

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

(2011年)

## 略 語 表

本論文では以下の略語を使用する。

AUC : 血漿中濃度時間曲線下面積 (Area under the plasma concentration-time curve)

ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT: Alanine aminotransferase)

AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST: Aspartate aminotransferase)

$C_0$  : 投与初期血漿中濃度 (Initial plasma concentration)

$C_{max}$  : 最高血漿中濃度 (Maximum plasma concentration)

CL : クリアランス (Clearance)

DIC : 汎発性血管内凝固症候群 (Disseminated intravascular coagulation)

EGF : 上皮成長因子(Epidermal growth factor)

ELISA : 酵素免疫測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay)

HPLC : 高速液体クロマトグラフィ (High-performance liquid chromatography)

Hct : ヘマトクリット値 (Hematocrit)

ND : 定量もしくは検出せず (Not detected)

PBS : リン酸化緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline)

PK: 薬物動態解析 (Pharmacokinetics)

PPK : 母集団薬物動態解析 (Population Pharmacokinetics)

SD : スプラグドローリー : ラットの系統名 (Sprague-Dawley)

$T_{1/2\alpha}$  :  $\alpha$  相の消失半減期 ( $\alpha$ -phase elimination half-life)

$T_{1/2\beta}$  :  $\beta$  相の消失半減期 ( $\beta$ -phase elimination half-life)

TCA : トリクロロ酢酸 (Trichloroacetic acid)

TM : トロンボモジュリン (Thrombomodulin)

TM- $\alpha$  : トロンボモデュリン アルファ:遺伝子組換え型の可溶性 TM (Thrombomodulin- $\alpha$ )

Vd : 分布容積 (Distribution volume)

Vss : 定常状態の分布容積 (Distribution volume in steady state)

グリセロールラット : glycerol-誘発急性腎不全モデルラット

腎摘ラット : 5/6 腎結紮モデルラット

# 成 果 公 表

本論文の内容は下記の学術誌に公表した。

1. Tsuruta K, Yamada Y, Serada M, Tanigawara Y. 2011.  
Model-based analysis of covariate effects on population pharmacokinetics of thrombomodulin alfa in disseminated intravascular coagulation (DIC) patients and normal subjects. J Clin Pharmacol. 51(9): 1276-85
2. Tsuruta K, Kodama T, Serada M, Hori K, Inaba A, Miyake T, Kohira T. 2009.  
Pharmacokinetics of recombinant human soluble thrombomodulin, thrombomodulin alfa in the rat. Xenobiotica. 39(2): 125-34
3. Nakashima M, Uematsu T, Umemura K, Maruyama I, Tsuruta K. 1998.  
A novel recombinant soluble human thrombomodulin, ART-123, activates the protein C pathway in healthy male volunteers. J Clin Pharmacol. 38(6): 540-4
4. Nakashima M, Kanamaru M, Umemura K, Tsuruta K. 1998.  
Pharmacokinetics and safety of a novel recombinant soluble human thrombomodulin, ART-123, in healthy male volunteers. J Clin Pharmacol. 38(1): 40-4

## 目次

概 要 .....	1
緒 言 .....	3
第一章 TM- $\alpha$ 測定系の確立 .....	7
第一節 概 要 .....	7
第二節 実験方法および結果 .....	7
第一項 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)系の確立 .....	7
第二項 生物活性測定に基づく TM- $\alpha$ 定量法 .....	12
第三項 ELISA による TM- $\alpha$ 定量法の実用性 .....	15
第四項 TM- $\alpha$ 依存的なプロテイン C 活性化の評価に基づく TM- $\alpha$ 定量法の実用性 .....	17
第五項 TM- $\alpha$ の定量値と生物活性指標との相関性 .....	18
第三節 考 察 .....	19
第二章 実験動物および健常成人での TM- $\alpha$ の体内動態 .....	23
第一節 概 要 .....	23
第二節 実験方法 .....	24
第一項 ラットでの TM- $\alpha$ 動態 .....	24
第二項 サルでの TM- $\alpha$ 動態 .....	28
第三項 健常成人での TM- $\alpha$ 動態試験 .....	29
第三節 結 果：ラットでの TM- $\alpha$ 体内動態と腎障害時の変動 .....	31
第一項 TM- $\alpha$ のラット血漿中濃度推移 .....	31
第二項 TM- $\alpha$ のラット組織分布 .....	33
第三項 TM- $\alpha$ のラットでの代謝 .....	35
第四項 TM- $\alpha$ のラットでの排泄 .....	38
第五項 腎障害モデルでの TM- $\alpha$ 動態 .....	40
第四節 結果：TM- $\alpha$ のサルでの体内動態 .....	42
第一項 TM- $\alpha$ 単回投与試験と用量依存性 .....	42

第二項	TM- $\alpha$ 反復投与試験	44
第五節	結果：TM- $\alpha$ のヒトでの体内動態	46
第一項	静脈内単回持続投与後の TM- $\alpha$ 血中濃度推移	46
第二項	TM- $\alpha$ 反復投与時の血漿中濃度推移	47
第六節	考 察	49
第三章	ヒトでの TM- $\alpha$ 体内動態に関する PPK 解析と DIC 罹患の影響	53
第一節	概 要	53
第二節	解析対象および試験方法	53
第一項	解析対象データ	53
第二項	PPK 解析方法	54
第三節	結 果	56
第一項	解析に用いた患者背景および PK データ	56
第二項	PPK 解析モデルの構築とその妥当性	58
第三項	構築モデルによる DIC 患者での TM- $\alpha$ 動態予測	63
第四節	考 察	65
結論と展望		68
参考文献		70
謝辞		76

## 概 要

血管内皮表在性タンパク質トロンボモジュリン (Thrombomodulin: TM) の欠失変異体である可溶性ヒト・トロンボモデュリン アルファ (TM- $\alpha$ ) は、抗血液凝固作用での臨床使用が期待される医薬品である。TM- $\alpha$  は、期待作用に要する体内濃度より小過剰で副作用を惹起することが危惧されており、体内濃度の精密な制御が安全・適正使用のために必須である。しかし、本剤の体内動態、とりわけ、代表的な適用疾患である汎発性血管内凝固症候群 (Disseminated intravascular coagulation ; DIC) での動態は殆ど解明されていない。そこで、本研究では、 $^{125}\text{I}$ -標識 TM- $\alpha$  を用いてラットでの基礎的検討を実施すると共に、サルとヒトでの動態を解析するための非標識 TM- $\alpha$  分析方法を構築して、これら種での解析も行った。更に、基礎実験での体内動態成果を基盤として、ヒト動態における Population pharmacokinetics (PPK) 解析を行い、DIC 患者での TM- $\alpha$  動態の予測を行った。また、タンパク質薬創薬の隆盛を念頭に、本研究で得られた成果と照らしながらタンパク質製剤の体内動態研究における一般的留意点を整理、考察した。

サルおよびヒトでの非標識 TM- $\alpha$  検出のため、TM- $\alpha$  の活性中心を認識するマウスモノクローナル抗体を作製し、サンドイッチ型の Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 系を確立した。本法は、ヒト血漿中の内在性 TM ないしその分解物 (約 2 ng/mL 以下) を検出すると共に、これに付加される外来 TM- $\alpha$  の濃度も測定可能であった。また、検出された TM- $\alpha$  が活性保持型か否かを確認するため、生物活性測定系も確立した。上記の両測定系を用いて、TM- $\alpha$  を投与したサルおよびヒトの血漿サンプルを測定し、それぞれの測定値間の相関性を調べた。その結果、ELISA 系と活性測定系の測定値の相関性は  $r > 0.98$  と良好であったため、ELISA 系を主測定系として差し支えないことを確認した。

TM- $\alpha$  の全身クリアランスに対する腎と腎外のクリアランス (CL) の寄与率を調べた結果、ラットとサルでは腎 CL と腎外 CL がほぼ 50:50 で、ヒトでは 60:40 であった。腎 CL では、用量依存的な排出、すわな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。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。

健康成人と DIC 患者での Pharmacokinetics (PK) データを用いて、PPK 解析を行い、健康成人と DIC 患者間の違い、並びに年齢、体重および血清成分濃度などの患者背景が PK 変動に相関するか否か等について解析した。その結果、TM- $\alpha$  の分布容積はヘマトクリット値と体重に相関し、CL の変動は腎機能、体重、ヘマトクリット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。

## 緒 言

米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) により、ヒトインスリンが組換え遺伝子工学技術を使った生物学製剤として 1983 年に初めて承認されて以来、多くのタンパク質製剤が開発されてきた。国内においても 2001 年以降、抗体医薬品やワクチンなどタンパク質製剤の承認数が増加している (表 1)。タンパク質製剤の特徴は、反応機構が明確であり従来の低分子化合物に比べ高い効果が期待できる点にある。急性期脳梗塞治療薬として開発された組織プラスミノゲンアクチベータや抗がん剤などの難治性疾患の治療薬として開発された抗体医薬がその代表的な例である。一方、タンパク質製剤は一般にリガンド等との特異性が高く、作用も強力なことが多いため、従来の低分子物質薬よりも過剰反応についての注意が必要である<sup>1)</sup>。2006 年 3 月に英国で起きたヒトリンパ球表面蛋白 CD28 に対するモノクローナル抗体の事例 (TNG1412 事件) では、第 1 相臨床試験の開始早々に投与群の 6 名全員に重篤なアナフィラキシー様症状が出現した<sup>2)</sup>。また、組織プラスミノゲンアクチベータは虚血性脳血管障害急性期などの重篤な血栓性疾患の治療薬として承認されているが、過剰な血栓溶解反応による出血を起こさないよう十分に注意することが添付文書に警告されている<sup>3)</sup>。これらのことは、タンパク質製剤の臨床使用では、有効性発現を実現する一方で、過剰反応の発現に注視しなければならないことを示唆する。従って、タンパク質製剤の医薬品開発においては、ヒトでの薬物動態とヒトでの反応性との関係を詳細に調べることにより、有効かつ安全な用法・用量を厳密に設定することが重要である。

タンパク質製剤の薬物体内動態については、これまでに肝臓などの臓器や血管内皮細胞表面上に存在する特異的な受容体を介したエンドサイトーシスによる取り込み機構<sup>4,6)</sup>や腎糸球体からの排泄機構<sup>7,8)</sup>などが報告されている。糸球体細胞のろ過に関しては、タンパク質の形状や荷電の種類と強弱によって影響されることも報告されている<sup>9-12)</sup>。このように、タンパク質製剤の体内動態については、一定の知見が得られてはいるものの、上記機構の普遍性や詳細についてはいまだ明確になっていないのが現状である。さらにタンパク質製剤は血漿中に存在する多くのタンパク質分解酵素や好中球由来の活性酸素種などにより、代謝・分解されることが知られている<sup>13,14)</sup>。従って、タンパク質製剤の生体内でのクリアラ

ンス (CL) には多くの機構が存在し、これらが同時にかつ複雑に生起するものと考えられる。加えて、腎機能は種々の病態や外来ストレスによって変動することから、このような異常状態下での動態もタンパク質製剤の有効性や安全性を評価する上で必須の知見と思われる。従って、病態モデル、特に適用対象疾患での動態特性をより正確に把握することが重要と考えられる。

表 1 遺伝子組み換え技術によって創製され国内で承認されたタンパク質製剤の一覧  
(2001 年以降 2010 年までを集計)

発売年	一般名	主な対象疾患
2001	インターフェロンアルファコン-1	C型慢性肝炎におけるウイルス血症
2001	インスリン アスパルト	インスリン療法が適応となる糖尿病
2001	リツキシマブ	ろ胞性非ホジキンリンパ腫など
2001	インターフェロンアルファ-2b	C型慢性肝炎におけるウイルス血症
2002	パリビズマブ	重篤な下気道患者の発症抑制
2002	インフリキシマブ (抗体医薬)	クローン病
2003	インフリキシマブ (抗体医薬)	関節リュウマチ
2004	トラスツズマブ (抗体医薬)	転移性乳癌
2004	アガルシダーゼ ベータ	ファブリー病
2005	モンテプラーゼ	肺動脈血栓の溶解
2006	ラロニダーゼ	ムコ多糖症など
2006	インターフェロン ベータ-1a	多発性硬化症の再発予防
2006	ホリトロピン アルファ	低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症
2007	ルリオクトコグ アルファ	血液凝固VII因子欠乏症
2007	ベバシズマブ (抗体医薬)	進行・再発の結腸・直腸癌
2007	イデュルスルファーゼ	ムコ多糖症II型
2007	ベグビソマント	先端巨大症
2007	インスリン デテミル	インスリン療法が適応となる糖尿病
2008	トシリズマブ(抗体医薬)	キャスルマン病に伴う諸症状
2008	エタネルセプト (抗体医薬)	関節リュウマチ
2008	フォリトロピンベータ	複数卵胞発育のための調節卵巣刺激ほか
2008	ゲムツズマブオゾガマイシン (抗体医薬)	再発又は難治性のCD33陽性の急性骨髄性白血病
2008	人血清アルブミン	アルブミン喪失など
2008	セツキシマブ (抗体医薬)	結腸・直腸癌
2008	トシリズマブ (抗体医薬)	関節リュウマチ
2008	エタネルセプト (抗体医薬)	関節リュウマチ
2008	トロンボモデュリン アルファ	播種性血管内凝固症候群 (DIC)
2009	ダルベポエチン アルファ	透析施工中の腎性貧血
2009	オマリズマブ (抗体医薬)	気管支喘息
2010	エポエチン ベータ	インスリン療法が適応となる糖尿病
2010	アバタセプト (抗体医薬)	関節リュウマチ
2010	エクリズマブ (抗体医薬)	発作性夜間ヘモグロビン尿症における溶血

トロンボモデュリン アルファ (Thrombomodulin- $\alpha$ : TM- $\alpha$ ) は、ヒト血管内皮細胞表面に存在する天然型トロンボモジュリン (Thrombomodulin:TM) を構成するドメイン 1~5のうち、可溶性部分 (ドメイン 1~3) のみを遺伝子工学的に動物細胞 (チャイニーズハ

ムスター卵巣細胞；CHO）にて発現させた欠失変異体である<sup>15)</sup>（図1）。TM- $\alpha$ の主作用である抗血液凝固作用は、天然型TMとほぼ同等であることが確認されている<sup>15)</sup>。TM- $\alpha$ は、図2に示すとおり、血液凝固因子であるトロンビンと結合し、トロンビンの基質を血液凝固因子のフィブリノーゲンから、血液凝固抑制因子であるプロテインCに切り替える機能を有する。TM- $\alpha$ はこの機構に基づいて、トロンビンの生成を抑制するモジュレーターとしての機能、ひいては血液凝固抑制作用を持つ<sup>16-21)</sup>。このような性質から、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。DICは血液癌などの悪性腫瘍や敗血症などの感染症などに高頻度に合併する症候群である。DICを発症すると血液凝固系の過度の活性化により微小血管内に播種性の血栓形成が起こり、虚血などによる血管内皮細胞障害により臓器障害を呈するとともに、止血系因子の消費性低下および二次線溶亢進による著明な出血傾向を生ずる。DICを合併した患者の予後は悪く、また患者は肝臓、腎臓および肺などに障害を併発している高齢者が多い<sup>22-24)</sup>。ヒト内因性TMの血漿中濃度はサイトカイン等とは異なり、数ng/mL程度と比較的高い<sup>25,26)</sup>。このことと関連するかもしれないが、血漿並びに尿中には未変化体のほかにも多くのTM由来の限定分解物（TMの抗原性を有する）の存在が示唆されている<sup>27)</sup>。さらに、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も推定されている<sup>26-28)</sup>。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- $\alpha$ 化学療法の有効性及び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に關与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Population pharmacokinetics（PPK）解析に基づく、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

以下にこれらの成績について論述する。

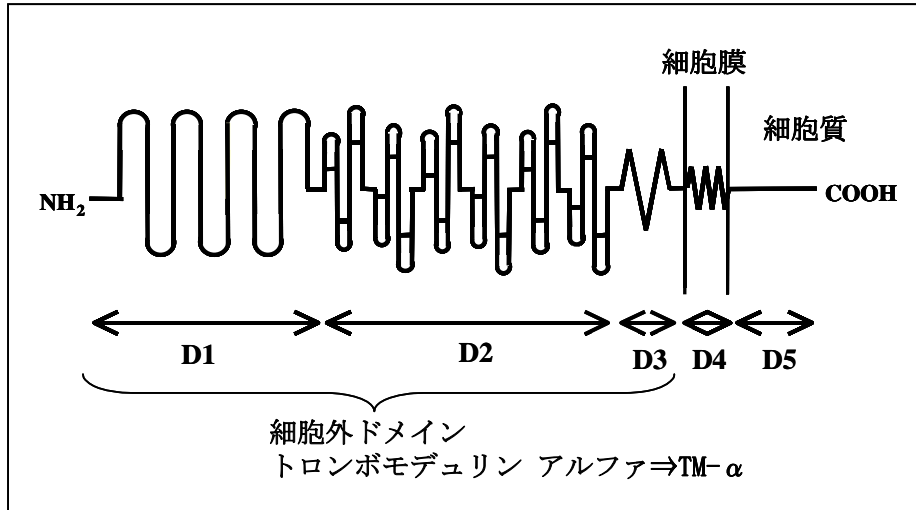


図1 トロンボモデュリン アルファ (TM-α) の構造

- D1 (ドメイン1: <sup>1</sup>Ala - <sup>226</sup>Asp); レクチン様ドメインよりなり、炎症性サイトカインである High Mobility Group Box-1 (HMGB1) と結合し抗炎症作用を示す
- D2 (ドメイン2: <sup>227</sup>Cys - <sup>462</sup>Cys); 6個の EGF 様ドメインよりなり、4~6番目の EGF 様ドメインが抗凝固作用の活性中心
- D3 (ドメイン3: <sup>463</sup>Asp - <sup>497</sup>Ser); 糖鎖結合ドメインで血漿中の消失半減期に関与している
- D4 (ドメイン4: <sup>498</sup>Gly - <sup>521</sup>Lue); 細胞膜通過ドメイン
- D5 (ドメイン5: <sup>522</sup>Arg - <sup>557</sup>Lue); 細胞内ドメインでその機能はまだ不明

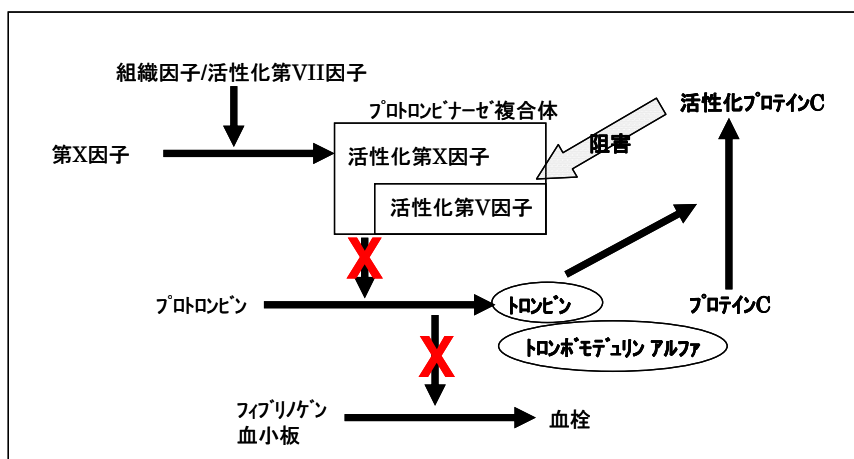


図2 トロンボモデュリン アルファの抗凝固作用機構

× : TM-α によって阻害される反応

## 第一章 TM- $\alpha$ 測定系の確立

### 第一節 概要

動物とヒトでの TM- $\alpha$  の薬物動態を明らかにするための測定法を確立するため、TM- $\alpha$  の放射能標識方法と標識体の体内動態解析法（ラットおよびサル）、並びに非標識体投与後の未変化体濃度を測定するための測定系（ヒト）の検討を行った。放射標識体の調製法は、既報のタンパク質製剤標識法を参考に、生物活性への影響が少ないと考えられた Enzyme-beads 法による  $^{125}\text{I}$  標識を選択した。調製した標識体は、生物活性の保持が確認され、かつ TM- $\alpha$  の薬物動態試験実施に必要な比放射能と安定性のいずれをも満足することが確認された。非標識体を測定する系としては、TM- $\alpha$  の生体内での分解・代謝情報や内因性 TM 濃度の事前情報を基に定量感度や特異性に関する到達目標を設定し、酵素免疫測定法と生物活性測定法の 2 つの測定系の確立を行った。さらに両測定系間の相関性を TM- $\alpha$  投与後の実サンプルを用いて検討した。両測定法間に高い相関性が得られたことから、簡便でかつ感度の高い酵素免疫測定法（Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA）系を測定系として選択した。

本章では上記の結果を踏まえ、生体内タンパク質製剤の薬物動態の測定系の確立についての一般的な指針についても提言する。

### 第二節 実験方法および結果

#### 第一項 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)系の確立

TM- $\alpha$  は、既報<sup>15)</sup>に基づき CHO 細胞に発現させ精製したタンパク質を用いた。Balb/c 雌性マウス（チャールス・リバー社、10 週令）にフロインド完全アジュバンド若しくは RIBI アジュバンド中に懸濁した TM- $\alpha$  (15 mg/kg/0.2 ml) を腹腔内投与して免疫を行った。2 および 4 週間後に同様な免疫を行った。体重増加が順調でかつ抗体産生能が高かったマウスを選択し、免疫開始 8 週間後にアジュバンドを含まない TM- $\alpha$  (2.95  $\mu\text{g}/\text{kg}/0.2$  ml 生

理食塩水)を腹腔内投与し最終免疫を行った。定法に従って、各マウスより脾臓を摘出し、マウスミエローマ細胞との細胞融合を行ったのち、抗体産生能が高い株をキャピラリークローニング法により選別した<sup>29,30)</sup>。クローニングされたハイブリドーマ細胞を増殖させたのち、Balb/c 雌性マウス(チャールス・リバー社、5週令)に約 $1 \times 10^7$ 細胞/マウスの用量で腹腔内投与した。腹水(ハイブリドーマ細胞投与から4週後に腹水を採取)を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(8株)は定法により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(緒言、図2参照)。さらに、これらの抗体の一部をビオチン標識し、以下に示すアビジン-ビオチン化法にて抗体間の組み合わせ試験を行った。すなわち、得られた抗体(10  $\mu\text{g protein}/100\mu\text{L/well}$ )を一次抗体として96穴マイクロプレートに固定化し、生理的リン酸緩衝液[pH 7.4; phosphate-buffered saline (PBS)] wellあたり200  $\mu\text{L}$ で5回洗浄したのちにTM- $\alpha$  0、10、100、1000 ng/mLを100  $\mu\text{L}$ 添加した。室温で2時間静置後、PBSで5回洗浄したのちにビオチン化した二次抗体(1  $\mu\text{g protein}/50 \mu\text{L/well}$ , 室温120分)を結合させた。さらにPBSで5回洗浄したのち、アビジン化ペルオキシダーゼ標識体(POD; 0.025 unit/0.1 mL saline/well; ロッシュ・ダイアグノスティックジャパン, 東京)を添加したのち、その特異的基質の酸化活性を測定した。その結果、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1次抗体-TM- $\alpha$ -2次抗体の3者複合体を検出できたことから、この組み合わせを選択した。各モノクローナル抗体の認識部位については、TM- $\alpha$ の部分構造を用いたエピトープ解析を行うことで推定した(成績未掲載)。TM- $\alpha$ のドメイン2は6個の上皮成長因子(Epidermal growth factor; EGF)様配列(以下EGF1~6と略す)より構成されるが、TMの抗凝固活性の中心は4番目から6番目のEGF様構造(EGF4~6)と報告されている<sup>16)</sup>。上記の2つの抗体のうち、R4D1はEGF4~6に結合する抗体であり、活性クエンチ型であった。一方、R4B6はEGF1~3

