

厚生省
新薬開発研究費

低分子酵素阻害物質による
難病治療薬の開発研究

江 橋 班

平成元年度研究報告書

平成2年3月

研究報告書の作成にあたって

本年度は新薬開発研究の主旨に沿って、本研究班の眼目であったベスタチン及びESTの臨床における薬効判定の二重盲検試験に入った。その成果が待たれるところである。

この研究を通して明らかになったことは、筋ジストロフィーの自然経過について治療薬検定の指針となるような的確な資料が不十分であったことである。これはどうやら世界的な傾向であって、業績主義の欧米では、この点で我が国よりも杜撰であることは想像に難くない。意外なところに研究のアキレス腱があったわけである。筋ジストロフィー治療の現実性が乏しかった時代には、薬効判定の立場からの厳密な臨床観察及びテストとその統計学的取り扱いに真の意欲がわかなかつたとしても止むを得ないことであった。

この度、本研究班員の涙ぐましいまでの努力により、幾多のテストを並行させながら、多数の症例の数年にわたる経過が集計されたことは、今後の本症研究者に大きな福音となることは疑いない。

今回の報告に見られた、適切、簡潔なテストと統計的処理は、現代的な臨床試験の一つのモデルを確立したものであって、世界に誇るに足るものと考えられる。

この外にも診断法について、数多くの有意義な知見がもたらされたのも、本年度の特徴であり、その多くが我が国独自の開発である。臨床研究というものが本当の意味で我が国に根を下して来たということであろう。

平成2年3月

主任研究者 江橋節郎

目 次

I 分担研究報告

- 1) CANP 遺伝子のクローニングに関する研究 3
—CANP インヒビターの構造と機能—
東京都臨床医学総合研究所 鈴木 紘一 石田 重樹 榎森 康文
川崎 博史 西道 隆臣
青山学院大学理工学部 伊藤 尚
- 2) 細胞内 CANP の活性化とその阻害 7
東京都老人総合研究所 川島 誠一 林 昌美
- 3) CANP 阻害剤の合成11
東京理科大学理学部 向山 光昭 植木 正彬
大正製薬株式会社総合研究所 大関 正弘 花田 和紀 玉井 正晴
横尾 千尋 田名 見享 村田 充男
宮下さつき
- 4) プロリン含有ペプチド分解酵素とその阻害物質.....16
微生物化学研究所 青柳 高明 和田 孝雄 小川 慶治
小島 藤子 永井真知子 原田 滋子
- 5) MEL 細胞の機能とプロリルエンドペプチダーゼ21
国立精神・神経センター神経研究所 杉田 秀夫 塚原 俊文 石浦 章一
- 6) E-64-C および EST の薬物動態24
—蛍光 HPLC によるマウス血清および筋肉中濃度の測定—
九州大学薬学部 大倉 洋甫 巢 文峰 甲斐 雅亮
- 7) CANP 阻害剤の一般薬理学的研究30
—表面筋電図中の呼吸運動関連成分の定量化に基づく筋機能評価法に関する基礎的研究—
東京慈恵会医科大学第二薬理学教室 福原 武彦 加藤 總夫 木村 直史
高野 一夫 塚元 葉子
- 8) 骨粗鬆現象における Cathepsin B の関与と E-64誘導体の効果37
徳島大学酵素科学研究センター 勝沼 信彦 二川 健 唐渡 孝枝
大正製薬総合研究所 花田 和紀 樋口 昭平 村田 光男
- 9) 哺乳類 C-タンパク質のアイソフォーム特異的モノクローン抗体の作成および
それを用いた筋病変に伴う C-タンパク質アイソフォーム変換の解析41
千葉大学理学部生物学科 丸山 工作 大日方 昂 小島 崇

- 10) jimpy マウス脳ミエリン局在の Ca 依在性プロテアーゼ活性の変動46
和歌山県立医科大学第二生理学教室 辻 繁勝
- 11) mdx マウスに対する bestatin の効果49
東邦大学医学部大橋病院第四内科 木下 眞男 岸 雅彦 栗原 照幸
根本 博之 日高 隆信
- 12) ベスタチン投与 mdx マウスにおける骨格筋組織所見53
国立療養所宇多野病院 西谷 裕 板垣 泰子 斎田 恭子
- 13) DMD 骨格筋 CT の経時的変化の検討57
東京大学医学部脳研病理 中野 今治
国立療養所下志津病院 清水 潤 松村喜一郎
東京大学医学部脳研神経内科 川井 充 国本 雅也
- 14) Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における筋障害の進行過程61
—CT による経時的評価—
国立療養所東埼玉病院内科 石原 傳幸 青柳 昭雄 儀武 三郎
国立療養所東埼玉病院リハビリテーション科 里宇 明元 原 行弘 江端 広樹
近藤 国嗣
- 15) 筋ジストロフィー症の血清 LAP について65
国立療養所兵庫中央病院 高橋 桂一
国立療養所兵庫中央病院研究検査科 益田 喜信 森鼻 文明 小林 浩子
岡 昭夫 梅枝 孝之
- 16) ヒト血清中の自己免疫筋抗原 (SE-antigen) の測定68
国立精神・神経センター武蔵病院 春原 経彦
国立精神・神経センター神経研究所 古川 昭栄 里吉栄二郎
- 17) 骨格筋ミオシン軽鎖測定のためのラジオイムノアッセイ法のキット化の試み71
東京大学医学部第三内科 矢崎 義雄 永井 良三 加藤 祐之
国立精神・神経センター神経研究所 杉田 秀夫
- 18) 当院において EST 服用を開始した一症例の経過74
—正常児との比較フォローを中心に—
国立療養所西別府病院 三吉野産治 山田みどり 江田伊勢松
- 19) EST 投与 Duchenne 型筋ジストロフィー症患者の臨床経過：77
—6年目の報告—
新潟大学脳研究所神経内科 宮武 正 桑原 武夫 湯浅 龍彦
国立療養所新潟病院 山崎 元義 近藤 隆春
- 20) Duchenne 型筋ジストロフィー症に対するベスタチン長期投与の握力に対する影響81
国立療養所箱根病院 村上 慶郎 岡崎 隆 林 英人
梁 正淵

21) Duchenne 型筋ジストロフィー症幼児例における運動機能	84
—ベスタチン二重盲検例を中心に—	
東京女子医科大学小児科	福山 幸夫 大沢真木子 斎藤加代子
	平沢 恭子 炭田 沢子 池中 晴美
	新井 ゆみ
22) Duchenne 型筋ジストロフィーに対するベスタチンの効果に関する研究	87
—年少児及び年長児に対する二重盲検試験の比較—	
東邦大学医学部大橋病院第四内科	木下 眞男
国立精神・神経センター神経研究所	里吉栄二郎
国立療養所箱根病院	村上 慶郎
国立療養所西別府病院	三吉野産治
東京女子医科大学小児科	福山 幸夫
国立療養所宇多野病院	西谷 裕
国立療養所兵庫中央病院	高橋 桂一
II 低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究班分担研究者一覧	93

分担研究報告

CANP 遺伝子のクローニングに関する研究 —CANP インヒビターの構造と機能—

鈴木 紘 一*

研究協力者 石田 重樹* 榎 森 康 文* 川 崎 博 史*
西 道 隆 臣* 伊 藤 尚**

はじめに

カルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) の内存性インヒビター (CANP インヒビター) は CANP に特異的なタンパク性インヒビターである。昨年までに、ウサギ CANP インヒビターに関し、cDNA のクローニング及びその発現実験を行って、CANP 阻害活性領域及び阻害機構を検討した^{1,2)}。その結果、CANP インヒビターは分子内に 3～4 回の繰り返し構造を持ち、その中央に存在する TIPPXYR 配列周辺が基質と競合的に CANP 分子と相互作用し、その活性を阻害することが明らかになった^{3,4)}。本年度は、ラットを材料に用いて、cDNA 及び遺伝子 DNA の単離と構造解析を行い、さらに詳細な CANP インヒビターの構造・活性相関等を明らかにした。

実験材料及び方法

既に報告したウサギ CANP インヒビターの cDNA を用いて、λgt 10 ベクターに組み込んだラット肝 cDNA ライブラリーをスクリーニングしてラット CANP インヒビターの cDNA クローンを単離した。得られたクローン of cDNA 挿入断片をプラスミドベクターにサブクローニングし、ジデオキシ法によってその塩基配列を解析し、その配列からラット CANP インヒビターの全アミノ酸配列を決定した。

ラット染色体 DNA ライブラリーを λEM-BL 3 をベクターに用いて構築し、上述したラット CANP インヒビターの cDNA をプローブに用いてスクリーニングしてラット CANP インヒビターの遺伝子クローンを得た。数百塩基対に細分した cDNA 断片をプローブとして得られた遺伝子クローン of サザンハイブリダイゼーション分析を行って、各クローンに含まれる cDNA 領域を決定した後、エキソンを含む DNA 断片をプラスミドベクターを用いたショットガン法によって得た。続いてその塩基配列の解析からラット CANP インヒビターの遺伝子構造を決定した。

結果および考察

1) ラット CANP インヒビターの構造

ラット CANP インヒビターの全アミノ酸配列を cDNA の塩基配列から明らかにした。その結果、ラット CANP インヒビターは、603 アミノ酸残基からなり、ウサギ CANP インヒビターと同様に分子内に約 140 残基からなる繰り返しを 4 回含んでいた。ラット・ウサギ間の相同性 (図 1) は、全体にわたって存在していたが、アミノ酸の一致は 64% で、これは標的プロテアーゼ (CANP) の哺乳動物間の相同性 (約 95%) より低かった。しかも、N 末端領域に 2 ケ所、第 2 と第 3 の繰り返し単位間に 1 ケ所の計 3 ケ所に数十アミノ酸残基の欠失が見られ、種間の相違が大きなタンパク質であることがわかった。しかし、反応部位である TIPPXYR 周辺の配

* 東京都臨床医学総合研究所
** 青山学院大学理工学部

列 (図1のA I~A IV) 及びその両側の α -ヘリックス領域 (α N-I~IV及び α C-I~IV) は同一性は高く、基本構造は互いによく類似しており、これらの同一性の高い領域がCANPインヒビターの機能に重要であることが確認された。このように、CANPインヒビターは動物種間の差は全体では大きいものの、反応部位周辺の配列はよく似ており、昨年報告した合成ペプチドCANPインヒビター、及び、それに官能基を付加した誘導体は種を超えて有効に作用すると考えられた。現在、ここで得られた反応部位周辺のアミノ酸配列も考慮して、さらにCANPに特異的でより強い阻害剤の合成と活性の検討を進めている。

2) CANPインヒビター遺伝子の単位と構造解析

CANPインヒビターには阻害単位を4個含み、肝臓、心臓などの多くの臓器に分布する一

般臓器型と、赤血球型と呼ばれる一般臓器型のN末端領域を欠き、阻害単位を3回含む分子量の小さい型の2種が存在するが、この生理的意味や生成機構は不明である。また、CANPインヒビターの発現量は臓器によって異なっているが、その遺伝子発現の制御機構に関する知見は全くない。これらの問題の解決や種々の疾病の病態と関係しているCANP活性の人為的制御等を行う上で、CANPインヒビターの遺伝子に関する情報は必須である。これを目的としてラットCANPインヒビター遺伝子の単離と構造解析を行った。

cDNAをプローブに用いて単離した6個の遺伝子クローンは図2および図3に示したようにそれぞれcDNAの数百塩基対に相当する領域を含んでいることが明らかになった。各クローンの挿入断片の長さ(10数kbp)とcDNAとの対応を考えると、CANPインヒビター遺伝子

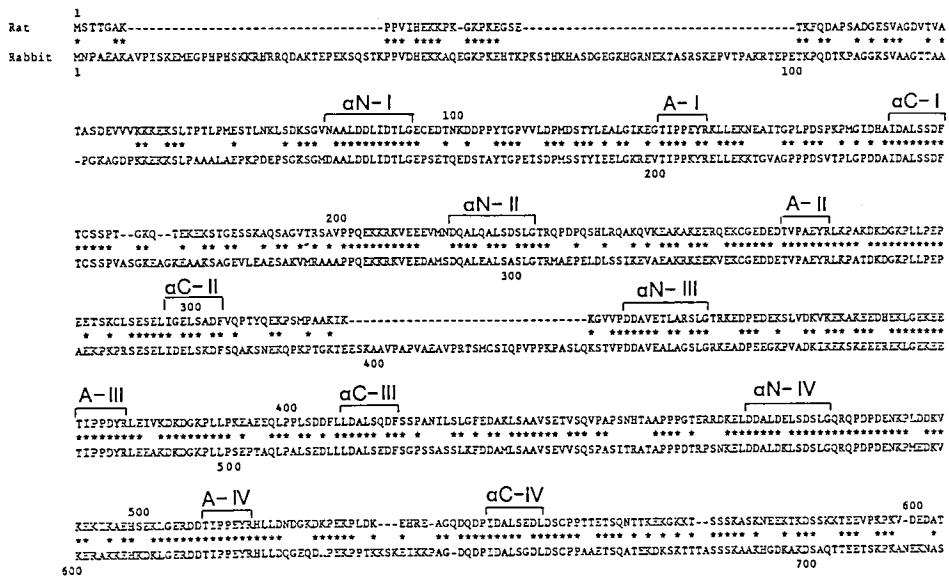


図1 ラット及びウサギCANPインヒビターのアミノ酸配列の比較

同じ残基は星印を2者の配列の間に示した。-は欠失を示す。A-I~IVは反応部位の中心にあるTIPPX_YR配列を、 α N-I~IV及び α C-I~IVはその両側に存在する α -ヘリックス領域を示している。

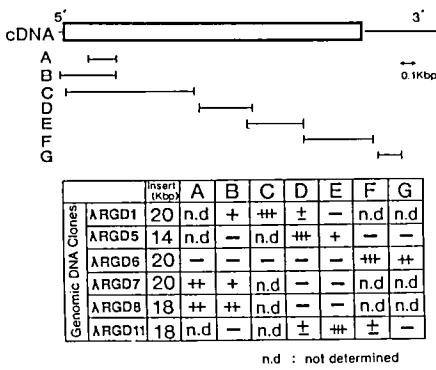


図2 得られた6個の遺伝子クローン (λRGD1, 5, 6, 7, 8, 11) とそれにハイブリダイズするcDNAの領域、上半分にプローブに用いたcDNA断片の領域を示し、下半分にサザンハイブリダイゼーションの結果を示す。+~###は強度を示す。

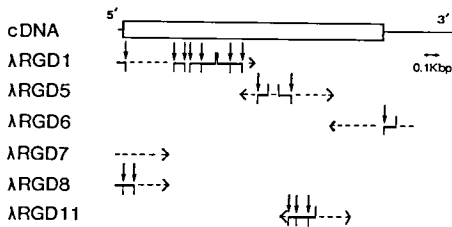


図3 遺伝子クローンとcDNAとの対応。横矢印 (←---→) は図2の結果から予想される各クローンが含むcDNAの領域を表わす。その中で実線部分は塩基配列の解析から確認された部分を示し、破線部分は未だ塩基配列の解析が済んでいない部分を示す。下向矢印は塩基配列の解析から明らかになったエクソン-イントロン接合部位を示す。

は少なくとも5万塩基対の大きさを持ち、おそらく多くのエクソンに分割して存在すると考えられた。

次に、各クローンに含まれるエクソンを同定するため、cDNAとハイブリダイズするサブクローンの塩基配列の解析を行った。現在までに約半分の遺伝子構造が明らかになっており、こ

の段階で得られた知見は以下のようにまとめることができた。

① CANP インヒビター遺伝子は少なくとも5万塩基対の範囲に及び、全体で20個以上のエクソンから構成されている。

② 4個の繰り返し (阻害) 単位はそれぞれ4個のエクソンからなり、エクソン-イントロン接合部位は単位間で相同な位置に存在する。したがって、4回の繰り返しは遺伝子重複によって生じたと考えられる。

③ ラット CANP インヒビターに存在する3カ所の欠失領域 (図1) は、いずれもエクソン-イントロン接合部位に存在した (図4)。このことから、ウサギには存在する3カ所の領域をコードするエクソンがラットでは用いられなくなったため欠失が生じた可能性が強く示唆された。

④ 赤血球型 CANP インヒビターのN末端の3残基前にエクソン-イントロン接合部位が存在した。このことは、この上流のイントロン中に赤血球特異的な転写を行うプロモーターが存在する可能性を示唆している。

現在、残された遺伝子構造の解明と CANP インヒビターの転写制御領域の構造と機能の解析を行っている。また、われわれが発見した骨格筋に特異的かつ多量に発現している nCANP のタンパク質レベルでの同定を行い、骨格筋における機能の解析を続けている^{5,6)}。

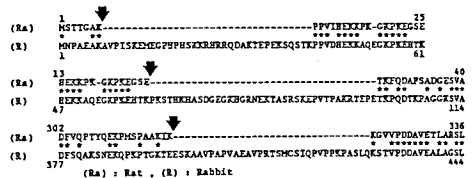


図4 ラット CANP インヒビターに存在する3カ所の大きな欠失領域 (---) とエクソン-イントロン接合部位 (下向矢印)。

文 献

- 1) Enori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Minami, Y. and Suzuki, K.: J. Biol. Chem., 263: 2364-2370 1988.
- 2) Kawasaki, H., Emori, Y., Imajoh-Ohmi, S., Minami, Y. and Suzuki, K.: J. Biochem., 106, 274-281 1989.
- 3) Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Ishida, S., Minami, Y. and Suzuki, K.: "Intra Cellular Protein Catabolism," (ed by, Katunuma, N. and Kominami, E.), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, 1989, pp. 345-352.
- 4) Suzuki, K. and Ohno, S.: Cell Structure and Function, 15: 1-6 1990.
- 5) Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y. and Suzuki, K.: J. Biol. Chem., 264: 20106-20111 1989.
- 6) Sorimachi, H., Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Saido, C.T., Ohno, S., Minami, Y. and Suzuki, K.: Biol. Chem. Hoppe-Syler, 1990, in press.

細胞内 CANP の活性化とその阻害

川 島 誠 一 *

研究協力者 林 昌 美 *

はじめに

カルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) は筋ジストロフィーにおける筋タンパク質の異常分解をもたらす元凶のひとつとされ、その阻害剤の開発が本研究班の目的である。CANP は大小二つのサブユニットから成り、通常は不活性な前駆体として存在する。試験管内での実験から、CANP はカルシウムイオンの存在下で自己消化を起し活性化されることが分かった。さらに、細胞膜タンパク質などの CANP の基質が存在すると CANP の活性化は促進され、要求するカルシウムイオン濃度も低下する。また、細胞内には CANP を特異的に阻害する内在性阻害物質も共存し、CANP の活性調節に関与している。このように、単純な試験管内の系でも CANP の活性調節は複雑であり、ましてや基質・内在性インヒビターあるいは未知の制御物質が存在し、それぞれの局在性も不明である細胞内で CANP 活性が同様な機構で調節されている証拠はない。そこで、最も単純な“細胞”であり、一種類の CANP (μ CANP) のみを含む赤血球を用い、細胞内 CANP の活性化機構を明らかにすると共に、それに伴うタンパク質の分解と赤血球の形態変化を検討した。さらに、試験管内で CANP を阻害する種々の合成阻害剤の細胞レベルでの効果を測定した。

実験方法

ウサギ末梢血より赤血球を単離し、カルシウムイオンおよびカルシウムイオノフォア (A_{23187}) により細胞内カルシウムイオン濃度

を上昇させた。CANP の活性化は、自己消化に伴う大サブユニットの分子量変化 (79 k \rightarrow 77 k \rightarrow 76 k) を指標とし、大サブユニットに特異的なモノクロナル抗体 (1 A_8A_2) を用いたウエスタンブロット法により検出した。赤血球の形態変化は、反応終了後グルタルアルデヒドで固定し、ノマルスキー顕微鏡で観察した。

結 果

ウサギ赤血球を A_{23187} あるいは Ca^{2+} 単独で処理後、全血球分画の CANP をウエスタンブロット法により検出したところ、いずれの場合も CANP に変化はなかった (図 1)。しかし、両者が共存すると赤血球内 CANP は自己消化 (活性化) を起こす。その変化は、試験管内での反応と同様に、中間体である 77 k を経て活性型の 76 k へ至るものであった。従って、細胞外 Ca^{2+} が流入し細胞内 Ca^{2+} が上昇すると、細胞内 CANP が試験管内と同様の様式で活性化することが判る。活性化は細胞外 Ca^{2+} 濃度に依存的で (図 2)、6 μ M と非常に低い濃度でも自己消化が認められる。一方、 A_{23187} が存在しないと 400 μ M の外液 Ca^{2+} でも活性化は起こら

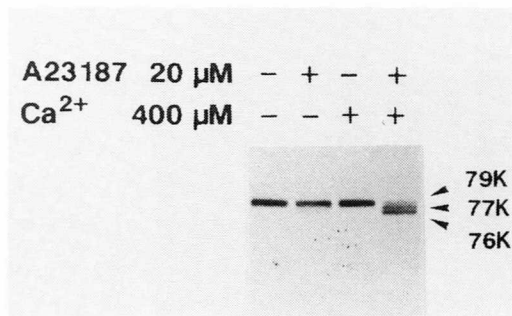


図 1 ウサギ赤血球内 CANP の自己消化

*東京都老人総合研究所

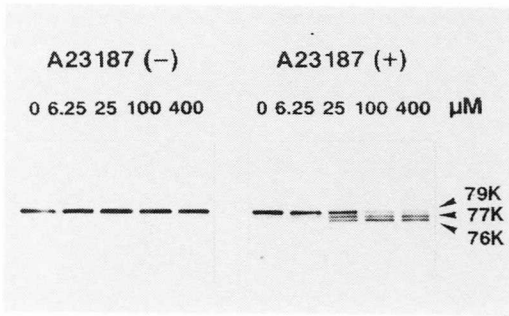


図2 ウサギ赤血球内 CANP の自己消化におよぼす細胞外 Ca^{2+} 濃度の影響

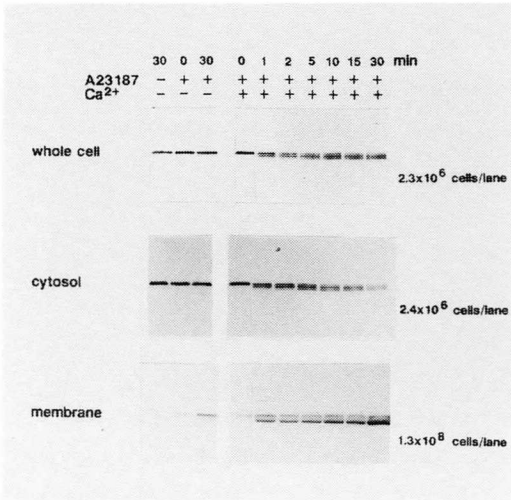


図3 赤血球内 CANP の自己消化と細胞膜への結合 (時間経過)

ない。

次に、活性化の過程を細胞質分画と膜分画とに分けて解析した (図3)。経時変化をみると、細胞質分画での変化は細胞全体の変化とほぼ同じであった。これは、CANP 全体の 98% 以上が細胞質分画に回収されるからである。膜分画に回収される CANP は Ca^{2+} の流入に伴って増加し、主として活性化型として結合している。このことから、試験管内実験で証明されたように細胞内でも細胞膜が活性化の場である可能性が示唆された。これを明確にするために、溶血させた赤血球全体とそれから膜分画を除いた細胞質分画について自己消化の Ca^{2+} 依存性を調べた (図4)。膜分画を含む溶血物全体での活性化の方が低濃度の Ca^{2+} で起こり、細胞膜が活性

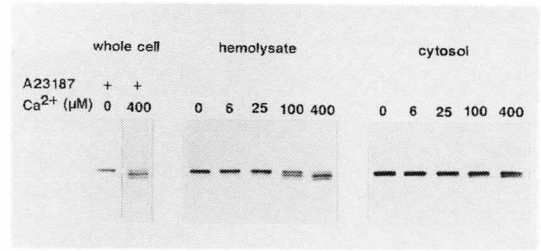


図4 CANP の自己消化における細胞膜の影響 (Ca^{2+} 依存性)

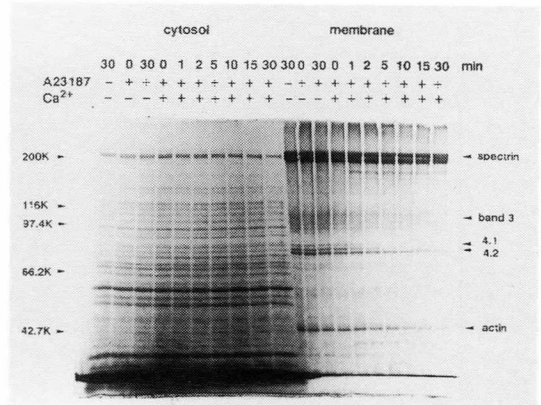


図5 Ca^{2+} 流入により起こる赤血球細胞質および膜タンパク質の分解

化の場であることを示した。

細胞内での CANP 活性化に伴い分解されるタンパク質を明らかにするため、図3の実験で細胞質分画と膜分画に存在するタンパク質のパターンを比較した (図5)。細胞質分画では変化が認められなかったが、膜分画ではスペクトリンの下に新しいバンドが出現し、バンド3、4.1は時間と共に減少する。

以上のように、細胞レベルで CANP の活性化を検出する系が確立できたので、本研究の目的である CANP 阻害剤の細胞レベルでの有効性について検討した (図6)。その結果、ロイペプチンおよび E-64 d は細胞内 CANP に対してほとんど効果がなかった。辻仲らの開発したカルペプチンはある程度の阻害を示したが、最も効果の高かったのは我々の開発した Cbz-Leu-Leu-Leu-al で、 $10 \mu\text{M}$ で CANP の活性化を抑えた。また、CANP の活性化に伴い生じ

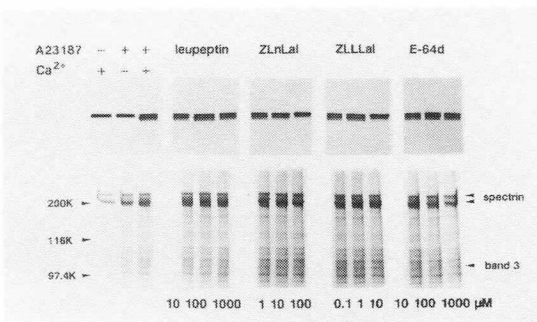


図6 赤血球内CANPの自己消化におよぼすCANP阻害剤の効果(1)

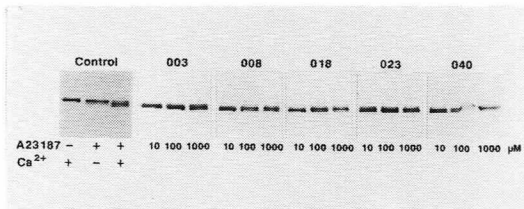


図7 赤血球内CANPの自己消化におよぼすCANP阻害剤の効果(2)

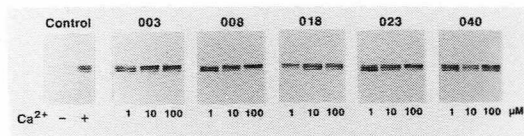


図8 膜存在下での試験管内CANP自己消化におよぼすCANP阻害剤の効果

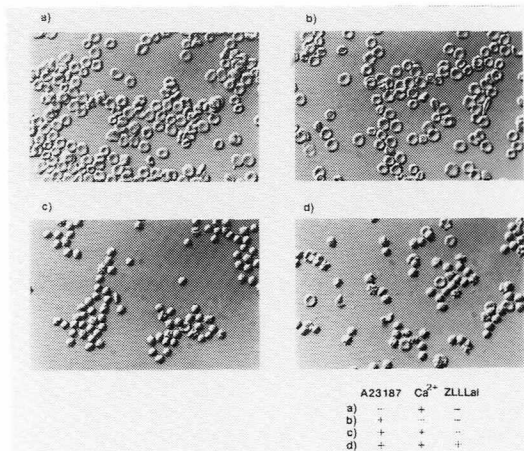


図9 Ca²⁺による赤血球の形態変化とCANP阻害剤の効果

膜タンパク質分解物の生成もこの阻害剤により減少した。一方、本研究班で最近開発されたエポキシ誘導体 (003, 008, 018, 023, 040) はいずれも阻害活性が弱かった(図7)。これらのエポキシ誘導体は細胞膜を含む試験管内実験ではCANPを阻害する(図8)ので、細胞膜透過性の低さが細胞レベルでの効果を減じているのであろう。

従来から赤血球の形態変化におけるCa²⁺の関与が報告されている。本研究でも、A₂₃₁₈₇とCa²⁺の存在下で赤血球は本来の円板型から有刺型を経て球状型へと変化した(図9)。この変化は細胞内CANPを阻害する10 μM濃度のCbz-Leu-Leu-Leu-alで抑えられる。従って、Ca²⁺による赤血球の形態変化は、細胞内で活性化されたCANPによりある種の細胞膜タンパク質が切断されて起こることが実証された。

考 察

プロテアーゼ阻害剤は、プロテアーゼの生理的機能を探る基礎的研究およびプロテアーゼに基づく疾患治療の臨床的研究のいずれの面からも必要とされる有力な武器である。細胞内プロテアーゼを標的とする場合、プロテアーゼに対する特異性に加え、標的プロテアーゼに到達するための細胞透過性が要求される。CANPについても、ロイペプチンやE 64-cは試験管内での阻害活性は高いものの細胞レベルでの有効性は疑問視され、それぞれカルペプチンおよびE 64-dが開発された。しかし、いずれの場合も細胞内CANPに対する効果を測定する方法に欠けていた。本研究では、CANPが活性化に伴い自己消化することを指標として、細胞内を反応の場とする系を検討することを試みた。

プロテアーゼ阻害剤が細胞に入る過程として、単に物理的に細胞膜を透過する場合とエンドサイトシスにより生理的に取り込まれる場合とがある。後者の場合、標的プロテアーゼは主としてリソゾーム系のプロテアーゼとなる。CANPは非リソゾーム系のプロテアーゼであるから、

前者の過程が重要である。この過程を吟味する上で、リソゾームに欠ける赤血球は適切な系であり、膜透過性に関して明確な答えが期待できる。

上述の実験結果から、赤血球の細胞内 CANP はカルシウムイオノフォア/ Ca^{2+} により活性化されることが明らかになった。この際、膜タンパク質が分解され赤血球の形態が変化する。次に種々の CANP 阻害剤を検討した結果、我々の開発した Cbz-Leu-Leu-Leu-al がこれら CANP の活性化・膜タンパク質の分解・形態変

化のいずれをも阻害した。このことは、後二者が CANP により引き起こされる結果であることを示すと同時に、本阻害剤が優れた膜透過性を有することを明らかにした。この阻害剤の疎水性は極めて高く、細胞膜との親和性が強いと思われる。そのため、本阻害剤は細胞膜を透過しても細胞質内に遊離することは難しく、細胞膜のすぐ内側に留まり機能している可能性が強い。幸い CANP は活性化の際に細胞膜を場とするので、本阻害剤は特異的かつ効率的に CANP の活性化を阻害できるのであろう。

CANP 阻害剤の合成

向山光昭* 大関正弘**

研究協力者 植木正彬* 花田和紀** 玉井正晴**
 横尾千尋** 田名見享** 村田充男**
 宮下さつき**

はじめに

我々は、カルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) に対する特異的阻害剤の創製を目的に研究を行なっている。本年度は、大きく分けて、次の2種類の化合物について研究を進めた。

(1) エポキシコハク酸誘導体

本研究班の鈴木班員らは、内在性 CANP インヒビターにおいて CANP を阻害するのに必要な部位は、4つのドメインに共通して見いだされる TIPPX_YR というアミノ酸配列を含む、図1に示した部位であると推定している¹⁾。

我々は昨年度までに、この TIPPX_YR 配列を基に、阻害活性基としてエポキシコハク酸を導入した化合物を約50種合成し評価してきた。その結果、E-64cよりも約9倍強い CANP 阻害活性を有する化合物 CA-050 を見いだした。

本年度は、昨年度までの研究を更に発展させ、新たに図1に示した位置へエポキシコハク酸を導入した誘導体を合成した。

また強力な CANP 阻害活性を有する CA-050 について、昨年度得られた知見を基に、特異性の向上を目的として周辺化合物の合成を行った。

(2) 新規システインプロテアーゼ阻害剤 FD-056 誘導体

FD-056 は、大正製薬総合研究所において、京都市上京区で採取した土壌より得られた、

Aspergillus sp. F-1656 の代謝産物として単離同定された、新規なシステインプロテアーゼ阻害剤である。図2に示すように、 β -ヒドロキシ脂肪酸を有するトリペプチド誘導体であり、その酵素阻害スペクトラムの特徴としては、表1に示すように、システインプロテアーゼのみを阻害すること、更にパパインやカタプシンBに対するよりも、CANP に対して阻害活性が強いことがあげられる。



図1 内在性 CANP インヒビター活性中心付近の一次構造とエポキシコハク酸の導入位置 (a~e)

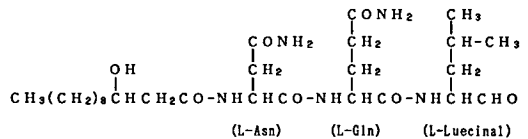


図2 FD-056 の構造

表1 FD-056 の酵素阻害スペクトラム

Enzyme	IC ₅₀ (μM)	Enzyme	IC ₅₀ (μM)
μCANP	2	Trypsin	>500
Papain	3.3	Chymotrypsin	>80
Cathepsin B	7.3	Elastase	>500
Cathepsin L	>1,000	Cathepsin D	>500
Cathepsin H	>1,000	Pepsin	180
		Collagenase	>500

*東京理科大学理学部
 **大正製薬株式会社総合研究所

しかしながら FD-056 は、水や有機溶媒に対してきわめて溶解性が悪く、CANP 阻害剤として開発するためには、CANP に対する阻害活性及び特異性の増強とともに、溶解性の改善が必要と考えられる。

そこでこれらの問題点を解決すべく、本年度より新たに FD-056 誘導体の合成研究を開始した。

方 法

(1) 合成

本年度合成した化合物を表 2 と 3 に示した。合成はすべて液相法を用い、エポキシコハク酸誘導体については、昨年度と同様の方法により合成した。

FD-056 誘導体については、 α -アミノアルデヒドに対応する α -アミノアルコール誘導体を原料として、トリペプチド誘導体を合成後、ジメチルスルフォキシド (DMSO) と三酸化イオウピリジンコンプレックス (Py-SO_3) を用いて酸化し、アルデヒド体とした。図 3 に代表的な例として AP-023 の合成法を示した。

(2) CANP 阻害活性の測定

μCANP (豚赤血球由来, 200 u/mg/ml, 半井化学) または mCANP (豚腎臓由来, 200 u/mg/ml, 半井化学) を用い、次のように測定した。

下記の反応溶液を、40°C で 5 分間プレインキ

表 2 本年度合成したエポキシコハク酸誘導体

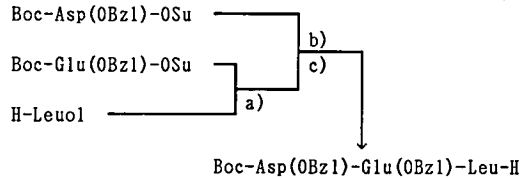
Compound. No	Structure
(新規誘導体)	
CA-069	HO-tES-Tyr-Arg(NO ₂)-His-OH
CA-079	HO-tES-Glu-Val-OH
CA-084	HO-tES-Leu-Gly-OH
CA-085	HO-tES-Leu-Gly-Lys-OH
CA-091	HO-tES-Tyr-Arg(NO ₂)-Glu-Val-OH
CA-092	HO-tES-Arg-Glu-Val-OH
CA-093	HO-tES-Lys-Arg-Glu-Val-OH
CA-094	HCl-H-Leu-Gly-NHNH-tES-OEt
(CA-050 周辺化合物)	
CA-055	HO-tES-Tyr-Arg(NO ₂)-IAA
CA-056	HO-tES-Tyr-Arg(NO ₂)-NHbz1
CA-057	HO-tES-Phe-Arg(NO ₂)-OBz1
CA-083	HO-tES-Tyr-Arg-IAA
CA-087	HO-tES-Tyr-Orn(Z)-NHbz1
CA-088	HO-tES-Tyr-Lys(Z)-NHbz1
CA-089	HO-tES-Tyr-Orn-NHBz1
CA-090	HO-tES-Tyr-Lys-NHBz1
CA-095	HO-tES-Tyr-Gln-NHBz1



表 3 本年度合成した FD-056 誘導体

Compound. No	Structure
AP-017	Ac-Asp(OBz1)-Glu(OBz1)-Leu-H
AP-023	Boc-Asp(OBz1)-Glu(OBz1)-Leu-H
AP-024	Z-Asp(OBz1)-Glu(OBz1)-Leu-H
AP-025	Boc-Asp(OMe)-Glu(OBz1)-Leu-H
AP-026	Ac-Asp(OMe)-Glu(OBz1)-Leu-H
AP-027	Boc-Asp(OBz1)-Glu(OMe)-Leu-H
AP-028	Ac-Asp(OBz1)-Glu(OMe)-Leu-H
AP-029	Ac-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Leu-H
AP-041	Boc-Asp(OBz1)-Glu(OBz1)-Ile-H
AP-042	Boc-Asp(OBz1)-Glu(OBz1)-Val-H
AP-043	Boc-Asp(OBz1)-Glu(OBz1)-Phe-H
AP-044	Boc-Asp(OBz1)-Glu(OBz1)-Met-H
AP-045	Boc-Asp(OBz1)-Glu(OBz1)-Ala-H
AP-046	Boc-Asp(OBz1)-Glu(OBz1)-Pro-H
AP-047	Boc-Asp(OBz1)-Glu(OBz1)-Gly-H
AP-048	Boc-Asp(OBz1)-Glu(OBz1)- β Ala-H
AP-049	Boc-Asp(OBz1)-Glu(OBz1)-Aib-H

Aib:-NBC(CH₃)₂CO-



- a) 4N HCl-Dioxane
b) Et₃N
c) DMSO, Py-SO₃, Et₃N

図 3 AP-023 の合成法

ュベーションした後、50 μl の CANP 溶液 (μCANP : 20 u/ml, mCANP : 40 u/ml) を加え、30°C で 20 分反応させた。10% トリクロロ酢酸 500 μl を加えて反応を止め、60 分放置後遠心し、上清の A_{280} を測定した。

反応溶液

- 1.2% Casein 100 μl
100 mM Sodium glycerophosphate-HCl
(pH 7.5) 200 μl
50 mM CaCl₂ 50 μl
250 mM 2-Mercaptoethanol 20 μl
Inhibitor (in 10% DMSO) 50 μl

