

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58年度研究報告書

班長 今堀和友

昭和59年3月

ま え が き

難病治療薬 (E-64) の開発研究も、開始以来 5 年を経過し、後一年を残すのみとなった。それだけに、この一年間においては、総仕上げのための追込みが急ピッチに進んだ印象がある。

基礎的な面でいうならば、筋ジストロフィーの発症に関与と思われる、カルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) の遺伝子のクローニング、それによる一次構造の決定が一挙に完了したことである。これによって、E-64 の作用機作の研究が一段と飛躍することが期待される。

モデル疾患動物に対する E-64-d (EST) の効果に関しては、前年からのハムスターに関してさらに詳細な検討がなされた他、ジストロフィーマウスに関しても投与により、自発運動の改善、平均寿命の延長がみられたのである。

臨床研究に関しても長足の進歩がなされた。昨年度に開始された第一相臨床試験は本年度において、1日3回、7日間の連投をも含む試験を終え、第二相臨床試験の前半をも終えるまでに至った。

組織の発足以来、本研究は十分な基礎固めの上に立った上で開発応用研究へと向ってきた。一年後に控えた、臨床応用の可能性の判定がどうでるにせよ、我々のとった道筋は誤っていなかったと思うし、研究によって得た所は少なくなかったと信じている。

最後に本研究に多大の援助を賜った厚生省薬務局の方々、研究に努力を傾注された班員の諸兄、さらに本年度よりの第二相臨床試験に献身的に協力賜った、国立療養所東埼玉病院、同新潟病院の方々に心からなる感謝を捧げるものである。

班長 今 堀 和 友

目 次

まえがき

I E-64 類縁体の開発

1. EST 製造法の検討 沢田 二郎 9
2. EST 原体の規格および試験方法の設定 沢田 二郎 13
3. EST の慢性毒性に関する研究 大関 正弘 19
4. EST の生殖に及ぼす影響 大関 正弘 41
5. EST のマウス骨髄細胞染色体異常試験 大関 正弘 59
6. EST の局所刺激に関する研究 大関 正弘 63
7. EST の一般薬理作用 福原 武彦 65
8. エポキシコハク酸 1,4-¹⁴C 標識体を用いた EST の
ラットにおける生体内動態 大関 正弘 75

II 酵素レベルでの効果

9. カルシウム高感受性および低感受性カルシウム依存性
中性プロテアーゼ 今堀 和友 87
10. カルシウムプロテアーゼの機能発現機構 鈴木 紘一 91
11. カルシウムプロテアーゼと細胞情報の受容伝達 西塚 泰美 95
12. 高分子量不活性型多重機能プロテアーゼ 市原 明 101

III 細胞・組織レベルでの効果

13. ニューロフィラメント変性とプロテアーゼ—統報— 杉田 秀夫 115
14. ハムスター培養筋の Z 帯変性に対する E-64-c の作用 小沢鏝二郎 121
15. 実験的急性筋崩壊に対する EST の効果 石浦 章一 127
16. 高感度免疫転写法を用いた血清中の α -アクチニンの検出 野々村禎昭 131

IV 個体レベルでの効果

17. ジストロフィーハムスターのカテプシン B & L に対する
EST の効果 勝沼 信彦 139
18. 筋ジストロフィーハムスター (UM-X 7.1) の骨格筋に対する
EST での治療効果——¹H-NMR による観察 宮武 正 145
19. 筋ジストロフィーハムスターの移植筋の再生および
アミノ酸代謝に及ぼす EST の効果 寺尾 寿夫 149
20. ハムスター心筋症発生機序の解明および
その抑制に関する研究 柴田 宣彦 155
21. EST の肝薬物代謝酵素ならびにグルタチオン関連酵素
に対する影響 北川 晴雄 165
22. 筋ジストロフィーハムスターにおける EST の薬効
に関する研究 大関 正弘 171
23. 筋ジストロフィーマウスにおける EST の効果
に関する研究 大関 正弘 183

V 臨床試験

24. EST の第 1 相臨床試験—続報— 宮原 正 193
25. EST の早期第 2 相臨床試験 杉田 秀夫 217
宮武 正

I E-64 類縁体の開発

1. EST 製造法の検討 沢田 二郎
2. EST 原体の規格および試験方法の設定 沢田 二郎
3. EST の慢性毒性に関する研究 大関 正弘
4. EST の生殖に及ぼす影響 大関 正弘
5. EST のマウス骨髄細胞染色体異常試験 大関 正弘
6. EST の局所刺激に関する研究 大関 正弘
7. EST の一般薬理作用 福原 武彦
8. エポキシコハク酸 1,4-¹⁴C 標識体を用いた EST のラットにおける
生体内動態 大関 正弘

1. EST 製造法の検討

沢田 二郎*

研究協力者 曾田 馨* 渡辺 慶昭* 横尾 千尋*
小 熊 清 司* 村 田 充 男*

目 的

本年度我々は、高品質の EST を、大量に安定供給する事が可能な、実用的製造法の確立を目的に、従来よりの製造法を基本とし、さらに以下に述べる項目につき、改良検討を実施した。

1. L-アルギニンを用いた光学分割法¹⁾により得られる中間体：L-トランス-エポキシコハク酸 (L-t-ES) ジエチルエステルの光学純度の改善。
2. 中間体：Boc-L-ロイシルイソアミルアミドの簡便な製造法の検討。
3. EST 製造の最終工程において、副生成物が少なく、精製が容易な製法の検討。

方 法

1. L-t-ES ジエチルエステルの光学純度の改善

G. B. Payne らの方法²⁾に準じてフマル酸より得た DL-t-ES を用い、既報の方法¹⁾に従って、L-t-ES と L-アルギニンのジアステレオマー塩を形成した後、直接エステル化を行った。

この際、ジアステレオマー塩を再結晶することにより、L-t-ES ジエチルエステルの光学純度を向上させることを検討した。

2. Boc-L-ロイシルイソアミルアミドの製造法の検討

Boc-L-ロイシン 1 水和物 と イソアミルアミン (IAA) を、種々の方法で縮合し、副生成物の

有無、収率等を比較検討した。また、最も好結果を与えた方法については、さらに当量関係の検討も行った。

3. EST 製造の最終工程の改良検討

L-t-ES モノエチルエステルと p-ニトロフェノールを縮合して活性エステル体とし、これを単離精製後、L-ロイシルイソアミルアミドと反応させることにより EST を製造する方法を検討した。また、得られた EST について、収率、純度を、従来法による場合と比較した。

結果および考察

1. L-t-ES ジエチルエステルの光学純度の改善

光学純度は、得られた L-t-ES ジエチルエステルの比旋光度と、文献上の最高値である +114.7°³⁾ から求めた光学収率を用いて表わした。

図 1 に示すように、DL-t-ES から L-t-ES と L-アルギニンのジアステレオマー塩を形成し、未精製のままエステル化した場合、L-t-ES ジエチルエステルの比旋光度は +98.8° で、光学収率は 86.1% であった。ところが、このジアステレオマー塩を、水-メタノール (2:1) より再結晶することにより、L-t-ES ジエチルエステルの比旋光度は +109.3° となり、光学収率を 95.3% に向上させることができた。

通算収率は若干低下したが、L-t-ES ジエチルエステルの光学純度は、EST の純度および最終工程の収率に大きく影響するため、この時点で光学純度を向上させることができたこと

