

LPS および CpG-DNA 投与ラットにおける digoxin 体内動態の変動

加藤隆児*, 井尻好雄, 田中一彦

Effects of LPS and CpG-DNA on Digoxin Pharmacokinetics

Ryuji KATO, Yoshio IJIRI, and Kazuhiko TANAKA

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 22, 2008; Accepted November 18, 2008)

Lipopolysaccharide (LPS) is a highly bioactive substance that can cause local and systemic damages to various organs in both humans and animals, even at very low doses. Deoxyribonucleic acid (DNA) from bacteria or viruses has been reported as one of the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that can induce endotoxemia-like inflammation in animals. We have reported that digoxin pharmacokinetics was changed by the administration of LPS or bacterial DNA containing unmethylated CpG motifs (CpG-DNA) in rats. However, there has been no report concerning the effects of LPS or CpG-DNA administration on the difference in digoxin pharmacokinetics. In this study, we compared the pharmacokinetics of digoxin as a probe ligand for a two-compartment model in a transient inflammatory model induced either by LPS or CpG-DNA. We also examined the changes in digoxin pharmacokinetics in rats after LPS or CpG-DNA administration. In addition, plasma concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and nitrite/nitrate (NOx) were determined after LPS or CpG-DNA administration (5 mg/kg, ip). The area under the plasma concentration-time curve (AUC_{po}) of digoxin increased significantly on Days 1-3 after LPS and CpG-DNA administration ($P < 0.05$). On Day 5 after LPS and CpG-DNA administration, there were no significant differences in either AUC_{po} or clearance compared with the control group. The elimination rate constant remained relatively unchanged throughout the experiment. The changes in digoxin pharmacokinetics in rats were similar for both LPS and CpG-DNA administration, but the amounts of plasma TNF- α , IL-1 β , and NOx production were significantly higher with LPS administration than with CpG-DNA administration. These findings suggest that a transient inflammatory condition is stronger when induced by LPS (5 mg/kg) than when induced by CpG-DNA (5 mg/kg), but the changes in digoxin pharmacokinetics in rats are influenced by both in a similar way.

Key words—lipopolysaccharide; CpG-DNA; digoxin; absorption; distribution

1. はじめに

Lipopolysaccharide (LPS) は多糖, 脂質, リン酸からなるグラム陰性菌の細胞外膜の主要構成成分で, 微量で諸臓器にさまざまな障害を起こす生理活性の高い物質である^{1,2)}. LPS は tumor necrosis

factor- α (TNF- α) および interleukin-1 β (IL-1 β) などのサイトカインの産生, 遊離に關与し, 発赤, 発熱, 腫張, 疼痛などの炎症反応を伴う局所性および全身性の多様な病態生理学的反応を惹起する³⁾. 一方, バクテリアまたはウイルス由来の DNA も pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)

* 大阪薬科大学 臨床薬剤学研究室, e-mail: rkato@gly.oups.ac.jp
本論考は, 加藤隆児の博士論文をもとに再構成したものである.

の1つであり、エンドトキシン様の炎症を誘発することが報告されている⁴⁾。その機序としては、エンドサイトーシスにより細胞内に侵入した非メチル化シトシン-リン酸-グアニンモチーフを含むDNA (CpG-DNA) が後期エンドソーム/リソソームにて Toll-like receptor (TLR) 9 により認識され nuclear factor kappa B (NF- κ B) の活性化が起こり、それにより炎症性サイトカインが産生されると考えられている⁴⁾。

現在までに我々は、LPS および CpG-DNA 投与により惹起された炎症時において、薬物体内動態が変動することを報告しているが^{5,6)}、変動の程度について両者を比較検討した報告はなされていない。

そこで、ラットに LPS および CpG-DNA 投与を行い、digoxin 体内動態に及ぼす LPS および CpG-DNA の影響について投与5日後までラットを用い比較検討した。また、炎症性サイトカイン (TNF- α および IL-1 β) および NOx の挙動についても検討した。

2. 材料および方法

2-1. 薬剤および試薬

LPS (*Escherichia coli*, Lot No. 064K4010, Sigma-Aldrich Co., MO, USA), CpG-DNA (*Escherichia coli*, Lot No. 084K4008, Sigma-Aldrich Co., MO, USA) および digoxin (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) を用いた。その他の試薬は特級品を用いた。

