

20050119A

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 17 年度 総括・分担報告書

主任研究者 大野泰雄

平成 18 年 3 月

主任研究者

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所・副所長）

分担研究者

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）

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-----	9
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 -----	12
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-----	17
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 -----	20
楠原洋之	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	23
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	25

「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、副所長）

研究要旨 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、血液脳関門（BBB）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。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が、これらの細胞機能に対する医薬品等の作用も明らかにされていない。In vitro BBB 病態モデル（脳虚血再灌流モデル及び熱性障害モデル）を作成し、免疫抑制薬 cyclosporin A (CsA)等の作用を検討した。CsA は脳虚血細管流 BBB モデルで物質透過性を顕著に亢進した。また発熱に起因する BBB 病態モデルにおいても、BBB 透過性が亢進することが明らかとなった。また、傷害時には細胞から ATP が漏出し、BBB 構成細胞群は ATP 刺激に曝されるが、毛細血管周囲を取り巻く周皮細胞は、ATP を P2Y2 受容体を介して受容し、収縮、bleb 形成及びメタロプロテアーゼ MMP9 産生等、BBB 機能障害を誘発する応答性を呈した。さらに、血液脳関門に発現する ABC トランスポーター-BCRP について、発現系を用いた in vitro 輸送実験、ならびに BCRP ノックアウトマウスを用いた in vivo 実験を行った。BCRP 基質となる化合物の中には、PHIP を始めとして BCRP ノックアウトマウスで脳内濃度が増加するものが見出された。速度論解析を行ったところ、ノックアウトの影響は取り込み初速度では評価できず、定常状態で評価する必要があることが明らかになった。

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・助教授

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らなっており、各医薬品によるその機能への影響も不明である。そこで昨年度来、BBB 機能に注目して、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て研究を進めてきた。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。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。

そこで本年度の研究では 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、特に病態時の 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) また 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に注目して解析し、特に傷害時に必ず放出・漏出する ATP による機能制御機序との関連性で探り、医薬品等の有害作用発生機序の及び薬物評価の為の指標と出来るべく検討を行った。また、インフルエンザ脳症マウスを作成し、BBB 機能を調べるべく基礎検討を開始した。更に、4) ABC 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

脳微小梗塞周囲部-BBB モデル：マウス脳血管内皮細胞株（MBEC4）を培養インサートに播種し、*in vitro* BBB モデルを作製した。本モデルを glucose-free Ringer、37°C、95% N₂ / 5% CO₂ 虚血条件下で 4 時間インキュベートした（hypoxia）後、glucose 含有 Ringer、95% air / 5% CO₂ 条件下で 1 時間（reoxygenation）、さらに glucose + 血清含有 Ringer、95% air / 5% CO₂ 下で 0-7 日間インキュベート（再構成）し、脳微小梗塞周囲部-BBB モデル（hypoxia 群）とした。

発熱-BBB モデル：高温度培養条件を BBB モデルに負荷することにより病態モデルを作製した。すなわち、serum free DMEM、38.5, 39, 40, 41°C、95% Air / 5% CO₂ 条件下で 6 時間インキュベートした。

BBB 透過性評価：上記の各病態モデルを使用し、血管側に sodium fluorescein (Na-F) および Evans blue albumin (EBA) を入れ、脳実質側から回収し透過係数を算出し、BBB 透過性の指標とした。

P-糖蛋白 (P-gp) 排出機能評価：MBEC4 培養プレートもしくは上記モデルを使用し、rhodamine 123 を加えて、一時間後に NaOH で可溶化し、MBEC4 内 rhodamine 123 (R123) 蓄積量を測定し、P-gp 機能の指標とした。

B-3) BBB 機能障害の分子メカニズムの検討

血管周皮細胞の培養：既報に従い、幼弱ラットの前脳より血管周辺組織を取り出し、内皮細胞が増殖しない条件で、初代培養を行った。血管周皮細胞は抗 α smooth muscle actin (aSMA) 抗体で確認した。

アストロサイトの培養：既報に従い、一日齢

ラットの前脳より、初代培養を行った。アストロサイトの精製は、一晚の振とうにより行った。アストロサイトは、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体により確認した。

細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定法：既報に従い、fura2 法及び fluo4 による共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

MMP 9 の測定：培養血管周皮細胞を各種 ATP アナログで刺激した後、24 時間後に細胞内の MMP 9 量を、Western blotting 法及びゼラチンの可溶性を観察するザイモグラフィにて定量的に観察した。

インフルエンザ脳症マウスの作成：マウス（4-5 週齢）の鼻腔に脳特異的インフルエンザウイルス（brain-adapted influenza A virus, H7N3）を感染させ、経時的にその脳内組織像を観察した。

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

マウスに静脈内定速静注を行い、定常状態での血漿中濃度ならびに脳内濃度を測定した。特に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 ABC トランスポーター-BCRP に注目し、そのノックアウト動物を用い、*in situ* 脳灌流法を適用し、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

前年度に引き続き、中枢神経系用剤以外で中枢神経系副作用を起こす医薬品を検索した。昨年度の検索により、中枢性副作用が疑われた度免疫抑制剤、NSADs シクロスポリン及びタクロリムスのような免疫抑制剤、NASID 等以外では、新たな中枢性有害作用は報告されていないが、抗ウイルス薬リン酸オセルタミビル（タミフル）と中枢性副作用が疑われる死亡事例が新聞報道等でなされたが、現時点でタミフル服用と、中枢性有害作用の因果関係が明らかになるものはなかった。

