チオールプロテアーゼ阻害剤 EST の筋疾患患者における生体内動態と安全性

今堀 和 友^{*1} 杉 田 秀 夫^{*2} 宮 武 正^{*3}
石 原 傳 幸^{*4} 宮 谷 信 行^{*5} 桑 原 武 夫^{*5}

(受付: 1985 年 10 月 2 日) (特別掲載)

Pharmacokinetics and Safety of EST, a New Thiol Protease Inhibitor in Patients with Muscle Diseases

Kazutomo IMAHORI^{*1} Hideo SUGITA^{*2} Tadashi MIYATAKE^{*3}
Tadayuki ISHIHARA^{*4} Nobuyuki MIYATANI^{*5} and Takeo KUWABARA^{*5}

^{*1} Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

^{*2} Division of Neuromuscular Research, National Center for Nervous, Mental and Muscular Disorders

^{*3} Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University

^{*4} National Higashisaitama Hospital

^{*5} National Sanatorium Niigata Hospital

EST, a newly synthesized inhibitor specific for thiol protease, is developing as a candidate for muscular dystrophy therapy.

A single dose of EST was administered to adult patients with muscle diseases, and a single dose as well as single doses everyday for seven consecutive days was administered to children with Duchenne muscular dystrophy in order to confirm the safety of this drug and also to compare the pharmacokinetics between the patients and healthy adult males.

^{*1} 東京都老人総合研究所

〒173 東京都板橋区栄町 35-2

^{*2} 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

^{*3} 新潟大学脳研究所神経内科

^{*4} 国立療養所東埼玉病院

^{*5} 国立療養所新潟病院

No side effect attributable to EST was observed in clinical signs or symptoms or in laboratory tests during administration.

EST was detected as E-64-c (effective form of EST) in the serum and urine after oral administration and there was no intrinsic difference between patients and healthy adult males in absorption and excretion of the drug.

Single dose and repeated dose administration did not produce different absorption and excretion patterns, with no accumulation of the drug being observed in either regimen.

Key words : thiol protease inhibitor, muscular dystrophy, EST, E-64-c

はじめに

EST : Ethyl (+)-(2*S*, 3*S*)-3-[(*S*)-3-methyl-1-(3-methylbutylcarbamoyl)butylcarbamoyl]-2-oxiranecarboxylate (Fig. 1) は, 筋ジストロフィーの治療薬として開発中のチオールプロテアーゼ阻害剤である。先に宮原ら¹⁾²⁾は, 健常成人男子を対象に EST を単回投与から反復投与まで行った。その結果, 安全性については何ら問題はなく, 生体内動態についても確認された。

R = C₂H₅ ; EST
R = H ; E-64-c

Fig. 1 EST および E-64-c の化学構造.

今回, 本格的な治療試験への移行に先立ち, 小児期 Duchenne 型筋ジストロフィーを含めた筋疾患患者に対する本剤の安全性および健常成人男子と比較した生体内動態についての検討を行った。

本試験は昭和 58 年 9 月～59 年 1 月までの 5 カ月間に実施された。

試験方法

1. 試験計画

本試験は, EST を筋疾患患者に単回および反復投与した際の生体内動態および安全性の検討を

Tab. 1 試験内容

段 階	対 象	用 法 ・ 用 量
A	筋疾患患者 (含む Duchenne 型) 成 人	2.1mg/kg 体重 × 1 回 (単回投与試験)
B	Duchenne 型 小児(歩行可能)	2.3mg/kg 体重 × 1 回 (単回投与試験)
C	Duchenne 型 小児(歩行可能)	3.6mg/kg 体重 × 1 回/日 × 7 日 (反復投与試験)

Tab. 2 小委員会構成委員

今堀 和友	東京都老人総合研究所
江橋 節郎	岡崎国立共同研究機構 生理学研究所
福原 武彦	東京慈恵会医科大学 第二薬理学
杉田 秀夫	国立武蔵療養所神経センター 疾病研究第一部
宮武 正	新潟大学脳研究所 神経内科
石原 傳幸	国立療養所東埼玉病院
大関 正弘	大正製薬株式会社 総合研究所

目的とし, Tab. 1 のごとく A～C の 3 段階に分けて 1 段階ずつ実施した。

本試験計画は, あらかじめ設けられた小委員会 (Tab. 2) において, 先に実施された健常成人を対象とした単回および反復投与試験の結果を十分吟味しつつ, 検討, 立案された。

