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２年度研究報告書

平成３年３月

研究報告書の作成にあたって

今年は、五年間に亘った「低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究」班の最終年度であり，ベスタチン及びEST，特に後者の二重盲検法による薬効判定に重点がおかれた．ジストロフィン発見によって招来された筋ジストロフィー研究の新時代において本研究班を推進することの意義は，前回及び前々回の報告書冒頭に記された通りであるが，ジストロフィン研究の進展に伴い，遺伝子欠損状況，及びそれと病状との関係が複数多岐に亘り，遺伝子治療への道は当初考えられた程平坦でないことが明らかになりつつある．他方，この線に沿った我々の希望が，いつの日か実現することもまた疑いのないところである．このような情勢の下においては，筋崩壊阻止という対症的治療法の追求は，却って緊急性を増大したというべきであろう．

今回の二重盲検法による結果の厳密な解析は更に時間を要するが，この様な解析を必要とすること自体，上記2物質が，実地に応用する対症療法薬としては理想から程遠いものであることを示している．しかし，今回の判定に際してとられた調査方法は，統計学的，臨床医学的な規準と，現場における実務的な要請とを見事に調和させたものであり，従来の薬効判定法が，瑣瑣にすぎて現実性に乏しく，結果として有効例を見落した場合もありうることを深く反省するものである．本研究班の成果に更に改良を加えることにより，筋ジストロフィーのみならず，広く難病一般の治療における薬効判定の標準モデルが確立されることが期待される．

平成3年3月

主任研究者　江　橋　節　郎

目　　次

I　分担研究報告

1）マルチキャタリティックプロティナーゼの構造と機能……3
国立精神・神経センター神経研究所　杉田　秀夫　石浦　章一　田川　一彦
野村　泰広　安楽　治美
東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部　鈴木　紘一

2）筋ジスマウスにおけるジペプチジルペプチダーゼ（DPP）活性の動態……7
微生物化学研究所　青柳　高明　和田　孝雄　小島　蕗子
永井真知子　原田　滋子
実験動物中央研究所　斉藤　宗男

3）CANP 遺伝子のクローニングに関する研究……11
東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部　鈴木　紘一　西道　隆臣　川崎　博史
羽田　明子　大野　茂男

4）細胞の増殖・分化と CANP……13
東京都老人総合研究所　川島　誠一　中村　愛

5）CANP 阻害剤の合成……16
東京理科大学理学部　向山　光昭　植木　正彬
大正製薬㈱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

6）E-64-C および EST の薬物動態……19
—LC／MS による精密計測の基礎研究—
九州大学薬学部　大倉　洋甫　甲斐　雅亮　高橋　利明

7）CANP 阻害剤の一般薬理学的研究……23
—筋ジストロフィー疾患モデル動物筋電図の定量的スペクトル解析に基づく薬効評価法—
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）骨吸収疾患モデルに対するE-64誘導体の効果……26
徳島大学酵素科学研究センター　勝沼　信彦　唐渡　孝枝　二川　健
大正製薬㈱総合研究所　村田　充男　玉井　正晴　花田　和紀
横尾　千尋

9）ジストロフィンの分子形態……28
千葉大学理学部生物学科　丸山　工作　佐藤　治

10) ミエリン膜局在のCaの依存性プロテアーゼ活性に対する各種脂質の影響 ……30
和歌山県立医科大学第二生理学教室　辻　繁勝

11) mdx mouseに対するbestatinの週2回間歇投与の効果……33
—電気生理学的及び病理学的検討—
東邦大学医学部第四内科　木下　眞男　岸　雅彦　吉村　牧子
栗原　照幸　根本　博之　日高　隆信

12) DMDにおける筋障害の進行過程 ……37
—CTによる2年間の経時的評価
国立療養所東埼玉病院　石原　傳幸　里宇　明元　江端　広樹
道免　和久　青柳　昭雄　儀武　三郎

13) 培養神経細胞に及ぼす自己免疫筋抗原（SE-antigen）の作用の検討 ……41
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
＊岐阜薬科大学分子生物

14) 比較的良好な経過を示したいわゆるDuchenne型筋ジストロフィーの臨床特徴……43
東京女子医科大学小児科　福山　幸夫　大沢真木子　池谷紀代子
平沢　恭子　新井　ゆみ　須加原信子
池中　晴美　炭田　沢子　斎藤加代子
宍倉　啓子　鈴木　暘子
国立精神・神経センター神経研究所機能研究部　小沢鉄二郎

15) ベスタチンのDuchenne　PMD投与に対する免疫グロブリンの変動 ……46
国立療養所箱根病院　村上　慶郎　岡崎　隆　西岡　昌紀

16) EST投与対象の1症例における臨床的背景について ……48
国立療養所西別府病院　三吉野産治
八代綜合病院小児科　山田みどり

17) サンドイッチ法による骨格筋ミオシン軽鎖測定法の開発とキット化の試み……52
東京大学医学部第三内科　矢崎　義雄　永井　良三　加藤　裕久
国立精神・神経センター神経研究所　杉田　秀夫

18) Duchenne型筋ジストロフィー症患者の新しい理学的評価法 ……56
—その意義と問題点—
東京大学医学部脳研病理　中野　今治
国立精神・神経センター神経研究所　杉田　秀夫
国立療養所東埼玉病院　石原　傳幸　熊井　初穂　浅野　賢
国立療養所下志津病院　藤村　則子　土佐　千秋　石沢　真弓
松村喜一郎
新潟大学脳研究所神経内科　桑原　武夫
国立療養所新潟病院　近藤　隆春　水野　京子　山崎　元義
国立療養所医王病院　崎田　朝保　本家　一也　武田　洋子
国立療養所南九州病院　幸福　圭子　福永　秀敏
大正製薬㈱開発部　藤田　繁　青木　寛　篠　由美子

19) ESTのDuchenne型筋ジストロフィーに対する臨床効果に関する研究 ……58
—Scalographic analysisによる薬効判定法—
国立療養所東埼玉病院　石原　傳幸
東京医科歯科大学難治疾患研究所　佐久間　昭
東京大学医学部脳研病理　中野　今治
国立療養所新潟病院　山崎　元義
国立療養所医王病院　本家　一也
国立療養所南九州病院　福永　秀敏
新潟大学脳研究所神経内科　宮武　正
国立精神・神経センター神経研究所　杉田　秀夫
大正製薬㈱開発部　藤田　繁　青木　寛　篠　由美子

20) デュシェンヌ型進行性筋ジストロフィー症に対するESTの臨床効果 ……64
—二重盲検試験結果報告—
新潟大学脳研究所神経内科　宮武　正　山崎　元義

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 ……69

分担研究報告

マルチキャタリティックプロテイナーゼの構造と機能

杉田秀夫*

研究協力者　石浦章一*　田川一彦*　野村泰広*
安楽治美*　鈴木紘一**

はじめに

マルチキャタリティックプロテイナーゼ(MCP)はインゲンシン，プロテアソームとも呼ばれる細胞質中の高分子量タンパク分解酵素で，サブユニット20数個から成り立つ巨大分子である．その特徴の1つは，多くの活性部位を持つことで，ArgのC末端を水解するトリプシン活性やTyrのC末端側を水解するキモトリプシン活性をあわせ持つことが知られている[1]．

今回，我々はCANP阻害剤として開発されたE-64アナログ並びにFD-056誘導体[2]の一部がMCP活性を阻害することを見出した．また，活性部位がサブユニットに分散しているのか，という点についても若干の知見を得たので報告する．

実験方法

(1) MCPの精製

MCPは従来の方法によって均一に精製した．方法は，硫安沈殿，DEAE-セルロース，ハイドロキシアパタイト，G-4000によるゲルろ過，並びにブルーセファロースである．材料は，ヒト赤血球，酵母ともに新鮮なものを用いた。

(2) 阻害活性の測定

ヒト赤血球MCPを用い以下のように阻害活性を測定した．MCP 50 unitと阻害剤（DMSOに可溶化し，DMSOで希釈したもので，DMSOの最終濃度は2％以下とした）を加え，37°C 30分間インキュベートした．5％SDSにて反応を停止させた後，遊離したアミノメチルクマリンを蛍光光度計にて定量した．

結果並びに考察

表1にFD-056誘導体の阻害効果を示す．MCP活性はトリプシン型(Boc-Leu-Arg-Arg-MCA，BLRR)，キモトリプシン型(Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA，SLLVY）及びメチオニンエンドペプチダーゼ型（Z-Val-Lys-Met-MCA, ZVKM）に分けて測定したものである．また比較のため，細胞質酵素の代表例の1つであるプロリルエンドペプチダーゼ[3]の値も示してある．これらロイシナール誘導体は低濃度でMCPのキモトリプシン活性を抑制することがわかる．最も効果があったのはAc-Asp（$OB_z l$）-Glu（$OB_z l$）-Leu-Hで，IC_{50}は1 μM以下であった．興味ある点はメチオニンエンドペプチダーゼ活性もこれら化合物で阻害されることで，トリプシン活性には全く影響がないことと

表1　FD-056類縁体（F-64アナログ）によるMCPとPEPの活性阻害(1)
Leuアナログの阻害活性はIC_{50}(μM)で表してある．

Reagent	SLLVY	BLRR	ZVKM	PEPase
Ac-Asp(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-H	0.80	>100	0.71	15
Z-Asp(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-H	0.66	>100	2.1	>100
Ac-Asp(OMe)-Glu(OBzl)-Leu-H	2.5	32	5.2	76
Ac-Asp(OBzl)-Glu(OMe)-Leu-H	5.4	>100	27	42
Ac-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Leu-H	20	>100	6.4	130

*国立精神・神経センター神経研究所
**東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部

好対照を示した．この値はCANPに対する値よりも小さく，CANPよりもMCPにより強く作用する可能性が考えられた．

次に，ロイシナール部分を他のアミノ酸に置換した化合物群の作用を検討した（表2）．ここでは表1よりも強力なMCP阻害物質は見つからなかったが，プロリナールを持つ物質がプロリルエンドペプチダーゼを特異的に阻害するという結論を得た．IC_{50}は52 μMとかなり強力な阻害物質であることが判明した．

昨年来，CANPインヒビター（カルパスタチン）の活性部位のアミノ酸数個とE-64の中心となっているエポキシコハク酸を結合させてより特異的なCANP阻害剤を合成する計画が進められている[2]．本年度はこれらCAシリーズの阻害剤がMCPを阻害するかどうか検討したところ，Tyr-Arg (NO_2)，Pro-Pro, Tyr-Arg, Thr-Ileの4種のペプチドを含む阻害剤は全くMCPを阻害しないことが判明した。

表2　FD-056類縁体によるMCPとPEPの活性阻害(2)
表1でLeucinalの代わりに種々のアミノ酸のアルデヒドを導入したもの．Prolinalが PEPの強い阻害剤であることがわかる．値はIC_{50} (μM)．

Reagent		SLLVY	BLRR	ZVKM	PEPase
Boc-Asp(OBzl)-Glu(OBzl)-Leu-H		1.5	54	2.7	49
	-Ile-H	5.4	>100	6.0	140
	-Val-H	5.4	>100	6.0	87
	-Phe-H	3.2	>100	8.3	320
	-Met-H	9.1	>100	7.6	0.36
	-Ala-H	23	>100	>100	>1000
	-Pro-H	>100	>1000	1000	0.052
	-Gly-H	>100	>1000	>100	14

次に，MCPのどのサブユニットに活性が存在するかを明らかにするため，サブユニットのクローニングを行った[4]．材料は酵母を用いgenomic DNAのクローニングを行った[5]．図1に，3つのサブユニットY 7，Y 8，Y 13の推定1次構造を示す．3サブユニット共に約30％のホモロジーを示し共通の祖先の存在が示唆された．しかし，プロテアーゼ特有の配列は見出せなかった．

これらサブユニットの重要性を検討するため，遺伝子破壊を行った[5]．これらの遺伝子をURA 3遺伝子で分断し生じたdiploidから胞子を取り出し生育を観察したところ，Y 7及びY 8を分断すると全く生育できなかった．このことより，Y 7，Y 8遺伝子産物は酵母の生育に重要な役割をはたしていることが明らかとなった．一方，Y 13遺伝子を破壊した半数体は一世代が正常の1.2倍と少々遅いが生育を見た．そこでY 13遺伝子破壊体（Y 13-D）と正常（N）からMCPを精製したところ，Y 13-Dでは分子量29 KDのバンド1本が欠けていることが明らかとなった．これは，Y 13の理論サブユニット分子量28,700と一致した（図2）．

そこで次にY 13-D酵素の作用について検討した．まずMCPの作用と考えられるATP依存性タンパク分解活性を見たところ，N及びY 13-D共にタンパク分解に差がないことが判明した（表3）．人工基質に対する活性もほぼ同じ

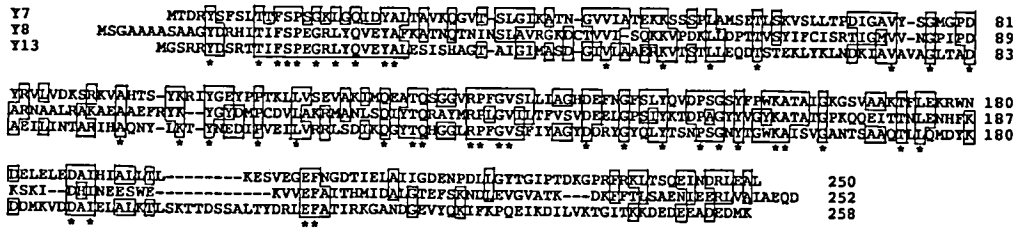


図1　酵母MCPの3つのサブユニットの推定1次構造
3つのサブユニットに共通なものには*，また共通シークエンスは囲ってある．

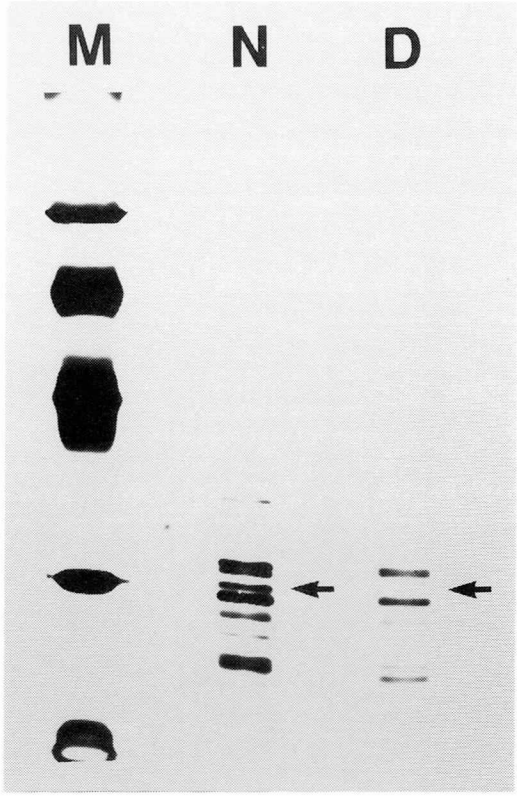


図2　精製した酵母 MCP（12 % SDS）
M，マーカー（96 k，67 k，42 k，30 k，21.5 k）
N，正常株
D，Y 13-D株
矢印のサブユニットがY 13がコードするもの．

表3　酵母エキス中の ATP 依存性タンパク分解活性基質はカゼイン，BSA 共に ^{14}C ラベルしてあるものを用いた．活性は抽出液 mg 当たりの TCA 可溶性部分のカウントで表現してある．

Substrate	Non-disruptant		Y13-disruptant	
	-ATP	+ATP	-ATP	+ATP
Casein	9,849	12,111	8,825	9,376
BSA	4,818	3,571	1,848	2,116

cpm/mg

であったが，Y 13-Dでは予想に反してZVKM，SLLVY 活性が上昇していることが明らかになった（**表4**）．SLLVYについてはタンパク質当たり 15 倍もの比活性が観察された．そこで，MCP に特徴的に見られる SDS による活性化を観察したところ，Nでは顕著な活性化が見られたが，Y 13-Dでは活性化能が低く，Conformation がもともとおかしい可能性が指摘された（**図3**）．従来より精製段階が上がるにつれて活性化に必要な SDS 濃度が低下していく傾向にあったが，これは精製に伴う酵素の変性と考えられている．本実験によってY 13-DのMCPは 20 数個のサブユニットのうち 1 個を欠くものであるがこの欠失によって特殊な活性がなくなることはないこと，逆に変性することによって活性化されることが発見された．この事実か

表4　NとY 13-Dの基質特異性の検索．基質は 0.1 mM（DMSO 1 %）の条件で測定した．値はタンパク質当たりに換算してある．

	N	D	D/N
Boc-Leu-Arg-Arg-MCA	4.37	4.65	1.07
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	3.70	1.28	0.35
Suc-His-Gln-Lys-MCA	0.27	0.16	0.58
Suc-His-His-Gln-MCA	0.11	0.11	1.00
Z-Val-Lys-Met-MCA	1.95	17.2	8.80
Suc-Leu-Tyr-MCA	3.77	9.37	2.49
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	4.33	63.7	14.7

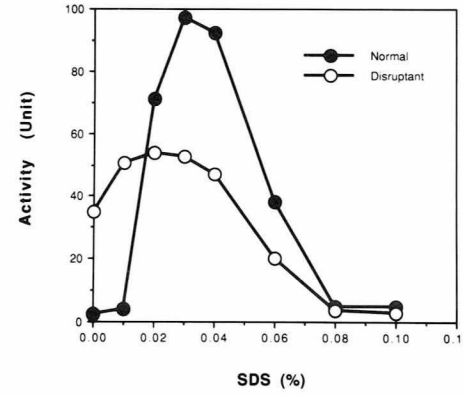


図3　正常（N）と遺伝子破壊（Y 13-D）酵母中の MCP の SDS 感受性．
活性は SLLUY-MCA を基質にして測定した．

らもＹ 13 サブユニットは生存には必須でないが，構造を保つうえで重要な役割を担っていると考えられる．

今後は，他のサブユニットについてもその作用を解明していく予定である．

文　　献

1）Ishiura, S., et al.: FEBS Lett., 189: 119—123, 1985.

2）向山光昭ほか：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，1990，pp 11—15.

3）Tsukahara, T., et al.: J. Biol. Chem., 265 : 21448—21453, 1990.

4）Sorimachi, H., et al.: Eur. J. Biochem., 193 : 775—781, 1990.

5）Emori, Y., et al.: Mol. Cell. Biol., 11 : 344—353, 1991.

筋ジスマウスにおけるジペプチジルペプチダーゼ（DPP）活性の動態

青　柳　高　明*

研究協力者　和　田　孝　雄*　小　島　蕗　子*　永　井　真知子*
原　田　滋　子*　斉　藤　宗　男**

筋ジストロフィー症の発症ならびに進展の機序に，プロテアーゼを含む各種の酵素活性の異常による筋蛋白崩壊が重要な役割を演じていることが可成り明らかになり，各種の酵素阻害物質を治療に用いる試みが報告されている[1)~9)]．筆者らは筋ジスマウスの前肢筋および後肢筋において，エンドペプチダーゼの他にエキソペプチダーゼが有意に増加すること[10)]，さらに患者血清中のアミノペプチダーゼとエンドペプチダーゼが発症機序に異なる役割を果していることを示唆した[11)]．

筋ジスマウスは後肢に麻痺を伴なう特徴的な症状が現われるが，酵素活性については前肢筋，後肢筋において著しい差違は認められなかった．今回は，特にこの両者間の差違について追究した結果，DPP-IIIに変化が誘起されることを認めたので報告する．

実験動物

筋ジスマウス（C 57 BL/6 dy/dy, 雄, 7週齢）および対照マウス（C 57 BL/6^{-+}/dy, 雄, 7週齢）は実験動物中央研究所より購入した．実験動物は屠殺後，直ちに前肢筋，後肢筋，脳などを摘出し，−70°C で保存した．臓器は10倍量の phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) 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，ホモジエネートの3,000 xg, 20分間の遠心上清を用いた．

酵素活性の測定

前肢筋，後肢筋および脳ホモジネートの遠心上清は，それぞれの基質溶液および緩衝液を含む反応管に分注し，37°C で1時間の反応を行なった．アミノペプチダーゼ（5種類），エンドペプチダーゼ（4種類）およびグリコシダーゼ（3種類）について活性を測定した．各酵素活性の測定法および基質は**表1**に示す[10),12)~19)]．すべての酵素活性の測定には3本宛の反応管を用い，その平均値を記載した[10),20)]．

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[21)] で測定した．

統計

多変量解析の一方法である主成分分析法[22)] によって解析した．

結果および考察

筋ジスマウスの前肢筋および後肢筋の酵素活性の動態をアミノペプチダーゼ，エンドペプチダーゼおよびグリコシダーゼについて調べ，対照と比較した．同時に脳内の酵素活性についても検討した．

表2に示したように，筋ジスマウスの前肢筋では AP-A, DPP-I, カテプシンB，カリクレイン，トリプシン，Gal-ase, GlcNAc-ase などの活性が有意に増加するのに対し，DPP-III活性のみ有意な低下を示した．

また後肢筋では AP-A, DPP-I，DPP-II, DPP-IV, PEP, カテプシンB，トリプシン，Gal

*微生物化学研究所
**実験動物中央研究所

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	10
Dipeptidyl peptidase I (EC3.4.14.1)	DPP-I	Gly-Arg·NA	12
Dipeptidyl peptidase II (EC3.4.14.2)	DPP-II	Lys-Ala·NA	13
Dipeptidyl peptidase III (EC3.4.14.4)	DPP-III	Arg-Arg·NA	14
Dipeptidyl peptidase IV (EC3.4.14.5)	DPP-IV	Gly-Pro·NA	15
Prolyl endopeptidase (EC3.4.21.26)	PEP	Z-Gly-Pro·NA	16
Cathepsin B (EC3.4.22.1)	Cathepsin B	Z-Arg-Arg·NA	17
Tissue kallikrein (EC3.4.21.35)	Kallikrein	Pro-Phe-Arg·MCA	18
Trypsin (EC3.4.21.4)	Trypsin	Boc-Gln-Ala-Arg·MCA	19
β-D-Galactosidase (EC3.2.1.23)	Gal-ase	NP-Gal	10
α-D-Mannosidase (EC3.2.1.24)	Man-ase	NP-Man	10
β-N-Acetyl-D-glucosaminidase (EC3.2.1.30)	GlcNAc-ase	NP-GlcNAc	10

Z: benzyloxycarbonyl, Boc: t-butyloxycarbonyl, Glu·NA: L-glutamic acid β-naphthylamide, Pro-Phe-Arg·MCA: L-prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine·4-methylcoumaryl-7-amide, NP-Gal: *p*-nitrophenyl β-D-galactosidase

表2　Enzymatic changes in limb muscles and brain of dystrophic mice

	Specific activity±S D					
	Forelimb		Hindlimb		Brain	
Enzyme	C (n=4)	D (n=5)	C (n=4)	D (n=5)	C (n=8)	D (n=10)
AP-A	0.52 ±0.09	1.68 ±0.32**	0.55 ±0.08	1.35 ±0.51*	0.59 ±0.14	0.47 ±0.05*
DPP-I	0.54 ±0.37	6.21 ±2.22**	0.40 ±0.22	4.50 ±1.90**	0.08 ±0.07	0.07 ±0.10
DPP-II	2.25 ±1.00	2.83 ±0.84	1.42 ±0.11	2.30 ±0.39**	3.24 ±0.45	3.76 ±0.40*
DPP-III	4.59 ±0.57	3.35 ±0.31**	4.64 ±0.27	3.98 ±1.20	7.20 ±1.68	6.53 ±1.43
DPP-IV	0.58 ±0.09	0.84 ±0.22	0.52 ±0.06	0.95 ±0.29*	0.81 ±0.11	0.71 ±0.07
PEP	5.89 ±1.48	7.42 ±1.19	5.48 ±1.17	7.83 ±1.30*	9.93 ±0.73	8.47 ±1.08**
Cathepsin B	1.79 ±0.37	16.05 ±2.97***	1.47 ±0.19	15.00 ±2.80***	7.36 ±0.41	6.98 ±0.82
Kallikrein	0.022±0.007	0.057±0.011***	0.026±0.021	0.031±0.010	0.020±0.006	0.022±0.007
Trypsin	0.019±0.003	0.044±0.0060***	0.010±0.001	0.032±0.0065***	0.016±0.001	0.014±0.0020*
Galactosidase	0.49 ±0.12	1.70 ±0.27***	0.32 ±0.09	1.37 ±0.29***	1.46 ±0.17	1.32 ±0.18
Mannosidase	0.31 ±0.05	0.43 ±0.10	0.23 ±0.04	0.61 ±0.12***	0.39 ±0.07	0.38 ±0.10
GlcNAc-ase	6.73 ±0.92	28.05 ±3.81***	3.51 ±0.42	23.44 ±5.64***	37.13 ±4.00	31.32 ±2.31**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ (according to Student's t-test)
C: control, D: dystrophy

-ase, Man-ase と GlcNAc-ase などが有意に増加した．しかし，前肢筋でみられた DPP-IIIの変動は認められなかった．一方，脳内の酵素活性の動態は前記筋肉内の動態と全く異なっていた．即ち，DPP-IIのみが増加するが，AP-A, PEP, トリプシンおよび GlcNAc-ase 活性などは有意に低下した．

上記筋肉内の酵素活性の動態を主成分分析法により，さらに解析した．表3に示すように，第1主成分に高い相関を有する酵素は Man-ase ($\gamma=0.77$)，DPP-IV ($\gamma=0.77$)，PEP ($\gamma=0.76$)，カテプシンB ($\gamma=0.73$)，GlcNAc-ase ($\gamma=0.65$) である．第2主成分に対しては，DPP-III ($\gamma=-0.92$)，カリクレイン (0.79)，AP-A ($\gamma=0.71$)，トリプシン ($\gamma=0.66$)，Gal-ase ($\gamma=0.61$) などである．DPP-IIIがマイナスの高い相関を示すのが特徴である．さらに，第3主成分に対しては DPP-II ($\gamma=0.79$) と DPP-I ($\gamma=0.64$) が有意な相関を示した．

表3　Relation to three main factors to various enzymes in limb muscles of dystrophic mice

Enzyme	Factor 1 (r)	Enzyme	Factor 2 (r)	Enzyme	Factor 3 (r)
Man-ase	0.77***	DPP-III	-0.92***	DPP-II	0.79***
DPP-IV	0.77***	Kallikrein	0.79***	DPP-I	0.64**
PEP	0.76***	AP-A	0.71***		
Cathepsin B	0.73***	Trypsin	0.66**		
GlcNAc-ase	0.65**	Gal-ase	0.61**		

** $p<0.01$, *** $p<0.001$

筋肉組織の崩壊に分解酵素が大きな役割を果している．筋ジスマウスの前肢筋と後肢筋における症状の差違にDPP-IIIの関与が考えられる．即ち，DPP-IIIは前肢筋において低下するが，後肢筋では有意な低下が認められない．DPP-IIIと他の酵素のバランスが筋ジス症の進行と深い関係にあると思われる．さらに検討中である．

おわりに

筋ジスマウスの前肢および後肢における症状の差違を明らかにすることを目的とし，12種類の酵素活性の変動を検討した．前肢筋と後肢筋の酵素変動は類似しているが，主成分分析により両者の差に寄因する2群の酵素を選出した．即ち，Man-ase, DPP-IV, PEPとカテプシンBのグループ，他のグループはDPP-III，カリクレインとAP-Aであった．これらの酵素はジストロフィー筋内で，特に低下することはないが，DPP-IIIのみ前肢筋で有意に低下した．後肢筋においてはDPP-IIIの低下は認められない．筋崩壊との関係が注目される．

文　献

1) Stracher, A., McGowan, E.B. and Shafiq, S.A.: In vivo effect of protease inhibitors in denervation atrophy. Exp. Neurol., **66**: 611—618, 1979.

