

厚生省
新薬開発研究費

微生物の二次代謝産物に由来する
難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究

梅沢 班

昭和58年度研究報告書

昭和59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、第 5 年度を迎えた。

第 5 年度は、前年度までの研究に引き続き、ロイペプチン、ペスタチン、ホルフェニシノールに加え、新たにホルフェニシンおよびアルファメニンなどにつき活発な基礎研究を行うとともに、ロイペプチンおよびペスタチンの臨床研究を行い、さらにホルフェニシノールについても臨床研究を開始した。また、本年度は本研究班の基礎ならびに臨床研究のよりいっそうの充実を図るため、新たに丸山班員、青柳班員、福山班員、および松本班員を加えた。

かくして、上述の低分子酵素阻害物質の生化学的、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の研究などの広範囲の基礎領域で大きな進展が得られたわけである。さらに、臨床研究において、生後速やかに阻害物質を投与することにより、治療効果を期待しうる可能性が示唆された。この事実は刮目すべき成果といえることができる。筋ジストロフィー症の治療薬開発という困難な研究領域に、ようやく解決の兆しがみえたといえよう。

本研究班の 5 年間にわたる成果に基づいて、さらに研究を続けることは、筋ジストロフィー症を含む難病の治療に大きな光を与えるものと信ずる。しかし、臨床効果の検討には、さらに 5 年以上にわたる長期の研究が必要である。本研究を重要課題としてとりあげられた厚生省薬務局に感謝する次第である。

昭和 59 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（ロイペプチン）
の開発研究 3
梅 沢 浜 夫

分 担 研 究 報 告

ロイペプチンのプロテアーゼ阻害作用に関する研究 17
村 地 孝

蛍光・HPLC による血清ホルフェニシノールの定量法と
p-ヒドロキシベスタチンのプレカラム蛍光誘導体化 25
大 倉 洋 甫

筋ジストロフィーマウスの筋肉代謝網に対する
低分子酵素阻害物質の影響 35
青 柳 高 明

EAE モルモットに対するロイペプチンの効果 43
岩 崎 祐 三

ロイペプチンの薬理学的研究 49
大 塚 正 徳

筋ジストロフィーハムスターに対するベスタチン投与の効果	61
高木昭夫	
塩酸ピピバカイン（マーカイン）処理による 筋崩壊と筋再生に対するベスタチンの影響	67
埜中征哉	
鶏ジストロフィー筋における新生児型構造蛋白質の出現 ——ベスタチンの投与と除神経の影響	73
丸山工作	
筋ジストロフィー症マウスに対するアルファメニン投与の影響	83
松下宏	
2, 3 の筋萎縮症患者に対するベスタチンの効果	89
村上慶郎	
ベスタチン服用時の DMD 患者の血中濃度および 臨床効果の検討	93
三吉野産治	
進行性筋ジストロフィー症に対するベスタチンの使用経験	101
福山幸夫	
筋疾患に対するベスタチンの効果に関する臨床的研究 ——Ⅰ. 神経筋疾患におけるベスタチン投与後の 尿中アミノ酸の変動	115
木下真男	
筋疾患に対するベスタチンの効果に関する臨床的研究 ——Ⅱ. 筋疾患に対するベスタチンの効果判定に関する 臨床的まとめ	119
木下真男	

筋ジストロフィーに対するベスタチンの影響 ——血清 CK と muscle-specific enolase を指標として	123
	祖父江 逸 郎
筋ジストロフィーを中心とする各種筋疾患に対する ベスタチン投与後の経過報告	131
	里 吉 栄二郎
ホルフェニシノールの体内動態に関する研究	143
	松 本 郁 男
ロイペプチンおよびベスタチンの難病治療薬としての 開発研究	149
	田中 亘・石井靖男
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	191

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

(ロイペプチン)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年度に厚生省薬務局より新薬開発研究として発足し、現在に至っている。

微生物の二次代謝産物として発見した多くの低分子酵素阻害物質は、広範囲の生理活性を有することで世界の注目を集めている。このうち、セリン・チオールプロテイナーゼ阻害物質として見出されたロイペプチンならびに細胞膜酵素阻害物質、すなわち細胞膜結合物質として発見されたベスタチンおよびホルフェニシノールが、筋ジストロフィーマウスの発症ならびに症状の進行を阻止する効果のあることが明らかにされた。このことは、筋ジストロフィー症の治療にきわめて重要なことである。さらに、臨床研究において、すでに症状の進行した症例には治療効果を望むことは難しいが、Duchenne型のような遺伝的疾患には、生後速やかに細胞膜結合物質を投与することにより、治療効果を期待できる可能性が示唆された。なお、ホルフェニシノールは、病因に関与する遺伝子に対する作用がモデル動物の試験で認められている。上述した成果は筋ジストロフィー症の治療に大きな光を与えたものといえよう。

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)：—ロイペプチン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)：—螢光・

HPLCによる血清ホルフェニシノールの定量法と *p*-ヒドロキシベスタチンのプレカラム螢光誘導体化

- 3) 青柳高明 (微生物化学研究所)：—筋ジストロフィーマウスの筋肉代謝網に対する低分子酵素阻害物質の影響

- 4) 岩崎祐三 (東北大学医学部)：—EAE モルモットに対するロイペプチンの効果

- 5) 大塚正徳 (東京医科歯科大学医学部)：—ロイペプチンの薬理学的研究

- 6) 高木昭夫 (国立武蔵療養所神経センター)：—筋ジストロフィーハムスターに対するベスタチン投与の効果

- 7) 桝中征哉 (国立武蔵療養所神経センター)：—塩酸ピピバカイン (マーカイン) 処理による筋崩壊と筋再生に対するベスタチンの影響

- 8) 丸山工作 (千葉大学理学部)：—鶏ジストロフィー筋における新生児型構造蛋白質の出現—ベスタチン投与と除神経の影響

- 9) 松下 宏 (和歌山県立医科大学)：—筋ジストロフィーマウスに対するアルファメニン投与の影響

- 10) 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

- 11) 村上慶郎 (国立療養所箱根病院)：—2,3の筋萎縮症患者に対するベスタチンの効果

- 12) 三吉野産治 (国立療養所西別府病院)：—ベスタチン服用時の DMD 患者の血中濃度およ

び臨床効果の検討

13) 福山幸夫(東京女子医科大学):一進行性筋ジストロフィー症に対するベスタチンの使用経験

14) 木下真男(東邦大学医学部):一筋疾患に対するベスタチンの効果に関する臨床的研究

15) 祖父江逸郎(名古屋大学医学部):一筋ジストロフィーに対するベスタチンの影響—血清CKとmuscle-specific enolaseを指標として

16) 里吉栄二郎(国立武蔵療養所 神経センター):一筋ジストロフィーを中心とする各種筋疾患に対するベスタチン投与後の経過報告

17) 松本郁男(万有製薬株式会社):一ホルフェニシノールの体内動態に関する研究

18) 田中 亘(日本化薬株式会社):一ロイペプチンおよびベスタチンの難病治療薬としての開発研究

次に、上記各班員の研究報告について要約する。

1. ロイペプチン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ンの阻害作用を検討する目的で、腎臓からカルパインの精製を行った。

動物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(カルパインと総称する)は、その Ca^{2+} 要求性に関し2種類あることが知られてきたが、そのいずれもがロイペプチンの強い阻害作用を受ける。

彼らは、ラット腎臓からI型、II型の2種類のカルパインを、ほとんど同様の方法により並行して精製した。3.64gの粗蛋白質分画から出発して、カルパインIを0.53mg(6,170倍精製)、カルパインIIを0.33mg(4,160倍精製)収得した。精製標品はいずれもゲル電気泳動的に均質性を示した。I型の等電点は5.3、II型のそれは4.6であった。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、

I・II両カルパインとも、80kDaおよび25kDaの2つのサブユニットから成るヘテロ二量体であることが明らかとなった。両酵素のアミノ酸組成はかなり類似しているが、決して同一ではない。

I型は $2.0\mu M Ca^{2+}$ で50%活性化を受けるのに対して、II型は $200\mu M Ca^{2+}$ で50%活性を発現する。I型は Sr^{2+} のほか Ba^{2+} および Mn^{2+} によってもかなり活性化されるが、II型では Sr^{2+} 以外のイオンはほとんど無効であった。

筋肉以外の組織からカルパインIとカルパインIIを同時に並行精製することは、いままで成功していなかった。今回の研究により、同一臓器の両酵素の直接比較が可能となったわけで、両酵素の類似点と相違点がかかなり明瞭に示された。今後、両者のサブユニット同士の比較実験や、免疫学的連関性などの研究により、これら諸酵素の作用および阻害機構が分子構造の水準で明らかにされるものと期待される。

2. 蛍光・HPLCによる血清ホルフェニシノールの定量法とp-ヒドロキシベスタチンのプレカラム蛍光誘導体化

大倉班員は、ホルフェニシノール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。

ホルフェニシノールがアルカリ性で酸化され、強い蛍光を発することを発見した。この蛍光反応条件を検討し、血清ホルフェニシノールの蛍光・HPLCによる定量法を開発した。また、57年度に提出したベスタチンの蛍光・HPLCでは血清中微量に存在するその代謝物p-ヒドロキシベスタチン[1nmol(400ng)/ml以下]を有意に定量できなかったため、新たにp-ヒドロキシベスタチンのHPLCにおける蛍光誘導体化法の基礎研究を行った。

1) 蛍光・HPLCによる血清ホルフェニシノールの定量

血清100 μl を過塩素酸で除蛋白し、その

上清 100 μ l に 25 mM フェリシアン化カリウム 50 μ l および 3.5 M KOH 200 μ l を加え、50°C で 15 分間加温する。反応液に、1.5 M Na_2SO_3 50 μ l および 1.0 M アンモニア緩衝液 (pH 8.5) と c. HCl の等容混液 100 μ l を加える。この反応液 100 μ l を HPLC に付す。HPLC は、カラムに Li Chrosorb RP-18 を、溶離液に 4 mM テトラ-*n*-ブチルアンモニウムヒドロキシドを含む 0.1 M アンモニア緩衝液 (pH 8.5) を用いて行う。蛍光検出は、励起 385 nm および発光 485 nm で行う。この方法により、血清中 1 nmol(200 ng)/ml 以上の濃度で存在するホルフェニシノールを 6 分以内に分離し、精度よく定量できた。

2) HPLC における *p*-ヒドロキシベスタチンの蛍光誘導体化

p-ヒドロキシベスタチンのフェノールのオルト位にアルデヒド基を導入し、アルデヒド試薬の 4,5-ジメトキシ-1,2-ジアミノベンゼンモノ塩酸塩によって蛍光ラベル化する。このラベル化反応は、チロシン含有ペプチドに対しても蛍光体を与える。これらのラベル化体は、逆相分配 HPLC により分離され、高感度に検出された (4~10 pmol/HPLC 注入量)。検量線は、少なくとも 5 nmol (HPLC 注入量) まで、それぞれ原点を通る直線性を示した。

3. 筋ジストロフィーマウスの筋肉代謝網に対する低分子酵素阻害物質の影響

青柳班員は、筋ジストロフィーマウスに対する低分子酵素阻害物質の治療効果を調べる目的で、阻害物質投与により誘起される筋肉を含む諸臓器内における酵素網の動態に関する研究を行った。

ロイペプチン (500 μ g/日)、ベスタチン (200 μ g/日)、ホルフェニシノール (500 μ g/日)、およびホルフェニシン (500 μ g/日) は筋ジストロフィーマウスに、毎日 1 回腹腔内に 8 日間連続投与

した。最終投与時の 3 時間後に屠殺したのち、前肢筋、後肢筋、心、脾、肝、腎を摘出し、ホモジネートの遠心上清について、7 種類のアミノペプチダーゼ、5 種類のエンドペプチダーゼ、3 種類のグリコシダーゼ、クレアチンキナーゼ、ホスファターゼ、およびエステラーゼなどの酵素活性の変動について検討した。上述の阻害物質を投与することにより、誘起された各臓器内の酵素活性の変動は、これらの阻害物質の *in vitro* における阻害活性とは無関係に、さまざまな酵素活性に影響を与えていることを明らかにした。

4 種の阻害物質投与により誘起された酵素変化のパターンには、何らかの類似性があることが推察された。それゆえ、順位相関係数を求めて検討した結果、前肢筋および後肢筋の酵素網に、上述の阻害物質がきわめて高い類似性をもった変動を与えることを明らかにした。ホルフェニシンはロイペプチン、ベスタチン、およびホルフェニシノールと同様に、筋ジストロフィーマウスの治療に有効であることを示唆した。

一方、脾の酵素網に対してはホルフェニシノールのみが、他の阻害物質の作用と異なることを認めた。ホルフェニシノールは免疫応答細胞に対し、他の阻害物質と異なる影響を与えるものと考えられる。

4. EAE モルモットに対するロイペプチンの効果

岩崎班員は、炎症性脱髄疾患に関するロイペプチンの研究を行った。

EAE (experimental allergic encephalomyelitis) は、ヒトの脱髄性神経疾患の動物モデルとして研究されている。この髄鞘脱落のメカニズムとして、免疫反応の中で活性化された macrophage の分泌する neutral proteinase が髄鞘の崩壊をきたすという考え方がある。この酵素の主なものとして plasmin であるということから、その拮抗剤であるロイペプチンが脱髄現象を防ぎうるのではないかと考えられる。このような考えから、以下の実

験を試みた。

〔方法〕 220~420 g の成熟モルモットを4群に分けた。第1群(15匹)、感作の前日よりロイペプチン 25 mg/kg, 2回/日腹腔内に投与したもの;第2群(15匹)、感作後1週目より同様にロイペプチンを投与したもの;第3群(15匹)、発症した日からロイペプチンを投与したもの;第4群(7匹)、ロイペプチンを投与しなかったもの。毎日の観察と体重測定を続けたのち、21日目にすべて灌流固定を行い、大脳と脊髄とを採取して組織観察に供した。効果判定に用いた項目は、臨床的および組織的発症率、発症日、臨床症状を5段階に分けて得られた臨床的重症度、一定の部位の観察から得られた組織的重症度、および体重の推移などである。

〔結果〕 1) 臨床的発症率では第1・2群でやや低率であったが、組織的発症率では差がなかった。2) 第3・4群の発症日は同じであったが、第1・2群ではそれより1日、2日遅かった。3) 臨床的重症度では、軽度ながら差がみられ、第1・2群で軽かった。しかし、組織的重症度には差はなかった。4) 体重増加の割合は、第1・2群に比較して第3・4群で高かった。体重増加の頂点に至る時期は第2・3・4群で一致していたが、第1群ではそれより3日遅れた。5) 発症後同時期に得られた脳、脊髄の標本で、第1・2・3群のものに好中球、microglia の浸潤が目立った。

以上の結果から、EAE モルモットに対するロイペプチン効果は、有効とはいいがたいものの、その過程の中で何らかの影響があるものと考えられた。

5. ロイペプチンの薬理学的研究

大塚班員は、ロイペプチンの薬理学的研究を行った。

1) ロイペプチンの血圧下降作用の検討

ロイペプチンによりウサギの血圧が一過性に下降することを昨年度報告し、神経節遮断作用によるものと推測した。この点を検討したところ、フェントラミン処置下においてもロイペプチンにより血圧下降がみられた。

2) 副交感神経節に対する作用

摘出したラット顎下神経節を Tyrode 液で灌流し、神経節細胞より細胞内記録を行った。ロイペプチンは、節前神経刺激で発生するコリン作動性 fast EPSP を抑制した。アセチルコリンを節後神経細胞に適用すると、時間経過の速い脱分極と、それに続く遅い経過の脱分極とが記録された。ロイペプチンは前者を抑制し、後者を増強した。

3) 脊髄運動ニューロンおよび I_a シナプス伝達に対する作用

ラットを人工呼吸器で維持し、脊髄運動ニューロンの細胞内記録により、活動電位、静止電位、後過分極を測定した。ロイペプチンを静脈内投与したのち最高4時間にわたって記録を行ったが、上記電気的性質の変化はみられなかった。また、 I_a 感覚神経刺激により発生する EPSP にも変化はみられなかった。

4) 摘出脳幹-脊髄標本に対する作用

本標本は最近開発され、呼吸様活動を *in vitro* で記録、観察しうる特性をもつ。ロイペプチンを灌流液中に適用したところ、9例中2例において呼吸様活動の頻度の増加が観察され、この効果はアトロピンにより抑制された。

5) 摘出脊髄-尾標本に対する作用

本標本で尾に圧侵害刺激を加えると、痛み反応と考えられる電位を前根から記録できる。圧侵害刺激により発生する時間経過の遅い電位はエンケファリンにより抑制された。ロイペプチンは、単独ではこの電位に影響を与えなかったが、エンケファリンの作用を増強し

た。

6. 筋ジストロフィーハムスターに対するベスタチン投与の効果

高木班員は、筋ジストロフィーハムスターにベスタチンを皮下注射により長期投与し、筋ジストロフィーの自然経過に対する影響を研究した。

〔方法〕筋ジスハムスター（BIO 14.6）19匹および対照（BIO FIB）8匹に、ベスタチン 2mg/動物/日を6～8週間にわたって背部皮下に連日投与した。筋ジストロフィー病変の指標として、血清CK値と筋組織中の壊死線維および再生線維数を採用した。

〔結果〕1)筋ジスハムスターは、実験中に約半数が死亡した。しかし、これは薬剤の影響でないことは明瞭であった。一般に、筋ジスハムスターの成長は対照に比して遅滞していた。2)筋ジスの血清CK値に関して、ベスタチン投与群と非投与群の間に差を認めなかった。しかし、両群において、CK値のばらつきは著明であった。3)筋ジスEDL筋における壊死線維の比率は薬剤群0～1.5%、生食群0～0.4%、また再生線維については、薬剤群2.8～26.4%、生食群4.6～17.7%であった。いずれについても、薬剤の影響は認めなかった。筋ジスSOLについても、同様な結果であった。

〔考案とまとめ〕今回の実験の問題点の第1は、筋ジス群の死亡数が多く少数例の観察となった点である。第2は、指標とした血清CK値あるいは壊死・再生線維数は、筋ジスでは明らかに異常であった。しかし、筋ジス個体間でのばらつきが著明なため、微妙な薬剤の効果を検出することは不可能と思われた。このような条件下の実験であったが、ベスタチンは筋ジスハムスターの自然経過に著明な影響を与えることはない結論された。

7. 塩酸プピバカイン（マーカイン）処理による筋崩壊と筋再生に対するベスタチンの影響

桝中班員は、塩酸プピバカイン処理による筋崩壊と筋再生に対するベスタチンの影響について研究を行った。

局所麻酔剤である塩酸プピバカイン（マーカイン）は、筋細胞膜のみを破壊し、他の支持組織は損傷しないので、筋線維の強い壊死のあとでも再生は早い。また、再生線維は均一で、その発育と分化過程に再現性があり、統計的処理が可能である。この実験系にベスタチンを投与し、その影響をみた。

約250gのWistarラット84匹を次の4群に分けた。①無処置、無治療群、②ベスタチン10mg/kg/日投与群、③マーカイン（0.25%液）0.5ml筋注群、④マーカイン、ベスタチン治療群。マーカインは、ヒラメ筋内に直接筋注した。①～④群とも、マーカイン注後2、7、14日目に相当する日に各群7匹ずつ計28匹よりヒラメ筋を採取し、生化学的、組織化学的検索を行った。

ベスタチン単独投与では酸ホスファターゼ、カテプシンD活性が多少上昇する傾向にあったが、それ以外の α -グルコシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ値には変動はなく、また筋線維径にも影響を与えなかった。マーカイン注により上記ライゾチーム酵素活性は上昇し、ベスタチンは酸ホスファターゼの活性をやや抑制する傾向にあったが、壊死の過程には大きな影響を与えなかった。再生線維はベスタチン投与によっても影響を受けず、その筋線維径、分化の状態は無治療群のそれと差はみられなかった。

マーカインによる筋の壊死はあまりに強烈であるので、緩徐に壊死、再生と繰り返す筋ジストロフィーと病変過程を等しくは評価できない。ロイペプチンは筋の再生を著明に遅延させたが、ベスタチンは再生の抑制はなかった。

8. 鶏ジストロフィー筋における新生児型構造蛋白質の出現—ベスタチン投与と除神経の影響

丸山班員は、ベスタチン投与における鶏ジストロフィー症の発症に及ぼす効果について研究を行った。

鶏胸筋では、孵化後の成長期に筋構造蛋白質のタイプが著しく変化する。たとえば、孵化直後のヒヨコの幼若筋には遅筋型C蛋白質が存在するが、孵化後2週間で消失し、速筋型に変る。他方、遺伝性の筋ジストロフィー鶏（NH 413系）では、筋ジストロフィー症の発症に伴い、消失した遅筋型C蛋白質が再出現し、孵化直後のヒヨコの筋に類似したものになる。したがって、C蛋白質のタイプの変化は筋ジストロフィー症の指標になりうる。

本研究では、ベスタチン投与が鶏における筋ジストロフィー症の発症に及ぼす効果について、主として遅筋型C蛋白質の消長を指標として検討した。

孵化後1週齢から、体重1kg当り5mgずつベスタチンを連日皮下注射により投与した。1カ月後、鶏筋胸をとり出し凍結切片を作製して抗遅筋C蛋白質抗体で処理し、蛍光抗体法により検出を試みたところ、大胸筋表層部細胞のうち遅筋型C蛋白質を含むものの割合は、ベスタチン投与したもので0.6%、非投与のもので3%であった。このことは、ベスタチン投与により、筋ジストロフィー症の進行がやや遅れることを示唆している。しかし、3カ月齢に達したものでは、今回の投与量ではベスタチンの効果はあまり認められなかった。

次に、筋ジストロフィー症の実験モデル系の1つとして、鶏除神経胸筋を作成して調べたところ、除神経後1~2週間で遅筋型C蛋白質や β 型トロポミオシンの出現が認められ、筋ジストロフィー筋とよく似た状態となることが明らかとなった。

9. 筋ジストロフィーマウスに対するアルファメニン投与の影響

松下班員は、アルファメニンを発症直後の筋ジストロフィーマウスに投与し、その症状回復効果について研究を行った。

ベスタチンおよびホルフェニシノールを発症直後の筋ジストロフィーマウスに連続投与することにより症状進行が完全に抑制されることが見出されたので、引き続き他のimmunomodifierについて、同様な方法によって症状進行に対する抑制効果の検定を行っている。本年度は、ベスタチンに類似した阻害活性を示すアルファメニンAおよびBを用いて実験を行った。

実験は、約1カ月齢で軽度な症状を示す筋ジストロフィーマウスを用いて行い、これらにアルファメニンAおよびBを1日2回ずつ2, 4, 6, および12週間連続投与したのち、血清中ならびに骨格筋中のマーカー酵素の活性に及ぼす影響を与えるかについて検討した。その結果、血清中のPK活性はAあるいはBの投与によって著明に低下していることが認められ、またCPK活性も同様に低下の傾向を示していた。骨格筋中での酵素活性の変化は、まずアルカリおよび中性プロテアーゼが全投与群で、著しい活性低下を示していることが注目された。また、PK, CPK, LDHなどの酵素活性は逆に、いずれの投与群でも増加の傾向を示していた。とくに、A投与群ではこの傾向が顕著であった。これらの結果は、アルファメニンの投与によって、筋線維の膜機能に関してやや改善の徴候がみられることを示唆しているものと考えられる。しかし一方、尿中のクレアチンおよびクレアチニンの含量は、アルファメニン投与によっても大きな変化を示さず、むしろ重篤なクレアチン尿症の状態を続けていた。また、6週間投与実験の場合の体重変化を調べてみると、AまたはB投与群とともに食塩水投与疾病マウスに比較してやや増加の傾向を示してはいたが、正常並みには戻らず、12週間投与によっても症状の進行

はまったく抑制されなかった。

以上の結果から、アルファメニンAまたはBは、すでに発症している筋ジストロフィーマウスの症状進行に対して、これを顕著に改善させる効果があるとは断定できなかった。しかしながら、投与時期をさらに早めることによって効果が得られる可能性はまだ残っているものと考えられる。

10. 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、筋ジストロフィーマウスの供給を行うとともに、米国産筋ジストロフィーハムスターの供給を行い、また、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。

11. 2,3 の筋萎縮症患者に対するベスタチンの効果

村上班員は、前年度に引き続きベスタチンを筋疾患患者に投与して、その効果について検討した。

対象は 19 例で、一部に前回から使用している症例が含まれている。使用期間は 6 カ月から 30 カ月。投与方法は、1 日量 60, 270 mg の固定法と、1 日量 30 mg より毎週、一部隔週に 30, 100 mg ずつ増量し、600 mg から 1,500 mg に及んだものもある。

成績は、自覚症状が初期に軽度の改善を認めた多発性筋炎の 1 例および 1 歳 8 カ月の Duchenne 型筋ジストロフィー症で症状の改善と血清 CPK の低下の傾向を認めたのみで、他はいずれも効果はみられなかった。

検査成績では、白血球数を含む一般血液検査、尿検査、血圧、心電図、握力、血液生化学検査に著変はみられなかった。

1 歳 8 カ月の Duchenne 型筋ジストロフィー症では、ベスタチンの増量とともに血清 CPK 値は低下の傾向を示し、症状でも、登はん性起立が

改善し、歩行も転倒回数の減少、階段の昇降が可能となったが、現在、経過観察中である。検査成績を含めて、特別の副作用はみられなかった。

12. ベスタチン服用時の DMD 患者の血中濃度および臨床効果の検討

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) 症患者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。

これまで、ベスタチンを朝食前 1 回服用させ血中濃度について検討してきたが、安定した血中濃度を得ることができなかった。

今回、DMD 患者 20 名にベスタチン成人量 60 mg/日を毎食後 3 回 1 週間服用させ、そのうちの 5 名は 1 週間ごとに倍量して成人量 480 mg/日まで漸増し、血中濃度と臨床効果について新たに検討した。

その結果、1) 分割投与により安定した血中濃度を得ることができた。2) 漸増法では、投与量増加とともに血中濃度が上昇した。3) 20 例中 19 例が 30 分後に最高血中濃度 $0.72 \pm 0.22 \mu\text{g/ml}$ を示し、1 時間より半減期 130 ± 68 分の短い安定した分布を示したことより、ベスタチンは半減期の短い比較的吸収の速い薬物であることが推測された。4) 1 日 1 回隔日投与より、1 日 3 回連日投与のほうが安定した血中濃度が得られた。5) 漸増法においては、GOT, GPT, LDH の漸増法実施前後の値に有意な差をみなかったが、CPK の低下してくる例がみられた。6) 服用期間が長くなると、CPK の低下する例がみられ、また血中濃度と CPK がともに上昇している例数が減少する傾向がみられた。7) ADL では、1 週間服用者 5 名中軽快 1 名、不変 1 名、低下 3 名であり、4 週間服用者 5 名中軽快 1 名、低下 4 名であった。8) 副作用として発疹 1 名、悪心・嘔吐 1 名をみたが、後者の因果関係は不明であった。

これらのことより、今後の方針として、1) 副作

用に注意しながら、投与量を成人量 480 mg/日より増量しつつ血中濃度の飽和点を見出すこと、2) その量の3ないし4分割投与による長期投与を行いながら臨床効果を判定したい、と考えている。

13. 進行性筋ジストロフィー症に対するベスタチンの使用経験

福山班員は、進行性筋ジストロフィー症に対するベスタチンの治療効果を評価する目的で、東京女子医大小児科外来に通院中の Duchenne 型 10 名 (preclinical case 1 例を含む)、Becker 型 3 名、肢帯型 2 名、先天型 5 名 (福山型 4 名、良性型 1 名) 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。

原則として、最初の 4 週間は成人相当量 60→120→240→480 mg を 1 日分として、1 週間ごとに漸増投与し、分 3 で服用させた。480 mg 相当量に達したのちは最終量で維持した。その後、副作用を認めない場合、30 mg/kg/日 まで増量した。この際、Duchenne 型の 1 例で、最高 45 mg/kg/日 を 5 週間服用した例があった。服用前と投与開始後最初の 4 週間は 1 週間ごとに採血および 1 日採尿を行い、血清 CPK などの酵素、ベスタチンの血中濃度、カルニチン、血中、尿中のクレアチン、クレアチニン、尿中 3-メチルヒスチジンの測定を行い、その後は約 1 カ月間隔で同血清酵素を検討した。同時に運動機能も評価した。1 例を除いて全例最初の 1 週間のみ入院で評価し、その後は外来で評価した。

全経過を通じ運動機能の獲得、改善を示したのは、Duchenne 型の preclinical case の 1 例と、先天型の 3 例 (全例運動機能上昇期にある) のみであった。これらの症例の投与後の運動機能獲得経過は、Duchenne 型、先天型の平均的自然経過に比して差がなかった。このほかに、Duchenne 型 2 例では全経過で軽度運動機能レベルの改善がみられた。他の症例では、一時的に起立時間、走行時間の改善をみた例もあったが、6 カ月全体を

通してみると悪化し、機能レベルとしては使用前のそれより低下していた。

Becker 型、LG 型では一過性にやや改善を示した 1 例を除き、運動機能レベル、走行時間、起立時間に変化がなかった。

Duchenne 型の検査所見では、血清 CPK は 1 例を除いて全例投与開始後 1, 2, 3 週目の値は低下傾向を示したが、その後は一定の傾向がなかった。45 mg/kg/日 服用した例では、服用後の CPK 値が服用前値の 1/5 の値まで低下していた。尿中の 3-メチルヒスチジン/クレアチニン比は開始前後で有意差なく、投与量 (mg/体重/日) とともに特別な関係はなかった。明確な副作用は消化器症状のみであり、服用中止、減量、消化剤投与などで改善した。服用中に全身倦怠を示し、中止後改善した例があったが、同時期に感冒症状もあり、ベスタチンの副作用か否かは不明である。

14. 筋疾患に対するベスタチンの効果に関する臨床的研究

木下班員は、ベスタチンの筋疾患患者に対する影響および 6 施設での評価について集計を行った。

1) 当施設での検討 (尿中アミノ酸の検討)

10 例の神経筋疾患患者に連続 4 週から 3 年にわたりベスタチンを投与し、1 例に有効性を認めた。また、同時に行った尿中アミノ酸の変動に関する検討では、とくに 3-メチルヒスチジンの排泄量を測定したが、有意な変化は得られなかった。

2) 6 施設での成績のまとめ

東邦大学、国立神経センター、国立箱根病院、国立西別府病院、名古屋大学、東京女子医大の 6 施設での 74 例の集計では、とくに Duchenne 型ジストロフィー症で投与開始後比較的早期に血清 LDH、CPK の一時的な改善があり、投与方法の改良によってはさらに有効な成績が得られる可能性が示唆された。また、多発筋炎の症例の一部では、ステロイ

ドとの併用で臨床所見の改善がみられ、このような使用法の有用性も確かめられた。

15. 筋ジストロフィーに対するベスタチンの影響—血清 CK と muscle-specific enolase を指標として

祖父江班員は、各種神経筋患者血清中の β 型 enolase を測定し、ベスタチンの効果を検討した。

〔目的〕筋障害の指標として血清 CK が広く利用されてきた。一方、解糖系酵素である β 型 enolase (muscle-specific enolase, MSE) は、骨格筋、心筋に存在し、CK 同様、筋障害の指標となることが期待される。そこで、さまざまな神経筋疾患患者で両者の関係を調べ、ベスタチン投与によってこれらがどのような影響を受けるか検討した。

〔対象と方法〕1) 血清 MSE と CK: 各種神経筋疾患患者 162 例と対照 53 例の血清 MSE を enzyme immunoassay 法で測定し、血清 CK 値、ミオグロビン値との相関をみた。PMD 患者における MSE と CK 値の異常値出現率を比較した。2) 当班のプロトコールに従ってベスタチンの投与（漸増法）と採血を行い、CK 値と MSE 値を中心に諸検査結果の推移を調べた。対象患者は 5 例（肢帯型 2 例、Duchenne 型 2 例、筋緊張性ジストロフィー 1 例）で年齢 19~36 歳。4 週間の漸増投与後、さらに 4 週間 90 mg/日 固定投与を行い、同様の方法で検査した。

〔結果〕1) 対照群の血清 MSE 値は 7.5 ± 3.8 ng/ml であり、PMD 群では有意に高い値を示した。2) 血清 MSE と CK 値の相関係数は 0.831 ($P < 0.001$)、ミオグロビンとは 0.595 ($P < 0.001$) であった。3) 神経筋疾患における CK と MSE の異常値出現率には有意な差がなかった。4) ベスタチン投与によって血清 CK 値、MSE 値とも有意な変動を示さなかった。5) 血中、尿中のクレア

チニン、クレアチン値とも明らかな変化を示さなかった。6) 自覚的に特記すべき副作用は認められなかった。

16. 筋ジストロフィーを中心とする各種筋疾患に対するベスタチン投与後の経過報告

里吉班員は、ベスタチン (NK 421) を各種筋疾患に長期投与を行い、その臨床経過を検討した。

〔対象と方法〕長期観察例の対象は、LG PMD 6 例、FSH PMD 1 例、myotonic dystrophy 2 例、Duchenne PMD 5 例、polymyositis 2 例、dermatomyositis 1 例の計 17 例で、最大投与量は 500 mg/日 5 例、450 mg/日 4 例、300 mg/日 2 例、240 mg/日 1 例、200 mg/日 2 例、60 mg/日 2 例、30 mg/日 1 例である。投与期間は 8~33 カ月（平均 19.2 カ月）である。以上の症例に対して 10 m 歩行、階段昇降時間、筋力テスト、血清 CPK 値を測定し、評価を行った。また、経過中 3 回にわたって低頻度反復電気刺激を行い、母指内転筋張力を測定した。NK 421 血中濃度測定の対象は、1 w 用量固定法では LG PMD 5 例、FSH PMD 1 例、myotonic dystrophy 3 例、Duchenne PMD 3 例、成人型 Pompe 1 例の計 13 例、4 w 用量漸増法では LG PMD 1 例、myotonic dystrophy 2 例の計 3 例である。

〔結果および考察〕筋ジストロフィーの長期投与例で臨床的改善を示した例はなかった。誘発筋電図では、2 例に筋張力低下がみられたが、1 例では 2 年半の経過中、筋張力低下は生じなかった。myositis 例では、steroid、免疫抑制剤に NK 421 を併用することにより臨床的改善を示す傾向があった。血清 CPK 値は、筋ジストロフィーの多数例で低下を示し、この傾向は CPK 高値の Duchenne PMD 例で強くみられた。血中濃度測定では、20 mg 服用後 1~2 hr で $500 \sim 1,000$ ng/ml の peak

値が得られ、480mg/日に漸増後(160 mg 服用後)には、7,000~8,000 ng/ml まで peak 値が上昇した。この観察期間中、多くの例で血清 CPK の低下がみられ、長期観察例でみられたと同様、高 CPK 値を示す LG PMD、Duchenne PMD 例で強くみられた。なお、血中 NK 421 濃度と血清 CPK 値の改善度の間に相関はなかった。NK 421 投与中、4 例に消化器症状がみられたが、NK 421 の増量により出現する傾向があった。しかし、これらの例でも一時中止、減量により症状が消失し、その後投与を続行することができた。血液、尿所見に異常はなかった。

17. ホルフェニシノールの体内動態に関する研究

松本班員は、ホルフェニシノールの難病治療薬としての開発研究に対する基礎研究を行った。

1) ホルフェニシノールの製造

各班員にホルフェニシノールを供給するために製造法の改良を行い、ホルフェニシノールの製造を行った。

2) 体内動態研究

2-1) ホルフェニシノールの未変化体血漿中濃度の測定法として、簡便で高感度の RIA 法の検討を行った。代謝物 M-2~M-6 の中で M-3 のみが 14% の交叉反応性を示したが、血漿中ではほとんど未変化体としてのみ存在しているため、とくに前処理を行うことなく定量できることを明らかにした。測定限界は 10 ng であった。

2-2) 代謝物 M-1~M-6 の定量法について検討を行った。尿中代謝物として現在までに知られている M-1~M-6 までの代謝物のうちアミノ基を有する M-1、M-3 は、強酸性イオン交換樹脂に吸着させ、分別溶出したのち RIA 法で定量する方法を確立した。また、未吸着の M-2、4、5、6 は、M-2 の不安定性

のためそのままでは測定できなかったため、メトキシイミノ体に誘導したのち HPLC で一斉分析する方法を、現在確立しつつある。

3) [³H]-ホルフェニシノールを経口および静脈内投与し、血中濃度、総排泄、bioavailability の検討を行った。1 mg/kg の経口投与では、投与後 21 分で最高濃度 1.703 μg/ml に達し、ピーク以後は速やかに減少し、投与後 8 時間で最高濃度の 1/30 以下までに減少した。また、静脈注射した場合の AUC と比較することにより、経口投与における bioavailability の高いことが示された。

また、投与後 48 時間までに投与量の 90~95% が尿中に排泄され、蓄積性があまりないことが示された。

18. ロイペプチンおよびベスタチンの難病治療薬としての開発研究

田中・石井両班員は、ロイペプチンおよびベスタチンの難病治療薬としての開発研究に対する基礎研究を行うとともに、各班員にロイペプチン、ベスタチンを提供した。

1) 治験薬の試製と製剤研究

治験用ベスタチン 10% ドライシロップ剤 8 kg およびベスタチン 100 mg カプセル剤 5 万カプセルを試製した。また、それらおよびロイペプチンの原末と治験用製剤(散剤、カプセル剤)の安定性を、前年度に引き続き追跡した。

2) Bioavailability

2-1) ベスタチンをマウスに経口投与したときの血中・筋肉中濃度の推移と代謝物を、³H-ベスタチンを用い、単回または 1 日 1 回 7 日間の連与について検討した。血中、筋肉中の放射活性は投与量に比例する。連与すると後期(投与後 4、8 時間)の値が上がり、24 時間の血中濃度曲線下面積は単回の 1.6 倍にのぼった。尿中回収率は単回で 83~91%、連

与で 97% に達し、投与量に依存しないが、低投与量 (1.32 mg/kg) では代謝物である AHPA が尿中放射活性の 47% を占め、高投与量 (12.47 mg/kg) では 22% と投与量に依存した。筋肉中でも同傾向であり、低投与量では 69%、高投与量では 26% の AHPA が検出された。血中 AHPA は少ない。血液・筋肉・尿中に他の代謝物は検出されなかった。なお、AHPA の存在比は連与によって増加しなかった。筋肉中濃度は初期 (投与後 1 時間) では血中の約半分であるが、後期では同等となり、連与 (12.6 mg/kg) の 1, 4, 8 時間値は放射活性でそれぞれ 750, 450, 220 ng/g であり、放射活性中の未変化ベスタチンの存在比は 1 時間値で 78% であった。したがって、筋肉にベスタチンを到達させて濃度を維持することは、ロイペプチンに比べて容易である。

2-2) ロイペプチンをラットに経口、十二指腸 (30 mg/kg)、門脈 (10 mg/kg) 投与したときの 6 時間の血中濃度曲線下面積はそれぞれ 0.36, 8.31, 20.47 ng・hr/ml であった。しかし、腸溶錠としたロイペプチンをイヌに経口投与したときの血中濃度は、裸錠のそれよりも低かった。また、フラジオマイシン前投与でラットの腸内細菌叢を減弱させておいても血中濃度は向上しなかった。人工胃液、人工腸液中 37°C での残存はそれぞれ 94% (4 時間)、80% (6 時間) であった。ロイペプチンのジエチルアセタールの経口血中濃度もロイペプチンのそれと異ならなかった。

経皮投与を親水軟膏でラットについて試みた結果は、30 mg/kg で 2, 4, 8 時間後に恒常的に約 100 ng/g の筋肉内濃度を示した。血中濃度も同水準であり、これを先に記した経口投与時のそれと比べると、血中濃度曲線下面積で 2.5 倍であった。また、3) に記すウサギの経皮毒性試験に際して、血漿、投与部位筋肉、非投与部位筋肉の標本を採取して分析したとき、最高血中濃度は初日に 150~280 ng/ml に達した。しかし、連与による上昇は認められなかった。筋肉中濃度は、連与による上昇傾向と用量依存傾向を示した。

2-3) ベスタチンの簡易定量法を開発した。

1 つは蛍光 HPLC 法であり、溶出ベスタチンと *o*-phthalaldehyde の反応成績体の蛍光検出により、血漿 0.2 ml 標本で 200 ng/ml まで測れる。これにより、臨床研究班員のプロトコールスタディーの血漿標本を測定した。他法はベスタチンの抗血清による RIA であり、1.25 ng/ml まで測ることができ、ベスタチンの生体内代謝物との交叉反応はない。

3) 毒性試験

ロイペプチンの経皮毒性試験として、日本白色種雄ウサギの刈毛した背部皮膚 (5×5 cm²) に 0, 10, 20, および 30% 硫酸ロイペプチン軟膏を 0.5 g, 35 日間連続塗布した結果、4 群とも死亡例なく、一般状態の変化も各検査所見のロイペプチンによると考えられる変化も認められず、この条件では何ら毒性を示さないと結論される。

分 担 研 究 報 告

ロイペプチン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) がロイペプチン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、とくにロイペプチンによって強い阻害を受けることを見出した。

そこで、骨格筋の CANP に関する進んだ知見と並行して、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pain 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pain を特異的に阻害する細胞内インヒビター蛋白質の存在を発見したので、これをカルpastatin (calpastatin) と名づけ、その精製と性質についても研究を行うことにした。

これらの研究を通じて、ロイペプチン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

ウィスター系ラット (200~300 g) を用い、断頭後可及的速やかに血液を除いた腎臓を4倍量の 20 mM トリス-HCl 緩衝液 (1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.25 M 蔗糖, 5 mM 2-メルカプトエタノール含有, pH 7.5) でホモゲナイズし、105,000 g, 90 分間超遠心して、その上清をカルpain I (低 Ca^{2+} 要求性) およびカルpain II (高 Ca^{2+} 要求性) の精製のための出発材料とした。

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ル酢酸可溶性ペプチドなどの増量を Folin-Lowry 法により、750 nm の吸光度増加として計測した。カルpain I の定量には 0.1 mM CaCl_2 を、カルpain II 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pain に対するカルpastatin の作用をみるためには、カルpastatin 標品をあらかじめカルpain 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pain を失活させるインヒビター活性を 1 単

* 京都大学医学部附属病院検査部

位とした。

質蛋白質標品として取得し、その諸性質を比較した。

研究結果

1. カルパイン I および II の並行精製

ラット腎臓よりカルパイン I および II を、ほぼ同様の方法により並行して精製し、それぞれを均

出発材料 360 ml を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフに供した結果を図 1 に示す。

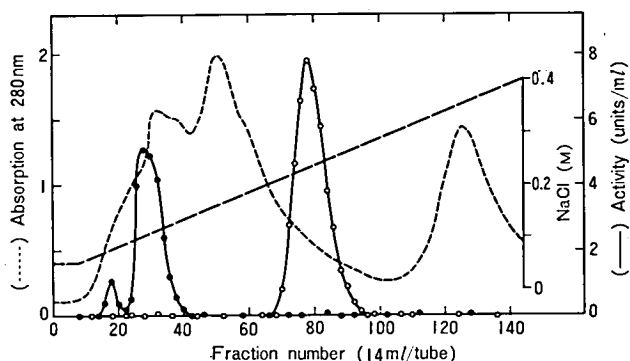


図 1 DE 52 chromatography of rat kidney crude extract. A column of DE 52 (3.2×17 cm) was loaded with rat kidney crude extract containing 3,640 mg of protein in 360 ml and eluted with 2 l of buffer A having a linear gradient of 50 to 400 mM NaCl and at a rate of 50 ml/hr. Fractions of 14 ml each were collected. ---, absorbance at 280 nm; -●-, calpain I activity; -○-, calpain II activity.

表 1 Purification of calpain I and calpain II from rat kidney

Protease	Step*	Total activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification (-fold)	Yield (%)
Calpain I	(1)	170**	3,640	0.0465	1	
	(2)	856	380	2.25	48	100***
	(3)	506	16.1	31.4	675	59.1
	(4)	236	1.13	203	4,470	27.6
	(5)	152	0.53	287	6,170	17.8
Calpain II	(1)	562**	3,640	0.154	1	
	(2)	1,810	134	13.5	87	100***
	(3)	619	3.43	180	1,170	34.2
	(4)	344	0.86	401	2,600	19.0
	(5)	215	0.33	642	4,160	11.9

* Steps are: (1) crude extract, (2) DE 52 chromatography, (3) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation and followed by TSK-Gel G 3000 SWG chromatography, (4) blue Sepharose CL-6B chromatography, and (5) DEAE-Bio-Gel A chromatography.

** Calpain activities in crude extract were only apparent values, since both enzymes were not separated and inhibitor(s) co-existed. We assumed that the proteolytic activity measured as 0.1 mM Ca^{2+} represented only calpain I activity and the activity measured at 5 mM Ca^{2+} represented calpain I plus calpain II activity.

*** Activities after DE 52 chromatography were taken as 100% for the respective enzymes.

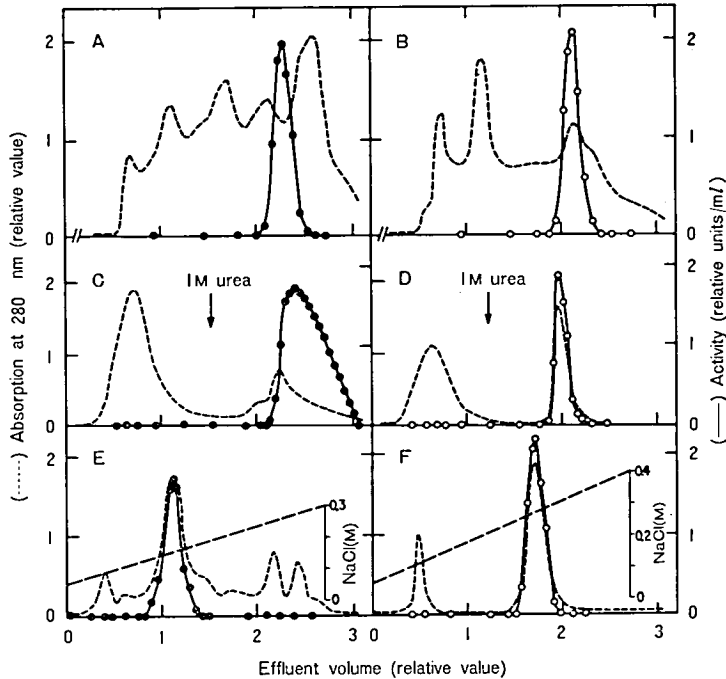


図 2 Comparison of chromatographic patterns of calpain I and calpain II from rat kidney. ---, absorbance at 280 nm; -●-, calpain I activity; -○-, calpain II activity. Abscissae and ordinates are graded in relative values. To obtain true values the relative values are to be multiplied by the following factors. For absorbance: A, 0.6; B, 0.3; C, 0.15; D, 0.085; E, 0.04; F, 0.025. For enzyme activity: A, 30; B, 48.5; C, 10; D, 26; E, 5; F, 10. For effluent volume: in A and B, 1 represents 108 ml, 2, 144 ml, and 3, 180 ml; in C and D a factor of 40 is to be used; in E and F a factor of 30 is to be used. A, C, and E are for calpain I and B, D, and F are for calpain II. The elution profiles are: A and B, from TSK-Gel G 3000 SWG (2.5×60 cm); C and D, from blue Sepharose CL-6B (1.5×7.5 cm); E and F, from DEAE-Bio-Gel A (1.3×6.0 cm). The flow rates (per hr) were: 180 ml in A and B; 40 ml in C and D; 15 ml in E and F.

NaCl 濃度勾配によって、先に溶出される I 型酵素と、あとで溶出される II 型酵素をそれぞれ集め、別々に次の各段階のクロマトグラフに供した (図 2)。両酵素は、ほぼ同様の操作により、それぞれ電気泳動的均質標品にまで精製された。表 1 に示す通り、3.64 g の粗蛋白質分画から出発して、カルパイン I を 0.53 mg (6,170 倍精製)、カルパイン II を 0.33 mg (4,160 倍精製) 取得した。

2. 精製カルパイン I および II の諸性質

1) サブユニット構造

精製標品のポリアクリルアミドゲル電気泳動結果を図 3 に掲げる。図 3A に示すように、両者ともに SDS 非存在下に単一バンドを与えるが、II 型のほうが陽極への移動度が大きく、より酸性蛋白質であることが知られた。この事實は、図 1 の陰イオン交換クロマトグラフにおける溶出位置の差をもよく説明している。一方、図 3B に示すよ

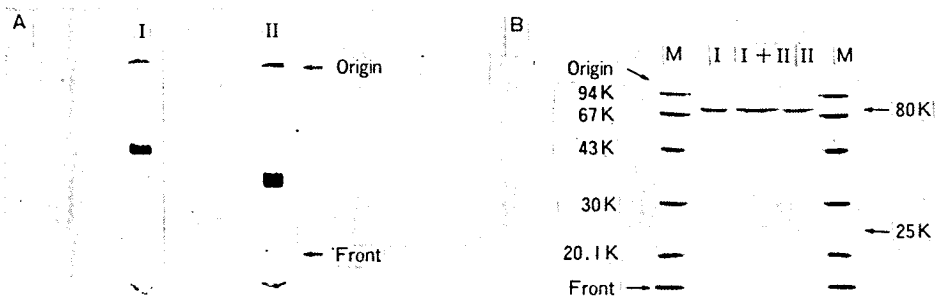


図 3 Gel electrophoresis of purified calpain I and calpain II from rat kidney. A, non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis; the cathode on top. Each 10 μg of purified calpain I (left) and calpain II (right) was applied to a 7.5% polyacrylamide gel and electrophoresed. B, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Polyacrylamide gel (12%) with 0.1% SDS was used. Marker proteins used were: phosphorylase *b* (94,000 (94 K)), bovine serum albumin (67,000 (67 K)), ovalbumin (43,000 (43 K)), carbonic anhydrase (30,000 (30 K)), soybean trypsin inhibitor (20,100 (20.1 K)) and α -lactalbumin (14,400 (14.4 K)). Lane M, marker proteins with α -lactalbumin on the gel front; lane I, 5 μg of purified calpain I; lane I+II, 4 μg of calpain I and 4 μg of calpain II; lane II, 5 μg of purified calpain II.

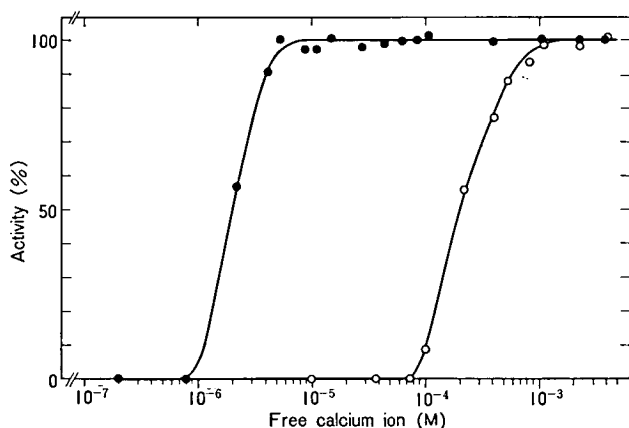


図 4 Calcium requirement of calpain I and calpain II from rat kidney. ●, calpain I; ○, calpain II. Purified enzymes were dialyzed against 20 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.5, containing 2 mM EGTA and 5 mM 2-mercaptoethanol. The enzymatic reaction was carried out at pH 7.3 in Ca^{2+} -EGTA buffers.

うに、SDS 存在下では I 型、II 型ともに 80 kDa と 25 kDa のサブユニットより成ることが明らかにされた。別に行ったゲル濾過実験の結果から、両酵素の分子量は約 110,000 であるので、両者ともに大小それぞれ 1 個ずつのサブユニットから成るヘテロ二量体構造であると結論された。

2) 等電点と最適 pH

等電点電気泳動の結果によれば、I 型の pI は 5.3、II 型の pI は 4.6 であった。 Ca^{2+} 非存在下に加温した場合の酵素蛋白質の熱安定性を比較すると、I 型は II 型に比して明らかに高い安定性を示した。カゼインを基質としたときの両型酵素の最適 pH はいずれも 7.5 付近でほとんど差異を

表 2 Effects of various divalent cations on the activity of calpain I and calpain II

Protease	Cation	Concentration (mM)				
		0.1	1	3	5	10
Calpain I	Mg ²⁺	0	0	0	0	4
	Mn ²⁺	0	44	61	60	60
	Ba ²⁺	0	48	87	100	100
	Sr ²⁺	0	81	100	100	100
	Ni ²⁺	0	0	0	0	0
Calpain II	Mg ²⁺	0	0	4	8	9
	Mn ²⁺	0	0	0	0	0
	Ba ²⁺	0	0	0	6	15
	Sr ²⁺	0	0	65	100	100

Figures in the table are expressed in percent, taking as 100% the activity measured at 1 mM Ca²⁺ for calpain I and that at 5 mM Ca²⁺ for calpain II. All the cations were used as the respective chlorides.

認めなかった。

3) Ca²⁺ 要求性

カルパイン I とカルパイン II の最も顕著な相違は、その Ca²⁺ 要求性に現れた。図 4 に示すように、カゼイン基質に対し、I 型は 2 μM Ca²⁺ で 50% 活性化を示したが、II 型ではこの値は 200 μM であった。しかし、活性の Ca²⁺ 依存曲線はまったく同様のパターンを示した。Ca²⁺ 以外の 2 価金属イオンの効果を表 2 に示す。I 型は Sr²⁺ のほか、Ba²⁺ および Mn²⁺ によってもかなり活性化されるが、II 型では Sr²⁺ 以外のイオンはほとんど無効であった。

4) カルバスタチンの阻害効果

ラット腎臓から部分的に精製したインヒビターであるカルバスタチンの効果を示したのが図 5 である。同じ見かけの活性に対する阻害度でみると、カルパイン II のほうがカルパイン I よりも強く阻害される結果が得られる。しかし、表 1 に示したように、I 型のほうがその比活性において II 型より 2 倍ほど強いことを考慮に入れると、カルパインとカルバスタチンの相互作用における分子間の比率は I・II 両型の間で大差がないものと考えてよい。

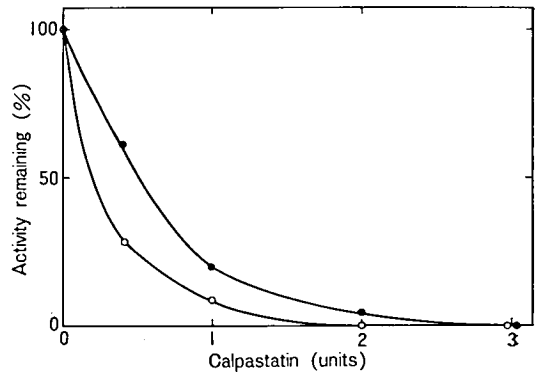


図 5 Effect of calpastatin on calpain I and calpain II. ●, calpain I; ○, calpain II. Each tube contained 0.4 unit of the purified enzyme. After preincubation with various amounts of calpastatin at 30°C for 5 min, the remaining activity was assayed.

5) アミノ酸組成

図 6 に、カルパイン I および II のアミノ酸組成を示す。一見してわかるように、両型酵素のアミノ酸組成はかなり類似しており、それに比して、カルバスタチンやカルモデュリンのアミノ酸組成との間には大差がある。カルパイン I および II は、それぞれほぼ同量の塩基性および芳香族アミノ酸を含有しているが、両者の間に明確な差異を示す

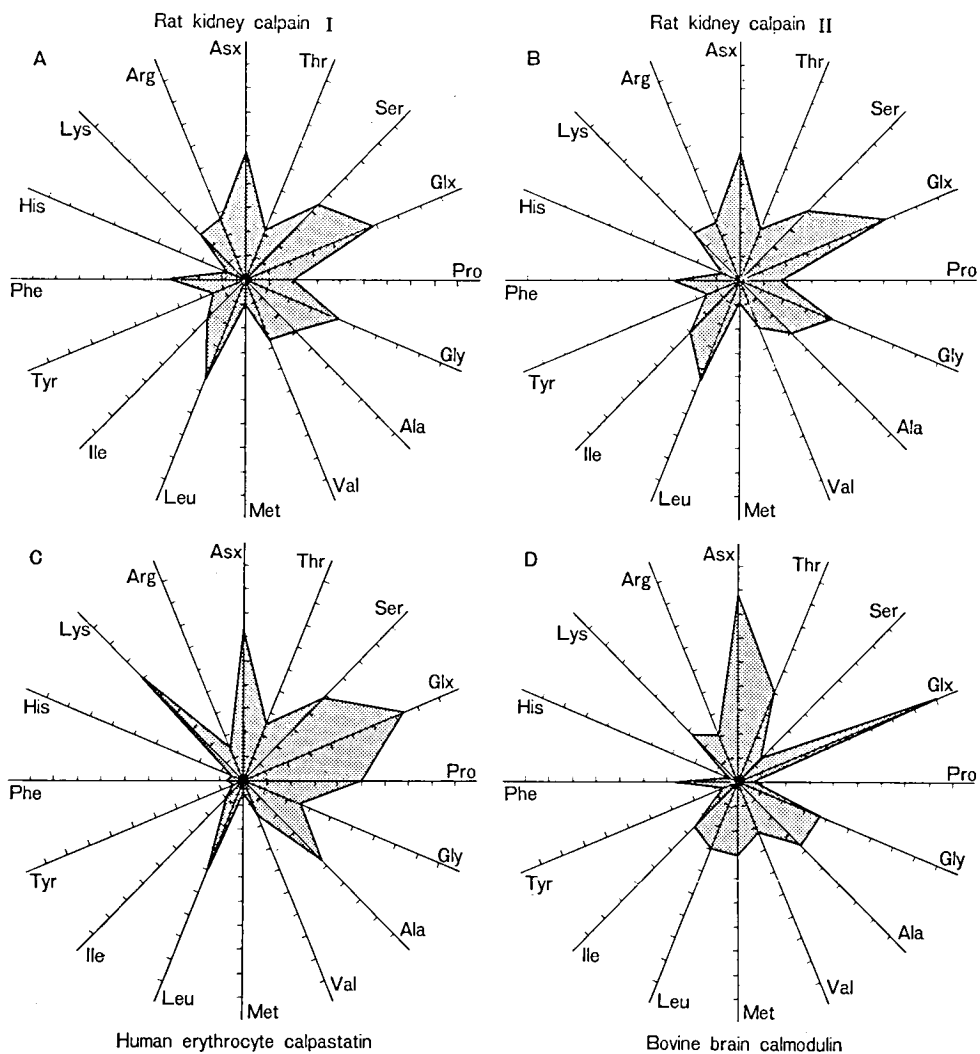


図 6 Comparison of amino acid compositions of rat kidney calpain I (A), calpain II (B), human erythrocyte calpastatin (C), and bovine brain calmodulin (D). The calculated mol % of amino acids are plotted on the spokes which have percent graduations (2% each) so that the distribution patterns can be directly compared among four proteins. Values of half-cystine and tryptophan were omitted from the plottings. In the case of calmodulin, one trimethyllysine residue was included into lysine residues.

アミノ酸成分もある。たとえば、カルパイン I はより多くのプロリンおよびバリンを含み、一方、カルパイン II はより多くのグルタミン酸とイソロイシンを含有している。

考 察

カルパイン (Ca^{2+} 依存性システインプロテイナーゼ) には、その活性化に μM 濃度の Ca^{2+} を必要とする I 型酵素と、 mM 濃度の Ca^{2+} を必要とする II 型酵素とのあることは 1980 年以來知ら

表 3 Comparison of some properties of calpain I and calpain II from rat kidney

Properties	Calpain I	Calpain II
Molecular weight		
Sephadex G-150	110,000	115,000
SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	80 K*+25 K	80 K+25 K
Isoelectric point	5.3	4.6
Free Ca ²⁺ concentration which gave :		
Half-maximal activity	2 μM	200 μM
Full activity	10 μM	1 mM
Temperature stability (after 10 min at 58°C)	More than 30% left	No activity left
Optimal pH	7.0~7.5	7.5~8.0

* 80 K, 25 K, etc., 80,000, 25,000, etc.

れていた。しかしながら、同一臓器に含まれる I・II 両型酵素を同時に(並行して)、しかもほぼ同様の方法で高度精製し、その諸性質を直接比較することには成功していなかった。われわれは、ラット腎臓が I・II 両型酵素をほぼ同量に含有し、しかも内在性インヒビターであるカルパスタチンの含量が少ないため I 型の精製に対する障害が少ないことに注目し、この臓器を出発材料として I・II 両型の平行精製を完成することができた。ブタ骨格筋については、カルpain I と II の比較研究があるが、それぞれ異なった方法によって精製されており、今回のわれわれの研究のような直接比較は達成されていない。

今回得られた諸性質の一部をまとめたものが表 3 である。また、アミノ酸組成の比較は図 6 に掲げた通りである。これらの結果から、カルpain I と II とは、その蛋白質分子としての全体像においてきわめて類似していること、しかも、その Ca²⁺ 要求性という一点においてはきわめて異なっていることがわかる。

このような特異な類似性と相違性が、両酵素蛋白質の化学構造とどのように関連しているのか、また両酵素は遺伝子支配を異にした分子であるのか、とくに 80 kDa サブユニットも 30 kDa サブユニットもそれぞれに互いに異なっているのか、それともたとえば 30 kDa サブユニットのみは I・II 型に共通であるのかなど、きわめて興味深

い研究課題が将来に残されている。

なお、精製カルpain I および II ともにロイペプチンの阻害作用を強く受け、その見かけの阻害率の間には差異を認めなかったので、ロイペプチンの結合部位や阻害機構のうえで両酵素間に差がないものと推定された。

また、生体内で I・II 両酵素のいずれがより生理的に有意義であるのかもまったく不明であり、両酵素の細胞内分布とともに、緊急に解明されるべき研究課題である。

カルpain, カルパスタチンに関して、われわれは、ラット腎臓カルpainの精製研究^{1,14)}のほか、広く動物組織に分布しているこの系につき酵素化学的ならびに免疫化学的研究を展開し、それぞれの成果をあげつつある^{2-4, 11-13, 15-17)}。また、カルpain, カルパスタチンに関する数篇の解説論文を発表した⁵⁻¹⁰⁾。

文 献

- 1) Yoshimura, N., Kikuchi, T., Sasaki, T., Kitahara, A., Hatanaka, M., and Murachi, T. Two distinct Ca²⁺-proteases (calpain I and calpain II) purified concurrently by the same method from rat kidney. *J. Biol. Chem.*, 258, 8883-8889 (1983).
- 2) Hatanaka, M., Kikuchi, T., and Murachi, T. Calpain I, a low Ca²⁺-requiring protease, from human erythrocytes: Purification and subunit structure. *Biomed. Res.*, 4, 381-388 (1983).
- 3) Yamato, S., Tanaka, K., and Murachi, T. The

- appearance of a 34,000-dalton inhibitor of calpain (Ca^{2+} -dependent cysteine proteinase) in rat liver after the administration of phenylhydrazine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **115**, 751-721 (1983).
- 4) Sasaki, T., Yoshimura, N., Kikuchi, T., Hatanaka, M., Kitahara, A., Sakihama, T., and Murachi, T. Similarity and dissimilarity in subunit structures of calpains I and II from various sources as demonstrated by immunological cross-reactivity. *J. Biochem.*, **94**, 2055-2061 (1983).
 - 5) Murachi, T. Calpain and calpastatin. *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 167-169 (1983).
 - 6) Murachi, T. Intracellular Ca^{2+} protease and its inhibitor protein: Calpain and calpastatin. *In Calcium and Cell Function*, ed. by W. Y. Cheung, Vol. 4, pp.377-410, Academic Press, New York (1983).
 - 7) Murachi, T., Takano, E., and Tanaka, K. Calpastatin, an endogenous inhibitor protein acting specifically on calpain. *In Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects*, ed. by N. Katunuma, H. Umezawa, and H. Holzer, pp.165-172, Japan Scientific Societies Press, Tokyo and Springer-Verlag, Berlin (1983).
 - 8) Murachi, T. Calcium-dependent proteinases and specific inhibitors: Calpain and calpastatin. Abstr., 607th Biochemical Society Meeting (December, 1983), London, England, pp. 46-47.
 - 9) 村地 孝. カルパイン. 金属タンパク質の化学, 大塚齊之助, 山中健生編, pp.76-78, 講談社, 東京 (1983).
 - 10) 村地 孝. カルパインとカルバスタチン. 代謝, **20**, 429-438 (1983).
 - 11) 小倉享一, 前田 満, 田中隆治, 野本享資, 田中一仁, 村地 孝. 新規チオールプロテアーゼインヒビター. 生化学, **55**, 825 (1983).
 - 12) 高野恵美子, 北原愛子, 畑中道代, 川口直美, 神奈木玲児, 村地 孝. カルパイン及びカルバスタチンの酵素免疫測定法 (EIA). 生化学, **55**, 828 (1983).
 - 13) 中山 昇, 稲本 俊, 田中一仁, 日笠頼則, 村地 孝. マウス及びヒト脾細胞幼若化におけるカルパイン・カルバスタチンの動態. 生化学, **55**, 828 (1983).
 - 14) 吉村長久, 畑中道代, 菊池孝信, 佐々木隆志, 村地 孝. カルパイン I とカルパイン II の同時精製. 生化学, **55**, 978 (1983).
 - 15) 菊池孝信, 湯元 昇, 畑中道代, 村地 孝. カルパインのサブユニットに関するタンパク化学的研究. 生化学, **55**, 979 (1983).
 - 16) 佐々木隆志, 吉村長久, 北原愛子, 先浜俊子, 村地 孝. カルパイン I とカルパイン II の免疫学的相違について. 生化学, **55**, 979 (1983).
 - 17) 吉田晴子, 村地 孝, 塚原 勇. ウシ眼水晶体のカルパイン, カルバスタチンおよび, 内部基質について. 生化学, **55**, 979 (1983).

螢光・HPLC による血清ホルフェニシノールの定量法と

p-ヒドロキシベスタチンのプレカラム螢光誘導体化

大 倉 洋 甫*

研究協力者 田村和彦*・石田淳一*・甲斐雅亮*

はじめに

われわれは、筋ジストロフィー症の治療薬として検討されているロイペプチン¹⁾、ベスタチン^{2,3)}および関連代謝物を螢光検出による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって定量する方法を開発してきた。今回、ホルフェニシノールがアルカリ性で酸化され、強い螢光を発することを見出し、血清中のホルフェニシノールを螢光・HPLC により簡便に定量する分析法を開発した。

また、57 年度において開発したベスタチンの螢光・HPLC 法を用い、引き続き、三吉野班員らにより筋ジストロフィー症患者に投与されたベスタチンの血清濃度を測定した。しかし、その活性代謝物である *p*-ヒドロキシベスタチン [1 nmol (400 ng)/ml 以下] については、血清に内在する妨害因子のために鋭敏に測定することができなかつたので、今回新たに *p*-ヒドロキシベスタチンの HPLC における螢光誘導体化法の基礎研究を行った。

I. 血清ホルフェニシノールの定量

開発した血清ホルフェニシノールの定量法は、除蛋白した血清中のホルフェニシノールをフェリシアン化カリウム存在下水酸化カリウム溶液中で

螢光体に導き、逆相分配 HPLC で分離、検出するものである。

実験方法

1) 試薬溶液の調製

a) 0.5 M アンモニア緩衝液 (pH 8.5)-塩酸 (6.2 M) 混液

1.0 M アンモニア緩衝液 (pH 8.5) は、1.0 M 塩化アンモニウムと 1.0 M 水酸化アンモニウム (25% アンモニア水を水で 6.5 倍に希釈して調製) で pH 8.5 に調整してつくる。このアンモニア緩衝液と市販の濃塩酸を等容量ずつ混合する。

b) HPLC の溶離液

市販の 0.5 M テトラ-*n*-ブチルアンモニウムヒドロキシド 4 ml と 0.1 M アンモニア緩衝液 (pH 8.5) 496 ml を混合する。使用前に、減圧下 (約 15 mmHg) で 5 分間脱気する。

2) 基準操作

a) 除蛋白法

血清 100 μ l に水 (検量線作成時にはホルフェニシノールの標準液) 50 μ l および 0.75 M 過塩素酸 100 μ l を加え、800 g で 5 分間遠心する。この上清 100 μ l を螢光反応に用いる。

b) 螢光反応

上記試料 100 μ l に 25 mM フェリシアン化カリウム (ホルフェニシノール標準液のみを試料とした場合は 1.0 mM) 50 μ l および 3.5 M 水酸化カリウム溶液 200 μ l を加え、50°C で 15 分間加温

* 九州大学薬学部

する。反応液に、1.5 M 亜硫酸ナトリウム 50 μ l およびアンモニア緩衝液と塩酸混液 100 μ l を加える。最終反応液 100 μ l を HPLC に付す。

c) HPLC

高速液体クロマトグラフには日立 655 型を使用し、LiChrosorb RP-18 (粒径 5 μ m, メルク社) を充填したカラム (150 \times 4 mm, i. d.) に溶離液を 1.0 ml/min (約 100 kg/cm² 圧力) で送液し、ホルフェニシノールの蛍光体を分離する。蛍光検出は、18 μ l のフローセルを装備した日立 650-10 LC 蛍光分光光度計を用い、励起波長 385 nm および発光波長 500 nm で行う。

結果および考察

1) 蛍光反応条件

HPLC による血清中のホルフェニシノールを定量する方法を確立するために、まず 10 nmol/ml のホルフェニシノールの標準液を用いて、アルカリ性酸化によるその発蛍光条件について検討した。なお、以下各条件を求めた実験操作では実験の部の基準操作 b) に準拠し、かつその 10 倍の試料

と各試薬容量を用いて得た最終反応液の蛍光を蛍光分光光度計 (日立 MPF-4, 1 \times 1 cm 石英セル使用) で測定した。

図 1 に、ホルフェニシノール標準液を基準操作に従って蛍光反応させたときに得られる蛍光スペクトルを示す。385 および 500 nm にそれぞれ励起および発光極大波長が認められる。このスペクトルは、最終反応液の pH, 反応に用いるフェリシアン化カリウムおよび水酸化カリウムの濃度を変化させても、その形において著しい変化を示さない。

この蛍光反応における反応時間とその温度について検討した結果を図 2 に示す。反応温度が高いほど、得られる蛍光強度は速く最大値に達する。しかし、70 および 100 $^{\circ}$ C において生じる蛍光は、それぞれ最適加熱時間を過ぎると急激に減少する。基準操作には、再現性のよい蛍光強度を得るために、50 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱する条件を選んだ。

図 3 に示すように、ホルフェニシノールの発蛍光は、フェリシアン化カリウムの濃度と試料溶液に共存する除蛋白血清量に著しく影響される。蛍

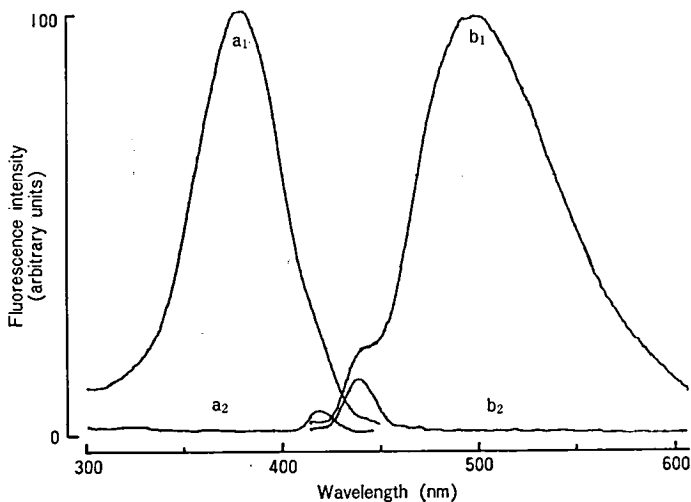


図 1 Excitation and emission spectra of the final reaction mixture of forphenicinol. a, excitation spectra; b, emission spectra. a₁ and b₁, a portion (1.0 ml) of 10 nmol/ml forphenicinol solution was treated by the standard procedure; a₂ and b₂, reagent blank corresponding to a₁ and b₁.

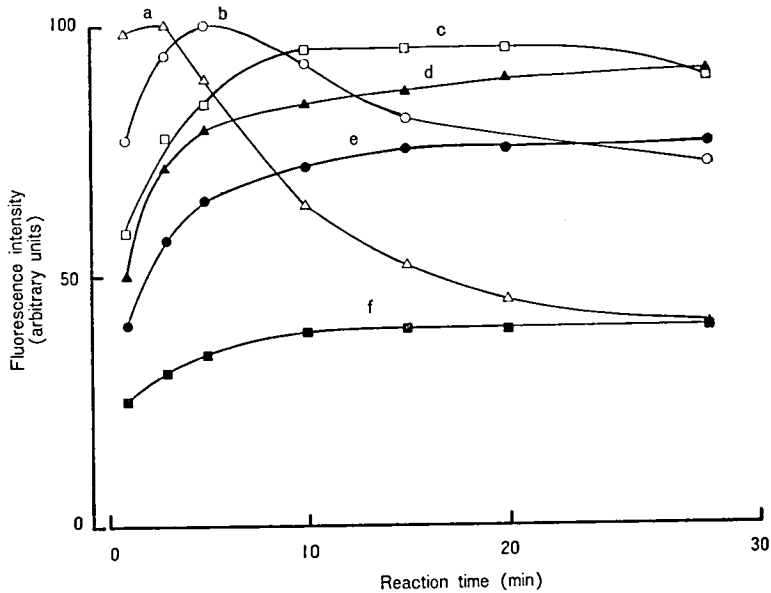


図 2 Effects of reaction temperature and time on the fluorescence development from forphenicicol. Portions (1.0 ml) of 10 nmol/ml forphenicicol solution were treated by the standard procedure but for various reaction times at different reaction temperatures. a, 100; b, 70; c, 50; d, 37; e, 23; f, 2°C.

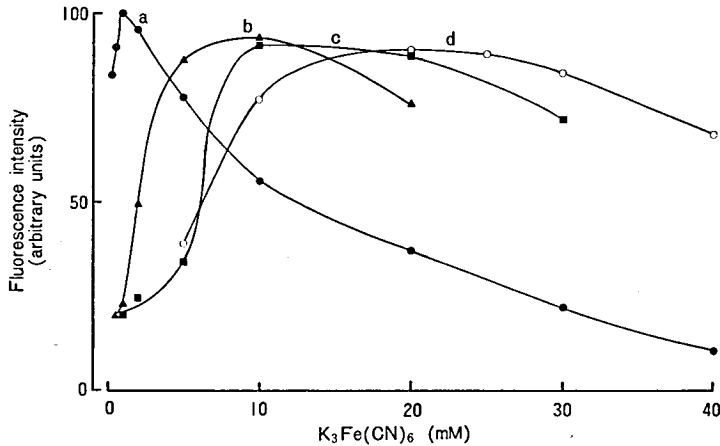


図 3 Effects of the potassium ferricyanide concentration and the deproteinized serum volume on the fluorescence development from forphenicicol. Portions (1.0 ml) of (a) 10 nmol/ml forphenicicol solution or the solutions in the presence of (b) 30, (c) 60, and (d) 90%, v/v of the deproteinized serum were treated by the standard procedure.

光反応に用いる試料がホルフェニンノール標準液の場合は、1.0 mM のフェリシアン化カリウムで最大の蛍光強度が得られるが、その試料に除蛋白した血清（基準操作 2）の a）で得た上清を共

存させると、より高濃度のフェリシアン化カリウムを必要とする。基準操作には、ホルフェニンノール標準液を試料とする場合は 1.0 mM のフェリシアン化カリウムを、血清試料を扱う場合は

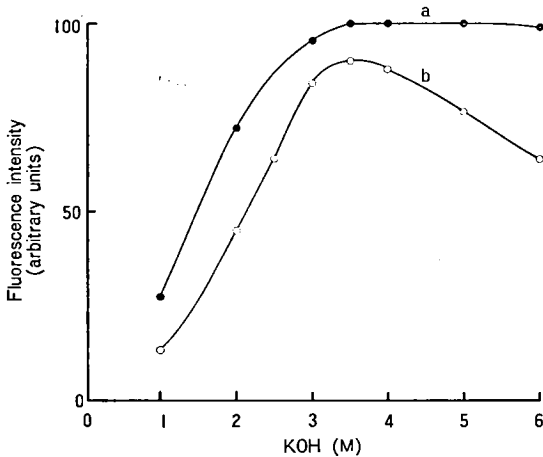


図 4 Effect of the potassium hydroxide concentration on the fluorescence development from forphenicinol. Portions (1.0 ml) of (a) 10 nmol/ml forphenicinol solution or (b) the solution in the presence of 90% v/v of the deproteinized serum were treated by the standard procedure.

