

エリスロポエチンのクリアランス機構

脾臓動脈の migration による up-regulation

1999

丸山聖治

①

## エリスロポエチンのクリアランス機構

標的細胞の migration による up-regulation

1999

加藤基浩

## 目次

略語表 .....	1
緒言 .....	2
1章 Mechanism for Nonlinear Pharmacokinetics of Erythropoietin in Rats--4	
要約 .....	5
緒言 .....	6
結果 .....	7
考察 .....	9
図表 .....	12
2章 Pharmacokinetics of Erythropoietin in Genetically Anemic Mice --- 21	
要約 .....	22
緒言 .....	23
結果 .....	24
考察 .....	26
図表 .....	29
3章 The Mechanism of Erythropoietin Induced Up-regulation of its Uptake Clearance by Spleen .....	36
要約 .....	37
緒言 .....	38
結果 .....	39
考察 .....	41
図表 .....	45
4章 Immunological Response to Repeated Administration of Recombinant Human Erythropoietin in Rats: Biphasic Effect on its Pharmacokinetics .....	53
要約 .....	54
緒言 .....	55
結果 .....	56
考察 .....	57
図表 .....	60
結論および今後の展望 .....	67
謝辞 .....	68
実験の部 .....	69
参考文献 .....	77

## 略語表

AUC : 血漿中濃度下面積

BFU-E : burst forming unit-erythroid

C0 : 血漿中初期濃度

CFU-E : colony forming unit-erythroid

CLtotal : 全身クリアランス

CLup : 組織取り込みクリアランス

EGF : epidermal growth factor

EPO : エリスロポエチン

G-CSF : 顆粒球コロニー形成刺激因子

GM-CSF : 顆粒球-マクロファージコロニー形成刺激因子

Hct : ヘマトクリット

HGF : hepatocyte growth factor

Kd : 解離定数

Km : ミカエリス定数

MRT : 平均滞留時間

rh-EPO : 遺伝子組換えヒト型エリスロポエチン

RME : レセプター介在性エンドサイトーシス

t-PA : tissue-plasminogen activator

T1/2 : 消失半減期

Vc : 中央コンパートメント分布容積

Vmax : 最大消失速度

Vss : 定常状態分布容積



## 緒言

近年、多くの生理活性タンパクあるいはペプチドが発見され、それらがアドレナリン、ヒスタミンなどの生理活性化合物同様、生理機能の調節や細胞の分化増殖などに働いていることが明らかになってきた。これらは生体内では微量にしか存在しないため、その機能についての研究はこれまで制限されてきた。しかし、遺伝子組換え技術の急速な進歩によりこれら生理活性タンパク、ペプチドが大量生産可能となり、その生理的機能が明らかとなり、さらに各種疾患の治療薬として使用されるまでになった。

生理活性タンパク、ペプチドの体内動態研究が進むにつれ、従来、使用されてきた低分子化合物とは全く異なる体内動態特性を示すことが明らかになった(59)。すなわち、生理活性タンパク、ペプチドに対するレセプターが、生理活性タンパク、ペプチドの分布および消失に大きく寄与し、このレセプターの飽和により血漿中濃度推移に非線形性がみられる(30,59,68)。また、このレセプターの down-, up-regulation により、動態に変動がみられている(31)。さらに、生理活性タンパク、ペプチドを医薬品として開発する場合、前臨床試験において、ヒト型生理活性タンパク、ペプチドを異種動物に投与するため、長期にわたる試験においては抗体が産生され、生理活性タンパク、ペプチドと抗体との反応により体内動態が変動することも低分子化合物と異なる点である。各種生理活性タンパク、ペプチドの体内動態が明らかにされてきているが、未だ十分でない。生理活性タンパク、ペプチドを医薬品として開発する場合、それら生理活性ペプチドの体内動態の種々の変動を明らかにすることは薬効、安全性を評価する上において極めて重要である。本研究ではエリスロポエチン(EPO)の体内動態について検討を行った。

EPOは主に腎臓において産生され、赤芽球系前駆細胞、主にCFU-Eに作用し、分化・増殖の促進作用を有する分子量30kdの糖タンパクである。EPOは宮家らにより、再生不良性貧血患者の尿から精製され(44)、その後相次いでcDNAがクローニングされた(9,10)、rh-EPOが臨床適応され、慢性腎不全にともなう貧血の改善に効を奏している(20,21)。また、さらに再生不良性貧血等各種貧血治療に対しての応用も期待されている。EPOの体内動態は非線形性を示すことが健康人およびラットにおいて示唆されており(10, 25)、さらに健康人および腎不全患者にrh-EPOを繰り返し投与することにより、血漿中消失半減期が短くなることが報告されている(36,43,46)。また、骨髓異形症候群の患者では消失が遅くなっていることも報告されている(3)。しかし、EPOの非線形体内動態およびその変動機構については明らかになっていない。EPOの臨床におけるより有効な使用法を考える上でEPOの体内動態機構を明らかにすることは重要である。

本研究の目的は以下の、3項目を明らかにすることである。

- 1) EPOの非線形体内動態機構の解明
- 2) 脾臓における組織取り込みクリアランスの up-regulation 機構の解明

3) EPO の体内動態に及ぼす抗体の影響

表 1

Table 1. The effect of anti-EPO antibody on the pharmacokinetics of EPO in the rat.

Table 1

Table 1

## 第 1 章

### Mechanism for the Nonlinear Pharmacokinetics of Erythropoietin in Rats

## 要約

本研究では rh-EPO を用いて EPO の標的臓器である骨髓、脾臓におけるレセプターが rh-EPO の非線形体内動態にどのように関与しているかを明らかにするためにラットを用いて検討した。ラットに  $0.25 \mu\text{g/kg}$  静脈内投与したときの  $\text{CL}_{\text{total}}$  は投与量の増加に従い減少し、高投与量では一定値を示した。このことから、rh-EPO の  $\text{CL}_{\text{total}}$  は飽和性クリアランスと非飽和性クリアランスからなることが示唆された。そこで、飽和性クリアランスにどの臓器が関与するか調べるため、いくつかの臓器における  $\text{CL}_{\text{up}}$  の投与量依存性を投与 30 分間の  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の取り込みから求め評価した。肝臓、腎臓では飽和性は認められなかったが、標的臓器である骨髓、脾臓の取り込みに飽和性が認められた。骨髓、脾臓における  $\text{CL}_{\text{up}}$  の投与量依存性から  $K_m$ ,  $V_{\text{max}}$  を求めたところ、いずれも 240-450 pM の範囲にあり、rat bone marrow cells を用いた binding 実験より報告されているレセプターの解離定数(180pM)に comparable な値であった。過剰量の非標識体の皮下投与により両組織における  $\text{CL}_{\text{up}}$  に down-regulation が見られた。さらに rh-EPO 0, 1, 5, 25  $\mu\text{g/kg}$  を 4 日に 2 回静脈内投与し、最終投与 2 日後における  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の  $\text{CL}_{\text{up}}$  を評価すると、処置量依存的に  $\text{CL}_{\text{up}}$  の増加がみられ、up-regulation が認められた。骨髓の  $\text{CL}_{\text{up}}$  はコントロール値の 1.3 倍に増加し、脾臓ではコントロール値の 4 倍に増加し、up-regulation は脾臓において顕著に認められた。EPO の処置により骨髓、脾臓における  $\text{CL}_{\text{up}}$  の和と Hct 値およびヘモグロビン濃度といった hematopoietic parameters との間に良い相関関係が認められた。以上過剰量の EPO 処置により投与後時間に応じてクリアランスの down-regulation, up-regulation が起きるという事実、そして up-regulation によるクリアランスの変動に平行して薬効の指標が変化するという事実より、薬効レセプターが rh-EPO の非線形体内動態の支配要因であると考えられた。



## 緒言

近年、遺伝子組換え技術の急速な進歩により生体内では微量にしか存在しない生理活性タンパク、ペプチドが治療薬として使用されてきている。Insulin(68), t-PA(63), EGF (22, 55), HGF(38, 39) といった生理活性ペプチドは肝臓での RME により速やかに取り込まれ、血中から速やかに消失する。これら生理活性ペプチドの pharmacokinetics は、この RME の飽和により非線形性を示す。この RME は生理活性ペプチドの体内動態の特徴であり、生理活性ペプチドの分布および消失に関与している(59)。生理活性ペプチドとレセプターとの結合により生理活性がおきるが、最近、Maack により生理活性を引き起こさない silent receptor の存在が報告されている(41)。生理活性ペプチドの体内動態における RME の寄与を明らかにすることは、薬効を考える上においても極めて重要である。

EPO, G-CSF, GM-CSF といった血液造血因子も相次いでクローニングされ(16, 37, 47, 70)、各種血液疾患に使用されている。顆粒球系前駆細胞の増殖因子である G-CSF の体内動態に非線形性が報告され(30)、G-CSF 誘導体 nartograstim を用いた詳細な研究(31, 32, 33)により、nartograstim では他の生理活性ペプチドでみられたような肝臓への特異的な取り込みはみられず、標的組織である骨髄における RME が非線形体内動態に起因していることが明らかになった(31, 32)。Nartograstim の骨髄におけるレセプター介在性の取り込みは過剰量の nartograstim の投与により down-regulation を引き起こし、さらに繰り返し投与により、レセプター介在性取り込みの up-regulation が認められ、CLtotal の増加がみられた(31)。骨髄におけるレセプター介在性取り込みの変化が、体内動態の変動要因であることが明らかになった。

一方、赤芽球系前駆細胞の増殖因子である EPO の体内動態においても非線形性がヒト(10)、ラット(25)において報告されている。本研究では、EPO の非線形体内動態機構について検討を加えた。EPO は主に腎臓において産生され、主に CFU-E に作用し、分化・増殖の促進作用を有する分子量 30kd の糖タンパクである(28)。EPO は宮家らにより、再生不良性貧血患者の尿から精製され(44)、その後相次いで cDNA がクローニングされた(16, 37)。Rh-EPO が臨床適応され、慢性腎不全にともなう貧血の改善に効を奏している(9, 69)。腎不全患者に rh-EPO を繰り返し投与することにより、血漿中消失半減期が短くなることが報告されている(36, 48)。この現象は rh-EPO を  $1 \mu\text{g/kg}$  の用量で正常ラットおよび 5/6 腎摘ラットに繰り返し投与した場合においても認められている(26)。Rh-EPO は広く臨床使用されているにも関わらず、非線形性についての定量的な解析は未だなされていない。

本研究はラットを用い、rh-EPO の非線形体内動態と標的臓器による取り込みの関係について検討し、さらに、rh-EPO 投与によるクリアランスの変動と標的臓器の取り込みの変動および薬効の指標である Hct の変動との関係についても検討を加えた。

## 結果

### 1. 血漿中濃度推移

Fig.1A に rh-EPO 0.2-5  $\mu$ g/kg 静脈内投与したときの血漿中濃度推移を、Table 1 に pharmacokinetic parameters を示した。血漿中 rh-EPO 濃度はいずれの投与量においても 2 相性の消失をし、 $T_{1/2}(\beta)$  は投与量の増加に従い、1.32 h (0.2  $\mu$ g/kg) から 2.36 h (5  $\mu$ g/kg) へ延長した。MRT も投与量の増加に従い延長した。分布容積は投与量による差は見られなかった。CLtotal は投与量の増加により減少し、高投与量では、一定値を示した。このことから、CLtotal は飽和を示すクリアランスと非飽和性クリアランスの 2 つのクリアランスから成ることが示唆された。Fig.1B に持続投与時の血漿中濃度推移を示した。投与開始 6 時間後に定常状態に達した。定常状態血漿中濃度から求めた CLtotal は 16, 32, 160, 1600 ng/kg/h で、それぞれ  $32.2 \pm 2.1$ ,  $31.1 \pm 0.8$ ,  $22.7 \pm 0.9$ ,  $20.6 \pm 2.1$  ml/kg/h であり、飽和現象が認められた。0.2  $\mu$ g/kg 急速投与の場合の CLtotal は 48.3 ml/kg/h であり、持続投与の場合の線形状態での CLtotal の  $31.1-32.2$  ml/kg/h よりも大きな値であった。これは定量限界のため急速投与の場合のサンプリング時間が十分でないためと思われる。

そこで血漿中濃度-時間 profiles を central compartment から線形と非線形消失するモデルで解析した。飽和クリアランスの  $V_{max}$ ,  $K_m$  はそれぞれ 47.5 ng/hr/kg, 4.03 ng/ml (219 pM)、非飽和クリアランス ( $keV_1$ ) は 23.5 ml/hr/kg と算出された。

### 2. $^{125}$ I-rh-EPO の組織取り込みクリアランス (CLup)

$^{125}$ I-rh-EPO 静脈内投与 30 分後の血漿中濃度、組織中濃度から CLup を評価した。Fig.2 に CLup と  $C_0$  との関係を示した。肝臓、腎臓の CLup は  $C_0$  の増加により変化しなかったが、標的臓器である骨髄、脾臓の CLup は  $C_0$  の増加により減少し、取り込みの飽和が認められた。CLup を式 (6) により解析した。骨髄、脾臓ともに 1 つの飽和性 component と非飽和性 component からなることが示された。骨髄の CLup の  $K_m$  は脾臓の値にほぼ一致した。骨髄における固有クリアランス ( $V_{max}/K_m + CL_{ns}$ ) は脾臓の 10 倍以上であった。

### 3. 短時間における rh-EPO 処置の効果

非標識 rh-EPO 1  $\mu$ g/kg を皮下投与し、4, 10, 24, 48 時間後、 $^{125}$ I-rh-EPO 0.1  $\mu$ g/kg を静脈内投与し、投与 30 分後の組織中濃度から CLup を測定した。Fig.3 は骨髄、脾臓における CLup のタイムコースを示した。骨髄、脾臓における CLup は非標識 rh-EPO 投与により低下し、down-regulation が認められた。最高血漿中濃度を示す非標識 rh-EPO 投与 10 時間後 (21) に骨髄、脾臓ともに最低値を示した。非標識 rh-EPO 投与 48 時間後に骨髄では非処置レベルに回復したが、脾臓では非処置に比べ有意な増加を示した。

#### 4. 長時間における rh-EPO 処置の効果

非標識 rh-EPO を 0, 1, 5, 25  $\mu$ g/kg 静脈内 2 回反復投与処置したラットに  $^{125}$ I-rh-EPO 0.2  $\mu$ g/kg 静脈内投与した時の血漿中免疫反応性放射能推移を Fig. 4 に示した。血漿中免疫反応性放射能は非標識 rh-EPO 処置量の増加に消失が早くなった。骨髓、脾臓における CLup も処置量依存的に増加がみられ、up-regulation が認められた(Fig. 5)。骨髓ではコントロール値の 1.3 倍に増加し、脾臓ではコントロール値の 4 倍に増加し、up-regulation は脾臓において顕著に認められた(Fig. 5)。Rh-EPO 処置により薬効の指標である Hct 値およびヘモグロビン濃度も処置量依存的に増加した。EPO 処置による Hct 値およびヘモグロビン濃度と骨髓、脾臓における CLup の和との間に良い相関を示した( $r>0.973$ ,  $P<0.05$ )。Rh-EPO 5  $\mu$ g/kg 処置ラットにおける骨髓、脾臓の CLup の  $V_{max}$ ,  $K_m$  を求めた(Fig. 6, Table 3)。脾臓では、対照と比べ rh-EPO 処置により、 $V_{max}$  の上昇、 $K_m$  の上昇が見いだされた。

## 考察

EGF(22, 55), insulin(68), HGF(38, 39), G-CSF 誘導体(30-33)等の生理活性ペプチドの体内動態に非線形性がみられ、飽和性クリアランス機構に RME が寄与していることが明らかになっている。Rh-EPO をラットに  $0.2-5 \mu\text{g/kg}$  静脈内投与したとき、 $CL_{\text{total}}$  は投与量の増加により減少し、高投与量では、一定値を示した(Fig. 1, Table 1)。また、持続投与においても、投与速度の増加に従い、 $CL_{\text{total}}$  の低下がみられ、高用量で一定値を示した。このことから、 $CL_{\text{total}}$  は飽和性を示すクリアランスと非飽和性クリアランスの2つのクリアランスから成ることが示唆された。飽和クリアランスの固有クリアランス( $V_{\text{max}}/K_m$ )は  $11.8\text{ml/kg/hr}$  であり、非飽和クリアランスの約半分のものであった(Fig. 1)。健常人においても rh-EPO の体内動態は非線形性を示し、投与量の増加に従い、消失半減期は 4 h から 11 h に延長し、 $CL_{\text{total}}$  も  $15\text{ml/kg/h}$  から  $4\text{ml/kg/h}$  に減少し、高投与量でクリアランスは一定値になった(10)ことから、ヒトにおいても rh-EPO の消失は飽和性の機構と非飽和性の機構の2つの機構からなっていると思われる。ヒトにおける飽和クリアランスの固有クリアランスは約  $10\text{ml/kg/h}$  以上と考えられ、非飽和クリアランスの約 2.5 倍大きなものであり、ヒトにおいては rh-EPO の消失に飽和性消失機構の寄与が極めて重要であると思われる。飽和性の固有クリアランスと非飽和性クリアランスの比が動物種により異なる原因は、飽和性の固有クリアランスがラットとヒトで体重当たりで類似しているのに対し、非飽和性クリアランスでは、ラットの値がヒトの値の 5 倍大きいことに起因している。ラット、イヌ(17)、ヒトの非飽和性クリアランスを  $CL = A (BW)^B$  という allometric 式により、その関係をみると  $CL = 17 (BW)^{0.700}$  という関係がみられた。allometric exponent は血流速度、腎クリアランス等で得られる値(7)に類似しており、ヒトにおける非飽和性クリアランスは allometric 式により予測可能であった。5/6 腎摘ラットに過剰量の rh-EPO ( $25 \mu\text{g/kg}$ ) を投与したとき、対照ラットのクリアランスの 2/3 に減少した(26)。また腎不全のイヌにおいてもクリアランスの減少がみられる(17)。更に、腎臓における  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の初期取り込みに投与量依存性は認められていない。これらのことから、非飽和性クリアランスは一部腎臓が関与していることが示唆された。rh-EPO 同様、飽和性クリアランスと非飽和性クリアランス機構により消失する G-CSF 誘導体の主な非飽和性クリアランスに寄与する臓器は腎臓であり、その機構は糸球体濾過と考えられている。腎臓における糸球体濾過は分子の分子量および電荷により制限されるものの、分子量 5-6 万まで糸球体濾過されること(62)から、腎臓における rh-EPO の非飽和性クリアランス機構は糸球体濾過であることが予想される。

Sawyer ら(57)は Friend Virus-infected Erythroid Cells を用い、 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO は RME により細胞に取り込まれ、引き続き lysosome enzyme により degradation され、細胞表面結合サイトが減少 (down-regulation) することを報告した。本研究における rh-EPO の飽和性クリアランスの  $K_m$  値は  $219\text{pM}$  であり、ラットの赤芽球系前駆細胞の EPO レセプ



ターの Kd 値 180pM (1) にほぼ一致している。このことは rh-EPO の飽和性クリアランス機構も EPO レセプターによる RME であることが予想された。実際、標的組織である骨髄、脾臓における  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の取り込みに飽和がみられた。骨髄、脾臓における CLup を体重あたりで考えると、骨髄で 38.5ml/kg/h (4 g/200g of rat; 8)、脾臓で 3.1ml/kg/h であり、血漿中非線形動態の大部分は骨髄による取り込みに起因しているものと思われる。多くのペプチドのクリアランス臓器として知られている肝臓、腎臓においては dose-dependency は認められず、rh-EPO の非線形消失におよぼす肝、腎の寄与はほとんどないものと思われる。

RME が飽和クリアランスに関与しているか明らかにするため、CLup の down-regulation について検討した。過剰量の非標識 rh-EPO を皮下投与した後、骨髄、脾臓における CLup は減少し、投与 10 時間後に最低値を示した (Fig. 3)。皮下投与 10 時間後の血漿中 rh-EPO 濃度は約 1ng/ml であった (21)。この非標識 rh-EPO と  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO との競合により、 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の骨髄、脾臓への取込みが減少した可能性も考えられた。このような血中残存 rh-EPO による阻害の可能性を否定するため、先の CLup のデータから得られた Km, Vmax より、投与 10 時間後の競合阻害による取込みの減少を計算した。計算された骨髄、脾臓での CLup の減少は、それぞれ 8%, 12% であった。実際の減少は骨髄、脾臓でそれぞれ 33%, 44% であり、計算値よりも低いものであったことから、この減少は RME によるレセプターの down-regulation が主に寄与しているものと考えられた。非標識投与 48 時間後の脾臓の CLup は 1.4 倍有意に増加した。組織取り込みクリアランスは短時間では down-regulation がみられるが、長時間では up-regulation がみられることが示唆された。

さらに、レセプター数の変動が体内動態に影響するかを明らかにするため、CLup の up-regulation について検討した。rh-EPO の処置量を変え、up-regulation の処置量依存性と体内動態の変化、rh-EPO 処置による薬効の発現との関係について考察を加えた。rh-EPO 処置により、処置量依存的に消失の促進が認められた (Fig. 4)。さらに、骨髄、脾臓における CLup も処置量依存的に増加がみられた。血漿からの消失の変化は標的臓器における CLup の変化に起因しているものと思われる。さらに、この骨髄と脾臓の CLup の和と Hct 値あるいはヘモグロビン濃度といった血液パラメータとの間にも良い相関がみられた。よって CLup の up-regulation は薬効レセプターの増加に起因していると思われる。腎不全患者 (36, 48) および健康人 (43) に rh-EPO を反復投与した場合にも、CLtotal の増加が認められており、rh-EPO の作用による標的細胞の増加に起因しているものと思われる。

以上まとめると、rh-EPO の CLtotal は飽和クリアランスと非飽和クリアランス機構からなり、飽和クリアランス機構は主に骨髄における取り込みに起因することが明らかになった。また、過剰量の EPO 処置により投与後時間に応じてクリアランスの down-regulation, up-regulation が起きるという事実、そして up-regulation によるクリアランスの変動にパラレルに薬効の指標が変化するという事実より、薬効レセプターが rh-EPO の非線形体内



動態の支配要因であると考えられた。



Figure 1 shows the relationship between the number of eggs and the number of larvae. The left graph shows a positive correlation, while the right graph shows a negative correlation. The data points are connected by lines, and the trends are generally consistent across the two graphs.

