

【原著・基礎】

Telithromycin のマウスの感染組織への移行に関する研究

前田 巧¹⁾・羽鳥 晶子²⁾・黒岩 浩幸²⁾¹⁾アベンティスファーマ株式会社研究開発本部開発研究所薬物動態研究室*²⁾株式会社生体科学研究所

Telithromycin (TEL) の感染部位への移行を検討するために、感染菌 (*Staphylococcus aureus*) を浸み込ませたペーパーディスクをマウス背部皮下に埋め込んだ感染モデルに 10 mg/kg の ¹⁴C-TEL を経口投与し、全身マクロオートラジオグラフィーおよび感染部位のミクロオートラジオグラフィーを行った。投与 2 時間後にペーパーディスク周辺組織のほぼ全域に放射能が認められ、炎症性細胞分布層、皮筋および骨格筋にまで広く分布した。投与 8 時間後では、多くの組織の放射能が低下したのに対し、感染部位の放射能濃度は維持されており、24 時間後においても肝臓と同程度の放射能が認められた。また、投与 24 時間後における感染組織の総放射能の 72.4% が未変化体として残存していた。感染組織に分布した放射性成分は他の組織に比して滞留時間が長いことが示され、投与後 24 時間において感染部位に分布した放射性成分の多くが未変化体であることから、感染組織に移行した TEL は代謝を受けにくく、投与後早期の分布において感染部位全体に広く分布したのち、白血球を多く含む炎症性細胞の分布層に比較的長く留まるものと推測された。

Key words: telithromycin, autoradiography, microautography, distribution, infection

Telithromycin (TEL) は、*in vitro* の試験系においてヒト食細胞（多形核白血球および腹膜マクロファージ）および組織培養細胞（上皮細胞および繊維芽細胞）において、能動的な取り込みおよび放出が確認されている^{1,2)}。そこで今回感染モデルマウスを用い TEL の感染組織への移行について検討したので報告する。

I. 材料と方法

1. 被験物質

本実験で使用した標識化合物は ¹⁴C-TEL（純度; 98% 以上、比放射能; 1.95 GBq/mmol）であり、非標識 TEL は純度 98.9% であった。

2. 試験動物

ICR 系雄性マウス 6 週齢（日本チャールス・リバー株式会社）を使用した。

3. 菌株の培養

Staphylococcus aureus (ATCC 25923, Lot: 602878) を液体培地 (Muller Hinton Broth, DIFCO) 37℃ でインキュベートして増殖させた後 $2.9 \sim 3.1 \times 10^6$ CFU/50 μ L の菌懸濁液を調製した。

4. 感染マウスの作成

感染マウスは横山ら³⁾の方法に準じ、マウスにエーテル麻酔を施して背部を除毛した後、背部皮膚を切開し、皮下に菌懸濁液 (*S. aureus* ATCC 25923) を 50 μ L 染み込ませたペーパーディスク 1 枚を埋め込んだ。試験には術後 5 日目の感染マウスを使用した。

5. 投与方法および投与量

投与経路は経口とし、絶食（投与前 16 時間以上）下の感染マウスに経口ゾンデを用いて胃内に強制的に投与した。投与後 4 時間までは絶食とした。

感染マウスを用いた全身マクロオートラジオグラフィーおよび代謝物分析試験における投与量は 18.37 MBq/10 mg/5 mL/kg で、感染部位ミクロオートラジオグラフィーでは 18.42 MBq/10 mg/5 mL/kg であった。

6. 感染マウスを用いた全身マクロオートラジオグラフィー

処置後 5 日目の感染マウスに ¹⁴C-TEL を経口投与し、投与後 2, 4, 8, 24 時間にエーテル麻酔死後、麻酔死させたマウスを液体窒素で凍結し、薄切切片を作製した。切片を凍結乾燥させた後、イメージングプレート (BAS III, 富士写真フイルム株式会社) を用いて、組織の放射能強度 (PSL-BG)/mm² を測定した。感染部位に関しては 72 時間露出を行い、オートラジオグラフを得た。オートラジオグラフ作製に用いた感染部位の切片をスキナーで読み画像化した像（切片像）を併記した。

