◇◇レビュー◇◇

顆粒球コロニー形成刺激因子 (G-CSF) のファーマコキネティクス —体内動態における受容体介在性クリアランスの寄与—

桑原 隆, 小林 智, 杉山 雄一*

Pharmacokinetics of a Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSF) —Role of Receptor-mediated Clearance in the Disposition of G-CSF—

Takashi KUWABARA, Satoshi KOBAYASHI, Yuichi SUGIYAMA*

Pharmaceutical Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo, Shizuoka;

**Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Tokyo*

Summary: Receptor-mediated endocytosis is one of the most important system for determining the disposition of physiologically active peptides. We reviewed the pharmacokinetic properties of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), one of the hematopoietic growth factors, and also the contribution of the receptor-mediated endocytosis in the disposition of G-CSF was discussed. At present, three kinds of recombinant human G-CSF have been on the market in Japan, *i.e.*, rhG-CSF produced by CHO cells, rhG-CSF by *E. coli* and mutant G-CSF by *E. coli* which has a different amino acid sequence in the N-terminal region. These G-CSFs commonly show the non-linear pharmacokinetic properties in no relation to the sugar chain or N-terminal sequence. That is, the total clearances of G-CSFs in the experimental animals and humans decrease as the dose increases and those increase after the repeated administrations. Pharmacokinetic analysis of the plasma concentration-time profiles reveals that the total clearance of G-CSF consists of both saturable and nonsaturable clearances. The mean apparent bioavailability of G-CSF after subcutaneous administration is about 60%. The role of a sugar chain in the disposition of G-CSF is not so important, but the negative charges of sialic acids of the sugar chain effect the total clearance and the absorption from the subcutaneous sites. The clinical observations that the total clearance of G-CSF well correlates with the absolute neutrophil counts in the peripheral blood, suggest the contribution of the G-CSF receptor to the saturable clearance of G-CSF. In fact, the several studies using mutant G-CSF have evaluated that the receptor-mediated clearance of the G-CSF receptor in the bone marrow mainly contributes to the saturable G-CSF clearance. On other hand, the glomerular filtration in the kidney is the major mechanism of the nonsaturable clearance of G-CSF.

Key words: Granulocyte, Colony-stimulating factor, Tissue uptake, Receptor down-regulation, Receptor-mediated endocytosis

はじめに

近年, 受容体介在性エンドサイトーシス (RME) が生理活性ペプチドの体内動態に大きく寄与することが報告され, “transport receptor” という概念も提唱されている^{1,2)}. これまでに insulin³⁾, epidermal growth factor (EGF)^{4,5)}, hepatocyte growth factor⁶⁾, atrial natriuretic factor (ANF)⁷⁾などが, 肝, 腎上の特異的レセプターによる RME により循環血中より消失し, そのために非線

形な体内動態を示すことが報告されている. 受容体とペプチドの相互作用は解離定数が nM 以下であり, 非常に特異的であるため, 生理的条件下ではこれらの生理活性ペプチドの循環血中濃度を調節する homeostatic regulator として働いていると考えられている. このため生理活性ペプチドの体内動態機構を解明し, より有効かつ安全に医薬品として用いるために受容体介在性エンドサイトーシスの寄与を明らかにする必要がある.

近年, 血液細胞の分化, 増殖あるいは活性化, 機能亢

協和発酵工業(株) 医薬研究所 〒411 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188

* 東京大学 薬学部 〒113 東京都文京区本郷 7-3-1

進に関与するコロニー刺激因子 (CSF) とよばれる一群の造血因子が、遺伝子組み換え技術により医薬品として開発されている。これらは多様な血液前駆細胞に lineage-specific に作用する一群の成長因子であり、erythropoietin (EPO), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin-3 (IL-3) などが知られている⁸⁾。これら CSF の分子量は 14 kDa から 90 kDa と多様であるが⁸⁾、いずれも非線形の体内動態を示すことが既に報告されている。すなわち EPO, GM-CSF, G-CSF, M-CSF などで投与量の増量に伴う全身クリアランスの減少が、また EPO, G-CSF, M-CSF では反復投与によるクリアランスの増加が報告されている⁹⁻¹⁴⁾。これらの非線形体内動態に、骨髓、脾臓等に存在する標的細胞表面上の受容体を介したクリアランスが重要な役割を果たしていることが考えられている。この CSF のクリアランス機構を明らかにすることは、臨床での有効性の向上のみならず生理的濃度の CSF の調節機構、血液細胞のホメオスタシスについて明らかにするためにも重要である。本論ではこのうち G-CSF に焦点を絞り、これまで報告された体内動態に関して、前半は遺伝子組み換え型ヒト G-CSF を用いた他の研究グループの成果についてまとめ、後半で mutant G-CSF を用いた我々の研究結果をまとめた。なお、その他の CSF の体内動態については総説を参考にして頂きたい^{9,10)}。

G-CSF は顆粒球系前駆細胞の顆粒球への分化促進、増殖刺激作用および成熟好中球の機能亢進作用等を有する¹⁵⁻¹⁷⁾。遺伝子組み換え技術により大量に生産されたヒト G-CSF は現在、臨床において化学療法、放射線治療後および骨髓移植後の顆粒球の早期回復などを目的として用いられている¹⁸⁻²⁰⁾。G-CSF の分子量は 18-19 kDa であり、生物作用には種差が少なく、ヒト型 G-CSF (hG-CSF) は多くの動物種で末梢血好中球の上昇などの作用を示す⁸⁾。また本邦では hG-CSF として動物細胞を宿主とした糖鎖を有する CHO-G-CSF (lenograstim, Fig. 1 糖鎖構造)、大腸菌を宿主とする *E. coli*-G-CSF (filgrastim)、および第 2 世代とよばれる N 末端部のアミノ酸を一部改変し大腸菌を宿主に生産された mutant G-CSF (nartograstim) の 3 剤が組換え

型 G-CSF (rhG-CSF) として上市されている。いずれの G-CSF も実験動物およびヒトにおいて非線形な体内動態を示す。本総説では G-CSF レセプターの G-CSF の体内動態における役割という観点を中心に、G-CSF のファーマコキネティクスについてまとめた。

実験動物におけるファーマコキネティクス

G-CSF のファーマコキネティクスについて論じる前にその血漿中濃度測定法について簡単に紹介したい。研究初期においては、血漿中濃度の測定はマウス骨髓細胞への ³H-Thymidine の取り込みを指標とした bioassay 法により行われた²¹⁾。その後、高感度な ELISA 法が開発され^{22,23)}、投与量による体内動態変化など、より詳細に検討が行われるようになった。ELISA 法は抗体への結合活性を、すなわち抗原性を指標として測定するため、G-CSF の生物活性を反映しているかが問題であるが、血漿中濃度測定においては従来の bioassay 法とよく一致し^{23,24)}、G-CSF 活性を持つ蛋白の動態を反映しているものと考えられている。

