遺伝子組換えヒト型エリスロポエチン (EPOCH)

皮下投与後の体内動態 (1) :

非標識 EPOCH 単回投与時のラット, イヌにおける動態

加藤 基浩, 丹羽 一与, 神山 博, 大久保一三, 岡崎 彬

中外製薬株式会社薬物動態研究所 〒171 東京都豊島区高田3-41-8

Key words : EPOCH, erythropoietin, pharmacokinetics, subcutaneous, rat, dog

The disposition of recombinant human erythropoietin (EPOCH)

after subcutaneous administration (1) :

Pharmacokinetics of non-labeled EPOCH in rats and dogs.

Motohiro KATO, Kazuyo NIWA, Hiroshi KAMIYAMA,

Kazumi OHKUBO and Akira OKAZAKI

Drug Metabolism and Pharmacokinetics Research Labs., Chugai

Pharmaceutical Co., LTD., 41-8, Takada 3-chome, Toshima-ku, Tokyo, 171, Japan

Summary

We studied the pharmacokinetics of EPOCH after subcutaneous administration to male rats and dogs. The EPOCH concentrations in samples were measured by RIA.

1. In rats given EPOCH subcutaneously at the doses of 1, 5 and 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the concentrations of EPOCH reached the peak at 8 to 12 hours after dosing and declined monoexponentially with a half-life ranging from 7.52 to 10.89 hours. MRT of EPOCH after sc dosing ranged from 15.82 to 17.71 hours at any dose levels. F value (AUC_{sc}/AUC_{iv}), which ranged from 0.45 to 0.64, tend to increase as dose increase. Cumulative urinary excretions within 48 hours after dosing were 2.7, 1.2 and 0.9% of dose at 1, 5 and 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

2. In male Beagle dogs given EPOCH subcutaneously at the dose of 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, pharmacokinetic parameters of EPOCH were obtained as follows ; C_{max} was $22.37 \pm 2.10 \text{ ng/ml}$, T_{max} was $6.50 \pm 2.50 \text{ h}$, AUC was $544.32 \pm 22.25 \text{ ng} \cdot \text{h/ml}$, MRT was $23.25 \pm 1.55 \text{ h}$, and $T_{1/2}$ was $12.71 \pm 0.47 \text{ h}$. F value was 0.46. Cumulative amount of EPOCH excreted in urine for 72h was $0.32 \pm 0.14\%$ of dose, and renal clearance was $0.39 \pm 0.17 \text{ ml/h/kg}$.

3. The molecular profile of immunoreactive materials, identified by gel filtration in plasma samples from rats and dogs given EPOCH subcutaneously, showed the single peak corresponding to the standard EPOCH at any sampling times. These results suggested that the immunoreactive material detected by RIA represented the unchanged EPOCH, and that no immunoreactive metabolite might be present in plasma and urine samples of rats given non-labelled EPOCH subcutaneously.

緒言

Erythropoietin (Epo) は腎皮質または腎尿管細管で産生され^{1,2)}, 赤血球系前駆細胞 BFU-E, CFU-E の分化・増殖作用を有する生理活性因子である。慢性腎不全患者の多くは、健常人に比べ血中 Epo 濃度が低く貧血を合併している。Epo が臨床応用されれば、これらの患者の貧血の治療に効果を発揮すると考えられた。ヒト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³⁾, Jacobs ら⁴⁾ および Lin ら⁵⁾ により相次いでクローニングされた。EPOCHは、遺伝子組換えヒト型 erythropoietin (epoetin beta) であり、現在静脈内投与剤として慢性腎不全患者を対象とした貧血治療薬として使用されている。今回われわれは、血中濃度の持続が期待できる皮下投与時の動態を明らかにするため、非標識 EPOCH をラットおよびイヌに皮下投与し、血漿中濃度推移、尿中排泄およびゲル濾過 (GPC) による血漿中、尿中免疫反応性物質の存在様式について RIA により検討した。

実験材料および実験方法

1. 実験動物

1) ラット

SD 系雄性ラット (Jcl : SD, 日本クレア(株), 東京) を恒温恒湿 (24±2℃, 50~60%) の条件下で約1週間予備飼育し、7週齢(体重200~272g) にて実験に供した。予備飼育および実験期間を通じて固型飼料 (CE-2, 日本クレア(株), 東京) および水道水を自由に摂取させた。

