

厚生省
新薬開発研究費

微生物の二次代謝産物に由来する
難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究

梅 沢 班

昭和 59 年度研究報告書

昭和 60 年 3 月

研究報告書の作成にあたって

「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）の開発研究」が、昭和 54 年度に厚生省薬務局より新薬開発研究としてとりあげられ、私が班長として本研究班が発足してから第 6 年度（昭和 59 年度）を迎え、これを終了した。

本年度（昭和 59 年度）は前年度までの研究に引き続き、ロイペプチン、ベスタチン、ホルフェニシノール、アルファメニン、ホルフェ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、ベスタチンおよびホルフェニシノールの臨床研究を行い、とくにベスタチンについては Single blind cross over 法による臨床試験が試みられた。

昭和 54 年から昭和 59 年度にわたり施行された筋ジストロフィー症に対する低分子酵素阻害物質の生化学的、薬理的、生理学的、病理学的研究、ならびにモデル動物に対する効果などの広範囲な基礎的研究に注目すべき成果が得られ、また臨床研究において小児患者にベスタチン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。これは刮目すべき成果といえることができる。かくして、昭和 60 年度にはベスタチンの無作為化比較試験およびホルフェニシノールの臨床試験が行われることになった。難病治療薬開発という使命を担った本班は、各班員の努力により、筋ジストロフィー症に対する治療薬開発の門を拓いたといえることができる。

なお、ベスタチンの無作為化比較試験とホルフェニシノールの臨床研究が本班を縮小して継続されることになったが、極めて適切なことである。ここに、本研究を重要課題としてとりあげられた厚生省薬務局ならびに班員各位に感謝する次第である。

昭和 60 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 *α*-ヒドロキシベスタチンとフォルフェニシノール
の高感度定量法 25
大 倉 洋 甫

酵素網の動的平衡に及ぼすベスタチンの効果 37
青 柳 高 明

急性脊髄損傷に対するロイペプチンの効果 47
岩 崎 祐 三

ロイペプチンの薬理学的研究 53
大 塚 正 徳

ジストロフィー筋よりの creatine kinase (CK) 遊離に対する各種薬 剤の影響	65
	高木昭夫
Mdx マウスに対するロイペプチン, ベスタチンの投与成績	71
	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	77
	丸山工作
筋ジストロフィー症マウスに対する高濃度ベスタチンおよびアルファ メニンB投与の効果	89
	松下宏
体外受精法によって作出された C57BL/6-dy ホモマウスに対する ベスタチンおよびロイペプチン投与の影響	95
	野村達次
筋疾患に対するベスタチンの長期投与を中心に	99
	村上慶郎
DMD 患者に対するベスタチン服用の臨床的検討について	105
	三吉野産治
Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMP) に対するベスタチンの 使用経験——臨床的立場から	111
	福山幸夫
血清 CPK の変動に対するベスタチンの効果	121
	木下真男

Duchenne 型筋ジストロフィー患者に対するベスタチンの影響

——新しい筋障害の marker を用いて 127

祖父江 逸 郎

筋ジストロフィー症に対する NK 421 (Bestatin) 長期投与後の

経過報告 135

里 吉 栄二郎

ホルヘニシノールの体内動態研究 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 155

田 中 亘

滝 田 智 久

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 183

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

梅沢浜夫らは微生物がつくる低分子の酵素阻害物質という新しい研究領域を開拓し、薬理活性を有する 50 以上の阻害物質を発見し、世界の注目を集めている。

これらの阻害物質の一つであるロイペプチンが、筋ジストロフィーマウスの発症および症状の進行を阻止することを米国ニューヨーク州立大学の Stracher 博士が発見した。ロイペプチンは筋蛋白の崩壊に関与するセリン・チオールプロテナーゼを阻害するため、試みられたわけである。

かくして、ロイペプチンについては外国で臨床研究が計画され、本班の設立とともに、ロイペプチンの毒性試験を含む前臨床研究を詳細に行い、安全な経口投与量を設定した。

一方、梅沢らは細胞膜に結合する微生物代謝産物の研究を始め、ベスタチン、ホルフェニシンなどを発見した。

すなわち、細胞膜に存在することを明らかにしたアミノペプチダーゼ、アルカリホスファターゼ、エステラーゼなどに対する阻害物質を土壌放線菌中に探索し、上記阻害物質を発見したわけである。なお、ホルフェニシンは経口投与では分解するので、より安定なホルフェニノールが詳しく研究された。

松下班員によってベスタチン、ホルフェニノールが筋ジストロフィーマウスの発症および症状の進行阻止に効果があることが確認された。青柳班員が筋ジストロフィーマウスにベスタチン、ホ

ルフェニシンを連続投与し、経時的に筋肉内の酵素網の動態を調べた結果、アミノペプチターゼを含む水解酵素活性が抑制されているという発見でも支持された。

ベスタチンは癌治療の目的で詳細な前臨床試験が行われていたが、Duchenne 型患者は小児であるので、さらに前臨床試験を行い臨床研究が始められた。臨床研究においては、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に作用する酵素阻害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。筋ジストロフィー症の治療に大きな光を与えたということができた。ベスタチンについては、なお投与量、投与方法などを検討し効果を確かめるには最低 3 年の研究が必要である。また、ホルフェニノールなどの研究も行うべきであると考ええる。