1. G-CSF の体内動態の投与量依存性

田中らはラットに *E. coli*-G-CSF を 1-100 $\mu\text{g/kg}$ 静脈内、および皮下投与後の血漿中濃度推移の投与量依存性について報告している²⁵⁾。すなわち血漿中 G-CSF はいずれの投与量においても 2 相性の消失を示すが、消失相の半減期は 5 $\mu\text{g/kg}$ の 1.08 時間から 100 $\mu\text{g/kg}$ では 1.70 時間と投与量の増量に伴い延長が認められる (Table I)。この時の全身クリアランスは 1 $\mu\text{g/kg}$ では 80 ml/hr/kg, 10 $\mu\text{g/kg}$ では 56 ml/hr/kg に低下し、10 $\mu\text{g/kg}$ 以上ではほぼ一定値を示す (Table I)。分布容積は約 50 ml/kg とほぼ血漿量に等しく、投与量による変化は認められていない。同様に糖鎖を持つ rhG-CSF である CHO-G-CSF についても投与量を 1 $\mu\text{g/kg}$ から 100 $\mu\text{g/kg}$ に増量したときに全身クリアランスが 98 ml/hr/kg から 60 ml/hr/kg に減少が認められる (Table I)²⁶⁾。これらの結果より、この G-CSF の消失に飽和性および非飽和性の 2 つのクリアランス機構が関与しており、投与量の増大によるクリアランスの低下は G-CSF 特有の消失機構の飽和によるものと考えられる。

さらに田中らは、ラットにおける血漿中濃度とそのときの薬理作用である末梢血中好中球増加について投与経路依存性について検討している²¹⁾。同投与量を投与したとき末梢血中の好中球増加作用は静脈内投与に比し皮下投与で持続性に優れている²¹⁾。皮下投与後の G-CSF は比較的速やかに吸収され、投与後 1-2 時間に最高濃度に達し、その後一相性に消失する^{21,25)}。 $C_{\max}$ は 1 $\mu\text{g/kg}$ で 1.71 ng/ml で、10 $\mu\text{g/kg}$ では 16.4 ng/ml とほぼ投与量に比例して上昇する。AUC についてもほぼ同様

Fig. 1 Structure of sugar chain of CHO-rhG-CSF
(from Okano K. et al.; Yakubutsu Dotai, 8: 1181, 1993)

Table I Pharmacokinetic parameters of rhG-CSFs after a single i.v. or s.c. administration to rats

G-CSF	Dose $\mu\text{g/kg}$	i.v.				s.c.			Ref.
		$t_{1/2\beta}$ hr	Vdss ml/kg	AUC ng·hr/ml	CL ml/hr/kg	$C_{\max}$ ng/ml	AUC ng·hr/ml	F app	
<i>E-Coli</i> -G-CSF (filgrastim)	1	—	—	13	80	1.7	8	0.64	25
	5	1.08	—	73	70	9.8	47	0.64	
	10	1.28	—	180	56	16.4	92	0.51	
	100	1.70	—	1960	53	238	1341	0.70	
CHO-G-CSF (lenograstim)	1	—	—	10	98	—	—	—	26
	10	1.13	83	146	69	8.0	73	0.50	
	100	1.43	88	1676	60	178	1106	0.70	

であるが、100 $\mu\text{g/kg}$ 投与時では $C_{\max}$ が 238 ng/ml と 10 $\mu\text{g/kg}$ の16倍に上昇し、皮下投与においても飽和性のクリアランスの関与が考えられた。同投与量の静脈内投与時の AUC と比較して算出した見かけの生物学的利用率は50-70%であり (Table I), G-CSF の作用が単に AUC に依存するのではなく滞留時間依存性であることを示唆している。さらに皮下投与時の飽和性クリアランスについては全身クリアランスの飽和だけでなく投与部位における代謝の飽和の可能性も考えられるが、それぞれの寄与については明らかにされていない。また糖鎖を有する CHO-G-CSF の皮下投与後の体内動態もほぼ同様な傾向を示し、見かけの生物学的利用率も50-70%とほぼ同様である²⁶⁾。

2. 反復投与後の体内動態変化

G-CSF は臨床的には反復投与により使用されていることから、反復投与時の体内動態を把握することは臨床での有効な投与計画をたてる上で重要である。田中らは *E. coli*-G-CSF 5 $\mu\text{g/kg}$ をラットに7日間反復投与時の

体内動態について報告している²⁷⁾。反復投与後の血清中濃度は単回投与に比較して、静脈内、皮下いずれの投与においても消失相において低下が認められる (Fig. 2)²⁷⁾。静脈内反復投与においては全身クリアランスは単回投与の43 から 52 ml/hr/kg に有意に増加することが認められている²⁷⁾。このとき分布容積に変化がないことより、反復投与により消失過程に変化が生じたことが考えられる。反復皮下投与後の $C_{\max}$ は 14.5 ng/ml と単回投与とほぼ同様であるが、AUC には 79 から 59 ng·hr/ml に約35%の低下が認められている²⁷⁾。 $C_{\max}$ に大きな変化がないことより、この皮下投与時の体内動態変化は皮下投与部位における代謝の飽和ではなく、循環血からの消失の変化である可能性が高い。また CHO-G-CSF についてはラットに 10 $\mu\text{g/kg}$ 1日1回14日間反復静脈内および皮下投与したとき、反復投与後において初回投与後に比較し血漿中濃度の低下および半減期の短縮が報告されている²⁸⁾。いずれの G-CSF についても反復投与によるクリアランスの増加が認められることより、この変化は G-CSF に共通の消失機構の変化である

Fig. 2 Serum concentration of *E. coli*-rhG-CSF after single s.c. administration (○) and during and after multiple s.c. administration for 7 days (●) at a daily dose of 5 $\mu\text{g/kg}$ in male rats.
(from Tanaka H. and Kaneko T.; *Drug Metab. Dispos.*, 19: 200, 1991)

と思われた。さらに G-CSF の反復投与により末梢血好中球数の増加が認められることとの関連が示唆されているが、これを証明するための定量的な実験はなされていない。