インフルエンザ脳症とリン酸オセルタミビル

インフルエンザの治療薬「タミフル」（リン酸オセルタミビル）と異常行動による事故

死との関連性が報道された（日本小児感染症学会、読売新聞等）。現時点で、タミフルを服用した16歳以下の異常行動によるものを含む小児13例の死亡が報告されているが、これら死亡事例とタミフルとの因果関係を明確に示す証拠は無い（米国食品医薬品局小児諮問委員会、2005年11月18日）。また欧州医薬品庁最新情報（Doc. Ref. EMEA/385013/2005, 2005年11月17日）においても、タミフル服用と異常・障害行動との因果関係は認められないと報告している。わが国では、社団法人日本小児科学会が、「現時点でタミフルとこれらの死亡についての因果関係が明らかなものはなかった」との見解を示している（平成17年11月30日）。厚生労働省は『新型インフルエンザに関するQ&A』の一部として、タミフルを服用した小児及び成人の死亡事例について2005年11月30日、成人については同年12月15日に公表したが、その中で、現時点でタミフル服用と死亡事例について因果関係が明らかなものはなかった、と記載している。

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

脳微小梗塞周囲部-血液脳関門モデルに対するCsAの作用：Hypoxia (4 hr) /reoxygenation

(1 hr) 負荷後、再構成1日目および再構成7日目では、細胞数およびNa-FとEvans blue albumin 透過係数については normoxia 群のそれらと有意な差は認められなかった。再構成7日目において rhodamine 123 細胞内取り込み量は normoxia 群と比較して有意に増加し、P-gp 蛋白量は減少していた。再構成7日目において、CsAによるBBB透過性亢進作用および rhodamine 123 細胞内取り込み量増加作用は、normoxia 群と比較して hypoxia 群で著明であった。

発熱-血液脳関門モデル構築：38.5-41℃で6時間高温環境にて培養したところ、温度依存的にNa-FとEvans blue albumin 透過係数は亢進した。また高温負荷による細胞障害は認められなかった。

C-3) BBB機能障害の分子メカニズムの検討

血管周皮細胞のP2受容体：培養血管周皮細胞を各種ATPアナログで刺激すると、顕著な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察され、薬理的解析によりP2Y2受容体が責任受容体であることが明らかとなった。毛細血管はアストロサイトのendfeetにより囲まれていること、アストロサ

イトが細胞外ATPのソースとしてよく知られていることから、アストロサイト-血管周皮細胞共培養系を用い、アストロサイトの刺激及びアストロサイトの傷害が血管周皮細胞にシグナルを送るか否かを検討した。アストロサイトの刺激・傷害によりATPが放出され、これは血管周皮細胞のP2Y2受容体を介して $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた。

血管周皮細胞P2Y2受容体刺激と応答：血管周皮細胞をATPで刺激すると、P2Y2受容体依存的に(1)細胞の収縮、(2)bleb形成、及び(3)MMP9産生が引き起こされた。

インフルエンザ脳症マウス：マウスをインフルエンザウィルスに感染させると、体重減少が生じ、1週間後には対照群の約60%程度にまで達した。感染後2週間目までに、ほぼすべてのマウスは死亡した。感染後3日目から脳組織に顕著な毛細血管の肥大が観察され、そのような血管周囲ではアストロサイトの肥厚、及び血管周皮細胞の消失が観察された。神経細胞そのものの病理像は観察されなかった。

C-4) 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

発癌物質であるPhIPの脳内濃度は、BCRPノックアウトマウスで増加した。血漿中濃度で補正した脳分布容積は、BCRPノックアウトマウスで野生型マウスの約3倍に増加した。またPhIPの代謝物であるN-OH体の脳内濃度もBCRPノックアウトマウスで増加し、脳分布容積は2倍に増加した。一方、*in situ*脳灌流法を用いて、脳への取り込み初速度を比較したときには両者に差が見られなかった。

BCRP基質として、pitavastatinとニューキノロン系抗生物質についても同様の実験を行った。両化合物ともに、胆汁排泄にはBCRPが関与しているものの、脳内濃度は野生型マウスとBCRPノックアウトマウスでは同じ値を示し、BCRPノックアウトの影響は見られなかった。

D. 考察

虚血傷害後には、一見障害から回復したように思われる脳血管内皮細胞だが、薬物負荷時には正常と異なる機能を呈すると考え、脳微小梗塞周囲部-BBBモデルを作製しCsAの作用を検討した。CsAはも調査の結果より、最も中枢性副作用を引き起こしやすい薬剤と考えられる。虚血再灌流傷害後に再構成されたBBBでは正常なBBBよりもP-gp機能が低下していた。これはP-gp発現量の減少によるものであった。またCsAによりBBB透

過性亢進作用および P-gp 排出機能障害作用が増強されたことから、虚血再灌流傷害後に再構成された BBB は CsA に対して脆弱であることが示された。CsA は P-gp により血液側に排出されることから、虚血傷害後に再構成された BBB では CsA 透過性が亢進することが考えられる。NSAIDs はインフルエンザ等の感染症により誘発された発熱下で使用される。そこで、発熱病態下での NSAIDs の作用を検討するため、発熱-BBB モデル作製に着手した。高温環境を負荷すると BBB 透過性は温度依存的に亢進した。発熱時には BBB 機能が低下することが示唆された。今回、発熱-BBB モデルを作製し、脳血管内皮細胞の密着結合能への影響を明らかにした。現在、密着結合構造蛋白質の発現変動、また各種トランスポーター (organic anion transporter, monocarboxylic acid transporter) の機能と発現の変動等に関する基礎的解析を行っている。NSAIDs 等による BBB 密着結合 (tight junction) 能への影響及びこれら医薬品の BBB 移行性について発熱-BBB モデルを用いて検討中である。また、脳微小梗塞周囲部-BBB モデルにおける CsA の BBB 移行性も明らかとなりつつある。これらの情報を総合すれば、医薬品による中枢性有害作用の回避対策に関して、BBB の病態生理を踏まえた試案を築くことが可能となるだろう。

