

付録-2 Ethylene Glycolの特性

Characterization of Ethylene Glycol Metabolism

1. Ethylene glycol is clearly shown to induce malformation in CD-1 mice and CD rats, but not to induce malformation in Fischer rats and rabbits.
2. Glycolic acid is produced as a metabolic intermediate and released to blood. It retains in blood for long time because of low excretion rate via kidney.
3. It is suggested that the ultimate substance to cause malformation is glycolic acid.
4. It is clearly shown that glycolic acid appears in blood of humans and monkeys.
5. The metabolism of glycolic acid to glyoxylic acid proceeds by lactate dehydrogenase and this reaction is relatively slow. The higher amount of ethylene glycol administration induces the higher ratio of glycolic acid appearance in blood of rats and mice as shown below (Frantz: Drug Metab. Disp. 1996). There is some information on the metabolic switching (saturation of the conversion) at rats and mice as shown in the following Figure 1 and 2 (from Frantz: Xenobiotica 1996).
6. There seems an extreme difference in depression of lactate dehydrogenase activity between rats and mice *in vivo*, leading to different dose response on teratogenicity between two species.

付録-3 Ethylene Glycolに関する勧告

Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan

MEMORANDUM

Date: February 7, 2002

From: Rapporteur, Q3C Maintenance Expert Working Group on Residual Solvents, International Conference on Harmonization (ICH)

Subject: PDE for Ethylene Glycol

To: ICH Steering Committee

The Q3C EWG has evaluated a request from EFPIA for an increase on the PDE of ethylene glycol. EFPIA requested an increase from 6.2 mg/day to 40 mg/day based upon comparative metabolism between animals and humans. The EWG analyzed this data and determined that it did not satisfy all of its concerns and thus rejected the request.

However, in this case, ethylene glycol is a synthetic by-product of the synthetic reaction in the production of hydroxyethyl-starch, a product that has been used in humans for many years. Ethylene glycol was not used in this production as a solvent because it was not used to solubilize any component of the reaction. The definition of a solvent in terms of Q3C "An inorganic or an organic liquid used as vehicle for the preparation of solutions or suspensions in the synthesis of a new drug substances." The Q3C EWG believes that, in this case, ethylene glycol is characterized as an impurity. Thus it believes that use of the Q3A guideline is better to resolve this problem.

An increase in a residual solvent/impurity level is supported by the Q3 guidelines, if appropriately justified.

Q3C EWG Members:

Klaus Olejniczak, EU

Fritz Erni, EFPIA

John Connelly, EFPIA

Yoshiro Ohtani, JPMA

Hayashi Matsukura, JPMA

Fumio Sagami, JPMA

Robert Osterberg, FDA

Jean Wyvratt, PhRMA

Jerry D. Frantz, PhRMA

P. Vanbel, WHO

John Miller, PhEur

Eric Sheinin, USP

Costin Camarasu, IGPA

Shigeo Kojima, MHLW, Co-Rapporteur

Ryuichi Hasegawa, NIHS, Co-Rapporteur

III. 分担研究報告（非臨床有効性部門）

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業） 分担研究報告書 国際的審査協力のための医薬品の評価方法の確立

分担研究者：豊島 聰（国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター センター長）
高仲 正（昭和大学薬学部 客員教授）
奥田 晴宏（国立医薬品食品衛生研究所有機化学 部長）

研究要旨

本研究では、国際的審査協力のための医薬品の評価方法を確立するため、非臨床的薬剤応答性評価に基づく医薬品有効性評価法の検討、医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討、バイオテクノロジー医薬品の効力比較法の基礎的検討をそれぞれモデル系を構築して遂行した。

- ・非臨床的薬剤応答性評価に基づく医薬品有効性評価法の検討（1,2-ジフェニルエチレンジアミンを用いた尿中遊離カテキン類の分離・定量法の基礎的研究）：有効性の明らかな薬物が不純物として微量の誘導体（生物活性を有するもの）を含む医薬品について、不純物を正確に定量することにより、その有効性を非臨床的に予測することが可能と考えられる。そこで、昨年度、微量定量法を確立したカテキンをモデルとして、高感度蛍光分析法用い、尿中遊離カテキン類の分析を行い、定量に成功した。
- ・医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討：生物統計学の目的の一つは、観察や測定により得られたデータを適切に要約することである。本年度は、薬効薬理試験で広く行われている、異なる時点における異なる用量の反応を調べる試験より得られた時間-用量反応型データの解析方法を検討して、Holzhütterら（1995）の提案する用量反応曲線モデルを利用し、特定のメカニズムを想定しない時間-用量反応型曲線モデルのあてはめを行った。その結果、良好なあてはまりが得られ、データの要約として十分な記述ができることが示された。
- ・バイオテクノロジー医薬品の効力比較法の基礎的検討：バイオテクノロジー医薬品のモデルとして糖たん白を選定し、製造方法スキームの変更又は製造方法中、細胞培養工程、精製工程等、各工程における具体的な製造方法・製造条件の変更の内容及び程度が、当該モデルたん白の物理的・化学的性質・生物学的性質・免疫学的性質に及ぼす影響の評価・分析を本年度もシクロオキシゲナーゼ（COX）-2をモデル糖タンパクとして遂行した。今年度は、COX-2の特性を評価する新たな手段の開発を目的として、COX-2を選択的に阻害する新規化合物の探索を昨年度に続き、行った。COX-2を選択的に阻害する新規化合物の探索においては、昨年度までに得られた構造活性相関の情報を基に、さらにサリドマイドのフタルイミド骨格部分を基本骨格としたフタルイミド誘導体及びホモフタルイミド誘導体を各種合成し、アスピリンをコントロール化合物としてCOX-1/2阻害活性を測定した。アスピリンより約100倍強力なCOX阻害活性をもつことが見出されたホモフタルイミド誘導体の構造を基に合成したフタルイミド誘導体及びホモフタルイミ

ド誘導体においては、COX-1/2選択性の向上は認められなかったものの、アスピリンより強いCOX阻害活性を有する新たな誘導体が見出され、さらにフタルイミド及びホモフタルイミド骨格上の置換基がCOX阻害活性に与える影響についての知見も得られた。今回合成した誘導体から得られた構造活性相関の情報を適用すれば、COX-2選択性の高い新規COX阻害化合物の開発が可能と考える。

キーワード：1,2-ジフェニルエチレンジアミン、カテキン、用量反応曲線モデル、Comparability、シクロオキシゲナーゼ

A. 研究目的

1. 臨床的薬剤応答性評価に基づく医薬品有効性

評価法の検討：有効性は明らかであるが、微量定量の困難な薬物について微量定量法を確立し、その有効性を非臨床的に予測することを目的とする。モデルとしてカテキンを選択し、昨年度確立した高感度定量分析法により、実際の有効性評価への応用を考え尿中の遊離カテキン類の定量をめざした。

2. 薬品等有効性評価法の生物統計学的検討：生物統計学の目的の一つは、観察や測定により得られたデータを適切に要約することである。しかしながら、しばしば医薬品等の試験結果についての有効性評価の際に行われるデータの統計処理として、広く知られた方法が形式的に用いられる結果、データの解釈を行い評価する際に役にたっていないことがあるように感じられる。つまり、用いられている方法が必ずしも得られたデータの適切な要約になっていないのである。本年度は、薬効薬理試験で広く行われている、異なる時点における異なる用量の反応を調べる試験より得られた時間-用量反応型データの解析方法を検討して、Holzhütterら（1995）の提案する用量反応曲線モデルを利用し、特定のメカニズムを想定しない時間-用量反応型曲線モデルのあてはめを行う。さらに、事例に検討したモデルを適用し、良好なあてはまりが得られ、データの要約として十分な記述ができるかどうかを検討する。また、このモデルが、多くの現象を柔軟に記述し、事例以外の試験方法により得られる様々な用量-時間反応型データを解析する上で有用なことを検証する。