(3) パパイン及びカテプシン B 阻害活性の測定
パパイン (24 u/mg, Sigma 社) 及びカテプシン B (牛脾由来, 25 u/mg, Sigma 社) を用い、次のように測定した。

下記の反応溶液を、40°C で 5 分間プレインキ

エペーションした後、基質溶液 (Z-Phe-Arg-MCA, 200 μ M) 25 μ l を加え、40°C で 10 分反応させた。10 mM E-64 c (in 0.1 M Acetate Buffer pH 6.8) 1 ml を加えて反応を止め、励起波長 380 nm, 測定波長 440 nm で蛍光を測定した。

反応溶液

0.4 M Na, K-Phosphate Buffer 250 μ l
(Containing 4 mM EDTA,
10 mM 2-Mercapto Ethanol)
(pH 6.8 : Papain, pH 6.0 : Cathepsin B)
Inhibitor (in 10% DMSO) 100 μ l
H₂O 175 μ l
0.1% Brij-35 (半井化学) 425 μ l
Enzyme 25 μ l
(Papain 400 nM, Cathepsin-B 200 nM)

結果及び考察

(1) エポキシコハク酸誘導体

表 4 に、新たな位置へエポキシコハク酸を導入した化合物について、CANP, パパイン, カテプシン B に対する阻害活性を 50% 阻害濃度で示し、その導入位置により a ~ e に分けてまとめた。

これらの中で、CANP に対して阻害活性を示した化合物は、エポキシコハク酸を a, b または e の位置へ導入した CA-084, 085, 092, 069 の 4 種であり、CA-069 の CANP 阻害活性は比較的強いものであった。しかしながら、最も注目すべき化合物は、CANP 阻害活性はやや弱いものの、パパインやカテプシン B に対しては阻

害活性を示さず CANP 特異性の認められた CA-092 である。

なお CA-094 は、エポキシコハク酸をヒドラージンを介してペプチド C 端へ導入した、新しい試みの化合物であるが、CANP に対しては無効であった。

次に表 5 には、CA-050 の周辺化合物についてまとめた。

昨年度報告したように、CA-050 のペプチド部分 C 端は、CANP に対する阻害活性を強める上で極めて重要である。すなわち、CA-009, 007, 008 と CA-050 を比較してわかるように、ペプチド C 端の置換基の違いにより、CANP に対する阻害活性は大きく異なり、ベンジルエステル体の CA-050 において、これまで最強の CANP 阻害活性が認められた。しかしながら、CA-050 はカテプシン B やパパインも強く阻害し、特異性は認められなかった。

本年度はまず、CA-050 のチロシンが持つフェノール性水酸基の影響を確認するため、チロシン部分をフェニルアラニンに変換した CA-057 を合成してみた。その結果 CA-057 においては、パパインやカテプシン B に対する阻害活性にあまり変化が無いのに対して、CANP に対する阻害活性のみが低下した。したがって、チロシンのフェノール性水酸基は CANP に対する阻害活性を強める効果があることが明らかとなった。

次に CA-050 のベンジルエステルを、ベンジルアミド及びイソアミルアミドに変換した化合物 CA-056, 055, 及び CA-055 のアルギニン側

表 4 エポキシコハク酸誘導体の酵素阻害活性 (1)

	Compound No.	Structure	I C ₅₀ (nM)		
			CANP	Papain	Cathepsin B
a	CA-084	HO-tES-Leu-Gly-OH	25,000	131	1,000
	CA-085	HO-tES-Leu-Gly-Lys-OH	9,500	101	970
b	CA-094	HCl·H-Leu-Gly-NHNH-tES-OEt	>100,000	26,300	>100,000
	CA-093	HO-tES-Lys-Arg-Glu-Val-OH	>100,000	>100,000	>100,000
c	CA-092	HO-tES-Arg-Glu-Val-OH	17,800	>100,000	>100,000
d	CA-079	HO-tES-Glu-Val-OH	>100,000	13,500	17,200
	CA-069	HO-tES-Tyr-Arg(NO ₂)-His-OH	14,200	57	2,000
e	CA-091	HO-tES-Tyr-Arg(NO ₂)-Glu-Val-OH	>100,000	96,000	>100,000
E-64 c			3,000	13	40

表5 エポキシコハク酸誘導体の酵素阻害活性(2)

Compound No.	Structure	I C ₅₀ (nM)		
		CANP	Papain	Cathepsin B
CA-009	HO-tES-Tyr-Arg(NO ₂)-OH	44,000	600	9,000
CA-007	HO-tES-Tyr-Arg(NO ₂)-OMe	5,000	41	700
CA-008	HO-tES-Tyr-Arg(NO ₂)-OEt	3,000	24	500
CA-050	HO-tES-Tyr-Arg(NO ₂)-OBz1	430	52	430
CA-057	HO-tES-Phe-Arg(NO ₂)-OBz1	1,300	60	298
CA-056	HO-tES-Tyr-Arg(NO ₂)-NHBz1	359	15	359
CA-055	HO-tES-Tyr-Arg(NO ₂)-IAA	460	23	370
CA-083	HO-tES-Tyr-Arg-IAA	290	21	230
CA-087	HO-tES-Tyr-Orn(Z)-NHBz1	101	17	220
CA-088	HO-tES-Tyr-Lys(Z)-NHBz1	131	20	186
CA-089	HO-tES-Tyr-Orn-NHBz1	562	68	160
CA-090	HO-tES-Tyr-Lys-NHBz1	585	39	148
CA-095	HO-tES-Tyr-Gln-NHBz1	1,050	488	546
E-64c		3,000	13	40

鎖ニトロ基を除去したCA-083を合成した。これらの化合物はいずれも、CA-050と同等またはそれ以上の強いCANP阻害活性を示したが、同時にパペインやカテプシンBに対しても強い阻害活性を示しており、特異性は改善されなかった。

更にアルニギン部分を、他の塩基性アミノ酸であるオルニチンやリジンに変換したのがCA-087~090であり、グルタミンに変換したのがCA-095である。これらの中には、CA-050などよりも更に強力なCANP阻害活性を示す化合物CA-087やCA-088が見いだされたが、特異性は認められなかった。またCA-095は、CA-089のオルニチン側鎖アミノ基部分がアミドに変化したものであるが、CANPに対する阻害活性の低下よりも、パペインに対する阻害活性の低下の方が相対的に大きく、今後のドラッグデザインの参考になるとと思われる。

(2) FD-056 誘導体

一般にアスパラギンやグルタミンを含むペプチドは溶解性が悪いことが知られている。またFD-056の場合、その構造にみられる長鎖の脂肪酸も、難溶性の一因と考えられる。

そこで本年度はまず、この脂肪酸部分を最も単純なアセチル基とし、かつアスパラギン及びグルタミンの側鎖アミド部分をエステルに変換して、それぞれアスパラギン酸及びグルタミン酸の誘導体とした化合物(AP-017, 026, 028,

029)を合成し、その酵素阻害活性を検討した。

その結果、表6に示すように、これらの化合物はいずれも強い酵素阻害活性を有することがわかった。また、アセチル基部分をペプチド合成で通常用いる保護基であるBoc基やZ基に変換した化合物(AP-023, 024, 025, 027)においても、その酵素阻害活性に大きな変化はなかった。

なおこれらの化合物の中には、CANPに対して特異性を示すものは見いだされなかったが、いずれの化合物も、E-64cやFD-056と同等もしくはそれ以上の強いCANP阻害活性を示し、なかでもAP-027と028は、先に示したエポキシコハク酸誘導体CA-050, 055, 056, 083などと同様極めて強いCANP阻害活性を有していた。

このように、FD-056のアスパラギン及びグルタミン部分を、それぞれアスパラギン酸及び

表6 FD-056 誘導体の酵素阻害活性(1)
R-Asp(R²)-Glu(R³)-Leu-H

Compound No.	R ¹	R ²	R ³	I C ₅₀ (nM)		
				CANP	Papain	Cathepsin B
AP-027	Boc	OBz1	OMe	430	130	340
AP-028	Ac	OBz1	OMe	450	67	280
AP-017	Ac	OBz1	OBz1	1,000	57	64
AP-029	Ac	OMe	OMe	1,630	133	344
AP-025	Boc	OMe	OBz1	1,700	74	34
AP-026	Ac	OMe	OBz1	2,400	15	19
AP-024	Z	OBz1	OBz1	3,400	920	900
AP-023	Boc	OBz1	OBz1	3,800	500	500
FD-056				2,000	33,000	7,300
E-64c				3,000	13	40

グルタミン酸に変えても、CANP に対して強い阻害活性を示すことがわかったため、次にロイシナール部分の変換を検討した。

表 7 に示すように、AP-023 のロイシナール部分を、10 種のアミノ酸由来アルデヒドに変換した化合物を合成し、酵素阻害活性を検討した。

その結果、プロリナール、 β アラニナール、ザルコシナールに変換した AP-046, 048, 053 では、CANP 阻害活性が失われたが、他の化合物はすべて CANP 阻害活性を示し、メチオナール誘導体 AP-044, アラニナール誘導体 AP-045 などが強い活性を示した。

特異性の面から考察すると、AP-044, 045 は他の化合物と比べ、相対的にパパインに対する阻害活性は弱い、カテプシン B に対しては他の化合物と同様強い阻害活性を有している。

しかしながら注目すべきことに、AP-045 のアラニナールの α 炭素にメチル基を導入し、アミノイソブチルアルデヒド体とした AP-049 に

おいては、パパイン、カテプシン B に対する阻害活性が大幅に低下したのに対して、CANP に対する阻害活性はあまり低下せず、CANP 特異性が認められた。

今後、ペプチド N 端、側鎖部分などの修飾により、更に CANP に対する阻害活性及び特異性の増強を目指していく予定である。

結 語

本年度我々は、内在性 CANP インヒビターの活性中心近傍のアミノ酸配列を応用したエポキシコハク酸誘導体、及び新規システインプロテアーゼ阻害剤 FD-056 の誘導体について研究を行い、表 8 に示すように CANP に対して特異性を有する化合物 CA-092 及び AP-049 を見いだした。しかしながら、これらの化合物の CANP 阻害活性、特異性に関してはまだ十分とはいえないため、今後更に検討を続ける予定である。

表 7 FD-056 誘導体の酵素阻害活性(2)
Boc-Asp(OBzl)-Glu(OBzl)-X-H

Compound No.	X	I C ₅₀ (nM)		
		CANP	Papain	Cathepsin B
AP-044	Met	800	1,320	289
AP-045	Ala	1,500	1,250	276
AP-042	Val	2,900	300	190
AP-023	Leu	3,800	500	500
AP-043	Phe	4,700	620	360
AP-047	Gly	6,500	342	942
AP-041	Ile	6,600	440	380
AP-049	Aib	7,800	38,000	31,000
AP-046	Pro	>100,000	68,900	17,600
AP-048	β Ala	>100,000	55,200	41,800
AP-053	Sar	>100,000	77,000	15,400
FD-056		2,000	33,000	7,300
E-64c		3,000	13	40

表 8 CANP に対して特異的阻害活性を有する化合物

Compound No.	Structure	I C ₅₀ (nM)		
		CANP	Papain	Cathepsin B
CA-092	HO-tES-Arg-Glu-Val-OH	17,800	>100,000	>100,000
AP-049	Boc-Asp(OBzl)-Glu(OBzl)-Aib-H	7,800	38,000	31,000

文 献

- 1) Kawasaki, H., Emori, Y., Imajoh-Ohmi, S., Minami, Y. and Suzuki, K.: J. Biochem. 106, 274-281, 1989.

プロリン含有ペプチド分解酵素とその阻害物質

青柳高明*

研究協力者 和田孝雄* 小川慶治* 小島路子*
永井真知子* 原田滋子*

筋ジスマウス前肢筋および後肢筋の各種酵素活性を経時的に調べ、エクトエンザイムであるアミノペプチダーゼが有意に増加することを認めたり³⁾。また、患者血清中のアミノペプチダーゼとエンドプロテアーゼが病状の進行に異なる役割を果たしていることを報告した⁴⁾。さらに、筋ジスの発症ならびに進展の機序にプロリン含有ペプチド分解酵素 (PPDE) が密接に関与していることを示唆した⁵⁾。

今回は新しい視点から PPDE に属する酵素の動態を筋ジスマウスで調べ、他疾患モデル動物と比較した。さらに、PPDE の作用機序を明かにすることを目的とし、Dipeptidyl peptidase II (DAP-II) 阻害物質の探索研究を行なった。

a) プロリン含有ペプチド分解酵素 (PPDE) の動態

実験動物

筋ジスマウス (C 57 BL/6-dy/dy) および対照マウス (C 57 BL/6⁺/dy) は実験動物中央研究所より購入した。実験動物は生後 1 週から 11 週まで、各週ごとに一匹宛屠殺したのち、直ちに前肢筋、後肢筋、心、脾、肝、腎を摘出し、-70°C で保存した。臓器は 10 倍量の phosphate buffered saline (PBS) の中で、組織ホモジナイザー (Ultraturrax) を用いて 1 分間ホモジナイズした。酵素活性の測定には、組織ホモジネートの 3,000 Xg, 20 分間の遠心し上清を用いた。

基質

酵素活性測定用の基質ならびに略語は下記に

示す。

Glu · NA, L-glutamic acid β -naphthylamide hydrochloride; Arg · NA, L-arginine β -naphthylamide hydrochloride; Pro · NA, L-proline β -naphthylamide hydrochloride; Gly-Arg · NA, glycyl-L-arginine β -naphthylamide; Lys-Ala · NA, L-lysyl-L-alanine β -naphthylamide; Arg-Arg · NA, L-arginyl-L-arginine β -naphthylamide; Gly-Pro · NA, glycyl-L-proline β -naphthylamide; Z-Arg-Arg · NA, N-cbz-L-arginyl-L-arginine β -naphthylamide; Z-Gly-Pro · NA, N-cbz-glycyl-L-proline β -naphthylamide; Boc-Val-Leu-Lys · MCA, t-butylloxycarbonyl-L-valyl-L-leucyl-L-lysine 4-methyl-7-coumarylamide; Pro-Phe-Arg · MCA, L-prolyl-L-Phenylalanyl-L-arginine 4-methyl-7-coumarylamide; Boc-Gln-Ala-Arg · MCA, t-butylloxycarbonyl-L-glutamyl-L-alanyl-L-arginine 4-methyl-7-coumarylamide; Suc-Leu-Leu-Val-Tyr · MCA, succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosine 4-methyl-7-coumarylamide; Suc-Ala-Pro-Ala · MCA, succinyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanine 4-methyl-7-coumarylamide; Boc-Val-Pro-Arg · MCA, t-butylloxycarbonyl-L-valyl-L-prolyl-L-arginine 4-methyl-7-coumarylamide.

緩衝液

酵素活性測定用の緩衝液は 0.02 M PBS (pH 7.2) を用いた。ただし、prolyl endope-

* 微生物化学研究所

ptidase の測定には 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.8) を用いた。

酵素活性の測定

ホモジネートの遠心上清画分は、それぞれの基質溶液および緩衝液を含む反応試験管に分注し、37°C で 1 時間の反応を行なった。Post-Pro-Enz については、前述の緩衝液を用いて測定した。すべての酵素活性の測定には 3 本の試験管を用い、その平均値を記載した。各酵素活性の測定法および基質は表 1 に示す。

蛋白の測定

標準蛋白としてウシ血清アルブミンを用い、Lowry 法⁹⁾で測定した。

統計

多変量解析の一手法である主成分分析法¹⁹⁾を用いて解析した。

結果および考察

PPDE に属する酵素の動態を調べることを目的とし、対照および筋ジスマウスの前肢、後肢における各酵素活性を検討し、主成分分析を行なった。表 2 に示すように、第 1 主成分に高い相関 (0.8~0.9) を有する酵素は PPDE およびセリン・プロテアーゼに属する酵素である。第 2 および第 3 主成分については高い相関を示

す酵素がなく、第 2 主成分に対してはエラストーゼが 0.69、第 3 主成分に対しては Pro-IP が 0.72 の相関を示すにとどまっている。

図 1 に、第 1 主成分の因子得点を週齢に関連づけてプロットした図を示す。対照マウスの曲線は前肢、後肢とも良く似た経過をとり、平行して双曲線状に低下する。一方、筋ジスマウスでは前肢、後肢とも第 2 週で 1 度上昇したのち、次第に低下する。ただし、この時、前肢、後肢間に解離が起こり前肢で遷延するのが認められた。

図 2 は第 2 主成分の因子得点をプロットしたものである。第 1 主成分におけるような前肢、後肢間の解離は見られなかった。図 3 は第 3 主成分についてのプロットであるが、全体的にあまり特徴的な動きが見られなかった。

筋蛋白の崩壊阻止にセリンおよびシステイン・プロテアーゼ阻害物質が有効であるという多くの報告があるが、PPDE に属する酵素の阻害物質も筋崩壊阻止に関与することが考えられる。次項で PPDE に属する Dipeptidyl peptidase II 阻害物質の探索研究について述べる。

b) Dipeptidyl peptidase II 阻害物質 Diocetins A と B の探索研究

プロリン含有ペプチド分解酵素 (PPDE) に属

表 1 List of the proteases measured and their substrates

Enzyme	Abbreviation	Substrate	Reference for assay method
Aspartate aminopeptidase (EC3.4.11.7)	AP-A	Glu-NA	1
Arginine aminopeptidase (EC3.4.11.6)	AP-B	Arg-NA	1
Proline iminopeptidase (EC3.4.11.5)	Pro-IP	Pro-NA	6
Dipeptidyl aminopeptidase I (EC3.4.14.1)	DAP-I	Gly-Arg-NA	7
Dipeptidyl aminopeptidase II (EC3.4.14.2)	DAP-II	Lys-Ala-NA	8
Dipeptidyl aminopeptidase III (EC3.4.14.4)	DAP-III	Arg-Arg-NA	9
Dipeptidyl aminopeptidase IV (EC3.4.14.5)	DAP-IV	Gly-Pro-NA	10
Cathepsin B (EC3.4.22.1)	Cathepsin B	Z-Arg-Arg-NA	11
Prolyl endopeptidase (EC3.4.21.26)	Post-Pro-Enz	Z-Gly-Pro-NA	6
Plasmin (EC3.4.21.7)	Plasmin	Boc-Val-Leu-Lys-MCA	12
Tissue kallikrein (EC3.4.21.35)	Kallikrein	Pro-Phe-Arg-MCA	13
Trypsin (EC3.4.21.4)	Trypsin	Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	14
Chymotrypsin (EC3.4.21.1)	Chy-try	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	15
Leukocyte elastase (EC3.4.21.37)	Elastase	Suc-Ala-Pro-Ala-MCA	16
α -Thrombin (EC3.4.21.5)	Thrombin	Boc-Val-Pro-Arg-MCA	17

Z: carbobenzyoxy, Boc: t-butyloxycarbonyl, Suc: succinyl

表2 Principal components and their relation to enzymes in muscle

Enzyme	PC-I (r)	Enzyme	PC-II (r)	Enzyme	PC-III (r)
DAP-II	0.89	Elastase	0.69	Pro-IP	0.72
Thrombin	0.86	Plasmin	0.57	AP-B	0.56
Trypsin	0.84	DAP-III	-0.50	PPCE	0.42
DAP-IV	0.83	DAP-I	0.49	Kallikrein	-0.38
Cathepsin B	0.83	AP-A	0.49	Elastase	0.32
Chy-try	0.83	Chy-try	-0.43	Thrombin	-0.28
PPCE	0.82	Pro-IP	0.39	DAP-IV	0.18
Plasmin	0.70	Trypsin	-0.39	Trypsin	-0.18
DAP-I	0.70	Cathepsin B	0.34	AP-A	-0.16

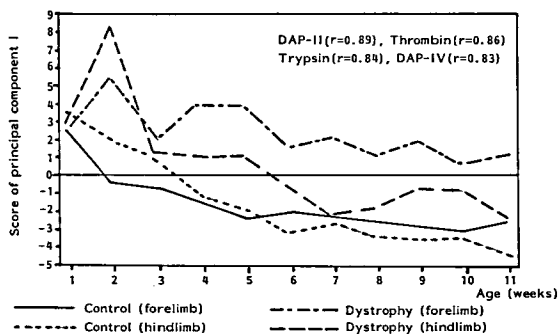


図1 Time course of principal components I

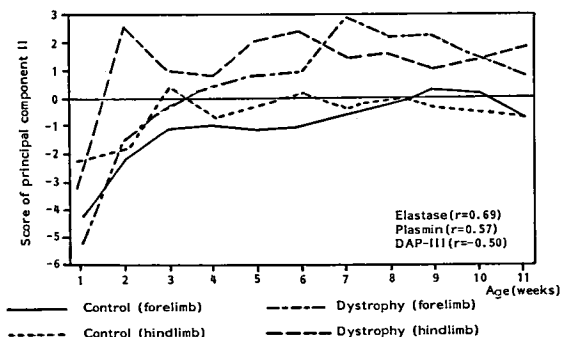


図2 Time course of principal component II

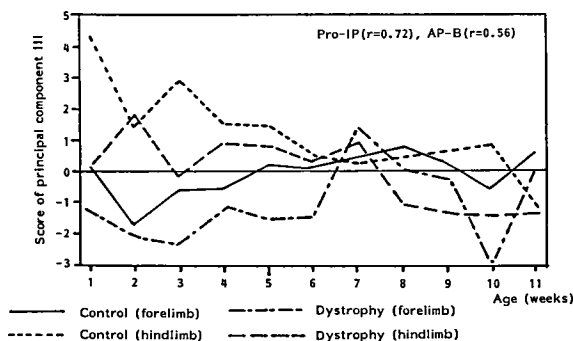


図3 Time course of principal components III

する酵素に対する阻害物質としては、既に下記の阻害物質を報告した。即ち、Pro-IP (proline iminopeptidase) に対する Probestin, DAP-IV (dipeptidyl peptidase IV) に対する Diprotins A と B, Post-Pro-EnZ (prolyl endopeptidase) に対する Poststatin, Collagenase に対する Steffimycins D などである²⁰⁾。

本報告は DAP-II 阻害物質として Streptomyces sp. SA-2581 培養濾液から新規阻害物質 Diocstatins A と B を見出したので、その単離、精製、阻害活性などについて述べる^{21),22)}。

Diocstatin の単離、精製

ラット脾臓より精製した DAP-II²³⁾ を用い、Lys-Ala·NA および Phe-Pro·NA を基質として阻害活性を測定した。Streptomyces sp. SA-2581 培養濾液より、YMC-GEL-ODS, シリカゲルなどのカラムクロマトグラフィーにより Diocstatins A と B を単離、精製した。

Diocstatins A と B の構造

図4の精製法により得た Diocstatins A と B の構造は下図のように決定した。即ち、

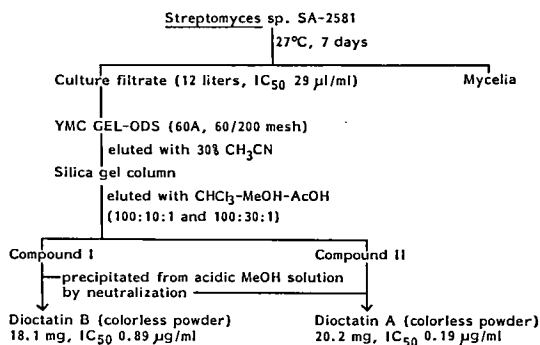
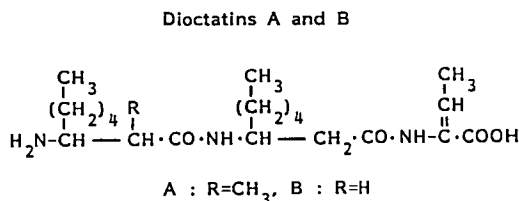


図4 Isolation and purification of diocstatins A and B



Dioclatin A は N-(N-(3-amino-2-methyloctanoyl)-3-aminooctanoyl)-2-aminobut-2-enoic acid, また Dioclatin B は N-(N-(3-aminooctanoyl)-3-aminooctanoyl)-2-aminobut-2-enoic acid である。

Dioclatins A と B の阻害活性

各種のアミノペプチダーゼおよびジペプチルペプチダーゼに対する Dioclatins A と B の阻害活性は DAP-II のみに強い阻害を示した (表 3)。Dioclatins A と B の DAP-II に対する阻害形式は括抗阻害, Ki 値は Dioclatin A が 2.0×10^{-7} M, Dioclatin B が 1.3×10^{-6} M であった。

Dioclatins A と B を含む PPDE 阻害物質の筋ジスマウスに対する効果は目下検討中である。

ま と め

筋ジスマウスの前肢筋および後肢筋中のプロテアーゼ活性の動態を経時的に追究した。各種のプロテアーゼ活性は対照に比べ有意に増加する。主成分分析による解析では, PPDE およびセリン・プロテアーゼに属する酵素が第 1 主成分に高い相関を示した。筋崩壊に関与することが考えられる DAP-II に対する阻害物質を探索し Dioclatins A と B を見出し, その構造を決定した。これらのプロテアーゼ阻害物質と筋崩壊

表 3 Inhibitory activity of dioclatins A and B against various peptidases

	IC ₅₀ (μg/ml)	
	Dioclatin A	Dioclatin B
DAP-II	0.19	0.89
DAP-I	>100	>100
DAP-III	>100	>100
DAP-IV	>100	>100
AP-A	>100	>100
AP-B	>100	>100
AP-M	>100	>100
Leu-AP	>100	>100
fMet-AP	>100	>100

AP: aminopeptidase; fMet: formylmethionine, DAP: dipeptidyl peptidase

との関連性を究明し, 難病解決の緒口としたい。

文 献

- 1) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H.: J. Clin. Invest., 67: 51-59, 1981.
- 2) Aoyagi, T., Tobe, H., Kojima, F., Hamada, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: J. Antibiot., 31: 636-638, 1978.
- 3) Umezawa, H., Aoyagi, T., Suda, H., Hamada, M. and Takeuchi, T.: J. Antibiot., 29: 97-99, 1976.
- 4) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Miyoshino, S. and Umezawa, H.: Clin. Chim. Acta., 129: 165-173, 1983.
- 5) 厚生省新薬開発研究(江橋班): 低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究, 昭和 63 年度研究報告書, 1989, p.p.3-7.
- 6) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Okubo, M., Masaki, Y. and Umezawa, H.: J. Appl. Biochem., 7: 273-281, 1985.
- 7) McDonald, J.K. and Schwabe, C.: In proteinases in mammalian cells and tissues (ed. by Barrett, A.J.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1977, p.p.314-322.
- 8) McDonald, J.K., Leibach, F.H., Crindelndland, R.E. and Ellis, S.: J. Biol. Chem., 243, 4143-4150, 1968.
- 9) Ellis, S. and Nuenke, J.M.: J. Biol. Chem., 242: 4623-4630, 1967.
- 10) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Osanai, M., Imahori, K. and Umezawa, H.: Biotech. Appl. Biochem., 8: 23-31, 1986.
- 11) Barrett, A.J. and Kirschke, H.: In methods in enzymology (ed. by Lorand, L.) Academic press, New York, 1981. p.p. 535-561.

- 12) Kato, H., Adachi, N., Ohno, Y., Iwanaga, S., Takada, K. and Sakakibara, S.: *J. Biochem.*, 88 : 183—190, 1980.
- 13) Nagase, H. and Barrett, A. : *Biochem. J.*, 193 : 187—192, 1981.
- 14) Kawabata, S., Miura, T., Morita, T., Kato, H., Fujikawa, K., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T. and Sakakibara, S. : *Eur. J. Biochem.*, 172 : 17—25, 1988.
- 15) Sawada, H., Yokosawa, H., Hoshi, M. and Ishii, S. : *Experientia*, 39 : 377—378, 1983.
- 16) Mumford, R.A., Strauss, A.W., Powers, J.C., Pierzchala, P.A., Nishino, N. and Zimmerman, M. : *J. Biol. Chem.*, 255 : 2227—2230, 1980.
- 17) Lottenberg, R., Christensen, U., Jackson, C.M. and Coleman, P.L. : In *methods in enzymology* (ed. by Lorand, L.) Academic Press, New York, 1981, Vol. 80, p.p.341—361.
- 18) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : *J. Biol. Chem.*, 193 : 265—275, 1951.
- 19) Kendall, M. : In *multivariate analysis*, Charles Griffin and Co., London, 1975, p.p.13—29.
- 20) Aoyagi, T. : In *bioactive metabolites from microorganisms* (eds. by Bushell, M.E. and Gräfe, U.) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1989, p.p. 403—418.
- 21) Aoyagi, T., Ogawa, K., Iinuma, H., Harada, S., Hamada, M. and Takeuchi, T. : *J. Antibiot.*, submit for publication.
- 22) Ogawa, K., Naganawa, H., Iinuma, H. and Aoyagi, T. : *J. Antibiot.*, submit for publication.
- 23) McDonald, J.K., Leibach, F.H., Grindelnd, R.E. and Ellis, S. : *J. Biol. Chem.*, 243 : 4143—4150, 1968.

MEL細胞の機能とプロリルエンドペプチダーゼ

杉田 秀夫*

研究協力者 塚原 俊文* 石浦 章一*

はじめに

細胞内タンパク質量は生合成と分解によってバランスを保たれ、それぞれ特有の半減期を持っている。このバランスは、細胞の状態や環境によって変化することが知られており、特に筋ジストロフィー等の進行性の筋萎縮を伴う疾患においてはタンパク分解の異常が病態と深く関わっている。このようなタンパク分解系の異常が生理機能の喪失や疾患といかなる関連性があるのかは十分に明らかにされていない。そこでこれを明らかにする研究の一環として特異的なタンパク分解が昂進して細胞のタンパク質の量が大きく変化すると考えられる細胞の分化をモデルとしてタンパク分解経路がどの様に変化するのかわ、分化誘導が容易な MEL 細胞を利用して調べた。さらに、より病的な状態の 1 例として細胞に熱処理やストレスを負荷し、同様な変化が引き起こされるか否かを検討した。

実験方法

MEL 細胞は 10% FCS を含む RPMI 1640 培地で培養した。細胞分化の誘導は、 4×10^4 cell/ml に調製した細胞を 1.5% DMSO 存在下で 6 日間培養することによって行った。培養後、遠心によって細胞を集め、PBS によって 4 回洗浄した後、細胞を超音波によって破壊し、遠心上清を用いてプロテアーゼ活性を測定した。

プロテアーゼ活性は MCA 基質の分解を指標として測定し、カテプシン B&L, マルチキヤタ

リティックプロテイナーゼ活性の他、種々の分解活性を検討した。プロリルエンドペプチダーゼ活性は Suc-GPLGP-MCA を基質として、2-メルカプトエタノール存在下、pH 7.0 で測定した。

細胞の熱処理は、FCS を含まない培地に懸濁した細胞を 45°C でインキュベートした。その後、氷冷した PBS を加えて直ちに遠心することによって細胞を集めた。

結果および考察

MEL 細胞を DMSO の存在あるいは非存在下で 6 日間培養後、細胞内プロテアーゼ活性を測定した。細胞は DMSO の添加によって赤芽球様に分化し、ヘモグロビンを合成するようになるが、表 1 に示したように DMSO 存在下で

表 1 Changes of protease activities during MEL cell differentiation

Substrate	pH	Activity	
		Cont	DMSO
		n mole/min/mg	
B-EKK-MCA	7.5	0.026	0.029
B-VPR-MCA	7.5	0.649	0.469*
B-VLK-MCA	7.5	0.206	0.240
B-FSR-MCA	7.5	0.585	0.507
PFR-MCA	7.5	0.833	0.696**
S-APA-MCA	7.5	0.254	0.126*
R-MCA	7.5	4.76	5.35
Z-FR-MCA	5.5	0.285	0.305
S-LLVY-MCA (-ATP)	9.0	0.108	0.269**
(+ATP)	9.0	1.069	1.687

*国立精神・神経センター神経研究所

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$

培養した細胞では非存在下で培養した細胞に比べて Suc-APA-MCA 分解活性が有意に減少していた。この活性減少は細胞の分化に伴う現象であると考えられたので、MEL 細胞から Suc-APA-MCA を分解する酵素を精製してその性質を調べた。この酵素は分子量約 7 万で Suc-GPLGP-MCA を最もよく水解した。2-メルカプトエタノールに依存的であったが、E-64 によっては阻害されなかった。これらの性質より、本酵素はプロリルエンドペプチダーゼと推定された。

次に、種々のプロテアーゼ阻害剤が細胞内でプロリルエンドペプチダーゼを阻害するか否かを調べるため、培地中に阻害剤を加えて培養した後に細胞を洗浄し、破碎後、細胞内の活性を測定した。特に、昨年の研究で細胞毒性を示した Bz-ES-PP-OBz が本酵素を阻害する可能性が示されたのでその効果も調べた。

しかし、表 2 に示したように細胞内に取り込まれて十分な効果を発揮する阻害剤はなかった。

一方、細胞を熱処理してプロリルエンドペプチダーゼ活性が減少するか否かを調べた。細胞を 42°C で処理しても活性は変化しなかったが、45°C で処理すると急速な失活がみられた。しかし、超音波破壊した細胞では 45°C 処理でも活性低下はみられなかった (表 3)。

ライゼートでは活性の減少がみられないことから、熱処理による失活が細胞機能と関わっていると考えられたのでどの様な機能が活性調節に必要なかを調べた。表 4 に明らかな様にこの失活はタンパク質や核酸の合成の阻害剤に影響さ

表 2 Effects of inhibitors on PEPase activity

Inhibitor	Conc.	Activity (%)
None	—	100
Z-Thioprotiazolidine	0.1 mM	72.2
pAPMSF	0.1 mM	69.7
Bz-ES-PP-OBz	0.1 mM	83.0

表 3 Residual activity of prolyl endopeptidase in heat-treated MEL cells

	Temp. (°C)	Time	Activity (%)
Intact	—	0	100
Intact	42	10	96.1
Intact	42	20	96.7
Intact	42	30	80.9
Sonicated	45	10	84.5
Intact	45	10	20.1

表 4 Effects of various reagents on thermal inactivation of PEPase

Reagent	Conc.	Residual Activity
Exp. 1 None	—	43
Cycloheximide	0.5 mM	40
Actinomycin D	25 µg/ml	35
Exp. 2 None	—	32
DMSO	1 %	34
EST	50 µg/ml	21
NH ₄ Cl	1 mM	13
EtO-ES-YR(NO ₂)-OBz	0.1 mM	16
HO-ES-TI-OMe	0.1 mM	12

れずこれらの合成は失活に必要なでないと考えられた。またプロテアーゼ阻害剤等の添加によっても失活が抑えられないことからリソソーム等で分解されて活性を失っているのでもないかと推定された。また熱処理によって細胞内インヒビターが活性化される可能性も考えられたが、熱処理した細胞内にはインヒビター活性は認められなかった。

熱以外のストレスを細胞に負荷したところ細胞内の酸化型グルタチオン濃度を上昇させるメナジオンの添加によってプロリルエンドペプチダーゼ活性が減少した (表 5)。そこで細胞ライゼートに酸化型グルタチオンを加えプロリルエンドペプチダーゼが失活するか否かを確かめた。

表 5 Effects of stresses on proteinase activities

Reagents	Conc.	PEPase	CathB&L	MCP
None	—	100	100	100
EtOH	6 %	68	87	117
H ₂ O ₂	1 mM	87	39	96
Menadione	50 µM	21	101	68

表6 Inactivation of PEPase by the addition of GSSG

	Conc. (mM)	Activity
at 45°C	0	100
	0.1	56
	0.3	38
	1	23
at 37°C	1	92

表6に示したように45°Cでインキュベートしたライゼートでは酸化型グルタチオンの濃度に依存して活性の減少がみられた。しかし37°Cでは酸化型グルタチオンを加えても活性は減少しなかった。この実験結果は細胞内においてはプロリルエンドペプチダーゼが熱処理やメナジオン添加によって生じた酸化型グルタチオンによって活性を調節されている可能性を示唆した。

結 論

MEL細胞の分化やストレスの負荷に伴ってプロリルエンドペプチダーゼ活性が特異的に減少した。ストレス負荷による活性減少には細胞内酸化型グルタチオン濃度の上昇が関与していることが示唆された。

文 献

- 1) Tsukahara, T., Ishiura, S. and Sugita, H.: Cell Struct. Funct., 14: 940, 1989.
- 2) Tsukahara, T., Ishiura, S., Kominami, E. and Sugita, H.: Exp. Cell Res., in press.
- 3) Prett, G., Hough, R. and Rechsteiner, M.: J. Biol. Chem., 264, 12525—12532, 1989.
- 4) Tsukahara, T., Ishiura, S. and Sugita, H.: submitted.

