アズレチル ナトリウム (KT1-32) の生体内動態 (第6報): KT1-32投与酢酸潰瘍ラットの胃壁への分布

佐藤 正雄, 須坂 浩章, 富山 格

寿製薬株式会社 総合研究所 〒389-06 長野県埴科郡坂城町6351

宮崎 浩

昭和大学医学部第2内科 〒142 東京都品川区旗の台1-5-8

Key words : Azuletil sodium, KT1-32, Rat, Anti-ulcer agent, Gastric ulcer.

Studies on the Metabolic Fate of Azuletil Sodium (V) : Distribution of Radioactivity in Gastric tissues after Oral Administration to Rats with Acetic Acid-Induced Gastric Ulcer.

Masao SATO, Hiroaki SUZAKA and Akira TOMIYAMA

Research Laboratories, KOTOBUKI SEIYAKU Co., Ltd.

Sakaki 6351, Nagano 389-06, Japan

Hiroshi MIYAZAKI

The Second Department of Internal Medicine,

Showa University, School of Medicine

1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo, 142, Japan

Summary

Distribution of radioactivity in the stomach with acetic acid-induced ulcer was studied after oral administrations of ^{14}C -KT1-32 to male rats.

1. The significantly high radioactivity was found in the site of the gastric ulcer at 6, 12 and 24hr after administration.

2. Radioactivity in normal mucosa was significantly higher than that in muscular layer at 1hr, but there were no significant differences between these tissues at 3, 6, 12 and 24hr.

3. Microautoradiography indicated that the density gradient of silver grains was found from the lumen to the muscular layer in glandular stomach at 3hr after administration.

These results suggested that ^{14}C -KT1-32 was located selectively in the lesion of the gastric ulcer induced with acetic acid for long period and penetrated through the lumen to the muscular after oral administration.

緒言

Azuletil sodium (AZE, KT1-32, sodium 3-ethyl-7-isopropyl-1-azulenesulfonate 1/3 hydrate) は, Fig. 1 に示す新規アズレン誘導体である¹⁾. 各種動物実験潰瘍モデルにおいて, 従来より用いられている水溶性アズレン (sodium 1,4-dimethyl-7-isopropylazulene-3-sulfonate 1/2 hydrate) よりも優れた抗潰瘍作用を有することが報告されており²⁾, また, 抗ペプシン作用¹⁾, トロンボキサン拮抗作用³⁾, 内因性 SH 基保護作用⁴⁾ および血管保護作用⁴⁾ が報告されている.

Fig. 1 Chemical structure of KT1-32.
*: the position labeled with ^{14}C

さらに, 薬理試験で実験潰瘍モデルにおいて, 本化合物の経口投与が最も有効であることが明らかにされており, 本化合物の抗潰瘍作用は, 潰瘍部位に直接的に作用することが示唆されている.

そこで, 本化合物の作用メカニズムを解明する目的で, ラット酢酸潰瘍モデルを用い, ^{14}C -KT1-32を経口投与し, 潰瘍部位への移行と組織中への分布を胃各組織中放射能濃度の測定およびマイクロオートラジオグラフィーにより検討した.

実験材料および実験方法

1. 標識化合物

^{14}C -KT1-32は, Fig. 2 に示す柳沢らの方法で合成したものをを用いた. その比放射能は220MBq (5.95mCi)/mmol (733KBq (19.8 μ Ci)/mg), 放射化学的純度は既報⁵⁾の放射能検出器付高速液体クロマトグラフィーで測定した結果, 99%以上であった.

2. 使用動物

日本ラットまたは日本チャールスリバー株式会社より体重180~200 g (6週齢)の雄性 Sprague-Dawley 系ラットを購入し, 恒温恒湿 (22 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$, 60 $\pm$ 10%) の環境下で予備飼育後7週齢となったものを使用した. 飼料は固型飼料 (CE-2, 日本クレア) を用い, 水は実験を通し自由に与えた. あらかじめ約16時間絶食させたラットを用いて, 酢酸潰瘍モデルは注入法⁶⁾により作成した. 胃組織中放射能濃度測定の場合は酢酸注入後5日目に, また, 胃組織のマイクロオートラジオグラフィー作製の場合は8日目に実施した.

