

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(ロイペプチノ)の開発研究

梅 沢 班

昭和57年度研究報告書

昭和58年3月

研究報告書の作成にあたって

「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」が、昭和54年度に厚生省薬務局より新薬開発研究としてとりあげられ、私が班長として本研究班が発足して第4年度を迎えた。[

第4年度は前年度に引き続き、ロイペプチン、ベスタチンおよびフルフェニシノールの活発な基礎研究を行うとともに、臨床研究の充実を図り、新たに里吉班員を迎えた。

かくして、本邦斯界の優れた研究者により本班が編成され、私は班長として任務を全うすることができたと思う。

本年度はロイペプチン、ベスタチンならびにフルフェニシノールの生化学的、薬理学的、生理学的、病理学的研究ならびにモデル動物に対する効果などの広範囲な基礎的研究に注目すべき成果が得られ、また臨床研究を対象とした薬効評価を決めるうえに、各臨床研究者の努力により大きな進展が得られた。難病治療薬開発という使命を担った本班は各班員の努力により、筋ジストロフィー症の治療薬開発に確実な前進を遂げている。

本研究班の4年間に亘る輝かしい成果を基にして、さらに研究を続けることは、筋ジストロフィー症の解決に大きな光を与えるものと信ずる。本研究を重要課題としてとりあげられた厚生省薬務局ならびに班員各位に感謝する次第である。

昭和58年3月

班長 梅沢浜夫

目 次

研究報告書の作成にあたって 梅沢浜夫 i

総括研究報告

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチノン）

の開発研究 3

梅沢浜夫

分担研究報告

ロイペプチノンのプロテアーゼ阻害作用に関する研究 15

村地孝

高速液体クロマトグラフィーによるベスタチノンの微量蛍光定量 21

大倉洋甫

アレルギー性脳炎の治療に関する実験的研究 27

岩崎祐三

ロイペプチノンの薬理学的研究 33

大塚正徳

ロイペプチノンの脱髓病変および培養筋への作用について 43

米沢猛

筋ジストロフィー症マウスに対するホルフェニシノール投与の影響 51

松下宏

ロイペプチソによる実験的治療 ······ 59

高木昭夫

塩酸ブピバカイン（マーカイン）処理による筋崩壊と筋再生に対する

ロイペプチソの影響 ······ 63

埜中征哉

筋ジストロフィー動物の生産・供給 ······ 71

野村達次

DMD に対するベスタチソ投与効果 ······ 73

三吉野産治

筋萎縮症患者に対するロイペプチソ、ベスタチソ効果 ······ 79

村上慶郎

ベスタチソ、ロイペプチソの筋疾患に対する効果 ······ 83

木下真男

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症患者に対するロイペプチソ、

ベスタチソの影響 ······ 93

祖父江逸郎

各種筋疾患に対するベスタチソ (NK 421) 投与後の経過報告 ······ 101

里吉栄二郎

ロイペプチソの難病治療薬としての開発研究 ······ 107

田中亘

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (ロイペプチソ)

開発研究班分担研究者一覧 ······ 119

總 括 研 究 報 告

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (ロイペプチノ) の開発研究

主任研究者 梅沢浜夫

本研究班は微生物の二次代謝産物に由来する筋ジストロフィー治療薬を開発することを目的として昭和 54 年に始まり、現在に至っている。本研究班の発足以前に、ニワトリの筋ジストロフィー症の筋肉で Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ (CANP) 活性の昂進が報告され、また Stracher 教授 (New York State University) らは、ロイペプチノが筋ジストロフィーニワトリおよびマウスに有効であることを見いだしていた。それゆえ、まずロイペプチノの筋ジストロフィー症への効果を調べることを第一の目的として本研究が開始された。

上記の知見を基にして、ロイペプチノをヒトに投与するための毒性が詳しく研究された。

一方、CANP 以外のプロテアーゼ、例えばアミノペプチダーゼなどが筋ジストロフィーマウス筋肉および初期の患者血清中で高い活性を示すことが認められた。これらの酵素はヒト、動物細胞の表面に存在する。さらに、これらの酵素を阻害するベスタチンは本研究班の発足以前に放線菌培養液中に発見され、それは動物細胞表面に結合し、癌患者で低下している免疫を増強し、癌治療のための臨床研究が行われていた。筋ジストロフィーの発現に細胞膜の異常が関与するという考え方もあり、また上述のようにアミノペプチダーゼがジストロフィー筋で上昇している。このベスタチンの筋ジストロフィーマウスに対する効果が調べられ、

生後 2 週間後からの投与で 50% 以上にジストロフィー症状の発現を阻止することが認められた。また、細胞表面にはアミノペプチダーゼの他に、アルカリリフォスファターゼなどが存在し、後者の阻害物質として放線菌培養液中からフォルフェニシンを発見していたが、その誘導体であるフォルフェニシノールは、酵素の阻害活性はきわめて弱いが細胞表面に結合するので、フォルフェニシノールの筋ジストロフィーマウスに対する効果が調べられ、ベスタチンと同様に著効を呈することが認められた。

かくして、ロイペプチノ以外にベスタチンの臨床研究が行なわれることとなり、フォルフェニシノールの臨床研究も計画されるようになった。また、臨床研究者として里吉班員の参加を求め、本研究班の充実を図った。

本年度は、ロイペプチノ、ベスタチン、フォルフェニシノールの生化学的研究、薬理学的研究、生理学的研究、病理学的研究、前臨床試験、モデル動物に対する効果ならびに臨床研究を対象とした薬効評価の基準の検討が行われた。各分担研究者により施行された研究は次の通りである。

- 1) 村地 孝 (京都大学医学部) : ロイペプチノのプロテアーゼ阻害作用に関する研究
- 2) 大倉洋甫 (九州大学薬学部) : 高速液体クロマトグラフィーによるベスタチンの微量蛍光定量

- 3) 岩崎祐三(東北大学医学部):—アレルギー性脳炎の治療に関する実験的研究
- 4) 大塚正徳(東京医科歯科大学医学部):—ロイペプチドの薬理学的研究
- 5) 米沢 猛(京都脳神経研究所):—ロイペプチドの脱髓病変および培養ジストロフィー筋への作用について
- 6) 松下 宏(和歌山県立医科大学):—筋ジストロフィー症マウスに対するフルフェニシール投与の影響
- 7) 高木昭夫(国立武藏療養所神経センター);—ロイペプチドによる実験的治療
- A 脱神経筋萎縮に対する効果
 - B *In vitro* 筋機能に対する影響
- 8) 垣中征哉(国立武藏療養所神経センター):—塩酸ブピバカイン(マーカイン)処理による筋崩壊と筋再生に対するロイペプチドの影響
- 9) 野村達次(実験動物中央研究所):—筋ジストロフィー動物の生産・供給
- 10) 三吉野産治(国立療養所西別府病院):—Duchenne型筋ジストロフィー症に対するベスタチンの投与効果
- 11) 村上慶郎(国立療養所箱根病院):—筋萎縮症に対するロイペプチド、ベスタチンの効果
- 12) 木下真男(東邦大学医学部):—A 実験的除神経筋に対するベスタチン投与の影響、B 神経筋疾患に対するベスタチン、ロイペプチドの臨床効果、C ベスタチン、ロイペプチドの臨床効果および臨床5施設での集計
- 13) 祖父江逸郎(名古屋大学医学部):—Duchenne型進行性筋ジストロフィー症患者に対するロイペプチド、ベスタチンの影響
- 14) 里吉栄二郎(国立武藏療養所神経センター):—各種疾患に対するベスタチン投与後の経過報告
- 15) 田中 亘(日本化薬株式会社):—ロイペプチドの難病治療薬としての開発研究

次に上記各班員の報告について要約する。

1. ロイペプチドのプロテアーゼ阻害作用に関する研究

村地班員は Ca^{2+} 依存性チオールプロテイナーゼに対するロイペプチドの阻害作用を検討する目的で、各種臓器内のカルパインおよびカルパスタチンの分別定量法の研究を行った。

ロイペプチド感受性の Ca^{2+} 依存性システィンプロテイナーゼは、骨格筋の CANP はじめ、動物諸臓器細胞に広く分布していて、カルパイン [EC 3.4.22.17] と総称される。また、カルパインに対する特異的内因性インヒビター蛋白質も同様に広く分布していて、われわれはこれをカルパスタチンと総称している。一方、カルパインにはその完全活性化に 1 mm 以上の Ca^{2+} を要求する II 型と、0.1 mm Ca^{2+} で十分な I 型とが存在する。われわれは、カルパイン群に属するプロテアーゼに共通なロイペプチドによる阻害の機構を、これまた共通なカルパスタチンによる阻害様式と対比して研究する目的で、まず従来完成していなかったヒト赤血球からのカルパスタチンの精製を試み、これに成功した。

400 ml のヒト血液の溶血上清を 2 回の DEAE-セルロース、Ultrogel AcA、Sephacryl S-200 クロマトグラフィーおよび熱処理を組み合せた方法で逐次分画し、約 10,000 倍の精製度で 0.38 mg の均一蛋白質であるカルパスタチンを収得した。精製カルパスタチンは等電点 4.55 の酸性単純蛋白質で、その単量体の分子量は 70,000 と算定された。きわめて集合しやすい性質を有し、通常は四量体の形 (280 kDa) で存在する。100°C、15 分間の熱処理でもその阻害活性を失わず、また、カルパインの阻害は反応系からの Ca^{2+} 奪取に起因するものではない。アミノ酸分析の結果によれば、ヒト赤血球カルパスタチンは芳香族アミノ酸に乏しく、グルタミン酸およびプロリンに富

む点で先に発表されたニワトリ骨格筋カルペスタチン（68 kDa）に類似してはいるが、両者は明らかに異なる分子である。カルパイン/カルペスタチン/ロイペプチ三者間の相互作用はまだ検討を終えていない。

2. 高速液体クロマトグラフィーによるベスタチンの微量蛍光定量

大倉班員はベスタチンの筋ジストロフィー症に対する薬効を判定する目的で、高感度定量法の開発研究を行った。

ベスタチンとそのヒトにおける主代謝物 *p*-ヒドロキシベスタチンは、アルカリ性で過ヨウ素酸酸化され、それぞれフェニルアセトアルデヒド、*p*-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドとなる。これらを新規蛍光試薬 4,5-ジメトキシ-1,2-ジアミノベンゼン・モノ塩酸塩 (DDB·HCl) で蛍光ラベル化し、HPLC に付すことにより定量可能なことを見いだした。

測定法の概要は次の通りである。ベスタチンおよび *p*-ヒドロキシベスタチン溶液 100 μ l に 1.5 M NH₄OH と 0.6 mg/ml NaLO₄ を加え、定温で 20 分間放置後 1.5 mg/ml Na₂SO₃ で過剰の NaLO₄ を分解する。DDB·HCl 溶液を加え 37°C で 50 分間加温する。1.0 M NaOH で反応を停止し、その 100 μ l を HPLC に付す。血清は、その 50 μ l に水またはベスタチン標準液と 4.2 mM 酢酸を加え 100°C、5 分間加熱後遠心して除蛋白し、上清 100 μ l を試料とする。HPLC は、カラムに Lichrosorb RP-18、溶離液にアセトニトリル-0.1 M トリス緩衝液 (pH 8.7) を用い、蛍光検出 (励起 320 nm、発光 390 nm) によって行う。

標準液を用いた場合、ベスタチンおよび *p*-ヒドロキシベスタチンを 12 分以内に分離検出できた。両物質の検出限度は、HPLC 注入量 100 μ l でともに 5 pg 以下であった。これをヒト血清中のベスタチンおよび *p*-ヒドロキシベスタチンの

定量に応用した。血清中 0.32 nmol/ml (100 ng/ml) 以上のベスタチンが再現性よく測定した。血清中の *p*-ヒドロキシベスタチンは極めて低濃度であるため、現在のところ測定不能である。本法により、三吉野産治班員より提供されたベスタチン投与患者の血中濃度を測定し良好な結果を得た。本法はヒト血液中ベスタチンの微量定量が可能で、動物体内における動態の検索に適用できる。

3. アレルギー性脳炎の治療に関する実験的研究

岩崎班員はロイペプチの炎症性脱髓疾患に関する基礎的研究を行った。

Cammer らの炎症性脱髓性疾患における髓鞘の破壊が、中性プロテアーゼによるミエリン塩基性蛋白の破壊によることを示唆する報告、永井らによる実験的アレルギー性脳炎のロイペプチによる治療成績、われわれが昨年報告したロイペプチによるウサギ視神経の破壊阻止などの成績をふまえ、ロイペプチの中枢神経の炎症性脱髓疾患への適応に関する基礎的実験を行った。

まず、高濃度のロイペプチの神経毒性を調べる目的で 10 mg/ml または 1 mg/ml の濃度のロイペプチを 50 μ g/hr、14 日間、各群 5 匹の成熟ラットの脳内皮下に埋込み浸透圧ポンプを用いて連続注入した。臨床的に異常を認めなかったのみならず、全例において組織学的検索でも全く異常を認めなかった。

次いで、脳血液閥門を通過しないロイペプチを脳実質組織に移行させる方法として、高張マニホールの頸動脈内注入による脳血液閥門の可逆的破壊実験を行った。エバンスブルー標識アルブミンは最初、脳内の血管にのみ限局していたが、術後 12-14 時にはマニホール注入側の大脳皮質、脳幹の神経細胞にエバンスブルーの蛍光が陽性となつた。

さらにウイルス感染後脳症のモデルとしてセン

ダイウイルス (HVJ) 脳内接種マウスにみられる炎症、変性病変に対する効果をみた。非投与例 6 匹全例に病変が出現したのに対し、ロイペプチド 2 mg を連日腹腔内に投与した群では病変の発現は 6 匹中 3 匹に減少していた。

4. ロイペプチドの薬理学的研究

大塚班員はロイペプチドおよびベスタチンの血圧、呼吸、血管平滑筋、ならびに摘出脊髄などに対する作用を検討した。

1) ウサギの血圧、呼吸、心電図に対するロイペプチドの効果：ウレタン麻酔下にウサギの大動脈から血圧を記録した。ロイペプチド 5-10 mg/kg を静脈内に与えると血圧は一過性に下降したが、呼吸数および心電図に変化はみられなかった。血圧下降の機序としては先に報告した神経節遮断作用が考えられる。

2) 血管平滑筋に対する作用：モルモットの胸部下行大動脈を摘出し、らせん状に切って作った条片をマグヌス管内に懸垂し、張力を記録した。ロイペプチドまたはベスタチンを 2-200 μg/ml の濃度で適用したが、張力の変化は起らなかった。しかし、ベスタチンはノルアドレナリン (0.3-2 μM) の血管平滑筋収縮作用を増強した。

3) 幼若ラット摘出脊髄に対する作用：

a) 下行性抑制：高位同側側索の条件刺激によって单シナプス反射および後根電位は抑制を受けたが、この抑制に対してロイペプチド 100 μg/ml は顕著な影響を与えたかった。

b) 侵害刺激による反射電位：半裁脊髄を坐骨神経、腰部および下肢が繋がったままとりだし、前根から電位を記録した。皮膚に機械的侵害刺激を加えると、L₄₋₅ の前根から遅い時間経過の脱分極性反射電位が記録された。この反射電位はエンケファリンにより抑制され、この抑制をロイペプチドおよびベスタチン 200 μM は著しく増強した。

c) ペプチド作動性シナプス伝達を含む反射電

位：後根に单一刺激を加えると反射側前根から遅い時間経過の反射電位が記録され、この反射電位発生にはペプチドが関与していると思われる。この電位はエンケファリンにより抑制され、この抑制をロイペプチドは軽度に、ベスタチンは著しく増強した。

d) ロイペプチドはアセチルコリンの脱分極作用に顕著な拮抗作用を示した。

5. ロイペプチドの脱髓病変および培養ジストロフィー筋への作用について

米沢班員は脱髓疾患の特徴的病変である脱髓病変の誘起に関するプロテアーゼに対するロイペプチドの効果を検討した。

I. 脱髓病変に及ぼすロイペプチドの影響

脱髓疾患の特徴的病変である脱髓は免疫学的背景による食細胞の賦活化を来し、髓鞘を特異的に破壊する変化である。脱髓病巣でプロテアーゼ活性の上昇することから、この食細胞での活性を抑制することにより病巣の進展を阻止しうるという作業仮説が一部でなされている現状である。このことを検討するため脱髓に関与する因子、抗体・感作リンパ球・リンフォカインのおのおのによる神経組織培養での脱髓病変にロイペプチドがいかに影響するかを調べた。被検材料はヒトの MS, ADAM, サルやウサギの EAE より得たものである。いずれの場合も、ロ剤前処置を行った培養でも、非処理培養でも、異なるところではなく、脱髓の進行がみられた。

プロテアーゼ活性が食細胞で上昇するにせよ、脱髓に関係する最初の変化は同細胞が髓鞘の層状構造を解離することにあり、髓鞘の脆弱性と相俟って脱髓が起ると考えられる。したがって、プロテアーゼ活性が作用するよりも前に脱髓という現象が起っているわけである。

II. 家鶏ジストロフィー筋および健康筋へのロイペプチドの影響

筋ジストロフィー家鶏 (California Davis 413) およびその対照動物 (同 412) の胚 (10-13 日) の浅胸筋の培養を用いてロ剤の影響を調べた。ロ剤は幼若培養細胞に対しきわめて毒性が強く、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ にて 24 時間に中毒性顆粒の出現を見る。いったん病変を生じたものもロ剤投与を中止すると回復してくるが、筋線維の発育成長の遅延が残る。また筋原線維の発育も悪い。しかし比較的侵襲の少ない筋線維でもジストロフィー病変の出現がみられる。このことによりロ剤によりプロテアーゼ抑制が生じてもジストロフィー病変の出現を阻止しないものと思われる。

6. 筋ジストロフィー症マウスに対するフルフェニシノール投与の影響

松下班員は筋ジストロフィー症マウスに対するベスタチンの疾病回復効果の作用機序を追求する手段の一つとして、フルフェニシノールをベスタチンと同様な条件で連続投与する実験を行った。

まず約 1 カ月齢ですでに症状がある程度進行している疾病マウスを用いて、1 週間、2 週間および 6 週間の連続投与を行い、血清中ならびに骨格筋中のマーカー酵素の活性変化を調べた結果、PK および CPK 酵素の活性は血清中で減少し、骨格筋中で増加するという典型的な回復変化を示し、筋線維での膜機能がフルフェニシノール投与によって改善の方向に向かっていることが示唆された。萎縮骨格筋におけるミトコンドリア分画中の GOT, GPT 活性の著しい低下および可溶性分画中の活性増加傾向がフルフェニシノール投与によって、いずれも正常方向に改善されていることが認められた。しかし一方、投与期間中の体重増加は食塩水投与群と全く同じ変化を示し、臨床症状にも目立った改善の徴候はみられなかった。そこで発症後できるだけ早い時期に投与を開始するようにしたところ、投与マウスの約 2/3 に著しい体重増加および筋ジストロフィー症状の消失が

認められた。しかし、そのうち、2 カ月以降徐々に後肢の固直状態を発現する個体が現れ、4 カ月齢で完全に正常状態を維持しているマウスは投与マウス全体の約 1/3 程度であった。これらの個体では、臨床症状は全く消失し、筋の耐久力も正常と変わらないほど、増強されていた。また、このような完全回復個体が得られる頻度は投与開始時期と相関性があり、生後 20 日までにフルフェニシノールの投与を開始すると約 50% の個体に、生後 30 日までに開始すると約 30% の個体に完全回復が得られた。しかし、1 カ月齢を経過してから連続投与を開始しても、もはや回復個体は得られなかつた。これらの結果から immunomodulator を連続投与することによってマウスの筋ジストロフィー症の症状進行を抑制できる可能性が明らかになった。

7. ロイペプチによる実験的治療

A 脱神経萎縮に対する効果

B *In vitro* 筋機能に対する影響

高木班員は昨年度、ロイペプチが脱神経後の筋萎縮にわずかではあるが有意な抑制効果のあることを認めた。本年度は例数を増やして、さらに検討を行った。

哺乳類の骨格筋を *in vitro* で反復収縮させると短時間で劣化現象が生ずる。この理由はまだ充分に理解されていないようだ。この経時的劣化に対するロイペプチ、ベスタチンおよびペプスタチンの影響を検討した。

方 法：一側坐骨神経を切断したラットにミニ浸透圧ポンプを使用してロイペプチ ($30 \text{ mg}/\text{kg}/\text{日}$) を投与した。7 日目に前脛骨筋 (TA) 長趾伸筋 (EDL) とひらめ筋 (SOL) をとり出して各種分析を行った。*in vitro* 実験は重量 20-30 mg の EDL を使用した。通気 ($95\% \text{ O}_2\text{-}5\% \text{ CO}_2$) した Krebs-Ringer 液中で白金板電極により連続電気刺激を行い、等尺性張力を測定した。

また筋肉中あるいは外液中の CPK 活性を測定して、酵素遊離を検討した。

結果：A：i) 脱神経後の筋萎縮は SOL で最も著明で、健側の 52% であった。ロイペプチノン投与群では 61% であった ($p=0.07$)。TA や EDL ではこの効果はみられなかった。ii) ロイペプチノンは健側および脱神経側で蛋白量を増加させる傾向を呈した。しかし統計的には有意ではなかった。

B：i) 強縮張力は薬剤群ではやや低値であった。ii) 1 Hz の連続刺激を継続して 60 分後には、単収縮張力は 21%，強縮張力は 32% に減弱した。薬剤投与群にも全く同程度の劣化が生じた。iii) 60 分後には両群において静止張力は約 10% (p. o. に対して) 増加した。iv) 両群において筋内の CPK 活性の約 0-30% が喪失した。

8. 塩酸ブビバカイン（マーカイン）処理による筋崩壊と筋再生に対するロイペプチノンの影響

塾中班員は過去にロイペプチノンの生体に対する影響を見るため、筋ジストロフィー鶏、筋ジストロフィーハムスターを使用し実験をしてきたが、陽性の結果は得られなかった。今回はヒト筋ジストロフィーと筋の崩壊像が酷似する塩酸ブビバカイン (BPVC) を使用しての実験を行った。

Wistar 系オスラット(約 250 g)を 2 群、すなわちロイペプチノン 50 mg/kg/日(miniosmotic pump 2002 使用)投与群と非投与群に分けた。各群をさらに 0.5% BPVC 処理群と非処理群に分け、注射後 48 時間、7, 14 日目に筋を取り出し、組織学的、生化学的に検索した。

0.5% BPVC をヒラメ筋内に注射すると、95-100% の筋線維は壊死に陥り、0.1% 液ではそれが局所的であった。壊死線維は 48 時間後には著明な貪食反応を伴っていた。ロイペプチノン投与はその壊死、貪食過程に何らの影響を与えたかった。

7, 14 日目には明らかな再生線維として出現し、ロイペプチノン投与群ではそれぞれ平均線維径 24.4 ± 5.3 , 29.9 ± 6.4 、非投与群では 29.0 ± 5.5 , $36.5 \pm 6.2 \mu\text{m}$ であり、投与群で再生線維は有意に小径であった。

BPVC 処理筋でライソゾーム酵素、とくにカテプシン B & L は 48 時間後著明に上昇し、再生が進むにつれて次第に低下していった。ロイペプチノンはカテプシン活性の上昇は抑制せず、むしろその値を上昇させた。

以上よりロイペプチノンは筋の崩壊、処理に関与する貪食細胞に十分とり込まれず、ライソゾーム酵素活性は抑制しないと思われた。ロイペプチノン投与により再生筋が小径であったことは、ロイペプチノンの大量投与による影響か、他の要因によるものか、その意味については、なお検討を要すると思われた。

9. 筋ジストロフィー動物の生産・供給

野村班員は筋ジストロフィー症治療薬開発研究班の班員に筋ジストロフィー鶏の卵を供給する目的で、種卵の生産ならびに飼育の改良を行った。さらに、米国産筋ジストロフィーハムスターの供給を行うとともに、遺伝的背景の均一な筋ジストロフィーハムスターの育成を検討している。

10. Duchenne 型筋ジストロフィー症に対するベスタチンの投与効果

三吉野班員はベスタチンの臨床効果を評価する目的で、Duchenne muscular dystrophy (DMD) 症患児にベスタチンを投与し、臨床効果および副作用の検討を行った。

- 1) 対象：年齢 4-10 歳、stage 1-2 DMD 患児 13 人を対象とした。
- 2) 方法：ベスタチンは、Ausberger 式を用い、成人量 30 mg/日 に相当する量を 10% ドライシロップの形で 1 カ月連日朝 1 回投与した。

1カ月の休薬期間の後2倍に增量し、同様の方法で4倍量まで增量を試みた。

3) 結果および考察：血清CPK値を生化学的指標としたが、内服前後の値に一定の傾向はなく、各投与量間の差異もみられなかった。また、ADL、10m走、階段昇降、立ち上がり時間でみた運動機能の改善も得られなかった。しかし、重大な副作用が認められなかつことから、より大量かつより長期にわたるプロトコールを計画し、今後の研究を進める方針である。

11. 筋萎縮症に対するロイペプチニン、ベスタチンの効果

村上班員は前年度に引き続き、種々の筋萎縮症にロイペプチニン、ベスタチンを投与してその効果について検討を加えた。

対象としてはロイペプチニンを使用したもの7例（肢帶型、シャルコー・マリー・トース病、脊髄性進行性筋萎縮症、多発性筋炎、Duchenne型のおのの1例ずつ、筋強直性ジストロフィー症2例）。ベスタチンを使用したものは21例〔筋強直性ジストロフィー症8例、筋ジストロフィー症7例（肢帶型4例、顔面肩甲上腕型2例、Duchenne型1例）、その他6例（クーゲルベルグ・ヴェランダー病2例、多発性筋炎2例、シャルコー・マリー・トース病、Duchenne型筋ジストロフィー症の保因者の各1例〕であった。

投与方法はロイペプチニンは100mg/dayから毎週50mgずつ增量して300mg/day、一部に450mg/dayで維持量とした。使用期間は21週から96週であった。ベスタチンは90mg/dayから開始して毎週30mgずつ增量して270mg/day、一部に480mg/dayで維持量とした。使用期間は12週から87週であった。

成績はロイペプチニンでは不变または軽度の悪化のみられたもの2例、明らかに悪化したもの5例であった。副作用は特にみられなかった。ベスタ

チンは筋ジストロフィー症では、不变または軽度に悪化したもの2例、明らかに悪化したもの5例で、筋強直性ジストロフィーでは不变または軽度に悪化したもの4例、悪化したもの4例であった。その他の筋萎縮症では有効であったもの（多発性筋炎）1例、不变1例、悪化したもの4例であった。

副作用は胃障害5例、心房細動？2例、一過性の発疹が1例であった。

12. 筋障害に対するベスタチンおよびロイペプチニンの影響ならびに臨床施設での集計

木下班員はベスタチン、ロイペプチニンの筋疾患者に対する影響および実験的筋障害の修復過程に及ぼす影響を検討した。さらにベスタチン、ロイペプチニンの臨床5施設での集計を行った。

1) 実験的除神経筋に対するベスタチン投与の影響：ラット坐骨神経切断後、ベスタチン2mg/kg、20mg/kgの注射を連続し、腓腹筋の変化を経時的に観察したが、対照との間に明らかな差はなく、除神経後の筋萎縮に対する本剤の効果は証明されなかった。

2) 神経筋疾患に対するベスタチン、ロイペプチニンの臨床効果—当教室での経験：現在、当教室では17例の神経筋疾患患者にロイペプチニンあるいはベスタチンを継続投与中であり、最長3年に及ぶが、わずかに血清CPKの低下をみた例と、自覚症状の改善をみた例とがあるが、全体としては著しい効果は両剤ともに認められていない。しかし、本来進行性の病勢を示す疾患が対象であるから、本剤投与が自然の進行に対してどの程度阻止作用を有しているかは明らかでない。

3) ベスタチン、ロイペプチニンの臨床効果—臨床5施設での集計：国立療養所西別府病院、同箱根病院、国立武藏療養所神経センター、名古屋大学、東邦大学の5施設の集計では、計72例の神経筋疾患患者にロイペプチニン、ベスタチンのい

ずれかを一定量連日、一定量間歇、漸増連日などの方法で投与した結果、一部の症例で血清 CPK の有意の低下をみた。しかし、10 m 歩行、階段昇降などの運動機能で明らかな改善を示した例はきわめて稀で、多くの判定資料のそろっているベスタチン群 43 例、ロイペプチニ群 16 例の投与前後の各数値の比較では、両群とも悪化を示していた。しかし、これは前述のように進行性経過を示す症例が投与の対象であり、厳密な意味で効果を検討するには投与前後の比較ではなく、基礎疾患、初発年齢、罹患期間、投与期間に一致した観察期間を一致させた対照群の病勢の推移と比較する必要があると考える。

13. Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症患者に対するロイペプチニ、ベスタチンの影響

祖父江班員は Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症 (DMD) 患者にロイペプチニ、ベスタチンを投与して、本症患者に対する薬剤の影響をみた。

対象は DMD 患者 17 例で、これを以下の 3 群に分けた。A 群：ロイペプチニ投与群で stage 1-4 の者 5 例、B 群：ベスタチン投与群で stage 1-4 の者 5 例、C 群：ベスタチン投与群で stage 5 以上の者 7 例、薬剤は各 1 cap/日 から投与開始し、3 cap/日 を維持量とした。ロイペプチニは 1 cap 50 mg、3 cap/日 を維持量とした。ロイペプチニは 1 cap 50 mg、ベスタチンは 1 cap 30 mg のものを用いた。各薬剤の影響を調べるために投与前と投与後 1 カ月、6 カ月、12 カ月の時点で
①運動機能：ADL、10 m 平地往復歩行時間、階段昇降時間、②CPK 活性値、血清ミオグロブリンの日内変動(午前 5 時 30 分、15 時 30 分の 2 回)、
③一般血液生化学、末梢血、尿の各検査、④凝固・線溶機能、などの諸点に検討を加えた。また自覚的副作用、合併症なども適宜チェックした。

結果は、①運動機能と CPK 活性値・ミオグロブリンなどを総合的に評価すると、明らかに改善を示した症例やまたは進行が停止したと考えられる症例は存在しなかった。②凝固系に若干の有意な変動がみられたが、それ以外とくに薬剤投与による変化はなかった。また凝固系の変動も正常域でのことであり、臨床上問題とはならなかった。
③特記すべき自覚的副作用、合併症は出現しなかった。

以上、これら薬剤を DMD 患者に投与した結果、1 年間の投薬期間では今回の評価方法から明らかな有効性は検出できなかった。安全性は高い薬剤と思われた。

14. 各種疾患に対するベスタチン (NK 421) 投与後の経過報告

里吉班員はベスタチンを各種筋疾患に投与し、臨床経過を検討した。

対象は LG PMD 6 例、FSH PMD 1 例、Duchenne PMD 1 例、Becker PMD 1 例、myotonic dystrophy 3 例、polymyositis 5 例、dermatomyositis 1 例、distal myopathy 1 例、ALS 1 例の計 20 例で、これらの症例に対し、NK 421 を 30 mg/日 より漸増投与した。最高投与量は 450 mg/日 7 例、360 mg/日 1 例、270 mg/日 3 例、180 mg/日 5 例、90 mg/日 1 例、60 mg/日 1 例、30 mg/日 2 例である。また経過観察期間は 1 カ月-1 年 7 カ月である。なお、myositis の 4 症例では steroid、Imuran を併用した。

臨床効果判定には、1 カ月ごとに 10 m 歩行、階段 11 段昇降時間、全身 18 筋の 5 段階筋力評価、血清 PK、aldolase 値を用いた。さらに LG PMD の 4 例に対し経過中 2 回にわたり (6 カ月間隔)、尺骨神経に電気的に低頻度反復刺激を与え、母指内転筋より筋張力、stair case の程度、収縮時間、1/2 弛緩時間を測定し半年の推移を観察した。さ

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチニン）の開発研究

らに副作用監視のため末梢血一般生化学、尿蛋白を測定した。

結果および考察：LG PMD の 2 例、myositis の 3 例の計 5 例に経過中一過性の自覚的な筋力改善がみられ、うち LG PMD の 1 例、myositis の 3 例には他覚的な改善がみられた。しかし長期的観察では臨床的改善を示した例はなかった。また若干 CPK 値の低下傾向があったのは FSH PMD, myotonic dystrophy の各 1 例のみであった。電気生理学的検索を施行した LG PMD 4 例のうち 3 例は症状の進行が示唆された（筋張力減少、収縮時間、1/2 弛緩時間延長）。筋力、CPK 値とも比較的安定していた 1 例では、収縮時間、1/2 弛緩時間ともに延長していたが筋張力に改善がみられた。以上の総合判定により明白な改善を示した症例はなかったが、進行を遅らせている可能性はある。投与中、複視、霧視、眼痛、ふらつき、頭痛、消化器症状がみられたが、多くは一過性で NK 421 との因果関係は不明であった。

15. ロイペプチニンの難病治療薬としての開発研究

田中班員はロイペプチニンの難病治療薬としての開発研究の基礎研究を行うとともに、各班員にロイペプチニン、ベスタチンを提供し、各班員から提供される血液、筋肉などの生物体試料中のロイペプチニン、ベスタチン量を測定することを目的とし、ロイペプチニンの 1) 原末試製、2) 製剤研究、3) 薬効研究、4) 毒性試験などを行った。それぞれの研究結果を以下に要約する。

1) 原末試製：硫酸ロイペプチニン原末 4.5 kg を製造した。3 ロットを実施した。

2) 製剤研究：室温 18 カ月の安定性を測定した。硫酸ロイペプチニン原末は室温 18 カ月で 2% 前後の力価低下を示し、その主因は C 末アルギニナルのラセミ化であることを確かめた。

臨床試験に提供している経口剤（散剤およびカ

プセル剤）の安定性についても、原末と同様な安定性が示された。

3) 薬効研究：線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の野生株 (N 2) および筋肉発育異常を生ずる変異株 (E 444) の形態および生態の観察を行い、それに対するロイペプチニンおよびその同族体、ベスタチンおよびその同族体、蛋白同化ホルモンの効果を検討した。

ロイペプチニンおよびその同族体に線虫の運動麻痹発現の遅延効果が認められたが、それは一般的成長の遅延で説明のつく水準を超えていた。また、一般的成長の不全を解除できなかった。また、ノマルスキーフ干渉顕微鏡で観察される筋細胞 Z 線類似のデンス・ボディ配列についても改善は認められなかった。

筋ジストロフィーマウス (10-13 週齢で既発症のもの) に脱毛しないままロイペプチニン軟膏を 30 mg/kg 左右後肢部の全面にわたって 1 回または 1 日 1 回連続 1 カ月間塗布して一般行動と車廻し運動とを観察したが、改善は認められなかった。このことは昭和 55 年度班研究報告に松下班員が、また、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981 に Stracher 博士らが記しているように、ロイペプチニンまたはベスタチンを筋ジストロフィーマウスの発症以前の幼若期 (3 週齢以前) から投与開始することが奏効の条件であることを考慮すれば、当然のことである。

ただし、同時に測定した筋肉中のロイペプチニン濃度は著しく高く、1 回投与では 1 時間後に平均 4.9 $\mu\text{g/g}$ 、1 カ月連続投与では 3.1 $\mu\text{g/g}$ が達せられていた。

4) 毒性試験：微生物突然変異原性試験は *S. typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538 および *E. coli* WP 2 *uvrA* の 6 株につき、S-9 ミックス添加の有無にかかわらず陰性であった。

ウサギにおける器官形成期投与試験によれば、

母体に対する安全量は 100-200 mg/kg 程度であり、胎児に対しては 300 mg/kg 程度までは著明な毒性を示さないと結論された。

ウサギにおける経皮毒性試験を 10%, 20%,

ワゼリン軟膏につき、1頭当たり 0.5 g を剃毛した背部皮膚 25 cm² に週 6 回 1 カ月間塗布して、毒性および血漿中ならびに筋肉内ロイペプチノ濃度を測定した。

分 担 研 究 報 告

ロイペプチドのプロテアーゼ阻害作用に関する研究

村 地 孝*

研究目的

ニワトリ骨格筋の Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ (CANP) がロイペプチドによって強く阻害されることはよく知られている。われわれは、ラット肝臓、脳、腎臓、脾臓、赤血球、胸腺などに広く分布する同種のプロテアーゼが、その Ca^{2+} 要求性および SH 還元剤要求性において、CANP と著しく類似していることを知り、これらに対する放線菌由来の一群のプロテアーゼ阻害剤の効果を検討したところ、とくにロイペプチドによって強い阻害を受けることを見いたした。

そこで、骨格筋の CANP に関する進んだ知見と平行して、上記の全身組織細胞に広く分布している Ca^{2+} 依存性システインプロテイナーゼ（以下カルパイン calpain と総称する）について、その精製と性質の研究を系統的に展開することにした。とくに、カルパインを特異的に阻害する細胞内インヒビータンパク質の存在を発見したので、これをカルパスタチン (calpastatin) と名づけ、その精製と性質についても研究を行うこととした。

これらの研究を通じて、ロイペプチドのプロテアーゼ阻害作用の一般的分子機構を解明するとともに、その生理的病態的意義を明らかにすることが本研究の目的である。

研究方法

材料となるヒト赤血球は、健康人からの採取血より白血球および血小板を注意深く除去して得た。5倍容量の 1 mM EGTA および 5 mM 2-メルカプトエタノールを含む 20 mM トリス・HCl 緩衝液 (pH 7.5) を加えて溶血させ、30 分間 10,000 g 遠沈上清を上記の緩衝液に 50 mM NaCl を加えた溶液に対して一夜透析して、これを精製の出発材料とした。

プロテアーゼ活性は、50 mM トリス・HCl 緩衝液を用いたカゼイン加水分解により定量した。通常、pH 7.5, 30°C で 30 分間温置によるトリクロール酢酸可溶性ペプチド等の増量を Folin-Lowry 法により、750 nm の吸光度増加として計測した。のちに述べるように、カルパインには、I 型と II 型の 2 種があるので、I 型の定量には 0.1 mM CaCl_2 を、II 型の定量には 5 mM CaCl_2 を活性化剤として加えた。いずれの場合も 5 mM L-システインを共存させた。プロテアーゼの 1 単位は 750 nm の吸光度 1.0 の増加を 30 分間で与えるべき酵素量と定義した。

カルパインに対するカルパスタチンの作用を見るためには、カルパスタチン標品を予めカルパインと pH 7.5, 30°C で 10 分間接触させたのち、反応混液のカゼイン加水分解活性を測定し、活性の低下度を計測する方法を用いた。1 単位のカル

* 京都大学医学部附属病院検査部

パインを失活させるインヒビター活性を 1 単位とした。

研究結果

ヒト赤血球シトソル画分よりカルパスタチンを均一タンパク質として精製し、その諸性質を明らかにした。

1. カルパスタチンの精製

出発材料 700 ml を 400 ml の DEAE-セルロースゲルと混じ、これを十分洗浄することによってヘモグロビンを除去したのち、カルパスタチン活性画分を 150 mM NaCl 含有緩衝液によって溶出させた。ついで溶出液をアミコン PM-10 により濃縮し、これを Ultrogel AcA 34 ゲルカラムによって分画した。カルパスタチン活性の大部分は 280 kDa の位置に溶出され、一方カルパイン活性は 80 kDa 付近に溶出されたので、この操作によって酵素とインヒビターの完全分離の行われたことが知られた。280 kDa 画分を第 2 回目の DEAE-セルロースクロマトグラフィーにかけ、溶出されてくるカルパスタチン活性画分を 10 ml に濃縮したのち、pH 7.5 で 100°C, 15 分間の熱処理を行い、その遠沈上清をコロジオンバッグで濃縮して Sephadryl S-200 ゲルカラムにより分画した。再び 280 kDa 画分を集めて精製カルバ

スタチンとした。

表 1 に総括するとおり、400 ml 血液より 0.38 mg の精製標品を得た。表の第(3)段階まではカルパインとカルパスタチンの相互分離が達成されていないので、真の精製度を直接計測することができない。すなわち、第(3)段階からの比較では 32.1 倍にすぎない精製度であるが、溶血液からの推定比較では約 10,000 倍の精製となる。第(5)段階、すなわち熱処理が精製度を飛躍的に高めていることがわかる。熱処理でなお僅かに残った混在タンパク質が最後の Sephadryl S-200 カラムで除去される。

精製の第(3)-(6)段階での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を図 1 に示す。すでに第(4)段階の標品でも、カルパスタチン活性は 70 kDa 付近に局在しており、これがそれ以降の段階で純化されてゆく過程がよくわかる。最終段階では 70 kDa の単一バンドを与える。図 1 は Fairbanks らの方法によった結果であるが、Laemmli 法によるときは、標品によって 70 kDa のほかに 68 kDa のバンドの現われる場合があったが、その原因を明らかにすることはできなかつた。

表 1 Purification of calpastatin from human erythrocyte cytosol

Step	Total protein ^a (mg)	Total activity		Specific activity		
		Units	%	Units/mg protein	Fold ^b	Fold ^c
(1) Hemolysate ^d (supernatant)	39,900	(2,710) ^e		(0.068) ^f		1
(2) 1st DEAE-cellulose (eluate)	271	(2,710) ^e		(10.0) ^f		141
(3) Ultrogel AcA 34 (inhibitor fraction)	117	2,710	100	23.2	1	341
(4) 2nd DEAE-cellulose (inhibitor fraction)	37.4	1,270	46.9	34.0	1.47	500
(5) Heat treatment (100°C, 15 min; supernatant)	1.92	895	33.0	466	20.1	6,853
(6) Sephadryl S-200 (peak fraction)	0.38	284	10.5	747	32.2	10,985

^a Calculated on the assumption that $A_{280}^{1\%}=10$. Correction for heme was made in the case of hemolysate.

^b A found specific activity of 23.2 units/mg protein for step 3 was taken as unity. ^c A deduced specific activity of 0.068 units/mg protein for step 1 was taken as unity. ^d From 400 ml of blood. ^e Total activity in these fractions could not be directly determined and was therefore assumed to be equal to the total activity found in step 3. ^f The value was obtained from the deduced total activity.

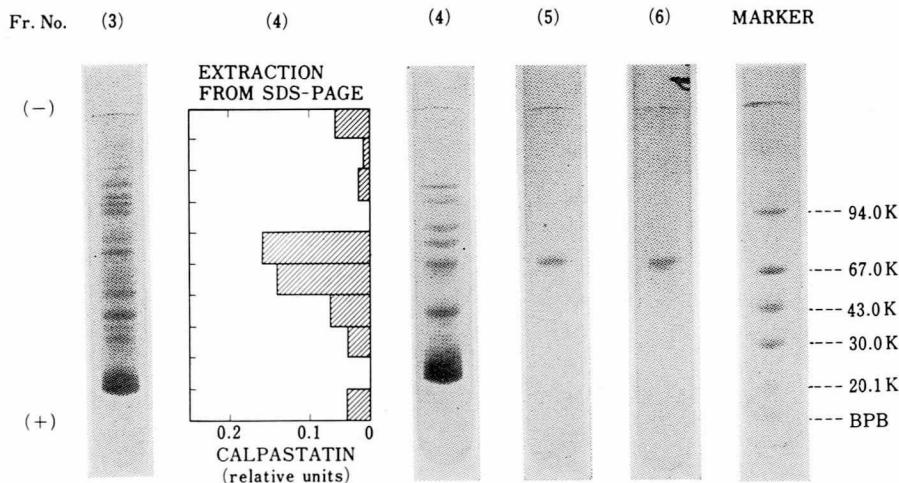


図 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human erythrocyte calpastatin. Numbers in parentheses indicate the purification steps listed in Table I. The electrophoresis was performed at 8 mA per tube for 1.5 hr. The proteins migrated from the cathode to the anode. They were stained with Coomassie Brilliant Blue. Marker proteins used were phosphorylase b (94.0 K), bovine serum albumin (67.0 K), ovalbumin (43.0 K), carbonic anhydrase (30.0 K), and soybean trypsin inhibitor (20.1 K). BPB, Bromophenol Blue. The gel for the material after step 4 was sliced in 0.9-cm segments, each of which was analyzed for the content of calpastatin.

