

厚生省新薬開発研究事業

微生物の二次代謝産物に由来する
難病治療薬（E-64）の開発研究

昭和54年度研究報告書

班長 今堀和友

昭和55年 3月

研究報告書作製にあたって

筋ジストロフィー症、特にドジャンヌ型のはきわめて重篤な遺伝病であり、一旦発症すれば20才前後で死亡するし、発症率も1万に1人と比較的高いため難病の中でも重視されるべきものの1つである。

本症が遺伝病であることもあって、その根本的治療はきわめて困難な状態にある。しかしながら、本症は筋肉の崩壊を伴うものであるから、この崩壊を喰い止めることができれば本症の進行も喰い止めることができることは充分予想される。

筋肉の崩壊は筋肉細胞の細胞質に存在するプロテアーゼによるものと考えられるが、現在までのところその様なプロテアーゼとしては、カルシウムで活性化される中性プロテアーゼ (CANP)、カテプシンB、カテプシンLが候補となる。したがって、これらのプロテアーゼを特異的に阻害する薬物があれば、上記の治療薬となる可能性が生じる。

この様な観点から、治療薬となりうる見込みのあるものとして、ロイペプチンとE-64が厚生省でとりあげられ、それぞれの開発を積極的に援助するため、それぞれについて研究組織が構成されることとなった。E-64は大正製薬で開発された試薬であるが、CANPの阻害について研究していたこともあって、私がE-64開発班の班長を命ぜられることになった。

本研究班の目的は実用に適する治療薬の開発である。それ故にこそ、私は軽々しく臨床への試用をさげ、まず基礎的データを蓄積することが大切だと考え、大別して3つの方向から研究を進めることを考えた。その第一はE-64及びその類縁体の製造である。治療薬として実用化されるためには、前記プロテアーゼのみを特異的に阻害し、他の酵素は阻害せず、また副作用を伴わないものであることが必要条件となる。そのためには微生物の二次代謝産物であるE-64にさらに手を加え、上記条件をよりよく満足するものを開発することを目指した。その結果、E-64-a、E-64-b、E-64-cの3種類が候補として残ってきた。第二はin vitroにおけるE-64及びその類縁体の効果の判定である。ここにおいては、CANPやカテプシン類に対する阻害機構の解明、至適濃度の決定の他、他の代謝酵素に対する影響をも研究することとした。第三にはin vivoにおけるE-64の効果の研究である。このグループではE-64及びその類縁体の毒性試験、一般薬理試験の他に、吸収、排泄、臓器分布、体内代謝など、実用に要する基礎的データをできる限り広く集めることを試みた。これに加えてモデル疾患動物に投与し、治療効果の判定にも着手している。

幸いにも各班員諸氏の御努力のおかげで、めざましい研究成果がこの一年間で得られたのである。本研究が厚生省の行った新薬開発研究事業の最初の例の1つであることから、この研究成果の今後に及ぼす影響も大きいと考えられるので、ここに研究の詳細をまとめて刊行することとした。この成果がわれわれの次年度の研究の大きな礎石となることは別としても、近縁の研究を行っておられる方々の御参考にもなると信じている。

最後に、本研究の推進に援助を惜しまれなかった厚生省薬務局の方々、本研究に協力され、かつ多忙の中にも報告書を執筆して頂いた班員の方々、さらに本報告書の作製を含め、本研究の事務を担当して頂いた大正製薬の方々に深く感謝するものである。

今 堀 和 友

目 次

研究報告書の作成に当って	今堀 和友	3
--------------------	-------	---

I 製 造 方 法

1. E-64 及びその類縁体の製造法に関する研究	沢田 二郎	9
2. L-トランスエポキシコハク酸製造法に関する研究	沢田 二郎	15

II 安 全 性

3. E-64 及びその類縁体の急性及び亜急性毒性に関する研究	大関 正弘	25
4. E-64 及びその類縁体のサルモネラ菌に対する突然変異原性 に関する研究	大関 正弘	37
5. E-64 及びその類縁体の生体膜に対する作用に関する研究	大関 正弘	41
6. E-64 及びその類縁体の局所刺激作用に関する研究	大関 正弘	45
7. E-64 及びその類縁体の細胞毒性に関する研究	大関 正弘	47

III In vivo の効果

(効力試験)

8. E-64 の筋ジスチキンに対する効果 (臨床観察)	杉田 秀夫	51
9. E-64 及びその類縁体の薬効に関する研究	大関 正弘	55

(一般薬理)

10. E-64 の一般薬理作用	福原 武彦	63
------------------------	-------	----

～特に呼吸・循環機能及び中枢神経系に及ぼす影響～

IV In vitro の効果

11. 微生物が産生するプロテアーゼ阻害物質の成熟ネズミ肝初代培養細胞に対する影響市原 明 83
12. 培養筋細胞に対する E-64 の作用小沢鉄二郎 91
- 12追補. E-64 処理を施したニワトリ骨格筋培養細胞の電子顕微鏡観察大槻 磐男 95
13. 筋ジストロフィー症における筋膜脂質に関する研究宮武 正 99
～筋ジストロフィーチキンの筋ガングリオンドに及ぼす E-64 の効果について～
14. 筋蛋白質代謝回転江橋 節郎 103
15. E-64 及び E-64 誘導体によるラット肝カテプシン B 及び L の阻害について (in vitro, in vivo)勝沼 信彦 109
16. カルシウムプロテアーゼと蛋白質燐酸化反応による生理機能の調節に関する研究西塚 泰美 117
17. Ca 依存性中性プロテアーゼ (CANP) に対する E-64 の効果今堀 和友 131
18. Ca 依存性プロテアーゼの活性測定法の問題点杉田 秀夫 139

V 吸収, 分布, 代謝, 排泄

19. E-64 及びその類縁体の生体内動態に関する研究大関 正弘 145
20. E-64 のラット肝薬物代謝酵素に対する影響北川 晴雄 155
21. E-64 及びその類縁体の生物薬剤学的研究沢田 二郎 159

I 製造方法

1. E-64 及びその類縁体の製造法に関する研究.....沢田 二郎
2. L-トランスエポキシコハク酸製造法に関する研究.....沢田 二郎

I 製造方法

々に加え、氷冷攪拌下2時間、更に室温で5時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣を300 ml の AcOEt 及び 200 ml の水に溶解した。その AcOEt 層を取り、10% citric acid, 飽和 NaHCO₃, 飽和 NaCl 水で順次洗浄、乾燥後 100 ml になる迄濃縮し、n-hexane を加えて結晶化した。収量 19 g (73%), mp 139~140°, $[\alpha]_D^{25} -49.8^\circ$ (C=1, EtOH), Anal. Calcd. C₁₉H₃₆N₂O₅: C, 61.26; H, 9.74; N, 7.52. Found: C, 61.36; H, 9.98; N, 7.35.