3. 投与方法および投与量

^{14}C -KT1-32は0.9%生理食塩水に溶かし, 非標識化合物を加え希釈し, 20mg/3ml/kg の割合で経口投与した.

4. 胃組織の放射能濃度

投与後1, 3, 6, 12および24時間に腹部大動脈腸骨

PA=phosphoric Acid

Fig. 2 Synthetic route of ^{14}C -KT1-32.

*: the position labeled with ^{14}C

分岐部より採血後、直ちに胃を摘出した。大彎に沿って切り、生理食塩水で軽く洗い、プロットイング後、直径3.6mmの円型に腺胃部正常部、潰瘍部および前胃部を切り取った。また、腺胃部正常部は直径11mmの円型に切り取り、荒川らの方法⁷⁾に従って粘膜層と筋層を分離した。それぞれ組織の湿重量を測定後、バイアルにとり、可溶化剤 NCS (Amersham 社) 1.0ml を加え、必要に応じ50℃以下で加温し可溶化させた。脱色剤として過酸化ベンゾイルのトルエン飽和溶液0.2 ml を用時調製し加え、50℃、30分間加温し脱色した。エマルジョン系シンチレーター ACS II (Amersham 社) を5.0ml 加え、液体シンチレーションカウンター (LSC 1000形, Aloka 社) で放射能を測定した。計数効率補正は外部標準線源によるチャンネル比法により行った。

5. 胃組織のマイクロオートラジオグラフィー

マイクロオートラジオグラム作製法は、水溶性・脂溶性マイクロオートラジオグラフィーの常法⁸⁾に従い標本とした。概略については下記のとおりであった。投与後3,6および12時間に動物をエーテル麻酔死させ、胃を摘出した。摘出した臓器を直ちに液体窒素を用いて凍結固定した。薄切切片をクリオスタット内でマイクロトーム (Leitz 1400 型) を用いて作製し、切片を冷却下で凍結乾燥させた。その後、原子核乳剤 OS-15 (富士写真フイルム(株)) と密着し、適正期間露出後、写真処理を行い、その後 H.E. 染色を行った。オートラジ

オグラムは、切片上の黒化現象銀の粒子分布を組織像と同時撮影した。

なお、本項目の実施は(株)生体科学研究所に委託した。

6. 統計処理

2 群間の平均値の検定は、F 検定で等分散性を検定した後、対応のない場合のステューデント t 検定で行い、等分散が成立しないときは、ウェルチの検定で行った。また、対応のあるデータは、対応のある場合のステューデント t 検定により行った。棄却検定はスミルノフの方法で行った。

結 果

1. 胃組織の放射能濃度

(1) 胃壁での放射能分布

¹⁴C-KT1-32 を 20 mg/kg の用量で酢酸潰瘍ラットへ経口投与し、胃壁各部位への放射能の移行を測定し、結果を Table I に示した。投与後 1 時間から 3 時間の放射能濃度では、腺胃部の潰瘍部は正常部に比較して高い値を示したが、有意な差は認められなかった ($p > 0.05$)。しかし、投与後 6 時間から 24 時間では、腺胃部潰瘍部は正常部に比較し、有意に高い値を持続していた ($p < 0.01$)。

前胃部では、投与後 1 時間 ($p < 0.05$) および 12 時間 ($p < 0.01$) において腺胃部正常部に比較して有意に高い値を示したが、投与後 3, 6, 24 時間では個体差による変動が大きく有意な差は得られ

Table I Distribution of radioactivity in the gastric wall after oral administration of ¹⁴C-KT1-32 to rats (dose : 20mg/kg)

Time (hr)	Glandular stomach		Fore stomach
	Normal tissue	Ulcer part	
1	62.6 ± 13.6	84.6 ± 25.2	251.0 ± 65.8*
3	86.3 ± 27.1	172.0 ± 64.7	140.6 ± 53.9
6	10.5 ± 3.9	18.6 ± 1.2**	37.2 ± 13.8
12	4.4 ± 1.0	11.1 ± 1.4**	12.0 ± 1.7**
24	3.2 ± 1.0	8.2 ± 1.8**	10.8 ± 3.5

Radioactive concentration : μg eg. of KT1-32/g wet wt.

