

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59年度研究報告書

班長 今堀和友

昭和60年3月

## まえがき

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) の開発研究が発足してから早6年が経過し、本年度はその最後の年にあたる。振り返ってみると、長くて短い6年ではあったが、班員の皆様の多大な御協力により着実な歩みを成し遂げてこられたことを喜びとも誇りともするところである。昭和54年度の報告書の序文を見るとそこには次の様にしるされている。「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せ、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。」この3つの方向とは、(1) 実用に適するE-64類縁体の開発、(2) 類縁体の *in vitro* によるスクリーニング、(3) *in vivo* における種々の効果の判定、である。

この基本方針はこの6年を通じて確実に守られてきたと言えるであろうし、またそれは正しいことであったと思う。事実臨床研究を実施したのは最後の二年間だけであったのである。しかし、この慎重な基礎研究により臨床研究に使用する薬剤の種類、形態、投与量等に関し、信頼できるデータが得られたのみではなく、毒性などに関しても十分なチェックがなされたので、我々は自信を以て臨床研究に踏み出すことができたのであった。

このような経過は、他の薬剤開発には滅多に見られないものであるかもしれないが、新薬開発の方向としては、最も正しいものであり、ひとつの case history と成ると自負しているものでもある。これが可能になったのも一つに班員の皆様の御協力のお陰であることはいうまでもないが、他方、大正製薬の異例なほどのご理解によっているのである。一見いかにものんびりした様に見えるこの開発経過は会社にとってはどんなに菌痒く、じれったく思われたことと察せられるが一度として口を差しはさむことがなかったのは敬服に値することである。

ここに本研究報告書の最終号をお届けすることになったが、内容を御覧頂ければすぐ分かるように、研究は決して終わってはいないのである。せっかくここまできた研究をここで終わらせるのはいかにも残念であり、今後とも何かの形で是非続けたいと考えている。皆様の暖かい御援助を切にお願いする次第である。

最後にこの6年間、研究の推進に御助力を賜った厚生省薬務局の方々、御多忙中にも係わらず報告書の執筆に協力された班員の諸氏、さらに本研究班の事務を引き受けてくださった上、報告書の上梓にまで御努力を惜しまれなかった大正製薬の皆様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 の製剤化研究……………沢田 二郎 9
2. エポキシコハク酸 1,4-<sup>14</sup>C 標識体を用いた  
EST の生体内動態(2) ……………大関 正弘 11
3. EST の生殖に及ぼす影響 ……………大関 正弘 17
4. EST の in vitro 染色体異常試験 ……………大関 正弘 33
5. EST の一般薬理作用—筋ジストロフィーハムスターの  
心電図に及ぼす影響を中心として— ……………福原 武彦 37

## II 酵素・細胞・組織レベルにおける研究

6. カルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) の構造と  
活性発現機構 ……………今堀 和友 51
7. カルシウムプロテアーゼの活性発現機構 ……………鈴木 絃一 57
8. レセプター機構におけるカルシウムプロテアーゼの  
問題点について ……………西塚 泰美 63
9. E-64-c の筋蛋白質分解への効果  
—平滑筋 S<sub>1</sub> の精製への利用— ……………野々村禎昭 67
10. EST の培養筋細胞への取り込みの測定についての試み  
……………小沢鎧二郎 71
11. 肝細胞の培養維持に関係した膜結合型  
トリプシン様エンドプロテアーゼ ……………市原 明 75
12. 培養マクロファージにおける E-64 誘導体の  
取り込みに関する研究 ……………勝沼 信彦 81

