

ウシ由来ラクトフェリンによるストレス  
軽減効果の発現とその作用機序

2007

山口大学大学院連合獣医学研究科

亀森 直

序論	1
1. ラクトフェリンの性質と特徴	1
2. ラクトフェリンの体内移行	2
3. ラクトフェリンの機能と応用例	3
4. ストレス応答に対するラクトフェリン関与の可能性	4
5. 本研究の目的	6
第1章 bLF によるストレス軽減効果の発現	7
I 目的	7
II 実験方法	7
III 結果	9
IV 考察	10
第2章 bLF の作用機序に関する行動薬理的解析	16
I 目的	16
II 実験方法	16
III 結果	18
IV 考察	21
第3章 bLF の作用機序に関する生化学的解析	35
I 目的	35
II 実験方法	36
III 結果	39
IV 考察	42

第4章 bLF の脳内移行動態の解析	63
I 目的	63
II 実験方法	63
III 結果	65
IV 考察	66
第5章 腸管からの LF 吸収の効率化	71
I 目的	71
II 実験方法	72
III 結果	74
IV 考察	76
総合的考察	86
要約	88
謝辞	91
参考文献	92

# 序 論

## 1. ラクトフェリンの性質と特徴

ラクトフェリン(LF)は哺乳類の乳汁をはじめ、血液、脳脊髄液、涙、唾液、膀胱液、精液など様々な分泌液に含まれている(Masson & Heremans, 1966; Levay & Viljoen, 1995; Brock, 2002)が、乳汁中、特に初乳中に多く含まれており、ヒトの初乳中濃度は5~7 mg/mlに達する。また、乳汁中のLF濃度は動物種によって大きく異なる。例えば、ヒト、マウス、ウマの乳汁中にはLFが高濃度含まれており、中等度に含有する動物としてウシ、ヒツジ、ブタがある。一方、ラットは乳汁中にLFをほとんど含まず、トランスフェリン(TF)が鉄結合蛋白の役割を担っている(Masson & Heremans, 1971)。

LFは分子量約80kDの鉄結合性塩基性糖蛋白であり、N-lobeとC-lobeから構成される。各lobeにそれぞれ1分子の鉄が結合することで鉄を輸送することができる。溶液中でのLFの鉄結合能(鉄飽和度)はpHによって異なり、約pH2で全ての鉄を放出してapo-LFとなる(Baker et al., 2002)。また、鉄の飽和度によってLFの種々の活性が異なるとの報告(Arnold et al., 1982)もあり、特にLFによる静菌・殺菌作用の強さは鉄飽和度に大きく依存すると考えられている。通常を試薬として入手されるbovine LF (bLF)は20-25%の鉄飽和度と考えられているが、多機能蛋白であるLFの作用効率と鉄飽和度との関係には不明な点が多い。

また、LFは熱や酸に弱く、60~70℃の熱処理によって変性する。さらに胃内では容易にペプシン消化を受けるため、経口投与によるLFの活性発現を維持するためには何らかの工夫が必要である。

## 2. ラクトフェリンの体内移行

多くの動物の新生子は生体機能の調節系や外界からの異物の侵入などに対する防御機能が未発達であるが、授乳によって劇的な発育を遂げる。乳汁中には生体防御に重要な役割を果たす免疫グロブリンをはじめ、種々の成長因子なども含まれており、新生子の消化管は生後のごく限られた期間に初乳中の免疫グロブリンを効率的に取り込む能力を備えている。この機能は生体防御と生後発育に必要不可欠のものであると考えられている。

また、脳は物理的および化学的に安定した環境下でのみ正常な機能を発揮できるため、脳の毛細血管、クモ膜および脈絡叢がバリアー機能を有し、物質の移動を制限していることはよく知られている。これらバリアーとして血液-脳関門 (Blood-brain barrier, BBB) ならびに血液-脳脊髄液関門 (Blood-cerebrospinal fluid barrier, BCSFB) には上皮細胞間の *tight junction* により高分子物質の移動は著しく制限されているが、新生子期の脳は成熟個体に比べて高い物質透過性を持つと報告されている (Fossan et al., 1985; Habgood et al., 1993)。

近年、Harada et al. (1999a) は新生豚において bLF が腸管から血液循環に移行した後、胆汁中に排出されることを報告し、LF が腸-肝循環する可能性を示唆している。また、経口的に投与された LF はウシ新生子 (Talukder et al., 2002) や離乳豚 (Harada et al., 1999b)、さらには離乳後の若齢ウシ (Talukder et al., 2003b) でも吸収され、体循環に移行することが報告されている。Talukder et al. (2003a) は、成熟ウシの十二指腸、空腸、回腸、結腸などの腸をはじめ、空回腸に分布するパイエル板に特異的 LF 受容体が存在することを報告した。興味深いことに、LF 受容体の密度は通常の腸管組織よりもパイエル板において高かった。したがって、Gut closure 後の動物における LF 輸送機構には、リンパ組織の関与が不可欠であると予想さ

れる。Kitagawa et al. (2003) は離乳後のブタで、Takeuchi et al. (2004) は成熟ラットで、それぞれ十二指腸内に投与した bLF が腸管から吸収され、リンパ管を介して血液循環に移行することを報告した。

経口的に投与された LF が多くの効果を持っていることはよく知られており、胃酸・ペプシンによる LF の分解産物である lactoferricin は、特に強い静菌・殺菌活性を有する(Brock, 2002)。Kuwata et al. (2001) は、成熟ラットの小腸に酵素分解後も LF 分子と lactoferricin が残存することを報告している。

以上のように、LF の腸管吸収ならびに吸収後の体内動態は、LF の生物活性を考える上で重要であり、また、LF の臨床応用を進めるためには、経口投与による吸収動態の解析が不可欠である。

### 3. ラクトフェリンの機能と応用例

LF は非常に多機能であり、静菌・殺菌作用 (Miehlke et al., 1996) をはじめ、抗ウイルス作用(Okada et al., 2002)、抗癌作用 (Wolf et al., 2007)、抗アレルギー作用(Kruzel et al., 2006)、抗酸化作用(Nielsen et al., 2004)などが報告されている。最近では、消化管粘膜での種々のサイトカインの誘導による免疫活性化が抗癌作用の主な作用機序であるとの報告がなされ、癌転移抑制効果、特に血管新生の抑制効果が重要であると考えられている(Iigo et al., 2004)。

ヒトの臨床応用例としては、C型肝炎ウイルス抑制(Miura et al., 2004)、*H. pylori* の抑制(Imoto et al., 2004)、大腸癌の抑制(Iigo et al., 1999)、歯周病の治療と予防 (Yumoto et al., 2004)、白癬菌の抑制(Yamauchi et al., 2000)などが報告されている。

獣医療に関連した報告として、bLF が *in vitro* で Madin-Darby イヌ腎細胞におけるイヌヘルペスウイルスへの感染と再感染に対する抑制効果 (Tanaka et al., 2003)、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)陽性および陰性のネコにおける難治性口内炎

の治療効果が報告されている(Sato et al., 1996)。産業動物に対しては、ウシの潜在性乳房炎治療 (Kawai et al., 2004)、馬の繋靱治療 (Momotani et al., 2004) などが知られている。また Diarra et al. (2003) は、bLF の単独投与またはペニシリン G との混合投与によって *S. aureus* に対する自己免疫防御機構を強化する可能性を示した。Hagiwara et al. (2003) は、潜在性乳房炎ウシにおける乳汁中の LF 濃度が健常ウシのそれよりも有意に高かったことから、乳房炎のマーカーとしての LF の有用性を報告している。

以上に述べた LF の作用は何れも末梢組織におけるものであるが、Hayashida et al. (2003a) は中枢神経系に対する新規作用として鎮痛効果を報告している。その作用機序は、内因性の一酸化窒素合成酵素 (NOS) を LF が活性化することにより、産生された一酸化窒素 (NO) が中枢神経系内の  $\mu$ -オピオイド受容体の作用を増強することが考えられている。中枢神経系に対する LF の作用については、不明な点が多く残されており、脳脊髄液へ移行した後の LF の役割についても議論すべき点が多い。

#### 4. ストレス応答に対するラクトフェリン関与の可能性

Hayashida et al. (2003b) は、LF が脊髄で強い鎮痛活性を発現することを報告したが、LF は鎮痛以外にも中枢神経系に対して作用する可能性は十分に考えられる。Takeuchi et al. (2003) は、ラット新生子にみられる母ラットからの分離不安関連行動を bLF が軽減することを報告した。これは、新生子に特有の行動を指標としているものの、LF の抗不安効果に関する最初の報告である。

成熟個体についてみると、一般的に生体にストレス刺激が加わった場合、生体は様々な反応を示すことが知られている。主なストレス応答として神経系と内分泌系が挙げられるが、前者は交感神経を介した副腎髄質からの epinephrine

(E) および norepinephrine (NE) の分泌であり、後者は視床下部-下垂体-副腎皮質軸(HPA 軸)である。これら交感神経ならびに HPA 軸を介したストレス応答は、多くの液性調節因子と神経性入力によって常時修飾を受けているが、近年、栄養学的因子、いわゆるサプリメントによる調節系に対する効果が注目されている。前述のように、LF は中枢神経系において鎮痛効果を発揮することから、ストレス応答に対しても何らかの修飾因子として作用する可能性が十分に予想される。

一方、内因性オピオイドが HPA 軸応答を直接的に修飾する可能性も示唆されている。例えば、ヒトでは、 $\mu$ -オピオイド受容体拮抗薬である naloxone が ACTH 分泌を増加させ、Met-エンケファリン誘導体投与により ACTH 分泌が低下すること、 $\delta$ -オピオイド作動薬が視床下部レベルで ACTH 分泌を抑制することなどが報告されている(degli Uberti et al., 1992)。

さらには、HPA 軸に対する NO の修飾についても様々な検討がなされており、Seo et al. (2004) は、ラットに foot-shock (FS) の負荷または lipopolysaccharide (LPS) の静脈内投与を行った後、神経性 NOS (nNOS) 含有細胞を脳の各部位で測定することにより、NO が視床下部室傍核を刺激し、HPA 軸を活性化する可能性があることを示唆している。また、血管内皮性 NOS (eNOS) と nNOS による NO 産生をともに阻害すると、nicotine 誘発による HPA 応答が顕著に増強されることなども報告されている (Gadek-Michalska & Bugajski, 2004)。さらに、N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) は、すべての型の NOS (誘導型: iNOS、eNOS、nNOS) を阻害し、血液由来サイトカインに対する ACTH 反応を顕著に増強するが、ラットにおける FS ストレスや心理的ストレスに対する反応は減少させるとの報告がみられる (Rivier, 1998)。これらの報告は HPA 軸の活性に関連するメカニズムが複雑であること、また刺激の型や強さ、与える時間になんら



かの関連性があることを示している。

いずれにしても、中枢神経系に対する鎮痛効果の解析から、bLF が NO を介して内因性オピオイド機構を増強することが強く示唆されており (Hayashida et al., 2003b)、LF のストレス軽減効果においても類似の作用機序が予想される。しかしながら、神経系調節ならびに HPA 軸応答のいずれについても LF の関与は未だ明らかにされていない。

## 5. 本研究の目的

前述のように、LF は体液中に広く分布し、また、経口投与した LF の一部は血液を介して脳脊髄液へ到達する可能性が指摘されている。さらに、鎮痛活性など、中枢神経系に対する LF の作用も明らかにされていることから、LF には鎮痛以外にも神経系活動を修飾する可能性が高いと予想される。

本研究では、LF による神経活動修飾作用の解析として、ラットを用いたストレス応答を中心に、行動学的ならびに生化学的解析を進めた。実験は大きく 3 つの内容を含んでいる。初めに、恐怖条件付けフリージングテストならびに高架式十字迷路による心理的不安・ストレス状態の解析、次いで、視床下部・下垂体・副腎皮質系を介したストレス応答に対する LF の作用解析、最後に、LF の脳内移行動態に関する免疫組織学的解析、さらには、経口投与による臨床応用を視野に入れた LF の体内移行動態の解析として、腸溶性 LF の胃内あるいは十二指腸内投与による腸管吸収の効率化について検討した。

# 第1章 bLF によるストレス軽減効果の発現

## I. 目的

近年、Takeuchi et al. (2003)は、母親や同腹子から離された10日齢のラットが示す探索行動や超音波発声を指標とし、bLFがこれら不安関連行動を抑制したと報告した。これは動物の新生子期に特異的にみられる探索行動の一種とも考えられるが、bLFの抗不安効果を示した最初の報告である。一般的に、新生子のBBBあるいはBCSFBでの物質透過性は成熟個体とは異なることから、成熟個体においてもLFがストレス軽減効果を有するか否かは不明である。

本実験では、成熟ラットにおけるbLFのストレス軽減効果を明らかにすることを目的とし、2種の異なる行動試験を行った。すなわち、強いストレス状態を評価する恐怖条件付けフリージングテスト、およびマイルドな心理的不安を評価する高架式十字迷路(Elevated plus-maze, EPM)テストである。尚、EPMについては、一般的なEPMが極めて軽微な心理的不安状態を評価するための手法であるという特徴から、本研究では、単回のFSとEPMを組み合わせた独自の手法を用い、ラットのストレス応答に対するbLFの効果を解析した。

## II. 実験方法

### 1. 動物

本実験には、雄のWistar-Imamichi系ラット(動物繁殖研究所, 茨城)を7週齢で導入し、1週間の予備飼育の後に実験に使用した。動物は、7:00-19:00を明期とする明暗サイクルの下、室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ で飼育し、餌と水は自由飲食とした。また、

すべてのラットについて1回のみ使用とし、実験終了後はエーテル麻酔下で安楽殺処分した。

## 2. 投与薬物

投与した bLF は和光純薬工業（大阪）から購入したものを使用した。

## 3. 恐怖条件付けフリージングテストのプロトコール

実験当日、ラットを飼育ケージから実験室に移し、少なくとも1時間は実験環境に慣れさせた。実験室は室内照明を点灯し、常に静穏を維持した。FS用の刺激箱(20×24×23 cm)はプレキシガラスの壁とステンレス格子の床で構成されたものを使用した。

実験手順は以下の通りである。はじめに、ラットを刺激箱の中に置き、3分間放置した。その後、FS刺激(1.5 mA×1 s)とビープ音(2 kHz, 90 dB, 1 s)を1分間隔で30回与えた。24時間後に Saline または bLF (10, 30, 100 mg/kg) を腹腔内投与し、その30分後に再び刺激箱に動物を入れ、フリージング行動を評価した。刺激箱に動物を入れた10分後に2分間ビープ音を聞かせ、さらにその後30分後までの行動をビデオカメラで録画した。フリージングの定義として、典型的なすくみ姿勢をとり、呼吸に伴う胸郭の動きを除いて動かない状態とし、40分間のフリージング行動を観察した。結果は、5分ごとのフリージング行動を示した時間で表示した。

## 4. 高架式プラスメイズテスト(EPM)のプロトコール

EPM に使用する装置は2つの開放されたアーム(オープンアーム 50×10 cm)と2つの閉ざされたアーム(クローズドアーム 50×10 cm)で構成され、それぞれ

のアームは床上 70 cm の高さで十字にクロスしている。

実験当日、ラットを飼育ケージから実験室に移し、少なくとも 1 時間は実験環境に慣れさせた。実験室は室内照明を点灯し、常に静穏を維持した。各薬物を腹腔内に投与し、その 30 分後に FS 刺激を与えた。FS 負荷群のラットを上述の刺激箱に入れ、1 回のみ FS 刺激(1.5 mA, 1 sec)を与え、そのまま 3 分間刺激箱内に留置した。直ちにラットを刺激箱から取り出し、メイズの中央部に置いた。ラットがクローズドアームに進入してから 5 分間の行動をビデオカメラで録画した。解析結果は、オープンアーム滞在時間(Time)、オープンアーム進入回数(Count)、1 回あたりのオープンアーム平均滞在時間(Time/Count)で表示した。また、FS 非負荷群(non-FS)のラットは、刺激箱に 3 分間入れたが FS 負荷は行わず、その後の操作は FS 群と同様に行った。

## 5. 統計学的分析

すべてのデータは mean±S.E.で表示した。bLF 投与の効果判定には one-way analysis of variance (ANOVA)および two-way ANOVA、Student's t-test を用い、 $P < 0.05$  を統計学的に有意とした。

## III. 結果

### 1. 恐怖条件付けフリージングテストにおける bLF の効果

Saline 群のラットは、条件付けから 24 時間後に刺激箱に入れた際、直ちに著しく高いフリージング時間を示し、5-10 分後ではわずかにフリージング時間が減少した(Fig.1)。さらに、ビーブ音を提示した後の 10 分間では再び高いフリー

ジング時間(211.6 sec/5 min)を示し、その後は徐々に減少して 30 分後にはベースラインまで減少した。低用量の bLF 投与 (10, 30 mg/kg) はフリージング行動にほとんど影響しなかった。これに対し、高用量の bLF (100 mg/kg) 群では、刺激箱に入れた直後から Saline 群よりもフリージング時間が有意に減少し、さらにビープ音の提示後もフリージング時間は有意に減少した [ $F_{(1,80)}=18.97$ ,  $P<0.0001$ ]。

## 2. EPM における bLF の効果

non-FS 条件では、bLF 群の Time と Count は saline 群に比べてわずかに増加傾向を示すものの、有意差は認められなかった(Fig.2)。これに対し、FS 負荷条件では、bLF 投与(100 mg/kg, ip)によって Time と Time/Count はいずれも有意に増加した。この結果は、EPM と単回 FS 刺激を組み合わせた条件下ではじめて bLF によるストレス軽減効果が発揮されることを示唆している。

さらに、EPM と FS を組み合わせた条件下で bLF の用量依存性効果について解析したところ、bLF 10 mg/kg、30 mg/kg および 100 mg/kg と用量の増大に伴って Time と Time/Count も増加傾向を示し、100 mg/kg 投与では有意な増加が認められた(Fig.3)。したがって、bLF によるストレス軽減効果は用量依存性であることが明らかとなった。

## IV. 考察

本実験では、bLF 投与によって恐怖条件付けフリージングテストにおけるフリージング時間が有意に減少し、さらに EPM におけるオープンアーム滞在時間および 1 回当たりのオープンアーム滞在時間がともに増加した。これらの結果

は、bLF がストレス軽減効果を有することを示している。

通常の EPM 評価では、動物が探索に対する欲求を示すと同時に、心理的不安状態にも陥っているため、オープンアーム滞在時間は著しく減少する (Morean et al., 1997)。本実験では、EPM と FS 刺激を組み合わせた独自の手法を採用し、通常の EPM よりもさらに強い不安・ストレス状態を作り出している。

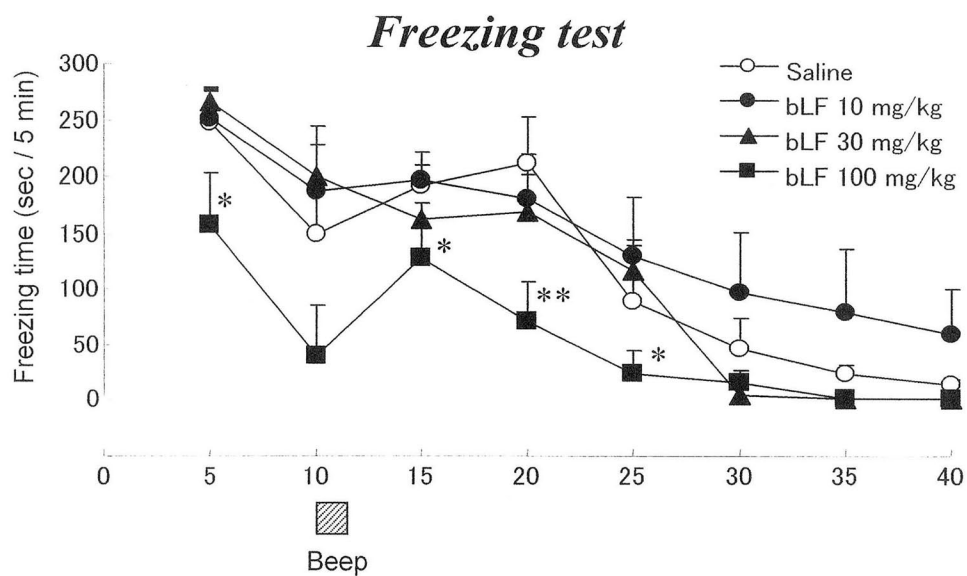
今回の研究により、bLF が成熟ラットにおけるストレス応答のうち、特に FS を伴った EPM や恐怖条件付けフリージングテストのような中程度から重度のストレス刺激に誘導される反応には軽減効果を持つことが示唆された。しかし、FS を伴わない EPM のような軽微なストレス応答に対して bLF はほとんど影響しなかった。これは、内因性の脳内ストレス応答が一定レベル以上に駆動されている状態で、はじめて LF の効果が発現すると理解でき、LF のストレス軽減効果の作用機序を解明する上でも重要な所見と位置づけられる。

一般に、精神的ストレスの強さは直接動物の行動に影響する。新奇環境刺激は動物において探索行動と恐怖行動を誘発することがよく知られている。Van den Berg et al. (1998) は感情的ストレスがラットにおいて FS のような物理的ストレス刺激とは反対の効果を示すことを報告している。例えば、5 日連続の FS 刺激を与えると、ラットの情動行動は少なくとも 15 日間減少させるのに対し、感情的ストレス刺激は、その後の 15 日間にわたって情動行動を増加させた。この報告から、ストレス応答の発生メカニズムはそれぞれの状態において異なる経路を有していると考えられる。

今回、2つの異なる評価系において、LF は 100 mg/kg の腹腔内投与で効果を表した。この用量は投与する薬物の量としては非常に多く、経口投与ではさらに多くの用量が必要であると考えられる。現実的な臨床応用を考えると、より効率的な薬剤の開発が不可欠である。今後は、LF の作用機序の解明が必要が必

要である。

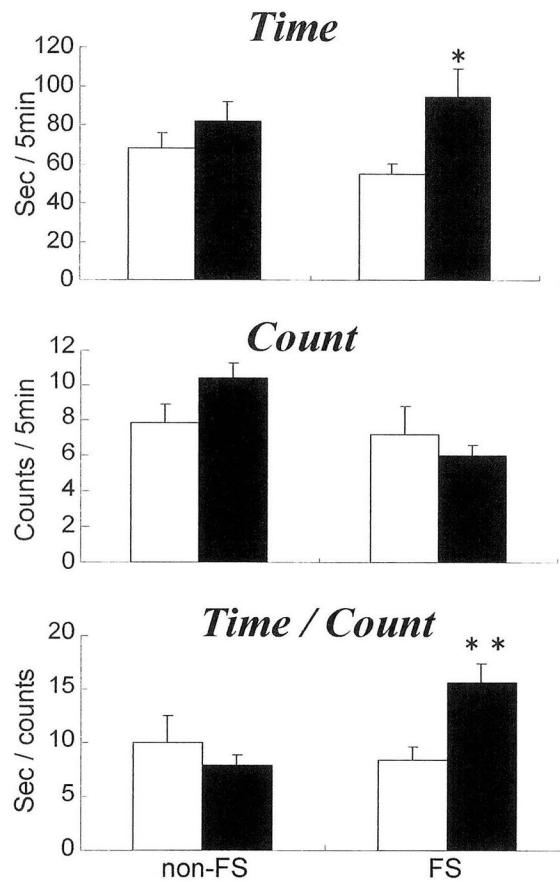
結論として、bLFは成熟ラットにおいてEPMのみの弱いストレス状態下では明らかな効果を持たなかったが、フリージングテストやFSを負荷した後のEPMなど、一定の強さのストレス状態下では軽減効果を有することが明らかとなった。さらに、この効果は用量依存性であることが確認された。



**Fig.1 Suppressive effects of bovine lactoferrin on the conditioned-fear-induced stress.**

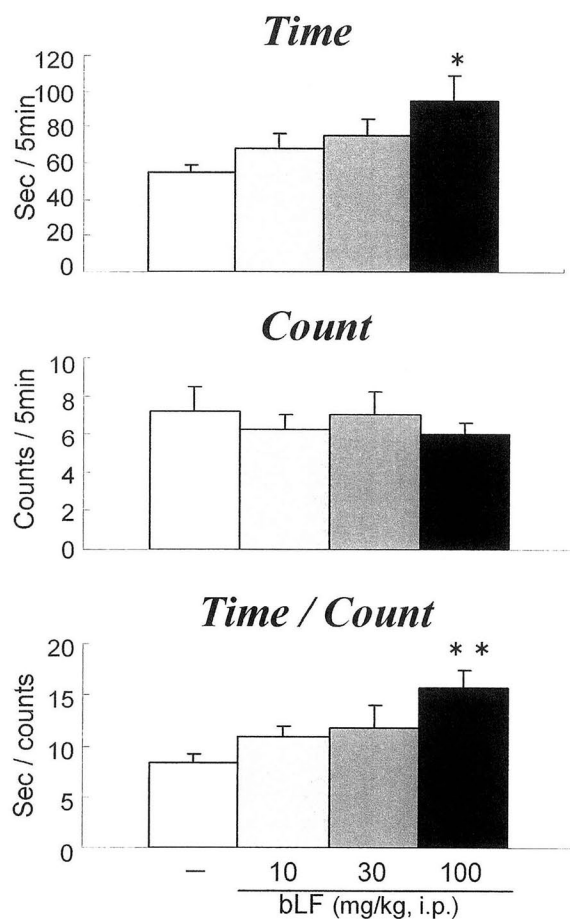
Each blot shows the change in time course of freezing time induced by conditioning. Bovine LF (10, 30, 100 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before the conditioning. Data are presented as total freezing time in each 5-min period. Beep sound was produced at 10 min from initiating re-exposure. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. from five rats. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 as compared with saline group.