に結合する抗体であり、また活性を阻害しないことが確認された。R4B6 および R4D1 株は抗体生産能を指標にして純化後、マウスへの投与/腹水採取/硫酸精製を行ったのちにプロテイン A カラムにて精製し、それぞれのモノクローナル抗体を得た。2 次抗体として使用する R4D1 抗体については、定法に従って POD 標識を行った<sup>31,32)</sup>。これらの 2 種のモノクローナル抗体を用いてサンドイッチ型 ELISA 系の確立の検討を行った。

サンドイッチ ELISA による TM- $\alpha$  定量は、以下の操作により行った。血漿サンプルは 0.9 M NaCl および 0.05% Tween80 を含む 150 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) にて 5 倍以上の希釈を行い、測定に供した。一方、尿サンプルは 0.15 M NaCl および 0.05% Tween80 を含む 150 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて 2 倍以上の希釈を行い、測定に供した。サンプル希釈に用いる緩衝液の塩濃度の違いの理由については後述する。96 穴マイクロプレートに 50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) に溶解した抗 TM- $\alpha$  抗体 (R4B6 ; タンパク質量、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を well あたり 50  $\mu\text{L}$  添加し、4°C で 24 時間静置した。PBS で 5 回洗浄したのち、ブロックエース溶液 [大日本住友製薬 (旧大日本製薬)、大阪 ; 蒸留水にて 4 倍希釈] を well あたり 200  $\mu\text{L}$  入れ、室温で 1 時間静置した。0.05% Tween80 を含む PBS で 5 回洗浄したのち、試料溶液を well あたり 100  $\mu\text{L}$  入れ、室温で 2 時間静置した。さらに 0.05% Tween80 を含む 150 mM リン酸溶液 (pH 7.4) に溶解した POD 標識抗 TM- $\alpha$  抗体 (2 次抗体; 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を well あたり 50  $\mu\text{L}$  添加し室温で 1 時間静置した。再び 0.05% Tween80 含有 PBS で 5 回洗浄したのち、基質溶液 [0.5 mg/mL オルトフェニレンジアミンおよび 0.0175% 過酸化水素水を含む 24 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.2)] を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  加え、暗所で約 20 分間反応させた。1.5 M 硫酸を 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  添加して反応を停止させたのち、96 穴用吸光光度計にて 492 nm の吸光度を測定した。標準溶液にて検量線を作製し、試料溶液中の TM- $\alpha$  濃度を算出した。

生体に投与された TM- $\alpha$  は、血漿以外に尿中にも出現することが示唆されているため<sup>25,26)</sup>、測定はこれらの 2 種の体液を対象として行った。一般に生体内タンパクを ELISA 法にて定量する際には体液中の妨害成分により影響を受けることから、Hashida らの報告<sup>33)</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する検討を行っ



た。血漿を試料とした場合、5倍希釈試料を用いても TM- $\alpha$  定量妨害物質の影響が無視できなかつた。図 1-1(A)には、20%血漿 (5倍希釈血清) の存在下および非存在下に TM- $\alpha$  (10 ng/mL)の定量を行った結果を示す。血漿存在下で測定した場合、試料中の塩濃度が低いと対照 (血漿非存在下) と比べて顕著に吸光度が低下した。しかし、血漿存在下でも、NaCl 濃度を増加させることによって、妨害物質の影響を排除できた[図 1-1(A)]。従って、上述の通り、血漿は予め 0.9 M NaCl 含有緩衝液で 5 倍に希釈することとした。尿では、2倍希釈試料でも尿成分による分析妨害は認められなかつた[図 1-1(B)]。血漿においては、0.9 M NaCl の添加により感度の低下が懸念されたが、これまでに報告されている内因性の TM 濃度文献値の範囲である 2 ng/mL 程度が本 ELISA 系にて定量可能であったことから、塩存在下でも十分な感度を得られると判断した。ヒト血漿での本 ELISA 系の検量線の一例を図 1-2 に示す。

本 ELISA 系がヒト血漿中の内因性 TM を検出するかどうかを確認するため、健康成人 6 例の血漿を用いて濃度測定を行ったところ、平均 2.5 ng/mL (最大値 2.9 ng/mL、最小値 2.1 ng/mL) といずれの個体も検出された (表 1-1)。さらにこの内因性 TM が ELISA 系の測定値に影響を及ぼすかどうかを確認するため、それぞれの血漿に 10 および 100 ng/mL の TM- $\alpha$  を添加し、その回収試験を実施した。その結果、いずれも許容される基準 (添加濃度の $\pm 20\%$ 以内) を満たしたことから、内因性 TM は ELISA の測定値に影響を及ぼさないと判断された。

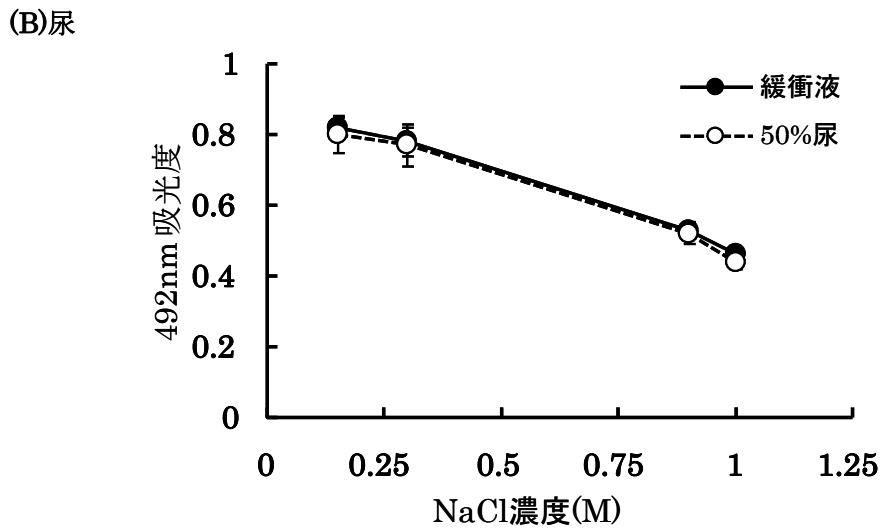
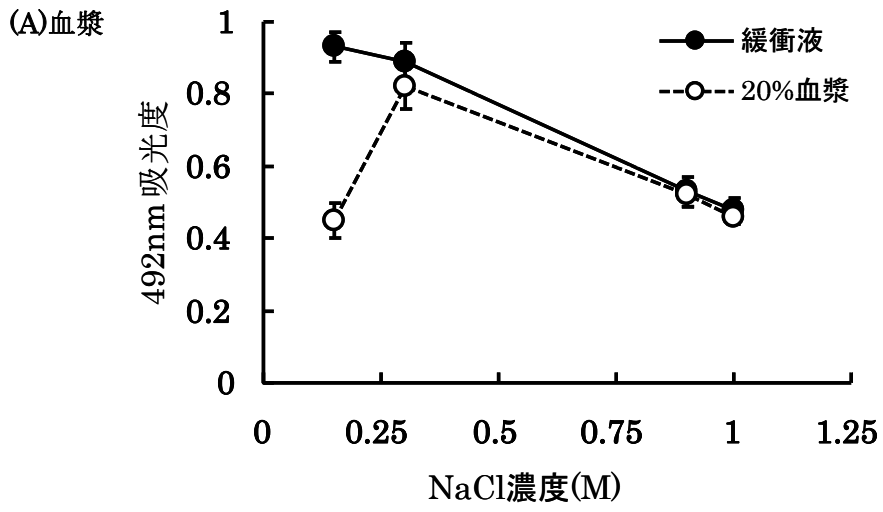


図 1-1 ヒト血漿および尿成分が TM- $\alpha$  定量に及ぼす影響とそれに対する NaCl 添加効果

各プロットは平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)

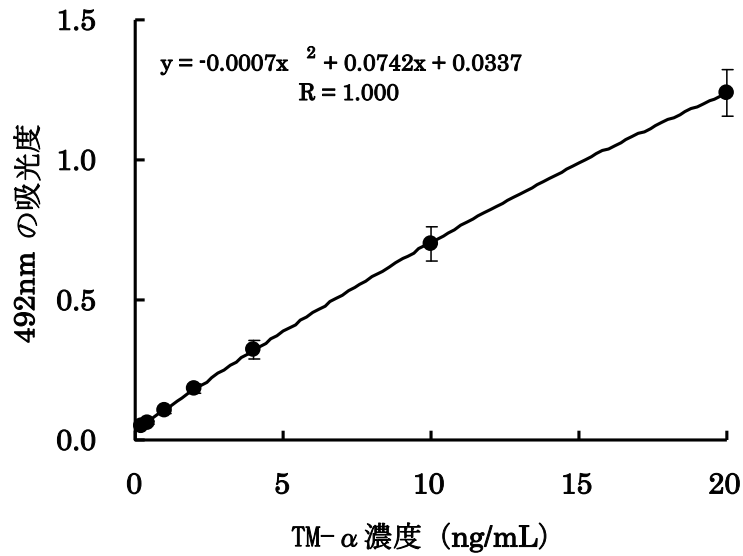


図 1-2 ヒト血漿 TM- $\alpha$  の ELISA による定量での検量線

各プロットは平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)

表 1-1 ELISA 系による内因性 TM 濃度の検出と TM- $\alpha$  回収率

被験者	総TM濃度 (ng/mL)			TM- $\alpha$ 回収率 (%) <sup>a)</sup>	
	内因性TM濃度	TM- $\alpha$ 10 ng/mL	TM- $\alpha$ 100 ng/mL	TM- $\alpha$ 10 ng/mL	TM- $\alpha$ 100 ng/mL
A	2.7	12.7	91.3	100.0	88.6
B	2.5	11.1	94.8	86.0	92.3
C	2.9	11.8	92.2	89.0	89.3
D	2.3	11.2	95.7	89.0	93.4
E	2.3	12.4	96.2	101.0	93.9
F	2.1	11.8	101.8	97.0	99.7
平均値 $\pm$ 標準偏差	2.5 $\pm$ 0.3	11.8 $\pm$ 0.6	95.3 $\pm$ 3.7	93.7 $\pm$ 6.4	92.7 $\pm$ 4.4

a) (TM- $\alpha$  添加血漿の総 TM 濃度 - 内因性 TM 濃度) / (TM- $\alpha$  添加濃度) X 100

## 第二項 生物活性測定に基づく TM- $\alpha$ 定量法

生物活性測定系の確立にあたっては、体液中妨害成分の影響を如何に除去するかが重

要な課題となる。本研究で調製した ELISA 用一次抗体 (R4B6) が生物活性非クエンチ型であったことから、ELISA と同様に、これを TM- $\alpha$  捕捉用の抗体として選択した。すなわち、血漿中の TM- $\alpha$  を捕捉し、これを洗浄して試料中の非分析対象成分を除去後、得られた TM- $\alpha$  含有試料にヒトトロンビンおよびヒトプロテイン C を添加して反応させた。TM- $\alpha$  依存的に生成する活性化プロテイン C 活性を、特異的基質(S2366)との反応で生成する着色生成物を測定して求め<sup>34)</sup>、これを TM- $\alpha$  生物活性の指標とした。ELISA と同様に 0.9 M NaCl と 0.05% Tween80 含有 PBS で試料を 2 倍以上に希釈することにより、サルおよびヒト共に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(成績未掲載)。そこで、緩衝液のみに溶解した TM- $\alpha$  標準液につき、上記と同様の操作を行って検量線を作成し、これに当てはめて生体試料中 TM- $\alpha$  量を算出した。具体的な測定方法を以下に示す。

96 穴マイクロプレートに 50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.6)に溶解した抗 TM- $\alpha$  抗体 (R4B6; 100  $\mu$ g protein/mL) を well あたり 100  $\mu$ L 添加し、4°C で 24 時間静置した。PBS 200  $\mu$ L/well で 5 回洗浄したのち、ブロックエース溶液 (4 倍希釈) を 250  $\mu$ L/well 入れ、室温で 1 時間静置した。0.05% Tween80 を含む PBS で 5 回洗浄したのち、TM- $\alpha$  標準溶液および試料溶液を well あたり 100  $\mu$ L 入れ 2 時間静置した。0.05% Tween80 を含む生理的リン酸緩衝液(pH 7.4)で 5 回洗浄したのち、ヒトトロンビン (0.4 国際単位/mL)、ウシプロテイン C (12  $\mu$ g/mL)、0.1%ウシ血清アルブミン、3 mM CaCl<sub>2</sub>、および 0.1 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.5)を 110  $\mu$ L/well 添加した。37°C で 5 時間反応させたのち、ウシアンチトロンビン III (0.29 mg/mL) およびヘパリン (67  $\mu$ g/mL) を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を 15  $\mu$ L/well 添加することにより、TM- $\alpha$  による活性化プロテイン C 生成反応を停止させた。室温で 15 分間静置させたのち、活性化プロテイン C に対する特異的発色基質 (S-2366、0.74 mM) および 0.2 M CsCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) を well あたり 90  $\mu$ L 添加した。室温で 20 分間反応させたのち、酢酸を 15  $\mu$ L/well 添加することにより発色反応を停止し、96 穴用吸光光度計にて 405 nm の吸光度を測定した。標準溶液にて検量線を作製し、試料溶液中の活性保持 TM- $\alpha$  量を算出した。検量線の一例を図 1-3 に示す。ELISA 系と同様に、TM- $\alpha$  の添加回収試験を実施した結果、いずれの被験

者においても TM- $\alpha$  を添加した血漿中の生物活性値は、許容される基準（設定濃度の $\pm 20\%$ 以内）を満たした。

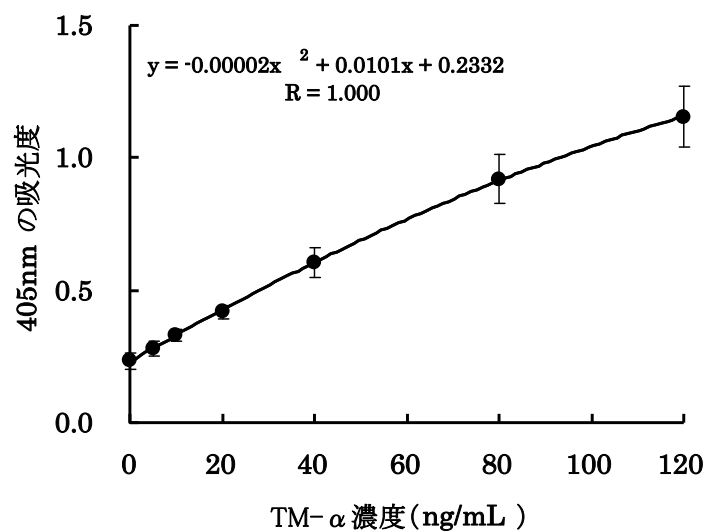


図 1-3 ヒト血漿 TM- $\alpha$  の生物活性測定による定量での検量線

各プロットは平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)

表 1-2 生物活性測定法による内因性 TM 濃度の検出と TM- $\alpha$  回収率

被験者	総TM濃度 (ng/mL)			TM- $\alpha$ 回収率 (%) <sup>a)</sup>	
	内因性TM濃度	TM- $\alpha$	TM- $\alpha$	TM- $\alpha$	TM- $\alpha$
		40 ng/mL	80 ng/mL	40 ng/mL	80 ng/mL
A	ND	36.4	81.4	90.9	101.8
B	ND	39.7	81.9	99.2	102.4
C	ND	38.0	81.9	95.1	102.4
D	ND	35.6	80.1	89.1	100.0
E	ND	37.7	75.5	94.2	94.4
F	ND	39.5	74.1	98.8	92.6
平均値 $\pm$ 標準偏差	ND	37.8 $\pm$ 1.6	79.2 $\pm$ 3.5	94.6 $\pm$ 4.1	98.9 $\pm$ 4.3

a) (TM- $\alpha$  添加血漿の総 TM 濃度 - 内因性 TM 濃度) / (TM- $\alpha$  添加濃度) X 100

ND: 未検出

### 第三項 ELISA による TM- $\alpha$ 定量法の実用性

ELISA 系を用いたラット、サルおよびヒトの血漿並びに尿中測定法の測定感度と再現性 (表 1-3) および試料保存条件 (表 1-4) をそれぞれ表に示す。ラット血漿 (20-1000 ng/mL)、サル血漿 (1-100 ng/mL)、サル尿 (2-200 ng/mL)、ヒト血漿 (1-100 ng/mL) およびヒト尿 (1-40 ng/mL) サンプルを繰り返し 3 回調製し濃度測定をおこなった。真度 {設定濃度からのずれ =  $[(\text{測定値} - \text{設定濃度}) / \text{設定濃度}] \times 100$ } が  $\pm 20\%$  以内であり、かつ精度 [定量値のバラつき =  $(\text{測定濃度の標準偏差} / \text{測定濃度の平均値}) \times 100$ ] が  $20\%$  以内であった最低濃度を定量限界値と判断した。ヒト血漿中濃度を測定する際の定量限界は、検量線上で 0.2 ng/mL であり、血漿を 5 倍以上希釈することから、1 ng/mL であった。一方、ヒト尿中測定時の定量限界は、検量線上で 0.5 ng/mL、尿の最低希釈率が 2 倍であることから、血漿と同様に 1 ng/mL であった。

測定内変動については、正常動物若しくは健常者ヒトの血漿および尿を用いて、想定される濃度範囲を含む 3 つの異なる TM- $\alpha$  濃度サンプル (設定濃度は表 1-3 参照、各  $n=3$ ) を測定した結果、設定濃度に対する変動値はいずれも  $\pm 20\%$  以内と良好な結果であった。測定間変動についても、測定内変動試験と同等な濃度にて 3 回の測定を行った結果、いずれも設定濃度に対する変動値はいずれも  $\pm 20\%$  以内と良好な結果であった。

これらの結果から、本測定系をラット、サルおよびヒトの薬物動態試験の定量法として使用することに問題はないと考えられた。また上記試料の安定性に関しては表中の条件下においていずれも安定であることが示され、試料採取時から分析に至るまでの過程における安定性も確認された。

表 1-3 ELISA 法バリデーション試験結果概要

動物種	生体 試料	定量限界 (ng/mL)	測定内変動 <sup>a)</sup>		測定間変動 <sup>b)</sup>	
			精度(%)	真度(%)	精度(%)	真度(%)
ラット	血漿	20	2.5~6.0	-4.2~5.3	2.2~7.0	-6.7~0.5
サル	血漿	1	1.1~4.9	-15~-0.5	2.4~7.8	-10.7~2.7
サル	尿	2	2.5~4.7	-9.3~1.5	1.7~2.1	3.4~5.3
ヒト	血漿	1	1.9~11.0	-6.5~-0.7	8.0~16.3	-10.4~-3.8
ヒト	尿	1	1.5~4.3	3.0~7.2	3.5~8.8	8.4~10.8

a) 下記に示した正常動物若しくは健常者ヒトの血漿および尿を用いて、想定される濃度範囲を含む3つの異なる TM- $\alpha$  濃度サンプルを3回調製し、同じ96プレート内にてこれら3つのサンプル(各 n=3)の濃度を測定した。なお検量線の範囲を超えるサンプルは希釈を行った。数字はいずれも設定濃度に対する変動値(%)を表示した。使用した3濃度は以下の通り：

ラット血漿；50、400 および 1,600 ng/mL

サル血漿；15、80 および 1,800 ng/mL、サル尿；7、80 および 1,800 ng/mL

ヒト血漿；10、100 および 1,000 ng/mL、ヒト尿；50、200 および 1,000 ng/mL

b) 上記の正常動物若しくは健常者ヒトの血漿および尿サンプル(測定内変動試験と同じ濃度)を1日1回調製し、3日間繰り返し測定した。なお検量線の範囲を超えるサンプルは希釈を行った。数字はいずれも設定濃度に対する変動値(%)を表示した。

表 1-4 ELISA 法による生体試料中保存安定性試験概要

動物種	生体試料	安定性が検証された保存条件 <sup>a)</sup>		
		操作中 <sup>b)</sup>	凍結保存 <sup>c)</sup>	凍結融解 <sup>d)</sup>
ラット	血漿	氷冷下で2時間	-30°C以下で4週間	3回
サル	血漿	室温で6時間	-80°C以下で1ヶ月間	5回
サル	尿	室温24時間	-80°C以下で1ヶ月間	5回
ヒト	血漿	室温で6時間	-80°C以下で2年間	5回
ヒト	尿	室温で24時間	-80°C以下で2ヶ月間	5回

a) 添加直後の TM- $\alpha$  定量値に比して $\pm 15\%$ 以内を満たすことが確認された条件を表示。

b) ラット血漿(50、1,600 ng/mL)、サル血漿(15、80 ng/mL)、サル尿(7、80 ng/mL)、ヒト血漿(10、100、1,000 ng/mL) およびヒト尿(100 ng/mL) に括弧内に示す濃度で TM- $\alpha$  を添加後、ELISA 系にて測定した (n=3)。

- c) ラット血漿 (50、1,600 ng/mL)、サル血漿 (15、80 ng/mL)、サル尿 (7、80 ng/mL)、ヒト血漿 (10、100、1,000 ng/mL) およびヒト尿 (10、100、1,000 ng/mL) に括弧内に示す濃度で TM- $\alpha$  を添加後、測定した (n=3)。
- d) ラット血漿 (50、1,600 ng/mL)、サル血漿 (15、80 ng/mL)、サル尿 (7、80 ng/mL)、ヒト血漿 (10、100、1,000 ng/mL) およびヒト尿 (10、100、1,000 ng/mL) に括弧内に示す濃度で TM- $\alpha$  を添加後、測定した (n=3)。

#### 第四項 TM- $\alpha$ 依存的なプロテイン C 活性化の評価に基づく TM- $\alpha$ 定量法の実用性

生物活性を指標とする定量法では、20~160 ng/mL (サル血漿)、および 5~120 ng/mL (ヒト血漿) の濃度範囲で TM- $\alpha$  添加量依存的な活性化プロテイン C による S-2366 分解の上昇が認められた (図未掲載)。添加量からのずれ (真度) および標準偏差の平均値に対する割合 (精度) 共に 15%未満と良好な結果を示した (表 1-5)。また、保存安定性についても表中のいずれの条件下でも安定であることが示され、試料採取時から分析に至るまでの過程における安定性も確認された (表 1-6)。ヒトおよびサル血漿中濃度測定時の検出感度は、試料希釈倍率 (2 倍) を補正後の値でそれぞれ 10 および 40 ng/mL であった。これは ELISA の感度 (いずれも 1 ng/mL) より劣るものの、TM- $\alpha$  の想定される血漿中濃度 (500 ng/mL 以上) を十分に定量可能であった。

表 1-5 生物活性法バリデーション試験結果の概要

動物種	生体試料	定量限界 <sup>a)</sup> (ng/mL)	測定内変動 <sup>b)</sup>		測定間変動 <sup>c)</sup>	
			精度(%) <sup>d)</sup>	真度(%) <sup>e)</sup>	精度(%) <sup>d)</sup>	真度(%) <sup>e)</sup>
サル	血漿	40	2.7~3.2	0.1~3.9	4.6~13.1	-0.5~0.9
ヒト	血漿	10	3.3~8.5	-11.4~6.8	3.0~5.2	-9.9~3.6