3. 糖鎖の体内動態に与える影響

これまでに述べたように、G-CSF は糖鎖の有無にかかわらず、体内動態に共通の特徴が認められるが、Table I のそれぞれの G-CSF の薬物速度論的パラメータはやや異なっている。これらの相違が本当に糖鎖の有無によるものかは、実験条件あるいは assay 法 (ELISA 法に用いている抗体の特異性) などが異なるため明確ではない。しかし、各研究グループで別々に糖鎖の体内動態への影響について検討がなされている。

hG-CSF は、Thr¹³³ に結合した O-グリコシド型糖鎖を持ち、1 個ないし 2 個のシアル酸を含んでいる (Fig. 1)²⁹⁾。この糖鎖は *in vitro* で G-CSF の安定性に寄与していることが報告されている³⁰⁾。田中らは、膀胱癌 5637 細胞より精製した糖鎖を持つ G-CSF (分子量 19.7 kDa) と *E. coli*-G-CSF (分子量 18.8 kDa) の体内動態および薬理効果をラットにおいて比較している。両者の G-CSF は、*in vitro* の骨髓細胞における増殖刺激活性および *in vivo* の 10 μ g/kg 静脈内投与後の白血球増多活性に差は認められていない³¹⁾。しかしその体内動態には若干の相違が認められる。すなわち Fig. 3 に示すように、静脈内投与後の血漿中濃度は *E. coli*-G-CSF に比較して、5637-G-CSF がやや高い。全身クリアランスは約 30% 小さく、分布容積にも差が認められたことより、糖鎖の付加により組織移行性が低くなっていることが考えられる³¹⁾。また皮下投与においては 5637-G-CSF の平均吸収時間は *E. coli*-rhG-CSF に比較して長く、投与部位から全身循環への吸収速度の低下が示唆される (Fig. 3)。このときの見かけの生物学的利用率は *E. coli*-G-CSF の 62% に対し 5637-G-CSF では 34% と低く、糖鎖の付加による吸収量の低下を示唆している。一方、岡野らは CHO-G-CSF を酵素処理し脱糖鎖化した G-CSF (degly-G-CSF)、および大腸菌で発現させた *E. coli*-G-CSF のラットにおける体内動態について比較している²⁹⁾。静脈内投与後の全身クリアランスは、CHO-G-CSF に比較し脱糖鎖化 G-CSF および *E. coli*-G-CSF で大きい。さらに皮下投与においては、糖鎖を有する G-CSF は平均吸収時間の延長が認められる。このときの見かけの生物学的利用率は糖鎖を有する G-CSF で 63–68%、脱糖鎖 G-CSF で 53–59% であり、田中らの報告とは異なり大きな生物学的利用率の差は認められていない。この原因としては 5637-G-CSF と CHO-G-CSF の糖鎖構造の相違が考えられる。事実、加藤らは、糖鎖にシアル酸を一つ含む monosialo-G-

Fig. 3 Serum concentration of 5637 (○) and *E. coli*-rhG-CSF (●) after i.v. (A) or s.c. (B) administration at a daily dose of 10 μ g/kg in male rats.

(from Tanaka H. and Kaneko T.; *J. Pharm. Exp. Ther.*, 262: 439, 1992)

CSF に比較して二つ含む disialo-G-CSF が全身クリアランスが小さく、平均吸収時間も長いことを示している (Fig. 4)³²⁾。すなわち糖鎖のシアル酸数が体内動態に影響を与えることを示している。これは負電荷の増加によ

Fig. 4 Plasma concentration of disialo- (○) and monosialo-CHO-rhG-CSF (●) after i.v. (A) or s.c. (B) administration at a daily dose of 50 µg/kg in male rats. (from Kato M. *et al.*; *Yakubutsu Dotai*, 8: 1191, 1993)

り、組織移行性の低下、糸球体濾過速度の低下が起こるためと考察している³²⁾。

4. 腎障害モデルラットにおける体内動態

G-CSF が制ガン剤の化学療法後に使われること、この中には Cisplatin のように副作用として nephrotoxicity を惹起する場合もあることより³³⁾、腎臓の G-CSF の体内動態における役割を明らかにすることは臨床重要であり、いくつかの実験が行われている。E. coli-G-CSF, CHO-G-CSF について、それぞれ片腎および両腎摘出ラットに 10 µg/kg 静脈内投与すると、血漿中濃度が上昇し全身クリアランスが低下することが報告されている^{34,35)}。すなわち E. coli-G-CSF は片腎摘出、両腎摘出でそれぞれ46%、79%クリアランスが減少し、CHO-

G-CSF ではそれぞれ30%、70%減少する。これらのことは、腎臓がこの投与量において G-CSF の体内動態に大きく寄与していることを示している。しかしながら、いずれの G-CSF についても1つの投与量でしか検討されていないため、腎臓が飽和性、非飽和性いずれのクリアランスに寄与するかは明確にはされていない。

5. 臨床におけるファーマコキネティクス

G-CSF の臨床試験は化学療法剤による好中球減少期間の早期回復を目的に開始され、有効な薬剤であることが種々の試験により明らかにされている^{18-20,36-38)}。投与経路と薬理作用については前臨床試験同様、同投与量では急速静脈内投与と比較し、皮下投与で高い好中球増多効果が得られることが認められている³⁶⁾。

体内動態に関しては Morstyn らが1988年に melphalan 投与後の悪性腫瘍患者に E. coli-G-CSF を 1-60 µg/kg 投与し、その一部について血漿中濃度を測定している³⁸⁾。3 µg/kg 静脈内投与後の血漿中 G-CSF は2相性に消失し、半減期はそれぞれ3-5分、96-105分と報告している。また Layton らは E. coli-G-CSF の phase I/II 試験の一環として薬理効果および体内動態の投与量および投与経路の依存性について報告している³⁹⁾。静脈内投与後の半減期は投与量の増大とともに1.4時間から4.2時間に延長が認められている (Fig. 5)。皮下投与においては血漿中 G-CSF は投与後4-8時間に C_{max} を示し、以降はほぼ一相性に消失する (Fig. 5)。また5日間反復皮下投与において、末梢血好中球の増加に伴って血清中 G-CSF 濃度が低下し (Fig. 6)、反復投与によりなんらかのクリアランスが亢進することを報告している。彼らはこの現象は好中球の受容体介在性の G-CSF の取り込みと分解であると推測している。さらに末梢血好中球数と G-CSF クリアランスの関係は Stute, Kearns らの報告により^{40,41)}明確にされている。すなわち Stute らは化学療法後の myelosuppressive な小児患者において、G-CSF を 5-15 µg/kg/day 10日間反復皮下投与し、体内動態を比較している。Table II に示したように高投与量では低投与量に比較し、見かけのクリアランスの低下が認められる。さらに投与10日目の見かけのクリアランスは平均で 0.71 ml/min/kg と投与初日のクリアランス 0.31 ml/min/kg に比較して有意に高い値を示し、個々のクリアランスは末梢血好中球数と正の相関を示している。さらに Kearns らは慢性好中球減少症の患者へ投与後の末梢血好中球数と G-CSF クリアランスの関係を E_{max} モデルにより解析を行っている (Fig. 7)。クリアランスの最大値、最小値をそれぞれ、1.92 および 0.29 ml/min/kg に固定したとき、50%のクリアランスを示す好中球数は $10.5 \times 10^9/L$ であった。これらの試験における G-CSF の投与はいずれも皮下投

Fig. 5 Pharmacokinetics of G-CSF after i.v. (A–C) or s.c. (D) administration of a single dose. Serum G-CSF levels were determined by RIA for six hours (A–C) or 24 hours (D) after G-CSF injection. Three patients were tested at each dose: (A) 30 µg/kg, (B and D) 10 µg/kg, (C) 3 µg/kg. Patients received G-CSF in the absence of cytotoxic drugs except for two patients in D (●, △) in whom serum levels were measured on day after an injection of melphalan.