2) Iodice, A.A.: The inhibition by pepstatin of cathepsin D and autolysis of dystrophic muscle. Life Sci., **19**: 1351—1358, 1976.

3) Kar, N.C. and Pearson, C.M.: Hydrolytic enzymes and human muscular dystrophy. In "Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies", (ed. by Rowland, L.P.) Excerpta Medica, Amsterdam, The Netherlands, 1977, pp 387—394.

4) Toyooka, T., Shimizu, T. and Masaki, T.: Inhibition of proteolytic activity of calcium activated neutral protease by leupeptin and antipain. Biochem. Biophys. Res. Commun., **82**: 484—490, 1978.

5) Ishiura, S., Murofiushi, H., Suzuki, K. and Imahori, K.: Studies of a calciumactivated neutral protease from chicken skeletal muscle. J. Biochem., **84**: 225—230, 1978.

6) Goll, D.E., Okitani, A., Dayton, W.R. and Reville, W.J.: A Ca-activated muscle protease in myofibrillar protein turnover. In "Protein Trunover and Lysosome Function" (ed by Segal, H.L. & Doyle, D. J.) Academic Press, Inc., New York, 1978, pp 587—588.

7) Bird, J.W.C., Spanier, A.M. and Schwartz, W.N.: Cathepsins B and D: proteolytic activity and ultra-structural localization in skeletal muscle. In "Protein Turnover and Lysosome Function" (ed. by Segal, H.L., & Doyle, D.J.) Academic Press, Inc., New York, 1978, pp 589—604.

8) Sanada, Y., Yasogawa, N. and Katsunuma, N.: Serine protease in mice with hereditary muscular dystrophy. J. Biochem., **83**: 27—33, 1978.

9) McGowan, E.B., Shafiq, S. A. and Stracher, A.: Delayed degeneration of dystrophic and normal muscle cell cultures treated with pepstatin, leupeptin and antipain Exp. Neurol., **50**: 649—657, 1976.

10) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H.: Various enzyme activities in muscle and other organs of dystrophic mice. J. Clin. Invest., **67**: 51—59, 1981.

11) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Miyoshino, S. and Umezawa, H.: Two different modes of enzymatic

changes in serum with progression of Duchenne muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta, **129**: 165—173, 1983.

12) McDonald, J.K. and Schwabe, C.: Intracellular exopeptidases. In "Proteinases in Mammalian Cells and Tissues" (ed. by Barrett, A.J.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York/Amsterdam, 1977, pp 314—322.

13) McDonald, J.K., Leibach, F.H., Grindeland, R.E. and Ellis, S.: Purification of dipeptidyl aminopeptidase II (dipeptidyl arylamidase II) of the anterior pituitary gland. Peptidase and dipeptide esterase activities. J. Biol. Chem. **243**: 4143—4150, 1968.

14) Theodore, H. D. and Kapralou, A.: A rapid assay for dipeptidyl aminopeptidase III in human erythrocytes. Anal. Biochem, **119**: 418—423, 1982.

15) Oya, H., Nagatsu, I. and Nagatsu, T.: Purification and properties of glycylprolyl β-naphthyl-amidase in human submaxillary gland. Biochim. Biophys. Acta, **258**: 591—599, 1972.

16) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Okubo, M., Masaki, Y. and Umezawa, H.: Abnormality of the post-proline-cleaving enzyme activity in mice with systemic lupus erythematosus-like syndrome. J. Appl. Biochem., **7**: 273—281, 1985.

17) Knight, C.C.: Human cathepsin B. Application of the substrate N-benzyloxy carbonyl-L-arginyl-L-arginine 2-naphthylamide to a study of the inhibition by leupeptin. Biochem. J., **189**: 447—453, 1980.

18) Nagase, H. and Barrett, A.: Human plasma kallikrein. Biochem. J., **193**: 187—192, 1981.

19) Sawada, H., Yokosawa, H., Hoshi, M. and Ishii, S.: Ascidian sperm chymotrypsin-like enzyme; paticipation in fertilization. Experientia, **39**: 377—378, 1983.

20) Aoyagi, T., Wada, T., Nagai, M., Kojima, F., Harada, S., Takeuchi, T., Takahashi, H., Hirokawa, K. and Tsumita,: Deficiency of kallikrein-like enzyme activities in cerebral tissue of patients with Alzheimer's disease. Experientia, **46**: 94—97, 1990.

21) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**: 265—275, 1951.

22) Kendall, M.: Principle components. In "Multivariate Analysis" Charles Griffin and Co., London, 1975, pp 13—29.

CANP 遺伝子のクローニングに関する研究

鈴 木 紘 一*

研究協力者　西 道 隆 臣*　川 崎 博 史*
羽 田 明 子*　大 野 茂 男*

CANP の前駆体が生体内で活性を発現するおおよその道筋は解明されたが，細い点では不明な点が多い．ここでは CANP の活性が発現するまでの幾つかの点をさらに検討した．

(1) 前駆体の活性化に及ぼすリン脂質の効果

CANP 前駆体を *in vitro* で活性化するには非生理的な高いカルシウム濃度が必要である．このカルシウム濃度を下げる因子としてリン脂質が見出されたが，ここではさらにリン脂質の効果を検討した．その結果イノシトール4,5-ビスリン酸 (PIP_2) が最も強い効果をもち，PIP_2 の存在下では 10^{-7}M カルシウム存在下でも CANP は活性を発現して基質ホドリンを切断した．PIP や PI も効果を示すが，リン酸基の数が多い方が効果が強いことが解った(図)．このイノシトールリン脂質の効果から，μCANP については生理的なカルシウム濃度で生体膜上で活性化されるが，mCANP については PIP_2 の存在下でも 10^{-5}M のカルシウムが必要で，mCANP については μCANP とは別の活性化機構が存在するはずで，mCANP のカルシウム感受性を上昇させる機構の検討を続けている．

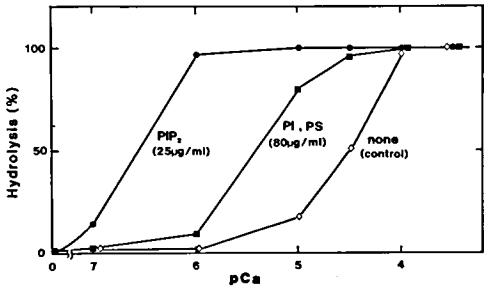


図　μCANP によるホドリンの加水分解におよぼすリン脂質の効果

(2) CANP 遺伝子の発現

昨年度までに mCANP 80 K サブユニット遺伝子の 5′ 上流域の構造を解析し，m 80 K 遺伝子にはホルボールエステル TPA で遺伝子発現が誘導されるタンパク質に共通にみられる TRE 配列の存在を明らかにした．この TRE 配列を含む部分を CAT 遺伝子の上流につないで CAT の発現をみる実験から，m 80 K 中の TRE は TPA に応答した遺伝子の発現を誘導することが解った．そこで，ラット線維芽細胞 3 Y 1 にプロテインキナーゼ Cα の cDNA を発現させた細胞を使って TPA 刺激後の CANP 遺伝子の発現を検討した．CANP 関連の 4 種の遺伝子のうち，m 80 K，30 K の遺伝子の発現は誘導されたが，μ 80 K の発現誘導は見られなかった．この結果，TPA 刺激では mCANP のレベルのみが特異的に上昇し，μCANP の発現は増加しないことを示す．30 K と μ 80 K 遺伝子の 5′ 上流域の機能の解析はしていないが，m 80 K と同様に TPE 配列を持つ．このうち μ 80 K 遺伝子だけが TPA に応答しないことになり，TPA やその他の刺激で細胞を刺激したときの CANP の発現をさらに調べている．なお，TPA 刺激で CANP インヒビターの発現も増強されるようで，今後の検討が必要である．

* 東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部

(3) CANP 基質の活性化

CANP は細胞質で常に基質と接しているにもかかわらず無秩序な分解がおこらないのは，CANP 側の活性調節の他に，基質側の調節もある．すなわち，プロテインキナーゼC（PKC）はリン酸化された分子種のみが特異的に分解され，リン酸化を受けていないものは切断されない．今年度は我々が新しく見出したカルシウム非依存性の nPKC も CANP の基質になるか否かを検討した．nPKCε は μ, mCANP で共に分解され，45 KDa のキナーゼドメインを生じた．nPKCε のリン酸化が CANP による分解とどう関係するかは見ていないが，血小板のタンパク質でもやはりリン酸化されたタンパク質が選択的に CANP で切断される．結局，リン酸化などによる基質の修飾が CANP による被分解性を著しく上昇させる現象が見出され，基質側にも CANP の活性調節機構が存在することが判明した．

CANP の活性発現と調節ではこれらいくつかの活性調節機構が複雑にからみ合ったものと予想され，これらの機構がどのように影響を及ぼし合うかなどを解明する必要がある。

細胞の増殖・分化とCANP

川　島　誠　一*

研究協力者　　中　村　　愛*

はじめに

カルシウム依存性中性プロテアーゼ（CANP）はCa^{2+}で活性化される非リソゾーム系プロテアーゼである．筋ジストロフィーでは筋細胞内Ca^{2+}が上昇しているので，本疾患での筋タンパク質の異常分解にCANPが関わっていると考えられている．しかし，当然CANPには正当な生理機能があるはずである．筋ジストロフィーの治療薬としてCANP阻害剤を投与する場合には，CANPの正常な機能も損なわれる可能性があるので，その機能を明らかにすることはCANP阻害剤使用の妥当性を主張する上で重要であろう．これまでCANPの機能として，酵素・受容体など活性タンパク質の限定分解による活性化や細胞骨格タンパク質の分解による細胞機能の調節が考えられているが，いずれも試験管内実験に基づくもので，実際に生体内でこれらの機能を果たしているかどうかは不明である．細胞内でのCANPの機能と密接な関係をもつものが，CANPの細胞内存在部位とその動きである．そこで，細胞の分化・増殖におけるCANPの動態を探るため，種々の増殖能・分化能をもつ細胞群が存在する骨髄および造血系培養細胞系を用いて，抗CANP抗体による免疫組織的局在およびウェスタンブロット法による量的差異について検討した．

*東京都老人総合研究所

実験方法

正常および悪性リンパ腫患者などの骨髄・血液・培養細胞の塗抹標本を作成し，μCANPに特異的なモノクロナル抗体（1 A_8A_2）およびmCANPに特異的なモノクロナル抗体（3 $A_{11}D_{12}$）で免疫染色した．培養細胞CANPのウェスタンブロットは，一定数の細胞をSDS電気泳動試料用緩衝液で溶解し，電気泳動したのちニトロセルロース膜に転写し，各モノクロナル抗体でCANPを検出した．

結　　果

骨髄細胞の抗CANP抗体染色の結果を図1に示してある．mCANPは赤芽球・骨髄細胞・形質細胞で陽性であるが，赤血球・血小板では検出限界以下であった．抗μCANP抗体では巨核球が強い反応を示した．mCANPもμCANPも細胞質に存在し，細胞核は陰性であった．表は血球・骨髄での抗体染色の結果をまとめたも

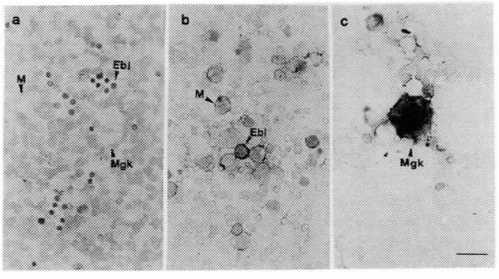


図1　ヒト骨髄におけるmCANPとμCANPの局在
a，コントロール抗体；b，抗mCANP抗体；c，抗μCANP抗体；M，骨髄球；Mbl，赤芽球；Mgk，巨核球

表　造血系細胞の抗 CANP 抗体に対する反応性

Antibody used	Anti-mCANP	Anti-μCANP
Erythroblast	+	±
Erythrocyte	−	−
Myeloblast	+	?
Myelocyte	+	±
Segmented granulocyte	−〜+	−
Monocyte	+	−
Megakaryocyte	−〜+	++
Platelet	−	+
Plasma cell	++	+
Lymphocyte	+	−

のである．傾向として，未分化で分裂能の高い細胞に mCANP が多く存在した．

これらの結果を確認するため，確立された種々の造血系培養細胞の CANP を検討した．**図2**のウェスタンブロットが示すように，mCANP 量は前骨髄性白血病細胞・骨髄細胞・単球系細胞に多く，T細胞系・B細胞系・リンパ球系の細胞には少なかった．μCANP 量はいずれの細胞系でも少なく，骨髄塗抹標本で強い免疫染色を示した巨核球系の培養細胞（T-33）でも僅量であった．この巨核芽球系細胞は細胞の免疫染色でもμCANP 陰性であり抗 mCANP 抗体にのみ反応した(**図3**)．この傾向は単核の状態でも巨核になった細胞でも同様であった．しかし，この培養巨核細胞は骨髄中の巨核細胞に比べて未熟な状態にあり，分離膜を

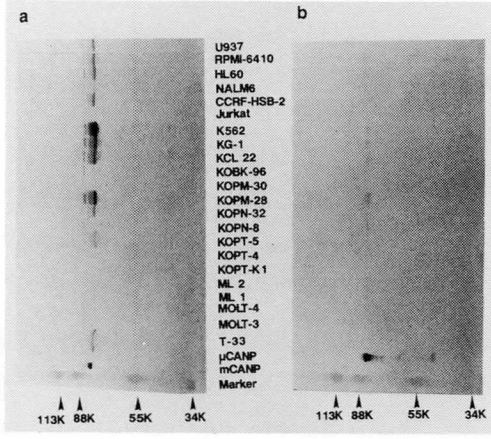


図2　造血系培養細胞の mCANP とμCANP のウェスタンブロット
a，抗 mCANP 抗体；b，抗μCANP 抗体

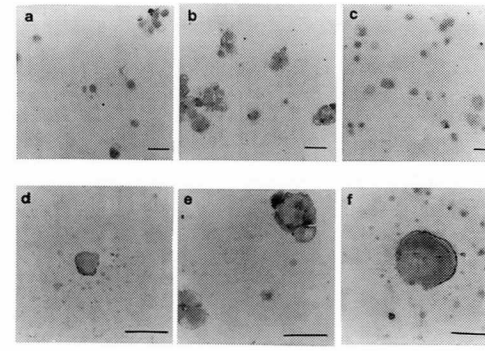


図3　巨核球系培養細胞（T-33）における mCANP とμCANP の局在
a，コントロール抗体；b，d，e，f，抗 mCANP 抗体；c．抗μCANP 抗体

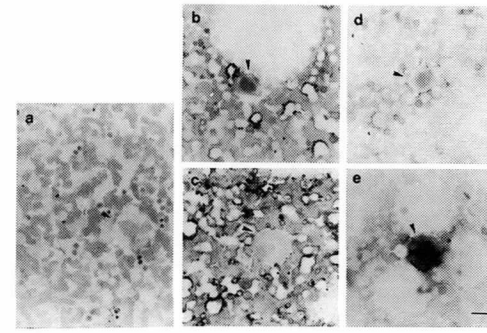


図4　特発性血小板減少性紫斑病患者骨髄の巨核球における mCANP とμCANP の局在
a，コントロール抗体；b，c，抗 mCANP 抗体；d，e，抗μCANP 抗体

有さない．したがって，mCANP とμCANP の逆転は巨核細胞の成熟過程で起こるものと思われる．このことを明らかにするため，種々の成熟過程にある巨核球を含む特発性血小板減少性紫斑病患者骨髄の塗抹標本を抗体染色したところ，未熟な巨核球は mCANP 抗体で陽性なのに対し成熟した巨核球は抗μCANP 抗体で陽性であった（**図4**）．

考　　察

本研究で得られた結果，即ち赤芽球・骨髄芽球・未熟巨核球などの未熟な細胞が mCANP を

多く含むことは，このCANP分子種が細胞分裂や分化の初期の段階で機能していることを示唆している．実際，細胞分裂期にmCANPが染色体に局在したり[1]，CANPの阻害剤であるE-64が細胞分裂を阻害すること[2]が報告されている．我々の研究室での結果でも，細胞内CANPを効率よく阻害する低分子性阻害剤（Cbz-Leu-Leu-Leu-al）がPC 12細胞の分化をもたらした[3]．したがって，mCANPは細胞増殖に関与し，その消滅あるいは阻害は増殖を止め分化が始まると仮定すると説明がつく．

一方，もうひとつのCANP分子種であるμCANPは巨核球の成熟に伴い強く発現された．巨核球はその後血小板となる前駆細胞であり，その際には細胞膜が千切れて融合する。人工的な赤血球の融合において細胞内のμCANPが関与しているといわれてきた[4]が，巨核球のμCANPは生体内で血小板の形成に際し膜融合の必須因子として機能しているのかも知れない．

いずれにせよ，細胞増殖や膜融合におけるCANPの作用機作を明らかにするためには，さらに検討が必要である．

文　献

1）Schollmeyer, J.E.: Science, **240**: 911—913, 1988.

2）Shoji-Kasai, Y., Senshu, M., Iwashita, S. and Imahori, K.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**: 146—150, 1988.

3）Saito, Y. and Kawashima, S.: J. Biochem., **106**: 1035—1040, 1989.

4）Glaser, T. and Kosower, N.S.: FEBS Lett., **206**: 115—120, 1986.

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

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，昨年度に引続き次の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

昨年度までに，内在性CANPインヒビターの活性中心のアミノ酸配列[1]を含むエポキシコハク酸誘導体を約70種合成し，CANPに対して特異性を有する化合物としてCA-092を見いだした(表1)．しかしながらCA-092のCANP阻害活性が弱いことから，本年度は更に周辺化合物の検討を行なった．

(2) FD-056誘導体

昨年度より，天然由来の新規なシステインプロテアーゼ阻害剤FD-056 (図1)[2]の誘導体の研究を開始し，CANPに対して比較的強い阻害活性と特異性を示す化合物AP-049を見いだした(表1)．本年度は昨年度の研究を更に発展させ，新たな誘導体を合成しその構造活性相関を検討した．

方法

表4に示した化合物については，図2に示した方法により合成し，他の化合物については昨年度までに報告した方法に準じた．また，酵素阻害活性の測定方法についても，昨年度までに報告した方法に準じた．

結果及び考察

(1) エポキシコハク酸誘導体

表2に本年度合成したエポキシコハク酸誘導体の構造式およびその酵素阻害活性を示した。主にCA-092のグルタミン酸部分とバリン部分を中心に構造変換させたが，現在までのところ，CANPに対する阻害活性を強めることには成功していない．しかしながら，これらの部分の構造上のわずかな違いが，カテプシンBおよび

表1 CA-092, AP-049の酵素阻害活性

Compound No.	Structure	IC_{50} (nM)		
		CANP	Papain	Cathepsin B
CA-092	HO-tES-Arg-Glu-Val-OH	35,000	>100,000	>100,000
AP-049	Boc-Asp(OBzl)-Glu(OBzl)-Aib-H	7,800	38,000	31,000

*東京理科大学理学部
**大正製薬㈱総合研究所

表2　エポキシコハク酸誘導体の酵素阻害活性

Compound No.	Structure	IC50 (nM)		
		CANP	Papain	Cathepsin B
CA－154	HO-tES-Arg(NO2)-Glu-Leu-OH	>100,000	>100,000	>100,000
CA－155	HO-tES-Arg(NO2)-Asp-Val-OH	>100,000	10,000	33,000
CA－156	HO-tES-Arg(NO2)-Asn-Val-OH	>100,000	3,100	10,000
CA－161	HO-tES-Arg(NO2)-Glu(OMe)-Val-OH	51,000	1,800	3,500
CA－162	HO-tES-Arg-Glu(OMe)-Val-OH	54,000	8,100	1,300
CA－092	HO-tES-Arg-Glu-Val-OH	35,000	>100,000	>100,000

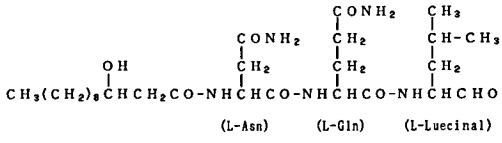


図1　FD-056の構造

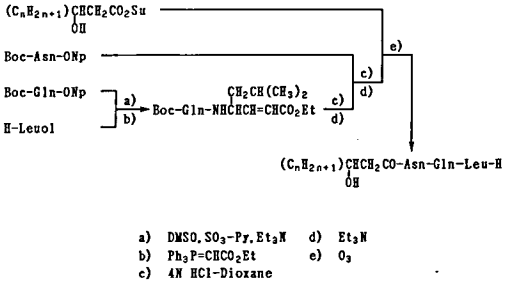


図2　FD-056誘導体の合成法

パパインに対する阻害活性を大きく変化させることが認められた.

(2) FD-056誘導体

昨年度, FD-056の脂肪酸部分をBoc基に, またAsn-Gln部分をAsp(OBzl)－Glu(OBzl)に置き換え, C端ロイシナール部分を変換することにより, AP-049を見いだした.

引き続き本年度は, C端をロイシナールに固定し, Glu(OBzl)部分を種々変換した化合物を合成した. 表3に示すように, これらの化合物の多くはCANPに対してFD-056と同等以上の強い阻害活性を示したが, CANP特異性を示したものはFD-056と同じGlnを有するAP-058のみであった. そこで次にペプチド部分は固定し脂肪酸部分を変換した化合物について検討した. 炭素数の異なる種々のβ-ヒドロキシ脂肪酸（ラセミ体）を有する誘導体を比較したところ, 表4に示すように, CANPに対する阻害活性は炭素数12（n＝9）で極大値を示したが, カテプシンBに対する阻害活性は炭素数の増加と共に減少した. また, パパインに対する阻害活性も炭素数12（n＝9）で極大値を示したが,

表3　FD-056誘導体の酵素阻害活性(1)

Compound No.	X	IC50 (nM)		
		CANP	Papain	Cathepsin B
AP－074	Nva	115	19	165
AP－071	Val	173	18	173
AP－062	Nle	225	88	470
AP－061	Met	330	100	740
AP－059	Leu	340	110	510
AP－058	Gln	380	1,150	1,400
AP－067	Ile	560	100	370
AP－065	Lys(Z)	850	190	850
AP－075	Ser(Bzl)	987	95	987
AP－073	Trp	1,120	2,140	527
AP－068	Ala	1,180	43	264
AP－077	Arg(NO2)	1,220	217	354
AP－070	Cys(Acm)	1,480	770	1,850
AP－063	cLeu	1,560	380	2,260
AP－069	Phe	1,760	44	247
AP－076	Thr(Bzl)	1,800	409	3,430
AP－039	Asp(OBzl)	1,800	1,247	288
AP－023	Glu(OBzl)	3,800	500	500
AP－064	Aib	5,540	2,570	8,700
AP－072	βAla	7,730	4,680	17,900
AP－060	Pro	12,400	970	5,400
AP－078	Tyr(Bzl)	12,650	3,310	2,520
AP－066	Gly	121,000	6,280	15,900
AP－079	Sar	>200,000	4,070	11,200
FD－056		2,000	33,000	7,300
E－64c		3,000	13	40

表4　FD-056誘導体の酵素阻害活性(2)

Compound No.	n	I C50 (nM)		
		CANP	Papain	Cathepsin B
AP−089	5	1,200	12,400	1,800
AP−090	7	460	11,700	2,100
AP−086	9	400	10,100	2,700
AP−094	10	510	40,400	14,900
AP−091	11	550	51,400	15,400
AP−095	12	1,400	>100,000	53,500
AP−092	13	2,500	>100,000	>100,000
FD−056		2,000	33,000	7,300
E−64c		3,000	13	40

CANPに対するよりも約25倍弱く，炭素数15（n＝12）以上ではほとんど活性を示さなかった．この結果，CANPに対する特異性も炭素数と共に変化し，炭素数13（n＝10）以上のものはいずれも特異性が高くなった．なおFD-056が，同じ炭素数のβ-ヒドロキシ脂肪酸を有し，FD-056に対応したAP-086よりも活性が弱い一因としては，FD-056のロイシナール部分が，精製過程で一部ラセミ化していることが考えられる．

結　　語

本年度我々は，昨年度に引続き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，後者の中からE-64-cと同等以上のCANP阻害活性を有し，かつFD-056などよりも特異性の高いいくつかの化合物を見いだした．

文　　献

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

2）向山光昭，大関正弘ほか：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，1990，p11.