- a) サル血漿 (20~160 ng TM- $\alpha$ /mL) およびヒト血漿 (5~120 ng TM- $\alpha$ /mL) を調製し、濃度測定を行った (n=3)。真度が $\pm$ 20%以内であり、かつ精度が 20%以内であった最低濃度を定量限界値と判断した。
- b) 薬物未処理サルおよびヒトの血漿に、TM- $\alpha$  投与後に想定される濃度を含む異なる濃度 (下記) の TM- $\alpha$  を添加後、濃度を測定した (n=3)。検量線の範囲を超えるサンプルは希釈ののちに分析した。  
サル血漿 ; 480 および 960 ng/mL  
ヒト血漿 ; 100 および 1,000 ng/mL
- c) 上記と同じ TM- $\alpha$  添加血漿サンプルを 1 日 1 回調製し、3 日間繰り返し測定した。
- d) 測定のバラツキを、(実測値の標準偏差 / 実測値の平均値) x 100 で算出
- e) 実測値の添加値からのズレを、 [(実測値 - 添加量) / 添加量] x 100 で算出



表 1-6 生物活性法による生体試料中保存安定性試験概要

動物種	生体試料	安定性が検証された保存条件 <sup>a)</sup>		
		操作中 <sup>b)</sup>	凍結保存 <sup>c)</sup>	凍結融解 <sup>d)</sup>
サル	血漿	室温で6時間	-80℃以下で1ヶ月間	5回
ヒト	血漿	室温で6時間	-80℃以下で1ヶ月間	5回

a) 添加直後の TM- $\alpha$  定量値に比して $\pm 15\%$ 以内を満たすことが確認された条件を表示。

b) サル血漿 (480、960 ng/mL) およびヒト血漿 (100、1,000 ng/mL) に括弧内に示す濃度で TM- $\alpha$  を添加後、生物活性法にて測定した (n=3)。

c) サル血漿 (480、960 ng/mL) およびヒト血漿 (100、1,000 ng/mL) に括弧内に示す濃度で TM- $\alpha$  を添加後、生物活性法にて測定した (n=3)。

d) サル血漿 (480、960 ng/mL) およびヒト血漿 (100、1,000 ng/mL) に括弧内に示す濃度で TM- $\alpha$  を添加後、生物活性法にて測定した (n=3)。

#### 第五項 TM- $\alpha$ の定量値と生物活性指標との相関性

サルおよびヒトに TM- $\alpha$  (サル、50~250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; ヒト、0.03~0.3  $\text{mg}/\text{bdy}$ ) を静脈内単回投与したのち、血漿サンプルを 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結果をそれぞれ図 1-3 および図 1-4 に示す。いずれの種においても、ELISA 法と生物活性指標評価法にて求めた TM- $\alpha$  量との相関係数は 0.98 以上で、かつ傾きはほぼ 1 であった。このことから、ELISA 法で算出された TM- $\alpha$  定量値は生物活性評価法で得た値と等価であることが確認された。従って、活性保持 TM- $\alpha$  の血漿中濃度分析は ELISA のみで定量しても問題ないと考えられた。

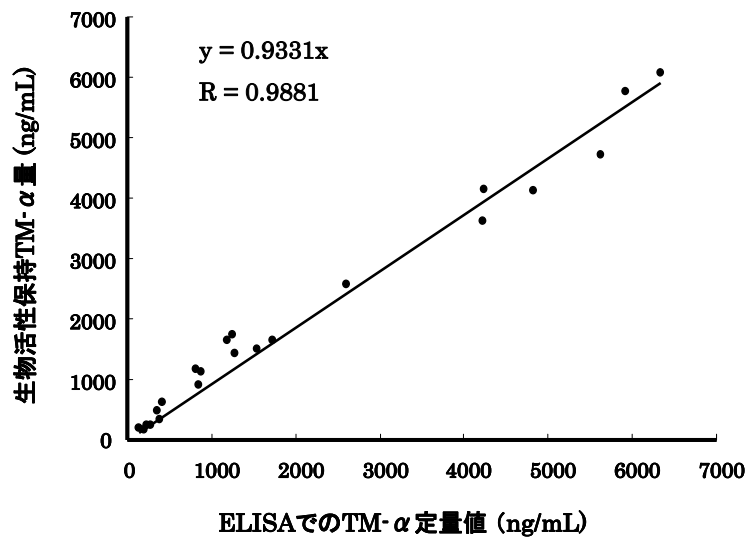


図 1-3 ELISA 系と生物活性測定法で求めた TM-α 定量値の相関：  
サル血漿サンプルでの検討（試料数=22）

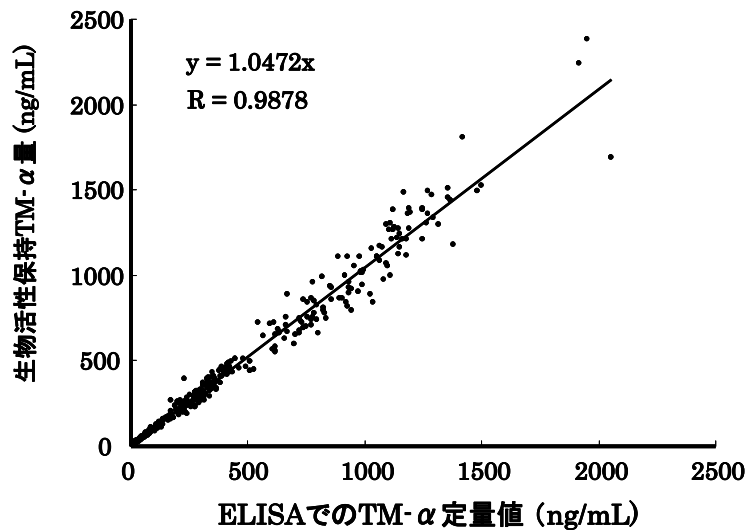


図 1-4 ELISA 系と生物活性測定法で求めた TM-α 定量値の相関：  
ヒト血漿サンプルでの検討（試料数=383）

### 第三節 考 察

生体試料中のタンパク質薬の定量法を確立する際には、生物活性を正確に反映する定量系の構築が重要な課題である。その中で確認すべき項目は、少なくとも以下の 3 点が考えられる。

(1)動物評価系において、外来タンパク質薬の活性代謝物の血漿や尿中への出現の有無

(2)ヒト血漿中に内因性タンパク質ないしその代謝物が存在する可能性の有無

(3)対象疾患と健常者間での内因性タンパク質とその代謝物の濃度に関する違いの有無

もし上記のすべての項目で該当がない場合には、ELISA系のみを確立すれば良いが、1項目でも該当する場合にはELISA系と共に生物活性測定系を確立する必要がある。求められる定量感度に関しては、投与した薬剤の濃度が内因性のタンパク質濃度より低い状況に至れば、それは治療有効濃度以下への変化を意味する。従って、外因性のタンパク質薬の測定感度は内因性の血漿中濃度が定量できる感度であれば実用上は問題ないと考えられる。一方、生物活性測定系に必要とされる感度は、タンパク質薬の臨床用量での血漿濃度推移を定量可能であれば良いと考えられる。目安としては最高血漿中濃度(Maximum plasma concentration:  $C_{max}$ )からその1/10程度までの範囲で定量できる感度である。TM- $\alpha$ の場合は、放射標識薬を用いた動物での予備動態試験の結果や文献情報<sup>26-28)</sup>等から、上記の3項目の中で(3)を除く2つが「是」と考えられた。このことから、ELISA系と共に生物活性測定系を確立した。内因性のTMは本研究で構築した生物活性測定法の定量限界値である10 ng/mLを超える濃度が存在することも報告されている<sup>26,28)</sup>。しかし、本生物活性測定系では、国内並びに海外の臨床試験のいずれでも内因性TM- $\alpha$ が検出されなかったことから、本生物活性測定法は内因性TMには不応答の測定法であると考えられた。この活性測定系は、固相化抗体で捕捉したTM- $\alpha$ の生物活性を連携末端酵素であるプロテインCの触媒機能を指標として測定する系である。本活性測定系は、ELISA法で用いた1次抗体を使用することから、ELISA法の対象と同一物質の活性を把握することができ、また血漿成分を除去洗浄することで特異的な検出が可能であると考えられた。一般に、内因性高分子化合物そのもの、あるいはこれに近似する薬物の場合、生体内物質の影響を排除して特異的かつ高感度な生物活性測定系を確立することは容易ではない。しかし、本研究でのTM- $\alpha$ 活性測定では、固相化抗体を利用する純化操作の導入により、これらの課題を克服できた。同様の方法は、酵素活性を有する他のタンパク質製剤の分析でも有用と考えられる。

ヒト内因性 TM の血漿中濃度の最低値は 2 ng/mL 程度と報告されており<sup>19,20</sup>、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。事実、健康成人の血漿を用いた内因性 TM 濃度の測定を行ったところいずれも応答し、平均で 2.5 ng/mL であった。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 系は特異性を有する測定系であると考えられた。

一方、サルに臨床用量 (50  $\mu$ g/kg) の TM- $\alpha$  を静脈内投与した際の  $C_{\max}$  が約 1,400 ng/mL であったことから、生物活性測定法は 7 半減期以上の時間をカバーできるものと考えられ、ELISA 系との相関性を確認するには十分な感度であることが確認された。生体内高分子化合物の薬物動態を研究するにあたっては、十分な感度の定量法を構築すると共に、その方法で検出された薬物が活性を保持するものか否かの判別に係る生物活性測定系の確立が必要である。本研究では臨床試験実施前の段階でこの課題を克服できた。

次に、ヒト TM- $\alpha$  の定量感度について考察する。一般に、対象とする化合物にて臨床試験を初めて開始する際には、安全性に考慮して十分に低い用量から実施する。TM- $\alpha$  の場合は、サル反復毒性試験時の無作用量 (0.6 mg/kg) でのトラフ濃度 (609 ng/mL) を超えない用量として、PK パラメータを参考に 0.03 mg/kg (体重 60kg として 1.8 mg/body) が算出され、これにヒト試験時に一般に使用される安全係数の 1/60 を乗じて 0.03 mg/body とした。ヒト尿中 TM- $\alpha$  の ELISA 系での定量感度は 1 ng/mL であったが、1 日あたりの尿量を 1,500 mL とした場合、投与された 0.03 mg が全て尿へ排泄されると仮定すると尿中平均濃度は 20 ng/mL と試算される。定量限界はこれの 1/20 なので、排泄率 5%程度までは定量可能であると考えられた。また、上記無作用量 (1.8 mg/body) まで用量を上げた場合には、さらにその 1/60 (投与薬剤の約 0.08%) まで検出が可能であることが確認された。従って、構築した ELISA 法はヒトの尿中濃度測定についても十分な感度を有すると考えられた。

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 であることから、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- $\alpha$  は生体内において一部代謝されて活性を失うものと推定される(詳細は後述、第二章考察参照)。本研究では、TM- $\alpha$  定量値は ELISA と生物活性検定法のどちらで測定しても等価であったことから、ELISA 系では代謝物を殆ど検出していないものと考えられた。今回構築した ELISA 系では、二次抗体に活性中心であるドメイン 2 の 4~6 番目の EGF 様構造部を認識するモノクローナル抗体を使用していることから、生物活性との高い相関性が期待されたが、試験結果はこれを支持した。

## 第二章 実験動物および健康成人での TM- $\alpha$ の体内動態

### 第一節 概要

本章記載の実験では、TM- $\alpha$  のクリアランス機構についての解析を実施し、 $^{125}\text{I}$  で標識した TM- $\alpha$  を用いてラットに静脈内投与後の組織分布や代謝物生成の程度を経時的に調べることで、TM- $\alpha$  の体内からの消失機構の解明を目指した。ラジオクロマトグラフィーを用いた代謝物の検討結果から、1) 生体内に投与された TM- $\alpha$  の一部は肝臓などの臓器によって取り込まれ代謝分解されること、また 2) 残りは腎臓を介して未変化体として排泄されることが分った。すなわち、TM- $\alpha$  の消失には腎クリアランスと腎外クリアランスが同程度関与し、それぞれ腎糸球体ろ過と組織での非特異的な代謝機構が関与するものと考えられた。

血漿中には主に未変化体が存在するものの、時間と共に低分子の代謝物が増加する傾向が見られたことから、未変化体のクリアランスを精度よく算出するためには、放射性元素による検出よりもむしろ第一章で述べた ELISA 法を用いるのが有用であると考えられた。そこで、ヒトへの外挿性については、ラット、サルおよびヒト（健康成人）に非標識体を投与したのちの TM- $\alpha$  未変化体の血漿中濃度推移並びに尿排泄率を ELISA 法にて検討した。その結果、アロメトリック法に基づきヒトへの外挿性を確認したところ、腎クリアランス並びに腎外クリアランスのいずれもヒトへ外挿可能であることがわかった。また腎クリアランスについては、一般的な急性腎障害モデル（50%グリセロールモデルラット；重度の障害）並びに慢性腎障害モデル（5/6 腎結紮モデルラット；中等度の障害）を用いて、腎障害の程度が TM- $\alpha$  未変化体の濃度推移に及ぼす影響について検討を加えた。その結果、いずれの障害モデルにおいても TM- $\alpha$  のクリアランスが低下する傾向が見られたものの統計学的に有意な変化は認められなかった。

## 第二節 実験方法

### 第一項 ラットでの TM- $\alpha$ 動態

#### 1) 放射能標識 TM- $\alpha$ の調製

体液や組織中の TM- $\alpha$  を検出する際、10 ng/mL 体液 (mg 組織) 程度を検出できることが望ましい (第一章・第三節 考察の項を参照)。放射能検出での分析限界水準を 100 dpm とした場合、TM- $\alpha$  の分子量 64 kDa を考慮すると、必要な検出感度を得るには 213 GBq/mmol 以上の比放射能が必要と算出された。汎用される標識用核種 4 種 ( $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$  および  $^{35}\text{S}$ ) のうち、これを容易に満足するのは  $^3\text{H}$  と  $^{125}\text{I}$  であり、分子内の核種維持率 ( $^3\text{H}<^{125}\text{I}$ ) 等も配慮して、 $^{125}\text{I}$  標識を選択することにした。 $^{125}\text{I}$  の標識体は、 $\text{Na}^{125}\text{I}$  を用いて、生物活性への影響が少ないとされている Enzyme-beads 法<sup>35)</sup>により合成した。これにより、比放射能が 1.8~3.2 TBq/mmol の TM- $\alpha$  が得られた。

#### 2) 放射能測定法

試料中の  $^{125}\text{I}$  の放射能は、ガンマカウンターにて 1 分間計数して測定した。放射能の検出限界はバックグラウンド値(dpm)の 2 倍とした。なお、一部の試料については、トリクロロ酢酸 (TCA) 処理を行い、未変化体を含む TCA 不溶性画分と、脱離した  $^{125}\text{I}$  および代謝を受けた低分子量代謝物を含む TCA 可溶性画分に分離し、それぞれの放射能濃度を測定した。放射能濃度は、TM- $\alpha$  当量 (ng/mL または ng/g) に換算して表記した。

#### 3) HPLC による分子量分布分析

臓器中の未変化体と代謝物の比率を、ゲルろ過を用いたラジオクロマトグラフィーにより分析した。TM- $\alpha$  が血清中のグロブリン (分子量約 160 kDa) やアルブミン (分子量約 70 kDa) と結合する可能性も想定し、10~500 kDa のタンパク質の分画が可能なカラム (TSK-gel G3000SW ; 7.5 mm I.D.  $\times$ 60 cm、東ソー) を選定した。試料を注入後、移動相として 0.15 M NaCl を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用い、室温下、流速 1 mL/min で溶出して 30 秒毎に分取し、各フラクションの放射能を測定した。本条件下、TM- $\alpha$  標準品は保持時間 11.8 分に鋭利な単一ピークとして観測された (図 2-1)。生体試料での代謝・分解物の分析では、HPLC のクロマトグラム上、「TM- $\alpha$  画分」並びに遊離した

$^{125}\text{I}$  が溶出してくる「低分子量画分」について、試料中放射エネルギーに対する割合 (% in sample) として表示した。「TM- $\alpha$  画分」および「低分子量画分」以外の画分については「others」として一括評価した。試料の HPLC への注入量は、体液（血清および尿）では未希釈液 100  $\mu\text{L}$  を、また固形臓器では 10% ホモジネート (PBS) のフィルターろ液を 100  $\mu\text{L}$  注入して実験を行った。

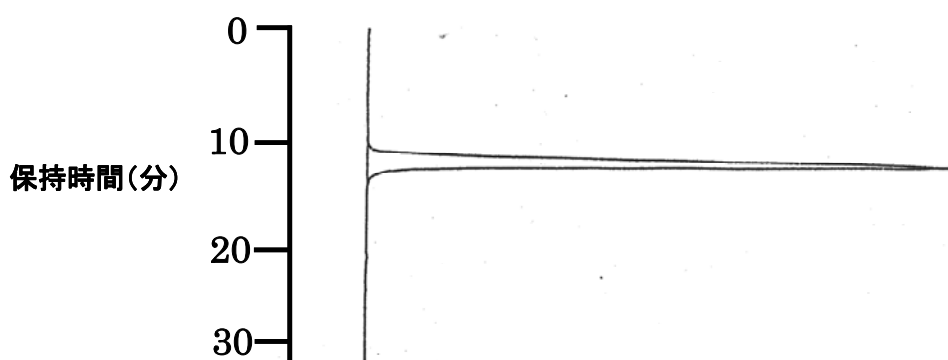


図 2-1 TM- $\alpha$  標準品 ( $^{125}\text{I}$  標識体) の HPLC クロマトグラム

注入量 : 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を 100  $\mu\text{L}$  ; 検出 : UV280 nm

#### 4) 動物と投与

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。Sprague-Dawley (SD)系雄性および雌性ラット（いずれも 7~8 週令）を日本チャールスリバー社（横浜）より購入して使用した。水および固形飼料 [CRF-1、オリエンタル酵母（東京）] を自由に摂取させ、温度  $24\pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度  $55\pm 10\%$  および 12 時間明暗サイクルの飼育条件下で 1 週間以上の予備飼育を行ったのち、試験に供した。雄性ラットをすべての試験に用い、血漿中濃度推移および尿・糞排泄試験についてのみ雌性ラットを用い、性差の検討を行った。いずれの実験も動物数は 1 群 3~4 匹とした。HPLC による分子量分布試験については、予備検討も含め個体間に予め大きな違いがないことが確認されたため、各個体からの試料を合して分析に供した。

TM- $\alpha$  および  $^{125}\text{I}$  標識 TM- $\alpha$  は 0.02% Tween80 を含む PBS (PBS-Tween) にて所定の濃度に希釈して投与液を調製した。投与液は用時調製とし、ラットの尾静脈に 1 mL/kg で投



与した。<sup>125</sup>I 標識体の投与放射能は 0.69～1.4 MBq/kg とした。また投与に際して動物は非絶食で用いた。

#### 5) 血漿中濃度推移試験

ラットに <sup>125</sup>I 標識 TM- $\alpha$  10～250  $\mu$ g/kg を静脈内投与したのち、尾静脈よりヘパリン処理した 1.0 mL シリンジにて血液約 250  $\mu$ L (1 回採血当たり) を投与 2 分～24 時間の間に採取した。なお測定時点数は、総採血量の薬物動態への影響に関する一般的指針<sup>36)</sup>を参考に循環血液量の 20%未満になるように設定した。採取した血液は速やかに氷冷し、4℃、1,800g の条件で 15 分間遠心分離し血漿を得た。得られた血漿は、放射能測定に供するまで-80℃で凍結保存した。

分解物も含めた TM- $\alpha$  血中濃度の検討では、ラットに <sup>125</sup>I 標識体 50  $\mu$ g/kg を単回若しくは反復静脈内投与 (1 日 1 回) したのち、上記と同様にして血液を採取した。単回投与時の採血時間は、投与後 2 分～72 時間とした。反復投与実験では、毎回投与 24 時間後および 7 回 (最終回) 投与後の 2 分～168 時間後に採血した。血液は速やかに氷冷し、4℃、1,800g の条件で 15 分間遠心分離し血漿を得た。この 100  $\mu$ L に等容量の 20% TCA を加え、氷冷下 15 分以上放置したのち、遠心分離 (4℃、1,800g、15 分) し、上清と沈殿の放射能を測定して未変化 TM- $\alpha$  量 (沈殿) および代謝物/分解物量 (上清) を求めた。

#### 6) 組織分布試験

ラットに <sup>125</sup>I-TM- $\alpha$  50  $\mu$ g/kg を反復静脈内投与したのち [詳細は上記 5) 項参照]、投与 30 分～168 時間後にエーテル麻酔下、腹部大静脈採血致死させ 28 種の組織を摘出した (測定対象組織については後述：第三節・第二項を参照)。採取した血液から 1 mL を取って血中全放射能を測定した。残りの血液は遠心分離 (4℃、1,800g、15 分) して血漿を得、その 1 mL 中の放射能を測定し、全血中放射能からこれを差し引くことによって、血球中 TM- $\alpha$  量を算出した。血液以外の組織は湿重量を測定したのち、小片を切り取り (小組織では全部を使用)、その湿重量と放射能を測定した。なお予め実施した全身オートラジオグラフィによる組織分布試験の結果から、肝臓などの臓器中への放射能の分布は一様で偏りがないことが確認されたため (成績未掲載)、全組織のホモジネートではなく一部の

組織のホモジネートを用いた。

#### 7) 排泄試験

雄性および雌性ラットに  $^{125}\text{I}$ -TM- $\alpha$  50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を静脈内投与したのち[詳細は上記5)項参照]、ラットを代謝ケージ (KN-646B、夏目製作所) に移し、自然排泄された尿および糞を採取した。尿と糞は投与後 8、24 時間、および以後 24 時間毎に 120 時間まで採取した。体内放射能残存率および甲状腺内総放射能残存率の測定も、投与 120 時間後に行った。

代謝物/分解物に関する検討では、採取した尿 100  $\mu\text{L}$  に等容量の 20% TCA を加え、氷冷下 15 分以上放置した。遠心分離後 (4°C、1,800g、15 分)、上清と沈殿の放射能を測定して、未変化 TM- $\alpha$  量 (沈殿) および代謝物/分解物量 (上清) を求めた。

#### 8) 腎障害ラットモデルを用いた PK 試験

Wilson ら<sup>37)</sup>や Ishikawa ら<sup>38)</sup>の方法に準拠し、以下の手順でグリセロール誘発急性腎不全モデルラットを作製した。すなわち、50% グリセロール/生理食塩水 (v/v) をろ過滅菌後 (0.22  $\mu\text{m}$ 、ミリポアフィルター)、24 時間の飲水禁止処置を行ったラットにエーテル麻酔下、5 mL/kg の用量で両側の下腿部筋肉内に投与した。50% グリセロール投与 24 時間後に採血を行い、血中尿素チッ素 (BUN) を測定し、BUN 値が 140 mg/dL を超える動物を選択した<sup>37)</sup>。50% グリセロールによる急性腎障害の誘発 48 時間後に試験に供した。

腎障害モデルラットは、Morrison ら<sup>39,40)</sup>の方法に従って、腎臓部分切除法 (5/6 腎結紮モデルラット) によっても作成した。ラットにペントバルビタール 50 mg/kg を腹腔内に投与して麻酔後、側腹部より切開し、左腎の上極および下極を切除した。約 1 週間後、ペントバルビタール 40 mg/kg 麻酔下にて再開腹し、右腎を全摘出した。右腎摘出 48 時間後に試験に供した。

