

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57年度研究報告書

班長 今堀和友

昭和58年 3月

ま え が き

今回お手許にお届けする報告書は、第4年次、すなわち昭和57年4月より58年3月の間の研究成果に関するものである。

研究の発展の上からいっても、この第4年次は種々の意味で画期的な年であったといえよう。まず第一に E-64 類縁体のうち、臨床的に使用するに最も適した薬剤および投与方法として、E-64-c のエチルエステルである E-64-d を経口投与することがほぼ確立された。事実動物に混餌投与された E-64-d は体内ですべて E-64-c に変換され、その効果は皮下にミニポンプを用いて E-64-c を連続投与したものに匹敵あるいは陵駕するものであった。

第二には、前年度の研究で有用性の認められたジストロフィーハムスターについてプロジェクト研究を行い、E-64-c および E-64-d の効果を、種々の臓器につき、種々の面から検討した。その結果は本報告書の中にまとめられているが、モデル疾患動物につき治療効果が確認できたことは特筆すべきである。

第三には、本年度より念願の第一相臨床試験が開始されたことが挙げられる。これは福原幹事の肝煎りもあって、慈恵会医科大学の宮原正教授ならびに下条貞友講師以下宮原内科の諸先生の深い御理解と並々ならぬ御協力によって可能となったのであった。結果は本文中に示しているが、期待以上の成果が得られたものと考えている。

その他の基礎研究も昨年引き続き着実な成果を挙げている。本研究はいわゆる目的指向的研究であることは云うをまたないが、その背骨を形成するのは基礎研究であると信じているので、今後もこれを継続してゆくつもりである。

おわりに本研究に種々御援助を賜った厚生省薬務局の方々、これをうけて研究に邁進された班員の皆様、第一相臨床試験に絶大な御協力を賜った上記宮原教授ならびに宮原内科の先生方、そして班の運営につき細部に亘って御助力頂いた大正製薬開発部の方々に心からの感謝を捧げるものである。

昭和58年3月

班を代表して
今 堀 和 友

目 次

まえがき

I E-64 類縁体の開発

1. E-64-d 製造法の検討	沢田 二郎	9
2. E-64-d の物理化学的性質および製剤化の検討.....	沢田 二郎	15
3. E-64-d の急性毒性に関する研究.....	大関 正弘	25
4. E-64-d の亜急性毒性に関する研究	大関 正弘	27
5. E-64-d の生殖に及ぼす影響	大関 正弘	55
6. E-64-d の変異原性試験 (Ames test).....	大関 正弘	65
7. E-64-d の小核試験.....	大関 正弘	69
8. E-64-d の抗原性に関する研究	大関 正弘	71
9. E-64-d の感覚器に及ぼす影響.....	大関 正弘	75
10. E-64-d の一般薬理作用	福原 武彦	79
11. E-64-d の中枢作用.....	大関 正弘	93
12. E-64-d の脊髄反射に対する作用.....	大関 正弘	105
13. E-64-d の平滑筋臓器への作用	大関 正弘	109
14. E-64-d の十二指腸内投与による呼吸, 血圧, 心拍数, 前腸 間膜動脈血流, 大腿動脈血流および心電図に及ぼす影響.....	大関 正弘	119
15. E-64-d の一般薬理作用	大関 正弘	121
16. E-64-d の生体内動態に関する研究	大関 正弘	127
17. E-64-d の Phase 1 試験.....	宮原 正	147

II 酵素レベルでの効果

18. カルシウムプロテアーゼによる蛋白質磷酸化酵素の限定分解	西塚 泰美	159
19. 天然型 μ -CANP の精製と性質.....	今堀 和友	167
20. カルシウムプロテアーゼの機能発現機構.....	鈴木 絃一	173
21. リソゾームチオールカテプシン群の性質と測定法の進歩.....	勝沼 信彦	179

III 細胞・組織レベルでの効果

22. 高濃度カリウムイオン溶液中における筋蛋白質代謝に及ぼす
E-64-c の影響江橋 節郎 185
23. 筋衛星細胞の培養について小沢 鏡二郎 189
24. 急性筋崩壊における E-64-c の効果石浦 章一 193
25. 移植筋の再生ならびにアミノ酸代謝に対する E-64 の効果.....寺尾 寿夫 201
26. ニューロフィラメント変性と μ -CANP杉田 秀夫 207
27. ヒト脳 Calcium-Activated Neutral Protease の部分精製および
ヒト脳 Myelin 蛋白の分解に対する E-64-a の抑制効果.....宮武 正 217

IV 個体レベルでの効果

28. 筋ジストロフィーハムスターの治療経過観察における
新しい視点 ——核磁気共鳴法の応用——宮武 正 223
29. E-64 投与の心筋症ハムスター (UM-X 7.1) 心筋に与える
影響について柴田 宣彦 229
30. 筋ジストロフィーハムスターに対する E-64-d の効果 (共同研究)
—研究分担—
- (1) 血液, 尿, 筋肉の生化学分析.....大関 正弘 239
- (2) プロテアーゼ活性に及ぼす効果
- ① CANP に対する効果鈴木 紘一 253
大関 正弘
- ② カテプシンに対する効果.....勝沼 信彦 257
- (3) 組織学的および組織化学研究
- ① 骨格筋の病理.....杉田 秀夫 261
埜中 征哉
- ② 心筋の病理.....大関 正弘 267
和田 昭
- (4) 筋エネルギー代謝に及ぼす影響.....市原 明 271
- (5) 筋ガングリオンドに対する影響.....宮武 正 273
- (6) 肝薬物代謝に及ぼす影響.....北川 晴雄 277

I E-64 類縁体の開発

1. E-64-d 製造法の検討.....沢田 二郎
2. E-64-d の物理化学的性質および製剤化の検討.....沢田 二郎
3. E-64-d の急性毒性に関する研究.....大関 正弘
4. E-64-d の亜急性毒性に関する研究.....大関 正弘
5. E-64-d の生殖に及ぼす影響.....大関 正弘
6. E-64-d の変異原性試験 (Ames test)大関 正弘
7. E-64-d の小核試験.....大関 正弘
8. E-64-d の抗原性に関する研究.....大関 正弘
9. E-64-d の感覚器に及ぼす影響.....大関 正弘
10. E-64-d の一般薬理作用.....福原 武彦
11. E-64-d の中枢作用.....大関 正弘
12. E-64-d の脊髄反射に対する作用.....大関 正弘
13. E-64-d の平滑筋臓器への作用.....大関 正弘
14. E-64-d の十二指腸内投与による呼吸, 血圧, 心拍数, 前腸間膜動脈血流,
大腿動脈血流および心電図に及ぼす影響大関 正弘
15. E-64-d の一般薬理作用.....大関 正弘
16. E-64-d の生体内動態に関する研究.....大関 正弘
17. E-64-d の Phase 1 試験.....宮原 正

1. E-64-d 製造法の検討

沢田二郎*

研究協力者 曾田馨* 渡辺慶昭* 畑山勝男*
横尾千尋* 塩原義則* 村田充男*
花田和紀* 玉井正晴* 小熊清司*

目 的

昨年度我々は、生体内利用性向上を目指し E-64-c の prodrug 化を検討した結果、E-64-c のエチルエステル体である E-64-d が、ラット腸管からの吸収性が優れており、経口剤としての開発の可能性が示唆された¹⁾。さらに、また筋ジストロフィー・ハムスターを用いた薬効試験においても、その有用性が明らかになってきた²⁾。

そこで我々は、E-64-d 実用化のため、工業的規模でより実用性の高い製造法の改良検討を行うことにした。

E-64-d は E-64-c の合成中間体であるため、既報の方法³⁾により工業的規模で製造可能である。しかしながら、その活性基である L-トランス-エポキシコハク酸（以後 L-t-ES と略す）の生産効率をあげることは、今後化合物の製品化を進めていく上で極めて有用である。

