ヒアルロン酸ナトリウム (SL-1010) の関節腔内投与後の体内動態 (第5報): ウサギにおける肩関節腔内単回投与後の分布, 代謝および排泄

秋間 和雄・松尾香世子・小林 慎一
長谷川雅明・佐藤 郁郎・渉 信敏

Studies on the Metabolic Fate of Sodium Hyaluronate (SL-1010) after Intra-articular Administration V: Distribution, Metabolism and Excretion after Intra-articular Injection into Rabbit Shoulder

Kazuo AKIMA, Kayoko MATSUO, Shin-ichi KOBAYASHI,
Masaaki HASEGAWA, Ikuro SATO, Nobutoshi WATARI

Pharmaceutical Research Laboratories, Shiseido Co., Ltd., Yokohama

Summary

Metabolic fate of a high molecular weight ^{14}C -labeled sodium hyaluronate (^{14}C -SL-1010), a highly purified preparation from the culture medium of *Streptococcus zooepidemicus*, was studied in rabbits after intra-articular injection into the shoulder.

1. Radioactivity in the synovial fluid was eliminated biphasically with an apparent half-life of 57 hr during the first phase, when most radioactivity was eliminated. The fraction of ^{14}C -labeled sodium hyaluronate to total radioactivity recovered from the synovial fluid was above 95%, indicating no metabolism in the synovial fluid.

2. In the joint region, the highest radioactivity was observed in the mesotenon, followed by the synovial tissue and tendon. In the whole body, the extremely high radioactivity was detected in the axillary lymph node, and relatively high radioactivity was observed in the liver and spleen than in other tissues. Approximately 90% of the radioactivity in the synovial tissue was derived from interstitial synovial fluid of synovial tissues. Analysis of distribution of radioactivity revealed that the main route of elimination of ^{14}C -SL-1010 from the cavity was *via* the lymphatic system, since the level of radioactivity in the axillary lymph node was much higher than that in the liver.

3. Analysis of metabolism of ^{14}C -SL-1010 in the synovial fluid and tissue, axillary lymph node, plasma and urine was done by gel filtration. Gel filtration patterns showed that ^{14}C -SL-1010 was not metabolized in the synovial fluid. However, slight metabolism occurred in the synovial tissue and rapid metabolism occurred in the axillary lymph node. The radioactivity in the plasma 168 hr after injection was derived from plasma protein and that in the urine was mainly detected in the fraction of V_t of gel filtration except for a very small fraction such as oligosaccharide.

4. Excretion of radioactivity at 76 hr was 39, 1.6 and 1.4% in expired air, urine and feces, respectively.

5. The intra-articular injection of ^{14}C -SL-1010 into the shoulder produced results similar to those after injection to the knee joint except for the site of lymphatic elimination; the elimination occurred mainly *via* the axillary lymph node after shoulder injection versus *via* the lumbar-iliac node after knee injection.

Key words : Sodium hyaluronate (SL-1010), Intra-articular injection, Distribution, Metabolism, Excretion, Axillary lymph node, Gel filtration, Shoulder, Rabbit

緒 言

SL-1010は *Streptococcus zooepidemicus* を用いて醗酵生産された高分子量のヒアルロン酸ナトリウム¹⁾で、変形性膝関節症および肩関節周囲炎等の治療薬としての開発研究が進められている。著者らは既に、 ^{14}C 標識 SL-1010 (^{14}C -SL-1010) をウサギの膝関節腔内に投与後の体内動態^{2,3)}および蛍光標識 SL-1010をウサギの肩関節腔内に投与後の組織分布⁴⁾について報告した。その結果、ウサギの膝関節腔内に投与された ^{14}C -SL-1010は、膝関節腔内より半減期32時間で主としてリンパ行性に消失し、所属リンパ節である腰椎リンパ節で大部分が代謝され、ヒアルロン酸ナトリウム (HA) としての全身移行性は僅かであることが判明した。

今回は膝関節腔内投与後の体内動態と比較する目的で、 ^{14}C -SL-1010をウサギの肩関節腔内に投与し、関節腔内からの消失速度、消失経路、組織分布、代謝および排泄について検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 標識化合物

