

## Azithromycinの感染組織への移行 —オートラジオグラフィーによる検討—

横山秀一・三浦和美・武藤秀弥・立松 洋・斎藤 享・榎垣一憲・下岡新雄  
ファイザー製薬株式会社新薬開発センター\*

中山一誠・山地恵美子  
日本大学医学部第三外科

島田 馨  
東京専売病院

Azithromycin (AZM)の感染組織への移行性ならびに移行様式を明らかにするため、局所感染モデルマウスを用い、感染部位オートラジオグラフィーならびにマイクロオートラジオグラフィーにより、感染巣周辺の本薬の分布および炎症細胞への移行性について検討した。

[<sup>14</sup>C]AZM 20mg/kgを経口投与した後24時間の感染部位オートラジオグラフィーでは感染組織の放射能濃度は非感染組織よりはるかに高く、AZMが感染組織に高濃度に局在することが示された。投与後72時間でも感染組織内濃度は周囲の組織内濃度より高かった。

また [<sup>3</sup>H]AZM 20mg/kgを経口投与した後24時間の感染部位のマイクロオートラジオグラフィーにおいても [<sup>3</sup>H]AZMの存在を示す銀粒子は好中球等の食細胞が局在する部位に高密度に認められた。

これらのことから、AZMは感染組織へ選択的に高濃度に分布し、その移行には食細胞による輸送、いわゆる phagocyte delivery が関与していることが示唆された。

**Key words** : azithromycin, distribution, autoradiography, micro-autoradiography, phagocyte delivery

Azithromycin (AZM)は米国ファイザー社で開発された15員環を有する新規マクロライド系抗生物質である。

Girard A Eらはマウス、ラットおよびイヌにAZMおよびerythromycin (EM)を経口投与した時の体内動態の成績から、AZMはEMに比べて血漿中濃度半減期が長く、良好な組織移行性を示すことを報告している<sup>1)</sup>。また各種感染モデル動物を用いたAZM投与による治療試験においても優れた治療効果が得られており、同時に行った感染組織内濃度測定試験の成績等より本薬の感染組織への移行は非感染組織より優れていることが示されている<sup>2-4)</sup>。

一方、Wildfeuer AらはAZMを *in vitro* で食細胞とインキュベートするとAZMは食細胞中に高濃度に取り込まれることを報告している<sup>5)</sup>。

これらのことから、AZMは感染部位へ食細胞により移送されている可能性が示唆される。

そこで今回著者らは、*in vivo*におけるAZMの感染部位の分布をオートラジオグラフィーにより検討し、さらに細胞レベルの分布についてマイクロオートラジオグラフ

ィーにより検討した。

### I. 実験材料および方法

#### 1. 標識薬物

[<sup>3</sup>H]または [<sup>14</sup>C]AZMは<sup>3</sup>Hまたは<sup>14</sup>C-ホルムアルデヒド (NEN)により、デスメチルアジスロマイシンの9a-アミノ基を<sup>3</sup>Hまたは<sup>14</sup>C-メチル化することにより合成した。すなわち、デスメチルアジスロマイシンをテトラヒドロフランに溶解し、これに<sup>3</sup>Hまたは<sup>14</sup>C-ホルムアルデヒドおよびギ酸を加えアルゴンガス下、80℃で18時間攪拌反応させた。反応後得られた粗精製物は、薄層クロマトグラフィー(エーテル：エタノール：アンモニア=85:15:2)で精製し、 [<sup>3</sup>H]または [<sup>14</sup>C]AZMを得た。標識AZMの構造式をFig. 1に示した。比放射能は [<sup>14</sup>C]AZM 0.92MBq/mg (24.8μCi/mg), [<sup>3</sup>H]AZM 13.2MBq/mg (357μCi/mg)であり、3種の薄層クロマトグラフィー(クロロホルム：ヘキサン：ジエチルアミン：トリエチルアミン=15:15:2:2, 酢酸エチル：ヘキサン：ジエチルアミン=15:15:2, ジエチルエーテル：メタノール：アンモニア=85:15:2)による放射化学的純度はいずれも98%以

上であった。経口投与に際しては非標識AZMで適宜希釈し放射能を調製して、0.05Mクエン酸緩衝液(pH 5.3)に溶解した。

## 2. 実験動物

ICR系SPFの雄性マウス(4週齢)を日本エスエルシー株式会社より購入し、実験に用いた。水および固形飼料(CE-2, 日本クレア)は自由に摂取させた。

感染モデルマウスはGirard Dら<sup>4)</sup>の方法に準じて作製した。エーテル麻酔下、マウスの背部皮膚を切開し、皮下に菌液(*Staphylococcus aureus* ATCC25923,  $3 \times 10^8$ CFU/disc/mouse)をしみ込ませたペーパーディスク(thick,  $\phi 8$ mm)を埋め込み、皮膚縫合を行った。術後、5日後に薬剤の投与を行った。