3. バイオテクノロジー医薬品の効力比較法の基礎的検討：バイオテクノロジー医薬品は、完全に人為的

に制御することが不可能な細胞の生合成過程を用いて生産されるために、生産物において分子間で構造面での不均一性が発生することが多い。特に翻訳後修飾として糖鎖付加を受ける糖たん白質性医薬品では、たん白質性医薬品全体に共通するプロセッシング等による1次配列の多様性のみならず、糖鎖結合部位への糖鎖の付加の有無、糖鎖の種類・構造・存在割合等の要因により、分子種として極めて多様な成分（グリコフォーム）から構成されている。本研究においては、ICHガイドラインの策定に先立つ複数のモデルデータの収集、それらデータの類型化及びcomparabilityに関する科学的評価方法の確立を目的とする。バイオテクノロジー医薬品のモデルとしては、不均一性の面をみて上記の特質をもつ糖たん白を選定し、製造方法スキームの変更又は製造方法中、細胞培養工程、精製工程等、各工程における具体的な製造方法・製造条件の変更の内容及び程度が、当該モデルたん白（本研究ではシクロオキシゲナーゼのアイソザイムの1つであるCOX-2を選択した）の物理的・化学的性質・生物学的性質・免疫学的性質に及ぼす影響を評価・分析することとした。

今年度は、昨年度に引き続き、さまざまな培養条件や精製方法により得られたCOX-2の特性を評価する新たな手段の開発を目的として、COX-2を選択的に阻害する新規化合物の探索を行った。

B. 研究方法

1. 1,2-ジフェニルエチレンジアミンを用いた尿中遊離カテキン類の分離・定量：カテキン類の蛍光標識は、試料溶液（尿）100 μ Lに、アセトニトリル600 μ L、0.6mol/Lリン酸緩衝液（pH 6.0）400 μ L、0.1mol/L DPE

溶液100 μ L及び1%ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム溶液50 μ Lを加え、80 $^{\circ}$ Cで50分間加熱することにより、行った。冷後、反応混液20 μ LをHPLCで分析することにより、各種カテキンの分離・定量を行った。

2. 医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討：検討事例は、ある薬剤の効果を調べるため、18匹のイヌを6匹ずつ3つの群に分け、vehicle、0.03mg/kg、0.3mg/kgを投与し、経時的に脳血流量を測定した実験である。検討には、Holzhütterらが提案した、多くのパラメータを含め、多様な形を表現することを可能とした用量反応曲線モデルを応用した。このモデルは、導出の過程で時点が考慮されているため、時間-用量反応曲線となっているが、本検討では、この式に直接データをあてはめることを試みた。
3. COX-2を選択的に阻害する新規化合物の検索：サリドマイドがリポ多糖によるCOX-2の発現誘導を抑制するとの報告 (Clin. Cancer Res. (2001) 7, 3349-3355) が発表されたことから、サリドマイドがCOX-2選択的阻害剤の新たなリード化合物になることを期待し、サリドマイドのフタルイミド骨格部分を基本骨格としたフタルイミド誘導体及びホモフタルイミド誘導体を各種合成し、アスピリンをコントロール化合物としてCOX-1/2阻害活性を測定した。

C. 研究結果

1. 1,2-ジフェニルエチレンジアミンを用いた尿中遊離カテキン類の分離・定量：標準品のカテキン類(CA, EC, ECG, EG及びEGCG)を操作法に従い蛍光ラベルし、それらをHPLC条件に従い分離したところ、CA, EC, ECG及びEGCGはそれぞれ単一ピークを与え、EGは二本のピークに分かれた。これらカテキン類は20分以内に良好な分離を示した。カテキン類の極大励起波長はほぼ329nm付近にあった。カテコール核を有するCA, EC及びECGの極大発光波長は460nm付近にあった。また、ピロガロール核を有するEG及びEGCGの極大発光波長は556nm付近にあった。感度等を勘案して、HPLCの測定波長は励起側329nm、発光側556nmを選択した。ヒト尿に適量の標準品を添加した試料を上記の操作法に従い、蛍光ラベル化-HPLC分析したところ、尿中の遊離カテ

キンを分離・定量することができた。

また、健康成人男女の随時尿における尿中遊離カテキン類を定量した結果、CA, EC, ECG, EG及びEGCGはそれぞれ204, 155, 34, 201及び3 μ g/mLの濃度で尿中に排泄されていることがわかった。排泄に関しては個人差が大きいことが示された。

2. 医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討：検討するモデルでは、状態数であるNの数をはじめに指定する必要がある、それをN=3として、検討を行った。vehicle群、0.03mg/kg群、0.3mg/kg群をあてはめた結果、あてはまりは良好であった。予備的な検討の結果、用量Dを固定した時間反応曲線のあてはまりはすべての群で良好であったため、時間-用量反応曲線のあてはめを行った。この検討でも予備検討と同様に状態数Nは3としたが、さらにNを4の場合と5の場合についても検討を行った。いずれの場合も非線形最小二乗法は収束し、パラメータの推定値を得ることができた。Nを3としたときには、0.03mg/kgでのあてはまりは明らかに悪かった。状態数Nが4と5の時に比べ残差平方和の値もこのとき大きい。一方、状態数Nを4、5としたとき、あてはまりは良好であり、残差平方和もNが3のときに比べ、かなり改善していた。
3. COX-2を選択的に阻害する新規化合物の検索：昨年度までの結果から、3,5-ジメチルフェニルフタルイミド誘導体及び3,5-ジメチルフェニルホモフタルイミド誘導体がアスピリンに比べて強力なCOX阻害活性を有することが明らかとなっていたことから、今年度は、フタルイミド骨格及びホモフタルイミド骨格上の置換基のCOX阻害活性に与える影響を検討することを目的に、新たな3,5-ジメチルフェニルフタルイミド誘導体及び3,5-ジメチルフェニルホモフタルイミド誘導体を合成し、それらのCOX-1/2阻害活性を評価した。その結果、フタルイミド骨格に電子吸引基であるニトロ基を導入すると、ほとんどの誘導体でCOX阻害活性がみられなくなったが、フタルイミド骨格の2つのカルボニル基を還元し、イソインドリン骨格とした場合にはアスピリンよりも強力なCOX-2阻害活性(約60倍)が認められた。さらに、フタルイミド骨格に電子供与基であるアミ

ノ基を導入しても、ほとんどの誘導体でCOX阻害活性がみられなくなったが、フタルイミドフタルイミド骨格のカルボニル基を1つ還元した場合には、COX-1阻害活性の増強が認められた。ホモフタルイミド骨格又はホモフタルイミド骨格をキナゾリンジオン骨格に変換し、ニトロ基又はアミノ基を導入した場合、ほとんどの誘導体でCOX阻害活性が認められなくなった。

D. 考 察

1. 1,2-ジフェニルエチレンジアミンを用いた尿中遊離カテキン類の分離・定量：昨年度確立した高感度分析法により、尿中遊離カテキン類(CA、EC、ECG、EG及びEGCG)の蛍光誘導体化及びそれらのHPLC分離・定量が可能であることが示された。この方法を用いて、ヒト随時尿中に排泄されるカテキン類の測定を行ったところ、CA、EC、ECG、EG及びEGCGはそれぞれ数 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で尿中に排泄されていることが判明した。
2. 医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討：検討したモデルは、個々の状態においてその反応がとる確率について時間-用量反応関係モデルを想定しており、測定値として得られる反応はこれらの重み付きの和であるため、推定されるパラメータの値ひとつひとつにおける解釈はやさしくはない。また、状態数を示すNも実際にその数の状態があるわけではない。本検討では、Nを状態数と呼んでいるが、このパラメータは柔軟性に対するパラメータという解釈をすべきと考えられる。吉村らは、データから想定される反応の形に近いモデルとしてガンマ関数型のモデルを採用している。これに対して本研究で用いたモデルは、形としての制約は少ない。このモデルでは、状態の数Nを指定する必要があるが、この数が多いほど複雑な形を捉えることができる。しかし、このことは逆に誤差の変動による変化も捉え易くすることになる。したがって、なんらかの方法でNの数を決めることが必要である。実際にこの方法を用いるときは、何らかの手順に基づき客観的にNの数を決めることが望ましいと思われる。本検討では、あてはめという点を重視したが、現実にこの

方法を用いる場合、用量が変わることにより、反応に変化があるかどうかについて客観的に判断を下したい。おそらく本事例で用いたデータでは、反応のピークと反応の面積に変化があるかどうかに興味の対象となるであろうと思われる。具体的な方法論は課題としたい非線形最小二乗法では、初期値を与える必要がある。初期値により結果が変わるのである。検討したモデルで、解釈可能なものは R_N であり、これは用量が0における反応である。したがって、 R_N の初期値は用量0での反応の平均値を用いればよいであろう。しかし、他のパラメータについては、このように簡単にはいかない。初期値は、今後なんらかの方法で設定できるようにすべきと考えられる。

