エドバコマブの実験動物における体内動態

関口 金雄・中村 仁美・横山 秀一・榎垣 一憲・下岡 新雄

Pharmacokinetics of Edobacomab in Experimental Animals

Kaneo SEKIGUCHI, Hitomi NAKAMURA, Shuichi YOKOYAMA,
Kazunori ENOGAKI, Kin-o SHIMOOKA

Nagoya New Product Development Center, Pfizer Pharmaceuticals Inc., Aichi

Summary

The plasma level, distribution, metabolism and excretion of Edobacomab, a novel anti-endotoxin mouse IgM monoclonal antibody were investigated after intravenous administration of [^3H]Edobacomab and unlabelled Edobacomab to experimental animals.

1. The radioactivity level in the plasma declined biexponentially after intravenous dose of the radiolabelled Edobacomab to male rats. Pharmacokinetic profile of radioactivity in rat plasma was similar to that from unlabelled Edobacomab. Plasma half lives in β phases were 11~15 hr in rat and monkey, and 21~23 hr in rabbit. The plasma levels showed dose proportionality in rat and rabbit, and the range of distribution volume was 28~48 ml/kg in these animals which is almost equal to the plasma volume.

2. The radioactivity was highest in plasma and distributed highly to reticuloendothelial tissues (eg. liver, spleen). Most of the radioactivity in plasma consisted of the unchanged drug, and small molecule metabolites were found in the spleen.

3. The cumulative urinary and fecal excretions of radioactivity were 95.7% and 0.9% of the dose, respectively, during 168 hr postdose. No unchanged drug was found in urine.

Key words : Edobacomab, IgM monoclonal antibody, Plasma level, Distribution, Metabolism, Excretion, Experimental animals

緒 言

近年, グラム陰性菌感染症の治療に対し種々の優れた抗生物質が開発され臨床で用いられているが, 重症感染症においては当該菌から放出されるエンドトキシンが临床上問題となる。

このエンドトキシンは様々な生物活性を有するグラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分であり, 凝

固線溶系および補体の活性化, 炎症性メディエーター産生の促進などの作用によりグラム陰性菌敗血症における成人呼吸窮迫症候群 (ARDS)¹⁾, 汎発性血管内血液凝固症候群 (DIC)²⁾, 急性腎不全 (ARF)³⁾等の諸症状を引き起こすと考えられている。グラム陰性菌敗血症に対する有効な治療法は未だ確立されておらず, エンドトキシンを中和あるいは不活化させる薬剤の開発が望まれて

きた。

抗エンドトキシンマウスモノクローナルIgM抗体・エドバコマブはグラム陰性菌敗血症に対する新しい治療薬としてXOMA社(米国)において開発されたエンドトキシン中和抗体である⁴⁾。エンドトキシンの生物活性を有する部位であるLipid Aの構造は多くの菌種で類似性を持ったため、エドバコマブは臨床上に重要なグラム陰性菌のエンドトキシンに広く中和作用を持つとされている^{5,6)}。エドバコマブの体内動態を知ることは、エドバコマブの有効性および安全性を評価する上で重要である。我々は今回、実験動物を用いてエドバコマブの単回静脈内投与時の血中動態、体内分布、代謝および排泄を検討した。

実験材料および実験方法

1. 試薬および標識化合物

エドバコマブは*E. coli* J5 (0111:B4変異株)の死菌で免疫したマウスの脾細胞と骨髓腫細胞とを融合させたハイブリドーマが産生するマウスIgMモノクローナル抗体(M.W.:970,000)である。試験にはXOMA社(米国)から供与された1mlあたり本薬2.0mgを含有する注射剤を用いた。本剤は、エドバコマブ、pH調整剤(リン酸緩衝液)、等張化剤(塩化ナトリウム)および安定化剤(ポリソルベート80)を含有する無色澄明な蛋白溶液製剤であり、2~8°Cの保存条件では15ヵ月間の安定性が保証されている。

標識化合物として^[3H]エドバコマブをBolton-Hunter法⁷⁾に準じて以下のように調製してトレーサー実験に使用した。この標識化合物はエドバコマブの末端アミノ基やリジン残基のアミノ基が^[3H]プロピオニル化されたものと考えられる。

標識試薬である^[3H]succinimidyl propionate (NEN) 0.5 ml, エドバコマブ注射剤 0.5 ml および 0.4 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 0.1 ml を氷冷下で30分間反応させた。未反応の標識試薬を失活させるため、2 M グリシン溶液/0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 0.4 ml を加え15分間反応させ

た。比放射能の高い標識化合物の調製時には標識試薬 0.5 ml, エドバコマブ注射剤 50 μ l および 0.4 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 10 μ l を同様に反応させた。2 M グリシン溶液/0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) の添加量は 40 μ l とした。ついで、低分子副反応生成物を除去するため、エドバコマブを含有しない注射用溶媒(プラセボ)で平衡化したセファデックス G-100ゲル(Pharmacia)充填カラムを用いて反応液を分画精製した。また、エドバコマブに相当する画分の蛋白濃度は、プロテインアッセイ (Bio Rad) を用いて測定した。ゲル濾過クロマトグラフィーにより分画したエドバコマブに相当する画分は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において非標識体と同一の位置にバンドを示した。また、この標識化合物のエンドトキシン結合性を酵素免疫学的方法 (ELISA 法) により測定した結果、標識前の107~109%であり標識後も免疫活性が維持されていたことから放射化学的純度は100%とみなした。試験に用いた標識化合物の比放射能は 5.8~7.6 MBq/mg であった。ただし、全身オートラジオグラフィーには投与薬液量を考慮して比放射能の高い標識化合物 (57.9 MBq/mg) を用いた。