2) L-leucyl isoamylamine

t-Butoxycarbonyl-L-leucyl-isoamylamine (18 g) を 99% HCOOH 200 ml 中に溶解し、室温に3時間放置後、減圧濃縮した。残渣を水 100 ml に溶解し、氷冷下 10% NaOH 水溶液にてアルカリ性にした後、chloroform にて抽出した。chloroform 層を飽和 NaCl 水にて洗浄、乾燥後溶媒を留去し、そのまま次の反応に利用した。

3) N-[N-(L-3-trans-ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-L-leucine ethyl ester

L-Monoethyl epoxysuccinate (8.54 g), L-leucyl-L-leucine ethyl ester (14.28 g) 及び 1-hydroxy benzotriazole (7.43 g) を tetrahydrofuran 200 ml に懸濁し、氷冷攪拌下、dicyclohexylcarbodiimide (15.9 g) の tetrahydrofuran 溶液 100 ml を滴下した。氷冷下2時間、更に室温で5時間攪拌した後、生じた沈でんを濾別し、濾液を 50 ml になる迄濃縮し、AcOEt 200 ml で稀釈した。これを 1N HCl, 飽和 NaHCO₃, 飽和 NaCl 水で洗浄、乾燥後、溶媒を留去した。残渣を ethyl ether に溶解し、petroleum ether を加えて結晶化した。収量 14.5 g (67%), mp 94~95°, $[\alpha]_D^{25} +18.7^\circ$ (C=1, EtOH), Anal. Calcd. C₂₀H₃₄N₂O₂: C, 57.94; H, 8.27; N, 6.76. Found: C, 57.77; H, 8.23; N, 6.81.

4) N-[N-(L-3-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-isoamylamine (E-64-C)

N-[N-(L-3-ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-isoamylamine (19.6 g) を ethanol 150 ml に溶解し KOH (4.8 g) の

ethanol 溶液 60 ml を氷冷攪拌下滴下した。氷冷下1時間、更に、室温で1時間攪拌後、反応液に氷水 700 ml を加え AcOEt にて抽出した。水層を氷冷しながら、HCl で pH 2 以下に調整し、AcOEt で抽出した。AcOEt 層を飽和 NaCl 水で洗浄し、乾燥後濃縮し ethyl ether を加えて結晶化した。収量 16.3g (90.6%) mp 158~159°, $[\alpha]_D^{25} +51.7^\circ$ (C=1, EtOH) Anal. Calcd. C₁₅H₂₅N₂O₅: C, 57.31; H, 8.34; N, 8.91. Found: C, 57.29; H, 8.13; N, 8.78.

5) N-[N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-1,4-diaminobutane (E-64-a)

N-[N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-N'-benzyloxycarbonyl-1,4-diaminobutane (3.8 g) を MeOH: AcOH: H₂O (8:2:1) 混液 80 ml に溶解し、5% Pd-C (1.2 g) を加え弱い水素気流下室温で6時間激しく攪拌した。触媒を濾別後、濾液を濃縮し、acetone 及び ethyl ether を加え生じた沈でんを濾取し、H₂O-acetone より結晶化した。収量 2.16 g (81%) mp 203~205° (decomp.), $[\alpha]_D^{25} +30.6^\circ$ (C=1, H₂O), Anal. Calcd. C₁₄H₂₅N₃O₅: C, 53.32; H, 7.99; N, 13.33. Found: C, 53.02; H, 7.89; N, 13.04.

2. E-64 及びその類縁体の ³H-ラベル体の製造

1の方法で得られた DL-E-64 及びその類縁体を Wiltzbach 法により ³H 置換した⁷⁾。

結果及び考察

E-64 の合成ルート及び収率は図1に示した。この方法で得られた L-E-64 及び D-E-64 [L 及び D は各々構成成分であるトランス-エポキシコハク酸の光学活性を示し、それぞれ (2S, 3S) 及び (2R, 3R) の配位を有している。] の物性を表2に示す。合成的に得た L 体の E-64 は天然の E-64 とよく一致した。K. Hanada の方法⁴⁾ と比べると行程数も短縮出来、収率も大幅に上昇したが、なお煩雑で overall の収率が低い。E-64 の構成成分の一つであるアグマチンを出発原料として利用し、K. Hanada の方法⁴⁾ を一部改良した方法も検討した。行程

1. E-64 及びその類縁体の製造法に関する研究

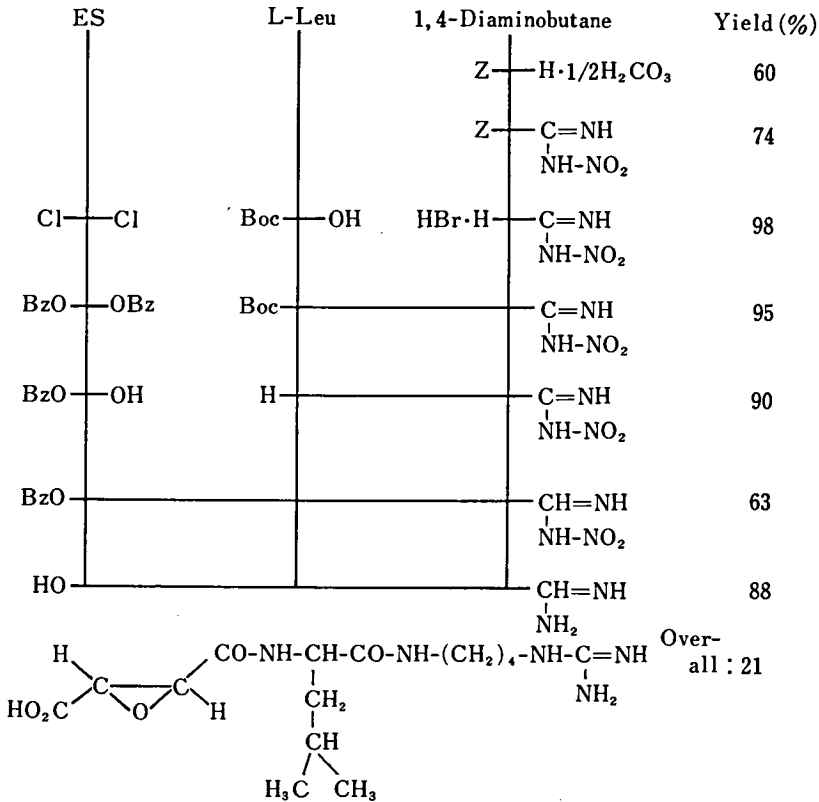


図1 E-64 の合成法

表2 合成L及び D-E-64 の物性

	Natural	L	D
mp	231—234°	233—237°	196—200°
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1, 0.1 N HCl)	+24.4°	+24.0°	-77.9°
Elemental analysis	Found. Calcd.	Found. Calcd.	Found. Calcd.
C	49.47 49.17	49.01 49.17	45.69 45.79
H	7.56 7.70	7.65 7.70	7.85 7.94
N	19.15 19.11	19.06 19.11	17.97 17.80
Molecular formula	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₅ ·1/2 H ₂ O	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₅ ·1/2 H ₂ O	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₅ ·2 H ₂ O
HPLC k'	5.64	5.64	6.18