その他、本検討には、数値計算上の問題などがある。

3. COX-2を選択的に阻害する新規化合物の検索：アスピリンより約100倍強力なCOX阻害活性をもつことが見出されたホモフタルイミド誘導体(昨年度報告)の構造を基に今回新たに合成したフタルイミド誘導体及びホモフタルイミド誘導体においては、COX-1/2選択性の向上は認められなかったものの、アスピリンより強いCOX阻害活性を有する新たな誘導体が見出され、さらにフタルイミド及びホモフタルイミド骨格上の置換基がCOX阻害活性に与える影響についての知見も得られた。今回合成した誘導体から得られた構造活性相関の情報を適用すれば、COX-2選択性の高い新規COX阻害化合物が開発可能と考える。高いCOX-2選択性を有する新規COX阻害化合物は、COX-2の物理的・化学的・生物学的・免疫学的性質の評価・分析における新たなツールとして有用であると考えられる。

E. 結 論

1. 1,2-ジフェニルエチレンジアミンを用いた尿中遊離カテキン類の分離・定量：昨年度確立したカテキン類の高感度分析法を用いることで、カテキン類の血中濃度測定や血中及び尿中の経時測定の可能となった。
2. 医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討：本検

討では、Holzhütterらの提案するモデルにもとづき、時間-用量反応曲線あてはめの実施可能性の検討を行った。用いた事例については、あてはめは良好であったことから、種々の時間-用量反応型データにこのモデルを適用することは可能であると考えられた。しかし、時間-用量反応型データの解析方法として、本検討のような曲線あてはめのアプローチが、検定や分散分析と同様に用いられるようになるためには、いくつかの検討事項が課題として残っている。最も大きな課題は、その使い方であろう。我々は、あてはめモデルの選択、あてはめの評価、結果の表記などを含めて、このアプローチをどのような手順でどう使えばよいかを示すガイドが必要であろうと考えている。また、本検討で用いた事例以外にも複数の事例を用いて、このアプローチが様々な時間-用量反応型データに適用可能であることを示すことが必要であると思われる。

3. COX-2を選択的に阻害する新規化合物の検索：本年度は、上記の研究目的のうち、基礎的な部分の検討に着手し、「C. 研究結果」欄及び「D. 考察」欄に記載した内容の知見が得られた。

昨年度までにヒト大腸がん等の株化細胞を用いて、発現細胞の違いや培養条件の変更により発現するCOX-2の構造の違いが生じることを示唆する結果が得られていることから、今年度はデータの報告を行わないが、種々の培養条件下での培養により得

られたヒトCOX-2糖鎖構造の解析と並行して、異なる培養条件下で発現させた個々のCOX-2における新規合成COX-2阻害剤の阻害活性の違いに関する検討を行っている。また、COX-2選択的な新規阻害剤の探索については、これまでに得られた結果を踏まえて、今後更なる構造展開を図り、より選択的にCOX-2を阻害する化合物を見出す予定である。

さらに、研究目的欄に記載のガイドライン作成に関わる部分についても検討中である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Nagaoka H., Toyoshima S. and Takeda K.: Spectrofluorimetric determination of catechins with 1,2-diphenylethylenediamine. *Analytical Sciences*, **18**, 951 (2002)

Noguchi T., Shimazawa R., Nagasawa K., Hashimoto Y.: Thalidomide and Its Analogues as Cyclooxygenase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 1043 (2002)

2. 学会発表

長岡寛明、豊島 聰、武田 建。1,2-Diphenylethylenediamineを用いた尿中遊離カテキン類の蛍光分析法の開発。日本薬学会第123年会（長崎）。

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書
非臨床的薬剤応答性評価に基づく医薬品有効性評価法の検討
－1,2-Diphenylethylenediamineを用いた尿中
遊離カテキン類の分離・定量法の基礎的研究－

分担研究者：高中 正（昭和大学薬学部 客員教授）
 豊島 聡（国立医薬品食品衛生研究所 医薬品医療機器審査センター長）
 研究協力者：長岡 寛明（国立医薬品食品衛生研究所 医薬品医療機器審査センター審査官）

要旨

カテキン類を蛍光誘導体化し、それらを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた分離・定量法の開発を行った。カテキン類はヘキサシアノ鉄酸（Ⅲ）カリウム存在下、リン酸緩衝液（pH6.0）中で1,2-diphenylethylenediamineと反応して発蛍光物を与え、それらは逆相分配型カラムを用いることで、分離・定量が可能であることがわかった。この方法を用いて、尿中の遊離カテキン類の定量を実施した。

キーワード： カテキン、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、蛍光誘導体化、尿、定量

A. 研究目的

茶葉（*Camellia sinensis* L.）中に含まれる主なカテキン類はカテキン（CA）、エピカテキン（EC）、エピガロカテキン（EG）とそれらの没食子酸エステルであるエピカテキン3-O-ガレート（ECG）及びエピガロカテキン3-O-ガレート（EGCG）であり（Fig.1）、これらが、茶葉中のポリフェノールの75%以上を占めている。茶葉中のカテキンの生体や医学薬学上の重要性が多数報告されて、例えば、EGCGには抗酸化作用^{1, 2)}、抗変異原作用³⁾、抗変異原/抗発癌作用⁴⁻⁶⁾、抗アレルギー作用^{7, 8)}、抗動脈硬化作用^{9, 10)}などがあることが知られている。

カテキンの検出及び定量に関しては、UV検出、クーロメトリック検出、カテキン自体が持つ蛍光を利用した蛍光検出、電気化学検出、化学発光検出が報告されている。カテキンの尿中の検出及び定量に関しては、UV検出¹¹⁾、クーロメトリック検出¹²⁾、電気化学検出¹³⁾がなされているが、除蛋白を実施しなければならない、濃縮を行わなければならないなどの煩雑な操作が必要

であり、更に、検出感度が低いなど種々の問題点がある。

そこで、我々は、カテキン類を強い蛍光を放つ蛍光誘導体に導き¹⁴⁾、これらを高速液体クロマトグラフィーによる分離・定量法の開発を目指した。さらに、尿中の遊離カテキン類の定量を実施したので、報告する。

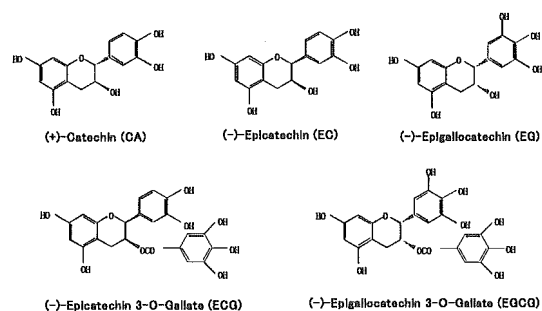


Fig.1 Structure of catechins

B. 研究方法

1. カテキン類の蛍光ラベル化法

試料溶液100 μ Lに、アセトニトリル600 μ L、0.6mol/Lリン酸緩衝液 (pH 6.0) 400 μ L、0.1mol/L DPE溶液100 μ L及び1%ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム溶液50 μ Lを加える。この混液を80 $^{\circ}$ Cで50分間加熱する。冷後、反応混液20 μ LをHPLCに付す。

2. HPLC分離条件

Column : TSK gel ODS-80Ts(150 \times 4.6mmI.D.)

Mobile Phase : Methanol - 0.1 mol/L Phosphate Buffer (pH 2.5)(55:45, v/v)

Column Temperature: Ambience

Flow Rate : 1.0mL/min

Detection : Ex 329nm, Em 565nm

C. 研究結果及び考察

標品のCA、EC、ECG、EG及びEGCGを操作法に従い蛍光ラベルし、それらをHPLC条件に従い分離した時のクロマトグラムをFig.2に示す。

CA、EC、ECG及びEGCGはそれぞれ単一ピークを与え、EGは二本のピークに分かれた。これらカテキン類は20分以内に良好な分離を示した。なお、EGが二つのピークを与える理由は不明である。

Table 1は各溶出液の励起及び発光波長の最大値を示したものである。極大励起波長はほぼ329nm付近にあ

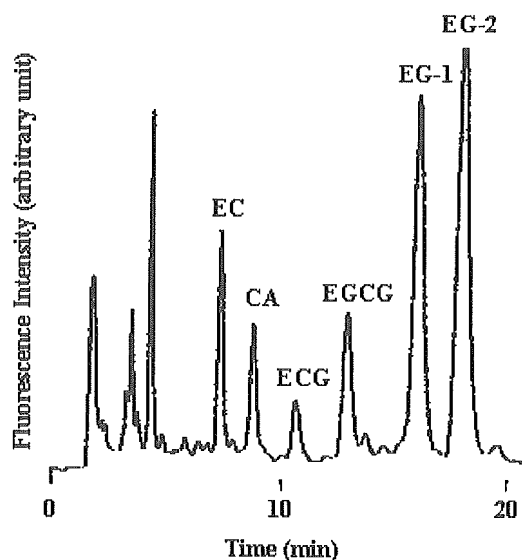


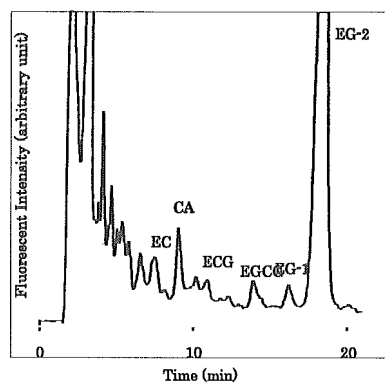
Fig.2 Chromatogram obtained from standard catechins.