我々は、既に報告したように、D-酒石酸より立体選択的に合成する方法およびデヒドロアピエチルアミンによる光学分割による L-t-ES 製造法を一応確立した^{4),5)}。しかしながら、合成法においては、原料である D-酒石酸が高価であるという問題点も残されていた。一方、光学分割法においても、分割剤であるデヒドロアピエチルアミンが、大規模での作業効率が悪いとい

う物性面での欠点に加えて、L-t-ES の水溶性が高いため溶媒抽出が困難であるなど、工業的規模ではさらに改善すべき問題点も指摘されてきた。

今年に入り、合成原料として D-酒石酸塩が国内で比較的安価に入手可能になってきた。我々はこの塩に着目し、これを原料とした L-t-ES 製造法ならびにその工業適性の検討、さらには、デヒドロアピエチルアミンに代わりうる実用性のより高い分割剤の開発をも併せ検討し、E-64-d の工場規模における製造法の改良を行ったのでここに報告する。

材料および方法

1. D-酒石酸塩類のエステル化

D-酒石酸のナトリウム・アンモニウム塩およびナトリウム・カリウム塩（昭和化工株）を使用した。D-酒石酸塩のエチルエステル化は、常法に従い図 1 に示すような方法で、種々の濃度の硫酸を触媒として加え、エタノール中で加熱還流して行った。

2. 光学分割法による L-トランス-エポキシコハク酸の製造

L-アルギニン、L-リジンは市販品を用い、L-フェニルアラニンエチルエステルは J. P. Greenstein ら⁶⁾の方法により合成した。また、DL-t-ES は G. B. Payne ら⁷⁾の方法に従ってフマル酸より合成した。上記アミンを分割剤として、L-t-ES とのジアステレオアイソマー塩を形成し分割する方法⁴⁾に準じ、DL-t-ES の

* 大正製薬株式会社総合研究所

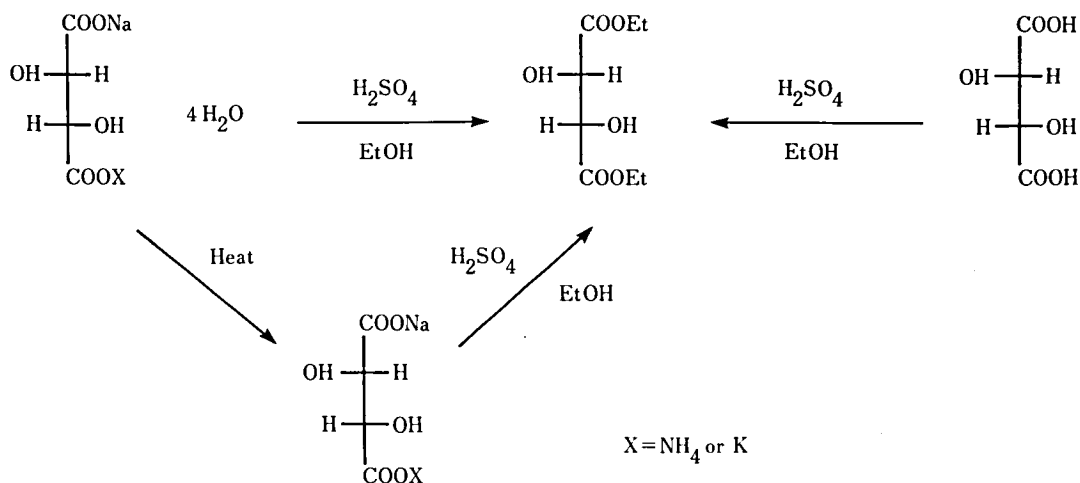


図1 D-酒石酸のエステル化

表1 D-酒石酸塩類のエステル化

Starting materials	H ₂ SO ₄ (molar ratio)	Yield (%)
D-Tartaric acid	0.3	78.0
D-Tartaric acid Na·NH ₄ salt·4H ₂ O	1.2	50.2
"	1.7	70.2
"	2.8	63.1
D-Tartaric acid Na·NH ₄ Salt	1.2	76.1
D-Tartaric acid Na·K salt	1.2	76.6

光学分割法を検討した。L-t-ES と L-アルギニンとのジアステレオアイソマー塩より直接 L-t-ES-ジエチルエステルを得る目的で、硫酸触媒を用いる方法を検討した。

結 果

1. D-酒石酸塩類のエステル化

まず、エステル化反応の触媒である硫酸の適量を、D-酒石酸ナトリウム・アンモニウム4水和物を用い検討した。得られたジエチルエステルは、純度の点ではほぼ満足できるものであったが、表1に示すように、最高収率の場合（硫酸1.7当量）でも70.2%と、遊離のD-酒石酸を原料にした場合より低収率であった。これは原料に含まれる多量の結晶水によるものであらうと思われたので、あらかじめ50~60°Cで真空乾燥し、ほとんどの結晶水を除去した後使用した。その結果、表1に示すようにナトリウ

ム・アンモニウム塩およびナトリウム・カリウム塩のいずれから、遊離の酒石酸を用いた場合とほぼ同等の収率でエチルエステルが得られ、その純度も満足できるものであった。

2. 光学分割法によるL-トランス-エポキシコハク酸の製造

これまでの経験をもとに、L-フェニルアラニンエチルエステル、L-リジンおよびL-アルギニンに焦点を絞り新たに検討した。その結果、表2に示すようにL-フェニルアラニンエチルエステルはジアステレオアイソマー塩の結晶化が困難であり、また、L-リジンの場合は分割能が低い実用不可能であったが、L-アルギニンは結晶性塩が得られ、しかも得られたt-ESの純度も高く、既に報告したL-フェニルアラニンアミドおよびデヒドロアビエチルアミンと比較しても、コストおよび作業効率の両面で優れていると考えられるので、さらに、塩形成の諸

1. E-64-d 製造法の検討

表2 DL-トランス-エポキシコハク酸の光学分割

Resolving agents	Solvent	Salt	t-ES	Overall yield (%)
		Yield (%)	$[\alpha]_D$	
L-Phenylalanine ethylester	MeOH	—	—	—
L-Lysine	75%MeOH	60	$\pm 0^\circ$	—
L-Arginine	"	75	$+118^\circ$	39.0
L-Phenylalanine amide	95%MeOH	84	$+115.4^\circ$	61.0
Dehydroabiethylamine	90%Acetone	83.8	$+115.7^\circ$	55.4

表3 L-アルギニンによる DL-トランス-エポキシコハク酸の光学分割

Exp.	DL-t-ES/L-Arg (molar ratio)	Solvent	Salt	L-t-ES		Overall yield (%)
			Yield (%)	Yield (%)	$[\alpha]_D$	
1)	1	75%MeOH	75.0	52.0	$+118^\circ$	39.0
2)	2	"	69.0	—	—	—
3)	1	80%MeOH	91.0	49.5	$+121^\circ$	45.0

表4 DL-トランス-エポキシコハク酸の L-アルギニンによる大量分割

A. Preparation of salt

DL-t-ES (g)	L-Arg (g)	Solvent	Salt	
			Yield (g)	$[\alpha]_D$
66.05	87.10	80%MeOH	73.1	$+51.6^\circ$

B. Isolation

Salt (g)	Extraction	L-t-ES		
		Yield (g)	$[\alpha]_D$	Overall yield
73.0	Acetone-Ethylacetate	20.9	$+122.2^\circ$	63.3%

条件を検討した。

表3に示すように、DL-t-ESと分割剤の比は1:1(モル比)、80%メタノールを用い、結晶を析出させる条件が最も良い成績を示した。

同条件下で約50倍のスケールで行った分割結果を表4に示す。

塩からL-t-ESを単離する際、L-t-ESの水溶性が高いため工業的規模では抽出効率が悪かったが、水層を塩化ナトリウムで飽和後、抽出溶媒としてアセトン-酢酸エチル(7-3)混液を用いることにより顕著に改善された。この結果はL-アルギニンがデヒドロアビエチルアミンよりも優れていることを示している。

