

TE-031の体内動態(第7報) 肺への移行性について

河野喜郎・吉田英生・吉富幸代・諏訪俊男
大正製薬株式会社総合研究所

TE-031の肺に対する親和性を明らかにするため、TE-031およびエリスロマイシン(EM)の¹⁴C標識体を用い、ラット肺における詳細な分布および遊離細胞内への移行性について検討した。

¹⁴C-TE-031を経口投与2時間後の肺マイクロオートラジオグラフィーにおいて、放射活性の肺胞壁における高濃度の局在が認められたが、脈管系への分布はわずかであった。¹⁴C-TE-031を外頸静脈内投与直後(5秒)の肺の濃度は、¹⁴C-EMに比べ有意に高く約4倍の濃度を示したが血漿中濃度は¹⁴C-EMの約1/2であり、TE-031の肺への著しい親和性が確認された。遊離肺細胞および遊離肝細胞を用い¹⁴C-TE-031および¹⁴C-EMの細胞内取り込みを比較検討した結果、遊離肺細胞への¹⁴C-TE-031の取り込みは、¹⁴C-EMに比べ著明に高くインキュベーション5分後で約10倍を示し、また遊離肝細胞においても¹⁴C-EMの約2倍の高い取り込みが認められた。¹⁴C-TE-031の遊離肺細胞への取り込みは温度および細胞活性の低下、さらに各種阻害剤により有意に低下し、その低下の程度は¹⁴C-EMに比べ高かった。このことから、¹⁴C-TE-031の著明な肺細胞内移行の過程には能動的代謝が大きく関与していることが示唆された。

TE-031は、エリスロマイシン(以下EMと略)のC-6水酸基をメトキシ基に変換した新規のマクロライド系抗生物質であり、呼吸器感染をはじめとする各種感染症モデルにおいて優れた防御効果が認められている¹⁾。また、TE-031をラットおよびマウスに経口投与後の組織移行性は、EMに比べ明らかに高く、特に肺へ著しい親和性を示すことを前報^{2,3)}において報告した。

一般にマクロライド系抗生物質は、肺へ比較的良好に分布することが知られているが、それらは主に組織中濃度あるいは肺胞マクロファージへの取り込みに関する研究^{4,5)}であり、肺実質細胞への移行性について詳細に検討を加えた報告は少ない。

そこで、今回著者らはTE-031の肺への親和性をより明らかにする目的で、TE-031およびEMの¹⁴C標識体を用い、ラット肺における詳細な分布、さらには遊離肺細胞を用いた細胞内への移行について検討を行ったので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 標識薬物

標識化合物は前報^{3,6)}に準じ、根本特殊科学株式会社において合成された[6-O-methyl-¹⁴C]TE-031(以下¹⁴C-TE-031と略)およびNew England Nuclear社(以下NEN社と略)より購入した[N-methyl-¹⁴C]エリスロマイシン(以下¹⁴C-EMと略)を使用した。比放射能は¹⁴C-TE-031が73.6 μ Ci/mg、¹⁴C-EMが35.2 μ Ci/mgであり、薄

層クロマトグラフィーによる放射化学的純度はいずれも97%以上であった。

2. 実験動物

実験動物はWistar系雄性ラット(7週齢)を静岡県実験動物農業協同組合より購入し、1週間予備飼育の後実験に使用した。経口投与の場合は¹⁴C-TE-031を非標識体で適宜希釈し、5%アラビアゴム懸濁液として20 mg/kgの用量で投与した。外頸静脈内投与の場合は標識薬物に当モル量の希塩酸を加えて溶解し、pH 7付近に調整したものを1 mg/kgの用量で投与した。

3. マイクロオートラジオグラフィー

¹⁴C-TE-031をラットに経口投与2時間後に肺を摘出し、直ちに液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結させた。凍結試料は暗室内クリオスタットマイクローム(CR-502、中川製作所)により-35°C下で厚さ4 μ mの切片を作製し、予め原子核乳剤(NTB-2、Kodak)を塗布したスライドガラス上に貼り付け2週間露出を行った。露出後の試料は現像処理ののちH. E.染色を施し、マイクロオートラジオグラムを得た。

