

血液脳関門機能低下マウスにおける
オセルタミビルの脳移行性に対する
葛根湯の作用

城西国際大学大学院薬学研究科
医療薬学専攻

大原 厚祐

目次

略語	．．． i
総論の部	
緒言	．．． 1
第1編 LPS 誘発 BBB 機能低下マウスにおける種々モデル物質の 脳移行性に対する葛根湯併用の影響	．．． 4
第1章 OP 経口投与後の OP および OC 脳移行性に対する 葛根湯併用の影響	．．． 4
第1節 OP および OC の血漿中および脳中濃度	．．． 7
第2節 肝 CES 活性	．．． 10
第3節 本章の考察	．．． 11
第2章 OC 静脈内投与後の OC 脳移行性に対する 葛根湯併用の影響	．．． 12
第1節 OC の血漿中および脳中濃度	．．． 12
第2節 血液生化学検査値	．．． 14
第3節 本章の考察	．．． 16
第3章 水溶性モデル物質の脳移行性に対する葛根湯併用の影響	．．． 17
第1節 水溶性モデル物質の脳移行性評価	．．． 18
第2節 本章の考察	．．． 20
第4章 小括	．．． 21

第2編 葛根湯による BBB 機能低下抑制効果の検討	・ ・ ・ 22
第1章 TJ 関連タンパク質の発現量に対する葛根湯の作用	・ ・ ・ 22
第1節 ZO-1、Occludin および Claudin-5 発現量	・ ・ ・ 24
第2節 本章の考察	・ ・ ・ 25
第2章 BBB 機能低下をもたらす炎症性物質に対する葛根湯の作用	・ ・ ・ 26
第1節 酸化ストレス関連物質	・ ・ ・ 27
第2節 TNF- α 、MMP-9 および TIMP-1	・ ・ ・ 29
第3節 本章の考察	・ ・ ・ 31
第3章 トランスポーターの発現量に対する葛根湯の作用	・ ・ ・ 32
第1節 MRP4 および OAT3 発現量	・ ・ ・ 33
第2節 本章の考察	・ ・ ・ 34
第4章 小括	・ ・ ・ 35
結論	・ ・ ・ 36
謝辞	・ ・ ・ 38
実験の部	
第1編 実験の部	・ ・ ・ 39
第2編 実験の部	・ ・ ・ 46
引用文献	・ ・ ・ 52

略語

本論文中に使用した略語について以下に記載する。

AJ	: Adherens junction
AUC	: Area Under the Concentration-time Curve
BBB	: Blood Brain Barrier
BPR	: Brain-to-Plasma Ratio
Cal	: Calcein
CES	: Carboxylesterase
EB	: Evans Blue
FDA	: Food and Drug Administration
FD-4	: Fluorescein isothiocyanate–dextran
Flu	: Fluorescein sodium salt
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IL	: Interleukin
LPS	: Lipopolysaccharide
JAMs	: Junctional adhesion molecules
MMP-9	: Matrix Metalloproteinase-9
MRP4	: Multidrug Resistance-associated Protein 4
NSAIDs	: Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
OAT3	: Organic Anion Transporter 3
OC	: Oseltamivir Carboxylate

OP : Oseltamivir Phosphate
PBS : Phosphate Buffered Saline
PMDA : Pharmaceutical and Medical Devices Agency
ROS : Reactive Oxygen Species
S.E.M. : Standard error of mean
SOD : Superoxide dismutase
TCA : Trichloroacetic acid
TJ : Tight junction
TLR4 : Toll like receptor 4
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
TIMP-1 : Tissue inhibitory metalloproteinase-1
ZO-1 : Zonulae Occludin-1

総論の部

総論の部

緒言

「かぜ」はありふれた疾患である。その 80–90%はウイルスに起因したものであるが、多くは無治療により治癒するか、あるいは、セルフメディケーションによる対症療法で軽快する。しかし、インフルエンザ感染症は、一般的な感冒と異なり重症化しやすく、脳症や肺炎を引き起こした場合、死に至るケースも少なくない¹⁾。そのため、インフルエンザ感染症の予防や治療は極めて重要である。

インフルエンザ感染症に対する薬物治療は、副作用の観点から、たびたび問題となってきた。1982 年、アスピリンとライ症候群の関係についての報告に端を発し²⁾、2000 年代には、インフルエンザ脳炎・脳症患者に対してジクロフェナクやメフェナム酸を使用すると高い致死率を示すことが明らかとなった³⁾。これらのことから、現在では、インフルエンザ感染症あるいは脳炎・脳症に対する非ステロイド性消炎鎮痛薬 (NSAIDs) の使用には医療上の規制がある。

一方、世界初の抗 A・抗 B インフルエンザ感染症治療薬であるオセルタミビルリン酸塩 (OP: 商品名 タミフル) は 2005 年以降、異常行動との関連性が指摘され、現在では 10–19 歳の未成年への投与は原則禁忌であるものの、その後開発された同効薬であるザナミビルやラニナミビルが吸入薬であるのに対し、OP は内服薬であることから、肺炎を合併した患者や重症患者でも使用でき、さらに使用実績が多く多数のエビデンスが報告されているため⁴⁸⁾、現在でも成人におけるインフルエンザ感染症の第一選択となることが多い。さらに、近年、OP は 0 歳児にも保険適応となり、有効性・汎用性の点から、優れた薬剤であると考えられている。しかしながら、依然として異常行動の問題は、解決するに至って

いない。

1976年、多くの漢方エキス製剤が日本の保険医療に導入され、これを契機に漢方薬が急速に普及するようになった。現在では、内科医の約90%が漢方薬の使用を経験しており⁴⁾、漢方薬は現代医療に欠かせないものとなっている。また、漢方薬は一般用医薬品（OTC）として市販されており、セルフメディケーションを担う薬剤として期待されている。とりわけ葛根湯は、インフルエンザ感染症を含む感冒の初期に効果があることから繁用されている。

葛根湯は、葛根、大棗、麻黄、甘草、桂皮、芍薬、生姜の7種の生薬で構成される漢方薬である。古くから日本や中国において感冒の治療薬として使用されてきた。漢方の原典といわれる『傷寒論』において、「太陽病、項背強ばること凡几、汗なく悪風するは葛根湯之を主る」と記されているように、葛根湯は、体力が充実した人の風邪の初期で、自然発汗がなく、悪寒、発熱、頭痛、項背部のこわばりを伴う場合に用いられる。

インフルエンザ感染症に対する葛根湯の効果に関しては、数多くの基礎研究が行われており、西洋医学的なエビデンスが確立されている。基礎研究では、葛根湯によるIL-1 α 産生抑制作用⁵⁾、IL-12産生亢進作用⁶⁾、マクロファージ貪食能の活性化⁷⁾、PI3K/Aktシグナル経路の抑制を介したインフルエンザウイルスの複製阻害作用⁸⁾、構成生薬である麻黄によるMDCK細胞中のインフルエンザA/PR/8/34（H1N1）ウイルスの成長阻害作用⁹⁾、葛根の主要成分であるゲニステインによる好中球遊走因子1および2の抑制作用¹⁰⁾、さらに大棗によるナチュラルキラー細胞の活性増強作用¹¹⁾が報告されており、葛根湯もしくは活性成分の多様な薬理作用が明らかになっている。

また、興味深いことに、患者を対象としたアンケート調査で、前述したOPと葛根湯の併用による有熱時間の短縮や、症状の早期改善といった相乗効果が報

告されている¹²⁾。

OP と葛根湯は共に「かぜ」の汎用薬であり、臨床的に併用されるケースがある。しかしながら、併用効果に関する基礎的研究はない。そこで、著者は、OP と葛根湯の併用効果を、副作用である異常行動発現の観点から検討するという発想に至った。

OP による異常行動は、独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 (PMDA) やアメリカ食品医薬品局 (FDA) の副作用データベースに多数報告されている。しかし、葛根湯の併用ケースは少数であり疫学的エビデンスを求めるのは困難である。その理由は、葛根湯は OTC として使用されることが大多数であり副作用データベースへの登録が行われなかったためと推定される。そのため、OP と葛根湯の併用効果については、基礎研究によって明らかにする必要がある。

一般に、薬物による中枢性の副作用は、薬物が脳へ移行することによって生じる。血液脳関門 (BBB) はこの脳移行性を厳密に制限している。ところが、インフルエンザ感染症のような全身性の炎症時には、BBB 機能が低下し、物質の脳移行性が亢進する。動物実験レベルでは、炎症時にジクロフェナクやメフェナム酸¹³⁾、OP の代謝物であるオセルタミビルカルボキシレート (OC)¹⁴⁾ の脳移行性が亢進することが明らかとなっており、このことが、上述の副作用発現の一因と考えられている。

そこで先ず、OP および OC の脳移行性に対する葛根湯併用の影響について検討し (第 1 編、第 1, 2 章)、併せて種々水溶性モデル物質の脳移行性に対する葛根湯併用の影響について調べた (第 1 編、第 3 章)。次に、BBB 機能、すなわち、タイトジャンクション (TJ) 関連タンパク質の量的変化、BBB 機能に影響する炎症性物質およびトランスポーター発現量に対する葛根湯の作用について詳細に調べた (第 2 編)。以下、これらの結果を 2 編にわたり論述する。

第1編 LPS 誘発 BBB 機能低下マウスにおける種々モデル物質の脳移行性に対する葛根湯併用の影響

第1章 OP 経口投与後の OP および OC 脳移行性に対する葛根湯併用の影響

緒言で述べたように、インフルエンザ感染症治療薬であるオセルタミビルリン酸塩 (OP : 商品名 タミフル) を服用した患者に異常行動が認められたことから、2007 年 3 月、厚生労働省は緊急安全性情報の配布を製薬会社に指示し、大きな社会問題となった¹⁵⁾。現在に至るまでに OP と異常行動との関連性についての研究は数多く行われているものの、未だ一貫した結論は得られていない。

2012 年に Hoffman KB らは、1999 年から 2011 年の間に FDA の副作用自発報告システムに報告された OP の異常行動のオッズ比は 29.35 と報告している¹⁶⁾。一方で、疫学的手法を用いた臨床的な検討では、OP 服用の有無にかかわらず、インフルエンザ感染症そのものに異常行動のリスクがあると結論付けている⁵⁰⁾。基礎研究では OP やその活性代謝物であるオセルタミビルカルボキシレート (OC) に海馬神経の興奮作用があること¹⁷⁾、また、動物の脳室内に OC を投与すると行動変化を生じること¹⁸⁾、が報告されており、OP および OC による異常行動が示唆されている。

このように、現時点において、異常行動が OP および OC による副作用であるかどうかの判断は難しいが、予防の原則のもと、それを未然に防ぐための手段としては、これらの脳移行性を抑制することである。

Oshima らは、リポポリサッカライド (LPS) 誘発 BBB 機能低下マウスに OP を経口投与すると、OC の脳移行性が亢進することを報告している¹⁴⁾。すなわち、このことから、BBB 機能低下時に OC の脳移行性が亢進し、これに伴い海馬神

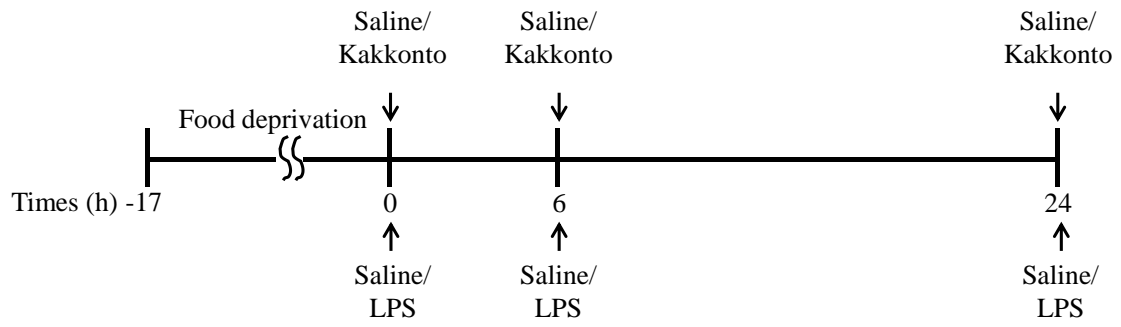
経が興奮して異常行動につながるという仮説が成り立つ。

葛根湯は、抗炎症作用¹⁹⁾、抗酸化作用²⁰⁾²¹⁾などの薬理作用を有することが報告されている。これら作用が、BBB 機能の低下を抑制し、OC の脳移行性を低下させる可能性があるものの、そのような研究は行われていない。脳移行性を抑制させるのであれば、臨床での積極的併用を推奨できる。

そこで、本章ではまず、LPS 誘発 BBB 機能低下マウスを用いて OP 経口投与後の OP および OC の脳移行性に対する葛根湯併用の影響について検討することとした。また、OP から OC への代謝酵素であり、これらの血漿中濃度を支配する肝カルボキシルエステラーゼ (CES) 活性についても、葛根湯投与の影響を受けるか、併せて検討することとした。

本研究では Scheme 1 に示すように LPS により BBB 機能を低下させ同時に投与された葛根湯の効果を検証した。LPS は 3 mg/kg、0.2 mL を腹腔内へ投与した。また、葛根湯は 0.125 g/kg、0.1 mL を経口投与した。Table 1 には群分けを示す。

SS 群と LS 群の結果はすでに Oshima らによって報告されているため、本章では LS 群と LK 群について、処理後の OP および OC の血漿中および脳中濃度、さらに肝 CES 活性を測定した。



Scheme 1 Experimental protocol for the animal study.

