遺伝子組換え型ヒトインターロイキン-2 (S-6820) の体内動態に関する研究 (第1報): S-6820投与後のラットにおける検討

西内 偉格, 甲斐 包子, 吉田 真里子, 高岸 靖

塩野義製薬株式会社研究所 〒553 大阪市福島区鷺洲5-12-4

山田 秀雄

北里大学薬学部

永井 修吾, 刈谷 巽, 佐々木 繁

塩野義製薬株式会社製造部 〒566 大阪府摂津市三島2丁目5-1

Key words : Recombinant human interleukin-2, S-6820, Rat, Bioassay, Enzyme immunoassay, Absorption, Distribution, Excretion, Metabolism, Repeated administration, Fetus, Milk

Disposition of Recombinant Human Interleukin-2 (S-6820) (I) :

Studies using non-radioactive S-6820 in Rats

Masanori NISHIUCHI, Kaneko KAI, Mariko YOSHIDA and Yasushi TAKAGISHI

Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

Hideo YAMADA

Kitasato University, School of Pharmaceutical Sciences

Syuugo NAGAI, Tatsumi KARIYA and Shimaru SASAKI

Production Department, Shionogi & Co., Ltd., Settsu-shi, Osaka 566, Japan

Summary

The absorption, distribution, excretion and metabolism of recombinant human interleukin-2 (S-6820) were studied following intravenous or subcutaneous injection at a dose of 5×10^5 U/kg to rats. Concentrations of S-6820 in serum, tissues and other body fluids were measured by a bioassay and an enzyme immunoassay.

1. After intravenous injection of S-6820 to rats, serum levels of S-6820 decreased biphasically and the half-lives of the α phase and β phase were 2.4 min and 16min, respectively.

2. Absorption ratio after subcutaneous injection of S-6820 was about 37 %.

3. After repeated intravenous injection of S-6820 once a day for 5 days, the levels of S-6820 in serum and tissues reached the same levels as after single administration. No accumulation was observed.

4. After intravenous injection of S-6820, especially high level was observed in the kidney, however, it decreased rapidly ($t_{1/2}=11$ min). The levels of S-6820 in the other organs (spleen, lung, heart and liver) were lower than the serum level.

5. After intravenous injection of S-6820 to 20-th day pregnant rat, S-6820 in the amniotic fluid and fetus was not detected.

6. After intravenous injection to lactating rats, the transfer of S-6820 from blood to milk was minimal.

7. A little of S-6820 was found in the bile by EIA. S-6820 was not detected in the urine by EIA method.

8. The disappearance rates of S-6820 in rats changed from $t_{1/2}(\beta)=0.41$ hr in sham operated rats to $t_{1/2}(\beta)=1.57$ hr in rats with renal excision. The kidney appeared to be the main metabolic site.

緒 言

S-6820は、Devos らによってクローニングされ、DNA 塩基配列が決定された¹⁾ 組換え型ヒトインターロイキン-2で、N末端にメチオニン残基を有する134個のアミノ酸から成るポリペプチドである。S-6820は、NK 細胞活性の増強作用^{2,3)} と LAK 細胞およびインターフェロン産生の誘導能を有する⁴⁻⁶⁾ ことから、悪性腫瘍に対して生体内防御機構を介しての効果が期待されている。

前報⁷⁾ において、著者らはS-6820をカニクイザルに投与したときの血中動態および尿中排泄について検討し、静注後の血清中濃度推移は2相性を示し、投与量に比例した水準を示すこと、反復投与（静注、皮下注）による蓄積性は認められなかったこと、尿中への排泄は全く認められなかったことなどを報告した。

本報では、S-6820の体内動態を明らかにするため、Bioassay 法および enzyme immunoassay 法（EIA 法）を用いてラットにおける血清中濃度推移、体内分布、胎仔移行、乳汁移行、排泄などについて検討を行ったので報告する。

試験法

(1) 検 体

S-6820（平均分子量：15500，等電点：約7.7）は、塩野義製薬株式会社により調製された凍結乾燥品（ 5×10^5 U/vial, lot CVS01）を、注射用蒸留水で 5×10^5 U/ml となるように調製して用いた。

(2) 実験動物

生後6週齢のJcl-SD 系雌雄ラットを購入（日本クレア株式会社）し、1週間の予備飼育ののち絶食せずに用いた。

胎仔への移行性を調べる実験では、雌雄ラットを交配させ、膣スミア中に精子を確認した日を妊娠0日目とし、妊娠20日目（体重：350～432 g）に使用した。

乳汁中への移行を調べる実験では、妊娠ラット中、正常に分娩した雌ラットの分娩日を出産0日目とし、出産12日目の授乳中の母ラット（体重：308～349 g）を用いた。

