

【研究紹介】

製紙副産物を用いた動物用関節炎治療薬の開発

奥村 正裕

北海道大学大学院獣医学研究院 臨床獣医学部門 獣医外科学教室

-----北獣会誌 67, 187~192 (2023)

はじめに

当研究室では、大手製紙会社と共同で動物用関節炎治療薬の開発を行っています。現在、本学産学・地域協働推進機構内に王子ファーマ株式会社と産学連携研究室をおき、日本中央競馬会畜産振興事業の支援を受けて、大学内では主に当該物質の作用機序解析を進めるとともに、国内外の機関と連携して臨床研究を進めています（資料1）。今後、北海道獣医師会会員の先生方にもさらにご指導、ご協力をいただき、純度が高く、価格競争力のある薬品の開発を進めてまいります。

ポリ硫酸ペントサン（PPS）は木質（現在は、西洋ブナが使用されている）から抽出されたヘミセルロースを硫酸化することによって半合成されたもので、ヘパリン類似の抗凝固能を持ち、また抗炎症作用を有する物質です。製剤としては、ヒト間質性膀胱炎の経口治療薬（主に米国）、動物の関節炎治療薬（主に欧州、オセアニア）として使用されています。最近、米国にて製剤のひとつ（Zycosan：Anzac Animal Health, USA）が馬用変形性関節症治療薬としてFDA（米国食品医薬品局）に承認されました。国内では、オーストラリア製の製剤（カルトロフェン・ベット：住友ファーマアニマルヘルス、大阪）が犬変形性関節症治療薬として輸入・使用されています。国内では、長崎大学医学部整形外科と旭化成によって、ヒト変形性膝関節症治療薬として臨床研究および治験が行われたこともありました。その臨床研究成果では、患者にPPSを規定回数投与（週1回、8週間）すると、疼痛スコアが有意に低下し、それが投与終了後も相当期間持続することがわかりました。さらに軟骨代謝マーカーを解析すると、関節症で持続的に関節構造が破壊されている反応もかなり長期間抑制されていることが示されました。また、この物質は、ヤコブ病の治療薬候補であることが議論されたり、犬のI型ムコ多糖症に

おける抗炎症とグリコサミノグリカン蓄積を減少させることが示されたり、話題の多い物質です。しかしながら、PPSのこのような特徴的な作用に関する機序解析は必ずしも進んでいません。

ここでは、本事業初期に、モンゴル生命科学大学との共同研究として、モンゴル国の競走馬を用いたPPSの臨床研究について公表した論文のなかから、本事業を展開させるきっかけとなった研究内容の一部を公表したものを紹介します。

紹介論文の内容

Clinical evaluation of pentosan polysulfate as a chondroprotective substance in native Mongolian horses
（モンゴル在来馬における軟骨保護物質としてのポリ硫酸ペントサンの臨床的効果）

Mijiddorj Tsogbadrakh¹⁾, 須永隆文¹⁾, Eugene C. Bwalya¹⁾, Suranji Wijekoon¹⁾, Ekkapol Akaraphutiporn¹⁾, Yanlin Wang¹⁾, Carol Mwale¹⁾, Adiya Naranbaatar²⁾, 金尚昊¹⁾, 細谷謙次¹⁾, Damdinsuren Alimaa²⁾, 奥村正裕¹⁾

- 1) 北海道大学大学院獣医学研究院獣医外科学教室
- 2) モンゴル生命科学大学獣医学部外科

Jpn J Vet Res, 68, 203-208 (2020)

要約

ポリ硫酸ペントサン（PPS）は、人間や動物の関節疾患の治療薬として広く使用されるが、その有効性に関する客観的かつ完全なエビデンスはまだ確立されていない。この研究の目的は、PPSの有効性の客観的な尺度を提供することである。25頭の健康で競走馬として飼養されて