本研究班はロイペプチンおよびベスタチンなどの筋ジストロフィー症に対する治療効果を研究するため、6 年間にわたり生化学的研究、薬理学的研究、生理学的研究、病理学的研究、製剤学的研究、前臨床研究ならびに臨床研究を行い、治療薬の早期開発を目的としたが、その一端を完成したと考える。

各分担研究者により施行された研究は次のとおりである。

1) 村地 孝 (京都大学医学部) : 一ロイペプ

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):一蛍光HPLCによる *p*-ヒドロキシベスタチンとホルフェニシノールの高感度定量法

3) 青柳高明(微生物化学研究所):一酵素網の動的平衡におよぼすベスタチンの効果

4) 岩崎祐三(東北大学医学部):一急性脊髄損傷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):一ロイペプチンの薬理学的研究

6) 高木昭夫(虎の門病院):一ジストロフィー筋よりのCK遊離に対する各種薬剤の影響

7) 埜中征哉(国立武蔵療養所神経センター):一mdxマウスに対するロイペプチン,ベスタチンの投与成績

8) 丸山工作(千葉大学理学部):一鶏ジストロフィー筋における新生児型構造蛋白の出現

9) 松下 宏(和歌山県立医科大学):一筋ジストロフィーマウスに対する高濃度ベスタチンおよびアルファメニンB投与の効果

10) 野村達次(実験動物中央研究所):一体外受精法により作成したC57BL-dy/dyマウスに対するベスタチンおよびロイペプチン投与の影響

11) 村上慶郎(国立療養所箱根病院):一ベスタチンの長期投与を中心として

12) 三吉野産治(国立療養所西別府病院):一DMD患者に対するベスタチン服用の臨床的検討について

13) 福山幸夫(東京女子医科大学):一Duchenne型進行性筋ジストロフィー(DMP)症に対するベスタチンの使用経験一臨床的立場から一

14) 木下真男(東京大学医学部):一運動負荷後の血清CK上昇に対するベスタチン投与の影響

15) 祖父江逸郎(国立療養所中央病院):一Duchenne型筋ジストロフィー患者に対するベスタチンの影響

16) 里吉栄二郎(国立武蔵療養所神経センター):一各種筋ジストロフィー症に対するベスタ

チン長期投与後の臨床経過

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研究

18) 田中 亘・滝田智久(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

村地班員はロイペプチンによって特異的阻害を受ける酵素としてカルパインを選び、その諸性質に、特に触媒作用特性および組織分布に関する研究を行った。

低Ca²⁺要求性カルパインIはブタ赤血球より、また、高Ca²⁺要求性カルパインIIはブタ腎臓よりそれぞれ均質標品として精製した。

(1) カルパインIおよびIIの触媒作用特性
数種オリゴペプチドの加水分解作用点を比較した結果、両酵素ともに、P₁位置にはメチオニン、チロシン、リジン、またはアルギニンのようなかさ高い残基を、そしてP₂にはロイニンまたはバリン残基を特に好む特性のあることが知られた。さらにSuc-Leu-Met-MCA始め数種のメチルクマリルアミド基質を合成し、それらを用いた蛍光測定法によってK_m, k_{cat}値を計測することができた。また、合成基質を用いて、ロイペプチンおよびアンチパインのカルパイン阻害作用が明瞭な競争阻害であること、また、ロイペプチンのほうが3分の1ないし4分の1小さいK_iを示すことを明らかにした。

(2) カルパインIおよびIIの免疫組織学的分布

それぞれの酵素の80kDaサブユニットを免疫原として特異抗体を作製し、これによって両酵素の各組織細胞における分布を明らかにすることができた。ペルオキシダーゼまたは蛍光標識抗体による検索の結果では、ブタまたはラット肝、腎、

筋肉、小腸等におけるカルパイン I と II の分布には大差のないこと、いずれの組織でもカルパインは実質細胞の細胞質に diffuse に分布していることが知られた。

2. 蛍光 HPLC による *p*-ヒドロキシベスタチンとホルフェニシノールの高感度定量法

大倉班員は血清中からベスタチンの主代謝物である *p*-ヒドロキシベスタチンを、また血漿および赤血球からホルフェニシノールを、それぞれ蛍光 HPLC により高感度で定量する方法を確立した。