The data represent the mean $\pm$ S.E. (n=5).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significant difference was calculated from normal tissue.

Fig. 3 Distribution of radioactivity in the gastric mucosa and muscular layer after oral administration of ^{14}C -KT1-32 in rats (dose: 20mg/kg).

The data represent the mean $\pm$ S.E. (n=5).

*p < 0.05: Significant difference from mucosa.

なかった ($p > 0.05$).

(2) 胃組織中での放射能分布

^{14}C -KT1-32を20mg/kg 酢酸潰瘍ラットへ経口投与し、腺胃部正常部の胃粘膜層および筋層中放射能濃度を測定した結果を Fig. 3に示した。

投与後1時間の放射能濃度は、粘膜層では139.9 $\mu\text{g/g}$ (KT1-32換算)、筋層では44.5 $\mu\text{g/g}$ であり、粘膜層では筋層に比較して有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。筋層中の放射能濃度は粘膜層の32%であった。

投与後3時間の放射能濃度は、粘膜層では151.6 $\mu\text{g/g}$ となり、平均値では約8%の上昇を示したに過ぎないのに反し、筋層では71.3 $\mu\text{g/g}$ となり、平均値では約60%の上昇を示した。粘膜層では筋層に比較して投与後1時間の場合と同様に高い値を示したが、有意差はなかった ($p > 0.05$)。筋層中の放射能濃度は粘膜層の47%であり、粘膜層放射能濃度に対する筋層放射能濃度の比は上昇した。

投与後6時間の放射能濃度は粘膜層では12.1 $\mu\text{g/g}$ 、筋層では12.9 $\mu\text{g/g}$ となり、経時的な放射

能濃度の減少が認められた。粘膜層放射能濃度に対する筋層放射能濃度の比は3時間よりもさらに上昇し、両者はほぼ等しい値となった。

投与後12時間から24時間の粘膜および筋層放射能濃度は、いずれも6時間の約1/2に低下したが、粘膜層放射能濃度に対する筋層放射能濃度比はほぼ等しく、その比に変化はなかった。

2. 胃組織のマイクロオートラジオグラフィー

絶食下雄性ラットに、 ^{14}C -KT1-32を20mg/kgの用量で経口投与した後の前胃部、腺胃部正常部および潰瘍部のマイクロオートラジオグラムを作製し、それぞれの部位での銀粒子の分布を調べた。

^{14}C -KT1-32を投与後3時間では、前胃部の胃腔内に非常に密な銀粒子が観察され、その粘膜下層組織にもかなりの銀粒子が分布していたが、銀粒子の分布には局在性は認められなかった (Fig. 4a)。同様に、腺胃部正常部の胃底腺頸部から体部にかけての銀粒子の分布にも局在性はなかった (Fig. 4b)。

腺胃部正常部においては、胃壁、胃小窩 (Fig.

Fig. 4 Microautoradiograms showing the distribution of radioactivity in stomach after oral administration of ^{14}C -KT1-32 to acetic acid-induced rat (dose: 20mg/kg).

- a) fore stomach (gastral cavity) at 3hr, $\times 320$.
- b) fundic gland (corpus glandulae) at 3hr, $\times 800$.
- c) ulcer part at 3hr, $\times 800$.
- d) ulcer part at 12hr, $\times 800$.