2. 実験動物

ラットはSD系(雄:6~8週齢, 体重160~300g, 雌:7週齢, 体重130~160g, SLC), マウスはICR系(雄, 5週齢, 体重約25g, SLC)を用いた。ウサギは日本白色種(雄, 7~8週齢, 体重1.74~1.90kg, 北山ラベス)を用いた。サルはカニクイザル(雄, 4~7歳, 体重3.30~3.62kg, 日本チャールズ・リバー)を用いた。ラット, ウサギおよびマウスには固型飼料(ラット, マウス:CE-2, ウサギ:CR-1, 日本クレア)および水道水を自由に摂取させた。また, サルには固型飼料(PS型, オリエンタル酵母工業)を毎朝1匹あたり約100g与え, 水は自由に摂取させた。動物はいずれも温度23 $\pm$ 2°C, 湿度55 $\pm$ 5%の環境下で1週間以上の予備飼育をした後試験に供した。

3. 投与薬液の調製

エドバコマブ 2 mg/ml 注射剤はそのまま用いた。また、 $[^3\text{H}]$ エドバコマブ溶液は非標識体（エドバコマブ注射剤）およびプラセボで適宜希釈し、投与液を調製した。

4. 分析方法

1) エドバコマブの測定

血漿、リンパ液、尿および胆汁中のエドバコマブの測定は ELISA 法により行った。

エドバコマブに対する抗原として Lipid A (*E. coli* J5 由来, RIBI) またはリポ多糖 (LPS, *E. coli* J5 由来, LBL) を用いた。20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の抗原溶液をマイクロタイタープレート (F 型, Greiner) の各ウェルに 100 μl ずつ添加し、4°C で一晩インキュベートしてコーティングした。プレートを 0.1 M Tris-塩酸緩衝液 (Tris-T, pH 8.3) で洗浄したのち 0.1% ウシ血清アルブミン (BSA, SIGMA) および 0.05% Tween 20 を含む Tris-T (BSA/Tris-T, pH 8.3) によりブロッキングを行った。測定に用いた検量線作成用の標準試料はブランク試料にエドバコマブを一定量添加して調製し、被検試料は BSA/Tris-T で適宜希釈した。標準試料溶液および被検試料溶液を各ウェルに 100 μl ずつ添加し抗原に結合させた。プレート洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgM 抗体 (ZYMED) を各ウェルに 100 μl ずつ添加し抗原-エドバコマブ複合体に結合させた。過剰の標識抗体を洗浄した後、基質として nitrophenyl phosphate 溶液を添加し遮光下室温で発色させた。酵素反応を 0.1 M EDTA で停止させた後、*p*-nitrophenol の極大吸収波長 (405 nm) における吸光度をプレートリーダー (Vmax, Molecular Devices) で測定した。なお、検出限界は、ラット、ウサギおよびサルの血漿試料についてそれぞれ 0.31, 0.63 および 0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、その他の試料については 0.31 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

2) 放射能の測定

血漿、尿および胆汁は直接液体シンチレーター (Aquasol-2, NEN) に溶解して放射能を測定し

た。また、糞試料および各組織は 3 倍容の水を加えてホモジナイズし自動試料燃焼装置 (ASC-113 型, Aloka) により燃焼し、生成した $^3\text{H}_2\text{O}$ を液体シンチレーター (Aquasol-2, NEN) に溶解後放射能を測定した。放射能の測定は液体シンチレーションカウンター (LSC-3500 型, Aloka) で行い、クエンチングの補正は $[^{137}\text{Cs}]$ 外部標準線源法により行った。試料中放射能濃度はエドバコマブ量に換算して示した。なお、検出限界は 0.01 μg エドバコマブ eq./g, ml であった。

3) 代謝物の分析

a) ゲル濾過クロマトグラフィーによる分析

血漿および尿はフィルター (0.45 μm , Millipore) で濾過後試料とした。脾臓は 2 倍容の 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えてホモジナイズした後遠心分離し、得られた上清を濾紙で濾過し試料とした。これらの試料をセファロース CL6B ゲル (Pharmacia) を充填したカラム (12.4 mm id $\times$ 900 mm) を用いて分画した。溶出は 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4, 流速 3 ml/hr) により行い、各画分の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定しクロマトグラムを作成した。分子量マーカーとしてリボスクレアーゼ (M. W. 13,700, Pharmacia) およびアルブミン (M. W. 67,000, Pharmacia) を用いた。エドバコマブおよび分子量マーカーとして使用した標準品の検出は、プロテインアッセイ染色液を用いて行った。

b) TCA 分画法

血漿および尿試料に 2 倍容の 15% トリクロル酢酸溶液 (TCA) を氷冷下で加えて攪拌した後、遠心分離し上清を得た。沈殿物は 2 倍容の TCA でさらに 2 回洗浄したのち、上清 (TCA 可溶性画分) および沈殿 (TCA 不溶性画分) の放射能を測定した。

c) 尿中の $^3\text{H}_2\text{O}$ の測定

尿中の $^3\text{H}_2\text{O}$ 量を測定するため試料を室温、減圧下で蒸留し得られた蒸留水の放射能を測定した。

5. 薬物投与および試料採取

1) 血漿中濃度

a) ラット

ラット (3~5 匹) に $[^3\text{H}]$ エドバコマブ 2 mg/kg を尾静脈内投与した。投与後 0.5, 1.5, 3, 6, 9, 24, 48 および 72 時間に外頸静脈より 0.2 ml ずつヘパリン処理シリンジにて採血した。得られた血漿中の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。また、エドバコマブ 2 および 4 mg/kg を尾静脈内投与したのち、0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 および 24 時間に同様に採血を行い血漿を ELISA 法により測定した。