25 mM のそれを、それぞれ使用することにした。酸化剤の最適濃度が血清量に依存する原因は、血清に存在する多数の還元性物質（糖、カテコールアミンなど）によってその酸化力が失われるものと考えられる。また、過剰のフェリシアン化カリ

ウムは、逆に蛍光反応を阻害するか、生じた蛍光物質の分解を促すものと思われる。なお、他の酸化剤として、過マンガン酸カリウム (0.01~10 mM)、過酸化水素 (0.1~10 mM) について検討したが、いずれもフェリシアン化カリウムによって得られる最大蛍光強度の 1/4 以下であった。

図 4 は、ホルフェニシノールの発蛍光に及ぼす水酸化カリウム濃度の影響について調べたものである。ホルフェニシノールの標準液および除蛋白血清を含むその試料を、それぞれ同様に処理したとき、両者とも基準操作に用いた 3.5 M の水酸化カリウム濃度で最大の蛍光強度が得られる。なお、水酸化カリウムのかわりに水酸化ナトリウムを用いても、同様な結果を示した。

図 5 に示すように、最終反応液の pH が 8.8~9.5 において最大の蛍光強度が得られるが、反応後の強アルカリ溶液中でも、その蛍光強度は比較的強い。基準操作では、HPLC の溶離液が弱アルカリ性であるので、アンモニア緩衝液と塩酸の混液で最終反応液の pH を 9.0~10.0 に調整した。

また、反応後に加えた亜硫酸ナトリウムは、反応を停止するとともに、生じた蛍光を安定化する。

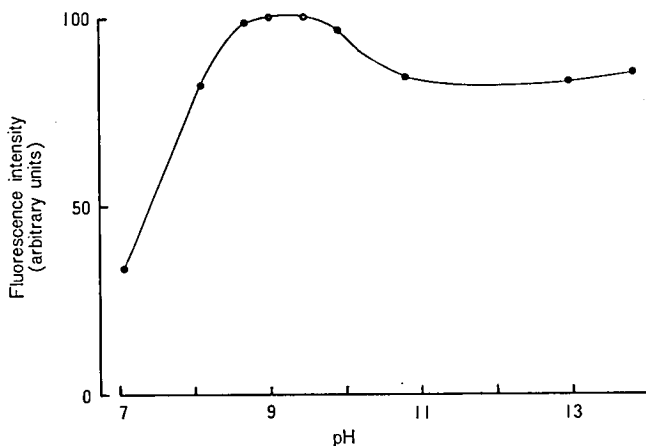


図 5 Effect of pH of the final reaction mixture on the fluorescence from forphenicinol. Portions (1.0 ml) of 10 nmol/ml forphenicinol solution were treated by the standard procedure but the final reaction mixtures were adjusted to various pHs with hydrochloric acid (6.2 M) and ammonium buffers (0.5 M, various pHs).

表 1 Fluorescences from other substances under the same reaction condition as that for forphenicinol

Compounds*	Relative fluorescence intensity
Forphenicinol	100**
Dopa	0.8
Dopamine	1.5
Adrenaline	3.2
Noradrenaline	0.4
Tyrosine	0.9
Tyramine	1.2
Serotonine	6.3
Phenylalanine	0.0
Alanine	0.0
Glucose	0.0
Galactose	0.0
Mannose	0.0
Ribose	0.0

* Portions (1.0 ml) of 100 nmol/ml solutions of the compounds were treated by the standard procedure.

** The fluorescence intensity from forphenicinol was taken as 100.

反応に、1.0 mM のフェリシアン化カリウムを用いた場合は 80 mM 以上、25 mM のフェリシアン化カリウムを用いた場合は少なくとも 0.8 M 以上の濃度の亜硫酸ナトリウムを必要とした。基準操作には、飽和濃度に近い 1.5 M のそれを使用している。これにより、最終反応液あるいは中和前の強アルカリ性溶液における蛍光は、それらの反応液を室温で少なくとも 1 時間放置しても安定である。

生体内に存在しかつ蛍光性を示す物質（カテコールアミン類、チロシン、およびセロトニン）を本蛍光反応で処理したときに得られる相対蛍光強度を表 1 に示した。等濃度のホルフェニシノールから得た蛍光強度と比較すると、それらの物質からの蛍光強度はきわめて小さい。同様に、フェニルアラニン、アラニン、グルコース、ガラクトース、マンノース、およびリボース（各 100 nmol/ml の溶液）を用いて検討したが、いずれも蛍光は認められなかった。この結果より、本蛍光反応

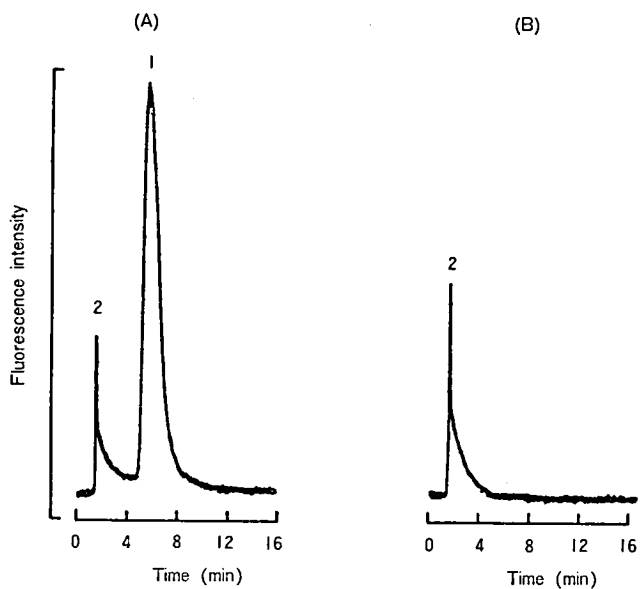
はホルフェニシノールに対してかなり高い選択性を有していることがわかる。

2) 血清ホルフェニシノールの HPLC

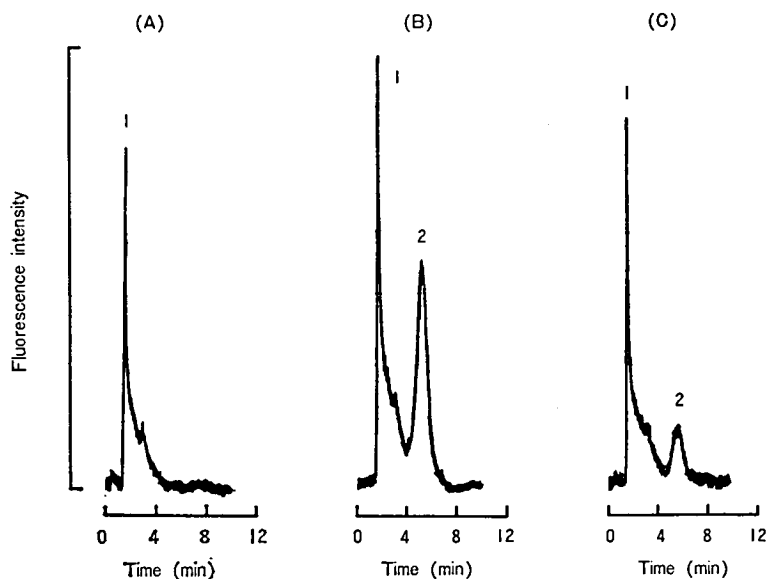
ホルフェニシノールの標準液 (20 nmol/ml) を用い、基準操作 2) の b) および c) に準じて処理したときに得られるクロマトグラムを図 6 に示す。ホルフェニシノールの蛍光体は保持時間 4.9 分に溶出され、試薬ブランクに基づく蛍光体 (2~4 分に溶出、図 6 の B) と完全に分離されている。また、表 1 に示した物質 (各 200 nmol/ml) を同様に処理して HPLC に付したところ、それらから認められた蛍光体はいずれも試薬ブランクの蛍光ピークと同じ保持時間に溶出し、ホルフェニシノールの測定を妨害しない。

HPLC によるこの分離は、逆相分配型の Li Chrosorb RP-18 を充填したカラムを用い、溶離液にカウンターイオン（四級アンモニウムカチオン）を含む pH 8.5 のアンモニア緩衝液を使用している。ホルフェニシノールの蛍光体が pH 8.8~9.5 で強く発蛍光することから、移動相の pH は弱アルカリ性が望ましい。また、カウンターイオンとして溶離液に加えたテトラ-*n*-ブチルアンモニウムヒドロキシドは、ホルフェニシノールの蛍光体と試薬ブランクのそれとの分離をよくするために加えたものである。このイオンが移動相にない場合は、ホルフェニシノールの蛍光ピークは早く溶出し、試薬ブランクのそれと重なる。このことは、ホルフェニシノールのカルボキシル基がその蛍光体にも残存していることを示唆する。

図 7 は、60 mg のホルフェニシノールを健常人に経口投与し、投与前と投与後（2 時間および 8 時間後）における血清中のホルフェニシノールをこの HPLC で処理したときのクロマトグラムである。投与前の血清で得られたクロマトグラム（図 7 の A）には、ホルフェニシノールの蛍光体が溶出する保持時間にはピークは検出されないが、投与後の血清では（図 7 の B と C）、明らかにホルフェニシノールの蛍光ピークが検出されている。



⊠ 6 Chromatograms obtained with (A) the reaction mixture of forphenicicol and (B) the reagent blank. Portion (1.0 ml) of 20 nmol/ml forphenicicol or water for the blank was treated by the standard procedure. HPLC conditions: column, LiChrosorb RP-18; mobile phase, 0.1 M ammonium buffer (pH 8.5) containing 4 mM tetra-*n*-butylammonium hydroxide; flow rate, 1.0 ml/min; fluorescence detection, E_x 385 nm and E_m 500 nm. Peaks: 1, forphenicicol; 2, reagent blank.



⊠ 7 Chromatograms obtained with (A) drug-free serum and sera at (B) 2 and (C) 8 hr after oral administration of forphenicicol to a healthy man. Dose: 60 mg. Peaks: 1, reagent blank containing some substances from serum; 2, forphenicicol. Serum concentration of forphenicicol (nmol/ml): A, 0.0; B, 7.5; C, 1.9.

このとき、ホルフェニシノールのピークが溶出したのちには、血清由来の蛍光ピークは認められない。したがって、HPLC の試料は約 8 分間隔で順次クロマトグラフに注入でき、分析できる。なお、図 7 の B におけるホルフェニシノールのピークの溶出液を分取し、その蛍光スペクトルを測定した

とき、図 1 のスペクトルと完全に一致した。

基準操作に従い、ヒト血清に添加したホルフェニシノールの検量線を作成した。添加したホルフェニシノールのピークの高さは、少なくとも 250 nmol/ml 血清中まで原点を通る直線を示した。このときの回帰直線式の相関係数 (r) は 0.9998 で

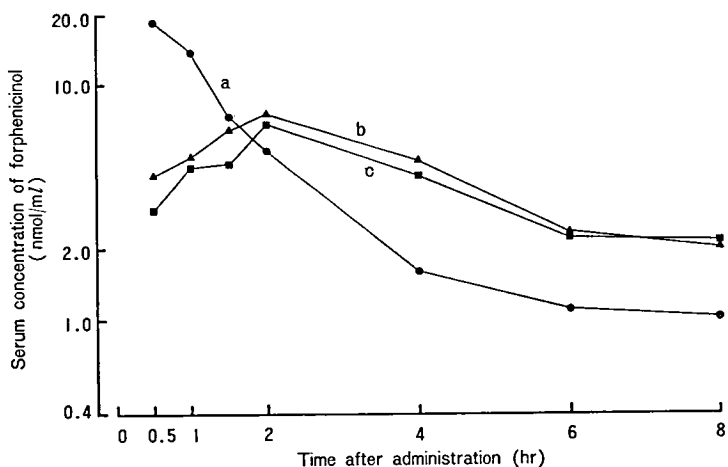


図 8 Serum concentrations of forphenicicol after oral administration of forphenicicol to three healthy men. Dose: 60 mg. a, administration at 5 hr after feeding; b and c, administration at 30 min after feeding.

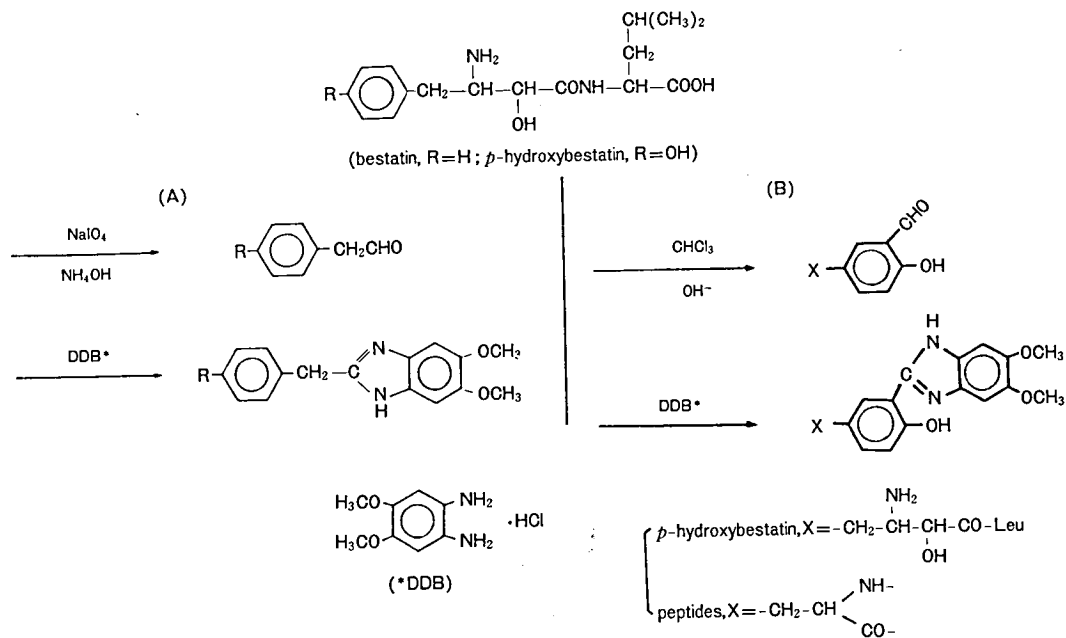


図 9 Scheme of the fluorescence derivatization of bestatin and *p*-hydroxybestatin with DDB.

あった。また、この検量線から求めた血清中のホルフェニシノールの検出限界は、 $S/N=2$ において $1.0 \text{ nmol}(197 \text{ ng})/\text{ml}$ であった。これは、HPLC の注入量で表すと、 $8 \text{ pmol}(1.6 \text{ ng})$ のホルフェニシノール量に相当する。除蛋白時におけるホルフェニシノールの添加回収率は、血清 $100 \mu\text{l}$ に 1.0 および 0.25 nmol のホルフェニシノールを添加した場合、それぞれ 98 ± 4.2 および $95 \pm 4.8\%$ (平均値 \pm 標準偏差, $n=10$) であった。

本法による血清ホルフェニシノールのモニター例として、 60 mg のホルフェニシノールを健常人(3名)に経口投与したときの血清濃度変化を測定した。結果を図8に示す。上述したように、蛍光反応に必要なフェリシアン化カリウムの濃度は各検体の血清によって多少変化する可能性があるため、図8における定量値は各血清に標準ホルフェニシノールを別に添加した標準添加検量線から求めている。検討した血清3検体に関しては、添加したホルフェニシノールのピークは同一添加量においてはほぼ同じ高さに示し、ホルフェニシノールの発蛍光性は検体間で差がなかった。

本法における繰返し精度を、図8で求めたb検体の2時間および8時間後の各血清中のホルフェニシノール濃度をそれぞれ10回繰返し測定して求めた。その変動係数(平均定量値)は、それぞれ 5.3% (7.5 nmol/ml) および 6.8% (1.9 nmol/ml) であった。

II. *p*-ヒドロキシベスタチンの蛍光誘導体化

p-ヒドロキシベスタチンの新たな蛍光ラベル化法の原理を図9Bに示す。この蛍光ラベル化法は、*p*-ヒドロキシベスタチンをクロロホルム存在下アルカリ性でホルミル化し(Reimer-Tiemann 反応⁴⁾)、当班員らによって開発した芳香族アルデヒド類の蛍光ラベル化剤[4,5-ジメトキシ-1,2-ジアミノベンゼンモノ塩酸塩(DDB)]と弱酸性($\text{pH} 3.8$)で反応させ、蛍光誘導体に導くもので

ある。

実験方法

1) 蛍光誘導体化反応

試料溶液 $200 \mu\text{l}$ に 3.0 M 水酸化カリウム溶液 $50 \mu\text{l}$ とクロロホルム $100 \mu\text{l}$ を加え、 60°C で10分間振盪する。 13.0 M 酢酸 $50 \mu\text{l}$ を加えてホルミル化反応を停止するとともに、蛍光反応の至適 $\text{pH} 3.8$ に導き、 1.3 mM DDB 溶液 $300 \mu\text{l}$ を加えて 60°C で18分間蛍光反応する。

2) HPLC 条件

高速液体クロマトグラフには東洋曹達 803 D を使用し、流速 0.8 ml/min に設定した。カラム ($150 \times 4 \text{ mm}$, i. d.) は Li Chrosorb RP-18 (粒径 $5 \mu\text{m}$, メルク社) を充填したもので、溶離液には、アセトニトリル、 9.2 M 塩化カリウム-塩酸緩衝液 ($\text{pH} 2.2$) および 0.05 M ヘキサンスルホン酸ナトリウムの混液(図10参照)を使用する。蛍光検出は、 $12 \mu\text{l}$ のフローセルを装備した島津 RF-530 蛍光モニターを用い、励起波長 348 nm および発光波長 420 nm で行う。

結果および考察

上記の蛍光ラベル化反応は、チロシン残基を有するペプチドに対してもDDBの蛍光ラベル化体を与えた。*p*-ヒドロキシベスタチンおよびチロシン含有ペプチドを用いて、HPLC-UV 検出(吸収波長: 260 nm)によってホルミル化条件を、HPLC 蛍光検出によってDDBによる蛍光誘導体化条件をそれぞれ検討し、実験方法に述べた基準操作を得た。

図10に、この操作によって得た*p*-ヒドロキシベスタチンおよびチロシン含有ペプチドの蛍光ラベル化体を逆相分配HPLCで分離し、蛍光検出したときのクロマトグラムを示す。各ラベル化体は良好に分離されている。このとき、*p*-ヒドロキシベスタチンを除いて他のペプチドからは、少量であるが、ペプチド結合が開裂して生じた副反応

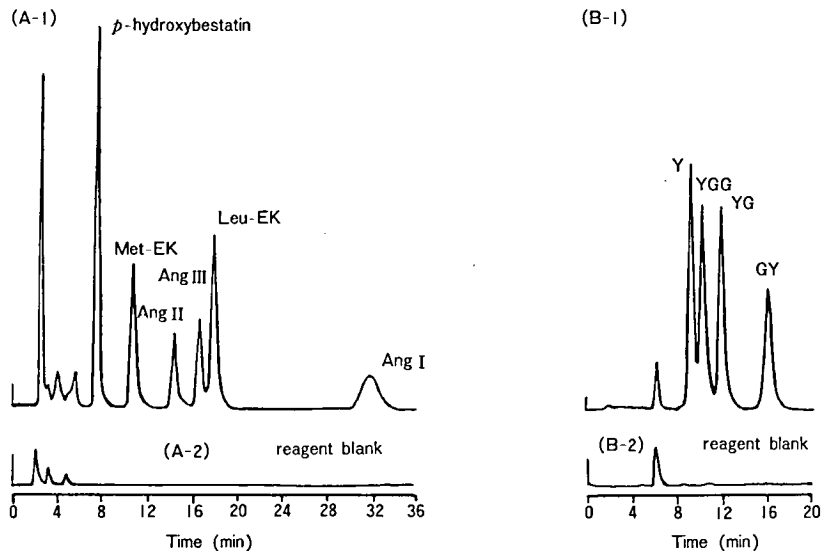


図 10 Chromatograms of DDB derivatives of formylated *p*-hydroxybestatin, tyrosine, and peptides containing tyrosyl residue. HPLC conditions: column, LiChrosorb RP-18; mobile phase, CH₃CN-0.2M KCl·HCl (pH 2.2)-0.05M sodium hexanesulfonate (A-1, 2; 26:64:10, v/v), (B-1, 2; 18:62:20, v/v); flow rate, 0.8 ml/min. Concentrations of compounds used for derivatization: A-1, 20 nmol/ml each; B-1, 10 nmol/ml each. Abbreviations: EK, enkephalin; Ang, angiotensin; Y, tyrosine; YG, Tyr-Gly; YGG, Tyr-Gly-Gly; GY, Gly-Tyr.

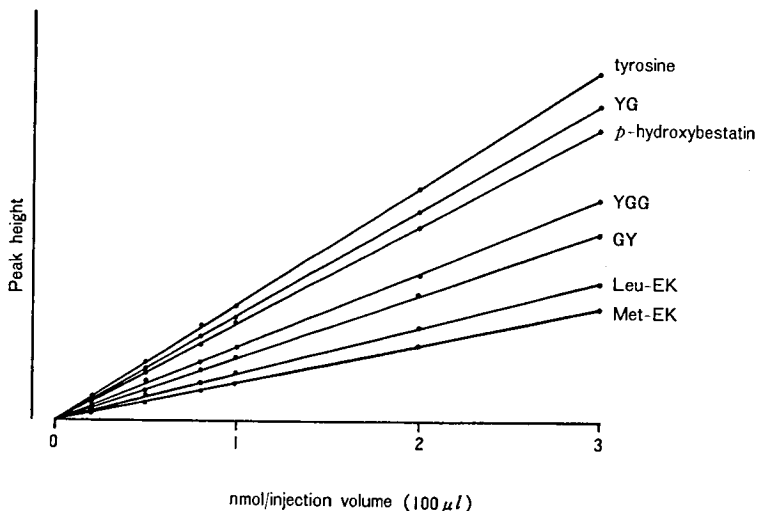


図 11 Relationship between the peak heights and the amounts of *p*-hydroxybestatin, tyrosine, and related peptides. The limits of detection (pmol of the compounds in an injection volume, 100 μ l): *p*-hydroxybestatin, 4.0; tyrosine, 3.4; YG, 3.7; YGG, 5.2; GY, 6.4; Met-EK, 10.5; Leu-EK, 8.7.

物がおのおのデッドボリューム付近に観察された。なお、クロマトグラム A-1 の HPLC 条件下では、クロマトグラム A-2 におけるジおよびトリペプチド類はすべてデッドボリューム付近に溶出される。

また、これらの化合物は、設定した操作によって再現性よくホルミル化され、かつ DDB によって蛍光体に導かれた。それらの検量線を図 11 に示す。いずれも原点を通る直線を示す。検出限界は、 $S/N=2$ において、*p*-ヒドロキシベスタチンでは 4.0 pmol(1.3 ng)/HPLC 注入量であり、他のペプチド類は 4~10 pmol/HPLC 注入量であった。本法による *p*-ヒドロキシベスタチン標品の検出感度は、先に提出した過ヨウ素酸酸化による DDB の蛍光誘導体化法のそれよりも 1/10 ほど劣る。この主な原因は、*p*-ヒドロキシベスタチンのホルミル化生成が完全でないことによる(収率:約 10%)。今後、さらにこのホルミル化条件を検討し、その収率を高める予定である。

お わ り に

本研究において、筋ジストロフィー症患者ある

いは動物に投与したホルフェニシノールの血中モニターが蛍光 HPLC により可能となった。しかし、ホルフェニシノールの代謝物が尿中において認められているので、HPLC によるそれらの分離と検出条件も調べる必要がある。

また、設定した *p*-ヒドロキシベスタチンの蛍光ラベル化法は、血中に微量存在するその HPLC 定量に適用可能と思われるが、このためには血清に存在する多数のフェノール性水酸基を有する化合物からの妨害を除去することが肝要であり、血清の前処理および HPLC の分離条件について充分検討する必要がある。

文 献

- 1) 大倉洋甫, 甲斐雅充, 三浦哲朗. 微生物の二次代謝物に由来する難病治療薬の開発研究. 昭和 55 年度報告書, p.25 (1980).
- 2) 大倉洋甫, 石田淳一, 山口政俊, 弓場郁代. 微生物の二次代謝物に由来する難病治療薬の開発研究. 昭和 57 年度報告書, p.21 (1983).
- 3) Ishida, J., Yamaguchi, M., Kai, M., and Ohkura, Y. *J. Chromatogr.*, **305**, 381-389 (1984).
- 4) Wynberg, H. *Chem. Rev.*, **60**, 169-184 (1960).

筋ジストロフィーマウスの筋肉代謝網に対する

低分子酵素阻害物質の影響

青柳高明*

研究協力者 和田孝雄*・小島落子*・永井真知子*・原田滋子*

再度比較検討したので、その結果について述べる。

はじめに

筋ジストロフィー症の発症および進展のメカニズムとして、蛋白分解酵素の異常による筋蛋白崩壊が重要な役割を演じているという考え方がかなり一般的になっている。筆者らは、正常および筋ジストロフィー症のニワトリ、マウス、およびハムスターなどの筋肉を含む各種臓器内の酵素活性の変動を経時的に調べた結果、従来注目されていたエンドペプチダーゼの異常のみでなく、アミノペプチダーゼ、グリコシダーゼ、ホスファターゼ、エステラーゼなどの広範囲な酵素活性の異常が関与していることを明らかにした¹⁻³⁾。この知見を基にして、各種の低分子酵素阻害物質を筋ジストロフィーマウスの治療に導入する試みがなされ、ベスタチン、ホルフェニシノールなどにおいて、その有効性が示唆されている^{4,5)}。正常および病態モデル動物における酵素網の変動を経時的に調べ、また酵素阻害物質の投与により誘起される代謝網の変動を追究することは、ホメオスタシス機構を明らかにするとともに、各種疾病の治療への応用を可能にするものと考えられる⁶⁾。

本報告では、すでに報告したロイペプチン、ベスタチン、ホルフェニシノールを筋ジストロフィーマウスに投与したとき誘起される酵素網の変動を⁷⁾、さらにホルフェニシンを加えることにより

実験方法

筋ジストロフィーマウス

3週齢(雄)の筋ジストロフィーマウス(C57BL/6J, dy/dy)は実験動物中央研究所より購入した。動物は酵素阻害物質の最終投与時の3時間後に屠殺し、直ちに前肢筋、後肢筋、心、脾、肝、および腎を摘出し、 -70°C で保存した。臓器は、10倍量のphosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)の中で、組織ホモジェナイザー(ultra-turrax)を用いて1分間ホモジェナイズした。酵素活性の測定には、組織ホモジェネートの $3,000\times g$ 、20分間の遠心上清を用いた。

酵素阻害物質

ホルフェニシン⁸⁾($500\mu\text{g}/\text{日}$)、ロイペプチン⁹⁾($500\mu\text{g}/\text{日}$)、ベスタチン¹⁰⁾($200\mu\text{g}/\text{日}$)、およびホルフェニシノール⁷⁾($500\mu\text{g}/\text{日}$)は生理食塩水(0.2ml)に溶かし、毎日1回、腹腔内に8日間連日投与した。対照群には、生理食塩水(0.2ml)を同様に投与した。阻害物質の構造は図1に示す。

基質

酵素活性測定用の基質は下記のものを用いた。L-glutamic acid β -naphthylamide hydrochloride (Glu-NA)、L-arginine β -naphthylamide

* 微生物化学研究所

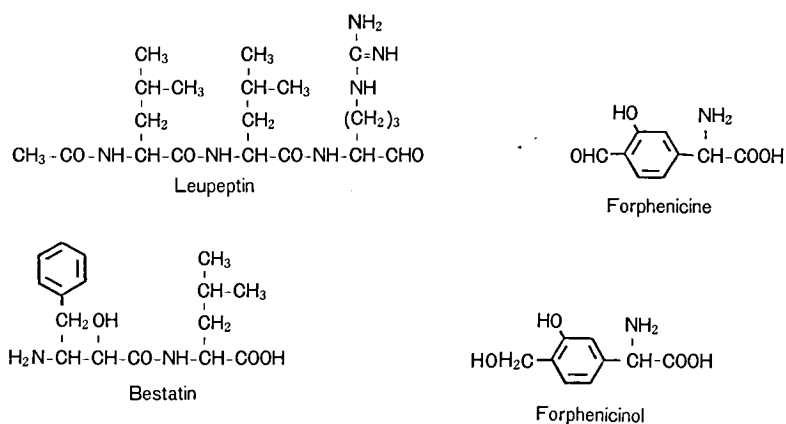


図 1 Structure of low-molecular weight enzyme inhibitors.

hydrochloride (Arg·NA), L-proline β-naphthylamide (Pro·NA), L-leucine β-naphthylamide (Leu·NA), L-formylmethionine β-naphthylamide (fMet·NA), L-phenylalanine β-naphthylamide (Phe·NA), glycyl-L-prolyl-L-leucine β-naphthylamide hydrobromide, N^α-benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride (BAEE), N^α-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE), acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine methyl ester (Ac(Ala)₃·ME), hemoglobin, p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (NP-Glc), p-nitrophenyl-α-D-mannopyranoside (NP-Man), p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (NP-GlcNAc), 1-¹⁴C-creatine, p-nitrophenyl phosphate (NPP), p-nitrophenyl acetate (NPA).

緩衝液

酵素活性測定用の緩衝液は 0.02 M PBS を用いた。ただし、カタプシン D の測定には 0.2 M sodium acetate buffer (pH 3.2), クレアチンキナーゼの測定には sodium glycine buffer (pH 9.0) を用いた。

酵素活性の測定

組織ホモジェネートの遠心上清分画は、それぞ

れの基質溶液および PBS を含む反応試験管 (1.5 × 10 cm) に分注し、37°C で 1 時間の反応を行った。カタプシン D とクレアチンキナーゼは前述の緩衝液を用い、pH 3.2 と pH 9.0 の条件下で反応を行った。すべての酵素活性の測定には 3 本ずつの反応試験管を用い、その平均値を記載した。各酵素活性の基質および測定方法は表 1 に記載する。すなわち、7 種類のアミノペプチダーゼ活性の測定は、2 mM β-naphthylamide 誘導体 (0.25 ml), PBS (0.65 ml), および上清分画 (0.1 ml, 適宜希釈) を用いて反応を行い、すでに報告した方法^{1,11,12)}で反応を止め、525 nm の吸光度を測定した。セリンプロテイナーゼ活性の測定は、75 mM ペプチドエステルあるいは N-アセチルアミノ酸を基質として用い、すでに報告した方法^{1,11)}で反応を止め、525 nm の吸光度を測定した。カタプシン D 活性の測定は、0.5% ヘモグロビン (1.0 ml, pH 3.2) を基質として用い、既報の方法^{1,11)}で反応を止め、280 nm の吸光度を測定した。グリオシダーゼ活性の測定は、2.5 mM p-nitrophenyl 誘導体 (0.1 ml) を基質として用い、既報の方法^{1,11,14)}で反応を止め、400 nm の吸光度を測定した。クレアチンキナーゼ活性の測定は、1 mM クレアチン (1-¹⁴C-クレアチン, 50,000 dpm) を基質として用い、反応終了後 Dowex 50 (H⁺) カラムの通過液の放射活性を測定した^{7,15)}。ホスファ

表 1 List of the enzymes measured and their substrates

Enzyme	Abbreviation	Substrate	Reference for assay method
Aspartate aminopeptidase (EC 3.4.11.7)	AP-A	Glu·NA	1, 11
Arginine aminopeptidase (EC 3.4.11.6)	AP-B	Arg·NA	1, 11
Proline aminopeptidase	Pro-AP	Pro·NA	1, 11
Leucine aminopeptidase (EC 3.4.11.1)	Leu-AP	Leu·NA	1, 11
Formylmethionine aminopeptidase	fMet-AP	fMet·NA	1, 12
Phenylalanine aminopeptidase	Phe-AP	Phe·NA	1, 11
Tripeptide aminopeptidase (EC 3.4.11.4)	Gly-Pro-Leu-AP	Gly·Pro·Leu·NA	1, 11
Serine proteinase (EC 3.4.21)	Trypsin-like	BAEE	1, 11
Serine proteinase (EC 3.4.21)	Chy-try-like	ATEE	1, 11
Serine Proteinase (EC 3.4.21)	Elastase-like	Ac(Ala) ₃ ·ME	1, 11
Carboxyl proteinase (EC 3.4.23.5)	Cathepsin D	Hemoglobin	1, 13
α -D-Glucosidase (EC 3.2.1.20)	Glucosidase	NP-Glc	1, 11, 14
α -D-Mannosidase (EC 3.2.1.24)	Mannosidase	NP-Man	1, 11, 14
β -N-acetyl-D-glucosaminidase (EC 3.2.1.30)	GlcNAc-ase	NP-GlcNAc	1, 11, 14
Creatine kinase (EC 2.7.3.2)	CK	1- ¹⁴ C-creatine	7, 15
Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1)	Phosphatase	NPP	1, 11, 14
Arylesterase (EC 3.1.1.2)	Esterase	NPA	1, 11, 14

ターゼならびにエステラーゼ活性の測定は、15 mM *p*-nitrophenyl 誘導体を基質として用い、既報の方法^{11,14)}で反応を止め、400 nm の吸光度を測定した。

蛋白の測定

標準蛋白として、ウシ血清アルブミンを用い、Lowry 法¹⁶⁾で測定した。

統計¹⁷⁾

各酵素活性の変化を、対照を基準として Student の *t* 値で表し、そのプラス値の大きいものからマイナス値の大きいものへと順位づけし、その順位についての相関を Spearman の順位相関係数 (r_s) として表した。

結果および考察

筋ジストロフィーマウスに前述の4種類の阻害物質を連日(1日1回)投与し、8日後に屠殺したのち、前肢筋、後肢筋、心、脾、肝、腎を摘出

し、表1に記載した17種類の酵素活性について、その変動を検討した。

表2は、前肢筋における酵素網の動態を示す。ロイペプチン投与群では fMet-AP, chy-try-like, cathepsin D などの活性が有意に増加する傾向を示したが、AP-A, Leu-AP, phosphatase, esterase などの活性は、有意に低下する傾向にあることが認められた。ベスタチン投与群では fMet-AP 活性のみ増加したが、AP-A, Leu-AP, Phe-AP, trypsin-like, glucosidase, creatine kinase, phosphatase, esterase などの活性が有意に低下する傾向にあることが認められた。また、ホルフェニシノール投与群では、fMet-AP 活性のみ増加したのに対し、AP-A, Leu-AP, trypsin-like, chy-try-like, glucosidase, GlcNAc-ase, phosphatase, esterase などの多くの酵素活性が有意に低下する傾向にあることが認められた。さらに、ホルフェニシン投与群では、AP-A, Leu-AP, Phe-AP, trypsin-like, chy-try-like, cathepsin D, glucosidase, GlcNAc-ase, phosphatase, esterase などの多くの酵素活性が有意

表 2 Changes in enzymatic activity of forelimb muscle of dystrophic mice induced by low-molecular-weight inhibitors

Enzyme	Specific activity \pm S. D. (N=5)				
	None(N=10)	Leupeptin	Bestatin	Forphenicinol	Forphenicine
AP-A	1.63 \pm 0.22	0.95 \pm 0.60**	1.26 \pm 0.22**	1.28 \pm 0.06**	1.24 \pm 0.31*
AP-B	10.45 \pm 1.53	8.39 \pm 2.29(*)	9.22 \pm 1.14	9.08 \pm 1.42	10.04 \pm 1.36
Pro-AP	2.65 \pm 1.25	2.42 \pm 0.49	1.45 \pm 0.43(*)	2.54 \pm 0.85	3.67 \pm 1.18
Leu-AP	8.96 \pm 0.93	5.68 \pm 3.45*	7.67 \pm 0.74*	7.58 \pm 0.12*	6.65 \pm 1.49**
fMet-AP	4.03 \pm 0.36	6.34 \pm 1.41***	5.17 \pm 0.67***	4.60 \pm 0.07**	4.42 \pm 0.80
Phe-AP	14.23 \pm 1.31	10.87 \pm 5.32(*)	10.93 \pm 2.31**	13.59 \pm 0.58	10.54 \pm 2.25**
Gly-Pro-Leu-AP	1.16 \pm 0.18	0.94 \pm 0.48	0.97 \pm 0.18(*)	1.03 \pm 0.15	1.19 \pm 0.26
Trypsin-like	72.79 \pm 8.72	102.07 \pm 47.93(*)	54.42 \pm 21.40*	55.11 \pm 13.43**	43.09 \pm 16.95***
Chy-try-like	74.98 \pm 14.62	134.26 \pm 25.32***	63.53 \pm 23.28	90.06 \pm 5.96*	48.01 \pm 19.05**
Elastase-like	49.00 \pm 7.51	48.74 \pm 18.50	45.76 \pm 18.82	54.11 \pm 7.22	45.36 \pm 15.29
Cathepsin D	0.0069 \pm 0.0007	0.0085 \pm 0.0009**	0.0071 \pm 0.0009	0.0066 \pm 0.0010	0.0048 \pm 0.0017**
Glucosidase	0.71 \pm 0.24	0.74 \pm 0.16	0.40 \pm 0.04*	0.43 \pm 0.0*	0.34 \pm 0.07**
Mannosidase	0.17 \pm 0.15	0.31 \pm 0.28	0.14 \pm 0.03	0.19 \pm 0.05	0.14 \pm 0.01
GlcNAc-ase	1.75 \pm 0.55	2.22 \pm 1.07	1.22 \pm 0.25(*)	1.13 \pm 0.14*	0.61 \pm 0.27***
Creatine kinase	22.51 \pm 4.76	19.75 \pm 10.43	16.05 \pm 2.74*	19.27 \pm 3.48	18.01 \pm 2.85(*)
Phosphatase	4.34 \pm 0.92	1.67 \pm 1.23***	1.46 \pm 0.20***	1.42 \pm 0.19***	2.40 \pm 0.29***
Esterase	131.56 \pm 45.58	67.62 \pm 16.80*	62.57 \pm 2.85**	57.31 \pm 4.81**	43.77 \pm 12.97**

(*), $p < 0.1$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

表 3 Changes in Enzymatic activity of hindlimb muscle of dystrophic mice induced by low-molecular-weight inhibitors

Enzyme	Specific activity \pm S. D. (N=5)				
	None (N=10)	Leupeptin	Bestatin	Forphenicinol	Forphenicine
AP-A	1.60 \pm 0.23	1.44 \pm 0.22	1.54 \pm 0.09	1.28 \pm 0.38(*)	1.36 \pm 0.48
AP-B	10.07 \pm 1.35	9.60 \pm 1.55	10.78 \pm 0.56	9.76 \pm 0.66	8.35 \pm 1.06*
Pro-AP	3.63 \pm 0.78	3.14 \pm 0.84	3.48 \pm 0.22	4.22 \pm 0.56	3.99 \pm 0.44
Leu-AP	4.56 \pm 0.37	6.46 \pm 0.20***	7.12 \pm 0.37***	6.15 \pm 1.49**	5.93 \pm 1.44*
fMet-AP	3.60 \pm 0.31	4.87 \pm 0.88**	4.70 \pm 0.27***	5.24 \pm 1.40***	3.82 \pm 0.83
Phe-AP	13.41 \pm 2.12	11.36 \pm 0.78(*)	12.11 \pm 0.70	11.86 \pm 1.24	9.38 \pm 2.69**
Gly-Pro-Leu-AP	1.28 \pm 0.17	1.38 \pm 0.11	1.32 \pm 0.09	1.15 \pm 0.15	1.08 \pm 0.25(*)
Trypsin-like	36.40 \pm 10.94	52.35 \pm 8.58*	38.05 \pm 5.01	33.81 \pm 12.51	22.51 \pm 4.33*
Chy-try-like	40.17 \pm 8.53	50.92 \pm 14.82(*)	40.90 \pm 6.09	51.95 \pm 12.75(*)	25.21 \pm 4.03**
Elastase-like	29.68 \pm 4.94	36.06 \pm 14.86	34.20 \pm 3.64(*)	31.55 \pm 5.29	26.00 \pm 6.00
Cathepsin D	0.0042 \pm 0.0005	0.0056 \pm 0.0005***	0.0047 \pm 0.0006	0.0043 \pm 0.0009	0.0034 \pm 0.0011(*)
Glucosidase	0.49 \pm 0.08	0.52 \pm 0.09	0.52 \pm 0.03	0.45 \pm 0.09	0.37 \pm 0.15(*)
Mannosidase	0.21 \pm 0.05	0.21 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02	0.18 \pm 0.03	0.19 \pm 0.04
GlcNAc-ase	0.86 \pm 0.15	1.20 \pm 0.19**	0.98 \pm 0.19	0.96 \pm 0.09	0.71 \pm 0.26
Creatine kinase	35.68 \pm 4.56	32.88 \pm 4.69	34.83 \pm 1.78	35.33 \pm 10.41	25.71 \pm 2.43***
Phosphatase	1.90 \pm 0.79	1.43 \pm 0.50	1.71 \pm 0.26	1.44 \pm 0.63	2.71 \pm 0.51(*)
Esterase	46.42 \pm 7.50	49.95 \pm 5.95	49.11 \pm 6.36	50.71 \pm 9.04	34.65 \pm 9.29*

(*), $p < 0.1$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

に低下する傾向にあるのに対し、酵素活性が増加する酵素は認められなかった。上記の阻害物質のうち、ホルフェニシン投与群が最も強く酵素網に変動を与えることが認められた。

表3は、後肢筋における酵素網の動態を示す。ロイペプチン投与群では Leu-AP, fMet-AP, trypsin-like, cathepsin D, GlcNAc-ase などの活性が有意に増加する傾向にあることが認められたが、活性低下を示す酵素は認められなかった。また、ベスタチンおよびホルフェニシノール投与群では Leu-AP および fMet-AP 活性が有意に増加したが、その他の酵素活性については有意な変動が認められなかった。一方、ホルフェニシン投与群では、AP-B, Phe-AP, trypsin-like, chy-try-like, creatine kinase, esterase などの活性が低下するのに対し、Leu-AP 活性のみ有意に増加することが認められた。後肢筋においてもホルフェニシン投与群が酵素網に強い変動を与えることが認められた。

表4は、脾における酵素網の動態を示す。ロイ

ペプチン投与群では、Pro-AP, Phe-AP, Gly-Pro-Leu-AP, cathepsin D, phosphatase などの活性が増加したが、trypsin-like 活性のみ有意に低下する傾向にあることが認められた。ベスタチン投与群では、AP-B, Pro-AP, Leu-AP, Phe-AP, Gly-Pro-Leu-AP などの活性が増加することが認められたが、trypsin-like および chy-try-like の活性は有意に低下した。また、ホルフェニシノール投与群では、Pro-AP, Leu-AP, Phe-AP, Gly-Pro-Leu-AP, phosphatase, esterase などの活性が増加することが認められたのに対し、trypsin-like, chy-try-like, glucosidase, mannosidase などの活性が有意に低下した。さらに、ホルフェニシン投与群では、Phe-AP, Gly-Pro-Leu-AP, phosphatase, esterase などの活性が増加するのに対し、AP-B, glucosidase, mannosidase などの活性が有意に低下する傾向を示した。

表2～表4で明らかなのは、これらの阻害物質を投与することにより誘起された各臓器内の酵

表4 Changes in enzymatic activity of spleen of dystrophic mice induced by low-molecular-weight inhibitors

Enzyme	Specific activity \pm S. D. (N=5)									
	None (N=10)		Leupeptin		Bestatin		Forphenicinol		Forphenicine	
AP-A	0.52 \pm 0.18	0.43 \pm 0.05	0.35 \pm 0.03(*)	0.50 \pm 0.09	0.64 \pm 0.16					
AP-B	16.74 \pm 1.15	15.78 \pm 2.60	18.40 \pm 1.35*	15.69 \pm 2.07	12.53 \pm 3.58**					
Pro-AP	1.47 \pm 0.04	1.60 \pm 0.15*	1.65 \pm 0.17**	1.79 \pm 0.27**	1.48 \pm 0.40					
Leu-AP	4.38 \pm 0.98	5.11 \pm 1.48	5.94 \pm 0.63**	7.13 \pm 1.03***	5.02 \pm 0.82					
fMet-AP	11.94 \pm 2.13	12.96 \pm 2.97	10.85 \pm 0.75	10.86 \pm 1.29	11.51 \pm 0.92					
Phe-AP	4.29 \pm 0.12	5.73 \pm 1.10***	4.70 \pm 0.46*	5.77 \pm 0.12***	5.47 \pm 1.00**					
Gly-Pro-Leu-AP	0.55 \pm 0.01	1.03 \pm 0.35***	0.68 \pm 0.05***	0.87 \pm 0.09***	0.94 \pm 0.41**					
Trypsin-like	231.33 \pm 52.17	160.73 \pm 73.59*	170.03 \pm 30.56*	175.03 \pm 10.93*	179.99 \pm 39.37(*)					
Chy-try-like	351.13 \pm 113.35	299.83 \pm 119.69	198.37 \pm 27.66*	209.97 \pm 120.64*	248.64 \pm 68.27(*)					
Elastase-like	147.43 \pm 97.42	126.57 \pm 55.77	103.60 \pm 31.54	134.92 \pm 13.84	195.18 \pm 64.61					
Cathepsin D	0.0303 \pm 0.0129	0.0384 \pm 0.0134*	0.0476 \pm 0.0174	0.0366 \pm 0.0129	0.0293 \pm 0.0202					
Glucosidase	1.05 \pm 0.32	0.76 \pm 0.34	0.85 \pm 0.19	0.15 \pm 0.16***	0.69 \pm 0.05*					
Mannosidase	0.74 \pm 0.30	0.49 \pm 0.34	0.48 \pm 0.12(*)	0.0 \pm 0.0***	0.10 \pm 0.14***					
GlcNAc-ase	9.11 \pm 9.81	3.43 \pm 1.16	3.92 \pm 0.96	2.27 \pm 0.13	2.04 \pm 0.22					
Phosphatase	1.94 \pm 0.32	2.43 \pm 0.48*	2.02 \pm 0.33	2.54 \pm 0.95*	2.67 \pm 0.45**					
Esterase	15.27 \pm 1.10	16.52 \pm 1.27(*)	16.50 \pm 1.02(*)	34.66 \pm 2.05***	24.33 \pm 3.77***					

(*), $p < 0.1$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

表 5 Correlations among enzymatic changes induced by low-molecular-weight inhibitors

Organs	x y	Forphenicine			Leupeptin		Bestatin
		Leupeptin	Bestatin	For-nol	Bestatin	For-nol	For-nol
Forelimb		0.69*	0.94**	0.92**	0.86**	0.88**	0.97**
Hindlimb		0.75**	0.84**	0.86**	0.96**	0.94**	0.98**
Spleen		0.92**	0.89**	0.08	0.95**	-0.13	-0.15

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

For-nol: forphenicol.

素活性の変動が、これらの阻害物質の *in vitro* における阻害活性とは無関係に、さまざまな酵素活性に影響を与えていることである。これらの結果から、少なくとも上記4種の阻害物質による酵素活性の変動には何らかの類似性があることが推察される。それゆえ、阻害物質の投与により誘起された各臓器内の酵素活性の変化を対照群と比較し、Student の t 値を算出した。 t 値は対照群からの変化の程度を表すものであるから、その変化の程度に順位をつけることにより、酵素変化のパターンを表すことが可能である。このようにして得た順位表を各阻害物質間で比較し、相互の相関の程度を順位相関係数 (r_s) を求めることにより検討した。

表 5 は、阻害物質投与により誘起された各臓器内の酵素網変化の相関性を示す。前肢筋における各阻害物質の相関性は、全般的にかなり類似している。ホルフェニシンはベスタチンおよびホルフェニシノールと、またロイペプチンはベスタチンおよびホルフェニシノールと、さらにベスタチンはホルフェニシノールとの間に、高い類似性が認められた。しかし、ホルフェニシンとロイペプチンの作用は、前肢筋において多少異なった傾向にあることが示唆された。

後肢筋における相関性はロイペプチン、ベスタチン、ホルフェニシノールの間に高い類似性が認められたが、ホルフェニシンの作用は少し異なるように思われる。しかし、前肢筋および後肢筋を総合的に観察するとき、上記4種の阻害物質の作用はきわめて類似性が高いといえる。

一方、脾臓における相関性は、ホルフェニシン、ロイペプチン、ベスタチンの間に高い類似性が認められるのに対し、ホルフェニシノールのみが他の阻害物質の作用とまったく異なっていることが認められた。脾臓の酵素網にホルフェニシノールのみ異なった作用を与えたことは、きわめて興味あることと考えられる。

ま と め

筋ジストロフィーマウスに対する低分子酵素阻害物質の治療効果を調べる目的で、阻害物質投与により誘起される筋肉を含む臓器内の酵素網の動態を検討した。ロイペプチン、ベスタチン、ホルフェニシノール、およびホルフェニシンは筋ジストロフィーマウスの筋肉内の酵素網に有意な変動を与えることを明らかにした。*in vitro* で異なる阻害活性を示す阻害物質の投与により起る酵素網の変動は、前肢筋および後肢筋において高い類似性を示した。ホルフェニシンはロイペプチン、ベスタチン、ホルフェニシノールと同様に、筋ジストロフィーマウスの治療に有効であることを示唆した。

一方、脾の酵素網に対しては、ホルフェニシノールのみが他の阻害物質の作用と異なることを認めた。ホルフェニシノールは、免疫応答細胞に対し、他の阻害物質とは異なる影響を与えるものと考えられる。

文 献

- 1) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., and Umezawa, H. *J. Clin. Invest.*, **67**, 51-59 (1981).
- 2) Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Aoyagi, T., and Umezawa, H. *J. Pharm. Dyn.*, **4**, 184-190 (1981).
- 3) Aoyagi, T., Wada, T., Yamamoto, K., Kojima, F., Nagai, M., and Umezawa, H. *J. Pharm. Dyn.*, **7**, 312-321 (1984).
- 4) Matsushita, H. In Study on the Clinical Applications of Secondary Metabolites from Microbes (Annual Report of Muscular Dystrophy Committee, supported by Ministry of Health and Welfare), pp.45-50 (1980) (in Japanese).
- 5) Matsushita, H. In Study on the Clinical Applications of Secondary Metabolites from Microbes (Annual Report of Muscular Dystrophy Committee, supported by Ministry of Health and Welfare), pp.51-57 (1982) (in Japanese).
- 6) 青柳高明. 自然, 10月号, 39-47 (1983).
- 7) Aoyagi, T., Wada, T., Iwabuchi, M., Kojima, F., Nagai, M., and Umezawa, H. *Biochem. Int.*, **5**, 97-103 (1982).
- 8) Aoyagi, T., Yamamoto, T., Kojiri, K., Kojima, F., Hamada, M., Takeuchi, T., and Umezawa, H. *J. Antibiot.*, **31**, 244-246 (1978).
- 9) Aoyagi, T., Miyata, S., Nambo, M., Kojima, F., Matsuzaki, M., Ishizuka, M., Takeuchi, T., and Umezawa, H. *J. Antibiot.*, **22**, 558-568 (1969).
- 10) Umezawa, H., Aoyagi, T., Suda, H., Hamada, M., and Takeuchi, T. *J. Antibiot.*, **29**, 97-99 (1976).
- 11) Aoyagi, T., Suda, H., Nagai, M., Ogawa, K., Suzuki, J., Takeuchi, T., and Umezawa, H. *Biochim. Biophys. Acta*, **452**, 131-143 (1976).
- 12) Suda, H., Yamamoto, K., Aoyagi, T., and Umezawa, H. *Biochim. Biophys. Acta*, **616**, 60-67 (1980).
- 13) Aoyagi, T., Kunimoto, S., Morishima, H., Takeuchi, T., and Umezawa, H. *J. Antibiot.*, **24**, 687-694 (1971).
- 14) Aoyagi, T., Nagai, M., Iwabuchi, M., Liaw, W. S., Andoh, T., and Umezawa, H. *Cancer Res.*, **38**, 3505-3508 (1978).
- 15) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Miyoshino, S., and Umezawa, H. *Clin. Chim. Acta*, **129**, 165-173 (1983).
- 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 17) Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. *Principles and Procedures of Statistics*, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York (1960).

EAE モルモットに対するロイペプチンの効果

岩崎 祐三*

研究協力者 山本 悌司*・今野 秀彦*

実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) は、中枢神経の白質あるいは髄鞘塩基性蛋白 (MBP) で感作された動物に生じる中枢神経系の疾患で、ヒトの多発性硬化症の一疾患モデルとして研究されている。この EAE にみられる脱髄現象のメカニズムについては種々論議されているが、Cammer²⁾ は、免疫反応によって活性化された macrophage が plasminogen activator を含む neutral proteinases を分泌し、これが髄鞘の崩壊を起すと述べている。もしこの neutral proteinase、とくに macrophage が分泌する plasminogen activator によって plasminogen から合成される plasmin が脱髄疾患の臨床徴候や病理像をひき起すのに重要な役割を演ずるとするならば、この酵素の拮抗剤であるロイペプチンの投与によって EAE の発病を防ぐことができるのではないかと考えられるのである。

このような考えに基づいて、EAE モルモットに対するロイペプチンの効果をみる目的から、以下の実験を行った。

方 法

220~420 g の成熟したモルモットに、FCA を加えた脊髄ホモジェネート 0.1 ml を背部の皮内に接種して感作した。このモルモットを4群に分け、第1群 (15匹) は感作前日より1日2回、ロ

イペプチン 25 mg/kg を腹腔内に投与したもので、第2群 (15匹) は感作後1週間目より同様にロイペプチンを投与したもので、第3群 (15匹) は発症した日からロイペプチンを投与したもので、第4群 (7匹) はロイペプチンの投与を行わなかったものとし、いずれも体重の測定と臨床的な観察を続け、生存したものすべて21日目に4%パラフォルム+0.5%グルタル液にて灌流固定を行った。臨床症状の判定は、0、まったく異常のみ見られない状態；1、体重減少とともに自発運動が少なくなった状態；2、後肢の運動麻痺と排便障害のみ見られた状態；3、著しい後肢麻痺のためほとんど動けなくなった状態；4、死亡；と5段階に分けて行った。連日記録されたこれらの score の中で最も高い値を、その例の臨床的重症度とした。なお、病気の進行のため、途中で灌流固定を行ったものも死亡として扱った。

各モルモットより採取した脳、脊髄から下垂体茎を通る部分、延髄上端、頸膨大部、胸髄のほぼ中央部および腰膨大部の5箇所を切り出し、H・E染色標本作製した (図3)。それぞれの組織学的な変化の強さを次のように6段階に分けて識別した (図4)。0、まったく異常のみ見られないもの；1、クモ膜下腔へのわずかな細胞浸潤がみられたもの；2、1と3の中間のもの；3、クモ膜下腔の細胞浸潤に加え実質内の血管周囲への細胞浸潤がみられたもの；4、3と5の中間のもの；5、これらの所見が広汎にしかも高度にみられ、実質

* 東北大学医学部 脳疾患研究施設

の崩壊が著しいもの。これらの grading を score とし、5枚の標本の結果を加算し各モルモットの組織的重症度とした。夜間死亡により試料の採取ができなかったのは、第1群の1例のみである。

効果判定に用いた項目は、臨床像からみた発病率、組織像からみた発病率、発症日、臨床的重症度、組織的重症度、組織所見および体重の推移などである。

結 果 (表 1, 図 1, 図 2)

発 症 率

臨床的には、第3・4群に比して第1・2群のものでやや低値の傾向がみられたが、症状発現が

把握できなかった症例でも、その組織像をみると明らかに細胞浸潤が認められた例もあり、組織像に基づいた発症率のほうが高率であった。しかし、いずれの発症率においても各群の間に有意差は確認されなかった。

発 症 日

症状の発現がみられた日を示す。発症前にロイペプチンの投与を受けなかった第3・4群では15.4±3.4日、これに対して第2群では約1日、第1群では約2日遅れて発症する結果となり、統計的に有意差は認められないが、ロイペプチン投与群では発症の遅れる傾向が示された。

表 1 The effect of leupeptin on the EAE guinea pig

	Incidence		Clinical onset (day)	Clinical score	Pathological score
	Clinical	Histological			
Group 1	11/15 73.3%	14/14 100%	17.4±3.6	1.5±1.3	13.4±4.8
Group 2	10/15 66.7%	14/15 93.3%	16.9±4.1	1.5±1.4	11.8±6.0
Group 3	13/15 86.7%	14/15 93.3%	15.0±3.3	2.0±1.2	12.6±4.8
Group 4	6/7 85.7%	7/7 100%	16.1±3.5	2.1±1.3	13.6±4.7

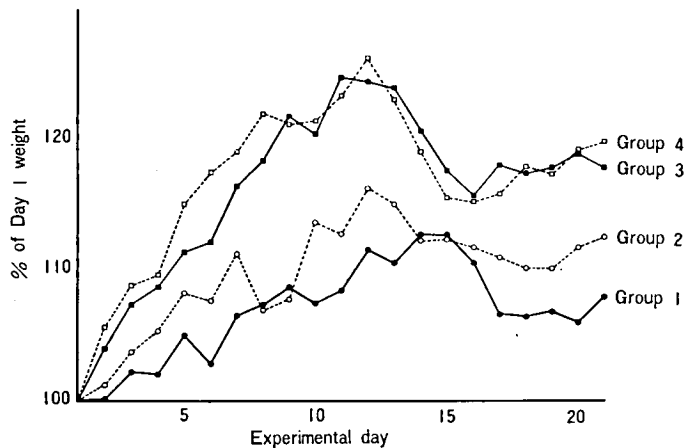


図 1 The mean weight for each group is expressed as percent of the mean weight of the respective group at Day 1.

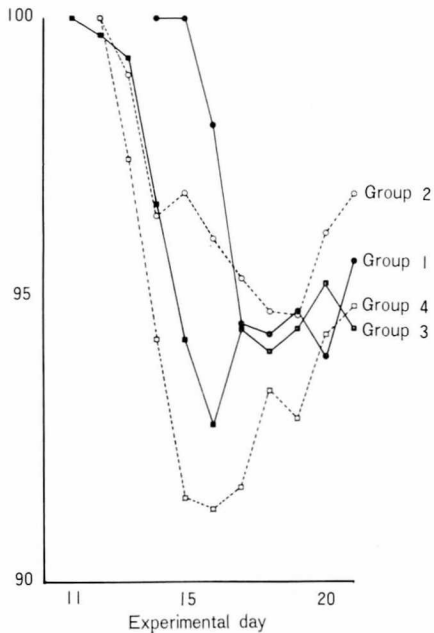


図 2 Percentile loss of BW relative to the maximum BW gain (100%) in each experimental group.

臨床的重症度

有意差検定では明らかな違いはないものの、平均値だけについてみるならば、発症以前からロイペプチンの投与を受けた第 1・2 群ではいずれも 1.5 であるのに対し、第 3 群では 2.0、第 4 群では 2.1 と重症度を増していた。また、罹病期間を考慮した臨床的重症度の適当な判定方法は見あたらないが、全体的には第 3・4 群に対し第 1・2 群で罹病期間がやや長い印象を受けた。

組織的重症度

細胞浸潤の程度あるいはその広がりなどについての検討であるが、第 2・3 群でやや低値がみられたものの、有意の差は得られなかった。一方、各群で、発症日および臨床的重症度のほぼ同様の例で病変の性格について比較を行った。その結果、発症して 3~4 日目に得られた標本では各群とも目立った違いは認められないものの、sacrifice までに 9~11 日間の経過を示したものでは、第 4 群

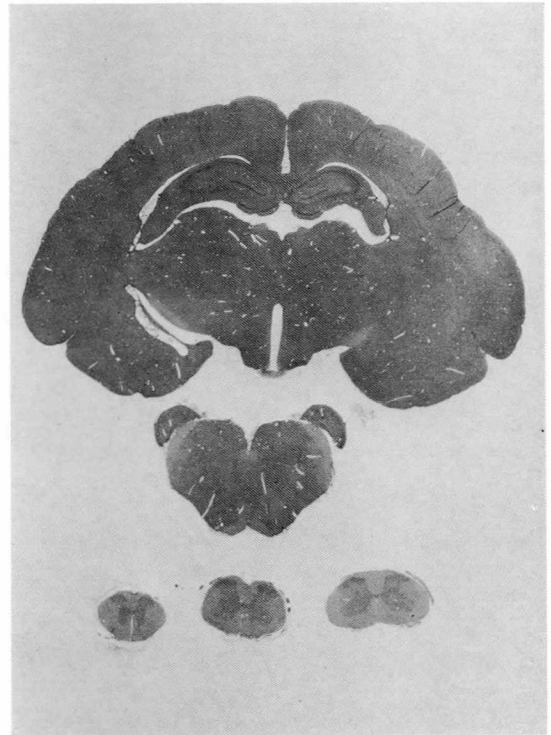
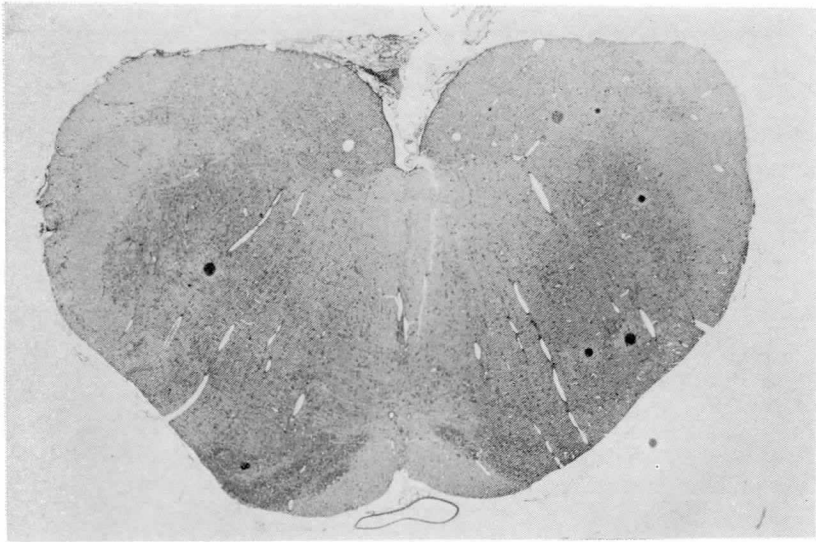


図 3 The five transverse sections of the brain and spinal cord from which the pathological gradings were made. The sections are through the optic chiasma, the upper medulla and the spinal cord (the cervical and lumbar intumescence, the mid-thoracic level).

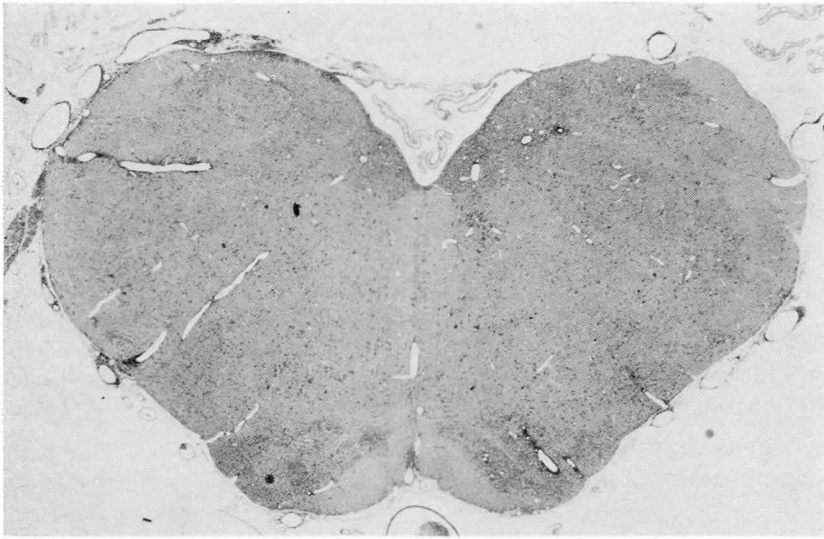
のものは細胞浸潤がクモ膜下腔や血管周囲にほぼ局限し、その細胞の種類もほとんどが mononuclear cell であるのに対し、その他の群ではこの血管周囲の病変からさらにこれを中心に実質内へ浸潤する細胞がみられ、この中には分葉核をもつ顆粒球が目立った (図 5)。また、クモ膜下腔の中にもこのような細胞が認められ、とくに第 1・2 群に明瞭であった。

体重の推移

感作当日の体重を 100 とし、その後の変化を割合で示したものが図 1 である。第 3 群と第 4 群とはほぼ同様の経過がみられた。それぞれ 11 日目、12 日目まで急激な体重増加を示すが、その後、約 5 日の間に著しい減少 pattern がみられ、緩やか



A



B



C

☒ 4

Example of the pathologies of varying severity, with which the grading was determined. A : Grade 1, in which only slight cellular infiltrations into the leptomeninges were observed, while no parenchymatous lesions were identified. B : Grade 3, the cellular infiltrations included parenchymatous perivascular regions. C : Grade 5, in which the parenchymal tissues were extensively involved with cellular infiltration as well as tissue destruction.

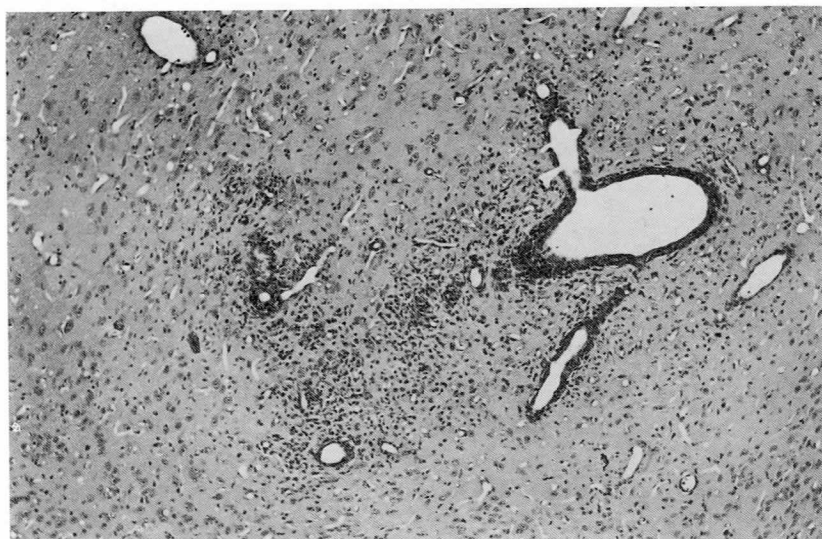


図 5 The encephalitic process involving the perivascular regions as well as the parenchymatous tissue remote from the blood vessels. The infiltrating cells identified include neutrophile, round cells, and microglia. This case was given leupeptin prior to administration of antigen (Group 1) and differs from Group 4 cases in which the pathological processes appeared to involve only perivascular areas at this stage.

な増加傾向へと移行していた。第 2 群の体重推移は、感作後 1 週目まで第 3・4 群とほぼ同様に増加しているが、次の 2 日間に軽度ながら減少の時期があり、再び増加へと向かうものの、12 日目を境に緩やかな減少傾向がみられた。これらに対して、第 1 群では、体重増加の割合は少ないものの、このピークに達する時期が 14 日目とやや遅くなっており、その後の体重減少は軽度で緩やかなものであった。

次に、体重減少の割合を明らかにする目的から、ピーク時期の体重を 100 とし、その後の減少を表したものが図 2 である。第 4 群は急激に著しい体重減少をきたすのに対して、第 2 群は徐々に、しかも減少の割合は軽いものであった。第 1 群は急激な減少を示すものの、減少の割合は少なかった。第 3 群では、第 4 群とほぼ同様の傾向がみられた。

考 案

ロイペプチンの EAE に対する予防および治療

効果という面からこれらの結果をみると、発症率については、臨床的にはロイペプチンの投与を行わなかった群でやや高いように思われた。組織像からみると、いずれも高率に病変がみられ、ロイペプチン投与群と非投与群との間に差は認められなかった。また、臨床的重症度や組織的重症度においても明瞭な違いはみられなかった。しかし、今回試みたいいくつかの検討項目の中で、結果に差がみられたものがある。その 1 つに発症日の違いがあげられる。つまり、あらかじめロイペプチンの投与を受けていた第 1・2 群では、非投与群より発症が遅れたことである。このことは、ある程度客観的に動物の状態を示す体重の変動によって裏づけられているように思われる。必ずしも症状出現の時期と体重減少の時期とは一致していないが、緩やかな体重減少を示した第 2 群を除けば、臨床的な発症時期の違いがそのまま体重減少の始まる時期の違いに移行しているように思えるのである。このようなことから、ロイペプチンに EAE の発症時期を遅らせる効果があるとは断定できな

いにしても、何らかの影響を与えることが推測される。

次に、ピーク後に続く体重減少の経過についてみると、第3・4群に比較して、第1・2群つまり症状出現より以前からロイペプチンを投与した群では、体重減少の割合が小さく、しかもそれが遷延する傾向にあるということである。ピークに達した体重を100とし、その後の減少を割合で示すこの方法は、1980年に Brosnan¹⁾が種々の proteinase inhibitor の EAE ラットに対する効果を判定するのに用いたものと同じ方法である。これによると、第1・2群の経過はロイペプチンの有効性を示すものと判断されることになる。しかし、感作当初からの体重増加の推移をみると、第1・2群と第3・4群との間に明らかな差がみられ、ロイペプチンの投与が体重の増加に何らかの影響も与えないとする田中⁴⁾の報告と異なるものであることから、この体重の変動についてはロイペプチン以外の要因の影響、たとえば1日に2回の注射の動物に与えるストレスなどについても考慮されなければならない、一概に有効と判断することはできないように思われる。

次に、病変の組織所見から、ロイペプチンを投与した第1・2・3群では実質内への細胞浸潤が血管周囲からさらに広い領域にまで及んでおり、この細胞の中には microglia や分葉核をもつ好中球が目立つことである。これらの細胞は EAE 病変においてしばしばみられるものであるが、とくに好中球は急激型の病変や組織崩壊の激しい部位に出現し、崩壊産物や血管より浸出した血漿成分によって招来される、EAE にとっては二次的に出現する細胞とされている⁹⁾。この場合、機能的にはいわゆる清掃細胞と考えられるのであるが、この細胞が出現しているということは崩壊産物が

まだその病変の中に存在することを意味するものであり、ロイペプチンを投与しなかった群と比較すると病変の吸収が遅延していることを示すものと思われる。この原因については、たとえば組織崩壊が激しかったために吸収作業が遅れているのか、あるいは清掃機能の低下によるもののかなど、種々のことが考えられるし、また、そこにロイペプチンがどのように関与しているのかなどについても、興味のもたれる点であろう。

ロイペプチンの EAE 動物に対する治療効果については、1980年に Brosnan ら¹⁾が実験を行っており、効果はなかったとしている。今回の実験では、投与方法あるいは判定方法などさらに工夫されなければならない点がいくつかあるが、これらの結果について全体的にみると、EAE の発症および経過に対し何らかの影響は示唆されるものの、治療効果の点からするならば有効性は認めがたいように思われる。

文 献

- 1) Brosnan, C. F., Cammer, W., Norton, W. T., and Bloom, B. R., Proteinase inhibitors suppress the development of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature*, 285, 235-237 (1980).
- 2) Cammer, W., Bloom, B. R., Norton, W. T., and Gordon, S. Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophage: A possible mechanism of inflammatory demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75, 1554-1558 (1978).
- 3) Waksman, B. H. and Adams, R. AD., A histologic study of the early lesion in experimental allergic encephalomyelitis in the guinea pig and rabbit. *Am. J. Pathol.*, 41, 135-162 (1962).
- 4) 田中寿子, 満辺満利. NK-381 のマウスおよびラットにおける急性毒性とラットにおける5週間の経口亜急性毒性. 実中研・前臨床, 3, 9-22(1977).