2) イヌ

(株)CSK実験動物研究所から入荷した Beagle/CSK 系雄性イヌを使用した。実験時は、17カ月齢(体重13~14kg) であった。飼育期間、実験期間を通して、恒温恒湿 (23±2℃, 50~60%) の条件下におき、固型飼料 (CD-5) を1日1回定刻に与え、水道水を自由に摂取させた。

2. 投与薬物および実験材料

EPOCH は、中外製薬(株)生産技術研究所で製造されたものを用いた。なお、EPOCH 量はすべてポリペプチド相当量で示した。これらの比活

性は、180IU/μg であった。Tween 20は和光純薬工業より、rat serum albumin(fraction V) および dog serum albumin (fraction V) は Sigma Chemical Company より購入した。その他の試薬は、市販の最高純度のものを使用した。ウサギ抗 EPOCH 血清は中外製薬(株)診断科学研究所より供与を受けたものを使用した。

3. 投与液の調製

1) ラット

EPOCH 原液 (1.259mg/ml) を Tween 20 0.05%, rat serum albumin 0.05%を含む生理食塩液で希釈し、最終 EPOCH 濃度0.5, 2.5 および12.5μg/ml に調製し投与液とした。

2) イヌ

EPOCH 原液を Tween 20 0.05%, dog serum albumin 0.05%を含む生理食塩液で希釈し、最終 EPOCH 濃度50μg/ml に調製し投与液とした。

4. 薬物の投与および試料の採取

1) ラット

静脈内投与

各投与群ともに3匹のラットを対象に行った。大腿動静脈にカニューレション (SP-31, 夏目製作所) を施したラットに、上記の投与液を2 ml/kg の割合で静脈カニューレより投与した。投与5, 15, 30分, 1, 2, 4, 6, 8, 24時間後に大腿動脈カニューレより、各時点200μl の血液をヘパリンをあらかじめ加えておいたサンプリングチューブに採取した。採取した血液は遠心分離後、血漿を得、これを測定試料とした。試料は、測定時まで-20℃で保存した。

皮下投与

各投与群ともに4匹のラットを対象として行った。実験期間を通じてラットを個別代謝ケージで飼育した。上記投与液を2 ml/kg の割合で背部皮下より投与した。血液は投与4, 8, 10, 12, 18, 24, 34, 48時間後にヘパリン処理した注射筒を用い、尾静脈より約200μl ずつを採取した。血液を遠心分離後、血漿を分離した。尿は投与後0~24, 24~48時間の間隔で採取した。試料は、測定時まで-20℃で保存した。なお、血漿中、尿中存在様

式の検討には、25 μ g/kg 投与群のうち1匹のラットから得られた血漿を分析の対象とした。

2) イヌ

4匹のイヌを対象に、投与前日に測定した体重に基づいて上記投与液を0.1ml/kgの割合で背部皮下に投与した。実験期間中、ビーグル犬は個別のケージに入れて飼育し、採尿パットにより尿を採取した。

EPOCH 投与4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 24, 34, 48, 72時間後に前腕桡側皮静脈よりヘパリン処理した注射筒を用いて血液1mlを採取した。血液を遠心分離(15,000rpm, 3分間)後血漿を分離し、これを測定試料として測定時まで-20℃で保存した。尿は、容器への吸着を防ぐ目的で、あらかじめ1% Tween 20溶液10mlを入れておいた採尿パットを用いて、投与後0~24, 24~48, 48~72時間の間隔で採取した。なお、血漿中存在様式の検討には、4匹のイヌのうち1匹のイヌから得た血漿を分析の対象とした。

5. GPC(TSKgel G3000SW_{XL})による分析

TSKgel G3000SW_{XL}カラム(7.8mmID×30cm)を溶離用緩衝液(0.2M NaClを含む0.1Mリン酸緩衝液:pH7.2)で平衡化させた後、試料25~100 μ lを注入し、カラムからの溶出液を0.5分間ずつのフラクションとして集め、各フラクションに含まれる免疫反応性物質をRIAにより測定した。

ゲル濾過の分析条件を以下に示す。

カラム: TSK-gel G3000SW_{XL} (7.8mmID×30cm), TOSOH

ポンプ: 島津 LC-7A

溶離液: 0.2M NaCl を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)