2. 精製カルパスタチンの諸性質

1) 等電点

7% Pharmalite を含むアガロースゲル薄層を用いた電気泳動法により、ヒト赤血球カルパスタチンの pI は 4.55 と測定された。この値は、ウサギ骨格筋カルパスタチンについて予報的に示された pI 6.0 よりはるかに酸性の値である。

2) アミノ酸組成

6 N 塩酸、105°C、48 時間および 72 時間加水分解によるアミノ酸分析の結果を表 2 に掲げる。トリプトファンは 0.5% チオグリコール酸含有 6 N HCl による加水分解法によって定量したが、これを検出することができなかった。バリン含量を 21.0 残基として近似整数を求めるとき、1 分子当たり 643 残基となり、分子量は 69,369 と計算された。この値は電気泳動で得られた単量体の分子質量 70 kDa とよい対応を示している。半シスチン残基は 1 残基以下、おそらくは 0 残基であったが、より正確な値は、たとえば過ギ酸酸化後の分析結果にまたなければならない。アルカリ分解によっ

ても γ -カルボキシグルタミン酸の存在は検出されなかった。またヘキソサミンも検出されていない。表 2 には Ishiura らによるニワトリ骨格筋カルパスタチンのアミノ酸組成を併せて掲げてある。両者の組成比は全般的に類似していることがわかる。

3) オリゴマー構造

図 2 は精製最終段階のゲルクロマトグラフィーでカルパスタチンが 280 kDa の位置に溶出されることを示す（黒丸）とともに、一旦採取したカルパスタチンを SDS-ゲル電気泳動で 70 kDa バンドとして把えたのち（図 1），これをゲルから抽出して再びゲルカラムで分析すると、また 280 kDa の位置に出現する（白丸）ことを示している。すなわち、精製カルパスタチンは 70 kDa の単量体を基本単位として、おもに四量体に集合して存在しやすい性質をもっている。このような 70 kDa と 280 kDa との相互移行現象は、精製の途中で 100°C、15 分間熱処理という烈しい操作を加えた結果生じたものではない。一方、Ishiura

表 2 Amino acid composition of calpastatin from human erythrocytes as compared with that from chicken skeletal muscle

Amino acid	Human erythrocyte ^a	Chicken skeletal muscle ^b
Aspartic acid	81	53
Threonine	32	38
Serine	62	52
Glutamic acid	96	96
Proline	65	43
Glycine	34	70
Alanine	61	47
Half-cystine	0.8	n. d. ^c
Valine	21	44
Methionine	7	7
Isoleucine	14	19
Leucine	51	41
Tyrosine	6	18
Phenylalanine	8	8
Lysine	78	36
Histidine	6	18
Arginine	20	22
Tryptophan	0 ^d	n. d. ^c
Total	643	612

^a All values were based upon 21 valine residues per molecule. ^b Taken from Ishiura, S., Tsuji, S., Murofushi, H., and Suzuki, K. *Biochim. Biophys. Acta* 701, 216-223 (1982); calculated for MW 68,000. ^c Not determined. ^d By hydrolysis in the presence of 0.5% thioglycolic acid.

らの得たニワトリ骨格筋カルパスタチンは SDSなどの変性剤の存在有無に拘わらず、68 kDa の質量をつねに示すと報告されており、ヒト赤血球カルパスタチンの易集合性と著しく異なっている。

4) 反応性

精製カルパスタチンはその添加量に応じてカルペイン活性を阻害するが、この作用は反応系に過剰の Ca^{2+} を添加しても除去されない(図3)。したがって、かねて粗標品で認められていた通り、カルパスタチンによるカルペインの阻害は Ca^{2+} の奪取に起因するものではない。

図4は精製カルパスタチンが、同起源のヒト赤血球カルペインを阻害するのみならず、ラット肝臓カルペインをも阻害することを示している。ラット肝臓カルペインIは40 μM Ca^{2+} により50%

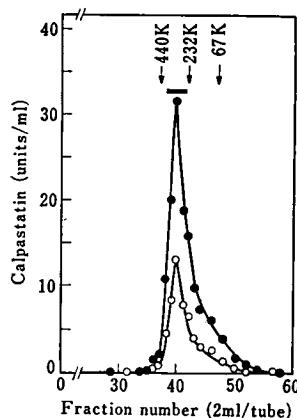


図 2 Chromatography of human erythrocyte calpastatin on a Sephadex G-200 column. ● calpastatin after the step of heat treatment; ○ calpastatin extracted from the gel after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. A 1.6×95 cm column was used. Horizontal bar indicates the fractions collected as the final product, which was then subjected to gel electrophoresis. 70 K-band protein was extracted from the gel, concentrated and rechromatographed on Sephadex G-200. Molecular weight markers used were ferritin (440 K), catalase (232 K), and bovine serum albumin (67 K).

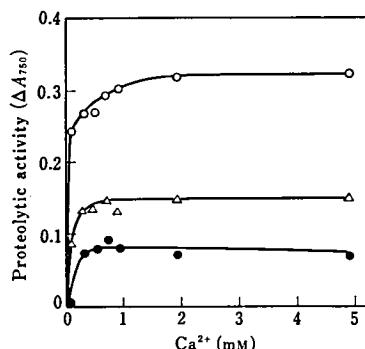


図 3 Effect of Ca^{2+} concentration on the inhibition of calpain by calpastatin, both from human erythrocytes. Purified calpastatin added per tube were: ○ zero; △ 0.21 μg ; ● 0.35 μg . Each tube contained 0.33 units of calpain.

活性化される分子種であり、カルペインIIは400 μM Ca^{2+} を50% 活性化に要する分子種である。

図4は同量のカルパスタチンがカルペインIIのほうをより強く阻害しうることを示しており、赤血球カルペインはこの阻害パターンからも、かねて報告されている通り、カルペインIに属する酵素

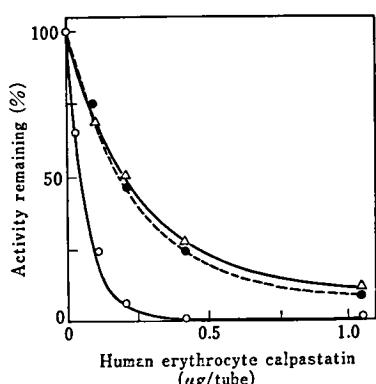


図 4 Organ and species specificity of inhibition by human erythrocyte calpastatin. ● rat liver calpain I; ○ rat liver calpain II; △ human erythrocyte calpain. The calpains used were the preparations partially purified from respective sources; 0.33 units of calpain was added to each tube. Ca^{2+} concentrations in the incubation medium were: 0.1 mM for rat liver calpain I and human erythrocyte calpain, and 5 mM for rat liver calpain II.

であることがわかる。

考 察

カルパインに対するロイペプチの阻害作用を研究する目的でカルパインを精製するとともに、その天然の内在性インヒビターであるカルパスタ

チンをヒト赤血球シトソル画分から均一タンパク質として精製することができた。精製カルパスタチンは等電点 4.55 の酸性単純タンパク質で、約 643 残基からなる一本鎖構造の 70 kDa 単量体が通常四量体構造をなしたものであることが知られた。そのアミノ酸組成は、ほとんど S-S 結合を含まず、トリプトファンを欠き、芳香族アミノ酸に乏しく、一方、グルタミン酸およびプロリンに富むやや特異な組成であることが知られたが、これからだけではカルパスタチンの示す高度耐熱性の機構は明らかにしない。

四量体構造をとりやすい性質を考慮し、またその阻害作用が反応系からの Ca^{2+} 奪取によるものではない点を取り入れて仮設的に描いた相互作用機構が図 5 である。今後この図に示された機構の正否を明らかにし、また、ロイペプチによる阻害機構との関連を明確にすることが残された興味ある研究課題である。

カルパインおよびカルパスタチンに関してわれわれは、ヒト赤血球カルパスタチンの精製研究^{1,9)}のほかに、広く動物および植物細胞材料につき同様の研究を展開し、それぞれの成果をあげ

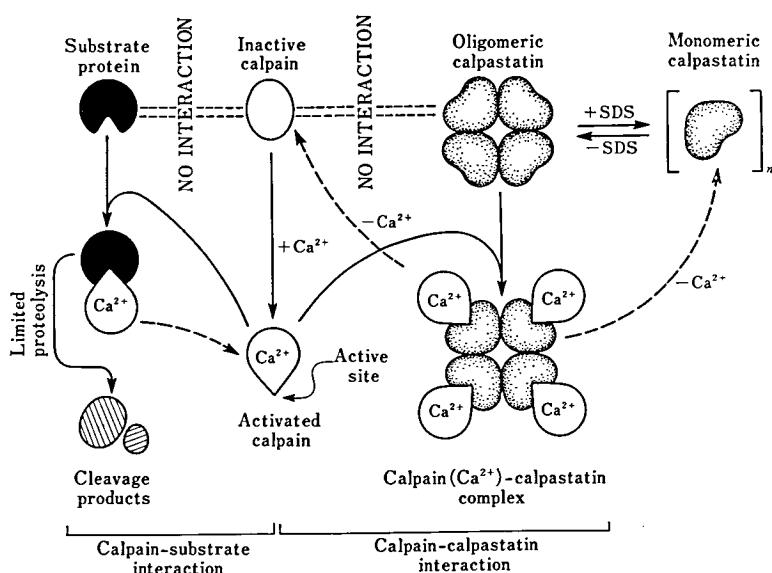


図 5 Hypothetical mechanism of the interaction between calpain, calpastatin and the substrate molecules as triggered by Ca^{2+} .

つつある^{2-8,10)}.

文 献

- 1) Takano, E. and Murachi, T. Purification and some properties of human erythrocyte calpastatin. *J. Biochem.* **92**, 2021-2028 (1982).
- 2) Murachi, T. Calcium-dependent proteinases and specific inhibitors. Abstracts, 12th International Congress of Biochemistry, August 15-21, 1982, Perth, Australia, p.28.
- 3) Murachi, T. and Kojima, K. Calcium-dependent thiol protease (calpain) and its endogenous inhibitor protein (calpastatin) in malignant tumor cells. Abstracts, 13th International Cancer Congress, September 8-15, 1982, Seattle, USA, p.536.
- 4) 村地 孝. カルパスタチン, 蛋白質核酸 酵素 **27**, 1707-1714 (1982).
- 5) 松田晴子, 吉村長久, 村地 孝. 培養網膜色素上皮細胞の Ca^{2+} 依存性チオールプロテアーゼ (カルペイン) について. 日本眼科学会誌 **86**, 717-723 (1982).
- 6) 吉村長久, 松田晴子, 村地 孝, 塚原 勇. 培養網膜色素上皮細胞のプロテアーゼ. 生化学 **54**, 796 (1982).
- 7) 村上俊男, 畠中道代, 村地 孝. ニワトリ赤血球のカルペイソーカルパスタチン系. 生化学 **54**, 796 (1982).
- 8) 菊池孝信, 村地 孝, 田中隆治, 太田喜元, ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) 培養細胞のカルペイン. 生化学 **54**, 797 (1982).
- 9) 高野恵美子, 菊池孝信, 村地 孝, 田中隆治. 精製ヒト赤血球カルパスタチンの性状. 生化学 **54**, 993 (1982).
- 10) 並河千里, 谷口佳子, 佐々木 実, 安本洋子, 高野恵美子, 村地 孝. ヒト $\alpha_{1,2}$ TPI による各種組織 Ca 依存性チオールプロテアーゼの阻害. 生化学 **54**, 993 (1982).

高速液体クロマトグラフィーによるベスタチンの微量蛍光定量

大倉 洋甫*

研究協力者 三吉野産治**・石田淳一*・山口政俊*・弓場郁代*

はじめに

ベスタチン (Best) の薬効を判定するための一手段として、Best およびそのヒトにおける主要代謝物、*p*-ヒドロキシベスタチン (*p*-OH Best) の生体内濃度をモニターする方法の検討を行った。まず、Best および *p*-OH Best の標準液を用いて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)・蛍光検出法により、これらを微量定量するための基礎的研究を行った。つぎに、これをヒト血清中の Best の定量に応用するため検討したところ、Best

のみを定量しうる方法を得た。この方法を Best 投与患者の血清 Best 濃度レベルモニターに実用を試みた。この方法で用いた Best および *p*-OH Best の蛍光ラベル化反応のスキームを図 1 に示す。Best および *p*-OH Best をアンモニアアルカリ性で過ヨウ素酸酸化し、生じるフェニルアセトアルデヒドおよび *p*-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドを、新しい芳香族アルデヒド類の選択的蛍光ラベル化剤、3,4-ジメトキシ-1,2-ジアミノベンゼンモノ塩酸塩 (DDB·HCl)¹⁾ と、塩酸酸性で蛍光ラベル化し、ラベル化体を HPLC で分離・定量する。

実験方法

1) 試葉溶液

DDB·HCl (1.3 mM) 溶液；DDB·HCl 5.3 mg を 0.3 M 塩酸に溶かし、全量 20 ml とする。調整後 3 時間以内に使用する。

2) 基準操作

a) 試料溶液 (血清の前処理操作)：血清 50 μ l に水 (あるいは Best 標準液) 50 μ l および 4.2 mM 酢酸 500 μ l を加え、100°C で 5 分間加熱する。約 800 g で 5 分間遠心したのち、上清 100 μ l を試料溶液とする。

b) 蛍光ラベル化反応：上記の試料溶液あるいは Best 標準液 100 μ l に 1.5 M アンモニア 50 μ l および 0.6 mg/ml 過ヨウ素酸ナトリウム 25 μ l

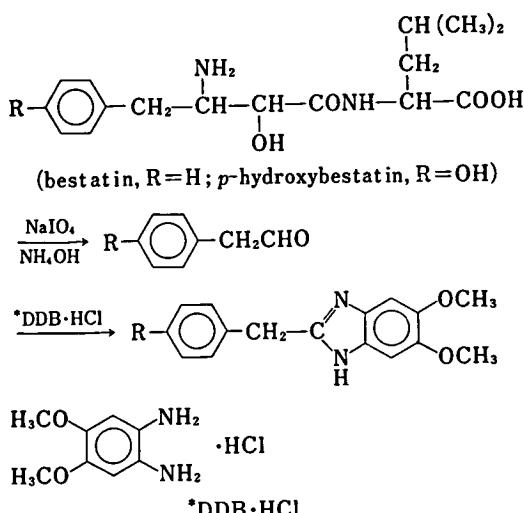


図 1 Fluorescence labeling of bestatin or *p*-hydroxybestatin with DDB·HCl.

* 九州大学薬学部薬品分析化学教室

** 国立療養所西別府病院

を加え、室温(25°C)で20分間放置する。1.5 mg/ml 亜硫酸ナトリウム 25 μl を加え、過剰の過ヨウ素酸ナトリウムを分解する。DDB·HCl 溶液 200 μl を添加し、37°C で50分間加温したのち、1.0M 水酸化ナトリウム 50 μl を加えて反応を停止する。反応液 100 μl を HPLC に付す。

c) HPLC：逆相分配型の充填剤である LiChrosorb RP-18 (Merck; 粒径 5 μm) を充填したカラム (150×4 mm, i. d.) を使用する。移動相には、アセトニトリル-0.1M トリス緩衝液 (pH 8.7) の混液 (25:75, v/v) を脱気して使用。高速液体クロマトグラフには、東洋曹達 803D を使用し、流速 0.8 ml/min に設定した。検出器には、島津 RF-530 fluorescence spectromonitor (蛍光励起波長 320 nm, 発光波長 390 nm) を使用した。

結果および考察

当分担研究者らが新たに開発した、芳香族アルデヒド類に特異的な試薬である DDB·HCl を用いる蛍光ラベル化反応は、芳香族アルデヒド類を塩酸酸性下で0-100°Cで反応させる方法である。本研究において、まずこの反応を Best および *p*-OH Best の蛍光ラベル化反応に適用するための検討を行った。Best および *p*-OH Best をア

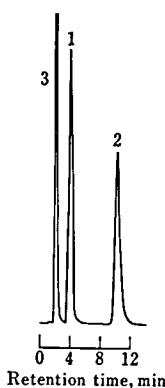


図 2 Chromatogram of the reaction mixture of a standard solution of bestatin and *p*-hydroxybestatin. Peaks : 1, *p*-hydroxybestatin (1×10^{-6} M); 2, bestatin (1×10^{-6} M); 3, reagent blank.

ンモニアアルカリ性で過ヨウ素酸酸化すると、それぞれフェニルアセトアルデヒドおよび *p*-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドを生成することがわかった。したがって、Best および *p*-OH Best を定量するために、これらのアルデヒドの DDB·HCl による蛍光ラベル化体を HPLC によって分離・検出することにした。

1. HPLC による分離条件

Best および *p*-OH Best の蛍光ラベル化体は、HPLC の充填剤に LiChrosorb RP-18 を、また移動相にアセトニトリル-0.1M トリス緩衝液 (pH 8.7) を用いたとき良好に分離した。Best お

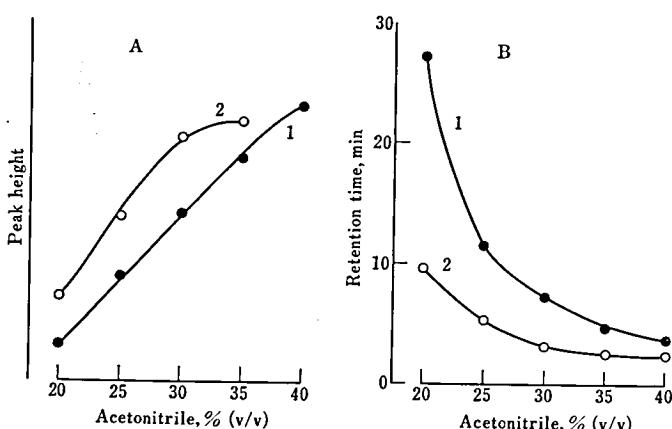


図 3 Effect of acetonitrile concentration in the mobile phase on peak height (A) and retention time (B). 1, bestatin (1×10^{-6} M); 2, *p*-hydroxybestatin (1×10^{-6} M).

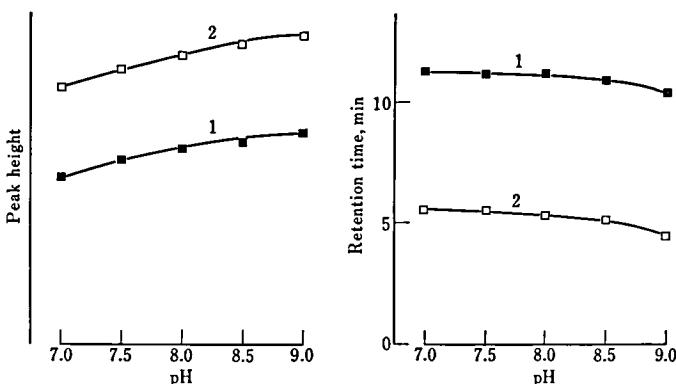


図 4 Effect of pH of the mobile phase on peak height (A) and retention time (B). 1, bestatin (1×10^{-6} M); 2, *p*-hydroxybestatin (1×10^{-6} M).

および *p*-OH Best の標準液（各 1×10^{-6} M）を試料溶液として基準操作の b) および c) に従って処理したときに得られるクロマトグラムを、図 2 に示す。Best および *p*-OH Best の蛍光ラベル化体は、12 分以内にそれぞれ単一のピークとして分離溶出される。使用したカラム充填剤は、シリカゲル担体にオクタデシルシランを化学修飾したものである。この充填剤は逆相分配型であるので、移動相のアセトニトリル濃度が高くなると各蛍光ラベル化体は速やかに溶出し、かつ鋭いピークを与える（図 3）。移動相のアセトニトリル濃度を 25% とした。図 4 に示すように、移動相中のトリス緩衝液の pH が 7.0—9.0 において各ラベル化体の分離状態は良好であるが、Best および *p*-OH Best の蛍光ピークは、アルカリ性側において徐々に高くなる。これは、各ラベル化体がアルカリ性で強い蛍光を発することによるものである。したがって、pH 8.7 の 0.1 M トリス緩衝液を使用することにした。このとき pH 8.7 のトリス緩衝液の濃度変化 (0.05—1.0 M) によって、各蛍光ピークの分離状態ならびにそれらのピークの高さには、著しい相違はみられなかった。なお、pH 9.0 より高い pH の緩衝液を用いた場合、カラム充填剤の劣化が著しく、長時間それを使用するには不都合であった。

2. 蛍光ラベル化反応

すでに述べたように、Best および *p*-OH Best は、直接には DDB-HCl と蛍光反応しないため、アンモニアアルカリ性下過ヨウ素酸ナトリウムによって酸化し、それzelfフェニルアセトアルデヒドおよび *p*-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドに導く。過ヨウ素酸ナトリウム濃度について検討し（図 5）、Best および *p*-OH Best ともに最大のピーク高さを与える 0.6 mg/ml を用いた。この酸化反応に要する時間および温度（図 6）について調べ、室温（25°C）で 18 分以上放置することにより最大かつ一定の蛍光を得た。室温で 20 分放置することにした。DDB-HCl によるアルデヒド類の蛍光ラベル化は、残存する過ヨウ素酸ナトリウムによって妨害されることが認められた。

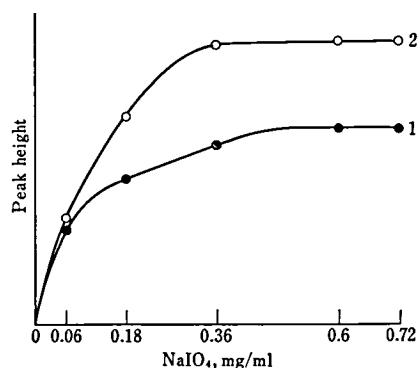


図 5 Effect of NaIO₄ concentration on the fluorescence development. 1, bestatin (1×10^{-6} M); 2, *p*-hydroxybestatin (1×10^{-6} M).

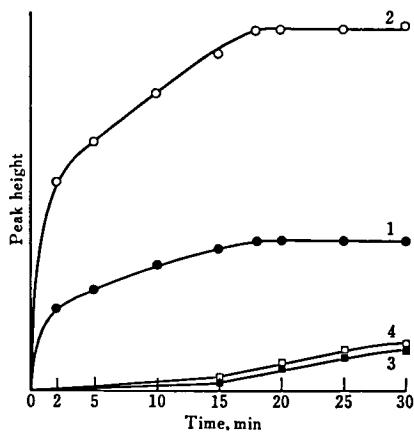


図 6 故の濃度と温度による過ヨウ素酸化反応時間に対する発光強度の変化。NaIO₄ 0.6 mg/ml で、1, 3: bestatin (1×10^{-6} M); 2, 4: *p*-hydroxybestatin (1×10^{-6} M)。1, 2: 25°C; 3, 4: 0°C。

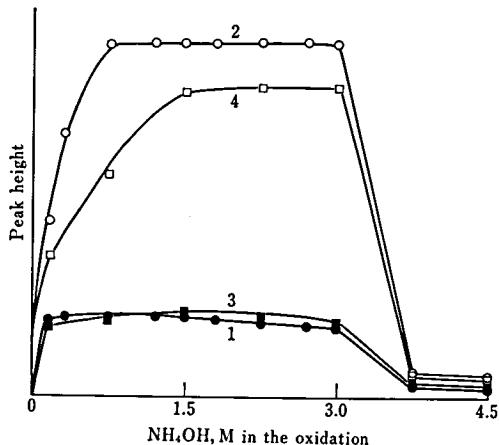


図 8 水酸化アソニウム濃度と塩酸濃度との関係。1, 2: 0.3 M HCl; 3, 4: 0.6 M HCl. 1, 3: bestatin (1×10^{-6} M); 2, 4: *p*-hydroxybestatin (1×10^{-6} M)。

この妨害は、ラベル化反応前に亜硫酸ナトリウムを加えることにより、過ヨウ素酸を分解すれば解消できることがわかった。この濃度について検討し(図 7)，最大の蛍光を与える 1.5 mg/ml を使用することにした。以上の検討により、酸化反応として試料溶液 100 μ l に 1.5 M アンモニア 50 μ l と 0.6 mg/ml 過ヨウ素酸ナトリウム 25 μ l を添

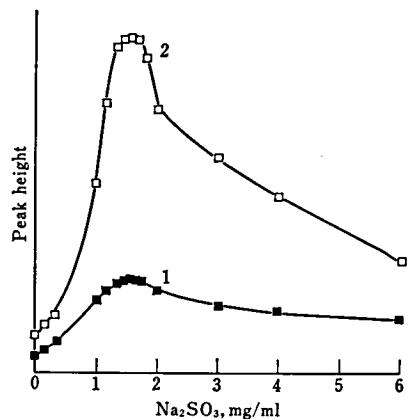


図 7 亜硫酸ナトリウム濃度による発光強度の変化。NaIO₄ 0.6 mg/ml で。1: bestatin (1×10^{-6} M); 2: *p*-hydroxybestatin (1×10^{-6} M)。

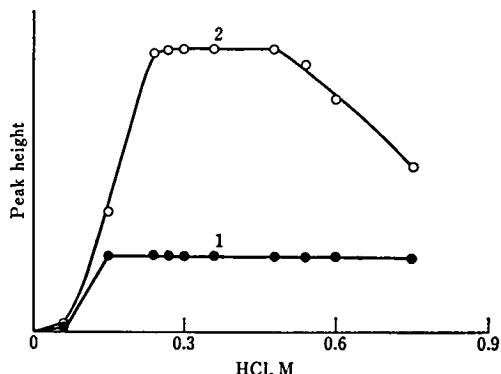


図 9 塩酸濃度による発光強度の変化。アンモニア 1.5 M で。1: bestatin (1×10^{-6} M); 2: *p*-hydroxybestatin (1×10^{-6} M)。

加し、室温(25°C)で20分間放置後、1.5 mg/ml 亜硫酸ナトリウム 25 μ l を加える操作を設定した。つぎに、蛍光ラベル化条件について検討した。過ヨウ素酸酸化は、アンモニアアルカリ性下で行われるが、生じたフェニルアセトアルデヒドおよび*p*-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドとDDB-HClの蛍光ラベル化反応は、塩酸酸性下で行う必要がある。図 8 および図 9 は、アンモニア濃度と塩酸濃度の関係について調べたものである。本法では、1.5 M アンモニアと 0.3 M 塩酸を使用することにした。図 10 は、基準操作に準じた条件において、蛍光ラベル化の反応時間とその温度

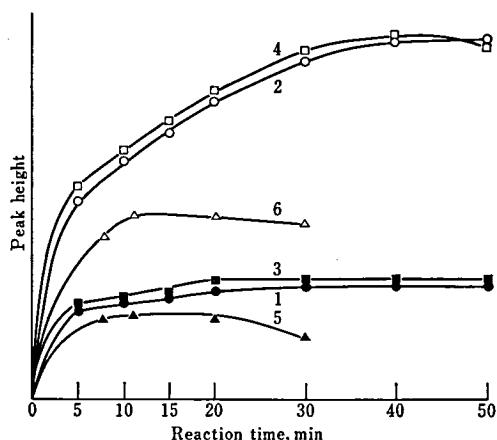


図 10 Effect of reaction time and temperature on the fluorescence development. 1, 3, and 5, bestatin (1×10^{-6} M); 2, 4, and 6, *p*-hydroxybestatin (1×10^{-6} M). 1 and 2, 37°C; 3 and 4, 50°C; 5 and 6, 100°C.

の影響をみたものである。37°Cで50分間の反応条件を採用した。また、加熱後ラベル化反応液を基準操作法に述べたようにアルカリ性に導けば、生じた蛍光ラベル化体は安定で、少なくとも室温に3時間放置しても、得られる蛍光ピークは、一定の高さを示した。標準試料を用いたときの Best および *p*-OH Best の検出限度 (S/N 比が 2 を示す濃度) は、ともに 5 pg/HPLC 注入量である。

3. ヒト血清中のベスタチン（および *p*-OH Best）の定量

ヒト血清中のベスタチンを HPLC 検出する場合、血清中に多量の蛋白質が存在するため、血清をそのまま試料として用いることはできない。このため、血清を除蛋白処理し、これを試料溶液として用いた。除蛋白法として、①血清に希酢酸を加え、ほぼアルブミンの等電点 pH 5.0 に導いて 100°C, 5 分間加熱する方法（加熱除蛋白法）、②血清に過塩素酸を添加し、遠心後上清に炭酸カリウムを加え過剰の過塩素酸を除去する方法、および③トリクロロ酢酸を添加する方法を用いた。①および②は、同様の蛋白質除去効果が得られた。また、血清に添加した Best および *p*-OH Best

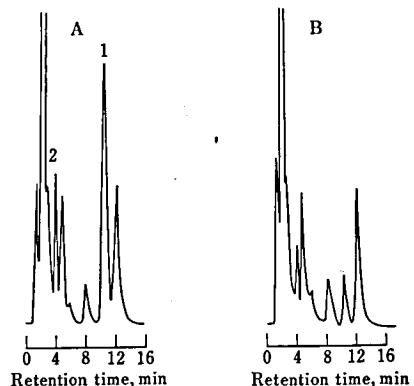


図 11 Chromatograms of bestatin and *p*-hydroxybestatin added to human serum. A, serum added with bestatin (320 pmol/50 μ l) and *p*-hydroxybestatin (150 pmol/50 μ l); B, drug-free serum. Peaks : 1, bestatin; 2, *p*-hydroxybestatin.

（各 150 pmol/50 μ l 血清）の回収率は、いずれも 78% で、これら 2 つの方法においてほぼ同様の結果を得た。また、③の方法は、そのままでは強酸性であるため、後の反応条件であるアンモニアアルカリ性に再現よくするのが困難であった。したがって、操作の簡単な加熱除蛋白法を採用した。Best および *p*-OH Best を添加したヒト血清ならびに無添加の同一血清を、基準操作に従って処理したときに得られる HPLC のクロマトグラムを図 11 に示す。保持時間 11 分に Best に基づくピークが現われる。他の数本の蛍光ピークは、試薬プランクに基づく蛍光ピーク（検出感度を上げた場合に観察される）と、血清中に存在する種々の化合物および除蛋白されなかった低分子の蛋白質やペプチド類に由来する蛍光ピークであると考えられる。基準操作に従ってヒト血清に添加した Best および *p*-OH Best の検量線を調べた。血清に添加した Best および *p*-OH Best の蛍光ピークは、いずれも少なくとも 20 μ g/ml 血清までその添加量に比例したピーク高さを示し、原点を通る直線を示した。つぎに、検出限度について調べた。Best および *p*-OH Best 無添加の血清においても、Best および *p*-OH Best と同じ保

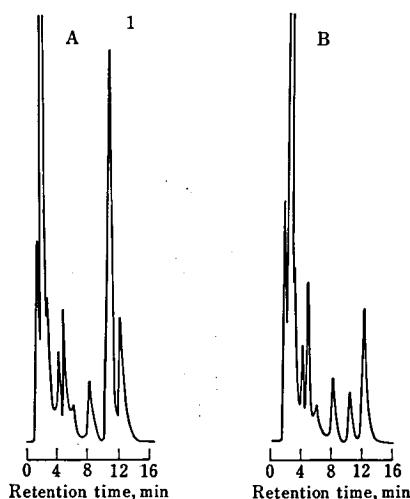


図 12 Chromatograms of bestatin in human serum obtained 30 min after oral administration (25 mg/17 kg). A, bestatin treated; B, control. Peak : 1, bestatin ($3.4 \mu\text{g}/\text{ml}$).

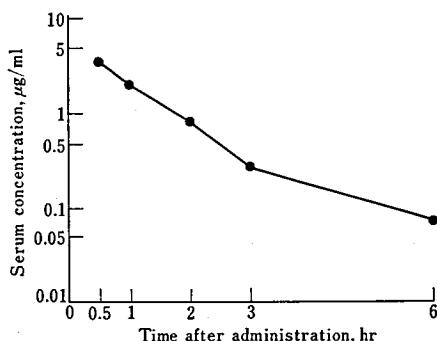


図 13 Serum concentration of bestatin after oral administration of bestatin (25 mg/17 kg) in human (male, 5 years of age).

持時間にピークが認められる(図11, B)。これは、血清中に存在し、フェニルアセトアルデヒドおよび

-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドに導かれる物質、あるいは内因性蛍光物質のいずれかに起因すると考えられる。このため、血清を試料とするととき標準系で得られた検出限度を達成する

ことは、不可能であった。血清を用いた場合、Best および *p*-OH Best が十分に定量可能な、それぞれブランクのピーク高さの 1.2 倍を検出限度としたとき、それぞれ $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 血清、 $200 \text{ ng}/\text{ml}$ 血清であった。変動係数は、血清中 Best 濃度が $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、および $500 \text{ ng}/\text{ml}$ のとき、それぞれ 1.8% および 3.0% (それぞれ $n=10$) であった。

この操作法に従って、筋ジストロフィー患児に Best を経口投与し、血清 Best 濃度モニターを行い、本法の有用性について検討した。血清は、三吉野産治班員より供与されたものである。一例として、投与前の血清(コントロール血清)および投与 30 分後の血清により得られたクロマトグラムを図 12 に、血清濃度曲線を図 13 に示す。患者 13 名に関する血清 Best 濃度については、三吉野班員の報告を参照されたい。

おわりに

本研究において、プレカラム蛍光誘導体化法による HPLC により、Best を分離・定量することが一応可能となった。本法により Best を投与した患者血清中の微量の Best をモニターすることができる。*p*-OH Best は、きわめて低濃度で、本法では投与 30-60 分後でも検出できなかった。定量の妨害をするピークの原因の除去、および *p*-OH Best 定量の高感度化が必要である。

文 献

- Nakamura, M., Toda, M., Saito, H., and Ohkura, Y. *Anal. Chim. Acta* 134, 39 (1982).

アレルギー性脳炎の治療に関する実験的研究

岩崎祐三*

多発性硬化症、急性散在性脳脊髄炎、ワクチン接種後脳脊髄炎など、いわゆる炎症性脱髓疾患はヒトの脱髓性疾患のなかで重要な位置を占めている。このような炎症性脱髓疾患の発現機序として、神経組織、とくに髓鞘構成成分に対する自己免疫反応の関与が強く示唆されてはいるが、病変の中核をなす髓鞘破壊の機序は未だ解明されておらず、これら疾患に対する適切な治療法も開発されていない。

多発性硬化症¹⁻³⁾、実験的急性アレルギー性脳脊髄炎⁴⁾、実験的ウイルス性脳脊髄炎^{5,6)}などの髓鞘破壊巢でカテプシン A、B-1、D をはじめ種々のライソゾーム酵素のほか、中性プロテアーゼの活性も上昇していることが報告されている。最近、賦活化されたリンパ球により、マクロファージから plasminogen activator などの中性プロテアーゼの分泌が誘導されることも明らかにされている^{7,8)}。さらに Cammer ら⁹⁾は *in vitro* の実験結果から炎症性脱髓疾患における髓鞘の破壊の機序として、まずマクロファージから plasminogen activator が放出され、次いで產生されたプラスミンにより髓鞘を構成する塩基性蛋白が破壊される過程を想定している。

このような、脱髓過程における蛋白分解酵素の役割に関する報告をもとに、われわれは蛋白分解酵素阻害剤であるロイペプチドにより炎症性脱髓

疾患を治療する可能性を実験動物を用いて検討しつつある。

ロイペプチドは脳血流閥門を通過しにくいので、皮下埋め込み浸透圧ポンプを用いて、直接脳内に持続注入した場合のラットの脳の組織学的検索の結果、高張液による可逆的脳血液閥門破壊実験、パライソフルエンザウイルスによるマウスの脳病変に対する治療効果について、今回報告する。

1. 脳内に持続注入した薬液の脳内分布について

予備実験として、浸透圧ポンプ Alzet、2 ML-1 をラットの背部に埋め込み、0.2% エバンスブルーを 7 日間、脳内に持続注入した。実験終了時の脳の表面は大脳、小脳から延髓に至るまで高度な着色がみられた。大脳および脳幹部の剖面をみると、注入側半球が高度に着色しているほか、反対側でも脳室を中心とした脳梁、脳幹に広範な着色がみられた。下部脳幹では着色は中脳水道や第 4 脳室周辺に限局していたが、小脳は皮質、白質とも一様に着色していた。次にこの標本の凍結切片を作り落射蛍光顕微鏡（励起フィルター BP 546）で観察した。図 1 は注入反対側の大脳皮質で、ここにみられるように肉眼で着色の明らかでない部分でもエバンスブルーの赤色蛍光が皮質全層の細胞に認められた。図 2 は脳梁の一部で、白質でもグリア細胞に色素がよくとり込まれている。以上の

* 東北大学医学部脳研

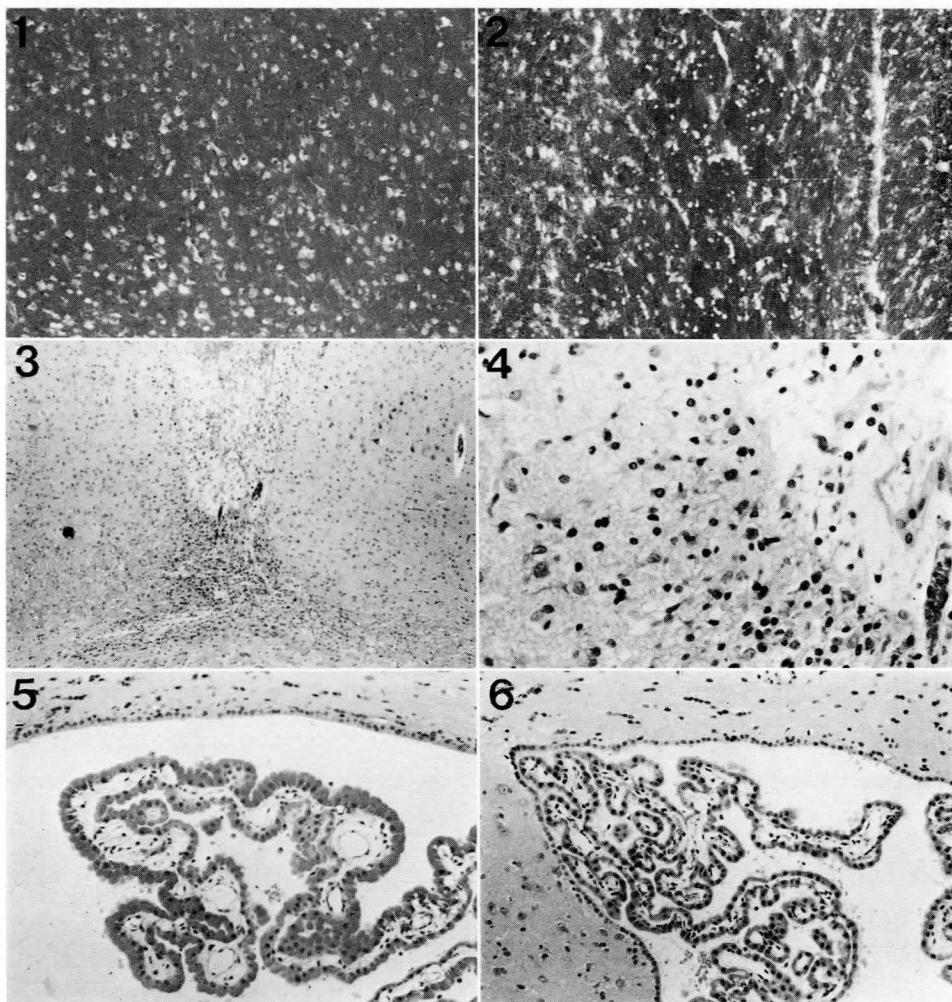


図 1 Uptake of Evans blue by neurons in contralateral cerebral cortex. The rat was continuously infused intracerebrally with 2% Evans blue for 7 days. A fluorescence micrograph taken with a Zeiss fluorescence microscope (BP 546) $\times 80$.

図 2 Uptake of Evans blue by oligodendroglial cells in callosal radiation of the rat shown in Fig. 1. $\times 160$.

図 3 A tissue defect after removal of a intracerebral catheter, H & E. $\times 40$.

図 4 A high power view of the margin of the tissue defect in Fig. 3, Note mild infiltration of macrophages and the presence of hypertrophic astrocytes. H & E. $\times 200$.

図 5 Hypertrophy of epithelial cells of the choroid plexus in ipsilateral lateral ventricle of the rat intracerebrally infused with 50 $\mu\text{g}/\text{h}$ of leupeptin for 14 days. H & E. $\times 100$.

図 6 Normal appearance of choroid plexus in the contralateral lateral ventricle of the rat shown in Fig. 5, H & E. $\times 100$.

結果から脳実質内に持続注入された物質は全脳によく浸透し、グリア細胞のみならず神経細胞にもよくとり込まれることが明らかになった。

2. ロイペプチドのラット脳内への持続注入

体重約 250g の雄ウイスター ラット、15 匹にフルオセン麻醉下に浸透圧ポンプ Alzet、2 ML-1 を埋め込んだ。動物は 3 群に分け第 1 群には計算上ロイペプチドが 50 $\mu\text{g}/\text{h}$ 、14 日間持続注入され

るよう、第2群はロイペプチド $5\text{ }\mu\text{g}/\text{h}$ 、14日間注入されるように予定し、第3群には対照として生理的食塩水を用いた。1日の脳内注入薬液量は計算上 $120\text{ }\mu\text{l}$ 、ロイペプチドの量にして 1.2 mg または 0.12 mg である。

各群の動物とも麻酔から覚醒後は、実験終了時まで全く異常がみられなかった。14日間持続注入後の脳の外表にはチューブ挿入による大脳の小孔以外に異常がみられなかった。脳は冠状面にそって薄切、パラフィン標本を作製、H-E染色、K-B染色を行った。標本の一部は電顕用に樹脂包埋を行った。

脳内へのチューブの挿入は手術顕微鏡下に脳表の血管を避けて行われたが、その先端の位置は動物により異なっており、側脳室内にあるものと、尾状核、アンモン核、大脳皮質など脳実質内にあるものに大別された。図3、4は大脳皮質内にチューブ先端があった場合のその周囲の組織像で、組織欠損部周囲にマクロファージの浸潤と星状膠細胞の増殖がみられるが、それに外接する脳実質組織は神経細胞を含めよく保たれている。図5はチューブ先端が側脳室内にあった場合の同側側脳室の脈絡叢上皮細胞の変化で、同拡大の対側側脳室のそれ(図6)に比べ胞体の肥大が明らかである。この場合にも脳室周辺組織には全く異常がみられない。図7、8は $50\text{ }\mu\text{g}/\text{h}$ 注入ラットの注入側大脳の皮質およびアンモン角錐体細胞、図9は小脳中部の皮質であるが、ここにも全く異常が認められない。 $5\text{ }\mu\text{g}/\text{h}$ のロイペプチドを注入した群では脈絡叢上皮細胞の変化は明白でない。いずれの群においても注入薬剤による細胞の変性を示唆する所見はみられなかった。

3. 高張マニトール液による脳血液閥門の破壊実験

体重 $200\text{--}250\text{ g}$ の雄ウィスター系ラットを用い以下の実験を行った。2%フルオセン吸入麻酔下

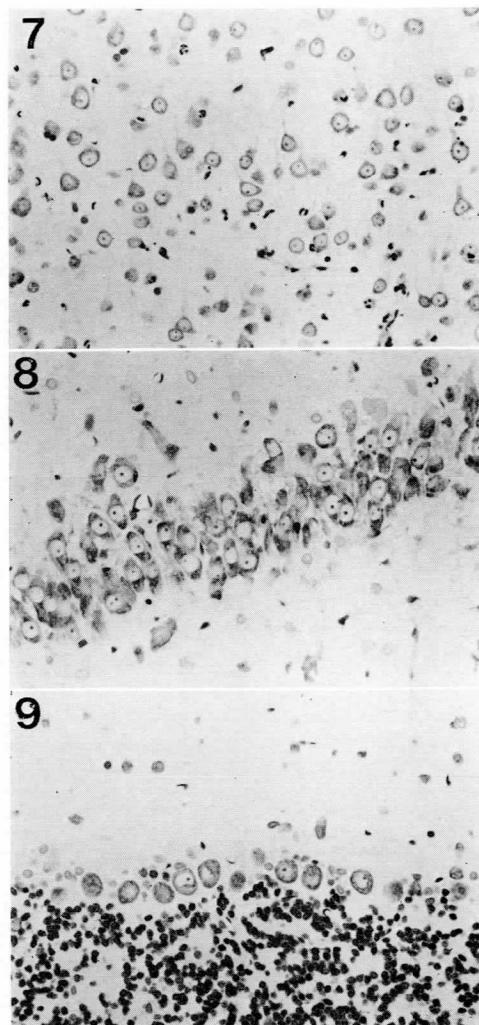


図7 Normal appearance of cortical neurons in the rat intracerebrally infused with $50\text{ }\mu\text{g}/\text{h}$ leupeptin for 14 days. Klüver-Barrera staining. $\times 200$.

図8 Pyramidal cells in Ammon's horn of the rat shown in Fig. 7. K & B. $\times 200$.

図9 Cerebellar cortex of the rat shown in Fig. 7. K & B. $\times 200$.