全身オートラジオグラフィー（24 時間露出）における組織の放射能分布はその放射能強度に応じて、下記に示す高濃度レベル、中濃度レベル、低濃度レベル、バックグラウンド (BG) レベルの 4 段階に区分し評価した。

高濃度レベル: 100 (PSL-BG)/mm² 以上

中濃度レベル: 10 (PSL-BG)/mm² 以上, 100 (PSL-BG)/mm² 未満

低濃度レベル: 1 (PSL-BG)/mm² 以上, 10 (PSL-BG)/

*埼玉県川越市南台 1-3-2

mm² 未満

BG レベル: 1 (PSL-BG)/mm² 未満

7. 感染マウスを用いた感染部位マイクロオートラジオグラフィ

処置後5日目の感染マウスに¹⁴C-TELを経口投与し、投与後2および8時間にエーテル麻酔死させた。ペーパーディスク周辺の感染組織を皮膚およびペーパーディスクごと摘出し、ただちに液体窒素を用いて凍結させ、ミクロトームを用いて薄切片（設定厚み7μm）を作製した。アプレトン法⁴⁾により切片と乳剤（NTB-3, Kodak）を凍結下で密着させ、8週間の露出を行った。写真処理後の標本は、ヘマトキシリン・エオシンの2重染色を行い、光学顕微鏡を用いて切片標本上の放射能によって還元された銀粒子の写真“マイクロオートラジオグラフ”を撮影した。また、切片作成時に検鏡用の切片を同一個体からとり、アルコール固定をした後にヘマトキシリン・エオシンの2重染色を行い、光学顕微鏡を用いて“組織標本の顕微鏡写真”を撮影した。

8. 代謝物分析

処置5日目の感染マウス1匹に18.37 MBq/10 mg/5 mL/kgを経口投与した。投与後24時間にエーテル麻酔死させ、ペーパーディスク周辺の感染組織を採取し、ホモジナイザーにより組織ホモジネートを調製した。ホモジネートを遠心分離（10,000×g, 5分, 4℃）し、得られた上清をHPLC分析用試料とした。

代謝物の分析はHPLC法を用いて行い、溶出液をフラクションコレクターで分取し液体シンチレーションカウンターで放射能を計測した。HPLC分析条件はカラム: Symmetry C 18 (250×4.6 mm I.D., 5 μm, Waters), 移動相: 0.385% 酢酸アンモニウム: アセトニトリル = 700:300, 検出波長: UV 263 nm とした。

II. 結 果

1. 感染マウスを用いた全身マイクロオートラジオグラフィ

絶食下の感染マウスに¹⁴C-TELを10 mg/5 mL/kgで経口投与し、投与後2, 4, 8および24時間の動物を用いて全身マイクロオートラジオグラフ（24時間露出）を作製した。投与8時間後の例をFig. 1に示し、感染部位のオートラジオグラフ（72時間露出）および切片像をFig. 2に示した。全身の放射能分布の経時的变化は以下の通りであった。

① 投与後2時間

高濃度レベル: 小腸・胃内容物, 胆嚢内胆汁, 膀胱内尿, 大腸, 肝臓, 盲腸内容物

中濃度レベル: 胃, 腎皮質, 顎下腺, 下垂体, 腎髄質, 褐色脂肪, 血液, 肺, 脾臓, ハーダー氏腺, 骨髄, 大腸内容物, 胸腺, 心臓, 感染部位（ディスク下部）