(from Layton J. E. *et al.*; *Blood*, 74: 1303, 1989)

Table II Median pharmacokinetic parameters of *E-Coli*-rhG-CSF after a single or repeated administration to patients

Dose µg/kg/day	Day 1			Day 10			Ref.
	C_{max} ng/ml	C_{24hr} ng/ml	CL app ml/min/kg	C_{max} ng/ml	C_{24hr} ng/ml	CL app ml/min/kg	
5	15(10–19)	1.2(0.1–5.3)	0.38(0.32–0.63)	16(3–19)	0.9(0.1–6.6)	0.69(0.25–2.52)	40
10	63(26–85)	5.4(1.0–19.4)	0.24(0.16–0.48)	37(11–49)	0.4(0.2–0.8)	0.56(0.29–1.16)	
15	64(11–94)	12.5(5.4–23.9)	0.25(0.18–0.32)	76(26–117)	3.0(1.2–4.7)	0.27(0.22–0.57)	

Numbers in parenthesis are the range of values.

Fig. 6 G-CSF and neutrophil levels in patients receiving a continuous infusion of G-CSF. (A) Six patients from phase I/II trial who received G-CSF at $10 \mu\text{g/kg/day}$ for five days before melphalan. (B) Three patients from ABMT trial who received $20 \mu\text{g/kg/day}$ for at least ten days after high-dose chemotherapy. (from Layton J. E. *et al.*; *Blood*, **74**: 1303, 1989)

Fig. 7 Relationship between absolute neutrophil counts (ANC) and clearance of rhG-CSF in patients. (from Kearns C. M. *et al.*; *J. Pediatr.*, **123**: 471, 1993)

与であるが、末梢血好中球数の増加とともに皮下投与後の G-CSF の見かけのクリアランスの増加が認められることより、循環血中の好中球が G-CSF と結合しクリアランス機構として働く と推察している。以上のように G-CSF の体内動態は実験動物においてだけでなく、ヒトにおいても投与量の増量に伴うクリアランスの低下、反復投与によるクリアランスの増加という共通の特徴を示し、G-CSF 特有のクリアランス機構は種によらず共通と考えられる。薬理効果に種差がないことを考慮すると、G-CSF 受容体の関与が強く示唆されるものである。

飽和性クリアランス機構の解明

G-CSF のクリアランスに飽和性の消失機構が関与し、またその飽和性クリアランスに好中球などの G-CSF レセプターが寄与していることが推察されるが、その詳細な機構については不明であった。我々は mutant G-CSF である nartograstim を用い、その G-CSF の体内動態の制御機構について種々の方法を用い検討した。

1. Nartograstim の血漿中濃度推移およびモデルによる解析

Nartograstim は大腸菌で生産された hG-CSF の N 末端の Thr-1, Leu-3, Gly-4, Pro-5, Cys-17 がそれぞれ Ala, Thr, Tyr, Arg, Ser に変換された誘導体であり^{42,43}、N 末端に Tyr 残基を有するために、生物学的活性を維持したまま lactoperoxidase 法により ¹²⁵I 標識化が可能である⁴⁴。In vitro では E. coli-G-CSF はサルおよびヒト血漿中で分解するのに対し、nartograstim では分解せず安定である。またラット血漿中では両者とも安定である²⁰。In vivo ではラット静脈内投与後の nartograstim の全身クリアランスは E. coli-G-CSF と差は認められず、皮下投与後の AUC は E. coli-G-CSF に比較し小さいものである⁴⁵。一方、サルに 10 µg/kg 静脈内投与後の nartograstim の全身クリアランスは 42 ml/hr/kg で E. coli-G-CSF の約 70% であり、皮下投与にお

いても高い血漿中濃度推移を示す⁴⁶。したがってこのような in vivo における体内動態の差は主に血漿中における安定性に起因していると考えられる。

Nartograstim の静脈内投与後の体内動態の投与量依存性について検討すると、ラットだけでなくサルにおいても投与量の増大に伴う半減期の延長およびクリアランスの低下が認められる (Table III)⁴⁷。ラットにおいては 50 µg/kg 以上、サルにおいては 10 µg/kg 以上の高投与量でクリアランスが一定値となることより、nartograstim のクリアランスには他の G-CSF 同様飽和性および非飽和性の 2 つの消失機構が存在すると考えられる。Nartograstim のラット、サルおよびヒトにおける血漿中濃度推移を Fig. 8 に示す central compartment からの一次消失と Michaelis-Menten 型消失の 2 種類の消失を含む 2-compartment open model により解析すると、実測値と良好な一致を得られている⁴⁷。Table IV にそのときの薬物速度論的パラメーターを示すが、得られた飽和消失過程の K_m 値は 39–244 pM と非常に低い値であることから、特異的なクリアランス機構が存在することを示唆している。また線形条件下での全クリアランスに対する飽和性クリアランスの割合はヒトを含むいずれの種でも 76–82% と高いものである。血漿中濃度が低い時、あるいは生理的条件下では飽和性クリア

Fig. 8 A nonlinear two-compartment open model used in pharmacokinetic analysis of nartograstim⁴⁷.

Table III Pharmacokinetic parameters of nartograstim after i.v. administration⁴⁷

Species	Dose µg/kg	$t_{1/2}$ hr	Vdss ml/kg	AUC ng·hr/ml	CL ml/hr/kg	MRT hr
Rat	1	0.68	66	9	109	0.58
	4	0.88*	76	42	95	0.80
	12	1.11*	76	134	89	1.06*
	50	1.25*	58*	1193	42*	1.39*
	150	2.08*	84	3393	45*	1.91*
Monkey	1	0.45	92	6	160	0.59
	10	1.34*	53*	240	42*	1.27*
	100	2.43*	93	2600	40*	2.37*

*: Significantly different from 1 µg/kg ($p < 0.01$).

Table IV Nonlinear pharmacokinetic parameters of nartograstim⁴⁷

Species	V_{max} ng/hr/kg (pmol/hr/kg)	K_m ng/ml (pM)	V_{max}/K_m ml/hr/kg	$ke \cdot V_1$ ml/hr/kg	Ratio*
Rat	876 (46)	4.42 (233)	198	46	0.811
Monkey	814 (453)	4.63 (244)	176	39	0.819
Human	57 (3)	0.75 (39)	76	24	0.760

*: The ratios were calculated from $(V_{max}/K_m)/(V_{max}/K_m + ke \cdot V_1)$.

