

〈研究論文〉

## LPS 誘発血液脳関門機能低下マウスの BBB 機能 および死亡率に対する漢方製剤投与の影響

大原 厚祐 ・ 小林 大介 ・ 秋元 雅之

### 【要旨】

インフルエンザ感染症治療薬オセルタミビルリン酸塩の副作用である異常行動は、代謝物オセルタミビルカルボキシレート (OC) の脳移行性が亢進するために生じると考えられている。脳移行性亢進の機序は、炎症による血液脳関門 (BBB) のバリアー能低下であり、これに対して著者らは、葛根湯の併用によりバリアー能の回復を認め、脳内 OC 濃度が低下することを報告した。そこで、本研究では、Lipopolysaccharide (LPS) 誘発血液脳関門 (BBB) 機能低下マウスを用いて葛根湯以外の感冒用漢方製剤が類似の効果を示すかについて調べた。BBB 機能はエバンスブルーの脳対血漿中濃度比 (BPR) から評価した。その結果、小青竜湯および葛根湯は有意に BPR を抑制した。しかし、小青竜湯および葛根湯はマウスの死亡率を増加させた。その傾向は葛根湯で顕著であった。葛根湯は BBB 機能を回復させるものの、LPS の炎症作用を増強させる可能性がある。

キーワード：漢方製剤、葛根湯、血液脳関門、Lipopolysaccharide、炎症

### 1. 緒言

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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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。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<sup>3)</sup>、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<sup>4)</sup>、が報告されており、OP および OC により異常行動が引き起こされる可能性を示している。

このように、今のところ異常行動が OP および OC による副作用かどうか判断が難しい状況である。その中で、異常行動が OP および OC に起因した副作用であることを想定し、予防の原則のもと、それを未然に防ぐための手段を探索することが重要であると考えられる。

一般に、異常行動のような中枢神経系の副作用は、薬物が脳へ移行することで生じる。しかしながら、OC は脳へ移行しにくいことが知られている<sup>5)</sup>。これには、血液と脳での物質交換を制御している血液脳関門 (BBB) が関与しており、BBB の機能によって OC の脳移行が制限されている。しかしながら、BBB 機能は炎症によって低下し、それに伴い、物質の脳移行性が亢進する。

Oshima らは、Lipopolysaccharide (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<sup>6)</sup>。すなわち、炎症による BBB 機能低下に伴い、OC の脳移行性が亢進し、異常行動が生じるという仮説が成り立つ。このことは、OP と BBB 機能低下を抑制する薬物を併用することで、異常行動を防げる可能性を示している。

そこで、BBB 機能低下を抑制する薬物として、インフルエンザ感染症に使用される漢方製剤に着目した。漢方製剤の中には、抗炎症作用、血管透過性抑制作用、抗酸化作用を有するものがあり<sup>7)8)</sup>、BBB 機能低下抑制効果を示す可能性がある。これまでに、著者は、OP と葛根湯を併用することで、BBB 機能低下の抑制に伴い、脳中 OC 濃度が低下することを報告している<sup>9)</sup>。このことから、葛根湯以外の漢方製剤にも、BBB 機能低下抑制効果を示す可能性があると考えられる。

本研究は、感冒の治療に用いられる漢方製剤 9 種のうち汎用製剤 5 種を選択し、BBB 機能マーカーとして汎用されるエバンスブルー (EB) の脳移行性に対する漢方製剤の影響について調べた基礎的研究である。また、LPS により炎症を惹起した動物は、実験中の死亡率が高く、多くの研究では、生存動物のみのデータから、炎症下の薬物動態・薬理を評価している問題がある。そのため、生存率も考慮に入れて評価することとした。

## 2. 方 法

### 2.1 試薬および実験材料

LPS、エバンスブルー、ヘパリンナトリウム塩はシグマ - アルドリッチ社 (MO、アメリカ) から購入した。グルコース、トリクロロ酢酸 (TCA) は和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。葛根湯 (lot : H20952)、柴胡桂枝湯 (lot : D14602)、小青竜湯 (lot : H00212)、麻黄湯 (lot : F47711)、麻黄附子細辛湯 (lot : H16081) は株式会社ツムラ (東京、日本) から購入した。