^{14}C -SL-1010は、既報⁵⁾と同じ方法により *Streptococcus zooepidemicus* の培養液中に前駆体として N-アセチル-D-[1- ^{14}C] グルコサミン(比放射能 2.1 GBq/mmol, 放射化学的純度99%以上, Amersham)を添加して生合成し、分離精製したものを使用した。得られた ^{14}C -SL-1010 (ロット H-30) の比放射能は51.9 kBq/mg であり、極限粘度より Laurent らの式⁶⁾から算出した粘度平均分子量は 1.98×10^3 kDa であった。電気泳動法お

よびヒアルロニダーゼ感受性⁵⁾を利用した ^{14}C -SL-1010の放射化学的純度は98.5%以上であり、また、エンドトキシン含量は2 EU/ml 以下であった。

2. 実験動物

日本白色種雄性ウサギ (SPF, 体重1.85~2.66 kg, 東京実験動物) を使用した。動物には、水および固型飼料 (ラボ R ストック, 日本農産) を自由に摂取させ、温度 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ の室内で3日間以上予備飼育したのち、1群3~8匹を実験に供した。

3. 投与液の調製および投与方法

^{14}C -SL-1010は、等張化リン酸緩衝液 (pH 7.3) を用いて臨床使用濃度である1% (w/v) に調製後、 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルター (MILLEX-HA, 日本ミリポア工業) で濾過し、投与液とした。

動物は、ケタミン (ケタラール50, 三共) およびキシラジン (セラクタール2%注射液, バイエルジャパン) の10:1 混液の筋肉内投与により全身麻酔させたのち、肩関節部を剪毛し、左肩上腕骨頭に沿って、1% ^{14}C -SL-1010を $200 \mu\text{l}$ のマイクロシリンジを用いて肩関節腔内に $150 \mu\text{l}$ を注入した。

4. 試料の採取および調製

1) 関節液および関節部組織

^{14}C -SL-1010を投与後、24, 48, 96および168時間にウサギをペントバルビタールによる全身麻酔下で、腹大動脈より採血して致死させた。左腋窩リンパ節 (投与側) を採取後、左上腕部より上腕

三頭筋および上腕二頭筋の一部を採取した。肩関節部周辺組織を可能な限り除いたのち、関節部を上腕二頭筋に沿って切開し、関節腔内を10 mlの生理食塩液で2回洗浄することにより関節液を回収した。関節部は新しい生理食塩液に10分間浸漬し、先の関節腔内洗浄液に合わせたのち、25 mlにメスアップした。なお、各時点の関節液中の総放射能残存率は、投与後直ちに同上洗浄操作を行った0時間の回収率で補正した。

洗浄終了後関節部より上腕二頭筋腱、二頭筋腱間膜および滑膜を採取した。全身組織では、血液、血漿、脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、腸間膜リンパ節、筋肉（大腿部）および脂肪（腹部）を採取した。関節液は一定量を採取後、各組織は湿重量を測定後放射能を測定した。

関節液中のHAの抽出は、既報の血中濃度定量法⁵⁾に準じて実施した。すなわち、¹⁴C-SL-1010を投与後の関節液は、プロナーゼ処理による蛋白消化後、セチルピリジニウムクロリド(CPC)沈殿操作、0.5 M NaClによる分別抽出操作によりHAを抽出し、ゲル濾過クロマトグラフィおよび定量用の試料とした。

滑膜（試料が少量のため3匹分をプールして用いた）は細切後、2 mlのクロロホルム・エタノール（2:1）を加えて一晚攪拌後、遠心して上清を除去することにより脱脂した。沈渣に抽出効率を高める目的で高張緩衝液（100 mM リン酸緩衝液-1 M NaCl (pH 7.4)）を加えたのち、100°C、5分加熱し、3,000 rpmで遠心して得られた上清を滑膜抽出液としてゲル濾過クロマトグラフィの試料とした。