* 大正製薬株式会社総合研究所

I E-64 類縁体の開発

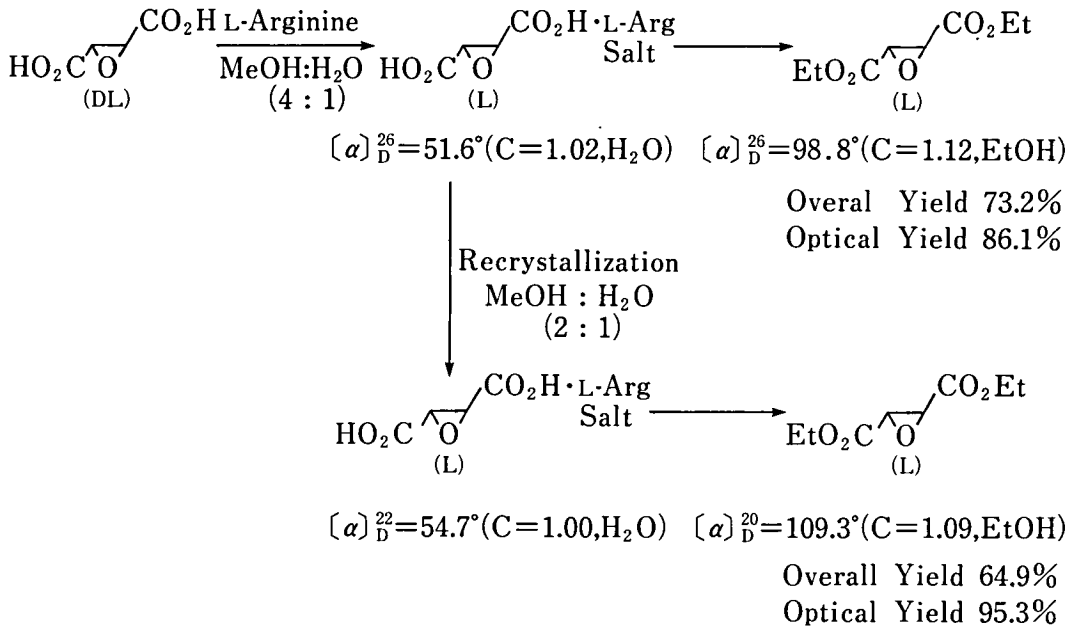
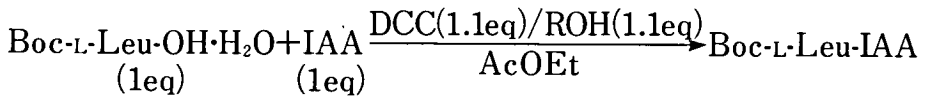
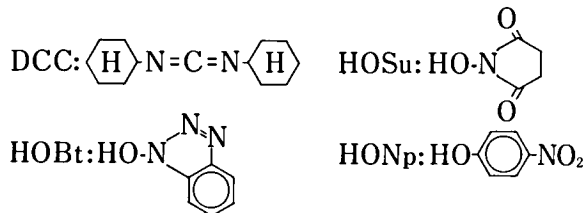


図1 L-t-ES ジエチルエステルの光学純度の改善

表1 Boc-L-ロイシルイソアミルアミドの製造法の検討 (1)

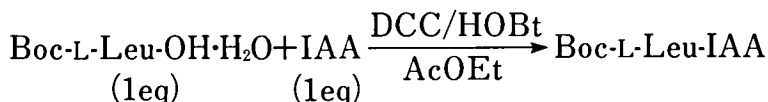


	ROH	Yield(%)
1	—	15.6
2	HONp	73.8
3	HOSu	79.3
4	HOBt	96.3



1. EST 製造法の検討

表2 Boc-L-ロイシリンイソアミドの製造法の検討 (2)



	DCC(eq)	HOBt(eq)	Yield(%)
1	1.1	1.1	96.3
2	1.0	1.0	95.3

A

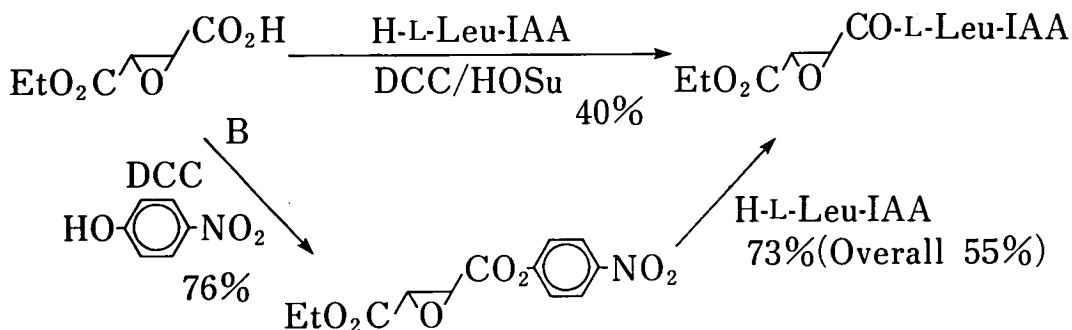


図2 EST 製造の最終工程の改良

は、極めて有利であると考えられる。

2. Boc-L-ロイシリンイソアミドの製造法の検討

Boc-L-ロイシン 1水和物とイソアミドを、表1に示すような4種類の方法によって縮合してみた。その結果、DCC/HOBt法が極めて収率が良く、副生成物も無いことから、得られたBoc-L-ロイシリンイソアミドは未精製でも十分に使用できることが明らかとなった。

そこで、次にDCC, HOBtの使用量を、1.1当量から1当量に減らしてみたが、表2に示す通り、同等の収率で良好な結果が得られた。以上の結果から、大量製造においては、DCC/HOBt法を用いることにした。

3. EST 製造の最終工程の改良検討

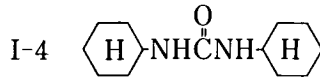
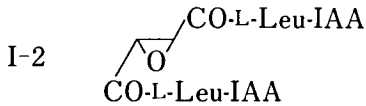
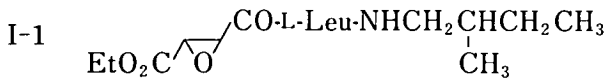
従来は、L-t-ESモノエチルエステルとL-ロ

イシリンイソアミドを、図2-Aに示すように直接縮合していたが、副生成物が多く、得られたESTの純度が低いため、精製を繰り返す必要があった。また、このため収率もかなり低下していた。

そこで、副生成物が少なく、精製が容易な縮合方法を検討した結果、図2-Bに示すような活性エステル体を経由する方法が、極めて優れていることを見出すことができた。すなわち、L-t-ESモノエチルエステルを、一旦、活性エステル体であるp-ニトロフェニルエステルに導き精製した後、L-ロイシリンイソアミドと反応させることにより、従来よりも高品質のESTを、安定して得ることに成功した。また、収率も従来法より向上した。

表3 EST の純度

Method	EST	HPLC(%)		
		I-1	I-2	I-4
A	96.8	0.5	0.8	1.9
B	99.3	0.5	0.2	0



得られた EST の純度は、高速液体クロマトグラフィー法によって測定したが、その結果を表3に示す。

従来法をA法、改良法をB法としたが、不純物 I-1 は、使用するイソアミルアミンの純度に由来するため変化は認められなかった。しかし、不純物 I-2、I-4 に関しては大幅な減少が認められ、その結果 EST 本体の純度は99.3%に向上した。

