

平成16年度厚生労働科学研究補助金

レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血液脳関門破綻に基づく医薬品副作用の予測系の確立
に関する研究

(H16-医薬-025)

研究報告書

研究代表者

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・薬理部)

研究班員

小泉修一 (国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・薬理部)

片岡泰文 (福岡大学薬学部・医療薬学)

楠原洋之 (東京大学大学院薬学系研究科・分子薬物動態学教室)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成16年4月__日

厚生労働大臣 尾辻 秀久 殿

住 所 〒227-0034横浜市青葉区桂台2-13-15

フリカ・ナ 材ノ ヤオ

研究者 氏 名 大野 泰雄

(所属機関 国立医薬品食品衛生研究所)



平成16年度厚生労働科学研究費補助金（医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）：安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究
(H16-医薬-025)

国庫補助金精算所要額：金 9,400,000円也（うち間接経費 円）

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙（別添1のとおり）
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次（別添2のとおり）
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書（別添3のとおり）
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書（別添4のとおり）
5. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添5のとおり）
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血液脳関門破綻に基づく医薬品副作用の予測系の確立に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

総括・分担研究者 大野 泰雄

平成17（2005）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
血液脳関門破綻に基づく医薬品副作用の予測系の確立に関する研究-----	1
大野泰雄	
II. 分担研究者報告	
1, 医薬品による中枢性副作用例に関する収集・解析-----	10
大野泰雄	
2, In Vitro BBBモデルを用いた各種薬物の作用評価及び副作用機序の解明 -----	14
小泉修一	
3, In vitro BBB病態モデル作成及びかKしゅ薬物の脳内移行性評価-----	21
片岡泰文	
4, 血液脳関門を介した異物排泄メカニズムにおける薬物間相互作用の 予測システムの開発 -----	25
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	28
IV.研究成果の刊行物・別刷 -----	31

「血液脳関門破綻に基づく医薬品副作用の予測系の確立」に関する研究

主任研究者 大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所、薬理部長）

研究要旨

血液脳関門（BBB）は、毛細血管内皮細胞、血管周皮細胞及びアストロサイトにより構築されている。BBB 機能維持には、周皮細胞とアストロサイトが重要な役割を果たしている。非ステロイド性抗炎症薬や免疫抑制剤など種々の医薬品が引き起こす中枢毒性や病態の悪化が、BBB の機能障害に起因している可能性が示唆されているが、両者の直接的な関連性は明らかにされていない。in vitro 血液脳関門再構成系(BBB 常態モデル)において、脳難移行性であるが中枢性有害作用を発現する免疫抑制薬 cyclosporin A (CsA)は脳血管内皮細胞由来 adrenomedullin (AM)産生阻害に基づく cAMP/protein kinase A (PKA) 経路の低下および周皮細胞由来 transforming growth factor (TGF- β)の産生阻害により BBB 機能を破綻させることが判明した。また、BBB 破綻等の細胞傷害時に ATP が細胞外に漏出し、血管周囲を取り巻く周皮細胞及びアストロサイトに作用し、種々のシグナルを伝える。今回、周皮細胞とアストロサイトが細胞外 ATP を介してコミュニケーションを取っていること、さらにアストロサイトが P2Y1 受容体を介して細胞外 ATP シグナルを受容し、酸化ストレスに対する抵抗性を獲得していることを明らかとした。また、BBB の異物排泄過程においてキーとなるトランスポーター遺伝子を同定するため、マウス in situ 脳灌流法を用いて野生型マウスと遺伝子欠損マウスで、脳移行性を比較解析した。BCRP 阻害剤 GF120918 処理により、DHEAS と mitoxantrone の脳内移行性は増加したが、脳毛細血管に発現している ABC トランスポーターである BCRP 欠損マウスと野生型マウスで脳内移行性に差は見られず、これらの薬物における BCRP を介した排出輸送の寄与率は小さいと思われた。一方、Mrp4 欠損マウスでは、DHEAS の脳内移行性は増加しており、Mrp4 が血液脳関門の関門機構として重要なトランスポーターであると思われた。

分担研究者

片岡泰文 福岡大学薬学部・教授
小泉修一 国立医薬品食品衛生研究所薬理部・室長
楠原 洋之 東京大学大学院薬学系研究科・講師

A. 研究目的

解熱鎮痛薬、免疫抑制剤等の薬物による脳炎、脳症、振戦、けいれんなどの重篤な中枢神経系の副作用が報告されている。これら薬剤は、BBB により脳内移行が制限されているにも関わらず、中枢性有害作用が発現することから医薬品の血液能関門(BBB)透過への影響が懸念される。また、病態時の BBB 機能変化は明らかになっておらず、各医薬品によるその機能への影響も不明である。そこで、

本研究は BBB 機能に注目し、薬物の中枢性有害作用発現予測システム及び中枢性副作用を回避するシステムを構築することを目的とした。

BBB 機能は、主に毛細血管内皮細胞に発現している各種トランスポーターとタイト結合 (tight junction) によって形成されているが、これらを取り巻く血管周皮細胞 (pericytes) 及びアストロサイトは、BBB 機能に強く影響すると共に、BBB としての機能も有する。

BBB 機能の破綻には、tight junction の障害による生理的な破綻と併用薬との薬物間相互作用による異物排泄メカニズムの機能低下による薬物動態学的な破綻の2つの可能性を考慮することが必要である。

そこで本研究では 1) BBB 機能障害が関係していると思われる中枢神経系副作用の調

査、2) BBB 構成細胞を *in vitro* で組み合わせ、常態時および病態時の *in vitro* BBB モデルを作製し、医薬品による BBB 機能に対する影響を検討し、中枢性有害作用との関連性を明らかにし医薬品の安全性確立を目指した。3) BBB 機能障害の分子メカニズムを、血管内皮細胞を取り巻く周皮細胞及びアストロサイトに注目して解析し、次年度の薬物評価の基礎検討を行うことを目的とした。更に、4) トランスポーターを介した BBB の異物排泄機構での薬物相互作用による BBB 機能の破綻に焦点をあて、異物排泄に働くトランスポーターを明らかにし、薬物間相互作用評価系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

B-1) BBB 機能障害が関係していると思われる中枢神経系副作用の調査

医薬品・医療用具等安全性情報（厚生労働省医薬局）及び、厚生労働省報道発表（医薬局安全対策課）資料より、中枢神経系副作用に関する情報を抽出し、BBB 機能障害との関連性を考察した。

B-2) 血液脳関門再構成系 *in vitro* BBB 常態モデルを用いた検討

マウス脳毛細血管内皮細胞株 (MBEC4) 単独培養系(monolayer)、MBEC4 と脳周皮細胞 (rat, human pericyte) の共培養系 (pericyte coculture) を作製した。このモデルあるいは MBEC4 培養プレートを使用し、BBB 透過性への影響を sodium fluorescein (Na-F) を用い、P-gp 排出機能評価は rhodamine 123 を用いて検討した。

B-3) BBB 機能障害の分子メカニズムの検討

ラット海馬からアストロサイト・周皮細胞の共培養系を構築した。また周皮細胞はヒト周皮細胞を購入し、パッセージ 2-5 の間で実験に用いた。細胞内カルシウム測定は fura2 法によるカルシウムイメージング法及び fluo4 を用いたレーザー共焦点法を用いた。周皮細胞は、anti-smooth muscle actin α で、アストロサイトは anti-GFAP 抗体を用いて同定した。DNA microarray を用いる検討では Affymetrix 社製 DNA microarray Gene Chip を用いた。結果として得られた画像イメージの解析には Microarray Suite Expression Analysis Software (version 5.0 ; Affymetrix 社製) を用いた。今回の実験ではアストロサイトに最終濃度 100 μ M に

なるように ATP を添加し、2 時間インキュベート (37 $^{\circ}$ C, 10 % CO₂/90 % O₂) した後 total RNA を回収した。各 target に対して 2 回ずつ Gene Chip による測定を行い、total RNA の調製は独立に 4 回行った。生細胞数の測定には MTT アッセイを応用した。