S-6820の血中からの消失に関して、腎の寄与を調べる実験では、ウレタン麻醉下、経時的に採血する目的で左足大腿部前脛骨動脈にポリエチレンチューブ（PE-50, Clay Adams 社）を挿入し、腹部を切開して左右の腎動脈および腎静脈を結紮したのち腎を摘除したラットを用いた。なお、対照群にはウレタン麻醉下で左足大腿前脛骨動脈にポリエチレンチューブを挿入し、腹部を切開したが腎を摘除していないラットを用いた。

(3) 投与方法

a) 静脈内注射

ラットを軽くエーテル麻醉し、尾静脈よりS-6820を 5×10^5 U/ml/kg の用量で、約5秒間で投与した。反復投与はS-6820を 5×10^5 U/ml/kg の用量で1日1回、5日間、繰り返しラット尾静脈内に投与した。

乳汁中への移行性を調べる実験では、授乳中の母ラットを軽くエーテル麻醉し、頸部皮膚を切開し、鎖骨部大胸筋を介して頸静脈内に 5×10^5 U/ml/kg のS-6820を約5秒間で注射した。投与した後、頸部皮膚をアロンアルファ（東亜合成化学）で接着した。

なお、投与量は投与前後のポリプロピレン製注射筒（テルモ）の重量差により確認した。

b) 皮下注射

ラットをエーテル麻醉したのち背部を刈毛し、その皮下にS-6820を 5×10^5 U/ml/kg の用量で皮下注射した。投与量は投与前後のポリプロピレン製注射筒の重量差により確認した。

(4) 生体試料採取法

a) 血 清

S-6820を 5×10^5 U/ml/kg の用量で静脈内注射または皮下注射して所定時間が経過した後、ラットをエーテル麻醉し、腹部を切開して腹部大動脈より全採血して致死させた。採取した血液は丸底スピッツ（栄研器材）に移し、4℃で2～3時間放置後、冷却下（4℃）遠心分離（3000rpm, 15分間）を行い、血清を分離した。

胎仔への移行性を調べる実験では、検体を投与して所定時間が経過した後、妊娠ラットをエーテル麻醉し、腹部を切開して腹部大動脈より全採血して致死させた。採取した血液は、丸底スピッツに移し、4℃で2～3時間放置後、冷却下（4

℃)遠心分離(3000rpm, 15分間)を行い、血清を分離した。胎仔血清は胎仔の胸部を切開し、心臓穿刺により約0.25ml(胎仔2~3匹分)を採血して、同様に遠心分離を行い血清を分離した。

乳汁中への移行性を調べる実験では、検体を投与して所定時間が経過した後、ラットをエーテルで軽く麻酔し、尾静脈より約0.25mlを採血して、同様に遠心分離を行い血清を分離した。

腎を摘出したラットの場合、検体を尾静脈内より投与し、左足大腿部前頸骨動脈に挿入したポリエチレンチューブから経時的に約0.25mlを採血して、同様に遠心分離を行い血清を分離した。

S-6820を投与して得られた血清は、非特異的な吸着を防ぐ目的で、1%ウシ血清アルブミン(BSA, Sigma 社製)を添加した0.1M食塩等張リン酸緩衝液(0.1M PBS, pH7.4)で適宜希釈して、bioassay 法および EIA 法による測定のための試料を作製した。得られた試料は、測定までの間-20℃で凍結保存した。なお、検量線は無処置のラットの血清に S-6820標準品を既知量添加して作製した。

b) 体液および主要臓器

検体を投与して所定時間が経過後、ラットをエーテルで麻酔し、腹部を切開して腹部大動脈より全採血して致死させたのち、主要臓器を摘出した。胎仔への移行性を調べる実験では、母獣を全採血して致死させ主要臓器を摘出したのち羊水、胎盤、胎仔肝、胎仔腎および胎仔脳を摘出した。胎仔肝および胎仔脳は胎仔2匹から、胎仔腎は母体1匹分の胎仔から採取したものを集めて測定に供した。

S-6820を投与して得られた臓器は、その重量を測定し、1% BSA を含む0.1M-PBS を9倍量加えて氷冷下ホモジナイズした。これら臓器ホモジネートは、冷却下(4℃)遠心分離(3000rpm, 15分間)して上清を分取し、1% BSAを含む0.1M PBS で適宜希釈して、EIA 法による測定のための試料を作製した。羊水は1%BSAを含む0.1M PBS で適宜希釈して測定のための試料を作製した。得られた試料は、測定までの間-20℃で保存した。なお、検量線は無処置のラットの臓器ホモジネートおよび羊水に S-6820標準