5 a), 胃底腺頸部 (Fig. 5 b), 胃底腺体部 (Fig. 5 c), 粘膜筋板 (Fig. 5 d), および筋層にかけ銀粒子の濃度勾配が観察された。

胃潰瘍部では、その表層に密な銀粒子の分布が観察された (Fig. 4 c)。

投与後6時間では、胃腔内、前胃部、腺胃部正常部および胃潰瘍部とも、3時間のものと比較して銀粒子の減少が認められた。

投与後12時間では、前胃部の胃腔内の銀粒子は、6時間のものと比較して顕著に減少を示したのに反し、胃潰瘍部ではその表層に銀粒子が認められた (Fig. 4 d)。

考 察

1. 胃壁での放射能分布

^{14}C -KT1-32経口投与後の腺胃部正常部、潰瘍部および前胃部での放射能濃度を Table I に示

した。潰瘍部の放射能濃度は、腺胃部正常部に比較して長時間高い値を保持していることは、ラットの酢酸潰瘍モデルにおいて、KT1-32経口投与 ($10\text{mg/kg} \times 3\text{回/日}$) で有効であった実験結果⁹⁾ を強く支持しているものと考えられた。

また、ラット酢酸潰瘍モデルの潰瘍部マイクロオートラジオグラム (Fig. 4 c, 4 d) においても、上述の結果は良く一致した。

投与後1時間および12時間では、前胃部では腺胃部正常部に比較して有意に高い放射能濃度が認められた (Table I)。この原因としては、野津らが報告¹⁰⁾ しているように、腺胃部正常部では粘液が分泌されているため、粘液分泌に伴い一部付着した ^{14}C -KT1-32が流出したためと考えられた。

一方、潰瘍部位では、腺胃部正常部に比較してKT1-32が長時間高濃度に保持されたのは、潰瘍

Fig. 5 Microautoradiograms showing the distribution of radioactivity in normal tissue of glandular stomach at 3hr after oral administration of ^{14}C -KT1-32 to acetic acid induced rat (dose: 20 mg/kg).

a) gastral cavity and gastric pits, $\times 320$.

b) neck of the gastric gland, $\times 320$.

c) corpus glandulae, $\times 320$.

d) lamina muscularis mucosa, $\times 320$.

部では粘膜の喪失による粘液分泌の低下に加え、既報¹¹⁾で報告したように、KT1-32の蛋白結合率が高いため、潰瘍形成過程で発生した潰瘍部の蛋白と結合しているためと考えられた。

すなわち、実験的に作成した酢酸潰瘍病変部には、毛細血管からの血漿蛋白の浸潤が認められるとされている¹²⁾。一方、KT1-32は血漿中の主要蛋白であるアルブミンと98%以上結合することから、潰瘍病変部においては、毛細血管から浸潤したアルブミンと ^{14}C -KT1-32が結合し、その放射能が潰瘍部に局在化し、長時間高濃度に保持されていたと考えられた。

2. 胃組織中での放射能分布

^{14}C -KT1-32投与後の粘膜層放射能濃度に対する筋層放射能の比は、Fig. 3に示したように、

上昇傾向が6時間までみられ、KT1-32が胃組織中へ容易に移行する可能性を示唆した。この事實は、本化合物が水に易溶のスルホン酸ナトリウム塩であるにもかかわらず、*n*-ブタノールあるいは酢酸エチルにも可溶な脂溶性（分配係数=2.64~1.26 (pH 3~9))¹³⁾であることに起因すると考えられた。

ラット酢酸潰瘍モデルの潰瘍部マイクロオートラジオグラムにおいても、上述の結果と良く一致していた。 ^{14}C -KT1-32経口投与後3時間では、腺胃部正常部の胃腔から粘膜筋板 (Fig. 5 a~d) および筋層にかけて銀粒子の濃度勾配が観察された。