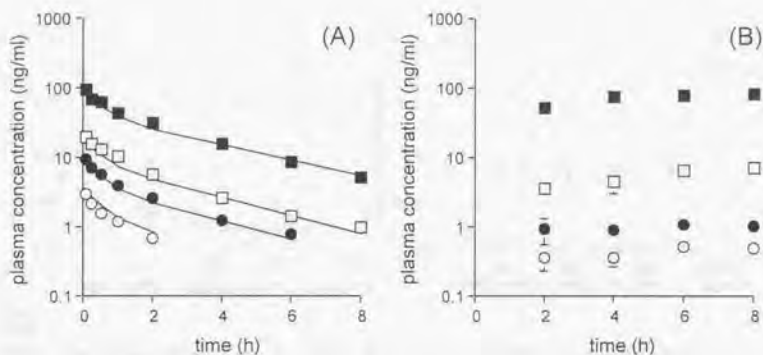


Fig. 1

Plasma concentration-time profiles for rh-EPO after intravenous bolus administration to rats at doses of 0.2(O), 0.5(●), 1(□) and 5(■) µg/kg (A) and during continuous infusion at rates of 16(O), 32(●), 160(□) and 1600(■) ng/kg/h (B) to rats. Each point with vertical bar represents mean  $\pm$  S.E. for 3 rats. Solid lines were obtained by fitting using Eqs. 2 and 3. Data at all doses examined were simultaneously fitted to Eqs. 2 and 3, and the fitted lines thus obtained are also shown. The Michaelis-Menten constant and maximum elimination rate of the saturable elimination process were  $4.03 \pm 3.03$  ng/ml (219 pM) and  $47.5 \pm 30.2$  ng/kg/h, respectively, while the nonsaturable clearance was  $23.5 \pm 1.2$  ml/kg/h (calculated mean  $\pm$  S.E.). In the case of infusion, rh-EPO was infused at the rates of 16, 32, 160 and 1600 ng/kg/h after a loading dose of 20, 40, 200 and 2000 ng/kg, respectively.

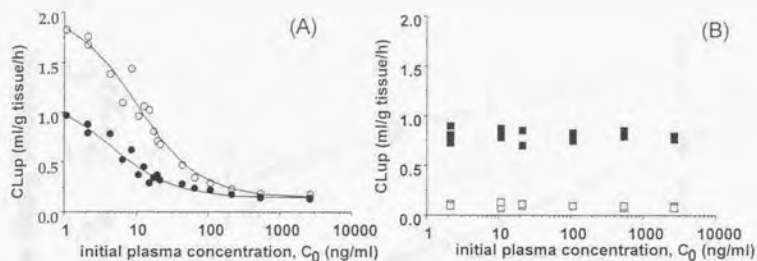


Fig. 2

The relationship between  $C_0$  and  $CL_{up}$  for bone marrow(○), spleen(●), liver(□) and kidney(■) for  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO. Solid lines were obtained by fitting using Eq. 6.

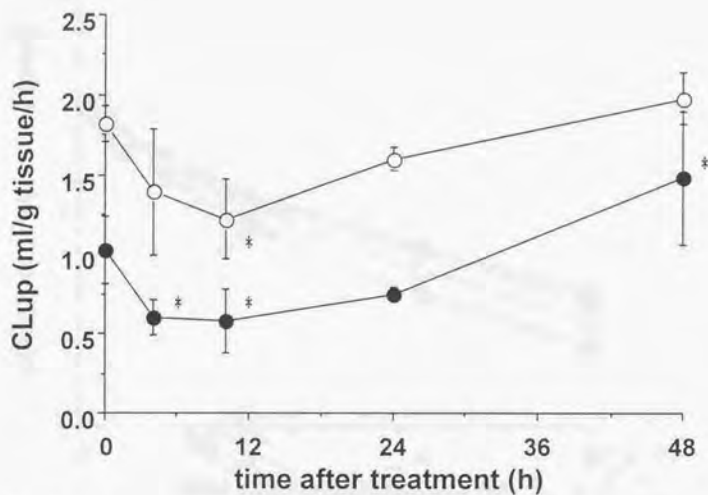


Fig. 3

Time course of CLup in bone marrow(O) and spleen(●). CLup for  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO was determined before and 4, 10, 24 and 48 h after subcutaneous administration of rh-EPO (1  $\mu\text{g/kg}$ ). \*Significant difference from control( $P<0.05$ ). Values are means  $\pm$  S.E. for 3 rats.

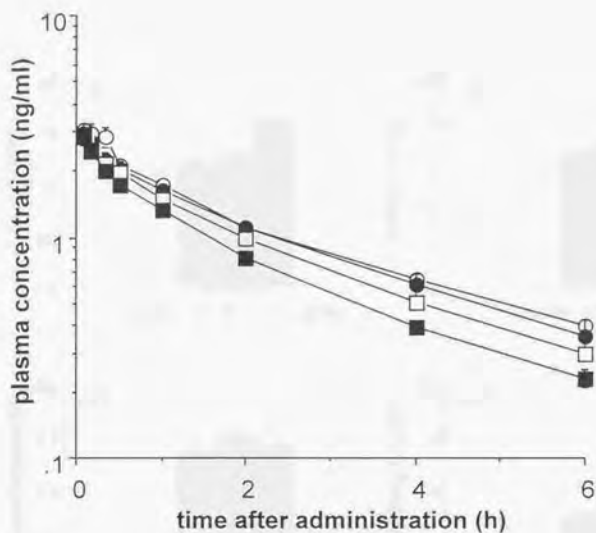


Fig. 4

Plasma concentrations of immunoreactive radioactivity following intravenous administration of  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO, 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , to rats treated with rh-EPO at the doses of 0 (○), 1 (●), 5 (□) and 25 (■)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Values are means  $\pm$  S.E. for 3 or 4 rats.



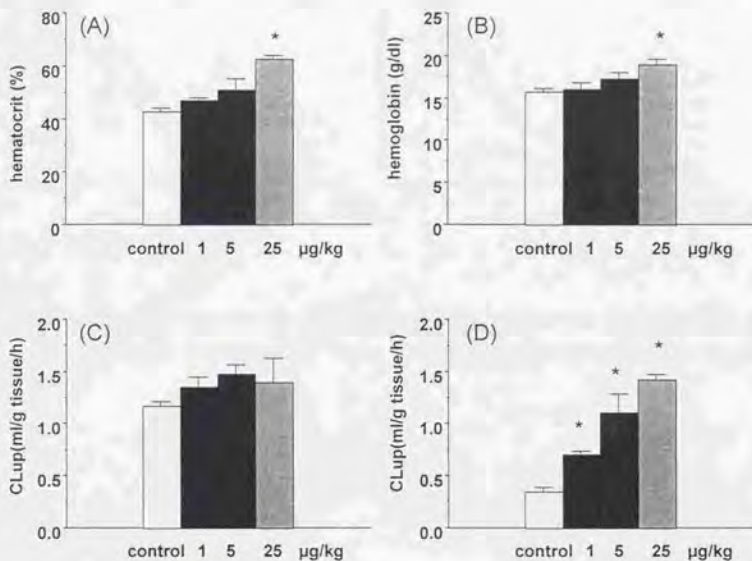


Fig. 5

The effects of EPO-treatment on hematocrit(A), hemoglobin(B), CLup of bone marrow(C), CLup of spleen(D). Values are means  $\pm$  S.E. for 3 or 4 rats. Rh-EPO was administered twice over four days to rats at the dose of 0, 1, 5 and 25 µg/kg.

\*Significant difference from control ( $P < 0.05$ ).

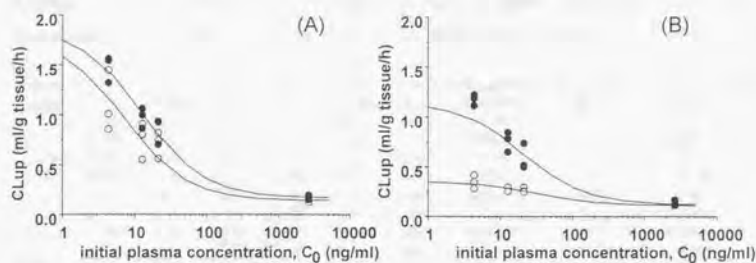


Fig. 6

The relationship between  $C_0$  and CLup of bone marrow (A) and spleen (B) in control (O) and EPO-treated rats (●). Solid lines were obtained by fitting using Eq. 6.

TABLE 1 Pharmacokinetic parameters of rh-EPO following intravenous administration of rh-EPO to rats at doses of 0.2, 0.5, 1 and 5  $\mu\text{g/kg}$ .

dose ( $\mu\text{g/kg}$ )	T1/2 ( $\beta$ ) (h)	Vc (ml/kg)	Vss (ml/kg)	MRT (h)	CLtotal (ml/kg/h)	CLp,early (ml/kg/h)	AUC <sub>0-2</sub> /dose ( $\text{kg}\cdot\text{h/ml}$ )	AUC <sub>0-8</sub> /dose ( $\text{kg}\cdot\text{h/ml}$ )	AUC <sub>0-infinity</sub> /dose ( $\text{kg}\cdot\text{h/ml}$ )
0.2	1.32 (0.12)	49.6 (4.2)	85.2 (1.4)	1.10 (0.09)	48.3 (3.9)	174 (12)	0.0141 (0.0006)	-	0.0208 (0.0016)
0.5	2.49* (0.38)	46.0 (4.3)	84.8 (3.5)	2.05* (0.09)	27.0* (0.3)	129* (1)	0.0193* (0.0000)	-	0.0371* (0.0004)
1	3.42* (0.15)	50.0 (1.1)	82.2 (2.2)	2.35* (0.08)	23.7* (0.6)	120* (4)	0.0224* (0.0005)	0.0373 (0.0006)	0.0423* (0.0011)
5	2.36* (0.16)	47.5 (4.5)	77.8 (3.8)	2.33* (0.03)	24.3* (1.8)	130* (9)	0.0205* (0.0011)	0.0377 (0.0027)	0.0413* (0.0029)

Each value represents mean(S.E.) of 3 animals.

\*: significant difference from 0.2  $\mu\text{g/kg}$  ( $P < 0.05$ ).

TABLE 2 Kinetic parameters for CLup of rh-EPO.

	Km (ng/ml)	Vmax (ng/g tissue/h)	CLns (ml/g tissue/h)	Vmax/Km + CLns (ml/kg B.W./h)
bone marrow	8.26(449 pM) ± 0.23	15.9 ± 0.3	0.163 ± 0.002	41.8 <sup>a)</sup>
spleen	4.42 (240 pM) ± 0.23	4.56 ± 0.13	0.143 ± 0.002	3.64 <sup>b)</sup>

a) The bone marrow weight per kilogram of body weight was assumed to be 20 g (8).

b) The spleen weight per kilogram of body weight was measured as 3.0 g.

Each value represents the calculated mean ± S.E.  
Twenty one rats were used.

TABLE 3 Kinetic parameters for CLup by bone marrow and spleen in control and EPO-treated rats.

	Km (ng/ml)	Vmax (ng/g tissue/h)	CLns (ml/g tissue/h)
Control			
bone marrow	16.8 (913pM) ± 3.0	20.3 ± 2.9	0.123 ± 0.032
spleen	23.8 (1290 pM) ± 3.6	7.98 ± 1.0	0.111 ± 0.006
EPO-treated			
bone marrow	12.3 (669pM) ± 1.0	21.4 ± 1.3	0.173 ± 0.018
spleen	8.54 (464 pM) ± 0.72	13.2 ± 0.8	0.144 ± 0.014

Each value represents the calculated mean ± S.E.

The values were estimated by Eq. 6.

Twelve rats/group were used.



## 第2章

### Pharmacokinetics of Erythropoietin in Genetically Anemic Mice

## 要約

本研究は再生不良性貧血といった造血障害時における EPO の体内動態を明らかにするために、W/W<sup>v</sup> マウスにおける rh-EPO の体内動態と正常マウス (+/+) における体内動態を比較した。W/W<sup>v</sup> マウスは stem cell factor receptor をコードする W 遺伝子の mutation により巨球性貧血を呈し、再生不良性貧血のモデル動物として考えられている。種々の投与量の非標識 rh-EPO を 1 日 1 回 1 週間反復静脈内投与したところ、8 日目の Hct 値は W/W<sup>v</sup> マウス、+/+ マウスともに投与量依存的に有意に上昇したが、W/W<sup>v</sup> マウスでは、+/+ マウスと同程度の薬効を得るには rh-EPO を +/+ マウスの投与量の 10 倍量必要であった。+/+ マウスでは、rh-EPO の頻回投与により、大腿骨、脾臓における CLup は脾臓で 0.48  $\mu$ g/kg で有意な増加がみられた。一方で、骨髄では有意な変化は見られなかった。この結果はラットを用いた検討結果と同様であり、rh-EPO の繰返し投与が、脾臓で選択的に CLup の up-regulation を起す事を示した。一方、W/W<sup>v</sup> マウスでの大腿骨、脾臓における CLup は骨髄で 4.8  $\mu$ g/kg で約 1.5 倍有意な増加がみられたが、脾臓では有意な変化は見られなかった。このことは、W/W<sup>v</sup> マウスと +/+ マウスで組織取込みの up-regulation の懸かり方が異なることを示した。Up-regulation の懸かり方が薬効の発現の懸かり方に関与していることが推察された。両マウスともに骨髄、脾臓の CLup は類似した Km 値(389-619 pM)をもつ飽和を示した。両マウスの 骨髄と脾臓の CLup の和と Hct 値の関係は同一の直線上にプロットされた。この結果から正常マウスばかりでなく貧血マウスにおいても薬理レセプターが組織取込みに働いていることが示唆された。

## 緒言

EPO は主に腎臓において産生され、主として CFU-E に作用し、分化・増殖の促進作用を有する分子量 30kd の糖タンパクである(28)。EPO は宮家らにより、再生不良性貧血患者の尿から精製され(44)、その後相次いで cDNA がクローニングされた(16, 37)。現在、rh-EPO が臨床適応され、慢性腎不全にともなう貧血の改善に効を奏している(9, 69)。腎不全患者の貧血の主な原因は、EPO 産生能の低下であり、不足している EPO を補うことで改善されていると考えられる。一方、骨髓異形成症候群、再生不良性貧血といった難治性貧血の患者は内因性 EPO レベルが高いにも関わらず貧血を呈している(13)。再生不良性貧血は造血幹細胞の減少ならびに造血微小環境の異常に由来するものと考えられているが、未だ不明な点が多い。近年、再生不良性貧血の患者に rh-EPO を大量投与すると一部の症例において貧血の改善がみられることが報告されている(10, 48, 67)。再生不良性貧血のモデル動物として W/W<sup>v</sup> マウスおよび Sl/Sl<sup>d</sup> マウスが知られている(2, 35)。W/W<sup>v</sup> マウスは造血細胞の遺伝的疾患動物であり、Sl/Sl<sup>d</sup> マウスは造血微小環境の遺伝的疾患動物である。W/W<sup>v</sup> マウスは stem cell factor receptor (c-kit) の point mutation により tyrosine kinase 活性が低下しているマウスである(51)。このマウスに rh-EPO を大量に投与すると、再生不良性貧血患者同様貧血の改善がみられている(5)。本実験ではこの W/W<sup>v</sup> マウスを再生不良性貧血のモデルとして実験に用いた。

本研究では、rh-EPO のラットにおける体内動態について検討し、標的組織における飽和性の取込みにより rh-EPO の体内動態は非線形性を示すことを明らかにした(1章)。飽和性の取込みに薬理レセプターが関与し、rh-EPO の投与により down-, up-regulation が起き、rh-EPO の体内動態を変動させることが明らかになった(1章)。W/W<sup>v</sup> マウスにおける rh-EPO の薬効と体内動態機構を明らかにすることは、難治性貧血における rh-EPO の有用性を評価する上において極めて重要である。そこで、本実験では、W/W<sup>v</sup> マウスにおける rh-EPO の血漿中濃度推移および標的臓器であり、クリアランス臓器である骨髓および脾臓の特異的な組織取り込みを検討した。

## 結果

### 1. 血漿中濃度推移

Fig. 7 に  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO 0.48  $\mu\text{g/kg}$  を W/W<sup>v</sup> マウスおよび+/+マウスに静脈内投与したときの血漿中 TCA 沈殿画分放射能推移を、Table 4 に pharmacokinetic parameters を示した。血漿中 EPO 濃度はいずれのマウスにおいても2相性の消失を示した (Fig. 7)。MRT は W/W<sup>v</sup> マウスでは 4.83 h と+/+マウスの 4.30 h に比べて長かった (Table 4)。Vc および Vss のいずれも+/+マウスに比べ W/W<sup>v</sup> マウスの方が大きいことが明らかになった (Table 4)。AUC は両マウスで約 20 ng·h/ml とほぼ同様の値を示しており、従って CL<sub>total</sub> も約 23 ml/h/kg と同様の値を示した。

### 2. $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の組織取り込みクリアランス

$^{125}\text{I}$ -rh-EPO 静脈内投与 30 分後の血漿中濃度、組織中濃度から CL<sub>up</sub> を評価した。CL<sub>up</sub> と C<sub>0</sub> との関係を Fig. 8 に示した。W/W<sup>v</sup> マウス、+/+マウスともに大腿骨、脾臓の CL<sub>up</sub> は C<sub>0</sub> の増加により減少し、取り込みの飽和が認められた (Fig. 8)。大腿骨、脾臓ともに1つの飽和性 component と非飽和性 component からなることが示された (Fig. 8)。大腿骨、脾臓の CL<sub>up</sub> の V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>, CL<sub>ns</sub> を Table 5 に示した。大腿骨、脾臓の K<sub>m</sub> 値は W/W<sup>v</sup> マウス、+/+マウスでそれぞれ類似した値を示した。EPO とレセプターとの K<sub>d</sub> 値(18)にも近い値であった。しかし、W/W<sup>v</sup> マウスの大腿骨の V<sub>max</sub> は、+/+マウスの V<sub>max</sub> の 0.43 倍であり、W/W<sup>v</sup> マウスの脾臓の V<sub>max</sub> は、+/+マウスの V<sub>max</sub> の 0.35 倍であった (Table 5)。