品を既知量添加した後、上記操作に従い作製した。

c) 乳汁

分娩後12日目の授乳中の母ラットに S-6820を静注したのち、投与後30分, 2, 4, 8および24時間にエーテルで軽く麻酔して尾静脈より採血後、母ラットの胸部および鼠蹊部の乳腺域および乳頭をマッサージして約0.15mlの乳汁を採取した。なお、乳仔は投与1時間前から投与4時間後の採乳までの間、母獣から離した。投与後8, 24時間の乳汁採取においては、採乳2時間前に乳仔を母獣から離し、採乳後再び同居させた。

採取した乳汁は1% BSA を含む0.1M PBS で適宜希釈して EIA 法による測定試料を作製した。得られた試料は、測定までの間-20℃で凍結保存した。なお、検量線は無処置のラットより得た乳汁に S-6820標準品を既知量添加して作製した。

d) 皮下注射部位

検体を皮下注射して所定時間が経過した後、ラットをエーテル麻酔して腹部を切開し、腹部大動脈より全採血して致死させた。投与部位である背部皮膚を皮下組織中に残存する検液と共に切り取り、さらに検液を包含する皮下組織を皮膚から切り放し、1% BSA を含む0.1M PBS を加えて氷冷下ホモジナイズしたのち、全量を10mlにした。皮下組織ホモジネートは、冷却下(4℃)遠心分離(3000rpm, 15分間)して上清を分取し、適宜希釈して EIA 法による測定のための試料を作製した。得られた試料は、測定までの間-20℃で保存した。なお、検量線は麻酔死させたラットの背部皮下に S-6820標準品を既知量注射したのち、背部皮膚を切り取り皮下組織中に残存する S-6820を上記操作に従って処理して作製した。

e) 胆汁

総胆管にポリエチレンチューブ(PE-10, Clay Adams 社)を挿入したラットをボルマン・ケージに固定し、氷冷したポリスピッツに胆汁を集めた。採集した胆汁は秤量したのち、1%BSAを含む0.1M PBS で32倍希釈して EIA 法による測定試料を作製した。得られた試料は、測定までの間-20℃で保存した。なお、検量線は投与し

ていないラットから採集した胆汁に S-6820 標準品を既知量添加したのち、直ちに氷冷し、1% BSA を含む 0.1M PBS で 32 倍希釈して作製した。

f) 尿

ペニスにガラス管 (8 mmφ×40mm) をかぶせ、アロンアルファで接着したラットをボルマン・ケージに固定し、排出する尿を氷冷したポリスピッツに集めた。採集した尿は秤量したのち、1% BSA を含む 0.1M PBS で 32 倍希釈して EIA 法による測定試料を作製した。得られた試料は、測定までの間 -20℃ で保存した。なお、検量線は投与していないラットから採集した尿に S-6820 標準品を既知量添加したのち、1% BSA を含む 0.1M PBS で 32 倍希釈して作製した。

(5) ラット血液、血清および尿中での安定性

a) 血液および血清

投与していないラットの血液 (ヘパリン濃度、10 単位/ml) および血清に S-6820 標準品を既知量添加 (100~500 U/ml) し、37℃ の条件下で経時的にサンプリングし、血清試料は適宜希釈して bioassay 法および EIA 法による測定試料とした。血液試料は冷却下 (4℃) 遠心分離 (3000 rpm, 15 分間) して血漿を分離し、1% BSA を含む 0.1M PBS で 8 倍希釈して bioassay 法および EIA 法による測定試料とした。得られた試料は、測定までの間 -20℃ で凍結保存した。

b) 尿

投与していないラットの尿に S-6820 標準品を既知量添加し、37℃ の条件下で経時的にサンプリングし、1% BSA を含む 0.1M PBS で 32 倍希釈して EIA 法による測定試料とした。得られた試料は、測定までの間 -20℃ で凍結保存した。

(6) 測定法

a) Bioassay 法

S-6820 の濃度測定は、IL-2 依存性の T 細胞クローン (CTLL-2) を用い、Gillis らの方法⁸⁾ を改良して行った。IL-2 の量に比例して CTLL-2 細胞は増殖するので、細胞の増殖程度から IL-2 量を算出することができる。細胞の増殖は 5% ウシ胎仔血清 (FCS) 加 RPMI 1640 培地 (日水製薬) を用い、その増殖は ³H-thymidine の取り込み量として、液体シンチレーションカウン

ターで測定した。また、標準品には米国 National Cancer Institute, Frederick Cancer Research Facility の Biological Response Modifiers Program (BRMP) Reference Reagent Human IL-2 (Jurkat)⁹⁾ を基準にして力価測定された自社標準品を用いた。

b) Enzyme immunoassay 法 (EIA 法)

森ら¹⁰⁾ の方法に準じて行った。マイクロタイタープレートにポリクローナル抗体を固相化し、S-6820 標準液または試料溶液を加えて第 1 反応 (37℃, 2 時間) を行った。次いで、horseradish peroxidase で標識したポリクローナル抗体を加えて第 2 反応 (37℃, 2 時間) を行った後、発色させ波長 450nm と 510nm における吸光度の差を測定した。