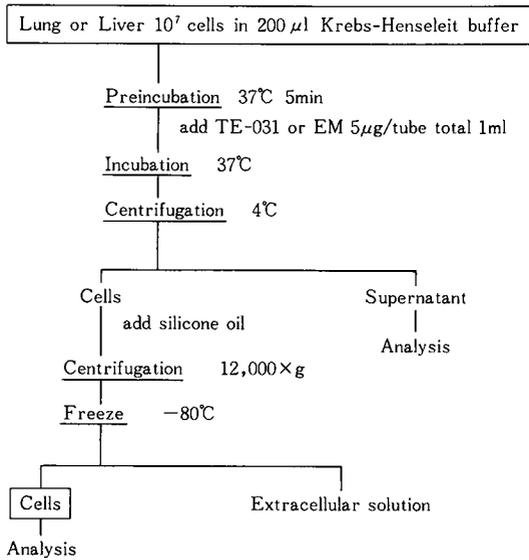
4. 外頸静脈内投与による分布実験

標識薬物をラットの外頸静脈より投与後、所定時間に放血死させ主要臓器を摘出、秤量し、前報³⁾に準じた方法により放射能測定用試料を調製した。

5. 遊離肺細胞および遊離肝細胞による取り込み実験
遊離肺細胞の調製はDAWSON⁷⁾らの方法に準じて行った。すなわち、ネンブタール麻酔下、肺動脈カニューレ

より Krebs-Henseleit 緩衝液 (KHB, pH7.4) を灌流して脱血し、次いで気管カニューレを施し、プロテアーゼ (Type VIII, Sigma 社) 0.1% および EDTA 1mM を含む Hanks 緩衝液 (pH7.4) にて 37°C で 30 分間灌流し消化を行った。得られたミンスは HEPES 25 mM およびグルコース 5 mM を含む KHB (pH 6.7) に懸濁したのちろ過し、さらに遠心分離 (4°C, 80×g) により遊離肺細胞を得た。

Fig. 1 Procedure for determination of uptake by isolated cells



遊離肝細胞は MOLDEUS[®] らの方法に準じ調製した。遊離細胞調製後のトリパンブルー染色により求めた viability は、それぞれ 90% 以上であった。

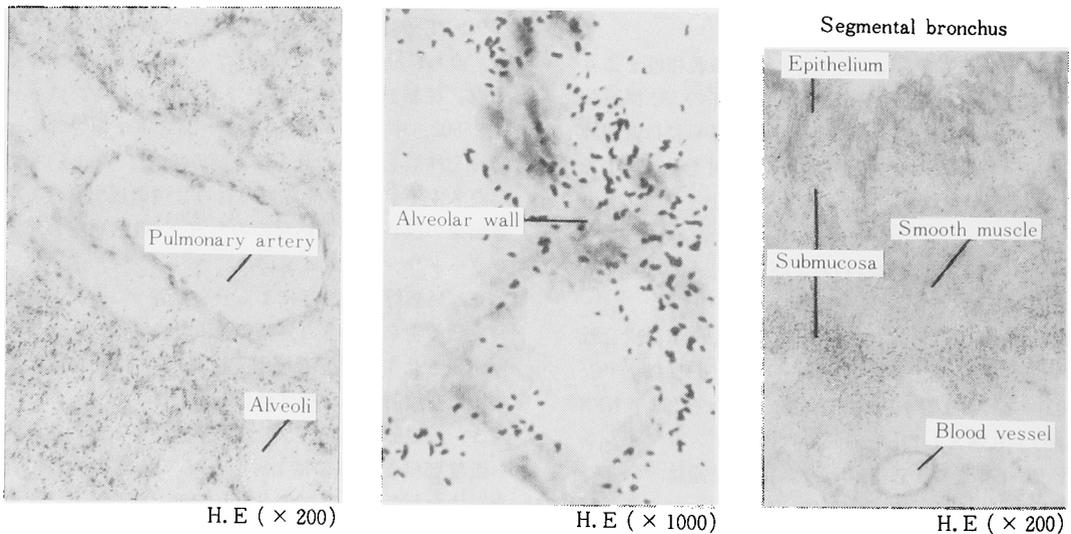
得られた肺および肝細胞の浮遊液 (10⁷ cells/0.2 ml KHB) は Fig. 1 に示すように、37°C で 5 分間インキュベートしたのち、KHB に溶解した標識薬物 (5 μg/0.8 ml, pH 7.4) を添加し、37°C で所定時間インキュベートして薬物の取り込みを測定した。一方、取り込みに対する温度環境、細胞活性および各種阻害剤の影響を検討するため、温度は 4°C で 5 分間インキュベートののち反応を行い、死細胞は 10% ホルマリンで 30 分間処理して調製し反応に供した。阻害剤としては、2,4-dinitrophenol (DNP) 1 mM および iodoacetic acid (IAA) 1 mM を用い、N₂ ガスは薬液および細胞浮遊液に 1 分間通気後反応を行った。