グリセロール誘発急性腎不全モデルラットおよび 5/6 腎結紮モデルラットより、ヘパリン処理した 1.0 mL シリンジを用いて約 200  $\mu\text{L}$  を鎖骨下静脈より採血した。血液は速やかに氷冷し、4°C、1,800g で 10 分間遠心分離して血漿を得、測定に供するまで -80°C で凍結保存した。市販の臨床検査用キット (BUN カイノス、VRE-EN カイノス; 株カイノス) を用いて、BUN およびクレアチニン濃度を測定した。また、上記の腎機能障害ラットに、

$^{125}\text{I-TM-}\alpha$  50  $\mu\text{g/kg}$  を静脈内投与し、経時的に鎖骨下静脈より約 150  $\mu\text{L}$  の血液を採取した。採血は投与 2～24 時間後に行った。採取した血液は速やかに氷冷し、血漿を調製後、測定に供するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

#### 9) 薬物速度論的解析並びに統計解析

TM- $\alpha$  のラットの血漿中濃度から求められる薬物速度論的パラメータは、市販ソフトウェアである WinNonlin(Ver.5.2、Pharsight)にて解析した。2 種の腎障害ラットのいずれも静脈内投与後の消失が 2 相性であったこと、並びに 1-コンパートメントモデルと 2-コンパートメントモデルの妥当性を赤池情報量基準 (AIC) (赤池の情報量：統計モデルの良さを評価するための指標<sup>41)</sup>) に照らした比較から、2-コンパートメントモデルを選択し、投与初期血漿中濃度 (Initial plasma concentration ;  $C_0$ )、血漿中濃度時間曲線下面積 (Area under the plasma concentration-time curve ; AUC)、 $\alpha$  相の消失半減期 ( $\alpha$ -phase elimination half-life;  $T_{1/2\alpha}$ )、 $\beta$  相の消失半減期 ( $\beta$ -phase elimination half-life;  $T_{1/2\beta}$ )、分布容積 (Distribution volume;  $V_d$ )および CL のパラメータを求めた。BUN 値およびクレアチニン値については、ダネットの多重検定により対照群と各腎障害モデルラット間の統計学的検定を行った。有意水準は両側 5%とした。

## 第二項 サルでの TM- $\alpha$ 動態

### (1) 動物および投与

全ての処理実験は施設の動物倫理委員会の事前審査を受け、承認を受けたのちに実施した。サル血漿中および尿中 TM- $\alpha$  は、第一章に記載した ELISA 法並びに一部の血漿サンプルは生物活性測定系にて定量した。3～6 才 (歯による推定) の雄性カニクイザルを用いた。固形飼料 (Teklad Premier 約 100g、A Harlan Sprague Dawley Inc.) を 1 日 1 回午後 3～4 時前後に与え、残った餌は回収した。水は自動給水装置 (岡崎産業株式会社) を用いて自由に摂取させた。ただし、採尿期間中は、午前 9 時前後 (投与日は投与直前) と午後 3 時前後にオートクレーブ処理水約 50 mL/body を経口ゾンデを用いて強制的に飲水させた。サルは温度  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50\pm 10\%$ 、12 時間明暗サイクルの飼育条件下で 5 週間

以上の予備飼育を行ったのち、試験に供した。動物数は1群3匹とした。

単回投与試験においては非標識 TM- $\alpha$  10~250  $\mu\text{g}/\text{kg}/0.2 \text{ mL PBS-Tween}$  を静脈内投与したのち、また反復投与試験では 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を1日に1回、7日間反復静脈内投与したのちに、経時に外頸静脈よりヘパリン処理注射器で 500  $\mu\text{L}$  を採血した。単回投与においては投与前と投与 5~24 時間後に採血した。反復投与においては、投与前と1回目投与後の 5~8 時間に加えて、2回目から6回目投与の直前並びに投与後 5 分、さらに7回目投与直前と投与 5~48 時間後にも採血した。採取した血液は速やかに氷冷し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、1,800g の条件で5分間遠心分離して血漿を得、これを測定に供するまで-80 $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

尿は、代謝ケージにビニールホースをつなぎ、氷冷ガラス製容器中に採取した。ケージ、ホースおよび受け容器は、TM- $\alpha$  の吸着を防ぐために PBS-Tween 溶液で予め共洗いを行った。ホースや受け容器は少量の PBS-Tween 溶液にて洗浄し、洗液を採取尿に加えた。洗浄液も含めた尿は容量を測定後、速やかに2% Tween80 を1/100容添加したのち攪拌し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。採尿は、単回投与においては、投与前（投与前 24 時間の蓄尿）、投与後 0~8、8~24、24~48、48~72、72~96、および 96~120 時間の7期間に行った。反復投与においては、投与前（投与前 24 時間の蓄尿）、1回目から6回目投与後の 0~24 時間、7回目投与後の 0~24、24~48、48~72、72~96、96~120 時間の12期間に採尿した。

TM- $\alpha$  血漿中濃度から求められる薬物速度論的パラメータは市販の解析ソフトウェアである WinNonlin(Ver.5.2、Pharsight)にて解析した。コンパートメントモデルについては、AIC の値を比較して2-コンパートメントモデルを選定した。

### 第三項 健常成人での TM- $\alpha$ 動態試験

以下に示す臨床試験は、診療施設並びに旭化成ファーマ(株)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。

#### 1) 静脈内持続投与試験

単回投与試験では、日本人の健康成人男性（1群各4例；20～40歳台）に TM- $\alpha$  0.03、0.1あるいは0.3 mg/body を2時間にわたって静脈内投与した。血漿中濃度測定のための採血（3 mL；ヘパリン処理採血管）は、投与開始1時間前と投与開始30～38時間後に行った。また、尿中排泄率の測定のため、投与前24時間と投与開始後より26時間までの尿を蓄尿した。最初に行った0.03 mg投与試験において、 $T_{1/2\beta}$ が約18時間と非臨床試験からの予測より長かったことから、0.1 mgおよび0.3 mgの投与群では採血時間を投与50時間後まで延長し、また投与開始後26から50時間までの尿を採取した。

反復投与試験（n=4/群、健常男性、20～40歳台）では、0.2 mg/body を1日1回、3日間静脈内投与した（1回の投与は2時間にわたって実施）。採血（3 mL）は各回投与の1時間前、1回目投与の30分～10時間後、2回目投与の2時間後、および3回目投与の30分～50時間後に実施した。また尿中排泄率の測定のため、投与前24時間と投与後5日間の24時間尿を採取した。採取した血液は遠心分離し血漿を得、また尿サンプルの一部を遠心分離しその上清を測定に供するまで-80℃で凍結保存した。血漿および尿中 TM- $\alpha$  は第一章に示した ELISA 法にて定量した。

## 2) 静脈内急速投与試験

日本人健康成人男性（4名、20～30歳台）に TM- $\alpha$  0.3 mg/body/1.5 mL を静脈内に1分間で静脈内に急速投与した。血漿中濃度測定のため、投与開始1時間前と投与開始5～48時間後に3 mLを採血した。また尿中排泄率の測定のため、投与前と投与後2日間の24時間尿を蓄尿した。採取した血液は遠心分離し血漿を得、また尿サンプルの一部を遠心分離しその上清を測定に供するまで-80℃で凍結保存した。血漿および尿中 TM- $\alpha$  は第一章に示した ELISA 法にて定量した。

## 3) 薬物動態解析

TM- $\alpha$ 血漿中濃度から求められる薬物速度論的パラメータを市販の解析ソフトウェアである WinNonlin(Ver.5.2、Pharsight)にて解析した。コンパートメントモデルについては、AICの値を比較して2-コンパートメントモデルを選定した。

### 第三節 結果：ラットでの TM- $\alpha$ 体内動態と腎障害時の変動

#### 第一項 TM- $\alpha$ のラット血漿中濃度推移

雄性 SD ラットに 10、50 および 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の  $^{125}\text{I}$ -TM- $\alpha$  を静脈内投与したのちの血漿中濃度を図 2-2 に、また薬物速度論的パラメータを表 2-2 に示す。血漿中濃度はいずれの用量においても投与直後より比較的速やかに消失する相とその後比較的緩やかに消失する相の 2 相性を示した。10~250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量範囲では、そのパターンに大きな変動は見られなかった。Vd、 $T_{1/2\alpha}$ 、 $T_{1/2\beta}$  および CL は用量の違いに関わらずほぼ一定であったが、 $C_0$  および AUC は用量に依存して増加した。

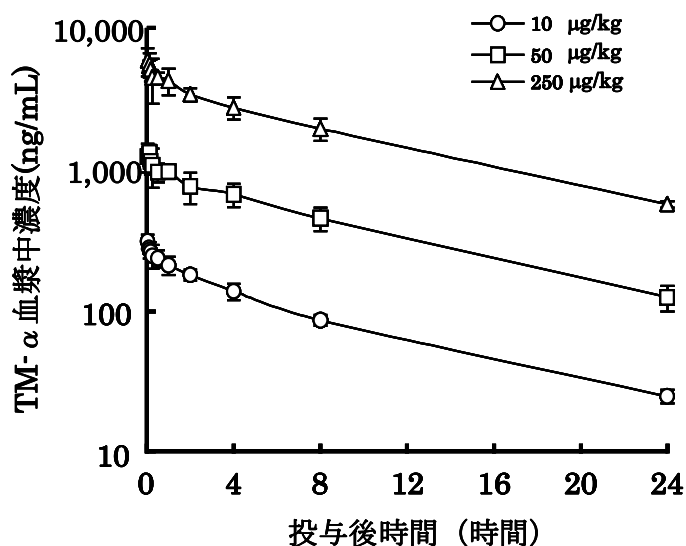


図 2-2 静脈内単回投与した TM- $\alpha$  のラット血漿中濃度推移

各プロットは平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=4)

表 2-2 TM- $\alpha$  静脈内単回投与時の薬物速度論的パラメータ

TM- $\alpha$ 投与量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	薬物速度論的パラメータ					
	Vd (mL/kg)	$T_{1/2\alpha}$ (hr)	$T_{1/2\beta}$ (hr)	CL (mL/hr/kg)	$C_0$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	AUC ( $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ )
10	31 $\pm$ 4	0.26 $\pm$ 0.22	6.1 $\pm$ 1.2	5.0 $\pm$ 0.8	0.32 $\pm$ 0.03	2.0 $\pm$ 0.3
50	38 $\pm$ 7	0.24 $\pm$ 0.14	7.8 $\pm$ 1.2	4.8 $\pm$ 0.9	1.35 $\pm$ 0.25	10.7 $\pm$ 2.1
250	41 $\pm$ 6	0.19 $\pm$ 0.09	7.2 $\pm$ 0.9	5.7 $\pm$ 1.0	6.14 $\pm$ 0.94	22.8 $\pm$ 8.1

平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=4)

静脈内単回投与時の  $C_0$  と AUC の線形性を検討した結果、原点を通る回帰式( $y=ax$ )で回帰すると、いずれも良好な寄与率( $R^2>0.99$ ) (高い相関係数)を示した (図 2-3)。このことから  $C_0$  と AUC は共に投与量に比例して増加することが明らかであり、TM- $\alpha$  の体内動態は、50~250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の投与量範囲において線形であることが確認された。

性差を検討するため、雄性および雌性の SD ラットに  $^{125}\text{I}$ -TM- $\alpha$  を静脈内投与したのちの血漿中 TCA 不溶性放射能濃度を調べた。用量としては TM- $\alpha$  の臨床用量 (0.06 mg/kg) に近い 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を選択した。図 2-4 に示すとおり、TM- $\alpha$  の血漿中濃度推移に性差は認められなかった。

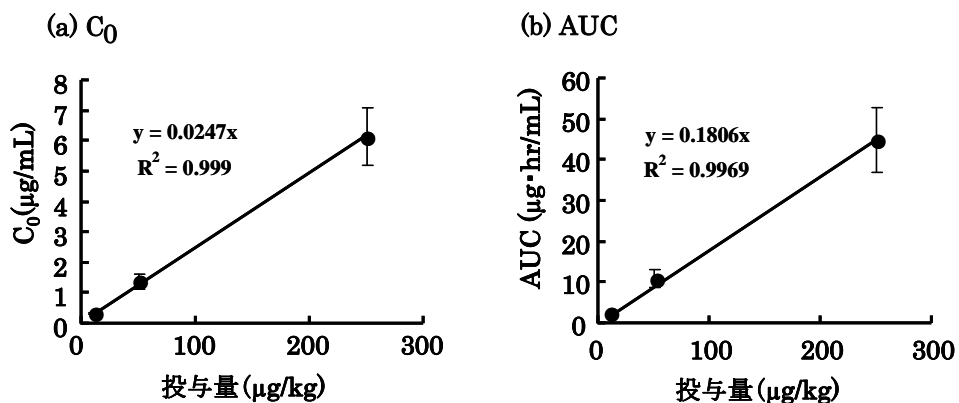


図 2-3 ラットに TM- $\alpha$  を静脈内投与した際の  $C_0$  および AUC と投与量の相関性

平均値 $\pm$ 標準偏差、n=4、線形性は原点を通ることが前提となるため、回帰式は原点を通る一次式にて作成。

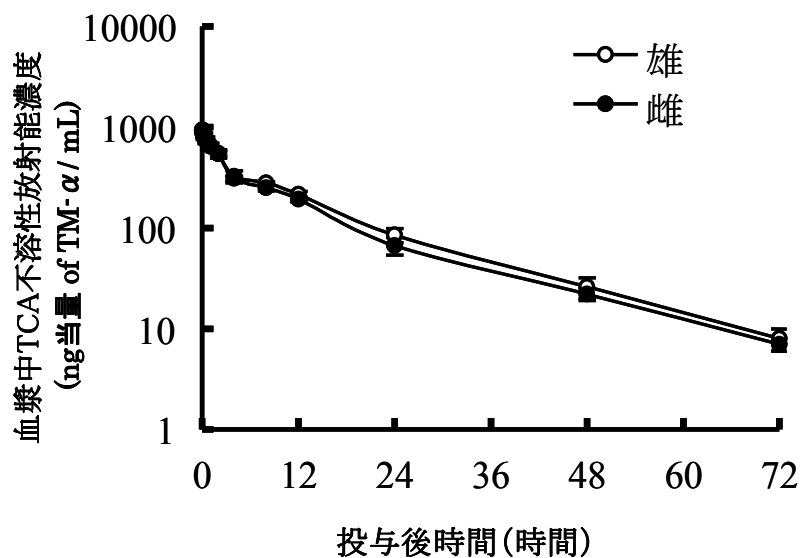


図 2-4  $^{125}\text{I}$ -TM- $\alpha$  50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を静脈内急速投与した際の雌雄ラットの血漿中濃度推移

各プロットは平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)

## 第二項 TM- $\alpha$ のラット組織分布

雄性ラットに 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の  $^{125}\text{I}$ -TM- $\alpha$  を静脈内投与し、組織内濃度の測定を実施した。その結果 (表 2-3)、投与後 5 分では血漿中 TM- $\alpha$  濃度が最も高く、次いで血液、肝臓、静脈血管、骨髄、腎臓、副腎、下垂体、肺の順であった。甲状腺および血液を除いた投与後 24 時間までの各組織の濃度は、血漿中濃度の 21%以下であり、TM- $\alpha$  の組織移行性は低かった。甲状腺を除き、いずれの組織も投与後 8 時間までに最高濃度に達したのち、血漿中濃度とほぼ同様に減衰し、投与 72 時間後では最高濃度の 6%以下となった。甲状腺における放射能の増加は、 $^{125}\text{I}$ -TM- $\alpha$  から脱離した  $^{125}\text{I}$  が  $^{125}\text{I}$ -チログロブリンとして集積するためと推察された<sup>42)</sup>。



表 2-3  $^{125}\text{I}$ -TM- $\alpha$  静脈内単回投与後のラット組織内濃度と推移

組織	TM- $\alpha$ 組織中濃度 (ng/g または ng/mL)				
	5分	30分	8時間	24時間	72時間
血漿	818.0 ± 6.0 [1.00]	744.6 ± 46.3 [1.00]	328.2 ± 24.1 [1.00]	93.6 ± 4.1 [1.00]	5.9 ± 0.9 [1.00]
血液	555.7 ± 8.4 [0.68]	503.6 ± 15.1 [0.68]	214.2 ± 14.7 [0.65]	60.8 ± 2.7 [0.65]	3.8 ± 0.6 [0.63]
大脳	7.4 ± 2.1 [0.01]	6.7 ± 0.2 [0.01]	3.6 ± 0.6 [0.01]	1.0 ± 0.2 [0.01]	ND -
小脳	10.4 ± 1.9 [0.01]	9.8 ± 0.9 [0.01]	4.8 ± 0.1 [0.01]	1.3 ± 0.2 [0.01]	ND -
下垂体	63.7 ± 26.4 [0.08]	121.8 ± 16.2 [0.16]	35.9 ± 4.8 [0.11]	13.7 ± 4.8 [0.15]	ND -
眼球	6.9 ± 0.2 [0.01]	10.2 ± 2.0 [0.01]	10.7 ± 1.3 [0.03]	4.2 ± 0.4 [0.04]	0.4 ± 0.1 [0.07]
ハーダー腺	9.8 ± 0.8 [0.01]	16.9 ± 3.5 [0.02]	19.1 ± 3.2 [0.06]	7.4 ± 0.1 [0.08]	0.5 ± 0.1 [0.08]
下顎腺	14.9 ± 3.6 [0.02]	29.6 ± 14.7 [0.04]	25.7 ± 2.3 [0.08]	11.1 ± 0.7 [0.12]	0.8 ± 0.2 [0.13]
甲状腺	35.9 ± 17.8 [0.04]	53.5 ± 17.2 [0.07]	40.5 ± 18.7 [0.12]	87.8 ± 6.1 [0.94]	71.0 ± 6.3 [11.95]
胸腺	7.9 ± 1.6 [0.01]	10.7 ± 0.6 [0.01]	11.6 ± 1.0 [0.04]	5.2 ± 0.5 [0.06]	0.4 ± 0.1 [0.07]
心臓	39.6 ± 2.8 [0.05]	53.3 ± 4.7 [0.07]	34.8 ± 6.6 [0.11]	10.7 ± 0.4 [0.11]	0.8 ± 0.3 [0.13]
肺	51.4 ± 9.2 [0.06]	69.9 ± 10.4 [0.09]	50.4 ± 6.6 [0.15]	14.4 ± 0.8 [0.15]	1.1 ± 0.2 [0.19]
肝臓	107.4 ± 6.0 [0.13]	67.8 ± 2.4 [0.09]	25.7 ± 4.5 [0.08]	7.9 ± 0.5 [0.08]	1.3 ± 0.0 [0.21]
腎臓	86.3 ± 7.6 [0.11]	95.4 ± 8.0 [0.13]	55.3 ± 6.8 [0.17]	17.1 ± 1.1 [0.18]	2.0 ± 1.0 [0.33]
副腎	81.9 ± 8.4 [0.10]	68.8 ± 5.3 [0.09]	30.8 ± 2.4 [0.09]	9.6 ± 0.6 [0.10]	ND -

表 2-3 のつづき

脾臓	35.0 ± 3.4 [0.04]	38.6 ± 2.4 [0.05]	17.9 ± 2.3 [0.05]	7.5 ± 1.2 [0.08]	1.5 ± 0.4 [0.24]
膵臓	20.7 ± 1.9 [0.03]	31.2 ± 4.4 [0.04]	25.7 ± 4.0 [0.08]	7.9 ± 1.0 [0.08]	0.6 ± 0.2 [0.11]
白色脂肪	8.4 ± 0.5 [0.01]	12.0 ± 5.0 [0.02]	7.9 ± 1.3 [0.02]	4.0 ± 0.6 [0.04]	0.4 ± 0.2 [0.06]
骨格筋	5.4 ± 0.2 [0.01]	9.7 ± 4.6 [0.01]	7.6 ± 0.8 [0.02]	3.7 ± 0.5 [0.04]	0.2 ± 0.0 [0.04]
皮膚	14.0 ± 3.7 [0.02]	15.0 ± 3.9 [0.02]	26.2 ± 4.1 [0.08]	14.7 ± 1.3 [0.16]	1.5 ± 0.1 [0.26]
骨髄	92.6 ± 16.2 [0.11]	85.7 ± 13.8 [0.12]	32.9 ± 5.3 [0.10]	12.7 ± 1.5 [0.14]	ND -
大腿骨	181 ± 5.8 [0.02]	30.8 ± 10.8 [0.04]	14.2 ± 2.1 [0.04]	5.3 ± 0.2 [0.06]	0.4 ± 0.1 [0.06]
腸間膜リンパ節	17.3 ± 2.2 [0.02]	43.7 ± 7.4 [0.06]	32.9 ± 4.1 [0.10]	11.3 ± 1.0 [0.12]	0.8 ± 0.2 [0.14]
動脈	32.0 ± 8.1 [0.04]	22.4 ± 7.4 [0.03]	19.8 ± 0.9 [0.06]	10.9 ± 3.0 [0.12]	ND -
静脈	106.5 ± 2.7 [0.13]	88.7 ± 40.0 [0.12]	55.3 ± 14.0 [0.17]	19.6 ± 6.4 [0.21]	ND -
精巣	9.3 ± 1.3 [0.01]	20.5 ± 1.7 [0.03]	34.5 ± 3.7 [0.11]	11.0 ± 0.8 [0.12]	0.7 ± 0.1 [0.11]
精巣上部	10.4 ± 1.9 [0.01]	18.8 ± 3.4 [0.03]	32.1 ± 4.7 [0.10]	12.4 ± 1.0 [0.13]	0.9 ± 0.3 [0.15]
膀胱	25.4 ± 15.4 [0.03]	25.7 ± 7.2 [0.03]	33.9 ± 2.4 [0.10]	19.7 ± 3.9 [0.21]	1.5 ± 1.1 [0.25]
胃	14.0 ± 0.8 [0.02]	24.5 ± 4.1 [0.03]	25.9 ± 3.4 [0.08]	11.6 ± 0.6 [0.12]	0.8 ± 0.3 [0.13]
小腸	16.9 ± 3.8 [0.02]	30.3 ± 1.7 [0.04]	184 ± 1.0 [0.06]	6.9 ± 0.3 [0.07]	0.6 ± 0.1 [0.11]
大腸	18.6 ± 1.4 [0.02]	26.1 ± 3.9 [0.04]	21.7 ± 2.2 [0.07]	7.9 ± 0.3 [0.08]	0.5 ± 0.1 [0.08]

平均値±標準偏差 (n=3)、ND：検出限界以下、[ ]内は血漿中放射濃度に対する比

### 第三項 TM-α のラットでの代謝

ラットに 50 μg/kg の <sup>125</sup>I-TM-α を、単回もしくは反復（1日1回計7回）静脈内投与したのち、組織（血漿、肝臓、腎臓、肺、動脈、静脈、乳汁、尿および胆汁）を採取し、

HPLCによる分子量分布分析によって試料中の代謝物を調べた。すなわち、未変化 TM- $\alpha$  が溶出されるピーク「未変化体画分」と、脱離した  $^{125}\text{I}$  および代謝を受けた低分子量代謝物を含むピーク「低分子量代謝物画分」に分画後、それぞれの割合を比較した。単回投与での成績を表 2-4 に、また反復投与での成績を表 2-5 にそれぞれ示す。血漿では、単回投与と 7 回反復投与 24 時間のどちらの場合も、未変化体画分と低分子量代謝物画分に放射能の分布が認められたが、投与後のどの時間帯においてもその殆どは未変化体画分（93%以上）に検出された。肝臓、腎臓および肺については、血漿に比べ未変化体の比率が低く、また低分子量代謝物画分以外の「その他の画分」での割合が高かった。特に、反復投与においてその傾向が顕著であった。尿中では、投与後 8 あるいは 24 時間までに、未変化体画分と低分子量代謝物画分への放射能分布がほぼ同程度の比率で認められた。