ンスの寄与が大きいことが明らかである。また、ラット骨髄細胞に対する ^{125}I -nartograstim の結合実験における K_d 値は 142 pM であり⁴⁷⁾, *in vivo* の血漿中濃度のモデル解析より得られた K_m 値 (233 pM) とほぼ近似している。さらに cyclophosphamide 投与による骨髄障害ラットにおいては K_m 値に変化はなく, $V_{\max}$ 値が約 1/2 に減少することは飽和型消失への G-CSF レセプターの関与を示唆している⁴⁸⁾。

2. G-CSF の組織取り込み機構の解析

前章で示した nartograstim の飽和性, 非飽和性クリアランスがどの組織に起因するかについて検討するために, その初期組織取り込みについてすでに報告した方法⁴⁹⁾に準じて速度論的解析を行った⁵⁰⁾。すなわち ^{125}I -nartograstim を非標識の nartograstim の存在下, あるいは非存在下でラットに静脈内投与し, 投与後 5 分におけるそれぞれの組織における放射能と 5 分までの血漿中濃度推移より初期組織取り込みクリアランス (CLuptake) を比較した。Fig. 9 に示したように tracer 量 ($0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$) における CLuptake は骨髄, 腎臓がもっとも大きく $0.085 \text{ ml}/\text{min}/\text{g}$, ついで脾臓 0.037 , 肝臓 $0.010 \text{ ml}/\text{min}/\text{g}$ の順である。腎臓および肝臓においては非標識 nartograstim の投与量を増大さ

せても CLuptake に大きな変化は認められず, それぞれ $0.058\text{--}0.086 \text{ ml}/\text{min}/\text{g}$, および $0.006\text{--}0.010 \text{ ml}/\text{min}/\text{g}$ とほぼ一定値を示す。一方, 骨髄においては $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ で $0.085 \text{ ml}/\text{min}/\text{g}$ であった CLuptake は, 投与量を増大させるとともに減少が認められる。脾臓においても同様に投与量依存性の CLuptake の減少が認められる。この飽和性 CLuptake における速度論的パラメーターを算出すると, 骨髄, 脾臓において K_m 値はそれぞれ 8.63 nM , 1.94 nM , $V_{\max}$ は 603 および $62 \text{ fmol}/\text{min}/\text{g}$ と骨髄のほうが low affinity, high capacity である。骨髄の個体あたりの容積は $4 \text{ ml}/200 \text{ g rat}$ と報告されており⁵¹⁾, 単位体重あたりの骨髄における飽和性クリアランスは $1.40 \text{ ml}/\text{min}/\text{kg}$ と, 脾臓の $0.09 \text{ ml}/\text{min}/\text{kg}$ の約 15 倍高いものである。両組織における飽和性取り込みに関するクリアランスの和 ($1.5 \text{ ml}/\text{min}/\text{kg}$) は血中消失データの非線形モデル解析により得られた値 ($3.3 \text{ ml}/\text{min}/\text{kg}$)⁴⁷⁾ とほぼ同等な値を示す。これらのことは骨髄および脾臓での取り込みが飽和性消失に, 腎臓および肝臓が非飽和性クリアランスの主因であることを示唆している。また nartograstim の代わりに *E. coli*-G-CSF を $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与しても, 同様に骨髄, 脾臓への CLuptake が減少することより, これらの組織への取り込みは G-CSF レセプターを介しているものと考えられる⁵⁰⁾。

Fig. 9 Dose-dependence of nartograstim CLuptake by various tissues in the rat. The CLuptake was calculated from the amounts in the tissue at 5 min and plasma concentration-time profile within 5 min of i.v. administration of ^{125}I -nartograstim with or without unlabeled nartograstim⁵⁰⁾.

Table V Effect of nartograstim administration on saturable CLuptake by the tissues and the binding of nartograstim in rat bone marrow and spleen cells⁵²⁾

Time (hr)	Bone marrow			Spleen		
	K _d (pM)	B _{max} (fmol/g tissue)	Saturable CLuptake (ml/min/tissue)	K _d (pM)	B _{max} (fmol/g tissue)	Saturable CLuptake (ml/min/g tissue)
0	233	2187	0.060	168	121	0.020
4	562	527	0.005	194	44	0
24	221	1600	0.073	342	825	0.058

Bone marrow and spleen cells were obtained from the rats treated with nartograstim (50 µg/kg, sc). Binding parameters were calculated by Scatchard plots.

さらに G-CSF レセプターの取り込みへの関与を証明するために CLuptake の down-regulation の有無について検討した。すなわち nartograstim をラットに 50 µg/kg 皮下投与後の飽和性 CLuptake の経時変化を測定している⁵²⁾。Table V に示したように骨髄における飽和性 CLuptake は投与前では 0.060 ml/min/g であるが、投与後 4 時間で投与前の 10% に低下し、24 時間では 0.073 ml/min/g と完全に投与前のレベルに回復する。一方、脾臓においては投与前 0.020 ml/min/g を示し、4 時間ではほとんど 0 に低下する。しかし 24 時間においては 0.058 ml/min/g と投与前の約 3 倍に上昇する。脾臓においては飽和性 CLuptake の回復は骨髄のそれに比較して遅いものである。このときの骨髄、脾臓について ¹²⁵I-nartograstim のレセプター結合についてパラメーターを低温下で求めた (Table V)。投与前の骨髄においては K_d 値 233 pM, B_{max} 2187 fmol/g tissue を示すが、nartograstim 投与により K_d に比較して B_{max} に大きな変化が認められる。投与後 4 時間に B_{max} は 527 fmol/g tissue と約 1/7 に減少するが、24 時間では投与前とほぼ同程度に回復する。一方、脾臓においても K_d 値に比較し B_{max} に大きな変化が認められた。投与前 B_{max} は 121 fmol/g tissue であるが、投与後 4 時間では B_{max} が 1/3 に減少し、投与後 24 時間では 825 fmol と約 7 倍に増加する。このような B_{max} の経時変化のパターンは CLuptake のそれとよく相関している。これらの結果は、骨髄、脾臓における飽和性取り込みクリアランスがそれぞれの細胞表面上のレセプターによるということを強く示唆するものである。脾臓において nartograstim 皮下投与後 24 時間において B_{max} および CLuptake が投与前に比較して高い理由としては、骨髄から遊離した好中球が脾臓中に貯留されるためではないかと考えられる。

以上の組織取り込み機構の解析結果は、循環血からの飽和型消失には骨髄、脾臓の飽和性の取り込みが、非飽和型消失には肝、腎の非飽和性の取り込みが関与していることを示唆している。また骨髄、脾臓における取り込みに down-regulation が認められることは、これらの飽

和性の取り込みに G-CSF 受容体の受容体介在性エンドサイトーシスが関与していることを示している。

3. モデル動物における nartograstim の定常状態クリアランスの変化

Nartograstim の組織取り込みの結果は飽和型消失への G-CSF レセプターの関与を示唆するものであるもので、さらに飽和型消失と G-CSF レセプターの関係について定量的に解析するために、G-CSF レセプター数を変化させたラットを用い *in vitro* の binding capacity (B_{max}) と *in vivo* の nartograstim の定常状態クリアランス (CLss) を比較した⁵²⁾。ラットに nartograstim を点滴静注し、4 時間までの血漿中濃度を ELISA 法で測定し、定常状態血漿中濃度 (C_{ss}) を算出し、CLss を計算した。正常ラットでは先に述べた bolus 投与同様、

Fig. 10 Dose-dependence of nartograstim clearance at steady-state during i.v. infusion in rats. The solid line represents the fitting data with Michaelis-Menten constant, maximal velocity for saturable process and nonsaturable clearance of 107 pM, 15.5 pmol/hr/kg and 39 ml/hr/kg, respectively⁵²⁾.

