

Pharmacokinetics of recombinant human soluble  
thrombomodulin, thrombomodulin alpha;  
Development of analytical system and  
pharmacokinetic analysis of normal subjects and  
target patients

鶴田, 一壽  
九州大学薬学府

<https://doi.org/10.15017/20711>

---

出版情報 : 九州大学, 2011, 博士 (薬学), 論文博士  
バージョン :  
権利関係 :

# 可溶性ヒト・トロンボモデュリン- $\alpha$ の体内動態：解析法構築および健常時と適用疾患時の動態解析

鶴田 一壽

## 【序論】

可溶性ヒト・トロンボモデュリン- $\alpha$  (Human soluble thrombomodulin alfa; TM- $\alpha$ )は汎発性血管内凝固症候群 (Disseminated intravascular coagulation ; DIC) への適用を認められた医薬品である。ヒト内因性 TM は、血漿並びに尿中に未変化体を含む多くの TM 由来の限定分解物 (TM の抗原性を有する) が存在するが、特に DIC 患者では血管内皮細胞上での炎症反応の亢進により、TM 分解物の濃度が有意に高くなること<sup>1)</sup>が推定されている。これらのことから、外来性の TM- $\alpha$  を患者に投与した際も、炎症依存的な分解亢進や腎機能低下によるクリアランス低下が複雑にからみあい、健常人や健常動物モデルとはかなり乖離した動態状況となる可能性が否定できない。しかし、これは推論であって、その検証を行った研究例が存在しない。このような背景の下に、本研究では TM- $\alpha$  化学療法の有効性や安全性確保を目的として、本剤の体内動態について詳細に解析を行った。具体的には、下記の 3 項目について順次検討を行った。

- 1) 活性保持 TM- $\alpha$  の体内動態解析法の確立
- 2) 動物での TM- $\alpha$  の全身 CL に関する消失機構解明とヒトへの外挿性
- 3) TM- $\alpha$  適応疾患患者での母集団薬物動態解析 (Population Pharmacokinetics; PPK) に基づく患者での Pharmacokinetics (PK) 変動の有無や変動が有効性/安全性に及ぼす影響

## 【方法】

### 活性保持 TM- $\alpha$ の体内動態解析法の確立

定法に従って、Balb/c 雌性マウス (チャールス・リバー社、10 週令) に免疫を行い、マウスより摘出した脾臓とマウスミエローマ細胞との細胞融合を行ったのち、硫酸沈殿法により精製しモノクローナル抗体を取得した。

得られたモノクローナル抗体は抗体のサブタイプを確認すると共に、トロンビンと TM- $\alpha$  との結合阻害の有無 (活性クエンチ型抗体か否かの確認)、並びにプロテイン C を介した TM- $\alpha$  の活性測定系への影響の有無 (プロテイン C 活性化の阻害能を有するか否かの確認) について確認を行った。アビジン-ビオチン法にて抗体間の組み合わせ試験を行い、最も高感度 TM- $\alpha$  を検出できた組み合わせを選択した。2 次抗体は定法に従って POD 標識を行い、サンドイッチ型 ELISA 系の確立の検討を行った。

Hashida らの報告<sup>2)</sup>に従って塩濃度を上げることによりこの妨害成分による影響を最小化の検討を行った。確立された測定系について、低分子化合物の一般的な試験法<sup>3)</sup>に準じてバリデーション試験を行った。さらにサルおよびヒトに TM- $\alpha$  を静脈内単回投与したのちの血漿サンプルを用いて、ELISA 法と生物活性に基づく分析法の測定に付し、両系での定量値の相関を解析した。

### 動物での TM- $\alpha$ の全身 CL に関する消失機構解明とヒトへの外挿性

動物実験は所属施設の倫理委員会に予め計画を提示し、審査を受けて承認を得たのちに実施した。実験動物として、Sprague-Dawley (SD) 系雄性および雌性ラット (いずれも 7~8 週令)

並びに雄性カニクイザル（3～6才（歯による推定））を用いた。健康成人での動態試験は、診療施設並びに実施者側の倫理委員会によるプロトコルの承認と文書による被験者の同意を得た上で実施した。全ての試験は非盲検試験として実施した。単回投与試験及び反復投与試験のいずれも、日本人の健康成人男性（20～40歳台）を対象とした。

ラットにおいては、予め調製した<sup>125</sup>I標識体を用いて、血漿中濃度、組織分布、代謝、排泄試験を、サル及びヒトにおいては非標識体を用いて血漿中濃度及び尿中排泄試験を実施した。また腎障害のモデルラットを作製し、非標識体を用いてそれらの血漿中濃度推移を正常ラットの動態と比較を行った。

#### ヒトでの TM-α 体内動態に関する PPK 解析と DIC 罹患の影響

日本人の健康成人を対象とした Phase1 試験（1施設、計20例）並びに DIC 患者を対象としたオープンラベル用量-反応試験（Phase2 試験；92施設、計116例）で得られた TM-α 血漿中濃度および臨床検査値や併用薬情報を含む患者データを PPK 解析に用いた。

