

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890294

研究課題名（和文）

発熱炎症病態下におけるオセルタミビル及び非ステロイド性抗炎症薬の中枢毒性発現機構

研究課題名（英文）

Mechanism of neurotoxicity induced by oseltamivir and NSAIDs under the inflammatory conditions

研究代表者

安藝 敬生 (AKI KEISEI)

長崎大学・大学病院・技術職員

研究者番号：50510179

研究成果の概要（和文）：

現在、インフルエンザ治療薬オセルタミビル服用後の異常行動や NSAIDs ジクロフェナクナトリウムによる脳炎・脳症の誘発または症状悪化が社会問題となっている。これら薬剤と有害事象との関連性は未だ不明である。そこで本研究では、発熱・炎症病態下の薬物血液脳関門 (BBB) 透過性変化に着目し、以下の成果を得た。(1) 新規 *in vitro* 炎症発熱 BBB モデルを構築した。(2) 炎症時 BBB の透過性変化は、ペリサイト由来 MMP-9 の増加が関与していた。(3) ジクロフェナクナトリウムの脳透過性は変化しなかった。

研究成果の概要（英文）：

Oseltamivir and NSAIDs are used in the treatment of influenza. Neurotoxicity such as abnormal behavior and encephalopathy has been reported in influenza patients prescribed their drugs. The purpose of the present study is to examine the blood-brain barrier (BBB) permeability of oseltamivir or NSAIDs under inflammatory conditions. In this study, we demonstrated that (1) novel *in vitro* BBB models reflecting inflammation were developed, (2) brain pericytes released MMP-9 which may be responsible for BBB dysfunction induced by inflammation, (3) the BBB permeability of diclofenac sodium salts was not changed under inflammatory conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：応用薬理学

キーワード：脳神経疾患、血液脳関門、中枢毒性

## 1. 研究開始当初の背景

血液脳関門 (blood-brain barrier ; BBB) は、脳という特異な環境における神経細胞の生存と活動のために進化した高度機能分化システムであり、薬物の脳内移行を制御する

最も重要な“関門”である。この BBB 機能は血液側の環境因子によって制御されるばかりではなく、脳実質側の環境因子によっても制御され、発熱・炎症時に血液側及び脳実質側から誘導・産生されるサイトカインは

BBB 機能障害の誘発に関与することが推定される。これらを総合すれば、発熱・炎症病態下では BBB 機能が脆弱化し、治療薬物の脳移行性上昇に伴う副作用発現の危険性が予測される。

近年、インフルエンザ治療薬であるオセルタミビル服用後に意識障害や異常行動に伴う死亡が大きな社会問題となっている。H19 年 3 月には厚生労働省より十代の未成年患者へのオセルタミビルの使用制限が発表された。また、インフルエンザ罹患時における NSAIDs の使用によるインフルエンザ脳炎・脳症の誘発または症状悪化も問題となっている。しかし、これら薬剤と有害事象との関連性は未だ不明である。インフルエンザ罹患時にはオセルタミビル及び NSAIDs の投与が不可避であり、これら薬剤と有害事象との関連性を明らかにすることが急務である。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、オセルタミビルおよび NSAIDs による中枢毒性発現に関して、次の仮説を立案した。

1. インフルエンザ罹患時に炎症反応が生じ、発熱及び炎症により誘発されたサイトカインが血液側及び脳実質側の両方向から BBB 機能を障害する。
2. 本病態下でオセルタミビル活性代謝物や NSAIDs を投与すると両薬剤の BBB 透過性が亢進し、脳内濃度が上昇する。
3. その脳内濃度が一定の閾値を越えると、脳神経細胞の機能異常を起こし、意識障害や異常行動を誘発する。

この仮説に基づき、インフルエンザ罹患時の代表的な症状である発熱・炎症病態下において、活性化しサイトカインを産生するミクログリアおよびペリサイトに着目し、オセルタミビル活性代謝物及び NSAIDs の脳移行性変化とこれに伴う BBB 及び神経細胞の機能障害を解明することを企てた。

## 3. 研究の方法

### (1) in vitro BBB 炎症・発熱モデルの構築と評価

In vitro BBB モデルは BBB 構成細胞の初代培養により再構築した。Transwell (Costar) システムを用いて、メンブラン上部に脳血管内皮細胞、下部にペリサイト、ウェルの底部にミクログリアを播種し共培養を開始する。炎症モデルでは、LPS によりミクログリアを活性化させた。また発熱モデルでは、インキュベータを 37~40°C に設定し培養した。両モデルを組み合わせた in vitro BBB モデルを in vitro インフルエンザ BBB モデルとした。

対照群として、37°C で培養した in vitro BBB モデルを常態時 in vitro BBB モデルとして用いた。

各モデルでの BBB 透過性評価には、NaF (経細胞間輸送) およびエバンスブルーアルブミン (経細胞内輸送) を用いた。

### (2) 炎症病態下 BBB におけるペリサイトの役割

各病態モデルでの BBB 透過性変化に対するペリサイトの影響を MMP-9 に着目し検討した。

培養上清中の MMP-9 発現量および活性は、western blot 法および gelatin zymogram にてそれぞれ評価した。炎症性サイトカイン処理による細胞傷害性は Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。