**Fig.2 Suppressive effects of bovine lactoferrin on the elevated plus-maze test with or without foot-shock.**

Saline or bLF was administered 30 min before the foot-shock (FS, 1.5mA, 1sec). Upper, middle and bottom panels represent the time spent in the open arms (Time), number of entries into the open arms (Count) and the time spent in the open arms per entry (Time / Count), respectively. Open column and solid column show Saline and bLF administer groups, respectively. Data are presented as mean  $\pm$  S.E. (n=6-7). \* P<0.05, \*\*P<0.01 as compared with Saline group



**Fig.3 Dose-dependent effect of bovine lactoferrin on the elevated plus-maze test with foot-shock.**

bLF (10, 30, 100 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before the FS. The expression of the graphs follows Fig.2. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=6-7). \*P<0.05, \*\*P<0.01 as compared with Saline group

## 第2章 bLF の作用機序に関する行動薬理的解析

### I. 目的

第1章ではbLFによるストレス軽減効果について述べたが、本章では、bLFの作用機序の解明を目的とし、主に行動薬理学的手法を用いて解析を進めた。すでに Takeuchi et al. (2003) は、10日齢ラットにおける単回の母子分離に伴う不安関連行動をbLFが抑制する際に、内因性のオピオイドやNO合成が関与する可能性を指摘しているが、成熟動物のストレス応答機構に対するLFの作用機序は依然として不明である。

本実験では、上述したオピオイド受容体やNOの関与を解析するとともに、脳内ストレス応答に重要である5-HT神経およびDA神経に注目し、これら神経伝達物質の受容体に対する各種agonistならびにantagonistを用いてEPMによる行動薬理的解析を試みた。

### II. 実験方法

#### 1. 供試動物

実験には、8週齢のWistar-Imamichi系雄ラットを使用した。導入および飼育条件はすべて第1章と同様である。

#### 2. 投与薬物

実験には、以下の薬物を使用した。

bLF : 30, 100 mg/kg (和光純薬, 大阪)、Naloxone hydrochloride :  $\mu$ -オピオイド受

容体拮抗薬 : 1 mg/kg (Sigma, St. Louis, MO, USA)、N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester : 非選択的 NOS 阻害薬 : 1, 3 mg/kg (L-NAME, Sigma)、N<sup>o</sup>-nitro-D-arginine methyl ester : L-NAME の異性体 : 1 mg/kg (D-NAME, Sigma)、L-arginine : NO の前駆物質 : 30, 100, 300 mg/kg (Sigma)、7-nitroindazole : nNOS 阻害薬 : 3 mg/kg (Cayman Chem., Ann Arbor, MI, USA)、Buspirone hydrochloride : 5-HT<sub>1A</sub> 受容体 agonist : 0.1, 0.3 mg/kg (Sigma)、WAY-100635 maleate salt : 5-HT<sub>1A</sub> 受容体 antagonist : 0.03, 0.1 mg/kg (Sigma)、Mianserine hydrochloride : 5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体 antagonist : 0.3, 1, 10 mg/kg (Sigma)、Imipramine hydrochloride : 5-HT 再取込み阻害薬 : 1, 3 mg/kg (Sigma)、Haloperidol : D<sub>2,3,4</sub> 受容体 antagonist : 0.03, 0.1 mg/kg (Sigma)。

### 3. 実験プロトコール

EPM 試験に使用した装置ならびに動物の取り扱いはすべて第 1 章と同様である。尚、以下に述べる二つの実験プロトコールによって、行動薬理的解析を行った。

#### 【実験 1】内因性オピオイドおよび NO 産生に関する解析

本実験では、 $\mu$ -オピオイド受容体拮抗薬である naloxone、非選択的 NOS 阻害薬である L-NAME、その構造異性体である D-NAME、NO の前駆物質である L-arginine、選択的 nNOS 阻害薬である 7-nitroindazole を用いた。脳への移行時間を考慮し、7-nitroindazole のみ EPM の 60 分前に腹腔内投与したが、その他の薬物はすべて EPM の 30 分前に腹腔内投与した。FS を組み合わせた EPM の実験方法および評価は第 1 章と同様に行った。

## 【実験 2】 DA および 5-HT との関連性

本実験では、5-HT 受容体および DA 受容体に対する各種 agonist ならびに antagonist を用いて EPM による行動薬理的解析を行った。

agonist または antagonist の薬物は EPM の 60 分前に、saline および bLF は EPM の 30 分前にそれぞれ腹腔内投与した。FS を組み合わせた EPM の実験方法および評価は第 1 章と同様に行った。また、パラメーターにはオープンアーム進入割合 (オープンアーム進入回数 / オープンアームとクローズドアームへの総進入回数×100)を加えた。

### 4. 統計処理

すべてのデータは mean±S.E.で表示した。bLF 投与の効果判定には one-way analysis of variance (ANOVA)および two-way ANOVA、Student's t-test を用い、 $P < 0.05$  を統計学的に有意とした。

## III. 結果

### 【実験 1】

#### 1. オピオイド受容体拮抗薬の影響

$\mu$ -オピオイド受容体拮抗薬である naloxone を前投与し、bLF によるストレス軽減効果を解析したところ、naloxone (1 mg/kg)の単独投与は Time や Count に影響を及ぼさなかったが、bLF 投与(100 mg/kg)に対し、naloxone は Time および Time/Count を有意に減少させた(Fig.4)。すなわち、bLF によるストレス軽減効果の作用機序には内因性オピオイド機構の活性化が関与することを示唆している。

## 2. NOS 阻害薬の影響

bLF と NOS 活性化との関連を明らかにするため、NOS 阻害薬である L-NAME (1, 3 mg/kg) を前投与した。L-NAME は bLF によって増加した Time/Count を用量依存性に有意に抑制した(Fig.5)。また、NOS 阻害薬の不活性な異性体である D-NAME は 1 mg/kg で bLF のストレス軽減効果に影響しなかった。これらの結果から、bLF のストレス軽減効果は NO の産生増強に関連して発現するものと考えられた。

## 3. L-arginine の影響

NO の基質である L-arginine の投与が bLF のストレス軽減効果に及ぼす影響を解析した。本実験では、それ自体は有意な効果を示さない低用量の bLF (30 mg/kg) と様々な用量の L-arginine (30, 100, 300 mg/kg) を腹腔内投与した。L-arginine の単独投与 (100, 300 mg/kg, ip) では、Time と Time/Count がともに増加する傾向を示したものの、有意な変化は見られなかった (Fig.6)。bLF (30 mg/kg) と L-arginine (30, 100 mg/kg) との混合投与では、いずれも saline 群に比べて Time が有意に増加した。さらに、bLF (30 mg/kg) と L-arginine (100 mg/kg) との混合投与では L-arginine 単独投与による Time と比べても有意な増加を示した( $P < 0.05$ )。

## 4. 選択的 nNOS 阻害薬の影響

選択的神経型 NO 合成酵素 (nNOS) 阻害薬である 7-nitroindazole を前投与したところ、Time は saline 群レベルまで有意に低下した (Fig. 7)。すなわち、bLF によるストレス軽減効果は、nNOS の活性化を介して発現することが明らかとなった。

## 【実験 2】

### 1. 5-HT<sub>1A</sub> 受容体に対する agonist および antagonist の影響

5-HT<sub>1A</sub> 受容体 agonist である buspirone を 0.1 mg/kg または 0.3 mg/kg で腹腔内投与したところ、単独投与では EPM に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 8)。また、bLF (100 mg/kg, ip) との併用では、buspirone 0.3 mg/kg 投与によって bLF の効果を有意にブロックした。

5-HT<sub>1A</sub> 受容体 antagonist である WAY-100635 を 0.03 mg/kg または 0.1 mg/kg 腹腔内投与すると、EPM の Time は増加傾向を示したものの、有意な変化ではなかった (Fig. 9)。また、bLF (100 mg/kg, ip) と WAY-100635 0.1 mg/kg を同時投与すると、Time/Count は有意に増加した。

以上の結果から、bLF のストレス軽減効果には、5-HT<sub>1A</sub> 受容体を介する作用機序が関与する可能性が考えられる。

### 2. 5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体に対する antagonist の影響

5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体 antagonist である mianserine (0.3, 1.0 または 10 mg/kg, ip) を投与しても、EPM には有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 10)。しかし、bLF (100 mg/kg, ip) と mianserine を同時投与すると、用量依存性に bLF の抗ストレス効果をブロックした。この結果は、bLF の作用に 5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体を介する機序が関与することを示唆している。

### 3. 5-HT 再取り込み阻害薬の影響

5-HT 再取り込み阻害薬である imipramine を 1 mg/kg あるいは 3 mg/kg 腹腔内投与すると、EPM の Time は増加傾向を示し、Time/Count に対しては 3 mg/kg の用量で有意な増加が認められた (Fig. 11)。一方、bLF と imipramine との同時投

与では、bLF の抗ストレス効果を有意に減弱させた。

#### 4. D<sub>2,3,4</sub> 受容体に対する antagonist の影響

D<sub>2,3,4</sub> 受容体 antagonist である haloperidol を 0.03 mg/kg あるいは 0.1 mg/kg の用量で腹腔内投与しても、EPM には有意な影響を及ぼさなかった(Fig. 12)。しかしながら、bLF との同時投与では、Time/Count を有意に低下させ、bLF の抗ストレス効果をブロックした。

## IV. 考察

Takeuchi et al. (2003) は、ラットの新生子による母子分離不安モデルを用いた実験から、bLF が不安関連行動を抑制する効果を有し、これが内因性オピオイド機構に関係していることを初めて報告した。この報告において、彼らは bLF が母子分離のようなある種のストレス下においてオピオイド機構を活性化しているのではないかと考えている。さらに、母子分離されたラットの新生子における bLF のストレス軽減効果は選択的  $\mu$ -もしくは  $\kappa$ -オピオイド受容体拮抗薬を投与すると消失した(Takeuchi et al. 2003)。ラットの脳では  $\mu$ -オピオイド受容体よりも  $\kappa$ -オピオイド受容体の方が早期に発達するため(Petrillo et al., 1987)、 $\mu$  のみならず  $\kappa$ -オピオイド受容体拮抗薬でも bLF の効果が消失したものと考えられる。これに対し、条件付けされた恐怖ストレス下の成熟ラットにおいては、 $\mu$ -オピオイド受容体は主として抗ストレス反応を活性化させると考えられている(Matsuzawa et al., 2000)。今回の研究において、bLF のストレス軽減効果は非選択的オピオイド受容体拮抗薬である naloxone によって有意に減弱した。しかしながら、bLF は  $\mu$ -および  $\kappa$ -オピオイド受容体のいずれにも結合しないことが報告



されている(Takeuchi et al., 2003)。さらに、LF のフラグメントはオピオイド作動薬というより、むしろオピオイド拮抗薬のように働くことが知られている(Teschemacher, 2003)。これらの報告から、bLF は他の機構を介して内因性オピオイド作用を増強していると考えられる。

本実験では、NOS 阻害薬である L-NAME が FS を伴った EPM において、bLF のストレス軽減効果をブロックするという結果が得られ、さらに低用量の bLF (30 mg/kg)と低用量の L-arginine との混合投与により、bLF のストレス軽減効果が増強された。これらの結果から、bLF が直接 NOS を活性化し、産生された NO がオピオイド機構を増強していると考えられる。このメカニズムはラットの脊髄における bLF の鎮痛効果のメカニズムと非常に似ている(Hayashida et al., 2003a, 2003b)。さらに本実験において、nNOS 特異的阻害薬である 7-nitroindazol が bLF のストレス軽減効果を顕著にブロックしたことから、bLF は、直接的あるいは間接的に nNOS を活性化していることが示唆される。

近年、Bilbo et al. (2003)の報告によると、nNOS ノックアウトマウスは野生型マウスと比べ、オープンフィールドテストでの不安行動が減少していることが指摘されており、さらに nNOS ノックアウトマウスは、ストレス誘発性のコルチコステロン上昇が減弱したことも報告されている。先人の報告によると、視床下部室傍核からの CRH 分泌調節に NO が関与していることが示唆されている(Seo, 2004)。nNOS は、視床下部の室傍核や視索上核を含む、脳の様々な領域に分布している(Huang et al., 1993; Nelson et al., 1997)。これらの神経核は CRH を含有する主要な領域であることから、NO は CRH 放出を介して HPA 軸を修飾しているものと考えられる。Kim and Rivier (2000)は、ラットにおいて FS により誘発された ACTH 放出が L-NAME 投与により抑制され、これが視床下部の NOS 活性減少を伴っていたと報告している。さらに、前駆オピオメラノコルチン

(POMC)フラグメントの免疫染色領域が nNOS ノックアウトマウスの下垂体細胞の多くで減少していた。つまり、nNOS の不足が下垂体オピオイドペプチドの細胞内濃度に影響していたのである (Keilhoff, 2001)。逆に、Givalois et al. (2002)は中枢性 NO 機構が HPA 軸の活性化に対してネガティブ効果を持っていることを報告している。

nNOS には nNOS-1 と nNOS-2 の 2 つのアイソフォームがあることもよく知られている。Kolesnikov et al. (1997)は、nNOS-1 と nNOS-2 を選択的に認識できるアンチセンスプローブを使用し、nNOS-2 を選択的に欠損させたマウスではモルヒネの鎮痛効果が顕著に抑制されたと報告した。さらに彼らは、痛みの発現と鎮痛効果に対する修飾作用は、nNOS-1 と nNOS-2 でそれぞれ個別に関連して動くことを提唱している。bLF のストレス軽減効果において、nNOS のいずれのアイソフォームが HPA 軸内で修飾作用を発現するのかは、今後明らかにしなければならぬ点である。

一方、恐怖条件付けによるストレスは線条体において DA の含有量を減少させ、様々な内因性オピオイドを脳の各部位ごとに増減させることが報告されている (Nabeshima et al., 1986, 1992)。さらに恐怖条件付けストレスは、オピオイドやドーパミン神経のみならずセロトニン神経を含む他の神経機構をも活性化することが報告されている (Inoue et al., 1994)。このように、恐怖条件付けストレスは DA や 5-HT の代謝に影響を与えることが知られており、bLF はオピオイド系を増強することにより、DA や 5-HT 系の活動に影響を与えている可能性が考えられた。

そこで、今回 5-HT 受容体や DA 受容体に対する LF の関与について行動薬理的解析を試みた。5-HT 受容体は末梢および中枢に広く分布していて、その機能も複雑である。中枢神経系ではシナプス後のみならず、他の神経終末部にお

いて神経伝達物質の分泌を調節している (Matsumoto et al., 1995)。血圧調節などの自律神経系での役割のほか、情動、感情などの調節にも関与していると考えられている (Yoshioka et al., 1995)。

DA は、中脳線条体で運動機能の調節に、中脳辺縁系では情動や認知などの精神機能に関与している。DA 受容体は、アデニル酸シクラーゼに共役し活性化する D<sub>1</sub> 受容体ファミリーと、抑制的あるいは共役しない D<sub>2</sub> 受容体ファミリーに分類され、さらに D<sub>1</sub> 受容体は D<sub>1</sub> と D<sub>5</sub> に、D<sub>2</sub> 受容体は D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>、D<sub>4</sub> のサブタイプに細分される (Civelli et al., 1993 ; Gingrich & Caron, 1993 ; Sokoloff & Schwartz, 1995 ; Seeman & van Tol, 1994)。辺縁皮質系での精神情動機能には、D<sub>2</sub> が最も関わっているが、最近では、抗精神病薬の作用点として D<sub>4</sub> も注目されている (Sato et al., 1995)。

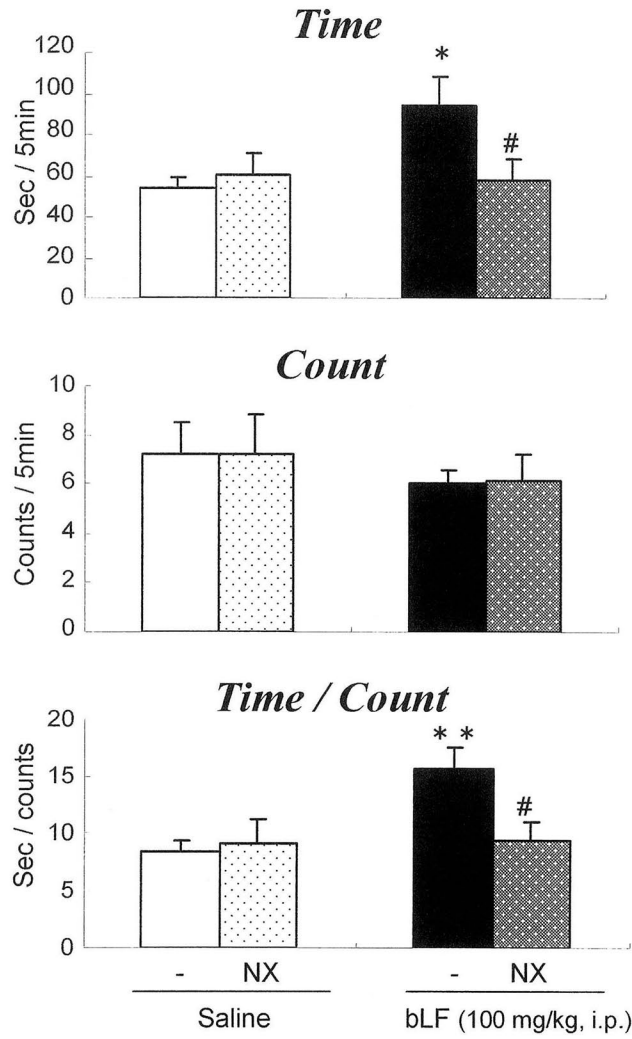
今回、5-HT<sub>1A</sub> 受容体作動薬、拮抗薬および 5-HT 再取込み阻害薬、あるいは D<sub>2,3,4</sub> 受容体拮抗薬の影響を解析したところ、bLF の抗ストレス効果は 5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体拮抗薬によって用量依存性に阻害されたことから、bLF の作用機序として 5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体が最も強く関与していることが示唆された。また、その他の agonist および antagonist も一部で bLF の効果を減弱したことから、bLF の作用機序には、5-HT と DA 神経活動に対する修飾が含まれるものと考えられる。

中枢では 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の機能亢進が幻覚、うつ病、精神運動機能興奮、不安などに関与すると考えられ、統合失調症の陰性症状にも関与すると推定されているが、5-HT<sub>2A</sub> 受容体作動薬である DOI が高架式プラスメイズ試験において抗不安作用を持つことも報告されている (Dhonnchadha et al., 2003a , 2003b)。

ただし、5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体拮抗薬として用いた mianserin は inverse agonist 作用やヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体阻害作用、アドレナリン α<sub>2</sub> 受容体阻害作用も少なからず有している。それらの作用が影響している可能性もあるので更なる実験が必要

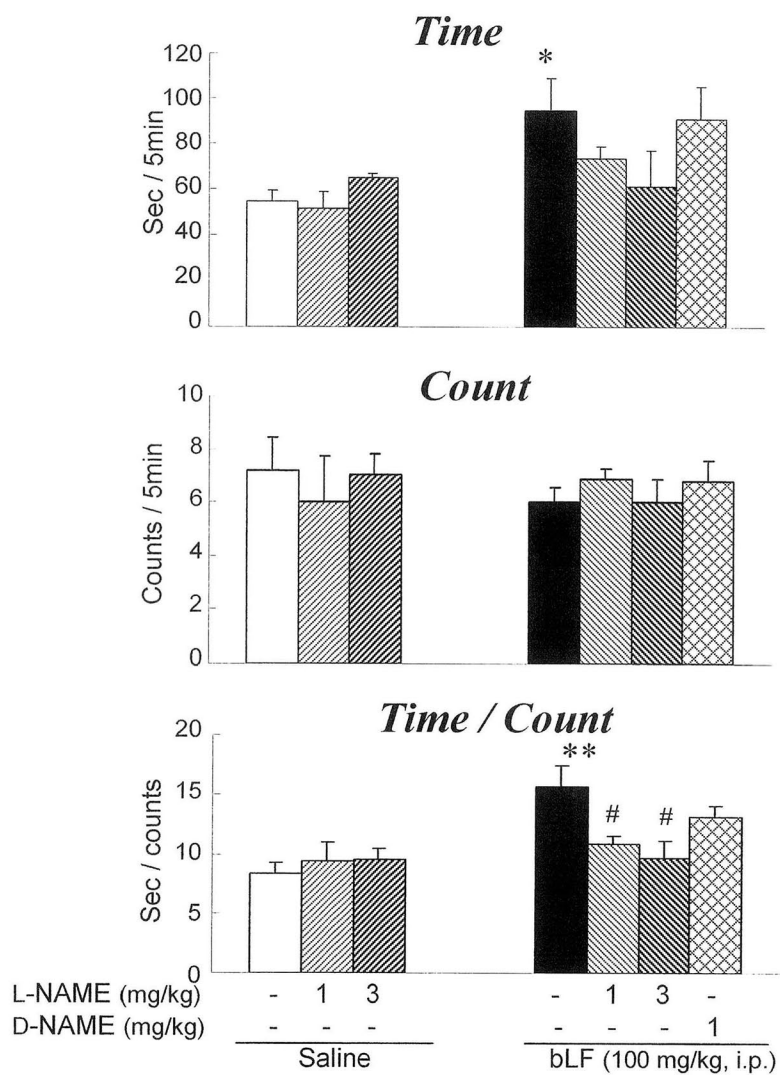
である。

結論として、bLF のストレス軽減効果には内因性オピオイド機構および nNOS による NO 産生が関わっていること、この効果は bLF と L-arginine との混合投与により増強されることが明らかとなった。このことから、bLF は nNOS による NO 産生を介して内因性オピオイド機構を活性化していると考えられる。また、他の作用機構として 5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体を中心とする 5-HT および DA 神経の活動も関与する可能性が示唆された。



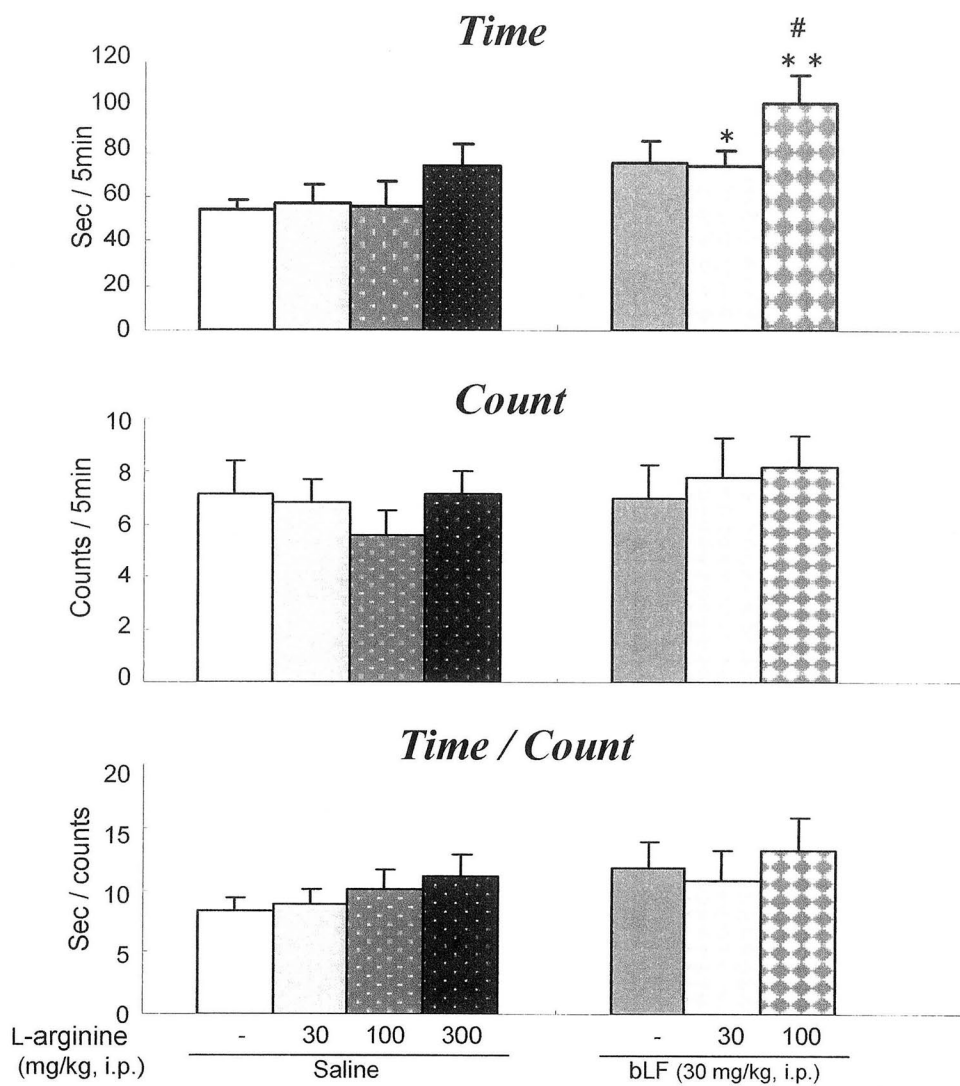
**Fig.4 Effects of opioid receptor antagonist on the elevated plus-maze test with foot-shock.**

Saline, bLF alone, naloxone (NX 1 mg/kg, i.p.) alone or bLF+NX (1 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before the FS. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=6-7). \*P<0.05, \*\*P<0.01 as compared with Saline alone. # P<0.05 as compared with bLF alone



**Fig.5 Effects of nitric oxide synthase inhibitor on the elevated plus-maze test with foot-shock.**

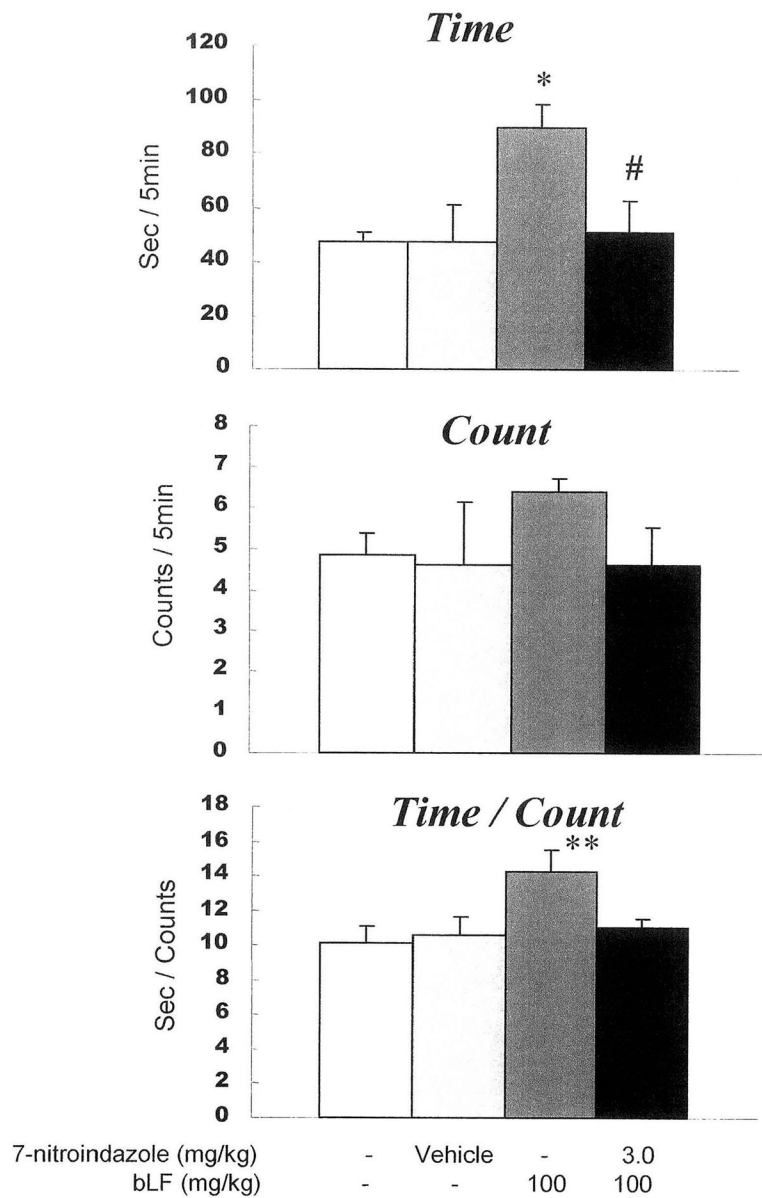
bLF+ L-NAME (1, 3 mg/kg) or D-NAME (1 mg/kg) was administered intraperitoneally 30 min before the FS. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-7). \*P<0.05, \*\*P<0.01 as compared with saline alone, #P<0.05 as compared with bLF alone.



**Fig.6 Effects of L-arginine on the elevated plus-maze test with foot-shock.**

Saline, L-arginine (30, 100, 300 mg/kg, i.p.) alone or combination of bLF (30 mg/kg, i.p.) and L-arginine (30, 100 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before the FS. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-7).

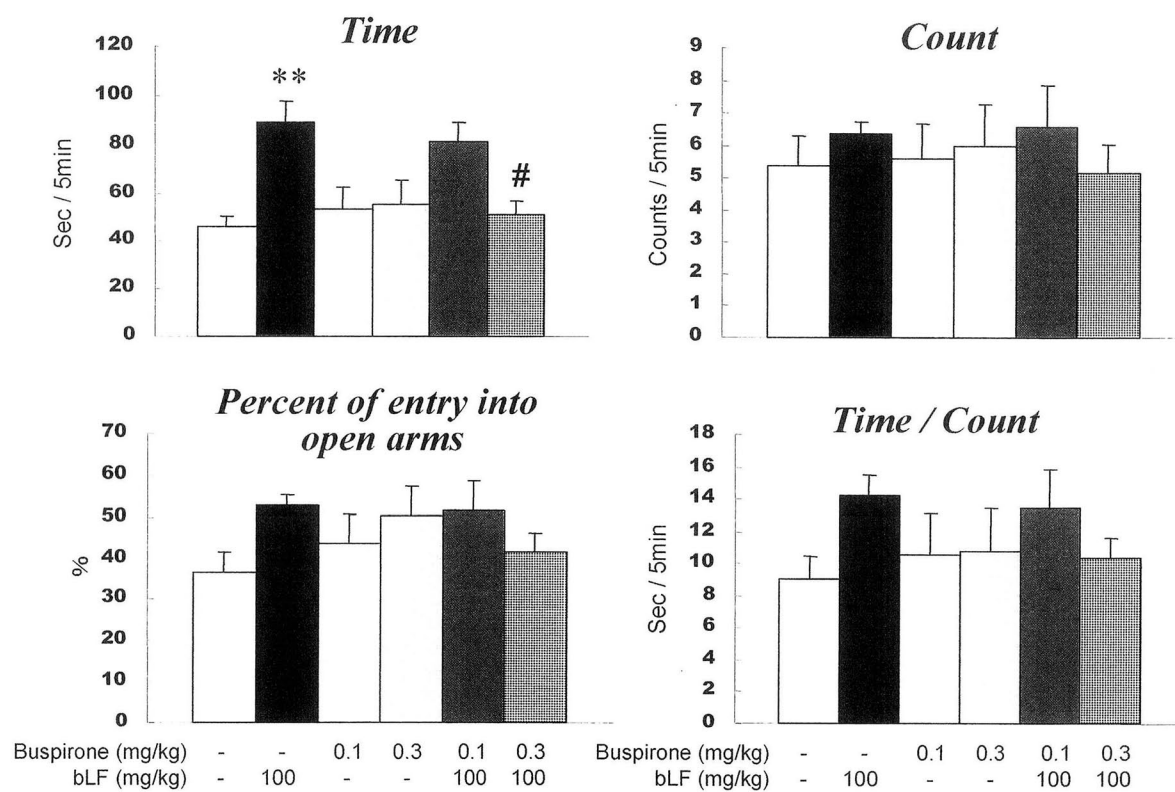
\*P<0.05, \*\*P<0.01 as compared with Saline group, # P<0.05 as compared with L-arginine (100 mg/kg) group.