E-64-C および EST の薬物動態

— 蛍光 HPLC によるマウス血清および筋肉中濃度の測定 —

大 倉 洋 甫 *

研究協力者 巢 文 峰 * 甲 斐 雅 亮 *

はじめに

われわれは、高選択的かつ高感度な蛍光誘導体化試薬を利用した蛍光検出・高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を手段として、血液ならびに筋肉中に分布しているロイペプチン¹⁾、ベスタチン^{2),3)}、p-ヒドロキシベスタチン^{3),4)}、ホルフェニノール^{5),6)}、アンチパイン⁷⁾、ホルフェニシン⁸⁾ などの実用的かつ簡便な薬物モニター法を開発し、それらの生体内動態を検討してきた。

昨年度は、ペプチド様化合物である E-64-c および EST の蛍光ラベル化剤として、当分担研究者らが既に開発した 3-プロモメチル-6,7-ジメトキシ-1-メチル-2(1H)-キノキサリノン (Br-DMEQ) を用い^{9),10)}、E-64-c のカルボキシル基を蛍光ラベルする反応条件を設定した。また、EST のラベル化には、酵素加水分解によって EST を E-64-c へ導き、続けて Br-DMEQ により蛍光ラベル化する方法を確立した (図 1)。

本年度は、この Br-DMEQ 試薬を用いる蛍光ラベル化法を蛍光検出 HPLC に応用し、マウス血清および筋肉中の E-64-c および EST の薬物モニター法を開発した。さらに、E-64-c または EST を経口投与したマウス体内 (血清および筋肉) の経時的濃度変化を調べた。

実験方法

(1) 経口投与：近交系の C 57 BL マウス (雄性, 5 週齢, 約 18 g 体重) に 5% アラビアゴム

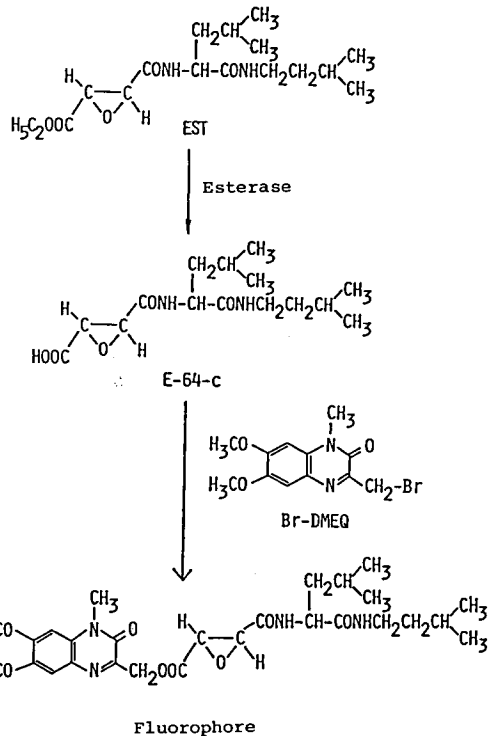


図 1 Fluorescence derivatization of EST and E-64-c with Br-DMEQ

水溶液に懸濁した EST あるいは E-64-c を 50 mg/kg の投与量で経口投与した。投与後、水だけを与え、各時間ごとにマウスを頸動脈切断により殺し、直ちに血清および僧帽筋を採取した。得られた血清および筋肉を -80°C の冷凍庫に保存した。

(2) E-64-c の定量：血清 10 μl に H₂O (検量線作成時, E-64-c の標準水溶液) 10 μl およびアセトン 200 μl を加え、除蛋白する。筋肉試料の場合は、筋肉 20 mg に H₂O (検量線作成時, E-64

* 九州大学薬学部

-cの標準水溶液)50 μ lを加え、ホモジナイズする。これにアセトン200 μ lを加え、除蛋白する。両試料とも、それぞれ1000 gで、5分間遠心後、各上清20 μ lを遮光バイアルに移す。バイアルに、100 mM KHCO_3 のDMF- H_2O (4:1, v/v)溶液10 μ lおよび4 mM Br-DMEQのDMF溶液70 μ lを加え、100°C 20分間加熱する。その50 μ lをHPLCに注入する。

(3) ESTの定量：血清10 μ lに H_2O (検量線作成時、ESTの標準水溶液)10 μ lおよび300 units (10 mg)/ml carboxyl esteraseの0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 2 μ lを加え、室温 (24 \pm 5°C)で30分間放置する。筋肉試料の場合は、筋肉20 mgに H_2O (検量線作成時、ESTの標準水溶液)50 μ lを加え、ホモジナイズする。ホモジネートに300 units (10 mg)/ml carboxyl esteraseの0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) 5 μ lを加え、室温 (24 \pm 5°C)で30分間放置する。酵素反応後、両反応液にアセトン200 μ lを加え、1000 gで5分間それぞれ遠心したのち、各上清20 μ lをE-64-cの定量法と同様に蛍光誘導体化反応に用い、HPLCによって蛍光ラベル化体を分離検出する。ESTの定量値はE-64-cの定量値を差し引くことによって求める。

(4) HPLC条件：カラムはTSKgel ODS-120 T (150 \times 4 mm, i.d.; 粒径, 5 μ m)を使用した。 $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (2:3, v/v)の溶離液を流速0.8 ml/minで送液した。E-64-cの蛍光体が溶出したのち、直ちに $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (19:1, v/v)の溶離液を同じ流速で流し、カラムを洗浄した。蛍光検出は、励起波長380 nmおよび発光波長460 nmで行なった。

結果および考察

(1) 試料の前処理および誘導体化反応

E-64-cの蛍光誘導体化反応は有機溶媒中で進行するので、生体試料の除蛋白剤としてアセトンを用いた。コントロールマウスの血清10 μ lにE-64-c標準液 (100 nmol/ml) 10 μ lを添加し、50-400 μ lのアセトンにより除蛋白した場

合、E-64-cの添加回収率を調べた (図2)。その結果、アセトン200 μ l以上を使用したときに良好な回収率 (80%) が得られた。

アセトンをラベル化反応液中0-60% (v/v)の範囲で変化させたとき、E-64-cの蛍光体の生成量を調べた。図3に示すように、反応液中のアセトン濃度が20%以上になると、蛍光生成物

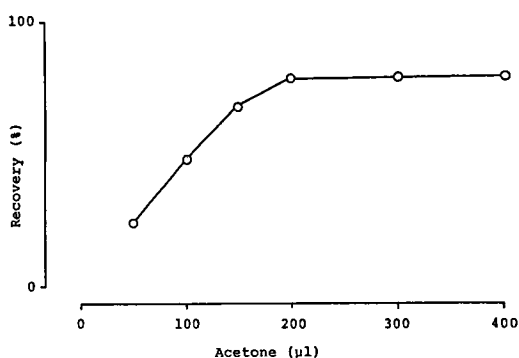


図2 Effect of the amount of acetone in the deproteinization on the recovery of E-64-c

A 10- μ l portion of 10 nmol/ml E-64-c was added to 10 μ l of serum and the mixture was deproteinized with acetone at various amounts and treated as in the recommended procedure.

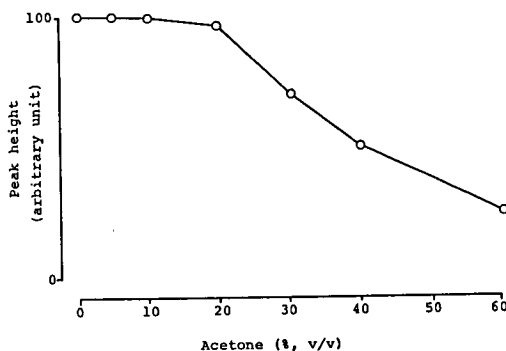


図3 Effect of the concentration of acetone in the reaction mixture on the derivatization of E-64-c

A 20- μ l portion of 10 nmol/ml E-64-c was treated as in the recommended procedure for the derivatization in the presence of acetone in the reaction mixture.

のピークはほぼ直線的に低くなり、アセトンによって誘導体化反応が阻害されることが分かった。しかし、反応に用いる試料量（アセトン除蛋白した上清）を減じることは、生体試料中の微量 E-64-c の測定が困難になるので、定量操作には上清 20 μ l をラベル化反応に用いた。

また、Br-DMEQ 試薬によるラベル化反応は KHCO_3 の存在下で進行する。 KHCO_3 の DMF-H₂O (4 : 1, v/v) 溶液 (濃度, 0-200 mM) を使用して、蛍光誘導化反応に及ぼす影響を調べた (図 4)。 KHCO_3 濃度が 100 mM 以上のとき蛍光ピークは最大となった。しかし、150 mM 以上の KHCO_3 溶液を室温で長時間放置すると、 KHCO_3 の結晶が生じるため、100 mM の溶液を用いた。

生体試料中の E-64-c を誘導体化する場合に必要な Br-DMEQ 濃度を検討した (図 5)。4 mM 以上の Br-DMEQ であるときに最大の反応収率が得られた。しかし、高濃度の試薬 (6 mM 以上) を用いると、試薬由来の蛍光ピークのテーリング部分が E-64-c の蛍光ピークの検出を妨害したので、4 mM Br-DMEQ を使用した。

生体試料を用いたとき、蛍光誘導化反応は標準試料の場合よりやや遅く進行した。60°C およ

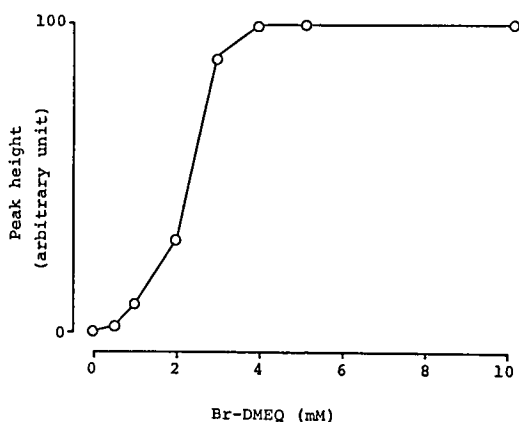


図 5 Effect of the concentration of Br-DMEQ on the derivatization of E-64-c

A 10- μ l portion of 10 nmol/ml E-64-c was added to serum and treated as in the recommended procedure with Br-DMEQ at various concentrations.

び 37°C では、少なくとも 1 時間反応しても最大の蛍光ピークは得られなかった。一方、100°C では、10-25 分間で最大の蛍光ピークが得られた (図 6)。したがって、100°C、20 分間の反応条件を選択した。

(2) E-64-c および EST の定量

図 7 は、E-64-c をマウスに経口投与し、投与

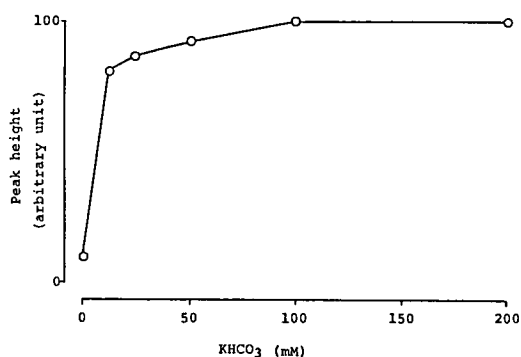


図 4 Effect of the concentration of KHCO_3 on the derivatization of E-64-c

A 10- μ l portion of 10 nmol/ml E-64-c was added to serum and treated as in the recommended procedure with KHCO_3 at various concentrations.

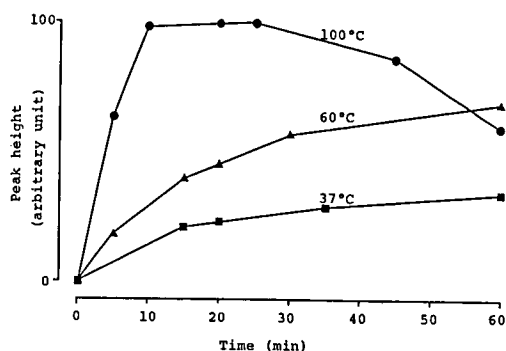


図 6 Effect of reaction time and temperature on the derivatization of E-64-c

A 10- μ l portion of 10 nmol/ml E-64-c was added to serum and treated as in the recommended procedure at 37, 60 and 100°C for various periods.

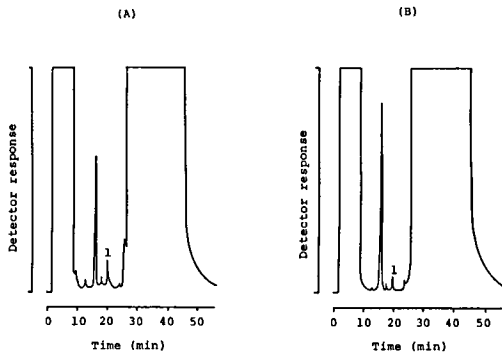


図7 Chromatograms of E-64-c in (A) serum and (B) muscle at 4 h after oral administration of E-64-c to a mouse (Dose: 50 mg/kg).

Peaks: 1=E-64-c, others = reagent blanks and endogenous substances in serum and music. Concentrations of E-64-c: (A) 8.40 nmol/ml in serum, (B) 3.88 nmol/g in muscle.

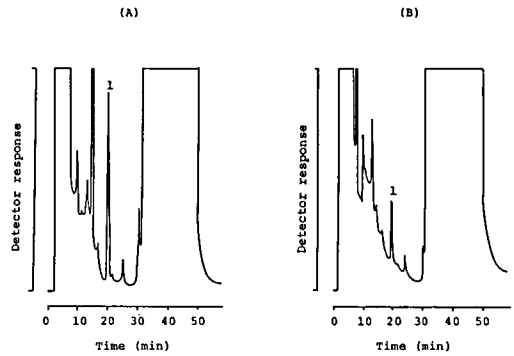


図8 Chromatograms of E-64-c obtained with hydrolysis of EST in (A) serum and (B) muscle at 4 h after oral administration of EST to a mouse (Dose: 50 mg/kg).

Peaks: 1=E-64-c, others=reagent blanks and endogenous substances in serum and muscle. Concentrations of E-64-c and EST: (A) 137 nmol E-64-c and 15 nmol EST/ml in serum; (B) 23 nmol E-64-c and 10 nmol EST/g in muscle.

後4時間における血清および筋肉試料から得られたクロマトグラムである。また、ESTを同様にマウスに投与し、同じく投与後4時間に採取した血清および筋肉中のESTを酵素反応によってE-64-cに変換したときに得られるクロマトグラムを図8に示す。E-64-cの蛍光ピークは保持時間20分に溶出し、試薬ブランクおよび生体由来の妨害ピークと良好に分離された。

マウス血清および筋肉に添加したE-64-cの検量線は少なくともそれぞれ0.5 $\mu\text{mol/ml}$ および0.8 $\mu\text{mol/g}$ の添加量まで原点を通る直線を示した。検量線の相関係数 (r) はそれぞれ0.999および0.998であった。また、S/N=3における検出限界は血清中では500 pmol/ml、筋肉中では320 pmol/gであり、HPLCの注入量で表わすと、約0.6 pmolに相当する。また、同じ試料を6回繰り返して測定して得られた相対標準偏差は5 nmol/ml血清の場合は4.7%で、1.5 nmol/g筋肉の場合は5.5%であった。

一方、マウス血清および筋肉に添加したESTの検量線は少なくともそれぞれ0.7 $\mu\text{mol/ml}$ および1.0 $\mu\text{mol/g}$ の添加量まで原点を通る直

線を示した。検量線の相関係数 (r) はそれぞれ0.999および0.997であった。また、S/N=3における検出限界はほぼE-64-cの場合と同様で血清中では500 pmol/ml、筋肉中では300 pmol/gであった。また、同じ試料を6回繰り返して測定して得られた相対標準偏差は5 nmol/ml血清の場合は5.2%で、1.5 nmol/g筋肉の場合は6.1%であった。

(3) E-64-cおよびESTの体内動態

E-64-cを投与したマウスの血清および筋肉中E-64-cの経時的濃度変化を調べた(図9A)。E-64-cの濃度は血清および筋肉中とも投与後1時間で最大値に達し、その後徐々に減少した。血清および筋肉における濃度曲線のE-64-cの消失半減期はそれぞれ約8.7および約5.2時間であった。なお、E-64-cを投与したとき、血清および筋肉中におけるESTの生成は認められなかった。

ESTを投与した場合の血清および筋肉中ESTの経時的濃度変化を調べた結果を図9B

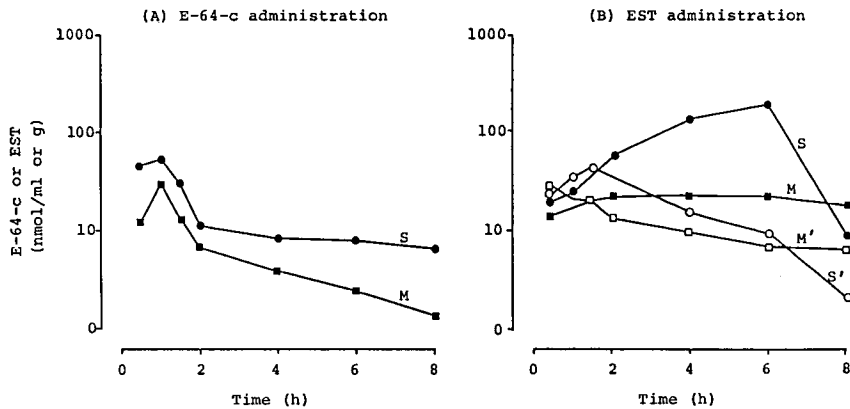


図9 Concentrations of E-64-c and EST in serum and muscle of mice (n=3) after oral administrations of (A) E-64-c and (B) EST (Dose; 50 mg/kg each).

Curves: S, E-64-c in serum; M, E-64-c in muscle; S', EST in serum; M', EST in muscle.

に示す。ESTの消失半減期は血清中では約4.0時間で、筋肉中では約5.3時間であった。ESTを投与したマウスの血清および筋肉中ではE-64-cもその代謝物として検出された。その濃度は投与後6時間まで徐々に増大した。また、血清では約0.8時間以後、筋肉では約1.5時間以後において、代謝物E-64-cの濃度はESTの濃度を上回り、それぞれ投与後4時間および6時間で最大値を示した。特に、6時間後採取した血清中のE-64-c濃度は、等量のE-64-cを投与したマウスの6時間後の血清中のE-64-c濃度の14倍も高い値を示した。これらの結果は、EST投与の方が、E-64-c投与より、より高い薬物活性が得られ易いことを示唆した。

おわりに

Br-DMEQ試薬を用いた蛍光HPLCは、E-64-cおよびESTを経口投与したマウスの血清および筋肉中の微量E-64-cの薬物モニターを可能にした。また、酵素による加水分解法によって生体試料中のESTも同じ蛍光HPLCによって高感度に定量できた。

開発した方法により、E-64-cあるいはEST投与マウスの血清および筋肉中の両薬物濃度を測定した結果、ESTを投与したとき、マウス体

内において、その薬物活性代謝物としてのE-64-cが高濃度に血清および筋肉中に分布し得ることを化学的に明らかにした。

文 献

- 1) Kai, M., Miura, T., Ishida, J. and Ohkura, Y.: J. Chromatogr., 345, 259-265, 1985.
- 2) Ishida, J., Yamaguchi, M., Kai, M. and Ohkura, Y.: J. Chromatogr., 305, 381-389, 1984.
- 3) Ishida, J., Kai, M. and Ohkura, Y.: Xenobio. Metabol. Dispos., 1, 397-403, 1986.
- 4) Ishida, J., Kai, M. and Ohkura, Y.: J. Chromatogr., 344, 267-274, 1985.
- 5) Tamura, M., Kai, M. and Ohkura, Y.: Jap. J. Clin. Chem., 13, 195-201, 1984.
- 6) Kai, M., Tamura, K., Ohno, M. and Ohkura, Y.: Biomed. Chromatogr., 1, 143-146, 1986.
- 7) 甲斐雅亮, 坂本靖浩, 三浦哲朗, 大倉洋甫: 分析化学, 35, 329-331, 1986.
- 8) Chao, W.-F, Kai, M. and Ohkura, Y.: J. Chromatogr., 430, 361-367, 1988.
- 9) Yamaguchi, M., Hara, S., Matsunaga, R.,

Nakamura, M. and Ohkura, Y.: Anal.
Sci., 1, 295—296, 1985.

Nakamura, M. and Ohkura, Y.: J.
Chromatogr., 346, 227—236, 1985.

10) Yamaguchi, M., Hara, S., Matsunaga, R.,

CANP 阻害剤の一般薬理学的研究

—表面筋電図中の呼吸運動関連成分の定量化 に基づく筋機能評価法に関する基礎的研究—

福原 武彦*

研究協力者 加藤 總夫* 木村 直史*
高野 一夫* 塚元 葉子*

目 的

ヒト筋ジストロフィー症の治療薬の開発を推進するうえで、生理学ならびに病態生理学的基盤に立った薬効の定量的評価法が確立される必要があることはいうまでもない。その評価法において用いられる指標が可及的に非侵襲的な計測手法によって測定することができ、しかも、実際の臨床症例に対しても適用可能であり、さらに治療薬の薬効のみならず病態、およびその進行もしくは改善の程度の評価方法としても応用され得ることが確認されるならば、その評価法の有用性は、極めて高いものとなるものと考えられる。

一方、麻酔下、人工換気下に導出された高等哺乳動物の呼吸筋ならびに呼吸補助筋群を支配する遠心性神経の吸息性活動電位が、60-130 Hz の成分、すなわち「高頻度同期波」成分をその主成分として多く含んでいることが知られており^{4),5),9),10)}、これは、脳幹に存在する呼吸中枢内の神経回路において共通に形成され、呼吸運動に関連した骨格筋群を支配する神経内の運動神経細胞の同期的発火を引き起こし、効率的な呼吸運動の中枢性制御に関与する成分である可能性が示されている⁹⁾。また、この高頻度同期波が神経筋伝達を介して呼吸筋の筋電図中にも発現する事実は、ウサギ、ネコ、イヌにおいても確認されており⁴⁾⁻⁷⁾、さらに、健常人の肋間筋も

しくは横隔膜の筋電図から、これに相当する成分を検出した報告もある^{2),8),12),13)}。

昨年度、我々は、ヒトの呼吸筋表面筋電図を非侵襲的に導出し、そこに含まれる高頻度同期波相当成分を周波数分析の手法を用いて同定することによって、呼吸調節系、運動神経機能、神経筋伝達、および呼吸筋収縮機能との関連のもとに、これらの機能的な異常を定量的に評価し得る可能性につき検討した⁸⁾。今年度我々は、諸種の中枢性運動性命令に対する呼吸筋群の電気的応答性を定量的に評価する方法の確立を目標として、健常人から導出された呼吸筋群の表面筋電図のパワースペクトル解析と複数の導出部位間のコヒーレンス解析¹¹⁾を組合せることによって、筋集合活動電位中に発現する呼吸運動関連成分とそれ以外の分別を試み、あわせてその臨床的検査ならびに診断への応用可能性を検討した。この評価法が、一つの臨床検査法として確立されれば、筋ジストロフィー、重症筋無力症あるいは筋萎縮性側索硬化症などの運動単位の障害をきたす疾患の病態ならびにその治療薬の薬効の機能的かつ非侵襲的な評価法として応用し得る可能性が期待される。

実験方法

呼吸器ならびに心疾患の既往歴のない健常男子7名(22~35歳)を被験者とした。座位において、以下の7部位より、約2 cmの間隔で装着した直径約8 mmの銀塩化銀皿電極により表

*東京慈恵会医科大学第二薬理学教室

面筋電図を双極性に導出した（時定数 0.03 秒）：左顎二腹筋前腹上（図 1 左上の模式図の ①），横隔膜胸骨部近傍上の剣状突起両側（同 ②，③），第 7，第 8 肋間前腋窩線上の左右肋間部（同 ④，⑤），および左右第 2，第 3 肋間鎖骨中線内側（同 ⑥，⑦）。筋電図の導出下，被験者に以下の 9 項目の負荷を実行させた（各 30 秒～1 分）：1) 安静呼吸，2) 下顎の開閉を伴う強制呼吸，3) バルサルバ・テスト，4) 連続的な唾液の嚥下，5) 舌突出，6) 吸息位での息こらえ，7) 呼息位での息こらえ，8) 深呼吸，および 9) ビニール・バッグ法による再呼吸。

上記の筋電図の記録を呼気中炭酸ガス濃度の

連続記録とともにデータレコーダ（TEAC, XR-510）に収録し，実験終了後，筋電図中に混入する心電図成分を R-波同期 FFT 法により除去した上で¹³⁾，これらの筋電図中に含まれる共通，および非共通の周波数成分を定量的に同定する目的で，1) 各筋電図の自己パワースペクトル密度関数，2) すべての筋電図間の組み合わせの相互パワースペクトル密度関数（同相ならびに直交パワースペクトル密度関数）を常法に基づいて 0-200 Hz の帯域につき推定演算した¹⁾。また，異なる部位から導出された 2 筋電図間の相関を各周波数ごとに 0 から 1 の間の数値で示すコヒーレンス（関連度関数）を推定した。

さらに，10-200 Hz の帯域全体における 2 筋

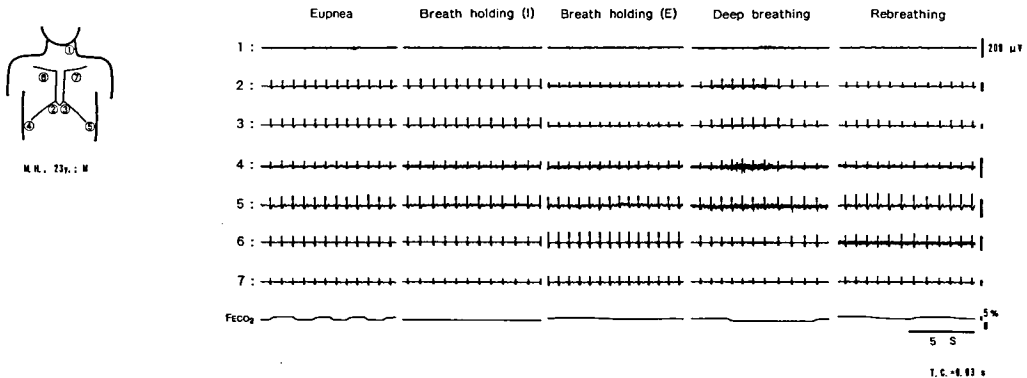
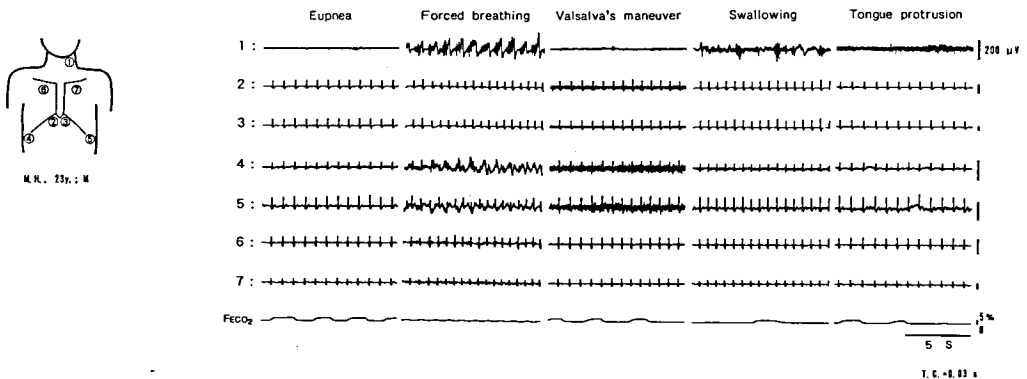


図 1, 図 2 1-7, 健常人から導出された筋電図記録。それぞれ左上の導出部位①-⑦の筋電図記録。FECo₂: 呼気炭酸ガス濃度（較正は 0-5%）。較正は 200 μV（1-7）。時標は 5 s。記録 2-7 中のスパイク様電位は ECG の混入。

電図間の相関の程度の指標として，“coherent index（付記参照）”を定義し，その安静呼吸下の値に対する対数変化率と，同帯域における筋電図振幅の二乗平均値の対数変化率を2次元平面上にプロットし，これを“power versus coherent index plot（P-C plot）”とした（付記参照）。

実験成績

呼吸性あるいは非呼吸性の負荷によって，各導出部位の表面筋電図の振幅は，それぞれの負荷により大きく変化したが，その程度は導出部位によって様々であった（図1および2）．その周波数分析を行なったところ，それぞれの筋電図の自己パワースペクトル密度関数，および異なる導出部位間のコヒーレンスにはさまざまな定性的ならびに定量的変化が見出された（図3および4；ただし以下には，最も特徴的かつ興味深い変化を示した左顎二腹筋前腹上および左右第2，第3肋間鎖骨中線内側の組み合わせの解析結果の一部のみを図示した）．本解析の結果，これらのスペクトルには，定常性の高い周

期性成分の存在を示唆するピークは検出し得なかったので，以下の解析においては，これらのスペクトルが大きく変化を示し，かつヒトならびに動物における高頻度周期波の発現周波数帯域^{2),4),5),9),10)}を含む10-200 Hzの帯域全体の変化を評価することとした．

そこで，これらが安静呼吸下に導出された筋電図に対する変化を定量的に検討する目的で，各負荷下の筋電図に対し，“P-C plot”を試みた（図5および6）．このプロットの横軸は，筋電図のパワー値，すなわちその振幅の二乗平均値の対安静呼吸変化率を示し，縦軸は，10-200 Hzの帯域における coherent index すなわち，共通の周波数成分の含有率の対安静呼吸変化率を示すものである．ここではそれぞれの対数としてプロットさせているため，安静呼吸時の座標点は原点上にのることになる．例えば，ある負荷によって座標点が第I象限に移動した場合，それは，2筋電図間の相関の程度が高まった上でそれぞれの活動量が増大したことを意味し，逆に，座標点が第IV象限に移動した場合，それは，それぞれの活動量が増大したものの，2筋電図

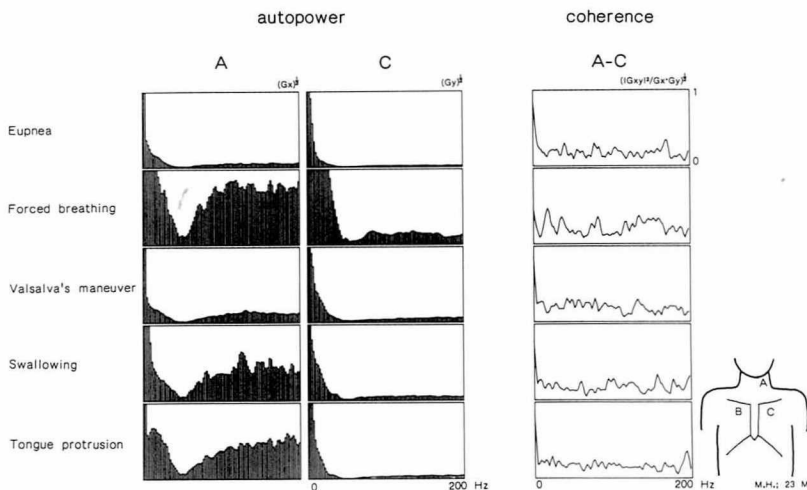


図3 左顎二腹筋前腹上および左第2，第3肋間鎖骨中線内側から導出された表面筋電図の自己パワースペクトルならびに両者間のコヒーレンス・スペクトル．横軸はいずれも周波数（0-200 Hz），自己パワースペクトル密度関数の縦軸，相対パワー密度の平方値（V/Hz）；コヒーレンス・スペクトルの縦軸，コヒーレンス（0-1）．A，B，C，A-CならびにB-Cは，右下の模式図における導出部位およびその組み合わせを表わす．

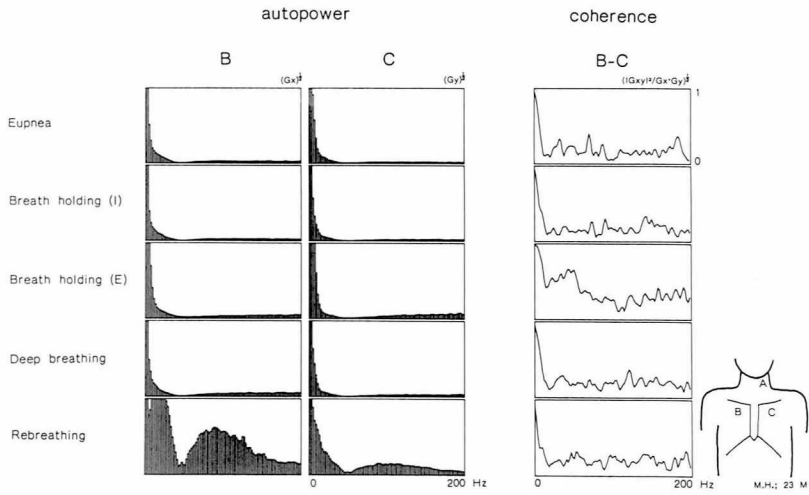


図4 左右第2, 第3肋間鎖骨中線内側から導出された表面筋電図の自己パワースペクトルならびに両者間のコヒーレンス・スペクトル解析. 詳細は図3および4に準ずる.

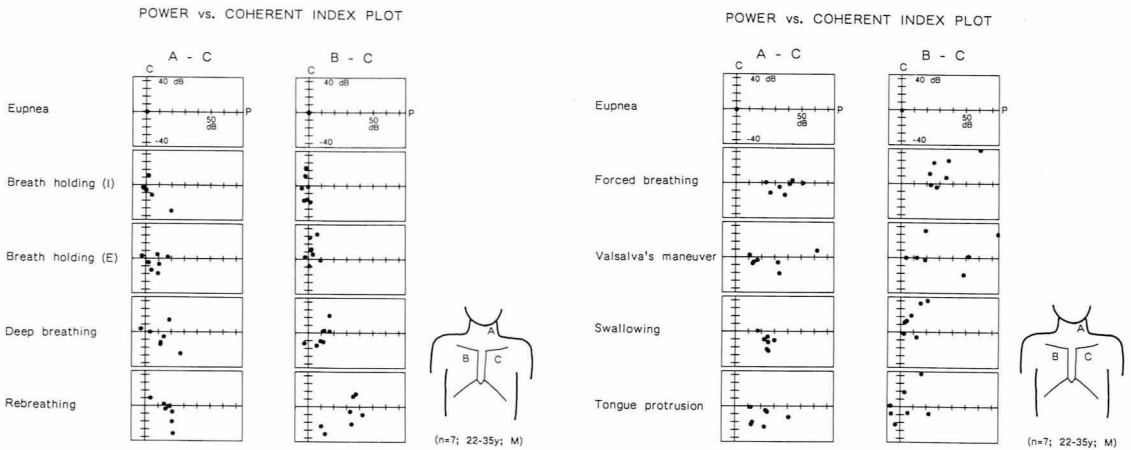


図5, 図6 左顎二腹筋前腹上および左右第2, 第3肋間鎖骨中線内側から導出された表面筋電図のスペクトル解析結果のP-C plot. A, B, C, A-CならびにB-Cは, 右下の模式図における導出部位およびその組み合わせを表わす. 一つの黒丸は一人の被験者の解析結果を示す. 縦軸, 横軸ともに, 1目盛が10 dB. P-C plotの詳細については本文参照.

間の相関の程度は低くなったことを意味する.

この“P-C plot”を行なった結果, 1) 解析の対象とする導出部位の組み合わせによって, ならびに, 2) 負荷の種類によって, その座標点は, さまざまな位置に移動することが確認された(図7). 特に, 脊髄上の異なる髄節, あるいは, 脳幹と脊髄のように, 離れた部位に起始す

る運動神経によって支配される筋群の筋電図間の解析結果は, 同じ負荷下においても全く異なる特徴的な変化を示した(図7の左右). ことに, 連続的な唾液の嚥下(図7の④)や舌突出(図7⑤)といった非呼吸性の負荷, あるいは, 強制呼吸(図7②)ならびに呼息位における息こらえ(図7⑦)といった呼吸性の負荷におい

POWER vs. COHERENT INDEX PLOT

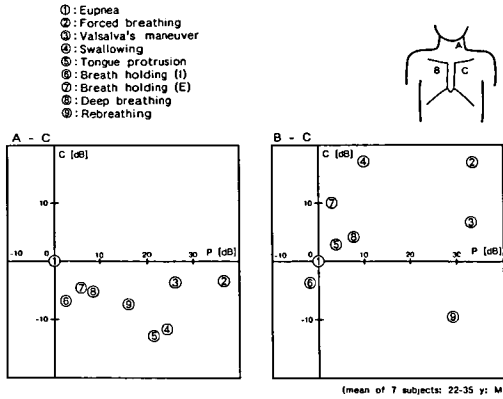


図7 左頸二腹筋前腹上および左右第2, 第3肋間鎖骨中線内側から導出された表面筋電図のスペクトル解析結果のP-C plot. A, B, C, A-CならびにB-Cは, 右下の模式図における導出部位およびその組み合わせを表わす。①~⑨は安静呼吸時および各種の負荷施行時の結果を全解析例 (n = 7) について平均した値を表わす。縦軸, 横軸ともに, 1目盛が10dB. P-C plotの詳細については本文参照。

て異なる導出部位間の組み合わせによる“P-C plot”上の座標点の位置の差は顕著であった(図5, 6および7)。

考 察

現在までに, 骨格筋の表面筋電図のパワースペクトル解析に基づいて, 筋ジストロフィー症における筋収縮機能の変化を解析する試みが行なわれている。永田¹¹⁾は上腕二頭筋の表面筋電図を記録し最大随意筋収縮ならびに正弦波追従補償トラッキング動作下のパワースペクトル密度関数を推定し, 疾患群の補償トラッキング動作下の平均パワー周波数が, 健常群のそれよりも有意に低い事実を示している。また, 安武¹²⁾は筋ジストロフィー症の患者において第6~第8肋間において横隔膜の双極表面筋電図を導出し, そのパワースペクトル解析の結果から, 呼吸筋の疲労を鋭敏に検出し得る指標と考えられている High frequency/Low frequency 比³⁾を

算出したが, 疾患群と健常群の間に有意な差は認められなかったことを報告している。

これらの研究では, 表面筋電図のパワースペクトル解析によってその周波数成分に及ぼす筋変性の影響を定量化することが試みられているが, 一般に表面筋電図の周波数成分は, 中枢神経系からの運動性命令が, 神経筋接合部における伝達ならびに筋活動電位の発生過程を通じて変調され, さらにそれが, 筋線維群の電気緊張電位性の相互干渉や時間的かつ空間的な加算を受けた上で集合電位として発現するものと見做される¹¹⁾。したがって, これらの研究において用いられたパワースペクトル解析のみによっては, 筋電図の周波数成分の変化が, 中枢神経系からの運動性命令の変化によるのか, 神経筋伝達機構, 筋活動電位発生機構ならびに筋収縮機構などをふくむ筋活動の変化によるのかを弁別することは不可能である。

一方, 本研究において認められたように, 電気緊張電位性の干渉の影響を無視し得る程度まで隔れた部位から導出した複数の筋電図間に共通の互いに同期した周波数成分が検出された場合, その同期性は, 中枢神経内の神経連絡に由来するものと見做し得る。

また, 呼吸中枢が血中酸素および炭酸ガス濃度を適正に維持するための反射性応答能を保持しているならば, 安静呼吸時に呼吸中枢から呼吸筋・呼吸補助筋群へと伝えられる運動性の出力は, 一般的な随意運動性の出力に比し, 定常性と安定性ならびに再現性に富んだものであると考えられ得る。

本研究では, 各筋電図間に共通な周波数成分の含有率を coherent index として定量化し, その変化を, それぞれの筋電図のパワースペクトル密度の変化とともに, 安静呼吸下との比較のもとに定量化することを試みた。その結果, 様々な呼吸性もしくは非呼吸性の負荷に対する, パワー値と coherent index の変化態度が, 導出した部位の組合せによって極めて多様, かつそれぞれに特徴的であることを確認し得た。しかも,

負荷によっては、異なる個体においてもその P-C plot 上の変化が、定常的に再現性をもって発現する事実も見出された。従って、筋電図を導出している部位の近傍において、筋線維の萎縮や、神経筋接合部の機能的障害などの病態生理学的な変化が生じた場合、この、coherent index とパワー値の対安静呼吸変化率にも大きな変化が認められるものと推察される。例えば、coherent index の低下をとともなわないパワー値の低下は、それが、中枢由来の運動性出力の減少ではなく、筋変性に由来した変化である可能性を示すと考えられる。従って、次の研究課題は、本研究において得られた成果をふまえ、適正かつ最適な測定条件、筋電図の導出方法などを初めとした標準的な計測ならびに解析方法および測定結果の解釈（臨床的所見との対応を含む）につき十分な知見を積み重ねることである。このような検討の結果に基づき確立される解析法は、筋ジストロフィー症における呼吸筋変性の進行の程度の機能面からの判定および CANP 阻害剤の治療効果に関する非侵襲的な定量的評価方法としても有効な臨床的応用が期待される。

付記

1. Coherent Index (C_{XY}) の推定

$$C_{XY} = \frac{\Delta \int_{10}^{200} |P_{XY}(f)|^2 df}{\int_{10}^{200} P_X(f) df \cdot \int_{10}^{200} P_Y(f) df}$$

P_{XY} : X, Y の相互パワースペクトル密度関数

P_X, P_Y : それぞれ、X および Y の自己パワースペクトル密度関数

2. Power versus Coherent Index Plot

(P-C plot)

横軸 P [dB] :

$$\frac{20 \cdot \log \frac{TP_X'}{TP_X} + 20 \cdot \log \frac{TP_Y'}{TP_Y}}{2}$$

但し、 $TP = \int_{10}^{200} P(f) df$

(TP' : 負荷下, TP : 安静呼吸下の値)

縦軸 C [dB] :

$$20 \cdot \log \frac{C_{XY'}}{C_{XY}}$$

(C' : 負荷下, C : 安静呼吸下の値)

文 献

- 1) Bendat, J.S. and Piersol, A.G.: "Random Data: Analysis and Measurement Procedures", John Wiley and Sons, New York, 1971.
- 2) Bruce, E.N. and Ackerson, L.M.: High-frequency oscillations in human electromyograms during voluntary contractions, J. Neurophysiol., 56, 542—553, 1986.
- 3) Cohen, C.A., Zagaelbaum, G., Gross, D. Roussos, C.H. and Macklem, P.T.: Clinical manifestations of inspiratory muscle fatigue, Amer. J. Med., 73, 308—316, 1982.
- 4) Dittler, R. and Garten, S.: Die zeitliche Folge der Aktionsströme in Phrenicus und Zwerchfell bei der natürlichen Innervation. Z. Biol., 133, 420—450, 1912.
- 5) Gasser, H.S. and Newcomer, H.S.: Physiological action currents in the phrenic nerve. An application of the thermionic vacuum tube to nerve physiology. Amer. J. Physiol., 57, 1—26, 1921.
- 6) 福原武彦: CANP 阻害剤の一般薬理学的研究—スペクトル解析を用いた筋電図および神経活動の定量的評価法—, 厚生省新薬開発研究費「低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究」江橋班昭和 61 年度研究報告書, 1987.
- 7) 福原武彦: CANP 阻害剤の一般薬理学的研究—筋電図および神経活動中の呼吸運動

- 関連成分の定量的評価法に関する基礎的研究一，厚生省新薬開発研究費「低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究」江橋班昭和 62 年度研究報告書，1988.
- 8) 福原武彦：CANP 阻害剤の一般薬理学的研究一神経活動および筋電図の周波数分析に基づく呼吸筋機能評価法に関する基礎的研究一，厚生省新薬開発研究費「低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究」江橋班昭和 63 年度研究報告書，1989.
- 9) Kato, F., Kimura, N., Takano, K. and Hukuhara, T., Jr.: Quantitative spectral analysis of high frequency oscillations in efferent nerve activities with respiratory rhythm, In: "Respiratory Muscles and their Neuromotor Control", eds, G.C. Sieck, S.C. Gandevia and W. E. Cameron. Alan R. Liss, New York, 1987, pp.263—267.
- 10) 加藤總夫，木村直史，福原武彦：呼吸リズムを発現する遠心性神経活動における高頻度同期波の局在とその機能的意義。自律神経，25, 503—510, 1988.
- 11) 永田晟：筋と筋力の科学—筋収縮のスペクトル解析，不味堂出版，1984, pp.204—213.
- 12) Sapuntsov, L.E.: Correlation analysis of electrical activity of human muscles of respiration. Bull. Exp. Biol. Med., 71, 604—606, 1971.
- 13) Schweitzer, T.W., Fitzgerald, J.W., Bowden, J.A. and Lynne-Davies, P.: Spectral analysis of human inspiratory diaphragmatic electromyograms, J. Appl. Physiol., 46, 152—165, 1979.
- 14) 安武敏明：横隔膜筋電図の周波数分析，厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の疫学，病態および治療開発に関する研究」昭和 62 年度報告書，1987, pp.228—232.