### (3) ジクロフェナクナトリウムの炎症・発熱病態下 BBB 透過性の変化

各病態モデルを構築後、任意の濃度のジクロフェナクナトリウムを添加した。任意の時間後脳実質側より回収した緩衝液中のジクロフェナク濃度を測定し、透過係数を算出した。

## 4. 研究成果

(1) LPS 1ng/mL 処理は脳血管内皮細胞単独では透過性に影響なかった。一方、ミクログリアとの共培養系では透過性の亢進が認められた (図 1 上)。LPS によるミクログリアの活性化が BBB 機能低下を惹起すると考えられた。また温度負荷により、BBB 透過性は亢進した (図 1 下)。以上より LPS 刺激および温度負荷による炎症・発熱 BBB モデルを構築できた。

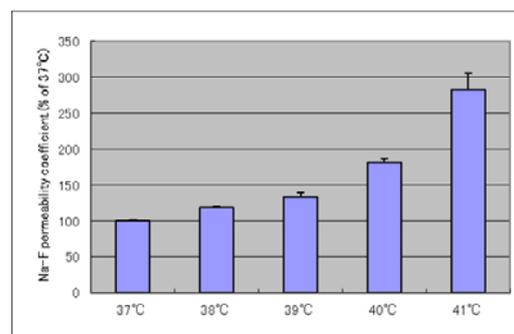
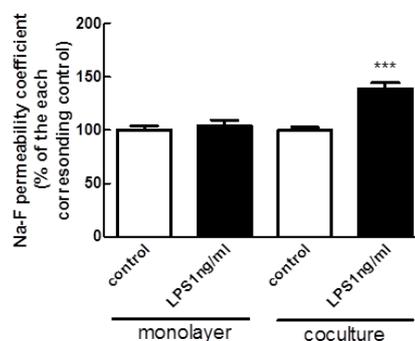


図1 BBB 透過性に及ぼす LPS 刺激および温度負荷の影響

(2) 炎症病態下では各種炎症性サイトカインが放出され、それらによって BBB 機能が低下していると推察される。炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  は、LPS 刺激応答および温度負荷により放出され、BBB 構成細胞であるペリサイトからの MMP-9 放出を惹起した(図 2)。MMP-9 による BBB 傷害により、透過性が亢進したと考えられた。

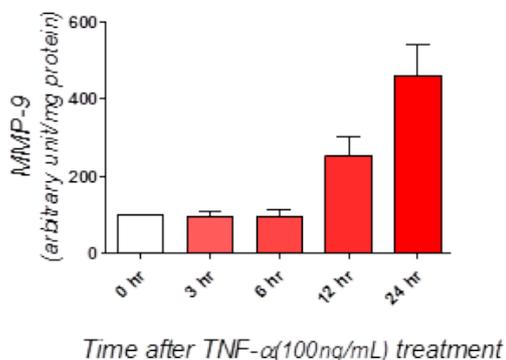


図2 TNF- $\alpha$  刺激によるペリサイトからの MMP-9 放出

(3) 炎症・発熱 BBB モデルに対して任意の濃度のジクロフェナクを添加したが、透過性は変化しなかった(図 3)。

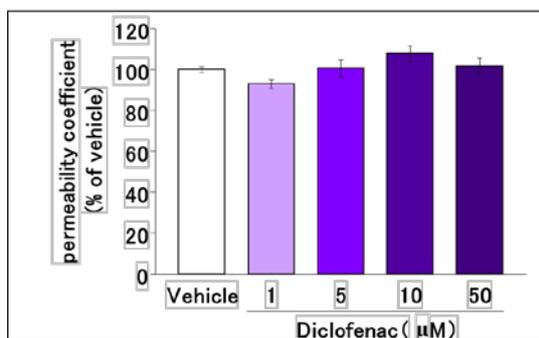


図3 ジクロフェナクナトリウムの BBB 透過性

以上、本研究では新規の in vitro BBB 炎症・発熱病態モデルの構築を行った。さらに、その病態時における BBB 透過性亢進には、ペリサイトからの MMP-9 放出が関与している可能性を示した。本モデルを用いた NSAIDs の透過性には変化が認められなかった。また当初目的であったオセルタミビルおよびその代謝物の BBB 透過性については、測定方法の不備などにより検討ができなかった。

今回構築したモデルは、インフルエンザなどの炎症・発熱時の薬物の脳透過性を評価しうる簡便なモデルといえる。オセルタミビルをはじめとした有害作用発現機序の検討ならびに中枢性薬物の脳移行評価に有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藝 敬生 (AKI KEISEI)

長崎大学・大学病院・技術職員

研究者番号：50510179

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：