ロイペプチンの薬理学的研究

大塚 正徳*

研究協力者 宮田雄平*・小西史朗*・柳澤光彦*・村越隆之*
岡本 司*・玉井 直*・松戸隆之*・宋 時榮*

これまでの研究に引き続き、ロイペプチン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5種の標本について実験を行った。

1) ウサギの血圧

昭和57年度の研究において、ロイペプチンの静注により、ウサギの血圧が一過性に下降することを認め、昭和54年度の研究におけるラット血圧に対する効果と一致する結果を得た。この降圧作用の機序としては、神経節遮断作用(昭和54、55年度報告)が考えられた。もしこの推定が正しいとすれば、 α 型遮断薬の前処置により交感神経性の血圧上昇機構を除いておけばロイペプチンの降圧作用は消失するのではないかと予想され、以下この点について検討を行った。

2) 副交感神経節に対する作用

昭和54年度および55年度の研究において、ロイペプチンがモルモット交感神経節における伝達を遮断することを報告した。これらに引き続き、今年度は、副交感神経節である顎下神経節(sub-mandibular ganglion)における、コリン作動性伝達と節後神経細胞のアセチルコリン感受性に対するロイペプチンの効果を検討した。

3) ラット脊髄に対する作用

脊髄反射および脊髄運動ニューロンに対するロイペプチンの効果は、これまで幼若ラットの摘出脊髄を用いて検討を行ってきた。今年度は、*in situ*の脊髄に対する薬理作用を検討するために、

24~33日齢ラットを脊髄動物とし、ロイペプチンの静注による効果を研究した。

4) 新生ラットの摘出延髄-脊髄標本

ロイペプチンは中小動物の呼吸活動に対しては影響を与えないと報告されているが、運動ニューロンに対する作用の検討のためラットにロイペプチンを静注した際、しばしば呼吸が不整になった。そこで、呼吸に対する作用をより直接的に調べるため、最近当教室において鈴江により開発された新生ラットの脳幹-脊髄標本^{1,2)}を用いて、その呼吸様活動に対する影響を検討した。

5) 新生ラットの摘出脊髄-尾標本

昨年度は、摘出脊髄に坐骨神経と腰部および下肢がつながった標本を用い、皮膚侵害刺激により誘発される脊髄反射電位に対するエンケファリンの効果、およびロイペプチン、ベスタチンによるエンケファリン効果の促進について報告した。その後の研究により、下肢よりも尾をつけた標本のほうが侵害反射の研究には適していることがわかったので、これを用いて研究を行った。

実験方法

1) ウサギの血圧

体重3.0~3.3kgの雄ウサギを用いた。ウレタン1g/kgを耳静脈から投与して麻酔し、大腿動脈および大腿静脈にポリエチレン製カテーテルを挿入した。動脈カテーテルは圧トランスデューサ

* 東京医科歯科大学医学部薬理学教室

ーに接続して血圧の連続的モニターに用い、静脈カテーテルからは薬物を投与した。

2) ラット副交感神経節

エーテル麻醉下に、ラット（2カ月齢）から顎下神経節を舌神経および顎下腺とともに摘出した。記録槽に神経節標本を固定し、Tyrode液（33～35℃）で連続的に灌流した。神経節細胞を微分干

渉顕微鏡で観察しながら、微小電極を刺入し、細胞内電位を記録した。舌神経を吸引電極を介して刺激して、コリン作動性 fast EPSP（興奮性シナプス後電位 excitatory postsynaptic potential）を誘発させた。ロイペプチンは Tyrode 液に溶かして、灌流によって適用した。アセチルコリン（acetylcholine chloride）は $30 \mu\text{g/ml}$ の濃度で微小ピペット（先端の直径 $10 \mu\text{m}$ ）に充填し、神経

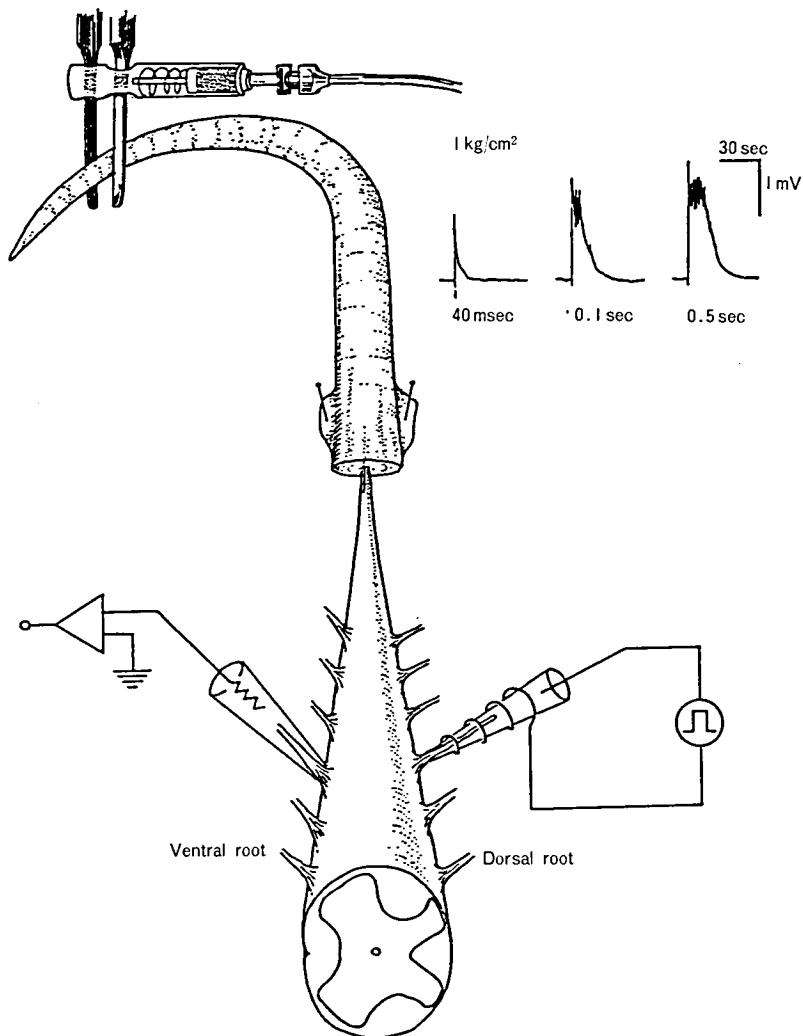


図 1 尾に圧侵害刺激 (tail pinch) を与えることにより誘発される脊髓反射電位測定の実験装置。1～3日齢ラットよりとり出した脊髓-尾標本を人工脳脊髄液灌流下の液槽中に固定した。右上の記録は尾に加える圧刺激の期間を延ばすことにより tail pinch potential が增大することを示している。記録下の数字は刺激期間を示す。1 kg/cm² は注射器のピストンに加えた圧。記録および tail pinch の方法は本文参照。

節細胞の近辺に圧力パルスによって適用した。

3) ラット脊髄

24~33 日齢の Wistar 系ラットを、ペントバルビタール (50 mg/kg, i. p.) 麻酔下に、Th 8~9 の高さで脊髄を切断し、脊髄動物とした。椎骨を除去して腰部脊髄を露出し、脊髄固定装置に固定した。また、左後肢において、外側腓腹筋ヒラメ筋 (以下 LGS と略す) および内側腓腹筋 (以下 MG と略す) の支配神経を露出し、末梢側で切断して、末端をそれぞれの白金刺激電極上に固定した。脊髄および神経は、流動パラフィンで覆って乾燥を防ぎ、脊髄の呼吸性動揺を抑えるために気胸し、人工呼吸を行った。ロイペプチンは経静脈的に 10 mg/kg を投与した。

LGS の運動ニューロンに、2 M 酢酸カリウムを填めた抵抗 15~30 MΩ のガラス微小電極を刺入し、逆行性活動電位、後過分極、静止電位、LGS および MG の神経刺激により発生する EPSP につき測定を行った。

4) 摘出延髄-脊髄標本

0~3 日齢 Wistar 系ラットから、エーテル麻酔下に脳脊髄を摘出して四丘体レベルで除脳し、小脳も除去した。標本を人工脳脊髄液で灌流中の槽内に固定し、第 4 ないし第 5 頸髄前根から吸引電極で細胞外記録を行った。実験によっては胸郭を接続したまま摘出し、肋間筋の一部に糸をかけ、トランスデューサーを介して運動を記録した (図 7 参照)。薬物は灌流により適用した。

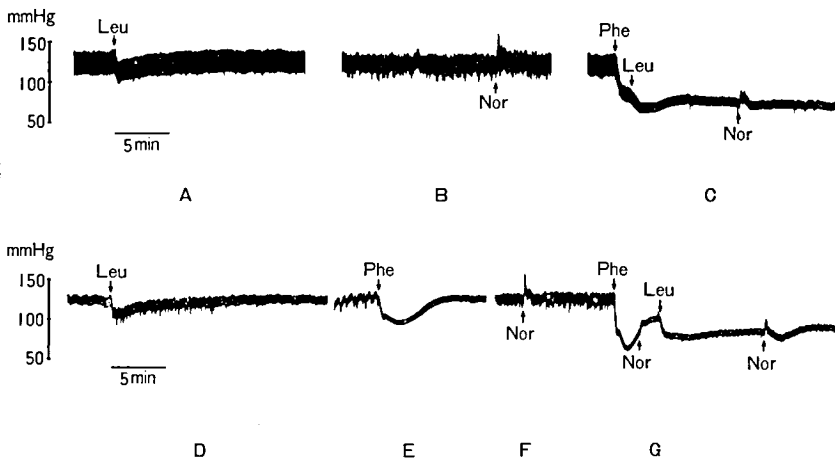


図 2 ウサギ血圧に対するロイペプチンの降圧作用とフェントラミンの影響。A および D: ロイペプチン (Leu) 10 mg/kg 静注によって起った降圧反応。B および F: ノルアドレナリン (Nor) 4 μg/kg 静注による昇圧反応。C: フェントラミン (Phe) 2.5 mg/kg 静注の 1 分 20 秒後にロイペプチン 10 mg/kg 静注したときの血圧の変化。フェントラミンによる降圧作用がプラトーに達したのちにも、ロイペプチン 10 mg/kg による降圧作用は単独投与の場合と同程度に認められた。フェントラミン投与の 11 分 30 秒後のノルアドレナリン 4 μg/kg 静注による昇圧反応は対照の約 1/3 に抑えられていた。E: フェントラミン 2.5 mg/kg 静注によって起った降圧反応。G: フェントラミン 2.5 mg/kg 静注の 4 分後にロイペプチン 10 mg/kg 静注したときの血圧の変化。フェントラミン投与の 2 分 20 秒後にノルアドレナリン 4 μg/kg 静注したが、明らかな昇圧反応は認められなかった。ロイペプチン投与により、回復しかけた血圧が再び下降している。フェントラミン投与の 13 分 40 秒後ノルアドレナリン 4 μg/kg 静注したが、昇圧反応は対照の約 40% に抑えられていた。A~C および D~G は、それぞれ同じ動物で得られた記録を示す。

5) 摘出脊髄-尾標本

1~3 日齢ラットより脊髄と尾を連続した状態でとり出し、液槽中に固定し、95% O₂, 5% CO₂ を通気して充分飽和した人工脳脊髄液を1分間に7 ml の速度で灌流した。尾の先端から3~4 mm のところにピンセットを固定し、4~5 分間隔で尾に約 0.6~1 kg/cm², 0.08~0.15 秒の圧刺激をピンセットを介して加え、機械的侵害刺激とした。tail pinch により誘発される脊髄反射電位は、L3~L5 の前根から細胞外記録によって記録した(図 1)。メチオニン・エンケファリン、ロイペプチン、およびベスタチンは人工脳脊髄液に溶解し、灌流適用した。

実験結果

1) ウサギ血圧に対するロイペプチンの効果と α 型遮断薬の影響

定常状態の血圧を記録し、血圧に動揺のないことを確認したのち、以下に記すように薬物の血圧に対する影響を調べた。安定状態での血圧は収縮期 120~140 mmHg, 拡張期 110~115 mmHg であった。

a) ロイペプチン単独の作用

ロイペプチン 10 mg/kg の静注により収縮期圧

は十数秒で 10~15 mmHg 下降し、以後ゆっくり回復して約5分でほぼもとのレベルに復帰した(図 2A および D)。

b) ノルアドレナリン単独の作用

ノルアドレナリン 4 μg/kg の静注により収縮期圧は数秒で約 30 mmHg 上昇し、速やかに下降して1分前後ではほぼ元のレベルに復した(図 2B および F)。

c) フェントラミン単独の作用

フェントラミン 2.5 mg/kg の静注により収縮期圧は 1~2 分で 30~60 mmHg 下降し、ゆっくり回復して 10 分前後で元のレベルに復帰した(図 2E)。ノルアドレナリンの昇圧反応は、フェントラミン 0.8 mg/kg 投与後少なくとも4分間はまったく消失していることを確かめた(図 2G 参照)。

d) フェントラミン前処置下でのロイペプチンの作用

ノルアドレナリン 4 μg/kg 静注により昇圧反応の認められることを確認したのち(図 2B, F), フェントラミン 2.5 mg/kg を静注した。その1ないし4分後にロイペプチン 10 mg/kg を静注した。ロイペプチンはフェントラミン投与により血圧が最小値に達し、一定あるいは回復傾向を示す時期に投与されたが、いずれにせよ、この時期は

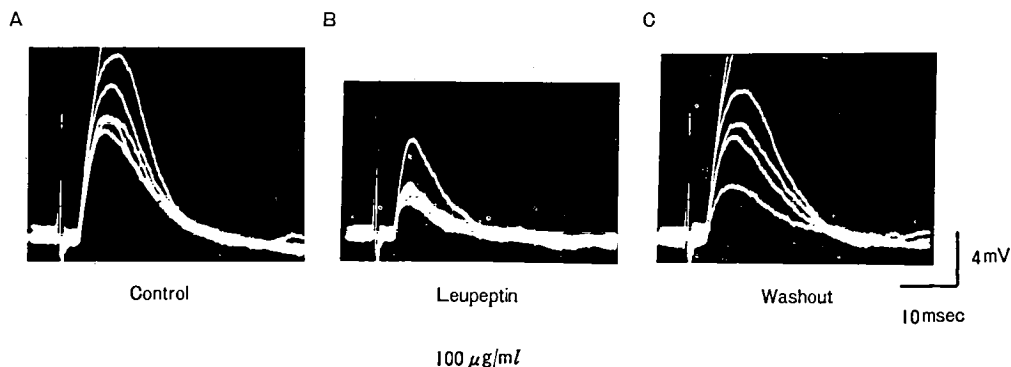


図 3 顎下腺神経節のコリン作動性伝達に対するロイペプチンの効果。神経節細胞から細胞内電位記録を行った。神経を 0.5 Hz で吸引電極を介して刺激して、コリン作動性 fast EPSP を誘発した。A: 正常溶液中の fast EPSP を 5 回重ねて記録したもの。B: ロイペプチン 10^{-4} g/ml を含む溶液で灌流して 2~3 分後。C: ロイペプチンを洗い去って 6~7 分後の反応。

ノルアドレナリンによる昇圧反応が認められない時期に相当していた。この条件下で血圧は平常血圧より 20~40 mmHg 下降したレベルにあったが、ロイペプチン 10 mg/kg を投与すると、血圧はさらに 8~20 mmHg の下降を示した (図 2C および G)。

2) ラット副交感神経節に対するロイペプチンの作用

ロイペプチン (10^{-4} g/ml) は、節前神経刺激で誘発されるコリン作動性 fast EPSP を抑制した。抑制率は約 50% であった (図 3)。このとき、節後ニューロンの活動電位、入力抵抗は変化しな

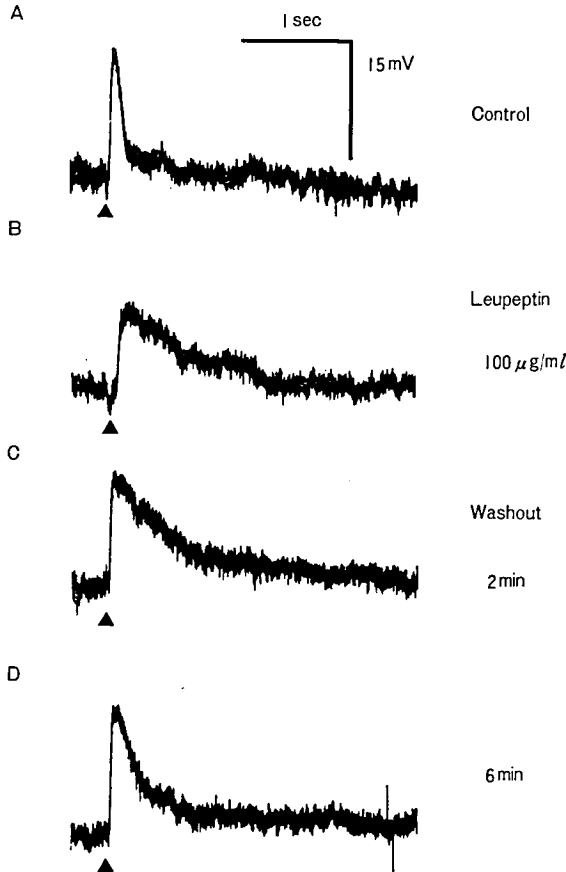


図 4 顎下腺神経節の節後神経細胞のアセチルコリン感受性に対するロイペプチンの効果。記録は図 3 と同じように行った。アセチルコリン ($30 \mu\text{g/ml}$) を微小ピペット (先端 $10 \mu\text{m}$) に詰め、圧力パルス (0.5 kg/cm^2 , 500 msec) をピペットに加えることによって、節後ニューロン近傍にアセチルコリンを局所適用した。A: 正常液中でアセチルコリンにより誘発された脱分極反応。速い経過の反応に続いて、遅い脱分極反応がわずかにみられる。B: ロイペプチン (10^{-4} g/ml) を灌流適用し始めて 2~3 分後。速い脱分極反応は抑制され、遅い脱分極反応は増大した。C: ロイペプチンを洗い去って 2 分後。D: ロイペプチンを洗い去って 26 分後。速い反応の抑制は完全に回復したが、遅い脱分極反応の増強はわずかに残っている。

った。

節後神経細胞にアセチルコリンを圧力パルスで適用すると、時間経過の速い脱分極と、それに続く遅い経過の脱分極が記録された(図4A)。ロイペプチン(10^{-4} g/ml)は、アセチルコリンの速い脱分極を約50%程度抑制した。これに対して、遅い脱分極成分はロイペプチンで著しく増強された(図4B)。ロイペプチンを洗い去って2分後に速い脱分極に対する抑制効果がほとんど消失した時期に、増強作用は依然として認められた(図4C)。6分後には増強作用もほとんど消失した(図4D)。

3) ラット脊髄運動ニューロンおよび脊髄反射に対するロイペプチンの効果

図5は、MGの神経刺激によりLGS運動ニューロンに発生したEPSPの大きさをヒストグラムにしたものである。Aがコントロール、Bがロイペプチン10 mg/kg投与群を示している。それぞれの平均値は、コントロール 1.41 ± 0.11 (S.E.M.) mV, ロイペプチン投与後 1.28 ± 0.09 mVであり、有意な差を認めなかった(表1)。

図6は、LGSの神経刺激によってLGS運動ニューロンに発生したEPSPのヒストグラムを示している。Aはコントロール、Bはロイペプチン

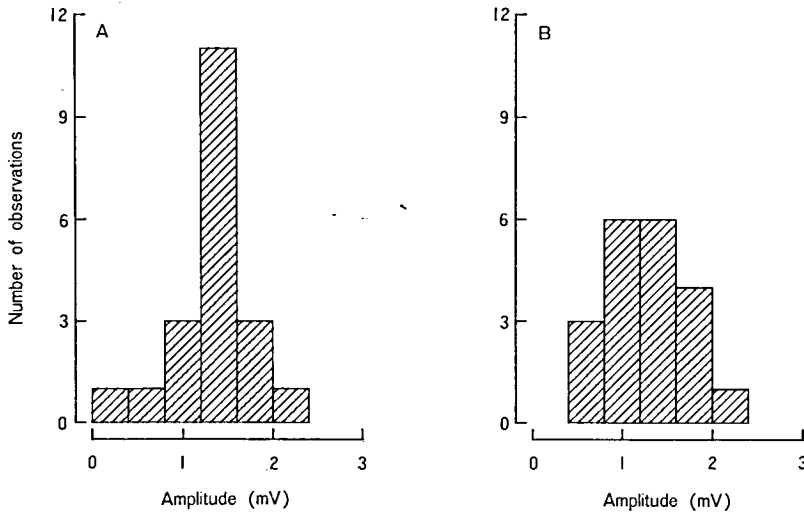


図5 MG神経刺激によってLGS運動ニューロンに起るEPSPの大きさの分布を示すヒストグラムとロイペプチンの効果。細胞内電極による記録。A: control. B: ロイペプチン投与後。P=0.05でAB両群間に有意差は認められない。

表1 ロイペプチンのLGS運動ニューロンの電気的特性およびEPSPに対する作用

	Action potential*1	AHP*2	EPSP*3 (MG)	EPSP*4 (LGS)
Control	72.27 ± 1.51 (n=26)	2.92 ± 0.28 (n=4)	1.41 ± 0.11 (n=21)	2.36 ± 0.17 (n=16)
Leupeptin	75.27 ± 2.18 (n=20)	2.44 ± 0.25 (n=7)	1.28 ± 0.09 (n=20)	2.44 ± 0.22 (n=17)

各値は平均値±S.E.M.(mV)。LGS運動ニューロンからの細胞内記録。上段の値は対照、下段の値はロイペプチン10mg/kg静注後。t-test(P=0.05)でいずれの値についてもロイペプチン投与群とコントロール群で有意差はみられなかった。

*1 逆行性活動電位の振幅。

*2 逆行性活動電位に続く後過分極の振幅。

*3 MG神経刺激によるEPSPの大きさ。

*4 LGS神経刺激によるEPSPの大きさ。

投与群を示す。平均値は、コントロール 2.36 ± 0.17 mV, ロイペプチン投与後 2.44 ± 0.22 mV で有意差を認めなかった (表1)。

そのほか、表1にみるように逆行性活動電位、後過分極も含めて、ロイペプチン投与群とコントロール群を比較したが、すべてのパラメーターに

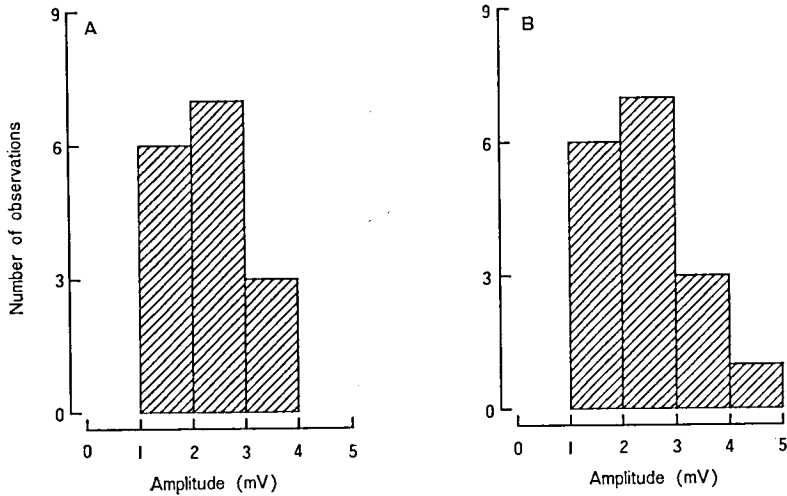


図6 LGS 神経刺激によって LGS 運動ニューロンに起る EPSP の大きさの分布を示すヒストグラムとロイペプチンの効果。細胞内記録。A: control. B: ロイペプチン投与後。P=0.05 で AB 両群間に有意差は認められない。

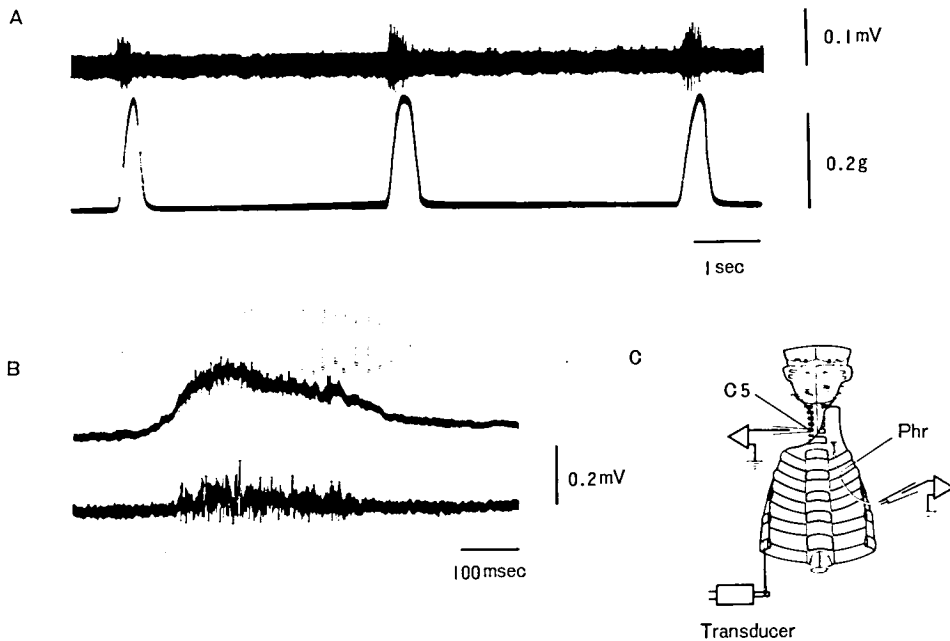


図7 摘出脳幹-脊髓-胸郭標本における活動。A: 上のトレースは横隔神経からの細胞外記録, 下のトレースは胸郭の上向きの動きを示す。B: 脊髓神経前根 (C5, 上のトレース) と, 反対側横隔神経 (下のトレース) からの同時記録。ともに細胞外記録。C: 標本および実験装置。Phr は横隔神経。

つき両群間に有意の差を認めなかった。

4) 新生ラットの摘出延髄-脊髄標本における呼吸様活動に対するロイペプチンの作用

図 7 C に示すように、第 4 または第 5 頸髄前根から細胞外記録を行うと、0.2 mV 程度の脱分極

が毎分 5~15 回の頻度で自発的かつ規則的に観察された (図 7)。この脱分極は対側の横隔神経から記録されるインパルス発射と同期し (図 7 B)、また脳幹-脊髄および胸郭の一部から成る標本では胸郭の上下運動とも同期していた (図 7 A)。以下、この自発的な頸髄前根脱分極の頻度を呼吸様

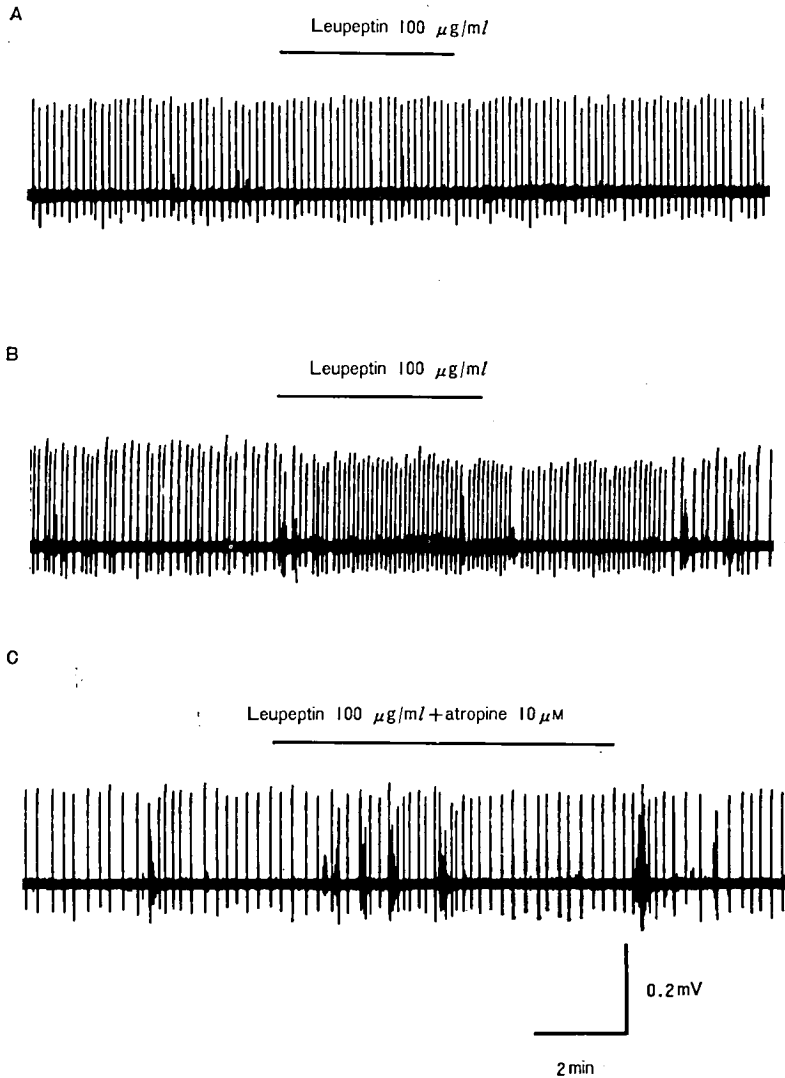


図 8 呼吸リズムに対するロイペプチンの影響。1日齢ラットより脳幹-脊髄を連続したまま摘出し、第 5 頸髄前根より自発性脱分極を AC 記録した (上向きが脱分極)。薬物を横線に示す期間、灌流により投与した。A: ロイペプチン 100 µg/ml が呼吸頻度に影響しなかった例。B: ロイペプチン 100 µg/ml が呼吸頻度を増加した例。C: B 例と同一標本で約 100 分後にロイペプチン 100 µg/ml とアトロピン 10 µM を同時投与した例。記録中、基線の振幅の一時的な増大は、遅い時間経過の不規則な電位変化が起った際のもの。

リズムの頻度の指標とした。

脳幹側灌流液の温度, pH, イオン濃度の変化に応じて呼吸様リズムの頻度も変化した^{1,2)}。また, 伝達物質およびそれに関連する薬物によっても頻度の変化が観察された³⁾。

ロイペプチン 100 $\mu\text{g/ml}$ の適用により 9 例中 7 例では頻度の著明な変化はなかったが (図 8 A), 2 例において灌流中に頻度が増加した (図 8 B)。この標本の呼吸数を著明に増加させるものとしては, 脳幹の伝達物質またはその候補物質の中で, substance P, TRH などのペプチドのほか, アセチルコリン (ムスカリン作用) が報告されている³⁾。本報告中の副交感神経節での研究により, ロイペプチンはアセチルコリンのニコチン作用を抑えムスカリン作用を増強させるという興味深い結果が得られているが, 呼吸様リズムの頻度増加作用がこのメカニズムによるか否かを検討するため, アトロピン 10 μM を同時適用した。図 8 C

は, 標本の状態が全体的に悪化し, B に比べて薬物適用前の頻度が落ちているので, 頻度に促進的に働く薬物の作用は出やすくなっている。頻度は適用直前をコントロールとして薬物投与により有意に増加しているが, ロイペプチン単独の効果に比べ明らかに作用が弱まっていることがわかる。図 8 B, C の例での呼吸周期の分布を図 9 に示す。呼吸頻度の増加に応じて周期の分布の中心が短いほうへずれていることがわかる。

5) 新生ラット摘出脊髄-尾標本における侵害反射電位に対するエンケファリンとロイペプチンの作用

図 1 に示す標本で尾に圧侵害刺激 (tail pinch) を加えると, 前根 (L3~L5) から約 15~40 秒続く脱分極性の反射電位 (tail pinch potential) が記録された。この反射電位は, メチオニン・エンケファリン (1 μM) やモルヒネ (2 μM) により著

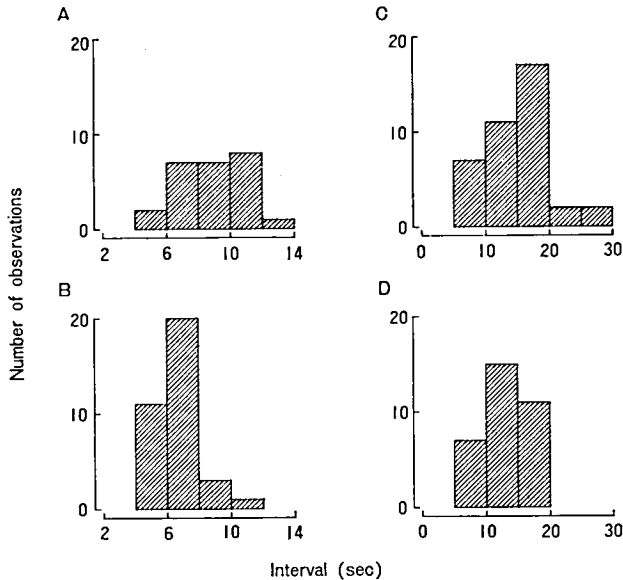


図 9 呼吸周期に対するロイペプチンの影響。図 8 B と C に示した記録より, 薬物投与前と投与中の連続する 60~70 回の呼吸周期を測り, 分布をヒストグラムに示した。A: 図 8 B のロイペプチン適用前。平均値, S. E. M., および例数 (以下数値は同様): $8.85 \pm 0.43 \text{ sec}$ (25)。B: 同じく適用中。 $6.53 \pm 0.21 \text{ sec}$ (35)。C: 図 8 C のロイペプチンとアトロピン適用前。 $15.0 \pm 0.75 \text{ sec}$ (39)。D: 同じく適用中。 $12.8 \pm 0.57 \text{ sec}$ (33)。

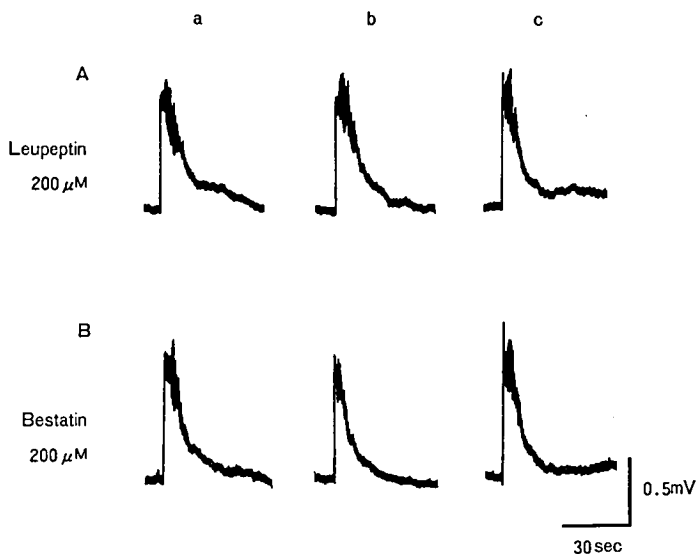


図 10 Tail pinch potential に対するロイペプチン (A) とベスタチン (B) の作用。2 日齢ラットの摘出脊髄-尾標本を用いた。尾に 5 分間隔で圧刺激 (0.6 kg/cm^2 , 80 msec) を加えた際に記録される電位変化。a は薬物投与前, b は灌流中, c は除去後。

しく抑制された。ロイペプチン $200 \mu\text{M}$ を適用すると前根にわずかな一過性の脱分極を生じたが, tail pinch potential はまったく影響を受けなかった (図 10)。しかし, ロイペプチンはメチオニン・エンケファリンの作用を明らかに増強した。すなわち, 図 11 A では, メチオニン・エンケファリン $0.1 \mu\text{M}$ は tail pinch potential にまったく影響を与えなかったが, ロイペプチン $200 \mu\text{M}$ 存在下では同じ濃度のメチオニン・エンケファリンは tail pinch potential を著しく抑制した (図 11 B)。一方, ベスタチンはそれ自身, 前根電位に対して抑制効果を示し, 自発発火を抑制し, tail pinch potential に対しても軽度の抑制作用を示した。この抑制は, ベスタチンを洗い去ると消失した (図 10)。また, ベスタチンはメチオニン・エンケファリンの作用を著しく増強し, ベスタチン $200 \mu\text{M}$ 存在下にメチオニン・エンケファリン $0.1 \mu\text{M}$ は tail pinch potential をほぼ完全に消失させた (図 11)。

考 察

今回のウサギ血圧に対する実験結果は, 最初に述べた推定とは反するものとなった。すなわち, α 型遮断薬の前処置によってもロイペプチンの降圧作用は消失せず, ロイペプチン単独投与の場合とほぼ同程度の降圧作用が観察された。今回用いたフェントラミンの量は, 30 mmHg の昇圧反応を惹起するノルアドレナリンの α 作用を遮断するのに十分な量であった。また, ロイペプチンの投与は, この α 遮断効果がまだ充分有効なときに行われた。したがって, 今回認められたロイペプチンの降圧作用を α 遮断効果の不足のためとは考えにくい。また, 今回は十分な数の実験を繰り返すことができなかったため, 結果に記載しなかったが, ヘキサメソニウム 8 mg/kg 投与後 (ノルアドレナリンの昇圧反応は 7 mmHg 程度に抑えられていた) にロイペプチン 10 mg/kg を静注しても降圧反応が認められた例がある。したがって, 今回の結果は, ロイペプチンの降圧作用機序として

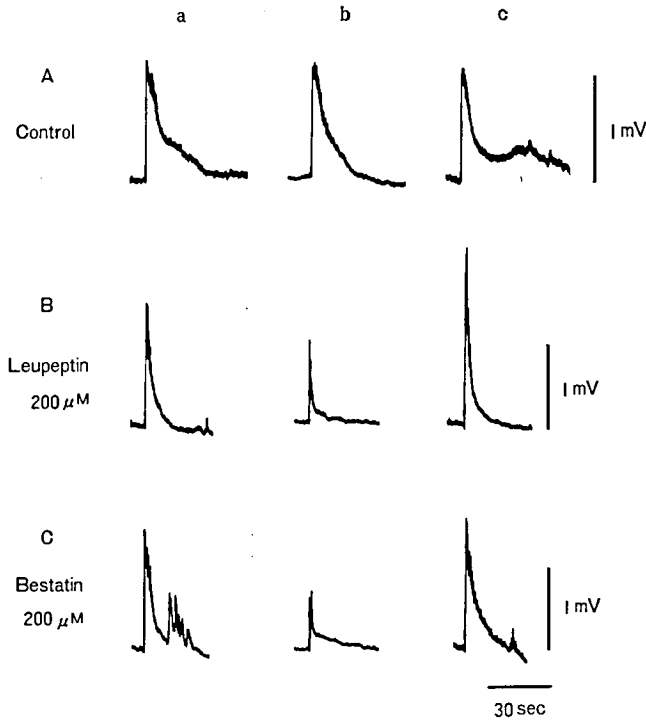


図 11 Tail pinch potential に対するメチオニン・エンケファリンの抑制作用とこれに対する増強効果。Aは正常人工脳脊髄液中、Bはロイペプチン、Cはベスタチンをそれぞれ 200 μM の濃度で灌流中、bでメチオニン・エンケファリン 0.1 μM の効果はほとんど認められないが、B、Cではロイペプチンおよびベスタチンがエンケファリンの作用を増強し、tail pinch potential を著しく抑制した。尾に5分間隔で一定の圧刺激 0.6 kg/cm^2 , 0.1 sec を加えた。

神経節遮断効果の関与を全面的に否定するものではないが、むしろこれ以外の可能性を示唆するものとなった。

ロイペプチンは、すでに昨年度までの研究で示したように、神経筋接合部や交感神経節におけるコリン作動性伝達を遮断するが、これと同様に副交感神経節のコリン作動性伝達も抑制した。この抑制効果は、節後神経細胞上のニコチン性アセチルコリン受容体の遮断作用によるものと結論できる。アセチルコリンで引き起される時間経過の遅い脱分極反応（おそらくムスカリン性アセチルコリン受容体を介する反応）がロイペプチンで著明に増強された事実は、ニコチン性およびムスカリン性受容体の機構上の差、あるいは電位発生機構

の差を考えるうえで興味深い。

今回ラット脊髄で観察した結果からは、脊髄運動ニューロンの電氣的諸特性は、ロイペプチンの静脈内投与によって投与後最高4時間にわたり影響を受けないと考えられる。これは、昭和55年度に、われわれが幼若ラット摘出脊髄の運動ニューロンについて報告した結果とよく符合する。しかし、経静脈的に投与されたロイペプチンが作用を示さなかったのは、血液脳関門を通過しなかったためかもしれず、この点は今後に残された問題である。

ロイペプチンによる呼吸様活動の頻度増加作用は主としてムスカリン性作用またはその増強によると考えられるが、9例中7例でこの作用がみら

れなかったのは、摘出標本において、呼吸リズムの形成にムスカリン性受容体を介するアセチルコリンの関与の程度が標本ごとに異なるためではないかと推定される。

本研究で新たに開発した摘出脊髄-尾標本を用い、尾に圧侵害刺激を与えたときに誘発される tail pinch potential についてロイペプチンおよびベスタチンの作用を検討した。ロイペプチンは tail pinch potential に対し、ほとんど影響を与えなかったが、少数例（5例中2例）で軽度の増大傾向を示した。この成績は、ロイペプチンが脊髄ニューロン周囲のプロテアーゼを抑制した結果、侵害刺激によって遊離される興奮性のペプチド性伝達物質の作用が増強された可能性が考えられる。一方、ベスタチンは、tail pinch potential を軽度抑制し、またメチオニン・エンケファリンの作用を著しく増強した。これらの結果は、ベスタチンのエンケファリナーゼ抑制作用によって説明が可能であり、さらに tail pinch potential に内因性のエンケファリン作動性ニューロンが関与している可能性を示唆するものである。

総 括

1) ロイペプチンの血圧下降作用の検討

ロイペプチンによりウサギの血圧が一過性に下降することを昨年度報告し、神経節遮断作用によるものと推測した。この点を検討したところ、フェントラミン処置下においてもロイペプチンにより血圧下降がみられた。

2) 副交感神経節に対する作用

摘出したラット顎下神経節を Tyrode 液で灌流し、神経節細胞より細胞内記録を行った。ロイペプチンは、節前神経刺激で発生するコリン作動性 fast EPSP を抑制した。アセチルコリンを節後神経細胞に適用すると、時間経過の速い脱分極とそ

れに続く遅い経過の脱分極とが記録された。ロイペプチンは前者を抑制し、後者を増強した。

3) 脊髄運動ニューロンおよび Ia シナプス伝達に対する作用

ラットを人工呼吸器で維持し、脊髄運動ニューロンの細胞内記録により、活動電位、静止電位、後過分極を測定した。ロイペプチンを静脈内投与したのち最高4時間にわたって記録を行ったが、上記電氣的性質の変化はみられなかった。また、Ia 感覚神経刺激により発生する EPSP にも変化はみられなかった。

4) 摘出脳幹-脊髄標本に対する作用

本標本は最近開発され、呼吸様活動を *in vitro* で記録、観察しうる特性をもつ。ロイペプチンを灌流液中に適用したところ、9例中2例において呼吸様活動の頻度の増加が観察され、この効果はアトロピンにより抑制された。

5) 摘出脊髄-尾標本に対する作用

本標本で尾に圧侵害刺激を加えると、痛み反応と考えられる電位を前根から記録できる。圧侵害刺激により発生する時間経過の遅い電位はエンケファリンにより抑制された。ロイペプチンは、単独ではこの電位に影響を与えなかったが、エンケファリンの作用を増強した。

文 献

- 1) Suzue, T. Electrical activities of *in vitro* brain stem-spinal cord preparation of the newborn rat: Reflexes and respiratory rhythm generation. Proceedings of the International Union of Physiological Sciences, 29th Congress, Sydney, Vol.15, p.40 (1983).
- 2) Suzue, T., Murakoshi, T., and Tamai, S. Electrophysiology of reflexes in an isolated brainstem-spinal cord preparation of the newborn rat. *Biomed. Res.*, 4, 611-614 (1983).
- 3) 村越隆之, 玉井 直, 鈴江俊彦, 大塚正徳. 摘出脳幹-脊髄標本の呼吸様リズムに対する薬物の影響. 第57回日本薬理学会総会プログラム・要旨集, p.221, 0-179 (1983).

筋ジストロフィーハムスターに対する

ベスタチン投与の効果

高木 昭夫*

研究協力者 藤田 武久*・猪飼 哲夫*・杉田 秀夫*・埜中 征哉*

近年、筋ジストロフィーに対する実験的治療として、蛋白分解酵素の阻害剤が応用されるようになった。対象を筋ジストロフィーのモデル動物に限った場合、その効用に関して必ずしもコンセンサスに達していないと思われる¹⁻⁹⁾。著者らは、前回筋ジストロフィー鶏にロイペプチンを投与した効果を報告した⁴⁾。今回は、筋ジストロフィーハムスターに対してベスタチンを投与したので、その効果を報告する。効果判定に際して、いかなる指標に基づくかは重要な問題である。ジストロフィー筋の特徴を分析してこの点も若干考察した。

方 法

生後4～6週齢の筋ジスハムスター (BIO 14.6) とその対照 (BIO FIB) は、実験動物中央研究所より供給を受けた。ベスタチンを生理食塩水に溶解し、2mg/動物 (15～30mg/kg/日に相当) を6～8週間にわたって連日 (日曜日を除く) 背部皮下に注射した。対照群には、同量の生理食塩水を注射した。薬剤投与中は体重の消長を記録した。屠殺時に採取した骨格筋 (長趾伸筋, EDL; ヒラメ筋, SOL) と血清について各種の分析を行った。creatine kinase (CK) 活性は NADPH 法 (CPK モノテスト, ベーリンガー, マンハイム) により測定した。蛋白量は Biuret 法により測定した。形態学的検索には、凍結切片標本

を作製し、通常の組織化学染色を行った。タイプ 2C 筋線維数はおのおの pH における ATPase 染色標本から算定した。壊死線維数は横断標本において壊死線維により占められる面積を測定し、それより逆算した。強縮張力は Krebs-Ringer 液中で白金板電極で刺激して記録した。刺激条件は 10 V, 15 msec, 50 Hz の矩形波である。

結 果

1. 筋ジストロフィーハムスター (表 1)

生後約4カ月齢の筋ジスと正常対照のハムスター間で比較を行った。最も顕著な差は血清 CK 値であった。筋ジスでは、対照の 49 倍に増加していた。EDL 筋についての比較では、筋湿重量が筋ジスで有意に増加していた。可溶性蛋白量、筋 CK 活性値や強縮張力に関しては、両者間に差を認めなかった。後述のように、形態指標では両者間に著明な差異を認めている。筋ジスでは、壊死筋線維の存在やタイプ 2C 筋線維数の増加が目立っている。

2. 薬剤投与中の成長 (図 1)

ベスタチン投与は生後4～6週目より開始した。筋ジスでは 9/19, 対照では 2/8 が実験中に死亡した。ベスタチン群と生食群の間で、死亡率には差はないようであった。この期間におけるハムスターの体重増加は正常対照のほうが顕著であった。

* 国立神経センター疾病研究一部

表 1 筋ジスハムスター (BIO 14.6) と対照 (BIO FIB) の特徴

	Dys (n=8)	Con (n=6)	
Serum CK (U/l)	15,227±5,501*	308±150	p<0.001
EDL, wet weight (mg)	36±6	26±3	p=0.02
Soluble protein (mg/g)	61±4	64±17	
CK in EDL muscle (U/g)**	1,815±545	2,166±303	
Tetanus tension (g/muscle)	2.2±0.4	2.3±0.1	

* Mean±S. D.

** CK, creatine kinase ; EDL, extensor digitorum longus muscle.

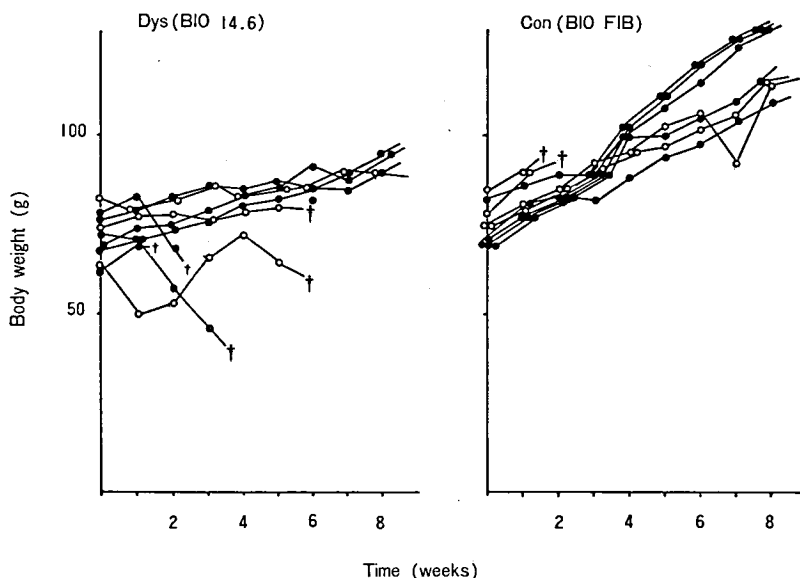


図 1 ベスタチン投与中における筋ジス (Dys) および対照 (Con) ハムスターの体重の増加。実験 1 のみを図示した。●, ベスタチン; ○, 生理食塩水; †, 死亡。

筋ジスと対照の両者において、ベスタチンは体重に影響を与えることはなかった。

3. 血清 CK 値 (表 2, 表 3)

筋ジスハムスターの血清 CK 値は、2,680 から 45,810 U/l の広範囲に分布していた。しかし、正常対照とオーバーラップすることはない。ベスタチン投与群と非投与群の間に CK 値の差はないものと判定した。正常ハムスターの血清 CK 値は 128 と 454 U/l の間に分布した。非投与群が少数のため、ベスタチンの影響は不明であった。

4. 骨格筋の壊死、再生 (表 4, 表 5)

筋ジス EDL 筋中の壊死線維数は 0~21 に分布していた。ベスタチンの影響は、とくに認められなかった。タイプ 2C (再生) 線維の全筋線維数に占める比率は 2.8~26.4% であった。この指標に対する影響もみられなかった。筋ジス SOL において、非投与群の壊死線維はやや少ない傾向を示した (p=0.05)。しかし、タイプ 2C 線維の比率には差は認められなかった。正常対照の EDL では、壊死筋線維は存在しない。タイプ 2C 線維は、存在したとしても 0.3% 以下であった。正常の SOL ではやはり壊死線維はなく、タイプ 2C は 1.6~4.1% 存在した。

筋ジストロフィーハムスターに対するベスタチン投与の効果

表 2 筋ジスハムスターの血清 CK に対するベスタチンの影響

I. D. No.	Bestatin	Serum CK (U/l)
901	+	2,680
903	+	35,905
904	+	6,190
908	+	45,810
922	+	9,492
923	+	4,870
924	+	10,565
Mean		16,501
S. E.		6,459
906	-	14,032
927	-	7,264
928	-	6,768
931	-	10,978
Mean		9,760
S. E.		1,705

表 3 対照ハムスターの血清 CK 値に対するベスタチンの影響

I. D. No.	Bestatin	Serum CK (U/l)
911	+	147
912	+	439
913	+	172
914	+	201
Mean		240
S. E.		67
916	-	128
917	-	454

考 案

筋ジス動物モデルを対象とした実験的治療の報告は数多くはない^{1-4,6-9)}。これらでは、効果判定の指標として、血清 CK 値、筋病理組織、筋内の諸酵素活性や運動能力が使用されてきた。いうまでもなく、筋ジスの本態、すなわち異常遺伝子の

発現が何であるかはまだ知られていない。しかし、筋線維壊死と再生は、筋ジスの本態に密接に関連した現象と推定される。他方、筋の諸酵素活性の変動、構成要素の変動などは、壊死、再生に伴う二次的現象と考えられる。今回は血清 CK 値、筋組織の壊死線維やタイプ 2C (再生) 線維の数を指標に採用した。血清 CK 値は筋ジスにおいて対照の平均 50 倍に増加しており、その差は歴然としている。正常対照の骨格筋には、壊死線維はまったく観察されない。また、タイプ 2C 線維は、正常 EDL には存在せず、正常 SOL には 1~4% 存在するのみであった。ちなみに、ハムスターを使用して筋再生実験を行うと、再生筋は

表 4 筋ジスハムスター EDL の壊死およびタイプ 2C 線維数に対するベスタチンの影響

I. D. No.	Bestatin	Necrotic fibers (%)	Type 2C fibers (%)	No. of total fibers
901	+	0.1	5.6	1,028
903	+	0	24.9	735
904	+	0.8	10.8	511
908	+	0.2	20.7	1,242
922	+	0	4.4	1,227
923	+	0	2.8	1,367
924	+	1.5	26.4	1,389
Mean		0.4	13.7	1,074
S. D.		0.7	10.1	337
906	-	0	4.6	745
927	-	0.4	10.5	1,389
928	-	0.2	17.7	1,260
931	--	0	10.4	1,024
Mean		0.2	10.8	1,104
S. D.		0.2	5.4	283

表 5 筋ジスハムスター SOL の壊死およびタイプ 2C 線維数に対するベスタチンの影響

I. D. No.	Bestatin	Necrotic fibers (%)	Type 2C fibers (%)	No. of total fibers
901	+	4.1	55.1	701
903	+	0.8	3.0	756
904	+	3.6	39.9	1,097
908	+	3.4	4.8	998
922	+	2.0	34.7	933
923	+	0	14.7	1,049
924	+	1.9	22.5	985
Mean		2.3	25.0	931
S. D.		1.5	19.2	148
906	-	1.4	22.8	654
927	-	0	21.8	1,128
928	-	0	42.3	1,051
931	-	0	25.0	1,090
Mean		0.2	28.0	980
S. D.		0.5	9.6	220

再生後4～5週にわたってタイプ2Cの反応を呈し、その後成熟筋になる。したがって、タイプ2C線維の存在は、1カ月以内に筋壊死が存在したことを意味すると解釈される。

生後4～6週の早期よりベスタチン投与を開始した。筋ジスハムスターは、原因は不明であるが、実験期間中に約半数が死亡した。したがって、少数例における検討ということになった。別の問題点は、上記のパラメーターたとえば血清CK値や壊死線維数で、筋ジスハムスターの個体間におけるばらつきが大きいことであった。したがって、薬剤の影響が著明なときのみ検出可能な性質のものと考えられた。

このような条件下の実験であったが、ベスタチンは筋ジスハムスターの自然経過に著明な影響を与えることはない結論された。筋ジストロフィーの薬物治療に関しては、さらに多種の薬剤のスクリーニングを行う必要がある。現在、スクリーニングの方法についての予備実験を行っている。

ま と め

筋ジストロフィー・ハムスターにベスタチンを

皮下注射により投与して、その影響を観察した。主として、血清CK値、筋組織における壊死および再生線維数を指標とした。少数例での実験であったが、ベスタチン投与は筋ジストロフィーの自然経過に著明な影響を及ぼすことはないようであった。

腓腹筋のベスタチン濃度測定は、日本化薬(株)総合研究所小山道則博士に依頼した。その結果は、筋ジスハムスター 132 ± 56 ng/gram (6)、対照ハムスター 135 ± 124 (4) であった。

文 献

- 1) 松下 宏, 辻 繁勝. ハムスター筋ジストロフィー症に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響. 厚生省新薬開発研究(梅沢班). 昭和56年度研究報告書, pp. 51-56 (1982).
- 2) Enomoto, A. and Bradley, W. B. Therapeutic trials in muscular dystrophy. *Arch. Neurol.*, **34**, 771-773 (1977).
- 3) 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. A.*, **78**, 7742-7744 (1981).
- 4) Nonaka, I., Ishiura, S., Takagi, A., and Sugita, H. Therapeutic trial with protease inhibitor (leupeptin) in chicken muscular dystrophy. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **58**, 279-285 (1982).

筋ジストロフィーハムスターに対するペスタチン投与の効果

- 5) 高木昭夫, 埜中征哉, 石浦章一ほか. ロイペプチンによる実験的治療. 厚生省新薬開発研究 (梅沢班). 昭和57年度研究報告書, pp.59-62 (1983).
- 6) Chelmicka-Schorr, E. E., Arnason, B. G. W., Aström, K. E., and Darzynkiewicz, Z. Treatment of mouse muscular dystrophy with the protease inhibitor pepstatin. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **37**, 263-268 (1978).
- 7) Hudecki, M. S., Pollina, C. M., and Heffner, R. R. *In vivo* effects of protease inhibitors on chickens with hereditary muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.*, **67**, 969-974 (1981).
- 8) Stracher, A., McGowan, E. B., and Shafiq, S. Muscular dystrophy: Inhibition of degeneration *in vivo* with protease inhibitors. *Science*, **200**, 50-51 (1978).
- 9) Sugita, H., Kimura, M., and Tarumoto, Y. *et al.* *In vivo* administration of a thiol protease inhibitor, E-64-C, to hereditary dystrophic chicken. *Muscle Nerve*, **5**, 738-744 (1982).

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ベスタチンの影響

梶 中 征 哉*

研究協力者 石 浦 章 一*・加 茂 功*
寺澤健二郎*・岡 田 理 美*

進行性筋ジストロフィーの骨格筋をみると、壊死線維が多くあり、進行するにつれて筋線維の数は減少する。壊死と同時に再生も活発にみられるが、この再生過程は壊死を代償しえないので病気は進行すると考えられている。もし再生が壊死を代償するならば、筋線維の数の減少や筋力低下はみられないはずだからである。

筋線維がなぜ壊死するかは不明であるが、膜の何らかの異常によるのではないかという膜説が有力視されている。膜に何らかの異常があり、細胞外から高濃度の Ca^{2+} が細胞内に流入し、そのためにカルシウム依存性中性プロテアーゼ(CANP)のような thiol protease が活性化されて自己消化を起すと考えられている。ロイペプチンはこの CANP の活性を抑制することは *in vivo* では確かめられているが、*in vivo* での効果はまだ確定的でない。

ベスタチンは、膜の表面に結合して膜内に局在するエンドペプチダーゼ活性を抑え、免疫増強作用があるとされている。ベスタチン投与により筋線維膜が補強されるならば、筋崩壊そのものの予防となり、理論的にはロイペプチンよりも理想的な薬剤といえる。ベスタチンは筋ジストロフィーマウスに有効であったとの報告もある¹⁾。

ベスタチンの有効性を確認するため、実験的に筋の壊死、再生を起させ、ベスタチンを投与した筋線維を壊死させるために、局所麻酔剤であるマ

ーカインを前回のロイペプチンの実験のときと同じように使用した²⁾。

対 象 と 方 法

対象としたのは、約 250 g の Wistar 系ラットである。

ラットは4群に分け、第1群は無処置、第2群ではベスタチンのみ 10 mg/kg/日を腹腔内投与し、第3群はマーカインのみ筋注、第4群はベスタチンを2日間投与し、3日目のベスタチン注射後3～4時間目にマーカインを注射した。マーカインは生理食塩水で 0.25% 液とし、両後肢に切開を加え、ヒラメ筋内に約 0.5 ml を直接注射した³⁾。第1～4群それぞれ 21 匹、計 84 匹を実験に使用した。ラットはマーカイン注射後 48 時間、7 日、14 日目に相当する日に、各群より7匹ずつ対象とした。右足のヒラメ筋は生化学用に、左足のヒラメ筋は組織学用に採取した。

1) 組織学的検索

採取したヒラメ筋は、前脛骨筋とともにトラガカントゴムを使用してコルク栓上に立て、液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速凍結した。凍結連続切片にヘマトキシリン・エオジン (HE)、Gomori トリクローム変法、NADH-TR、酸ホスファターゼ染色を行った。また、一部の筋には筋線維タイプの分化をみるため ATPase 染色 (pH

* 国立武蔵療養所神経センター

9.4, 4.5, 4.3) をも行った. 今回実験を行った 84 匹すべての (マーカイン注後 2 日目を除く) 筋標本で HE 染色のものから最終倍率 250 倍の写真を作成し, 各標本より 200 本の筋線維直径 (マーカイン注群では再生線維径) を計測してヒストグラムを作成した.

2) 生化学的分析

ヒラメ筋を 10 倍量の PBS-0.1% Triton X-100 液でホモジェナイズし, 遠心後上清を採取して粗抽出液とした. 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. 沈殿はアルカリで可溶化し, 構造蛋白質の測定に使用した. ライソゾーム酵素として, カテプシン

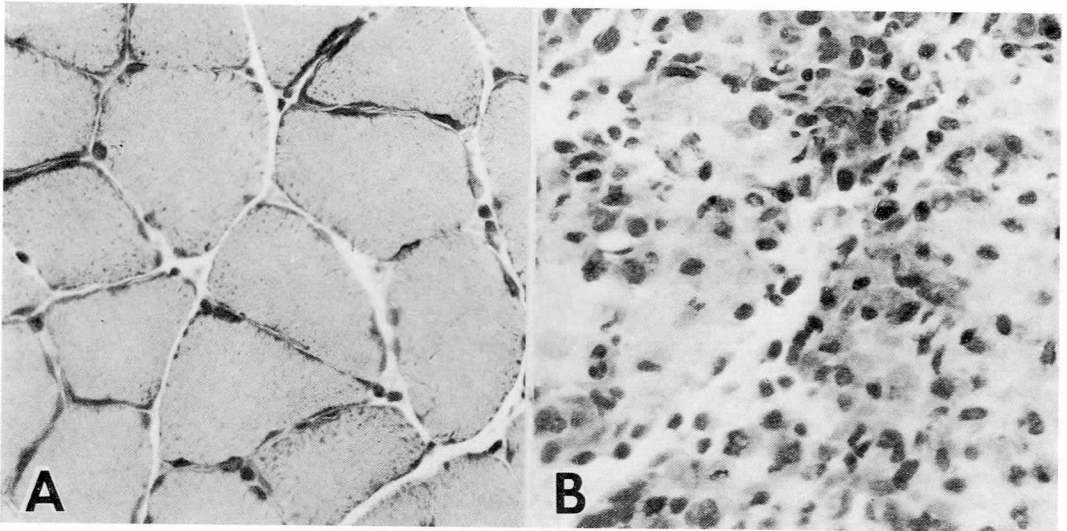


図 1 ラットヒラメ筋にマーカインを投与したときの筋の壊死 (B). 壊死線維には多数の貪食細胞を認める. 壊死後 48 時間目. 対照筋 (A). HE 染色, $\times 350$.

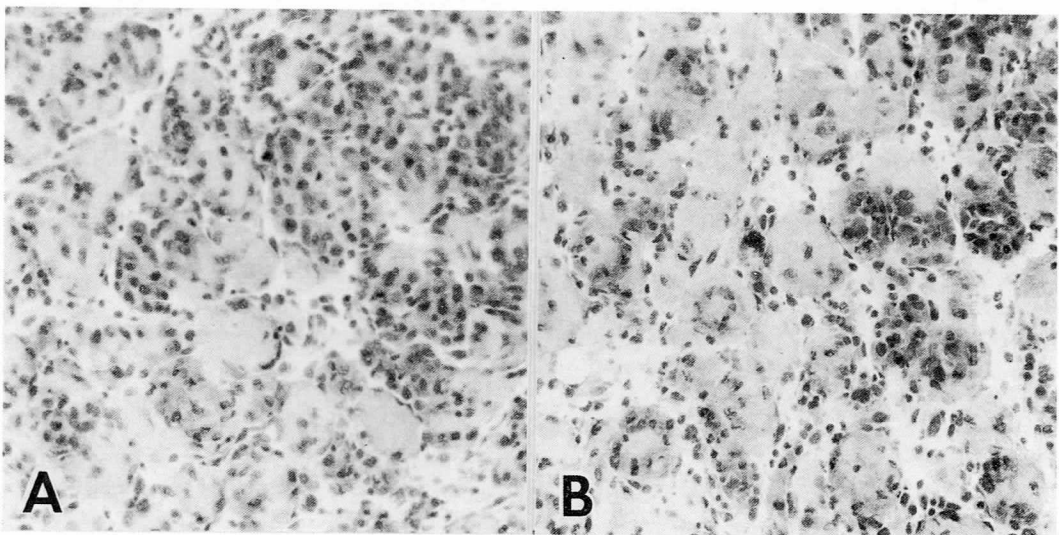


図 2 マーカイン注後 48 時間目のヒラメ筋. 無治療対照 (A) とベストアチン治療筋 (B) の間に形態学的な差はみられない. HE 染色, $\times 180$.

D, 酸ホスファターゼ, α -グルコシダーゼ, α -ガラクトシダーゼを測定した. 測定法はすでに報告した方法に従った³⁾.

結 果

1) 組織学的および組織化学的所見

0.25% マーカインを注射した筋では, 例外なくその筋線維の 90% 以上は壊死に陥り, 生化学

的に検索しても再現性のあることが確認された. マーカインを注射した筋では, 注射後 48 時間目には壊死線維内に強い貪食細胞の侵入をみた (図 1, 図 2A). この貪食細胞は, 酸ホスファターゼ染色で強い陽性反応を示した. ベスタチンをあらかじめ投与したラットでもマーカインによって強い筋線維の壊死, 貪食反応を認め, ベスタチンが筋の壊死を抑えている像は得られなかった (図 2B).

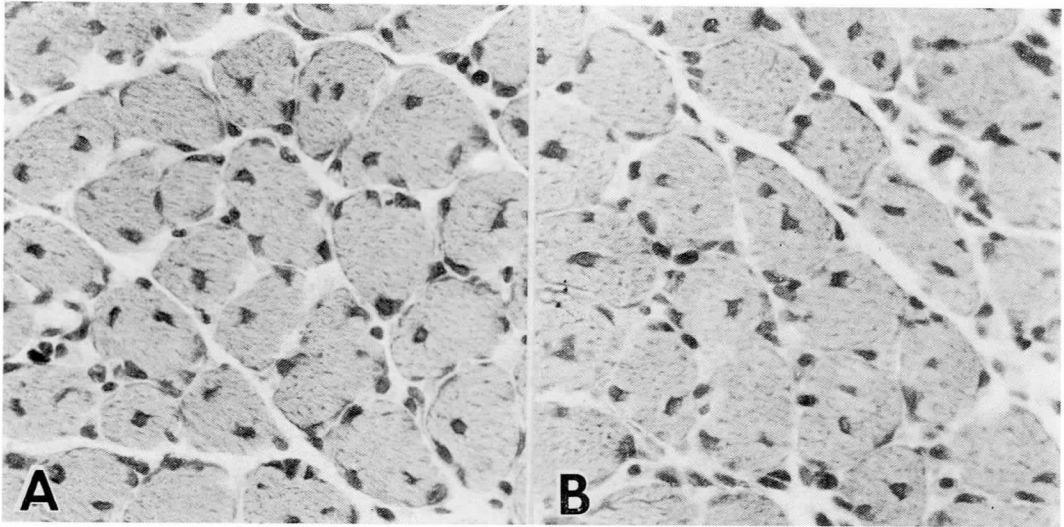


図 3 マーカイン注後 7 日目の再生筋. 無治療対照 (A) とベスタチン治療筋 (B). 再生線維の形態に差は認められない. HE 染色, $\times 180$.

Fiber diameter histogram in regenerating fibers

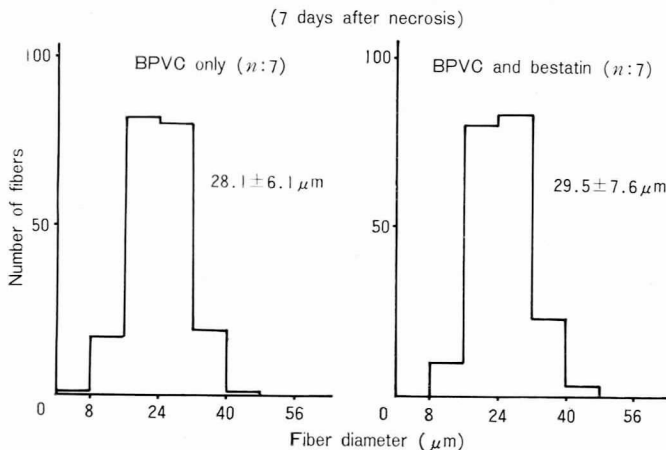


図 4 BPVC (マーカイン) のみ投与の群と BPVC とベスタチン投与の群の間には再生線維径ヒストグラムに差はない.

マーカインを投与して4日目ころより、再生線維としての形態をみる事ができた。7日目には再生線維は28 μm 径前後となり、中心核、塩基好性の胞体で特徴づけられ、容易に同定できた(図3A)。ベスタチンをあらかじめ投与し、マーカインを注射し、さらにベスタチンを連続投与したラットでも再生は速やかで、その形態にはベスタチン無治療のものとは比べて大差なかった(図3B)。ベスタチン無治療のものの平均再生線維径と筋線維の大小不同の幅は28.1 \pm 6.1 μm (S.D.)で、治療群の29.5 \pm 7.6 μm との間に有意の差はみられなかった(図4)。

再生線維は7日目以降も急速にその直径を増し、

マーカイン注後14日目には38 μm 前後となった。この時期でも再生線維には中心核があり、塩基好性の胞体をもっていたので、その同定に困難はなかった。ベスタチン無治療の再生筋の平均線維径と筋線維の大小不同のばらつきは38.2 \pm 6.9 μm (S.D.)で、治療群の平均37.1 \pm 7.3 μm と比較して両者間に差は認めなかった(図5)。

ベスタチンのみ14日間投与したラットのヒラメ筋直径は50 μm 弱であり、これは無処置、無治療の対照と比較して何ら差は認めなかった。また、組織化学的にみてもベスタチン投与による筋の変化は認められなかった。以上をまとめると、ベスタチンはプピバカイン投与における筋の壊死、再

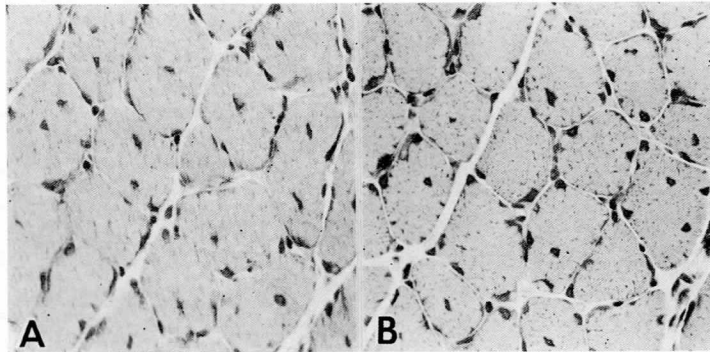


図5 マーカイン注後14日目の再生筋。無治療対照(A)とベスタチン治療筋(B)の間に形態学的な差はみられない。HE染色、 $\times 120$ 。

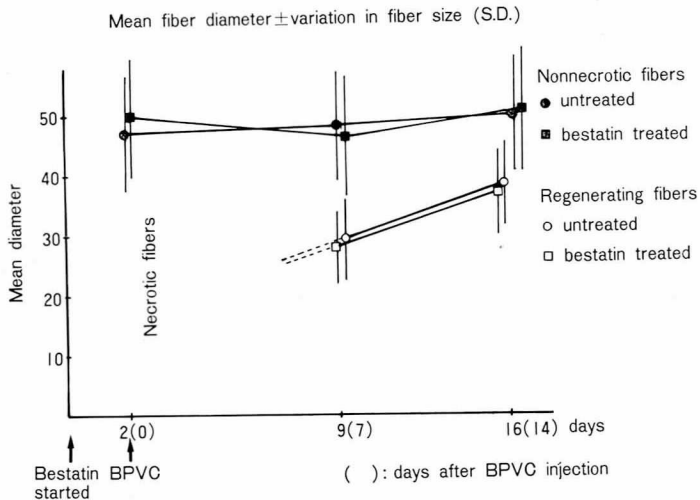


図6

生の過程に何ら影響を与えないことがわかった(図 6).

2) 生化学的所見

構造蛋白の量は正常対照では 11.2 ± 1.0 mg/ml であったが、マーカイン注後 2 日目には 6.5 ± 1.1 mg/ml と減少していた。ベスタチンをあらかじめ投与した筋でも 5.8 ± 1.4 であり、構造蛋白量からみても、ベスタチンは筋の破壊を阻止しえなかった。

ライソゾーム酵素の活性はカテプシン D, 酸ホスファターゼ, α -グルコシダーゼがマーカイン注により上昇した。注射後 2 日目と 7 日目の酸ホスファターゼ値はベスタチン投与により抑制される傾向にあった ($p < 0.01$)。その他の酵素では、有意の差はみられなかった。

考 察

局所麻酔剤である塩酸ピピバカイン(マーカイン)

は、筋細胞膜を選択的に破壊する^{3,4)}。実験動物の骨格筋内にマーカインを直接注射すると、注射部位は広汎に壊死に陥り、24 時間目頃より強い貪食細胞の細胞内への侵入をみる。貪食細胞で清掃された壊死線維は再生を開始し、注射後 4 日目には再生線維として形態的にとらえられる。マーカインは支持組織である血管や末梢神経は破壊しないので再生は速く、1 カ月以内でほぼ完全に再生を完了する。この実験系でみる再生線維は大小不同が少なく均一で、経時的な観察で再生の状態に再現性があるため、直径計測など統計的処理に信頼がおける利点がある⁵⁾。

進行性筋ジストロフィーの主な病理学的特徴は、筋線維の壊死と再生である^{6,7)}。薬物などによる治療効果をみるには筋ジストロフィーのモデル動物があるが、ヒト筋ジストロフィーと異なる点も多く、その評価に多くの問題を残している^{8,9)}。薬物が筋の壊死、再生にどのような影響を与えるかを形態的に追求するには、マーカインによる筋壊死はよい実験モデルといえる。しかし、マーカインのような薬物による筋の壊死はあまりに激烈であり、緩徐にくる筋ジストロフィーの壊死と必ずしも等価に評価はできない。

昨年、われわれはこのマーカインによる実験系にロイペプチンを投与して、その壊死、再生における態度をみた。ロイペプチン投与では壊死は抑制されず、再生線維が小径である事実を得た。それは、ロイペプチンが筋細胞内に入り、筋の壊死と再生に何らかの作用をしている証明となった²⁾。しかし、再生の遅延がどのような意味をもつのか、解決すべき大きな問題であった。

ベスタチンは、細胞膜に結合して膜内に局在するエンドペプチダーゼ活性を抑制し、さらに免疫増強作用があることで知られている。この薬物をあらかじめ動物に投与し、膜増強後にマーカインを注射した際、壊死に何らかの影響を与えるかどうか試みるのが今回の実験の目的であった。ベスタチン投与後 2 日目にマーカインを注射したが、

Lysosomal enzyme activities

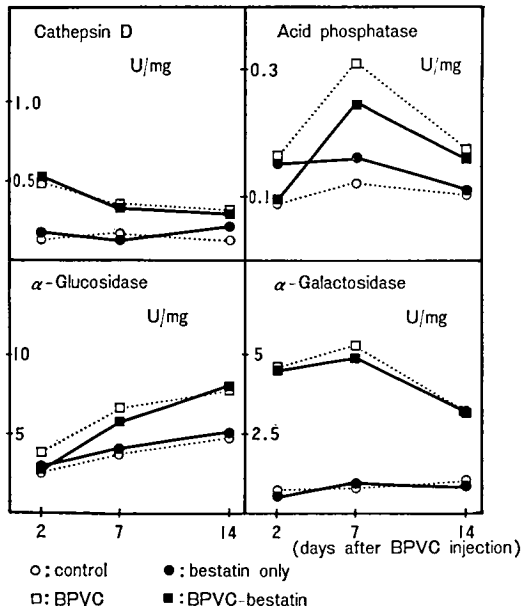


図 7

形態的にも生化学的にも、筋の壊死には何らの影響もみられなかった。これは、マーカインという薬物による筋毒性があまりに強く、ベスタチンの効果をみる事ができなかったことが原因かもしれない。壊死後の再生線維はベスタチン投与により影響を受けなかった。これは再生を遅らせるロイペプチンとは対照的であった。

結 語

ベスタチン 10 mg/kg をあらかじめ (2日間) 投与し、次に筋線維を壊死させるマーカインを筋注した。さらに、壊死後の再生に対する影響をみるためベスタチンを連日投与した。ベスタチンが筋の壊死の過程を抑制する事実は得られなかった。再生線維を経時的にみたが、再生に対しても何らかの影響を与えている事実は得られなかった。

文 献

- 1) 松下 宏, 辻 繁勝. 筋ジストロフィーマウスに見られる種々な酵素の活性変動に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響. 厚生省新薬開発研究 (梅沢班). 昭和 55 年度研究報告書, pp. 55-61 (1981).
- 2) 埜中征哉, 石浦章一, 藤田武久, 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ンの影響. 厚生省新薬開発研究 (梅沢班). 昭和 57 年度研究報告書, pp. 63-69 (1983).

- 3) Nonaka, I., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H., and Sugita, H. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **60**, 167-174 (1983).
- 4) 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).
- 5) 小林繁一, 鴨下重彦, 埜中征哉. 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).
- 6) Nonaka, I., Takagi, A., and Sugita, H. The significance of type 2C muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, **4**, 326-333 (1981).
- 7) 埜中征哉, 杉田秀夫. 進行性筋ジストロフィー症の筋病理—opaque 線維を中心として—. 神経進歩, **24**, 718-728 (1980).
- 8) 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).
- 9) 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).