った。カテコール核を有するCA、EC及びECGの極大発光波長は460nm付近にあった。また、ピロガロール核を有するEG及びEGCGの極大発光波長は556nm付近にあった。感度等を勘案して、HPLCの測定波長は励起側329nm、発光側565nmを選択した。

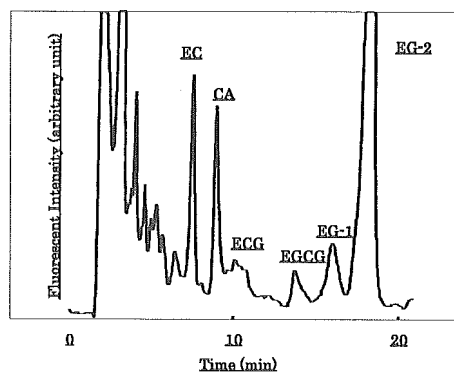
Table 1 Excitation and emission maximum obtained from each eluate

Compound	Concentration (nmol/mL)	Excitation maximum (nm)	Emission maximum (nm)
CA	2	327	458
EC	2	326	460
ECG	100	328	460
EG	300	329	567
EGCG	300	330	566

Fig.3(a)は、ヒト尿を操作法に従い、蛍光ラベル化—HPLC分離により得られたクロマトグラムの例である。



(a) Human urine without the catechins



(b) Human urine with the catechins

Fig.3 Chromatogram obtained from urine with or without the standard catechins

(b)は、ヒト尿に適量の標品を添加した試料を操作法に従い、蛍光ラベル化-HPLC分離により得られたクロマトグラムである。ここに示したように、本法を用いれば、尿中の遊離カテキンの定量が可能であることがわかった。

Table 2は健康成人男女の随時尿における尿中遊離カテキン類を定量した結果である。定量の結果、CA、EC、ECG、EG及びEGCGはそれぞれ204、155、34、201及び3 μ g/mLの濃度で尿中に排泄されていることがわかった。排泄に関しては個人差が大きいことが示された。

Table 2 Concentrations of catechins in urine from healthy persons

Sex	Age	Concentration (μ g/mL)				
		CA	EC	ECG	EG	EGCG
M	55	52	38	0	107	0
M	39	509	279	89	236	7
M	35	124	56	0	241	5
M	32	147	78	0	235	0
M	31	188	104	19	112	0
M	25	181	149	0	316	0
M	24	163	161	0	173	0
M	24	156	161	21	232	0
M	24	688	693	106	895	4
M	23	167	72	6	317	5
M	23	238	137	0	422	0
M	22	143	157	17	104	0
M	22	214	57	69	160	5
F	50	115	59	0	367	0
F	28	22	41	6	81	0
F	26	104	78	20	308	9
F	25	225	186	0	608	0
F	24	431	418	73	262	4
F	22	17	49	0	55	0
Average		204	156	22	275	2
Standard Deviation		168	160	34	201	3

D. 考察

カテキン類 (CA、EC、ECG、EG及びEGCG) の蛍光誘導体化及びそれらのHPLC分離が可能であった。HPLC分離は良好であり、それらは20分以内での測定が可能であった。この方法を用いて、ヒト随時尿中に排泄されるカテキン類の測定を行ったところ、CA、EC、ECG、EG及びEGCGはそれぞれ数 μ g/mLの濃度で尿中に排泄されていることがわかった。

E. 結論

本法を用いることで、カテキン類の血中濃度測定や血中及び尿中の経時測定の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hiroaki Nagaoka, Satoshi Toyoshima, and Ken Takeda. High performance liquid chromatographic determination of free catechins in urine by utilized 1,2-diphenylethlenediamine. J.Chromatogr.B Submitted

2. 学会発表

長岡寛明、豊島 聡、武田 建。1,2-Diphenylethylenediamineを用いた尿中遊離カテキン類の蛍光分析法の開発。日本薬学会第123年会 (長崎)。

参考文献

1. N.Salah, N.J.Miller, G.Paganga, L.Tijburg, G.P.Bolwell and C.Riceevans, *Arch. Biochem. Biophys.*, **322**, 339 (1995)
2. S.G.Khan, S.K.Katiyar, I.R.Agarwa and H.Mukhtar, *Cancer Res.*, **52**, 4050 (1992)
3. Z.Y.Wang, S.J.Cheng, Z.C.Zhou, M.Athar, W.A.Khan, D.R.Bickers and H.Mukhtar, *Mutat. Res.*, **223**, 273 (1989)
4. S.Valcic, B.N.Timmermann, D.S.Alberts, G.A.Wachter, M.Krutzsch, J.Wymer and J.M.Guillen, *Anti-Cancer Drug*, **7**, 461 (1996)
5. M.Suganuma, S.Okabe, M.Oniyama, Y.Tada, H.Ito and H.Fujiki, *Carcinogenesis*, **19**, 1771 (1996)
6. N.Ahmad and H.Mukhtar, *Nutr. Rev.*, **57**, 78 (1999)
7. N.Matsuo, K.Yamada, K.Shoji and M.Mori, *Allergy*, **52**, 58 (1997)
8. T.Shiozaki, K.Sugiyama, K.Nakazato and T.Takeo, *Yakugaku Zasshi*, **117**, 448 (1997)
9. K.Nakagawa, S.Okuda and T.Miyazawa, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1981 (1997)
10. S.Miura, M.Watanabe, M.sano, T.Tomita, T.Osawa, Y.Hara and I.Tomita, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1 (1995)
11. K.Okushio, M.Suzuki, N.Matsumoto, F.Nanjo and Y.Hara, *Drug Metab.Dispos.*, **27**,309(1999)
12. B.A.Warden, L.S.Smith, G.R.Balentine and

- B.A.Clevidence, *J.Nutr.*, **131**,1731(2001) (1999)
13. K.H.Van Het Hof, S.A.Wiseman, C.S.Yang and L.B.M.Tijburg, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **220**,203
14. H.Nagaoka, S.Toyoshima and K.Takeda, *Anal.Sci.*, **18**,951(2002)

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討

分担研究者：奥田 晴宏（国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 部長）

研究協力者：大森 崇、荒戸 照世、井出 勝久、志村 紀子

（国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター審査官）

研究要旨

生物統計学の目的の一つは、観察や測定により得られたデータを適切に要約することである。本年度は、薬効薬理試験で広く行われている、異なる時点における異なる用量の反応を調べる試験より得られた時間-用量反応型データの解析方法を検討として、Holzhütterら（1995）の提案する用量反応曲線モデルを利用し、特定のメカニズムを想定しない時間-用量反応型曲線モデルのあてはめを行った。事例に検討したモデルを適用した結果、良好なあてはまりが得られ、データの要約として十分な記述ができることが示された。このモデルでは、多くの現象を柔軟に記述することが可能であるため、事例以外の試験方法により得られる様々な用量-時間反応型データを解析する上で有用であろう。

キーワード：薬効薬理試験、時間-用量反応、統計解析、非線形最小二乗法、パラメータ

A. 研究目的

生物統計学の目的の一つは、観察や測定により得られたデータを適切に要約することである。しかしながら、しばしば医薬品等の試験結果についての有効性評価の際に行われるデータの統計処理として、広く知られた方法が形式的に用いられる結果、データの解釈を行い評価する際に役にたっていないことがあるように感じられる。つまり、用いられている方法が必ずしも得られたデータの適切な要約になっていないのである。

