学的に有意差ありとした。

## 3.3 結果

### 3.3.1 Normobaric hypoxia に対する作用

VA-045 及び TRH は 0.3 mg/kg 以上の静脈内投与で用量依存的でかつ有意に生存時間を延長させた (Table 3-1)。

作用持続時間の検討で、VA-045 1.0 mg/kg の静脈内投与は、normobaric hypoxia 開始 120 分前処置でも生存時間を有意に延長させた (Fig.3-1)。しかし、TRH 1.0 mg/kg の静脈内投与は、normobaric hypoxia 開始 30 分前処置では生存時間の延長作用は消失した (Fig.3-1)。

Table 3-1  
Effects of VA-045 and TRH on normobaric hypoxia in mice

Drugs	Dose (mg/kg)	n	Survival time (min)			
Vehicle	—	12	2.2	±	0.2	
VA-045	0.1	12	2.2	±	0.2	
	0.3	12	2.8	±	0.2	*
	1.0	12	2.8	±	0.2	*
Vehicle	—	12	2.3	±	0.2	
TRH	0.1	12	2.0	±	0.2	
	0.3	12	3.0	±	0.2	*
	1.0	12	3.0	±	0.2	*

Test drugs were administered i.v. 10 min before the hypoxic condition.

\* p < 0.05 vs. vehicle-treated group (Student's t-test).

Each value represents the mean ± S.E.M. (n=12).

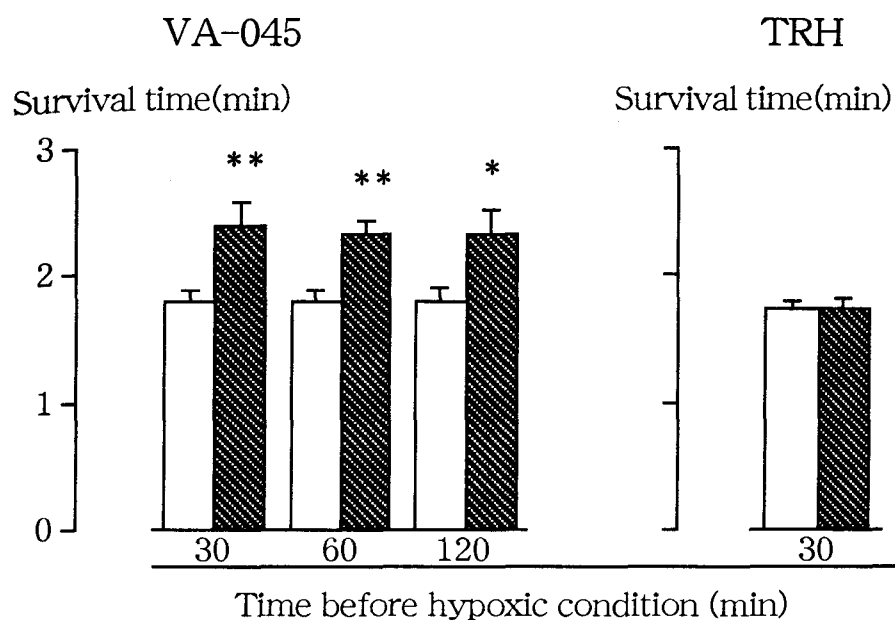


Fig. 3-1 Duration of action of VA-045 and TRH on normobaric hypoxia in mice.

The vehicle-treated group: open column.

The drug-treated group: hatched column.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs vehicle-treated group (Student's t-test or Aspin-Welch's t-test).

Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=12).

### 3.3.2 Histotoxic anoxia に対する作用

VA-045 1.0 mg/kg の静脈内投与は, KCN 投与による生存時間を有意に延長させた (Table 3-2) . しかし, TRH (0.1~1.0 mg/kg) の静脈内投与では, KCN 投与による生存時間に変化はなかった (Table 3-2) .

作用持続時間の検討で, VA-045 1.0 mg/kg の静脈内投与は, KCN 投与 30 分前処置では生存時間に変化はなかった (Fig.3-2) .

Table 3-2  
Effects of VA-045 and TRH on histotoxic anoxia in mice

Drugs	Dose (mg/kg)	n	Survival time (sec)	
Vehicle	—	12	30.8	± 0.8
VA-045	0.1	12	30.3	± 0.8
	0.3	12	31.3	± 1.1
	1.0	12	34.5	± 1.0 *
Vehicle	—	12	30.7	± 0.8
TRH	0.1	12	31.1	± 0.9
	0.3	12	31.3	± 0.4
	1.0	12	31.7	± 1.2

Test drugs were administered i.v. 10 min before KCN injection.

\*  $p < 0.05$  vs. vehicle-treated group(Student's t-test ).

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=12).

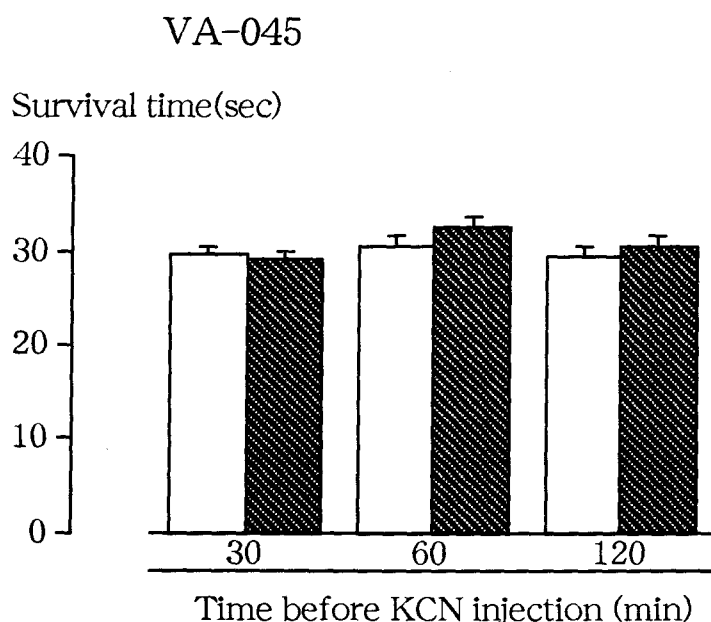


Fig. 3-2 Duration of action of VA-045 on histotoxic anoxia in mice.

The vehicle-treated group:open column.

The drug-treated group:hatched column.

Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=12).

### 3.3.3 Complete ischemia に対する作用

VA-045 0.1 mg/kg 以上の静脈内投与で用量依存的な gasping duration の延長作用を示し, 1.0 mg/kg 投与で有意差が認められた

(Table 3-3) . TRH は 0.1 mg/kg 以上の静脈内投与で gasping duration を延長し, 0.1 及び 1.0 mg/kg 投与で有意差が認められた (Table 3-3) .

作用持続時間の検討では, VA-045 1.0 mg/kg の静脈内投与は, 断頭 60 分前処置で gasping duration を有意に延長させた (Fig.3-3) .

一方, TRH 1.0 mg/kg の静脈内投与では断頭 30 分前処置で gasping duration に変化はなかった (Fig.3-3) .

Table 3-3

Effects of VA-045 and TRH on decapitation-induced gasping in mice

Drugs	Dose (mg/kg)	n	Gasping duration (sec)			
Vehicle	—	12	18.7	±	0.5	
VA-045	0.1	12	19.6	±	0.5	
	0.3	12	20.3	±	0.7	
	1.0	12	21.8	±	0.9	**
Vehicle	—	12	18.2	±	0.6	
TRH	0.1	12	19.7	±	0.3	*
	0.3	12	19.6	±	0.4	
	1.0	12	20.4	±	0.3	**

Test drugs were administered i.v. 10 min before decapitation.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated group(Student's t-test).

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=12).

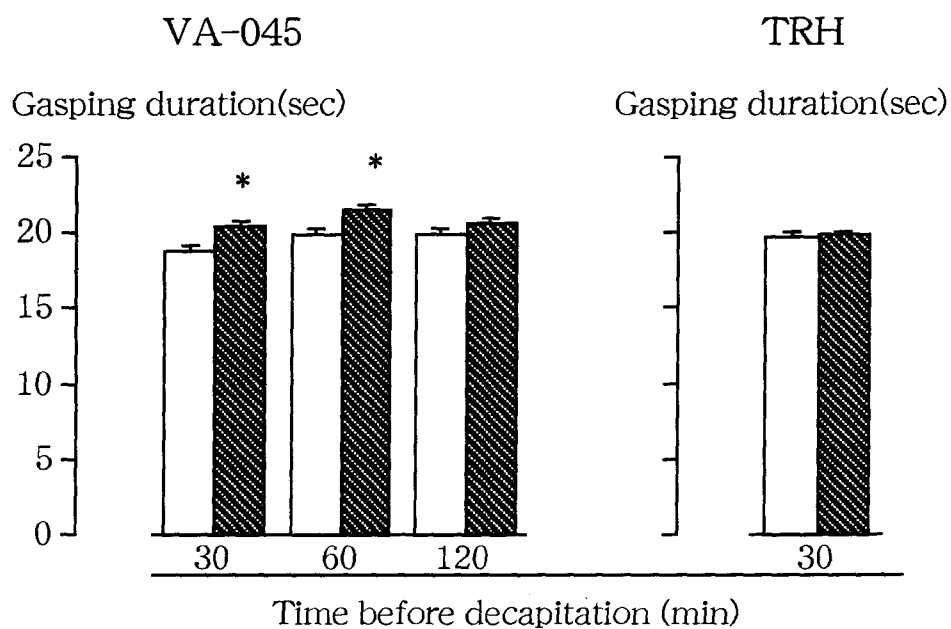


Fig. 3-3 Duration of action of VA-045 and TRH on decapitation-induced gasping in mice.  
The vehicle-treated group:open column.  
The drug-treated group:hatched column.  
\*  $p < 0.05$  vs. vehicle-treated group(Student's t-test).  
Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=12).

### 3.4 考察

脳への酸素と glucose の供給が不十分になると脳機能障害が誘発される。臨床上、心停止、脳外傷、脳血管痙攣及び脳卒中の場合、脳は低酸素、無酸素及び虚血状態になることが報告されている<sup>44)</sup>。

VA-045 は normobaric hypoxia, histotoxic anoxia 及び complete ischemia に対して有意な脳虚血保護作用を示した。

Normobaric hypoxia モデルにおいて VA-045 及び TRH の 0.3 mg/kg の静脈内投与で有意に生存時間が延長した。この結果は低酸素条件下でも VA-045 及び TRH は脳への酸素供給を改善し、虚血保護作用を発現したと考えられる。

KCN による致死は、主に ミトコンドリアのチトクロームオキシダーゼ活性の抑制と細胞内エネルギー代謝の障害により起きることが報告されている<sup>45)</sup>。

特に安田ら<sup>46)</sup>は、KCN の致死を詳細に検討し、KCN の致死量の投与で、lactate 及び adenosine monophosphate (AMP) の著しい増加を伴う脳内 glucose、クレアチンリン酸及び adenosine triphosphate (ATP) の急速かつ有意な減少を引き起こし、脳内エネルギー代謝を障害することを報告している。

VA-045 は KCN による histotoxic anoxia において生存時間を有意に延長した。この結果は VA-045 が脳内エネルギー代謝障害に対しても改善作用を示すことを示唆している。実際、VA-045 は <sup>31</sup>P-NMR を用いた in vivo の実験で頭部外傷による ATP 含量の減少を改善し<sup>47)</sup>、脳エネルギー代謝を改善することが報告されている。

一方、TRH は histotoxic anoxia に対して無効であった。また、Nagai et al.<sup>48)</sup>らは TRH が脳局所グルコース利用率 (local cerebral glucose utilization: LCGU) を低下させ、脳エネルギー代謝に抑制的に作用することを報告している。

断頭による complete ischemia の場合、薬物による生存時間の延長は呼吸中枢の神経細胞の保護に関与する可能性が報告されており<sup>49)</sup>、呼吸中枢神経機能の維持が生存時間の延長につながると思われる。

VA-045 及び TRH は、断頭による gasping duration を延長させたことから、呼吸中枢の神経細胞を保護する作用を持つ可能性が考えられる。また、VA-045 の complete ischemia による脳保護作用の持続時間は TRH より長かった。

この点に関しては TRH が生体内で速やかに代謝されることに起因していると考えられる。さらに、VA-045 は静脈内投与により中枢神経系に速やかに入り、血液脳関門を通過し、脳の広範な部位に長時間分布す

る（未発表データ）ことによると考えられる。

多くの研究者は、barbiturates や他の中枢神経抑制薬の脳保護作用を報告している<sup>50, 51, 52)</sup>。これら薬物の脳保護作用のメカニズムは脳代謝の低下またはエネルギー需要の抑制によると説明されている<sup>50, 52)</sup>。しかしながら、脳内エネルギー代謝を改善する VA-045 は、pentobarbital による睡眠時間を短縮し、この効果は TRH より強力であった<sup>53)</sup>。なお、VA-045 の睡眠短縮作用の作用機序については脳内エネルギー代謝の改善が関与している可能性は高いが詳細は不明である。VA-045 は脳血管拡張作用および脳血流増加作用を示すことから、この作用による脳保護効果も考えられる。TRH については中枢のコリン作動性の神経伝達を活性化することにより pentobarbital による睡眠時間を短縮することが知られている<sup>4, 5, 6, 7)</sup>。

以上、VA-045 と TRH の脳保護作用は、barbiturates や抗アノキシア薬とは異なる機序により発現することが明らかとなった。



### 3.5 小括

1. Normobaric hypoxia に対し, VA-045 及び TRH は用量依存的に生存時間を延長させた. 作用持続時間の検討で, VA-045 は normobaric hypoxia 開始 120 分前処置でも生存時間を有意に延長した. しかし, TRH は normobaric hypoxia 開始 30 分前処置では生存時間の延長作用は消失した.
2. Histotoxic anoxia に対し, VA-045 は KCN 投与による生存時間を有意に延長させた. しかし, TRH は KCN 投与による生存時間を変化させなかった. 作用持続時間の検討で, VA-045 の KCN 投与 30 分前処置では生存時間に変化はなかった.
3. Complete ischemia に対し, VA-045 は用量依存的に gasping duration を延長させた. TRH も同様に gasping duration を延長させた. 作用持続時間の検討で, VA-045 は断頭 60 分前処置で gasping duration を有意に延長させた. TRH の断頭 30 分前処置では gasping duration に変化はなかった.
4. 以上, VA-045 は TRH に比べ強力でかつ持続的な脳虚血保護作用を有することが明らかとなった. さらに, VA-045 の脳虚血保護作用は barbiturates や抗アノキシア薬と異なる作用機序により発現することが明らかとなった.