### III 個体レベルにおける研究

13. 筋ジストロフィーハムスター (UM-X7.1) の骨格筋に対する  
EST での治療効果—<sup>1</sup>H-NMR による観察 (第2報) ……………宮武 正 89
14. 筋ジストロフィー動物の尿中アミノ酸排泄に及ぼす  
EST の効果 ……………寺尾 寿夫 95
15. ハムスター筋症発生機序の解明およびその抑制に関する研究  
—心筋の中性 Ca<sup>2+</sup> プロテアーゼ (CANP) とその内在性  
阻害因子の検討ならびに EST による治療実験— ……………柴田 宣彦 101
16. 筋ジストロフィーハムスター (UM-X7.1) における  
EST の薬効 ……………大関 正弘 109
17. ラット, マウス, ハムスターにおける EST の薬物代謝酵素系  
およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響……………北川 晴雄 113
18. 筋ジストロフィーマウス (C57BL/10-mdx) における  
生化学的検討 ……………大関 正弘 119
19. 実験的クロロキンミオパチーにおける EST の効果……………杉田 秀夫 123
20. 体外受精法による筋ジストロフィーマウス  
(C57BL/6-dy/dy) の作出……………野村 達次 129

### IV 臨床試験

21. EST 第2相臨床試験—中間報告—  
……………今堀 和友, 杉田 秀夫, 宮武 正, 石原 傳幸 133
22. EST 服用中の Duchenne 型筋ジストロフィー症患者における  
natural killer および antibody dependent cell  
mediated cytotoxicity 活性の変動について……………宮武 正 149

## I E-64 類縁体の開発

1. EST の製剤化研究 ..... 沢田 二郎
2. エポキシコハク酸 1,4-<sup>14</sup>C 標識体を用いた EST の生体内動態(2) ..... 大関 正弘
3. EST の生殖に及ぼす影響 ..... 大関 正弘
4. EST の in vitro 染色体異常試験 ..... 大関 正弘
5. EST の一般薬理作用——筋ジストロフィーハムスターの  
心電図に及ぼす影響を中心として—— ..... 福原 武彦

# 1. EST の製剤化研究

沢田二郎\*

研究協力者 村山普\* 岬哲夫\* 小団扇省三\*  
小沢康雄\* 根本正美\* 吉田継親\*  
小山郁夫\* 吉田一義\* 田中唯夫\*  
栗山恵美子\*

## 緒言

EST の製剤化は従来硬カプセル剤で検討を進めて来たが、これに加え投与量の調節、小児への適用、他剤との配合を考慮し、顆粒剤についても検討を行った。

これら製剤の暫定的な規格および試験方法を設定し、苛酷条件下における経時変化試験を実施し安定性を予測した。

また、カプセル剤と顆粒剤の生物学的同等性を溶出試験およびイヌ、バイオイクイバレント試験（以下 BE 試験と略）により評価した。

## 測定項目および試験方法

第十改正日本薬局方（以下日局と略）の通則および一般試験法に記載されている項目については日局に準拠した。

### 1. 規格および試験方法

前報（昭和 58 年度研究報告書、2. EST 原体の規格および試験方法の設定）を参考に設定した。

### 2. 安定性試験

各製剤を市販予定の形態で包装し、室内、恒温恒湿槽、蛍光槽または太陽照射下のいずれかで一定期間保存した後、各項目の測定を行った（表 1, 2）。

### 3. 溶出試験

日局溶出試験第 2 法（パドル法）に準拠し、

試験液には日局崩壊試験法第 1 液 (pH1. 2)、酢酸緩衝液 (pH4. 0) および精製水を各々 900ml (37° ± 0.5°C) 使用した。パドル回転数は 100 rpm とした。製剤は 1 回に 1 カプセルまたは顆粒 0.5g を用い、各々 3 回の測定を実施した。

### 4. イヌ BE 試験

クロスオーバー法に基づき雌性ビーグル犬 6 頭を 2 群に分け前期投与後休薬期間を 1 週間とし後期投与を行った（表 3）。

投与 18 時間前から絶食させ、カプセル剤および顆粒剤を各々体重 1kg 当たり EST 量として 2mg 相当量を経口投与した。投与後 15 分、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、5 時間および 7 時間に採血し血漿中の E-64-c の濃度を測定した。

## 結果

### 1. EST 製剤の規格および試験方法

カプセル剤および顆粒剤の暫定的な規格および試験方法を表 4 に示す。

### 2. EST 製剤の安定性

カプセル剤、顆粒剤とも、いずれの苛酷条件下においても何ら変化は認められなかった。

### 3. *in vitro* 同等性試験

EST25mg 含有カプセル、50mg 含有カプセルおよび 10% 含有顆粒の 3 製剤とも 3 種の試験液で良好な溶出性を示し、そのパターンも類似していた。従って、3 製剤は *in vitro* 溶出試験において同等であると判断した。