資料1
2019年4月12日北海道新聞記事

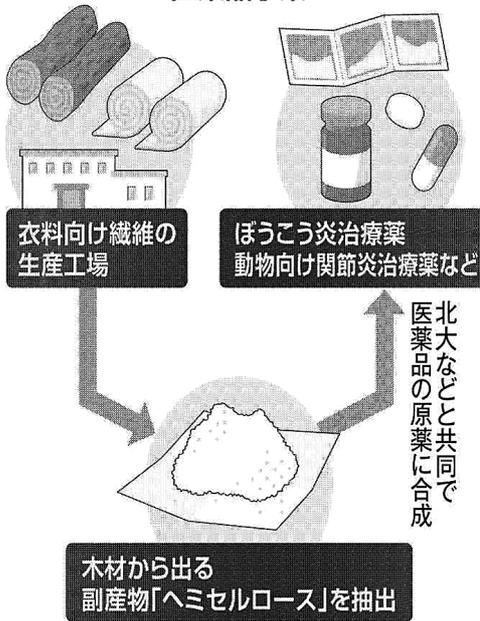
王子HDと北大 医薬品共同開発

木材繊維の副産物活用

王子ホールディングス（HD、東京）は11日、北大と共同で、木材から衣料用繊維を造る過程で生じる未利用の副産物「ヘミセルロース」を生かし、医薬品原薬の開発を始めると発表しました。ぼうこう炎治療薬などを手掛ける国内外の製薬会社に供給する。ペーパーパレスタで紙市場が縮小する中、医薬品事業を新たな収

王子HDは2016年末に奥村教授との共同研究に着手。傘下の王子製紙米子工場（鳥取県）で出たヘミセルロースを化学合成し、

王子ホールディングスが取り組む 医薬品事業



益の柱に据えたい考えだ。王子HDと北大は今年1日、北大産学・地域協働推進機構内に専任部局を開設した。北大獣医学研究院の奥村正裕教授（臨床獣医学）を中心に研究を進める。

炎症を抑える効果があるとされる「ポリ硫酸ペントサリナトリウム（PPS）」を抽出する技術を確立した。数百頭規模の動物実験を通じて、PPSの効能も確認してきた。

（大阪）の協力を得て、医薬品原薬の量産化試験に入る。今後、道内など各製紙工場に生産拠点を設けることも視野にしている。

PPSは、1940年代から欧州で研究開発が進み、欧米では近年、人間のぼうこう炎のほか、馬や犬の

関節炎の治療薬に使われている。現在、世界の関連市場は数百億円規模に上るが、日本では輸入された犬向けの関節炎治療薬が使われる程度で、人間の医薬品としては承認されていない。

王子HDは欧米向けに販路開拓を進めるとともに、10年後をめどに国内でも新薬の承認を受けたい考え。

「発電などのボイラーで燃やしていたヘミセルロースを有効活用できる」（同社）としている。奥村教授は海外より安価な原薬を開発し、国内で生産する安全性をPRできたら」と話している。

（長谷川紳二）

いる在来モンゴル馬を3つのグループに無作為に割り当てた。それぞれのグループの馬にPPSの3つの異なる用量（0/1.2/3.0 mg/kg体重あたり）を週に1回、連続4週間筋肉内投与した。初回投与から14および28日後の血清軟骨オリゴメリックマトリックスポロテイン（COMP）/プロコラーゲンIIC-プロペプチド（CPII）の相対比は、PPS 0/1.2/3.0 mg/kg投与群でそれぞれ97.9/87.6/61.8（14日後）および94.2/104.3/88.1（28日後）であった。これらの結果は、供試馬における軟骨代謝のバランスがPPS投与によって用量依存性に有意に同化（軟骨保護）に誘導されることを示している。