また、滑膜は関節液に直接接触している組織であるので、投与後24時間の滑膜を用い、滑膜細胞内と滑膜の組織間空隙（interstitial space）に存在する放射能の分別定量を行った。すなわち、滑膜組織を2 mlの10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）-0.9% NaClに懸濁、ヒアルロニダーゼ（ウシ臍丸由来、終濃度20 U/ml）を加え、37°Cで、一晚反応させた。遠心により沈渣と上清に分離し、沈渣の放射能を細胞内に取り込まれた放射

能とし、上清の放射能を組織間空隙の放射能とした。

2) リンパ節

腋窩リンパ節（試料が少量のため3匹分をプールして用いた）に、3 mlの10 mM リン酸緩衝液-1.15% KCl (pH 7.4)を加え、氷冷下テフロンホモジナイザーにより、ホモジネートを調製した。ホモジネートの0.1 mlを用いて燃焼法により総放射能を測定し、また1 mlを用いて関節液と同様にHAを抽出して定量した。残りの1.9 mlに400 μ lの500 mM リン酸緩衝液-5 M NaClを加えることにより高張とし、以下滑膜の場合と同様の操作でリンパ節抽出液を調製してゲル濾過クロマトグラフィの試料とした。

3) 呼気、尿および糞

¹⁴C-SL-1010を肩関節腔内に投与後直ちに動物を代謝ケージに移し、呼気をモノエタノールアミン/メタノールまたはエタノールの1:1混液を入れた捕集瓶に導入し、投与後72時間まで24時間ごとに呼気中の¹⁴CO₂を捕集し放射能を測定した。尿および糞についても24時間ごとに72時間まで採取し、放射能を測定した。

5. ゲル濾過クロマトグラフィ

セファクリル S-1000（関節液、滑膜および腋窩リンパ節試料に対して）またはセファクリル S-300（尿および血漿試料に対して）を充填した内径15 mm、高さ700 mmのカラムを用いてゲル濾過分析を実施した。カラムは、予め10 mM リン酸緩衝液-0.9% NaCl (pH 7.4)で十分平衡化させたのち、2 ml（血漿の場合は5 ml）の試料をカラムに添加した。4~7 ml/cm²/hrの流速で試験管1本あたり2 ml（血漿の場合は5 ml）ずつ分画し、放射能を測定した。また、血漿試料については、ヒアルロニダーゼおよびプロナーゼ処理後の試料もゲル濾過分析に供した。なお、尿試料については、放射能濃度が低いため、減圧乾固後約2 mlの蒸留水に溶解したものをゲル濾過分析用の試料とした。

6. 放射能の測定

組織などの固形試料については、サンプルオキシダイザー (ASC-113, Aloka) にて燃焼後、液体シンチレーションカウンター (LS 6000, Beckman) で放射能を測定した。関節液などの液体試料はアクアゾール2 (NEN Research Products), 尿試料はアトムライト (NEN Research Products) を加え放射能を測定した。計数効率の補正は、外部標準線源法によった。

実験結果

1. 関節腔内残存率

^{14}C -SL-1010をウサギ肩関節腔内に投与後の放射能の関節腔内残存率の結果を Fig. 1 に示す。関節腔内に投与された ^{14}C -SL-1010は、関節腔内より二相性に1次速度で減少し、主消失を占める第一相の半減期は約57時間であった。また、投与後168時間では3.1%に減衰した。

関節液中総放射能に占める HA 由来の放射能

Fig. 1 Elimination of radioactivity from joint cavity after intra-articular injection of ^{14}C -SL-1010 into shoulder of male rabbits
Each point: mean $\pm$ S.D. of 4 to 8 animals
Data are expressed as percentage of dose.