流速: 0.5ml/min

なお、分子量マーカーとして Gel Filtration Calibration Kit (Pharmacia Fine Chemicals AB)を用いた。

6. RIA による EPOCH の測定

試料中の EPOCH 濃度は、松原らの方法⁶⁾に準じて Radioimmunoassay により測定した。血漿または尿を、測定用緩衝液(phosphate bu-

ffer pH7.2, 2.7mM potassium chloride, 8.1mM disodium hydrogenphosphate, 1.5mM sodium dihydrogenphosphate, 0.8% sodium chloride, 1% BSA, 0.05% Tween 20, 0.1% sodium azide)で適宜希釈し、その100 μ lに抗血清の15万倍希釈液300 μ lを加えて室温で一晩反応させた。次に、¹²⁵I-Epo(アマジャム)100 μ l(約10,000cpm)を加え4時間室温で反応させた後、immunobead second antibody(バイオ・ラド)溶液(4mg/ml)を250 μ l加えて1時間室温で反応させた。生理食塩液2mlで洗浄後3,000rpm, 5分間遠心分離し、沈澱の放射能をガンマカウンタ(Model ARC-600, アロカ)で測定した。同様の操作を行った標準品の放射能より検量線を作成し EPOCH 濃度を算出した。

7. 結果の解析

RIAにより測定した血漿中 EPOCH 濃度から、pharmacokinetic parametersを算出した。静脈内投与の場合は、2コンパートメントモデルにあてはめ非線形最小二乗法(MULTI⁷⁾)を用い、中央コンパートメントの分布容積(V_c)、定常状態分布容積(V_{ss})および α 相、 β 相における半減期T_{1/2}(α)、T_{1/2}(β)を求めた。

皮下投与の場合は、EPOCHの最高血漿中濃度(C_{max})および最高血漿中濃度到達時間(T_{max})は実測値をもとにそれぞれ算出した。消失半減期(T_{1/2})は、EPOCH濃度を時間に対して片対数プロットし、投与後18時間以降の消失相における点より最小二乗法で求めた傾きkから(1)式より求めた。

$$T_{1/2} = \ln 2/k \quad (1)$$

EPOCHの血漿中濃度曲線下面積(AUC)および平均滞留時間(MRT)は、検出限界値までを台形公式により求め、以後は1次速度で減衰するものとして外挿して求めた。

また、全身クリアランスおよび腎クリアランスは(2)、(3)式を用いて求めた。

$$CL_{total} = D/AUC \quad (2)$$

$$CL_{renal} = X/AUC \quad (3)$$

ただし、Dは投与量、Xは投与後48あるいは72時間までの尿中排泄量である。吸収率(F)は、

静脈内投与時の AUC の比として求めた。

結 果

1. 血漿中濃度推移

1) ラット

静脈内投与

ラットに非標識 EPOCH を1,5および25 μ g/kg の用量で静脈内投与したときの血漿中 EPOCH 濃度の推移を Fig. 1に, pharmacokinetic parameters を Table I に示した。血漿中 EPOCH 濃度推移は, いずれの投与量群においても2相性の消失パターンを示した。T_{1/2} (α) は0.26~0.67h, T_{1/2} (β) は2.34~2.95hであった。AUC は投与量の増加に比例しており, 線形性が認められた。CL_{total} は22.48~23.88ml/h/kg, MRT は3.63~3.92hであった。

皮下投与

非標識 EPOCH を1,5および25 μ g/kg の用量でラットに皮下投与したときの血漿中 EPOCH 濃度の推移を Fig. 2に, pharmacokinetic parameters を Table II に示した。いずれの投与

群においても T_{max} は投与8~12時間後に認められ, 以後, 血漿中濃度は1相性に減少した。C_{max} は1 μ g/kg 投与群で0.83ng/ml であったのに対し, 5 μ g/kg 投与群では5.58ng/ml, 25 μ g/kg 投与群では34.29ng/ml と, 投与量の増加よりもやや大きいものであった。T_{1/2}は1 μ g/kg 投与群で10.89h, 5 μ g/kg 投与群で7.56h, 25 μ g/kg 投与群で7.52hであった。AUC は1 μ g/kg 投与群で18.99ng·h/ml, 5 μ g/kg 投与群で110.32ng·h/ml, 25 μ g/kg 投与群で668.78 ng·h/ml であり, C_{max} 同様, その増加は投与量の増加よりも大きいものであった。MRT はいずれの投与群においても15.82~17.71hの範囲であり, 投与群間で差は認められなかった。また, 静脈内投与時の AUC の比から算出したF(AUC_{csc}/AUC_{iv})は0.45~0.64であり, 投与量の増加に従い増加する傾向にあった。

EPOCH 皮下投与後48時間までの累積尿中排泄率は1, 5, 25 μ g/kg 投与群でそれぞれ2.7%, 1.2%, 0.9%であり, CL_{renal} はそれぞれ1.40, 0.54, 0.32ml/h/kg であった。

Fig. 1 Plasma concentrations of EPOCH following intravenous administration of EPOCH at the doses of 1, 5 and 25 μ g/kg in male rats. Each point with vertical bar represents the mean $\pm$ S.E. of 3 animals.