2-2. 実験動物

通常飼育の条件下にある Wistar ST 系雄性ラット (体重: 約 300 g, 8-9 週齢, Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan) を用いた。動物は温度 24 \pm 1 $^{\circ}$ C, 湿度 55 \pm 10%, 照明時間 6:00 ~ 18:00 の環境下で、水道水および固形試料 (NMF, Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) を自由に

摂取させ、1週間以上予備飼育を行った。全ての実験は、大阪薬科大学動物施設使用ガイドラインに従って行った。

2-3. Digoxin 経口投与実験

2-3-1. 投与薬液の調製

Digoxin を生理食塩液に溶解し、0.1 mg/mL 溶液を調製し、投与量が 0.1 mg/kg となるようにした。LPS については、生理食塩液を用いて 2.5 mg/mL となるように調製し、投与量が 5 mg/kg となるようにした。CpG-DNA については、生理食塩液を用いて 1.25, 2.5, 5 mg/mL となるように調製し、投与量が 2.5, 5, 10 mg/kg となるようにした。

2-3-2. 手術法および薬液投与方法

一晩絶食したラットを diethyl ether によって麻酔した後、手術台に背位固定し、頸静脈に 100 U/mL のヘパリン生理食塩液を満たしたポリエチレンチューブ (PE50, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) を用いてカニューレーションを施した。血液凝固を防止するため、カニューレより 100 U/mL のヘパリン生理食塩液を 0.1 mL 注入し、クレンメで止めた。LPS 投与群においては、LPS (5 mg/kg) を腹腔内投与し、投与 1, 2, 3, 5 日後に、コントロール群と同様の方法で digoxin の経口投与を行った。コントロール群には生理食塩液 (2.5 mL/kg) を腹腔内投与し、投与 1 日後に経口ゾンデを用いて digoxin (0.1 mg/kg) の経口投与を行った。実験中は、体温維持のために上方からランプで照射した。CpG-DNA 投与群においては、CpG-DNA (2.5, 5, 10 mg/kg) を腹腔内投与し、投与 1 日後に、コントロール群と同様の方法で digoxin の経口投与を行った。また、CpG-DNA (5 mg/kg) においては、投与 2, 3, 5 日後にも、コントロール群と同様の方法で digoxin の経口投与を行った。

2-3-3. 採血

各群とも採血前日から15時間以上絶食とした。採血はdigoxin投与直前、投与後1, 2, 4, 6, 8, 12, 24時間に頸静脈より採血を行った。採血に際しては、頸静脈カニューレより予備採血として血液約0.3 mLを採血した後、本採血として血液約0.5 mLを採血した。予備採血で得た血液は、頸静脈カニューレからラットに戻し、さらに100 U/mLヘパリン生理食塩液約0.1 mLを注入してカニューレを満たした。採血した血液は、予めヘパリン処理したポリエチレンチューブにすばやく移し、遠心機(himac CF16RX, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)を用いて遠心分離を行い(500 × g, 10 min), 得られた血漿250 μLを採取して血漿中濃度測定用サンプルとした。

2-4. Digoxin 濃度の測定

得られた血漿試料200 μLに除タンパク剤(Abbott, IL, USA)200 μLを添加し、試験管ミキサーで30秒間攪拌後、500 × gで5分間遠心分離を行い、上清250 μLを用いて蛍光偏光免疫測定法(FPIA法: TDx Digoxin®, Abbott, IL, USA)によりdigoxinの定量を行った。なお、5 ng/mL以上の濃度については、希釈法により150 ng/mLまで測定を行った。本検討における測定範囲は、0.5-150 ng/mLであり、日内変動および日間変動は5%以内であった。

2-5. 血漿中TNF- α , IL-1 β およびNOxの測定

LPS (5 mg/kg), CpG-DNA (5 mg/kg) および生理食塩液投与前、投与後3, 6, 9, 12時間に, diethyl etherによる麻酔下で、頸静脈より採血(0.5 mL), 除タンパク後、目的物質の測定に供した。

採血した血漿試料を用いて、TNF- α およびIL-1 β をELISA法(Quantikine® TNF α /IL-1 β ,

R&D Systems, MN, USA), NOx はNitric Oxide Assay kit (Fluorometric, Calbiochem, CA, USA)を用いて測定した。

2-6. データ解析

Digoxinの血漿中濃度時間曲線下面積(AUC_{po})を台形近似法にて算出した。Digoxinの経口クリアランス(CL/F)については投与量/AUC_{po}により、消失速度定数(K_{el})は消失相の傾きから算出した。