の割合は、投与後24, 48および96時間とも95%以上のほぼ一定の高い値を示し、経時変化は観察されなかった。

Table 1 Tissue levels of radioactivity after intra-articular injection of ^{14}C -SL-1010 into shoulder of male rabbits at dose of 1.5 mg/head

	Radioactivity (μg eq. of ^{14}C -SL-1010/g wet tissue)			
	24 hr	48 hr	96 hr	168 hr
Plasma	0.07 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.02
Blood	0.04 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01
Brain	0.05 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.03
Lung	0.10 $\pm$ 0.12	0.18 $\pm$ 0.13	0.11 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.03
Liver	0.33 $\pm$ 0.07	0.35 $\pm$ 0.10	0.54 $\pm$ 0.10	0.36 $\pm$ 0.11
Kidney	0.09 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.05
Spleen	0.13 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.05
Adrenal	0.06 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.04
Mesenteric lymph node	0.10 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.04
Muscle (right thigh)	0.01 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01
Fat (abdominal)	0.00 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.03
Axillary lymph node (Left shoulder joint)	21.83 $\pm$ 8.51	17.49 $\pm$ 3.82	15.26 $\pm$ 4.04	8.85 $\pm$ 4.98
Synovial tissue	162.43 $\pm$ 68.38	185.16 $\pm$ 66.36	263.27 $\pm$ 55.00	117.17 $\pm$ 54.51
Mesotendon	649.86 $\pm$ 399.85	499.01 $\pm$ 129.91	448.07 $\pm$ 132.47	179.14 $\pm$ 70.41
Tendon	60.81 $\pm$ 20.43	81.20 $\pm$ 50.92	40.93 $\pm$ 12.14	23.80 $\pm$ 10.69
Brachial biceps	0.03 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.02
Brachial triceps	0.02 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.07	0.09 $\pm$ 0.02

The data represent the mean $\pm$ S.D. of 3 to 5 animals.
Radioactivity is converted to μg equivalent of ^{14}C -SL-1010.

2. 関節部および全身組織分布

組織分布の測定結果を **Table 1** に、さらに主要組織については結果を **Fig. 2** に示す。関節部組織分布では、上腕二頭筋腱間膜に最も高い放射能が認められ、滑膜、上腕二頭筋腱の順に放射能は低下した。経時的には投与後96時間まで比較的高い放射能が認められたが、投与後168時間ではピーク時の1/3程度に減少した。なお、上腕二頭筋および三頭筋の放射能は、いずれの時間も血漿と同程度であり、著しく低かった。

主要組織分布の結果を **Fig. 2** に示したが、肩関節の所属リンパ節と考えられる腋窩リンパ節に際立って高い放射能が認められた。放射能濃度は、対照として採取した腸間膜リンパ節の60～220倍高い値であった。また、静脈内投与の場合の主代謝組織である肝臓⁷⁾と比較しても25～70倍高い値であった。なお、肩関節腔近傍の上腕リンパ節の放射能はバックグラウンドレベルであった。

腋窩リンパ節以外では、肝臓がやや高く、次の

Fig. 2 Tissue levels of radioactivity after intra-articular injection of ^{14}C -SL-1010 into shoulder of male rabbits

Each symbol represents (●—●), axillary lymph node; (▲—▲), liver; (△—△), spleen; (○—○), mesenteric lymph node; (■—■), plasma and (□—□), blood

Each point: mean $\pm$ S.D. of 3 to 5 animals

Radioactivity is converted to μg equivalent of ^{14}C -SL-1010.

で脾臓にも比較的高い放射能が認められた。血漿および全血中放射能濃度は低かった。これらの組織濃度は経時的に投与後48～96時間にピークを示したが、投与後168時間では減衰傾向を示した。

3. 代謝物の分析

1) 関節液

投与原体の ^{14}C -SL-1010ならびに投与後24, 48および96時間の関節液より抽出したHAの分子量分布を **Fig. 3** に示す。投与原体の ^{14}C -SL-1010と比較して分子量分布には経時的变化はほとんど認められなかったが、投与後96時間では関節腔内残存率は約1/3に減少したものの、低分子部分の速い排泄に伴って高分子部分の割合が相対的に増加し、結果的にピークは前方にシフトした。