Table 1 Grouping for the animal study.

Group	LPS	Kakkonto
SS (Saline-Saline)	-	-
LS (LPS-Saline)	+	-
LK (LPS-Kakkonto)	+	+

第1節 OP および OC の血漿中および脳中濃度

本節では、OP 経口投与後の OP および OC の脳移行性に対する葛根湯併用の影響について検討した。3 回目の LPS 投与から 4 時間後に OP (300 mg/kg) を経口投与し、そこから 5 分、60 分、120 分の血漿および脳を採取し、OP および OC 濃度を測定した。得られた結果から、濃度時間曲線下面積 (AUC) の BPR ($AUC_{\text{brain}}/AUC_{\text{plasma}}$ ratio) を算出し、OP および OC の脳移行性を評価した。

Fig. 1 には、OP 経口投与後の血漿中および脳中 OP 濃度の経時的变化を示す。血漿中 OP 濃度は、LS 群と比較して LK 群で有意に高値を示し (Fig. 1 (a))、LK 群の脳中 OP 濃度は、LS 群と比較して 60 分および 120 分で有意に高値を示した (Fig. 1 (b))。LK 群の血漿中 OP 濃度の AUC_{0-120} 、脳中 OP 濃度の AUC_{0-120} は、LS 群と比較して、それぞれ 2.60 倍、2.52 倍高値を示した (Table 2)。

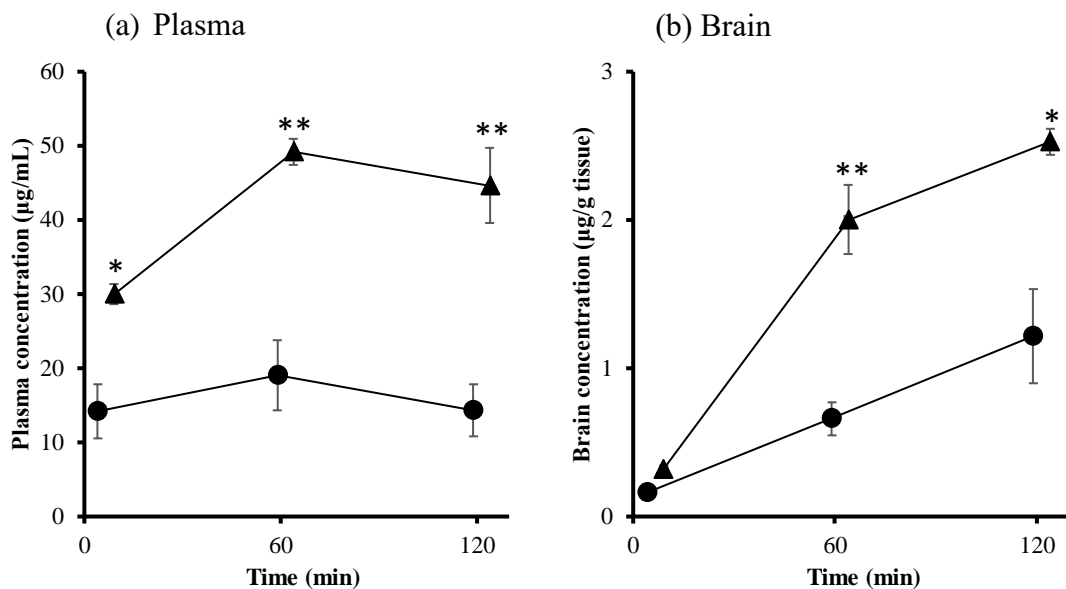


Fig. 1 Plasma (a) and Brain (b) concentrations versus time profiles of OP after the oral administration of OP to mice with LPS-induced inflammation. Data represent the means \pm S.E.M. of 3-7 mice. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, Student's t-test. Symbols: ●, LS group, ▲, LK group.

Fig. 2 には、OP 経口投与後の血漿中および脳中 OC 濃度の経時的変化を示す。血漿中 OC 濃度は、LS 群と比較して LK 群では、5 分および 120 分で有意に高値を示した (Fig. 2 (a))。また、脳中 OC 濃度は、LS 群と比較して LK 群では、投与後 60 分で有意に低値を示し、120 分でも低い傾向を示した (Fig. 2 (b))。LK 群の血漿中 OC 濃度の AUC_{0-120} 、脳中 OC 濃度の AUC_{0-120} は、LS 群と比較して、それぞれ 1.57 倍、0.37 倍となった (Table 2)。

OP の BPR は、LS 群に比べて LK 群で約 0.97 倍であった。一方、OC では約 0.23 倍であり、葛根湯の併用は OP の脳移行性には影響を与えず、OC の脳移行性を抑制することが明らかとなった (Table 2)。

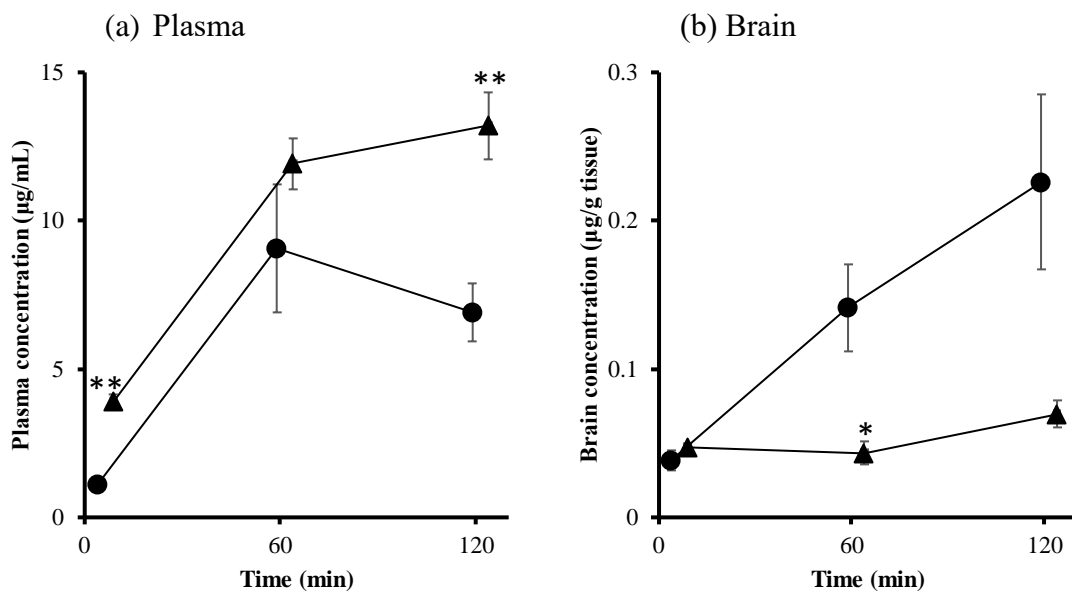


Fig. 2 Plasma (a) and Brain (b) concentrations versus time profiles of OC after the oral administration of OP to mice with LPS-induced inflammation. Data represent the means \pm S.E.M. of 3-7 mice. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, Student's t-test. Symbols: ●, LS group, ▲, LK group.

Table 2 The AUC₀₋₁₂₀ and the mean BPR of OP and OC following oral administration of OP to mice with LPS-induced inflammation.

	AUC				BPR	
	Plasma (min•μg/mL)		Brain (min•μg/g tissue)		(mL/g tissue)	
	OP	OC	OP	OC	OP	OC
LS	1949.86	762.01	79.35	16.06	0.041	0.021
LK	5066.10	1199.90	200.21	5.98	0.040	0.005

第2節 肝 CES 活性

OP は、エステル型のプロドラッグであり、肝臓の CES によって OC へと代謝される²²⁾。臨床研究において、ある被験者の血漿中 OP 濃度の AUC が、他の被験者の平均より 6–10 倍高値を示したが、これは肝 CES 活性の違いによるものであることが明らかとなっている²³⁾。そのため、肝 CES 活性は、OP および OC の動態に大きく影響を及ぼすと考えられる。前節において、葛根湯併用により血漿中 OP および OC 濃度が上昇した。この要因には、葛根湯の併用により OP の吸収が増大している可能性があること、また、肝 CES 活性の低下を生じている可能性も考えられる。そこで、本節では、肝 CES 活性に対する葛根湯投与の影響について検討した。

Fig. 3 には、LS 群および LK 群の肝ミクロソーム分画における OP から OC への代謝速度を示す。LS 群と比較して LK 群では代謝速度の低下傾向は認められたものの、有意な差は認められなかった。

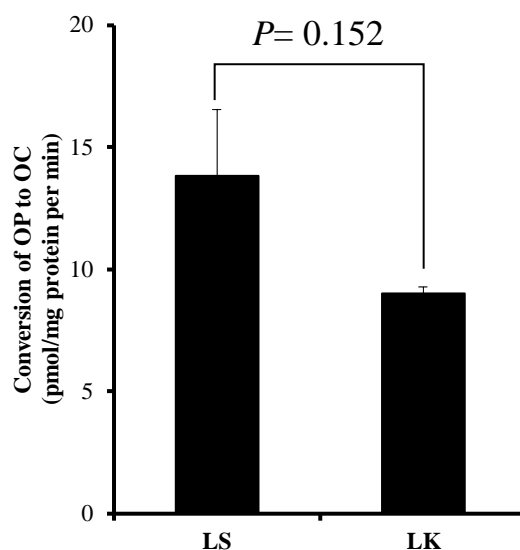


Fig. 3 Effect of Kakkonto on the rate of OP conversion to OC in mice with LPS-induced inflammation. Data represent the means \pm S.E.M. of 3-5 mice.

第3節 本章の考察

本章では、OP 経口投与後の OP および OC の脳移行性に対する葛根湯併用の影響について検討した。その結果、OP と葛根湯の併用により、血漿中 OP および OC 濃度は上昇するものの、OC の脳移行性は抑制されることを明らかにした (Figs. 1 and 2)。LK 群では、肝 CES 活性は低値であったが、有意な差は認められなかったことから (Fig. 3)、葛根湯併用による血漿中 OP 濃度の上昇は、肝 CES 活性の低下よりも、OP の吸収増大がより大きく寄与している可能性が示唆された。葛根湯の構成生薬である葛根に消化管運動亢進作用、芍薬および桂皮に末梢血管拡張作用があり、これら作用が、OP の吸収増大に関与している可能性がある。また、OP の吸収増大に伴い、OC の血漿中濃度が上昇したと考えられる。OC はインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼを阻害する活性代謝物であることから、葛根湯併用による血漿中 OC 濃度の上昇は、インフルエンザ感染症に対する治療効果を高める可能性が示唆された。その一方で、葛根湯の併用により血漿中 OC 濃度が高値を示したにも関わらず、OC の脳移行性が抑制されたことから、OC に起因する中枢性副作用の発現を抑制できる可能性がある。すなわち、OP と葛根湯の併用は、相乗効果が期待でき、また OC に起因した異常行動の発現リスクを減らす可能性が示唆された。

第 2 章 OC 静脈内投与後の OC 脳移行性に対する葛根湯併用の影響

前章では、OP と葛根湯の併用により、OC の脳移行性が抑制されることを明らかにした。しかしながら、経口投与の実験であるため、吸収過程の影響を排除できない。そこで、OC の脳移行性に対する葛根湯の影響にのみ焦点を当てるために、本章では OC の静脈内投与と葛根湯の併用実験を行った。また、併せて臓器機能を評価するために血液生化学検査値を測定した。

第 1 節 OC の血漿中および脳中濃度

Scheme 1 の 3 回目の LPS 投与から 4 時間後に OC (20 mg/kg) を静脈内投与し、そこから 5 分、60 分、120 分の血漿および脳を採取し、OC 濃度を測定した。得られた結果から、 AUC_{0-120} の BPR を算出し、OC の脳移行性を評価した。