インフルエンザ脳症モデルマウスでは、最初に認められる病理像が毛細血管の極端な肥大であった。このとき、アストロサイトは反応性になり、血管周皮細胞は消失していた。つまり、脳症の初期に先ず、毛細血管を構築するこれらの細胞群の機能変化・低下が惹起され、脳症・脳炎の悪化に繋がっていくものと考えられた。そこで、外傷、炎症及び虚血性傷害時等の脳障害時に必ず漏出する ATP に注目し、血管周皮細胞の機能に与える影響を観察した血管周皮細胞は P2Y2 受容体を強く発現していた。この P2Y2 受容体刺激により、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が誘発され、収縮、bleb 形成、及び MMP9 産生を引き起こした。収縮に関しては、脳の微小循環の制御との関連性を示唆するが、一方では血管外腔からの剥離を誘発している可能性が考えられる。実際、血管周皮細胞の脱落による、毛細血管透過性の亢進は報告されている。また、bleb の形成が観察されたが、これはアポトーシス時に認められる典型的な胞構造である。収縮後の bleb 形成は、血管周皮細胞の機能障害と強く関連しているものと考えられる。MMP9 はメタロ

プロテアーゼであり、細胞外マトリックスを消化する。これにより、自身及び周辺の血管構築構造が破壊され、以って BBB の機能障害が誘発されている可能性が強く示唆された。

以上外傷、炎症、虚血時に放出される ATP は血管周皮細胞 P2Y2 受容体を活性化し、これにより血管周皮細胞の機能低下さらには BBB 障害が引き起こされる可能性が強く示唆された

血液脳関門における重要な異物排泄トランスポーターである P-gp は、脳への取り込み初速度に影響を与えることが知られている。これに対して、BCRP は *in situ* 脳灌流法で評価した初期の取り込み初速度に影響を与えない、という速度論上の違いが見られた。P-gp は膜内から基質を認識すると考えられており、医薬品の細胞膜透過能に直接影響を与える。BCRP は初速度に影響を与えないことから、細胞質方向から基質を認識するものと考えられる。PhIP 以外に検討した pitavastatin とニューキノロン系抗生物質については、胆汁排泄過程と異なり、BCRP の基質となるもの脳内移行性に BCRP は関与していなかった。ニューキノロン系抗生物質のいくつかは P-gp により脳内からくみ出されていることが明らかにされており、P-gp の寄与率の方が高いものと思われる。Pitavastatin についても同様の議論が可能と考えている。

E. 結論

脳血傷害後に一旦再構成される BBB ではあるが、CsA 等に曝されると正常 BBB と比較して明らかに脆弱であり、その脳移行は容易である可能性が示唆された。このように、BBB 病態モデルの作成及び本モデルを用いての薬物による中枢性有害作用の危険因子の探索は、実際の中枢性副作用回避対策に関する実験証拠を提供するものとして非常に有用なものであると考えられる。

インフルエンザ脳症マウスの脳では、先ず最初に毛細血管が肥大し、アストロサイトが反応性に変化し、血管周皮細胞が消失する病理組織像が観察されたことから、毛細血管及びその niche の病変が脳炎・脳症に重要な役割を果たす可能性が示唆された。外傷、炎症、及び虚血後に漏出する ATP により、P2Y2 受容体を介して、毛細血管 niche 構造である血管周皮細胞の機能障害が惹起される可能性が示唆された。病態時の BBB 機能を考える際に、血管周皮細胞の P2Y2 受容体の制御が重要であること、また血管周皮細胞 P2Y2 受容

体に影響する医薬品に注意が必要である可能性が示唆された。

血液脳関門における排出輸送系として、BCRPが異物排泄に働くことを明らかにした。その寄与率に関しては、P-gpとともに考慮する必要がある、今後P-gpとBCRPによる輸送能をin vitroで評価し、輸送活性と脳内濃度の増加について定量的に考察することが必要である。PhIPは、BCRP発現系を用いたin vitro阻害実験のほか、マウスやラットのin vivo実験において、薬物間相互作用を評価するためのプローブ化合物として利用可能である。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

(1)論文発表

1. Shuto H, Yamauchi A, Ikeda M, Sohda Y, Koga A, Tominaga K, Egawa T, Kataoka Y Forced exercise-induced flushing of tail skin in ovariectomized mice, as a new experimental model of menopausal hot flushes *J. Pharmacol. Sci.*, 98, 323-326, (2005)
2. Yamauchi A, Shuto H, Dohgu S, Nakano Y, Egawa T, Kataoka Y. Cyclosporin A aggravates electroshock-induced convulsions in mice with a transient middle cerebral artery occlusion. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 25(5), 923-928, (2005)
3. Inoue, K., Denda, M., Tozaki, H., Fujishita, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2005) Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 124, 756-763.
4. Narita, M., Miyatake, M., Shibasaki, M., Tsuda, M., Koizumi, S., Narita, M., Yajima, Y., Inoue, K. and Suzuki, T. (2005) Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: enhancement of protein kinase C-dependent astrocytic response and behavioral sensitization. *J. Neurochem.*, 93, 1383-1392.
5. Nasu-tada, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2005) The involvement of $\alpha 1$ integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: different regulations by ADP through PKA. *Glia*, 52, 98-107.
6. Fujishita, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2006) Upregulation by retinoic acid of P2Y2 receptors in normal human epidermal keratinocytes.

Purinergic Signaling, in press.