遊離細胞と細胞外液との分離は速度勾配遠心分離法⁹⁾ により行った。すなわち、microcentrifuge tube にシリコンオイル (SH 550 : SH556 = 5 : 6, トーレシリコン) 0.5 ml を入れ、細胞浮遊液 0.4 ml を重層したのち、4°C, 12,000×g で肺細胞は 3 分、肝細胞は 20 秒間遠心分離 (微量高速遠心機, MC-15A, トミー精工) を行った。分離後の試料は tube ごと -80°C で凍結したのち、メスを用いて細胞外液層と遊離細胞層に切断し、遊離細胞層はメタノール 1 ml を加えて放射能測定用試料とした。

6. 放射能測定

血漿および組織試料は Soluene-350 (Packard 社) で可溶化し、必要に応じてイソプロピルアルコール 0.5 ml および 30% 過酸化水素水 0.4 ml で脱色したのちシンチ

Fig. 2 Microautoradiograms of lung 2 hours after oral administration of ¹⁴C-TE-031 (20mg/kg) to rat



レーター(Aquazol-2, NEN 社)を加え、遊離細胞には直接シンチレーターを加えた。各試料中放射能は液体シンチレーションカウンター(Tri-Carb 3255型, Packard 社)により測定した。

II. 実験結果

1. ミクロオートラジオグラフィ

^{14}C -TE-031(20 mg/kg)をラットに経口投与後2時間の肺におけるミクロオートラジオグラムをFig. 2に示す。

放射活性の分布を示す現像銀粒子は肺胞壁に高濃度に局在したが、血管内および周囲組織の現像銀粒子の分布はわずかであった。一方、肺門付近の一次気管支においては、平滑筋を除く粘膜下組織に多くの現像銀粒子の分布が観察された。

2. 外頸静脈内投与における臓器分布

^{14}C -TE-031および ^{14}C -EM(1 mg/kg)をラット外頸静脈内投与後5秒および30分の主要臓器内放射能濃度をFig. 3に示す。

肺における ^{14}C -TE-031の濃度は ^{14}C -EMに比べ有意に高く、投与後5秒で約4倍の濃度を示し、その後の消失も緩慢であった。その他、心においても ^{14}C -TE-031の方が有意に高かったが、血漿中濃度は ^{14}C -EMの約

1/2であった。

3. 遊離肺細胞および遊離肝細胞への移行性

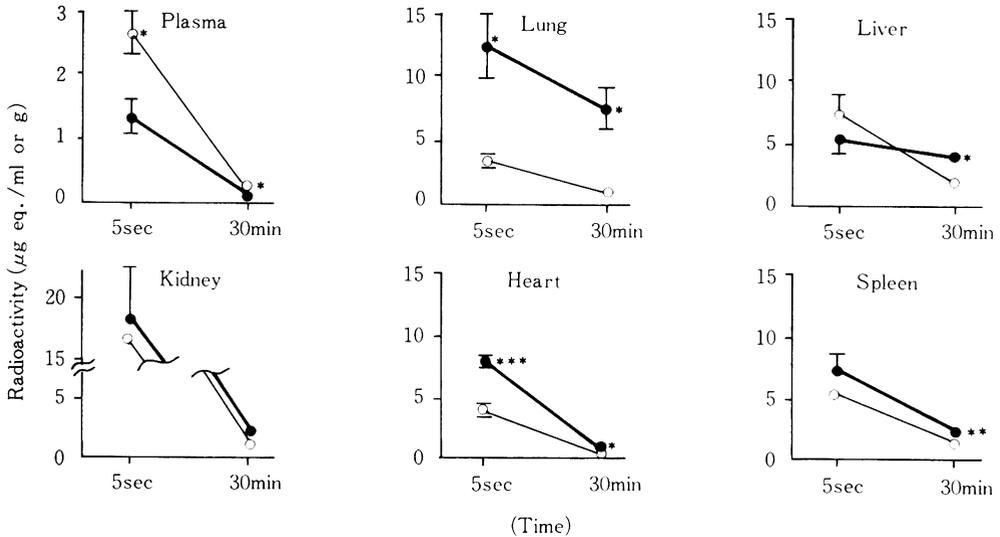
^{14}C -TE-031および ^{14}C -EM 5 μg をそれぞれ肺および肝細胞浮遊液中(10^7 cells/ml)にて37°Cで所定時間インキュベートし、各遊離細胞への放射能の取り込みを測定した。