2) 滑膜

投与後24および48時間の滑膜抽出液のセファクリルS-1000ゲル濾過クロマトグラフィの結果を **Fig. 4** に示す。滑膜抽出液の放射能は、投与原体の ^{14}C -SL-1010の溶出位置とカラム容積(Vt)に相当する位置に分別して溶出された。そこで、投与後24時間の滑膜をヒアルロニダーゼ処理することにより、組織間空隙に存在する放射能と滑膜細胞内に取り込まれた放射能を分別定量した。測定は2例で行ったが、組織間空隙に存在する放射能の比率はそれぞれ91.9および86.4%で、残りの放射能は滑膜細胞に存在し、滑膜中放射能の約90%が組織間空隙に存在した。したがって、**Fig. 4** の ^{14}C -SL-1010の溶出位置の放射能は組織間空隙の放射能を示し、Vt付近の放射能は滑膜細胞内に取り込まれた放射能に相当するものと考えられる。

3) 腋窩リンパ節

投与後24および48時間の腋窩リンパ節中HA濃度を測定した。その結果、腋窩リンパ節中の総放射能に占めるHAの割合は、投与後24時間では13.2%であったが、投与後48時間では1.5%と少なかった。

Fig. 3 Sephacryl S-1000 gel filtration patterns of ^{14}C -HA isolated from synovial fluids after intra-articular injection of ^{14}C -SL-1010 into shoulder of male rabbits

(○—○): ^{14}C -SL-1010; (●—●): 24 hr
(▲—▲): 48 hr; (◆—◆): 96 hr

Fig. 4 Sephacryl S-1000 gel filtration patterns of radioactivity in synovial tissues after intra-articular injection of ^{14}C -SL-1010 into shoulder of male rabbits

(●—●): 24 hr; (▲—▲): 48 hr

Fig. 5 Sephacryl S-1000 gel filtration patterns of radioactivity in axillary lymph node after intra-articular injection of ^{14}C -SL-1010 into shoulder of male rabbits
(●—●): 24 hr; (▲—▲): 48 hr

Fig. 6 Sephacryl S-300 gel filtration patterns of radioactivity in plasma at 168 hr after intra-articular injection of ^{14}C -SL-1010 into shoulder of male rabbit before (○—○) and after pronase (●—●) or hyaluronidase (△—△) treatment

投与後24および48時間の腋窩リンパ節抽出液のセファクリル S-1000ゲル濾過クロマトグラフィの結果を **Fig. 5** に示す。その結果、放射能のほとんどは V_t 付近に溶出され、腋窩リンパ節の高い HA 代謝活性が示された。

4) 血漿

投与後168時間の未処理の血漿ならびにヒアルロニダーゼおよびプロナーゼ処理後の血漿をセファクリル S-300ゲル濾過クロマトグラフィにより分析した。 **Fig. 6** に示すように、ヒアルロニダーゼ処理ではクロマトグラムは変化しなかったが、プロナーゼ処理により放射能のピークは V_t 付近に移動した。また、未処理の血漿の280 nmの紫外吸収と放射能の溶出位置が一致した。これらの結果より、投与後168時間の血漿中放射能は、HA ではなく血漿蛋白に由来することが示された。

5) 尿

投与後24～48および48～72時間に採取した尿

試料のセファクリル S-300を用いたクロマトグラムを **Fig. 7** に示す。その結果、投与後24～48時間の尿試料では、フラクション番号40～45付近のオリゴ糖領域にも若干の放射能が認められたが、ほとんどの放射能が V_t 付近に観察された。

4. 呼吸、尿および糞中排泄

呼吸、尿および糞中排泄の結果を **Fig. 8** に示す。投与後72時間までの累積排泄率は呼吸中に39%，尿中に1.6%，糞中に1.3%であり、呼吸中にほとんどの放射能が排泄され、尿および糞中排泄は少なかった。

考 察

^{14}C -SL-1010をウサギの膝関節腔内に投与後の体内動態^{2,3)}ならびに蛍光標識 SL-1010 (FR-SL-1010) をウサギの肩関節腔内に投与後の肩関節部組織分布⁴⁾については、既に報告した。その結果、ウサギの膝関節腔内に投与された ^{14}C -SL-

Fig. 7 Sephadryl S-300 gel filtration patterns of radioactivity in pooled urine after intra-articular injection of ^{14}C -SL-1010 into shoulder of male rabbits (○—○), 24-48 hr; (●—●), 48-72 hr