(HPLC: Nucleosil 5 C₁₈, 4 x 150 mm, 55°, 0.5% H₃PO₄, -10% CH₃OH-H₂O)

数は短くなる利点はあるが、アグマチンが高価であること、又、エポキシコハク酸モノエステルよりの収率が図1の方法では約55%であるのに比して約30%と低いことが欠点である。アグマチン及び光学活性エポキシコハク酸モノエステルが容易に又安価に入手出来れば、この方法を利用した E-64 の合成は更に容易になると思

われる。

類縁体 a, b, c の合成ルート及び収率を図2～4に括めた。又、それらの物性を表3に示した。本年度中に得られた E-64 及びその類縁体の総計を表4に示す。いずれの類縁体も E-64 に比較し、その合成行程も短く、しかも高収率で得られることが解った。又、実験室レベルで

I 製造方法

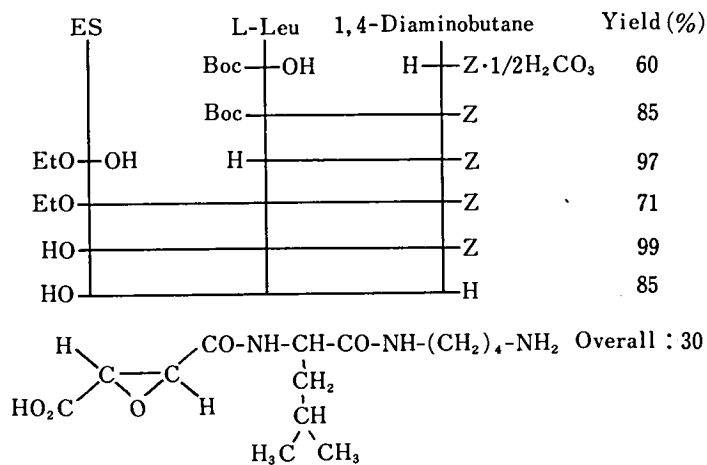


図2 E-64-a の合成法

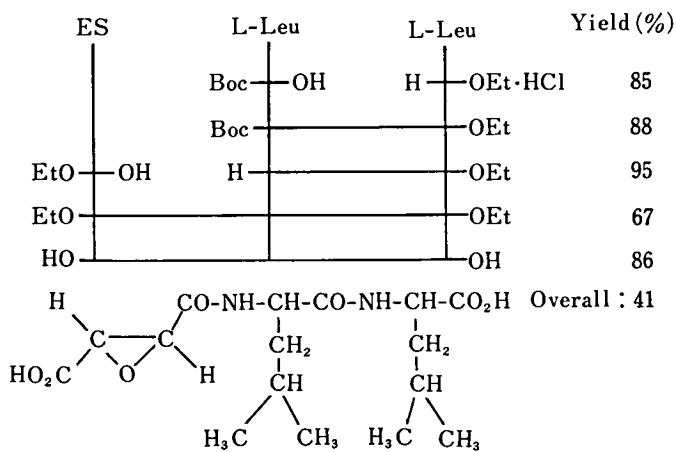


図3 E-64-b の合成法

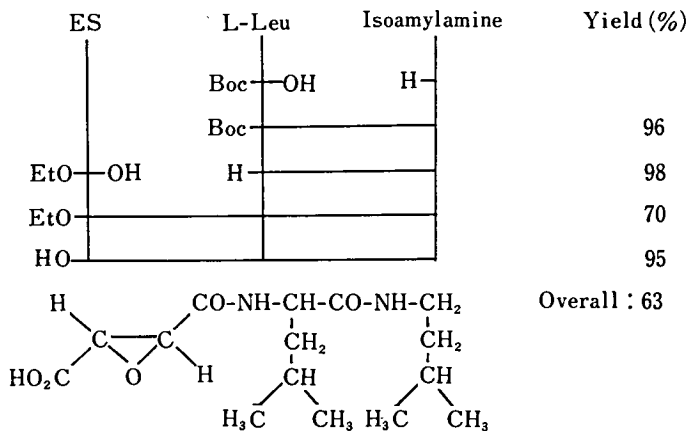


図4 E-64-c の合成法

1. E-64 及びその類縁体の製造法に関する研究

表 3 E-64 類縁体の物性

Compound		mp (°)	$[\alpha]_D$	Molecular formula (MW)
E-64-a	L	220—225 (decomp.)	+62.1° (c=1, H ₂ O, 28°)	C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₅ (315)
	D	195—199 (decomp.)	-70.0° (c=1, H ₂ O, 25°)	
E-64-b	L	105—107	+20.0° (c=1, EtOH, 26°)	C ₁₆ H ₂₆ N ₂ O ₇ (348)
	D	205—207 (decomp.)	-96.3° (c=1, EtOH, 26°)	
E-64-c	L	158—159	+51.7° (c=1, EtOH, 29°)	C ₁₅ H ₂₆ N ₂ O ₅ (314)
	D	83—85	-88.0° (c=1, EtOH, 30°)	

表 4 昭和54年度に製造した E-64 及びその類縁体の総量

E-64	DL	47 (g)
	L	100
E-64-a	DL	24
	L	5
	D	0.1
E-64-b	DL	21
	L	4
	D	0.5
E-64-c	DL	17.5
	L	342
	D	0.1

はスケールアップも可能である。c, b, a の順に合成が容易であり、それぞれの overall の収率にそれが反映されている。a については光学的に純粋なモノベンジルエポキシコハク酸が得られれば1段階行程が短縮出来、より収率が上昇すると思われる。b については、D 体は結晶性が良いのに反し、L 体は悪い。この点が大きな欠点となっている。一方、c は中でも一番行程数が短く、各段階の収率も総じて高く、又、結晶性も良く合成に関してはほとんど問題がない。c に関するかぎり大量合成の最大の問題点は光学的に純粋なモノエチルエポキシコハク酸製造法にあり、この問題が解決すれば医薬品として開発して行く上での製造上の大きな問題はなくなるとと思われる。

³H-体の製造結果は表5に示す様に E-64, -a, -c については ³H 置換, 単に精製し使用出来る標品が得られたが、E-64-b は生成物が不安定なため、Wiltzbach 法により ³H-ラベル体を得ることは出来なかった。

表 5 ³H-ラベル化合物の製造

	Total radioactivity (mCi)	Specific activity (μ Ci/mg)
E-64	21.62	92
E-64-a	2.04	22.9
E-64-c	18.25	365

(by Wiltzbach method)