骨粗鬆現象における Cathepsin B の関与と E-64 誘導体の効果

勝 沼 信 彦*

研究協力者 二 川 健* 唐 渡 孝 枝* 花 田 和 紀**
樋 口 昭 平** 村 田 光 男**

研究の目的・意義

脱灰 (Ca) 現象に起因する骨粗鬆症は多い。これは高齢化社会を迎えて普遍的な病態として特に重要であることは言うまでもない。その上に悪性腫瘍による Malignant hyper calcemia や妊娠時・閉経後の骨粗鬆症も長く解決すべき対照疾患として問題にされてきた。最近ではビタミン D₃ と PTH の研究が急速に進展して、骨形成不全に対する対策は大きな進歩をみせた。しかし、脱灰 (Ca) の作用因子と機構に関する分子レベルでの研究はなかった。Ca を支持するマトリックス蛋白の分解に関与している酵素に関しても、主にコラゲナーゼのみが注目されており一部エラスターゼも取扱われていた。我々は、各種の高カルシウム血症動物の血中 Ca 濃度を E-64 誘導体が著明に低下させることから、骨マトリックス蛋白の分解に Cathepsin 群が関与していることを予想した。一般にマクロファージやクッパー細胞等の網内系食細胞には Cathepsin B が圧倒的に多く、且つ容易に誘導的増加も起すことを明らかにしてきた。従って Osteoclast の Cathepsin 群がこれに関与していることは最も考え易い。実際に骨脱灰における Osteoclast の Cathepsin 群の役割を明らかにし、その特異的阻害剤 E-64 誘導体および Cystatin 群の効果を明らかにすることを目的としている。

実験方法と結果

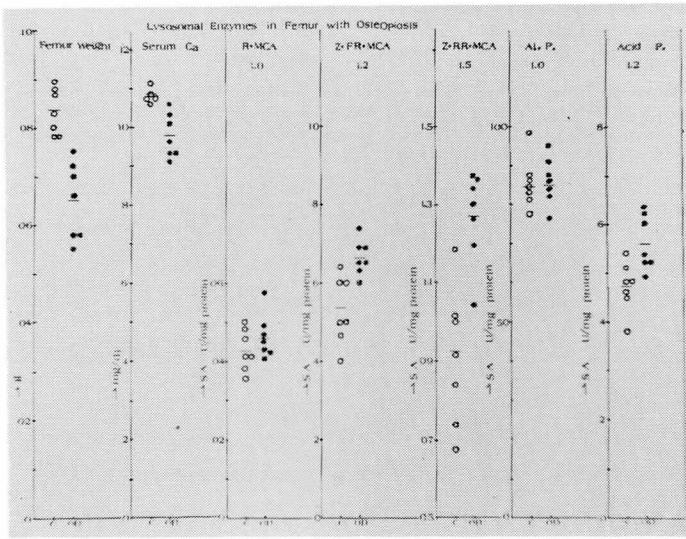
(1) 無 Ca 食餌による実験的骨粗鬆症の Cathepsin 群の動態

無 Ca 食で飼育したラットを 4 週と 6 週に殺し、大腿骨を取り、液体窒素共存下に磨砕し、バッファーで抽出する。血清 Ca は軽度低下を示すが、一定以上の低下はおこらない。骨からの脱 Ca により補給されるため、大腿骨重量は図 1 のごとく低下する。磨砕に対しても物理的に著明に脆くなっている。Cathepsin H 活性を R-MCA, Cathepsin B+L 活性を Z-F-R-MCA で、Cathepsin B は Z-R-R-MCA で測定した。H にはまったく両群に差はない。B は著明に上昇しており、B+L 活性には軽度の上昇があるが、これは B の上昇による値である。夫々の抗体で測定すると明らかに無 Ca 食群で Cathepsin B の量のみが増加しており、L と H の量は全く変化していない。従来から一番着目されてきたコラゲナーゼ (type IV) は図 2 のごとく無 Ca 食による脱灰には関与していないことが明らかとなった。

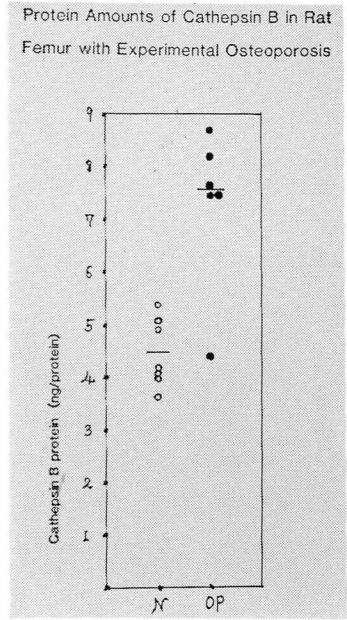
(2) E-64 投与による骨 Cathepsin 群の抑制

同様に無 Ca 食で 6 週間後に E-64 を腹腔注射して 6 時間後に大腿骨の Cathepsin 群を測定したのが図 2 である。普通食群、無 Ca 食群を問わず、腹腔注射された E-64 は骨のカテプシン群を非常によく阻害することがわかる。これまでの集積された実験により、腹腔注射された E-64 a は 6 時間後にはほとんど無い。また E-64 a による阻害は B と L に比べて H に対して感度が悪いので、細胞内に取込まれた E-64 の

*徳島大学酵素科学研究センター
**大正製薬総合研究所



(a) 骨重量と酵素活性



(b) 抗体による Cathepsin B のタンパク量測定

図1 無Ca食ラット, 大腿骨の lysosome 酵素の変動

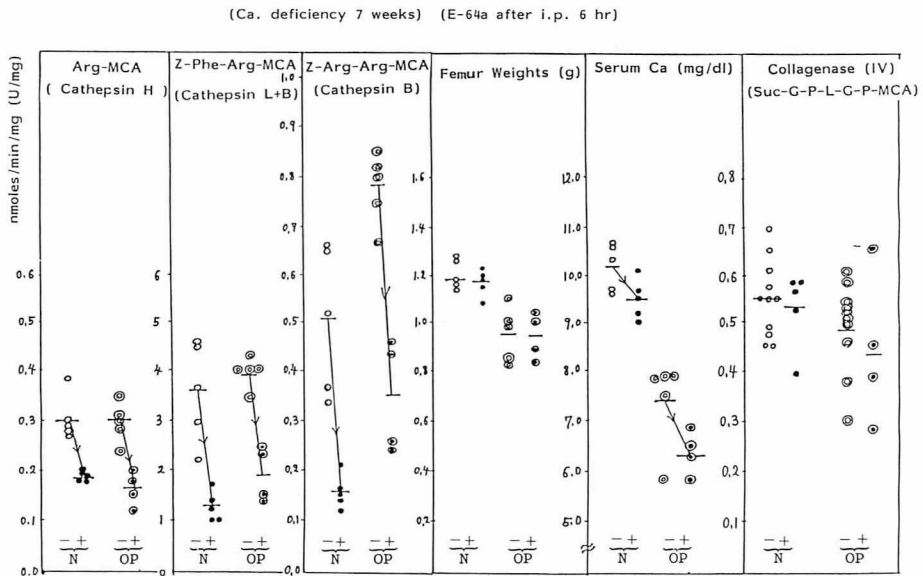
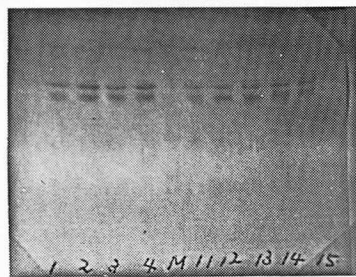


図2 Movements of lysosomal cystein proteinases in femur with osteoposis

濃度ではHは阻害されていない。一般には *in vivo* でリソゾーム内にある場合、BとLは完全阻害されてもHは全く阻害されないのが普通で

ある。しかし、この実験では、B、L、Hともに阻害されているところから、大部分が Osteoclast から分泌されたものであろうと推定され

る。図3のごとくウェスタンブロットの結果は、カテプシン群は活性型（成熟型）として分泌されて骨のマトリックス蛋白骨格を分解して脱灰をおこすのであると推定できる。図4にその模式図が示してある（マクロファージでは大部分がプロ型で分泌される）。



✓ Pro, Ca, B
← Mature Ca, B
^ Initial product

Osteopalis Control

図3 Western blotting of Cathepsin B in femur extracts

Mechanism of Bone Resorption by Osteoclast

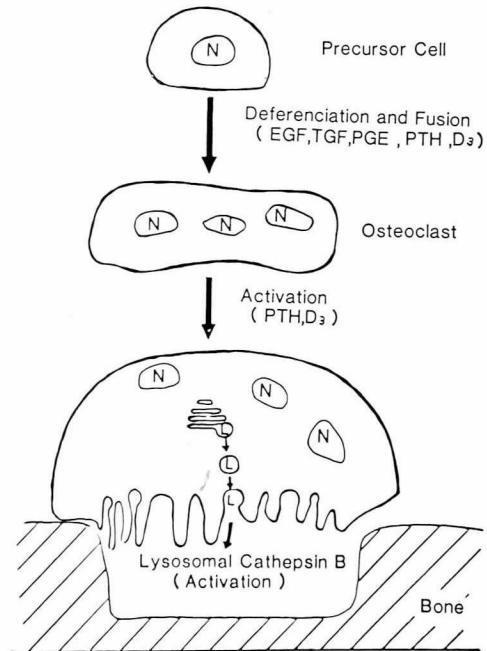


図4

表1 Inhibition specificieies of E-64 derivtives for Cathepsin B, L and H (No.1)

	(ID ₅₀ nM)					B :	L :	H	
	B	L	H	CANP					
No.16	50	138,000	1,940,000	500,000	1 :	3,000 :	40,000	} B specific	
No.30	3	35,000	320,000	500,000	1 :	10,000 :	100,000		
No.42	54	1,800,000	1,000,000	200,000	1 :	30,000 :	20,000		
No.29	23	46	1,600	43,000	1 :	2 :	70	Evenly effective	
E-64c	3.4	0.087	1,640	255	40 :	1 :	20,000		
No.50	310	4.8	250,000	330	65 :	1 :	50,000		
No.14	49	2	240,000	2,000	30 :	1 :	100,000		
No.17	880	100	1,200,000	40,000	10 :	1 :	10,000	} L, B-specific	
No.23	1,190	110	1,280,000	14,000	10 :	1 :	10,000		
No.7	170	18	400,000	5,000	10 :	1 :	20,000		
No.8	150	16	400,000	3,000	10 :	1 :	30,000		

(3) Ca 欠乏食ラットでの E-64 による血中 Ca 濃度の低下

食物から Ca の供給がない動物においては E-64 a の投与により 6 時間をピークにした著明な血中 Ca 濃度の低下がおこる。骨からの脱灰による血中への供給が阻止されるためと考えることができる。また Malignant hyper calcemia

の高 Ca 血症が E-64 で低下させうるとのデータもある。

(4) Cathepsin B 特異的 E-64 誘導体の開発

E-64 とカテプシンの -SH との結合部であるエポキシコハク酸のカルボキシル基に各種のトリペプチドを結合したものを合成したところ、表1における No.16, No.30, No.42 の阻害は完

表2 Inhibition specificities of E-64 derivatives for Cathepsin B, L and H (No.2)

	(ID ₅₀ nM)		
	Cathepsin B	Cathepsin L	Cathepsin H
E-64 c	6.8 (3.4)	0.5 (0.1)	500 (1640)
No.28	110 (160)	335 (810)	3,800 (6250)
No.30	4.9 (3)	41,000 (35,000)	430,000 (320,000)
No.62	30	150,000	1,250,000
No.65	18	150,000	900,000
No.71	2,080	180,000	>1,000,000
No.74	4.5	200,000	400,000

全にB特異的であった。特に No.30 はBに対する感度が良く、E-64 cと同じレベルであるので使用し易いはずである。E-64 cはBとLと同時阻害に使用できるが、この場合Hに対する感度はかなり悪い。しかしこのシリーズはエステル誘導体であり、*in vivo* では水解して特異的を失う。この欠点をカバーすべく No.30 の構造を基

にした誘導体のうち水解されない、しかもBへの特異性の強い No.74 をトップとする No.62, No.65 等の合成に成功している。これらB特異的阻害剤は上記骨粗鬆症の治療剤として期待できる。更に、各種 Cystatin 群のこの目的に対する治療薬としての開発にも可能性がある(表2)。

哺乳類 C-タンパク質のアイソフォーム特異的モノクローン抗体の作成およびそれを用いた筋病変に伴う C-タンパク質アイソフォーム変換の解析

丸 山 工 作 *

研究協力者 大日方 昂* 小島 崇*

C-タンパク質は鶏骨格筋の発達過程や萎縮過程で著しい変化を示すことが特異的なモノクローン抗体を使用して明らかにされている^{1),2)}。特に鶏筋ジストロフィー症では、速筋である胸筋の中に遅筋型の C-タンパク質アイソフォームが出現する³⁾。最近二次元電気泳動法による C-タンパク質の詳細な解析が可能とされ⁴⁾、ジストロフィー筋ではある種の遅筋型アイソフォームが特徴的に現われることが解明された⁵⁾。

鶏でみる限り C-タンパク質は筋の病変過程を探る良い指標と思われる。哺乳類の筋ジストロフィー症でも C-タンパク質の変化は顕著に起こるであろうか。もしそうであれば、哺乳類筋ジストロフィー症も C-タンパク質を一つの指標として解析していけることになる。このことを明らかにするために、私達は有用なモノクローン抗体を作成すること、C-タンパク質の変化をとらえるための二次元電気泳動システムの確立を進めてきた。本年度、哺乳類遅筋 C-タンパク質に対する特異抗体の作成に成功した。そして、筋ジストロフィー症マウスをモデルとして哺乳類筋ジストロフィー症における C-タンパク質の変化を検討した。

実験の方法

1. 抗体の作成

ウサギのヒラメ筋より Offer⁶⁾の方法に従い DEAE-Sephadex カラムクロマト法で C-タン

パク質の粗画分を得、これをマウスに免疫してモノクローン抗体を作成、抗遅筋 C-タンパク質抗体 RX-75 をクローニングした。確立した他のモノクローン抗体、速筋/心筋 C-タンパク質に対するもの (FC-18) (前年度報告) とミオシン H-鎖に対するもの (MF-20) ⁷⁾ も用いた。

2. その他の方法

等電点電気泳動は平林の方法⁸⁾に従い、支持体にはアガロースを用い、pH 領域の異なる酸性、中性、塩基性の 3 層のゲルを重ねて行った。この方法が C-タンパク質の解析に有効であることは既に報告した⁵⁾。その後、二次元目の電気泳動は SDS-7% アクリルアミドゲル上に展開し、CBB 染色するか、ニトロセルロース膜に転写後、抗体を反応させてタンパク質のスポットを同定した。SDS-PAGE は Laemmli⁹⁾に従い、イムノプロット法は Towbin ら¹⁰⁾の方法に従って行った。電気泳動用試料のほとんどは、新鮮な筋を 8 M グアニジン HC1 抽出したものを、5 M 尿素-1 M チオ尿素液に透析して作成して用いた。精製遅筋 C-タンパク質は酪農学園大学山本克博博士よりご供与いただいた。

結 果

(1) 哺乳類の遅筋 C-タンパク質特異的モノクローン抗体 RX-75 の作成

遅筋 C-タンパク質を免疫原として得られたモノクローン抗体の一つ RX-75 はイムノプロット法において、精製したウサギヒラメ筋 (遅筋) C-タンパク質に反応し (図 1 a), ヒラメ筋

*千葉大学理学部生物学科

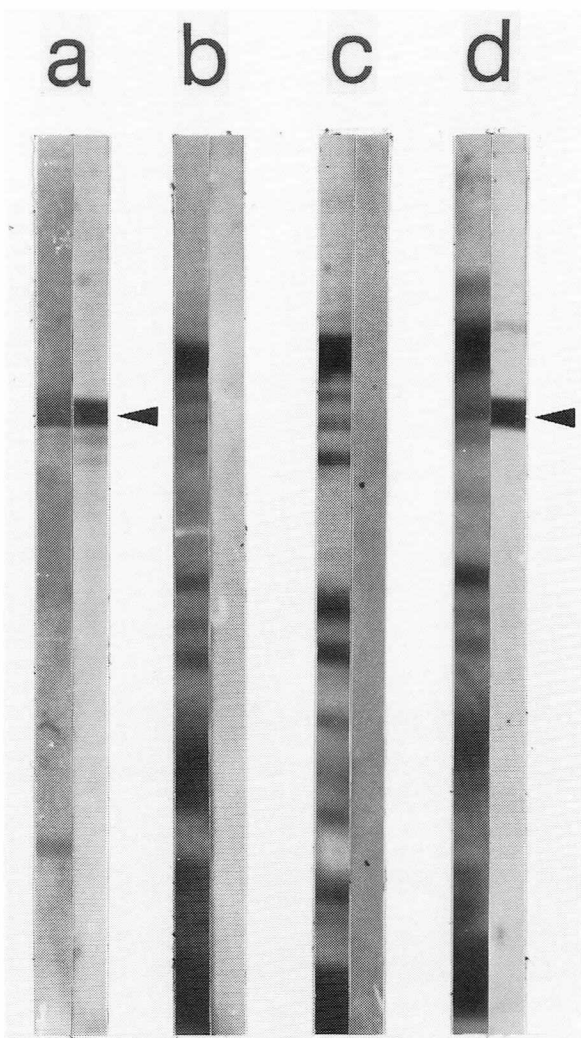


図1 哺乳類遅筋 C-タンパク質を認識するモノクローン抗体 RX-75 の特異性
ウサギのヒラメ筋(遅筋)から精製した C-タンパク質(a), 心筋(b), 大腿直筋(速筋)(c), ヒラメ筋(d)の全タンパク質抽出液を SDS-PAGE (7%ゲル)に展開し, イムノブロット法により抗体(RX-75)の反応性を調べた。アミドブラック染色による電気泳動パターン(左)と抗体処理の結果を示す。

の全タンパク質抽出物に対しても C-タンパク質と同じ分子量(約 14 万)に相当する単一のバンドにのみ反応することがわかった(図 1 d)。しかし, ウサギの心筋や速筋(大腿直筋)の全タンパク質抽出物には反応しなかった(図 1 b

と c)。またこの抗体はウサギのヒラメ筋(遅筋)筋原線維の M 線付近を除く A 帯の中央部を染めた(図 2 a と b)。この部位に C-タンパク質が存在することが既によく知られている。しかし, 心筋と速筋の筋原線維を染めることはなかった(図 2 c と d)これらのことから考えて, この抗体は遅筋 C-タンパク質に特異的と言える。一方, ラット, マウスより SDS-処理により抽出したタンパク質をイムノブロット法により検定したところ, 遅筋, 速筋, 心筋いずれの場合にもこの抗体は反応性を示さなかった。しかし, 蛍光抗体法で調べるとラット, マウスの遅筋由来の筋原線維の C-タンパク質の局存部位を選択的に染めた(データ省略)。従って, ラット, マウスの遅筋 C-タンパク質とも交差反応できるものの, 変性したこれらタンパク質との反応性は低下するものと考えられる。

(2) 哺乳類 C-タンパク質の二次元電気泳動パターン

ウサギの遅筋, 速筋, 心筋からの抽出タンパク質を二次元電気泳動ゲルに展開, RX-75 と FC-18, MF-20 との反応性を根拠にウサギの遅筋型(sc), 速筋型(fc), 心筋型(cc) C-タンパク質アイソフォームの電気泳動ゲル上でのスポットを確定した。図 3-a, c に 3 種の筋タンパク質の混合物に上記の 3 抗体を反応させ同定さ

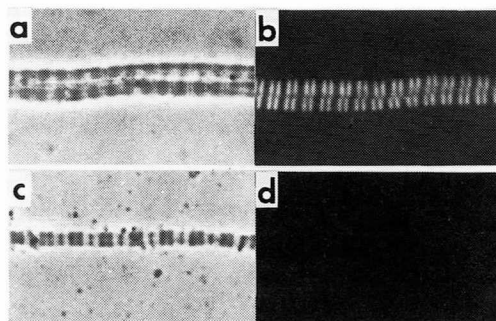


図2 RX-75 とウサギのヒラメ筋(a, b)と大腿直筋(c, d)の筋原線維との反応 RX-75 処理後, FITC-抗マウス IgG 処理による間接蛍光抗体法で調べた。位相差像(左)と蛍光像(右)を示す。

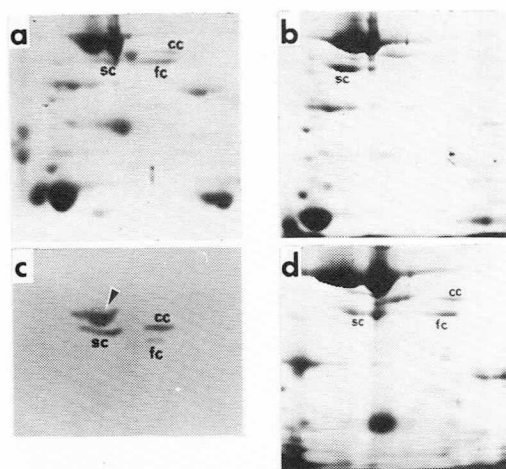


図3 ウサギ(左)とマウス(右)のC-タンパク質の二次元電気泳動パターン
ウサギの心筋, 長指伸筋(速筋), ヒラメ筋の抽出タンパク質の混合物を二次元に展開し, CBBによる染色(a)またはRX-75, FC-18(抗心筋/速筋C-タンパク質抗体)とMF-20(抗ミオシンH-鎖抗体)の3重処理(c)により, 心筋(cc), 速筋(fc), 遅筋(sc)C-タンパク質およびミオシンH-鎖(矢尻)を同定した. マウスのヒラメ筋(b), および心筋, 長指伸筋, ヒラメ筋の抽出タンパク質の混合物内のC-タンパク質のスポットをウサギとの比較により推定した.

れたC-タンパク質アイソフォームとミオシンH-鎖の位置関係を示す. マウスの場合, RX-75が反応しなかったので遅筋C-タンパク質スポットを免疫学的に同定できなかったが, 電気泳動パターンをウサギの場合と比較することにより, scのスポットを推定した. fcとccはFC-18の結合によって同定された. マウスの3種のC-タンパク質アイソフォームの位置関係は図3dのようになる.

(3) 筋発達とC-タンパク質アイソフォームの変化

筋病変時のC-タンパク質の変化を理解する基礎として, 正常マウスの筋発達過程でC-タンパク質アイソフォームがどう変化するかを大腿直筋(ほぼ速筋)を材料に, 二次元電気泳動法

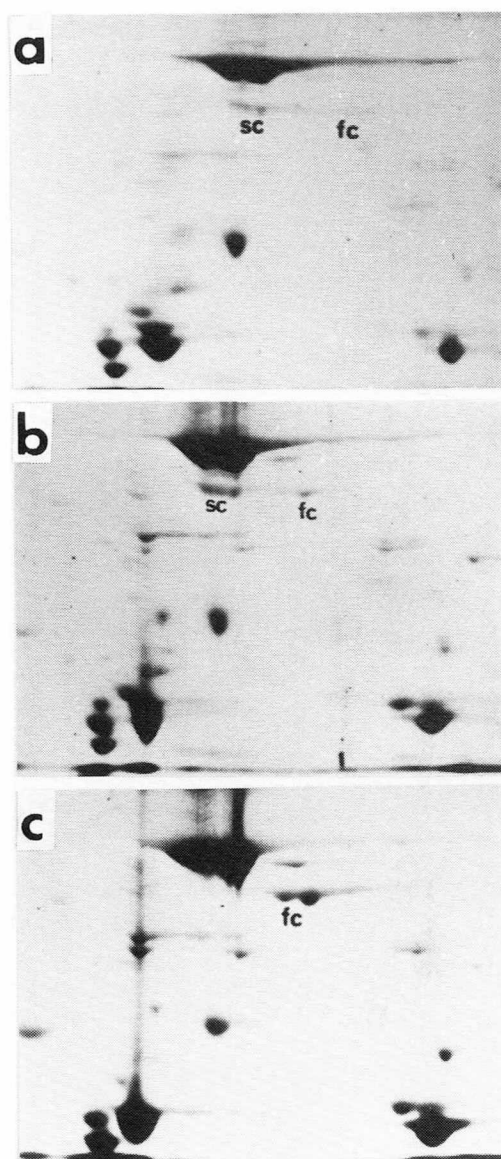


図4 マウスの大腿直筋の成長に伴うC-タンパク質アイソフォームの変化
a. 生後3日齢; b. 生後7日齢;
c. 生後30日齢. 略号は図3に同じ.

により調べた(図4). 生後3日齢では速筋型C-タンパク質はわずかに見られる程度で, 主として遅筋型C-タンパク質が存在していた(図4a). 7日齢では速筋型が明瞭に検出されるようになり, 遅筋型アイソフォームとの共存が認められた(図4b). その後成長につれ遅筋型C-タンパク質は消失していき, 14日齢には痕跡程度

にまで減少し、30日齢には完全に消失した(図4c)。一方、その間、速筋型C-タンパク質には増加が見られた。生後30日齢では速筋型と思われる2つのスポットがあり、そのうち、塩基性側のスポットが量的に多く出現しており、その後両スポットの割合は変化するように見える。このように、哺乳類の速筋発生過程においてC-タンパク質のアイソフォームは、遅筋型から速筋型へ移行することが明らかになった。

(4) 筋ジストロフィー症 dy マウスにおける C-タンパク質アイソフォームの変化

マウス筋ジストロフィー症モデルの一つ dy マウスでは十分に発症している生後3カ月齢になると、速筋に遅筋C-タンパク質(sc)が出現するのが見られた。大腿直筋と長指伸筋(EDL)の場合を図5に示す。正常大腿直筋では、速筋C-タンパク質(fc)のみでscはほとんどみられない(図5a)のに対しdyではscが明瞭に検出された(図5b)。EDL筋の場合、正常筋でもscを含む(図5c)がdyマウスではscの量が増し、fcよりもむしろ主成分となる(図5d)。遅筋であるヒラメ筋でも筋の萎縮は見られたが、C-タンパク質の泳動パターンにはほとんど変化は見られなかった。即ち、正常、dyマウスともscが検出されるのみであった(図5e, f)。

考 察

前年度と本年度の研究で、哺乳類(特にウサギ)のC-タンパク質アイソフォームを識別するモノクローン抗体が用意された。これにより、筋タンパク質の二次元電気泳動マップの上でC-タンパク質アイソフォームの位置が決定され、筋の発達や病変時のC-タンパク質の変化を探っていく基盤ができた。最近の二次元電気泳動法によるニワトリC-タンパク質の研究結果によれば、筋の発達、病変時にC-タンパク質は複雑に、しかし顕著に変化することがわかったので、哺乳類についても、今後更に詳細な電気泳動法による解析がなされるべきと思われる。

これらの抗体は筋のウサギ、ラット、マウス、

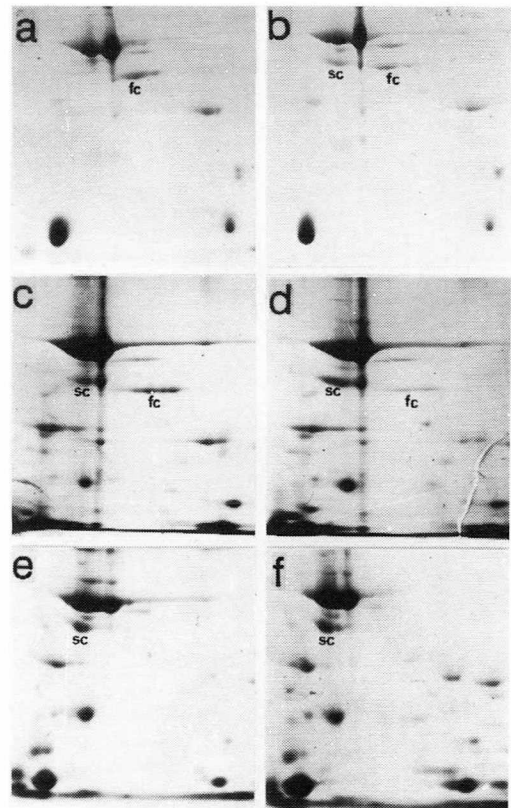


図5 正常(a, c, e)およびdyマウス(b, d, f)の速筋および遅筋におけるC-タンパク質の比較
筋の全抽出タンパク質の二次元電気泳動パターンを示す。aとb、大腿直筋；cとd、EDL筋；eとf、ヒラメ筋。略号は図3に同じ。

ヒトの筋組織凍結切片とも反応するので、免疫組織化学的研究にも適用できる。ただしマウスの場合、二次抗体の問題から直接蛍光抗体法がなされるべきであろう。モノクローンである故、抗体を多量に得ることは容易であり問題はない。ヒト場合、予備的な検定では、RX-75とFC-18のC-タンパク質アイソフォームへの特異的結合が鮮明ではなく、もう少し検討することが求められている。

本研究で明らかになった哺乳類の筋成長過程と筋病変に伴うC-タンパク質の変化の内容は、ニワトリでみられた傾向によく似ている。即ち、幼若期の速筋における遅筋型C-タンパク質の

発現であり、筋変性の著しい dy マウスの速筋における遅筋 C-タンパク質の出現である。しかし、遅筋での C-タンパク質の変化は見られなかった。このことは、ニワトリの発生過程で遅筋では C-タンパク質の変化しない¹⁾、ヒト筋ジストロフィー症での変化は速筋で主に現れるというなど以前の報告¹¹⁾に一致する。

文 献

- 1) Obinata, T., Reinach, F.C., Bader, D., Masaki, T., Kitani, S. and Fischman, D. A.: *Dev. Biol.*, 101: 116—124, 1984.
- 2) Obinata, T.: *Zool. Sci.*, 2: 833—847, 1986.
- 3) Obinata, T. and Shinbo, K.: *Muscle and Nerve*, 10: 351—358, 1987.
- 4) Takano-Ohmuro, H., Goldfine, S.M., Kojima, T., Obinata, T., and Fischman, D.A.: *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 10: 369—378, 1989.
- 5) Kojima, T., Sano, K., Hirabayashi, T. and Obinata, T.: *J. Biochem.*, 107: 470—475, 1990.
- 6) Starr, R. and Offer, G.: *Methods Enzymol.*, 85: 130—138.
- 7) Bader, D., Masaki, T. and Fischman, D. A.: *J. Cell Biol.*, 95: 763—770, 1982.
- 8) Hirabayashi, T.: *Anal. Biochem.*, 117: 443—451, 1981.
- 9) Laemmli, U.: *Nature*, 227: 680—685, 1970.
- 10) Towin, H., Stahlin, T. and Gordon, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 76: 4350—4354, 1979.
- 11) Webster, C., Silberstein, L., Hays, A.P. & Blau, H.M.: *Cell*, 52, 503—513, 1988.

jimpy マウス脳ミエリン局在の Ca 依存性プロテアーゼ活性の変動

辻 繁 勝 *

Jimpy マウスは中枢神経系の成熟オリゴデンドログリア細胞の数が極端に少く、その結果ミエリン膜形成不全を発症し、頻発する強直性痙攣発作のため1ヶ月齢迄に死亡するが、その発現症状の類似性からヒトの Pelizaeus Merzbacher 病のモデル動物として知られている¹⁾。病因に関しては X-染色体上の Proteolipid protein (PLP) 遺伝子のエクソンの1つに異常が存することが認められているが²⁾、発症期にミクログリア或いはマクロファージの数が著しく増加していることも報告されている³⁾。発症に至る迄の過程に就いては未解明である。一方、ミエリン膜構成蛋白の分解に関しては種々の膜内在性プロテアーゼが関与していることがヒト⁴⁾或いはラット⁵⁾、ウシ⁶⁾などの中枢神経系を用いた研究によって報告されている。そこで、我々は jimpy マウスの脳中で、ミエリン形成期に起こると考えられる種々のプロテアーゼ活性の変動を調べ、ミエリン形成不全発症におけるプロテアーゼの関与に就いて検討を行なった。

材料と方法

実験に使用した動物は当教室で維持している B6 CBA/J-jp 系マウスの2~3週齢の発病個体(jp/Y)及び正常対照個体(+/Y)である。プロテアーゼ活性の測定には種々の peptidyl-MCA 合成基質を用い、25°C、30分間、インキュベートし、反応終了後遊離した AMC を励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm で蛍光測定して行った。脳ホモジネートの分画には通常の 0.32 M 蔗糖液による分画法を用い、又ミエリン膜の

分離には Norton らの方法を用いた。CANP インヒビターの除去には DEAE セルローズによる方法を行なった。即ち、ミエリン膜標品の 3 ml と DEAE セルローズ(ワットマン DE 52)液を 3:7 の割合で混合し、4°C で 30 分間攪拌した後、セルローズ粒子を遠心分離し、これを緩衝液 A (トリス-HCl (pH 7.4): 25 mM, EDTA: 2 mM, EGTA: 10 mM, β -メルカプトエタノール: 50 mM, ベンザミジン-HCl: 5 mM) に 100 mM の NaCl を加えた液 10 ml で 2 回洗滌する。更に、セルローズ粒子を緩衝液 A に 250 mM の NaCl を加えた液 5 ml で 3 回洗滌する。この 250 mM NaCl 洗滌液を合せたもの(15 ml)をインヒビター除去 mM CANP 酵素標品とした。

結 果

まず脳ホモジネート中のプロテアーゼ活性を調べる為に種々のプロテアーゼに対応する peptidyl-MCA 基質を用いて pH 7.4 での活性を測定した。その結果、キモトリプシン用基質の Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA と、トリプシン用基質の Boc-Phe-Ser-Arg-MCA に対する水解活性が jimpy マウス脳において高い値を示すことが判った(表 1)。更に、マウス脳中には

表 1 Protease activities in brain of jimpy mouse

Substrate	Jimpy	Control	J/C
Z-Arg-Arg-MCA	0.64	0.72	0.89
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	1.43	1.11	1.29
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	1.18	0.82	1.43
Suc-Ala-Pro-Ala-MCA	0.22	0.25	0.88
Z-Phe-Arg-MCA	1.95	2.34	0.83
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	1.79	1.88	0.95

Unit: n moles AMC/30 min/mg protein

*和歌山県立医科大学第二生理学教室

Boc-Phe-Ser-Arg-MCA 水解活性は至適 pH 域が酸性 (pH 6.5) のものとアルカリ性 (pH 8.6) のものの 2 々が存在し、粗ミトコンドリア分画を Digitonin 処理することによって現われる酸性プロテアーゼ活性が jimpy に於て対照の約 2 倍程高くなっていることが判った (表 2)。一方、Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA を基質とする中性 (pH 7.4) プロテアーゼ活性も、粗ミトコンドリア分画中では jimpy マウス脳の方が対照マウス脳よりも有意に高い値を示した (表 3)。然し、細胞質分画中の活性には差異は認められなかった。この基質は Ca^{++} -依存性中性プロテアーゼ (CANP) によっても水解されること、ヒト、ラットなどでミエリン膜中に CANP 活性が存在し、ミエリン構成蛋白の turn over に重要な役割を果たしていることなどが知られていることから、この粗ミトコンドリア分画中の中性プロテアーゼ活性がミエリン分画中に存在し、 Ca^{++} に対して感受性か否かを検討する実験を行なった。その結果、マウス脳のミエリン分画中には Ca^{++} -非依存性の活性と共に反応液中に Ca^{++} を添加することによって上昇する活性が存在し、しかも jimpy マウス脳において対照と比較して有意に活性上昇してい

表 2 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA hydrolyzing activities in mitochondrial and cytosol fraction of jimpy brain

Fraction	Jimpy	Control	J/C
Mitochondrial* (pH 6.5)	11.2	5.97	1.88
Cytosol (pH 8.6)	2.94	3.09	0.95

Unit: n moles AMC/30 min/mg protein
*: Digitonin treated

表 3 Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA hydrolyzing activities (pH 7.4) in mitochondrial and cytosol fraction of jimpy brain

Fraction	Jimpy	Control	J/C
Mitochondrial	9.52 ± 0.35(5)*	5.87 ± 0.54(5)	1.62
Cytosol	0.57 ± 0.12(5)	0.69 ± 0.26(5)	0.83

Unit: n moles AMC/10 min/mg protein
Parenthesis show numbers of mice used.
*: P < 0.01

ることが認められた (表 4)。又、添加する Ca^{++} の濃度は 0.5 mM の時、最も有効であることが判った。そこで Ca^{++} 存在下で賦活されるプロテアーゼ活性について、種々のプロテアーゼインヒビターによる阻害実験を行い、その性質を調べてみた。結果は表 5 の如く EDTA, E-64, Leupeptin, Antipain などによって強く活性阻害を受けることが判り、この活性はキモトリプシン様中性プロテアーゼで、CANP に極めて類似した性質を有することが推定された。

次に、この活性がはたして CANP 酵素に依るものか否かを知る為、脳ミエリン分画から予め、CANP インヒビターを除去したものを標品として、CANP 特異的な基質として合成された Suc-Leu-Tyr-MCA⁷⁾ と、キモトリプシン用基質で、CANP によっても水解されることが認められている Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA の 2 つの基質に対する水解活性を比較する実験を行なった。活性は 0.5 mM の Ca^{++} 存在下で

表 4 Ca^{++} -activated and -independent neutral protease activities in myelin fraction from jimpy brain

	Jimpy	Control	J/C
Ca^{++} -added	0.396 ± 0.076(5)*	0.118 ± 0.026(5)	3.36
Ca^{++} -free	0.521 ± 0.162(5)**	0.190 ± 0.046(5)	2.74

Unit: n moles AMC/10 min/mg protein
Substrate: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA
*: P < 0.001, **: P < 0.02

表 5 Effect of protease inhibitors on Ca^{++} -activated neutral protease activity in myelin fraction of mouse brain

Inhibitor	Concentration	% inhibition
DFP	1 nM	34.6
PMSF	10 nM	46.3
EDTA	1 nM	98.8
PCMB	1 nM	0
E-64	10 μM	100.0
Pepstatin A	10 μM	29.2
Leupeptin	10 μM	99.2
Antipain	10 μM	97.6
Chymostatin	10 μM	52.6
Elastatinal	10 μM	77.2
Phosphoramidon	10 μM	0
Bestatin	10 μM	2.6

Substrate: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA
Enzyme source was preincubated with one of the inhibitors at 25°C for 30 min, and the residual activity was determined.