Fig. 8 Cumulative excretion of radioactivity in expired air (●—●), urine (■—■) and feces (▲—▲) after intra-articular injection of ^{14}C -SL-1010 into shoulder of male rabbits
Each point: mean $\pm$ S.D. of 3 animals

1010は、関節腔内より32時間の消失半減期でリンパ行性に消失し、所属リンパ節である腰椎リンパ節で代謝されることが明らかとなった。さらに、関節腔内滞留性には分子量依存性があり、分子量の低下に伴って関節腔内滞留性が減少することが判明した³⁾。また、肩関節腔内に投与されたFR-SL-1010は蛍光顕微鏡観察の結果、滑膜等の組織の表面ないしは表層にのみ分布していることが認められた。

今回は ^{14}C -SL-1010をウサギの肩関節腔内に投与し、投与後の関節腔内消失速度および消失経路、組織分布、代謝ならびに排泄について検討した。これらの結果を膝関節腔内投与後の結果と比較すると、肩関節投与においても膝関節投与と同様に ^{14}C -SL-1010はリンパ行性に消失し、所属リンパ節である腋窩リンパ節で代謝されることが明

らかとなり、投与部位による所属リンパ節が異なる点を除いては消失経路、全身分布、血漿および尿中放射能の由来ならびに排泄経路ともにはほぼ一致した結果が得られた。

肩関節腔内に投与された ^{14}C -SL-1010は、関節腔内より1次速度で二相性に消失し、消失の大部分を占める（投与後96時間まで）の第一相の半減期は57時間であった。この二相性の消失は膝関節腔内投与の場合^{2,3)}と同様であったが、消失半減期は膝関節投与の場合の32時間に対して肩関節投与の57時間は長く、肩関節投与後の持続性が認められた。この相違に関しては投与量（膝関節の投与量は1 mg/kg）、肩関節腔と膝関節腔の容積の大きさ、あるいは滑膜面積などの差異に起因するものと考えられる。投与後24, 48および96時間の関節液中HA濃度を定量した。そ

の結果、総放射能に占める HA の割合はいずれの時間も95%以上を示した．この値は HA 抽出操作における添加回収率 $96.5 \pm 2.2\%$ ($n=4$)⁵⁾にほぼ匹敵した．また、関節液中より HA を抽出し、分子量分布の経時変化を投与後96時間まで調べた結果、投与原体の ^{14}C -SL-1010の分子量分布と比較して、投与後48時間までは分子量分布の変化はほとんど観察されなかった．投与後96時間では低分子部分の速い排泄に伴って、相対的に高分子部分の割合が増加し、結果としてピークが前方にシフトした．これらの結果は関節腔内での ^{14}C -SL-1010の代謝は認められないことを示している．また、既報²⁾の膝関節腔内投与の場合でも、投与後24時間より ^{14}C -SL-1010の低分子部分がより速く関節腔内より排泄される現象を認め、今回の傾向と一致した．

関節部組織の放射能濃度は、上腕二頭筋腱間膜に最も高く、以下滑膜、上腕二頭筋腱の順に放射能が低下した．腱間膜は組織学的には疎性結合組織と上皮組織⁸⁾であることから、組織内部に広い組織間空隙を有すると考えられ、腱間膜の高い放射能は、この部分に ^{14}C -SL-1010が移行した結果であると推測される．

全身組織部分では、肩関節腔の所属リンパ節と考えられる腋窩リンパ節の放射能濃度が著しく高い値を示し、対照として採取した腸間膜リンパ節の60～220倍高かった．なお、肩関節腔の末梢に位置する上腕リンパ節の放射能は低かった．これらのことより、膝関節腔の所属リンパ節が腰椎リンパ節²⁾であったのに対し、肩関節腔の所属リンパ節は腋窩リンパ節であることが判明し、肩関節腔内に投与された ^{14}C -SL-1010は膝関節腔内投与の場合と同様、リンパ行性の消失が主たる消失経路であることが明らかとなった．腋窩リンパ節以外では、肝臓がやや高く、次いで脾臓にも比較的高い放射能が認められた． ^{14}C -SL-1010を静脈内投与した場合には、脾臓の放射能は肝臓に対して2～3倍高かったが⁷⁾、肩関節腔内投与の場合には、逆に肝臓中濃度が1.5～2倍高かった．これらの結果も、関節腔内に投与された ^{14}C -SL-1010