Fig. 4に示すように、遊離肺細胞における ^{14}C -TE-031の取り込みは ^{14}C -EMに比べ著明に高く、5分後の値は ^{14}C -EMの約10倍を示した。一方、遊離肝細胞への取り込みは1分間インキュベーションで両薬物ともほぼ最高値に達し、 ^{14}C -TE-031の方が ^{14}C -EMに比べ有意に高く、5分後で約2倍の値を示した。なお、インキュベーション5分後の肺細胞およびメディウム中TE-031の代謝物を分析した結果、両者とも90%以上が未変化体であった。

4. 遊離細胞への取り込みに及ぼす各種阻害因子の影響

^{14}C -TE-031および ^{14}C -EMの遊離肺細胞および遊離肝細胞における取り込みについて、温度、細胞活性あるいは各種阻害剤の影響を検討した。Fig. 5に示すように、遊離肺細胞における ^{14}C -TE-031の取り込みは、いずれの条件においても有意に低下したが、 ^{14}C -EMの取り込みはIAAおよび N_2 処理で影響されず、またDNPによ

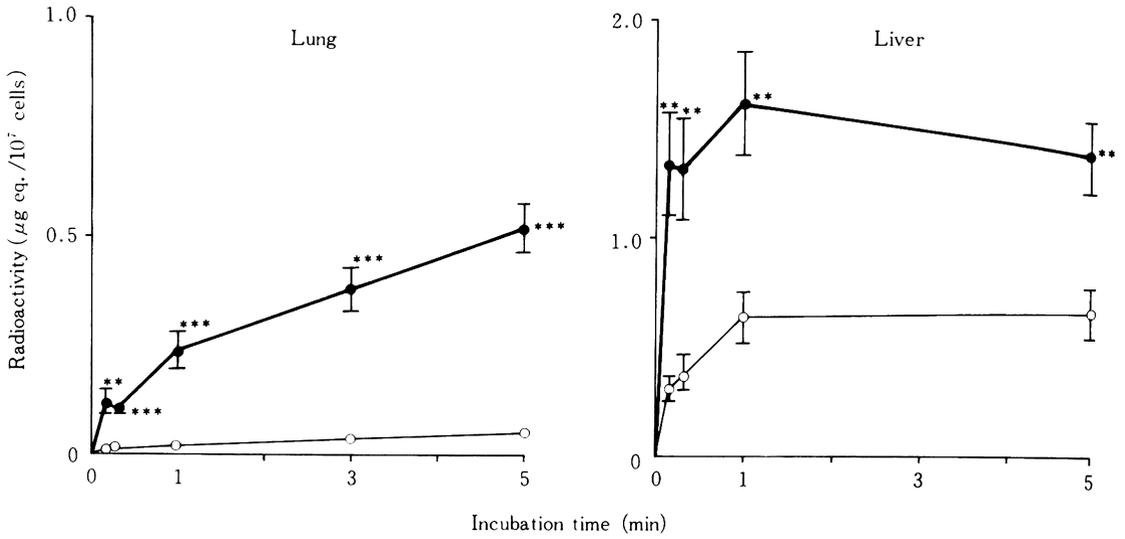
Fig. 3 Tissue levels of radioactivity in rats after administration of ^{14}C -TE-031 (●) and ^{14}C -EM (○) (1mg/kg) into external jugular vein