## 3. 感染部位オートラジオグラフィ

感染5日後のマウスに $[^{14}\text{C}]$ AZM 20mg/kgを胃ゾンデを用いて経口投与した。投与後2, 6, 24および72時間にエーテル麻酔死させ、CMCで包埋しドライアイスアセトン中で凍結した。マイクロトーム(Leitz 1300)を用い厚さ $30\mu\text{m}$ の切片を作製し、イメージングプレート(20 $\times$ 40cm, 富士写真フィルム)と3日間密着露出後、バイオイメージングアナライザーシステム(BAS 2000 II, 富士写真フィルム)を用いて潜像を読み取り(Gradation 1024, Resolution 100, Sensitivity 10000, Latitude 4)、オートラジオグラムを得た。また、感染1ヵ月後、埋め込んだディスクがマウスの背部挿入部より排除され、感染部位が治癒した状態のマウスに $[^{14}\text{C}]$ AZMを投与し、投与後24時間のオートラジオグラムを同様にして得た。なお、感染部位のオートラジオグラムは画像処理により32色の疑似カラーで表示し、4倍に拡大して出力した。

## 4. ミクロオートラジオグラフィ

感染5日後のマウスに $[^3\text{H}]$ AZM 20mg/kgを胃ゾンデを

用いて経口投与した。投与後24時間にエーテル麻酔死させ、ディスクを含む感染部位周囲の組織を摘出して直ちに整形し、O.C.T. compound(TISSUE-TEK Miles Inc.)を用い、ドライアイスアセトン中で凍結包埋した。凍結包埋試料を $-20^\circ\text{C}$ のクリオスタット(CRYOCUT 1800, Leica)内で、厚さ $4\mu\text{m}$ に薄切し、StumpfらのThaw mount法<sup>6)</sup>に準じて、マイクロオートラジオグラフィ用乳剤(NTB-3, Kodak)を予め塗布したスライドガラス上に切片をとり、すばやく密着させ乾燥した。 $-80^\circ\text{C}$ で2週間の露出後、現像(Dectol, Kodak)、定着(コニフィクス, コニカ)処理した後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施してマイクロオートラジオグラムを作製した。

また、組織の鏡検に用いるため、同じ試料から薄切した切片を乳剤未塗布のスライドガラス上にとり、同様に染色し組織観察用の標本を作製した。なお、写真はディスクを含む筋肉側の部分を目的に応じて、マイクロオートラジオグラムは200倍、組織観察用標本は100倍とし、細胞の確認のためさらに組織観察用標本を400倍で撮影した。

## II. 実験結果

### 1. 感染部位オートラジオグラフィ

*S. aureus* ATCC25923をしみ込ませたペーパーディスクをマウスの背部皮下に埋め込んだ後、5日後に $[^{14}\text{C}]$ AZM 20mg/kgを経口投与したときのペーパーディスク周辺組織のオートラジオグラムをFig. 2に示した。

投与後2時間のペーパーディスク周辺組織の放射能分布は、他の皮下組織と同程度の濃度分布であったが、投与後6時間ではペーパーディスク周辺の組織がその外側の組織より明らかに高い濃度を示した。投与後24時間ではさらにペーパーディスク周辺組織の濃度は高くな

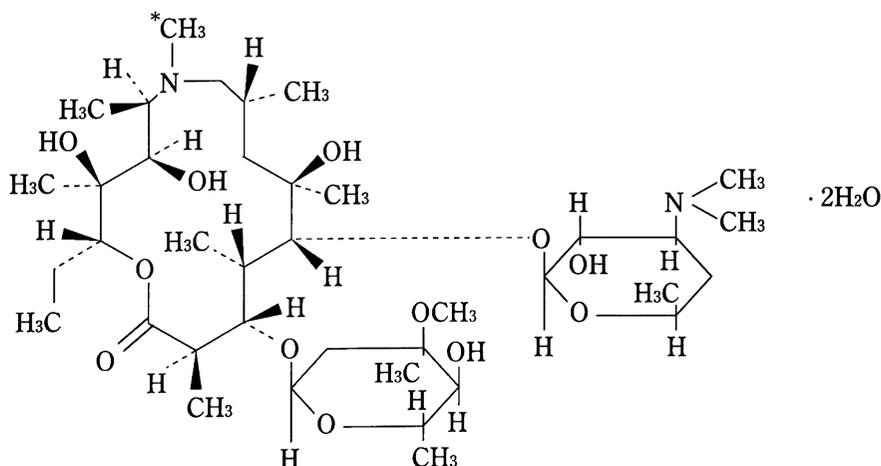


Fig. 1. Structure of azithromycin.