\* 大正製薬株式会社総合研究所

表1 カプセル剤の安定性試験 (包装; PTP および缶)

|           |                 |        |
|-----------|-----------------|--------|
| (1)長期保存試験 |                 |        |
| ・A法       | 室温              | (3年+a) |
| ・B法       | 25° 75% RH      | (2年)   |
| (2)苛酷試験   |                 |        |
| ・加温       | 40°             | 6ヶ月    |
|           | 50°             | 3ヶ月    |
| ・加温加湿     | 40° 75% RH      | 6ヶ月    |
| ・光照射      | 蛍光灯 (1,000 ルクス) | 3ヶ月    |
|           | 太陽光             | 1ヶ月    |
| (3)試験項目   |                 |        |
| ・外観       |                 |        |
| ・崩壊試験     |                 |        |
| ・定量値      | 高速液体クロマトグラフ法    |        |
| ・不純物      | 高速液体クロマトグラフ法    |        |
| (分解物)     | または薄層クロマトグラフ法   |        |

表2 顆粒剤の安定性試験 (包装; 缶)

|                           |                 |        |
|---------------------------|-----------------|--------|
| (1)長期保存試験                 |                 |        |
| ・A法                       | 室温              | (3年+a) |
| ・B法                       | 25° 75% RH      | (2年)   |
| (2)苛酷試験                   |                 |        |
| ・加温                       | 40°             | 6ヶ月    |
|                           | 50°             | 3ヶ月    |
| ・光照射                      | 蛍光灯 (1,000 ルクス) | 3ヶ月    |
|                           | 太陽光             | 1ヶ月    |
| (3)加速試験 (原体およびカプセル剤と相対比較) |                 |        |
| ・40° 75% RH               |                 | 6ヶ月    |
| (4)試験項目                   |                 |        |
| ・外観                       |                 |        |
| ・崩壊試験                     |                 |        |
| ・定量値                      | 高速液体クロマトグラフ法    |        |
| ・不純物                      | 高速液体クロマトグラフ法    |        |
| (分解物)                     | または薄層クロマトグラフ法   |        |

4. *in vivo* 同等性試験

分散分析の結果、各測定時間におけるE-64-c濃度、投与後7時間までの血漿中濃度下面積 (AUC<sub>0-7hr</sub>)、最高血漿中濃度 (C max) および最高血漿中濃度への到達時間 (T max) のいずれにおいてもカプセル剤と顆粒剤の間に5%の有

表3 カプセル剤および顆粒剤の生物学的同等性 (イヌ BE 試験)

動物 : ビーグル犬 1群3頭  
(実験前日より18時間絶食)

投与量: 2mg/kg  
クロスオーバー法

\*試験計画

| 個体 No.      | 前期              | 後期              |
|-------------|-----------------|-----------------|
| 1<br>2<br>3 | 対照製剤<br>(カプセル剤) | 被験製剤<br>(顆粒剤)   |
| 4<br>5<br>6 | 被験製剤<br>(顆粒剤)   | 対照製剤<br>(カプセル剤) |

表4 カプセル剤および顆粒剤の規格および試験方法 (暫定案)

|        |  |
|--------|--|
| 性状     | 外観 (カプセル内容物、色、におい、味)                                     |
| 確認試験   | (1)エステルの確認<br>(2)アミノ酸の確認<br>(3)高速液体クロマトグラフ法によるピークの相対保持時間 |
| 重量偏差試験 | (カプセル剤のみ)  |
| 粒度試験   | (顆粒剤のみ)  |
| 崩壊試験   | 日局第1液 (pH1. 2)   |
| 定量値    | 高速液体クロマトグラフ法   |

意水準において差は認められなかった。以上の結果から、両製剤はイヌを用いた *in vivo* BE 試験において同等であると判断した。

## 結 語

1. カプセル剤および顆粒剤について暫定的な規格および試験方法を定め、苛酷条件下における経時変化試験において安定性を確認した。

2. カプセル剤および顆粒剤の生物学的同等性を *in vitro* 溶出試験およびイヌを用いた *in vivo* BE 試験により評価し、同等であることを確認した。