*: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ ***: $P < 0.001$

Each point represents the mean \pm S. E. of three animals

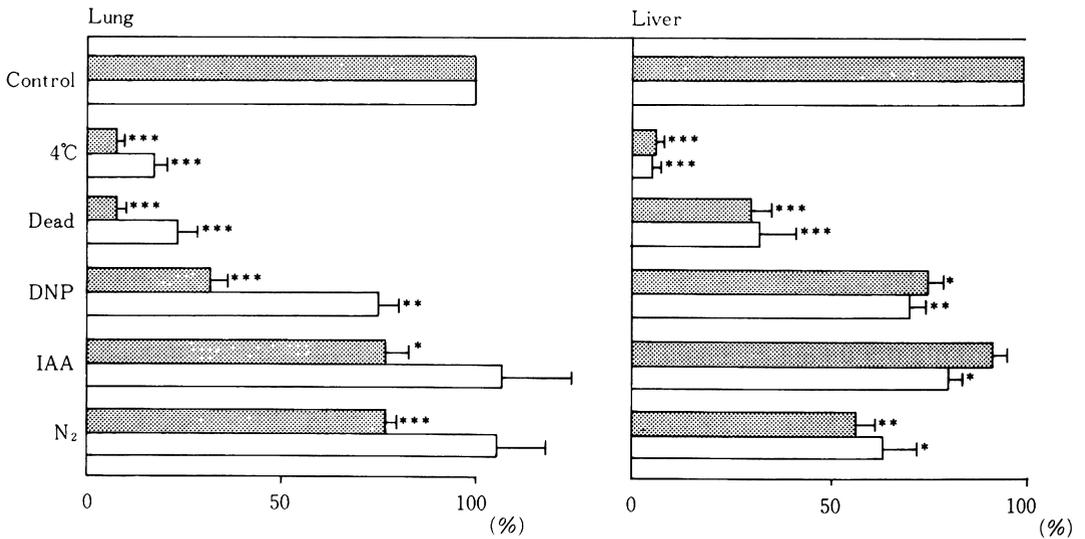
Fig. 4 Uptake of ¹⁴C-TE-031 (●) and ¹⁴C-EM (○) by isolated cells from rats



*:P<0.05 **:P<0.01 ***:P<0.001

Each point represents the mean ± S. E. of six experiments

Fig. 5 Effect of metabolic inhibitors on the uptake of ¹⁴C-TE-031 (⊗) and ¹⁴C-EM (⊙) by isolated cells



*:P<0.05 **:P<0.01 ***:P<0.001

Each point represents the mean ± S. E. of six experiments after a one - minute incubation period

る阻害の割合も ^{14}C -TE-031に比べ低かった。一方、遊離肝細胞においては、 ^{14}C -TE-031でIAAを除き有意な取り込みの低下が認められたが、 ^{14}C -EMではいずれの条件においても取り込みの低下が認められ、DNPによる低下も ^{14}C -TE-031に比べ顕著であった。

Ⅲ. 考 察

前報³⁾において著者らは、bioassayおよびradioassayによりTE-031の体内動態をEMと比較検討した。その結果、TE-031は組織移行性に優れ、特に肺に高濃度に分布し、ラットに20 mg/kg経口投与後の肺におけるピーク時の放射能濃度はEMの約15倍、活性体濃度は約70倍に達することを報告した。また、この肺への移行性の差異は、両薬物を静脈内投与後の全身オートラジオグラムにおいても確認された。

本研究においては、TE-031の肺への移行性に関しさらに詳細に検討するため、光顕レベルで放射能分布を観察するマイクロオートラジオグラフィ、外頸静脈内投与後の組織中濃度および遊離細胞を用いた細胞内への取り込みについてEMと比較した。

^{14}C -TE-031をラットに経口投与2時間後の肺マイクロオートラジオグラフィにおいて、肺胞壁に高濃度の放射能が観察されたが、脈管系への分布はほとんど認められなかった。この所見から、 ^{14}C -TE-031が血中から組織へ極めて良好に移行すること、さらに主として肺胞壁へ局在することが明らかとなった。一方、肺門付近の一次気管支において、粘膜下組織に高い放射活性の分布が認められたが、この部位には脈管系とともに粘液を分泌する気管腺が存在することから、気管内分泌物中への移行性も良好であろうことが推察された。