**Fig.7 Effects of 7-nitroindazole on the elevated plus-maze test with foot-shock.**

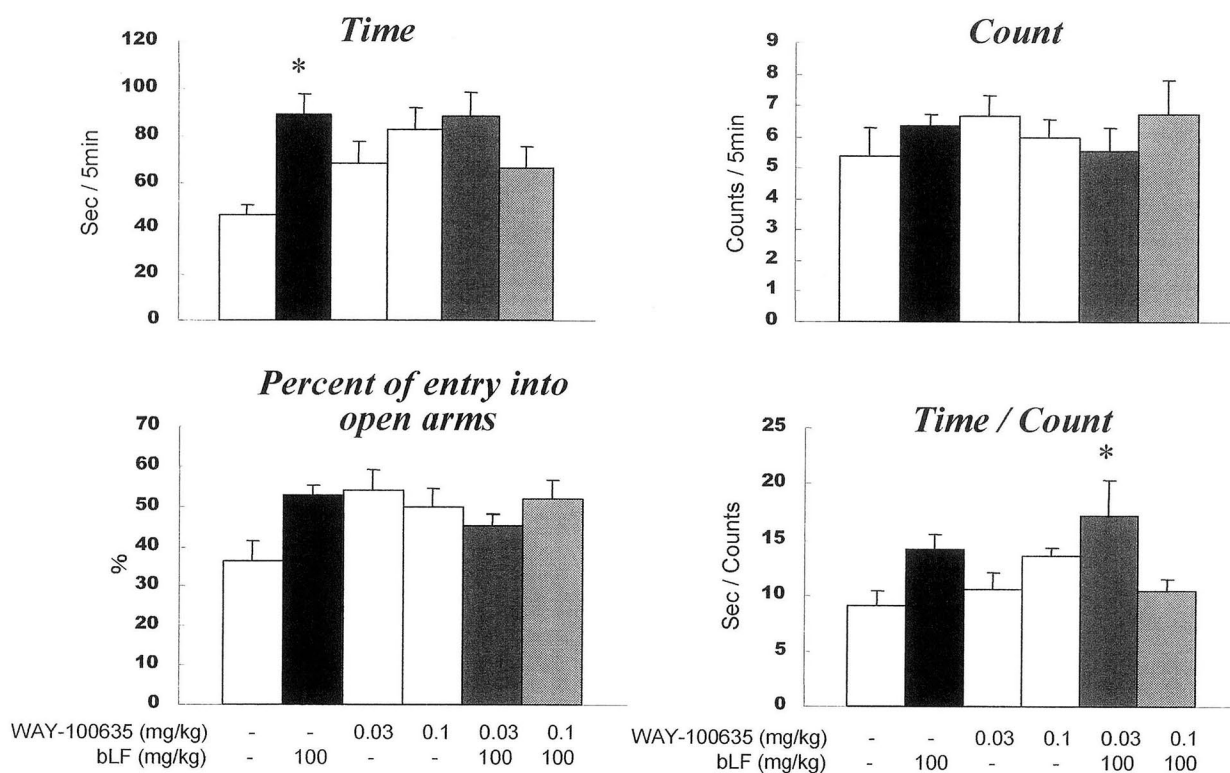
Vehicle or 7-nitroindazole (3 mg/kg, i.p.) was administered 60 min before the FS, and bLF (100 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before the FS. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=5-11). \* P<0.05, \*\*P<0.01 as compared with Saline + Saline group, # P<0.05 as compared with Saline + bLF (100 mg/kg) group.





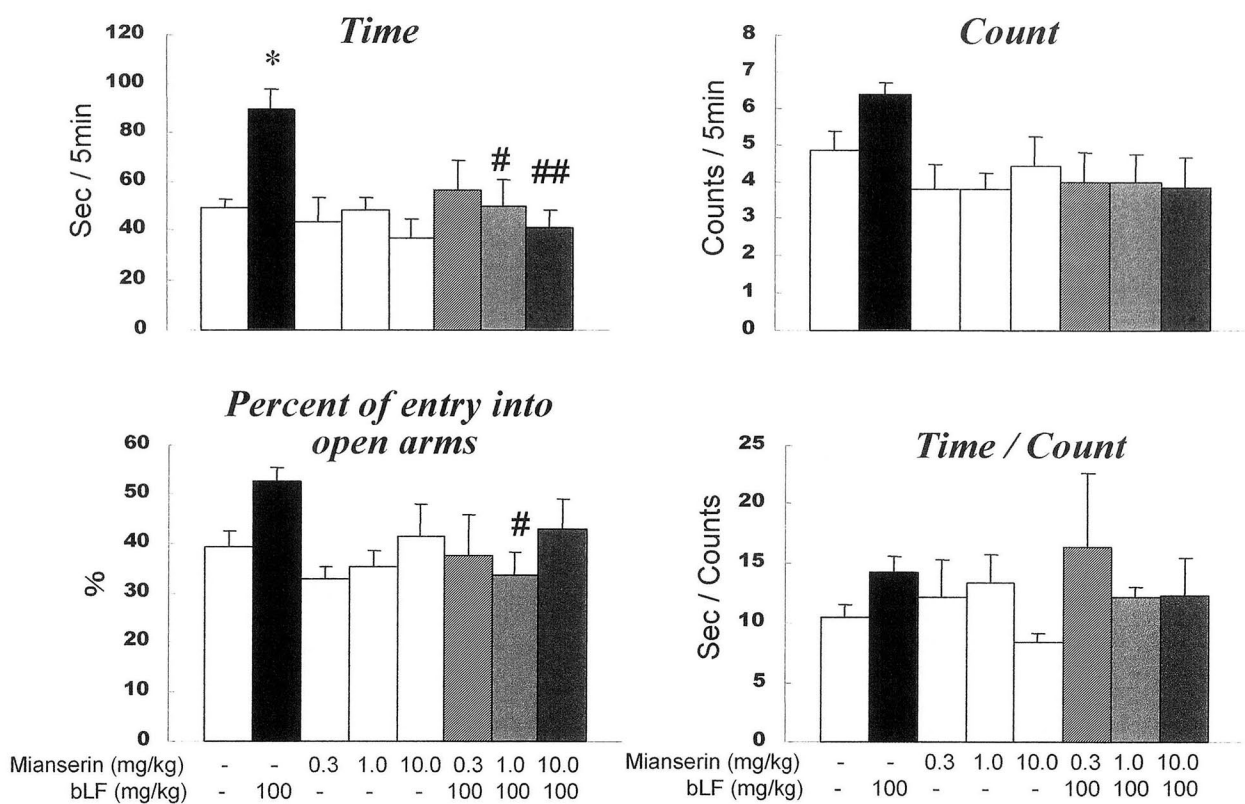
**Fig.8 Effects of Buspirone on the elevated plus-maze test with foot-shock.**

Buspirone (0.1, 0.3 mg/kg, i.p.) was administered 60 min before the FS, and bLF (100 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before the FS. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=5-11). \*\* P<0.01 as compared with Saline + Saline group, # P<0.05 as compared with Saline + bLF (100 mg/kg).



**Fig.9 Effects of WAY-100635 on the elevated plus-maze test with foot-shock.**

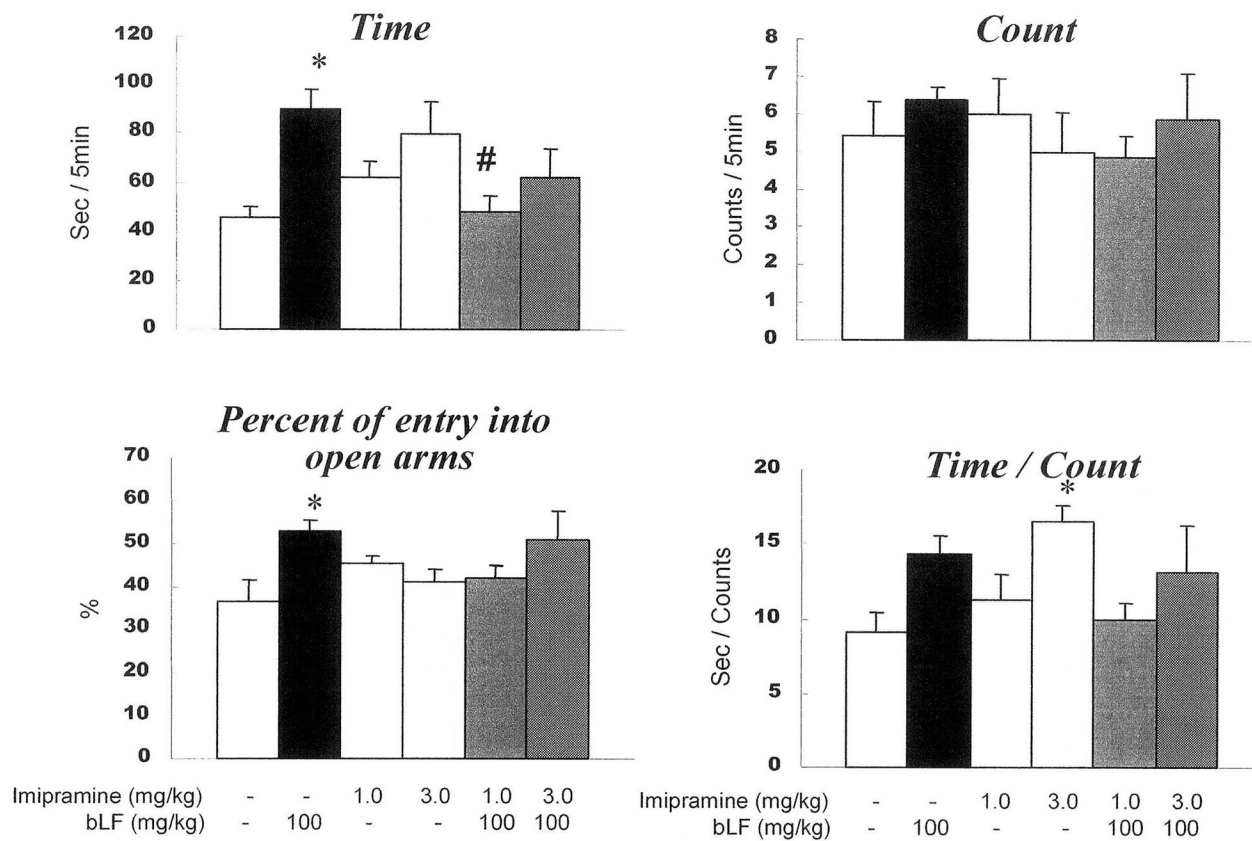
WAY-100635 (0.03, 0.1 mg/kg, i.p.) was administered 60 min before the FS, and bLF (100 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before the FS. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=5-11). \*P<0.05 as compared with Saline + Saline group.



**Fig.10 Effects of Mianserin on the elevated plus-maze test with foot-shock.**

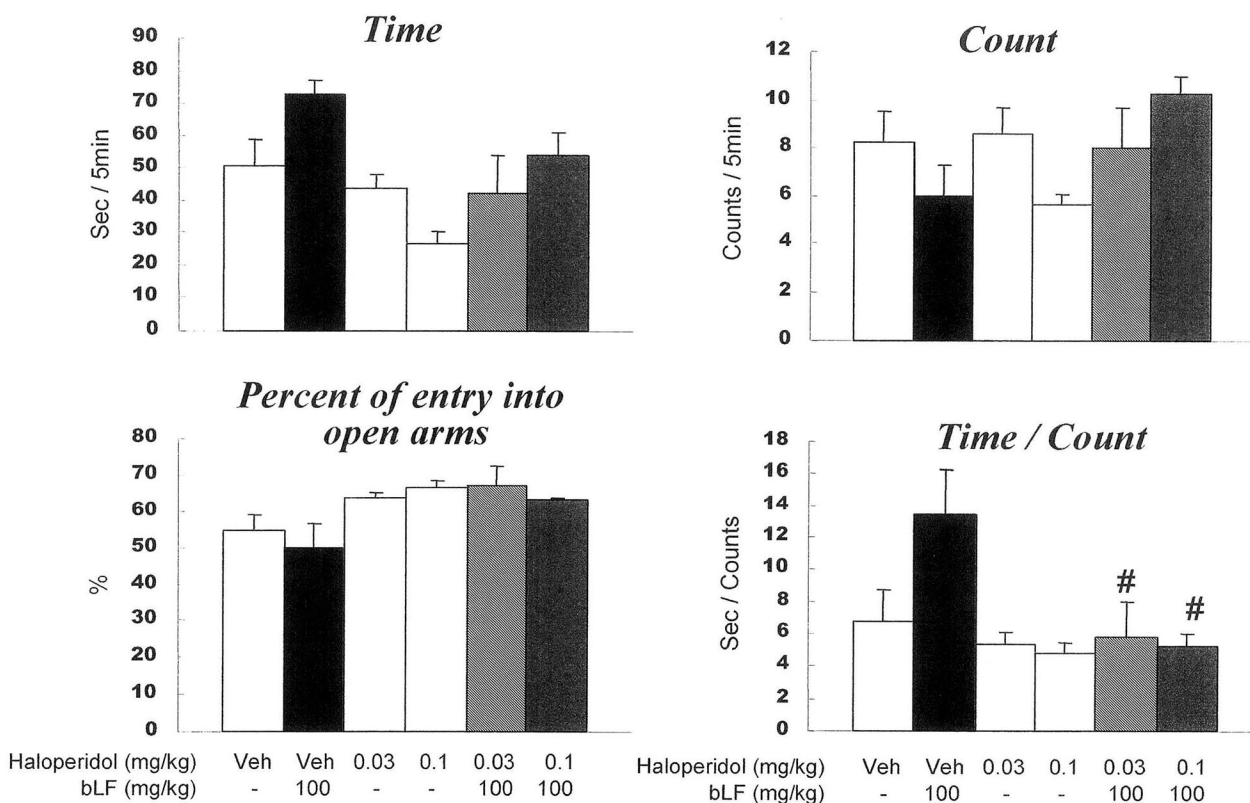
Saline or Mianserin (0.3, 1, 10 mg/kg) was administered 60 min before the FS, and Saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the FS. The expression of the graphs follows Fig.1. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=5-11).

\* p<0.05 as compared with Saline + Saline group, # p<0.05, ## p<0.01 as compared with Vehicle + bLF (100 mg/kg) group.



**Fig.11 Effects of Imipramine on the elevated plus-maze test with foot-shock.**

Imipramine (1, 3 mg/kg, i.p.) was administered 60 min before the FS, and bLF (100 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before the FS. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=5-11). \*P<0.05 as compared with Saline + Saline group, # P<0.05 as compared with Saline + bLF (100 mg/kg) group.



**Fig.12 Effects of Haloperidol on the elevated plus-maze test with foot-shock.**

Haloperidol (0.03, 0.1 mg/kg, i.p.) was administered 60 min before the FS, and bLF (100 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before the FS. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-5). # P<0.05 as compared with Vehicle + bLF (100 mg/kg) group. Veh: vehicle

## 第3章 bLF の作用機序に関する生化学的解析

### I. 目的

これまでの実験により、LF は中等度から強度のストレス下にある成熟ラットに対して抗ストレス作用を発揮し、この効果は内因性オピオイド機構および NO 産生を介したものであることが明らかとなった。また、5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体など一部のセロトニン受容体の関与も示唆された。

一般的に、生体がストレス刺激を受けると神経性および内分泌性の防衛反応が引き起こされることは良く知られている。このうち内分泌性の活動として HPA 軸は中心的な役割を果たすが、ストレス刺激が持続的に加わった場合、長期にわたってグルココルチコイド濃度が上昇すると海馬の神経細胞が傷害され、結果的に負のフィードバック機構が正常に作用し難い状況となる (Vernikos et al., 1982)。このような慢性ストレスが負荷された状態は、心臓病 (Miller & Mallov, 1977)、高血圧 (Hecht et al., 1976)、うつ病 (Glavin, 1985)、免疫低下 (La Via et al., 1996) などの誘因にもなる。

そこで本実験では、ラットに新奇環境ストレスあるいは FS ストレスを与えた場合の脳各部位での神経伝達物質の代謝回転に対する bLF の影響について解析を試みるとともに、血漿 ACTH およびコルチコステロン濃度を指標として、HPA 軸のストレス応答に対する bLF の影響を解析した。

## II. 実験方法

実験は、以下に述べる 2 種の異なる手法で行った。

### 【実験 1】 脳内神経伝達物質代謝回転の解析

#### 1. 供試動物

実験に使用した動物ならびに飼育方法は第 1 章と同様であり、試験はすべて明期に行った。

#### 2. 実験プロトコール

実験環境に適応させるため、少なくとも試験の 1 時間前にラットを実験室に移動した。

ラットを以下の 3 群に分けた。無処置群：刺激箱にも入れず、FS も与えなかった。新奇環境ストレス群：ラットをホームケージから刺激箱に移し、FS は与えず刺激箱内に 30 分間放置した。FS ストレス群：刺激箱に移した後に 10 分間 FS (1.2 mA, 1 sec×3 / min) を与え、さらに 20 分間刺激箱に放置した。

薬物投与は、ラットをホームケージから刺激箱に移し変える 60 分前に Saline、N<sub>ω</sub>-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME, 3 mg/kg, ip, Sigma) または Naloxone hydrochloride (1 mg/kg, ip, Sigma) を、30 分前に Saline または bLF (100 mg/kg, ip, 和光純薬) をそれぞれ投与した。

#### 3. 脳内モノアミンの抽出および定量法

処置を終えたラットを直ちに断頭し脳を摘出した。摘出した脳は急速冷凍し、測定まで -80℃ で保存した。測定は、凍結保存した脳から大脳皮質前頭葉、側坐核、線条体、海馬、縫線核の各部位を切り出し、秤量した後に 0.2 mM EDTA2Na、

0.2 mM NaHSO<sub>3</sub>を含む 0.1 M 過塩素酸を加えてホモジナイズし、氷冷下にて 30 分静置して除蛋白を行った。次に、20,000×g、4 °Cにて 15 分間冷却遠心を行った。上清を分離した後に 0.45µm フィルターで濾過し、抽出液のうち 50µl を HPLC に注入して神経伝達物質の定量を行った。尚、移動相には 0.1 M クエン酸-酢酸 Na (15 %メタノール、5 mg EDTA 2Na/l、pH3.9) を使用し、カラムはモノアミン分析用カラム (MA-5 ODS、Φ2.1×150 mm、Eicom) を用いた。測定したモノアミンは、NE、Hydroxymethoxyphenylglycol piperazinesalt (MHPG)、DA、Dihydroxyphenylaceticacid (DOPAC)、Homovanillicacid (HVA)、5-HT、5-Hydroxyindoleaceticacid (5-HIAA) とし、検出には電気化学検出器 (Eicom, 京都) を使用した。検出結果はクロマトコーダー (Chromatocorder21, SISTEM INSTRUMENTS, USA) により解析した。

## 【実験 2】視床下部-下垂体-副腎皮質系のストレス応答に対する LF の作用

### 1. 供試動物

実験に使用した動物ならびに飼育方法は第 1 章と同様であり、試験はすべて明期に行った。

### 2. 採血方法及び採血・脳室内 (icv) 投与用カニューレの留置

Sodium Pentobarbital (Nembutal, 50 mg/kg) の腹腔内投与により麻酔を行い、右側外頸静脈にポリエチレン製血液採取用カニューレを挿入した。頭皮を正中切開し頭蓋を露出後、カニューレを右側外頸静脈から皮下を通して頭頂部より出した。カニューレの末端にはステンレス製カニューレを接続し、先端をナイロン製キャップで封入した。

その後、動物を脳定位固定装置にて保定し、アンカービス (AN-3, Eicom) 2



本を頭蓋に固定し、Paxinos and Watson (1986)のラット脳地図に従って、ガイドカニューレ (AG-8, Eicom) を側脳室 (bregma より後方 0.8 mm、左側方 1.5 mm、脳表から深さ 3.8 mm) に挿入した。血液採取用カニューレとガイドカニューレを共にアクリル系レジン (GC-UNIFAST, GC) で頭蓋に固定した。ガイドカニューレにはダミーカニューレ (AD-8, Eicom) を挿入し、キャップナット (AC-1, Eicom) でガイドカニューレに固定した。

4 日間の術後回復の後、血液採取を行った。術後の期間中は 1 日 2 回、50 単位ヘパリン加生理食塩水にて血液採取用カニューレをフラッシュした。

実験当日、血液採取用のカニューレにエクステンションチューブを装着し、実験環境に適応させるために、ラットを実験室に 1 時間静置した。

### 3. 実験プロトコール

1) FS (1.2 mA, 1 sec $\times$ 3 / min, 10min) を与える 60 分前に Saline の icv 投与を、30 分前に bLF (100 mg / kg)もしくは Saline (1 ml / kg) の腹腔内投与を行った。刺激前の血漿 ACTH 濃度を確認する目的で、FS を与える 60 分前、すなわち icv 投与を行う直前に血液を採取した。また、FS を与える直前の 0 分、投与 10 分後、30 分後、60 分後の各時点でも血液を採取し、血漿 ACTH 濃度および血漿コルチコステロン濃度を測定した。

2) CRH 分泌に関する bLF の影響を解析するために、FS は行わずに CRF (1 $\mu$ g) の icv 投与を行い、前述と同様の各時間における血漿コルチコステロン濃度を測定した。

#### 4. 血液試料の処理

すべての血液サンプルには EDTA を添加して遠心分離 (5,000 rpm、4 °C、5 min) により血漿を分離し、-80 °Cにて凍結保存した。

#### 5. 血漿 ACTH およびコルチコステロン濃度の測定

血漿 ACTH 濃度の測定には ELISA-kit (Bachem, Torrance, CA, USA) を、血漿コルチコステロン濃度の測定には RIA-kit (Amersham Biotech, UK) を用いた。

### III. 結果

#### 【実験 1】脳内神経伝達物質代謝回転の解析

##### 1. 新奇環境ストレスと bLF 投与による変化

新奇環境ストレス負荷により、non-treatment 群に比べ側坐核の NE 含量は増加する傾向 (約 2.12 倍) にあり、縫線核の NE 含量は有意に増加した (約 1.93 倍,  $P<0.01$ )。この変化は、新奇環境ストレス負荷前の bLF 投与によって抑えられる傾向にあり、側坐核ではストレス負荷群と bLF 投与群の間に有意差が認められた (Fig.13)。

脳各部位での MHPG 含量についてみると、non-treatment 群に比べ bLF 群で、側坐核 (約 0.41 倍)、海馬 (約 0.36 倍)、縫線核 (約 0.48 倍) の 3 つの部位で減少する傾向にあり、縫線核ではストレス負荷群に比べて bLF 投与群では有意に低値であった (Fig. 14)。

脳各部位での DA、DOPAC、HVA 含量についてみると、新奇環境ストレス負荷によって皮質の HVA は有意に増加したが ( $P<0.05$ )、DA および DOPAC の含

量には有意な変化は認められなかった (Fig. 15-17)。また、bLF 投与によっても有意な変化は認められなかった。

脳各部位での 5-HT および 5-HIAA 含量には、特に変化がみられなかった (Fig. 18, 19)。

脳各部位での新奇環境ストレス負荷による NE の代謝回転を比較すると、側坐核および縫線核の MHPG/NE 比は低下傾向にあり、さらに、bLF 投与によって縫線核の MHPG/NE 比が有意に減少した ( $P<0.01$ , Fig. 20)。DOPAC/DA 比および HVA/DA 比には明らかな変化が認められなかった (Fig. 21, 22)。一方、線条体の 5-HIAA/5-HT 比は新奇環境ストレス負荷によって有意に上昇したが、bLF 投与による影響はみられなかった (Fig. 23)。

## 2. FS ストレスと bLF 投与による変化

FS ストレス負荷を行うと、線条体の NE 含量は non-treatment 群に比べ有意に高値を示した ( $P<0.05$ , Fig. 13)。また、bLF を投与によって、この NE 含量の上昇は抑えられる傾向にあったが、有意差は認められなかった。

脳各部位の MHPG, DA および DOPAC 含量は、FS ストレス負荷によってもほとんど変化がみられなかったが、皮質の HVA 含量は、FS ストレス負荷によって non-treatment 群よりも高値を示した ( $P<0.05$ , Fig. 17)。bLF を投与すると、皮質の HVA 含量はさらに上昇した ( $P<0.01$ , Fig. 17)。5-HT および 5-HIAA 含量には特に変化がみられなかった (Fig. 18, 19)。

線条体の MHPG/NE 比は FS ストレス負荷によって non-treatment 群よりも有意に低下した ( $P<0.05$ , Fig. 20)。また、bLF 投与によって、この低下は抑えられる傾向にあったが、有意差は認められなかった (Fig. 20)。

脳各部位の DOPAC/DA 比および HVA/DA 比には有意な変化は認められなかつ

たが、線条体の 5-HIAA/5-HT 比は FS ストレス負荷によって non-treatment 群よりも有意に増加したが ( $P<0.05$ , Fig. 23)、bLF 投与による影響はみられなかった。

### 3. 新奇環境ストレスと L-NAME および bLF 投与の影響

新奇環境ストレス負荷前に L-NAME 投与を行うと、皮質、側坐核、海馬および縫線核の MHPG 含量は有意に低下し、この傾向は bLF を投与しても同様に認められた (Fig. 24)。MHPG/NE 比も同様の变化を示し、新奇環境ストレス負荷前と L-NAME 投与を組み合わせることによって、大きく変化した (Fig. 25)。その他のモノアミンには有意な変動は認められなかった。

### 4. 新奇環境ストレスと Naloxone および bLF 投与の影響

新奇環境ストレス負荷前に Naloxone 投与を行うと、脳各部位の MHPG 含量は、皮質、側坐核、海馬および縫線核でいずれも有意に減少した (Fig. 24)。また、bLF との同時投与を行ってもこれらの変化は同様であった。

皮質の MHPG/NE 比は Naloxone 投与によって有意に減少し ( $P<0.01$ )、bLF 投与は特に影響しなかった (Fig. 25)。側坐核、海馬および縫線核においても同様の傾向は認められたが、有意な変化ではなかった。

## 【実験 2】視床下部—下垂体—副腎皮質系のストレス応答に対する LF の作用

### 1. FS ストレスによる血漿 ACTH およびコルチコステロン濃度の変化

血漿 ACTH 濃度は、bLF 群では FS 負荷後 10 分の血漿 ACTH 濃度が Saline 群に比べ増加傾向 (1.36 倍) を示した (Fig. 26)。

一方、血漿コルチコステロン濃度についてみると、Saline 群では FS 負荷後 30 分に上昇のピークが現れた。bLF 群の安静時の血漿コルチコステロン濃度は

Saline 群に比べ高値を示したが、FS 負荷後 30 分の血漿コルチコステロン濃度は Saline 群に比べて有意に ( $P<0.05$ ) 減少した (Fig. 27)。

## 2. CRF 脳室内投与に対する反応

CRF (1  $\mu\text{g}$ ) の icv 投与により、血漿コルチコステロン濃度値は投与直後に最大となり、その後 60 分にかけて漸減した。bLF (100 mg/kg, ip)投与群においても全く同様の变化を示した (Fig. 28)。すなわち、bLF は CRF の icv 投与による血漿コルチコステロン濃度上昇には影響しなかった。

## IV. 考察

### 1. 脳内神経伝達物質代謝回転の解析

ストレス刺激を与えることによって脳内神経伝達物質量が変化することはよく知られており、bLF のストレス軽減効果における作用機序を解明する目的でこれらを測定することには大きな意義があると考えられる。

本実験では、大脳皮質前頭葉、側坐核、線条体、海馬、縫線核のモノアミン類の代謝回転について解析を試みたところ、新奇環境負荷を行った Saline 群では、側坐核および縫線核の NE 含量が増加し、大脳皮質の DA、DOPAC、HVA 含量も増加傾向を示したが、bLF 投与によりこれらの上昇は抑制される傾向にあった。したがって、bLF のストレス軽減効果は、これら神経系活動を介して発現する可能性がある。

特に、DA 神経系については、中脳皮質 DA 路が投射する前頭前野のニューロンは側坐核に出力し、さらに、この側坐核には腹側被蓋野 DA 神経からの投射

があり（中脳辺縁 DA 路）、5-HT と DA 間での相互作用が認められると報告されている（De Deurwaerdere & Spampinato, 1999; Di Matteo et al., 2000; Sakaue et al., 2000）。中脳辺縁 DA 系と中脳皮質 DA 系は、schizophrenia の陰性症状（極度の鬱など）に深く関わり、これら DA 系ニューロンの異常が病態の根底にあると考えられている。上述した DA 系の働きを修飾する主要なものに、縫線核 5-HT 神経系がある。実際、schizophrenia の治療には、5-HT<sub>2A</sub> 受容体 antagonist や 5-HT<sub>1A</sub> agonist など、さまざまな 5-HT 受容体サブタイプの薬物が開発され、利用されている（Deutch et al., 1991）。しかし、5-HT の DA 神経系への作用機序は単純ではなく、領域によって異なる 5-HT 受容体が関与している（De Deurwaerdere & Spampinato, 1999; Di Matteo et al., 2000; Sakaue et al., 2000）。