母集団モデルの構築には、解析用プログラムとして NONMEM Version V、データプリプロセッサとして NM-TRAN Version III を使用した。PK 解析としては、1-コンパートメントモデルを、PK パラメータの個体間変動に関しては指数誤差モデルを、血漿中濃度の個体内変動に関しては比例誤差モデルをそれぞれ使用した。全ての変数を取り込んだフルモデルの作成後に、目的関数最小値が 3.84 以上（ $p < 0.05$ ）の変数のみを有意な変数として最終モデルを作成した。

#### 【結果】

##### 定量系（Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)及び生物活性系）の確立

固層（1次）抗体としてクローン R4B6（IgG1）を、また標識（2次）抗体としてクローン R4D1（IgG1）を組み合わせた場合が最も高感度に TM-α を検出できたことから、この組み合わせを ELISA 系の抗体として選択した。これらの2つの抗体のうち、R4D1 は活性クエンチ型であり、一方 R4B6 は活性を阻害しないことが確認された。R4B6 が生物活性を阻害しないことから、ELISA と同様に、これを TM-α 捕捉用の抗体として選択して生物活性測定系を確立した（図1）。

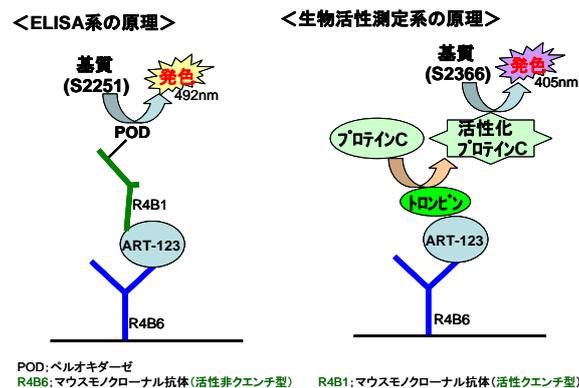


図1 TM-α の定量測定系の原理（ELISA 系および生物活性測定系）

作製された測定系は血漿においては 0.9 M NaCl、尿においては 0.15M NaCl と 0.05% Tween80 含有 PBS にて試料を希釈することで、生体成分による分析妨害を完全に除去できることが確認された。バリデーション試験の結果、いずれも測定系としての一般的な基準を満たしているこ

とが確認された。TM- $\alpha$  投与後のサルおよびヒトの血漿中濃度を上記 ELISA および生物活性検定で比較検討したところ、両系での定量値には高い相関性 ( $r>0.98$ ) が得られ、かつ、回帰直線の傾きがほぼ 1 であった。

#### 動物での TM- $\alpha$ の全身クリアランス(Clearance; CL)に関する消失機構解明とヒトへの外挿性

ラット、サル並びに健康成人のいずれにおいても静脈内投与された TM- $\alpha$  は 2 相性で消失し、その消失半減期はラット、サルにおいて約 6~7 時間、ヒトにおいて 20 時間であった。いずれの種においても線形性が確認され、また反復投与においてもその動態は変化しなかった。尿中には、ラットおよびサルにおいては約 50%が、ヒトにおいては 60~70%が未変化体として排泄されていた。ラットにおける組織分布並びに代謝試験の結果から、TM- $\alpha$  は組織移行性が低く特異的に分布する組織はないものの、肝臓、腎臓、肺により代謝分解されていることが明らかとなった。ラット、サルおよびヒトでの腎 CL 並びに腎外 CL を算出しアロメトリック法に基づき、その相関性を調べた結果、いずれも体重に対して良好な直線性を示し、アロメトリック係数は腎 CL および腎外 CL でそれぞれ 0.80 および 0.72 であった。

腎障害モデルラットでの検討から、腎障害により全身 CL が低下する傾向が認められたが、その変動は腎の障害度には影響を受けなかった。

#### ヒトでの TM- $\alpha$ 体内動態に関する PPK 解析と DIC 罹患の影響

PPK 解析の最終モデルパラメータから、分布容積(Distribution volume; Vd)は体重と相関し、またヘマトクリット(Hematocrit; Hct)値によって影響を受けることがわかった。一方、CL は体重と相関し、クレアチニン CL、年齢および Hct 値に影響を受けることがわかった。肝機能を含むその他の因子によっては TM- $\alpha$  の動態は影響を受けなかった。最終モデル式から得られるパラメータを用いて、個別モデル予測値 (PRED) を算出し、実測値との比較を行ったところ、原点を通る直線で回帰され、 $R=0.9504$  と高い相関性を示した。また 200 回繰り返しのブートストラップ法にてパラメータの再算出を行ったところ、いずれのパラメータも最終パラメータとの差異は 6%以内で一致した。