E-64-c および EST の薬物動態
—LC/MS による精密計測の基礎研究—

大 倉 洋 甫*

研究協力者　甲 斐 雅 亮*　高 橋 利 明**

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，タンパク質分解酵素の阻害物質(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)]，ホルフェニシノール[5)6)]，アンチパイン[7)]，ホルフェニシン[8)]，E-64-c[9)]，EST[9)]）の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．

最近，難揮発性物質を HPLC のオンライン上で質量分析 (MS) する LC/MS 計測法が注目されている．上述のプロテアーゼ阻害剤は，ペプチド様あるいはアミノ酸様化合物であるので，いずれも難揮発性物質である．そこで本年度は，HPLC と直結できる大気圧イオン化インターフェイスを備えた四重極型 MS 検出による E-64-c および EST の薬物モニター法に関する基礎的研究を行った．

実験方法

(1) **標準試料**：E-64-c および EST は水に溶解した．SD ラット (7 週齢) 血清の前処理：血清 100 μl に 1 M$HClO_4$ 200 μl を加え除蛋白した．上清 200 μl を ODS-C 18 ミニカートリッジ (東ソー社製) に導入し，水 2 ml，0.1 M 塩酸 2 ml，水 2 ml で洗浄したのち，CH_3CN-H_2O (9：1，v/v) 1.5 ml で溶出した．溶出液を減圧下乾固し，適量の水に溶解した．

* 九州大学薬学部
** 日立計測エンジニアリング㈱

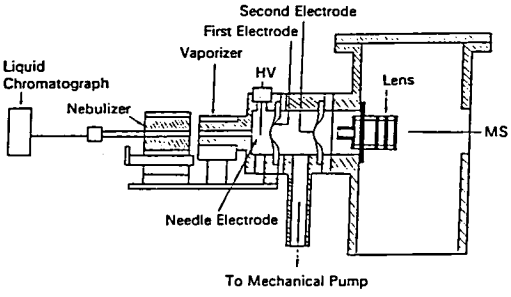


図 1　Schematic diagram of LC/API-MS interface

(2) **HPLC**：Hitachi 655 形装置を使用した．Capcellpak C 18 カラム (250×4.6 mm i. d., 粒径 5 μm) を使用した．溶離液にはメタノールと 0.1 M 酢酸アンモニウムの混液を用いた．溶離液の流速は 1.0 ml/min とした．溶出液は，まず UV (210 nm) 検出器に導き，続いて MS 検出器へ導入した．

(3) **MS 検出**：Hitachi M-1000 形 LC/MS 分析計を使用した．この LC/MS インターフェイスは霧化部およびイオン化部(針電極を装備)からなる (図 1)．噴霧器の温度を 230°C に設定し，3 kv に印加した針電極のコロナ放電により大気圧下イオン化させた．質量分離部は四重極からなる．

結果および考察

MS と HPLC を直結する数種のインターフェイスが開発されているが，本研究では，図 1 に示す大気圧イオン化 (API) インターフェイスを使用した．このインターフェイスでは，HPLC 溶離液の脱溶媒及び溶質のイオン化が大気圧下

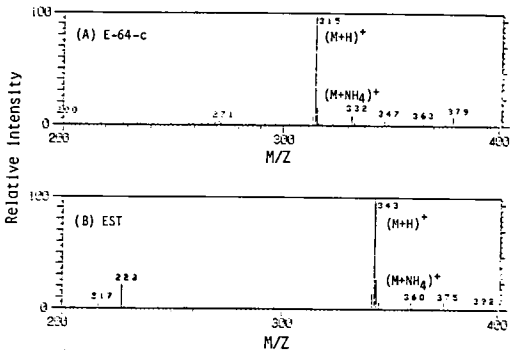


図2　Mass spectra of (A) E-64-c and (B) EST

で行われる．E-64-c 及び EST を HPLC に用いる溶離液（メタノールと 0.1 M 酢酸アンモニュムの混液）に導入し API/MS によって検出したマススペクトルを図2に示す．E-64-c 及び EST ともプロトン化分子イオンピークが基準ピークとして検出できた．従って，E-64-c は M/Z=315 また EST は M/Z=343 において，それぞれ選択イオン検出できることが分かった．

E-64-c 及び EST を逆相 HPLC によって分離し，まず UV 検出し，続けて API-MS による選択検出を行った（図3）．MS 検出によるクロマトグラムから，明らかに，両化合物は設定した M/Z 値でそれぞれ選択的に検出された．この HPLC/MS 条件において，EST および E-64-c の検量線を作成した場合，検出された両化合物のイオン量は HPLC 注入量（0～100 ng）に比例した．検出限界は両者とも約 1 ng（3 pmol）/HPLC 注入量であった（図4）．この感度は既に提出した両化合物のプレカラム蛍光誘導体化 HPLC[9] によるそれよりも劣る（約 1/10）が，MS 検出は特殊な反応を必要としないので，両化合物の簡便な同時検出が可能である．

薬物動態研究への適用を目的として，まずラット血清に添加した EST 及び E-64-c の検出を試みた．ラット血清は，常法の除蛋白処理および固相抽出処理を行いクリーンアップした．この試料に EST 及び E-64-c を添加し，逆相

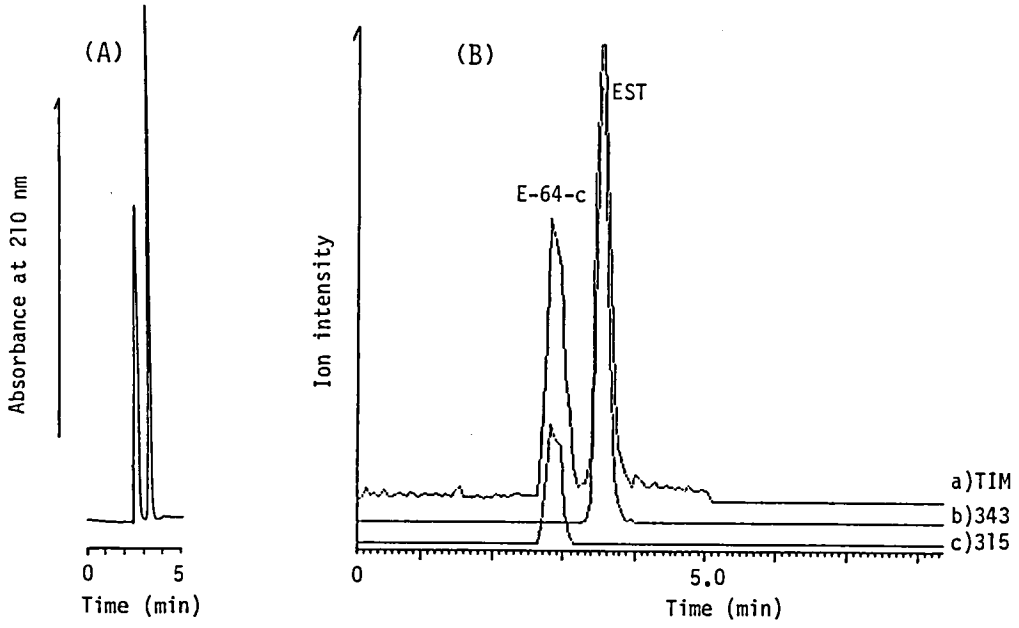


図3　Chromatograms of E-64-c and EST (5 μg each) obtained by (A) UV detection and (B) API-MS detection
HPLC conditions: column, Capcellpak C 18 (250×4.6 mm I.D., 5 μm) ; mobile phase, methanol+0.1 M ammonium acetate (9: 1, v/v) ; flow rate, 1.0 ml/min.
MS detection: a) total ion monitoring; b) selected ion monitoring at M/Z=343; c) selected ion monitoring at M/Z=315.

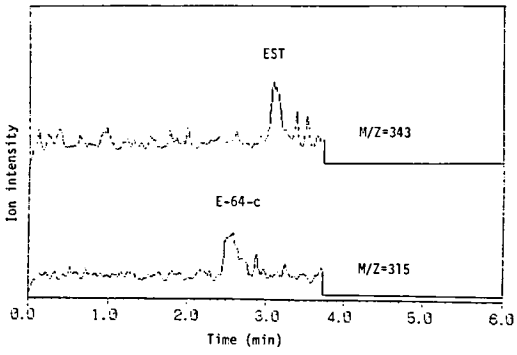


図4　Chromatogram of E-64-c and EST (I ng, each) obtained by HPLC/API-MS (selected ion monitoring)

HPLCによって分離後，UVおよびMS検出したときのクロマトグラムを図5に示す．このHPLC条件では，生体試料と共存させたESTは良好に検出されたが，早く溶出するE-64-cのイオン（M/Z=315）は検出されなかった．一方，HPLCの移動相中のメタノール濃度を低下させ，溶出時間を遅くさせると，E-64-cも検出可能になった（図6）．しかし，検出感度は標準試料の場合よりも約1/10に低下した．

以上の結果により，生体試料に存在する夾雑物質がイオン化を妨げるものと考えられる．そこで図6の条件でEST及びE-64-cが選択検出された溶出液のマススペクトルを調べた（図7）．ESTの溶出液では，そのプロトン化分子イオンピークのみが検出されているが，E-64-cの溶出液では，そのプロトン化分子イオンピーク以外にもマスユニットの違うピークも多く存在していた．これは，選択イオン検出によりその物質を高選択的に検出できることを示す．

おわりに

APIインターフェイスをそなえたMS検出は，通常のHPLCとオンラインで直結でき，標準試料では容易にESTやE-64-cを高感度定量できることが分かった．それらの検出限界は1 ngレベルであり，薬物動態を研究するには十分な検出感度であると考えられる．しかし，実試料を計測する場合，複雑な生体マトリックス内成分が，目的化合物のAPI-MSによるイオン化を妨げることも明らかになった．したがって，この分析法の実用化には，試料のクリーンアップも含めてHPLCの分離条件の検討が必要不可欠であることが示唆された．

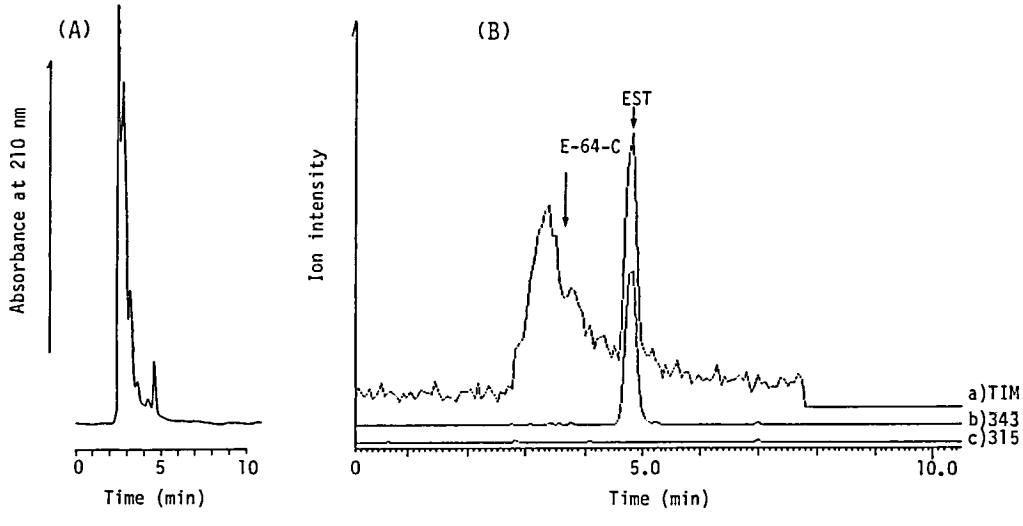


図5　Chromatograms of rat serum (10 μl) spiked with E-64-c and EST (0.5 μg each) obtained by (A) UV detection and (B) API-MS detection
HPLC mobile phase: methanol+0.1 M ammonium acetate (8: 2, v/v).
The serum was pretreated with deproteinization and solid phase extraction.

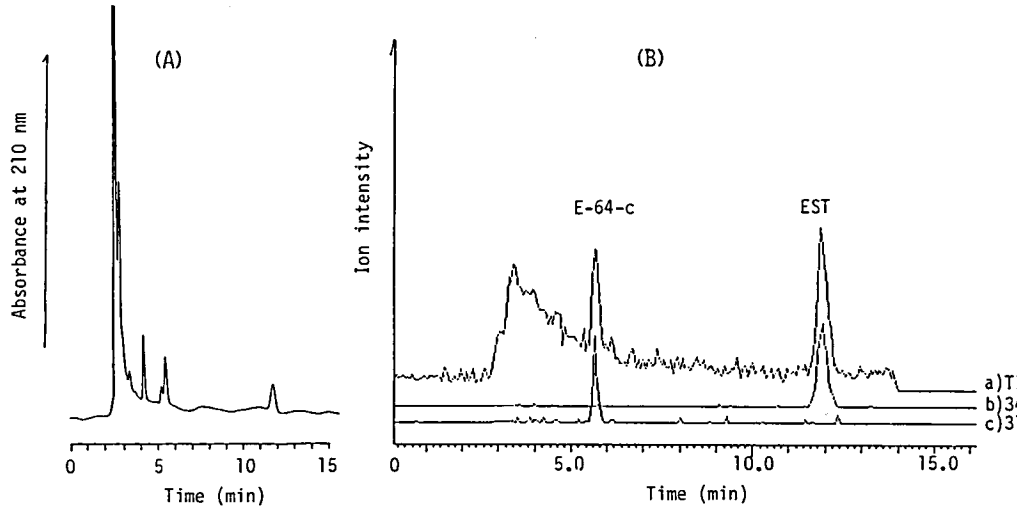


図6 Chromatograms of rat serum (10 μl) spiked with E-64-c and EST (0.5 μg each) obtained by (A) UV detection and (B) API-MS detection
HPLC mobile phase: methanol+0.1 M ammonium acetate (65: 35%, v/v).
The serum was pretreated with deproteinization and solid phase extraction.

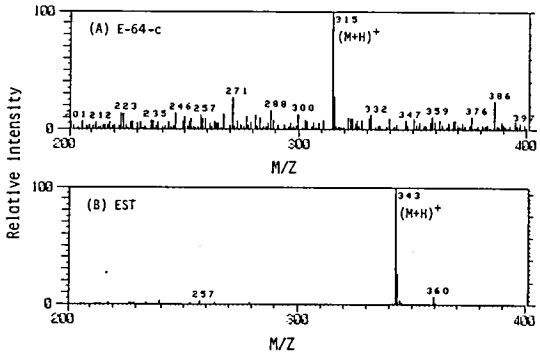


図7 Mass spectra of HPLC eluates for (A) E-64-c and (B) EST in rat serum

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) Chao, W. -F., Kai, M. and Ohkura, Y.: J. Chromatogr., **526**：77—86, 1990.

CANP 阻害剤の一般薬理学的研究
―筋ジストロフィー疾患モデル動物筋電図の定量的スペクトル解析に基づく薬効評価法―

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*

はじめに

筋ジストロフィー症治療薬の一般薬理学的ならびに薬効薬理学的な評価を行なうにあたり，適切な疾患モデル動物において妥当な方法により導出された生体活動を詳細に定量化解析することが有用な情報を与え得ることは言うまでもない．筋ジストロフィー症の疾患モデル動物としては，マウス，ハムスターを初めとする小動物がよく用いられており，その病態生化学ならびに病態生理学的性質について多くの知見が得られている．しかしながら，臨床・病態生理学的知見との対応の下に筋収縮機能を評価する上で，優れた指標であると考えられる呼吸筋群の筋電図活動を，小動物において定量的に評価する際，大きな障害となるのが，呼吸筋筋電図への心電図由来成分の混入である．本年度，我々は，胸腕部から導出された呼吸性活動を含む電気的活動から，この心電図由来成分を特異的に除去した上で筋電図性活動を定量的に評価する方法を確立した．さらに，この解析法を用いて，筋ジストロフィー症モデル動物に対する EST の薬効評価を試みた．

方法と結果

1．心電図由来成分除去法の確立

Pentobarbital (50 mg/kg, ip) 麻酔下の雌雄のゴールデン，および，UM-X 7.1 系ハムスターの左右の胸腕部から，単極性針電極 1 対を用いて，胸腕部の電気的活動 (10-1000 Hz) を導出したところ，著明な心電図由来性成分と，それに重畳する筋電図由来性成分が認められた (図 1)．そのパワースペクトル上には，心電図由来の成分に対応する大きいパワー値を示す成分帯域が認められた (図 1 下段)．15 秒間の安静自発呼吸下の記録をディジタル化した後，計算機を用いて心電図由来成分を R 波同期平均加算法 (加算回数 100 回以上) によって抽出し，1 心拍周期分の心電図由来成分の「鋳型」を作成した．これを，原波形中の総ての R 波前後の波形から減じることにより，心電図非由来性成分を算出したところ，その大部分を占めると考えられる胸腕部筋群の筋電図由来の成分を選択的に抽出し得た (図 2)．その抽出波形中には，同時導出された胸郭の呼吸性運動と同期した呼吸筋

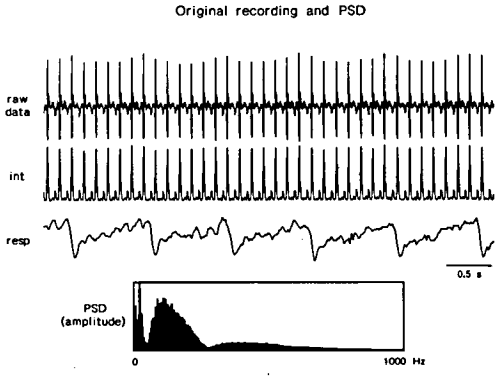


図 1　胸腕部から導出された電気的活動
raw data，原波形；int，整流平滑化波形；resp，胸郭部の呼吸運動曲線；PSD，パワースペクトル密度関数 (振幅)

* 東京慈恵会医科大学第二薬理学教室

群の筋電図活動が明瞭に検出された（図3）.

2．筋ジストロフィーハムスターの胸腕部筋電図に及ぼすESTの影響

雌雄のUM-X 7.1系(10週齢，11匹)ならびに，ゴールデンハムスター（9週齢，14匹）を各々2群に分け，1群の飼料中に0.375％のEST（約300 mg/kg/日に相当）を加え，26週間飼育した．ESTの適用終了後，さらに15週間，通常飼料で飼育した．EST適用開始後，0, 25, および40週目に上記方法にて，筋電図を導出し，パワースペクトル密度関数解析を行なった．推定されたパワースペクトルから，筋電図全体の分布を表わす以下の統計量を推定した（図4）．1）総パワー値（mean square value, MSV；0-1000 Hz），2）低周波数帯総パワー値（0-30 Hz），3）高周波数帯総パワー値（60-1000 Hz），4）高周波数帯／低周波数帯パワー比（H/L比），5）最大パワー周波数，6）平均周波数（0-1000 Hz），7）同上（50-1000 Hz），8）周波数の標準誤差，9）パワー密度分布の歪み(skewness)，10)パワー密度分布の尖り（kurtosis）．上記統計量の1）～3）は，ゴールデンハムスターではEST適用中に増大し，また，第40週で減少する傾向が全群で認められた．またUM-X 7.1ハムスターにおいて，適用開始25週目に，上記の2)が，ゴールデンハムスターと比し，有意に低い値を示し，これに伴って，筋疲労の程度を反映すると考えられているH/L比が増大した．一方，5）～7）の周波数軸上の分布形を表わす統計量は，全群において，EST適用の有無によらず加齢に伴う低下傾向が認められた．この事実は，同じ実験標本において，呼吸回数が加齢に伴い減少するという報告[1]と併せて，興味深い新知見である．

結　　語

本研究において開発された小動物の呼吸筋筋電図の定量化法を，さらに，BIOハムスターやmdxマウスなどの疾患モデル動物から導出された電気活動に応用することにより，健常人もしくは患者から非侵襲的に導出された筋電図との対応の下に，有効な薬効の評価法として応用され得るものと期待される．

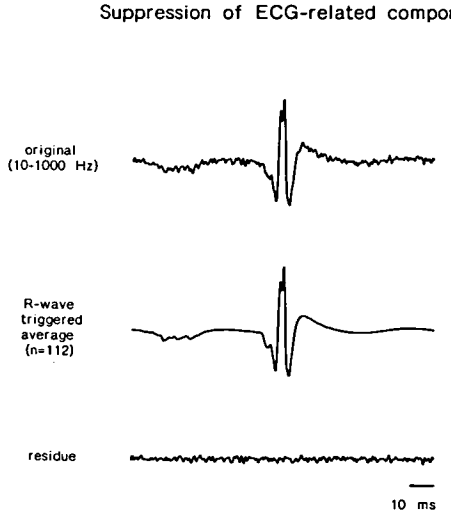


図2　心電図由来成分の除去法
上段，原波形．中段，R波同期加算平均波形．下段，原波形から加算平均波形を引いた波形．縦軸のスケールはいずれも同じ．

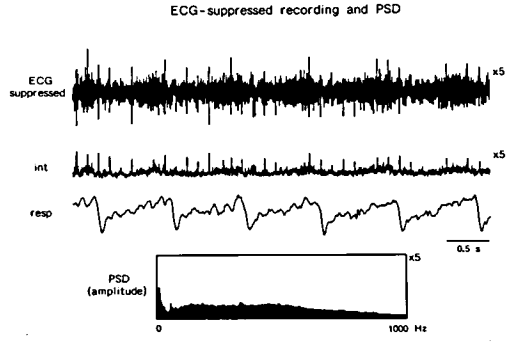


図3　図1の波形から心電図由来成分を除去した記録．×5は，図1に対し，縦軸のスケールが5倍に拡大されていることを表わす．詳細は図1参照．

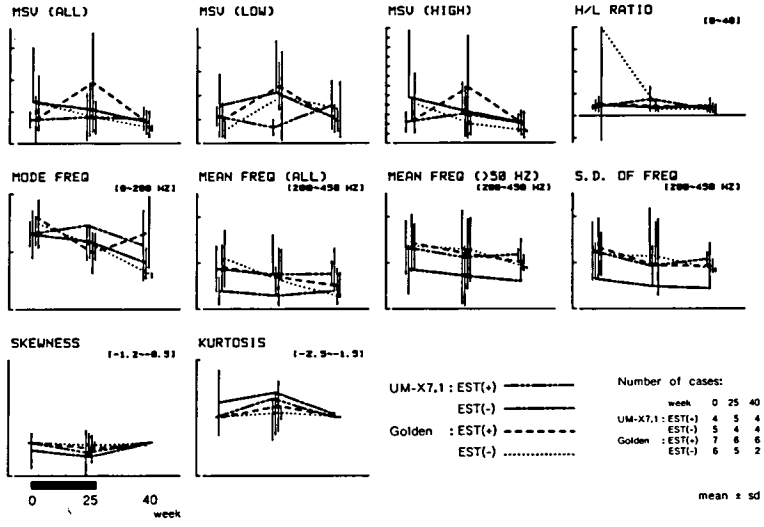


図4　胸腕部筋電図のパワースペクトル密度関数の全体的分布形状を表わす統計量とそれらに及ぼすESTの作用
詳細は本文参照．横軸は飼育の時間経過で，EST適用開始時点を0週とした（黒横線の期間でESTを投与した）．

文　献

1）福原武彦，木村直史，高野一夫，加藤総夫，中川辰郎，山田順子：EST (E-64-d) の筋ジストロフィーハムスター（UM-X 7.1系）の心電図に及ぼす影響．東京慈恵会医科大学雑誌，100 (6)：1233—1240，1985.