(7) 薬物速度論的解析法

得られた血清中濃度の解析は、NONLIN プログラム¹¹⁾ を用い、two-compartment model により行った。血清中濃度曲線下面積 (AUC) は台形法により求めた。

結果

(1) Bioassay 法と EIA 法の比較

ラットの血清に S-6820 標準品を添加して種々の濃度の検体を調製し、それらを 2 分して、一方を bioassay 法により、他方を EIA 法により

Fig. 1 The relationship between bioassay and EIA for S-6820 added to rat serum
The regression equation between bioassay (x U/ml) and EIA (y U/ml) : $y = 1.02x + 0.90$, $n = 12$, $r = 0.978$

Fig. 2 Stability of S-6820 added to whole blood and serum of rat (37°C, mean (n=3))

[A] Bioassay [B] EIA, ●Whole Blood, ■Serum, ▲0.1MPBS

Fig. 3 Stability of S-6820 added to blank urine of rat (37°C, mean±S.D. (n=3), by EIA)

測定した。その結果を Fig. 1 に示す。これによれば、ラット血清中の S-6820 に対する両測定法の成績はよく一致することが認められた。

(2) ラット全血、血清および尿中での安定性

a) 全血および血清

投与していないラットの全血および血清に S-6820 を添加し、37°C でインキュベーションを行い、bioassay 法および EIA 法により測定した。その結果は Fig. 2 に示すように、全血および血清中で S-6820 は安定であった。

b) 尿

投与していないラットの尿 (pH 6.4) に S-6820 を添加し、37°C でインキュベーションを行い EIA 法により測定した。その結果は Fig. 3 に示すように尿中で安定であった。

(3) 単回静脈内投与後の血清中濃度推移

S-6820 (5×10^5 U/kg) をラットに静脈内投与し、その血清中濃度推移を bioassay 法および EIA 法により求めた。その結果は Fig. 4 に見られるごとく、いずれも 2 相性を示し、その濃度は bioassay 法および EIA 法ともに良く似た値を示した。また、この場合の薬物速度論的パラメーターを Fig. 4 に併記したが、bioassay 法の結果によれば、消失半減期は α 相で 0.04 時間 (2.4 分)、 β 相で 0.26 時間 (16 分)、この投与量での AUC は $770 \text{ U} \cdot \text{hr} / \text{ml}$ であった。

(4) 皮下注射後の血清中濃度推移および投与部位残存率

a) 血清中濃度推移

S-6820 (5×10^5 U/kg) をラットの背部皮下に注射し、その後の血清中濃度推移を bioassay 法および EIA 法により測定した。その結果を Fig. 5 に示す。両測定法における測定結果はよく似た値を示し、この場合の薬物速度論的パラメーターは Fig. 5 に併記したごとく、bioassay 法の結果によれば、皮下注射後 1 時間に最高値を示したのち半減期 0.49 時間 (29 分) で消失し、その AUC は $287 \text{ U} \cdot \text{hr} / \text{ml}$ であった。

b) 投与部位残存率

S-6820 (5×10^5 U/kg) をラットの背部皮下に注射したのち、皮下注射部位に残存する S-6820 を EIA 法により測定し、投与量に対する残存率 (%) の時間的推移を求めた。その結果は Fig. 6 に示すように、残存率は時間とともに低下し、

Fig. 4 Serum concentrations of S-6820 in rats following intravenous injections at a dose of 5×10^5 U/kg (by Bioassay and EIA)

Each point with vertical line represents the mean $\pm$ S.D. of three rats.

a) Used mean value

b) Trapezoidal method (0- ∞)

3時間後には10%以下になった。

(5) 単回静脈内投与後の組織内濃度

S-6820 (5×10^5 U/kg) をラットに単回静脈内投与した後の主要組織内濃度を EIA 法により測定した。その結果を Table I に示すが、比較のため Fig. 4 に示した血清中濃度の EIA 法による測定値も併記した。腎組織内濃度が最も高く、他の主要臓器における濃度は血清中濃度に比べ低い値であった。これらの組織内濃度の消失半減期は、Table I の右端に付記したごとく、0.11~0.22時間（すなわち6.6~13.2分）であり、各組織とも速やかな消失を示した。

(6) 反復静脈内投与後の血清中濃度推移および組織内濃度

a) 血清中濃度推移

S-6820 (5×10^5 U/kg) を1日1回、5日間ラットに静脈内投与し、その血清中濃度推移を bioassay 法および EIA 法により求めた。最終回投与後の結果は Fig. 7 に見られるごとく、いずれも2相性を示し、両測定法による測定値はよく似た値を示した。Bioassay 法の結果によれば、この最終回投与後のラットにおける S-6820 の消失半減期は α 相で0.07時間（4.2分）、 β 相で0.42時間（25分）、この投与量での AUC は754 U·hr/ml であり、単回静脈内投与後の結果 (Fig. 4) に近似した値であった。また、各回投与直前の血清中濃度（静注後24時間値）は、いずれも定量下限（5U/ml）以下であり、第2回～