本実験では、神経伝達物質代謝回転に及ぼす NO 産生の影響を解析する目的で、新奇環境ストレス負荷の前に L-NAME の投与を行った。その結果、皮質、側坐核、海馬、縫線核の 4 部位の MHPG 含量は Saline 群に比べ低値を示し、bLF との同時投与を行ってもこれらの低下は変化しなかった。また、NE の代謝率の減少がこれらの脳部位で認められ、Naloxone 投与によってもこれらの脳部位での NE 代謝率は減少したままであった。

以上の結果から、新奇環境ストレス負荷条件下において、皮質、側坐核、海馬、縫線核の NE 代謝は、NOS とオピオイドの影響を受けるものの、神経伝達物質代謝回転に及ぼす bLF の影響は NOS あるいはオピオイド受容体を介したものであるのではない可能性が考えられる。

一方、FS 刺激を与えると、線条体の NE 含量は non-treatment 群に比べて高値を示し、代謝率は低値を示したが、これらの変化はいずれも bLF 投与によって抑制される傾向にあった。しかしながら、FS 刺激による大脳皮質の HVA 含量の増加は、bLF で抑制することができなかった。また、Deutch (1991) は FS により

前頭皮質の IL 領域において DA 代謝が活性化されることを報告している。また、Doherty & Gratton (1996) は 15 分間の拘束ストレスで IL 領域の DA 代謝が活性化されることを報告している。

以上に述べたように、神経伝達物質代謝回転に及ぼす LF の影響は、新奇環境負荷と FS 刺激では一部異なることから、ストレスの型あるいは強度によって LF の関与の仕方も異なる可能性が予想された。

## 2. 視床下部—下垂体—副腎皮質系のストレス応答に対する LF の作用

本実験では、HPA 軸のストレス応答に対する LF の作用機序は依然として不明であることから、FS ストレスによって誘導される ACTH 及びコルチコステロンの放出反応を指標として、HPA 軸のストレス応答に対する LF の作用機序を解析した。

その結果、bLF 群では FS 負荷後 10 分の血漿 ACTH 濃度が Saline 群に比べ 1.36 倍の高値を示した。これは、bLF のストレス軽減効果と相反するように思われる。Kim & Rivier (2000) は NOS 阻害薬である L-NAME の icv 投与により FS 刺激に対する ACTH 反応が減弱することを報告している。また、NOS もしくはヘムオキシゲナーゼ阻害薬の全身投与により、物理的および心理的ストレスに対する ACTH 反応が減弱され (Rivier,1994; Turnbull et al.,1998)、NO ドナーである SIN-1 の投与により ACTH 反応が増強されるとの報告もみられる (Lee et al.,1999)。さらに、CRF と VP 放出を NO が刺激することも明らかにされている (McCann et al.,1996; Cao et al.,1996; Ota et al.,1993; Raber et al.,1995)。

先に述べたように、bLF は FS 負荷後 10 分の血漿 ACTH 濃度を上昇させたが、CRF の icv 投与による血漿コルチコステロン濃度上昇には影響を与えなかったことから、CRH 分泌より上流の機序を修飾する可能性が示唆された。bLF が NOS

を活性化することはすでに報告されており、HPA 軸に対しても、NOS の活性化を介して ACTH 分泌を一時的に促進することは、上述した先人の報告とも一致していると考えられる。しかしながら、FS 負荷前 0 分での血漿コルチコステロン濃度は bLF 投与によってすでに上昇しており、10 分後では逆に減少傾向を示し、さらに 30 分後では Saline 群に比べて有意に低値であった。FS 負荷前のコルチコステロン上昇については、視床下部室傍核からの CRH 分泌そのものに対して bLF が作用する可能性が考えられる。

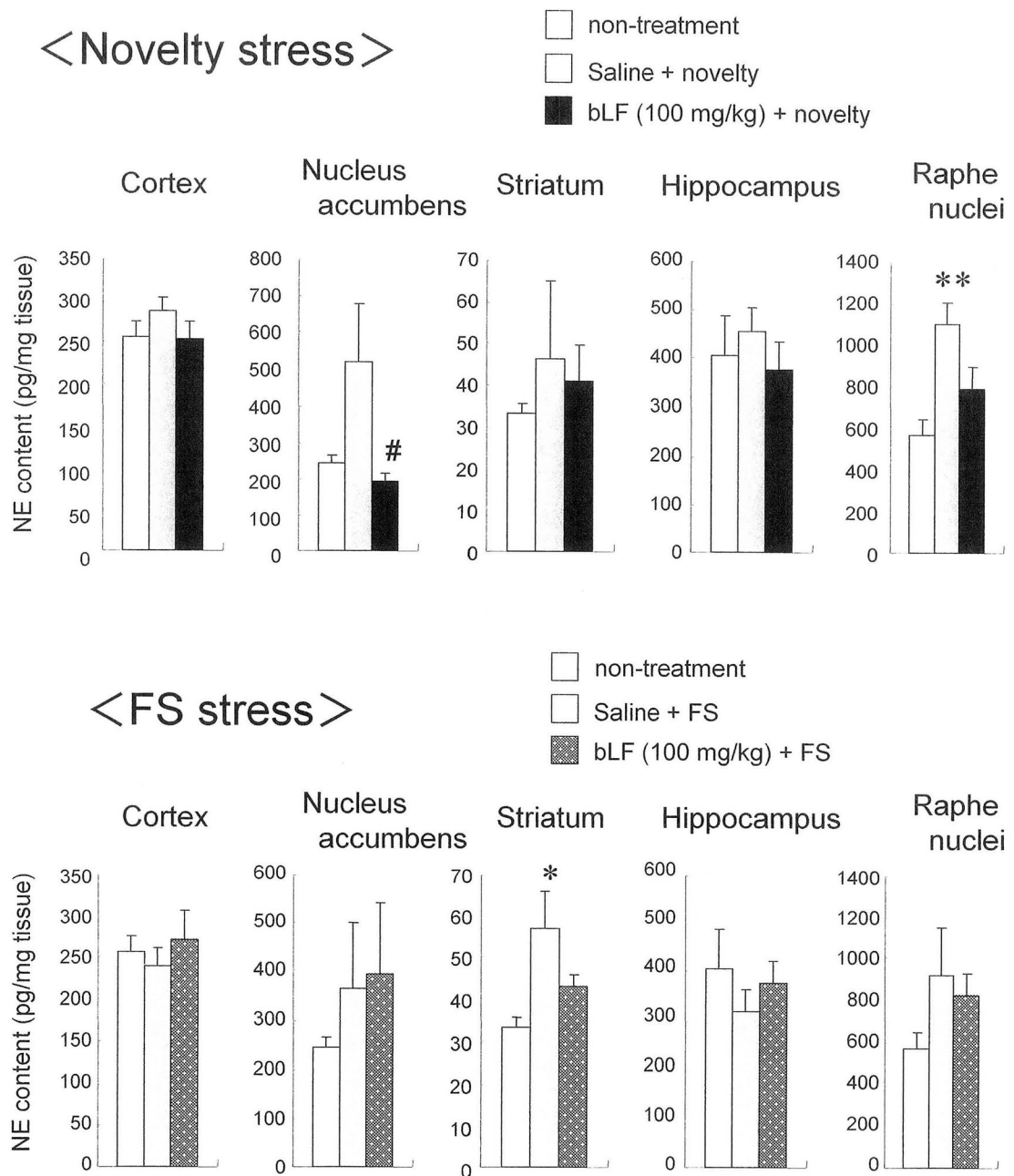
すでに述べたように、CRH 分泌は内因性オピオイドや NO によって修飾されることから、bLF がオピオイドや NO を介して影響していることも予想される。また、FS 負荷後にみられるコルチコステロン濃度の低下は、負のフィードバック機構が早期に作動していることを示唆すると考えられる。血漿中に上昇したコルチコステロンは、海馬をはじめ、脳内のコルチコステロン受容体に作用して、HPA 軸の反応を down regulation するが、bLF はこの調節機構を早期に活性化させている可能性がある。さらに、CRH の icv 投与によるコルチコステロン上昇に対して bLF は影響しなかったことから、視床下部室傍核への神経性入力あるいは液性調節因子を介し、bLF が CRH 分泌を修飾するとの仮説も成り立つ。しかしながら、これら血漿コルチコステロン濃度の変動に対する bLF の作用については、bLF による直接的な副腎への影響も考慮する必要があり、詳細なメカニズムについては今後さらに検討する必要がある。

Matheson et al. (1997)は、5-HT<sub>2</sub>受容体 antagonist である Carvotroline を投与すると 30 分から 60 分の間にピークをもつ血漿コルチコステロン濃度の上昇が起こり、rotatory ストレスと共に与えると Saline 群に比べて、コルチコステロン濃度が低下することを報告している。この報告と第 2 章に述べた、EPM において 5-HT 受容体の agonist および antagonist を用いた実験結果から bLF の血漿コルチ



コステロンに対する影響は 5-HT<sub>2</sub> 受容体が関与している可能性も考えられる。

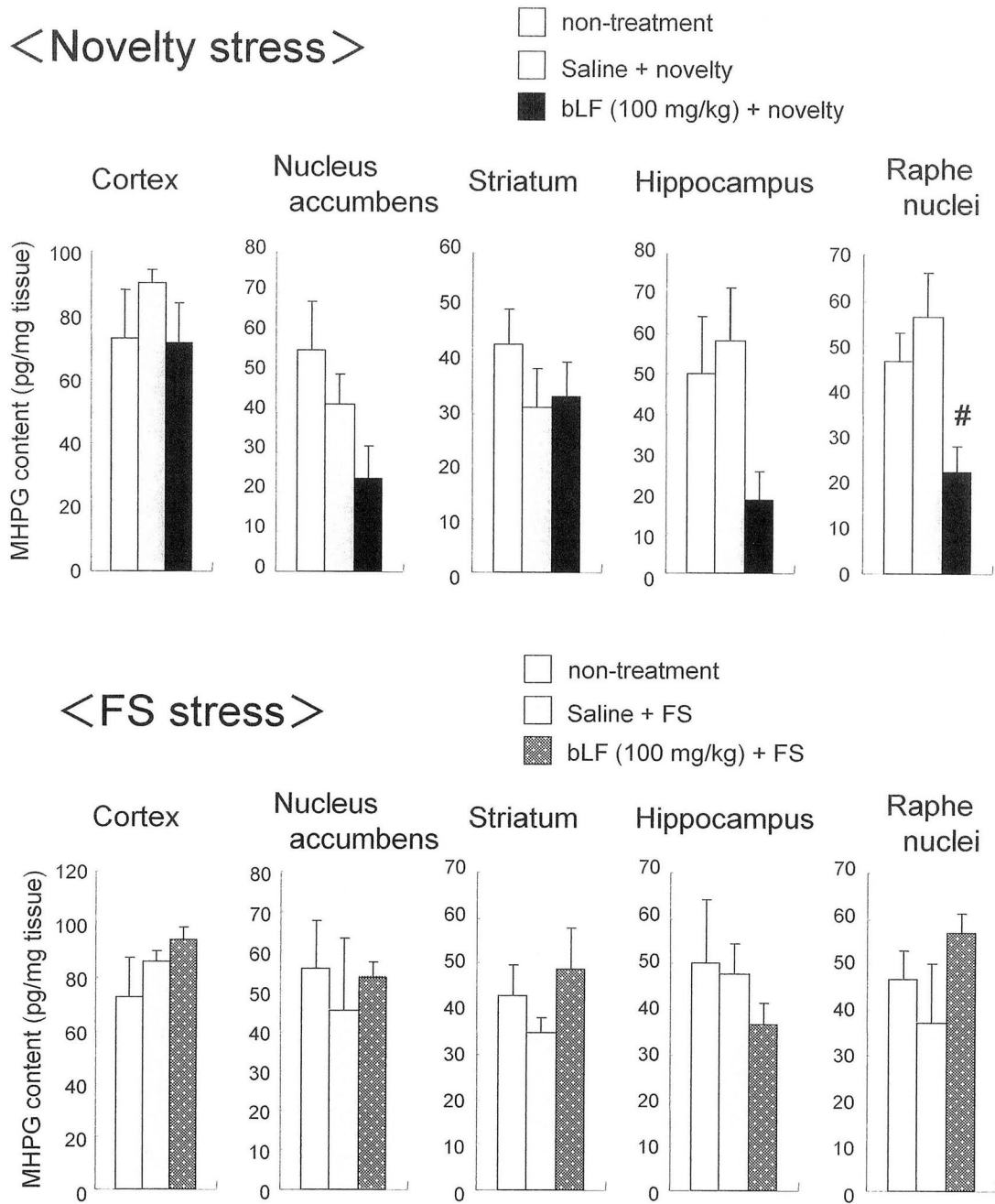
以上に述べたように、今回の実験から、bLF によるストレス軽減効果は、新奇環境下における神経伝達物質代謝回転に対する修飾、あるいは CRH 分泌より上流の脳内機序を修飾することによって発現する可能性が示唆された。



**Fig.13 Changes in the NE content of brain tissues induced by novelty or FS stress and combination with bLF administration**

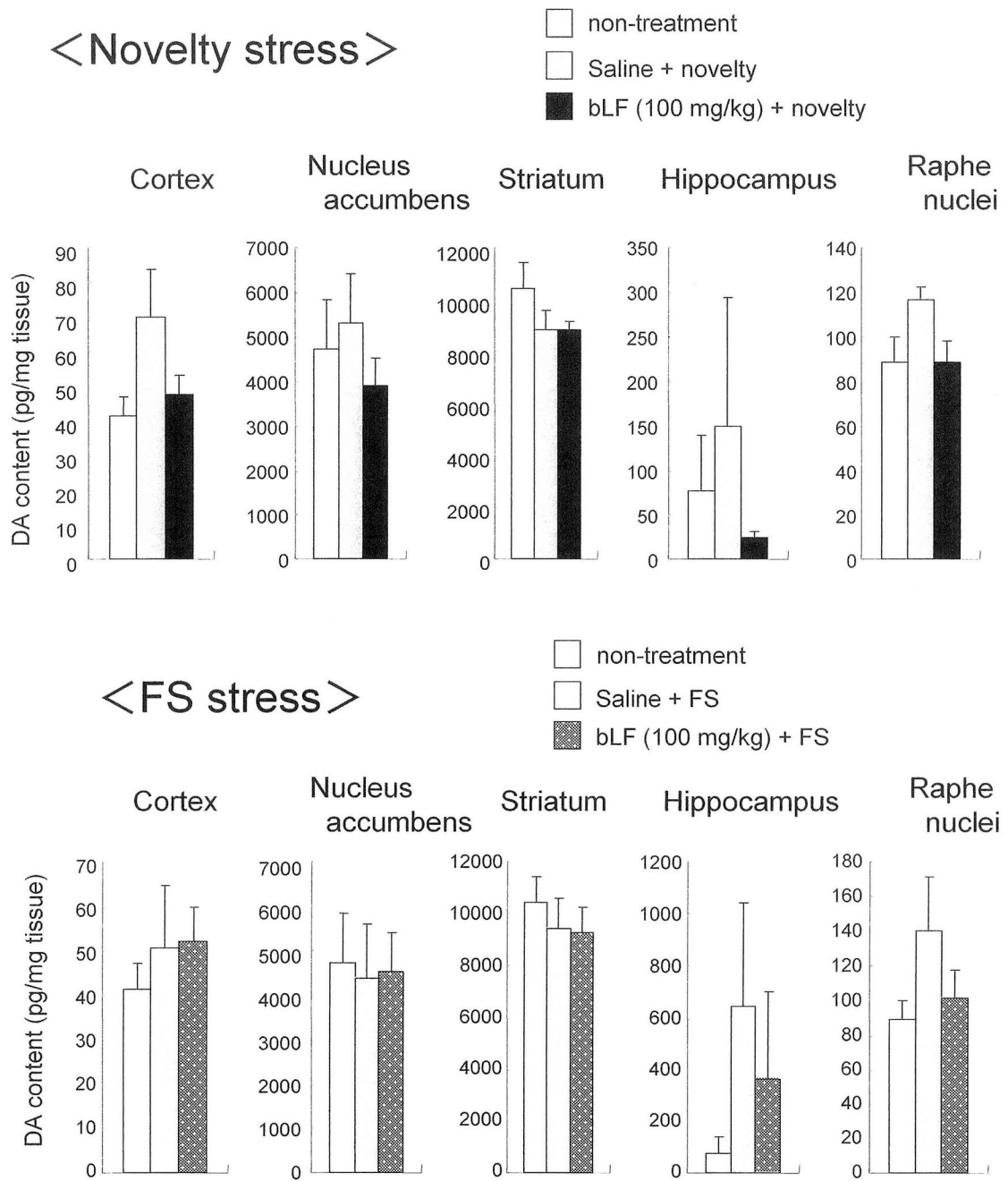
Saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the novelty or FS stress. After the stresses, the content of NE (pg/mg tissue) was measured in cortex, nucleus accumbens, striatum, hippocampus and raphe nuclei. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-6).

\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs. non-treatment group, # P<0.05 vs. saline + stress group.



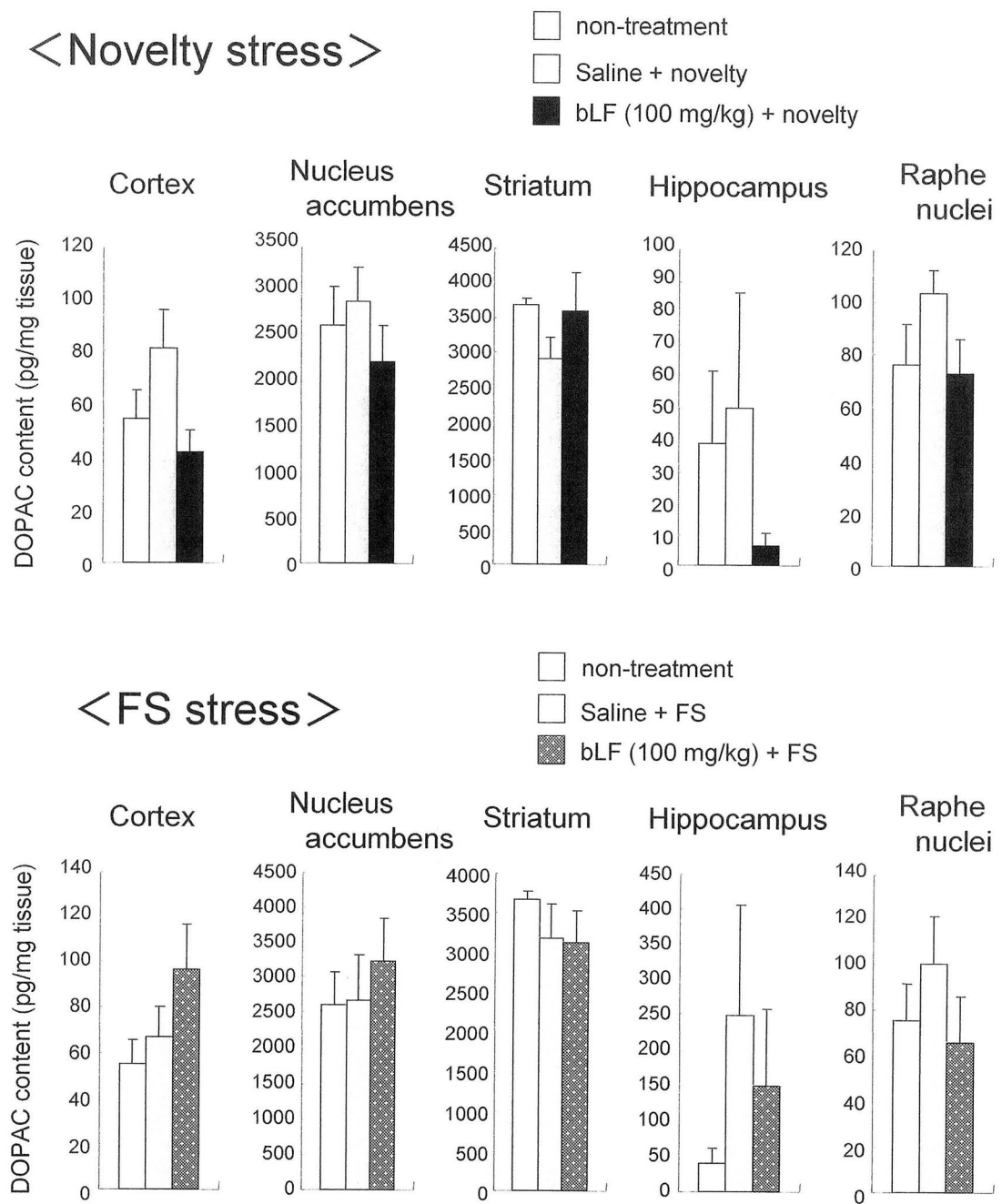
**Fig.14 Changes in the MHPG content of brain tissues induced by novelty or FS stress and combination with bLF administration**

Saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the novelty or FS stress. After the stresses, the content of MHPG (pg/mg tissue) was measured in cortex, nucleus accumbens, striatum, hippocampus and raphe nuclei. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-6). # P<0.05 vs. saline + stress group.



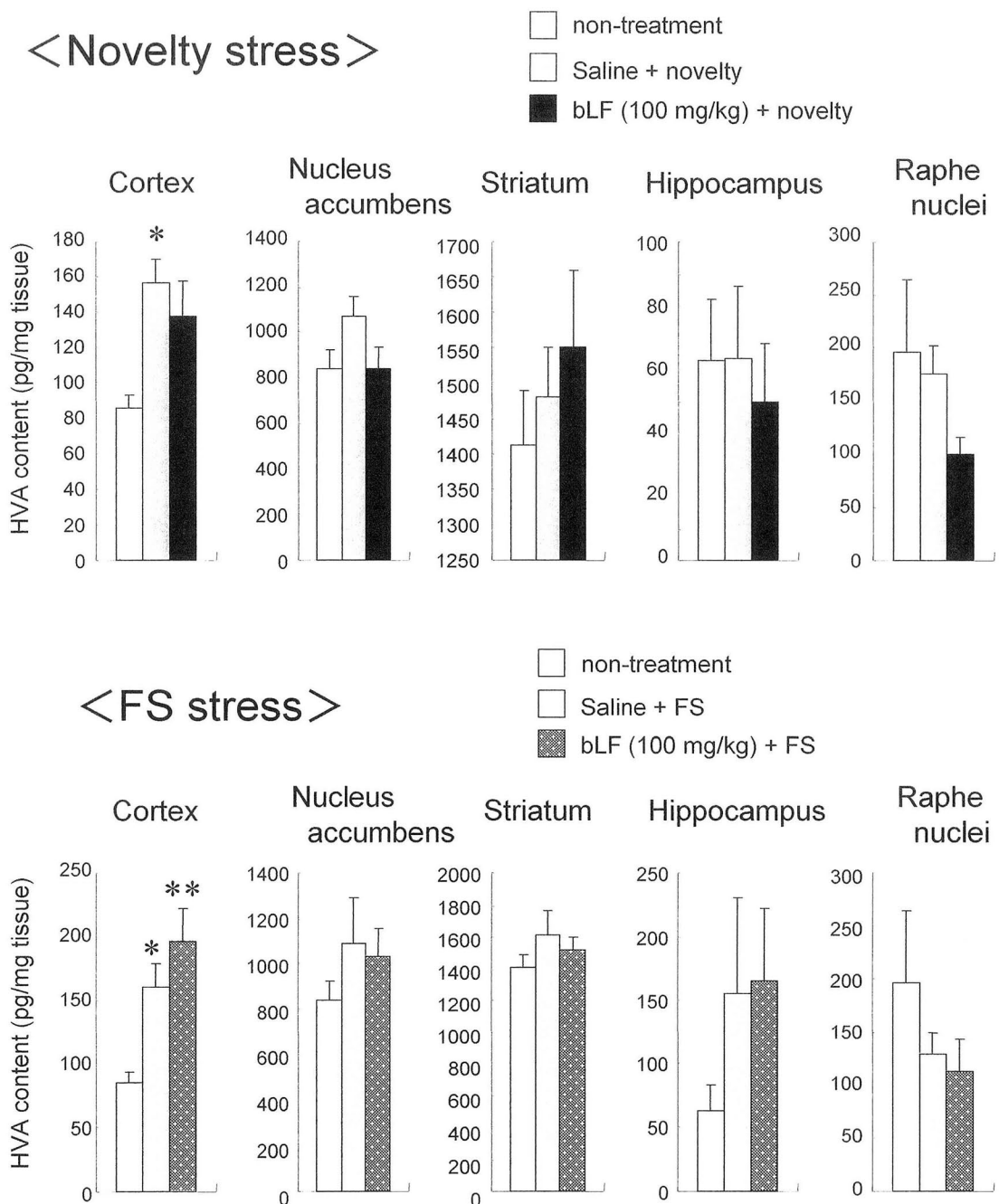
**Fig.15 Changes in the DA content of brain tissues induced by novelty or FS stress and combination with bLF administration**

Saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the novelty or FS stress. After the stresses, the content of DA (pg/mg tissue) was measured in cortex, nucleus accumbens, striatum, hippocampus and raphe nuclei. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-6).



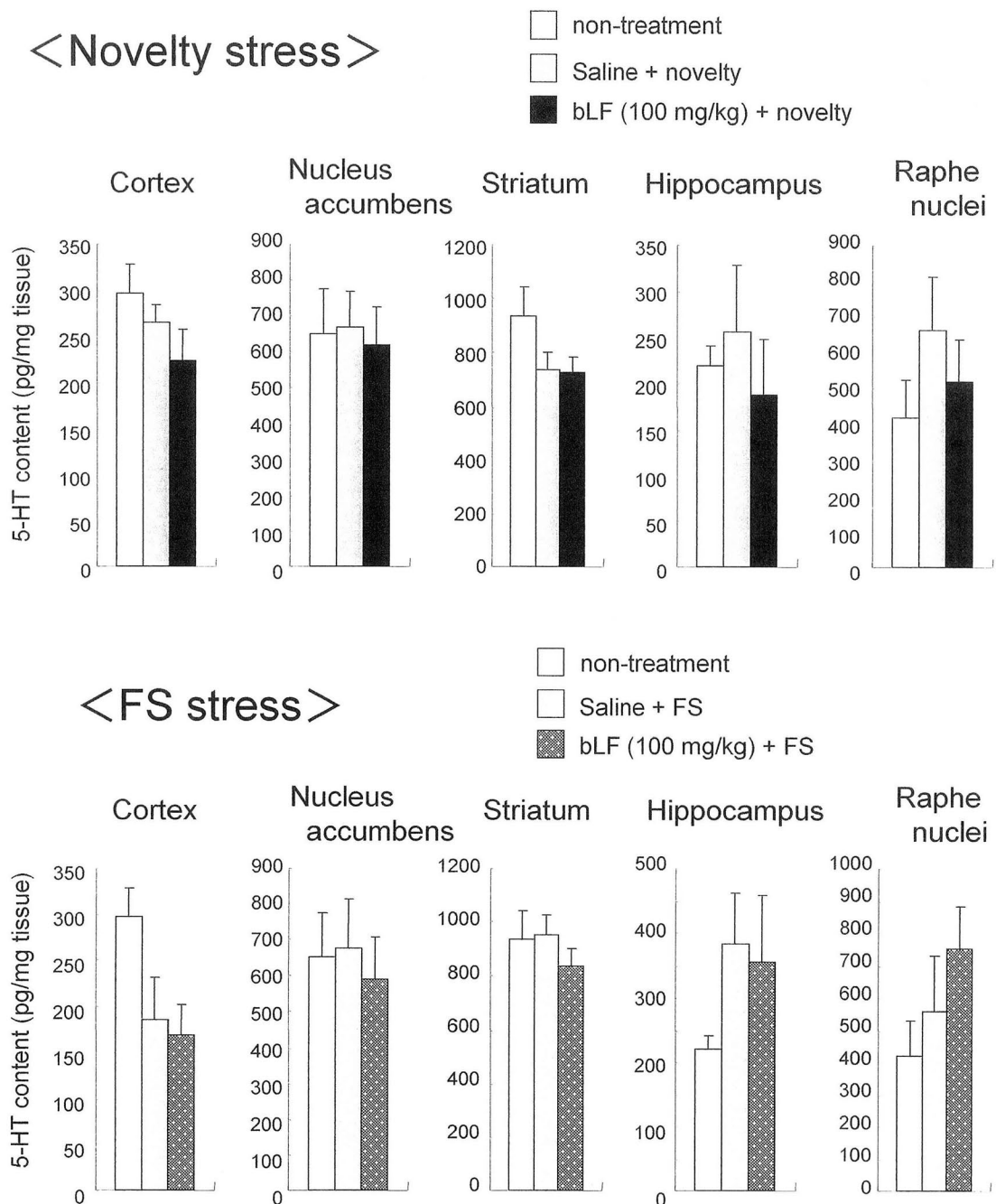
**Fig.16 Changes in the DOPAC content of brain tissues induced by novelty or FS stress and combination with bLF administration**

Saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the novelty or FS stress. After the stresses, the content of DOPAC (pg/mg tissue) was measured in cortex, nucleus accumbens, striatum, hippocampus and raphe nuclei. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-6).