2. 対象患者

A 段階は, Duchenne 型筋ジストロフィー (以下 DMD と略す) を含む成人筋疾患患者を対象とした。B 段階および C 段階は, 独立歩行可能な

Tab. 3 患者の背景

段階	疾患名	例数	年齢 (歳)	体重 (kg)	投与量 (mg/kg)
A	Duchenne 型	5	22	44.6	2.2
			24	47.0	2.1
			20	51.2	2.0
			23	31.0	2.4
			20	21.3	2.3
	Kugelberg-Welander 病	2	52	46.0	2.2
			27	34.2	2.2
	筋緊張型ジストロフィー	2	51	49.0	2.0
			51	63.0	1.6
	Becker 型	1	24	47.0	2.1
B	Duchenne 型	16	9.6 ± 0.4	24.2 ± 1.8	2.2 ± 0.1
C	Duchenne 型	12	9.7 ± 0.6	24.4 ± 1.0	3.6 ± 0.1

平均 ± S. E.

DMD 患者を対象とした。

各段階とも本試験について説明を受け、本人または保護者が自主的に本試験への参加に同意し、医師が投薬前に臨床検査を実施し、本試験に参加することに問題がないと判断された患者を対象患者として採用した。

Tab. 3 に各段階における被験者の背景を示した。

3. 実施施設

本試験は国立療養所新潟病院および国立療養所東埼玉病院で実施された。

なお、血清中および尿中の EST および活性体 E-64-c の定量は、ガスクロマトグラフ質量分析法により、大正製薬(株)総合研究所において行った。

4. 被験薬および投与方法

被験薬は、EST 25 mg および 50 mg を含有するゼラチン硬カプセル剤を使用した。

A, B 段階は単回投与とし、朝食後 30 min に 100 mg/40 kg (A 段階平均 2.1 mg/kg, B 段階平均 2.3 mg/kg) を投与した。

C 段階は、1 日 1 回朝食後 30 min, 7 日間反復投与した。用量については、B 段階の単回投与試験の結果を参考に、筋肉の崩壊に関与していると

考えられる骨格筋中のカルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) を理論上十分に阻害する量として 4.0 mg/kg (平均 3.6 mg/kg) とした (Fig. 2)。

5. 試験スケジュールおよび検査項目

各段階の試験スケジュールを Fig. 3, 4 に示した。

1) 臨床症状の観察

服薬による生体への影響を観察するため、A, B 段階については、血圧、心拍数、体温の測定を投薬前および投薬後 1 週間以内に、C 段階については、心拍数、体温の測定を投薬開始時および最終投薬後 24 hr に実施した。

心電図の測定は、A 段階についてのみ、投薬前および投薬後 1 週間以内に実施した。

2) 臨床検査

臨床検査として血液一般検査 (赤血球数、白血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン、血小板数)、血液生化学検査 (CK, GOT, GPT, Al-P, LDH, γ -GTP, BUN) ならびに尿検査 (pH, タンパク、糖、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣) を、A, B 段階では投薬前および投薬後 1 週間以内に、C 段階では投薬開始前および最終投薬後 24 hr に実施した。

Fig. 2 投与量設定の根拠.

	試験前	1 日 目					2 日 目	試験後
		0	2	4	6	8	24 hr	
投 薬		◎						
食 事		●		●		●	●	
臨床検査	△							△
諸 検 査*	○							○
採 血		↑	↑	↑	(↑)**	↑	↑	
採 尿 (蓄 尿)		↓	蓄 尿					

• : 血圧, 心拍数, 体温, 心電図

** : A段階のみ実施

Fig. 3 A, B 段階試験スケジュール.

3) 生体内動態

投薬後の血清中薬物濃度の経時的推移を観察するため、採血を、A段階では投薬前および投薬後2, 4, 6, 8, 24 hrに、B段階では投薬前および投薬後2, 4, 8, 24 hrに実施した。小児期Duchenne型患者の場合、頻回の採血は非常に困難なため、C段階では、投薬前および最終投薬後2, 3, 6, 24 hrまたは3, 4, 8, 24 hrの2群に分けて採血し、補完的に血清中薬物濃度推移を観察した。尿中への薬物の排泄を調べるため、A, B段階では投薬後24 hr蓄尿を行い、C段階では最終投薬後24 hr蓄尿を行った。

試験成績

1. 臨床症状

全段階を通して、血圧 (A, B 段階のみ実施)、心拍数、体温について検討した結果、本剤による影響は認められなかった。A段階で実施した心電図においても、本剤による影響は認められなかった。また全段階を通して自覚症状に何ら異常は認められなかった。

2. 臨床検査成績

1) 単回投与試験

A段階においては、血液、尿検査に本剤によると考えられる変動は全く認められなかった。B段

		1 日 目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7 日 目	8 日 目
	甲 群	0						0 2 3 6	24 hr
	乙 群	0						0 3 4 8	24 hr
投 薬		◎	◎	◎	◎	◎	◎		
検 査*		○							○
採 血	甲 群	↑						↑ ↑ ↑	↑
	乙 群	↑						↑ ↑ ↑	↑
採 尿		↓							

*：血液検査，尿検査，その他

Fig. 4 C 段階試験スケジュール.