Fig. 4 には、血漿中および脳中 OC 濃度の経時的変化を示す。血漿中 OC 濃度は投与後 60 分、120 分において、SS 群と比較して LS 群で有意に高値を示し、LS 群と LK 群の血漿中 OC 濃度の比較では、投与後 60 分において、LK 群で有意に低値を示した (Fig. 4 (a))。また、SS 群と LS 群の脳中 OC 濃度の比較では、投与後 60 分で高い傾向を示し、120 分で有意に高値を示した (Fig. 4 (b))。一方、LK 群では、SS 群とほぼ変わらない脳中濃度を示し、LS 群で認められた脳中濃度のばらつきを有意に低下させた (F-test : 5 min; $p = 0.023$, 60 min; $p = 0.036$, 120 min; $p = 0.008$) (Fig. 4 (b))。

OC の AUC_{0-120} の BPR は、SS 群と比較して LS 群では 2.1 倍高値を示し、LS 群と比較して LK 群では 0.38 倍となった (Table 3)。このことから、葛根湯の併用は、LPS 投与により増大した OC の脳移行性を抑制することが明らかとなった。

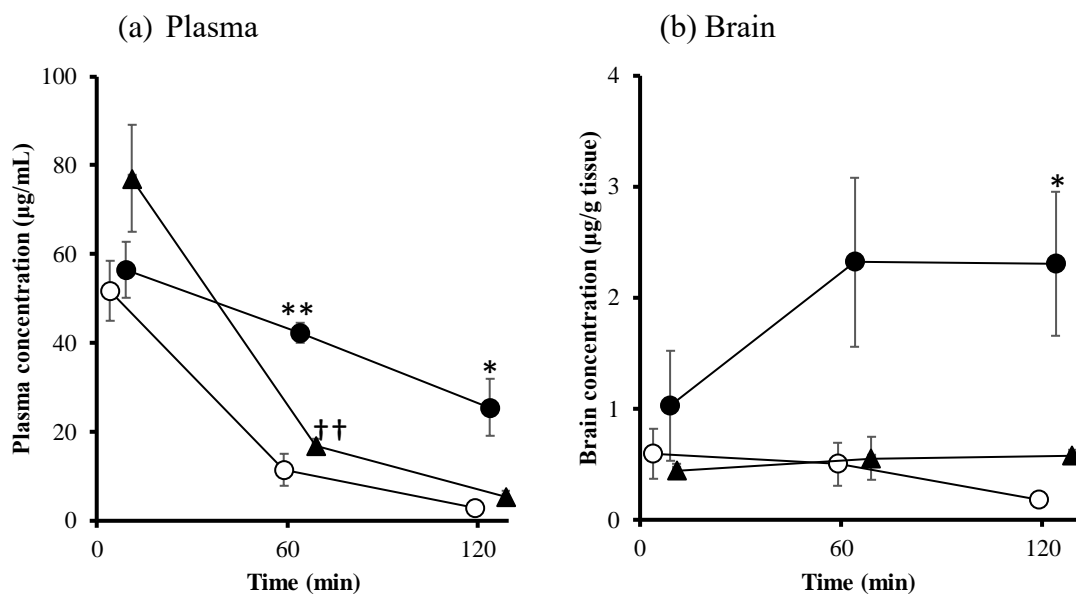


Fig. 4 Plasma (a) and Brain (b) concentrations versus time profiles of OC after the intravenous administration of OC to mice with LPS-induced inflammation. Data represent the means \pm S.E.M. of 3-6 mice. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ (versus SS group), †† $P < 0.01$ (versus LS group), Tukey-Kramer test. Symbols: \circ , SS group, \bullet , LS group, \blacktriangle , LK group.

Table 3 The AUC₀₋₁₂₀ and the mean BPR of OC following intravenous administration of OC to mice with LPS-induced inflammation.

	AUC		BPR
	Plasma (min \cdot $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Brain (min \cdot $\mu\text{g}/\text{g}$ tissue)	(mL/g tissue)
SS	2304.00	52.23	0.023
LS	4889.48	233.51	0.048
LK	3434.75	62.69	0.018

第2節 血液生化学検査値

第1章のOP経口投与実験と同様に、前節のOC静脈内投与実験においても、葛根湯併用によりOCの脳移行性が抑制されることを明らかにした。

本節では、肝機能や腎機能は薬物動態の変動要因であることから、臓器機能に対する葛根湯投与の影響を調べることにした。

Table 4には、血液生化学検査値の結果を示す。LS群に葛根湯を経口投与するとクレアチニン（CRE）濃度の値が定量下限値まで低下した。また、SS群と比較してLS群で血中尿素窒素（BUN）が有意に高値を示し、LK群ではSS群と比較して高い傾向を示したものの、有意な差は認められなかった。アルブミン（ALB）濃度は、SS群と比較してLS群およびLK群で有意に低値を示した。カルシウムイオン（Ca⁺⁺）濃度は、SS群と比較してLS群で有意に高値を示し、LK群とSS群は有意な差は認められなかった。また、グルコース（GLU）濃度は、SS群と比較してLS群およびLK群で有意に低値を示した。その他の測定項目は、3群間で有意差を認めなかった。

Table 4 Blood biochemistry parameters in mice with LPS-induced inflammation.

	SS	LS	LK
ALP	88.0 ± 12.86	51.4 ± 21.45	33.6 ± 3.39
ALT	38.2 ± 5.69	71.2 ± 15.12	69.6 ± 3.61
AMY	913.4 ± 52.02	1058.2 ± 107.55	949.8 ± 100.96
CRE	<0.2 †	0.5 ± 0.11 *	<0.2 †
BUN	18.4 ± 3.23	75.8 ± 23.22 *	59.4 ± 4.21
TP	4.9 ± 0.22	5.3 ± 0.10	5.0 ± 0.06
ALB	3.7 ± 0.16	2.7 ± 0.07 ***	2.6 ± 0.06 ***
TBIL	0.3 ± 0.04	0.3 ± 0.02	0.2 ± 0.02
Na+	141.0 ± 1.22	145.8 ± 2.75	139.4 ± 1.33
K+	6.2 ± 0.38	6.9 ± 0.49	7.3 ± 0.48
Ca++	8.5 ± 0.17	9.4 ± 0.10 **	8.9 ± 0.17
PHOS	7.7 ± 0.27	10.2 ± 1.4	10.2 ± 0.36
GLU	127.6 ± 20.25	33.6 ± 8.86 **	65.4 ± 3.12 *

Data represent the means ± S.E.M. of 5-6 mice.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ (versus SS group), Tukey-Kramer test.

† Below the limit of quantitation.

第3節 本章の考察

本章では、OC 静脈内投与後の OC 脳移行性に対する葛根湯併用の影響について検討した。その結果、LPS の投与により OC 脳移行性が亢進し、これに葛根湯を併用することで、OC 脳移行性が抑制されることを明らかにした (Fig.4 and Table 3)。

また、CRE 値が LS 群と比較して LK 群で低値 (定量下限値) を示し、BUN 値は LK 群で低い傾向を示したことから (Table 4)、葛根湯には腎機能低下抑制効果がある可能が示唆された。これにより、腎からの OC 排泄が正常化し、血漿中 OC 濃度の低下につながったと考えられる。

第3章 水溶性モデル物質の脳移行性に対する葛根湯併用の影響

血液から脳への物質移行は、BBB によって制限されており、この BBB は脳毛細血管内皮細胞間のタイトジャンクション (TJ)、アストロサイトおよびペリサイトから構成される⁵¹⁾。さらに、脳内への異物侵入を防ぐ排出トランスポーターも BBB における基質薬物の透過に影響する。

BBB の受動拡散による物質透過機構は、細胞間隙経路と細胞実質経路に分けられる²⁴⁾。前者は、水溶性低分子の移行に寄与するが、TJ によって、ほとんど物質は透過しない。一方、後者は脂溶性低分子の透過に関与するが、分子量 500 以下、油水分配係数 ($\log P$) が 2 付近という制限がある。

OC は、水溶性低分子であり、細胞間隙経路を通過しにくく、また、脳から血液方向への排出輸送に関わる MRP4 および OAT3 の基質になることが報告されている。そのため、通常、脳へ移行しにくい²⁵⁾。しかしながら、炎症状態では、BBB 機能の低下が起こり、脳移行性が亢進する。LPS による OC の脳移行性亢進を葛根湯が抑制させたことから、バリアー機能の維持あるいはトランスポーター機能に影響を及ぼしている可能性がある。

そこで先ず、本章では LPS による BBB バリヤー能低下と葛根湯同時投与による機能低下抑制効果について調べる目的で、種々分子量の水溶性モデル物質の脳移行性について検討した。すなわち、分子サイズの異なる水溶性物質の透過性を調べることで TJ の細胞間隙経路の破綻のレベルを知ることができる。例えば、TJ 関連タンパク質のひとつである Claudin-5 をノックアウトしたマウスでは、分子量選択的な BBB の破綻が認められている²⁶⁾。

水溶性モデル物質として Table 5 に示す 4 種物質を用いた。これらモデル物質の脳移行性に対する葛根湯併用の影響について調べた。なお、脳移行性は BPR

で評価し、FD-4 および Cal は血中濃度が同程度になるように投与量を調節した。EB は BBB 機能評価で汎用される色素であり、血中のアルブミンと 99% 結合するため、EB の脳移行性はアルブミン（高分子量物質）の脳移行性を反映している²⁷⁾。

Table 5 Molecular weight of model substance.

Model substance	MW
Evans blue-albumin (EB)	69,000
Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4)	4,400
Calcein (Cal)	622.5
Fluorescein sodium (Flu)	376.3

第 1 節 水溶性モデル物質の脳移行性評価

Fig. 5 は、3 回目の LPS 投与から 4 時間後に、各水溶性モデル物質を静脈内投与した 2 時間後の BPR である。EB、FD-4 および Cal の BPR は SS 群と比較して LS 群で有意に高値を示し、LK 群は LS 群と比較して有意に低い値を示し SS 群とほぼ変わらない値となった (Fig. 5 (a), (b), (c))。Flu の BPR は SS 群と比較して LS 群および LK 群で有意に高値を示し、LS 群と LK 群には差は認められなかった (Fig. 5 (d))。

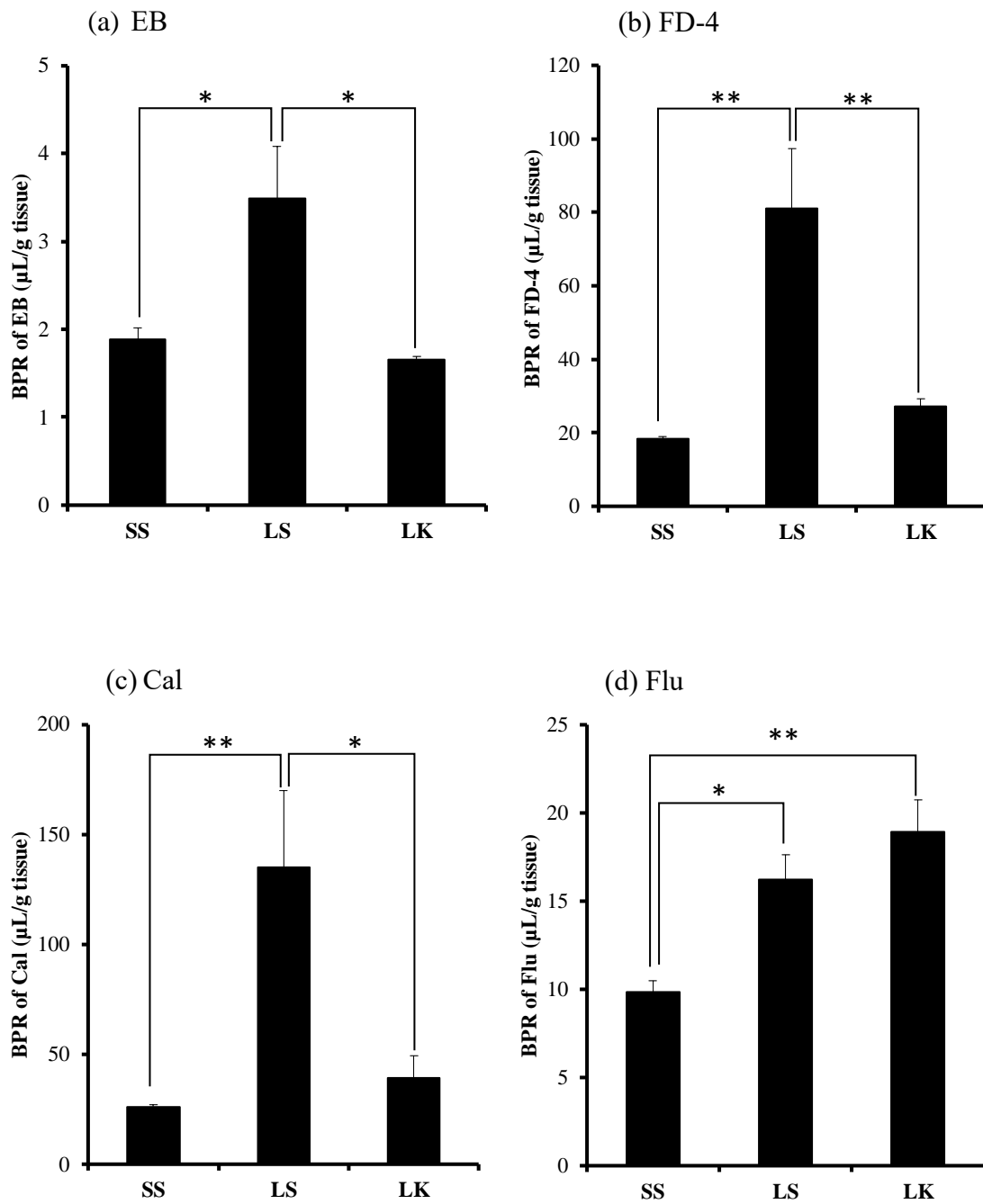


Fig. 5 Effect of Kakkonto administration on BBB integrity in mice with LPS-induced inflammation. (a) EB, (b) FD-4, (c) Cal, (d) Flu. Data represent the means \pm S.E.M. of 4-9 mice. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, Tukey-Kramer test.