1) プレカラム蛍光誘導体化による血清 *p*-ヒドロキシベスタチンの HPLC 定量法：ベスタチン (Best) の主代謝物である *p*-ヒドロキシベスタチン (*p*-OH Best) の選択的蛍光誘導体化条件を検討し、その HPLC 定量法を開発した。血清 200 ml を試料とし、過塩素酸で除蛋白後、CHCl₃ 存在下 KOH 溶液中 70°C で 8 分間加熱し、*p*-OH Best のフェノール性水酸基のオルト位にホルミル基を導入した。直ちに、その反応液を酢酸酸性 (pH 3.3) に導き、アルデヒドの蛍光試薬 DDB を加え、H₂O₂ 存在下 70°C で 10 分間加熱することによって、*p*-OH Best の蛍光体を得た。この蛍光体は、TSKgel ODS-120 T カラムおよびアセトニトリルと 50 mM 酢酸 Na·HCl 緩衝液 (pH 2.2) (9:41, v/v) からなる溶離液を用いた HPLC によって分離、蛍光検出された。この HPLC によって、Best を経口投与した健常人および筋ジストロフィー患者血清中のその代謝液 *p*-OH Best を定量した。*p*-OH Best の蛍光体は保持時間 5.5 分に、妨害血清成分は 32 分以内にそれぞれ分離溶出する。*p*-OH Best の検出下限は、血清中 62 pmol (20 ng)/ml である。

2) 自然蛍光検出による血漿および赤血球ホルフェニシノールの HPLC 定量法：ホルフェニシノール (Fenol) が発蛍光性であることを見出し、この自然蛍光を検出する Fenol の HPLC 定

量法を開発した。血漿 100 μl および赤血球 50 μl 中の Fenol は、アセトニトリルで除蛋白後、直ちに、Unisil/NH₂ カラムおよびアセトニトリルと 75 mM クエン酸塩緩衝液 (pH 3.5) (3:1, v/v) からなる溶離液を用いた HPLC によって分離、蛍光検出された。この方法によって、血漿および赤血球にそれぞれ 65 pmol (13 ng)/ml および 160 pmol (32 ng)/ml 以上の濃度で存在する Fenol を、12 分以内に妨害物質と分離し、定量した。この方法は、58 年度に提出した Fenol の蛍光誘導体化 HPLC よりも、前処理が極めて簡便でかつ 15 倍ほど感度も高い。

3. 酵素網の動的平衡におよぼすベスタチンの効果

青柳班員はベスタチンの作用機序を明らかにするために、ベスタチンにより誘起される臓器内および血清中の酵素網の動態について研究を行った。

ベスタチンは ICR マウスに 30 日間連続投与し、経時的に屠殺した臓器内の酵素網の動態ならびにベスタチンを筋ジストロフィー患者に連続投与した前後の血清中における酵素網の動態について検討した。

ベスタチン [(2S, 3R) AHPA-(S)-Leu] 投与群のマウス脾、腎で特徴的な変化が認められ、一定な律動性を有する酵素活性の振動が認められた。一方不活性体 [(2R, 3R) AHPA-(S)-Leu] ではランダムな振動を示すだけであった。この結果はベスタチンが生体内の酵素網にシンクロナイズ効果を与え、細胞機能の変化を誘起したことを示唆する。

また、患者血清中における酵素網の動態はベスタチン投与群では、アミノペプチダーゼ A (AP-A)、AP-B、カルボキシペプチダーゼ B (CP-B)、アルカリホスファターゼ、エステラーゼ活性が有意に低下することを見出した。有意な変化を示さない酵素においても、投与群と非投与群で異なった振動が見られた。多変量解析により、この変

動を検討した結果、ベスタチンはヒト体内の酵素網にシンクロナイズ効果を与え、マウス臓器における知見と類似した結果を得た。

ベスタチンは細胞膜に作用するとともに、オリゴペプチドの代謝に影響を与え、また間接的に蛋白代謝全般に効果をおよぼし、免疫担当細胞を含む細胞機能に変化をひき起すと考えられる。また筋ジストロフィー患者血清中の加水分解酵素活性にも、明らかな変動を与えるので、今後症例を増やして検討する必要があると考える。

4. 急性背髄損傷に対するロイペプチンの効果

岩崎班員は急性脊髄損傷に対するロイペプチンの効果に関する研究を行った。

筋組織のみならず、中枢神経組織の損傷に対する蛋白分解酵素阻害剤の効果を検討してきたが、今回は、急性脊髄損傷でみられる軸索の変性がロイペプチンの投与により有意に抑制し得ることを実験的に証明し得たので報告する。

脊髄伝達路を構成する軸索の主要な細胞骨格系の一つである Neurofilament が脊髄損傷に際し高度に破壊されること、また、この破壊にはカルシウム依存性プロテアーゼの関与が大きいことが示唆されている。

脊髄損傷に対する薬物療法の効果判定の困難性はしばしば指摘されている。われわれは、軸索終末の初期変性を Fink-Heimer 法により組織化学的にとらえ、これを自動画像解析装置により計測、脊髄損傷に伴う軸索変化の程度を定量的に表現する方法を新たに開発し、この実験系を用いてロイペプチンの薬効を判定した。

成熟ラットの第 9, 10 胸椎の椎弓を切除、脊髄を一定圧で 30 秒間圧迫することにより脊髄損傷を作製、これに伴う脊髄下行路の変性を検索するため、術後 7 日目に第 6 腰髄の Fink-Heimer 染色を行い、Rexed の Lamina VIII において変性軸索終末の占める面積をルーゼックス 5000 画像解析装置により計測した。実験群にはロイペプチ