Fig. 11 Relationship between nartograstim clearance and its binding capacity in the bone marrow.

CLssは点滴速度の上昇とともに減少し、C_{ss}に対してプロットするとFig. 10のように飽和性および非飽和性クリアランスの関与が明らかである。Cyclophosphamide投与により骨髄傷害を引き起こしたラット (CY-treated), および nartograstim を9日間反復皮下投与し末梢血好中球数を増加させたラットにおける (NTG-treated) 骨髄当たりの nartograstim の binding capacity は Fig. 11 に示すようにそれぞれ正常ラットの約 1/20 および 2 倍である。同様の処置を施したラットに nartograstim を高投与および低投与速度で点滴静注し CLss を算出したところ、非飽和性 CLss は 10–11 ml/hr/rat と正常ラットと差は認められない (Fig. 11)。一方、低投与速度においては NTG-treated では 74 ml/hr/rat と正常ラットと比較して高く、CY-treated では 18 ml/hr/rat であり、control に比較して低いものである (Fig. 11)。2つの投与量における CLss の差より飽和性 CLss を算出すると、NTG-treated では 63 ml/hr/rat と control の約 2 倍、CY-treated では 7 ml/hr/rat と約 1/5 であり、この飽和性 CLss の変動は骨髄における binding capacity の変動とほぼ一致している (Fig. 11)⁵²⁾。このように骨髄中の nartograstim binding capacity の変動と飽和性 CLss が平行に変動することは、飽和性クリアランスは G-CSF レセプターに起因するという考え方を支持するものである。一方、これらのモデルラットにおいて高投与量時の CLss が変化しないことより、G-CSF レセプターの非飽和性クリアランスへの寄与は少ないものと考えられる。

また、腎傷害ラットを用いて腎機能と nartograstim の CLss の関係についても検討している⁵³⁾。すなわち腎

障害の程度の異なる2つのモデルラット、糸球体濾過および尿細管分泌が約50%に低下した片腎結紮ラット、および10%に低下した Cisplatin 腎障害ラットを用いて検討した。これらのラットにおいては飽和性 CLss に変化は認められず、非飽和性 CLss が片腎結紮ラットに25%、Cisplatin 腎障害ラットにおいて43%の低下が認められる (Fig. 12)。これらのことより腎は nartograstim の非飽和性クリアランスの約40–50%を担っていることが示唆される。これより算出された nartograstim の腎クリアランスは約 20 ml/hr/kg であり、これはラットの糸球体濾過速度と nartograstim のラット血漿における蛋白結合率から計算された糸球体濾過クリアランスとほぼ一致する⁵⁰⁾。このことは nartograstim の腎クリアランスはほとんどが糸球体濾過であることを示唆している。また濾過後の運命については、すでに国正らによりラット摘出腎還流系を用い糸球体濾過された G-CSF が腎尿細管組織に luminal side から取り込まれ、尿中にはほとんど排泄されないことが示されている⁵⁴⁾。

4. *In vitro* 骨髄細胞における受容体介在性エンドサイトーシス

これまで *in vivo* の実験データより G-CSF 受容体の飽和性クリアランスへの関与を考察したが、実際に骨髄細胞で nartograstim が受容体介在性エンドサイトーシスを介して分解されるかを pulse-chase 実験により検討している。すなわち 40 pM の ¹²⁵I-nartograstim を低温下で結合させた後、37°Cに移し、経時的に表面結合量、内在化量および分解物量の経時変化について測定した

Fig. 12 Relationship between nartograstim nonsaturable clearance and the glomerular filtration rate in rats with renal failure.

Fig. 13 Time course of the internalization and degradation of ^{125}I -nartograstim by rat bone marrow cells. ^{125}I -nartograstim was bound to the cells at 0°C for 2 hr. After washing, the cells were transferred to the medium and incubated at 37°C . The surface bound radioactivity (●), the internalized radioactivity (○), and the radioactivity of degraded product in the medium (△) were counted⁽⁵⁵⁾.

(Fig. 13)⁽⁵⁵⁾. 細胞表面量は10分まで速やかに減少し、これに伴い内在化量の増加が認められる。また内在化量は15分に最大値を示した後、徐々に減少し、これに伴い分解物量の増加が認められた。分解物の生成には約3分のlag timeが認められ、60分後にはほとんどの結合したnartograstimが分解物としてmedium中に放出される。表面結合量の低下に伴う、逐次的な内在化量、分解物量の増加および分解物の増加におけるlag timeの存在により、nartograstimが受容体介在性エンドサ

イトーシス機構により分解していることが示唆される。

おわりに

G-CSFは投与量の増大に伴うクリアランスの減少、および反復投与によるクリアランスの増大といった非線形体内動態を示す薬物である。この非線形消失は実験動物およびヒトにおいて共通に認められ、またG-CSFの種類にも依存しないものである。この非線形消失機構についてG-CSF誘導体nartograstimを用いて検討し、G-CSFの標的組織である骨髄中のレセプターがその体内動態に重要な役割を果たすことが*in vivo*および*in vitro*の実験より明らかとなった。すなわちG-CSFの体内動態の特徴はG-CSFを投与することによるG-CSFレセプターのdown-, up-regulationにより引き起こされていることを見いだした。EGF, HGFに代表されるように、これまで多くの生理活性ペプチドの体内挙動に影響を与えるレセプターは、いわゆるクリアランス組織である肝、腎に存在している (Fig. 14)⁽¹⁻⁵⁾。肝、腎以外の骨髄のような組織中のレセプターも、クリアランスレセプターとして働き得ることが*in vivo*および*in vitro*の実験より実証された最初の例である。骨髄中にレセプターを持つ他の造血因子、すなわちEPO, GM-CSF, M-CSF, IL-3などについてもその体内動態に飽和性消失機構の関与が示されており、このような機構が造血細胞の制御機構として機能していることも考えられる。

要 旨

受容体介在性エンドサイトーシスは、生理活性ペプチドの体内動態においてもっとも重要な機構の一つである。今回、造血因子の一つであるヒト顆粒球コロニー刺

Fig. 14 The contribution of the receptor-mediated clearance to the systemic clearance of physiologically active peptide.