第2節 本章の考察

本章では、種々分子量の水溶性モデル物質の脳移行性に対する葛根湯併用の影響について検討した。その結果、LPS 投与により EB、FD-4、Cal、Flu の脳移行性が亢進し、これに葛根湯を併用することで EB、FD-4 および Cal の脳移行性が抑制されたが、Flu の脳移行性は抑制されなかった。このことから、葛根湯は Flu レベル (MW 376.3) の物質移行を制限するまでの BBB の機能低下抑制効果は持たず、Cal レベル (MW 622.5) よりも大きな分子に対するバリアー能の維持効果を有していることが示唆された。すなわち、LPS の細胞間隙拡張効果を抑制している可能性が示唆された。

第4章 小括

第1章および第2章では、OP 経口投与実験およびOC 静脈内投与実験において、葛根湯投与によりOC 脳移行が抑制されることを明らかにした。また、葛根湯はLPSによる腎機能障害に対して抑制効果を示した。第3章では、LPS投与によりEB、FD-4、Cal およびFluの脳移行が亢進し、これに葛根湯を投与することでEB、FD-4 およびCalの脳移行を抑制することを明らかにした。しかし、葛根湯はFluの脳移行性には影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、葛根湯投与による、①OC 脳移行性の抑制効果、②LPSによるTJ 間隙拡張作用を抑制する効果が明らかとなった。

しかし、①と②は、矛盾する点がある。すなわち、葛根湯はLPSにより増大したFlu (MW 376.3)の脳移行性を抑制しなかった一方で、それよりも分子量の小さいOC (MW 284.4)の脳移行性を抑制した。このことは、葛根湯によるOCの脳移行性抑制効果は、TJ 間隙の拡張を抑える効果だけでは説明がつかない。前述したようにOCは排出系トランスポーターであるMRP4やOAT3の基質になることが知られていることから、葛根湯投与はこれらトランスポーター機能に影響を及ぼしていることも考えられる。

そこで、第2編では、TJ 関連タンパク質およびトランスポーター機能に対する葛根湯の作用について詳細に検討する。

第2編 葛根湯による BBB 機能低下抑制効果の検討

第1章 TJ 関連タンパク質の発現量に対する葛根湯の作用

BBB は脳毛細血管内皮細胞、それを取り囲むアストロサイトの足場およびペリサイトから構成され、これらの機能が協調することにより、バリアー能を維持している⁵¹⁾ (Fig. 6)。BBB は末梢の血管内皮細胞とは異なり、TJ 関連タンパク質が発現しており、これにより細胞間隙の密着性を高めている。しかしながら、インフルエンザ感染症や敗血症などの全身性の炎症、虚血性脳血管障害や脳傷害では、BBB 機能が低下し、物質の脳移行性が亢進する。LPS を投与された動物や虚血再灌流モデル動物において、TJ 関連タンパク質が消失・分解し、脳毛細血管内皮細胞においてその発現量が低下することが報告されている⁵⁴⁾。

第1編において、LPS の投与により、種々水溶性モデル物質の脳移行性が亢進し、これに葛根湯を投与することで、Cal レベル (MW 622.5) よりも大きな分子に対するバリアー能の維持、すなわち、細胞間隙拡張に対する抑制効果を示すことが明らかになった。このことから、葛根湯が TJ 関連タンパク質の機能に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

TJ 関連タンパク質は、Occludin、Claudins および JAMs の膜貫通タンパク質と裏打ちタンパク質である ZOs に大別され²⁸⁾、これらは BBB のバリアー能の中心的役割を担っている。Occludin は分子量 60-65 kDa の 4 回膜貫通タンパク質であり、最初に発見された TJ 関連タンパク質である。その作用は未だ解明されていないが、BBB のバリアー能に関与していると考えられている。Claudins は、哺乳類では 24 種のサブタイプからなる 4 回膜貫通タンパク質である。脳毛細血管内皮細胞では、Claudin-1、Claudin-3、Claudin-5、Claudin-12 などのサブタイプが

発現しているが、Claudin-5 が BBB 透過性において最も重要である。Claudin-5 のノックアウトマウスでは分子量 800 以下の物質の透過が亢進するものの、それ以上の分子量の物質の透過には影響を与えないことが報告されている²⁶⁾。ZOs は、3 つのサブタイプからなる裏打ちタンパク質である。Occludin や Claudin-5 の膜貫通タンパク質と結合しアクチン骨格と連結することで TJ 関連タンパク質の安定性を維持している。ZO-1 の発現量低下は、BBB 透過性亢進を引き起こすことが知られている。

本章では、BBB において重要な TJ 関連タンパク質である ZO-1、Occludin および Claudin-5 発現量に対する葛根湯の作用について検討した。

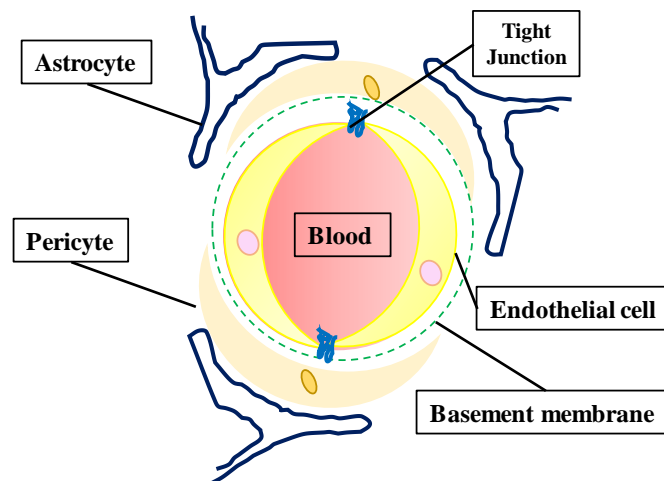


Fig. 6 Structure of BBB.

第1節 ZO-1、Occludin および Claudin-5 発現量

Fig. 7は、第1編で示した Scheme 1 の3回目のLPS投与から4時間後のマウス脳毛細血管内皮細胞中の TJ 関連タンパク質発現量をウエスタンブロット法により測定した結果である。ZO-1 発現量は SS 群と比較して LS 群および LK 群で有意に低値を示したが、LK 群は LS 群よりもわずかに高い値を示した (Fig. 7 (a)) Occludin 発現量は SS 群と LS 群で差は認められなかったが、LK 群で増加傾向を示した (Fig. 7 (b))。Claudin-5 発現量は SS 群と比較して LS 群で低い傾向を示し、LS 群と LK 群では差は認められなかった (Fig. 7(c))。

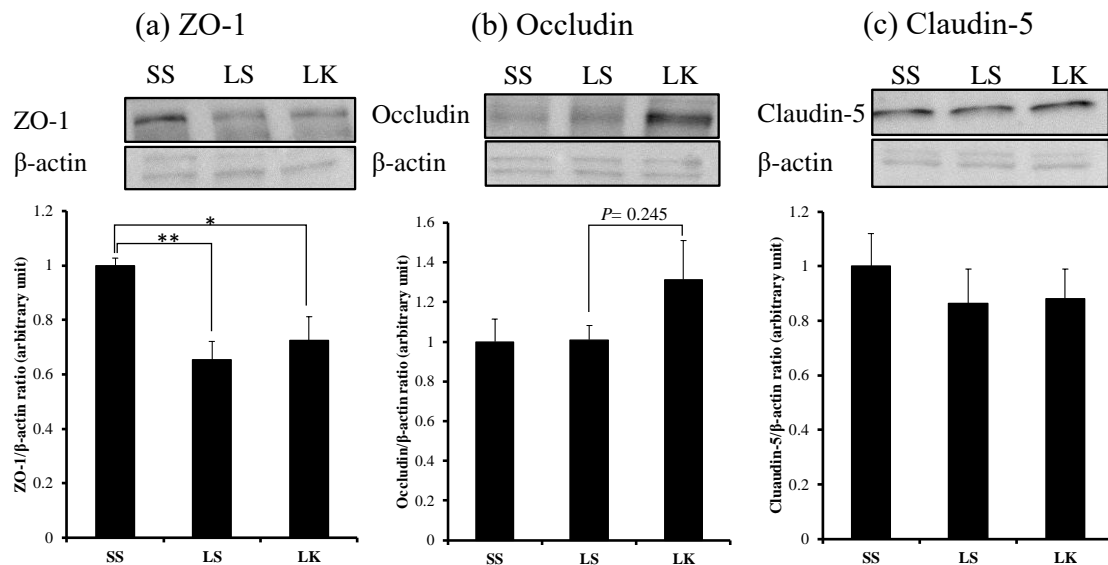


Fig. 7 Effect of Kakkonto on the expression of TJ proteins in the brain. (a) ZO-1, (b) Occludin, (c) Claudin-5. Data represent the means \pm S.E.M. of 5-9 mice. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, Tukey-Kramer test.

第2節 本章の考察

本章では、ZO-1、Occludin および Claudin-5 発現量に対する葛根湯の作用について検討した。ZO-1 発現量は SS 群と比較して LS 群で有意に低値を示し、Claudin-5 発現量は SS 群と比較して LS 群で低い傾向にあったことから、第1編における LPS 投与による BBB 透過性亢進は、これら TJ 関連タンパク質の発現量低下も一因である可能性が示された (Fig. 7 (a) and (c))。また、Claudin-5 発現量は LS 群と LK 群で変わらなかった (Fig. 7 (c))。前述したように BBB における TJ 関連タンパク質の中で Claudin-5 が密着性に最も寄与し、分子量 800 Da 以下の物質に対する透過制御を担っている²⁶⁾。LPS 投与によって低下傾向を示した Claudin-5 発現量に対し、葛根湯は増加させなかったことは、Flu (MW 376.3) の脳移行性を抑制させなかったことを反映していると考えられる。しかし、葛根湯による Cal (MW 622.5) の脳移行抑制については Claudin-5 発現量では説明できない。

総じて本章における ZO-1、Occludin および Claudin-5 の量的変化だけでは、第1編で生じた物質の脳移行性の変化、すなわち LPS 投与により脳移行性が亢進し葛根湯がこれを抑制するという現象を十分に説明できるものではなかった。

TJ の密着性は本章で検討した ZO-1、Occludin および Claudin-5 以外の TJ 関連タンパク質の影響も受けているが、十分に明らかになってはいない。そこで、炎症下において TJ 関連タンパク質の viability を変化させうる諸因子に対する葛根湯の作用について調べることにした。

第2章 BBB機能低下をもたらす炎症性物質に対する葛根湯の作用

BBB機能低下に関与する物質として報告があるものに、活性酸素種（ROS）や活性窒素種などの酸化ストレス関連物質²⁹⁾³⁰⁾、TNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカイン³¹⁾³²⁾、好中球遊走因子2（CCL2）などのケモカイン³³⁾、シクロオキシゲナーゼ（COX）³⁴⁾³⁵⁾、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMPs）³⁶⁾、MMPsの制御因子である組織メタロプロテアーゼ阻害物質（TIMPs）³⁷⁾³⁸⁾、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）³⁹⁾などが挙げられる。これら物質は TJ 関連タンパク質、AJ 関連タンパク質および細胞外マトリックスの消失・分解に関与する。

そこで、本章では、上記物質のうち BBB 機能に関連した報告数の多い ROS、TNF- α 、MMPs および TIMPs に着目し、これら炎症性物質に対する葛根湯の作用について検討することとした。Fig. 8 に、炎症性物質と BBB 透過性亢進の関係を簡潔にまとめた。