鶏ジストロフィー筋における新生児型構造蛋白質の出現

——ベスタチンの投与と除神経の影響——

丸山 工 作*

研究協力者 大日方 昂*・新保和彦*

研究目的

孵化直後の新生期のヒヨコと成鶏の胸筋とでは、収縮構造を形成する構造蛋白質のタイプに大きな違いがみられる。成鶏胸筋は速筋としての特徴を備え、したがって蛋白質の面からみると、速筋型C蛋白質、速筋型ミオシン、 α 型トロポミオシン、胸型トロポニンTなどが存在している。ところが、新生期のヒヨコでは、これらに加えて、遅筋型C蛋白質、 β 型トロポミオシン、足型トロポニンTなども存在する。鶏胸筋に関しては、これらを新生児型構造蛋白質とみなすことができる¹⁾。これらの蛋白質の存在の有無は、電気泳動と免疫学的手法で容易にとらえることができる。これらの蛋白質のタイプの解析により、筋の成熟度を知ることができる。新生児型蛋白質から親型蛋白質組成への移行は、孵化後約1週間の筋の成長期に急速に進み、2週間でほぼ終了する。

遺伝性の筋ジストロフィー鶏 (NH 413 系) では、筋ジストロフィー症の発症に伴い、 β 型トロポミオシン²⁾や足型トロポニン T³⁾ のような新生児型構造蛋白質の出現が起ることがすでに明らかにされた。さらに最近、われわれは、筋ジストロフィー筋の細胞に遅筋型C蛋白質が顕著に出現することを報告した⁴⁾。C蛋白質に関しては、速筋型と遅筋型アイソフォームを特異的に認識する抗

体がすでに作成されているので、これらを用いて免疫組織化学的な解析を行うことにより、個々の細胞単位で筋ジストロフィー症に伴う変化をとらえることが可能となっている⁵⁾。鶏筋ジストロフィー筋では発症に伴って蛋白質が新生児型へ逆行するという事実を考えると、正常鶏に人為的に新生児型蛋白質の出現をひき起させる条件をつくり出せれば、筋ジストロフィー症研究のうえで有効な実験モデル系となると思われる。

筋ジストロフィー症マウスの場合、ベスタチンが症状の軽減にかなり有効であるという報告が、松下らによりすでになされている⁶⁾。この研究では、ベスタチンの効果は血流中への酵素の放出と運動機能を指標として検討された。したがって、ベスタチンがジストロフィー筋の収縮運動系にどのような効果をもたらすかということも、また興味のもたれるところである。

本研究では、以上の背景に立って、まず筋ジストロフィー鶏をモデル動物として、ベスタチン投与が収縮構造蛋白質系にどのような影響を与えるか、とくに筋ジストロフィー症発症に特徴的にみられる新生児型蛋白質の再出現がベスタチンにより抑制されるかどうかに着目して研究した。次に、筋ジストロフィー鶏にみられる筋蛋白質の変異を正常鶏にも人為的にもひき起す条件を探る目的で、除神経筋を作成し、その際の蛋白質の変動を筋ジストロフィー症の場合と比較検討した。その結果、鶏除神経筋では筋ジストロフィー症によく似た状

* 千葉大学理学部

況がつくり出されることを見出した。

実験材料と方法

1) ベスタチンの投与

ベスタチンは、微化研の青柳博士から御供与いただいた。筋ジストロフィー鶏 (NH 413 系) およびそれに対する対照鶏 (NH 412 系) に、孵化 1 週齢から、ベスタチン (0.9% 食塩水溶液) を 5 mg/kg/日となるように連日皮下注射により投与した。当初、孵化直後から 10 mg/kg/日を投与することを計画したが、注射したヒヨコが 1~2 週以内にすべて死亡し、結果を得るに至らなかった。対照としては、生理食塩水のみを注射したものをを用いた。

2) 神経支配の除去

孵化直後、または 2~4 カ月齢の鶏胸筋を支配する神経 (14, 15, 16 頸椎神経) を、脊髓に近い部位でまとめて切断し、神経の再生を妨げるために、神経末端部を背部の皮膚に縫いつけて固定した。手術は胸筋の片側のみについて行い、他方は対照として用いた。除神経の側の翼の運動はほぼ完全に妨げられ、また筋の重量の低下がひき起された。

3) 蛋白質の解析

筋ジストロフィー症および除神経に伴う変化の指標として、筋構造蛋白質である C 蛋白質とトロポミオシンのアイソフォームを用いた。C 蛋白質のタイプの解析は、すでに作成されている抗速筋型 C 蛋白質抗体 (ポリクローナル抗体) と抗遅筋型 C 蛋白質抗体 (モノクローナル抗体, ALD 66)⁹⁾ を用い、免疫組織化学的に行った。具体的には、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結固定した筋の連続切片を作成し、これを 3% ホルマリンで固定したのち、一次抗体として前述の抗 C 蛋白質抗体、二次抗体として FITC で標識

された抗マウスまたは抗ラビット IgG 抗体を反応させ、間接蛍光抗体法により筋線維中に存在する C 蛋白質のタイプを調べた。トロポミオシンのタイプは、O'Farrell の二次元電気泳動法により、 α 型および β 型トロポミオシンの存在の有無に着目して分析した。鶏胸筋では部域により多少蛋白質組成が異なることが知られているので、大部分の実験は、胸筋の表層部かつ中央部付近の筋を採取して行った。

結果

1) ベスタチン投与による影響

正常鶏 (NH 412 系)、筋ジストロフィー鶏 (NH 413 系) のいずれにおいても、孵化直後の胸筋の筋線維は速筋型 C 蛋白質と遅筋型 C 蛋白質を共有している (図 1)。いずれの系統の鶏でも、遅筋型 C 蛋白質をもつ細胞は孵化後 2 週までにほぼ消失する。正常鶏では以後遅筋型 C 蛋白質の出現をみることはできないが、筋ジストロフィー鶏では、1 カ月齢になると遅筋型 C 蛋白質をもつ細胞が再び胸筋内に検出されるようになる (図 2 上段、-Bestatin 参照)。このことは、筋ジストロフィー鶏では筋細胞の幼若化が起ることを意味すると同時に、筋ジストロフィー症の発症の初期の徴

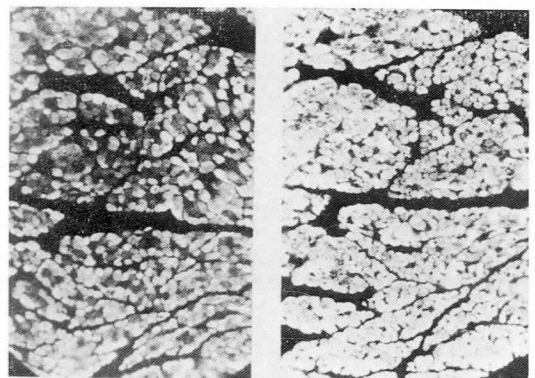


図 1 幼若なヒヨコ胸筋に存在する C 蛋白質のタイプ。孵化後 2 日目のヒヨコ胸筋の連続切片を抗速筋 C 蛋白質 (左) または抗遅筋 C 蛋白質 (右) 抗体で処理し、間接蛍光抗体法により調べた。

鶏ジストロフィー筋における新生児型構造蛋白質の出現

候とみることができる。筋ジストロフィー症の発症が明瞭になる3～4カ月齢では、遅筋型C蛋白質の存在も非常に明瞭となる(図3)。ベスタチン投与が筋ジストロフィー症に伴う遅筋型C蛋白質の出現にどのような効果をもつかを検討した。図2に、孵化後1週齢から1カ月齢までベスタチンを投与された筋ジストロフィー鶏胸筋の筋線維

の横断切片の蛍光顕微鏡像を示す。この時期、ベスタチン非投与の筋ジストロフィー鶏では遅筋型C蛋白質をもつ細胞がある程度の頻度で見られるのに対して、ベスタチン投与された場合、遅筋型C蛋白質をもつ細胞の数はかなり少なかった。胸筋の領域によっては遅筋型C蛋白質をほとんど検出できない部分もみられた。本研究ではベスタチ

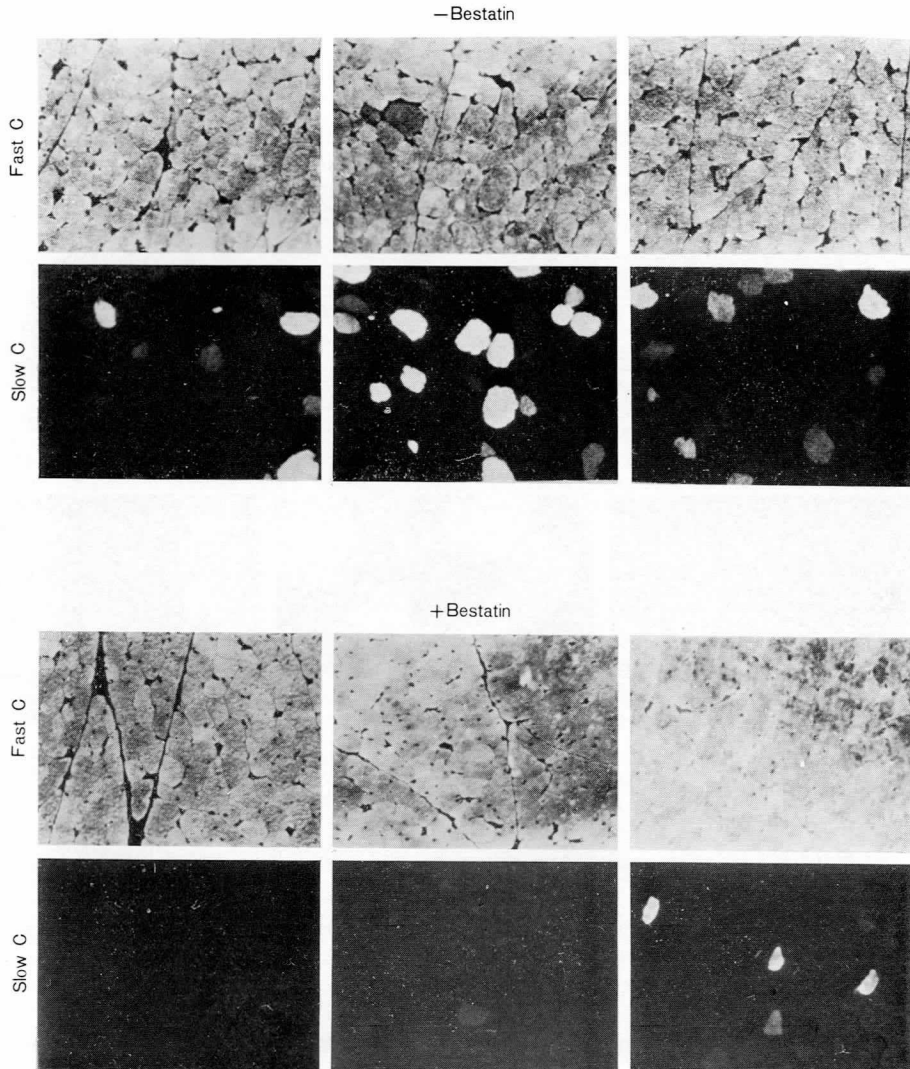


図2 筋ジストロフィー鶏(NH 413系)へのベスタチンの効果——1カ月齢で見られるC蛋白質の変化。下段は孵化後1週から1カ月齢までベスタチン(5mg/kg/日)を投与されたもの。上段はベスタチン非投与の筋。胸筋の切片に抗速筋C蛋白質抗体(fast C)または抗遅筋C蛋白質抗体(slow C)を作用させ、間接蛍光抗体法で観察した。すべての細胞が速筋C蛋白質を含むのに対し、遅筋C蛋白質を含む細胞は少数である。上段はベスタチンを投与されない1カ月齢の筋ジストロフィー鶏胸筋の場合、遅筋型C蛋白質をもつ細胞がかなりみられる。

ン非投与2例、ベスタチン投与3例について比較したが、ベスタチン投与の有無でみられる違いの基本的な傾向はいずれの場合でもみられた。観察に用いた大胸筋の表層かつ中央部の細胞の中で遅筋C蛋白質を含む細胞の割合は、ベスタチン非投与では3~5%、ベスタチン投与では0.4~0.6% (表1参照)で、ベスタチン投与が遅筋型C蛋白質の出現(いいかえれば細胞の幼若化)をある程度抑制していると思われる。筋ジストロフィー症の発症がより顕著となる2~3カ月齢の時期にベスタチンの効果がどの程度認められるかが重要な

課題である。本年度の研究ではまだ予備的な観察にとどまっているが、今回行ったベスタチン投与量では、2~4カ月齢まで成長するにつれて、筋ジストロフィー鶏では遅筋型C蛋白質の出現は次第に顕著となってきた。図3に、ベスタチン投与された3カ月齢の筋ジストロフィー鶏胸筋の例を示す。細胞の形はかなり不揃いとなり、遅筋型C蛋白質をもつ細胞数が多くみられる。したがって、筋ジストロフィー症の発症は進行しているものとみなされる。しかし、この例ではフリップテストでみる限りかなり軽症と思われた。この実験例で

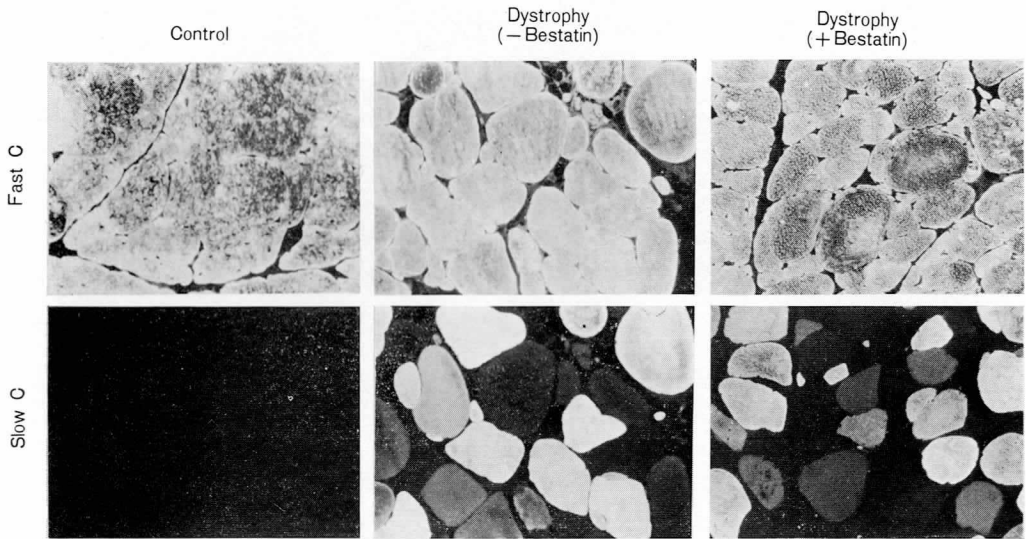


図3 ベスタチンの投与、非投与の親(3カ月齢)の筋ジストロフィー鶏と、対照鶏にみられる遅筋型C蛋白質の出現。筋の凍結切片に対して上段は抗速筋C蛋白質抗体、下段は抗遅筋C蛋白質抗体を作用させたもの。

表1 筋ジストロフィー鶏胸筋中への抗遅筋C蛋白質抗体に陽性な細胞の出現頻度に対するベスタチン投与の効果

		No. of cells counted	Positively stained with anti-slow C-protein		
			+	++	Total
Without Baestatin	No. 1	25,524 (100%)	624 (2.45)	249 (0.98)	378 (3.42)
	No. 2	487 (100%)	15 (3.08)	11 (2.25)	26 (5.34)
With Bestatin	No. 1	17,400 (100%)	66 (0.38)	8 (0.05)	74 (0.43)
	No. 2	34,032 (100%)	130 (0.38)	82 (0.24)	212 (0.63)

ベスタチン投与は1週齢から1カ月齢まで行い、1カ月齢に採取した筋の凍結切片を間接蛍光抗体法で調べた。
+, weakly stained; ++, strongly stained.

みる限り、この時期まで成長したとき、ベスタチン投与の有無による差はあまりないように思われる。詳細は、今後さらに検討されねばならない。ジストロフィー筋に出現するC蛋白質のタイプを電気泳動におけるペプチドバンドと関連させて解析するために、ベスタチン投与および非投与の筋から抽出された蛋白質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、分離されたペプチドをニトロセルロース膜に転写し、これに抗体を反応させて調べる、いわゆるイムノブロット法を適用した。この手法によっても、免疫組織化学による解析とほぼ同様に、ジストロフィー筋に遅筋型C蛋白質が検出された。この場合、ベスタチン投与された筋では、非投与の場合に比べて遅筋型C蛋白質がやや量的に少ない傾向にあった。

正常鶏 (NH 412 系) にベスタチンを投与した場合、C蛋白質の面からみて、ベスタチン非投与の鶏との違いを見出すことはまったくできなかつ

た。すなわち、いずれの場合にも、2週齢以降では速筋型C蛋白質のみがすべての細胞に検出された (図4)。また、細胞の形態の面からみても、両者で差はみられなかった。筋ジストロフィー鶏胸筋でみられるβ型トロポミオシンの出現がベスタチンの投与により影響されるかどうかを2カ月齢まで調べたが、ベスタチン投与、非投与いずれの場合にもごく少量のβ型トロポミオシンの出現を認めたのみで、ベスタチン投与の効果があるかどうかについて結論を得るに至っていない。筋ジストロフィーに伴って起るC蛋白質の変異に比べて、トロポミオシンの変異はやや遅れて起るように思われる²⁾ので、トロポミオシンに関しては筋ジストロフィーの発症がさらに進む時期まで追跡、検討していく必要がある。

2) 除神経筋にみられる筋蛋白質の変化

孵化直後 (2日齢) に除神経した鶏胸筋と対照

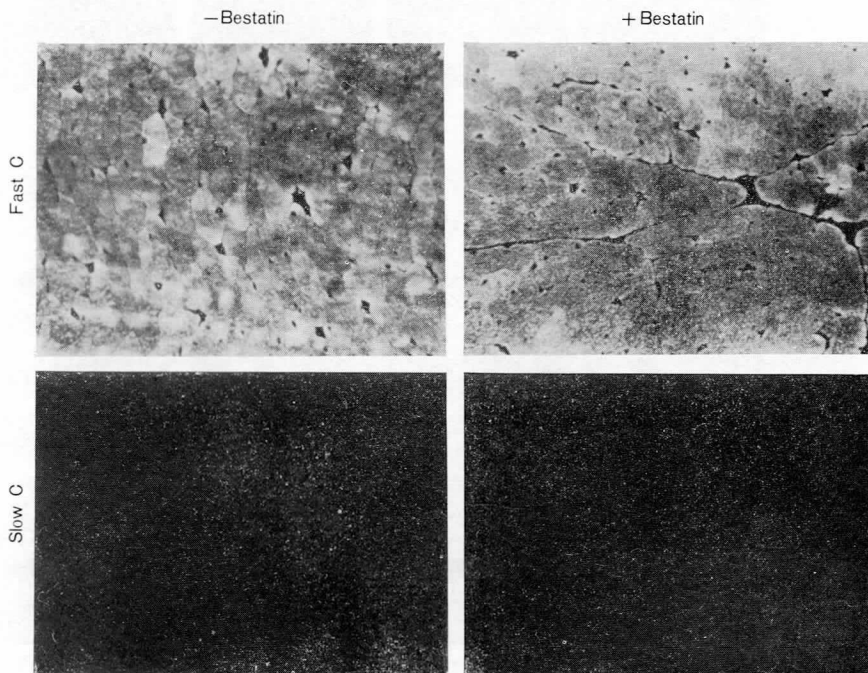


図4 正常鶏 (NH 412 系) に対するベスタチン投与の影響。1カ月齢について示す。1週から1カ月齢までベスタチンを投与された。ベスタチン投与の有無によらず、抗速筋C蛋白質 (上段) のみが検出され、遅筋C蛋白質 (下段) は検出されない。

筋の成長過程で、筋線維中に存在するC蛋白質がどのように変化するかを経時的に調べたところ、すでに述べたように、対照筋では1週目までに遅筋型C蛋白質をもつ細胞はごく少数となり、2週齢では完全に遅筋型C蛋白質は消失し、親型蛋白質へ移行がほぼ完了する（図5上段、Control参照）。これに反して除神経された側の胸筋では、鶏の成長にもかかわらず、遅筋型C蛋白質はほと

んど消失することなく、多くの細胞に存在し続けることが認められた（図5下段、Denervation参照）。本研究では最長2.5カ月齢まで観察を行ったが、この場合でも、遅筋型C蛋白質の存在が多くの細胞に認められた。また、途中で局部的に神経の再支配が起っているような場合には、遅筋型C蛋白質の減少がみられた。これらのことから、神経を介した情報が新生児型から親型への蛋白質

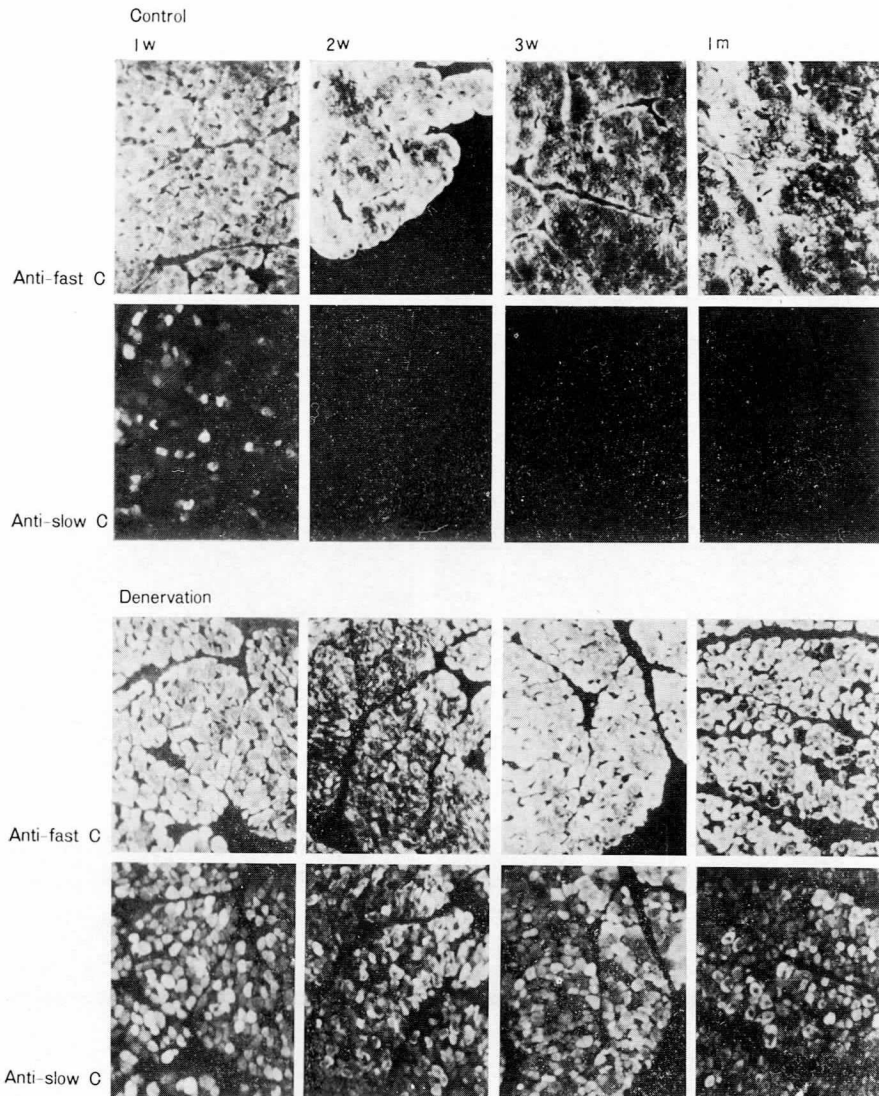


図5 新生児型から親型へのC蛋白質の変化に及ぼす除神経の効果。孵化2日目に除神経された筋（下段）と対照筋（上段）の成長過程でみられるC蛋白質の変化を示す。手術後1週（1w）、2週（2w）、3週（3w）、1カ月齢（1m）に採取された筋の横断連続切片に抗速筋C蛋白質（anti-slow）抗体を作用させたのち、間接蛍光抗体法により観察した。除神経筋では遅筋型C蛋白質が存在し続ける。

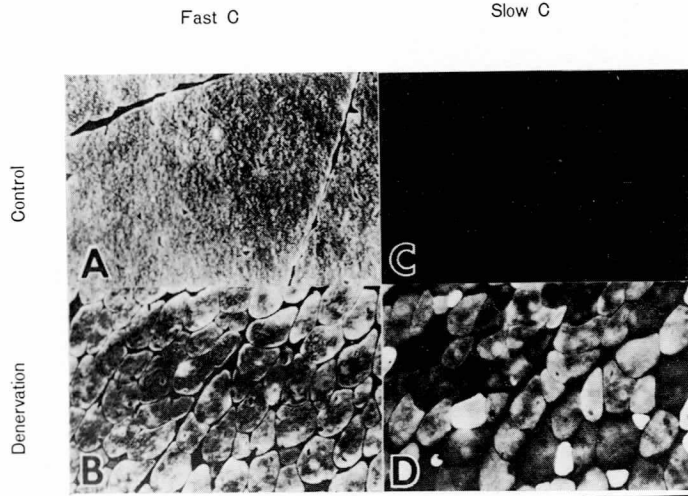


図 6 成鶏胸筋の除神経によって引き起されるC蛋白質アイソフォームの変化. 2カ月齢の鶏胸筋を除神経し, 1週間後に凍結切片を作成して間接蛍光抗体法で調べた. 抗速筋C蛋白質抗体(A, B)または抗遅筋C蛋白質抗体(C, D)との反応を示す. 上段(A, C)は無処理の筋, 下段(B, D)は除神経筋を示す.

の変化に深く関わっていることは疑いない. 除神経により新生児型から親型への蛋白質のタイプの変化が妨げられる現象は, トロポミオシン, トロポニンT, ミオシンのアイソフォームの場合についても同様に認められた.

一方, すでに成熟し, 親型蛋白質組成となっている2~4カ月齢の鶏の胸筋を支配する神経を切断した場合には, 時間の経過とともに筋細胞の中に遅筋型C蛋白質の出現が起ることが認められた. たとえば, 2カ月齢の鶏胸筋を除神経した場合, 術後1週間ですでに多くの細胞内に遅筋型C蛋白質の存在が認められた(図6). 3週間後には, ほとんどすべての細胞が遅筋型および速筋型C蛋白質を共有しているのが確認され, C蛋白質の面からみると, ほぼ完全に新生児型に戻っているものと判断された. 除神経筋に遅筋型C蛋白質が再出現する場合, 既存の大型の筋線維にその出現が認められ, 再生細胞のような小型細胞に特異的に出現するのではない. すなわち, 除神経により, 既存細胞の幼若化が起るものとみなされる. 除神経の効果は, トロポミオシンの場合についても同様

に認められた(図7). 3カ月齢の鶏胸筋では, ほぼ100% α 型トロポミオシンのみで, β 型トロポミオシンは検出されない. 3カ月齢の胸筋が除神経されたとき, 約2週間後に微量の β 型トロポミオシンが出現し(図7f), 1カ月後にはさらに明瞭に検出されるようになった(図7g). このとき, α 型トロポミオシンと β 型トロポミオシンの量比をみると, ちょうど孵化直後のヒヨコの場合(図7a)と類似していた. このことは, 除神経されることにより, ほぼ完全に新生児型に逆行したことを示唆している. 除神経を受けていない例の対照筋では, トロポミオシンのタイプの変化はほとんど認められない(図7b~d). 除神経筋では, 新生児型蛋白質のもう1つの特徴である足型トロポニンTの出現も, トロポミオシン, C蛋白質の変化に並行して起ることが認められた. このようにC蛋白質, トロポミオシン, トロポニンTが新生児型へ移行するという点では, 除神経筋での変化と鶏筋ジストロフィー症での変化とはきわめてよく似ている. 両者に共通するもう1つの点として, ミオシン軽鎖の変化をあげることができる.

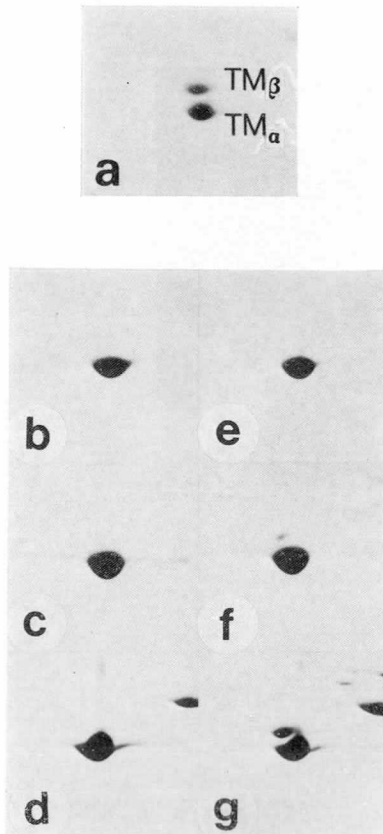


図7 正常筋と除神経筋のトロポミオシンの二次元電気泳動パターン。3カ月齢の鶏胸筋を除神経し、手術後1週間後(a, e), 2週間後(c, f), または3週間後(d, g)に調べた。図の左半分は対照筋を、右半分は除神経を示す。aは孵化後2日目の胸筋におけるトロポミオシンのパターン。

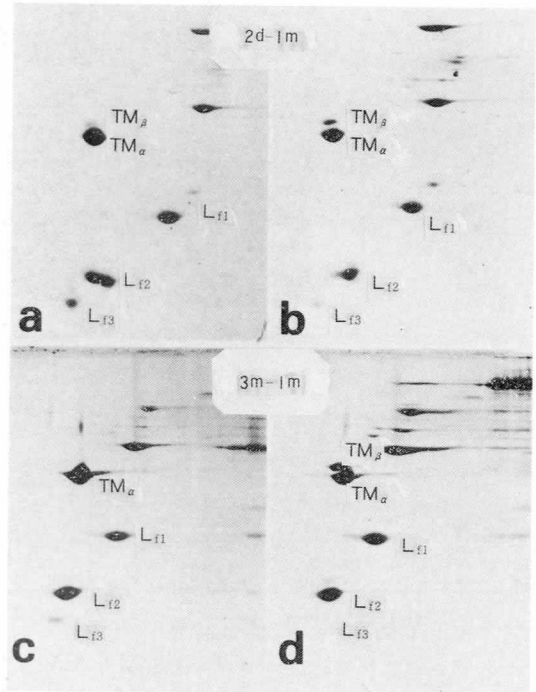


図8 除神経された鶏胸筋におけるミオシン軽鎖の変化。孵化2日目(上段, 2d-1m)および3カ月齢(下段, 3m-1m)の鶏胸筋を除神経し、1カ月後にミオシン軽鎖のパターンをO'Farrell二次元電気泳動法により調べた。a, cは対照筋, b, dは除神経筋。Lf₁, Lf₂, Lf₃は速筋ミオシン軽鎖を示す。

筋ジストロフィーの発症に伴い、速筋型軽鎖の1つ L_{f3} の顕著な減少が起る。除神経筋の場合にも、まったく同様に、速筋型軽鎖 L_{f3} の減少が認められた(図8)。L_{f3} が量的に少ない点は、新生児筋に共通する現象である。また、胚子期の胸筋には遅筋型軽鎖の存在が知られているが、ジストロフィー筋、除神経筋、新生児筋のいずれでも遅筋型軽鎖は検出されない⁷⁾。

以上述べてきたように、蛋白質の特性からみる限り、鶏の場合、ジストロフィー筋と除神経筋とはかなり類似点がみられ、除神経筋をジストロフ

ィー筋の1つの実験モデルとみなしうる可能性を秘めている。

まとめと考察

鶏筋ジストロフィー症に対するベスタチンの効果に関して、新生児型蛋白質の有無を指標として検討した。現時点では実験例が多くないので明確な結論は差し控えたいが、本実験でみる限り、ジストロフィー症の初期段階での変化、すなわち新生児型C蛋白質の出現に対しては、ある程度抑制

的効果を示したといえる。しかし、ジストロフィー症の発症の進行に対して十分な抑制的効果を発揮したとはみなしがたい。今後の実験においては、鶏の飼育条件に慎重な配慮を払いつつ、孵化直後からベスタチン投与を開始すること、成長に沿って投与量を増加させることを検討する必要がある。

ここでまず問題となるのは、ベスタチンの投与開始時期と投与量である。本実験では、蛋白質の面からみて、新生児型から親型への移行がある程度進行した時点（孵化1週間後）で投与を開始した。また、投与量は従来の報告より少ない量を用いた。これは、ベスタチン投与が幼若ヒヨコに及ぼす影響を及ぼしたからである。本実験では主として筋ジストロフィー症の初期段階についてC蛋白質に焦点を合せてみたが、筋ジストロフィー症の影響が顕著に現れるトロポミオシンとトロポニンTについても比較検討を加えることにより、新たな知見が得られるものと思われる。

鶏胸筋については、除神経により、蛋白質のタイプの間からみて筋ジストロフィー症とよく似た状態がつけられることが明らかにされた。しかし、除神経筋の筋細胞は、形態的にみると、筋ジストロフィーのように細胞の肥大化や大きな不均一化が顕著に起るわけではない。細胞が丸くなったり、細胞間隙の増大などは認められる。除神経筋にみられる新生児型蛋白質の出現が、ベスタチン

の投与によりどう影響されるか、筋ジストロフィー症に対する効果と合せて検討することは意味があるように思われる。

文 献

- 1) 大日方昂. 筋肉の分化—筋タンパク質の多型性と可変性—. 科学, 53(11), 689-696 (1983).
- 2) Takeda, S. and Nonomura, Y. Presence of the tropomyosin β -chain in dystrophic chicken breast muscle. *Biomed. Res.*, 1, 176-179 (1980).
- 3) Obinata, T., Takano-Ohmuro, H., and Matsuda, R. Changes in troponin T and myosin isozymes during development of normal and dystrophic chicken muscles. *FEBS Lett.*, 120, 195-198 (1980).
- 4) 大日方昂. 鶏ジストロフィー筋におけるC蛋白質分子種の変化. 厚生省筋の発生と分化に関する基礎的研究 (江橋班). 昭和57年度研究報告書, pp. 102-108 (1983).
- 5) Reinach, F. C., Masaki, T., Shafiq, S. A., Obinata, T., and Fischman, D. A. Isoforms of C-protein in adult chicken skeletal muscle: Detection with monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.*, 95, 78-84 (1982).
- 6) 松下 宏, 辻 繁勝. 筋ジストロフィーマウスにみられる種々な酵素の活性変動に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響. 厚生省新薬開発研究 (梅沢班). 昭和55年度研究報告書, pp. 55-61 (1981).
- 7) Obinata, T., Takano-Ohmuro, H., and Matsuda, R. Types of troponin T and myosin isozymes in the breast muscle of dystrophic chicken. *In Muscular Dystrophy*, ed. by S. Ebashi, pp. 105-115, Univ. Tokyo Press, Tokyo (1982).

筋ジストロフィー症マウスに対する アルファメニン投与の影響

松 下 宏*

研究協力者 辻 繁勝*・楠本茂夫*・土井芳夫*

研究目的

微生物由来の低分子 immunomodifier の 1 つであるベスタチン、あるいはホルフェニシノールを筋ジストロフィー症マウスに対して連続投与する実験を行い、発症直後の 3 週齢頃までに投与を開始したマウスの中で、いったん発現した症状が消失し、外見的にまったく正常な成長を遂げる個体が得られることを見出している^{1,2)}。また、初期投与による症状の消失に失敗した個体も、長期間投与を続けることによって有意な寿命の延長が得られることが認められた。

そこで、引き続き、これら有効物質に構造の類似している他の低分子 immunomodifier を使用して、筋ジストロフィー症マウスに同じような連続投与を行う実験を計画し、症状進行に対する抑制効果の有無の検定を行っている。本年度は、ベスタチンに構造の類似しているアルファメニン A および B に関する実験結果を報告する。

材料と方法

実験には、C 57 BL/6 J-dy 系マウスの疾病個体 (dy/dy) および、同齢の正常個体 (+/-) を自家繁殖または実験動物中央研究所から購入して使用した。

薬剤投与実験には、約 1 カ月齢の疾病マウス 80 頭を 2 群に分け、一方をアルファメニン A 投与、他方を B 投与に使用した。各群はさらに各 10 頭ずつ 4 実験区に分け、それぞれ 2 週間投与、4 週間投与、6 週間投与、および 12 週間投与の実験に用いた。各実験区はさらに 5 頭ずつ 2 ケージに分け、一方は薬剤投与マウス、他方は生理食塩水投与対照マウスとした。

アルファメニン粉末は使用当日に生理食塩水に 1 mg/ml 濃度に溶解し、1 回 0.2 ml ずつ、1 日 2 回、連日背部皮下に注射した。対照群には、生理食塩水を 0.2 ml ずつ同様に注射した。

それぞれの期間連日投与を行ったのち、マウスは屠殺し、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、同時に尿中のクレアチン、クレアチニン含量の測定も行った。

酵素活性測定には採血後分離した新鮮血清をそのまま、また屠後肢筋は屠殺後直ちに採取し、10 倍容の 0.32 M 蔗糖液に入れ、テフロンホモジェナイザーでホモジェナイズし、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って膜の破碎を行ったのち、それぞれを酵素標品として使用した。

酵素活性の測定法は、アルカリプロテアーゼ活性は Edmund and Pennington の方法³⁾、Ca²⁺ 依存性中性蛋白分解酵素 (CANP) は Dayton らの方法⁴⁾、クレアチンキナーゼ (CPK) は Hess

* 和歌山県立医科大学第二生理学教室

表 1 Alkaline protease activities in several tissues of mice with muscular dystrophy

	Normal	Dystrophic	D/N	Pr.
Muscle	21.4±9.5 (7)	58.4±13.6 (7)	2.73	P<0.001
Heart	5.0±3.6 (4)	6.7±4.6 (4)	1.34	N.S.
Liver	3.6±1.6 (4)	4.9±3.7 (4)	1.36	N.S.

Unit: $\Delta E/mg$ protein.

Parenthesis show numbers of mice used.

らの UV 法⁵⁾, 乳酸脱水素酵素 (LDH) は Wroblewski らの方法⁶⁾, ビルビン酸キナーゼ (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。

骨格筋中のヒスタミン含量は, Shore らの *o*-フタルアルデヒド法を基にした Anton らの変法⁸⁾に従って測定した。

結 果

1) 疾病による酵素活性の変動

疾病進行の生化学的マーカーとしては, すでにいくつかの酵素が血清中, 骨格筋中で特異的な活性変動を示すことが知られている。これらのうち, 今回は PK, CPK, および LDH について測定を行った。また, プロテアーゼ活性としては, CA-NP のほかに, アルカリ側に至適 pH のある (pH 9.1) アルカリプロテアーゼ活性も疾病進行のマーカーとして測定した。無処置疾病マウスならびに正常対照マウスにおけるこれらマーカー酵素の活性変動については, アルカリプロテアーゼを除いてすでに度々報告してきたので^{9,10)}, 今回は実験を省略した。アルカリプロテアーゼ活性の変動については, この酵素が myofibrillar protease と呼ばれ, 筋線維内に存在することがわかっていると同時に, mast cell 中にも同一酵素が多量に存在すること¹¹⁾, ならびに筋ジストロフィー症マウスで著しく活性が増加していること¹²⁾などが知られている。さらに, 骨格筋中の mast

表 2 Histamine concentrations in several tissues of mice with muscular dystrophy

	Normal	Dystrophic	D/N
Muscle	3.52	12.35	3.51
Heart	1.52	2.00	1.32
Liver	0.42	0.35	0.83

Unit: $\mu g/g$ wet tissue weight.

Each data show average values of three trials.

cell の数が筋ジストロフィー症マウスで増加しているという古い報告¹³⁾もあることから, この酵素の活性変動を疾病進行のマーカーとして利用すると同時に, 萎縮筋中の mast cell の量的変化を示すものとして, mast cell のもう1つの特異的な産物であるヒスタミンの量的変化と比較検討した。使用されたマウスの月齢は2~3カ月である。

結果は, 表1のように, 無処置の疾病マウスでは骨格筋中のアルカリプロテアーゼ活性が正常対照に比較して3倍近く活性上昇しており, 統計的にも有意な差異を示していることがわかった。さらに, 組織中のヒスタミン含量についても, 表2のように骨格筋中で大幅に増加していることが認められ, アルカリプロテアーゼ活性とほぼ並行した変化を示しており, 筋ジストロフィー症マウスでは症状進行に伴って mast cell の量的増加が存在することが確かめられた。

2) アルファメニン短期投与による体重変化

1カ月齢の疾病マウスにアルファメニンAあるいはBをそれぞれ単独で6週間連続投与した場合

筋ジストロフィー症マウスに対するアルファメニン投与の影響

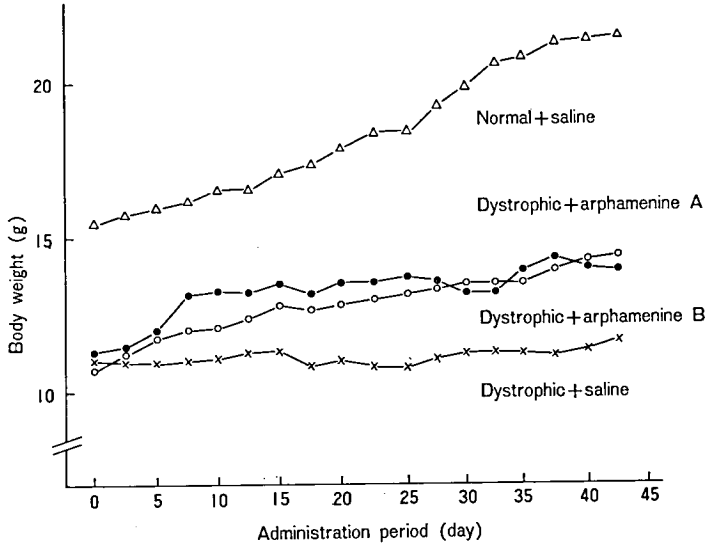


図 1

に、臨床症状および体重の変化に対してどのような影響を及ぼすかについて観察を行った。症状進行に関しては、食塩水投与対照あるいは同齢無処置疾病マウスと比較してほとんど変化が認められなかった。体重変化に関しては、図 1 のように、わずかに投与群で増加の傾向が認められた。アルファメニン A と B の間にはそれほど差異は認められなかったが、対照群に比較して体重増加の最も著しいのは投与開始後 2 週間くらいまでで、その後は対照群とほとんど並行的な経過を示していた。

3) アルファメニン連続投与のマーカー酵素活性に対する影響

発症後やや時間が経過し症状進行がみられる 1 カ月齢の疾病マウスを用いて、アルファメニンを種々の期間に分けて短期連続投与を行い、血清中に遊出しているマーカー酵素の活性変動に与える影響を調べた。表 3 および表 4 は、それぞれアルファメニン A および B についての結果を示したものである。

まず、アルファメニン A であるが、2 週間の投与によってすでに PK および CPK 活性が大幅に低下していることが認められる。12 週間投与で

表 3 Effects of arphamenine A administration on serum enzyme activities in dystrophic mice

Enzymes	Administration period			
	2 weeks	4 weeks	6 weeks	12 weeks
PK	70.9	84.2	69.2	84.5
CPK	52.0	63.6	85.9	122.5
LDH	—	92.6	—	146.0

Unit : arphamenine A/saline ×100.

表 4 Effects of arphamenine B administration on serum enzyme activities in dystrophic mice

Enzymes	Administration period			
	2 weeks	4 weeks	6 weeks	12 weeks
PK	128.1	67.6	45.0	64.4
CPK	72.1	94.6	100.8	110.6
LDH	147.5	125.7	140.4	115.2

Unit : arphamenine B/saline ×100.

CPK 活性がわずかに上昇している以外は、この傾向は他の投与期間でも同様に認められた。

また、アルファメニン B 投与の場合は、PK 活性は投与期間が長いほど低下の傾向が強く現れているが、CPK の場合はあまり大きな変化はみられなかった。

表 5 Effects of arphamenine A administration on muscle enzyme activities in dystrophic mice

Enzymes	Administration period			
	2 weeks	4 weeks	6 weeks	12 weeks
PK	136.1	159.0	151.4	155.9
CPK	139.3	106.7	87.6	198.1
LDH	133.4	124.2	134.1	133.3
Alk. protease	63.5	48.8	69.4	79.7
Neut. protease	72.2	86.3	158.2	89.3

Unit : arphamenine A/saline $\times 100$.

表 6 Effects of arphamenine B administration on muscle enzyme activities in dystrophic mice

Enzymes	Administration period			
	2 weeks	4 weeks	6 weeks	12 weeks
PK	100.9	142.9	78.2	114.3
CPK	110.2	165.6	70.9	100.2
LDH	89.0	143.3	145.8	133.7
Alk. protease	60.7	80.3	61.5	45.4
Neut. protease	72.8	87.6	83.9	60.9

Unit : arphamenine B/saline $\times 100$.

表 7 Effects of arphamenine administration on urinary creatine concentration in dystrophic mice

Treatment	Period	Creatine	Creatinine	$\frac{\text{Creatine}}{\text{Creatinine}}$
Arphamenine A	2 weeks	16.08	11.40	1.41
	4 weeks	12.35	11.04	1.12
	6 weeks	19.98	6.08	3.29
	12 weeks	19.87	6.20	3.20
Arphamenine B	2 weeks	13.58	7.64	1.78
	4 weeks	9.63	6.16	1.56
	6 weeks	12.71	11.96	1.06
	12 weeks	14.69	9.18	1.60
Dystrophic	—	16.53	9.63	1.72
Normal	—	8.66	10.61	0.82

Unit : mg/dl.

さらに、LDH 酵素の活性に関しては、両薬剤とも、その投与によって血清中の活性上昇をもたらすことが認められた。

一方、骨格筋中におけるマーカー酵素群の活性変化は、表 5 および表 6 のごとくであった。

アルファメニン A 投与では、2 週間で PK、

CPK、および LDH の活性がいずれも上昇し、この傾向は 12 週間投与でさらに強くなり、とくに CPK 活性は対照マウスの 2 倍に活性が上昇し、ほぼ正常マウスの値になっていることが認められた。また、プロテアーゼ活性も 2 週間投与で大幅な活性低下を示し、12 週間でも同様な傾向が認

められた。

アルファメニンB投与の場合はプロテアーゼ活性に対する影響がさらに顕著で、12週間投与では、中性、アルカリ性ともに対照マウスの約1/2に低下していた。ところが、PK, CPK, LDHなどの活性については、いずれの期間でもあまり著しい変化はみられなかった。

4) アルファメニン投与による尿中クレアチン含量の変化

表7は、無処置の正常および疾病マウス尿中のクレアチン排泄量とクレアチン対クレアチニン比、ならびに疾病マウスに種々の期間アルファメニンAおよびBを投与したときの変化を示したものである。疾病マウスでは、正常に比較して尿中のクレアチン排泄量が大幅に増加しており、クレアチン対クレアチニン比が1より高い、いわゆるクレアチン尿症を呈しているのがわかるが、アルファメニンAあるいはBの投与によってもこの傾向はほとんど変わらず、したがってクレアチン対クレアチニン比もすべて1を超えていた。

考 察

今回、疾病のマーカー酵素として用いた PK, CPK, LDH ならびに CANP は、いずれも筋ジストロフィー症マウスにおいて、疾病の進行に密接した活性変動を示すことがすでに知られている酵素群である。今回新たにマーカー酵素として活性測定されたアルカリプロテアーゼは、生後2～3カ月齢の筋ジストロフィー症マウス骨格筋中で正常対照の3倍近い活性上昇を示していることがわかり、疾病進行のマーカー酵素として充分利用できるものと判断された。また同時に、この酵素を多量に含有する mast cell についても、その特異的産物であるヒスタミンの含量が同齢の筋ジストロフィー症マウスの骨格筋で約 3.5 倍に増加していることから、間接的ながら、mast cell の

細胞数がアルカリプロテアーゼ活性の上昇と並行して増加していることが推定された。さらに、心臓、肝臓などではこれら一連の変化があまり顕著に認められないことから、これらの変化が骨格筋の萎縮症状の進行に強く関連したものであることが推測される。

1カ月齢の症状がやや進行した筋ジストロフィー症マウスに、アルファメニンAあるいはBを6週間連続投与した場合の体重増加に与える影響をみる実験では、食塩水投与筋ジストロフィー症マウスに比較していずれもやや好転の傾向を示す結果が得られたが、実験個体数が少ないこと、投与期間が短いことなどから、確然たる変化とは認めがたかった。また、増加の傾向も、投与開始後2週間くらいまでが最も著しく、その後は対照マウスの変化とほぼ並行した変化を示していることから、このまま長期間投与を続けたとしても症状の消失に結びつくものとは考えられなかった。

薬剤投与による血清中マーカー酵素の活性変化はアルファメニンAのほうがBよりもやや良好な結果を示しており、とくに PK 活性に関しては、A, Bともに投与を続けることによって活性が明らかに低下する傾向を示していた。これは、骨格筋中の活性増加の傾向と相まって、筋細胞での膜機能の改善を示唆する結果と考えられる。

また、骨格筋中のマーカー酵素の活性変化も総体的に改善の傾向を示しているが、アルファメニンAのほうがやや良好な結果を示していた。とくに、12週間投与で、PK, CPK 酵素が対照の2倍に近い活性増加を示していることが注目される。さらに、プロテアーゼ活性は、中性、アルカリ性ともにアルファメニンAあるいはBの投与によって活性低下を示しており、萎縮筋線維中の蛋白分解増加に対して改善の傾向があることを示唆するものと考えられる。しかし、アルファメニンがこれらプロテアーゼに対して直接活性阻害作用をもつものか、あるいは間接的に影響するものかについては、今回の結果のみでは判断できない。

次に、尿中に排泄されるクレアチン量ならびにクレアチン対クレアチニン比に関しては、今回の実験区すべてについてほとんど改善が認められなかった。とくに、アルファメニンAの長期間投与によって、むしろクレアチン排泄量の増加傾向があることが示された。この結果は骨格筋および血清中のマーカー酵素活性の示す変化傾向とは一致しないが、その原因は不明である。

今回の実験結果全体を通して、アルファメニンAとBの効果に関してあまり大きな差異は認められなかった。いずれにしても、アルファメニンAあるいはBをすでにある程度症状の進行した筋ジストロフィー症マウスに対して単独に連続投与することにより、わずかではあるが病状改善の傾向を示す結果が得られたことから、さらに発症直後あるいは未発症の時期からこの薬剤の投与を開始することによって、よりはっきりした疾病抑制効果が得られる可能性が示されたものと考えられる。

文 献

- 1) Tsuji, S. and Matsushita, H. Effect of protease inhibitors on the activity changes of several enzymes in murine muscular dystrophy. *J. Physiol. Soc. Jpn.*, **43**, 374 (1981).
- 2) 松下 宏, 辻 繁勝. 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. 厚生省新薬開発研究費. 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究. 昭和57年度研究報告書, pp. 51-57 (1982).
- 3) Edmund, T. and Pennington, R. J. T. Mast cell origin of myofibrillar protease of rat skeletal and heart muscle. *Biochem. Biophys. Acta*, **661**, 28-31 (1981).
- 4) Dayton, W. R., Reville, W. J., Goll, D. E., and Storomer, M. H. A Ca^{++} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover: Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry*, **15**, 2159-2167 (1976).
- 5) 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).
- 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).
- 8) Anton, A. H. and Sayre, D. F. A modified fluorometric procedure for tissue histamine and its distribution in various animals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **166**, 285-292 (1969).
- 9) 辻 繁勝, 松下 宏. 筋ジストロフィー症マウスに見られる種々の酵素活性変動に対するロイペプチン投与の影響. 第15回日本実験動物学会講演要旨集, p. 75 (1980).
- 10) 松下 宏, 辻 繁勝. 筋ジストロフィーマウスに見られる種々の酵素の活性変動に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響. 厚生省新薬開発研究費. 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究. 昭和55年度研究報告書, pp. 55-61 (1980).
- 11) Woodbury, R. G., Everitt, M., Sanada, Y., Katunuma, N., Lagunoff, D., and Neurath, H. A major serine protease in rat skeletal muscle: Evidence for its mast cell origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 5311-5313 (1978).
- 12) Sanada, Y., Yasogawa, N., and Katunuma, N. Serine protease in mice with hereditary muscular dystrophy. *J. Biochem. (Tokyo)*, **83**, 27-33 (1978).
- 13) Bois, P. Mast cells and histamine concentration in muscle and liver of dystrophic mice. *Am. J. Physiol.*, **206**, 338-340 (1964).

2,3 の筋萎縮症患者に対するベスタチンの効果

村 上 慶 郎*

研究協力者 岡 崎 隆*・林 英人*・石川和彦*

はじめに

前年度までにロイペプチン、ベスタチンの筋ジストロフィー症および筋萎縮性疾患に対する効果をみるために検討を加えてきたが、今回はベスタチンを筋疾患を主に投与して、その結果を検討し、さらに松下班員のベスタチンが動物実験で投与開始時期が早いほど有効であるとの成績から、1例の1歳8カ月の Duchenne 型筋ジストロフィー症の患者に使用を試み、興味ある成績を得たので報告する。

対象および方法

対象は19例で、いずれも国立療養所箱根病院に入院または外来通院中の患者で、1例の神経原性の筋萎縮症を除いてすべてミオパチーである。内訳は、筋強直性ジストロフィー症3例、Duchenne 型筋ジストロフィー症3例、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー症2例、肢帯型筋ジストロフィー症2例、および多発性筋炎、Duchenne 型筋ジストロフィー症の保因者、背髄性進行性筋萎縮症が各1例ずつであった。年齢は1歳8カ月から66歳に及び、男性13例、女性5例であった。

ベスタチンの使用量は、1日量 60, 270 mg の固定法と、1日量 30 mg より毎週、一部隔週に30,

100 mg ずつ増量し、600 mg から 1,500 mg に及んだものもある。

使用期間は6カ月から30カ月に及んでいる。

成 績

19例の成績は表1に示すごとくで、初期に自覚症状の軽度の改善がみられた多発性筋炎と1歳8カ月の Duchenne 型筋ジストロフィー症のおの1例以外、明瞭に効果を認めたものはなかった。また、1例の30歳の Duchenne 型筋ジストロフィー症は肺炎を併発し、呼吸不全で死亡した。

検査成績では、一般尿検査（蛋白、糖、ウロビリノーゲン、沈渣）には異常は認めなかった。赤沈、一般血液検査（赤血球数、血色素、ヘマトクリット、血小板数、白血球数）でも異常を認めなかった。血液生化学検査では、総コレステロール、総蛋白、電解質（Na, K, Cl）、尿素窒素、クレアチニンに異常を認めなかった。

血清 GOT, GPT, LDH, CPK も、1歳8カ月の Duchenne 型筋ジストロフィー症を除いては有意の変動を示さなかった。

副作用については、とくに認むべきものはなかった。

1歳8カ月の Duchenne 型筋ジストロフィー症のベスタチン投与例

症例は男子で、1歳6カ月で一人立ちの遅れを

* 国立療養所箱根病院

表 1

Name	Age	Sex	Diagnosis	Duration on bestatin (months)	Doses (mg/day)	CPK (units/l)	Effect	Side effect
S. F.	48	M	Myotonic dystrophy	30	270	55~140	—	—
S. N.	47	M	Myotonic dystrophy	30	270	179~392	—	—
O. M.	42	M	Myotonic dystrophy	30	270	20~85	—	—
K. I.	58	M	Myotonic dystrophy	30	270	31~199	—	—
Y. S.	35	F	Myotonic dystrophy	30	270	44~541	—	—
H. M.	30	M	Duchenne PMD	30	270	99~584	Died	—
O. N.	40	M	Myotonic dystrophy	28	270	30~80	—	—
N. M.	31	F	FSH dystrophy	30	270	33~90	—	—
T. S.	66	M	FSH dystrophy	30	270	42~142	—	—
A. O.	54	F	LG dystrophy	30	270	37~92	—	—
T. W.	52	F	LG dystrophy	30	270	37~97	—	—
K. O.	60	M	Myotonic dystrophy	9	60	160~334	—	—
N. I.	37	M	Myotonic dystrophy	12	60	109~279	—	—
S. K.	60	M	Myotonic dystrophy	12	60	46~110	—	—
N. U.	52	M	Spinal muscular atrophy?	6	60	56~101	—	—
H. I.	50	M	Polymyositis	28	480~600	126~356	±	—
T. M.	10	M	Duchenne PMD	19	270~600	1,800~800	—	—
Y. H.	55	F	Duchenne carrier	30	300~900	180~460	—	—
K. I.	2	M	Duchenne PMD	6	60~1,500	10,830~4,510	±	—

主訴として保健所に相談に行き、筋ジストロフィー症を疑われ本院に紹介された。

家族歴では、母親の2人の弟が Duchenne 型筋ジストロフィー症で死亡している。そのうち1人は、本院で18歳で死亡している。患児の祖母が四肢近位筋の筋力低下を訴え、本院に通院中である。患児には4歳の姉がいるが、症状は現れていない。

臨床経過は、正常満期産で生下時体重は3,000g、頸定は3カ月、1歳6カ月で一人立ちができなかった。

来院時の現症は、下肢の近位筋の筋力低下が著明で、両腓腹筋部に仮性肥大を認める。一人立ちは可能であったが、歩行は数歩のみ可能であった。また、登はん性起立を示していた。

体重は12kgで、検査成績は、尿検査で蛋白(—)、糖(—)、ウロビリノーゲン(+), 沈渣は異常なし。一般血液検査では、赤血球数 477×10^4 、白血球数7200、ヘマトクリット34.9、血色素11.2g/dL、BUN 15mg/dL、クレアチニン0.4mg/dL

であった。血清CPKは10,830単位、LDH 2,450単位、GOT 195単位、GPT 168単位であった。

昭和58年7月からベスタチン60mg/dayより開始し、ほぼ60mgずつ、隔週に増量していった。この間、最初はベスタチンの服用が困難でミルクに混じりしていたが、そのうち患者が気づいて服用しなくなり、次いで患者がヨーグルトが好物であることから、これに混ぜることにより、服用がスムーズにゆくようになった。

服用開始後4週目の8月下旬には、歩行がかなり可能となった。しかし、歩行に際してよく転んだ。

2カ月後の9月下旬にはベスタチンを300mg/dayに増量したが、この頃から登はん性起立がみられなくなった。しかし、歩行に際してはよく転んでいた。血清CPKは6,670単位、GOT 168単位、GPT 103単位、LDHは2,782単位であった。

10月下旬には、歩行能力は、前月に比して転ぶのがやや少なくなったと母親は述べている。CPK

2.3 の筋萎縮症患者に対するベスタチンの効果

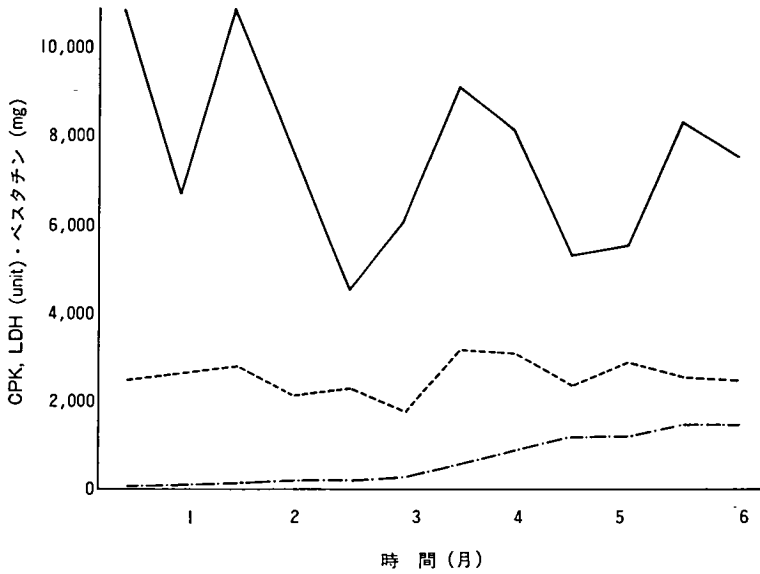


図 1 CPK, LDH の推移。——, CPK ; ----, LDH ; - · - · -, ベスタチン。

は 7,720 単位, LDH は 2,112 単位, GOT は 121 単位, GPT は 111 単位であった。

11 月には, ベスタチン 800 mg/day に増量した。下旬には, 手すりを使用して階段の昇降が可能となってきた。

12 月には, ベスタチン 1,000 mg/day に増量, CPK は 5,300 単位, LDH 2,366, GOT 135 単位, GPT 134 単位となったが, 臨床的には前月と著変はなかった。

昭和 59 年 1 月には体重 14.5 kg となり, ベスタチンも 1,200 mg/day と増量した。血清 CPK は 7,570 単位, LDH 2,520 単位, GOT 180 単位, GPT 180 単位であった。臨床的には, 手すりにつかまらずに, ゆっくりと階段を昇降できるようになった。

2 月には体重は 15 kg に増加したので, ベスタチンを 1,500 mg/day に増量した。これは, 体重 1 kg 当り 100 mg のベスタチンを投与したことになる。臨床的には, 患児は, 転ぶ回数が著しく減少し, 駅の階段を手すりを使用せずに昇降できるようになった。血清 CPK は 5,230 単位, GOT は 111 単位, GPT は 112 単位, LDH は 2,174

表 2 ベスタチン大量投与後の検査成績 (6 カ月後)

	Before	After
Gait	Unable	Able
Gower sign	Positive	Negative
Body weight	12 kg	15 kg
CPK	10,830 units/l	7,570 units/l
LDH	2,450	2,530
GOT	198	180
GPT	168	158
WBC	6,700	6,000
RBC	477×10^4	475×10^4
Hb	11.2 g/dl	11.5 g/dl
Ht	34.9	34
TP	6.6	6.8

単位であった (表 2)。

ベスタチンの投与量と血清 CPK, LDH の変動との関係は図 1 のごとくである。血清 CPK は変動の幅が非常に大きい, ベスタチンの増量とともに減少の傾向にあるようである。LDH, GOT, GPT はベスタチンの増量と関係がみられる。

本症例でも, 尿検査で蛋白, 糖, 沈渣などに異常は認められなかった。白血球数, 赤血球数などの一般血液検査では異常が認められなかった。その他の血液生化学的検査においても, とくに異常

は認められなかった。

また、現在のところ自覚的な副作用は認められていない。

考 案

筋疾患 19 例（1 例の神経原性筋萎縮症を含む）にベスタチンの長期間（最大 30 カ月）の連続投与を行い、自覚的症状と CPK 活性値などの生化学的な面からの効果について検討を加えたが、60, 270 mg/day の固定法では、臨床的にも生化学的にも効果は認められなかった。しかし、今回の患者の大多数は成人の患者であり、Duchenne 型筋ジストロフィー症を含めて、発病後相当期間経過しており、かつ種々の型を含んでいるため同様には論じられない。

松下らは、筋ジストロフィーマウスの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したり、長期投与により著しい延命効果があると述べている。この考えに従えば、発病初期の患者に投与するほど効果がみられるわけであるが、大多数の成人の筋ジストロフィー症の患者は正確に発病初期に発見することは困難な場合が多い。これに反して、Duchenne 型筋ジストロフィー症は、比較的発病初期に発見されやすい。われわれの最後の症例は 1.8 歳であり、かなり早期からベスタチンが使用され始めたといえる。また、ベスタチンを次第に増量するにつれて、血清 CPK 値は下降の傾向にあった。

従来われわれの成人の症例の場合、ベスタチンの使用開始後一時的に CPK 値が減少するものがみられたが、これはその後増加し、その後はあ

まり変動をみなかった。この症例も、最初に CPK が減少したが、再び増加し、その後変動を繰り返しながら下降している。

ベスタチンの量と筋ジストロフィーマウスの症状の回復については、松下らは至適投与量の使用が最も効果があると述べているが、ヒトにおいてはこの量が明らかではない。そこでわれわれは、もし至適投与量があるならばそれを見出す目的で、ベスタチンの量を体重 1 kg 当り 100 mg まで増加してみたが、本症例では、CPK に関してはベスタチンの量の増加に伴って減少を示すようにみえた。しかし、LDH, GOT, GPT はベスタチンの量には関係がみられなかった。

臨床症状については、Gower の徴候の消失、歩行時の転倒回数の減少、階段の昇降が可能になるなどの改善が 6 カ月間のベスタチンの使用でみられたが、これは患児の自然の発育過程によるものかもしれない。直ちにベスタチンの効果とは断定できない。今後さらに、長期間の経過観察が必要である。

お わ り に

19 例の筋疾患患者にベスタチンを 60 mg/day から 1,500 mg/day, 6 カ月から 30 カ月にわたって使用したが、1 例の Duchenne 型筋ジストロフィー症を除いて効果はみられなかった。また、認むべき副作用もなかった。

1 例の 1.8 歳の Duchenne 型筋ジストロフィー症に 60 mg/day から 1,500 mg/day までのベスタチンの漸増大量投与を 6 カ月間行って、血清 CPK の減少傾向と症状の改善傾向を認めた。

ベスタチン服用時の DMD 患者の血中濃度 および臨床効果の検討

三吉野 産治*

研究協力者 樋口重典*・金子 薫*・羽田 明*・裊 徳也*
谷山晶彦*・原口洋吾*・折口美弘*

目 的

これまで、われわれは Duchenne 型筋ジストロフィー症（以下 DMD と略す）入院患者 10 例にベスタチンを隔月投与法（1 日 1 回早朝空腹時服用）を試み、約 7 カ月間にわたり血中濃度を検討してきた。その結果、安定した血中濃度の維持は得られなかった。

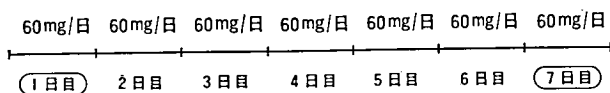
今回入院 DMD 20 例に投与法、投与期間を変更し、別に外来 DMD 5 例と昨年実施した入院 DMD 5 例のデータも参考として、血中濃度と臨床効果について新たに検討したので報告する。

方 法

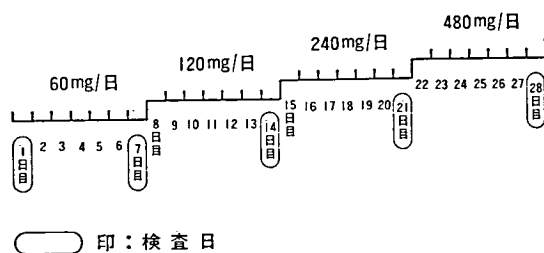
対象は DMD 患者 20 名、年齢は 7 歳から 21 歳、Stage（上田の分類）は 2 から 7 である。表 1 に投与量、投与法、検査日を示した。投与量は成人量で書いているが、アウグスバーガー式より小児薬用量に換算して服用させた。DMD 20 例に成人量として 60 mg/日 相当を毎食後 30 分に服用させ、7 日間投与したものを用量固定法とした。さらに、そのうちの 5 例については 7 日間ごとに倍量投与し、成人量 480 mg/日 まで漸増した。検査日は、内服開始第 1 日目および倍量された薬用量の最終服薬日にあたる第 7、14、21、28 日と

表 1

A) 用量固定法



B) 漸 増 法



○ 印：検査日

* 国立療養所西別府病院

表 2

A) Laboratory data	
1) Serum concentration of bestatin	
	0.5 (hr)
	1.0
	2.0
	4.0
2) Blood	
	GOT
	GPT
	LDH
	CPK
	creatine
	creatinine
3) Urine	
	urine volume
	creatine
	creatinine
B) ADL	

した。血中濃度および臨床効果を検討するために、以下の項目をその指標とした(表 2)。1) 血中濃度測定は、検査日の朝食後投与から 30 分後、1 時間後、2 時間後、4 時間後に採血した血清を用いて、大倉班員に測定していただいたものをデータとした。2) 血液生化学検査として、GOT, GPT, LDH, CPK, クレアチン, クレアチニンを測定した。3) 尿検査は、検査日前日より 24 時間蓄尿し、尿量および尿中クレアチン, クレアチニンを測定した。4) 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)を測定し、ベスタチン服用前後で比較した。5) 副作用の検討には、皮膚症状, 消化器症状, その他の一般状態に注意した。

結 果

図 1 は、成人量 60 mg/日 を用量固定法にて投与した場合の血中濃度である。朝食後 30 分に服用させ(成人量 20mg の 1 回投与に相当する)、時間ごとに血中濃度を測定した服用 1 日目の値である。20 例中 19 例が 30 分後に最高血中濃度 $C_{max}=0.72\pm 0.22 \mu\text{g/ml}$ を示し、服用 1 時間よ

成人量 20mg/1回

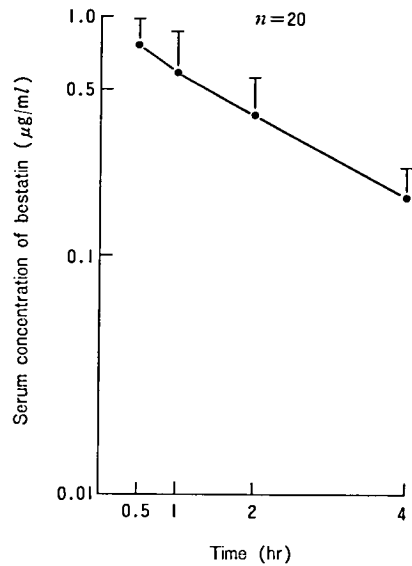


図 1 朝食後投与での血中濃度推移。

り半減期 $t_{1/2}=130\pm 68$ 分の短い安定した分布を示した。

図 2 は、28 日間に及ぶ漸増法 5 例について朝食後投与した場合の血中濃度(1 時間後と 4 時間後)の推移をみたもので、投与量増量につれて血中濃度は上昇を示した。とくに、成人量 480 mg/日 投与 7 日後には、1 時間後の血中濃度が $5.64\pm 1.96 \mu\text{g/ml}$ とかなりの上昇を示した。しかし、4 時間後は $1.44\pm 0.25 \mu\text{g/ml}$ で、1 時間後に比較してあまり上昇を示さなかった。

次に、図 2 の成人量 60 mg/日 投与した 7 日間での各人の血中濃度の変動と、別に実施した成人量 600 mg/日 毎食後投与 7 日間の朝食 1 時間後の各人の血中濃度の変動をみた。図 3 に示すように、成人量 60 mg/日 投与では、1 日目に比べ 7 日目に血中濃度上昇を示した症例は 19 例(1 名測定不能)中 12 例で、とくに 1 日目の血中濃度が $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以下と低値を示した 5 例については、7 日目には前測定値以上の上昇を示した。成人量 600 mg/日 投与では、血中濃度の日差変動が 2 倍以上を示す場合もあった。成人量 60 mg/日 および 600 mg/日 投与とも、7 日間の短期投与ではかな

ベスタチン服用時の DMD 患者の血中濃度および臨床効果の検討

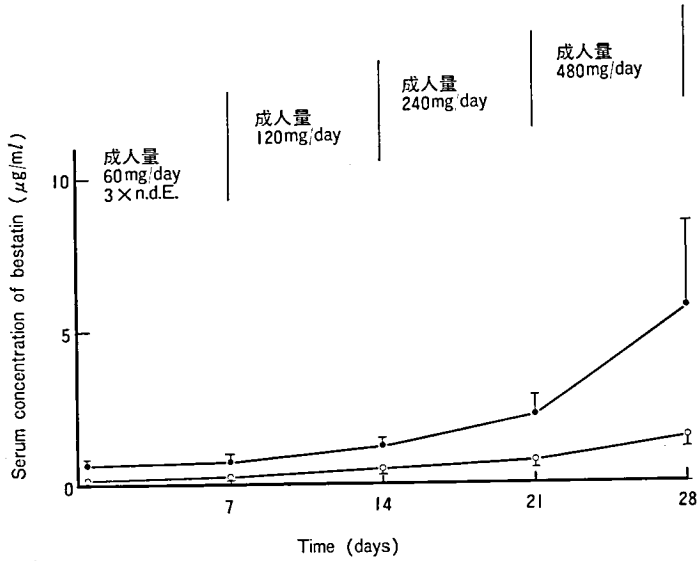


図 2 漸増法での血中濃度変化。漸増法 5 例についての、1 時間後の血中濃度 (●) と 4 時間後の血中濃度 (○) を示す。

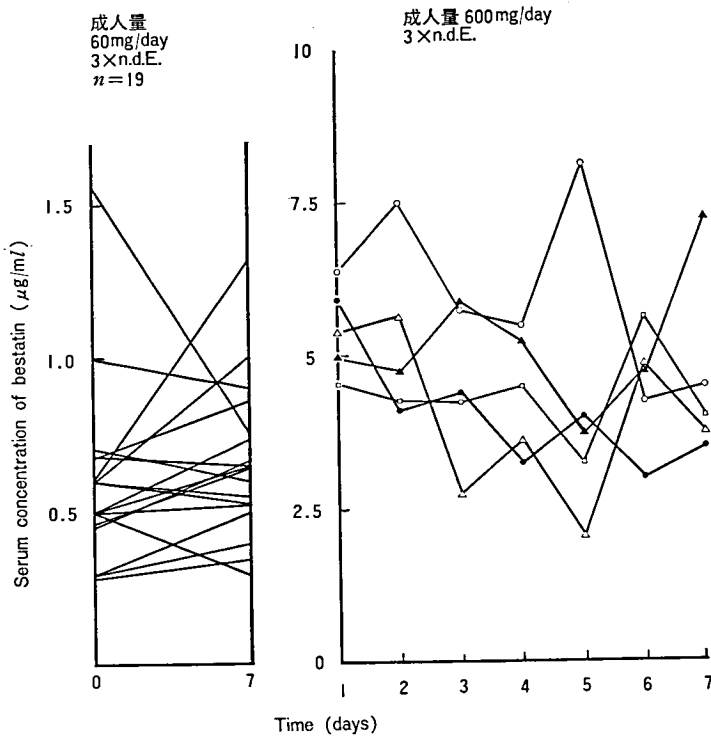


図 3 7 日間投与での各人の血中濃度の変動。縦軸の値は朝食後 1 時間の血中濃度を示す。

りのばらつきを示していた。

表 3 は、漸増法 5 例において、投与開始量すなわち成人量 60 mg/日 投与での第 1 日目と投与最

終量すなわち成人量 480 mg/日 投与での 7 日目の C_{max} を現す時間をみたもので、成人量 60 mg/日 投与では 5 例すべてが 30 分後に C_{max}

表 3 漸増法での C_{max} 時間の変動

Case	Serum concentration of bestatin ($\mu\text{g/ml}$)							
	成人量 60 mg/日				成人量 480 mg/日			
	0.5	1	2	4 (hr)	0.5	1	2	4 (hr)
1	0.4	0.3	0.2	0.09	6.3	7.5	3.0	1.2
2	0.4	0.3	0.3	0.15	5.4	4.1	3.7	1.8
3	0.65	0.6	0.35	0.2	7.35	7.9	3.1	1.2
4	0.7	0.6	0.3	0.15	6.4	5.1	3.7	1.5
5	0.9	0.7	0.4	0.15	3.4	3.6	2.9	1.5

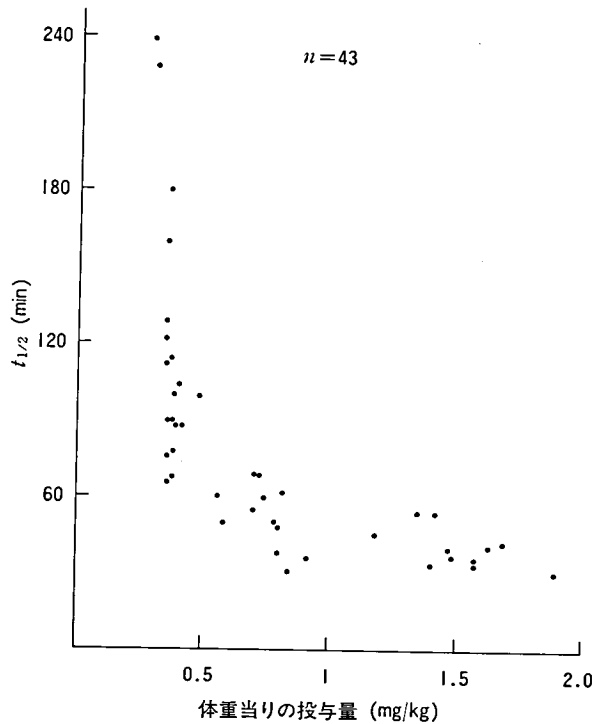


図 4 体重当りの投与量と $t_{1/2}$ の関係.

を示したが、成人量 480 mg/日 投与では 5 例中 3 例が 1 時間目に C_{max} を示した。

図 4 は、半減期 ($t_{1/2}$) と体重当りの投与量 (mg/kg) との相関をみたものである。対象は、いままで当院にて投与した症例の中から、少なくとも 4 週間の服用中止によりベスタチンが Wash-out されていると思われた症例も含めた。 $t_{1/2}$ は、投与 1 時間後から 4 時間後までの血中濃度より算出した。図で示すように、体重当りの投与量が 0.3~0.5 と 0.5 以上では $t_{1/2}$ に差が現れ、体重当りの投与量が 0.5 以上となるに従い $t_{1/2}$

が短くなると推定された。

図 5 は、以前実施した DMD での 1 日 1 回早朝空腹時投与の隔月投与法による、1 時間後の血中濃度をみたもので、表 4 で示す成人量 150~200 mg/日 が成人量 480 mg/日 1 日 3 回のおよそ 1 回分に相当する。隔月投与では、成人量 120~150 mg/日 に増量した頃より、投与期間とともに低下傾向を示す症例がみられ、さらに成人量 150~200 mg/日 では低下症例が多くなった。

図 6 は、成人量 20 mg/日 1 回投与時の血中濃度について、年齢別に 7~12 歳 (8 例) と 13~21

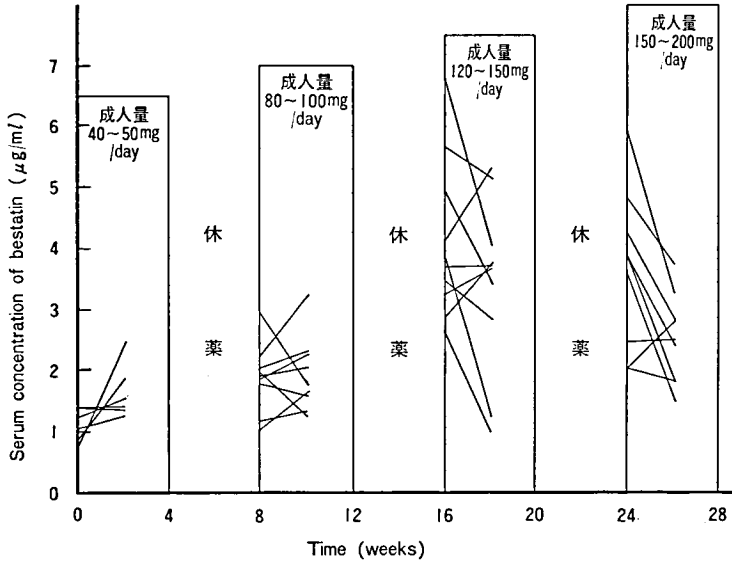


図 5 1日1回隔月投与での血中濃度変化. 年齢5~9歳の10例にベスタチンを早朝空腹時服用させた. 投与法は1カ月間投薬し, その後1カ月休薬を繰返した. 投与後1時間の血中濃度を示す(ただし, 血中濃度測定不能者が数名ある).