*In vivo*におけるTE-031の肺への親和性をより明らかにするため、 ^{14}C -TE-031および ^{14}C -EMをラット外頸静脈より投与し、心臓を経由して直接肺動脈へ送り込むことにより、両薬物の組織移行性、特に肺への親和性を比較検討した。その結果、投与直後(5秒)の肺における ^{14}C -TE-031の濃度は、 ^{14}C -EMに比べ有意に高く約4倍の濃度を示し、その後の消失も緩慢であったが、これに対し血漿中濃度は ^{14}C -TE-031で有意に低かった。本実験法は投与後、肺へ到達するまでの薬物に及ぼす諸要因を出来るだけ排除した手法であり、*in vivo*におけるTE-031の肺に対する著明な親和性をより直接的に証明したものと考えられる。

そこで、肺および肝の遊離細胞を調製し、 ^{14}C -TE-031および ^{14}C -EMの*in vitro*における細胞内移行性を検討したところ、両遊離細胞とも ^{14}C -TE-031の方が有意に高い取り込みを示した。特に肺細胞では5分間インキ

ュベーションで ^{14}C -EMの約10倍の取り込みが認められ、肺細胞への高い親和性が示された。前報³⁾において ^{14}C -TE-031および ^{14}C -EMをラットに経口投与したところ、 ^{14}C -TE-031の肝におけるピーク時の放射能濃度は ^{14}C -EMの約2.5倍であったのに対し、肺では約15倍に達したことは、今回の遊離細胞の結果と良く符号していると思われた。

ところで、本実験に供した遊離肝細胞は、調製の際の遠心分離操作によりクッパー細胞、内皮細胞等は除かれ、肝実質細胞で占められている。一方、遊離肺細胞の場合、そのほとんどが肺胞上皮I型細胞であるが、その他II型細胞15%、気管上皮細胞1%、クララ細胞およびマクロファージ1%未満などを含んでいる。また、肺細胞の大きさは肝細胞の約1/5程度であり⁷⁾、蛋白含量は肝細胞が3.5 mg/10⁶ cells¹⁰⁾であるのに対し、肺細胞は0.2 mg/10⁶ cells⁷⁾と約1/18にすぎない。そこで、今回のheterogeneousな肺細胞の体積を約0.4 μl /10⁶ cellsと仮定し(肝細胞の体積は8.8 μl /10⁶ cells)¹⁰⁾、 ^{14}C -TE-031および ^{14}C -EMの肺細胞内濃度を求め、外液中濃度との比から細胞内移行率を換算した。その結果、 ^{14}C -TE-031は約12倍、 ^{14}C -EMでは約1.2倍となり、TE-031の場合、濃度勾配に逆らった著しい細胞内移行性が示唆された。

各種抗生剤の細胞内移行に関し、JOHNSONら¹¹⁾はウサギ肺マクロファージ、PROKESCHら¹²⁾はヒト多形核好中球を用いて検討し、これら貪食細胞への移行性は特にクリンダマイシンにおいて高く、その取り込みには能動的代謝を必要とすることを報告している。そこで、本研究においてもTE-031の肺細胞への取り込み機序を明らかにするため、肺および肝細胞への取り込みに及ぼす温度環境、細胞活性および各種阻害剤の影響をEMと比較検討した。その結果、肺細胞への ^{14}C -TE-031の取り込みは4℃下および死細胞において著明に低下したことから、受動拡散による細胞膜透過の寄与は少なく、能動輸送系の存在が示唆された。さらに、酸化的リン酸化の脱共役剤であるDNP、SH基と結合し主に解糖系を阻害するIAAおよびN₂置換下での取り込みは、いずれの場合においても有意な低下を示し、その阻害の程度は ^{14}C -EMに比べ高かった。このことから、TE-031の著明な肺細胞内移行の過程には、前述のクリンダマイシンと同様、能動的代謝が大きく関与していることが示唆され、他方EMの場合、その寄与は比較的少ないものと推察された。なお、肝細胞においては ^{14}C -EMの方がやや強い取り込み抑制が認められ、肺細胞の場合と異なった阻害パターンが認められた。