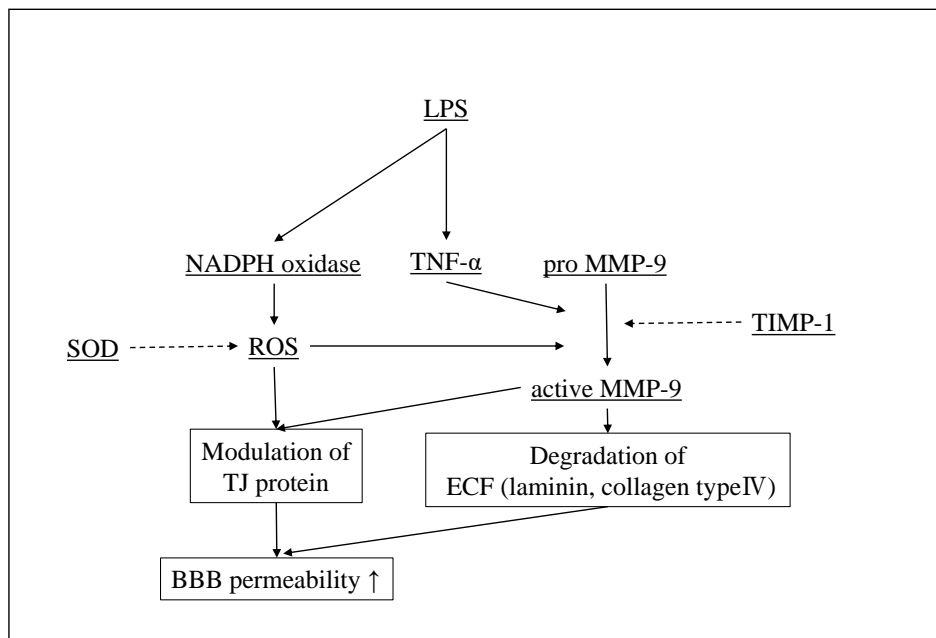


Fig. 8 Pathway of BBB breakdown.

第1節 酸化ストレス関連物質

酸化ストレスは、BBBの機能低下を招くことが知られている。酸化-抗酸化バランスの崩壊は結果として物質の透過亢進を引き起こす。ROSは、NADPHオキシダーゼから産生され、TJの密着性に関連する多くのタンパク質を分解する⁵³⁾。

LPSをマウスに腹腔内投与し、24時間後に脳内ROSレベルおよび高分子物質の脳移行性を測定した研究では、ROSが約2倍に増加し、これに伴い、高分子物質の脳移行が増大し、さらに、この動物にハンセン氏病治療薬であるダプソンを投与すると、脳内ROSレベルが減少することが報告されている⁴⁰⁾。

葛根湯は、*in vitro*において、抗酸化能を有することが知られている²⁰⁾。このことから、第1編で観察された葛根湯投与による細胞間隙狭小化には、酸化ストレスが関与しており、葛根湯が脳内ROSレベルを低下させ、BBB機能を回復させた可能性がある。

そこで、本節では、脳内ROSレベル、ROS消去作用を有するSODに対する葛根湯の作用について検討した。

Fig. 9には、脳内ROSレベル、脳内SOD活性の測定結果を示す。脳内ROSレベルはSS群と比較してLS群で約1.2倍高値を示したが、LS群とLK群では差は認められなかった (Fig. 9 (a))。脳内SOD活性は、SS群とLS群では差は認められなかったものの、LK群はLS群と比較して有意に低値を示した (Fig. 9 (b))。

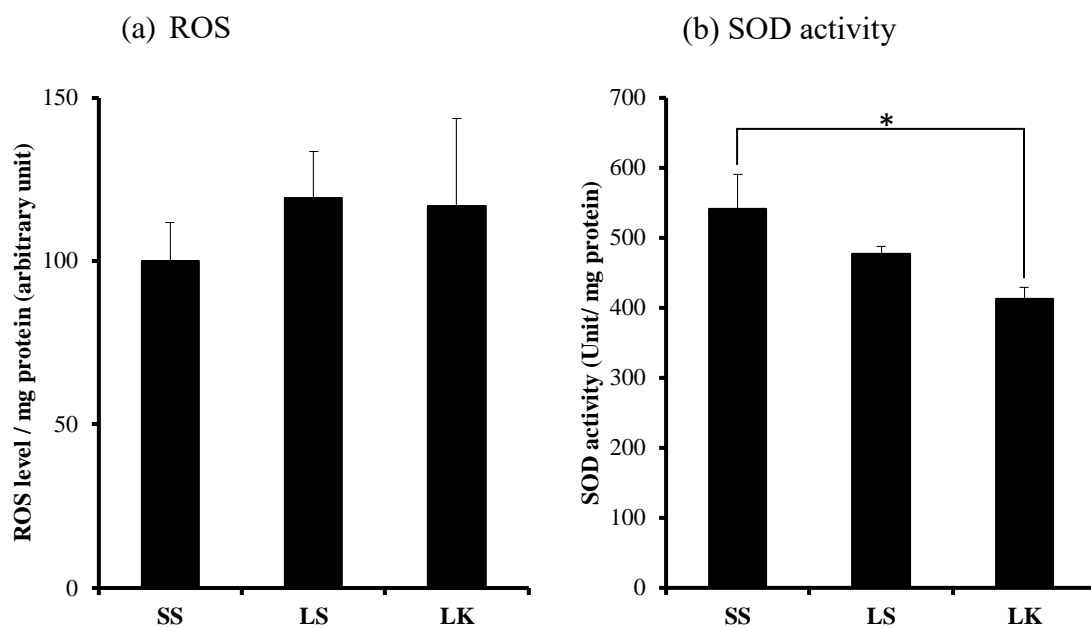


Fig. 9 Effect of kakkonto administration on oxidant stress in the brain. (a) ROS level, (b) SOD activity. Data represent the means \pm S.E.M. of 5-7 mice. * $P < 0.05$, Tukey-Kramer test.

第2節 TNF- α 、MMP-9 および TIMP-1

炎症性サイトカインである TNF- α は、中枢では主にミクログリアから産生・放出され、BBB 透過性を増加させることが報告されている⁵²⁾。例えば、Shiga like toxin-II 処置マウスに FD-4 を投与すると脳移行性が亢進し、これに対し TNF- α 産生阻害薬であるペントキシフィリンを併用すると脳移行が抑制される³¹⁾。また、TNF- α をラットに静脈内注射すると脳内 MMP 活性が上昇することが報告されており、TNF- α は MMP 活性化作用を有する。

MMPs は、活性中心に亜鉛を含むタンパク質分解酵素ファミリーであり、細胞外マトリックスを分解する。MMPs のひとつである MMP-9 (ゲラチナーゼ/タイプIVコラゲナーゼ) は、脳毛細血管基底膜に存在する基底層タンパク質 (コラーゲンIV、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン) や TJ 関連タンパク質 (Occludin、Claudin-5) を分解することで、BBB の透過性を亢進させる。ドキシサイクリンやミノサイクリンといったテトラサイクリン系抗生物質は亜鉛への結合を介して MMP を阻害することが知られており、これらを BBB 機能低下動物に投与すると、FD-40 や ¹⁴C-sucrose の脳移行が抑制される⁴¹⁾⁴²⁾。以上のことから、BBB 透過性において、TNF- α —MMP-9 系の寄与は無視できず、これらの産生あるいは活性阻害が葛根湯の BBB 回復機能と関係しているかもしれない。

TIMP-1 は、MMP-9 の触媒ドメインに高親和性の非共有結合をすることで、MMP-9 の活性を阻害する。

そこで、本節では、脳内 TNF- α 濃度、total MMP-9 活性、脳内 TIMP-1 濃度に対する葛根湯の作用について検討した。

Fig. 10 には、脳内 TNF- α 濃度、Total MMP-9 活性および脳内 TIMP-1 濃度の測定結果を示す。脳内 TNF- α 濃度は、SS 群と比較して LS 群および LK 群で有意に上昇したが LS 群と LK 群では差は認められなかった (Fig. 10 (a))。脳内 MMP-9 活性は、SS 群と比較して LS 群および LK 群で有意に上昇したが LS 群と LK 群では差は認められなかった (Fig. 10 (b))。脳内 TIMP-1 濃度は SS 群と比較して LS 群および LK 群で有意に上昇し、さらに LS 群と LK 群の比較では、LK 群で脳内 TIMP-1 濃度は有意に高値を示した (Fig. 10 (c))。

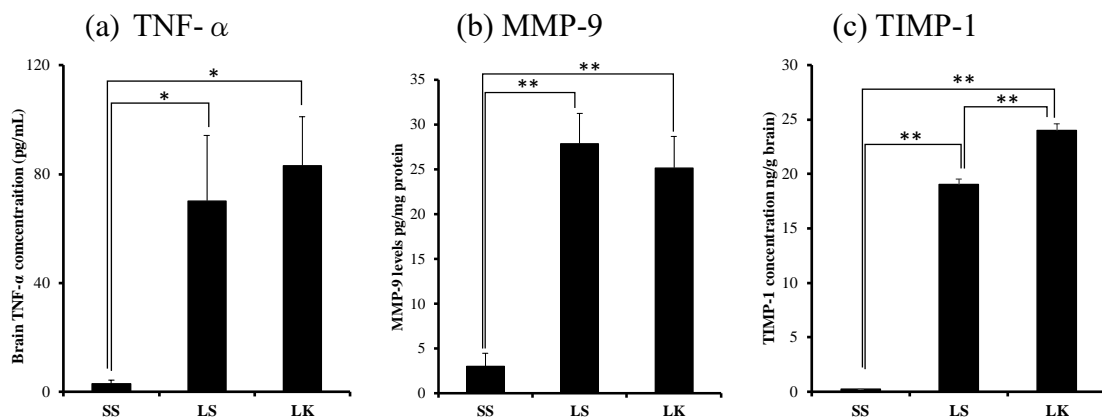


Fig. 10 Effect of kakkonto administration on brain TNF- α concentration (a), total MMP-9 activity (b) and TIMP-1 concentration (c) in the brain. Data represent the means \pm S.E.M. of 5-7 mice. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, Tukey-Kramer test.

第3節 本章の考察

本章では、脳毛細血管内皮細胞あるいは脳内の炎症性物質に対する葛根湯の作用について検討した。

脳毛細血管内皮細胞内の ROS レベルは LS 群で増加傾向を示し、葛根湯では LS 群と変わらない値であった (Fig. 9)。一方、葛根湯は有意に SOD 活性を低下させた (Fig. 8)。そのため、葛根湯には抗酸化作用は認められず、葛根湯による細胞間隙の狭小化には酸化ストレスを介した機序はないと考えられる。

脳内 TNF- α 濃度および total MMP-9 活性は、SS 群と比較して LS 群で有意に高値を示した (Fig. 10 (a) and (b))。このことから、第1編における LPS 投与による BBB のバリアー能低下には TNF- α および MMP-9 の関与が強く示唆された。葛根湯の投与は、LPS により増大した脳内 TNF- α 濃度を低下させず、わずかなではあるが上昇させた (Fig. 10 (a))。葛根湯の水溶性画分には Toll like receptor 4 (TLR4) を介したアジュバント効果があり⁴³⁾、葛根湯の投与は、炎症反応を増幅させた可能性がある。また、total MMP-9 活性は、SS 群に比べて LS と LK 群で有意に上昇し、両者に差はなかった。さらに、葛根湯は MMP-9 の阻害物質である TIMP-1 の脳内濃度を増加させた (Fig. 10 (c))。TIMP-1 は pro MMP-9 から active MMP-9 への変換を阻害する。本研究では、active MMP-9 のみの活性は測定できなかったため、pro (前駆体) と active (活性体) を合わせた total MMP-9 活性を測定している。これらのことから、葛根湯は TIMP-1 を増加させることで、MMP-9 の活性体への変換を阻害している可能性が示唆された。すなわち、葛根湯は脳内 TIMP-1 濃度上昇を介して MMP-9 を阻害し、元来 MMP-9 によって分解される基底層タンパク質のコラーゲンIVやラミニンの viability を維持して BBB 機能の低下を防いだ可能性が示唆された。

第3章 トランスポーターの発現量に対する葛根湯の作用

BBB における脳毛細血管内皮細胞には、前述の TJ 関連タンパク質のみならず、トランスポーターも多く発現している。これは、脳への糖やアミノ酸といった栄養の供給や、異物の排除を行っている。

第1編では、OP と葛根湯の併用により、OC 脳移行性が抑制されることを見出し、このことは TJ 間隙狭小化では説明できず、トランスポーター機能に対して作用している可能性が示唆された。