また、性差の検討のため、雌雄ラットにエドバコマブ 2 mg/kg を静脈内投与したのち、投与 24 時間まで同様に採血し、血漿を ELISA 法により測定した。なお、体重による体内動態への影響を考慮し、雌雄の体重差を少なくするため雄ラットは 6 週齢 (160~180 g)、雌ラットは 7 週齢 (140~160 g) をそれぞれ用いた。

b) ウサギ

ウサギ (4 匹) にエドバコマブ 2 および 4 mg/kg を耳静脈内投与した。投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 および 72 時間に、投与と反対側の耳静脈より 0.5 ml ずつ採血し、血漿を ELISA 法により測定した。

c) サル

サル (3 匹) にエドバコマブ 2 mg/kg を後肢伏在静脈内に点滴投与 (0.15 ml/kg/分) した。投与直後、投与後 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 および 48 時間に投与と反対側の後肢伏在静脈より 0.6 ml ずつ採血を行い、血漿を ELISA 法により測定した。

2) 体内分布

a) 組織内濃度

ラット (4 匹) に $[^3\text{H}]$ エドバコマブ 2 mg/kg を尾静脈内投与した。投与後 1.5, 3, 9, 24, 48, 72 および 168 時間にエーテル麻酔下で腹大動脈より採血、致死させた。

屠殺後直ちに脳、眼、唾液腺 (顎下腺)、甲状腺、胸腺、心臓、肺臓、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、副腎、精巣、前立腺、脊髄、骨髓、腸間膜リ

ンパ節、筋肉、脂肪および皮膚を摘出した。投与後各時間に得た血漿およびこれらの組織中の放射能を測定した。

b) 全身オートラジオグラフィー

マウスに $[^3\text{H}]$ エドバコマブ 2 mg/kg を尾静脈内投与し、投与後 15 分および 24 時間にエーテル麻酔死させた。マウスの全身に 2 % CMC を塗布した後、ドライアイス-アセトン中で凍結し、さらに 10 % CMC に凍結包埋した。ミクロトーム (Leitz) を用いて厚さ 30 μm の全身切片を作成した。これらの切片を凍結乾燥させたのち、オートラジオグラフィー用フィルム (MARG ^3H type, Konica) に約 5 週間密着させ、現像処理してオートラジオグラムを得た。

c) リンパ移行

ラット (3 匹) にエドバコマブ 2 mg/kg を尾静脈内投与し、投与後 1, 4, 8 および 24 時間に以下の方法で胸管リンパ液を採取した。ペントバルビタール・ナトリウムを腹腔内投与し麻酔下で胸管にシリコンチューブ (id 0.5 mm, od 1.0 mm) を挿入してリンパ液を採取できるよう処置した。各採取時間に胸管リンパ液約 100 μl を集め、ELISA 法による測定に供した。

3) 代謝

ラットに $[^3\text{H}]$ エドバコマブ 2 mg/kg を尾静脈内投与した。投与後 1 および 8 時間にエーテル麻酔下で腹大動脈より採血し、血漿を代謝物の検索に用いた。また、同様に投与したラットを代謝ケージ (メタボリカ、杉山元医理器) で個別飼育し、尿は投与後 8 時間まで氷冷下で蓄尿した。得られた尿を用い代謝物の検討を行った。

また、組織中代謝物の検索のため前項 5-2)-a) においてラットに $[^3\text{H}]$ エドバコマブ 2 mg/kg を尾静脈内投与した後 1.5 時間に採取した脾臓試料の一部を用いた。

4) 排泄

a) 尿・糞中排泄

$[^3\text{H}]$ 標識エドバコマブまたはエドバコマブ 2 mg/kg をラット (各 4 匹) に尾静脈内投与した。 $[^3\text{H}]$ 標識エドバコマブ投与群については投

与後24時間ごとに168時間までの尿および糞を、エドバコマブ投与群については投与後0～6 および6～24時間の尿をそれぞれ採取し試料とした。

b) 胆汁中排泄

ラット (3 匹) の総胆管にカニューレ (PE 10, Clay Adams) を留置し, $[^3\text{H}]$ エドバコマブ 2 mg/kg を尾静脈内投与し, Bollman 型ケージに固定した。投与後24時間ごとに48時間までの胆汁を氷冷下で採取し放射能を測定した。

また, エンドトキシン中和活性体の胆汁中排泄を検討するため, 同様の手順でエドバコマブ 2 mg/kg を静脈内投与したラットから投与後0～3, 3～6, 6～24および24～48時間の胆汁を採取し, ELISA 法による測定に供した。

6. 血漿中動態の解析

各実験動物における血漿中薬物動態は解析用プログラム, PAG-CP (インターデック) を用いて非線形最小二乗法により解析した。2-指数関数式 $C_p = A \cdot \exp(-\alpha t) + B \cdot \exp(-\beta t)$ への血漿中濃度-時間データのあてはめを行い, 得られたパラメータから α 相および β 相の血漿中濃度半減期 ($T_{1/2\alpha}$, $T_{1/2\beta}$), 血漿中濃度-時間曲線下面積 ($AUC_{0-\infty}$) および投与初期の分布容積 (V_d) を以下の計算式より算出した。

$$T_{1/2\alpha} = \ln 2 / \alpha$$

$$T_{1/2\beta} = \ln 2 / \beta$$

$$AUC_{0-\infty} = A / \alpha + B / \beta$$

$$V_d = \text{Dose} / (A + B)$$

ここで C_p は血漿中濃度, A , B , α , β は定数である。

結 果

1. 血漿中濃度推移

1) ラット

ラットに $[^3\text{H}]$ エドバコマブ 2 mg/kg 静脈内投与した時の血漿中濃度推移 (エドバコマブ換算量) を Fig. 1 に, エドバコマブ 2 および 4 mg/kg を静脈内投与した時の血漿中濃度推移を Fig. 2 に示した。

$[^3\text{H}]$ エドバコマブ投与後の血漿中放射能濃度

Fig. 1 Plasma levels of radioactivity in male rats after intravenous administration of $[^3\text{H}]$ Edobacomab at a dose of 2 mg/kg (Mean $\pm$ S.D., $n=4$)