表 4 隔月投与における血中濃度と CPK の変動

	Serum conc. CPK ↑	Serum conc. CPK ↓
I n=6	5	0
II n=9	4	2
III n=10	1	3
IV n=9	2	0

ベスタチンを1日1回早朝空腹時に服用させた. 対象は4歳から9歳の10例である. 投与量および投与期間は図5に示している. Iは1カ月間投薬した場合, IIはその後1カ月休薬し, さらに次の1カ月間服薬した場合である. III, IVも同様の投与法を繰返している.

歳(12例)の2群に分けて比較検討したものである. 13~21歳の年齢の群のほうが, 各時間における平均血中濃度は前者よりやや高値を示した.

図7は, 同じく肥瘦度との相関をみたものである. 今回肥満傾向の症例が少なかったため, はっきりとはいえないが, 肥満傾向に伴って血中濃度が低下することも考えられる.

図8は, 成人量 60 mg/日 投与時における $t_{1/2}$

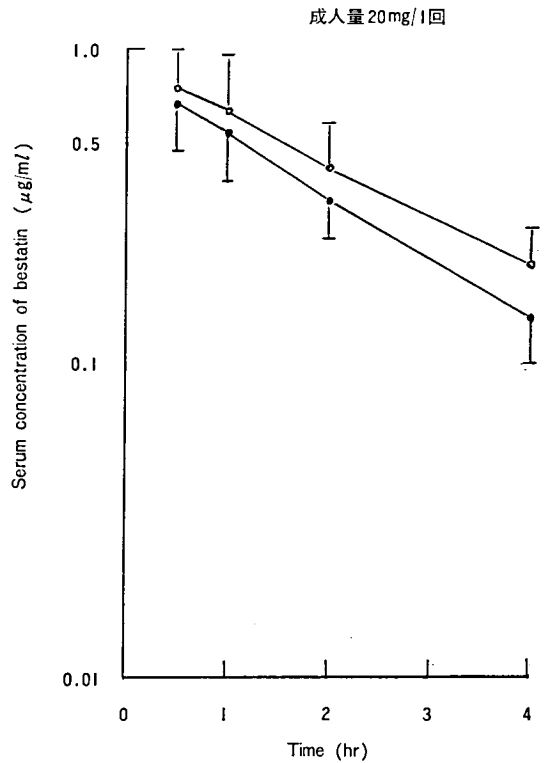


図 6 年齢別による血中濃度の比較. ○, 13~21歳(12例); ●, 7~12歳(8例).

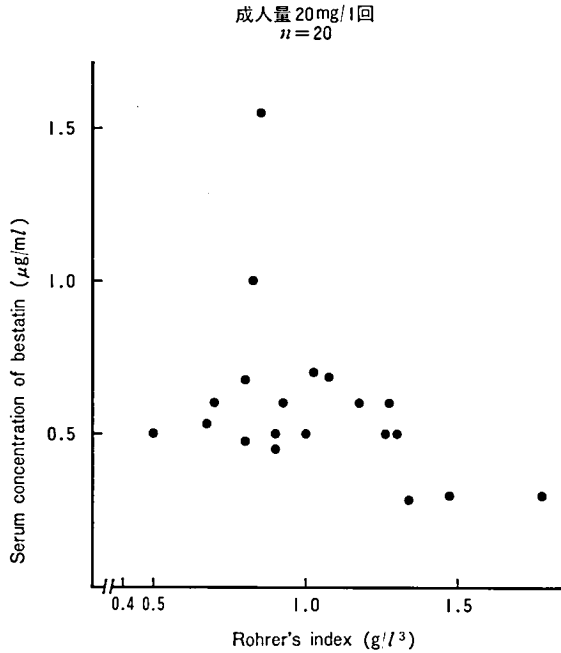


図7 肥瘦度と血中濃度の相関. 横軸の値は体重 (g) を身長 (cm) の3乗で割って100倍したものを示す. 縦軸の値は投与後1時間の血中濃度を示す.

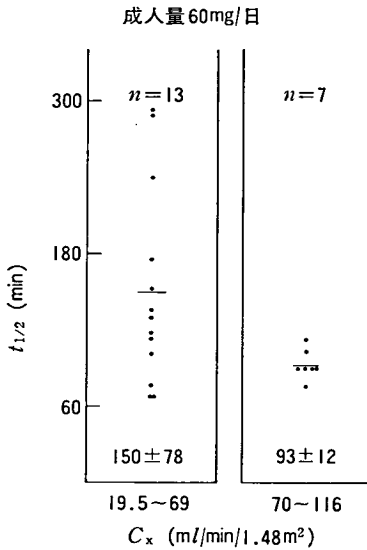


図8 C_x と $t_{1/2}$ の相関.

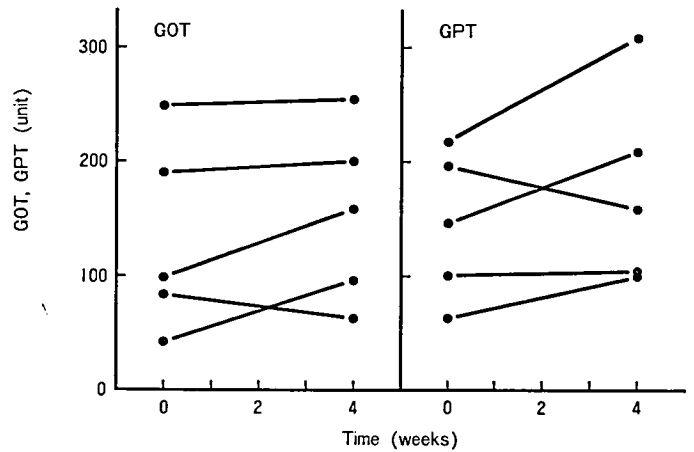


図9 漸増法での GOT と GPT の変動.

とクレアチニン, クレアランス (C_x) との相関をみたものである. C_x 値を 19.5~69 (13 例) と 70~116 (7 例) の 2 群に分けて比較すると, C_x 値が 70~116 では $t_{1/2}$ が 93±12 分と短く, しかもばらつきも小さかった. 一方, C_x 値が

19.5~69 では $t_{1/2}$ が 150±78 分と長く, ばらつきが大きかった.

次に, ベスタチンの臨床効果について検討を加えた. ベスタチンを漸増投与した 5 例につき, 服薬前および最終服薬日 (28 日目) の GOT, GPT

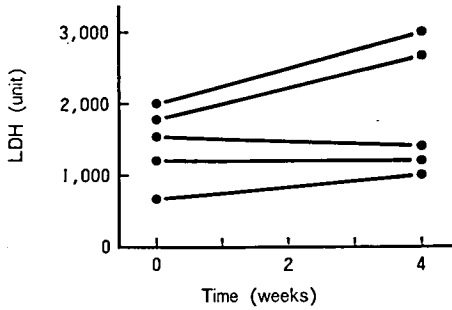


図 10 漸増法での LDH の変動。

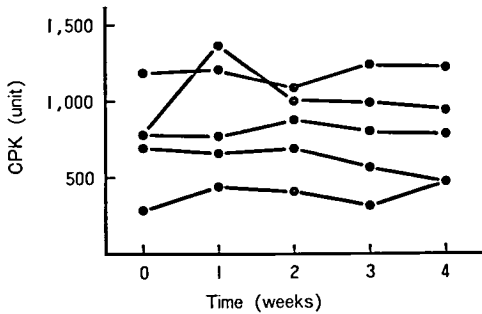


図 11 漸増法での CPK の変動。

(図 9), LDH (図 10) を測定した。GOT は前後の値に大きな変化はみられず, GPT において上昇傾向が見受けられた。LDH は上昇した者が 2 例, ほとんど変化しなかった者が 3 例であった。

図 11 は, 同様に CPK の変動をみたものである。CPK の値には一定した傾向はみられず, 各個人においてもいくぶん変動はあるものの, 低下する傾向は示さなかった。図 12 は, ベスタチンを長期間投与した場合の CPK の動きをみたものである。外来患者 4 名に, ベスタチンを 60 mg/日

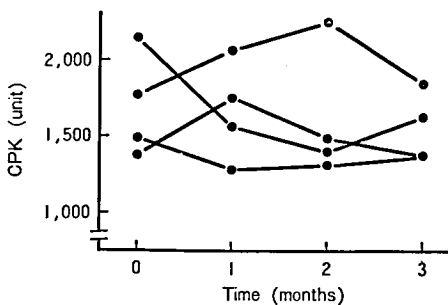


図 12 長期服用における CPK の変動。ベスタチン 60 mg/日を毎食後投与した 4 例の CPK を測定した。

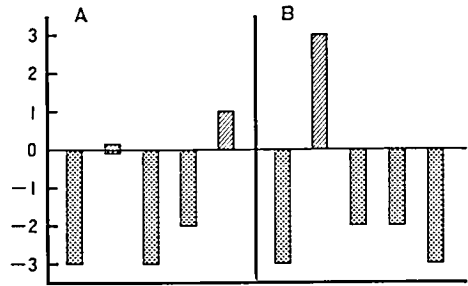


図 13 ADL に及ぼすベスタチンの効果。縦軸は服用後の ADL 値より服用前の ADL 値を差し引いた値である。60 mg/日を 1 週間投与した 5 例を A に, 漸増法を 4 週間行った 5 例を B に示す。

毎食後投与して CPK を測定すると, 2 ないし 3 カ月頃より CPK が低下してくる例がみられた。すでに図 5 に示したように, ベスタチンを 1 日 1 回早朝空腹時に隔月投与し, 7 カ月まで服用させた患者について, 血中濃度と CPK の動きに関し検討を加えたものが表 4 である。血中濃度が上昇し CPK も上昇している例数は, 投与期間が長くなるにつれて少なくなる傾向がみられた。一方, 血中濃度が上昇しているが CPK は低下してきた例数は, 5 カ月頃までは増加しつつあった。

図 13 は, 用量固定法および漸増法のそれぞれ 5 例につき, 服薬前後の ADL の値の変動をみたものである。1 週間投与した場合 (A), 軽快 1 名, 不変 1 名, 低下 3 名であり, 4 週間の漸増法 (B) では軽快 1 名, 低下 4 名であった。

副作用に関しては, 服用者 20 名中, 発疹 1 名, 悪心, 嘔吐 1 名であった。発疹は, 服薬 4 週目頃より体幹部にみられ, 服薬終了後に消失した。その性状は米粒大ないし大豆大の膨疹であったが, 掻痒感はなかった。悪心, 嘔吐は服薬ごとにみられたわけではなく, その因果関係は不明であった。

考 察

これまで, われわれはベスタチンの投与量, 投与法を吟味しながらその血中濃度を測定してきたが, 安定した血中濃度を得ることが困難であっ

た。今回、毎食後3回の分割投与を行うことにより、ベスタチンの増量に伴いその血中濃度も上昇し、また安定した血中濃度を得ることができた(図1)。これにより半減期を測定することが可能となり、ベスタチンは半減期の短い比較的吸収の速い薬物であることが推測された。また、その投与量により C_{max} を示す時間にずれがみられた(表3)。その原因として、一般的には、肝内薬物代謝に伴う血液中での薬物ターンオーバーの速度の変化が考えられる。しかし、漸増法5例の各投与量ごとの検査日の血中濃度を検討した結果、 C_{max} がすべて服用後30分ないし1時間にあり、正確にはベスタチン代謝物の増減をみないとわからないが、30分前後のずれからは薬物代謝の変化によるものとは考えにくい。また、半減期と体重当りの投与量の関係で、0.5 mg/kg 以上になると半減期が短くなることが推定された(図4)。このことは、体重当りの投与量が増加するに伴い C_{max} の値が上昇するのに比べて、投与後4時間での血中濃度の上昇はあまり高くなかったためと考えられる。これらの血中濃度の検討結果から、投与方法、投与量、投与期間について以下のことが考えられた。毎食後投与では夕食後投与から翌日の朝食後投与までに12時間以上のブランクがあり、ベスタチンの半減期が短いことも考え合せると、1日4回の分割投与がより有効と考えられる。また、毎食後3回投与では480 mg/日 まで増量するにつれて血中濃度が上昇しており(図2)、その上昇が飽和点に達するベスタチンの量を求めることも今後に残された課題の1つである。さらに、600 mg/日 7日間の短期間では各人の血中濃度にばらつきが大きいこと、また1日1回隔月投与方法よりも1日3回連日投与のほうが安定した血中濃度が得られたことより、ベスタチンの長期間服用

が必要と思われる。

一方、臨床効果を検討してみると、今回の投与方法において、GOT, GPT, LDH の漸増法前後の値に有意な差はみられなかったが(図9, 図10)、CPK の低下してくる症例がみられたことがわれわれの興味をひく点である(図11)。また、60 mg/日 毎食後投与においても、期間が2ないし3ヵ月になると CPK の低下する例がみられている(図12)。さらに、50~65 mg/日 1回投与においても、CPK が低下してきている症例が長期間服用により増加傾向を示している(表4)。このことは、臨床効果には、投与量や方法よりむしろ、期間を延ばすことがより重要であることを示唆しているとも考えられる。ADL の結果をみると、1週間から4週間という短期間では増悪する例のほうが多いが(図13)、長期間投与すれば改善する例あるいは進行が遅れる例がみられるかもしれない。ただし、投与期間が長期になると、病状の進行に伴う CPK の低下例がみられることより、可能な限り年齢や進行度を合せた対照群が必要であろう。

今後の課題として、ADL の検討も含め、血中濃度と年齢、肥瘦度、 C_x との相関をより詳しく検討することが残されている。

したがって、今後の方針として、副作用に注意しながらベスタチンの投与量を480 mg/日 よりさらに増量しつつ血中濃度の飽和点を見出し、その量の3ないし4分割投与による長期投与を行いながら臨床効果を判定したいと考えている。

本研究を行うにあたり、血中濃度を測定していただきました大倉洋甫教授に深謝致します。また、他の面で協力いただきました西別府病院 吉田祐三、植田博子、矢野恵子、守田和正、小園美昭の各氏に深謝致します。

進行性筋ジストロフィー症に対する ベスタチンの使用経験

福山幸夫*

研究協力者 大澤真木子*・宍倉啓子*・鈴木暘子*
陶山亜理子*・森本武彦*

目 的

アミノペプチダーゼBおよびロイシンアミノペプチダーゼの活性を拮抗阻害する作用をもつベスタチンの、進行性筋ジストロフィー症に対する治療効果につき臨床的に検討する。

対 象

東京女子医科大学小児科筋肉外来に通院中の Duchenne 型 10 名, Becker 型 3 名, 肢帯型 2 名, 先天型 5 名 (福山型 4, 良性型¹⁾ 1) の計 20 名である (表 1 参照)。Duchenne 型の症例 1 と先天型を除き, 全例階段昇降可能である。

投 与 方 法

原則として, 最初の 4 週間は図 1 に示すごとく漸増量に従い, 1 週間ごとに成人量の 60→120→240→480 mg 相当量を 1 日分として漸増投与し, 毎食後 30 分に分 3 で服用させた。480 mg 相当量に達したのちは最終量で維持した。この場合, 小児量の換算は

$$\text{小児薬用量} = \frac{(\text{小児の体重}) \times 1.5 + 10}{100} \\ \times \text{成人薬用量}$$

の式に従った。また, さらにその後副作用を認めない場合, 家族と合意のうえで 30 mg/kg/日まで増量した。この際, Duchenne 型の症例 10 は 15 mg/kg/日で投与したつもりであったが, 家族の誤解で 45 mg/kg/日で服用してしまい, すぐには減量したくないとの家族の希望もあり 5 週間同量で継続した。また, Duchenne 型の症例 8, 9, および LG 型の 2 例はプロトコールの手違いがあり, 投与方法が少々異なっている。

検 査 方 法

図 1 に示すごとく, 最初の 4 週間は 1 日目 (服用前), 7 日目, 14 日目, 21 日目, 28 日目に採血および一日採尿を行い, 血清中の LDH, GOT, GPT, CPK, アルドラーゼ, クレアチニン, クレアチン, カルニチン, ベスタチンの血中濃度, 尿中のクレアチン, クレアチニン, 3-メチルヒスチジンの測定を行った。その後は, 約 1 カ月間隔で同血清酵素を検討した。

運 動 機 能 評 価

投与開始前, 7 日目, 14 日目, 21 日目, 28 日目および, その後は約 1 カ月ごとに評価した。運動機能評価としては, 自覚症状 (転びやすさ, 活発さなど), 運動機能レベル, 20 m 走行時間, 20 m 歩行時間, 階段を昇る時間 (9 段), 片足立ち

* 東京女子医科大学小児科

表1 ベスタチン使用例一覧

Case	Dose and duration of bestatin												Clinical episode	Motor function		
	a : mg/day	b : mg/kg/day	c : matched adult dose	1w	1w	1w	1w	2d	2d	2d	3w	12w				
Duchenne type																
1. S. S. 1y2m VI ¹	a	15	3.4	7	60	120	192	192	0	60	120	192	240	26**	* Exanthema and fever ** Measles *** Anorexia **** Urticaria	Walk \bar{c} support ⊕ Stand up \bar{c} Support ⊕
	b	1.7	3.4	7	21*	42	84	84	0	7	14	21	26**			
	c	60	120	240	480	770	770	770	0	240	480	770	770	960		
2. S. S. 2y10m II-15 ¹	a	15	3.0	6.0	60	120	180	180	90	120	156	156	120	0	* Measles ** Anorexia *** Urticaria	Transient improv. (II-14→(II-15)→II-14→(II-15))
	b	1.5	3.0	6.0	12.0*	6.0	6.0	9.0	10.0	14**	10.0***					
	c	60	120	240	480	240	240	360	480							
3. D. N. 5y2m I-1 ¹	a	24	4.8	9.6	96	192	312	312	600	600	600	600	600		* Anorexia	(II-14→I-1→II-13)
	b	1.4	2.7	5.6	11.0	17.3	31.6									
	c	60	120	240	480	860	1,530									
4. S. S. 5y5m II-14 ¹	a	19.5	2.4	4.8	78	156	192	240	240	192	192	192	192		* Anorexia	(II-14→I-1→II-13)
	b	1.2	2.4	4.8	9.8	11.6	14.6*	11.6								
	c	60	120	240	480	590	740	590								
5. N. K. 5y9m II-15 ¹	a	20	4.0	8.0	80	160	160	320	320	384	384	384	384		* Anorexia * General malaise	Transient improv. Worse(?) (II-15)
	b	1.3	2.7	4.5	5.3	10.7	20.0	24.0*								
	c	60	120	210	240	480	960	1,130								
6. T. K. 6y2m I-2 ¹	a	30	6.0	12.0	120	240	300	390	390	600	600	600	600		(I-02→II-14→II-13)	Transient improv. (II-14→II-15)
	b	1.4	2.9	5.7	11.4	13.6	17.7	27.2								
	c	72	144	289	578	697	906	1,395								
7. T. A. 7y8m II-14 ¹	a	20	4.5	9.0	180	240	240	300	300	300	300	300	300		* Fever	Transient improv. (II-14→II-15)
	b	1.1	2.4	4.8	9.6	12.8	16.0									
	c	53	118	237	473	631	788									
8. N. Y.** 9y7m II-13 ¹	a	50	100	100	90	180	180	180	180	180	180	180	180		No change (II-15→II-13→II-14→II-13)	Transient improv. (II-13→II-14)
	b	2.3	4.6	4.1	8.7											
	c	117	234	210	438											
9. K. I.** 7y9m II-13 ¹	a	60	120	240	240	30	120	120	60	270	390	600	600		* Fever	Transient improv. (II-13→II-14)
	b	3.2	6.3	12.6	1.6	63	9	15.0	20	30	30	30	30			
	c	156	312	623	78	312	415	701	968	1,489						

進行性筋ジストロフィー症に対するバスタチンの使用経験

10. J. S.	a	30	1w →	60	2w →	90	2w →	120	4w →	60	8w →	120	5w →	270	4w →	1,170	5w →	750	**** Dose of drug were mistaken	Transient improv. (II-14→II-15)		
7y5m	b	1.3	2.5	3.8	5	2.5	5	10	45****	30												
II-14 ¹	c	67	132	198	265	129	252	568	2,463	1,675												

Becker

1. Y. K.	a	24	1w →	48	1w →	96	1w →	192	8w →	180	12w →								No change (I-1)		
6y3m	b	1.2	2.4	4.8	9.5	9.4															
I-1 ¹	c	60	120	240	480	450															
2. K. K.	a	30	1w →	60	1w →	120	1w →	240	8w →	300	4w →	450	5w →	480					* Eczema sebaceum (I-1)		
10y3m	b	1.0	2.0	4.0	7.9	9.9*	14.8	15.8													
I-1 ¹	c	55	109	218	436	545	818	873													
3. Y. I.	a	39	1w →	78	1w →	180	1w →	360	11w →	390									No change (I-1)		
13y2m	b	1.1	2.2	5.2	10.3	11.2															
I-1 ¹	c	62	125	288	576	624															

LG

1. D. S. **	a	60	1w →	120	2w →	30	4w →	120	7w →	210	3w →	300	2w →	390	8w →	600			* Headache (II-13→I-1→II-13)	
8y11m	b	2.9	5.8	1.5	5.8*	10**	15	18.6***	29.4											** Nausea
II-13 ¹	c	147	293	73	293	506	723	940	1,478											*** Epigastralgia
2. O. H. **	a	60	1w →	120	1w →	40	9w →	90	4w →	180	4w →	360	8w →						* Abdominal pain (II-13)	
11y0m	b	1.6	3.2	1.1	2.3	4.6	9.2*													
II-13 ¹	c	88	175	58	131	263	526													

CMD

1. M. K.	a	19	1w →	39	1w →	78	1w →	156	3w →	192	6w →								* Fever (I-2)	
2y2m	b	1.9	4.0	8	16	21*														
I-1 ²	c	78	160	320	640	787														
2. R. T.	a	60	1w →	120	2w →	240	2w →	300	8w →										Standing ⊖ support in bath ⊕	
2y10m	b	5.5	11	22	26															
I-4 ²	c	244	480	960	1,200															
3. H. O.	a	19	1w →	39	1w →	78	1w →	156	8w →	192	12w →	0							* Fever (I-2)	
8y8m	b	1.4	3	6	11*	14**														** Vomiting and fever
I-2 ²	c	61	125	251	503	619														No change, worse(?)

Case	Dose and duration of bestatin			Clinical episode	Motor function					
	a : mg/day	b : mg/kg/day	c : matched adult dose							
4. Y. O. 9y 11m	a	19.5 $\xrightarrow{1w}$ 39 $\xrightarrow{3w}$ 78 $\xrightarrow{2w}$ 156 $\xrightarrow{4w}$			Body weight gain (I-2)					
	b	1.4	3	6	11					
	c	64	128	257	513					
5. H. K. 2y 5m	a	15 $\xrightarrow{1w}$ 30 $\xrightarrow{1w}$ 63 $\xrightarrow{1w}$ 129 $\xrightarrow{1w}$ 96 $\xrightarrow{2w}$ 120 $\xrightarrow{4w}$ 196 $\xrightarrow{3w}$ 240 $\xrightarrow{8w}$				Subjective improv.				
	b	1.5	3	6	11*	10	12	18**	21**	* Fever
	c	57	113	226	426	362	452	740	906	** Fever and urticaria

1 運動機能レベル, 筋ジストロフィー症 (祖父江班) 機能障害プロジェクチーム案 (下表; 文献 2) 参照) を用いた.

<歩行可能>

- 階段昇降可 {手の介助なし}..... I-1
- 手すり不要 {手の膝おさえ}..... I-2
- 階段昇降可 {片手手すり}..... II-13
- 手すり要 {片手手すり・手膝}..... II-14
- 椅子から起立可..... II-15
- 歩行可能..... III

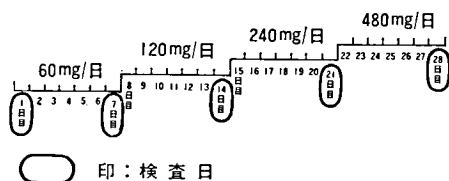
<車の生活>

- 四つ這い可..... V
- 四つ這い不能・いざり可..... VI
- 座位保持可..... VII
- 座位保持不能..... VIII
- <車椅子の生活>
- 車椅子上ADL 独立 (移動を含む)..... V
- 車椅子上ADL 介助要..... VI
- 車椅子作動可・背部支持要..... VII
- 寝たきり全介助..... VIII

2 上田による先天型進行性筋ジストロフィー症用の運動機能レベルを用いた.

進行性筋ジストロフィー症に対するベスタチンの使用経験

漸 増 法



検査スケジュール

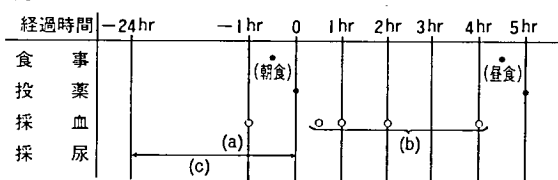


図 1 投薬法および検査スケジュール.

保持時間, 上肢挙上保持 (180°) 時間, 下肢挙上保持 (90°) 時間, 寝返り, 臥位→座位時間, 臥位からの立ち上がり時間, ジャンプ力, 肺機能, ピンチメーターによるピンチ力測定, 腱反射の有無, などである. 歩行不能な先天型あるいは preclinical Duchenne 型 (症例 1) では, いざり這いのスピード, つかまり立ち保持時間など, 適宜項目を変更して評価した.

副作用の評価

皮膚症状, 消化器症状, 精神症状, 体温などの一般状態, 血液一般, 血液生化学所見につきチェックした.

評価法

Duchenne 型の症例 3 は最初の 4 週間は入院で評価したが, 他の症例は全例最初の 1 週間のみ入院で評価し, その後は外来で評価した.

結 果

1. 全症例の運動機能レベルの変化

表 1 右端の欄に示すごとく, 全経過を通して明

らかな運動機能の獲得, 改善を示したのは Duchenne 型の症例 1 (preclinical case) と先天型の症例 1, 2, 5 のみであった.

Duchenne 型では, 症例 4, 8 が全経過を通じて軽度運動機能レベルの改善がみられた, 他の症例では, 一時的に次に述べる起立時間や, 走行時間の改善をみたものもあったが, 機能レベルとしては使用前の機能レベルより低下していた.

Becker 型, LG 型では, 一過性にやや機能レベルの上昇した 1 例を除き運動機能レベルの変化はなく, また走行時間や起立時間などについてもほとんど変化がみられなかった.

先天型では, 前述の運動機能上昇期¹⁾にある症例 1, 2, 5 では多少の機能の改善があったが, 運動機能下降期¹⁾にある症例 3, 4 では明らかな運動機能の改善は認められなかった. しかし, 症例 4 では過去 1 年間体重が減少傾向にあったものが増加し, 活気が出てきたという.

2. Duchenne 型筋ジストロフィー症の投与前後の変化について

1) 運動機能

種々の項目につき検討したが, 起立時間, 20 m 走行時間 (走行といっても Duchenne 型では速

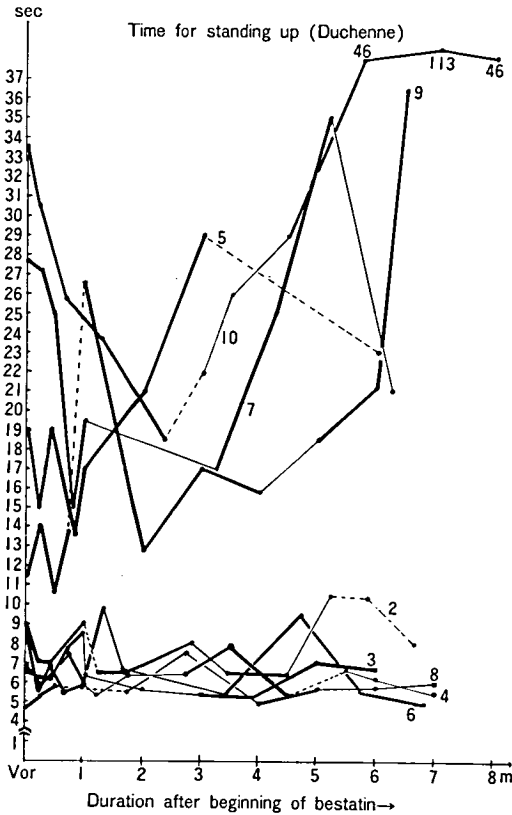


図 2 床からの立ち上がり時間のベスタチン投与前後の変化。太い実線は左方の測定点より右方の測定点へ移る間に薬の量がふえていることを示し、細い実線は薬が同量で維持されたことを示す。点線は薬が減らされたことを意味する。図 3 についても同様の表現法を用いた。

歩のような状態となる) が最もばらつきが少なく信頼性があると思われるので、この 2 項目につき述べる。

a) 床からの起立時間 (図 2)

ベスタチン開始前には、仰臥位から 10 秒以内に起立可能な例 (症例 2, 3, 4, 6, 8; 2 歳 10 カ月 ~ 6 歳 7 カ月) と 10 秒以上要する例 (症例 5, 7, 9, 10; 症例 5 を除き全例 7 歳以上) とあった。図 2 をみても明らかなように、症例 3, 6 を除き初期に一過性ながら起立時間の短縮が認められた。とくに、症例 10 では投与開始前 33 秒であったのが、5 mg/kg/日 (成人換算量 120 mg) を服用後 18 秒 5 に短縮していた。しかし、その後 2.5 mg/kg/日に減量したのちは徐々に延

長し、最終観察時には 46 秒もかかるようになり、なおかつ何かものにつかまらなければ立てなくなっている。同様に、症例 7 でも開始前 27 秒 9 であったのが、4.8 mg/kg/日 (成人換算量 120 mg) に 15 秒と短縮した。しかし、これも一過性である。

症例 5 はやや特異である。開始前の起立時間が 19 秒であったものが、第 2, 第 3 週には軽度短縮 (13~15 秒) した。しかし、その後増量とともに再び延長し、24 mg/kg/日投与後には 28 秒に至った。その後 1 カ月に、食欲不振、感染に伴う全身倦怠感のため家族が勝手に服薬を中止し、中止後 1 カ月半で測定したタイムは 22 秒と再び短縮していた。

10 秒以内に起立可能であった症例 4, 6 では、投与前に比し、最終観察時には平均 2 秒 6 短縮している。

b) 20 m 走行時間 (図 3)

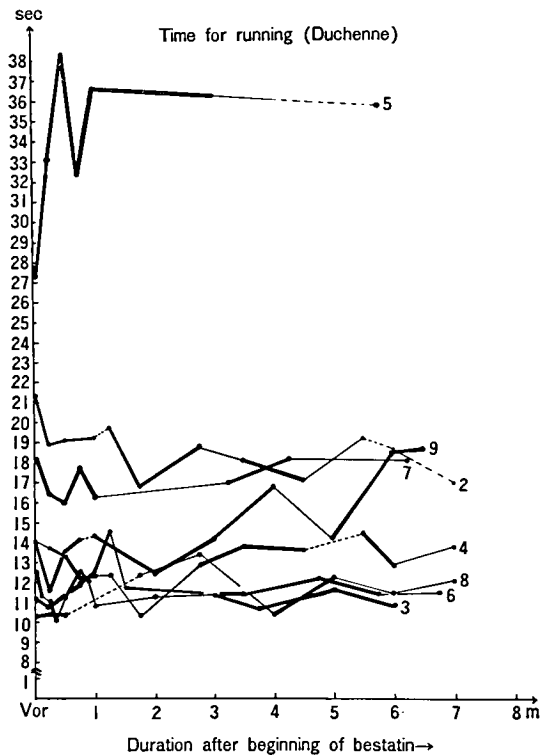


図 3 20 m 走行時間。

進行性筋ジストロフィー症に対するベスタチンの使用経験

症例5, 6, 8を除き初期に一過性の改善が認められる傾向にあり, 症例3, 4では最終観察時に, 開始前より平均2秒早くなっている.

2) 検査所見

a) 血清クレアチンホスフォキナーゼ (CPK) 値

図4に示すごとく, 症例3を除く全例で, 投与開始1, 2, 3週は低下傾向を示した. その後は, 開始前値より高い値を示すものも低い値を示すものもあった. 症例10は開始前5,220 mU/mlであったものが, 45 mg/kg/日服用しているときにはその1/5の値の1,016 mU/mlまで低下していた.

b) 尿中 3-メチルヒスチジン/クレアチニン比
尿中の 3-メチルヒスチジンは主として筋肉由来

来といわれ, 筋肉崩壊の目安となるといわれている. 筋ジストロフィー症では全身の筋量が減少していると考えられるので, 3-メチルヒスチジン/クレアチニン比を出して全身の筋量に対する筋崩壊の指標とした.

今回の研究では, とくに投与開始4週間までの間, 1週間ごとに蓄尿を行い分析を試みた. しかしながら, 蓄尿が失敗に終る例もあり, 開始前値から値を得られたものは5例のみであった.

このうち3例(症例2, 4, 8)では, 前値より4週間目の値のほうが低かったが, 2例(症例5, 7)ではむしろ増加していた. 開始前値と1, 2, 3, 4週目の値を比較したが, 有意な差はなかった(図5).

ベスタチンの投与量(/体重/日)と3-メチルヒ

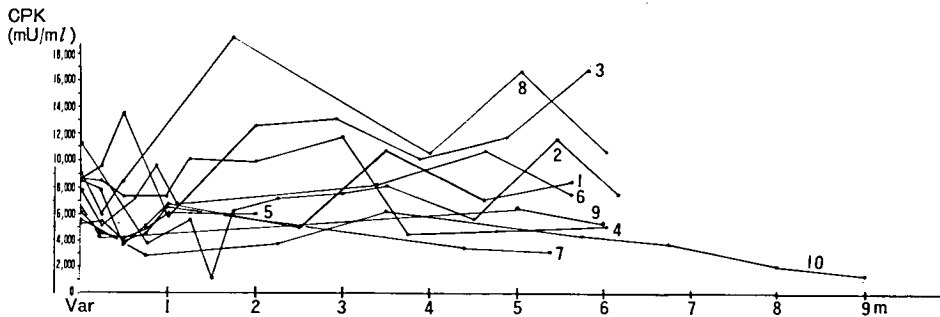


図4 CPKの変化. 横軸には投与開始後の期間(月)がとってある.

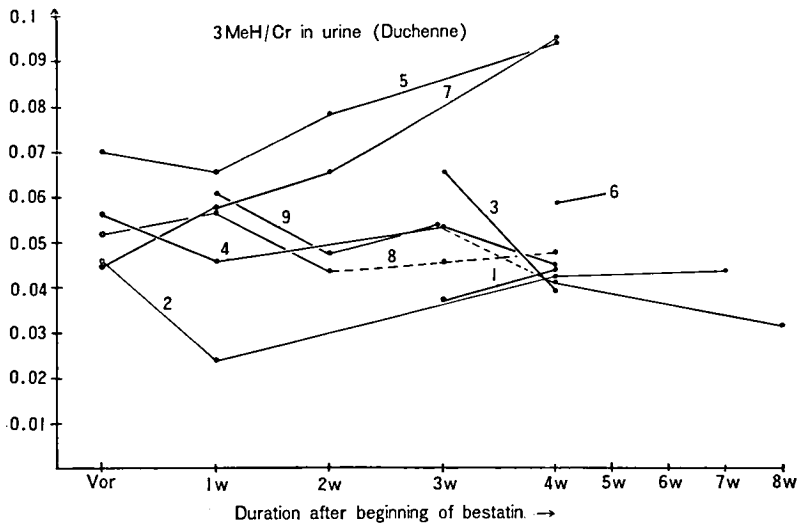


図5 3-メチルヒスチジン/クレアチニン比のベスタチン投与後の変化.

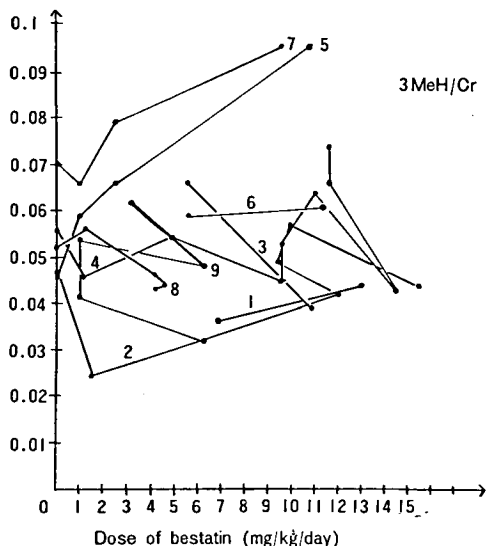


図 6 3-メチルヒスチジン/クレアチニン比の体重当りベスタチン投与量 (mg/kg/日) との関係.

スチジン/クレアチニン比を比べてみても、特別な関係は得られなかった (図 6).

3) Duchenne 型筋ジストロフィー症 2, 3 の例について

a) 運動機能獲得を示した preclinical Duchenne (症例 1) について (図 7)

本症例は、新生児期に黄疸が強かったため血清

中の GOT, GPT が測定され、その高値のために乳児肝炎として他院で経過観察中であった症例である。たまたま血清 CPK 値高値が発見され、当院に転科してきた。定額 3 カ月、座位保持 8 カ月で、投与開始直前 1 歳 2 カ月の状態で移動はいざり這いにより、つかまり立ちが 10 秒可能であったが、四つ這いや stand up with support は不能であった。投与開始 1 カ月後 (1 歳 3 カ月) にはつかまり立ちが 20 分くらい可能となり、2.5 カ月後 (1 歳 4 カ月) にはつたい歩きが可能となり、5 カ月半後 (1 歳 7.5 カ月) には stand up with support が、また 1 歳 8 カ月現在 10 秒くらい一人立ちが可能である。

血液検査所見では、CPK, GOT, アルドラーゼともに 2 週目に一過性に減少傾向を示したが、その後は元の値に戻っている。

ベスタチンの量を 21.5 mg/kg/日に増加したところで発熱、発疹が出現し、咽頭発赤その他の感染徴候がなかったため薬疹を疑い、投薬を中止した。その後 2, 3 日で発疹は消失したが、この投薬を中止してから非常に元気がなくなり、機嫌が悪く食欲も悪かったという。1 週間の休薬のち

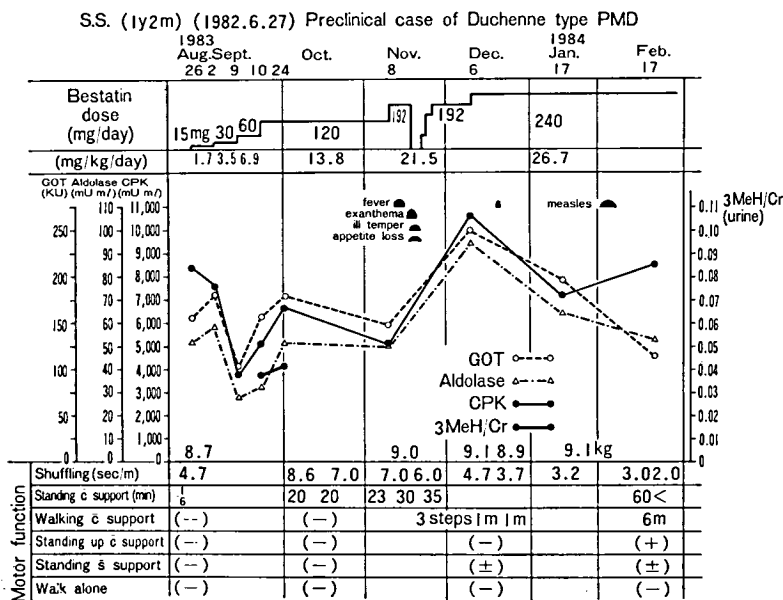


図 7 ベスタチンの投与中に運動機能獲得を示した preclinical Duchenne の 1 例 (症例 1).

進行性筋ジストロフィー症に対するベスタチンの使用経験

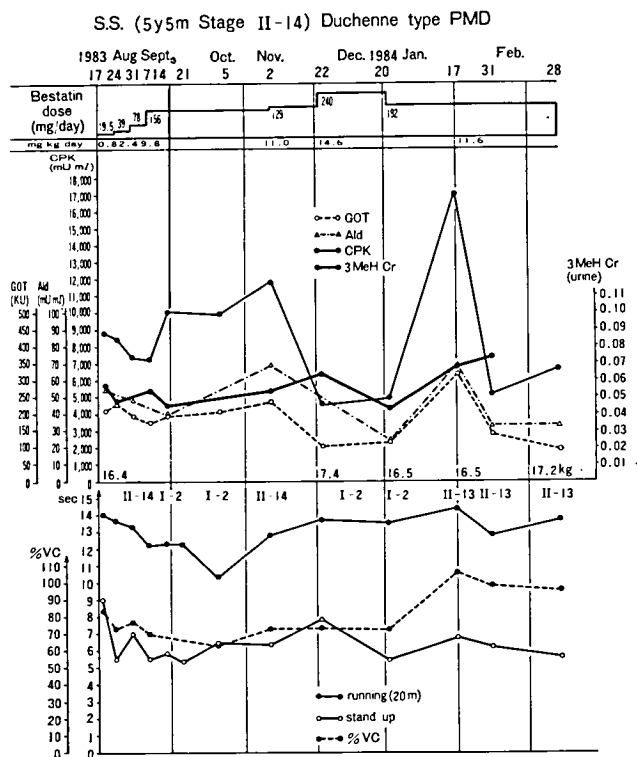


図 8 一過性に運動機能レベルの改善のみられた症例。

再び少量ずつ投与したが、著変なく、また食欲も出て元気もよくなったという。

b) 一過性に運動機能レベルの改善のみられた症例 (症例 4) (図 8)

母親の兄弟に筋ジストロフィー症の患者がおり、母の姉妹の遺伝相談からこの患児を発見し、2歳10カ月より経過をみている症例である。ベスタチン開始前は、階段を昇るのに片手は手すりにつかまり、片手は膝に手を置く状態 (II-14) であった。投与開始後1カ月の状態で階段を昇るのを観察したところ、手すりも使わず、片手の膝おさえのみ (I-2) でさっさと昇っていった。この時期には、走行時間も起立時間も軽度短縮していた。その後同量 (9.8 mg/kg/日) で薬を続けていたが、寒くなると同時に、階段上昇に片手手すりと片手膝おさえを必要 (II-14) とするようになった。薬を 14.6 mg/kg/日まで増量して投与し、1カ月経過したときには、再び手すりなしで階段を昇ることができる (I-2) ようになり、起立時間も短縮

していた。しかしながら、食欲不振があり、体重も減少していたので、増量前の量に戻した。その後再び手すりを必要とするようになったが、機能レベルとしては II-13 にとどまっている。また、%肺活量も、投与開始前 80% であったのが 95% に増加している。

血清 CPK, GOT, アルドラーゼの動きをみると、投与開始後初期に一過性に減少し再び増加しているが、11~14.6 mg/kg/日投与中にはやや低下している。また、14.6 mg/kg/日から 11.6 mg/kg/日に減量投与したのち1カ月の時点では、逆に増加している。

尿中 3-メチルヒスチジン/クレアチニン比については、14.6 mg/kg/日投与後1カ月の時点でやや低下したが、他はほとんど変化がない。

c) 一過性に改善傾向を示したが、中止後3日目に最悪の状態を示し、中止後1カ月半には無投薬のまま改善を示した症例 (症例 2) (図 9)

症例 4 の弟である。座位保持 8 カ月、歩行開始

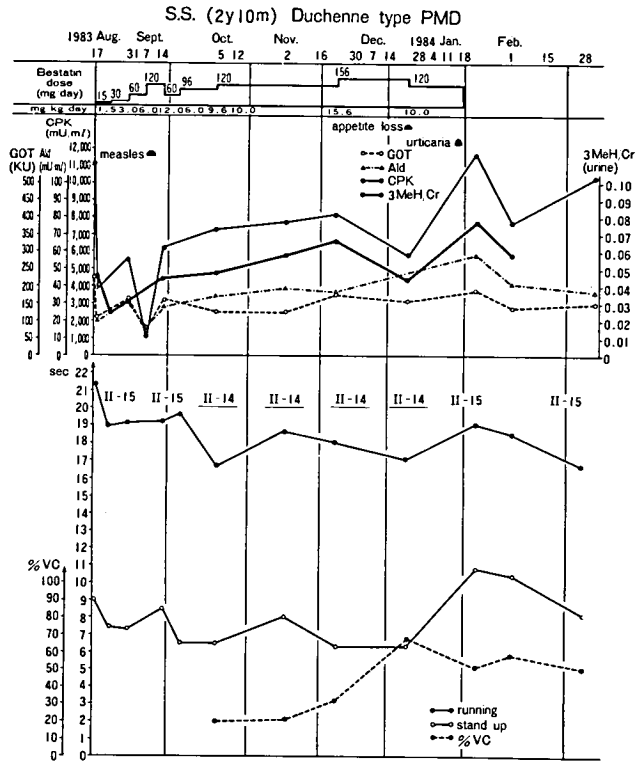


図 9 一過性に改善傾向を示したが中止後3日目に最悪の状態を示し、中止後1カ月半には無投薬のまま軽度改善を示した例(症例2)。

1歳6カ月である。2歳10カ月現在走れず、階段は四つ這いで昇る。投与開始後走行時間、立ち上がり時間ともに短縮し、1カ月半後には階段を昇るのに片手手すり、片手膝おさえ(II-14)で昇るようになり、改善をみた。15.6 mg/kg/日で投与したあとが最もよい状態にあったが、食欲不振があったため10 mg/kg/日に減量した。3週間くらいで蕁麻疹が出現したため、親が勝手に薬を中止して、3日目に来院した。この時点で階段昇降は四つ這いで可能、走行時間も起立時間も延長していた。この状態が自然の経過なのか、薬を急激に中止したことの影響なのか、寒さの影響か、多量投与が悪影響を与えたのか不明であったので、そのまま無投薬で経過をみることにした。投薬中止後2週間および1カ月半に観察したところでは、走行時間も起立時間も中止後3日目の状態に比べると短縮し改善を示していた。運動機能レベルに

については変化がなかった。

血清 CPK, GOT, アルドラーゼについては軽度低下している。ことに CPK についてみると、開始前 11,000 mU/ml あったものが、開始後から4カ月までの間は、6,000~7,000 mU/ml 程度に落ち着いており、また 15 mg/kg/日投与していたあとは、5,770 mU/ml とやや低下している。その後、服薬中止後3日目の採血では、11,716 mU/ml と上昇している。この患児においては、尿中の3-メチルヒスチジン/クレアチニン比は血清 CPK と並行して動いている傾向にあったが、開始前の値より低下していたのは1週間のみであった。

3. 先天型筋ジストロフィー症で運動機能獲得のみられた症例について

a) 福山型の1例(症例2)(図10)

福山型先天性筋ジストロフィー症2歳10カ月

進行性筋ジストロフィー症に対するベスタチンの使用経験

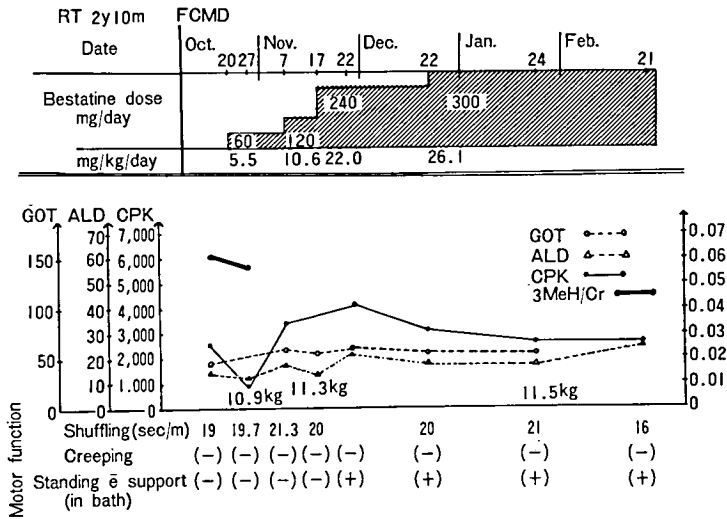


図 10 運動機能の獲得を示した福山型先天性筋ジストロフィー症の 1 例。

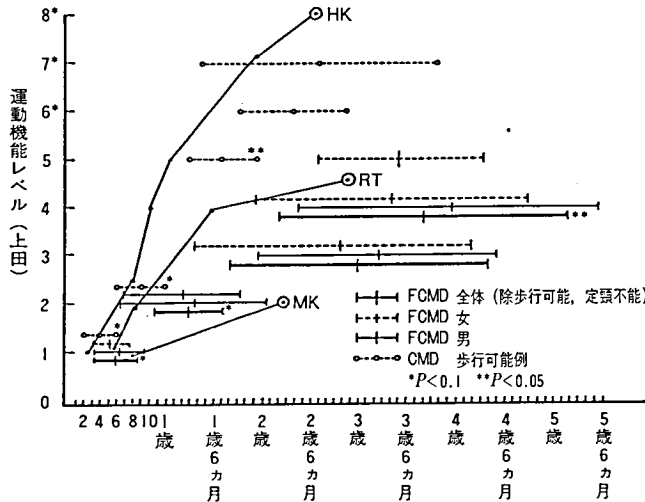


図 11 先天性筋ジストロフィー症における運動機能獲得歴とベスタチン使用例の運動機能獲得歴との比較。●はベスタチン使用開始前にそのレベルに到達したことを示し、◎はベスタチン使用開始後に到達したことを示す。図中 HK は症例 5 の良性先天型、RT は症例 2、MK は症例 1 で、ともに福山型である。

の症例で、いざり這い移動は可能であったが四つ這い不能、つかまり立ち不能であった。ベスタチン投与開始後 1 カ月頃より、浮力の助けを借りれば湯舟の中でつかまり立ち可能となった。いざり這いのスピードはあまり変化がなかった。血清 CPK は入院 1 週間目に軽度低下したが、GOT、アルドラーゼはほとんど変化がない。

b) 他の先天型筋ジストロフィー症の運動発達歴と比較して (図 11)

図 12 に示したのは、東京女子医大小児科筋肉外来において経験した先天型筋ジストロフィー症の運動機能獲得歴の平均±S. D. である。症例 1 (M. K.) は、2 歳になっても座位保持可能とならず、生涯定額のみで終る可能性もあると危惧して

いた症例であるが、ベスタチン服用を開始した翌日より数秒ずつ座位保持可能となり、現在は30～40分可能である。

症例2 (R. T.) は、1歳5カ月でいざり這い可能となっており、福山型の女児例としてもともと運動機能獲得の早い症例であった。「四つ這い可能もしくはつかまり立ち可能」が次の目標とする獲得機能である。ベスタチン投与開始後、湯舟の中ではつかまり立ち可能となったが、四つ這いは不能であり、レベル4と5の間と考えるべきであろう。

症例5 (H. K.) は、ベスタチン開始前より2、3歩独歩可能であり、良性先天性筋ジストロフィー症と考えられる症例である。ベスタチン開始後歩行の安定化、スピード化をみた。2歳8カ月より両手で手すりにつかまり、すべり台の階段を昇るようになった。著者らの経験では、良性先天型で階段昇降可となったのは、これまで1例のみ(4歳10カ月で獲得)である。

4. 副作用

表1の clinical episode の欄に、ベスタチン服用中に起った、患児にとって不利な episode を記してある。この際、体重当りのベスタチン量の欄 (b) にその episode が生じた時期を*印で記した。これらの episode の中で、発熱はほとんどの場合上気道感染の徴候を伴っており、ベスタチンとは因果関係がないと思われる。ベスタチンのために生じたと思われるのは消化器症状で、Duchenne の症例2, 4, 5, LG 型の2例でみられた。このときの投与量は10～24 mg/kg/日である。これら消化器症状は軽いもので、減量または消化剤投与で消失している。ベスタチンを中止した症例は3例いた。1例は前述の Duchenne の症例2で、蕁麻疹が出たために両親が服薬を中止してきた症例である。中止したのちも蕁麻疹が出没しており、ベスタチン以外の原因が考えられる。両親はベスタチン再投与を希望しているが、前述の理

由で無投薬のまま経過を観察中である。

2例目は Duchenne 型の症例5で、新生児～乳児期に先天性筋炎の診断名で他院においてステロイド剤を投与されていた例で、年齢(5歳9カ月)のわりに運動機能レベルが落ちている症例である。24 mg/kg/日で投与して2週間目頃より食欲不振があり、ごろごろと横になってばかりいたという。たまたま母親のお産で祖母がみていたが、感染罹患も重なり、感冒薬をのませるためにベスタチンを中止したところ、翌日から元気に動き回るようになったという。以後、この例には投薬を行っていない。

3例目は、先天型の症例3である。ベスタチン投与中に上気道感染があり、高熱が出たために、解熱剤(潰瘍の合併がしばしば報告されているもの)を併用投与した。3日目より食欲不振、嘔吐があり、少量の吐血を伴ったため、直ちにすべての薬剤の経口投与を中止した。翌日からは嘔吐も消化管出血もみられないが、この症例にはベスタチンを再投与していない。

ベスタチン服用中に麻疹に罹患した症例が2例あったが、その症状、経過とも平均的なものであった。

考案

ベスタチンは、アミノペプチダーゼBおよびロイシンアミノペプチダーゼの活性を拮抗阻害する作用をもつと同時に、細胞表面に結合する。この結果に基づいて免疫増強剤として開発されている。筋ジストロフィーマウスおよびニワトリの筋肉内のアミノペプチダーゼ活性が正常群に比して異常に上昇していることが明らかになったことから、本剤が筋ジストロフィー症の治療薬として使用されるようになった³⁾。また、ジストロフィーマウスの実験では、血清酵素の減少、体重増加、および金網よじ登り実験による筋力回復が報告されている。この場合、発症初期に投与開始することが

重要であるという⁴⁾。

今回のわれわれの使用経験では、明らかな運動機能の改善がみられたのは、preclinical Duchenne の1例(症例1)と運動機能上昇期にある症例1, 2, 5の4例のみであった。preclinical Duchenne の症例1では、つかまり立ち保持時間の延長、つたい歩きの獲得、stand up with support が可能となって、明らかに運動発達がみられた。しかし、1歳8カ月現在まだ独歩不能であり、Duchenne 型一般の運動発達歴で独歩開始の年齢が1歳5.82カ月±5.78カ月である⁵⁾から、それに比し早いとはいえず、ベスタチンの効果によるのか自然の発達なのか判断できない。むしろ、後者の可能性のほうが強いであろう。

先天型の3例についても、やはり自然の運動発達である可能性が強い。

軽度運動機能の改善のみられた症例4は、最もベスタチンの効果を感じさせる症例である。しかし、その弟(症例2)は、ベスタチン14mg/kg/日で投与しているときに最良の状態であったが、10mg/kg/日に減量し、しかも蕁麻疹のために中止して3日経過したときには運動機能も悪く、その後休養1カ月で評価したところ、無投薬の状態でありながら走行時間も起立時間も改善している。ほかにも減量直後に悪い状態を示した症例(9, 10)があることから、減量による一過性の反動現象のようなものがあるのかもしれない。しかし、その後無投薬のまま状態がよくなっているということは、他の例の運動機能改善の判断にも慎重を要するということになる。本症例ではもうしばらく無投薬で運動機能を評価し、悪化傾向がみられるようならば再投与して評価するつもりである。

全経過を通しての運動機能は悪化傾向にあっても、投与開始後間もない時期に、一過性に起立時間、走行時間の改善をみた症例が多かった。症例2のように無投薬でも改善傾向を示す例もあるので、一概にはいえないが、ベスタチンによる一時的改善と考えたい。松下らも、筋ジストロフィー

にベスタチン20mg/kg/日の治療開始後1~2週で筋力の回復がみられたが、3週目からは再び元の状態に戻ったと報告している⁶⁾。著者らの経験では、使用開始後3週目頃までの改善傾向が目立っているのだから、投与量をふやしすぎないほうがよいのかもしれないが、中には減量により悪化し始め、増量により再び改善したものもあり(症例9)、現在のところ理由は判明しない。今後、

1) 長期投与した場合、生体側に慣れの現象が生じて効果が出なくなるのか。これは量に関係するか否か。

2) 至適投与量は体重1kg当りどれくらいなのか。また、その量を超えて投与した場合、むしろ悪化する可能性があるのか。

3) 減量または中止したのちに反動現象がみられる可能性があるのか。また、その理由は何かなど、解明してゆくべき問題がある。

検査所見では、血清CPK, GOT, アルドラーゼなどが一時的に減少を示した症例が多かった。最初の1週目は入院中に測定したので、より安静が保たれ、低値を示したともいえるが、2週目以後の値については入院、外来は無関係である。また、45mg/kg/日で投与した例では明らかな低下がみられ、膜の安定性に本剤が関係していることがうかがわれる。

結 語

1) 進行性筋ジストロフィー症20名に対してベスタチンを経口投与し、その効果につき検討を加えた。

2) Duchenne 型筋ジストロフィー症のpreclinical case および運動機能上昇期にある先天型の3例ではベスタチン投与中に運動機能獲得をみたが、Duchenne 型、先天型の平均的経過に比べて明らかによいとはいえなかった。

3) 一過性に運動機能の改善や血清酵素の低下がみられる例が多かったが、6カ月全体を通して

みると、運動機能が低下する傾向にあった。

4) 運動機能評価は、走行時間、起立時間、階段昇降時間が最も適切な方法と思われた。

文 献

- 1) 大澤真木子, 鈴木暘子, 福山幸夫. 先天型進行性筋ジストロフィー症(福山型)の遺伝・臨床・病理. 神経進歩, **24**, 702-717 (1980).
- 2) 福山幸夫, 高柳哲也, 松家 豊, 佐藤 元, 野島元雄, 上田 敏, 伊藤文雄, 和田正士, 三吉野産治, 深津 要, 大澤真木子. プロジェクト II 機能障害の進展過程と臨床評価の基準化(班長: 祖父江逸郎). 厚生省神経疾患研究委託費. 筋ジストロフィー症の疫学, 臨床および治療に関する研究. 昭和 57 年度報告書, 昭和 58 年 3 月, pp. 25-38.
- 3) 梅沢浜夫. 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. 厚生省新薬開発研究費. 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究(梅沢班). 昭和 55 年度研究報告書, 昭和 56 年 3 月, pp. 3-14.
- 4) 松下 宏, 辻 繁勝. 筋ジストロフィーマウスにみられる種々な酵素活性変動に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響. 同上, pp. 55-61.
- 5) 福山幸夫, 高柳哲也, 松家 豊, 佐藤 元, 野島元雄, 上田 敏, 伊藤文雄, 和田正士, 三吉野産治, 深津 要, 大澤真木子. 機能障害の進展過程の基準化. 厚生省神経疾患研究委託費. 筋ジストロフィー症の疫学および治療に関する研究(班長: 祖父江逸郎). 総合班会議, 昭和 58 年 12 月, 東京.
- 6) 松下 宏, 辻 繁勝. ハムスター筋ジストロフィー症に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響. 厚生省新薬開発研究費. 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究(梅沢班). 昭和 56 年度研究報告書, pp. 51-56.

筋疾患に対するベスタチンの効果に関する臨床的研究

I. 神経筋疾患におけるベスタチン投与後の尿中アミノ酸の変動

木下真男*¹

研究協力者 山田信興*¹, 岩崎泰雄*¹, 馬場繁二*¹, 仁科牧子*¹

今回、われわれは、ベスタチンの神経筋疾患に与える影響について、客観的かつ定量的に薬効判定を行う目的で、血中ベスタチン濃度と血清CPKをはじめとする種々の血清酵素を測定して検討を行った。さらに、筋線維蛋白代謝の指標となる尿中3-メチルヒスチジンを測定して、ベスタチン投与による影響についても検討を行った。

対象および投与方法

ベスタチン投与を行った患者は、男性7例、女性3例の10名で、平均年齢は38.6歳であった。その内訳は、多発性筋炎3例、皮膚筋炎1例、肢帯型ジストロフィー症1例、顔面肩甲上腕型ジストロフィー症1例、脂肪蓄積性ミオパチー1例、scapulo-peroneal ミオパチー1例、筋萎縮性側索硬化症2例で、全例が筋力低下および筋萎縮を示していた。

投与方法は、ベスタチン60mgより漸増法にて1週ごとに倍量とし分3投与、480mgを維持量とした。投与期間は4週から5週であった。

これらの患者のうちでステロイドを併用したのは、多発筋炎2例、皮膚筋炎1例、scapulo-peroneal ミオパチー1例の4例であったが、各症例においてベスタチン投与期間中は一定量とした(表1)。

表1

Name	Age	Sex	Diagnosis	PSL	Urinary 3-MH
T. T.	53	F	PM	+	↓
T. Y.	32	M	PM	+	↑
U. M.	26	M	PM	-	N
T. K.	44	F	DM	+	↓
J. H.	34	M	LG	-	N
S. K.	43	M	FSH	-	N
T. U.	36	M	LSM	-	N
A. S.	30	M	SPM	+	N
K. N.	37	M	ALS	-	↓
T. O.	51	F	ALS	-	N

尿中3-メチルヒスチジンは投与前の値を示す。

結 果

1) 尿中3-メチルヒスチジンの変化

尿中3-メチルヒスチジン(正常値:180~390 $\mu\text{mol/day}$)がベスタチン投与前に正常より低値を示したのは3例で、筋疾患では多発筋炎172.2 $\mu\text{mol/day}$ と皮膚筋炎146.6 $\mu\text{mol/day}$ であり、神経疾患では筋萎縮性側索硬化症74.1 $\mu\text{mol/day}$ であった。逆に、投与前に高値を示したのは、多発筋炎419.4 $\mu\text{mol/day}$ であった。その他の6例においては、ベスタチン投与前の尿中3-メチルヒスチジンは正常であった(表1)。

筋疾患患者5例における尿中3-メチルヒスチジンの変動では、ベスタチン投与により、多発筋炎とscapulo-peroneal ミオパチー患者で2、3週に一時高値を示したが、4週に投与前と同程度

*¹ 東邦大学医学部第四内科

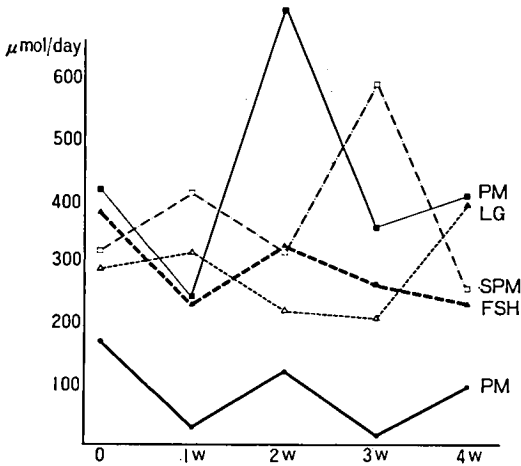


図 1 筋疾患患者における尿中 3-メチルヒスタミンの変動。

の値となった。

別の 1 例の多発筋炎患者においては、ベスタチン投与前に正常値よりやや低い値を示していたが、投与により低下傾向を示した。この症例については後述する。

その他の 2 例においては、ベスタチンの投与によって有意な変化は認めなかった (図 1)。

神経疾患患者における尿中 3-メチルヒスタミンの変動は、1 例の筋萎縮性側索硬化症患者では 1, 3 週に低下を認めたが、4 週にはベスタチン投与前と同程度となり、他の 1 例ではベスタチン

投与前より正常値下限の半分以下の $74.1 \mu\text{mol/day}$ と低値を示し、投与によっても変動を認めなかった (図 2)。

2) 血清酵素の変化

10 例のうち、明らかに GOT, CPK が低下したのは多発筋炎 1 例であったが、この症例についてはのちに提示する。

その他の 9 例中、GOT のみが低下したのが皮膚筋炎患者で、45 I. U. から 22 I. U. と低下した。CPK のみが低下傾向にあったのは多発筋炎と脂肪蓄積性ミオパチーの 2 例で、それぞれ 826 I. U. が 615 I. U., 3,750 I. U. が 2,950 I. U. であった。また、逆に CPK が上昇傾向にあったのは肢帯型ジストロフィー症患者で、629 I. U. が 1,000 I. U. となった。

血清酵素に変化をみた患者のうちステロイドを併用したのは、多発筋炎と皮膚筋炎の 2 症例であった。

その他の患者においては、有意な変化を認めなかった (表 2)。

3) 血中ベスタチン濃度の変化

ベスタチン投与により血中濃度の上昇を示したのは 8 例で、残りの 2 例については、一部で測定

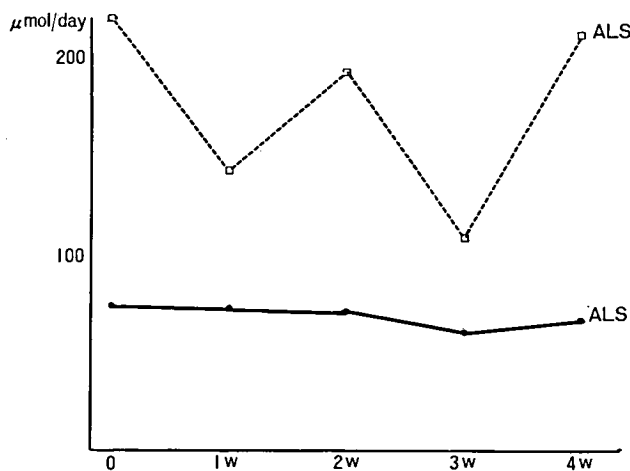


図 2 神経疾患患者における尿中 3-メチルヒスタミンの変動。

筋疾患に対するベスタチンの効果に関する臨床的研究

表 2 ベスタチン投与による酵素および血中ベスタチン濃度の変化

	GOT	LDH	CPK	Urinary 3-MH ($\mu\text{mol/day}$)	Serum bestatin level (ng/ml)
T. T. (PM)	↓	~	↓	↓	↑
T. Y. (PM)	~	~	~	~	↑
U. M. (PM)	~	~	↓	~	?
T. K. (DM)	↓	↓	~	~	↑
J. H. (LG)	~	~	↑	~	↑
S. K. (FSH)	?	?	~	~	?
T. U. (LSM)	?	~	↓	~	↑
A. S. (SPM)	~	~	~	~	↑
K. N. (ALS)	~	~	~	~	↑
T. O. (ALS)	~	~	~	~	↑

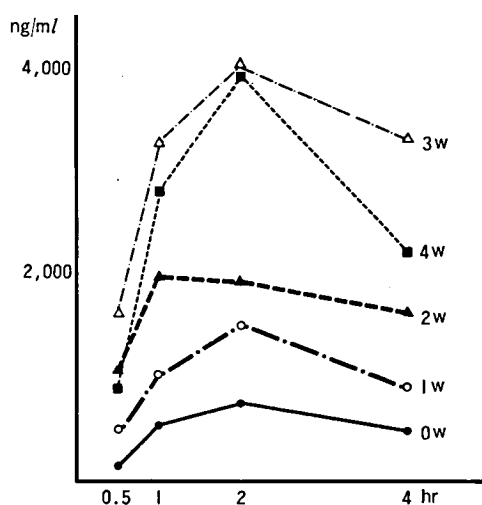


図 3 血中ベスタチン濃度の経時的変化

を行っていなかった時期があったため“?”とした(表2)。

ベスタチン投与後の血中濃度の変化については、投与開始時、1、2、3、4週いずれも投与後30分より上昇し、2時間後にピークとなり、4時間後には低下傾向を示した。

投与量との関係については、投与量を60mgから460mgまで漸増するにつれ血中濃度も上昇するが、480mgを維持量とした4週の時点で低下傾向にあった(図3)。

4) 副作用

副作用については、多発筋炎患者1例において

嘔気を認めたが、一過性であり、ベスタチン投与を中止するに至らなかった。

5) 症例について

症例は、53歳の多発筋炎患者で、昭和56年8月に筋力低下を自覚し、同年8月24日に当科に入院した。入院時、全身の筋萎縮および筋力低下を認め、寝たきりの状態であった。

その後、プレドニンおよびロイペプチン、ベスタチン投与を行い、現在は介助歩行可能である。

今回、ベスタチンを一時中止し、wash out後ベスタチン60mgより投与を始めた。プレドニンは30mg/dayを維持量として併用した。

尿中3-メチルヒスチジンは、ベスタチン投与前は172.2 $\mu\text{mol/day}$ と正常下限よりやや低値を示したが、5週目にはさらに低下し73.0 $\mu\text{mol/day}$ となった。

血中ベスタチン濃度は、ベスタチン投与後ピークと考えられる2時間目のものであるが、3週までは上昇し、それに伴って血清酵素も低下した。しかし、4週、5週では、血中ベスタチン濃度は低下傾向にあった。それに反して、CPKはベスタチン投与前の518I.U.から162I.U.まで低下を認めた。

なお、第2週の血中ベスタチン濃度もベスタチン投与後2時間目のものであるが、この週に限り、血中濃度のピークが投与後4時間を示している

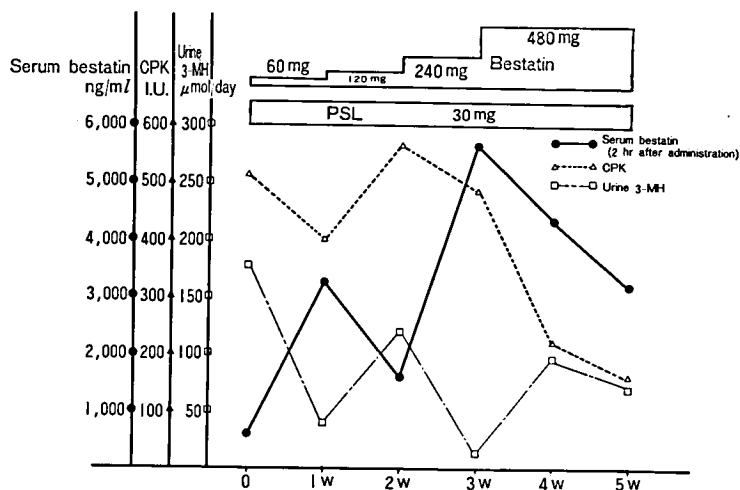


図4 症例：T. T. (PM), 53Y, F.

(約 3,000 ng/ml). 単純な technical error と思われる訂正する。

臨床症状としては、自覚的に筋力改善（腰が軽くなった）を認めたが、他覚的に変化は認めなかった（図4）。

結 語

尿中 3-メチルヒスチジンは、アミノ酸中での存在がアクチンおよびミオシンに限定されており、また筋肉以外にはごく少量しか存在しておらず、その終末代謝物として尿中に排泄される物質である。

このため、従来、尿中 3-メチルヒスチジンは筋肉の代謝回転を知るうえで注目され、筋疾患の治療効果判定に有用であるといわれてきた。

しかし、ジストロフィーマウスにおいて、筋の変性により尿中 3-メチルヒスチジン排泄が増加

して異常高値を示し、また高度な筋萎縮があれば、逆に尿中 3-メチルヒスチジン排泄は減少するという報告もある。要するに、神経筋疾患において、筋代謝の異常によっても尿中 3-メチルヒスチジンは高値を示したり、低値を示したり、一定していない。

今回の結果でも、尿中 3-メチルヒスチジンの値は症例により高値を示す場合と低値を示す場合があって一定しておらず、このことから、尿中 3-メチルヒスチジンはベスタチン投与による効果判定のパラメーターにはなりえなかった。

血中ベスタチン濃度は、ベスタチン投与後2時間でピークを示した。また、投与量の増加とともに血中濃度も上昇を示した。しかし、480 mg を維持量とした4週以降においては、血中濃度は低下傾向を示した。このことは、enzyme induction の関与も考えられ、今後投与方法についての検討の必要があるように思われる。

筋疾患に対するベスタチンの効果に関する臨床的研究

II. 筋疾患に対するベスタチンの効果判定に関する臨床的まとめ

木下真男*¹

研究協力者 里吉栄二郎*², 祖父江逸郎*³, 三吉野産治*⁴
村上慶郎*⁵, 福山幸夫*⁶

筋疾患に対するベスタチンの効果判定に関して、従来から臨床部会の各班員が種々の検索を行ってきた。しかし、いずれも比較的少数に対する経験であり、また各自の投与方法が不定であったため、統計学的結論を出すに至っていない。そのため、昨年度より投与方法を比較的しぼって、多数の症例の検討ができるように検討してきた。本年度は、さらに投与方法を画一的にし、この検討を進めるとともに、連続投与によって本剤の血中濃度がどのように上昇を示すかを明らかにし、今後の臨床部会の進むべき道を決定するための資料とする目的でまとめを行った。

対象および方法

1) 対象

対象は、Duchenne 型ジストロフィー症 35 例、肢帯型ジストロフィー症 11 例、顔面肩甲上腕型ジストロフィー症 1 例、先天型筋ジストロフィー症 5 例、その他の筋ジストロフィー症 3 例、筋強直性ジストロフィー症 8 例、多発性筋炎 6 例、神経筋萎縮 4 例、その他 1 例の計 74 例であった。そのうち、男は 63 例、女は 11 例、年齢別には、

1~10 歳 23 例、11~20 歳 20 例、21~30 歳 4 例、31~40 歳 12 例、41 歳以後 15 例であった。

2) 方法

投与方法は、固定方法 (33 例)、漸増方法 (41 例) の 2 つの方法で行った。投与期間は 4~5 週間とした。

固定方法は、1 日投与量を 60 mg で固定して行った。漸増方法は、初回投与量を 60 mg/day としてその後徐々に漸増し、1 週後に 120 mg/day、2 週後に 240 mg/day、3 週後 480 mg/day にし、この投与量を維持とした。今回は、漸増方法を中心に結果を述べる。

行った検査項目は、血清 GOT、GPT、LDH、CPK、クレアチン、クレアチニン、尿中クレアチン、クレアチニン、血中ベスタチン濃度である。検査は、投与開始日、7、14、21、28 日目の早朝空腹時に行った。ただし、血中ベスタチン濃度は、施行日に、投与後 30、60、120、240 分の計 4 回行った。

結果

1) 血中ベスタチン濃度 (図 1)

血中ベスタチン濃度は、図 1 に示すように、投与後 1 時間をピークとし、その後低下傾向を示した。投与量の増加とともに、血中濃度は上昇傾向を示した。年齢別にみた場合も、疾患別にみた場

*¹ 東邦大学医学部第四内科

*² 国立武蔵療養所神経センター

*³ 名古屋大学医学部第一内科

*⁴ 国立療養所西別府病院

*⁵ 国立療養所箱根病院

*⁶ 東京女子医科大学小児科

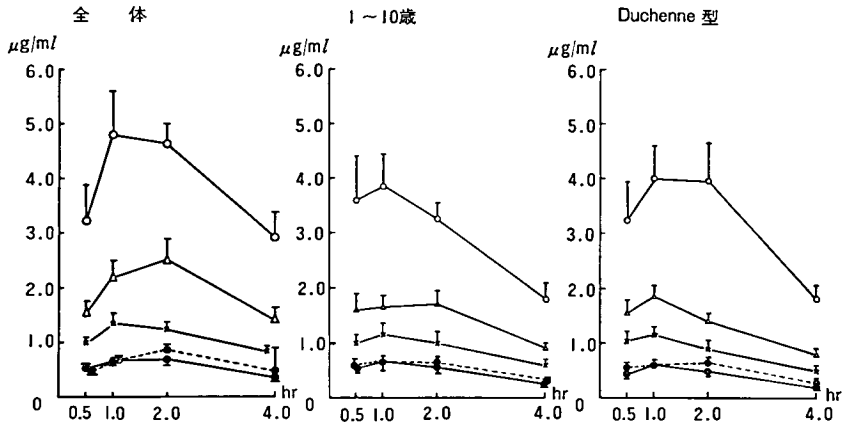


図1 ベスタチン血中濃度の投与後の変化。—●—, 開始; …●…, 1w; ×, 2w; △, 3w; ○, 4w.