2-7. 統計解析

統計処理はDunnett検定を用い、両側危険率5%未満(P < 0.05)を有意差ありと判定した。

3. 結果

3-1. Digoxin 経口投与実験

LPS (5 mg/kg) およびCpG-DNA (5 mg/kg) 投与1, 2, 3日後ではコントロール群と比較して、AUC_{po}の有意な増加が認められた。LPS投与1, 2, 3日後およびCpG-DNA投与1, 2日後ではCL/Fの有意な減少が認められた。LPSおよびCpG-DNA投与5日後においてはAUC_{po}, CL/Fとも有意な差は認められなかった。一方、K_{el}に関しては、コントロール群と比較して、CpG-DNA投与群において有意な差は認められなかった(Figure 1, Figure 2, Table 1, Table 2)。

CpG-DNA (2.5, 5, 10 mg/kg) 投与1日後ではコントロール群と比較して、CpG-DNA10 mg/kg投与群において、C_{max}の有意な増加が認められたが、CpG-DNA各投与群間では有意な変動は認められなかった。AUC_{po}については、コントロール群と比較してCpG-DNA投与群において、有意な増加が認められたが、CpG-DNA各投与群間では有意な変動は認められなかった(Figure 3)。

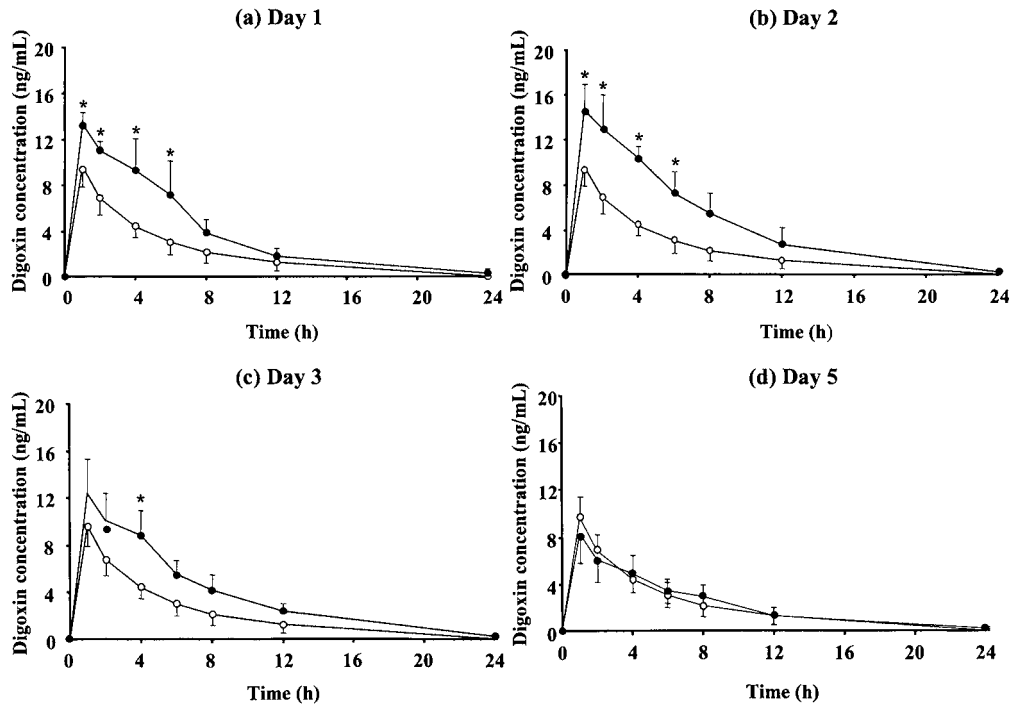


Figure 1. Plasma digoxin concentrations in rats treated with (●) or without (○) LPS (5 mg/kg). LPS was administered to rats intraperitoneally, and digoxin (0.1 mg/kg) was then administered orally on Day 1-3, and Day 5. LPS, lipopolysaccharide. Each bar indicates the standard deviation (mean \pm SD, $n = 4-5$). * $P < 0.05$, compared with the control group.