激因子 (G-CSF) のファーマコキネティクスについてまとめ、その体内動態における受容体介在性の役割について考察した。G-CSF としては現在、CHO 細胞を宿主とし糖鎖を有するもの、大腸菌を宿主とし糖鎖を有しないもの、および N 末端のアミノ酸配列を改変した mutant G-CSF の 3 種が上市されている。これらの G-CSF の体内動態は糖鎖の有無、アミノ酸配列の改変にかかわらず非線形性を示す。すなわち実験動物およびヒトにおいて G-CSF の投与量の増量に伴う全身クリアランスの減少、および反復投与によるクリアランスの増加が認められる。体内動態の解析の結果、G-CSF の体内動態に飽和性クリアランスと非飽和性クリアランスの関与が明らかとなった。また皮下投与時の生物学的利用率は約 60% である。糖鎖の体内動態に与える影響はそれほど大きなものではないが、糖鎖末端のシアル酸残基の負電荷により全身クリアランスおよび皮下からの吸収に差が認められる。また飽和性クリアランスのメカニズムについては臨床的に末梢血好中球数と全身クリアランスが相関することも報告されていることから、G-CSF レセプターがその飽和性クリアランスに関与することが考えられる。実際、mutant G-CSF を用いた研究により骨髓中の G-CSF レセプターが G-CSF のこの飽和性クリアランスに関与していること、その全身クリアランスへの寄与は低投与量では 80% 程度であることが明らかとなった。一方、腎障害ラットにおいて全身クリアランスが低下することなどから、高投与量において主に寄与する非飽和性クリアランスの主機構の 1 つとして腎における糸球体濾過の関与が明らかとなった。

文 献

- 1) Sugiyama Y. and Hanano M.: Receptor-mediated transport of peptide hormones and its importance in the overall disposition in the body. *Pharm. Res.*, **6**: 192-202 (1989).
- 2) Sugiyama Y. and Kato Y.: *In vitro* models of hepatic clearance: Methods to determine the kinetic parameters for receptor-mediated hepatic clearance. in Taylor M. D. and Amidon G. (eds): "Peptide Based Drug Design: Controlling Transport and Metabolism" Washington DC.; ACS Books, (1995) pp 525-551.
- 3) Whitcomb D. C., Cataland T. M., Shetzline M. A. and Nishigawara M. T.: Identification of tissue insulin receptors: Use of a unique *in vivo* radio-receptor assay. *Am. J. Physiol.*, **249**: E561-E567 (1985).
- 4) Sato H., Sugiyama Y., Sawada Y., Iga T., Sakamoto S., Fuwa T. and Hanano M.: Dynamic determination of kinetic parameters for the interaction between peptide 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).
- 5) Kato Y., Sato H., Ichikawa M., Suzuki H., Sawada Y., Fuwa T., Hanano M. and Sugiyama Y.: Existence of two pathways for the endocytosis of epidermal growth factor by rat liver: Phenylarsine oxide sensitive and insensitive pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89**: 8507-8511 (1992).
- 6) Liu K. X., Kato Y., Nakamura M., Kim D. C., Hanano M., Higuchi O., Nakamura T. and Sugiyama Y.: Importance of the liver in the plasma clearance of hepatocyte growth factor in rats. *Am. J. Physiol.*, **263**: G642-G649 (1992).
- 7) Maack T., Suzuki M., Almedia F. A., Nussenzweig D. and Scarborough R. M.: Physiological role of silent receptor of atrial natriuretic factor. *Science (Wash)* **238**: 675-678 (1987).

- 8) Clark S. C. and Kamen R.: The human hematopoietic colony-stimulating factor. *Science (Wash)* **236**: 1229-1236 (1987).
- 9) Stoudemire J. B.: Pharmacokinetics and metabolism of hematopoietic proteins. in Ferraiolo B. L. (ed): *Protein Pharmacokinetics and Metabolism*, New York; Plenum Press, 1992, pp 180-222.
- 10) Modi N. B.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant proteins and peptides. *J. Control. Rel.*, **29**: 269-281 (1994).
- 11) McMahon F. G., Vargas R., Ryan M., Jain A. K., Ables 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).
- 12) Huhn R. D., Yurkow E. J., Kuhn J. G., Clarke L., Gunn H., Resta D., Shah R., Myers L. A. and Seibold J. R.: Pharmacodynamics of daily subcutaneous recombinant human interleukin-3 in normal volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **57**: 32-41 (1995).
- 13) Bauer R. J., Gibbons J. P., Luo Z-P. and Young J. D.: Non-linear pharmacokinetics of recombinant human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in rats. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **268**: 152-158 (1994).
- 14) Yoon E. J., Bae E. J., Jeong Y. N., Kim M. M., 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).
- 15) Nicola N. A., Metcalf D., Matsumoto M. and Johnson G. R.: Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells: Identification as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *J. Biol. Chem.*, **258**: 9017-9023 (1983).
- 16) 長田重一: 顆粒球コロニー刺激因子の遺伝子構造とその作用. 生化学, **61**: 61-74 (1989).
- 17) Nicola N. A.: Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**: 45-77 (1989).
- 18) Brounchud M. H., Scarffe J. H., Thatcher N., Crowther D., Souza L. M., Alton N. K., Testa N. G. and Dexter T. M.: Phase I/II study of recombinant granulocyte colony-stimulating factor in patients receiving intensive chemotherapy for small cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, **56**: 809-813 (1987).
- 19) Morstyn G., Cambell L., Lieschke G., Layton J. E., Maher D., O'Connor M., Green M., Sheridan W., Vincent M., Alton K., Souza L., McGrath K. and Fox R. M.: Treatment of chemotherapy-induced neutropenia by subcutaneous administered granulocyte colony-stimulating factor with optimization of dose and duration of therapy. *J. Clin. Oncol.*, **7**: 1554-1562 (1989).
- 20) 小川一誠: rhG-CSF の臨床第1相および第2相試験. 癌と化学療法, **16**: 3537-3542 (1989).
- 21) Tanaka H., Okada Y., Kawagishi M. and Tokiwa T.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human colony-stimulating factor after intravenous and subcutaneous administration in the rat. *Pharm. Exp. Ther.*, **251**: 1199-1203 (1989).
- 22) Kuwabara T., Okumura S., Kobayashi S. and Hirata T.: Highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for marograstim (KW-2228), a mutant of human granulocyte colony-stimulating factor. *J. Pharmacobio-Dyn.*, **15**: 121-129 (1992).
- 23) Tanaka H. and Kaneko T.: Development of a competitive radioimmunoassay and a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. A application to a pharmacokinetic study in rats. *J. Pharmacobio-Dyn.*, **15**: 358-366 (1992).
- 24) 山本由佳, 桑原 隆, 奥村修造, 小林 智, 平田 正: Marograstim (KW-2228) の体内動態 (5): KW-2228 の血漿中濃度における bioassay と ELISA の相関. 薬物動態, **7**: 3-14 (1992).
- 25) Tanaka H. and Tokiwa T.: Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor studied in the rat by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **255**: 724-729 (1990).
- 26) 木下春喜, 加藤基浩, 天野 潤, 平松優佳, 岡野 健, 大石哲久, 岡崎 彬, 龍味哲夫, 古藤正男, 安達二郎: rG-CSF の体内動態 (1)—ラット, イヌ, サルにおける rG-CSF の血中動態 (単回). 薬理と治療, **18**(Suppl): 445-453 (1990).
- 27) Tanaka H. and Kaneko T.: Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in the rat: Single and multiple dosing studies. *Drug. Metab. Dispos.*, **19**: 200 (1991).
- 28) 木下春喜, 加藤基浩, 天野 潤, 平松優佳, 岡野 健, 岡崎 彬: rG-CSF の体内動態 (2)—rG-CSF 反復投与時のラットにおける血中動態. 薬理と治療, **18**(Suppl): 455-458 (1990).
- 29) 岡野 健, 加藤基浩, 天野 潤, 平松優佳, 木下春喜, 岡崎 彬: 遺伝子組換え型ヒト顆粒球コロニー形成刺激因子 (rG-CSF) の体内動態における糖鎖の役割 (1): 脱糖鎖型 rG-CSF および大腸菌産生 rG-CSF を用いた検討. 薬物動態, **8**: 1181-1190 (1993).
- 30) Oh-eda M., Hasegawa M., Hattori K., Kuboniwa H., Kojima T., Orita T., Tomonou K., Yamazaki T. and Ochi N.: O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity. *J. Biol. Chem.*, **265**: 11432-11435 (1990).
- 31) Tanaka H. and Kaneko T.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparisons between human granulocyte colony-stimulating factor purified from human bladder carcinoma cell line 5637 culture medium and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor produced in *Escherichia coli*. *J. Pharm. Exp. Ther.* **262**: 439-444 (1992).
- 32) 加藤基浩, 天野 潤, 岡野 健, 平松優佳, 木下春喜, 岡崎 彬: 遺伝子組換え型ヒト顆粒球コロニー形成刺激因子 (rG-CSF) の体内動態における糖鎖の役割 (2): シアル酸の役割. 薬物動態, **8**: 1191-1197 (1993).
- 33) Ries F. and Katstersky J.: Nephrotoxicity induced by cancer chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. *Am. J. Kid. Dis.*, **8**: 368-378, (1986).
- 34) Tanaka H. and Tokiwa T.: Influence of renal and hepatic failure on the pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (KRN8601) in the rats. *Cancer. Res.*, **50**: 6615-6619 (1990).
- 35) 加藤基浩, 天野 潤, 岡野 健, 平松優佳, 木下春喜, 岡崎 彬: 遺伝子組換え型ヒト顆粒球コロニー形成刺激因子 (rG-CSF) の消失における腎の役割. 薬物動態, **8**: 1213-1227 (1993).
- 36) Morstyn G., Lieschke G. L., Cebon J., Duhren U., Villevall J. L., Sheridan W., McGrath K. and Layton J. E.: Early clinical trials with colony-stimulating factor. *Cancer Inves.*, **7**: 443-456 (1989).