\* denotes position of tritium or carbon-14 label

り、高濃度を示す組織の中央部は局所的に更に高濃度に達していることが確認された。投与後72時間でもペーパーディスク周辺の濃度は他の皮下組織と比べ明らかに高く $^{14}\text{C}$ AZMが感染組織に維持されていることが示された。

一方、感染治癒後のマウスに $^{14}\text{C}$ AZMを経口投与したときの投与後24時間の皮下組織には、投与後同時間の感染マウスでみられたような放射能の分布は認められなかった。

## 2. ミクロオートラジオグラフィー

前述と同様にペーパーディスクをマウスの皮下に埋め込んだ後、5日後に $^3\text{H}$ AZM 20mg/kgを経口投与し、投与後24時間にペーパーディスクの周辺組織を摘出し得られた組織標本の鏡検写真およびミクロオートラジオグラムをFig. 3に示した。

組織標本の鏡検から、ペーパーディスク周辺に肉芽組織の形成ならびに好中球、マクロファージおよび線維芽細胞等の炎症性細胞の浸潤が観察され、*S. aureus*による

感染巣の形成が確認された。特に好中球がペーパーディスクの周囲に高密度に認められ、層状に分布していた。

ミクロオートラジオグラムでは、放射能の分布を示す銀粒子がペーパーディスクの周辺組織のほぼ全体に認められたが、上述の好中球が高密度に分布する層では多くの銀粒子が分布し、より外側の組織では少なくなる傾向にあった。この様に銀粒子が高密度に分布する部位と炎症性細胞の局在する部位はほぼ一致した。

## Ⅲ. 考 察

今回、*S. aureus*による感染巣を成立させたマウスに $^{14}\text{C}$ AZMを投与した場合、感染巣周囲に極めて高い濃度のAZMが局在していることが確認され、AZMが高濃度を示す部位には好中球等の食細胞が高密度に存在していることが明らかになった。さらに、 $^3\text{H}$ AZMを用いたミクロオートラジオグラフィーにより、これらの食細胞がAZMを保持していることが示唆された。