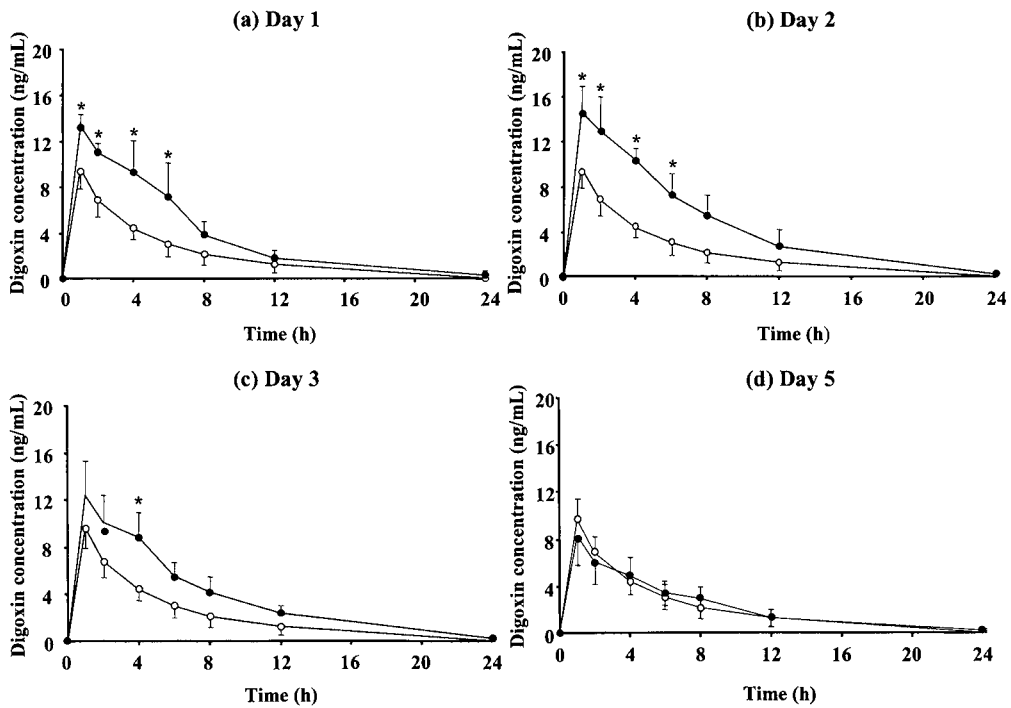


Figure 2. Plasma digoxin concentrations in rats treated with (●) or without (○) CpG-DNA (5 mg/kg). CpG-DNA was administered to rats intraperitoneally, and digoxin (0.1 mg/kg) was then administered orally on Day 1-3, and Day 7. CpG-DNA, bacterial DNA containing unmethylated CpG motifs. Each bar indicates the standard deviation (mean \pm SD, $n = 4-5$). * $P < 0.05$, compared with the control group.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of digoxin in LPS-treated rats

	Control	LPS (5 mg/kg, ip)			
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 5
AUC _{po} (ng·h/mL)	50.7 ± 15.3	88.8 ± 19.6*	94.1 ± 19.4*	85.4 ± 36.7*	43.9 ± 6.32
CL/F (mL/min)	505 ± 141	284 ± 62.6**	252 ± 40.4**	283 ± 110**	581 ± 80.1
Kel (h ⁻¹)	0.10 ± 0.06	0.13 ± 0.05	0.20 ± 0.12	0.18 ± 0.11	0.07 ± 0.02

Digoxin was orally administered on Day 1-3, and Day 5 after LPS administration. Control is no LPS treated group.

LPS, lipopolysaccharide; ip, intraperitoneal administration; AUC, area under the plasma concentration-time curve; CL, total clearance, F, bioavailability; Kel, elimination rate constant.

Data are means ± SD (n = 4-5). Statistical analysis was performed with the use of the Dunnett's test. *P < 0.05, **P < 0.01, compared with Control.

Table 2. Pharmacokinetic parameters of digoxin in CpG-DNA-treated rats

	Control	CpG-DNA (5 mg/kg, ip)			
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 5
AUC _{po} (ng·h/mL)	41.3 ± 5.0	75.7 ± 16.8*	70.3 ± 4.1*	68.1 ± 18.9*	53.7 ± 17.7
CL/F (L/h)	0.60 ± 0.06	0.38 ± 0.10*	0.36 ± 0.03*	0.43 ± 0.11	0.59 ± 0.20
Kel (h ⁻¹)	0.17 ± 0.04	0.18 ± 0.05	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.07

Digoxin was orally administered on Day 1-3, and Day 7 after CpG-DNA administration. Control is no CpG-DNA treated group.

CpG-DNA, bacterial DNA containing unmethylated CpG motifs; ip, intraperitoneal administration; AUC, area under the plasma concentration-time curve; CL, total clearance, F, bioavailability; Kel, elimination rate constant.