### 2.2 実験動物

雄性 ddy マウス (8±1 週齢) は三協ラボサービス株式会社 (東京、日本) から購入した。

なお、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：H26023）。

### 2.3 BBB 機能低下マウスの作成と漢方製剤の投与

本研究の実験プロトコルを Fig. 1 に示す。雄性 ddy マウスに LPS（15 mg/kg, 0.2 mL）を腹腔内投与し BBB 機能低下マウスを作成した。腹腔内投与と同時に 5% グルコース溶液（0.1 mL）もしくは漢方製剤（0.125 g/kg, 0.1 mL）を経口投与し、その 6 時間、21 時間後に同量を経口投与した。漢方製剤は生理食塩液に懸濁した。

漢方製剤の投与量は臨床用量の 3 倍とし、既報<sup>9)</sup> に準じた。

BBB 機能低下マウスに 5% グルコース溶液を経口投与した群を炎症群（Glu 群）とし、漢方製剤を投与した群をそれぞれ、葛根湯群（KKT 群）、柴胡桂枝湯群（SKT 群）、小青竜湯群（SSRT 群）、麻黄湯群（MOT）群、麻黄附子細辛湯群（MBST 群）とした。なお、生理食塩液（0.2 mL）を腹腔内投与し、5% グルコース溶液（0.1 mL）を経口投与した群を非炎症群（Con 群）とした。

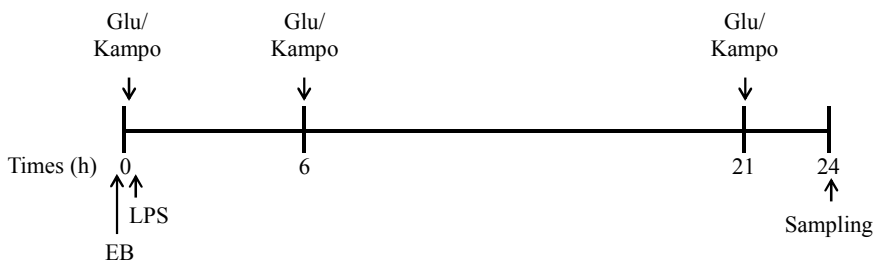


Fig. 1 Experimental protocol for the animal study.

### 2.4 EB の血中および脳中濃度の測定

LPS の腹腔内投与の 5 分前に 2% (w/v) EB（4 mL/kg）を尾静脈から投与した。LPS 投与から 24 時間後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で頸静脈から採血した。採血後、5 Unit/mL のヘパリン／生理食塩液で心灌流をし、直ちに脳を摘出した。

EB の血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℃）し、その上清を血漿サンプルとした。血漿サンプル（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×g, 5 min, 20℃）し、上清を回収した。上清は 50% (v/v) TCA で 50 倍希釈した。

摘出した脳は、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×g, 10 min, 4℃）し、その上清を採取した。

EB の血中および脳中濃度は 611nm の吸光度により測定した。なお、測定した EB 濃度から、

脳対血漿中濃度比 (Brain-to-Plasma concentration ratio : BPR) を算出し、脳移行性の評価として使用した。

## 2.5 生存率の評価

実験に使用したマウスの数から生存したマウスの数の割合を求め、カプランマイヤー法で評価した。

## 2.6 血中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 濃度の測定および血中 LPS 濃度の測定

非炎症群、炎症群、さらに葛根湯群の3群について、血中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 濃度および血中 LPS 濃度を測定した。

LPS 投与から 24 時間後に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、下大静脈から採血した。血液は遠心分離 (2,000 $\times$ g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) し、その上清を血漿サンプルとした。血漿サンプル中の TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 濃度は ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN、アメリカ) を用いて測定した。血中 LPS 濃度は LAL end-point assay (QCL-1000<sup>®</sup>) を用いて測定した。測定にはマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2<sup>®</sup>、モレキュラーデバイスジャパン株式会社、東京、日本) を使用した。また、血中 TNF- $\alpha$ 、IL-10 濃度から IL-10/TNF- $\alpha$  比を算出し、LPS による死亡転帰の指標マーカーとして使用した。

## 2.7 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 Dunnett test または Tukey-Kramer test を用いた。

# 3. 結果

## 3.1 EB の脳移行性に及ぼす漢方製剤の影響

Fig. 2 には EB の BPR を示す。KKT 群および SSRT 群の BPR は Glu 群と比較して、それぞれ 0.43 倍、0.36 倍に低下し、有意差が認められた。SKT 群、MOT 群、MBST 群は Glu 群と比較して有意差は認められなかった。