骨吸収疾患モデルに対するE-64誘導体の効果

勝沼信彦*

研究協力者　唐渡孝枝*　二川　健*　村田充男**
玉井正晴**　花田和紀**　横尾千尋**

研究目的と意義

臨床的には各種の分類・定義から各種の名が附されている．しかし，骨吸収現象のおこる主因は次の2つの相違なる内容から成り立っている．その第1はCa沈着に関与する要因であり，その代表例は最近著しい進歩を遂げたビタミンD_3などがある．第2は骨の支持タンパク（主にはタイプI，コラーゲンである）の分解に関与する要因である．この硬骨コラーゲンの分解亢進に関与するプロテアーゼの特定を進めている．今日迄の研究でカテプシン群のどれかがこれに重要な役割をはたしていることが明らかになってきたので，E-64やCystatin類などのカテプシン群の特異的阻害剤群による治療法の開発をすることを目的としている．

更に硬骨コラーゲン分解に大きな役割を演じているにもかかわらず作用機構不明のPTHとカルチトニンの作用点を解明しつつある．

研究結果

ラットを低カルシウム食で飼育したり，PTH投与による骨吸収現象を使用している．これらのラットの大腿骨の重量は著明に低下し，骨折し易い状態になっている．この場合に，骨からのCaの遊離と骨コラーゲンからのハイドロオキシプロリン（Hyp）の血中への遊離が増加している．この場合に骨のカテプシン群を測定するとカテプシンBのみは活性，量ともに50％程の増加がある．LとHには変化はない．このBの増量する機構と意義は不明であるが，この上昇は骨コラーゲンの分解には何らの関与をしていないことが明らかとなった．ここで大切なことはタイプIコラゲナーゼの活性は全く変化していないことであり，この酵素はE-64で全く阻害されないことである．これらのラットにE-64aを1度腹腔注射をして1時間後には血中のCaもHypも遊離が著明に抑制されて低下してくる．この投与により，骨カテプシン群はB，H，Lともに著明な阻害を受けている．この場合もコラゲナーゼ活性は全く変化しておらず，これは関与していないことが明確に示されている．骨の臓器培養でPTHにより著明な骨吸収がおこり培地へのCaとHypの遊離がおこるが，これもE-64の添加により抑制できた．従ってPTHの骨吸収亢進機構はカテプシンによるものであることが明らかとなった．

次にE-64で阻害されるプロテアーゼのうち，どのカテプシンが最も大きな関与をしているのかを特定する研究を進めた．まず，コラーゲンは極めてプロテアーゼで分解されにくいものであり，Hは分解できず，コラゲノリティック・カテプシンと言われるものの中ではLが圧倒的に強い分解能を持つ．我々はカテプシンBに完全な特異性のあるE-64誘導体を2種類CA-030とCA-074を開発した．その中でCA-030はin vitroのみでBに特異性があるが，in vivoでは特異性がない．CA-074は両者で極めて強いB特異性がある．さて，CA-074投与により骨

* 徳島大学酵素科学研究センター
** 大正製薬㈱総合研究所

表1　Effect of E-64 and low Ca diet on serum Ca, serum hydroxyproline and bone cathepsins

		Bone weight (g)	Serum Ca (mg/dl)	Serum Hyp (nmoles/ml)	Bone (Fumer) Z-F-R-MCA (B + L) (nmoles/min/mg)	Z-R-R-MCA (B)	R-MCA (H)	Suc-G-P-L-G-P-MCA (Collagenase)
Normal	—	1.21	10.4	52.6	3.40	0.58	0.37	0.55
	E-64a	1.18	9.8	42.6	0.58	0.16	0.18	0.54
Low Ca	—	0.94	7.9	86.7	4.55	0.83	0.43	0.50
	E-64a	0.96	6.6	70.8	1.92	0.30	0.16	0.45

(7 weeks Ca deficient diet, one hour after E-64a injection)

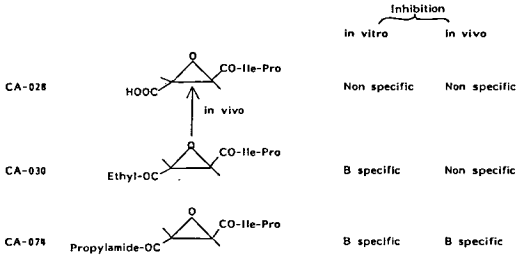


図1　Cathepsin B specific E-64 derivertives

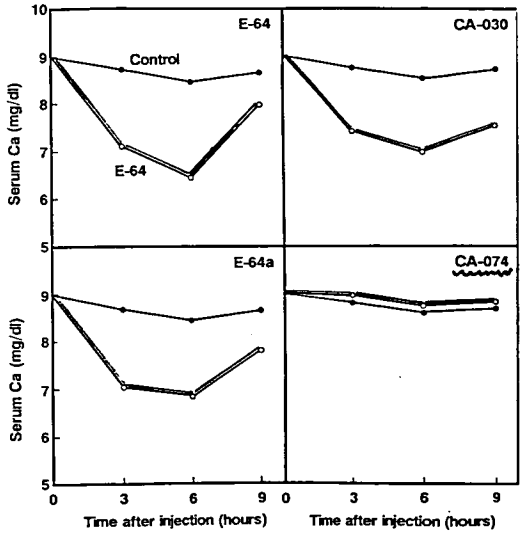


図2　Time course of serum Ca level response to E-64 derivertives

のカテプシンBは完全に阻害されている．しかしLは全く阻害を受けていない状態では骨からのCaとHypの遊離は抑制できない．即ち，カ

表2　Specific inhibition of cathepsin B *in vivo* by CA-074

		Z-F-R-MCA (B + L)	Z-R-R-MCA (B)	R-MCA (H)
Bone	Control	5.4 ± 1.4	0.89 ± 0.27	0.48 ± 0.05
	E-64a (8 mg/100 g B.W.)	2.0 ± 0.4	0.26 ± 0.06	0.23 ± 0.04
	CA-074 (8 mg/100 g B.W.)	3.1 ± 0.3	0.42 ± 0.04	0.43 ± 0.07
Liver	Control	78.6 ± 6.3	8.38 ± 0.59	6.35 ± 0.72
	E-64a (8 mg/100 g B.W.)	6.03± 1.81	0.18 ± 0.10	0.32 ± 0.16
	CA-074 (8 mg/100 g B.W.)	46.8 ± 13.3	0.74 ± 0.3	7.87 ± 1.60

(normal rats)

テプシンBは骨コラーゲンの分解に関与していないことになる．Lである可能性は一番高いが，まだ直接証明はない．

カテプシンの抗体によるウエスタンブロットで骨カテプシンを分析すると，大部分が活性の成熟型で存在している．恐らく活性成熟型で破骨細胞から分泌されるものと考えている．この点は大部分が不活性なプロ型で分泌されるマクロファージ等とは異なる．

更に強くはないが，大量のシスタチン（カテプシンの内在性インヒビター）A及びCで骨コラーゲンの分解抑制が見られるので，今後投与法等の改良を必要としているが，カテプシンが主役を演じていることのサポートの証明にはなっている．E-64誘導体でL特異性のあるものの開発，ならびにCathelinの如きL特異阻害剤のテストも大切である．

ジストロフィンの分子形態

丸　山　工　作*

研究協力者　　佐　藤　　治*

ジストロフィンは，そのアミノ酸配列から α-アクチニンと相同性の高いアクチン結合部，スペクトリンと似た細胞膜裏打ち構造ならびに特有部分から成る細長い分子と考えられている[1]．正常な筋細胞膜下での局在性[2]からみても，ジストロフィンはスペクトリンと同じように細胞膜の裏打ち構造を形成しているものと思われる．その意味からいっても，ジストロフィン分子の形態がどのようなものであるかはたいへん興味が持たれる．その分子の形状は，これから解明されるべき機能の理解に重要である．

ジストロフィンの低角度回転影付法による電子顕微鏡像については，すでに2つの論文が発表されている．ひとつは，私たちの結果で，ウサギ骨格筋から得られたジストロフィンは長さ100～120 mmの鉄亜鈴状ダイマーが末端結合してフィラメントをつくりうるという報告である[3]．これに対して，フランスのJ. Légerグループは，ニワトリ筋胃から単離されたジストロフィンが175±15 nmのフィラメント（モノマー）で，末端結合や側面結合がありうるとしている[4]．両者の形はまったく異なっている．

そこで，私たちのサンプルについて検討を重ねた結果をここにまとめてみたい．まず第1に，鉄亜鈴はサンプル中にごくわずかしか存在しない．これを不純物とみなすか，大多数を占める100 nmほどのフレキシブルロッドをジストロフィンの真の形とするかが問題となる．私たちは，フレキシブルロッドやもつれあった球状会合体を鉄亜鈴がくずれたのではないかと考えた．

ジストロフィンを高速液体クロマトグラフィ（HPLC）でゲル濾過して各画分について調べてみた．図1にみられるように，素通り画分に近いところからa，b，cの3画分を取ってみた．aには鉄亜鈴が，cはフレキシブルロッドが主成分であり，bは中間形であった．いずれもSDSゲル電気泳動パターンは430 KDaのジストロフィンが主成分であり，抗ジストロフィン抗体と反応した．少なくとも鉄亜鈴が不純物である可能性は否定できたといえよう．

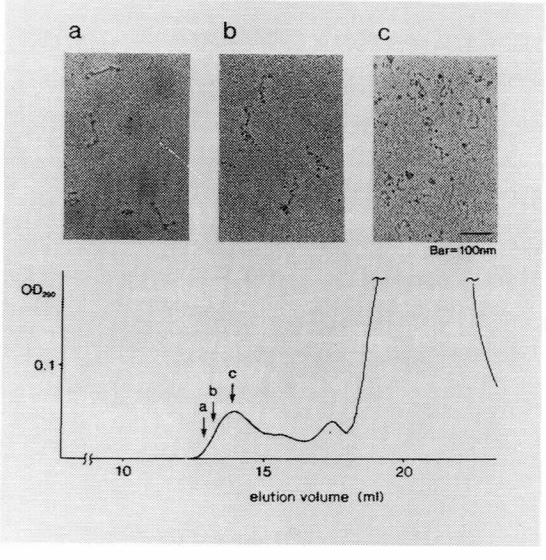


図1　高速液体クロマトグラフィによるゲル濾過（Asahi Pak GS-710）によるジストロフィン分画と電子顕微鏡像
溶媒：0.5 M NaCl，20 mM Tris-HCl（pH 7.5），0.01 mM DFP，0.05 % NaN_3，0.1 % TritonX-100．a，b，c画分の電顕像を上に示す．Bar，100 nm．

* 千葉大学理学部生物学科

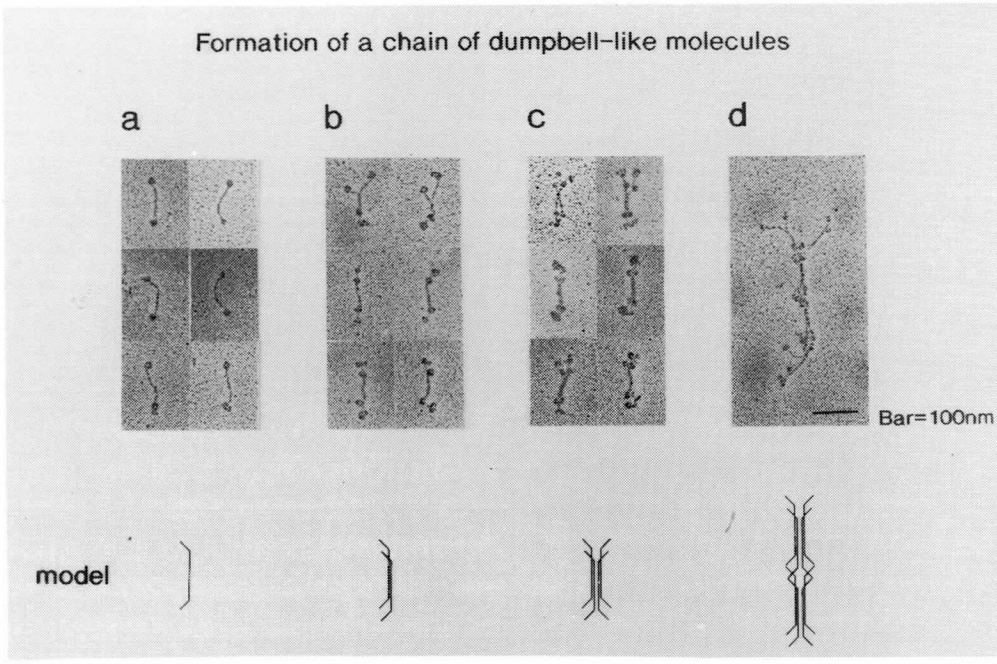


図2　ジストロフィン分子の会合モデル図1のa画分に見られる電顕像にもとづいて（a，b，c，d），鉄亜鈴状会合体の形成過程を推論した．

ひとつの可能性は，もともとジストロフィン分子は鉄亜鈴状ダイマーが末端結合した形で細胞膜下の裏打ち構造をつくっているが，可溶化と精製過程で大部分はフレキシブルロッドになるということである．図2は，図1のa画分で観察されたジストロフィン分子の電顕像からモノマー(a)，ずれた側面会合ダイマー(b)，(b)が会合したテトラマー(c)，さらにテトラマーが末端会合したオクタマーをモデルとともに示したものである．これらの考え方が正しいかどうか，さらに検討を重ねてゆきたい．

文　献

1）Koenig, M., Monaco, A.P. and Kunkel, L. M.: Cell, **53**: 219—228, 1988.

2）Arahata, K., Ishiura, S., Ishiguro, T., Tsukahara, T., Suhara, Y., Eguchi, C., Ishihara, T., Nonaka, I., Ozawa, E. and Sugita, H.: Nature, **333**: 861—863, 1988.

3）Murayama, T., Sato, O., Kimura, S., Shimizu, T., Sawada, H. and Maruyama, K.: Proc. Jpn. Acad., **668**: 96—99, 1990.

4）Pons, F., Augier, N., Heilig, R., Léger, J., Mornet, D. and Léger, J.J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**: 7851—7855, 1990.

ミエリン膜局在のCa依存性プロテアーゼ活性に対する各種脂質の影響

辻　　繁　勝*

中枢神経組織のミエリン膜分画中にCa^{++}依存性中性蛋白分解酵素（CANP）活性が存在することは，既にヒトおよび幾つかの哺乳動物について報告されている[1)~3)]．又，この酵素の生理作用としてミエリン膜構成蛋白のturn overに関与している可能性が指摘されている．我々は昨年度の報告でマウス中枢神経系においても同様な酵素活性が存在していることを示したが，同時にミエリン形成不全を発症するJimpyマウスの脳中でCANP活性が著しく上昇していることから，その症状発現の一因として，グリア細胞形質膜構成蛋白の分解亢進が関与している可能性を認めた．本年度はJimpy並びに正常マウス脳を用いてミエリン膜に局在するCANP活性の生理的意義を膜構成脂質との関連から追求する目的で研究を行った．

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B6CBA/J-jp系マウスの2-3週齢の発病個体（jp/Y）及び対照個体（+/Y）並びに5-10週齢の正常個体である．CANP活性の測定にはpeptidyl—MCA合成基質であるSuc-Leu-Tyr-MCA及びSuc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA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0.32 M庶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．内在性の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った．即ち，ミエリン膜標品3 mlとDEAEセルローズ（ワットマンDE 52）懸濁液を3：7の割合で混合し，4°Cで30分間攪拌した後，セルローズ粒子を分離し，これを緩衝液A（トリス-HCl：25 mM，pH 7.4，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回洗浄し，内在インヒビターを除去する．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回洗浄する．この洗浄液を合せたもの（15 ml）をインヒビター除去mCANP標品とした．実験に用いたミエリン膜構成脂質は，phosphatidylinositol (PI), galactocerebroside (GC), sulfatide (Sul), phosphatidic acid (PD)で，いずれもSigma社から購入した．脂質は予めクロロフォルム：メタノール(2：1 v/v)液に溶かした後，窒素ガスで乾燥させ，緩衝液（トリス-HCl：0.5 mM，pH 7.4）でソニケートした後使用した．ミエリン膜分画の指標として用いたCNPase活性はOlafsonらの方法[4)]によって測定した．

結　　果

まず内在性インヒビターを除去した酵素標品についてSuc-Leu-Tyr-MCA及びSuc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCAの2つの基質に対する水解活性の違いを調べる実験を行った．結果は表1の如く，活性値の違いはあるが，いずれの基質でもJimpyマウスにおいて約6倍の活性上昇が認められた．活性は0.5 mMのCa^{++}存在下

*和歌山県立医科大学第二生理学教室

表1 Activity change of Ca^{++}-activated neutral protease in CNS myelin at different substrate

Substrate	Jimpy	Control	J/C	Pr
A	112.6 ± 69.5	18.8 ± 3.4	6.0	P< 0.01
B	69.7 ± 21.8	11.7 ± 2.3	6.0	P< 0.01

A: Suc-Leu-Tyr-MCA
B: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA
Unit: mM AMC/30 min/μM CNPase

表2 Ca^{++}-activated neutral protease activities in CNS myelin fraction from Jimpy and control mice after removal of the inhibitor

Unit base	Jimpy	Control	J/C	Pr
CNPase*	131.2 ± 24.0	22.5 ± 4.6	5.8	P< 0.01
Protein**	87.5 ± 16.0	17.3 ± 3.6	5.0	P< 0.01

Unit: *; mM AMC/30 min/ M CNPase
**; μM AMC/30 min/10mg protein

表3 Lipid mediated activation of Ca^{++}-activated neutral protease in CNS myelin fraction

Conditions	% Stimulation
Enzyme + Phosphatidylinositol (300μM)	340.8 ± 21.3*
Enzyme + Sulfatide (800μM)	201.6 ± 17.3
Enzyme + Phosphatidic acid (250μM)	178.9 ± 18.7
Enzyme + Cerebroside (800μM)	145.2 ± 12.3

*: Values are expressed as mean ± S.E. of four different observations.
Percent change was calculated compared to enzyme activity alone.
Parenthesis show the concentration of each lipids.
0.5 mM Ca^{++} were added in each reaction medium.

での値から Ca^{++}-非依存性の活性値を差引いた値をミエリン膜の指標酵素である CNPase 活性単位で表したものである．次に CANP に対する特異的基質である基質Aに対する活性を蛋白量当りと CNPase 活性当りで比較した．結果は表2の如くであるが，Jimpy マウスと対照マウスの活性差がミエリン膜単位では約6倍であるのに対して蛋白量単位では約5倍と差が小さいことが認められた．この事は Jimpy マウスにおける活性上昇の一因としてミエリン膜自体の構造異常が係わっている可能性を示唆しているものと考えられる．そこで，ミエリン膜構成脂質がそこに局在する CANP 活性を賦活させる

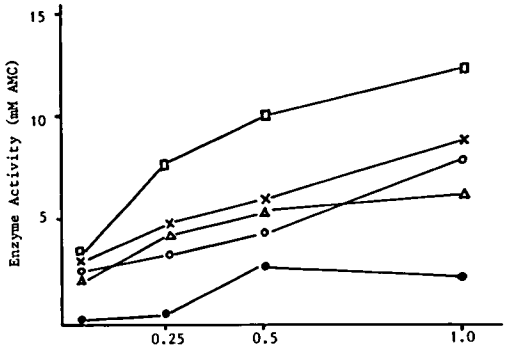


図 The effect of lipids on Ca^{++} sensitivity of myelin CANP activity. ● : enzyme alone, ○ : cerebroside, ▲: phosphatidic acid, □: phosphatidylinositol and ×: sufatide

可能性について検討を行った．結果は表3の如く添加した脂質が程度は違うがいずれも無添加の場合よりも活性増加をもたらしたことを示している．最も増加率の高いのは phosphatidylinositol で，対照の 341 %，最も低いのが cerebroside で 145 %の増加であった．次に添加する Ca^{++} の濃度と脂質の濃度との相互関係を示したのが図である．この結果は脂質を添加することによって賦活と同時に CANP の Ca^{++} 依存性にも変化が起こることを示している．

考　察

マウス中枢神経組織のミエリン膜中に mCANP 活性が存在することは昨年度の研究結果で報告したが，今回の実験結果によって，この酵素活性がミエリン膜構成脂質の或るものによって賦活されることが認められた．又これら脂質を添加することによって，CANP の Ca^{++} 依存性が変化する可能性が示唆された．更に Jimpy マウスにおけるミエリン膜 CANP 活性がミエリン膜単位で表示した場合と蛋白量単位で表わした場合に違いが認められたことから，Jimpy マウスでの活性上昇の原因の1つにミエリン膜構成脂質の異常が関わっている可能性が示唆された．Chakrabarti ら[5] はブタ脳中のミエリン膜 CANP 活性がミエリン膜構成脂質

の添加によって著しく活性増加することを報告している．今回の我々の結果はこの結果とよく一致しており，マウス脳においてもミエリン膜脂質がCANP活性に影響を与えていることが判明した．ミエリン膜構成脂質，特にPhosphatidylinositolがどの様な機序で膜局在のmCANPを活性上昇させ，又Ca^{++}-感受性を変化させるかについては更に詳細な検討が必要である．

文　献

1）Sato, S. and Miyatake, T. : Biomed. Res., **3**: 411, 1982.

2）Banik, N.L., et al. : J. Neurochem., **45** (2): 581, 1985.

3）Chakrabarti, A.K., et al. : Neurochem. Res., **14** (3): 259, 1989.

4）Olafson, R.W., et al. : Canad. J. Biochem., **47**: 961, 1969.

5）Chakrabarti, A.K., et al. : Biochem. Biophys. Acta., **1038**: 195, 1990.

mdx mouse に対する bestatin の週2回間歇投与の効果
—電気生理学的及び病理学的検討—

木下眞男*

研究協力者　岸　雅彦*　吉村牧子*　栗原照幸*
根本　博*　日高隆信*

我々は bestatin には mdx マウスの静止膜電位（RMP）改善作用と electrical myotonia を抑制する作用があることを指摘してきた．bestatin を筋ジスの患者に投与する場合，連日投与では CK の低下は持続しないが，間歇投与では CK の低下が投与後に一過性に見られることがある．このことより，今回我々は mdx マウスに対し，週2回の間歇腹腔内投与を施行し，その影響を電気生理学的及び病理学的に検討したので報告する．

方　法

約12週齢の mdx マウス3匹に対して bestatin 0.2 mg の腹腔内投与を週2回施行し，約8週間続けた．最終投与後2時間，1日，4日に横隔膜の電気生理学的検索及び骨格筋の病理学的検索を行った．

電気生理学的検索：mdx マウスの横隔膜標本を Tyrode 溶液に浸し，3 M の KCl を満たしたガラス管微小電極を用いて200本の筋線維の RMP および electrical myotonia の有無を調べた．200本の筋線維測定には約2時間要するため，統計学的解析は前半の100本と後半の100本に分けて行った．Bestatin の間歇投与に伴う効果が，最終投与された bestatin の直接効果だけによるものなのかを判断するために，同週齢の mdx マウスに同量の bestatin の腹腔内投与を1回だけ施行し，2時間後に同様の検索を行った．

病理学的検索：Bestatin 間歇投与を行った mdx マウス及び未治療の mdx マウスの腓腹筋，長趾伸筋，ヒラメ筋，前脛骨筋を採取後，すみやかに3μの凍結切片を作製し，Hematoxyline-Eosine 染色を施し光顕的に観察した．

結　果

Bestatin 最終投与後2時間の mdx マウスでは，未治療の mdx マウスに比べると，electrical myotonia の頻度はやや低下しており，RMP のヒストグラムでは low　RMP 筋線維の減少と high　RMP 筋線維の増加が見られた（図1）．Bestatin 最終投与後1日，4日と最終投与後の時間が長くなるにつれて，RMP に対する bestatin の効果は減弱する傾向にあった．（図2，3）．RMP の Wilcoxon test を未治療 mdx マウスと各 bestatin 投与マウスの間で行いそれぞれの p 値をみると，最終投与後1日までは RMP の改善が有意であることがわかる（$p < 0.01$）．又，どのマウスでも測定前半の RMP に比べ後半の RMP は低下している．これは横隔膜に浸透していた bestatin が wash out されるためと思われた．しかし electrical myotonia の頻度は最終投与後の時間とはあまり関係なく，未治療の mdx マウスよりわずかに改善した状態を維持してきた（表）．

未治療の mdx マウスに対し，bestatin を1回だけ腹腔内投与し，投与後2時間に同様の検索を行った．RMP はヒストグラム上，やや low

*東邦大学医学部第四内科

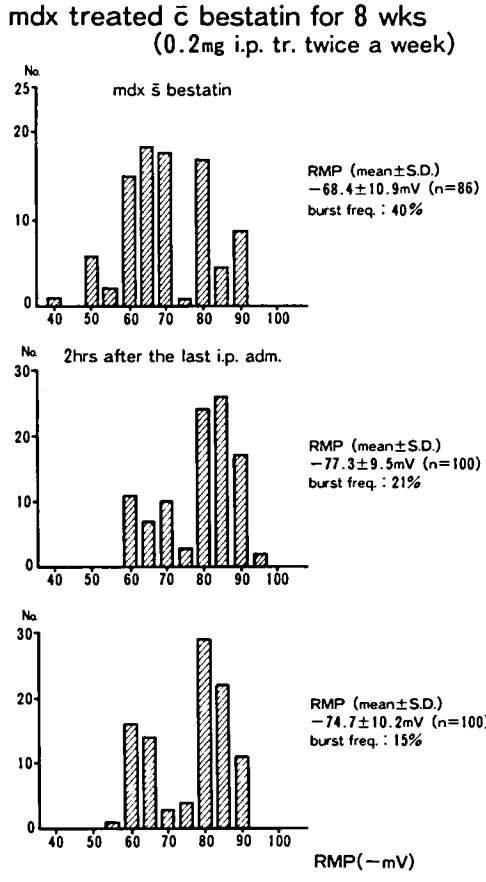


図1　Bestatin 間歇投与 mdx マウス．最終投与後2時間では low RMP 筋線維の減少と High RMP 筋線維の増加が明瞭である．Electrical myotonia の頻度（Burst freq.）は，未治療 mdx マウス（上段）よりも減少している．測定後半の RMP(下段）は測定前半の RMP（中段）と比較すると，bestatin の効果は wash out のために減弱している．