Data are means ± SD (n = 4-5). Statistical analysis was performed with the use of the Dunnett's test. *P < 0.05, compared with Control.

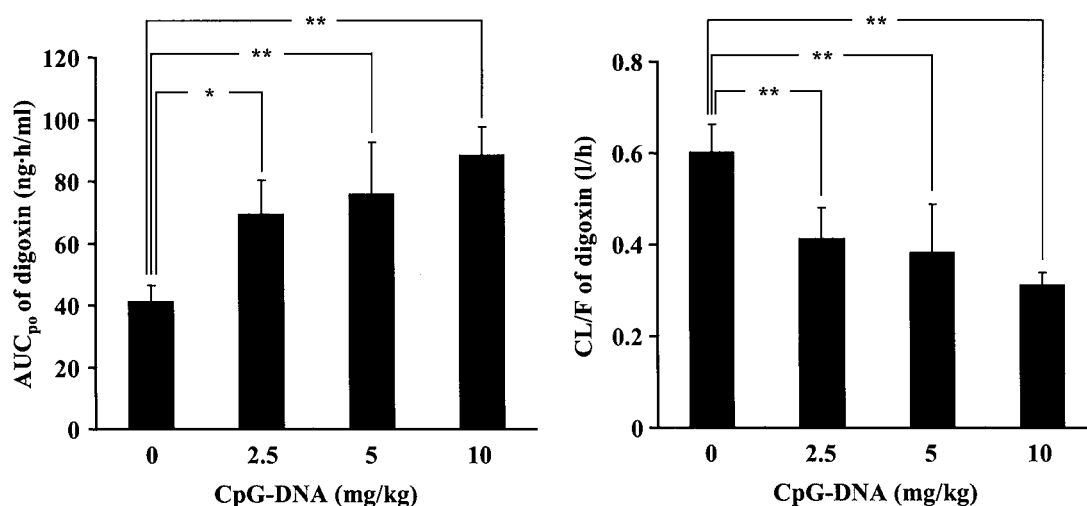


Figure 3. Effects of CpG-DNA (2.5, 5, and 10 mg/kg) on AUC_{po} and CL/F of digoxin.

CpG-DNA or endotoxin-free distilled water was administered to rats intraperitoneally, and digoxin (0.1 mg/kg) was then administered orally on Day 1. No significant differences were observed among the CpG-DNA (2.5, 5, and 10 mg/kg) groups in AUC_{po} and CL/F. AUC, area under the plasma concentration-time curve; CL, total clearance; F, bioavailability; CpG-DNA, bacterial DNA containing unmethylated CpG motifs. Data are means \pm SD (n = 4-5). Statistical analysis was performed with the use of the Tukey test. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, compared with the control group (without CpG-DNA administration).

3-2. 血漿中 TNF- α , IL-1 β および NOx 濃度

3-2-1. LPS 投与群

血漿中 TNF- α 濃度は、コントロール群では血漿中 TNF- α は検出されなかったのに対し、LPS 投与群では LPS 投与後 3, 6 時間に有意に上昇した ($P < 0.05$)。また、その挙動については LPS 投与後 3 時間後に最大値に達し、その後は経時的に減少した (Figure 4a)。血漿中 IL-1 β 濃度は、コントロール群では血漿中 IL-1 β 値は検出されなかったのに対し、LPS 投与群では LPS 投与後 3, 6, 9 時間に有意に上昇した ($P < 0.05$)。また、その挙動については LPS 投与後 6 時間に最大値に達し、その後は経時的に減少した。LPS 投与後 12 時間後ではコントロール群との間に有意な差は認められなかった (Figure 4b)。血漿中 NOx 濃度は、コントロール群と比較して、LPS 投与群では LPS 投与後

6, 9, 12 時間に有意に上昇した ($P < 0.05$)。また、LPS 投与 12 時間までの検討においては、NOx 濃度は LPS 投与 12 時間後が最大であった (Figure 4c)。

3-2-2. CpG-DNA 投与群

血漿中 TNF- α 濃度は、コントロール群と比較して CpG-DNA (5 mg/kg) 投与 3 時間後に有意に上昇し、その後は経時的に減少し 6, 12, 24 時間後には有意な差は認められなかった (Figure 5a)。血漿中 IL-1 β 濃度は、コントロール群と比較して CpG-DNA 投与 6 時間後に有意に上昇し、その後は経時的に減少し 9, 12, 24 時間後には有意な差は認められなかった (Figure 5b)。血漿中 NOx 濃度は、コントロール群と比較して CpG-DNA 投与 12 時間後に有意に上昇し、その後は経時的に