のリンパ行性消失を裏付ける傍証であると考えられる．また、血漿中放射能は、HAではなく血漿蛋白質に由来することが示され、膝関節投与の結果と一致した．この結果は腋窩リンパ節などにおいて低分子化された HA、あるいは血中に移行した HA が主代謝臓器である肝臓に取り込まれ、構成単糖である N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸となり、構成単糖は更に分解されて呼吸中に CO_2 として排泄⁹⁾されるとともに一部は生体成分、特に蛋白質等の合成に再利用されたものと考えられる．

滑膜は関節液に直接接触した組織間空隙の広い疎性結合組織であるため、投与後24時間の組織を用い、ヒアルロニダーゼ処理することにより、滑膜細胞に取り込まれた放射能と組織間空隙に存在する放射能を分離定量した．その結果、滑膜の放射能の約90%は組織間空隙に存在する放射能であることが明らかとなった．投与後24および48時間の滑膜抽出液をセファクリル S-1000のゲル濾過クロマトグラフィにより分析した．その結果、放射能は投与原体の ^{14}C -SL-1010に相当する位置とカラム容積 (V_t) に相当する位置に分別して溶出された． V_t に相当する位置の放射能は、滑膜細胞に取り込まれ代謝されたものと見なすにはかなりの部分を示しているが (Fig. 4)、これはゲル濾過分析用の滑膜抽出液を調製する際に高分子量 HA が完全に抽出されなかったものと考えられる．これらの結果は ^{14}C -SL-1010の僅かな部分は実際に滑膜細胞に取り込まれ、代謝されることを明らかに示している．

投与後24時間の腋窩リンパ節中総放射能に占める HA の割合は13.2%であり、48時間では1.5%に減少した．投与後24時間の13.2%は、膝関節腔内投与の場合の腰椎リンパ節の総放射能に占める HA の割合の約8%に近似した値であった．

腋窩リンパ節抽出液の放射能をセファクリル S-1000ゲル濾過クロマトグラフィで分析したところ、投与後24および48時間のいずれの試料もほとんどが V_t 付近に溶出され、リンパ節の高

いHA代謝活性が示された。この結果は、膝関節腔内投与後の腰椎リンパ節の結果²⁾と同様であった。

投与後24~48時間および48~72時間の尿試料をセファクリル S-300ゲル濾過クロマトグラフィにより分析したところ、ほとんどの放射能がVt付近の低分子部分にのみ溶出され、膝関節腔内投与後の結果と類似した。

膝関節内投与との排泄パターンの類似性を比較する目的で、¹⁴C-SL-1010を肩関節腔内に投与後72時間までの呼気、尿および糞中排泄率を調べた。72時間までの累積排泄率は、呼気中に39%、尿中に1.6%、糞中に1.3%であり、呼気中からほとんどの放射能が排泄され、膝関節腔内投与後の結果と一致した。

以上をまとめると肩関節腔内に投与された¹⁴C-SL-1010は関節腔内ではほとんど代謝を受けず、大部分はリンパ行性に消失し、所属リンパ節である腋窩リンパ節に移行し、リンパ節で比較的速やかに構成単糖まで代謝されると考えられる。代謝により生成したN-アセチルグルコサミンは、大部分がエネルギー源として利用されCO₂として呼気中に排泄されるが、一部は血漿蛋白質などの生体成分の生合成に再利用され、残りの部分が尿中に排泄されるものと考えられる。これらの結果は膝関節腔内投与後の主消失経路である所属リンパ節の腰椎リンパ節が異なる点を除いて、膝関節投与の結果とよく一致した。