一方、L-アルギニンとL-t-ESのジアステレ

オアイソマー塩から直接エステル化が可能であるならば抽出工程が省け、作業効率および収率の両面での大幅な改善が可能になると考えられる。かかる理由より、塩から直接エステル化を試みたところ、触媒として硫酸を塩に対して3当量使用することにより成功し、図2に示すように通算収率が大幅に上昇し、得られたL-t-ES-ジエチルエステルの純度も高く、ほぼ満足のいく結果が得られた。

考 察

これまで我々は、E-64-dの主原料として用いるL-t-ESの合成法に関し、2通りの方法について報告してきた。この方法により工場レベ

I E-64 類縁体の開発

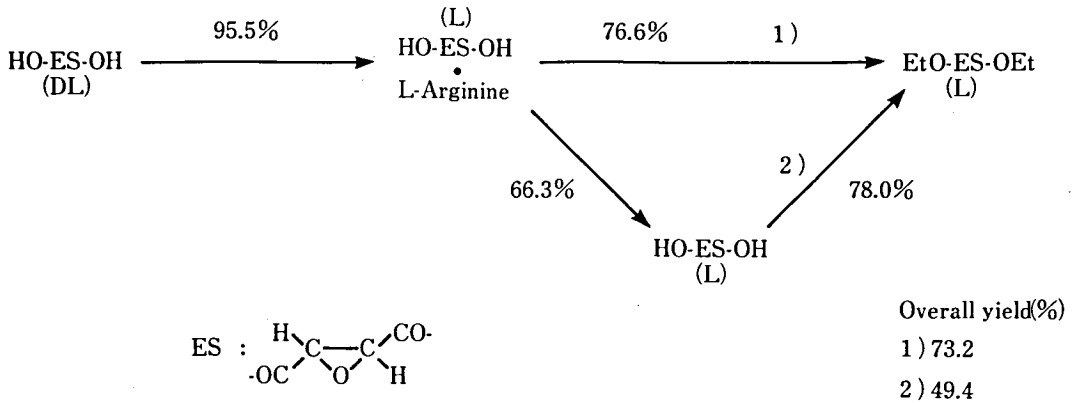


図2 L-トランス-エポキシコハク酸ジエチルエステルの合成法

ルの製造を検討するにつれて、さらに改善しなければならぬ問題も新たに喚起されてきた。

その一つは立体選択的合成法による場合で、原料であるD-酒石酸にコストおよび供給面で問題が残っていた。そこで国内で安価に得られる酒石酸ナトリウム・アンモニウム塩に着目し、これを用いて製造法を再検討した結果、大幅なコストダウンに成功した。すなわち、この塩を用いL-トランス-エポキシコハク酸ジエチルエステルを高収率で得ることができた。一方、既報のDL-t-ESの分割剤であるデヒドロアビエチルアミンに代わりうる分割剤の検討を進めた結果、作業性の良いL-アルギニンが実用面から優れていることが明らかになってきた。しかもL-アルギニンの場合、L-t-ESとのジアステレオアイソマー塩を直接エステル化することが可能であることがわかり、L-トランス-エポキシコハク酸ジエチルエステルの通算収率が飛躍的に上昇した。

現在その工場適性に関しさらに改良検討を進めているところである。

結 語

E-64-dの主原料であるL-t-ESの製造法について改良検討した。この結果、以下の点で改良が可能となり生産効率および製造コストの面で大幅に改善することができた。

1. 立体選択的合成法において、安価で安定供給ができるD-酒石酸ナトリウム・アンモニウ

ム塩4水和物を、D-酒石酸の代わりに出発原料として用いることが可能となった。

2. 光学分割法において、分割剤としてL-アルギニンをデヒドロアビエチルアミンの代わりに用いることにより、操作上の問題点が改善された。

3. L-t-ESのL-アルギニンとのジアステレオアイソマー塩よりエチルエステル化が可能であることがわかった。

参 考 文 献

- 1) 沢田二郎：E-64-c エステル誘導体の生物薬剤学的研究，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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 29, 1982.
- 2) 大関正弘：E-64 およびその類縁体の筋ジストロフィーハムスターに対する薬効に関する研究，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，今堀班，昭和56年度研究報告書，p. 135, 1982.
- 3) 沢田二郎：E-64 およびその類縁体の製造法に関する研究，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，今堀班，昭和54年度研究報告書，p. 9, 1980.
- 4) 沢田二郎：L-トランス-エポキシコハク酸製造法に関する研究，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，今堀班，昭和54年度研究報告書，p. 15, 1980.
- 5) 沢田二郎：DL-トランス-エポキシコハク酸の光学分割法に関する研究，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

1. E-64-d 製造法の検討

(E-64) の開発研究, 今堀班, 昭和55年度研究報告書, p. 11, 1981.

6) Greenstein, J. P. and Winitz, M.: "Chemistry of the Amino Acids" 2, p. 763, John Wiley & Sons, Inc., N. Y. 1961.

7) Payne, G. B., Williams, P. H.: Reaction of hydroperoxide IV. Sodium tungstate catalyzed epoxidation of α , β -unsaturated acid, J. Org. Chem., 24, 54, 1959.

2. E-64-d の物理化学的性質 および製剤化の検討

沢田二郎*

研究協力者 小団扇 省三* 小沢 康雄* 根本 正美*
吉田 継親* 小山 郁夫* 田中 唯夫*
中池 郁子* 法美奈子*

目 的

前報¹⁾において、優れたプロテアーゼ阻害作用を有する E-64-c へ消化管粘膜透過性を賦与するための Prodrug 化を指向し、そのエチルエステル体 (E-64-d) が、実用的に有用である可能性を示唆した。

本報の目的は、この E-64-d の消化管吸収性における動物種差を調査する一方で、その構造および物理化学的性質を明らかにし、さらに経口剤として製剤化に必要な基礎的検討を行い基本的な処方を確認することにある。

方 法

1. 試料

E-64-d は著者らが合成したものをを用いた。その化学名、構造式、分子式、分子量を表 1 に、また日本薬局方通則および一般試験法に従って測定した各試験結果を表 2 に示す。

2. 使用動物

犬はビーグル犬雌の体重約 10 kg、ラットは Wistar 系雄の体重約 150 g およびハムスターはゴールデン系雄の体重約 70 g を、それぞれ用いた。

3. 赤外吸収スペクトル

本品約 1 mg に KBr 約 150 mg を加え、乳鉢で粉碎混合したものにつき、日本薬局方一般試験法の赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリ

ウム錠剤法により測定した。

4. 核磁気共鳴スペクトル

本品約 0.01 g に重クロロホルム 0.4 ml を加えて溶かした液につき、テトラメチルシランを内部標準として 200 MHz の共鳴周波数で水素核について 0~10 ppm の範囲を掃引した。

5. 質量スペクトル

本品をイオン化電圧 20 eV イオン加速電圧 3.5 KV およびイオン源温度 290° の条件で直接導入法で測定した。

6. 分配係数

本品約 0.1 g をとり pH3 および pH6 の 0.05 M リン酸緩衝液 (イオン強度 0.2) 40 ml を加え、室温で 1 時間振盪する。この液をポアサイズ 0.45 μm のミリポアフィルターで濾過する。この濾液 10 ml に、それぞれ酢酸エチル、クロロホルム各 10 ml を加えた後、室温で 1 時間振盪する。遠心分離した後、水相および有機溶媒相中の E-64-d の濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC)¹⁾ により測定した。

7. 吸湿性

本品約 0.5 g を秤量びんにとり、デシケータ中で 24 時間減圧乾燥した後、室温下相対湿度 44% (K_2CO_3 飽和水溶液)、65% ($\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$ 飽和水溶液) および 75% (NaCl 飽和水溶液) のデシケータ中にそれぞれ 3 週間放置し、重量増加率 (%) を測定した。