## 2. エポキシコハク酸 1, 4-<sup>14</sup>C 標識体を用いた EST の生体内動態 (2)

大 関 正 弘\*

研究協力者 福 島 清 実\* 河 野 喜 郎\* 長 部 亘\*  
篠 崎 文 子\* 新 井 正 行\* 谷 川 恵 子\*  
森 田 和\* 諏 訪 俊 男\*

### 研究目的

昨年度著者<sup>1)</sup>は、EST の活性基と推定されるエポキシコハク酸部分を標識した〔エポキシコハク酸 1, 4-<sup>14</sup>C〕EST を用いて、ラットにおける単回投与後の体内動態をロイシン標識体の場合と比較検討した。その結果、ロイシン標識体に比較して速やかに体内から消失したことから、ロイシン標識体にみられた残留性は大部分ロイシンに由来したものであることを明らかにした。

今回、さらに薬効との関連および体内動態の種差を明らかにするため、正常および病態ハムスターにおける体内動態について検討したので報告する。

### 実験材料および方法

〔エポキシコハク酸 1, 4-<sup>14</sup>C〕EST (以下 <sup>14</sup>C-EST) は、〔1, 4-<sup>14</sup>C〕フマル酸より合成した。比放射能は 54.61 $\mu$ Ci/mg、放射化学的純度は 98% であった。

実験動物は、当社で繁殖した 8 週令の UM-X 7.1 系筋ジストロフィー雄性ハムスターおよび正常雄性ハムスターを使用した。また一部の実験には、8 週令の雄性ゴールデンハムスター (金丸動物より購入) を使用した。

標識化合物は 5% アラビアゴムに懸濁し、特記する場合を除いて 50mg/kg の用量で経口

投与した。

薬物投与後の試料の採取、全身オートラジオグラフィーおよび放射能の測定は前報<sup>1)</sup>と同様に実施した。なお、心筋および骨格筋のマイクロオートラジオグラフィーは、Stumpf ら<sup>2)</sup>の thaw-mount 法を一部改良した手法により行った。

### 結果および考察

UM-X 7.1 系筋ジストロフィーハムスターおよび正常ハムスターに <sup>14</sup>C-EST 50mg/kg 経口投与後の放射能の排泄を比較した結果、両者間に有意な差はなく、主に尿中へ約 60% 排泄され、糞中への排泄は少なかった (約 30%)。呼気中への排泄はごくわずかであった。一方、ゴールデンハムスターに <sup>14</sup>C-EST 5mg/kg 経口投与後の胆汁中への放射能の排泄は、24 時間までに約 13% であった。これらの結果はラットの場合<sup>1)</sup>と明らかに異なり、ハムスターの場合は胆汁を介しての糞中への排泄は少なく、主に尿中へ排泄されるものと考えられる。呼気中への放射能の排泄はラットの場合と同様に認められたことから、ハムスターにおいても EST の一部は CO<sub>2</sub> にまで代謝されるものと思われる。

正常ハムスターにおける <sup>14</sup>C-EST の体内分布は、全身オートラジオグラムおよび組織内濃度の測定結果から、投与後 30 分で腎に最も高濃度分布し、次いで肝に比較的高い放射能が認められ、心筋、骨格筋を含む他の組織では血中レベル以下の濃度を示した。投与後 24 時間で