表 2-4  $^{125}\text{I}$ -TM- $\alpha$  50 $\mu\text{g}/\text{kg}$  を単回静脈内投与した際の試料中分子量分布

試料	計測時間 または期間	試料中の放射エネルギーの割合 (%)		
		未変化体画分	低分子量代謝物画分	その他
血漿	5 分	99.4	0.3	0.3
	30 分	98.2	1.3	0.5
	2 時間	97.7	1.6	0.7
	8 時間	95.6	4.0	0.4
	24 時間	95.6	3.9	0.5 <sup>a)</sup>
肝臓	5 分	73.9	10.6	5.1 <sup>a)</sup>
	30 分	57.7	10.4	19.5
	2 時間	52.2	14.0	24.8
	8 時間	73.5	10.1 <sup>a)</sup>	4.8 <sup>a)</sup>
腎臓	5 分	73.2	8.2	10.1
	30 分	57.2	13.6	22.9
	2 時間	46.8	14.6	27.8
	8 時間	57.0	15.9	27.1
肺	5 分	79.4	2.4 <sup>a)</sup>	9.5
	30 分	65.1	6.3	18.9
	2 時間	71.6	5.4 <sup>a)</sup>	21.6
	8 時間	68.6	9.6	21.0
尿	0~8 時間	52.8	41.4	5.8
	0~24 時間	42.6	47.9	9.5

ラット 3 匹の組織抽出物を合して分析。

a) : バックグラウンドの放射能カウントの 2 倍未満であるため検出限界を表示。各臓器の採取時間の違いによりラジオクロマトグラフィーに注入する放射エネルギーが異なるため、サンプル毎に検出限界値が異なる。

表 2-5 TM- $\alpha$  50 $\mu$ g/kg を 1 日 1 回 7 回、反復静脈内投与した際の試料中分子量分布

試料	計測時間 または期間	試料中の放射エネルギーの割合 (%)		
		未変化体画分	低分子量代謝物画分	その他
血漿	30分	97.4	2.0	0.6
	8時間	94.3	4.5	1.2
	24時間	93.6	5.9	0.5
肝臓	30分	62.7	16.0	19.6
	8時間	56.0	6.2 <sup>a)</sup>	34.9
	24時間	48.7	13.3 <sup>a)</sup>	38.0
腎臓	30分	25.2	42.5	22.8
	8時間	60.8	13.0	26.2
	24時間	19.4	13.2	51.8
肺	30分	65.6	16.4	13.6
	8時間	62.7	6.5	30.8
	24時間	24.8	18.9	46.3
動脈	30分	19.4	2.0 <sup>a)</sup>	65.9
	8時間	20.4	0.9 <sup>a)</sup>	55.2
	24時間	1.9 <sup>a)</sup>	0.5 <sup>a)</sup>	11.9
静脈	30分	19.1	5.7 <sup>a)</sup>	50.0
	8時間	22.6	1.5 <sup>a)</sup>	54.6
	24時間	11.0 <sup>a)</sup>	3.4 <sup>a)</sup>	85.6
尿	0~24時間	41.8	55.1	3.1

ラット 3 匹の組織抽出物を合して分析。

a) : バックグラウンドの放射能カウントの 2 倍未満であるため検出限界を表示。各臓器の採取時間の違いによりラジオクロマトグラフィーに注入する放射エネルギーが異なるため、サンプル毎に検出限界値が異なる。

#### 第四項 TM- $\alpha$ のラットでの排泄

雌雄のラットに 50  $\mu$ g/kg の  $^{125}$ I-TM- $\alpha$  を静脈内急速投与し、投与 120 時間後までの尿と糞中への排泄を検討した (表 2-6)。雄性ラットでは、投与後 24 時間の尿と糞中に投与量の 71.0 および 1.0%が、また 120 時間までにそれぞれ 93.1 および 1.7%が排泄された。甲

甲状腺およびカーカスを含めた総回収率は 95.7%であった。雌性ラットもほぼ同様な排泄率を示し、尿・糞中排泄に性差は認められなかった。尿中に排泄された放射能の 45～56% (雄) と 42～51% (雌) は TCA 不溶性であり、未変化体と推定された。これらの結果は尿中代謝物での検討結果とほぼ一致した (本節、第三項参照)。

表 2-6  $^{125}\text{I-TM-}\alpha$  50 $\mu\text{g/kg}$  を単回静脈内急速投与した際のラット尿及び糞中排泄

(a) 雄性ラット

投与後時間 (時間)	累積排泄率 (投与量に対する%)					
	尿	糞	尿+糞	甲状腺	カーカス	計
0～8	33.0 ± 1.5 [18.5]	—	—	—	—	33.0 ± 1.5
0～24	71.0 ± 0.8 [34.1]	1.0 ± 0.3	72.0 ± 1.0	—	—	72.0 ± 1.0
0～48	85.9 ± 0.8 [39.4]	1.4 ± 0.4	87.3 ± 0.5	—	—	87.3 ± 0.5
0～72	90.8 ± 1.3 [41.0]	1.5 ± 0.4	92.3 ± 0.9	—	—	92.3 ± 0.9
0～96	92.5 ± 1.6 [41.5]	1.6 ± 0.4	94.1 ± 1.1	—	—	94.1 ± 1.1
0～120	93.1 ± 1.7 [41.7]	1.7 ± 0.4	94.8 ± 1.3	0.0 ± 0.0	0.9 ± 0.2	95.7 ± 1.3

(b) 雌性ラット

投与後時間 (時間)	累積排泄率 (投与量に対する%)					
	尿	糞	尿+糞	甲状腺	カーカス	計
0～8	34.1 ± 3.5 [17.3]	—	—	—	—	34.1 ± 3.5
0～24	71.5 ± 6.4 [31.8]	0.9 ± 0.5	72.4 ± 6.7	—	—	72.4 ± 6.7
0～48	87.2 ± 4.2 [37.3]	1.4 ± 0.2	88.6 ± 4.3	—	—	88.6 ± 4.3
0～72	92.4 ± 3.1 [38.9]	1.6 ± 0.2	94.0 ± 3.2	—	—	94.0 ± 3.2
0～96	94.2 ± 2.4 [39.5]	1.7 ± 0.2	95.9 ± 2.6	—	—	95.9 ± 2.6
0～120	94.9 ± 2.1 [39.7]	1.7 ± 0.2	96.6 ± 2.3	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.4	97.0 ± 2.3

平均値±標準偏差、n=3

— : 未解析

[ ]内は TCA 不溶性放射能排泄率の平均値

## 第五項 腎障害モデルでの TM- $\alpha$ 動態

TM- $\alpha$  動態の検討に先立ち、先ず、作成した腎障害モデルラットでの障害発生を確認するため、腎機能マーカーである血清中 BUN とクレアチニン濃度を調べた。BUN 濃度は、グリセロールモデルラット、5/6 腎結紮モデルラットおよびコントロールラットで、それぞれ  $167.5 \pm 3.2$ 、 $37.7 \pm 5.8$  および  $14.2 \pm 1.4$  mg/dL であり、2 種の腎障害ラットでは有意な上昇が認められた。血清クレアチニン濃度についても、グリセロールモデルラット、5/6 腎結紮モデルラットおよびコントロールラットで、それぞれ  $4.6 \pm 0.6$ 、 $1.1 \pm 0.1$  および  $0.5 \pm 0.1$  mg/dL で、腎障害ラットでの有意な上昇が認められた。これらの結果から、急性腎障害モデルであるグリセロールモデルラットでは、慢性腎障害モデルである 5/6 腎結紮モデルラットに比べ、より重篤な腎機能障害の発現が確認された。

腎障害モデルラットおよびコントロールラットに非標識 TM- $\alpha$  50  $\mu$ g/kg を静脈内投与した際の未変化体の血漿中濃度を ELISA 法にて測定した。モデルラットとコントロールのいずれのラットも静脈内投与された TM- $\alpha$  は 2 相性で消失した (図 2-5)。腎障害モデルでは対照に比べ、分布相の消失半減期 ( $T_{1/2\alpha}$ ) には影響がなかったものの、消失相の消失半減期 ( $T_{1/2\beta}$ ) がやや遅延し、その結果として CL が小さくなる傾向が見られた (表 2-7)。これらの変化は、腎障害の程度とは関係なく、グリセロールモデルラットと 5/6 腎結紮モデルラットとの間での差異は認められなかった (表 2-7)。次に、モデルの検証と低分子化合物の動態との比較を行うため、100%腎排泄型薬物として知られているブレデニン<sup>43)</sup> を用いて血漿中濃度推移を調べた (図 2-6)。その結果、ブレデニンの体内動態は腎障害の重症度と一致した変動が見られ、急性腎障害モデルであるグリセロールモデルラットではほぼその消失が 100%抑制された。このことから、TM- $\alpha$  の消失には腎排泄の寄与が大きいにも関わらず、本薬物は血中からの消失の際に腎機能障害の影響を受けない特徴的な性質を有することが明らかになった。

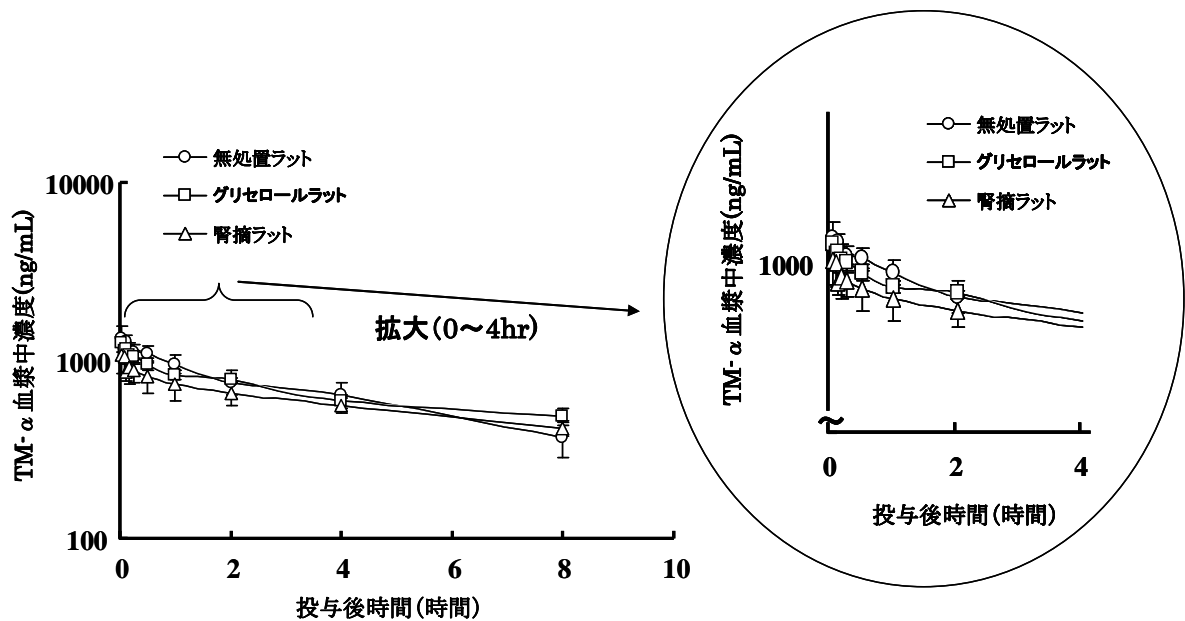


図 2-5 腎障害モデルラットでの TM-α 血漿中濃度推移

各プロットは平均値±標準偏差 (n=3)

表 2-7 腎障害モデルラットでの TM-α 体内動態に関する薬物速度論的パラメータ

投与群	薬物速度論的パラメータ				
	$T_{1/2\alpha}$ (hr)	$T_{1/2\beta}$ (hr)	CL (mL/hr/kg)	Ke (1/hr)	AUC ( $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{kg}$ )
無処置ラット	0.10±0.01	5.0±0.6	6.4±1.4	0.18±0.04	8.0±1.7
グリセロールラット	0.20±0.06	7.4±0.5	5.0±0.2	0.12±0.01	10.1±0.5
5/6 腎結紮ラット	0.18±0.14	9.2±3.7	5.0±1.1	0.12±0.05	10.3±2.4

平均値±標準偏差 (n=3)



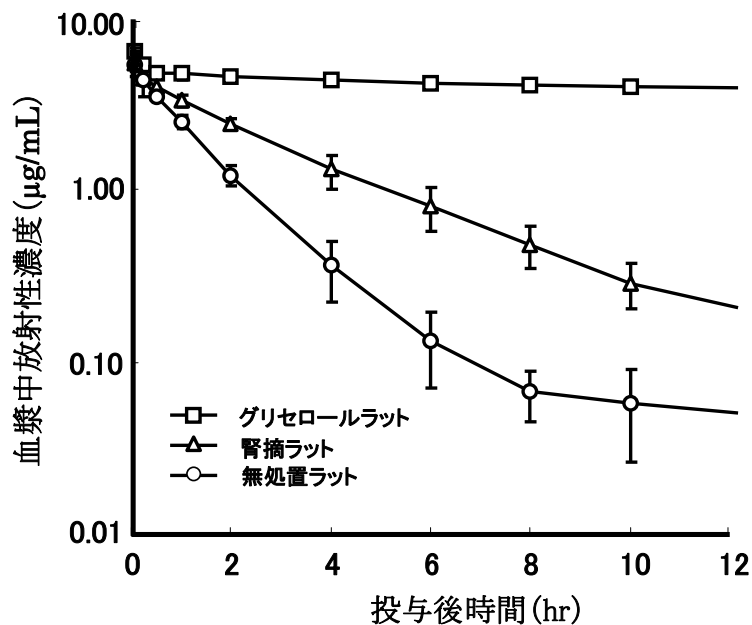


図 2-6 腎障害モデルラットにおける  $^{14}\text{C}$ -ブレデニン血漿中濃度推移

各プロットは平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)

$^{14}\text{C}$ -ブレデニンを 1 mg/kg/mL の用量でラットに静脈投与後、血漿中放射性濃度を測定。

#### 第四節 結果：TM- $\alpha$ のサルでの体内動態

##### 第一項 TM- $\alpha$ 単回投与試験と用量依存性

雄性カニクイザルに 10、50 および 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の TM- $\alpha$  を静脈内急速投与したのち、血漿中および尿中濃度を ELISA 法で測定すると共に、薬物速度論的パラメータを算出した。血漿中 TM- $\alpha$  はラットと同様に二相性で消失し (図 2-7)、その際の  $T_{1/2\beta}$  は 5~7 時間であった (表 2-8)。AUC および  $C_0$  は、ほぼ用量に比例した増加が見られたが、 $T_{1/2\beta}$ 、Vd および CL は用量による変動はなく、ほぼ一定であった (表 2-8)。ラットと同様に、静脈内投与時の  $C_0$  と AUC の線形性を検討した結果、両者には高い相関が認められた (図 2-8)。このことから 10~250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量範囲で、静脈内投与時の TM- $\alpha$  の動態は線形であると考えられた。TM- $\alpha$  の尿中への排泄率は、いずれの投与量においても投与後 120 時間で投与量の 50%前後であり (表 2-9)、用量による大きな変動はなかった。

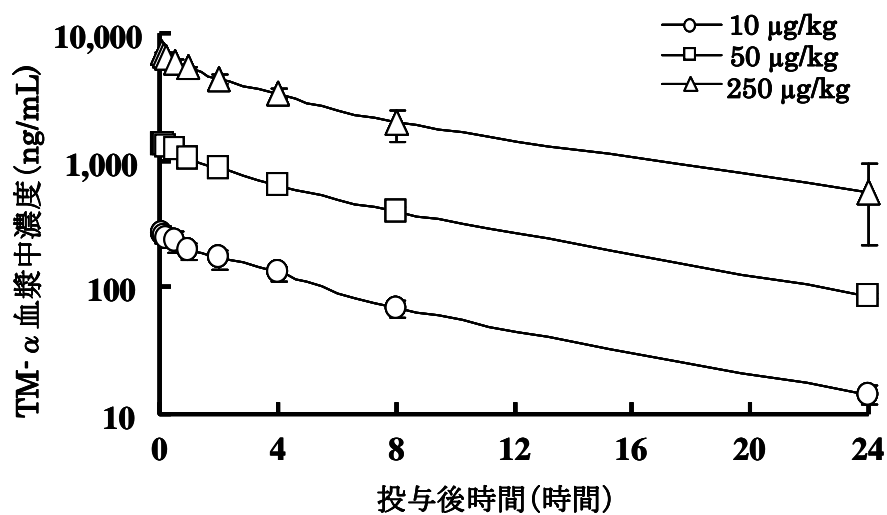


図 2-7 単回静脈投与 TM-α のサル血漿中濃度推移

各プロットは平均値±標準偏差 (n=3)

表 2-8 サルに TM-α を単回静脈内投与した際の薬物速度論的パラメータ

TM-α 投与 量 (μg/kg)	薬物速度論的パラメータ					
	C <sub>0</sub> (ng/mL)	Vd (μg/kg)	T <sub>1/2α</sub> (hr)	T <sub>1/2β</sub> (hr)	CL (mL/hr/kg)	AUC (μg·hr/kg)
10	0.35 ± 0.2	31 ± 11	0.21 ± 0.20	4.8 ± 0.5	6.3 ± 0.6	1.6 ± 0.2
50	1.4 ± 0.1	36 ± 12	0.97 ± 0.15	7.0 ± 0.4	5.2 ± 0.2	9.5 ± 0.4
250	7.5 ± 0.7	34 ± 3	0.77 ± 0.75	6.7 ± 1.8	5.2 ± 1.2	49.5 ± 12.0

平均値±標準偏差 (n=3)

表 2-9 TM- $\alpha$  単回静脈内投与時のサル尿中排泄率

時間 (hr)	尿中排泄率 (投与量に対する%)		
	TM- $\alpha$ 投与量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
	10	50	250
0~24	39.3 $\pm$ 11.6	45.6 $\pm$ 6.5	32.5 $\pm$ 8.5
0~48	45.1 $\pm$ 13.2	50.8 $\pm$ 6.8	38.6 $\pm$ 6.9
0~72	47.5 $\pm$ 13.1	52.9 $\pm$ 7.2	41.1 $\pm$ 6.5
0~96	48.3 $\pm$ 13.0	53.9 $\pm$ 7.2	42.4 $\pm$ 6.5
0~120	48.3 $\pm$ 13.0	54.5 $\pm$ 7.2	43.1 $\pm$ 6.4

平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)

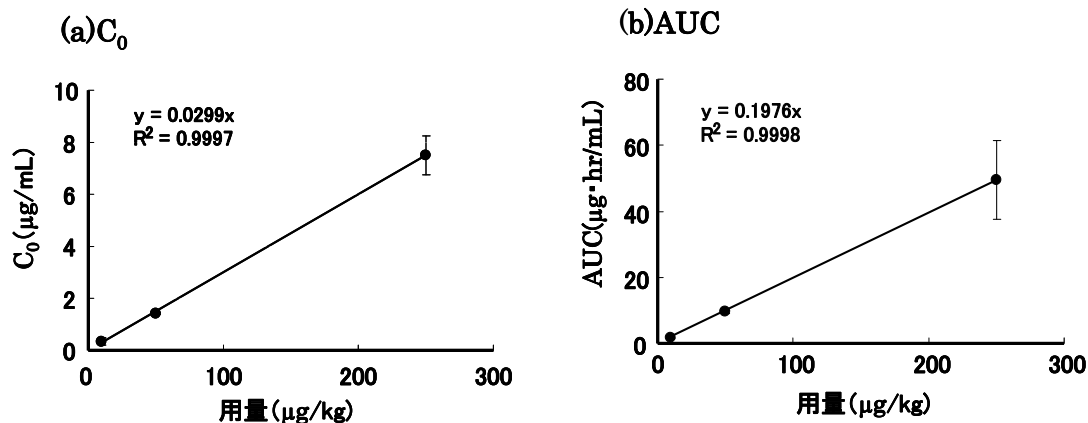


図 2-8 サルに TM- $\alpha$  を静脈内投与した際の  $C_0$  および AUC と投与量の相関性

平均値 $\pm$ 標準偏差、n=3、線形性は原点を通ることが前提であるため、回帰式は原点を通る一次式にて作成。

## 第二項 TM- $\alpha$ 反復投与試験

雄性カニクイザルに 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の TM- $\alpha$  を 1 日 1 回、7 回反復静脈内投与した際の血漿中濃度および尿中排泄率をそれぞれ図 2-9 と表 2-10 に示す。血漿中 TM- $\alpha$  は、反復投与により若干の上昇が見られたが、3 日目以降ではほぼ定常状態に達した。1 回目投与時の血漿中濃度のパラメータを用いて反復投与時動態の予測を行ったところ、実測値はこれとほ

ば一致した (図 2-9)。TM- $\alpha$  の尿中への排泄率は、投与開始時より 50~60% でほぼ一定であり、反復投与による大きな変動はなかった。

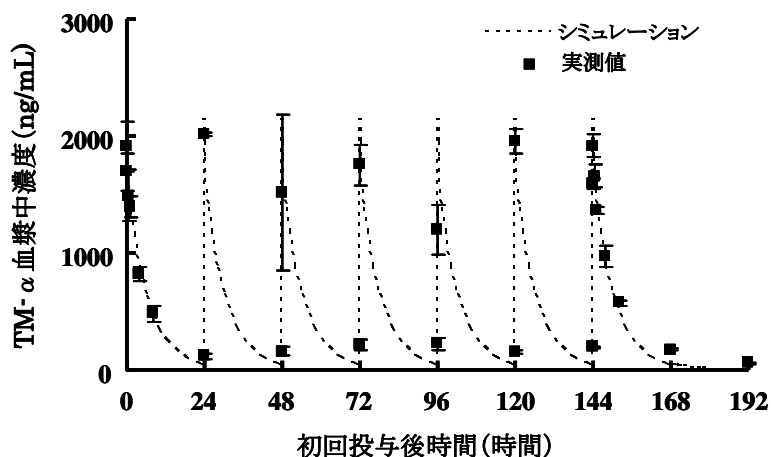


図 2-9 TM- $\alpha$  静脈内反復投与時のサル血漿中濃度推移

各プロットは平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)、初回投与時の血漿中濃度を用い市販ソフトウェア (WinNonlin Vr.5.1) の 2 コンパートメントモデルにて PK パラメータを求めた。このパラメータを用いて同ソフトウェアにて動態予測 (シミュレーション) を行った。

表 2-10 TM- $\alpha$  反復静脈内投与時のサル尿中排泄率

投与後時間	尿中排泄率 (投与量に対する%)
1 回投与後24 時間	49.7 $\pm$ 11.1
2 回投与後24 時間	57.0 $\pm$ 14.0
3 回投与後24 時間	53.7 $\pm$ 11.2
4 回投与後24 時間	53.5 $\pm$ 13.8
5 回投与後24 時間	50.8 $\pm$ 13.1
6 回投与後24 時間	56.4 $\pm$ 18.3
7 回投与後24 時間	56.1 $\pm$ 16.7
48 時間	58.0 $\pm$ 17.1
72 時間	58.6 $\pm$ 17.2
96 時間	58.8 $\pm$ 17.4
120 時間	58.9 $\pm$ 17.4

各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)