8. 水溶液中での安定性

2% アセトニトリル含有の 0.05 M リン酸緩

* 大正製薬株式会社総合研究所

I E-64 類縁体の開発

表1 E-64-d の構造

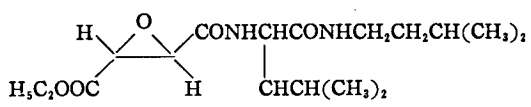
Chemical Name	: Ethyl (2s, 3s)-3[(s)-3-methyl-1-(3-methylbutylcarbamoyl)butylcarbamoyl] oxirane-2-carboxylate
Structural Formula	: 
Molecular Formula	: C ₁₇ H ₃₀ N ₂ O ₅
Molecular Weight	: 342

表2 E-64-d の性状, 示性値および溶解性

Appearance	: White crystals or crystalline powder
Melting point	: 125.5
Specific rotation	: $[\alpha]_D^{25}$, +50.8 (1% Ethanol sol.)
Solubility	: freely sol. in DMSO, chloroform, methanol, ethanol soluble in acetone, dioxane sparingly sol. in ethyl acetate slightly sol. in ether practically insol. in water, n-hexane

衝液および塩化カリウム・塩酸緩衝液 (pH 1~8, イオン強度 0.2) を用い, 本品の濃度 10 μg/ml の溶液を調製する。この液を 40° に保存し, E-64-d の経時残存率を HPLC¹⁾ により測定した。また, 同様に pH 8 の Britton-Robinson 緩衝液中における安定性を 30°, 40° および 50° で検討し温度依存性を調査した。

9. 粉末状態での安定性

本品を無色透明のガラスびんに入れ, 室温, 加温 (40°, 50° の恒温器), 加温・加湿 (40° 相対湿度 75% の恒温恒湿器) および室内散光 (300~900 ルクス) 下に 3 カ月間保存し, 残存率の経時的变化を HPLC¹⁾ により測定した。

10. 製剤の処方および安定性

表 3 に示すようにポリソルベート 80 の添加および無添加の 2 処方で, 日本薬局方製剤総則カプセル剤の製法に準じて, 本品 100 mg を含有する硬カプセル剤を製した。

処方 1 のカプセル剤を無色透明のガラスびんに入れ, 粉末の場合と同様に保存して経時的变化を観察した。

11. 溶出試験

日本薬局方一般試験法・溶出試験法の第 2 法

表3 カプセル剤の処方

Ingredients	per Capsule Quantities	
	Rp. 1	Rp. 2
E-64-d	100 mg	100 mg
Polysorbate 80	5 mg	—
Corn Starch	q. s.	q. s.
Crystalline Cellulose	50 mg	50 mg
Magnesium Stearate	1 mg	1 mg
Total	200 mg	200 mg

(試験液: 崩壊試験法の第 1 液 900 ml, 回転速度: 100 rpm, 温度: 37°) で試験し, 累積溶出量を HPLC¹⁾ で測定した。

12. 経口投与実験

(1) ラット, ハムスター

5% アラビアゴム水溶液 10 ml に E-64-d (または E-64-c) 100 mg を懸濁し投与検液とした。これをあらかじめ一夜絶食した動物に, 体重 1 kg 当り 50 mg を投与した後, 一定時間ごとに採血し血漿を得た。

(2) 犬

あらかじめ一夜絶食したビーグル犬に, 体重

2. E-64-d の物理化学的性質および製剤化の検討

1 kg 当り 50 mg となるように、E-64-d (または E-64-c) をカプセルにつめて、水約 50 ml と共に投与した。製剤については 1 頭当り 5 カプセル (E-64-d 38 mg/kg) を投与した。投与後一定時間ごとに採血し、血漿を得た。

血漿中の薬物の定量は HPLC¹⁾ を用いて行った。

結果および考察

1. 構造および物理化学的性質

元素分析、赤外吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトルおよび質量スペクトルとその帰属を表 4 および図 1～3 に示した。これらのデータは E-64-d の化学構造 (表 1) を矛盾なく支持した。

また、本品の分配係数および吸湿性の測定結果を表 5, 6 に示した。この結果、E-64-d はほとんど吸湿性がなく、脂溶性の高い物性を持つことが確認された。

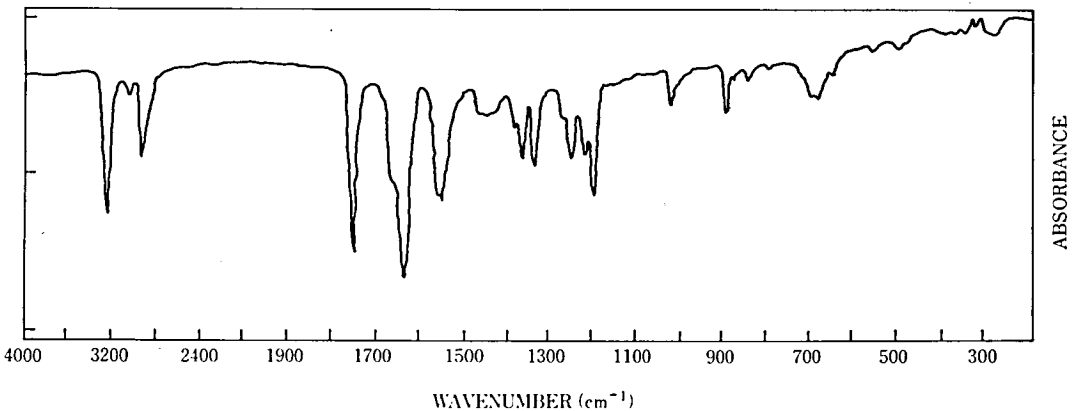
2. 安定性

(1) 水溶液中での安定性

前報¹⁾よりさらに広域 pH において安定性を調査した。その結果、E-64-d は水溶液中では pH 3～5 で安定であり、その至適 pH は 4 付近にあることが明らかとなった。エステル化合物である E-64-d は、至適 pH の酸性側およびアルカリ性側で見掛上一次的反応式に従って分解しており、酸、塩基触媒反応の存在を示唆した (図 4, 5)。また、pH 8 におけるアレニウスプロット (図 6) の示す直線の傾きより、活性化エネルギーは 19.0 Kcal/mole であった。

(2) 粉末状態および製剤での安定性

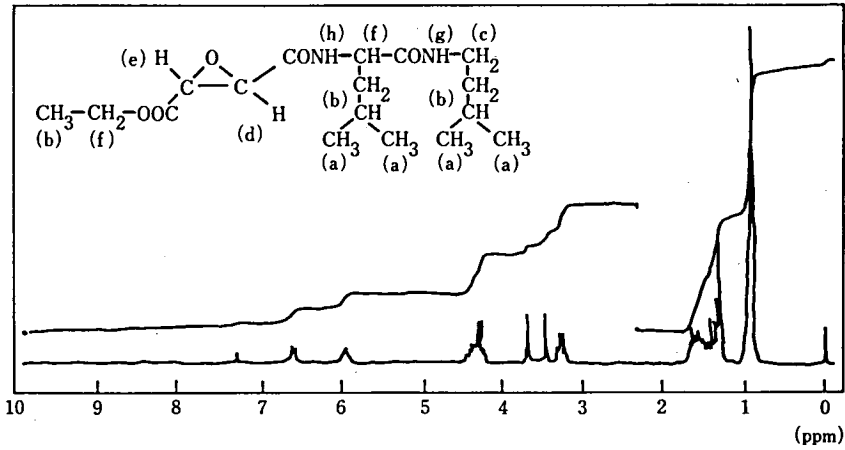
E-64-d 原末およびカプセル剤 (処方 1) を室温、40°, 50°, 40° 相対湿度 75% および室内散光下に 3 カ月間保存し、外観、崩壊時間 (製剤) の観察および定量の結果、いずれの場合もほとんど経時的な変化を認めず、原末、カプセル剤共に熱、湿度および光に対して安定であった (表 7)。



Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment
3270	∨ N-H
2950	∨ C-H
1750	∨ C=O(COOC ₂ H ₅)
1640	∨ C=O(CONH)
1550	∫ N-H
890	∨ as <chem>C=C</chem>