Fig. 2 Plasma levels of Edobacomab in male rats after intravenous administration at a dose of 2 and 4 mg/kg (Mean $\pm$ S.D., 2 mg/kg: $n=5$, 4 mg/kg: $n=4$)

は投与後0.5時間に50.8 $\mu\text{g eq./ml}$ を示し, $T_{1/2\beta}$ 13.3時間で減衰した。 $AUC_{0-\infty}$ は 400.9 $\mu\text{g eq.} \cdot \text{hr/ml}$ であった。初期濃度 (C_0) は 54.3 $\mu\text{g eq./ml}$, 投与初期の V_d は 37.0 ml/kg であった。

エドバコマブを投与した場合の投与後0.25時間

Fig. 3 Plasma levels of Edobacomab in male or female rats after intravenous administration at a dose of 2 mg/kg (Mean $\pm$ S.D., male: n=3, female: n=4)

Fig. 5 Plasma levels of Edobacomab in male monkeys after intravenous infusion at a dose of 2 mg/kg (Mean $\pm$ S.D., n=3)

Fig. 4 Plasma levels of Edobacomab in male rabbits after intravenous administration at a dose of 2 and 4 mg/kg (Mean $\pm$ S.D., n=4)

の血漿中濃度は、2 および 4 mg/kg 投与でそれぞれ 63.8 および 105.3 $\mu\text{g/ml}$ であり用量に対応して増加した。 $T_{1/2\beta}$ はそれぞれ 11.1 および 12.0 時間であった。 $\text{AUC}_{0\sim\infty}$ は 2 および 4 mg/kg 投与でそれぞれ 462.6 および 800.2 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ で用

量に対応して増加し、 V_d はそれぞれ 28.4 および 30.3 ml/kg であった。 エドバコマブ投与時の血漿中濃度推移は $[^3\text{H}]$ エドバコマブを投与した場合とほとんど変わらなかった。

雌雄ラットにエドバコマブ 2 mg/kg を静脈内投与した時の血漿中濃度推移を Fig. 3 に示した。血漿中濃度は投与後 0.25 時間において雌雄とも 38.1 $\mu\text{g/ml}$ であり投与後 24 時間まで同じ推移を示した。 $T_{1/2\beta}$ は雄、雌でそれぞれ 13.2 時間および 15.2 時間、 $\text{AUC}_{0\sim\infty}$ はそれぞれ 389.0 および 375.0 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ 、 V_d はそれぞれ 40.5 および 48.1 ml/kg であった。血漿中濃度および血漿中動態パラメータはいずれも雌雄間で有意な差は認められなかった (t 検定, $p > 0.05$)。

2) ウサギ

ウサギにエドバコマブ 2 および 4 mg/kg を静脈内投与した時の血漿中濃度推移を Fig. 4 に示した。投与後 0.25 時間の血漿中濃度は 2 および 4 mg/kg 投与でそれぞれ 61.9 および 78.7 $\mu\text{g/ml}$ であった。血漿中濃度の減衰はゆるやかで、 $T_{1/2\beta}$ はそれぞれ 22.7 および 21.1 時間を示し、 $\text{AUC}_{0\sim\infty}$ はそれぞれ 888.7 および 1952.5 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ で用量に対応して増加した。また、 V_d はそ

れぞれ 33.1 および 47.5 ml/kg であった.

3) サル

サルにエドバコマブ 2 mg/kg を点滴静脈内投与した時の血漿中濃度推移を **Fig. 5** に示した. 血漿中濃度は点滴終了時に最高値 35.8 $\mu\text{g/ml}$ を示し, 投与後約 2 時間まで速やかに減衰し, それ以降は $T_{1/2\beta}$ 13.2 時間で比較的ゆるやかな減衰を示した. 投与後 48 時間における血漿中濃度は 0.74 $\mu\text{g/ml}$ であった. $\text{AUC}_{0\sim\infty}$ は 211.1 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ であった.

以上の各実験動物におけるエドバコマブの血中動態パラメータを **Table I** にまとめて示した.

2. 体内分布

1) 組織内濃度

ラットに $[^3\text{H}]$ エドバコマブ 2 mg/kg を静脈内投与した時の血漿および各組織内放射能濃度 (エドバコマブ換算量) を **Table II** に示した. 放射能濃度はほとんどの組織で投与後 1.5 時間または 3 時間に最高値を示し, 脾臓で最も高く 26.4 $\mu\text{g eq./g}$, ついで腸間膜リンパ節 11.8 $\mu\text{g eq./g}$, 肝臓 6.18 $\mu\text{g eq./g}$, 肺臓 5.23 $\mu\text{g eq./g}$, 腎臓 4.75 $\mu\text{g eq./g}$, 骨髄 3.82 $\mu\text{g eq./g}$, 副腎 3.08 $\mu\text{g eq./g}$ の順に高かったが, いずれも血漿中濃度 35.2 $\mu\text{g eq./ml}$ より低かった. その他の組織内濃度は血漿中濃度の 1/10 以下と低く, 特に脳, 脊髄, 眼, 筋肉および脂肪組織内濃度は約 1/90 以下であった. その後, 各組織内濃度は血漿中濃度の減衰に伴って推移し, 投与後 168 時間ではほとんどの組織では検出限界 (0.01 $\mu\text{g eq./g}$ or ml) 以下となった.