B-4) トランスポーターを介した BBB の異物排泄機構への影響の検討

マウス *in situ* 脳灌流法を用いて、脳移行性を測定した。脳毛細血管内皮細胞の管腔側に発現していることが明らかにされている 2 つの ABC トランスポーター、BCRP と MRP4 に焦点をあてた。BCRP 阻害剤である GF120918 (10mg/kg, iv) による効果を検討した。BCRP⁻、MRP4 欠損マウスを用いて、薬物の脳移行性を検討し、野生型マウスと比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験等倫理委員会の承認の元、動物実験を行った。

C. 研究結果

C-1) BBB 機能障害が関係していると思われる中枢神経系副作用の調査

中枢神経系用剤以外で中枢神経系副作用を起こすものにはシクロスポリンやタクロリムスのような免疫抑制剤による振戦、痙攣、頭痛、意識障害、脳症、幻覚、副腎皮質ホルモンによる多幸感、気分高揚、躁鬱、けいれん、脳症状、NSAID による頭痛めまい、錯乱、睡眠障害、フェニルプロパノールアミンやフェントラミンによる脳出血、クモ膜下出血、クラリスロマイシン(マクロライド系)のような抗生物質によるけいれん、振戦、および頭痛が知られている。

インフルエンザ脳症とNSAID

解熱鎮痛薬による中枢性副作用としてライ症候群 (Reye's Syndrome) が疑われている。これは 1963 年にオーストラリアの病理学者 Reye ら (Reye, Morgan and Baral) が原因不明の小児急性脳症として『Lancet』に報告したものであるが、1980 年に米国での疫学調査により、ライ症候群にサリチル酸製剤 (アスピリン等) の関与が指摘された。更に、1982 年米国保健省長官が『アスピリン系の解熱剤を水痘やインフルエンザに使用するとライ症候群になりやすい』との警告文を公表し、1982 年には米国小児科学会に『水

痘の小児及びインフルエンザが疑われる小児には、通常アスピリンを処方すべきでない』との勧告文が掲載された。

わが国では、1982年に厚生省調査『Reye症候群に関する調査研究』が開始され、1990年には『重篤な後遺症をもたらす原因不明の急性脳症と薬剤との関係に関する調査研究』がなされたが、ライ症候群とサリチル酸製剤の明確な関連性は立証できなかったが、1998年に厚生省は『サリチル酸製剤について、15歳未満の水痘、インフルエンザ患者に対する投与を原則禁忌』と通告し、1999年には厚生省科学研究『インフルエンザ脳炎・脳症の臨床疫学的研究班』（森島班）がサリチル酸製剤以外の非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）とインフルエンザ脳炎・脳症との関連性を研究。作用の強いNSAIDs（ジクロフェナク・メフェナム酸）使用症例で死亡率が高かったが、重症患者ほど強力なNSAIDsを使用したことに起因する可能性も否定できないと報告した。2000年の森島班の継続研究で、ジクロフェナク使用群は他のNSAIDs使用群より高い有意性をもって死亡率が高いことが示された。また脳の病理学的検査により、脳血管に損傷が生じていることが特徴的に見出された。そこで、厚生省は『（明確な因果関係は認められないものの）インフルエンザ脳炎・脳症患者に対するジクロフェナクの投与を禁忌』と通告した。また、2001年には医薬品等安全対策部会は『小児のインフルエンザに伴う発熱に対し、メフェナム酸製剤の投与は基本的には行わないこと』との合意事項を発表した。

インフルエンザ脳症の発症機構は不明だが以下の可能性が示唆されている。

- 1) インフルエンザウイルスが、ウイルス血症を介して、中枢神経系に進入して、脳症を起こす。
- 2) インフルエンザウイルスが、ウイルス血症を介して、血管内皮細胞に感染し、サイトカインが産生され、脳血管を障害し、脳症となる。
- 3) インフルエンザの全身症状（高熱、頭痛、四肢痛、倦怠感）は、呼吸器細胞や白血球、リンパ球から産生されるサイトカインによって生じると言われている。インフルエンザウイルス感染により、サイトカインが異常に強く産生され脳症を起こす。
- 4) ジクロフェナクは血管内皮の修復に関与する酵素を抑制する作用が強い。NSAIDsが脳症誘発・重症化に関与する機序の一つか？

なお、インフルエンザに感染した子どもの一部に起きるインフルエンザ脳症の中に、意識障害などの神経症状が出る前に子どもが突然死したケースが2002-03年の冬に大阪府で6例あった（2005年2月24日新聞報道、厚生労働省研究班の調査より）。

インフルエンザ脳症とリン酸オセルタミビル

抗ウイルス剤であるリン酸オセルタミビルは小児を含む14人（10歳未満の小児が5人、10歳代が5人、成人が4人）が幻覚や意識障害などの症状（発現頻度：不明、稀）が報告されている。重症例としては、小学校高学年の男児がインフルエンザウイルス感染症において、体温39℃で服用2日目で嘔吐、そのまま3分ほど意識状態が悪化した。意識回復後に便失禁したが、中止2日後には症状が回復した。また、大阪府内で1-8歳の子ども6人がインフルエンザ発症後すぐに、寝ている間に突然死した。子どもには事前に脳症をうかがわせるような異常はなく、うち3人は脳が腫れていた。90年代半ばごろにも同様の死亡例が府内であった。6人のうち4人は抗ウイルス薬リン酸オセルタミビル（タミフル）を飲んでしたが、タミフルの発売前にも症例があり、タミフルが原因ではない可能性が高い（研究班メンバーの塩見正司大阪市立総合医療センター小児救急科部長）。

幼弱ラットを用いた前臨床試験では7日齢ラットにオセルタミビルを単回投与したところ、異常に高い脳内薬物濃度（成熟ラットの1,500倍）が観察され、これに起因すると考えられる死亡が認められた。この様な高い曝露は、幼弱ラットBBBの発達が未熟であることに関連している可能性が高い。ヒト乳児に対するこれら前臨床データの臨床的意義は不明であるが、BBB関門が未熟である1歳未満の乳児にはオセルタミビルの投与は推奨できない（医薬品安全情報）。BBB機能が低下している病態時での投与にも注意する必要があると思われた。

アマンタジン

パーキンソン症候群治療薬である塩酸アマンタジンにも精神症状（幻覚、妄想、せん妄、錯乱等）（発現頻度不明）痙攣、意識障害（昏睡を含む）などの中枢性副作用が報告されている。今のところ、BBB及び脳血管系への作用との因果関係は不明である。

フェニルプロパノールアミン

フェニルプロパノールアミンは鼻水、鼻づまりの症状緩和に使用されているが、2000年に米国での大規模な疫学調査により、女性が食欲抑制剤として用いた場合に、その服用と出血性脳卒中の関連性が有意に高い結果が得られた。米国食品医薬品局は、PPAを含む医薬品の自主的販売中止を要請した。これを受けて、同年、厚労省は心臓病の人及び脳出血の既往がある人等は使用しないように注意喚起し、適正使用を徹底させた。この措置の後、一般医薬品で5例、医療用医薬品で2例の脳出血等の副作用報告がなされた。これらは適切な用量・用法の範囲を超えたことに起因していると考えられた。しかし、厚労省は関係企業、関連団体に、PPAを含む医薬品からブソドエフェドリン (PES) を含有する医薬品に可及的速やかに切り替えを行うように指示した。

PPAの中枢性副作用は脳出血、悪心、頭痛で発現頻度は少ない。副作用症例としては、女性(20代)が鼻炎症状のためPPA服用(通常の3倍量服用)したところ、服用30分後に、頭痛、意識障害を起し、血圧が通常の100/mmHg程度から160mm/Hg程度へと上昇した。CTによる出血は確認されず、中止1日後、痙攣発作を起し、MRI検査によりくも膜下出血が確認され、中止26日後に退院した。

なお、本薬の副作用とBBB及び脳血管系への作用との因果関係は不明である。

抗生物質

マクロライド系抗生物質であるクラリスロマイシンは主としてグラム陽性菌、マイコプラズマ等感染症に使用されているが、希に、中枢性副作用として間代性痙攣が現れる。症例としては、上気道炎のため服用した60代男性が服用8日目で間代性痙攣(両肩を上下させる運動、回/0.2~0.3秒)を起した。患者は10ヶ月前にもマクロライド系抗生物質で同様の間代性痙攣を起していた。なお、投与中止後2~5日後に症状が回復した。