ン 25mg/kg を手術当日より 1 日 2 回連続投与した (3 日目以降、半量に減量)。単位面積 ($5.174 \times 10^{-2} \text{mm}^2$) 当りの変性軸索の占める割合は、対照群 (7 匹) の $28.4 \pm 0.77\%$ (mean \pm S. E.) に対し投与群 (10 匹) では $23.6 \pm 0.40\%$ で、投与群で有意 ($p < 0.001$) に減少していた。

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) ロイペプチンの平滑筋に対する作用

a) ネコの大腿動脈ラセン状条片標本にノルアドレナリンを投与し、収縮力がプラトーに達した後、 $100 \sim 400 \mu\text{g/ml}$ のロイペプチンを加えたところ、最大 35% に達する収縮力の減少が認められた。

b) モルモットの気管ラセン状条片標本において $200 \mu\text{g/ml}$ のロイペプチンは、アセチルコリンによる収縮を増強した。

2) 交感神経節に対する作用

昨年度、副交感神経節においてロイペプチンがアセチルコリンの速い脱分極作用を抑制し、それに続く遅い時間経過の脱分極を増強することを報告した。本年度はモルモット下腸間膜動脈神経節において実験を行った。神経節細胞から細胞内記録を行い、アセチルコリンを圧パルスにより適用すると速い時間経過の脱分極と、これに続く遅い時間経過の脱分極とが発生した。拮抗薬を用いた分析によって、前者はニコチン作用、後者はムスカリン作用であることが分かった。ロイペプチンはアセチルコリンのニコチン作用を抑え、ムスカリン作用の時間経過を延長させた。

3) 摘出脳幹-脊髄-肺標本に対する作用

新生ラットの摘出脳幹-脊髄-肺標本を用いて実験を行った。空気を気管から入れて肺を拡張させると一経過に呼吸の抑制が起った。この反射性呼吸抑制はロイペプチン $200 \mu\text{g/ml}$ を脳幹側に与えても、また肺側に灌流適用しても影響を受けな

った。

4) 脊髄運動ニューロンに対するベスタチンの効果

ラットの脊髄運動ニューロンから細胞内記録を行い、ベスタチン 20mg/kg を腹腔内に与えた。Ia群線維の刺激によって内側腓腹筋運動ニューロンに発生する興奮性シナプス後電位は軽度増大した。

6. ジストロフィー筋よりのCK遊離に対する各種薬剤の影響

高木班員はMDXマウスを用いて、長趾伸筋(EDL)からCKの遊離を、各種薬剤を*in vivo*(慢性)に投与して、CK遊離に対する影響を検討した。

ハムスターは筋ジス(B10 14.1)と対照(B10 FIB)を使用した。MDXマウスと対照(C57 B1)を使用した。実験法は既報(Biomed Res 5: 311, 1984)によった。還流液に混じ直接効果を検討した薬剤はLeupeptin, Bestatin, Pepstatin, menadione, dantrolene, diamoxである。またleupeptinとpepstatinを4~6週腹腔内に投与して慢性的効果を検討した。1側下腿筋の形態的検討を行った。

1 Hz 単収縮反復中のCK遊離速度(*in vitro*)は、対照マウス 1.4 ± 0.8 (U/g/hr, $n=16$)、MDXマウス 36.0 ± 25.8 ($n=28$, $p < 0.001$)であった。leupeptinとpepstatinを腹腔内投与したMDXでは 35.6 ± 16.4 ($n=12$)であり、未処理のものと差は認めなかった。

Bestatin, leupeptin, pepstatin, dantrolene, menadione, diamoxの直接投与はいずれもCK遊離に影響を与えなかった。leupeptinとpepstatin投与は形態的指標に対して影響を与えなかった。

今回使用した実験系において、CK遊離の機序として筋膜を通しての漏出が推定されている。しかしまだ確実ではない。ジストロフィー筋に特長

的であり、1指標として考えられた。この現象に影響を及ぼす薬剤は発見されなかった。

7. mdxマウスに対するロイペプチン、ベスタチンの投与成績

榎中班員はX染色体性劣性遺伝をとる筋ジストロフィー(mdx)マウスの筋病変に対するプロテアーゼインヒビターの効果について研究を行った。

まずmdxマウスの臨床、病理学的特徴を明らかにするため、生後0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120日目にmdxマウスとその対照(C57 BL/10 ScSn)マウス各々5匹ずつにつき金網よじ登り試験、体重測定を行い、ヒラメ筋(赤筋)、長指伸筋、前脛骨筋(白筋)を採取し病理学的検索を行った。治療の対象としたのはmdxマウス11匹で生後3日目よりロイペプチン10mg/kgとベスタチン10mg/kgを30日間連日皮下注射し、その効果をみた。同腹の16匹を対照とした。

mdxマウスには生後10日目まで壊死線維はみられず、筋線維の発育、分化は対照と何ら変らなかったが、15~20日目頃より壊死線維が群をなして出現し、壊死に続く再生線維をみるようになった。再生線維は中心核と塩基好性の胞体で特徴づけられていて、30日目には中心核線維はいずれの筋でも筋線維の約40%を占めた。