このように、EST の製造において、最も大きな問題点があると考えられた最終工程を改良できたことにより、従来よりも大幅なスケールアップが可能となった。

結 論

本年度我々は、EST 製造法に関して改良検討を行い、次のような成果を得ることができた。

- (1) 中間体 L-t-ES ジエチルエステルはフマル酸を原料とする光学分割法を用い、L-t-ES と L-アルギニンのジアステレオマー塩を再結晶することにより、従来よりも光学純度が高く、高品質のものが得られるようになった。
- (2) 中間体 Boc-L-ロイシルイソアミルアミド

は、DCC/HOBt 法で製造することにより、未精製でも使用可能なものが得られるようになった。

- (3) EST の純度に大きく影響を与える最終工程を、p-ニトロフェノールを用いる活性エステル法に改良した結果、従来よりも高純度の EST を安定して得ることに成功した。

EST 製造法に関して、上記のような改良を行った結果、現在、kg スケールでのパイロット製造が可能となったので、本格的な大量製造の目処がついたものと考えている。

参考文献

- 1) 沢田二郎：E-64-d 製造法の検討，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，9-26，1983。
- 2) Payne, G. B. and Williams, P. H.: Reaction of Hydrogen Peroxide IV. Sodium tungstate catalyzed epoxidation of α, β -unsaturated acid, J. Org. Chem., 24, 54, 1959.
- 3) Seebach, D. and Wasmuth, D.: Herstellung von erythro-2-Hydroxybernstensäure-Derivaten aus Äpfelsäureester, Helv. Chim. Acta, 63, 197, 1980.

2. EST 原体の規格および試験方法の設定

沢 田 二 郎*

研究協力者 岬 哲 夫* 吉 田 継 親* 丸 田 忠 雄*
半 田 光 一* 田 中 唯 夫* 築 山 文 枝*

目 的

EST 原体¹⁾の品質確保のための暫定規格および試験方法を設定する。

方 法

1. 試料

本実験に用いた試料は大正製薬㈱で合成されたものである。表1に EST の構造式，化学名，分子式および分子量を示す。

2. 測定機器

EST 原体の規格 および試験方法の設定には以下の装置を用いた。

赤外吸収スペクトル：日本分光工業製 DS-701 G 型回析格子赤外分光光度計。

旋光度：日本分光工業製 DIP-4 型デジタル旋光計。

融点：ヤマト科学製 MP-21 型融点測定器。

高速液体クロマトグラフ：日立製作所製 655 型液体クロマトグラフ。

自動積分計：SIC システムインスツルメンツ製 SIC 7000 A 型データ処理装置。

3. 測定項目および方法

第十改正日本薬局方(以後日局と略す。)通則および一般試験法に準拠した。

結果および考察

1. 性状

原体5ロットについて観察した結果，全ロッ

ト結晶性の粉末であった。また，色，においおよび味については，全ロット白色でにおいはなく，味は初めないが後にわずかに苦かった。初め味がない理由としては，本品の溶解速度が遅いことによるものと考えられた。

溶解性については「局方記載の手引について」に記載の溶媒および本試験に用いる溶媒すべてについて測定した。結果は表2に示すとおりである。

2. 確認試験

確認試験(1)は，本品のエステル部分にヒドロキシルアミンを作用させ，生成するヒドロキサム酸に塩化第二鉄を加え，錯塩を形成させる呈色反応である。確認試験(2)は，本品を塩酸で加水分解後，生成するアミノ酸をニンヒドリンで発色させる呈色反応である。両法ともに操作が簡単で呈色も明瞭であり，確認試験法として利用可能であった。確認試験(3)は赤外吸収スペクトルを利用し，本品の特性波数を用いて確認する方法である(図1)。原体5ロットについて上記確認試験(1)(2)(3)を適用した結果，すべて陽性であった(表3)。

3. 旋光度

本品は3個の不斉炭素有し，光学活性を示す。鈴木²⁾の報告より，光学純度は薬理活性と相関があると考えられるので，旋光度を規定することは重要である。旋光度測定には濃度および温度が影響するので，これらについて検討した。結果は表4に示すとおりで，濃度0.5~2.0%，温度15~25°の範囲では，ほぼ一定の比旋

* 大正製薬株式会社総合研究所

I E-64 類縁体の開発

表1 ESTの化学名, 構造式, 分子式および分子量

Chemical Name : Ethyl (2 s, 3 s)-3 [(S)-3-methyl-1-(3-methylbutylcarbamoyl) butylcarbamoyl] oxirane-2-carboxylate

Structural Formula :

Molecular Formula : C₁₇H₃₃N₂O₅
Molecular Weight : 342.43

表2 各種溶媒に対する溶解性

Solvents	Solubility at 20°C Solvent (ml)/Solute (lg)	Description Term in J. P. X
Methanol	5	Freely soluble
Dehydrated Ethanol	9	Freely soluble
Ethanol	10	Soluble
Acetone	13	Soluble
Ether	1,420	Very slightly soluble
Water	>10,000	Practically insoluble

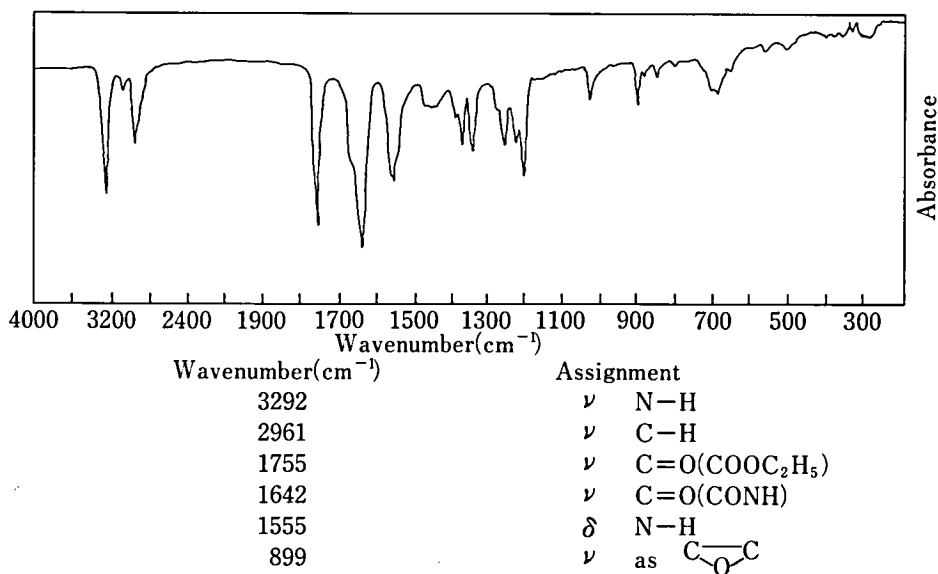


図1 確認試験(3)赤外吸収スペクトル

表3 性状および確認試験(1)(2)(3)の測定結果

Items	Lot	A	B	C	D	E
	Description		+	+	+	+
Identification	(1)	+	+	+	+	+
	(2)	+	+	+	+	+
	(3)	+	+	+	+	+