低濃度レベル: 骨格筋（臀部）, 精巣

BG レベル: 脊髄, 脳

② 投与後4時間

高濃度レベル: 盲腸内容物, 小腸内容物, 胃内容物, 肝臓

中濃度レベル: 胃, 大腸, 褐色脂肪, 顎下腺, 腎皮質, 脾臓, 腎髄質, 胸腺, ハーダー氏腺, 脾臓, 肺, 下垂体, 骨髄, 血液, 心臓

低濃度レベル: 感染部位（ディスク下部）, 骨格筋（臀部）

BG レベル: 脊髄, 脳

③ 投与後8時間

高濃度レベル: 大腸内容物, 盲腸内容物, 胆嚢内胆汁

中濃度レベル: 小腸内容物, 膀胱内尿, 胃, 肝臓

低濃度レベル: 胸腺, 感染部位（ディスク下部）, 褐色脂肪, 脾臓, 腎皮質, 腎髄質, ハーダー氏腺, 骨髄, 胃内容物, 脾臓, 精巣, 下垂体, 顎下腺, 肺

BG レベル: 血液, 心臓, 骨格筋（臀部）, 脊髄, 脳

④ 投与後24時間

高濃度レベル: 該当なし

中濃度レベル: 該当なし

低濃度レベル: 大腸内容物, 胃, 盲腸内容物, 肝臓, 小腸内容物, 感染部位（ディスク下部）

BG レベル: 脾臓, 褐色脂肪, ハーダー氏腺, 骨髄, 顎下腺, 腎臓, 脾臓, 肺, 心臓, 骨格筋（臀部）

¹⁴C-TEL 経口投与後の放射能濃度は投与部位である胃内容物および消化管内容物で顕著に高く、消化管内の放射性成分は経時的に胃腔内から消化管下部へと移行していることが画像から示された。また、胆嚢内胆汁および膀胱内尿などにも高い放射能分布が認められ、肝臓の放射能濃度が比較的高かった。投与後2時間の放射性成分は脳および脊髄を除きほぼ全身に広く分布した。これらの結果から¹⁴C-TELの吸収、放射性成分の全身分布は速やかであることが示された。投与後24時間では消化管内容物, 胃, 肝臓および感染部位において低濃度レベルの放射能が認められたが、他の組織の放射能濃度はBGレベルであった。したがって消化管内容物, 胃, 肝臓および感染部位以外の組織における放射性成分の消失は速やかであることが示された。

投与後の感染部位において放射能濃度が比較的高い部位はペーパーディスク下部であった。感染部位（ペーパーディスク下部）は投与後2時間で中濃度レベルを示し、投与後4, 8および24時間では低濃度レベルとなった。投与後8時間では他の組織の放射能濃度が低下したのに対して感染部位の放射性成分は維持され、24時間においても肝臓と同程度の放射能濃度を示した。したがって、感染部位に分布した放射性成分は他の組織に比して長く保持されることが明らかとなった。