図 1 E-64-d の赤外吸収スペクトル (KBr 法)

I E-64 類縁体の開発



Signal	Chemical Shift	Coupling Pattern	Intensity (H)
(a)	0.90-0.94	doublet-doublet	12H
(b)	1.28-1.78	multiplet	9H
(c)	3.22-3.29	quartet	2H
(d) or (e)	3.45-3.47	doublet	1H
(d) or (e)	3.68-3.70	doublet	1H
(f)	4.24-4.30	quartet	3H
(g)	5.86-6.04	broad	1H
(h)	6.30-6.66	broad	1H

図2 E-64-d の核磁気共鳴スペクトル

表4 E-64-d の元素分析

	C	H	N
Anal. Calca.	8.18%	59.63%	8.83%
Found	8.04%	59.40%	8.65%

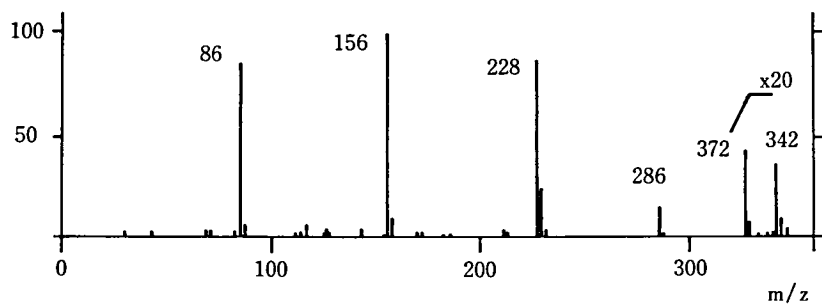
表5 E-64-d の分配係数 (室温)

org. phase aq. phase	Ethyl Acetate	Chloroform
pH 3	49.3	89.8
pH 6	77.3	77.3

表6 E-64-d の吸湿性 (室温)

R. H.	Weight gain (%)		
	1 week	2 weeks	3 weeks
44%	0.1	0.1	0.0
65%	0.3	0.2	0.2
75%	0.1	0.0	0.0

2. E-64-d の物理化学的性質および製剤化の検討



m/z	Relative Intensity (%)	Assignment
342	2	M ⁺
327	2	(M - CH ₃) ⁺
286	15	(M - CH=CHCH ₃) ⁺ CH ₃
228	86	
156	100	
86	84	⁺ N=CHCH ₂ CH(CH ₃) ₂

図3 E-64-d の質量スペクトル

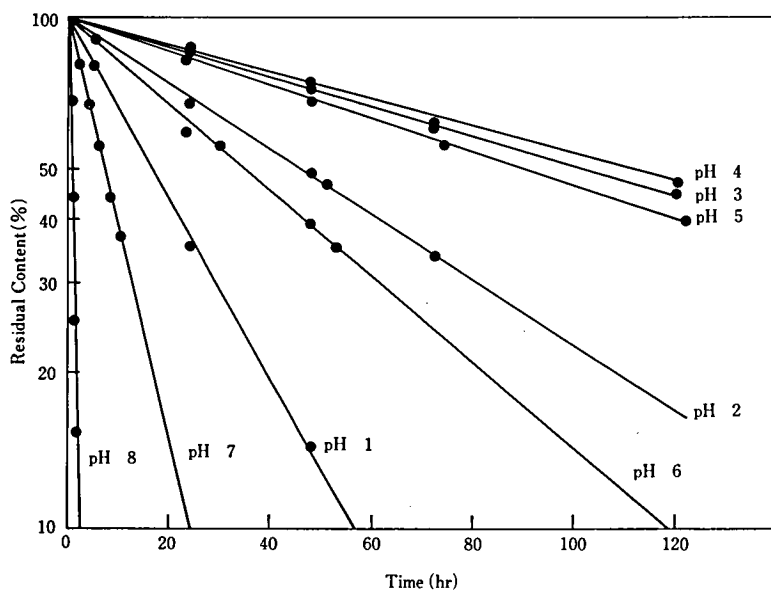


図4 E-64-d の水溶液中での安定性 (40°)

I E-64 類縁体の開発

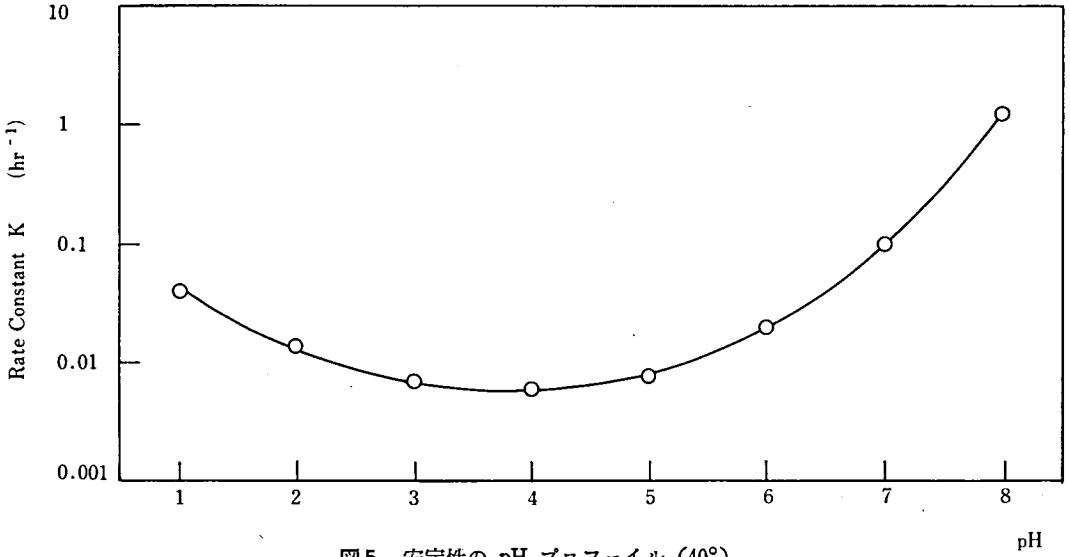


図5 安定性の pH プロファイル (40°)

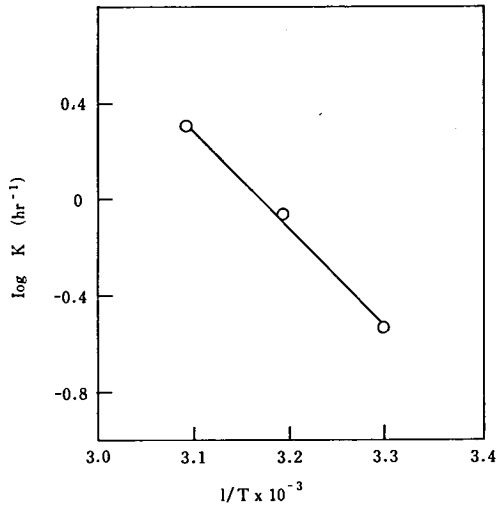


図6 アレニウスプロット (pH 8)

3. 経口投与による吸収性

(1) 動物種差

前報¹⁾において、E-64-c および E-64-d をラットに経口投与した場合、前者がほとんど吸収されないのに対して後者が優れた吸収性を示したので、今回種差の影響を観察するために、ハムスター、犬について同様な比較実験を行った。その結果、図7に示すように、ハムスターでは、E-64-c はわずかな吸収しかなく1時間後におけるピーク血中濃度は 0.81 $\mu\text{g/ml}$ であ

ったが、E-64-d は極めて吸収が良く、ピーク血中濃度は 4.9 $\mu\text{g/ml}$ であり、AUC は E-64-c に比べ約 8 倍であった。一方、犬では、両薬物の吸収パターンは類似しており、AUC もほぼ同等であった。なお、E-64-d を投与した場合、脱エステル体 (E-64-c) として血中に存在しており、未変化体の E-64-d は検出感度 (0.1 $\mu\text{g/ml}$) 以下であった。以上の結果から、両薬物を経口投与した場合、E-64-d は動物種に関係なく吸収されやすいのに対し、E-64-c