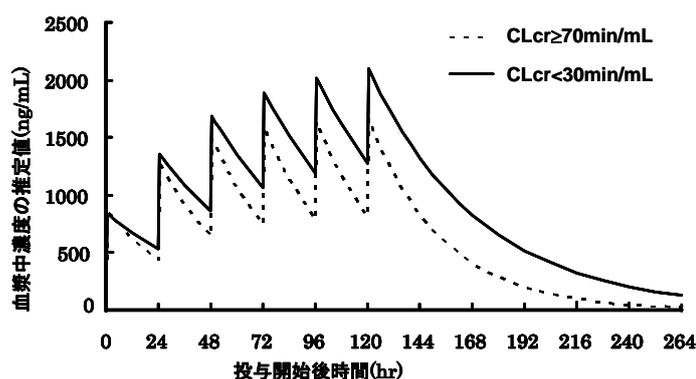


図 2 最終モデル式より想定される母集団の PK 比較 (正常腎 CL v s 腎機能障害 DIC 患者)

DIC 患者における平均的な Vd および CL は、健康成人のそれらの値に対して Vd で 1.5 倍、CL で 1.2 倍に増加した。CL と Vd の双方に影響を与えた低 Hct 値は、DIC 患者の特徴的な症状であり、DIC 患者の 90%以上が低値であった。高齢者では TM- $\alpha$  血中濃度の上昇が見られたが、健康成人の最高血漿中濃度(Maximum plasma concentration; Cmax)を超えることはなかった。高齢者と非高齢者間に Vd には殆ど差異はなかったが、CL では高齢者で 20%ほど

の低下が見られた。腎機能障害を持った DIC 患者（クレアチニン CL < 30 mL/min）と腎機能障害を有していない DIC 患者（クレアチニン CL ≥ 70 mL/min）間で本剤の PK の違いについて検討した結果、高齢者の場合と同様に、Vd には両者間で差異はなかったものの、CL は 30%ほど低下した。（図 2）。

#### 【考察】

ヒト内因性 TM の血漿中濃度の最低値は 2 ng/mL 程度と報告<sup>4)</sup>されており、本研究で構築した ELISA 系の定量限界値（1 ng TM- $\alpha$ /mL）はこれよりも低値であったことから、感度的には十分であると考えられた。さらに内因性 TM による TM- $\alpha$  投与後の血漿中濃度値への影響の有無を検討した結果、内因性 TM による定量値への影響はないことが確認されたことから、本 ELISA 系は特異性も有する測定系であると考えられた。本 ELISA 系と生物活性検定との比較試験の結果から、ELISA 系にて検出された TM- $\alpha$  の多くは活性を保持するものと考えられた。

TM- $\alpha$  の全身クリアランスには腎 CL と腎外 CL の両者が関与し、それぞれの全身 CL への寄与率はラットとサルではほぼ 50:50、ヒトで 60:40 であった。腎 CL では、用量依存的な排出、すなわち非飽和性の排出が認められたことから、非特異的糸球体ろ過機構が主要な役割を演じると考えられた。また、腎外 CL では、肝、肺および腎臓などに発現する非特異的なスカベンジャー受容体により取り込まれて代謝されるものと推定された。動物とヒトでの TM- $\alpha$  体内動態解析データを基にして、腎 CL および腎外 CL に関するアロメトリック係数を算出したところ、それぞれ 0.80 および 0.72 であった。一般に、タンパク質薬と低分子薬の別を問わず、アロメトリック係数が 0.6~0.8 であった場合には、当該薬物の CL 機構は動物種間で同一と考えられる<sup>5)</sup>。従って、TM- $\alpha$  の腎および腎外 CL に関する上述の機構はヒトにも適合するものと考えられた。

PPK 解析の結果から、TM- $\alpha$  の分布容積は Hct 値と体重に相関し、CL の変動は腎機能、体重、Hct 値および年齢の違いに連動することが分かった。これらの因子のうち、体重が最も重要かつ安全性に影響する可能性が示唆されたことから、本剤は体重あたりの用量設定が必要であると考えられた。その他の要因については、Hct 値、年齢、腎機能が一部影響を与えるものの、有効性・安全性への影響が小さいと考えられ、用法・用量への配慮は必要ないと判断された。

#### 【引用文献】

- 1) Amano K, Tateyama M, Inaba H, Fukutake K, Fujimaki M. 1992. Thromb Haemost. 68(4): 404-6
- 2) Hashida S, Nakagawa K, Imagawa M, Inoue S, Yoshitake S, Ishikawa E, et al. 1983. Clin Chim Acta. 135: 263-73
- 3) 厚生労働省医薬局審査管理課長通知，医薬審発第七九六号，平成 13 年 6 月 1 日，「医薬品の臨床薬物動態試験について」
- 4) Ishii H, Majerus PW. 1985. J Clin Invest. 76(6):2178-2181.
- 5) Mordenti J, Chen SA, Moore JA, Ferraiolo BL, Green JD. 1991. Pharmaceutical Research. 8(11): 1351-1359.