また、このマイクロオートラジオグラムにおいては、腺胃部正常部の粘液分泌細胞などの特定の部位での銀粒子の局在性は観察されず (Fig. 4 b,

5b~d), 血液を介しての胃組織への移行は正常組織では少ないことが示唆された。

望月らの報告(未発表データ)によると, ラット急性潰瘍モデルであるエタノール潰瘍で, 本化合物の予防効果を検討した結果, 経口投与では, ED₅₀が5.5mg/kg であったのに対し, 皮下投与

では, 100mg/kg で抑制作用が認められなかったと述べている。この結果は, 本化合物の保護作用が, 胃粘膜に対し, 直接的に作用していることを示唆したものと考えられる。

本実験結果は, 本化合物の薬理作用を, 放射能分布から, 支持したものと考えられた。

文 献

- 1) Yanagisawa, T., Wakabayashi, S., Tomiyama, T., Yasunami, M., Takase, K.: Synthesis and anti-ulcer activities of sodium alkylazulene sulfonates. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(2): 641-647 (1988).
- 2) 岡部 進, 竹内孝治, 森 吉美, 古川 修, 山田義治: Azulene 誘導体, KT1-32 のラットの各種胃・十二指腸潰瘍に対する効果. 日薬理誌, **88**: 467-476 (1986).
- 3) Mochizuki, S., Wakabayashi, S., Tomiyama, A., and Shibata, S.: Thromboxane A₂ antagonistic action of new anti-ulcer agent, azuletil sodium (KT1-32). *Scand. J. Gastroenterol.*, **24** (Suppl. 162): 194-197 (1989).
- 4) Rogers, C., Brown, A., Szabo, S.: Gastric mucosal protection by new aryl sulfhydryl drugs. *Digestive diseases and sciences*, **133**(3): 324-329 (1988).
- 5) 須坂浩章, 竹下通廣, 佐藤正雄, 富山 剛, 宮崎 浩: アズレチル ナトリウム (KT 1-32) の生体内動態 (第1報) ラット尿中代謝物の同定. 薬物動態, **5**(2): 217-228 (1990).
- 6) Takagi, K., Okabe, S. and Saziki, R.: A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. *Jap. J. Pharmacol.*, **19**: 418-426 (1969).
- 7) 荒川哲男, 中村 肇, 蝶野慎治, 山田博明, 小林絢三: ラット胃粘膜 prostaglandin E₂に関する研究 (第1報) 日本消化器病学会誌, **77**(7): 1052-1058 (1980).
- 8) P.B. ガーハン編, 重松昭世, 平田 明訳: オートラジオグラフィー技術, p. 131 (1987), 講談社サイエンティフィク.
- 9) 若林修一, 望月誠一郎, 小坂井一宏, 関口仁美, 松本 真, 富山 格, 竹内雅也, 竹内孝治, 岡部 進: 実験的慢性潰瘍に対する Azuletil sodium (TK1-32) の治療促進効果および SPF 施設での実施による治癒の促進について, 日薬理誌, in press.
- 10) 野津隆司, 青柳忠雄, 河野喜郎, 大関正弘: 正常および潰瘍ラットにおける 2'-Carboxymethoxy-4, 4-bis-(3-methyl-2-butenyloxy)-chalcone (SU-88) のオートラジオグラフィーによる体内分布, 応用薬理, **18**(5): 823-833 (1979).
- 11) 佐藤正雄, 須坂浩章, 富山 格, 宮崎 浩: アズレチル ナトリウム (KT1-32) の生体内動態 (第5報) 蛋白結合性および血球移行性. 薬物動態, **5**(3): 375-382 (1990).
- 12) Nagashima R., Hinohara V., Hirano T., Kamiyama H.: Selective Binding Sucralfate to Ulcer Lesion *Arzneim-Forsch*, **30**(1): 84-88 (1980).
- 13) 吉田宗生, 柳沢 隆, 赤羽俊英, 窪田光一, 富山 剛: Azuletil sodium の物理化学的性質及び安定性. 医薬品研究, **21**(4): 613-625 (1990).