## 第4章 VA-045 の実験的意識障害モデルに対する改善作用

### 4.1 緒言

意識障害をきたす主な疾患としては頭部外傷，脳血管障害，脳腫瘍，脳炎，髄膜炎，脳膿症，重傷感染症，糖尿病あるいは肝性昏睡などの代謝性疾患がある．頭部外傷や脳血管障害に伴う意識障害は患者の予後に及ぼす影響が大きく，治療の対象として重要な疾患であり，その患者数は年々増加している．

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) は実験的意識障害モデル，すなわち，頭部衝撃昏睡マウス<sup>10, 11)</sup>，頭部衝撃ラット<sup>12)</sup>，脳虚血ラット<sup>13, 14)</sup>，後部視床下部破壊ネコ<sup>5, 15)</sup>及び脳幹圧迫ネコ<sup>16)</sup>で意識障害改善作用が報告されている．臨床的にも TRH は頭部外傷やクモ膜下出血による遷延性意識障害の治療薬として用いられている<sup>54, 55)</sup>．しかしながら，外因性の TRH は血液中や脳内でその分解酵素である thyroliberinase や TRH deamidase によって速やかに不活性化されることが報告されている<sup>17, 18, 19)</sup>．

VA-045 は選択的に椎骨動脈血流量及び大脳皮質血流量を増加させることを第1章で明らかとした．さらに，第3章では，VA-045 は TRH に比べ強力でかつ持続的な脳虚血保護作用を有することが明らかとなった．本章では，VA-045 の各種意識障害モデルに対する改善作用を TRH と比較した．

## 4.2 実験材料及び方法

### 4.2.1 動物

体重約 30 g の ICR 系雄性マウス（日本チャールス・リバー）と体重約 320 g の Wistar 系雄性ラット（日本チャールス・リバー）を使用した。

動物は実験を開始する前に 3 日間以上は室温  $22 \pm 2$  °C, 湿度  $55 \pm 15$  % で 8:00 AM ~ 8:00 PM 照明の明暗サイクルの部屋で飼育し, 飼料（CRF-1, オリエンタル酵母）及び水は自由に摂取させた。実験は 9:00 AM ~ 6:00 PM の間に行った。

### 4.2.2 薬物

VA-045（大正製薬）は 2.5 % アスコルビン酸溶液に溶解した。Thyrotropin-releasing hormone 酒石酸塩（TRH）（Sigma）は生理食塩液に溶解した。

### 4.2.3 ラットの pentobarbital 睡眠に対する作用

Pentobarbital-Na 50 mg/kg の腹腔内投与によりラットを麻酔した。VA-045 及び TRH は pentobarbital-Na 投与 10 分後に静脈内投与し, 正向反射消失時間（睡眠時間）を測定した。

### 4.2.4 マウスの頭部衝撃に対する作用<sup>56)</sup>

ハロセン吸入麻酔後, マウスをスポンジの上に腹臥位に手で固定し, プラスチック管をマウスの頭頂部に設定した。頭部衝撃は 35 cm の高さからプラスチック管を通して 21 g の重りを頭頂部に落下させることで行った。この頭部衝撃直後, マウスは強直性痙攣を誘発した。頭部衝撃数分後には痙攣はおさまり無動状態が観察された。その後, マウスは正向反射の回復と探索行動を伴う落ち着きのない歩行が観察された。意識障害の観察は頭部衝撃から自発運動発現までの時間を指標とした。

VA-045 及び TRH は静脈内投与の場合, 頭部衝撃 10 分前に, 経口投与の場合は 30 分前にそれぞれ投与した。加えて, この試験では VA-045 及び TRH の静脈内投与による作用持続時間もあわせて検討した。

#### 4.2.5 マウスの自発運動量に対する作用

マウスの自発運動量は防音箱内の SCANET 装置 (Neuroscience Inc.) を用いて 5 分毎に 30 分間測定した。1 群 5 匹のマウスを使用し、自発運動量の変化は媒体投与群の総カウントを 100 % とした時の VA-045 及び TRH 投与後の総カウント数の変化率 (%) を求めた。

VA-045 及び TRH は自発運動量測定 10 分前に静脈内投与した。

#### 4.2.6 ラットの脳虚血に対する作用<sup>14)</sup>

ラットを pentobarbital-Na 50 mg/kg の腹腔内投与により麻酔し、脳定位固定装置 (SR-6, 成茂化学器械研究所) に腹臥位に固定した。背側頸部の皮膚及び筋肉層を切開して、第 1 頸椎を露出し、第 1 頸椎の両端にある alar foramine に双極性固定器 (Mizuho, MICRO-30) のピンセットの先端を刺入して椎骨動脈を両側性に電気焼均して皮膚を縫合した。

次に、ラットを背位に固定し腹側頸部を切開して、両側総頸動脈に糸を輪状にかけた後、皮膚を縫合した。椎骨動脈焼均の翌日、ハロセン吸入麻酔後、ラットを背位に固定し、腹側頸部の皮膚を再び開き、両側総頸動脈を露出させた。吸入麻酔停止後、動脈クレメンで両側総頸動脈を 10 分間閉塞した。動物は閉塞後数秒で正向反射の消失が観察された。

また、閉塞 10 分後、動脈クレメンを注意深く除去したが、両側総頸動脈再灌流後しばらくの間、ラットには正向反射の消失が観察された。その後、ラットは正向反射の回復と探索行動を伴う落ち着きのない歩行が観察された。神経障害は両側総頸動脈の再灌流から正向反射の回復までの時間と、自発運動の回復までの時間を指標とした。

VA-045 と TRH は、両側総頸動脈の再灌流直前に腹腔内投与した。

#### 4.2.7 受動的回避学習反応に対する作用

ギロチンドアで仕切られた明箱（12 cm×12 cm×25 cm）と床のグリッドから電気刺激を与えられる暗箱（30 cm×12 cm×25 cm）の 2 箱からなる step through 型受動的回避反応装置を用いた。ギロチンドアを閉めたままの状態でラットを明室に入れ、ギロチンドアを開けた。

ラットの四肢が完全に暗室に入ったときギロチンドアを閉め、床のグリッドを通して 0.3 ～ 0.35 mA の電気刺激を 3 秒間与えた。その後、ラットを装置から取り出し、ホームケージに戻した。ここまでの操作を獲得試行とした。獲得試行 24 時間後に保持試行を行い、ラットを明箱に入れてから、暗箱に入るまでの時間を step through latency として測定した。また、step through latency は最長 300 秒とした。

4.2.6 と同様の方法で椎骨動脈を永久閉塞したラットを作製し、24 時間後に両側総頸動脈閉塞による 10 分間の一過性前脳虚血を行った。一過性前脳虚血 1 時間後にラットを明箱に入れ、step through latency を測定した。VA-045 及び TRH は再灌流直前に腹腔内投与した。

#### 4.2.8 統計処理

受動的回避反応以外のデータは平均値と標準誤差（mean±S.E.M.）で示した。検定は、一元配置分散分析後、Scheff'e 検定または Dunnett 検定を用いた。受動的回避反応のデータは中央値と 4 分位数で示した。検定は、Kruskal-Wallis 検定後、Scheff'e 型検定を用いた。いずれの検定においても、危険率 5 % 以下で差がみられる場合を統計的に有意差ありとした。

## 4.3 結果

### 4.3.1 ラットの pentobarbital 睡眠に対する作用

VA-045 0.1 ~ 1.0 mg/kg の静脈内投与及び TRH 1 ~ 10 mg/kg の静脈内投与により睡眠時間は用量依存的な短縮を示した (Table 4-1) .

また, VA-045 0.3 mg/kg 以上の静脈内投与及び TRH 10 mg/kg の静脈内投与では有意な短縮を示した (Table 4-1) .

Table 4-1

Effects of VA-045 and TRH on the disturbance in consciousness induced by concussive head injury in mice, on spontaneous locomotor activity in mice and on pentobarbital anesthesia in rats

Drugs	Dose	Route	n	Disturbance time in consciousness (sec)	n	Duration of Anesthesia (sec)	n (+)	Total locomotor activity count for 30 min (% of control)
Vehicle	—	i.v.	19	486 ± 38	8	5378 ± 226	4	100
VA-045	0.03	i.v.	10	406 ± 43		N.T.		N.T.
	0.1	i.v.	10	313 ± 34 *	8	4751 ± 280	4	N.T.
	0.3	i.v.	10	214 ± 38 **	8	3743 ± 227 ##	4	85
	1.0	i.v.		N.T.	8	3419 ± 118 ##	4	86
	3.0	i.v.		N.T.		N.T.		77
Vehicle	—	p.o.	11	400 ± 42		N.T.		N.T.
VA-045	1.0	p.o.	11	323 ± 40		N.T.		N.T.
	3.0	p.o.	13	215 ± 22 **		N.T.		N.T.
	10.0	p.o.	10	170 ± 22 **		N.T.		N.T.
Vehicle	—	i.v.	10	644 ± 79	8	4923 ± 560	4	100
TRH	0.1	i.v.	13	423 ± 69		N.T.		N.T.
	0.3	i.v.	12	266 ± 27 **		N.T.		N.T.
	1.0	i.v.	10	275 ± 36 *	8	4109 ± 356	4	93
	3.0	i.v.		N.T.	8	3639 ± 349	4	141
	10.0	i.v.		N.T.	8	3037 ± 174 ##	4	200 #

n : number of animals.

n (+) : number of groups (5 animals/group).

N.T. : not tested.

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 vs. vehicle-treated group (Scheffe's test).

# p < 0.05, ## p < 0.01 vs. vehicle-treated group (Dunnett's test).

#### 4.3.2 マウスの頭部衝撃に対する作用

VA-045 0.03 ~ 0.3 mg/kg の静脈内投与及び 1 ~ 3 mg/kg の経口投与により自発運動の回復時間は用量依存的に短縮した (Table 4-2) .

静脈内投与の場合は 0.1 mg/kg 以上で, 経口投与の場合は 3 mg/kg 以上で有意な短縮を示した (Table 4-1) .

TRH 0.1 ~ 1.0 mg/kg の静脈内投与により自発運動の回復時間は VA-045 と同様, 用量依存的に短縮し, 0.3 mg/kg 以上では有意な短縮を示した (Table 4-1) . VA-045 0.3 mg/kg 及び TRH 1.0 mg/kg の静脈内投与の作用持続時間の検討で, VA-045 は頭部衝撃 60 分前投与においても自発運動回復時間の有意な短縮作用が認められた (Fig.4-1) .

一方, TRH は頭部衝撃 30 分前投与では自発運動回復時間の有意な短縮作用は認められなかった (Fig.4-1) .

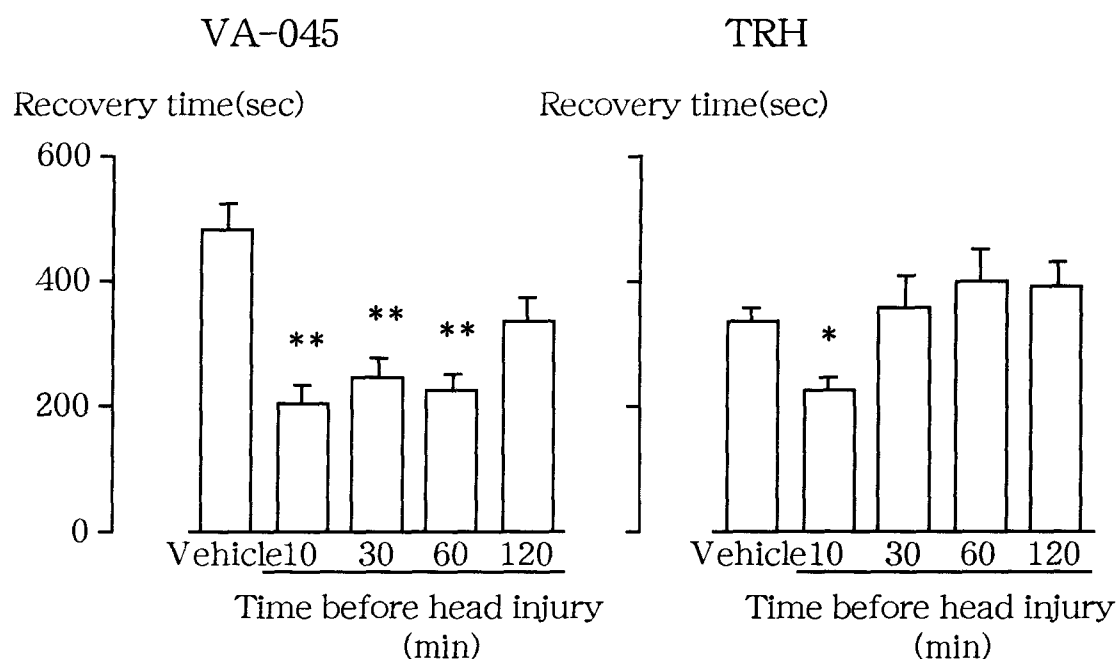


Fig. 4-1 Duration of action of VA-045 and TRH on the disruption of spontaneous movement caused by head impact in mice.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated group (Scheffe's test).

Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=10-15).

#### 4.3.3 マウスの自発運動量に対する作用

VA-045 0.3 ~ 3.0 mg/kg の静脈内投与は，自発運動量に対して影響しなかった (Table 4-1) .

TRH 1 および 3 mg/kg の静脈内投与は，自発運動量に対して影響しなかったが，10 mg/kg の静脈内投与は，自発運動量を有意に増加した (Table 4-1) .

#### 4.3.4 ラットの脳虚血による神経障害に対する作用

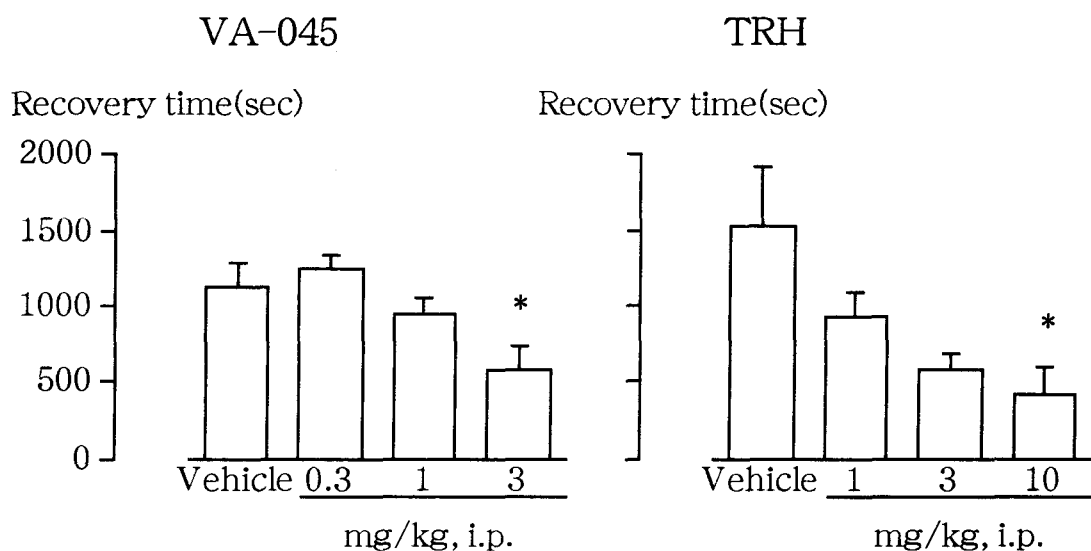
脳虚血による正向反射消失時間及び自発運動消失時間は，VA-045 0.3 ~ 3.0 mg/kg 及び TRH 1 ~ 10 mg/kg の腹腔内投与で用量依存的に短縮した (Fig.4-2) .

#### 4.3.5 ラットの受動的回避学習反応における脳虚血による学習障害に対する作用

Step through 型受動的回避反応における step through latency は，脳虚血により有意に短縮し，脳虚血によって学習障害が惹起された (Fig.4-3) . VA-045 0.3 ~ 3.0 mg/kg の腹腔内投与は，脳虚血により短縮した step through latency を延長させたが，TRH 1 ~ 10 mg/kg の腹腔内投与では step through latency に影響しなかった (Fig.4-3).



## Righting reflex



## Spontaneous movement

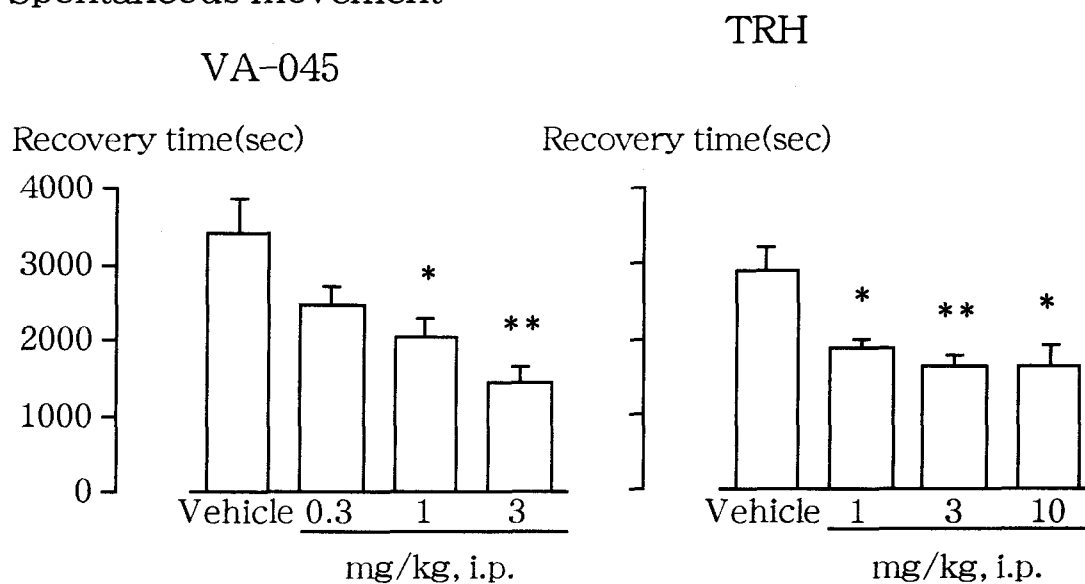


Fig. 4-2 Effects of VA-045 and TRH on the recovery time of righting reflex and of spontaneous movement induced by global cerebral ischemia in rats.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated group (Scheff's test). Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=6).