### 3. rh-EPO 処置による体内動態および薬効の変動

非標識 rh-EPO 0.48, 4.8, 48  $\mu\text{g/kg}$  を 1 日 1 回 1 週間反復静脈内投与し、8 日目の Hct 値および  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の大腿骨および脾臓における CL<sub>up</sub> を評価した。rh-EPO 投与により W/W<sup>v</sup> マウス、+/+マウスともに処置量依存的に Hct 値は増加し、+/+マウスでは 0.48  $\mu\text{g/kg}$  で有意な Hct 値の増加 (処置前値の 1.20 倍) が認められた (Fig. 9)。W/W<sup>v</sup> マウスにおいては、より高投与量の 4.8  $\mu\text{g/kg}$  で Hct 値の有意な上昇 (処置前値の 1.16 倍) が認められた (Fig. 9)。W/W<sup>v</sup> マウスでは、+/+マウスと同程度の薬効を得るために 10 倍量の rh-EPO を必要とした (Fig. 9)。+/+マウスでの大腿骨、脾臓における CL<sub>up</sub> は脾臓で 4.8  $\mu\text{g/kg}$  で約 4 倍有意な増加がみられたが、骨髄では有意な変化は見られなかった (Fig. 10)。このような現象は正常ラットを用いた解析における結果と同様であった (1 章)。一方、W/W<sup>v</sup> マウスでの大腿骨、脾臓における CL<sub>up</sub> は骨髄で 4.8  $\mu\text{g/kg}$  で約 1.5 倍有意な増加がみられたが、脾臓では有意な変化は見られなかった (Fig. 10)。このように W/W<sup>v</sup> マウスと+/+マウスで CL<sub>up</sub> の up-regulation の懸かり方が異なった (Fig. 10)。骨髄、脾臓における CL<sub>up</sub> と Hct 値との関係を Fig. 11 に示した。両マウスの骨髄と脾臓の CL<sub>up</sub> の和と

Het 値の関係は同一の直線上にプロットされ、有意な相関が見られた (Fig. 11)。



## 考察

再生不良性貧血の治療は、骨髄移植を除くと免疫抑制療法が主流であるが、必ずしも全例に有効ではない。近年、EPO、G-CSFといった造血因子が遺伝子組換え技術により臨床応用され、再生不良性貧血にも有用性を示すことが報告されてきている(10, 48, 67)。実際、本実験でも、再生不良性貧血のモデル動物である W/W<sup>v</sup> マウスにおいて薬効がみえている(Fig. 9)。しかし、再生不良性貧血における体内動態は明らかでない。そこで W/W<sup>v</sup> マウスにおける体内動態を正常マウスと比較した。

両マウスで CL<sub>total</sub> に差はなかった(Fig. 7, Table 4)。このことは両マウスで EPO の消失が同程度であることを示唆すると共に、内因性 EPO レベルの違いの原因についても暗示する。すなわち、本研究において両マウスにおける内因性 EPO レベルを rh-EPO 投与前に測定したところ、W/W<sup>v</sup> マウスにおける内因性 EPO 濃度は約 1ng/ml (data not shown) であり、+/+マウスより約 10 倍高かった。EPO の内因性レベル(Cepo)は

$$\text{Cepo} = \text{産生速度} / \text{CL}_{\text{total}}$$

によって決まるものと考えられる。従って、W/W<sup>v</sup> マウスにおける内因性濃度の上昇は EPO の産生速度の増加に起因していると思われる。一方、W/W<sup>v</sup> マウスの V<sub>c</sub> は、+/+マウスに比べ大きかった(Table 4)が、血液濃度から求めた V<sub>b</sub> は両マウス間で差がなかった(W/W<sup>v</sup> マウス、+/+マウスでそれぞれ 97.8、98.8ml/kg)。W/W<sup>v</sup> マウス、+/+マウスの Hct 値はそれぞれ、0.366、0.519 であり、いずれのマウスでも V<sub>c</sub> は V<sub>b</sub>(1-Hct)とほぼ等しかったことから、血液当たりの血漿の量が貧血マウスの方が大きいこと、すなわち W/W<sup>v</sup> マウスの Hct 値が低いことが V<sub>c</sub> の差になっているものと考えられた。

本研究では、以前ラットにおける体内動態解析によって、骨髄、脾臓といった rh-EPO の標的臓器における RME が飽和性組織取込みに関与することを報告した(1章)。本研究においても両マウスの標的組織における CL<sub>Lup</sub> は飽和を示し(Fig. 8)、その K<sub>m</sub> 値は両マウスで類似しており、EPO-receptor の K<sub>d</sub> 値(18)にほぼ一致している(Table 5)。また、rh-EPO の頻回投与により脾臓または骨髄の CL<sub>Lup</sub> は up-regulation を受けた(Fig. 10)。このような up-regulation は、既にラットにおいても見出ししており、RME がこの取込みに寄与することを示唆している(1章)。さらに CL<sub>Lup</sub> の増加と Hct 値の増加は同程度に観察され、骨髄、脾臓の CL<sub>Lup</sub> の和と Hct 値の間に相関が認められた(Fig. 11)。しかも、その相関は+/+マウス、W/W<sup>v</sup> マウスで同一の相関直線を示した(Fig. 11)。既に正常ラットにおいて CL<sub>Lup</sub> と薬効(Hct、ヘモグロビン濃度)との間に正の相関があることを示しており(1章)、この結果から正常マウスばかりでなく貧血マウスにおいても薬理レセプターが組織取込みに働いていることが示唆された。両マウスの組織取込みを比較した場合、親和性には差はない。しかし、貧血マウスの V<sub>max</sub> は正常マウスに比べて低い。V<sub>max</sub> の低下の原因としては細胞当たりのレセプター数が正常に比べ少ない、あるいは標的細胞の絶対数が少ないことが考えられる。W/W<sup>v</sup> マウスは Hct 値が正常マウスに比べて低く(Fig. 9)。

標的細胞の絶対数が少ないことを反映しているものと思われる。

+/+マウスにおける組織取込みの up-regulation は骨髄よりも脾臓において顕著に認められた (Fig.10)。脾臓では骨髄以上に CFU-E が EPO の投与により増加する (50)。これが組織取込みの増加に起因していると考えられる。CFU-E は赤血球に分化し、Het 値も上がる。W/W<sup>v</sup> マウスの脾臓では CFU-E の有意な増加はみられなかったため Het 値もあまり顕著に上昇しなかったと考えられる。Nijhof ら (50) は骨髄、脾臓中 BFU-E、CFU-E 数の経時的変化から骨髄中の BFU-E が rh-EPO 投与により脾臓に移行し、脾臓で CFU-E に分化すると報告している。Nijhof らの仮説にしたがって、この脾臓の up-regulation の違いの原因を考えると2つの可能性が考えられる。1つは W/W<sup>v</sup> マウスでは骨髄から細胞が遊離しなかった。もう1つは骨髄から遊離した細胞が脾臓に居着かなかった。1つめの可能性を支持する報告はない。2つ目の可能性についてはいくつか支持する報告がある。W/W<sup>v</sup> マウスにおいて mutation を起している c-kit の ligand である stem cell factor は造血微小環境を形成するストロマ細胞に膜結合型蛋白として存在している (11)。正常骨髄細胞、肥満細胞の c-kit は stem cell factor に結合し、その作用で細胞表面のインテグリンが活性化し、フィブロネクチンとの結合性が増加する (6, 27)。しかし、W/W<sup>v</sup> マウスの細胞は c-kit の mutation により、インテグリンの活性化がみられず、フィブロネクチンに結合しない (23)。これらの情報から以下のように説明できる。骨髄から遊離した BFU-E は脾臓にいき、正常細胞では脾臓中の stem cell factor に結合し、インテグリンの活性化により脾臓内のフィブロネクチンに結合するが、W/W<sup>v</sup> マウスの細胞では stem cell factor と結合した後、インテグリンの活性化がおきないことにより脾臓に居着かないと考えられる。いずれにしても、脾臓の著しい up-regulation に c-kit が関与していることが示唆された。

ラットにおいて rh-EPO の体内動態は標的臓器への取込みに起因する非線形性が認められる (1 章)。健常人における低投与量での CLtotal 15ml/h/kg が高投与量では 5ml/h/kg に低下する (10) ことから、ヒトにおいては飽和性のクリアランスが rh-EPO の動態に大きく寄与する。一方、ラットで定速投与したときの、CLtotal は、低速度の場合 (linear)、32ml/kg/h であり、高速度の場合 (excess) は 20ml/kg/h であり、線形状態での飽和性クリアランスの寄与は約 30%と考えられた。ヒトとラットで CLtotal に占める飽和性クリアランスの寄与に種差がみられた。マウスにおいても標的臓器への取込みに非線形性が認められ、両マウス間で Vmax に差が認められている (Table 5)。しかしながら、CLtotal には両マウスで差が認められなかった (Fig. 7, Table 4)。このことはマウスでは、飽和性クリアランスの CLtotal に占める割合が小さいと考えれば説明できる。事実、<sup>125</sup>I-rh-EPO (0.1-125  $\mu$ g/kg) 静脈内投与 30 分後の血漿中濃度は投与量に比例していた。さらに、マウスにおける骨髄および脾臓の CLup の和 (18.5ml/h/kg) は、ラットの骨髄および脾臓の CLup の和 (41.6 ml/h/kg) の約半分であり、マウスではラットに比べ、CLtotal に占める飽和性クリアランスの割合はより小さいと考えられる。

ヒトにおいては飽和性のクリアランスが rh-EPO の動態に大きく寄与する。一方、再生

不良性貧血患者における rh-EPO の体内動態はほとんどわかっていないが、再生不良性貧血患者では骨髄細胞の低下がみられており他の貧血患者よりも飽和性クリアランスが減少していると考えられる。このことは、再生不良性貧血患者、骨髄異形成症候群の患者の血漿中 EPO 濃度は鉄欠乏性貧血といった他の貧血患者に比べても高値を示す理由かもしれない(13)。一方、骨髄異形成症候群の患者については内因性 EPO 濃度が高い患者ほど rh-EPO の半減期が長いことが報告されている(3)。このことは内因性 EPO 濃度が高い患者ほど rh-EPO のクリアランスが小さいことを示している。このことが内因性 EPO によるクリアランスの飽和、あるいは骨髄細胞の減少による取込み低下のどちらに起因するか明らかでなく、さらなる情報が必要である。

本研究において、W/W<sup>m</sup>マウスにおいても薬理レセプターが骨髄、脾臓への飽和性の取込みに関与していることが示唆された。W/W<sup>m</sup>マウスの組織取込みの親和性は+/+マウスと同様であったが、capacity は、低下していた。

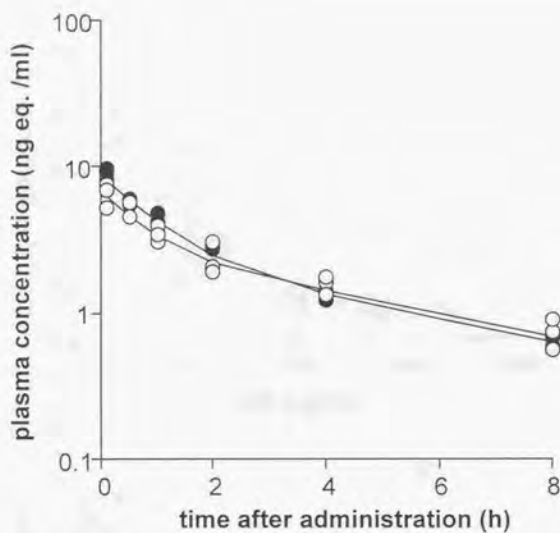


Fig. 7 Plasma concentration of TCA-precipitable radioactivity after intravenous administration of  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO to +/+(●) and W/W<sup>v</sup>(○) mice. Injected dose was  $0.48 \mu\text{g/kg}$ .

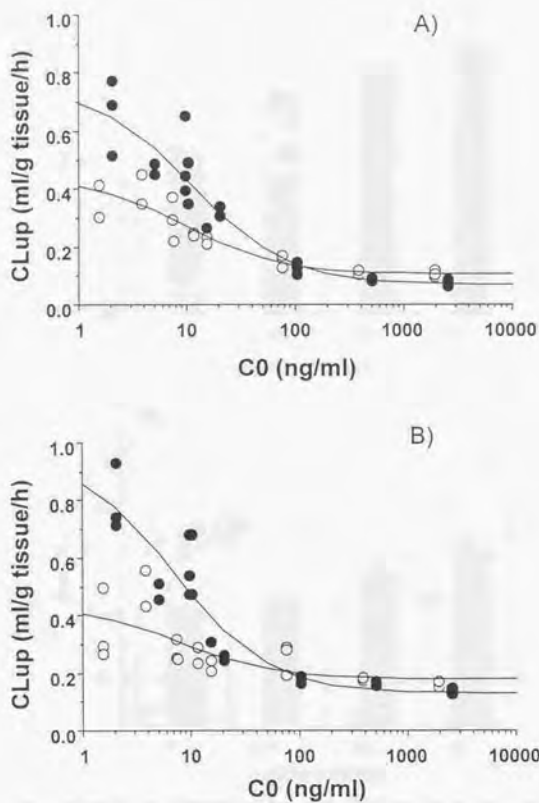


Fig. 8 The relationship between initial plasma concentration and tissue uptake clearance of  $^{125}I$ -rh-EPO by femur (A) and spleen (B) in  $+/+$  (●) and  $W/W^v$  (○) mice.



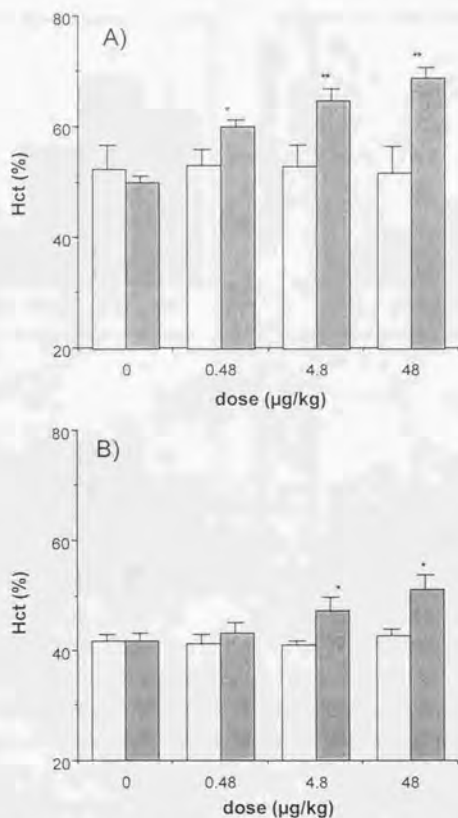


Fig. 9 The effect of repeated administration of rh-EPO on Hct in +/+ (A) and W/W<sup>v</sup> (B) mice. Rh-EPO was administered to +/+ and W/W<sup>v</sup> mice at doses of 0, 0.48, 4.8, and 48  $\mu$  g/kg once a day for 7 days. Hct was measured on the 8th day. Each bar represent mean and S.E. of 3-5 animals. The open bar represents the Hct before rh-EPO treatment. The closed bar represent the Hct after rh-EPO treatment. \*Significant difference from control ( $P < 0.05$ ).

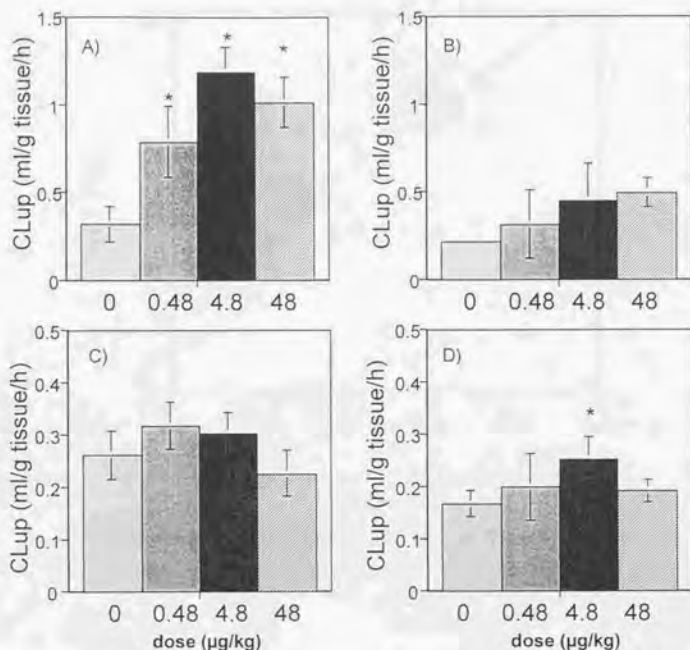


Fig. 10 The effect of repeated administration of rh-EPO on CLup of  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO by spleen and femur in  $+/+$  and  $W/W^v$  mice. rh-EPO was administered to  $+/+$  (A, C) and  $W/W^v$  (B, D) mice at doses of 0, 0.48, 4.8, and 48  $\mu\text{g/kg}$  once a day for 7 days. The CLup of  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO in the spleen (A, B) and femur (C, D) was measured on the 8th day. Each bar represents mean and S.E. of 3-5 animals. \*Significant difference from control ( $P < 0.05$ ).

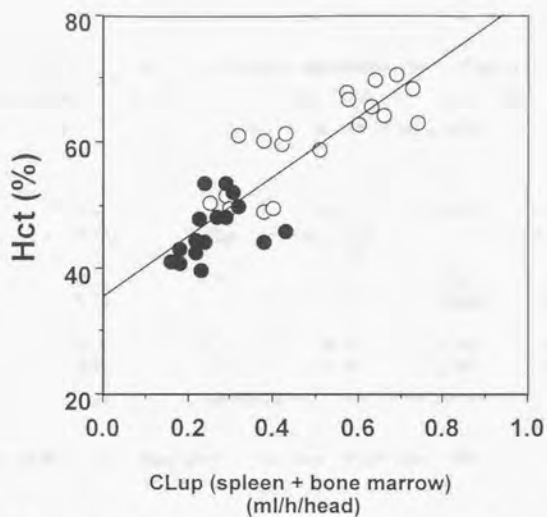


Fig. 11 The relationship between Hct and the sum of CLup by bone marrow and spleen.

TABLE 4 Pharmacokinetic parameters calculated from plasma concentrations of TCA-precipitable radioactivity in W/W<sup>v</sup> and +/+ mice after intravenous administration of <sup>125</sup>I-rh-EPO at the dose of 0.48  $\mu$ g/kg.

	Vc (ml/kg)	Vss (ml/kg)	AUC (ng h/ml)	MRT (h)	CLtotal (ml/kg/h)
W/W <sup>v</sup>	67.5 (7.7)	119 (14)	19.4 (1.3)	4.83 (0.66)	24.7 (1.6)
+/+	52.3 (3.3)	99.1 (8.5)	20.8 (1.8)	4.30 (0.40)	23.0 (0.9)

Values in parenthesis represent computer calculated SD.

TABLE 5 Kinetic parameters for tissue uptake clearance in W/W<sup>v</sup> and +/+ mice.

		Km	Vmax	CLns
W/W <sup>v</sup> mice	femur	10.0 (544 pM) ± 4.1 ng/ml	3.35 ± 1.17 ng/g tissue/h	0.105 ± 0.019 ml/g tissue/h
	spleen	7.93 (431 pM) ± 8.14 ng/ml	2.01 ± 1.70 ng/g tissue/h	0.182 ± 0.034 ml/g tissue/h
+/+ mice	femur	11.4 (619 pM) ± 4.2 ng/ml	7.80 ± 2.36 ng/g tissue/h	0.069 ± 0.033 ml/g tissue/h
	spleen	7.15 (389 pM) ± 2.97 ng/ml	5.94 ± 1.88 ng/g tissue/h	0.132 ± 0.039 ml/g tissue/h

Values represent mean ± calculated SD.