なお、本薬の副作用とBBB及び脳血管系への作用との因果関係は不明である。

ケトライド系抗生物質であるテリスロマイシンは主としてグラム陽性菌、マイコプラズマ等感染症に使用されている。特に他の抗生物質が効きにくい耐性肺炎球菌にも効果とされている。希に中枢性副作用として意識消失(2004.12.28現在、累計15例)が現れる。

副作用症例としては、歯根膜感染のためジ

クロフェナクと併用で服用した50代男性が服用約3時間後、車運転中に意識消失した。突発性で前駆症状は無かった。

また、急性咽喉頭炎のために服用した70代男性(アレルギー体質有り)に投与4時間後、意識消失発作が現れた。同日の内に回復したが、次の日、本剤服用約4時間後、再度意識消失した。頭部精査するも異常はなし。同日回復した。

なお、本薬の副作用とBBB及び脳血管系への作用との因果関係は不明である。

C-1)血液脳関門再構成系 in vitro BBB 常態モデルを用いた検討

BBB 構成細胞である脳毛細血管内皮細胞、アストロサイト、周皮細胞の共培養系において、経内皮電気抵抗の上昇および tight junction 構成蛋白質(occludin, claudin-5, ZO-1)の発現量の増加を確認した。Monolayer において AM は MBEC4 透過性および R123 蓄積量を減少させた。このとき cAMP 産生量は増加した。これら作用は adrenomedullin (AM) アンタゴニストおよび PKA 阻害剤(H89)により抑制された。Pericyte coculture では monolayer と比較し、MBEC4 透過性および R123 蓄積量は減少した。この減少は transformng growth factor- β 1 (TGF- β 1)抗体および TGF- β 1 受容体阻害剤処理により monolayer と同程度まで上昇した。一方、CsA は MBEC4 透過性および R123 蓄積量を増大した。この増大は pericyte couclture において著明であった。このとき MBEC4 産生 AM、cAMP および周皮細胞産生 TGF- β は減少した。また H89 と CsA の併用により MBEC4 透過性は上昇した。

C-2) BBB 機能障害の分子メカニズムの検討

免疫組織化学的検討により、アストロサイトを GFAP 抗体で、血管内皮細胞を RECA-1 で染色することにより、内皮細胞が周皮細胞、さらにアストロサイトで囲まれていることが示された。我々は以前、アストロサイト間の情報連絡に細胞外 ATP が重要であることを報告したが(Koizumi et al., PNAS, 2003)、ATP 依存的な Ca^{2+} wave はアストロサイトから周皮細胞に、さらに周皮細胞からアストロサイトへ伝達されることが明らかとなり、BBB を形成するアストロサイト及び周皮細胞が、細胞外 ATP を使ってコミュニケーションを取っていることが明らかとな

った。

次いで、アストロサイトが ATP 刺激に曝された際に、どのような分子がアストロサイトで誘導されるのかについて、DNA チップを用いた網羅的解析を行った。ATP 処置後、種々の遺伝子群が変動したが、特に酸化還元応答に関連した遺伝子、carbonyl reductase、SOD 様分子及び thioredoxin reductase の mRNA レベルが上昇した。これらの上昇は定量的 RT-PCR を用いた解析でも確認できた。種々の生理的条件下、また病体時に ATP が放出されることはよく知られているが、この細胞外 ATP は、血管壁を取り囲むアストロサイトの endfeet に作用し、アストロサイトを酸化ストレス保護するように働く、との仮説を立て、過酸化水素 (H_2O_2) による細胞障害に対する ATP の作用を検討したところ、 H_2O_2/H_2O_2 は、処置時間依存的に、また濃度依存的に、アストロサイトの cell viability を減少させた。一方、 H_2O_2 刺激 24 時間前に処置した ATP はアストロサイトの H_2O_2 による細胞死を顕著に抑制した。ATP は 1 μM の低濃度から保護作用を示し、1000 μM まで濃度依存的な作用を示した。ATP は、刺激後 12 時間未満までは顕著な保護作用を示さないが、12 時間以降、 H_2O_2 による細胞障害を強く抑制し、control の 60 %程度まで cell viability を回復させた。また、ATP の作用は蛋白質合成阻害剤である cycloheximide(CHX, 1 μM)の同時投与によって強く抑制された。このことから ATP によって誘導される保護効果には機能的な蛋白質の発現が関与していると考えられた。ATP 単独では今回の実験条件では細胞数に影響は与えなかった。また、cycloheximide 単独による細胞数の減少及び H_2O_2 誘導性細胞死への影響は無かった。

アストロサイトでは $P2Y_1$ 受容体が発現、機能している事が報告されているため (Koizumi et al. 2003)、 $P2Y_1$ 受容体選択的アゴニスト及びアンタゴニストの作用について調べた。選択的 $P2Y_1$ 受容体アゴニストである ADP βS 及び 2MeSADP(各 1 μM)は ATP と同じく H_2O_2 誘導性細胞死からアストロサイトを強く保護した。更に、 $P2Y_1$ 受容体選択的アンタゴニストである MRS2179 によって ATP の保護作用は濃度依存的に抑制された。このことから ATP の保護作用は主に $P2Y_1$ 受容体を介した経路で発揮されている事が明らかとなった。

ATP によって発現誘導されたこれらの遺伝

子が、実際に H_2O_2 に対する保護作用に関係するかどうかを確認した。ATP (100 μM)及び 2MeSADP (1 μM)処置(24 hr)によって誘導される H_2O_2 に対する保護作用は、TrxR 選択的阻害剤である auranofin によって濃度依存的 (0.1-2 μM)に抑制された。

C-3) トランスポータを介した BBB の異物排泄機構への影響の検討

GF120918 処理群では、dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)、ならびに抗癌剤 mitoxantrone の脳内移行性 (CL_{uplake})は増加した。しかし、BCRP 欠損マウスにおいても、この GF120918 処理による効果は観察された。更に、BCRP 欠損マウスと野生型マウスで、脳内移行性を比較した場合に、BCRP 欠損による脳内移行性の増加は観察されなかった。mitoxantrone については、P-glycoprotein 欠損マウスにおいて、脳内濃度が増加していることから、GF120918 の効果は一部 P-gp の阻害であることが示唆されている。

Mrp4 欠損マウスを用いて同様の実験をおこなったところ、Mrp4 欠損マウスでは、DHEAS の脳内移行性が野生型マウスに比べて 1.6 倍に増加した。しかし、GF120918 の効果は、依然として Mrp4 欠損マウスにおいても観察された。

D. 考察

BBB は、脳毛細血管内皮細胞、周皮細胞及びアストロサイトの 3 種類の細胞が互いに協調することで機能を維持する。血液脳関門再構成系 in vitro BBB 常態モデルを用いた検討により、三者の協調維持機構に、脳毛細血管内皮細胞産生 AM および周皮細胞産生 TGF- β が促進的に関与していることが判った。また、CsA は脳血管内皮細胞由来 AM 産生の低下に伴う cAMP/PKA 経路の阻害および直接的な cAMP/PKA 経路の阻害によって BBB 機能を低下させ CsA の脳内への侵入を許す。脳内に侵入した CsA は周皮細胞の TGF- β 産生を阻害し、さらに BBB 機能を破壊させると考える。

今後、病態下における CsA の脳移行機序について in vitro BBB 病態モデルを作製し検討していく必要がある。

周皮細胞とアストロサイトが ATP を介してコミュニケーションをとっていることが明らかとなった。アストロサイト及び周皮細胞は、血管の収縮・弛緩等、機械刺激に頻繁に

曝されているが、これら機械刺激は両細胞からの ATP 放出を誘発する。また、細胞内には約 5 mM 以上と計算されている濃度の ATP が存在しており、障害時、例えば BBB が破綻した等の細胞傷害時には、漏出し、周皮細胞及びアストロサイトはこれら細胞外 ATP に曝されることになる。従って、血管を取り巻く細胞は、生理的にも、病体生理時にも ATP に曝される機会が多いと考えられる。特に、BBB 破綻時には、血液成分中の高濃度の ATP も漏出して来る可能性が高い。このような細胞外 ATP の情報を、アストロサイトは P2Y1 受容体を介し受容し、また周皮細胞は主に P2X 受容体を介して受容し（結果未発表）、様々な応答を呈する。今回、このうちアストロサイトは、細胞外 ATP/P2Y1 受容体を介し、種々の酸化ストレスに抵抗性を示す分子種の発現を亢進させることが明らかとなった。また、実際 ATP 曝露により、アストロサイトは酸化ストレスに抵抗性を示すようになり、この抵抗性の獲得は thioredoxin reductase 阻害剤により消失した。