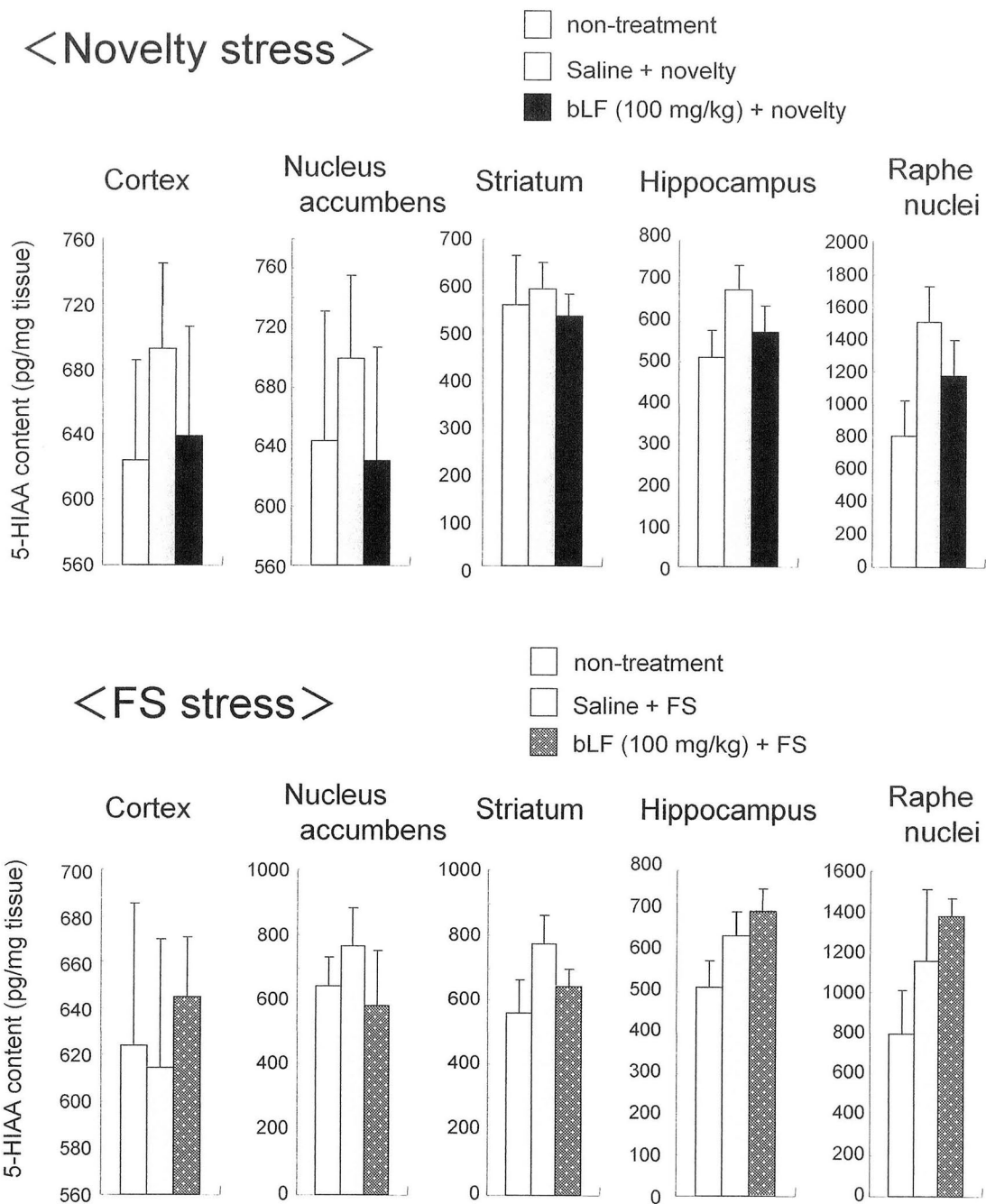
**Fig.17 Changes in the HVA content of brain tissues induced by novelty or FS stress and combination with bLF administration**

Saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the novelty or FS stress. After the stresses, the content of HVA (pg/mg tissue) was measured in cortex, nucleus accumbens, striatum, hippocampus and raphe nuclei. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-6). \* P<0.05, \*\* P<0.01 vs. non-treatment group.



**Fig.18 Changes in the 5-HT content of brain tissues induced by novelty or FS stress and combination with bLF administration**

Saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the novelty or FS stress. After the stresses, the content of 5-HT (pg/mg tissue) was measured in cortex, nucleus accumbens, striatum, hippocampus and raphe nuclei. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-6).

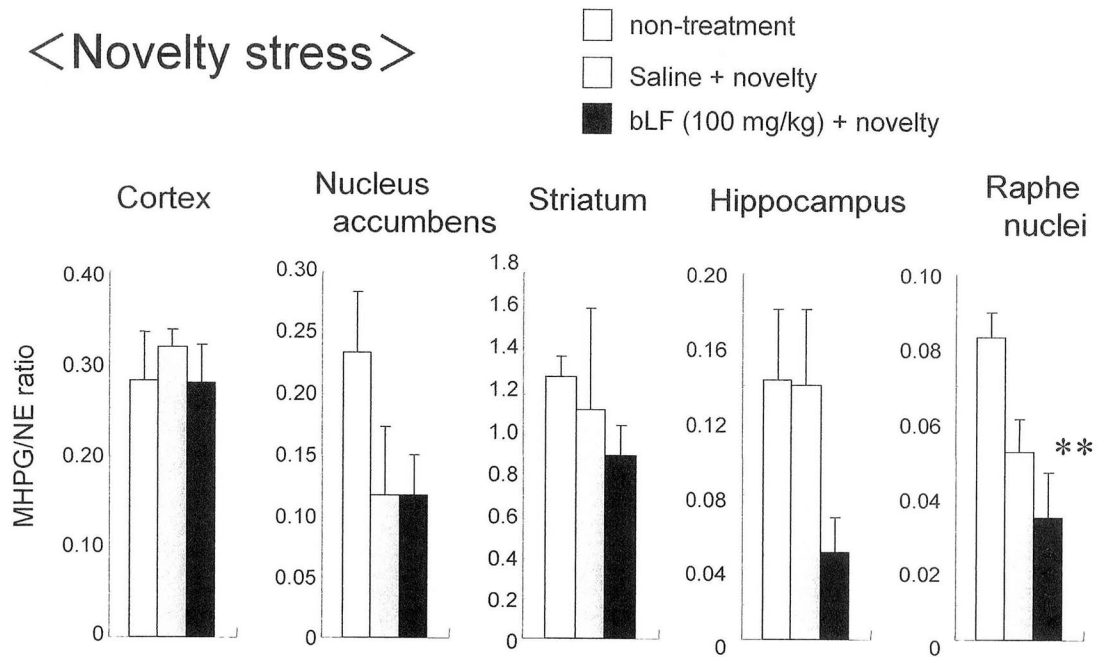


**Fig.19 Changes in the 5-HIAA content of brain tissues induced by novelty or FS stress and combination with bLF administration**

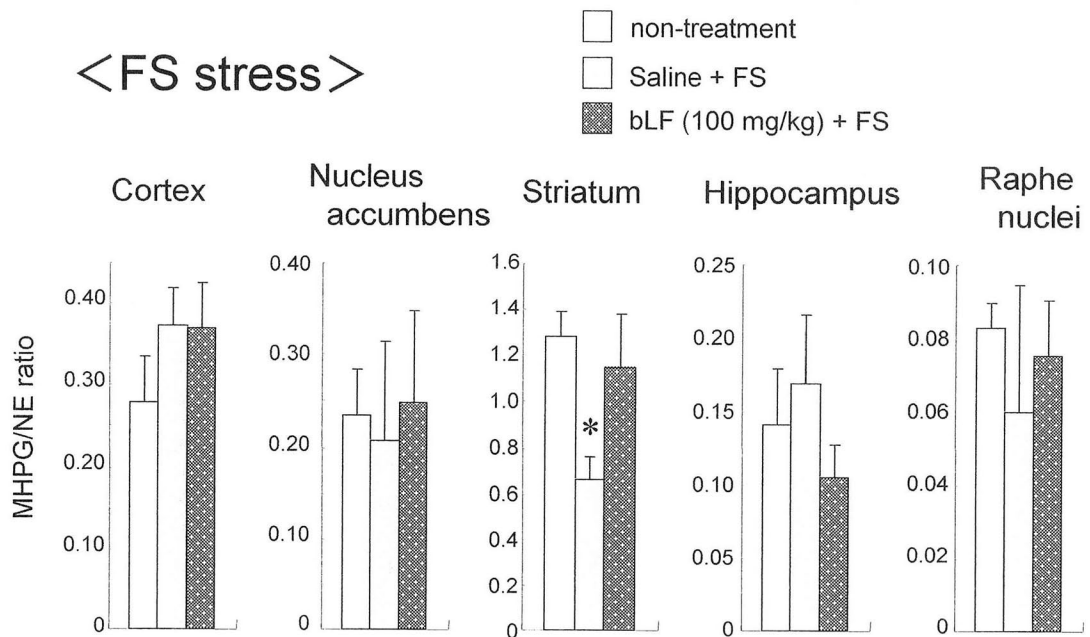
Saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the novelty or FS stress. After the stresses, the content of 5-HIAA (pg/mg tissue) was measured in cortex, nucleus accumbens, striatum, hippocampus and raphe nuclei. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-6).



### <Novelty stress>



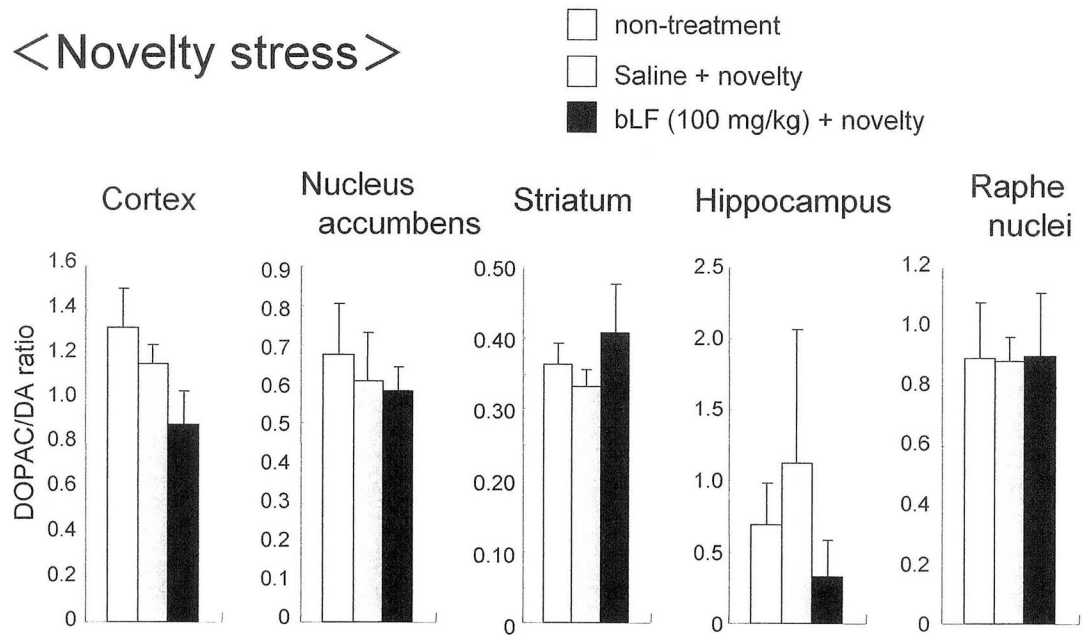
### <FS stress>



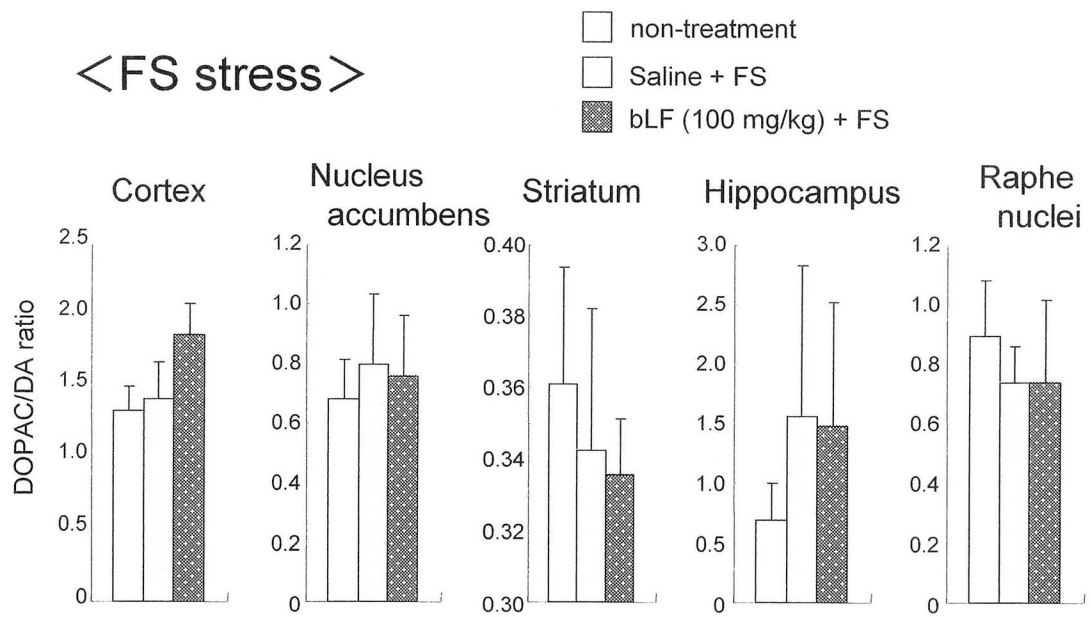
**Fig.20 Changes in the MHPG/NE ratio of brain tissues induced by novelty or FS stress and combination with bLF administration**

Saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the novelty or FS stress. After the stresses, the MHPG/NE ratio was measured in cortex, nucleus accumbens, striatum, hippocampus and raphe nuclei. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-6). \* P<0.05, \*\* P<0.01 vs. non-treatment group.

### <Novelty stress>

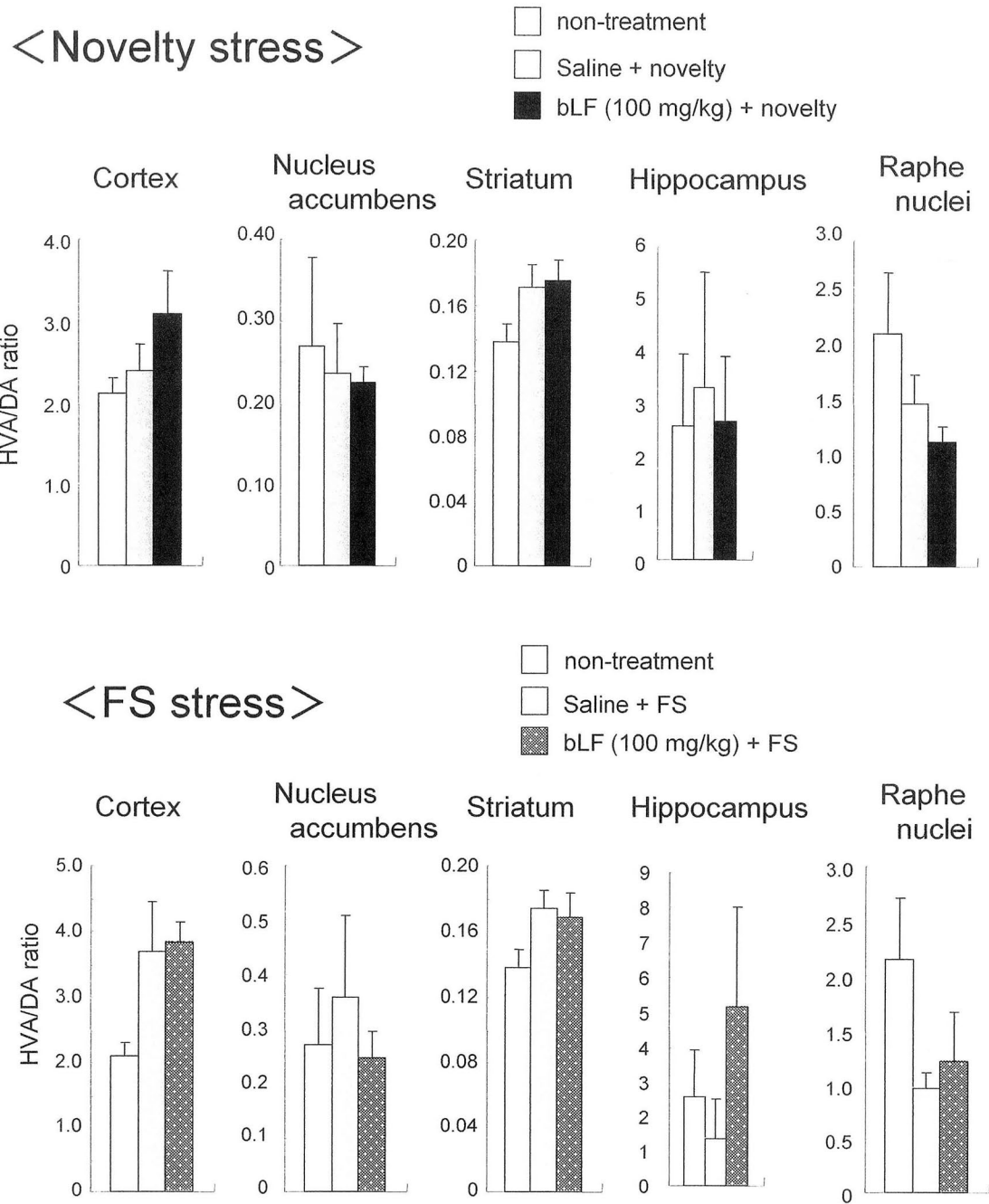


### <FS stress>



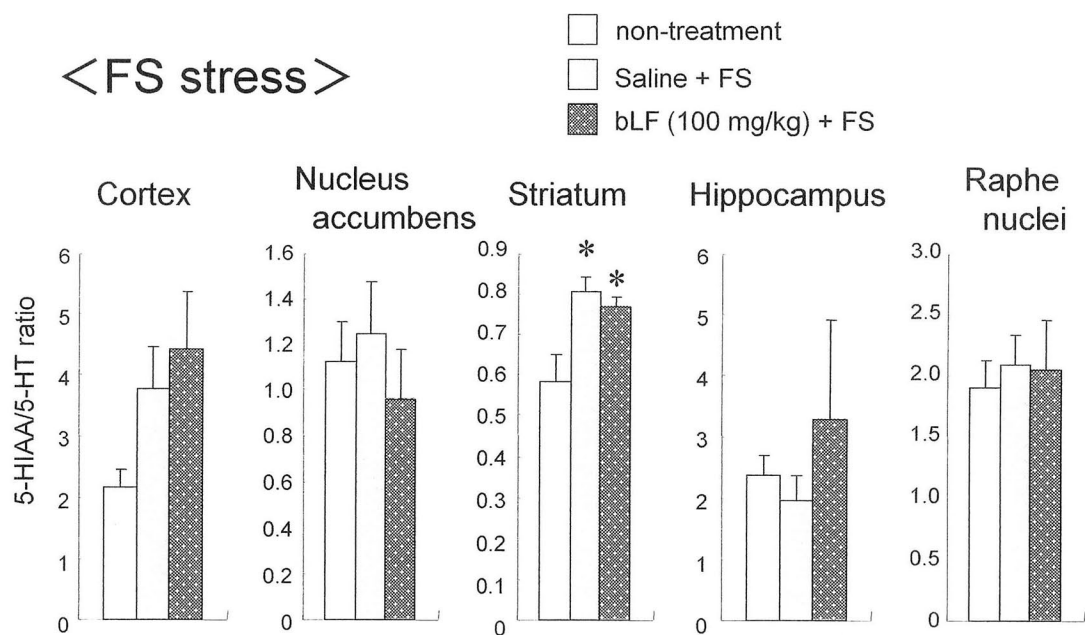
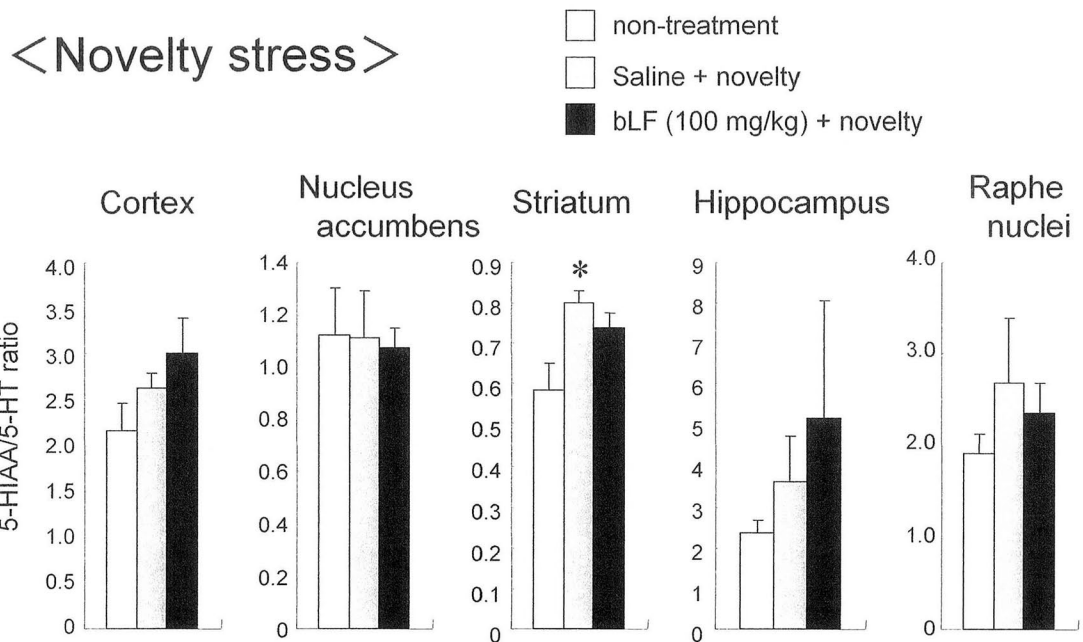
**Fig.21 Changes in the DOPAC/DA ratio of brain tissues induced by novelty or FS stress and combination with bLF administration**

Saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the novelty or FS stress. After the stresses, the DOPAC/DA ratio was measured in cortex, nucleus accumbens, striatum, hippocampus and raphe nuclei. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-6).



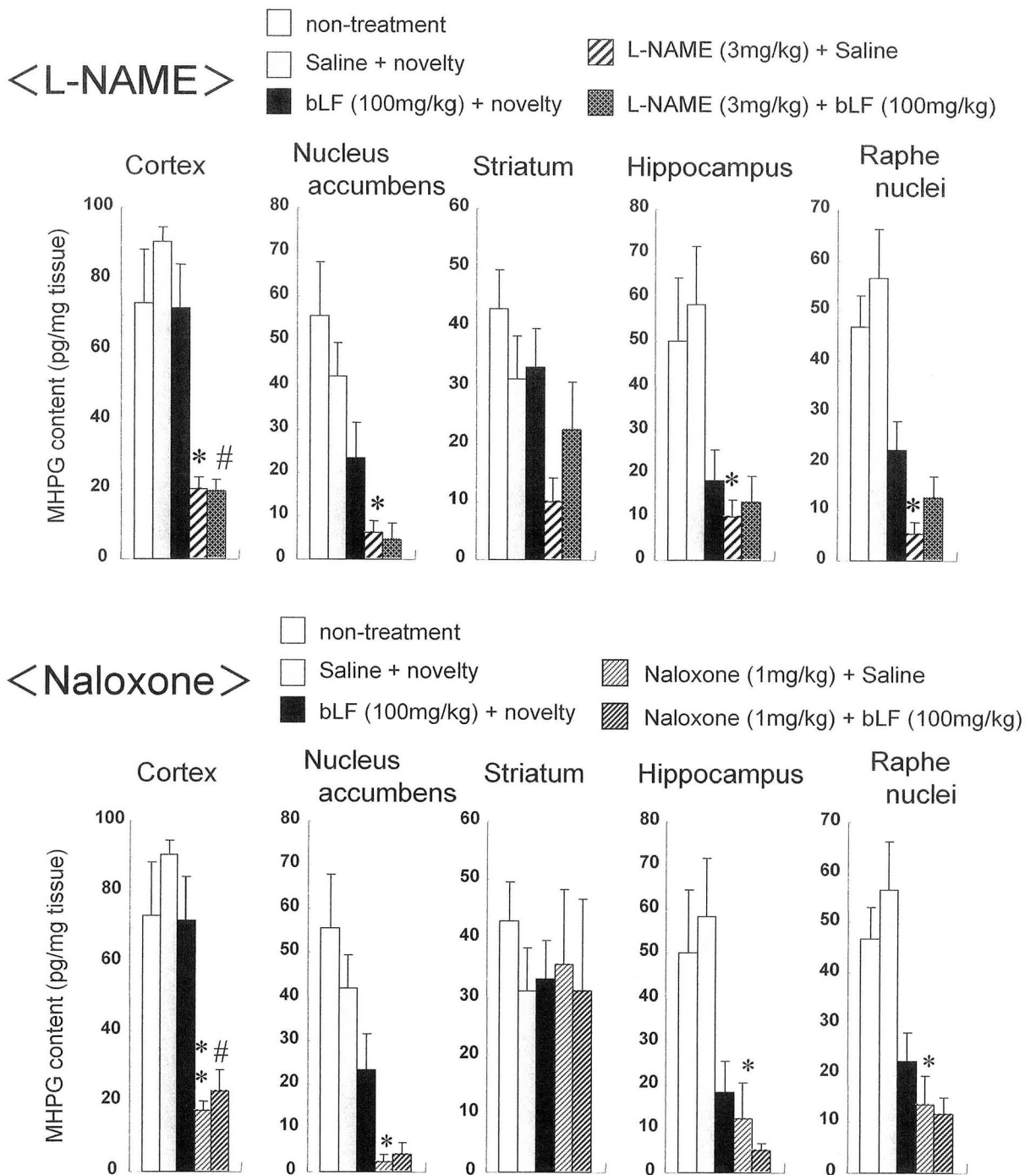
**Fig.22 Changes in the HVA/DA ratio of brain tissues induced by novelty or FS stress and combination with bLF administration**

Saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the novelty or FS stress. After the stresses, the HVA/DA ratio was measured in cortex, nucleus accumbens, striatum, hippocampus and raphe nuclei. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-6).