に右総頸動脈を露出、外頸動脈を切開、ここから内頸動脈の分岐部までチューブを挿入、これに自動注入器を接続した。左大腿動脈に接続したトランスデューサーにより全身血圧を観察しながら、自動注入器により 1.6 M のマニトール 2.5 ml を 0.083 ml/sec の速さで内頸動脈に注入、次いで左大腿静脈より2%エバンスブルー 0.5 ml を注入、手術創を閉じた。術後30分、1, 2, 3, 12, 24

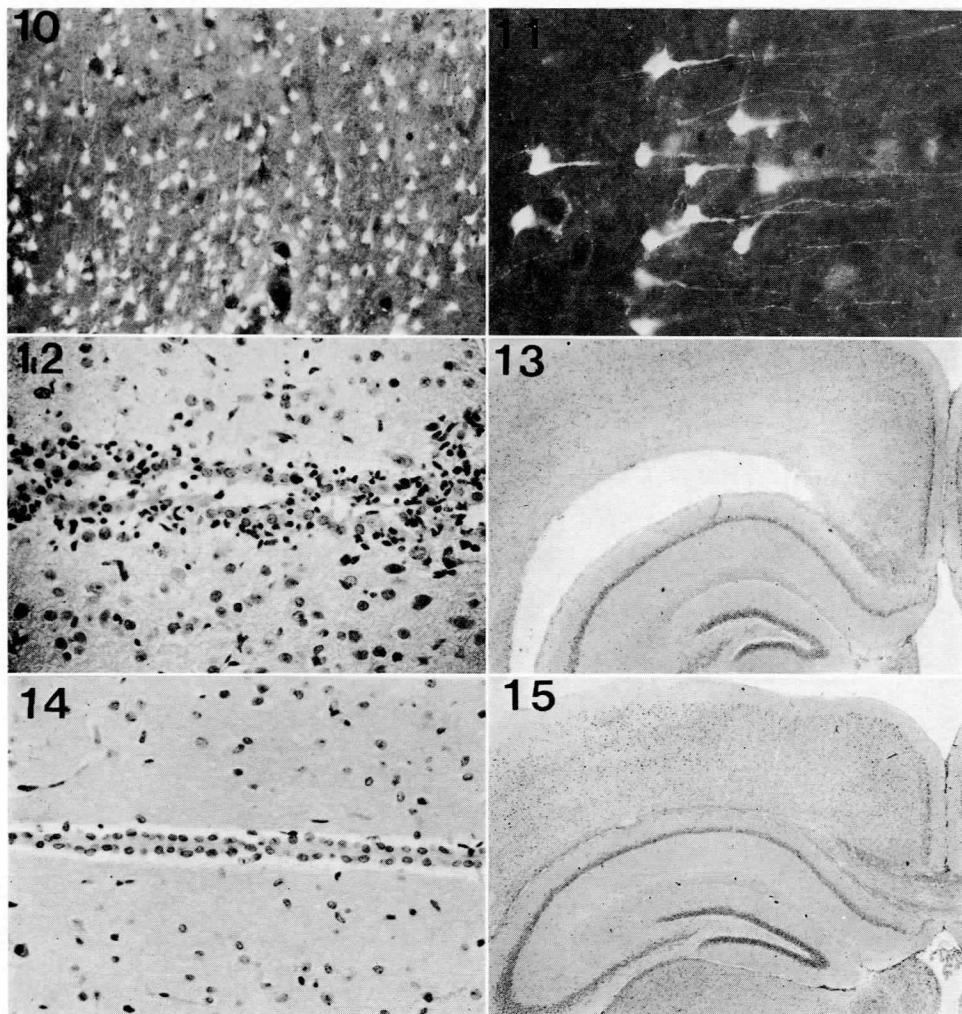


図 10 Evans blue taken up by cortical neurons 24 hours after the transient opening of blood brain barrier by intracarotid infusion of hypertonic mannitol. $\times 130$.

図 11 A high power view of the neurons shown in Fig. 10. $\times 320$.

図 12 Ependymitis of the 3rd ventricle in the rat inoculated with HVJ 17 days ago, Untreated, H & E. $\times 200$.

図 13 Dilatation of lateral ventricle and rarefaction of paraventricular tissue in the shown in Fig. 12. H & E. $\times 20$.

図 14 Normal appearance of the 3rd ventricles in the rat inoculated with HVJ and treated with leupeptin. H & E. $\times 200$.

図 15 Normal appearance of lateral ventricle in the rat shown in Fig. 14, H & E. $\times 20$.

時間後にグルタールアルデヒド・パラフォルム混合液による灌流固定により組織を固定した。次いで脳の凍結切片を作製、エバンスブルーアルブミン結合体の脳内局在を落射蛍光顕微鏡を用いて追跡した。全身血圧はマニトール注入直後に一時低下するが、補液により回復した。術後3時間まで

はエバンスブルーの蛍光は脳内血管、脳膜に局在しているが、術後12時間目には、脳実質細胞に蛍光がみられるようになり、24時間目には図10、11にみられるように、多くの神経細胞の胞体と樹状突起、軸索に蛍光が認められた。術後早期にみられる蛍光陽性血管は脳全体に分布しているが、

12 時間以降にみられる蛍光陽性神経細胞の局在は、マニトール注入側の大脳半球皮質および脳幹に限局していた。グリア細胞への蛍光物質のとり込みは確認できなかった。

以上の実験から高張マニトールの頸動脈注入により、注入側大脳実質組織内へ血中のエバンスブルー-アルブミン結合体が流入すること、流入した物質は神経細胞に高濃度にとり込まれることが明らかになった。この方法はロイペプチなど、脳血流閥門を通過しにくい物質を脳実質内に送り込む手段として有用であろう。

4. ウィルスによりひきおこされる実験的脳症に対するロイペプチの効果

われわれは、パラミクソウイルスの一つである HVJ をマウスの脳内に注入すると、ウイルスの局在が脳内に証明されなくなった注入 7 日目以降に脳室周辺の白質に徐々に進行性の変性がおこること、この白質変性は宿主の免疫抑制で防止されること、ヌードマウスではこのような変化がみられないことなどから、この現象を、ウイルスが引き金となった自己免疫反応と考えられているヒトのウイルス感染後脳症の実験モデルと考え、研究をすすめてきた^{10, 11)}。今回、この実験モデルについて、ロイペプチ全身投与の効果を検討した。

7 週齢 DBA/2 雌マウス 36 匹に紫外線不活 HVJ 0.03 ml (45 HAU/マウス) を脳内注射、その半数に HVJ 注射当日から実験終了まで連日ロイペプチ 2 mg (1 mg/体重 10 g) を腹腔内投与した。HVJ 接種後、3, 10, 17 日目に各群 5-6 匹について組織学的に検索、ロイペプチ投与群と非投与群の対比を行った。両群とも神経症状の出現はみられず、ウイルス接種 7 日目の蛍光抗体法による検索では脳内にウイルス抗原は検出できなかった。接種後 3 日目、10 日目の検索では軽度の髄膜炎の所見がみられたが、両群の間に差が認められなかった。しかし、17 日目の標本では

ロイペプチ非投与群 6 匹全例に図 12 のような ependymitis の所見と、図 13 のような脳室の拡大と脳室周辺組織の破壊像がみられたのに対し、ロイペプチ投与群 6 匹のうち 3 匹に同様な所見がみられたのみで、残る 3 匹には図 14, 15 に示すように全く異常がみられなかった。つまり、ロイペプチ投与によりウイルス接種後の炎症と変性が半数の動物で抑制されていた。

次にロイペプチ投与がウイルスの増殖に及ぼす影響を検討する目的で以下の実験を行った。8 週齢の DBA/2 マウス 10 匹に非不活化 HVJ 0.01 ml (32 HAU/マウス) を脳内接種直後、その半数のマウスの対側大脳半球にロイペプチ 0.02 ml (200 µg/マウス) を注入、接種 7 日目に組織学的検索を行った。両群とも軽度な髄膜炎と血管周囲の单核細胞浸潤のほか異常はみられず、ロイペプチ投与による脳炎増悪の所見は得られなかった。つまり、HVJ 感染の特徴である self-limiting infection の機構はロイペプチ投与により障害されたものと思われる。

5. まとめ

今回、中枢神経疾患に対するロイペプチの使用についての基礎的実験を行った。10 mg/ml の濃度のロイペプチを平均脳重量 2 g のラット脳内に 1 日 0.12 ml, 14 日間連続注入したが、臨床的に全く異常がみられないのみならず、組織学的検索でも、注入部周囲の組織を含め神経組織、細胞の変性像はみられなかった。

高張マニトール頸動脈注入後の血中の高分子物質の脳実質組織への移行をエバンスブルー-アルブミン結合体を指標として蛍光顕微鏡により追求したが、脳血流閥門破壊後 12-24 時間で動注側の大脳の皮質および脳幹部の神経細胞内への蛍光物質のとり込みが確認された。

HVJ の脳内接種後にみられるマウス脳の炎症、変性の発現がロイペプチ 1 mg/体重 10 g を連

日腹腔内に投与することにより、半数の動物で抑制された。

文 献

- 1) Bowen, D. M. and Davidson, A. N. Macrophages and cathepsin A activity in multiple sclerosis brain. *J. Neurol. Sci.* **21**, 227-231 (1974).
- 2) Hirsch, H. E., Duquette, P., and Parks, M. E. The quantitative histochemistry of multiple sclerosis plaques : Acid proteinase and other acid hydrolases. *J. Neurochem.* **26**, 505-512 (1976).
- 3) Allen, I. V. and McKeown, S. R. A histological, histochemical and biochemical study of the macroscopically normal white matter in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **41**, 81-91 (1979).
- 4) Govindarajan, K. R., Rauch, H. C., Clausen, J. et al. Changes in cathepsin B-1 and D, neutral proteinase and 2, 3-cyclic nucleotide-3-phosphohydrolase activities in monkey brain with experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurol. Sci.* **23**, 295-306 (1974).
- 5) McMartin, D. N., Koestner, A., and Long, J. F. Enzyme activities associated with the demyelinating phase of canine distemper. *Acta Neuropath.* **22**, 275-287 (1972).
- 6) Bowen, D. M., Flack, H. A., Martin, R. O. et al. Biochemical studies on degenerative neurological disorders : 1. Acute experimental encephalitis. *J. Neurochem.* **22**, 1099-1107 (1974).
- 7) Vassalli, J-D. and Reich, E. Macrophage plasminogen activator : Induction by products of activated lymphoid cells. *J. Exp. Med.* **145**, 429-437 (1977).
- 8) Werb, Z. and Gordon, S. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* **142**, 346-360 (1975).
- 9) Cammer, W., Bloom, B. R., Norton, W. T. et al. Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages : A possible mechanism of inflammatory demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **75**, 1554-1556 (1978).
- 10) Iwasaki, Y. and Koprowski, H. Parainfluenza-virus infection in mouse brain : A possible model from virus-induced demyelination. *Lancet* **1**, 738-739 (1974).
- 11) Iwasaki, Y., Aden, D., and Koprowski, H. Thymus-dependent sensitizing processes involved in the induction of CNS disease in mice by parainfluenza type 1 virus. *J. Immunol.* **114**, 1846-1847 (1975).

ロイペプチドの薬理学的研究

大塚正徳*

研究協力者 宮田雄平*・小西史朗*・柳沢光彦*

赤木宏行*・岡本司*・村越隆之*・玉井直*

これまでの研究にひき続きロイペプチドおよびベスタチンの薬理作用を研究したが、今年度はとくに次の3種の標本について実験を行った。

1) ウサギの血圧、呼吸および心電図：昭和54年度の研究¹⁾においてロイペプチド 0.1-10 mg/kg をラット静脈内に与えたとき、血圧はほとんど変化しないか、あるいはわずかな下降がみられることを報告した。一方、田中班員らがネコおよびイスの静脈内にロイペプチド 10 mg/kg を投与した場合には明らかな血圧下降がみられている²⁾。本研究ではウサギを用いてロイペプチドの血圧に対する作用を検討し、併せて心拍数、呼吸数、心電図に対する効果も観察した。

2) 血管平滑筋に対する作用：上記の血圧下降作用と関連してロイペプチドの血管平滑筋に対する作用が問題となる。昭和54年度の研究では、モルモットの摘出小腸に対してロイペプチドは 10⁻⁷ g/ml から 10⁻⁴ g/ml の範囲で収縮を起こさないことを報告した¹⁾。今年度の研究では、モルモットの大動脈平滑筋に対するロイペプチドの作用を観察し、またベスタチンの効果についても検討を行った。

3) 幼若ラット摘出脊髄に対する作用：この標本に対しては過去3年間にわたって検討してきたが、その結果ロイペプチドは 10⁻⁵ g/ml の濃度では前根電位および単シナプス反射に影響を与えた

いことが示された¹⁾。また運動ニューロンからの細胞内記録では、ロイペプチド 10⁻⁴ g/ml が静止膜電位をわずかに脱分極方向に移動させるが、活動電位、入力抵抗および後根の電気刺激で起こるシナプス電位には影響を与えないことが示された³⁾。一方、ロイペプチドおよびベスタチンのプロテアーゼ阻害作用から当然期待されるように、P物質の運動ニューロン脱分極作用はロイペプチドおよびベスタチン (200 μM) によって増強され³⁾。またエンケファリンの抑制作用はロイペプチド (200 μM) によっては影響されなかつたが、ベスタチン (200 μM) によっては著明に増強された⁴⁾。このベスタチンの効果はエンケファリナーゼ抑制によるものと思われる⁵⁾。これらの結果に基づき、今年度は摘出脊髄における下行性抑制に対するロイペプチドの効果、侵害刺激による反射電位、およびペプチド作動性シナプス伝達を含む反射電位に対するロイペプチド、ベスタチンの効果、およびエンケファリンとの相互作用などを検討した。次に、ロイペプチドがアセチルコリンの作用を抑制することがこれまでの神経筋接合部、および交感神経節での研究から明らかになっているので^{1,3)}、脊髄でも同じような作用があるかどうかを検討した。

* 東京医科歯科大学医学部薬理

実験方法

1) ウサギの血圧、呼吸、心電図

ウレタン (1 g/kg) 静脈注射で麻酔した雄ウサギ体重 (4 kg) の大腿動脈から圧力トランステューサを介して血圧を測定した。薬物は生食に溶かして大腿静脈内に注入した。呼吸運動は、胸部の動きを張力トランステューサを介して記録した。心電図は、左右前肢皮下に注射針電極を刺入して導出した。

2) 血管平滑筋

体重 300 g の雄性モルモットを撲殺後、直ちに胸部下行大動脈を摘出し、酸素を十分含んだ Tyrode 液中に移し、血管周囲の脂肪や結合組織を除去した後、大動脈をらせん状に切り、幅 1.5 mm 、長さ 1.5 cm の条片を作製した。条片は 37°C の Tyrode 液を満たしたマグヌス管内に懸垂し、 $95\% \text{ O}_2$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ を通気した。 0.5 g の負荷をかけ、ストレインゲージ（新興通信、UL-2-240）によりひずみ測定器（三栄測器、6W 61）を介して反応をペンレコーダー上に記録した。実験は約 1 時間インキュベートした後に開始した。

3) ラット摘出脊髄

生後 1-5 日目のウイスター系ラットを用い、エーテル麻酔下に脊髄を椎骨とともに切り出し、あらかじめ $95\% \text{ O}_2$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ で飽和させた Krebs 液または人工脳脊髄液中で実体顕微鏡下に椎体を切り離し、脊髄を摘出した。胸髄以下の脊髄をそのまま、あるいは半裁して液槽内に固定し、人工脳脊髄液で灌流した。側索または $\text{L}_3\text{-L}_5$ 後根を吸引電極で刺激し、反射電位を $\text{L}_3\text{-L}_5$ 前根から神経根の大きさにびったり合う径の吸引電極で細胞外記録を行った。薬物は灌流により適用した。

皮膚侵害刺激により誘発される脊髄反射電位を記録するには、半裁脊髄を一側の坐骨神経、腰部および下肢と繋がったまま摘出し、脊髄と腰神経叢、およびその支持組織を液槽内に固定し、人工脳脊髄液で灌流した。記録は L_4 または L_5 前根から吸引電極により行った。刺激には 6 分間隔で 2 秒間、 $1.6\text{-}2\text{ kg}\cdot\text{w}/\text{cm}^2$ のガス圧をピンセットに加え、このピンセットで L_{4-5} 神経根支配域の皮膚の一定部位をつまみ、機械的侵害刺激とした（図 6）。

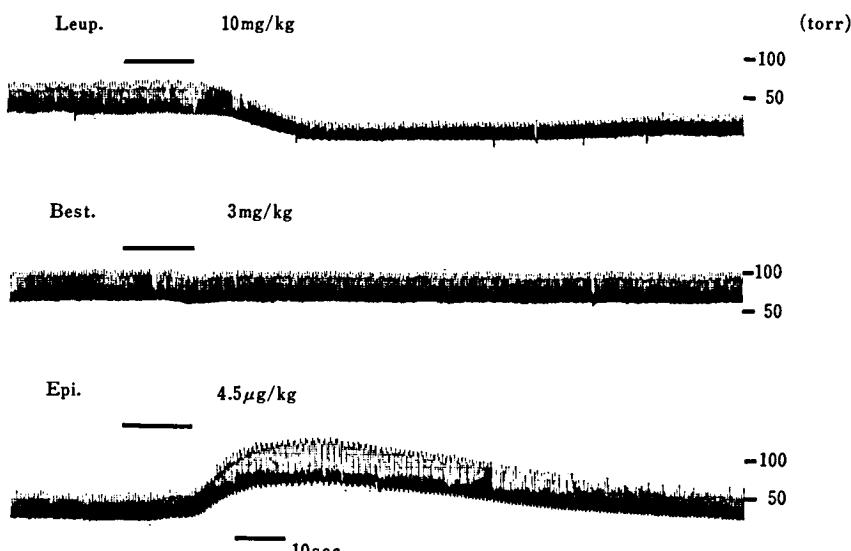


図 1 ウサギ血圧に対するロイペプチシン、ベスタチンおよびエピネフリンの効果。ウレタンで麻酔したウサギの大動脈から圧力トランステューサを介して血圧を測定した。薬物は生食に溶かして、図中の横線で示す期間に大腿静脈内に注入した。Leup. : ロイペプチシン、Best. : ベスタチン、Epi. : エピネフリン。

実験結果

1) ウサギの血圧、呼吸、心電図に対するロイペプチおよびベスタチンの効果

図1および図2に示すように、ロイペプチ5-

10 mg/kg を静脈内投与すると一過性の血圧下降が起こった。ベスタチン 3 mg/kg では血圧の変化はほとんどなく、エピネフリン 4.5 μ g/kg では血圧上昇が起こった。表1はロイペプチおよび

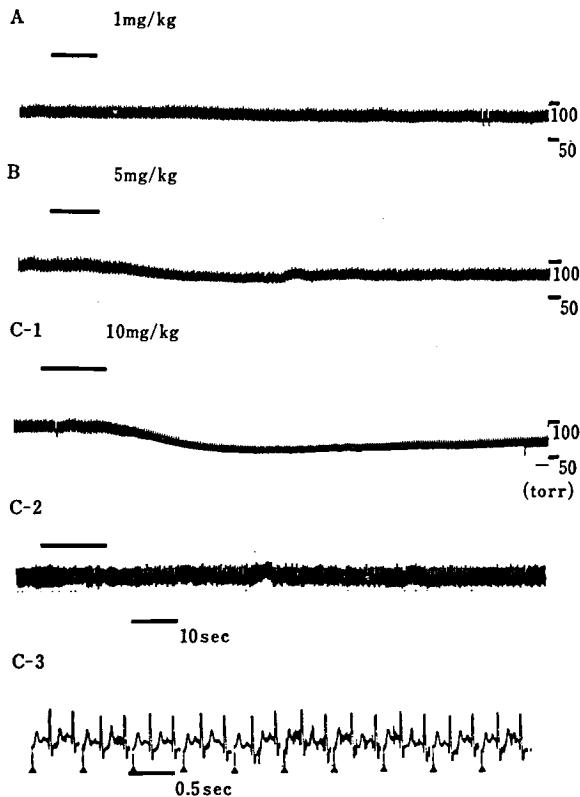


図2 ロイペプチのウサギ血圧、呼吸および心電図に対する効果の用量依存性。ウレタノで麻酔したウサギで、図1と同様に血圧を測定した。呼吸運動および心電図の記録法は本文参照。ロイペプチは、図中の横線で示す期間に大腿静脈より注入し、A, B, C でそれぞれロイペプチの用量を 1 mg, 5 mg, 10 mg/kg と増加した。A, B, C-1 は血圧の記録。C-2, C-3 は C-1 の血圧記録と同時に、それぞれ呼吸運動と心電図を記録したもの。C-3 は、0.5 秒間の心電図をトランジェントメモリを介して記録し、ペンレコーダ上に遅い時間経過 (10 秒間) で描出したものである。C-3 の各三角で示した位置は記録のスタートを示し、C-1, C-2 の実際の時間に対応しているが、それ以後は速い時間掃引 (0.5 秒) による記録を示している。

表1 ロイペプチとベスタチンの心拍数および呼吸数に対する影響

Dose mg/kg	Leupeptin				Bestatin			
	Heart rate		Respiration rate		Heart rate		Respiration rate	
	Control	Test	Control	Test	Control	Test	Control	Test
1	234	241	140	150	—	—	—	—
3	266	288	170	176	*244	*240	*154	*154
5	228	239	142	146	—	—	—	—
10	*230	*244	*133	*128	—	—	—	—

薬物適用直前の1分間当たりの回数を Control の欄に、ロイペプチとベスタチン静注後1分間の回数を、それぞれ Test の欄に示した。* は2回の平均を示す。他は1回の測定値。

ベスタチン投与前後の心拍数および呼吸数を示している。この実験例では呼吸数が正常域より多かったが、ロイペプチントンおよびベスタチンは用いたいずれの用量でも心拍数、呼吸数に影響を与えたかった。図2C-3はロイペプチントン10 mg/kg投与の心電図に対する効果を示したものである。RR、QTおよびPR間隔などにとくに著しい変化はみられなかった。

2) 血管平滑筋に対する作用

血管条片は図3のaに示すように、ノルアドレナリン(0.1-2 μM)の1分間適用により収縮し、その大きさは濃度に依存して増大した。しかしロ

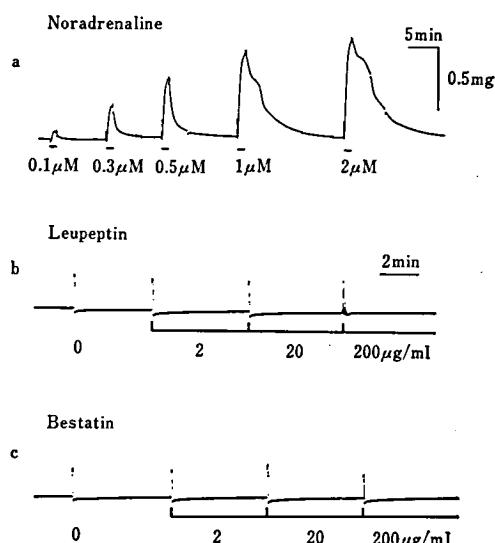


図3 モルモット下行大動脈らせん状条片標本に対するノルアドレナリン、ロイペプチントンおよびベスタチンの作用。横線に示した期間薬物を適用した。

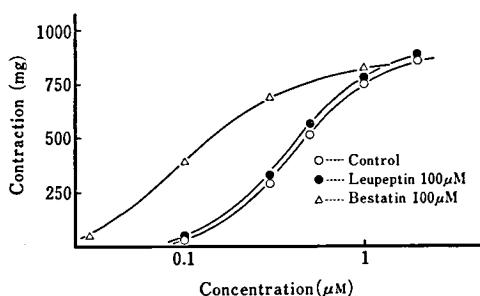


図4 ノルアドレナリンによる下行大動脈らせん状条片収縮の用量作用曲線と、ロイペプチントンおよびベスタチンの影響。各点は図3aに示すような収縮曲線のピークを測りプロットした。

イペプチントン(2-200 μg/ml)およびベスタチン(2-200 μg/ml)を5分間適用しても血管条片に対する作用は全く認められなかった。

図4はノルアドレナリンの血管収縮の強さをmgで表わし、これに対するロイペプチントンおよびベスタチンの影響を示したものである。ロイペプチントン(100 μM)はノルアドレナリンの収縮作用にほとんど影響を与えたかったが、ベスタチン(100 μM)はノルアドレナリンの作用を著しく増強した。

3) 幼若ラット摘出脊髄に対する作用

a) 下行性抑制

図5に示すように、高位側索条件刺激により単シナプス反射および後根電位は著明な抑制を受けた。ロイペプチントン100 μg/mlを灌流液に加えた条件下で同じ実験をくり返したが、下行性抑制の程度は、単シナプス反射に対してはほとんど変化なく、後根電位に対してはわずかに増強したが、その効果は著しいものではなかった。

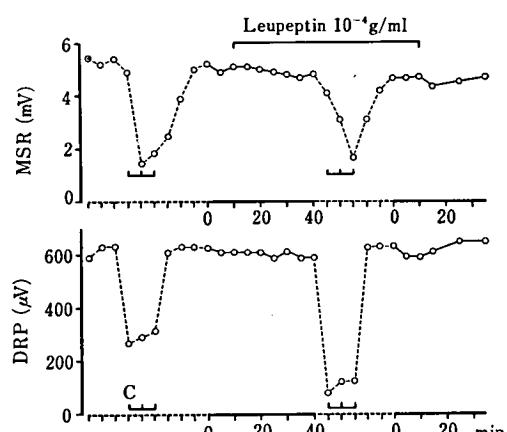


図5 ラット摘出脊髄における下行性抑制とそれに対するロイペプチントン100 μg/mlの効果。上は単シナプス反射、下は後根電位の大きさを示す。腰部後根に单一刺激を加え、同じ分節の前根および隣接後根から細胞外記録を行った。横軸は時間を示すが、点線の部分は1目盛が10秒、実線の部分は1目盛が5分。プロットの下に横線と縦目盛で示した時点で、10秒間隔で3回、高位側索に条件刺激を後根刺激に250 ms先立って加えた。ロイペプチントンは図の上の横線で示した期間、灌流で適用した。

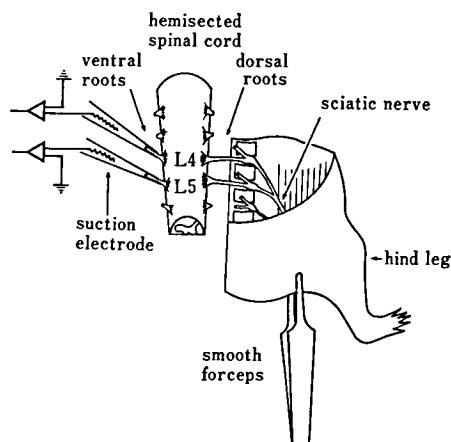


図 6 皮膚侵害刺激により誘発される脊髄反射電位測定の実験系を示す模式図。1-4 日齢ラットより左側腰部、下肢、坐骨神経および半裁脊髄を摘出し、人工脳脊髄液灌流下の液槽中に固定した。脊髄と腰部-下肢との連絡は L₄₋₅ の後根を残してすべて切断した。記録および刺激の方法については本文参照。

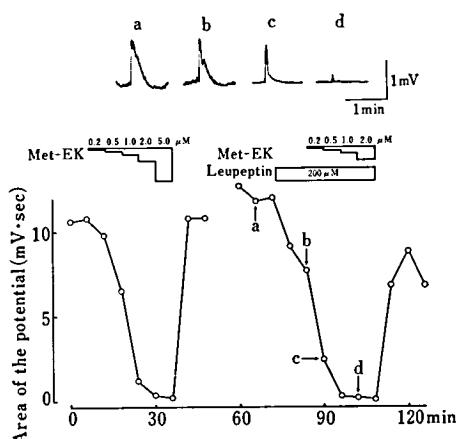


図 7 侵害刺激によって前根にひき起こされる反射電位に対する各種薬剤の作用。下段のグラフは反射電位と基線との間に囲まれる面積を時間に対してプロットしたもの。メチオニン・エンケファリン (Met-EK, 0.2-5.0 μ M), ロイペプチ 200 μ M および両者を、上に示す期間、人工脳脊髄液に溶かして灌流した。上段は下のグラフに a, b, c, d で示す各点における sample record を示す。人工脳脊髄液中の Ca^{2+} 濃度は 1.26 mM, Mg^{2+} 濃度は 2.0 mM。

b) 侵害刺激による反射電位

図 7a にみるように、侵害刺激を加えると前根 (L_{4-5}) から約 20 秒続く脱分極性反射電位が記録された。この反射電位はメチオニン・エンケファ

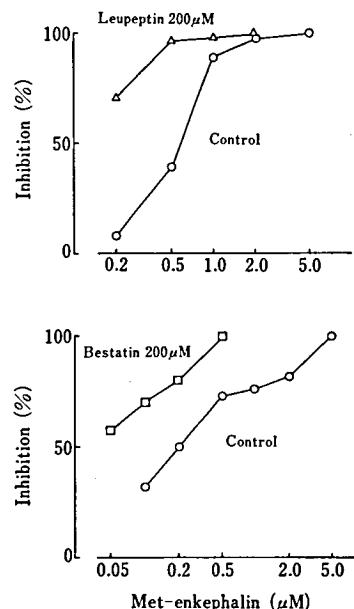


図 8 メチオニン・エンケファリンによる侵害刺激誘発前根反射電位の抑制に対するロイペプチおよびベスタチン各 200 μ M の影響。横軸に示す濃度のメチオニン・エンケファリンにより反射電位が抑制される率を dose-response curve としてプロットした。コントロール (○)：メチオニン・エンケファリンのみ、ロイペプチ (△) (上段)、ベスタチン (□) (下段) は各 200 μ M をエンケファリンと一緒に投与したもの。人工脳脊髄液は上段 [Ca^{2+}] 1.26 mM, [Mg^{2+}] 2.0 mM, 下段 [Ca^{2+}] 1.26 mM, [Mg^{2+}] 1.15 mM を含む。

リン (1-5 μ M) により著明に抑制された。一方ロイペプチ 200 μ M は侵害刺激による反射電位を軽度に抑制したが、これに加えてメチオニン・エンケファリンの作用を著しく増強した (図 7, 図 8)。またベスタチン (200 μ M) はそれ自身では反射電位に影響を与えたかったが、メチオニン・エンケファリンの作用を顕著に増強した (図 8)。

c) ベプチド作動性シナプス伝達をふくむ反射電位

半裁しない摘出脊髄において一側の L_4 前根から細胞外記録を行なながら、同側および反対側の L_4 後根に単一刺激を加えると、いずれの側の刺激によっても速い時間経過の反射 (潜時 10-60 ms) に引き続き、遅い時間経過の脱分極性電位が記録された (図 9, A, B1)。とくに反対側刺激に

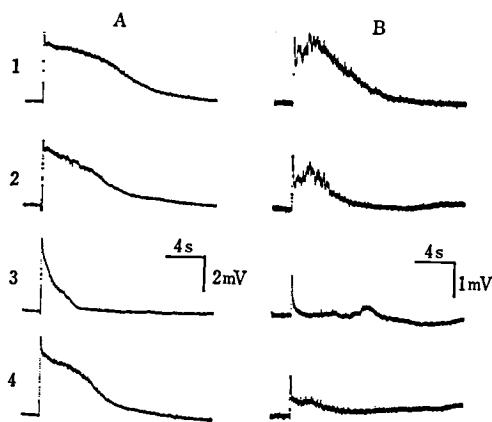


図 9 左側および右側の腰部後根の単一刺激によって同じ分節の前根から記録される遅い脱分極性反射電位に対するメチオニン・エンケファリンの抑制作用と、この作用に対するロイペプチドおよびベスタチンの効果。幼若ラット摘出脊髄の左側 L₄ 前根から吸引電極で DC 電位を記録しながら、同側 (5 V, 0.2 ms) と反対側 (8 V, 0.3 ms) の後根を 1 分ごとに交互に刺激した。A：同側の後根刺激によって発生する反射電位。B：反対側後根を刺激したときの記録。1：薬液を加える前。2：0.25 μM メチオニン・エンケファリンによる抑制。3：200 μM ベスタチン存在下でのメチオニン・エンケファリンによる抑制。4：200 μM ロイペプチド存在下でのメチオニン・エンケファリンによる抑制。

応じて発生する遅い反射電位はピーク（刺激後 2-5 秒）が観察され、速い成分と区別することができた。多くの実験結果から、この反射電位発生にはペプチドとともに P 物質が関与していると考えられる⁶⁾。0.25 μM メチオニン・エンケファリンの

適用によって同側刺激による遅い電位の持続時間が短縮し（図 9, A 2），また反対側刺激による遅い電位の振幅が約 50% 減少した（図 9, B 2）。ベスタチン 200 μM の適用によってメチオニン・エンケファリン（0.25 μM）の抑制効果は著しく増強され、とくに反対側刺激による遅い電位は完全に抑制された（図 9, B 3）。ロイペプチド 200 μM の添加によっても反対側刺激による遅い電位に対するメチオニン・エンケファリンの抑制効果が増強された（図 9, B 4）が、ベスタチンの効果と比べると増強の程度は軽度であった。

図 10 A に、反対側後根刺激によって発生する反射電位に対するメチオニン・エンケファリンの抑制作用の用量反応曲線を示す。ベスタチン（200 μM）はメチオニン・エンケファリンの効果を約 8 倍に増強した。これに対してロイペプチドによる増強作用の程度は軽度であった。

d) 抗アセチルコリン作用

昭和 54, 55 年度にロイペプチドは末梢神経系においてクラーレ様の抗アセチルコリン作用があることを報告した^{1,3)}。本年度は中枢においても同様な作用があるか否かを検討した。

摘出脊髄の L₄ 前根から電位を記録しながらアセチルコリン（ACh, 3 mM, 1.5 秒）および P 物質（SP, 3 μM, 1.5 秒）を短時間適用すると、前

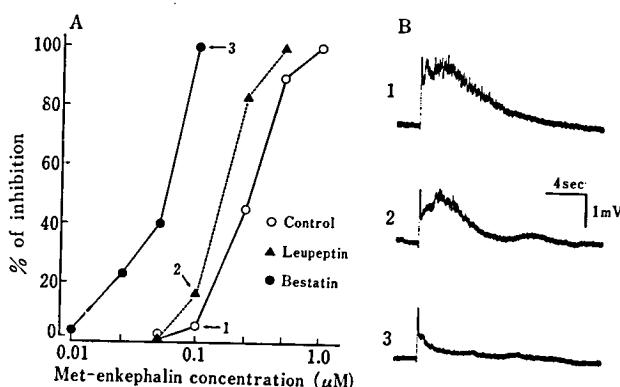


図 10 A : 反対側後根刺激による遅い反射電位に対するメチオニン・エンケファリンの抑制作用の用量反応曲線。○コントロール、▲200 μM ロイペプチド存在下、●200 μM ベスタチン存在下。B : A 図中の番号で示した点の sample record.

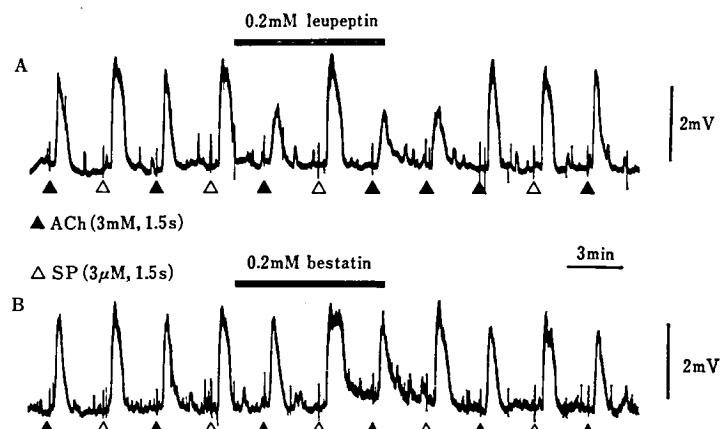


図 11 幼若ラット脊髄ニューロンのアセチルコリン (ACh) と P 物質 (SP) による脱分極に対するロイペプチ (A) とベスタチ (B) の効果。 ACh (3 mM, 3 秒▲) と SP (3 μM, 3 秒△) を 3 分ごとに適用し、運動ニューロンの脱分極を L₄ 前根から細胞外記録した。図の上の横線で示した期間、ロイペプチおよびベスタチを灌流適用した。

根に脱分極が生じた。200 μM のロイペプチ適用によってアセチルコリンによる脱分極が約 50% 抑制された (図 11, A)。この作用はロイペプチの除去後速やかに回復した。ロイペプチの適用によって P 物質の脱分極性反応の持続時間が軽度に延長した (図 11, A)。一方、200 μM ベスタチの適用ではアセチルコリンの作用に有意な変化はみられなかったが、P 物質による脱分極の持続時間は約 2 倍に延長した。

考 察

ロイペプチ 5-10 mg/kg の静注で血压の下降がみられたことは、田中班員らがネコおよびイスで得た結果に一致する²⁾。ウサギにおける血压下降は昭和 54 年度のラットで観察したロイペプチの作用に比べてより著しいものである¹⁾。この血压下降の機序として考えられるのは昭和 54, 55 年度に報告した神経節遮断作用である^{1, 3)}。すなわち、モルモット交感神経節におけるシナプス伝達は 2×10^{-5} g/ml のロイペプチによって抑制された。10 mg/kg のロイペプチ静注によって神経節における薬物の濃度がこの程度になることは十分考えられることである。もし、ロイペプチ

の血压下降作用が交感神経節における伝達遮断作用によるとすれば、あらかじめ α 型遮断薬によって交感神経性の血压上昇機構を除いておけばロイペプチの血压下降は起こらなくなるはずで、この点は明年度の研究において検討したいと考えている。

大動脈平滑筋にロイペプチが 10^{-7} - 10^{-4} g/ml の濃度で全く無作用であったことは、昭和 54 年度のモルモット摘出小腸における所見と一致する¹⁾。すなわち、一般にロイペプチは平滑筋に対する直接作用はないことを示唆するもので、上記の血压下降も神経性の機序のほうが考えやすい。一方、ベスタチがノルアドレナリンの作用を増強したことは注目すべきことである。この機序は現在のところ、全くわからない。一つの可能性はノルアドレナリンのとり込みの抑制である。

幼若ラットの摘出脊髄における遅い時間経過の反射に対して、メチオニン・エンケファリンは頗著な抑制作用を示した。メチオニン・エンケファリンの作用機序としては、1) 一次知覚神経線維の終末に作用して伝達物質の放出を抑制する、2) 後角の介在ニューロンのシナプス後膜に作用して伝達物質に対する感受性を抑制する、などの可能

性がまず考えられる。ベスタチンがエンケファリンの作用を増強したのはおそらくエンケファリナーゼの抑制によるものであろう^{5,7)}。ロイペプチソもエンケファリンの作用を増強したが、その程度はベスタチンよりも軽度であった。ロイペプチソの濃度は 200 μM と高濃度で、エンケファリナーゼを抑制する可能性も考えられる。

これまで神経筋接合部および交感神経節での研究からロイペプチソは抗アセチルコリン作用をもつことが知られていた。これらの場所ではニコチニン性のアセチルコリン受容体が存在している。一方、ロイペプチソはモルモット腸管のアセチルコリン収縮には影響を与えたなかった¹⁾。したがって、ロイペプチソはムスカリン性のアセチルコリン受容体には影響を与えないのかもしれない。今回得られた結果はロイペプチソが末梢神経系のみならず、中枢神経系でもアセチルコリン受容体に抑制作用をもつことを示している。摘出ラット脊髄でみられるアセチルコリンの運動ニューロン脱分極作用はアトロビンで抑制される成分とクラーレで抑制される成分とがある(未発表)。ロイペプチソは後者すなわちニコチニン性のアセチルコリン受容体が関与する成分を抑制している可能性が大きい。

総 括

1) ウサギの血圧、呼吸、心電図に対するロイペプチソの効果

ウレタン麻酔下にウサギの大脳動脈から血圧を記録した。ロイペプチソ 5-10 mg/kg を静脈内に与えると血圧は一過性に下降したが、呼吸数および心電図に変化はみられなかった。血圧下降の機序としては、先に報告した神経節遮断作用が考えられる。

2) 血管平滑筋に対する作用

モルモットの胸部下行大動脈を摘出し、らせん状に切って作った条片をマグヌス管内に懸垂し、

張力を記録した。ロイペプチソまたはベスタチンを 2-200 μg/ml の濃度で適用したが、張力の変化は起らなかった。しかし、ベスタチンはノルアドレナリン (0.3-2 μM) の血管平滑筋収縮作用を増強した。

3) 幼若ラット摘出脊髄に対する作用

a) 下行性抑制：高位同側側索の条件刺激によって単シナプス反射および後根電位は抑制を受けたが、この抑制に対してロイペプチソ 100 μg/ml は顕著な影響を与えたなかった。

b) 侵害刺激による反射電位：半裁脊髄を坐骨神経、腰部および下肢が繋がったままとりだし、前根から電位を記録した。皮膚に機械的侵害刺激を加えると、L₄₋₅ の前根から遅い時間経過の脱分極性反射電位が記録された。この反射電位はエンケファリンにより抑制され、この抑制をロイペプチソおよびベスタチン 200 μM は著しく増強した。

c) ペプチド作動性シナプス伝達を含む反射電位：後根に单一刺激を加えると反対側前根から遅い時間経過の反射電位が記録され、この反射電位発生にはペプチドが関与していると思われる。この電位はエンケファリンにより抑制され、この抑制をロイペプチソは軽度に、ベスタチンは著しく増強した。

d) ロイペプチソはアセチルコリンの脱分極作用に顕著な拮抗作用を示した。

文 献

- 1) 大塚正徳。ロイペプチソの薬理学的研究。厚生省新薬開発研究費、微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチソ）の開発研究、昭和 54 年度研究報告書, pp. 37-43 (1979).
- 2) 田中 亘。ロイペプチソの難病治療薬としての開発研究。厚生省新薬開発研究費、微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチソ）の開発研究、昭和 54 年度研究報告書, pp. 63-116 (1979).
- 3) 大塚正徳。ロイペプチソの薬理学的研究。厚生省新薬開発研究費、微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチソ）の開発研究、昭和

ロイペプチドの薬理学的研究

- 55年度研究報告書, pp. 41-48 (1980).
- 4) 大塚正徳. ロイペプチドの薬理学的研究. 厚生省新薬開発研究費, 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチド)の開発研究, 昭和56年度研究報告書, pp. 39-44 (1981).
- 5) Hachisu, M., Nakamura, T., Kawashima, H., Shitoh, K., Fukatsu, S., Koeda, T., Sekizawa, Y., Munakata, M., Kawamura, K., Umezawa, H., Takeuchi, T., and Aoyagi, T. Relationship between enhancement of morphine analgesia and inhibition of enkephalinase by 2S, 3R 3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid derivatives. *Life Sci.* **30**, 1739-1746 (1982).
- 6) Yanagisawa, M., Otsuka, M., Konishi, S., Akagi, H., Folkers, K., and Rosell, S. A substance P antagonist inhibits a slow reflex response in the spinal cord of the newborn rat. *Acta Physiol. Scand.* **116**, 109-112 (1982).
- 7) Chaillet, P., Marcais-Collado, H., Costentin, J., Yi, C. C., De la Baume, S., and Schwartz, J. C. Inhibition of enkephalin metabolism by, and antinociceptive activity of, bestatin, an aminopeptidase inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* **86**, 329-336 (1983).