\* 大正製薬株式会社総合研究所



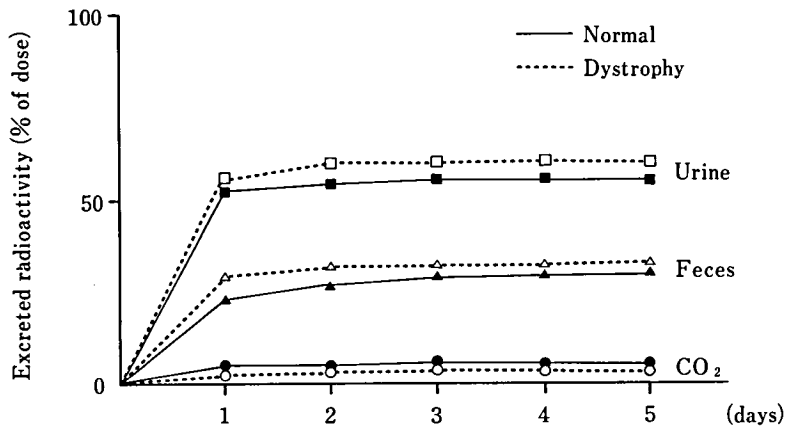


図1 ハムスターに <sup>14</sup>C-EST 50mg/kg を経口投与後の放射能の尿糞呼吸中排泄率  
各点は正常ハムスターは N=3, 筋ジストロフィーハムスターは N=4 の平均値を示す。

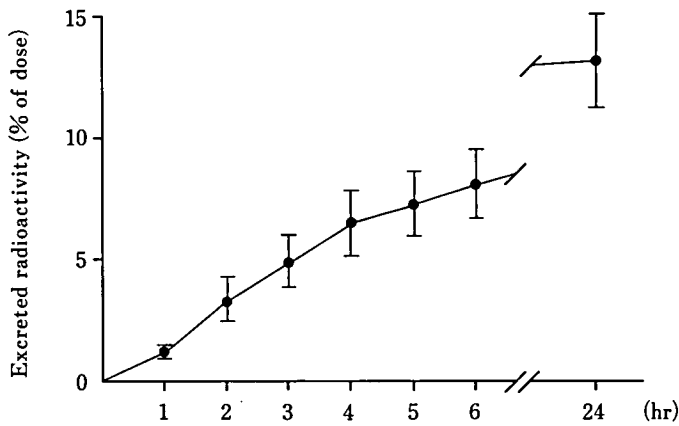


図2 ハムスターに <sup>14</sup>C-EST 5 mg/kg を経口投与後の放射能の胆汁中排泄率  
各点は N=4 の平均値 ± S.E. を示す。

は、全身オートラジオグラム上では腸内に高い放射活性が認められたほかは、腎皮質および肝にのみ微弱な放射活性が残存した。

筋ジストロフィーハムスターの場合においても正常ハムスターと同様な分布パターンを示し、大きな差は認められなかった。

ラットの場合と比較すると、ラットでは投与初期において肝に最も高く、次いで腎の順であり、分布パターンにも種差が認められた。これらの結果は、EST の毒性試験<sup>9)</sup>に認められた肝

毒性の種差の一因と考えられる。

EST の標的組織である筋肉への分布は、他の臓器に比べて低濃度であったが、組織レベルでの分布状態を検討することは、薬理効果との関連で重要であると思われる。そこで、<sup>14</sup>C-EST 経口投与後 30 分の正常および筋ジストロフィーハムスターの心筋、骨格筋（前脛骨筋）のマイクロオートラジオグラムを作成し、光学顕微鏡レベルでの放射能の分布を検討した。

2. エポキシコハク酸 1, 4-<sup>14</sup>C 標識体を用いた EST の生体内動態 (2)