2) 全身オートラジオグラフィー

マウスに $[^3\text{H}]$ エドバコマブ 2 mg/kg を静脈内投与し, 投与後 15 分および 24 時間に作成したオートラジオグラムを **Fig. 6** に示した. 投与後 15 分において肝臓, 肺臓, 腎臓, 脾臓, 骨髄, ハーダー腺および血液に強い放射能が認められたが, 脳, 眼および脊髄には認められなかった. 各組織内の放射能は投与後 24 時間では全般的に低下し, 肝臓, 肺臓, 腎臓および血液に弱い放射能が認められた他は痕跡程度であった. これらの結

Table I Pharmacokinetic parameters after intravenous administration of $[^3\text{H}]$ Edobacomab or Edobacomab to experimental animals

Drug	Animal	Gender	n	Dose (mg/kg)	A ($\mu\text{g/ml}$)	B ($\mu\text{g/ml}$)	α (1/hr)	β (1/hr)	$T_{1/2\alpha}$ (1/hr)	$T_{1/2\beta}$ (1/hr)	Vd (ml/kg)	$\text{AUC}_{0\sim\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$)
$[^3\text{H}]$ Edobacomab	Rat	M	4	2	41.5 $\pm$ 1.6	12.7 $\pm$ 4.3	0.27 $\pm$ 0.06	0.05 $\pm$ 0.004	2.70 $\pm$ 0.55	13.3 $\pm$ 0.9	37.0 $\pm$ 2.4	400.9 $\pm$ 41.0 ¹⁾
Edobacomab	Rat	M	5	2	45.2 $\pm$ 10.2	26.1 $\pm$ 2.4	1.01 $\pm$ 0.19	0.06 $\pm$ 0.002	0.71 $\pm$ 0.14	11.1 $\pm$ 0.4	28.4 $\pm$ 3.2	462.6 $\pm$ 39.5
			4	4	91.9 $\pm$ 19.1	42.8 $\pm$ 4.2	1.50 $\pm$ 0.53	0.06 $\pm$ 0.006	0.52 $\pm$ 0.23	12.0 $\pm$ 1.2	30.3 $\pm$ 4.9	800.2 $\pm$ 19.8
		M ²⁾	3	2	34.9 $\pm$ 6.9	14.9 $\pm$ 5.9	1.90 $\pm$ 1.31	0.05 $\pm$ 0.027	0.53 $\pm$ 0.47	13.2 $\pm$ 3.7	40.5 $\pm$ 9.2	389.0 $\pm$ 144.0
		F	4	2	26.4 $\pm$ 2.0	15.5 $\pm$ 3.7	0.73 $\pm$ 0.29	0.05 $\pm$ 0.007	1.04 $\pm$ 0.33	15.2 $\pm$ 2.4	48.1 $\pm$ 4.6	375.0 $\pm$ 58.2
	Rabbit	M	4	2	36.4 $\pm$ 12.7	25.1 $\pm$ 8.0	0.39 $\pm$ 0.14	0.03 $\pm$ 0.005	1.93 $\pm$ 0.65	22.7 $\pm$ 4.1	33.1 $\pm$ 5.1	888.7 $\pm$ 112.6
			4	4	20.8 $\pm$ 3.5	63.6 $\pm$ 6.9	1.52 $\pm$ 1.41	0.03 $\pm$ 0.002	0.73 $\pm$ 0.42	21.1 $\pm$ 1.2	47.5 $\pm$ 2.8	1952.5 $\pm$ 97.4
	Monkey	M	3	2	34.9 $\pm$ 4.1	12.0 $\pm$ 8.1	8.95 $\pm$ 12.4	0.07 $\pm$ 0.038	0.45 $\pm$ 0.58	13.2 $\pm$ 7.4	44.1 $\pm$ 10.6	211.1 $\pm$ 123.7

Each parameter was estimated with nonlinear least-squares regression of a two-compartment open model (mean $\pm$ S.D.).

1) This value is showed as μg equivalent of Edobacomab $\cdot\text{hr/ml}$.

2) Six-week-old male rats were used, since their body weights were similar to 7-week-old female rats.

Table II Tissue distribution of radioactivity in male rats after intravenous administration of [³H] Edobacomab at dose of 2 mg/kg

Tissue	Concentration ($\mu\text{g eq. of edobacomab/g or ml}$)						
	1.5	3	9	24	48	72	168 (hr)
Plasma	35.24 $\pm$ 3.32	29.24 $\pm$ 0.71	16.09 $\pm$ 1.17	5.17 $\pm$ 0.07	1.35 $\pm$ 0.18	0.35 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.01
Brain	0.36 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.05	0.17 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.01	ND
Eye	0.24 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.08	0.26 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.01	ND
Thyroid	2.04 $\pm$ 0.70	2.17 $\pm$ 0.09	0.94 $\pm$ 0.27	0.33 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02	ND	ND
Salivary gland	0.73 $\pm$ 0.07	0.76 $\pm$ 0.20	0.44 $\pm$ 0.07	0.18 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.08	0.07 $\pm$ 0.01	ND
Thymus	1.19 $\pm$ 1.07	0.89 $\pm$ 0.05	0.74 $\pm$ 0.62	0.19 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	ND
Heart	2.41 $\pm$ 0.66	2.39 $\pm$ 0.06	1.24 $\pm$ 0.16	0.48 $\pm$ 0.07	0.17 $\pm$ 0.06	0.04 $\pm$ 0.02	ND
Lung	5.06 $\pm$ 1.34	5.23 $\pm$ 0.28	1.97 $\pm$ 0.29	1.18 $\pm$ 0.08	0.21 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.02	ND
Liver	6.18 $\pm$ 0.51	4.64 $\pm$ 0.44	2.02 $\pm$ 0.09	0.54 $\pm$ 0.09	0.12 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	ND
Spleen	26.40 $\pm$ 7.28	16.00 $\pm$ 0.93	8.15 $\pm$ 1.22	1.38 $\pm$ 0.18	0.35 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.00
Pancreas	1.61 $\pm$ 0.08	1.60 $\pm$ 0.07	0.83 $\pm$ 0.12	0.32 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	ND
Kidney	4.75 $\pm$ 0.56	4.44 $\pm$ 0.41	2.32 $\pm$ 0.34	0.83 $\pm$ 0.13	0.19 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.00	ND
Adrenal	3.08 $\pm$ 0.35	2.37 $\pm$ 0.17	1.34 $\pm$ 0.15	0.43 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	ND
Testis	0.73 $\pm$ 0.07	0.81 $\pm$ 0.11	0.64 $\pm$ 0.12	0.19 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	ND
Prostate	0.60 $\pm$ 0.03	0.93 $\pm$ 0.20	0.48 $\pm$ 0.14	0.18 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	ND
Spinal cord	0.31 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	ND
Bone marrow	3.82 $\pm$ 0.40	3.23 $\pm$ 0.57	2.15 $\pm$ 0.44	0.53 $\pm$ 0.05	0.16 $\pm$ 0.05	0.03 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01
Mesenteric lymphnode	8.03 $\pm$ 3.85	11.84 $\pm$ 3.66	7.19 $\pm$ 1.46	1.26 $\pm$ 0.71	0.41 $\pm$ 0.12	0.09 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.01
Muscle	0.20 $\pm$ 0.05	0.17 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	ND	ND
Fat	0.19 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.06	0.16 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.00	ND	ND
Skin	0.90 $\pm$ 0.79	0.59 $\pm$ 0.42	0.36 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	ND

Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=4)

ND: Not detected (less than 0.01 $\mu\text{g eq. of edobacomab/g or ml}$)

Table III Lymph levels of Edobacomab in male rats after intravenous administration at dose of 2 mg/kg

Time	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
	1	4	8	24 (hr)
	6.65 $\pm$ 0.30	3.33 $\pm$ 0.55	2.20 $\pm$ 1.04	0.42* $\pm$ 0.09

Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3, *: n=2)

果はラットで行った摘出法による組織内分布の結果と同様の傾向を示した。

3) リンパ移行

ラットにエドバコマブ 2 mg/kg を静脈内投与した時の胸管リンパ液中のエドバコマブ濃度を投与後24時間まで測定し **Table III** に示した。投与後1時間におけるリンパ液中エドバコマブ濃度 (6.65 $\mu\text{g/ml}$) は血漿中濃度 (41.8 $\mu\text{g/ml}$, Fig.

2) の約 1/6 であった。その後、リンパ液中濃度は血漿中濃度推移と同様に減衰し、投与後24時間には血漿中濃度 (6.0 $\mu\text{g/ml}$) の 1/10以下の濃度の 0.42 $\mu\text{g/ml}$ となった。

3. 代謝

1) 血漿中代謝物

ラットに [³H] エドバコマブ 2 mg/kg を静脈内投与した時の血漿を TCA 沈殿法により分画し、可溶性および不溶性画分の放射能を測定した。血漿中エドバコマブ由来放射能は、投与後1時間ではその98.7%が、8時間では95.3%が TCA 不溶性画分にあった (**Table IV**)。

また、血漿中放射能をゲル濾過クロマトグラフィーで分析した結果、投与後1時間ではその98.1%が、8時間では94.1%がエドバコマブに相当する画分に存在した (**Fig. 7**)。

15 min.

24 hour

Fig. 6 Whole body autoradiograms of male mice after intravenous administration of $[^3\text{H}]$ Edobacomab at a dose of 2 mg/kg

Condition
Column : Sepharose CL6B (12.4mm ϕ x 900mm)
Flow rate : 3ml / hr

Fig. 7 Gel chromatograms of rat plasma collected after intravenous administration of $[^3\text{H}]$ Edobacomab at a dose of 2 mg/kg

2) 脾臓ホモジネート上清中代謝物

ラット組織移行試験時の投与後1.5時間の脾臓のホモジネート上清について代謝物の検索を行った (Fig. 8). エドバコマブに相当する画分の放射能の割合は11.9%であり, 低分子代謝物に相当する画分の放射能の割合は74.4%であった. この低分子代謝物に相当する画分は分子量マーカーであるリボヌクレアーゼ (M. W. 13,700) より低分子側に溶出した. この他, クロマトグラム上でエドバコマブと低分子代謝物の中間に位置する画

Table IV Radioactivity in TCA soluble and insoluble fractions of plasma or urine in rats after intravenous administration of $[^3\text{H}]$ Edobacomab at a dose of 2 mg/kg

		Radioactivity(%)	
		TCA soluble	TCA insoluble
Plasma	1 hr	1.3	98.7
	8 hr	4.7	95.3
Urine*	0~8 hr	100.0	0

* $^3\text{H}_2\text{O}$ was 0.1% of total urinary radioactivity

分にもわずかながら放射能が認められた.

3) 尿中代謝物

ラットに $[^3\text{H}]$ エドバコマブ 2 mg/kg を静脈内投与した時の尿を TCA 分画し可溶性画分と不溶性画分の放射能を測定した (Table IV). 尿中の放射能はすべて TCA 可溶性画分に存在し, エドバコマブは低分子の代謝物として尿中に排泄されることが明らかになった. なお, $[^3\text{H}]$ 標識部位の生体内安定性を確認するためラット尿試料を蒸留して $^3\text{H}_2\text{O}$ 放射能を測定した結果, $^3\text{H}_2\text{O}$ の割合は尿中の放射能の0.1%程度であった.

4. 排泄

1) 尿・糞中排泄

ラットに $[^3\text{H}]$ エドバコマブ 2 mg/kg を静脈内投与した時の尿および糞中の放射能排泄率を Table V に示した. 投与後168時間までの尿および糞中排泄率はそれぞれ投与放射能の95.7および0.9%で, 合計96.6%であった. 投与放射能の78.3%(尿77.9%, 糞0.4%) が投与後24時間までに排泄された. また, エドバコマブ 2 mg/kg をラットに静脈内投与した時の尿試料について ELISA 法により測定した結果, 投与後24時間までの尿中には Lipid A 結合活性は認められず, 未変化のエドバコマブは存在しないと判断された.

