

LPS 誘発血液脳関門機能低下マウスにおける イブプロフェンの脳移行性に対する葛根湯併用の影響

大原 厚祐 ・ 小林 大介 ・ 秋元 雅之

【要旨】

葛根湯は、炎症下において、血液脳関門(BBB)の排出トランスポーターである Organic anion transporter 3 (OAT3) をアップレギュレートさせる。このことについては、既報において示した¹⁾。葛根湯は臨床汎用薬であり、非ステロイド性解熱鎮痛消炎剤 (NSAIDs) と併用される可能性が高い。また、多くの NSAIDs は OAT3 の基質である。そのため両者の併用による薬物相互作用は、NSAIDs の脳内濃度の低下を招く可能性がある。そこで、一般薬としても使用頻度の高いイブプロフェンと葛根湯の薬物相互作用について検討した。Lipopolysaccharide (LPS) 誘発 BBB 機能低下マウスにイブプロフェンと葛根湯を投与して、イブプロフェンの脳対血漿中濃度比 (BPR) を測定した。葛根湯を投与せず、LPS の有無による比較では、脳中イブプロフェン濃度に差は認められなかったが、投与後 5 分の BPR は、LPS 群で有意に高かった。また、LPS 誘発炎症下に葛根湯とイブプロフェンを併用すると、投与後 5 分および 60 分において BPR は有意に上昇した。これらのことから、イブプロフェンの脳中濃度には、OAT3 のみならず、他の要因が影響していると考えられ、今後さらなる検討が必要である。

キーワード：イブプロフェン、葛根湯、Organic anion transporter 3、血液脳関門、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²⁾。これは、炎症による血液脳関門 (BBB) の機能低下に伴い、主として OP の代謝物であるオセルタミビルカルボキシレート (OC) の脳移行性が亢進した結果生じる副作用と考えられている³⁾。

これまでに著者は、Lipopolysaccharide (LPS) 誘発 BBB 機能低下マウスに、OC を投与すると脳移行性が亢進し、これに葛根湯を併用すると OC の脳移行性が抑制されることを報告している¹⁾。さらに、この葛根湯による OC の脳移行抑制効果は、脳から血液方向への排出

輸送に関わる Organic anion transporter 3 (OAT3) のアップレギュレーションによるものと推定された。これらのことから、葛根湯と OAT3 の基質となる薬物の併用は、脳移行性の抑制を介した薬物相互作用を示す可能性がある。

非ステロイド性解熱鎮痛消炎剤 (NSAIDs) の多くは OAT3 の基質である⁴⁾。なかでも、イブプロフェンは汎用薬であり、日本の医療現場において、葛根湯と併用されうる薬物である。しかしながら、これらの併用に関する研究はない。イブプロフェンは葛根湯との併用により脳移行性が低下し、解熱鎮痛効果の低下を招いている可能性がある。一方で、副作用の観点からは、脳炎・脳症の悪化を招くことで著名なジクロフェナク⁵⁾のような NSAIDs の場合、葛根湯の併用は中枢性の副作用回避方法につながるかもしれない。

そこでまず、本研究では、葛根湯の併用がイブプロフェンの脳移行性にどのような影響を与えるのか、検討することとした。

2. 方法

2.1 試薬および実験材料

イブプロフェン塩酸塩、インドメタシン、ヘパリンナトリウム塩、リン酸、LPS はシグマ-アルドリッチ社 (MO、アメリカ) から購入した。葛根湯は株式会社ツムラ (lot : H44002、東京、日本) から購入した。その他の試薬は市販特級もしくは高速液体クロマトグラフ用を購入して用いた。

2.2 実験動物

雄性 C57BL/6 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 : H28020)。

2.3 BBB 機能低下マウスの作成と葛根湯の投与

本研究の実験プロトコールを Fig. 1 に示す。雄性 C57BL/6 マウスを 17 時間絶食した後、LPS (3 mg/kg, 0.2 mL) または生理食塩液 (0.2 mL) を腹腔内投与し、投与後 6 時間、24 時間後に同量を計 3 回投与し、BBB 機能低下マウスを作成した。また、腹腔内投与と同時に生理食塩液 (0.1 mL) または葛根湯 (0.125 g/kg, 0.1 mL) を経口投与した。生理食塩液のみを投与した LPS 非投与マウスを非炎症群 (Saline-Saline : SS 群) とし、BBB 機能低下マウスに生理食塩液もしくは葛根湯を経口投与した群をそれぞれ炎症群 (LPS-Saline : LS 群)、葛根湯群 (LPS-kakkonto : LK 群) とした。

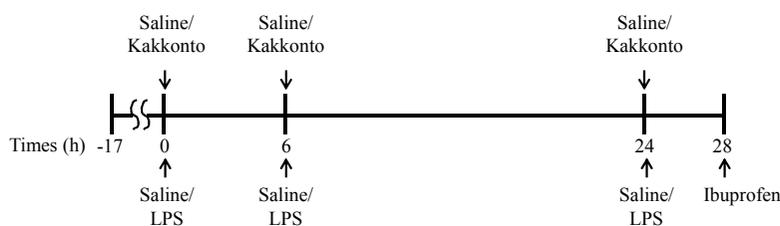


Fig. 1 Experimental protocol for the animal study.