### 3 章

## The Mechanism of Erythropoietin Induced Up-regulation of its Uptake Clearance by Spleen

## 要約

Rh-EPO を反復投与すると脾臓において  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO のレセプター介在性取り込みクリアランスの up-regulation が観察される (1 章)。本研究では、最初に、この増加が EPO の target cell である CFU-E 数の増加に由来するかどうかを検討するために、rh-EPO 処置をした後、脾臓中 CFU-E、BFU-E 数を測定した。脾臓中 CFU-E 数は rh-EPO 処置量依存的に有意な増加を示し、CFU-E 数と脾臓の CLup との間に良い相関が認められた。CFU-E 数は  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の脾臓細胞への特異的な binding 量とも相関した。これらのことから脾臓における CLup の増加は細胞当たりのレセプター数の増加ではなく、標的細胞である CFU-E の増加に起因していることが示唆された。次に、脾臓におけるこのような CFU-E 数の増加は、標的細胞の骨髄から脾臓への移動によるものかどうかについて検討した。 $^{111}\text{In}$ -rh-EPO を用い、RME を利用してラット in vivo で EPO レセプターを持つ CFU-E を標識した。 $^{111}\text{In}$  の骨髄中、脾臓中放射能は、過剰量の rh-EPO 投与により対照群に比べ、有意に減少した。このことより、脾臓で観察された up-regulation の原因が rh-EPO 投与による骨髄中 CFU-E の脾臓への移行のためではないことが示された。次に、 $^3\text{H}$ -thymidine で増殖細胞全体を標識した。 $^3\text{H}$  の骨髄中放射能は、過剰量の rh-EPO 投与により対照群に比べ、有意に減少した。一方、脾臓中放射能は、rh-EPO 投与により、対照群に比べ有意に増加した。このことより、rh-EPO 投与により、骨髄中の増殖細胞が脾臓へ移行したことが示唆された。Percoll 分画法により脾臓中の細胞の状態を調べたところ、脾臓中で増加した細胞は、rh-EPO 処置 1-2 日後では BFU-E に相当する細胞であったが、3-4 日後では CFU-E に相当する細胞であったことより、BFU-E が migrate し、脾臓中で CFU-E に分化・増殖したものと考えられた。脾臓中の BFU-E に相当する細胞を静脈内投与した結果、血液を介して、脾臓へ約 20% が移行するという実験結果もこの考えを支持した。

以上、rh-EPO 投与により、骨髄中 BFU-E が脾臓へ移動し、そこで CFU-E へ分化、増殖することにより、脾臓での up-regulation がみられたものと思われる。本例は機能の up-regulation が細胞の migration 及び subsequent な分化増殖によることを実証した初めての例である。

## 緒言

EPO、G-CSF、GM-CSF といった血液造血因子が、近年、クローニングされ、その生理的役割が明らかにされつつある。また、その遺伝子組み換え産物は、各種血液疾患に使用されている。EPO は、主に腎臓において産生される分子量 30kd の糖タンパクであり、赤芽球系前駆細胞、主に CFU-E に作用し、その分化・増殖の促進作用を有する(28)。現在、rh-EPO は EPO 産生が低下し、貧血を呈する慢性腎不全患者の貧血治療薬として使用されている。

生理活性ペプチドの生理的な役割を明らかにする上で、それらの分布や消失機構を明らかにすることは重要である。多くの生理活性ペプチドの体内動態研究により、生理活性ペプチドの体内動態は、レセプターが分布、消失に寄与することが明らかになった(59)。ヒト G-CSF 誘導体 nartograstim(30-33)および rh-EPO(1 章)のラットにおける体内動態に非線形性がみられ、これら造血因子の全身血中からの消失には骨髄や脾臓といった標的臓器における RME が重要である。さらに、興味深いことに EGF、HGF では標的臓器の肝臓がクリアランス臓器である(22, 38, 39)。多くの生理活性ペプチドは RME を受ける。過剰量のリガンドはレセプターの飽和かレセプターの表面密度の減少(down-regulation)を引き起こし、結果、体内動態が非線形性を示す(33, 38, 55, 59, 63)ことが報告されている。

Rh-EPO 投与により  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の組織取り込みの down-および up-regulation が起こり、この組織取り込みの変動により体内動態の変動が見られた。さらに、ラット、マウスともに rh-EPO 処置後の骨髄、脾臓における  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の CLup の和と Het 値の間に良い相関が認められたことから、薬効レセプターが CLup に関与していると考えられた(1 章, 2 章)。ラット、マウスともに rh-EPO 投与によって引き起こされる  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の CLup の増加は骨髄ではわずかであるのに対し、脾臓では著しく増加し、脾臓において顕著に観察され、up-regulation に組織特異性が認められた(1 章, 2 章)。脾臓における著しい up-regulation は、nartograstim を投与した場合にも認められており、G-CSF レセプターを持つ好中球の脾臓での増加に起因していることが示唆された(31)。一方で EPO の tissue-specific up-regulation のメカニズムは不明である。

本研究では、脾臓における  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の CLup の up-regulation が細胞当たりのレセプターの増加であるのか、標的細胞の増加によるのか、および up-regulation の骨髄、脾臓での違いは何に起因するかを検討した。

## 結果

Rh-EPO を 2 回投与し、脾臓中 CFU-E、BFU-E 数および脾臓細胞への  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の特異的結合を測定した。脾臓中 CFU-E 数は、rh-EPO 処置量依存的に有意な増加を示したが、BFU-E は  $1.5 \mu\text{g/kg}$  処置では有意な増加は示さず、 $25 \mu\text{g/kg}$  の処置量でのみ有意な増加を示した (Fig. 12, Table 6)。同じ条件のラットでの tracer 量の  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO を静脈内投与し、組織取り込み量を血中濃度推移の AUC で normalize することにより CLup を求めた。脾臓における CLup は rh-EPO の処置量依存的に増加した (Fig. 12)(1 章)。CFU-E 数と CLup との間にほぼ原点を通る良い比例関係が認められたが、EPO レセプターの少ないことで知られる BFU-E との間には有意な相関はみとめられなかった (Fig. 12)。さらに CFU-E 数と脾臓細胞の EPO-binding との間にも良い相関関係が認められた (Fig. 12)。このことは EPO レセプターの増加は CFU-E 数の増加に起因していることを示している。

Rh-EPO の投与は脾臓でのみ CLup の増加を示し、骨髄での CLup の増加はわずかである。本研究では脾臓特異的な CLup の up-regulation が標的細胞である CFU-E が骨髄から脾臓へ移行したことに起因するという仮説を立て、この仮説の検証を試みた。 $^{111}\text{In}$ -rh-EPO を静脈内投与し、EPO レセプターによる RME を利用することにより CFU-E を  $^{111}\text{In}$  により標識した。 $^{111}\text{In}$ -rh-EPO の骨髄中放射能は対照群においても経時的に減少したが、過剰量の rh-EPO 投与により対照群に比べ、減少は有意に促進された (Fig. 13)。血球中の放射能は逆に上昇していたことから、骨髄中 CFU-E が、rh-EPO の刺激により CFU-E のまま、または、より分化した形で血液中に放出されたと考えられた (Fig. 14)。一方、脾臓中放射能は過剰量の rh-EPO 投与による上昇は観察されず、むしろ、わずかではあるものの対照群に比べ有意に減少した。このことから上記の仮説は否定され、脾臓のみで観察された up-regulation の原因は rh-EPO 投与によって、骨髄に存在していた CFU-E の脾臓への移行が促進されたためではないことが示唆された。また、他の臓器中放射能は rh-EPO 処置により変化しなかった (Fig. 14)。

$^3\text{H}$ -thymidine を投与し、増殖細胞を標識した場合、 $^3\text{H}$ -thymidine の骨髄中放射能も過剰量の rh-EPO 投与により対照群に比べ、有意に減少した (Fig. 15)。一方、脾臓中放射能は過剰量の rh-EPO 投与により対照群に比べ、有意に増加した。この結果は  $^3\text{H}$ -thymidine 標識された何らかの増殖細胞の他臓器から脾臓への移行が EPO により促進されたことを示唆する。CFU-E ばかりでなく BFU-E も増殖細胞であることから、新たな仮説の一つとして、骨髄中の CFU-E よりも幼若で、EPO レセプターをわずかにしか持たない BFU-E が、脾臓に移行し、そこで CFU-E に分化したことが考えられた。

脾臓で増加した放射能が BFU-E によるかどうかを明らかにするために、Percoll を使い、CFU-E と BFU-E を比重によって分離することを試みた。無処置ラットの isolated bone marrow cells を Percoll により分画し、各フラクションの両細胞数をコロニーアッセイで測定した (Fig. 16)。ラット骨髄中 BFU-E、CFU-E はそれぞれ比重 1.050 および 1.065 に存在し、比重の違いにより CFU-E と BFU-E を分離できることが明らかになった (Fig. 16)。

予め  $^3\text{H}$ -thymidine を投与したラットを rh-EPO 処置後、脾臓を経時的に採取し、脾臓細



胞を同じ方法により分画した。処置 1、2 日後の脾臓では BFU-E に相当する分画の放射能が対照群に比べ増加していたが、CFU-E に相当する分画の放射能の増加はわずかであった。処置 3、4 日後では、BFU-E に相当する分画の放射能の増加はわずかであり、CFU-E に相当する分画の放射能の増加が認められた (Fig. 17)。BFU-E が脾臓に移行し、CFU-E に分化したと考えられた。

$^3\text{H}$ -thymidine により増殖細胞を標識した後、rh-EPO 処置を行い、rh-EPO 処置 2 日後の脾臓細胞を Percoll を用い、比重の違いにより分画し、BFU-E に相当する分画の細胞を得た。この細胞をラットに投与し、組織中放射能を経時的に調べた。投与初期には肺、肝臓に多く分布したが経時的に減少した (Fig. 18)。脾臓は経時的に増加し、投与 24 時間後の放射能は投与量の約 18% であった。この値は、肺、肝臓よりも高かった。骨髄においてはいずれの時間においても検出限界以下であった。BFU-E は血液を介して、脾臓に特異的に居着くことが示唆された。



## 考察

Rh-EPO の投与により、骨髄、脾臓において CLup の一過的な down-regulation がみられ、その後、脾臓では up-regulation がみられた(1章)。EPO レセプターは主に CFU-E にみられることから、CLup の up-regulation は、脾臓における CFU-E の増加によるものと推測した。実際、脾臓における  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の CLup と CFU-E 数との間に相関を見出し、さらに CFU-E 数と  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の脾臓細胞への binding との間にも良い相関が認められた(Fig.12)。このことから脾臓における CLup の増加は細胞当たりのレセプター数の増加ではなく、標的細胞である CFU-E の増加によるものであることが明らかになった。同様な CFU-E 数の増加によるレセプターの up-regulation は内因性 EPO の増加時においても観察され、赤羽らは、貧血による内因性 EPO の増加に伴う骨髄中 CFU-E と骨髄細胞への  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の結合との間に良い相関があることを報告した。このような高濃度 EPO 存在下における標的細胞数の増加は EPO 消失効率の増加につながるから、EPO 濃度維持のための一つの homeostatic regulator であるのかもしれない。同様な現象は G-CSF においても認められ、桑原らは G-CSF 誘導体 nartogastim 投与後、骨髄、脾臓中の G-CSF レセプターの一過的な down-regulation がみられ、脾臓においては、その後 up-regulation がみられることを報告した(30-33)。この up-regulation は G-CSF レセプターを持つ好中球の脾臓での増加に起因していることが示唆された。このように G-CSF 投与によるレセプターの up-regulation においても target cell の増加が原因である。

本研究で骨髄、脾臓における CLup の up-regulation のかかり方の違いが標的細胞である CFU-E が骨髄から脾臓へ移行したことに起因するという仮説を立て、 $^{111}\text{In}$ -rh-EPO を静脈内投与し、組織中放射能を経時的に測定することにより、この仮説の検証を試みた(Fig.13)。EPO レセプターは主に CFU-E に存在し、 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO は RME により細胞に取り込まれることが知られている。 $^{111}\text{In}$ -rh-EPO を静脈内投与することにより  $^{111}\text{In}$ -rh-EPO は RME により CFU-E に取り込まれると考えられる。細胞内に取り込まれた  $^{111}\text{In}$  は細胞内の ferritin といった鉄結合性タンパクに結合し、細胞からの efflux は極めて遅いと考えられている。実際この  $^{111}\text{In}$  の性質を利用して、各種タンパクを  $^{111}\text{In}$  で標識し、タンパクの CLup の評価に利用されている(4)。本研究において、 $^{111}\text{In}$ -rh-EPO を用い、in vivo で、EPO レセプターによる RME を利用することにより CFU-E を  $^{111}\text{In}$  により標識することを試みた(Fig.13)。 $^{111}\text{In}$ -rh-EPO 投与 12 時間後の骨髄中放射能は脾臓中放射能の約 20 倍であり(Fig.13)、この値は  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO で評価した CLup の比(約 13 倍)に近い値であった(1章)。さらに、過剰量の rh-EPO 投与により、 $^{111}\text{In}$ -rh-EPO の骨髄、脾臓への分布は阻害された(data not shown)。これらのことより、 $^{111}\text{In}$ -rh-EPO により CFU-E が特異的に標識されたと考えられた。 $^{111}\text{In}$ -rh-EPO の骨髄中放射能は対照群においても経時的に減少したが、過剰量の rh-EPO 投与により対照群に比べ、減少は有意に促進された(Fig.13)。脾臓中放射能も対照群に比べ有意に減少した。これらの結果は EPO が両臓器ともににおいて、CFU-E の放出を促進することを示唆する。このことから上記の仮説は否定され、脾臓のみで観察された up-regulation の原因は rh-EPO 投与によって、

骨髄に存在していた CFU-E の脾臓への移行が促進されたためではないことが示唆された。

$^3\text{H}$ -thymidine を投与し、増殖細胞を標識した場合、 $^3\text{H}$ -thymidine の骨髄中放射能も過剰量の rh-EPO 投与により対照群に比べ、有意に減少した (Fig. 15)。一方、脾臓中放射能は過剰量の rh-EPO 投与により対照群に比べ、有意に増加した。この結果は  $^3\text{H}$ -thymidine 標識された何らかの増殖細胞が EPO 投与により他の臓器から脾臓に移行してきたことを示している。Nijhof ら(50)は rh-EPO 投与により、マウスの骨髄中 BFU-E が減少し、脾臓中 BFU-E が増加するという事実より、rh-EPO により BFU-E の骨髄から脾臓への再分布が起きることを示唆している。そこで新たに、骨髄中 BFU-E が、脾臓に移行し、そこで CFU-E に分化・増殖することにより脾臓のみで up-regulation がみられると仮定した。本研究ではこの仮説をより direct に証明するため、 $^3\text{H}$  放射標識された細胞の脾臓への移行の kinetics を測定することを試みた (Fig. 17)。ラットの BFU-E、CFU-E の比重は明らかでないが、マウスの BFU-E、CFU-E は比重が異なることが示唆される (49)。脾臓で増加した放射能が BFU-E によるかどうかを明らかにするために、Percoll を用い、CFU-E と BFU-E を比重によって分離することを試みた。ラット骨髄中 BFU-E、CFU-E はそれぞれ比重 1.050 および 1.065 に存在し (Fig. 16)、それぞれヒト、マウスの CFU-E と BFU-E の比重に類似していることが明らかになった (42, 49)。脾臓細胞を Percoll により分画した結果、処置 1, 2 日後の脾臓では BFU-E に相当する分画の放射能が増加し、処置 3, 4 日後では、BFU-E に相当する分画の放射能の増加はわずかであり、CFU-E に相当する分画の放射能の増加が認められた (Fig. 17)。BFU-E が脾臓に移行し、CFU-E に分化したと考えられた。

この仮説を検証する目的で BFU-E が脾臓に選択的に移行することを証明することを試みた。 $^3\text{H}$ -thymidine により標識した BFU-E に相当する細胞をラットに投与し、組織中放射能を経時的に調べた。投与初期には肺、肝臓に多く分布したが、これは非特異的な分布と思われる。なぜなら、この分布は経時的に減少したためである (Fig. 18)。これに対し、脾臓は経時的に増加し、24h では他臓器よりも高かった。BFU-E は血液を介して、脾臓に特異的に居着くことが示唆された。骨髄の放射能はいずれの時点においても検出限界以下であったが、これは BFU-E が骨髄に移行しないことを意味していない。なぜなら、投与放射能が少ないこと、大腿骨から得られる骨髄量が極めて少ないことが、検出限界以下になった理由かもしれない。BFU-E に相当する細胞の肝臓、肺への分布は毛細血管への非特異的なひっかかりかもしれない。水野ら(45)は、ガン細胞が肺、肝臓に多く分布し、その分布は細胞の大きさに起因する毛細血管への物理的なひっかかりに起因することを示した。BFU-E の脾臓への特異的な定着のメカニズムは明らかでない。本研究では、c-kit (stem cell factor receptor) の mutation マウス (W/W<sup>v</sup> マウス) では、rh-EPO による脾臓の  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の CLup の up-regulation がみられないことを報告した (2 章)。この結果は up-regulation に c-kit が必須であることを示唆している。この W/W<sup>v</sup> マウスの結果より、BFU-E の脾臓への定着に以下のメカニズムが推測される。c-kit の ligand である stem cell factor は造血微環境を形成するストロマ細胞に膜結合型蛋白として存在している (11)。正常骨髄細胞、肥満細胞の c-kit は stem cell factor に結合し、その作用で、それら細胞表面のインテグリンが活性化し、造血微環境内の細胞表面が extracellular

matrix に存在するフィブロネクチンとの結合性が増加する (6, 27)。この結合はこれら細胞の造血微小環境内での安定性を上昇させると考えられる。W/W<sup>v</sup> マウスの細胞は c-kit の mutation により、インテグリンの活性化がみられず、フィブロネクチンに結合しない (23)。以上を考慮にいと、骨髄から遊離した BFU-E は脾臓にいき、正常細胞では脾臓中の stem cell factor に結合し、インテグリンの活性化により脾臓内のフィブロネクチンに結合するが、W/W<sup>v</sup> マウスの細胞では stem cell factor と結合した後、インテグリンの活性化がおきないことにより脾臓に居着かないと考えられる。

EPO 投与により脾臓において対照ラットに比べ、BFU-E の増加が認められた。EPO 投与により骨髄中 <sup>3</sup>H-thymidine 標識増殖細胞が減少すること、BFU-E は骨髄、脾臓、血液以外の臓器において認められないことから、脾臓において増加した BFU-E は骨髄からきたものと考えられる。従って、EPO による脾臓での BFU-E の上昇の理由は (i) BFU-E の骨髄からの release が増えた (ii) BFU-E の脾臓への定着が EPO により促進したという2つの可能性がある。後者の可能性は unlikely である。というのも BFU-E fraction の細胞の脾臓への分布は EPO により促進されない。前者の可能性が強い。最近、末梢血中 BFU-E の c-kit 発現は骨髄中 BFU-E での発現量に比べ少ないことから、骨髄からの BFU-E の遊離にも c-kit の関与が示唆されている (65)。c-kit 欠損マウスで up-regulation が観察されなかったという先の結果を考慮すると、c-kit を介した BFU-E の骨髄からの放出が up-regulation に必須であろう。EPO 投与が BFU-E の骨髄からの放出をどのように促進したか、その分子メカニズムは不明である。今後さらなる検討が必要である。

<sup>111</sup>In 標識タンパクは取り込まれた臓器中に <sup>111</sup>In 放射能が滞留する (4)。すなわち、臓器中放射能の量比が、そのタンパクの消失に対する寄与率を示していると考えられる。EPO は飽和性と非飽和性クリアランス機構により、消失している。飽和性クリアランスは骨髄、脾臓による RME であることを明らかにした (1 章)。非飽和性クリアランスに一部腎臓が関与していることが示唆されている (1 章、26) が、他の臓器の寄与については明らかになっていない。

<sup>111</sup>In-rh-EPO 投与 3 6 時間後の放射能は筋肉、皮膚にそれぞれ 15%, 9% 分布している。この分布量は骨髄の 12% とほぼ同等な値であり、この <sup>111</sup>In-rh-EPO の筋肉、皮膚への分布は筋肉、皮膚が rh-EPO のクリアランス部位として機能していることを示唆している。しかし、<sup>125</sup>I 標識体を用いた実験では、投与 2 4 時間後の筋肉、皮膚の放射能はそれぞれ 0.8%, 6% であり、ほとんど分布していない (66)。<sup>125</sup>I 標識タンパクは代謝を受けると放射能が細胞外に efflux されることから、この時間では既に大部分代謝されていると考えられる。さらに、ラットに rh-EPO を皮下投与した時のバイオアベイラビリティ (AUC<sub>sc</sub>/AUC<sub>iv</sub>) が約 0.5 である (21) ことから、筋肉、皮膚での代謝が示唆される。

これらの結果から、rh-EPO 処置によりまず骨髄中の BFU-E が血液中に放出され、脾臓に移行し、そこで CFU-E に分化、増殖することにより、脾臓で著しい CFU-E の増加が認められたと考えられた。脾臓における CFU-E の増加により、脾臓中 EPO レセプターが増加し、<sup>125</sup>I-rh-EPO の CLup の増加が認められたと考えられる。本例はレセプター介在性クリアランスの up-regulation が細胞の migration 及びその後の分化増殖によることを実証した初めての



例である。



FIG. 11. The diagram shows the mechanical system. The central vertical rod is fixed to the frame. The horizontal rod is attached to the central rod at its midpoint. A spring is connected to the horizontal rod and the central rod. A weight is suspended from the horizontal rod. The diagram is labeled with various components and dimensions.