+ : Positive

2. EST 原体の規格および試験方法の設定

表4 旋光度測定条件の検討

温度の影響				EST 濃度の影響					
No	Temp.	15°	20°	25°	No	Conc.	0.5%	1.0%	2.0%
1		+51.7°	+52.4°	+51.5°	1		+52.7°	+51.9°	+51.4°
2		+51.6°	+51.8°	+52.2°	2		+52.5°	+50.9°	+50.8°
Av.		+51.7°	+52.1°	+51.9°	Av.		+52.6°	+51.4°	+51.1°

表5 旋光度の測定結果

Optical Rotation	Lot					Av.	CV.	Specification
	A	B	C	D	E			
$[\alpha]_D^{20}$	+51.7°	+52.1°	+52.1°	+52.7°	+52.4°	+52.2°	0.7%	+49~+54°

(0.1 g, Dehydrated Ethanol, 10 ml, 100 mm)

表6 融点, 純度試験(1)(2)(3), 乾燥減量および強熱残分の測定結果

Items	Specifications	Lot				
		A	B	C	D	E
Melting Point (°C)	123~127°	125.9	125.8	125.9	125.9	125.5
Purity:						
(1) Chloride (%)	<0.012			Not more than 0.0095		
(2) Heavy Metals (ppm)	<10			Not more than 2		
(3) Arsenic (ppm)	<2			Not more than 0.5		
Loss on Drying (%)	<0.30	0.05	0	0	0.05	0.07
Residue on Ignition (%)	<0.10	0.04	0.04	0	0.04	0.02

光度が得られたので、測定条件としては EST 濃度 1%, 測定温度 20° とした。

原体 5 ロットをこの条件で測定した結果、各ロットとも +52° 前後の旋光度を示した (表 5)。この結果より規格範囲は平均値およびロット間のバラツキを考慮し、+49~+54° と定めた。

4. 融点

日局一般試験法により測定した結果、本品 5 ロットの実測値は 125.5~125.9° の範囲内であった。この結果より、規格範囲としては実測値および日局を参考にして 123~127° と定めた (表 6)。

5. 純度試験

合成過程で塩酸を使用していることから塩化物の定性反応ならびに常法に従い重金属およびヒ素の試験法を設定し、それぞれ純度試験(1)(2)(3)とした。

純度試験(1)~(3)の原体 5 ロットの試験結果は表 6 に示すとおりで、いずれもほとんど検出されなかった。それぞれの規格は実測値、検出限界および日局各条の規格を考慮して設定した。

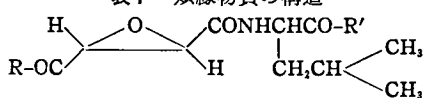
なお、副生成物を規制することを目的として、類縁物質の検出法を検討中である。類縁物質としては、合成時の副生成物、合成原料等、表 7 に示す 5 物質が考えられ、現在高速液体クロマトグラフ法 (HPLC 法) を用いて試験中である。

6. 乾燥減量

本品は熱に安定であることから乾燥温度は 105° とし、0.5~3 時間の範囲内で乾燥減量を測定したところ、どの時間においてもほとんど減量は認められず、本品はほとんど吸湿性がないものと考えられた。測定条件としては 105°, 2 時間とし、限度値は日局各条の規格を参考として 0.30% 以下と定めた (表 6)。

I E-64 類縁体の開発

表7 類縁物質の構造



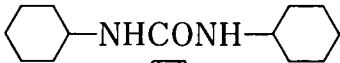
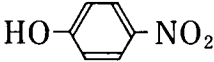
No	Structures	
EST	R: -OC ₂ H ₅	R': -NHCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂
I-1	R: -OC ₂ H ₅	R': -NHCH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
I-2	R: -NHCHCONHCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	R': -NHCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂
I-3	R: -OH	R': -NHCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂
I-4		
I-5		

表8 定量値に及ぼすアルカリ反応温度及び時間の影響

Temp. (°C)	Room Temp.		Reflux (80-85°C)		
	10	60	10	20	30
Time (min)					
Found (%)	100.1	100.6	100.1	99.3	99.1

表9 定量法の精度および再現性

No	1	2	3	4	5	6	7	Av.	CV.
Found (%)	99.8	99.4	100.1	99.9	100.1	99.7	99.5	99.8	0.3

表10 原体5ロットの定量結果 (%)

Lot	A	B	C	D	E
1	100.1	100.6	100.8	99.9	99.8
2	101.3	100.4	100.8	99.9	99.7
3	99.8	100.1	100.6	100.1	99.6
Av.	100.4	100.4	100.7	100.0	99.7
CV.	0.8	0.3	0.1	0.1	0.1

Total Av. \bar{x}_{15} = 100.2% SD = 0.5

7. 強熱残分

日局一般試験法に従って測定した結果、強熱残分はほとんど認められなかった。

限度値としては、日局各条の規格を参考として0.10%以下と定めた(表6)。

8. 定量法

定量法としては、絶対量を測定する目的で滴定法を検討した。本法はESTのエステル部分にアルカリを反応させた後、過剰のアルカリを

塩酸で逆滴定する方法である。初めにアルカリとの反応温度および時間について検討した。結果は表8に示すとおりで、室温10分および60分ならびに80°で10~30分のいずれの条件でも100%近い定量値が得られた。従って、反応条件としては最も操作が簡単で緩和な条件である室温10分間と定めた。

本法での繰り返し定量を行った結果は表9に示すとおりで、平均値 \bar{x}_7 = 99.8%, 変動係数

2. EST 原体の規格および試験方法の設定

(CV) 0.3% と良好な値が得られた。

以上の結果から、本法は簡単で実用性のある方法と判断し、定量法として採用した。次に本法を用いて原体5ロットを定量した結果、総平均値 $\bar{x}_{15}=100.2\%$ 、標準偏差 (SD) 0.5 であったので含量規格としては $\bar{x}_{15} \pm 3SD$ (100.2 ± 1.5) を考慮し、98.0~102.0% に暫定的に設定した (表10)。

9. 暫定規格および試験方法

1~8の検討結果より、原体の暫定規格および試験方法を以下のように設定した。

本品を乾燥したものは定量するとき、EST ($C_{17}H_{30}N_2O_5$) 98.0~102.0% を含む。

性状 本品は白色の結晶性粉末で、においはなく、味は初めないが、後にわずかに苦い。

本品はメタノールまたは無水エタノールに溶けやすく、エタノールまたはアセトンにやや溶けやすく、エーテルに極めて溶けにくく、水にほとんど溶けない。

確認試験 (1)本品 0.1g に水酸化カリウム・エタノール試液 5ml および塩酸ヒドロキシルアミンの飽和エタノール溶液 5ml を加え、10分間加熱する。冷後、希塩酸 3ml および塩化第二鉄試液5滴を加えるとき、液は赤褐色~暗紫色を呈する。

(2) 本品 0.02g をとり、5N 塩酸試液 5ml を加え、還流冷却器を付け1時間加熱する。冷後、5N 水酸化ナトリウム水溶液約 5ml を加えて pH を 6~9 に調整後、ニンヒドリン試液 5ml を加え、水浴中で時々振り混ぜながら10分間加熱するとき、液は青紫色を呈する。