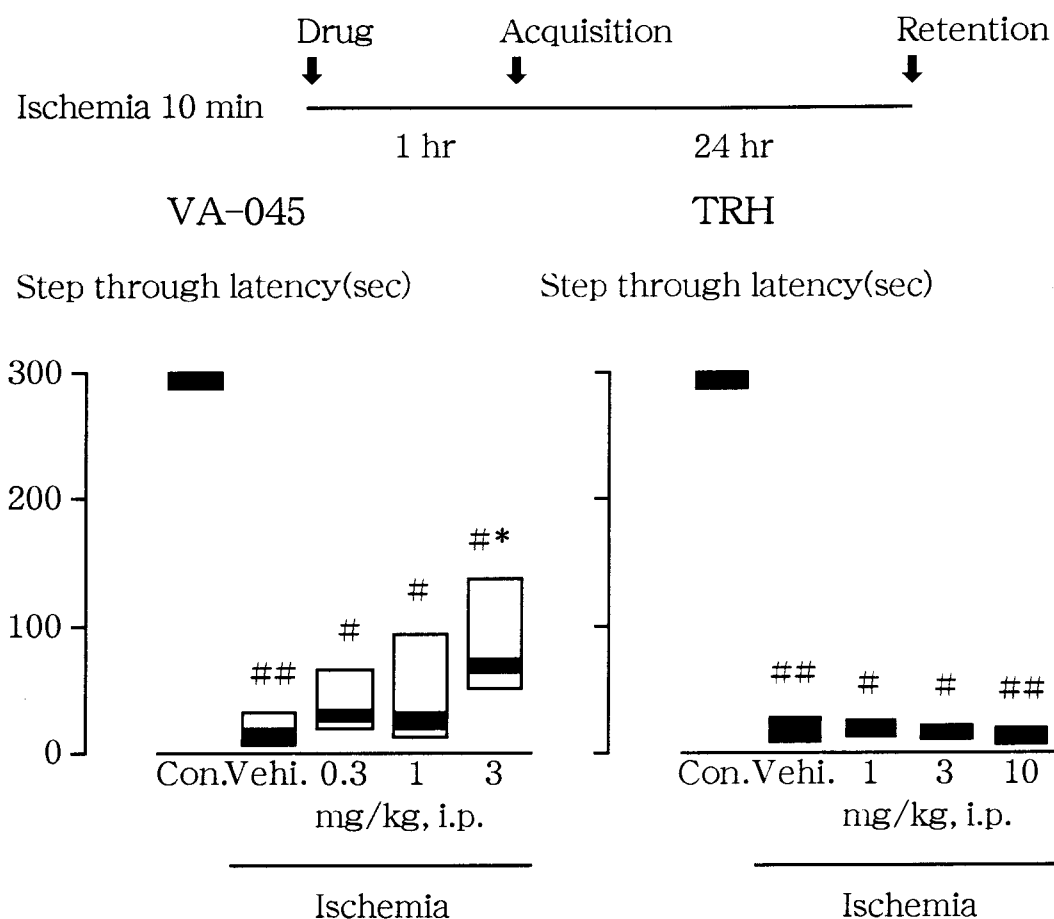


Fig. 4-3 Effects of VA-045 and TRH on global cerebral ischemia-induced cognitive dysfunction in a passive avoidance task in rats.

The middle line indicates the value of the animal whose is 50 % in the group (medium), likewise the bottom line indicates 25 % (quartile Q1) and the top line indicates 75 % (quartile Q3).

Con.:control

Vehi.:vehicle

#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  vs. control group (Scheffe's test).

\*  $p < 0.05$  vs. vehicle-treated global cerebral ischemia group (Scheffe's test).

Each group consists of 8 animals.

#### 4.4 考察

VA-045 は pentobarbital 誘発睡眠を短縮し、その作用は TRH よりも強力であった。TRH は、pentobarbital 誘発睡眠を短縮すること<sup>4, 5, 6, 7)</sup> 及び自発運動量を増加させること<sup>1, 2, 3)</sup> が報告されており、本研究の結果と一致するものであった。一方、VA-045 は pentobarbital 誘発睡眠の短縮作用は認められたが、自発運動量の増加作用は認められなかった。さらに、TRH は脳幹網様体の神経細胞を興奮させるが<sup>57)</sup>、VA-045 には脳幹網様体賦活作用はなく<sup>58)</sup>、抑制性の線条体－視床－皮質系を遮断することが報告されている<sup>59)</sup>。

意識障害に対する薬物の効果を検討する場合に、振盪性頭部外傷<sup>5)</sup> や両側椎骨動脈焼灼 24 時間後に両側頸動脈を閉塞するモデル<sup>14)</sup> が用いられる。VA-045 はマウスの頭部衝撃モデルの自発運動回復時間を短縮した。VA-045 はラット脳虚血による神経症状の指標である自発運動消失時間と正向反射消失時間を短縮させ、これらの作用は TRH よりも強力であった。従って、VA-045 は臨床上、意識障害を改善する可能性が示唆された。

VA-045 は脳虚血による受動的回避学習反応の step through latency の短縮を延長したが、TRH では作用は認められなかった。従って、受動的回避学習反応における VA-045 の改善作用は、脳虚血による記憶障害の改善が関与している可能性が考えられる。

振盪性頭部外傷や脳虚血は中枢の monoamine 系, choline 系, amino acids 系及び脳内エネルギー代謝を障害すること<sup>14, 60, 61)</sup> が報告されている。

VA-045 の頭部外傷モデルを用いた脳局所グルコース利用率 (local cerebral glucose utilization : LCGU) の測定の結果、頭部外傷により低下した LCGU は VA-045 により改善することが報告されている<sup>62)</sup>。さらに、Arakawa et al.<sup>63)</sup> は VA-045 が頭部外傷による青斑核の自発発火頻度の減少を回復させることを報告している。従って、頭部外傷及び脳虚血モデルに対する VA-045 の改善作用はこれら神経伝達物質や脳内エネルギー代謝系が関与している可能性も考えられる。

一方、TRH や TRH 誘導体の中枢作用は、中枢の dopamine 作動性神経系と choline 作動性神経系が関与していることが報告されている<sup>4, 5, 6, 7, 64, 65)</sup>。従って、VA-045 と TRH の中枢神経系に対する作用態度は異なると思われる。

#### 4.5 小括

1. ラットの pentobarbital 睡眠に対し, VA-045 及び TRH は用量依存的な睡眠時間の短縮作用を示した.
2. マウスの頭部衝撃に対し, VA-045 は腹腔内投与及び経口投与により自発運動回復時間を用量依存的に短縮した. TRH は静脈内投与により自発運動回復時間を VA-045 と同様, 用量依存的に短縮した. VA-045 及び TRH の静脈内投与の作用持続時間の検討で, VA-045 は頭部衝撃 60 分前投与においても自発運動回復時間の有意な短縮作用が認められたが, TRH は頭部衝撃 30 分前投与では自発運動回復時間の有意な短縮作用は認められなかった.
3. マウスの自発運動量に対し, VA-045 の静脈内投与で変化はみられなかったが, TRH の静脈内投与では有意に増加した.
4. ラットの脳虚血による神経症状に対し, VA-045 及び TRH の腹腔内投与で用量依存的な改善作用を示した.
5. ラットの受動的回避学習反応における step through latency は, 脳虚血により有意に短縮し, 脳虚血によって学習障害が惹起された. 脳虚血により短縮した step through latency に対して, VA-045 には延長作用がみられたが, TRH は影響を及ぼさなかった.
6. 以上, VA-045 は意識障害モデルに対して改善作用を示すことが明らかとなり, さらに, VA-045 の中枢神経系に対する作用態度が TRH とは異なることが明らかとなった.

## 第5章 頭部衝撃モデルに対する VA-045 の改善作用

### 5.1 緒言

第4章で、VA-045 がマウス頭部衝撃モデルで頭部衝撃後の正向反射の消失や自発運動の回復時間に対して改善作用を示した。また、ラット脳虚血に伴う神経症状の改善作用や受動的回避学習反応の改善作用を有することも明らかにした。本章では VA-045 の頭部衝撃に対する改善作用をより明確にすることを目的として、ラット頭部衝撃 (closed head injury) 後の意識障害に対する VA-045 の作用を TRH と比較した。

### 5.2 実験材料及び方法

#### 5.2.1 動物

体重約 380 g の Wistar 系雄性ラット (日本チャールス・リバー) を使用した。

動物は実験を開始する前に 3 日間以上、室温  $22 \pm 2$  °C、湿度  $55 \pm 15$  % で 7:00 AM ~ 7:00 PM 照明の明暗サイクルの部屋で飼育し、飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母) 及び水は自由に摂取させた。

実験は 9:00 AM ~ 6:00 PM の間に行った。

#### 5.2.2 薬物

VA-045 (大正製薬) は 2.5 % アスコルビン酸溶液に溶解した。Thyrotropine-releasing hormone 酒石酸塩 (TRH) (Sigma) 及び塩酸 scopolamine (和光純薬工業) は生理食塩液に溶解した。

#### 5.2.3 頭部衝撃モデル<sup>66)</sup>

ハロセン吸入麻酔後 (神経学的実験及び受動的回避反応) または urethane 麻酔後 (電気生理学的実験), ラットをスポンジの上に腹位に、または脳定位固定装置に固定し、ラットの頭部にプラスチック管を設置した。頭部衝撃は 70 cm の高さからプラスチック管を通して 400 g の重りを頭頂部に落下させて行った。

#### 5.2.4 神経症状

頭部衝撃直後、ラットは強直性痙攣と意識障害を発現し、無動状態が観察された。その後、ラットは正向反射の回復と探索行動を伴う落ち着いた行動が観察された。意識障害の観察は頭部衝撃から正向反射回復までの時間と自発運動発現までの時間を指標に行った。VA-045 と TRH は頭部衝撃直前に静脈内投与した。

#### 5.2.5 受動的回避学習反応

ギロチンドアで仕切られた明箱（12 cm×12 cm×25 cm）と床のグリッドから電気刺激を与える暗箱（30 cm×12 cm×25 cm）の 2 箱からなる step through 型受動的回避学習反応装置を用いた。ギロチンドアを閉めたままの状態ではラットを明室に入れ、ギロチンドアを開けた。ラットの四肢が完全に暗室に入ったときギロチンドアを閉め、床のグリッドを通して 0.3 ～ 0.35 mA の電気刺激を 3 秒間与えた。その後、ラットを装置から取り出し、ホームケージに戻した。ここまでの操作を獲得試行とした。獲得試行 24 時間後に保持試行を行い、ラットを明箱に入れてから、暗箱に入るまでの時間を step through latency として測定した。また、step through latency は最長 300 秒とした。

頭部衝撃 135 分後にラットを明箱に入れ、step through latency を測定した。Scopolamine（1 mg/kg）は獲得試行 30 分前に腹腔内投与した。VA-045 及び TRH は獲得試行 120 分前に静脈内投与した。

#### 5.2.6 電気生理学的実験

ラットを urethane（1.2 g/kg）の腹腔内投与麻酔後、脳定位固定装置（SR-6、成茂化学器械研究所）に腹位に固定し、保温機で体温を 37～38℃ に維持した。刺激用の針電極を左前足の手掌の表面に装着した。体性感覚誘発電位は刺激と対側の脳半球から単極で記録した。直径 10 mm のステンレス円板と導出電極（ステンレスネジ）を頭骨に固定した。刺激は 1 Hz, 1 msec, 0.2 ～ 2 mA の矩形波を用いた。体性感覚誘発電位はオシロスコープ（VC-10、日本光電）を通して 20 回の波形加算を行い、波形加算平均装置（DAT-1100、日本光電）を用い加算平均し、その波形をレコーダ（WT-645G、日本光電）に記録した。体性感覚誘発電位に対する薬物の影響と頭部衝撃の影響は、negative wave の振幅の変化を指標に行った。VA-045 及び TRH は頭部衝撃 5 分後に静脈内投与した。

### 5.2.7 統計処理

神経学的及び電気生理学の実験のデータは平均値と標準誤差 (mean ± S.E.M.) で示した。検定は、一元配置分散分析後、Scheff'e 検定または Dunnett 検定を用いた。受動的回避反応のデータは、中央値と 4 分位数で示した。検定は、Kruskal-Wallis 検定後、Scheff'e 型検定を用いた。いずれの検定においても、危険率 5 % 以下で差が見られる場合を統計的に有意差ありとした。

## 5.3 結果

### 5.3.1 病理学的所見

頭部衝撃群では大脳基底槽に軽いクモ膜下出血を形成しているが、脳挫傷や脳梗塞病変は見られなかった。また、肉眼的にはいずれの動物にも脳実質内出血は認められなかった。

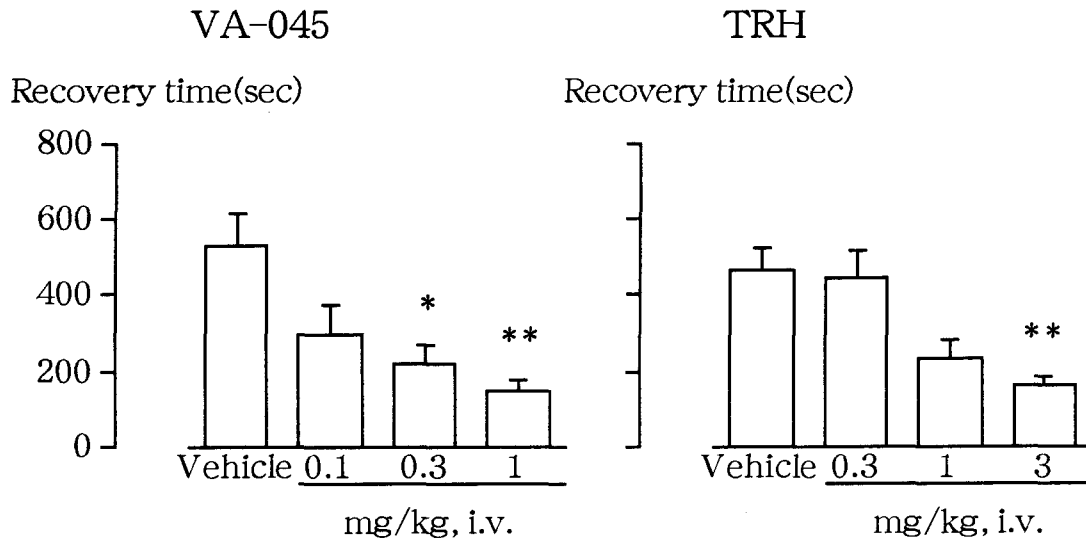
### 5.3.2 神経症状に対する作用

VA-045 0.1 ~ 1.0 mg/kg 及び TRH 0.3 ~ 3.0 mg/kg の静脈内投与は、頭部衝撃による自発運動消失時間と正向反射消失時間を用量依存的に短縮した (Fig.5-1)。また、VA-045 の効果は TRH より 3 倍以上強力であった。

### 5.3.3 受動的回避学習反応に対する作用

Step through 型受動的回避反応における step through latency は頭部衝撃によって有意に短縮した (Fig.5-2)。VA-045 1.0 mg/kg の静脈内投与は、頭部衝撃による受動的回避学習反応での step through latency の短縮を延長したが、TRH 3.0 mg/kg の静脈内投与では影響しなかった (Fig.5-2)。しかしながら、VA-045 0.3 ~ 10.0 mg/kg の静脈内投与では scopolamine (1.0 mg/kg) による step through latency の短縮を延長しなかった。

## Righting reflex



## Spontaneous movement

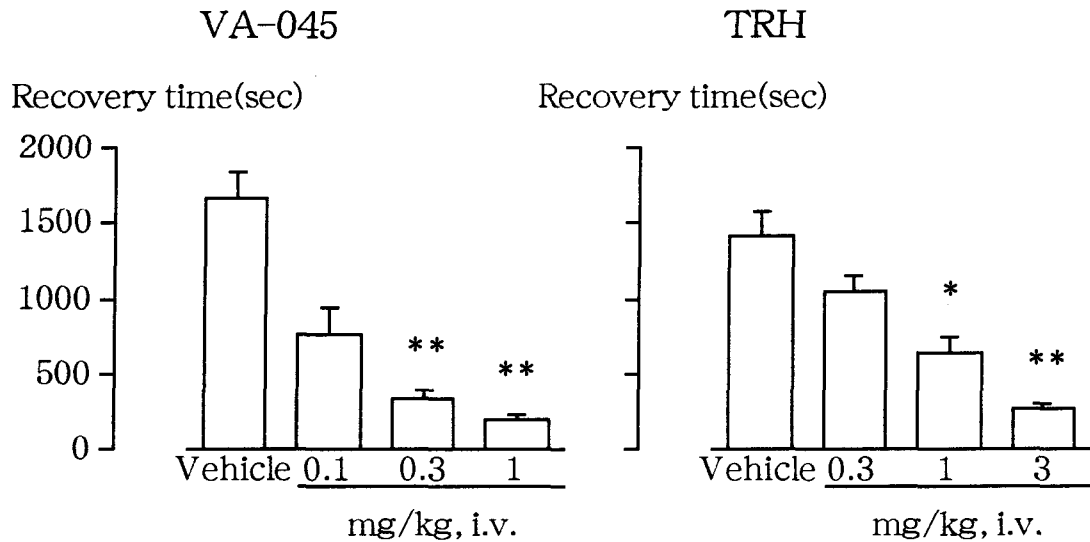


Fig. 5-1 Effects of VA-045 and TRH on the recovery time of righting reflex and of spontaneous movement following closed head injury (CHI)-induced in rats.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated group (Scheffe's test). Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=10-12).