結 論

1. E-64 及びその類縁体の合成的製造法を確立し、必要なサンプルを各班員に供給した。
2. E-64 及びその類縁体の ³H-ラベル体を製造し、各班員に研究材料として提供した。

文 献

- 1) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., Tanaka, I.: Isolation and Characterization of E-64, a new thiolprotease inhibitor, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 523, 1978.
- 2) 今堀和友: 細胞内蛋白分解酵素の新しい役割, 第20回医学会総会誌 **I**, 60, 1979.
- 3) Sugita, H., Ishiura, S., Suzuki, K., Imahori, K.: Inhibition of epoxide derivative on chicken calcium-activated neutral protease (CANP) in vitro and in vivo, *J. Biochem.*, **87**, 339, 1980.
- 4) Hanada, K., Tamai, M., Ohmura, S., Sawada, J., Seki, T., Tanaka, I.: Structure and synthesis of E-64, a new thiolprotease inhibitor, *Agric. Biol. chem.*, **42**, 529, 1978.
- 5) Hanada, K., Tamai, M., Morimoto, S., Adachi, T., Ohmura, S., Sawada, J., Tanaka, I.:

I 製造方法

- Inhibitory activity of E-64 derivatives on papain, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 537, 1978.
- 6) Hanada, K., Tamai, M., Morimoto, S., Adachi, T., Oguma, K., Ohmura, S., Ohzeki, M.: A specific thiolprotease inhibitor, E-64 and its derivatives, *Peptide chemistry*, **1979**, 31, 1979.
- 7) Wiltzbach, K. E.: Tritium-labelling by exposure of organic compounds to tritium gas, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1013, 1957.

2. L-トランスエポキシコハク酸製造法に関する研究

沢田二郎*

研究協力者 花田和紀* 玉井正晴*
安達孝* 小熊清司*
金岡祐一** 飯塚廣***

目 的

筋肉中には Ca^{++} により選択的に活性化を受ける中性チオールプロテアーゼ (CANP) が存在する¹⁾。このプロテアーゼの異常な活性化が筋ジストロフィー症発症の一つの要因であるとする有力な推論がある^{2), 3)}。従って、可能な治療法の1つとして CANP 阻害剤の開発が望まれている。

Asp. japonicus TPR-64 の培養エキスから単離された E-64⁴⁾ が CANP 阻害剤として効果的であること⁵⁾、更には、E-64類縁体研究の過程から有力な類縁体 E-64-a, -b, -c がクローズアップされて来た⁶⁾。

L-トランスエポキシコハク酸 (以後、L-t-ES と略す) は E-64 及びその類縁体のチオールプロテアーゼ阻害に必須の活性基である⁷⁾。

E-64 及びその類縁体 a, b, c の光学異性体の CANP に対する阻害作用について今堀ら⁸⁾ は t-ES が (2S, 3S) 配位を有する L 体の方が、(2R, 3R) 配位を有する D 体比して極めて高い活性を示すことを述べている。従って、E-64 及びその類縁体をヒト筋ジストロフィー症治療薬として開発していく上で、工業的規模で応用可能な L-t-ES 製造法を確立することが極めて重要である。

本研究の目的は光学活性 L-t-ES を選択的に製造する方法を開発し、E-64 及びその類縁体の製造原料として供することにある。

1. 合成法による L-トランスエポキシコハク酸製造法の検討

方法及び結果

K. Mori ら (1979) は δ -mutistriatin 合成の中間体として、L-diethyl-trans-epoxysuccinate を得ている。我々はこの方法を一部改良し、D-酒石酸から、簡単な操作で、高収率に L-diethyl-trans-epoxysuccinate を得、次いで水酸化カリウムで部分加水分解してモノエチルエステル K 塩の白色結晶を得た。更にこれを水に溶かし、塩酸処理によりモノエチルエステルを結晶として得た。この経路の概要を図 1 に示す。以下各操作を詳述し、得られた化合物の物理恒数を示す。

L-Diethyl-trans-epoxysuccinate

Diethyl-2-hydroxy-3-bromosuccinate 70 g を acetone 420 ml にとかし、氷冷攪拌下、triethylamine 52.6 g を滴下し、室温で6時間攪拌した。析出した白色塩を濾別し、濾液を減圧下濃縮し、ethylether 500 ml を加え、水、1N HCl、飽和 NaHCO_3 水、飽和 NaCl 水で順次洗浄し、無水 MgSO_4 で乾燥した。エーテルを留去したのち、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (benzene: acetone=100:3) で精製し、油状物を得た。収量、32 g (収率65.4%)。

* 大正製薬株式会社総合研究所

** 北海道大学薬学部薬品合成化学講座

*** 東京理科大学理工学部応用生物科学科

I 製造方法

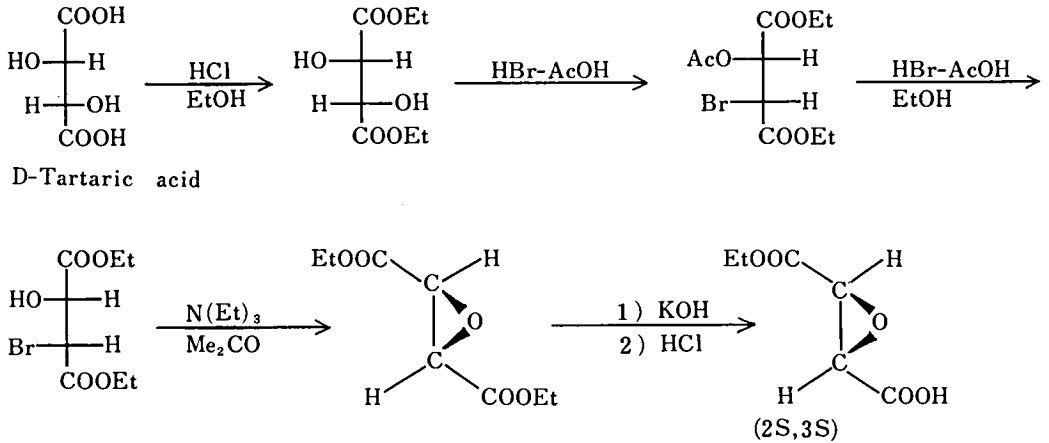


図1 光学活性トランスエポキシコハク酸モノエチルエステルの製造法

L-Ethyl,hydrogen-trans-epoxysuccinate

L-Diethyl-trans-epoxysuccinate 90.12 g を ethylalcohol 300 ml にとかし, ethylalcohol 200 ml にとかした potassium hydroxide 29.57 g を氷冷攪拌下滴下し, そのまま1時間攪拌した。さらに, 室温で2時間攪拌したのち, ethylether 400 ml を加え, 生じた白色結晶を沓取し, L-ethyl, potassium-trans-epoxysuccinate 67.72 g を得た。これを dil. HCl にとかし, ethylacetate で抽出し, 水で1回洗浄後, 無水 MgSO₄ で乾燥した。減圧で濃縮後, ethylether-petroleum ether から結晶化した。収量, 52.0 g (68%), mp 61.5-62.5°, $[\alpha]_D^{25} +114.4^\circ$ (c=1, EtOH), Anal. Calcd. C₆H₁₀O₅: C, 45.00; H, 5.04. Found: C, 45.04; H, 5.18.