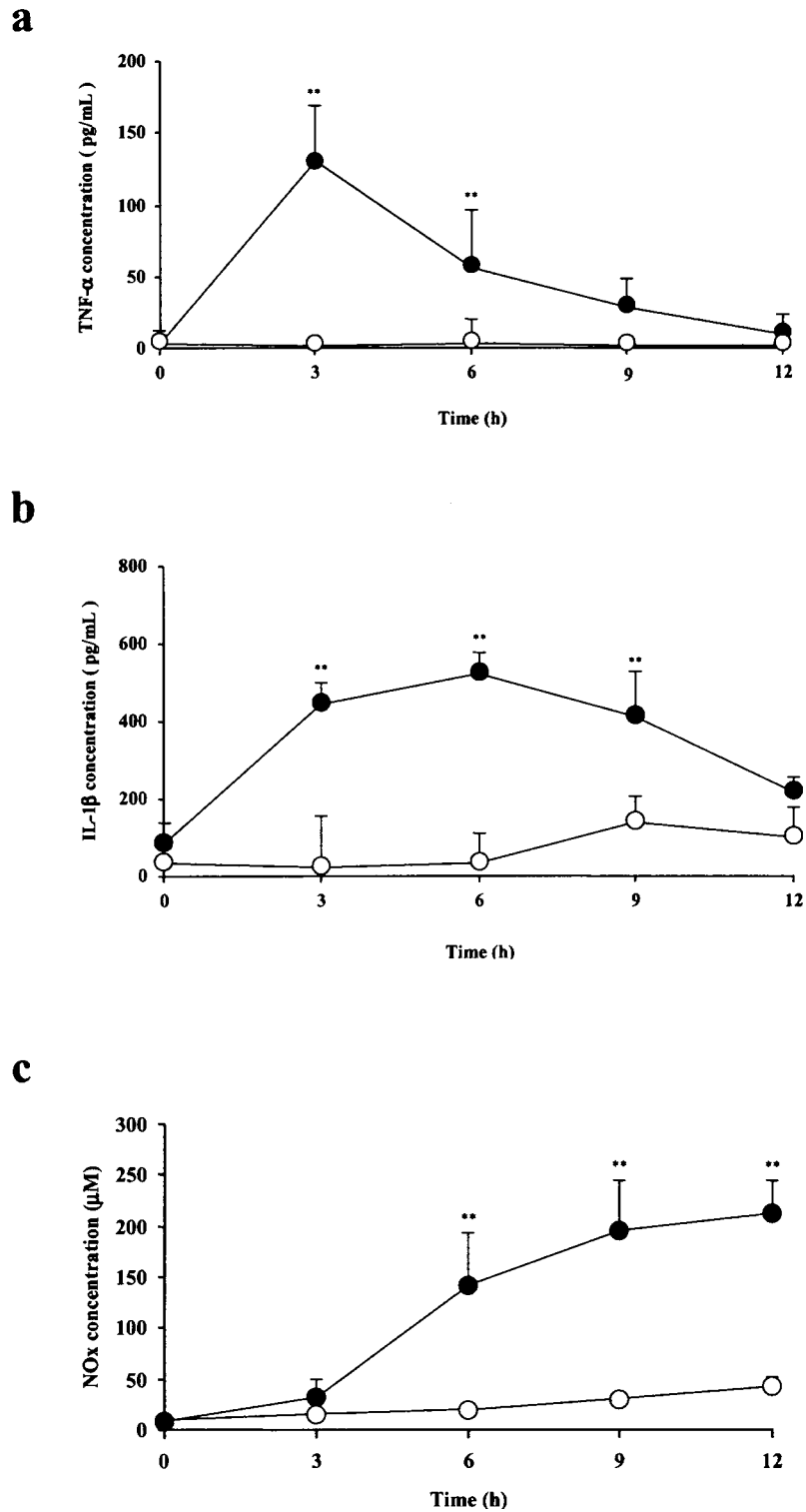


Figure 4 (a) Plasma TNF- α concentrations in rats treated with (●) or without (○) LPS (5 mg/kg). Data are means \pm SD (n = 6-10). (b) Plasma IL1- β concentrations in rats treated with (●) or without (○) LPS (5 mg/kg). Data are means \pm SD (n = 4-6). (c) Plasma NOx concentrations in rats treated with (●) or without (○) LPS (5 mg/kg). Data are means \pm SD (n = 4-7). LPS, lipopolysaccharide; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL-1 β , interleukin-1 β ; NOx, nitrite/nitrate. * P < 0.05, compared with the control group (without LPS administration) at each time point.