**Fig.23 Changes in the 5-HIAA/5-HT ratio of brain tissues induced by novelty or FS stress and combination with bLF administration**

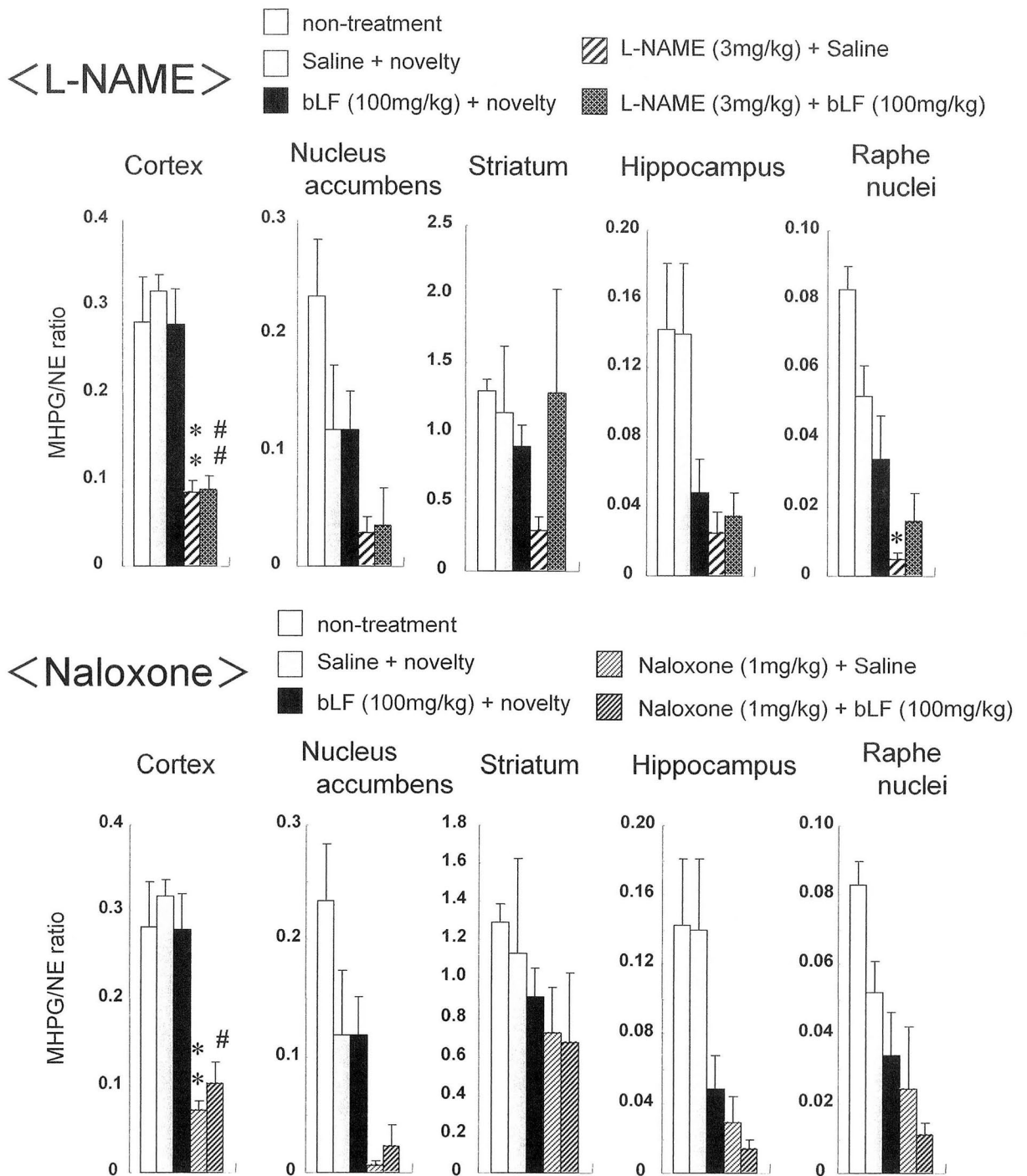
Saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the novelty or FS stress. After the stresses, the 5-HIAA/5-HT ratio was measured in cortex, nucleus accumbens, striatum, hippocampus and raphe nuclei. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-6). \* P<0.05 vs. non-treatment group.



**Fig.24 Changes in the MHPG content of brain tissues induced by novelty stress and combination with bLF and L-NAME or Naloxone administration**

L-NAME (3 mg/kg) or Naloxone (1 mg/kg) was administered 60 min before and saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the novelty stress, respectively. After the stresses, the content of MHPG (pg/mg tissue) was measured in cortex, nucleus accumbens, striatum, hippocampus and raphe nuclei. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-6).

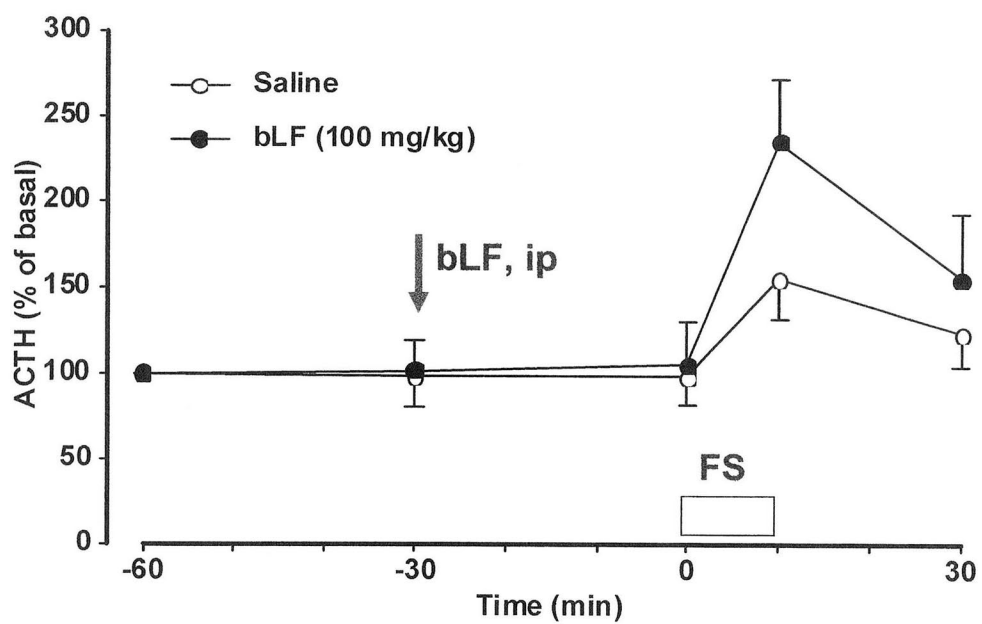
\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs. saline + novelty, # P<0.05 vs. bLF + novelty group.



**Fig.25 Changes in the MHPG/NE ratio of brain tissues induced by novelty stress and combination with bLF and L-NAME or Naloxone administration**

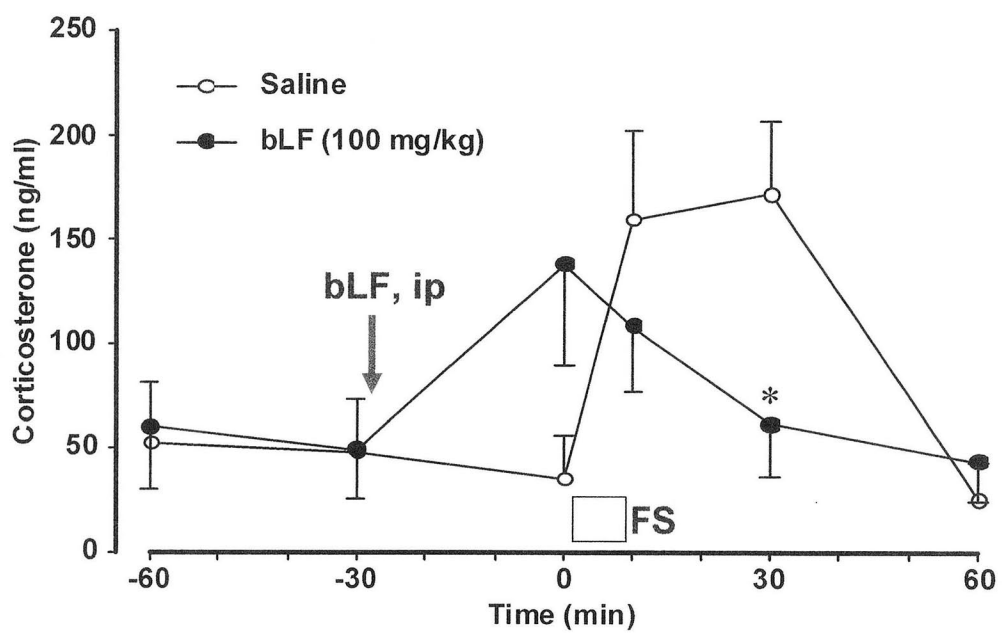
L-NAME (3 mg/kg) or Naloxone (1 mg/kg) was administered 60 min before and saline or bLF (100 mg/kg) was administered 30 min before the novelty stress, respectively. After the stresses, the MHPG/NE ratio was measured in cortex, nucleus accumbens, striatum, hippocampus and raphe nuclei. Data are represented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-6).

\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs. saline + novelty, # P<0.05 vs. bLF + novelty group.



**Fig.26 Changes in the time course of the plasma ACTH concentration induced by foot-shock**

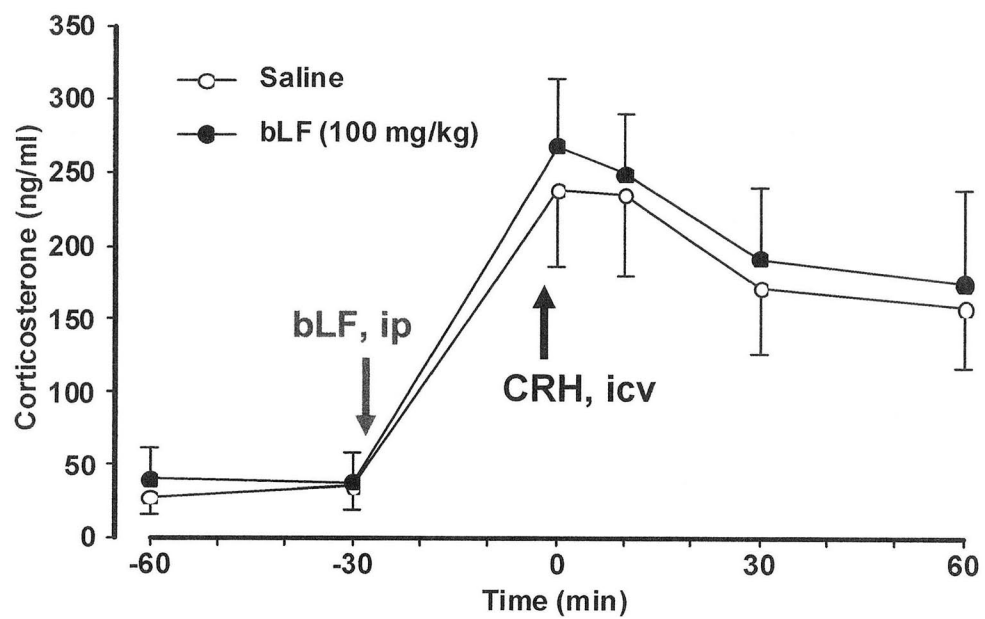
Plasma ACTH concentration is expressed as percentages of pre-administration level. Open circle and closed circle shows saline and bLF (100 mg/kg, ip) group, respectively. Foot-shock was applied for 10 min. Data represent the mean  $\pm$  S.E. from 5 rats.



**Fig.27 Changes in the time course of the plasma corticosterone concentration induced by foot-shock**

Open circle and closed circle shows saline and bLF (100 mg/kg, ip) group, respectively. bLF or saline was administered at 30 min before the foot-shock. The foot-shock was applied for 10 min. Data represent the mean  $\pm$  S.E. from 5 rats. \* $P < 0.05$  vs. saline group.





**Fig.28 Changes in the time course of the plasma corticosterone concentration induced by CRH icv.**

Open circle and closed circle shows saline and bLF (100 mg/kg, ip) group, respectively. bLF or saline was administered at 30 min before the CRH (1  $\mu$ g, icv) injection. Data represent the mean  $\pm$  S.E. from 5 rats.

## 第4章 bLFの脳内移行動態の解析

### I. 目的

Hayashida et al. (2003a) は、ラットの中枢神経系において bLF が鎮痛活性などの新規作用を発現することを明らかにした。この鎮痛活性は腹腔内投与のみならず経口投与 (Hayashida et al., 2003a; Tsuchiya et al., 2006) によっても確認された。したがって、腸管から吸収されて血液中へ移行した LF は、中枢神経系組織へ到達することが予想される。しかしながら、血管系と脳組織との間には、BBB および BCSFB による物質移動が厳しく制限されており、どのようにして LF がこれらバリアーを通過するかは不明な点が多い。Talukder et al. (2003b) は、ウシの脳室脈絡叢から調製した膜成分に LF 受容体が存在することを報告しており、この受容体を介した特異的な輸送機構が重要な役割を担っていると予想される。

本実験では、BBB および BCSFB を通過する LF を免疫組織学的に捉えることを目的とし、静脈内に bLF を投与したラットの脳組織を解析するとともに、CSF 中の bLF 濃度の経時的変化についても解析した。

### II. 実験方法

#### 1. 供試動物

実験には、8週齢の Wistar-Imamichi 系雄ラットを使用した。導入および飼育条件はすべて第1章と同様である。

## 2. 実験プロトコール

### 1) 脳の免疫組織化学的解析

5匹のラットを用い、urethan 麻酔下 (1 g/kg, sc) にて尾静脈から bLF 溶液 (10 mg/kg) を投与した。10 分後に periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定液を 20 分間にわたって心臓から灌流し、全身の固定を行った。その後、脳を取り出し、前頭部に断面を加えた後、4°C の PLP 固定液中に一晩浸漬した。脳組織片を液体窒素で急速凍結し、クリオスタット (Coldtome HM505E, Carl Zeiss, Germany) にて凍結切片を作製した。

染色法は前報 (Takeuchi et al., 2004) に準拠して行った。すなわち、凍結切片を 0.05%-Tween 添加リン酸緩衝液 (pH 7.4, PBS) で洗浄し、メタノール原液および 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で処理した。さらに、野生のウシガエル血清 (1 %) を添加した後に、horseradish peroxidase (HRP) 標識抗-bLF ヤギ IgG を添加し、4°C で 20 時間反応させた。発色は、0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む 3, 3'-diaminobenzidine-HCl で行い、counter-stain として hematoxylin を使用した。

### 2) 脳脊髄液中への bLF 移行動態

60 匹のラットを使用し、以下の 3 群に分けた。

- a) 生理食塩水投与群：生理食塩水を 1 ml/kg 投与。
- b) 低用量 bLF 群：生理食塩水に粉末 bLF を溶解し、10 mg/kg 投与。
- c) 高用量 bLF 群：生理食塩水に粉末 bLF を溶解し、30 mg/kg 投与。

覚醒状態のラットを保定箱に入れ、各溶液を尾静脈内に投与した。その後、ラットをケージに戻し、一定時間後に CSF を採取した。CSF 採取の方法としては、urethan 麻酔下 (1 g/kg, sc) にて直接大槽に 26 G の注射針を刺入して CSF 0.2

ml を採取した。試験溶液投与後の CSF 採取時間は、投与前、投与後 30 分、1 時間および 2 時間とした。また、CSF 中への血液の混入を避けるため、CSF 採取は個体につき 1 回のみとした。CSF は 1,500 x g, 4°C にて遠心分離を行い、上清を採取した。

### 3. bLF の ELISA 測定

CSF 中の bLF の定量には ELISA キット(Bethyl Lab. Inc., Montgomery, TX, USA) を使用した。尚、bLF の検出感度は 2 ng/ml であった。

### 4. 統計処理

データは mean ± S.E. で表した。CSF 中の bLF 濃度の比較は Unpaired Student's t-test で行い、P<0.05 を統計的有意水準とした。

## III. 結果

### 1. 脳の免疫組織化学的解析

bLF を静脈内に投与した 10 分後の脳組織についてみると、前頭葉の白質に分布する毛細血管内皮細胞に抗-bLF 抗体陽性像が確認され、陽性を示す粒子は主に血管内皮細胞の膜上に認められた (Fig. 29-a)。

さらに強い陽性像が脳室脈絡叢の上皮細胞に認められた (Fig. 29-b)。抗-bLF 抗体陽性を示すおびただしい数の粒子が脈絡叢上皮細胞の膜上に確認された (Fig. 29-c)。一方、生理食塩水投与ラットの脳では、陽性所見は認められなかった。

## 2. 脳脊髄液中 bLF 濃度の変化

bLF 静脈内投与後の CSF 中 bLF 濃度についてみると、高用量投与群 (bLF 30 mg/kg)では、投与後 30 分で CSF 中から bLF が検出された (Fig. 30)。その後、bLF 濃度は時間経過とともに上昇し、高用量群では 1 時間後に最大( $621.8 \pm 261.7$  ng/ml)となった。また、低用量群 (bLF 10 mg/kg) においても 2 時間後に最大 ( $388.1 \pm 109.1$  ng/ml) となった。以上のように、用量によって最大濃度に達する時間は異なるが、静脈内に投与した bLF は CSF へ移行することが確認された。

## IV. 考察

これまでの報告から、bLF がラットやマウスに対して強い鎮痛活性を有することが明らかにされており (Hayashida et al., 2003a; 2003b)、さらに、我々は成熟動物に対して bLF がストレス軽減効果を発揮することを明らかにしてきた。これら中枢神経系に対する LF の作用は経口投与でも確認されており (Hayashida et al., 2003a)、腸管から吸収された LF は、さらに血液から脳へ到達することが予想された。本実験の結果から、血液から脳への移行は、脳室脈絡叢を介した CSF 中への分泌が主な移行経路と考えられた。また、同時に脳白質の毛細血管内皮細胞にも bLF 陽性像が確認されたことは、LF は BBB をも通過する可能性が強く示唆される。実際、ストレス軽減効果は、bLF の腹腔内投与 30 分後で十分な活性を認めており、CSF が唯一の移行経路であれば、30 分という時間は LF が脳実質に到達するには短時間過ぎると思われる。bLF の静脈内投与後の CSF 中 bLF 濃度の時間経過をみても、ピークに到達するのは 1 時間以降であり、脳室系か

ら脳実質へ LF が拡散するにはさらに時間を要すると考えられる。

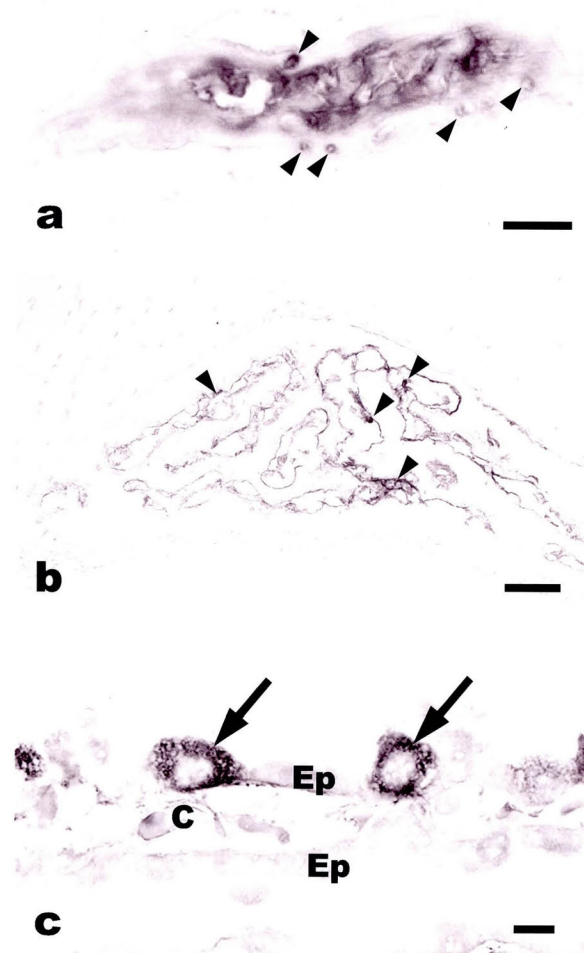
したがって、本研究で得られた結果は、LF が BBB および BCSFB を通過して、血液中から脳実質へ移行する可能性を強く示唆するとともに、LF の作用発現には BBB と BCSFB の両者を通過することが必要であると考えられるが、実際の機能発現にはさらに複雑なメカニズムが存在するものと予想される。

実験的には、高血圧 (Westergaard et al., 1977)、出血 (Westergaard et al., 1976)、ヒスタミン投与 (Gross et al., 1982)、cyclic nucleotide 投与 (Joo, 1994) などによっても、高分子物質の BBB 透過性は変化すると報告されている。また、LF の BCSFB 透過性は動物の成熟状態によっても変化することが指摘されており、Talukder et al. (2002; 2003b) は、ウシ新生子の血漿中 LF 濃度は離乳ウシよりも高いにもかかわらず、CSF 中の LF 濃度は離乳ウシの方が高濃度であったと報告している。本実験では、CSF 中の bLF 濃度は、30 mg/kg の静脈内投与時で最大 621 ng/ml であり、CSF へ移行した bLF 量はわずかである。しかし、経口投与した動物においても、bLF の中枢作用が発現していることから考え合わせると、脳実質へ到達する bLF 量はごく微量であっても作用は発現し得るものと思われる。

一方、Fillebeen et al. (1999) は、脳の毛細血管内皮細胞をシート状に培養し、LF の透過性を検討したところ、血管内皮細胞を通過した LF は元の分子量サイズを維持していたと報告している。Harada et al. (1999b; 2002) も、ブタ新生子を用いた実験から、CSF へ移行した bLF は少なくとも元の分子量のものを含んでいると述べている。これに対して Strahan et al. (1992) は、血液中の TF は毛細血管内皮細胞へ取り込まれるものの、脳実質へは到達せず、血管内へ再分泌されとの結果を報告している。同様に Ji et al. (2006) は、<sup>125</sup>I 標識した TF を用いて

実験を行ったところ、TFはBBBを通過できないと報告した。したがって、鉄結合性蛋白であっても、BBBあるいはBCSFBを通過できるのはLFの特徴であると考えられる。

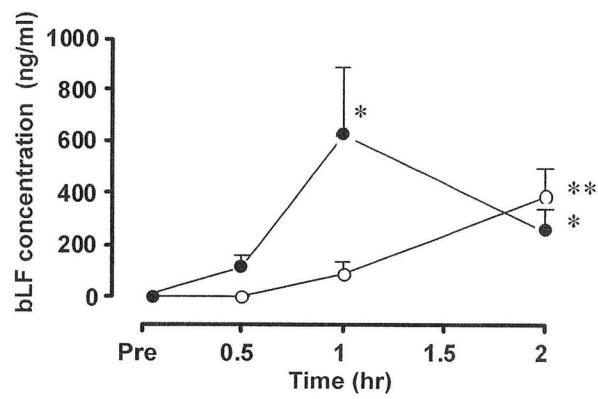
以上のように、本実験から、ラットの静脈内に投与したbLFはBBBおよびBCSFBを通過して脳実質あるいは脳脊髄液中へ移行することが、免疫組織化学的解析ならびに、CSF中のbLF濃度測定から確認された。これらの所見は、LFが中枢神経系において鎮痛ならびにストレス軽減効果を発現するための作用機序を理解する上で、極めて重要な所見であり、経口投与されたLFが中枢神経系に対して作用し得ることを強く支持している。



**Fig.29 Distribution of bLF immunoreactivity in the adult rat brain.**

(a) High-magnification light micrograph of blood capillaries in cerebral white matter. Positively stained membranes are visible in the cytoplasm (arrowheads). (b) Low-magnification micrograph of a choroid plexus. bLF immunoreactivity remains in the lumina of blood capillaries (arrowheads). (c) High-magnification of a blood capillary (C) of the choroid plexus. Numerous small vesicles with bLF-positive membranes are visible in some ependymal cells (arrows) of the choroid plexus. Ep: ependymal cells. Bars: a = 10  $\mu$ m, b = 100  $\mu$ m, c = 100  $\mu$ m.





**Fig.30 Changes in bLF concentrations in the CSF after the intravenous infusion of bLF in adult rats.**

Open and closed circles show data from rats at doses of 10 mg/kg and 30 mg/kg, respectively. Data represent the mean  $\pm$  SE from 5 rats. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. pre.

## 第5章 腸管からの bLF 吸収の効率化

### I. 目的

経口投与された LF の体循環への移行量は少なく、さらに血中残存時間も短い。これには、胃内での消化や肝臓での代謝による影響が大きいと考えられる。したがって、LF の効率的な腸管からの吸収は臨床応用を考える上で極めて重要である。一般に、腸管からの蛋白吸収にはいくつかの制限がある。すなわち、腸上皮細胞間のタイトジャンクションによるバリアー機構に代表されるように、高分子物質は腸管からは吸収され難い。また、胃内での消化酵素によって蛋白質が変性あるいは不活化され、腸上皮細胞膜の受容体に対する結合活性が低下したり、疎水性であると腸上皮の透過性が低下すること、などが含まれる (Paulsen et al., 1979; Maberly et al., 1982; Saffran et al., 1986)。したがって、これらの問題点を解決したドラッグ・デリバリー・システムの確立は、経口薬の汎用性をさらに広げることになり、応用性が期待される。

LF についても、リポゾーム化によって胃酸・ペプシンに抵抗性をもたせ、吸収効率の向上を検討した報告がみられる (Ishikado et al., 2005)。この研究では、ラットに経口投与したリポゾーム化 LF が CCl<sub>4</sub> 誘発性の肝障害に対し、無処理の LF よりも強い抑制効果を発現した。さらに Ishikado et al. (2005) は、bLF をマウスに皮下投与すると顕著な抗体価の上昇を惹起するのに対し、経口投与では抗原性が有意に低下することを報告した。したがって、LF の臨床応用に際しては経口投与が望ましいと考えられ、効率的な腸管吸収の実現が不可欠である。

本実験では、胃酸・ペプシン消化に抵抗し得ると予想される bLF の腸溶性剤

を胃内または十二指腸内に投与し、胸管リンパ液中の bLF 量を測定することによって、腸溶性 bLF が腸管からの吸収効率を向上させるか否かを解析した。

## II. 実験方法

### 1. 供試動物

実験には、8週齢の Wistar-Imamichi 系雄ラットを使用した。導入および飼育条件はすべて第1章と同様である。

### 2. 試薬

Tris [hydroxymethyl] aminomethane は和光純薬工業(大阪)から購入した。ウシ血清アルブミンは Sigma (St. Louis, MO, USA)から、ヤギ抗-bLF 抗体は Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA) から購入した。

### 3. 投与薬物

粉末の bLF はこれまでの実験で使用したものと同様である。腸溶性 bLF は NRL Pharma Inc. (川崎) から譲り受けた。腸溶性 bLF の詳細な生産法は international patent submission No. PCT/JP2006/301619 に記載した通りである。腸溶性 bLF は bLF 粉末を 10% 含有し、豆乳でコーティングしたものであり、粒径は 1 mm 未満、サイズ no. 16 のメッシュを通過する大きさとなっている。

### 4. 実験プロトコール

ラットを以下の 3 群に分けた。

a) 粉末 bLF (30 mg/kg) 群 : 粉末 bLF を生理食塩水に溶解し、30 mg/kg 投与。

b) 粉末 bLF (300 mg/kg) 群 : 粉末 bLF を生理食塩水に溶解し、300 mg/kg 投与。

c) 腸溶性 bLF (30 mg/kg) 群 : 腸溶性 bLF を生理食塩水に懸濁し、30 mg/kg 投与。

すべてのラットは一晩絶食し、25 % urethan (1 g/kg) および Sodium Pentobarbital (Nembutal, 50 mg/kg) の皮下投与による麻酔下にて、外頸静脈から約 3 cm の深さまでポリエチレン製カニューレを挿入した。また、Bollman et al. (1948)の方法に従って胸管にリンパ液採取用のポリエチレンチューブ (0.8 mm OD) を挿入した。

粉末 bLF 溶液と腸溶性 bLF 懸濁液を 1 ml シリンジ、26 ゲージの注射針を介して胃内または十二指腸内に 1 分以上かけて投与した。胸管リンパ液は bLF 投与前 1 時間と投与後 1 時間おきに 4 時間まで、ヘパリン処理チューブに採取した。胸管リンパ液の流量はリンパ液採取後のチューブの総重量から採取前の空のチューブの重量を引いて算出した。これらのサンプルは 4 °C、5,000 rpm で 15 分間遠心し、上清とリンパ球残渣は分析まで -80 °C で保存した。胸管リンパ液への bLF の吸収量はリンパ流量とリンパ液中の bLF 濃度に基づいて算出した。

## 5. リンパ球中の bLF 含量の解析

リンパ球中の bLF を測定するために、サンプルチューブ内のリンパ球ペレットに生理的食塩水を加えて超音波破碎処理を行った。さらに、12,000 x g、4 °C で 10 分間遠心分離し、上清を細胞質成分として分取した。沈渣に 0.2% Triton X-100 を加えて溶解し、これを細胞膜成分とした。両成分中の総 bLF 含量を ELISA 法で分析した。

## 6. ELISA 法による bLF の定量

bLF の定量は第 4 章と同様の方法で行った。

## 7. 統計処理

すべてのデータは  $\text{mean} \pm \text{S.E.}$  で表した。胸管リンパ液のリンパ流量、bLF 濃度、総 bLF 吸収量、および血漿中の bLF 濃度について、各群間の比較は Unpaired Student's t-test で行った。P<0.05 を統計的有意水準とした。

## III. 結果

### 1. リンパ液中 bLF 濃度の解析

各群とも、リンパ流量は薬物投与後 1 時間でピークとなり、その後は 4 時間まで徐々に減少した。胃内投与および十二指腸内投与のいずれにおいても 3 群間のリンパ流量に有意差は認められなかった(Fig. 31-A, B)。