考 察

DL-トランスエポキシコハク酸は合成的に, G. B. Payne ら (1959) によりフマル酸から得る方法が確立しているが, 天然 E-64 の構成々分である L 体に関しては, K. Mori らにより僅かに, D-酒石酸から L-diethyl-trans-epoxysuccinate の合成法が報告されているだけである。我々はこの方法を一部改良し, 図1に示したルートにより最終的に高純度のL-トランスエポキシコハク酸モノエチルエステルを得ることに成功した。Mori らは diethyl-2-

hydroxy-3-bromosuccinate をエポキシ化する際に, エタノール中, ナトリウムエトキシドを使用しているが, この方法は金属ナトリウムを使用するため, 大量にプロモヒドリンを処理するには必ずしも適当ではない。我々は, 安全にしかも効率よくこの行程をスケールアップする目的で, 有機塩基を種々検討したところ, トリエチルアミンが最適であることがわかった。この際, 溶媒系はアセトンあるいはジクロロメタン等を用いると反応速度も大きく実用性が高いことが明らかになった。アセトン中, トリエチルアミンによる反応は, 後処理が簡単で, 大量処理が容易であり, しかも光学的に高純度の目的物を得ることができる。

然しながら, この方法は原料として非天然型 D-酒石酸を用いねばならず, 実験室レベルでの合成法としてはすぐれているが, 将来, E-64 或いはその類縁体の原料の大量供給法としてはコストの面で問題が残る, 今後更に検討し, D-酒石酸に代りうる安価な原料を確保する必要がある。

2. 光学分割法による L-トランスエポキシコハク酸製造法の検討

目 的

L-トランスエポキシコハク酸製造法研究の一環として合成的に得られるDL-トランスエポ

2. L-トランスエポキシコハク酸製造法に関する研究

キシコハク酸を出発原料としてこれを化学的に分割するに必要な分割剤を開発する。

方 法

分割剤として安価に、しかも容易に製造可能なアミンを用い、酸とアミンとのジアステレオマー塩形成によるトランスエポキシコハク酸分割法を検討した。

DL-トランスエポキシコハク酸は、Payneら(1959)の方法によりフマル酸より合成し、これを出発原料とした。合成法の概要を図2に示す。

本報で使用した分割剤の一覧を表1に示す。これらのうちアミノアルコール及び、アミノ酸アミドの製造法は文献に従った。その概要及び文献を表2にまとめて示した。その他のものは

市販特級試薬を使用した。

結 果

(1) アミノアルコール類による分割

分割剤として、先ずアミノアルコールについて検討した。L-チロシノール、L-パリノール、L-プロリノールはいずれも塩の結晶化が困難であり、D- α -フェニルグリシノール、L-トリプトファンは低光学収率であったが、L-フェニルアラニノールにより高純度の右旋性のL-トランスエポキシコハク酸を得ることができ、塩形成の母液よりD-フェニルアラニノールを用いて左旋性のものを得ることができた。

(2) アミノ酸アミド類による分割

次いで、より塩の結晶性のよいことが期待さ

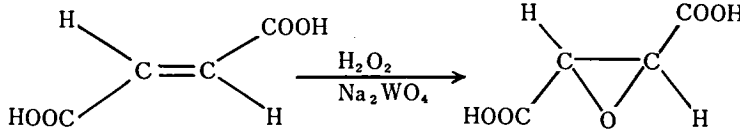


図2 DL-トランスエポキシコハク酸の合成法

表1 被験化合物

L-Phe-ol

L-Tyr-ol

L-Try-ol

L-Val-ol

L-Pro-ol

D- α -PhGly-ol

L-Phe-NH₂

L-Tyr-NH₂

L-Try-NH₂

L-Pro-NH₂

D- α -PhGly-NH₂

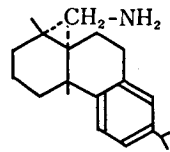
D-N,N-Dimethyl- α -PhGly-NH₂

L-N,N-Dimethyl-Phe-ol

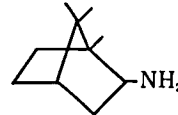
α -Phenylethylamine

α -(p-Nitrophenyl) ethylamine

Dehydroabiethylamine



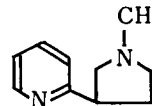
exo-Bornylamine



Fenchylamine

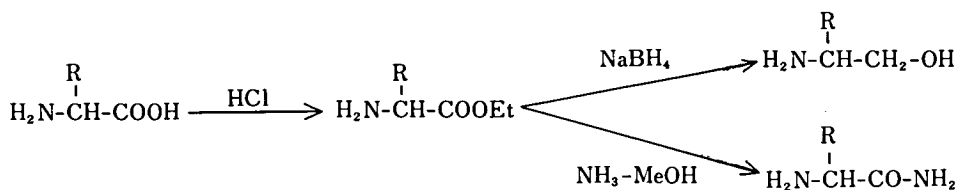


Nicotine



I 製造方法

表2 分割剤の製造法



L-Phenylalaninol

S. Yamada et al., Chem. Pharm. Bull., 13, 995, 1965.

L-Phenylalanine amide

F. Bergel and M. A. Pentherer, J. Chem. Soc., 3973, 1964.

K. Blau and S. G. Waley, Biochem. J., 57, 538, 1954.

D- α -Phenylglycine amide

D. G. Neilson and D. E. Ewing, J. Chem. Soc. (c), 393, 1966.

表3 トランスエポキシコハク酸の分割例

Resolving agent	Salt		t-Epoxy succinic acid	
	Composition (acid: amine)	$[\alpha]_D$ (MeOH)	$[\alpha]_D$ (EtOH)*	Overall yield (%)
L-Phenylalaninol	1:2	+39.8°	+121°	40.0
L-Phenylalanine amide	1:1	+64.6°	+110°	68.0
D- α -Phenylglycine amide	1:2	-62.8° (H ₂ O)	+111°	32.2
Dehydroabiethylamine	1:2	+50.8°	+116°	26.2

* +117.8° [J. Ohhashi and K. Harada, Bull. Chem. Soc. Japan, 40, 2977, 1967.]