背景と目的

PPSは、ブナ材由来の半合成ポリ硫酸化キシランである⁸⁾。PPSは弱い抗凝固作用⁹⁾と抗炎症作用を示すヘパリノイドであり、間質性膀胱炎¹⁶⁾、変形性関節症¹⁾、ムコ多糖症⁶⁾などの疾患の対症療法薬として、ヒトおよび動物に広く使用されている。PPSが変形性関節症の治療薬として作用する可能性のある病態には、滑膜炎、軟骨下骨とその周辺構造における微小循環、軟骨下骨硬化、関節軟骨異化（変形性関節症時の軟骨破壊）などと考えられている⁵⁾。競走馬および競技馬の関節炎治療や関節の健康状態維持にPPSが多く使用されているにもかかわらず¹⁸⁾、PPSがどのように臨床的な効果を発現しているのかを示すエビデンスは非常に限られている。本研究の目的は、PPSが通常の野外飼養されているモンゴル競走馬の日常的な関節負荷、すなわち関節軟骨分解活性を臨床的に制御できるかを客観的手法で証明することである。

材料および方法

本研究では、馴致後の2歳のモンゴル在来馬25頭（平均体重±標準誤差：242±9 kg、雄14頭、雌11頭）を無作為に選択した。すべての馬は、モンゴル国ヘンティ県にある1地区の同じ放牧条件で飼養されていた。供試馬は、身体検査、血液生化学検査および整形外科的検査で健康であることが確認された。PPS（OJI-200EI：王子ホールディングス、東京）を、それぞれ2群10頭ずつの馬に週1回3.0または1.2 mg/kg体重を合計4回、筋肉内注射した。別の5頭の馬には、PPS投与と同じ手順で対照としてリン酸緩衝生理食塩水が注射された。馬は各群に無作為に割り当てられ、PPS投与は非盲検法で行われた。本研究で用いた馬へのPPSの使用は、夏場に運動量が極端に増える遊牧形態のモンゴル在来馬の多くが関節症を発症する状況において、PPSが日常運動の関節負荷を軽減できるかを客観的に評価することを目的とし、

所有者の合意のもと行われた¹⁸⁾。動物の評価として、PPSあるいはリン酸緩衝生理食塩水投与時に身体的および整形外科的評価により関節症以外の病態の有無を評価し、初回投与時、その2および4週間後に血液を採取した。血清を分離後、血清は分析に用いるまで-80℃に凍結保存された。血液生化学検査はアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、乳酸脱水素酵素（LDH）、血中尿素窒素（BUN）、およびクレアチニン（Cr）などを、フジドライケムNX500（フジフィルム、東京）を用いて実施した。軟骨代謝マーカーのCOMPはMy BioSource（San Diego, CA, USA）にて、CPIIはIBEX Pharmaceuticals（Montreal, QC, Canada）にて、それぞれ測定キット製造元のマニュアルに従って酵素免疫測定した。すべての処置は、モンゴル生命科学大学獣医学部の倫理標準に基づき、モンゴルの登録獣医専門家によって行われた。異なる量のPPS投与群間で初回投与の14日後または28日後のCOMP/CPII相対比の変動は分散分析（ANOVA）を用いて解析した。各群間のPPS投与によるCOMP/CPII比変動の有意性は、線形混合効果モデル適合解析によって評価した。統計的有意水準は、*p*値が0.05未満に設定した。

結果

PPS投与および観察期間中、注射部位、その他に身体的な病変はみられなかった。血清生化学検査では、分析されたすべてのパラメーターは参照範囲内であった（表1）。初回投与から14および28日後の間における、関節軟骨代謝バランスが表現される血清COMP値と血清CPII値の相対比は、それぞれPPSが0、1.2、3.0 mg/kg投与された3群間で97.9/87.6/61.8（0～14日間）および94.2/104.3/88.1（0～28日間）であった（図1）。PPS 3.0 mg/kg投与群におけるCOMP/CPII比は、初回投与・14日後間と初回投与・28日後間の両方で、PPS 0 mg/kg投与群のCOMP/CPII比低い傾向を示した（それぞれ*p*=0.2517；*p*=0.1762）（図1）。さらに各PPS投与群における投与経過における血清COMP値および血清CPII値の変化を線形混合効果モデルでシミュレートした（図2）。その結果、PPS投与量は軟骨代謝の同化マーカーである血清CPII値と正の相関がある傾向を示し（*p*=0.167）、PPS投与量と注射は血清COMP値と統計的に有意な負の相関を示した（*p*=0.027）。