7. Nasu-Tada, K. *, Koizumi, S. *, Tsuda, M. *, Kunifusa, E. and Inoue, K. (2006) Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X₄, a key molecule for mechanical allodynia. *Glia*, in press. (*equal contribution)
 8. 小泉修一, 藤下加代子, 津田誠, 井上和秀 (2006) ATPを介した皮膚ケラチノサイト間情報連絡と痛み, *Pain Research*, 印刷中
 9. 小泉修一, 藤下加代子, 津田誠, 井上和秀 (2006). G-蛋白共役型 ATP 受容体と痛み, *Pain Clinic*, 印刷中
 10. Kuroda M, Kusuhara H, Endou H, Sugiyama Y. Rapid elimination of cefaclor from the cerebrospinal fluid is mediated by a benzylpenicillin-sensitive mechanism distinct from organic anion transporter 3. *J Pharmacol Exp Ther.* 314:855-61, 2005.
- ##### (2) 学会発表
1. Takata F, Dohgu S, Sumi N, Yamauchi A, Shuto H, Kataoka Y. Dysfunction of the Blood-Brain Barrier with RAGE ligands. VI th Conference on Cerebral Vascular Biology, Munster, Germany, June, 2005
 2. Koizumi, S. and Inoue, K. Dynamic astrocyte-to-neuron communication mediated by astrocytic ATP in hippocampal cultures. Euroglia Meeting, 17-21 May 2005, Amsterdam, Holland.
 3. 小泉修二, 大野泰雄, 井上和秀, アストロサイトによるシナプス伝達制御 (シンポジウム), 日本薬理学会関東部会, 2005年6月18日, 東京
 4. Koizumi, S. Astrocytes function as an interface of neurovascular system (Symposium), 26-28, July, Neuro2005, Tokyo
 5. Koizumi, S. Fujishita, K. Inoue, K. Tsuda, M. and Inoue, K. ATPを介した表皮ケラチノサイト間情報連絡と痛み (シンポジウム), 第27回日本疼痛学会, 7月26-27日, 宇都宮
 6. Koizumi, S., Fujishita, K. and Inoue, K. Glia-to-vascular communication mediated by extracellular ATP (Symposium). 第48回日本神経化学会, 28-30 Oct., Fukuoka
 7. Koizumi, S., Tsuda, M. and Inoue, K. Mechanical allodynia induced by P2Y2 receptor activation. Society for Neuroscience, Washington DC., 12-16 Nov.,

2005

8. Tsuda, M. Kunifusa, E., Nasu-Tada, K., Hasegawa S., Koizumi, S. and Inoue, K. Fibronectin increases expression of P2X₄ receptors in microglia. Society for Neuroscience, Washington DC., 12-16 Nov., 2005.
9. 小泉修一、藤下加代子、末石浩二、高田英友子、片岡泰文、ATP 受容体を介するアストロサイトーペリサイト系による毛細血管制御 (シンポジウム)、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 日、横浜
10. 津田誠、国房恵巳子、多田薫、小泉修一、井上和秀、フィブロネクチンはミクログリアにおける P2X₄ 受容体の発現を増強する、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 日、横浜
11. 藤下加代子、末石浩二、片岡泰文、井上和秀、小泉修一、血管周費細胞ペリサイトに発現する P2 受容体の生理的役割、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 日、横浜
12. 篠崎陽一、小泉修一、井上和秀、アストロサイトにおける P2Y₁ 受容体活性化を介した酸化ストレス誘導製細胞死シグナリングに対する拮抗作用、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 日、横浜
13. 多田薫、斉藤秀俊、井上和秀、小泉修一、アストロサイトの pinocytosis における P2Y₆ 受容体の関わり、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 日、横浜
14. 大久保聡子、多田薫、斉藤秀俊、小泉修二、ラットアストロサイトにおけるリポポリサッカライドによる P2 受容体の変化、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 日、横浜
15. 戸崎秀俊、津田誠、小泉修一、井上和秀、レチノイン酸による初代培養ミクログリアの P2X₄ 受容体発現増強、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inoue, K., Denda, M., Tozaki, H., Fujishita, K., <u>Koizumi, S.</u> and Inoue, K.	Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes.	J.Invest. Dermatol	124	756-763	2005
Narita, M., Miyatake, M., Shibasaki, M., Tsuda, M., <u>Koizumi, S.</u> , Narita, M., Yajima, Y., Inoue, K. and Suzuki, T.	Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: enhancement of protein kinase C- dependent astrocytic response and behavioral sensitization.	J.Neurochem.	93	1383-1392	2005
Nasu-tada, K., <u>Koizumi, S.</u> and Inoue, K.	The involvement of $\beta 1$ integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: different regulations by ADP through PKA.	Glia	52	98-107	2005
Fujishita, K., <u>Koizumi, S.</u> and Inoue, K.	Upregulation by retinoic acid of P2Y2 receptors in normal human epidermal keratinocytes.	Purinergic Signaling,			IN PRESS
Nasu-Tada, K. *, <u>Koizumi, S.*</u> , Tsuda, M.*, Kunifusa, E. and Inoue, K.	Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X ₄ , a key molecule for mechanical allodynia.	Glia			IN PRESS
小泉修一、藤下加代子、 津田誠、井上和秀	ATP を介した皮膚ケラチノサイト間 情報連絡と痛み、	Pain Research			IN PRESS
小泉修一、藤下加代子、 津田誠、井上和秀	G 蛋白共役型 ATP 受容体と痛み	Pain Clinic			IN PRESS

Shuto H, Yamauchi A, Ikeda M, Sohda Y, Koga A, Tominaga K, Egawa T, <u>Kataoka Y</u>	Forced exercise-induced flushing of tail skin in ovariectomized mice, as a new experimental model of menopausal hot flushes	J. Pharmacol. Sci.	98	323-326	2005
Yamauchi A, Shuto H, Dohgu S, Nakano Y, Egawa T, <u>Kataoka Y</u>	Cyclosporin A aggravates electroshock-induced convulsions in mice with a transient middle cerebral artery occlusion	Cell. Mol. Neurobiol.,	25	923-928	2005