の値から EGTA 添加によって Ca^{++} -free の状態で測定した Ca-非依存性の中性プロテアーゼ活性を差引いた値を mMCANP 活性として表示した。結果は表 6 の如く、jimpy マウス並びに対照マウス共に Suc-Leu-Tyr-MCA に対する水解活性の方が Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA に対する値よりも数倍高く、又、jimpy と対照との活性差も、前者では 5 倍近い値を示していた。以上の結果からこの Ca-依存性のキモトリプシン様プロテアーゼ活性は mMCANP 酵素による活性であることが強く示唆され、又、jimpy マウスに於ては、発病期に脳中のミエリン膜分画におけるこの酵素活性が著しく増加していることが判明した。

考 察

中枢神経系のミエリン膜分画中に CANP 活性が存在し、ミエリン膜構成蛋白の PLP, MBP などの turn over に重要な役割をはたしていることはヒト、ラット、或いはウシなどに於て報告されている。又、ヒトの脱髄疾患などでは、疾病に伴ってこの酵素活性に異常が認められることが知られている⁸⁾。我々はマウスの中枢神経系のミエリン膜分画中で同様な酵素活性が存在することを認めた。この酵素活性は CANP

表 6 Ca^{++} -activated neutral protease activities (pH 7.4) in myelin fraction of jimpy brain after removal of inhibitor

Substrate	Jimpy	Control	J/C
A	5.01 ± 2.43(8)*	1.02 ± 0.34(6)	4.9
B	1.33 ± 0.66(5)*	0.53 ± 0.33(5)	2.5

Substrate: A, Suc-Leu-Tyr-MCA
 B, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA
 Unit: μM AMC/30 min/mg protein
 Parenthesis show numbers of mice used.
 *: $P < 0.01$

特異的基質である Suc-Leu-Tyr-MCA を水解すること、E-64, ロイペプチン、などのプロテアーゼ阻害物質によってほぼ完全な活性阻害を受けることなどの事実から、mCANP である可能性が強く示唆された。

今回の結果から、発病した jimpy マウス (2 ~ 3 週齢) 脳中のミエリン膜分画でこの酵素活性が著しく上昇していることが明らかになったが、この事はこの時期の jimpy マウス脳中ではオリゴデンドログリア細胞形質膜中で主要構成蛋白の或るものの分解が亢進している状態が存在することを示唆しており、未成熟段階でのオリゴデンドログリア細胞の破壊、或いは成熟ミエリン膜形成の抑制という現象を引き起こす原因の一つになっている可能性が考えられる。

文 献

- 1) Farkas-Bargeton et al: Acta. Neuropathol. (Berl.), 21: 272, 1972.
- 2) Ikenaka, K. et al: J. Mol. Biol., 199: 587, 1988.
- 3) Imamoto, K.: Arch. Histol. Jap., 48(4): 411, 1985.
- 4) Sato, S. and Miyatake, T.: Biomed. Res. 3: 461, 1982.
- 5) Banik, N.L. et al: J. Neurochem., 45(2): 581, 1985.
- 6) Chakrabarti, A.K. et al: Neurochem. Res., 14(3): 259, 1989.
- 7) Sasaki, T. et al: J. Biol. Chem., 259(20): 12489, 1984.
- 8) Hogan, E.L. and Banik, N.L.: In Handbook of Neurochemistry ed by A. Lajtha, Plenum Press, N.Y., 1985, Vol. 10, p.p. 285-337.

mdx マウスに対する bestatin の効果

木 下 眞 男*

研究協力者 岸 雅彦* 栗原照幸*
根本博之* 日高隆信*

我々は前回, mdx マウスの筋細胞膜の電気生理学的異常に対する bestatin の作用を検討し, bestatin には mdx マウスに対する筋細胞膜安定化作用があることを指摘した¹⁾. そして, bestatin の効果は数十分程度の短時間でその効果を発揮することから, bestatin は筋細胞膜に直接作用しているものと考えられる. 又, 近年 mdx マウスでは Duchenne 型筋ジストロフィー症と同様に dystrophin の欠損があることが報告されている²⁾. しかし, mdx マウスの dystrophin 欠損は, 我々が電気生理学的に認めることのできる筋細胞膜異常^{3),4)} とどのように関連しているのかは明かではなく, bestatin が筋細胞膜にどのように作用するかも明かではない.

今回, 我々は bestatin の効果が mdx マウスに限られたものなのか, 非特異的なものかを知る目的で, 他の myotonia のモデルに対する bestatin の効果を検討した. 又, bestatin の効果が発現する濃度を調べる目的で, 種々の濃度で bestatin を mdx マウスに作用させてその効果を検討したので報告する.

方 法

まず, C₅₇BL/10 Sc(B10) マウス及び Wistar 系ラットを用いて横隔膜標本を作成し, 40 mg/L の bestatin を作用させ, 投与前後で静止膜電位 (RMP) を計測した.

次に, B10 マウスを用いて, 2 種類の myotonia のモデル作成した. Tyrode 溶液の組

成の内, NaCl の代わりに 59.6 mM の Na₂SO₄, KCl の代わりに 5 mM の KH₂PO₄ を用いて作成した低 Cl 溶液^{5),6)} に標本を浸し, myotonia のモデルの一つとした. 又, 通常の Tyrode 溶液に Cl channel blocker である anthracene-9- carboxylic acid (A-9-C) を 1×10^{-4} M の濃度で加える事により myotonia モデルを作成した^{7),8)}. 以上の 2 つの myotonia のモデルに対して, bestatin を 40 mg/L の濃度で作用させ, electrical myotonia の頻度, RMP にどのような変化を来すかを観察した.

約 4 週齢の mdx マウスの横隔膜標本を作成し, Tyrode 溶液中の bestatin の濃度を 20 mg/L, 40 mg/L とした場合の electrical myotonia の頻度と RMP の変化を検討した. RMP の検討は前回同様, 同一検体から 50-100 本の RMP を測定し, ヒストグラムを用いて検討した. Bestatin の濃度変化に対しては, 同実験を数回試行して集計したのを用いた. Bestatin の効果は Wilcoxon 検定を用いて検討した.

結 果

Rat 及び B10 マウスに bestatin を作用させても, RMP のヒストグラムには変化を来さなかった. 又, electrical myotonia は bestatin を作用させる前後において, ほとんど出現しなかった (図 1, 2). B10 マウスの横隔膜標本を低 Cl 溶液に浸すと, RMP は著明に低下し, 65~70 % の線維で electrical myotonia が出現するようになる. このモデルに bestatin を作用させても, electrical myotonia の頻度を減少させることはない (図 3). B10 マウスに A-9-C を作用

*東邦大学医学部大橋病院第四内科

RMPs of rat hemidiaphragm before and after adding Bestatin (40mg/L) to the muscle chamber.

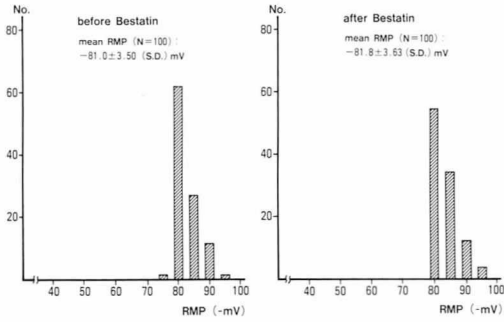


図1 正常 Rat に bestatin を作用させても、RMP には変化を来さない。

RMPs of a 57-day-old B10 mouse before and after adding Bestatin (40mg/L) to the muscle chamber.

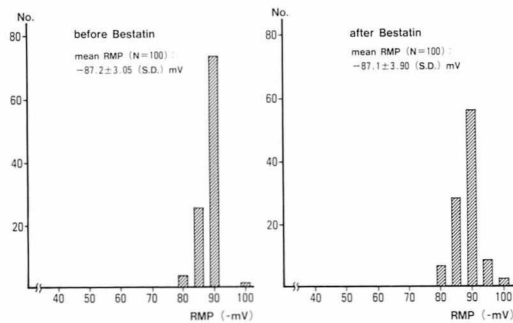


図2 B10 マウスに bestatin を作用させても、RMP には変化を来さない。

させると、やはりほとんど全ての線維で electrical myotonia が出現するようになる。しかし、ガラス管微小電極が細胞内に入った時には著明な electrical myotonia が出現して脱分極するため、安定した RMP の測定は困難であった。このようなモデルに bestatin を作用させても、やはり全ての線維で微小電極刺入時に electrical myotonia が出現し、(図4) bestatin によりその頻度が減少する傾向は認められなかった。

Bestatin を 20 mg/L の濃度で mdx マウスに作用させた場合、RMP のヒストグラム上には変化は見られず、Wilcoxon 検定においても有意差は認められなかった。しかし、mdx マウスに見られる electrical myotonia は bestatin

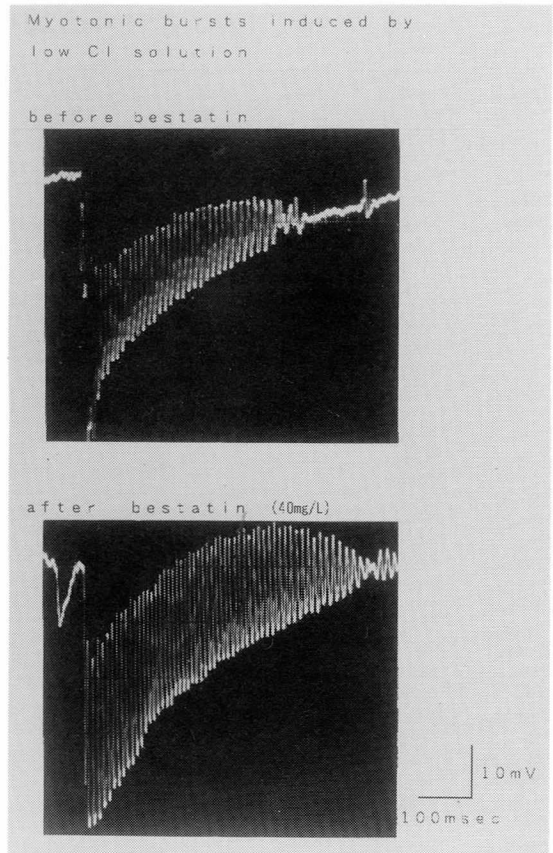


図3 低 Cl 溶液により誘発された B10 マウスの electrical myotonia. bestatin により抑制されない。

使用前微小電極を刺入した筋線維の 44%に見られたものが、bestatin 使用後は 25%に減少した。Bestatin 40 mg/L の濃度では RMP のヒストグラム上、RMP の低い線維が減少し、RMP の正常な線維が増加する傾向を認めた。これは Wilcoxon 検定においても 0.5%の危険率で有意であった。そして、electrical myotonia の頻度は 20 mg/L の時と同じく 26%に減少した(図5)。Bestatin は 20 mg/L の濃度で mdx マウスの electrical myotonia を抑制するが、mdx マウスの低下した RMP の改善は 40 mg/L の濃度に達しないと認められなかった。

考 察

Bestatin は正常な筋細胞膜には電気生理学

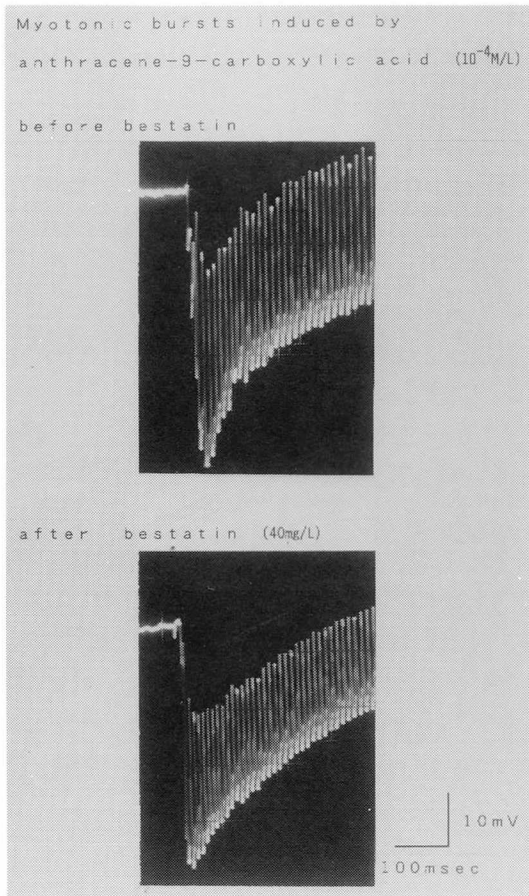


図4 1×10^{-4} M/L の anthracene-9-carboxylic acid(A-9-C)により誘発された B10 マウスの electrical myotonia. Bestatin により抑制されない。

的には影響を及ぼさないし、低 Cl 溶液の為に低下した RMP を改善することはなかった。そして mdx マウスの RMP 低下に対して bestatin が効果を発揮するのは 20 mg/L では不十分で 40 mg/L の濃度からであった。低 Cl と A-9-C によって誘発される electrical myotonia は bestatin では抑制されないという結果を得た。mdx マウスの electrical myotonia に対する阻止作用は RMP がまだ改善する作用を及ぼさない 20 mg/L の濃度から出現する事が今回の実験で明らかになった。低 Cl 溶液による electrical myotonia や A-9-C によって Cl channel を block することによって生じる electrical myotonia に対しては bestatin の効

Histogram of resting membrane potentials

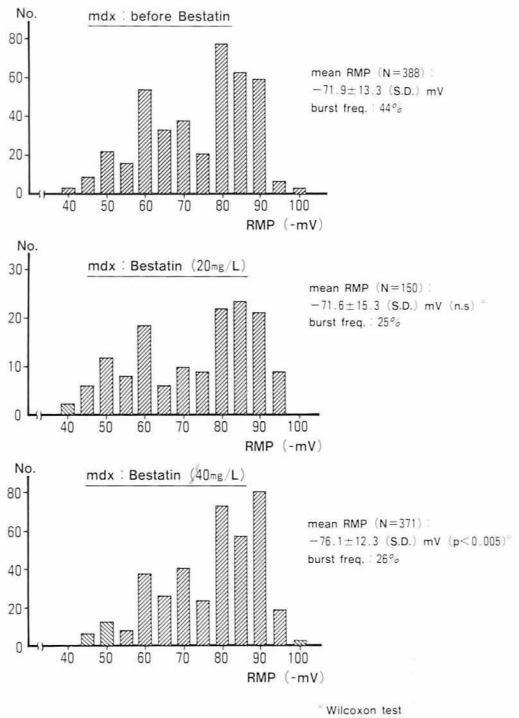


図5 Mdx マウスに bestatin を 20 mg/L, 40 mg/L の濃度で作用させたときの RMP のヒストグラム。20 mg/L の濃度では electrical myotonia の頻度は減少するが、有意な RMP の改善は認められない。40 mg/L の濃度では electrical myotonia の頻度は低下し、RMP も有意に改善する。

果はなく mdx マウスの electrical myotonia は bestatin によって抑制されることを考え合わせると mdx マウスの electrical myotonia は Cl conductance の低下以外の機序で起こっている可能性を示唆する。Mdx マウスの低下した RMP を改善する機序については今後の検討が必要である。

Mdx マウスの筋線維を電気生理学的に検討すると、RMP の正常な筋線維と低い筋線維が混在し、又、electrical myotonia も全ての筋線維で見られる訳ではない。Mdx マウスでは、全ての筋線維で dystrophin が欠損している事から、これらの電気生理学的異常を来すのは

dystrophin 欠損とそれ以外の factor も関与していることを示唆する。そして、微小電極が挿入できる筋線維はある程度の大きさのある筋線維で、壊死に陥った小さい線維ではなく筋細胞壊死に至る途中の過程にある筋線維をここでは計測記録していると考えられる。従って bes-tatin は、mdx マウスの筋細胞が壊死に陥る以前の過程にもその効果を発揮するものと思われる。

文 献

- 1) 木下眞男, 岸雅彦ら: ベスタチンの筋細胞膜安定化作用に関する実験的研究. 厚生省「新薬開発研究費」低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究 (江橋班) 昭和63年度研究報告書, 1989, pp 19-21.
- 2) Arahata, K. Ishiura, S., Ishiguro, T., et al: Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature*, 333: 861-863, 1988.
- 3) 栗原照幸, 内田東彦ら: mdx マウスに見られる myotonic burst の筋細胞内記録. 厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究 (杉田班). 昭和62年度研究報告書, 1988, pp 227-231.
- 4) 岸 雅彦, 栗原照幸ら: Mdx マウスにみられるミオトニーの筋細胞内記録と Ca 拮抗剤のミオトニーに対する効果. *臨床神経*, 29: 563-567, 1989.
- 5) Iyer, V., Ranish, N.A., et al: The effect of denervation on subsequent in vitro induction of myotonia. *Neurology*, 27: 669-671, 1977.
- 6) 塩屋敬一, 田中政幸, 栗原照幸ら: 筋細胞外 Na, K, Cl 濃度とミオトニーの発生機序に関する研究. *臨床神経*, 26: 856-862, 1986.
- 7) Bryant, S.H., Morales-Aguilera, A. et al: Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibers and the action of monocarboxylic aromatic acids. *J. Physiol.*, 219: 367-383, 1971.
- 8) 栗原照幸: ミオトニーの発生機序に関する電気生理学的研究. *臨床神経*, 18: 332-338, 1978.

ベスタチン投与 mdx マウスにおける骨格筋組織所見

西 谷 裕 *

研究協力者 板 垣 泰 子* 齋 田 恭 子*

Mdx マウスは、Ducenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) と同じ膜蛋白である dystrophin の欠損を有し、DMD のモデル動物として注目されている¹⁾²⁾。今回我々は mdx マウスにベスタチンを投与し、筋組織学的にその影響につき検討したので報告する。

対象と方法

対象として 3 週齢と 7 週齢の mdx マウス各 4 匹を使用した (表 1)。いずれも生後 2 週目より腹腔内へベスタチンを 1 日 0.4 mg 連日投与した。したがって 3 週齢の mdx マウスでは 7 日間、7 週齢の mdx マウスでは 35 日間の投与を行った。コントロールとしては同年齢の無投与の mdx マウスを使用した。

エーテル麻酔下に両側上腕三頭筋を採取し、凍結切片にて HE 染色、Gomori-trichrome 染色、NADH 染色、ATP 染色を行い壊死、再生の検討および線維径の比較検討を行った。

結 果

3 週齢の無投与の mdx マウスでは、部分的に群をなして壊死線維の集団が認められた。壊死線維の集団は 10 数個から 100 個近くのもの

も存在した。しかしその殆どの部位において細胞反応が盛んであり、貪食細胞に加えて恐らく多くの筋芽細胞が存在するものと思われた。また多くの myotube が認められ、中心に核を有した再生線維も存在し、活発な再生現象が認められた。

ベスタチン投与を行った mdx マウスでは、これに比し同様に群をなした壊死線維の存在が認められたが、細胞反応に乏しく大部分では myoblast や myotube の存在を認めることが出来なかった。壊死線維以外の部位では筋線維は中心核を有するものはなく、また変性所見も乏しく大小不同も著明でなかった (図 1)。

7 週齢のマウスでは、やはり壊死線維の集団が存在し、中には筋束全体に及ぶような部分もあったが、再生所見も活発に認められた。筋線維は大小不同が著明で線維径が 100 μm に近い肥大線維も多く存在した。数多くの中心核を持った線維が認められ、以前変性し崩壊した部分は結合織や脂肪織の増殖を伴う事なく形態上はほぼ完全に修復されている様に思われた。

ベスタチン投与マウスでも、これらの所見は無投与のマウスに比較して特に異なる所見はなかった (図 2)。

図 3 では、中心核を有する線維数の全体の筋線維に占める比率を示した。これは再生の指標であると同時に、壊死を起こした線維数をも表していると考えられている³⁾。ベスタチン投与マウスでは 3 週では 7.4 %、無投与マウスでは 34.6 % と明かにベスタチン投与マウスで低値であった。7 週齢では中心核を有する線維の割合はベスタチン投与マウスが 75 %、無投与マウ

表 1 Materials and methods

	Age	No	Bestatin Administration
MDX MOUSE	3W	4	2mg/day for 7 days
		4	(-)
	7W	4	2mg/day for 35 days
		3	(-)

*国立療養所宇多野病院

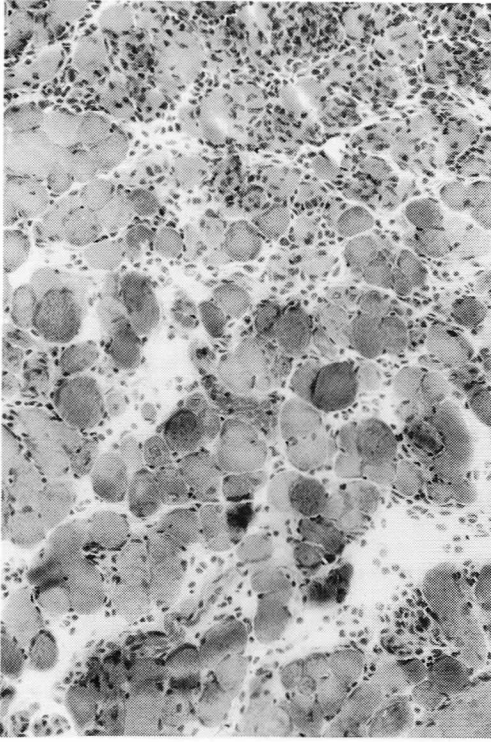


図1 A) 3週齢コントロールmdx マウス

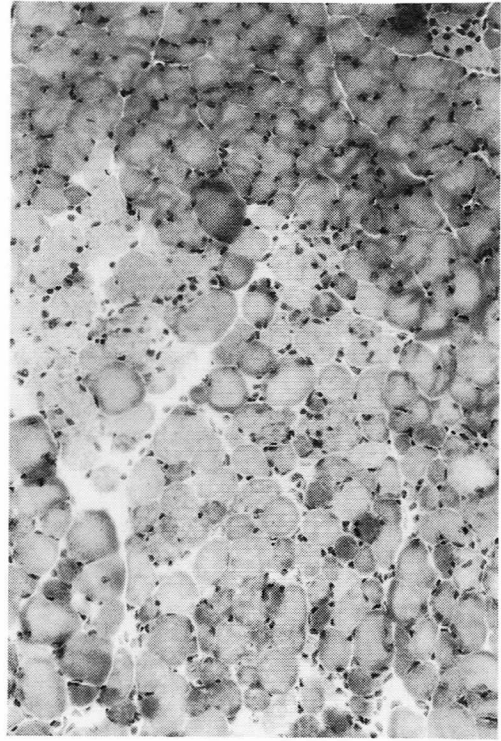


図1 B) 3週齢ベスタチン投与mdx マウス

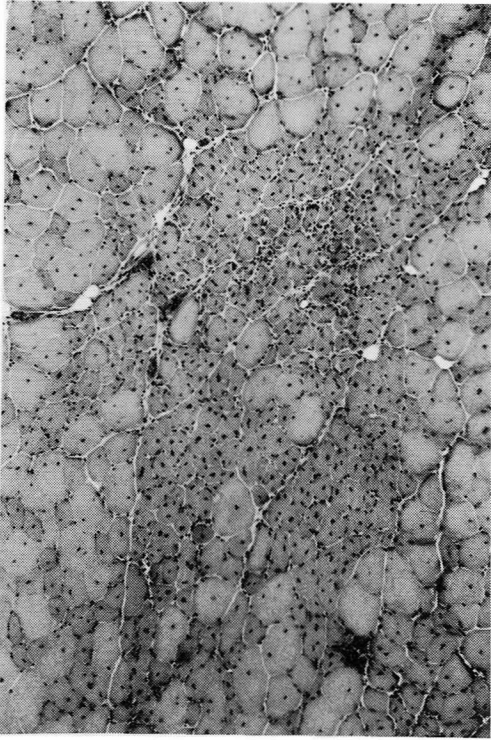


図2 A) 7週齢コントロールmdx マウス

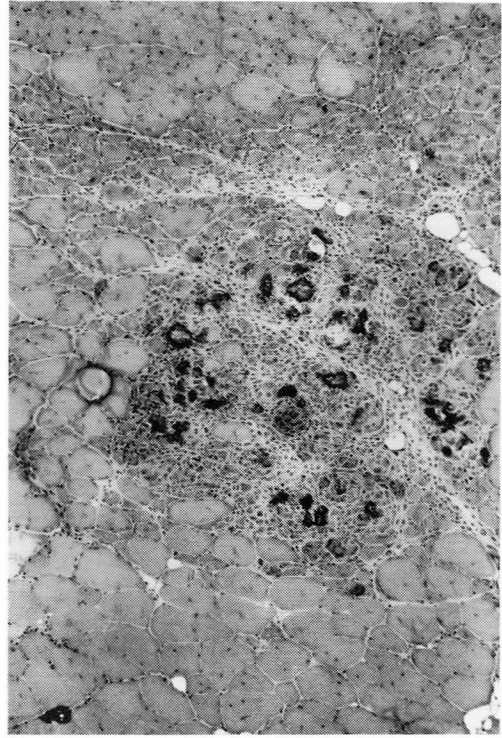


図2 B) 7週齢ベスタチン投与mdx マウス

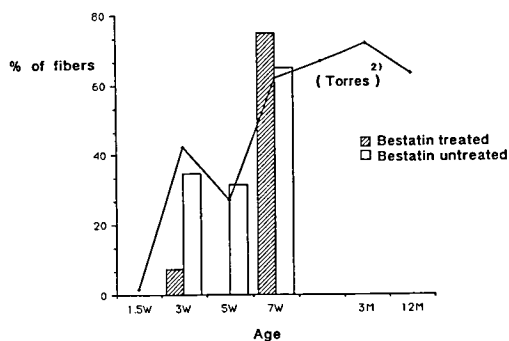


図3 Frequency of fibers with internal nuclei (Triceps brachii)

スが65%と、ベスタチン投与マウスでやや高めであった。

筋線維径のヒストグラムの比較では、ベスタチン投与マウスでは、3週齢、7週齢とも無投与のマウスに比べて小径化傾向が認められた(図4)。

表2において筋線維径の分析を示した。3週

齢、7週齢ともに最大径、最小径ではベスタチン投与マウスと無投与マウスで大差ないが、平均径はベスタチンを投与したもので低値であった。また標準偏差値を平均値で割り1000を掛けた variability coefficient は、筋線維の大小不同を示す指標としてよく使われているが250以下が正常とされてる⁴⁾。投与マウス、無投与マウスともいずれも250より大きかった。ベスタチン投与マウスでは、コントロールマウスと比較して3週齢で低く7週齢で高値であった。初期における筋崩壊の遅延とその後引き続き再生現象の遅れを示しているのではないかと思われた。

考 察

1986年辻、松下らは dy/dy マウスにベスタチンを投与し、臨床症状の改善、血清酵素値の正常化と同時に、組織学的に筋線維の変性、壊死、結合織の増殖等の筋ジストロフィー特有の所見の改善を認めている⁵⁾。今回の我々の試みでは、大勢におい

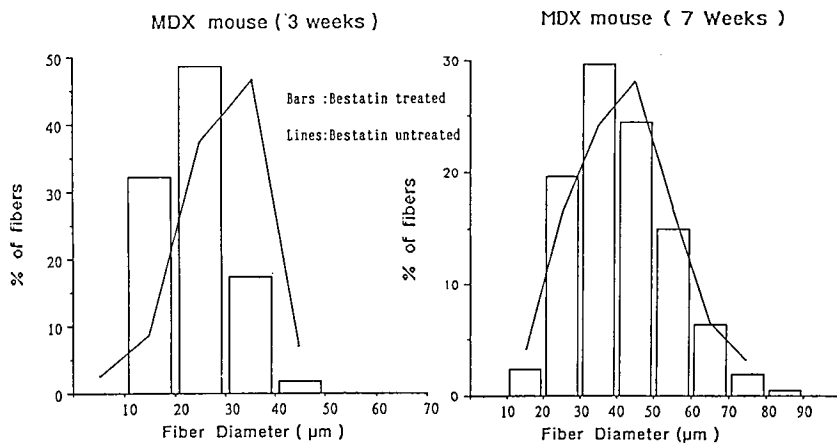


図4

表2 Analysis of fiber diameters (Triceps brachii)

ANALYSIS of FIBER DIAMETERS(Triceps Brachii)					
	Max. (μm)	Min. (μm)	Mean (μm)	S.D.	Variability Coefficient
3W MDX B(+)	46.7	9.8	24.0	6.6	275
MDX B(-)	44.5	9.5	28.2	7.5	338
7W MDX B(+)	95.3	13.5	41.4	12.8	309
MDX B(-)	98.0	13.6	46.5	12.9	278

て組織上の筋ジスの変化に改善を認めることはできなかった。Dy/dy マウスではマクロファークやTリンパ球等の細胞性免疫の異常が同時に存在することが知られており、これらへのベスタチンの影響も無視できないのではないかと思われた。しかし mdx マウスにおける3週齢での中心核線維の出現率の低さと平均径の小径化は、初期の筋崩壊を遅延させている可能性を示唆していると考えられた。

文 献

- 1) Tanabe, Y., Esaki, K. and Nomura, T.: Skeletal muscle pathology in x chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta. Neuropathol. (Berl.)*, 69: 91, 1986.
- 2) Torres, L.F.B. and Duchon, L.W.: The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. *Brain*, 110: 269, 1987.
- 3) Karpati, G., Carpenter, S. and Prescott, S.: Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer necrosis in mdx mouse dystrophy. *Muscle Nerve*, 11: 795, 1988.
- 4) Coulton, G.R., Morgan, J.E., Patridge, T.A. et al: The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. a histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 14: 53, 1988.
- 5) Tsuji, S. and Matsushita, H.: Successful treatment of murine muscular dystrophy with the protease inhibitor Bestatin. *J. Neurol. Sci.*, 72: 183, 1986.