治療群マウスでは外見的に非治療群と差はなく、1月治療後の体重は 14.5 ± 2.9 g(対照: 14.2 ± 3.0)であり、CK値は 5.100 ± 2.800 IU(4.700 ± 1.980)で有意の差はなかった。病理学的にみると治療群にも筋線維の壊死と再生像はほぼ等しく存在し、筋線維の平均径は $30.1 \pm 5.0 \mu$ (対照: 3.02 ± 4.1)と有意差なく、また中心核線維の頻度も $43.6 \pm 9.7\%$ (37.3 ± 9.5)と両者間に差は認められなかった。

mdxマウスに対して筋線維の壊死出現(発症)以前よりロイペプチン、ベスタチンを投与したが、壊死過程の抑制効果は認められなかった。

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を筋ジストロフィー症の発症の指標として、ベスタチンの効果について研究を行った。

筋構造蛋白質には異なる分子種が存在し、その発現は胚から新生児、親への成長過程で著しく変化する。また、鶏のジストロフィー筋では、新生児期を特徴づける蛋白質（遅筋型C蛋白質、 β トロポミオシンなど）が発現されること、および除神経筋でも同様の変化が起ることがすでに見い出された。本研究では、これらの新生児型蛋白質の出現を筋ジストロフィー症の発症の指標として、薬剤（ベスタチン）投与が筋ジストロフィー症に対してどのような効果をもつかを検討した。前年度、ふ化直後から1カ月齢までベスタチンを継続投与した時、筋ジストロフィー鶏胸筋における遅筋型C蛋白質を含む細胞の出現が抑制される傾向にあるという予備の結果を得た。本年度は、発症が顕著となる3か月齢までベスタチンを継続投与した時の効果を、主として遅筋型C蛋白質の発見の面から検定した。ベスタチンは微化研青柳博士からご供与いただき1~2週齢の期間は5mg/kg、それ以降は10mg/kgを連日皮下に投与した。3月齢の鶏胸筋の凍結切片にC蛋白質に対する抗体を作用させて免疫組織化学的に調べた結果、正常鶏ではこの月齢では全く遅筋型C蛋白質は検出されないが、筋ジストロフィー鶏（無処理または生理食塩水投与）ではかなり多くの細胞（雄では15~50%の細胞）に遅筋型C蛋白質、さらに少数の小型細胞に心筋型C蛋白質も検出された。遅筋型C蛋白質の出現は明らかに雌より雄に多く、筋ジストロフィー症は雄に顕著であることを示唆した。ベスタチン投与された鶏では、対照鶏より遅筋型C蛋白質をもつ細胞の出現率が低い傾向があるが、遅筋型C蛋白質の出現を阻止するこ

とはできなかった。 β トロポミオシンの出現や運動機能の検定（フリップテスト）の結果も、遅筋C蛋白質を指標とした結果と同じ傾向であった。前年度の結果と合わせ考えると、今回のベスタチン投与方法では、鶏筋ジストロフィーの発症をやや遅延させるものの、発症を抑えることはできないと思われる。

9. 筋ジストロフィーマウスに対する高濃度ベスタチンおよびアルファメニンB投与の効果

松下班員は筋ジストロフィーマウスに対するベスタチンおよびアルファメニンBの効果を、投与量ならびに投与時期などについて研究を行った。

筋ジスマウスに発症初期から投与を開始することによって回復効果があることが認められているベスタチンを、従来の5倍（2mg/day）および10倍（4mg/day）の投与量で、症状のかなり進行している1か月齢の筋ジスマウスに短期間投与し、症状進行を抑制する効果の有無を検討する実験を行った。その結果、4週間および6週間の投与では血清中のマーカー酵素（PK, CPK）活性は著しく低下し、骨格筋中のマーカー酵素（PK, CPK, GOT, GPTなど）はいずれも有意に増加していた。また骨格筋中のAlkaline proteaseおよびNeutral proteaseは共に有意に活性低下を示していた。さらにその間の体重変化を見ると、投与開始から1週間位の間に急激に体重が増加するのが認められたが、その後は対照マウスと同様にゆるやかな減少傾向を示した。これらの結果から、すでに症状の進行している筋ジスマウスに対しても高濃度のベスタチンを投与することで症状の進行をある程度抑制することが可能であること、ならびに、その効果は連続投与よりも、むしろ時々休む断続的な投与方法の方が良いかも知れないことが示唆された。