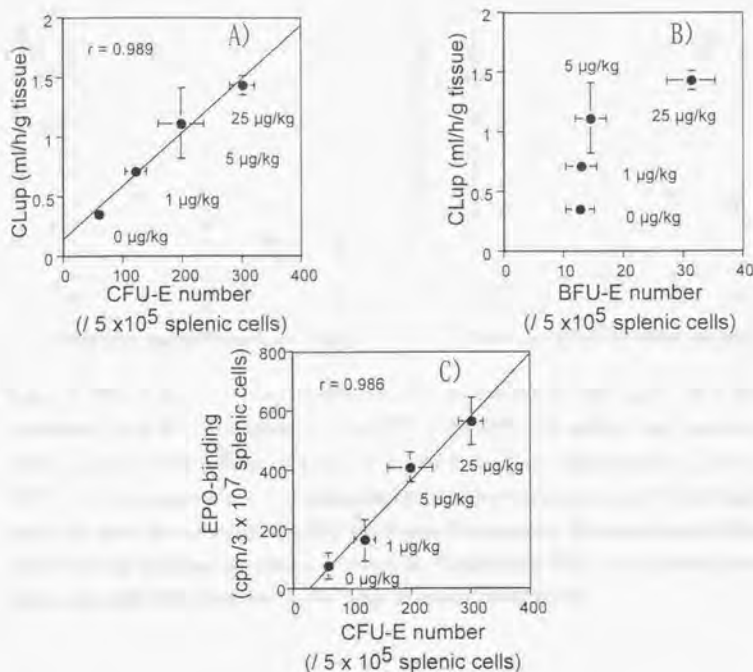


Fig.12 Relationship between the number of CFU-E and CLup(A), BFU-E and CLup(B), CFU-E and EPO-binding(C) in spleen in EPO-treated rats. Rh-EPO was administered twice over four days to rats at doses of 0, 1, 5 and 25 µg/kg. The number of CFU-E and BFU-E in spleen was measured on day 4. Values are means  $\pm$  S.D. for 3 rats. The CLup was obtained from reference 19.



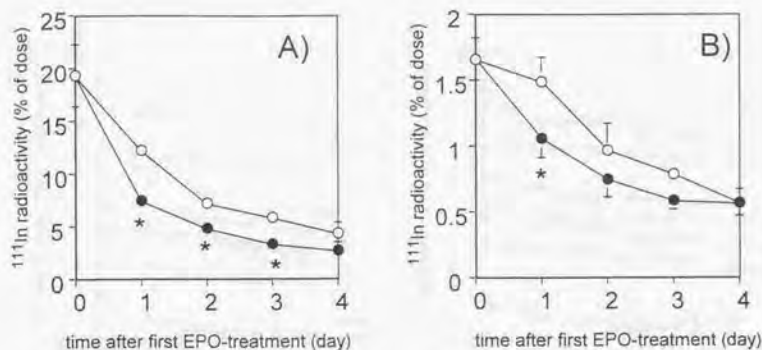


Fig. 13 The change of  $^{111}\text{In}$ -radioactivity in bone marrow(A) and spleen(B) following treatment with(●) or without(○) rh-EPO. Rh-EPO, 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , was administered intravenously to rats both at 12 h and 60 h after intravenous administration of  $^{111}\text{In}$ -rh-EPO. Values represent the  $^{111}\text{In}$ -radioactivity in whole organ, normalized by the injected dose, and were shown as mean  $\pm$  S.D. for 3 rats. Comparisons of means were performed using one-way analysis of variance followed by Tukey's test. The asterisk represents the significant difference compared to the value in control rats( $P < 0.05$ ).

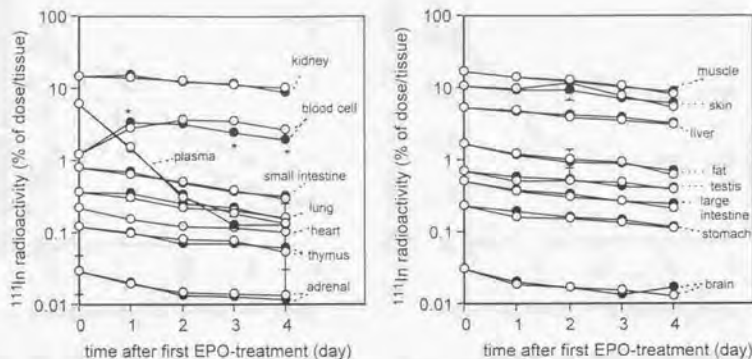


Fig. 14 The change in  $^{111}\text{In}$ -radioactivity in tissues following treatment with (●) or without (○) rh-EPO. Rh-EPO, 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , was administered intravenously to rats both at 12 h and 60 h after intravenous administration of  $^{111}\text{In}$ -rh-EPO. Values represent the  $^{111}\text{In}$ -radioactivity in whole organ, normalized by the injected dose, and are shown as mean  $\pm$  S.D. for 3 rats. To calculate the radioactivity per whole organ for skin, muscle and blood cell, it is assumed that the weights of these organs were 43.7 g, 125.0 g and 8.8 g, respectively. Comparisons of means were performed using one-way analysis of variance followed by Tukey's test. The asterisk represents the significant difference compared to the value in control rats ( $P < 0.05$ ).

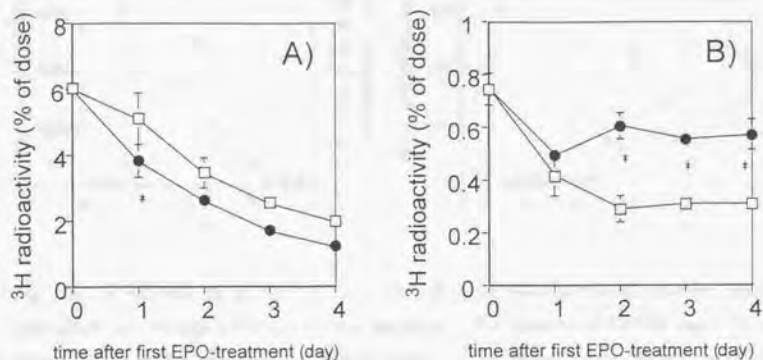


Fig. 15 The change of  $^3\text{H}$ -radioactivity in bone marrow(A) and spleen(B) following treatment with(●) or without(○) rh-EPO. Rh-EPO, 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , was administered intravenously to rats both at 12 h and 60 h after intravenous administration of  $^3\text{H}$ -thymidine. Values represent the  $^3\text{H}$ -radioactivity in whole organ, normalized by the injected dose, and are shown as mean  $\pm$  S.D. for 3 rats. Comparisons of means were performed using one-way analysis of variance followed by Tukey's test. The asterisk represents the significant difference compared to the value in control rats( $P < 0.05$ ).

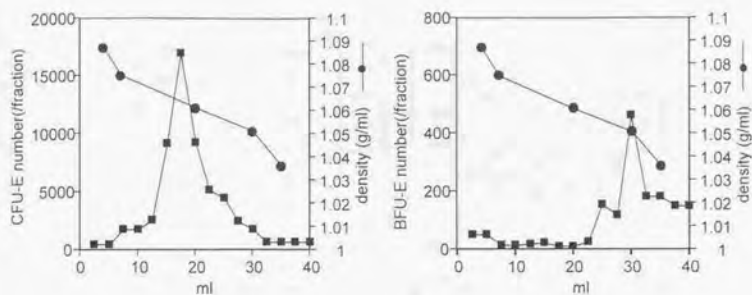


Fig. 16 Fractionation of CFU-E and BFU-E from isolated bone marrow cells by centrifugation through a Percoll density gradient. The number of CFU-E and BFU-E in each fraction were measured by colony assay. The closed circle shows the density markers.

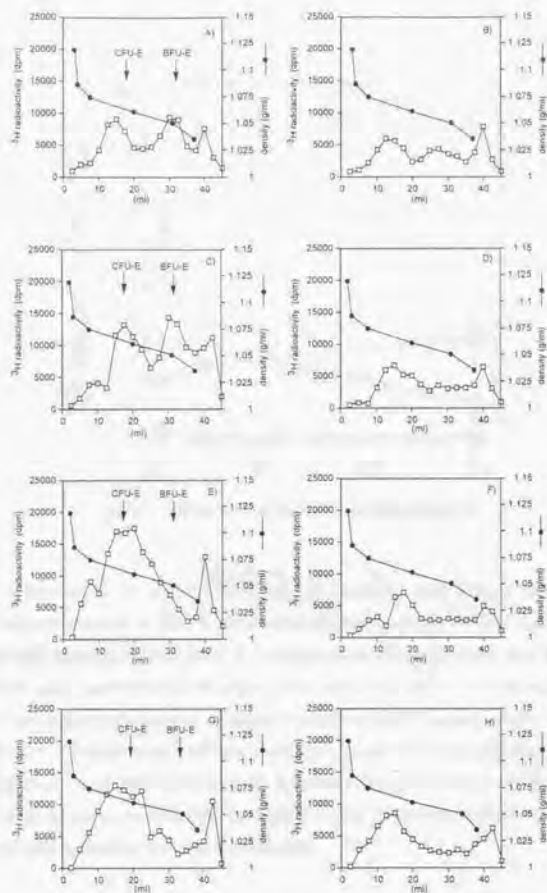


Fig. 17 The change of  $^3\text{H}$ -radioactivity in fractions from isolated splenic cells by centrifugation through a Percoll density gradient during rh-EPO treatment. rh-EPO, 25  $\mu\text{g/kg}$ , was administered intravenously to rats both at 12 h and 60 h after intravenous administration of  $^3\text{H}$ -thymidine. Splenic cells were isolated at 1 (A, B), 2 (C, D), 3 (E, F), and 4 (G, H) days after  $^3\text{H}$ -thymidine administration from control (B, D, F, H) and rh-EPO-treated (A, C, E, G) rats and fractionated by centrifugation through a Percoll density gradient. The open square represents the  $^3\text{H}$ -radioactivity, the closed circle shows the density markers.



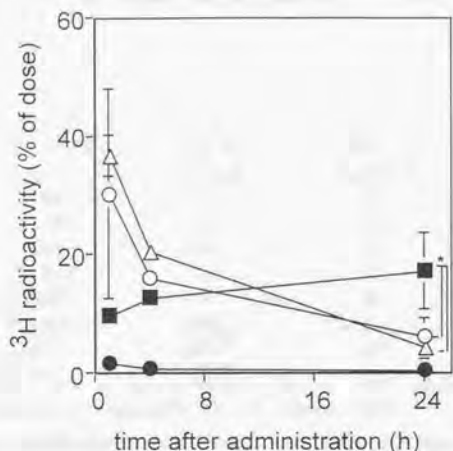


Fig. 18  $^3\text{H}$ -radioactivity in spleen(■), liver(○), lung(△) and kidney (●) in rats after intravenous administration of the  $^3\text{H}$ -thymidine labeled cells in BFU-E fraction. The  $^3\text{H}$ -thymidine-labeled splenic cells in BFU-E fraction were obtained from rats 2 days after rh-EPO-treatment, and injected intravenously into untreated rats. No  $^3\text{H}$ -radioactivity was detected in blood and bone marrow. Values represent the  $^3\text{H}$ -radioactivity in whole organ, normalized by the injected dose, and are shown as mean  $\pm$  S.D. for 3 rats. Comparisons of means among liver, lung and spleen at 24 h after administration were performed using one-way analysis of variance followed by Tukey's test. Another independent experiment was performed and a similar result was obtained.

TABLE 6 Effect of EPO-treatment<sup>a)</sup> on cell numbers and tissue uptake clearance in spleen.

	spleen weight (g)	CFU-E (/5x10 <sup>5</sup> cells)	BFU-E (/5x10 <sup>5</sup> cells)	CLup <sup>b)</sup> (ml/g tissue/h)
control	0.795 (0.106)	59 (9)	13 (2)	0.350 (0.068)
1 µg/kg	0.894 (0.191)	122* (19)	13 (3)	0.710* (0.049)
5 µg/kg	1.353* (0.140)	198* (38)	15 (3)	1.11* (0.30)
25 µg/kg	1.852* (0.151)	301* (22)	31* (4)	1.43* (0.08)

Each value represents mean(S.D.) of three rats.

a) Rh-EPO was administered twice over four days to rats at the dose of 0, 1, 5 and 25 µg/kg.

b) The CLup was obtained from reference 19.

\*: significant difference from control(P<0.05)

#### 4 章

### Immunological Response to Repeated Administration of Recombinant Human Erythropoietin in Rats: Biphasic Effect on its Pharmacokinetics

## 要約

$^{125}\text{I}$ -rh-EPO をラットに反復皮下投与したときの、 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の体内動態の変動について検討した。 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO を週 1 回 4 回にわたって皮下投与した際、10 例中 8 例のラットで、4 回目投与時の血漿中濃度はほとんど検出されなかったが、残り 2 例は対照ラットと同等かそれ以上の増加がみられた。 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の代わりに vehicle を 3 回投与した対照ラットでは  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO 投与 1 回目と同様の血漿中濃度推移を示した。 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO 反復投与群ではすべての個体で抗体が検出された。2 例はいずれも残り 8 例よりも抗体量が少なかった。種々の volume のラット抗 rh-EPO 抗血清をラットに静脈内投与した後、 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO を  $0.1 \mu\text{g/kg}$  静脈内投与し、血漿中 TCA 沈殿画分放射能推移を調べた。抗 rh-EPO 抗血清を増やすに従い、 $T_{1/2}(\beta)$ 、MRT は有意に延長し、 $CL_{\text{total}}$  は減少した。さらに抗 rh-EPO 抗血清の投与量を増加させると  $T_{1/2}(\beta)$ 、MRT は逆に短縮し、 $CL_{\text{total}}$  は増加した。これらの結果は、抗体の産生量が rh-EPO の pharmacokinetics に biphasic な影響を与えることを示唆した。すなわち、少量産生された場合は  $CL_{\text{total}}$  は減少し、EPO の血中滞留性は増加するが、大量に産生された場合は、 $CL_{\text{total}}$  は増加し、EPO は血中から速やかに消失することが示唆された。

## 緒言

EPO は、G-CSF、GM-CSF といったものを含む血液造血因子の 1 つであり、主に腎臓において産生される分子量 30kd の糖タンパクである(28)。EPO は、主に CFU-E に作用し、分化・増殖の促進作用を有する。現在、rh-EPO は慢性腎不全患者の貧血治療薬として使用されている。これらの患者では EPO 産生が低下し、貧血を呈していることから、rh-EPO の投与により貧血の著しい改善が認められている。

多くの生理活性ペプチドは RME を受け、体内動態が非線形性を示す(38, 55)ことが明らかになりつつある。EPO も RME により消失するため、pharmacokinetics が非線形性を示すことを明らかにした(1 章)。その研究において、rh-EPO の投与により、標的臓器におけるレセプター介在性取込みの down-regulation, up-regulation がみられ、これらにより rh-EPO の体内動態に変動がみられることを見いだした。これらの実験は、1 週間以内の短期なものであり、抗体の影響は少ないと考える。しかし、生理活性ペプチドは前臨床試験において、マウス、ラットといった異種動物で薬効、安全性、薬物動態等を評価しており、長期にわたる試験も必要である。しかし、ヒト型生理活性ペプチドを異種動物に投与するため、長期にわたる試験においては抗体が産生され、生理活性ペプチドの薬効を著しく減少させることがある。rh-EPO の場合もマウスに繰返し投与すると、薬効の著しい減少がみられている(5)。生理活性ペプチドに対する抗体が産生された場合の、それら生理活性ペプチドの体内動態を明らかにすることは薬効、安全性を評価する上において極めて重要である。本研究において、抗体産生が rh-EPO の体内動態に影響を与え、その影響が biphasic であることを報告する。



## 結果

$^{125}\text{I}$ -rh-EPO をラットに週 1 回 4 回にわたって皮下投与したときの、1 および 4 回目における血漿中濃度推移を Fig. 19 に示した。 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO 初回投与時の血漿中免疫反応性放射能はすべてのラットにおいて投与後 10-12 時間後に最高血漿中濃度を示し、以後約 10 時間の半減期で減少した (Fig. 19)。しかし、 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO 4 回投与時の血漿中 TCA 沈殿画放射能は、No. 6, 9 のラットを除き、ほとんど上昇しなかった (Fig. 19)。 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の代わりに vehicle を 3 回投与した対照ラットでは  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO 投与 1 回目と同様の血漿中濃度推移を示した (Fig. 19)。抗体の有無を調べたところ、 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO 反復投与群ではすべての個体で抗体が検出されたが、対照群では検出されなかった。

4 回目投与後の際にも血漿中濃度の上昇がみられた No. 9 の投与 10 時間後の血漿のゲル濾過パターンをみると血漿中の放射能の大部分は  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO よりも高分子量フラクション (232-669 kd) に溶出された (Fig. 20)。血漿中濃度の上昇がほとんどみられなかった No. 5 のラットの血漿中では  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO、高分子量フラクションともにほとんど放射能はみられず、ヨードイオンの溶出位置に相当するフラクションにのみ放射能が認められた (Fig. 20)。対照ラットの血漿では主に  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO に相当する放射能とヨードイオンに相当する放射能が認められた (Fig. 20)。 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO と各ラット血清中の immunoglobulin との結合を immunoglobulin 抗体を用いて測定した。Fig. 21 に Scatchard plot を Table 7 に結合パラメータを示した。血漿中濃度の上昇しないラットの血清は、上昇したラット (No. 6, 9) の血清に比べ、Bmax が大きい値であった (Table 7)。AUC<sub>0-48h</sub> と Bmax とをプロットした (Fig. 22)。AUC<sub>0-48h</sub> の高い 2 例はいずれも Bmax が低く、それらの Bmax よりも高い Bmax を持つラットでは AUC<sub>0-48h</sub> は極めて低かった (Fig. 22)。すなわち、ある濃度以上の抗体が産生されると一気にクリアランスが上昇したことが示唆された (Fig. 22)。

ラット抗 rh-EPO 抗血清をラットに 5, 50, 500  $\mu\text{l}$  静脈内投与した後、 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO を 0.1  $\mu\text{g/kg}$  静脈内投与した時の血漿中 TCA 沈殿画放射能推移を Fig. 23 に示した。抗 rh-EPO 抗血清を 5, 50  $\mu\text{l}$  と増やすに従い、T<sub>1/2</sub>( $\beta$ ) は 3.15h から 4.66h, 7.30h へ有意に延長し、さらに抗 rh-EPO 抗血清を 500  $\mu\text{l}$  に増加させると、3.81h へ短縮した (Table 8)。クリアランスは抗 rh-EPO 抗血清を 5, 50  $\mu\text{l}$  と増やすに従い、16.6ml/h/kg から 10.5ml/h/kg, 6.70ml/h/kg へ有意に減少し、さらに抗 rh-EPO 抗血清 500  $\mu\text{l}$  に増加させると、21.4ml/h/kg に増加した (Table 8)。分布容積は抗 rh-EPO 抗血清の投与による変動はみられなかった (Table 8)。

## 考察

近年、遺伝子組換え技術の急速な進歩によりヒト型生理活性蛋白、ペプチドが治療薬として使用されてきている。しかし、生理活性ペプチドは前臨床試験では、ヒト型の蛋白を動物に投与することになる。従って、抗体の産生が懸念される。本研究で、抗体の産生による pharmacokinetics への影響が biphasic であることを明らかにした。