Tab. 4 臨床検査成績 (C 段階)

患 者 No.	G O T (Karmen u)			G P T (Karmen u)			C K (mu/ml)			A l - P (K-A, u)		γ-GTP (mu/ml)	
	前	後	過去1年間 の変動	前	後	過去1年間 の変動	前	後	過去1年間 の変動	前	後	前	後
1	93	149	109 ~ 179	119	146	119 ~ 183	2642	3354	3174 ~ 3945	8.9	10.3	5	6
2	83	147	93 ~ 149	106	135	111 ~ 171	1491	2340	2519 ~ 2889	12.4	14.6	11	9
3	112	157	115 ~ 162	113	135	73 ~ 184	3406	3795	3128 ~ 4576	13.3	14.6	7	9
4	154	144	123 ~ 202	92	98	86 ~ 123	1621	1528	1025 ~ 1698	10.8	11.4	11	13
5	81	91	95 ~ 165	94	97	106 ~ 195	1922	2175	2133 ~ 3779	15.8	16.8	7	9
6	131	265	156 ~ 275	226	333	195 ~ 386	3607	3808	3526 ~ 4345	9.9	10.3	6	6
7	174	142	104 ~ 169	152	132	117 ~ 163	3069	2830	2193 ~ 3268	11.6	12.6	6	7
8	110	105	89 ~ 176	121	128	136 ~ 265	3118	2502	2050 ~ 4251	9.9	11.0	7	8
9	98	93	115 ~ 163	125	127	137 ~ 198	2332	2063	2442 ~ 3737	8.7	9.0	7	9
10	68	115	66 ~ 144	77	110	81 ~ 139	1271	1277	1521 ~ 3389	13.3	12.8	8	12
11	130	219	149 ~ 156	295	276	285 ~ 319	3091	3747	3491 ~ 3573	10.8	11.4	7	8
12	79	73	97 ~ 172	70	71	108 ~ 142	2296	2043	2812 ~ 4118	11.6	12.0	11	11

階においては，試験終了後一部の症例で筋由来と考えられる CK, GOT, GPT の上昇が認められた。

2) 反復投与試験

血液検査（末梢血，血清電解質）および尿検査

については試験前後で変動は認められなかった。血液生化学検査において一部に B 段階と同様 CK, GOT, GPT の上昇が認められた (Tab. 4)。

3. 生体内動態

1) 血清中濃度

Fig. 5 EST 経口投与後の血清中 E-64-c 濃度 (A 段階).

Tab. 5 薬物速度論的定数

段階	被験者	例数	投与量 (mg/kg)	AUC ^{*1} (μg·hr/ml)	Cmax (μg/ml)	Tmax (hr)	T _{1/2} (hr)	尿中排泄率 (%)
A	成人筋疾患患者	10	2.1±0.1	1.79±0.18	0.47±0.06	3.8±0.6	0.87±0.09	29.2±1.6
	成人Duchenne型	5	2.2±0.1	1.50±0.12	0.34±0.03	4.4±0.7	0.83±0.12	32.1±1.2
B	小児Duchenne型	16	2.2±0.1	1.07±0.13	0.28±0.02	3.2±0.3	0.92±0.11	32.0±1.9
C ^{*2}	小児Duchenne型	12	3.6±0.1	1.67	0.35	4.0	1.37	34.2±4.1
第1相臨床試験 ¹⁾	健康成人男子(第1段階・空腹時)	6	1.7±0.3	1.35±0.10	0.44±0.02	1.2±0.3	1.34±0.08	25.2±1.5
	健康成人男子(第2段階・食後)	6	1.7±0.2	1.81±0.18	0.53±0.05	3.2±0.3	1.43±0.42	32.8±1.4
	健康成人男子(第3段階・食後)	6	3.4±0.2	3.30±0.27	0.85±0.09	3.3±0.2	1.96±0.59	28.0±2.0

(平均±S.E.)