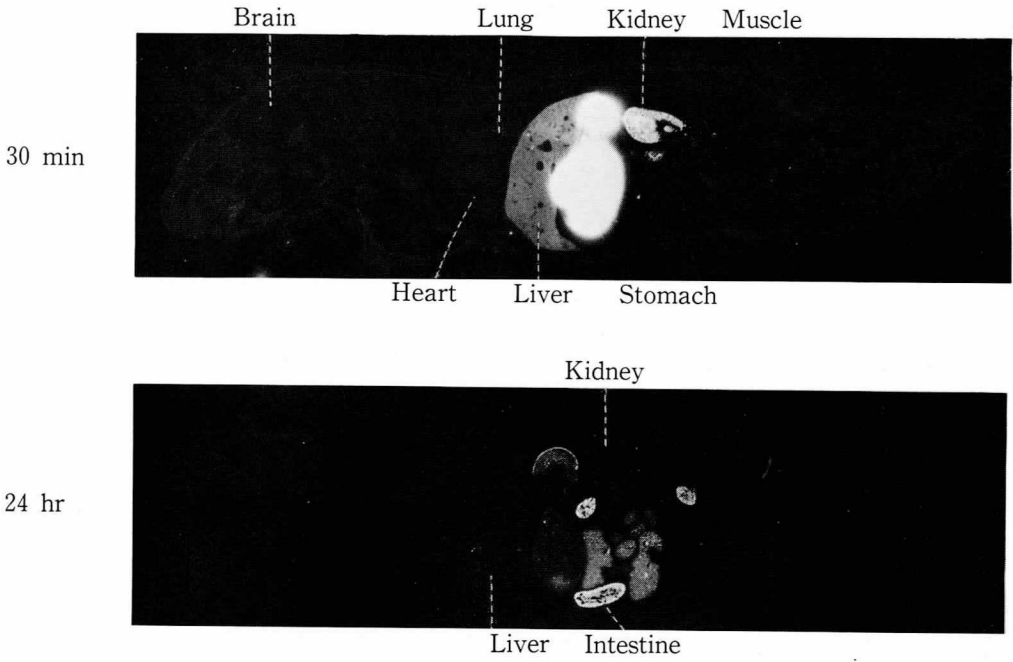


図3 正常ハムスターに <sup>14</sup>C-EST 50mg/kg を経口投与後の全身オートラジオグラム

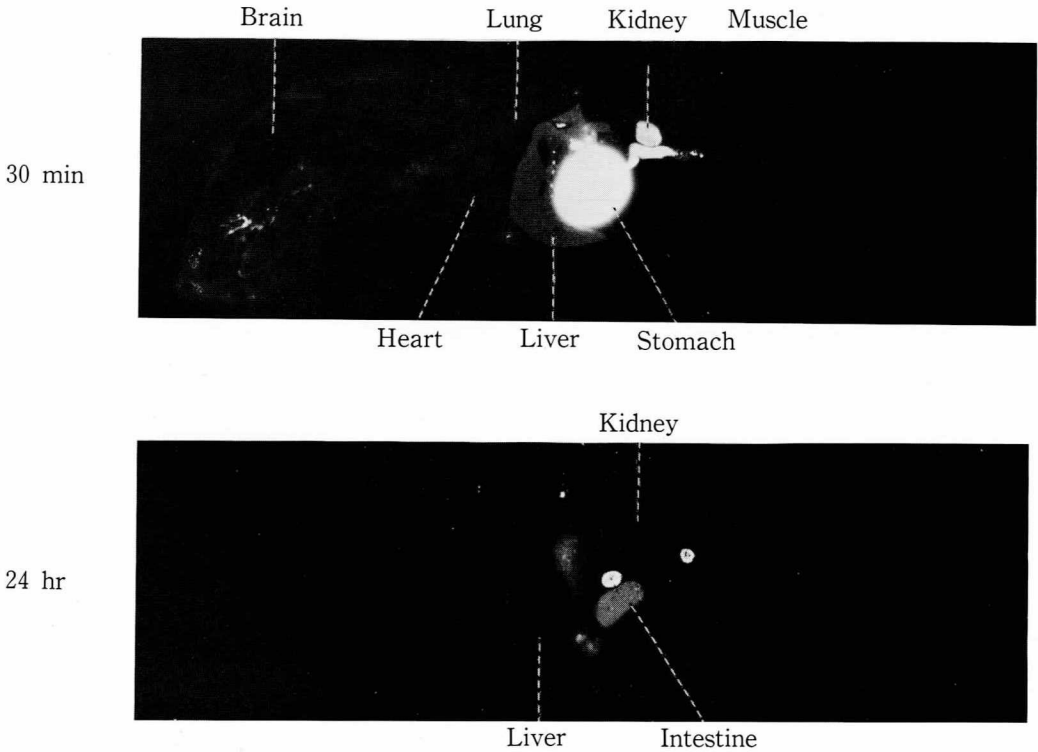


図4 筋ジストロフィーハムスターに <sup>14</sup>C-EST 50 mg/kg を経口投与後の全身オートラジオグラム