DMD 骨格筋 CT の経時的変化の検討

中野 今治*

研究協力者 清水 潤** 松村 喜一郎**
川井 充*** 国本 雅也***

はじめに

DMD の骨格筋 CT 像の病勢に伴う変化については、これまで主に臨床ステージ別患者群の CT 画像を用い、間接的に推定されてきた。今回我々は、同一症例の経過を年余にわたり追跡し、DMD 骨格筋 CT 所見の経時的変化を検討した。

対象

1983 年より 1989 年までの 7 年間に、最低 2 年以上臨床経過を追跡し、この間 2 回以上筋 CT を行なった DMD 33 例を対象とした。症例は 3 歳—28 歳までで、年齢別の例数は図 1 に示すとおりである。表 1 に症例の CT 所見の追跡年数を示す。表 2 に同一症例で撮った CT の回数を示す。

表 1 対象：デュシャンヌ型筋ジストロフィー 33 例

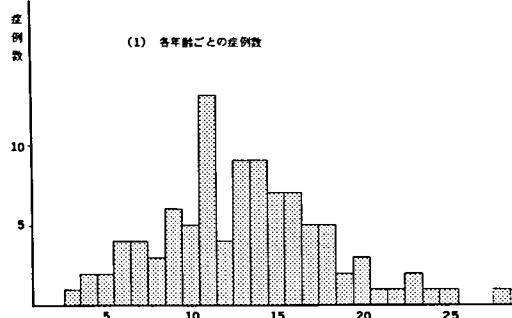


図 1 対象：デュシャンヌ型筋ジストロフィー 33 例

表 1 症例の CT 所見追跡年数

追跡年数	症例数
2 年間	2
3 年間	5
4 年間	4
5 年間	8
6 年間	11
7 年間	3
平均	4.9 年間

表 2 同一症例で撮った CT の回数

CT の回数	症例数
2 回	12
3 回	9
4 回	8
5 回	4
平均	3.1 回

方法

CT は TCT 604 Toshiba を使い、WL 0、WW 300 の条件で、肉眼的障害の程度を表 3 に示すように、画像上の筋の脂肪化の割合に注目し、5 段階に分類した。この障害度分類に基づき、全身の 23 筋について評価した。

又、23 筋の障害進行度を比較し、進行度の異

* 東京大学医学部脳研病理
** 国立療養所下志津病院
*** 東京大学医学部脳研神経内科

表3 CT画像上の筋の肉眼的障害度分類

障害度	I	正常
障害度	II	軽度虫食い状に低吸収域(筋相当部の5~10%以下)が認められるもの
障害度	III	中等度低吸収域(筋相当部の10~50%)が認められるもの
障害度	IV	高度低吸収域(筋相当部の50%以上)が認められるもの
障害度	V	完全に脂肪化したもの

なる代表筋として、大臀筋、大腿四頭筋、薄筋、頸部板状筋を選び、これらの筋の進行度の単純和をCT総和値とした。CT総和値の経時的変化を追うと同時に、上田の機能障害度との対応もおこなった。

結 果

今回の検討に用いた症例のうち、1症例の骨格筋CTの経時的変化を図2に示す。

DMDの筋障害の進行には筋により差異が存在することが知られている。そこで、代表となる筋を選び、各症例ごとにDMDの骨格筋CTの経時的変化を検討するため、まず全身23筋の障害の進行パターンを比較した。今回の症例を用い、各筋について年齢ごとの筋障害度数の平均値を求め、全身の筋障害度が比較できるよう

に図3に示した。縦軸は筋障害度数の平均を示し、横軸は筋障害度の重い順になるように筋肉をならべている。障害進行度の異なる代表筋として、大臀筋、大腿四頭筋、薄筋、頸部板状筋の4筋を選び、検討することにした。

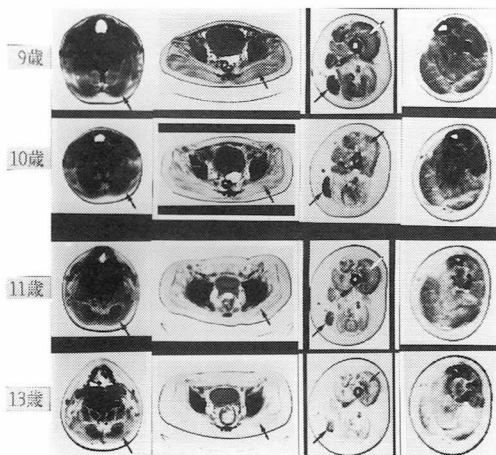
図4に代表筋4筋の各症例ごとの筋障害の経時的変化を示す。縦軸に筋障害度を取り、横軸に年齢を取り、個人の経過を直線で結んだ。図上、太線は12歳以上まで歩行可能であった比較的機能のよいDMD例を示す。

大臀筋の筋障害の進行は、5歳の時点ですすでに障害度II度又はIII度に達しており、急速に進行し11歳頃には障害度V度に達している。大腿四頭筋は、5歳の時点では障害度I度又はII度であり、やはり急速に進行し11歳頃には障害度IV度又はV度に達し、その後緩徐進行となる。薄筋は、障害の開始は前2筋と比べるとやや遅く8歳以降であり、進行スピードも遅く、やはり11歳に障害度III度又はIV度に達し緩徐進行となる。頸部板状筋においては、さらに障害の開始及び進行が遅くなる。

このように、いずれの筋も年齢の進行と共に筋障害も進行している。しかし、筋によりその障害進行の時期、障害のスピードに差異が存在する。

次に個々の筋における個人の経時的変化に注

図2 代表症例の筋障害の経時的変化



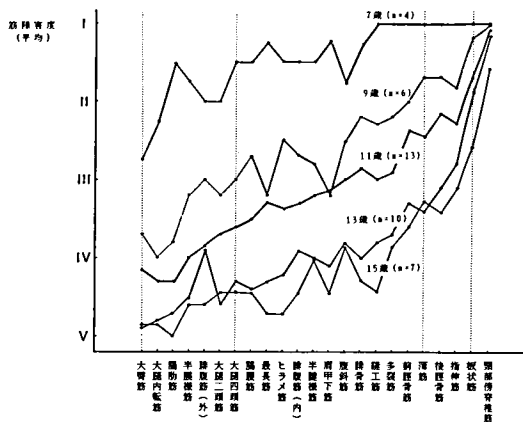


図3 全身23筋の筋障害度の比較

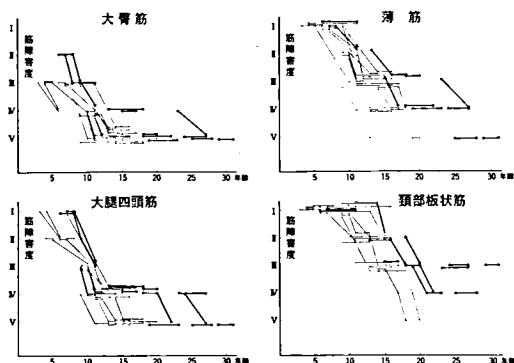


図4 代表筋4筋の筋障害の経時的変化

目する。いずれの筋においても、筋障害は5歳から10歳の間に急速に進行するが、11歳頃からは、数年間同じ障害度にとどまり、その後徐々に進行する傾向を有す。このように経過が急速進行期と緩徐進行期にわけられる傾向は、代表筋以外の他の筋においても、緩徐進行となる障害度は筋により異なるが11歳頃を境として存在した。歩行不能となる年齢が、ちょうどこの時期であり、筋障害の進行と臨床像との対応を考える上で興味深い。

以上のように、各筋の障害経過は、それぞれ固有の進行パターンを取る。

一方、図からわかるように、各筋障害度に達する年齢及び次の筋障害度に移る年齢には数年の個人差が存在する。又、2段階以上の筋障害の進行を追跡できた症例では、経過を結んだ線

が交差せず、幅を保ちつつ進行していく傾向がある。このことにより、筋障害は個人差に相当する数年の幅を持ちながら固有の進行パターンに沿って進行していることがわかる。又、図上機能の比較的よいDMD例が全体の中で遅い方にシフトし、しかも障害度が進行するほど、そのずれが目立っている。機能のよい例の方が、画像上も遅く進行することを示すものと考えられる。

次にDMDの画像上の進行度を代表する値としてのCT総和値の経時変化を図5に示す。図よりわかるように、CT総和値は3-9歳の間から増加しはじめ、年齢の進行とともに増加している。そして、各CT総和値に達する年齢には、個人により数年の差がある。やはり、太線で示す機能のよい例の方が遅い方にシフトし、CT総和値の増加の開始が遅れ、増加のスピードも遅いことがわかる。

図6にCT総和値と上田の機能障害度との対応を示す。図よりわかるように、機能障害度の進行にともない、CT総和値は増加している。又、機能障害度がV度以上の末期に近い例では、機能障害度上変化なくても、CT総和値では増加を示す例が少なからずあることがわかる。

考 察

DMDのCT画像上の筋障害について、川井ら¹⁾は、臨床ステージごとの患者群の検討より、DMDの個々の筋はそれぞれ固有の障害進行を

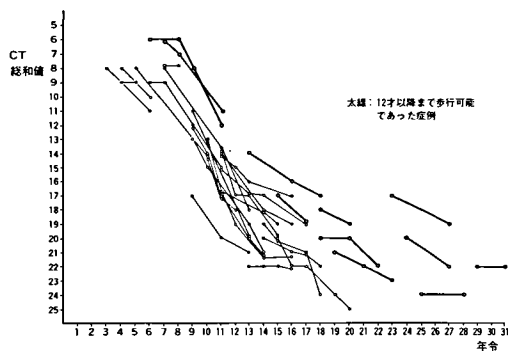


図5 CT総和値の年齢に伴う変化

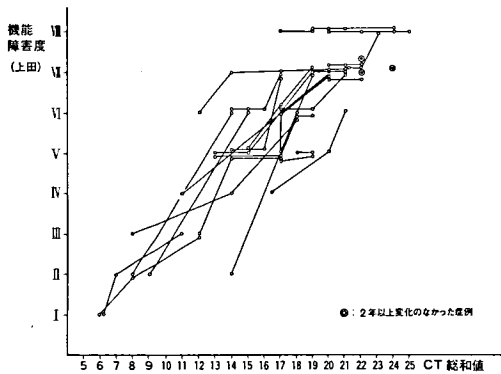


図6 CT 総和値と機能障害度との対応

たどることを明らかにし、それに基づいて筋障害進行のパターン分類をおこなっている。今回我々は、同一症例を用い、個々の筋の経時的变化を実際に追うことで、DMD 各筋の固有の障害進行パターンを明らかにした。

CT 画像上の筋障害度の評価のしかたとしては、筋 CT 値²⁾、筋 CT-index³⁾、筋%断面積⁴⁾、などを用いた報告がある。筋 CT 値を障害の指標として用いる場合、特に末期の障害の強い筋や、痩せの強い例の筋では、筋の輪郭を明瞭に同定できなかつたり、筋膜や血管の CT 値に影響され、正確な値が得られにくい場合がある。また、筋断面積を用いる筋 CT-index は、さらに個人差の要素がはいってくる。今回我々が用いた筋 CT 像の肉眼的評価法は、筋 CT 値に比べれば、栄養状態に影響されにくく、末期の像でも適用しやすい。そして、筋内の筋線維と脂肪化の割合に注目すれば、比較的たやすい。実際の臨床の場で、CT 画像上筋障害度を評価するのに、有用な方法と考えられた。

今回、本評価法を用いて、DMD の各筋の固有の障害進行パターンを明らかにした。さらに、これらのパターンに基づき、DMD の画像上の進行度を代表する値として、CT 総和値を提唱し、この値の経時的变化を追った。CT 総和値は、機能障害度が年齢とともに段階的に変化していくのに対し、年齢とともに比較的なめらかに増加した。又、機能障害度上では進行がなくても、CT 総和値では増加を示す例も多く、こ

のことは、CT 総和値が DMD の進行を示すより細かい指標となりうることを示唆する。一方、CT 総和値の進行の時期、および速度には個人差に相当する幅があり、個人の CT 総和値はこのパターンに沿って進行している。従って、個人の経過中の一枚の筋 CT 画像を用い、DMD 全体の中で、画像上の進行度の位置づけができ、将来の進行度についてもある程度予測が立てられると考えられる。さらに、CT 総和値と各種臨床機能との対応をつけることにより、DMD の進行を客観的に評価する指標として筋 CT を用いられると考えられる。

まとめ

1. DMD の骨格筋 CT 像を肉眼的に評価し経時的に追跡した。
2. 筋障害の進行は、個人差に相当する幅を持ちつつ各筋固有のパターンに沿い進行した。
3. CT 画像上の筋障害度を示す代表値として、CT 総和値を提唱した。
4. CT 総和値は個人差に相当する数年の幅を保ちつつ、年齢に伴い増加した。

文献

- 1) 川井充, 国本雅也ら: Duchenne 型筋ジストロフィー症の骨格筋 CT 所見とこれにもとづく病期分類. 臨床神経, 25:578, 1985.
- 2) 立野勝彦, 西村敦ら: 進行性筋ジストロフィー症の下肢筋群の CT パターンについて. 総合リハ, 10:525, 1982.
- 3) 堀川博誠, 小長谷川正明ら: Duchenne 型筋ジストロフィー下肢筋 CT 像の定量的解析. 臨床神経, 25:1277, 1985.
- 4) 石原傳幸, 里宇明元ら: CT スキャンによる筋障害の定量的評価法. 第 2 報 Duchenne 型筋ジストロフィー症における下腿筋の障害の進展過程. 筋ジストロフィー症の疫学, 病態および治療開発に関する研究. 昭和 62 年度研究報告書, 1988, p.114.

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における筋障害の進行過程 —CT による経時的評価—

石原 傅 幸*

研究協力者 里 宇 明 元** 原 行 弘** 江 端 広 樹**
近 藤 国 嗣** 青 柳 昭 雄* 儀 武 三 郎*

はじめに

我々は、これまで CT による筋障害の定量的評価法の検討を行い、性、年齢別の正常値を報告するとともに疾患例の評価に応用してきた^{1),2)}。筋障害を評価するための指標としては、従来の CT 値と断面積に加えて、残存する筋の割合と脂肪置換の程度を評価するために考案した筋および脂肪の%断面積という指標を用いた。この定量的評価法を用いて、昨年度の本会議などで、71 例の DMD 例を対象に下肢筋の筋障害の進行過程を分析した結果を報告した (表 1)^{1),2)}。障害が初期から認められる筋は、骨盤帯・体幹では、大臀筋、中臀筋、大腿筋膜張筋、大腿では、大腿二頭筋、内転筋群、大腿四頭筋、下腿では腓骨筋、腓腹筋であり、腸腰筋、腰方形筋、傍脊柱筋、半腱様筋、半膜様筋は中期よ

り障害が認められた。これに対し、腹筋群、縫工筋、薄筋、後脛骨筋は比較的末期まで残存するという結果を得た。昨年度までの研究は多数例を対象とした横断的研究であったが、今年度は EST 治験例 10 例を対象に、筋障害の進行過程の 1 年間の縦断的追跡を行ったので、ADL、筋力の推移と合わせて報告する。

対象および方法

対象は、EST 治験施行中の DMD 10 例で、年齢は 6 歳から 10 歳、Swinyard stage は、初回評価時が stage II 7 例、III 3 例、一年後の評価時は II 6 例、III 1 例、IV 1 例、V 2 例であった。1 年間の stage の変化は、不変が 6 例 (II→II, 6 例)、一段階増悪が 2 例 (II→III, III→IV, 各 1 例)、二段階増悪が 2 例 (III→V, 2 例) であった。

方法は 10 例の下肢筋の CT 像を初回と 1 年後の 2 回評価し、さらに EST プロトコールで用いられている ADL スコア (9 項目、38 点満点) および徒手筋力テストによる筋力の評価との関連を検討した。CT スキャナーは日立 CTW-500 を使い、撮影条件はスライス幅 5 mm、スキャン時間 6 秒、X 線 120 KVp, 200 mA とした。また、CT 値の安定性を確認するための較正を定期的に行った。スライス部位は大腿中央部および下腿最大径部とし、大腿と下腿各筋の CT 値の平均、断面積および%断面積を求めた。%断面積は、CT 値が 30 から 120 の筋の部分と -60 から -200 の脂肪の部分各々について

表 1 Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における筋障害の進行過程—CT による評価のまとめ

筋 群	初 期	中 期	晩 期
骨盤帯 体 幹	大臀筋 中臀筋 大腿筋膜張筋	腸腰筋 腰方形筋 傍脊柱筋	腹直筋 腹斜筋
大 腿	大腿二頭筋 内転筋群 大腿四頭筋	半腱様筋 半膜様筋	縫工筋 薄 筋
下 腿	腓骨筋 腓腹筋	前脛骨筋 ヒラメ筋	後脛骨筋

* 国立療養所東埼玉病院内科

** 国立療養所東埼玉病院リハビリテーション科

求め、残存する筋の割合と脂肪置換の程度を評価した。

図1に実際の方法を示す。まず、トラックボールで目的とする筋を囲うことにより、CT値の平均と断面積が表示される。次に level detection を用いて、30 から 120 の正常の筋 CT 値を有する部分の割合を求める。この例では腓骨筋の筋の%断面積は 2.7% と表示されている。さらに右に示すように、-60 から -200 の脂肪の CT 値を有する部分の割合を求める。本例では脂肪の%断面積は 74.8% と表示されている。以上の操作を下肢の各筋において行い、各筋の CT 値、断面積、筋および脂肪の%断面積を求めた。

結 果

1. 下肢筋の CT 値、筋および脂肪の%断面積の変化：図 2 a に大腿、下腿各筋の CT 値の 10 例の平均を示す。実線は初回評価時、破線は 1 年

後の評価を表す。内転筋群、大腿二頭筋、大腿四頭筋、腓骨筋、腓腹筋は初回評価の時点から CT 値が低く、1 年後の評価でもさらに低下を認めた。各筋とも 1 年後の評価では CT 値の低下を認めたが、その程度は後脛骨筋、ヒラメ筋、縫工筋、薄筋では少なかった。図 2 b, 2 c には各筋の筋の%断面積と脂肪の%断面積の変化を示すが、内転筋群、大腿二頭筋、腓骨筋、腓腹筋において、筋線維部分の減少と脂肪置換が早く進む傾向が認められた。

実例として、初回評価時 stage III、1 年後 stage IV の症例の腓腹筋とヒラメ筋の CT 所見の変化を示す(図 3)。腓腹筋は筋の%断面積が 25.9% から 12.0% に低下しているのに対し、ヒラメ筋は 63.9% から 61.4% とほとんど変化がなく、1 年間の両筋の筋障害の進行程度には差が見られた。

2. 症例毎の CT 所見の推移：図 4 に各症例毎の大腿全体の CT 値、筋の%断面積、脂肪の%

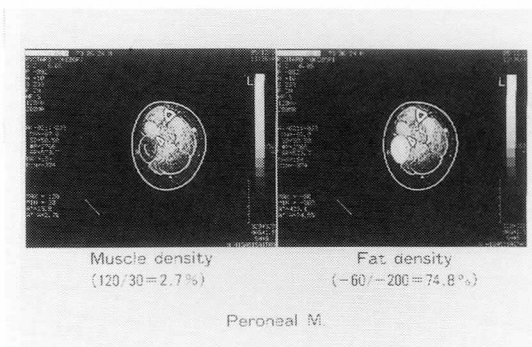


図1 CT スキャンによる定量的評価法 (本文参照)

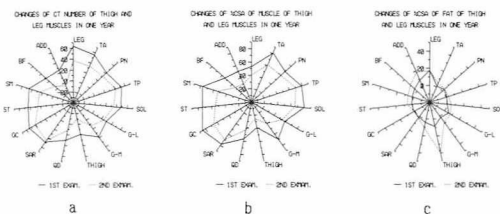
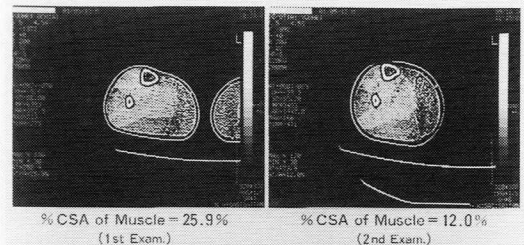
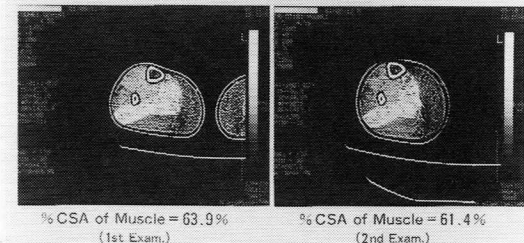


図2 下腿、大腿各筋の CT 値 (HU)、筋の%断面積 (%), 脂肪の%断面積 (%) の一年間の推移



GASTROCNEMIUS (MEDIAL HEAD)



SOLEUS

図3 一症例における腓腹筋とヒラメ筋の%断面積の一年間の変化 (本文参照)

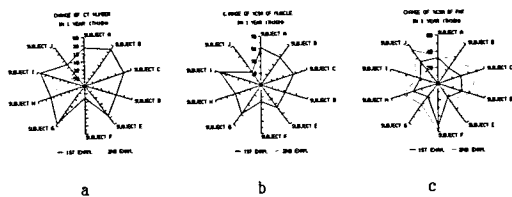


図4 10症例の大腿全体のCT値(HU), 筋の%断面積(%), 脂肪の%断面積(%)の一年間の変化(本文参照)

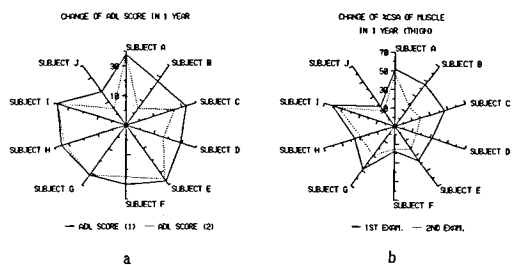


図5 ADLスコアの推移とCT所見の推移との関係: a. ADLスコア, b. 大腿全体の筋の%断面積(%)

断面積の変化を示す。症例B, C, Dにおいては1年間の変化が大きいのに対し, 症例A, Iでは変化が少なかった。症例F, Jは初回評価の時点からCT値と筋の%断面積の低下および脂肪の%断面積の増加の程度が他の症例に比べて大きかった。

3. CT所見の推移とADLスコアの推移との関係: 図5aにADLスコアの変化を, 図5bに大腿の筋の%断面積の変化を示す。全体の傾向としては, 筋の%断面積が大きいほどADLスコアも高い傾向が認められた。しかし, 症例Fのように筋の%断面積が低いにもかかわらず, ADLスコアは高いという例外も見られた。また, 症例B, Cのように, 筋の%断面積の低下が大きい症例ほどADLスコアの低下も大きい傾向が認められた。さらに, CT所見とADLスコアとの関係を検討したところ(図6), 両者には有意な正の相関が認められた(Spearmanの順位相関係数=0.74, $P < 0.05$)。

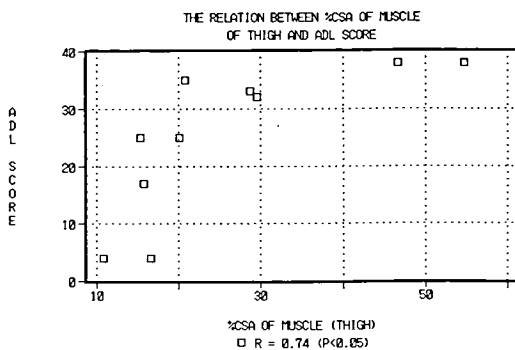


図6 大腿全体の筋の%断面積とADLスコアとの関係

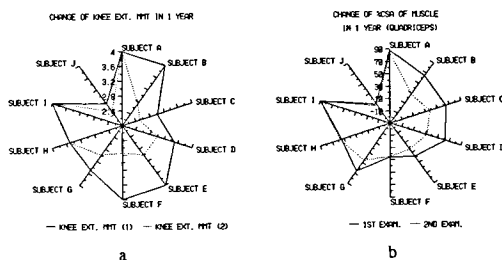


図7 大腿四頭筋の筋力(a)と筋の%断面積(b)の一年間の推移

4. 筋力の推移とCT所見の推移との関係: 図7aは徒手筋力テストで評価した大腿四頭筋筋力の変化を, 図7bは大腿四頭筋の筋の%断面積の変化を示す。両者のレーダーチャートの形はある程度対応した変化を示したが, 症例E, Fのように, CT値の変化はほとんどないにもかかわらず, 筋力の低下は著しい症例も見られた。

図8には大腿四頭筋の正常の筋CT値を有する部分の断面積の絶対値と徒手筋力テストとの関係を示す。両者には有意な相関が認められ, Spearmanの順位相関係数は0.78であった。

考 察

今回我々はCTスキャンを用いて, DMD 10例の下肢筋の筋障害の進行過程を1年間経時的に観察した。その結果, 筋障害の進行過程に関して, 前回71例を対象に横断的研究を行った時

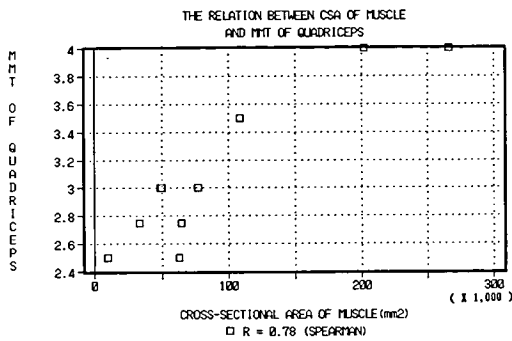


図8 大腿四頭筋の筋力と筋の断面積との関係

とはほぼ同様の結果を得た。すなわち、大腿では大腿二頭筋、内転筋群、大腿四頭筋は早期より障害され、かつ、障害の進行も早いのに対し、内側ハムストリングスの障害は比較的緩徐に進み、縫工筋、薄筋は障害の進行が極めて緩徐であった。下腿では、腓骨筋、腓腹筋の障害が早く、前脛骨筋、ヒラメ筋がこれに続き、後脛骨筋は障害の進行が遅かった。このように筋によって障害の進行速度に差が見られる原因は不明だが、ひとつの可能性としては、筋の使用頻度の違いが考えられる。すなわち、動作中に多く使用される筋ほど、overworkによる障害が起り易く、そのために障害の進行が早いという可能性である³⁾。この点に関しては、今後、動作中の筋の使用動態の分析を含めて、さらに検討を加える必要がある。いずれにしても、筋障害の進行過程に関して、今回の縦断的研究で前回の横断的研究と同様の結果が得られたことは、意義あるものと考えられ、今後さらに長期間の追跡を行っていく予定である。

今回の対象例10例においては、筋障害の進行が早い群と比較的遅い群の2群がみられたが、その理由については、対象例がEST治験例であることもあり、自然経過なのか、薬物の影響なのか判断ができず、今後の検討課題である。

ADLおよび筋力の推移とCT所見の推移との間にはある程度の相関が認められたが、このことは我々のCTによる定量的評価法の妥当性を示しているものと考えられる。ただし、特に

筋力に関しては、徒手筋力テスト自体が定性的な評価法であり、今後より定量的、かつ実用的な評価法を検討し、CTの諸指標との対比を行っていく必要がある。

筋障害のCTによる定量的評価は疾患の自然経過の把握、薬物や訓練の効果判定などのひとつの補助手段として有用と考えられる。今後、さらに長期間の追跡を行っていききたい。

結 語

1. CT スキャンを用いて、DMD 10 例の下肢筋の筋障害の進行過程を経時的に観察し、筋力、ADL の推移との対比を行った。
2. 筋障害の進行過程は、前回の横断的研究とはほぼ同様の結果であり、障害は大腿では、大腿二頭筋、内転筋群、大腿四頭筋→半腱様筋、半膜様筋→縫工筋、薄筋の順に、下腿では、腓骨筋、腓腹筋→前脛骨筋、ヒラメ筋→後脛骨筋の順に進行する傾向が認められた。
3. 症例の中で、障害の進行が早い例と遅い例が認められた。
4. ADL および筋力の推移と CT 所見の間にはある程度の相関が認められた。

文 献

- 1) 里宇明元：Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症 (DMD) における筋障害の進行過程—CT スキャンによる定量的評価—。リハ医学, 26 : 159—171, 1989.
- 2) 石原傳幸, 里宇明元ら：Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における筋障害の進行過程—CT スキャンによる定量的評価—厚生省低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究, 昭和 63 年度研究報告書, 1989, p.p. 67—71.
- 3) Benett, R.I. and Knowlton, G.C.: Overwork weakness in partially denervated skeletal muscle. Clin. Orthop., 12 : 22—29, 1958.

筋ジストロフィー症の血清LAPについて

高橋 桂一*

研究協力者 益田 喜信** 森 鼻 文 朗** 小 林 浩 子**
岡 昭 夫** 梅 枝 孝 之**

目 的

これまでに我々は Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) にベスタチンを投与すると 2 時間後に血清 leucine aminopeptidase 活性 (LAP) が有意に低下し, placebo では低下せず, 測定法の検討の結果から, この現象が生体内で起こっていることを報告した^{1),2)}.

今回は他の筋疾患での LAP の値の検討と, DMD における LAP がどのような因子と関連しているかを検討したので報告する. またベスタチン長期投与の例として, 当院で行った二重盲検が解錠されたので, LAP の変動を検討した結果も報告する.

方 法

種々の筋疾患患者の血清 LAP を L-ロイシル-P-ニトロアニリドを基質としたオートアナライザー法で測定した. DMD 患者および入院中の患者では早朝安静空腹時に採血した.

結 果

1) DMD 25 例 (厚生省研究班 8 段階分類で障害度 1 : 5 名, 4 : 2 名, 5 : 3 名, 6 : 7 名, 7 : 4 名, 8 : 4 名) の LAP は 138.2 ± 20.7 (平均 \pm SD) Goldberg Rutenburg Unit であった. 当院での成人の正常値は 125 ± 25 で 3 SD を上限にとると 200 以上が異常高値になる. DMD で 200 を越えたものは 1 名もなかつ

た. 同年齢の正常対照と比較する必要があるが今回は出来なかった. 平均値で比較すると DMD ではやや高値である. DMD 25 症例について検討した. 年齢と障害度は相関係数 $r = 0.94$ ($P < 0.01$) で, また障害度と log CK 値は $r = -0.93$ ($P < 0.01$) の有意な相関がみられたが, 障害度と LAP, 年齢と LAP, LAP と CK, LAP と LDH, LAP と γ -GTP (以下 GTP) の間には有意な相関はみられなかった. 図 1 に障害度と LAP の関係, 図 2 に LAP と log CK の関係を示す.

2) 筋緊張性ジストロフィー症 (MyD) の血

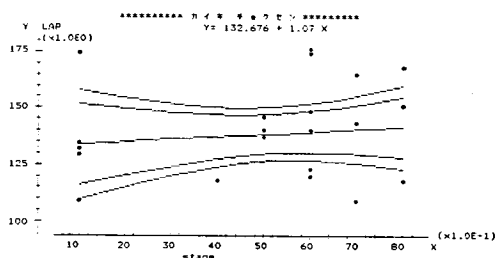


図 1 デュシャンヌ型筋ジストロフィー症における障害度と血清 LAP の関連

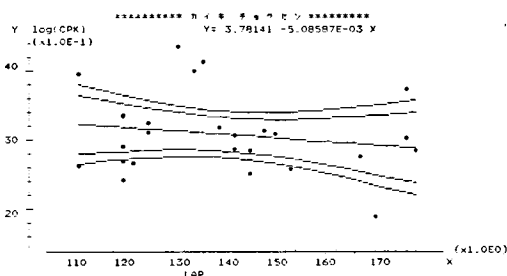


図 2 デュシャンヌ型筋ジストロフィー症における血清 LAP と log CK の関連

* 国立療養所兵庫中央病院
** 国立療養所兵庫中央病院研究検査科

清 LAP は 170.0 ± 24.8 ($n=10$) で、年齢と相関傾向を示したが有意ではなかった。CK は年齢と逆相関の傾向を示すが、LAP と CK はむしろ正相関の傾向を示した (図 3)。また LAP は GTP および LDH と正相関を示し、後者は $r=0.74$ ($P<0.05$) で有意であった (図 4)。

3) 肢帯型筋ジストロフィー症 (LG) の LAP は 164.1 ± 35.7 ($n=7$) で DMD より危険率 5% で有意に高かった。LG の LAP は年齢、CK、LDH、GTP と有意の相関を示さなかった。

4) これら 3 種の疾患 42 名を合わせて検討すると年齢と LAP は $r=0.49$ ($P<0.01$) で正相関し、LAP と \log CK は $r=-0.40$ ($P<0.01$) の逆相関を示した。LAP と LDH、LAP と GTP は有意の相関がなかった。

5) ベスタチンの長期投与例として二重盲検での LAP の変動を昨年度報告した (図 5)²⁾。図中点線で結んだ No 19 と No 21 は LAP の低下がないと判断したが、これらは鍵の結果偽薬と一致した。No 53 と No 96 は低下し、No 20 は判定不能としたが、鍵の結果 No 53 と

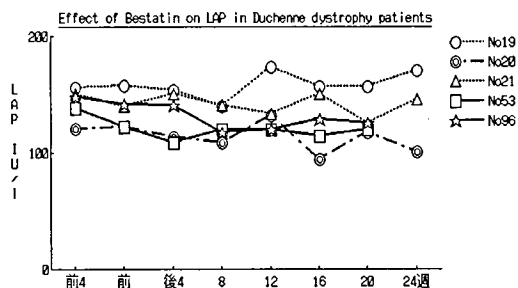


図 5 ベスタチン 150 mg 分 3 食後および偽薬内服の血清 LAP におよぼす影響。鍵結果：No 20 および No 53 がベスタチン、No 19、No 21、No 96 が偽薬。

No 20 が真薬で、No 96 は偽薬であった。投与後 4 週での LAP の低下が意味を有すると思われた。

考察および結論

山本らは DMD で血清 LAP の有意な上昇を報告し、各症例の経時的測定で障害度 5~6 で最も高くなることを報告している³⁾。但し障害度 7 の症例は 1 例のみで障害度 8 の症例は含まれていない。我々の症例には障害度 5 以上の症例が 18 例含まれているが障害度との相関は得られなかった。また各障害度での LAP の平均値の間に有意差はなかった。また山本らは血清 CK と LAP の有意の相関を認めないことを報告しているが、我々の結果も同様であった。MyD では LAP の平均値は DMD より高いが、体重や臓器の大きさを考慮する必要がある。MyD では LAP は LDH と有意の相関を示し、DMD とは相違した。このことは MyD における LDH の由来や臓器よりの酵素遊離の機構の相違があり、MyD の多系統疾患の一つの表現かも知れない。LG は MyD より平均年齢は若く、いずれも介助起立ないし歩行の可能な症例で LAP も DMD より高値を示したが、同様に筋肉量や臓器重量の差を考慮すべきであろう。LG では MyD にみられた LAP と LDH の相関は観察されなかった。すべての症例をあわせて LAP を検討すると、年齢と有意の正相関があり、CK

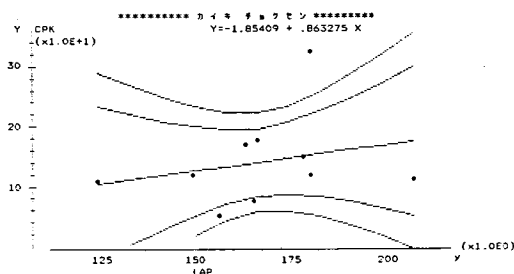


図 3 筋緊張性ジストロフィー症における血清 LAP と CK との関連

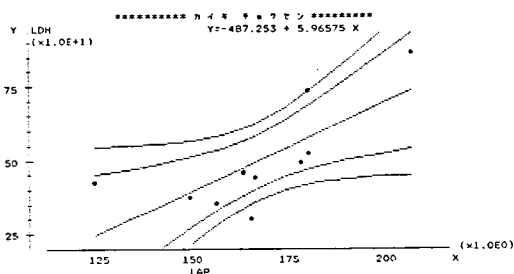


図 4 筋緊張性ジストロフィー症における血清 LAP と LDH の相関

とは逆相関する。このことから我々の血清 LAP の測定では筋由来の LAP をどの程度測定しているかが問題になる。

ベスタチンの内服で短期、長期ともに血清 LAP の低下が観察されたが、DMD の臨床的な改善あるいはメリットをもたらすかどうかはここでは結論できなかった。

文 献

- 1) 高橋桂一, 西尾英久: Duchenne 型筋ジストロフィー症の血清酵素におよぼすベスタチン (NK 421) の効果. 厚生省新薬開発研究費・低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究 (江橋班), 昭和 62 年度研究報告書, 1988, pp 83—85.
- 2) 高橋桂一, 梅枝孝之ら: ベスタチンの血清 LAP に及ぼす影響. 厚生省新薬開発研究費・低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究班 (江橋班), 昭和 63 年度研究報告書, 1989, pp 93—95.
- 3) 山本真理, 佐藤 猛, 杉田秀夫: Duchenne 型筋ジストロフィー患者血清の Aminopeptidase 活性—骨格筋に由来する酵素の同定および活性について—, 臨床神経学, 28: 735—741, 1988.

ヒト血清中の自己免疫筋抗原 (SE-antigen) の測定

春原 経彦*

研究協力者 古川 昭栄** 里吉 栄二郎**

重症筋無力症や多発性筋炎の約半数の患者血中に、骨格筋から生理食塩水で抽出される物質に対する抗体が存在する¹⁾。以後この抗原物質を saline extract (SE)-antigen とよぶ。我々はこれまでに SE-antigen に対するモノクローナル抗体を作製し、これを用いて以下に示すような SE-antigen のいくつかの分子特性、組織内分布を明らかにしてきた。1) SE-antigen は骨格筋、心筋に分布し胸腺にも微量存在する。2) 分子量は 210 kda., 3) 培養下では融合した多核筋管細胞が合成し、分裂中の細胞には存在しない、4) 細胞外に分泌される、5) 筋組織の細胞外マトリックスと横紋構造に相関する構造に存在する。

以上の知見から SE-antigen は血中にも存在することが予想される。そこで SE-antigen の生理的機能を明らかにすること、自己免疫筋疾患との関連を調べる目的でヒト血清中の SE-antigen の定量系を確立した。

方 法

血清サンプル

正常人血清 48 例、重症筋無力症 (MG) 患者 82 例、多発性筋炎 17 例の血清を 1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含む TH buffer (組成は下記) にて 10 倍に希釈し、EIA に供与した。抗アセチルコリン受容体抗体価、抗 SE-antigen 抗体価の測定
抗アセチルコリン受容体抗体価、抗 SE-antigen

抗体価はすでに報告した方法にしたがった^{1),2)}。

SE-antigen 測定系の確立

一般的に感度、定量性、信頼性の高いサンドイッチエンザイムイムノアッセイ (EIA) 法を採用した。SE-antigen 分子上の認識エピトープを異にする 2 種のモノクローナル抗体 1E7, 7D9 を用いた。まず一方の抗体を 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.6 (TH buffer) で希釈したものを 50 μl ずつ 96 穴ポリスチレンプレートに添加し 90 分間固相化した。0.5% スキムミルクを含む TH buffer で 30 分間ブロッキングし、プレートを洗浄後、1% BSA を含む TH buffer に溶解した測定サンプル 50 μl を室温で 3 時間反応させた。次にビオチン化したもう一方の抗体を 4°C で 15 時間反応させ、ストレプトアビジン標識した β -D-ガラクトシダーゼを反応させた。プレートに結合した酵素活性を 4-メチルウンベリフェリル β -D-ガラクトシドを基質として測定した。SE-antigen はいまだ完全に精製されていないため、ヒト骨格筋の PBS 抽出物をセファロース 6B にてゲルろ過し、SE-antigen 活性の最も高い分子量 100 kda. 以上の画分を濃縮したものを常に標準品として用いた。

結果と考察

SE-antigen 定量システムの確立

2 種のモノクローナル抗体の組合せを試した結果、7D9 抗体をプレートに固相化しビオチン化した 1E7 抗体を用いた EIA システムだけが SE-antigen の測定が可能であった。標準試料 0.01—100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で用量依存的な検

* 国立精神・神経センター武蔵病院
** 国立精神・神経センター神経研究所

量曲線が得られた (図 1)。

ヒト血清中の SE-antigen レベル

正常人, PM, MG の血清中の SE-antigen レベルを図 2 にしめす。標準試料換算で検出限界以下のものから 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度を示すものまで広範囲にわたって分布していた。性差および 3 群間の有意差は見いだせなかった。この結果から SE-antigen は自己免疫筋疾患患者, 正常人を問わずほとんどのヒト血清中に存在することがわかる。

血清中の SE-antigen レベルと抗 SE-antigen 抗体価および抗アセチルコリン受容体抗体価との相関性の検討

MG 患者血清について縦軸に SE-antigen レベルを, 横軸に抗 SE-antigen 抗体価をプロットし, 両者の相関性を調べたのが図 3 A である。両者にはまったく相関性が認められなかった

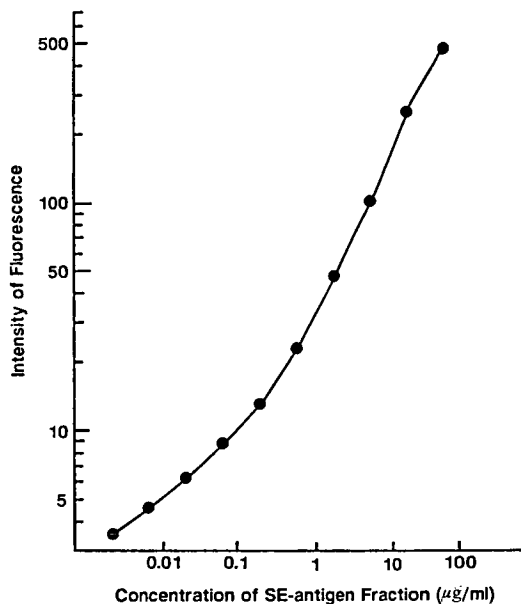


図 1 ヒト SE-antigen の標準検量曲線

ヒト骨格筋の PBS 抽出物をゲル濾過し活性のある溶出画分を濃縮して標準試料とした。

横軸はそのタンパク質濃度, 縦軸は β -D-ガラクトシダーゼ活性の蛍光強度を示す。

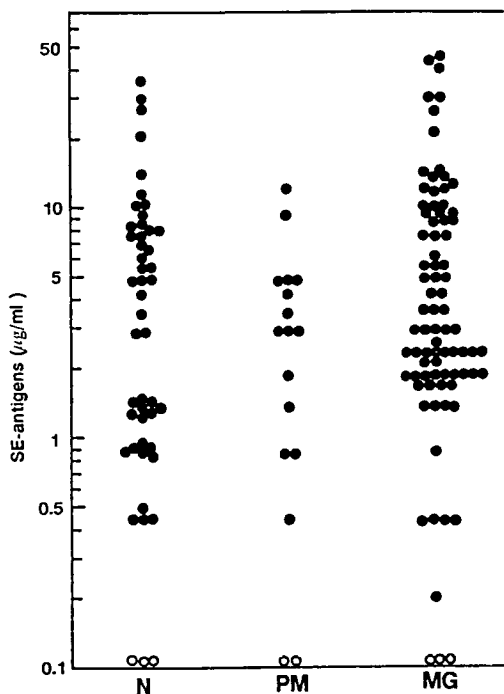


図 2 正常人, 多発性筋炎, 重症筋無力症患者血清中の SE-antigen レベル
N: 正常人, PM: 多発性筋炎, MG: 重症筋無力症

($R^2=0.001$)。同様に MG 患者血清 80 例について縦軸に SE-antigen レベルを, 横軸に抗アセチルコリン受容体抗体価をプロットし, 両者の相関性を調べたのが図 3 B である。抗 SE-antigen 抗体価と同様に両者にはまったく相関性が認められなかった ($R^2=0.014$)。

血清中の SE-antigen レベルの加齢にともなう変化

SE-antigen の血中レベルは筋疾患患者, 正常人共に存在濃度範囲がきわめて広く, 疾患に対する特異性も見いだせないため年齢との相関を検討した。20—50 歳の正常人血清中の SE-antigen レベルを年齢に対してプロットしたのが図 4 A である。ほぼ 32 歳をピークとする山なりの分布を示し, SE-antigen の血中レベルは青年期後半に最も高く以後徐々に減少すると推定された。MG 患者群での年齢対比では (図 4 B) この傾向はあまり顕著でなく, 20—30 歳の年齢

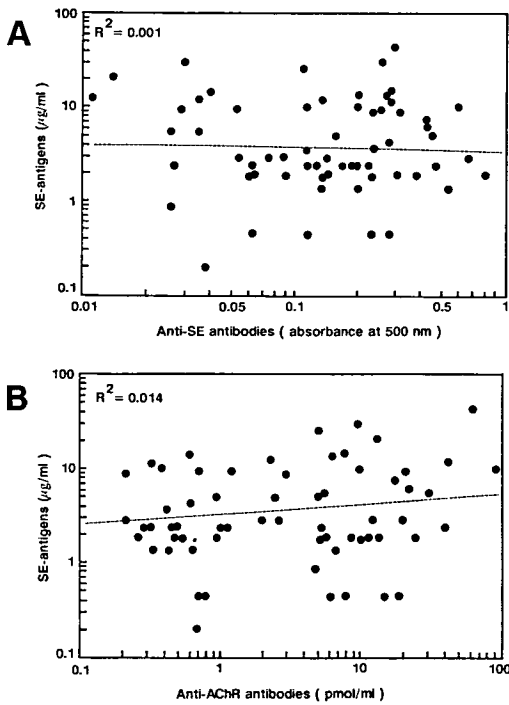


図3 血清中のSE-antigen レベルと抗SE-antigen 抗体価および抗アセチルコリン受容体抗体価との相関性の検討
縦軸は血清中のSE-antigen レベルを、横軸は抗SE-antigen 抗体価 (A)、抗アセチルコリン受容体抗体価 (B) を示す。

層に高値の、50 歳以上の年齢層に低値を示すものが多い傾向を認めた。

まとめと結論

ラットの組織内分布を調べた以前の結果から SE-antigen は骨格筋と心筋にのみ局在していることが明らかになっている。今回の検討により、SE-antigen が正常人を含めたほとんどのヒト血中に見いだされること、その血中レベルは年齢依存性であること、などからなんらかの筋肉機能と相関していることが示唆された。

文 献

- 1) Akazawa, S., Furukawa, S., Kamo, I., Satoyoshi, E. and Hayashi, K.: J.