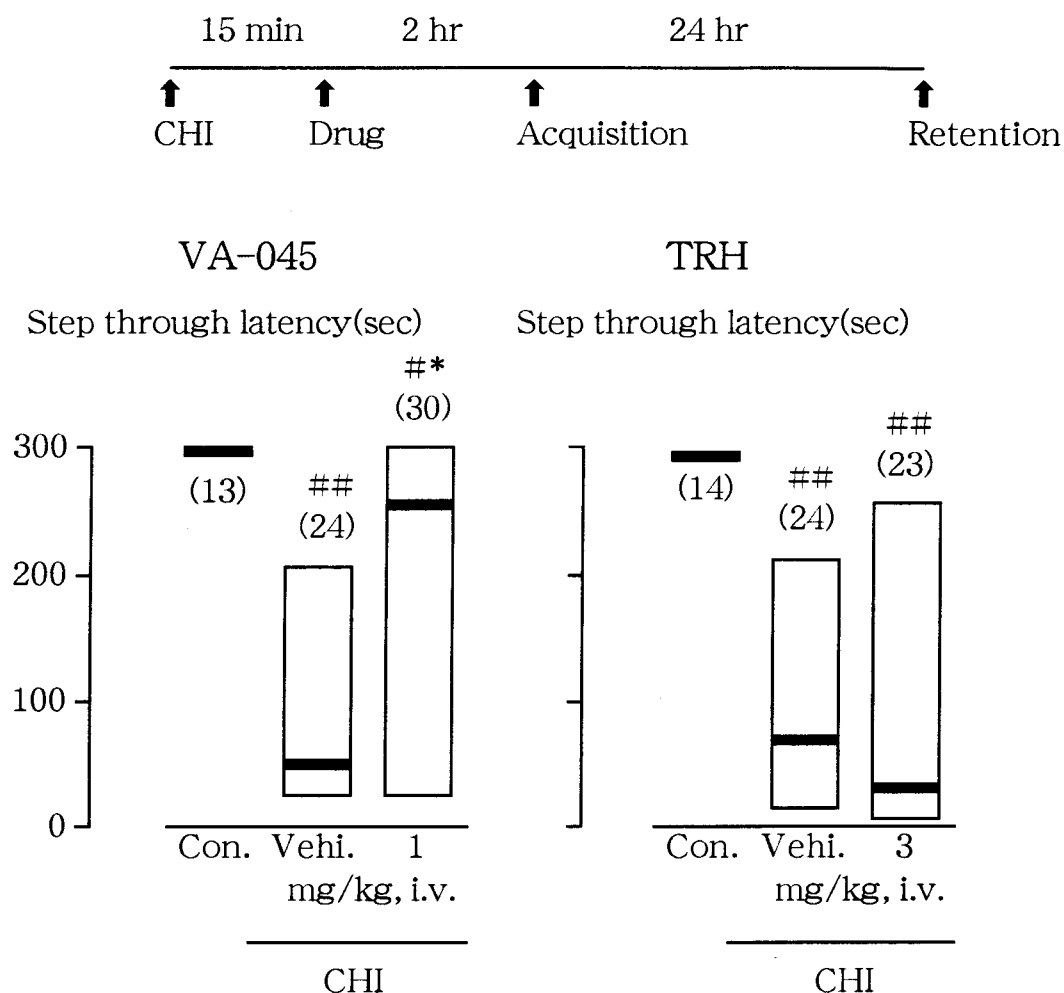


Fig. 5-2 Effects of VA-045 and TRH on closed head injury (CHI)-induced cognitive dysfunction in a passive avoidance task in rats.

The middle line indicates the value of the animal whose is 50 % in the group (medium), likewise the bottom line indicates 25 % (quartile Q1) and the top line indicates 75 % (quartile Q3).

Con.:control

Vehi.:vehicle

#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  vs. control group (Scheffe's test)

\*  $p < 0.05$  vs. vehicle-treated CHI group (Scheffe's test)

Numbers in parentheses show number of animals.

### 5.3.4 電気生理学的実験

体性感覚誘発電位の振幅は頭部衝撃によって 60 ~ 70 % 減少した (Fig.5-3) . 体性感覚誘発電位の振幅の減少は VA-045 0.1 ~ 1.0 mg/kg の静脈内投与で用量依存的に改善した (Fig.5-3) . TRH 3.0 mg/kg の静脈内投与では頭部衝撃による体性感覚誘発電位の減少に影響しなかった. なお, VA-045 1.0 mg/kg の静脈内投与は, 正常ラットの体性感覚誘発電位の振幅に影響しなかった (Fig.5-3) .

### 5.4 考察

振盪性頭部外傷動物は意識障害に対する steroid<sup>67, 68)</sup>, N-methyl-D-aspartate antagonist<sup>69)</sup>, TRH<sup>5)</sup> 及び TRH 誘導体<sup>5, 6)</sup> の評価に用いられている. 本研究で VA-045 が頭部衝撃後の神経機能障害を改善することを明らかにした.

VA-045 は頭部衝撃による正向反射消失時間や自発運動消失時間の短縮を延長し, その作用は TRH より強力であった. また, TRH は流涎などの自律神経作用<sup>70, 71)</sup>, 呼吸興奮などの中枢興奮作用<sup>72)</sup> と共に振戦<sup>70, 73)</sup> などの不随意運動が発現することが報告されているが, VA-045 0.1 ~ 1.0 mg/kg の静脈内投与では唾液分泌, 興奮, 低体温及び鎮静のような異常行動は発現しなかった. TRH は意識障害の患者に治療薬として汎用されている<sup>74)</sup> ことから, VA-045 もまた意識障害患者の治療薬に使用できる可能性が高い.

VA-045 は外傷後投与で頭部衝撃による受動的回避学習反応の step through latency の短縮を延長したが, TRH は外傷後投与では影響しなかった. 本研究に用いた VA-045 と TRH の用量は神経症状の実験で十分に効果を発現する用量を用いた. 同じスケジュールで scopolamine 投与による step through latency の短縮に対して VA-045 は影響しなかった. 従って, VA-045 の受動的回避学習に対する作用は薬物誘発健忘に対する作用とは異なり, 頭部外傷による機能障害による記憶障害を改善することが示唆された. また, 頭部衝撃による体性感覚誘発電位の振幅の減少を VA-045 は改善したが, TRH は影響しなかった. 一般的に誘発電位は頭部外傷予後の実験の指標に使用され<sup>75)</sup>, 主要な感覚皮質からの感覚情報の伝達の延長の関与が示唆されている<sup>76)</sup>.

従って, VA-045 は頭部衝撃による体性感覚経路のシナプス伝達の障害または機能不全に対して改善作用を有しているものと思われる.

% of pre-drug value

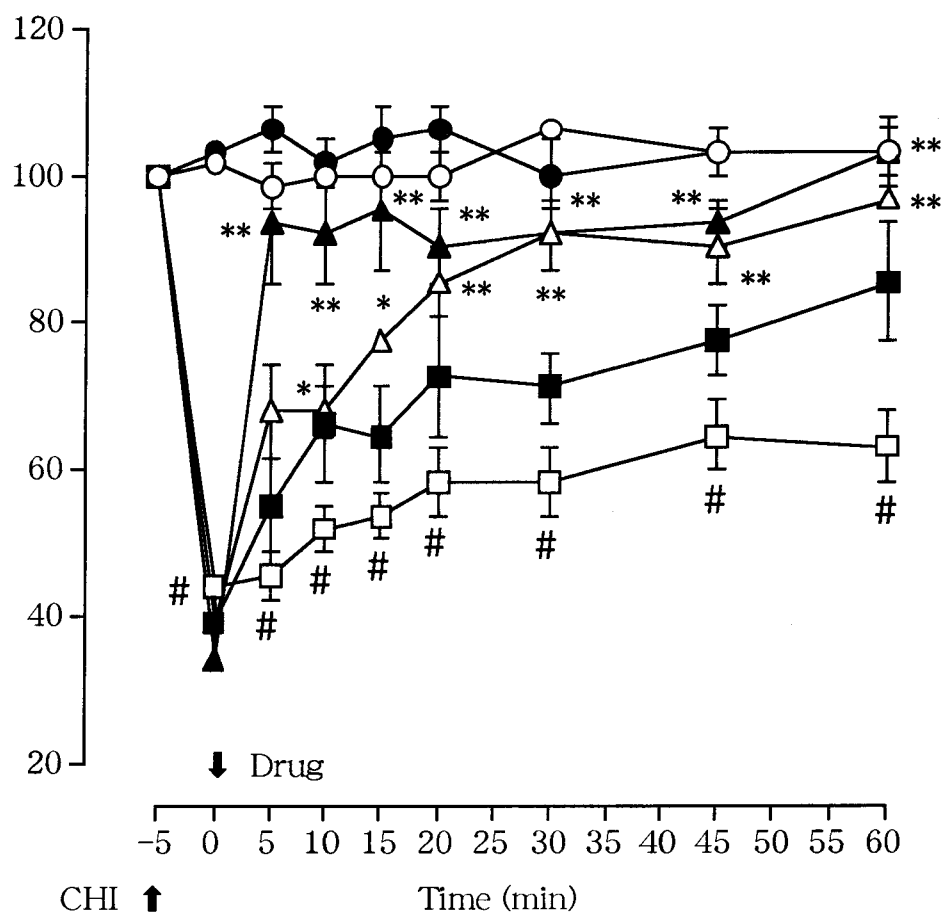


Fig. 5-3 Effect of VA-045 on closed head injury (CHI)-induced reduction in the amplitude of the somatosensory evoked potentials in rats.

#  $p < 0.001$  vs. sham + vehicle-treated group (Student's t-test).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. CHI + vehicle-treated group (Dunnett's test).

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=6).

- Sham + Vehicle
- Sham + VA-045 1mg/kg
- CHI + Vehicle
- CHI + VA-045 0.1mg/kg
- △— CHI + VA-045 0.3mg/kg
- ▲— CHI + VA-045 1mg/kg

## 5.5 小括

1. 頭部衝撃による神経症状に対し，VA-045 及び TRH は自発運動消失時間と正向反射消失時間を用量依存的に短縮させた． また，VA-045 の効果は TRH より 3 倍以上強力であった．
2. Step through 型受動的回避学習反応における step through latency は頭部衝撃によって有意に短縮した． VA-045 は頭部衝撃による受動的回避学習反応での step through latency の短縮を延長したが，TRH は影響しなかった． しかし，VA-045 は scopolamine による step through latency の短縮には影響しなかった．
3. 体性感覚誘発電位の振幅は頭部衝撃によって 60 ～ 70 % 減少した． 体性感覚誘発電位の振幅の減少に対し VA-045 は用量依存的に改善した． TRH は頭部衝撃による体性感覚誘発電位の減少に影響しなかった．
4. 以上，ラット頭部衝撃モデルの神経症状に対しても VA-045 は TRH より強力な改善作用を有することが明らかとなった．

## 第 6 章 老齡ラットにおける頭部衝撃による神経障害に対する VA-045 の改善作用

### 6.1 緒言

人間の外傷性脳障害予後の予測において、年齢は重要な因子の 1 つである。すなわち、外傷性脳障害は、運動性と認知性の損失の増加を示し、外傷性脳障害による急性の神経障害と死亡率の増加と関係していることが報告されている<sup>77,78)</sup>。また、老化が外傷による特定部位での神経膠星状細胞の反応性の増加に関連していることが報告されている<sup>79)</sup>。このことから、老齡ラットは加齢により増加する易損性脳障害の唯一のモデルであると考えられている。VA-045 は年齢に関連した機能変化、例えば caudate spindle の促進、自発性紡錘突発波の増加、受動的回避学習反応の障害などを改善することが報告されている<sup>26)</sup>。

また、第 5 章では、VA-045 がラットの頭部衝撃による意識障害に対して改善作用を有することを明らかにした。

本章では、加齢ラットを用いて、頭部衝撃による神経障害に対する VA-045 の作用を検討した。

### 6.2 実験材料及び方法

#### 6.2.1 動物

21 ～ 28 箇月齢の Wistar 系雄性ラット（日本チャールス・リバー）を使用した。

動物は実験を開始する前に 3 日間以上は室温  $22 \pm 2$  °C、湿度  $55 \pm 15$  % で 7:00 AM ～ 7:00 PM 照明の明暗サイクルの部屋で飼育し、飼料（CRF-1、オリエンタル酵母）及び水は自由に摂取させた。

#### 6.2.2 薬物

VA-045（大正製薬）及び Thyrotropine-releasing hormone 酒石酸塩（TRH）（Sigma）は 2.5 % アスコルビン酸溶液に溶解した。

### 6.2.3 頭部衝撃モデル<sup>66)</sup>

ハロセン吸入麻酔後，ラットをスポンジの上に腹位に固定し，ラットの頭部にプラスチック管を設置した．頭部衝撃は 150 cm の高さからプラスチック管を通して 400 g の重りを頭頂部に落下させて行った．なお，外傷後は人工呼吸を 3 分間行い，自発呼吸が回復しないラットについては最長 30 分間人工呼吸を行った．

### 6.2.4 慢性神経症状

神経症状は足反射で評価し，刺激（pinch）の間に足が反応した時，足反射陽性と判定した．また，足反射は下記に示す基準で評価した．

（スコアー 4）4 足の反射抑制

（スコアー 3）3 足の反射抑制と 1 足の正常反射

（スコアー 2）2 足の反射抑制と 2 足の正常反射

（スコアー 1）1 足の反射抑制と 3 足の正常反射

（スコアー 0）4 足の正常反射

### 6.2.5 Beam balance task<sup>80)</sup>

Beam balance task は幅が 3 cm の木の棒の上にラットを置き，棒の上の保持時間で評価し，最大 60 秒として測定した．頭部衝撃実施約 1 時間前に 3 回の beam balance task を行い，3 回の平均保持時間を頭部衝撃前値とした．なお，保持時間と体重は，頭部衝撃誘発後 14 日間毎日測定した．

### 6.2.6 試験条件

予備試験として頭部衝撃惹起前 2 日間 beam balance task と足反射を試行した。

頭部衝撃惹起 1 時間以上、4 足反射の抑制が持続した動物を下記に示す 4 つ（第 2 群～第 5 群）のグループに分けた。

第 1 群：偽衝撃群（2.5% アスコルビン酸溶液投与）

第 2 群：頭部衝撃惹起群（2.5% アスコルビン酸溶液投与）

第 3 群：頭部衝撃惹起群（VA-045 1 mg/kg 投与）

第 4 群：頭部衝撃惹起群（VA-045 3 mg/kg 投与）

第 5 群：頭部衝撃惹起群（TRH 10 mg/kg 投与）

なお、2.5% アスコルビン酸溶液、VA-045 及び TRH の腹腔内投与は、頭部衝撃惹起 24 時間後にスタートし、1 日 1 回 14 日間行った。

### 6.2.7 統計処理

データは平均値と標準誤差（mean  $\pm$  S.E.M.）で示した。検定は Friedman または一元配置分散分析後、Student's *t*- 検定を用いた。いずれの検定においても危険率 5 % で差がみられる場合を統計的に有意差ありとした。