## 3.2 生存率

Fig. 3 に実験開始から終了までの 24 時間におけるマウスの生存率を示す。KKT 群が最も生存率が低く 31%であった。

Fig. 4 には、死亡率と BPR の関係を示した。死亡率と BPR に負の関連性が認められ、葛根湯を除くと高い相関が認められた ( $r = -0.97$ ,  $p < 0.01$ )。葛根湯では高い死亡率を示した。

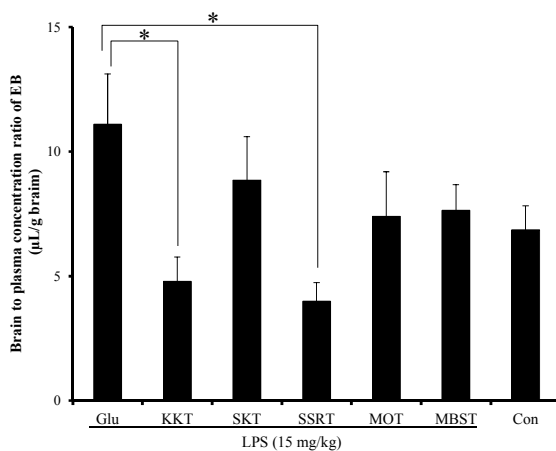


Fig. 2 Effect of Kampo administration on BBB integrity in mice with LPS-induced inflammation. Data represent the means  $\pm$  S.E.M. of 4-9 mice. \*  $P < 0.05$ , Dunnett test.

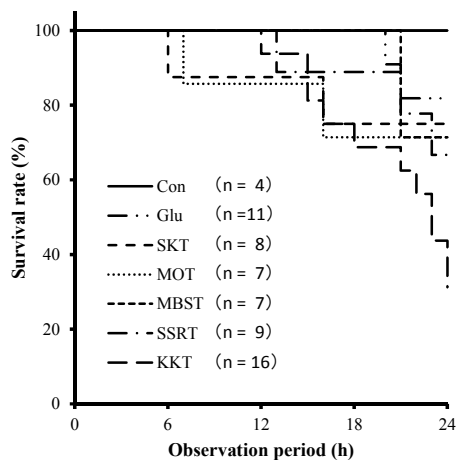


Fig. 3 Survival rate.

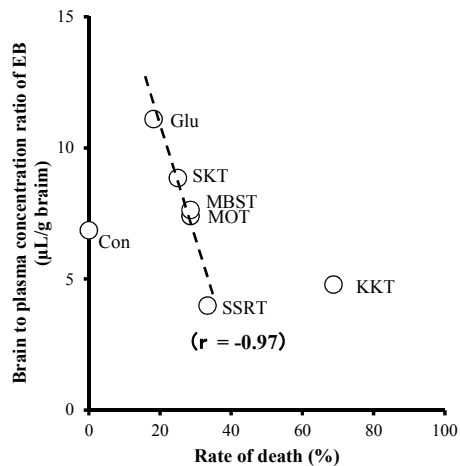


Fig. 4 Relationship between BPR and Rate of death.

### 3.3 血中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 濃度および血中 LPS 濃度

葛根湯で高い死亡率が認められたことから、LPS 投与から 24 時間後の血中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 および IL-10 濃度を調べた (Fig. 5)。血中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 濃度は Con 群と比較して Glu 群で増加傾向を示し、KKT 群は Glu 群と比較して抑制傾向を示した (Fig. 5 (a), (b), (c))。IL-10/TNF- $\alpha$  比は、Con 群と比較して Glu 群および KKT 群で低値を示した (Fig. 5 (d))。