- 37) Gabrilove J. L. and Jakubowski A.: Granulocyte colony-stimulating factor: Preclinical and clinical studies. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **3**: 427-440 (1989).
- 38) Morstyn G., Cambell L., Souza L. M., Alton N. K., Keech J., Green M., Sheridan W. and Metcalf D.: Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. *Lancet*, **1**: 667-672 (1988).
- 39) Layton J. E., Hockman H., Sheridan W. P. and Morstyn G.: Evidence for a novel *in vivo* control mechanism of granulopoieses: Mature cell related control of a regulatory growth factor. *Blood*, **74**: 1303-1307 (1989).
- 40) Stute N., Santana V. M., Rodman J. H., Schell M. J., Ihle J. N. and Evans W. E.: Pharmacokinetics of subcutaneous recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children. *Blood*, **79**: 2849-2854 (1992).
- 41) Kearns C. M., Wang W. C., Stute N., Ihle J. N. and Evans W. E.: Disposition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children with severe chronic neutropenia. *J. Pediatr.* **123**: 471-478 (1993).
- 42) Kuga T., Komatsu Y., Yamasaki M., Sekine S., Miyaji H., Satoh M., Yokoo Y., Asano M., Okabe M., Morimoto M. and Itoh S.: Mutagenesis of human granulocyte colony-stimulating factor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **159**: 103-111 (1989).
- 43) Okabe M., Asano M., Kuga T., Komatsu Y., Yamasaki M., Itoh S., Morimoto M. and Hirata T.: *In vitro* and *in vivo* hematopoietic effect of mutant humangranulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, **75**: 1788-1793 (1990).
- 44) 浅野 誠, 五味克成, 岡部正実: KW-2228を用いた NFS60細胞の G-CSF レセプターの解析とヒト G-CSF の構造活性相関の検討. 薬理と治療, **19**: 2781-2787 (1991).
- 45) 柴原 隆, 奥村修造, 小林 智, 平田 正: Marograstim (KW-2228) の体内動態 (3): ラットにおける血漿中動態. 薬物動態, **6**: 875-885 (1991).
- 46) 柴原 隆, 加藤 謙, 奥村修造, 山本光雄, 池永哲二, 小林 智, 平田 正: Marograstim (KW-2228) の体内動態 (4): サルにおける血漿中動態. 薬物動態, **6**: 887-897 (1991).
- 47) Kuwabara T., Kato Y., Kobayashi S., Suzuki H. and Sugiyama Y.: Nonlinear pharmacokinetics of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor derivative (nartograstim): Species differences among rats, monkeys and humans. *J. Pharm. Exp. Ther.* **271**, 1535-1543 (1994).
- 48) 柴原 隆, 奥村修造, 小林 智, 平田 正: Marograstim (KW-2228) の体内動態 (6): Cyclophosphamide 誘発白血球減少ラットにおける血漿中動態. 薬物動態, **7**: 15-24 (1992).
- 49) 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).
- 50) Kuwabara T., Uchimura T., Takai K., Kobayashi H., Kobayashi S. and Sugiyama Y.: Saturable uptake of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor derivative, nartograstrim by the bone marrow and spleen of rats *in vivo*. *J. Pharm. Exp. Ther.* **273**: 1114-1122 (1995).
- 51) Dedrick R. L., Zaharko D. S. and Lutz R. J.: Transport and binding of methotrexate *in vivo*. *J. Pharm. Sci.*, **62**: 882-890 (1973).
- 52) Kuwabara T., Uchimura T., Kobayashi H., Kobayashi S. and Sugiyama Y.: Receptor-mediated clearance of G-CSF derivative nartograstim in bone marrow of rats. *Am. J. Physiol.* **269** (Endocrinol. Metab. **32**): E1-E9 (1995).
- 53) Kuwabara T., Ishikawa Y., Kobayashi H., Kobayashi S. and Sugiyama Y.: Renal clearance of a recombinant granulocyte colony-stimulating factor, nartograstim in rats. *Pharm. Res.* **12**: 1466-1469 (1995).
- 54) Kunimasa J., Itoga Y., Tanigawara Y., Yasuhara M., Hori R., Amano J., Kamiyama H. and Okazaki A.: Renal handling of recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF) and its derivative in the isolated perfuse rat kidney. *Proceeding of Deliver of Protein Drug—The Next 10 Years.* **219** (1993).
- 55) Kuwabara T., Kobayashi S. and Sugiyama Y.: Kinetic analysis of receptor-mediated endocytosis of G-CSF derivative, Nartograstim, in rat bone marrow cells. *Am. J. Physiol.* (Endocrinol. Metab.) in press.