Kuroda M, <u>Kusuhara H</u> , Endou H, Sugiyama Y.	Rapid elimination of cefaclor from the cerebrospinal fluid is mediated by a benzylpenicillin-sensitive mechanism distinct from organic anion transporter 3.	J Pharmacol Exp Ther.	314	855-861	2005
--	---	-----------------------	-----	---------	------

研究要旨

中枢性有害作用は重篤なものが多い。そのなかで、医薬品等が血液脳関門（BBB）に作用することに起因すると考えられ有害作用も報告されている。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、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。本研究は前年度に引き続き、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行った。抗ウイルス薬リン酸オセルタミビルの中枢性有害作用等の報道がなされたが、当該薬物と中枢性有害作用との因果関係は認められなかった。また、免疫抑制剤及び NSAIDs 以外による中枢性有害作用の報告は認められなかった。

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、特に傷害時に必ず放出・漏出する ATP による機能制御機序との関連性で探り、医薬品等の有害作用発生機序の及び薬物評価の為の指標と出来るべく検討を行った。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 ABC 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。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

前年度に引き続き、中枢神経系用剤以外で中枢神経系副作用を起こす医薬品を検索した。昨年度の検索により、中枢性副作用が疑われ

た度免疫抑制剤、NSADsシクロスポリン及びタクロリムスのような免疫抑制剤、NASID等以外では、新たな中枢性有害作用は報告されていないが、抗ウイルス薬リン酸オセルタミビルと中枢性副作用が疑われる事例が新聞報道等でなされた。

インフルエンザ脳症とリン酸オセルタミビル
インフルエンザの治療薬「タミフル」（リン酸オセルタミビル）と異常行動による事故死との関連性が報道された（日本小児感染症学会、読売新聞等）。現時点で、タミフルを服用した16歳以下の異常行動によるものを含む小児13例の死亡が報告されているが、これら死亡事例とタミフルとの因果関係を示す明確な証拠は無いと評価されている（米国食品医薬品局小児諮問委員会、2005年11月18日）。また欧州医薬品庁最新情報(Doc. Ref. EMEA/385013/2005, 2005年11月17日)においても、タミフル服用と異常・障害行動との因果関係は認められないと報告している。わが国では、社団法人日本小児科学会が、「現時点でタミフルとこれらの死亡についての因果関係が明らかなものはなかった」との見解を示している（平成17年11月30日）。厚生労働省は『新型インフルエンザに関するQ&A』の一部として、タミフルを服用した小児及び成人の死亡事例について2005年11月30日、成人については同年12月15日に公表したが、その中で、現時点でタミフル服用と死亡事例について因果関係が明らかなものはなかった、と記載している。

また昨年度報告した免疫抑制剤及びNSAIDs等以外に、今年度は新たに中枢性有害作用を呈する医薬品等の報告はなされていない。

D. 考察

今回も医薬品による中枢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直接的な因果関係を明らかにすることは出来なかった。また、特に昨年度以降、新たに中枢性有害作用が報告された医薬品等

はなかった。リン酸オセルタミビルの中枢性有害作用に関する報道がなされたが、当該医薬品と報告された意識障害・異常行動の間には、明確な因果関係は無いと考えられる。従って、昨年度から問題になっている、免疫抑制剤シクロスポリン及びNSAIDsメフェナム酸及びジクロフェナクに注目して、そのBBB破綻との因果関係、作用の詳細および作用機序を*in vitro*及び*in vivo*試験系を用いて明らかにすることが必要と考えられる。作用機序の解明に関しては、BBBを構成する毛細血管内皮細胞、周皮細胞及びアストロサイトの3種類の細胞それぞれに対する作用に加え、内皮細胞に存在する特異的トランスポーター機能との関連性を明らかにする必要がある。

E. 結論

昨年度の検索以来、新たな中枢性副作用を呈する医薬品は見つからなかった。免疫抑制剤、NSAIDsの頻度が高い医薬品等に絞り、BBB機能と中枢性有害作用発症との因果関係を明らかにする必要がある。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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当無し					

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 室長

研究要旨 血液脳関門(BBB)は、血管内皮細胞、血管周皮細胞（ペリサイト）及びアストロサイトより構成され、物質の脳への移行を制限している。病態下での BBB 機能は極度に変化し、時に医薬品による中枢性有害作用発現を引き起こす。インフルエンザ脳症モデルマウスでは、先ず血管を取り囲むアストロサイトさらにペリサイトの病変が観察される。昨年度の本研究は、BBB 構成要素のうちアストロサイトに注目して検討を行ったが、本年度はペリサイトに注目して検討を行い、外傷、炎症、及び虚血性脳傷害時に漏出する ATP が、その特異的受容体 P2Y2 受容体を介し、ペリサイトの収縮、bleb 形成、さらにはメタロプロテアーゼ（MMP 9）を放出させることを明らかとした。これらは、ATP/P2Y2 受容体を介するシグナルが、ペリサイトの機能障害、ひいては BBB 機能障害を引き起こす可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

医薬品による副作用の中で、中枢性有害作用は重篤なものが多い。例えばインフルエンザ時のある種の解熱鎮痛薬の服用は脳症及びその増悪作用を引き起こし、それは死に直結する。通常医薬品は血液脳関門（BBB）によりその脳内移行性が制限されているが、BBB の病態生理については不明な点が多く、各医薬品による BBB 機能への影響も明らかではない。インフルエンザ脳症モデル動物による病理組織解析によると、最も顕著な形態変化は BBB を形成するアストロサイト及び周皮細胞（ペリサイト）であった。昨年度はアストロサイトに注目して BBB との関連性を追求したが、本年度は BBB 構成成分のうち、ペリサイトに注目し、その機能を、傷害時に漏出する ATP との関連性から解析を行った。また、インフルエンザ脳症モデル動物の作成を開始し、病態モデル動物の BBB 病変及び薬物の作用に関する基礎的解析を行い、実際の BBB 機能と医薬品の副作用との関連性を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