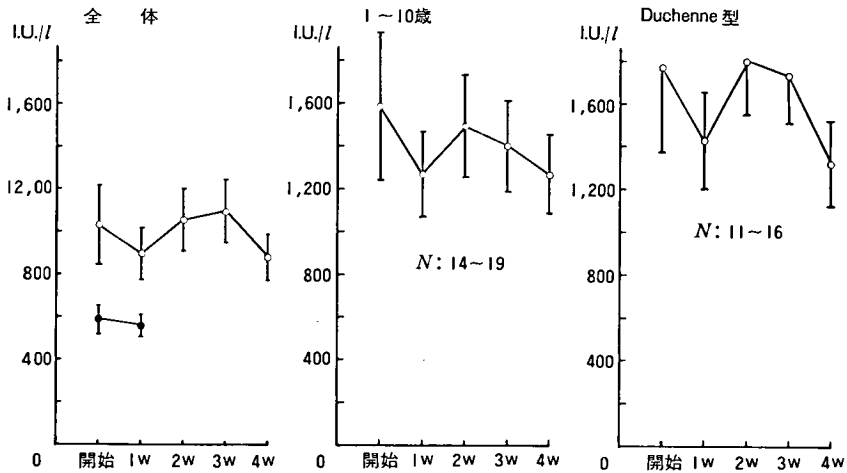


図2 ベスタチン投与後の血清 LDH の変化。●, 固定法; ○, 漸増法.

合も、同様の曲線を描いた。

2) 血清諸酵素の変化

a) 血清 GOT

血清 GOT は、投与開始日より4週目まで、有意な変化は認められなかった。これは、年齢別にみた場合も、疾患別にみた場合も同様であった。

b) 血清 GPT

血清 GOT と同様で、年齢別にみた場合も、疾患別にみた場合も、有意な変化は認められなかった。

c) 血清 LDH (図2)

血清 LDH は、投与開始1週後に若干減少を示したが、その後2、3週目に増加し、4週目に再び減少した。年齢別にみた場合、1~10歳の年齢層で同様の変化を示し、投与前1,600 I.U./l前後を示していたが、1週後に1,200 I.U./l前後まで減少した。また、疾患別にみた場合、Duchenne型ジストロフィー症で同様の変化を示し、投与前1,700 I.U./l前後であったのが、1週後に1,400 I.U./l前後まで減少し、その後再び増加した。

d) 血清 CPK (図3)

血清 LDH と同様に、投与開始後1週目に一時

筋疾患に対するベスタチンの効果に関する臨床的研究

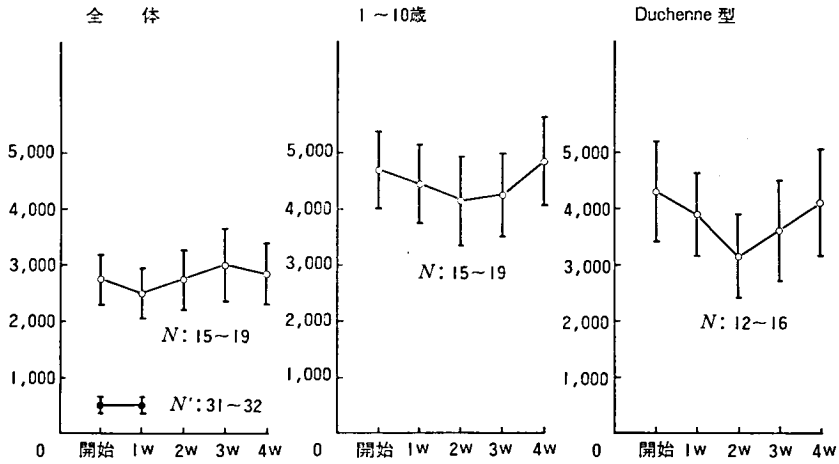


図3 ベスタチン投与後の血清 CPK の変化。●, 固定法; ○, 漸増法。

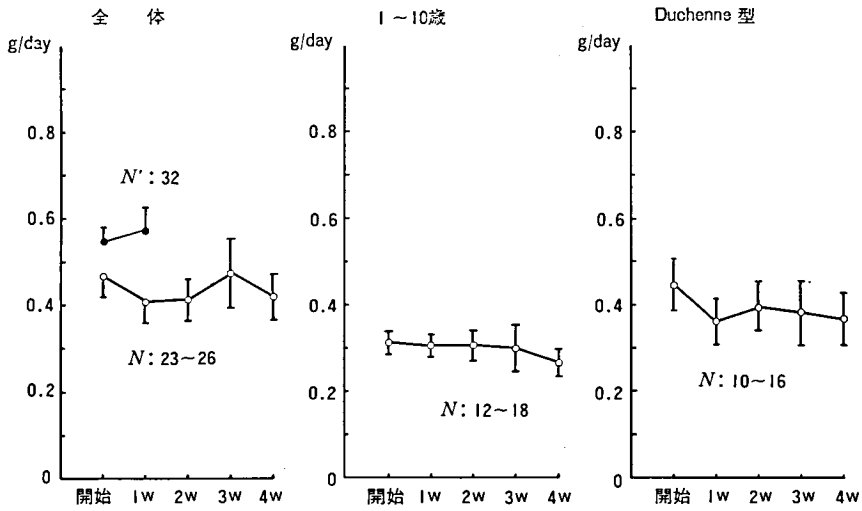


図4 ベスタチン投与後の尿中クレアチンの変化。●, 固定法; ○, 漸増法。

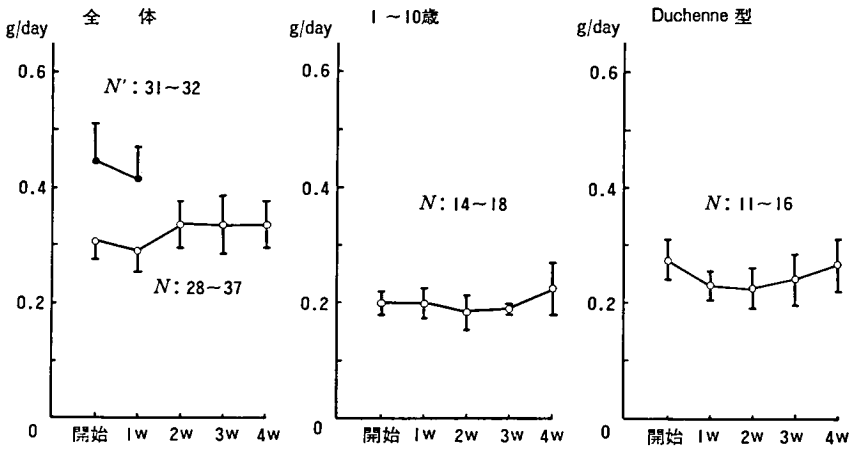


図5 ベスタチン投与後の尿中クレアチニンの変化。●, 固定法; ○, 漸増法。

的な減少を示し、その後2、3週目で増加を示した。年齢別にみた場合、1～10歳の年齢層で同様の変化を示し、投与後1、2週目で減少し、その後増加を示した。疾患別にみた場合、Duchenne型ジストロフィー症でのみ同様の変化を示し、投与開始時4,200 I. U./l前後であったのがベスタチン増量とともに減少し、2週目で3,000 I. U./l前後まで減少を示したが、その後ベスタチン増量にもかかわらず増加し、4週目で4,000 I. U./l前後となった。

e) 血清クレアチン・クレアチニン

血清クレアチンは、投与前と投与後において、有意な変化は認められなかった。年齢別にみた場合も、疾患別にみた場合も、同様に有意な変化を認めなかった。

血清クレアチニンも血清クレアチンと同様、投与後有意な変化を認めなかった。また、年齢別にみた場合も、疾患別にみた場合も同様であった。

f) 尿中クレアチン・クレアチニン (図4, 図5)

尿中クレアチンは、投与後1、2週目に低下傾向を示したが、3週目に再び増加し、4週目にまた減少した。年齢別にみた場合、1～10歳の層で、投与後徐々に減少傾向を示した。疾患別にみた場合、Duchenne型ジストロフィー症でのみ、投与後1週目に減少、2週目で再び増加し、その後徐々に減少傾向を示した。

尿中クレアチニンは、投与後1週目で一時的に減少したが、その後増加傾向を示した。年齢別にみた場合、各年齢層において、同様な傾向は認め

られなかった。疾患別にみた場合、Duchenne型ジストロフィー症でのみ同様の傾向を示し、一時的に減少したものの、その後再び増加傾向を示した。

考案および結語

血中ベスタチン濃度について、よく投与量を反映し、投与量の増量とともに増加傾向を示した。

血清酵素の変動では、血清CPKおよびLDHにおいて、投与前に比べて、投与後1週目ないし2週目まで一時的に減少を示し、ベスタチン投与に効果があった可能性がある。このことは、尿中クレアチン・クレアチニンについても同様であった。これを疾患別にみた場合、Duchenne型ジストロフィー症でのみ同様な変化を認めたことから、全体としての変化は、Duchenne型ジストロフィー症に対しての変化を反映しているように思われる。また、年齢別にみた場合、1～10歳の層で同様の変化を認めたのは、おそらくこの年齢層の大多数がDuchenne型ジストロフィー症で占められているためと思われる。

以上より、今回の漸増方法では、Duchenne型ジストロフィー症で若干の効果を示したように思われ、特に10才以下でその傾向が著しかったように見られるが、決して満足すべきほどの改善ではなかった。今後、さらに大量の投与、一時的な大量投与、ないし間歇的な投与方法に進む必要があるように思われる。

筋ジストロフィーに対するベスタチンの影響

—血清 CK と muscle-specific enolase を指標として—

祖父江 逸 郎*

研究協力者 陸 重 雄*・杵野 謙 次*

印 東 利 勝*・松岡 幸 彦*・加藤 兼 房**

る。

はじめに

進行性筋ジストロフィー（以下 PMD と略記）の治療の試みとして蛋白分解酵素阻害剤が導入され、種々の検討がなされてきたが、その評価はまだ一定していない。ことに実際の臨床上の有効性に関しては、判定基準の設定の困難性もあり、多くの問題を残している。

これまで、筋障害の指標として、血清 CK をはじめとする種々の酵素、ミオグロビンなどが広く使われてきた。最近、解糖系の酵素である enolase のうち β 型が骨格筋、心筋などに特異的に存在することが明らかにされ^{1,2)}、血清 CK 同様 PMD における動態が注目される。われわれの施設では、杵野ら³⁾が各種神経筋疾患で血清 β 型 enolase（以下、これを muscle-specific enolase, MSE, と呼ぶ）を測定し、血清 CK はじめ従来使用されてきた種々の筋障害の指標と比較検討してきた。その結果、血清 MSE は CK に匹敵する筋障害のよいマーカーとなりうると考えられた。

ここでは、血清 MSE の臨床的意義を簡単に述べ、さらに、少数の患者であるが、ベスタチンを投与することによって血清 CK および MSE 値がどのような影響を受けるか検討したので報告す

対象と方法

I. 各種神経筋疾患と血清 MSE 値

対象は種々の神経筋疾患患者 162 例で、年齢 4～72 歳、男 144 例、女 18 例であった。疾患の内訳は、PMD 131 例（Duchenne 型 99 例、LG 型 15 例、FSH 型 9 例、先天型 8 例）、筋緊張性ジストロフィー（MyD）9 例、筋萎縮性側索硬化症（ALS）8 例、脊髄性進行性筋萎縮症（SPMA）3 例、重症筋無力症（MG）2 例、その他 9 例。対照群は年齢、性を一致させた 53 例で、年齢 5～62 歳、男 47 例、女 6 例であった。これらについて、enzyme immunoassay 法で MSE を測定した。

また、対象患者のうち PMD 131 例を含む 140 例について血清 CK を、さらにそのうち 126 例についてミオグロビンを合せて測定し、MSE との相関を調べた。

II. ベスタチンの血清 CK 値、MSE 値に及ぼす影響

PMD 4 例と筋緊張性ジストロフィー 1 例の計 5 例を対象とし、ベスタチンの影響を調べた。全例男で、年齢は 19～36 歳。患者の内訳と概略は以下の通りである。Duchenne 型 2 例（ただし、典型例に比べ経過が長く Becker 型に近い。しか

* 名古屋大学医学部第一内科

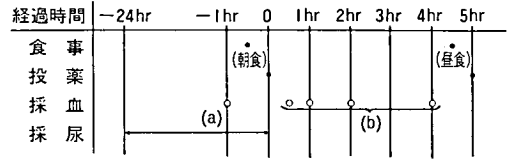
** 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所生化学部門

し、心筋障害が強く、同胞や血縁で発症している者の生命余後が必ずしも良好ではないので、ここでは Duchenne 型として扱った) : M. K., 19 歳, 身長 161 cm, 体重 46 kg, 4 歳頃発症, 独歩可能. K. U., 21 歳, 身長 157 cm, 体重 43 kg, 発症は 7 歳頃, 独歩可能. LG 型 2 例 : S. O., 23 歳, 身長 151 cm, 体重 36 kg, 3 歳頃歩行障害で発症したと推定, 独歩可能. T. H., 33 歳, 身長 173 cm, 体重 56 kg, 13 歳頃発症, 独歩不能で車椅子生活であるが, 上肢機能は良好. 筋緊張性ジストロフィーの 1 例 (K. M.) は 36 歳, 身長 170 cm, 体重 65 kg, 14 歳頃発症, 介助してかろうじて歩行可能であるが, 大部分車椅子生活.

ベスタチンの投与方法は, 当研究班のプロトコールに従った (図 1). 60 mg/日で開始, 1 週ごとに倍増し, 4 週間で 480 mg/日まで増量した. その後 90 mg/日に減量し, 用量を固定して, さらに 4 週間投与した. 服薬は 3 分服とし, 薬剤は 30 mg または 10 mg のカプセルを使用した. 検査実施日は, 第 1 日目, 7 日 (1 週間) 目, 28 (4 週間) 目, および 8 週間目とし, それぞれの日に, 服薬前, 服薬後 30 分, 1 時間, 2 時間, 4 時間

Methods

検査スケジュール



漸増法

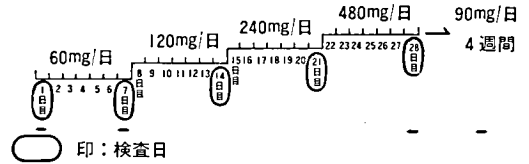


図 1 ベスタチンの投与方法と検査スケジュール.

の各時点で採血を行い, CK 値, MSE 値のほかベスタチンの血中濃度を測定した. また, 各検査日に血中と尿中のクレアチニン, クレアチン, GOT, GPT, LDH などを合せて測った.

結果

I. 神経筋疾患患者の血清 MSE 値とその特徴

対照群 53 例の血清 MSE 値は 7.5 ± 3.8 (平

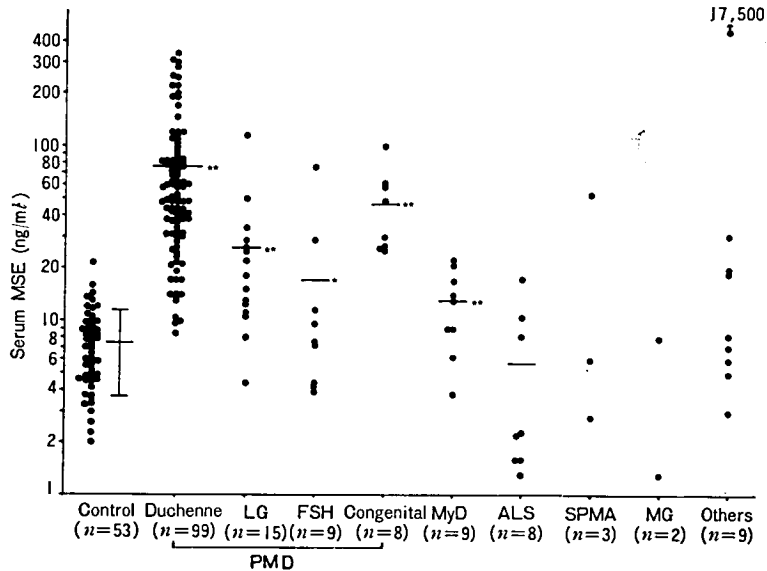


図 2 対照群および各種神経筋疾患患者の血清 MSE 値. * $P < 0.01$, ** $P < 0.005$.

筋ジストロフィーに対するベスタチンの影響

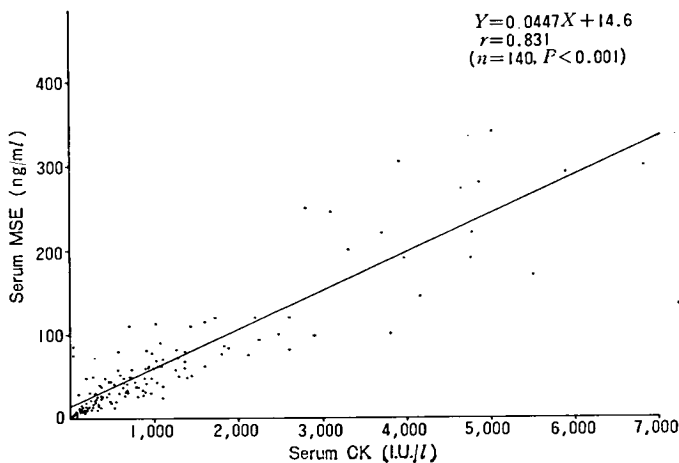


図3 血清 MSE 値と CK 値との相関。

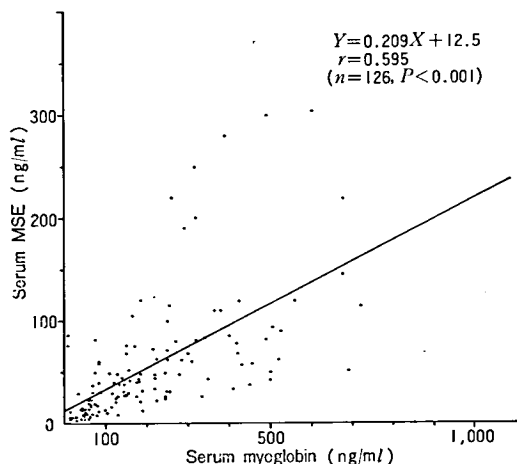


図4 血清 MSE 値とミオグロビン値との相関。

均±S. D., 以下同様) ng/ml であった。PMD 群では, Duchenne 型 75.7±70.7 ng/ml, LG 型 26.2±26.3 ng/ml, FSH 型 17.0±22.1 ng/ml, 先天型 47.3±27.5 ng/ml といずれも高値を示し, それ以外の疾患では, 筋緊張性ジストロフィーが 12.8±6.1 ng/ml と有意に高い値をとったほかはさまざまであった(図2)。

血清 MSE と CK の相関係数は 0.831 ($P<0.001$) と高い相関を示したが, ミオグロビンとの相関係数は 0.595 ($P<0.001$) であり, CK より低かった(図3, 図4)。

次に, PMD 患者 131 例について, 血清 CK 値

表1 PMD 患者における血清 MSE と CK 値の異常値出現率

Type	No.	No. (%) with elevated serum levels of		χ^2 -test
		MSE	CK	
Duchenne	99	91 (92)	96 (97)	N. S.
LG	15	9 (60)	12 (80)	N. S.
FSH	9	2 (22)	2 (22)	—
Congenital	8	8 (100)	8 (100)	—

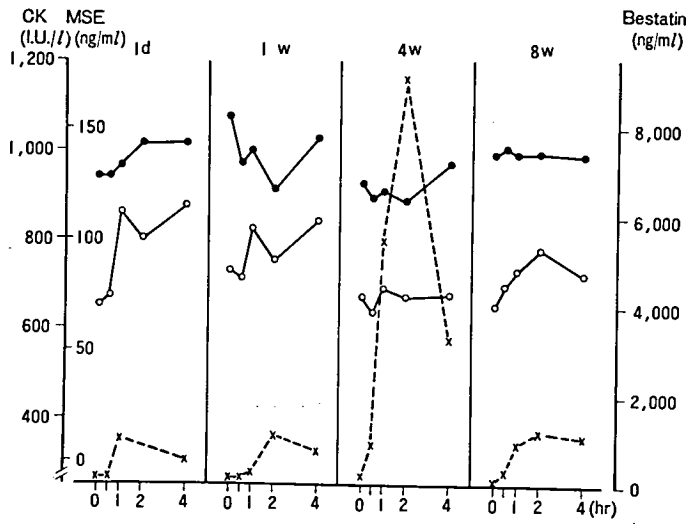
N. S. =not significant.

と MSE 値の上昇例の頻度を調べた。その際, CK 値は 125 I. U. /l, MSE 値は 15.2 ng/ml を超えたものを上昇例とした。Duchenne 型, LG 型とも, MSE より CK の上昇率が高い傾向にあったが, 有意な差ではなかった。FSH 型, 先天型では, 両酵素の上昇率は等しかった(表1)。

II. ベスタチン投与による諸検査結果の変化

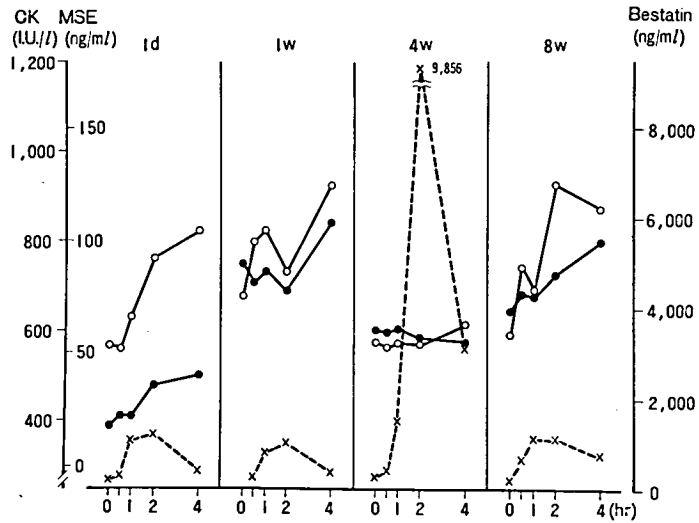
今回対象とした5例は同一疾患(病型)ではないので, 症例別に結果を検討した(図5 a~e)。全体としてみると, 血清 CK 値と MSE 値の時間的変動はかなり並行していた。ただし, 筋緊張性ジストロフィーの患者は, CK 値がほぼ正常域にあるにもかかわらず, MSE 値はかなり高値を示した。これらの酵素の投与による影響をみると, いずれの例も8週間の投薬では明らかな改善は得

(a)



a. M. K., 19 歳, 男, Duchenne 型.

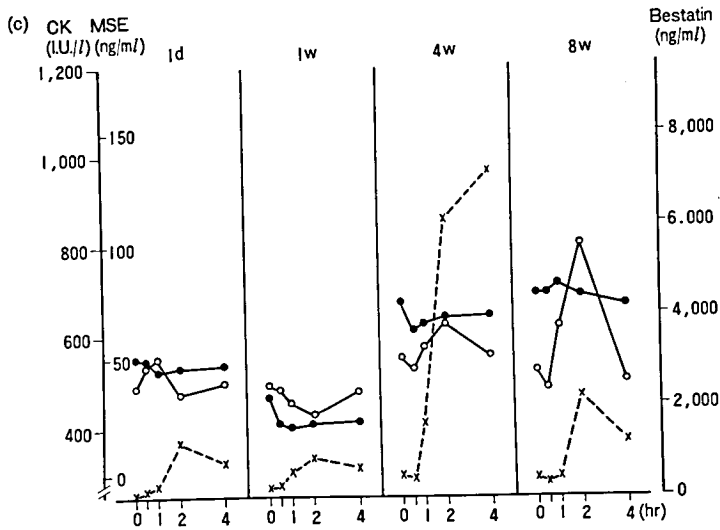
(b)



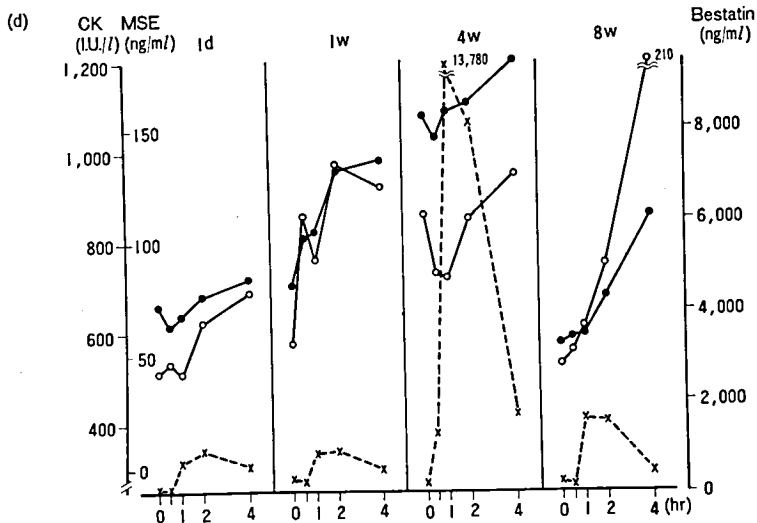
b. K. U., 21 歳, 男, Duchenne 型.

图 5

筋ジストロフィーに対するベスタチンの影響



c. S.O., 23 歳, 男, LG 型.



d. T.H., 33 歳, 男, LG 型.

図 5

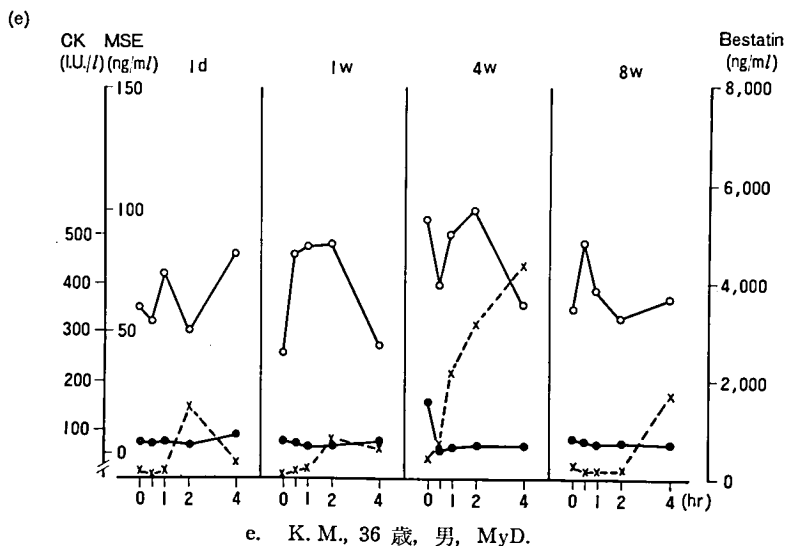


図 5 症例別にみた血清 CK 値 (●), MSE 値 (○), およびベスタチン (×) の血中濃度の推移。

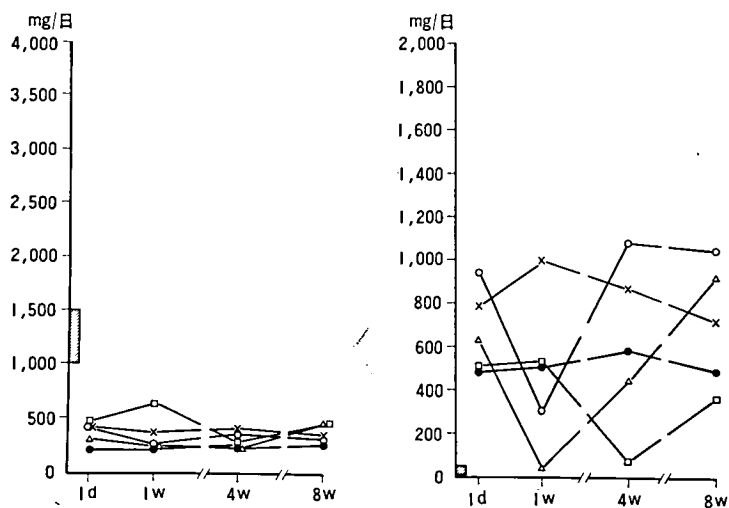


図 6 5 症例の尿中クレアチニン値 (左) とクレアチニン値 (右) の投薬に伴う推移。

られなかった。

ベスタチンの血中濃度は、60 mg/日では初日と 7 日目ではほとんど変化なく、大体 200~1,000 ng/ml の濃度を保った。480 mg/日投与した第 28 日目ではいずれも高値を示し、4,000~13,000 ng/ml 程度の値であった。90 mg/日投与した 8 週目の終りでは、60 mg/日投与と類似した値を示した。服薬時間との関係を見ると、ほとんどの場合

服薬後 2 時間で最高濃度となったが、ときには 4 時間の濃度が高いこともあった。このベスタチンの血中濃度と血清 CK 値, MSE 値を比較すると、薬剤の増量に従ってベスタチンの血中濃度は着実に上昇したが、両酵素ともそれに対応して変化する傾向はなかった。一般に、PMD では尿中クレアチニンの排泄量低下, 尿中クレアチニンの排泄増加があるが、これらの値もベスタチン投与によ

て改善を示さなかった(図6)。そのほか、血中クレアチニン、クレアチン、GOT、GPT、LDHなども特記すべき変化を示さなかった。

自覚的にも他覚的にも、副作用の発現はなかった。

考 察

ここに述べた解糖系の酵素 enolase は、 α 、 β 、 γ の3種の subunit をもち、これらの二量体として全身組織に広く分布する。 $\alpha\alpha$ -enolase はすべての組織に、 $\alpha\gamma$ 、 $\gamma\gamma$ -enolase は主に神経系組織に存在するのに対して、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ -enolase は横紋筋組織に特異的に局在することが知られている^{1,2)}。この β 型 enolase (MSE) は、細胞内ではCK同様大部分が可溶成分として細胞質に存在し、分子量88,000~89,000でCK(MM型)の分子量82,000に近いという特徴をもっている。

今回の結果からわかるように、各種神経疾患において、血清MSEはCKに類似した態度を示した。血清CK値との相関係数は0.831と高く、またPMD患者の異常値検出率においても血清CKとMSEとの間には有意な差がなく、MSEはCKに匹敵する筋障害の指標になりうると結論された。次に、早朝から昼にかけて一定の時間に検査した日内変動パターン(これはもっぱら運動による変動を示していると思われる)を比較してみると、CKとMSEの変動様式は、一部を除いてよく類似していた。ミオグロビンでみられたような大きな変動は認められず、この点でも、MSEはCKとともに薬剤投与などの効果判定に最も適した指標の1つとしてよいと思われる。

次に、PMD患者に対するベスタチンの影響について考えたい。結論的にいえば、血清CK値、MSE値あるいは血中、尿中のクレアチニン、クレアチン値など、筋障害の指標となる検査成績で評価する限り、明らかな改善は得られなかった。とくにCK値については、これまで著者らは、

①安静時のCK値が下降すること、②運動によるCK値の上昇が抑制されること、の2点が重要であるとの見解を示してきたが、今回の結果ではCK値、MSE値ともそのような傾向を示さなかった。ベスタチンの血中濃度と比較してみても、投与量の増加に伴って血中濃度は確実に上昇しており、ことに480mg/日投与した28日目には著しく高濃度を示したにもかかわらず、これら酵素の遊出が阻止されたとはいいいがたい。そこで、当班で行った投与計画を見直してみると、次のような問題点があげられる。ベスタチンの血中濃度は、多くの場合服薬後2時間でピークに達し、4時間ではかなり下降するのが普通であった。患者は1日3回毎食後薬剤を服用しているため、深夜から早朝にかけて期待すべき血中濃度を確保できない可能性がある。さらに大きな問題は、どの程度の血中濃度がPMD患者の筋肉崩壊の阻止のために必要とされるかという点である。いまのところまったく不明の状態であるが、今回の使用量よりもさらに大量投与をしたほうがよいようであるとの印象がもたれており、慎重に患者を観察しながら大量投与を行っていくことが大切な試みの1つと思われる。幸いにして、ベスタチンによる重篤な副作用の発現はPMD患者にみられていない。その他の問題として、対象患者の選択、投与期間の問題があげられる。われわれが今回対象とした患者はいずれも成人で、長期の罹病期間を有しており、これまでの経験からしても変化が得られにくいようである。投与期間に関しては、われわれの施設では、すでに少量1年半投与で明らかな改善が得られなかったという成績がある。以上の点を総合して今後の方針を考えると、若年患者を対象とし、長期間大量投与を行い、臨床症状と検査所見の両面から評価していくことが望ましいと考えられる。

ま と め

1) 各種神経筋疾患患者の血清 MSE を測定し、血清 CK 値などと比較した。その結果、血清 MSE は CK と類似した動態を示し、筋障害のよい指標となることが示された。

2) 5 例の PMD 患者（1 例は筋緊張性ジストロフィー）にベスタチンを投与し、薬剤の血中濃度と血清 CK 値、MSE 値その他の検査所見とを比較した。ベスタチンの血中濃度の上昇は良好であったが、8 週間の投与期間では血清 CK 値、MSE 値などで評価する限り、明らかな有効性は認められなかった。

3) 特記すべき副作用はみられなかった。

本研究のベスタチン血中濃度の測定は、日本化薬(株)医薬事業本部臨床開発部でなされた。ここに深く感謝致します。

文 献

- 1) Rider, C. C. and Taylor, C. B. Enolase isoenzymes in rat tissues : Electrophoretic, chromatographic and kinetic properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **365**, 285 (1974).
- 2) Kato, K. and Okagawa, Y., *et al.* Immunoassay of human muscle enolase subunit in serum : A novel marker antigen for muscle diseases. *Clin. Chim. Acta*, **131**, 75 (1983).
- 3) 杵野謙次, 陸 重雄ら. 神経筋疾患における血清 muscle-specific enolase 値の分析—新しい筋障害の指標としての可能性について—. *臨床神経*, **23**, 852 (1983).

筋ジストロフィーを中心とする各種筋疾患に対する ベスタチン投与後の経過報告

里 吉 栄二郎*

研究協力者 春原 経彦*・富 英明*

昭和 56 年より、筋ジストロフィーを中心とする筋疾患に対してベスタチン (NK 421) を経口投与し、その後の臨床経過を観察した。また今回、一部の症例に対して NK 421 の用量固定法・漸増法を施行し、血中濃度測定を行ったもので、その結果をあわせて報告する。

対 象

1. NK 421 長期投与経過観察の対象は、肢帯型筋ジストロフィー (LG PMD) 6 例、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSH PMD) 1 例、筋強直性ジストロフィー (myotonic dystrophy) 2

表 1

1) NK 421 長期投与経過観察 (59 年 2 月現在)

対 象	M/F	年 齢	罹病期間 (年)	最大投与量 (mg/日)
1. 肢帯型筋ジストロフィー	3/3	36~53	10~30	200~500
2. 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー	1/0	49	32	300
3. 筋強直性ジストロフィー	1/1	39, 43	13, 21	450, 500
4. Duchenne 型ジストロフィー	5/0	4~18	1.5~11	30~200
	Stage II 3			
	VI 1			
	VI 1			
5. 多発性筋炎	1/1	34, 48	12, 24	450
6. 皮膚筋炎	1/0	68	13	450

2) NK 421 血中濃度測定対象

対 象	M/F	年 齢	罹病期間 (年)
a) 1w 用量固定法			
1. 肢帯型筋ジストロフィー	2/3	36~53	6~29
2. 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー	1/0	49	32
3. 筋強直性ジストロフィー	2/1	31~43	14~21
4. Duchenne 型筋ジストロフィー	3/0	9~18	3~16
5. 成人型 Pompe 病	1/0	42	6
b) 4w 用量漸増法			
1. 肢帯型筋ジストロフィー	1/0	53	15
2. 筋強直性ジストロフィー	1/1	39, 43	13, 21

* 国立武蔵療養所神経センター

例, Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne PMD) 5 例 (うち Stage II 3 例, VI 1 例, VII 1 例), 多発性筋炎 (polymyositis) 2 例, 皮膚筋炎 (dermatomyositis) 1 例の計 17 例.

2. NK 421 血中濃度測定の対象は, a) 1 週間用量固定法では, LG PMD 5 例, FSH PMD 1 例, myotonic dystrophy 3 例, Duchenne PMD 3 例, 成人型 Pompe 病 1 例の計 13 例. b) 4 週間用量漸増法では, LG PMD 1 例, myotonic dystrophy 2 例の計 3 例である (表 1).

方 法

1. NK 421 長期投与例では, 30 mg/日より経口投与を開始して適時に漸増し, 最高投与量は, 表 2 のように 500 mg/日が 5 例, 450 mg/日が 4 例, 300 mg/日が 2 例, 240 mg/日が 1 例, 200 mg/日が 2 例, 60 mg/日が 2 例, 30 mg/日が 1 例である. ただし, polymyositis の 2 例, dermatomyositis の 1 例では steroid, Imuran が併用された.

表 2 最大投与量

投与量 (mg/日)	期間 (日)	例 数
500	33	2
	30	1
	24	1
	15	1
	15	1
450	32	3
	22	1
300	8	1
	4	1
240	11	1
200	30	1
	4	1
60	7	2
30	2	1

表 3 測定項目

- 10m 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, 棘上筋, 棘下筋, 前鋸筋, 広背筋, 上腕二頭, 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, 血小板, CPK, aldolase, ESR, 血清蛋白, T. bil., GOT, GPT, LDH, Al-P, BUN, creatinine
- 尿蛋白

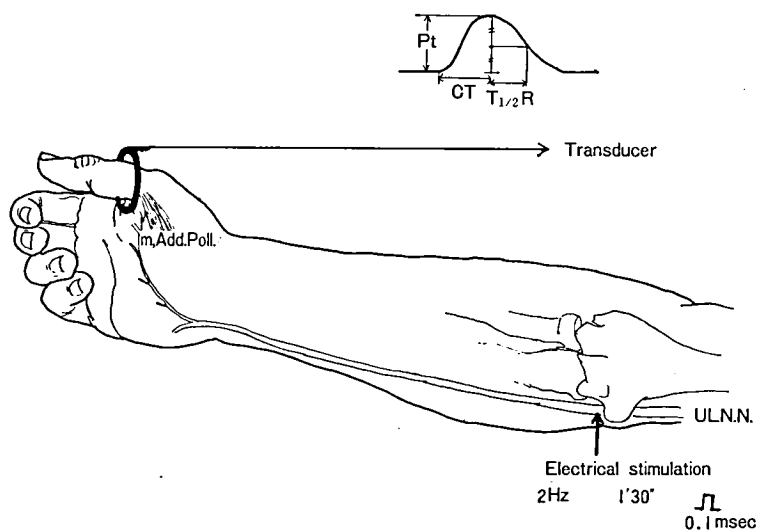


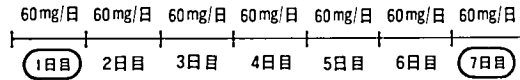
図 1

筋ジストロフィーを中心とする各種筋疾患に対するベスタチン投与後の経過報告

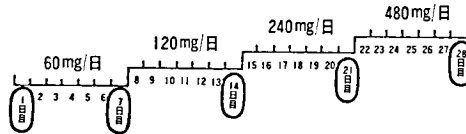
① 投与法

用量固定法 (60 mg/日, 毎食後分3) と漸増法 (60 mg/日, 毎食後分3からスタートし4週後 480 mg/日, 毎食後分3に漸増する) の2法とする.

イ) 用量固定法



ロ) 漸増法



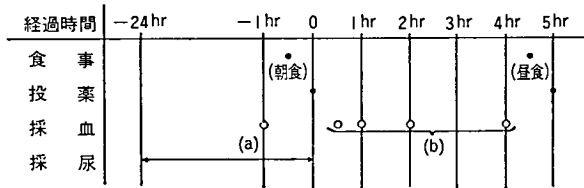
印: 検査日

注1) 現在ベスタチンを投与中の症例を改めて使用する場合は2週間の wash out を要す.

注2) 小児薬用量は以下の式により換算する.

$$\text{小児薬用量} = \frac{(\text{小児の体重}) \times 1.5 + 60}{100} \times \text{成人薬用量}$$

② 検査スケジュール



③ 臨床検査項目

血清: LDH, GOT, GPT, CPK, クレアチニン, クレアチン

尿中: クレアチニン, クレアチン

注1) 血清は検査スケジュール中 (a) で示す早朝空腹時に採血する.

注2) 尿は24時間蓄尿し, 尿量を測定後サンプリングする.

④ ベスタチン血中濃度

注1) 検査スケジュール中 (b) で示される, 投与後 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 hr の点で採血する.

注2) 測定は日本化薬(株)にて実施する.

図2 実施要領.

これら 17 例の経過観察期間は, 8~33 カ月平均 19.2 カ月) である. 臨床効果判定には, 1 カ月間隔で 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を施行し, これらによる総合評価を行った. また, 午前中一定時刻での血清 CPK 値, aldolase 値を測定し, NK 421 投与開始時点での連続 3 カ月の平均値と最近の連続 3 カ月の平均値との比をとった (表 3). このため, この比が 1 より小さくなれば改善を示

したことになる. さらに, LG PMD の症例 No. 3, 4, 5 の 3 例に対し, 57 年 9 月, 58 年 3 月, 59 年 2 月と 3 回にわたり, 尺骨神経に肘部にて電氣的に低頻度反復刺激 (0.1 msec 矩形波, 2 Hz, 1'30'') を与え, 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, NK 421 投与中の推移を観察した (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, Al-P, BUN, CRN を, 尿より尿蛋白を測定した.

2. NK 421 の血中濃度測定方法について:

a) 用量固定法では, NK 421 を 60 mg/日, 分3で経口投与した. 小児の場合は,

$$\frac{(\text{体重}) \times 1.5 + 60}{100} \times 60$$

を目安として投与した. 検査項目, スケジュールに関しては, プロトコールに従い, NK 421 60 mg/日投与開始日と7日目の早朝(服薬前), LDH, GOT, GPT, CPK, creatinine, creatinine を, 前日よりの24時間蓄尿分から尿中 creatinine, creatinine を測定. さらに朝, NK 421 服用後(20 mg) 30分, 1時間, 2時間, 4時間後に採血し, NK 421 の血中濃度を測定した. b) 漸増法は, 60 mg/日より1週間ごとに 120, 240,

480 mg/日と漸増し, 4週間にわたり投与を続けた. 採血, 採尿は用量固定法と同様に, 1, 7, 14, 21, 28日目に行い, 同様の検査項目を測定した(図2).

結 果

1. 長期観察中の各症例につき, 総合的な臨床評価を行い, CPK 値の変化とあわせ表4に示した. 臨床症状の改善を示した例は No. 15, 16 の polymyositis の2例のみで, そのほかはすべて投与開始時に比較して症状が進行していた. 筋ジストロフィー例で改善を示した例はなかった. 一方, 血清 CPK 値は, 筋ジストロフィーの14例中12例で投与開始時に比較して軽~中等度の低下を示した. この傾向はとくに, 元来 CPK 値が高かった Duchenne PMD の例 (No. 10, 12, 14) で

表4 NK 421 長期投与患者経過一覧表

症 例	病 名	年齢	罹病 期間 (年)	最 大 投与量 (mg/日)	投与 期間 (日)	CPK 平均値 (3ヵ月)		比	臨床症状	副作用
						開始時	現在			
1. S. A.	LG PMD	53M	15	200	30	450→	376	0.84	進行	
2. M. Y.	LG PMD	36F	30	500	30	1,253→	1,028	0.82	進行	
3. Y. T.	LG PMD	51F	10	500	15	2,035→	1,268	0.62	進行	悪心 (450 mg)
4. K. O.	LG PMD	37M	26	500	33	668→	466	0.70	進行	
5. Y. K.	LG PMD	47M	20	500	33	1,054→	923	0.88	進行	
6. F. K.	LG PMD	44F	28	300	4	218→	209	0.96	進行	
7. T. O.	Myotonic dys.	39F	21	450	22	103→	55	0.53	進行	
8. K. N.	Myotonic dys.	43M	13	500	24	177→	131	0.74	進行	
9. M. Y.	FSH PMD	49M	32	300	8	161→	136	0.84	不変	
10. R. K.	Duchenne PMD (Stage II)	9M	5	240	11	4,636→	3,208	0.69	進行	食欲低下 (120 mg)
11. T. A.	Duchenne PMD (Stage V)	12M	8	60	7	1,440→	1,760	1.22	進行	悪心 (30 mg)
12. N. A.	Duchenne PMD (Stage II)	9M	3	60	7	7,480→	5,050	0.68	進行	
13. T. S.	Duchenne PMD (Stage II)	4M	1.5	30	2	383→	618	1.61	進行	
14. E. I.	Duchenne PMD (Stage II)	18M	11	200	4	1,540→	567	0.37	進行	
15. M. S.	Polymyositis	48F	12	450	32	95→	200	2.11	改善	悪心 (450 mg)
16. A. S.	Polymyositis	34M	24	450	32	440→	478	1.09	やや改善	
17. K. O.	Dermato- myositis	68M	13	450	32	94→	172	1.83	不変	

筋ジストロフィーを中心とする各種筋疾患に対するベスタチン投与後の経過報告

No.10 R.K. 9 y.o. M.Duchenne PMD

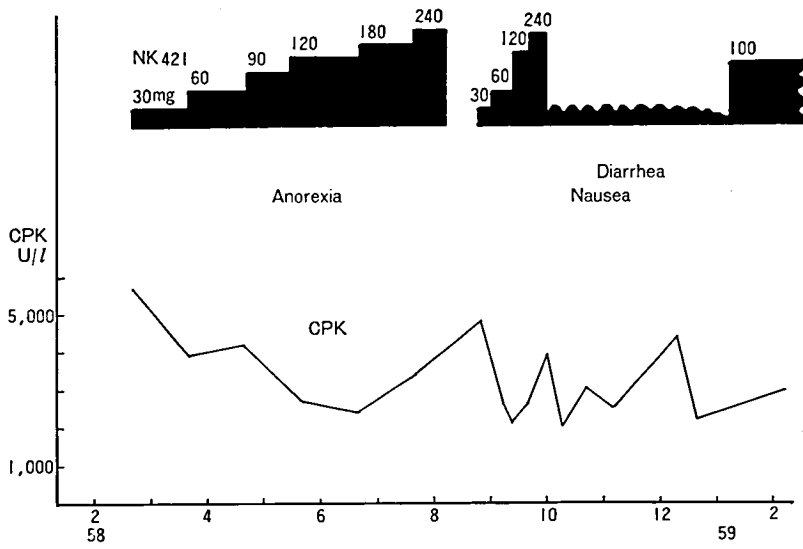


図 3

No.15 M.S. 48y.o. F, Polymyositis

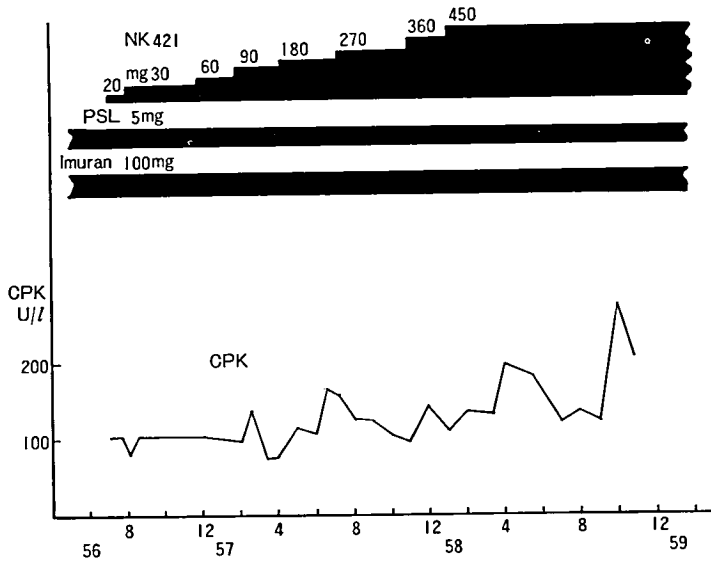


図 4

みられた。図 3 は、No. 10, Duchenne PMD, 9 歳の経過表である。NK 421 投与開始時に比較して臨床的には進行していたものの、血清 CPK 値は投与前に比較し低下傾向がみられている。また、この CPK の動きは、NK 421 投与量と比較的並

行していた。一方、図 4 および図 5 は、No. 15, 16 の polymyositis の症例である。それぞれ筋力改善が臨床的に認められたにもかかわらず、血清 CPK 値では増加傾向が認められている。

LG PMD の 3 例について、経過中に 3 回誘発

No.3 Y.T. 51yo. F, LG PMD

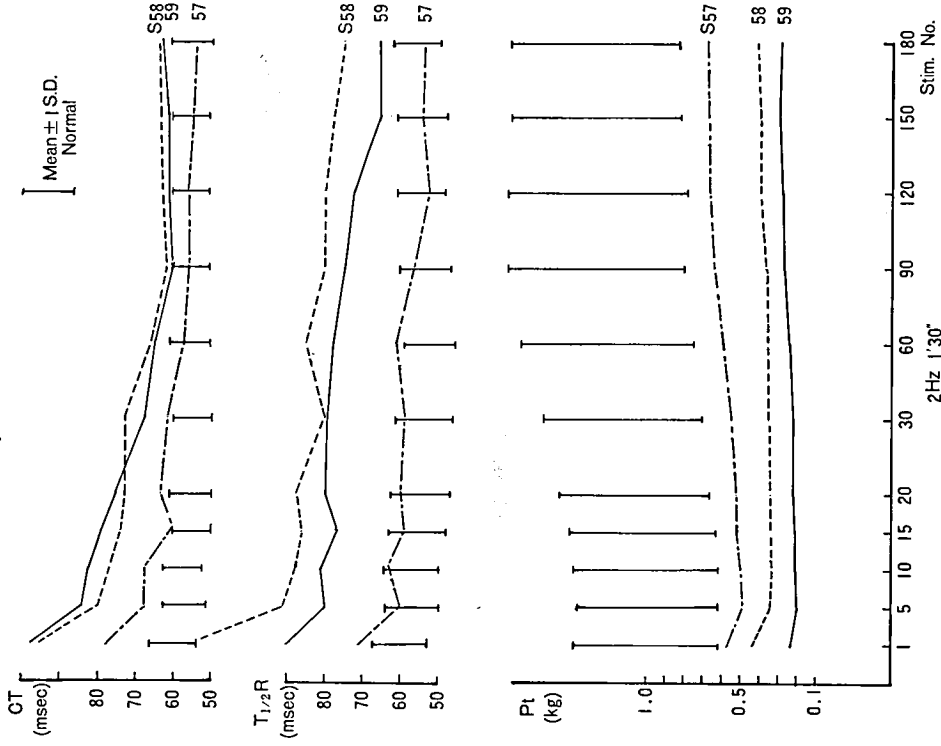


図 6

No.16 A.S. 34yo. M, Polymyositis

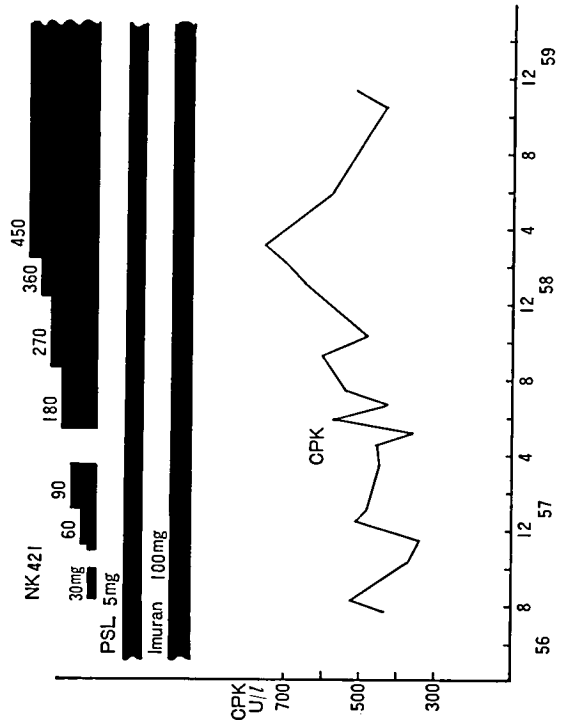


図 5

筋ジストロフィーを中心とする各種筋疾患に対するベスタチン投与後の経過報告

No.5 Y.K. 47y.o. M, LG PMD

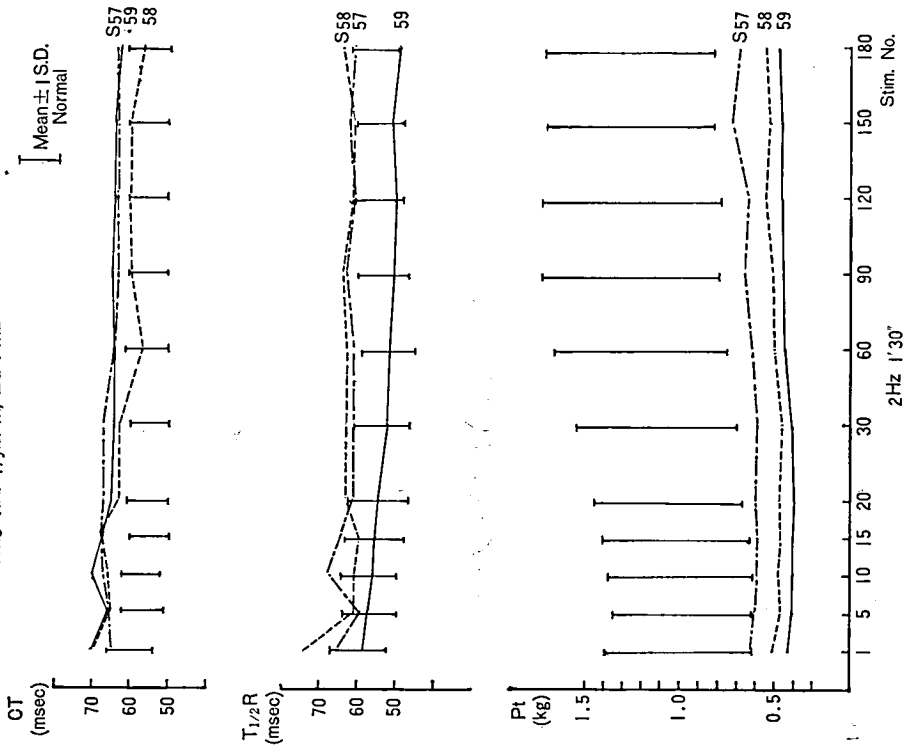


図 7

No.4 K.O. 37y.o. M, LG PMD

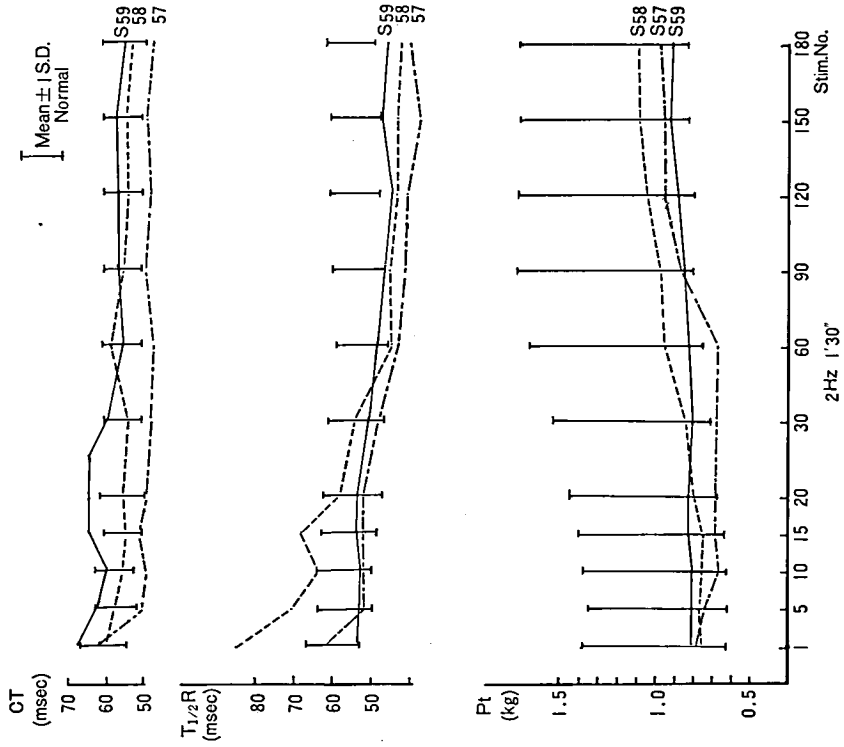


図 8

NK 421 60mg/day 投与 1 日目の血中NK 421 濃度
(20mg 服用後)

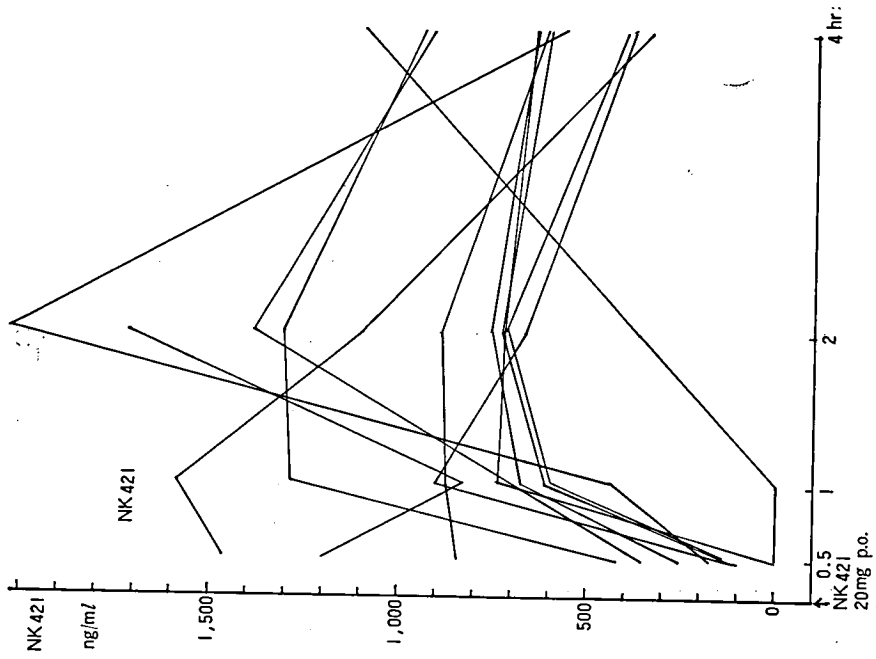


図 9

NK 421 60mg/day 投与 7 日目の血中NK 421 濃度
(20mg 服用後)

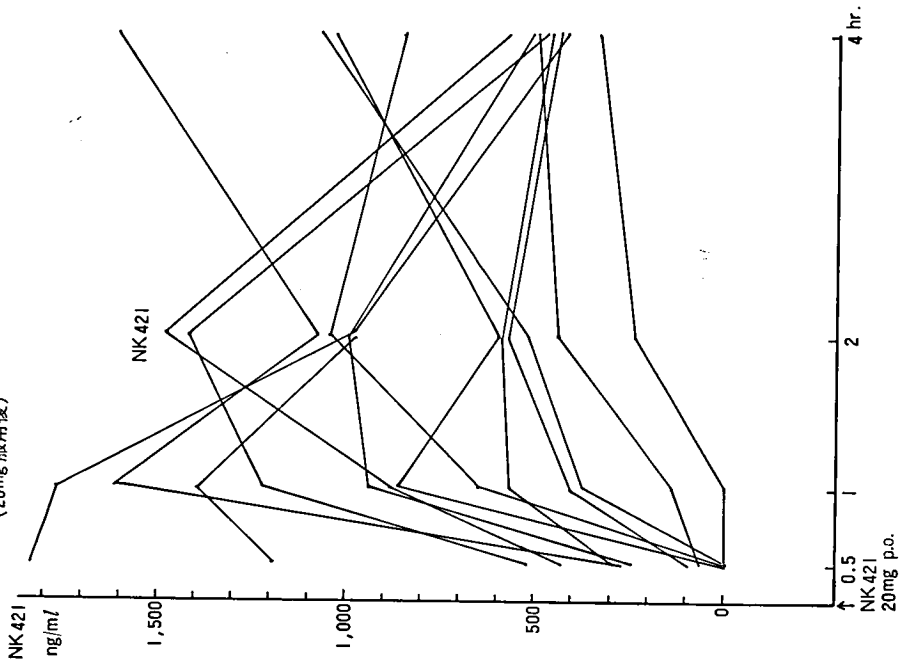


図 10

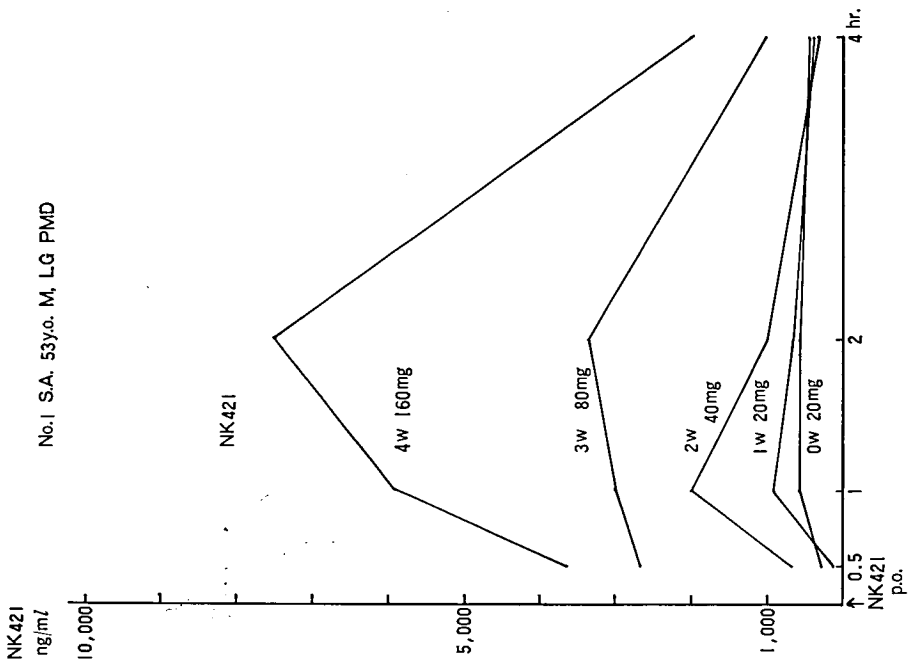


図 11

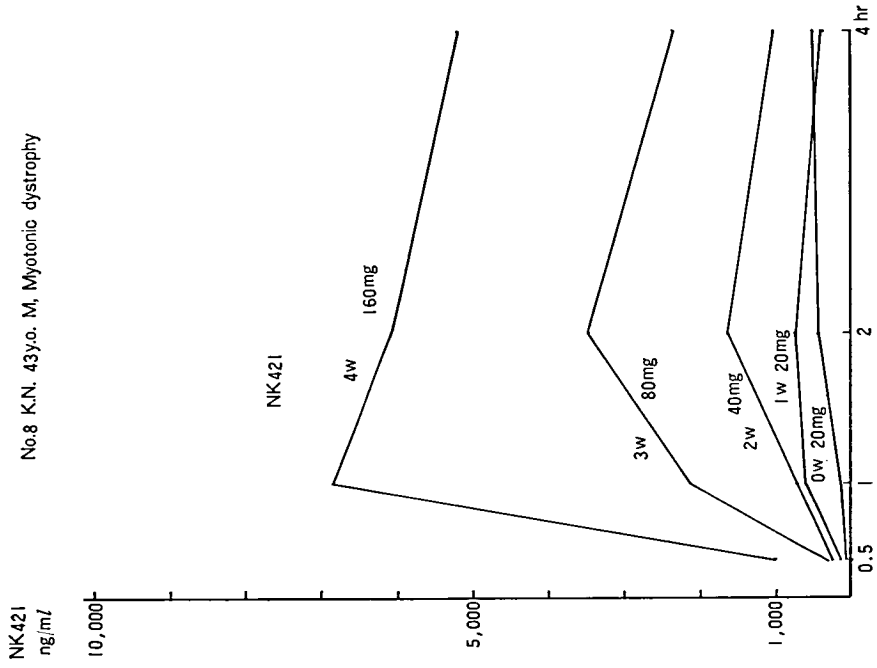


図 12

表 5 NK 421 血中濃度測定期間中の CPK 値の変動

症 例 病 名	年齢	罹病期間 (年)	CPK 値				
			投与前	1 週後 (600 mg/日 服用中)	2 週後 (120 mg/日 服用中)	3 週後 (240 mg/日 服用中)	4 週後 (480 mg/日 服用中)
1. S. A. LG PMD	53M	15	464	434	377	438	190
2. M. Y. LG PMD	36F	30	758	681			
3. Y. T. LG PMD	51F	10	1,280	651			
6. F. K. LG PMD	44F	28	218	99			
18. M. S. LG PMD	51M	6	313	312			
7. T. O. Myotonic dys.	39M	21	34	39	44	38	46
8. K. N. Myotonic dys.	43F	13	119	95	102	89	82
19. H. N. Myotonic dys.	31M	15	314	357			
9. M. Y. FSH PMD	49M	32	95	80			
11. T. A. Duchenne PMD	12M	8	1,760	770			
12. N. A. Duchenne PMD	9M	3	7,640	5,050			
14. E. I. Duchenne PMD	18M	11	990	704			
20. E. K. Adult Pompe	42M	6	228	83			

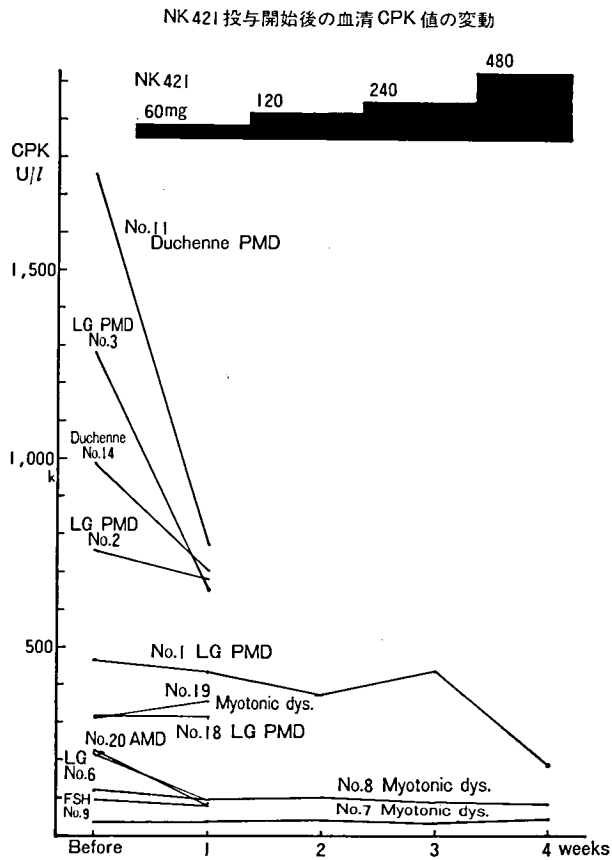


図 13

筋電図を施行し、筋張力の変化を観察した。図 6 は、No. 3 の結果である。この症例は、NK 421 投与後、CPK 値の低下はみられたが、進行性に筋力低下が認められた例である。57 年、58 年、59 年と年を追うに従って筋張力低下がみられ、同時に CT、 $T_{1/2}R$ の延長がみられており、疾患の進行が示唆されている。

図 7 は同様に CPK 値の低下がみられたにもかかわらず、筋力低下が進行している No. 5 の LG PMD の症例である。No. 3 の結果とほぼ同様に、筋張力の低下が認められ、疾患の進行が示唆された。図 8 は、No. 4 の LG PMD の症例である。この例は、進行性に筋力低下がみられているにもかかわらず、筋張力、CT、 $T_{1/2}R$ は経過中ほとんど変化がみられなかった。

2. NK 421 血中濃度測定結果：

図 9 は、NK 421 60 mg/日投与開始日、朝 20 mg 服用後の NK 421 血中濃度の推移である。服用後 1～2 時間の間に 500～1,500 ng/ml で peak を示し、4 時間後に 500 ng/ml へ低下する例が多かった。図 10 は、NK 421 60 mg/日服用 1 週間目、朝 20 mg 服用後の血中 NK 421 濃度である。血中濃度の peak は、やはり同様に 1～2 時間の間でみられ、500～1,500 ng/ml であった。図 11 および図 12 は、4 週間にわたり漸増法を施行した症例 No. 1, 8 の結果である。それぞれ週を追うごとに血中濃度が増加し、4 週間目の peak 値は 7,000 ng/ml 前後であった。なお、このときの peak も 1～2 時間後であった。表 5 および図 13 は、NK 421 血中濃度測定期間中の血清 CPK 値の変化を示したものである。1 週間法を施行した多くの例で、血清 CPK 値の低下が観察された。とくに CPK 値が 1,000 U/l 以上の症例 No. 3, 11, 14 では、中～高度の CPK 値の低下がみられた。この 3 例のうち、2 例は Duchenne PMD、残り 1 例は LG PMD であった。

NK 421 投与中、4 症例 (No. 3, 10, 11, 15) に消化器症状 (悪心、食欲低下、下痢) がみられた

表 6 副作用

症 例	病 名	投与量 (mg/日)	症 状
3. Y. T.	LG PMD	450	悪心
10. R. K.	Duchenne PMD	120	食欲低下, 悪心, 下痢
11. T. A.	Duchenne PMD	30	悪心
15. M. S.	Polymyositis	450	悪心

(表 6). これらの症状は、NK 421 投与量が増加するにつれて出現する傾向があり、成人 2 例では 450 mg/日、小児 2 例では 30, 120 mg/日 で出現している。なお、これらの症状は、服用を中止して消失した例 (No. 10, 11) のほか、服用継続中自然消失した例 (No. 3, 15) もあった。そのほか、血液、尿検査上、異常を示した例はなかった。

ま と め

筋ジストロフィーを中心とする筋疾患に対して NK 421 の長期投与を行ってきたが、筋ジストロフィー群で臨床的改善をみたものはなかった。しかし、多くの例で血清 CPK 値の改善がみられ、とくに Duchenne PMD などきわめて CPK 値が高値を示していた症例で、この改善傾向が強かった。このことより、NK 421 が、臨床的改善を示さないまでも疾患の進行を抑制している可能性が残された。

Polymyositis, dermatomyositis の症例では、steroid、免疫抑制剤に NK 421 を併用することにより、臨床的改善を示す傾向が認められた。

NK 421 服用後の血中濃度は、大多数の例で、服用後 1～2 時間で 500～1,000 ng/ml の peak 値をとり、480 mg/日に漸増後の 4 週間目では 7,000～8,000 ng/ml まで peak 値が増加した。

NK 421 の血中濃度と血清 CPK 値の改善度との間には、相関は認められなかった。なお、NK 421 血中濃度測定のための短期間の観察期間中でも、多くの例で、NK 421 投与前に比較して CPK 値の改善を示した。この傾向は、血清 CPK

値の高い例、とくに Duchenne PMD で強くみられた。

NK 421 投与中、消化器症状が4例に認められたが、その後休薬あるいは一時減量することによ

り消失し、再び投与開始、増量することができた。そのほか、血液、尿所見での異常はみられなかった。

ホルフェニシノールの体内動態に関する研究

松本 郁 男*

ホルフェニシノールは、細胞表面に存在する種類の酵素の阻害物質の1つとして微生物化学研究所で発見されたアルカリホスファターゼ阻害剤ホルフェニシンの誘導体である。ホルフェニシンは、腹腔内投与で免疫賦活作用を有する¹⁾。ホルフェニシノールは酵素阻害活性は示さないが、経口投与で遅延型過敏症を増強し、感染症に対する防御効果、マウス移植性腫瘍に対する抗腫瘍効果を示すことが知られている^{2,3)}。急性毒性はマウス>8,000 mg/kg, ラット>8,000 mg/kg, ウサギ>5,000 mg/kg, イヌ>1,000 mg/kg の経口投与で認められず、またラットに400 mg/kg 207日間経口投与しても毒性が認められない、きわめて低毒性な分子量197の低分子化合物である⁴⁾。

同様な膜に存在する酵素の阻害剤でやはり免疫増強作用を示すベスタチンが筋ジストロフィー症マウスに有効であることから、ホルフェニシノールについても当研究班の松下らにより検討が加えられ、筋ジストロフィー症マウスに発症初期から連続投与することにより、症状回復、体重増加、筋の耐久力増強などの効果のあることが明らかにされた⁵⁾。

われわれは昨年7月より本研究班に参加し、ホルフェニシノールの製造および体内動態研究を担当することになったが、今年度は主としてホルフェニシノールおよびその代謝物の簡便で精度の高い定量法の開発を検討した。また、³H-ホルフ

フェニシノールを経口投与および静脈投与した場合の血中濃度、総排泄についても検討を行った。

I. ホルフェニシノールの原末調製

製造法を図1に示した。m-ヒドロキシベンズアルデヒドを原料として、常法に従ってm-ヒドロキシフェニルグリシンとしたのち、アミノ基をアセチル化する。次いで、ホルマリンを用いてヒドロキシメチル化したのち、糸状菌由来のアシラーゼを用いて不斉加水分解し、L-ホルフェニシノールを通計収率29%で得ることができる。回収されたD-N-Ac-ホルフェニシノールは、ラセミ化させて再度アシラーゼ処理を行うことにより、さらに収率を上昇させることができる。

II. ホルフェニシノールの体内動態

1. 未変化体の測定法

われわれは、未変化体の測定法として、簡便で大量のサンプルを処理できるRIA法について検討を行った。

a) 標識抗原の調製

放線菌の培養で得られたL-ホルフェニシンを水溶液中でNaB³H₄を用いて還元し、容易に³H]-L-ホルフェニシノールを得ることができた(図2)。

* 萬有製薬(株)目黒研究部

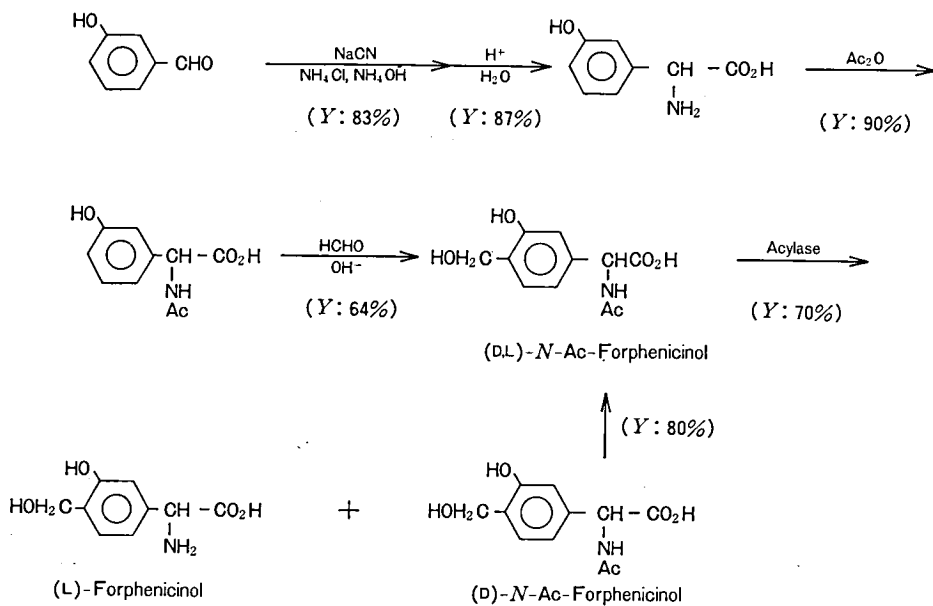
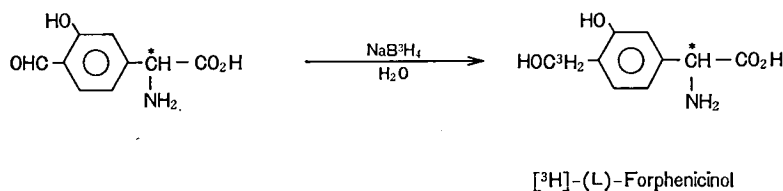


図 1 Production of (L)-forphenicinol.