ロイペプチの脱髓病変および培養筋への作用について

米 沢 猛*

I. 脱髓病変に及ぼすロイペプチの影響

脱髓疾患を特徴づける脱髓病変は賦活化因子（抗体、感作リンパ球、リンフォカイン）により活性化した食細胞が髓鞘の層状構造を解離し、破壊物質を貪食するという現象である。この活性化した食細胞では、抗原物質の貪食作用が増強しているのみならず、プロテアーゼをはじめとする種種の酵素が活性化している。このような点より食細胞のプロテアーゼをはじめとする酵素活性を抑制することにより脱髓病変の進展をおさえ、さらには脱髓疾患の治療にも役立てようとの試みがなされている。われわれはこの脱髓病変を *in vitro* の神経組織で再現せしめ脱髓機構の解明を試みてきたが、この *in vitro* での脱髓（抗髓鞘抗体、感作リンパ球、リンフォカイン等による）に及ぼすロ剤の影響を検討した。

実験方法

新生仔マウス小脳をとり出し、型のごとくマキシモウ二重カバーグラス法にて培養を行った。培養後5日よりロ剤 25 µg/ml を含む培養液を投与し、次第にロ剤を増し、培養2週以降には 100 µg/ml のロ剤を含む培養液を用いた。このような培養では、ロ剤の中毒性変化を示すことなく髓鞘形成は培養の 96-100% にみられる。

一方、ヒトの多発性硬化症4症例（いずれも増

悪期および寛解期を含む）、急性散在性脳脊髓炎1症例および実験的アレルギー性脳脊髓炎動物（家兎、日本ザル）より血清を分離し、また Ficoll 法にてリンパ球を分離し、さらにリンパ球培養に抗原を加え、上清よりリンフォカインを分離分画した。この分画のうち、細胞毒性を有するもの、および食細胞遊走阻止能を有する分画を有効分画として検索に用いた。

前述のロ剤にて前処理した培養組織に

① 被検血清の場合には、新鮮血清を 10-25% の割に培養液で希釀して培養組織に投与して、生ずる *in vitro* の脱髓所見を対照と比較検討した。

② 患者リンパ球および EAE 動物リンパ球の場合には、Ficoll 法にて分離したリンパ球を、さらに nylon column を用いて可及的に T 細胞を集め、10⁷ 個/ml の割で培養液に浮遊せしめた後、培養組織に投与した。

③ リンフォカインの場合には、上述の分画を濃縮し、培養液に 10-25% の割で混合し、培養組織に投与した（このリンフォカインはセファデックス G-200、一分画は 10 ml の濾液をさらに 1/5 に濃縮し、さらに培養液で 10-25% に希釀した）。

対照としてはロ剤前処理を行っていない培養を用い、検体を上述の方法と同じように加えて培養組織に生ずる変化を調べた。

ロ剤の影響の判定は、主として *in vitro* の神経組織に出現する髓鞘の変性所見の時間的経過に

* 京都脳神経研究所

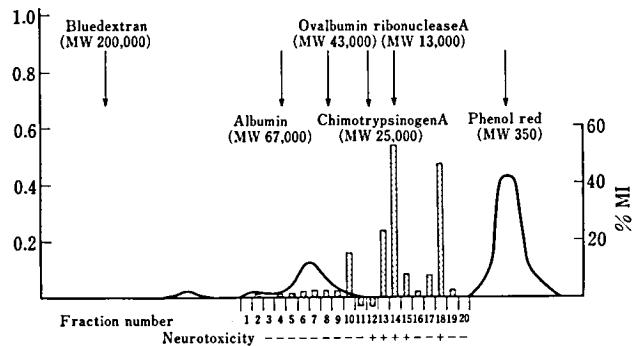


図 1 ヒト多発性硬化症患者の末梢リンパ球より分離したリンフォカイン分画とその生物学的活性との関係

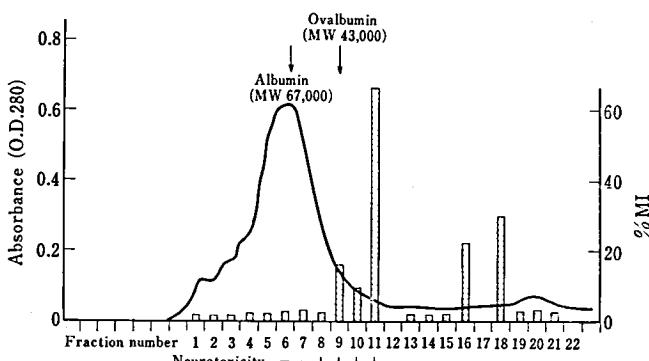


図 2 EAE 家兔リンパ節細胞より分離したリンフォカインの分画とその生物学活性との関係

よって行い、対照群との質的病変の違いも判定の参考とした。

実験結果

1) 患者血清ならびに抗血清による変化

患者血清ならびに抗血清を補体 C₃ 添加の下に培養に投与すると、それらの血清中の抗体の力値にもよるが、約 30 分後頃より髓鞘の腫脹が始まると同時に近傍に存在する食細胞は活発なアミーバ運動を行っているが、いったんその突起が髓鞘に接触すると、固着して髓鞘の層状構造を解離し剥離してゆく。髓鞘は次第に寸断されてミエリン滴として食細胞や髓鞘保持細胞であるオリゴデンドログリア内に吸いよせられるようにとり込まれる。これらミエリン滴は次第に消化されてしまう。そしてあとに髓鞘の消失した裸の軸索が残る。口剤前処理を行った培養においても、これ

らの髓鞘破壊を生ずる食細胞の態度は同様である。

2) リンパ球投与の場合

リンパ球投与を行った培養では、一部は培養液中に浮遊するが、多くは培養組織に付着し、さらにその一部は食細胞の周囲にロゼット状に付着している。投与後約 2 日を過ぎるころになると食細胞による髓鞘貪食が認められる。その破壊の状態は前述の抗血清によって生ずるものと類似しているが、貪食現象がより一層顕著である。この変化はリンパ球投与後少なくとも 2 日以降に出現する遅延型のものである。また投与するリンパ球が増加すると現れる変化は中毒性の変性像を示す。これらの脱髓性変化および中毒性変化は、口剤の前処置によても同様にみられ、口剤による病変の修飾は認められない。

3) リンフォカイン投与の場合

リンフォカインを小脳培養に投与すると、既報のごとく一定の分画（分子量 36,000）でとくに著しい中毒性変化を招来する。しかしリンフォカインの割を低くすることにより食細胞賦活化を来す。その変化はリンパ球投与の場合と同様である。しかし上述のごとき遅延型の変化ではない。そしてロ剤前処置によっても影響されることはない。

考 案

以上のごとく脱髓因子と見做されている抗髓鞘抗体、感作リンパ球およびリンフォカインなどによる脱髓は、いずれも賦活化された食細胞による髓鞘破壊である。その機序は細胞表面に IgG 抗体や補体 C₃ の受容体が存在するため、上述の抗体や補体により食細胞が賦活化するわけである。この活性化は細胞内の種々の酵素の活性化と相俟って食細胞の特異的機能である貪食作用が發揮されるわけである。しかし神経組織での脱髓では食細胞が髓鞘の層状構造の間へ、いわゆるカタピラ一現象によりその突起を侵入させ、髓鞘の脆弱性のため髓鞘保持細胞や食細胞内でミエリン滴に破壊される。したがって、たとえプロテアーゼ等の細胞内酵素活性が上昇した場合でも、その作用が及ぶより以前に髓鞘が破壊されてしまうものと理解される。このように脱髓現象を理解し、上述のデータを考えると、脱髓という現象はプロテアーゼの関与する場と異なった場での免疫学的現象で始まり、細胞内酵素活性の作用は第 2 段の現象へと進むわけである。したがって、ロ剤のごとき抑制剤の作用するより以前の現象として脱髓病変を理解すべきであろう。

結 論

脱髓疾患を特徴づける脱髓病変には、食細胞のプロテアーゼ活性がみられるところから、阻止剤により脱髓病変の進展を防ぐことが一部で提唱されている。この点をプロテアーゼ阻止剤であるロイペプチを用いて脱髓に及ぼす影響を神経組織

の培養を用いて検討した。被検材料はヒトの多発性硬化症、急性散在性脳脊髄炎およびサルとウサギの実験的アレルギー性脳脊髄炎の血清・末梢リンパ球あるいはリンパ節細胞およびリンフォカインを用い、脱髓病変に関する食細胞への影響を調べた。結果として食細胞への影響を認めることはできなかったが、これは脱髓病変の最初の現象として生ずる免疫学的現象にはロ剤が作用しないこと、続いて生ずる貪食・細胞内消化はプロテアーゼ以外の種々の酵素の賦活化によるものと思われる。

II. 家鶏ジストロフィー筋および健康筋へのロイペプチの影響について

家鶏ジストロフィー筋に対するロイペプチの影響は、プロテアーゼ活性を抑制してジストロフィー病変(ジス病変)の出現を阻止するということよりも筋での中毒性病変が前景に立っている。このことはとくに幼若筋に対して著しい。この筋の中毒性病変を培養筋を用いてさらに検討を加えた。

実験方法

筋ジス家鶏 (California Davis 413) およびその対照健康動物 (同 412) の胚浅胸筋をとり出し、
細切後、ネズミコラジエン塗布を行ったカバーグラス上に植え付け、マキシモウニ重カバーグラス法にて培養を行った。培養液の組成は

Gey 塩類溶液	9
Eagle MEM	9
馬血清	9
50% 鶏胚抽出液	9
10% ブドウ糖	2

である。

植え付け後 2-14 日にロ剤 25-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を培養液に混じて投与し、生ずる変化を検索した。観察は主として光頭による生態観察と電頭によるもので、電頭試料は培養組織を塩類溶液で洗浄後、2.5% グルタール (pH 7.4) および 1% オスマニウム酸にて固定、ウェストパール包埋を行い薄切後

電顕観察を行った。

実験結果

ロ剤投与量と培養日数との関係についてみると、培養初期の幼若な筋組織はロ剤に対しきわめて敏感で、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の投与によっても容易に変性像を示す。すなわち培養 2 日後に上述濃度のロ剤を投与すると、約 24 時間後には筋芽細胞および筋管細胞は全体に細顆粒状の変性物の出現がみられる。この物質は電顕観察では核近傍に始まる限界膜のないオスミウム好性の不定形の物質で、いわゆる dense body と呼ばれるものに相当する。このような所見を呈する筋芽細胞や筋管細胞では筋収縮線維の発育が障害され、培養 1 週を経過しても収縮線維は散在性に小集団を作り存在するにすぎない。

培養 5-7 日以後にロ剤を同じ濃度で投与しても、上述の変性像の出現はきわめて軽度である。この時期には $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の投与で類似の変化が出現するが、その程度は軽い。すなわちこの時期の培養では、ロ剤 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ を投与しても非投与群と同様の発育と成長を示し、変性所見は少ない。 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ での変性像はみられるものの、投与を続けても顆粒は徐々に減少してくる。しかし筋の発育成長は遅延する。さらに $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 投与では変性像はかなり多くなる。

培養 10 日以後には $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 投与により、軽度の変性顆粒の出現が数日内にみられる。しかしこの顆粒の出現は散在性で、筋の発育にはとくに障害を与えていない。

これらの所見より、幼若筋細胞はロ剤に敏感で、容易に中毒性変性顆粒の出現を来すが、筋の成長に伴ってその耐性は急速に上昇し、培養 10 日以降には $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度にも耐えうるわけである。

また変性所見を示した筋培養にロ剤の投与を中止し、その変性の回復と残された障害をみると、投与によって生じた変性顆粒は次第に減少していく。それとともに遅延していた発育成長が回復する。しかし侵襲の著しいもの、とくに初期にロ剤を投与したものでは成長は充分ではない。成長後の筋の径は細く、線維の長さも短い。電顕観察では前述の dense body の貯留、さらに著しい場合



図 3 ジス筋培養、ロ剤投与なし、20 DIV. 筋はやや細いが横紋はよく形成されている。

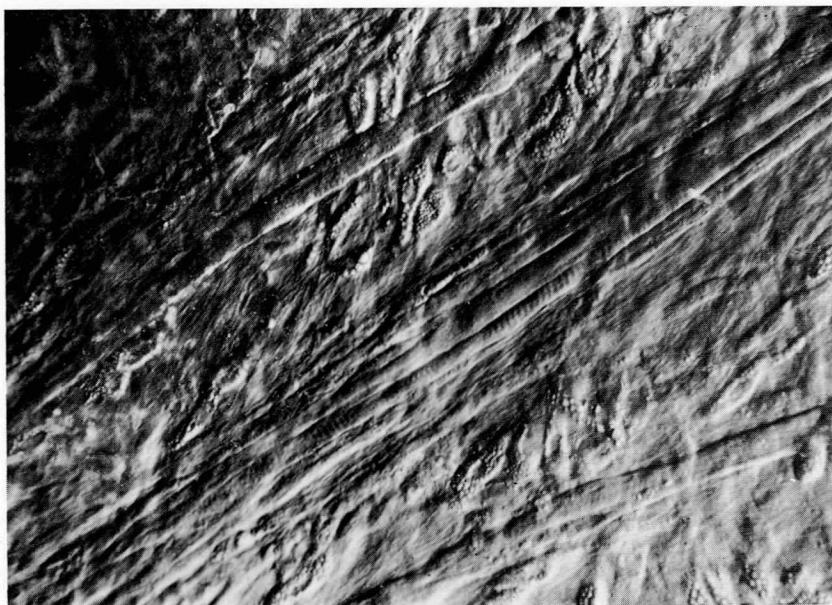


図 4 ジス筋培養, $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ロ剤投与, ロ剤除去後 2 週経過. 中毒性病変は消退するも横紋形成は遅延している。



図 5 ジス筋培養, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ロ剤投与, ロ剤除去後 2 週. 発育の不完全な状態を示している。



図 6 ジス筋培養, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ロ剤を 20 日後に投与. ロ剤による変化はないが、ジス病変が出現している。



図 7 ジス筋培養, ロ剤 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 投与群にみられたジス病変. 横紋の変化と壞死部が同一組織にみられる。

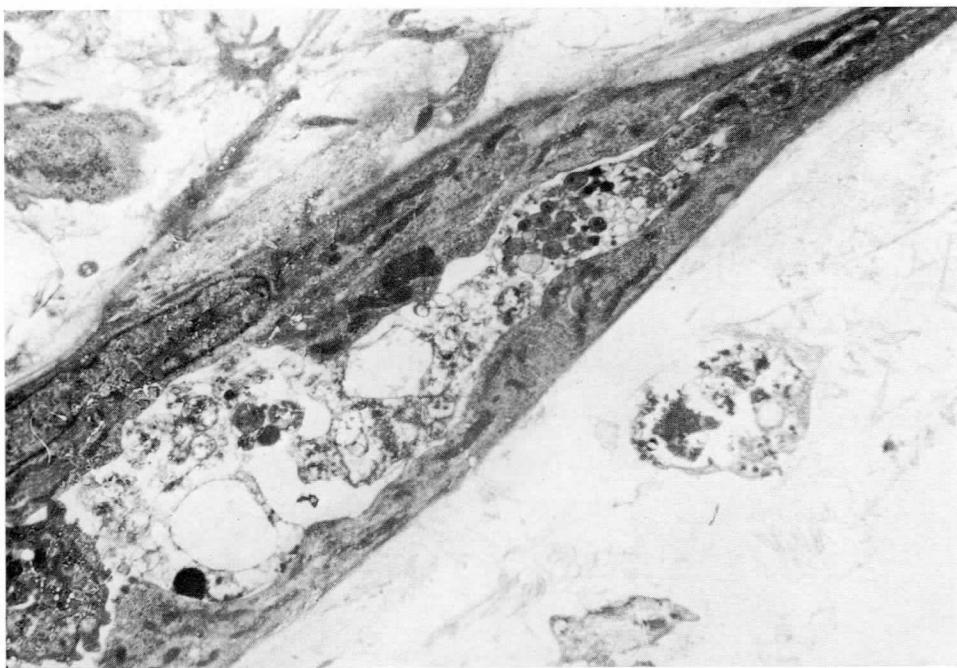


図 8 ジス筋(電顕), 培養 2 日後にロ剤 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 投与, その後 6 日の所見. SR の破壊, dense body の出現, 筋漿の融解がみられる.

には SR 等の細胞内膜様構造の破壊と筋漿の融解像などがみられる. そして筋の収縮線維の発育も障害をうけている.

このようにロ剤で処理された培養では, 細顆粒出現, SR の破壊, 筋漿の融解などの変化を来すが, これらの変化を来さない濃度で処理されたジス筋では, やがてジス病変の出現がみられる. その病変の特徴の一つとして筋の過収縮がある. すなわち, 筋の形成された横紋の間隔が変化し, I および A 帯の区別ができず過収縮の状態を示したり, また筋線維の腫脹とともに横紋が不明瞭になり, 索状ないし塊状の壞死性変化を示していく. とくにジス筋の特徴として, 1 本の筋線維で健康部, 過収縮部および壞死部と連続してみられることがある. このような変化はロ剤の効果が仮令存在するにせよ, ジス病変の出現を阻止できないことを示すものであろう. また上述の中毒性変化はジス筋にも, 健康筋にも共通してみられる変化である.

考 案

このようにロ剤の作用は幼若細胞にとくに著しく, その侵襲部位は SR などの膜様物質と考えられる. そしてその障害によって筋の発育や成長が妨げられるものと思われる. とくに培養日数の少ない組織では, $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ の少量でも 24 時間に変性顆粒の出現を来す. この程度の投与量では, 投与を続けると次第に顆粒の減少を来し, 10 日程の経過で回復する. しかし投与量がこれ以上の場合には, 同様の変性顆粒は永く残存し, 筋の発育成長は著しく障害される. このことは単に筋培養でみられるだけでなく, 他の幼若細胞にも共通してみられる現象であろう. このロ剤の侵襲部位は細胞質内の膜様構造物と思われ, SR や細胞内小胞の変性, ライソゾームへの障害, dense body の出現などの変化が著明である. この変化が筋の発育成長の遅延ないし停止を来す形態学的裏付けといいうるであろう. ロ剤による中毒性変化の少ないジス筋では, 後にジス病変を現していく. これは, ロ剤のみではジス病変の出現を必ずしも抑

制阻止しないことを示すものであろう。

結 語

筋ジス鶏胚の浅胸筋の培養を用いて、ロ剤の影響を検討した。幼若筋培養では比較的容易に中毒性病変を生ずる。培養期間の長いものでは 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のロ剤濃度にも耐えうる。その病変は SR 等の膜様構造物で、dense body の出現、SR の破壊、さらに筋漿の融解である。これらの変化は徐々に回復しうるが、発育の不充分な筋として残る。また侵襲のきわめて少ないジス筋の一部にはジス病変と見做しうる変化を呈してくるものがあり、ロ剤による変化は中毒性変化が前景に立ち、ジス病変の出現を抑制する効果は不充分と思われる。

path. Exp. Neurol. **20**, 141-160 (1961).

- 2) 米沢 猛. 日神経病理会誌 **67**, 31-55 (1978).
 - 3) Yonezawa, T., Hasegawa, M., Arizono, N., and Okabe, H. *Acta Neuropath.*, Suppl. **VII**, 162-164 (1981).
 - 4) 宮路祐文. 京都府立医大誌 **90**, 955-966 (1981).
 - 5) Wisniewski, H. M., Brosnan, C. F., and Bloom, B. R. in "Suppression of Experimental Allergic Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis", eds. Davison, A. N. and Cuzner, M. C., Academic Press, pp. 45-58 (1980).
 - 6) Yonezawa, T. *Acta Neuropath.*, Suppl. **VIII**, in press (1983).
- IIに關し
- 7) Busch, W. A., Stromer, M. H., Gall, D. E., and Suzuki, A. *J. Cell Biol.*, **53**, 367-381 (1972).
 - 8) McGowan, E. B., Shafiq, S. A., and Stracher, A. *Exp. Neurol.* **50**, 639-657 (1970).
 - 9) Stracher, A., McGowan, E. B., and Shafiq, S. A. *Science*, **200**, 50-51 (1978).

文 献

Iに關し

- 1) Bornstein, M. B. and Appel, S. H. *J. Neuro-*

筋ジストロフィー症マウスに対する

ホルフェニシノール投与の影響

松 下 宏*

研究協力者 辻 繁 勝*

研究目的

われわれは従来、マウスあるいはハムスターの筋ジストロフィー症をモデル実験動物として、ロイペプチドおよびベスタチンを投与した場合の進行性筋ジストロフィー症に対する治療効果について、主として病態生化学的手法を用いて種々の検討を重ねてきたが、その結果、筋ジストロフィー症マウスに発症直後からベスタチンを連続投与することによっていったん発現した症状が完全に回復する場合があることを見いだした^{1,2)}。また、ロイペプチドまたはベスタチンの投与によって疾患の完全な回復が得られなかったマウスも長期間投与を続けることによって著しい延命効果があることが認められた。

ロイペプチドとベスタチンはともにプロテアーゼ・インヒビターであるが、ベスタチンは細胞膜の表面に結合して、膜局在のエンドペプチダーゼ活性を抑制すると同時に免疫増強作用があることも知られている。したがってベスタチン投与による疾患回復効果にはプロテアーゼ・インヒビターとしての作用の他に、膜表面に結合することによって筋線維の生理機能を変化させる作用が関与している可能性が考えられる。そこで本年度はベスタチンの作用機序を追求する第1歩として、プロテアーゼ・インヒビターとしての作用は知られて

いないがベスタチンと同じく細胞膜表面に結合して免疫増強作用を示すことが知られているホルフェニシノールを用いて、ベスタチンと同様な条件で筋ジストロフィー症マウスに連続投与した場合の疾患進行に与える影響を検討した。

材料と方法

実験には C 57 BL/6 J-dy 系マウスの疾病個体および同腹正常個体が用いられた。1カ月齢に満たない個体は当教室で維持繁殖しているもの、1カ月齢以上のマウスは実験動物中央研究所より購入したものをそれぞれ使用した。

すでに症状の進んだマウスに対する短期間の投与実験には約1カ月齢の罹患マウス 30 頭を 3 実験区各 10 頭ずつに分け、それぞれ 1 週間投与群、2 週間投与群、および 6 週間投与群とした。各実験区は更に 5 頭ずつ 2 ケージに分け、1 ケージはホルフェニシノール投与群、他は食塩水投与対照群とし、それぞれの期間連日投与を行った後、屠殺して血清および骨格筋中のマーカー酵素群の活性を測定した。また、無処置のマウスでの酵素活性測定には同齢の罹患マウスおよび正常対照マウス各 5 頭が用いられた。一方、早期投与開始による疾患回復効果をみる実験は、dy ヘテロ個体同士の交配によって得られた新生児を生後 10 日目から連日、尾をもってつり下げ、発病の徴候をしらべる作業を行い、発病を確認した後直ちにホル

* 和歌山県立医科大学第二生理学教室

フェニシノール投与を開始し、臨床症状の観察、体重測定、筋の耐久テストなどを行った。

ホルフェニシノール粉末は使用直前に生理的食塩水に 1 mg/ml 濃度に溶解し、1 回 0.25 ml ずつ、1 日 2 回、連日、背部皮下に注射した。対照群には生理的食塩水を 0.25 ml ずつ同様に注射した。

酵素活性測定には、被検マウスを断頭採血し、血液は 30 分間室温静置後、2,000 rpm 10 分間遠沈し、分離した血清を直ちに酵素標品として使用した。後肢の骨格筋は、断頭後速やかに 10 倍容の 0.32 M 蔗糖液に入れ、テフロンホモジナイザーでホモジナイズし、通常の Schneider 法に従って可溶性分画とミトコンドリア分画に分離し、前者はそのまま、後者はさらに低張液処理による膜の破碎を行った後それを酵素標品として使用した。

酵素活性の測定は CANP は Dayton らの方法³⁾、CPK は Hess らの UV 法⁴⁾、GOT および

GPT は Karmen 法⁵⁾、LDH は Wroblewski らの方法⁶⁾、PK は Tanaka らの方法⁷⁾にそれぞれ準じて行った。酵素標品中の蛋白含量は Lowry 法によって測定した。

結 果

1) 疾病による酵素活性の変動

表 1 は無処置の 2 カ月齢の C 57 BL/6 J-dy 系マウスについて血清中の遊出酵素の活性値を示したものである。LDH を除き、いずれの酵素も罹患マウスのほうが、正常対照マウスよりも高い活性を示しており、中でも PK および CPK で著しい活性上昇が認められた。LDH 活性は変化がなかった。骨格筋中の各酵素の活性値は表 2 のごとく、CANP 活性および GOT, GPT の可溶性分画中の活性がいずれも罹患マウスで上昇している他は、すべて正常対照よりも著しく低い活性値を示しており、以前に度々行われた測定結果とよく一致した傾向を示している。以上の結果から、用

表 1 Activities of various enzymes in sera from normal and dystrophic mice

Enzymes	Dystrophic	Normal	D/N × 100
PK	3.80 ± 0.59	0.53 ± 0.03	716.9
CPK	8.01 ± 0.92	4.30 ± 0.21	186.3
LDH	2.08 ± 0.16	2.01 ± 0.14	103.5
GOT	1.87 ± 0.09	1.29 ± 0.23	145.0
GPT	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.05	103.6

Units : PK, CPK, LDH ; μmoles NADH/ml serum/min, GOT, GPT ; Karmen U/μl serum.

表 2 Activities of various enzymes in muscle from normal and dystrophic mice

Enzymes	Dystrophic	Normal	D/N × 100
PK	0.84 ± 0.27	1.62 ± 0.32	51.9
CPK	9.38 ± 3.98	14.51 ± 5.68	64.9
LDH	3.41 ± 1.75	3.89 ± 1.47	87.7
GOT cytosol	3.15 ± 0.67	2.83 ± 0.60	111.3
mitochondrial	0.24 ± 0.04	0.29 ± 0.03	82.8
GPT cytosol	76.0 ± 7.1	59.5 ± 5.3	127.7
mitochondrial	102.1 ± 19.7	126.7 ± 25.8	80.6
CANP	8.4 ± 0.7	6.2 ± 0.4	135.5

Units : PK, CPK, LDH ; μ moles NADH/mg protein/min, GOT, GPT ; Karmen U/μg protein, CANP ; ΔE/g protein/2 hrs.

筋ジストロフィー症マウスに対するホルフェニシノール投与の影響

表 3 Effect of forphenicinol administration on serum enzyme activities in dystrophic mice

Enzymes	Administration period		
	1 week	2 weeks	6 weeks
PK	91.0	49.1	60.1
CPK	89.7	70.9	57.6
LDH	76.4	96.9	85.5
GOT	66.3	79.4	79.4
GPT	82.7	41.8	59.8

Unit : forphenicinol/saline ×100.

表 4 Effect of forphenicinol administration on muscle enzyme activities in dystrophic mice

Enzymes	Administration period		
	1 week	2 weeks	6 weeks
PK	104.9	164.3	171.4
CPK	163.0	223.2	188.2
LDH	76.2	85.7	94.3
GOT cytosol	89.6	54.9	78.4
mitochondrial	112.5	140.8	130.9
GPT cytosol	84.9	98.9	132.3
mitochondrial	103.5	300.4	261.9
CANP	127.4	32.6	27.0

Unit : forphenicinol/saline ×100.

いられた酵素が筋ジストロフィー症の症状進行に伴っていずれも特異的な活性変化を示すことが確かめられたので、これらをマーカー酵素として、ホルフェニシノールを投与した場合の疾病進行に対する効果を検討した。

2) ホルフェニシノール短期投与のマーカー酵素活性に対する影響

まず、発症後やや時間を経過し、症状がある程度進行した生後 1 カ月の罹患マウスを用いて、ホルフェニシノールの短期間投与による血清中遊出酵素の活性変動に与える影響を調べた。表 3 はその結果を示したものであるが、1 週間の投与ですでに測定した全酵素でわずかながら活性の低下が認められる。2 週間後でもこの傾向はやや増強された形で継続され、6 週間の連続投与では、PK, CPK などの活性値は、食塩水投与対照群の半分近くにまで低下していることが認められた。一方、

骨格筋中の酵素活性の変化は表 4 に示すとく、1 週間の投与で LDH, GOT, GPT の可溶性分画を除く各酵素に活性上昇の傾向が認められた。とくに CANP 活性は、1 週間投与ではむしろ活性上昇の傾向を示すことが注目される。2 週間投与では CPK, PK および GOT, GPT のミトコンドリア分画中の活性値がそれぞれ著しく高くなり、とくに、CPK で 2 倍、ミトコンドリア GPT では 3 倍の増加が認められた。CANP 活性は、2 週間の連続投与で著しい減少を示し、食塩水投与対照群の約 1/3 に低下しているのが注目される。6 週間投与群では 2 週間投与群で認められた傾向がそのまま継続された状態を示していた。LDH 活性は、ホルフェニシノールの短期間投与では血清中でも骨格筋中でもやや減少の傾向をみせていたが、それほど大きな変化は示さなかった。

3) ホルフェニシノール短期投与による体重変化

約1カ月齢の罹患マウスにホルフェニシノールを6週間連続投与することによって、疾病のマーク酵素群が血清ならびに骨格筋中で疾病改善の方向に変化することが認められたので体重の変化について測定を行ったところ、図1に示すとく、同齢の正常マウスの場合は6週の間に約4gの体重増加がみられたのに対して、ホルフェニシノール投与および食塩水投与の疾病マウスではほとんど体重増加が認められなかつた。わずかに食塩水投与対照マウス体重減少の傾向があるのに対して、ホルフェニシノール投与マウスがやや増加の方向を示しているという差異がみられる程度であった。また、臨床症状にも目立った変化は認められず、わずかに食欲増進の傾向がみられる程度であった。

4) ホルフェニシノール早期投与開始による症状回復効果

すでに症状の進行した筋ジストロフィー症マウスにホルフェニシノールを短期間投与した場合に疾病進行を遅らせるごとき傾向が間接的にみられたことから、次に発症後のできるだけ早い時期からホルフェニシノールの連続投与を行った場合の臨床症状に対する回復効果の有無を検討した。表5は、約2週齢からホルフェニシノールを投与開始した筋ジストロフィー症マウスと、無処置の同齢筋ジストロフィー症マウスの1カ月齢および3カ月齢時の体重増加を比較したものであるが、1カ月齢ですでに雌雄ともに、投与群のほうが有意

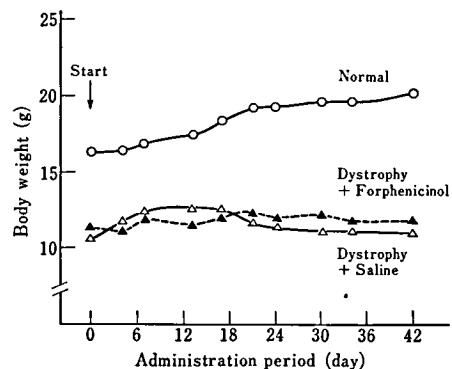


図1 1カ月齢の筋ジストロフィー症マウスにホルフェニシノールを連続投与したときの体重変化。

な体重増加を示していることが認められる。この変化は肉眼的にも歴然と認められるが、同時にほとんどの投与マウスでいったん筋ジストロフィー症状が消失することが確かめられた。この傾向は、3カ月齢時に至っても同様に認められ、投与群の平均体重は無処置罹患マウスの2倍近くに増加し、ほぼ正常マウス並みの成長を示していた。一方投与マウスの中に体重増加は顕著にみられるが、注射など外部からの刺激が与えられたときに、後肢の引づり、あるいは頭部の上下運動などの症状を軽度に発現する個体があり、これらはついに完全な症状の消失に至らず、3カ月齢以降になると後肢に明らかな stickiness を起こし、歩行異常を示すようになった。しかしこれらの疾病回復に失敗したマウス群も、投与を継続することによって無処置の罹患マウスに比較して著しい寿命の延長がみられている。

図2は、ホルフェニシノール投与筋ジストロフ

表5 Comparison of body weight of forphenicinol treated dystrophic mice with that of untreated dystrophic mice

Sex	Treatment	1 month	3 month
Male	Treated	15.5±3.4(13)* [10.0-21.5]	22.5±2.9(13)* [17.5-26.5]
	Untreated	9.6±1.5(10) [7.1-11.3]	12.1±0.7(10) [11.3-13.0]
Female	Treated	14.3±1.3(12)* [12.0-16.0]	17.7±1.2(12)* [15.0-25.5]
	Untreated	7.8±1.1(10) [6.0-10.1]	10.8±0.8(10) [9.8-12.0]

Brackets show the range of each data. Parentheses show the numbers of mice used.
Unit : g body weight. * p<0.01.

筋ジストロフィー症マウスに対するホルフェニシノール投与の影響

表 6 Starting age of dystrophic mice with forphenicinol administration and recovery rate

Numbers of mice	Starting age (day)			Total
	13-20	21-30	31-40	
Treated	33(♂ 20, ♀ 13)	24(♂ 12, ♀ 12)	23(♂ 11, ♀ 12)	80(♂ 43, ♀ 37)
Succeeded	15(♂ 6, ♀ 9)	7(♂ 1, ♀ 6)	0	22(♂ 7, ♀ 15)
Unsucceeded	18(♂ 14, ♀ 4)	17(♂ 11, ♀ 6)	23(♂ 11, ♀ 12)	58(♂ 36, ♀ 22)
Recovery rate (%)	45.5	29.2	0	27.5

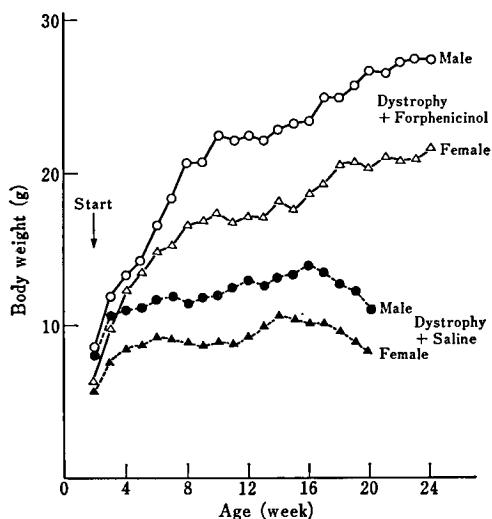


図 2 発症直後からホルフェニシノールを投与し、症状の消失したマウスと、無処置筋ジストロフィー症マウスの成長曲線。

イー症マウスと無処置筋ジストロフィー症マウスの典型的な例による成長曲線を示したものであるが、20 週齢でほぼ 2 倍の体重差を示していることがわかる。

表 6 は、現在までに実施したホルフェニシノール早期投与実験の全マウスについて、投与を開始した日齢と 4 カ月齢以後に疾病が完全に消失していることが判定された個体の出現率との関係を示したものである。その結果、20 日齢までに投与の開始を行えば罹患マウスの約 1/2 が疾病から回復することが認められた。また、投与開始日齢がそれより遅くなればなるほど回復率が低下し、1 カ月齢以降に投与を開始しても、もはや疾病の回復が起こらなくなことが明らかになった。

そこで、症状が完全に消失し、体重増加が正常

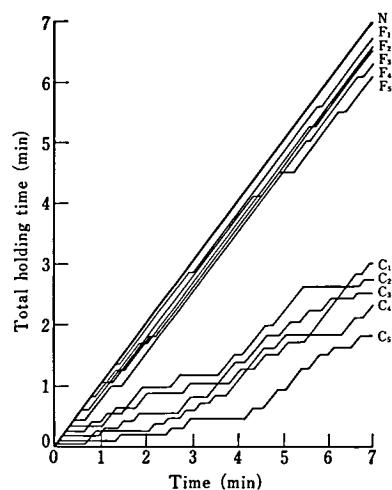


図 3 金網しがみつき法による筋の耐久力テスト。
N：正常マウス、F₁₋₅：ホルフェニシノール投与により症状の消失した筋ジストロフィー症マウス、C₁₋₅：無処置の筋ジストロフィー症マウス、いずれも約 3 カ月齢。

マウス並みのホルフェニシノール投与マウスについて、骨格筋の耐久力に関しても回復が実際に起こっているのか否かを確かめるために運動強制負荷テストを行った。60°C のホットプレート上に被検マウスを置き、円筒状で蓋付きの金網をその上にかぶせておくと、マウスは足の裏が熱いため側面の金網をよじ登る。この状態を 7 分間継続して、ホットプレート上から完全に足を離し、金網にすがり付いていた時間の総和を示したものが、図 3 である。約 2 カ月齢の正常マウスは 10 回試みたが、すべていったん金網に登ると、実験時間中はホットプレート上に落ちることはなかったのに対して無処置の同齢筋ジストロフィー症マウスでは 2/3 以上の時間、ホットプレート上に落ちていることが判る。ところが、ホルフェニシノール

投与によって完全に症状の消失した筋ジストロフィー症マウスではほとんど落下せず、正常に近い筋の耐久力を回復していることが認められた。

考 索

マーカー酵素として用いられた 6 酵素はいずれも筋ジストロフィー症マウスにおいて、症状の進行に伴って特異的な活性変動を示すことがすでに確かめられている酵素群であるが、今回実験を進めるに当って再度活性測定を行い、この事実を確かめた。すなわち CANP 活性は骨格筋中で著しい活性増加を示しており、PK および CPK 活性は血清中で活性が増加し、骨格筋中で低下していくことが認められた。また GOT, GPT 活性は血清中で上昇していたが、骨格筋中では可溶性分画中の isozyme 活性がともに増加し、逆にミトコンドリア分画中の活性は減少していることが判った。LDH 活性は骨格筋中ではやや活性低下を示していたが、血清中への遊出増加はほとんど認められなかった。

約 1 カ月齢で筋ジストロフィー症状がやや進行した状態の罹患マウスにホルフェニシノールを短期的に連続投与すると、骨格筋中の CANP 活性は 1 週間投与でむしろやや活性上昇を示したが、6 週間投与によって対照の約 1/4 に低下することが認められた。これは、ホルフェニシノール投与により、筋線維内の生理状態の改善が行われた結果、二次的に減少したものと考えられる。PK および CPK 活性は、ホルフェニシノール投与 1 週間で早くも血清中で減少し、骨格筋中で増加する傾向が認められ、6 週間ではさらにこの傾向が強調されていた。この結果は、ホルフェニシノールが筋膜に結合することによって膜機能が改善されることを明瞭に示しているものと考えられる。また、GOT と GPT 活性も筋ジストロフィー症マウスでは血清中で上昇傾向を示しているが、骨格筋中では可溶性分画とミトコンドリア分画に分

けて測定した結果、可溶性分画で活性上昇し、ミトコンドリア分画で低下していることが判った。これにホルフェニシノール投与を行うと血清への遊出が減少し、骨格筋中では可溶性分画で活性低下し、ミトコンドリア分画で上昇するという正常方向への回復効果が認められた。しかし、この実験で体重増加、あるいは臨床症状の改善などに関して顕著な変化がみられなかったのは、症状のかなり進行した状態ではホルフェニシノールによつてもたらされる筋線維の回復能力を越えた破壊がすでに起こっているためと考えられる。

発症直後の時期からホルフェニシノール投与を開始すると、ベスタチンの場合と同じく約半数の個体で症状の完全な消失および正常な体重あるいは筋の耐久力の獲得が行われることを見いだしたが、回復率は投与開始が早いほど高く、1 カ月齢を過ぎるともはや回復が起らないことから、ホルフェニシノールの筋ジストロフィー症に対する効果は対症療法的効果ではなく、疾病進行の原因を抑制する効果であろうと考えられる。したがって発症以前に投与開始を行えば、発病を完全に抑止できる可能性を示唆しているものと思われる。

総 括

- 1) 筋ジストロフィー症マウスにホルフェニシノールを短期間連続投与することによって、血清中ならびに骨格筋中でのマーカー酵素の活性変動を症状改善の方向に変化させることが認められたが、その結果は投与期間が長いほど著しい傾向がみられた。
- 2) 発症初期からホルフェニシノールを連続投与することによって疾病マウスに症状回復、体重増加、筋の耐久力増強などの効果が認められた。

文 献

- 1) Tsuji, S. and Matsushita, H., Effect of protease inhibitors on the activity changes of several enzymes in murine muscular dystro-

筋ジストロフィー症マウスに対するホルフェニシノール投与の影響

- phy. *J. Physiol. Soc. Japan* **43**, 374 (1981).
- 2) 辻 繁勝, 松下 宏. プロテアーゼ・インヒビターマウスによるマウス進行性筋ジストロフィー症の症状回復について. 和歌山医学 **30** (4), 331 (1982).
- 3) Dayton, W. R., Reville, W. J., Goll, D. E., and Stromer, M. H. A Ca^{++} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover : Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry* **15**, 2159-2167 (1976).
- 4) Hess, J. W., Murdock, K. J., and Natho, G. J. W. Creatine phosphokinase, A spectrophotometric method with improved sensitivity, *Am. J. Clin. Pathol.* **50**, 89 (1968).
- 5) Karmen, A., Wroblewski, F., and LaDue, J. S. Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.* **34**, 126 (1955).
- 6) Wroblewski, F. and La Due, J. S. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **90**, 210-213 (1955).
- 7) Tanaka, T., Harano, Y., Sue, F., and Morimura, H. Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinases isolated from rat tissues. *J. Biochem.* **62**, 71-91 (1967).

ロイペプチによる実験的治療

高木 昭夫*

研究協力者 塙中征哉*・石浦章一*・宮沢 寛*
安部和子*・小川敬子*

結 果

A. 脱神経萎縮筋に対する効果

これまでロイペプチの実験的筋萎縮に対する効果を報告してきた^{1,2)}。今回は前年に引き続き神経切断後の筋萎縮に対するロイペプチの効果を分析した。ロイペプチの効果は劇的なものではないが、一部で筋萎縮過程の修飾を示唆する結果を得た。

方 法

体重300g前後のウィスター系雄ラット10匹を使用した。神経切断の方法、ロイペプチの投与法は既報と同一である²⁾。7日間薬剤投与後に鴉血により屠殺し、ひらめ筋(SOL)、前脛骨筋(TA)および長趾伸筋(EDL)を採取し分析に供した。筋蛋白測定にはTAを使用した。H₂O中でホモジエネートを作製し、3,000 rpm 30分遠心後の上清と沈渣の蛋白をビューレット法で測定した。沈渣分画については0.1N NaOHで可溶、10% TCAにより沈澱する蛋白量を測定した。SOLとEDLについては凍結切片の組織標本を作製し、形態学的検査を行った。筋直径はKontron MOP 2 image analyzerを使用して測定した。血漿、腓腹筋(健側と脱神経側)と肝臓についてロイペプチ濃度が測定された(日本化薬K.K. 田中亘氏による)。

1) ロイペプチ濃度(表1)

血漿中、ロイペプチ濃度は0.5-1.8 μg/ml、腓腹筋では0.1-0.6 μg/gであった。脱神経側の筋では健側より平均2倍高値であった。肝臓では平均6.0 μg/gであり、かなり高値であるのが注目される。

2) 実験期間中ラット体重

ロイペプチ投与群で平均25g、非投与群で平均20g増加した。健側の筋湿重量はロイペプチ

表1 血漿、肝臓、腓腹筋のロイペプチ濃度
(μg/ml または μg/g)

Rat No.	Plasma	Liver	Muscle*		D/C
			C	D	
363	0.86	5.39	0.197	0.653	3.31
364	1.39	6.34	0.102	0.254	2.49
366	1.84	5.73	0.170	0.191	1.12
374	0.48	6.77	0.246	0.250	1.02
Mean	1.14	6.06	0.179	0.337	1.99
S. D.	0.60	0.62	0.060	0.213	1.12

* C: 健側, D: 脱神経側

表2 健側の筋湿重量(g)

	ロイペプチ(-)	ロイペプチ(+)
TA	0.53±0.04(7)*	0.50±0.12(6)*
EDL	0.14±0.02(7)	0.14±0.02(6)
SOL	0.13±0.02(7)	0.12±0.01(6)

* 平均±標準偏差(例数)。TA: tibialis anterior, EDL: extensor digitorum longus, SOL: soleus.