2) 胆汁中排泄

総胆管カニユーレを施したラットに $[^3\text{H}]$ エドバコマブ 2 mg/kg を静脈内投与した時の胆汁中放射能排泄率を測定し, Table V に示した. 胆汁中には投与後48時間までに投与放射能の

Condition

Column : Sepharose CL6B(12.4mm ϕ x 520mm)

Flow rate : 5.4ml / hr

Fig. 8 Gel chromatogram of supernatant of spleen homogenate in rat at 1.5 hr after intravenous administration of [^3H]Edobacomab at a dose of 2 mg/kg

Table V Urinary, fecal and biliary excretions of radioactivity in male rats after intravenous administration of [^3H] Edobacomab at a dose of 2 mg/kg

Time (hr)	Recovery (% of dose)			
	Urine	Feces	Urine + Feces	Bile*
0-24	77.91 $\pm$ 1.94	0.35 $\pm$ 0.25	78.26 $\pm$ 2.03	2.53 $\pm$ 0.89
24-48	11.55 $\pm$ 1.56	0.32 $\pm$ 0.30	11.87 $\pm$ 1.52	0.75 $\pm$ 0.38
48-168	6.28 $\pm$ 0.43	0.19 $\pm$ 0.11	6.47 $\pm$ 0.51	—
Total	95.74 $\pm$ 1.61	0.86 $\pm$ 0.64	96.61 $\pm$ 1.73	3.28 $\pm$ 1.26

Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=4, *: n=3)

3.3%が排泄された。

また、同投与量のエドバコマブをラットに静脈内投与した時の胆汁中には投与後48時間までに Lipid A 結合活性は認められず、未変化のエドバコマブは存在しないと判断された。

考 察

エドバコマブまたは [^3H] エドバコマブの実験動物における血中動態、体内分布、代謝および排泄を調べた。

試験に用いた [^3H] エドバコマブは、定法で

ある Bolton-Hunter 法⁷⁾に準じてリジン残基または末端アミノ基を従来用いられてきた [^{125}I] 標識に代わり [^3H] プロピオニル化したものである。 [^3H] エドバコマブを投与したとき、生体内での標識部位の安定性の指標となる ^3HO の尿中排泄はラットで尿中放射能の0.1%に過ぎなかった。この事は [^3H] 標識を行ったことにより標識部位の生体内での安定性が向上したことを示唆しており、 [^{125}I] の遊離あるいは遊離した [^{125}I] の特定組織への集積など蛋白質の体内動態の解釈上の問題点⁸⁾の解消に繋がると考えられる。

また、 $[^3\text{H}]$ エドバコマブによる試験結果は ELISA 法による測定結果とほぼ一致しており、エンドトキシン結合性をもったエドバコマブの体内動態を反映することができるものと期待できる。

エドバコマブはラットに静脈内投与したとき、用量に応じた血漿中濃度推移を示し、 $T_{1/2\beta}$ はいずれの用量でも11~15時間の間にあり、血中動態に性差はなかった。また、サルではラットと同様の $T_{1/2\beta}$ を示したが、ウサギにおいてのみ比較的緩やかな減衰を示した。試験に用いたいずれの動物種においても、 V_d は 28~48 ml/kg と小さくほぼ血漿容積に近い値であり、エドバコマブが高分子たん白質（推定分子量：970,000）であることから血管外へ移行し難いためと考えられる。S. Harkonen らにより実施された健常成人におけるエドバコマブの体内動態試験⁹⁾において、エドバコマブの $T_{1/2}$ は約 7~20 時間、 V_d は小さく 3.7~8.2 l であり、ヒトと動物で同様の体内動態パラメータを示し種差の少ないことが確認された。また、 $[^3\text{H}]$ エドバコマブの血中濃度推移はマウス由来の IgM である FT166¹⁰⁾（ラットにおける $T_{1/2}$ 12.6 時間）や大腸癌に対するヒト IgM MAb-16.88¹¹⁾（ $T_{1/2}$ ；担癌ヌードマウス 8 時間、ヒト約 20 時間）について報告されている結果とおおむね一致した。これらの成績からエドバコマブもこれらの異種 IgM 抗体と類似の血中動態を示すものと考えられるが、ヒトあるいは動物における自己 IgM の血中半減期（ヒト：5.1 日¹²⁾、サル：4.7 日¹³⁾、ウサギ：3~4 日¹²⁾）に比べ明らかに消失が速く、異種 IgM 抗体のクリアランスには免疫系が関与しているためと報告されている^{12,13,14)}。

ラットに $[^3\text{H}]$ エドバコマブを静脈内投与した時の組織分布性を検討したところ、組織中の放射能濃度は血漿中濃度より低かったものの脾臓、腸間膜リンパ節、肝臓、肺臓、腎臓、骨髓などの細網内皮系組織で高かった。これらの組織のうち脾臓のホモジネート上清についてゲル濾過クロマトグラフィーにより検討したところ、エドバコマ

ブに相当する画分の放射能の割合は投与後 1.5 時間で 11.9% であり、ほとんどが低分子代謝物（74%）として存在していた。脾臓では食細胞が多く存在することから、エドバコマブは異種蛋白として認識されて細胞内に取り込まれ、プロテアーゼ等により代謝または分解されることが示唆された。

また、静脈内投与後の胸管リンパ液を経時的に採取したところエドバコマブの移行が認められており、腸間膜リンパ節にも比較的高い放射能濃度が認められていることから、リンパ系が体内動態に一部関与していることが示された。

$[^3\text{H}]$ エドバコマブをラットに静脈内投与した時の血漿中放射能の 95% 以上が TCA 不溶性画分に存在し、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分析でもほとんどの放射能が未変化のエドバコマブに相当する画分に存在することが示された。このことは、ラットにエドバコマブを静脈内投与した時の血漿中薬物動態（ELISA 法）と $[^3\text{H}]$ 標識エドバコマブを静脈内投与した時の血漿中放射能動態が比較的よく一致していることとも符合しており、エドバコマブは血漿中ではその大部分が未変化体として循環していることを示唆している。