考察

以上の結果は、PPSの作用機序のひとつと考えられている軟骨代謝における分解活性の抑制が臨床的な条件下で見出したものであり、PPSが多くの関節疾患でも効果

表 1. 各群の血液生化学的検査 (ALT、LDH、BUN、Cr) 結果

	days after injection	PPS 3.0 mg/kg bw	PPS 1.2 mg/kg bw	PPS 0 mg/kg bw
ALT (U/l)	0	16.6±6.5	18.4±14.9	11.8±2.8
	14	9.8±2.2	10.3±2.5	8.2±2.2
	28	10.6±2.2	9.2±6.1	7.2±1.2
LDH (U/l)	0	481±105	634±165	465±119
	14	620±112	452±157	363±173
	28	535±73	542±144	351±103
BUN (mg/dl)	0	19.1±2.6	20.9±4.6	19.0±5.2
	14	20.9±3.3	19.8±4.8	17.1±4.1
	28	19.2±1.8	17.3±4.3	11.3±3.4
Cr (mg/dl)	0	0.52±0.24	0.65±0.10	0.54±0.12
	14	0.88±0.08	0.84±0.15	0.60±0.13
	28	0.84±0.05	0.93±0.16	0.59±0.14

各群の検査値は、すべて正常な基準範囲内であった
値は、平均±標準偏差で表した

的に軟骨異化活性を抑制できることが示唆される⁵⁾。これまで、*in vitro*培養細胞を用いた検討においてPPSが古典的なマイトジェン活性化プロテインキナーゼ経路のいくつかに対して抑制的に作用すること^{1,15)}、炎症環境下で本来の硝子軟骨としての表現型を失った軟骨細胞の分化度をPPSが適切な状態に調節すること⁴⁾、滑膜炎を調節しうる造血幹細胞由来の細胞の分化誘導をPPSが制御すること^{2,17)}、さらに関節炎モデルラットにおいてPPSが滑膜炎の発現を抑制すること¹⁹⁾などが、PPSの機序として実験的に示されている。馬、特に競技馬、競走馬の所有者とトレーナーにとって、運動機能の中核となる関節における関節炎発症予防と治療の両方のためにPPSが注目されて、実際に用いられている。前述のように実験的にはその効果がシミュレーションされているが、臨床的な研究ではその効果が示唆されているが、客観的な手段によるエビデンスを提供するには至っていなかった^{3,7)}。これは、大型動物における軟骨代謝マーカーの基準値に大きなばらつきがあり、得られたデータを適切に解釈できていない可能性があることを示唆している。

個体差が大きい環境では、平均値または中央値を使用した統計分析は結果の生理学的変動を適切に表現するのに適していない。軟骨同化マーカー (CPII) と軟骨分解マーカー (COMP) のバランスに関する結果は、PPSが陰性対照と比較して異化作用をより少なくする傾向を示唆していた (図 1)。個体差を最小限にするために、REMLに適合する線形混合効果モデルを使用して分析した結果、COMPの変化がPPSの用量および連続使用と有意に相関することが明らかになった。すなわち、PPSが関節疾患の過程で生じる軟骨分解を抑制することが、臨床的な条件下で証明された (図 2)。