## 6.3 結果

### 6.3.1 体重に対する作用

頭部衝撃群で、頭部外傷前の体重と頭部外傷後の体重は、それぞれ  $437 \pm 9$  g と  $412 \pm 9$  g となり、頭部衝撃により体重が有意に減少した。頭部衝撃群の媒体投与群は偽衝撃群の媒体投与群に比較して体重が有意に減少した。

頭部衝撃群の媒体投与群の体重と比較して VA-045 3 mg/kg 投与群の体重は有意に重かった。一方、VA-045 1 mg/kg 及び TRH 10 mg/kg 投与群の体重は、媒体投与群の体重と差はなかった（Fig.6-1）。

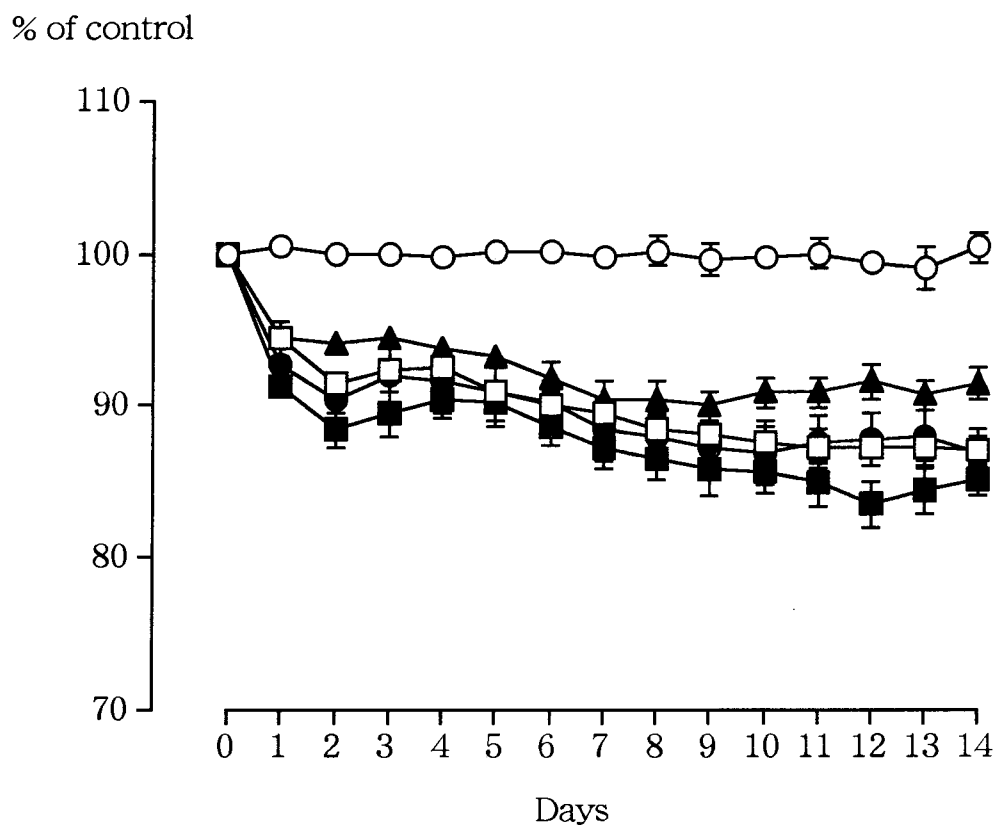


Fig. 6-1 Effects of VA-045 and TRH on the closed head injury (CHI)-induced loss of body weight in aged rats. Body weight before injury and 24 hr after injury was  $437 \pm 9$  g and  $412 \pm 9$  g, respectively. Data is expressed as the means  $\pm$  S.E.M. of body weight before CHI percentage, and analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA). ANOVA showed; sham vs. CHI,  $F(1,168)=1161.30$ ,  $p < 0.01$ ., CHI vs. VA-045 3mg/kg,  $F(1,168)=56.80$ ,  $p < 0.01$ .

- Sham (n=7)
- CHI (p < 0.01 vs. Sham, ANOVA) (n=7)
- CHI + TRH 10mg/kg (n=7)
- CHI + VA-045 1mg/kg (n=7)
- ▲— CHI + VA-045 3mg/kg (p < 0.01 vs. CHI, ANOVA) (n=7)



### 6.3.2 慢性神経障害に対する作用

頭部衝撃群の媒体投与群と偽衝撃群の媒体投与群間でスコアに有意な差が認められた。頭部衝撃群の VA-045 1 及び 3 mg/kg 投与群と偽衝撃群の媒体投与群とのスコアの差は頭部衝撃群の媒体投与群と偽衝撃群の媒体投与群のスコアの差より小さくなり、有意であった。一方、TRH 10 mg/kg 投与群では差はなかった (Fig.6-2)。

### 6.3.3 Beam balance task に対する作用

頭部衝撃群の媒体投与群では、偽衝撃群の媒体投与群と比較して beam balance task の保持時間の有意な短縮がみられた。頭部衝撃群において VA-045 3 mg/kg 投与群は、媒体投与群と比較して beam balance task の保持時間が有意に延長した。一方、TRH 10 mg/kg 投与群では影響しなかった (Fig.6-3)。

## 6.4 考察

本研究の成績により、老齢ラットの頭部衝撃では長期的な神経障害（体重の減少及び beam balance task の保持時間の短縮）が惹起されることが明らかとなった。若齢ラットでは、頭部衝撃による神経障害（自発運動消失及び正向反射消失）は 24 時間以内に回復するため、頭部外傷急性期のモデルとして適している<sup>81)</sup>。Hamm et al.<sup>78)</sup> はラットの fluid percussion brain injury モデルで加齢に伴い増加する人間の脳障害でみられる慢性の病巣を再現できることを報告している。従って、老齢ラットの頭部衝撃モデルは、老人の脳損傷による神経障害の治療薬の評価に適していると考えられる。

本研究で VA-045 は、老齢ラットの頭部衝撃による神経障害（体重の減少及び beam balance latency の保持時間の減少）を改善した。また、VA-045 の投与は頭部衝撃 24 時間後に開始し、1 日 1 回 14 日間としたが、VA-045 は頭部衝撃後の投与でも神経障害に効果があることが明らかとなった。このことは、VA-045 を臨床での治療に使用する場合、かなり重要なことである。

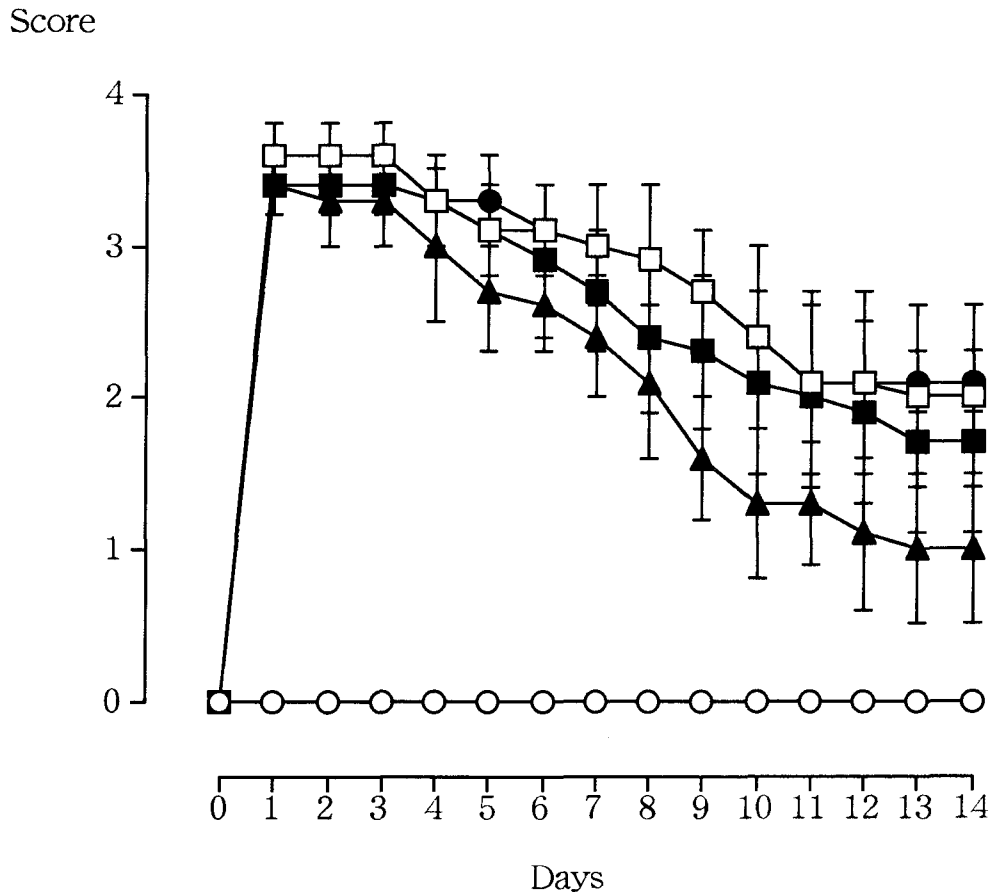


Fig. 6-2 Effects of VA-045 and TRH on the closed head injury (CHI)-induced neurological deficits in aged rats. Data is expressed as the mean  $\pm$  S.E.M., and analyzed using Friedman with rank (non-parametric two-way analysis of variance with block design) using mean values of each day.

Statistical data showed; sham vs. CHI,  $Q(1)=14$ ,  $p < 0.01$ .,

CHI vs. VA-045 1mg/kg,  $Q(1)=8.64$ ,  $p < 0.01$ .,

CHI vs. VA-045 3mg/kg,  $Q(1)=14$ ,  $p < 0.01$ .

- Sham (n=7)
- CHI ( $p < 0.01$  vs. Sham, Friedman) (n=7)
- CHI + TRH 10mg/kg (n=7)
- CHI + VA-045 1mg/kg ( $p < 0.01$  vs. CHI, Friedman) (n=7)
- ▲— CHI + VA-045 3mg/kg ( $p < 0.01$  vs. CHI, Friedman) (n=7)

Latency (sec)

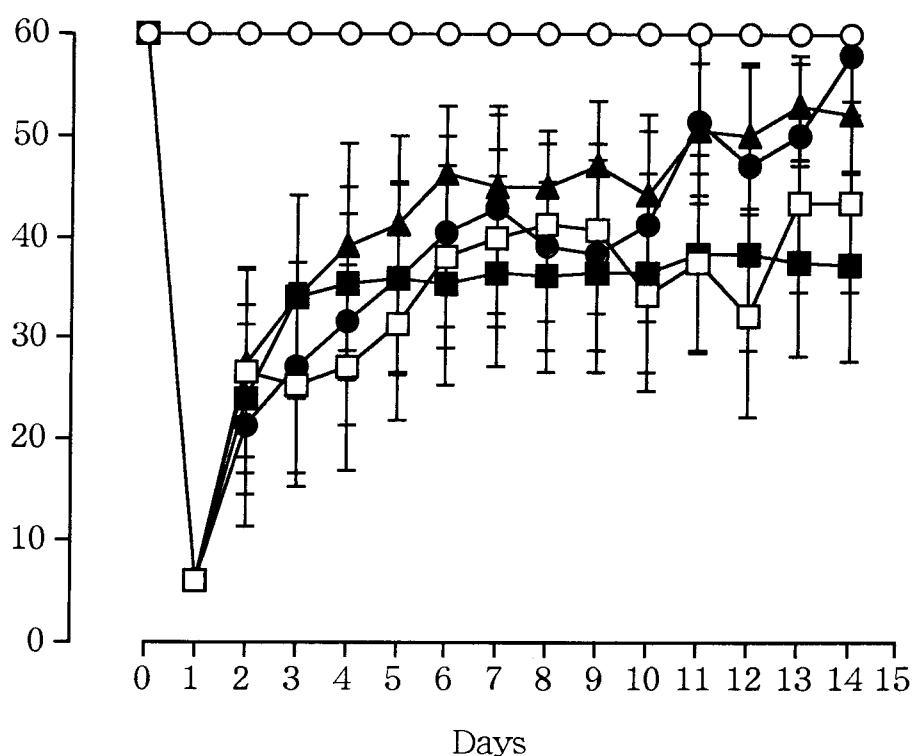


Fig. 6-3 Effects of VA-045 and TRH on the closed head injury (CHI)-induced shortened beam balancing latency in aged rats.

Data is expressed as the means  $\pm$  S.E.M., and analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA).

ANOVA showed; sham vs. CHI,  $F(1,168)=130.84$ ,  $p < 0.01$ ., CHI vs. VA-045 3mg/kg,  $F(1,168)=6.69$ ,  $p < 0.01$ .

- Sham (n=7)
- CHI (p < 0.01 vs. Sham, ANOVA) (n=7)
- CHI + TRH 10mg/kg (n=7)
- CHI + VA-045 1mg/kg (n=7)
- ▲— CHI + VA-045 3mg/kg (p < 0.01 vs. CHI, ANOVA) (n=7)

N-methyl-D-aspartate (NMDA) の fluid percussion injury 後 30 分以内<sup>82)</sup> や fluid percussion injury 前投与<sup>83)</sup> で頭部外傷に対する脳保護作用を示すことが報告されている。また、ムスカリン受容体拮抗薬である scopolamine の fluid percussion injury 15 分後の投与では体重の減少と協調運動障害を改善するが、fluid percussion injury 30 及び 60 分後の scopolamine 投与では運動障害には無効であることが報告されている<sup>84, 85)</sup>。

VA-045 の作用機序は明確ではないが、頭部衝撃または adrenaline  $\alpha_2$  受容体アゴニストである clonidine による青斑核の神経活動の低下を回復させることが報告されている<sup>63)</sup>。また、VA-045 による青斑核の神経活動の変化は、自発脳波の脱同期に先行していること<sup>63)</sup>、同様に脳幹網様体では頭部衝撃や clonidine による神経発火頻度の減少を VA-045 が用量依存的に回復させることが報告されている<sup>58)</sup>。しかし、VA-045 は scopolamine による神経発火頻度の減少には作用しないことから中枢性 choline 作動性神経系の関与の可能性は低いことが報告されている<sup>58)</sup>。

脳幹（青斑核、脳幹網様体）の機能低下が意識障害の発現に重要な役割をはたし<sup>58, 63)</sup>、意識障害には中枢の noradrenaline 作動性神経系及び choline 作動性神経系の抑制が関与している<sup>58)</sup>。頭部衝撃による神経障害に対する VA-045 の改善作用は中枢の adrenaline  $\alpha_2$  受容体を介した脳幹の神経活動の抑制の活性化に関与していることが考えられる。しかし、VA-045 は adrenaline  $\alpha_2$  受容体に親和性を示さず、頭部衝撃による青斑核の発火頻度の減少に対して VA-045 の青斑核への電気泳動的な直接適用でも影響を示さない<sup>63)</sup>。また、VA-045 は自発脳波及び脳幹網様体の自発発火頻度に影響しないことも報告されている<sup>58, 63)</sup>。従って、VA-045 は noradrenaline 作動性神経系に対して、間接的に賦活することが示唆された。

## 6.5 小括

1. 老齡ラットの頭部衝撃により慢性的な神経症状を発現することが明らかとなった。
2. 頭部衝撃前の体重と頭部衝撃後の体重を比較すると、頭部衝撃により体重は有意に減少した。頭部衝撃群の溶媒投与群は偽衝撃群の媒体投与群に比較して体重が有意に減少した。頭部衝撃群の媒体投与群の体重と比較して VA-045 投与群の体重は有意に重かった。
3. 慢性神経症状は頭部衝撃群の媒体投与群と偽衝撃群の媒体投与群間でスコアに有意な差が認められた。頭部衝撃群の VA-045 投与群と偽衝撃群の媒体投与群のスコアの差は頭部衝撃群の媒体投与群と偽衝撃群の媒体投与群のスコアの差より小さくなり有意であった。一方、TRH 投与群では差はなかった。
4. 頭部衝撃群の媒体投与群では、偽衝撃群の媒体投与群と比較して beam balance task の保持時間の有意な短縮がみられた。頭部衝撃群において VA-045 投与群は媒体投与群と比較して beam balance task の保持時間を有意に延長した。一方、TRH 10 mg/kg 投与群で影響は認められなかった。
5. VA-045 が老齡ラットの頭部衝撃による慢性的な神経障害を改善することが明らかとなった。