アストロサイトは血管壁を取り巻く BBB の最外層に位置し、周皮細胞と積極的にコミュニケーションをとり、BBB の機能維持に役立っている。このアストロサイトの機能を支える、ATP/P2Y1 受容体の動態、さらにこの刺激により惹起される酸化ストレス軽減因子の動態は、BBB 機能に強く影響するものと考えられる。今後、*in vitro* 及び *in vivo* BBB モデルを用いた検討により、ATP、P2Y1 受容体、さらにこれら刺激により誘発される遺伝子群の動態と BBB 機能の関連性を明らかとすることが重要である。

DHEAS と mitoxantrone は BCRP の基質になるものの、BCRP 欠損マウスでは脳内移行性に差がみられないことから、少なくともこの 2 化合物については、血液脳関門において BCRP による排出の寄与率は小さいことが示唆された。mitoxantrone については、一部 P-gp により説明されることが明らかになった。Mrp4 を欠損した場合には、DHEAS の脳内移行性が増加していることから、Mrp4 が血液脳関門において異物排泄に関与していることが示唆された。Mrp4 がどのような薬物について脳内からの排出に関与するのか、更なる解析が必要である。

E. 結論

今回作製した血液脳関門再構成系 *in vitro*

BBB 常態モデルは *in vivo* に外挿しうるモデルであり、医薬品の脳移行性および BBB 機能への影響を簡便に評価でき、中枢性有害作用の予測に有用である。

周皮細胞とアストロサイトが、ATP を介してコミュニケーションを取っていることが明らかとなった。また、アストロサイトは ATP/P2Y1 受容体を介するシグナルにより、酸化ストレスに対する抵抗性を獲得していた。ATP は BBB 障害時に放出されると考えられており、アストロサイトは ATP に曝される機会が多い。ATP/P2Y1 受容体を介するアストロサイトの応答性が実際の BBB 機能とどのようにリンクしているか、また、この P2Y1 受容体及びこの受容体シグナルにより誘導される酸化ストレスを軽減遺伝子群が、BBB 機能にどのように影響しうるかを明らかにする必要がある。

DHEAS と mitoxantrone については、BBB において BCRP が主要な排出トランスポーターではないことが示唆された。一方、DHEAS については Mrp4 によるくみ出しが示唆された。GF120918 による脳内移行性の増加については、BCRP・MRP4 以外のトランスポーターの阻害によることが示唆された。BCRP と MRP4 欠損マウスとの比較を行い、更に関門における排出トランスポーターとしての重要性を明らかにすることが必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

- 1) Dohgu S, Takata F, Yamauchi A, Nakagawa S, Egawa T, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Niwa M, Kataoka Y: Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor- α production. *Brain Res.*, 1038: 208-215, 2005
- 2) Satoh K, Shirabe S, Eguchi K, Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M, Nishida N, Katamine S: Toxicity of quinacrine can be reduced by co-administration of P-glycoprotein inhibitor in sporadic Creutzfeldt-

- Jakob disease. *Cell Mol Neurobiol.*, 24: 873-875, 2004
- 3) Yamauchi A, Dohgu S, Shuto H, Oishi R, Kataoka Y. *Cell. Mol. Neurobiol.* Tacrolimus-induced neurotoxicity and nephrotoxicity is ameliorated by the administration in the dark period in rats. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 24: 695-704, 2004
 - 4) Dohgu S, Yamauchi A, Nakagawa S, Takata F, Kai M, Egawa T, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Niwa M, Kataoka Y: Nitric oxide mediates cyclosporine-induced impairment of the blood-brain barrier in coculture of mouse brain endothelial cells and rat astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 505: 51-59, 2004
 - 5) Dohgu S, Yamauchi A, Takata F, Naito M, Tsuruo T, Higuchi S, Sawada Y, Kataoka Y: Transforming growth factor- β 1 supports maintenance of the blood-brain barrier function. *Cell. Mol. Neurobiol.* 24: 491-497, 2004
 - 6) Dohgu S, Yamauchi A, Takata F, Sawada Y, Higuchi S, Naito M, Tsuruo T, Shirabe S, Niwa M, Kataoka Y: Uptake and efflux of quinacrine, a candidate for the treatment of prion diseases, at the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Neurobiol.* 24: 205-217, 2004
 - 7) Nakajima M, Yamada T, Kusuhara T, Furukawa H, Takahashi M, Yamauchi A, Kataoka Y: Results of Quinacrine Administration to Patients with Creutzfeldt-Jakob Disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 17: 158-163, 2004
 - 8) Tsuda, M., Mizokoshi, A., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, Kohsaka, S. and Inoue, K. (2004). Activation of p38MAPK in spinal hyperactive microglia contributes to neuropathic pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia*, 89, 89-95.
 - 9) Inoue, K., Tsuda, M. and Koizumi, S. (2004) ATP- and Adenosine-Mediated Signaling in the Central Nervous System: Chronic Pain and Microglia: Involvement of the ATP Receptor P2X(4). *J. Pharmacol. Sci.*, 94, 112-114.
 - 10) Koizumi, S., Fujishita, K., Inoue, K., Shigemoto-Mogami, Y., Tsuda, M. and Inoue, K. (2004) Ca^{2+} waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons; involvement of extracellular ATP and activation of P2Y2 receptors. *Biochem., J.*, 380, 329-338.
 - 11) Shinozaki, Y., Koizumi, S., Ishida, S., Sawada, J., Ohno, Y., and Inoue, K. Cytoprotection against oxidative-stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors. (2005) *Glia*, 49, 288-300.
 - 12) Nasu-tada, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2005) The involvement of β 1 integrin in P2Y12/13 receptor-mediated chemotaxis of microglia and its regulation of microglial proliferation that is inhibited by ADP. *Glia*, in press
 - 13) Lee YJ, Kusuhara H, Jonker JW, Schinkel AH, Sugiyama Y.: Investigation of efflux transport of dehydroepiandrosterone sulfate and mitoxantrone at the mouse blood-brain barrier: a minor role of breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther.* 312 :44-52, 2005
 - 14) Tohyama K, Kusuhara H, Sugiyama Y.: Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier. *Endocrinology.* 145 :4384-91, 2004.
 - 15) Kusuhara H, Sugiyama Y. Efflux transport systems for organic anions and cations at the blood-CSF barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 56 :1741-63, 2004
 - 16) 植原洋之、竹内 健二、杉山 雄一 肝シヌソイド側における異物排泄トランスポーター(MRP4)の機能解析 薬理と治療
- 2.学会発表
- 1) Dohgu S, Takata F, Nakagawa S,

- Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M.: The brain pericytes contribute to the up-regulation of the blood-brain barrier functions through transforming growth factor- β (TGF- β) production. Potsdam, Germany, Sep., 2004
- 2) Koizumi, S., Miyatake, M., Tsuda, M. and Inoue, K. Tonic regulation of signaling cascades by spontaneously released ATP in astrocytes, Purines2004, 6-9 June, 2004, Chapel Hill, U.S.A.
 - 3) Fujishita, K., Koizumi, S., Inoue, K. Skin-to-sensory neuron communication mediated by ATP and activation of P2Y2 receptors in NHEKs, Purines2004, 6-9 June, 2004, Chapel Hill, U.S.A.
 - 4) Shinozaki, Y., Koizumi, S. and Inoue, K. Cytoprotective action against oxidative stress by ATP/P2Y1 receptors-mediated pathways in astrocytes. Purines2004, 6-9 June, 2004, Chapel Hill, U.S.A.
 - 5) 小泉修一, 藤下加代子, 井上和秀: ATPによる血管周皮細胞周皮細胞第10回アストロサイト連関, ATP・アデノシン研究会, 2004年8月26-27日, 岡崎
 - 6) 多田 薫, 小泉修一, 井上和秀, β 1インテグリンを介するミクログリアの増殖・ケモタキシスとP2Y12受容体, 第10回ATP・アデノシン研究会, 8月26-27日, 岡崎
 - 7) 篠崎陽一, 小泉修一, 井上和秀: ATPによるアストロサイトの酸化ストレスからの細胞保護作用: 第10回ATP・アデノシン研究会, 2004年8月26-27日, 岡崎
 - 8) 藤下加代子, 小泉修一, 井上和秀: レチノイン酸による皮膚 P2Y2 受容体の発現制御: 第10回ATP・アデノシン研究会, 2004年8月26-27日, 岡崎
 - 9) 重本一最上由香里, 小泉修一, 多田薫, 津田誠, 井上和秀: P2Y6受容体活性化によるミクログリア細胞のファゾサイトーシス脳増大: 第10回ATP・アデノシン研究会, 2004年8月26-27日, 岡崎
 - 10) 國房恵巳子, 多田薫, 小泉修一, 津田誠, 井上和秀: 細胞外マトリックスとミクログリアのP2受容体, 第10回ATP・アデノシン研究会, 2004年8月26-27日, 岡崎
 - 11) 津田誠, 國房恵巳子, 小泉修一, 井上和秀: 神経因性疼痛モデルにおけるグリア細胞の活性化様式, 第10回ATP・アデノシン研究会, 2004年8月26-27日, 岡崎
 - 12) Koizumi, S., Fujishita, K., Inoue, K., Shigemoto-Mogami, Y., Tsuda, M. and Inoue, K. Ca^{2+} waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons; involvement of extracellular ATP and activation of P2Y2 receptors, Neuro2004, 2004年, 9月21-23日, 大阪
 - 13) Koizumi, S., Fujishita, K., Inoue, K., Shigemoto-Mogami, Y., Tsuda, M. and Inoue, K.: Ca^{2+} waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons; involvement of extracellular ATP and activation of P2Y2 receptors, Society for Neurosciences, 23-28, Oct., 2004, San Diego, U.S.A.
 - 14) 篠崎陽一, 小泉修一, 井上和秀: ATPによるアストロサイトの酸化ストレス抵抗性の獲得, グリア研究会, 2004年11月20日, 福岡
 - 15) 戸崎秀俊, 小泉修一, 井上和秀: 核内受容体の介した初代培養ミクログリアのP2X4受容体発現増強: 第29回クロマフィン研究会, 2004年11月27-28日, 軽井沢
 - 16) 藤下加代子, 小泉修一, 井上和秀: レチノイン酸による皮膚P2受容体の発現制御, 第29回クロマフィン研究会, 2004年11月27-28日, 軽井沢
 - 17) 小泉修一, 篠崎陽一, 井上和秀: アストロサイトはP2Y1受容体を介して酸化ストレス耐性を獲得する: 第29回クロマフィン研究会, 2004年11月27-28日, 軽井沢
 - 18) Koizumi, S., Fujishita, K. and Inoue, K. P2Y1 receptor-mediated Ca^{2+} wave propagation in the hippocampus. 第78回日本薬理学会, 2005年3月22-24日, 横浜
 - 19) Fujishita, F., Koizumi, S. and Inoue, K. Pericyte-to-astrocyte communication via extracellular ATP. 第78回日本薬理学会, 2005年3月22-24日, 横浜
 - 20) Shinozaki, S., Koizumi, S. and

- Inoue, K. Mechanisms underlying protection of oxidative-stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y₁ receptors. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
- 21) Tozaki, H., Koizumi, S., Sato, Y., Tsuda, M. and Inoue, K. Retinoic acid upregulates P2X4 receptor expression in microglia. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
- 22) Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Tada, K., Tsuda, M. and Inoue, K. The physiological function of P2Y6 receptor in rat microglial cells. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
- 23) Tada-Nasu, K., Koizumi, S. and Inoue, K. The involvement of β1 integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin : P2Y_{12/13} receptor has opposite roles. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
- 24) Kunifusa, E., Tsuda, M., Hasegawa, S., Tada-Nasu, K., Koizumi, S. and Inoue, K. Up-regulation by fibronectin of P2X4 receptors in microglia. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む。)
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

血液脳関門破綻に基づく医薬品副作用の予測系の確立に関する研究
（医薬品による中枢性副作用例に関する収集・解析）

分担研究者 大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所、薬理部長）

研究要旨

血液脳関門（BBB）は、毛細血管内皮細胞、血管周皮細胞及びアストロサイトにより構築されている。BBB 機能維持には、周皮細胞とアストロサイトが重要な役割を果たしている。インフルエンザ脳症と非ステロイド性抗炎症薬との関係や免疫抑制剤や抗生物質など種々の医薬品が引き起こす中枢毒性や病態の悪化が、BBB の機能障害に起因している可能性が示唆されているが、両者の直接的な関連性は明らかにされていない。

A. 研究目的

解熱鎮痛薬、免疫抑制剤等の薬物による脳炎、脳症、振戦、けいれんなどの重篤な中枢神経系の副作用が報告されている。これら薬剤は、BBB により脳内移行が制限されているにも関わらず、中枢性有害作用が発現することから医薬品の血液脳関門（BBB）透過への影響が懸念される。また、病態時の BBB 機能変化は明らかになっておらず、各医薬品によるその機能への影響も不明である。そこで、本研究は BBB 機能に注目し、薬物の中枢性有害作用発現予測システム及び中枢性副作用を回避するシステムを構築することを目的とした。

BBB 機能は、主に毛細血管内皮細胞に発現している各種トランスポーターとタイト結合（tight junction）によって形成されているが、これらを取り巻く血管周皮細胞（pericytes）及びアストロサイトは、BBB 機能に強く影響すると共に、BBB としての機能も有する。

BBB 機能の破綻には、tight junction の障害による生理的な破綻と併用薬との薬物間相互作用による異物排泄メカニズムの機能低下による薬物動態学的な破綻の 2 つの可能性を考慮することが必要である。

そこで本研究では 1) BBB 機能障害が関係していると思われる中枢神経系副作用の調査、2) BBB 構成細胞を *in vitro* で組み合わせ、常態時および病態時の *in vitro* BBB モデルを作製し、医薬品による BBB 機能に対する影響を検討し、中枢性有害作用との関連性を明らかにし医薬品の安全性確立を目指した。3) BBB 機能障害の分子メカニズム

を、血管内皮細胞を取り巻く周皮細胞及びアストロサイトに注目して解析し、次年度の薬物評価の為の基礎検討を行うことを目的とした。更に、4) トランスポーターを介した BBB の異物排泄機構での薬物相互作用による BBB 機能の破綻に焦点をあて、異物排泄に働くトランスポーターを明らかにし、薬物間相互作用評価系を確立することを目的とし、分担研究者は 1) の BBB 機能障害が関係していると思われる中枢神経系副作用の調査を担当した。

B. 研究方法

医薬品・医療用具等安全性情報（厚生労働省医薬局）及び、厚生労働省報道発表（医薬局安全対策課）資料より、中枢神経系副作用に関する情報を抽出し、BBB 機能障害との関連性を考察した。

（倫理面への配慮）

全て、公表されているデータを使用した。また、個人を特定する情報は扱っていない。

C. 研究結果

中枢神経系用剤以外で中枢神経系副作用を起こすものにはシクロスポリンやタクロリムスのような免疫抑制剤による振戦、痙攣、頭痛、意識障害、脳症、幻覚、副腎皮質ホルモンによる多幸感、気分高揚、躁鬱、けいれん、脳症状、NSAID による頭痛めまい、錯乱、睡眠障害、フェニルプロパノールアミンやフェントラミンによる脳出血、クモ膜下出血、クラリスロマイシン（マクロライド系）のような抗生物質によるけいれん、振戦、頭痛がし