* 国立武藏療養所神経センター

表 3 筋湿重量の比(脱神経側/健側)

	ロイペプチニ (-)	ロイペプチニ (+)
TA	0.69±0.03(7)	0.70±0.04(6)
EDL	0.74±0.08(7)	0.81±0.10(6) ($p=0.1$)
SOL	0.52±0.08(7)	0.61±0.11(6) ($p=0.07$)

表 4 前脛骨筋の蛋白含量(mg/wet g)

	健側	脱神経側
上清	L(-)*: 40±9(6)	44±5(6)
	L(+): 44±9(5)	48±8(5)
沈渣	L(-): 134±17(6)	118±15(6)
	L(+): 139±14(5)	120±6(5)

* L(-): ロイペプチニ非投与群,
L(+): ロイペプチニ投与群。

の投与、非投与にかかわらず両群で同一であった(表2)。

3) 脱神経筋に対する効果(表3)

脱神経による筋萎縮は SOL で最も著明で湿重量は健側の 52% に減少した。 EDL が最も軽度で 74% であった。 ロイペプチニ投与により SOL は 61% に ($p=0.07$)、 EDL は 81% に ($p>0.1$) に改善した。

4) 筋蛋白量(表4)

健側および脱神経側の TA 蛋白量を測定した。 脱神経により沈渣分画の蛋白がより減少する傾向を呈した。 上清および沈渣分画の蛋白はロイペプチニ投与により有意に変化することはなかった。

5) 筋線維直径に対する効果(表5)

筋線維直径は同体重ラットにもかかわらず個体差がかなり認められた。 それぞれの個体で筋線維 200-400 本について平均値を出した後で、その平

表 6 平均筋直径の比(脱神経側/健側、D/C)

	D/C
SOL	L(-): 0.70±0.11(5)
	L(+): 0.70±0.09(4) ($p>0.1$)
EDL	L(-): 0.87±0.06(5)
	L(+): 0.94±0.07(4) ($p>0.1$)

均について投与群と非投与群で比較検討した。 また脱神経側に関しては健側の直径に対する比で表現した。 非投与群の平均直径は EDL 37.4 μm , SOL 38.7 μm と両者に差はなかった。 脱神経により EDL は 87% に減じ、 SOL は 70% に減じた。 SOL で湿重量の減少が強いのに対応する所見である。 ロイペプチニ投与により健側では直径はやや増加の傾向を呈したが、有意差は認めなかった。 同様に脱神経側においてもロイペプチニ投与の効果はみられなかった。

考 察

ロイペプチニは前回同様にミニ浸透圧ポンプで 30 mg/kg/日 の予定で投与した。 骨格筋内の濃度は肝や血漿に比してかなり低値であった。 最近カテプシン B & L の 50% 活性抑制に必要なロイペプチニ濃度は 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とされた(石浦章一、私信)。 筋蛋白分解に関与する酵素がすべて知られているわけではないが、この知見からみれば、筋肉でも充分有効濃度内に達しているものと推定される。

今回の成績は、前回同様筋萎縮の阻止に非常に劇的といえる効果は観察されなかった。しかし SOL の筋萎縮に対しては軽度ではあるが有効性

表 5 平均筋線維直径(μm)

ロイペプチニ (-)			ロイペプチニ (+)		
Rat No.	SOL	EDL	Rat No.	SOL	EDL
368	40.2	34.6	363	40.2	34.3
369	42.5	40.8	364	39.3	34.3
370	33.8	34.1	366	45.3	46.0
371	38.3	37.5	374	43.0	36.9
372	38.5	40.0			
平均	38.7±3.2	37.4±3.0	平均	42.0±2.7	37.9±5.6

を示唆する所見を得た。また筋蛋白量や筋直径などのパラメーターに関しても検定上の有意差は認めないまでも、萎縮の経過を修飾する傾向を示唆するデータを得た。従来筋萎縮の治療に関する情報はきわめて乏しいことを考慮すれば、興味ある知見と思われる。今後このようなロイペプチニの作用を筋機能の面から検索することも重要と思われる。ロイペプチニ投与下でも筋萎縮は明らかに進行している。筋蛋白濃度は分解と合成のバランスの上に成り立っている。Goldspinkによれば、脱神経筋では蛋白分解と合成の両方が亢進しているとされた³⁾。もし本実験で蛋白分解が完全に抑制されなければ萎縮は生じないこととなる。それ故、①ロイペプチニにより影響をうけない蛋白分解が存在する。②ロイペプチニは蛋白合成をも抑制する（これは *in vitro* では否定されている）。③ *in vitro* と違って *in situ* ではロイペプチニは分解酵素を阻害しない、などの可能性を追求する必要があろう。

まとめ

脱神経後の実験的筋萎縮がロイペプチニ投与により修飾されるかどうかを検討した。筋組織内濃度はカテプシンB活性を阻止できる範囲に維持された。ひらめ筋の萎縮にはロイペプチニは若干有効であった。しかしロイペプチニ投与中でもいずれの筋肉においても筋萎縮は明瞭に進行していた。

どうして筋萎縮が進行するかは重要な問題であろう。

B. *In vitro* 筋収縮に対する影響

骨格筋を *in vitro* で反復収縮させると、劣化現象が生じてくる。この経時的劣化には種々の要因の関与が推定される。本実験ではこの劣化現象が蛋白分解酵素阻害剤であるロイペプチニ、ベスタチンやペプスタチンで修飾されるかどうかを検討した。

方 法

体重 80-100 g のウィスター系雄ラットの EDL (湿重量 30-40 mg) を使用した。摘出筋は直ちに混合ガス (95% O₂-5% CO₂) で飽和したクレブス-リングル液中にうつし、電気刺激により等尺性張力を記録した。電気刺激の条件は 1 Hz, 15 msec 持続、約 10 V 振幅の連続刺激を 60 分継続した。同時に 50 Hz, 15 msec 持続、10 V 振幅の強縮刺激を 10 秒ずつ 5 分ごとに反復し、強縮張力の時間推移を観察した（図 1）。筋長は単収縮が最大となるように調節した。電気刺激後筋肉および外液中の CPK 活性を測定した。CPK 測定にはベーリンガー社のキットを使用した。外液中の CPK 値は電気刺激中に平均約 50% 失活したためこれを補正した。クレブス-リングルの液組成は以下のように変更して使用した。118.1 mM

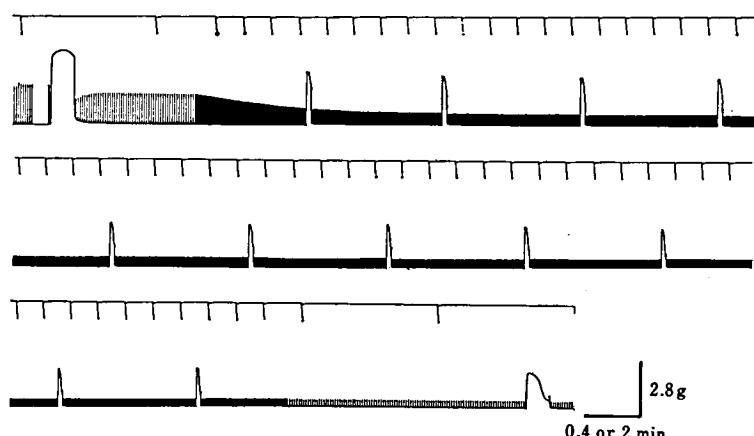


図 1 Decay in twitch and tetanus tension (rat-3 EDL)

NaCl, 3.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 11.1 mM glucose, 25 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM 還元型グルタチオン (pH 7.4) である。酵素阻害剤の最終濃度は、0.2 µg/ml ペプスタチン, 10 µg/ml ロイペプチノン, 2 µg/ml ベスタチンである。

結 果

1) 収縮特性 (表 7-10)

蛋白分解酵素阻害剤を含む溶液中では強縮張力 (P_0) は、105 g 重/wet g から 77 g 重/wet g に減少した ($p=0.05$)。twitch/tetanus の比は、両群間で差はなかった。60 分経過後の単収縮張力は約 20% に、 P_0 は約 30% に減衰した。両群に差は認められない。また筋拘縮のために基線は P_0 の約 10% 上昇した。これも両群で差を認めなかった。このように薬剤群で P_0 の低値以外には有意の差を認めなかった。

2) 筋 CPK 活性に対する効果 (表 11)

60 分の電気刺激中に筋 CPK 活性は 80-94% のレベルに減少した。しかしこの減少に対して薬剤の効果は認められなかった。また外液中の CPK 値測定からは筋内の 0.4-0.5% が漏出したと推定された。この漏出に対しても薬剤の効果は認められなかった。

考 察

In vitro で筋収縮を反復させると、標本の劣化が生ずることはしばしば経験される。この劣化には細胞膜機能の低下、細胞の機械的破損、細胞の ATP 供給の低下などの因子の関与が推定される。しかしこの因子が最も重要なのは知られていないと思われる。ジストロフィー筋の特性には、一部この自然の劣化に共通するものがあろうと想像される。そこで *in vitro* での劣化現象に対して蛋白分解酵素阻害剤の影響の有無を検討した。結果としてはこの種の薬剤により修飾されるものでないことが判明した。なお薬剤群で強縮張力の低下が認められた。薬剤添加より溶液の pH やイオン強

表 7 強縮張力 (g 重/wet g)

対 薬 剤 群	照 (n=5) 群 (n=5)	105±14* 77±21**
------------------	--------------------	--------------------

* 平均土標準偏差。

** $p=0.05$ 、なお 1 g 重 = 10 mN.

表 8 単収縮/強縮張力の比

対 薬 剤 群	照 (n=5) 群 (n=5)	0.52±0.06 0.56±0.03
------------------	--------------------	------------------------

表 9 電気刺激 60 分後の相対張力 (ゼロタイムの張力を 1.0 とした)

単収縮 強 縮	対 照 (n=5) 薬 剤 (n=4)	0.21±0.06 0.18±0.05
	対 照 (n=5) 薬 剤 (n=4)	0.32±0.09 0.30±0.11

表 10 電気刺激 60 分後の基線の上昇 (ゼロタイムの強縮張力に対する比で表現した)

対 薬 剤	照 (n=5) 群 (n=5)	0.08±0.06 0.12±0.07
-------------	--------------------	------------------------

表 11 電気刺激 60 分後の筋 CPK 活性値の喪失 (%)

対 薬 剤	照 (n=5) 群 (n=5)	23±22% 14±13%
-------------	--------------------	------------------

度が変化しないことは確認しており、よく説明できない現象であった。

ま と め

In vitro で筋肉を連続刺激により反復収縮させ、その経時変化（劣化）と筋肉 CPK 値の変化を測定した。ロイペプチノン、ベスタチン、ペプスタチンの投与はこの劣化現象を修飾することはなかった。

文 献

- 高木昭夫, 楢中征哉, 水沢英洋, 助川卓行, 安部和子, 小川敬子. ラット実験的筋萎縮に対するロイペプチノンの影響. 厚生省新薬開発研究(梅沢班), 昭和 55 年度研究報告書, pp. 63-66 (1981).
- 高木昭夫, 楢中征哉, 石浦章一, 宮沢 寛. 脱神経による実験的筋萎縮に対するロイペプチノンの効果. 厚生省新薬開発研究(梅沢班), 昭和 56 年度研究報告書, pp. 57-60 (1982).
- Goldspink, D. F. The effects of denervation on protein turnover of rat skeletal muscle. *Biochem. J.* 156, 71-80 (1976).

塩酸ブピバカイン（マーカイン）処理による筋崩壊と筋再生に対するロイペプチソの影響

塙 中 征哉*

研究協力者 石浦 章一*・藤田 武久*・高木 昭夫*

進行性筋ジストロフィー骨格筋の主病変は筋線維の壞死である。壞死に続いて活発な再生もみられることが知られている。すなわち、筋ジストロフィーの病理は筋線維の壞死と再生の繰り返し像をみていることになる。筋ジストロフィーの進行を阻止するためには、あるいは阻止しないまでも進行を遅らせるには、筋線維の壞死を抑制するか、あるいは再生を促す方法が考えられる。

ロイペプチソは筋崩壊に何らかの形で関与すると考えられているプロテアーゼ、とくにチオルブロテアーゼの活性を抑えるため、本剤の投与は筋壞死の過程を抑制ないし阻止するのではないかと期待されている。しかしながら動物実験での成績はまだすべてが満足すべきものではない。筋ジストロフィー鶏、筋ジストロフィーマウス何れを使用した実験でも、効果を認めたとするもの^{1,2)}と無効とするもの^{3,4)}がある。これらのモデル動物では進行性筋ジストロフィーといつてもヒト、とくに Duchenne 型筋ジストロフィーとは異なるところが多い。そのために動物で無効といつても、それが必ずしもヒトに無効というわけではない。またその逆もいえる。私たちは今まで筋ジストロフィー鶏や筋ジストロフィーハムスターを使用し、ロイペプチソの治療効果を主として病理学的にみてきたが、満足すべき結果を得なかつた。

今回は塩酸ブピバカインをラット骨格筋に注射

し、筋線維の壞死を起こさせ、その壞死に対するロイペプチソの影響をみた。壞死の後に筋線維は速やかに再生するが、その再生に対する影響をも検索した。塩酸ブピバカインは局所麻酔剤であるが、本剤は筋線維への毒性が強く、筋線維のみ選択的に障害する。血管、末梢神経、筋衛星細胞、神經筋接合部は障害しないため速やかな均一な再生線維が得られることでも知られている⁵⁻⁷⁾。

対象と方法

対象としたのは約 250g の Wistar 系雄ラットである。

ロイペプチソ治療群ではロイペプチソが 50mg/kg/日となるように miniosmotic pump 2002 (Alza, California) をラット背部皮下に挿入した。挿入後、24-48 時間後に左室よりロイペプチソの血中濃度測定のため採血した。一部のラットはその直後に 0.1%，あるいは 0.5% 塩酸ブピバカイン約 0.5ml をヒラメ筋内に注射した。

注射後 48 時間、7 日、14 日目にヒラメ筋を採取し、右は生化学用に左は組織学用に固定した。対照としたのは、①塩酸ブピバカイン注のみのもの、②ロイペプチソのみ投与し塩酸ブピバカイン④のないもの、③全くの無処置の、3 種である。検体を採取する際にもロイペプチソの血中および筋内濃度を測定するため、左室からの採血と、腓腹筋の採取を行つた。

* 国立武藏療養所神経センター

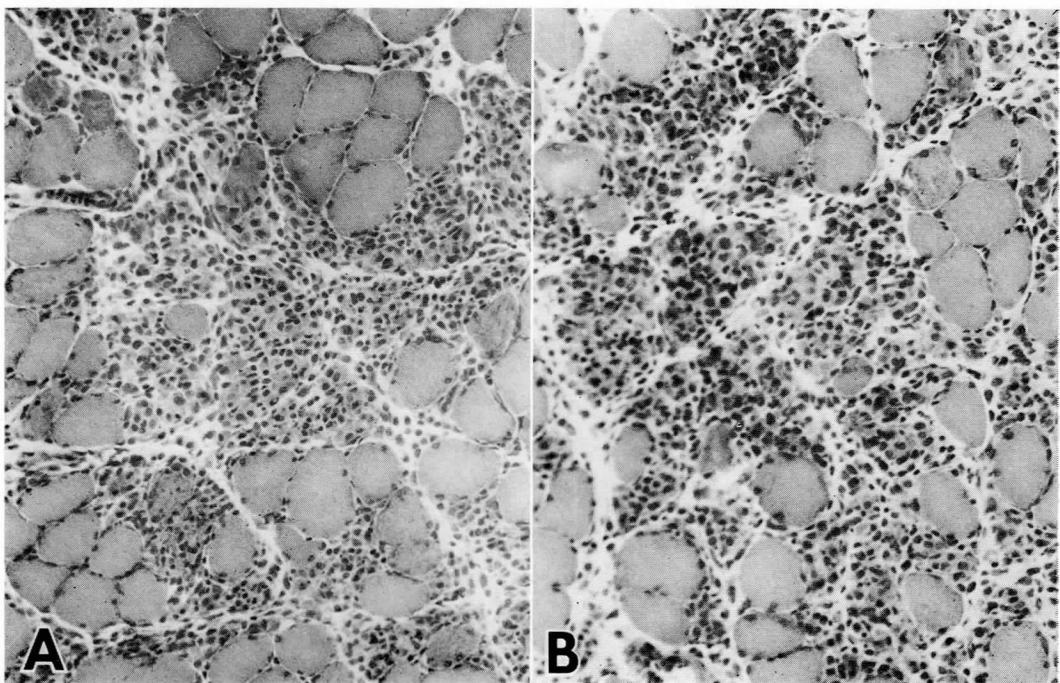


図 1 0.1% 塩酸ブピバカイン注射後 48 時間. 筋線維はかなり残ってはいるが, 広範囲の壊死部を認める. それはロイペプチニ未処理 (A) でも治療中 (B) でも壊死の量, 質には差はない. HE 染色, $\times 150$.

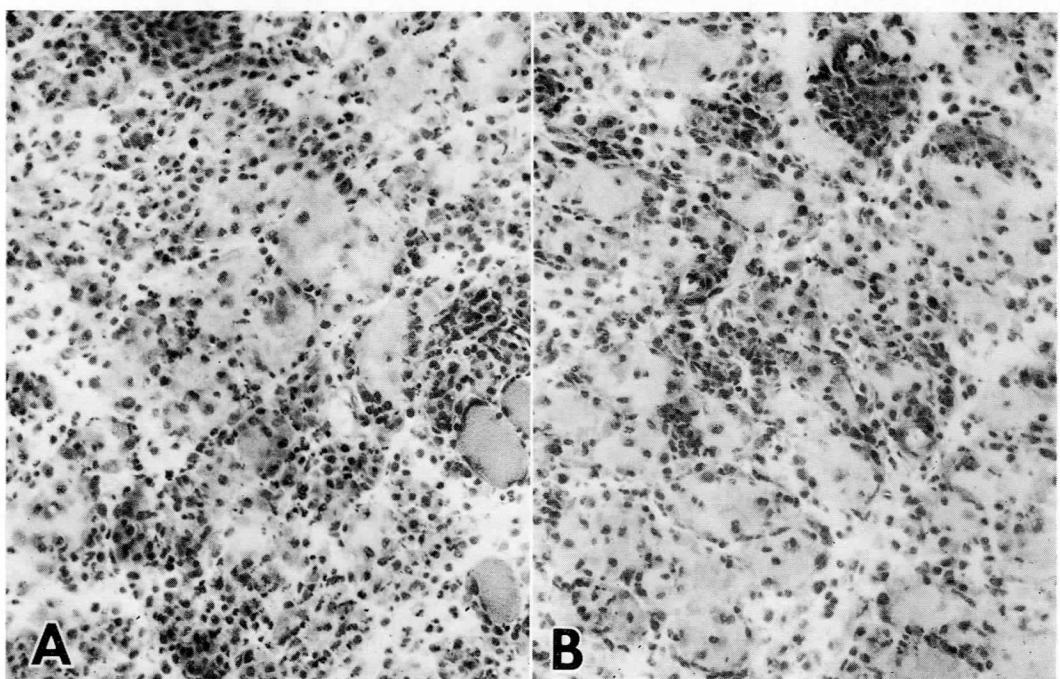


図 2 0.5% 塩酸ブピバカイン注射後 48 時間. ほとんどすべての筋線維は壊死に陥り, 強い貪食反応を伴っている. ロイペプチニ治療 (A) と対照 (B) の間に差はない. HE 染色, $\times 150$.

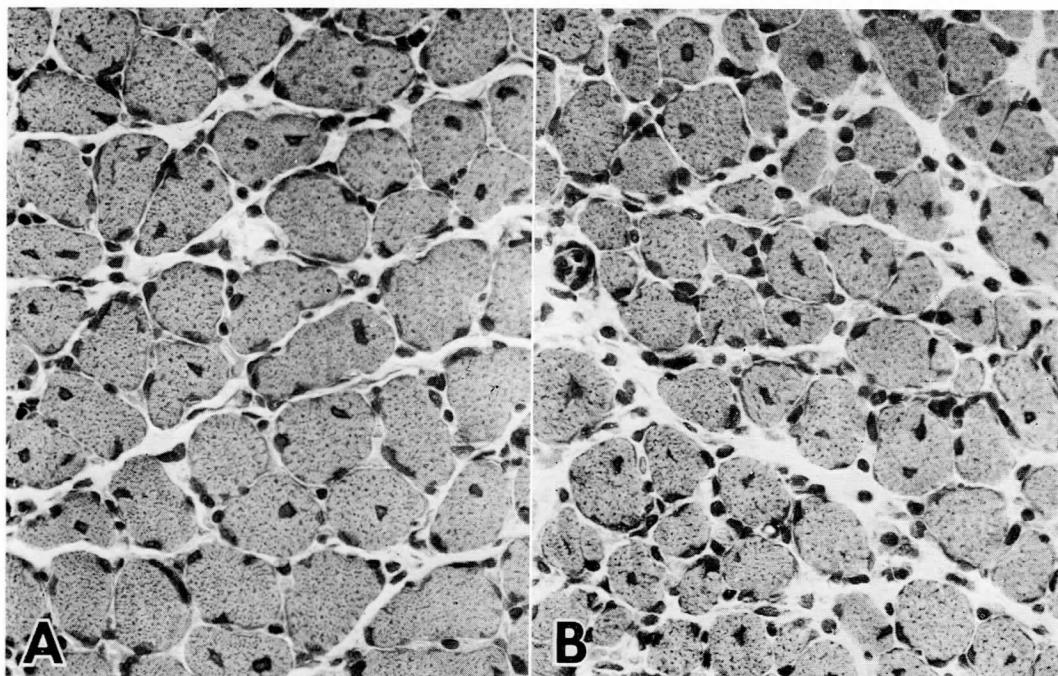


図 3 0.5% 塩酸ブピバカイン注射後 7 日目。塩基好性の胞体と大型の中心核、核小体の存在によって特徴づけられる再生線維。対照 (A) に比べロイペプチの治療群 (B) でその直径が小である。HE 染色, $\times 300$.

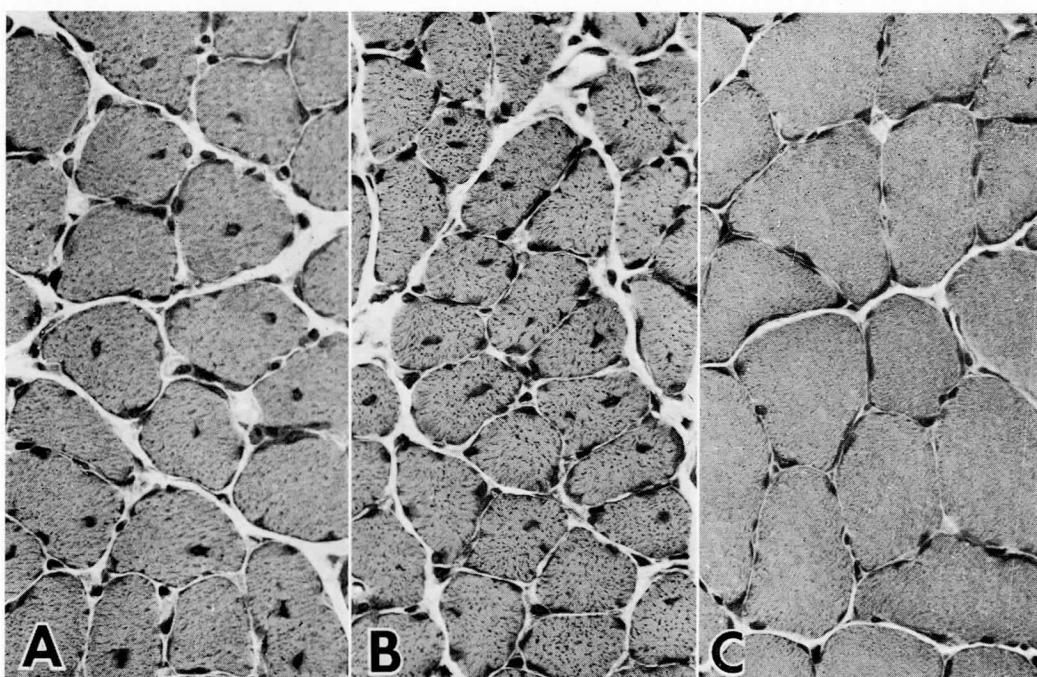


図 4 0.5% 塩酸ブピバカイン注射後 14 日目。再生筋は著しくその径を増している。対照 (A) に比べ、ロイペプチの治療群 (B) ではその直径は小である。未処置の筋 (C) を参考までにつけ加えた。HE 染色, $\times 300$.

左ヒラメ筋は前脛骨筋とともにトラガカントゴムでコルク栓上にたて、液体窒素で冷却したイソペンタンで直ちに凍結固定した。凍結連続切片にヘマトキシリン・エオジン(HE), Gomori trichrome変法, NADH-TR, 酸フォスファターゼ染色を行い、一部の筋には ATPase (pH 10.3, 4.5, 4.3 前処理)を行った⁸⁾。再生筋の状態を数量的に検討するため、各個体の HE 染色標本より最終倍率 250 倍の写真を作成し、200 本ずつの筋線維径を MOP 2 (Kontron) にて測定した。

生化学的分析

ヒラメ筋を 10 倍量の PBS-0.1% Triton X-100 液にてホモジナイズし、遠心後上清を採取し粗抽出液とした。Triton X-100 の添加により筋全体の 95% 以上のライソゾーム酵素が上清に回収され、本法が適当であることが確認された。

ロイペプチドの標的酵素であるカテプシン B & L は、Suc-Tyr-Met-Naphthylamide (NA) を基質とする勝沼の方法で測定した。そのほかは既報によった⁷⁾。

結 果

1) 組織学的および組織化学的所見

a) 0.1% 塩酸ブピバカイン注：0.1% の塩酸ブピバカインを注射したヒラメ筋（5 匹全例）では局所的に筋線維の壊死像を認め、48 時間後では強い貪食反応を伴っていた（図 1A）。しかし大半の筋線維は壊死に陥らず健在であった。

ロイペプチドをあらかじめ miniosmotic pump で与えていたラット 5 匹全例にやはり非治療群と同様の変化を認めた。壊死線維は散在し、強い貪食細胞の侵入があった（図 1B）。

注射後 7 日目、14 日目には非治療群（おのおの 5 匹ずつ）、治療群（おのおの 5 匹ずつ）何れにも活発な再生像があった。その再生線維の形態は両者間にあまり大差ないように思われた。再生線維は散在性であり、数も少なく、両群間での数量

的検討はなしえなかった。

b) 0.5% 塩酸ブピバカイン注

① 筋線維の壊死：0.5% 塩酸ブピバカインをヒラメ筋に注射すると、ほとんどすべて（95% 以上）の筋線維は例外なく壊死に陥った。48 時間後にはほとんどすべての壊死線維は貪食細胞で満たされ、間質も浮腫状で多数の多核球、単球の浸潤をみた（図 2 A）。この貪食細胞はすべて酸フォスファターゼで強く陽性であった。末梢神経や筋紡錘はよく残存し、形態学的に異常を認めなかつた。

ロイペプチドをあらかじめ投与したラット（8 匹）全例にやはり同様の壊死、貪食細胞の侵入を認め（図 2 B），投与群、非投与群の間に形態学的な差を認めなかつた。

② 再生線維：壊死した筋線維は貪食細胞で清掃されるが、それと同時に再生が始まり、注射後 4 日目頃より再生線維としての特徴を備え始め、7 日目では明らかな再生線維と確認できた。それはロイペプチド非投与群（図 3 A）でも、投与群（図 3 B）でも形態学的に明らかな差はなかつた。すなわち、塩基好性の胞体をもち、やや大型で細胞体の中心に位置する核、明瞭な核小体がしばしば存在した。この頃はまだ筋線維は未分化で ATPase でもタイプ 1, 2 タイプ 2 線維の区別はなかつた。ロイペプチド治療群（7 匹）、非治療群（8 匹）で 7 日目に線維径を測定したところ、前者は平均 $24.4 \pm 5.3 \mu\text{m}$ 、後者は $29.0 \pm 5.5 \mu\text{m}$ （前者 1,400、後者 1,600 本の筋線維径平均とその偏差値）となり、前者のほうが線維径は小であった ($p < 0.01$)（表 1）。

塩酸ブピバカイン注後 14 日目には再生線維はその径を著しく増し、ロイペプチド治療群（8 匹）で平均直径 $29.9 \pm 6.4 \mu\text{m}$ 、非治療群（8 匹）で $36.5 \pm 6.2 \mu\text{m}$ となっていた。その径はやはりロイペプチド治療群で有意に小であった ($p < 0.01$)。ロイペプチド治療群のほうが再生線維は細かった

表 1 筋線維径 (μm) 分布

塩酸ブピバカイン処理後日数 群	0 日 目	7 日 目	14 日 目
ロイペプチジン 50 mg/kg/日			
塩酸ブピバカイン (−)	46.9 ± 8.8	46.7 ± 8.4	47.9 ± 7.8
塩酸ブピバカイン (+)		24.4 ± 5.3*, **	29.9 ± 6.4*, **
対 照			
塩酸ブピバカイン (−)		48.3 ± 8.0	49.5 ± 9.4
塩酸ブピバカイン (+)		29.0 ± 5.5*	36.5 ± 6.2*

* 再生線維径. ** $p < 0.01$

が、細胞内の形態に差はなく(図 4)、7 日のときと同じく中心核を高頻度に認める塩基好性の線維であった。また組織化学的には両群の再生線維とも未分化であった。

ロイペプチジンをラットに投与するとラットの体重はやや減少するが、塩酸ブピバカイン非処理筋ではとくに変化はなく、また筋線維径を減ずるような傾向もみられなかった。

2) 生化学的所見

0.5% 塩酸ブピバカイン処理後、48 時間後にはカテプシン B & L の活性が正常の 10 倍以上に上昇することが明らかになった。同様にライソゾーム酵素であるカテプシン D (4 倍), α -ガラクトシダーゼ (4 倍), 酸フォスファターゼ (2 倍) などが上昇し、48 時間目にみられる筋構造蛋白質の減少は、これらの酵素の上昇と密接な関係があるものと考えられた(図 5)。

このライソゾーム酵素の上昇は以後 7 日まで継続し、筋の再生とともに減少していくことが判明した。0.1% の塩酸ブピバカイン投与においては、活性上昇の程度が 0.5% より軽微であった。

これらの生化学的变化に対するロイペプチジン投与の結果は以下の通りであった。

- 1) ロイペプチジンはマクロファージ由来のカテプシン B & L の上昇を抑えなかった。
- 2) ただし、*in vitro* ではロイペプチジン (0.01 mM) は完全に Suc-Tyr-Met-NA 水解活性を抑制した。

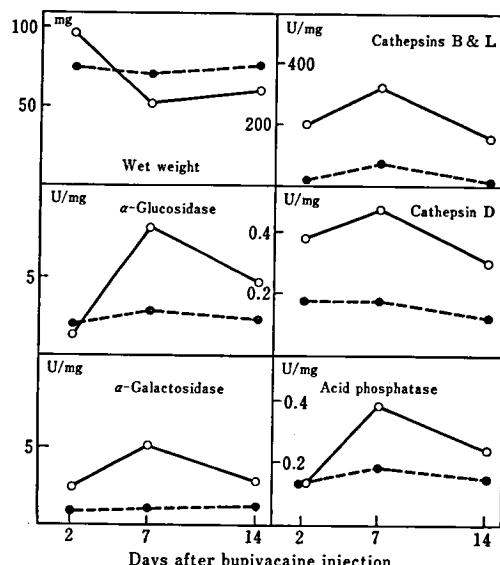


図 5 ロイペプチジン負荷中のヒラメ筋重量およびライソゾーム酵素活性の経時的変化。○塩酸ブピバカイン筋筋, ●未処置筋。

3) ロイペプチジンは筋肉内の他のライソゾーム酵素の活性は多少上昇させるが、ほとんど影響を与えたなかった。

4) ロイペプチジンと塩酸ブピバカインを同時に筋内投与した場合、初期の筋崩壊 (Z 線の遊離) はある程度抑制された。

考 察

ロイペプチジンが筋ジストロフィーの筋崩壊に関与すると考えられているチオルプロテアーゼ酵素の活性を抑制することは *in vitro* の実験で確かめられている。しかし *in vivo* での効果はまだ確定

的でない。その理由の一つとして、ヒトの筋ジストロフィーと等価とみなされるようなよいモデル動物が見いだされていないことがあげられる。

筋ジストロフィー鶏では筋の崩壊機序がヒト筋ジストロフィーと大きく異なっているのではないかと考えられている⁹⁾、筋ジストロフィーハムスターは筋線維壊死後の再生が活発で、筋壊死をよく代償しているので筋力低下がほとんどみられない。また筋ジストロフィーマウスでは神経系の異常がみられるし、何れのモデル動物も個体差が大きく効果の判定が大変困難であった。

局所麻酔剤である塩酸ブピバカインによる筋の崩壊過程は、ヒト筋ジストロフィーにみられるそれと類似していることが最近指摘されている⁵⁻⁷⁾。塩酸ブピバカインは筋の膜にまず何らかの障害を加えるため、筋線維の過収縮 (opaque 線維) をみ、次いで筋線維内に増加する Ca^{2+} の存在が組織化学的に確かめられている⁹⁾。塩酸ブピバカインを注射して数時間で Z 線蛋白である α -アクチニンの遊離をみ、次に筋原線維は断裂する。24 時間目頃より貪食細胞が壊死線維内に侵入し、48 時間目には最も活発な貪食反応を見る。

塩酸ブピバカインは末梢神経、血管、筋衛星細胞を侵さないため速やかな再生をみることができる^{7,10)}。注射後 4 日目には中心核をもつ、好塩基性の再生線維として認めることができる。塩酸ブピバカイン注では筋線維のみ壊死させ、周囲の組織は侵されないので再生線維は大小不同が少なく均一であり、経時にきわめて高い再現性を示す¹⁰⁾。0.5% 溶液をラットのヒラメ筋に注射するとほぼ 100% の筋線維が壊死に陥り、再生する。0.1% 液では壊死は局所的であり、0.01% 液では壊死のない場合もあり、壊死があっても狭い範囲に限られる。今回 0.5% 塩酸ブピバカイン液を使用したのは確実に筋線維を壊死させるためである。

塩酸ブピバカインによる筋の壊死はあまりに激

烈であり、筋ジストロフィーのときの壊死はもっと緩やかなものと思われ、全く同一視はされえない。しかしロイペプチドが筋の壊死と再生に何らかの働きをしているとするならば、本実験モデルに何らかの形で影響を与えるはずである。そのような考えで本実験を行った。ロイペプチドは 50 mg/kg/日 となるよう miniosmotic pump を使用した。

ロイペプチドの大量はラットの体重を減少させたが、2 週間では重篤な副作用はなかった。pump 插入後 48 時間目とロイペプチドの血中濃度が十分上昇したところで塩酸ブピバカインを注射した。0.1% 液のときも 0.5% のときも壊死・貪食反応に対しては形態学的に何らの影響もなかった。これは、筋の壊死があまりにも激烈であるので、ロイペプチドの影響の有無はとても判断できなかつたことによると思われる。再生線維はロイペプチド投与群で明らかに小径で、再生現象が抑制されていた。このことの意味は不明であり、今後の検討が必要であると思われた。進行性筋ジストロフィーでは活発な再生があるのに病気が進行するのは、再生が壊死を十分代償しないからと考えられている¹¹⁾。もしロイペプチドが再生を遅延させると、筋ジストロフィー患者への投与は慎重を期さねばならないことになる。

本研究で生化学的に目的としたところは、ロイペプチドが *in vivo* で標的酵素活性を抑制するか否かである。今回の実験で筋肉の崩壊に主として関与するのは、非筋細胞由来のライソゾーム酵素であることが明らかになったが、miniosmotic pump でロイペプチドを持続的に投与しても、その活性を低減させることは不可能であった。*in vitro* ではロイペプチドは Suc-Tyr-Met-NA 水活性を抑制するのに、*in vivo* ではカテプシン B & L の上昇を抑えないのは、ロイペプチドがマクロファージに十分とり込まれないためであろうと考えられる。

ロイペプチノ投与で肝細胞のライソゾーム酵素活性の上昇が報告されている。その傾向が骨格筋でも認められたが、これは50mg/kg/日という大量投与の結果と思われた。

ロイペプチノと塩酸ブピバカインを同時に筋注すると、細胞内ロイペプチノ濃度が一気に上昇して、早い時期に起こるZ線の消失が抑えられた。これは、細胞内のCa依存性プロテアーゼを阻害した結果であると考えられる。

筋壊死は、最初Ca依存性中性プロテアーゼのような筋肉蛋白分解酵素によりまず構造蛋白の崩壊をみ、次に変性した筋原線維は貪食細胞のカテプシンなどライソゾーム酵素により貪食清掃される。理論的には第1段階の筋の崩壊が抑制されることが理想的である。今回の実験で高濃度のロイペプチノがあれば、Ca依存性中性プロテアーゼの活性が抑制され α -アクチニンの遊離が抑えられることが分った。しかし、これは同時に注射するなどかなり限定された条件下である。

もし筋線維が壊死に陥ったときは貪食細胞による速やかな壊死部の貪食と清掃が必要である。というのは、貪食反応があってこそそれに続く再生があるからである。その意味ではカテプシンなどのライソゾーム酵素活性の抑制がないほうがよい。ロイペプチノはその酵素活性を抑えないので理想的である。しかしながらロイペプチノ投与した群では再生線維はロイペプチノ非投与群に比べ小径で明らかな再生の遅れがある。このことは、ロイペプチノが高濃度すぎることによるのかも知れない。いずれにしても、ロイペプチノがもっと筋線維内に高濃度に入り、第1段階の筋の壊死を少しでも抑制する方法を開発することが必要であると思われた。

文 献

- 1) Stracher, A., McGowan, E. B., and Shafiq, S. A. Muscular dystrophy : Inhibition of degeneration *in vivo* with protease inhibitors. *Science* **200**, 50-51 (1978).
- 2) Sher, J. H., Stracher, A., Shafiq, S. A., and Hardy-Stashin, J. Successful treatment of murine muscular dystrophy with the proteinase inhibitor leupeptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **78**, 7742-7744 (1981).
- 3) Enomoto, A. and Bradley, W. G. Therapeutic trials in muscular dystrophy. III. Studies of microbial proteinase inhibitors in murine dystrophy. *Arch. Neurol.* **34**, 771-773 (1977).
- 4) Nonaka, I., Ishiura, S., Takagi, A., and Sugita, H. Therapeutic trial with protease inhibitor (leupeptin) in chicken muscular dystrophy. A histologic and histochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **58**, 279-285 (1982).
- 5) Benoit, P. W. and Belt, W. D. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anesthetic, bupivacaine (Marcaine). *J. Anat.* **107**, 547-556 (1970).
- 6) Jirmanová, S. and Thesleff, S. Ultrastructural study of experimental muscle degeneration and regeneration in the adult rat. *Z. Zellforsch.* **131**, 77-97 (1972).
- 7) Nonaka, I., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H., and Sugita, H. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride(Marcaine). *Acta Neuropathol. (Berl.)*, in press.
- 8) Dubowitz, V. and Brooke, M. H. Muscle Biopsy. A Modern Approach. Saunders, London (1973).
- 9) Nonaka, I. and Sugita, H. Intracytoplasmic vacuoles in α W fibers of dystrophic chicken muscle ; probable early pathologic event initiates massive fiber necrosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **55**, 173-181 (1981).
- 10) 小林繁一, 鴨下重彦, 塙中征哉. Bupivacaine筋注による実験的筋再生現象の組織化学的研究. 臨床神経 **22**, 1191 (1982).
- 11) Nonaka, I., Takagi, A., and Sugita, H. The significance of type 2C muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **4**, 326-333 (1981).

筋ジストロフィー動物の生産・供給

野 村 達 次^{*1}

研究協力者 梅沢 英彦^{*2}・齊藤 宗雄^{*1}

1. 筋ジストロフィーチキンの飼育・生産

前年度に引き続き、筋ジストロフィー症ニワトリ（筋ジスチキン）の維持ならびに繁殖を、山梨県小淵沢町の財団法人日本生物科学研究所（日生研）附属実験動物研究所に委託し、今年度は、NH 413 および、NH 412 系の種卵約 3,000 個を生産し研究班員へ供給した。

一方、筋ジスチキンの飼育管理法の開発については、やがては微生物的にクリーンな動物の生産をはかるために、ビニールアイソレータを用いての飼育を試み良好な成績を得た。

2. 筋ジストロフィーハムスターの供給と改良

筋ジスハムスターは、BIO Research Consultantsにおいて、1960 年代 NIH, USA から導入したハムスターを基に、各種近交系やミュータント系を育成する過程で発見されたものである。

この筋ジスハムスター約 400 匹を BIO Research Consultants から輸入し班員に供給した。

一方、輸入できる筋ジスハムスターは BIO 14.6 系のオスに限られ、しかもその対照として使用できる正常ハムスターは BIO 87.20 のメスと BIO 1.5 のオスの交雑 F_1 , BIO F_1B であり、両者は遺伝的背景をまったく異にし、実験に使用

するうえで疑問がある。そこで、これらのハムスターの改良を開始した。

1) 正常ハムスター系統へ *my* 遺伝子を導入した筋ジスハムスター系の育成

ハムスターにおける筋ジストロフィーは、劣性 *my* 遺伝子で遺伝し、そのホモ型 *my/my* で発症する。*my* 因子を正常ハムスター系統に導入するには、次のような方法がとられている。

すなわち、まず、筋ジス系統 *my/my* と既存の正常近交系ハムスター $+/+$ を交配し、 F_1 動物 $+/my$ を得る。この F_1 動物間の交配 $+/my \times +/my$ により、*my/my*, $+/my$, $+/+$ のいずれかの因子を持つ仔動物群を得る。この中から、筋ジスの場合舌端に白斑を生ずることから、舌端の観察により *my/my* を選ぶ。この *my/my* に再び上述の正常ハムスター $+/+$ を交配し、 $+/my$ 動物を得る。以後、同様にして世代を重ねることにより、*my* 因子を徐々に既存の近交系ハムスターに導入することができる。

この方法は、既存の近交系ハムスターをコントロールとして使用するため、そのハムスターの従来の生理的特性を参考とすることができます。しかし、この方法により、遺伝的背景が近似した筋ジスハムスターを育成するには、戻し交配 7 回以上、期間は最短でも 3-4 年必要である。

^{*1} (財) 実験動物中央研究所

^{*2} (財) 日本生物科学研究所

2) 筋ジスハムスター BIO 14.6 に正常遺伝子を導入した系統（コントロール）の育成

筋ジスハムスターのコントロールとしては、既存の筋ジス系統から、*my* 因子を除くことによっても、遺伝的背景の均一な系統を育成することができる。

筋ジスハムスター *my/my* と正常ハムスター $+/+$ を交配し、 F_1 動物 $+/my$ を得る。この $+/my$ に筋ジスハムスター *my/my* を交配し、 $+/my$ と *my/my* のいずれかの因子を持つ仔動物を得る。筋ジスハムスター *my/my* は舌端に白斑を生ずることから、舌端を観察し、 $+/my$ を選ぶ。この $+/my$ にまた *my/my* を交配する。このような交配により世代を重ねることによって、正常因子を BIO 14.6 へ導入、すなわち、BIO 14.6 から *my* 因子を除くことができる。

この方法では前述の正常ハムスターへの *my* 因子の導入に比べ、世代は約倍の早さで進めることができある。

3. 今後の方向

単一遺伝子で遺伝する形質または因子を、他の正常動物に導入する戻し交配は、マウス等で通常行われているが、ハムスターで行った例は少ない。今後、前述の戻し交配の過程でどのような障害があるか不明である。たとえば、筋ジス因子が他の系統に導入されることによって、その表現型が変わり、筋ジスの発症の程度、舌端の白斑の状態、ならびに繁殖力等に影響することが考えられる。

これらは、今後、育成の過程で解決しなければならない問題である。

DMDに対するベスタチン投与効果

三吉野 産 治*

研究協力者 坂口正実*・足立尚登*・折口美弘*

表 1

目的

ベスタチンの Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) に対する臨床効果および副作用を検討するために、入院中の DMD 患児 13 人にベスタチン投与を行った。

方 法

表 1 に示すように、年齢 4-9 歳、stage 1-2 の DMD 患児 13 人を対象とした。ベスタチンは、Ausberger 式を用い成人量 30 mg/日 に相当する量を 10% ドライシロップの形で 1 カ月間連日の朝 1 回投与を行った。1 カ月の休薬の後 2 倍量に增量し、同様の方法で 4 倍量すなわち成人量にして 120 mg/日 に相当する量まで增量を試みた。各症例における投与量は表 1 に示す。

臨床効果および副作用の判定は以下のとく行った。

- 1) 生化学的には血清 CPK 値を内服期間中 1 週毎に継続的に測定した。
- 2) 運動機能評価として日常生活動作 (ADL ; 整形外科的筋ジストロフィー症 ADL テスト、厚生省基準)、立ち上り時間 (立ち上り動作をビデオ記録し、再生画像で動作時間を 3 回測定し平均時間を求めた)、階段昇降、10 m 走を指標とした。
- 3) 副作用の検討には皮膚症状、消化器症状、

No.	Name	Age	Sex	Stage	Regimen (mg/day)			
					A	B	C	D
1	T. E.	4y	M	1	12	25	36	50
2	K. F.	6y	M	1	—	25	36	50
3	M. T.	6y	M	1	12	35	36	50
4	T. S.	6y	M	1	12	25	36	50
5	M. A.	6y	M	1	12	25	36	50
6	K. Y.	7y	M	1	15	30	45	60
7	T. I.	8y	M	1	15	30	45	60
8	K. E.	9y	M	1	16	32	50	65
9	H. K.	4y	M	2	12	25	36	50
10	M. M.	5y	M	2	12	25	36	50
11	H. K.	8y	M	2	15	30	45	60
12	M. O.	8y	M	2	15	30	45	60
13	Y. T.	8y	M	2	15	30	45	60

精神神経症状その他的一般状態および早朝尿による一般検尿、一般検血、血清電解質、血沈、血清蛋白値、肝機能の測定を行った。

結 果

各投与期間における血清 CPK 値の推移は (図 1-4)，個々の症例でみるといったん増加した後に減少するもの、ほとんど変化のないもの、逆に減少した後再び増加するものがあるなど一定しない。

これを平均値の推移でみると、内服 1 週間後の CPK 値は投与期間 A-D のすべてにおいて有意に減少しているが、1 週以降の値は増加あるいは減少と一定の傾向はない (増加および減少はいず

* 国立療養所西別府病院小児科

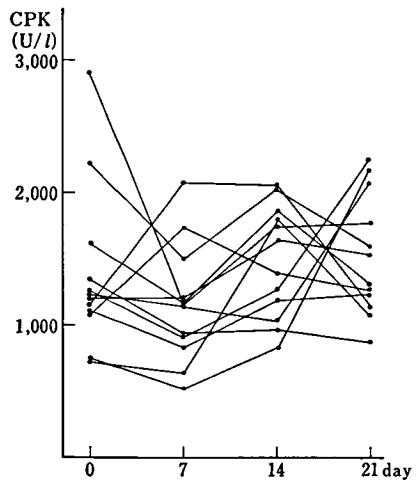


図 1 Regimen A

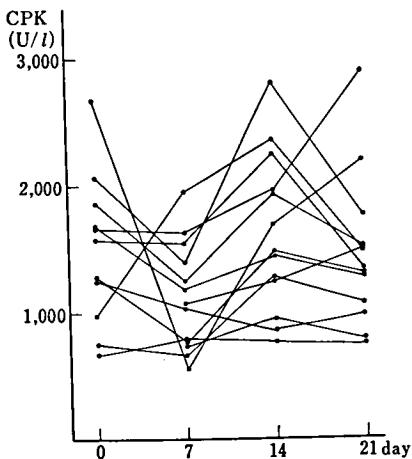


図 4 Régimen D

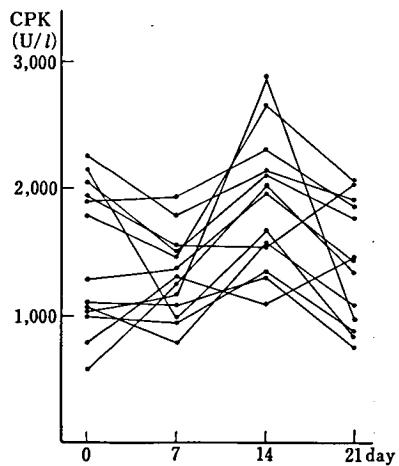


図 2 Regimen B

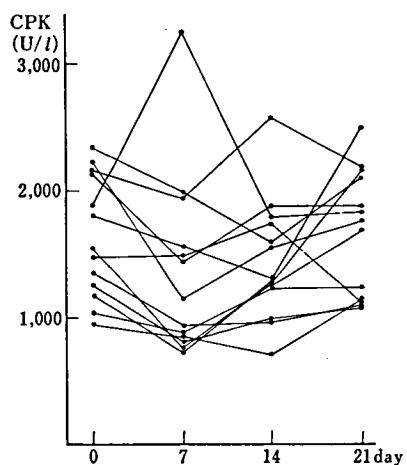


図 3 Regimen C

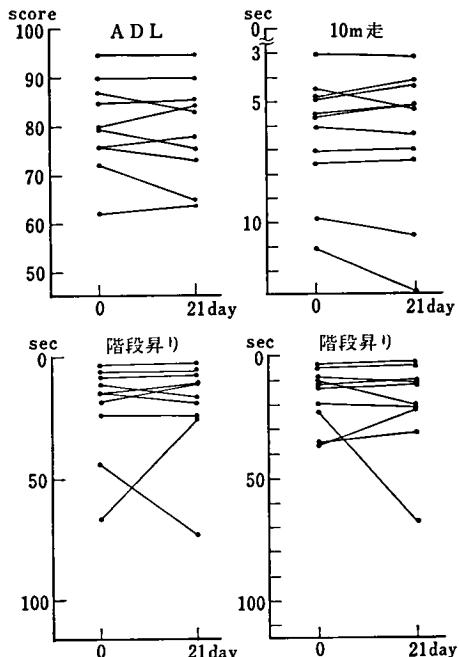


図 5 Regimen A での測定値の推移

れも投与前値に対する差で、5% 危険率で有意と判定される)。次に、投与期間中の運動機能評価、すなわち ADL、階段昇降、10 m 走、立ち上り時間の推移(図 5-9)をみると、1, 2 例を除いてほとんどベスタチン内服の影響はみられない。この関係は平均値の推移(図 10, 図 11)でみると一層明瞭となる。立ち上り時間は投与期間Cにおいて、むしろ有意に延長している。