胃内投与による吸収動態についてみると、投与前のリンパ液中からは、いずれの群においても bLF は検出されなかった。粉末 bLF (30 mg/kg) 群における胸管リンパ液中の bLF 濃度は、投与後ごくわずかに増加を示した。粉末 bLF (300 mg/kg) 群では投与直後の 1 時間で明らかな上昇を示し、その後 3 時間は同レベルを維持した。一方、腸溶性 bLF (30 mg/kg) 群のリンパ液中 bLF 濃度は投与後に顕著な上昇を認め、粉末 bLF (30 mg/kg) 群と比べて投与後 1-4 時間で有意であった。また、粉末 bLF (300 mg/kg) 群と比べても、腸溶性 bLF (30 mg/kg) 群は投与後 3 時間で高値を示した(Fig. 32-A)。

これとは対照的に、十二指腸内に bLF を投与した場合、リンパ液中の bLF 濃

度は用量依存性であった(Fig. 32-B)。投与前はすべての群において bLF は検出されなかった。粉末 bLF (300 mg/kg) 群では、投与後 1-4 時間において他の 2 群と比べて有意に高い bLF 濃度を示したが、粉末 bLF (30 mg/kg) 群と腸溶性 bLF (30 mg/kg) 群との間には差異はほとんど認められなかった。

リンパ液中の bLF 吸収量の時間的変化は投与後のリンパ液中 bLF 濃度とほぼ相関していた。胃内投与後、腸溶性 bLF (30 mg/kg) 群の bLF 総吸収量は 3 から 4 時間後において他の 2 群よりも有意に高値であった(Fig. 33-A)。一方、十二指腸内投与後における総 bLF 吸収量はすべての群において 1 時間でピークとなり、4 時間まで徐々に減少した。粉末 bLF (300 mg/kg) 群では、1~4 時間まで他の 2 群より高値となり、1 時間後では有意差が認められた。腸溶性 bLF (30 mg/kg) 群と粉末 bLF (30 mg/kg) 群の間には有意差は認められなかった(Fig. 33-B)。

投与後 4 時間の胸管リンパ液中総 bLF 吸収量を Fig. 34 に示した。胃内投与における腸溶性 bLF (30 mg/kg) 群の bLF 吸収量は他の 2 群に比べて顕著に高く、粉末 bLF (30 mg/kg) 群の約 10 倍であった(Fig. 34-A)。しかし、十二指腸内に同用量を投与した場合、粉末 bLF 群と腸溶性 bLF 群との間に差は見られなかった(Fig. 34-B)。

## 2. リンパ球中 bLF 含量の解析

Fig. 35 に示すように、十二指腸内に bLF または BSA を投与した場合の胸管リンパ液中のリンパ球数はわずかに増加したが、2 群間に有意差はみられなかった。投与後、大部分の bLF はリンパ液の上清に含まれていたが、1-8%程度の bLF はリンパ球中にあり(Fig. 36-B)、その内訳は、リンパ球の膜成分と細胞質成分で同程度であった(Fig. 36-A)。

#### IV. 考察

Takeuchi et al. (2004) は、成熟ラットの十二指腸内に投与した bLF が胸管のリンパ液を介して血液循環に移行することを報告した。この報告によると、胸管リンパ液を採取しなかったラットでは、bLF の十二指腸内投与後に血漿中 bLF 濃度が速やかに上昇したのに対して、胸管リンパ液を採取した個体では血漿中に bLF は検出されなかった。これらの所見は、腸管腔内に存在する bLF が腸上皮細胞に取り込まれた後、門脈経路ではなく、リンパ経路を介して血液循環へ到達することを示唆している。したがって、吸収された bLF は肝臓での代謝を受ける前に全身に到達し、種々の作用を発揮し得るものと考えられる。

今回の実験では、粉末 bLF を 30 mg/kg と 300 mg/kg の用量で用いたが、高用量粉末 bLF 群のリンパ液中 bLF 濃度は十二指腸内投与時のみならず、胃内投与時においても低用量粉末 bLF 群よりも高値であった。また、リンパ液への総 bLF 吸収量も同様の結果であった。したがって、リンパ液中 bLF 濃度は小腸内の bLF 濃度にある程度相関するものと考えられる。Kawakami & Lonnerdal (1991) はヒトの胎児と幼児の小腸から LF 受容体を分離している。その他、ラット (Takeuchi et al., 2004)、ブタ (Harada et al., 1999a) およびウシ (Talukder et al., 2003a) において、十二指腸内に投与した bLF が受容体を介する取り込み機構によって腸上皮細胞から吸収されることが報告されている。したがって、bLF が小腸の管腔内で高濃度に存在すれば、腸上皮細胞膜に接する効率は上昇すると考えられる。腸溶性 bLF 群におけるリンパ液中の bLF 濃度と吸収量は、十二指腸内投与の場合、低用量粉末 bLF 群と比べて有意な差は見られなかった。したがって、小腸では bLF

濃度が吸収に影響する主な要因であると考えられた。

胃内投与後の腸溶性 bLF 群におけるリンパ液中 bLF 濃度と吸収量は、粉末 bLF (300 mg/kg) 群よりも有意に高いものであった。これらの結果は、腸溶性 bLF が胃酸・ペプシン消化に対して耐性を有し、消化されない状態で小腸に到達した後に吸収されることを明確に示唆している。一般的に、抗胃酸処理は胃酸やペプシンなどの酵素に強いことが知られている。Nolan & Mine (2005) は、胃を通過し、小腸での放出を調節するためにマイクロカプセル処理した免疫グロブリン Y が *in vitro* で 6 時間まで胃内環境に耐えたことを報告した。

一方、血漿中に移行した後の LF についてみると、通常、吸収された LF は門脈を経て肝臓に到達し、肝細胞にすばやく取り込まれ、クリアランスされてしまうため、循環血液中の濃度は比較的短時間で低下することが報告されている。例えば、Regoeczi et al. (1985) は、<sup>125</sup>I-LF を 1-2  $\mu$ g/100g の用量でラットの血管内に投与したところ、放射活性の推移は、投与した <sup>125</sup>I の 85% が最初の 10 分で血液中から消失するが、肝臓からの <sup>125</sup>I の消失は非常に緩徐であったと報告している。このことから、血液中の LF は肝臓に達し、その多くが肝細胞内に留まった後に分解されることが考えられる。Harada et al. (1999a) による報告では、新生ブタにおいて血液中の LF が胆汁中に移行し、腸から再吸収されることを示した。したがって、肝臓に取り込まれた LF の一部は胆汁中に排泄され、腸肝循環していると考えられる。

今回の実験では、十二指腸内に投与され、吸収された bLF の約 8% がリンパ球に存在することが明らかとなった。我々は、bLF を含んだリンパ球の生理的役割を解明するには至らなかったが、好中球は内因性 LF のもっとも主要な貯蔵場所であると考えられている。血液中に遊離している bLF は迅速に肝臓に取り込ま

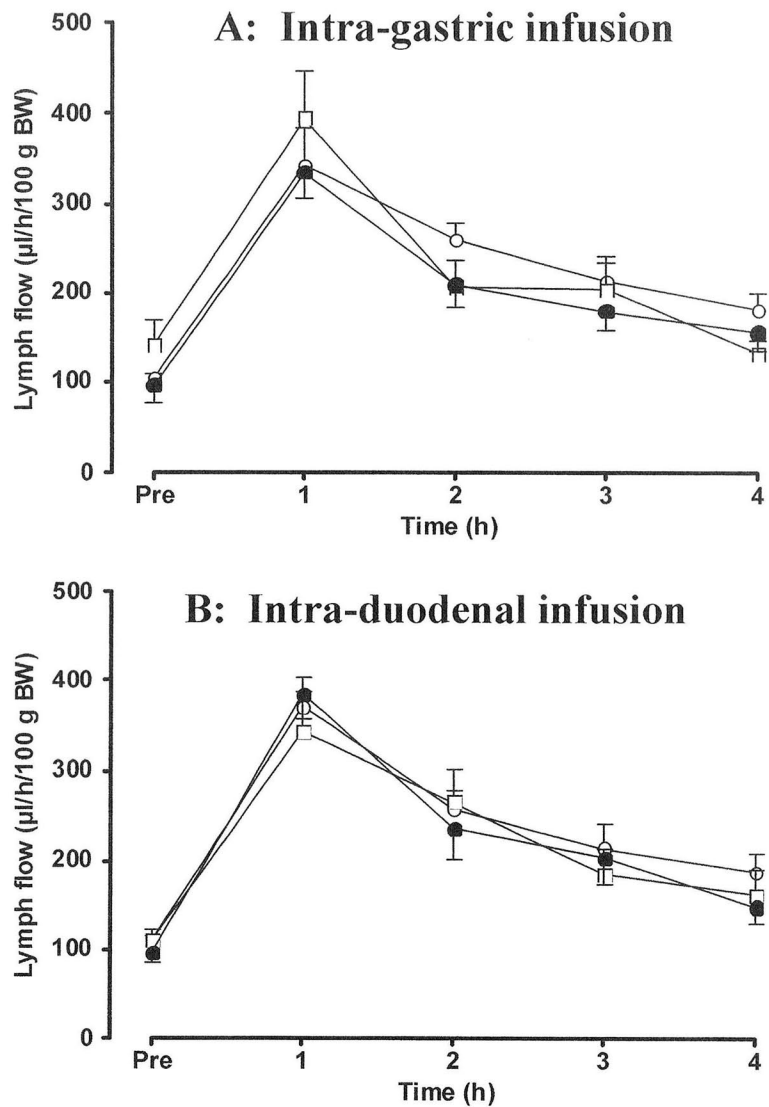


れ、胆汁中に分泌される。Priels et al. (1978) は、血管内に投与した LF の約 90% が投与後 10 分以内に肝臓によって血液循環から除去されることを報告した。また、Ziere et al. (1992) も、血管内に投与した LF の  $92.8 \pm 9.5\%$  が投与後 5 分で肝臓によって血液循環から除去されることを示した。この残存時間は非常に短く、長時間にわたって生体の各組織に効果を及ぼすことは困難である。したがって、リンパ球や肝臓に一時的に貯蔵され、必要に応じて血液中へ再度放出され、全身の組織に効果をもたらすことも予想される。

LF は抗菌作用、抗炎症作用、鉄結合能、抗ガン作用、抗侵害受容作用、抗ストレス作用など多くの作用を持つ蛋白質としてよく知られている。Inoue et al. (2004) は、ヒトにおける血液中の LF 濃度がジョギングの後で増加することを報告した。なぜ内因性 LF はジョギングによって血流に即時に放出されたのか。なぜ LF は各組織に異なる作用を持っているのかは依然として不明である。

Iigo et al. (1999; 2004) は、LF が IL-18 などのサイトカイン産生促進によって癌抑制効果を発揮することを報告している。LF は複数のサイトカイン産生に関与することが報告されているが。例えば、bLF はラットの IL-10 産生を亢進させることによって、炎症性サイトカインである IL-6 を抑制し、結果的にリュウマチ性関節炎の症状を緩和することも明らかにされている (Hayashida et al., 2004)。サイトカイン産生はリンパ球の機能と密接に関連していることから、仮に LF がリンパ球内に取り込まれて、何らかの修飾因子として作用するのであれば、前述のように、生体防御因子の一つとしての LF の役割が想定しうる。しかしながら、内因性 LF を含む、体内に存在する LF がどのようにリンパ球の機能を修飾するのかを明らかにするためにさらなる研究が必要である。

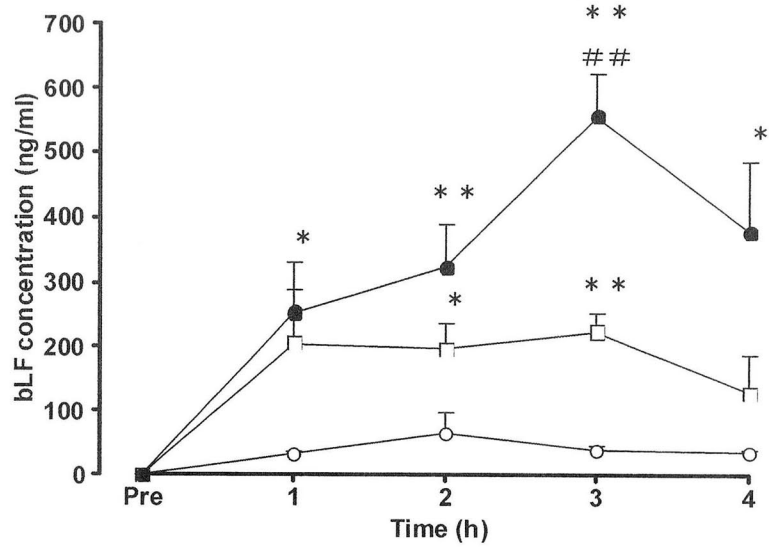
以上に述べたように、今回の実験により、成熟ラットにおいて腸溶性 bLF は胃酸・ペプシン消化に耐性を有し、腸上皮細胞からの吸収を高める効果があることが確認された。さらに、腸から吸収された bLF の約 8% がリンパ球に分布していた。



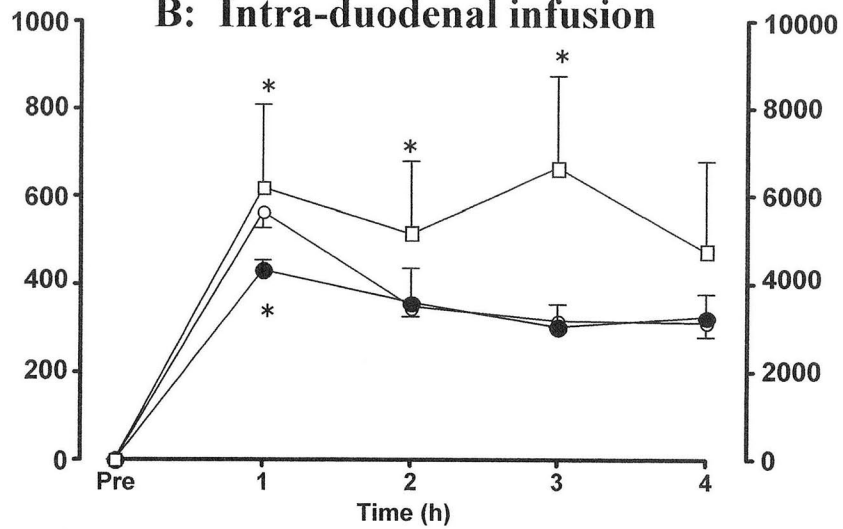
**Fig.31 Changes in the time course of the lymph flow rate into the thoracic lymph fluid following intra-gastric (A) or intra-duodenal (B) infusion of bLF.**

Lymph flow rate is expressed as total volume during each hour, and calculated per 100 g body weight. It shows 30 mg/kg (open circle) and 300 mg/kg (open square) of the non-EF-bLF groups and 30 mg/kg of the EF-bLF group (closed circle). Data represent the mean  $\pm$  S.E. from 5 rats.

### A: Intra-gastric infusion

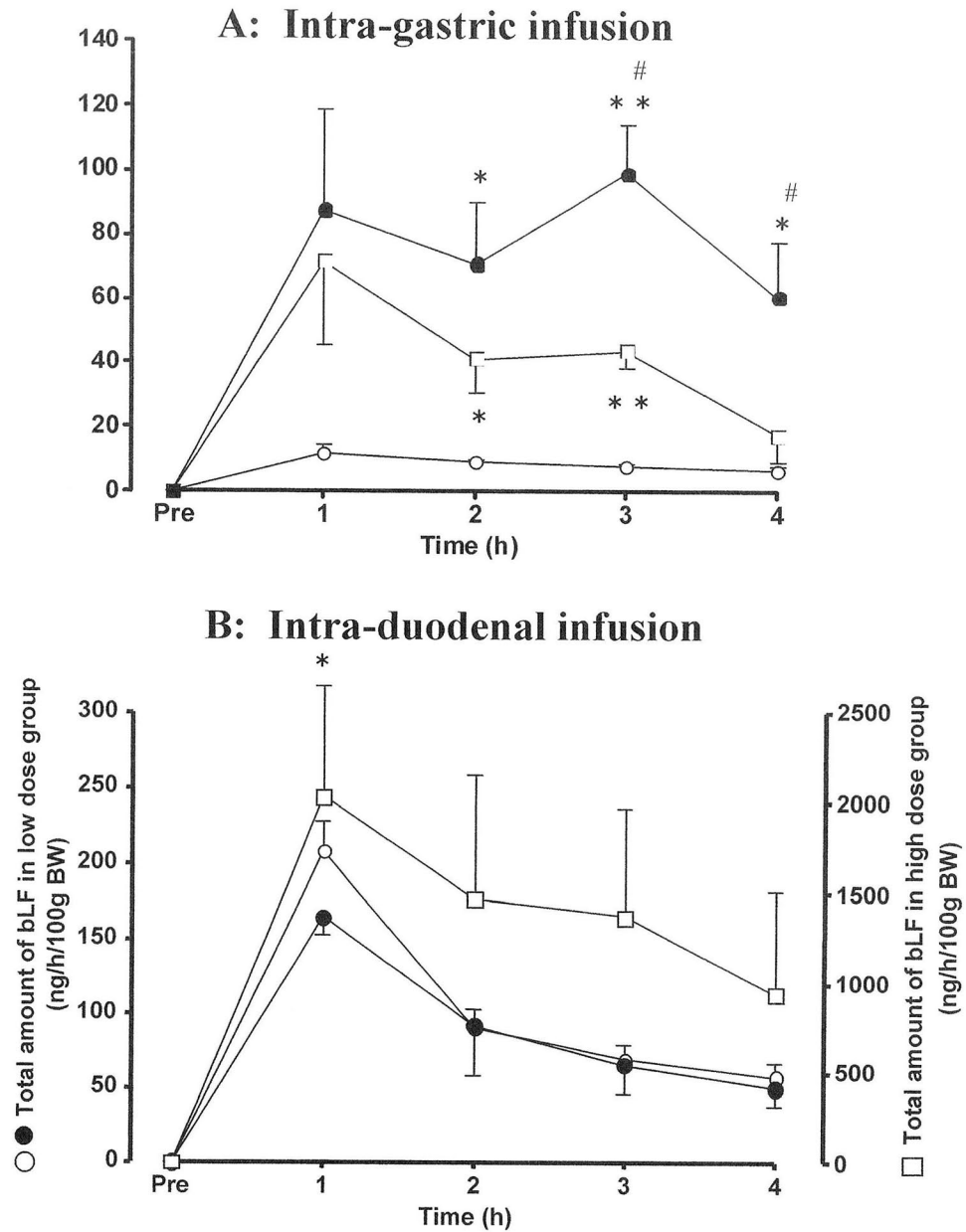


### B: Intra-duodenal infusion



**Fig.32 Changes in the time course of bLF concentration in the thoracic lymph fluid following intra-gastric (A) or intra-duodenal (B) infusion of bLF.**

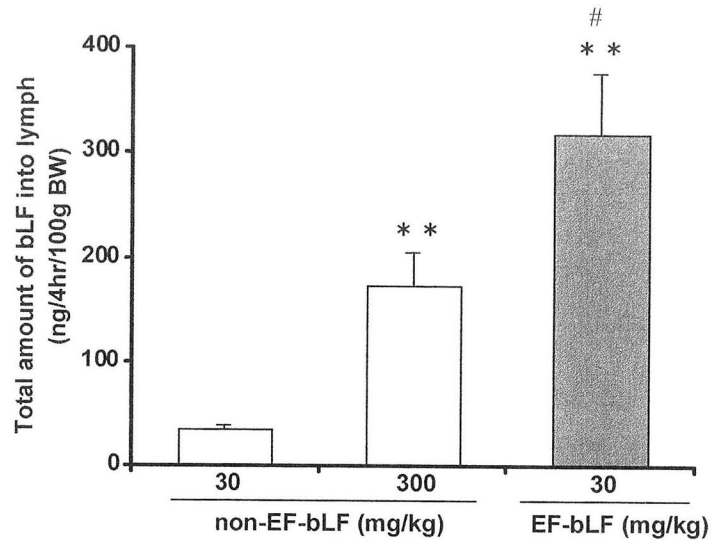
Lymphatic bLF concentration is expressed as a mean during each hour. It shows 30 mg/kg (open circle) and 300 mg/kg (open square) of the non-EF-bLF groups and 30 mg/kg of the EF-bLF group (closed circle). Data represent the mean  $\pm$  S.E. from 5 rats. \*, \*\*, significant differences from 30 mg/kg of the non-EF-bLF group at  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , respectively. ##; significant difference from 300 mg/kg of the non-EF-bLF group at  $P < 0.01$ .



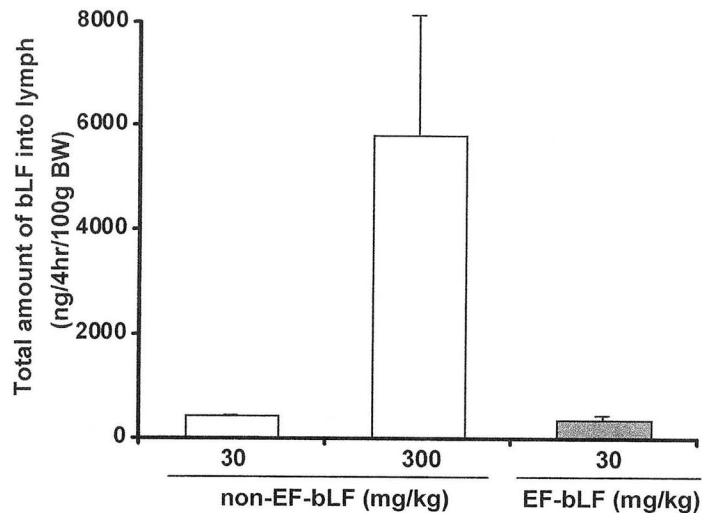
**Fig.33 Changes in the time course of bLF output into the thoracic lymph fluid following intra-gastric (A) or intra-duodenal (B) infusion of bLF.**

Output bLF is expressed as total volume during each hour, and calculated per 100 g body weight. It shows 30 mg/kg (open circle) and 300 mg/kg (open square) of the non-EF-bLF groups and 30 mg/kg of the EF-bLF group (closed circle). Data represent mean  $\pm$  S.E. from 5 rats. \*, \*\*, significant differences from 30 mg/kg of the non-EF-bLF group at  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , respectively. #; significant difference from 300 mg/kg of the non-EF-bLF group at  $P < 0.05$ .

### A: Intra-gastric infusion

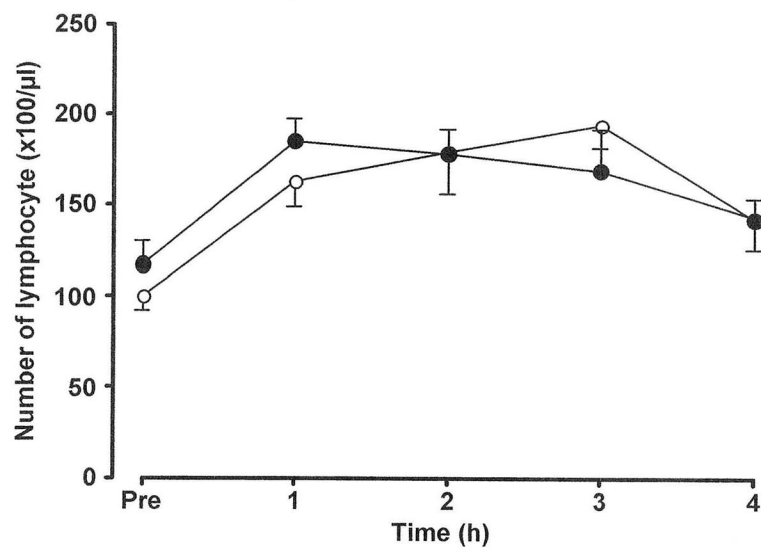


### B: Intra-duodenal infusion



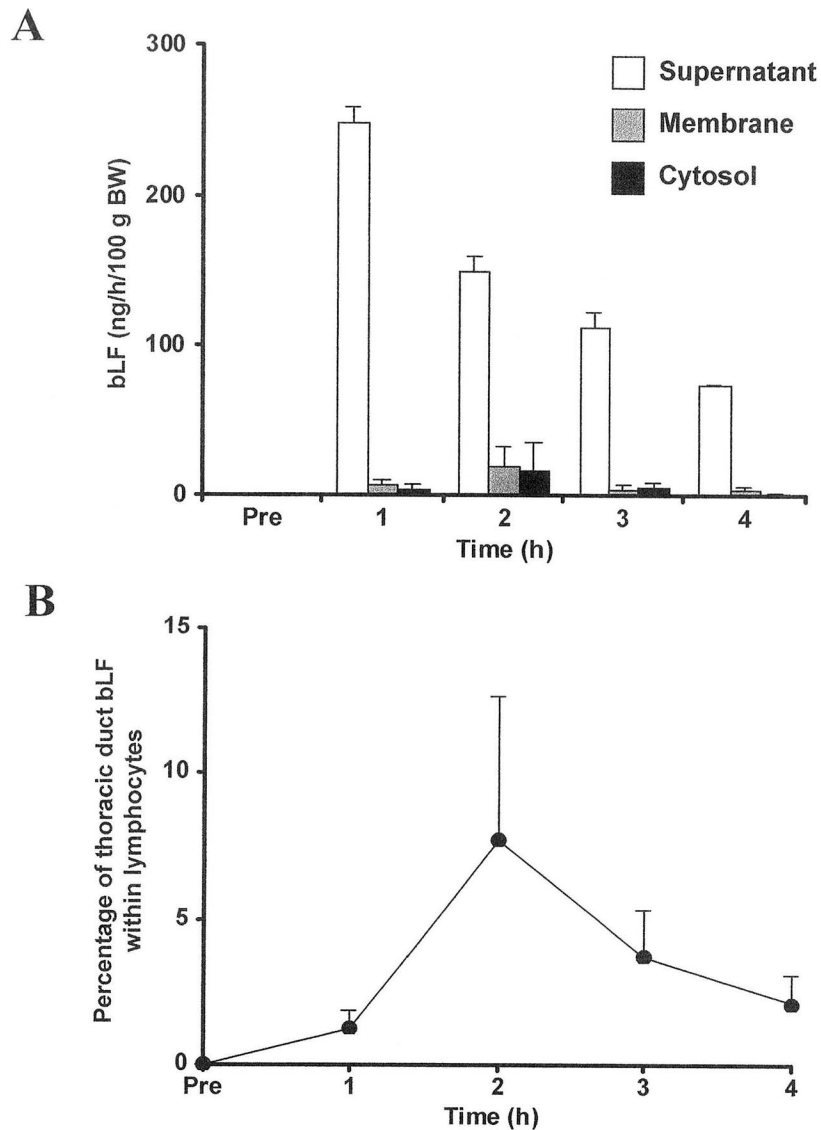
**Fig. 34 Total output of bLF into the thoracic lymph fluid for 4 hours following intra-gastric (A) or intra-duodenal (B) infusion of bLF.**

Total output of bLF is expressed as total volume over 4 hours, and calculated per 100 g body weight. Data represent mean  $\pm$  S.E. from 5 rats. \*\*, significant differences from 30 mg/kg of the non-EF-bLF group at  $P < 0.01$ . #; significant difference from 300 mg/kg of the non-EF-bLF group at  $P < 0.05$ .



**Fig. 35** Time course of the number of lymphocytes in the thoracic lymph following intra-duodenal infusion of non-EF-bLF (closed circle) or BSA (open circle) at dose of 30 mg/kg.

Number of lymphocytes was expressed as a total number during each hour, and calculated per 1  $\mu$ l. Data represent mean  $\pm$  S.E. from 5 rats.



**Fig. 36** Time course of bLF contents of lymphocytes in the thoracic lymph fluid following the intra-duodenal infusion of bLF.

It shows the localization of bLF contents within the supernatant of thoracic lymph fluid, the cell membrane and cytosolic fraction (A), and the percentage of bLF within the lymphocytes collected from the thoracic lymph fluid (B). The calculation of bLF contents and the percentage were performed using a total volume during each hour. Data represent mean  $\pm$  S.E. from 5 rats.