2. E-64-d の物理化学的性質および製剤化の検討

表7 E-64-d 原体および製剤の安定性

		Bulk		Capsules (Rp. 1)		
		Appearance	Residual Content (%)	Appearance	Disinteg. Time (min.)	Residual Content (%)
Initial		*-1	100	*-2	3~4	100
Room Temperature	1M	**	99.8	**	3~4	98.9
	2M	**	100.0	**	3~4	100.0
	3M	**	102.0	**	3~4	99.1
40°	1M	**	96.7	**	3~4	100.4
	2M	**	102.1	**	3~4	97.0
	3M	**	101.2	**	3~4	101.3
50°	1M	**	97.4	**	3~4	101.1
	2M	**	102.4	**	3~4	100.0
	3M	**	102.3	**	3~4	101.3
40° 75% RH	1M	**	97.8	**	3~4	98.9
	2M	**	99.6	**	3~4	96.5
	3M	**	100.0	**	3~4	100.1
Indoor Light	1M	**	98.3	**	3~4	99.4
	2M	**	100.7	**	3~4	97.8
	3M	**	100.8	**	3~4	100.4

*-1: White crystalline powder

*-2: White hard capsule included white granular powder

** : No change was observed in appearance.

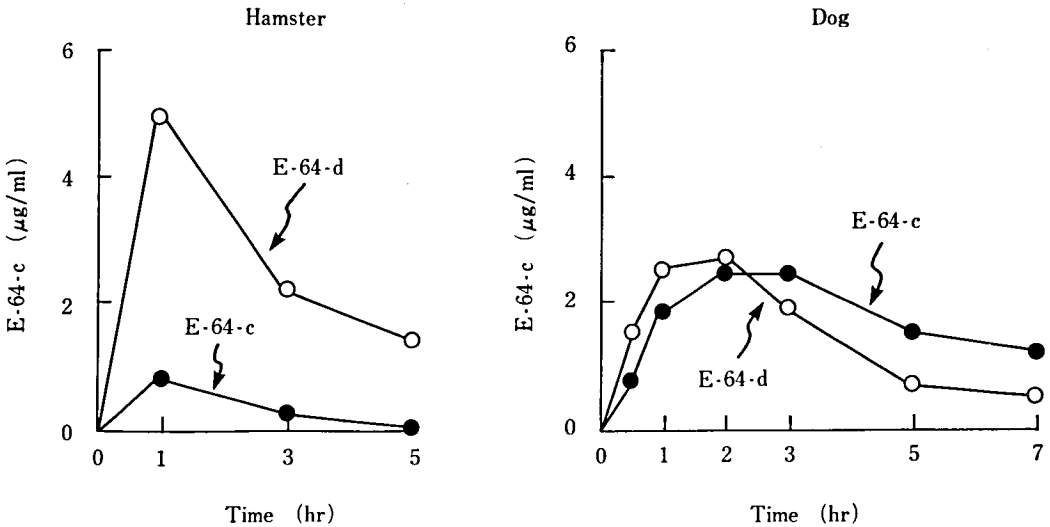


図7 経口投与後の血中濃度 (投与量 50 mg/kg) (種差の影響)

I E-64 類縁体の開発

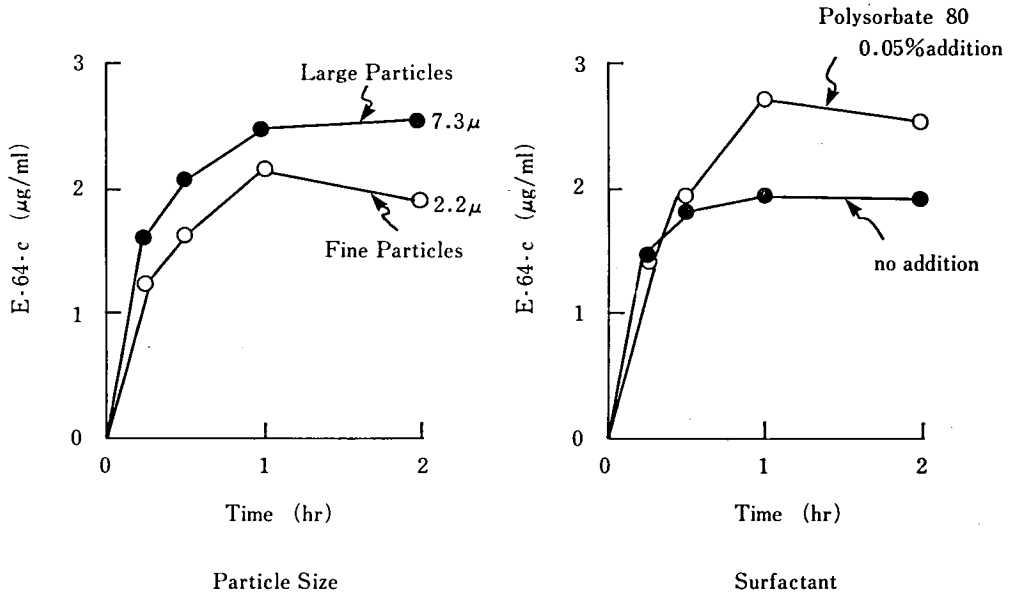


図8 経口投与後の血中濃度 (投与量 50 mg/kg)
(粒子径および界面活性剤の影響)

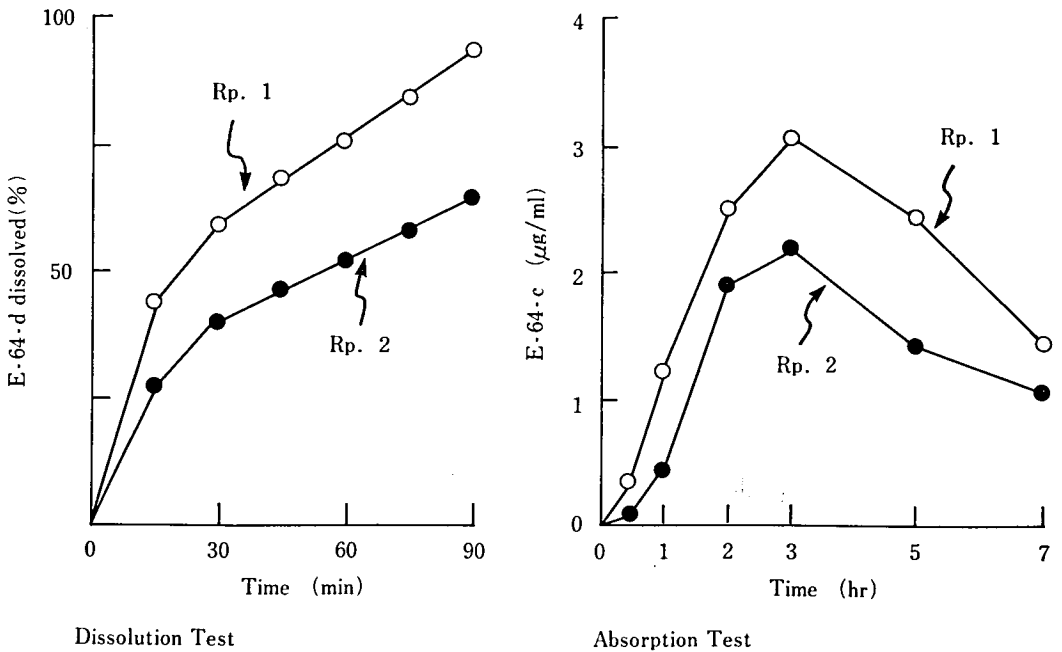


図9 カプセル剤の溶出試験およびイヌに対する経口投与試験

2. E-64-d の物理化学的性質および製剤化の検討

の吸収には種差があることがわかった。

(2) 粒子径および界面活性剤の影響

E-64-d のような、水に溶け難い疎水性の薬物の吸収を高めるためには、一般に微粉化あるいは界面活性剤を加えて、「濡れ」を改善し溶解速度を促進する手段がとられる。