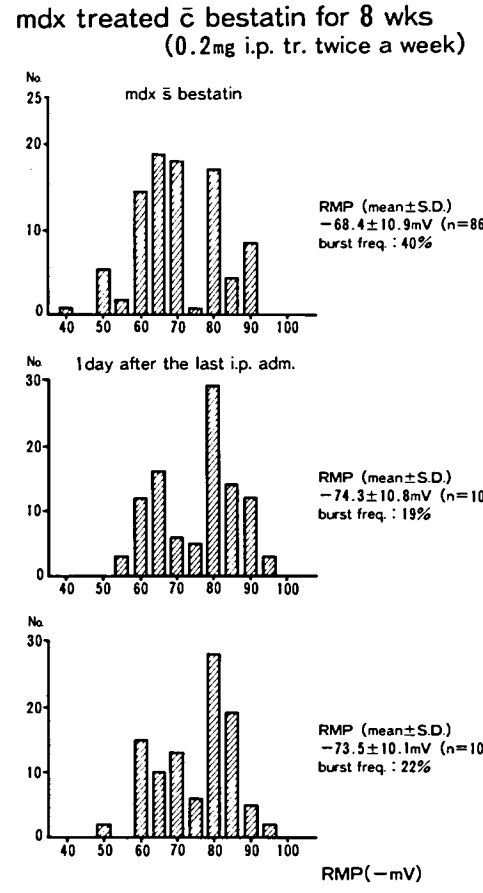


図2　Bestatin 間歇投与 mdx マウス．最終投与後1日でも low RMP 筋線維の減少と High RMP 筋線維の増加が見られる．

RMP の筋線維が減少し，high RMP の筋線維が増加する傾向を認めたが（図4），Wilcoxon test では有意差が認められなかった（$p<0.01$）．Electrical myotonia の頻度は週2回投与を続けた mdx マウスと同様にやや低下していた（表）．

病理学的には約12週齢の未治療 mdx マウスでは，筋線維の大小不同，小さな群性の壊死線維がみられ，ほとんどの筋線維で中心核を有している．Bestatin の間歇投与 mdx マウスで

表　Bestatin の RMP 改善効果は最終投与後，時間がたつにつれて減弱するが，electrical myotonia の頻度の減少は持続している．Bestatin の1回投与では投与後2時間でも8週間の間歇投与していたもののように RMP の改善作用は著明ではない．

Resting membrane potentials (RMPs) and burst frequency of the bestatin treated mdx mouse
(Wilcoxon test between non-treated and treated mdx mouse)

	RMP±S.D. (mV)	burst freq.	P value
·Non-treated mdx mouse	-68.4±10.9	40%	Control
·Single treated mdx mouse.			
2hrs after bestatin i.p.	-72.2± 9.9	15%	0.010119
	-71.9± 9.8	11%	0.015411
·Treated mdx mouse by 0.2mg bestatin i.p. twice a week			
2hrs after last adm.	-77.3± 9.5	21%	0.000000*
	-74.7±10.2	15%	0.000116*
1day after last adm.	-74.3±10.8	19%	0.000349*
	-73.5±10.1	22%	0.001093*
4days after last adm.	-72.1±10.4	25%	0.015358
	-71.5±10.9	22%	0.040211

Wilcoxon test: $p<0.01$*

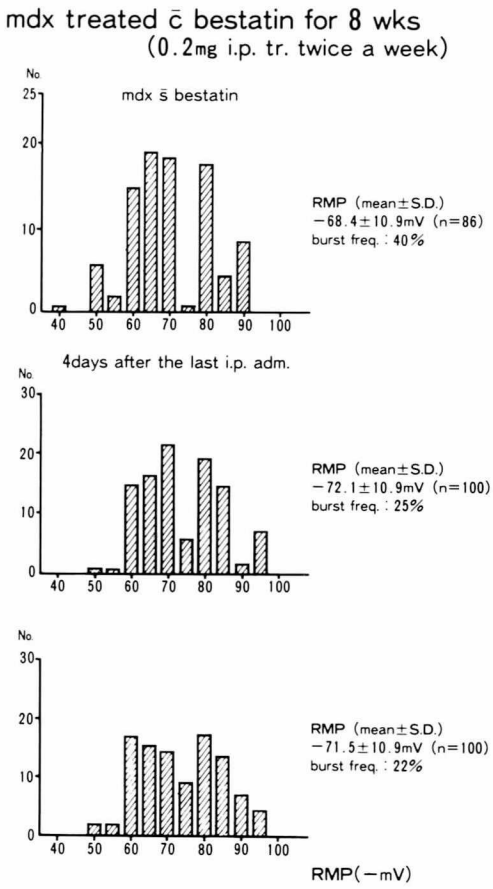


図3　Bestatin 間歇投与 mdx マウス．最終投与後4日では low RMP 筋線維の減少と high RMP 筋線維の増加はわずかに見られるが，未治療 mdx マウスとの差は明瞭ではない．

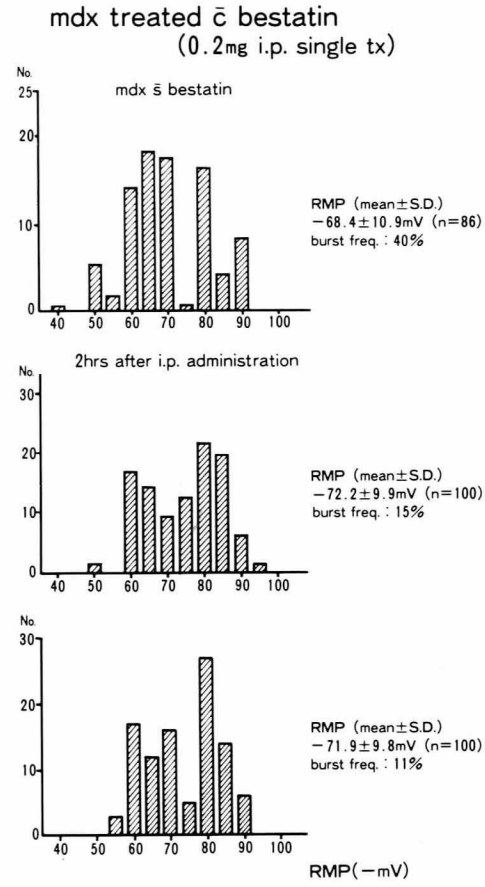


図4　Bestatin 1回投与 mdx マウス．Bestatin 投与後2時間では RMP のパターンには明瞭な変化は現れない．electrical myotonia の頻度は減少している．

も同様の所見を呈し差は認められなかった（図5）．

考　　察

我々は最初，bestatin 10 mg/day 腹腔内投与を1週間連続して mdx マウスに対して行ない，RMP 改善と electrical myotonia が抑制される事を見いだした[1),2)]．しかし，このような bestatin の作用機序は不明である．ただ，抗不整脈剤であるが，DM 性ニューロパチーや paramyotonia に有効であると言われている mexiletine には mdx マウスの RMP を改善する作用があるとする，意見もある[3)]．

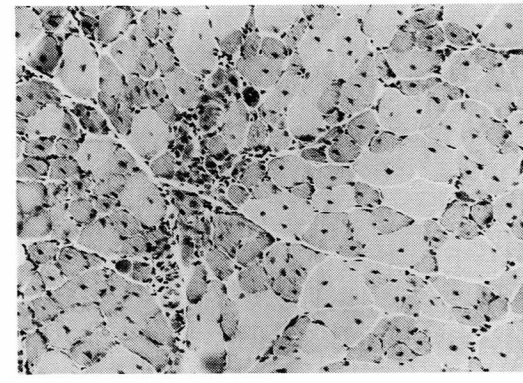


図5　HE 染色．Bestatin 間歇投与 mdx マウスでも筋線維の大小不同，小さな群性の壊死線維がみられ，未治療 mdx マウスとの差はない．

今回は間歇的投与を行ったが，生下時より1カ月連続投与を行った埜中らの報告[4]と同様に，病理学的改善は認められなかった．今回は前回の連続投与よりも少用量のbestatinを間歇投与に用いたが，この用量でも電気生理学的にはelectrical myotoniaの抑制は見られ，これは投与間歇時にも持続して見られた．しかし，RMPの改善作用は投与後の時間が長くなると徐々に減弱してくる．このことは，RMP改善作用はbestatinの体内濃度の影響を受けており，さらにRMP改善を認めるbestatin濃度はelectrical myotoniaの抑制を認めるbestatin濃度よりも高いため[5]と思われた．未治療のmdxマウスに同用量のbestatinを1回腹腔内投与しただけではelectrical myotoniaの抑制は見られるが，RMP改善作用は明確には見られない．この投与量でRMP改善作用を出現させるためには，間歇的bestatin投与により体内のbestatin濃度が上昇している必要があると考えられた．

間歇的bestatin投与は電気生理学的に有効と考えられたが，病理学的に変化はなく，一時的効果と思われた．Bestatinは高価な薬であり，このような方法が今後残された方法ではないかと思われた．

文　献

1）木下眞男，岸雅彦ほか：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，pp 19—21，1989.

2）Kishi, M., Kurihara, K., Hidaka, T., et al.: The stabilizing effect of bestatin on the resting membrane potentials of X-linked muscular dystrophy mice. Jp J Psy Neurol, 44: 595—600, 1990.

3）栗原照幸，日高隆信ほか：mdxマウスの電気生理学的及び治療的研究．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成因と治療法開発に関する研究（荒木班）平成2年度研究報告書，印刷中．

4）埜中征哉，田辺雄三：mdxマウスに対するロイペプチン，ベスタチンの投与成績．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薬(ロイペプチン)の開発研究（梅沢班）昭和59年度研究報告書，pp 71—75，1985.

5）木下眞男，岸雅彦ほか：mdxマウスに対するbestatin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）平成元年度研究報告書，pp 49—52，1990.

DMDにおける筋障害の進行過程
—CTによる2年間の経時的評価—

石原傅幸*

研究協力者　里宇明元*　江端広樹*　道免和久*
青柳昭雄*　儀武三郎*

はじめに

我々はCTによる定量的評価法を用いて，DMD例の筋障害の進行過程を検討し，71例を対象とした横断的研究により表1のような結果を得た[1]．さらに昨年の本会議ではEST治験例10例を対象に1年間の縦断的追跡を行い，1)筋障害の進行過程に関して先の横断的研究と同様の結果が得られたこと，2)進行が速い例と遅い例が見られたこと，および3)CT所見の推移と筋力やADLの推移との間にある程度の相関が認められたことを報告した[2]．今回はさらに長期間の追跡を行ったのでその結果を報告する．

対象および方法

対象はCTの評価を含めて2年間追跡し得たEST治験例8例で，開始時の年齢は5歳から8歳，最終評価時の年齢は7歳から10歳であった．スウィンヤードステージは開始時がステージ2が6例，3が2例，2年後は2が5例，5が2例，6が1例で，ステージ不変が5例(ステージ2→2)，2段階悪化が1例(3→5)，3段階悪化が2例（2→5，3→6）であった．

CTによる評価は初回と1年後，2年後の3回行った．CTスキャナーは日立CTW-500を用い，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と下腿最大径部とし，大腿と下腿各筋のCT値と%断面積を求めた．%断面積はCT値が30から120 HUの範囲に入る筋の%断面積と−60から−200 HUの範囲に入る脂肪の%断面積を求め，残存する筋の割合と脂肪置換の程度を評価した．評価法の詳細は文献を参照されたい[1]．さらにESTプロトコールで用いられたADLスコアおよび徒手筋力テストによる筋力の推移とCT所見の推移との比較を行った．

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

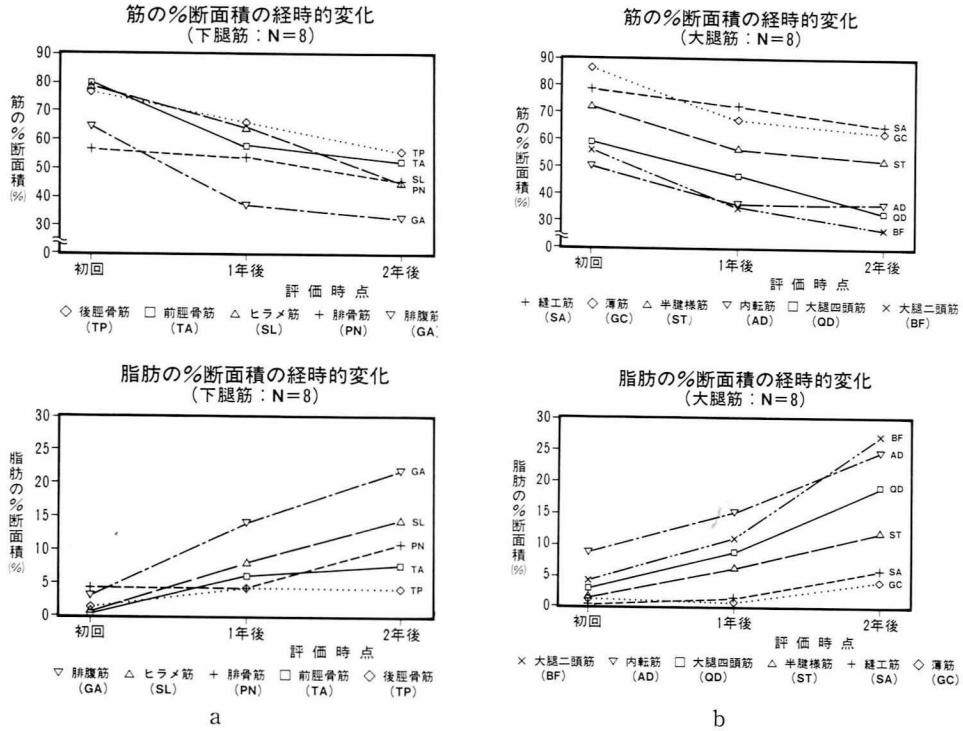
筋群	初期	中期	晩期
骨盤帯 体幹	大臀筋 中臀筋 大腿筋膜張筋	腸腰筋 腰方形筋 傍脊柱筋	腹直筋 腹斜筋
大腿	大腿二頭筋 内転筋群 大腿四頭筋	半腱様筋 半膜様筋	縫工筋 薄筋
下腿	腓骨筋 腓腹筋	前脛骨筋 ヒラメ筋	後脛骨筋

*国立療養所東埼玉病院

結果

1．下肢筋の障害の経時的変化

図1aに下腿筋の筋と脂肪の%断面積の8例の平均値の経時的変化を示す．各筋とも経過とともに筋の%断面積が低下し，脂肪の%断面積が増加する傾向が認められたが，その程度は腓腹筋が最も著しく，腓骨筋，ヒラメ筋がこれに続き，前脛骨筋と後脛骨筋は変化が比較的少なかった．大腿筋においても同様に経過とともに



a　　b

図1　筋および脂肪の%断面積の経時的変化
a．下腿筋　　b．大腿筋

筋の%断面積が減少し，脂肪の%断面積が増加する傾向が認められたが，その程度は大腿二頭筋，大腿四頭筋，内転筋群で著しく，ついで半腱様筋，半膜様筋と続き，縫工筋と薄筋は変化が比較的少なかった（**図1b**）．実際のCT像を**図2**に示す．

2．筋障害の進行速度の個人差

図3に示すように筋障害の進行程度には個人差があり，図中の症例A，B，Fは変化が速いのに対し，症例C，E，Dは変化が軽度であった．ただし，EST実薬群とプラセボ群の間にはCT所見からみた筋障害の進行の程度に関し，有意差は認められなかった（**表2**）．

3．CT所見の推移とADLスコア，筋力の推移との関係

図4に代表的な症例の各評価項目の初回評価時，1年後，2年後の値を示すが，ステージが2から5と進行が速かった症例Aでは，ステージの進行，ADLスコア，膝伸筋筋力の低下と大

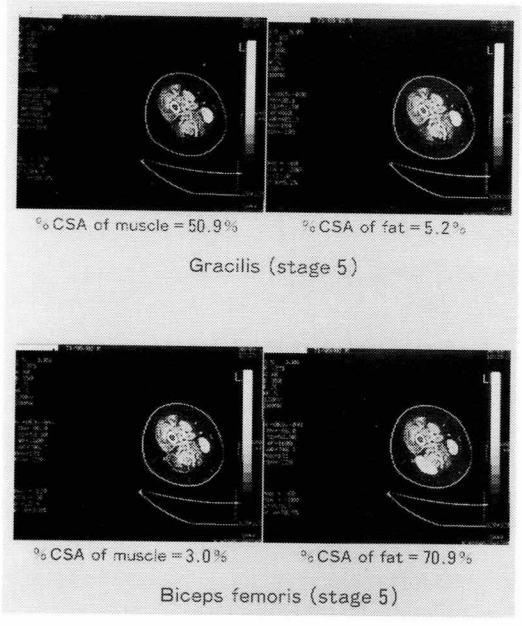


図2　障害程度の筋による差：ステージ5の症例の薄筋と大腿二頭筋のCT像を示す．薄筋は筋の%断面積が50.9%，脂肪の%断面積が5.2%であるのに対し，大腿二頭筋はそれぞれ3.0%，70.9%と，両筋には大きな差が見られる．

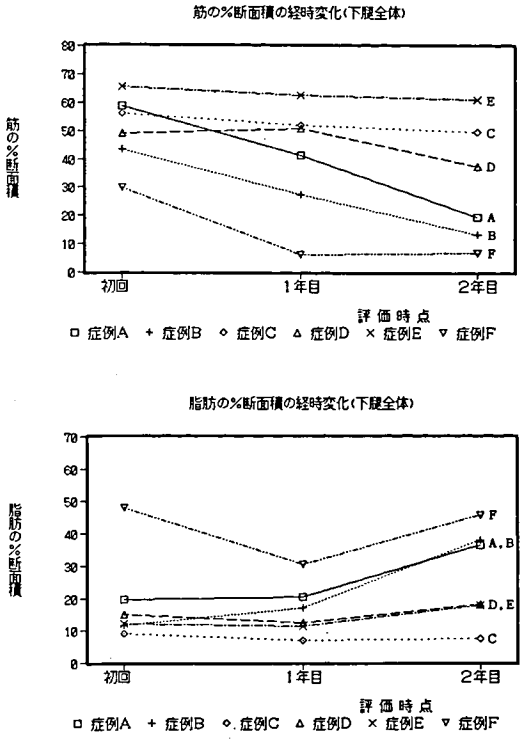


図3　筋障害の進行速度の個人差

表2　CT所見の推移とEST治験薬との関係
(N=8)

	ﾌﾟﾗｾﾎﾞ群	実薬群
CT所見悪化	1	2
CT所見不変	4	1

$*\chi^2 = 1.74$ (NS)

腿，下腿の筋の%断面積の低下および脂肪の%断面積の増加が平行して進んでいた．これに対し，ステージが初回評価時，2年後ともに2と不変であった症例Eでは他の評価項目も大きな変化が見られなかった．他の症例においてもCT所見の推移はステージ，ADL，筋力の推移とよく一致していた．

考察およびまとめ

今回我々はCTによる定量的評価法を用いてDMD 8例の下肢筋の障害の進行過程を2年間経時的に追跡した．その結果，以前の横断的研究とほぼ同様の結果が得られ（表1），従来の我々の報告の妥当性を確認することができた．今回の対象例ではCT上筋障害の進行が速い群と遅い群の2群が見られたが，EST実薬群とプラセボ群の間に差は認められなかった．このように筋障害の進行は一定の順序をたどるにもかかわらず，その進行速度には症例により差がある理由は不明だが，今後さらに多数例の縦断的追跡を行い，解明していく必要がある．また，CT所見の増悪と平行して，ステージの進行，ADLスコアおよび筋力の低下が認められたことは，我々のCTによる定量的評価法の妥当性を示すものと思われる．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補助手段として有用と考えられ，今後さらに長期間の追跡を行っていきたい．

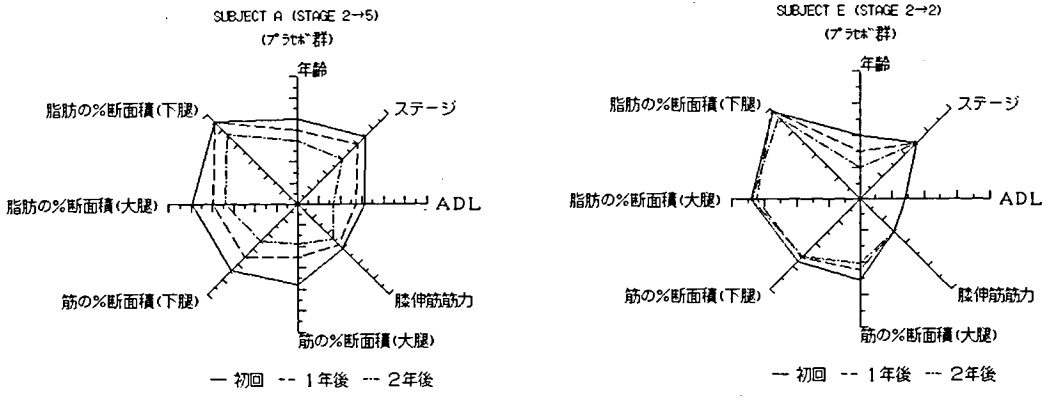


図4　CT所見の推移とステージ，ADL，筋力の推移との関係（本文参照）

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，里宇明元ほか：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—．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，pp61—64，1990．

培養神経細胞に及ぼす自己免疫筋抗原（SE-antigen）の作用の検討

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角筋管細胞が合成し，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．6) ヒト血中に存在するが疾患特異性はなく血中濃度は年齢とある程度相関する．

以上の知見から SE-antigen は横紋筋細胞の細胞外マトリックス成分として，神経細胞の生存や突起形成になんらかの機能を果たすのではないかと推定し検討した．

方　法

神経細胞の培養：ふ化 10 日の鶏胚から交感神経節を摘出し，0.08 %トリプシンで 37°C 30 分間インキュベートしたのち，ピペッティング操作で個々の細胞に分散し，予め poly-L-ornithine コートした 96 穴マルチウエルプレートに播種した．培養液は無血清完全合成培地を用いた（Dulbecco's MEM medium/Ham's F-12 medium の 1：1 混合培地に insulin 5 μg/ml, transferrin 5 μg/ml, 2×10^{-8} M progesterone, 3×10^{-8} M Na_2SeO_3, 0.5 %牛血清アルブミンを含む）．

実験 1：神経細胞の培養開始と同時に nerve growth factor (NGF) や，種々の筋抗原画分を培養液に添加し，5 % CO_2 下，37°C で 2 日間培養後生存する神経細胞数を数えた．

実験 2：培養液で予め希釈した筋抗原を培養ウエルに添加，4°C で 15 時間インキュベートした後，よく洗浄し，分散した神経細胞を添加した．実験 1 と同じ条件で 2 日間培養し，細胞の直径より長い突起を持つ神経細胞数を数えた．

筋抗原サンプル：これまで行ってきた筋抗原の各部分精製画分を用いた．M-1（ラット骨格筋の PBS 抽出物），M-2（セファロース 6 B クロマト溶出の高分子画分），M-3(高速液体クロマトグラフィーで溶出された活性画分の一つ)，M-4（抗原認識モノクローナル抗体の固相アフィニティクロマト画分），M-5(抗原非認識抗体によるアフィニティクロマト画分)．

結果と考察

神経細胞生存維持活性：実験 1 の結果を図 1 に示した．単位面積当たりの生存神経細胞数は nerve growth fact or (NGF) の存在下で最大値を示した．M-1 画分は 1.4 mg protein/ml で NGF とほぼ同等の活性を示すことから，筋抽出物中には交感神経細胞の維持に関与する因子が存在することを示している．しかし NGF と同一物質かどうかは確認していない．M-4 画分

*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
***岐阜薬科大学分子生物

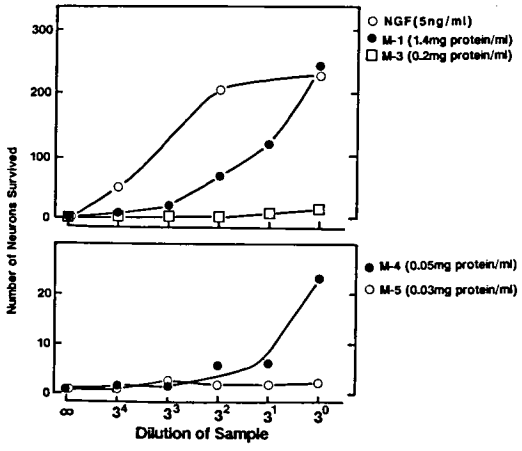


図1　各骨格筋分画成分の培養交感神経細胞に対する生存維持作用
骨格筋から調製した各画分を段階希釈し，交感神経細胞の培養液に添加した．2日間培養後，ウエル中心部の4 mm² に存在する生細胞数を位相差顕微鏡下で数えた．

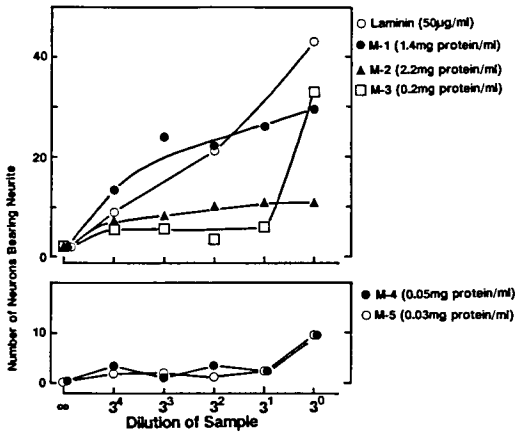


図2　各骨格筋分画成分の培養交感神経細胞に対する神経突起伸展作用
骨格筋から調製した各画分を予めウエルにコートしておき，交感神経細胞を培養した．24時間培養後，ウエル中心部の4 mm² に存在する生細胞のうち突起をもつ細胞数を位相差顕微鏡下で数えた．

には抗原物質と非抗原物質が含まれるがM-5画分はそのうち非抗原物質だけを含むことがわかっている．この両者の比較によって筋抗原の作用を類推することができるはずである．図1下段に示すように0.05 mg protein/mlのM-4画分に弱いながら活性が見いだされるがM-5には見いだせない．またラミニンにもこの活性はない．このことから筋抗原SEは弱いながら交感神経細胞の生存維持活性をもつと推定される．

神経突起伸展作用：実験2の結果を図2に示した．この実験系で強い作用を持つラミニンは50 μg/mlで最大作用を示した．M-1画分は非濃度依存的に，M-3画分は0.2 mg/mlでラミニンに比肩し得る活性を示した．しかし，M-4，M-5画分ともに実験に供した濃度内ではまったく神経突起形成を促進しなかった．

以上の結果から，自己抗原物質SEには弱いながら交感神経細胞の生存維持作用があるが，神経突起伸展作用はないと推定した．自己免疫疾患において自己抗体にさらされることによりSEが崩壊し，神経機能維持作用が妨害される可能性が示唆された．

文　献

1）Akazawa, S., Furukawa, S., Kamo, I., Satoyoshi, E. and Hayashi, K.: An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against saline-solukle muscle components in myasthenia gravis. J. Immunol. Methods, **94**: 161, 1986.