Wildfeuer Aらは*in vitro*でAZMをヒトマクロファージ又は好中球とインキュベートした場合、これらの食細胞

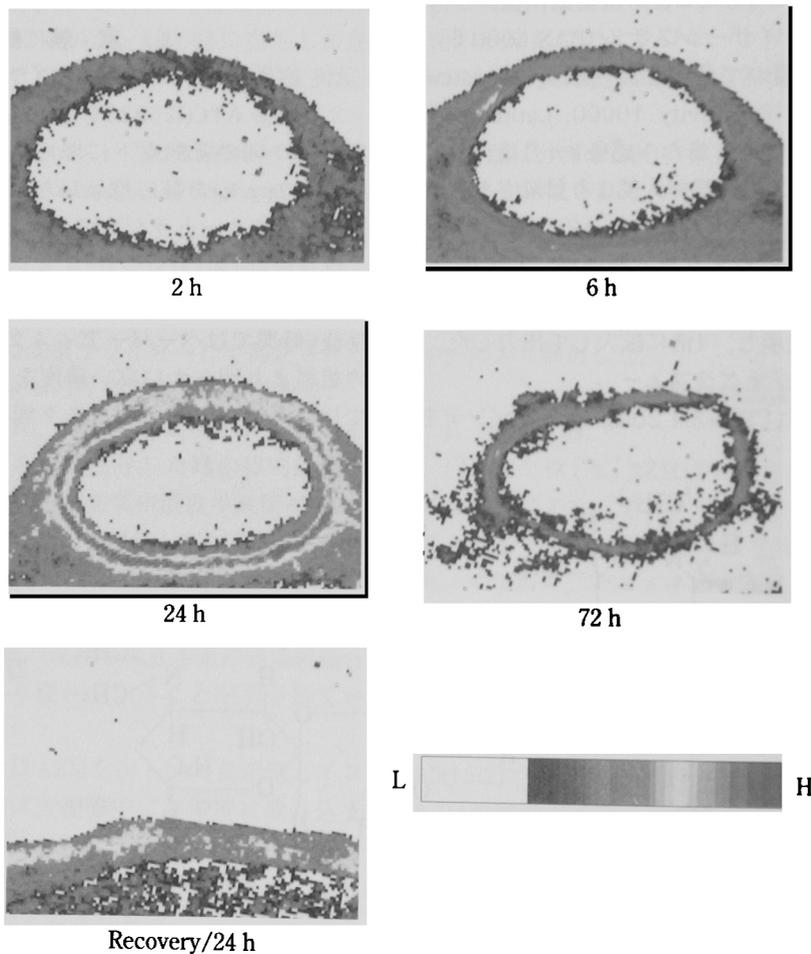


Fig. 2. Autoradiograms of infected sites showing the distribution of radioactivity after oral administration of  $^{14}\text{C}$  azithromycin (20 mg/kg) to mice, 5 days post-implantation of *Staphylococcus aureus* impregnated disc. ( $\times 4$ )

中へAZMが高濃度に取り込まれることを報告している<sup>9)</sup>。

また、Retsema J Aらはマウスの大腿部に*S. aureus*を注入して感染巣を成立させ、AZMを投与した場合、投与後145時間の感染巣組織内のAZM濃度は非感染組織内濃度の20倍高いことを報告している<sup>9)</sup>。

今回の試験成績ならびにWildfeuer AらおよびRetsema J Aらの報告と考え合わせると感染組織に高濃度にAZMが局在する現象は化学遊走により集積する食細胞にAZMが取り込まれ感染局所に移送されるいわゆるphago-

cyte deliveryにより説明されるものと考えられる。

AZMは感染モデル動物を用いた治療試験において、*in vitro*の抗菌活性の指標であるMIC値から予想される以上に優れた効果が得られている<sup>10)</sup>。このようにAZMが*in vivo*の治療試験で*in vitro*のMICの成績から予想される以上に好成績を示すのは、今回の実験結果が示す様にAZMは感染局所に選択的に食細胞により高濃度に送達され、これらの食細胞の貪食殺菌作用とあいまって、更に強い抗菌活性を示すためと考えられる。