平均粒子径の異なる E-64-d (空気透過法で測定した比表面積径は、それぞれ $2.2\ \mu\text{m}$ および $7.3\ \mu\text{m}$) を、アラビアゴムに懸濁してラットに経口投与したところ、両者間に有意な吸収の差はなかった (図8)。微細化粒子 ($2.2\ \mu\text{m}$) で血中濃度が若干低くなっているが、これは粒子の凝集によるものと考えられ、E-64-d の場合、粒子径よりむしろ「濡れ (分散性)」の改善の必要性を示唆している。

一方、同じ粒子径 ($2.2\ \mu\text{m}$) を持つ E-64-d にポリソルベート80を0.05%添加したものと無添加の検体をラットに投与した場合も、両者の間に有意な吸収の差はなかったが、界面活性剤を添加した方が血中濃度が高くなる傾向を示した (図8)。

(3) 製剤 (カプセル剤) での吸収性

(1), (2) の結果より、E-64-d は $10\ \mu\text{m}$ 程度以下の粒子径であれば、その吸収性は粒子の大きさによるよりも「濡れ」の改善によって増進する傾向を示したので、ポリソルベート80を添加した処方と無添加の処方でカプセル剤を調製して、これらについて *in vitro* 溶出試験および *in vivo* 犬投与実験を行った。その結果は図9に示す通りであり、ポリソルベート80の有無は *in vivo* 試験で統計的には有意差を示さなかったものの、脂溶性の高い E-64-d の物理

化学的性質を考慮するとき、消化管液への「濡れ」を増進する界面活性物質 (ポリソルベート80, ポリエチレングリコール等) の添加は、E-64-d を経口投与する場合、消化管からの吸収促進に有用であることが明らかである。

結 論

E-64-d の物理化学的性質、安定性、および経口投与した場合の消化管吸収性の動物種差、粒子径と添加剤の影響を明らかにし、経口剤としての基礎的な製剤化検討を行った。

その結果は次のように要約される。

1. 本品は水に溶け難く、脂溶性の高い光学的に活性な化合物である。
2. 本品は水溶液中で酸・塩基触媒的に分解を受け、pH 4 付近で最も安定である。
3. 本品は粉末状態およびカプセル剤とした状態では、熱、湿度、光に対して安定である。
4. 本品は E-64-c と異なり、動物種に関係なく優れた消化管吸収性を有する。
5. 本品は前記の物性を持つにもかかわらず、 $10\ \mu\text{m}$ 程度以下の粒子径であれば、粒子の大きさは余り吸収性を支配しない。
6. 本品は、「濡れ (分散性)」促進作用を有する界面活性物質の添加によって、吸収性が増大する傾向がある。

参 考 文 献

- 1) 沢田二郎: E-64-c エステル誘導体の生物薬剤学的検討, 厚生省「新薬開発研究事業」微生物の二次代謝物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究, 今堀班, 昭和56年度研究報告書, p. 29~34, 1982。

3. E-64-d の急性毒性に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 中 根 貞 雄* 樽 本 保 男* 瀬 戸 山 蔭 義*
小 池 正 信* 大 島 隆*

目 的

E-64-d の安全性研究の一環として、マウスおよびラットに腹腔内、皮下および経口投与し、その急性毒性を検討する。

方 法

動物は4週令の ddY 系雌雄マウス（静動協：体重 21 g 前後）および6週令の Wistar 系雌雄ラット（静動協：体重 160 g 前後）をそれぞれ7日間の予備飼育の後、実験に使用した。被験薬物の E-64-d は、5%アラビアゴム液にて懸濁し、一投与段階あて10匹の動物に腹腔内、皮下および経口投与した。投与後、7日間、各動物の一般症状を観察するとともに生死を確認し、死亡例については発見後すみやかに剖検を行った。

LD₅₀ 値は、Litchfield-Wilcoxon 法により算出した。

結 果

1. 一般症状

マウスでは腹腔内投与において、投与10~15分後に歩調異常、自発運動の抑制、また2~3時間後には後肢麻痺、腹臥の姿勢を示し、呼吸困難を呈したのち死亡する例が散見された。他の投与経路では特に症状変化は観察されなかった。

ラットでは皮下および経口投与において投与1.5~2.0時間後に軽度の鼻出血および尿失禁による下腹部の濡れが認められた。

腹腔内投与では投与20~30分後に歩調異常、自発運動の抑制がみられ、投与5~6時間後には、経口および皮下投与と類似の症状が観察された。

2. 剖 検

死亡はマウスおよびラットとも腹腔内投与例にのみ認められ、これら死亡例の剖検ではマウスで肺出血またはうっ血がみられ、ラットでは肝腫大、胃の出血およびうっ血、ならびに腹腔内の検体残留が観察された。7日後の屠殺例ではマウス、ラットともに皮下投与で投与部位の痂皮形成および検体残留が散見され、経口投与では何等異常は観察されなかった。腹腔内投与では肝腫大が認められた。

3. LD₅₀ 値

LD₅₀ 値を一括して表1に示す。

皮下および経口投与では、マウス、ラットとも検液調製および投与容量から考えられた最大可能量を投与しても死亡例は認められなかった。腹腔内投与では、マウスで雄 3,265 mg/kg、雌 3,391 mg/kg、ラットで雄 2,086 mg/kg、雌 2,050 mg/kg の LD₅₀ 値を示し、マウスとラットの間に若干の種差が示唆されたが、性差はみられなかった。

考 察

E-64-d はマウスおよびラットにおいて皮下

* 大正製薬株式会社総合研究所

I E-64 類縁体の開発

表1 E-64-d のマウスおよびラットにおける急性毒性

Route	LD ₅₀ mg/kg (95% C.L.)*			
	Mice		Rats	
	Male	Female	Male	Female
経口投与	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
皮下投与	>7,000	>7,000	5,000	5,000
腹腔内投与	3,269 (2843-3759)	3,391 (2923-3934)	2,086 (1846-2357)	2,050 (1783-2358)

* Litchfield-Wilcoxon method

投与および経口投与では投与可能最大量においても死亡例がなく、また、腹腔内投与では死亡例が出現するもののいずれも 2,000 mg/kg を越える高い LD₅₀ 値を示し、その毒性は弱いものと思われる。

一方、E-64-d は、E-64-c のエステル体であることから生体内では速やかに加水分解され、E-64-c に代謝されるとされている。先に著者ら¹⁾は、E-64-c の急性毒性を報告しているが、E-64-d の毒性は E-64-c と質的な相違はないものと推察された。

結 語

E-64-d をマウスおよびラットに腹腔内、皮

下および経口投与し、その急性毒性を検討した。その結果、E-64-d のマウスおよびラットへの大量投与は投与部位の皮膚、腹腔内に局所的刺激を誘発するが、LD₅₀ 値は、いずれの投与経路においても 2,000 mg/kg 以上の値を示し、その毒性は弱いものと推察された。またマウスとラットの間に若干の種差が示唆されたが性差は認められなかった。

参 考 文 献

- 1) 大関正弘：E-64-c の急性毒性および亜急性毒性に関する研究，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，今堀班，昭和55年度研究報告書，p.99, 1981.