要 約

ウサギの肩関節腔内に投与された¹⁴C-SL-1010は、関節腔内より見かけ上二相性に減少し、主消失を占める第一相の半減期は57時間であった。この値は、¹⁴C-SL-1010を膝関節腔内に投与した場合の消失半減期32時間と比較して長かった。また、肩関節腔内からの消失は主にリンパ行性であり、その所属リンパ節は腋窩リンパ節であることが明らかとなった。この結果は膝関節腔内投与後のリンパ行性(所属リンパ節は腰椎リンパ節)の消失と全く一致した。

関節部組織分布では、疎性結合組織と上皮組織からなる上腕二頭筋腱間膜に最も高い放射能が認められ、次いで滑膜、上腕二頭筋腱の順に放射能が低下した。また、滑膜では放射能の約9割が組織間空隙に存在した。全身組織分布では、腋窩リンパ節が著しく高く、肝臓および脾臓には他の臓器に比べやや高い放射能が観察された。

関節液中より単離したHAの分子量分布を投与後96時間まで調べたが低分子化は観察されず、関節腔内では¹⁴C-SL-1010は代謝されなかった。しかし、滑膜組織においては僅かな代謝が認められた。一方、腋窩リンパ節では著しい代謝を認め、これらの結果は膝関節腔内投与後の結果と一致した。

¹⁴C-SL-1010を投与後72時間までの呼気、尿および糞中排泄を調べた。その結果、膝関節腔内投与の場合と同様、放射能のほとんどが呼気中に排泄されることが判明した。

以上、肩関節腔内に投与された¹⁴C-SL-1010の生体内運命は、主消失経路である所属リンパ節が異なる点を除き、膝関節腔内投与後のそれとほぼ同様な経路を辿るものと考えられた。

文 献

- 1) 赤坂日出道, 瀬戸 進, 柳 光男, 福島正二, 光井武夫: *Streptococcus zooepidemicus* によるヒアルロン酸の工業生産に関する研究. *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, **22**: 35-42 (1988).
- 2) 秋間和雄, 佐藤郁郎, 長谷川雅明, 松尾香世子, 岩田佑平, 渉 信敏: ヒアルロン酸ナトリウム (SL-1010) の関節腔内投与後の体内動態 (第1報), ウサギにおける膝関節腔内単回投与後の分布, 代謝及び排泄. *薬物動態*, **8**: 333-347 (1993).
- 3) 佐藤郁郎, 松尾香世子, 秋間和雄, 渉 信敏: ヒアルロン酸ナトリウム (SL-1010) の関節腔内投与後の体内動態 (第4報), ウサギにおける膝関節腔内滞留性の分子量依存性. *薬理と治療*, **21** (Suppl 2): 185-192 (1993).
- 4) 秋間和雄, 守屋佳樹, 松尾香世子, 岩田佑平, 渉 信敏: ヒアルロン酸ナトリウム (SL-1010) の関節腔内投与後の体内動態 (第3報), 蛍光標識SL-1010のウサギにおける肩関節腔内投与後の分布. *薬理と治療*, **21** (Suppl 2): 173-183 (1993).
- 5) 岩田佑平, 秋間和雄, 佐藤郁郎: ヒアルロン酸ナトリウム (SL-1010) の体内動態 (第1報), ウサギにおける前房内投与後の分布, 代謝及び排泄. *薬理と*

- 治療, **19** (Suppl 1): 309-326 (1991).
- 6) Laurent, T. C., Ryan, M. and Pietruszkiewicz, A.: Fractionation of hyaluronic acid. The polydispersity of hyaluronic acid from the bovine vitreous body. *Biochim. Biophys. Acta*, **42**: 476-485 (1960).
- 7) 岩田佑平, 秋間和雄, 佐藤郁郎, 長谷川雅明: ヒアルロン酸ナトリウム (SL-1010) の体内動態 (第2報), ウサギにおける静脈内投与後の分布, 代謝及び排泄. 薬理と治療, **19** (Suppl 1): 335-356 (1991).
- 8) 大野藤吾, 二ノ宮節夫, 吉川靖三, 立石昭夫, 阿部光俊, “臨床整形外科学1 基礎編” 中外医学社, 東京, pp. 115-116, (1988).
- 9) Smedsrød, B.: Cellular events in the uptake and degradation of hyaluronan. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **7**: 265-278 (1991).