Table I Pharmacokinetic parameters of EPOCH after intravenous administration at the doses of 1, 5 and 25 μ g/kg in rats.

	$T_{1/2}(\alpha)$ (h)	$T_{1/2}(\beta)$ (h)	V_c (ml/kg)	V_{ss} (ml/kg)	AUC (ng $\cdot$ h/ml)	MRT (h)	CL _{total} (ml/h/kg)
1 μ g/kg	0.67 $\pm$ 0.08	2.95 $\pm$ 0.16	49.08 $\pm$ 1.53	77.60 $\pm$ 2.07	41.96 $\pm$ 0.30	3.63 $\pm$ 0.17	23.84 $\pm$ 0.17
5 μ g/kg	0.26 $\pm$ 0.11	2.34 $\pm$ 0.13	46.47 $\pm$ 5.10	77.11 $\pm$ 4.56	222.91 $\pm$ 8.00	3.89 $\pm$ 0.34	22.48 $\pm$ 0.78
25 μ g/kg	0.34 $\pm$ 0.02	2.78 $\pm$ 0.13	47.87 $\pm$ 0.81	90.62 $\pm$ 2.96	1049.06 $\pm$ 33.33	3.92 $\pm$ 0.17	23.88 $\pm$ 0.74

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 3 animals.

Fig. 2 Plasma concentrations of EPOCH following subcutaneous administration of EPOCH at the doses of 1, 5 and 25 μ g/kg in male rats.
Each point with vertical bar represents the mean $\pm$ S.E. of 4 animals.

2) イヌ

EPOCH 5 μ g/kg をビーグル犬の背部に皮下投与したときの血漿中濃度推移を Fig. 3 に示した。血漿中 EPOCH 濃度は、投与6.50時間後に最高濃度22.37ng/ml を示し、以後1相性に減少した。また、EPOCH の pharmacokinetic parameters を Table III に示した。EPOCH の AUC は544.32ng $\cdot$ h/ml, MRT は23.25h, $T_{1/2}$ は12.71h, CL_{renal} は0.39ml/h/kg であった。また、投与72時間後までの EPOCH の尿中累積排泄率は0.32%であった。また、静脈内投与時の AUC⁸⁾ の比から算出したF (AUC_{sc}/

AUC_{iv}) は0.46であった。

2. 血漿中・尿中免疫反応性物質の存在様式

ラット並びにイヌに EPOCH を皮下投与した後の血漿中および尿中での免疫反応性物質の存在様式を調べるために、TSKgel G3000SWXL カラム (排除限界分子量約50万) を用いて血漿および尿のゲル濾過を行い、分画した各フラクションについて RIA で検討した。各試料のゲルクロマトグラムを Fig. 4 に示した。

ラットにおいて、EPOCH 25 μ g/kg 皮下投与10および48時間後の血漿および投与24時間までの

Table II Pharmacokinetic parameters of EPOCH following subcutaneous administration of EPOCH at the doses of 1, 5 and 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in rats.

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	AUC (ng·h/ml)	MRT (h)	F	U _{ex} (0-48)* (% of dose)	CL _{renal} (ml/h/kg)
1	0.83±0.05	9.50±0.96	10.89±0.88	18.99±1.55	17.71±1.69	0.45	2.7±0.3	1.40±0.14
5	5.58±0.28	9.50±0.96	7.56±0.38	110.32±8.52	15.82±0.56	0.49	1.2±0.2	0.54±0.08
25	34.29±2.28	10.00±0.82	7.52±0.22	668.78±19.25	16.59±0.19	0.64	0.9±0.2	0.32±0.07

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 4 rats.

*: Cumulative urinary excretion within 48 hours after dosing.

Fig. 3 Plasma concentrations of EPOCH following subcutaneous administration of EPOCH at the dose of 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in male beagle dogs.

Each point with vertical bar represents the mean $\pm$ S.E. of 4 animals.