4. E-64-d の亜急性毒性に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 中 根 貞 雄* 樽 本 保 男* 大 島 隆*
木 村 正 明* 森 泉 高 弘* 八 木 健 一*
河 西 章* 阪 川 隆 司* 筒 井 良 文*

I. ハムスター

目 的

E-64-d の安全性研究の一環として、ハムスターに14日間 E-64-d を経口投与し、その亜急性毒性を検討する。

方 法

1. 動 物

6週令の雄性ゴールデンハムスター（静動協：体重 80~100g）を1週間の予備飼育後、1群10匹あて群別し実験に供した。動物は温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ のオープンシステムの動物舎内で飼育し、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. 投与量および投与方法

E-64-d は水に難溶性のため5%アラビアゴム水溶液に懸濁し投与量を500および1,000mg/kgとし、投与容量を体重100gあたり各々0.5mlとして1日1回定時に14日間連続経口投与した。対照群には5%アラビアゴム水溶液を同様に投与した。

3. 検査項目

(1) 一般症状および体重

毎日一般症状の観察および体重測定を行った。

(2) 血液学的検査

14日間の投与終了後、ペントバルビタール軽麻酔下で外腸骨静脈より採血し、自動血球分析装置（コールターカウンター SP 型）により赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数および白血球数を測定した。

(3) 血液生化学的検査

外腸骨動・静脈より採取した新鮮血の遠心分離血清についてオートアナライザー（日立分析装置712型）を用い、血糖量（ブドウ糖酸化法）、総蛋白量（Biuret 法）、アルブミン量（BCG 法）、A/G 比（アルブミン量/総蛋白量-アルブミン量）、総コレステロール量（酵素法）、尿素窒素量（Urease-Indophenol 法）、クレアチニン量（Jaffe 変法）、GOT・GPT 活性（UV 法）、ALP 活性（Kind-King 変法）、LDH 活性（UV 法）、CPK 活性（Oliver 変法）、無機リン量（Fiske-Subbarow 法）を測定し、さらに Na, K 量（炎光法-島津原子吸光 AA-650）についても測定した。

(4) 尿検査

投与終了後の強制排泄尿について糖、蛋白、pH、ケトン体および潜血反応（ラプスティックス-日本エームス社）の半定量的検査を行った。

(5) 病理学的検査

投与終了後、外観の肉眼的観察を行い、その

* 大正製薬株式会社総合研究所

後ペントバルビタール軽麻酔下で外腸骨動・静脈切断により放血致死させ、開胸腹して内部諸臓器を観察し、摘出した心、肺、肝、腎、副腎、脾、腸間膜リンパ節、胸腺、精巣および精巣上体について重量測定した。

心、肺、肝、腎、副腎、脾、腸間膜リンパ節、胸腺、精巣、精巣上体、胃、十二指腸、大腿筋および投与部皮膚については10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従って切片を作製し、H. E. 染色を施し病理組織学的検索を行った。

(6) 推計学的処理

各測定値は平均値およびその標準偏差を求め、t-検定により対照群と投与群の平均値の差の有意性を検討した。

結 果

1. 一般症状および体重変動

投与期間中特記すべき症状、死亡例の発現は観察されなかった。

体重変動を図1に示す。

対照群の推移に比べて500 mg/kg ではやや上昇、1,000 mg/kg では下降の傾向を示したが、統計的に有意な差はみられず、体重への明らかな影響は認められなかった。

2. 血液学的検査

血液学的検査所見を表1に示す。

500, 1,000 mg/kg ともに赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の減少傾向がみられた。

3. 血液生化学的検査

血液生化学的検査所見を表2に示す。

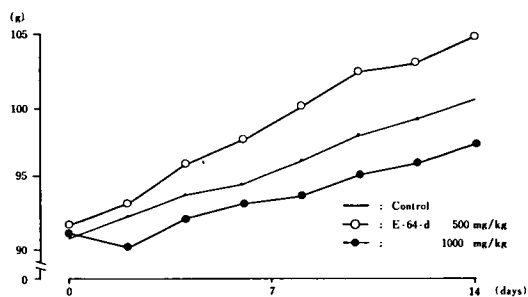


図1 ハムスター亜急性毒性試験における体重変化

500, 1,000 mg/kg に総コレステロール量の増加、1,000 mg/kg に尿素窒素量の減少が認められたが、その他の項目に著変はみられなかった。

4. 尿検査

尿検査所見を表3に示す。

いずれの投与群においても著変は認められなかった。

5. 病理学的検査

剖検所見の主なものとして1,000 mg/kg に腎の軽度腫脹と褪色、肝の軽度腫脹が観察された。

各臓器の絶対重量を表4、相対重量を表5に示す。

500, 1,000 mg/kg ともに肝および腎重量の増加がみられた。

病理組織学的検査所見を表6に示す。

E-64-d 投与に関連した組織変化が主として腎および肝に観察された。腎の主要変化は皮質域を中心とした尿細管上皮の硝子滴沈着であった。該硝子滴は Weigert の線維素染色で陽性

表1 ハムスター亜急性毒性試験における血液学的検査所見

Groups	Control	E-64-d	
		500 mg/kg	1,000 mg/kg
Erythrocytes ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	940 \pm 40	876 \pm 61 ↓	877 \pm 55 ↓
Hemoglobin (g/dl)	18.6 \pm 0.6	17.6 \pm 1.3	17.6 \pm 1.1 ↓
Hematocrit (%)	56.2 \pm 2.6	52.5 \pm 3.7 ↓	52.3 \pm 3.5 ↓
Platelets ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	443 \pm 60	485 \pm 36	520 \pm 95
Leucocytes ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	65 \pm 13	73 \pm 28	56 \pm 20

Mean \pm S. D. ↓: $p < 0.05$

4. E-64-d の亜急性毒性に関する研究

表2 ハムスター亜急性毒性試験における血液生化学的検査所見

Groups	Control	E-64-d	
		500 mg/kg	1,000 mg/kg
No. of animals	10	10	10
Glu (mg/dl)	141.4 ± 24.9	160.8 ± 23.0	149.3 ± 30.2
TP (g/dl)	6.01 ± 0.34	6.02 ± 0.35	6.16 ± 0.37
Alb (g/dl)	2.49 ± 0.13	2.46 ± 0.15	2.56 ± 0.28
A/G	0.70 ± 0.01	0.69 ± 0.03	0.70 ± 0.03
BUN (mg/dl)	27.4 ± 1.9	24.7 ± 1.9	23.9 ± 2.7↓↓
Cre (mg/dl)	0.34 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0.37 ± 0.09
T-Cho (mg/dl)	159.2 ± 17.2	203.4 ± 35.6↑↑	223.2 ± 51.5↑↑
GOT (K-U)	113.9 ± 91.8	121.1 ± 68.0	137.1 ± 85.2
GPT (K-U)	45.8 ± 18.6	51.0 ± 18.9	40.1 ± 16.0
CPK (I-U)	3,609 ± 2,599	9,579 ± 5,557	10,599 ± 9,154
ALP (K.A-U)	22.1 ± 1.5	21.7 ± 2.7	20.9 ± 5.4
LDH (I-U)	506.9 ± 379.2	587.0 ± 302.6	629.8 ± 462.6
IP (mg/dl)	5.79 ± 0.54	6.78 ± 0.93	7.14 ± 1.92↑
Na (mEq/l)	147.6 ± 3.8	146.2 ± 1.8	145.6 ± 3.7
K (mEq/l)	7.28 ± 0.72	8.37 ± 0.90	8.80 ± 2.09

Mean ± S. D. ↑: p<0.05 ↑↑, ↓↓: p<0.01

表3 ハムスター亜急性毒性試験における尿検査所見

Groups	Control	E-64-d	
		500 mg/kg	1,000mg/kg
No. of animals	10	10	10
Glucose	9	10	10
Protein	1		
pH	10	10	10
	6.5	1	
	7.5	2	1
	8.0	8	9
	8.5	2	
Ketone bodys	9	10	10
	1		
Occult blood	10	10	10
	+		

反応を示す微細顆粒としてみられ、500 mg/kg では軽度、1,000 mg/kg では中等度に観察された。肝では対照群において小葉中心性の肝細胞に限定した中等度の脂肪沈着が認められ、500, 1,000 mg/kg ではいずれもその沈着程度

が減弱されて観察された。

なお、一部の例に気管支炎、肺炎および精細管の萎縮、精子形成不全がみられたが、その他の臓器においては注目すべき組織変化は認められなかった。