$^{125}\text{I}$ -rh-EPO  $1 \mu\text{g/kg}$  をラットに週 1 回、4 回にわたり反復皮下投与したときの血漿中濃度推移について検討した (Fig. 19)。その結果、全てのラットに抗体が産生され、抗体の産生に起因すると考えられる体内動態の変化が認められた (Fig. 19)。今回の結果から 2 つの場合が認められた。すなわち 4 回目投与後の血漿中 TCA 沈澱画分放射能推移はほとんどのラットで 1 回目投与後あるいは対照群の各推移を下回ったが、10 個体中 2 個体 (ラット No.6 および No.9) に関してはこれらと異なる放射能推移を示した (Fig. 19)。このように抗体が産生された場合、血中安定性を著しく低下させるケースと低下させないか、むしろ増加させるケースがあることが明らかになった。rh-EPO 以外の他のタンパク質に関する限り、抗体の産生と pharmacokinetics の関係についてはいくつかの報告がある。牛血清アルブミン (BSA) により抗体 (IgG) を産生させたラットにおける  $^{125}\text{I}$ -BSA の TCA 沈澱画分放射能の血中消失半減期は、対照ラットでは 24h であるのに対して 6min と著しく短く、これは血中で BSA-IgG 複合体がつくられ、肝細胞にとりこまれたことによると報告されている (64)。また、eel calcitonin を反復投与し、抗体が産生された患者の calcitonin 投与後の血清中 calcitonin 濃度は抗体が産生されていない患者よりも著しく高いことが報告されている (60)。さらに rINF- $\alpha$  2A では 28 日間の連続筋肉内投与により大部分のラットに中和抗体が産生され、抗体価の高いものは著しい血中濃度の低下がみられたものの、抗体価の低いものは血中濃度が上昇していた (61)。このように、抗体が産生された場合の血中動態は血中からすみやかに消失する場合と持続的に維持される場合の 2 つの場合があることが示唆される。

これら異なる血漿中放射能濃度推移を示した原因として、 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO と抗体の結合性の違いが考えられる。そこで、血漿中での  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の存在状態をゲル過クロマトグラムにより調べた (Fig. 20)。その結果、No.9 のラット血漿では分子量 232k-669k に免疫複合体のダイマー、トリマーの分子量に相当する高分子が認められ、遊離型の  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO はほとんど認められなかった (Fig. 20)。このことは抗体産生が血中安定性を低下させなかった No.9 のラットにおいても  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO は抗体と結合した状態で血中に存在していることを示している (Fig. 20)。一方、抗体の産生によって血中安定性が著しく低下した No.5 のラットにおいてはほとんどが分解物として存在し (Fig. 20)、血中に入ったあと著しく安定性が低くなったと考えれば説明可能である。免疫複合体の観察されなかった rat No. 5 の血中にも抗体は存在しており、その濃度はむしろ複合体の観察された rat No.9 よりも高いレベルであった (Table 7)。則ち、各抗体の Bmax, Kd についてラット間で比較したとこ

ろ (Fig. 21)、血中安定性が低下しなかった 2 例では、他の 8 例に比べ Bmax が低下しており、親和性よりも結合量の違いが動態を変動させている要因であることが示唆された (Fig. 21, Table 7)。抗体の産生が低い場合には、血中安定性が維持され、高いレベルになった場合に著しく安定性が悪くなることが示唆された。

このことは次の結果からも直接証明された。すなわち、ラット抗 rh-EPO 抗血清を 5, 50 および 500  $\mu$ l 投与したラットに  $^{125}$ I-rh-EPO を静脈内投与した後の、血漿中 TCA 沈殿画分放射能の T1/2( $\beta$ ) は、抗 rh-EPO 抗血清の投与量を 5, 50  $\mu$ l と増やすに従い、対照群に比較して延長し、更に 500  $\mu$ l に増やすと逆に対照群より短くなった (Fig. 22, Table 8)。また、CLtotal についても T1/2( $\beta$ ) の結果と同様に、抗 rh-EPO 抗血清の投与量 5, 50  $\mu$ l では小さくなり、500  $\mu$ l では大きくなった (Fig. 22, Table 8)。さらに抗 rh-EPO 抗血清を 2 ml 投与したラットは T1/2( $\alpha$ ) が 0.08 h, T1/2( $\beta$ ) が 2.35 h と非常に短くなり、CLtotal も 47.2 ml/h/kg に増加した (data not shown, n=1)。以上の結果から、抗 rh-EPO 抗血清投与量が少量のときには、T1/2( $\beta$ ) は延長し、CLtotal は減少するが、さらに抗 rh-EPO 抗血清投与量が増えるに従って、T1/2( $\beta$ ) は短縮し、CLtotal は増加することが明らかになった。

抗原と結合した抗体のクリアランスは、抗原抗体複合体の大きさの大きいもの (トリマー以上) は数分以内に肝臓によって除かれるため小さいもの (モノマー、ダイマー) に比べ消失が速いことが報告されている (53)。従って抗体量により pharmacokinetics への影響が変化する原因は次のように考えれば説明できる。抗体の量が少ない時、 $^{125}$ I-rh-EPO は抗体と結合しモノマーあるいはダイマーの形で存在し、この複合体は EPO のクリアランス機構による消失から免れるため、 $^{125}$ I-rh-EPO のクリアランスが小さい。一方、抗体量が多い場合、 $^{125}$ I-rh-EPO と抗体はトリマー以上の高分子複合体を形成するため、肝臓で速やかに取り込まれ分解される。モノクローナル抗体投与後 rIFN を投与すると血漿中濃度が持続し、AUC が約 15 倍になるという報告 (14) やモノクローナル抗体と rIL-2 を静脈内投与したとき rIL-2 単独で投与したものに比較して CLtotal が約 1/6 に低下したという報告がある (56)。モノクローナル抗体では、モノマーの抗原抗体複合体のみ形成される。モノクローナル抗体ではクリアランスの減少のみがみられ、クリアランスの増加はみられないと考えられる。

生理活性ペプチドを医薬品として開発する場合、臨床、非臨床ともに抗体の産生される可能性ある ligand と結合し、ligand と receptor の結合を阻害する抗体いわゆる中和抗体が産生されたことにより薬効が低下することが考えられる。しかし、receptor を阻害しない抗体が産生されても、その量次第で高分子量の免疫複合体が形成され、血液中から速やかに消失することにより薬効を示さない可能性も考えられる。我々の今回の研究においても 10 例中 8 例でこの現象が見られている。一方、10 例中 2 例においてみられた抗体の産生量が少なく血中での安定性が増すような場合は単純ではない。Eel calcitonin を反復投与し、抗体が産生された患者で血漿中 calcitonin 濃度の上昇がみられ、血中カルシウム濃度

の低下もみられている(60)。このことは、たとえ抗体が産生されても、血中から除去されるほどのレベルでなく、しかも抗体が ligand の receptor 結合を阻害しない場合には免疫複合体は薬効を示す可能性があることを示している。このように生理活性ペプチドに対する抗体の産生とそれに伴う生理活性ペプチドの体内動態の変化を明らかにすることは薬効、安全性を評価する上において極めて重要である。



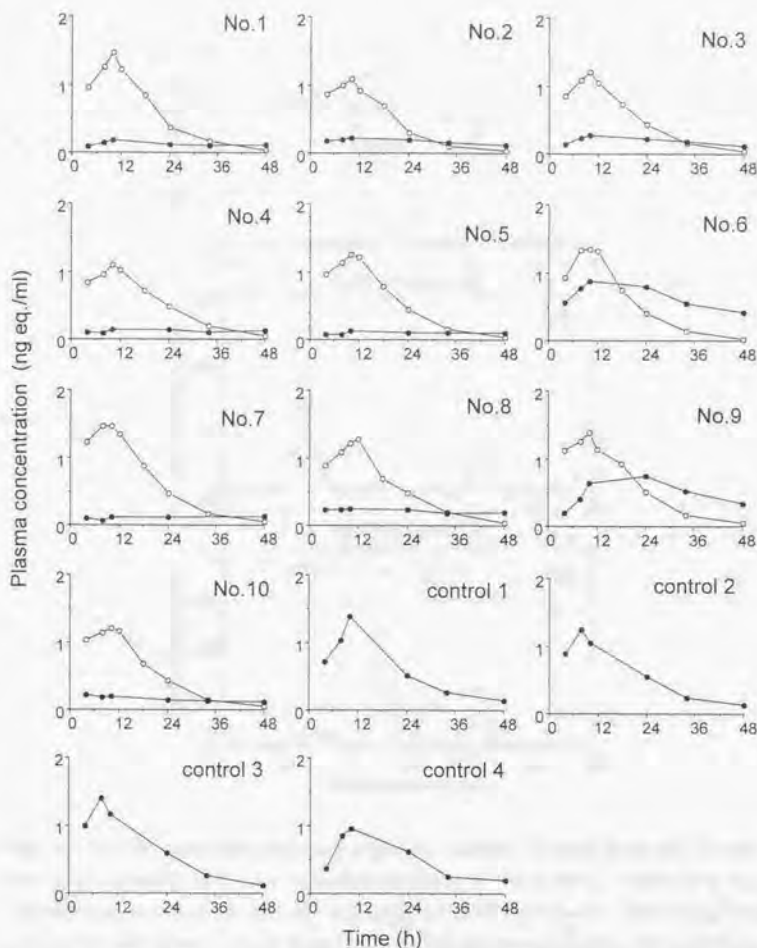


Fig. 19 Plasma concentration of radioactivity following repeated subcutaneous administration of  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO.  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO was administered to rats (No. 1 to 10) at a dose of  $1 \mu\text{g/kg}$  once a week for 4 weeks. The plasma concentration ( $\circ$ ) after 1st-administration represents immunoreactive radioactivity. The plasma concentration ( $\bullet$ ) after 4th-administration represents TCA-precipitable radioactivity. The control rats (Control 1 to 4) received the vehicle solution three times instead of three sequential administrations (from 1st to 3rd) of  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO.



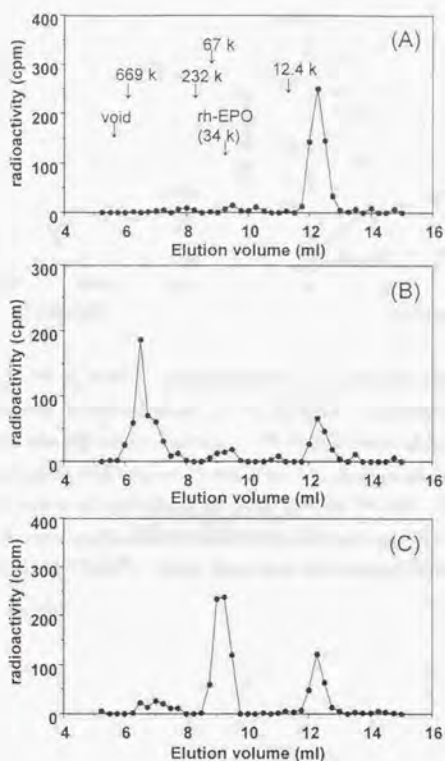


Fig. 20 Gel filtration chromatogram of plasma samples obtained from rat No.5(A), 9(B) and control(C) 10 h after 4th-administration of  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO.  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO was administered to rats at the dose of  $1 \mu\text{g/kg}$  once a week for 4 weeks. The control rats received vehicle solution three times instead of three sequential administration (from 1st to 3rd) of  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO.

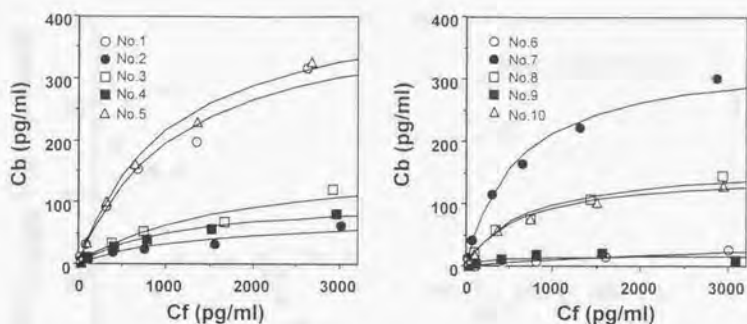


Fig. 21 Binding of  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO to immunoglobulin in serum obtained from rats given repeated subcutaneous administration of  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO. Individual rat serum was obtained 96 h after the 4th administration.  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO was added to serum diluted 10000-fold. The mixture was allowed to stand for 4 h, then incubated for 1 h with Bio Mag Goat anti-Rat IgG and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. Five hundred  $\mu\text{l}$  supernatant and the precipitated fraction were counted in a gamma counter. Binding parameters are shown in Table 7. Solid lines were obtained by fitting using Eq. 9.

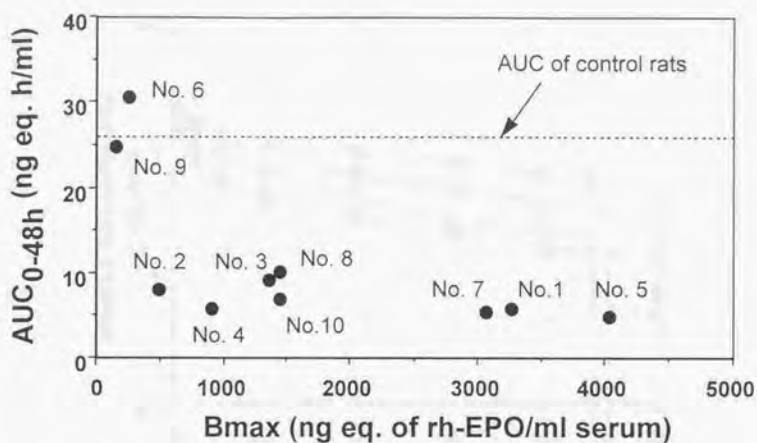


Fig. 22 The relationship between  $B_{max}$  of serum immunoglobulin and  $AUC_{0-48h}$ .  $AUC_{0-48h}$  was calculated by the trapezoidal rule from the individual rat data shown in Fig. 19.  $B_{max}$  values are taken from Table 7.

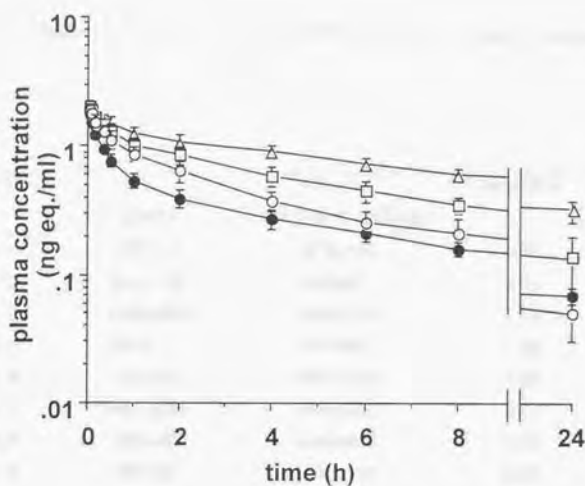


Fig. 23 Effect of pretreatment with anti-rh-EPO serum on pharmacokinetics of  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO.  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO was administered at the dose of  $0.1 \mu\text{g/kg}$  to rats treated with rat anti-rh-EPO serum, the volume used being  $0(\bigcirc)$ ,  $5(\square)$ ,  $50(\triangle)$ , and  $500(\bullet) \mu\text{l}$ . Plasma concentrations of TCA-precipitable radioactivity was measured. Pharmacokinetic parameters are shown in Table 8.

TABLE 7 Bmax and Kd for  $^{125}$ I-rh-EPO binding to IgG fraction in rat serum.

Rat No.	Kd (pg/ml)	Bmax (ng eq. of rh-EPO/ml)	Bmax/Kd
No.1	697 $\pm$ 47	3270 $\pm$ 460	4.69
No.2	538 $\pm$ 165	490 $\pm$ 90	0.91
No.3	1150 $\pm$ 260	1360 $\pm$ 200	1.18
No.4	825 $\pm$ 121	900 $\pm$ 86	1.09
No.5	872 $\pm$ 89	4030 $\pm$ 270	4.62
No.6	2120 $\pm$ 2360	254 $\pm$ 200	0.12
No.7	451 $\pm$ 58	3060 $\pm$ 240	6.78
No.8	491 $\pm$ 76	1450 $\pm$ 130	2.95
No.9	386 $\pm$ 180	156 $\pm$ 44	0.40
No.10	555 $\pm$ 42	1450 $\pm$ 60	2.61

Each value represents the calculated mean  $\pm$  SD.



TABLE 8 Pharmacokinetic parameters after intravenous administration of  $^{125}$ I-rh-EPO at the dose of 0.1  $\mu$  g/kg to rats treated with rat anti-rh-EPO serum, the volume used being 0, 5, 50, and 500  $\mu$  l.

dose volume ( $\mu$ l)	T1/2( $\alpha$ ) (h)	T1/2( $\beta$ ) (h)	Vc (ml/kg)	AUC (ng eq. h/ml)	CL <sub>total</sub> (ml/h/kg)
0	0.23 (0.05)	3.15 (0.49)	49.1 (4.1)	6.18 (1.16)	16.6 (3.0)
5	0.23 (0.05)	4.66 (1.04)	46.6 (3.0)	9.53* (0.37)	10.5* (0.4)
50	0.25 (0.07)	7.30* (1.92)	46.6 (3.7)	15.0* (1.3)	6.70* (0.58)
500	0.17 (0.05)	3.81 (0.56)	51.6 (5.5)	4.73 (0.56)	21.4 (2.5)

Each value represents the mean (SD) of 3 or 4 animals.

\*: significant difference from control ( $p < 0.05$ ).