OC は、有機アニオントランスポーターである MRP4 および OAT3 によって脳から血液方向へ排出されることが報告されている²⁵⁾。MRP4 は BBB の管腔側膜（血液側膜）に、OAT3 は反管腔側膜（脳側膜）に発現している⁴⁴⁾。これらのトランスポーターは LPS や Shiga like toxin-II によって発現量が低下し、物質の脳移行が亢進することが報告されている⁴⁵⁾¹³⁾。

本節では MRP4 および OAT3 発現量に対する葛根湯の作用について検討した。

第1節 MRP4 および OAT3 の発現量

Fig. 11 は、脳内 MRP4 および OAT3 発現量をウェスタンブロット法により測定した結果である。脳内 MRP4 発現量は 3 群間で有意な差は認められなかった (Fig. 11 (a))。脳内 OAT3 発現量は、SS 群と LS 群で有意差は認められなかったものの、LS 群で減少傾向を示した。LS 群と LK 群の比較では、LK 群で 1.28 倍高値を示し、有意差が認められた (Fig. 11 (b))。

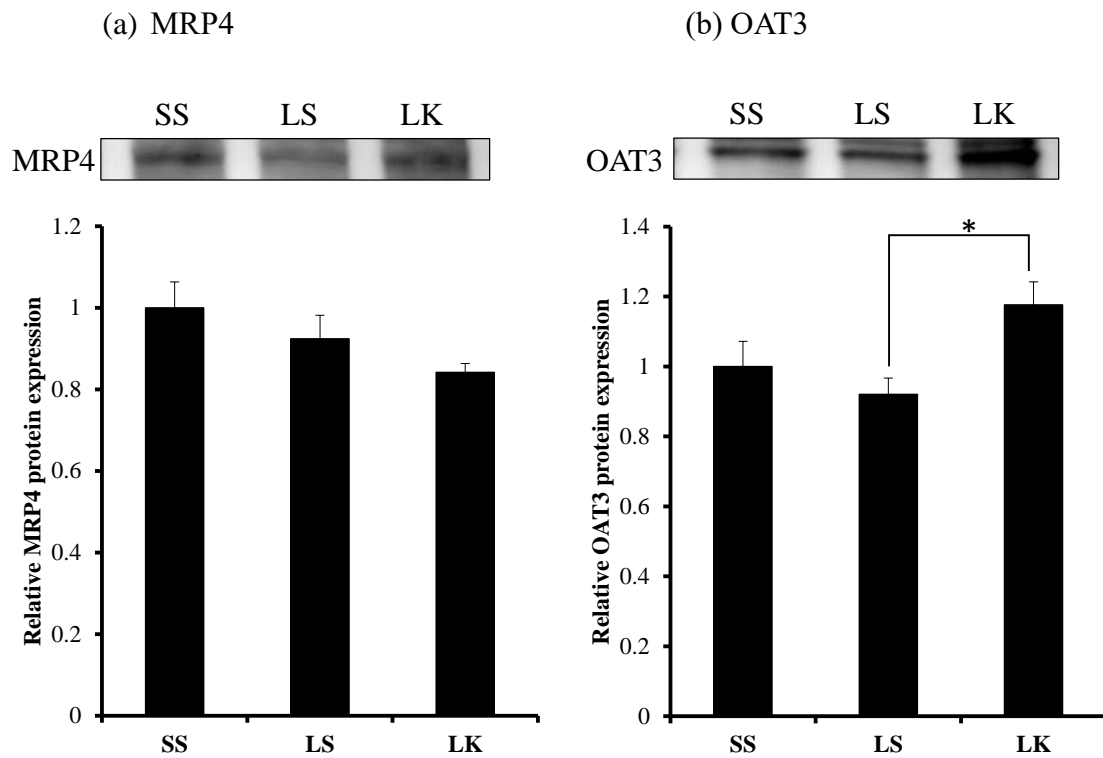


Fig. 11 Effect of Kakkonto on the expression of MRP4 (a) and OAT3 (b) proteins in the brain. Data represent the means \pm S.E.M. of 6 mice. * $P < 0.05$, Tukey-Kramer test.

第2節 本章の考察

本章では、脳内 MRP4 および OAT3 発現量に対する葛根湯の作用について検討した。その結果、葛根湯は、OAT3 をアップレギュレーションさせることを明らかにした (Fig. 11 (b))。このことから、葛根湯は OAT3 のアップレギュレーションを介して OC の脳移行性を抑制させている可能性が示唆された。

OAT3 は BBB 以外にも腎近位尿細管の血液測膜に存在し⁴⁶⁾、その発現量は LPS によって低下することが報告されている⁴⁷⁾。第1編第2章で、葛根湯が腎機能低下抑制効果を示し、LS 群と比較して血漿中 OC 濃度を低下させたことは、葛根湯が腎臓の OAT3 に対しても影響を及ぼし、OC の尿中排泄を上昇させたことによるのかもしれない。

第4章 小括

第1章において、葛根湯投与により、脳内 TIMP-1 濃度が上昇し、これに伴い MMP-9 活性を阻害している可能性が示唆された。このことが、第1編でみられた種々水溶性モデル物質の脳移行性抑制機序のひとつであると考えられる。

また、第2章では、葛根湯が OAT3 をアップレギュレーションさせることを明らかにした。このことから、第1編における OC 脳移行性抑制効果は OAT3 のアップレギュレーションに起因するものと考えられる。

結論

オセルタミビルリン酸塩 (OP:商品名 タミフル)の副作用である異常行動は、代謝物 OC の脳移行性が亢進することにより発症する可能性が高く、OP の適応症であるインフルエンザ感染症では、まれに、炎症により BBB のバリエー能力低下が引き起こされる。葛根湯は抗炎症効果を有するかぜの汎用薬であり、OP と临床上併用されうる。そのため、葛根湯が異常行動の原因物質である OC の脳移行性にどのような影響を及ぼすかは興味深く、種々の観点から検討した。

第 1 編では、OP・OC および水溶性モデル物質の脳移行性に及ぼす葛根湯投与の影響について検討した。その結果、葛根湯と OP あるいは OC の併用により、OC の脳移行性が抑制された。また、葛根湯は水溶性モデル物質である EB、FD-4 および Cal の脳移行性を抑制したものの、低分子量の Flu の脳移行性には影響を及ぼさなかった。このことから、葛根湯の BBB 機能低下抑制効果は Cal レベルより大きな分子で認められることが明らかになった。また、葛根湯は Flu よりも低分子量である OC の脳移行性を抑制したことから、能動輸送系であるトランスポーターに対しても作用していることが示唆された。

第 2 編では、第 1 編の現象を明らかにする目的で、先ず、BBB の主たる構造物である TJ 関連タンパク質の量的変化を調べ、次に、BBB 機能に影響する炎症性物質およびトランスポーターの発現量について調べた。その結果、葛根湯は BBB 機能に対し 2 つの作用を有することが明らかになった。

一つは、脳内 TIMP-1 濃度を増加させたことであり、これにより、BBB の構造および機能に関連するタンパク質を分解する MMP-9 の活性を阻害し、細胞間隙経路の密着性を維持している可能性が示された。

もう一つは、BBB の OAT3 をアップレギュレーションさせたことである。OAT3

は OC を基質として脳から血管側へ排出し、脳内濃度を低下させる。すなわち、葛根湯は OAT3 の発現量増加を介して、脳内の OC 濃度を低下させる可能性が示された。

以上、本研究によって、異常行動の要因である OC の脳移行性亢進が葛根湯併用により抑制できる可能性およびその機序を明らかにした。葛根湯とタミフルの併用は、異常行動の発症抑制が期待でき、今後、インフルエンザ感染症の薬物治療のオプションとして臨床的検討が期待される。さらに、葛根湯には、中枢性副作用が問題となる薬物の抑制剤としての応用性が期待できる。

謝辞

本研究に臨み終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました城西国際大学薬学部薬物動態学研究室教授 秋元雅之先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に当たり終始有益な御指導、御助言を賜りました恩師、城西大学薬学部薬剤作用解析学講座教授 小林大介先生に深謝の意を表します。

また、本研究の遂行に当たり終始御指導と実験の御協力を賜りました城西大学薬学部薬剤作用解析学講座助教 大島新司先生、同講座助手 根岸彰生先生に心から感謝の意を表します。

また、本研究の遂行に当たり有益な御意見ならびに御激励を賜りました城西大学薬学部薬局管理学研究室准教授 大嶋繁先生、同研究室准教授 井上直子先生、同研究室准教授 沼尻幸彦先生、城西大学薬局 冲田光良氏、城西大学大学院薬学研究科薬剤作用解析学講座 秋元勇人学士に感謝の意を表します。

さらに、本論文の作成に当たり御校閲と御教示を賜りました城西国際大学薬学部薬理学研究室教授 堀江俊治先生ならびに城西国際大学薬学部臨床栄養学研究室教授 太田篤胤先生に感謝の意を表します。

最後に、本研究の実施に御支援、御協力を戴きました城西大学薬学部旧医薬品情報学講座ならびに薬剤作用解析学講座の諸氏に深く感謝いたします。

実験の部

実験の部

第1編 実験の部

1. 試薬および実験材料

オセルタミビルリン酸塩 (OP) は Sequoia Research Products Ltd. (Pangbourne, UK) から購入した。オセルタミビルカルボキシレート (OC) は MedChemexpress Co., Ltd. (Monmouth Junction, NJ, USA) から購入した。サルモネラ由来のリポポリサッカライド (LPS)、エバンスブルー (EB)、Fluorescein sodium salt (Flu)、Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4) およびヘパリンナトリウム塩は Sigma Chemical Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA) から購入した。ペントバルビタールナトリウム塩および Calcein (Cal) は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。葛根湯エキス顆粒 (lot : F25972、J26252) は株式会社ツムラ (東京、日本) から購入した。その他の試薬は市販特級もしくは高速液体クロマトグラフ用を購入して用いた。

2. 実験動物

雄性 C57BL/6 マウス (8 ± 1 週齢) を三協ラボサービス株式会社 (東京、日本) より購入した。すべての動物実験は、城西大学実験動物規定にそって計画し、全学実験動物管理委員会の承認を得て実施した (承認番号 : H24011)。

3. BBB 機能低下マウスの作製

雄性 C57BL/6 マウスを 17 時間絶食した後、LPS (3 mg/kg, 0.2 mL) を腹腔内投与し、投与後 6 時間、24 時間後に同容量を計 3 回投与し BBB 機能低下マウス

を作製した。また、腹腔内投与と同時に生理食塩液 (0.1 mL) または葛根湯 (0.125 g/kg, 0.1 mL) を経口投与した。生理食塩液のみを投与した LPS 非投与マウスを非炎症群 (Saline-Saline : SS 群) とし、BBB 機能低下マウスに生理食塩液もしくは葛根湯を経口投与した群をそれぞれ炎症群 (LPS-Saline:LS 群)、葛根湯群 (LPS-kakkonto : LK 群) とした。

4. OP 経口投与実験および OC 静脈内投与実験

3 回目の LPS 投与から 4 時間後に OP (300 mg/kg, 0.2 mL) を経口投与あるいは OC (20 mg/kg, 0.1 mL) を静脈内投与した。OP あるいは OC 投与後 5、60、120 分において、ペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg, *i.p.*) 麻酔下で頸静脈から採血した。採血後、マウス胸部を開胸し、右心耳に切り込みを入れた後にヘパリン/生理食塩液 (37°C) を左心室から灌流させた。断頭後、直ちに脳を摘出し、氷冷等張リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) で洗浄した。

5. OP および OC の定量

第 1 章 : OP・OC の血漿中および脳中濃度は HPLC-UV を用いて測定した。

採取した血液を遠心分離 (4°C, 2,000 × g, 15 min) し、その上清を血漿サンプルとした。摘出した脳は、3.5 mL/g brain になるよう PBS を添加し、氷冷下でホモジナイズした。脳ホモジネートを、遠心分離 (4°C, 12,000 × g, 10 min) し、上清を得た。得られた上清から OP および OC を固相抽出した。Extraction cartridge (Oasis[®] MCX; 1 cc/30 mg, Waters, MA, USA) をメタノール (1 mL) および純水 (1 mL) を通液して前処理した。得られた上清 (1 mL) を通液し、夾雑物質を除去するためカートリッジに 2% ギ酸、メタノール、0.005% 水酸化アンモニウム/メタノール (各 1mL) を通液した。そして、OP および OC を溶離させるため

に 5% 水酸化アンモニウム/メタノール (3 mL) を通液し、溶出液を窒素気流下 40°C で濃縮乾固した。そして、HPLC で測定するまで、-40°C で保存した。窒素乾固したサンプルを PBS (200 µL) で再構築し、そのうち 40 µL を HPLC にアプライした。

HPLC システムは、LC-10ADVP ポンプ、DGU-12A 脱気装置、SPD-10AV 紫外可視吸光度検出器、CTO-10A カラムオーブン (島津製作所、京都、日本) およびカラム (Zorbax® SB-CN 5µm particle size, 4.6×250 mm, Agilent Technologies, CA, USA) から構成され、これを定量に用いた。HPLC 定量条件を Table 6 に示す。

Table 6 HPLC condition for OP and OC.