られている。以下に、今回調査した結果を示す。

インフルエンザ脳症とNSAID

解熱鎮痛薬による中枢性副作用としてライ症候群 (Reye's Syndrome) が疑われている。これは1963年にオーストラリアの病理学者Reyeら (Reye, Morgan and Baral) が原因不明の小児急性脳症として『Lancet』に報告したものであるが、1980年に米国での疫学調査により、ライ症候群にサリチル酸製剤 (アスピリン等) の関与が指摘された。更に、1982年米国保健省長官が『アスピリン系の解熱剤を水痘やインフルエンザに使用するとライ症候群になりやすい』との警告文を公表し、1982年には米国小児科学会に『水痘の小児及びインフルエンザが疑われる小児には、通常アスピリンを処方すべきでない』との勧告文が掲載された。

わが国では、1982年に厚生省調査『Reye症候群に関する調査研究』が開始され、1990年には『重篤な後遺症をもたらす原因不明の急性脳症と薬剤との関係に関する調査研究』がなされたが、ライ症候群とサリチル酸製剤の明確な関連性は立証できなかったが、1998年に厚生省は『サリチル酸製剤について、15歳未満の水痘、インフルエンザ患者に対する投与を原則禁忌』と通告し、1999年には厚生省科学研究『インフルエンザ脳炎・脳症の臨床疫学的研究班』 (森島班) がサリチル酸製剤以外の非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) とインフルエンザ脳炎・脳症との関連性を研究。作用の強いNSAIDs (ジクロフェナク・メフェナム酸) 使用症例で死亡率が高かったが、重症患者ほど強力なNSAIDsを使用したことに起因する可能性も否定できないと報告した。2000年の森島班の継続研究で、ジクロフェナク使用群は他のNSAIDs使用群より高い有意性をもって死亡率が高いことが示された。また脳の病理学的検査により、脳血管に損傷が生じていることが特徴的に見出された。そこで、厚労省は『(明確な因果関係は認められないものの) インフルエンザ脳炎・脳症患者に対するジクロフェナクの投与を禁忌』と通告した。また、2001年には医薬品等安全対策部会は『小児のインフルエンザに伴う発熱に対し、メフェナム酸製剤の投与は基本的には行わないこと』との合意事項を発表した。

インフルエンザ脳症の発症機構は不明だが以下の可能性が示唆されている。

1) インフルエンザウイルスが、ウイルス血症を介して、中枢神経系に進入して、脳症を起こす。

2) インフルエンザウイルスが、ウイルス血症を介して、血管内皮細胞に感染し、サイトカインが産生され、脳血管を障害し、脳症となる。

3) インフルエンザの全身症状 (高熱、頭痛、四肢痛、倦怠感) は、呼吸器細胞や白血球、リンパ球から産生されるサイトカインによって生じると言われている。インフルエンザウイルス感染により、サイトカインが異常に強く産生され脳症を起こす。

4) ジクロフェナクは血管内皮の修復に関与する酵素を抑制する作用が強い。NSAIDsが脳症誘発・重症化に関与する機序の一つか？

抗ウイルス剤であるリン酸オセルタミビルは小児を含む14人 (10歳未満の小児が5人、10歳代が5人、成人が4人) が幻覚や意識障害などの症状 (発現頻度: 不明、稀) が報告されている。重症例としては、小学校高学年の男児がインフルエンザウイルス感染症において、体温39℃で服用2日目で嘔吐、そのまま3分間ほど意識状態が悪化した。意識回復後に便失禁したが、中止2日後には症状が回復した。

なお、インフルエンザに感染した子どもの一部に起きるインフルエンザ脳症の中に、意識障害などの神経症状が出る前に子どもが突然死したケースが2002-03年の冬に大阪府で6例あった (2005年2月24日新聞報道、厚生労働省研究班の調査より)。

インフルエンザ脳症とリン酸オセルタミビル

大阪府内で1-8歳の子どもの6人がインフルエンザ発症後すぐに、寝ている間に突然死した。子どもには事前に脳症をうかがわせるような異常はなく、うち3人を解剖すると脳が腫れていた。90年代半ばごろにも同様の死亡例が府内であったという。6人のうち4人は抗ウイルス薬リン酸オセルタミビル (タミフル) を飲んでしたが、タミフルの発売前にも症例があり、タミフルが原因ではない可能性が高い (研究班メンバーの塩見正司大阪府立総合医療センター小児救急科部長)。

幼弱ラットを用いた前臨床試験では7日齢ラットにオセルタミビルを単回投与したところ、異常に高い脳内薬物濃度 (成熟ラットの1,500倍) が観察され、これに起因すると考えられる死亡が認められた。この様な高い曝露は、幼弱ラットBBBの発達未熟であるこ

とに関連している可能性が高い。ヒト乳児に対するこれら前臨床データの臨床的意義は不明であるが、BBB関門が未熟である1歳未満の乳児にはオセルタミビルとの投与は推奨できない（医薬品安全情報）。BBB機能が低下している病態時での投与にも注意する必要か？

アマンタジン

パーキンソン症候群治療薬である塩酸アマンタジンにも精神症状（幻覚、妄想、せん妄、錯乱等）（発現頻度不明）痙攣、意識障害（昏睡を含む）などの中樞性副作用が報告されている。今のところ、BBB及び脳血管系への作用との因果関係は不明である。

フェニルプロパノールアミン

フェニルプロパノールアミンは鼻水、鼻づまりの症状緩和に使用されているが、2000年に米国での大規模な疫学調査により、女性が食欲抑制剤として用いた場合に、その服用と出血性脳卒中の関連性が有意に高い結果が得られた。米国食品医薬品局は、PPAを含む医薬品の自主的販売中止を要請した。これを受けて、同年、厚労省は心臓病の人及び脳出血の既往がある人等は使用しないように注意喚起し、適正使用を徹底させた。この措置の後、一般医薬品で5例、医療用医薬品で2例の脳出血等の副作用報告がなされた。これらは適切な用量・用法の範囲を超えたことに起因していると考えられた。しかし、厚労省は関係企業、関連団体に、PPAを含む医薬品からプソイドエフェドリン（PES）を含有する医薬品に可及的速やかに切り替えを行うように指示した。

PPAの中樞性副作用は脳出血、悪心、頭痛で発現頻度は少ない。副作用症例としては、女性（20代）が鼻炎症状のためPPA服用（通常の3倍量服用）したところ、服用30分後に、頭痛、意識障害を起こし、血圧が通常の100/mmHg～160mm/Hg～と上昇した。CTによる出血は確認されず、中止1日後、痙攣発作を起こし、MRI検査によりくも膜下出血が確認され、中止26日後に退院した。

なお、本薬の副作用とBBB及び脳血管系への作用との因果関係は不明である。

抗生物質

マクロライド系抗生物質であるクラリスロマイシンは主としてグラム陽性菌、マイコプラズマ等感染症に使用されているが、希に、中樞性副作用として間代性痙攣が現れる。

症例としては、上気道炎のため服用した60代男性が服用8日目で間代性痙攣（両肩を上下させる運動、回/0.2～0.3秒）を起こした。患者は10ヶ月前にもマクロライド系抗生物質で同様の間代性痙攣を起こしていた。なお、投与中止後2～5日後に症状が回復した。

なお、本薬の副作用とBBB及び脳血管系への作用との因果関係は不明である。

ケトライド系抗生物質であるテリスロマイシンは主としてグラム陽性菌、マイコプラズマ等感染症に使用されている。特に他の抗生物質が効きにくい耐性肺炎球菌にも効果とされている。希に中樞性副作用として意識消失（2004.12.28現在、累計15例）が現れる。

副作用症例としては、歯根膜感染のためジクロフェナクと併用で服用した50代男性が服用約3時間後、車運転中に意識消失した。突発性で前駆症状はなかった。

また、急性咽喉頭炎のために服用した70代男性（アレルギー体質有り）に投与4時間後、意識消失発作が現れた。同日の内に回復したが、次の日、本剤服用約4時間後、再度意識消失した。頭部精査するも異常はなし。同日回復した。

なお、本薬の副作用とBBB及び脳血管系への作用との因果関係は不明である。

D. 考察

今回示した医薬品による中樞神経系への副作用発現において、それらのBBB及び脳血管系への作用との因果関係は不明なところが多い。これはBBB破綻を詳細にしらべることのできる適切なin vitro試験系がなかったことによるものである。BBBは脳毛細血管内皮細胞、周皮細胞及びアストロサイトの3種類の細胞が互いに協調することで機能を維持することから、我々の研究班で用いている血液脳関門再構成系in vitro BBB常態モデルや特異的トランスポーター発現BBBモデルを用いた検討、また、in vivoモデルによる、今後の研究が待たれる。