## 第五節 結果：TM- $\alpha$ のヒトでの体内動態

### 第一項 静脈内単回持続投与後の TM- $\alpha$ 血中濃度推移

健康成人男性に TM- $\alpha$  0.03 mg、0.1 mg あるいは 0.3 mg/人を 2 時間かけて静脈内持続投与したときの血漿中濃度推移（ELISA 法）を図 2-10 に、またこれを基に算出した薬物速度論的パラメータを表 2-11 に示す。血漿中濃度は、 $C_{max}$  に達したのち、二相性で消失した。 $T_{1/2\alpha}$  は約 3~4 時間、 $T_{1/2\beta}$  は約 18~21 時間であり、動物の消失半減期より延長していた（前掲の表 2-2 および表 2-8 参照）。 $C_{max}$  および AUC は投与量に比例して増加したが、 $T_{1/2}$  と  $CL_{tot}$  は投与量によらずほぼ一定であった。

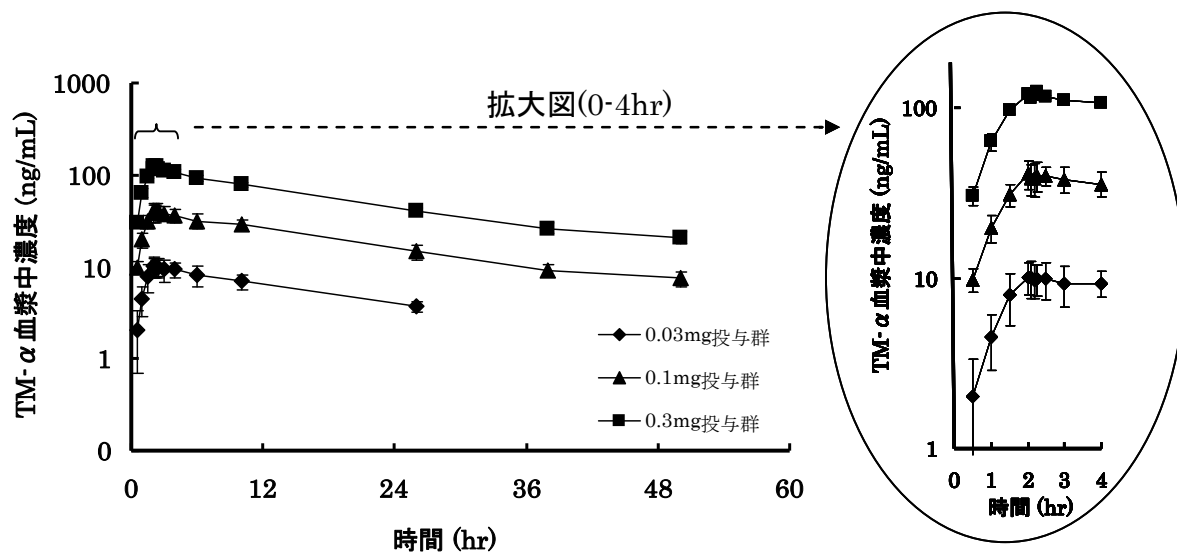


図 2-10 TM- $\alpha$  単回投与時の血漿中濃度推移

各プロットは平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=4)

表 2-11 TM- $\alpha$  単回投与時の薬物速度論的パラメータ

TM- $\alpha$ 投与量 (mg/人)	薬物速度論的パラメータ				
	$C_{\max}$ (ng/mL)	AUC (ng·hr/mL)	$T_{1/2\alpha}$ (hr)	$T_{1/2\beta}$ (hr)	CL (mL/hr/kg)
0.03	10.2 $\pm$ 2.7	257 $\pm$ 32	2.80 $\pm$ 2.02	18.34 $\pm$ 3.1	1.91 $\pm$ 0.47
0.1	39.7 $\pm$ 6.84	1074 $\pm$ 162	3.71 $\pm$ 1.82	20.75 $\pm$ 3.80	1.47 $\pm$ 0.26
0.3	121.75 $\pm$ 5.16	3031 $\pm$ 292	3.97 $\pm$ 1.96	20.48 $\pm$ 2.22	1.52 $\pm$ 0.25

各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3)

## 第二項 TM- $\alpha$ 反復投与時の血漿中濃度推移

次に、健康成人男性に TM- $\alpha$  0.2 mg/人を 2 時間かけて 1 日 1 回、3 日間反復静脈内持続投与し、血漿中濃度推移を解析した。血漿中濃度は 3 日目投与終了時に 1 日目投与終了時の約 1.5 倍の最高濃度を示したのち、二相性で消失した (図 2-12)。1 日目の血漿中濃度からもとめた薬物速度論的パラメータを用いて、3 日間反復投与での血漿中濃度推移を予測したところ、いずれの時点も実測値とほぼ一致した。このことから、本剤の反復投与により出現する血漿中濃度の上昇は、TM- $\alpha$  の比較的長い半減期 (約 20 時間) によるものであることが示唆された。 $C_{\max}$  および AUC 変動の用量依存性を調べたところ、いずれも良好な相関性を示した (図 2-13)。

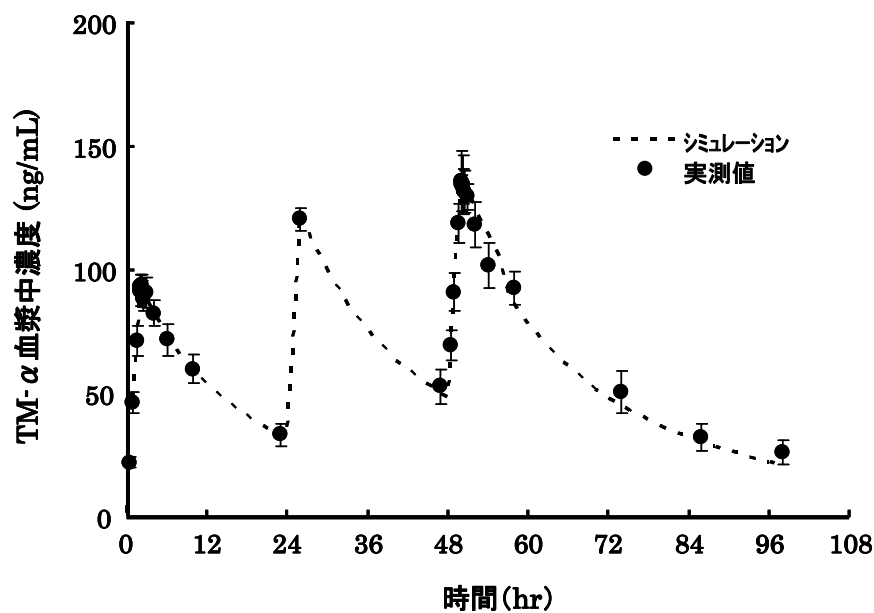


図 2-12 TM-α 反復投与時の血漿中濃度推移

各プロットは平均値±標準偏差 (n=4)、初回投与時の血漿中濃度を用い市販ソフトウェア (WinNonlin Vr.5.1) の 2 コンパートメントモデルにて PK パラメータを求めた。このパラメータを用いて同ソフトウェアにて動態予測 (シミュレーション) を行った。

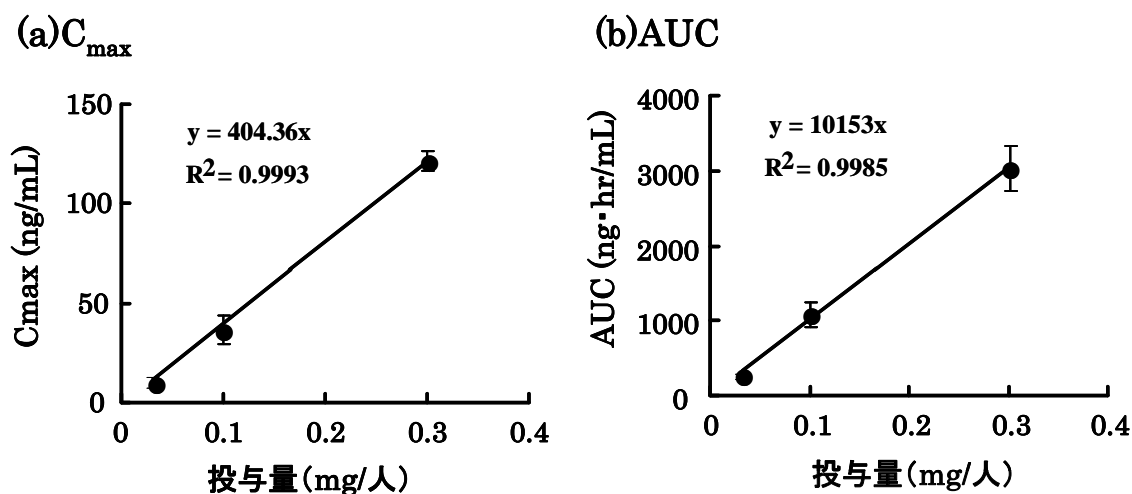


図 2-13 ヒトに TM-α を静脈内投与した際の  $C_{max}$  および AUC と投与量の相関性

平均値±標準偏差、n=4、線形性は原点を通ることが前提であるため、回帰式は原点を通る一次式にて作成。

## 第六節 考 察

本研究で検討したラット、サルおよびヒトのいずれの種においても、静脈投与した TM- $\alpha$  の大部分は尿中に未変化体として検出されたことから、本薬物は腎クリアランスを主な機構として排出されるものと推定された。これ以外の経路に関しては、ラットでの組織分布実験において、肝臓、腎臓あるいは肺等に未変化体の他にかなりのレベルの低分子量放射能が認められた。このことから、TM- $\alpha$  のクリアランスには臓器による取り込みと分解も関与するものと考えられた。臓器中に取り込まれた TM- $\alpha$  は、臓器内で分解されたのちに再び低分子量代謝物として血漿中に放出され、最終的には尿中に排泄されるものと考えられた。一般に、タンパク質製剤の代謝にはマクロファージ等に発現するスカベンジャーレセプターを介した非特異的取り込み、若しくは特異的な取込/代謝機構が関与すると考えられている<sup>44,45)</sup>。静脈内投与した TM- $\alpha$  は血漿よりも高い濃度で分布する臓器が認められず、また用量増加によっても組織集積に飽和が見られないこと等から、スカベンジャーレセプターを介した非特異的取込による代謝の寄与が大きいと推定された。

ヒト血漿中には内因性の TM が存在し<sup>26-28)</sup>、これの生体内 CL には血液中（血管内皮細胞上）の好中球などによる分解反応が関与する可能性が示唆されている<sup>13)</sup>。しかし、<sup>125</sup>I-標識 TM- $\alpha$  を用いたラットでの動態試験の結果では、血漿中には限定分解物を含め低分子量化した代謝物が殆ど検出できなかった。若し、臓器や血球への取り込みがクリアランスの主要機構であれば、臓器に取り込まれたあとにアミノ酸にまで分解代謝を受けたあとに血漿中に一部放出されることが想定され、血漿中に中間的な代謝物が現れる可能性は低い。従って今回の試験結果からは、好中球などによる分解反応の全身 CL への寄与は低いと考えられた。しかし、DIC などの全身的な炎症反応時に血球細胞の寄与率が増加する可能性は否定できず、今回の結果のみで DIC 患者での TM- $\alpha$  体内動態や機構を推定することは困難である。従って、本研究では DIC 患者での解析を実施して、この問題の解決を試みた（後述、第三章参照）。

今回のラットの動態試験結果から算出された TM- $\alpha$  の腎 CL は、約 0.08 mL/min/kg で、ラット腎糸球体ろ過速度の 1%程度と低値であった。また、尿排泄率が用量により変動せず一



定であったことから、非飽和性であると考えられた。これらのことから、腎 CL についても代謝と同様に、飽和性の特異的な取り込み受容体の関与の可能性は低く、糸球体細胞による単純ろ過が主要な機構と考えられた。このように、TM- $\alpha$  の CL には腎糸球体ろ過と組織での非特異的な代謝機構が存在するものの、いずれも消失速度が遅く、血漿中に存在する TM- $\alpha$  はこれらの機構によって比較的ゆっくりと消失するものと考えられた。

ラット、サルおよびヒトでの腎 CL 並びに腎外 CL を算出し（表 2-12）、アロメトリック法に基づき<sup>46)</sup>、その相関性を調べた。その結果（図 2-14）、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（図 2-14-A）および腎外 CL（図 2-14-B）でそれぞれ 0.80 および 0.72 であった。一般に、アロメトリック係数が 0.6~0.8 で体重に比例する場合、CL 機構が動物種により変化しないことを示す<sup>47)</sup>。従って、ラットで推定される上述の CL 機構は、ヒトにあてはめることが可能であり、ヒトにおいても非飽和性の腎 CL と腎外 CL が主要な TM- $\alpha$  の CL 機構であると考えられた。

表 2-12 ラット、サルおよびヒトの TM- $\alpha$  クリアランスの比較

動物種	体重 (kg)	トータルCL (mL/min/kg)	腎 CL (mL/min/kg)	腎外CL (mL/min/kg)	腎 CL の 寄与率	腎外CL の寄与率
ラット <sup>a)</sup>	0.3	0.08	0.04	0.04	50.0	50.0
サル <sup>b)</sup>	3	0.08	0.04	0.04	50.0	50.0
ヒト <sup>c)</sup>	60	0.025	0.015	0.01	60.0	40.0

a) 非標識体 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  静脈速投与時のトータル CL と標識体 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  静脈内投与時の尿中未変化体の割合（ラジオクロマトグラフィー）から算出した。

b) 非標識体 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  静脈速投与時のトータル CL と尿中排泄率より算出した。

c) 非標識体 0.3 mg 静脈速投与時のトータル CL と尿中排泄率より算出した。

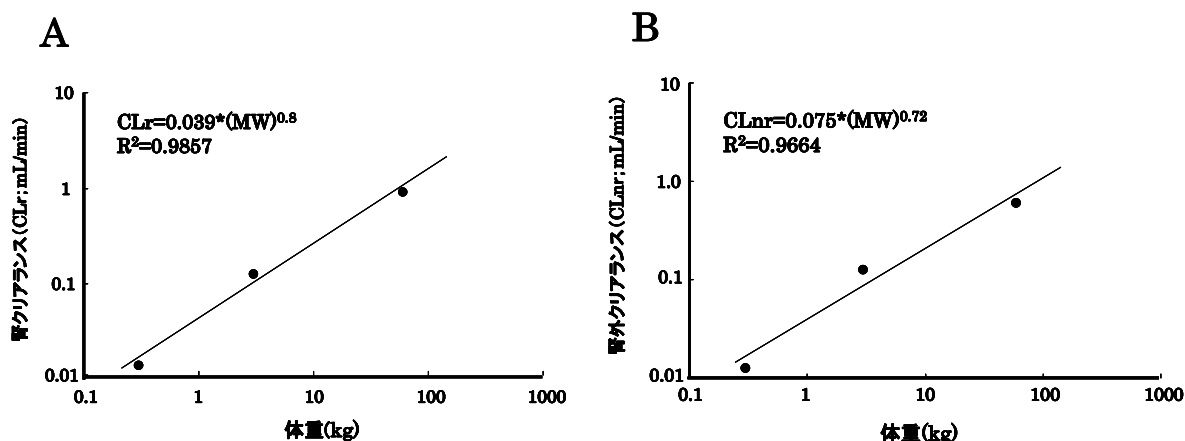


図 2-14 腎クリアランス (A)並びに腎外クリアランス (B)のアロメトリック解析

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。ただし、その変動は腎の障害度には影響を受けなかった。一方、腎排泄型の低分子化合物であるブレデニンでは、腎の障害度に従って CL の有意な低下が認められた。前述の通り、TM- $\alpha$  は動物においては約 50%、ヒトにおいては約 60~70%程度が腎 CL によって消失するものと考えられるため、腎 CL 機構が完全に障害を受けた場合、全身 CL としては腎外 CL のみが残るため、それぞれ 50% (動物) あるいは 30~40% (ヒト) 程度に低下することが想定される。しかし、今回の試験結果は、グリセロールモデルのような重度の障害を起こした動物でも TM- $\alpha$  の全身 CL の低下は 30%程度であり、想定される値 (50%) とはかなりの違いが見られた (想定の 6 割程度の低下)。一般に、高分子化合物の腎排泄の多寡や速度は、対象物質の高次構造や荷電などによって異なる。アルブミン (pI=4.9) のように生理的条件下で負に荷電したタンパク質では、腎障害により糸球体細胞表面上の静電的反発 (陰電荷) が破壊されることで、逆に腎排泄が亢進され尿中に排泄される (ネフローゼ症候群) ことが知られている。一方、腎機能低下は腎血流量の低下から腎 CL 自体を低下させるため、この相反する作用も同時に生起するものと考えられる。TM- $\alpha$  (pI=3~4) についてもアルブミンと同様に生理的条件下では負に荷電し、かつ分子量もアルブミンとほぼ同等であることから、腎傷害による糸球体細胞上の静電的反発の減少により排泄速度の増加と腎血流量の低下による腎 CL の低下が同時に起こる可能性がある。このことが、TM- $\alpha$  CL に及ぼす

腎障害の影響が現れにくい理由の一つと推測された。なお今回用いた動物モデルはいずれも尿量が低下していたため、尿の採取が殆どできず、直接腎 CL を検出することができなかった。今後さらにこの TM- $\alpha$  の腎 CL のメカニズム解明のためには、摘出腎臓の還流系などを用いた検討や尿細管からの取り込み機構の解明など、より詳細な検討が必要であると考えられる。

### 第三章 ヒトでの TM- $\alpha$ 体内動態に関する PPK 解析と DIC 罹患の影響

#### 第一節 概要

TM- $\alpha$  の対象疾患である DIC 患者では、その多くが PK に影響を及ぼす肝臓や腎臓などに障害を併発しているため、PPK 解析などの解析手法により DIC 患者での薬物動態を明らかにすることは DIC 患者での適切な用法用量を設定する上で重要である。前章に記載したように、TM- $\alpha$  の CL には非飽和性の腎並びに腎外 CL が関与し、またヒトでは分布相が僅かしか確認されずその寄与率が低かったことなどから、DIC 患者での PPK 解析には用量に依存しない線形の 1 コンパートメントモデルにて解析可能であると考えられた。このことから後期第 2 相臨床試験時の採血時点としては、解析可能な範囲で患者への負担を最小化する観点から、1 日目投与終了時、6 日目投与終了時（ピーク濃度）および 6 日目投与終了後 24 時間時（トラフ濃度）の 3 時点とした。なお本 PPK 解析においては、上記 DIC 患者の様々な背景因子（共変量）による PK への影響の検出感度を上げること、並びに上記 3 時点のデータを補完し精度の高い解析を行うことを目的に、DIC 患者と併せて健康成人の PK も解析対象とした。その結果、実測値と最終モデル式からの推定値との相関性やブートストラップ法によるバリデーションなどから、本 PPK 解析結果は頑健性を有する信頼性の高いものであると考えられた。

解析結果から想定される TM- $\alpha$  の DIC 患者での薬物動態には、体重を除いて影響を及ぼす要因がないことが明らかとなった。このことから、用法用量設定に際して、体重以外の背景因子への配慮は必要ないものと結論づけた。

#### 第二節 解析対象および試験方法

##### 第一項 解析対象データ

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- $\alpha$  血漿中濃度および臨床検査値を含む患者データを解析に用いた。Phase1 試験では、第二

章、第二節に記載した投与・採血手順で得られた血漿サンプルのデータを用いた。Phase2 試験では、厚生省 DIC 診断基準<sup>48)</sup>に基づき、「DIC」または「DIC の疑い」と診断された患者を対象として、TM- $\alpha$  用量-反応の解析を目的として、3 用量非盲検並行群間比較試験を実施した。この試験では、TM- $\alpha$  を 1 日 1 回、6 日間反復静脈内投与した。1 回当りの TM- $\alpha$  投与は 30 分間に渡って持続注入した。初回投与前後（1 時間前と投与直後）、6 回目投与終了直後および 6 回目投与終了 24 時間後にヘパリン処理採血管にて血液 3 mL を採取した。採取した血液は遠心分離して血漿を得、測定に供するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。血漿中 TM- $\alpha$  濃度は、第一章に記載した ELISA 法にて測定を行った。

## 第二項 PPK 解析方法

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<sup>49)</sup> Level 1.1 および PREDPP Version IV Level 1.1<sup>50)</sup>、データプリプロセッサとして NM-TRAN Version III<sup>51)</sup> Level 1.1 を使用した。これらのプログラムは、Windows2000 (Microsoft corporation) を OS とするパーソナルコンピュータ (OPTIPLEX G1;DELL corporation) 上にインストールした。また、FORTRAN コンパイラとして DIGITAL VISUAL FORTRAN Version 5.0 (Digital Equipment corporation) を使用した。NONMEM プログラムを用いた計算で、各要因の影響度を表すモデルパラメータの有意度検定を行う場合、モデルパラメータを自由に変動させる full model と、無効値に固定した reduced model の間で、計算により得られた目的関数最小値の差が対数尤度の  $-2$  倍となり  $\chi^2$  分布に従うことを利用した<sup>52)</sup>。 $\chi^2(1, 0.05)$  および  $\chi^2(1, 0.005)$  の値はそれぞれ 3.84 および 6.63 であり、full model と reduced model の間での目的関数最小値の差がこれらの値以上となったとき、それぞれ  $p < 0.05$  および  $p < 0.005$  でモデルパラメータは有意であると判定した。

Phase1 試験データでは、1-コンパートメントモデルと比較して 2-コンパートメントモデルでやや良好なフィッティングが得られた。しかし、AUC に対する  $\alpha$  相の寄与率が 12% と小さく、2-コンパートメントモデルを用いる必要性は高くないと考えられた。また、今回のデータを用いた予備検討の結果、2-コンパートメントモデルを用いた複雑なモデルで

は計算が困難であったことから、静脈内持続投与時の血漿中薬物濃度推移を表す薬物速度論モデルとして、(1)式に示す 1-コンパートメントモデルを用いた。

$$C_p = \frac{R}{CL} * \left[ 1 - \exp\left(-\frac{CL}{V} * T\right) \right] \exp\left(-\frac{CL}{V} * (-T)\right) \quad (1)$$

$C_p$  : 血漿中薬物濃度 (ng/mL)    $R$  : 投与速度 (ng/h)    $T$  : infusion 持続時間 (h)

$CL$  : クリアランス (L/h)    $V$  : 分布容積 (L)

PK パラメータの個体間変動に関しては、(2)式に示す指数誤差モデルを使用した。

$$\begin{aligned} V_i &= \tilde{V} * \text{EXP}(\eta_v) \\ CL_i &= \tilde{CL} * \text{EXP}(\eta_{CL}) \end{aligned} \quad (2)$$

ここで、 $V_i$  および  $CL_i$  は、個体  $i$  に特異的な分布容積とクリアランスの値を、 $\tilde{V}$  および  $\tilde{CL}$  は、分布容積とクリアランスの母集団平均値を表す。また、 $\eta_v$  および  $\eta_{CL}$  は、平均値が 0 で、分散がそれぞれ  $\omega_v^2$  および  $\omega_{CL}^2$  の正規分布に従うランダム変数と仮定した。血漿中濃度の個体内変動に関しては、(3)式に示す比例誤差モデルを使用した。なお、TM- $\alpha$  の濃度測定には ELISA 法を用いているため、少なくとも 10 倍以上の希釈を行うことから、下記の比例誤差モデルを採用した。

$$C_{pi,j} = \tilde{C}_{pi,j} (1 + \varepsilon) \quad (3)$$

ここで、 $\tilde{C}_{pi,j}$  は  $V_i$  と  $CL_i$  を用いて(1)式により計算される血漿中濃度推測値を、 $C_{pi,j}$  は実測値を表す。また、 $\varepsilon$  は平均値 0、分散  $\sigma^2$  の正規分布に従うランダム変数と仮定した。共変数モデルの作成にあたっては、まず NONMEM プログラムの POSTHOC オプションを用いて個別の PK パラメータ ( $V_d, CL$ ) を推定した。被験者の体重と PK パラメータとの相関性は目的関数最小値に基づき統計学的な有意性を確認した。次に、体重の要因を含むモデルを用いて、被験者の背景情報と PK パラメータとの相関を確認した。解析に用いた患者背景データは以下の通り：年齢、性、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット (Hct)、白血球数、総タンパク、アルブミン、アルブミン/グロブリン比、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、乳酸脱水素酵素、アルカリフォスファターゼ、総ビリルビン、総コレステロール、中性脂