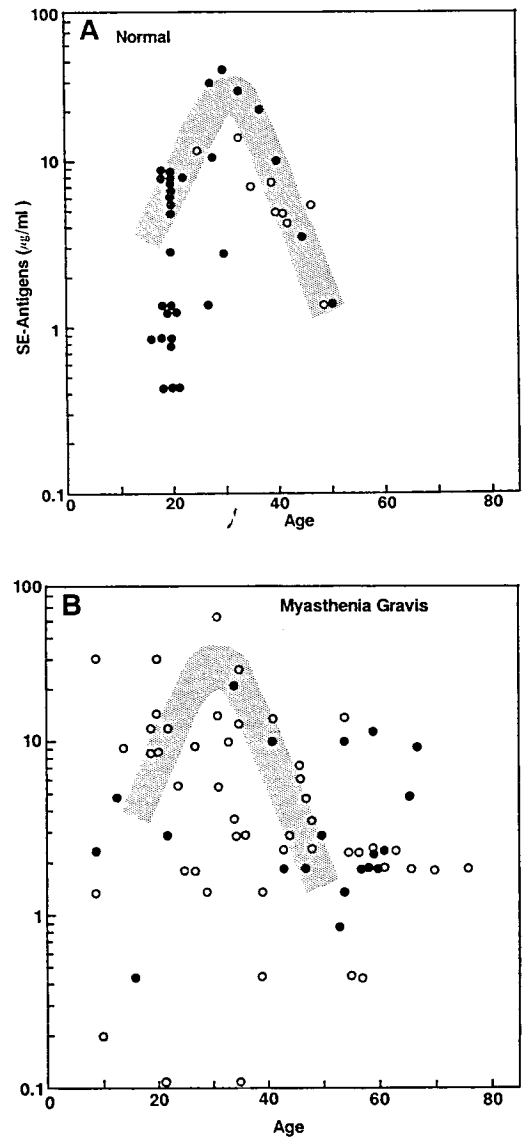


図4 正常人と重症筋無力症患者における血清 SE-antigen レベルと年齢との関係
縦軸は正常人 (A) と重症筋無力症患者 (B) 血清中の SE-antigen レベルを、横軸は年齢をしめす。○: 女, ●: 男。

Immunol. Methods, 94, 161, 1986.

- 2) Furukawa, S., Akazawa, S., Furukawa, S., Kamo, I., Satoyoshi, E. and Hayashi, K.: J. Neuroimmunol., 6, 397, 1984.

骨格筋ミオシン軽鎖測定のためのラジオイムノアッセイ法のキット化の試み

矢崎 義雄*

研究協力者 永井 良三* 加藤 祐之* 杉田 秀夫**

収縮の最小単位である筋原線維を構成している収縮蛋白のミオシンの、小さなサブユニットである軽鎖は、筋細胞の障害時に筋原線維から容易に解離し、また小分子であることから速やかに細胞外に逸脱し血中に出現する。したがって、血中のミオシン軽鎖を検出してその濃度を測定できれば、筋原線維の崩壊の進展状況を知ることが可能となる。従来の指標であるCPKやLDHなどの筋蛋白酵素は、可溶性蛋白であるために、細胞障害時に細胞膜透過性亢進により迅速に逸脱してしまい、細胞構築崩壊をその血中濃度は必ずしも反映するものではない。したがって、血中ミオシン軽鎖値の測定は、筋障害の定量的な診断と薬物療法などによる治療効果の評価に、臨牀的にきわめて有用な指標になるものと考えられる。

われわれはすでに、骨格筋ミオシン軽鎖Iに対するラジオイムノアッセイ系を開発し、筋ジストロフィー症で血中軽鎖値が著しく高値となることを示した。しかし本法では、標準蛋白としてヒトの骨格筋ミオシン軽鎖が必要であり、また抗体血清にも量的制限があって、広く一般臨床に用いられるに至っていない。そこで今回われわれは、骨格筋ミオシン軽鎖Iのアミノ酸配列より部分ペプチドを生合成し、これを抗原にしてラジオイムノアッセイ系の確立を試みた。

I 骨格筋ミオシン軽鎖Iの部分ペプチドの作製

われわれは、ヒト胎児心筋のmRNAから作製したcDNAライブラリーから、心房筋および心室筋ミオシンの軽鎖I(アルカリ軽鎖)の遺伝子をクローニングして、その塩基配列からアミノ酸配列を決定した。図1に示すように、心室筋タイプミオシン軽鎖Iは、心房筋タイプとアミノ酸レベルでその相同性は約71%であった。骨格筋ミオシンで右筋タイプの軽鎖Iとの相同性は約62%認められた。このようなアミノ酸配列から、われわれは心筋ミオシン軽鎖Iと比較的相同性の少ない骨格筋ミオシン軽鎖Iの部分配列(#4 EEKIDLSAI, #5 TGDSKIILS-QV)を基に2種類の合成ペプチドを作製した。

II 部分ペプチドに対する抗体の作製

2種類の合成ペプチドをウシ血清アルブミン蛋白と結合させ、完全フロイントアジュバント

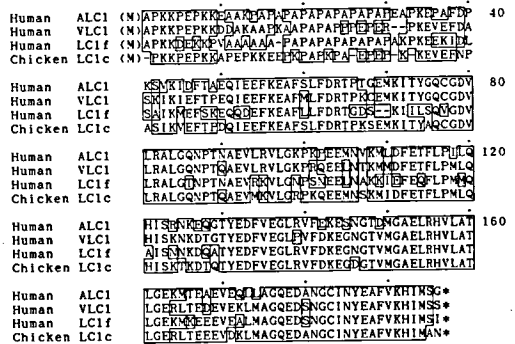


図1 骨格筋ミオシン軽鎖Iのアミノ酸配列と、抗原として用いた部分ペプチド#4と#5の構造を示す。

*東京大学医学部第三内科

**国立精神・神経センター神経研究所

と混合した後、ウサギに 250 μg ずつ 2 週間おきに 3 回皮内注を行い免疫した。5 週目に血清を採取してその抗体価を ELISA 法にて測定した。

図 2, 3 に示す ELISA 法は以下のように行った。まず 96 穴型ウェルの固相に PBS 緩衝液に溶解したヒト骨格筋ミオシン軽鎖 I の部分ペプチド、#4 と #5 のそれぞれを固定した。次に血清を図に示すような稀釈倍率で加え、さらにビオチンで標識したヤギの抗ウサギ IgG 抗体を添加して 4°C 24 時間インキュベートした。その後洗滌をくり返し行い、さらにアビチンで標識したペルオキダーゼ酵素を加えた。発色色素として OPD を加え、最終的にはその発色の吸光度を分光光度計にて測定した。したがって、その吸光度が抗体の力価に相当する。

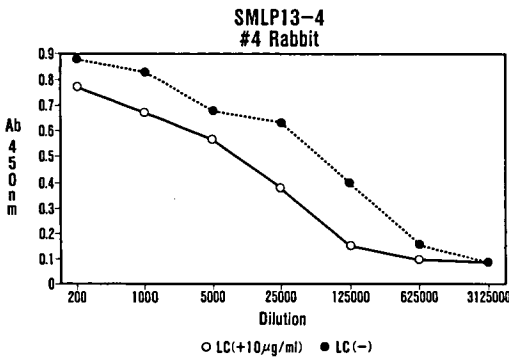


図 2 骨格筋ミオシン軽鎖 I の部分ペプチド #4 に対する抗血清の稀釈曲線

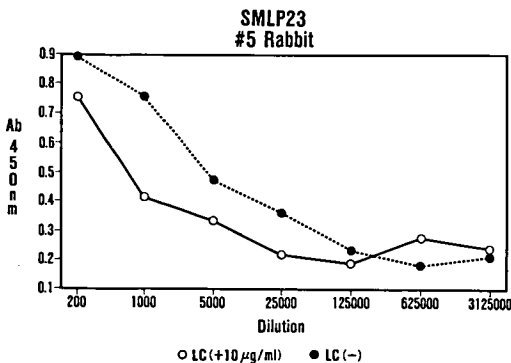


図 3 骨格筋ミオシン軽鎖 I の部分ペプチド #5 に対する抗血清の稀釈曲線

図表で明らかなように #4 では血清の数十倍、そして #5 では数万倍稀釈より有意の発色が認められた。そして EC_{50} は #4 で数万倍、#5 では数千倍稀釈と、きわめて結合親和性の高い抗血清が得られていることが明らかとなった。また実線に示したように、それぞれの合成ペプチドが 10 $\mu\text{g/ml}$ 存在することにより反応系に抑制がかかることから、特異性にもこの合成ペプチドに対する抗血清はすぐれていることが示された。

III 骨格筋ミオシン軽鎖 I の測定

次に、このような合成ペプチドに対する抗血清により、実際の骨格筋ミオシン軽鎖 I 蛋白が測定可能であるか、同様に ELISA 法により検討した。

まずウェルにヒト骨格筋より稀釈法によって抽出純化したミオシン軽鎖 I を吸着させ、そこに段階的に稀釈した抗血清を反応させた。コントロールとして、前回確立したラジオイムノアッセイに用いた抗血清を同様に稀釈して加えた。図 4 に示すように、ラジオイムノアッセイに用いた、骨格筋ミオシン軽鎖 I 蛋白に対する抗体では、数千倍稀釈から有意の反応を呈して、吸光度が上昇したが、合成ペプチドに対する抗血清では、#4 に対するものも、#5 に対するもの

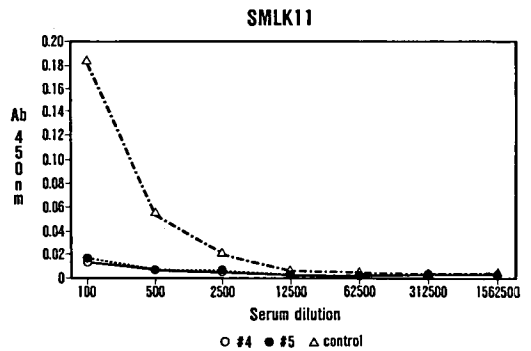


図 4 ペプチド #4 および #5 に対する抗血清の骨格筋ミオシン軽鎖 I との反応曲線
コントロールは前回報告したラジオイムノアッセイ用の抗血清の反応を示す。

にも百倍稀釈まで検討したが、有意の反応は認められなかった。

これは合成ペプチドに対しては、親和性も特異性も高い抗血清が得られたが、これらの抗血清は残念ながら、骨格筋ミオシン軽鎖Ⅰ蛋白には反応せず、合成ペプチドの認識される抗原提示部分が蛋白分子構造の内部に埋没してしまって結合出来ない可能性が考えられた。

考 按

われわれは心筋ミオシン軽鎖Ⅰに対するモノクローナル抗体を用いたイムノラジオメトリック法あるいは ELISA 法による測定キットを開発し、急性心筋梗塞を中心とした心筋障害の感度と特異性にすぐれた診断薬として広く日常臨床においても使用されるようになった。一方、骨格筋ミオシン軽鎖Ⅰに対するラジオイムノアッセイの開発も試み、筋ジストロフィー症患者での骨格筋ミオシン軽鎖Ⅰ血中値の著しい上昇を示し、昨年本研究会において発表した。しかし、その抗血清の抗体価が、抗原として十分な量のヒト骨格筋ミオシン軽鎖Ⅰ蛋白が得られな

かったために、その正確な定量には 2 千倍稀釈が限度であり、したがって測定可能な検体数は限られてしまい、広く多施設で使用出来るキット化はほとんど不可能である。

そこで今回われわれは、骨格筋ミオシン軽鎖Ⅰのアミノ酸配列から合成ペプチドを作製して、これを抗原に抗血清が得られれば、十分な抗原量ばかりでなく標準蛋白としても量的制限がなくなり、日常臨床で使用できるキット化が可能である。このようなアプローチから、骨格筋ミオシン軽鎖Ⅰのアミノ酸配列から、9 個と 12 個からなる合成ペプチドを作製して抗血清を作り、ELISA 法を行った。しかし合成ペプチドに対しては、感度も特異的にもすぐれた抗血清が、ウサギを免疫することにより得られたが、実際の軽鎖蛋白分子では、その認識する抗原決定基が分子構造の内部に埋没されてしまい、反応が得られず測定系の確立にまでは至らなかった。出来れば次回は N 末端に近いアミノ酸配列から構造を選択して合成ペプチドを作製し、再度測定系のキット化を試みたいと思う。

当院において EST 服用を開始した一症例の経過 — 正常児との比較フォローを中心に —

三吉野 産 治*

研究協力者 山 田 みどり* 江 田 伊勢松*

はじめに

我々は、当院で初めて EST(ロキシスタチン)を使用する症例をフォローするために、EST 調査票の項目の中から、運動機能に関係するところを取りあげ、正常コントロール群と比較検討した。

症 例

症例：5 歳，男子

主訴：肝機能異常

妊娠・分娩歴：異常なし

既応歴：クループ，気管支喘息

家族歴：家系内に同様の疾患なし。但し，母の CK 値 825 単位（正常 0～25 単位）と高値であった。

現病歴：頸定 3 ヶ月，坐位の時期は不明であるが，1 歳までは特に異常に気づかれなかった。昭和 61 年にクループのため，唐津赤十字病院に入院し，その時，肝機能異常を指摘された。その後，乳児肝炎としてフォローされた。昭和 63 年 12 月，CK の高値に気づかれた。翌，平成元年 1 月に，九州大学小児科で筋生検を受け，Duchenne 型筋ジストロフィー症と診断された。同年 10 月，EST による加療を希望して当院を受診した。

理学的所見：身長 96.9 cm (−2 SD)，体重 15.0 kg (−1 SD) で，腓腹筋の肥大と Gowers' 徴候が見られた。

神経学的所見：深部腱反射は消失しており，

遠城寺法にて DQ=59 と，知能低下がみられた。

初診時検査所見（表）：血液生化学検査で，GOT 354 単位，GPT 643 単位，LDH 3826 単位，CK 12890 単位，アルドラーゼ 113 シグマ単位と上昇しており，尿中クレアチニンの減少，尿中クレアチンの増加がみられた。胸部レントゲン，心電図では，特に異常は認めなかった。下肢の骨格筋 CT で，大腿中央部において，半膜様筋部の low density を認めた。

比較検討

EST 調査票の中から以下の 8 項目について，正常コントロール群と比較し，EST の効果判定の有効性について検討した。

- ①右手握力，②左手握力，③仰臥位からの立ち上り時間，④仰臥位からの起き上がり時間，⑤椅子からの立ち上がり時間，⑥階段 4 段昇り時間，⑦ 10 m 走行時間，⑧ 3 m 這行時間。

正常コントロール群は，3 歳 9 か月から 6 歳 3

表 初診時検査所見

ヘモグラム	血液生化学
RBC 454×10 ⁶ /mm ³	T-Pro 6.2g/dl Alb 4.0g/dl
Hb 12.5g/dl	T-Bil 0.28g/dl Alp 14.9K AU
Ht 38.5%	GOT 354IU/l GPT 643IU/l
WBC 7000/mm ³	LDH 3826IU/l γ-GTP 510/l
(St 6% Seg 49% Ly 37%	T-Chol 141mg/dl TG 67mg/dl
Mo 1% Eo 7%)	BUN 12.1mg/dl Cr 0.35mg/dl
Plt 27.4×10 ⁶ /mm ³	Na 139mEq/l K 4.0mEq/l
検尿 異常なし	Cl 108mEq/l Ca 8.8mg/dl
尿中クレアチニン 低下	P 4.7mg/dl ICDH 4.6IU/l
尿中クレアチン 上昇	CK 12890IU Ald 113.0 シグマ
Chest X-P WNL	
E C G WNL	
骨格筋 CT 半膜様筋の Low density	

* 国立療養所西別府病院

か月（平均5歳0か月）の神経・筋疾患のない10名で、男子7名、女子3名である。

結 果

①右手握力；患児は平均3.2 kg～3.5 kg、コントロール群は平均4.6 kg～10.8 kgとやや差がみられた。

②左手握力；患児は平均3.0 kg～3.6 kg、コントロール群は平均4.3 kg～11.2 kgで、差はみられなかった。

③仰臥位からの立ち上がり時間（図1）；患児は3.92秒～5.54秒、コントロール群は1.20秒～1.98秒と明らかな差がみられた。

④仰臥位からの起き上がり時間（図2）；患児は2.60秒～2.08秒、コントロール群では0.51秒～1.44秒とやや差がみられた。

⑤椅子からの立ち上がり時間；患児は0.7秒～0.6秒、コントロール群は0.20秒～0.50秒と差を認めなかった。

⑥10 m 走行時間（図3）；患児は5.57秒～

4.15秒、コントロール群は2.92秒～3.57秒と差がみられた。

⑦3 m 這行時間；患児は5.53秒～5.32秒、コントロール群は2.70秒～4.53秒とやや差がみられた。

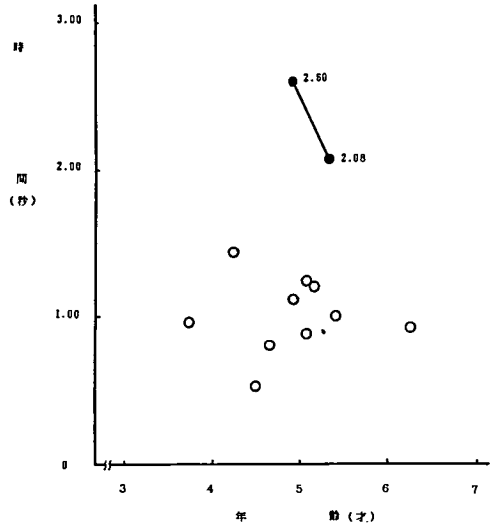


図2 仰臥位からの起き上がり（無補助）

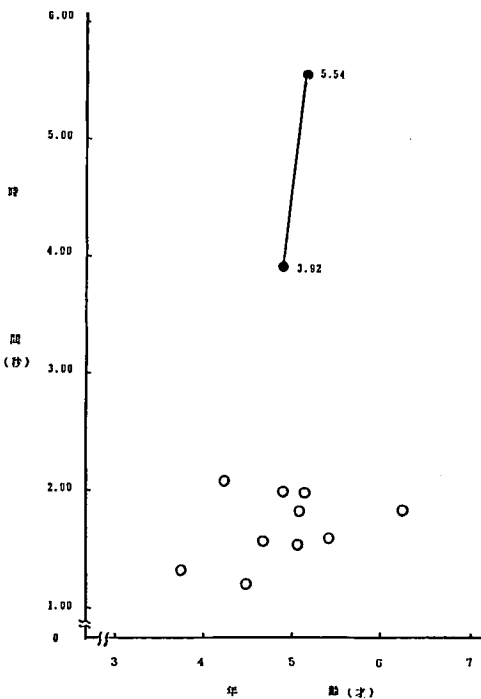


図1 仰臥位からの立ち上がり

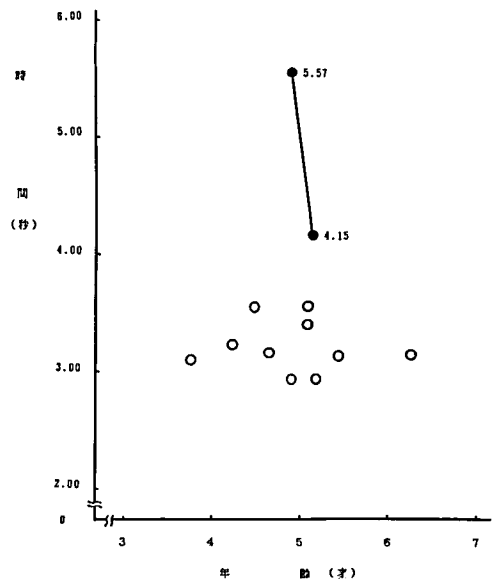


図3 10 m 走行 歩行時間（無補助）

考 按

我々の症例は1例で、EST服用を開始したばかりである。今回は、本症例をフォローしていくなかで、ESTの有効性をよりよく反映するものを正常児10名と比較して検討した。

正常値という点からみると、3-6歳という年齢の運動機能の発達は、個人差が激しいと考えられる。更に、この年齢では、患児は患児なり of 発達を確得し続けているなど、効果判定に難しい点がある。

そのためには、よりバラツキの少ない項目が、又、患児とコントロール群との差が明らかな項目が、効果判定に有効と思われる。

今回の結果では、バラツキが少ない項目は仰臥位からの立ち上がり時間、仰臥位からの起き上がり時間、10m走行時間であった。なかでも、患児とコントロール群に明らかな差がみられたのは、仰臥位からの立ち上がり時間であった。

以上より、本症例をフォローしていくうえで、

ESTの効果判定に最も有効であるのは仰臥位からの立ち上がり時間であろうと思われた。

ま と め

1. 当院でEST(ロキシスタチン)を初めて使用した5歳、Duchenne型筋ジストロフィー症の臨床経過を報告した。

2. 患児に対するESTの効果をより明らかにするために、3-6歳の正常児10名の握力、仰臥位からの立ち上がり、及び起き上がり、椅子からの立ち上がり、階段4段昇り、10m走行、3m這行の時間を比較検討した。

3. 本児1名ではあるが、正常児と比較して、以上の項目の中では、仰臥位からの立ち上がり時間が、ESTの効果判定に有効であると思われた。

4. 今後、患児の経時的データと、機会があれば、更に症例数を増やし、ESTの臨床的效果を判定していきたい。

EST 投与 Duchenne 型筋ジストロフィー症患者の 臨床経過：—— 6 年目の報告——

宮 武 正 *

研究協力者 山 崎 元 義 ** 近 藤 隆 春 **
桑 原 武 夫 * 湯 浅 龍 彦 *

はじめに

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症 (以下 DMD) に対して, E-64 (以下 EST) 投与による臨床治験が開始されて, 約 6 年が経過した. 日常生活動作能力 (以下 ADL) で検討すると EST 投与群では, 非投与群に比して, より高値をとる傾向にあった¹⁾. 本年は昨年引き続き EST 投与 DMD 児の ADL を, 非投与児の下肢筋力 (MMT), 関節可動域 (ROM), ADL の面から比較検討したので報告する. そして EST 投与 DMD 児の現況についても報告する.

対 象

国立療養所新潟病院入院中の DMD 男児で入院時歩行可能であった 22 例である. 入院時平均年齢は 9.6 歳±1.6 歳で, 平均歩行不能年齢は 11.5 歳±1.9 歳であった. 入院時の stage は I 2 名, II 16 名, III 1 名, IV 3 名である. EST 投与群は昨年と同様 EST 投与时歩行可能であった 7 例である.

方 法

下肢の ADL スコア, 下肢の筋力下肢の ROM で検討した. 下肢の ADL スコア 8 項目すなわち①立っている, ②椅子にすわる, ③椅子から立ちあがる, ④しゃがむ, ⑤床から立ちあがる, ⑥階段を昇る, ⑦階段をおりる, ⑧歩

く, を各項目 4 点満点計 32 点を 100 % として計算した. 下肢筋力は, 以下の 6 筋, すなわち, 腸腰筋, 大殿筋, Hamstrings, 大腿四頭筋, 前脛骨筋, 腓腹筋, を Daniels 法で 13 段階に細分化し, 筋力に 0~10 点の評価で 60 点を 100 % として, その経年変化を検討した. ROM は各関節の拘縮度を Brooke らの方法で算出し, % で示した.

結 果

下肢 ADL スコアは経年的に低下しているが, 急速に低下している群と比較的保たれる群がみられた (図 1). 筋力も同時に加齢と共に低下するが, かなりの variation がみられた (図 2). 歩行不能時の平均は 46.5±6.2 % であった. ROM は加齢と共に制限が高度となった (図 3). 歩行不能時の 3 関節の ROM をみると (図 4) 股関節の屈曲拘縮が強く, これが歩行不能の一因と思われた. DMD 児が歩行不能になる原因として, 絶対的な筋力低下だけでなく, 拘縮が原因となる症例も認められた. このことは

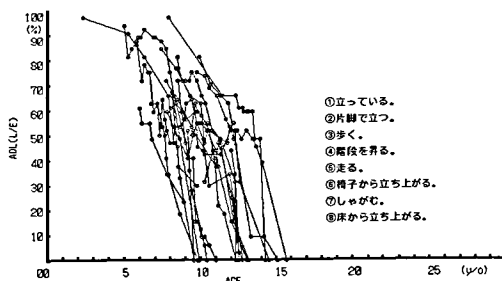


図 1 下肢 ADL の経年変化

* 新潟大学脳研究所神経内科
** 国立療養所新潟病院

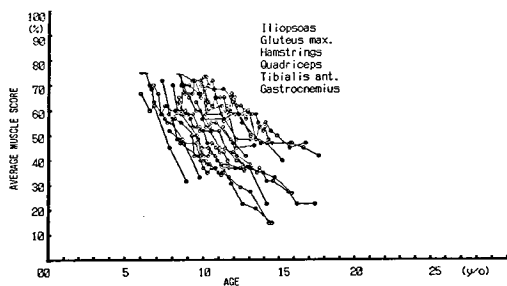


図2 下肢筋力の推移

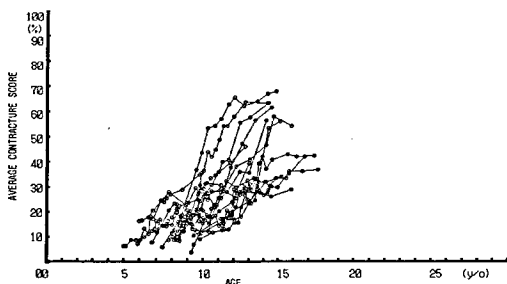


図3 下肢関節 ROM

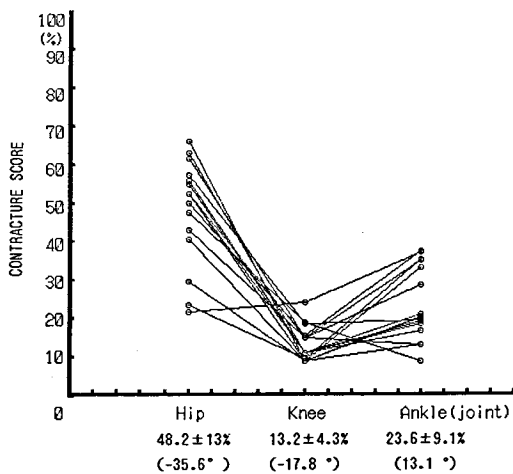


図4 歩行不能時の下肢3関節のROM

EST 投与群においても検討されなければならない重要な点である。昨年 EST 投与時歩行可能であった7例につき下肢 ADL スコアを検討し、非投与群に比して5例で機能が維持される傾向がみられたこと、EST 投与開始時歩行可能であり投与1年後でも歩行可能であった5例

の歩行速度を検討したところ、3例において若干の改善をみたことを報告²⁾した。今回はその3例の下肢 ADL スコアについて現在までの経過につき検討した(図5)。その結果症例1は筋力が十分保たれており良好な下肢機能を維持していたが、12歳時に拘縮のため急速に歩行不能となった。症例2もかなり長期まで筋力が維持されていたが、拘縮の進行と共に歩行不能となった。症例3は EST 服用時は非投与群と同程度であったが、徐々に良好な経過をとり、いわゆる stage IV 期が長く続いたが、下肢機能の低下は非投与群と同様な経過をとった。

国立療養所新潟病院において24例の Open study が行われてきた³⁾が、投与開始時の stage に比して全例進行しており、現在の歩行可能児はいない(表1)。stage VIII の2例は呼吸不全にて体外式人工呼吸器を使用している。投与開始時2例に軽度の嘔気、嘔吐を認めたが消化剤の併用で改善している。rGTP の軽度上昇を3例に認めたがその後正常範囲におちついている。

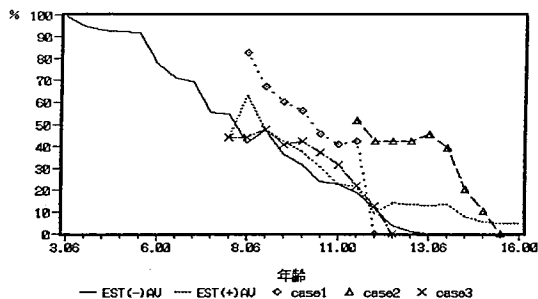


図5 下肢 ADL の経年変化

表1 EST 投与群 (24例)

Stage	開始時 (昭和59年)	現在 (平成2年)
I	1	0
II	7	0
III	0	0
IV	1	0
V	8	1
VI	7	7
VII	0	12
VIII	0	4

検血，血液生化学上も著変なく安全性が認められている。なお，投与時点で死亡した例はいない。1例，上腸間膜動脈症候群で投与を中止している。

考 察

進行性の疾患である DMD に対して EST 投与を行い約 6 年が経過した。全例で stage は進行しているが，副作用の発現はみられていない。歩行可能の早期より EST 投与を受けた群に下肢機能が長く維持される傾向があり，臨床的にも有用と思われた。

歩行不能となってからの薬物評価が困難であることから，より多数例での検討が必要である^{4),5),6),7)}。そのため平成 1 年より stage I～III でかつ 6～10 歳の患者に限定し，より簡便で合理的な基準に基づいた二重盲検試験が開始された。DMD の natural course の多様性をふまえ，的確に病態をとらえることが，薬効判定の上でも重要である。その観点から今回歩行不能となる要因を，ADL，筋力，拘縮という面から検討し，歩行不能になる条件としていくつか異なった理由が存在することを確認した。今後は，より客観的に評価検討するために，筋肉 CT，MRI を用い，EST の臨床的有用性と比較検討してゆくことが必要と思われる。

歩行不能となってからの評価法には困難があるが，私達は下肢 ADL と同様に，体幹 ADL が有用であることを提案したい。体幹に関連した ADL としては以下の 6 項目①首のすわり②座位姿勢を保つ，③ねころぶ，④ねがえる，⑤這う，⑥起きあがる，である(表 2)。試みに国立療養所新潟病院での EST 投与群と非投与群の経年変化をしめす(図 6)。下肢 ADL と同様の検討を行ったが，下肢と同様，EST 投与群でやや高値を維持する傾向にある印象をうけ，今後多数例の検討が望まれる。

DMD においては各病態に応じて，その病期毎に種々の観点から，薬剤の有用性を臨床的に正しく評価していく事が重要と思われた。

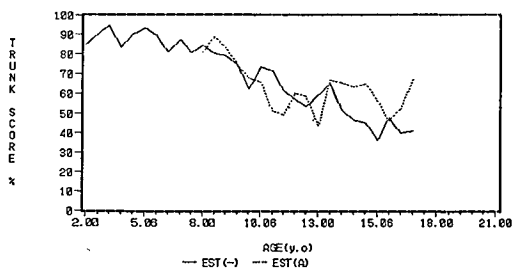


図 6 体幹 ADL の経年変化

表 2 体幹 ADL 項目 (6 項目)

1 首のすわり	4点 普通に出来る 3・ 頭ばいで頭をもたげうが仰けでもたげられない 2・ 頭ばいでも頭をもたげられない 1・ 坐位では首がすわっているが少しでも傾けると頭が倒れる 0・ 首坐り不能
2 坐位姿勢	4点 バランスがくずれても立ちなおる(40°以上胴幹を傾けても) 3・ 多少のバランスはとれる(10°～35°胴幹を傾けても) 2・ 少しバランスをくずすとすぐに倒れる(10°未満の横きで) 1・ 少しさえれば坐っておられる 0・ よりかからねば坐っておれない
3 坐位回転	4点 手を使わずに仰けにゆっくり回転する 3・ 手を使えば仰けにゆっくり回転する(一旦横向きになってからも含む) 2・ 一旦横向きになってから回転する 1・ 手が交さず勝手にそのままくずれないように回転する 0・ 介助なしには回転できない
4 寝返る	4点 ぐるぐる回れる 3・ 手と足を使って寝返るがやや困難を感じる 2・ 時間をかければやっと寝返りが出来る(15秒～30秒) 1・ 寝返りは出来ないが横向きになれる 0・ 横向きにもならない
5 這う	4点 四つん這いで速く這える 3・ 寝をついて四つん這いで進むが指先を外方ないしは後方に置いて徐々に這う 2・ 床につけて這う(四つん這いをとるのに時間を要し這うのも速い) 1・ 床に肘をつけて這おうとするが進めない(四つん這い保持可、這えない) 0・ 全く這えない
6 起き上がる	4点 手を使わずに起き上がる 3・ 手を使って起き上がる 2・ まず腹臥位となり起き上がる 1・ まず腹臥位となり起き上がるが長時間を要す(20秒～1分) 0・ 起き上がり不能

文 献

- 宮武正ほか：Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の臨床経過：日常生活活動能力 (ADL) の経年推移。厚生省新薬開発研究費・低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究会議 (江橋班) 昭和 61 年度研究報告書，1987，p.p. 3—97。
- 宮武正ほか：Duchenne 型筋ジストロフィー症の臨床的検討：EST 投与群 5 年目の経過と EST 二重盲検試験の出発。厚生省新薬開発研究費・低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究，昭和 63 年度研究報告書，1989，p.p. 85—87。

- 3) 宮武正ほか：EST 臨床試験，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) の研究開発班会議 (今堀班)，昭和 60 年度研究報告書，1986，p.p. 109—121.
- 4) Dubowitz et al.: Management of muscular dystrophy: pharmacological and physical aspects. Bull., 36: 139—144, 1980.
- 5) Brooke M.H. et al.: Clinical investigation in Duchenne muscular dystrophy: 2 Determination of the Power of Therapeutic trials based on the natural history. M & N, 6: 91103, 1989.
- 6) 石原傳幸ほか：EST 臨床試験，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) の開発研究班会議，昭和 60 年度研究報告書，1986，p. 123.
- 7) 石原傳幸ほか：治療薬の効果判定法における問題点。厚生省新薬開発研究費・低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究，昭和 61 年度研究報告書，1987，p.p. 99—103.