E. 結論

免疫抑制剤、NSAID、フェニルプロパノールアミンやリン酸オセルタミビルのような風邪薬、クラリスロマイシン、テリスロマイシンのような抗生物質は中樞性副作用を起こすが、その機構は不明なところが多く、今後の研究が待たれる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

1. 論文発表
なし

2.学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
 分担研究報告書

血液脳関門破綻に基づく医薬品副作用の予測系の確立に関する研究
 (In vitro BBB モデルを用いた各種薬物の作用評価及び副作用機序の解明)

分担研究者 小泉 修一 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長

研究要旨 血液脳関門 (BBB) は、毛細血管内皮細胞、血管周皮細胞及びアストロサイトにより構築されている。BBB 機能維持には、周皮細胞とアストロサイトが重要な役割を果たしている。BBB 破綻等の細胞傷害時には、ATP が細胞外に漏出するが、この ATP が血管周囲を取り巻く周皮細胞及びアストロサイトに作用し、種々のシグナルを伝える。今回、周皮細胞とアストロサイトが細胞外 ATP を介してコミュニケーションを取っていること、さらにアストロサイトが P2Y1 受容体を介して細胞外 ATP シグナルを受容し、酸化ストレスに対する抵抗性を獲得していることを明らかとした。このようなアストロサイトの ATP/P2Y1 シグナルは、BBB 機能維持に重要な役割を果たすと考えられる。

小泉修一

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長

A 研究目的

解熱鎮痛薬、免疫抑制剤等の薬物による中枢神経系の副作用が報告されているが、この原因の一つに、上述した薬物が病体時の血液脳関門 (BBB) 機能に影響することが指摘されている。本研究は、BBB 機能に注目し、薬物の中枢性有害作用発現予測システム及び中枢性副作用を回避するシステムを構築することである。BBB 機能は、主に毛細血管内皮細胞に発現している各種トランスポーターとタイト結合 (tight junction) によって形成されているが、これらを取り巻く血管周皮細胞及びアストロサイトは、BBB 機能に強く影響すると共に、BBB としての機能も有する。本年度は、BBB 機能障害の分子メカニズムを、血管内皮細胞を取り巻く周皮細胞 (pericytes) 及びアストロサイトに注目して解析し、次年度の薬物評価の為の基礎検討を行うことを目的とした。

B 研究方法

細胞：既報に従い、ラット海馬からアストロサイト・周皮細胞の共培養系を構築した。また周皮細胞はヒト周皮細胞を購入し、パッセージ2-5の間で実験に用いた。細胞内カルシウム測定：既報通り、fura2 法によるカルシウムイメージング法及び fluo4 を用いたレーザー共焦点法

を用いた。

免疫組織学的検討：周皮細胞は、anti-smooth muscle actin α を、アストロサイトは anti-GFAP 抗体を用いて細胞の同定を行った。

DNA microarray

Affymetrix 社製 DNA マイクロアレイ Gene Chip とハイブリダイズさせる target への total RNA からの変換は Affymetrix 社のプロトコールに基づいて行った。各 target は rat genome U34A Gene Chip と 45 °C で 16-24 時間ハイブリダイズした。その後 DNA マイクロアレイを Affymetrix のプロトコールに基づいて Fluidics Station で洗浄及び染色を行った。マイクロアレイをスキャニングし、その画像イメージを Microarray Suite Expression Analysis Software (version 5.0 ; Affymetrix 社製) を用いて解析した。アストロサイトの遺伝子発現の変化は各プローブセットのコントロール群及び試薬処置群で Student's *t*-test を用いて判定した。今回の実験ではアストロサイトに最終濃度 100 μ M になるように ATP を添加し、2 時間インキュベート (37 °C, 10 % CO₂/90 % O₂) した後に total RNA を回収した。各 target に対して 2 回ずつ Gene Chip による測定を行い、total RNA の調製は独立に 4 回行った。生細胞数測定 (Cell viability 測定)：生細胞数の測定には MITT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium) アッセイを用いた。これは、MITT が細胞内ミトコンドリアの脱水素酵素の基質となり、生存能の高い細胞程多くの MITT が還元され、その結果生じるホルマザン量が生存細胞数とよく対

応する事に基づいた方法である。アッセイには、測定キット(CHEMICON International, Temecula, CA)を用いた。

C 研究結果

免疫組織化学的検討により、アストロサイトを GFAP 抗体で、血管内皮細胞を RECA-1 で染色すると、GFAP 陽性シグナル (赤) が、RECA-1 陽性シグナル (緑) を取り囲んでいることがわかる (図 1、C)。また B では、アストロサイト (GFAP、緑) の内側に周皮細胞 (α SMA-1、赤) が、A では周皮細胞 (α SMA-1、緑) の内側に内皮細胞 (RECA-1、赤) があることがわかる。つまり、内皮細胞は、周皮細胞、さらにアストロサイトで囲まれているのである。我々は以前、アストロサイト間の情報連絡に細胞外 ATP が重要であることを報告したが (Koizumi et al. PNAS, 2003)、ATP 依存的な Ca^{2+} wave はアストロサイトから、周皮細胞に、さらに周皮細胞(図 2、細胞 1)から、アストロサイト (細胞 2, 3, 4) へ伝達されることが明らかとなり、BBB を形成するアストロサイト及び周皮細胞が、細胞外 ATP を使ってコミュニケーションを取っていることが明らかとなった (図 2)。

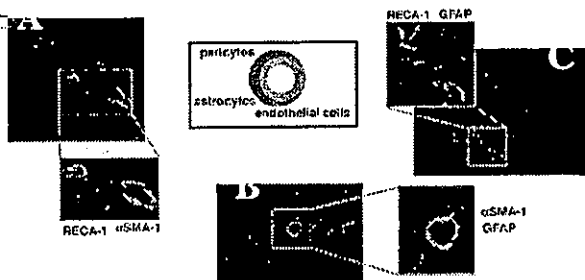


図 1 アストロサイト、周皮細胞及び血管内皮細胞の免疫組織化学像

アストロサイト、周皮細胞及び内皮細胞を、それぞれ GFAP、 α SMA-1 及び RECA-1 で染色した。内皮細胞の外側に周皮細胞が (A)、周皮細胞の外側にアストロサイトが (B)、内皮細胞の外側にアストロサイトが (C) 位置しているのがわかる。

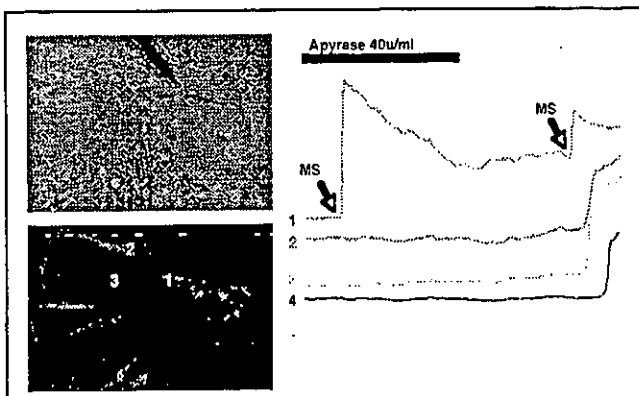


図 2 周皮細胞からアストロサイトへの ATP 依存的なシグナル伝達

図左上: 透過光像。機械刺激用のピペットが中央に見える。図左下: アストロサイト

(赤) 及び血管周皮細胞 (緑) の免疫組織化学像。右トレース; 周皮細胞 1 を *apyrase* 存在下で機械刺激 (MS) すると、内皮細胞の Ca^{2+} は上昇するが、これは周辺細胞には伝播しない。しかし、*apyrase* 除去後、改めて 2 度目の機械刺激を行うと、周皮細胞の Ca^{2+} は、周辺アストロサイトへ伝播した。

そこで、まずアストロサイトが ATP 刺激に曝された際に、どのような分子がアストロサイトで誘導されるのかについて、DNA チップを用いた網羅的解析を行った。表 1 に ATP 処置後、変動した遺伝子群を解析した結果を示した。種々の遺伝子群が変動したが、特に酸化還元応答に関連した遺伝子、carbonyl reductase、SOD 様分子及び thioredoxin reductase の mRNA レベルが上昇した。これらの上昇は定量的 RT-PCR を用いた解析でも確認できた (表 1 括弧内数値)。