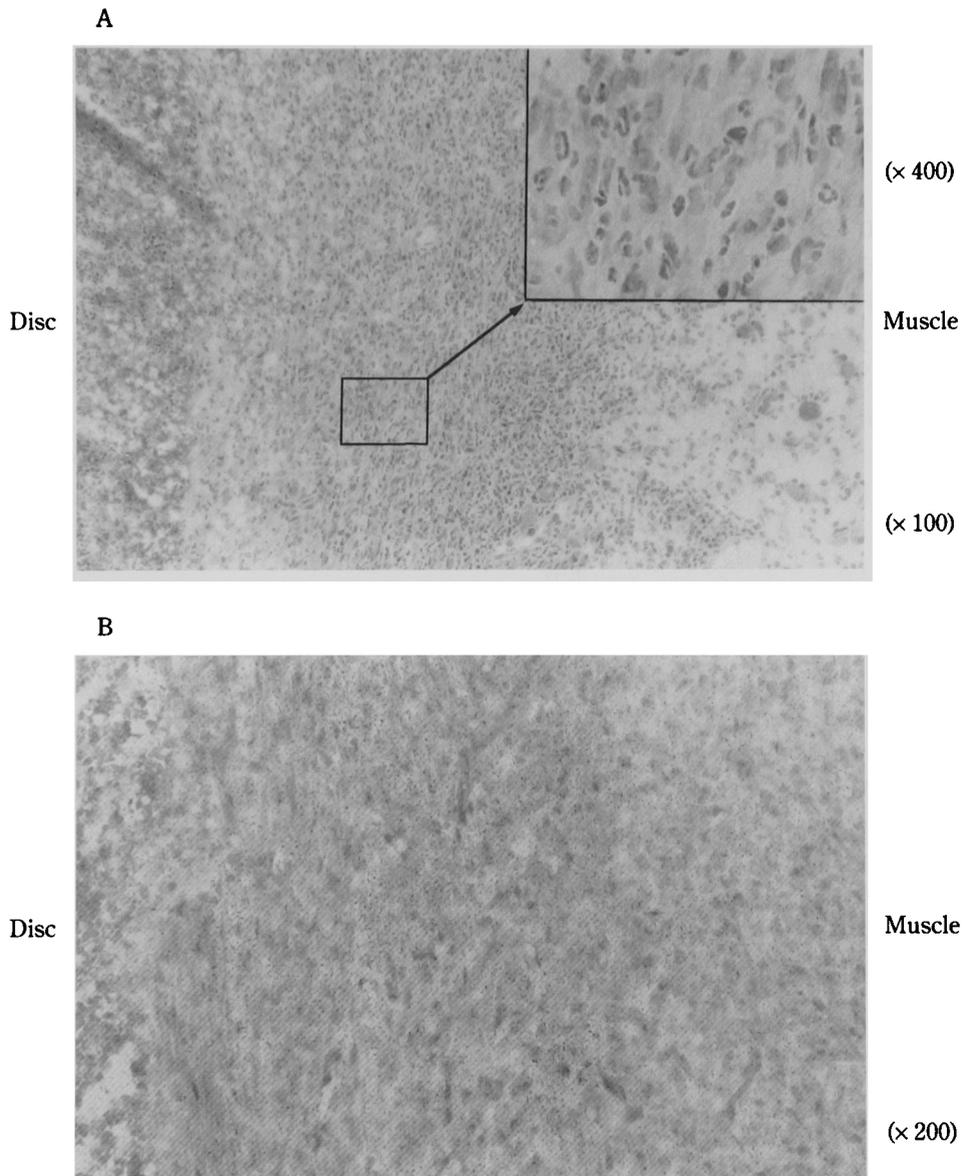


Fig. 3. Photomicrograph and micro-autoradiogram of infection site in a mouse at 24 h after oral administration of [<sup>3</sup>H] azithromycin (20 mg/kg), 5 days post-implantation of *Staphylococcus aureus* impregnated disc.

A: Photomicrograph clearly shows distribution of phagocytic cells (neutrophils, macrophages) and fibroblasts.  
B: Micro-autoradiogram shows more distribution of silver grains over phagocytic cells.

## 文 献

- 1) Girard A E, Girard D, English A R, Gootz T D, Cimochoowski C R, Faiella J A, Haskell S L, Retsema J A: Pharmacokinetic and *in vivo* studies with azithromycin (CP-62, 993), a new macrolide with an extended half-life and excellent tissue distribution. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1948 ~ 1954, 1987
- 2) Retsema J A, Bergeron J M, Girard D, Milisen W B, Girard A E: Preferential concentration of azithromycin in an infected mouse thigh model. *J Antimicrob Chemother* 31, Suppl E: 5~16, 1993
- 3) Girard A E, Girard D, Retsema J A: Correlation of the extravascular pharmacokinetics of azithromycin with *in vivo* efficacy in models of localized infection. *J Antimicrob Chemother* 25, Suppl A: 61 ~71, 1990
- 4) Girard D, Bergeron J M, Milisen W B, Retsema J A: Comparison of azithromycin, roxithromycin, and cephalexin penetration kinetics in early and mature abscesses. *J Antimicrob Chemother* 31, Suppl E: 17~28, 1993
- 5) Wildfeuer A, Reiser I and Laufen H: Uptake and subcellular distribution of azithromycin in human phagocytic cells. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 43 (I), Nr 4: 484~486, 1993
- 6) Stumpf W E: Techniques for the autoradiography of diffusible compound, (In) *Methods in Cell Biology* 13, ed. DM prescott, Academic Press, New York, 171, 1976

## Penetration of azithromycin in a murine bacterial infection model — Autoradiographic study —

Syuichi Yokoyama, Kazumi Miura, Hideya Muto, Hiroshi Tatematsu, Susumu Saito,  
Kazunori Enogaki, Kino Shimooka  
Pfizer Pharmaceuticals Inc., New Product Development Center  
5-gochi, Taketoyo-cho, Chitagun, Aichi 470-23, Japan

Issei Nakayama, Emiko Yamaji  
3rd Department of Surgery, Nihon University, School of Medicine

Kaoru Shimada  
Tokyo Senbai Hospital

The distribution of azithromycin (AZM) in the infection site, following an oral dose of 20 mg/kg, was studied in mice with localized *Staphylococcus aureus* infections.

1. Autoradiograms of [<sup>14</sup>C] AZM showed that the radioactivity was well distributed to infection sites, and that the degree of radioactivity in the infection site was higher than in non-infected regions, suggesting that AZM was selectively distributed to infection sites.

2. Micro-autoradiograms of [<sup>3</sup>H] AZM showed that radioactive silver grains were presented with phagocytic cells in granulation tissues, such as neutrophils and macrophages, suggesting that AZM *in vivo* had apparently penetrated into phagocytic cells.