2.4 イブプロフェンの血中および脳中濃度の測定

イブプロフェン塩酸塩 (20 mg/kg) は3回目のLPS投与から4時間後に尾静脈から投与した。イブプロフェン投与後5、30、60、120分において、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。

イブプロフェンの血中および脳中濃度はHPLC-UVを用いて測定した⁶⁾。血液は遠心分離 (12,000×g, 10 min, 4°C) し、その上清を血漿サンプルとした。血漿サンプル (70 μL) に、1 M塩酸 (35 μL) を加えて5分間振とうし、さらにアセトニトリル (700 μL) を加えて2分間振とうした後、遠心分離 (5,500×g, 5 min, 4°C) し、その上清を採取した。上清 (750 μL) を、窒素気流下 40°Cで濃縮乾固した。

摘出した脳は、PBS (1.2 mL, pH 7.4) および内部標準物質としてインドメタシン (1.25 μg/mL, 200 μL) を加えて氷中でホモジナイズを行った。脳ホモジネートは、2 M塩酸 (120 μL) を加えて5分間振とうし、さらにアセトニトリル (1,600 μL) を加えて2分間振とうした後、遠心分離 (7,500×g, 10 min, 4°C) し、その上清を採取した。上清 (2,400 μL) に純水 (800 μL) を加え、C18 Solid phase extraction cartridges (Discovery DSC-18; Supelco, Bellefonte, PA, アメリカ) を用いて固相抽出を行った。抽出物を窒素気流下 40°Cで濃縮乾固した。乾固物はHPLCによる測定まで-45°Cで保存した。

HPLCシステムは、LC-20Aポンプ、DGU-20A₃脱気装置、SPD-20A紫外・可視吸光度検出器、CBM-20Aシステムコントローラー (島津製作所、京都、日本)、TSK-gel ODS-80TM (4.6×250、東ソー株式会社、東京、日本) から構成され、これを定量に用いた。サンプル中のイブプロフェン濃度は、波長 222 nmにより測定した。移動相には、アセトニトリル: 20 mMリン酸緩衝液 (pH 2.5) = 55 : 45、流速は 1.0 mL/minとした。

乾固物は55%アセトニトリル水 (血漿: 140 μL、脳: 200 μL) で再構築し、メンブランフィルター (Millex®-GV₄、孔径: 0.22 μm、MILLIPORE、アメリカ) で濾過した。そのうち 40 μLをHPLCに注入した。

2.5 統計解析

データは平均値±S.E.M.として表記し、結果の解析には、Tukey-Kramer testを用いた。

3. 結果

3.1 イブプロフェンの血中および脳中濃度

Fig. 2 にはイブプロフェンの血中および脳中濃度のプロファイルを示す。イブプロフェンの血中濃度は、5分、30分、60分においてSS群と比較してLS群およびLK群で有意に低値を示した。イブプロフェンの脳中濃度は、SS群とLS群を比較すると差は認められなかった。LK群のイブプロフェン脳中濃度は、LS群と比較して5分および60分で有意に高値を示した。

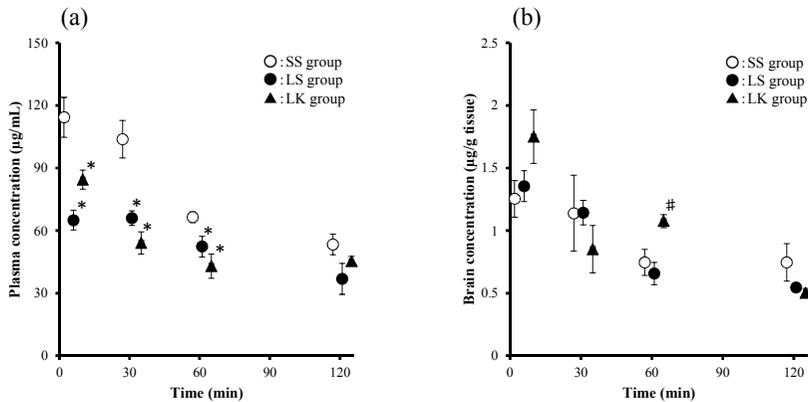


Fig. 2 Plasma (a) and Brain (b) concentrations versus time profiles of ibuprofen after the administration of ibuprofen to mice with lipopolysaccharide induced inflammation. Data represent the means \pm S.E.M. of 3 mice. * $P < 0.05$ vs. SS group, # $P < 0.05$ vs. LS group, Tukey-Kramer test.