Duchenne 型筋ジストロフィー症に対するベスタチン 長期投与の握力に対する影響

村 上 慶 郎*

研究協力者 岡 崎 隆* 林 英 人* 梁 正 淵*

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィーに対する原因療法的な薬物はまだ開発されておらず、今回作られた蛋白質分解酵素阻害剤であるベスタチンなどは、筋ジストロフィー症の進行するのを遅らせるのが可能かどうか期待されているものである。従来からの研究では、CK などの血清酵素の変動も年単位の経過の評価にはあまり適さないことが判明している。そこで種々の臨床データ、特に運動機能、ADL、CT 等による筋の画像診断等をこの目的のために用いることが試みられている。

運動機能の中では、徒手筋力テスト、握力、立ち上がり時間、10 m 走行時間等がよく用いられている。中でも握力は、筋ジストロフィー症では、手指の筋力かなり末期まで保たれ、歩行不能になっても測定が可能のため、広く用いられている。これは、前腕及び手指の総合筋力として、前述の如く、比較的末期まで測定可能であり、且測定手技が簡単であるためである。

そこで、今回は握力がベスタチンの長期投与によって影響されるかどうかを検討した。

Duchenne 型筋ジストロフィーの握力の経年的変化とベスタチンの効果

日本人の握力の年齢別の正常児の平均についての報告は見られるが、Duchenne 型筋ジストロフィー症の年齢別の平均握力については散見するにすぎない。

そこで、私どもは、本院外来を受診した、未治療の Duchenne 型筋ジストロフィー症の平均握力を測定した。対照となった患者は、4 歳児 4 例、13 歳、15 歳、16 歳の患者はいずれも 5 例、5 歳、6 歳、7 歳、8 歳、10 歳、11 歳、12 歳、14 歳の患者はいずれも 6 例、9 歳の患者が 7 例、計 74 例で全て男性であった。測定した側はいずれも右側の手であった。

握力計は竹井機器製のデジタル握力計 (30 kg まで測定可能で 100 g 目盛り) を使用して、3 回測定し、その最高値を取った (表 1)。

Duchenne 型筋ジストロフィー症の握力の平

表 1 Duchenne 型筋ジストロフィー症の握力の変動 (右)

4 歳 (4 例)	2. 7 ± 2. 14
5 歳 (6 例)	4. 8 ± 1. 83
6 歳 (6 例)	5. 8 ± 1. 40
7 歳 (6 例)	6. 1 ± 2. 02
8 歳 (6 例)	8. 2 ± 3. 81
9 歳 (7 例)	8. 5 ± 4. 12
10 歳 (6 例)	8. 2 ± 3. 81
11 歳 (6 例)	8. 5 ± 4. 12
12 歳 (6 例)	8. 1 ± 4. 30
13 歳 (5 例)	8. 2 ± 4. 91
14 歳 (6 例)	7. 3 ± 4. 80
15 歳 (5 例)	6. 5 ± 4. 86
16 歳 (5 例)	6. 2 ± 5. 01

*国立療養所箱根病院

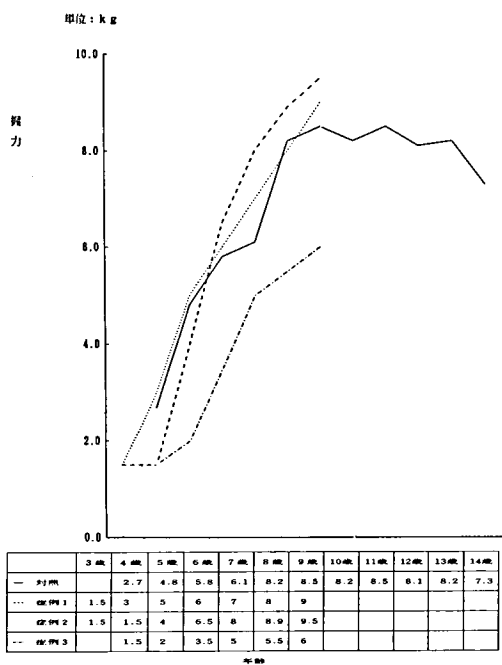


図1 ベスタチンの使用と握力(3—4歳より開始群)①

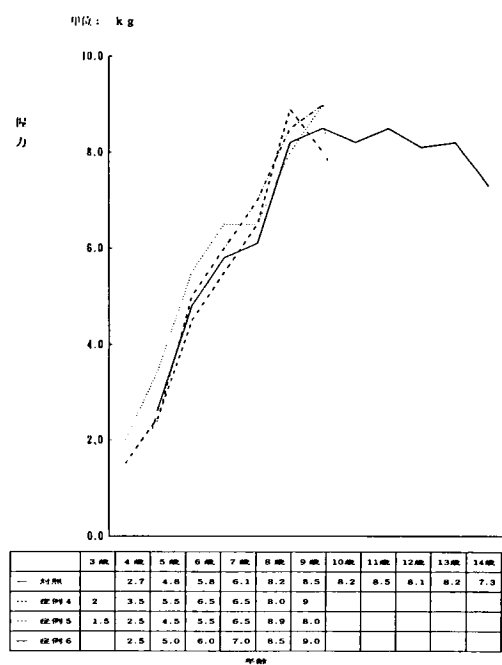


図2 ベスタチンの使用と握力(3—4歳より開始群)②

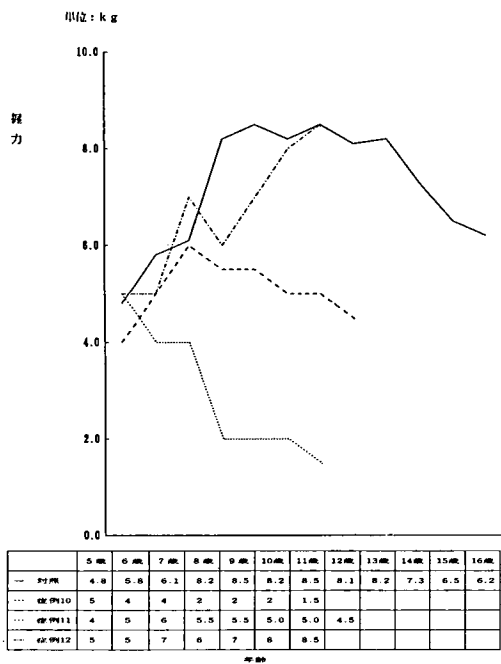


図3 ベスタチンの使用と握力(6歳より開始群)①

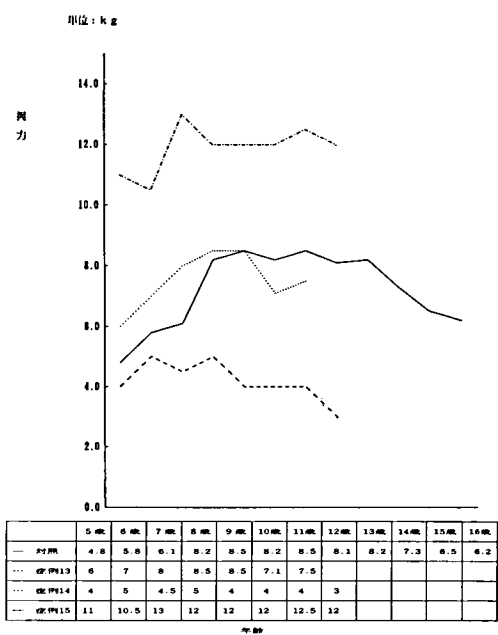


図4 ベスタチンの使用と握力(6歳より開始群)②

均は11歳台で最高となり、以後減少の傾向にあるが個人差も多く、それより高齢まで増加するものもある。

次に、3~4歳からベスタチンの使用を始めたグループと6歳頃からベスタチンの使用を始めたグループとに分け、5~7年後に、握力がどの様に変化したかを検討した。ベスタチンは1日量150mgを投与した。

3~4歳で投与を開始した6症例では、症例1, 2, 5, 6が対照の握力の平均値より上回っていた。また1例(症例5)は8歳までは上回っていたが、9歳で下回った(図1, 2)。

次に6歳でベスタチンを使用し始めた6例では、1例を除いては、いずれも対照を上回らなかった(図3, 4)。

以上、ベスタチンを5~7年間使用した場合3~4歳で使用開始したものと6歳で使用を始めたものとの握力の変化は前者の方が後者よりもベスタチンを使用しない対照に比べて、握力は上回っていた。

なおベスタチンの使用期間中に特別な副作用は認めなかった。

少 括

ベスタチン15mg/日を5~7年間に渡ってDuchenne型筋ジストロフィー症に使用して握力の変動を検討したが、3~4歳から使用開始したグループと6歳から使用を開始したグループでは3~4歳から開始したグループがベスタチンを使用しない対照に比して、握力の低下は遅れる傾向にあった。

1歳8ヶ月からベスタチンを使用開始したDuchenne型筋ジストロフィー症の7年後の経過について

次に1歳8ヶ月からベスタチンを使用開始して、7か年に渡って使用している1例について述べる。この症例は1昨年の本研究班で発表し

た症例のその後の経過である。

症例:1歳6ヶ月で独り立ちの遅れで本院に紹介された。

家族歴では、母親の2人の弟がDuchenne型筋ジストロフィー死亡している。歩行不能には2人とも5~6歳でなっている。1人は本院で18歳で死亡している。

臨床経過は、正常満期産、生下時体重は3000g、1歳7か月で1人立ち可能。

来院時の現症は下肢の近位筋の筋力低下著明で、下肢に仮性肥大が著しい。歩行は数歩可能。体重12kg、血清CKは10830単位。

1歳8ヶ月よりベスタチン投与を開始、1歳9ヶ月頃より歩行が可能になった。しかしよく転んだ。

その後の経過は表2のごとくで、現在は小学校2年に在学中。階段は手摺が必要、とはん性起立である。

母親は弟たちに比べて歩行期間が長いと言っている。

表2 ベスタチン投与後の運動機能, ADLの変化(1歳8か月より開始)

投与前	投与前	6ヶ月後	12ヶ月	18ヶ月	24月	36月	42月	54月	60月	76月	72月	78月
ベスタチン mg	600	900	600	900	300	150	150	150	150	150	150	150
立ち上がり時間, 秒	4.8	5.1	3.6	2.9	2.05	2.57	2.83	3.24	4.31	4.36	5.52	
握力(右) kg						2	3	6	5.5	6	7.5	
バーチカル指数	65	65	85	90	90	95	95		95	95	95	95
体重 kg	12	14	16	16.5	19	20	21		22	24	25	

おわりに

ベスタチンの6~7年間の長期投与はDuchenne型筋ジストロフィー症に対して効果は見られないようであるが、しかし、私どもの早期からの使用の結果と1歳8ヶ月からの使用の例から見るとやや進行を遅らしているようにも思われる。従来の動物実験の結果等からしても、生後できるだけ早くベスタチンの使用を開始すれば多少の効果が見られるかも知れない。

Duchenne 型筋ジストロフィー症幼児例における運動機能 —ベスタチン二重盲検例を中心に—

福 山 幸 夫 *

研究協力者 大 沢 真木子* 齋 藤 加代子* 平 沢 恭 子*
炭 田 沢 子* 池 中 晴 美* 新 井 ゆ み*

近年筋ジストロフィー症の診断年齢が低下し、乳児期診断例も増加してきた。また幼若例を対象とした新薬の治療も試みられている。一方、薬効判定の基準となる自然歴がなく、薬効評価をどのように行うかが1つの課題になっている。

我々は、過去1年間 Duchenne 型筋ジストロフィー症に対する NK 421 の第Ⅲ相二重盲検試験に参加し、その例に於ける真薬、偽薬の別が今回明らかになったので、投薬後の両群に於ける運動機能変化につき検討した結果を報告し、さらに過去の NK 421 服用経験例と非経験例の日常動作所要時間についても報告する。

A. 二重盲検試験

1. 対象：表1に示すごとく NK 421 使用例5例、プラシーボ群5例である。新薬の1例は途中で転院のため脱落した。プラシーボ群に含まれている両足跳躍2cm可能な例は抗ジストロフィン抗体染色にて生検筋が染色されず、Duchenne 型であることを確認した。

2. 方法：対象例の日常動作所要時間の測定、動作様式の観察、筋力テストおよび血清 GOT, GPT, CPK 測定などを投薬開始前8週間より4週毎に投与後52週まで行った。全体の結果は別に報告される予定であるので、ここでは日常動作所要時間についてのみ述べる。

日常動作所要時間は投薬開始以前の値で最も短いものを基礎値とし、その値からの変動を見

表1 二重盲検登録症例

症例	開始時		Gowers 徴候	過去の 使用経験	歩行開始 年齢	両足 跳躍	終了時 stage
	年齢	stage					
B.H.T	4:11	2, II-13	+	無	2:00	0	脱落
B.H.O	3:06	2, II-13	+	有	1:06	0	2, II-14
B.D.N	3:02	2, II-15	+	無	1:06	0	2, II-15
B.Y.K	2:10	2, II-13	+	有	1:03	0	1, I-1
B.T.S	2:00	3, III	+	無	1:05	0	2, II-13
P.H.K	6:01	2, II-13	-	無	1:04	0	2, II-14
P.K.Y	3:07	2, II-15	+	無	1:03	0	2, II-13
P.H.M	3:00	2, II-13	-	無	1:03	2cm	1, I-1
P.Y.S	2:09	2, II-13	-	無	1:10	0	2, II-15
P.S.O	2:07	3, III	+	有	1:04	0	2, II-15

た。

3. 結 果

1) ステージの変化：表1に示すごとく治験終了時のステージは、真薬群で低下1/4例、不変1/4例、上昇2/4例、偽薬群で順に2/5例、0/5例、3/5例で、両群間に特に差は認められなかった。

2) 日常動作所要時間

a. 10m 走行：図1に投与開始後の基礎値からの変動を示した。投与開始後の変動幅は偽薬例は-3秒から+2秒にと小さいが、真薬例の方は-10秒から1秒の変動を示していた。図2に変動の平均±SDを示したが、投与開始後12週、および36週から48週では真薬例の方が偽薬群よりも所要時間がより短縮している。

b. 床からの立ち上がり時間

同様に投与開始後の所要時間の変化を図3に示した。真薬投与例では投与開始後の所要時間の変動は一定の傾向を示さなかった。平均±SD

*東京女子医科大学小児科

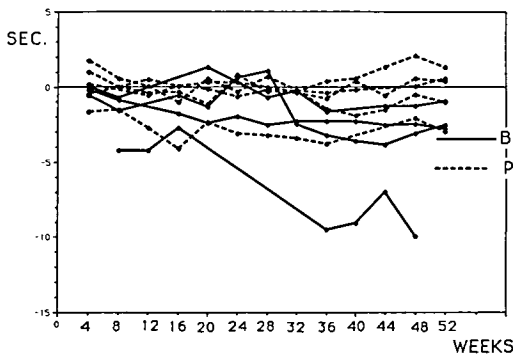


図1 10 m 走行所要時間の投与開始後の変化 (破線はブラシーボ例, 実線はベスタチン投与例)

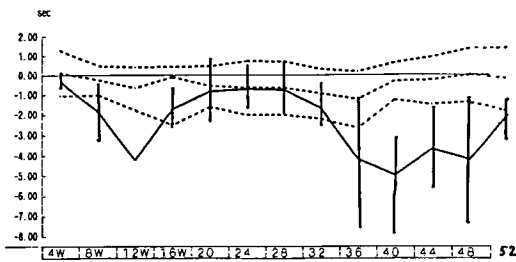


図2 10 m 走行所要時間の投与開始後の変化 (平均±SDの範囲を示す)。(破線はブラシーボ例, 実線はベスタチン投与例)

でみると図4のようになり, 投与開始後28週の時点で真薬例の所要時間の方が短い傾向を示したが, 他の時点では所要時間はむしろ真薬例の方でより延長する傾向を示していた。

B. Duchenne型筋ジストロフィー症に於ける日常動作所要時間

1. 対象並びに方法: 対象は東京女子医大小児科を1974年以降1989年12月までに受診し, 10 m 走行時間, 床からの立ち上がり時間を測定したことのある【いわゆる Duchenne 型筋ジストロフィー症】の症例計32例である。これらの例の同動作観察年齢は症例ごとに異なるが1歳から10歳6ヵ月に及ぶ。

これらの症例を両足跳躍の可否(高さ5 cmの箱を飛び越えられるか否か), 頸部の前屈筋の筋力が3以上あるか否かで検討すると, 26例が

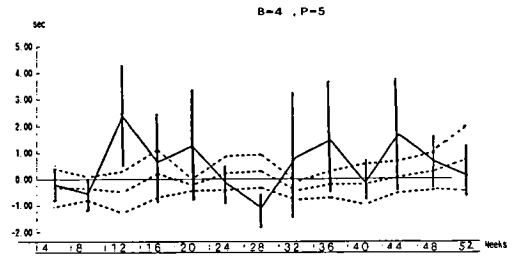


図3 床からの立ち上り所要時間の投与開始後の変化

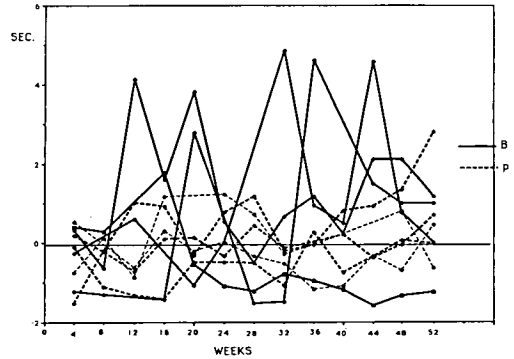


図4 床からの立ち上り所要時間の投与開始後の変化 (平均±SD), (実線はベスタチン, 破線はブラシーボ)

同不能, 6例が可能であった。前者を典型例, 後者を良性例として扱った。これらの症例を過去のベスタチン投与歴の有無で分け, 測定した10 m 走行所要時間および床からの立ち上がり時間を歴年齢半年毎に抽出し平均±標準偏差を計算した。

2. 結果 (表2)

1) 10 m 走行所要時間

表2に示すごとく, Duchenne型典型例では5歳時に最も短く, これはベスタチン使用例も非使用例も差がなかった。これに対し良性例では7歳時に最も短い傾向を示した。

また, 10 m 走行が患児なりに明らかに遅くなり始める年齢は, 典型例では7歳, 良性例では10歳であった。

2) 起立所要時間

Duchenne型典型例では4, 5歳時で最も短

表2 年齢別各動作所要時間の平均

年 齢 別		起 立					10m 走行						
		正常児	全 体	Duchenne Bestatin使用例	非使用例	症 状 Bestatin使用例	症 状 非使用例	正常児	全 体	Duchenne Bestatin使用例	非使用例	症 状 Bestatin使用例	症 状 非使用例
1歳	所発秒数	3.27±0.42 (11)	8.5 (1)					8.40±2.33 (1)	10				
1歳6ヵ月	所発秒数		5.83±1.85 (3)						11.5 (1)				
2歳	所発秒数	3.00±0.86 (19)	4.40±0.78 (5)					4.42±1.17 (20)	15.15±3.15 (15)				
2歳6ヵ月	所発秒数		4.51±0.66 (8)						8.8±1.2 (3)				
3歳	所発秒数	2.32±1.32 (22)	5.92±1.80 (9)	5.50±1.15 (4)	4.4 (1)			3.83±0.52 (22)	8.01±1.30 (7)	8.01±2.43 (7)			
3歳6ヵ月	所発秒数		5.40±2.24 (12)	5.95±2.42 (9)	3.58±0.68 (3)				8.47±2.20 (12)	8.75±2.30 (12)	7.64±1.57 (12)		
4歳	所発秒数	1.71±0.40 (24)	5.09±2.18 (11)	5.30±2.48 (8)	3.30±0.43 (3)			3.25±0.29 (25)	7.21±1.85 (11)	7.42±2.12 (9)	6.67±0.40 (2)		
4歳6ヵ月	所発秒数		5.43±2.52 (12)	5.66±2.76 (9)	4.25±1.86 (3)				6.27±1.70 (11)	6.43±1.84 (9)	5.57±0.23 (2)		
5歳	所発秒数	1.76±0.45 (14)	5.72±3.01 (10)	6.1±3.4 (9)	5.11±0.11 (3)	5.20 (1)		3.64±0.30 (20)	5.67±1.27 (11)	5.63±1.18 (11)	5.19±1.81 (2)	5.00 (1)	
5歳6ヵ月	所発秒数		5.52±1.92 (12)	5.11±1.44 (9)	8.35 (1)	3.40±0.2 (1)			5.96±1.47 (11)	6.24±1.46 (9)	4.66±0.55 (2)	3.92±0.35 (2)	
6歳	所発秒数	1.51±0.27 (20)	6.15±2.60 (14)	6.23±2.27 (13)	6.23 (1)	3.55±0.25 (2)	2.33±0.35 (2)	2.94±0.16 (14)	6.06±1.06 (11)	6.19±1.07 (9)	5.0 (1)	3.92±0.10 (2)	2.0 (1)
6歳6ヵ月	所発秒数		8.32±7.71 (14)	7.44±3.17 (12)	8.37 (1)	3.20±0.4 (2)	3.0±0.9 (2)		6.96±0.87 (10)	6.19±0.86 (9)	5.25 (1)	4.0±0.00 (1)	2.3 (1)
7歳	所発秒数		13.37±12.81 (14)	13.68±13.25 (13)	0.06 (1)	4.0±1.3 (2)			7.10±1.10 (13)	7.06±1.15 (13)	7.33 (1)	3.8±0.20 (2)	
7歳6ヵ月	所発秒数		12.80±5.82 (15)	18.66±22.5 (13)	27.29 (1)	4.15±1.85 (2)	5.85±3.14 (2)		8.58±1.82 (14)	8.50±1.88 (13)	8.35 (1)	3.9±0.30 (2)	
8歳	所発秒数		24.62±13.12 (12)	29.21±24.45 (13)		5.35±2.65 (2)	13.0±0.0 (2)		8.94±1.92 (12)	8.65±1.94 (12)	6.02 (1)	5.65±1.85 (2)	
8歳6ヵ月	所発秒数		54.0±32.74 (9)	59.58±34.45 (8)		8.20±5.20 (2)	15.00 (1)		10.75±1.53 (9)	10.75±1.53 (9)		5.4±1.40 (2)	
9歳	所発秒数					12.4±0.1 (2)	不能					5.2±1.70 (2)	
9歳6ヵ月	所発秒数					51.55±48.45 (2)						8.0±2.00 (2)	
10歳	所発秒数					4.8 (1)						6.5±2.75 (2)	
10歳6ヵ月	所発秒数											7.70±3.60 (2)	

く、これはベスタチン使用例も非使用例も差がなかった。これに対し良性例では6, 7歳時に最も短い傾向を示した。

また、床からの立ちあがり明らかに困難になり始める年齢は、典型例では6歳半-7歳で、何か物に掴まらなければ立ちあがれなくなるのが7歳6か月で1例、8歳で1例、8歳6か月で5例、9歳で3例、9歳6か月で1例で、それ以降可能な例は1例もない。ベスタチン非使用例の例数が少ないので比較はできないが、使用例、非使用例の間に特に差は認められなかった。

良性例では8歳頃より立ち上がりが困難になりはじめるが、10歳過ぎた現在でも可能な例もある。

3. 考 察

Duchenne型筋ジストロフィー症は、生下時からすでに発病しているが、その後遅れながらも発達し運動機能を獲得し6歳頃から機能低下が目だってくるといわれてきた。しかしながら近年、新薬開発が進み、より幼児児において治療が行なわれるようになると、それらの症例において薬効を短期間に判定するための詳細な基礎データがないことが問題となってきた。

昨年我々は、これら治験で使用される日常動作所要時間と動作様式発達パターンの正常児に

おける基礎値を求め報告し、最も誘発しやすい日常動作は10m 走行、起立動作であり同所要時間測定が最も有効であろうと報告した。その結果をふまえて今回は10m 走行、起立動作を検討した。

2重盲検試験の結果では、ベスタチン使用例と非使用例で10m 走行では前者の方が所要時間が短縮する傾向にあったが、起立所要時間はむしろ後者の方が良い傾向を示しベスタチンが有効とはいえなかった。起立動作と10m 走行では前者で使用する筋は主に軀幹の筋であり、後者よりは本症患者にとってより早期に困難となる動作である。したがってあまり進行の進んでいない筋に対しては一時的に有効であるということとは否定できない。

過去にベスタチンを服用したことのある例と非使用例において、10m 走行、床からの立ち上がり時間を見たが特定の傾向は認められなかった。しかしながら10m 走行所要時間と、床からの立ち上がり所要時間が最も短い年齢は前者が5歳、後者が3~4歳と異っており、今後治療効果を見る時には運動の種類と年齢を考慮する必要がある。今回集積したデータは今後治療の際などに比較データとして使用できると思われる。

Duchenne 型筋ジストロフィーに対する ベスタチンの効果に関する研究

— 一年少児及び年長児に対する二重盲検試験の比較 —

木 下 真 男*

研究協力者 里 吉 栄二郎** 村 上 慶 郎*** 三吉野 産 治****
福 山 幸 夫† 西 谷 裕†† 高 橋 桂 一†††

Duchenne 型筋ジストロフィーに対するベスタチンの効果を研究する動きは、臨床試験としては既に昭和 56 年¹⁾から行われており、全国規模でのオープン試験を経て、昨年度から二重盲検試験を行った。参加施設は表 1 に示す通りで、症例は 3 歳以下、3~5 歳の二群に層別し、以下の方法で実施した。

表 1 参加施設

国立療養所八雲病院	国立療養所刀根山病院
北海道社会事業協会帯広病院	国立療養所西奈良病院
国立療養所西多賀病院	神戸市立中央市民病院
国立療養所岩木病院	鳥取大学医学部
国立療養所箱根病院	国立療養所原病院
国立精神神経センター	国立療養所徳島病院
東邦大学医学部大橋病院	高知医科大学
東京都立神経病院	高知県立子鹿園
東京女子医科大学	国立療養所西別府病院
国立療養所鈴鹿病院	福岡大学医学部
浜松医科大学	福岡市立子供病院
福井医科大学	久留米大学医学部
岡崎市立岡崎病院	熊本大学医学部
名古屋市立東市民病院	大分医科大学
国立療養所兵庫中央病院	国立療養所沖縄病院
国立療養所宇多野病院	(以上 31 施設)

方 法

対象は 3 歳以下、3~5 歳の二群で、独歩可能な Duchenne 型筋ジストロフィー診断確定者。被検薬はベスタチンドライシロップ 1 日 1 回 50 mg 内服。対照薬はマンニトール。投与期間は 52 週間。

効果判定には図 1 に示すような観察項目を用い、それぞれの項目について経時的変化を調べた。また副作用についても同図左側に示すような観察を行った。

成 績

対象とした症例は表 2 に示す通りで、最終的には計 101 例に対して治験を行った。

図 2 以下に成績の主なものを示すが、それらのうち、分散分析の結果では若年群の階段昇り時間 (図 2)、GOT (図 4)、CPK (図 5) の変化において実薬群で有意に改善の成績を示した。全体としては表 3 に示すように若年群の総合改善度が、実薬 61%、プラセボ 44% と実薬群でより改善を示す例が多かった。しかし推計学的には有意でなかった。

考 按

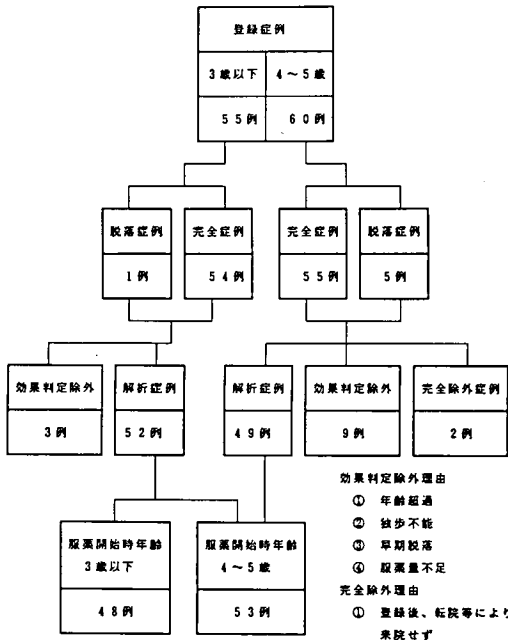
ベスタチンの本症に対する効果としては、前回のオープントライアルでも、5 歳未満の患児において階段昇降姿勢、頸筋、股関節筋などの筋力の改善を認め、また 20 m 直進歩行、階段昇降、仰臥位から起坐までの時間などの短縮を認

* 東邦大学医学部大橋病院
** 国立精神・神経センター神経研究所
*** 国立療養所箱根病院
**** 国立療養所西別府病院
† 東京女子医科大学小児科
†† 国立療養所宇多野病院
††† 国立療養所兵庫中央病院

氏名	性別	年齢	登録年月	経過観察表
鈴木 太郎	男	3歳	1985.10	経過観察表
田中 花子	女	4歳	1986.05	経過観察表
山本 一郎	男	5歳	1987.03	経過観察表
佐藤 美香	女	4歳	1988.01	経過観察表
高橋 健太	男	5歳	1989.06	経過観察表
中村 真由	女	4歳	1990.02	経過観察表
北村 大輔	男	5歳	1991.08	経過観察表
藤田 由美	女	4歳	1992.04	経過観察表
石川 光太郎	男	5歳	1993.09	経過観察表
渡辺 悠香	女	4歳	1994.03	経過観察表
菅原 拓也	男	5歳	1995.07	経過観察表
小林 結衣	女	4歳	1996.01	経過観察表
佐々木 龍一	男	5歳	1997.05	経過観察表
新井 明日香	女	4歳	1998.09	経過観察表
吉川 直樹	男	5歳	1999.02	経過観察表
加藤 舞子	女	4歳	2000.06	経過観察表
山崎 隼人	男	5歳	2001.10	経過観察表
長谷川 結衣	女	4歳	2002.04	経過観察表
石川 光太郎	男	5歳	2003.08	経過観察表
渡辺 悠香	女	4歳	2004.01	経過観察表
菅原 拓也	男	5歳	2005.05	経過観察表
小林 結衣	女	4歳	2006.09	経過観察表
佐々木 龍一	男	5歳	2007.02	経過観察表
新井 明日香	女	4歳	2008.06	経過観察表
吉川 直樹	男	5歳	2009.10	経過観察表
加藤 舞子	女	4歳	2010.03	経過観察表
山崎 隼人	男	5歳	2011.07	経過観察表
長谷川 結衣	女	4歳	2012.11	経過観察表
石川 光太郎	男	5歳	2013.04	経過観察表
渡辺 悠香	女	4歳	2014.08	経過観察表
菅原 拓也	男	5歳	2015.12	経過観察表
小林 結衣	女	4歳	2016.05	経過観察表
佐々木 龍一	男	5歳	2017.09	経過観察表
新井 明日香	女	4歳	2018.02	経過観察表
吉川 直樹	男	5歳	2019.06	経過観察表
加藤 舞子	女	4歳	2020.10	経過観察表

図1 経過観察表

表2 対象症例



階段昇り時間

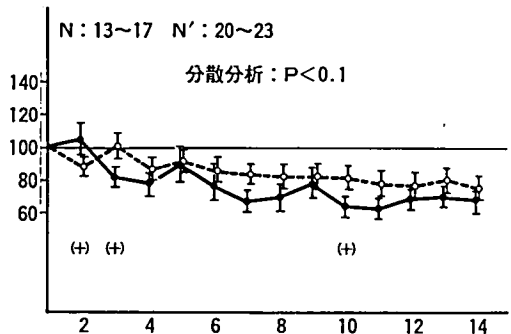


図2 若年者群，階段昇り時間・実線（実薬群）の方が点線（プラセボ群）より時間が有意に短縮している。

階段降り時間

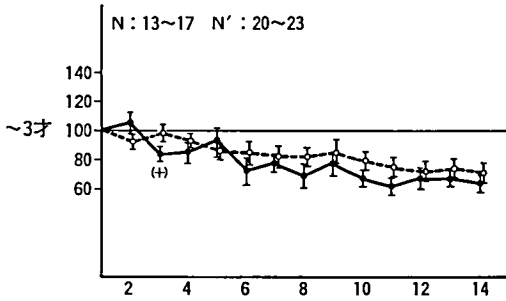


図3 階段降り時間, 全体としては有意差はないが, 実薬群が短縮傾向にある。

LDH

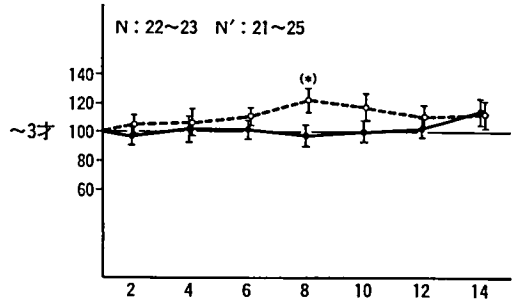


図6 同CPK, 全体としては有意差はないが(一部で有意*), 全体として実薬群が低値の傾向にある。

GOT

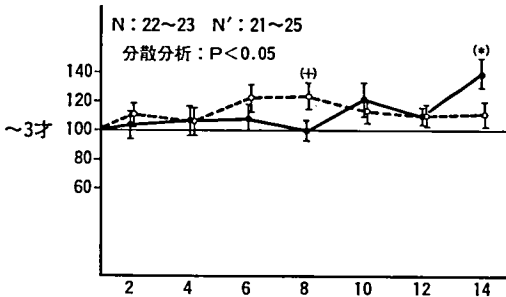


図4 同血清 GOT, 全体として実薬群の方が低値を示している。

CPK

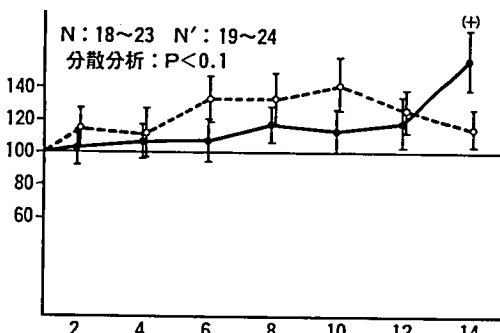


図5 同CPK, 同様に実薬群が低値を示している。

表3 総合改善度

層別	薬剤名	改善	程度改善	不変	程度悪化	悪化	計	改善率 (>軽改)	χ^2 -検定
3歳以下	HK-421	1例	13例	8例	1例	0例	23例	61%	N.S.
	734F	0例	11例	12例	2例	0例	25例	44%	
4~5歳	HK-421	1例	7例	13例	3例	2例	26例	31%	N.S.
	734F	0例	10例	13例	3例	1例	27例	37%	

の結果, 僅かに幾つかの項目で若年児群で本剤がプラセボに勝る結果を得た。しかし, その効果は部分的であり, 疾患治療薬としての意義を認めてまでには至らないように考えることができる。また副作用については表4に示す通りで, 本剤の安全性には全く問題はないと考えられた。ベスタチンについては10年を越す治験活動が行われてきたが, 今回の二重盲検試験を以って一応の終結とすることが妥当と考えるに至った。

結 語

1. 3歳未満, 3~5歳の二群について, Duchenne型筋ジストロフィーに対するベスタチンの効果を二重盲検法により比較した。
2. 若年者群において, 階段昇り時間, 血清GOT, CPKの年間推移がベスタチン群の患児で良好な成績が得られた。
3. 総合改善度についても, 若年者群でベスタ

めた²⁾。このことから本剤が若年患児ほど効果を示す可能性を考えて, 今回は更に若年とし, 3歳未満, 4~5歳児に分けて治験を行った。そ

表4 副作用症状

薬剤名	症例番号	症 状	発現率	χ^2 -検定
NK421	33	嘔吐	12%	N. S.
	39	嘔吐・軟便・腹痛		
	64	嘔気		
	65	発疹		
	75	嘔吐・下痢・発熱		
	78	嘔吐・下痢		
106	下痢			
プラセボ	23	嘔吐・下痢	9%	
	74	皮膚掻痒感		
	76	嘔吐・下痢・発熱		
	77	下痢・食欲不振		
	84	口角炎・発疹		

チン群が良好な成績を示したが、推計学的に有意な差には至らなかった。

4. 本剤が若年者の方に有効である可能性が示唆された。
5. 本剤に起因すると考えられる副作用はなか

った。

6. Ducheene 型筋ジストロフィーの治療剤として、本剤が高い有用性を有するという成績は得られなかった。

文 献

- 1) 木下真男, 川崎研一, 山田信行, 亀井敦行: 筋障害に対するベスタチン・ロイペプチンの影響—実験的及び臨床的研究, 厚生省新薬開発研究費, 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療剤(ロイペプチン)の開発研究, 昭和56年度研究報告書, 1982, p.p. 77—83.
- 2) 木下真男, 里吉栄二郎, 福山幸夫, 三吉野産治, 村上慶郎: Duchenne 型進行性筋ジストロフィーに対するベスタチンの効果, 厚生省新薬開発研究費, 低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究, 昭和61年度研究報告書, 1987, p.p. 127—133.

分 担 研 究 者 一 覽

低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究班・班員名簿

氏名	所属	所在地	電話番号
班長 江橋 節郎	岡崎国立共同研究機構 生理学研究所	444 岡崎市明大寺西郷中38	0564-53-7345 (直)
幹事 青柳 高明	微生物化学研究所 酵素研究部	141 品川区上大崎 3-14-23	03-441-4173
幹事 木下 真男	東邦大学医学部大橋病院 第四内科	153 目黒区大橋 2-17-6	03-468-1251
幹事 勝沼 信彦	徳島大学酵素科学研究センター	770 徳島市蔵本町 3-18-15	0886-31-3111 内2550
監事 福原 武彦	東京慈恵会医科大学 第二薬理学教室	105 港区西新橋 3-25-8	03-433-1111 内2255
運営 幹事 杉田 秀夫	国立精神・神経センター 神経研究所	187 小平市小川東町 4-1-1	0423-41-2711 内5101
班員 丸山 工作	千葉大学理学部生物学科	260 千葉市弥生町 1-33	0472-51-1111 内2622
班員 大倉 洋甫	九州大学薬学部 薬品分析化学教室	812 福岡市東区馬出 3-1-1	092-641-1151 内6151
班員 辻 繁勝	和歌山県立医科大学 第二生理学教室	640 和歌山市 9番丁9	0734-31-2151 内319
班員 福山 幸夫	東京女子医科大学 小児科教室	162 新宿区河田町 8-1	03-353-8111
班員 三吉野産治	国立療養所西別府病院	874 別府市大字鶴見 4548	0977-24-1221
班員 村上 慶郎	国立療養所箱根病院	250 小田原市風祭 412	0465-22-3196
班員 鈴木 紘一	東京都臨床医学総合研究所 遺伝情報研究部	113 文京区本駒込 3-18-22	03-823-2101
班員 川島 誠一	東京都老人総合研究所 生化学部臨床第一研究室	173 板橋区栄町 35-2	03-964-1131 内3068
班員 向山 光昭	東京理科大学 理学部化学教室	162 新宿区神楽坂 1-3	03-260-4271 内268
班員 大関 正弘	大正製薬(株) 総合研究所	330 大宮市吉野町 1-403	0486-63-1111 内351
班員 矢崎 義雄	東京大学医学部第三内科	113 文京区本郷 7-3-1	03-815-5411 内8274, 8278
班員 宮武 正	新潟大学脳研究所神経内科	951 新潟市旭町通一番町 757	0252-23-6161 内5180
班員 石原 傳幸	国立療養所東埼玉病院 第三内科	349-01 蓮田市大字黒浜 4147	0487-68-1161
班員 西谷 裕	国立療養所宇多野病院	616 京都市右京区 鳴滝音戸山町 8	075-461-5121
班員 高橋 桂一	国立療養所兵庫中央病院	669-13 三田市大原 1314	07956-3-2121
班員 中野 今治	東京大学医学部脳研病理	113 文京区本郷 7-3-1	03-815-5411
班員 春原 経彦	国立精神・神経センター 武蔵病院放射線診療部	187 小平市小川東町 4-1-1	0423-41-2711
班友 石井 靖男	日本化薬株式会社	102 千代田区富士見町 1-11-2	03-237-5154
班友 岩城 正広	鳥居薬品株式会社	272 市川市南八幡 3-14-3	0473-78-4121
顧問 今堀 和友	三菱化成生命科学研究所	194 町田市南大谷 11	0427-26-1211