モンゴルの在来馬は、遊牧民によって、モンゴルの草原の特定の気候と環境に合わせた伝統的な方法で飼養されている。夏は過度の運動と遊牧のための定期的な長距離移動が頻繁に行われ、冬は動きが極端に少なく、栄養摂取量が非常に制限される。すなわち、これらの馬は短い温暖な季節に荒れた地面で活発に動き、競馬に供され、骨格系に多大な身体的ストレスを強いられる^{11,13)}。このような条件のもと、関節軟骨の分解活性は確実に高くなり、その結果、多くの馬が徐々に変形性関節症を発症する。変形性関節症は、運動競技を課される馬で最も一般的な疾患のひとつである¹²⁾。軽度のヒト変形性膝関節症にPPSを投与した臨床研究では、軟骨分解マーカーのひとつであるC2Cの有意な減少が観察され、PPSによる軟骨分解の抑制効果が示唆された¹⁰⁾。病的な関節軟骨代謝を2つの軟骨代謝マーカーを用いて検討した本研究の結果は、個体差の大きい馬におけるPPSの軟骨代謝調節を示した初のエビデンスになる。血清の生化学的検査および整形外科的検査では、PPS投与に関連した悪影響は見られなかった。

基本的にPPSは非常に安全であると信じられており、ヒトの疼痛を伴う特定の間質性膀胱炎の唯一の鎮痛・治療薬として、生涯経口投与が承認されている (米国FDA)¹⁹⁾。最近、PPSを15年以上の経口投与された60歳以上のヒトに視力障害が生じる可能性があることが一部の眼科医によって報告された¹⁴⁾。一方、PPSを短期間使用しても重大な有害事象が発生することはないと考えられているが、安全性を確立するには、PPSの作用機序に関する知識と臨床経験の蓄積が必要である。

結論として、PPS投与による軟骨代謝マーカー変動の分析によって、PPSが遊牧形態のモンゴル在来馬におけ

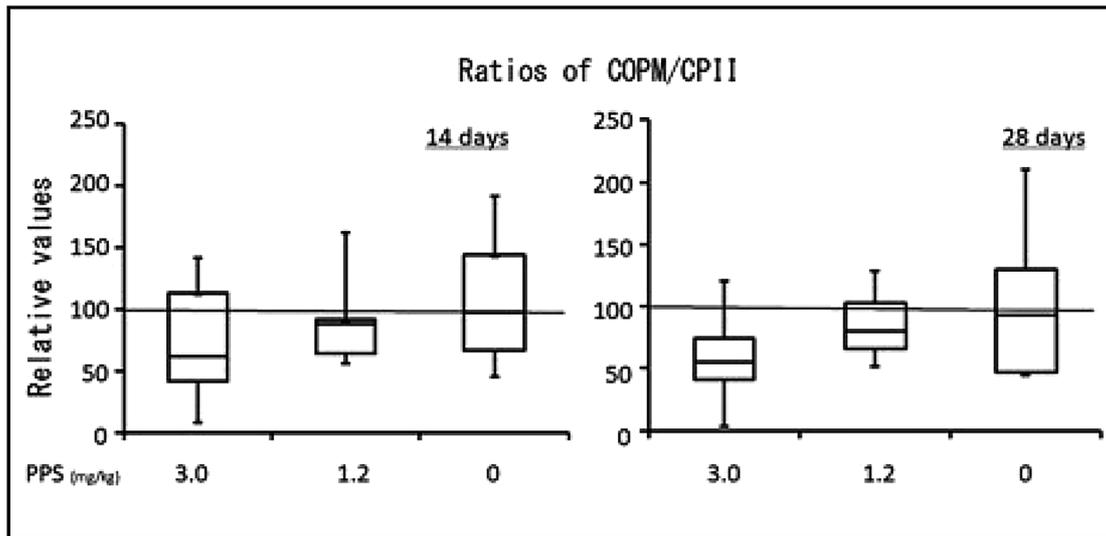


図1. 各容量のPPSの初回注射後14日および28日におけるCOMP/CPII相対比の変動
 各軟骨代謝マーカーの相対値は、初回投与時に対する%値で示した
 統計学的な解析は分散分析 (ANOVA) を使用して、最初の注射の14日後または28日後に、PPS
 の異なる用量グループ間でCOMP/CPII相対比を比較した
 $p < 0.05$ にて有意ありとした