ペリサイトの培養：既報に従い、幼弱ラット

の前脳より血管周辺組織を取り出し、内皮細胞が増殖しない条件で、初代培養を行った。ペリサイトは抗 α smooth muscle actin(aSMA)抗体で確認した。

アストロサイトの培養：既報に従い、一日齢ラットの前脳より、初代培養を行った。アストロサイトの精製は、一晚の振とうにより行った。アストロサイトは、抗 glial fibrillary acidic protein(GFAP)抗体により確認した。

細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定法：既報に従い、fura2 法及び fluo4 による共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

MMP 9 の測定：培養ペリサイトを各種 ATP アナログで刺激した後、24 時間後に細胞内の MMP 9 量を、Western blotting 法及びゼラチンの可溶性を観察するザイモグラフィーにて定量的に観察した。

インフルエンザ脳症マウスの作成：マウス（4-5 週齢）の鼻腔に脳特異的インフルエンザウイルス (brain-adapted influenza A virus, H7N3) を感染させ、経時的にその脳内組織像を観察した。

（倫理面への配慮）

本研究施設に設置されている動物実験等倫理委員会の承認の元、実験を行った。

C. 研究結果

M., Koizumi, S., Narita, M., Yajima, Y., Inoue, K. and Suzuki, T. (2005) Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: enhancement of protein kinase C-dependent astrocytic response and behavioral sensitization. *J. Neurochem.*, 93, 1383-1392.

3. Nasu-tada, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2005) The involvement of α integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: different regulations by ADP through PKA. *Glia*, 52, 98-107.

4. Fujishita, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2006) Upregulation by retinoic acid of P2Y2 receptors in normal human epidermal keratinocytes. *Purinergic Signaling*, in press.

5. Nasu-Tada, K. *, Koizumi, S.*, Tsuda, M.*, Kunifusa, E. and Inoue, K. (2006) Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X₄, a key molecule for mechanical allodynia. *Glia*, in press. (*equal contribution)

6. 小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀 (2006) ATP を介した皮膚ケラチノサイト間情報連絡と痛み、*Pain Research*、印刷中

2. 学会発表

1. Koizumi, S. and Inoue, K. Dynamic astrocyte-to-neuron communication mediated by astrocytic ATP in hippocampal cultures. Euroglia Meeting, 17-21 May 2005, Amsterdam, Holland.

2. 小泉修一、大野泰雄、井上和秀、アストロサイトによるシナプス伝達制御 (シンポジウム)、日本薬理学会関東部会、2005年6月18日、東京

3. Koizumi, S. Astrocytes function as an interface of neurovascular system (Symposium), 26-28,

July, Neuro2005, Tokyo

4. Koizumi, S. Fujishita, K. Inoue, K. Tsuda, M. and Inoue, K. ATP を介した表皮ケラチノサイト間情報連絡と痛み (シンポジウム)、第27回日本疼痛学会、7月26-27日、宇都宮

5. Koizumi, S., Fujishita, K. and Inoue, K. Glia-to-vascular communication mediated by extracellular ATP (Symposium). 第48回日本神経化学会、28-30 Oct., Fukuoka

6. Koizumi, S., Tsuda, M. and Inoue, K. Mechanical allodynia induced by P2Y2 receptor activation. Society for Neuroscience, Washington DC., 12-16 Nov., 2005

7. Tsuda, M. Kunifusa, E., Nasu-Tada, K., Hasegawa S., Koizumi, S. and Inoue, K. Fibronectin increases expression of P2X₄ receptors in microglia. Society for Neuroscience, Washington DC., 12-16 Nov., 2005.

8. 小泉修一、藤下加代子、末石浩二、高田英友子、片岡泰文、ATP 受容体を介するアストロサイトーペリサイト系による毛細血管制御 (シンポジウム)、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜

9. 津田誠、国房恵巳子、多田薫、小泉修一、井上和秀、フィブロネクチンはミクログリアにおける P2X₄ 受容体の発現を増強する、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜

10. 藤下加代子、末石浩二、片岡泰文、井上和秀、小泉修一、血管周費細胞ペリサイトに発現する P2 受容体の生理的役割、第79回日本薬理学会、2006年3月8-10日、横浜

11. 篠崎陽一、小泉修一、井上和秀、アストロサイトにおける P2Y₁ 受容体活性化を介した酸化ストレス誘導製細胞死シグナリングに

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inoue, K., Denda, M., Tozaki, H., Fujishita, K., <u>Koizumi, S.</u> and Inoue, K.	Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes.	J.Invest. Dermatol	124	756-763	2005
Narita, M., Miyatake, M., Shibasaki, M., Tsuda, M., <u>Koizumi, S.</u> , Narita, M., Yajima, Y., Inoue, K. and Suzuki, T.	Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: enhancement of protein kinase C- dependent astrocytic response and behavioral sensitization.	J. Neurochem.	93	1383-1392	2005
Nasu-tada, K., <u>Koizumi, S.</u> and Inoue, K.	The involvement of $\beta 1$ integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: different regulations by ADP through PKA.	Glia	52	98-107	2005
Fujishita, K., <u>Koizumi, S.</u> and Inoue, K.	Upregulation by retinoic acid of P2Y2 receptors in normal human epidermal keratinocytes.	Purinergic Signaling,			IN PRESS
Nasu-Tada, K. *, <u>Koizumi, S.*</u> , Tsuda, M.*, Kunifusa, E. and Inoue, K.	Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X ₄ , a key molecule for mechanical allodynia.	Glia			IN PRESS
小泉修一、藤下加代子、 津田誠、井上和秀	ATP を介した皮膚ケラチノサイト間 情報連絡と痛み、	Pain Research			IN PRESS
小泉修一、藤下加代子、 津田誠、井上和秀	G 蛋白共役型 ATP 受容体と痛み	Pain Clinic			IN PRESS