薬効薬理試験では、評価する物質の性質により相違するものの、ある反応について用量の違いによる時間反応の検討が行われることがよく行われる。本検討では、この用量と時間に対する反応の関係を、時間-用量反応関係と呼ぶことにする。時間-用量反応関係の検討を行うために実施された薬効薬理試験から得られたデータの統計解析では、通常、(1)各時点における用量群間の検定、(2)用量群ごとのベースライン（0時点）から投与後の各測定時点との検定、(3)用量と時点を因子とした分散分析などが用いられる。上記の3

つの方法は、検定結果として図示される星印やp値によりデータが要約される。しかしながら、これらの統計処理が行われた多くの報告の考察では、

- ・「薬剤〇〇は用量依存的に…」
- ・「薬剤〇〇は投与後、△△分で最大に達し…」
- ・「その効果は□□分まで有意に持続した。」

などといった表現を目にすることが多く、上記の統計処理があまり役に立っているとは思えない。これらの考察は、用量ごとの反応平均値と時間との関係を示したグラフからなされているわけである。吉村ら（1997）は、時間-用量反応型データのデータ解析方法に関する一つアプローチとして、用量と時間の関数を用い、曲線あてはめのアプローチを提唱した。この方法は、データにあてはめた曲線に基づき検討が行えるため、上述した考察を行うのに適していると思われる。彼らはある事例のデータにガンマ関数型の数学曲線のあてはめを行ったが、時間-用量反応曲線型データは様々な試験により得られ、その反応のパターンも多種多様である。曲線あてはめのアプローチを他の時間反応型デー

々に適用していくためには、彼らの検討したガンマ関数型モデルですべてを表現できるとは思えない。そこで、より柔軟に用量と時間により変化する反応を表現する関数が必要となる。

Holzhütterら (1995) は、細胞毒性試験から得られた用量と反応の関係が、従来用いられているS字型の曲線では表現しきれないことから、多くのパラメータを含め、多様な形を表現することを可能とした用量反応曲線モデルを提案した。このモデルは、導出の過程で時点が考慮されているため、時間-用量反応曲線となっている。

本検討では、このモデルを吉村ら (1997) が用いて、特定のメカニズムを想定しないHolzhütterら (1995) の導出した時間-用量反応型曲線モデルの適用可能性の検討を行うことにする。このモデルを利用することができれば、多くの現象を柔軟に記述することが可能であり、数多くの試験方法により得られる様々な時間-用量反応型データを解析する上で有用であろう。

B. 研究方法

1. 検討するための事例

はじめに事例を説明する。この例は、ある薬剤の効果を調べるために、18匹のイヌを6匹ずつ3つの群に分け、vehicle、0.03mg/kg、0.3mg/kgを投与し、経時的に脳血流量を測定した実験である。各投与群について、0時点を100%とする率に変換した脳血流量の平均値の推移を図1に示す。エラーバーは標準誤差を表している。

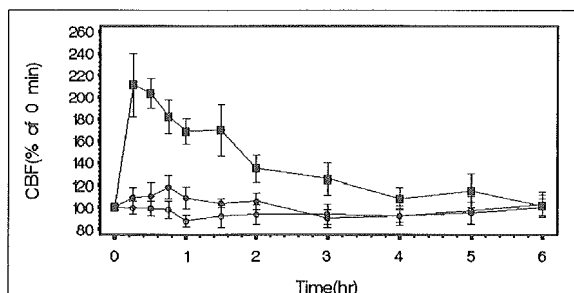


図1 時間-用量反応曲線型データの例

2. 時間-用量反応曲線の導出

Holzhütterら (1995) は、投与における生体の状態の変化が経時的に反応として表れるモデルを提案した。

今、投与初期の状態を S_0 とし、その反応を R_0 とする。そして、投与によりある時点で何らかの影響が生じ、状態は S_1 という状態に推移しはじめ、それに伴う反応 R_1 が R_0 とともに現れるとする。いま、状態 S_0 と S_1 がとる確率をそれぞれ p_0 、 p_1 とする。このとき、我々がある時点で測定した反応は $p_0R_0+p_1R_1$ となっているであろう。状態は二つとは限らないので、一般化し N 個の状態を考えることにすると、測定される反応は、 $p_0R_0+p_1R_1+\dots+p_NR_N$ となる。彼らは、ある状態 S_i の確率 p_i が用量と時間の関数となるモデル

$$p_i(D,t) = \frac{1}{(i-1)!} (ktD^n)^{(i-1)} \exp(-ktD^n) \quad i=1, \dots, N-1$$

$$p_N(D,t) = 1 - \sum_{i=1}^{N-1} p_i(D,t) \quad (1)$$

を導いた。この式で D は用量、 t は時間、 N はモデルに含める状態の数、 k と n はそれぞれパラメータである。

(1)を用いたとき、用量 D 、時点 t の反応の関数 $R(D,t)$ は

$$R_i(D,t) = \sum_{i=1}^{N-1} \frac{R_i - R_N}{(i-1)!} (ktD^n)^{(i-1)} \exp(-ktD^n) \quad (2)$$

とあらわされる。

彼らは、用量反応曲線としてこの式を用いるために、時点 t を固定しこの曲線を利用したが、本検討では、この式に直接データにあてはめることを試みる。

2. パラメータの推定方法

解析に用いるデータは、用量 D 、時点 t 、測定値 R である。よって、(2)式において推定すべきパラメータは k 、 n の他に $R_1 \sim R_N$ となる。

本検討では、これらのパラメータの推定は非線形最小二乗法を用いる。データの解析にはSASバージョン8.2のNLINプロシジャを用いる。

3. 検討方法

非線形最小二乗法は、通常の最小二乗法とは異なり逐次計算を必要とする。その際、あてはめるモデルの形や逐次近似に用いる初期値によっては、推定はうまくいかない。逐次近似が破綻するのである。また、あてはまりが悪いところに収束してしまうことがあり、収束してもあてはまりが悪いこともある。

上述したようにHolzhütterら (1995) は、(2)式で時点 t を固定し、用量反応曲線のあてはめを行っている。

しかし、本検討では時点 t を固定しないため、より制約がゆるいモデルをあてはめることになる。このときに非線形最小二乗法はうまくいかないかもしれない。そこで、予備検討として用量 D を固定して、時間と反

応の関係で曲線があてはまるかどうかを確認した後に、用量 D も含めた時間-用量反応関係を検討することにした。

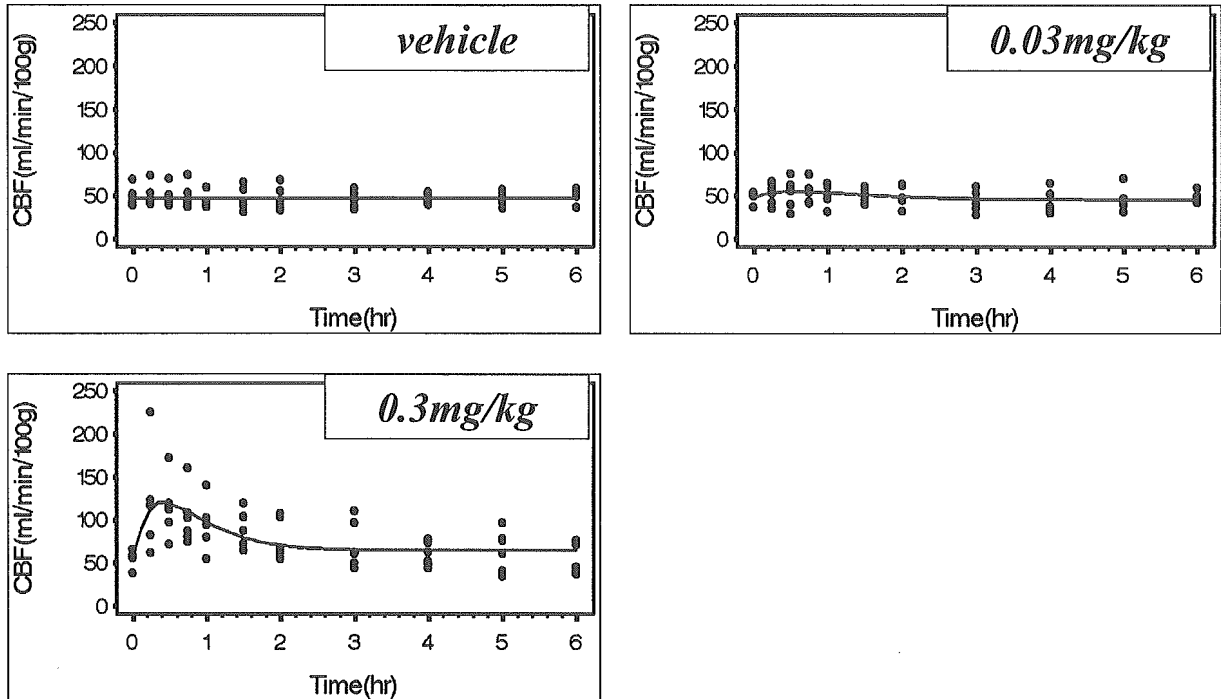


図2 各用量を固定したときの個々の時間-反応曲線のあてはめ (状態数 N が3の場合)