Specific activity 0.78 Ci/mmol

Radiochemical yield 45%

図 2 Synthesis of ³H-labeled-(L)-forphenicinol.

b) 感作抗原の調製

8種類の感作抗原を調製して、ウサギに感作した(表 1)。

MI-06, MI-07は非常に高い抗体産生能を示したが、ホルフェニシノール自体とは結合せず、サクシニル化したホルフェニシノールとのみ交叉結合した。したがって、血中のホルフェニシノールを測定する場合、サクシニル化をまず行わなければならないが、血清を同条件下サクシニル化を行うと標識抗原と抗体の結合を妨害する物質が多量に生成し、この抗血清は使用できないことが明らかとなった。最終的には、抗体価は低いながらも、ホルフェニシノールとBSAをε-アミノ-カ

プロン酸を介して結合したMI-03により、ウサギに感作して得た抗血清を測定に使用した。

c) 基本操作

図3に示したように、検体に標識抗原と抗血清を加えて平衡化させたのちポリエチレングリコールを用いて沈殿させ、沈殿をアルカリで溶解したのち放射能を測定する方法である。この方法で得られた検量線を図4に示したが、測定限界は10ngである。

d) 代謝物の交叉反応性

ホルフェニシノールの代謝物としてはM-1(未変化体)からM-5まで知られていたが、後述するラットの吸排実験により、新たにラットの主

表 1

Immunogen	Antibody production	Immunogen	Antibody production
<chem>Oc1ccc(cc1C(=O)O)C(N)C(=O)NBSA*</chem>	0/10	<chem>Oc1ccc(cc1C(=O)O)C(N)C(=O)NCC(=O)NBSA</chem> (MI-06)	7/7
<chem>Oc1ccc(cc1C(=O)O)C(N)C(=O)NCC(=O)NCC(=O)NBSA</chem> (MI-02)	0/3	<chem>Oc1ccc(cc1C(=O)O)C(N)C(=O)NCC(=O)NCC(=O)NBTG**</chem> (MI-07)	6/6
<chem>Oc1ccc(cc1C(=O)O)C(N)C(=O)N(CCC)CC(=O)NBSA</chem> (MI-03)	1/3	<chem>Oc1ccc(cc1C(=O)O)C(N)C(=O)NCC(=O)NCC(=O)Nc2ccc(cc2)/N=N/c3ccc(cc3)N=NBSA</chem> (MI-01)	0/3
<chem>Oc1ccc(cc1C(=O)O)C(N)C(=O)NCC(=O)c2ccc(cc2)/N=NBSA</chem>	0/10	<chem>Oc1ccc(cc1C(=O)O)C(N)C(=O)OPVP***</chem>	0/2

* Bovine serum albumin.

** Bovine thyroglobulin.

*** Polyvinyl pyrrolidone.

Sample 100 μ l
 50mM phosphate buf. pH 7.4-0.5% BSA 320 μ l
 3 H-forphenicol (0.78 Ci/mmol, 1.0 μ Ci/ml) 40 μ l
 ↓ ← Antiserum 40 μ l
 Incubate, 4°C, overnight
 ↓ ← 1% rabbit γ -globulin 100 μ l
 ↓ ← 22% polyethyleneglycol 2 ml
 Centrifuge, 3,000 g, 15 min
 ↓
 Aspirate and discard the supernatant
 ↓
 Dissolve the precipitate in 1 ml 0.1 N NaOH
 ↓ ← Toluene-Triton-scintillator 10 ml
 Count in Packard Tri-Carb.

図 3 Radioimmunoassay procedure.

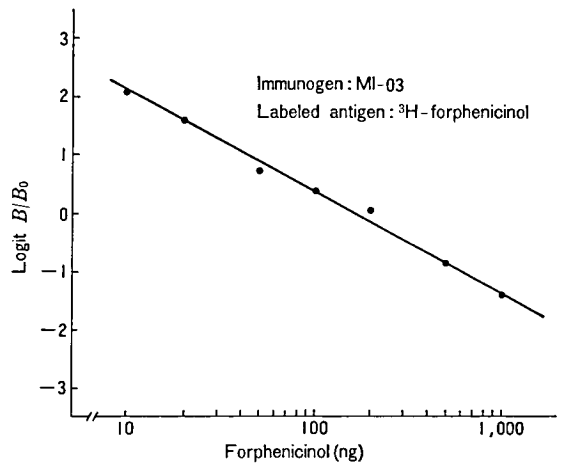
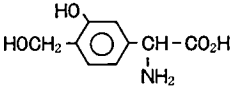
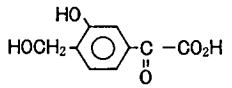
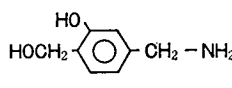
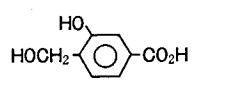
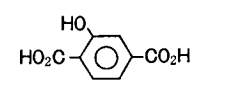
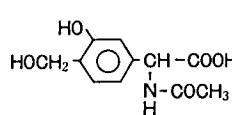


図 4 Standard curve.

代謝物として M-6 が見出された。表 2 に示したように、これらの代謝物の中で M-3 のみが 14% の交叉反応性を示したが、GC-MS 法, RI を用いた実験などでラット, ウサギ, ヒトでは血中には

M-3 は存在しないことがすでに知られているので、血中の未変化体濃度は前処理をすることなくこの RIA 法で測定可能であることが明らかとなった。

表 2 Metabolites of forphenicolol

	Metabolite	RIA cross reactivity (%)
M-1 (unchanged)		100
M-2		—
M-3		14
M-4		—
M-5		—
M-6		—

2. 血漿中, 尿中, 糞中代謝物の定量法

代謝物の定量法としてはすでに TLC 法, GC-MS 法が確立されているが, TLC 法は精度に, GC-MS 法では簡便性と代謝物 M-2 の誘導化に際しての分解に問題があったので, 今回さらに検討を重ねた.

ホルフェニソールの代謝物は M-1~M-6 まで知られているが, アミノ基を有する M-1, M-3, 酸性物質である M-2, M-4, M-5, M-6 に大別できる. 代謝物定量の前処理に関するわれわれの基本的な考えとして, この性質を利用し, 強酸性カチオン交換樹脂 (CG-120) に M-1, M-3 を吸着させ, 未吸着の M-2, M-4, M-5, M-6 は HPLC で定量する. 吸着した M-1, M-3 は分別溶出したのち, M-3 の交叉反応性を利用して, M-1, M-3 とも前述の RIA 法で定量を行うこととした.

前処理法の概略を図 5 に示した. CG-120 にかける前のサンプルの処理としては, 尿はそのまま使用したが, 糞はホモジェナイズしたその上清を, また血漿は蛋白をエタノール沈殿させ遠心分離した上清を乾固したのち, 水で再溶解し, CG-120 のショートカラムを通過させた. 吸着成分は, まず 2M ピリジンで M-1 を溶出したのち, 4N アンモニア水で M-3 を溶出させ, それぞれ RIA 法で定量を行った. 未吸着部分の M-2, M-4, M-5, M-6 の HPLC による一斉分析は M-2 の不安定性のために難行したが, M-2 のメトキシミノ体への誘導化を行い, Clin Elut (Analytichem International, U. S. A.) を用いたカラム抽出法で clean-up する方法により, 現在定量法を確立しつつある.

ホルフェニシノールの体内動態に関する研究

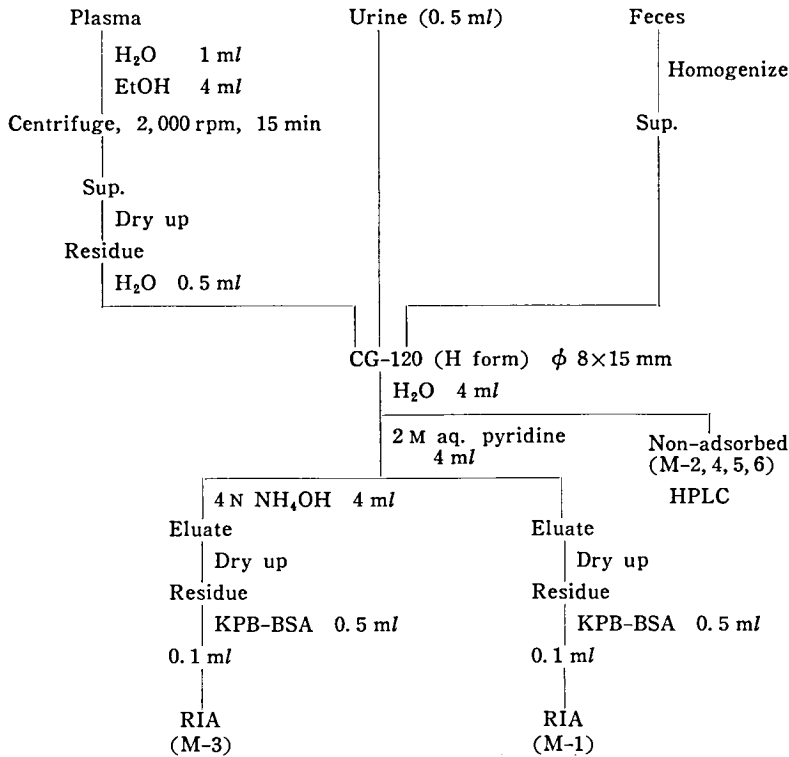


図 5 Clean-up procedure.

3. ホルフェニシノールの体内動態

RIA 法の標識抗原として調製した [³H]-ホルフェニシノールをラットに 1 mg/kg 経口投与, あるいは 1 mg/kg 静脈注射し, ホルフェニシノールの血中濃度, 総排泄, バイオアベイラビリティについて検討を行った.

図 6 に, 絶食下経口投与および静脈注射したときの, ホルフェニシノールの血中濃度の経時変化を示した. 経口投与では, 投与後平均 21 分で最高濃度 1.703 μg/ml (ホルフェニシノール換算量) に達し, ピーク以後は速やかに減少し, 投与後 8 時間で最高濃度の 1/30 以下までに減少する.

台形方式で求めた経口投与における AUC は平均 3.677 μg·hr/ml であり, 静脈注射における AUC 3.52 μg·hr/ml と比較してほぼ同じ値を示し, 経口投与における吸収性のよいことが明らかとなった.

図 7 に, 尿および糞中への総排泄についての結果を示した. 図に示した通り, 経口投与, 静脈

注射とも尿中への排泄がほとんどであり, 投与後 8 時間で投与量の約 70%, 48 時間までに 90~95% 排泄され, 糞中には投与後 48 時間で 1~2% ときわめてわずかで, 腸肝循環はあまりないと考えられる.

以上の結果から, ホルフェニシノールは投与後速やかに吸収され, 蓄積することなく速やかに尿中に排泄される薬剤であることが示された.

なお, 代謝物の定量, dose response, 連続投与による体内動態研究など, さらに検討中である.

文 献

- 1) Umezawa, H. Small molecular weight immunomodifiers produced by microorganisms: Their screening and discoveries, and the genetics of microbial secondary metabolites. *In* Small Molecular Immunomodifiers of Microbial Origin. ed. by H. Umezawa, pp. 1-16, Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1981).
- 2) Ishizuka, M., Ishizeki, S., Masuda, T., Momose, A., Aoyagi, T., Takeuchi, T., and Umezawa, H.

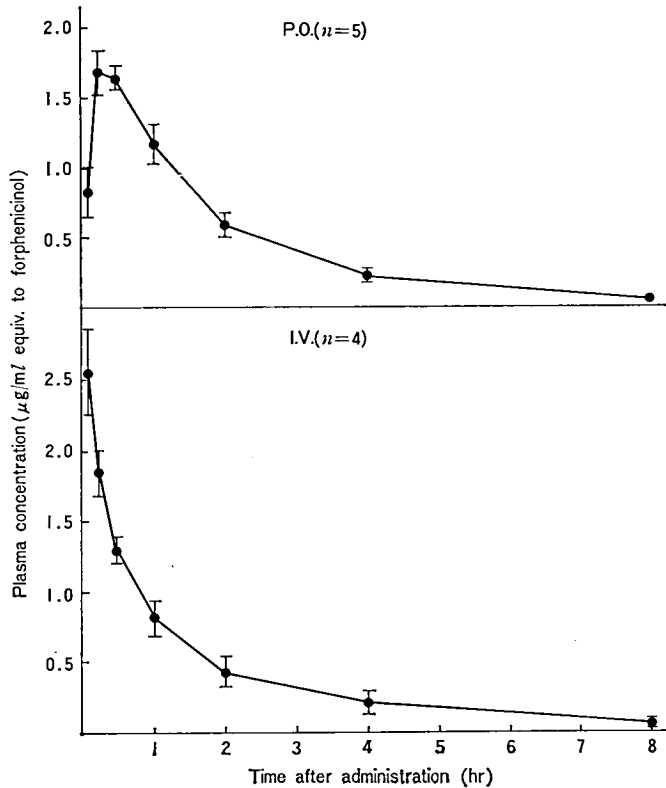


図 6 Plasma levels of radioactivity after administration of 1 mg/kg of [^3H]-forphenicicol in rats (mean \pm S. D.).

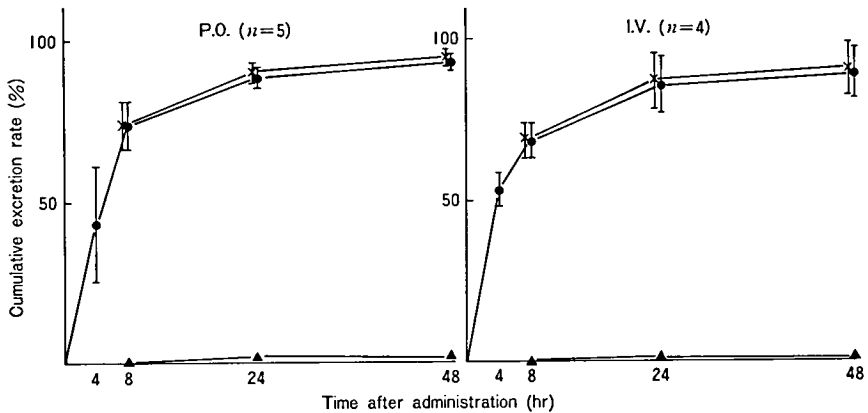


図 7 Cumulative excretion of radioactivity in urine and feces after administration of 1 mg/kg of [^3H]-forphenicicol in rat (mean \pm S. D.).

●, urine; ▲, feces; ×, total.

- Studies on effects of forphenicicol on immune responses. *J. Antibiot.*, **35**, 1042-1048 (1982).
- 3) Ishizuka, M., Masuda, T., Kanbayashi, N., Watanabe, Y., Matsuzaki, M., Sawazaki, Y., Ohkura, A., Takeuchi, T., and Umezawa, H. Antitumor effect of forphenicicol, a low molecular weight immunomodifier, on murine

transplantable tumors and microbial infections. *J. Antibiot.*, **35**, 1049-1054 (1982).

- 4) 微生物化学研究所, 萬有製薬株式会社. Forphenicicol の概要, pp.35-47 (1981).
- 5) 松下 宏, 辻 繁勝. 微生物の二次代謝産物に由来する 難病治療薬の開発研究. 57 年度研究報告書, pp.51-57 (1983).

ロイペプチンおよびベスタチンの 難病治療薬としての開発研究

田中 亘*2・石井靖男*2

I. Bioavailability

1. ロイペプチンの bioavailability

研究協力者 山下幸和*1, 渡辺恵子*1, 水口 茂*1, 高山秀樹*1, 石橋正元*1, 宮崎 浩*2, 円堂 隆*1, 新井貞男*1, 竹井征夫*1, 島津忠寿*1

2. マウスにおけるベスタチンの bioavailability

研究協力者 諏訪正人*1, 亀谷俊一*1, 渡辺紀子*1, 小山道則*1, 石橋正元*1, 宮崎 浩*2

3. RIA によるベスタチンの微量定量法

研究協力者 諏訪正人*1, 渡辺紀子*1, 浅川紀子*1, 入江朱美*1, 小山道則*1, 石橋正元*1, 宮崎 浩*2

4. 高速液体クロマトグラフィーによる血中ベスタチンの簡易微量定量法

研究協力者 矢沢勇一*1, 松田隆蔵*1, 中川淑子*1, 東海林栄敏*1, 島津忠寿*1

II. 製剤研究

1. 硫酸ロイペプチンおよびその製剤の安定性

研究協力者 石間戸秀之*1, 青木 稔*1, 寺田 隆*1, 二宮 宏*1

2. 硫酸ロイペプチン新製剤の研究

研究協力者 石間戸秀之*1, 青木 稔*1, 寺田 隆*1, 二宮 宏*1

3. ベスタチンのドライシロップ剤（細粒状）の調製とその安定性

研究協力者 石間戸秀之*1, 青木 稔*1, 寺田 隆*1, 二宮 宏*1

III. 毒性試験

—ロイペプチン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）総合研究所

*2 日本化薬（株）医薬事業部

*3 食品薬品安全センター秦野研究所

ロイペプチンおよびベスタチンの 難病治療薬としての開発研究

I. Bioavailability

1. ロイペプチンの bioavailability

ロイペプチン (Leup) の bioavailability を高めるために、これまでマウス¹⁾、ラット²⁾、イス³⁾、およびニワトリ⁴⁾を用いて、種々の投与経路におけるロイペプチンの血漿中濃度の差異につき検討してきた。しかしながら、動物種差は認められるものの、いずれの動物種においても、経口投与では bioavailability は低いと判断せざるを得なかった。経口投与において、この低い血漿中濃度を示す原因として、①肝臓における初回通過効果、②腸内細菌叢による分解、③経口吸収性の悪さ、④胃、腸内での分解などが考えられる。そこで、初回通過効果の有無を明らかにするため、門脈内注入、十二指腸内投与した際の血漿中濃度を測定し、経口投与時のそれと比較した。一方、ラットの硫酸フラジオマイシン投与群と非投与群に対して十二指腸内投与した際の血中濃度測定によって腸内細菌叢による分解の可能性を、また日本薬局方に記載された人工胃液、人工腸液での安定性などを明らかにしつつロイペプチンの bioavailability を高めるに足る新しい投与方法を検索するため、改めて基礎的な検討を行った。

1-1. ラットの門脈内、十二指腸内、および経口投与時の血中濃度

1) 実験方法

a) 動物

雄性 CRJ-SD ラット、7週齢 (220~240 g)

b) 投与量

ロイペプチン (Lot. 32) 60 mg/ml 生食溶液を、ロイペプチンとして門脈内投与時 10 mg/kg、十二指腸内および経口投与時 30 mg/kg として投与した。

c) 採血方法

下記の投与時間後に尾静脈採血し、常法により血漿を得た ($n=5$)。

門脈内投与： 5, 15, 30 分, 1, 2, 4, 6 時間

十二指腸内投与： 15, 30 分, 1, 2, 4, 6, 8 時間

経口投与： 30 分, 1, 2, 4, 6, 8 時間

d) ロイペプチンの測定

昭和 56 年度研究報告書に記載した RIA 法⁵⁾に従って、ロイペプチンの測定を行った。

2) 結果および考察

ロイペプチン投与後の血中濃度の経時変化を図 1 に示した。今回の検出限界は 0.3 ng/ μ l 血漿であった。[AUC]_{0-6hr} は門脈投与で 20.47 \pm 7.62

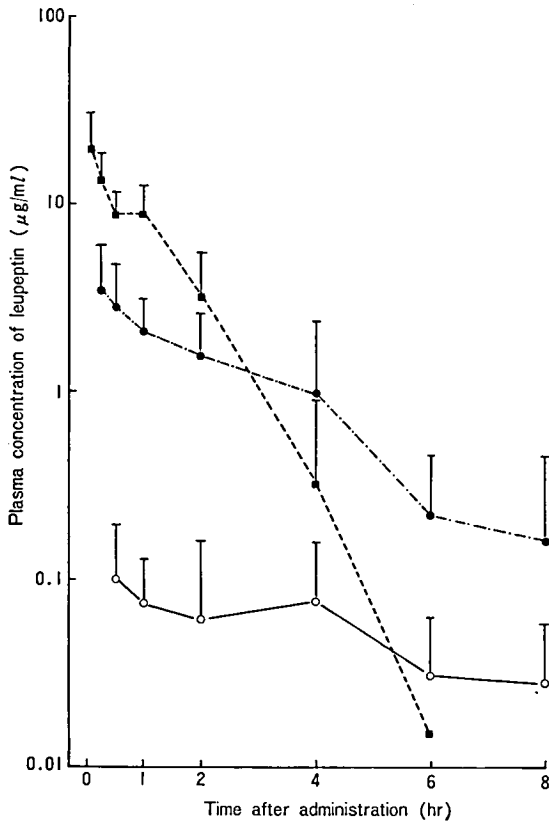


図1 Plasma concentration of leupeptin in rats after intravenous (10 mg/kg ; portal vein) (■), intraduodenal (30 mg/kg) (●), and oral (30 mg/kg) (○) administration of leupeptin.

$\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ (10 mg/kg), 十二指腸内投与 $8.31 \pm 4.94 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ (30 mg/kg), 経口投与 $0.36 \pm 0.31 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ (30 mg/kg) であった。

[AUC]_{0-8hr}を比較すると、経口投与時のAUCを100としたとき、十二指腸内投与時で231、門脈内投与時569であった。門脈内投与後の血中濃度は予想したより高い値を示したことから、経口投与時の血中濃度が門脈内投与よりも低い理由として、肝臓における初回通過効果の関与は大きくないことが示唆された。一方、十二指腸内投与に比べ経口投与による血中濃度は非常に低かったことから、腸管からの吸収率の悪さが経口投与時の血中濃度低下の原因ではないことが示唆された。

1-2. 腸内細菌がロイペプチンの bioavailability に及ぼす影響

1) 実験

腸内細菌の処理には硫酸フラジオマイシン(経口投与)を用いた。実験条件は下記の通りである。

a) 動物

CRJ-SD 雄性ラット, 8週齢 (270~300 g)

b) 投与方法

i) 腸内細菌処理群 (n=5)

硫酸フラジオマイシン (100 mg/rat/回) を1日2回, 1週間にわたり経口投与したのち, 30 mg/ml 生食溶液を, ロイペプチン 30 mg/kg b.w. となるように十二指腸内投与した。投与にあたっては, 胃幽門部を結紮後, テルモシリンジを用いて十二指腸内に薬液を注入した。

ii) 対照群 (n=4)

硫酸フラジオマイシンの前投与を行わずに, ロイペプチンを投与した。

c) 採血時間

ロイペプチン投与後, 15, 30分, 1, 2, 4, 6, および8時間に尾静脈より採血した。血液は採取後 10,000 rpm×5時間遠心し, 血漿を得たのち測定時まで -20°C で凍結保存した。

d) 血中ロイペプチン測定

昭和56年度研究報告書に記載したRIA法により行った⁹⁾。

2) 結果および考察

フラジオマイシン処理群および非処理群両者の血中濃度曲線を図2に示す。[AUC]₀₋₈はフラジオマイシン処理群で 5.23 ± 3.77 , 非処理群で $6.19 \pm 3.74 (\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml})$ であり, 両者間に有意差は認められなかった。また, いずれの測定時点においても血中濃度に有意差は認められなかった。前節に述べた門脈内注入と十二指腸内投与時の bioavailability の差が, 腸内細菌によるロイペ

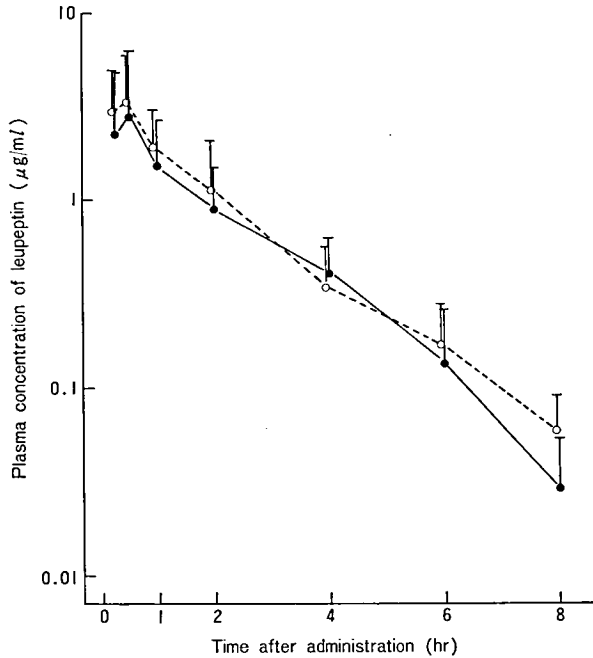


図 2 Plasma concentration of leupeptin in rats after intraduodenal administration of leupeptin (30 mg/kg). ○, control ; ●, fradiomycin treatment (100 mg×2/head/day for 7 days).

チンの分解に起因する可能性は小さいと判断された。

1-3. ロイペプチンの人工胃液および人工腸液中での安定性

前節の報告にみられたように、ラットにロイペプチンを投与したとき、投与方法の違いによりその血中濃度に大きな差が認められた。たとえば、投与後 30 分後の血中濃度は、経口投与の場合を 1 としたとき、十二指腸投与ではその約 30 倍、門脈内投与では約 200 倍である。十二指腸投与で高い血中濃度が測定されたことは、剤型を改良することによる効果の改善の可能性を示しており、非常に興味のあることである。この原因の 1 つとして、投与部位におけるロイペプチンの安定性の差を考慮することができるが、本研究班の 56 年度報告書に記載されている水溶液中の安定性⁴⁾ によれば、上記の血中濃度の差を説明することはでき

ない。そこで、実際の胃液あるいは腸液中でのロイペプチンは、水溶液中とは異なった挙動を示すとの想定に基づき、消化酵素を含む人工胃液および人工腸液中での安定性を測定した。

1) 実験方法

a) 試料および試液

i) 0.1% ロイペプチン人工胃液溶液

ロイペプチン 500 mg に、第 7 改正日本薬局方の崩壊試験法に記載されているペプシンを含む人工胃液 (pH 1.2) を加えて 500 ml とする。

ii) 0.05% および 0.1% ロイペプチン人工腸液溶液

ロイペプチン 250 mg および 500 mg に上記薬局法に記載されているパンクレアチンを含む人工腸液 (pH 6.8) を加えておのおの 500 ml とする。

iii) ペプシン

和光純薬工業 (株) Pepsin, 1 : 100

iv) パンクレアチン

日本薬局方パンクレアチン（ミクニ化学産業（株））

v) 水素化ホウ素ナトリウム溶液

水素化ホウ素ナトリウム 320 mg に 0.1% 水酸化ナトリウム溶液を加えて 100 ml とする。

b) 安定性試験の方法

実際に投与した場合を考慮し、試験温度は 37°C とし、保持時間は人工胃液では 0.5, 1, 2, および 4 時間、人工腸液では 0.5, 1, 2, 4, および 6 時間とする。a) の i) および ii) で調製したおのおのの溶液約 20 ml を各保持時間ごとに準備し、37°C の水中で、水平振盪機を用いて振盪し、決められた時点でとり出し、その 10 ml を用いてロイペプチンの残存量を測定する。

c) 定量法

安定性試料溶液 10 ml をとり、これに 1% の水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を 12 に調整する。次に、水素化ホウ素ナトリウム溶液 2 ml を加えて 30 分間室温に放置し、1% リン酸水溶液 2 ml および内部標準溶液 5 ml を加え、さらに水を加えて全量を 50 ml とし、試料溶液とする。

一方、ロイペプチン 5 mg および 10 mg を約 10 ml の水に溶かし、上と同様に処理して内部標準溶液 5 ml を加え、さらに水を加えて全量を 50 ml とし、それぞれを 0.05% および 0.1% 標準溶液とする。

試料溶液および標準溶液について、次の操作条件で HPLC によりロイペプチンの定量を行う。

機器： 日立 655 型高速液体クロマトグラフ

カラム： Nucleosil 5 C 18(H) 4.6 mm i. d. × 160 mm

カラム温度： 30°C

溶媒： 0.05 M リン酸一アンモニウム：メタノール：アセトニトリル=80：12：8

溶媒流量： 毎分 1.4 ml

測定波長： 200 nm

注入量： 0.1% 溶液, 80 μ l; 0.05% 溶液, 160 μ l

内部標準溶液： *p*-ヒドロキシ安息香酸エチル 75 mg を 50% エタノールに溶かし 100 ml とする。

2) 結果

人工胃液および人工腸液中のロイペプチンの安定性を残存率として表 1 に示し、標準溶液および各試料の最終時点での HPLC クロマトグラムを図 3A~D に示す。

ロイペプチンの残存率は人工胃液 (pH 1.2) 中では 4 時間後 94.0%, 人工腸液 (pH 6.8) では 6 時間後 82.4% (0.05% 溶液) および 79.9% (0.1%) であった。いずれの場合にも生成物はラセミ化による D-ロイペプチンであり、分解物は認められなかった。また、反応液において経時的な pH の変化も認められず、これらの結果から、ロイペプチンは人工胃液および人工腸液中で比較的安定であるといえる。

3) 考察

投与方法と血中濃度の関連を究明するため、人工胃液および人工腸液中での安定性を測定したが、いずれの場合もロイペプチンは比較的安定であった。経口投与の場合の血中濃度は十二指腸投与の場合の約 1/30 であったことから、人工胃液中で

表 1 人工胃液および人工腸液中でのロイペプチンの安定性

試料	残存率 (%)				
	0.5	1	2	4	6 (hr)
人工胃液 (0.1%)	92.9	95.5	94.3	94.0	
人工腸液 (0.05%)	94.3	94.3	93.1	87.1	82.4
人工腸液 (0.1%)	96.1	93.4	90.6	84.9	79.9

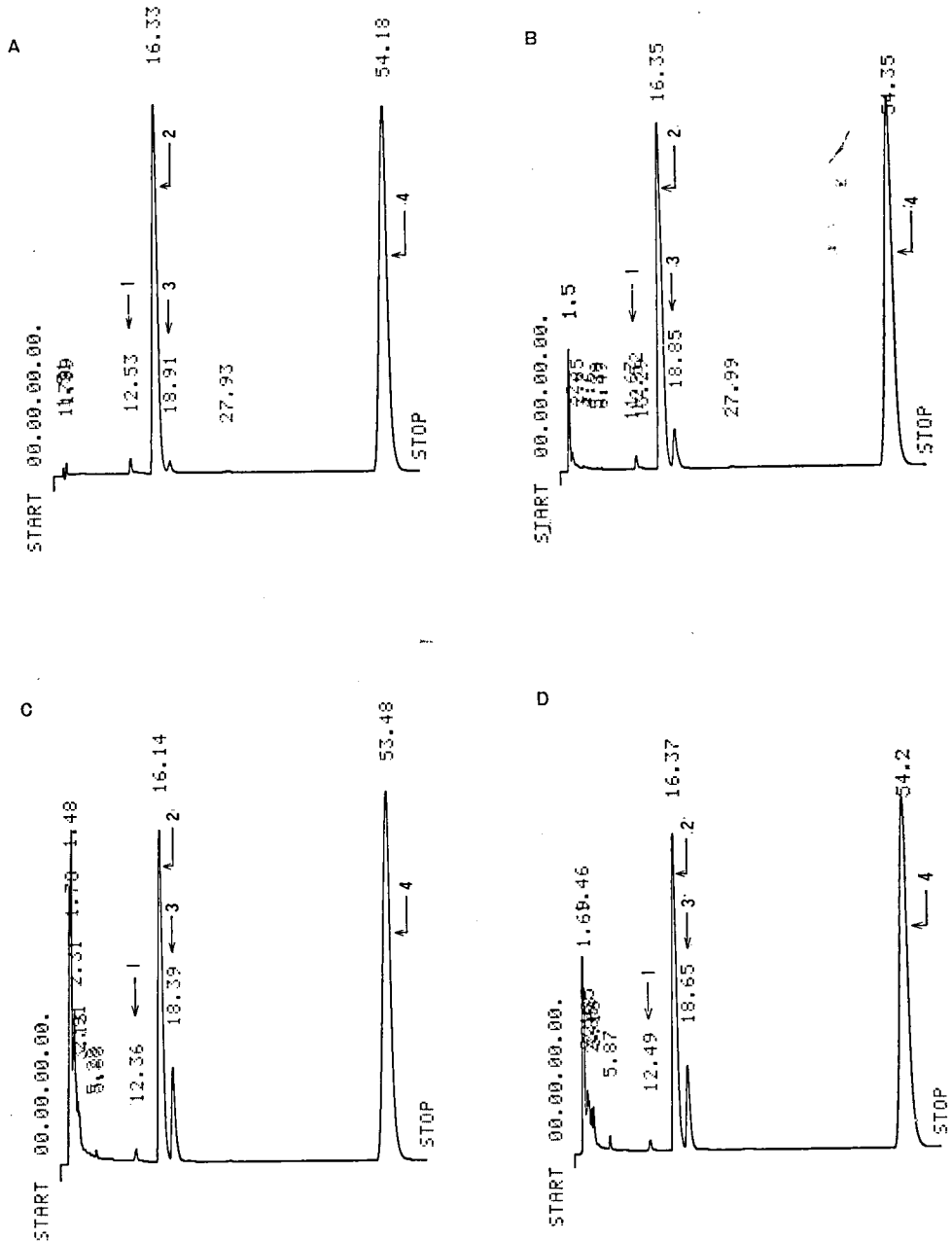


図3 標準溶液および反応溶液の HPLC クロマトグラム。A, 標準溶液 (0.1%) ; B, 人工胃液 (0.1%, 4時間) ; C, 人工腸液 (0.05%, 6時間) ; D, 人工腸液 (0.1%, 6時間)。peak 1, アセチルロイシルロイシン ; peak 2, L-ロイペプチノール ; peak 3, D-ロイペプチノール ; peak 4, 内部標準物質。

のかなりの不安定性を予想したが、人工腸液中に比べむしろ人工胃液中でのほうが安定性が大きかった。

また、これらの結果は、56年度本研究班の報告

書に記載されている酸性水溶液および各種 pH のリン酸緩衝液中でのロイペプチンの安定性の結果と同等であり、人工胃液および人工腸液中に添加されているペプシンおよびパンクレアチンによる

影響はほとんど認められなかった。

したがって、得た結果からは、投与方法の違いによる血中濃度の差を説明することができない。それらの差は、何らかの他の原因によるものと考えられる。

1-4. イヌにおける腸溶錠の経口投与

1) 実験方法

a) 製剤および投与方法

ロイププチン 50 mg を含有する裸錠を製し、これに腸溶皮膜を施して、裸錠および腸溶錠とした(本研究報告書Ⅱ節)。これらの2錠を水 50 ml とともにイヌに経口投与した。なお、同一個体に対して、腸溶錠投与後1週間に裸錠投与を行った。

b) 動物

ビーグル犬(雄性, 体重約 10 kg, $n=3$)。投与

前 24 時間は絶食した。

c) 採血

投与後 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, および 24 時間に前肢静脈より採血した。血液は、常法により血漿とし、測定時まで -20°C で凍結保存した。

d) 血中濃度の測定

血漿 100 μl を用いて、昭和 56 年度研究報告書に記載した RIA 法により測定した³⁾。

2) 結果および考察

裸錠および腸溶錠をイヌに経口投与したときの血中濃度を図 4 に示した。裸錠投与時の吸収は速やかであり、投与後 30 分ですでにピークに達した。一方、腸溶錠は投与後 4 時間で最高血中濃度を示し、腸溶錠としての特徴を有していた。 $[\text{AUC}]_{0-24\text{hr}}$ は腸溶錠で 0.27 ± 0.11 , 裸錠で $0.84 \pm 0.17 \mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$ であり、腸溶錠は裸錠の $[\text{AUC}]_{0-24\text{hr}}$ に比し 1/3 にすぎなかった。

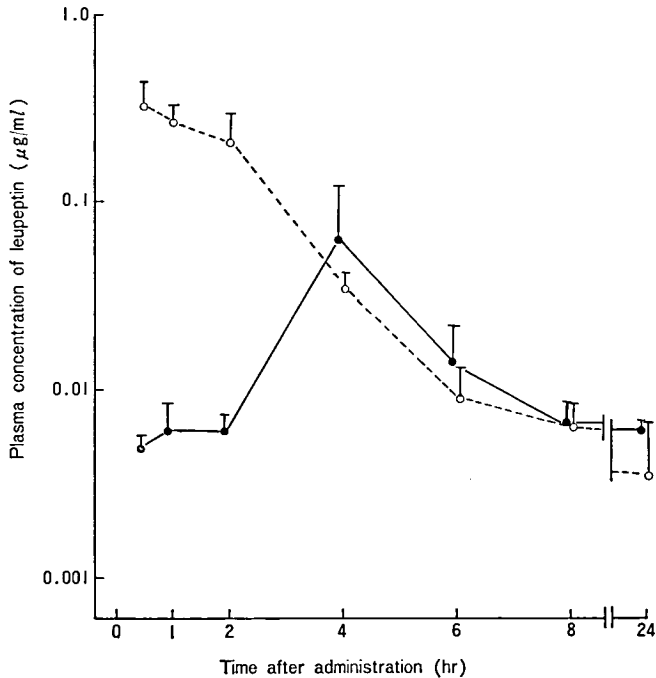


図 4 Plasma concentration of leupeptin in male beagle dogs after oral administration of leupeptin-tablets ($50 \text{ mg} \times 2$) (O) and leupeptin-enteric coated tablets ($50 \text{ mg} \times 2$) (●).

前節で述べたように、ラットにおいては経口投与時よりも十二指腸内投与時のイヌが高い血中濃度を示したが、イヌでの結果はこれと相反する傾向を示し、bioavailability 向上のための腸溶錠の可能性は小さいことが示唆された。

1-5. ロイペプチンジエチルアセタール投与時のロイペプチンならびにロイペプチンジエチルアセタールのラットにおける血中濃度

1) 実験

a) 動物

CRJ-SD 系雄性ラット

b) 投与量

ロイペプチンジエチルアセタールを 30 mg/kg で経口投与した。

c) 採血

投与後 0.5, 1, 2, 4, 6, および 8 時間に前肢腋窩動脈より採血した。

d) ロイペプチンおよびロイペプチンジエチルアセタールの血中濃度測定

ロイペプチンおよびロイペプチンジエチルアセタールの測定は、交叉反応性を利用した RIA 法³⁾により実施した。

2) 結果および考察

a) ロイペプチンおよびロイペプチンジエチルアセタールの測定法

³H-ロイペプチンをトレーサーとし、ロイペプチンカルボキシメトキシムをハプテンとして得られた抗血清を用いたときのロイペプチンおよびロイペプチンジエチルアセタールの特異性を図 5 に示す。

図から明らかなように、両者の検量線は完全に一致し、この方法によりロイペプチンおよびロイペプチンジエチルアセタールの識別はできないものの、両者の総量の測定が可能となった。

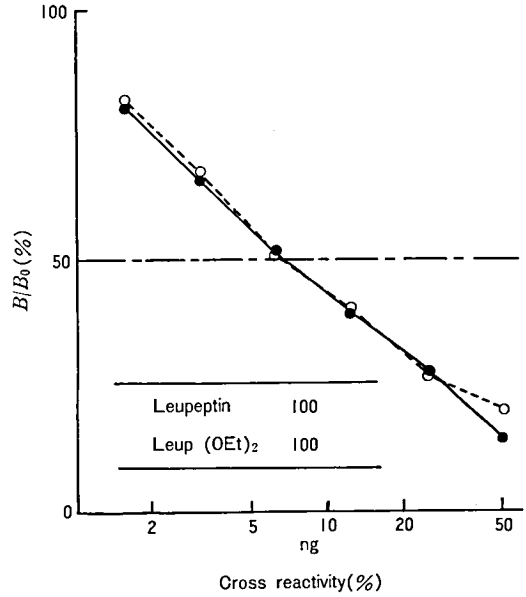


図 5 Cross reactivity of Leup (OEt)₂ (○) to leupeptin (●) by the use of [³H]-leupeptin and antiserum A-2.

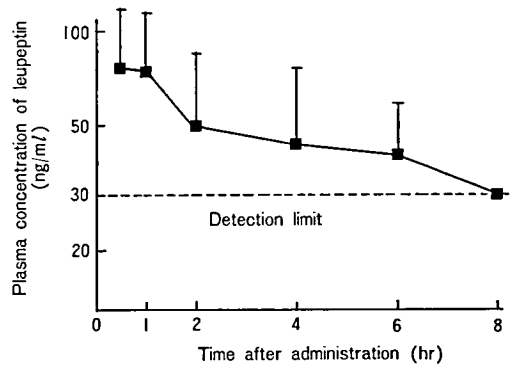


図 6 Plasma concentration of leupeptin in rats after oral administration of Leup (OEt)₂ (30 mg/kg).

b) ラットにおける bioavailability

本法により、ロイペプチンジエチルアセタールをラットに 30 mg/kg で経口投与したときのロイペプチンおよびロイペプチンジエチルアセタールの総量の血漿中濃度を図 6 に示す。このときの検出限界は 30 ng/ml (ロイペプチン換算) であった。この図から明らかなように、ロイペプチンを経口投与したときの血中濃度とほとんど変わらず、ロイペプチンジエチルアセタールのプロドラッグとし

ての可能性はほとんどないことが示唆された。

1-6. ラットにおける親水軟膏投与

1) 実験方法

下記の計画に従って投与を行い、各時点で全血採取後、軟膏塗布部直下の筋肉を採取した。

a) 製剤ならびに投与量

20% ロイペプチン-親水軟膏。投与直前に調製し、30 mg/kg の割合で、脱毛した背部に塗布した。

b) 動物

CRJ-SD 雄性ラット。8週齢(260~290 g)、各群 $n=3$ 。投与前日にエバクリーム®を用いて背部(塗布面)を除毛する。自由摂餌。

c) 血液ならびに筋肉の採取

投与後1, 2, 4, および8時間。採取した血液は血漿とし、また筋肉は採取したままの状態、測定時まで -20°C で凍結保存。

d) 血中濃度測定は、血漿 $100\ \mu\text{l}$ を用いて、常法に従い RIA 法³⁾で行う。筋肉内濃度測定においては、組織に結合した状態で存在するロイペプチンを n -nonanoyl-L-Leu-L-Arg-CHO を用いて遊離型としたのち、全ロイペプチン量を測定した³⁾。

2) 結果および考察

血中および筋肉内濃度曲線を図7に示す。

血中濃度は投与後1~8時間ではほぼ一定の値を維持した。筋肉内濃度は投与後2時間以降8時間まで、血中濃度と同レベルで推移し、大きな変動は認められなかった。

$[\text{AUC}]_{0-8}$ は血中で 0.98, 筋肉内で 0.77 ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ or g) である。これまでに行った20%ロイペプチン-ワセリン軟膏(投与量は今回同様30 mg/kg)投与実験(ラット)³⁾では、 $[\text{AUC}]_{0-8}$ が血中で 1.29, 筋肉内で 1.50 ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ or g) だったので、今回の親水軟膏ではワセリン軟膏投与時の AUC と比べて血中で約 $3/4$, 筋肉内で約 $1/2$ の値が得られたことになる。

しかしながら、ワセリン軟膏についてはこれまでに行われた3回の実験間での AUC に数倍の差が認められている^{3,6)}。したがって、今回までの結果から、親水軟膏、ワセリン軟膏の bioavailability の優劣を論ずるのは困難であった。

一方、前節で述べた経口投与時の血中 $[\text{AUC}]_{0-8}$ は $0.43\ \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ であったのに対して、親水軟膏 $[\text{AUC}]_{0-8}=0.98$, ワセリン軟膏 $1.29\ \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ であった。経口投与よりも軟膏剤のほうが高い AUC を示し、軟膏剤の有用性が示唆された。

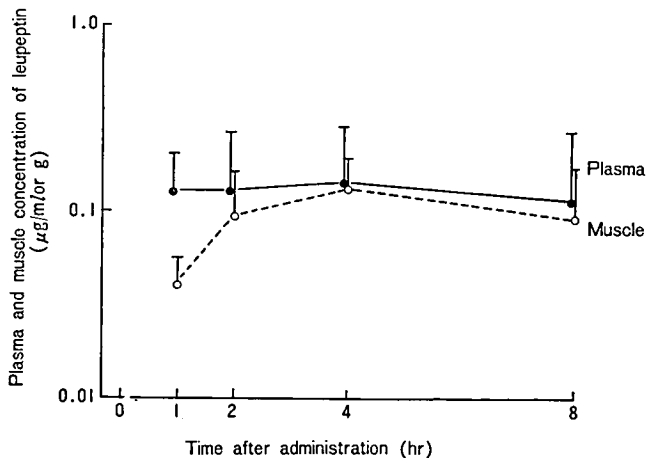


図7 Plasma and muscle concentration of leupeptin in rats after percutaneous administration of leupeptin (30 mg/kg; 20% hydrophylic ointment).

今後、bioavailability の高い軟膏剤の設計を含めて、残された問題の解決にあたりたい。

1-7. ウサギにおけるワセリン軟膏塗布後の血漿および筋肉内濃度

1) 実験

(財) 食品薬品安全センターにて、ウサギにおける 35 日間経皮毒性試験を実施した際に試料を提供していただいた。

a) 試料

i) 血液

毒性試験と並行して、血中濃度測定のため 1 群 3 匹で連続投与し、初回、14 日目および 35 日目に経時的に血液を採取した。

ii) 筋肉

1 群 5 匹で実施した毒性試験において、35 日

間の連続投与終了後、剖検時に塗布部直下および大腿部より約 10 g を採取した。

b) 投与量

Vehicle control と 10%, 20%, および 30% ロイペプチン-ワセリン軟膏を、脱毛した背部皮膚 25 cm² に 0.5 g 投与した(ロイペプチン投与量として 0, 19, 38, および 57 mg/kg b. w. に相当する)。

c) 濃度測定

採取された血漿および筋肉内ロイペプチン濃度測定を、昭和 56 年度研究報告書に記載した RIA 法⁹⁾に準じて行った。

2) 結果および考察

測定結果は表 2~表 7 に示す通りであった。図 8 に示すように、血中ロイペプチン濃度は、単回塗布において投与量に依存して上昇したが、連続

表 2 Plasma concentration of leupeptin (vehicle control)

Period (week)	Time (hr)	Plasma concentration (leupeptin ng/ml plasma)			
		No. 6	No. 7	No. 8	Mean ± S. D.
0	0	N. D.	13.8	N. D.	7.9 ± 4.1
	1	N. D.	20.6	N. D.	10.2 ± 7.4
	2	33.4	31.6	18.8	27.9 ± 6.5
	4	12.6	15.6	19.6	15.9 ± 2.9
	6	25.0	11.2	23.4	19.9 ± 6.2
	24	N. D.	27.6	N. D.	12.5 ± 10.7
	AUC (ng·hr/ml)	377.8	466.5	353.9	386.1 ± 57.3
2	0	N. D.	11.4	N. D.	7.1 ± 3.0
	1	N. D.	N. D.	N. D.	5.0 ± 0.0
	2	N. D.	17.8	N. D.	9.3 ± 6.0
	4	N. D.	N. D.	N. D.	5.0 ± 0.0
	6	N. D.	N. D.	11.0	7.0 ± 2.8
	24	N. D.	N. D.	N. D.	5.0 ± 0.0
	AUC (ng·hr/ml)	120.0	142.4	180.0	147.5 ± 24.8
5	0	24.0	28.0	72.4	41.5 ± 21.9
	1	N. D.	67.8	N. D.	25.9 ± 29.6
	2	14.8	10.4	13.2	12.8 ± 1.8
	4	N. D.	18.2	N. D.	9.4 ± 6.2
	6	N. D.	10.4	14.8	10.1 ± 4.0
	24	N. D.	N. D.	N. D.	5.0 ± 0.0
	AUC (ng·hr/ml)	144.2	282.8	264.0	230.3 ± 61.4

N. D. < 10.0 ng leupeptin/ml plasma.

表 3 Plasma concentration of leupeptin (10% leupeptin)

Period (week)	Time (hr)	Plasma concentration (leupeptin ng/ml plasma)			
		No. 14	No. 15	No. 16	Mean±S. D.
0	0	12.2	13.4	17.8	14.5± 2.4
	1	792.4	20.0	24.4	278.8±362.9
	2	30.0	20.2	17.2	22.5± 5.5
	4	15.0	77.4	N. D.	32.5± 32.0
	6	N. D.	23.8	N. D.	11.3± 8.9
	24	N. D.	N. D.	N. D.	5.0± 0.0
	AUC (ng·hr/ml)	968.5	494.8	164.1	542.5±330.1
2	0	N. D.	20.0	18.0	14.3± 6.6
	1	15.8	N. D.	24.4	15.1± 7.9
	2	33.4	41.8	45.2	40.1± 5.0
	4	20.0	112.4	N. D.	45.8± 47.5
	6	10.0	17.4	60.0	29.1± 22.0
	24	53.6	24.6	33.8	37.3± 12.1
	AUC (ng·hr/ml)	690.8	697.9	1,015.4	801.4±151.4
5	0	15.2	121.0	113.2	83.1± 48.2
	1	N. D.	56.8	10.0	23.9± 23.3
	2	N. D.	38.2	N. D.	16.1± 15.7
	4	N. D.	N. D.	N. D.	5.0± 0.0
	6	N. D.	14.6	N. D.	8.2± 4.5
	24	N. D.	26.6	117.2	69.6± 76.6
	AUC (ng·hr/ml)	125.1	570.0	1,728.9	808.0±676.0

N. D. <10.0 ng leupeptin/ml plasma.

表 4 Plasma concentration of leupeptin (20% leupeptin)

Period (week)	Time (hr)	Plasma concentration (leupeptin ng/ml plasma)			
		No. 22	No. 23	No. 24	Mean±S. D.
0	0	N. D.	N. D.	N. D.	5.0± 0.0 [5.0± 0.0]
	1	194.2	235.8	107.2	179.1± 53.5 [150.7± 43.5]
	2	113.8	273.8	115.2	167.6± 75.1 [114.5± 0.7]
	4	56.8	967.4	73.4	365.9± 425.4 [65.1± 8.3]
	6	120.0	1,368.0	166.4	551.5± 577.7 [143.2± 23.2]
	24	104.2	840.0	29.0	324.4± 365.9 [66.6± 37.6]
	AUC (ng·hr/ml)	2,618.8	23,823.8	2,354.3	9,599.0±10,059.1 [2,486.6±132.3]
2	0	11.4	/	N. D.	8.2± 3.2
	1	N. D.	/	N. D.	5.0± 0.0
	2	N. D.	/	15.2	10.1± 5.1
	4	13.2	/	16.4	14.8± 1.6
	6	13.6	/	12.0	12.8± 0.8
	24	33.2	/	42.2	37.7± 4.5
	AUC (ng·hr/ml)	479.4	/	562.9	521.2± 41.8
5	0	12.4	/	N. D.	8.7± 3.7
	1	N. D.	/	N. D.	5.0± 0.0
	2	N. D.	/	10.4	7.7± 2.7
	4	19.4	/	15.2	17.3± 2.1
	6	16.6	/	16.6	16.6± 0.0
	24	46.8	/	10.4	28.6± 18.2
	AUC (ng·hr/ml)	644.7	/	313.1	478.9± 165.8

/ : not measured because of death. [] : without No. 23. N. D. <10.0 ng leupeptin/ml plasma.

表 5 Plasma concentration of leupeptin (30% leupeptin)

Period (week)	Time (hr)	Plasma concentration (leupeptin ng/ml plasma)			
		No. 30	No. 31	No. 32	Mean±S. D.
0	0	N. D.	N. D.	N. D.	5.0± 0.0
	1	288.0	17.8	69.0	124.9± 117.2
	2	81.2	67.2	686.8	278.4± 288.8
	4	338.4	348.8	117.0	268.1± 106.9
	6	176.8	276.0	96.2	183.0± 73.5
	24	10.2	517.2	78.0	201.8± 224.7
	AUC (ng·hr/ml)	2,948.9	8,233.5	2,999.7	4,727.4±2,479.3
2	0	63.2	132.4	31.6	75.7± 42.1
	1	34.2	58.8	28.6	40.5± 13.1
	2	92.6	61.6	57.2	70.5± 15.8
	4	50.0	47.8	54.0	50.6± 2.6
	6	52.0	66.4	35.2	51.2± 12.7
	24	451.6	190.0	184.0	275.2± 124.8
	AUC (ng·hr/ml)	4,889.1	2,687.0	2,246.2	3,274.1±1,156.1
5	0	365.4	160.8	171.4	232.5± 94.1
	1	159.0	49.2	48.0	85.4± 52.0
	2	30.0	78.8	20.8	43.2± 25.5
	4	43.2	35.8	11.4	30.1± 13.6
	6	39.2	33.8	22.6	31.9± 6.9
	24	28.0	26.6	38.2	30.9± 5.2
	AUC (ng·hr/ml)	1,117.1	896.8	757.5	923.8± 148.0

N. D. <10.0 ng leupeptin/ml plasma.

表 6 Plasma and muscle concentration of leupeptin at 24 hr after percutaneous administration of leupeptin (10, 20, and 30%) ointment

Group	Plasma and muscle concentration (ng/ml or g)			Group	Plasma and muscle concentration (ng/ml or g)				
	No. 33	No. 34	Mean±S. D.		No. 37	No. 38	Mean±S. D.		
Vehicle control	P	N. D.*	N. D.*	5.0± 0.0	20% leupeptin	P	13.0	18.8	15.9± 2.9
	A	N. D.	N. D.	12.5± 0.0		A	N. D.	N. D.	12.5± 0.0
	B	N. D.	N. D.	12.5± 0.0		B	25.1	41.1	33.1± 8.0
10% leupeptin		No. 35	No. 36	Mean±S. D.	30% leupeptin		No. 39	No. 40	Mean±S. D.
	P	N. D.*	19.0	12.0± 7.0		P	15.6	38.8	27.2±11.6
	A	N. D.	84.3	48.4±35.9		A	44.8	202.7	123.8±79.0
	B	N. D.	40.5	26.5±14.0	B	N. D.	21.9	17.2± 4.7	

N. D.* <10.0 ng leupeptin/ml plasma.

N. D. <25.0 ng leupeptin/g tissue.

P, plasma; A, vastus m., lateral; B, latissimus dorsi m.

投与による著しい濃度上昇は認められなかった。vehicle control 群においては再測定によってもロイペプチンが検出されたが、この原因は不明である。図 8 に示した通り、同一投与量と比較すると、

連続投与により AUC の減少することが観察された。単回投与時の筋肉内ロイペプチン濃度は、個体間の変動が大きく、投与量と筋肉内濃度値の関係を論ずることができなかった。連続投与終了時

表 7 Muscle concentration of leupeptin at 24 hr after repeated percutaneous administration of leupeptin (10, 20, and 30%) ointment for 5 weeks

Group		Muscle concentration (leupeptin ng/g tissue)					Mean±S. D.	
Vehicle control	A	No. 1 57.1	No. 2 N. D.	No. 3 N. D.	No. 4 N. D.	No. 5 N. D.	21.4± 17.8	
	B	N. D.	N. D.	37.9	32.5	N. D.	21.6± 11.3	
10% leupeptin	A	No. 9 N. D.	No. 10 N. D.	No. 11 N. D.	No. 12 61.9	No. 13 42.7	28.4± 20.4	
	B	201.1	37.3	N. D.	70.4	27.7	69.8± 68.3	
20% leupeptin	A	No. 17 N. D.	No. 18 N. D.	No. 19 N. D.	No. 20 N. D.	No. 21 N. D.	12.5± 0.0	
	B	N. D.	101.3	N. D.	530.1	N. D.	133.8± 201.1	
30% leupeptin	A	No. 25 N. D.	No. 26 62.4	No. 27 44.3	No. 28 N. D.	No. 29 123.2	51.0± 40.9	
	B	3,928.0	67.2	85.3	50.7	188.3	863.9±1,532.8	

N. D. < 25.0 ng leupeptin/g tissue.

A, vastus m., lateral; B, latissimus dorsi m.

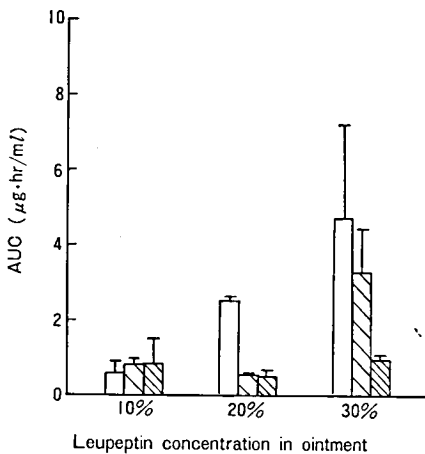


図 8 AUC in rabbits after single and repeated administration of leupeptin ointment. □, 0; ▨, 2; ▩, 5 weeks.

における筋肉内ロイペプチン濃度は、塗布部直下において大腿部よりも高濃度を示し、その濃度は投与量に依存して上昇した。これに反し、大腿部におけるその上昇はわずかであった(図9)。血中濃度と筋肉内濃度は対応した変化を示さなかった。

(財)食品薬品安全センターの所見として、軟膏を連続投与すると、皮膚が肥厚したということ

である。皮膚は、発毛期になると肥厚するとされ、軟膏塗布という局所刺激により hair cycle が変化するために起った現象であろうと考察されている。連続投与により AUC が小さくなった原因の1つとして、この皮膚厚化による吸収低下の可能性が示唆された。一方、連続投与により AUC が小さくなるという現象は、これまでに行われた筋ジストロフィー発症マウスに対するワセリン軟膏連続投与実験⁵⁾ およびヒトに対する経口による連続投与³⁾ においても認められているので、ロイペプチンが連続投与により代謝酵素誘導を起す可能性も考えられよう。

2. マウスにおけるベスタチンの bioavailability

ベスタチンを筋ジストロフィー症の治療薬として開発するにあたって、投与量と血中動態との関係を明らかにし、血中濃度値から標的組織である筋肉への移行量を推定可能とすることは適切な投与計画を立案するうえで重要である。ここでは、筋ジストロフィー発症マウスにベスタチンを投与するに先立ち、C 57 BL/6 マウスにおける単回お

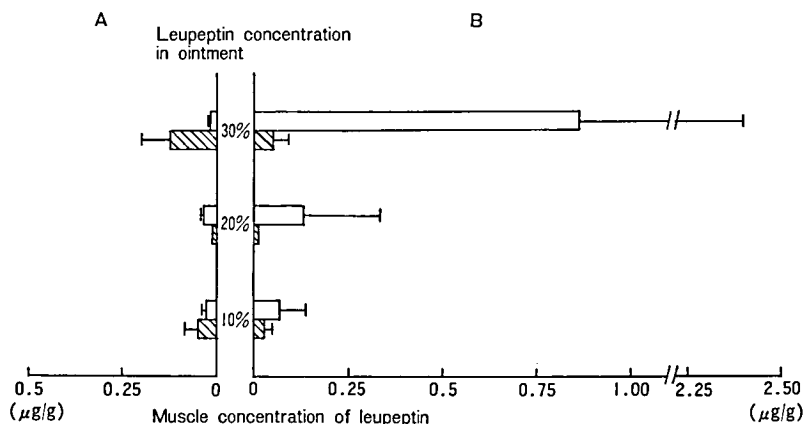


図 9 Muscle concentration of leupeptin in rabbits after percutaneous.
 ▨, v. m. lateral; □, muscle (administration site). A, 24 hr after administration; B, 24 hr after repeated administration for 5 weeks.

よび連続投与時のベスタチン血中動態および筋肉内におけるベスタチンとその代謝物の動態を明らかにし、血中動態との比較を行うこととした。さらに、ベスタチン投与時の尿中代謝物の検討をも同時に実施した。

1) 実験方法

a) 試 薬

ベスタチンは日本化薬(株)にて製造した医薬品純度のものを使用した。放射性同位元素標識化合物である $[^3\text{H}]$ -ベスタチン(N -[(2*S*, 3*R*)-3-amino-2-hydroxy-4-(2'- $[^3\text{H}]$)-phenylbutanoyl]-*L*-leucine)は N -[(2*S*, 3*R*)-3-benzyloxy-carbonyl-amino-2-hydroxy-4-(2'-bromo)-phenylbutanoyl]-*L*-leucine benzyl ester を原料として New England Nuclear 社(Boston, Mass.)にて ^3H -ガスによる接触還元を行ったのち、得られた還元生成物をさらに当研究所にて精製した。得られた $[^3\text{H}]$ -ベスタチンは放射能検出器(Berthold HPLC Radioactivity Monitor LB-503 型, 西ドイツ)付 HPLC(Shimadzu, LC-4A, 島津製作所, 京都)を用いて放射化学的純度を測定した結果, 99% 以上であった。また, このものの比放射能は 15 mCi/mg であった。

b) 実験動物および投与方法

単回投与群については、日本チャールスリバーより購入した雄性マウス C 57 BL/6 (体重 20.5 ± 0.1 g, 8 週齢) を 1 群 3 匹として使用した。 $[^3\text{H}]$ -ベスタチンを 1.32 mg・1.26 mCi/kg, 5.04 mg・1.26 mCi/kg, および 12.47 mg・1.26 mCi/kg の割合でおおのこの群に経口用ゾンデを用いて投与した。連続投与群については、雄性マウス C 57 BL/6 (体重 21.9 ± 0.3 g, 8 週齢) を 1 群 3 匹として、 $[^3\text{H}]$ -ベスタチンを 12.60 mg・1.33 mCi/kg の割合で 1 日 1 回, 7 日間連続経口投与した。

c) 筋肉および血液中濃度の測定

i) 単回投与群

血液中濃度測定群はベスタチン投与後 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間に尾静脈より heparinized capillary tube (国産遠心器(株), 東京)で経時的に採血し, COMBUSTCONE および PAD (Packard 社, Illinois, U. S. A.) にとり乾燥後サンプルオキシダイザー (Packard 社, B-306 型)で燃焼し, 生じたトリチウム水を冷却して捕集し, Mono PHASE-40 (Packard 社) をシンチレーターとして用いて液体シンチレーションカウンター (LSC-753 型, アロカ社, 東京) で放射能を測定

した。

また、筋肉中濃度測定群はベスタチン投与後、1, 4, 8時間にエーテル麻酔下、上腕動脈より放血させ、血液および筋肉（後肢大腿部）を採取した。筋肉は一定量を試料とし、燃焼法により放射能を測定した。

ii) 連続投与群

最終投与後、血液中濃度、筋肉中濃度測定群は i) と同様に行った。

d) 尿糞中排泄率の測定

i) 単回投与群

[³H]-ベスタチンを経口投与したマウスをメタボリックケージ（杉山元医理器（株）、東京）中で飼育し、24時間までに自然排泄された尿を採取した。尿は、その一定量に液体シンチレーター Atom light（New England Nuclear 社）を加えたのち、直接液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

ii) 連続投与群

i) の方法と同様に、尿は24時間ごとに採取し、その放射能を測定した。糞は24時間ごとに採取し、水を加えてホモジェネートし、その一定量を試料として燃焼法により放射能を測定した。

e) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による尿中、血漿中、筋肉中代謝物の同定および定量

e-1) HPLC 条件

装置は、Shimadzu LC-4A に UV 検出器 SPD-1（島津製作所）と放射能検出装置 LB-503 を装着したものをを用いた。カラムは、Nucleosil 7C18H（センシュエ科学、東京）4.6 mm i. d. × 20 cm をを用いた。試料注入後A液（20 mM リン酸アンモニウム溶液、pH 6.0）のみを10分間流し、その後B液（メタノール）を毎分2%の割合で50%まで増加させるグラジェント溶出法により分析した。流速は1.5 ml/min とした。

e-2) HPLC 分析のための試料調製

i) 尿

24時間までに排泄されたものをを用い、マイレ

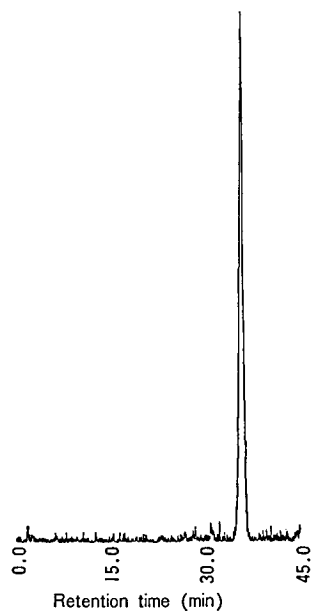


図 10 Radiochromatogram of [³H]bestatin by HPLC-RDI.

クス GS（日本ミリポア、リミテッド、東京）で濾過して得た濾液を HPLC 用試料とした。

ii) 血漿

ベスタチン投与後1時間のものをを用いた。すなわち、血漿 150 μl にエタノールを 40ml 加え、室温で 10 分間放置した。その後 3,000 rpm で 10 分間遠心して得た上清を分取し、溶媒を減圧下で留去したのち、残渣を 0.5 ml の純水に溶解した。次いで、マイレクス GS で濾過したのち、濾液を HPLC 用試料とした。

iii) 筋肉

ベスタチン投与1, 4, 8時間後に採取したものをを用いた。すなわち、筋肉 1g に生理食塩水 30 ml を加えてホモジェネートし、3,000 rpm で 20 分間遠心して得た上清を、XAD-W（オルガノ工業（株）、東京）カラム（15 mm i. d. × 50 mm）に移し純水 100 ml で洗浄後、メタノール 100 ml で溶出した。溶出液を減圧下で留去し、残渣を 0.5 ml の純水に溶解した。次いで、マイレクス GS で濾過したのち、濾液を HPLC 用試料

とした。

f) マウス後肢大腿筋ホモジェネートによるベスタチンの代謝 (*in vitro*)

C57BL/6 マウスをエーテル麻酔下で上腕動脈より放血死させ、後肢大腿部より筋肉を得た。その約 1g に 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.3) 5ml を加えてホモジェネートしたのち、10,000 rpm にて 20 分間遠心して上清を得た。この上清に [³H]-ベスタチンを 1×10⁷ dpm (sp. ac. 15 mCi/

mg)/30.4 mg protein の割合で加え、37°C で 24 時間インキュベーションした。インキュベーション後、反応液をマイレクス GS にて濾過し、得られた濾液を HPLC 用試料とした。

2) 結果および考察

雄性マウス C57BL/6 に [³H]-ベスタチンを 1.32, 5.04, および 12.47 mg/kg の割合で単回経口投与したときの 3 匹の平均血液中濃度 (放射活

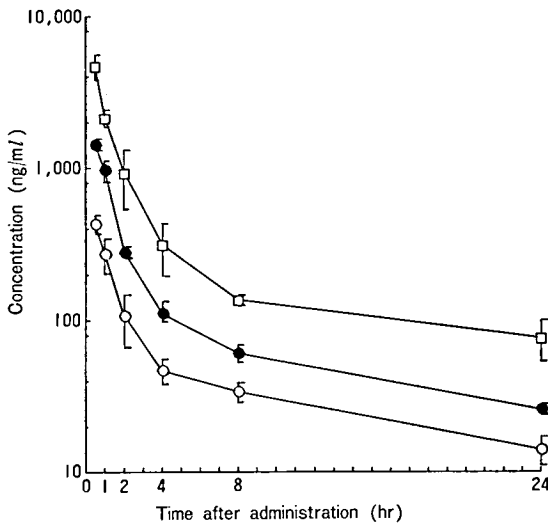


図 11 Blood concentrations of the radioactivity after a single oral administration to three male mice in a dose of 1.32 mg/kg (○), 5.04 mg/kg, and 12.47 mg/kg (●) of [³H]bestatin. The radioactivity was calculated in the amount of bestatin.

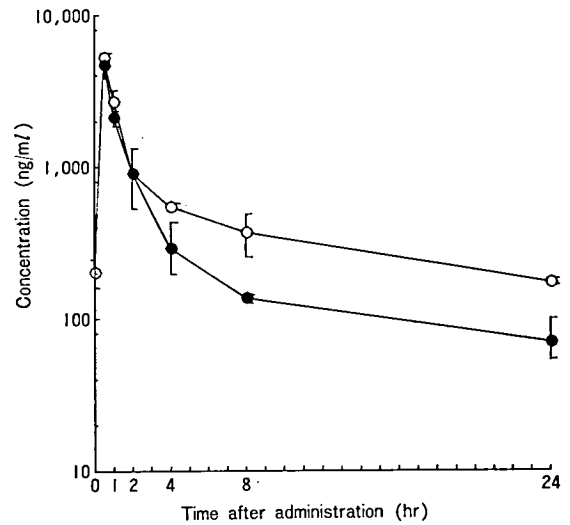


図 12 Comparison of blood concentrations of the radioactivity after a single (12.47 mg/kg) (●) and a repeated (12.60 mg/kg×7 days) (○) oral administration of [³H]bestatin. The radioactivity was calculated in the amount of bestatin.

表 8 Pharmacokinetic parameters of mean blood concentration after a single and a repeated oral administration of [³H]bestatin on several doses

Dose (mg/kg)	[AUC] ₀₋₂₄	C _{max}	T _{max}	t _{1/2α}	t _{1/2β}	K _{eα}	K _{eβ}
1.32	1,172.75	429	0.5	0.56	12.49	1.243	0.055
5.04	3,003.75	1,485	0.5	0.53	13.00	1.315	0.053
12.47	8,277.50	4,699	0.5	0.60	19.24	1.156	0.036
12.60*	12,793.75	5,241	0.5	0.43	14.64	1.621	0.047

*: repeated in daily dose of 12.60 mg/kg for 7 days.

[AUC]₀₋₂₄: area under blood concentration vs. time curve (ng·hr/ml).

C_{max}: maximum blood concentration (ng/ml).

T_{max}: time to maximum blood concentration (hr).

K_{eα} or K_{eβ}: elimination rate constant (hr⁻¹).

t_{1/2α} or t_{1/2β}: blood half-life (hr).

性値のベスタチン換算値)の推移を図 11 に示す。また、雄性マウス C 57 BL/6 に [^3H]-ベスタチンを 12.60 mg/kg の割合で 1 日 1 回、7 日間連続経口投与したときの最終回投与後の、3 匹の平均血液中濃度の推移を図 12 に示す。これら血液中濃度値より算出した pharmacokinetic parameters を表 8 に示した。

単回経口投与群の平均血液中濃度における T_{\max} はいずれも 0.5 時間を示し、 C_{\max} は用量依存的に増加した。 α 相の半減期はいずれの投与量においてもほぼ一定の値 ($t_{1/2\alpha}$ 0.5~0.6 時間、投与後 0.5~2 時間値で算出) を示した。一方、 β 相の半減期 ($t_{1/2\beta}$ 12~9 時間、投与後 8~24 時間値で算出) は投与量の増加に伴ってわずかに延長する傾向を示した。[AUC] $_{0-24}$ は用量依存的に増加することが認められた。また、投与量と [AUC] $_{0-24}$ との間にはよい相関 ($r=0.997$) がみられた。連続経口投与群の平均血液中濃度において、 T_{\max} は単回経口投与時と同様に 0.5 時間であった。また、 C_{\max} は単回経口投与時のそれと比較すると約 1.1 倍となり、わずかな増加にと

どまった。各測定点における平均血液中濃度は、単回経口投与群に比べ高くなる傾向がみられたが、有意差が認められたのは投与後 24 時間 ($P<0.01$) のみであった。連続投与群における α 相の半減期および β 相の半減期は単回投与群のそれと比較してわずかに減少したものの、両者の間に有意差は認められなかった。連続投与群の [AUC] $_{0-24}$ は、単回投与群のそれに比較して 1.55 倍有意 ($P<0.01$) に増加した。この [AUC] $_{0-24}$ の増加は、最終回投与直前 (前回投与後 24 時間値) の値が 145 ng/ml を示していることに起因するものと推察される。

雄性マウス C 57 BL/6 に [^3H]-ベスタチンを 1.32, 5.04, および 12.47 mg/kg の割合で単回経口投与したときの、平均筋肉中濃度および平均血液中濃度の推移を図 13 に示す。各投与量における筋肉中濃度の推移は、血液中濃度の場合と同様に、用量依存的に増加することが認められた。ベスタチンを単回経口投与したときの筋肉中濃度を血液中濃度と比較した場合、投与後 1 時間では筋肉中濃度は血液濃度の 1/2 以下のレベルであっ

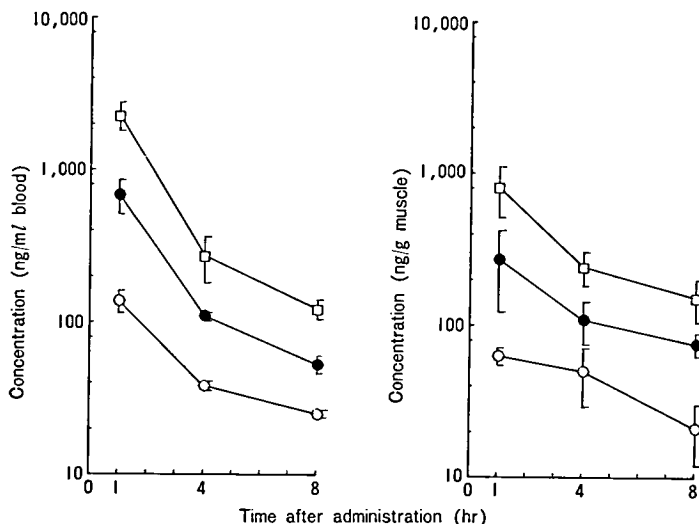


図 13 Blood (left) and muscle (right) concentrations of the radioactivity after a single oral administration to three male mice in the doses of 1.32 mg/kg (○), 5.04 mg/kg (●), and 12.47 mg/kg (□) of [^3H] bestatin. The radioactivity was calculated in the amount of bestatin.

表 9 Concentration and relative percentage of bestatin and (2*S*, 3*R*)AHPA in plasma and muscle at 1 hr after a single oral administration to three male mice

Dose (mg/kg)		Concentration (ng/ml plasma or g muscle)		Relative (%)	
		Bestatin	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)AHPA	Bestatin	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)AHPA
1.32	Plasma*	51	21	71.5	28.5
	Muscle	19±3	43±6	30.9	69.1
5.04	Plasma	619	92	87.0	13.0
	Muscle	156±116	115±31	53.7	46.3
12.47	Plasma	2,727	128	95.5	4.5
	Muscle	605±263	205±41	73.6	26.4

The radioactivity was calculated in the amount of bestatin.

* Plasma (*n*=1).

たが、投与後 4, 8 時間では両者のレベルはほぼ同程度となった。

さらに、得られた血漿および筋肉からの抽出物を HPLC-RID により分析したとき、血漿中および筋肉中に見出された 2 本のピークは、それらの保持時間から (2*S*, 3*R*) AHPA および未変化体であるベスタチンと同定した。他の代謝物は、このクロマトグラムから見出すことはできなかった。単回経口投与群の各投与量における投与後 1 時間の筋肉中および血漿中ベスタチンと、その代謝物である (2*S*, 3*R*) AHPA の濃度と、それらの存在比を表 9 に示す。単回投与後 1 時間における血漿中ベスタチンの割合と、投与量との間には相関関係 ($r=0.937$) が認められ、投与量の増加に伴ってベスタチンの割合が増加した。筋肉中におけるベスタチンおよび (2*S*, 3*R*) AHPA の絶対量はともに投与量の増加に伴って増加し、筋肉中ベスタチン濃度と投与量との間に相関関係 ($r=0.994$) が認められた。すなわち、1.32 mg/kg におけるベスタチンの存在率は (2*S*, 3*R*) AHPA のそれに比して約 1/2 を示し、筋肉中には主に (2*S*, 3*R*) AHPA が存在していた。しかしながら、この傾向は投与量の増加に伴って逆転し、12.47 mg/kg の場合、ベスタチンは (2*S*, 3*R*) AHPA の約 2.8 倍を示した。標的組織である筋肉においてベスタチンと (2*S*, 3*R*) AHPA

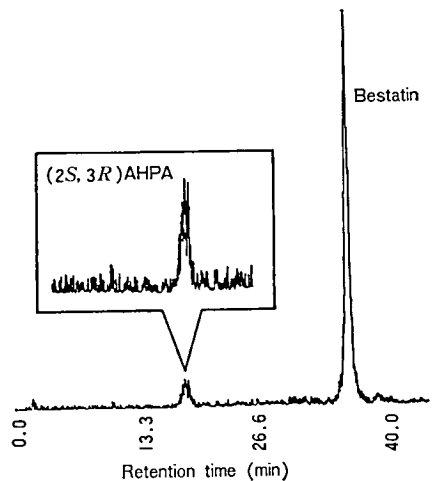


図 14 Radiochromatogram obtained from the incubation mixture of [³H] bestatin and mouse homogenate.