2. 感染マウスを用いた感染部位マイクロオートラジオグラフィ

¹⁴C-TEL 10 mg/kgを経口投与し、2および8時間後

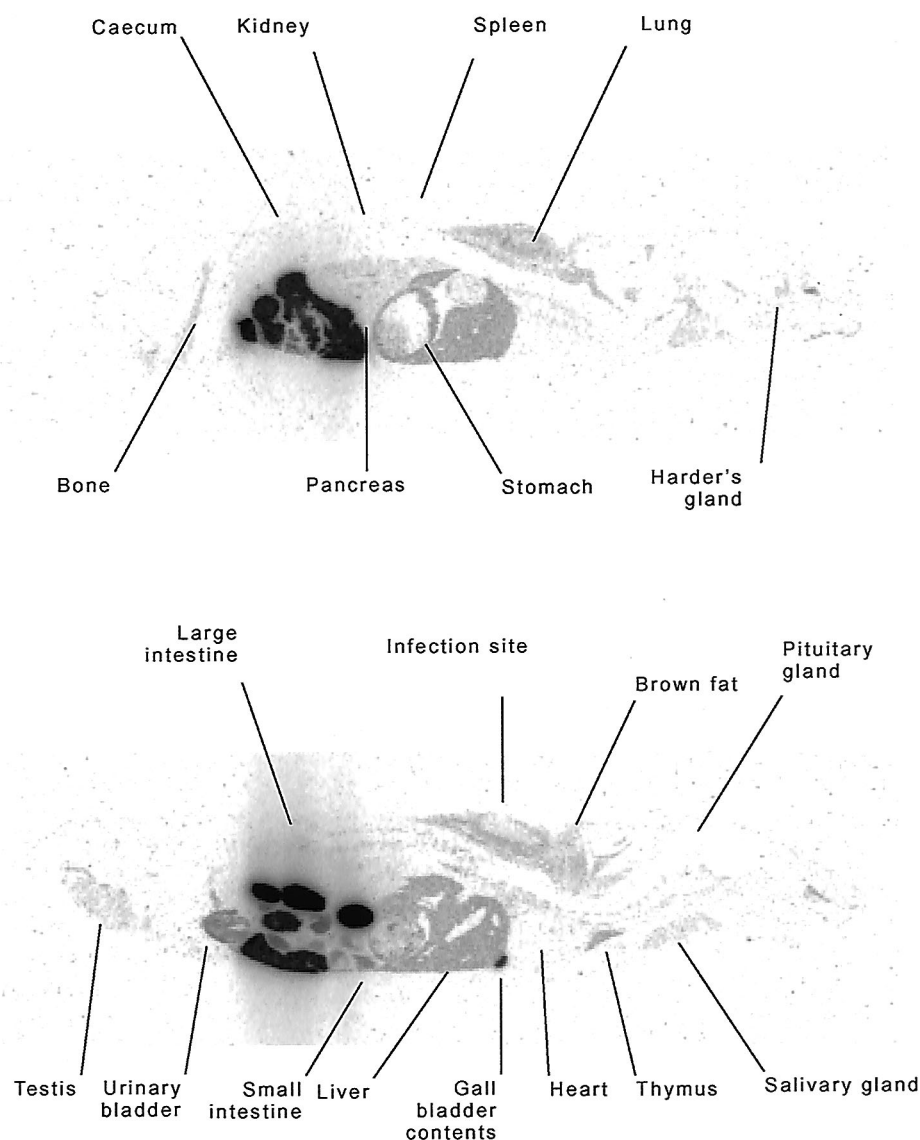


Fig. 1. Whole body autoradiograph of infectino model mouse 8 h after oral dosing of ^{14}C -telithromycin (24 h exposure).

の感染部位マイクロオートラジオグラフ（8週間露出）を作成し、その2時間後の例をFig. 3に示した。

マイクロオートラジオグラフ作製に用いた組織標本を検鏡した結果、ペーパーディスク周辺部には白血球が多く認められ、特にペーパーディスク下部では層状に広く分布していた（白血球分布層）。また、白血球分布層の外郭には繊維芽細胞などの炎症性細胞の浸潤や肉芽組織の形成が認められ、白血球の分布も多かった。放射性成分の分布を示す還元銀粒子はペーパーディスク周辺組織のほぼ全体に認められ、投与後2時間では炎症性細胞分布層、皮筋および骨格筋にまで広く分布した。投与後8時間では還元銀粒子の密度は低下し、白血球分布層の外郭に位置する炎症性細胞分布層において銀粒子密度がやや高く、骨格筋にはあまり分布していなかった。これらの結果から、 ^{14}C -TEL経口投与後の放射性成分は早期

の分布において感染部位全体に広く分布した後、白血球を多く含む炎症性細胞の分布層に比較的長く留まるものと推察された。

3. 代謝物分析

^{14}C -TEL投与24時間後のペーパーディスク周辺の感染組織中に含まれる放射性成分をHPLC法により分析した。

投与後24時間の感染組織中放射能濃度は $0.04\ \mu\text{g eq./g}$ で、HPLC分析用試料の放射性成分の抽出率は87.9%であった。

HPLC法による分析の結果、感染組織中には ^{14}C -TELが検出され、その放射能配分比は分析に供した放射能量の72.4%であった。 ^{14}C -TEL以外のフラクションの計数値は低く、代謝物は確認できなかったが、投与後24時間において感染組織中に存在した放射能の主成分は