In vitro BBB 病態モデル作成及び各種薬物の脳内移行性評価

分担研究者： 片岡泰文 福岡大学薬学部・教授

研究要旨 薬物の脳移行は血液脳関門(BBB)により制限されている。しかし、病態下での BBB 機能は変容することが知られており、薬物の BBB 機能への影響および脳移行性は常態時と異なる可能性がある。医薬品による中枢性有害作用発現の解明には BBB 病態の視点導入が必要である。そこで、cyclosporin A (CsA)の中枢性有害作用危険因子として加齢とともに進行する無症候性脳梗塞周囲部 BBB、NSAIDs のそれとして発熱時 BBB に着目した。In vitro において無症候性脳梗塞および発熱病態下の BBB を外挿するため、微小脳梗塞周囲部- BBB モデルおよび発熱- BBB モデル作製を試み、その確立のための基礎的検討およびこれらモデルにおける CsA および NSAIDs の作用を検討した。虚血再灌流傷害後に再構成された BBB は、P-糖たんぱく質(P-gp) 排出機能低下を示し、CsA による BBB 障害作用に対して脆弱であった。また BBB 透過性は高温環境負荷により亢進することが判った。

A. 研究目的

医薬品による中枢性有害作用は重篤なものが多い。例えば免疫抑制薬や NSAIDs などによる脳炎、脳症、振戦、けいれんなどである。これら薬剤は、BBB により脳内移行が制限されている。しかし、これら医薬品による中枢性有害作用の発現は、病態下の医薬品 BBB 透過の変容を示唆する。BBB の病態生理については不明な点が多く、各医薬品によるその機能への影響も明らかではない。そこで、常態時および病態時の in vitro BBB モデルを作製し、BBB 病態の解析と医薬品による影響について検討することを企てた。本成績と中枢性有害作用との関連性を明らかにし病態下の医薬品安全性の確立を目指す。

B. 研究方法

脳微小梗塞周囲部-BBB モデル：マウス脳血管内皮細胞株 (MBEC4) を培養インサートに播種し、in vitro BBB モデルを作製した。本モデルを glucose-free Ringer、37°C、95% N₂ / 5% CO₂ 虚血条件下で 4 時間インキュベートした (hypoxia) 後、glucose 含有 Ringer、95% air / 5% CO₂ 条件下で 1 時間 (reoxygenation)、さらに glucose+血清含有 Ringer、95% air / 5% CO₂ 下で 0-7 日間インキュベート (再構成) し、脳微小梗塞周囲部-BBB モデル (hypoxia 群) とした。

発熱-BBB モデル：高温度培養条件を BBB モ

デルに負荷することにより病態モデルを作製した。すなわち、serum free DMEM、38.5, 39, 40, 41°C、95% Air / 5% CO₂ 条件下で 6 時間インキュベートした。

BBB 透過性評価：上記の各病態モデルを使用し、血管側に sodium fluorescein (Na-F) および Evans blue albumin (EBA) を入れ、脳実質側から回収し透過係数を算出し、BBB 透過性の指標とした。

P-gp 排出機能評価：MBEC4 培養プレートもしくは上記モデルを使用し、rhodamine 123 を加えて、一時間後に NaOH で可溶化し、MBEC4 内 rhodamine 123 (R123) 蓄積量を測定し、P-gp 機能の指標とした。

(倫理面への配慮)

本研究施設に設置されている動物実験等倫理委員会の承認の元、実験を行った。

C. 研究結果

脳微小梗塞周囲部-血液脳関門モデルに対する CsA の作用：Hypoxia (4 hr) / reoxygenation (1 hr) 負荷後、再構成 1 日目および再構成 7 日目では、細胞数および Na-F と Evans blue albumin 透過係数については normoxia 群のそれらと有意な差は認められなかった。再構成 7 日目において rhodamine 123 細胞内取り込み量は normoxia 群と比較して有意に増加し、P-gp 蛋白量は減少して

いた。再構成 7 日目において、CsA による BBB 透過性亢進作用および rhodamine 123 細胞内取り込み量増加作用は、normoxia 群と比較して hypoxia 群で著明であった。

発熱-血液脳関門モデル構築 : 38.5-41°C で 6 時間高温環境にて培養したところ、温度依存的に Na-F と Evans blue albumin 透過係数は亢進した。また高温負荷による細胞障害は認められなかった。

D. 考察

虚血傷害後に修復された脳血管内皮細胞が正常な機能を有していないと考え、脳微小梗塞周囲部-BBB モデルを作製し CsA の作用を検討した。虚血再灌流傷害後に再構成された BBB では正常な BBB よりも P-gp 機能が低下していた。これは P-gp 発現量の減少によるものであった。また CsA により BBB 透過性亢進作用および P-gp 排出機能障害作用が増強されたことから、虚血再灌流傷害後に再構成された BBB は CsA に対して脆弱であることが示された。CsA は P-gp により血液側に排出されることから、虚血傷害後に再構成された BBB では CsA 透過性が亢進することが考えられる。NSAIDs はインフルエンザ等の感染症により誘発された発熱下で使用される。そこで、発熱病態下での NSAIDs の作用を検討するため、発熱-BBB モデル作製に着手した。高温環境を負荷すると BBB 透過性は温度依存的に亢進した。発熱時には BBB 機能が低下することが示唆された。今回、発熱-BBB モデルを作製し、脳血管内皮細胞の密着結合能への影響を明らかにした。現在、密着結合構造蛋白質の発現変動、また各種トランスポーター (organic anion transporter, monocarboxylic acid transporter) の機能と発現の変動等に関する基礎的解析を行っている。NSAIDs 等による BBB 密着結合能への影響及びこれら医薬品の BBB 移行性について発熱-BBB モデルを用いて検討中である。また、脳微小梗塞周囲部-BBB モデルにおける CsA の BBB 移行性も明らかとなりつつある。これらの情報を総合すれば、医薬品による中枢性有害作用の回避対策に関して、BBB の病態生理を踏ま