れるアミノ酸アミド類について検討した。L-プロリンアミドの塩は吸湿性であり、L-チロシンアミド、L-トリプトファンアミドは低光学収率であったが、L-フェニルアラニンアミドと D- α -フェニルグリシンアミドでは満足すべき光学収率であった。分割剤のアミノ基のエポキシ基への付加反応をさけるために、D- α -フェニルグリシンアミドのアミノ基をジメチル化したものを分割に用いたが塩の結晶化が困難であった。

(3) アミン類による分割

さらに、アミノ酸以外のアミンについて検討した。ニコチンの塩は吸湿性であり、L- α -フェニルエチルアミン、L- α -(p-ニトロフェニル)-エチルアミン、エキソボルニルアミン、フェニルエチルアミンでは低光学収率であったが、デハイドロアビエチルアミンでは純粋な右旋性の L-トランスエポキシコハク酸を得ることができた。

以上、3つのグループの分割剤のうち、成功したものを比較すると、L-フェニルアラニンアミドは塩が高純度で得られ、通算収率が J. Ohhashi ら (1967) によるエフェドリンの場合よりも高いので、今回検討したもののうちで最もすぐれた分割剤といえる。次いで、L-フェニルアラニノール、D- α -フェニルグリシンアミドがすぐれている。デハイドロアビエチルアミンは収率は多少低い、安く市販されているのでアミノ酸誘導体よりコストの点ですぐれている。これらの結果を表3にまとめて示す。

考 察

有機酸の光学分割法には塩の形成による方法、誘導体による方法、酵素を利用する方法、クロマトグラフィーを利用する方法等があるが、本研究では酸と分割剤アミンとのジアステレオマー塩形成による DL-トランスエポキシコハク酸の光学分割法を検討した。トランスエポ

2. L-トランスエポキシコハク酸製造法に関する研究

キシコハク酸の光学分割に関しては若干の報告があり、よく用いられるアルカロイド類のシンコニン、ストリキニーネ、ブルシン等では成功しなかったが、モルヒネ、エフェドリンを用いて分割できるという報告がある (Ohhashi ら 1967)。しかし、モルヒネは麻薬であり、エフェドリンは覚せい剤原料であるので、これを工業レベルで使用することは不可能である。本報では、手軽で安価に使える分割剤アミンとして、アミノ酸誘導体を中心に検討した。分割剤として市販されている α -アミノ酸の誘導体を用いているので、必要ならアンチポードのアミノ酸を用いることによりフェニルアラニンの例で示した様に任意の旋光性のトランスエポキシコハク酸を得ることができるときのこの分割法の利点である。

表3に示したように実験室レベルではあるが、安価に製造可能なDL-トランスエポキシコハク酸を効率よく分割しうる2, 3の分割剤を開発することができた。しかも、これらはいずれも安価に、かつ、容易に製造しうる。今後は、このスケールアップの検討、更には、トランスエポキシコハク酸エステル等の分割等、その実用化、即ち量産に対する検討が必要である。

結 論

DL-トランスエポキシコハク酸を分割し、L-トランスエポキシコハク酸を製造する目的で、安価に、しかも容易に入手しうる分割剤の開発研究を行い、少なくとも実験室レベルの規模で分割可能なL-フェニルアラニンアミド等2, 3の有用な分割剤を見出すことができた。

3. 微生物学的方法による L-トランスエポキシコハク酸製造法の検討

目 的

L-トランスエポキシコハク酸製造法研究の一環として微生物学的方法による製造法を検討する。

方 法

- (1) L-トランスエポキシコハク酸を培地中へ直接生成する糸状菌の検索。
 - (2) フマル酸からL-トランスエポキシコハク酸を生成する糸状菌の検索。
 - (3) DL-トランスエポキシコハク酸を資化し、D体だけを分解する微生物の検索。
- 以上3つの条件を設定し広く有用微生物をスクリーニングする。

結 果

(1) L-トランスエポキシコハク酸を培地中へ直接生成する糸状菌の検索

保存株45株、新たに分離した株計124株についてスクリーニングを行ったが、陽性の結果が得られなかったため、更に土壌サンプル131点から糸状菌200株を分離した。その内訳は、*Aspergillus* 属29株、*Penicillium* 属44株、*Fusarium* 属4株、*Mucor* 属26株、*Rhizopus* 属5株、担子菌2株、その他90株であった。現在これらの菌株についてトランスエポキシコハク酸生成能を検索中である。

(2) フマル酸からL-トランスエポキシコハク酸を生成する糸状菌の検索

分離細菌123株について、フマル酸を唯一の炭素源として資化の有無、程度を調べた。その結果、生育の良好(フマル酸を殆ど資化)なもの88株、生育中程度(残存フマル酸が認められるもの)のもの24株、生育の認められなかったもの11株であった。生育中程度の株及び最終pHの低かった株など22株の培養液について、イオン交換樹脂処理により脱塩後、薄層クロマトグラフィーを行った。供試株中E-24-1, E-20-1, E-31, E-14-1及びb-21-1の5株において、トランスエポキシコハク酸とRfの一致するスポットが認められた。現在これらのサンプルについてその生成物を確認中である。又、生育の認められなかった株については、グルコース或いはコハク酸を添加して菌を生育させ、フマル酸からのトランスエポキシコハク酸への転換の有無を検索中である。

(3) DL-トランスエポキシコハク酸からD体のみを資化する微生物の検索

(2)で用いた分離細菌123株についてDL-トランスエポキシコハク酸の有無及びその程度を調べた。その結果、資化能即ち分解能のすぐれた(残存トランスエポキシコハク酸の認められないもの)株は22株、資化能はあるが残存トランスエポキシコハク酸の認められるものは4株であった。その他の株は分解能が認められなかった。現在、完全分解菌に関しては変異株の造成、又、中程度分解菌に関しては質的分解能(例えばD体のみ分解)について検討中である。

考 察

醗酵法により直接製造する、或いはフマル酸からの変換、更にはDL体を炭素源としてD体だけを選択的に資化する微生物のスクリーニング等種々の角度から微生物を利用してL-トランスエポキシコハク酸製造法の検討を行った。

現在フマル酸を変換し培地中にトランスエポキシコハク酸と同スポットを与える糸状菌、或いは、DL体を資化するバクテリアを分離してその生成物の確認を行っている段階である。今後変異株の作成等によりこれらの微生物がトランスエポキシコハク酸製造の一手段となりうるか否かその質的な検討を行う計画である。

更には、将来の実用化を考える時、これらの基礎データをもとに今後はDL-トランスエポキシコハク酸エステルを微生物学的(酵素学的手段を含めて)分割法が重要であろう。

結 論

醗酵法によるL-トランスエポキシコハク酸製造に有用な微生物のスクリーニングを行い、フマル酸からの変換能を有する糸状菌、或いはDL体を部分的に資化するバクテリア等数株を分離した。現在その醗酵生成物について精査中である。

総 括

E-64及びE-64類縁体の合成原料として将来実用可能なL-トランスエポキシコハク酸の製造法の研究を開始した。

即ち、1)合成法による方法、2)DL体の光学分割法による方法、3)微生物学的方法の3つの方向からアプローチした。

合成的にフマル酸を原料としてDL体を製造することは極めて容易であり原料面での問題はないが、D-酒石酸から光学活性なL-トランスエポキシコハク酸エステルを製造するには技術上の問題は解決されたが原料の入手が困難でかつ高価なため量産法としては必ずしも実用的ではない。従って、合成的にはD-酒石酸にかわりうる原料の開発が今後の課題である。