*1: A～C段階のAUCは、投与後12時間の血清中濃度を0として算出。

AUC: 血清中濃度曲線下面積

*2: C段階は、7日目投与後の平均血清中E-64-c濃度推移より算出。

Cmax: 最高血清中濃度

Tmax: 最高血清中濃度到達時間

T_{1/2}: 生物学的半減期

ESTは経口投与後、健康成人男子の場合と同様、酵素阻害活性のより強いE-64-cとして検出されるため、E-64-cの濃度推移を追った。

成人筋疾患患者(A段階)では、最高血清中濃度(C_{max})は0.47 μg/ml、血清中濃度曲線下面積(AUC)は1.79 μg·hr/ml、最高血清中濃度到達時間(T_{max})は3.8 hrであり、同様の用法・用量で検討された健康成人男子(100 mg/body、食

後)¹⁾でC_{max}が0.53 μg/ml、AUCが1.81 μg·hr/ml、T_{max}が3.2 hrという結果と比較していずれも統計学的有意差は認められず同等であった(Fig. 5, Tab. 5)。

成人DMD患者では、C_{max}が0.34 μg/ml、AUCが1.50 μg·hr/mlで、前述の健康成人男子での結果と比較してC_{max}は有意(P<0.05)に低く、AUCも統計学的有意差は認められなかつ

Fig. 6 EST 経口投与後の血清中 E-64-c 濃度 (B 段階).

Fig. 7 EST 経口投与後の血清中 E-64-c 濃度 (C 段階).

たが、数値上はやや低値であった。一方、 T_{max} は 3.8 hr であり健常成人男子と同等であった (Tab. 5)。

小児 DMD 患者においては、 C_{max} が $0.28 \mu\text{g/ml}$ 、 AUC が $1.07 \mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ で成人 DMD 患者での結果と比較して、いずれも統計学的有意差は認められなかった。さらに T_{max} 、 $T_{1/2}$ についても同等であり、DMD 患者における血清中濃度推移は、成人、小児とも同様であることが確認された

(Tab. 5, Fig. 6)。

EST を小児 DMD 患者に 1 週間反復投与し、最終投与後の血清中濃度推移より算出した T_{max} は 4.0 hr、 $T_{1/2}$ は 1.37 hr で単回投与と同様のパターンを示し、最終投与後 24 hr で血清中に薬物は検出されず蓄積性は認められなかった (Fig. 7)。

また、 3.6 mg/kg 投与した C 段階と、 2.3 mg/kg 投与した B 段階との間には、 C_{max} 、 AUC とも

に用量相関が認められた (Fig. 7).

2) 尿中排泄

各段階とも、健常成人男子の場合と同様、EST 投与後、EST 未変化体は検出されず、脱エステル化された E-64-c として検出された。EST に換算した尿中排泄率を Tab. 5 に示したが、各段階とも健常成人男子と同様、投与後 24 hr 以内に投与量の約 30% が尿中へ排泄された。

考 察

本研究は、厚生省新薬開発事業の一環として発足した「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」研究班と大正製薬(株)との共同研究により筋ジストロフィーの治療薬の開発を目的に進められている。

筋ジストロフィーは、骨格筋の崩壊を主症状とする疾患であるが、症状が進行し、起立歩行不能になると二次的に腸の蠕動運動も不良となり、薬物の吸収が健常人と異なり、それにより生体内動態に影響を与える可能性が考えられる。

今回、本格的な治療試験に移行する前段階として、まず成人筋疾患患者における本剤の生体内動態ならびに安全性を検討した。

また動物試験の結果より、本剤は発症初期から投与することが効果的であるとの示唆が得られていることから、今後の臨床試験では小児患者が対象になる可能性が考えられる。一方、小児における本剤の生体内動態は全く未知であり、成人と異なる挙動を示す可能性もあるため、次の段階として小児患者における本剤の安全性および生体内動態を検討した。

1. 安全性

血圧、心拍数、体温、心電図、自覚症状などの臨床症状には、本剤の投与によると考えられる影響は全く認められなかった。

臨床検査成績については、血液検査 (末梢血、血清電解質)、尿検査に本剤によると考えられる変動は認められなかった。血液生化学検査についてもほとんどの症例で本剤によると考えられる変動はなかったが、一部の症例で CK, GOT, GPT

Fig. 8 CK と GOT の関係 (C 段階).

Fig. 9 CK と GPT の関係 (C 段階).