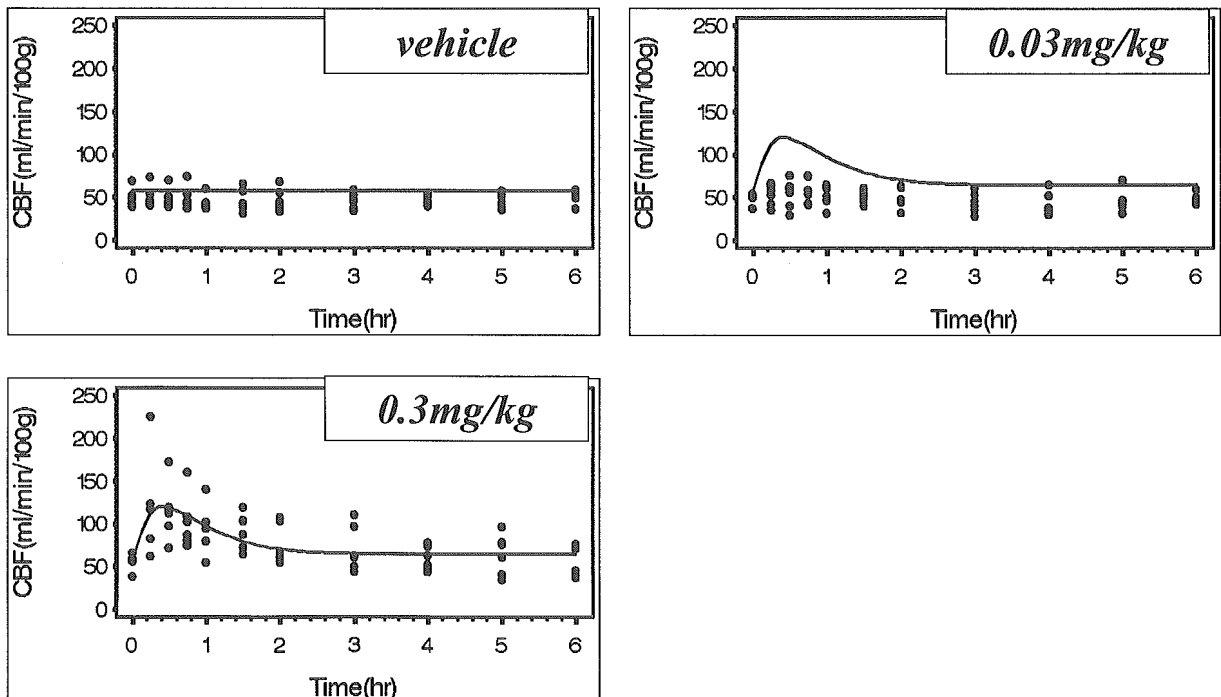


図3 時間-用量反応曲線のあてはめ (状態数 N が3の場合)

C. 研究結果

1. 時間反応関係のあてはめ

検討するモデルでは、状態数であるNの数をはじめに指定する必要がある。予備検討ではNは3として、

検討を行った。図2にそれぞれvehicle群、0.03mg/kg群、0.3mg/kg群をあてはめた結果を示す。あてはまりは良好である。

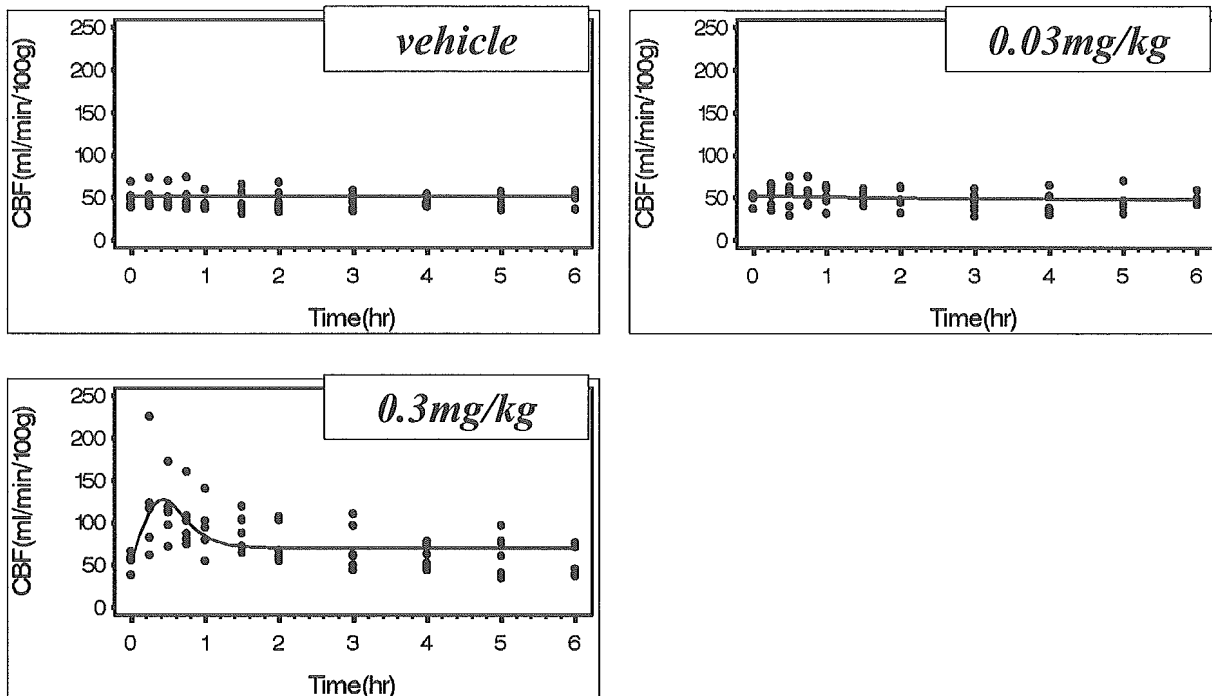


図4 時間-用量反応曲線のあてはめ (状態数Nが4の場合)

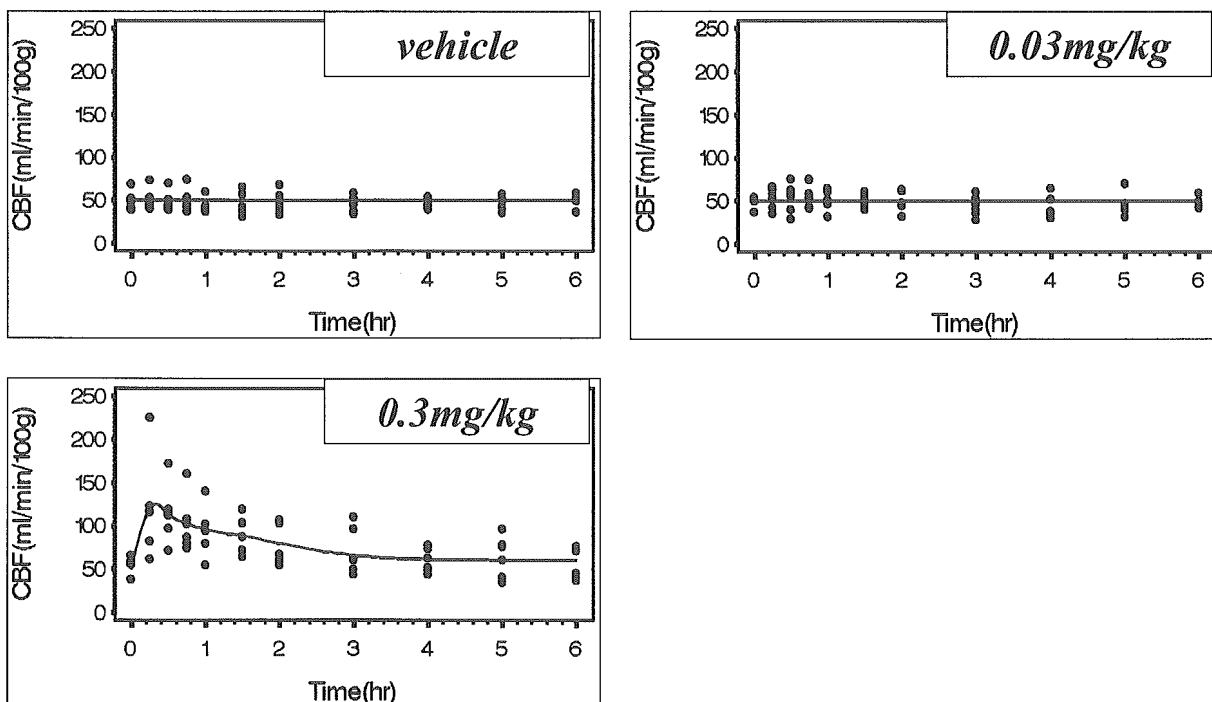


図5 時間-用量反応曲線のあてはめ (状態数Nが5の場合)