## 結論および今後の展望

本研究により、ラットにおける EPO の血中からの消失は飽和性クリアランス機構と非飽和性クリアランス機構の 2 つの機構からなることが明らかになった。EPO の非線形クリアランス機構は  $K_m$  値が EPO レセプターの  $K_d$  値に類似していること、骨髓、脾臓における組織取り込みの down-regulation および up-regulation が認められ、これらはいずれも RME に特徴的な現象であること、レセプターを持つ CFU-E 数と CLup が相関することから EPO レセプターを介した RME によることが明らかになった。さらに、EPO により BFU-E の骨髓から脾臓への migration が促進され、この migration に起因した EPO レセプターの up-regulation の臓器間差が見られることが明らかになった。この標的臓器における CLup の up-regulation により CLtotal が増加し、EPO の消失が促進したものと考えられた。EPO は標的細胞に作用し、レセプター数を変動させ、EPO 自身のクリアランスの変動因子になっていることが示され、これらのことより、これらの細胞の変動が生体における EPO のホメオスタシスを担っていると考えられた。また、抗体が産生された場合、抗体の産生量により、消失の遅延あるいは促進という相反する 2 つの現象を示すことが明らかになった。

EPO の非線形クリアランス機構は標的細胞の EPO レセプターを介した RME によることが明らかになり、この変動が薬効発現に関係していることが示された。非線形クリアランスと薬効発現とが密接に関係しており、各種貧血により内因性 EPO 濃度が異なっていることから、個々の条件における EPO の体内動態をより詳細に明らかにすることにより、患者毎の指摘な投与計画を立てることができると考えられる。また、細胞の migration の生理的意義を明らかにし、その生体における造血機構を応用することにより、難治性血液疾患の治療法を開発できるかもしれない。EPO により細胞の migration が促進されることが明らかになり、造血細胞が特異的に造血組織に移行することが示された。W/W<sup>v</sup> マウスの結果から、この細胞の migration に c-kit (stem cell factor receptor) が関与していることが示唆されたが、このような細胞の臓器による認識性を明らかにすることにより、この認識性を利用した臓器特異的 Drug delivery system の開発にも応用可能と考えられる。今後、生理活性タンパク、ペプチド以外の抗体等生理活性を持たず逆に阻害するような高分子も臨床応用されると考えられる。ヒト型遺伝子組み換え体においても抗体産生が全くないとは言え切れず、抗体が産生された場合の体内動態の変動も注意が必要と思われる。

タンパク、ペプチドといった高分子化合物の体内動態は未だ未知の部分が多く、本研究でみられた細胞の migration に引き続く、レセプターの up-regulation のような生理活性に基づく体内動態の変動などもあり、今後も高分子化合物の体内動態の更なる検討が必要と考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するに際し、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科・杉山雄一教授に深甚なる謝意を表します。

終始有益な御助言と御指導を頂いた東京大学大学院薬学系研究科・加藤将夫博士に厚く感謝の意を表します。

有益な御助言と御指導を頂いた東北大学薬学部・寺崎哲也教授、東京大学大学院薬学系研究科・鈴木洋史助教授、北里大学薬学部・伊藤清美講師、中外製薬（株）・岡崎彬執行役員、熊木健治博士、神山博氏に厚く感謝の意を表します。

本実験にご協力頂いた三浦久美さん、丹羽一与さんはじめ中外製薬（株）薬物動態研究所の諸氏および東京大学大学院薬学系研究科製剤設計学教室の諸氏に厚く感謝の意を表します。



## 1. 実験材料

R h-EPO は 中外製薬 (株) で産生されたものを使用した。 $^{125}\text{I}$ -sodium iodine (17.4 Ci/mg),  $^{111}\text{In}$ -indium chloride,  $^3\text{H}$ -thymidine および  $^{125}\text{I}$ -erythropoietin (radioimmunoassay) は Amersham, plc (Amersham, UK) から購入した。Iodo-Gen<sup>TM</sup> (1,3,6-tetrachloro-3,6-diphenylglycouril), Immunobead second antibody, protein A および diethylenetriamine-N, N, N', N', N''-pentaacetic acid anhydride (DTPA) はそれぞれ Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA), Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA), Behring Diagnostics (La Jolla, CA, USA) および Dojindo (Kyoto, Japan) から購入した。Hemoglobin B-test Wako<sup>TM</sup> は和光純薬 (Osaka, Japan) から購入した。Percoll および density marker beads は Pharmacia Biotech, AB (Uppsala, Sweden) から購入した。その他の試薬は特級品を用いた。

## 2. 標識体の調製

### (1) $^{125}\text{I}$ -rh-EPO

$^{125}\text{I}$ -rh-EPO は Iodo-Gen 法により調製した (24)。50  $\mu\text{g/ml}$  の Iodo-Gen クロロホルム溶液 40  $\mu\text{l}$  をサンプルチューブに入れ、窒素気流により乾固した。このチューブに rh-EPO 5-30  $\mu\text{g}$  (1 mg/ml),  $^{125}\text{I}$ -sodium iodide (200  $\mu\text{Ci}$ ) 5  $\mu\text{l}$ , 500 mmol/l sodium phosphate buffer (pH 7.5) を混合した溶液の 30  $\mu\text{l}$  を加え、氷冷下、2 分間放置した。1 mg/ml の methionine 溶液 100  $\mu\text{l}$  を加え反応を停止させた。この反応液を 120 mg/ml rat serum albumin, 20 mg/ml potassium iodide を含んだ 50 mmol/l sodium phosphate buffer (pH 7.5) 300  $\mu\text{l}$  に加え、この混合液を Sephadex G-10 column (20 cm  $\times$  1 cm I.D.) でゲルろ過し、 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO を分取した。溶離液に 0.1% Tween 20 and 0.05% rat serum albumin を含んだ 50 mmol/l sodium phosphate buffer (pH 7.4) を用いた。比放射能は 2.6-17.6  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 、放射化学的純度は 93-97% (ゲルろ過法) であった。

### (2) $^{111}\text{In}$ -rh-EPO

rh-EPO 溶液 (800  $\mu\text{g/ml}$ ) 250  $\mu\text{l}$  に DTPA の DMSO 溶液 (6 mg/ml) 5  $\mu\text{l}$  を加え、室温で 30 分間放置後、0.05% Tween 20 を含んだ 50 mM Hepes buffer (pH 7.0) を溶離液として用い、Sephadex G-25 (PD-10, ファルマシア) で未反応の DTPA を除去し、DTPA-rh-EPO を分離した。DTPA-rh-EPO 100  $\mu\text{l}$  (150  $\mu\text{g/ml}$ ) に 0.2 M citrate-acetate buffer (pH 5.0) 100  $\mu\text{l}$  を加え、さらに  $^{111}\text{InCl}_3$  200  $\mu\text{Ci}$  を加え氷冷下 30 分放置後、0.05% Tween 20 を含んだ 50 mM Hepes buffer (pH 7.0) を溶離液として用い、Sephadex G-25 (PD-10, ファルマシア) で未反応の  $^{111}\text{In}$  を除去し、 $^{111}\text{In}$ -rh-EPO を分離した。比放射能は 4.5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 、放射化学的純度は 98% (ゲルろ過法) であった。



### 3. 動物

雄性 Sprague-Dawley 系ラット(JCLSD, 日本クレア, 東京)、雄性 WBB6F1-W/W<sup>v</sup> および WBB6F1-+/+ 系マウス (日本エスエルシー, 静岡) を1週間以上、環境に馴化させた後、実験に用いた。ラットは7週齢で、マウスは8-9週齢で用いた。動物は飼育期間、実験期間を通して恒温(24℃)、恒湿(55%)下で飼育した。固形飼料(CE-2, 日本クレア, 東京)、水を自由に摂取させた。

### 4. 血漿中濃度推移

ラット: 0.05%(W/V)Tween 20 and 0.05%(W/V) rat serum albumin を含んだ生理食塩液で  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO(0.1, 0.25, 0.5, 2.5  $\mu\text{g/ml}$ )投与液を調製した。rh-EPO を 0.2, 0.5, 1 および 5  $\mu\text{g/kg}$  の用量で大腿静脈カニューレから静脈内投与した (各投与群3匹)。血液を動脈カニューレからヘパリン処置したチューブに、投与 5, 15, 30 分、1, 2, 4, 6, 8 時間後に採取した。インフュージョンの場合は、20, 40, 200 および 2000 ng/kg の急速静脈内投与に引き続き、それぞれ 16, 32, 160 および 1600 ng/kg/h の速度で定速投与した。血液はインフュージョン開始 2, 4, 6, 8 時間に採取した。血液は 15,000 rpm で3分間遠心し、血漿を得た。

マウス: 0.05%(W/V)Tween 20 and 0.05%(W/V) mouse serum albumin を含んだ生理食塩液で  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO(0.24  $\mu\text{g/ml}$ )投与液を調製した。 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO を 0.48  $\mu\text{g/kg}$  の用量で尾静脈内投与した。投与 5, 30 分、1, 2, 4, 8 時間後にエーテル麻酔下、心臓採血した。血液は 15,000 rpm で3分間遠心し、血漿を得た。

### 5. $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の組織取り込み

0.05%(W/V)Tween 20 and 0.05%(W/V) rat serum albumin (マウスの場合は mouse serum albumin) を含んだ生理食塩液で  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO(0.025-62.5  $\mu\text{g/ml}$ )投与液を調製した。ラットあるいはマウスに  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO を 0.05 (マウスの場合は 0.1) -125  $\mu\text{g/kg}$  (2 ml/kg) の用量で尾静脈内投与した。投与 30 分後にエーテル麻酔下、心臓採血した。脾臓および骨髄 (マウスの場合は大腿骨) を採取した。血液はヘパリン処置したチューブに移し、15,000 rpm で3分間遠心し、血漿を得た。血漿 0.1 ml および摘出組織を直接ガンマカウンターで放射能を測定した。

### 6. rh-EPO のラジオイムノアッセイ

血漿を RIA buffer (8.1mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.7mM KCl, 0.8 % NaCl, 1 % BSA, 0.05 % Tween 20, 0.1 %  $\text{NaN}_3$ , pH 7.2) で適宜希釈し、その 100  $\mu\text{l}$  に抗血清の 15 万倍希釈液 300  $\mu\text{l}$  を加えて室温で一晩反応させた。次に、 $^{125}\text{I}$ -erythropoietin (2  $\mu\text{Ci}/3200\text{ml}$  RIA buffer) 100  $\mu\text{l}$  を加え 4 時間室温で反応させた後、immunobead second antibody 溶液 (4 mg/ml) を 250  $\mu\text{l}$  加えて 1 時間室温で反応させた。生理食塩

液 2 ml で洗浄後 3,000 rpm, 5 分間遠心分離し、沈殿の放射能をガンマカウンタで測定した。

#### 7. TCA 沈殿画分放射能および免疫反応性放射能の測定

TCA 沈殿画分放射能の測定：25% TCA 溶液 200  $\mu$ l および 1 M NaF 150  $\mu$ l を血漿 50  $\mu$ l に加え、10 分間室温放置後、3,000rpm 5分間遠心し、沈殿中放射能を測定した。

免疫反応性放射能の測定：200  $\mu$ l RIA buffer および 100 倍希釈した anti-rabbit serum 200  $\mu$ l を血漿 50  $\mu$ l に加え、16 時間室温放置し、5% protein A 100  $\mu$ l を加えさらに 1 時間放置した。0.9% NaCl 200  $\mu$ l を加え、15,000 rpm 3分間遠心し、沈殿中放射能を測定した。

#### 8. EPO 処置の効果

##### 1) 短時間における rh-EPO 処置の効果

rh-EPO を 1  $\mu$ g/kg 皮下投与し、投与 4, 10, 24, 48 時間後に  $^{125}$ I-rh-EPO 0.1  $\mu$ g/kg を静脈内投与し、骨髓、脾臓の CLup を測定した。

##### 2) 長時間における rh-EPO 処置の効果

ラット：rh-EPO を 0, 1, 5, 25  $\mu$ g/kg 4 日間 2 回静脈内投与し、初回投与 4 日後に  $^{125}$ I-rh-EPO 0.2  $\mu$ g/kg 静脈内投与し、血漿中免疫反応性放射能を測定した。EPO 処置ラットにおける CLup を評価した。さらに、5  $\mu$ g/kg 処置ラットにおける CLup の Km, Vmax を評価した。初回投与 7 日後にヘマトクリットおよびヘモグロビン濃度を測定した。

マウス：非標識 rh-EPO をマウスに 1 日 1 回 7 日間に渡って 0, 0.48, 4.8, 48  $\mu$ g/kg 尾静脈内投与した。 $^{125}$ I-rh-EPO を 0.48  $\mu$ g/kg 非標識 rh-EPO 初回投与 8 日目に尾静脈内投与した。投与 30 分後の骨髓、脾臓中放射能を測定し、CLup を評価した。初回投与 7 日後にヘマトクリットを測定した。

#### 9. 細胞懸濁液の調製

脾臓細胞を 100 $\mu$ m のステンレスメッシュを通し、細胞を 20% FCS を含む alpha MEM に懸濁した。骨髓細胞は大腸骨から 20% FCS を含む alpha MEM で洗い流し、懸濁した。細胞を 400xg, 10 min 遠心し、上清を捨て、20% FCS を含む alpha MEM で再懸濁した。

#### 10. BFU-E および CFU-E の測定

BFU-E および CFU-E はメチルセルロース法により測定した (15)。

#### 11. $^{125}$ I-rh-EPO の脾臓細胞への Binding

Binding 実験は tracer 量の  $^{125}$ I-rh-EPO (約 10,000cpm) および、 $3 \times 10^7$  splenic cells/ml を含ん

だ alpha MEM 1 ml を室温(24°C)で1時間放置し行った。細胞を 400 xg で5分間遠心し、上清を除いた後 ice-cold alpha MEM 2 ml で2回洗浄した後、細胞の放射能を測定した。特異的 binding は 500 ng/ml の非標識 rh-EPO 存在下で同様の操作を行った場合の放射能を差し引くことにより求めた。

#### 1 2. rh-EPO 処置による $^{125}\text{I}$ -rh-EPO または $^3\text{H}$ -thymidine によって標識した細胞の分布に及ぼす影響

$^{125}\text{I}$ -rh-EPO(0.4  $\mu\text{g/kg}$ ) あるいは  $^3\text{H}$ -thymidine(100  $\mu\text{Ci/kg}$ ) を尾静脈内投与した。 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO あるいは  $^3\text{H}$ -thymidine 投与 12 時間(day 0)および 60 時間(day3)後に rh-EPO 25  $\mu\text{g/kg}$  を静脈内投与した。初回投与 0, 1, 2, 3, 4 日後にエーテル麻酔下、心臓採血し、組織を採取した。血液はヘパリン処置したチューブに移し、15,000 rpm で3分間遠心し、血漿を得た。血漿 1 ml および摘出組織の放射能を測定した。

#### 1 3. 細胞の分画

脾臓細胞の場合は、3匹のラットから得たものを合わせた。Cell suspension 2ml を 45% Percoll (20% FCS を含んだ alpha MEM) 43 ml と混合し、10,000 xg 90 分間遠心し、底から 2.5ml ずつ集めた。Density marker を 45% Percoll に加え同様の操作を行い、分離液の比重を求めた。各分画に alpha MEM 2.5ml を加え、希釈した。細胞を、400 xg 5分遠心した。細胞の沈殿に alpha MEM 2 ml を加え、更に 400 xg 5分遠心した。細胞の沈殿に alpha MEM を加え再懸濁した。

#### 1 4. $^3\text{H}$ -標識脾臓細胞の分布

$^3\text{H}$ -thymidine (100  $\mu\text{g/kg}$ ) 静脈内投与し、1 2 時間後に rh-EPO を 25  $\mu\text{g/kg}$  静脈内投与し、rh-EPO 処置 2 日後に脾臓を摘出した。脾臓細胞を前述の方法により、Percoll にて分画し、BFU-E に相当する 4 fraction(fr. No.11-14)を集めた。細胞を前述の方法により、alpha MEM で2回洗浄し、alpha MEM に再懸濁した。ラットに 2ml/kg (20,000-30,000dpm/head) の用量で投与した。細胞投与 1, 4, 24 時間後に臓器を摘出した。

#### 1 5. $^3\text{H}$ -放射能の測定

細胞懸濁は soluen(Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA)により溶解し、scintillator(Hionicflow, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA)を加え、放射能を測定した。臓器は全量あるいは一部を、室温で約1週間乾燥させた後、sample oxidizer(ALOKA Co. Ltd., Tokyo, Japan)により燃焼させ、 $\text{T}_2\text{O}$  として回収し、scintillator を加え放射能を測定した。

#### 1 6. 反復皮下投与

$^{125}\text{I}$ -rh-EPO を 10 匹のラットの背部皮下に 1  $\mu\text{g/kg}$  の用量で週1回4週間に渡って投与



した。対照ラットには  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO を除いた vehicle 溶液を 3 回投与し、4 回目に  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO を投与した。血液は尾静脈より投与した 4, 8, 10, 12, 24, 48 時間後に採取した。血液はヘパリン処置したチューブに移し、15,000 rpm で 3 分間遠心し、血漿を得た。抗血清は 4 回目投与 4 日後に得た。

#### 1.7. rh-EPO の pharmacokinetics に及ぼす抗体の効果

ラット抗 rh-EPO 抗血清をラット No.5 から採取し、5, 50 および 500  $\mu\text{l}$  を投与した。対照群には、rh-EPO を投与していないラットの血清を投与した。 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の投与量は 0.1  $\mu\text{g/kg}$  とし、血清投与 1 時間後に大腿静脈カニューレを介して投与した。血液は、大腿動脈カニューレより約 200  $\mu\text{l}$  を  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO 投与 2, 5, 10, 20, 30 分、1, 2, 4, 6, 8, 24 時間後に採取した。血液は、採取後 15,000 rpm, 10 分間遠心し、血漿を分離した。

#### 1.8. 抗体価の測定

抗体の検出は嶋根らの方法により行なった (58)。抗体との binding 特性は以下の方法により評価した。ラット抗血清の 1000 倍希釈液 100  $\mu\text{l}$  に  $^{125}\text{I}$ -rh-EPO を 32000, 16000, 8000, 4000, 1000 および 250 pg/ml の各濃度 100  $\mu\text{l}$ 、測定用 buffer (0.8% NaCl, 2.7mM KCl, 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.47mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1% BSA, 0.05%  $\text{NaN}_3$ ; pH 7.2) 400  $\mu\text{l}$  を加え、4 時間放置した。さらに、Bio Mag Goat anti-Rat IgG (Advanced Magnetics Inc, MA, USA) 400  $\mu\text{l}$  を加え、1 時間放置した後、3,000 rpm, 10 分間遠心分離した。上清 500  $\mu\text{l}$  を分取し、残りの上清を吸引除去し、沈査および上清 500  $\mu\text{l}$  をそれぞれ  $\gamma$ -カウンターで測定した。

#### 1.9. 血漿サンプルのゲルろ過

血漿サンプルのゲルろ過は、TSK gel G3000SW<sub>XL</sub> を用いて行い、溶離液として 0.2M NaCl を含む 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) を用い、流速は 0.5ml/min とした。分子量マーカーとして cytochrom c 12.4 kD, bovine serum albumin 67 kD, catalase 232 kD, thyroglobulin 669 kD を用い、280 nm の吸光度を測定した。溶出液をフラクションコレクターで集め、各フラクション中放射能を測定した。

#### 2.0. データ解析

##### 1) 血漿中濃度推移

血漿中濃度データを非線形最小二乗法プログラム MULTI(72)により当てはめ計算した。血漿中濃度は 2 相性の消失をすることから式 (1) に当てはめた。

$$C = A \exp(-\alpha t) + B \exp(-\beta t) \quad (1)$$

C は血漿中濃度である。分布容積 (Vc) は  $\text{dose}/(A+B)$  により求めた。

AUC および AUMC は台形公式により計算し、最終測定点以降は外挿して求めた。MRT

は AUMC/AUC より求めた。全身クリアランスは、dose/AUC より求めた。

#### 非線形解析

各投与量の平均血漿中濃度を 2-コンパートメントモデルにより MULTI(RUNGE)(73)を用い同時当てはめした。重みは  $1/C_1^2$  を用いた。このモデルは central compartment から 1 次速度消失と Michaelis-Menten type の消失をするモデルである。このモデルは以下の微分方程式により記述される。

$$dC_1/dt = -\{k_{12} + k_e + V_{max}/[V_1 \cdot (K_m + C_1)]\} \cdot C_1 + k_{12} \cdot C_2 \quad (2)$$

$$dC_2/dt = k_{21} \cdot C_1 - k_{12} \cdot C_2 \quad (3)$$

$C_1$  は central compartment の rh-EPO 濃度、 $C_2$  は peripheral compartment の濃度である。 $K_m$  は Michaelis-Menten constant、 $V_{max}$  は飽和消失過程の最大消失速度、 $k_{12}$  および  $k_{21}$  は central と peripheral compartment 間の first-order transfer constant、 $k_e$  は 1 次消失速度定数、 $V_1$  は central compartment の分布容積である。

#### 2) 組織取り込みクリアランス (CLup)

CLup は投与 30 分後の組織中濃度を  $AUC_{0-30}$  により除することにより算出した。 $AUC_{0-30}$  は血漿中濃度が投与後 30 分まで monoexponential に減衰することから投与 30 分後の血漿中濃度 ( $C_p$ ) を基に次式により求めた。

$$C_0 = \text{dose}/V_c, \quad k_e = (\ln(C_0) - \ln(C_p))/0.5 \quad (4)$$

$$AUC_{0-30} = C_0/k_e (1 - \exp(-0.5 k_e)) \quad (5)$$

非線形性を表す parameters ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) は次式により求めた。

$$CL = V_{max}/(K_m + C_0) + CL_{ns} \quad (6)$$

ここで  $C_0$  は血漿中初期濃度を、 $CL_{ns}$  は非飽和性クリアランスを表す。

EPO 反復投与の場合の取込みクリアランス (CLup') は、繰返し投与した非標識 rh-EPO が血漿中に残存し、 $^{125}\text{I}$ -rh-EPO の取込みを競合阻害すると考えられることから、非標識 rh-EPO の残存濃度  $C_{min}$  を (5) 式より求め、(6) 式により実測値 (CLup) を補正して求めた。

$$C_{min} = B (1 - \exp(-7 \beta \cdot 24)) \exp(-\beta \cdot 24) / (1 - \exp(-\beta \cdot 24)) \text{ dose} / 0.48 \quad (7)$$

$$CLup' = (K_m + C_0 + C_{min}) (CLup - CL_{ns}) / (K_m + C_0) + CL_{ns} \quad (8)$$