Fig. 5 Serum concentrations of S-6820 in rats following subcutaneous injections at a dose of 5×10^5 U/kg (by bioassay and EIA)

Each point with vertical line represents the mean $\pm$ S.D. of three rats.

a) Used mean value

b) Trapezoidal method (0- ∞)

Table I Tissue levels of S-6820 in rats following intravenous injections at a dose of 5×10^5 U/kg (by EIA)

							(U/ml or U/g)
Tissue	Time after i.v. injection						t _{1/2} (hr)
	5 min	15 min	30 min	1 hr	2 hr	4 hr	
Serum	3221 ± 81	581 ± 81	229 ± 44	69 ± 9	8 ± 1	N. D. ^{a)}	0.29 ^{h)}
Liver	219 ± 15	N. D. ^{b)}	N. D. ^{b)}	N. D. ^{b)}	N. D. ^{b)}	N. D. ^{b)}	—
Kidney	10473 ± 584	5849 ± 767	1677 ± 24	488 ± 90	N. D. ^{c)}	N. D. ^{c)}	0.18 ⁱ⁾
Lung	402 ± 37	223 ± 20	131 ± 24	N. D. ^{d)}	N. D. ^{d)}	N. D. ^{d)}	0.22 ⁱ⁾
Heart	341 ± 34	131 ± 13	N. D. ^{e)}	N. D. ^{e)}	N. D. ^{e)}	N. D. ^{e)}	0.11 ⁱ⁾
Spleen	576 ± 51	222 ± 15	123 ± 3	N. D. ^{f)}	N. D. ^{f)}	N. D. ^{f)}	0.15 ⁱ⁾
Brain	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	—

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three rats.

a) < 6 U/ml, b) < 94 U/g, c) < 92 U/g, d) < 82 U/g, e) < 126 U/g,

f) < 68 U/g, g) < 53 U/g, h) $t_{1/2}$ (β), i) Used mono-exponential equation

第5回静注後5分の血清中濃度の値は、第1回静注後5分の値と類似の値を示した。

b) 組織内濃度

S-6820 (5×10^5 U/kg) を1日1回、5日間ラットに静脈内投与し、その最終回投与後の主要組織内濃度をEIA法により測定した。その結果をTable IIに示すが、比較のためFig. 7に示した血清中濃度のEIA法による測定値も併記した。腎内濃度が最も高く、他の主要臓器にお

ける濃度は血清中濃度に比べ低い値であった。これらの傾向および濃度は、Table Iに示した単回静脈内投与後の結果と良く似たものであり、この条件下では蓄積性は認められなかった。

(7) 胎仔移行

妊娠20日目のラットにS-6820 (5×10^5 U/kg) を静脈内投与し、5分、15分、30分、1時間、3時間後の母獣の血清、肝、腎、脳、羊水、胎盤ならびに胎仔の血清、肝、腎、脳における濃度を

Fig. 6 Percentage of remained S-6820 in administered site following subcutaneous injections at a dose of 5×10^5 U/kg in rats (by EIA)
Each point with vertical line represents the mean $\pm$ S.D. of three rats

Fig. 7 Serum concentrations of S-6820 in rats following multiple intravenous injections (every 24 hour, 5 times) at a dose of 5×10^5 U/kg (by bioassay and EIA)
Each point with vertical line represents the mean $\pm$ S.D. of three rats
a) Used mean value
b) Trapezoidal method (0- ∞)

Table II Tissue levels of S-6820 in rats following multiple intravenous injections every 24 hour for 5 times at a dose of 5×10^5 U/kg (by EIA)

Tissue	Time after the last i.v.injection						$t_{1/2}$ (hr)
	5 min	15 min	30 min	1 hr	2 hr	4 hr	
Serum	3358 ± 43	687 ± 15	219 ± 15	71 ± 11	10 ± 3	N. D. ^{a)}	0.32 ^{h)}
Liver	273 ± 19	N. D. ^{b)}	N. D. ^{b)}	N. D. ^{b)}	N. D. ^{b)}	N. D. ^{b)}	
Kidney	13282 ± 2008	7429 ± 1053	1645 ± 297	523 ± 101	N. D. ^{c)}	N. D. ^{c)}	0.17 ⁱ⁾
Lung	679 ± 106	326 ± 16	189 ± 18	N. D. ^{d)}	N. D. ^{d)}	N. D. ^{d)}	0.19 ⁱ⁾
Heart	332 ± 28	130 ± 16	N. D. ^{e)}	N. D. ^{e)}	N. D. ^{e)}	N. D. ^{e)}	0.11 ⁱ⁾
Spleen	627 ± 20	258 ± 37	N. D. ^{f)}	N. D. ^{f)}	N. D. ^{f)}	N. D. ^{f)}	0.11 ⁱ⁾
Brain	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	