## 総合的考察

LF は、その存在が発見されて以来、様々な分野で研究されてきた。現在も、化学構造解析、受容体の遺伝子解析をはじめ、抗癌作用、抗ウイルス作用、抗菌作用、抗炎症作用、免疫調節作用などの薬理作用についても活発に研究が行われている。これまで我々は、bLF の腸管吸収動態について解析する過程で、循環血液中へ移行した bLF が脳内に到達することを明らかにし、さらに、脳内の作用について研究を進めてきた。その結果、新生子ラットの母子分離不安に対する軽減作用や成熟ラットにおける鎮痛作用などを明らかにしている。

上述した中枢神経系に対する作用の他に、今回の研究により、bLF が成熟ラットにおいても抗ストレス作用を発揮することが明らかになった (Kamemori et al., 2004)。このことは、人および獣医療における臨床応用の可能性を示唆している。例えば、人の抗うつ剤として、または犬猫の問題行動の治療薬として用いることができるかもしれない。

LF によるストレス軽減効果の作用機序としては、nNOS の活性化による NO 産生促進を介した内因性オピオイド作用の増強のほか、HPA 軸の CRH 分泌よりも上流で作用し、かつコルチコステロンの **negative-feedback** を促進することを示唆する結果が得られた。しかしながら、脳内のストレス応答は非常に複雑であり、今回の研究で検討していない部位においても何らかの作用を発現している可能性も否定できない。正確な作用機序の解明には長期にわたる研究の継続が不可欠であると思われる。

また、高分子物質の脳内移行は未だ不明な点が多いが、本研究では静脈内に投与した bLF が脳毛細血管内皮細胞および脈絡叢上皮細胞に検出された

(Kamemori et al., in press)。LF を含む高分子物質の脳内移行はドラッグデリバリーシステムとしての応用性も期待され、今後も多方面で研究が進むと予想される。BBB および BCSFB の透過性は種々の病態において変化すると考えられ、今後は病態モデルを用いた解析が不可欠であると思われる。

LF の臨床応用を考えると、最も問題となるのは投与経路であろう。LF は高分子の蛋白質であるため、皮下や静脈への注射投与は抗体産生を伴うため、後にIV型アレルギー反応を起こす可能性が高い。そこで、より安全な投与経路は必然的に経口投与となる。実際に、経口投与であれば抗体産生はわずかであり、アレルギー反応を引き起こす可能性は極めて低い (Ishikado et al., 2005)。本実験では、これらの観点から、経口投与での腸管からの吸収動態についても解析し、腸溶性 bLF は通常の bLF の 10 倍以上の吸収効率を有することが証明された。今後は、これら新たな LF 製剤の開発が進められるものと予想され、臨床応用への道がさらに拓かれることが期待される。

## 要 約

Lactoferrin (LF) は、様々な体液に含まれる鉄結合性タンパク質であり、多様な生理作用を持っていることが知られている。本研究では、ストレス応答に対する bovine LF(bLF) の軽減効果を明らかにするために、成熟ラットにおける行動学的解析および生化学的解析を行った。また、bLF の中枢神経系に対する作用の裏付けとなる、bLF の脳内移行について解析するとともに、経口投与を視野に入れた bLF の腸管吸収の効率化についても検討し、以下の結果を得た。

### 1. bLF のストレス軽減効果における行動学的解析

恐怖条件付けフリージングテストおよび高架式プラスメイズテスト (EPM) を行った。また、プラスメイズテストでは bLF の作用機序を調べるために各種 agonist および antagonist を bLF とともに用いた。

恐怖条件付けフリージングテストにおいて、bLF はラットの不動時間を有意に減少させたことから、bLF は強いストレス負荷に対して有意に軽減効果を有することが明らかとなった。EPM においては、単回の Foot-shock (FS) を組み合わせた独自の手法を取り入れて解析したところ、bLF は FS による不安状態の亢進時に有意な軽減効果を発現することが確認された。また、この bLF の効果は用量依存性であった。

LF の作用機序の解明を目的とし、 $\mu$ -オピオイド受容体 antagonist である Naloxone の前投与の後に EPM による解析を行ったところ、bLF の効果は消失した。さらに、一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害薬である L-NAME の前処置を行ったところ、bLF のストレス軽減効果は有意に減弱し、神経性 NOS 阻害薬である 7-nitroindazole によっても bLF の効果は有意に消失した。また、NO の前駆物

質である L-arginine により bLF の効果は増強された。

5-HT<sub>1A</sub> 受容体 agonist, antagonist、5-HT 再取込み阻害薬および D<sub>2,3,4</sub> 受容体 antagonist は bLF の持つストレス軽減効果に対して一貫した影響を及ぼさなかったが、5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体 antagonist は bLF の作用を用量依存性に阻害した。したがって、bLF の作用機序には 5-HT<sub>2A/2C</sub> 受容体の関与が含まれるものと考えられた。

## 2. bLF のストレス軽減効果における生化学的解析

脳内各部位のモノアミン含量を測定し、新奇環境ストレスまたは FS ストレスと bLF 投与の影響を比較した。新奇環境負荷を行った Saline 群では、側坐核および縫線核の NE 量が増加し、大脳皮質の DA、DOPAC、HVA 量も増加傾向を示した。bLF 投与により側坐核の NE 上昇は有意に抑制された。FS ストレスでは、bLF 投与による有意な変化はみられなかった。したがって、新奇環境ストレスに伴うこれらモノアミンの変化は、bLF のストレス軽減効果に関連している可能性が示唆された。

血漿中の ACTH およびコルチコステロンの変動を指標とし、HPA 軸に対する bLF の作用を検討したところ、bLF 投与によって FS 負荷 10 分後の血漿 ACTH 濃度は上昇傾向を示し、安静時の血漿コルチコステロン濃度も上昇傾向を示した。しかしながら、FS 負荷 30 分後の血漿コルチコステロン濃度は bLF 投与によって有意に減少したことから、bLF はグルココルチコイドの負のフィードバックを早期に発動させる可能性が示唆された。

CRF の icv 投与による血漿コルチコステロン濃度上昇に対して、bLF は全く影響しなかったことから、bLF は CRH 分泌よりもさらに上流の機序を修飾する可能性が示唆された。

### 3. LF の脳内移行ならびに腸管吸収効率の向上

ラットの静脈内に bLF を投与し、10 分後に灌流固定して脳を採取し、免疫組織化学的解析を行ったところ、大脳白質の毛細血管内皮細胞に抗-bLF 陽性粒子が検出された。脈絡叢上皮細胞ではさらに多数の抗-bLF 陽性粒子が検出されたことから、bLF の脳内移行は主に脈絡叢を介して行われる可能性が示唆された。

また、bLF の腸管吸収の効率化を目的とし、胃酸・ペプシン消化に耐性を有する腸溶性 bLF を用いて解析を進めた。bLF 溶液を胃内あるいは十二指腸内に投与し、胸管リンパ液中の bLF 濃度を測定すると、胃内投与した腸溶性 bLF は通常の bLF に比べて数倍の濃度でリンパ液へ移行しており、投与後 4 時間の吸収総量では約 10 倍に増加した。一方、十二指腸内に投与すると、腸溶性 bLF と通常の bLF での吸収量に差異は認められず、腸溶性 bLF の吸収効率の向上は主に胃内消化に抵抗することによると考えられた。

以上に述べたように、本研究では、bLF によるストレス軽減効果を明らかにするとともに、その作用機序として、nNOS の活性化による NO 産生を介した内因性オピオイド作用の増強、5-HT 神経および NE 神経の関与、さらには視床下部における CRH 分泌のさらに上流での修飾が関与している可能性を指摘した。これら bLF の作用を目的とした臨床応用に際しては経口投与が不可欠であるが、LF の腸溶化などにより腸管吸収を効率化することも可能であると考えられる。

## 謝 辞

本研究は、原田悦守名誉教授、竹内 崇教授、山本芳実教授、日笠喜朗教授、佐藤 宏教授のご指導のもとで行われたことを記し、深く謝意を表します。また、研究の遂行にあたり、多大なご助言を頂きました杉山晶彦助教に深く感謝いたします。最後に、本研究に素晴らしい結果を与えてくれた動物達に敬意と感謝を捧げます。

## 参考文献

**Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Brewer M and Gauthier JJ.** Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect Immun* 35: 792-799, 1982.

**Baker EN, Baker HM and Kidd RD.** Lactoferrin and transferrin: Functional variations on a common structural framework. *Biochem Cell Biol* 80: 27-34, 2002.

**Bilbo SD, Hotchkiss AK, Chiavegatto S and Nelson RJ.** Blunted stress responses in delayed type hypersensitivity in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *J Neuroimmunology* 140: 41-48, 2003.

**Brock JH.** The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol* 80: 1-6, 2002.

**Cao L, Sun X and Shen E.** Nitric oxide stimulates both the basal and reflex release of vasopressin in anesthetized rats. *Neurosci Lett* 221: 49-52, 1996.

**Civelli O, Bunzow JR and Grandy DK.** Molecular diversity of the dopamine receptors. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol* 33: 281-307, 1993.

**De Deurwaerdère P and Spampinato U.** Role of serotonin(2A) and serotonin(2B/2C) receptor subtypes in the control of accumbal and striatal dopamine release elicited in vivo by dorsal raphe nucleus electrical stimulation. *J Neurochem* 73: 1033-1042, 1999.

**Degli Uberti EC, Salbadori S, Transforini G, Margutti A, Ambrosio MR, Rossi R, Portaluppi F and Pansini R.** Effect of deltorphin on pituitary-adrenal response to insulin-induced hypoglycemia and ovine corticotropin-releasing hormone in healthy man. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 370-374, 1992.

**Deutch AY, Moghaddam B, Innis RB, Krystal JH, Aghajanian GK, Bunney BS and Charney DS.** Mechanisms of action of atypical antipsychotic drugs. Implication for novel therapeutic strategies for schizophrenia. *Schizophr Res* 4: 121-156, 1991.

**Deutch AY.** Heterogeneity of the prefrontal cortical dopamine system in responsiveness to stress. *Soc Neurosci Abstr* 17: 529, 1991.

**Dhonnchadha BAN, Hascoët M, Jolliet P and Bourin M.** Evidence for a 5-HT<sub>2A</sub> receptor mode of action in the anxiolytic-like properties of DOI in mice. *Behav Brain Res* 147: 175-184, 2003a.

**Dhonnchadha BAN, Bourin M and Hascoët M.** Anxiolytic-like effects of 5-HT<sub>2</sub> ligands on three mouse models of anxiety. *Behav Brain Res* 140: 203-214, 2003b.

**Diarra M, Petittclerc D, Deschenes E, Lessard N, Grondin G, Talbot B and Lacasse P.** Lactoferrin against *Staphylococcus aureus* Mastitis. Lactoferrin alone or in combination with penicillin G on bovine polymorphonuclear function and mammary epithelial cells colonisation by *Staphylococcus aureus*. *Vet Immunol Immunopathol* 95: 33-42, 2003.

**Di Matteo V, Di Giovanni G, Di Mascio M and Esposito E.** Biochemical and electrophysiological evidence that RO 60-0175 inhibits mesolimbic dopaminergic function through serotonin(2C) receptors. *Brain Res* 865: 85-90, 2000.

**Fillebeen C, Dehouck B, Benaissa M, Dhennin-Duthille I, Cecchelli R and Pierce A.** Tumor necrosis factor-alpha increases lactoferrin transcytosis through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 73: 2491-2500, 1999.

**Fossan G, Cavanagh ME, Evans CA, Malinowska DH, Møllgård K, Reynolds ML and Saunders NR.** CSF-brain permeability in the immature sheep fetus: a CSF-brain barrier. *Brain Res* 350: 113-124, 1985.

**Gadek-Michalska A and Bugajski J.** Role of nitric oxide in the nicotine-induced pituitary-adrenocortical response. *J Physiol Pharmacol* 55: 443-455, 2004.

**Gingrich JA and Caron MG.** Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Ann. Rev Neurosci* 16: 299-321, 1993.

**Givalois L, Li S and Pelletier G.** Central nitric oxide regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult male rats. *Brain Res Mol Brain Res* 102: 1-8, 2002.

**Glavin GB.** Stress and brain noradrenaline: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 9: 233-243, 1985.

**Gross PM, Teasdale GM and Graham DI.** Intra-arterial histamine increases blood-brain transport in rats. *Am J Physiol* 243: H307-H317, 1982.



**Habgood MD, Knott GW, Dziegielewska KM and Saunders NR.** The nature of the decrease in blood-cerebrospinal fluid barrier exchange during postnatal brain development in the rat. *J Physiol* 468: 73-83, 1993.

**Hagiwara S, Kawai K, Anri A and Nagahata H.** Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *J Vet Med Sci* 65: 319-323, 2003.

**Harada E, Araki Y, Furumura E, Takeuchi T, Sitizyo K, Yajima T and Kuwata T.** Characteristic transfer of colostrum-derived biologically active substances into cerebrospinal fluid via blood in natural suckling neonatal pigs. *J. Vet. Med A* 49: 358-364, 2002.

**Harada E, Itoh Y, Sitizyo K, Takeuchi T, Araki Y and Kitagawa H.** Characteristic transport of lactoferrin from the intestinal lumen into the bile via the blood in piglets. *Comparative Biochem Physiol Part A* 124: 321-327, 1999a.

**Harada E, Sugiyama A, Takeuchi T, Sitizyo K, Syuto B, Yajima T and Kuwata T.** Characteristic transfer of colostrum components into cerebrospinal fluid via serum in neonatal pigs. *Biol Neonate* 76: 33-43, 1999b.

**Hayashida K, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K and Harada E.** Novel function of bovine milk-derived lactoferrin on antinociception mediated by mu-opioid receptor in the rat spinal cord. *Brain Res* 965: 239-245, 2003a.

**Hayashida K, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K and Harada E.** Lactoferrin enhances opioid-mediated analgesia via nitric oxide in the rat spinal cord. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R306-R312, 2003b.

**Hayashida K, Kaneko T, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K and Harada E.** Oral Administration of Lactoferrin Inhibits Inflammation and Nociception in Rat Adjuvant-Induced Arthritis. *J Vet Med Sci* 66: 149-154, 2004.

**Hecht K, Hai NV, Moritz V and Hecht T.** [The significance of stress intensity for the emotional and visceral reactivity, especially for blood pressure regulation] *Acta Biol Med Ger* 35: 23-33, 1976.

**Huang PL, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH and Fishman MC.** Targeted disruption of the

neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75: 1273-1286, 1993.

**Iigo M, Kuhara T, Ushida Y, Sekine K, Moore MA, and Tsuda H.** Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice. *Clin Exp Metastasis* 17: 35-40, 1999.

**Iigo M, Shimamura M, Matsuda E, Fujita K, Nomoto H, Satoh J, Kojima S, Alexander DB, Moore MA and Tsuda H.** Orally administered bovine lactoferrin induces caspase-1 and interleukin-18 in the mouse intestinal mucosa: a possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis. *Cytokine* 25: 36-44, 2004.

**Imoto I, Okuda M, Nakazawa T, Miyashiro E, Yamauchi K, Takakura N, Teraguchi S, Tamura Y and Adachi Y.** Suppressive effect of bovine lactoferrin against *Helicobacter pylori*. *Milk Sci* 53: 288-290, 2004.

**Inoue H, Sakai M, Kaida Y and Kaibara K.** Blood lactoferrin release induced by running exercise in normal volunteers: antibacterial activity. *Clinica Chimica Acta* 341: 165-172, 2004.

**Inoue T, Tsuchiya K and Koyama T.** Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 49: 911-920, 1994.

**Ishikado A, Imanaka H, Takeuchi T, Harada E and Makino T.** Liposomalization of lactoferrin enhanced its anti-inflammatory effects via oral administration. *Biol Pharm Bull* 28: 1717-1721, 2005.

**Ji B, Maeda J, Higuchi M, Inoue K, Akita H, Harashima H and Suhara T.** Pharmacokinetics and brain uptake of lactoferrin in rats. *Life Sci* 78: 851-855, 2006.

**Joo F.** Insight into the regulation by second messenger molecules of the permeability of the blood-brain barrier. *Micros Res Tech* 27: 507-515, 1994.

**Kamemori N, Takeuchi T, Hayashida K and Harada E.** Suppressive effects of milk-derived lactoferrin on psychological stress in adult rats. *Brain Res* 1029: 34-40, 2004.

**Kamemori N, Takeuchi T, Sugiyama A, Miyabayashi M, Kitagawa H, Shimizu H, Ando K and Harada E.** Trans-endothelial and trans-epithelial transfer of lactoferrin into the brain through BBB

and BCSFB in adult rats. *J Vet Med Sci* 70: in press, 2008.

**Kawai K, Nagahata H and Shimazaki K.** Effect of infusing lactoferrin hydrolysate into bovine mammary glands with subclinical mastitis. *Milk Science* 53: 301-303, 2004.

**Kawakami H and Lonnerdal B.** Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes. *Am J Physiol* 261: G841-G846, 1991.

**Keilhoff G, Seidel B, Reiser M, Stanarius A, Huang PL, Bogerts B, Wolf G and Bernstein H.** Lack of neuronal NOS has consequences for the expression of POMC and POMC-derived peptides in the mouse pituitary. *Acta Histochem* 103: 397-412, 2001.

**Kim CK and Rivier CL.** Nitric oxide and carbon monoxide have a stimulatory role in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to physico-emotional stressors in rats. *Endocrinol* 141: 2244-2253, 2000.

**Kitagawa H, Yoshizawa Y, Yokoyama T, Takeuchi T, Talukder MJR, Shimizu H, Ando K and Harada E.** Persorption of bovine lactoferrin from the intestinal lumen into the systemic circulation via the portal vein and the mesenteric lymphatics in growing pigs. *J Vet Med Sci* 65: 567-572, 2003.

**Kolesnikov YA, Pan YX, Babey AM, Jain S, Wilson R and Pasternak GW.** Functionally differentiating two neuronal nitric oxide synthase isoforms through antisense mapping: evidence for opposing NO actions on morphine analgesia and tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8220-8225, 1997.

**Kruzel ML, Bacsı A, Choudhury B, Sur S and Boldogh I.** Lactoferrin decreases pollen antigen-induced allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Immunology* 119: 159-166, 2006.

**Kuwata H, Yamauchi K, Teraguchi S, Ushida Y, Shimokawa Y, Toida T and Hayasawa H.** Functional fragments of ingested lactoferrin are resistant to proteolytic degradation in the gastrointestinal tract of adult rats. *J Nutr* 131: 2121-2127, 2001.

**Lee S, Kim CK and Rivier C.** Nitric oxide stimulates ACTH secretion and the transcription of the genes encoding for NGFI-B, corticotropin-releasing factor, corticotropin-releasing factor receptor type 1, and vasopressin in the hypothalamus of the intact rat. *J Neurosci* 19: 7640-7647, 1999.

**Levy PF and Viljoen M.** Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 80: 252-267, 1995.

**Maberly GF, Wait GA, Kilpatrick JA, Loten EG, Gain KR, Stewart RD and Eastman CJ.** Evidence for insulin degradation by muscle and fat tissue in an insulin resistant diabetic patient. *Diabetologia* 23: 333-336, 1982.

**Masson PL, Heremans JF and Dive C.** An iron-binding protein common to many external secretions. *Clin. Chim. Acta.* 14: 735-739, 1966.

**Masson PL and Heremans JF.** Lactoferrin in milk from different species. *Comp Biochem Physiol B* 39: 119-129, 1971.

**Matheson GK, Knowles A, Gage D, Michel C, Guthrie D, Bauer C, Blackbourne J and Weinzapfel D.** Modification of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity by serotonergic agents in the rat. *Pharmacology* 55: 59-65, 1997.

**Matsumoto M, Yoshioka M, Togashi H, Tochiwara M, Ikeda T and Saito H.** Modulation of norepinephrine release by serotonergic receptors in the rat hippocampus as measured by in vivo microdialysis. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 1044-1051, 1995.

**Matsuzawa S, Suzuki T and Misawa M.** Involvement of  $\mu$ -opioid receptor in the salsolinol-associated place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *Alcohol Clin Exp Res* 24: 366-372, 2000.

**McCann SM, Karanth S, Kimura M, Yu WH and Rettori V.** The role of nitric oxide (NO) in control of hypothalamic-pituitary function. *Rev Bras Biol [Suppl 1]* 56: 105-112, 1996.

**Miehlke S, Reddy R, Osato MS, Ward PP, Conneely OM and Graham DY.** Direct activity of recombinant human lactoferrin against *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 34: 2593-2594, 1996.

**Miller DG and Mallov S.** Quantitative determination of stress-induced myocardial damage in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 7: 139-145, 1977.

**Miura K, Ochi J, Nishikawa H and Torii A.** Clinical effect of administered bovine lactoferrin against type C chronic hepatitis. *Milk Sci* 53: 291-293, 2004.

**Momotani E, Yoshii M, Watanabe N, Takahashi A and Yamauchi K.** Promotion of grease heel healing by lactoferrin in thoroughbreds. *Milk Sci* 53: 299-300, 2004.

**Morean JI, Kilpatrick G and Jenck F.** Urocortin, a novel neuropeptide with anxiogenic-like properties. *NeuroReprod* 8: 1697-1701, 1997.

**Nabeshima T, Katoh A, Hiramatsu M and Kameyama T.** A role played by dopamine and opioid neuronal system in stress-induced motor suppression (conditioned suppression of motility) in mice. *Brain Res* 398: 354-360, 1986.

**Nabeshima T, Katoh A, Wada M and Kameyama T.** Stress-induced changes in brain Met-enkephalin, Leu-enkephalin and dynorphin concentrations. *Life Sci* 51: 211-217, 1992.

**Nelson RJ, Kriegsfeld LJ, Dawson VL and Dawson TM.** Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior. *Front Neuroendocrinol* 18: 463-491, 1997.

**Nielsen NS, Petersen A, Meyer AS, Timm-Heinrich M and Jacobsen C.** Effects of lactoferrin, phytic acid, and EDTA on oxidation in two food emulsions enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Agric Food Chem* 52: 7690-7699, 2004.

**Nolan JK and Mine Y.** Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y. *J Immunol Meth* 296: 199-209, 2005.

**Okada S, Tanaka K, Sato T, Ueno H, Saito S, Okusaka T, Sato K, Yamamoto S and Kakizoe T.** Dose-response trial of lactoferrin in patients with chronic hepatitis C. *Jpn J Cancer Res* 93: 1063-1069, 2002.

**Ota M, Crofton JT, Festavan GT and Share L.** Evidence that nitric oxide can act centrally to stimulate vasopressin release. *Neuroendocrinol* 57: 955-959, 1993.

**Paulsen EP, Courtney JW 3<sup>rd</sup> and Duckworth WC.** Insulin resistance caused by massive degradation of subcutaneous insulin. *Diabetes* 28: 640-645, 1979.

**Petrillo P, Tavani A, Verotta D, Robson LE and Kosterlitz HW.** Differential postnatal development of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid binding sites in rat brain. *Dev Brain Res* 31: 53-58, 1987.

**Prieels JP, Pizzo SV, Glasgow LR, Paulson JC and Hill RL.** Hepatic receptor that specifically binds oligosaccharides containing fucosyl-1, leads to 3N-acethylglucosamine linkages. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 2215-2219, 1978.

**Raber J, Koob GF and Bloom FE.** Interleukin-2 (IL-2) induces corticotropin-releasing factor (CRF) release from the amygdala and involves a nitric oxide-mediated signaling; comparison with the hypothalamic response. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 815-824, 1995.

**Regoeczi E, Chindemi PA, Debanne MT and Prieels JP.** Lactoferrin catabolism in the rat liver. *Am J Physiol* 248: G8-G14, 1985.

**Rivier C.** Endogenous nitric oxide participates in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by noxious stimuli. *Endocrinol* 2: 367-373, 1994.

**River C.** Role of nitric oxide and carbon monoxide in modulating the ACTH response to immune and nonimmune signals. *Neuroimmunomodulation* 5: 203-213, 1998.

**Saffran M, Kumar GS, Savariar C, Burnham JC, Williams F and Neckers DC.** A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs. *Science* 233: 1081-1084, 1986.

**Sakaue M, Somboonthum P, Nishihara B, Koyama Y, Hashimoto H, Baba A and Matsuda T.** Postsynaptic 5-hydroxytryptamine(1A) receptor activation increases in vivo dopamine release in rat prefrontal cortex. *Br J Pharmacol* 129: 1028-1034, 2000.

**Sato R, Inanami O, Tanaka Y, Takase M and Naito Y.** Oral administration of bovine lactoferrin for treatment of intractable stomatitis in feline immunodeficiency virus (FIV)-positive and FIV-negative cats. *Am J Vet Res* 57: 1443-1446, 1996.

**Sato Y, Wada H, Horita H, Suzuki N, Shibuya A, Adachi H, Kato R, Tsukamoto T and Kumamoto Y.** Dopamine release in the medial preoptic area during male copulatory behavior in rats. *Brain Res* 692: 66-70, 1995.

**Seeman P and van Tol HH.** Dopamine receptor pharmacology. *Trend Pharmacol Sci* 15: 264-269, 1994.

**Seo DO, Lee SY and Rivier CL.** Comparison between the influence of shocks and endotoxemia on

the activation of brain cells that contain nitric oxide. *Brain Res* 998: 1-12, 2004.

**Sokoloff P and Schwartz JC.** Novel dopamine receptors half a decade later. *Trend Pharmacol Sci* 16: 270-275, 1995.

**Strahan ME, Crowe A and Morgan EH.** Iron uptake in relation to transferrin degradation in brain and other tissues of rats. *Am J Physiol* 263: R924-R929, 1992.

**Takeuchi T, Hayashida K, Inagaki H, Kuwahara M, Tsubone H and Harada E.** Opioid mediated suppressive effect of milk-derived lactoferrin on distress induced by maternal separation in rat pups. *Brain Res* 979: 216-224, 2003.

**Takeuchi T, Kitagawa H and Harada E.** Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adults rat. *Exp Physiol* 89: 263-270, 2004.

**Talukder MJ, Takeuchi T and Harada E.** Transport of colostral macromolecules into the cerebrospinal fluid via plasma in newborn calves. *J Dairy Sci* 85: 514-524, 2002.

**Talukder MJR, Takeuchi T and Harada E.** Characteristics of lactoferrin receptor in bovine intestine: higher binding activity to the epithelium overlying Peyer's patches. *J Vet Med A* 50: 123-131, 2003a.

**Talukder MJ, Takeuchi T and Harada E.** Receptor-mediated transport of lactoferrin into the cerebrospinal fluid via plasma in young calves. *J Vet Med Sci* 65: 957-964, 2003b.

**Tanaka T, Nakatani S, Xuan X, Kumura H, Igarashi I and Shimazaki K.** Antiviral activity of lactoferrin against canine herpesvirus. *Antiviral Res* 60: 193-199, 2003.

**Teschemacher H.** Lactoferrin elicits opioid-mediated antinociception without development of tolerance: central nNOS-1 set off duty? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R302-305, 2003.

**Tsuchiya T, Takeuchi T, Hayashida K, Shimizu K, Ando K and Harada E.** Milk derived lactoferrin may block tolerance to morphine analgesia. *Brain Res* 1068: 102-108, 2006.

**Turnbull AV, Kim CK, Lee S and Rivier CL.** Influence of carbon monoxide, and its interaction

with nitric oxide, on the adrenocorticotropin hormone response of the normal rat to a physico-emotional stress. *J Neuroendocrinol* 10: 793-802, 1998.

**Van den Berg CL, Lamberts RR, Wolterink G, Wiegant VM and Van Ree JM.** Emotional and footshock stimuli induce differential long-lasting behavioral effects in rats; involvement of opioids. *Brain Res* 799: 6-15, 1998.

**Vernikos J, Dallman MF, Bonner C, Katzen A and Shinsako J.** Pituitary-adrenal function in rats chronically exposed to cold. *Endocrinology* 110: 413-420, 1982.

**Westergaard E, Go KG, Klatzo I and Spatz M.** Increased permeability of cerebral vessels to horseradish peroxidase induced by ischemia in Mongolian gerbils. *Acta Neuropath (Berl)* 35: 307-325, 1976.

**Westergaard E, van Deurs B and Brondsted HE.** Increased vesicular transfer of horse-radish peroxidase across cerebral endothelium, evoked by acute hypertension. *Acta Neuropath (Berl)* 37: 141-152, 1977.

**Wolf JS, Li G, Varadhachary A, Petrak K, Schneyer M, Li D, Ongkasuwan J, Zhang X, Taylor RJ, Strome SE and O'Malley BW Jr.** Oral lactoferrin results in T cell-dependent tumor inhibition of head and neck squamous cell carcinoma in vivo. *Clin Cancer Res* 13: 1601-1610, 2007.

**Yamauchi K, Hiruma M, Yamazaki N, Wakabayashi H, Kuwata H, Teraguchi S, Hayasawa H, Suegara N and Yamaguchi H.** Oral administration of bovine lactoferrin for treatment of tinea pedis. A placebo-controlled, double-blind study. *Mycoses* 43: 197-202, 2000.

**Yoshioka M, Matsumoto M, Togashi H and Saito H.** Effects of conditioned fear stress on 5-HT release in the rat prefrontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 515-519, 1995.

**Yumoto Y, Fujiwara J, Ikeda M, Kobayashi T and Nakashima K.** Distributions of human lactoferrin on a dental root surface and its roles in the pathogenesis of periodontitis. *Milk Sci* 53: 285-287, 2004.

**Ziere GJ, Van Dijk MCM, Bijsterbosch MK and van Berkel TJC.** Lactoferrin uptake by the rat liver. Characterization of the recognition site and effect of selective modification of arginine residues. *J Biol Chem* 267: 11229-11235, 1992.