Fig. 6 に LPS 投与から 24 時間後の血中 LPS 濃度を示す。血中 LPS 濃度は Glu 群と KKT 群で差はなかった。

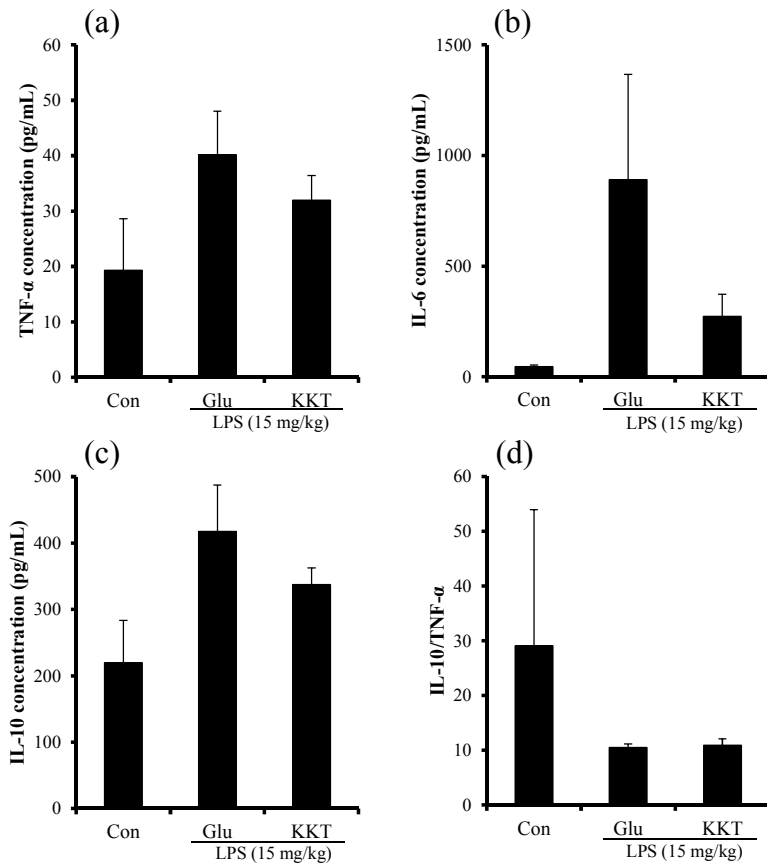


Fig. 5 Effect of Kakkonto administration on plasma TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 concentration at 24 h after LPS-treatment. (a) TNF- $\alpha$ , (b) IL-6, (c) IL-10, (d) IL-10/TNF- $\alpha$ . Data represent the means  $\pm$  S.E.M. of 5-7 mice.

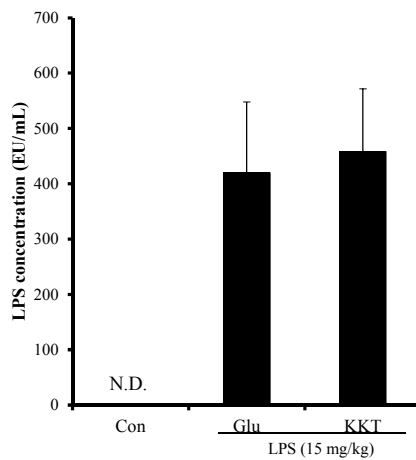


Fig. 6 Effect of Kakkonto administration on plasma LPS concentration at 24 h after LPS-treatment. Data represent the means  $\pm$  S.E.M. of 5-7 mice.

## 4. 考 察

血液から脳実質への物質移行は、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、アストロサイトおよびペリサイトから構成される。BBB の受動拡散による物質透過機構は、細胞実質経路と細胞間隙経路に分けられる<sup>10)</sup>。細胞実質経路は、脂溶性低分子の透過に関与する。その一方で、細胞間隙経路は、水溶性低分子の移行に寄与するが、タイトジャンクションによって、ほとんど物質は透過しない。EB は分子量 960.8 の水溶性色素であり、血漿中アルブミン（分子量：69,000）とほぼ結合することから、通常 BBB を通過できないことが知られている<sup>11)</sup>。しかしながら、炎症などの細胞傷害により BBB 機能が低下すると、細胞間隙経路が開口し、血液中の EB が脳実質へ移行する。

本研究において、EB の BPR は、Glu 群に比べて、KKT 群および SSRT 群で有意に低下した (Fig. 2)。このことから、葛根湯と小青竜湯は、炎症による BBB 機能低下を抑制する可能性が示唆された。しかし一方で、KKT 群は他の漢方製剤より高い死亡率を示した (Fig. 3)。このことから、著者は葛根湯を投与することにより、血管透過性亢進が抑制され、血中 LPS 濃度が上昇し、それに伴い死亡率が増加した可能性があると考えた。これを作業仮説として、葛根湯投与時の TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10、および血中 LPS 濃度を測定した (Figs. 5 and 6)。その結果、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 は Glu 群に比べて KKT 群は抑制傾向を示した。また、LPS の死亡転帰の指標マーカーとして報告されている IL-10/TNF- $\alpha$  比は、Glu 群および KKT 群は低値を示し、同様に血中 LPS 濃度も Glu 群に対して有意な差は認められなかった。このことから、LPS に起因した死亡ではない可能性が示唆された。