次にアルファメニンBの投与量を変えて疾病マウスに6週間および12週間投与する実験を行っ

た。その結果 0.4mg/day, 0.8mg/day, 1.2mg/day 投与で、いずれも血清中および骨格筋中のマーカー酵素の活性変化、あるいは尿中のクレアチン排泄量の変化などから症状改善効果があることが認められたが、全般的に 0.8mg/day 投与の場合が最も大きな効果を示していた。同じアルファメニンBの連続投与による延命効果をしらべる実験を各投与量について平均 15 頭ずつの疾病マウスを用いて行った。その結果食塩水投与の対照マウスに比較して、いずれの投与群も明らかな延命効果を示したが、やはり 0.8mg/day dose で最も効果が認められた。1.2mg/day 投与では、平均寿命としては延命効果があるが、全投与マウスが数日以内に死亡するという他の場合とはやや異なった傾向を示した。これらの結果から、アルファメニンBをすでに症状の進行した筋ジスマウスに投与すると症状改善効果が認められ、寿命の延長が得られるが、1日投与量は 0.8mg が最も効果的であるという結論が得られた。

10. 体外受精法によって作成された C 57 BL 16-dy/dy マウスに対するベスタチンおよびロイペプチン投与の影響

野村班員は体外受精法により得られた C 57 BL 16-dy/dy マウスを用いて、ベスタチンおよびロイペプチン投与の効果を研究した。

従来、筋ジストロフィー dy ホモマウスを得るためには、dy 遺伝子をヘテロにもつ保因マウスのメス、オスを交配する方法がとられている。しかし、この交配では、その仔の4分の1に dy ホモマウスが現れるのみであり、しかも生後 2~3 週齢にならないと正常と筋ジストロフィーを区別することが出来ないために胎生期や生後の早い時期にホモのマウスを実験に使用することができなかった。そこで、体外受精の技術を用いて dy ホモマウスを作出し、ベスタチンおよびロイペプチン投与の影響を調べた。

〔成 果〕 筋ジストロフィーを発症した dy ホ

モマウスを用い、メスにホルモン処理をして排卵を誘起した後に卵管膨大部から未受精卵を採取した。一方、オスの精巣上体から精子を採取して、試験管内で受精能を獲得させた。これらの卵と精子の浮遊液体を体外で混合して、受精を成立させ、さらに細胞期まで培養した。この α 細胞期の胚を、あらかじめ擬妊娠を起させた借腹親の卵管内に移植して胎仔あるいは出生仔まで発生させた。

ベスタチンおよびロイペプチンは 2mg/ml の濃度に溶かし、dy ホモマウス（生後 1~2 週齢）の頸部皮下に連日投与した。対照群は生理食塩水を同様に投与した。経時的に体重、発症時期などを調べた結果、ベスタチンおよびロイペプチンとも、dy 筋ジストロフィーマウスの症状改善に、はっきりとした効果は認められなかった。今後さらに詳細な検討が必要と考える。

11. ベスタチンの長期投与を中心として

村上班員は筋疾患のうち Duchenne 型筋ジストロフィー症を中心にベスタチンの長期投与の影響の検討を行った。

対象は肢体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、筋強直ジストロフィー症 4 例、多発性筋炎 2 例、Duchenne 型筋ジストロフィー症 10 例、計 21 例で男性 17 例、女性 4 例であった。使用期間は 2 カ月から 42 カ月で、使用量は 60mg から 1.500mg（体重 1kg 当り 2mg から 100mg）に及んでいる。

長期間の投与成績は血清酵素（CPK, LDH, GOT, GPT）はベスタチン使用開始後暫くの間は低下するが、その後は徐々に増加の傾向が多く見られる。しかし、そうでないものも見られる。長期間の投与で症状の改善の見られたものは Preclinical の Duchenne 型筋ジストロフィー症の 1 例のみで多発性筋炎 2 例はステロイドの節約作用が見られたが病状は進行していた。尿検査、血液一般検査に異常は認められず、認むべき副作用もなかった。

12. DMD 患者に対するベスタチン服用の臨床的検討について

三吉野班員はベスタチンの臨床効果を評価するため、Duchenne muscular dystrophy (DMD) 症患者 (10 歳以下) 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。

10 歳以下の Duchenne 型筋ジストロフィー症の入院患者 6 例にベスタチン、プラセボ、ベスタチンの順で、20mg/kg/日 (1.000mg/日/成人) 分 3 (7時, 15時, 21時) で 8 週間ずつを投与し、血中濃度 (4W, 6W, 8W)、血液生化学所見、運動機能、ADL などについて、臨床効果を検討した。

その結果 1) 朝服薬 1 時間後の血中濃度は 18 週目の 1 例を除き、安定な状態を呈した。2) CPK は、ほぼ不変が 1 名、低下したまま 1 名、低下後上昇が 2 名、上昇後低下が 2 名であった。平均として、ベスタチン投与で低下し、プラセボに変更後、上昇を示した。3) GOT, GPT, LDH などでは、有意な変動はなかった。4) 10m 往復歩行時間、立ち上り時間、階段昇降時間、握力などでは、変動があったが、有意差は認められなかった。ADL は一時改善があり、その後低下していた。5) 皮診、嘔気などの副作用は見られなかった。

まとめとして、CPK は、血中濃度の上昇にしたがって、下降してきた。重回帰分析により、CPK は ADL に最も相関する変数であったが、5% の有意差は認められなかった。臨床効果については、10m 往復歩行、立ち上り、握力、ADL などは一過性に運動機能の改善が見られる例があったが、全体として運動機能が悪化する傾向にあった。