一方、エドバコマブをラットに静脈内投与した時、投与放射能の 95.7% が尿中に、また、0.9% が糞中にそれぞれ排泄された。尿中放射能はすべて TCA 可溶性画分にあり、未変化のエドバコマブに相当する高分子画分には放射能が認められなかったこと、ELISA 法による測定で Lipid A への結合性は認められなかったことから、エドバコマブは不活化された低分子代謝物として尿中に排泄されることが示唆された。なお、胆汁中には Lipid A 結合活性は認められず、脾臓と同様に肝臓での代謝によってもエドバコマブは不活化されたのち胆汁を介して、糞中へわずかながら排泄されることが示された。

以上のことから、実験動物の静脈内に投与されたエドバコマブは主に未変化体として循環血液内に存在するが、脾臓、リンパ節、肝臓等にも他の組織より高濃度に分布し、これらの細網内皮系組

織で低分子に代謝分解され、そのほとんどが尿中に排泄されることが明らかになった。

要 約

実験動物を用いてエドバコマブの単回静脈内投与時の血中動態、体内分布、代謝および排泄を検討した。

1. ラットに静脈内投与した時、血漿中濃度は用量とともに増加した。また、 $[^3\text{H}]$ エドバコマブを静脈内投与した時の血中動態はエドバコマブ投与時と同様であり、血漿中濃度は二相性に消失したが性差は認められなかった。サルにエドバコマブを点滴静脈内投与した時の消失半減期はラットとはほぼ同じであり、ウサギでは $T_{1/2\beta}$ はやや長く種差が認められた。いずれの動物においても、Vd は $28 \sim 48 \text{ ml/kg}$ と小さくほぼ血漿量に相当し、エドバコマブは主として血液中に分布することが示された。

2. $[^3\text{H}]$ エドバコマブを静脈内投与した時のラットの組織内放射能濃度は脾臓、肝臓などの細網内皮系組織で比較的高かったがいずれも血漿中濃度より低く、組織移行性が低いことが示された。この成績は、全身オートラジオグラムの成績とはほぼ一致した。胸管リンパ液への移行も認められ、リンパ系の体内動態への関与が示唆された。

3. ラットに $[^3\text{H}]$ エドバコマブ静脈内投与した時、血漿中放射能の95%以上が TCA 不溶性画分にあり、ゲル濾過クロマトグラフィーにおいても血漿中放射能の90%以上が未変化の $[^3\text{H}]$ エドバコマブであることが示された。

脾臓ホモジネート上清中の放射能はそのほとんどが低分子代謝物であり、脾臓を初めとする細網内皮系組織が本薬の除去機構および代謝に強く関わっていることが示唆された。

4. $[^3\text{H}]$ エドバコマブは投与後168時間まで投与放射能の約97% (尿96%, 糞1%) が排泄され、尿中放射能はすべて TCA 可溶性画分に存在し、Lipid A 結合性は認められなかった。

文 献

- 1) 石坂彰敏, 他: 肺病変と好中球プロテアーゼ. 代謝, **29**(1), 41 (1992).
- 2) 志賀淳治, 他: 人体症例にみるシェワルツマン反応とその病因論. エンドトキシン研究の新しい展開. 羊土社, 143 (1986).
- 3) 谷 徹, 他: 肝腎症候群に対する新しい治療のアプローチ—エンドトキシン吸着除去の試み. 麻酔と蘇生, **20**(別冊), 133 (1984).
- 4) K. M. Olsen and G. D. Campbell: E5 monoclonal immunoglobulin M antibody for the treatment gram-negative sepsis, DICP. *The Annals of Pharmacotherapy*, **25** July/August, 784 (1991).
- 5) David M. Wood, James B. Parent, *et al.*: Reactivity of monoclonal antibody E5 with endotoxin. I. Binding to lipid A and rough lipopolysaccharides. *Circ. Shock*, **38**, 55 (1992).
- 6) J. B. Parent, H. G. Santoro, *et al.*: Reactivity of monoclonal antibody E5 with endotoxin. II. Binding to short- and long-chain smooth lipopolysaccharides. *Circ. Shock*, **38**, 63 (1992).
- 7) A. E. Bolton and W. M. Hunter: The Labelling of proteins to high specific radio activities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. *Biochem. J.*, **133**(3), 529 (1973).
- 8) 升永博明, 他: 遺伝子組換え型ヒトエリスロポエチン (SNB-5001) の体内動態 (II): ラットにおける ^{125}I -SNB-5001 の静脈内および皮下投与後の血漿中濃度推移, 分布, 代謝, 排泄および蓄積性. 薬物動態, **6**(5), 693 (1991).
- 9) S. Harkonen, P. Scannon, *et al.*: Phase I study of a murine monoclonal anti-lipid A antibody in bacteremic and nonbacteremic patients, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**(5), 710 (1988).
- 10) R. L. Wahl, J. Barrett, *et al.*: The intraperitoneal delivery of radiolabeled monoclonal antibodies: Studies on the regional delivery advantage. *Cancer Immunol Immunother*, **26**, 187 (1988).
- 11) H. J. Haisma, M. A. P. Kesel, *et al.*: Human IgM monoclonal antibody 16.88: P pharmacokinetics and distribution in mouse and man. *Br. J. Cancer*, **62** Suppl. X, 40 (1990).
- 12) T. A. Waldmann and W. Strober: Metabolism of immunoglobulins. *Progr. Allergy*, **13**, 1 (1969), Karger, Basel, New York.
- 13) S. J. Challacombe and M. W. Russell: Estimation of the intravascular half-lives of normal rhesus monkey IgG, IgA and IgM. *Immunology*, **36**(2), 331 (1979).
- 14) J. V. Peppard and E. Orlans: The biological half-lives of four rat immunoglobulin isotypes. *Immunology*, **40**(4), 683 (1980).