表1 状態数と残差平方和

状態数N	残差平方和
3	94557.5
4	56509.6
5	54166.6

2. 時間-用量反応関係のあてはめ

予備的な検討として用量Dを固定した時間反応曲線のあてはめはすべての群で良好であったため、時間-用量反応曲線のあてはめを行った。この検討でも予備検討と同様に状態数Nは3としたが、さらにNを4の場合と5の場合についても検討を行った。いずれの場合も非線形最小二乗法は収束し、パラメータの推定値を得ることができた。結果を図3～5に、残差平方和を表1に示す。

Nを3としたときには、0.03mg/kgでのあてはめは明らかに悪い。状態数Nが4と5の時に比べ残差平方和の値もこのときも大きい。一方、状態数Nを4、5としたとき、あてはめは良好であり、残差平方和もNが3のときに比べ、かなり改善している。

D. 考 察

1. 検討で適用したモデルの解釈

検討したモデルは、個々の状態においてその反応がとる確率について時間-用量反応関係モデルを想定しており、測定値として得られる反応はこれらの重み付きの和であるため、推定されるパラメータの値ひとつひとつにおける解釈はやさしくはない。また、状態数を示すNも実際にその数の状態があるわけではない。本稿では、Nを状態数と呼んでいるが、このパラメータは柔軟性に対するパラメータという解釈をすべきであろう。

2. 状態数の選択

吉村ら(1997)は、データから想定される反応の形に近いモデルとしてガンマ関数型のモデルを採用している。これに対して本研究で用いたモデルは、形としての制約は少ない。このモデルでは、状態の数Nを指定する必要があるが、結果で示したように、この数が多いほど複雑な形を捉えることができる。しかし、このことは逆に誤差の変動による変化も捉え易くことに

なる。したがって、なんらかの方法でNの数を決めることが必要である。実際にこの方法を用いるときは、何らかの手順に基づき客観的にNの数を決めることが望ましいと思われる。一つの方法は、残差平方和に基づきNの数の異なるモデル間で検定を行うことが考えられる。同様に、統計的モデル選択の方法は利用できるであろう。具体的な方法は他の機会に検討したい。

3. 用量依存性の評価

本検討では、あてはめという点を重視したが、現実にはこの方法を用いる場合、用量が変わることにより、反応に変化があるかどうかを客観的に判断を下したい。おそらく事例で用いたデータでは、反応のピークと反応の面積に変化があるかどうかに興味の対象となるであろうと思われる。具体的な方法論は課題としたい。

4. 初期値の設定等、計算機上の問題

非線形最小二乗法では、初期値を与える必要がある。初期値により結果が変わることがあるのである。検討したモデルで、解釈可能なものは R_N であり、これは用量が0における反応である。したがって、 R_N の初期値は用量0での反応の平均値を用いればよいであろう。しかし、他のパラメータについては、このように簡単にはいかない。初期値は、今後なんらかの方法で設定できるようにすべきであろう。

その他に数値計算上の問題として、本検討では(2)式を直接指定していない。

$$\exp(-ktD^n)$$

の部分が計算途中で破綻することが多かったため、

$$\exp(-kt \exp(n \ln(D)))$$

とした。また、用量0 (vehicle群)で対数はとれないので、ダミー変数を用いて用量0とそれ以外の用量との計算で別の式を用いた。

E. 結 論

本検討では、Holzhütterら(1995)の提案するモデルにもとづき、時間-用量反応曲線あてはめの実施可能性の検討を行った。用いた事例については、あてはめは良好であったことから、様々な時間-用量反応型データにこのモデルを適用することは可能であると考えられる。

しかし、時間-用量反応型データの解析方法として、

本検討で検討している曲線あてはめのアプローチが、t 検定や分散分析と同様に本アプローチが用いられるようになるためには、いくつかの検討事項が課題として残っている。最も大きな課題は、その使い方であろう。我々は、あてはめるモデルの選択、あてはめの評価、結果の表記などを含めて、このアプローチをどのような手順でどう使えばよいかを示すガイドが必要であるうと思っている。また、本検討で用いた事例以外にも複数の事例を用いて、このアプローチが様々な時間-用量反応型データに適用可能であることを示すことが必要であると思われる。本検討で、課題としたいくつかの事項とともに、他事例への適用、曲線あてはめのアプローチについてのガイドの作成は次年度にまとめることにしたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 参考資料

- (1) Holzhütter H., G. and Quedenau J., Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biologocal Systems, Vol3 (1995) pp.127-138.
- (2) 松本一彦、橋本修二、吉村功 薬効薬理データの統計解析Q&A. 日薬理誌108 (1996) pp.186-188.
- (3) 吉村功、大森崇 薬理試験における統計解析のQ&A -反復測定データの解析法への一提案-。日薬理誌110 (1997) pp.333~340.

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書
国際的審査協力のための医薬品の評価方法の確立
ーバイオテクノロジー医薬品の効力比較法の基礎的検討ー

分担研究者 豊島 聰（国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター センター長）
研究協力者 鹿野 真弓（国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター 審査官）
嶋澤るみ子（国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター 審査官）
永田 龍二（国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部 主任研究官）

研究要旨

近年、バイオテクノロジー医薬品開発の技術は目覚ましい発展を続けており、医薬品としての有効性・安全性の向上や製造工程の効率化を目的として、研究開発段階や承認・上市後に製造方法の改良が行われる場合が少なくない。そのような製造方法の変更を審査当局が承認／許可する際には、変更前の製造方法により製造された製品と変更後の製造方法により製造された製品との間において、医薬品としての有効性・安全性のcomparability（同等性／同質性）を確認することが必須である。また、製造者においても、このような比較評価は当該医薬品開発の方向性を決定する際に重要な判断根拠を与える。Comparabilityについては、2002年2月の日米EU医薬品規制調和会議（ICH）においてガイドライン策定のための専門家グループの設定が正式に提案され、現在作業が進められているところである。

本研究においては、ICHガイドラインの策定に先立つ複数のモデルデータの収集、それらデータの類型化及びcomparabilityに関する科学的評価方法の確立を目的とする。バイオテクノロジー医薬品のモデルとしては、構造上の不均一性が発生しやすい特質を有する糖たん白を選定し、製造方法スキームの変更又は製造方法中、細胞培養工程、精製工程等、各工程における具体的な製造方法・製造条件の変更の内容及び程度が、当該モデルたん白の物理的・化学的性質・生物学的性質・免疫学的性質に及ぼす影響を評価・分析することとした。最初に検討するモデル糖たん白としては、シクロオキシゲナーゼ(COX)-2を選択した。今年度は、昨年度に引き続き、さまざまな培養条件や精製方法により得られたCOX-2の特性を評価する新たな手段の開発を目的として、COX-2を選択的に阻害する新規化合物の探索を行った。

COX-2を選択的に阻害する新規化合物の探索においては、昨年度までに得られた構造活性相関の情報を基に、さらにサリドマイドのフタルイミド骨格部分を基本骨格としたフタルイミド誘導体及びホモフタルイミド誘導体を各種合成し、アスピリンをコントロール化合物としてCOX-1/2阻害活性を測定した。アスピリンより約100倍強力なCOX阻害活性をもつことが見出されたホモフタルイミド誘導体の構造を基に合成したフタルイミド誘導体及びホモフタルイミド誘導体においては、COX-1/2選択性の向上は認められなかったものの、アスピリンより強いCOX阻害活性を有する新たな誘導体が見出され、さらにフタルイミド及びホモフタルイミド骨格上の置換基がCOX阻害活性に与える影響についての知見も得られた。今回合成した誘導体から得られた構造活性相関の情報を適用すれば、COX-2