Each value represents the mean ± S.D. of three rats.

a) <5U/ml, b) <80U/g, c) <64U/g, d) <74U/g, e) <63U/g,

f) <98U/g, g) <59U/g, h) $t_{1/2}$ (β), i) Used mono-exponential equation

Table III Tissue levels of S-6820 in 20-th day pregnant rats following intravenous injections at a dose of 5×10^5 U/kg (by EIA)

Tissue	Time after i.v. injection					(U/ml or U/g)
	5 min	15 min	30 min	1 hr	2 hr	
Mother						
Serum ^{j)}	7650 ± 599	2137 ± 94	627 ± 192	188 ± 17	5.1 ± 1.7	
Liver	470 ± 61	157 ± 18	N. D. ^{a)}	N. D. ^{a)}	N. D. ^{a)}	
Kidney	14510 ± 766	13272 ± 1396	3109 ± 425	1043 ± 81	N. D. ^{b)}	
Brain	N. D. ^{c)}	N. D. ^{c)}	N. D. ^{c)}	N. D. ^{c)}	N. D. ^{c)}	
Placenta	760 ± 79	289 ± 38	N. D. ^{d)}	N. D. ^{d)}	N. D. ^{d)}	
Amniotic fluid	N. D. ^{e)}	N. D. ^{e)}	N. D. ^{e)}	N. D. ^{e)}	N. D. ^{e)}	
Fetus						
Serum	N. D. ^{f)}	N. D. ^{f)}	N. D. ^{f)}	N. D. ^{f)}	N. D. ^{f)}	
Liver	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	N. D. ^{g)}	
Kidney	N. D. ^{h)}	N. D. ^{h)}	N. D. ^{h)}	N. D. ^{h)}	N. D. ^{h)}	
Brain	N. D. ⁱ⁾	N. D. ⁱ⁾	N. D. ⁱ⁾	N. D. ⁱ⁾	N. D. ⁱ⁾	

Each value represents the mean ± S.D. of three rats.

a) <83U/g, b) <67U/g, c) <60U/g, d) <102U/g, e) <5U/ml,

f) <6U/ml, g) <95U/g, h) <63U/g, i) <54U/g,

j) Pharmacokinetic parameter*

$T_{1/2}(\alpha)$ (hr)	$T_{1/2}(\beta)$ (hr)	V_1 (ml/kg)	V_2 (ml/kg)	Cl_{tot} (ml/min/kg)	MRT (hr)	AUC† (U·hr/ml)
0.07	0.33	31.4	19.4	3.81	0.21	2214

* Used mean value

† Trapezoidal method (0 ~ ∞)

Table N Milk and serum concentrations of S-6820 in lactating rats following intravenous injections at a dose of 5×10^5 U/kg (by EIA)

(U/ml)

	Time after i.v. injection					
	5 min	30 min	2 hr	4 hr	8 hr	24 hr
Serum	4781 $\pm$ 1139	286 $\pm$ 37	21 $\pm$ 7	N. D. ^{a)}	N. D. ^{a)}	N. D. ^{a)}
Milk	— ^{b)}	18 $\pm$ 4	22 $\pm$ 6	18 $\pm$ 3	N. D. ^{c)}	N. D. ^{c)}

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of four rats (The value at 24hr represents the mean $\pm$ S.D. of three rats.).

a) <10 U/ml, b) not collected, c) <12 U/ml

Fig. 8 Serum concentrations of S-6820 in renal excision rats and in sham operated rats following intravenous injections at a dose of 5×10^5 U/kg (by EIA)

Each point with vertical line represents the mean $\pm$ S.D. of four rats

a) Used mean value

b) Trapezoidal method (0- ∞)

EIA 法により測定した。その結果を Table III に示す。S-6820は静注後、母獣の腎に最も高濃度に移行し、次いで母獣の血清、胎盤が高い濃度を示したが、羊水および胎仔の血清、肝、腎、脳の S-6820濃度は、いずれも定量下限以下であり、胎仔側への移行は認められなかった。

(8) 乳汁中移行

分娩後12日目の授乳中の母ラットに、S-6820(5

$\times 10^5$ U/kg) を静脈内投与し、経時的に採取した血清および乳汁を EIA 法により測定した。その結果は Table N に示すように、静注後30分、2時間、4時間の乳汁中に S-6820が測定されたが、その濃度はいずれも低いものであった。