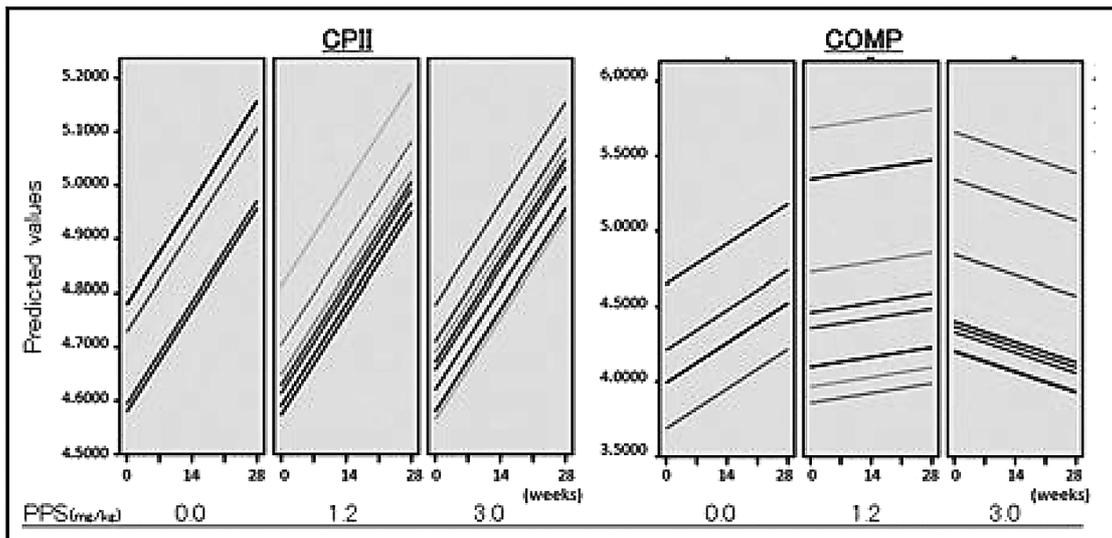


図2. 線形混合効果モデルを使用した、PPS投与が軟骨代謝に及ぼす影響の分析
 PPS投与は軟骨代謝同化マーカーCPII値と正の相関がみられた (左)
 一方、PPS投与 (3.0 mg/kg) は有意性にCOMP値と負の相関がみられた (右) ($p=0.027$)
 各バーは、それぞれの馬のマーカー量を示す
 マーカー量とPPS投与の容易な関連性をREMLに適合する線形混合効果モデルによって評価した
 $p < 0.05$ にて有意ありとした

る特徴的飼養環境に関連した骨格負荷によって生じる関節軟骨代謝分解活性を抑制させることについて信頼できる臨床的エビデンスが得られた。

謝辞

著者一同、貴重なPPS製剤を提供し、研究実施のためにサポートを提供して下さった王子ホールディングス株式会社および同社研究所の皆様にご心から感謝します。

参考文献 (文献番号は原論文に準拠)

[1] Bwalya EC, Kim S, Fang J, Wijekoon HMS, Ho-soya K, Okumura M: Pentosan polysulfate inhibits IL-1 β -induced iNOS, c-Jun and HIF-1 α upregulation in canine articular chondrocytes, PLoS ONE 12, e0177144 (2017)
 [2] Bwalya EC, Kim S, Fang J, Wijekoon HMS, Ho-