一方、醗酵法によるL-トランスエポキシコハク酸の直接製造能を有する微生物の検索を行ったが現段階では応用可能な有用菌は見出されていない。

更に、安価に供給しうるDL体を化学的、或いは微生物学的手法で分割しL体を製造する方法を検討した。化学的方法としては容易に製造しうる分割剤を開発するという前提でアミンとアミノ酸誘導体を中心に検討し、L-フェニアラニンアミド、デハイドロアピエチルアミン等が極めて有用であることを明らかにした。微生物学的にはその可能性を示唆するデータが得られつつあるが更に今後の検討を要する。

今後更に、これらの基礎データをもとに、エポキシコハク酸のエステル体の化学的、或いは酵素的手段による分割等も有望と期待されるので、L-トランスエポキシコハク酸の工業的規模での実用化の見通しは極めて明るいと考えられる。

参考文献

- 1) 今堀和友：筋肉のCa⁺⁺依存性プロテアーゼ、代謝, 16, 139, 1979.
- 2) 石浦章一、今堀和友：筋カルシウム依存性蛋白分解酵素とその抑制物質について、日本臨床, 35, 3910, 1977.
- 3) 杉田秀夫：Z線構成蛋白とカルシウム依存性蛋

2. L-トランスエポキシコハク酸製造法に関する研究

- 白分解酵素, 日本臨床, 35, 3915, 1977.
- 4) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., Tanaka, I.: Isolation and Characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor, *Agric. Biol. Chem.*, 42, 523, 1978.
 - 5) Sugita, H., Ishiura, S., Suzuki, K., Imahori, K.: Inhibition of epoxide derivatives on chicken calcium-activated neutral protease (CANP) in vitro and in vivo, *J. Biochem.*, 87, 339, 1980.
 - 6) 沢田二郎: 第1回 E-64 研究班会議発表要旨, 1979.
 - 7) Hanada, K., Tamai, M., Morimoto, S., Adachi, T., Oguma, K., Ohmura, S., Ohzeki, M.: A specific thiolprotease inhibitor, E-64 and its derivatives, *Peptide chemistry*, 1979, 31, 1979.
 - 8) 今堀和友: 私信.

Ⅱ 安 全 性

3. E-64 及びその類縁体の急性及び亜急性毒性に関する研究……………大関 正弘
4. E-64 及びその類縁体のサルモネラ菌に対する突然変異原性に関する研究……………大関 正弘
5. E-64 及びその類縁体の生体膜に対する作用に関する研究……………大関 正弘
6. E-64 及びその類縁体の局所刺激作用に関する研究……………大関 正弘
7. E-64 及びその類縁体の細胞毒性に関する研究……………大関 正弘

3. E-64 及びその類縁体の急性及び亜急性毒性に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 笹 島 道 忠* 中 根 貞 雄*
樽 本 保 男* 木 村 正 明*
河 西 章* 岸 恭 子*
尾 上 早 百 合*

1. 急性毒性

目 的

E-64 及びその類縁体 a, b, c の安全性研究の一環として、これらをマウス及びラットに皮下及び腹腔内投与し、その急性毒性を検討する。

方 法

動物は4週齢の dd 系雄マウス（静動協：体重 20 g 前後）及び6週齢の Wistar 系雄ラット（静動協：体重 200 g 前後）を5～10日の予備飼育の後、実験に使用した。被験物質は E-64 をアラビアゴム懸濁液、E-64-a を生食水溶液 E-64-b 及び -c は重曹水で中和溶解後生食水溶液とし、一投与段階あて10匹の動物に各々皮下及び腹腔内投与した。各被験物質投与後7日間は一般症状を観察するとともに生死を確認し、死亡例は発見後できるだけすみやかに、また投与7日後生存例は屠殺剖検し諸臓器の異常の有無を観察した。

結 果

(1) 一般症状

マウスでは E-64 及び a, b 5000 mg/kg の皮下あるいは腹腔内投与により、投与24時間後まで自発運動の軽度な抑制とともに一ヵ所に静止状態を保つ鎮静症状が観察されたが、投与2

日以降はこれら症状も消失し、他に新たな症状変化の発現もなかった。E-64-c の 5000 mg/kg 投与では皮下、腹腔内投与とも鎮静症状が継続した状態でうずくまったまま投与24時間以内に死亡した。しかし E-64-c の 2500 mg/kg 投与では、これらの変化はまったく観察されなかった。

ラットでの皮下あるいは腹腔内投与においてもその症状はマウスとほとんど同様であったが E-64 の皮下投与及び E-64-c の腹腔内投与で出現した死亡例はマウスの場合より死亡までの日数がやや延長し、いずれも投与3日目に死亡した。この間鎮静症状とともに採食活動もまったく無くなり、また被毛の粗毛化が観察された。

(2) 剖検所見

E-64-c 投与群で死亡したマウスでは皮下、腹腔内投与例とも著変は認められず、ラットでは腹腔内投与例に腹腔内脂肪の変性が観察された。投与7日後生存例ではマウスの場合、皮下、腹腔内投与とも、いずれの被験物質においても胸腺萎縮、腎表面の褪色性変化、肝の限局性壊死を示す例が観察された。しかしラットではこれらの変化は明らかでなかった。なおいずれの被験物質も皮下もしくは腹腔内に検液の貯留は認められなかった。

(3) LD₅₀

LD₅₀ 値を一括して表1に示す。E-64 のラットにおける皮下投与、E-64-c のマウスにおける皮下及び腹腔内投与ならびにラットでの腹腔

* 大正製薬株式会社総合研究所

Ⅱ 安 全 性

表1 E-64 及びその類縁体のマウス及びラットにおける急性毒性

Animals	Route	Sex	LD ₅₀ (95% C. L.) mg/kg			
			E-64	E-64-a	E-64-b	E-64-c
Mice	S. C.	♂	>5000	>5000	>5000	2500—5000
	I. P.	♂	>5000	>5000	>5000	2500—5000
Rats	S. C.	♂	1000—2500	>5000	>5000	>5000
	I. P.	♂	>5000	>5000	>5000	1000—2500

内投与を除いて、いずれの場合も物理的に投与限界量である 5000 mg/kg においても死亡例が認められず、これらの LD₅₀ 値は 5000 mg/kg 以上と判断された。なお上記の E-64 及び -c は供試サンプル量の都合上、LD₅₀ 値の範囲を示すにとどめたが、いずれも 1000 mg/kg 以上の LD₅₀ と推察された。