インフルエンザ感染マウスに葛根湯を投与すると、インフルエンザ感染による体温および死亡率の上昇を抑制する<sup>12)</sup>。本研究で用いた LPS 投与による BBB 機能低下マウスでは、体温の低下が観察されている（データは示していない）。このことから、LPS 投与下で、体温が低下し、衰弱したマウスに葛根湯を投与することに問題のある可能性が示唆された。また、葛根湯の水溶性画分には、LPS 受容体である Toll like receptor 4 (TLR4) を介したアジュバント効果があり、LPS による毒性を増強した可能性がある<sup>13)</sup>。すなわち、葛根湯を投与したマウスは、葛根湯に対する感受性の違いにより、生死を分けた可能性が示唆された。今後、さらなる検討が必要である。

## 【引用文献】

- 1) 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).
- 2) Hoffman K. B., Demakas A., Erdman C. B., Dimbil M., Doraiswamy P. M., *Bmj*, **347**, f4656 (2013).
- 3) 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).

- 4) Uchiyama H., Hiromura M., Shiratani T., Kuroki H., *Neurosci. Lett.*, **599**, 7–11 (2015).
- 5) Ose A., Kusahara H., Yamatsugu K., Kanai M., Shibasaki M., Fujita T., Yamamoto A., Sugiyama Y., *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 427–434 (2008).
- 6) Oshima S., Nemoto E., Kuramochi M., Saitoh Y., Kobayashi D., *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**, 1397–1400 (2009).
- 7) Ozaki Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 559–562 (1995).
- 8) Nishimura K., Osawa T., Watanabe K., *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, **2011**, 1–7 (2011).
- 9) Ohara K., Oshima S., Fukuda N., Ochiai Y., Maruyama A., Kanamuro A., Negishi A., Honma S., Ohshima S., Akimoto M., Takenaka S., Kobayashi D., *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, **2015**, 1–11 (2015).
- 10) Kang E. J., Major S., Jorks D., Reiffurth C., Offenhauser N., Friedman A., Dreier J. P., *Neurobiol. Dis.*, **52**, 204–218 (2013).
- 11) Belayev L., Busto R., Zhao W., Ginsberg M. D., *Brain Res.*, **739**, 88–96 (1996).
- 12) Kurokawa M., Imakita M., Kumeda C. A., Yukawa T. A., Shiraki K., *J. Tradit. Med.*, **13**, 201–209 (1996).
- 13) Ishijima Y., Kawamura T., Kimura A., Kohno A., Okada T., Tsuji T., Watanabe Y., *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **24**, 43–54 (2011).



# Effect of Kampo medicine on blood-brain barrier integrity and death rate in mice with lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption

Kousuke Ohara, Daisuke Kobayashi, Masayuki Akimoto

## Abstract

Abnormal behavior, which is a side effect of oseltamivir phosphate, a drug for influenza infection, is considered to be the result of increased penetration of oseltamivir carboxylate (OC), an oseltamivir phosphate metabolite, to the brain. The mechanism of increased drug penetration to the brain is a decrease in the blood-brain barrier (BBB) function caused by inflammation. Based on this known fact, we reported that the barrier function of the BBB was recovered following combination treatment with kakkonto and oseltamivir phosphate, and that the brain OC concentration decreased. In this study, we investigated whether Kampo medicines used for common cold other than kakkonto have similar effects. The BBB function was evaluated by using the Evans blue brain-to-plasma concentration ratio (BPR). The result showed that shoseiryuto and kakkonto significantly suppressed the BPR. However, shoseiryuto and kakkonto increased the mortality rate of mice. A high mortality rate was seen, especially with kakkonto. Kakkonto attenuated LPS-induced BBB dysfunction, but Kakkonto may enhance inflammation of Lipopolysaccharide.

**Keywords:** Kampo medicine, Kakkonto, Blood-Brain Barrier, Lipopolysaccharide, Inflammation