肪、BUN、血清クレアチニン、コリンエステラーゼ、尿酸、血清 Na、血清 K、グルコースおよび CRP。腎機能のマーカーとしては、クレアチニン CL と estimated glomerular filtration ratio (eGFR) をそれぞれ Cockcroft-Gault formula 法<sup>53)</sup> と Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) 式<sup>54)</sup> に従って算出した。性差、AST、ALT、乳酸脱水素酵素および併用薬については、治験に参加した施設の測定方法が異なっていたため、カテゴリカル変数として解析に用いた。その他の変数については、連続変数とカテゴリカル変数の両方にて解析に用いた。連続変数については、ANOVA 解析時の寄与率(R)が 0.5 を超えるもの、カテゴリカル変数については、Tukey の多重検定で  $p < 0.05$  であるものを有意な変数として選択した。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。

### 第三節 結果

#### 第一項 解析に用いた患者背景および PK データ

PPK 解析に用いた背景データの一覧を表 3-1 に示す。PPK 解析には、健康成人男性 20 例および DIC 患者男女 116 例から、それぞれ平均 17.4 時点/人および 2.6 時点/人の血漿サンプル (計 653 サンプル) を用いた。DIC 患者の年齢は 62.4 歳で、その内 56 例が 65 歳以上の高齢者であった。血清クレアチニン値並びにクレアチニン CL の平均値は健康成人と DIC 患者でほぼ同等であったが、DIC 患者群には 30 mL/min 未満のクレアチニン CL の腎機能障害者が 15 例含まれていた。また DIC 患者群の AST 値 および ALT 値は、健康成人のそれらの値に比べ有意に高かった。また DIC 患者においては、Hct 値が健常者に比べ有意に低下していた。H<sub>2</sub> ブロッカー、利用剤、血液製剤を含む 19 種類の薬剤が DIC 患者の 15% 以上で併用されていた (表 3-2)。図 3-1 に示すとおり、DIC 患者の血漿中濃度のばらつきは健康成人被験者のそれに比べ大きかった。

表 3-1 TM-αの PPK 解析に用いた被験者背景一覧

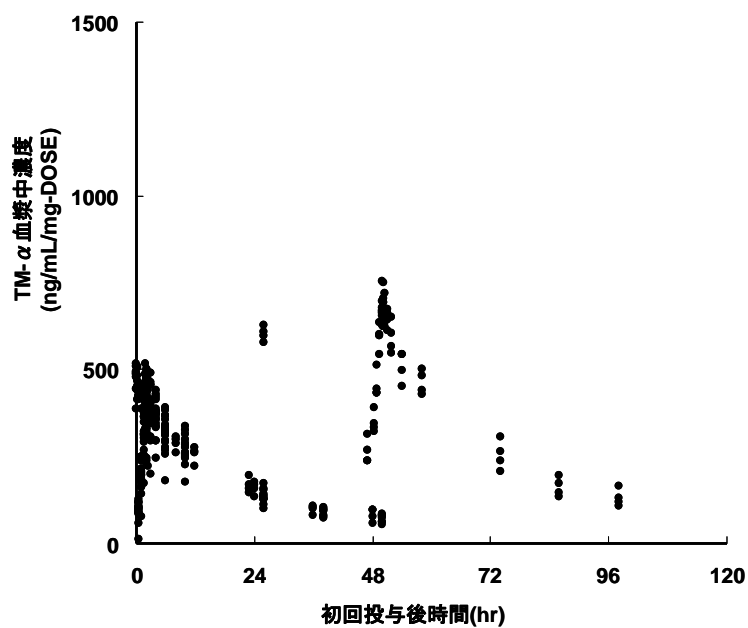
項目	健康成人	DIC 患者
例数	20	116
性別 (男性/女性)	20 / 0	59 / 57
測定時点数	348	305
被験者1例あたりの平均測定時点数	17.4	2.6
体重 (kg)	平均 ±標準偏差	65.1 ±7.1
	中央値(範囲)	53.5 ±11.6
年齢 (年)	平均 ±標準偏差	64.8 (55.2-79.5)
	中央値(範囲)	52 (31-90)
血清クレアチニン (mg/dL)	平均 ±標準偏差	32.2 ±5.1
	中央値(範囲)	62.4 ±15.5
AST (IU/L)	平均 ±標準偏差	32 (24-44)
	中央値(範囲)	64 (18-88)
ALT (IU/L)	平均 ±標準偏差	1.04 ±0.14
	中央値(範囲)	1.16 ±1.29
ヘマトクリット (Hct ; %)	平均 ±標準偏差	1.0 (0.8-1.3)
	中央値(範囲)	0.8 (0.3-11.5)
腎クリアランス (CLr ; mL/min)	平均 ±標準偏差	20.5 ±12.1
	中央値(範囲)	142.5 ±471.3
ヘマトクリット (Hct ; %)	平均 ±標準偏差	22.5 ±9.2
	中央値(範囲)	115.9 ±309.3
腎クリアランス (CLr ; mL/min)	平均 ±標準偏差	21 (11-46)
	中央値(範囲)	35 (1-2202)
ヘマトクリット (Hct ; %)	平均 ±標準偏差	44.0 ±1.9
	中央値(範囲)	26.7 ±7.5
腎クリアランス (CLr ; mL/min)	平均 ±標準偏差	43.9 (40.7-47.8)
	中央値(範囲)	25.7 (11.4-53.3)
腎クリアランス (CLr ; mL/min)	平均 ±標準偏差	117.5 ±21.6
	中央値(範囲)	100.5 ±73.4
腎クリアランス (CLr ; mL/min)	平均 ±標準偏差	118.4 (83.0-153.0)
	中央値(範囲)	85.9 (5.0-490.9)

表 3-2 15%以上の併用率を示す併用薬一覧

薬剤名	治療クラス	併用率(%)
濃縮血小板血漿	血液製剤	53
電解質補液	補液	46
新鮮凍結人血漿	血液製剤	23
ファモチジン	H <sub>2</sub> 受容体拮抗剤	37
人赤血球濃厚液	血液製剤	37
フロセミド	高圧利尿剤	36
フルコナゾール	トリアゾール系抗菌剤	29
アルプリノール	高尿酸血症治療薬	27
高カロリー輸液用総合ビタミン剤	高カロリー輸液	24
ブドウ糖	補液	21
水酸化アルミニウムゲル・	胃炎・消化性潰瘍治療薬	20
アムホテリシンB	ポリエンマクロライド系真菌治療剤	19
高カロリー輸液用基本液・アミノ酸液	高カロリー輸液	18
塩酸ラニチジン	H <sub>2</sub> 受容体拮抗剤	18
イミペネム・シラスタチンナトリウム	カルバペネム系抗生物質	18
スルファメトキサゾール・	合成抗菌剤	18
人血清アルブミン	血液製剤	17
炭酸水素ナトリウム	制酸・中和剤	17
耐性乳酸菌	生菌製剤	15



(a) 健常者



(b) DIC患者

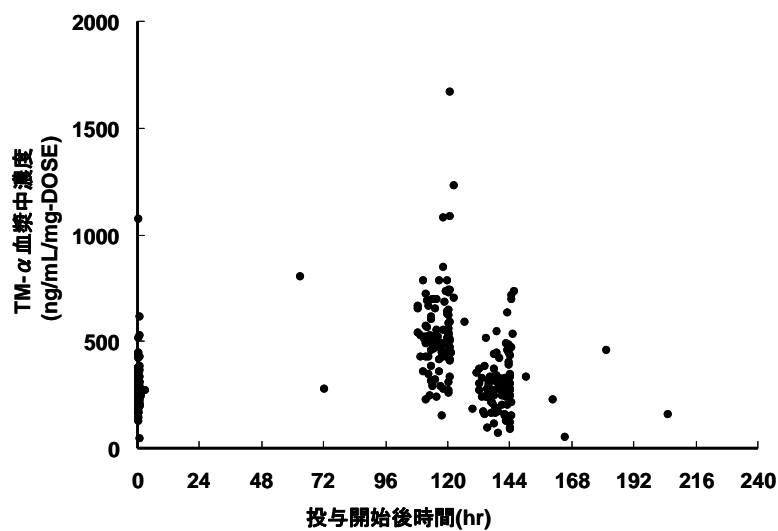


図 3-1 PPK 解析に用いた TM-α の血漿中濃度の推移

## 第二項 PPK 解析モデルの構築とその妥当性

PPK 解析の最終モデルパラメータを表 3-3 に示す。Vd は体重と相関し、Hct 値によって影響を受けた。一方、CL は体重と相関し、クレアチニン CL、年齢および Hct 値に影響を受けた。それぞれの目的関数の最小値 (MOF ; この値が大きい程、影響が大きい)

を見ると、最も大きな値を示した因子は Hct であり、Vd および CL に対していずれも 50 以上であった。一方、クレアチニン CL および年齢に対する目的関数の最小値は Hct よりも小さくいずれも 30 以下であった。なお、クレアチニン CL と eGFR との結果には殆ど差がなかったことから、クレアチニン CL の結果のみを示した。Vd 並びに CL の体重との相関については、体重の因子を含んでない Basic model と体重の因子を含む Final model のいずれも個体間変動パラメータ (ETA) は体重と相関していた (図 3-2)。このことから、TM- $\alpha$  の PK パラメータのうち、Vd と CL が体重と相関することが確認された。また患者の体重は最大で 3 倍程度の差異が見られた (図 3-2)。

低 Hct 値 (男性 ; <40%、女性 ; <35%) の DIC 患者では、Vd および CL はそれぞれ Hct 値正常患者に比べて 1.5 倍および 1.4 倍に増大した。65 才以上の高齢患者では、CL は非高齢患者の約 70%水準に低下した。Vd および CL に対する個体間変動は、それぞれ 31.9%および 29.0%であったが、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 (図 3-3)。PPK モデル式より推定される薬物濃度に対する重み付き残差の分布を調べたが、特定の傾向は認められずほぼ均一に分布していた (図 3-4)。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 (表 3-4)。

表 3-3 PPK 解析による最終モデルパラメータ

パラメータ	パラメータの意味	推定値	95%信頼区間 (下限値 上限値)	目的関数の 変化値
$\theta_1$	Coefficient for WT in V	0.104	(0.0933, 0.1147)	71.50
$\theta_2$	Coefficient for WT in CL	0.00162	(0.0008, 0.0024)	41.71
$\theta_3$	Coefficient for Hct in V	-0.0126	(-0.0142, -0.0110)	88.39
$\theta_4$	Coefficient for CLcr in CL	0.175	(0.1007, 0.2493)	29.90
$\theta_5$	Coefficient for Hct in CL	-0.0117	(-0.0141, -0.0093)	52.00
$\theta_6$	Coefficient for Age in CL	-0.00374	(-0.00595, -0.00153)	9.98
$\theta_V$	Interindividual variability in V	29.7% (CV)	(24.7%, 34.7%)	—
$\omega_{CL}$	Interindividual variability in CL	24.7% (CV)	(23.1%, 26.2%)	—
$\Sigma$	Intraindividual residual variability	11.9% (CV)	(11.5%, 12.3%)	—

最終モデル式:  $V(L) = \theta_1 \cdot WT \cdot (\theta_3 \cdot Hct + 1)$

$CL(L/h) = \theta_2 \cdot WT \cdot (CLcr^{0.4}) \cdot (\theta_5 \cdot Hct + 1) \cdot (\theta_6 \cdot Age + 1)$

OBJmin = 4594.80、WT = 体重 (kg)、Hct = ヘマトクリット値 (%)

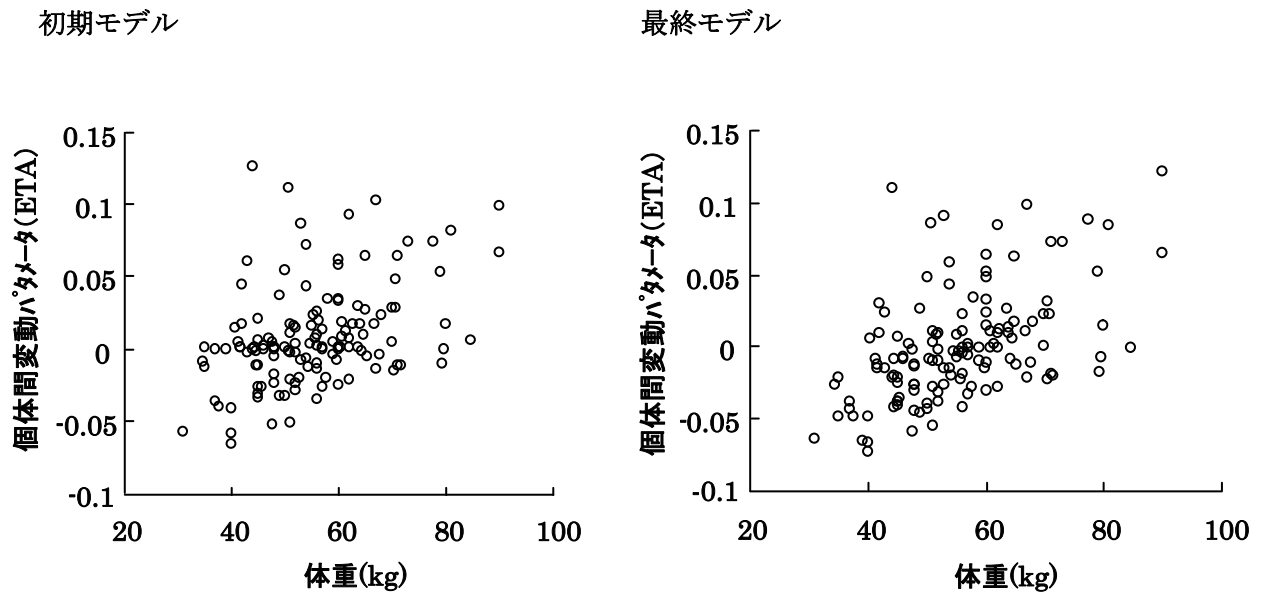
CLcr = Cockcroft-Gault の推定式により算出されたクリアチニン CL

表 3-4 ブートストラップ法によるパラメータの算出と最終モデル式との比較

パラメータ	モデルパラメータの 最終推定値	200 回のブートストラップ推定値			相対値 <sup>a)</sup>
		(平均	±	標準誤差)	
$\theta_1$	0.104	0.105	± 0.005	101%	
$\theta_2$	0.00162	0.00172	± 0.00052	106%	
$\theta_3$	-0.0126	-0.0126	± 0.0007	100%	
$\theta_4$	0.175	0.170	± 0.042	97.1%	
$\theta_5$	-0.0117	-0.0117	± 0.0013	100%	
$\theta_6$	-0.00374	-0.00363	± 0.00134	97.1%	
$\omega_V^2$	0.0884	0.0890	± 0.0252	101%	
$\omega_{CL}^2$	0.0609	0.0600	± 0.0081	98.5%	
$\Sigma^2$	0.0142	0.0141	± 0.0022	99.3%	

a) ブートストラップ推定値の平均値 / モデルパラメータの最終推定値 x 100

(a) CL



(b) Vd

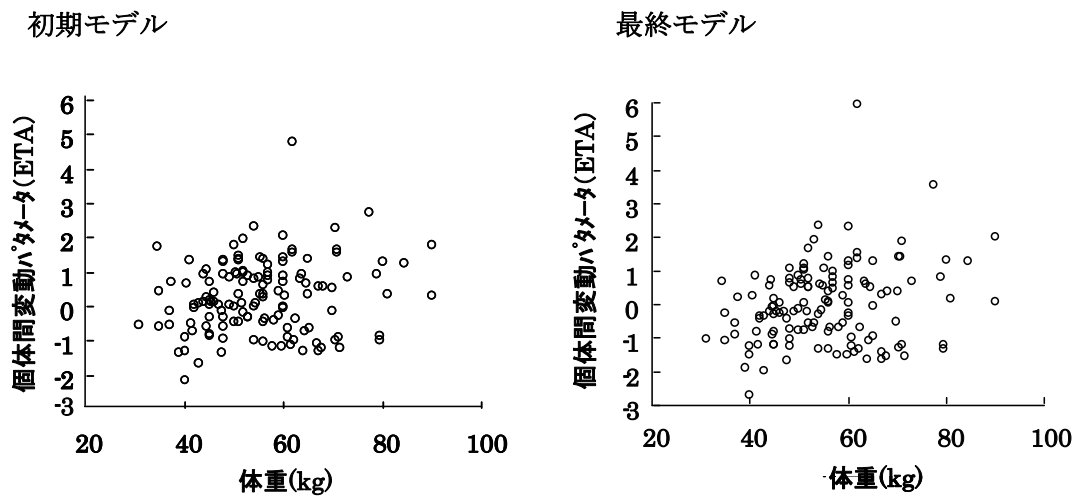


図 3-2 CL および Vd についての個体間変動パラメータ (ETA) と体重との相関

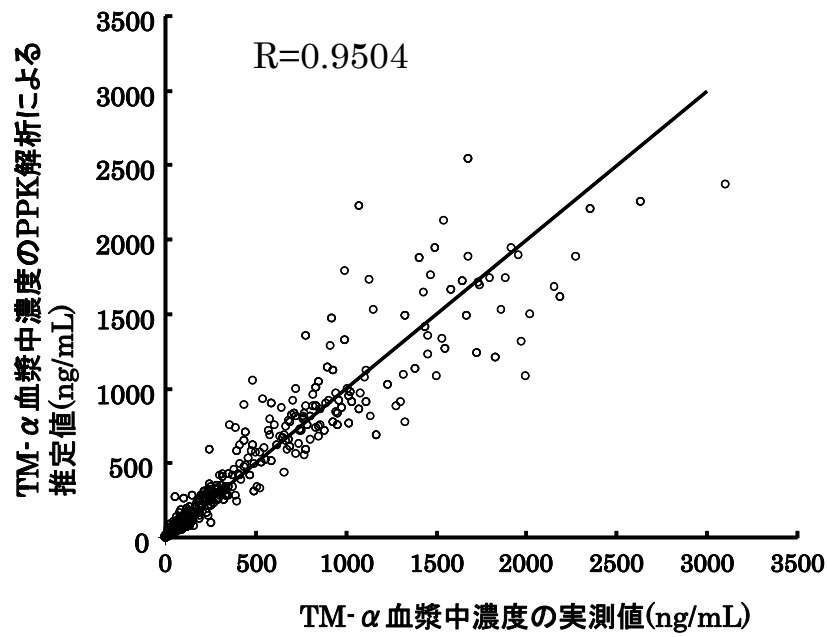


図 3-3 最終モデル式より推定された個別血漿中濃度と実測の血漿中濃度との相関

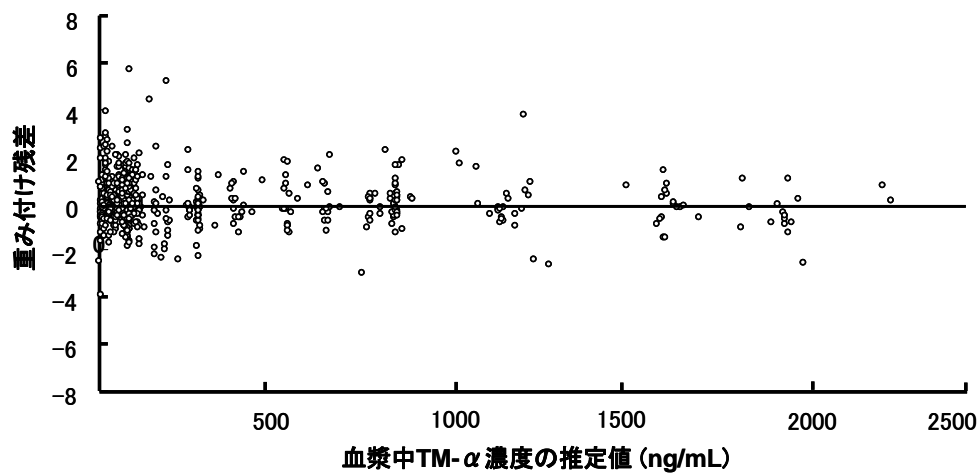


図 3-4 血漿中濃度予測値に対する重み付き残差の分布

直線は残差 0 の値を示す。

### 第三項 構築モデルによる DIC 患者での TM- $\alpha$ 動態予測

第二項にて論述したとおり、TM- $\alpha$ 体内動態の PPK 解析結果は再現性がありかつ解析結果から推定される濃度値はほぼ実測値と一致したことから、本研究では、DIC 患者での薬物動態の変動の有無を、モデル式より推定される濃度値や PK パラメータを用いて検討した。

TM- $\alpha$ を臨床用法用量（0.06 mg/kg の 30 分点滴静注を 1 日 1 回で 6 日間）で投与された DIC 患者の個別の血漿中濃度は投与直後より上昇し、各投与終了時に最大濃度となり、その後緩やかに消失した。反復投与により血漿中濃度は徐々に増加し、6 日目の投与終了時には  $C_{\max}$ (約 1,600 ng/mL)に達した[図 3-5(a)]。DIC 患者における平均的な Vd および CL はそれぞれ 60.0 mL/kg および 1.91 mL/hr/kg で、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（DIC 患者；Hct=26.7%、健常者；Hct=44.0%）。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  $C_{\max}$  を超えることはなかった[図 3-5(b)]。高齢者と非高齢者間に Vd には殆ど差異はなかったが（高齢者；Vd=69.4 mL/kg、非高齢者；Vd=68.5 mL/kg）、CL では高齢者で 20%ほどの低下が見られた（高齢者；CL=1.69 mL/h/kg、非高齢者；CL=2.11 mL/h/kg）。TM- $\alpha$ は主として腎臓から排泄されることから、腎機能障害を持った DIC 患者（クレアチン CL < 30 mL/min）と腎機能障害を有していない DIC 患者（クレアチン CL  $\geq$  70 mL/min）間で本剤の PK の違いについて検討した[図 3-5(c)]。その結果、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（腎機能障害 DIC 患者; 70.0 mL/kg, vs. 正常腎機能 DIC 患者; 69.1 mL/kg）、CL は 30%程度の低下が認められた（腎機能障害 DIC 患者; 1.40 mL/h/kg, vs. 正常腎機能 DIC 患者; 2.06 mL/h/kg）。