DMD に対するペスタチン投与効果

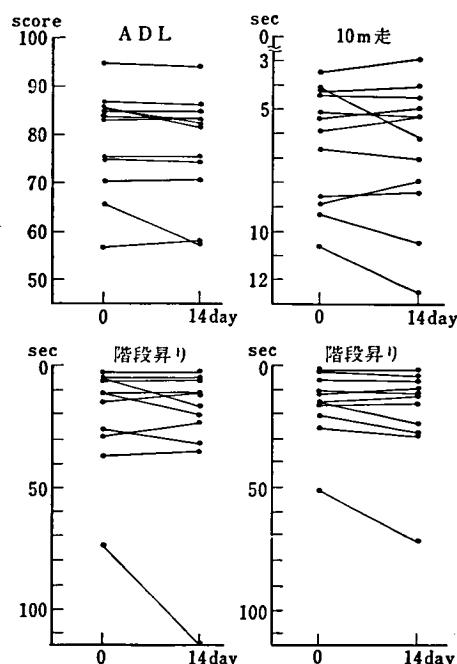


図 6 Regimen B での測定値の推移

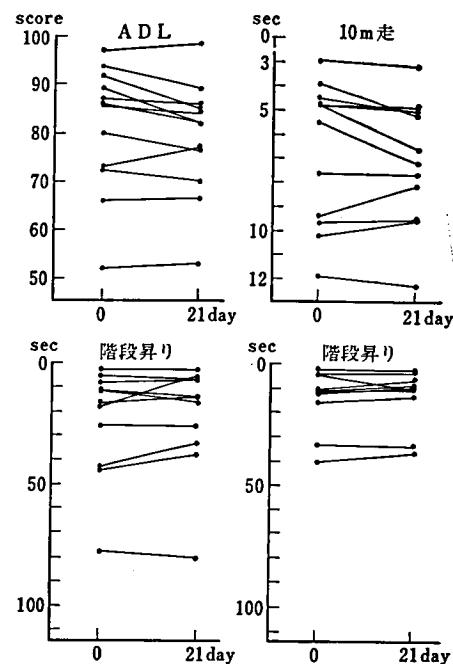


図 7 Regimen C での測定値の推移

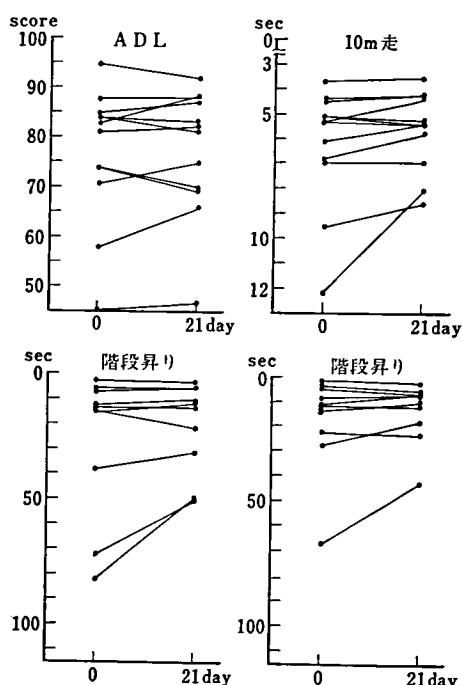


図 8 Regimen D での測定値の推移

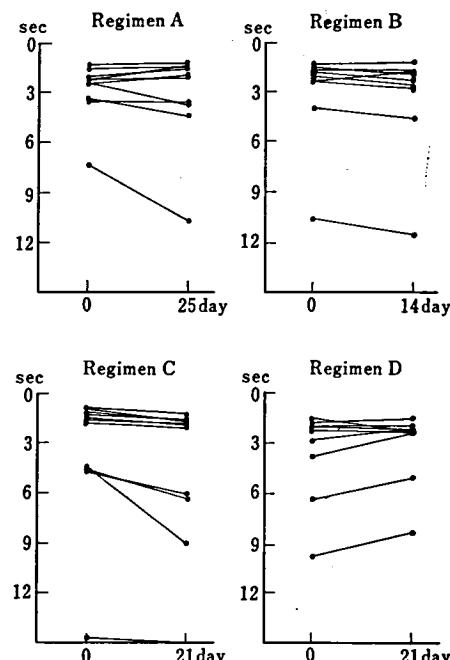


図 9 立ち上り時間の推移

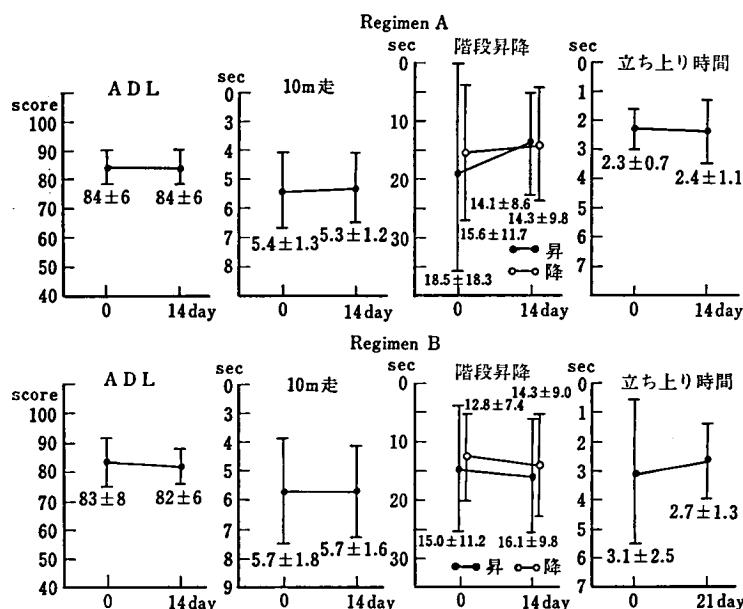


図 10 ベスタチン投与による測定値の推移 (平均±S. D.)

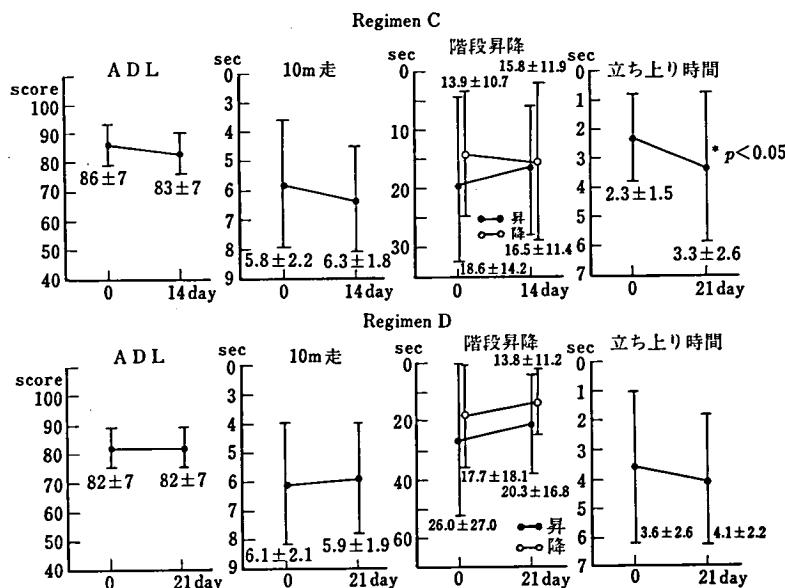


図 11 ベスタチン投与による測定値の推移 (平均±S. D.)

副作用に関しては、インフルエンザ流行と時期を同じくしたため、13例中5例の熱発者を認めたが、他の入院中のDMD患児と比較し経過に大きな相違はなかった。発疹、瘙痒、出血斑等の皮膚症状、腹痛、下痢、嘔気等の消化器症状、お

よび興奮、頭痛、眩暈等の精神神経症状など特別な異常は認めなかった。一般検尿（蛋白、糖定性、ウロビリノーゲン、および沈渣）、一般検血（Hb、Ht、赤血球数、血小板数、白血球数および分画）、血清電解質（Na, K, Cl, Ca）、血清総蛋白量およ

DMD に対するベスタチン投与効果

び分画、血沈は投与開始前後で変化はみられなかった。また、肝機能は CCLF, ZTT, TTT, γ -GTP, LAP, Al-P について検討したが、いずれも正常範囲での変動だった。

考 察

本研究ではベスタチンの 1 カ月間連日の朝 1 回投与を行ったが、期待された程の効果は認められなかった。本来、DMD とくに stage 1-2 という早期の例では血清 CPK 値の変動が大きく、投与期間 A-D のすべてにおいて CPK の平均値が内服開始 1 週間後に減少している事実も、その後の値に一定の傾向がないことを考えると、ベスタチンの効果とみるには無理がある。また、ADL そ

の他の運動機能は変化が緩徐であり、かつ変動があるため、1 カ月という短期間の結果で結論を出すことは危険である。今回は血中濃度に関する報告を割愛したが、有効血中濃度が未だ不明であり、かつ一定の血中濃度を維持すべきか否かも明らかでないため投与量の決定は難しく、また朝 1 回投与という形式に固執する必要もない。しかし、成人量 120 mg/日 に相当する量まで增量しても目立った副作用がないことから、より大量かつより長期の投与が可能と考えられる。今後は症例数を増やすとともに、血中濃度の解析結果と照し合せ、新たなプロトコールを計画し研究を進める方針である。

筋萎縮症患者に対するロイペプチニン、ベスタチンの効果

村上慶郎*

研究協力者 岡崎 隆*・林 英人*・石川和彦*

前年度に引き続き、私どもはロイペプチニンを7例の筋萎縮性疾患患者に、ベスタチンを21例の筋萎縮性疾患患者に長期間投与して、自他覚的症状および諸検査を行って、その効果を調べたので報告する。

1. ロイペプチニン

1) 対象および方法

対象は肢帶型筋ジストロフィー症、Duchenne型筋ジストロフィー症、シャルコー・マリー・トース病、脊髄性進行性筋萎縮症、多発性筋炎のおのの1例ずつ、筋強直性ジストロフィー症2例で、歩行可能患者3例、車椅子患者4例であった。使用期間は20週から最高96週で、1日の使用量は100mg/dayから始めて50mgずつ增量して150mg/dayから400mg/dayを維持量とした。年齢は9-57歳で、女性2例、男性5例であった。

2) 結 果

成績は表1のごとくで、効果のうち十は何らかの自覚的、他覚的改善の認められたもの、土は不变か軽度の筋力低下、日常生活動作の低下のみられたもの、一は明らかに悪化の認められたもの（疾病の自然経過と思われるもの）に分類した。

この分類では、効果は不变か軽度の悪化が2例、悪化が5例であった。

検査成績では、一般血液生化学(CPKを含む)、末梢血、尿の諸検査は異常はみられなかった。

長期間の使用にも拘らず、副作用には認むべきものはみられなかった。

2. ベスタチン

1) 対象および方法

対象は筋強直性ジストロフィー症8例、筋ジストロフィー症7例（内訳は、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー症2例、肢帶型筋ジストロフィー症

表1 Effect of leupeptin on various muscular atrophy

Name	Age	Sex	Diagnosis	Weeks of administration	Dose (mg/day)	Effect	Side effect	CK
M. N.	38	M	LG	20	400	-	-	560-410
T. I.	45	M	MD	26	350	±	-	35-200-63
T. A.	24	M	CMT	93	350	-	-	95-115-104
K. A.	55	M	SPMA	96	350	-	-	390-108
T. T.	49	F	Polymyositis	78	350	±	-	380-420-280
K. I.	57	F	MD	52	350	-	-	104-197
T. M.	9	M	Duchenne	52	150	-	-	1,650-1,900-800

* 国立療養所箱根病院

4例, Duchenne型筋ジストロフィー症1例), その他の筋萎縮性疾患6例(内訳は、クーゲルベルグ・ベーランダー病2例, シャルコー・マリー・トース病1例, 多発性筋炎2例, Duchenne型筋ジストロフィー症の保因者1例)であった。

使用期間は4週間から96週間に及んでいた。1日の使用量は30mg/dayより漸増して維持量として270mg/dayに至り, 一部に480mg/dayを使用した。年齢は24-69歳, 男性は14例, 女性は7例であった。また, 歩行可能患者は9例, 車椅子患者は12例であった。

2) 結 果

筋強直性ジストロフィー症には全例270mg/dayの維持量で使用した。効果は8例中3例に不变か軽度の日常生活動作の低下をみた。残りの5例は悪化進行した。ミオトニア現象に対しては効果は認められなかった。

副作用としては, 胃症状が1例, また心房細動が2例にみられたが, β -ブロッカーの使用により

軽快した。これとベスタチンとの因果関係は明らかではない。

検査成績では, とくに一般血液生化学では異常は認められず, CPKも一定の傾向は認められなかつた(表2)。

7例の筋ジストロフィー症では, 270mg/dayを維持量としたが, 効果は2例が不变か軽度の日常生活動作の低下をみたのみで, 残りの5例は明らかに悪化していた。顔面肩甲上腕型, 肢帶型, Duchenne型の間の効果の相違は, 症例の少ないためもあって明らかではなかつた。

副作用は胃症状が2例, 1例に一過性の発疹をみたが, いずれも投薬の中止には至らなかつた。

検査成績では, 尿, 一般血液生化学, 末梢血検査に異常を認めず, CPKも一定の傾向を示さなかつた(表3)。

他の筋萎縮性疾患6例は280mg/dayから480mg/dayを維持量として用いた。1例の多発性筋炎は歩行時間の短縮などの明らかな効果を認

表2 Effect of Bestatin on various muscular atrophy

Name	Age	Sex	Diagnosis	Weeks of administration	Dose (mg/day)	Effect	Side effect	CK
T. S.	56	M	MD	34	270	—	—	105-42
Y. S.	34	F	MD	32	270	—	—	210-290-110
S. F.	46	M	MD	75	270	±	—	82-170-62
S. N.	45	M	MD	80	270	—	Atrial fibrillation?	132-265-104
T. M.	29	M	MD	34	270	—	Atrial fibrillation	104-130-106
S. M.	39	M	MD	75	270	±	—	42-120-63
T. M.	37	M	MD	25	270	+	—	66-145-125
K. I.	57	F	MD	4	270	±	Upset stomach	50-42

表3 Effect Bestatin on various muscular atrophy

Name	Age	Sex	Diagnosis	Weeks of administration	Dose (mg/day)	Effect	Side effect	CK
N. M.	29	F	FSH	72	270	—	Upset stomach	59-124-52
J. S.	66	M	FSH	71	270	—	Upset stomach	55-165-52
T. O.	51	F	LG	73	270	—	—	250-500-250
S. Y.	30	M	LG	72	270	±	—	250-420-97
T. N.	34	F	LG	87	270	—	—	34-420-97
H. M.	27	M	Duchenne	77	270	—	Rash	124-350-99
K. S.	24	M	LG	12	270	±	—	390-360

筋萎縮症患者に対するロイペプチシン、ベスタチンの効果

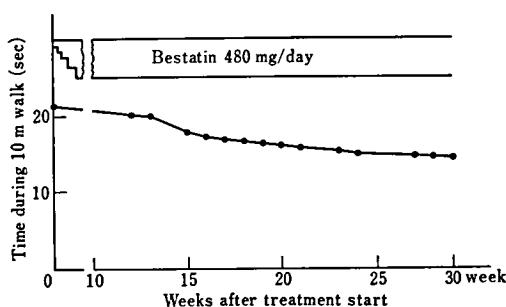


図 1 H. I., 48 y. o., M. polymyositis

めた。

この患者は 48 歳の男性で、5 年前より歩行困難を来たし、某医院で多発性筋炎として本院に転院。転院時には predonin 10 mg 使用しており、平行棒内歩行が可能であった。CPK も 562 単位であった。入院後 predonin を中止し、ベスタチンに切り換え、90 mg/day より漸増し 480 mg/day で維持量とした。さらにベスタチン使用開始後 1 週間目に平行棒歩行からロフストランド杖による歩行に変更した。

ロフストランド杖による 10 m 歩行時間は、図 1 のごとく、開始時が 21 秒であったが、20 週後には 15.2 秒と改善してきた。

CPK は本例は低下の傾向にあったが、握力は著明な改善はみられなかった。

1 例の Duchenne 型筋ジストロフィー症の保因者では不变であり、残りの 4 例は悪化した。

副作用では胃症状が 2 例にみられたが、投薬中止する程ではなかった。

検査成績では、一般血液生化学、末梢血検査、

尿検査にも異常は認められなかった。CPK は一定の傾向のあるものは前述の多発性筋炎のみで、他は特別の傾向を示さなかった（表 4）。

3. 考案ならびに結語

前回に統いて、ロイペプチシンおよびベスタチンをかなり長期間投与してその結果を検討した。一部に前回発表した症例をさらに継続投与した。

ロイペプチシン、ベスタチンいずれも、使用当初においては自覚的には効果があると述べるもののがかなりみられたが、他覚的に効果のあるものは比較的少なかった。私どもが長期間使用した例はいずれも最初に自覚的に効果を認めたものが大部分で、数カ月すると自覚的な効果を訴えなくなるものが多い。他覚的に効果の認められた 1 例の多発性筋炎は、ベスタチン使用時にはステロイドを中止してベスタチンのみの使用で歩行時間の短縮がみられたが、これが直ちにベスタチンの効果と考えるのは早計である。この患者はリハビリテーションも行っているため、これの効果も考えられる。本患者は亜急性型に属するものと思われるが、従来、私どもの同様の症例ではステロイドとの併用効果、あるいは節約効果がみられているが、全くステロイドを中止した例はなく、今後さらに検討が必要と思われる。その他の症例ではロイペプチシン、ベスタチンともに自他覚的な著しい改善を認めたものではなく、歩行時間、握力では有効性を明らかに証明するものはみられなかった。

副作用も消化器症状が軽度にみられたもの、一

表 4 Effect of Bestatin on various muscular atrophy

Name	Age	Sex	Diagnosis	Weeks of administration	Dose (mg/day)	Effect	Side effect	CK
T. H.	52	F	KW	52	270	-	-	290-500-280
U. O.	45	M	KW	17	270	-	Upset stomach	62, 145-84
N. W.	45	M	CMT	60	270	-	-	42-124
H. O.	69	M	Polymyositis	69	450	-	Upset stomach	50-330-52
H. I.	48	M	Polymyositis	30	480	+	-	562-330-52
Y. H.	54	F	Duchenne'carrier	72	270	±	-	398-180-262

過性の発病がみられた症例があったが、いずれも投薬を中止する程ではなかった。

今後、さらに長期間使用したり、もっと初期の

患者に使用を試みたり、あるいはさらに使用量を変更してみるなどの試みが必要と思われる。

ベスタチン、ロイペプチの筋疾患に対する効果

木下真男*

研究協力者 山田信興*・鳥居重夫*・馬場繁二*
里吉栄二郎・祖父江逸郎・三吉野産治・村上慶郎

ベスタチン、ロイペプチが筋ジストロフィー症およびその他筋萎縮を主症状とする疾患群にどの程度有効であるかを明らかにするため、今回まで検討を加えてきたが、今回は神経原性筋萎縮に対する効果を動物実験で観察し、また臨床効果については当教室での従来からの症例への継続投与に関する成績とともに、当班臨床5施設での結果を、三吉野、村上、祖父江、里吉、木下の5班員で集計し、両剤の臨床例に対する有効性の有無を判断し、次年度の研究方針を確立するための資料とすることにした。

I. 実験的除神経筋に対するベスタチン

投与の影響

前回まで私どもは、蛋白分解酵素阻害物質であるベスタチンおよびロイペプチを用いて、実験的筋障害の修復過程の影響について検討を行った。今回は、除神経後の筋萎縮に対するベスタチンの影響について検討した。

方 法

200g 前後のウィスター系、雄、成熟ラットを使用した。ラットはネンブタールで腹腔内麻酔をし、その後一側下腿に切開を加え、腓腹筋に至る坐骨神経分枝を筋直前で切断し、それより中枢部 7-8 mm にわたって神経を切除した後手術創を閉鎖した。この間、筋肉には全く侵襲を加えないよ

うに努めた。その後、連日ベスタチンを腹腔内に注射し、除神経後の実験的筋萎縮に対する影響を経時的に観察した。

ラットは、除神経後に生食、ベスタチン 2 mg/kg、ベスタチン 20 mg/kg を各々投与し、計 3 群に分けて実験を施行した。投与後 1 日、3 日、7 日、14 日、21 日、28 日目に腓腹筋を採取し、各群について NADH, Gomori-trichrome 変法、PAS, phosphorylase, myosin ATPase 染色を行い、筋線維直径の変化、筋線維構造の変化、タイプ別分布状態、タイプ I, II の染色性の相違などについて検討を行った。ベスタチンのラットへの影響をみる目的で、体重の変化についても検討した。

結 果

1) 体重の変化

除神経後のラットにベスタチンを投与し、その後の体重の変化について観察を行った。生食投与群、2 mg/kg 投与群、20 mg/kg 投与群の 3 群の間に有意差はみられなかった。

2) 筋線維構造および組織化学的タイプの比較

コントロール群では、除神経後 24 時間、3 日後では著明な変化はみられなかったが、7 日後には、NADH, PAS および phosphorylase 染色で染色性が低下し、とくにタイプ II 線維により強く phosphorylase および glycogen の染色性が低下し、そのため、タイプ I とタイプ II 線維の差が不明瞭となってくる傾向がみられた。14 日

* 東邦大学医学部第四内科学教室

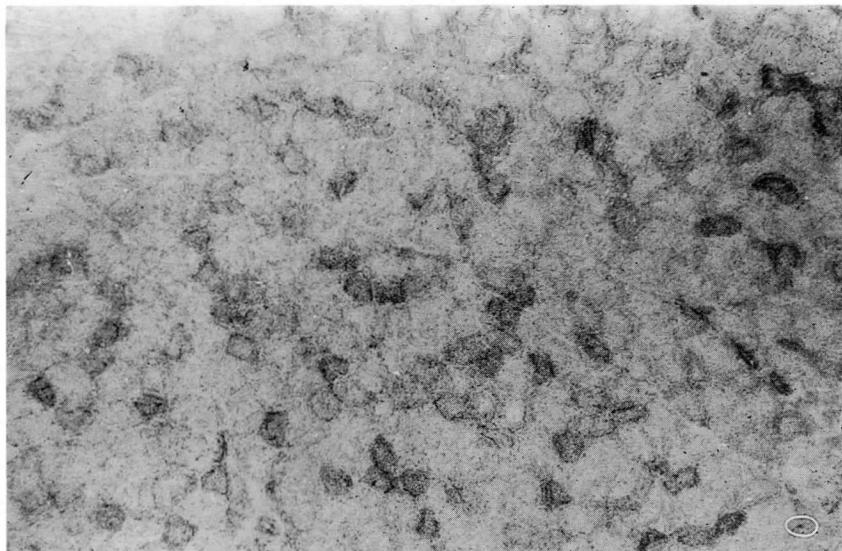


図 1 ベスタチン 20 mg/kg/day 投与 7 日後. 染色性の低下によりタイプ I および タイプ II 判別が不鮮明になってきた.

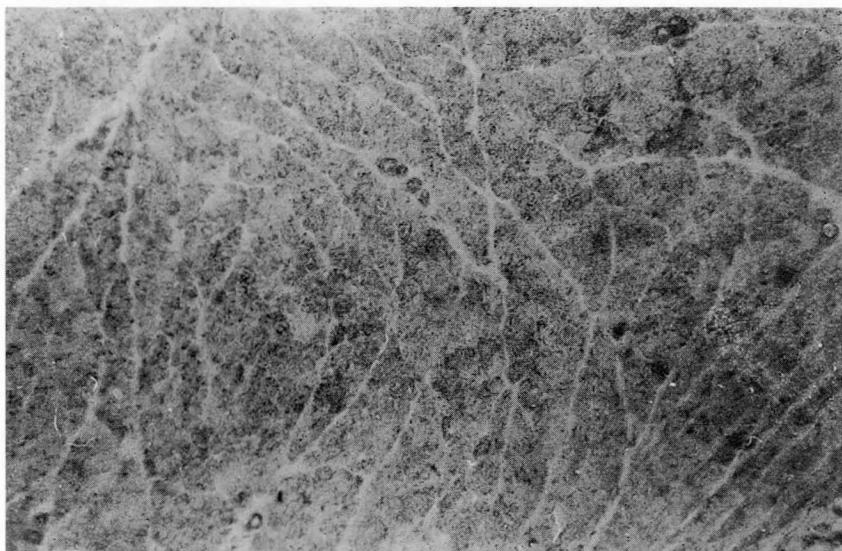


図 2 ベスタチン 20 mg/kg/day 投与 14 日後. 染色性の低下によりタイプ I および タイプ II の区別が不可能になった. また, endomysial connective tissue の増加 もみられた.

後には、タイプ I とタイプ II の判別がほとんど不可能になってきた。このころになると、核の増加および中央核をもつ筋線維の集団および endomysial connective tissue の増加も著明になってきた。21 日後、28 日後においては、その傾向がさらに強くなってきた。

ベスタチン投与群では、生食投与群と同様に 7

日目ごろより、タイプ I とタイプ II の差が不明瞭となり、14 日目にはほとんど判別が不可能となった(図 1, 図 2)。

3) 筋線維直径の変化(図 3)

除神経後の筋線維直径の変化について、生食投与群、2 mg/kg 投与群、20 mg/kg 投与群の 3 群について検討を行った。

ベスタチン、ロイペプチジンの筋疾患に対する効果

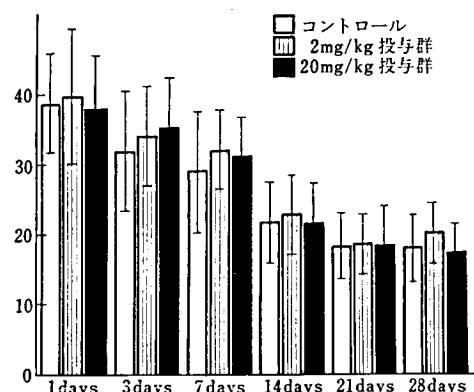


図3 ベスタチン投与後の筋線維径の変化

除神経後7日目までの筋線維の萎縮は全体として緩徐であった。生食投与群とベスタチン投与群で比較すると、若干ベスタチン投与群のほうが萎縮が軽かったが、投与量による差ではなく、7日目には、筋線維直径は生食投与群で $30.5 \pm 6.5 \mu\text{m}$ 、2 mg 投与群で $33.5 \pm 6.0 \mu\text{m}$ 、20 mg 投与群で $32.5 \pm 6.4 \mu\text{m}$ となった。14日目は、生食投与群およびベスタチン投与群とも急速に萎縮し、両者とも $22 \mu\text{m}$ 前後を示し、両者の間に差はみられなくなった。21日目、28日目にはさらに萎縮し、 $19 \mu\text{m}$ 前後まで低下した。

4) 筋線維径のヒストグラムによる変化

生食投与群では、除神経後1日目においては $45 \mu\text{m}$ 前後の大径線維と $35 \mu\text{m}$ 前後的小径線維の2つのピークがみられた。これはタイプIおよびタイプIIが主体をなしている。3日目には、 $40 \mu\text{m}$ 前後と $20 \mu\text{m}$ 前後でピークがみられ、全体として徐々に筋線維が萎縮してきて、グラフ上で左方移動がみられた。7日目になると左方移動はさらに強くなり、ヒストグラム上で $25 \mu\text{m}$ 前後をピークとする一峰性を示すに至った。その後14日目にはさらに萎縮し、 $20 \mu\text{m}$ 前後がピークとなった。21日目および28日目については、とくに14日目と変わりなかった。

20 mg/kg 投与群では、生食投与群と同様に24時間目では2つのピークを示した(図4)。3日

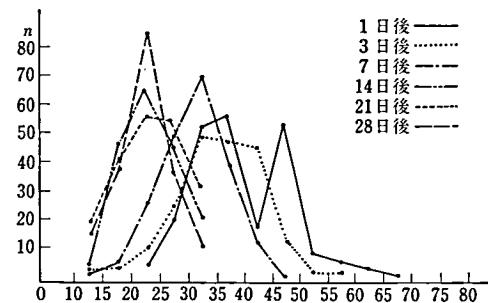
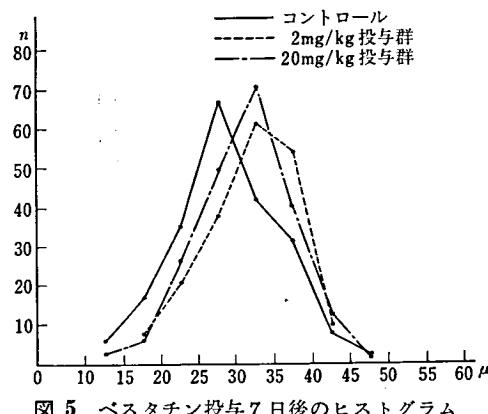


図4 ベスタチン 20 mg/kg/day 投与後のヒストグラムの変化



目になると $35 \mu\text{m}$ 前後をピークとする一峰性を示すようになり、7日目には筋線維径はさらに萎縮し、 $30 \mu\text{m}$ 前後がピークとなつた。

7日日のヒストグラムでは、20 mg 投与群では生食投与群に比べて、若干右方移動している(図5)。14日目にはさらに萎縮し $20 \mu\text{m}$ 前後がピークとなつた。21日目、28日目については、とくに14日目と変わりなかった。

2 mg/kg 投与群については、20 mg/kg 投与群ととくに変わりなかった。

考 案

今回私どもは、除神経後の実験的筋萎縮に対して、ベスタチンがどのような影響を与えるかについて検討を行つた。その結果、除神経後の筋萎縮の過程において、生食投与群、2 mg/kg 投与群、20 mg/kg 投与群の3群において、基本的に著しい差異はなくほぼ同じ過程を示した。しかし、除

神経後初期の段階においては、生食投与群に比べてベスタチン投与群では、筋線維径が若干大きく、また7日目のヒストグラムにおいて、ベスタチン投与群では、生食投与群に比べ右に位置していることから、初期の段階では筋線維の萎縮の進行が軽度であるが抑制されたように思われる。しかし、ベスタチンの投与量による差はみられなかったことから、薬剤による影響かどうかははっきりせず、今後の検討が必要と思われる。

II. 神経筋疾患に対するベスタチンおよびロイペプチニの効果——当教室での成績

今回、私どもは17例の神経筋疾患患者に、ベスタチンおよびロイペプチニの投与を約2年間試み、それぞれ患者に対して、自覚症状、他覚症状および一般血液生化学検査を施行し、臨床効果について検討を行った。

対象および方法

ベスタチンの投与を行った患者11人の内訳は、多発筋炎4例（女性2例、男性2例）、筋萎縮性側索硬化症3例（女性）、肢帶型ジストロフィー症1例（男性）、Kugelberg-Welander病1例（男性）、脂肪蓄積性ミオパチー1例（男性）、脊髄性進行性筋萎縮症1例（女性）であった。これらの症例のうちでステロイドを併用したのは、多発筋炎の2例についてであった。全例が筋力低下を主訴として来院した。投与期間は2カ月から18カ月間で、投与方法は隔週投薬方法（B₁法、後述）ないし、漸増療法により行った。

ロイペプチニの投与を行った患者12例の内訳は、多発筋炎4例（女性2例、男性2例）、Kennedy-Alter-Sung症候群2例（男性）、肢帶型ジストロフィー症2例（女性1例、男性1例）、Kugelberg-Welander病1例（女性）、脂肪蓄積性ミオパチー1例（男性）、顔面肩甲上腕型ジストロフィー症1例（女性）、脊髄性進行性筋萎縮症1例（女性）であった。そのうち、ステロイド

との併用を行ったのは、多発筋炎3例とKennedy-Alter-Sung症候群1例であった。投与期間は、2カ月から24カ月間で、投与方法は、漸増療法により行った。150mgまで漸増したのは1例、300mgまでが5例、450mgまでが3例、600mgまでが3例であった。

結果

1) ベスタチン投与群

ベスタチン投与群で自覚症状の改善を認めたのは、筋萎縮性側索硬化症患者3例であった（表1）。第1例は、55歳の女性で、自覚的にfasciculationの軽減を認めた。第2例は50歳の女性で、筋肉の硬さがとれた。残りの1例は、60歳の女性で、昭和55年8月筋力低下が出現し、その後昭和56年6月、筋力低下、呂律不良、嚥下困難、筋肉のつっぱり感が認められ、入院、精査の結果、筋萎縮性側索硬化症と診断された。その後、メスチノン、ダントリウム等で加療をしていたが、症状の改善がみられず、昭和57年8月10日より、ベスタチンの隔週投与方法を開始した（図6）。投与4週後より、休薬週になると、呂律不良、嚥下困難に改善が認められるようになった。ベスタチン服薬中、一過性に霧視、唾液分泌亢進を認めた。

副作用については、この1年間において、前述した症例においてみられた霧視および唾液分泌亢進以外認められなかった。

2) ロイペプチニ投与群（表1）

投与期間中、自覚的に症状の改善を認めたのは6例であった。6例のうち3例、すなわち多発筋炎2例とKennedy-Alter-Sung症候群1例については、ステロイドの併用により筋力低下あるいはwaddling gaitに改善が認められた。他の3例、すなわち、第1例は47歳の顔面肩甲上腕型ジストロフィー症の女性で、階段昇降に改善が認められた。第2例は、43歳の脊髄性進行性筋萎縮症の女性で、fasciculationの改善がみら

ベスタチン、ロイペプチの筋疾患に対する効果

表 1 神経筋疾患におけるベスタチン、ロイペプチ投与による臨床効果

A. ベスタチン

Name	Age	Sex	Diagnosis	Duration	PSL	Dose(mg)	Symptom	Effect	CPK	Side effect
R. H.	55	F	ALS	2 M	—	B ₁	W	+	63-61	—
T. T.	49	F	PM	6 M	+	B ₁	W	—	446-497	—
K. W.	60	F	ALS	6 M	—	B ₁	W	+	45-63	Blurred vision?
N. F.	50	F	ALS	3 M	—	B ₁	W	+	—	—
S. O.	37	F	PM	12 M	—	B ₄ , B ₁	W	—	33-	Palpitation?
U. M.	23	M	PM	2 M	—	B ₁	W	—	745-736	—
N. A.	22	M	KW	6 M	—	B ₁	W	—	51-61	—
N. S.	43	F	SPMA	6 M	—	B ₁	W	—	135-	—
J. H.	34	M	LG	3 M	—	B ₁	W	—	965-850	—
T. U.	35	M	LSM	3 M	—	B ₁	W	—	3,590-4,510	—
T. Y.	32	M	PM	4 M	+	B ₁	W	—	1,579-1,504	Blurred vision?

W : weakness, ALS : amyotrophic lateral sclerosis, PM : polymyositis, KW : Kugelberg-Welander disease, SPMA : spinal progressive muscular atrophy, LG : limb-girdle muscular dystrophy, LSM : lipid storage myopathy.

B. ロイペプチ

Name	Age	Sex	Diagnosis	Duration	PSL	Dose(mg)	Symptom	Effect	CPK	Side effect
S. O.	57	F	PM	18 M	+	L ₂	W	+	349-101	—
N. K.	23	M	KAS	3 M	—	L ₁	W	—	119-	—
T. I.	46	M	KAS	10 M	+	L ₂	W	+	935-868	—
K. U.	32	F	LG	19 M	—	L ₂	W	—	390-353	—
Y. I.	45	F	PM	10 M	+	150-450	W	±	6-	Optic neuritis?
M. S.	47	F	FSH	24 M	—	50-450	W	+	170-174	—
U. M.	23	M	PM	4 M	—	150-450	W	—	406-647	—
N. A.	22	M	KW	6 M	—	L ₂	W	—	54-51	—
N. S.	43	F	SPMA	8 M	—	L ₂	W	±	135-	—
J. H.	34	M	LG	21 M	—	L ₃	W	—	833-965	Epigastralgia
T. U.	35	M	LSM	2 M	—	L ₃	W	—	1,850-2,090	—
T. Y.	32	M	PM	10 M	+	L ₃	W	±	1,504-1,209	—

W : weakness, PM ; polymyositis, KAS : Kennedy-Alter-Sung syndrome, LG : limb-girdle muscular dystrophy, FSH : facioscapulohumeral muscular dystrophy, KW : Kugelberg-Welander disease, SPMA : spinal progressive muscular atrophy, LSM : lipid storage myopathy.

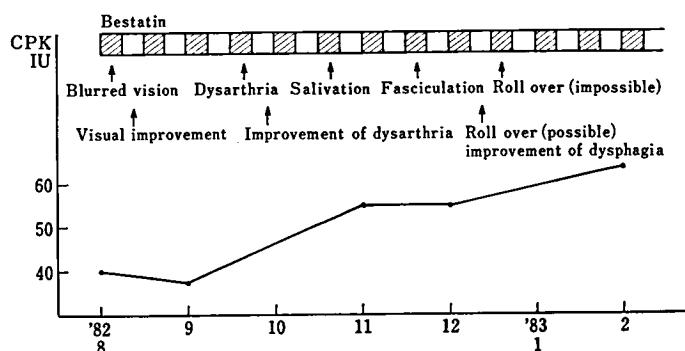


図 6 筋萎縮性側索硬化症患者 (K. W.) の臨床経過

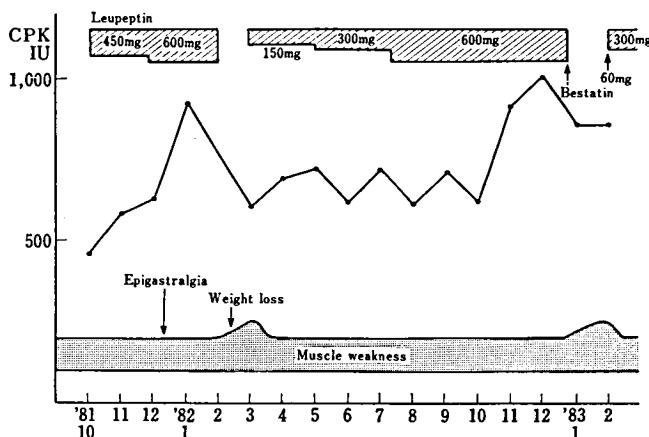


図 7 肢帶型ジストロフィー症患者 (J.H.) の臨床経過

れた。第3例は、32歳の多発筋炎の男性で、自覚的に階段昇降に改善を認めた。

34歳の肢帶型ジストロフィー症の男性に、ロイペプチニンを150mgより漸増法により治療を開始した。600mgに増加した時点で、女性化乳房、心窩部痛が出現し一時休薬した。休薬中に四肢脱力が出現し、さらに体重も減少したため、ロイペプチニンの投与を再開した。その結果、四肢の脱力はやや改善した。しかし、その後、心窩部痛が出現したためベスタチン週投薬方法に切り換えたところ、再び症状が増悪したため、現在、ロイペプチニン300mg/dayにて経過観察中である(図7)。

考 案

ベスタチン投与群では、自覚的に症状の改善を示したのは11例中3例で、すべて筋萎縮性側索硬化症患者であった。1例については、特徴的に休薬中に症状の改善がみられたことである。つまり、投薬方法によっては症状の改善がみられる可能性のあることが今後の検討課題である。また、ベスタチンは従来、ミオパチーに対して有効であるといわれていたが、今回の結果からみると、ニューロパチーに対しても試みていく必要があるようと思われた。

ロイペプチニンについては、自覚的に症状の改善

を示したのは12例中6例であった。そのうち3例についてはステロイドと併用しており、ロイペプチニンの効果は不明であった。その他の3例については、ロイペプチニン単独によりやや症状の改善を示した。また、肢帶型ジストロフィー症患者では、休薬により症状が2回も増悪しており、ロイペプチニンが何らかの効果を有しているように思われるが、なお今後の経過を観察により判定する必要がある。

III. ベスタチン、ロイペプチニンの臨床効果

—臨床5施設での集計

今までに、国立西別府病院、国立箱根病院、国立神経センター、名古屋大学、東邦大学の5施設において、各種神経筋疾患に対して、ロイペプチニンおよびベスタチンの投与が試みられてきた。今回、これらの5施設の症例を集計し、臨床効果について総合的に検討した。

対 象

対象は、Duchenne型ジストロフィー症30例、肢帶型ジストロフィー症11例、多発筋炎10例、筋強直性ジストロフィー症5例、顔面肩甲上腕型ジストロフィー症5例、筋萎縮性側索硬化症4例、Kennedy-Alter-Sung症候群2例、Becker型ジ

ベスタチン、ロイペプチノ筋疾患に対する効果

ストロフィー症 2 例、脊髄性進行性筋萎縮症、脂肪蓄積性ミオパチー、Kugelberg-Welander 病各 1 例の計 72 例について検討を行った。大人(16 歳以上)は 47 例、小児(15 歳以下)は 25 例であった。性別では男性 55 例(大人 30 例、小児 25 例)、女性 17 例(すべて大人)であった。年齢は 27.0±17.2 歳(大人 37.0±12.6 歳、小児 8.2±2.9 歳)であった。

投与方法

ベスタチンに関しては、i) 隔週投薬方法(B₁ 法)、ii) 隔月投薬方法(B₂ 法)、iii) 3 カ月投薬 1 カ月休薬方法(B₃ 法)、iv) 従来方法: 漸増療法、維持療法(B₄ 法)の 4 方法をとった。

ロイペプチノに関しては、i) 漸増により 150 mg を維持する方法(L₁ 法)、ii) 漸増により 300 mg を維持(L₂ 法)、iii) 漸増により 600 mg を維持(L₃ 法)の 3 方法で行った。

効果判定方法

血清 CPK、ADL、10 m 歩行時間、階段昇降時間、立ち上り時間、片足立ち時間、握力、自覚症状について、投与前および投与経過中に検討を行った。なお、血清 CPK については各施設によって測定方法が異なるため、投与前の血清 CPK 値を 1 として換算した。

結果

1) 投与方法による比較検討

a) ベスタチン

① 隔週投与方法(9 例): 血清 CPK 値は投与

後 1.05±0.23 と若干上昇した。握力は、投与前、右 9.8±8.1 kg、左 8.0±5.5 kg、投与後、右 8.0±5.5 kg、左 9.8±6.7 kg と変わりなかった。自覚的には、休薬により 3 例の患者で fasciculation の減少、嚥下障害の改善がみられた。

② 隔月投薬方法(3 例): 血清 CPK 値は投与後 1.81±0.28 と上昇した。握力は、投与前、右 11.0±12.7 kg、左 10.5±12.0 kg、投与後、右 10.5±12.0 kg、左 9.5±10.6 kg と変わりなかった。

③ ベスタチン 90 mg 維持療法(9 例): 血清 CPK 値は投与後 0.64±0.42 と低下した。しかし ADL は、投与前 71.8±11.4、投与後 60.2±20.6 と低下した。また、階段昇降時間および片足立ち時間についても投与前におのの 44.0±6.9 秒、8.9±10.4 秒であったが、投与後 47.2±2.8 秒、9.8±10.2 秒と若干延長した。自覚的に症状の改善のみられた患者はいなかったが、1 例において、症状はほとんど進行しなかった。

④ ベスタチン漸増療法(30 例): 血清 CPK 値は投与後 1.23±0.51 と上昇した。ADL、10 m 歩行時間、握力、階段昇降時間、立ち上り時間について、投与前と投与後にとくに変化はみられなかった(表 2)。

自覚症状では、投与経過中に一時的に階段昇降や嚥下が改善された患者が 2 例あった。

b) ロイペプチノ

① ロイペプチノ漸増療法(10 例): L₁ 法、L₂

表 2 ベスタチン漸増療法(n=30)