比較的良好な経過を示したいわゆる Duchenne 型筋ジストロフィーの臨床特徴

福　山　幸　夫*

研究協力者　大　沢　真木子*　池　谷　紀代子*　平　沢　恭　子*
新　井　ゆ　み*　須加原　信　子*　池　中　晴　美*
炭　田　沢　子*　斎　藤　加代子*　宍　倉　啓　子*
鈴　木　暘　子*　小　沢　鍈二郎**

目　的

薬効評価を通じ，Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の経過にはかなりの変異があり，いわゆる良性例が存在することが判明してきた．欧米では境界型，中間型ともいわれる．小児腰帯型筋ジストロフィーの良性経過例の臨床特徴を検討し，予後判定を小児期早期に可能とするための基準を確立する．

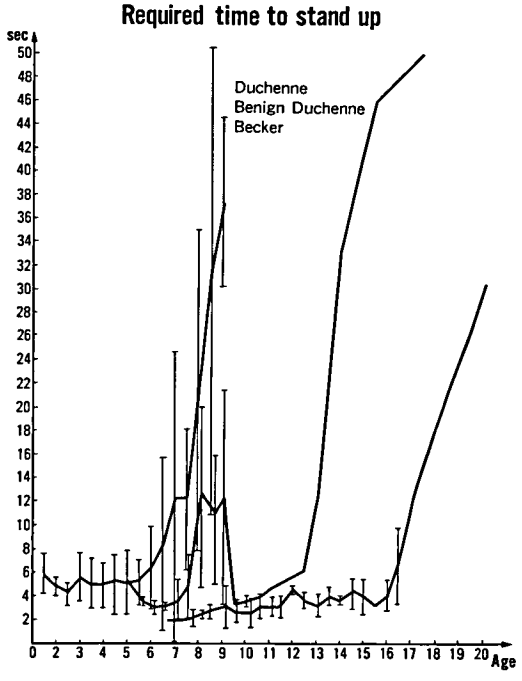


図1　Required time to stand up

方　法

女子医大小児科を受診し，半年毎に 10 m 走行・立ちあがり所要時間を測定しえた小児腰帯型筋ジストロフィー（1-20 歳；延べ 283 回数）例を，その経過により Duchenne, 良性型, Becker 型に分け同動作所要時間の平均±標準偏差を算出した．また DMD/Becker 型（BMD）両型の中間的位置を占める 4 例につきその臨床特徴を分析検討した．また 3 例で，Dystrophin 蛋白分子の部分に相当する合成ペプチドを用いてウサギで作成したポリクローナル抗体 PO 4, POO, P 23, P 34 を用いて免疫組織染色を施行した．

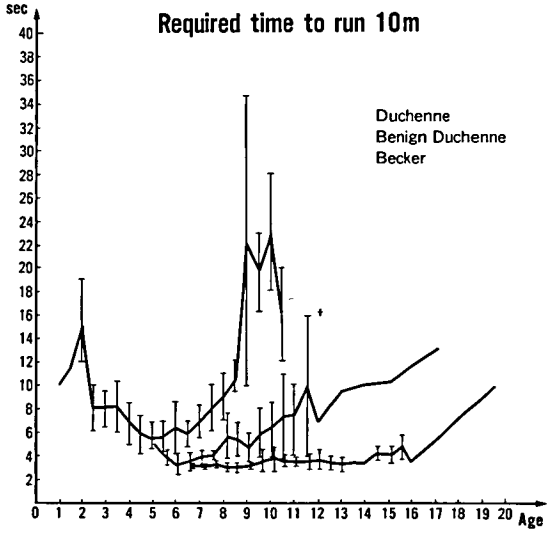


図2　Required time to run 10 m

＊東京女子医科大学小児科
＊＊国立精神・神経センター神経研究所

表　良好な経過を示したいわゆる Duchenne 型の臨床

		OH	KI	SM	MK
初診年齢		10y 7m	12y4m	6y0m	4y11m
最終観察時	年齢	18y 1m	16y6m 死亡	7y11m	11y6m
	機能経過	低下中	低下中	上昇中	低下中
定頸		4m		3m	4m
坐位保持		1y		7m	10m
いざりばい		+		−	−
四つ這い		−		+	1y
歩行開始		1y8m	1y8m	1y9m	1y8m
走り方		速歩様 (6Y ～)	つま先で小走り	走れる (5y ～)	走れる (6y～)
両足とび不可				5y	4 ～5Y
両足とび獲得		2 ～3cm		5cm:6 ～7y	20～30cm:6～8y
両足とび不能		12y3m		7y11m 可	10y7m
階段	片足交互	6y		～7y11m	～11y6m
	両足揃え	8Y		／	／
上昇	片手手摺要	10y		／	／
立ち挙がり不能（支え無しで）		14y2m	12y11m	7y11m 可	11y6m 可
歩行不能		18y1m 一応可	13y5m	7y11m 可	11y6m 可
臥位→坐位：腹筋使用		～15y1m		～7y11m	～11y6m
筋力	頸部	前屈＞後屈	前屈＞後屈	前屈＜後屈	前屈＝後屈
	躯幹	前屈＞後屈		前屈＜後屈	前屈＜後屈
	膝	伸展＞屈曲	伸展＜屈曲	伸展＜屈曲	伸展＝屈曲
顔筋罹患		軽度	軽度	軽度	軽度
巨舌		−	+	−	
下顎前突		+	+	+	±
仮性肥大		下腿	下腿	下腿・大腿	下腿
PTR		17y3m −	初診時−	7y11m +	10y9m +
ATR		17y4m 減弱	16y6m	7y11m +	10y9m +
下肢痛		11y -12y		−	発熱時 4y～
心拡大			16y3m		
CPK		5380	5070	11380	7709
IQ		99		86	88
家族歴		健康兄	健康兄	健康兄	健康妹
母CK		np	np	np	np
Dystrophin		±	±（剖検筋）	+	未施行

結　　果

1. 立ち挙がり所要時間（図1）

DMD では 2-5.5 歳で 4-5 秒とほぼ横這い，良性 DMD では 5.5-7.5 歳で，BMD では 7.5-12 歳でいずれも 2-4 秒の最短値を示していた．

2. 10 m 走行時間（図2）

DMD では 4.5-5.5 歳は 5 秒，良性 DMD では 5.5-7.5 歳に 3-4 秒，BMD では 6.5-14 歳に 3 秒，7.5-12 歳に 2-4 秒と最短値を示していた．

3. 良性経過をとった DMD の臨床

1) 表に良性の経過をとった 4 例の臨床像を示す．この 4 例が均一なものか否かは現段階では結論できない．MK は両足跳躍の力が強く，やや異質な印象をうけている．共通点は乳児期発

症の腰帯筋優位の筋ジストロフィーであること，乳児期の低緊張が目立つことであった．例えばOHでは，4ヵ月より定頸開始するも腹臥位で頭部挙上不可，5ヵ月過ぎても陽性支持反応無く下肢を屈曲してしまい，7ヵ月：坐位保持可となるも，背が丸くなった．6歳より状態改善するも，8歳より再び筋力低下に気付いている．10歳6ヵ月初診時，筋力：頸部の前屈4／後屈3，股関節屈曲伸展3，他は4であり，仰臥位から坐位への変換は腹筋使用，その後蹲踞姿勢となり上半身前屈のまま臀部挙上し，上肢の力を借りて上体を起こしていた．他の3例とも共通して頸部・軀幹の前屈筋が3以上あり，頸の前屈・臥位から坐位時の腹筋使用が可能であった時期がある．

2) 筋CT

KIを除く3例の筋CT値をみると，SMとMKはBMDのそれと近似しており，いずれもgracillisよりもquadriceps femorisの方が高CT値を示していた．

3) Dystrophinを用いた免疫組織染色

HOは正常に比し細胞膜の染色性が弱く不均一な染色性（荒畑らのpathy or discontinuous pattern）を示し，SMは細胞膜が連続的に一様に強く染色された．

考　　案

薬効評価に際しDMDではその経過が不均一であることが問題となり，将来の臨床経過を予測可能な小児期早期における指標が望まれている．今回の我々の検討結果からは，立ち挙がり所要時間が6歳以上の時点で約3秒ないしそれ以下，10m走行時間が7歳以上の時点で約4秒ないしそれ以下であれば良性の経過をとるであろうことが推測された．

DMDとBMDの中間的経過を呈する例の特徴として乳児期に筋緊張低下が目だつこと，6-8歳頃に患児なりの最高機能を呈し，頸部・軀幹の前屈筋の筋力が3以上あり，臥位から坐位へ腹筋利用による起き挙がりが長期に可能である．両足とび可能あるいは他児とほぼ同様に走行可能である時期を有することがあげられる．

Dystrophinに対するポリクローナル抗体PO4による免疫組織染色の結果から，SM例は肢帯型と考えられる．HOは臨床像からは肢帯型と考えていたがBeckerと診断すべきなのかもしれない．いずれにせよこれら良性経過をとった4例が同一疾患に属するか否かは今後の検討を待ちたい．

以前我々は乳児期に筋緊張低下が目だち，著明な筋の仮性肥大を呈する例をsevere Duchenneとして報告した．乳児期に筋緊張低下が目だつ点では今回良性経過を呈した例と類似しているが，これらの例ではdystrophinは陰性であった．

ベスタチンのDuchenne PMD投与に対する免疫グロブリンの変動

村 上 慶 郎*

研究協力者　岡 崎　隆*　西 岡 昌 紀*

はじめに

私どもは酵素阻害物質であるフォルフェノシノール，ベスタチンをDuchenne PMDに長期間投与した．投与期間中，Duchenne PMD患者から，感冒に罹患しなくなった．或いは感冒に罹患しても軽症で恢復するようになったということを多くの投与患者から聞くようになった．そこでこれらの薬物の感冒に対する効果をみ，また投与時及び投与後の免疫グロブリンの変動について検討を加えた．

対象及び方法

対象は年齢4歳から8歳までのDuchenne PMD患者で全例歩行可能であった．フォルフェンシノールは50～150 mg/day，ベスタチンは150 mg/dayを投与した．投与期間は14～27月であった．免疫グロブリンの測定はベスタチンの投与期間中及び投与中止後約1ヵ月後で測定した．免疫グロブリンの測定法は，Ig-G，Ig-M，Ig-Aはネフェメトリー法，Ig-DはSRID法，Ig-EはEIA法によった．

結果及び考察

フォルフェンシノールの投与では，1年間に10例中8例に感冒の罹患回数が減少し，うち3例はまったく1年間感冒に罹らなかった．さらに使用を中止後の1年間の感冒罹患回数については，1例は再び感冒罹患回数が増加したが，残りの6例は感冒罹患回数は投与中と比べてあまり変化はなかった．

フォルフェンシノールの投与による感冒罹患回数の減少は昭和62年度の本研究班でも発表したが，これはフォルフェンシノールが免疫抵抗を増強さすためであると思われる．

ベスタチンについての成績では使用前の1年間の感冒罹患回数に比べて使用中は，11例のうち8例が感冒罹患回数が減少しており，使用中止後の1年間での感冒罹患回数は使用中と同様であったもの2例，1例は減少していた（表）．

免疫グロブリンのうちIg-Gは使用中に比して，全例に使用後は減少していた．Ig-Mでは11例中10例が使用後減少していた．また呼吸器感染症に関係があるとされているIg-Aでは11例中10例に投与中より投与後に減少しており，うち4例はかなりの減少であった．

これらの点からベスタチンもフォルフェンシノールと同様Duchenne PMDの感冒罹患回数を減少または症状を軽減するようである．

Duchenne PMDは学齢期に休暇，或いは感冒などの疾病で臥床した後歩行能力が落ち，歩行不能になることが良く知られている．このため感冒などによる感染症のための臥床をできるだけ短期間にすることが望まれる．ベスタチン，フォルフェンシノール等の投与は感冒などの感染症による臥床期間を短縮するために，間接的にDuchenne PMDの歩行期間を延長するとも考えられる．

おわりに

1. ベスタチン，フォルフェンシノールはDu-

*国立療養所箱根病院

表　ベスタチン使用者の感冒罹患回数と免疫グロブリン

症例	感冒罹患回数 使用前	中	後	Ig-G mg/dl 前	中	後	Ig-M mg/dl 前	中	後	Ig-A mg/dl 前	中	後	Ig-D mg/dl 前	中	後	Ig-E IU/ml 前	中	後
1	3	1	3	1490	1040		63	61		351	290		2.0	2.0		25	25	
2	4	2	3	1700	1450		71	62		667	422		2.0	2.0		238	230	
3	3	0	2	1780	1620		449	410		295	224							
4	4	2	3	1690	1390		256	219		302	284		2.0	2.0		25	25	
5	2	2	2	1450	1420		80	76		287	290		2.0	2.0		59	25	
6	2	1	2	1250	1050		118	129		256	228		2.0	2.0		25	25	
7	2	2	1	1210	884		42	35		88	78		2.0	2.0		33	25	
8	2	2	3	2250	2079		45	40		115	110							
9	3	2	3	1340	1040		126	95		206	146		2.0	2.0		840	790	
10	1	1	2	1350	1040		224	190		326	310							
11	1	0	1	2650	2170		112	102		284	218							

chenne PMD の感冒罹患回数を減少，あるいは罹患しても症状を軽減する．

2．ベスタチンは Duchenne PMD の免疫グロブリン Ig-G，Ig-M，Ig-A を増加させる．

EST投与対象の1症例における臨床的背景について

三吉野　産治*

研究協力者　　山田　みどり**

EST投与対象となった1症例の臨床的な背景について，約束されたプロトコールの各条項の他に，PCR法による遺伝子診断，CTスキャンによる筋の画像診断，動作による分析のなかで，立ち上がりの型と所要時間について検討を加え，幼児期の疾患と発育の問題つまり疾患による正常な発達の障害と，発育が疾患のdownn hill courseをマスクして押し上げる事の絡み合い，これが幼児期の薬効評価の難しさについて述べる．

患者は現在6歳2ヵ月男子

家族歴　両親，兄1名，本人以外にDMDの患者はいない．

病　歴　昭和60年12月18日満1歳の時，38度の発熱，嗄声，呼吸困難，全身チアノーゼ，けいれん発作があり抗けいれん剤を服用，脳波に異常なく熱性けいれんの類，一過性の脳虚血等があったものと思われる，某病院に入院，点滴処置などを受けたときに，GOT, GPT, LDHの病的な異常高値があり，Infantile hepatitisの疑いで8カ月間経過観察，異常高値は殆ど変動なく，63年4月，3歳6月の時，たまたまCKの検査で異常高値を示した事から筋疾患を疑われた，筋生検の結果DMDと診断された．**表1**

現病歴　4歳10月，EST投与の目的にて入院，**表2**に示すように，CK 1415で母：19，父：21であった．IQ：79，遺伝子診断ではPCR法によりExon，8，12，17，19，44，の欠損，両親はNormal PCRであった．突然変異については現在，RFLPにより分析中である．

表1

患者　T. U.　男　6才
生年月日　昭和59．12．16．

家族歴：兄弟2人の弟で他にDMDの患者はいない。

病歴：昭和60．12．18．38℃の発熱　嗄声、呼吸困難、が悪化し、点滴処理　中にケイレン発作、全身チアノーゼ等あり
入院。
入院時検査により　GOT、GPT、LDHの上昇があった。
その後、Infantile Hepatitisの疑いにて経過観察中8カ月間GOT、GPT、LDH、は高値のまま殆ど変動しなかった。
63．4、CPK高値により筋疾患を疑われた。
筋生検の結果DMDと診断された

表2

現症：4才10カ月（入院時年齢）
Gowers signあり、動揺性歩行、仮性肥大
GOT354、GPT643、LDH3826、
CPK1415（母、CPK19、父、21）
IQ．79

遺伝子診断（九大生医研鈴木教室PCR法）

	mg／ml	EXON 4	8	12	17	19	44	45	48	51
本人(5)	2.57	+	-	-	-	-	-	+	+	+
母　(40)	3.02	+	+	+	+	+	+	+	+	+
父　(35)	2.48	+	+	+	+	+	+	+	+	+

CT画像　両側大腿中央部及び下腿最大周囲部の画像では前者に強い虫食い状のlow density areaがみられた．9月の画像経過ではやや進んでいるようであった．

立ち上がり時間　**表3**のように第1回目から1年6月間，毎月1回の割合でVTRに撮り，床から手が離れた時からどちらかの足が床を離れる時，あるいは軀幹が真直ぐに立ち上がった時までの時間を繰り返し3回測定し平均した値をだした．平均所用時間は，1回目1.04秒，2回

*国立療養所西別府病院
**八代総合病院小児科

表3　立ち上がり時間

	日時	測定回数 第1回	第2回	第3回	平均	備考
1	H1.10.26	0.96	1.03	1.13	1.04	
2	11.22	0.82	0.92	0.75	0.83	
3	12.20	0.67	0.75	0.66	0.69	
4	H.2.1.17	2.55	2.86	2.86	2.78.	B型他A型
5	3.14	1.06	0.89	1.00	0.98	
6	4.11	0.85	1.05	0.95	0.95	
7	5. 9	0.82	0.82	0.80	0.81	
8	6. 6	0.73	0.81	0.86	0.80	
9	7. 4	0.77	0.71	0.65	0.71	
10	8. 1	1.50	1.60	1.79	1.63	leg pain
11	9. 5	0.82	0.78	0.85	0.81	
12	11.14	0.82	0.80	0.81	0.81	
13	12.12	0.85	1.00	0.92	0.92	
14	H.3.2.15	1.03	1.07	0.97	1.02	

目0.83秒，4回目は感冒，10回目は遠足の後で下肢痛があり時間がかかっているのでこの2項目を除くと短くて0.69～0.95，大体0.70～0.85～0.92～1.02秒となりもっと測定方法を考えないと当てになる数ではない．（表2）

考　　察

昭和56年度及び昭和57年度筋ジス第3班成果報告書にまとめた成績をしめす．すなわち，DMD患児が筋力の低下にともなう立ち上がり方の異常と，正常な幼児の立ち上がり動作の分析について，まとめたもので，対象は別府保健所乳幼児健診を訪れた健康な1歳6月児42例，2歳児51例，3歳児65例，計158例についてVTRに録画し，後に再現し繰り返し動作の分析を行い，立ち上がりの型をみて次のように分類した．A型は仰臥位から腹臥位となり四つ這いになり立ち上がる（図1）．B型は四つ這いになるまではA型と同じであるが，片足を一歩前に出して立ち上がる（図2）．C型は仰臥位から腹臥位をとらずしゃがみこんで立ち上がる（図3）．その他BとCの中間型があった．表4は158例の集計から1歳6月，2歳，3歳のそれぞれの平均値から±1SDをはずれる例を除いて

A型

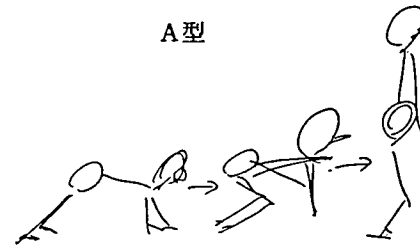


図1

B型

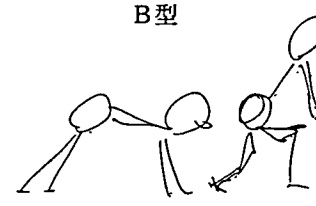


図2

C型

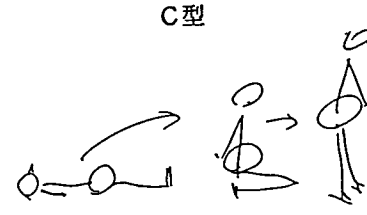


図3

表4　1歳半（within $\overline{X}\pm SD$）
$\overline{X}$(平均値)＝1.1　SD(α)＝0.4

型 / 性別	A型 人数	時間解析	B型 人数	時間解析	C型 人数	時間解析	混合型 人数	時間解析	計 人数	時間解析
男	16	0.9	0	−	0	−	0	−	16	0.9
女	13	1.0	1	1.5	0	−	0	−	14	1.0
計	29	1.0	1	1.5	0	−	0	−	30	1.0

表5　2歳（within $\overline{X}\pm SD$）$\overline{X}$1.4　SD＝0.5

型 / 性別	A型 人数	時間解析	B型 人数	時間解析	C型 人数	時間解析	混合型 人数	時間解析	計 人数	時間解析
男	14	1.4	2	1.6	0	−	0	−	16	1.4
女	16	1.3	3	1.4	0	−	1	1.5	20	1.3
計	30	1.3	5	1.5	0	−	1	1.5	36	1.4

集計したものである．1歳6月，30例中A型29例(96.6％)，時間1.0秒．**表5**は同様にして2歳児でA型36例中30例（83.3％），B型5例，時間平均A型，1.4秒，B型　1.5秒．**表6**は3歳児，A型52例中18例（34.6％），B型52例中16例(30.7％)，C型52例中14例(26.9％)であり立ち上がり形式の多様化がみられる．時間は，A型0.4～0.6秒，B型0.4～0.5秒，C型0.3～0.6秒，平均して0.5～0.6秒であった．まとめると1歳6月で0.6秒±0.4，2歳で1.4秒±0.5，3歳で0.6秒0.4である．

表7はDMD患児9例の内容で，4歳～9歳，Stage 1～3でStage 1；5例，Stage 2；3例，Stage 3；1例について14月間の経過を，ADL（100点法），階段昇降，立ち上がり時間，10m疾走につき検討した．

図4にしめすように，ADLでは有意差なく**図5**，階段昇降で，昇り下りの間に有意差はなく，変動の幅が大きくなり症例によってバラエティーがある．

表6　3歳（within $\overline{X}$±SD）$\overline{X}$0.6　SD＝0.4

性別＼型	A型		B型		C型		混合型		計	
	人数	時間秒	人数	時間秒	人数	時間秒	人数	時間秒	人数	時間秒
男	11	0.6	8	0.5	2	0.3	1	0.4	22	0.5
女	7	0.4	8	0.4	12	0.6	3	0.6	30	0.5
計	18	0.5	16	0.4	14	0.5	4	0.5	52	0.5

表7　調査対象者

CASE	NAME	AGE	SEX	STAGE
1	KY	7	M	1
2	MM	4	M	2
3	HK	7	M	2
4	TI	7	M	2
5	MO	8	M	3
6	MA	5	M	1
7	MT	6	M	1
8	TS	5	M	1
9	KE	9	M	1

M：MALE

図6，10m疾走と立ち上がり時間では，平均4.8秒で測定した11月間では有意差なく立ち上がりの所要時間は，1981年8月平均1.5秒，4月後約2秒と延長し，1982年3月から個人差

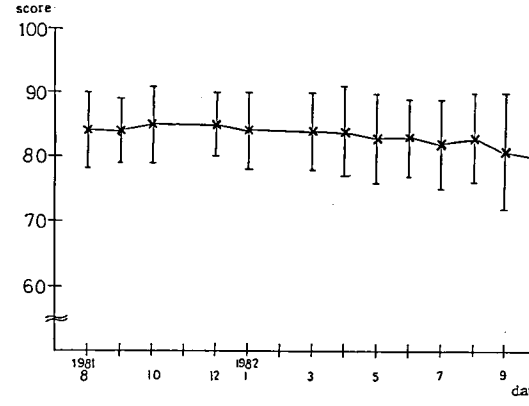


図4　ADL 100点法の推移

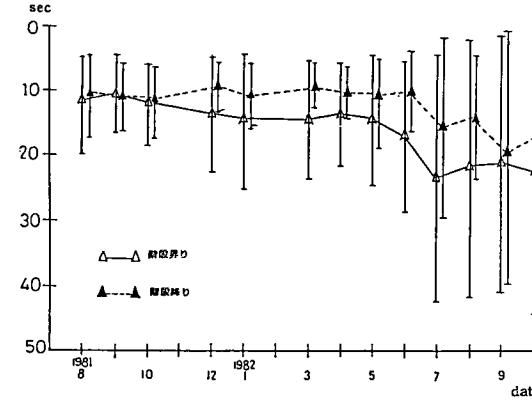


図5　階段昇降用時間の推移

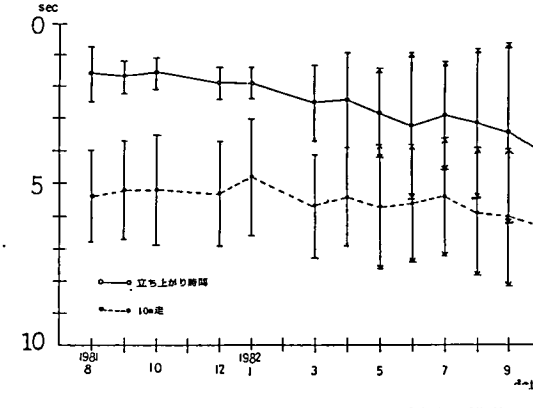


図6　立ち上がり時間10m走所用時間の推移

表8　立ち上がり時間　ADL　10m走　階段昇降の各月別推移(平均値±SD)　n＝9

	立ちあがり時間(秒)	ADL(点)	10m走(秒)	階段昇降 昇(秒)	階段昇降 降(秒)
S 56. 8	1.61 ± 0.91	84 ± 6	5.4 ± 1.4	12.2 ± 7.5	10.7 ± 6.5
9	1.73 ± 0.53	84 ± 5	5.2 ± 1.5	10.4 ± 6.1	11.0 ± 5.3
10	1.63 ± 0.53	85 ± 6	5.2 ± 1.7	12.0 ± 6.3	11.8 ± 5.7
12	1.92 ± 0.55	85 ± 5	5.3 ± 1.6	13.8 ± 9.1	9.4 ± 3.7
S 57. 1	1.89 ± 0.54	84 ± 6	4.8 ± 1.8	14.6 ± 10.5	10.8 ± 5.2
3	2.48 ± 1.17※	84 ± 6	5.7 ± 1.6	14.5 ± 9.3	9.1 ± 3.3
4	2.39 ± 1.51※	84 ± 7	5.4 ± 1.5	13.7 ± 8.1	10.1 ± 4.0
5	2.78 ± 1.36※※	83 ± 7	5.7 ± 1.9	14.4 ± 10.2	10.4 ± 5.4
6	3.16 ± 2.31※※	83 ± 6	5.6 ± 1.8	17.0 ± 11.8	10.0 ± 6.3
7	2.93 ± 1.65※※	82 ± 7	5.4 ± 1.8	23.6 ± 18.9	15.6 ± 13.9
8	3.11 ± 2.31※	83 ± 7	5.9 ± 1.9	21.9 ± 19.9	14.1 ± 9.7
9	3.37 ± 2.76※	81 ± 9	6.0 ± 2.1	21.1 ± 19.9	19.8 ± 19.3
10	3.97 ± 3.15※	80 ± 8	6.3 ± 2.1	22.8 ± 21.4	16.9 ± 14.3