- soya K, Okumura M: Effects of pentosan polysulfate and polysulfated glycosaminoglycan on chondrogenesis of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in alginate and micromass culture, *J Vet Med Sci*, 79, 1182-1190 (2017)
- [3] Cruz AM, Hurtig MB: Multiple pathways to osteoarthritis and articular fractures; is subchondral bone the culprit? *Vet Clin North Am Equine Pract*, 24, 101-116 (2008)
- [4] Francis DJ, Hutadilok N, Kongtawelert P, Ghosh P: Pentosan polysulphate and glycosaminoglycan polysulphate stimulate the synthesis of hyaluronan in vivo, *Rheumatol Int*, 13, 61-64 (1993)
- [5] Ghosh P: The pathobiology of osteoarthritis and the rationale for the use of pentosan polysulfate for its treatment, *Semin Arthritis Rheum*, 28, 211-267 (1999)
- [6] Hennermann JB, Gökce S, Solyom A, Mengel E, Schuchman EH, Simonaro CM: Treatment with pentosan polysulphate in patients with MPS I; results from an open label, randomized, monocentric phase II study, *J Inher Metab Dis*, 39, 831-837 (2016)
- [7] Jambaldorj S: Horse treasure book (Морин эрдэнэсудар), 1st ed, Central library of Mongolian, Ulaanbaatar, Mongolia, 11-14 (1996) (in Mongolian)
- [8] Koenig TJ, Dart AJ, McIlwraith CW, Horadagoda N, Bell RJ, Perkins N, Dart C, Krockenberger M, Jeffcott LB, Little CB: Treatment of experimentally induced osteoarthritis in horses using an intravenous combination of sodium pentosan polysulfate, N-acetyl glucosamine, and sodium hyaluronan, *Vet Surg*, 43, 612-22 (2014)
- [9] Kramer CM, Tsang AS, Koenig T, Jeffcott LB, Dartb CM, Dartc AJ: Survey of the therapeutic approach and efficacy of pentosan polysulfate for the prevention and treatment of equine osteoarthritis in veterinary practice in Australia, *Aust Vet J*, 92, 482-487 (2014)
- [10] Kumagai K, Shirabe S, Miyata N, Murata M, Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M: Sodium pentosan polysulfate resulted in cartilage improvement in knee osteoarthritis—an open clinical trial, *BMC Clin Pharmacol*, 28, 7 (2010)
- [11] Losonczy H, Nagy I, Menyhei G: Management of chronic venous insufficiency with the combination of coumarin (Syncoumar) and oral pentosan polysulfate (PPS, SP 54) (preliminary report), *Orv Hetil*, 134, 291-295 (1993)
- [12] McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE: Evaluation of intramuscularly administered sodium pentosan polysulfate for treatment of experimentally induced osteoarthritis in horses, *Am J Vet Res*, 73, 628-633 (2012)
- [13] Orgil D, Lo Y: Racehorse lameness and treatment (Хурданморьдоголохэмгэгбаэмчилгээ), 1st ed, Mongolian University of Life Science, Ulaanbaatar, Mongolia, 16-21 (2019) (in Mongolian)
- [14] Pearce WA, Chen R, Jain N: Pigmentary maculopathy associated with chronic exposure to pentosan polysulfate sodium, *Ophthalmology*, 125, 1793-1802 (2018)
- [15] Sunaga T, Oh N, Hosoya K, Takagi S, Okumura M: Inhibitory effects of pentosan polysulfate sodium on MAP-kinase pathway and NF- κ B nuclear translocation in canine chondrocytes in vitro, *J Vet Med Sci*, 74, 707-711 (2012)
- [16] van Ophoven A, Vonde K, Koch W, Auerbach G, Maag KP: Efficacy of pentosan polysulfate for the treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome: results of a systematic review of randomized controlled trials, *Curr Med Res Opin*, 35, 1495-1503 (2019)
- [17] Wijekoon S, Bwalya EC, Fang J, Kim S, Hosoya K, Okumura M: Chronological differential effects of pro-inflammatory cytokines on RANKL-induced osteoclast differentiation of canine bone marrow-derived Macrophages, *J Vet Med Sci*, 79, 2030-2035 (2017)
- [18] Wijekoon HMS, Bwalya EC, Fang J, Kim S, Hosoya K, Okumura M: Inhibitory effects of sodium pentosan polysulfate on formation and function of osteoclasts derived from canine bone marrow, *BMC Vet Res*, 14, 152 (2018)
- [19] Wijekoon S, Kim S, Bwalya EC, Fang J, Hosoya K, Okumura M: Anti-arthritic effect of pentosan polysulfate in rats with collagen-induced arthritis, *Res Vet Sci*, 122, 179-185 (2019)