の上昇が認められた。

C 段階において認められた変動について、解析を行った結果を Fig. 8, 9 に示した。CK と GOT, GPT の変動には高い相関性が認められ、GOT, GPT の上昇は筋由来の可能性が高いと考えられた。

ラット、マウスの亜急性毒性試験³⁾およびラットの慢性毒性試験⁴⁾において GOT, GPT の上昇が認められているが、これらの変動は CK との間に相関を認めていないことからげっ歯類での変動と、今回の一部の症例で認められた変動とは原因が異なると考えられた。

また、筋ジストロフィー患者における CK, GOT, GPT 値は特に発症初期では非常に高値を示し、かつ変動が大きいことが知られている。B, C 段階の患者について過去 1 年間のこれら検査値の変動を調査した結果、今回の値はこの変動

範囲内であった。また、 γ -GTP, Al-P は投与前後で変動は認められなかった (Tab. 4, C 段階)。

以上より、ここで認められた GOT, GPT の上昇は本剤に起因するとは考えにくい、GOT, GPT が骨格筋および肝の両方に由来することから、今後の治療試験においては肝に特異的なマーカーを設け、安全性をさらに確かめる必要があると考えられる。

2. 生体内動態

成人および小児筋疾患患者に EST を経口投与した結果、健常成人男子の場合と同様に¹²⁾血清中に EST は全く検出されず、酵素阻害活性においてより活性型の E-64-c として検出された。また、血清中濃度推移は、成人および小児 DMD 患者において C_{max} はそれぞれ $0.34 \mu\text{g/ml}$, $0.28 \mu\text{g/ml}$, AUC はそれぞれ $1.50 \mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$, $1.07 \mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ であり、健常成人男子での C_{max} が $0.53 \mu\text{g/ml}$, AUC が $1.81 \mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ であったのに比較するとやや低値であった。これは、DMD 患者における採血が小児はもとより成人においても非常に困難で、1日の採血回数に制約があるため、健常成人男子ほど血中濃度推移を詳細に追跡できなかったことが影響していると考えられた。しかしながら T_{max} は成人および小児 DMD 患者、健常成人男子を通じて 3~5 hr, $T_{1/2}$ は約 1 hr であり、いずれの間にも統計学的有意差は認められなかった。さらに、健常成人男子での結果同様¹⁾、小児 DMD 患者においても C_{max} , AUC に用量相関が認められ、反復投与しても本剤の吸収、排泄に影響のないことが確認された。一方、投与後 24 hr までの尿中回収率についても、健常成人の場合と同様約 30% であった。

以上のことから、成人および小児 DMD 患者において当初懸念された腸の蠕動運動不良に伴う薬物の吸収に対する影響は認められず、EST を経口投与した際の生体内動態は健常成人男子と比較して本質的相違はないものと判断された。

ま と め

EST 単回および反復投与時の筋疾患患者 (成

人、小児)における生体内動態および安全性の検討を行うために、成人筋疾患患者に単回、また小児期 Duchenne 型筋ジストロフィー患者に単回および 1 日 1 回 7 日間反復投与した。

安全性に関して、臨床症状および臨床検査に対して、本剤によると考えられる影響は認められなかった。

生体内動態に関しては、経口投与により生体内では E-64-c として検出され、健常成人男子と比べ吸収、排泄に本質的な相違は認められなかった。また、反復投与後も吸収排泄パターンは単回投与の場合と同様であり、体内への蓄積性も認められなかった。

以上より、筋疾患患者における生体内動態が確かめられ、安全性についても問題はなかった。

本研究は、厚生省新薬開発研究費の補助によるものである。

文 献

- 1) 宮原正, 下條貞友, 大関正弘ほか: チオールプロテアーゼ阻害剤 EST の第 1 相臨床試験 (第 1 報). 臨床薬理, 16: 357-365 (1985).
- 2) 宮原正, 下條貞友, 大関正弘ほか: チオールプロテアーゼ阻害剤 EST の第 1 相臨床試験 (第 2 報). 臨床薬理, 16: 537-546 (1985).
- 3) 大関正弘, 中根貞雄, 樽本保男ほか: E-64-d の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 57 年度研究報告書, pp. 27-54 (1983).
- 4) 大関正弘, 中根貞雄, 樽本保男ほか: EST の慢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 58 年度研究報告書, pp. 19-39 (1984).
- 5) 大関正弘, 福島清実, 河野喜郎ほか: E-64-d の生体内動態に関する研究. 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 57 年度研究報告書, pp. 127-146 (1983).
- 6) 鈴木絃一, 久保田俊一郎, 木村吉雄ほか: カルシウムプロテアーゼの機能発現機構. 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 57 年度研究報告書, pp. 173-178 (1983).