(3) 本品を乾燥後、1~2mg をとり、赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法によって測定するとき、 $3,292\text{ cm}^{-1}$ 、 $2,961\text{ cm}^{-1}$ 、 $1,755\text{ cm}^{-1}$ 、 $1,642\text{ cm}^{-1}$ 、 $1,555\text{ cm}^{-1}$ および 899 cm^{-1} 付近に吸収を認める。

旋光度 $[\alpha]_D^{20}$: +49~+54° (乾燥後、0.1g、無水エタノール、10ml、100mm)。

融点 123~127°。

純度試験 (1) 塩化物 本品 0.3g にアセトン 30ml を加えて溶かし、希硝酸 6ml および

水を加えて 50ml とする。これを検液とし試験を行う。比較液は 0.01N 塩酸 0.10ml にアセトン 30ml、希硝酸 6ml および水を加えて 50ml とする (0.012% 以下)。

(2) 重金属 本品 1.0g をとり、第2法により操作し、試験を行う。比較液には鉛標準液 1.0ml を加える (10ppm 以下)。

(3) ヒ素 本品 1.0g をとり、第3法により検液を調製し、装置Bを用いる方法により試験を行う (2ppm 以下)。

(4) 類縁物質 本項目については現在検討中である。

乾燥減量 0.30% 以下 (1g、105°、2時間)。

強熱残分 0.10% 以下 (1g)。

定量法 本品を乾燥し、その約 0.8g を精密に量り、正確に 0.1N 水酸化カリウム・エタノール液 50ml を加えて溶かし、約 10分間放置後、0.1N 塩酸で滴定する。(指示薬フェノールフタレイン試液3滴)。同様の方法で空試験を行う。

0.1N 水酸化カリウム・エタノール液 1ml = 34.243mg ($C_{17}H_{30}N_2O_5$)

貯法 シャ光した気密容器。

結 論

EST 原体の品質を保証するために、規格および試験方法の検討を行った。

その結果は次のように要約される。

1. 本品の確認試験法としては、2種類の呈色反応と特性波数を用いる赤外吸収スペクトル法を設定した。
2. 本品は結晶性の粉末で、光学活性体であることから、示性値として融点および旋光度の規格を設定した。
3. 本品の純度試験項目としては塩化物、重金属およびヒ素の限度値を設定し、この他に不純物含量を規制する目的で、HPLC 法による限度値の設定を検討している。
4. 本品の定量法としては、操作が簡便で絶対量を測定する滴定法を設定した。
5. 本品5ロットについて、今回設定した暫定規格および試験方法を適用した結果、全ロッ

I E-64 類縁体の開発

ト規格内であったが、今後さらに詳細な検討を進める予定である。

参考文献

1) 沢田二郎 : E-64-d の物理化学的性質および製剤化の検討, 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」昭和57年度研究報告書, 9-23, 1982.

2) Suzuki, K. : Reaction of calcium-activated neutral protease (CANP) with an epoxysuccinyl derivative (E-64-c) and iodoacetic acid, *J. Biochem.*, **93**, 1305-1312, 1983.

3. EST の慢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* 阪 川 隆 司* 筒 井 良 文*
渡 辺 隆* 川 西 正 彦* 長 戸 千 裕*

I. ラ ッ ト

目 的

EST の安全性研究の一環として、ラットに 6 ヶ月間 EST を経口投与し、その毒性ならびに回復性を検討する。

方 法

1. 動物

6 週令の Wistar 系雌雄ラット（静動協：体重雄 191~220 g, 雌 123~136 g）を約 1 週間予備飼育後、1 群 15~22 匹（回復性を検討する動物を含む）あて群分けして実験に使用した。動物は、空調を施したバリエーションシステムの動物室で個別に飼育し、飼料（MF：オリエンタル酵母社製）と水は自由に摂取させた。

2. 投与量および投与方法

EST は水に難溶であるため 5%アラビアゴム水溶液で懸濁した。投与量は、2, 10 および 50 mg/kg とし、投与方法は経口投与として、投与開始後 5 週目までは毎日、6 週以降は、1 週 6 回投与を行った。対照には、5%アラビアゴム水溶液を同様に投与した。

3. 検査項目

(1) 一般状態および死亡状況

投与期間中は投与時、休薬期間中は 1 週 1 回、

死亡の有無および一般状態を観察した。

(2) 体重

投与期間中は投与 5 週目までは 1 週 2 回、それ以降および休薬期間中は 1 週 1 回体重を測定した。

(3) 摂食量および摂水量

投与期間中は投与 13 週までは、1 週 1 回、それ以降および休薬期間中は 2 週に 1 回摂食量および摂水量を測定した。

(4) 血液学的検査

投与および休薬期間終了後、エーテル軽麻酔下に大腿静脈より採取した EDTA・2K 加血液について、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数、白血球数、MCV, MCH および MCHC (Coulter counter model S plus, Coulter electronics INC.), 白血球百分率および網赤血球数 (Hematrak 480, Geometric data corporation), 赤血球膜抵抗 (C. P. C. system, 三鬼エンジニアリング株式会社) を、またクエン酸ナトリウム処理により得た血漿について、プロトロンビン時間 (Clotek system, Hyland division travenol laboratories INC.) を検査した。

(5) 血液生化学的検査

血液学的検査用試料の採取後、大腿動脈および静脈切断により採血し、遠心分離 (3,000 rpm, 15 分間) した血清について、血糖 (酵素法)、

* 大正製薬株式会社総合研究所

総蛋白質（ビウレット法），アルブミン（BCG法），尿素窒素（酵素法），クレアチニン（Jaffé法），総ビリルビン（Jendrassik-Cleghorn法），総コレステロール（酵素法），トリグリセライド（GPO-MEHA法），GOT（UV法），GPT（UV法），ALP（Kind-King変法），LDH（Wróblewski-La Due法），無機リン（モリブデンブルー直接法），リン脂質（酵素法），尿酸（酵素法），カルシウム（OCPC法），CPK（GSCC準拠法）を自動生化学分析装置（CL-12，島津製作所）により，またナトリウムおよびカリウムイオンをイオンメーター（CLM-101 CL，島津製作所）にて各々測定した。またA/G比を総蛋白質およびアルブミン量より算出した。

(6) 尿検査

投与開始の前日，投与100日目および182日目また休薬35日目の24時間蓄尿について，糖，蛋白，pH，ケトン体，潜血（ラプスティックスⅢ，マイルス三共株式会社）の半定量的検査を行った。

(7) 尿分析

投与開始の前日，投与100日目および182日目また休薬35日目の24時間蓄尿について，尿量を測定し，またクレアチニン（Jaffé法）を自動生化学分析装置（CL-12，島津製作所）により，ナトリウムおよびカリウムイオンをイオンメーター（CLM-101 CL，島津製作所）にて各々測定した。

(8) 病理解剖学的検査

投与および休薬期間終了後，エーテル軽麻酔下で，放血致死させ，開胸腹して，内部諸臓器を観察し摘出した。脳，心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓，腸間膜リンパ節，胸腺，下垂体，甲状腺，副腎，精巣，精巣上体，卵巣および子宮については重量を測定した。