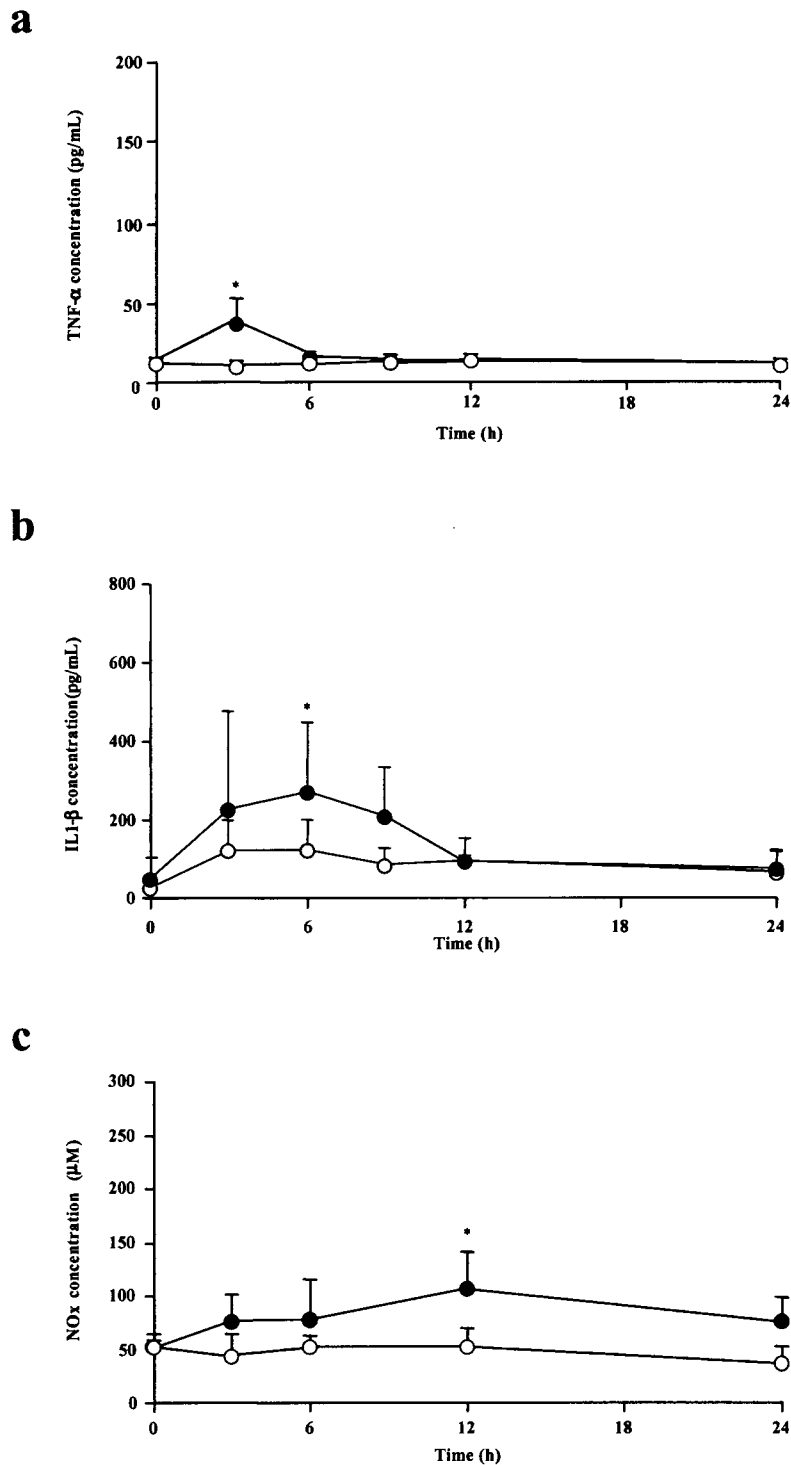


Figure 5 (a) Plasma TNF- α concentrations in rats treated with (●) or without (○) CpG-DNA (5 mg/kg). Data are means \pm SD (n = 6-10). (b) Plasma IL1- β concentrations in rats treated with (●) or without (○) CpG-DNA (5 mg/kg). Data are means \pm SD (n = 4-6). (c) Plasma NO $_x$ concentrations in rats treated with (●) or without (○) CpG-DNA (5 mg/kg). Data are means \pm SD (n = 4-7). CpG-DNA, bacterial DNA containing unmethylated CpG motifs; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL-1 β , interleukin-1 β ; NO $_x$, nitrite/nitrate. * P < 0.05, compared with the control group (without CpG-DNA administration) at each time point.