	前	後
CPK	1 (1,063.1±866.6)	1.23±0.51 (1,310.9±928.1)
ADL	81.8±9.2	79.9±12.2
10 m 歩行時間	8.6±4.0	8.8±3.1(sec)
握力(右)	14.9±10.2	13.9±9.6(kg)
(左)	15.9±10.0	15.7±11.4(kg)
階段昇降時間	44.0±41.8	48.8±43.8(sec)
立ち上り時間	2.3±0.7	3.6±2.8(sec)

法, L₃ 法それぞれの症例が少ないとめ、まとめて検討した。

血清 CPK 値は、投与後 1.04 ± 0.16 と若干上昇した。握力は投与前、右 11.8 ± 10.2 kg, 左 12.2 ± 9.7 kg, 投与後、右 11.7 ± 10.4 kg, 左 12.3 ± 10.5 kg と変わりなかった。自覚的に 1 例で、投与経過中に一時的に階段の昇降に改善がみられた。

② ロイペプチド 150 mg 維持療法 (5 例)：血清 CPK 値は投与後 0.66 ± 0.17 と有意に低下した。ADL は投与前 72.6 ± 18.0 であったが、投与後 87.6 ± 94.5 と低下した。階段昇降時間、

10 m 歩行時間については、投与前におのおの 40.0 ± 34.3 秒, 17.7 ± 6.1 秒であったが、投与後には 87.6 ± 94.5 秒, 21.6 ± 11.4 秒と延長した。自覚的には不变ないし進行性であった。

2) 疾患別による検討

a) Duchenne 型ジストロフィー症 (35 例)

(表 3)

① ベスタチン：血清 CPK 値は投与後 1.01 ± 0.57 と若干上昇した。ADL, 10 m 歩行時間、階段昇降時間、立ち上り時間、片足立ち時間については、投与後に低下ないし延長がみられた。

② ロイペプチド：血清 CPK 値は有意に低下

表 3 Duchenne 型ジストロフィー症 (n=35)

	前	後
ベスタチン (n=30)		
CPK	1 (1,540.76 ± 868.1)	1.01 ± 0.57 (1,399.8 ± 980.8)
ADL	78.0 ± 10.5	73.6 ± 16.9
10 m 歩行時間	10.8 ± 9.6	11.4 ± 12.6 (sec)
階段昇降時間	29.7 ± 20.8	41.7 ± 31.3 (sec)
立ち上り時間	2.3 ± 0.7	3.6 ± 2.8 (sec)
片足立ち時間	10.4 ± 11.9	14.4 ± 11.3 (sec)
ロイペプチド (n=5)		
CPK	1 (3,228.0 ± 628.5)	0.66 ± 0.17 (2,105.4 ± 1,019.7)
ADL	72.6 ± 18.0	65.4 ± 12.5
階段昇降時間	40.0 ± 34.3	87.6 ± 94.5 (sec)
10 m 歩行時間	17.7 ± 6.1	21.6 ± 11.4 (sec)
片足立ち時間	6.4 ± 4.7	14.2 ± 8.6 (sec)

表 4 肢帶型ジストロフィー症 (n=11)

	前	後
ベスタチン (n=8)		
CPK	1 (850.4 ± 472.1)	1.45 ± 0.43 (1,241.3 ± 601.0)
階段昇降時間	71.5 ± 64.5	74.5 ± 64.5 (sec)
握力 (右)	16.0 ± 12.0	14.2 ± 10.8 (sec)
(左)	16.6 ± 11.9	16.7 ± 13.7 (kg)
10 m 歩行時間	13.3 ± 4.6	11.9 ± 2.8 (sec)
ロイペプチド (n=3)		
CPK	1 (551.0 ± 245.0)	1.06 ± 0.42 (572.0 ± 276.1)
握力 (右)	9.3 ± 11.0	8.7 ± 9.8 (kg)
(左)	9.3 ± 9.3	8.0 ± 8.7 (kg)

ベスタチン、ロイペプチノの筋疾患に対する効果

がみられたが、ADL、階段昇降時間、10m歩行時間、片足立ち時間については低下ないし延長した。

b) 肢帶型ジストロフィー症(11例)(表4)

① ベスタチン：血清CPK値は投与後 1.45 ± 0.43 と上昇した。階段昇降時間、10m歩行時間については、投与前におのおの 71.5 ± 64.5 秒、 13.3 ± 4.6 秒で、投与後は 74.5 ± 64.5 秒、 11.9

± 2.8 秒ととくに変わりなかった。握力については、投与前、右 16.0 ± 12.0 kg、左 16.6 ± 11.9 kgで、投与後、右 14.2 ± 10.8 kg、左 16.7 ± 13.7 kgと変わりなかった。

② ロイペプチノ：血清CPK値は、投与後 1.06 ± 0.42 と上昇した。握力は投与前、右 9.3 ± 11.0 kg、左 9.3 ± 9.3 kgで、投与後、右 8.7 ± 9.8 kg、左 8.0 ± 8.7 kgと変わりなかった。

表5 各種疾患のベスタチン投与後のCPKの変動

	前	後	
Duchenne type dystrophy	1 (1,540.8 ± 868.1)	1.01 ± 0.57 (1,399.8 ± 980.8)	
Limb-girdle dystrophy	1 (850.4 ± 472.1)	1.45 ± 0.43 (1,242.3 ± 661.0)	
Polymyositis	1 (1,477.5 ± 1,254.9)	0.97 ± 0.36 (1,504.0 ± 1,572.1)	
Myotonic dystrophy	1 (146.6 ± 95.9)	0.86 ± 0.24 (116.6 ± 38.2)	
Facioscapulohumeral muscular dystrophy	1 (80.0 ± 37.0)	1.24 ± 0.68 (89.3 ± 34.5)	
Amyotrophic lateral sclerosis	1 (119.3 ± 153.5)	1.10 ± 0.2 (123.0 ± 105.6)	

表6 ベスタチン投与による効果(n=43)

	前	後	
CPK	1 (1,252.7 ± 1,052.0)	1.05 ± 0.49 (1,197.8 ± 1,117.4)	
ADL	78.1 ± 10.5	72.9 ± 17.1	
10m歩行時間	7.7 ± 3.8	9.3 ± 5.3 (sec)	
階段昇降時間	48.1 ± 43.5	52.6 ± 44.8 (sec)	
立ち上り時間	2.4 ± 0.7	3.6 ± 2.9 (sec)	
片足立ち時間	8.9 ± 10.8	9.8 ± 10.2 (sec)	
握力(右)	11.9 ± 9.0	10.8 ± 8.2 (kg)	
(左)	13.6 ± 10.2	13.3 ± 11.1 (kg)	

表7 ロイペプチノ投与による効果(n=16)

	前	後	
CPK	1 (1,341.3 ± 1,342.9)	0.96 ± 0.35 (1,087.5 ± 1,025.2)	
ADL	72.6 ± 18.0	65.4 ± 22.5	
階段昇降時間	40.0 ± 34.4	87.6 ± 94.5 (sec)	
立ち上り時間	7.7 ± 6.1	21.6 ± 11.4 (sec)	
片足立ち時間	6.4 ± 4.7	14.2 ± 8.6 (sec)	
握力(右)	3.3 ± 0.6	3.0 ± 0.0 (kg)	
(左)	3.7 ± 0.6	3.0 ± 0.0 (kg)	

c) 疾患別の CPK の変動：ベスタチンについては、投与前に比べて投与後に上昇したのは、肢帶型ジストロフィー症、顔面肩甲上腕型ジストロフィー症、筋萎縮性側索硬化症であった。逆に低下したのは、多発筋炎および筋強直性ジストロフィー症であったが、自覚症状の改善はみられなかった。変化がほとんどみられなかつたのは、Duchenne 型ジストロフィー症であった（表 5）。ロイペプチニについては、多発筋炎、肢帶型ジストロフィー症、顔面肩甲上腕型ジストロフィー症、Kugelberg-Welander 病、Kennedy-Alter-Sung 症候群、脂肪蓄積性ミオパチーについて行われたが、とくに変化はみられなかつた。

3) ベスタチンおよびロイペプチニ投与による効果

ベスタチンおよびロイペプチニを投与した疾患について、それぞれ集計し検討した。

a) ベスタチン：血清 CPK 値は、投与後 1.05 ± 0.49 と上昇した、ADL、10 m 歩行時間、階段昇降時間、立ち上り時間、片足立ち時間、握力については、投与後、増悪ないし変化なしであった（表 6）。

b) ロイペプチニ：血清 CPK 値は、投与後 0.96 ± 0.35 と若干低下がみられた。しかし、ADL、階段昇降時間、立ち上り時間、片足立ち時間、握力については、増悪ないし変化なかつた（表 7）。

ま と め

72 例の神経筋疾患患者にベスタチン、ロイペプチニのいずれか、あるいは両者を交互に投与した成績を集計した。従来各施設での投与方法がそれぞれ異なっていたため、全体の集計が困難であった。今回は、少しでも共通な方法にしたいと考え、一応のモデル投与法を設定したが、なおかなり多様な投与法が行われている。今後はさらにこれらのうちから有効な可能性のあるものを選んで投与法の統一をはかるべきと考えられる。

ベスタチンに関しては、Duchenne 型で血清 CPK のわずかな低下がみられたが、運動機能は悪化した。ロイペプチニでは血清 CPK の改善はなかったが、一部の例では服用により自覚症状の改善をみている。また、隔週法も一部の例で自覚症状の改善をみているが、これらが placebo 効果か否か判断は必ずしも容易でない。また、本来進行性を示す疾患であるため、投与中悪化したとしても本来の経過とどの程度異なるのかも簡単には判断できない。

投与量としては両剤とも最低 60 mg から最高 600 mg までと幅が広いが、明らかな dose-response の関係を示唆する成績はなかった。

集計開始後、なお日が浅く、分析はきわめて不充分な段階であるが、今後の治療に若干の参考となる事実が得られたと思われる。投与法の選択とともに年齢、疾患の一一致したコントロール群を選び投与群との経過の比較を行う必要がある。

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症患者に対する ロイペプチニン、ベスタチンの影響

祖父江 逸郎*

研究協力者 陸 重雄*・印東利勝*・松岡幸彦*

はじめに

蛋白分解酵素阻害剤による筋ジストロフィー症の治療には大きな関心が寄せられてきた。一部の動物実験でその有効性が報じられているが、臨床的応用についてはまだ研究の歴史が浅く、しかも効果判定が必ずしも容易でないことなどから一定の評価がなされていない。

われわれは、約1年前からロイペプチニンやベスタチンを Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症 (DMD) 患者に投与し、これら薬剤の本症患者に与える影響について検討を加えてきた。本研究では、より客観的かつ定量的に薬効判定を行うとの意図から、多方面にわたっていくつかの評価項目を設け、患者の選択も十分な観察が可能である入院患者に限った。

昨年度は短期間の投与経験について述べたが、本年度はこれを継続させ、1年間連続投与した結果を報告する。

対象と方法

対象は昨年と同一症例であり、方法も CPK 活性値の評価で一部変更がある以外はほぼ同様であるため、簡単に要点のみを記す。

1) 対象

国立療養所鈴鹿病院に入院中の DMD 患者 17

例で以下の3群に分けた。A群：運動機能障害度 (stage) 1-4 でロイペプチニン投与群 (5例), B群：同 stage でベスタチン投与群 (5例), C群：stage 5 以上でベスタチン投与群 (7例)。各薬剤はいずれも1日3カプセルを毎食後経口で連日投与した。ロイペプチニンとベスタチンはそれぞれ1カプセル 50 mg と 30 mg のものを用いた。

2) 検索項目

a) 臨床評価：ADL (100点法), 10 m 平地往復歩行時間 (秒), 階段昇降時間 (秒), 片足立ち時間 (秒)。また stage の変化も合せて観察した。

b) CPK 活性値の日内変動：昨年度は5回採血法によったが、患者に対する負担が大きいため早朝離床前の5時30分と、多くの例で最高値を示した15時30分の2回測定をし、それぞれ最低値、最高値とした。ミオグロブリンについても同時刻に採取した血清を用いて定量を行った。

c) 一般血液生化学、末梢血、尿の諸検査。

d) 血液凝固機能 (線溶因子・阻止因子を含む)。

これらの各評価項目は原則として薬剤投与前、投与後1カ月、6カ月、12カ月の時点で検討され、c), d) については状況に応じてその他のときにも適宜検査した。

e) その他：自覚的副作用、投与期間中に生じた合併症など。

* 名古屋大学医学部第一内科

結 果

1) 臨床評価 (図 1 A-C)

症例による差が大きく、また途中で実施不能となった種目も存在するので、各群全体としての処理は行わなかった。

① ADL score : A, B 両群とも 2 例で明らかに悪化したが、残りの 3 例ではほとんど変化がなかった (図 1 A)。

② 10m 平地往復歩行時間 : A 群は 4 例で実施され、ほぼ不变 2 例、軽度悪化 1 例、他の 1 例は途中で歩行不能となった。B 群では、5 例中 1 例がほぼ不变であった以外、他は全例悪化、うち 2 例が途中で独歩不能となった (図 1 B)。

③ 階段昇降時間 : A, B 両群とも 4 例で検索した。両群とも 2 例はほぼ不变であったが、他の 2 例は著しく悪化した (図 1 C)。

なお、片足立ち時間は検査を施行するつどに変

動が大きく、評価が困難であったため今回の結果には含めなかった。

2) CPK 活性値の日内変動 (図 2-4)

① A 群 : 症例による差がかなり大きいが、全体としてみると 6 カ月までほとんど変化がなかった。12 カ月の時点では最低値が低下していたが有意ではなく、最高値はほとんど変化がなかった (図 2 A, B)。

② B 群 : 症例によっては次第に低下していくものもあったが、全体としてはほとんど変化がなく、12 カ月最低・最高値とも下降していたが、有意な低下ではなかった (図 3 A, B)。

③ C 群 : 前 2 群に比べ CPK 活性値は全体的に低く、日内変動も少なかった。7 例中 3 例が途中で脱落したが、12 カ月まで評価できた残り 4 例では、CPK 活性値が若干低下する傾向にあった (図 4 A, B)。

④ 血清ミオグロブリンの変化 : 今回は 6 カ月

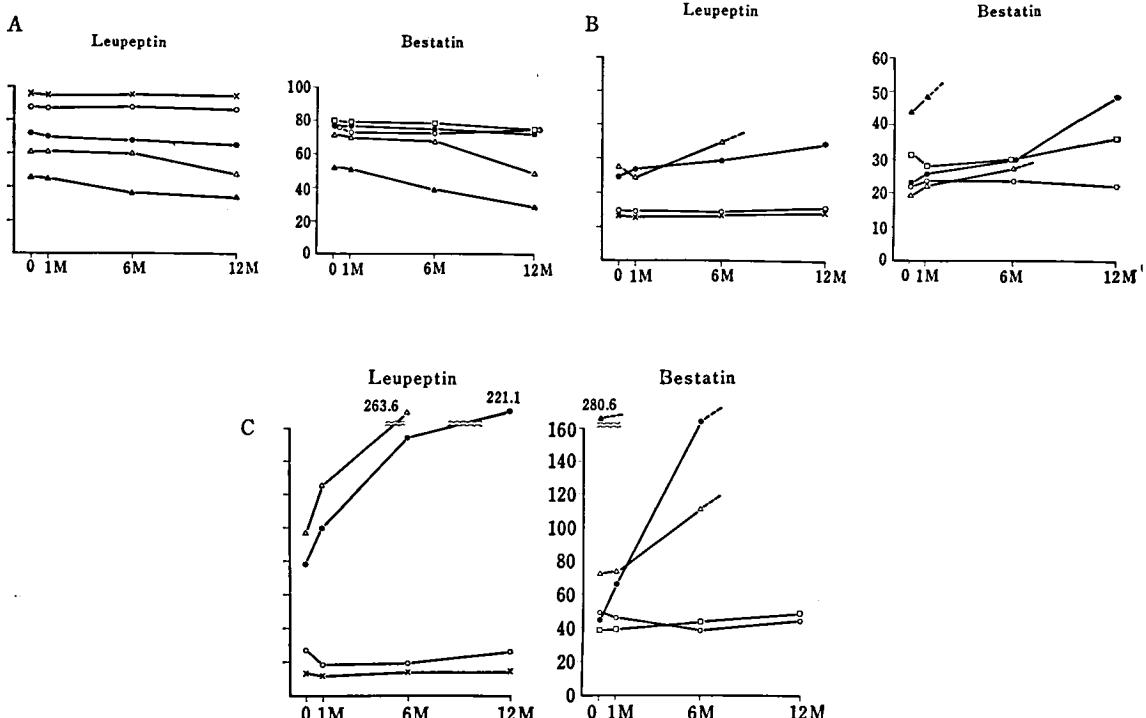


図 1 各運動機能の推移。A : 10m 往復歩行時間 (秒), B : ADL score, C : 階段昇降時間。

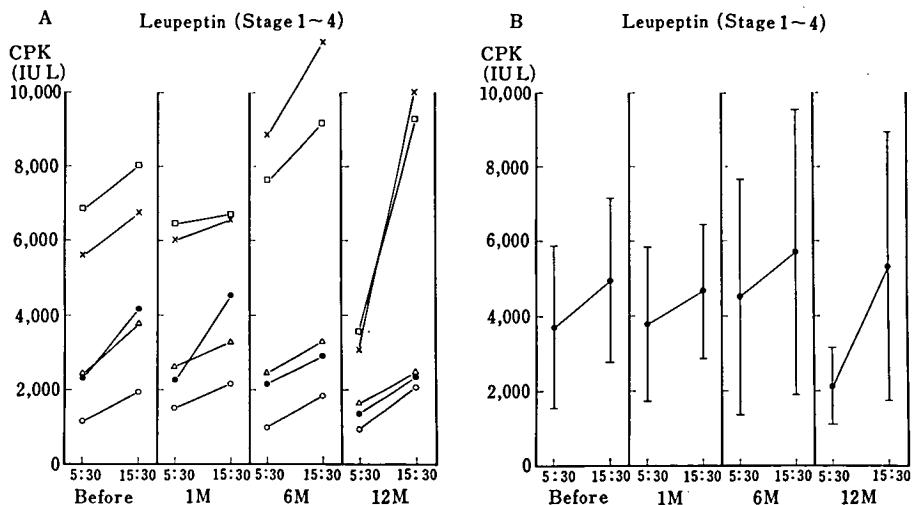


図 2 A群の CPK 活性値の日内変動。個々の症例によってかなりばらつきがある (A) が、全体としては有意な変化はない (B)。

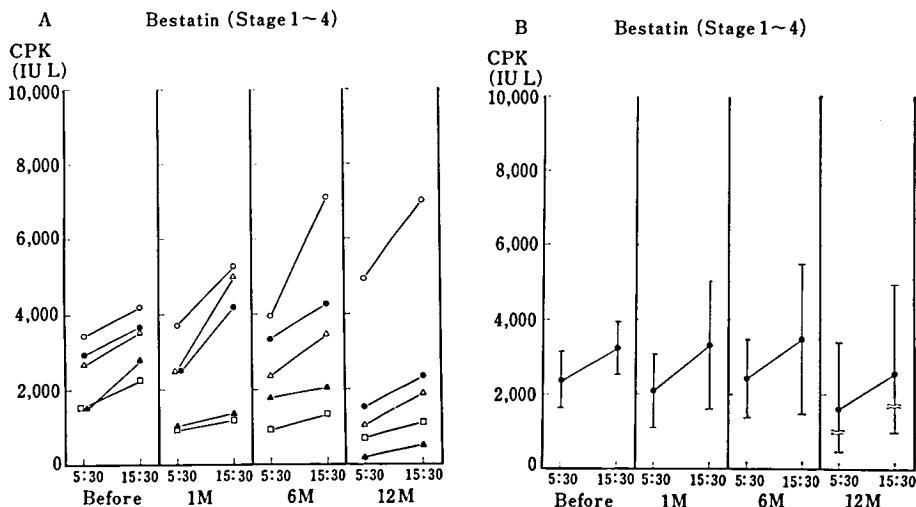


図 3 B群の CPK 活性値の日内変動とその推移

までの結果について述べる。A群では6カ月後の値が全体として下降していたが、有意な変化ではなかった(図5A)。B,C群では目立った変化は示さなかった(図5B,C)。

総合評価—運動機能とCPK活性値—：投与した薬剤の効果を分析する目的で、A,B両群について1), 2)で述べた運動機能とCPK活性値がどのような関連をもって変化しているか比較した。

① A群(表1A)：症例1,2では、CPK活性値のうち最低値(Min)は低下したが最高値

(Max)は改善がなかった。またstageの変化はなく、各運動機能評価でも進行は認められなかつた。他の3例ではMin, Max両CPK活性値が下降したが、いずれも機能障害の悪化が明瞭であった。

② B群(表1B)：症例1-3はMin, Max両CPK活性値とも低下する経過をとったが、運動機能障害の進展がいずれも高度であった。症例4は症例1-3と同年代であり、これまで類似の臨床経過をとってきた症例であったにもかかわらず、

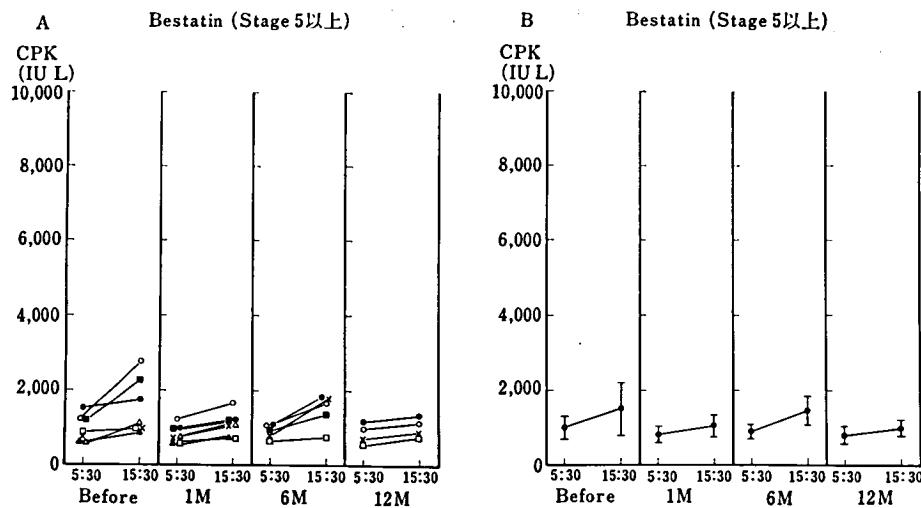


図 4 C群のCPK活性値の日内変動とその推移

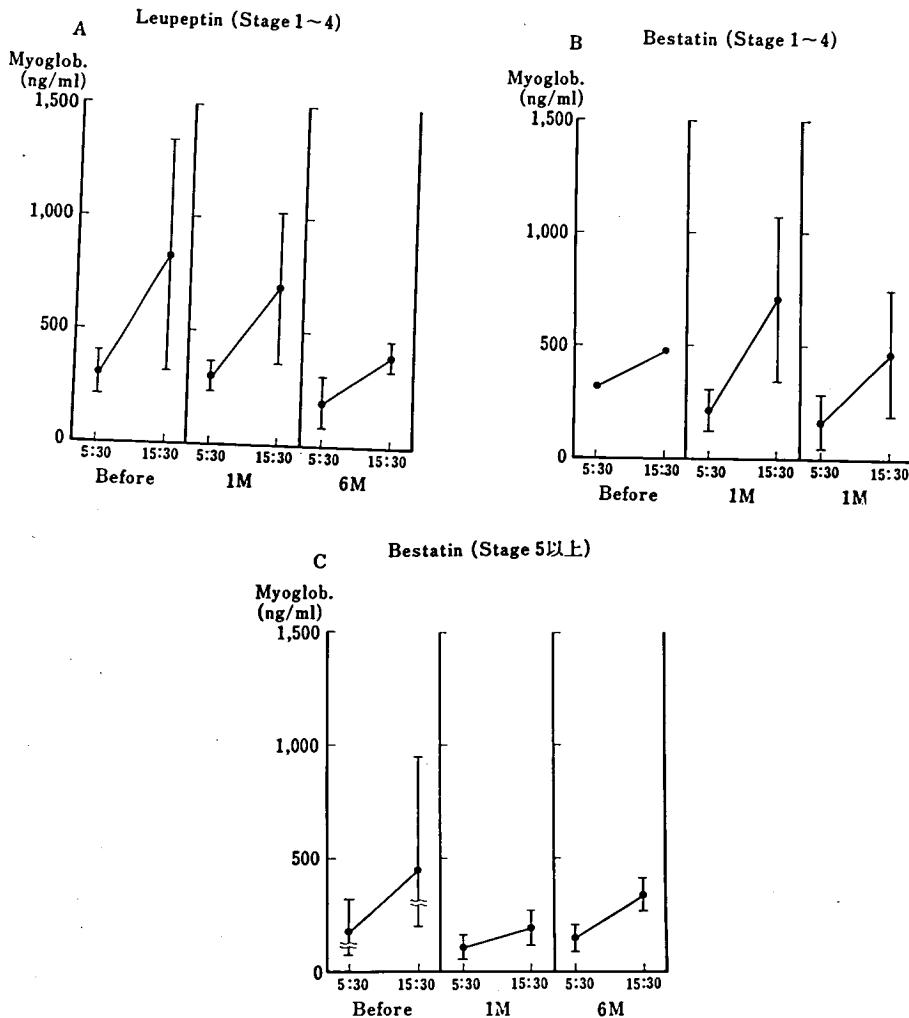


図 5 血清ミオグロブリンの日内変動。6ヶ月間の評価では各群とも有意な改善はない。
A: A群, B: B群, C: C群

Duchenne型進行性筋ジストロフィー症患者に対するロイペプチシン、ベスタチンの影響

表 1 総合評価——A, B 群の CPK 活性値の推移（矢印は薬剤投与前、投与後 6 カ月・12 カ月の各時点での相対的な変化を示す）と運動機能障害度との関係。

A ロイペプチシン

Age		CPK			Stage
		Min	Max	Max/Min	
1	6	↑	↑	↑	1 → 1
2	7	↓	→	↑	2 → 2
3	9	↓	→	↑	2 → 2-3
4	10	↓	→	↑	4 → 5
5	11	↓	→	↑	3 → 5

B ベスタチン

Age		CPK			Stage
		Min	Max	Max/Min	
1	10	↑	↓	↑	2 → 5
2	11	↑	↓	→	2 → 3
3	12	↓	→	↑	2 → 5
4	11	↓	→	↑	2 → 2
5	17	↓	→	↑	2 → 2

CPK 活性値はむしろ上昇傾向にあり、運動機能もほとんど変化しなかった。症例 5 は Becker 型と思われ、これまで進行が緩徐であった。CPK 活性値は低下傾向を示し、stage の変化もないが、階段昇降や平地歩行時間が軽度悪化傾向をとった。

3) 一般血液生化学・末梢血・尿検査

各群とも薬剤投与後 2 週、1 カ月、2 カ月、6 カ月、9 カ月、12 カ月のいずれの時点でも、投与前の値と比べ特記すべき異常を認めなかった。

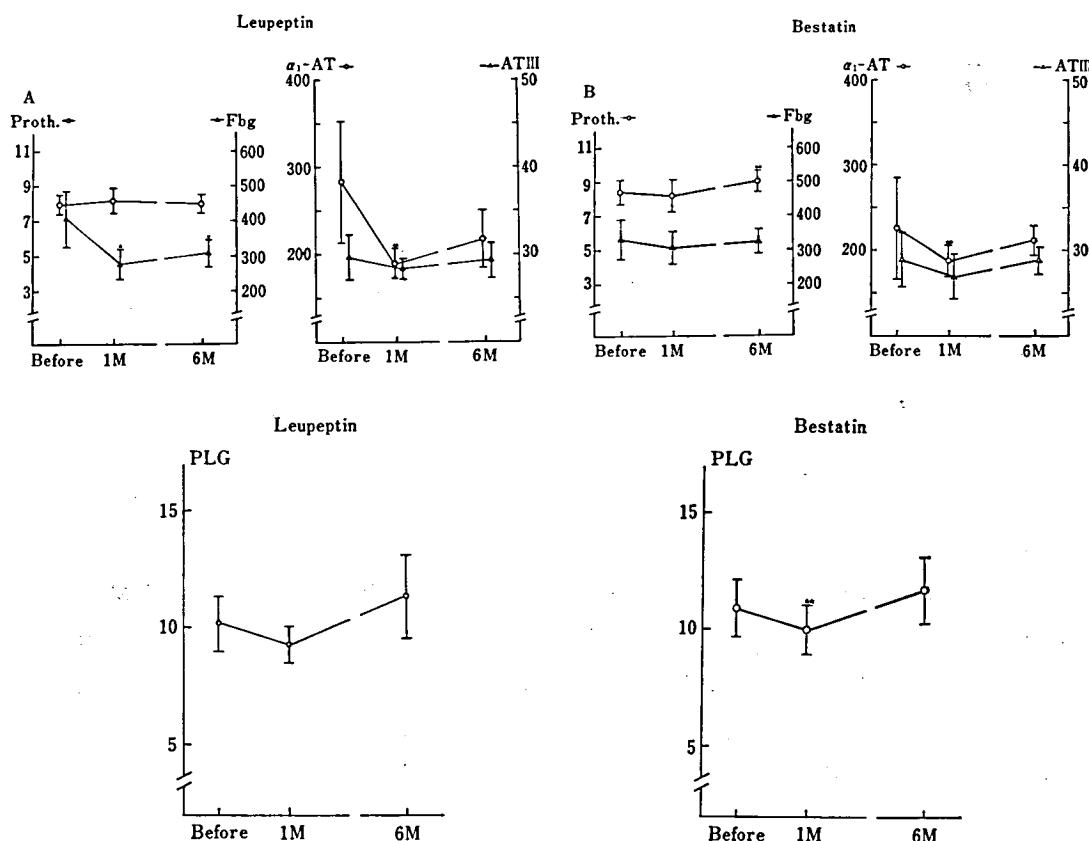


図 6 血液凝固機能の変化。ロイペプチシン投与群 (A 群, 6 A), ベスタチン投与群 (B, C 群, 6 B) とも有意な変動を示す項目がみられる。* $p < 0.02$, ** $p < 0.05$ 。

4) 血液凝固機能 (図 6)

A群では、フィブリノーゲンと α_1 -AT が有意に低下した ($p < 0.02$, $p < 0.05$)。B, C 群のベスタチン投与群でもプロトロンビン, α_1 -AT, プラスミノーゲンなどに変化がみられた ($p < 0.05$)。しかしながら、これらの変動はいずれも正常範囲内でのことであり、臨床的に問題となるような異常は生じなかった。

5) その他の

薬剤投与による自覚的副作用は特記すべきものになかった。C群の1例で腹部不快感を訴えた者があり、一時休薬したが、再開後とくに異常はみられなかった。A群の1例で肺炎を併発し、その間休薬をした。C群の3例がこの1年間で死亡し、本研究から脱落した。直接死因はいずれも心肺機能不全によるものであった。

考 察

DMD 患者 17 例に対し、1 年間にわたってロイペプチナまたはベスタチンの長期連続投与を行い、運動機能と CPK 活性値などの生化学的検査の両面から有効性を検討した。その際、最も重要視したのは CPK 活性値の変化である。なぜなら、一般に多発性筋炎など薬剤反応性のミオパシーではまず CPK 活性値の下降があり、次いで臨床症状の改善が得られるという事実が知られており、本症でもそれが適用されるであろうと推測されたためである。そこでより正確に判断するために、われわれは5回採血による CPK 活性値の日内変動パターンを分析したが、患者への負担が大きいことから、最低値と最高値および両者の比をみるとことで評価を試みた。仮に薬剤が有効であった場合、安静時ののみならず運動負荷後の CPK 活性値も低下することが期待される。このような観点から CPK 活性値の推移をみると、A, B 両群とも明らかに低下する経過をとった症例が存在した。これが薬剤によるものか他の要因によるものかが

次の問題となる。そこでもう一つの評価基準であり、しかも CPK 活性値に影響を与えるやすい運動機能との関係をみてみると、これらの症例ではいずれも運動機能が明らかに悪化しており、CPK 活性値の低下が症状の改善につながったとはい難い。むしろ機能障害が進行したため運動量が減少し、二次的に CPK 活性値が下降したと考えるのが妥当であろう。事実、最も運動機能障害の悪化が著しかったB群の症例1において CPK 活性値の低下の割合が最大であった。A群の症例1, 2 では5時30分の CPK 活性値の低下があり、運動機能障害の進行もなかったが、薬剤の効果によるとは断じ難く、まだ若年であるため DMD の自然経過であろうと思われる。これとは対照的に B群の症例4は、年齢的にかなり急速に悪化する状態にあると考えられるが、CPK 活性値は高値を保ったまま、運動機能の悪化もなく、その解釈に問題を残している。この症例に関しては注意深く経過を見る必要があろう。

副作用に関しては、自覚的にも検査結果のうえでもほとんど問題がなかった。そのうちで、一部の凝固系検査において有意な変動がみられたことは注目される。もともと DMD 患者には軽度ながら線溶活性に異常が存在するとする報告があり、われわれの結果をこうした背景と合せて考えてみると、投与した蛋白分解酵素阻害剤がこれら患者の有している何らかの凝固・線溶機能の異常に作用し、変化が生じたものと推察される。しかしこの変化は異常域に達するものではなく、臨床的に問題とはならないであろう。また DMD 患者の線溶異常は二次的な現象であるとされており、これの変動が直接本症の治療に結びつく可能性も少ないと思われる。その他、1 例に肺炎の発生があったが、これは細菌性のものであり抗生素に反応し速やかに回復した。投与していた薬剤との関係は明らかでないが、偶然の合併と理解している。また不幸にして 3 例の患者が死亡したが、その最

Duchenne型進行性筋ジストロフィー症患者に対するロイペプチノ、ベスタチンの影響

期は一般の DMD 患者と同様の経過をとっており、治験薬との関係はないものと考えられる。

ま　と　め

DMD 患者 17 例にロイペプチノ、ベスタチンを投与し、1 年間その影響を観察した。運動機能と CPK 活性値などの生化学的データとを総合し

て評価した限り、明らかにこれらの薬剤が有効であると判定された症例は存在しなかった。特記すべき副作用は認められず、安全性は高いと思われた。

機能障害度の軽い症例について、さらに長期間、多数例分析することが望ましいと考えられた。

各種筋疾患に対するベスタチン (NK 421) 投与後の経過報告

里 吉 栄二郎*

研究協力者 春原 経彦*・富 英明*

昭和 56 年より筋ジストロフィーなどを中心とする筋疾患に対し NK 421 を経口投与し、その後の臨床経過を観察した。ここでは、その結果と今後の問題点につき検討した。

対 象

肢帶型筋ジストロフィー (L.G. PMD) 6 例、年齢は 34-51 歳、罹病期間は 9-24 年、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (F.S.H. PMD) 1 例、27 歳、罹病期間 16 年、Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne PMD) 1 例、4 歳、罹病期間 1 年、Becker 型筋ジストロフィー (Becker PMD) 1 例、40 歳、罹病期間 35 年、筋強直性ジストロフィー (myotonic dystrophy) 3 例、年齢は 30-42 歳、罹病期間 12-18 年、多発筋炎 (polymyositis) 5 例、年齢は 29-47 歳、罹病期間 2-23 年、皮膚筋炎 (dermatomyositis) 1 例、65 歳、罹病期間 18 年、遠位筋ミオパシー (distal myopathy) 1 例、33 歳、罹病期間 13 年、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 1 例、37 歳、罹病期間 2 年の計 20 例を対象とした (表 1)。なお、投与開始時点では全例歩行可能であった。

方 法

上記の症例に対して NK 421 を 30 mg/日 より経口投与し、症例に応じて 1 カ月単位で漸増した。最高投与量は表 2 のごとくであるが、現在のところ 450 mg/日 1 カ月が polymyositis の 1 例、2 カ月が L.G. PMD の 2 例、polymyositis, dermatomyositis の各 1 例、3 カ月が L.G. PMD, myotonic dystrophy の各 1 例である。360 mg/日 2 カ月が L.G. PMD の 1 例、270 mg/

表 1 対 象

病 名	例 数	年齢(歳)
肢帶型筋ジストロフィー (L.G. PMD)	6	34-51
顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (F.S.H. PMD)	1	27
Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne PMD)	1	4
Becker 型筋ジストロフィー (Becker PMD)	1	40
筋強直性ジストロフィー (myotonic dystrophy)	3	30-42
多発筋炎 (polymyositis)	5	29-47
皮膚筋炎 (dermatomyositis)	1	65
遠位筋ミオパシー (distal myopathy)	1	33
筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	1	37
計	20	4-67

* 国立武藏療養所神経センター

表 2 最大投与量

投与量 (mg/日)	期間 (月)	例 数
450	1	1
	2	4
	3	2
360	2	1
	1	1
	2	1
180	13	1
	1	1
	2	2
90	3	1
	13	1
	2	1
60	1	1
	2	2

表 3 測定項目

- 10 m 歩行時間
- 階段 11 段昇降時間
- 筋力検査 (5 段階方式徒手筋力テスト)
 - 僧帽筋, 三角筋, 大胸筋, 肋上筋, 前鋸筋, 広背筋, 上腕二頭筋, 三頭筋, 腕橈骨筋, 手関節屈筋, 伸筋, 握力, 腸腰筋, 大腿内転筋, 外転筋, 大腿四頭筋, 大腿屈筋, 前脛骨筋, 下腿三頭筋
- 体重
- 自覚症状
- 副作用
- 血液
 - RBC, WBC, Hb, Plat., CPK, aldolase, ESR, T. Prot., T. Bil., GOT, GPT, LDH, Al-P, BUN, creat.
- 尿蛋白

日 1 カ月が ALS の 1 例, 2 カ月が polymyositis 1 例, 13 カ月が L. G. PMD の 1 例. 180 mg/日 1 カ月が Becker PMD の 1 例, 2 カ月が Duchenne PMD, myotonic dystrophy の各 1 例, 3 カ月が distal myopathy の 1 例, 13 カ月が F. S. H. PMD の各 1 例である. 90 mg/日 2 カ月が myotonic dystrophy 1 例. 60 mg/日 1 カ月が L. G. PMD 1 例. 30 mg/日 2 カ月が polymyositis の 2 例である.

なお poly myositis の症例 No.13, 16, 17 の 3 例, dermatomyositis の 1 例の計 4 例では, steroid, Imuran が併用された. これら 20 例の

経過観察期間は 1 カ月 - 1 年 7 カ月 (平均 10.9 カ月) である.

臨床効果判定には 1 カ月ごとに 10 m 歩行時間, 階段 11 段昇降時間, 全身 18 筋の 5 段階方式による筋力評価と, 午前中一定時刻での血清 CPK 値, aldolase 値を用いた (表 3).