今回のベスタチン治験はまだ進行中なので、中間報告として発表する。

13. Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症 (DMP) に対するベスタチンの使用経験—臨床的立場から—

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検討する目的で、東京女子医科大学小児科通院中の Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症 (以下 DMP) 12 例 (年齢 2 歳～8 歳) および非典型的な良性 DMP 1 名 (12 歳) に、ベスタチン 20mg/kg/日 を 8 週間交代の Single blind cross over 法に従い 1 日 3 回に分けて投与した。ベスタチン投与歴のある例では 2 週間以上休薬後、投与を開始した。また偽薬投与後に家族が悪化を訴えてきた場合には、2～4 週間で真薬に戻して検討した。

服用前と投与開始後 4 週間ごとに採血および 1 日採尿を行い、クレアチン・フォスフォカイネース (CPK) などの血清酵素、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った。

各運動機能所用時間 (20m 走行・階段昇降・起立・起坐・寝返り) の測定および運動機能・筋力の変化につき評価した。

〔結果〕 1. 血清 CPK 値: DMP 新鮮例 5 例中 4 例では、投与開始後 4 週の時点で全例低下した。使用経験有の例ではこの傾向は明確でなかった。

2. 運動機能の変化: 1) Preclinical stage の 2 歳の 2 例では、使用経験有の例も新鮮例も共に投与開始後の運動機能は上昇していた。

2) 4 歳以上の使用経験有の例では、休薬前・開始前・開始後・偽薬後の変化につき検討した。

a) 3 例では休薬後悪化し、投与開始後もさらに悪化、偽薬後著明な悪化をみたが、1 例では真薬再投与後軽度改善、1 例では真薬再投与後 4 週で改善 8 週で再び悪化、他の 1 例では 4 週も 8 週も更に悪化した。

b) 3 例では休薬の変化は明確でなかったが、偽薬後悪化があり、真薬再投与後軽度改善した。

いずれの症例も全体の機能は a) の 3 例より良好であった。

3) 新鮮例では、2 例のみ偽薬投与まで観察し得た。5 歳の 1 例は投与後改善、偽薬後悪化、真薬再投与後改善した。7 歳の 1 例は投与後も軽度悪化していたが、偽薬 4 週後、明らかな悪化を示し、8 週でもさらに悪化し続けた。

3. 使用経験有の例の休薬前と新鮮例の投与前の運動機能を比較したが、年齢を合致させてみて前者の方が良好という傾向は無かった。

以上ベスタチン投与により著明な臨床効果の認められた例はなかったが、一時的な改善を示す例はみられた。進行が急速な 6～7 歳例では、休薬および偽薬に変更後の悪化が服薬中よりも目立つ印象を受けた。また軽症例では偽薬で悪化しても、真薬投与後改善する傾向がみられた。しかしながら、使用経験有の例の休薬前と新鮮例の投与前の運動機能を比較し、年齢を合致させてみた場合、前者のそれの方が、良好という傾向は無く、現時点では本剤の治療効果について結論し難い。

14. 運動負荷後の血清 CK 上昇に対するベスタチン投与の影響

木下班員は運動負荷後の血清 CK 上昇に対するベスタチン投与の影響および 6 施設での評価について集計を行った。

進行性筋ジストロフィーの患者において、血清 CK が高値を示すことは良く知られているが、最近ベスタチン投与でこれが低下傾向を示すことが相次いで報告されている。その作用機序については未だ詳細が明らかではないので、これに関する解明の手がかりを得る目的で次の研究を行った。

1) 筋ジストロフィー症患者について長期間血清 CK を連日測定し、小量投与、大量投与、薬剤なしの安静保持、大量投与で安静保持の 4 期に分けてベスタチンの影響を比較検討したところ、血清 CK は安静によっても大きな影響を受け、有意な低下を示した。また、これにベスタチン投与を

加えるとさらに低下の傾向が見られたが、安静を守らない場合には明らかな効果は見られなかった。

2) 健康成人に種々の種類の運動を負荷し、血清 CK が上昇することを確認してから、ベスタチン投与で、これがどう変動するかを検討した。CK は負荷後 24 時間で最高に達するが、ベスタチン非服用時には平均 51.0 単位の上昇を示すのに対し、服用を 1 週間続けた後では平均 28.57 単位の上昇で、前値に比して減少の傾向を示した。

運動負荷後の血清 CK の上昇の機序は明らかではなく、細胞膜からの透過、筋線維の断裂などの機序が想定されているが、通常程度の運動では形態学的変化は確認されておらず、膜の透過の可能性が高い。今回の研究の結果、ベスタチンがこれを抑制する作用を有することが示唆され、本剤の筋ジストロフィー症の血清 CK 低下作用には、こうした非特異的な膜の安定作用も加わっているのではないかと推定した。

15. Duchenne 型筋ジストロフィー (PMD) 患者に対するベスタチンの影響——新しい筋障害の marker を用いて——

祖父江班員は進行性筋ジストロフィー (PMD) 患者に対するベスタチンの影響を検討するため、血清 CK と新しい筋障害の marker である muscle-specific enolase (MSE), carbonic anhydrase III (CA-III) について研究を行った。