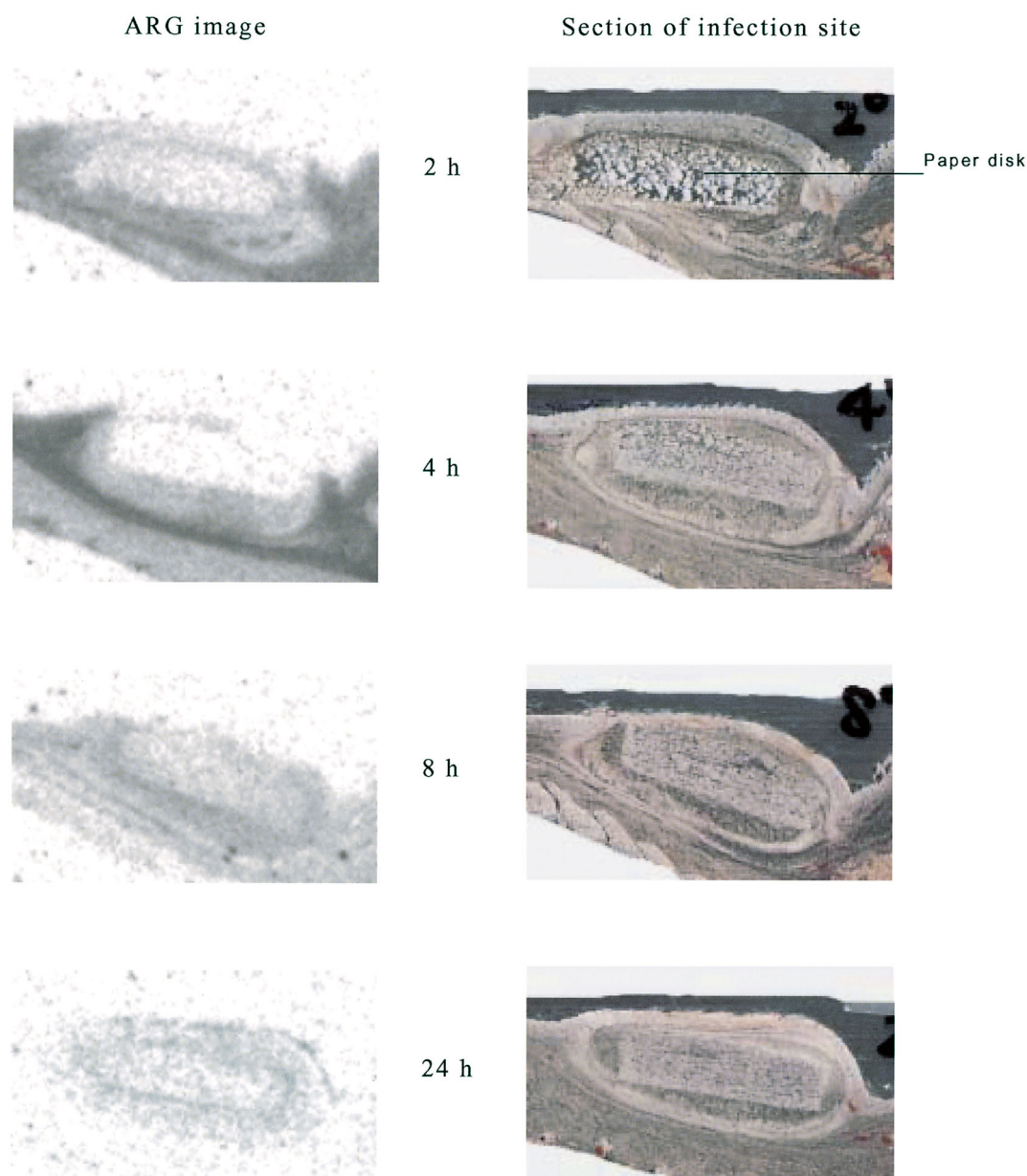


Fig. 2. Autoradiograph of infected site after oral administration of ^{14}C -telithromycin in infection model mouse (72 h exposure).