これら諸臓器ならびに大腿骨，大腿骨骨髓，骨格筋，脊髄，膵臓，胃，十二指腸，回腸，結腸，皮膚，眼球，膀胱，前立腺，精のうおよび乳腺については10%中性緩衝ホルマリン液で固定後，常法に従い，パラフィン切片からH.E.染色標本を作成した。さらに肝臓と腎臓につい

ては，各群の約半数例にPAS染色およびOil red O染色を加え，また腎臓には全例Weigertのfibrinoid染色を施し，病理組織学的検査を実施した。

(9) 推計学的処理

各測定値は，対照群と投与群間で分散分析（F-検定）を行い，等分散の場合は，t-検定，不等分散の場合はAspin-Welch法によりそれぞれ有意性を検定した。

結 果

1. 一般状態および死亡状況観察

試験期間中，EST投与による死亡例は認められず，中毒症状も観察されなかったが，投与過誤により雄の対照群で2例，50 mg/kg群で1例が死亡した。

2. 体重，摂食量および摂水量

体重変動を図1に示した。体重は，雄の50 mg/kg群に投与19週以降，増加抑制が認められた。休薬期間中は，対照群と同様の推移を示した。

摂食量および摂水量は，投与および休薬期間中ともEST投与による変化は認められなかった。

3. 血液学的検査

血液学的検査結果を表1，2に示した。

投与期間終了時，雄において10 mg/kg以上の群にMCVの減少，50 mg/kg群に網状赤血球数の増加が認められたが，いずれも生理的範囲内の変動であった。

4. 血液生化学的検査

血液生化学的検査結果を表3，4に示した。

投与期間終了時，雄の2 mg/kg以上の群にGOT，GPT，LDHの増加，10 mg/kg以上の群にトリグリセライドの減少が認められた。雌では，10 mg/kg以上の群にGOT，GPTの増加が認められた。

その他の測定項目において種々の変化が認められたが，いずれも生理的範囲内にあり，意義ある変化とは思われなかった。休薬期間終了後上記変化のうち，雄でGOT，GPT，LDHの増加，雌でGPTの増加が継続して認められた。

3. EST の慢性毒性に関する研究

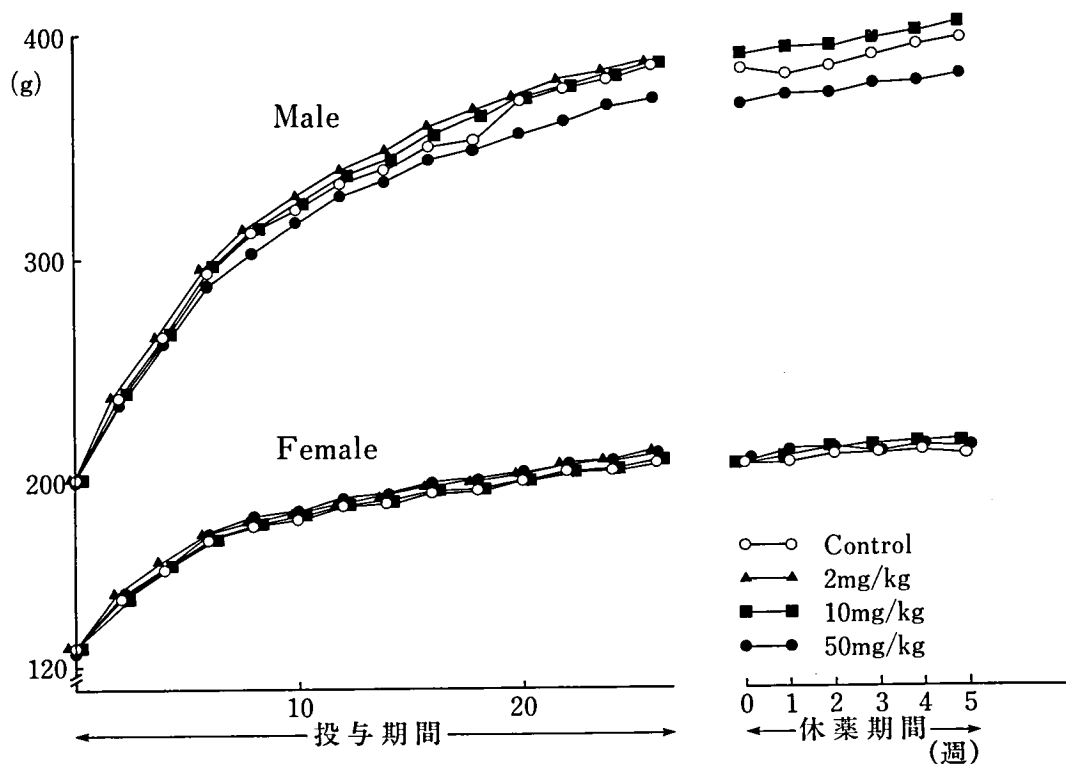


図1 ラット慢性毒性試験における体重変動

5. 尿検査および尿分析

尿検査および尿分析において EST による変化は認められなかった。

6. 病理学的検査

(1) 剖検所見

いずれの投与群においても著変は認められなかった。

(2) 臓器重量

絶対重量を表 5, 6 に, 相対重量を表 7, 8 に示した。

投与期間終了時, 絶対および相対重量において, 雄の 10 mg/kg 以上の群, 雌の 50 mg/kg 群に腎臓重量の増加が認められた。その他, 腸間膜リンパ節および精巣重量に変化が認められたが, いずれも一定の傾向が認められず, 投薬による影響ではないと思われた。

休薬期間終了後, 雌の 50 mg/kg 群において, 腎臓重量の増加が継続して認められた。

(3) 病理組織学的検査

EST 投与により, 肝臓および腎臓に組織変化が観察された。

肝臓: 投与期間終了時, 3 核以上の多核肝細胞が, 2 mg/kg 以上の群で多数出現し, 用量反応性に増加して認められた。また肝細胞の小域の増殖巣 (健常細胞よりも小型で, 胞体は塩基好性を示す) が, 雄の 10 mg/kg 以上の群に見られた (写真 1)。その他, 肝細胞の単細胞性あるいは, 小巣状性壊死が, 雄の 2 mg/kg 以上の群および雌の 50 mg/kg 群に散見された。

休薬期間終了後, 肝細胞の多核化と肝細胞の増殖巣が, 上記投与期間終了時とほぼ同等に観察されたが, 肝細胞の小巣状性壊死は, ほとんど認められなかった。

腎臓: 投与期間終了時, 雌雄とも 10 mg/kg 以上の群に, 尿細管上皮細胞に, 硝子滴沈着が用量反応性に増強して認められた (写真 2)。

休薬例においても, 上記変化が認められたが, 投与期間終了時と比較して, 軽減して観察され

表1 ラット慢性病毒性試験における血液学的検査所見 (雄)