尿について検討した結果、いずれの試料においても一つのピーク (9.00~9.25 ml) のみが認められ、これは EPOCH の溶出位置と一致した。また、イヌに関しては、EPOCH 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下投与 4 時間後の血漿について検討したところ、ラット同様、EPOCH の溶出位置と一致した一つのピークのみが認められた。

考 察

EPOCH 皮下投与後のラット、イヌ血漿をゲル濾過し、各フラクションを RIA により調べ

た結果、EPOCH に相当する溶出位置にのみ免疫反応性物質が認められ、免疫反応性代謝物は認められなかった。一方、ラットに非標識 EPOCH を静脈内投与したとき、血漿中の EPOCH 濃度を生物学的活性測定法により求めた値と、RIA により求めた値 (免疫反応性物質濃度) の間にはよい相関関係 ($r=0.917$) が認められた⁸⁾ との報告がある。これらのことから、今回 RIA により測定されたものは、免疫反応性を有し、しかも生物活性のある未変化体の EPOCH のみであると考えられた。

Table III Pharmacokinetic parameters of EPOCH following subcutaneous administration of EPOCH at the doses of $5\mu\text{g/kg}$ in beagle dogs.

C_{max} (ng/ml)	T_{max} (h)	$T_{1/2}$ (h)	AUC (ng·h/ml)	MRT (h)	F	Uex (0-72)* (% of dose)	CLrenal (ml/h/kg)
22.37 ± 2.10	6.50 ± 2.50	12.71 ± 0.47	544.32 ± 22.25	23.25 ± 1.55	0.46	0.32 ± 0.14	0.39 ± 0.17

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 4 dogs.

*: Cumulative urinary excretion within 72 hours after dosing.

Fig.4 Gel chromatograms of the plasma and urine samples after subcutaneous administration of EPOCH to a rat and a dog at the dose of 25 and $5\mu\text{g/kg}$ respectively.

ラットに EPOCH 1, 5, $25\mu\text{g/kg}$ を単回静脈内投与したときの MRT および CLtotal は、いずれの投与量においても $3.63 \sim 3.92\text{h}$, $22.48 \sim 23.88\text{ml/h/kg}$ であり、線形性が認められた。ラットに EPOCH 1, 5, $25\mu\text{g/kg}$ を単回皮下

投与したときの最高血漿中濃度は投与 9～12 時間後に認められ、他の蛋白製剤 rG-CSF (T_{max} : 約 2～3 h)⁹⁾, IL-2 (T_{max} : 約 1 h)¹⁰⁾ に比べて吸収が比較的遅いことが示唆された。皮下投与後の $T_{1/2}$ は約 8～9 h と静脈内投与のときの $T_{1/2}$

(β) に比べ大きな値であり、さらに MAT > MRTiv の関係がみられることから、みかけの半減期が吸収速度を表す flip-flop タイプの動態を示すと考えられた。この EPOCH の遅い吸収により、血漿中濃度は静脈内投与の場合に比べ、長時間維持されることが期待された。静脈内投与時の AUC は投与量に比例していたが、皮下投与時の $C_{\max}$ および AUC の増加は投与量の増加よりも大きい傾向を示した。EPOCH の AUC から求めた吸収率 F は 0.45~0.64 であり、 $rG-CSF$ (0.50), $IL-2$ (0.37) といった他の蛋白製剤と同程度であった。しかし、EPOCH の MAT は、これらに比べ 4 倍程度長く、投与部位に約 4 倍程長くどどまっていると考えられることから、EPOCH はこれらの蛋白に比べ皮下で分解されにくいものと思われる。この EPOCH の吸収の遅さ、分解のされ難さは、長時間血漿中濃度を維持させるには有用な性質と考えられる。

EPOCH 5 μ g/kg をイヌの背部に皮下投与し、EPOCH の血漿中濃度推移を検討したところ、最高血漿中濃度は投与 6.50 時間後に認められた。ラットにおける $T_{\max}$ は 9~12h であったことから、イヌにおける EPOCH 皮下投与後、最高血漿中濃度に達する時間はラットに比べてかなり速く、吸収が速いことが示唆された。皮下投与時の MRT は 23.25h であり、同一投与量を静脈内投与した場合⁸⁾ の MRT は 17.14h であった。これらより、イヌにおける投与部位から循環血への移行に要する MAT を算出したところ、6.11h という値が得られた。この値はラットでの 12.4h お