^{14}C -TEL であることが示された。

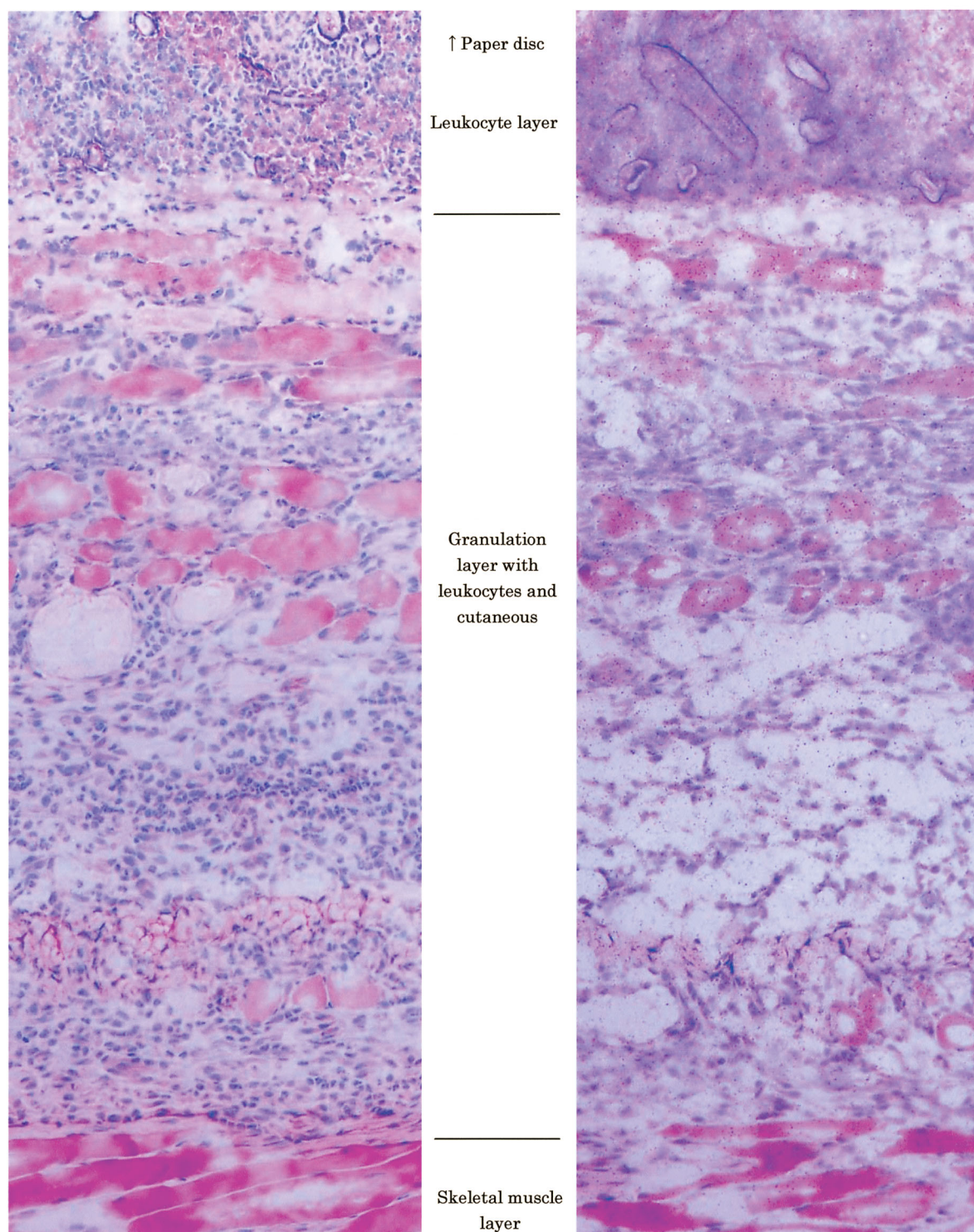
III. 考 察

TEL の感染組織への *in vivo* 取り込みを全身マクロオートラジオグラフィーおよび感染部位ミクロオートラジオグラフィーにより検討した。

感染菌 (*S. aureus*) を浸み込ませたペーパーディスクをマウス背部皮下に埋め込んだモデルに ^{14}C -TEL 10 mg/kg を経口投与した場合、2 時間後の放射能は、脳および脊髄を除く組織および感染部位に速やかに分布した。感染組織には白血球が多く存在し、ペーパーディスク周辺組織のほぼ全体に放射能が認められ、炎症性細胞分布層、皮筋および骨格筋にまで広く分布した。8 時間

後では、多くの組織の放射能が低下したのに対し、感染部位の放射能は維持され、24 時間後においても肝臓と同程度の放射能が認められた。24 時間後の感染組織放射能の 72.4% が未変化体であり、以上のことから、経口投与した TEL は、未変化体として感染部位に長時間留まることが示された。

このことは、ヒト多形核白血球を用い各種マクロライドの取り込みおよび放出を比較検討した試験^{3,4)}の結果と矛盾しない。すなわち、TEL は erythromycin (EM), clarithromycin (CAM), azithromycin (AZM) よりも取り込みが早く、かつその取り込みは 3 時間にわたって持続した。その細胞内濃度/細胞外濃度の比はインキ



Histological photograph (HE ×200)

Microautoradiograph (HE×200)

Fig. 3. Microautoradiograph of infected site 2 h after oral administration of ^{14}C -telithromycin in infection model mouse (8 weeks exposure).

ュベーション開始後3時間で約300であった。TELを取り込ませた白血球を薬物を含んでいないメディウム中でインキュベートしたとき、TELの放出はEM、CAMより遅くAZMとほぼ同様であった。取り込まれたTEL

の20%が最初の5分で放出したが、その後の放出はゆるやかであった。

これらのことから、白血球を多く含む炎症性細胞は、TELを炎症部位に運搬する役目も果たしている可能性

が考えられる¹⁾。

文 献

- 1) Varifeh D, Preira A, Bryskier A, et al.: Interactions between HMR 3647, a New Ketolide, and Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1944~1951, 1998
- 2) Miosec-Bratoli C, Pilatre L, Peyron P, et al.: The new Ketolide HMR 3647 accumulates in the azurophil granules of human polymorphonuclear cells,

Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2457~2462, 1999