の割合が血漿中のそれと異なった原因として、筋肉中におけるベスタチンの代謝が推察された。そこで、マウス筋肉ホモジネートと [³H]-ベスタチンを 24 時間インキュベーションした結果、図 14 に示すように、(2*S*, 3*R*) AHPA の生成が観察された。このことから、[³H]-ベスタチンは筋肉中の protease により加水分解されることが確認され、筋肉内のベスタチンの割合が血漿中のそれと異なる要因の 1 つと推察される。

雄性マウスに [³H]-ベスタチンを 12.60 mg/kg の割合で 1 日 1 回、7 日間連続経口投与したとき

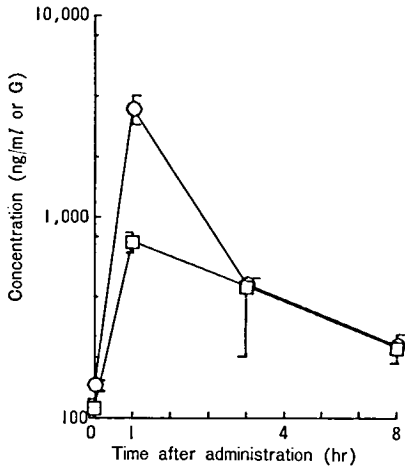


図 15 Blood (○) and muscle (□) concentrations of the radioactivity after a repeated oral administration to three male mice in daily dose of 12.60 mg/kg of [³H]bestatin. The radioactivity was calculated in the amount of bestatin.

の最終投与前および最終投与後1, 4, 8時間における平均筋肉中濃度を, 平均血液中濃度の推移とともに図 15 に示す。最終投与前と最終投与後1時間において, 平均血液中濃度は平均筋肉中濃度よりも高い値を示すものの, 投与後4, 8時間ではそれらのレベルはほぼ同じ値を示した。この結果は, 単回投与群でみられた結果とよく一致した。単回投与群と連続投与群との間で平均血液中濃度および平均筋肉中濃度について比較したとき, いずれの時点においても平均血液中濃度は連続投与群のほうが高く, 投与後4, 8時間値に有意差(それぞれ $P < 0.05$, $P < 0.001$) がみられた。また, 筋肉中濃度は, 投与後1時間で単回投与群, 連続

投与群ともほぼ同等の値を示したが, 投与後4, 8時間では連続投与群のほうが高くなる傾向がみられた。

雄性マウスに [³H]-ベスタチンを 12.60 mg/kg の割合で1日1回, 7日間連続経口投与したときの, 最終投与後1時間における筋肉および血漿中に存在するベスタチンと (2*S*, 3*R*) AHPA の濃度と, それらの存在比を表 10 に示す。血漿中に存在するベスタチンの割合は単回投与群とほとんど変化がなく, 97.2% であった。投与後1時間における血液中ベスタチン濃度は, 連続投与により上昇する傾向がみられた。筋肉中に存在するベスタチンの割合は単回投与群とほぼ同じ値を示し, 78.3% であった。投与後1時間における筋肉中ベスタチン濃度は, 連続投与にもかかわらず, その上昇は観察されずほぼ同じ値を示した。

雄性マウスに [³H]-ベスタチンを 12.60 mg/kg の割合で1日1回, 7日間連続経口投与し, 0~1日と5~6日に排泄された尿を実験の部 e) の方法に従って分析した radiochromatograms を図 16 に示す。18.3分に溶出するピークは (2*S*, 3*R*) AHPA であり, 36.0分に溶出するピークはベスタチンであった。それ以外のピークは, このクロマトグラムからは見出すことができなかった。すなわち, 単回投与時にみられたのと同様に, 連続投与した場合においても, 尿中にはベスタチンおよび (2*S*, 3*R*) AHPA が認められたのみであり, 連続投与による代謝経路への影響は認められなかった。

雄性マウスに [³H]-ベスタチンを 1.32, 5.04,

表 10 Concentration and relative percentage of bestatin and (2*S*, 3*R*)AHPA in plasma and muscle at 1 hr after a repeated oral administration for 7 days to male mouse in daily dose of 12.60 mg/kg of [³H]bestatin

Dose (mg/kg/day)		ng/ml plasma or g muscle		Relative %	
		Bestatin	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)AHPA	Bestatin	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)AHPA
12.60	Plasma	4,858	140	97.2	2.8
	Muscle	537	149	78.3	21.7

The radioactivity was calculated in the amount of bestatin.

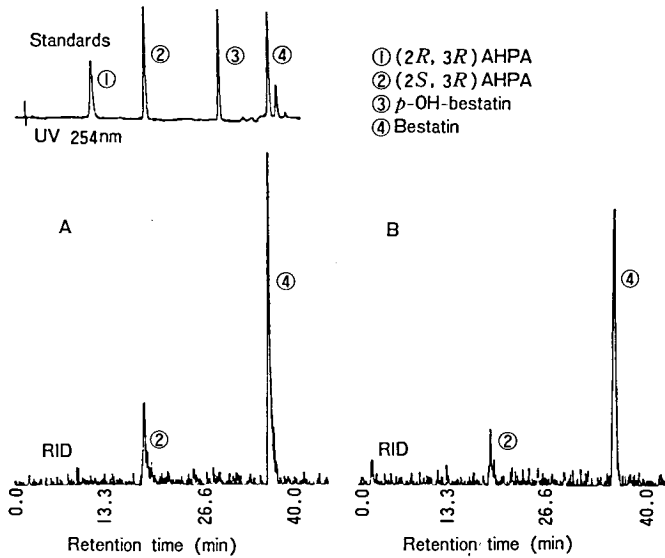


図 16 Radiochromatograms of the 24 hr mouse urine after a single (A) and a final of repeated (B) administration of [³H] bestatin.

表 11 Excretion rates (% of dose) of bestatin and (2*S*, 3*R*) AHPA as metabolite in 24 hr urine after a single oral administration of [³H]bestatin to male mouse (*n*=1)

Dose (mg/kg)	% of dose		
	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)AHPA	Bestatin	Total
1.32	39.4	44.2	83.6
5.04	25.4	65.8	91.2
12.47	18.1	64.7	82.8

および 12.47 mg/kg の割合で単回経口投与したときの、投与後 24 時間までに排泄された尿を HPLC で分析した結果を表 11 に示す。投与された [³H]-ベスタチンは投与量に依存せず、その放射活性でみた場合、0~24 時間に 82.8~91.2% が尿中に排泄されており、きわめて吸収のよい薬物であると推察された。ベスタチンと (2*S*, 3*R*) AHPA の存在割合は投与量に大きく依存しており、低投与量の割合には (2*S*, 3*R*) AHPA の割合が投与量の約 40% を占めたのに反し、投与量が増加するに従って (2*S*, 3*R*) AHPA の割合が減少し、未変化体が増加する傾向が認められた。

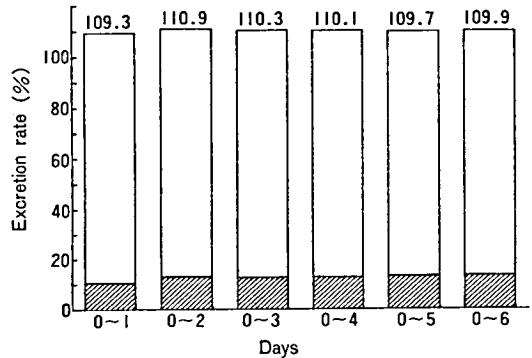


図 17 Cumulative excretion rates (% of dose) of the radioactivity in mouse urine and feces after a repeated oral administration for 7 days to male mice (*n*=5) in daily dose of 12.60 mg/kg of [³H] bestatin. □, urine; ▨, feces.

雄性マウスに [³H]-ベスタチンを 12.60 mg/kg の割合で 1 日 1 回、7 日間連続経口投与したときの尿および糞中排泄率を図 17 に示す。0~1 日では尿に 98.7±1.9%、糞に 10.6±2.9%、合計で 109.3±3.4% 排泄された。また、0~6 日間の累積排泄率は尿に 96.5±3.5%、糞に 13.4±1.7%、合計で 109.9±2.1% 排泄された。期間を

通じて尿および糞中排泄率がほとんど変化しないことから、連続投与による吸収率の変化はほとんどないものと推察された。

3) ま と め

1. [^3H]-ベスタチンを 1.32, 5.04, および 12.47 mg/kg の割合でマウスに経口投与するとき、血液中の放射活性値から計算した $[\text{AUC}]_{0-24}$ は用量依存的に増加した。また、12.60 mg/kg の割合で7日間連続経口投与時の $[\text{AUC}]_{0-24}$ は単回投与時のそれに比較して約 1.55 倍に増加した。血漿中放射活性の内訳は、未変化体であるベスタチンと、その代謝物である (2*S*, 3*R*) AHPA のみであった。

2. [^3H]-ベスタチンを 1. と同様に投与したとき、筋肉内放射活性値は用量依存的に増加した。また、筋肉内には、未変化体であるベスタチンと (2*S*, 3*R*) AHPA 以外に代謝物は見出されなかった。これら化合物は、いずれも投与量に比例して筋肉内濃度も増加するものの、両者の存在比は血漿中のそれと異なるものであった。すなわち、1.32 mg/kg 投与量の場合、ベスタチンの (2*S*, 3*R*) AHPA に対する割合は 1/2 以下であったのに対し、12.47 mg/kg 投与量の場合のそれは約 2.8 倍となった。このことより、標的組織におけるベスタチン濃度を高めるためには投与量を上昇させる必要のあることを認めた。

3. 筋肉内に移行した未変化体であるベスタチンは筋肉内 protease により加水分解を受け、(2*S*, 3*R*) AHPA が生成することが確認された。この事実は、2. における低投与量での筋肉内ベスタチン濃度の低下を裏づける要因の 1 つと推察された。

4. 7日間連続投与におけるベスタチンの筋中濃度は単回投与時のそれとほぼ同等の値を示し、連筋投与による上昇は観察されなかった。

5. ベスタチン経口投与時の 24 時間マウス尿中には、投与量の約 83~91% が排泄され、用量

依存的な傾向は観察されなかった。尿中には、未変化体であるベスタチンが主に排泄され、次いで (2*S*, 3*R*) AHPA が確認された。他の代謝物は観察されなかった。

6. 7日間連続投与におけるベスタチンの尿、糞中排泄率はきわめて高値を示し、高投与量においてもベスタチンの吸収はきわめてよいものと推察された。

3. RIA によるベスタチンの微量定量法

ベスタチン ((2*S*, 3*R*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-L-leucine ; (2*S*, 3*R*)-AHPA-L-leu) は、*Streptomyces olivoreticuli* の培養濾液中から見出されたジペプチドである。この薬物の生体内動態 (pharmacokinetics) を知るためには、高感度で特異的な定量法の確立が必須である。先にわれわれは、ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリーを用いたセレクトッドイオンモニタリング (GC-MS-SIM) 法による微量定量法について報告した⁷⁾。この方法はきわめて高感度であり、しかも特異性に優れた方法であった。また、生体内において活性代謝物として見出された *p*-OH-ベスタチンをも同時に定量することが可能であった。

今回われわれは、GC-MS-SIM 法にかわる、より簡便な微量定量法を開発すべく、ラジオイムノアッセイ法を検討した。そして、従来困難とされたジペプチドの抗血清の調製に成功した。本報告では、ベスタチンを直接 BSA に結合させることによって得た抗原を用いて製した抗血清の評価を行うとともに、確立した RIA 法を GC-MS-SIM 法と比較検討した結果について述べる。

1) 実験方法

a) 試 薬

ベスタチンは日本化薬 (株) にて製造した医薬品純度のものを使用した。各種のベスタチン同族

体は日本化薬(株)にて製造した標準品を使用した。ウシ血清アルブミン(BSA)はシグマ社(RIA grade, St. Louis, U. S. A.)より購入したものをを使用した。1-ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl) carbodiimide (ethyl-CDI)は東京化成工業(株)(東京)より購入したものをを使用した。

³H 標識 ベスタチン, *N*-[(2*S*, 3*R*)-3-amino-hydroxy-4-(2'-³H)phenylbutanoyl]-*L*-leucine は, 日本化薬にて合成した *N*-[(2*S*, 3*R*)-3-benzyl-oxy-carbonyl-amino-2-hydroxy-4-(2'-bromo)-phenylbutanoyl]-*L*-leucine benzyl ester を原料として, New England Nuclear 社 (Mass., Boston) にて ³H ガスによる接触還元を行ったのち, 当社にひ精製した。得られた [³H]-ベスタチンは, 放射能検出器 (Berthold HPLC Radioactivity Monitor LB-503 型) 付 HPLC (島津 LC-4 A 型) を用いて放射化学的純度を測定した結果, 99% 以上であった。また, このものの比放射能は 15mCi/mg であった。

b) ベスタチン-BSA 結合体の調製

ベスタチン-BSA 結合体は, 図 18 に示すように, Gharib らの方法⁹⁾により ethyl-CDI を用いて調製した。すなわち, BSA 50 mg を 25 ml の蒸留水に溶解したのち, この溶液中に ethyl-CDI 30 mg を加えた。次に, あらかじめ 5 ml の dimethylsulfoxide に溶解した [³H]-ベスタチン 5 mCi を含む 50 mg のベスタチンを 0.1 N NaOH または HCl で pH 5.5 に保ちながら徐々

に滴下, 攪拌する。滴下終了の 10 分後にさらに 10 mg の ethyl-CDI を加え, 暗所で 18 時間攪拌した。反応終了後 72 時間透析し, 凍結乾燥により, 白色粉末 45.5 mg を得た。ここで得られたベスタチン-BSA 結合体は, BSA 1 mol に対してベスタチン約 9 mol が結合していることを確認した。

c) 抗血清の調製

上記方法により合成したベスタチン-BSA 結合体を Complete Freund's adjuvant でエマルジョン化したものを在来種白色家兎(雌体重 2.5~3.0 kg)の背部皮下に繰返し投与して, 抗血清を得た。

d) アッセイ法

標準品, [³H]-ベスタチン, および抗血清はすべてリン酸緩衝液 (0.05 M リン酸緩衝液, pH 7.3; 0.1% NaN₃, 0.1% セラチン, および 0.9% NaCl 含有) で希釈した。

ベスタチン (250 pg~20 ng) の緩衝液 (0.1 ml) に [³H]-ベスタチン 0.1 ml, 希釈抗血清 (0.1 ml), リン酸緩衝液 0.2 ml を加えてよく攪拌したのち, 4°C で 18 時間インキュベートした。

結合型および遊離型ベスタチンの分離は, デキストラン-炭末混合溶液 0.5 ml を反応溶液に加えてよく攪拌し 4°C で 15 分間放置したのち, 上清をアトムライト® 液体シンチレーター 4 ml に加え, 液体シンチレーションカウンター (Aloka 社製 Model LSC-753 型, 東京) にて測定した。

e) 投与および試料調製法

健康成人男子 6 名にベスタチン 30 mg カプセルを経口投与後, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 時間目にそれぞれ血液を採取し, 次いで 4°C で遠心分離 (×2,000 g) して血清を得た。得られた血清は必要に応じて上記緩衝液にて希釈し, アッセイに供した。

f) GC-MS-SIM 法

e) で得られた血清について, すでに報告した方法⁷⁾により GC-MS-SIM で測定した。

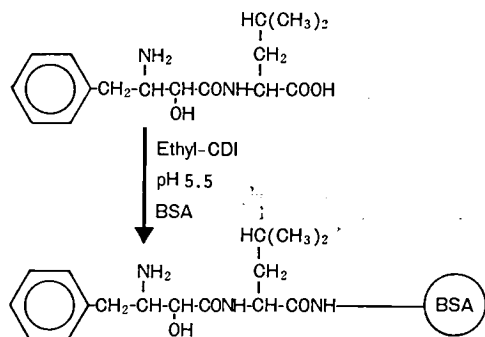


図 18 Synthesis of bestatin-BSA conjugate.

2) 実験結果および考察

a) 交叉反応性

ベスタチン-BSA をハプテン抗原として得られた抗血清について、 $[^3\text{H}]$ -ベスタチンをトレーサーとして、ベスタチンおよびその同族体8種の交叉反応性について検討した。最終希釈率 200 倍における、この抗血清の各化合物に対する交叉反応性を図 19 および表 12 に示す。表 12 から明らかなように、ベスタチンをヒトに投与したとき、血中に見出された活性代謝物である *p*-OH-ベスタチンに対する交叉反応性はわずか 0.4% であった。さらに、人尿中にベスタチンの pepti-

dase による加水分解物として見出された (2*S*, 3*R*) AHPA への交叉反応性は、*p*-OH-ベスタチンと同様にわずか 0.4% であった。また、他のベスタチン同族体に対する交叉反応性はきわめて弱く、いずれも 0.014% 以下であった。

Scatchard plot 法によりこの抗体のベスタチンへの結合定数 (K_a) を求めたところ、 $6.757 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ の値を示した。このことより、得られた抗血清はベスタチンに対してきわめて高い親和性を有し、その光学異性体をも識別しうる、特異性に優れた抗体であることが明らかになった。

b) 検量線および検出感度

アッセイ法に準じて、最終希釈率 200 倍の抗血清を用いて作成した検量線を図 20 に示す。検量線は 250 pg~20 ng/tube の範囲で良好な直線性を示し、血清中ベスタチンの微量定量が可能となった。また、RIA 法におけるベスタチンの検出限界は 125 pg/tube であった。

c) 精度および正確度

2~10 倍希釈したヒト血清中にベスタチンをそれぞれ 0.5, 1.0, 2.5, 10.0 ng 添加し、本法により分析したときの回収率を表 13 に示す。本回収実験の結果から、本法の実用血中濃度測定範囲

表 12 Cross-reactivity of structurally related substances with anti-bestatin serum

	IC ₅₀	Cross-reactivity (%)
(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , <i>L</i>)Bs	1.4 ng	100
(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , <i>L</i>) <i>p</i> -OH-Bs	350.0 ng	0.4
(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)AHPA	350.0 ng	0.4
(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , <i>L</i>)Bs	>10 μg	<0.014
(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , <i>L</i>)Bs	>10 μg	<0.014
(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)AHPA	>10 μg	<0.014
(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)AHPA	>10 μg	<0.014
(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)AHPA	>10 μg	<0.014
(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)AHPA	>10 μg	<0.014

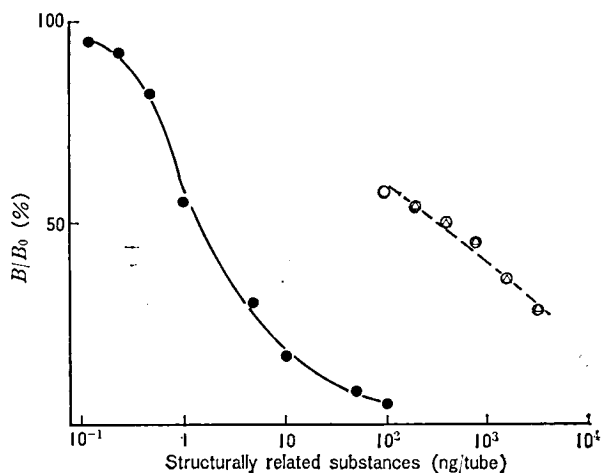


図 19 Standard curve for bestatin (●) and cross-reactivity of (2*S*, 3*R*, *L*) *p*-OH-bestatin (○) and (2*S*, 3*R*) AHPA (△) with anti-bestatin serum.

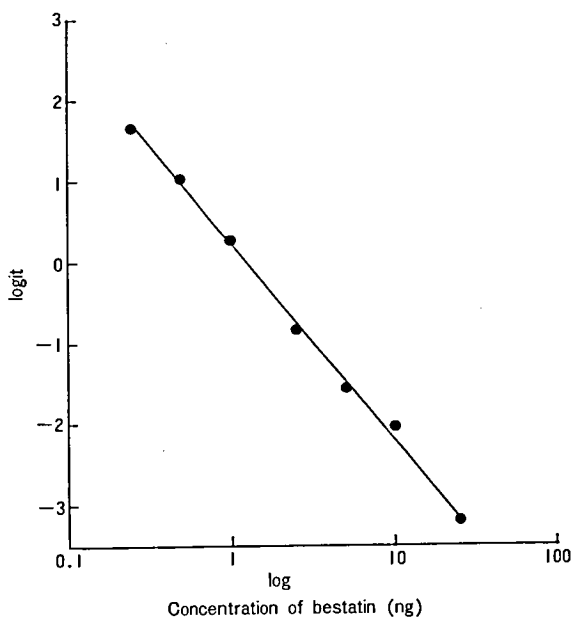


図 20 Calibration curve for bestatin.

表 13 The recovery of bestatin from normal human serum

Added bestatin (ng/tube)	Diluted serum	Estimated	Recovery	Coefficient of variation	n
		(ng/tube)	(%)	(%)	
0.5	×2	0.46±0.03	92.5±15.4	16.6	4
	×5	0.47±0.08	94.0±16.8	17.9	4
	×10	0.51±0.07	101.5±14.7	14.5	4
1.0	×2	1.03±0.14	103.2±13.6	13.2	5
	×5	1.08±0.07	108.2± 6.6	6.1	5
	×10	0.99±0.05	99.4± 4.5	4.5	5
2.5	×2	2.58±0.19	103.4± 7.7	7.5	5
	×5	2.45±0.15	98.0± 6.0	6.1	5
	×10	2.42±0.14	96.8± 5.8	6.0	5
10.0	×2	10.73±1.34	107.3±13.4	12.4	4
	×5	10.34±0.92	103.6±10.1	9.8	5
	×10	9.28±1.03	92.8±10.3	11.1	5

において精度，正確度とともに充分満足しうるものであった。

d) 血清中濃度の測定

6名の健常人にベスタチン 30 mg を経口投与したときの血清中濃度を RIA 法および GC-MS-SIM 法により測定した結果を図 21 に示す。両方法から得られた値はきわめて類似しており、6人の平均血清中濃度曲線は RIA 法，GC-MS-SIM

法ともに同一のパターンを示した。また、血清中濃度測定点において平均値の差の検定を行った結果、いずれの測定点においても有意差は認められず、RIA 法，GC-MS-SIM 法により得られた血清中濃度値はよい一致を示すことを確認した。

e) RIA と GC-MS-SIM による測定値の相関性

図 21 に示したヒト血清中濃度の測定において

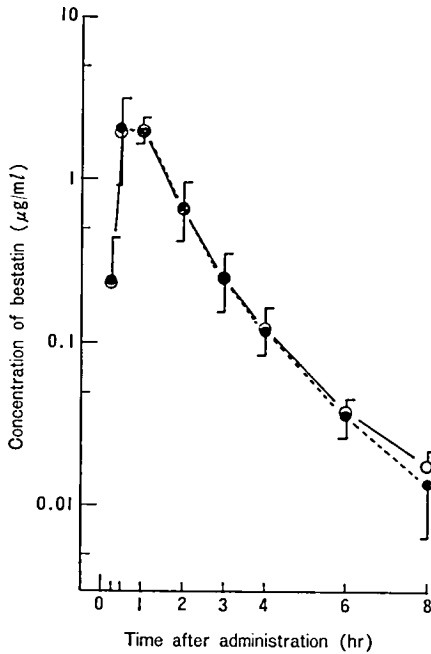


図 21 Mean serum concentration of bestatin after oral administration of 30 mg bestatin to male 6 volunteers measured by use of RIA (●) and GC-MS-SIM (○).

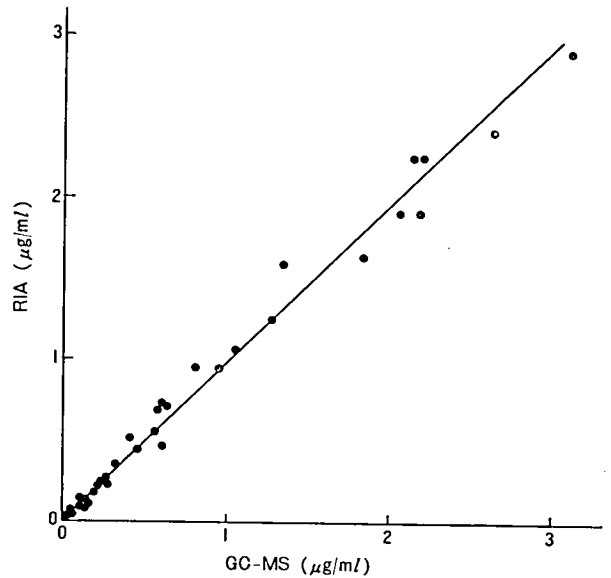


図 22 Correlation curve of bestatin concentration obtained by use of RIA and GC-MS-SIM. $Y=0.01473+0.97148 X (r=0.989)$.

得られた結果を RIA 法および GC-MS-SIM 法の両方法について比較したところ、両者の測定値はきわめてよく一致しており、図 22 に示す相関図から得られた直線式は $Y=0.01473+0.97148 X$ となり、その相関係数は $r=0.989$ であった。

3) 結 論

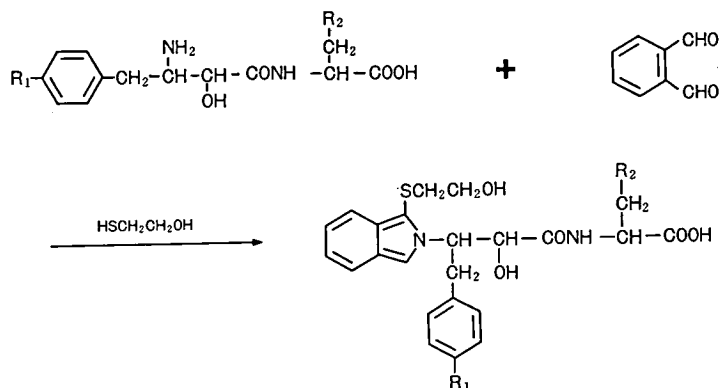
従来から抗体の作成が困難とされているジペプチドに類別されるベストチンの抗血清の調製に成功した。本抗血清はベストチン生体内代謝物同族体および類縁化合物のいずれにも交叉反応性を示さず、きわめて化合物特異性の高いものであった。本抗血清を用いて確立した血清中ベストチン測定法は、実用血清中濃度測定範囲で充分な検出感度を有していた。また、健常人 6 名にベストチンを経口投与して得た血清につき、本法と GC-MS-SIM 法にて同時に測定した結果、両者には統計

的有意差は認められず、よく一致した値を示すことが実証された。

4. 高速液体クロマトグラフィーによる血漿中ベストチンの簡易定量法

近年、薬効の評価、薬物治療の適正化など臨床において、血中薬物濃度を測定する意義は大きく、その際の測定法としては、特異性に優れ、高感度で良好な再現性を有し、簡易迅速性のある方法が望まれている。

血中ベストチンの測定法としては、ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (GC-MS) 法⁹⁾、プレカラム反応を用いた高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法¹⁰⁾、RIA 法¹¹⁾などが報告されているが、今回われわれは、ポストカラム法を用いた HPLC による血漿中ベストチンの簡易



	R ₁	R ₂
ベスタチン	H	CH(CH ₃) ₂
<i>p</i> -ヒドロキシベスタチン	OH	CH(CH ₃) ₂
(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニルブタノイル-L-フェニルアラニン	H	C ₆ H ₅

図 23 ベスタチンおよびベスタチン類縁物質の蛍光ラベル化反応

定量法を設定した。

すなわち、ベスタチンは、その構造中に第一アミンを有するので、第一アミンの発蛍光試薬として広く利用されている *o*-フタルアルデヒドとの蛍光ラベル化反応 (図 23) により、ベスタチンの微量蛍光定量法を確立した。

1) 実験方法

a) 試薬および試液

i) 2-メルカプトエタノール (東京化成工業(株), 試薬特級)

ii) *o*-フタルアルデヒド (和光純薬(株), 試薬特級)

iii) アンバーライト XAD-IV (オルガノ社製)

iv) 0.4 M ホウ酸緩衝液 (pH 10.4)

ホウ酸 24.7 g を秤り、水 900 ml を加えて溶かし、8 N 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を 10.4 に調整したのち、全量を 1 l とする。

v) 蛍光ラベル化反応液

o-フタルアルデヒド 30 mg を 1~2 ml のメタノールに溶かし、2-メルカプトエタノール 0.3 ml を加え、液の淡黄色が消えて無色透明になる

まで攪拌したのち、0.4 M ホウ酸緩衝液 1 l と混合する。

vi) 定量用ベスタチン標準品

純度 99.5% 以上のものを用いる。

vii) 内部標準溶液

当研究所において西沢ら¹²⁾の合成した (2*S*, 3*R*)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニルブタノイル-L-フェニルアラニン約 11 mg を精密に秤り、水を加えて溶かし、正確に 200 ml とする。この液 2 ml を正確にとり、水を加えて正確に 200 ml とする。

b) 試料溶液の調製

ヒト血漿 0.2 ml を 70 ml 容遠心分離管にとり、内部標準溶液 2 ml を加えて軽く混合し、さらにエタノール 40 ml を加え、超音波装置を用いて 15 分間攪拌する。15 分間静置したのち、3,000 rpm で 10 分間遠心分離する。上清を 100 ml 容ナス型フラスコにとり、40°C で減圧乾固する。残留物に 0.1 N 塩酸 5 ml を加えて溶かし、10 ml 容遠心分離管に移したのち、クロロホルム 4 ml で洗い流す。これを超音波装置を用いて 30 分間攪拌したのち、3,000 rpm で 10 分間遠心分離する。上清を、あらかじめ調製したアンバーライトカラ

ム (直径 6 mm, 長さ 100 mm) にかき、水 20 ml で 2 回洗浄後、メタノール 20 ml で溶出させる。溶出液を減圧乾固し、残留物を液体クロマトグラフィー移動相 200 μ l にて溶かし、試料溶液とする。

c) 標準溶液の調製

定量用ベスタチン標準品約 26.4 mg を精密に秤り、水を加えて溶かし、正確に 300 ml とする。この液 5 ml を正確にとり、水を加えて正確に 100 ml とし、標準原液とする。さらに、原液を公比 2 で 3 段階希釈する。原液および希釈液 0.1 ml ずつをそれぞれ 70 ml 容遠心分離管にとり、それぞれに血漿 0.2 ml およびエタノール 40 ml を加え、以下試料溶液の調製と同様に操作し、標準溶液とする。

d) ポストカラム法による液体クロマトグラフィー

試料溶液および標準溶液のそれぞれ 90 μ l につ

き、次に示す操作条件の液体クロマトグラフィーにより得られる溶出液に、送液ポンプから送られてきた蛍光ラベル化反応液を混合する。テフロンチューブ (内径 0.5 mm) 中で 50°C, 1 分間反応させたのち、さらに 20°C で 2 分間反応を行い、生成した蛍光反応物の蛍光強度を測定する。測定法の概略を図 24 に示す。

〔操作条件〕

装置： 日立高速液体クロマトグラフ 635 A 型

検出器： 日立分光蛍光光度計 650-10 S 型

検出波長： 励起波長 340nm, 蛍光波長 415nm

カラム： Nucleosil 5 C 18 (直径 6 mm, 高さ 250 mm)

カラム温度： 25°C 付近の一定温度

移動相： 0.1% リン酸-アセトニトリル混液 (82:18) を 5 N NaOH 溶液を用いて pH 6.8 に調整する。

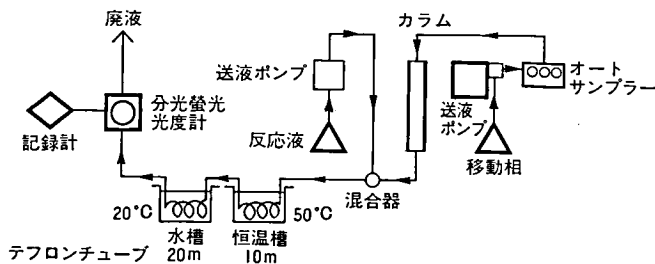


図 24 ポストカラム法による液体クロマトグラフィー

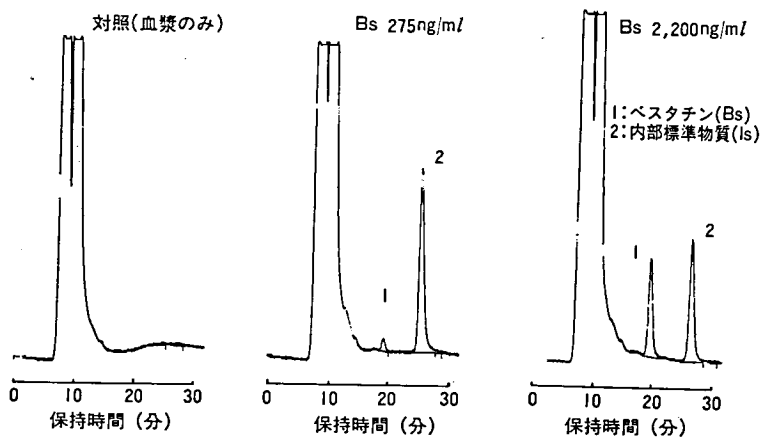


図 25 血漿に添加したベスタチンおよび内部標準物質の液体クロマトグラム

流速： 毎分 1.2 ml

反応液送液ポンプ： オリエンタルモーター社

製

反応液流速： 毎分 0.7 ml

2) 実験結果および考察

a) 液体クロマトグラム

本定量法による液体クロマトグラムを図 25 に示す。血漿中ベスタチンの抽出精製法は、Selected Ion Monitoring 法によるベスタチンの GC-MS 微量定量法のために開発された方法をそのまま適用したとき、保持時間 15 分までに血漿中生体成分に由来すると思われる大きなピークが出現した。ベスタチンおよび内部標準物質は、それぞれ約 19 分および約 26 分に良好な単一ピークとして分離溶出された。内部標準物質としては、ベスタチン同族体のうちで (2*S*, 3*R*)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニルブタノイル-L-フェニルアラニンが保持時間で最良であった。

ベスタチンの生体内代謝物である *p*-ヒドロキシベスタチンの保持時間は約 12 分であり、生体夾雑物のピークと重なるため、測定は不可能であった。

b) 検量線の作成

血漿中ベスタチンの検量線を図 26 に示す。血漿にベスタチンと内部標準物質を添加し、検量線作成用標準溶液とした。ベスタチン濃度を横軸に、クロマトグラムより得られた内部標準物質のピーク高さに対するベスタチンピーク高さ比を縦軸に

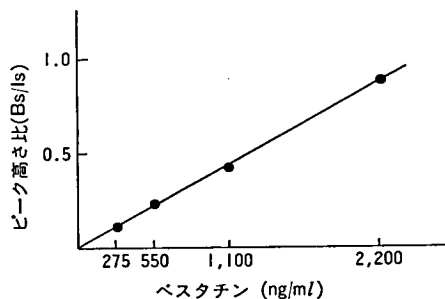


図 26 ベスタチン測定における検量線

表 14 ベスタチンを血漿に添加した際の回収率

添加量 (ng/ml)	実測値 (ng/ml)	回収率 (%)
276.25	294.8	106.7
552.50	545.9	98.8
1,105.00	1,018.8	92.2
2,210.00	2,378.0	107.6

とり、それぞれの標準溶液の測定値をプロットするとき、ベスタチン濃度 0~2,200 ng/ml の範囲で原点を通る良好な直線性を示すことが確認された。また、この際のベスタチン検出限界は、血漿 0.2 ml を用いたとき、約 200 ng/ml (S/N =約 2) であった。

c) 回収率

血漿 0.2 ml 中にベスタチンをそれぞれ 55.25, 110.5, 221.0, 442.0 ng となるように添加した試料を調製し、本法に従って測定したときの回収率を表 14 に示す。

いずれの濃度においても良好な回収率が得られ、本法は充分使用可能な方法であると判断した。

d) ヒト血漿中ベスタチン濃度の測定

筋ジストロフィー患者からベスタチン経口投与前後の血液を採取し、本法により血漿中ベスタチン濃度を測定した。血中濃度推移の 1 例 (52 歳, 男性, 体重 46 kg, 20 mg 経口投与) を図 27 に示す。

3) 結論

第一アミンの発蛍光試薬 *o*-フタルアルデヒドを用いて、ベスタチンを蛍光を有する誘導体に変

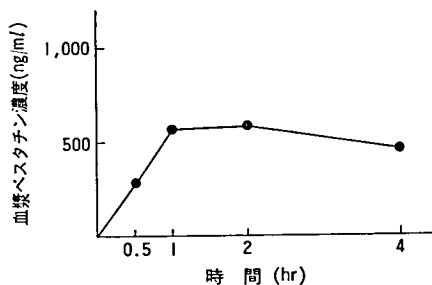


図 27 ベスタチンの血中濃度推移

換することにより、血漿中ベスタチンを高感度に定量する液体クロマトグラフ法を確立した。

本法によれば、ベスタチンおよび内部標準物質のいずれも生体夾雑物から完全に分離された。また、いずれも良好なピーク形状を示した。

本法を用いることにより、約 20 ng のベスタチンを定量することが可能であり、血漿 0.2 ml を使用した場合、定量限界濃度は 200 ng/ml であった。本法は、ベスタチンの薬効評価、治療の適正化など臨床研究において、ベスタチンの血中濃度を測定するには有用な簡易定量法であると考えられる。

II. 製 剤 研 究

1. 硫酸ロイペプチンの安定性に関する研究

前報に引き続き、硫酸ロイペプチンの原末および治験用経口製剤（散剤とカプセル剤）の安定性を検討した。

1) 実験方法

a) 試 料

原末、散剤（D-マンニトール 10 倍散）、およびカプセル剤（ロイペプチン 50 mg 含有）を室温下に密栓状態で 24 カ月および 30 カ月間保存したのちに、ロイペプチン含量および外観変化の観察を行った。

b) 測 定 法

各試料の定量は、昭和 56 年度の本報告書に記載された方法により、ロイペプチンを NaBH_4 で還元してロイペプチノールとなし、下記の条件にて HPLC により分析した。

機 器： 日立 655 型高速液体クロマトグラフ

検出器： 日立 638-4 型紫外吸光光度計（測定波長 200 nm）

カラム： Nucleosil 5 C 18 (H) 4.6 mm

i. d. × 160 mm

カラム温度： 30°C

移動相： 0.05 M リン酸-アンモニウム溶液 80 ml にメタノール 12 ml およびアセトニトリル 8 ml を加える。

流 速： 1.4 ml/min

内部標準溶液： *p*-ヒドロキシン安息香酸エチル 7.5 mg を 50% エタノール水に溶かし 100 ml とする。

2) 結果および考察

a) 硫酸ロイペプチン原末の安定性

表 15 に示すように、室温 30 カ月保存後において試料中のロイペプチンの L 体の残存率は 94.8~97.0% であり、また外観も白色粉末の状態を保持して変化せず、安定であった。

b) 硫酸ロイペプチン製剤の安定性

表 16 に示すように、室温 30 カ月保存後における試料中のロイペプチンの L 体の残存率は、散

表 15 The stability of leupeptin bulk stored at the room temperature

Lot No.		Residual amount (%) of leupeptin	
		Storage time (months)	
		24	30
32	L-form	96.6	97.0
	D-form	4.8	1.5
35	L-form	94.7	94.8
	D-form	4.9	1.1
36	L-form	95.3	95.5
	D-form	1.2	1.0

表 16 The stability of the oral preparation for the clinical trial of leupeptin stored at the room temperature

Preparations		Residual amount (%) of leupeptin	
		Storage time (months)	
		24	30
Powder (Leup 10% in D-mannitol)	L-form	98.3	96.7
	D-form	3.5	5.6
Capsule (Leup 50mg)	L-form	99.3	96.3
	D-form	4.1	7.1

剤で 96.7%，カプセル剤で 96.2% であり，また外観も白色粉末の状態を保持して変化せず，安定であった。

2. 硫酸ロイペプチン製剤の研究

2-1. 腸溶錠の製剤研究

先に，ラットおよびイヌにロイペプチンを種々の投与ルートおよび投与方法を用いて投与したとき，その血中濃度に大きな差が認められた。これに引き続いてさらに検討したところ，ロイペプチンは投与後 30 分の血中濃度が，経口投与に比べて十二指腸投与ではその約 30 倍，門脈内投与では約 200 倍であることが見出された。このことは，ロイペプチンを腸溶性製剤として投与することにより，bioavailability の向上の可能性を示している。そこで今回は，ロイペプチン腸溶錠の製造方法として，まず裸錠の調製方法を，次いで腸溶性コーティングを施す方法を検討した。

1) 裸錠の試製実験

錠剤の処方種々検討した結果，崩壊性がよいものとして，ロイペプチン 25 部，D-マンニトール 53.8 部，アビセル®（結晶セルロース）10 部，プリモジェル®（カルボキシメチル澱粉誘導体）7 部とした。これらを混合し，常法により造粒，乾燥後，ステアリン酸マグネシウム 1.2 部を加えて 1 錠当りの全量が 200 mg，ロイペプチン含量 50 mg の錠剤を得た。

〔結果および考察〕

得られた錠剤の試験結果を表 17 に示す。調製した錠剤中のロイペプチン含量は 44.5 mg/錠で，表示含量の 89.0% であった。日局 10，製剤総則・錠剤に記載される試験方法および一般試験法・崩壊試験法に基づいての試験結果から明らかのように，本錠剤は日本薬局方に適合するものであり，腸溶錠とするためのコーティング操作に使

表 17 Test results of leupeptin tablet

Test items	Results
Appearance	White tablet
Leup content	44.5 mg/tab.
Disintegration time (min)	8~9
Weight variation test (deviation)	Within 7.5%
Hardness	6 kg

用しうるものと判断した。

2) 腸溶錠の試製実験

1) で得たロイペプチン裸錠に腸溶性コーティングを施す実験を行った。皮膜物質として通常使用されている化合物につき，ロイペプチンに対する配合安定性を検討した結果，HP-55（ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート），および HPMC-AS（ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート）の 2 種が有用であることを確認した。両者とロイペプチンの配合変化を経時的に追跡した結果，HP-55 にわずかな着色を認めたのに反し，HPMC-AS は何ら変化を認めなかったことから，HPMC-AS を最終的に選んだ。

次に，HPMC-AS をイソプロピルアルコールおよび塩化メチレンに溶解し，本液を用いて上記裸錠をスプレーコーティングした。

〔結果および考察〕

得られた腸溶コーティング錠の試験結果を表 18 に示す。この結果から，ロイペプチン腸溶錠は日局 10，一般試験法記載の崩壊試験条件に適合し，腸溶性製剤の特質を充分保持しうるものであ

表 18 Test results of leupeptin enteric-coated tablet

Test items	Results
Appearance	Pale yellow tablet
Leup content	44.5 mg/tab.
Disintegration time (min)	
The 1st fluid	Not disintegrated
The 2nd fluid	20~25
Thickness of enteric coat	80~90 μm

る。本腸溶錠のロイペプチン含量は、イニシャル値の 99.9% であり、ここで検討したコーティング方法により含量低下のないことを確認した。さらに本腸溶錠は、1) で調製した裸錠をコントロールとした bioavailability の確認実験に供することができるものである。

2-2. 軟膏剤の製剤研究

昭和 56 年度の本報告書に示したロイペプチンと各種軟膏基剤との安定性試験の結果において、ロイペプチンは日局親水軟膏中で経時的に含量の低下することを認めた。この原因の1つとして、水分および界面活性剤の影響によるロイペプチンのラセミ化が示唆された。そこで、先報ではロイペプチンの安定性に優れたワセリンを基剤とした軟膏を用い、ラット¹³⁾ およびウサギ¹⁴⁾ での経皮吸収実験を行った結果、ロイペプチンが経皮によって吸収されることが確認された。

今回は、吸収の促進を目的として日局親水軟膏を用いた経皮吸収の実験を行うことにし、ロイペプチン親水軟膏調製に際しての諸条件につき検討した。

用時調製ロイペプチン親水軟膏の試製

ロイペプチンと通常市販されている日局親水軟膏を種々の比率で練合した結果、練合操作の容易性、性状（稠度、外観など）および塗布時の展延性などを考慮するとき、さらに、可能な限り高含有率のロイペプチン軟膏の調製を意図したとき、ロイペプチンの含有量の上限は約 25 部であり、20 部含有製剤は使用上何ら支障のないことが判明した。そこで、両者の比率を 20 部：80 部とし、ロイペプチン親水軟膏を用時調製して、bioavailability の確認実験に供することにした。

なお、調製したロイペプチン親水軟膏は、たとえば室温 24 時間放置で、外観的な変化はまったく観察されなかった。本製剤の安定性については

現在検討中である。

3. ベスタチンのドライシロップ剤（細粒状）の調製とその安定性

ベスタチンの治験用サンプルとしては、カプセル剤が用いられている。今回の筋ジストロフィーに対する治験用サンプルとしては、投与量の増減が簡便なこと、小児への投与が容易なこと、および他剤との配合投与が可能なことなどを考慮して、細粒状のドライシロップ剤（10 倍散）が適当と考えた。そこで、この剤型の製造方法について検討を行った。

1) ドライシロップ剤の調製法の検討

種々検討した結果、成分、組成がベスタチン 10 部、D-マンニトール 86 部、HPC-L3 部、および蔗糖脂肪酸エステル 1 部から成るドライシロップ剤を常法により造粒して調製した。得られたドライシロップ剤の外観は白色の細粒、粒度は細粒剤粒度規格（日局）に適合した。また、ベスタチン含量は 100.0% であり、結果として、本品は治験用サンプルとしての品質を満足していると判断される。

2) ドライシロップ剤の安定性

1) で得られたドライシロップ剤について、室温保存、および苛酷条件下保存における安定性を検討した。

a) 実験方法

i) 試料

室温下に密栓状態で 14 ヶ月間保存、40°C、75% R.H.、50°C、74% R.H. 下に密栓および開放状態で 2 ヶ月間保存、自然直射光下に密栓状態で 2 ヶ月保存したのちに、ベスタチンの含量、外観変化、および薄層クロマトグラフ法による観察などの測定を行った。

ii) 測定法

外観変化は肉眼観察とした。ベスタチンの含量は、以下に示す条件の高速液体クロマトグラフ法で測定した。

機器： 日立 655 型高速液体クロマトグラフ

検出器： 日立 638-4 型紫外吸光度計 (測定波長 200 nm)

カラム： Nucleosil 5 C 18 (4.6 mm i. d. × 160 mm)

カラム温度： 30°C

移動相： 1%リン酸水溶液 83 ml にアセトニトリル 17 ml を加える。

流量： 1.4 ml/min

内部標準溶液： 安息香酸エチルエステル 150 μg/ml (50% エタノール水)

試料： ベスタチンとして 150 μg/ml (30% アセトニトリル水)

注入量： 20 μl

薄層クロマトグラフは、以下に示す条件で行った。

試料： ベスタチンとして 2 mg/ml (メタノール溶液)

プレート： シリカゲル 60 F-254 (Merck)

展開溶媒： *n*-ブタノール 40 ml, 氷酢酸 10 ml, 水 10 ml から成る混液

スポット量： 50 μl

展開時間： 約 4 時間

確認： ニンヒドリン試液吹付け発色

b) 実験結果

結果を表 19 に示す。室温下に密栓状態で 14 カ月間、および苛酷条件下 2 カ月間のいずれの保存においても、ベスタチンの含量は低下せず安定であった。また、外観は、50°C, 74% R. H. 開放 2 カ月間の苛酷条件下でわずかに黄色に着色したが、室温下密栓 14 カ月間、その他の条件下では白色であった。また、薄層クロマトグラフで、いずれの保存条件下でもスポットは単一であり、分解物の生成は認められなかった。

以上の結果から、ベスタチンドライシロップ剤は室温 14 カ月保存で何ら含量の低下は認められず、治験用サンプルとして供給しうることを確認した。

Ⅲ. 毒性試験——ロイペプチン軟膏のウサギにおける 35 日間経皮毒性試験

今回われわれは、ロイペプチン (軟膏) の安全性試験の一環として、ウサギを用い、経皮毒性を検討したので、その結果を報告する。

試験材料および条件

1) 使用動物と飼育条件

生後 8 週齢で購入した日本白色種雄ウサギ (JW-NIBS, 日生研 (株) 産) を室温 23±2°C, 湿度 45~60% に調節した飼育室で 5 週間予備飼

表 19 The stability of bestatin dry syrup (fine granules) on the long-term and accelerated storage conditions

Storage conditions : Storage time (months) :	Initial	Long-term			Accelerated		Day-light
		Room temp. Close* 14	40°C, R. H. 75% Open** 2		50°C, R. H. 74% Open** 2		
Residual amount (%) of bestatine	100	100.9	99.8	100.7	99.8	99.9	99.4
Appearance	White	White	White	White	Pale yellow	White	White
TLC	One spot	One spot	One spot	One spot	One spot	One spot	One spot

* Sealed in glass bottle.

** Open glass bottle.

育し、この期間に一般状態に異常の認められなかった20匹を実験に供した。

実験開始時の体重は2.3~2.7kgであった。動物をケージ（日本ケージ製）に1匹ずつ収容し、飼料として固型飼料NRT-1（日生研（株）産）、飲料水として水道水を全実験期間を通じ自由に摂取させた。

2) 検体調製および塗布方法

a) 試験検体

日本化薬（株）総合研究所製剤研究室で調製された以下の4種類の軟膏を用いた。

対 照： 軟膏基剤

10% 軟膏： ロイペプチン 10% 含有（Lot No. L 010-001）

20% 軟膏： ロイペプチン 20% 含有（Lot No. L 020-001）

30% 軟膏： ロイペプチン 30% 含有（Lot No. L 030-001）

b) 塗布方法

塗布開始の前日にあらかじめウサギの頸背部被毛を電気バリカンで刈毛し、脊椎を中心とした面積5×5cmの皮膚に検体0.5ml（重量約0.5g相当）を均一になるように塗布したのち、その上を5×5cmの油紙で被い、さらに厚さ1mm、6×30cmの防湿ゴムで固定した。塗布部の固定をほぼ24時間継続後、塗布部の被いを除去して動物の塗布面の観察を行い、塗布部を清拭したのち、同部に新たに同様の塗布を行った。塗布は、週6回（日曜日休業）、5週間行った。

3) 実験群

対 照 基 材 軟 膏 群： 5 匹

10% ロイペプチン群： 5 匹

20% ロイペプチン群： 5 匹

30% ロイペプチン群： 5 匹

4) 検査項目

a) 一般状態の観察

塗布部の観察を毎日塗布前に行い、さらに塗布後の動物の一般状態についても全期間にわたって観察した。

b) 体重測定

塗布開始前、および塗布開始後1週ごとに各動物の体重を測定した。

c) 摂餌量測定

1週ごとに、各動物の1日量の摂餌量を測定した。

d) 尿検査

5週間の塗布終了後の剖検時に、全動物について、膀胱より注射筒を用いて採尿した。

色調、混濁を調べたあと、尿試験紙ヘマコンピティックス（マイルス三共）を用いてpH、潜血、総蛋白、糖を、ウロビリスティックス（マイルス三共）でウロビリノーゲンを、イクトスティックス（マイルス三共）でビリルビンを、ケトスティックス（マイルス三共）によりケトン体を、それぞれ半定量的に測定した。

e) 血液学的検査

5週間の塗布期間終了時（屠殺の前々日）に右耳動脈より採血し、コールターカウンターモデルS型（コールターエレクトロニクス社）にて赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、平均赤血球容積（以下、MCVと略す）、平均赤血球色素濃度（以下、MCHCと略す）、および白血球数を測定し、コールターカウンターZBI（コールターエレクトロニクス社）にて血小板数を測定したほか、Brecher法により塗抹標本を作製して網状赤血球比率を、またライト・ギムザ染色塗抹標本により白血球型別百分率を算定した。さらに、屠殺前日に右耳動脈より3.8%クエン酸ソーダ（10%容量）加注射筒を用いて採血し、クロティック（日本トラベノール）を用いてプロトロンビン時間を測定した。

f) 血液生化学的検査

血清蛋白分画は、屠殺前々日の血液学的検査用血液採血時に、乾燥注射筒を用いて採血した血液を遠心分離したのち得られた血清について、ヘレナ電気泳動装置を用いて実施し、各血清蛋白分画の比率を算定した。また、屠殺解剖時に、放血に先立って、ペントバルビタールソーダ麻酔下でヘパリン処理注射を用いて下大静脈より採血し、以下の項目について血液生化学検査を実施した。

総蛋白濃度、アルブミン濃度、総コレステロール濃度、ブドウ糖濃度、尿素窒素濃度、尿酸濃度、クレアチニン濃度、アルカリホスファターゼ活性、GOT 活性、GPT 活性、LDH 活性、カルシウム濃度（以上、テクニコンオートアナライザー SMA 12/60 型使用）、総ビリルビン濃度、無機リン濃度（以上、テクニコンオートアナライザー II 型使用）、ナトリウム濃度、カリウム濃度（以下、炎光比色法・日立 205 D 型使用）、塩素濃度（電量滴定法・平沼クロライドカウンター CL-3 型使用）、さらに A/G 比を計算により求めた。

g) 臓器重量測定および病理学的検査

i) 臓器重量

血液生化学検査用の上記採血を行ったのち、各動物を腋窩動脈の切断により放血致死させて剖検した。摘出した臓器のうち、脳、胸腺、心、肺、腎、脾、肝、精巣、副腎、顎下腺、甲状腺につい

て重量を測定した。さらに、体重に対する相対重量も算定した。

ii) 組織学的観察

脳、心、大動脈、肺、気管、肝、腎、脾、胃、小腸、大腸、睪、下垂体、甲状腺、副腎、精巣、前立腺、膀胱、胸腺、顎下腺、脊髄、大腿骨骨髓、リンパ節、乳腺、座骨神経、皮膚（塗布局所）を 10% 中性ホルマリン液で固定したのちパラフィンに包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して病理組織学的検査を実施した。

h) 統計処理法

本試験における諸測定値は、各群間の平均値の差で表示した。各群間の平均値の差の検定は Student の *t*-検定法、また不等分散の場合は Aspin-Welch 法に従って有意差検定を行った。

試験結果

1) 死亡率および一般状態

全実験期間を通じて、各群とも死亡例はみられなかった。対照基剤塗布群、各検体塗布群ともに塗布部皮膚の軽度の発赤が散発的にみられたが、いずれも用量に依存した変化ではなく、さらに発赤の程度が進む傾向もみられなかった。30% 塗布群の 1 例では、実験開始後 21 日目に塗布部皮膚に軽度の痂皮形成が認められたが、その後増強

表 20 Body weight and food consumption of rabbits during administration with leupeptin for 5 weeks

Dose (%)	Body weight (kg) or food consumption (g)	Dosage period (weeks)						
		-1	0	1	2	3	4	5
Control	B. W.	2.46±0.07 ^a	2.55±0.11	2.56±9.13	2.61±0.15	2.65±0.16	2.67±0.12	2.68±0.11
	F. C.	179±36	158±30	152±13	146±20	143±40	153±4	135±8
10	B. W.	2.46±0.13	2.49±0.12	2.52±0.13	2.61±0.20	2.63±0.18	2.64±0.19	2.64±0.21
	F. C.	175±29	167±17	157±16	150±22	160±18	139±21	133±18
20	B. W.	2.51±0.12	2.53±0.12	2.61±0.11	2.63±0.13	2.72±0.14	2.73±0.12	2.75±0.12
	F. C.	159±29	144±19	162±25	166±23	166±32	156±31	133±25
30	B. W.	2.48±0.07	2.48±0.06	2.44±0.19	2.56±0.10	2.60±0.09	2.66±0.10	2.71±0.10
	F. C.	153±18	153±16	143±28	147±19	152±18	149±15	150±16

^a Mean±S. D.

表 21 Urinalysis of rabbits administered with leupeptin for 5 weeks

Dose (%)	Animal No.	Color	Turbidity	pH	Glucose	Protein	Occult blood	Ketones	Urobilinogen	Bilirubin
Control	1	y	+	8.0	-	+	±	-	±	-
	2	y	+	7.5	-	±	±	-	±	-
	3	y	±	7.5	-	++	++	-	±	-
	4	y	-	8.0	-	+	+++	-	±	-
	5	y	±	7.5	-	±	±	-	±	-
10	9	y	+	7.0	-	±	-	-	±	-
	10	y	+	7.5	-	±	+	-	±	-
	11	yb	+	8.0	-	++	±	-	±	-
	12	y	+	8.0	-	+	+++	-	±	-
	13	yb	-	8.0	-	+	-	-	±	-
20	17	y	±	7.5	-	±	-	-	±	-
	18	y	±	6.5	-	-	±	-	±	-
	19	ly	+	7.5	-	±	-	-	±	-
	20	y	-	6.5	-	-	+	-	±	-
	21	ly	+	6.5	-	-	-	-	±	-
30	25	y	-	7.0	-	-	±	-	±	-
	26	ly	-	7.0	-	+++	-	-	±	-
	27	y	+	7.5	-	+	±	-	±	-
	28	y	+	7.0	-	±	++	-	±	-
	29	y	+	8.0	-	++	±	-	±	-

-, negative; +~+++, positive.
y, yellow; yb, yellowish brown; ly, light yellow.

表 22 Hematological findings of rabbits administered with leupeptin for 5 weeks

Daily dose (%)	No. of animals	Red blood cells						
		Count (×10 ⁴ /mm ³)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	MCV (μ ³)	MCH (pg)	MCHC (%)	Reticulocyte (%)
Control	5	(5) 706.4 ±20.7	(5) 15.74 ±0.40	(5) 45.36 ±1.17	(5) 64.2 ±0.8	(5) 22.28 ±0.40	(5) 24.72 ±0.65	(5) 1.60 ±3.05
		(5) 689.4 ±28.7	(5) 15.34 ±0.68	(5) 43.86 ±1.82	(5) 63.6 ±1.5	(5) 22.26 ±0.41	(5) 35.00 ±0.43	(5) 1.00 ±1.73
20	5	(5) 700.2 ±44.9	(5) 15.40 ±0.56	(5) 44.18 ±1.36	(5) 63.2 ±2.3	(5) 22.04 ±0.71	(5) 34.86 ±0.57	(5) 0.60 ±0.89
		(5) 695.0 ±19.3	(5) 15.54 ±0.32	(5) 44.62 ±1.07	(5) 64.2 ±1.1	(5) 22.36 ±0.54	(5) 34.82 ±0.47	(5) 0.40 ±0.55

Hematological data, mean±S.D.; (), N.
Significantly different from control

することもなかった。そのほか、実験開始前および実験期間中を通じて、一般状態の変化は認められなかった。

2) 体重および摂餌量

全実験期間の体重、摂餌量を表 20 に示したが、検体投与群いずれにおいても、対照群と比較して体重、摂餌量に差は認められなかった。

表 23 Hematological findings of rabbits administered with leupeptin for 5 weeks

Sex	Daily dose (%)	No. of animals	White blood cells						
			Count ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	Differentiation (%)					
				Band.	Segs.	Eos.	Baso.	Mono.	Lymph.
Male	Control	5	(5) 98.4 \pm 12.5	(5) 0.0 \pm 0.0	(5) 28.0 \pm 15.1	(5) 1.2 \pm 1.8	(5) 1.6 \pm 1.5	(5) 2.2 \pm 1.6	(5) 67.0 \pm 14.8
	10	5	(5) 105.6 \pm 18.2	(5) 0.0 \pm 0.0	(5) 28.2 \pm 8.6	(5) 1.8 \pm 0.4	(5) 2.8 \pm 1.3	(5) 1.6 \pm 1.1	(5) 65.6 \pm 8.7
	20	5	(5) 117.0 \pm 39.9	(5) 0.0 \pm 0.0	(5) 24.2 \pm 10.6	(5) 2.4 \pm 1.5	(5) 3.8 \pm 2.0	(5) 2.2 \pm 0.8	(5) 67.4 \pm 9.4
	30	5	(5) 100.2 \pm 15.7	(5) 0.0 \pm 0.0	(5) 30.4 \pm 7.0	(5) 2.6 \pm 1.9	(5) 4.0 \pm 2.0	(5) 1.4 \pm 1.1	(5) 61.6 \pm 7.9

Hematological data, mean \pm S. D.; (), N.
Significantly different from control

表 24 Prothrombin time of rabbits administered with leupeptin for 5 weeks

Dose (%)	No. of animals	Prothrombin time (sec)
		Male
Control	5	6.2 \pm 0.1 ^a
10	5	6.5 \pm 0.2
20	5	6.2 \pm 0.4
30	5	6.2 \pm 0.2

^a Mean \pm S. D.

3) 尿検査成績

屠殺剖検時に採取した膀胱尿の検査成績を表 21 に示した。各群ともに、尿の色調、混濁度、pH、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、およびビリルビンに著変は認められなかった。対照基剤塗布群を含む各群に散発的に蛋白および潜血反応陽性例が認められたが、用量依存性がなかったことから、本検体塗布に起因する変化ではないと判断された。

4) 血液学的検査成績

血液学的検査成績を表 22 および表 23 に示した。

各群とも、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、MCV、MCH、MCHC、網状赤血球比率、白血球数と白血球型別分類、および血小板数いずれにも異常は認められなかった。プロトロンビン時間の測定成績を表 24 に示した。対照

基剤塗布群と各検体塗布群との間で、プロトロンビン時間に差は認められなかった。

5) 血液生化学的検査成績

血液生化学測定成績を表 25 および表 26 に示した。

10% 検体塗布群ではグルコース濃度、20% 検体塗布群では尿素窒素、尿酸、クレアチニン、無機リン、カリウム濃度に軽度の減少が認められ、30% 塗布群の A/G 比は増加を示したが、いずれの値も生理的変動範囲内にあり、用量依存性がないことから、本検体塗布に起因する変化ではないと判断された。

血清蛋白分画にも、対照基剤塗布群と各検体塗布群との間に差は認められなかった。

6) 臓器重量成績

臓器重量成績および体重に対する相対重量成績を表 27、表 28 に示した。

30% 検体塗布群の胸腺重量および相対重量が対照基剤塗布群に比べて軽度に増加していたが、その他の臓器重量には、各群間で差は認められなかった。

7) 病理組織学的所見

各動物の病理所見を表 29 に示した。対照基剤塗布群を含む一部の例で、肺に点状出血、肝に肝

表 25-1 Biochemical findings of rabbits administered with leupeptin for 5 weeks

Sex	Dose (%)	No. of animals	Biochemical data									
			Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G ratio	Cholesterol (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Uric acid (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Inorganic phosphorus (mg/ml)	
Male	Control	5	6.06±0.54 (5)	3.76±0.29 (5)	1.644±0.095 (5)	29.8±4.9 (5)	121.2±13.4 (5)	21.8±1.9 (5)	0.46±0.13 (5)	1.32±0.11 (5)	6.88±0.64 (5)	
	10	5	6.54±0.42 (5)	4.10±0.30 (5)	1.694±0.202 (5)	29.2±6.6 (4)	90.8±3.6** (5)	24.0±3.0 (5)	0.38±0.11 (5)	1.18±0.13 (5)	6.86±0.73 (5)	
	20	5	6.18±0.40 (5)	3.85±0.10 (4)	1.802±0.205 (5)	28.3±1.3 (4)	141.0±17.3 (5)	17.8±2.3* (5)	0.26±0.05* (5)	1.06±0.05** (5)	5.82±0.36* (5)	
	30	5	6.08±0.22 (5)	4.00±0.00 (4)	1.882±0.173* (5)	30.8±5.8 (5)	120.4±19.4 (5)	23.0±3.9 (5)	0.32±0.08 (5)	1.34±0.24 (5)	6.64±1.05 (5)	

Biochemical data, mean±S.D.; (), N.

* Significantly different from control * P<0.05, ** P<0.01.

表 25-2 Biochemical findings of rabbits administered with leupeptin for 5 weeks

Sex	Dose (%)	No. of animals	Biochemical data									
			Alkaline phosphatase (mU/ml)	LDH (mU/ml)	S-GPT (mU/ml)	S-GOT (mU/ml)	Total bilirubin (mg/dl)	Na (meq/l)	K (meq/l)	Ca (mg/dl)	Cl (meq/l)	
Male	Control	5	59.2±13.8 (5)	214.5±104.2 (4)	75.8±12.0 (5)	52.5±9.1 (4)	0.06±0.05 (5)	145.52±1.82 (5)	3.823±0.447 (4)	11.20±0.22 (4)	101.94±2.88 (5)	
	10	5	53.8±11.6 (5)	188.8±49.7 (5)	77.6±25.3 (5)	49.8±11.9 (5)	0.10±0.00 (5)	143.38±1.98 (5)	3.878±0.500 (5)	11.02±0.53 (5)	105.18±2.31 (5)	
	20	5	63.4±10.0 (5)	263.6±89.8 (5)	86.2±19.2 (5)	46.2±11.3 (5)	0.06±0.05 (5)	143.78±0.55 (5)	2.964±0.312* (5)	11.60±0.54 (4)	103.35±0.58 (5)	
	30	5	67.8±10.2 (5)	284.0±73.5 (5)	68.6±8.3 (5)	42.6±7.6 (5)	0.04±0.05 (5)	143.74±2.53 (5)	3.501±0.346 (5)	11.33±0.10 (4)	100.12±1.80 (5)	

Biochemical data, mean±S.D.; (), N.

* Significantly different from control * P<0.05, ** P<0.01.

表 26 Protein fraction of rabbits administered with leupeptin for 5 weeks

Sex	Dose (%)	No. of animals	Albumin (%)				Globulin (%)		
			α_1	α_2	β	γ			
Male	Control	5	70.6±2.4 ^a	4.0±0.3	10.4±0.7	8.6±2.4	6.6±0.7		
	10	5	72.0±1.3	5.0±0.6*	11.3±0.7	6.4±1.0	5.4±1.0		
	20	5	71.2±1.8	4.1±0.3	11.8±1.4	7.2±1.7	5.7±1.8		
	30	5	73.9±3.0	3.8±0.6	10.6±1.2	6.2±1.4	5.5±1.5		

^a Mean±S.D.

* Significantly different from control * P<0.05.

表 27-1 Absolute organ weight of rabbits administered with leupeptin for 5 weeks

Sex	Dose (%)	No. of animals	Body weight		Organ weight						
			Initial (kg)	Final (kg)	Brain (g)	Thymus (g)	Heart (g)	Lung (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Spleen (g)
Male	Control	5	2.6±0.1	2.6±0.1	8.92±0.60	1.72±0.45	6.12±0.62	7.40±0.58	66.67±7.68	14.47±0.87	0.85±0.22
	10	5	2.5±0.1	2.6±0.2	9.24±0.58	1.87±0.79	5.78±0.46	9.16±2.62	69.45±4.52	14.97±0.48	0.82±0.18
	20	5	2.5±0.1	2.7±0.1	8.97±0.65	2.00±0.36	6.13±0.72	7.67±0.50	72.26±10.16	15.34±1.03	0.75±0.09
	30	5	2.5±0.1	2.6±0.1	8.71±1.02	2.56±0.57*	5.93±0.47	7.67±0.65	66.99±4.00	14.17±1.01	1.34±0.90

Body weight, mean±S.D.; organ weight, mean±S.D.; (), N.
Significantly different from control * P<0.05, ** P<0.01.

表 27-2 Absolute organ weight of rabbits administered with leupeptin for 5 weeks

Sex	Dose (%)	No. of animals	Organ weight			
			Ovary/testis (g)	Thyroid (mg)	Adrenals (mg)	Submaxillary gland (g)
Male	Control	5	4.43±1.92	178±112	264±52	1.28±0.09
	10	5	5.26±0.68	219±95	296±89	1.13±0.12
	20	5	5.61±0.51	178±105	321±72	1.22±0.07
	30	5	5.14±0.46	159±29	314±122	1.16±0.10

Organ weight, mean±S.D.; (), N.
Significantly different from control * P<0.05, ** P<0.01.

表 28-1 Relative organ weight of rabbits administered with leupeptin for 5 weeks

Sex	Dose (%)	No. of animals	Body weight		Organ weight						
			Initial (kg)	Final (kg)	Brain (g/kg)	Thymus (g/kg)	Heart (g/kg)	Lung (g/kg)	Liver (g/kg)	Kidneys (g/kg)	Spleen (g/kg)
Male	Control	5	2.6±0.1	2.6±0.1	3.38±0.20	0.65±0.14	2.32±0.21	2.80±0.19	25.23±2.38	5.49±0.49	0.32±0.09
	10	5	2.5±0.1	2.6±0.2	3.64±0.47	0.72±0.26	2.26±0.10	3.60±1.05	27.21±1.71	5.88±0.59	0.32±0.05
	20	5	2.5±0.1	2.7±0.1	3.33±0.36	0.74±0.12	2.27±0.21	2.85±0.25	26.71±3.00	5.68±0.14	0.23±0.04
	30	5	2.5±0.1	2.6±0.1	3.32±0.28	0.99±0.25*	2.26±0.13	2.92±0.17	25.62±2.02	5.41±0.22	0.51±0.34

Body weight, mean±S.D.; relative organ weight (mg/body weight (g)), mean±S.D.; (), N.
Significantly different from control * P<0.05, ** P<0.01.

表 28-2 Relative organ weight of rabbits administered with leupeptin for 5 weeks

Sex	Dose (%)	No. of animals	Organ weight			
			Ovary/testis (g/kg)	Thyroid (mg/kg)	Adrenals (mg/kg)	Submaxillary gland (g/kg)
Male	Control	5	(5) 1.70±0.75	(5) 68±44	(5) 101±24	(5) 0.49±0.04
	10	5	(5) 2.08±0.37	(5) 85±36	(5) 116±34	(5) 0.44±0.03
	20	5	(5) 2.08±0.22	(5) 66±41	(5) 119±30	(5) 0.45±0.01
	30	5	(4) 1.96±0.19	(5) 60±8	(5) 120±46	(5) 0.44±0.03

Relative organ weight (mg/body weight (g)), mean±S. D.; (), N.

Significantly different from control * P<0.05, ** P<0.01.

表 29 ロイペプチンを 35 日間連続塗布したウサギの病理所見

投与量 (%)	動物番号	病理所見
対照群	1	肺：点状出血
	2	肝：肝細胞の巣状壊死。 副腎：皮質の点状出血
	3	肝：肝細胞の巣状壊死
	4	肝：小葉辺縁帯肝細胞の空胞変性
	5	著変なし
10	9	肝：小葉辺縁帯肝細胞の空胞変性
	10	著変なし
	11	肝：肝細胞の巣状壊死。 肺：肺胞内に泡沫細胞の浸潤
	12	肝：肝細胞の巣状壊死
20	13	肝：小葉辺縁帯肝細胞の空胞変性。 肺：点状出血
	17	肺：点状出血。 脾：間質のヘモジデリン沈着。 副腎：皮質の点状出血。 腎：尿管内の微小結石
	18	肺：点状出血。 副腎：皮質の点状出血
	19	著変なし
30	20	肺：点状出血
	21	肺：点状出血
	25	肺：点状出血。 副腎：皮質の点状出血。 大動脈：限局性の中膜の石灰化、投与局所の皮膚に微小な潰瘍、痂皮形成
	26	著変なし
	27	肺：点状出血
	28	肺：点状出血。 肝：肝細胞の巣状壊死
	29	肺：点状出血、肺胞の骨化生。 肝：肝細胞の巣状壊死。 副腎：皮質の点状出血

細胞の巣状壊死と小葉辺縁肝細胞に局限した空胞変性、副腎皮質に点状出血が散発的にみられたほか、まれに肺胞内への泡沫細胞の浸潤、脾の間質

のヘモジデリン沈着、腎の尿管内の微小結石、大動脈中膜の限局性の石灰化のみられる例もあった。しかし、これらの変化の発生率、変化の程度に明らかな用量依存性はなく、またいずれもウサギに自然発生的にみられる病変であることから、検体投与に起因する変化ではないと判断された。

なお、検体 30% 塗布群の 1 例の塗布部の皮膚に直径約 3 mm 大の潰瘍、痂皮の形成が認められた。しかし、その他の例には皮膚の発赤などの異常が認められなかったことから、本検体塗布に起因した変化でないと判断された。

結 論

ロイペプチンの経皮毒性試験として、日本白色種雄ウサギの背部皮膚に 10, 20, 30% ロイペプチン軟膏を 35 日間にわたり連続 (週 6 回) 塗布した。

その結果、塗布局所には、ロイペプチンあるいは基剤による局所刺激性はほとんど認められなかった。したがって、ロイペプチン 30% を含有する軟膏をウサギの皮膚に 35 日間連続塗布しても、何ら毒性はないと結論される。

文 献

- 1) 田中 亘. 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (ロイペプチン) の開発研究. 昭和 55 年度研究報告書, p.101 (1981).

ロイペプチンおよびベスタチンの難病治療薬としての開発研究

- 2) 田中 亘. 同上. 昭和 54 年度研究報告書, p. 65 (1980).
- 3) 田中 亘. 同上. 昭和 56 年度研究報告書, p. 103 (1982).
- 4) 田中 亘. 同上. 昭和 56 年度研究報告書, p. 98 (1982).
- 5) 田中 亘. 同上. 昭和 57 年度研究報告書, p. 113 (1983).
- 6) 田中 亘. 未発表.
- 7) Koyama, M., Hashimoto, M., Asakawa, N., Ishibashi, M., and Miyazaki, H. *Biomed. Mass Spectrom.*, **7**, 372 (1980).
- 8) Gharib, H., Ryan, R. J., Mayberry, W. E., and Hockert, T. *J. Clin. Endocrinol.*, **33**, 509 (1971).
- 9) Koyama, M., Hashimoto, M., Asakawa, N., Ishibashi, M., and Miyazaki, H. *Biomed. Mass Spectrom.*, **7**, 372 (1980).
- 10) 大倉洋甫, 三吉野産治, 石田淳一, 山口政俊, 弓場郁代. 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. 昭和 58 年度研究報告書, p. 21 (1983).
- 11) 小山道則, 渡辺紀子, 石橋正元, 宮崎 浩. 日本薬学会第 104 年会 (仙台) 講演要旨集, p. 598 (1984).
- 12) Nishizawa, R., Saino, T., Takita, T., Suda, H., Aoyagi, T., and Umezawa, H. *J. Med. Chem.*, **20**, 510 (1977).
- 13) 田中 亘. 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (ロイペプチン) の開発研究. 昭和 56 年度研究報告書, p. 113 (1982).
- 14) 田中 亘. 同上. 昭和 57 年度研究報告書, p. 118 (1983).

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
班員 岩崎 祐三	東北大学医学部脳疾患研究施設脳微細構造部門	980	仙台市星陵町 2-1 0222-74-1111 (内 2313)
〃 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 (内 3145)
〃 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 (内 20)
〃 高木 昭夫	国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部	187	小平市小川東町 2620 0423-41-2711 (内 5115)
〃 埜中 征哉	国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部	187	小平市小川東町 2620 0423-41-2711 (内 5211)
〃 松下 宏	和歌山県立医科大学第二生理学教室	640	和歌山市 9 番丁 9 0734-31-2151 (内 319)
〃 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 (直)
〃 大倉 洋甫	九州大学薬学部薬品分析化学教室	812	福岡市東区馬出 3-1-1 092-641-1151 (内 6151~4)
〃 三吉野産治	国立療養所西別府病院	874	別府市大字鶴見 4548 0977-24-1221~3
〃 村上 慶郎	国立療養所箱根病院	250	小田原市風祭 412 0465-22-3196
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
班員 祖父江逸郎	名古屋大学医学部第一内科教室	466	名古屋市昭和区鶴舞町 65 052-741-2111
監事 里吉栄二郎	国立武蔵療養所神経センター	187	小平市小川東町 2620 0423-41-2711 (内 400) 0423-44-3781 (直)
班員 福山 幸夫	東京女子医科大学小児科教室	162	東京都新宿区市谷河田町 10 03-353-8111 (内 3508)
〃 丸山 工作	千葉大学理学部生物学教室	260	千葉市弥生町 1-33 0472-51-1111
幹事 青柳 高明	微生物化学研究所酵素研究部	141	東京都品川区上大崎 3-14-23 03-441-4173
〃 田中 亘	日本化薬株式会社	115	東京都北区志茂 3-31-12 03-901-2878
班員 松本 郁男	万有製薬株式会社研究本部	153	東京都目黒区下目黒 2-9-3 03-492-4106
〃 石井 靖男	日本化薬株式会社医薬研究開発部	102	東京都千代田区富士見 1-11-2 東京富士見ビル 03-237-5131
班友 江橋 節郎	岡崎国立共同研究機構生理学研究所	444	岡崎市明大寺町字西郷中 38 0564-54-1111 (内 821)
〃 勝沼 信彦	徳島大学医学部酵素化学研究施設	770	徳島市蔵本町 3-18-15 0886-31-3111