Mobile phase	Acetonitrile : 10 mM potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 3.0) = 1 : 9 (v:v)
Flow rate	1.5 ml/min
Column temperature	50°C
Detection	UV 215 nm

第 2 章 : 第 1 章の方法を一部改変して OC の血漿中および脳中濃度を HPLC-UV により測定した。

採取した血液を遠心分離 (4°C, 2,000 × g, 15 min) し、その上清を血漿サンプルとした。血漿 (70 µL) に 0.1 M 塩酸 (910 µL) および内標準物質として 15 µg/mL Floropipamide (70 µL) を添加した。

摘出した脳は、4 mL/g brain になるように 0.1 M 塩酸を添加し、氷冷下でホモジナイズした。脳ホモジネートを遠心分離 (4°C, 12,000 × g, 10 min) し、上清 (900 µL) に 0.1 M 塩酸 (145 µL) および内標準物質として 20 µg/mL Floropipamide (55

μL) を添加した。第 1 章と同様の手順で固相抽出を実施し、溶離液を窒素乾固後、HPLC で測定するまで、 -40°C で保存した。窒素乾固したサンプルを移動相 (200 μL) で再構築し、そのうち 40 μL を HPLC にアプライした。

HPLC システムは、LC-10ADVP ポンプ、DGU-12A 脱気装置、SPD-10AV 紫外可視吸光度検出器、CTO-10A カラムオーブン (島津製作所、京都、日本)、カラム (Mightysil[®] C18 3μm particle size, 2.0×150 mm, Kanto Chemical, Tokyo, Japan) およびガードカラム (Mightysil[®] C18 3μm particle size, Kanto Chemical) から構成され、これを定量に用いた。HPLC 定量条件を Table 7 に示す。

Table 7 HPLC condition for OC.

Mobile phase	Acetonitrile : 10 mM potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 3.0) = 1 : 9 (v:v)
Flow rate	0.2 ml/min
Column temperature	40°C
Detection	UV 215 nm
Internal standard	Floropipamide

6. 肝 CES 活性の測定

LS 群および LK 群の肝ミクロソーム画分を CES の酵素試料として用いた。

ミクロソーム画分を単離するために、3 回目の LPS 投与から 4 時間後、ペントバルビタール麻酔下のマウスを 1.15% 塩化カリウム溶液で血液灌流し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓を氷冷 PBS で洗浄し、3 倍容量の PBS を添加後、氷冷下でホモジナイズした。次に、この懸濁液を遠心分離 (4°C , $10,000 \times g$, 20 min) し、上清を得た。さらに遠心分離 (4°C , $105,000 \times g$, 60 min) し、得られた沈殿物

に氷冷 PBS (3 mL) を添加し懸濁後、再び遠心分離 (4°C, 105,000 × g, 60 min) し、沈殿物を再度得た。この沈殿物 40 mg あたり PBS を 1 mL 添加し、総タンパク質量を、BCA protein assay kit (Pierce, IL, USA) で測定した。

ミクロソーム画分/PBS (1 mg/mL) と OP (100 μmol/L) の等容量溶液をインキュベート (37°C, 60 min) 後、遠心分離 (4°C, 12,000 × g, 5 min) し、上清を得た。上清中の OC 濃度を HPLC-UV により測定し、肝 CES 活性を評価した。

7. 生化学検査値の測定

3 回目の LPS 投与から 4 時間後にペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg, *i.p.*) で麻酔後、ヘパリンリチウム/生理食塩液 (5 units/mL) で処理したシリンジで頸静脈から採血した。全血 (0.1 mL) を VetScan VS1 Chemistry Analyzer[®] (Abaxis, CA, USA) にアプライし、生化学検査値を測定した。

8. 水溶性モデル物質の静脈内投与実験

3 回目の LPS 投与から 4 時間後に各水溶性モデル物質 (EB, FD-4, Cal, Flu) を静脈内投与した。各水溶性モデル物質の投与後 120 分において、ペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg, *i.p.*) 麻酔下で頸静脈から採血した。採血後、マウス胸部を開胸し、右心耳に切り込みを入れた後にヘパリン/生理食塩液 (37°C) を左心室から灌流させた。断頭後、直ちに脳を摘出し PBS (pH 7.4) で洗浄した。

9. EB の定量

EB の血漿中および脳中濃度は紫外可視分光光度計 (UV-2400PC、島津株式会社、京都、日本) を用いて測定した。血液は遠心分離 (2,000 × g, 15 min, 4°C) し、その上清を血漿サンプルとした。血漿 (40 μL) に、100 % TCA (40 μL) を

加えて振とうし、氷中で 10 分間放置した後、遠心分離 ($12,000 \times g$, 5 min, 20°C) し、上清を回収した。上清は 50 % TCA で 50 倍希釈した。

摘出した脳には、50 % TCA を 3.5 mL/g brain となるように加えて氷中でホモジナイズを行った。脳ホモジネートを遠心分離 ($10,000 \times g$, 10 min, 4°C) し、その上清を採取した。EB の血中および脳中濃度は 610 nm の吸光度により測定した。なお、測定した EB 濃度から、BPR を算出し、脳移行性の評価として使用した。

10. FD-4、Cal および Flu の定量

FD-4、Cal および Flu の血漿中・脳中濃度は蛍光分光光度計 (F-2500、株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京) を用いて測定した。

血液は遠心分離 (4°C , $1,000 \times g$, 15 min) し、その上清を血漿サンプルとした。Flu および Cal 投与群では、血漿に 50% TCA を、FD-4 投与群では PBS を、それぞれ添加した。その後、遠心分離 (20°C , $12,000 \times g$, 5 min) し上清を回収した。

摘出した脳には、Flu および Cal 投与群では 50% TCA、FD-4 投与群では PBS を 4 mL/g brain となるように加えて、氷中でホモジナイズを行った。脳ホモジネートを遠心分離 (4°C , $1,000 \times g$, 20 min) し、その上清を採取した。FD-4、Cal および Flu の血漿中・脳中濃度は、Table 8 に示す検出波長により測定した。なお、測定した FD-4、Cal および Flu 濃度から、BPR を算出し、脳移行性の評価として使用した。

Table 8 Detection wavelengths for model substance.

Model substance	Ex. (nm)	Em. (nm)
FD-4	493	517
Cal	448	515
Flu	441	478

11. 統計解析

データは平均値 \pm S.E.M.として表記した。2 群間の比較には Student's t-test、3 群以上の比較には Tukey-Kramer test を用いた。

第2編 実験の部

1. 試薬および実験材料

2', 7'-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート (DCFH-DA) は Sigma Chemical Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA) から購入した。デキストラン (MW 70,000) は東京化成工業から購入した。mouse anti-ZO-1、mouse anti-Occludin および mouse anti-Claudin-5 は、Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から購入した。rat anti-MPR4 monoclonal antibody は Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa cruz, CA, USA)、rabbit anti-OAT3 polyclonal antibody は Biorbyt ltd. (Cambridge, UK) から購入した。HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG は、Enzo Life Science Inc. (Farmingdale, NY, USA) から購入した。その他の試薬は市販特級もしくは高速液体クロマトグラフ用を購入して用いた。

2. 実験動物

第1編と同様の実験動物を用いた。

3. ROS level の評価

脳血管内皮細胞の単離および ROS level の測定方法は、Zhou らの方法⁴⁰⁾に従って行った。3 回目の LPS 投与から 4 時間後、マウスをジエチルエーテルで麻酔し直ちに断頭した。頭蓋骨から脳を取り出し、氷冷 PBS で洗浄後、直ちに脳血管内皮細胞の単離操作を行った。

脳血管内皮細胞中の ROS レベルを評価するために 2', 7'-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート (DCFH-DA) を用いた。DCFH-DA を最終濃度 10 μ M になるようにウェルに添加し、暗所で反応させた (37°C, 30 min)。マイクロプレ

ートリーダー (SpectraMax M2e、モレキュラーデバイスジャパン株式会社、東京、日本) により蛍光 (励起波長 485 nm、蛍光波長 530 nm) を測定した。

4. SOD 活性の測定

3 回目の LPS 投与から 4 時間後、マウスをジエチルエーテルで麻酔し直ちに断頭した。頭蓋骨から脳を取り出し、氷冷 PBS で洗浄した。脳は液体窒素で凍結後、測定まで -45°C で保存した。脳は、氷冷下において 5 倍容量の PBS でホモジナイズし、遠心分離後に上清を採取した。脳内の SOD 活性の測定には、SOD Assay kit-WST (Dojindo, 日本) を用いた。測定にはマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e、モレキュラーデバイスジャパン株式会社、東京、日本) を用いた。

5. TNF- α 濃度の測定

3 回目の LPS 投与から 4 時間後、マウスをジエチルエーテルで麻酔し直ちに断頭した。頭蓋骨から脳を取り出し、氷冷 PBS で洗浄した。脳は液体窒素で凍結後、測定まで -45°C で保存した。脳は、氷冷 cell lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA , 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM beta-glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride) でホモジナイズし、遠心分離 (4°C , $10,000 \times g$, 10 min) 後、その上清を採取した。脳内 TNF- α 濃度は、Quantikine ELISA Mouse TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e、モレキュラーデバイスジャパン株式会社、東京、日本) を用いて測定した。

6. total MMP-9 活性の測定

3 回目の LPS 投与から 4 時間後、マウスをジエチルエーテルで麻酔し、直ちに断頭した。頭蓋骨から脳を取り出し、氷冷 PBS で洗浄した。脳は液体窒素で凍結後、測定まで -45°C で保存した。脳は、5 倍容量の lysis buffer (10 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 % Triton X-100、pH 7.4) でホモジネートした。遠心分離 (4°C , $10,000 \times g$, 10 min) 後、上清を回収し、QuickZyme Mouse MMP-9 activity assay (QuickZyme Biosciences) を用いて total MMP-9 活性を測定した。測定にはマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e、モレキュラーデバイスジャパン株式会社、東京、日本) を用いた。

7. TIMP-1 濃度の測定

3 回目の LPS 投与から 4 時間後、マウスをジエチルエーテルで麻酔し、直ちに断頭した。脳は頭蓋骨から取り出し、すぐに氷冷したトリス緩衝液 (pH 7.4) に浸した。氷冷下において 5 倍容量のトリス緩衝液でホモジナイズし、遠心分離 (4°C , $10,000 \times g$, 10 min) した。上清中の TIMP-1 濃度は Mouse TIMP-1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用い測定した。測定にはマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e、モレキュラーデバイスジャパン株式会社、東京、日本) を用いた。

8. 脳毛細血管内皮細胞の単離

脳毛細血管内皮細胞の単離は、デキストラン密度勾配遠心法により行った⁴⁹⁾。3 回目の LPS 投与から 4 時間後、マウスをジエチルエーテルで麻酔し、直ちに断頭した。脳は頭蓋骨から取り出し、すぐに氷冷した Solution A (103 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L CaCl_2 , 1.2 mmol/L KH_2PO_4 , 1.2 mmol/L MgSO_4 , 15

mmol/L HEPES, pH 7.4) に移した。髄膜、小脳、脳幹を取り除き、脳は 0.8 mL の氷冷した Solution B (103 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L CaCl₂, 1.2 mmol/L KH₂PO₄, 1.2 mmol/L MgSO₄, 15 mmol/L HEPES, 25 mmol/L NaHCO₃, 10 mmol/L glucose, 1 mmol/L Na pyruvate, dextran (MW 70,000) 10 g/L, Protease inhibitor cocktail, pH 7.4) でホモジナイズした。ホモジナイズは Potter-Elvehjem ホモジナイザー を用い、無回転で 15 ストローク行った。その後、1.6 mL の 24% Dextran を加え、5,800 × g で 10 分間遠心分離した。上清は捨て、沈殿物は 5 mL の Solution B で再懸濁させ、80 μm のナイロンメッシュフィルターでろ過した。フィルターを通したサンプルを 1,500 × g で 10 分間遠心分離した。上清を取り除き、沈殿物に対して 0.8 mL の Solution B を加え、再び、1,500 × g で 10 分間遠心分離を行った。得られた沈殿物に 0.5 mL の RIPA buffer (25 mmol/L Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) を加え、氷中で 15 分ごとに一時間、22 ゲージの注射針と注射筒 (2.5 mL) を用いてホモジナイズした。その後、サンプルは 14,000 × g で 15 分間遠心分離し、その上清を TJ 関連タンパク質の発現量の測定に使用した。