- 3) 横山秀一, 三浦和美, 武藤秀弥, 他: Azithromycin の感染組織への移行—オートラジオグラフィによる検討—. *日化療会誌* 43: 122~126, 1995
- 4) Appleton T G: Autoradiography of Diffusible Substances. In *Autoradiography for Biologists* (P. B. Gaban Bd.) Chap 4. Academia Press, London, 1972

Studies on *in vivo* transfer into infected tissue in mouse

Takumi Maeda¹⁾, Akiko Hattori²⁾ and Hiroyuki Kuroiwa²⁾

¹⁾Drug Metabolism & Pharmacokinetics, Lead Optimization, Drug Inovation & Approval Division, Aventis Pharma Ltd., 1-3-2, Minamidai, Kawagoe, Saitama, Japan

²⁾Institute of whole body metabolism

Studies on *in vivo* transfer of telithromycin (TEL) into infected tissue of mouse were conducted. In the infection model produced by implantation of paper-disk infiltrated with *Staphylococcus aureus*-suspended solution into the back-subcutis of mouse, 10 mg/kg of ¹⁴C-TEL was orally administered and studied by whole body autoradiography and microautoradiography. The radioactivity was detected almost all tissues around the paper-disk implanted area, and widely distributed to the phagocytes accumulated layer, cutaneous muscle and skeletal muscle by microautoradiography. Radioactivity of most of all the tissues was decreased 8 h after dosing of TEL, on the other hands that of infected site was maintained for long time, and was detected as same level of that of the liver at 24 h after dosing. At 24 h after dosing of TEL, 72.4% of total radioactivity in infected site was remained as the unchanged form.