Groups (mg/kg)	投与終了時			休業終了時				
	Control	2	15	10	50	Control	10	50
No. of animals	14	15	15	15	14	6	7	7
Erythrocytes (10 ⁶ /mm ³)	8.84±0.38	8.65±0.55	8.99±0.52	8.99±0.52	8.81±0.49	8.96±0.20	9.05±0.26	8.90±0.40
Hemoglobin (g/dl)	16.6±0.4	16.6±0.3	16.6±0.3	16.6±0.3	16.6±0.3	16.7±0.4	16.5±0.1	16.4±0.3
Hematocrit (%)	41.8±1.9	40.8±3.0	41.9±2.4	41.9±2.4	41.3±2.4	42.2±0.8	42.3±1.3	41.6±1.6
MCV	47.3±0.4	47.1±0.7	46.5±0.6**	46.5±0.6**	46.8±0.3**	47.1±0.6	46.7±0.5	46.7±0.4
MCH	18.8±0.9	19.3±1.2	18.5±1.2	18.5±1.2	18.9±1.0	18.6±0.2	18.3±0.5	18.5±0.6
MCHC	39.7±2.0	41.0±2.8	39.7±2.5	39.7±2.5	40.4±2.2	39.5±0.5	39.1±1.2	39.6±0.9
Reticulocytes (%)	7±3	8±4	9±4	9±4	10±4**	11±5	14±4	15±2
Platelets (10 ³ /mm ³)	789±104	795±88	760±67	760±67	796±83	738±60	729±67	721±36
Leucocytes (10 ³ /mm ³)	7.0±0.9	7.2±0.8	7.3±0.7	7.3±0.7	7.2±0.8	7.5±0.6	7.4±0.6	6.7±0.8
Hemogram (%)								
Eosinophils	0.8 (0.0-2.0)	1.0 (0.0-3.0)	1.7 (0.0-4.0)	1.7 (0.0-4.0)	1.1 (0.0-3.0)	1.7 (1.0-3.0)	0.7 (0.0-2.0)	1.0 (0.0-2.0)
Basophils	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Neutrophils (seg.)	28.4 (16.0-39.0)	29.3 (19.0-38.0)	26.6 (12.0-44.0)	26.6 (12.0-44.0)	25.9 (6.0-39.0)	16.5 (11.0-25.0)	20.1 (10.0-31.0)	21.6 (14.0-33.0)
Neutrophils (stab.)	0.2 (0.0-1.0)	0.1 (0.0-1.0)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Monocytes	7.3 (2.0-12.0)	6.3 (2.0-10.0)	8.7 (3.0-18.0)	8.7 (3.0-18.0)	7.4 (3.0-12.0)	8.3 (6.0-11.0)	9.1 (7.0-11.0)	7.6 (3.0-14.0)
Lymphocytes	63.3 (48.0-76.0)	63.3 (54.0-70.0)	63.1 (45.0-79.0)	63.1 (45.0-79.0)	65.7 (49.0-90.0)	73.1(6) (67.0-80.0)	70.0 (59.0-82.0)	69.9 (60.0-76.0)
Others	0.6 (0.0-1.0)	0.5 (0.0-3.0)	0.2 (0.0-1.0)	0.2 (0.0-1.0)	0.6 (0.0-2.0)	0.3 (0.0-1.0)	0.4 (0.0-2.0)	0.0
Erythrocyte resistance								
HSP (mOsm)	119.1 (112.0-126.0)	-	-	-	116.3 (110.0-123.0)	117.0 (115.0-120.0)	-	115.7 (109.0-119.0)
HEP (mOsm)	73.4 (68.0-79.0)	-	-	-	72.1 (68.0-78.0)	72.7 (70.0-75.0)	-	72.1 (70.0-76.0)
HMP (mOsm)	99.9 (94.0-107.0)	-	-	-	96.8 (92.0-101.0)	99.0 (92.0-103.0)	-	98.1 (96.0-100.0)
Range (mOsm)	45.6 (41.0-52.0)	-	-	-	44.2 (42.0-48.0)	44.3 (42.0-46.0)	-	43.6 (38.0-48.0)
Prothrombin time (sec.)	12.6±0.6	12.6±0.7	12.0±0.7	12.0±0.7	12.7±0.8	11.6±0.5	11.7±0.4	12.2±0.3*

Mean±S.D., Mean (Range), *: p<0.05, **: p<0.01

3. EST の慢性毒性に関する研究

表2 ラット慢性毒性試験における血液学的検査所見 (雌)

Groups (mg/kg)	投与終了時			休業終了時		
	Control	2	10	Control	10	50
No. of animals	15	15	15	7	7	7
Erythrocytes (10 ⁶ /mm ³)	7.54±0.32	7.68±0.34	7.82±0.47	7.82±0.51	8.02±0.33	8.16±0.30
Hemoglobin (g/dl)	16.0±0.3	16.1±0.3	16.1±0.4	16.1±0.2	16.1±0.3	16.4±0.3*
Hematocrit (%)	38.4±1.8	39.0±1.9	39.7±2.7	40.2±2.4	41.1±1.9	41.8±1.4
MCV	50.8±0.5	50.7±0.4	50.7±1.3	51.4±0.5	51.1±0.2	51.2±0.4
MCH	21.3±1.0	21.0±0.9	20.7±1.4	20.7±1.2	20.1±0.5	20.2±0.7
MCHC	41.9±2.1	41.4±2.0	40.8±2.7	40.3±2.2	39.2±1.1	39.4±1.2
Reticulocytes (%)	8±3	7±2	9±5	13±4	12±5	12±4
Platelets (10 ³ /mm ³)	706±79	718±79	710±67	720±97	673±84	697±56
Leucocytes (10 ³ /mm ³)	5.3±0.9	5.0±0.6	5.0±1.4	5.5±0.7	5.5±0.9	4.9±0.4
Hemogram						
Eosinophils	0.5 (0.0-2.0)	0.7 (0.0-2.0)	0.7 (0.0-2.0)	0.9 (0.0-2.0)	1.0 (0.0-2.0)	1.3 (1.0-2.0)
Basophils	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Neutrophils (seg.)	22.1 (16.0-35.0)	19.5 (12.0-30.0)	21.7 (13.0-33.0)	15.1 (10.0-27.0)	17.3 (11.0-23.0)	16.7 (13.0-26.0)
Neutrophils (stab.)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Monocytes	5.2 (2.0-8.0)	5.6 (2.0-9.0)	5.1 (2.0-9.0)	8.1 (3.0-12.0)	8.6 (6.0-16.0)	6.7 (4.0-10.0)
Lymphocytes	72.2 (60.0-80.0)	74.2 (65.0-82.0)	72.5 (62.0-80.0)	75.9 (60.0-83.0)	73.1 (61.0-80.0)	75.3 (64.0-81.0)
Others	1.5 (0.0-3.0)	1.3 (0.0-3.0)	1.6 (0.0-4.0)	0.0	0.0	0.0
Erythrocyte resistance						
HSP (mOsm)	116.7 (111.0-125.0)	-	-	117.6 (114.0-123.0)	-	121.0 (116.0-127.0)
HEP (mOsm)	75.1 (72.0-82.0)	-	-	75.1 (70.0-80.0)	-	77.0 (75.0-80.0)
HMP (mOsm)	97.8 (90.0-103.0)	-	-	98.9 (95.0-104.0)	-	101.6 (97.0-107.0)
Range (mOsm)	41.6 (37.0-48.0)	-	-	42.4 (40.0-46.0)	-	44.0 (39.0-48.0)
Prothrombin time (sec.)	11.1±0.6	11.2±0.4	10.9±0.4	10.8±0.1	10.5±0.8	10.5±0.3

Mean±S.D., Mean (Range), *: p<0.05, **: p<0.01

表3 ラット慢性毒性試験における血液生化学的検査所見(雄)