考 察

E-64 及びその類縁体はマウス、ラットの皮下及び腹腔内投与においてその LD₅₀ 値がいずれも 1000 mg/kg を越え、総じて急性毒性の弱い物質群と推察された。被験物質相互間の比較では死亡例のあった E-64 及び E-64-c が E-64-a, -b に比較して若干強いようであるが、一方一般症状、剖検所見では 4 者の相似性が高いことから、質的にはいずれも同様な作用を有するものと考えられる。また各被験物質とも投与経路の相違による毒性の差が少ない事から、いずれの投与経路においてもほぼ同程度でかつ良好な吸収性を示す事が推察される。なお、今後更に種差、性差および E-64-c における詳細な検討が必要と考えられる。

結 論

E-64 及びその類縁体のマウス、ラットにおける皮下及び腹腔内投与による急性毒性を検討し、以下の結論を得た。

- 1) E-64 及びその類縁体 a, b, c の LD₅₀ 値は皮下、腹腔内投与とも 1000 mg/kg 以上であった。
- 2) いずれの被験物質も大量投与により、肝、腎への影響が示唆された。

3) 投与経路及びマウス、ラット間での種差による毒性差は認められなかった。

2. 亜急性毒性—1)

目 的

E-64 及びその類縁体 a, b, c の安全性研究の一環として、これらをラットに 2 週間皮下連続投与し、その亜急性毒性を検討する。

方 法

- (1)動物：生後 5 週齢の Wistar 系雄ラット（静動協）を 1 週間の予備飼育ののち、1 群 8 匹あて群別し、実験に使用した。これらの動物の投与開始時体重は 104~133 g であった。動物は温度 23±2°, 湿度 55±5% のバリエーションシステムの動物室で飼育し、飼料（オリエンタル酵母社製 MF）と水は自由に摂取させた。
- (2)投与量、投与方法：検液は E-64 をアラビアゴム懸濁液、E-64-a を生食水溶液、E-64-b 及び -c は重曹水にて中和後生食水溶液とし、各々 5, 10% (w/v) 液に調製した。投与量はいずれの被験物質も 200 及び 400 mg/kg とし、投与容量は体重 100 g あたり 0.4 ml として 1 日 1 回 14 日間、毎日定時にラットの背部に皮下投与した。対照群には 5% アラビアゴム液を同様に投与した。
- (3)検査項目：
 - 1) 一般症状：毎日一般症状の観察及び体重測定を行うとともに 1 週間に 2 度摂食量の測定を行った。
 - 2) 血液学的検査：14 日間の投与終了後、エーテルによる軽麻酔下に眼窩静脈叢より採取した

3. E-64 及びその類縁体の急性及び亜急性毒性に関する研究

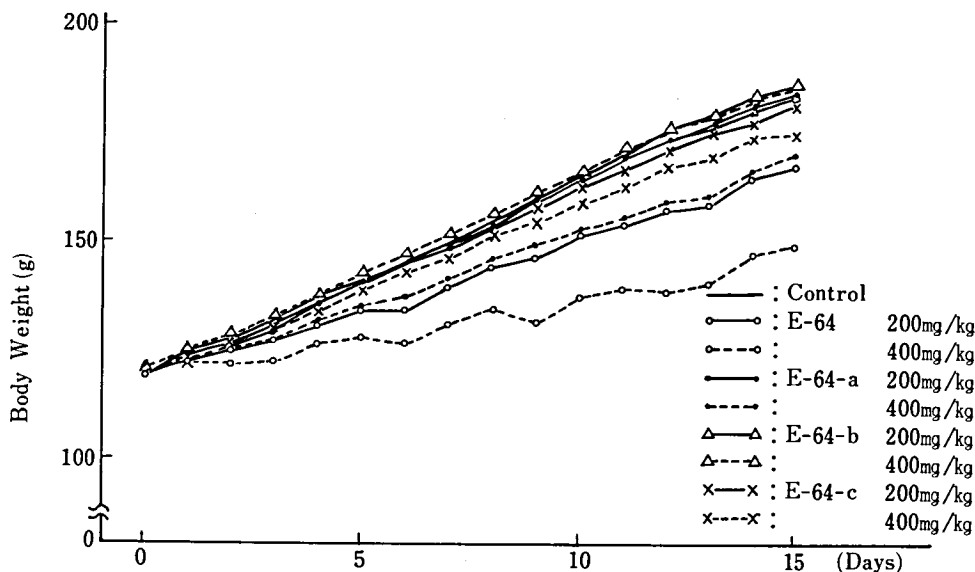


図1 E-64 及びその類縁体のラットへの2週間連続投与における体重変動

新鮮血を用い、赤血球数、白血球数、血小板数（マイクロセルカウンター：東亜社）、ヘモグロビン量（Cyanmethemoglobin 法）、ヘマトクリット値（毛細管遠心分離法）を測定した。

3) 血液生化学的検査；投与終了後、エーテルによる軽麻酔下に股動脈より採取した新鮮血を遠心分離して得た血清についてオートアナライザー（日立500型自動分析装置）を用い、総蛋白量（Biuret 法）、A/G 比（アルブミン/総蛋白 - アルブミン）、グルコース量（ブドウ糖酸化酵素法）、尿素窒素量（Urease-Indophenol 法）、クレアチニン量（Jaffe 法）、総ビリルビン量（Jendrassik-Cleghorn 法）、総コレステロール量（Lieberman-Burchard 法）、トリグリセライド（ヤترون TG-E キット法）、GOT・GPT 活性（Reitman-Frankel 変法）、ALP 活性（Kind-King 変法）、LDH 活性（ビルビン酸ヒドラジン発色法）、無機燐量（Fiske-Subbarow 法）を測定し、さらに CPK 活性（ヤترون CPK-S キット法）、Na, K（炎光法-島津原子吸光 AA-650）量についても測定した。

4) 尿検査；投与終了時の強制排泄尿について蛋白、糖、pH、ケトン体、潜血（ラブスティックス-日本エームス社）の半定量的検査を行い、また各群3匹については代謝ケージで24時

間尿を採取し、尿量、クレアチニン量（Jaffe 法）を測定した。

5) 病理解剖学的検査；投与終了後、エーテルの軽麻酔下に放血致死させ、開胸腹して胸部、腹部諸臓器を観察し、摘出した脳、心、肺、肝、腎、脾、胸腺、下垂体、甲状腺、副腎、精巣については各々重量を測定した。これら諸臓器のうち肝、腎ならびに大腿筋については10%ホルマリン液で固定後、常法のごとく切片を作製し H-E 及び PAS 染色を施し、病理組織学的検索を行った。

結 果

投与期間中、いずれの被験物質投与群においても死亡及び一般症状の変化は観察されなかった。

体重変動を図1に示す。E-64 の 200, 400 mg/kg 群、E-64-a, -c の 400 mg/kg 群に比較的投与初期から有意な体重増加の抑制が認められ、この変化は E-64 の 400 mg/kg 群においてもっとも顕著であった。また体重の変化に伴って摂食量にも各々の投与群に抑制傾向が見られ、E-64 の 400 mg/kg 群に、より明らかであった。

血液学的検査所見を表2に示す。いくつかの