減少し 24 時間後にはコントロール群との間に有意な差は認められなかったもののコントロール群よりも高い値を示した (Figure 5c).

4. 考察

4-1. 最初の選択的 hH₄R アゴニスト OUP-16

LPS (5 mg/kg) を投与したラットにおいて digoxin 体内動態について検討を行った. Digoxin 経口投与の結果から, LPS 投与 1, 2, 3 日後において AUC_{po} の有意な上昇が認められ, また, LPS 投与 1, 2, 3 日後では CL/F が有意に減少した (Table 1). しかし, LPS 投与 5 日後ではコントロール群に対して有意な差は認められなかったことから LPS 投与による digoxin 体内動態に対する影響は, LPS 投与 1, 2, 3 日後が大きいと考えられた. また, K_{el} が一定であったことから, AUC_{po} が上昇した原因は digoxin の吸収量が増大した可能性が示唆された (Table 1).

次に, CpG-DNA (5 mg/kg) を投与したラットにおいて digoxin 体内動態について検討を行った. CpG-DNA 投与 1, 2, 3 日後ではコントロール群と比較して, AUC_{po} が有意に増加し, また, CpG-DNA 投与 1, 2 日後では CL/F が有意に減少した (Table 2). CpG-DNA 投与 7 日後においては AUC_{po} および CL/F とも有意な差は認められなかった. K_{el} に関しては, コントロール群と比較して, CpG-DNA 投与群において有意な差は認められなかった. これらの結果から, CpG-DNA 投与 1, 2, 3 日後において digoxin の AUC_{po} および CL/F は変動し, その影響は CpG-DNA 投与 1, 2, 3 日後が特に大きいことが明らかとなった. CpG-DNA 投与群において, コントロール群と比較して C_{max} は 10mg/kg 投与で有意な上昇が認められたが, 各投与量群間では有意な変動は認められなかった. AUC についてはコントロール群と比較して各投与量群で有意な増加が認められたが, 各投与量群間では有意な変動は認められなかった. したがって,

投与量と体内動態の変動に関連性が小さいことが示唆された.

LPS 投与ラットにおいて, 炎症性サイトカイン (TNF- α および IL-1 β) および NOx の産生増加が認められた (Figure 4). サイトカインの発現機序としては LPS が TLR 4 により認識され NF- κ B の活性化が起こり, それにより炎症性サイトカインが産生されると考えられている.⁴⁾ CpG-DNA (5 mg/kg) 投与ラットにおける血漿中 TNF- α , IL-1 β および NOx についても, 有意な産生増大が認められた (Figure 5). 血漿中の TNF- α , IL-1 β , および NOx 濃度はそれぞれ CpG-DNA 投与後 3, 6, 12 時間に一過性に上昇し, その後経時的に減少した. サイトカインの発現機序としては, エンドサイトーシスにより細胞内に侵入した CpG-DNA が後期エンドソーム/リソソームにて TLR 9 により認識され NF- κ B の活性化が起こり, それにより炎症性サイトカインが産生されると考えられている.⁴⁾

LPS および CpG-DNA 投与時, TNF- α と比較して IL-1 β および NOx の産生増大が遅れた理由としては, NF- κ B の活性化により TNF- α の産生が誘導され, それに引き続いて IL-1 β および NOx が CpG-DNA 単独または TNF- α を介して誘導されたものと考えられた.

ラットにおいて, digoxin は CYP3A2 で代謝および P-gp で排泄を受けることが報告されている.^{7,8)} また, 炎症時において, CYP3A2 および P-gp の発現量および活性が低下することが報告されている. その原因としては, 炎症性サイトカイン (TNF- α および IL-1 β など) や NOx の関与が考えられている.⁹⁻¹¹⁾ したがって, LPS および CpG-DNA (5 mg/kg) 投与による digoxin 体内動態変動は, 一過性の炎症状態が誘起されたことにより, 炎症性サイトカインや NOx の産生が増大したことによるものと考えられた.

LPS および CpG-DNA (5 mg/kg) 投与時の digoxin (0.1 mg/kg) 投与後の薬物体内動態パラメータを比較すると, 同様の変動を示した (Table