## 第7章 ラットの中樞 noradrenaline 神経系に対する VA-045 の作用

### 7.1 緒言

第4章で、VA-045 が脳虚血による神経症状を改善することを明らかにした。また、第5章で、VA-045 が頭部衝撃による意識障害を改善することを、第6章で、VA-045 が老齢ラットの頭部衝撃による慢性的な神経症状を改善することを明らかにした。VA-045 の作用機序の一部はVA-045 が頭部衝撃による青斑核の自発発火頻度の減少<sup>63)</sup>及び脳幹網様体の自発発火頻度の減少<sup>58)</sup>を回復させることから、中樞 noradrenaline 作動性神経系が関与することが報告されている。また、VA-045 は adrenaline  $\alpha_2$  受容体アゴニストの clonidine による青斑核の自発発火頻度減少を回復させる<sup>63)</sup>こと、同様に、VA-045 は clonidine による脳幹網様体の自発発火頻度の減少を回復させることが報告されており、中樞 noradrenaline 作動性神経系のうち  $\alpha_2$  受容体が関与することが示唆されている<sup>58)</sup>。

一方、VA-045 は adrenaline  $\alpha_2$  受容体に親和性を示さないこと、頭部衝撃による青斑核の自発発火頻度の減少に対して VA-045 の静脈内投与では改善作用を示すが、青斑核への直接適用では影響を示さない<sup>63)</sup>、さらに、正常動物の自発脳波、青斑核及び脳幹網様体の自発発火頻度に影響しないことが報告<sup>58)</sup>されており、VA-045 は noradrenaline 作動性神経系に対して間接的に作用していることが示唆された。

本研究では VA-045 の中樞 noradrenaline 作動性神経系に対する作用を詳細に検討した。

## 7.2 実験材料及び方法

### 7.2.1 動物

体重約 330 g の Wistar 系雄性ラット（日本チャールス・リバー）を使用した。

動物は実験を開始する前に 14 日間以上は室温  $22 \pm 2$  °C、湿度  $55 \pm 15$  % で 7:00 AM ~ 7:00 PM 照明の明暗サイクルの部屋で飼育し、飼料 (CRF-1, オリオンタル酵母) 及び水は自由に摂取させた。実験は 9:00 AM ~ 6:00 PM の間に行った。

### 7.2.2 薬物

VA-045（大正製薬）は 2.5 % アスコルビン酸溶液に溶解した。Thyrotropine-releasing hormone 酒石酸塩 (TRH)（Sigma）及び塩酸 clonidine（フナコシ）は生理食塩液に溶解した。

### 7.2.3 頭部衝撃モデル<sup>66)</sup>

ハロセン吸入麻酔後、ラットをスポンジの上に腹位に固定し、ラットの頭部にプラスチック管を設置した。頭部衝撃は 70 cm の高さからプラスチック管を通して 400 g の重りを頭頂部に落下させて行った。

### 7.2.4 神経学的実験

頭部衝撃直後にラットは強直性痙攣と意識障害を発現し、無動状態が観察された。その後、ラットは正向反射の回復と探索行動を伴う落ち着きのない行動が観察された。意識障害の観察は頭部衝撃から正向反射回復までの時間と自発運動発現までの時間を指標に行った。VA-045 及び TRH は頭部衝撃直前に静脈内投与した。

### 7.2.5 N-2-chloroethyl-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP4) 処置

選択的 noradrenaline 神経毒である DSP4 (50 mg/kg) は使用直前に生理食塩液に溶解し、ラットに腹腔内投与した。意識障害は DSP4 処置 14 日後に頭部衝撃により惹起させた。

#### 7.2.6 脳内 monoamine 濃度の測定

ラットにマイクロ波を照射 (TMW-6402, 東芝) し, 脳を摘出した. 脳は氷上で前脳皮質, 線条体, 扁桃体, 視床下部, 海馬, 視床+中脳, 橋+延髄及び小脳の 8 部位に分割した. 各部位の noradrenaline, dopamine 及び serotonin 濃度は高速液体クロマトグラフィーで分離後, 電気化学検出器で定量した. なお, 抽出液中の蛋白は Lowry 法<sup>86)</sup>で測定し, 各 monoamine との比を算出した.

#### 7.2.7 脳内微小透析法

ラットを urethane (1.0 g/kg, i.p.) で麻酔し, 脳定位固定装置 (SR-6, 成茂化学器械研究所) に固定し, 保温機を用いて体温 37 ~ 38 °C に維持した. 透析プローブを Paxinos and Watson<sup>87)</sup> の脳図譜に従って, 大脳皮質前頭葉 (FC) (A: 3.7 mm, L: 3.5 mm, 硬膜から 3.5 mm) と青斑核 (LC) (A: -3.0 mm, L: 1.2 mm, I: 2.75 mm) に挿入し, 頭蓋骨に固定した. 透析プローブは FC 用透析プローブ (透析膜 2 mm, 分子量 50000, 外径 0.22 mm, A-I-4-2, Eicom) と LC 用透析プローブ (透析膜 1 mm, 分子量 50000, 外径 0.22 mm, A-I-12-1, Eicom) を使用し, 無菌のリンゲル液 (NaCl: 147 mM, KCl: 4 mM, CaCl<sub>2</sub>: 2.3 mM) をマイクロシリンジポンプ (EP-60, Eicom) を用いて 2  $\mu$  l/min で灌流した. 脳灌流スタート 1 時間後, 灌流液を 20 分間隔で回収した. 脳灌流液中の noradrenaline, dopamine 及び serotonin の各濃度は高速液体クロマトグラフィーで分離後, 電気化学検出器で定量した.

#### 7.2.8 統計処理

データは, 平均値と標準誤差 (mean  $\pm$  S.E.M.) で示した. 神経症状実験の検定には, 一元配置分散分析後, Tukey 検定を用いた. 脳内 monoamine 濃度及び脳内微小透析法による noradrenaline 濃度については一元配置分散分析後, Student's t- 検定を用いた. いずれの検定においても危険率 5 % 以下で差が見られる場合を統計学的に有意差ありとした.



## 7.3 結果

### 7.3.1 神経症状に対する作用

本研究の VA-045 と TRH の投与量は、第 5 章で、頭部衝撃による神経障害を高率的に改善する用量，すなわち，VA-045 は 1 mg/kg を，TRH は 3 mg/kg を用いた．

DSP4 処置で，ラットの一般症状に異常はみられなかった．頭部衝撃群の媒体投与群でみられる正向反射の消失時間及び自発運動の消失時間を VA-045 1 mg/kg 及び TRH 3 mg/kg の静脈内投与は有意に短縮させた (Fig.7-1) ．一方，頭部衝撃による神経障害に対する VA-045 の改善作用は DSP4 前処置により消失したが，TRH の神経障害に対する改善作用は DSP4 前処置で影響されなかった．なお，DSP4 処置により全ての中枢神経系部位の内因性 noradrenaline 濃度は有意に減少した (Table 7-1) ．前脳皮質の dopamine 及び serotonin 濃度は DSP4 処置では影響を受けなかった．

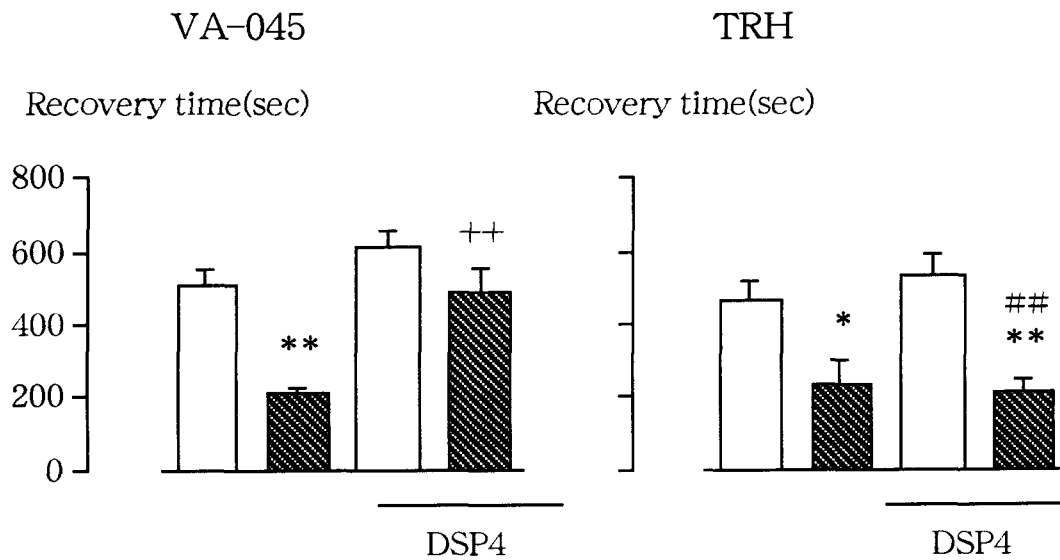
Table 7-1  
Regional changes in noradrenaline (NA) concentrations in the CNS of rats treated with vehicle or DSP4

Brain regions	Noradrenaline (ng/mg protein)					
	n	Vehicle-treated rats		n	DSP4-treated rats	
Frontal cortex	8	3.6	± 0.5	8	0.5	± 0.2 ***
Stratum	8	1.8	± 0.2	8	1.1	± 0.1 **
Amygdala	8	4.6	± 2.2	8	1.3	± 0.2 ***
Hypothalamus	8	8.8	± 1.0	8	4.8	± 0.8 **
Hippocampus	8	3.5	± 0.1	8	0.1	± 0.1 ***
Thalamus + Midbrain	8	4.0	± 0.2	8	1.2	± 0.1 ***
Pons + Medulla	8	4.3	± 0.3	8	2.9	± 0.6 *
Cerebellum	8	1.6	± 0.1	8	0.2	± 0.0 ***

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. vehicle-treated group (Student's t-test).

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8).

## Righting reflex



## Spontaneous movement

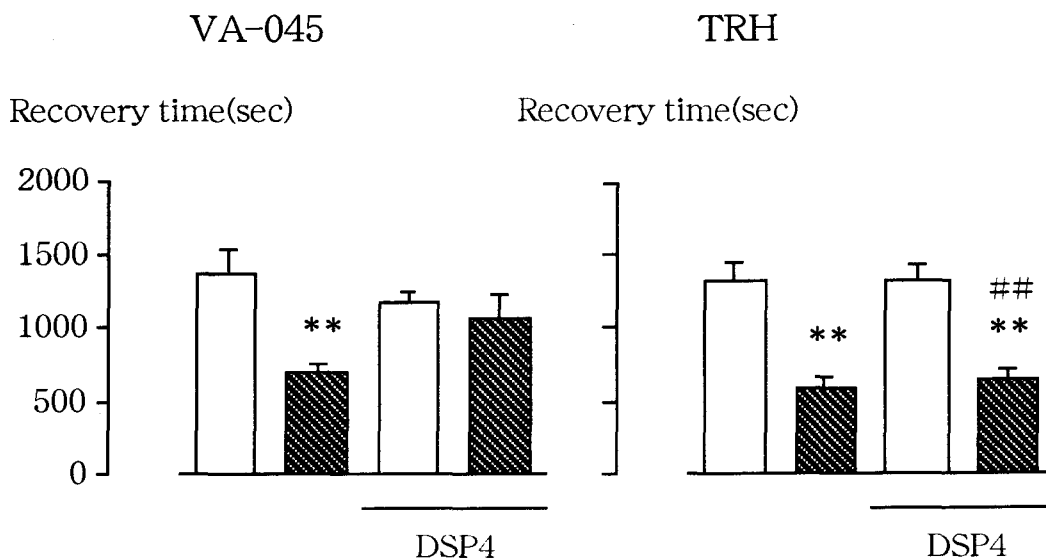


Fig. 7-1 Effects of VA-045 and TRH on the recovery time of righting reflex and of spontaneous movement induced by closed head injury in vehicle- or DSP4-treated rats.

The vehicle-treated group: open column.

The drug-treated group: hatched column.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated group (Tukey's test).

++  $p < 0.01$  vs. vehicle + VA-045-treated group (Tukey's test).

##  $p < 0.01$  vs. DSP4 + vehicle-treated group (Tukey's test).

Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=12).

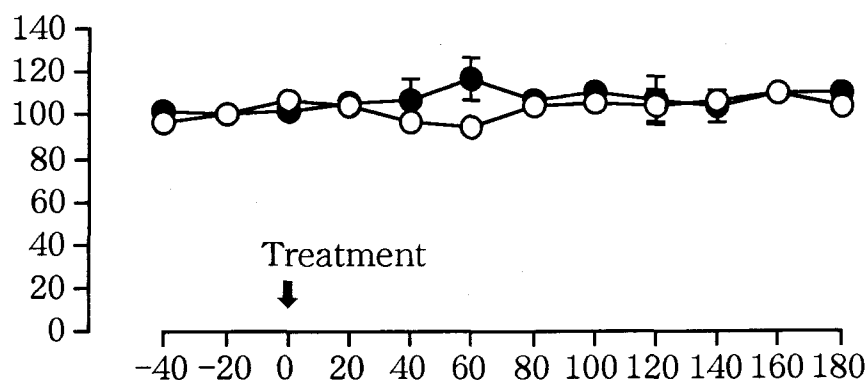
### 7.3.2 ラットの前脳皮質及び青斑核の細胞外 noradrenaline 濃度に対する VA-045 の作用

前脳皮質及び青斑核の noradrenaline 濃度は、灌流 2 時間後に安定した。前脳皮質の媒体投与群と VA-045 投与群の投与前の noradrenaline 濃度の平均値はそれぞれ  $2.68 \pm 0.23$  pg/20 min と  $2.76 \pm 0.23$  pg/20 min であった。また、青斑核の媒体投与群と VA-045 投与群の投与前の noradrenaline 濃度の平均値はそれぞれ  $6.10 \pm 1.28$  pg/20 min と  $6.13 \pm 1.19$  pg/20 min であった。

VA-045 1 mg/kg の静脈内投与では前脳皮質及び青斑核の細胞外 noradrenaline 濃度は変化しなかった (Fig.7-2)。

(A)

% of baseline values



(B)

% of baseline values

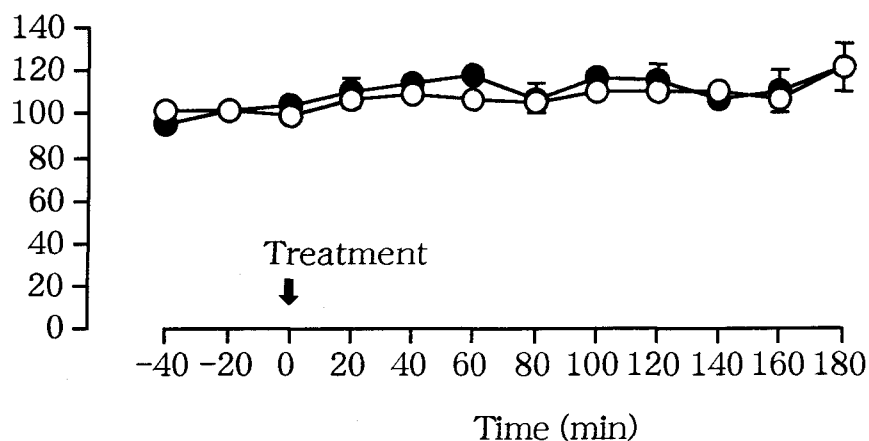


Fig. 7-2 Effect of VA-045 on extracellular concentrations of noradrenaline (NA) in the rat frontal cortex (A) and locus coeruleus (B) in rats. For each time point, mean  $\pm$  S.E.M. (n=6) is expressed as a percent of the respective baseline values of NA (average of three samples collected before the administration of VA-045 or vehicle).

—○— Vehicle

—●— VA-045 1mg/kg, i.v.