Groups (mg/kg)	投与終了時			休業終了時		
	Control	2	10	Control	10	50
No. of animals	14	15	15	6	7	7
Blood sugar (mg/dl)	194±24	179±25	179±32	168±11	171±16	163±16
Total protein (g/dl)	6.7±0.3	6.7±0.2	6.7±0.3	6.9±0.2	6.9±0.2	6.8±0.1
Albumin (g/dl)	4.0±0.2	4.0±0.1	4.0±0.2	4.0±0.1	3.9±0.1	4.0±0.1
A/G ratio	1.4±0.1	1.4±0.1	1.5±0.1	1.4±0.0	1.3±0.1	1.4±0.0
BUN (mg/dl)	23.0±2.0	22.2±2.1	22.1±2.1	22.0±1.5	22.0±1.0	20.5±1.3
Creatinine (mg/dl)	0.71±0.14	0.65±0.09	0.70±0.06	0.57±0.12	0.55±0.06	0.51±0.12
Total bilirubin (mg/dl)	0.22±0.05	0.21±0.05	0.19±0.05	0.23±0.03	0.23±0.05	0.21±0.05
Cholesterol (mg/dl)	63±5	70±5**	73±10**	27±7	30±9	27±6
Triglyceride (mg/dl)	170±30	145±51	109±30**	140±33	159±64	108±48
GOT (IU/l)	137±41	304±104**	578±163**	153±24	366±44**	439±84**
GPT (IU/l)	94±29	206±66**	424±122**	97±7	240±30**	304±64**
AL-P (K-AU)	35.3±4.6	34.4±3.2	36.0±4.6	37.2±2.6	37.4±4.9	34.3±3.5
LDH (IU/l)	974±197	1,230±282*	1,439±413**	821±94	1,081±111**	962±193
I. Phosphorus (mg/dl)	4.5±0.6	4.5±0.8	4.9±0.9	4.9±0.3	4.7±0.3	4.4±0.6
Na (mEq/l)	134±1	134±1	135±2	136±9	138±2	140±2
K (mEq/l)	4.4±0.3	4.4±0.4	4.6±0.3	5.0±0.2	5.0±0.4	4.9±0.3
Ca (mg/dl)	10.5±0.2	10.5±0.2	10.7±0.2*	10.3±0.2	10.2±0.2	10.4±0.1
Uric acid (mg/dl)	1.0±0.3	1.0±0.3	1.0±0.3	1.2±0.3	1.0±0.3	0.7±0.3*
CPK (IU/l)	1,011±297	958±320	1,036±384	693±310	528±480	493±432
Phospholipid (mg/dl)	145.7±10.5	152.0±14.6	153.9±17.6	157.5±11.3	162.4±17.8	150.3±11.0

Mean±S.D., *: p<0.05, **: p<0.01

表4 ラット慢性毒性試験における血液生化学的検査所見 (雌)

Groups (mg/kg)	投与終了時			休薬終了時		
	Control	2	10	Control	10	50
No. of animals	15	15	15	7	7	7
Blood sugar (mg/dl)	166±12	169±12	174±19	152±11	151±6	147±7
Total protein (g/dl)	7.3±0.2	7.5±0.2	7.2±0.3	7.1±0.5	7.2±0.2	7.0±0.3
Albumin (g/dl)	4.5±0.2	4.5±0.2	4.3±0.3	4.3±0.4	4.4±0.2	4.3±0.1
A/G ratio	1.6±0.1	1.5±0.1*	1.5±0.2	1.5±0.1	1.6±0.1	1.6±0.1*
BUN (mg/dl)	21.4±2.3	22.1±2.5	22.2±3.3	22.4±1.6	23.4±1.2	21.4±2.3
Creatinine (mg/dl)	0.56±0.11	0.53±0.10	0.51±0.21	0.62±0.15	0.57±0.06	0.55±0.07
Total bilirubin (mg/dl)	0.18±0.03	0.16±0.04	0.15±0.04*	0.17±0.02	0.18±0.02	0.20±0.08
Cholesterol (mg/dl)	90±13	93±9	87±9	90±9	90±8	87±4
Triglyceride (mg/dl)	76±30	92±34	58±21	92±32	81±19	79±19
GOT (IU/l)	189±37	188±53	265±102*	220±64	220±105	282±52
GPT (IU/l)	135±36	132±31	192±72*	148±37	171±72	209±49*
ALP (K-AU)	42.1±5.3	42.0±4.1	39.0±7.2	33.8±2.5	31.6±2.6	30.9±4.5
LDH (IU/l)	580±127	546±127	635±271	527±108	474±146	617±202
L. Phosphorus (mg/dl)	3.5±0.8	3.4±0.5	3.7±1.1	2.9±0.4	3.2±0.3	3.1±0.3
Na (mEq/l)	141±2	140±2	139±3*	142±1	140±1	142±1
K (mEq/l)	4.3±0.4	4.4±0.4	4.3±0.4	4.5±0.2	4.3±0.2	4.6±0.4
Ca (mg/dl)	10.6±0.3	10.7±0.2	10.6±0.3	9.8±0.3	10.0±0.2	9.8±0.1
Uric acid (mg/dl)	1.1±0.2	1.0±0.2	1.1±0.2	1.2±0.2	1.2±0.3	1.3±0.4
CPK (IU/l)	829±439	729±362	802±459	389±161	541±169	633±383
Phospholipid (mg/dl)	186.4±17.0	192.9±15.3	178.4±18.7	196.1±20.6	200.3±14.5	193.7±11.3

Mean±S.D., *: p<0.05, **: p<0.01

表5 ラット慢性毒性試験における臓器絶対重量(雄)

Groups (mg/kg)	投与終了時			休薬終了時		
	Control	2	10	Control	10	50
No. of animals	14	15	15	6	7	7
Brain (g)	1.71±0.05	1.74±0.05	1.71±0.06	1.76±0.07	1.72±0.05	1.75±0.04
Heart (mg)	926±63	946±63	925±82	959±40	943±69	935±80
Lung (mg)	1,079±50	1,100±56	1,083±70	1,161±132	1,171±61	1,179±156
Liver (g)	11.65±0.85	11.82±0.98	11.64±1.10	13.11±0.76	13.20±1.37	12.22±1.14
Kidney (g)	2.24±0.14	2.31±0.10	2.37±0.19*	2.43±0.16	2.53±0.14	2.52±0.11
Spleen (mg)	605±38	625±45	630±56	632±27	629±34	633±54
Mesenteric lymph nodes (mg)	126±30	133±32	102±19*	119±11	135±32	122±45
Thymus (mg)	133±19	132±15	132±20	135±33	113±37	117±17
Hypophysis (mg)	8±2	9±2	8±2	9±1	9±1	9±2
Thyroid gland (mg)	20±5	23±3	20±4	21±4	22±3	23±4
Adrenal gland (mg)	41±4	44±4	39±5	40±3	40±3	44±8
Testis (g)	3.03±0.11	3.13±0.13*	2.83±0.55	3.22±0.10	3.02±0.10**	3.11±0.21
Epididymis (mg)	1,045±51	1,058±51	996±159	1,058±46	1,109±58	1,064±64
Final body weight (g)	387.2±27.0	389.0±25.6	386.8±24.7	399.4±15.5	406.8±40.0	383.1±33.4

Mean±S.D., *: p<0.05, **: p<0.01