9. ZO-1、Occludin および Claudin-5 の発現量

ZO-1、Occludin および Claudin-5 の発現量はウエスタンブロット法により測定した。脳毛細血管内皮細胞から抽出したタンパク質 (15 μg) は、7.5%および 12% SDS-PAGE gels を用いて 200 V で 40 分間電気泳動し、PVDF 膜に転写した。その後、ブロッキング溶液として 5 %スキムミルクおよび 0.05 % Tween-20 を含む Tris buffered saline (TBS-T) で 1 時間インキュベートした。TBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回行い、TBS-T で希釈した 1 次抗体の ZO-1 (1:500)、Occludin (1:250)、Claudin-5 (1:500) および β-actin (1:10000) を用いて 4 °C で一晩インキュベ

トした。TBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回行い、TBS-T で希釈した 2 次抗体 (1:10000) で 45 分間インキュベートした。TBS-T で 10 分間の洗浄を 4 回行った後、PVDF 膜に SuperSignal[®] West Dura を塗布し、その化学発光は LuminoGraph を用いて測定し、バンドの光学密度から TJ 関連タンパク質の発現量を各群と相対的に比較した。なお、サンプルのタンパク質濃度は、BCA protein assay kit (Pierce, IL, USA) を用いて測定した。

10. MRP4 および OAT3 発現量

3 回目の LPS 投与から 4 時間後、マウスをペントバルビタールナトリウムで麻酔し、直ちに断頭した。脳は 5 倍容量のホモジネート緩衝液 (0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, 20 µg/mL aprotinin, leupeptin, pepstatin) でホモジナイズし、遠心分離 (4°C, 6,500 ×g, 15 min) した。上清を再び遠心分離 (4°C, 140,000 ×g, 30 min) した。沈殿物は 1% NP-40 を含んだホモジネート緩衝液で溶解し、これをサンプルとした。

MRP4 および OAT3 発現量はウエスタンブロット法により測定した。サンプルに 20% sodium dodecyl sulfate を加え、タンパク質 25 µg を含む量を 7.5% SDS-polyacrylamide gel に注入した。40 分間の電気泳動後、ゲルをニトロセルロース膜に転写し、5% スキムミルク含有 T-PBS で 1 時間ブロッキングした。1 次抗体として anti-OAT3 antibody (1:500) および anti-MRP4 antibody (1:100) を一晩 4°C で反応させた。翌日、2 次抗体として anti-rabbit IgG (1:5000) または anti-rat IgG (1:5000) を常温で 1 時間反応させた。SuperSignal[®] West Dura で発光させ、LAS 1000-light で撮影した。画像を ImageJ で解析し、バンドの光学密度から OAT3 および MRP4 の発現量を各群と相対的に比較した。なお、サンプルのタンパク質濃度は、BCA protein assay kit (Pierce, IL, USA) を用いて測定した。

10. 統計解析

データは平均値 \pm S.E.M.として表記した。2 群間の比較には Student's t-test、3 群以上の比較には Tukey-Kramer test を用いた。

引用文献

- 1) Morishima T., Togashi T., Yokota S., Okuno Y., Miyazaki C., Tashiro M., Okabe N., *Clin. Infect. Dis.*, **35**, 512–517 (2002).
- 2) Ermias D. Belay, M.D., Joseph S. Bresee, M.D., Robert C. Holman, M.S., Ali S. Khan, M.D., Abtin Shahriari, M.P.H., and Lawrence B. Schonberger M. D., *N. Engl. J. Med.*, **340**, 1337–1382 (1999).
- 3) 製薬企業（33社），緊急安全性情報-インフルエンザ脳炎・脳症患者に対するジクロフェナクナトリウム製剤の使用について-(2000).
- 4) Yoshino T., Katayama K., Horiba Y., Munakata K., Yamaguchi R., Imoto S., Miyano S., Mima H., Watanabe K., *BMC Med. Inform. Decis. Mak.*, **16**, 118 (2016).
- 5) Kurokawa M., Imakita M., Kumeda C. A., Yukawa T. A., Shiraki K., *J. Tradit. Med.*, **13**, 201–209 (1996).
- 6) Kurokawa M., Tsurita M., Brown J., Fukuda Y., Shiraki K., *Antiviral Res.*, **56**, 183–188 (2002).
- 7) Muraoka K., Yoshida S., Hasegawa K., *J. Tradit. Med.*, 30–37 (2003).
- 8) Wu M. S., Yen H. R., Chang C. W., Peng T. Y., Hsieh C. F., Chen C. J., Lin T. Y., Horng J. T., *J. Ethnopharmacol.*, **134**, 614–623 (2011).
- 9) Mantani N., Imanishi N., Kawamata H., Terasawa K., Ochiai H., *Planta Med.*, **67**, 240–243 (2001).
- 10) Tanabe J., Watanabe M., Kondoh S., Mue S., Ohuchi K., *Br J Pharmacol*, **113**, 1480–1486 (1994).

- 11) Yamaoka Y., Kawakita T., Kaneko M., Nomoto K., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 936–939 (1996).
- 12) 西勝久, *phil漢方*, No. 28, 14–15 (2009).
- 13) Fukuda M., Kitaichi K., Abe F., Fujimoto Y., Takagi K., Takagi K., Morishima T., Hasegawa T., *J. Pharmacol. Sci.*, **97**, 525–32 (2005).
- 14) Oshima S., Nemoto E., Kuramochi M., Saitoh Y., Kobayashi D., *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**, 1397–1400 (2009).
- 15) 中外製薬, 緊急安全性情報-タミフル服用後の異常行動について-(2007).
- 16) Hoffman K. B., Demakas A., Erdman C. B., Dimbil M., Doraiswamy P. M., *Bmj*, **347**, f4656 (2013).
- 17) Usami A., Sasaki T., Satoh N., Akiba T., Yokoshima S., Fukuyama T., Yamatsugu K., Kanai M., Shibasaki M., Matsuki N., Ikegaya Y., *J. Pharmacol. Sci.*, **106**, 659–662 (2008).
- 18) Uchiyama H., Hiromura M., Shiratani T., Kuroki H., *Neurosci. Lett.*, **599**, 7–11 (2015).
- 19) Ozaki Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 559–562 (1995).
- 20) Nishimura K., Osawa T., Watanabe K., *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, **2011**, 1–7 (2011).
- 21) Jeong S. J., Yoo S. R., Kim O. S., Seo C. S., Shin H. K., *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, **2014**, 1–9 (2014).
- 22) Shi D., Yang J., Yang D., LeCluyse E. L., Black C., You L., Akhlaghi F., Yan B., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**, 1477–1484 (2006).

- 23) Suzaki Y., Uemura N., Takada M., Ohyama T., Itohda A., Morimoto T., Imai H., Hamasaki H., Inano A., Hosokawa M., Tateishi M., Ohashi K., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **69**, 21–30 (2013).
- 24) Kang E. J., Major S., Jorks D., Reiffurth C., Offenhauser N., Friedman A., Dreier J. P., *Neurobiol. Dis.*, **52**, 204–218 (2013).
- 25) Ose A., Ito M., Kusuhara H., Yamatsugu K., Kanai M., Shibasaki M., Hosokawa M., Schuetz J. D., Sugiyama Y., *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 315–321 (2009).
- 26) Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **161**, 653–660 (2003).
- 27) Belayev L., Busto R., Zhao W., Ginsberg M. D., *Brain Res.*, **739**, 88–96 (1996).
- 28) Sandoval K. E., Witt K. A., *Neurobiol. Dis.*, **32**, 200–219 (2008).
- 29) Schreibelt G., Kooij G., Reijerkerk A., van Doorn R., Gringhuis S. I., van der Pol S., Weksler B. B., Romero I. a, Couraud P.-O., Piontek J., Blasig I. E., Dijkstra C. D., Ronken E., de Vries H. E., *FASEB J.*, **21**, 3666–3676 (2007).
- 30) Liu Z., *Exp. Mol. Pathol.*, **97**, 386–392 (2014).
- 31) Zhao Y. L., Du J., Kanazawa H., Cen X. B., Takagi K., Kitaichi K., Tatsumi Y., Takagi K., Ohta M., Hasegawa T., *Brain Res.*, **956**, 246–253 (2002).
- 32) Tsuge M., Yasui K., Ichiyawa T., Saito Y., Nagaoka Y., Yashiro M., Yamashita N., Morishima T., *Microbiol. Immunol.*, **54**, 417–424 (2010).
- 33) Ramirez S. H., Fan S., Zhang M., Papugani A., Reichenbach N., Dykstra H., Mercer A. J., Tuma R. F., Persidsky Y., *Am. J. Pathol.*, **176**, 881–892 (2010).
- 34) Aid S., Silva A. C., Candelario-jalil E., Choi S., Rosenberg G. A., Bosetti F., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **30**, 370–380 (2009).

- 35) Banks W. A., Gray A. M., Erickson M. A., Salameh T. S., Damodarasamy M., Sheibani N., Meabon J. S., Wing E. E., Morofuji Y., Cook D. G., Reed M. J., *J. Neuroinflammation*, 1–15 (2015).
- 36) Dal-Pizzol F., Rojas H. A., Dos Santos E. M., Vuolo F., Constantino L., Feier G., Pasquali M., Comim C. M., Petronilho F., Gelain D. P., Quevedo J., Moreira J. C. F., Ritter C., *Mol. Neurobiol.*, **48**, 62–70 (2013).
- 37) Wei H., Wang S., Zhen L., Yang Q., Wu Z., Lei X., Lv J., Xiong L., Xue R., *J. Mol. Neurosci.*, **55**, 872–879 (2015).
- 38) Chen F., Radisky E. S., Das P., Batra J., Hata T., Hori T., Baine A. T., Gardner L., Yue M. Y., Bu G., Zoppo G., Patel T. C., Nguyen J. H., *J. Cereb. Blood Flow & Metab.*, **33**, 1041–1049 (2013).
- 39) Suzuki Y., Nagai N., Umemura K., *Front. Cell. Neurosci.*, **10**, 1–10 (2016).
- 40) Zhou T., Zhao L., Zhan R., He Q., Tong Y., Tian X., Wang H., Zhang T., Fu Y., Sun Y., Xu F., Guo X., Fan D., Han H., Chui D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **453**, 419–424 (2014).
- 41) Raul Reyes M. S., Miao Guo M. S., Kathryn Swann B. S., Siddharth U. Shetgeri M. S., Shane M. Sprague B. S., David F. Jimenez M. D., Constance M. Barone, M.D. A., Yuchuan Ding, M.D. P. D., *J. Neurosurg.*, **110**, 1218–1226 (2009).
- 42) Rosenberg G. A., Estrada E. Y., Mobashery S., *Brain Res.*, **1133**, 186–192 (2007).
- 43) Ishijima Y., Kawamura T., Kimura A., Kohno A., Okada T., Tsuji T., Watanabe Y., *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **24**, 43–54 (2011).
- 44) Mori S., Takanaga H., Ohtsuki S., Deguchi T., Kang Y., Hosoya K., Terasaki T., *Blood*, **3**, 432–440 (2003).

- 45) Akanuma S., Uchida Y., Ohtsuki S., Tachikawa M., Terasaki T., Hosoya K.,
Fluids Barriers CNS, **8**, 24 (2011).
- 46) Duan P., Li S., You G., *Eur. J. Pharmacol.*, **627**, 49–55 (2010).
- 47) Höcherl K., Schmidt C., Bucher M., *Kidney Int.*, **75**, 373–380 (2009).
- 48) 鍋谷大二郎, 藤田次郎, *インフルエンザ*, **17**, 29–34 (2016).
- 49) Seelbach, R. D., Brooks, T. A., Egleton, R. D., Davis, T. P., *J. Neurochem.*, **102**,
1677–1690 (2007).
- 50) 厚生労働省, 医薬品・医療機器等安全性情報, No. 329 (2016).
- 51) Hawkins, B. T., and Davis, T. P., *Pharmacol. Rev.*, **57**, 173-185 (2005).
- 52) Nishioku T., Matsumoto J., Dohgu S., Sumi N., Miyano K., Takata F., Shuto H.,
Yamauchi A., and Kataoka Y., *J pharmacol Sci.*, **112**, 251–254 (2010).
- 53) Yu HY., Cal YB., Liu Z., *Brain inj.*, **29**, 777-784 (2015).
- 54) Yu H., Wang P., An P., Xue Y., *J Mol Neurosci.*, **46**, 236-247 (2012).

本学位論文の審査は城西国際大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 城西国際大学大学院薬学研究科教授 博士（薬学） 堀江 俊治

副査 城西国際大学大学院薬学研究科教授 博士（薬学） 秋元 雅之

副査 城西国際大学大学院薬学研究科教授 博士（薬学） 太田 篤胤