(9) 胆汁中排泄

S-6820 (5×10^5 U/kg) をラットに静脈内投与した後、胆汁中に排泄される S-6820を EIA

法により測定した。各個体ごとの結果は、静注後1時間の胆汁中に定量下限 ($47\text{U}/\text{mI}$) 以下であるが、その存在は認められた。しかし、静注後1時間以降の胆汁中にはその存在は認められなかった。

(10) 尿中排泄

S-6820 ($5 \times 10^5\text{U}/\text{kg}$) をラットに静脈内投与したのち、尿中に排泄される S-6820 を EIA 法により測定した。各個体ごとの結果は、いずれの測定点も定量下限 ($21\text{U}/\text{mI}$) 以下であり、尿中に認められなかった。

(11) 腎を摘除したラットにおける血清中濃度推移

左右の腎を摘除したウレタン麻酔下のラットに、S-6820 ($5 \times 10^5\text{U}/\text{kg}$) を静脈内投与し、血清中濃度を EIA 法により求めた。その結果を Fig. 8 に示すが、比較のため、腎摘除していないウレタン麻酔下のラットでの血清中濃度推移を対照群の値として併記した。腎摘除したラットの静注後5分の血清中濃度は対照群に比べ2倍以上の高い値を示し、血清中からの消失パターンは対照群に比べ緩慢となり、2相性で血清中から消失した。

考 察

S-6820を $5 \times 10^5\text{U}/\text{kg}$ の用量でラットに静脈内投与したのちの血清中濃度を bioassay 法で測定した結果は、Fig. 4 に示すように、 $t_{1/2}(\alpha) = 0.04$ 時間 (2.4分)、 $t_{1/2}(\beta) = 0.26$ 時間 (16分) で、血清中から2相性で消失した。Colburn らの報告¹²⁾にみられるラットでの半減期 ($t_{1/2}(\beta) = 20 \sim 39$ 分) に比べやや短い傾向が見られるが、Colburn らの実験での投与量 ($10 \sim 20 \times 10^6\text{U}/\text{kg}$) が、本実験での投与量 ($5 \times 10^5\text{U}/\text{kg}$) に比べて高く、20~40倍にもなっていることに基因する可能性があるように思われる。

ラットの背部皮下に注射した後の血清中濃度推移は、Fig. 5 に示したとおりであり、同量を静脈内投与した後の AUC に対する皮下注射後の AUC の比 (%) を吸収率の指標として求めると、bioassay 法および EIA 法による結果はそれぞれ37.3%、35.3%であった。しかし、Fig. 6によれば、投与部位の皮下組織中 S-6820残存

率は時間の経過とともに低下し、皮下注後3時間で投与量の10%以下となった。吸収率が約35~37%である原因として、注射された S-6820 が皮下組織内で代謝、変性を受けたか、未変化のまま皮下組織に強く吸着してホモジネートの上清に移行しないかなどについては必ずしも明らかではないが、投与5分後の回収率が99%以上ではほぼ全量回収されることから、組織への吸着はさほど大きいものではないと思われる。皮下組織中で分解されている可能性が大きいと考えられる。また、皮下注後の平均滞留時間 (MRT) と静注後のその差から求めた平均吸収時間は、bioassay 法および EIA 法でそれぞれ1.56時間、1.26時間であった。

S-6820の単回および反復静脈内投与した場合の薬物速度論的パラメーターをそれぞれ Fig. 4 および Fig. 7 に併記した。単回および反復静脈内投与後の血清中濃度はよく似た推移を示し、bioassay 法および EIA 法による両測定値はよく似た値であった。しかしながら、 V_1 の計算値は $42.4 \sim 84.6\text{mI}/\text{kg}$ の範囲内にばらつき、その平均値は $57.3 (\pm 19.1 : \text{SD})\text{mI}/\text{kg}$ であった。これは V_1 を算出するのに必要な測定点の数が少なく、しかも α 相の半減期が短いので、わずかな定量誤差が反映されやすいためと思われる。この値はラットの血漿の体積 ($39.2\text{mI}/\text{kg}$ ¹³⁾) と比較してやや大きな値であり、compartment 1としては血清以外に S-6820が高い親和性を示すある種の臓器が考えられる。静脈内投与された S-6820は速やかに腎に高濃度に移行 (Table I, Table II) することから、おそらく腎はそのような臓器の一つであると思われる。なお、Fig. 8に併記した薬物速度論的パラメーター V_1 の値は、腎を摘除することにより減少することが認められ、前述した“compartment 1の分布容積に対する腎の寄与”を支持する結果であった。

妊娠ラットにおける V_1 および Cl_{tot} は、それぞれ $31\text{mI}/\text{kg}$ 、 $3.81\text{mI}/\text{min}/\text{kg}$ で、雄性ラット (Fig. 4, Fig. 7) におけるそれらの値に比べてやや小さな値であった。これは S-6820の胎仔側への移行は認められないが、胎仔を含む母獣の体重あたりで算出したことに基因するものと思われる。