※※　P＜0.01
※　P＜0.05

が著しくなり平均で4.0秒，最も悪い例では7.2秒と延長している．

表8に，以上の事をまとめてみた．立ち上がり時間，ADL，10m疾走，階段昇り，下りの5項目中有意差のあったのは立ち上がり時間の延長であった．

以上述べたように，DMDの機能障害進展過程の評価法については，すでに多くの報告があり，Stageの分類も幾つか報告され，利用されているが，正常幼児期の正常発達との比較，すなわち，DMD患児の病状の進行と重症化が正常児の発達からどの部分がどのような遅れを示すのか，また，訓練や治療の効果判定の指標として何が適当であるのか，殊に乳幼児期の小児では，意志，理解力など客観的，定量的評価は困難である．

立ち上がる，立つ，歩く，走る，昇る，降るなどの様々な動作はDMD患者の年齢，Stageにより異なってくるが，3歳から6歳頃までの立ち上がり時間の測定は比較的短い期間，6月～10月間の評価に応用できるのではないかと思われる．

まとめ

EST投与対象の1例についてdystrophin遺伝子の欠損（Exon 8，12，17，19，44）が証明され，CT画像上low density areaの存在と9月間の経過上やや進展のみられたIQ 79の患児について報告した．

Duchenne 型筋ジストロフィー症患者の新しい理学的評価法
―その意義と問題点―

中野今治*

研究協力者　杉田秀夫**　石原傅幸***　熊井初積***
浅野賢***　藤村則子****　土佐千秋****
石沢真弓****　松村喜一郎****　桑原武夫†
近藤隆春††　水野京子††　山崎元義††
崎田朝保†††　本家一也†††　武田洋子†††
幸福圭子††††　福永秀敏††††　藤田繁‡
青木寛‡　篠由美子‡

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）における薬効評価の指標としては理学的評価，中でも日常生活動作（ADL）が重要である．今回 EST の二重盲検試験を全国的に行うにあたり，従来の ADL 評価法の再検討を迫られて，新しい評価基準を作成したことは一昨年の本班会議で報告した[1]．新評価法は細心の注意を払って作成したので，実施してみて予想通りの利点が認められた．一方，新評価法はいくつかの問題を含んでいることも分かった．そこで，今回はこれらの点について検討した．

新評価法作成の概略

二重盲検試験では，1)統計処理上多数患者の参加が必要であること，2)短期間で評価しやすい進行の速い年齢の歩行可能な軽症患者を対象とするなどの条件があるため，入院患者と外来患者の双方を対象とする必要があった．この治験に旧評価法を適用するにあたっての問題点として，1)評価項目が多すぎる．例えば，ADL 25 項目では項目が多すぎて時間的に不可能である．2)旧評価法では下肢機能以外にも相当なウェイトが置かれていた．例えば ADL 25 項目中 12 項目が上肢挙上，手拭を絞るなど下肢以外の機能をはかる項目であるが，これらは軽症患者では短期間では変化しない．3)評価基準が曖昧である．旧評価法は入念に検討して作成されたものであるが，実際に適用してみると評価基準が不明瞭な項目，学習効果が大きく作用する項目などが含まれており，そのため，ある項目では軽症者（総得点の多い患者）は出来ないのにかえって重症者（総得点の少ない患者）が出来るという矛盾が生じていた．

上述のような問題点を考慮すると，新評価法の条件として，1)簡略であること．そのためには項目数を減らす必要がある．2)軽症例で短期間に変化する項目を選ぶこと．具体的には下肢機能が中心となる．3)再現性，均質性を有すること．全国の筋ジス施設にまたがる治験であるから誰が何時行なっても同じ動作や機能には同じ評価点を出せるような評価基準が必要となる．そのためには時間測定などを含めた出来るだけ客観的な評価基準を作成する事が望まれる．

* 東京大学医学部脳研病理
** 国立精神・神経センター神経研究所
*** 国立療養所東埼玉病院
**** 国立療養所下志津病院
† 新潟大学脳研究所神経内科
†† 国立療養所新潟病院
††† 国立療養所医王病院
†††† 国立療養所南九州病院
‡ 大正製薬㈱開発部

新評価法の決定，評価基準の統一とビデオ判定

以上のような諸条件を勘案して，1988年3月，実務委員会で新評価法の原案を作成した．特に，ADLは旧評価法の25項目から一気に9項目に減らした．1）立っている，2）椅子に座る，3）椅子から立ち上がる，4）しゃがむ，5）這う，6）床から立ち上がる，7）階段を昇る，8）階段を降りる，9）歩くの9項目である．“這う”を除いて8項目が主に下肢機能に関するものであることが分かる．

このようにして作成した新評価法の信頼性を確かめる目的で，入院患者をVTRに撮り，実務委員会に持ち寄って検討した．意見の分かれるような場面では評価方法の統一を図り，また一部では評価基準の見直しを行なった．

これらの点を踏まえて新評価法に基づく評価基準を作成し，1988年9月10日，国立療養所22施設のOT，PTが集まって，患者のVTRを用いて新評価法の説明会を開き，全員の評価基準の統一を図った（**表1**）．

ADL評価の正確を期する為に，その各項目毎の患者の動作を，投薬開始前と終了時にビデオに撮り，治験終了後，拡大実務委員会のOT，PT 15人が3人ずつ5つのグループに分かれて3日間かけて患者全員のビデオを見，主治医とは別に，ビデオ判定を出した．この段階ではいくつか問題点が残ったので，後に実務小委員会を開き，問題症例の問題項目のビデオを再チェックした（**表1**）．

表1　DMD患者に対するFST二重盲検試験の為の新しい理学的評価法作成とビデオ判定までの経緯

*87.1.17：	Open studyに参加した国療6施設の研究会にて、実務検討委員会（杉田秀夫委員長）の設置を決定
2.28：	第1回実務委員会
3.14：	第2回実務委員会
	1）試験デザインとして二重盲検試験を採用
	2）理学的評価項目の検討
	ＯＴ，ＰＴ，医師により、ＡＤＬテスト、筋力テスト、運動機能テスト、関節可動域テストの再検討開始
5月-10月：	Scalogram（尺度解析法）による旧ＡＤＬテスト項目の見直し（東京医科歯科大学　佐久間昭教授）
88.1.23：	実務委員会にてメンバーの拡大を決定。
2. 6：	第1回拡大委員会
3. 4：	第2回拡大委員会
	Scalogramによる評価項目と実地評価面からの項目の比較検討　→　評価基準の改訂
3.25：	第3回拡大委員会
	ビデオを用いて、新評価法の信頼性（再現性、均質性）の確認
4.15：	第4回拡大委員会
	新評価法に基づくプロトコール、ケースカードの立案
	治験時にビデオ撮影をし、ビデオでの判定を行なうことを決定
7.22：	第1回世話人会
9.10：	参加全施設のＯＴ，ＰＴによる打ち合せ会
	ＡＤＬ新評価法の説明、および信頼性の確認
9.14：	参加全施設による全体会議
	プロトコール、ケースカードの固定
10月から：	治験順次開始
*89.9.9：	第2回世話人会
	ビデオによる統一判定のための実務委員会設置を決定
*90年9月：	治験終了
10月5,6,7日：	ビデオ統一判定委員会によるビデオ判定
10.13：	ビデオ判定小委員会によるビデオ最終判定

新評価法を実施して

1）利点：新評価法の利点として，次の様なことが分かった．1）項目が少ないので1回の評価の時間が少なくてすむ．旧評価法では1人1回当り約2時間かかっていたのが，新評価法では約40分で済んだ．旧評価法で2時間続けて評価すると患者も検者も疲れてしまうので，2日に分けて実施していたのが実状であった．2）各項目毎に考え得る限りの患者の動作を想定して評価基準を作ったので，曖昧な部分が少なく判定が容易になった．この2つの要因が相まって，新評価法には高い再現性，均質性が認められた．

その例として，主治医判定とビデオ判定の高い一致率が挙げられる．開始時のADLに関して主治医（実際には各施設のOT，PT）の評価とビデオ判定委員会との一致率を見てみると，一致率が一番低い「しゃがむ」でも81％と高率であり，平均で91％と非常に高い値を示している（**表2**）．これは，終了時についても同様であった．

2）問題点：この新評価法を実際に適用していく場面や，ビデオ判定の際に，新評価法自体に関していくつか問題点があることが分かった．

(1)　基準以外の動作をする場合が時々見られた．例えば「階段を上る」際に，片手を手摺に

表2　主治医とビデオ判定の一致率（開始時）

＊立っている	：	94％
＊椅子に座る	：	87〃
＊椅子から立ち上がる	：	90〃
＊しゃがむ	：	81〃
＊這う	：	100〃
＊床から立ち上がる	：	89〃
＊階段を昇る	：	92〃
＊階段を降りる	：	94〃
＊歩く	：	91〃
平均		91〃

かけ，片手は階段の床に付けて上ったり，「歩く」の際，小走りをしたり，「しゃがむ」際，関節拘縮のため，しゃがんだ姿勢が取れなかった患者がいた．また，「椅子からの立ち上がり」の際，体幹を捻ることによって腰を浮かせる患者がいたが，この動作には評価点が設定されていなかった．

(2) 評価基準に曖昧さを残していた．一つには評価の指標に主観的な判断が入る項目があった．例えば，「椅子にすわる」や「しゃがむ」の際に，“ゆっくりと”の表現を使っているが，実際場面では判定が困難な例があった．また，動揺性歩行の基準が曖昧で，ビデオ判定でも一部の患者では議論になった．二つめとして，基準の設定が不十分な項目があった．例えば，「床からの立ち上がり」で，つかまるものを規定していなかったために，同じ能力でも，つかまるものによって評価点が違ってしまった．

(3) 知的に低い患児では協力が得にくい動作があった．そのような動作として，ゆっくり座る，30秒じっと立っている，しゃがむ姿勢をとるなどが挙げられる．

考　　案

DMDの理学的評価基準としては，日本では厚生省筋ジス研究班のもの[2]，海外ではBrookeらのプロトコールが知られており[3]，我々の旧評価法はこれらを基準にして作成されたものである．今回，ESTの二重盲検試験を実施するに当り，それにふさわしい理学的評価基準の作成を試み，実際にそれに則って治験を行なった．中でもADLを最も重視し，その評価に統一性をもたせるために，最善を尽くした．その結果は，新評価法の高い再現性と均質性に現われている．

新評価法を実施してみての問題点の多くは実施上の手技の問題であって，我々の作成した評価法自体の問題は多くはなかった．しかし，いくつか問題点を有していることも確かである．今後解決して行くべき問題と思われる．

運動器官に障害を持つ患者が，その障害を克服するために工夫する動作は健康な人間の想像を越えたものがある．そのような患者の動作を一定の枠で評価しようとする事に限界を感じつつも，「新評価法は今回の治験の大きな成果である」と参加者全員の自負するところである．

今回の二重盲検試験で，全国の筋ジス療養所がこの新評価法を使用した．これを契機に，現在これらの施設のOT，PTが，この評価法を普及させ，さらにはより良いものにしようとする動きが自然に生じてきている．この機運も，今回の評価法の利点が認められ，大きな関心をもたれたことの現れと思われる．新しい評価法を土台にしてより完全なものが出来ることを願う次第である．

文　　献

1）中野今治，杉田秀夫，石原傅幸ほか：筋ジストロフィー症患者の理学的評価法の再検討．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，pp 79—83，1989．

2）野島元雄，松家豊，松田芳郎ほか：関節機能障害，脊柱運動障害，恥骨機能障害，拘縮について．“筋ジストロフィー症の臨床”（祖父江逸郎，西谷裕編）医歯薬出版，東京，pp 88—106，1985.

3）Brooke, M.H., Griggs, R.C., Mendell, J. R., et al.: Clinical trial in Duchenne dystrophy. I. The design of the protocol. Muscle Nerve, 4: 186—197, 1981.

サンドイッチ法による骨格筋ミオシン軽鎖測定法の開発とキット化の試み

矢 崎 義 雄*

研究協力者　永 井 良 三*　加 藤 裕 久*　杉 田 秀 夫**

緒　言

筋ジストロフィー症をはじめとする骨格筋障害の診断に，現在，クレアチンキナーゼ（CK）等の酵素活性を血中で測定する方法が一般的に行なわれている．しかしながらこれらの酵素の多くは細胞質内に存在するため，血中の活性値が筋細胞の壊死過程や重症度を反映するとは限らない可能性がある．さらに骨格筋障害の治療法を開発する場合は，治療効果をいかにして評価するかという問題を避けて通ることはできない．

我々は心筋梗塞や心筋炎において，CKやGOTだけでなく，心筋ミオシン軽鎖のような構造蛋白を血中で測定することにより，従来の方法では得られなかった新しい診断法あるいは重症度評価が可能となることを示してきた．すでに心筋ミオシン軽鎖はモノクローナル抗体を用いた簡便な測定法がキット化されており，広く臨床応用されている．心筋ミオシン軽鎖は骨格筋のなかの赤筋と同一のミオシンを発現するため，本キットによって骨格筋障害を診断することも可能である．しかしながら心筋ミオシン軽鎖測定用に用いられている抗体は白筋に存在するミオシン軽鎖とはクロスしない．すなわち骨格筋障害をより正しく診断するためには，新たに赤筋と白筋のミオシン軽鎖を等しく認識する抗体と，アッセイ系の開発が必要である．そこで我々はヒト大腿筋を試料として，骨格筋ミオシン軽鎖の簡便な測定方法の開発を試みた．

* 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

方　法

(1) 骨格筋ミオシンとモノクローナル抗体の作製

ヒト大腿筋よりミオシン軽鎖をGubba-Straub法によって抽出，25 μgを完全フロイントアジュバントと共にBalb/cマウスに2週間おきに3回腹腔内に投与し，最後に10 μgを静注した，静注3日後にマウスのSpleen Cellsを摘出，ポリエチレングリコール存在下で，マウスミエローマ細胞（P3U1）と10：1の割合で細胞融合を行なった．抗体のスクリーニングはヒト骨格筋ミオシン軽鎖を用いたELISA法によって行なった．

(2) モノクローナル抗体の特異性の検討

96ウエルマイクロプレートにヒト骨格筋ミオシン軽鎖またはヒト心筋軽鎖を吸着し，抗ヒト骨格筋ミオシン軽鎖抗体（3G3，4H1，6E4，10H7）を1 μg/mlから連続的に5倍希釈し反応させた．さらにビオチン化マウスIgG，アビジン西洋ワサビパーオキシダーゼを反応させ，基質（ABTS）を加え発色させた．

(3) サンドイッチアッセイの検討

4種類の抗体を固相化抗体，または標識抗体として16通りの組み合わせでサンドイッチアッセイを検討した．96ウエルマイクロプレートに4種類の抗体を吸着し，ヒト骨格筋ミオシン軽鎖を反応させた．さらに過ヨウ素酸法により西洋ワサビパーオキシダーゼ（HRPO）で標識した4種類の抗体を反応させ，基質（ABTS）を加えて発色させた．

結　　果

1回の細胞融合でヒト骨格筋ミオシン軽鎖に反応する抗体4種類（3G3，4H1，6E4，10H7）を確立した．いずれの抗体も心室筋ミオシン軽鎖に比べ，骨格筋とより強く反応した（20-100倍）（図1）．またイムノブロットによる検討を行なったところ，いずれの抗体も骨格筋ミオシン軽鎖1と軽鎖2に同等に反応した，これらの抗体を用いたサンドイッチ法による測定系では，骨格筋ミオシン軽鎖の測定感度の下限は現在50-100 ng/mlである（図2）．

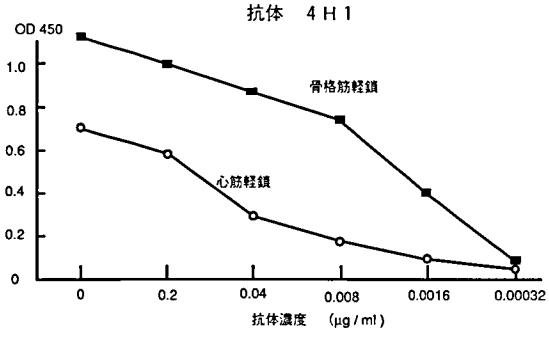


図1　モノクローナル抗体4H1の骨格筋および心筋ミオシン軽鎖との結合反応曲線

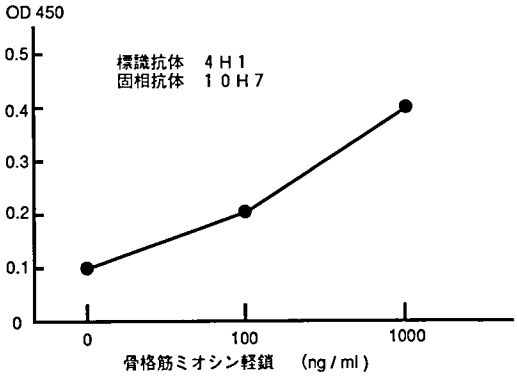


図2　モノクローナル抗体4H1と10H7を用いた骨格筋ミオシン軽鎖のサンドウィッチ法による測定

考　　察

ヒト骨格筋ミオシン軽鎖をマウスに免疫することにより，軽鎖1と軽鎖2の双方を認識するモノクローナル抗体が得られた．今回確立した4種類のモノクローナル抗体は，骨格筋により特異性が高く，赤筋だけでなく白筋も認識していると考えられる．しかしながら測定範囲が50 ng/ml以上であるため，現時点ではやや感度が不十分であると思われる．測定系を改良すると共に，できるだけ多くの抗体を開発して検討を重ねる必要がある．

ESTのDuchenne型筋ジストロフィーに対する臨床効果に関する研究
—Scalographic analysisによる薬効判定法—

石原傅幸*

研究協力者　佐久間昭**　中野今治***　山崎元義****
本家一也†　福永秀敏††　宮武正†††
杉田秀夫††††　藤田繁‡　青木寛‡
篠由美子‡

はじめに

ESTの第2相臨床試験は1984年に開始された．Duchenne型筋ジストロフィー(以下DMD)は常に進行性の経過を取る上，ESTはDMDの本態を直接に攻撃する薬剤ではないので，筋力低下の進行を逆転する効果は期待できないことは当初より予想されてきた．臨床家にとっては，このような進行性に悪化して行く疾患での薬効判定はどうするのかは困難な問題であった．

さて薬効判定を企図する以上は自然歴を知ることが第一である．これまでに当班では種々の試みがなされてきたが詳細は昭和62年度の報告書を参照して欲しい[1]．客観的な判定方法として第2相試験に参加したDMD患者のADLを，神経筋疾患では一度も試みられなかったGuttmannのScalographic analysis(尺度分析法)で分析し，昭和62年度の班会議で発表した．その際に我々が選んだ12段階新障害度分類はRepやPPR*の値が優れており信頼性のある障害度分類として発表した．しかし従来の8度分類と称されている四肢機能障害度分類があまりに広く行きわたっていたこと，またこの新分類が12段階評価と実用には面倒なことから全く実用に使われなかった．

今回は二重盲検試験をDMD多数例で行ったので，その薬効判定法の一つとしてGuttmannのScalographic analysisによる客観的な尺度(障害度分類)を作成し役立てようとした．

対象と方法

今回のdouble blind testには約170名の患者が参加した．今回は歩行可能児で試験を行うため従来のままのADLスコアでは妥当ではないと考え，実務委員会でPTやOTの意見を聞きながら新しい下肢機能中心のADLを作成した(表1)．この評価法は9項目よりなり，各項目は1点から4点に分けられている．このサブ項目は合計38個ありこれを独立の項目と考え尺度分析を行った．

今回の判定は前後に撮影したVTRを全国より集まったPTとOTよりなるVTR判定委員会で判定した評点を使用した．

結果

図1は全項目におけるscalogramである．PPR*も0.7097とよい結果とは言えない．そこで誤反応が最小になるように11のアイテムを選んでscalogramを作ると図2に示すようにPPR*は0.9428とよい結果が得られた．

表2は上で選んだアイテムからなる歩行可能DMD患者の障害度新分類である．やはり12段

*国立療養所東埼玉病院
**東京医科歯科大学難治疾患研究所
***東京大学医学部脳研病理
****国立療養所新潟病院
†国立療養所医王病院
††国立療養所南九州病院
†††新潟大学脳研究所神経内科
††††国立精神・神経センター神経研究所
‡大正製薬㈱開発部

表1　日常生活動作テスト項目

1	① 立っている	: 4. 左右の踵を互いにつけて30秒以上立っていられる。
2		: 3. スタンスを広げれば30秒以上立っていられる。
3		: 2. スタンスを広げれば30秒未満なら立っていられる。
4		: 1. 物につかまれば立っていられる。
5	② 椅子に坐る	: 3. 手を使わずにゆっくり坐る。(膝関節屈曲約45° 位で一時停止ができる)
6		: 2. 手に膝をついてゆっくり坐る。(膝関節屈曲約45° 位で一時停止ができる)
7		: 1. 支えきれずドスンと坐る。(膝関節屈曲約45° 位で一時停止ができない)
8	③ 椅子から立ち上がる	: 4. 普通にできる。
9		: 3. 膝に手をついて立ち上がる。
10		: 2. 坐面を使って立ち上がる。
11		: 1. 立ち上がろうとして腰を浮かせるが立ち上がれない。
12	④ しゃがむ	: 4. 最後までゆっくりとしゃがめる
13		: 3. 手で膝を支えれば、最後までゆっくりとしゃがめる。
14		: 2. 崩れるようにしゃがむが、その姿勢(スクワット位 床に手をついても可)が保てる。
15		: 1. 崩れるようにしゃがむが、そのまま坐ってしまう。
16	⑤ 這う	: 4. 3m這行　5秒未満。
17		: 3. 3m這行　5秒以上 30秒未満。
18		: 2. 3m這行 30秒以上 60秒未満。
19		: 1. 3m這行 60秒以上。又は四つ這い位の自力保持可能。
20	⑥ 床(正坐位)から	: 4. 手を使わずに立ち上がれる
21	立ち上がる	: 3. 床に手を使わずに立ち上がれる。
22		: 2. 床に手をつき、手で膝を押して立ち上がる。
23		: 1. 物につかまれば立ち上がれる。
24	⑦ 階段を昇る	: 6. 普通に昇れる。（1足1段）
25		: 5. 普通に昇れる。（2足1段）
26		: 4. 手で膝を押えて昇る。
27		: 3. 片手を手摺にかければ昇れる。
28		: 2. 両手を手摺にかければ昇れる。（前向き）
29		: 1. 両手で手摺にすがって昇る。（横向き）
30	⑧ 階段を降りる	: 5. 普通に降りられる。（1足1段）
31		: 4. 普通に降りられる。（2足1段）
32		: 3. 片手を手摺にかければ降りられる。
33		: 2. 両手を手摺にかければ降りられる。（前向き）
34		: 1. 両手で手摺にすがって降りる。（横向き）
35	⑨ 歩く	: 4. 普通に歩ける。
36		: 3. 動揺性歩行をする。
37		: 2. 物につかまれば（手摺，壁づたい）独りで歩ける。
38		: 1. 何等かの補助（平行棒・車椅子押し，介助など）があれば歩ける。
		ただし、Braceは用いない。