Fig. 3 には、イブプロフェンの脳対血漿中濃度比 (Brain-to-Plasma concentration ratio : BPR) を時間ごとに示した。SS群とLS群のBPRを比較すると、イブプロフェン投与後5分においてLS群で有意に高く、30分において高い傾向を示した。また、LK群のBPRは、SS群と比較すると、イブプロフェン投与後5分および60分において有意に高く、LS群と比較すると、60分において有意に高値を示した。

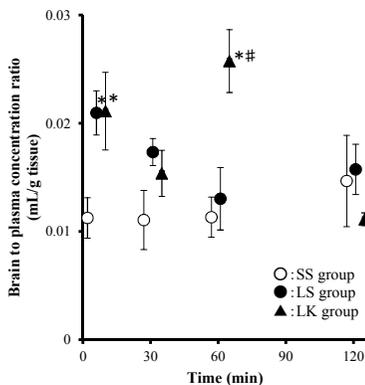


Fig. 3 Brain to plasma concentration ratio versus time profiles of ibuprofen after the administration of ibuprofen to mice with lipopolysaccharide induced inflammation. Data represent the means \pm S.E.M. of 3 mice. * $P < 0.05$ vs. SS group, # $P < 0.05$ vs. LS group, Tukey-Kramer test.

4. 考 察

イブプロフェンはタンパク結合率が99%以上と高いことが知られている。LPSは、血中のアルブミン値を低下させ、また、葛根湯を投与してもアルブミン値は回復しないことから（データは示していない）、LS群およびLK群で血中の総イブプロフェン濃度が低下した原因は、アルブミンの低下によるものと考えられた（Fig. 2 (a)）。すなわち、LS群およびLK群では、LPS投与により血管透過性が亢進し、これに伴いアルブミンが減少し、同時にアルブミンと結合したイブプロフェンが組織側に移行し、血中濃度の低下を招いたことが強く示唆された。

LPSによる炎症は、OAT3をダウンレギュレートさせ、葛根湯はこれを回復させる¹⁾。Fukudaらは、シガ毒素誘発の炎症により、ジクロフェナクおよびメフェナム酸の脳移行性が亢進することを報告しており、OAT3の関与を示唆している⁷⁾。このことから、同じNSAIDsであるイブプロフェンも炎症により脳中濃度が上昇すると予想していた。しかしながら、LS群とSS群では、イブプロフェンの脳中濃度に差は認められず、OAT3のダウンレギュレーションの影響は認められなかった（Fig. 2 (b)）。OAT3との基質親和性は、ジクロフェナクとイブプロフェンとでほぼ等しい⁴⁾。そのため、イブプロフェンの脳中濃度の変化には、OAT3だけでは説明できない別の要因があると考えられた。

一方、LK群ではイブプロフェン投与後60分においてSS群およびLS群と比較して、有意に脳中濃度およびBPRが高値を示した（Figs. 2 (b) and 3）。これは、当初の作業仮説とは逆の現象であった。葛根湯が既報¹⁾のようにOAT3をアップレギュレートさせていることを前提とすると、イブプロフェンの脳中濃度は低下するはずである。そのため、脳移行過程において、OCとは異なる、他の機序の影響を考慮しなければならない。しかしながら、調べ得た限りでは、これを考察することのできる報告は見当たらず、今後の検討課題である。

【引用文献】

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) Oshima S., Nemoto E., Kuramochi M., Saitoh Y., Kobayashi D., *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**, 1397–1400 (2009).
- 4) Burckhardt G., *Pharmacol. Ther.*, **136**, 106–130 (2012).
- 5) 製薬企業（33社）、緊急安全性情報 - インフルエンザ脳炎・脳症患者に対するジクロフェナクナトリウム製剤の使用について - (2000).
- 6) Mannila A., Rautio J., Lehtonen M., Järvinen T., Savolainen J., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **24**, 101–105 (2005).
- 7) Fukuda M., Kitaichi K., Abe F., Fujimoto Y., Takagi K., Takagi K., Morishima T., Hasegawa T., *J. Pharmacol. Sci.*, **97**, 525–32 (2005).

Effect of combination therapy with kakkonto on the penetration of ibuprofen to the brain in mice with lipopolysaccharide (LPS)-induced blood-brain barrier disruption

Kousuke Ohara, Daisuke Kobayashi, Masayuki Akimoto

Abstract

Kakkonto was previously reported to upregulate the organic anion transporter 3 (OAT3), which acts as an efflux transporter at the blood-brain barrier (BBB) during inflammation¹⁾. Kakkonto is a clinical generic drug that is likely to be used with non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which are mostly OAT3 substrates. The drug interaction that occurs following the combined administration of both agents can decrease the brain concentration of NSAIDs. Therefore, in this study, we examined the drug interaction between the frequently used generic drug ibuprofen and kakkonto. The brain-to-plasma concentration ratio (BPR) of ibuprofen was determined following its combined administration with kakkonto to mice with lipopolysaccharide (LPS)-induced BBB disruption. Without kakkonto administration, no difference was observed in the brain ibuprofen concentration when the BPR with and without LPS-stimulation were compared. However, 5 minutes after ibuprofen administration, the BPR was significantly higher in the LPS-stimulated group than in the unstimulated group. Cotreatment with kakkonto and ibuprofen during LPS-induced inflammation increased the BPR significantly 5 and 60 minutes after administration. These results indicate that in addition to OAT3, other factors also have an effect on the ibuprofen brain concentration; and further research is needed to elucidate this in the future.

Keywords: Ibuprofen, Kakkonto, Organic anion transporter 3, Blood-Brain Barrier, Inflammation