静脈内投与されたS-6820は腎に高濃度に移行する (Table I) が、体内からの消失に対する腎の寄与を調べるため、腎動脈および腎静脈を結紮して左右の腎臓を摘出したラットにS-6820を静脈内投与し、血清中濃度をEIA法により測定した。その結果、Fig. 8に示すように、腎を摘除することによって静注後5分の血清中濃度は2倍以上に上昇し、血清中からの消失は緩慢になった。この場合、静注後5分の血清中濃度が2倍以上に上昇したのは、腎動脈、腎静脈を結紮することにより腎への移行が妨げられた結果と考え

ることができ、また、血清中からの消失が対照群のそれに比べて緩慢となったのは、体内からの消失に対する腎の寄与の大きさを示すものと推定される。さらに、S-6820は尿中にも胆汁中にもそのままの形ではほとんど排泄されないことから、その消失は代謝によるものと思われる。したがって、腎はS-6820の代謝に大きく関与していることが考えられる。この点については、放射性ヨード標識S-6820を用いた検討¹⁴⁾によって、より一層明らかにすることができた。

文 献

- 1) Devos, R., Plaetinck, G., Cheroutre, H., Simons, G., Degraeve, W., Tavernier, J., Remaut, E. & Fiers, W.: Molecular cloning of human interleukin 2 cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucl. Acids Res.*, **11**: 4307-4323 (1983).
- 2) Djeu, J.Y., Heinbauch, J.A., Holden, H.T. & Herberman, R.B.: Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J. Immunol.*, **122**: 175-181 (1979).
- 3) Henney, C.S., Kuribayashi, K., Kern, D.E. & Gillis, S.: Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*, **291**: 335-338 (1981).
- 4) Itoh, K., Shiiba, K., Shimizu, Y., Suzuki, R. & Kumagai, K.: Generation of activated killer (AK) cells by recombinant interleukin 2 (rIL2) in collaboration with interferon- γ (IFN- γ). *J. Immunol.*, **134**: 3124-3129 (1985).
- 5) Shiiba, K., Suzuki, R., Kawakami, K., Ohuchi, A. & Kumagai, K.: Interleukin 2-activated killer cells: generation in collaboration with interferon γ and its suppression in cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.*, **21**: 119-128 (1986).
- 6) Handa, K., Suzuki, R., Matsui, H., Shimizu, Y. & Kumagai, K.: Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL2) II. IL2-induced interferon γ production. *J. Immunol.*, **130**: 988 (1983).
- 7) 西内偉格, 甲斐包子, 小泉謙三, 佐藤孝三郎, 山田秀雄, 永井修吾, 刈谷 巽, 山下武夫, 武藤通彦, 中井健史, 高木英敏: 遺伝子組換え型ヒトインターロイキン-2 (S-6820) のカニクイザルにおける薬物速度論的研究, 基礎と臨床, **23**: 3035-3041 (1989).
- 8) Gillis, S., Ferm, M.M., Ou, W., and Smith, K.A.: T cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.*, **120**: 2027-2032 (1978).
- 9) Dumonde, D.C., and Papermaster, B.W.: Towards the standardization of lymphokines: First report of the lymphokine standardization. *Lymphokine Res.*, **3**: 193-227 (1984).
- 10) 森 秀輔, 佐川恵子, 小南悟郎, 河野昌雄, 永井修吾, 刈谷 巽, 佐々木繁: S-6820 のサンドイッチエンザイムイムノアッセイ, 基礎と臨床, **22**: 5955-5962 (1988).
- 11) Metzler, C.M., Elfring, G.L. & McEwen, A.J.: A users manual for NONLIN and associated programs, The Upjohn Co., Kalamazoo, Michigan, 1974.
- 12) Colburn, W.A., Hakimi, J., and Bekersky, I.: Plasma concentration profiles of human recombinant interleukin-2 (HrIL-2) in the rat following administration by various systemic routes. *Drug Metab. Dispos.* **15**: 429-431 (1987).
- 13) Gerlowski, L.E. and Jain, R.K.: Physiologically based pharmacokinetic

- modeling : Principles and applications., *J. Pharm. Sci.*, **72** : 1103-1127(1983).
- 14) 西内偉格, 吉田真里子, 木下春樹, 高岸 靖, 山田秀雄, 稲沢和博, 中野正行, 能登谷満, 長谷川博司, 水平敏知, 菅野浩一: 遺伝子組換え型ヒトインターロイキン-2 (S-6820) の体内動態に関する研究 (第2報) ^{125}I -標識S-6820投与後のラットにおける検討, 薬物動態, **5** : 179-197 (1990).