マウスの全骨髄量は femur 量を 17 倍して求めた。femur は全骨髄量の 6% を含んでいると考えられている (40)。

#### 3) $^{125}\text{I}$ -rh-EPO と抗体との結合

抗血清の最大結合量 ( $B_{max}$ ) および解離定数 ( $K_d$ ) は抗体結合放射能 ( $C_b$ )、遊離型放射能 ( $C_d$ ) を (9) 式に当てはめることにより算出した。



$$Cb = Bmax \ Cb / (Kd + Cb)$$

(9)

## 2.1. 統計解析

パラメータの比較は、Bartlett の等分散の検定を行い、1 元配置分散分析を行い、引き続き例数が等しい場合は Dunnett test あるいは Tukey test を、例数が等しくない場合は Scheffe test を行った。有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 参考文献

- 1) AKAHANE, K., TOJO, A., FUKAMACHI, H., KITAMURA, T., SAITO, T., URABE, A. AND TAKAKU, F.: Binding of iodinated erythropoietin to rat bone marrow cells under normal and anemic conditions. *Exp. Hematol.* 17: 177-182, 1989.
- 2) BERNSTEIN, S.E.: Tissue transplantation as an analytic and therapeutic tool in hereditary anemias. *Am. J. Surg.* 119: 448-451, 1970.
- 3) BROWEN, D., EHMER, B., NEUBERT, P., LEWIS, T. AND JACOBS, A.: The clearance of a single i.v. bolus recombinant human erythropoietin from the serum of patients with myelodysplastic syndrome and its effects on erythropoiesis. *Exp. Hematol.* 19: 613-616, 1991.
- 4) BROWN, B. A., COMEAU, R. D., JONES, P. L., LIBERATONE, F. A., NEACY, W. P., SANDS, H. AND GALLAGHER, B.M.: Pharmacokinetics of the monoclonal antibody B72.3 and its fragments labeled with either  $^{125}\text{I}$  or  $^{111}\text{In}$ . *Cancer Res.* 47: 1149-1154, 1987.
- 5) CYNSHI, O., SATOH, K., HIGUCHI, M., IMAI, N., KAWAGUCHI, T. AND HIRASHIMA, K.: Effects of recombinant human erythropoietin on anaemic W/W<sup>v</sup> and Sl/Sl<sup>d</sup> mice. *Br. J. Haematol.* 75: 319-324, 1990.
- 6) DASTYCH, J. AND METCALF, D. D.: Stem cell factor induces mast cell adhesion to fibronectin. *Journal of Immunology* 152: 213-219, 1994.
- 7) DEDRICK, R. L.: Animal scale up. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1: 436-461, 1973.
- 8) DEDRICK, R. L., ZAHARKO, D. S. AND LUTZ, R. J.: Transport and binding of methotrexate in vivo. *J. Pharm. Sci.* 62: 882-890, 1973.
- 9) ESCHBACH, J. W., EGRIE, J. C., DOWNING, M. R., BROWNE, J. K. AND ADAMSON, J. W.: Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *N. Engl. Med.* 316: 73-78, 1987.
- 10) FLAHARTY, K. K., CARO, J., ERSLEV, A., WHALEN, J. J., MORRIS, E. M., BJORNSSON, T. D. AND VLASSES, P. H.: Pharmacokinetics and erythropoietic response to human recombinant erythropoietin in healthy men. *Clin. Pharmacol. Ther.* 47: 557-564, 1990.
- 11) FLANAGAN, J. G., CHAN, D. C. AND LEDER, P.: Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell* 64: 1025-1035, 1991.
- 12) FUJITA, T., YASUDA, Y., TAKAKURA, Y., HASHIDA, M. AND SEZAKI, H.: Tissue distribution of  $^{111}\text{In}$ -labeled uricase conjugated with charged dextrans and polyethylene glycol. *J. Pharmacobio-Dyn.* 14: 623-629, 1991.

- 13) HIRASHIMA, K., BESSHO, M., NAGATA, A., HIRASAWA, Y., SUZUKI, S., MIURA, K., SUDA, T., KAWAI, T., SOTOYAMA, K., YOSHIKAWA, O., AOKI, I., MORI, M., YOSHIDA, Y., HORIUCHI, A., HAMAZAKI, H., HIDAI, H., OOWADA, S. AND MAENAMI, T.: Clinical evaluation of radioimmunoassay of erythropoietin. *J. Med. Pharmacol. Sci.* 24: 703-711, 1990.
- 14) HIRASHIMA, K., BESSHO, M., and JINNAI, I.: Improvement of anemia by recombinant human erythropoietin (rhEPO) in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and aplastic anemia. *Contrib. Nephrol.* 88: 254-264, 1990.
- 15) ISCOVE, N.N. AND SIEBER, F.: Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture. *Exp. Hematol.* 3: 32-43, 1975.
- 16) JACOBS, K., SHOEMAKER, C., RUDERSDORF, R., NEILL, S.D., KAUFMAN, R. J., MUFSON, A., SEEHRA, J., JONES, S. S., HEWICK, R., FRITSCH, E. F., KAWAKITA, M., SHIMIZU, T. AND MIYAKE, T.: Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313: 806-810, 1985.
- 17) JUAN, J.-S.F., LERTORA, J.J.L., BROOKINS, J., RICE, J.C. AND FISHER, J.W.: Pharmacokinetics of erythropoietin in intact and anephric dogs. *J. Lab. Clin. Med.* 111: 669-676, 1988.
- 18) KABAYA, K., AKIYAMA, H., NISHI, N., MISAIZU, T., OKADA, Y., KAWAGISHI, M., AMANO, K., KUSAKA, M., SEKI, M. AND UZUMAKI, H.: Improvement of anemia in W/W<sup>v</sup> mice by recombinant human erythropoietin (rHuEPO) mediated through EPO receptors with lowered affinity. *Life Sci.* 57: 1067-1076, 1995.
- 19) KATO, M., KAMIYAMA, H., OKAZAKI, A., KUMAKI, K., KATO, Y. AND SUGIYAMA, Y.: Mechanism for the nonlinear pharmacokinetics of erythropoietin in rats. *J. Pharm. Exp. Ther.* 283: 520-527, 1997.
- 20) KATO, M., MIURA, K., KAMIYAMA, H., OKAZAKI, A., KUMAKI, K., KATO, Y. AND SUGIYAMA, Y.: Pharmacokinetics of erythropoietin in genetically anemic mice. *Drug Metab. and Dispos.* 26: 126-131, 1998.
- 21) KATO, M., NIWA, K., KAMIYAMA, H., OHKUBO, K. AND OKAZAKI, A.: The disposition of recombinant human erythropoietin (EPOCH) after subcutaneous administration (1). *Yakubutu dotai* 8: 471-479, 1993.
- 22) KIM, D.C., SUGIYAMA, Y., SATOH, H., FUWA, T., IGA, T. AND HANANO, M.: Kinetic analysis of in vivo receptor-dependent binding of human epidermal growth factor by rat tissues. *J. Pharm. Sci.* 77: 200-207, 1988.
- 23) KINASHI, T., AND SPRINGER, T. A.: Steel factor and c-kit regulate cell-matrix adhesion. *Blood* 83: 1033-1038, 1994.
- 24) KINOSHITA, H., OHISHI, N. AND OKAZAKI, A.: Preparation of iodine labeled

- recombinant human erythropoietin. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 41: 568-570, 1991.
- 25) KINOSHITA, H., OHISHI, N., KATO, M., TOKURA, S. AND OKAZAKI, A.: Pharmacokinetics and distribution of recombinant erythropoietin in rats. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 42: 174-178, 1992.
- 26) KINOSHITA, H., OHISHI, N., TOKURA, S. AND OKAZAKI, A.: Pharmacokinetics and distribution of recombinant human erythropoietin in rats with renal dysfunction. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 42: 682-686, 1992.
- 27) KODAMA, H., NOSE, M., NIIDA, S. AND NISHIKAWA, S.: Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cell to stromal cells. *Exp. Hematol.* 22: 979-984, 1994.
- 28) KRANTZ, S.B.: Erythropoietin. *Blood* 77: 419-443, 1991.
- 29) KUBO, T. AND NAKAHATA, T.: Different responses of human marrow and circulating erythroid progenitors to stem cell factor, interleukin-3 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Int. J. Hematol.* 58: 153-162, 1993.
- 30) KUWABARA, T., KATO, Y., KOBAYASHI, S., SUZUKI, H. AND SUGIYAMA, Y.: Nonlinear pharmacokinetics of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor derivative (nartograftim). Species differences among rats, monkey and humans. *J. Pharm. Exp. Ther.* 271: 1535-1543, 1994.
- 31) KUWABARA, T., UCHIMURA, T., KOBAYASHI, S. AND SUGIYAMA, Y.: Receptor-mediated clearance of G-CSF derivative nartograftim in bone marrow. *Am. J. Physiol.* 269: E1-9, 1995.
- 32) KUWABARA, T., UCHIMURA, T., TAKAI, K., KOBAYASHI, H., KOBAYASHI, S. AND SUGIYAMA, Y.: Saturable uptake of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor derivative, nartograftim, by the bone marrow and spleen of rats in vivo. *J. Pharm. Exp. Ther.* 273: 1114-1122, 1995.
- 33) KUWABARA, T., ISHIKAWA, Y., KOBAYASHI, H., KOBAYASHI, S. AND SUGIYAMA, Y.: Renal clearance of a recombinant granulocyte colony-stimulating factor, nartograftim in rats. *Pharm. Res.* 12: 1466-1469, 1995.
- 34) LAYTON, J.E., HOCKMAN, H., SHERIDAN, W. AND MORSTYN, P.: Evidence for a novel in vivo control mechanism of granulopoiesis: mature cell-related control of a regulatory growth factor. *Blood* 74: 1303-1307, 1989.
- 35) LEWIS, J.P., O'GRADY, L.F., BERNSTEIN, S. E., RUSSELL, E. S. AND TROBAUGH, F.E.: Growth and Differentiation of Transplanted W/W<sup>v</sup> Marrow. *Blood* 30: 601-616, 1967.
- 36) LIM, V.S., DeGOWIN, R.L., ZAVALA, D., KIRCHNER, P.T., ABELS, R., PERRY, P. AND FANGMAN, J.: Recombinant human erythropoietin treatment in pre-dialysis



patients. *Annals of Internal Medicine* 110: 108-114, 1989.

37) LIN, F.-K., SUGGS, S., LIN, C.-H., BROWNE, J.K., SMALLING, R., EGRIE, J.C., CHEN, K.K., FOX, G.M., MARTIN, F., STABINSKY, Z., BADRAWI, S.M., LAI, P.-H. AND GOLDWASSER, E.: Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7580-7584, 1985.

38) LIU, K.X., KATO, Y., NARUKAWA, M., KIM, D.C., HANANO, M., HIGUCHI, O., NAKAMURA, T. AND SUGIYAMA, Y.: Importance of the liver in plasma clearance of hepatocyte growth factor in rats. *Am. J. Physiol.* 263: G642-G649, 1992.

39) LIU, K.X., KATO, Y., YAMAZAKI, M., HIGUCHI, O., NAKAMURA, T. AND SUGIYAMA, Y.: Decrease in the hepatic clearance of hepatocyte growth factor in carbon tetrachloride-intoxicated rats. *Hepatology* 17: 651-660, 1993.

40) LOEFFLER, M. AND WICHMANN, H.E.: Mathematical modeling of cell proliferation; stem cell regulation in hemopoiesis, vol. II, pp.163, CRC Press, Boca Raton, Fla, 1985.

41) MAACK, T., SUZUKI, M., ALMEIDA, F.A., NUSSENZVEIG, D., SCARBOROUGH, R.M., McENROE, G.A. AND LEWICKI, J.A.: Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 238: 675-678, 1987.

42) MARTIN, H., HIBBIN, J. A., DOWDING, C., MATUTES, E., TINDEL, R. AND GOLDMAN, J. M.: Purification of haematopoietic progenitor cells from patients with granulocytic leukaemia using percoll density gradients and elutriation. *Br. J. Haematol.* 63: 187-198, 1986.

43) McMAHON, F. G., VARGAS, R., RYAN, M., JAIN, A. K., ABELS, R. I., PERRY, B. AND SMITH, I. L.: Pharmacokinetics and effects of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous injections in healthy volunteers. *Blood* 76: 1718-1722, 1990.

44) MIYAKE, T., KUNG, C.K.-H. AND GOLDWASSER, E.: Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252: 5558-5564, 1977.

45) MIZUNO, N., KATO, Y., SHIROTA, K., IZUMI, Y., IRIMURA, T. AND SUGIYAMA, Y.: Mechanism of initial distribution of blood-borne colon carcinoma cells in the liver. *J. Hepatology* 27, in press.

46) MUSOLINO, C., ORLANDO, A., ALONCI, A., SANTORO, M.C., BELLOMO, G., QUARTARONE, M. AND SQUADRITO, G.: Effective therapy of aplastic anaemia post-hepatitis with recombinant human erythropoietin. *Am. J. Hematol.* 46: 59-60, 1994.

47) NAGATA, S., TSUCHIYA, M., ASANO, S., KAZIRO, Y., YAMAZAKI, T., YAMAMOTO, O., HIRATA, Y., KUBOTA, N., OHEDA, M., NOMURA, H. AND ONO,



M.:Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 319: 415-418, 1986.

48) NEUMAYER, H. H., BROCKMOLLER, J., FRITSCHKA, E., ROOTS, L., SCIGALLA, P. AND WATTENBERG, M.: Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin after SC administration and in long-term IV treatment in patients on maintenance hemodialysis. *Contributions to Nephrology* 76: 90-97, 1989.

49) NIJHOF, H., and WIERENGA, P. K.: Isolation and characterization of the erythroid progenitor cell: CFU-E. *J. Cell Biol.* 96: 386-392, 1983.

50) NIJHOF, W., GORIS, H., DONTJE, B., DRESZ J. and LOEFFLER, M.: Optimal erythroid cell production during erythropoietin treatment of mice occurs by exploiting the splenic microenvironment. *Exp. Hematol.* 21: 496-501, 1993.

51) NOCKA, N., TAN, J. C., CHIU, E., CHU, T. Y., RAY, P., TRAKTMAN, P. AND BESMER, P.: Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37,Wv, W41 and W. *EMBO J.* 9: 1805-1813, 1990.

52) REDMAN, B.G., FLAHERTY, L., CHOU, T.H., KRAUT, M., MORTINO, S., SIMON, M., VALDIVIESO, M. AND GROVES, E.: Phase I trial of recombinant macrophage colony-stimulating factor by rapid intravenous infusion in patients with cancer. *J.Immunother.* 12: 50-54, 1992.

53) ROITT, I., BROSTOFF, J. AND Male, D.: Immunology Third Edition., pp. 21.7, Mosby-Year Book Europe, 1993.

54) ROSENBLUM, M. G., UNGER, B.W., GUTTERMAN, J. U., HERSH, E. M., DAVID, G. S. and FRINCKE, J. M.: Modification of human leukocyte interferon pharmacology with a monoclonal antibody. *Cancer Res.* 45: 2421-2424, 1985.

55) SATO, H., SUGIYAMA, Y., SAWADA, Y., IGA, T., SAKAMOTO, S., T. FUWA, T. AND HANANO, M.:Dynamic determination of kinetic parameters for the interaction between polypeptide hormones and cell-surface receptors in the perfused rat liver by the multiple-indicator dilution method. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 85: 8355-8359, 1988.

56) SATO, J., HAMAGUCHI, N., DOKEN, K., IWASA, S., OGAWA, Y. AND TOGUCHI, H.: Pharmacokinetics alteration in rats of recombinant interleukin-2(rIL-2) by immunocomplexing with a monoclonal antibody against rIL-2. *Biol. Pharm. Bull.* 17: 535-538, 1994.

57) SAWYER, S. T., KRANTZ, A. B. AND GOLDWASSER, E.:Binding and receptor-mediated endocytosis of erythropoietin in Friend virus-infected erythroid cells. *J.Biol.Chem.* 262: 5554-5562, 1987.

58) SHIMANE, M., MOTOJIMA, H. AND FUKUSHIMA, M.: Development of assay

methods for anti-recombinant human erythropoietin antibodies. *Journal of Clinical Therapeutics and Medicines* 6 suppl. 2: 33-50, 1990.

59) SUGIYAMA, Y. AND HANANO, M.: Receptor-mediated transport of peptide hormones and its importance in the overall hormone disposition in the body. *Pharm. Res.* 6: 192-202, 1989.

60) TAGLIARO, F., DORIZZI R. AND LUISETTO, G.: Effect of antibodies to calcitonin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the Hormone. *Horm. metab. Res.* 27: 31-34, 1995.

61) TAHARA, T., KURUMA, I. AND YAMASHITA, H.: Pharmacokinetics of recombinant interferon alpha 2a. *Antibiotics and Chemotherapy* 4: 1324-1330, 1988.

62) TAKAKURA, Y., FUJITA, T., HASHIDA, M. AND SEZAKI, H.: Disposition characteristics of macromolecules in tumor-bearing mice. *Pharm. Res.* 7: 339-346, 1990.

63) TANSWELL, P., HEINZEL, G., GREISCHEL, A. AND KRAUSE, J.: Nonlinear pharmacokinetics of tissue -type plasminogen activator in three animal species and isolated perfused rat liver. *J. Pharm. Exp. Ther.* 255: 318-324, 1990.

64) THORNBURG, R. W., DAY, J. F., BAYNES, J. W. AND THORPE, S. R.: Carbohydrate-mediated clearance of immune complexes from the circulation. *J. Biol. Chem.* 255: 6820-6825, 1980.

65) TO, L.B., HAYLOCK, D. N., DOWSE, T., SIMMONS, P. J., TRIMBOLI, S., ASHMAN, L. K. AND JUTTNER, C. A.: A comparative study of the phenotype and proliferative capacity of peripheral blood (PB) CD34+ cells mobilized by four different protocols and those of steady-phase PB and bone marrow CD34+ cells. *Blood* 84: 2930-2939, 1994.

66) UEMURA, I., NIWA, T., NAGAO, N., MISAITSU, T. AND SHINKAI, H.: Metabolic fate of recombinant human erythropoietin(KRN5702)(II)-plasma level, distribution, metabolism and excretion of <sup>125</sup>I-KRN5702 after single intravenous administration to rats. *The Clinical Report* 22: 5583-5602, 1988.

67) URABE, A., MIZOGUCHI, H., TAKAKU, F., MIYAZAKI, T., YACHI, A., NIITSU, Y., MIURA, Y., MUTOH, Y., FUJIOKA, S. AND NOMURA, T.: Effects of rHuEPO on aplastic anemia: results of a Phase II clinical study. *Rinsyo-ketueki* 34: 1002-1010, 1993.

68) WHITCOMB, D.C., O'DORISIO, T. M., CATALAND, S., SHETZLINE, M. A. AND NISHIKAWARA, M. T.: Identification of tissue insulin receptors: use of a unique in vivo radioreceptor assay. *Am. J. Physiol.* 249: E561-567, 1985.

69) WINEARLS, C. G., OLIVER, D. O., PIPPARD, M. J., REID, C. AND DOWNING, M. R.: Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on anemic of

patients maintained by the chronic haemodialysis. *Lancet* 11: 1175, 1986.

70) WONG, G. G., WITEK, J. S., TEMPLE, P. A., WILKENS, K. M., LEARY, A. C., LUXENBERG, D. P., JONES, S. S., BROWN, E. L., KAY, R. M., ORR, E. C., SHOEMAKER, C., GOLDE, D. W., KAUFMAN, R. J., HEWICK, R. M., WANG, E. A. AND CLARK, S. C.: Human GM-CSF: Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant protein. *Science* 228: 810-815, 1985.

71) WU, H., KLINGMULLER, U., BESMSER, P. AND LODISH, H. F.: Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 377: 242-246, 1995.

72) YAMAOKA, K., TANIGAWARA, Y., NAKAGAWA, T. AND UNO, T.: A Pharmacokinetic analysis program(MULTI) for microcomputer. *J.Pharm.Dyn.* 4: 879-885, 1981.

73) YAMAOKA, K. AND NAKAGAWA, T.: Nonlinear least squares program based on differential equations, MULTI(RUNGE), for microcomputers. *J.Pharm.Dyn.* 6: 595-606, 1983.

74) YOON, E. J., BAE, E. J., JEONG, Y. N., KIM, M. M., KIM, B., LEE, S. H. AND LEE, M. G.: Dose-dependent pharmacokinetics of human granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor in rabbits. *Int.J.Pharm.* 97: 213-218, 1993.