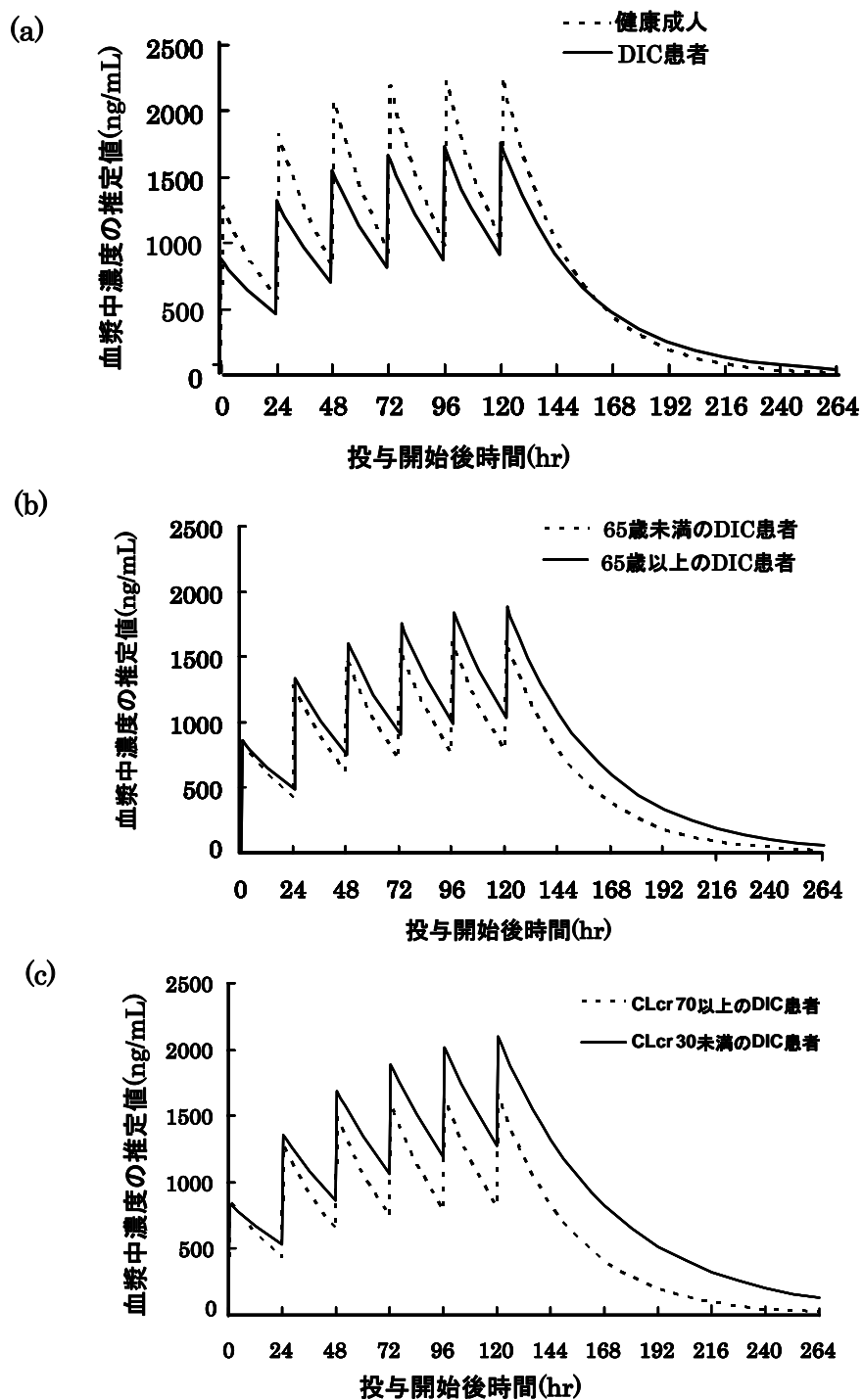


図 3-5 PPK 解析結果より推定される DIC 患者の血漿中濃度推移(0.06 mg/kg/day)

(a) 健康成人と DIC 患者との比較 (平均値)

健康成人; 体重=65.1 kg、Hct 値=43.8%、クレアチニン CL (CLcr)=117.5 mL/min、年齢=32 歳

DIC 患者; 体重=53.7 kg、Hct 値=26.7%、CLcr=100.5 mL/min、年齢=62.5 歳

(b) 65 歳以上と 65 歳未満の DIC 患者との比較 (平均値)

65 歳未満 ; 体重=56.8 kg、Hct 値=27.1%、CLcr=131.9 mL/min、年齢=50.7 歳

65 歳以上 ; 体重=50.6 kg、Hct 値=26.4%、CLcr=68.0 mL/min、年齢=74.8 歳

(c) 腎機能障害(CLcr < 30 mL/min)と腎機能正常の DIC 患者(CLcr ≥ 70 mL/min)との比較 (平均値)

CLcr ≥ 70 mL/min ; 体重=56.8 kg、Hct 値=26.6%、CLcr=134.4 mL/min、年齢=58.1 歳

CLcr < 30 mL/min ; 体重=48.3 kg、Hct 値=24.8%、CLcr=17.1 mL/min、年齢=69.8 歳

#### 第四節 考 察

本 PPK 解析によって得られたパラメータを用いて算出される TM- $\alpha$  血漿中濃度の推定値と実測値との比較を行ったところ、原点を通る直線に回帰され、相関も良好であった。また、ブートストラップ法によるバリデーションにおいても頑健性が確認されたことから、本推定法は再現性と信頼性を有する解析手法と考えられた。静脈内投与した TM- $\alpha$  の Vd および CL は、体重と有意に相関していた (第三節、第二項)。DIC 患者は高齢者が比較的多いため、体重が若年層のそれに比べかなり低い可能性が想定される。事実、今回の TM- $\alpha$  の臨床試験において体重は最大 3 倍程度の差が認められ (第三節、第二項)。TM- $\alpha$  の非臨床サルの毒性試験の結果から、臨床用量の 3 倍以上程度の用量で出血の副作用の発現が予想されている。従って、TM- $\alpha$  用量の中毒域は薬効域と大きくは乖離しておらず、DIC 患者の体重のバラツキを考慮すると体重あたりの用量設定が患者の安全性担保の観点より必要であると考えられた。

PPK 解析結果から、Hct 値の低下に依存して Vd の増大が認められたが、これは以下の理由によるものと考えられる。TM- $\alpha$  は高分子量タンパク質 (分子量約 64 kDa) であるため細胞膜を透過することが困難であり、TM- $\alpha$  は主に血漿中に局在すると考えられる。事実、ヒトおよび動物に静脈内投与した際の定常状態の分布容積は 50~80 mL/kg と血漿容量に近かった。Hct 値は血漿と血球成分の比を示し、低 Hct 値の場合、血漿成分の比率が増加することから、Vd が大きくなったものと考えられた。また、DIC の患者の多く (90% 以上) が、低 Hct 値であることから、DIC 患者では Vd の増大とそれに伴う CL の増大が見られたものと考えられた。このように、DIC 患者では、Hct 値の低下に伴う TM- $\alpha$  血漿



中濃度の低下が認められたが、臨床用法用量にて投与された際の血漿中濃度は、投与期間中、後期第 2 相臨床試験成績と血漿中濃度の解析より想定された有効濃度（約 500 ng/mL）を上回っていたことから、有効性には殆ど影響しないものと考えられた。一方、高齢の DIC 患者では CL の低下による血漿中濃度の上昇が見られたものの、 $C_{max}$  は健康成人のそれを超えておらず、臨床濃度の 3 倍を超える濃度域（副作用発現域）には達しないと想定され、これらの患者集団においても安全性に大きな懸念は生じないものと考えられた。

本 PPK 解析結果から、腎機能障害は TM- $\alpha$  の血漿中濃度を有意に低下させるものの、その程度は大きなものではなかった。これはラットの腎障害モデルのそれとほぼ一致する。ヒトにおいて、TM- $\alpha$  の腎 CL の寄与率は未変化体の尿排泄率から 60~70%程度で、腎機能が高度に障害された場合、全身 CL は 30~40%に低下する可能性が考えられる。今回の PPK 解析の結果を用いて、10 mL/min 未満の腎機能障害患者での正常腎機能患者に対する CL 値の低下率を算出したところ、約 50%と上記の推定値（60~70%の低下）に比べ腎機能障害による CL への影響はやや小さくなっていった。このことからヒトでもラットと同様に、原因は明確ではないものの、高度腎機能障害者でもその全身 CL への影響は比較的小さいものと推定された。

最後に、DIC 患者での内皮細胞表面上の炎症細胞などによる分解機構の全身 CL に対する寄与について考察する。本研究で構築した ELISA 系は、第一章（第二節）で述べたとおり、内因性の TM をも検出する測定系である。ELISA 系で検出された投与前の TM- $\alpha$  濃度は健康成人で  $4.9 \pm 7.9$  ng/mL (N=74; 中央値=2.8)、DIC 患者では  $8.0 \pm 9.7$  ng/mL (N=112; 中央値=5.5) で、DIC 患者では約 2 倍の増加 ( $p < 0.05$ ) が見られ、これは既報の健常者と DIC 患者間の比とほぼ同じ (1.8~2.5) であった<sup>27,28)</sup>。このことから、DIC 患者では内皮細胞上の分解活性の増加などによる TM- $\alpha$  様のタンパク質が放出されているものと考えられる。即ち DIC 患者では、健康成人に比べ炎症細胞による分解反応が亢進しているものと考えられた。ただ、健康成人と正常腎機能を有する DIC 患者の全身 CL を比較すると、DIC 患者では 30%程度の増加が見られていたが、この増加は主にヘマトクリット値

の低下（分布容積の約 4 割の増大）によって説明された。従って、上述の炎症細胞による分解反応機構は、DIC 患者ではその存在が否定できないものの、全身 CL に対する寄与は小さいものと考えられた。

## 結論と展望

本研究により以下の点が明らかとなった。

- ・ 血漿中並びに尿中の生物活性を保持した TM- $\alpha$  濃度を高感度かつ特異的に定量可能な測定系を確立した。
- ・ TM- $\alpha$  の全身 CL には非飽和性の腎と腎外 CL が存在し、それぞれの CL の寄与率はラットおよびサルで 50:50、ヒトで 60:40 であった。
- ・ アロメトリック法を用いて動物からヒトへの PK の外挿性を検討した結果、動物での PK をほぼそのままヒトに外挿可能であることがわかった。
- ・ 動物並びに健康成人の PK データを基に DIC 患者での採血時点を設定し、PPK 解析を行ったところ、当初の期待どおり、患者の負担を減らしたデザインにて頑健性のある解析結果が得られた。
- ・ PPK 解析結果より、TM- $\alpha$  の PK の変動に対して体重が最も重要な背景因子であり、体重あたりの用量調整の有効性が示唆された。その他の背景要因はいずれも大きな PK 変動を惹起せず、投与実施の際に特には配慮の必要はないと判断された。

TM- $\alpha$  の体内動態に関する本研究での成果や経験より、生体内タンパク質製剤の開発にあたっては、下記の点に留意して進めることが重要と考えられた。

- ・ 生体内薬物濃度測定系確立における一般的な留意事項  
低分子薬の体内動態解析においては、活性代謝物を含む活性体の動態を明らかにすることが薬効や安全性評価の観点から重要であり、このことは現実に配慮されて創薬研究が行われている。タンパク質製剤でもこの状況は同一であり、活性保持型の検出や定量法の確立が重要と考えられる。ただ、多数の測定点やサンプルの解析を要する PK 試験では活性を無視した ELISA 法の有用性や機動性も有用である。活性保持型の検出と ELISA 法検出を組み合わせて、相互に補完させる体制で解析を実施するのが理想的

と考えられるが、従前のタンパク質薬の PK や pharmacodynamics (PD)解析ではこれを満足する状況で実施された例が殆どなかった。本研究では、この問題を排除して、活性保持型検出法と ELISA 法を併用し、後者での定量値は活性保持体を含むことを確認して進めた。この研究デザインは、今後のタンパク質薬 PK 解析にとって貴重な先行例になるものと思慮される。本研究成果はこの課題に対して重要な指針になるものと考えられる。

- 生体内タンパク質製剤のクリアランス機構解明の意義について

一般に生体内タンパク質製剤のクリアランス機構の解明については、検出系の問題などから、詳細な報告は殆どなされていない。本研究では、動物における詳細なクリアランス機構の解明がヒトへの外挿や PPK 解析時の設計並びにモデル解析時に重要な指針を与えることを実証した。特に重篤な患者を対象とした場合、採血時点数は可能な限り最小化するべきであり、本研究成果は患者を対象とした後続研究において貴重な参考例になるものと考えられる。

## 参考文献

- 1) 絵野沢 伸. 2009, 医薬品原材料としての生物由来物質の現状, *Oeran Biology*. 217(5)-23(11)
- 2) Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA(英国)), TNG1412 final report-3,2006, <http://www.mhra.gov.uk/NewsCenter/Pressreleases/CON2023822>
- 3) 血栓溶解剤（静脈用 rt-PA 製剤）アルテプララーゼ（遺伝子組替え）注射剤添付文書, [http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/3959402D1035\\_3\\_05/](http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/3959402D1035_3_05/)
- 4) Krzyzanski W, Wyska E. 2008. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of erythropoietin receptor in healthy volunteers. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 377(4-6): 637-45
- 5) Mager DE, Jusko WJ. 2002. Receptor-mediated pharmacokinetic/pharmacodynamic model of interferon-beta 1a in humans. *Pharm Res*. 19(10): 1537-43
- 6) Krzyzanski W, Wiczling P, Lowe P, Pigeolet E, Fink M, Berghout A, Balsler S. 2010. Population modeling of filgrastim PK-PD in healthy adults following intravenous and subcutaneous administrations. *J Clin Pharmacol*. 50(9 Suppl): 101S-12S
- 7) Donat F, Duret JP, Santoni A, Cariou R, Necciari J, Magnani H, de Greef R. 2002. The pharmacokinetics of fondaparinux sodium in healthy volunteers. *Clin Pharmacokinet*. 41(Suppl2): 1-9
- 8) Moll S, Lindley C, Pescatore S, Morrison D, Tsuruta K, Mohri M, Serada M, et al. 2004. Phase I study of a novel recombinant human soluble thrombomodulin, ART-123. *J Thromb Haemost*. 2(10): 1745-51
- 9) Asgeirsson D, Venturoli D, Fries E, Rippe B, Rippe C. 2007. Glomerular sieving of three neutral polysaccharides, polyethylene oxide and bikunin in rat. Effects of molecular size and conformation. *Acta Physiol (Oxf)*. 191(3): 237-46
- 10) Rippe C, Rippe A, Torffvit O, Rippe B. 2007. Size and charge selectivity of the glomerular filter in early experimental diabetes in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 293(5): F1533-8
- 11) Guasch A, Deen WM, Myers BD. 1993. Charge selectivity of the glomerular filtration barrier in

- healthy and nephrotic humans. *J Clin Invest.* 92(5): 2274-82
- 12) Rennke HG, Venkatachalam MA. 1979. Glomerular permeability of macromolecules. Effect of molecular configuration on the fractional clearance of uncharged dextran and neutral horseradish peroxidase in the rat. *J Clin Invest.* 63(4): 713-7
  - 13) Boehme MW, Galle P, Stremmel W. 2002. Kinetics of thrombomodulin release and endothelial cell injury by neutrophil-derived proteases and oxygen radicals. 107(3): 340-9
  - 14) Glaser CB, Morser J, Clarke JH, Blasko E, McLean K, Kuhn I et al. 1992. Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. A potential rapid mechanism for modulation of coagulation. *J Clin Invest.* 90(6): 2565-73
  - 15) Gomi K, Zushi M, Honda G, Kawahara S, Matsuzaki O, Kanabayashi T et al. 1990. Antithrombotic effect of recombinant human thrombomodulin on thrombin-induced thromboembolism in mice. *Blood.* 75: 1396-9
  - 16) Zushi M, Gomi K, Yamamoto S, Maruyama I, Hayashi T, Suzuki K. 1989. The last three consecutive epidermal growth factor-like structures of human thrombomodulin comprise the minimum functional domain for protein C-activating cofactor activity and anticoagulant activity. *J Biol Chem.* 264(18): 10351-3
  - 17) Esmon NL, Owen WG, Esmon CT. 1982. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem* 257: 859-64
  - 18) Esmon CT, Esmon NL, Harris KW. 1982. Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem.* 257: 7944-7
  - 19) Esmon NL, Carroll RC, Esmon CT. 1983. Thrombomodulin blocks the activity of thrombin to activate platelets. *J Biol Chem* 258: 12238-42
  - 20) Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M, et al. 2000. Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* 404: 518-25

- 21) Marlar RA, Kleiss AJ, Griffin JH. 1982. Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. *Blood*. 59: 1067-72
- 22) Levi M, Ten Cate H. 1999. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 341:586-592.
- 23) Toh CH, Dennis M. 2003. Disseminated intravascular coagulation: old disease, new hope. *BMJ*. 327: 974-7
- 24) Esmon CT. 2005. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol*. 131: 417-30
- 25) Boehme MW, Stremmel W. 2004. Comparison of three commercially available thrombomodulin ELISA kits. *J Immunol Methods*. 286(1-2): 231-40
- 26) Sakamaki F, Kyotani S, Nagaya N, Sato N, Oya H, Nakanishi N. 2003. Increase in thrombomodulin concentrations after pulmonary thromboendarterectomy in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest*. 124(4): 1305-11
- 27) Ishii H, Majerus PW. 1985. Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J Clin Invest*. 76(6): 2178-81
- 28) Amano K, Tateyama M, Inaba H, Fukutake K, Fujimaki M. 1992. Fluctuations in plasma levels of thrombomodulin in patients with DIC. *Thromb Haemost*. 68(4): 404-6
- 29) Von Hoff DD, Forseth BJ, Huong M, Buchok JB, Lathan B, 1986. Improved plating efficiencies for human tumors cloned in capillary tubes versus Petri dishes. *Cancer Res.*, 46(8): 4012-7
- 30) Peng XE, Chen GZ, Lu YF, Murphy MJ Jr. 1989. Capillary cloning of primary human tumor cells: assay miniaturization for drug efficacy testing. *Int J Cell Cloning*. 7(5): 322-9
- 31) Tsang VC, Hancock K, Maddison SE. 1984. Quantitative capacities of glutaraldehyde and sodium m-periodate coupled peroxidase-anti-human IgG conjugates in enzyme-linked immunoassays. *J Immunol Methods*. 70(1): 91-100
- 32) Kodama S, Uchijima E, Nagai M, Mikawatani K, Hayashi T, Suzuki K. 1990. One-step sandwich enzyme immunoassay for soluble human thrombomodulin using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta*. 192(3): 191-9

- 33) Hashida S, Nakagawa K, Imagawa M, Inoue S, Yoshitake S, Ishikawa E, et al. 1983. Use of inorganic salts to minimize serum interference in a sandwich enzyme immunoassay for human growth hormone using Fab'-horseradish peroxidase conjugates. *Clin Chim Acta*. 135: 263-73
- 34) Bertina RM, Broekmans AW, Krommenhoek-van Es C, van Wijnqaarden A. 1984. The use of a functional and immunologic assay for plasma protein C in the study of the heterogeneity of congenital protein C deficiency. *Thromb Haemost*. 51(1): 1-5
- 35) Kienhuis CB, Heuvel JJ, Ross HA, Swinkels LM, Foekens JA, Benraad TJ. 1991. Six methods for direct radioiodination of mouse epidermal growth factor compared: effect of nonequivalence in binding behavior between labeled and unlabeled ligand. *Clin Chem*. 37(10 Pt 1): 1749-55
- 36) 実験動物の被験物質の投与(投与経路、投与容量)及び採血に関する手引き、EFPIA(欧州連邦製薬工業協会)、ECVAM(欧州代替法バリデーションセンター) 2000年2月作成
- 37) Wilson DR, Thiel G, Arce ML, Oken DE. 1967. Glycerol induced hemoglobinuric acute renal failure in the rat. 3. Micropuncture study of the effects of mannitol and isotonic saline on individual nephron function. *Nephron* 4(6): 337-55
- 38) Ishikawa I, Hollenberg NK. 1976. Pharmacologic interruption of the renin-angiotensin system in myohemoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int Suppl*. 6: S183-90
- 39) Morrison AB. 1962. Experimentally induced chronic renal insufficiency in the rat. *Lab Invest* 11: 321-32
- 40) Morrison AB. 1966. Experimentally chronic renal sufficiency. *Meth Achiev Exp Pathol* 1: 455-75
- 41) Akaike, H. 1973. "Information theory and an extention of the maximum likelihood principle", 2nd International Symposium on Information Theory, Petrov, B. N., and Csaki, F. (eds.), Akadimiai Kiado, Budapest: 267-81
- 42) Ekholm R, Wollman SH. 1975. Site of iodination in the rat thyroid gland deduced from electron microscopic autoradiographs. *Endocrinology* 97(6): 1432-44
- 43) Stypinski D, Obaidi M, Combs M, Weber M, Stewart AJ, Ishikawa H. 2007. Safety, tolerability



- and pharmacokinetics of higher-dose mizoribine in healthy male volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 63(4): 459-68
- 44) Terpatra V, van Amersfoort ES, van Velzen AG, Kuiper J, van Berkel TJ. 2000. Hepatic and Extrahepatic Scavenger Receptors Function in Relation to Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 1860-72
- 45) Linehan SA, Martinez-Pomares L, Gordon S. 2000. Mannose receptor and scavenger receptor: two macrophage pattern recognition receptors with diverse function in tissue homeostasis and host defense. *Adv Exp Med Biol.* 479: 1-14
- 46) Hayton WL *Health Phys* 1989. Pharmacokinetic parameters for interspecies scaling using allometric techniques. 57 Suppl 1: 159-64
- 47) Mordenti J, Chen SA, Moore JA, Ferraiolo BL, Green JD. 1991. Interspecies Scaling of Clearance and Volume of Distribution Data for Five Therapeutic Proteins. *Pharmaceutical Research.* 8(11): 1351-9
- 48) Wada H, Gabazza EC, Asakura H, Koike K, Okamoto K, Maruyama I, Shiku H, Nobori T. 2003. Comparison of diagnostic criteria for disseminated intravascular coagulation (DIC): diagnostic criteria of the International Society of Thrombosis and Hemostasis and of the Japanese Ministry of Health and Welfare for overt DIC. *Am J Hematol.* 74(1): 17-22
- 49) Boeckmann AJ, Beal SL, Scheiner LB. *NONMEM Supplemental Guide.* San Francisco: University of California, San Francisco, NONMEM Project Group; 1998
- 50) Boeckmann AJ, Beal SL, Scheiner LB. *PREDPP Guide.* San Francisco: University of California, San Francisco, NONMEM Project Group; 1992
- 51) Boeckmann AJ, Beal SL, Scheiner LB. *NM-TRAN Guide.* San Francisco: University of California, San Francisco, NONMEM Project Group; 1992
- 52) Boeckmann AJ, Beal SL, Scheiner LB. *NONMEM Introductory Guide.* San Francisco: University of California, San Francisco, NONMEM Project Group; 1994
- 53) Cockcroft DW, Gault MH. 1976. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine.

Nephron. 16: 31-41

- 54) Imai E, Horio M, Nitta K, Yamagata K, Iseki K, Hara S et al. 2007. Estimation of glomerular filtration rate by MDRD equation modified for Japanese patients with chronic kidney disease. Clin Exp Nephrol. 11: 41-50

## 謝辞

本論文の作成にあたりご指導、ご援助を頂きました以下の皆様方に心より御礼申し上げます。

九州大学大学院薬学研究 大学院薬学府

分子衛生薬学分野	山田 英之 教授
	石井 祐次 准教授
蛋白質創薬学分野	植田 正 教授
薬物動態分野	家入 一郎 教授

浜松医科大学	中島 光好 名誉教授
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科	丸山 征郎 特任教授
慶應義塾大学医学部臨床薬剤学教室	谷川原 祐介 教授
浜松医科大学医学部薬理学講座	梅村 和夫 教授
医療法人社団三宝会 志都呂クリニック	金丸 光隆 院長
医療法人白楊会 白楊クリニック	植松 俊彦 院長

積水メディカル株式会社	三宅 隆行 様
	稲葉 厚弘 様
	堀 勝行 様

旭化成ファーマ株式会社	小平 輝朋 様
	瀬良田 政志 様
	児玉 俊幸 様
	故・山田 好延 様