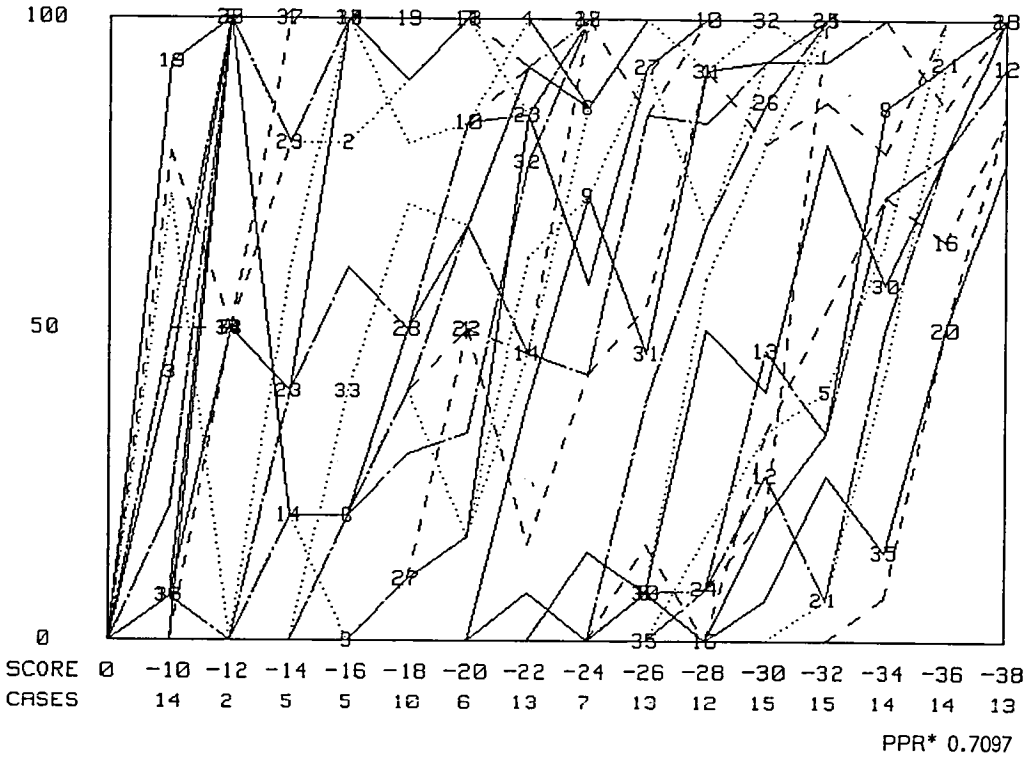


図1　ADL（38 項目；VTR 判定）の scalogram（開始時＋終了時データ）

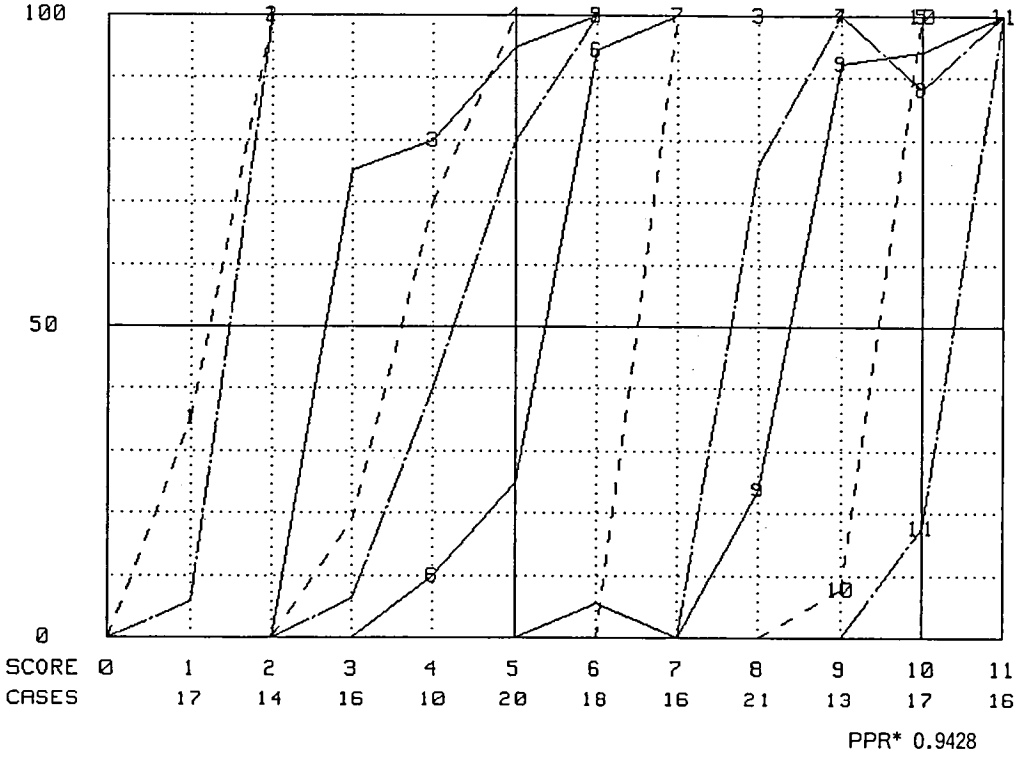


図2　ADL（11 項目；VTR 判定）の scalogram（開始時＋終了時データ）

表2　日常生活動作テスト項目　新基準

1	⑨　歩く	：2. 物につかまれば（手摺・壁づたい）独りで歩ける
2	②　椅子に坐る	：1. 支えきれずにドスンと坐る
3	③　椅子から立ち上がる	：2. 坐面を使って立ち上がる
4	⑧　階段を降りる	：3. 片手を手摺にかければ降りられる
5	⑦　階段を昇る	：3. 片手を手摺にかければ昇れる
6	⑧　階段を降りる	：4. 普通に降りられる（2足1段）
7	⑦　階段を昇る	：5. 普通に昇れる（2足1段）
8	⑦　階段を昇る	：6. 普通に昇れる（1足1段）
9	③　椅子から立ち上がる	：4. 普通にできる
10	⑥　床（正坐位）から立ち上がる	：3. 床に手をつかずに、手で膝お押して立ち上がる
11	⑥　床（正坐位）から立ち上がる	：4. 手を使わずに立ち上がれる

階と煩雑ではあるが，客観的な障害度分類として信頼性が高い．

考　　察

表3はこの機能障害度分類を使って今回の対象患者の分類を行ったものである．EはEST投与群でPはplacebo群を示す．開始前も終了時も全く両群には有意差がない．しかし，下段のように変化点数をとるとEST群の方が悪化率が高いようである．この点についてはまだ結論をくだすことは避けたい．

このように今回のVTRによるコントロールされた客観的判定法を使うことにより，障害度分類が確立されたこと，1年間の障害度の低下度が計算できたことにより，同じ程度の患者群であれば1年間の実薬testだけで薬効評価が可能となった．このことはESTが有効でないという結論が出されたとしても今後のtrialに対しては重大な貢献をすることとなる．DMDには従来決定的な治療手段が見いだせなかったこともあり，これまで行われてきた薬効判定法には決定的なものはない．1980年にDubowitzらは，効果判定に必要な条件として，1. 診断基準の作成．2. 適当な対照群の設定，3. 二重盲検試験．4. 簡単な臨床検査に加え詳細な検査による評価．5. 2年またはそれ以上の期間，の5つの点をあげた[2]．今回の二重盲検試験はこのうち最後の2年間という条件は欠いているがあとの条件は満たしている．

一方1983年にBrookeらは治療効果判定に必要な条件として，1. 診断の確実性を増すための診断基準の作成，2. 二重盲検試験，3. power算出，4. データのばらつきをモニターできること，の4点をあげた[3]．そしてBrookeを含むアメリカの研究者グループは徒手筋力測定法（MMT）を判定基準として採用した．我々はMMTはあまりにグローブな判定基準であることを理由に採用しなかった．

1989年にアメリカでは筋ジストロフィー協会の後援でEvaluating Muscle Strength and

表3　ADL-VTR 判定　scalogram による検討

選択したＡＤＬ項目　易・歩く　：物につかまれば（手摺・壁づたい）独りで歩ける。
・椅子に座る　：支えきれずにドスンと座る
・椅子から立ち上がる：座面を使って立ち上がる
・階段を降りる　：片手を手摺にかければ降りられる
・階段を昇る　：片手を手摺にかければ昇れる
・階段を降りる　：普通に降りられる（２足１段）
・階段を昇る　：普通に昇れる（２足１段）
・階段を昇る　：普通に昇れる（１足１段）
・椅子から立ち上がる：普通にできる
・床（正座位）から立ち上がる：床に手をつかずに、手で膝お押して立ち上がる
難・床（正座位）から立ち上がる：手を使わずに立ち上がれる

機能度を可能な項目の数とした場合

		ＡＤＬ機能度の分布												mean	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	±S.D.	
開始時	E n=57	2 3.5	0	1 1.8	6 10.5	5 8.8	11 19.3	4 7.0	4 7.0	6 10.5	5 8.8	9 15.8	4 7.0	7.6 ±2.9	N.S.
	P n=55	0	2 3.6	4 7.3	6 10.9	2 3.6	7 12.7	3 5.5	7 12.7	8 14.5	3 5.5	7 12.7	6 10.9	7.6 ±3.0	
終了時	E n=44	5 11.4	3 6.8	5 11.4	5 11.4	4 9.1	3 6.8	5 11.4	3 6.8	5 11.4	1 2.3	1 2.3	4 9.1	5.8 ±3.4	N.S
	P n=49	5 10.2	3 6.1	7 14.3	2 4.1	2 4.1	3 6.1	8 16.3	4 8.2	4 8.2	5 10.2	1 2.0	5 10.2	6.4 ±3.5	

	ＡＤＬ機能度の変化（終了時－開始時）											mean	
	－6	－5	－4	－3	－2	－1	0	1	2	3	4	±S.D.	
E n=43	1 2.3	1 2.3	5 11.6	11 25.6	9 20.9	7 16.3	6 14.0	2 4.7	1 2.3	0	0	-2.0 ±1.7	P<0.1
P n=45	0	1 2.2	4 8.7	8 17.4	9 19.6	7 15.2	11 23.9	5 10.9	0	0	1 2.2	-1.3 ±1.8	

Function という Workshop が開催され MMT の客観性に疑問が投げかけられ，少数の筋群を測定するなら筋力計による測定すなわち quantiative muscle testing (QMT) の必要性が重要視された[4]．1989 年の Brooke らの Neurology に掲載された論文では従来から発表してきた MMT スコアについては触れておらず，われわれと同様に障害度分類を下肢と上肢用に別々に作成し，通過期間を測定した[5]．この点では我々が最初に考えたのと同様で感慨深いものがある．

英国では従来より筋力計を使用してきたが，器械が高価であること，たくさんの筋力測定は出来ない，体位のちょっとした変換で tricky な筋力を測定してしまう可能性などが考えられ，日本では器械による筋力測定は早い段階で断念した．

アメリカのグループでは，先ほど述べた power の概念の重要性を相変わらず重視している．我々はまだ今回の結果を power table で計算できなかったが，今後の trial にはぜひ必要な概念であろう．

さて客観的な薬効判定法については，最近発達がめざましい画像診断が採用できるのではないかと考え一昨年よりこの班で発表してきた．当院の里宇が発表した通りかなりの定量性が認められるので今後の trial には採用すべき判定法として推賞したいと思う．

Guttmann の Scalographic analysis については神経筋疾患の進行の評価や薬効判定に適用されたのは本試験が最初であり，従来 ADL などの評点をどう評価するかは困難で，通常は総

点で評価してしまうが，実際には各評点間での進行度は違うわけで単純に合計点で比較するのは論理的ではない．この点でこの評価法では数学的に各アイテムがかなり等間隔に設定できるため，従来の8度分類に比べより論理的な評価法であると考えられる．今後のtrialにはぜひ採用されるべき評価法といえよう．

結　論

1. 日本には従来より，ADLのデータが国立療養所に蓄積されていたため，ADL評点を薬効判定に使うことに決定した．

2. Double blind testのためには新しい歩行可能児用の下肢機能中心のADL評価法を作成する必要があった．

3. ADLデータにはばらつきが大きかったがscalographic analysisを導入することにより，DMDの障害度新分類が作成できた．

4. Scalographic analysisが神経筋疾患の臨床薬効評価に取り入れられたのは初めての試みであり，今後他の神経筋疾患の薬効評価には有効な手段となり得る．

文　献

1）石原傳幸，佐久間昭ほか：ADL scoreの検討による筋ジストロフィー障害度の再評価．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，pp 111—117，1988.

2）Dubowiz, V., Heckmatt, J., et al.: Management of muscular dystrophy: Pharmacological and physical aspects. Br. Med. Bull., 36: 139—144, 1980.

3）Brooke, M.H., Fenichel, G.M., et al.: Clinical investigation in Duchenne muscular dystrophy: 2. Dtermination of the "Power" of therapeutic trials based the natural history. Muscle Nerve, 6: 91—103, 1983.

4）Evaluating muscle strength and function. Proceeding of a workshop. Muscle Nerve, 13 (suppl): s 1—s 57, 1990.

5）Brooke, M.H., Fenichel, G.M., et al.: Duchenne muscular dystrophy: Patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. Neurology, 39: 475—481, 1989.

デュシェンヌ型進行性筋ジストロフィー症に対するESTの臨床効果
―二重盲検試験結果報告―

宮　武　　正*

研究協力者　山　崎　元　義*

はじめに

デュシェンヌ型進行性筋ジストロフィー症（以下DMD）に対して，ESTによる臨床治験が昭和59年度よりオープン試験で開始され約7年が経過した．平成元年度より，この結果[1)~3)]をふまえて，全国規模の二重盲検試験が開始され，平成2年度に終了したので報告する．参加施設は表1に示す通りである．

表1　二重盲検比較試験参加施設

国立精神・神経センター	杉田秀夫
東京大学	中野今治
新潟大学	宮武正，湯浅龍彦
国立療養所 道北病院	橋本和季
国立療養所 札幌南病院	島功二
国立療養所 八雲病院	南良二，石川幸辰
国立療養所 岩木病院	大竹進，石川玲
国立療養所 西多賀病院	大村清，五十嵐俊光
国立療養所 東埼玉病院	石原傳幸，浅野賢，熊井初穂
国立療養所 下志津病院	松村喜一郎，土佐千秋，藤村則子，石澤真弓
国立療養所 箱根病院	村上慶郎
国立療養所 新潟病院	山崎元義，近藤隆春
国立療養所 医王病院	本家一也，崎田朝保
国立療養所 中部病院	加知輝彦，市村京子
国立療養所 長良病院	西村正明
国立療養所 鈴鹿病院	飯田光男，高井輝雄，本田仁，米山栄，浅野康彦 宮城秀一，堂前裕二
国立療養所 宇多野病院	西谷裕，板垣泰子
国立療養所 刀根山病院	姜進，植田能茂
国立療養所 兵庫中央病院	高橋桂一
国立療養所 西奈良病院	岩垣克巳，舟川格，安東範明
国立療養所 松江病院	笠木重人
国立療養所 原病院	亀尾等，唐川武典
国立療養所 徳島病院	松家豊，斉藤孝子
国立療養所 東高知病院	谷淳吉
国立療養所 筑後病院	岩下宏
国立療養所 川棚病院	渋谷統寿，金澤一，中川真吾
国立療養所 西別府病院	三吉野産治
国立療養所 再春荘病院	寺本仁郎，内野誠
国立療養所 宮崎東病院	井上謙治郎，仲地剛，井上忍
国立療養所 南九州病院	福永秀敏，幸福圭子
国立療養所 沖縄病院	中川正法，竹永智（神経内科）

*新潟大学脳研究所神経内科

方　　法

対象は独立歩行可能なDMD患者で，投与開始時5～10歳で機能障害度1～IIIの171例である．被検薬はEST 25，50 mgカプセルで，12 mg/kg/日を1日2回朝，夕食後に内服した．対照薬はデンプンを用い，投与期間は48週間とした．効果判定は，3ヵ月毎に，臨床評価として体重，機能障害度，日常生活動作テスト，筋力テスト，握力，運動機能テスト，関節可動域テストを行い，同時に血液，生化学，尿検査を行った．試験終了時に，臨床効果，概括安全度，有用度の総合評価を行った．

結　　果

解析対象例は，除外例をのぞいた134例である（図1）．日常生活動作，筋力の推移に両群間

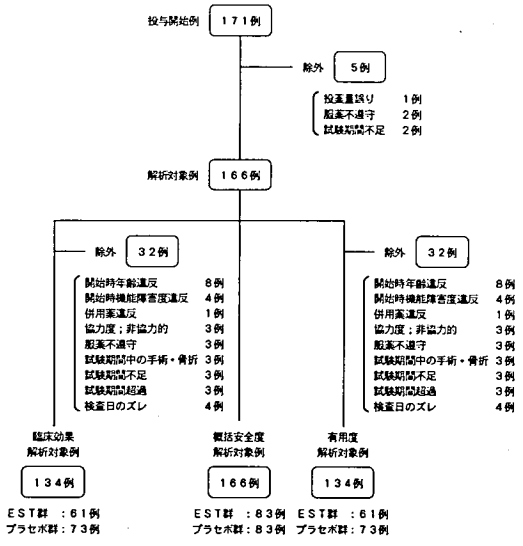


図1　解析対象例の内訳

で差を認めなかった（図2）．臨床効果，有用度については，EST群で若干良好な結果であったが統計的な有意差は認めなかった（表2）．副作用は，EST群に嘔気，嘔吐を投与初期に21.7％認めた．そのため3例は服用を中止した（表3）．血液，生化学的には異常所見を認めなかった．

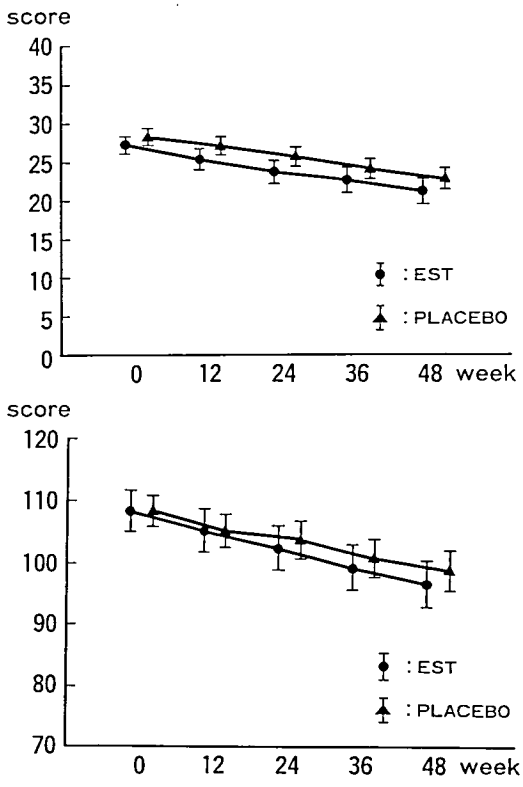


図2　日常生活動作テスト，筋力テスト総点数の推移

表2　総合評価

臨床効果　（ ）：%

薬剤	改善	不変	軽度悪化	中等度悪化	著明悪化	計	判定不能	検定 Wilcoxon	検定 χ^2-test 不変以上		検定 χ^2-test 軽度悪化以上	
E	2 (3.3)	22 (36.1)	23 (37.7)	14 (23.0)	0	61	22	p=0.395	24 (39.3)	p=0.21	47 (77.0)	p=1.00
P	2 (2.7)	19 (26.0)	36 (49.3)	14 (19.2)	2 (2.7)	73	10		21 (28.8)		57 (78.1)	

概括安全度　（ ）：%

薬剤	安全	ほぼ安全	安全性に問題がある	安全でない	計	検定 Wilcoxon	検定 χ^2-test 安全		検定 χ^2-test ほぼ安全以上	
E	71 (85.5)	11 (13.3)	1 (1.2)	0	83	p=0.053	71 (85.5)	p=0.01	82 (98.8)	p=1.00
P	81 (97.6)	2 (2.4)	0	0	83		81 (97.6)		83 (100)	

有用度　（ ）：%

薬剤	極めて有用	有用	やや有用	有用性なし	好ましくない	計	判定不能	検定 Wilcoxon	検定 χ^2-test 有用以上		検定 χ^2-test やや有用以上	
E	0	15 (24.6)	23 (37.7)	23 (37.7)	0	61	22	p=0.504	15 (24.6)	p=0.28	38 (62.3)	p=0.86
P	1 (1.4)	11 (15.1)	32 (43.8)	29 (39.7)	0	73	10		12 (16.4)		44 (60.3)	

表3　副作用

（ ）：%

薬剤		EST	プラセボ
解析対象例数		83	83
副作用発現例数		18 (21.7)	3 (3.6)
副作用による中止例数		3 (3.6)	0
副作用総数		20 (24.1)	6 (7.2)
症状内訳	嘔気・嘔吐	18 (21.7)	1 (1.2)
	腹痛	0	2 (2.4)
	軟便・下痢	1 (1.2)	2 (2.4)
	食欲不振	1 (1.2)	1 (1.2)

考　察

DMDにおいては自然発達によりみかけ上，機能が改善したようにみえる例が知られており，本試験では5歳未満を除外した．しかしながら今回解析した全症例の開始時の日常生活動作能をみると，6歳に至るまで自然発達の影響がみられ，正確な比較検討には6歳未満を除外する必要があると思われる（図3）．

我々は，下肢機能の保たれた時期にESTを投与されたDMD例の中に良好な経過をとる例があることを報告[2),3)]してきたが，全体の経過の中ではDMDのnatural courseに含まれることも指摘してきた．症例間の重症度にかなりのvariation[4)]がある本症において，正しく薬効を評価するには，ほぼ同じ機能を有する2群間

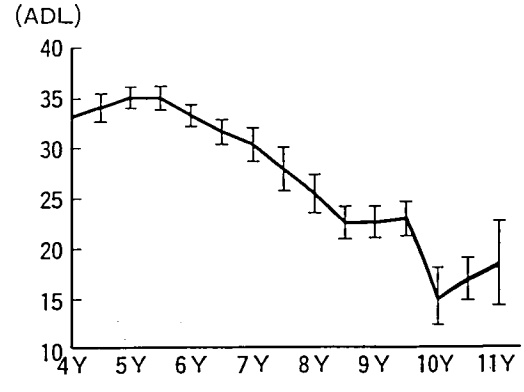


図3　開始時総点数による日常動作テストの自然経過

で，障害度別に比較検討することが重要と思われる[5]．そこで開始時年齢6歳未満の症例をのぞいた118例で，機能障害度別に両群間の臨床効果を比較検討した(表4)．各機能障害度でみると，EST投与群で若干良好な結果が認められた．その結果，開始時重症度等の影響を補正する層別Wilcoxon法で解析すると，EST群で臨床効果の有意な改善を認めた．この結果が具体的に日常生活動作能や筋力などのどのような機能の改善を反映しているのかについては，解析中である．

表4　背景因子別臨床効果
（開始時年齢6歳未満の症例を除く）

開始時機能障害度－1度　（ ）：%

薬剤	改善	不変	軽度悪化	中等度悪化	著明悪化	計	検定 Wilcoxon	χ^2-test 不変以上		軽度悪化以上	
E	1 (5.0)	10 (50.0)	9 (45.0)	0	0	20	p=0.092	11 (55.0)	p=0.15	20 (100)	p=1.00
P	0	10 (32.3)	21 (67.7)	0	0	31		10 (32.3)		31 (100)	

開始時機能障害度－2度　（ ）：%

薬剤	改善	不変	軽度悪化	中等度悪化	著明悪化	計	検定 Wilcoxon	χ^2-test 不変以上		軽度悪化以上	
E	1 (3.7)	6 (22.2)	9 (33.3)	11 (40.7)	0	27	p=0.135	7 (25.9)	p=0.50	16 (59.3)	p=0.28
P	0	4 (15.4)	7 (26.9)	13 (50.0)	2 (7.7)	26		4 (15.4)		11 (42.3)	

開始時機能障害度－3度　（ ）：%

薬剤	改善	不変	軽度悪化	中等度悪化	著明悪化	計	検定 Wilcoxon	χ^2-test 不変以上		軽度悪化以上	
E	0	0	0	2 (100)	0	2	p=0.056	0	－	0	p=0.10
P	0	0	3 (100)	0	0	3		0		3 (100)	

開始時機能障害度－4度　（ ）：%

薬剤	改善	不変	軽度悪化	中等度悪化	著明悪化	計	検定 Wilcoxon	χ^2-test 不変以上		軽度悪化以上	
E	0	2 (40.0)	2 (40.0)	1 (20.0)	0	5	p=0.416	2 (40.0)	P=0.44	4 (80.0)	p=1.00
P	0	0	3 (75.0)	1 (25.0)	0	4		0		3 (75.0)	

開始時重症度の影響を補正する（層別wilcoxon）：E＞P（P=0.038）

文　献

1）宮武正，桑原武夫，湯浅龍彦ほか：Duchenne型進行性筋ジストロフィー症の臨床経過：EST投与群での検討．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 107—109.

2）宮武正，山崎元義，近藤隆春ほか：Duchenne型進行性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（江橋班）昭和63年度研究報告書，1989，pp 85—87.

3）宮武正，山崎元義，近藤隆春ほか：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—．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，1990，pp 77—80.

4）宮武正，桑原武夫，近藤隆春ほか：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（江橋班）昭和61年度研究報告書，1987，pp93—97.

5）石原傳幸，宮川雅仁，儀武三郎ほか：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（江橋班）昭和61年度研究報告書，1987，pp 99—103.

分担研究者一覧

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	03-3441-4173
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	03-3468-1251
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	03-3433-1111 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	03-3353-8111
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	03-3823-2101
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	03-3964-3241 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	03-3260-4271 内268
班員	大関　正弘	大正製薬㈱　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	03-3815-5411 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	中野　今治	東京大学医学部脳研病理	113	文京区本郷 7-3-1	03-3815-5411 内3542
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	03-3237-5154
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