よびヒト¹¹⁾ での 39.8h に比べてかなり小さく、イヌではラット並びにヒトよりも投与部位からの吸収が速いことが明らかになった。ラット並びにヒト¹¹⁾ では、MAT > MRTiv の関係がみられ、みかけの半減期が吸収速度を表す flip-flop タイプの動態を示したのに対して、イヌにおいては MAT < MRTiv の関係が成立し、ラット並びにヒトとは異なった動態を示すものと思われる。このことは、ラット並びにヒト¹¹⁾ においては、EPOCH 皮下投与後の $T_{1/2}$ が静脈内投与後の $T_{1/2}$ と比較して長かったのに対して、イヌの場合は皮下投与後の $T_{1/2}$ (12.71h) が、同一投与量を静脈内投与した場合⁸⁾ の $T_{1/2}$ (γ) (14.12h) にほぼ一致していることから確かめられた。

このイヌにおける動態の違いは、投与部位からの吸収が速いことが一因と考えられるが、イヌにおける吸収速度とラット、ヒトにおける消失速度を MAT および MRT を指標にして比較した場合、イヌの吸収速度がラット、ヒトでの消失速度に比べ小さいものではない。イヌの CL_{total} はラットの約 1/5、ヒトの約 1/2 であり、ラット、ヒトに比べイヌの消失がきわめて遅いことがイヌにおける動態の違いに主に起因しているものと思われる。

以上、EPOCH の皮下投与後の体内動態には種差がみられ、イヌよりもラットの方がヒトの動態に近いと思われた。EPOCH を皮下投与した場合、EPOCH は皮下に比較的安定に長時間存在し、皮下からの緩徐な吸収により徐放効果が得られることが明らかになった。

文 献

- 1) Koury, S.T., Koury, M.J., Boundurant, M.C., Caro, J. and Graber, S. E. : Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization : Correlation with hematocrit renal erythropoietin mRNA, and serum concentration. *Blood*, **74** : 645-651 (1989).
- 2) Schuster, S.J., Wilson, J.H., Erslev, A.J. and Caro, J. : Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood*, **70** : 316-318 (1987).
- 3) Miyake, T., Kung, C.K.-H. and Goldwasser, E. : Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.*, **252** : 5558-5564 (1977).
- 4) Kenneth Jacobs, Charles Shoemaker, Richard Rudersdorf, Suzanne D. Neill, Randal J. Kaufman, Allan Mufson, Jasbir Seehra, Simon S. Jones, Rodney Hewick, Edward F. Fritsch, Makoto Kawakita, Tomoe Shimizu and Takaji Miyake, Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, **313** : 806-810 (1985).
- 5) Fu-Kuen Lin, Sidney Suggs, Chi-Hwei Lin, Jeffrey K. Browne, Ralph

- Smalling, Joan C. Egrie, Kenneth K. Chen, Gary M. Fox, Frank Martin, Zippora Stabinsky, Sayed M. Badrawi, Por-Hsiung Lai, and Eugene Goldwasser, Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82** : 7580-7584 (1985).
- 6) Matsubara, K., Yoshimura, T., Kamachi, S., Fukushima, M., Hino, M. and Morii, H. : Radioimmunoassay for erythropoietin using anti-recombinant erythropoietin antibody with high affinity. *Clinica Chimica Acta*, **185** : 177-184 (1989).
 - 7) Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T. and Uno, T. : A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, **4** : 879-885 (1981).
 - 8) 木下春喜, 登倉佐知子, 大石哲久, 市川文彦, 加藤基浩, 飯田理文, 清水トシコ, 水野光司, 岡崎 彬 : rh-EPO の体内動態(1) ラット, イヌにおける rh-EPO の血漿中濃度推移および尿中排泄. *臨床医薬*, **6** Suppl. 2 : 578-584 (1990).
 - 9) 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)ーラット, イヌ, サルにおける rG-CSF の血中動態 (単回)ー. *薬理と治療*, **18** Suppl. 9 : 445-453 (1990).
 - 10) 西内偉格, 甲斐包子, 吉田真里子, 高岸 靖, 山田秀雄, 永井修吾, 刈谷 巽, 佐々木繁 : 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. *薬物動態*, **5** : 165-177 (1990).
 - 11) Salmonson, T., Danielson B.G. and Wikstrom, B. : The pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous administration to healthy subject. *Br. J. clin. Pharmac.* **29** : 709-713 (1990).