### 7.3.3 Clonidine 灌流時のラットの前脳皮質及び青斑核の細胞外 noradrenaline 濃度に対する VA-045 の作用

Clonidine は最終濃度が  $5 \times 10^{-6}$  M になるようにリンゲル液に溶解し、透析プループを通して灌流した。Clonidine の灌流開始 1 時間後には灌流液中の noradrenaline 濃度は減少し、noradrenaline 濃度は clonidine 灌流開始 3 時間後に clonidine 灌流開始前値の 1/2 に減少した (Table 7-2)。青斑核で認められた noradrenaline 放出に対する clonidine の抑制作用は前脳皮質でより強力であった。前脳皮質及び青斑核において、VA-045 1 mg/kg の静脈内投与は、noradrenaline 遊離に対する clonidine の抑制作用に対して拮抗した (Fig.7-3)。

Table 7-2

Clonidine ( $5 \times 10^{-6}$  M) infusion led to inhibition of NA output in the frontal cortex (FC) and locus coeruleus (LC) in rats

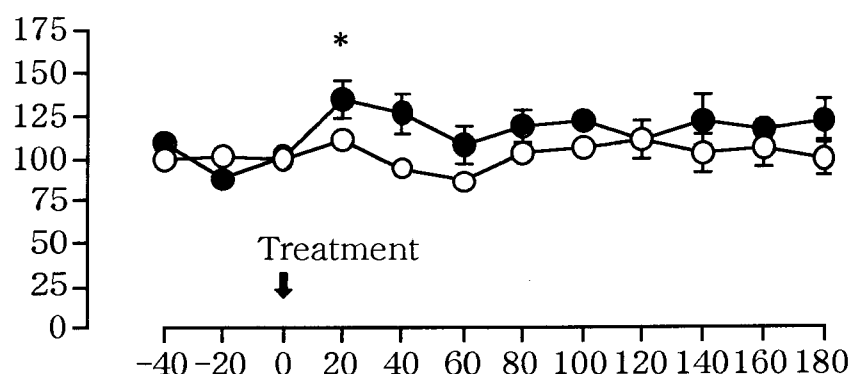
	Noradrenaline (pg/20min)			
	n	FC	n	LC
Pre-clonidine				
Vehicle-treated group	6	2.72 $\pm$ 0.24	6	6.36 $\pm$ 0.78
VA-045-treated group	6	3.68 $\pm$ 0.56	6	7.86 $\pm$ 0.75
Post-clonidine				
Vehicle-treated group	6	1.19 $\pm$ 0.13 **	6	2.87 $\pm$ 0.68 **
VA-045-treated group	6	1.81 $\pm$ 0.28 **	6	3.23 $\pm$ 0.44 **

\*\* p < 0.01 vs. Pre-clonidine value (Student's t-test).

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=6).

(A)

% of pre-drug values



(B)

% of pre-drug values

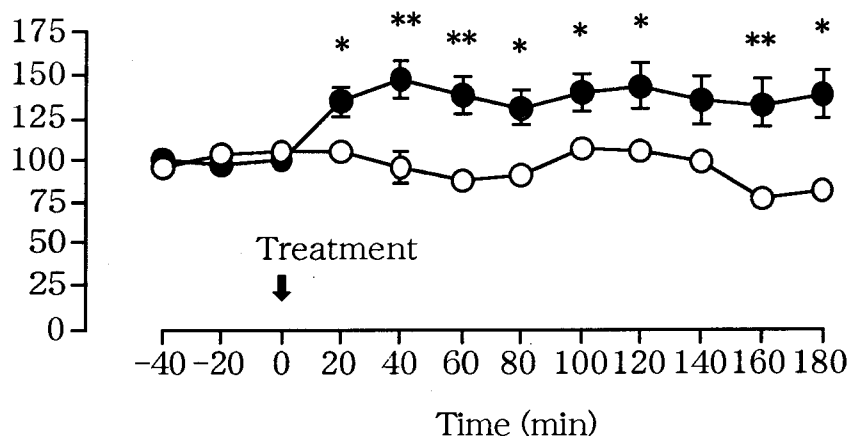


Fig. 7-3 Effect of VA-045 on after local infusion of clonidine ( $5 \times 10^{-6}$  M) on extracellular concentration of noradrenaline (NA) in the frontal cortex (A) and locus coeruleus (B) in rats.

For each time point, mean  $\pm$  S.E.M. (n=6) is expressed as a percent of the respective baseline values of NA (average of three samples collected before the administration of VA-045 or vehicle).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated group (Student's t-test).

—○— Vehicle  
—●— VA-045 1mg/kg, i.v.

## 7.4 考察

Noradrenaline 作動性神経系が DSP4 の全身投与によって生化学的及び病理学的にも障害されることが実験動物でも認められ、この現象は DSP4 による noradrenaline 作動性神経の神経終末の変性によって生じることが報告されている<sup>88)</sup>。しかし、DSP4 は末梢の noradrenaline 作動性神経にも作用するが、その作用は短時間であることが報告されている<sup>89)</sup>。

本研究で、DSP4 の全身投与によってすべての脳部位で noradrenaline 濃度を有意に減少させ、DSP4 が dopamine 及び serotonin 作動性神経に作用せず、noradrenaline 作動性神経に対して非常に選択的に作用することが明らかとなった。

頭部衝撃による神経障害に対する VA-045 の改善作用は、DSP4 の前処理により消失した。しかし、TRH の改善作用には影響しなかった。この結果は、VA-045 の作用機序に中枢の noradrenaline 系が関与することを示唆している。一方、TRH の興奮作用は、脳内の dopamine 系及び choline 系神経と TRH 神経系の相互作用の結果であることが報告されており<sup>4)</sup>、中枢 noradrenaline 神経系の関与は少ないと考えられる。

脳微小透析法において、VA-045 は正常ラットの前脳皮質及び青斑核の noradrenaline の細胞外濃度に影響しなかった。このことは、VA-045 が自発脳波と脳幹（青斑核及び脳幹網様体）の自発発火頻度に影響しないことと一致している<sup>58, 63)</sup>。一方、clonidine の注入によるシナプス前の noradrenaline  $\alpha_2$  受容体の活性化が noradrenaline 濃度を減少させ、これらの autoreceptor が青斑核の細胞体と同様に前脳皮質の noradrenaline 作動性神経終末にも存在し<sup>90)</sup>、clonidine の灌流によって細胞体及び神経終末の noradrenaline 放出が抑制されることが報告されている<sup>85)</sup>。また、noradrenaline の放出に対する clonidine の抑制作用は青斑核の方が前脳皮質より強力であった。この相違は神経節前部の noradrenaline  $\alpha_2$  受容体の局所性によって説明できる。すなわち、青斑核の noradrenaline  $\alpha_2$  受容体の密度が細胞体では前脳皮質より高いこと<sup>91)</sup>によっても支持される。

本研究では clonidine による noradrenaline 放出の抑制が VA-045 によって拮抗された。従って、VA-045 の作用機序は青斑核や前脳皮質の noradrenaline  $\alpha_2$  受容体の拮抗作用の関与が考えられる。また、電気生理学的にも頭部衝撃や clonidine による青斑核神経の自発発火頻度の減少は、VA-045 の静脈内投与によって改善し、VA-045 による青斑核神経活動の変化は自発脳波の脱同期に先行することが報告されてい

る<sup>63)</sup>。さらに、同様の結果は、脳幹網様体でも認められ、VA-045 は用量依存的に頭部衝撃及び clonidine による自発発火頻度の減少を改善することが報告されている<sup>58)</sup>。頭部衝撃による脳幹（青斑核と脳幹網様体）の神経活動の低下のメカニズムは明確ではないが、青斑核から辺縁皮質系に投射する noradrenaline 作動性神経が外部刺激から起こる神経の入力を高め、注意力や覚醒レベルを調節していることが報告されており<sup>92)</sup>、少なくとも脳幹の神経活動の減少が意識障害の発現に重要な役割りをしている可能性が示唆されている。さらに、その一部は中枢 noradrenaline 作動性神経系の抑制に関係していると思われる。

以上、頭部衝撃による神経障害に対する VA-045 の改善作用は中枢 noradrenaline 作動性神経系を介した脳幹の神経活動の低下の賦活化に関係していると考えられる。しかし、VA-045 は、noradrenaline  $\alpha_2$  受容体に親和性を示さないこと、さらに、VA-045 の青斑核への直接適用では、頭部衝撃による青斑核の自発発火頻度の減少に対して影響しないことから、VA-045 は直接 noradrenaline  $\alpha_2$  受容体に作用するのではなく、青斑核に入力している興奮性入力（グルタミン作動性神経）の亢進、あるいは抑制性入力（GABA 作動性神経）の抑制が考えられるが、詳細は不明である。



## 7.5 小括

1. 頭部衝撃群の媒体投与群でみられる正向反射の消失時間及び自発運動の消失時間を VA-045 及び TRH は有意に短縮させた.
2. DSP4 処置で, ラットの一般行動に異常は認められなかった. 頭部衝撃による神経障害に対する VA-045 の改善作用は DSP4 前処置により消失したが, TRH の神経障害に対する改善作用は DSP4 前処置で影響されなかった. なお, DSP4 処置により全ての中樞神経系部位の内因性 noradrenaline 濃度は有意に減少したが, 前脳皮質の dopamine 及び serotonin 濃度は DSP4 処置では影響を受けなかった.
3. VA-045 の静脈内投与で正常ラットの前脳皮質及び青斑核の細胞外 noradrenaline 濃度は変化しなかった.
4. Clonidine の灌流開始 1 時間後には灌流液中の noradrenaline 濃度は減少し, noradrenaline 濃度は clonidine 灌流開始 3 時間後に clonidine 灌流開始前値の 1/2 に減少した. 青斑核で認められた noradrenaline 放出に対する clonidine の抑制作用は前脳皮質でより強力であった. 前脳皮質及び青斑核において, VA-045 は noradrenaline 遊離に対する clonidine の抑制作用に対して拮抗した.
5. VA-045 は中枢の noradrenaline  $\alpha_2$  受容体を介した脳幹の神経活動の低下を活性化させることにより意識障害を改善することが明らかとなった.

## 第 8 章 総括

VA-045 は大正製薬で開発された vinpocetine の誘導体であり、頭部外傷及び脳血管障害後の意識障害とそれに付随する脳神経障害に対し、治療効果が期待できる化合物である。本研究では、VA-045 の薬理学的特徴を明確にすることを目的に研究し、以下の結論を得た。

### 1. VA-045 の末梢循環及び脳循環に対する作用

VA-045 は麻酔イヌにおいて  $0.03 \sim 0.3 \text{ mg/kg}$  の静脈内投与で椎骨動脈血流量を用量依存的に増加させ、その増加率は総頸動脈血流量及び大腿動脈血流量の増加率を上回った。一方、血圧及び心拍数は  $0.3 \text{ mg/kg}$  で有意に減少した。また、VA-045  $0.03 \sim 1.0 \text{ mg/kg}$  の静脈内投与は、大脳皮質血流量を用量依存的に増加させたが、血圧は低下傾向を示すのみであった。

Vinpocetine  $0.03 \sim 0.3 \text{ mg/kg}$  の静脈内投与は、椎骨動脈血流量、総頸動脈血流量、大腿動脈血流量、血圧及び心拍数に影響しなかった。

また、vinpocetine  $0.03 \sim 1.0 \text{ mg/kg}$  の静脈内投与は、大脳皮質血流量を増加させる傾向がみられたが、血圧は低下傾向を示した。

Nicergoline  $0.01 \sim 0.1 \text{ mg/kg}$  の静脈内投与は、椎骨動脈血流量、総頸動脈血流量、大腿動脈血流量及び心拍数に影響しなかったが、血圧は用量依存的に低下させた。Nicergoline  $0.01 \sim 0.1 \text{ mg/kg}$  の静脈内投与は、大脳皮質血流量には影響せず、血圧を用量依存的に低下させた。

### 2. VA-045 のウサギ摘出脳底動脈に対する作用

VA-045  $10^{-9} \sim 10^{-5} \text{ M}$  の添加で、histamine ( $10^{-6} \text{ M}$ ) による脳底動脈の収縮を濃度依存的に弛緩させた。また、VA-045 は histamine ( $10^{-6} \text{ M}$ ) +  $15 \text{ mM K}^+$  及び等張性の high  $\text{K}^+$  ( $30$  または  $65 \text{ mM}$ ) による脳底動脈の収縮に対して弛緩作用を示したが、この作用は histamine 収縮に対してよりも高濃度を必要とした。

一方、脳底動脈に対する VA-045 の弛緩作用は、5 種類の  $\text{K}^+$  チャネル遮断薬 ( $10^{-3} \text{ M}$ : tetraethylammonium,  $10^{-4} \text{ M}$ : 4-aminopyridine,  $10^{-6} \text{ M}$ : charybdotoxin,  $10^{-7} \text{ M}$ : apamin 及び  $10^{-6} \text{ M}$ : glybenclamide) 及び guanylate cyclase の特異的拮抗薬 ( $10^{-5} \text{ M}$ : methylene blue) で影響されなかった。

### 3. VA-045 の脳虚血保護作用（マウスの normobaric hypoxia, histotoxic anoxia 及び complete ischemia）

VA-045 0.3 mg/kg 以上の静脈内投与は、いずれの方法においても脳虚血保護作用を示した。一方、TRH は normobaric hypoxia 及び complete ischemia で脳虚血保護作用を示したが、histotoxic anoxia では無効であった。持続時間の検討では、normobaric hypoxia の場合、VA-045 は 120 分前投与で、complete ischemia の場合、VA-045 は 60 分前投与で脳虚血保護作用を示した。

一方、TRH は両試験法において、10 分前投与では脳虚血保護作用を示したが、30 分前投与では無効であった。

### 4. VA-045 の意識障害に対する作用

VA-045 0.1 ~ 1.0 mg/kg の静脈内投与は、ラットの pentobarbital 誘発睡眠を用量依存的に短縮し、その作用は TRH より強力であった。

VA-045 0.03 ~ 0.3 mg/kg の静脈内投与は、マウスの頭部衝撃後の正向反射回復時間を短縮させなかったが、自発運動回復時間は用量依存的に短縮させた。

一方、TRH は正向反射回復時間及び自発運動回復時間を短縮させたが、用量依存性は認められなかった。

VA-045 は自発運動回復時間を 120 分前投与で短縮させたが、TRH は 10 分前投与でのみ有効であった。VA-045 0.3 ~ 3.0 mg/kg の腹腔内投与は、脳虚血による神経障害を改善した。

一方、TRH 1 ~ 10 mg/kg の腹腔内投与は、脳虚血による神経障害を改善した。また、脳虚血による受動的回避反応の step through latency の短縮に対して、VA-045 0.3 ~ 3.0 mg/kg の腹腔内投与は、step through latency を延長させたが、TRH 1 ~ 10 mg/kg の腹腔内投与では延長作用は認められなかった。

VA-045 0.3 ~ 3.0 mg/kg の静脈内投与は、自発運動量に影響しなかったが、TRH 10 mg/kg の静脈内投与は、自発運動量を増加させた。

## 5. ラットの頭部衝撃モデルに対する作用

VA-045 0.1 ~ 1.0 mg/kg の静脈内投与は、頭部衝撃による自発運動消失時間及び正向反射消失時間を短縮した。また、この作用は TRH より 3 倍強力であった。

VA-045 1.0 mg/kg の静脈内投与は、頭部衝撃による受動的回避学習反応の step through latency の短縮を延長したが、TRH 3 mg/kg の静脈内投与では延長作用は認められなかった。VA-045 0.3 ~ 10.0 mg/kg の静脈内投与は、scopolamine による受動的回避学習反応の step through latency の短縮に影響しなかった。

VA-045 0.1 ~ 1.0 mg/kg の静脈内投与は、頭部衝撃による体性感覚誘発電位の振幅の減少を改善したが、TRH 3 mg/kg の静脈内投与では改善作用を示さなかった。

## 6. 老齢ラットの頭部衝撃による神経障害に対する作用

21~28 箇月齢のラットにおいて VA-045 1 及び 3 mg/kg の腹腔内投与で頭部衝撃による持続的な体重減少及び神経障害を改善したが、TRH 10 mg/kg の腹腔内投与は、改善作用を示さなかった。

また、VA-045 は beam balance task の保持時間の減少を有意に延長したが、TRH は延長作用を示さなかった。

## 7. ラットの中樞 noradrenaline 作動性神経に対する作用

VA-045 1 mg/kg の静脈内投与による頭部衝撃後の神経障害の改善作用は、選択的 noradrenaline 神経毒の DSP4 の前処置で消失した。

また、正常ラットにおいて、VA-045 1 mg/kg の静脈内投与は、前脳皮質及び青斑核の細胞外 noradrenaline 濃度に影響しなかったが、noradrenaline  $\alpha_2$  受容体アゴニストである clonidine による前脳皮質及び青斑核の noradrenaline 遊離抑制作用に対しては拮抗作用を示した。

以上の結果をまとめると、VA-045 は経口投与、静脈内投与及び腹腔内投与で頭部外傷あるいは脳血管障害によって生じる意識障害（神経症状、体性感覚誘発電位の振幅減少及び受動的回避学習能障害）を改善した。また、VA-045 はこれら作用の他に pentobarbital 麻酔拮抗作用、抗アノキシア作用及び脳血管弛緩作用による脳循環改善作用を示した。VA-045 の作用は TRH より強力かつ持続的であった。なお、VA-045 による頭部外傷後の意識障害の改善作用は noradrenaline 神経を DSP4 で破壊することにより消失すること、また、VA-045 は正常ラットの noradrenaline 遊離に作用を示さず、noradrenaline  $\alpha_2$  受容体アゴニスト（clonidine）による noradrenaline の遊離抑制に拮抗することから、VA-045 は中枢 noradrenaline 作動性神経系を活性化させることにより意識障害を改善することが示唆された。

## 謝 辞

本研究にあたり多大の御指導，御鞭撻を賜りました星薬科大学南原 利夫 学長ならびに星薬科大学医薬品化学研究所機能形態研究室助教授 鎌田 勝雄 博士，また，防衛医科大学校脳神経外科教授 島 克司 博士に謹んで感謝申し上げます．

また終始本研究を御指導頂きました大正製薬株式会社 奥山 茂博士ならびに株式会社日本バイオリサーチセンター 山口 和政博士に深謝致します．さらに，本研究の実施にあたり，終始御協力を頂きました株式会社日本バイオリサーチセンター 吉田 孜代表取締役社長ならびに株式会社日本バイオリサーチセンター薬理研究部の方々に感謝致します．

## 掲載雑誌目録

本論文の内容は下記の雑誌に掲載されたものです.