10 m 歩行, 階段昇降時間, CPK 値については投与前を 1 として投与後, 現在での値との比をとった. 比が 1 より小さければ改善を示したことになる. 一方, 筋力に関しては全身の筋力評価の値 (5 段階方式) の総和を求めて投与前との比をとった. この場合 1 より大きければ筋力改善を示し

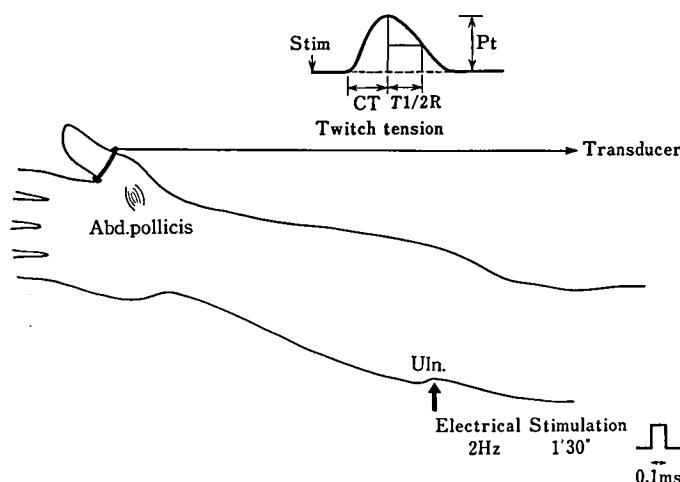


図 1

各種筋疾患に対するベスタチン投与後の経過報告

たことになる。

さらに L.G.PMD の No.2, 3, 5, 6 の 4 例に對し、経過中 2 回にわたり（6 カ月間隔）尺骨神経を肘部にて電気的に低頻度反復刺激（0.1 msec, 矩形波, 2 Hz 1 分 30 秒）を与える、母指内転筋より筋張力、staircase の程度、収縮時間、1/2 弛緩時間を測定し、半年間の推移を観察した（図 1）。

NK 421 投与中の副作用監視のため、血液より赤血球数、ヘモグロビン、白血球数、血小板数、血沈、CPK、aldolase、総蛋白、総ビリルビン、GOT、GPT、LDH、ALP、BUN、CRN を、尿より尿蛋白を測定した。

結果および考察

各症例につき 10 m 歩行時間、階段昇降時間、筋力、血清 CPK 値を NK 421 投与前と比較し表 4 に示した。

筋力に関しては投与後改善を示した症例はなかった。L.G.PMD の No.6 の 1 例、Becker

PMD の No.9 の 1 例、myotonic dystrophy の No.10, 11 の 2 例、polymyositis の No.17 の 1 例、distal myopathy の No.18 の 1 例の計 6 例では、投与前後で筋力に大きな変化がみられなかった。とくに L.G.PMD の No.6, myotonic dystrophy の No.11, polymyositis の No.17 では、いずれも 18 カ月以上筋力が保持されており注目される。一方、L.G.PMD の No.3, 4, 5, F.S.H.PMD の No.7, polymyositis の No.14, 15 では、中等度の筋力低下がみられた。このように長期間の観察で筋力改善を示した症例はなかったが、L.G.PMD の No.1, 2 の 2 例、polymyositis の No.16, 17 の 2 例、dermatomyositis の No.19 の計 5 例に経過中一過性の自覚的な筋力改善がみられ、このうち No.1 の症例を除く 4 例には他覚的な筋力改善もみられた。

10 m 歩行、階段昇降時間がともに改善したのは L.G.PMD の No.3 のみで、投与前と同程度のものが L.G.PMD の No.2, 5 の 2 例、

表 4 経過表

病名	性	年齢	罹病期間(年)	投与期間(月)	最大投与量(mg/日)	筋力	10m歩行	階段昇降	CPK値	副作用
1 L.G.PMD	M	26	22	1	60	—	—	—	—	
2 "	M	51	14	19	270	0.95	1.02	1.00	1.44	
3 "	F	50	9	3	360	0.84	0.80	0.87	2.52	
4 "	F	34	14	19	450	0.70	—	—	1.07	
5 "	M	45	17	19	450	0.79	0.88	1.09	1.51	
6 "	M	36	24	19	450	0.99	1.00	1.41	0.96	胃痛
7 F.S.H.PMD	F	27	16	16	180	0.81	1.33	1.30	0.71	
8 Duchenne PMD	M	4	1	5	180	0.95	1.00	—	1.15	
9 Becker PMD	M	40	35	7	180	1.00	1.04	1.11	1.25	
10 Myotonic dys.	M	30	14	4	180	1.00	1.00	1.00	0.54	
11 "	M	36	18	18	450	0.98	0.96	1.67	1.00	
12 "	F	42	12	1	90	0.92	1.00	1.09	0.83	複視
13 Polymyositis	F	39	2	1	30	—	—	—	—	
14 "	M	38	7	6	30	0.75	—	不能	1.21	霧視
15 "	F	29	3	10	270	0.85	1.00	1.00	1.59	瞼麻疹
16 "	F	47	11	19	450	—	—	—	1.04	
17 "	M	33	23	19	450	0.96	—	—	1.50	
18 Distal myopathy	M	33	13	9	180	0.96	1.00	1.13	0.88	吐氣、ふらつき
19 Dermatomyositis	M	65	18	19	450	—	—	—	2.65	
20 ALS	M	37	2	4	270	—	—	—	0.98	

myotonic dystrophy の No. 10 の 1 例, polymyositis の No. 15 の計 4 例にみられた。

CPK 値の改善は, L.G.PMD の No. 6, F.S.H.PMD の No. 7, myotonic dystrophy の No. 10, 12, distal myopathy の No. 18, ALS の No. 20 の計 6 例にみられ, さらにそのうち F.S.H.PMD の No. 7, myotonic dystrophy の No. 10 の各 1 例には経過を通じての減少傾向がみられた。しかし No. 7 の症例では有意差がみられず, また No. 10 の症例は, CPK 値自体かなり改善を示し

たものの, 観察期間が 4 カ月と短く, 効果判定には不十分と思われた。図 2 は, 投与期間中一過性に自他覚的筋力改善を認めた L.G.PMD の No. 2 の症例の経過表である。NK 421 180 mg/日 投与中一過性に CPK 値が低下し, 階段昇降時間の軽度短縮がみられている。図 3 は同じく L.G.PMD の No. 6 の症例の経過表であるが, 投与開始より一過性に CPK 値が減少し, その後 NK 421 を增量したにもかかわらず CPK 値は徐々に増加し, 階段昇降時間にも延長がみられている。

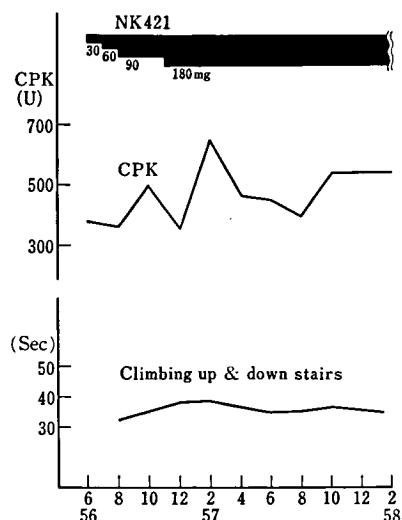


図 2 No. 2, L.G.PMD, 51 y. o. male

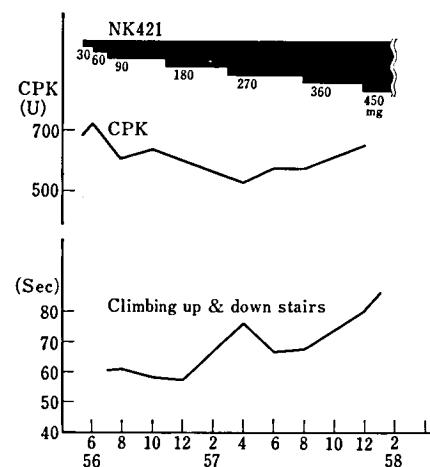


図 3 No. 6, L.G.PMD, 36 y. o. male

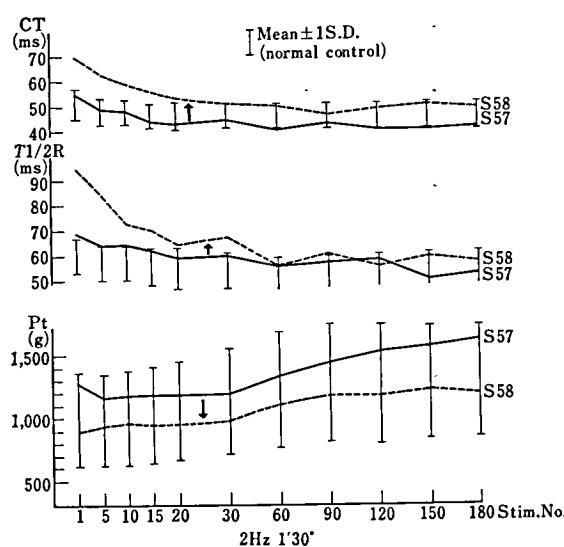


図 4 No. 2, L.G.PMD, 51 y. o. male

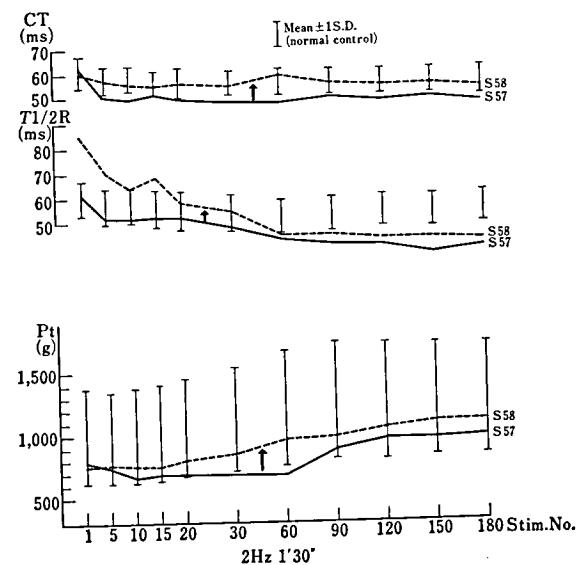


図 5 No. 6, L.G.PMD, 36 y. o. male

各種筋疾患に対するベスタチン投与後の経過報告

ただし、この症例は、MMTによる筋力検査では投与前後で大きな変化がみられなかった。

電気生理学的検索を施行した L.G.PMD の No. 2, 3, 5, 6 の 4 例のうち、No. 2, 3, 5 の 3 例では筋張力の減少がみられ、さらに収縮時間、 $1/2$ 弛緩時間の延長もみられ、症状の進行が示唆された。図 4 は一過性に自他覚的筋力改善をみた L.G.PMD の No. 2 の症例の低頻度反復刺激の結果である。横軸に 2 Hz の刺激回数、縦軸に筋収縮力 Pt (g)、 $1/2$ 弛緩時間 T 1/2 R (msec)、収縮時間 CT (msec) をとっている。帯の部分は正常人の平均値 ± 1 SD の領域を意味している。この症例での筋収縮力 Pt (g) は経過中正常範囲内であったが、2 回目の測定では低下がみられた。さらに CT、T 1/2 R の延長もみられ症状の進行が示唆された。図 5 は、図 3 で示した、比較的筋力、CPK 値が安定していた L.G.PMD の No. 6 の症例の低頻度反復刺激の結果である。この症例では、CT、T 1/2 R がともに延長しているにもかかわらず Pt が改善しており、また staircase (低頻度連続刺激による筋収縮力の漸増現象) にも改善がみられており、筋収縮機能の改善が示唆された。

以上、臨床症状、血液生化学所見、電気生理学的所見を総合して明らかに改善を示した症例はみられなかった。しかし myositis の症例では ste-

表 5 副作用

症例 No.	投与量 (mg/日)	症 状
6	450	胃 痛
12	60	複 視
14	30	霧 視
15	60	尋 麻 痒
18	90	悪 心

roid、免疫抑制剤のみの場合に比較して NK 421 の併用により臨床症状の改善傾向がうかがわれた。その他の疾患群の間には臨床効果に差異がなく、また性別、罹病期間、投与期間、投与量とも無関係であった。このように、NK 421 による明らかな効果はみられなかったが、疾患の自然経過を遅らせている可能性があり、今後さらに長期的な観察が必要であると思われる。

NK 421 投与中の副作用では、L.G.PMD の No. 6 で 450 mg/日 投与中に胃痛が、myotonic dystrophy の No. 12 で 60 mg/日 投与中に複視が、polymyositis の No. 14 で 30 mg/日 投与中に霧視が、また No. 15 で 60 mg/日 投与中に尋麻疹が、distal myopathy の No. 18 で 90 mg/日 投与中に恶心がみられている (表 5)。しかしこれらの症例では、NK 421 を持続的に投与してもかかわらず症状が自然消失しており、上記の副作用との因果関係については不明であった。血液生化学、尿検査では異常はみられなかった。

ロイペプチソの難病治療薬としての開発研究

田 中 亘^{*1}

I. 製 剤 研 究

硫酸ロイペプチソとその製剤の安定性

研究協力者 石間戸秀之^{*2} 中田 実^{*2} 寺田 隆^{*2} 二宮 宏^{*2} 新井 貞男^{*2}
島津 忠寿^{*2}

II. 薬 効 研 究

1. 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の野生株 (N 2) および筋肉発育異常を生ずる変異株 (E 444) に対する薬物の作用

研究協力者 蔡内 正彦^{*2} 八木 敬子^{*2} 加藤 和夫^{*2} 高橋 泰^{*2}

2. 筋ジストロフィーマウスの運動障害に対するロイペプチソ軟膏の作用

研究協力者 中村 敬太^{*2} 小沢 義人^{*2} 山下 幸和^{*2} 水口 茂^{*2} 高山 秀樹^{*2}
石橋 正元^{*2} 宮崎 浩*

III. 毒 性 試 験

1. 硫酸ロイペプチソの微生物突然変異原性試験

研究協力者 塩崎 光春^{*2} 鈴木寿美江^{*2} 松尾 薫^{*2} 島津 忠寿^{*2}

2. ロイペプチソ (NK 381) のウサギにおける器官形成期投与試験 (その 2)

試験責任者 水谷 正寛^{*3}

実験計画指導者 井筒 稔^{*3}

試験実施担当者 松田 洋^{*3} 橋本 豊^{*3} 長尾 哲二^{*3} 代田真理子^{*3} 片上 敦子^{*3}
藤木 南^{*3} 宮内 量久^{*3}

3. ロイペプチソ軟膏のウサギにおける 35 日間経皮毒性試験

試験責任者 井坂 英彦^{*3}

実験計画指導者 大滝 恒夫^{*3}

試験実施担当者 山口 一喜^{*3} 松井 英一^{*3} 今井 清^{*3}

*1 日本化薬(株)医薬事業部

*2 日本化薬(株)医薬事業部総合研究所

*3 (財)食品薬品安全センター秦野研究所

ロイペプチンの難病治療薬としての開発研究

I. 製 剤 研 究

硫酸ロイペプチンとその製剤の安定性

1) 硫酸ロイペプチンの安定性

前報（梅沢班，昭和 56 年度研究報告）に引き続き硫酸ロイペプチン (Leup) 原末の室温長期および 40°C 下の保存における安定性を検討した。結果を表 1 に示す。

室温 18 カ月密封保存後に試料中の L 体の含有率は 97.8-98.4%，D 体の含有率は 1.6-2.5% であり、Leup の原末は安定であった。

一方、40°C、6 カ月密封保存後に L 体の含有率は 93.1-95.6% と含量低下が認められたが、D 体の含有率は 4.1-5.2% であり、L 体の含有率の低下はほとんどラセミ化によることがわかった。なお、いずれの温度下の保存においても原末の外観は変化しなかった。

表 1 The stability of leupeptin bulk under the room temperature and 40°C

Lot No.		Content of leupeptin (residual % to initial)						
		Room temperature			40°C			
		6	12 (months)	18	40	80 (days)	120	180
32	L-form	101.2	97.8	98.4	98.8	97.9	97.1	93.1
	D-form	1.2	1.6	1.6	1.1	2.5	2.3	4.7
35	L-form	99.5	99.2	97.8	99.3	98.8	97.5	94.1
	D-form	1.6	1.8	2.0	1.1	1.6	1.8	4.1
36	L-form	98.9	99.5	98.3	98.6	99.6	99.0	95.6
	D-form	1.8	2.0	2.5	1.2	2.2	3.0	5.2

表 2 The stability of the oral preparation of leupeptin for the clinical trial under the room temperature

		Content of leupeptin (residual % to initial)		
		Storage time (months)		18
Powder (Leup 10% in D-mannitol)	L-form	98.0	98.1	
	D-form	2.2		2.3
Capsule (Leup ; 50 mg)	L-form	97.9	97.1	
	D-form	2.0	2.3	

2) 硫酸ロイペプチ製剤の安定性

治験用経口製剤である散剤 (D-マンニトール 10 倍散) およびカプセル剤 (Leup 50 mg, D-マンニトール 98.5 mg およびステアリン酸マグネシウム 1.5 mg を 2 号ゼラチンカプセルに充填) について室温長期保存の安定性を検討した。結果を表 2 に示す。

いずれの治験用経口製剤とも室温 18 カ月密封保存で安定であり、外観変化も認められなかった。

II. 薬効研究

1. 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の野生株 (N 2) および筋肉発育異常を生ずる変異株 (E 444) に対する薬物の作用

A. 目的

C. elegans は体長 1 mm 程の土壤自活性線虫で、細胞数は生殖系を除いて約 1,000 個と少ないが、筋肉、神経、消化管、生殖線、表皮をもち、細胞レベルでよく分化している。また、運動および形態異常変異株を中心に多数の変異株¹⁾ が知られ、薬物の作用点を探求するに際し、よいモデル生物となる可能性が示されている。そこで、筋肉の発達異常により段階的な麻痺を起こす運動異常の変異株²⁾ (*unc-52*, E 444) の形態観察と、それに対する Leup 等の薬物の作用を検討した。

B. *C. elegans* の発育過程とその形態について

1) 結果と考察

変異株 E 444 は、生育の初期においては正常の運動機能をもつが、ある時期から段階的な麻痺を起こし、成虫では動けなくなる。この E 444 の段階的な運動異常現象を野生株 N 2 との比較を通して、形態上から観察した。

図 1 は、*C. elegans* (N 2, E 444) の生育の経

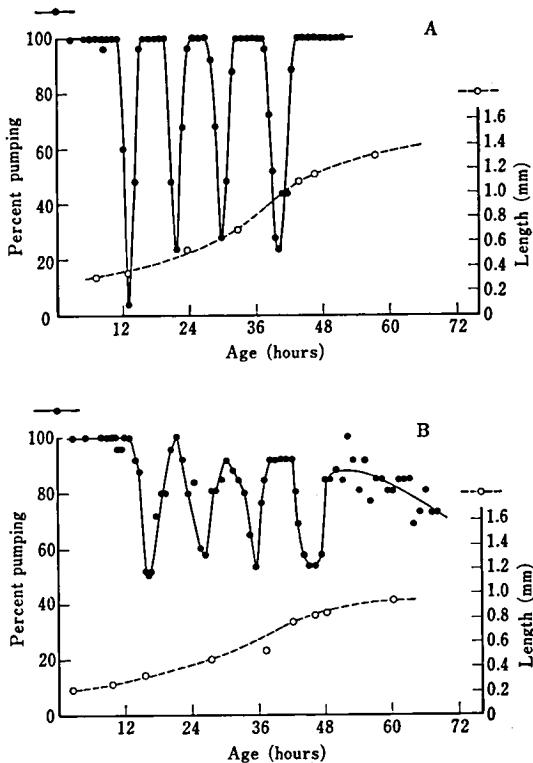


図 1 Growth of *C. elegans*

過を、脱皮の時期および虫の大きさから観察したものである。*C. elegans* は、4 回の脱皮（各幼虫の段階を L1, L2, L3, L4 と呼ぶ）を経て成虫となるが、脱皮のときには餌をとらなくなり、咽頭の pumping の回数が減るので、その時期を知ることができる。N 2 と比較すると、E 444 では全体的な脱皮時間の遅延と乱れを観察することができた。一方、成長（長さの増加）に関しては、時間的な遅延と体の矮小化が認められた。とくに、L4 と成虫の段階における矮小化が著しい。また、L4 で運動機能が低下し、成虫では動けなくなることから、発育と筋肉の発達には強い相関のあることが見いだされた。

一方、図 2 は、筋細胞の発達を dense body (横紋筋では Z 帯に対応) の配列数から追跡したものである。線虫の筋肉は、斜紋筋と呼ばれる特異な構造から成っており、Z 線上に dense body と呼ばれる密度の高い顆粒が配列している。この

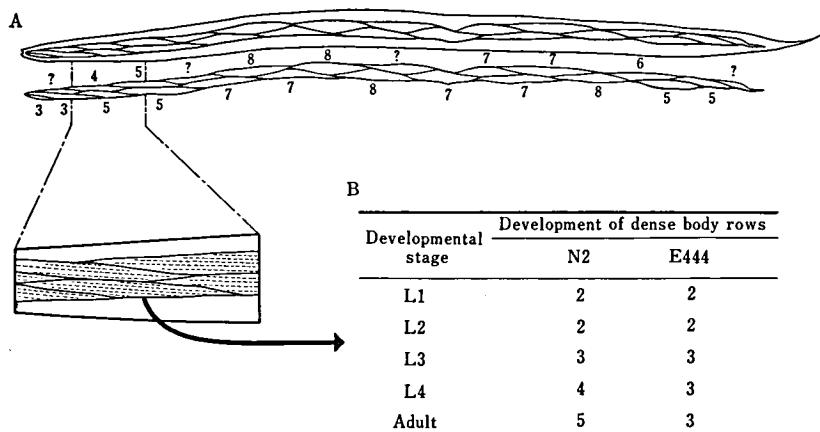


図 2 Schematic drawing of body wall muscle cells and dense bodies in N2 *C. elegans* (A) and development of dense body rows of N2 and E444 *C. elegans* (B)

顆粒は、生きている虫を Nomarski 微分干渉顕微鏡を用いて顕鏡することにより確認することができ、これは、筋細胞の発達の様子を直接反映している。

N2 成虫の筋細胞および dense body の配列数は図 2A のようであり、体の部位により発達の度合が異なることがわかる。また、虫の咽頭部位(図 2A の拡大部分)の筋細胞の発達の経過を、図 2B に示した。N2 では、成長とともに dense body の配列数が 2→5 と段階的に増加するのに対し、E444 では、2→3 で止まり、L3 段階で筋細胞の生育は停止していた。

また、E444 成虫の動けなくなった部位の筋細胞を、N2 のそれと比較したものを図 3 に示した。上段の Nomarski 微分干渉顕微鏡像によると、N2 の規則的な dense body の配列が E444 では認められず、下段の偏光顕微鏡像では、sarcomere の走行の乱れ(図中の矢印)が観察された。

以上、E444 の形態上の観察結果をまとめると、以下の通りである。

- ① 筋細胞の発達は L3 で止まる。
- ② L4 で運動が乱れ、成虫で動けなくなる。
- ③ 動けなくなった虫の筋肉構造(sarcomere)は大きく乱れている。

これら観察結果は E444 の遺伝子(*unc-52*)が sarcomere の構成を制御している可能性を示している^{2,3)}。もし、この過程に何らかのプロテアーゼが関与しているならば、Leup 等の阻害剤の効果が期待できる。このような考察のもとに、次に E444 に対する薬物の投与を検討した。

C. Leup 等の薬物の作用

1) 実験方法

C. elegans は寒天培地上で培養した *E. coli* (OP 50) を餌として飼育される¹⁾が、このとき薬物を培地に添加することにより、経口的にとり込ませた。そして、孵化してから死ぬまでの成長、形態、生殖系などへの影響を Nomarski 微分干渉顕微鏡、および実体顕微鏡を用いて観察した。

2) 結 果

a) 実験の信頼性に及ぼす因子の検討

E444 を用いて、同一条件下におけるプレート間の変動と薬物等による餌の量の減少が、生育どのように影響するかを調べた(表 3)。その結果、プレート間の変動はほとんどなく、結果の信頼性は高いといえるが、餌の量の減少(peptone の量を減少させ、*E. coli* の生育を悪くする)は、虫の生育、生殖系に大きく影響した。また、運動

N 2



E 444

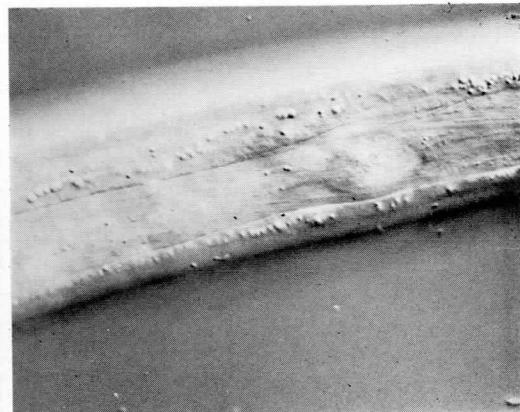


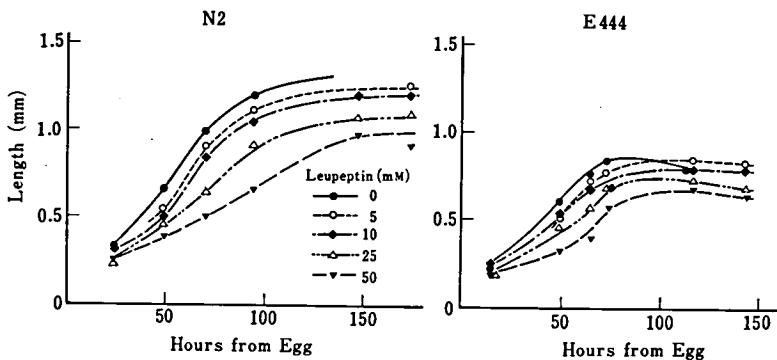
図 3 Body-wall muscle of *C. elegans*, (upper) Nomarski light microscopy,
(lower) polarized light microscopy

表 3 Effect of *E. coli* concentration on the exhibition time of paralysis (E 444)

Peptone (g/l)	Growth of <i>E. coli</i>	Maximum length Time(hr) (A)	Length (mm)	Exhibition of paralysis(hr) (B)	Hatch (hr)	Brood size	(B)/(A)
1.5 (plate A)	+	61	0.87	49.	78.8	+	0.8
1.5 (plate B)	+	61	0.87	49.	78.8	+	0.8
0.8	+	62	0.79	54.5	79.5	+	0.9
0.4	+	62	0.78	54.5	79.5	+	0.9
0.2	+	61.5	0.76	69.5	79.5-98.3	+	1.1
0.1	+	60	0.73	69.5	79.5-98.3	+	1.2
0	+	60	0.74	69.5	100.5-122.3	+	1.2

表 4 Effect of leupeptin on development of N 2 and E 444 *C. elegans*

Strain	Leupeptin (mm)	Growth of <i>E. coli</i>	Survival after hatching (%)	Maximum length		Exhibition of paralysis (hr) (B)	Egg laid (hr)	Hatch (hr)	Brood size	(B)/(A)
				Time(hr) (A)	Length (mm)					
N 2	0	#	100	86	1.25	—	70.5	78	#	—
	100	—	0	—	—	—	—	—	—	—
	50	#	60	140	0.97	—	94.5-147	94.5-147	+	—
	25	#	86	108	1.09	—	94.5	94.5-147	#	—
	10	#	94	92	1.20	—	70.5-94.5	94.5	#	—
	5	#	100	90	1.25	—	78	70.5-94.5	#	—
E 444	0	#	100	70	0.84	64.5-72.5	—	72.5-116.5	#	0.9-1.0
	100	—	0	—	—	—	—	—	—	—
	50	#	75	82	0.68	72.5-116.5	—	—	—	0.9-1.4
	25	#	88	78	0.73	72.5-116.5	—	116.5-142.5	+	0.9-1.5
	10	#	97	76	0.80	72.5	—	72.5-116.5	#	1.0
	5	#	100	76	0.84	62.5-72.5	—	72.5-116.5	#	0.8-1.0

図 4 Effect of leupeptin on growth of *C. elegans*

の段階的麻痺現象の発現、すなわち虫が動けなくなるまでの時間は、生育の不全に伴って見かけ上遅延することが明らかとなった。

b) Leup とその同族体の作用

N 2, E 444 のいずれに対しても、5 mm 以上で Leup 濃度に依存する下記の変化が認められた（表 4）。

- ① 孵化後の死亡虫数の増加 (LD_{50} 50-100 mm)
 - ② 成長の遅延、および生育不全（図 4）
 - ③ 産卵および孵化開始時間の遅延
 - ④ 孵化した小虫数 (Brood size) の低下
 - ⑤ E 444 の動けなくなるまでの時間の遅延
- E 444 では、運動の段階的麻痺現象の発現が遅

れ、見かけ上の効果が認められるが、*E. coli* の量を減少させるだけでも同様のことが起こり〔表 3、表 4 の (B)/(A) で比較〕、Leup の段階的麻痺抑制作用とは判断できない。また、筋細胞の Nomarski 像からも改善は認められなかった。

一方、Leup では全く変化の認められない濃度 (1 mm 以下) で、E 444 に対する Leup 同族体の作用を検討したところ、Z-L-Phe-DL-Arg CHO, Z-D-Phe-DL-Arg CHO に Leup 同様の、運動の段階的麻痺現象発現の遅延効果が認められた（表 5）。

d) ベスタチンおよびその他の薬物

アミノペプチダーゼの阻害剤であるベスタチン (AHPA-Leu), AHPA-Arg, および免疫増強作

ロイペプチノの難病治療薬としての開発研究

表 5 Effect of leupeptin analogues on development of E 444 C. elegans

	Concentration of drug (mm)	Growth of E. coli	Maximum Time(hr) (A)	length (mm)	Exhibition of paralysis (hr) (B)	Hatch (hr)	Brood size	(B)/(A)
Control	—	#	73	0.91	47.5-73.5	73.5-91.5	#	0.7-1.0
Z-D-Phe-ArgCHO(DL)	1.0	#	92	0.86	73.5	91.5	#	0.8
Z-Phe-Leu-ArgCHO	0.2	#	92	0.88	47.5-73.5	73.5-91.5	#	0.5-0.8
H-Phe-Leu-ArgCHO	1.0	#	73	0.86	47.5-73.5	73.5-91.5	#	0.7-1.0
Z-Val-Pro-ArgCHO	0.4	#	92	0.89	47.5-73.5	73.5-91.5	#	0.5-0.8
Z-Phe-ArgCHO(DL)	1.0	#	100	0.86	73.5	91.5	#	0.7
Z-Pro-ArgCHO	1.0	#	80	0.91	47.5-73.5	73.5-91.5	#	0.6-0.9
Z-Pro-ArgCH(OBu) ₂	0.7	#	73	0.86	47.5-73.5	73.5-91.5	#	0.7-1.0
Bestatin	10.0	+	73	0.73	47.5-73.5	91.5-114.5	+	0.7-1.0

All amino acids were L-configuration unless otherwise stated.

表 6 Effect of bestatin on development of E 444 C. elegans

	Concentration of drug (mm)	Growth of E. coli	Survival after hatching (%)	Maximum Time(hr) (A)	length (mm)	Exhibition of paralysis (hr) (B)	Hatch (hr)	Brood size	(B)/(A)
Control		#	100	76	0.90	52.5-65.3	89.8	#	0.7-0.9
Bestatin	20	#	0	—	—	—	—	—	—
	10.1	#	75	90	0.82	65.3-77.8	89.8-113.3	#	0.7-0.9
	5.0	#	86	90	0.90	52.5-65.3	89.9-113.3	#	0.6-0.7
	2.1	#	100	73	0.92	52.5-65.3	89.8	#	0.7-0.9
	0.54	#	100	73	0.91	52.5-65.3	89.8	#	0.7-0.9
Leupeptin	10	#	56	90	0.80	65.3-77.8	113.3	+	0.7-0.9

用のある forphenicinol についても検討したが、Leup 類似の作用が有るのみで、運動の段階的麻痺現象の改善は認められなかった。また、蛋白質同化ホルモンである mestanolone は、培地に全く溶解しないこともあるが、飽和濃度で何の変化も示さなかった（表 6）。

D. 考 察

Leup の薬効を評価するにあたり、C. elegans の筋肉発達異常変異株 (E 444) を用いて、薬物の作用および作用部位の探求を試みたが、Leup をはじめ、他の薬剤についても、C. elegans (E 444) の運動の段階的な麻痺を改善するに至らず、満足する結果は得られなかった。しかしながら、N 2 と E 444 株における dense body 配列状態の違いなど新しい知見が得られ、今後異なる観点からの C. elegans の利用により、筋肉異常等の解明

に大きく寄与するものと思われる。

2. 筋ジストロフィーマウスの運動障害に対するロイペプチノ軟膏の作用

筋ジストロフィー症病態動物においては、蛋白質分解酵素である lysosomal protease あるいは calcium activated neutral protease 活性の著しい亢進が認められており、筋肉組織における Leup 濃度が効果に大きく影響すると考えられる。筋ジストロフィーマウスに Leup を皮下投与した際の血漿および筋肉中動態については、昭和 55 年度にすでに報告した。今回、血漿および筋肉内濃度と効果との関係を明らかにするため、Leup 軟膏を筋ジストロフィーマウスに 1 カ月間連続投与し、運動障害に対する効果を行動薬理学的に観察するとともに、血漿および筋肉内 Leup 濃度の測定を行った。

表 7 症状 score

実験方法

1) 実験動物および投与方法

C 57 BL/6 J-dy/dy (雄性, 10-13 週齢) の筋ジストロフィーおよび正常マウスに, Leup-ワセリン軟膏 (20% w/w) を 1 日 1 回, 両肢大腿部に 30 mg/kg の割合で 1 カ月間塗布した。単回投与群においては, ワセリン軟膏を 1 カ月間塗布し, 最終日に Leup-ワセリン軟膏を投与し, 単回投与とした。

2) 運動障害に対する作用

Leup 軟膏塗布開始前および塗布開始 2 週間, 4 週間後に下記の観察を行った。

a) 症状観察および平面の運動量測定

直径 60 cm, 底面を同心円状に 41 区画に仕切った円筒状の open field 装置を使用し, VTR で行動を録画した。観察時間は 3 分間とし, 表 7 の基準による score と, 移動区画数を数えて運動量の測定を行った。なお, 測定は 2 人の観察者が行い, その平均値を被験マウスの測定値とした。

b) 回転籠法による運動量の測定

マウスを回転籠に入れ, その後から 30 分間の回転数を計測した。

3) 血漿および筋肉内 Leup 濃度

最終投与 1 時間後に屠殺し, 筋肉および血液を採取した。Leup の測定は, 前年度報告書の「RIA による Leup の微量定量法」に記載されて

- 0: 全観察時間にわたり, 正常マウスとの差異なし。
- 1: 肢関節, 膝関節はかなり動き, 協調歩行可能。ただし, 足根関節の機能が不全で, 歩行時に足根骨の返しが円滑でなく, 指が体軸と直角に外側方向に向き, 後肢を開きぎみにヨコヨコ歩行したり, ときに体軸の移動に付いて行けず, 足が後方へ流れる。
- 2: 肢関節はかなり動くが, 膝関節, 足根関節の屈伸機能が不十分で, カエル泳ぎのような歩行を呈するときがある。ただし, 正常マウスと同様の体位に後肢を戻すことは可能。
- 3: 肢関節, 膝関節および足根関節の機能不全が進行し, 後肢のがびてひきずるような歩行が発現する。このとき, score 1, 2 の症状も同時に観察されうる。
- 4: 全観察時間にわたり後肢のがびっぱなしとなる。ただし, 股, 膝, 足根関節はわずかに動き, 後肢を開いたまま腰を振るように前進する。
- 5: 全観察時間にわたり, 後肢は完全に固く屈曲したままで全く動かない。麻痺が両後肢に及ぶ場合は, 脊柱彎曲も伴い, 後肢は交叉して腰から下は全く動かない。

いる方法に従って行った。

実験結果および考察

実験結果を表 8 にまとめた。投与前の測定値と処置 2 週および 4 週後の測定値を paired t 検定により比較し, 障害の進行度を検討した。Leup 軟膏連続投与群で, 塗布 2 週間後と投与前の回転数に有意な差が認められなかった。さらに, Leup 軟膏連続投与群においては, 対照群に比較して著明な体重増加は認められなかった。全般的には対

表 8 Leup の筋ジストロフィーマウス運動障害に対する作用

	Open field 法		回転籠法
	症 状	移動量/3 分	回転数/30 分
対照群 (11 例)			
処 置 前	1.20±0.28	59.8±6.7	104.9±16.6
処置 2 週間後	2.66±0.25**	46.2±6.6	72.9±18.5*
処置 4 週間後	3.11±0.30**	28.7±4.1**	50.8±18.5**
Leup 群 (11 例)			
処 置 前	2.05±0.40	52.5±8.8	109.7±22.6
処置 2 週間後	2.66±0.41**	48.0±10.6	82.6±19.3
処置 4 週間後	3.05±0.39**	36.8±10.8*	53.4±16.0**

数値は平均±標準誤差。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 対前処置。

ロイペプチノの難病治療薬としての開発研究

表 9 Plasma and muscle concentration of leupeptin (1 hr) and body weight after percutaneous repeated administration of leupeptin in muscular dystrophy mice

Administration	Age (weeks)	Plasma ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Muscle ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Body weight (g)
S	13	8.3	10.7	12.3
R		2.3	3.3	20.9
S	12	3.8	4.4	12.7
R		6.4	4.3	11.7
S	11	9.3	2.5	12.9
R		2.1	2.7	11.0
S	10	1.9	2.0	10.9
R		1.4	2.2	12.2
S	10-13	5.8±3.5	4.9±4.0	12.4±1.1
R		3.1±2.3	3.2±0.9	11.4±1.9

S : single administration, R : repeated administration for 1 month.

照群, Leup 投与群とも同様の症状進行が認められた。

筋ジストロフィーマウスに Leup-ワセリン軟膏を単回および連続投与し, 1時間後における血漿中濃度および筋肉内濃度を表9に示す。血漿および筋肉内の Leup 濃度は連続投与よりも単回投与のほうがいずれも高い値を示し、意外な結果となつたが、両者に有意差は認められなかつた。

以上の結果から、軟膏1カ月間連続投与においては Leup により筋ジストロフィーマウスの運動障害の進行および症状は抑制ないし改善はみられなかつた。

III. 毒性試験

1. 硫酸ロイペプチノの微生物突然変異原性試験

Ames ら⁴⁾が開発したヒスチジン要求株およびトリプトファン要求株 (*Salmonella typhimurium his-* および *E. coli trp-*) を用いて硫酸ロイペプチノの遺伝子(復帰)突然変異試験を行つた。

試験方法

硫酸ロイペプチノは Lot FLP-19 を用いて試験を行つた。変異原性陽性物質は、ベンゾ[a]ピレン (B[a]P), 2-アミノアントラセン (2-AAN), 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2), N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (ENNG), 9-アミノアクリジン (9-AAC) および 2-ニトロフルオレン (2-NF) を用いた。被験菌株は国立がんセンター研究所の杉村隆博士より分与された *S. typhimurium TA 98*, *TA 100*, *TA 1535*, *TA 1537*, *TA 1538* および *E. coli WP 2 uruA* を使用した。試験方法は矢作ら⁵⁾によって報告された突然変異原性試験法に従い、以下の手順により行つた。

- ① 硫酸ロイペプチノの DMSO 溶液 0.1 ml を滅菌試験管に入れる。
- ② ①に S-9 Mix または 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml を加える。
- ③ ②被験菌培養液 0.1 ml を加える。
- ④ ③に 45°C の軟寒天を 2 ml 加え、グルコース最小寒天平板上に注ぐ。これを 37°C で 2 日間培養し、ヒスチジン非要求性またはトリプトフ

表 10 硫酸ロイペプチの変異原性試験

検体濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	<i>S. typhimurium</i> TA 98			
	S-9 Mix あり		S-9 Mix なし	
	コロニー数	パックグランド	コロニー数	パックグランド
10,000	34(38) 41	++	38(35) 32	++
5,000	46(55) 63	++	35(37) 39	++
1,000	36(41) 46	++	21(24) 26	++
500	43(46) 49	++	19(22) 24	++
100	34(34) 33	++	29(24) 18	++
50	41(37) 33	++	23(23) 22	++
DMSO	46(37) 27	++	29(26) 22	++
AF-2 0.1			549(533) 516	++
B[a]P 5	477(475) 473	++		

表 12 硫酸ロイペプチの変異原性試験

検体濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	<i>S. typhimurium</i> TA 1535			
	S-9 Mix あり		S-9 Mix なし	
	コロニー数	パックグランド	コロニー数	パックグランド
10,000	18(18) 18	+	7(9) 10	+
5,000	21(20) 19	++	5(6) 6	++
1,000	13(15) 16	++	7(7) 6	++
500	7(10) 13	++	9(7) 5	++
100	13(14) 15	++	7(5) 3	++
50	20(17) 14	++	12(11) 10	++
DMSO	21(19) 17	++	15(20) 25	++
ENNG 5			172(188) 204	++
2-AAN 2	210(197) 183	++		

アン非要求性の復帰変異株の集落を数える。

結果および考察

硫酸ロイペプチの 6 菌株に対する突然変異原

表 11 硫酸ロイペプチの変異原性試験

検体濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	<i>S. typhimurium</i> TA 100			
	S-9 Mix あり		S-9 Mix なし	
	コロニー数	パックグランド	コロニー数	パックグランド
10,000	160(161) 162	++	143(147) 151	++
5,000	162(165) 168	++	189(180) 170	++
1,000	158(147) 135	++	179(191) 202	++
500	162(152) 142	++	175(180) 185	++
100	144(147) 150	++	180(180) 180	++
50	163(164) 164	++	188(170) 152	++
DMSO	150(149) 148	++	177(163) 148	++
AF-2 0.01			610(560) 510	++
B[a]P 5	977(872) 767	++		

表 13 硫酸ロイペプチの変異原性試験

検体濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	<i>S. typhimurium</i> TA 1537			
	S-9 Mix あり		S-9 Mix なし	
	コロニー数	パックグランド	コロニー数	パックグランド
10,000	6(10) 13	++	7(9) 10	++
5,000	5(9) 13	++	5(6) 6	++
1,000	13(10) 6	++	7(7) 6	++
500	12(10) 7	++	9(7) 5	++
100	12(12) 11	++	7(5) 3	++
50	15(14) 12	++	12(11) 10	++
DMSO	16(12) 8	++	5(8) 10	++
9-AAC 8			11(10) 9	++
B[a]P 5	103(89) 74	++		

性試験結果は表 9-15 に示したとおりである。すなわち、陽性対照として加えた B[a]P および 2-AAN は S-9 Mix 存在下で、また、AF-2, ENNG, 9-AAC および 2-NF は、S-9 Mix 非

ロイペプチの難病治療薬としての開発研究

表 14 硫酸ロイペプチの変異原性試験

検体濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	<i>S. typhimurium</i> TA 1538			
	S-9 Mix あり		S-9 Mix なし	
	コロニー数	パックグランド	コロニー数	パックグランド
10,000	36 25(31)	++	15 14(15)	++
5,000	23 21(22)	++	14 25(20)	++
1,000	33 15(24)	++	17 17(17)	++
500	28 22(25)	++	10 8(9)	++
100	30 23(27)	++	16 14(15)	++
50	28 23(26)	++	11 19(15)	++
DMSO	28 26(27)	++	17 15(16)	++
2-NF ₁			527 581(554)	++
B[a]P ₅	217 212(215)	++		

存在下で、いずれも強い突然変異活性を示した。これに対し硫酸ロイペプチは、被験菌 6 菌株に対し、いずれも、S-9 Mix の有無にかかわりなく、自然復帰変異株の集落数以上の集落を出現させず、硫酸ロイペプチは *S. typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538 および *E. coli* WP 2 *uvrA* に対し突然変異作用を示さないと判断した。ただし、試験濃度は試験菌に対して毒性を示さない限度値である 10,000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ を最高濃度とした。

2. ロイペプチ (NK 381) のウサギにおける器官形成期投与試験 (その 2)*

JW-KBL ウサギを用い、胎児器官形成期に相当する妊娠時期に NK 381 を経口投与し、母体ならびに胎児に対する影響を検討した。

試験

予備試験の成績を参考にして、JW-KBL ウサ

表 15 硫酸ロイペプチの変異原性試験

検体濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	<i>E. coli</i> WP 2 <i>uvrA</i>			
	S-9 Mix あり		S-9 Mix なし	
	コロニー数	パックグランド	コロニー数	パックグランド
10,000	25 22(24)	++	23 27(25)	++
5,000	22 26(24)	++	20 28(24)	++
1,000	25 15(20)	++	17 13(15)	++
500	13 14(14)	++	24 16(20)	++
100	17 19(18)	++	28 21(25)	++
50	18 16(17)	++	10 26(18)	++
DMSO	17 20(19)	++	14 24(19)	++
AF-2 0.01			78 53(66)	++
2-AAN 80	1,483 1,620(1,552)	++		

ギの妊娠 6-18 日 (13 日間) に、NK 381, 0 (蒸留水), 30, 100 および 300 mg/kg/day を連続強制経口投与した。帝王切開は、妊娠 28 日に行った。

観察結果

1) 母動物に対する影響

妊娠 28 日において解剖した各群の動物数 (交尾確認動物数) および妊、不妊等の内訳は、表 16 に示す通りである。

300 mg/kg 群で 23 例中 6 例が投与開始 2 回または、3 回後に死亡した。主な剖検所見は、ショック腎様変化、肺のうっ血などであった。

また、流産例が 100 mg/kg 群に 1 例、300 mg/

表 16 使用動物数 (交尾確認動物数)

群	対照群	NK 381 (mg/kg)		
		30	100	300
交尾確認動物数	16	16	17	23
不妊動物数	0	1	4	3
妊娠動物数	16	15	13	20
死亡または切迫屠殺動物数	0	0	0	6
流産動物数	0	0	1	2

* この報告は、昭和 56 年度研究報告書の一部にも報告されている。

kg 群に 2 例認められた。その他、300 mg/kg 群で投与初期における投薬終了後、一時的な自発運動の低下が認められた。

体重推移については、300 mg/kg 群で投与開始後（妊娠 10-23 日）の体重増加が有意に抑制される傾向を示し、妊娠 28 日においても有意ではないが、体重増加が引き続き抑制される傾向が認められた。

飼料摂取量は、300 mg/kg 群で対照群と比較して、ほぼ投薬期間中を通じて有意に減少し、体重の増加の抑制と相関関係を示した。

2) 胎児に対する影響

胚・胎児死亡率が有意ではないが、用量-反応の関係を示して増加する傾向が認められた。また胎児体重も有意の差ではないが、300 mg/kg 群でわずかに抑制される傾向が認められ、さらに NK 381 投与群内で用量-反応性に減少する傾向にあった。

胎盤重量は、NK 381 投与群内で用量-反応の関係を示して減少する傾向が認められたが、対照群と比較するといずれの NK 381 投与群においても胎盤重量は重かった。

外形異常は、対照群を含むすべての群において成立しなかった。

骨格、内臓の異常または変異の出現頻度には、NK 381 投与の影響は認められなかった。

評 価

以上の結果から本試験条件下においては、NK 381 の母体に対する安全量は 100-200 mg/kg 程度と考えられる。また、胎児に対しては、300 mg/kg までの量は著明な発生毒性を示さないと結論される。

3. ロイペプチド軟膏のウサギにおける 35

日間経皮毒性試験*

日本白色種家兔雄 40 匹を使用し、ロイペプチ

ン 10, 20 および 30% を含有する軟膏を背部皮膚に 1 四辺り 0.5 g を 35 日間連続塗布（6 回/週）による経皮毒性試験を開始し、現在 3 週間を経過した。

実験には、以下の 3 項目の実験系を設けた。

① 各種ロイペプチド濃度軟膏の 1 回塗布における筋肉中ロイペプチド濃度測定

動物試験は終了し、筋肉中ロイペプチド定量分析を実施中（日本化薬）。

② 各種ロイペプチド濃度軟膏の塗布後における血液中ロイペプチド濃度の推移

第 1 回目の塗布後・連続 2 週間塗布後および 5 週間塗布後の血液中ロイペプチド濃度推移を調べる目的で、各期における塗布後 1, 2, 4, 6 および 24 時間目の血液中ロイペプチドレベルの測定を実施中。

③ 35 日間塗布における経皮毒性試験

試験期間の一般症状の観察、体重、摂餌量の測定を実施中である。塗布期間終了時には尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査および病理組織学的検査を行う予定で試験を継続中である。

文 献

- 1) Brenner, S. *Genetics*, 77, 71 (1974).
- 2) Mackenzie, J. M., Garcea, R. L., Zengel, J. M., and Epstein, H. E. *Cell*, 15, 751 (1978).
- 3) Zengel, J. M. and Epstein, H. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 852 (1980).
- 4) Ames, B. N., McCann, J. M., and Yamasaki, E. *Mut. Res.*, 31, 347-368 (1975).
- 5) Yahagi, T., Dagawa, M., Seino, Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T., and Hoshimoto, Y. *Cancer Lett.*, 1, 91-96 (1975).

* 中途経過報告、昭和 58 年 3 月 31 日現在

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）
開発研究班分担研究者一覧

氏名	所属	住所
班長 梅沢 浜夫	微生物化学研究所	〒141 東京都品川区上大崎 3-14-23 03 (441) 4173
幹事 木下 真男	東邦大学医学部附属大橋病院第四内科	153 東京都目黒区大橋 2-17-6 03 (468) 1251
" 田中 亘	日本化薬株式会社薬品研究所	115 東京都北区志茂 3-31-12 03 (901) 7171
" 青柳 高明	微生物化学研究所	141 東京都品川区上大崎 3-14-23 03 (441) 4173
監事 米沢 猛	京都脳神経研究所	615 京都市西京区上桂森下町 1-95 075 (391) 0292
班友 江橋 節郎	東京大学医学部薬理学教室	113 東京都文京区本郷 7-3-1 03 (812) 2111
" 勝沼 信彦	徳島大学医学部酵素研究施設	770 徳島市蔵本町 3-18-15 0886 (31) 3111
班員 岩崎 祐三	東北大学医学部脳疾患研究施設	980 仙台市星陵町 2-1 0222 (74) 1111
" 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
" 大塚 正徳	東京医科歯科大学医学部薬理学教室	113 東京都文京区湯島 1-5-45 03 (813) 6111
" 里吉栄二郎	国立武藏療養所神経センター	187 東京都小平市小川東町 2620 0423 (41) 2711
" 祖父江逸郎	名古屋大学医学部第一内科	466 名古屋市昭和区鶴舞町 65 052 (741) 2111
" 高木 昭夫	国立武藏療養所神経センター	187 東京都小平市小川東町 2620 0423 (41) 2711
" 垣中 征哉	国立武藏療養所神経センター	187 東京都小平市小川東町 2620 0423 (41) 2711
" 野村 達次	実験動物中央研究所	213 川崎市宮前区野川 1430 044 (755) 5441
" 松下 宏	和歌山県立医科大学第二生理学教室	640 和歌山市九番丁 9 0734 (31) 2151
" 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
" 村上 慶郎	国立療養所箱根病院	250 小田原市風祭 412 0465 (22) 3196
" 村地 孝	京都大学医学部附属病院検査部	606 京都市左京区聖護院川原町 075 (751) 3502

(五十音順)