Identifier	title	fold increase (RT-PCR)	oxidoreductase activity
DB9069	inducible carbonyl reductase	6.5 (8.9)	GO:0016616; oxidoreductase activity
DB9070	non-inducible carbonyl reductase	6.8	GO:0016616; oxidoreductase activity
X95986	carbonyl reductase	5.9	GO:0016616; oxidoreductase activity
AA926129	schlafen-4 (similar to *SOD-2)	3.1 (17.2)	GO:0016721; oxidoreductase activity
U63923	issue type liver thioredoxin reductase	2.3 (2.9)	GO:0016654; oxidoreductase activity

* SOD-2: superoxide dismutase-2
GO: ontology defined by Gene Ontology Consortium (<http://www.godatabase.org/docdocs.html>)

種々の生理的条件下、また病体時に ATP が放出されることはよく知られているが、この細胞外 ATP は、血管壁を取り囲むアストロサイトの *endfeet* に作用し、アストロサイトを酸化ストレス保護するように働く、との仮説を立て、過酸化水素に対する細胞障害に対する ATP の作用を検討した。

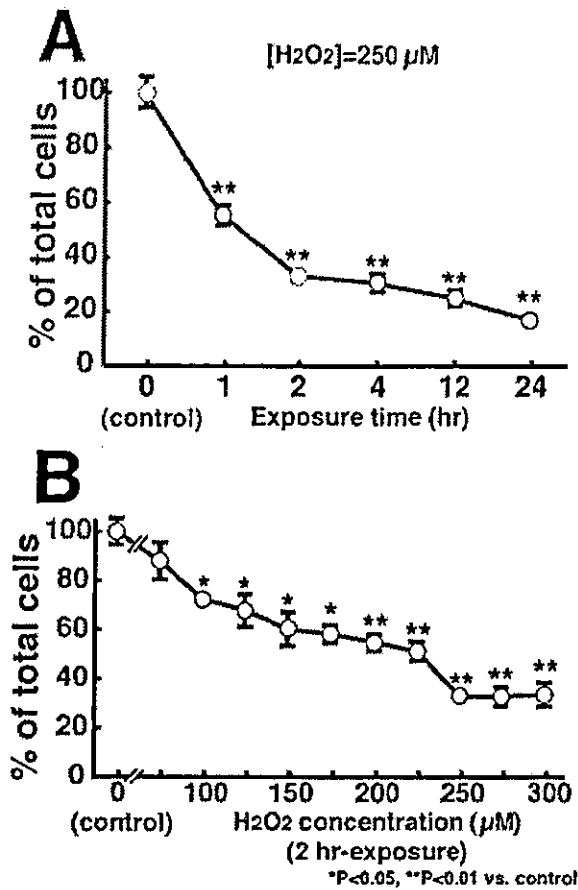


図3.アストロサイトのH₂O₂による cell viability の減少

A:H₂O₂濃度と cell viability の減少。細胞を様々な時間H₂O₂(250 μM)とインキュベートして細胞生存試験を行った。細胞生存試験はMITアッセイを用いた。H₂O₂はインキュベート時間依存的にアストロサイトの cell viability を減少させた。B:H₂O₂処置時間と cell viability の減少。細胞を様々な濃度のH₂O₂と2時間インキュベートし、その後細胞生存試験を行った。H₂O₂は濃度依存的に cell viability を減少させた。

図3は、過酸化水素 (H₂O₂) のアストロサイトに対する影響を検討し、その濃度及び時間依存性を示したものである。Cell viability の測定には、MITアッセイを用いた。H₂O₂は体内の活性酸素種としてよく知られ、実際に種々の障害時に体内で産生されている。H₂O₂は、処置時間依存的に (A)、また濃度依存的に(B)、アストロサイトの cell viability を減少させた。

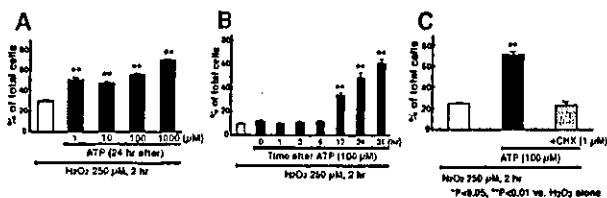


図4 ATP の H₂O₂ 誘導性細胞死への影響。A: ATP の H₂O₂ 誘導性細胞死に対する効果の濃度依存性

ATP の H₂O₂ 誘導性細胞死への保護効果は 1-1000 μM で濃度依存的であった。ATP は H₂O₂ 処置前 24 時間前に細胞に処置した。B: ATP の作用の時間依存性。ATP (100 μM) の H₂O₂ 誘導性細胞死に対する保護作用は刺激後 12 時間未満では発現されず、12 時間以上で時間依存的に発現された。C: ATP 誘導性保護作用に対する蛋白合成阻害剤の作用。ATP によって誘導される保護作用は蛋白合成阻害剤である cycloheximide (1 μM) によって強く抑制された。

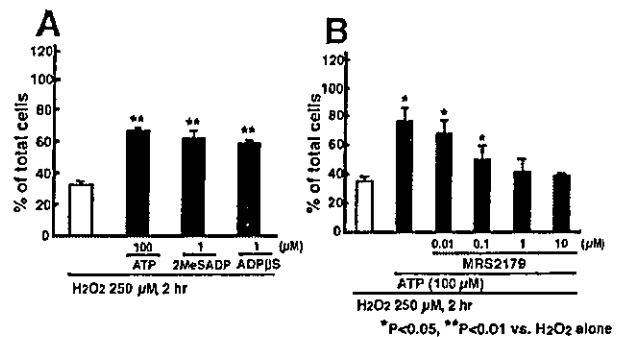


図5 選択的 P₂Y₁ 受容体アゴニスト及びアンタゴニストの H₂O₂ 誘導性細胞死に対する作用。A: 選択的 P₂Y₁ 受容体アゴニストの H₂O₂ 誘導性細胞死への作用。選択的 P₂Y₁ 受容体アゴニスト ADPβS 及び 2MeSADP (1 μM) は ATP (100 μM) の保護作用を再現した。B: 選択的 P₂Y₁ 受容体アンタゴニストの ATP による保護作用の阻害。選択的 P₂Y₁ 受容体アンタゴニスト MRS2179 (0.01-10 μM) は濃度依存的に ATP の保護作用を抑制した。各 P₂Y₁ 受容体アゴニスト及びアンタゴニスト単独ではアストロサイトの cell viability に影響を与えなかった。ATP, 2MeSADP 及び ADPβS は H₂O₂ 処置前 24 時間前に細胞に処置した。MRS2179 は ATP 処置前 15 分前に細胞に処置した。

続いて H₂O₂ 誘導性細胞死に対する ATP の効果を調べた。ATP は H₂O₂ 刺激 24 時間前に処置した。ATP はアストロサイトの H₂O₂ による細胞死を顕著に抑制した (図4)。ATP は 1 μM の低濃度から保護作用を示し、1000 μM まで濃度依存的な作用を示した (図4A)。ATP は、刺激後 12 時間未満までは顕著な保護作用を示さないが、12 時間以降、H₂O₂ による細胞障害を強く抑制し、control の 60% 程度まで cell viability を回復させた (図4B)。また、ATP の作用は蛋白質合成阻害剤である cycloheximide (CHX, 1 μM) の同時投与によって強く抑制された (図4C)。このことから ATP によって誘導される保護効果には機能的な蛋白質の発現が関与していると考えられた。ATP 単独では今回の実験条件では細胞数に影響は与えなかった。また、cycloheximide 単独による細胞数の減少及び H₂O₂ 誘導性細胞死への影響は無かった (control: 100 ± 6%, cycloheximide 1 μM: 90 ± 6%, n=6)。

アストロサイトでは P₂Y₁ 受容体が発現、機能している事が報告されているため (Koizumi et al. 2003)、P₂Y₁ 受容体選択的アゴニスト及びアンタゴニストの作用について調べた。