選択性の高い新規COX阻害化合物が開発可能と考えられる。

昨年度までにヒト大腸がん等の株化細胞を用いて、発現細胞の違いや培養条件の変更により発現するCOX-2の構造に違いが生じることを示唆する結果が得られていることから、今年度はデータの報告は行わないが、種々の培養条件下での培養により得られたヒトCOX-2糖鎖構造の解析と並行して、異なる培養条件で発現させた個々のCOX-2における新規合成COX-2阻害剤の阻害活性の違いに関する検討を行っている。

キーワード：医薬品、Comparability、シクロオキシゲナーゼ、COX-2、サリドマイド

A. 研究目的

近年、バイオテクノロジー医薬品開発の技術は目覚ましい発展を続けており、医薬品としての有効性・安全性の向上や製造工程の効率化を目的として、研究開発段階や承認・上市後に製造方法の改良が行われる場合が少なくない。そのような製造方法の変更を審査当局が承認/許可する際には、変更前の製造方法により製造された製品と変更後の製造方法により製造された製品との間において、有効成分である目的物質の分子特性・品質特性が目的物質関連物質を含めてみた際に同等/同質であるか、不純物の種類・混在量にどの程度の変化があり、それが製品にどのような影響を与えるか等について、科学的かつ合理的に比較評価した上で、最終的には、製造方法変更前後での製品間における医薬品としての有効性・安全性のcomparability（同等性/同質性）を確認することが必須である。また、製造者においても、このような比較評価は当該医薬品開発の方向性を決定する際に重要な判断根拠を与える。米国食品医薬品庁（FDA）及び欧州医薬品庁（EMA）からcomparabilityの考え方を示したガイドライン（FDA = FDA Guidance Concerning Demonstration of Comparability of Human Biological Products, Including Therapeutics Biotechnology-derived Products (1996)、Guidance for Industry – Changes to an Approved Application: Biological Products – (1997)、Guidance for Industry – Changes to an Approved Application for Specific Biotechnology and Specified Synthetic Biological Products – (1997)、EMA = Note for Guidance on Comparability of Medicinal Products Containing Biotechnology-derived Proteins as Drug Substance (2001))が出されているものの、日米欧の審査当局間の考え方は

はまだ統一されておらず、2002年2月にBrusselsにおいて開催された日米EU医薬品規制調和会議（ICH）においてcomparabilityに関するガイドライン策定のための専門家グループの設定が提案され、現在作業が続けられているところである。

バイオテクノロジー医薬品は、人為的に完全に制御することが不可能な細胞の生合成過程を用いて生産されるために、生産物において分子間で構造面での不均一性が発生することが多い。特に翻訳後修飾として糖鎖付加を受ける糖たん白質性医薬品では、たん白質性医薬品全体に共通するプロセッシング等による1次配列の多様性のみならず、糖鎖結合部位への糖鎖の付加の有無、糖鎖の種類・構造・存在割合等の要因により、分子種として極めて多様な成分（グリコフォーム）から構成される。本研究においては、ICHガイドラインの策定に先立つ複数のモデルデータの収集、それらデータの類型化及びcomparabilityに関する科学的評価方法の確立を目的とする。バイオテクノロジー医薬品のモデルとしては、構造の不均一性の面で上記の特質をもつ糖たん白を選定し、製造スキームの変更又は製造方法中、細胞培養工程、精製工程等、各工程における具体的な製造方法・製造条件の変更の内容及び程度が、当該モデルたん白の物理的・化学的性質・生物学的性質・免疫学的性質に及ぼす影響を評価・分析することとした。

最初に検討するモデル糖たん白として、シクロオキシゲナーゼ（COX、プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ）のアイソザイムの1つであるCOX-2を選択した。COXは、細胞膜等に存在するリン脂質からホスホリパーゼA2によって切り出されたアラキドン酸をプロスタグランジン（PG）H2に変換する

酵素で、各種PGやロイコトリエンの産生において重要な酵素である。COXには、体内の多様な組織に広く分布し構造的に発現しているCOX-1、及び腎臓などで発現している他は、リポ多糖などの炎症性刺激やホルモン等の刺激により一過性に誘導され、炎症、血液凝固系、がん化等にも密接に関連するCOX-2の2つのアイソザイムが知られている。共に約600アミノ酸より成る糖たん白質で、両者のアミノ酸配列の相同性は約70%である。また、各分子内のN-糖鎖付加部位は、それぞれ3カ所及び4カ所であることが知られている。COX-1及びCOX-2に対する阻害活性を有する非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は古くから医療現場で広く用いられているが、近年、NSAIDsによる胃粘膜障害等の副作用はCOX-1の阻害により引き起こされることが示されたことから、より副作用の少ない抗炎症薬開発を目的としたCOX-2選択的阻害剤の探索の他、大腸がんへのCOX-2の関与メカニズム解明及びCOX-2をターゲットとした抗がん剤の開発など、COX-2は医薬品開発のターゲットとして注目を集めている。

今年度は、昨年度に引き続き、さまざまな培養条件や精製方法により得られたCOX-2の特性を評価する新たな手段の開発を目的として、COX-2を選択的に阻害する新規化合物の探索を行った。

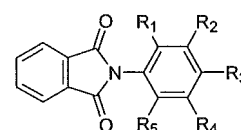
B. 研究方法

サリドマイドがリポ多糖誘導によるCOX-2の発現誘導を抑制するとの報告 (Clin. Cancer Res. (2001) 7, 3349-3355) が発表されたことから、サリドマイドがCOX-2選択的阻害剤の新たなリード化合物になることを期待し、サリドマイドのフタルイミド骨格部分を基本骨格としたフタルイミド誘導体及びホモフタルイミド誘導体を各種合成し、アスピリンをコントロール化合物としてCOX-1/2阻害活性を測定した。

C. 研究結果

昨年度までの結果から、3, 5-ジメチルフェニルフタルイミド誘導体 (Figure 1) 及び3, 5-ジメチルフェニルホモフタルイミド誘導体 (Figure 2) がアスピリンに比べて強力なCOX阻害活性を有することが明らかとなっていたことから、今年度は、フタルイミド骨格及び

ホモフタルイミド骨格上の置換基のCOX阻害活性に与える影響を検討することを目的に、新たな3, 5-ジメチルフェニルフタルイミド誘導体及び3, 5-ジメチルフェニルホモフタルイミド誘導体を合成し、それらのCOX-1/2阻害活性を評価した。その結果、フタルイミド骨格に電子吸引基であるニトロ基を導入すると、ほとんどの誘導体でCOX阻害活性がみられなくなったが、フタルイミド骨格の2つのカルボニル基を還元し、イソインドリン骨格とした場合にはアスピリンよりも強力なCOX-2阻害活性 (約60倍) が認められた (Figure 3)。さらに、フタルイミド骨格に電子供与基であるアミノ基を導入しても、ほとんどの誘導体でCOX阻害活性がみられなくなったが、フタルイミド骨格のカルボニル基を1つ還元した場合には、COX-1阻害活性の増強が認められた (Figure 4)。ホモフタルイミド骨格又はホモフタルイミド骨格をキナゾリンジオン骨格に変換し、ニトロ基又はアミノ基を導入した場合、ほとんどの誘導体でCOX阻害活性が認められなくなった (Figure 5及びFigure 6)。



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	RA1	RA2
H	H	H	H	H	—	—
Me	H	H	H	H	—	—
Me	H	H	H	Me	—	—
H	Me	H	Me	H	7.4	13.2
Me	Me	H	Me	H	0.33	1.18
Me	Me	H	Me	Me	0.20	0.67

Figure 1. COX-inhibiting activities of phenylphthalimide derivatives. Inhibitory activity of the compounds on COX-1 and COX-2 was assayed by the use of Colorimetric COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman, No. 760111) according to the protocol recommended by the supplier. The activities of compounds are presented as relative activities [RA values (RA1 and RA2, for COX-1 and COX-2 inhibiting activities, respectively)] defined as $IC_{50}(\text{aspirin}) / IC_{50}(\text{test compounds})$.