以上、本研究においてTE-031を投与後の肺に認められた著しい親和性は肺細胞内への著明な取り込みによる

し、その取り込みには能動的代謝に依存した輸送系が大きく関与していることが示された。

文 献

- 1) MITSUHASHI, S.; T. ONO, T. NAGATE, K. SUGITA & S. OMURA: A new macrolide antibiotic, TE-031, *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities. Abstracts of papers of 26th Intersci. conf. on Antimicrob. Agents Chemother. No. 412, New Orleans, La., 1986
- 2) 諏訪俊男, 吉田英生, 福島清実, 長手尊俊: TE-031の体内動態(第1報)ラットおよびマウスにおけるTE-031とエリスロマイシンステアレートと比較。Chemotherapy 投稿中
- 3) 諏訪俊男, 河野喜郎, 吉田英生, 福島清美: TE-031の体内動態(第2報)ラットにおけるN-methyl-¹⁴C標識体を用いたTE-031とエリスロマイシンの比較。Chemotherapy 投稿中
- 4) POCIDALO, J. J.; F. ALBERT, J. F. DESNOTTES & S. KERNBAUM: Intraphagocytic penetration of macrolides: *In vivo* comparison of erythromycin and spiramycin. J. Antimicrob. Chemother., 16, Suppl. A: 167-173, 1985
- 5) HAND, W. L.; N. L. KING-THOMPSON & T. H. STEINBERG: Interactions of antibiotics and phagocytes. J. Antimicrob. Chemother., 12, Suppl. C: 1-11, 1983
- 6) 諏訪俊男, 吉田英生, 河野喜郎, 吉富幸代, 太田勝次: TE-031の体内動態(第3報)マウス, ラットおよびイヌにおける¹⁴C-TE-031の吸収・分布・排泄。Chemotherapy 投稿中
- 7) DAWSON, J. R.; K. NORBECK & P. MOLDEUS: The isolation of rat lung cells for the purpose of studying drug metabolism. Biochem. Pharmacol., 31: 3549-3553, 1982
- 8) MOLDEUS, P.; J. HÖGBERG & S. ORRENIUS: Isolation and use of liver cells. "Methods in enzymology" vol. 52, FLEISHER, S. and PACKER, L.(ed.) Academic Press, New York pp. 60-71, 1978
- 9) 古賀宏延, 中里博子, 長沢正夫, 渡辺謙一, 福田義昭, 田中光, 朝長昭光, 重野芳輝, 藤田紀代, 鈴山洋司, 山口恵三, 斉藤厚, 原耕平: 各種抗生剤のヒト多形核好中球内への移行に関する研究。Chemotherapy 33: 688-695(1985)
- 10) IGA, T.; D. L. EATON & C. D. KLAASSEN: Uptake of unconjugated bilirubin by isolated rat hepatocytes. Am. J. Physiol. 236: 9-14, 1979
- 11) JOHNSON, J. D.; W. L. HAND, J. B. FRANCIS, N. KING-THOMPSON & R. W. CROWIN: Antibiotic uptake by alveolar macrophages. J. Lab. Clin. Med., 95: 429-439, 1980
- 12) PROKESCH, R. C. & W. L. HAND: Antibiotic entry into human polymorphonuclear Leukocytes. Antimicrob. Agents Chemother., 21: 373-380, 1982

METABOLIC FATE OF TE-031(A-56268)(VII)
Uptake into the lung

YOSHIRO KOHNO, HIDEO YOSHIDA, SACHIYO YOSHITOMI & TOSHIO SUWA
Reserch Center, Taisho Pharmaceutical Co. Ltd., Saitama

To define the affinity of TE-031 to the lung, detailed distribution and uptake by the isolated cells were studied in rats, using ^{14}C -labeled TE-031 and EM.

Two hours after oral administration of ^{14}C -TE-031, microautoradiography revealed that radioactivity in the lung was confined almost entirely to the alveolar wall, but was rather low in the vascular system. Immediately (5 sec) after the administration of ^{14}C -TE-031 into the external jugular vein, pulmonary radioactivity was significantly high, about four times that of ^{14}C -EM, whereas the plasma level was only about half that of ^{14}C -EM. These results confirmed that TE-031 had a remarkable affinity to lung tissue. When the cellular penetration of ^{14}C -TE-031 was compared with that of ^{14}C -EM in isolated lung and liver cells, ^{14}C -TE-031 uptake was c. 10 times that of ^{14}C -EM in lung cells and about twice that in liver cells. Uptake of ^{14}C -TE-031 by the isolated lung cells significantly declined with a decrease in temperature or cell viability and in the presence of various metabolic inhibitors, and this inhibition was more pronounced than in ^{14}C -EM. These findings suggest that cellular uptake of TE-031 by the lung was largely dependent upon active metabolic processes.