- 第 1 章 : General Pharmacology, 26, 1419 (1995).  
Effects of VA-045 on peripheral and central circulation  
in anesthetized dogs
- 第 2 章 : Research Communications in Molecular Pathology and  
Pharmacology, 90, 269 (1995).  
Effects of VA-045, a novel apovincaminic acid derivative,  
on rabbit basilar artery
- 第 3 章 : Research Communications in Molecular Pathology and  
Pharmacology, 86, 83 (1994).  
Cerebral protective effects of VA-045, a novel  
apovincaminic acid derivative, in mice
- 第 4 章 : Research Communications in Molecular Pathology and  
Pharmacology, 82, 91 (1993).  
The effect of VA-045 on disturbance in consciousness  
in experimental animal models
- 第 5 章 : Life Sciences, 53, PL 273 (1993).  
Effect of VA-045 on a closed head injury model in rats
- 第 6 章 : Neurological Research, 19, 300 (1997).  
Effect of VA-045, a novel apovincaminic acid derivative,  
on closed head injury-induced neurological dysfunction  
in aged rats
- 第 7 章 : General Pharmacology, 27, 1013 (1996).  
Effect of VA-045 on central noradrenergic neuronal  
system in rats

## 文 献

- 1) Havlicek, V., Rezek, M. and Friesen, H., *Pharmacol. Biochem. Behav.* **4**. 455 (1976).
- 2) Heal, D.J. and Green, A.R., *Neuropharmacology* **18**. 23 (1979).
- 3) Horita, A., Carino, M.A. and Lai, H., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **26**. 311 (1986).
- 4) Miyamoto, M., Nagai, Y., Narumi, S., Saji, Y. and Nagawa, Y., *Pharmacol. Biochem. Behav.* **17**. 797 (1982).
- 5) Yamamoto, M. and Shimizu, M., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **336**. 561 (1987).
- 6) Oka, M., Ochi, Y., Furukawa, K., Ito, T., Miura, Y., Karasawa, T. and Kadota, T., *Arzneim.-Forsch.* **39**. 297 (1989).
- 7) Yamamura, M., Kinoshita, K., Nakagawa, H. and Ishida, R., *Jpn. J. Pharmacol.* **55**. 69 (1991).
- 8) Beale, J.S., White, R.P. and Huang, S.P., *Neuropharmacology* **16**. 499 (1977).
- 9) Andry, D.K. and Horita, A., *Pharmacol. Biochem. Behav.* **6**. 55 (1977).
- 10) Manaka, S. and Sano, K., *Neurosci. Lett.* **8**. 255 (1978).
- 11) Tanaka, K., Ogawa, N., Mori, A. and Yanaihara, N., *Regul. Pept.* **38**. 129 (1992).
- 12) Faden, A. I., *Brain Res.* **486**. 228 (1989).
- 13) Latham, A., Lye, R.H., Shrewsbury-Gee, J. and Slater, P., *Regul. Pept.* **13**. 80 (1985).
- 14) 武 陽明, 成実 茂彦, 栗原 悦男, 柴生田 正樹, 佐治 美昭, 名川 雄児, *日薬理誌* **85**. 143 (1985).
- 15) 土居 孝行, 佐治 義昭, 名川 雄児, *薬理と治療* **6**. 3229 (1978).
- 16) 福田 尚久, 佐治 美昭, 名川 雄児, *日薬理誌* **75**. 321 (1979).
- 17) Taylor, W.L. and Dixon, J.E., *J. Biol. Chem.* **253**. 6934 (1978).
- 18) Rupnow, J.H., Taylor, W.L. and Dixon, J.E., *Biochemistry* **18**. 1206 (1976).
- 19) Giffiths, E.C., Kelly, J.A., Ashcroft, A., Ward, D.J. and Robson, B., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **553**. 217 (1989).
- 20) 宮崎 学, *薬理と治療* **10**. 1945 (1982).
- 21) 鬼頭 剛, 奥田 裕子, 菊地 健三, *基礎と臨床* **18**. 779 (1984).



- 22) 今本 哲治, 藤原 秀司, 田辺 正雄, 嶋本 典夫, 平田 稔,  
薬理と治療 **10**. 1877 (1982).
- 23) 垣花 満, 寿野 正広, 柴生田 正樹, 浜條 和弘, 永岡 明伸,  
日薬理誌 **80**. 225 (1982).
- 24) Graham, D. I., Ford, I., Adams, J.H., Doyle, D., Teadale, G.M.,  
Lawrence, A. E. and McLellan, D.R., J. Neurol. Neurosurg.  
Psychiat. **52**. 364 (1989).
- 25) Yamakami, I. and McIntosh, T.K. : Alterations in regional  
cerebral blood flow following brain injury in the rat, J. Cereb.  
Blood Flow Metab. **11**. 655 (1991).
- 26) Okuyama, S., Hashimoto - Kitsukawa, S., Ogawa, S., Imagawa,  
Y., Kawashima, K., Kawashima, Y., Araki, H. and Otomo, S.,  
Gen. Pharmac. **25**. 1311 (1994).
- 27) Miyata, N., Yamaura, H., Tanaka, M., Muramatsu, M.,  
Tsuchida, K., Okuyama, S. and Otomo, S., Life Sci. **52**. PL 181  
(1993).
- 28) Lim, R.K.S., Liu, Chan-Nao and Moffitt, R.L., A Stereotaxic  
Atlas of the DOG'S BRAIN, Charles C Thomas, U.S.A. (1960).
- 29) Karpati, E. and Szporny. L. Arzneim.-Forsch. **26**. 1908 (1976).
- 30) Katsuragi, T., Ohba, M., Mori, R., Kushiki, K. and  
Furukawa, T. Gen. Pharmac. **15**. 43 (1984).
- 31) Shintomi, K., Ogawa, Y., Yoshimoto, K. and Narita, H., Folia.  
Pharmac. Japon. **87**. 537 (1986).
- 32) Von Lievre. M., Ollagnier, M. and Faucon, G.,  
Arzneim.-Forsch. **29**. 1227 (1979).
- 33) 萩原 正敏, 遠藤 登代志, 日高 弘義, 日薬理誌 **80**. 317  
(1982).
- 34) Benham, C.D., Bolton, T.B., Lang, R.J. and Takewaki, T.,  
Pfluegers Arch. **403**. 120 (1985).
- 35) Banks, B.E.C., Brown, C., Burgess, G.M., Burnstock, G.,  
Claret, M., Cocks, T.M. and Jenkinson, D.H., Nature (Lond.)  
**282**. 415 (1979).
- 36) Maas, A.J.J. and Hertog, A.D., Eur. J. Pharmacol. **58**. 151  
(1979).
- 37) Hugues, M., Romey, G., Dunal, D., Vinot, J.P. and Lazdunski,  
M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**. 1308 (1982).
- 38) Standen, N.B., Quayle, J.M., Davies, N.W., Brayden, J.E.,  
Huang, Y. and Nelson, M.T., Nature (Lond.) **245**. 177 (1989).

- 39) Brayden, J.E., Am. J. Physiol. **259**. H668 (1990).
- 40) Harata, N., Hunakata, M., Araki, H. and Akaike, N., Society for Neuroscience (Abstract) (1995).
- 41) Yamamoto, M. and Shimizu, M., Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. **286**. 272 (1987).
- 42) Sakurai, T., Hatanaka, S., Yamasaki, T., Kojima, H. and Akashi, A., Jpn. J. Pharmacol. **54**. 33 (1990).
- 43) Kawashima, Y., Ikemoto, T., Horiguchi, A., Hayashi, M., Matsumoto, K., Kawarasaki, K., Yamazaki, R., Okuyama, S. and Hatoyama, K., J. Med. Chem. **36**. 815 (1993).
- 44) Suzuki, J., Experimental and clinical study, (Suzuki, J. ed.) pp. 158-204, Springer-Verlag, Wien and New York (1987).
- 45) Ashton, D., Van Reempts, J. and Wauquier, A., Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. **254**. 196 (1981).
- 46) 安田 寛, 泉 律好, 中西 正人, 阿南 惟毅, 丸山 裕, 日薬理誌 **88**. 363 (1986).
- 47) Suzuki, M., Nishina, M., Suga, T., Matsushita, K., Hori, E., Shima, K. and Okuyama, S., Jpn. J. Pharmacol. **64**. Suppl. I 197P (1994).
- 48) Nagai, Y., Narumi, S., Nagawa, Y., Sakurada, O., Ueno, H. and Ishii, S., J. Neurochem. **35**. 963 (1980).
- 49) Wauquier, A., Ashton, D., Clincke, G. and Niemegeers, C.J.E., Ach. Int. Pharmacodyn. Ther. **249**. 330 (1985).
- 50) Nakanishi, M., Yashuda, H. and Tsumagari, T., Life Sci. **13**. 467 (1973).
- 51) Yashuda, H., Shuto, S., Tsumagari, T. and Nakajima, A., Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. **233**. 136 (1978).
- 52) Yashuda, H., Nakanishi, M., Tsumagari, T., Nakajima, A. and Nakanishi, M., Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. **242**. 77 (1979).
- 53) Okuyama, S., Imagawa, Y., Ogawa, S., Saito, Y., Araki, H., Otomo, S., Sakagawa, T., Yamada, S. and Shima K., Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. **82**. 91 (1993).
- 54) 間中 信也, 淵之上 徳郎, 近藤達也, 堀 智勝, 佐野 圭司, 脳と神経 **29**. 1075 (1977).
- 55) 佐野 圭司, 喜多村 孝一, 竹内 一夫, 都留 美都雄, 金谷 春之, 鈴木 二郎, 植木 幸明, 中村 紀夫, 桑原 武夫, 影山 直樹, 神経進歩 **23**. 184 (1979).

- 56) 間中 信也, 三井 香児, 杉山 弘行, 平川 公義, 日災害医誌 **25**. 202 (1977).
- 57) Yasuhara, M. and Naito, H., Intern. J. Neurosci. **21**. 197 (1983).
- 58) Okuyama, S., Kawashima, N., Araki, H., Otomo, S. and Shima, K., Life Sci. **20**. 1577 (1994).
- 59) Okuyama, S., Kawashima, K., Hashimoto-Kitsukawa, S. and Otomo, S., Clin. Neuropharmacol. **15** suppl.: 1.Pt.B 460B (1992).
- 60) Marshall, L. F., Bruce, D. A., Bruno, L. and Langfitt, T.W., J. Neurosurg. **48**. 560, (1978).
- 61) Nilsson, P., Hillered, L., Ponte, U. and Ungerstedt, U., J. Cereb. Blood Flow Metab. **10**. 631 (1990).
- 62) Shima, K., Nawashiro, H., Chigasaki, H. and Okuyama, S., The society for treatment of coma **4**. 17 (1994).
- 63) Arakawa, S., Nakamura, S., Kawashima, N., Nishiike, S. and Okuyama, S., Life Sci. **57**. 1803 (1995).
- 64) Plontikoff, N. D., Prange, A. J., Bresse, G. R. and Wilson, I. C., Life Sci. **14**. 1271 (1974).
- 65) Miyamoto, M. and Nagai, Y., Eur. J. Pharmacol. **44**. 143 (1977).
- 66) Marmarou, A., Montasser, A., Foda, A.-E, Van Den Brink, W., Campbell, J., Kita, H. and Demetriadou, K., J. Neurosurg. **80**. 291 (1994).
- 67) Hall, E. D., McCall, J. M., Chase, R. L., Yonkers, P. A. and Braughler, J. M., J. Pharm. Exp. Ther. **242**. 137 (1987).
- 68) Hall, E. D., J. Neurosurg. **62**. 882 (1985).
- 69) Shapira, Y., Yadid, G., Cotev, S., Niska, A. and Shohami, E., J. Neurotrauma **7**. 131 (1990).
- 70) Ushijima, I., Yamada, K. and Furukawa, T., Psychopharmacology (Berlin) **82**. 301 (1984).
- 71) Costall, B., Hui, S. G., Metcalf, G. and Naylor, R. J., Eur. J. Pharmacol. **53**. 143 (1979).
- 72) Denkin, M. S., Richerson, G. B. and Getting, P. A., Science **229**. 67 (1985).
- 73) Wei, E., Sigel, S., Loh, H. and Way, E. L., Nature **253**. 739 (1975).
- 74) Sano, K., Adv. Neurol. Sci. **23**. 184 (1979).
- 75) Hume, A. L. and Cant, B. R., Ann. Neurol. **10**. 411 (1981).

- 76) Shaw, N. A. and Cant, B. R., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. **62** (Pt.3). 361 (1984).
- 77) Hamm, R. J., Jenkinsl, W., Lyeth, B. G., White-Gbadebo, D. M. and Hayes, R. H., J. Neurosurg. **75**. 916 (1991).
- 78) Hamm, R. J., White-Gbadebo, D. M., Lyeth, B. G., Jenkins, L.W. and Hayes, R. L., Neurosurg. **31**. 1072 (1992).
- 79) Topp, K. S., Faddis, B. T. and Vijayan, V. K., Glia **2**. 201 (1989).
- 80) Dixon, C. E., Lyeth, B. G., Povlishock, J. T., Hamm, R. J., Marmarou, A., Young, H. F., and Hayes, R. L., J. Neurosurg. **67**. 110 (1987).
- 81) Okuyama, S., Imagawa, Y., Ogawa, S., Araki, H., Otomo, S., Sakagawa, T., Yamada. S., and Shima, K., Life Sci. **53**. PL273 (1993).
- 82) Faden, A. L., Demeduk, P., Panter, S. S. and Vink, R., Science **244**. 798 (1989).
- 83) Hayes, R. L., Jenkins, L. W., Lyeth, B. G., Balsterr, L., Robinson, S. E., Clifton, G. L., Stubbins, J. F. and Young, H.F., J. Neurotrauma **4**. 259 (1988).
- 84) Lyeth, B. G., Dixon, C. E., Jenkins, L. W., Hamm, R. L., Alberico, A., Young, H. F., Stonnington, H. H. and Hayes, R.L., Brain Res. **452**. 39 (1988).
- 85) Lyeth B. G., Ray, M., Hamm, R. J., Schnabel, J., Saady, J. J., Poklis, A., Jenkins, L. W., Gudeman, S. K. and Hayes, R. L., Brain Res. **569**. 281 (1992).
- 86) Lowry, O. H., Rosebrough, H. J., Farr, A. L. and Randall, R., J. Biol. Chem. **193**. 265 (1951).
- 87) Paxinos, G. and Watson, C., The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, Sydney (1982).
- 88) Jonsson, G, Hallman, H. and Sundstrom, E., Neurosci. **7**. 2895 (1982).
- 89) Ross, B. S., Br. J. Pharmacol. **58**. 521 (1976).
- 90) Svensson, T. H., Bunney, B. S. and Aghajanian, G. K., Brain Res. **92**. 291 (1975).
- 91) Boyajian, C., Loughlin, S. E. and Leslie, F.M., J. Pharmacol. Exp. Ther. **241**. 1079 (1977).
- 92) Harley, C. W., Prog. Neuro-Psych. Biol. Psychiatry **11**. 419 (1987).