えた試案を築くことが可能となるだろう。

E. 結論

虚血傷害後に再構成されて BBB は CsA に脆弱であるために、その脳移行は容易である可能性が示唆された。本研究は、BBB 病態モデルを用いて薬物による中枢性有害作用の危険因子の探索とその回避対策に関する実験証拠を提供するものとして興味深い。

F. 健康危機情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) **Forced exercise-induced flushing of tail skin in ovariectomized mice, as a new experimental model of menopausal hot flushes**

Shuto H, Yamauchi A, Ikeda M, Sohda Y, Koga A, Tominaga K, Egawa T, Kataoka Y
J. Pharmacol. Sci., **98**, 323-326, (2005)

2) **Cyclosporin A aggravates electroshock-induced convulsions in mice with a transient middle cerebral artery occlusion**

Yamauchi A, Shuto H, Dohgu S, Nakano Y, Egawa T, Kataoka Y
Cell. Mol. Neurobiol., **25**(5), 923-928, (2005)

2. 学会発表

Takata F, Dohgu S, Sumi N, Yamauchi A, Shuto H, Kataoka Y

Dysfunction of the Blood-Brain Barrier with RAGE ligands. VIth Conference on Cerebral Vascular Biology, Munster, Germany, June, 2005

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shuto H, Yamauchi A, Ikeda M, Sohda Y, Koga A, Tominaga K, Egawa T, Kataoka Y	Forced exercise-induced flushing of tail skin in ovariectomized mice, as a new experimental model of menopausal hot flushes	J. Pharmacol. Sci.	98	323-326	2005
Yamauchi A, Shuto H, Dohgu S, Nakano Y, Egawa T, Kataoka Y	Cyclosporin A aggravates electroshock-induced convulsions in mice with a transient middle cerebral artery occlusion	Cell. Mol. Neurobiol.,	25	923-928	2005

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
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

分担研究者 楠原 洋之 東京大学大学院薬学系研究科 助教授

研究要旨 血液脳関門の異物排泄過程における薬物間相互作用予測システムの構築を目指して研究を行った。血液脳関門に発現する ABC トランスポーター-BCRP について、発現系を用いた *in vitro* 輸送実験、ならびに BCRP ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 実験を行った。BCRP 基質となる化合物の中には、PhIP を始めとして BCRP ノックアウトマウスで脳内濃度が増加するものが見出された。速度論解析を行ったところ、ノックアウトの影響は取り込み初速度では評価できず、定常状態で評価する必要があることが明らかになった。

A. 研究目的

血液脳関門の関門機能の破綻には、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。後者については、キニジンとロペラミドとの薬物間相互作用は血液脳関門を介した異物排泄メカニズムを介したものであることが示唆されている。このような薬物間相互作用を予測・評価するシステムを開発することは、安全な薬剤療法を達成するために必須である。

本研究では、特に後者による関門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、薬物間相互作用の可能性について検討、ならびにその評価系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

マウスに静脈内定速静注を行い、定常状態での血漿中濃度ならびに脳内濃度を測定した。また、*in situ* 脳灌流法を用いて、初期脳移行速度を測定した。

C. 研究結果

発癌物質である PhIP の脳内濃度は、BCRP ノックアウトマウスで増加した。血漿中濃度で補正した脳分布容積は、BCRP ノックアウトマウスで野生型マウスの約 3 倍に増加した。また PhIP の代謝物である N-OH 体の脳内濃度も BCRP ノックアウトマウスで増加し、脳分布容積は 2 倍に増加した。一方、*in situ* 脳灌流法を用いて、脳への取り込み初速度を比較したときには両者に差が見られなかった。

BCRP 基質として、pitavastatin とニュー

キノロン系抗生物質のについても同様の実験を行った。両化合物ともに、胆汁排泄には BCRP が関与しているものの、脳内濃度は野生型マウスと BCRP ノックアウトマウスでは同じ値を示し、BCRP ノックアウトの影響は見られなかった。

D. 考察

血液脳関門における重要な異物排泄トランスポーターである P-糖蛋白質 (P-gp) は、脳への取り込み初速度に影響を与えることが知られている。これに対して、BCRP は *in situ* 脳灌流法で評価した初期の取り込み初速度に影響を与えない、という速度論上の違いが見られた。P-gp は膜内から基質を認識すると考えられており、医薬品の細胞膜透過能に直接影響を与える。BCRP は初速度に影響を与えないことから、細胞質方向から基質を認識するものと考えられる。PhIP 以外に検討した pitavastatin とニューキノロン系抗生物質については、胆汁排泄過程と異なり、BCRP の基質となるもの脳内移行性に BCRP は関与していなかった。ニューキノロン系抗生物質のいくつかは P-gp により脳内からくみ出されていることが明らかにされており、P-gp の寄与率の方が高いものと思われる。Pitavastatin についても同様の議論が可能と考えている。

E. 結論

血液脳関門における排出輸送系として、BCRP が異物排泄に働くことを明らかにした。その寄与率に関しては、P-gp とともに考慮する必要があり、今後 P-gp と BCRP による輸送能を *in vitro* で評価し、輸送活性と脳内濃度の増加について定量的に考察することが必要である。PhIP は、BCRP 発現系を用いた *in vitro* 阻害実験のほか、マ