1) 143 例の PMD 患者で調べた血清 CA-III の異常値出現率は、CK や MSE と同程度かそれ以上であった。

2) 血清 CA-III 値と CK 活性値の相関係数は 0.8471, MSE 値とでは 0.7818 というれも高い値を示した ($p < 0.001$)

3) 10 例の歩行可能な Duchenne 型 PMD 患者に 8 週間ベスタチン投与 (20mg/kg/日) を行った結果、6 週目に血清 CK 活性値は薬剤投与前に比べ有意に低い値を示した。しかし血清 CA-III, MSE では有意な変化はみられなかった。

4) ベスタチン投与終了後ひきつづき Placebo を8週間投与した。Placebo に変更後4週間の時点で薬剤投与中止時に比べ、CK, MSE, CA-III のいずれの酵素も有意に高い値を示した。

5) 血清 CA-III は CK, MSE とほぼ同様の推移をとり、ベスタチン投与によって特別な変化を示さなかった。

6) 血清酵素の変動に平行した運動機能の改善はみられなかった。

7) 特記すべき副作用はみられなかった。

16. 各種筋ジストロフィー症に対するベスタチン長期投与後の臨床経過

里吉班員はベスタチン (NK 421) を各種筋ジストロフィー症の患者に長期投与を行い、その臨床経過について研究した。

約4年間にわたる長期 NK 421 投与を続け、臨床経過を観察中の9例。内訳は、肢帯型筋ジストロフィー (LG PMD) 5例、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSH PMD) 2例、Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne PMD) 2例である。以上の症例に対し、NK 421 を少量より経口投与開始し、副作用の発現に注意した上で症例により1カ月単位で漸増させた。昭和60年3月現在での最大投与量は、200~1,000mg/day でNK 421 投与期間は7~45カ月(平均32.7カ月)である。

臨床症状の判定には定期的な全身の筋力評価、10m歩行時間、階段昇降時間を用いた。血液生化学的指標には CPK を用い、その他副作用監視のため、末梢血液、肝、腎機能を観察した。

〔結果〕 臨床的に改善を示した例はなく、臨床的に不変の FSH, PMD の1例と subclinical な Duchenne PMD の計2例を除き全例に症状の進行がみられた。一方血清 CPK 値は LG PMD の1例を除き低下傾向がみられた。この傾向は Duchenne PMD などの、従来より CPK が著しく高値を示す例で顕著にみられた。しかしこれら

の例でも臨床的には明らかに症状の進行がみられており、CPK 血清値の動きと臨床的变化との間に相関はみられなかった。

NK 421 投与中、3例に悪心、食欲低下、下痢などの消化器症状を訴えたものがあつた。(240mg, 450mg, 1,000mg 服用中)しかしこれらの例でも、減量、一時的休薬にて自然に症状消失、その後も NK 421 の投与を続けることが出来た。血清、血液生化学、尿所見では異常がみられず、重篤な副作用はみられなかった。

NK 421 投与により、明らかな症状改善を示す例はなかったが、多くの例で CPK の低下を認めており、症状の進行を遅らせている可能性は否定出来ず、今後、二重盲検法などによる検討がさらに必要と思われた。

17. ホルフェニシノール (BF-121) の体内動態研究

松本班員はホルフェニシノールの体内動態を調べるため、ラット、ウサギ、イスおよびヒトに単回投与を行い、血中濃度、尿、糞中排泄、代謝物を測定し、動物種差の体内動態の比較検討を行った。また、ラットに単回経口投与した時の組織内分布についても研究した。

1) 測定法：ラットの体内動態はすべて [³H]-BF-121 を用いて行った。他の実験は、M-1 (未変化体)、M-3 は RIA 法 (前年度報告)、M-2, M-4, M-5, M-6 は HPLC 法で分析したが、M-2 についてはその不安定性のためにメトキシイミノ体に誘導したのち測定した。

2) 結果：ホルフェニシノールは、いずれの動物種においても消化管から速やかに吸収され、投与30分~1時間で最高血中濃度に達し、また血中からの消失も早い。いずれの動物種においても血中代謝物は、大部分が未変化体である。

総排泄率は80%前後であるが、そのほとんどが尿中に排泄され、経口吸収性は良く、また蓄積性は認められなかった。

尿中代謝物については大きく種差が認められ、ラットでは M-6, ウサギでは M-4, イヌでは M-1, ヒトでは M-3 が主代謝物で、それぞれ尿中代謝物の 50% 以上を占めた。

組織への移行性は良く、多くの組織では血中よりも高濃度に分布し、特に脳下垂体、腎臓、膵臓が高い値を示したが、排泄も早く、血中からの消失とほぼ並行する。しかし肝臓にはあまり分布せず、免疫系に関与するリンパ節、胸腺、骨髄、脾臓に比較的高濃度に分布するのが特徴的である。

また筋肉中へはあまり高濃度に分布せず、投与 1 時間後で血中濃度のはぼ 3 分の 1 であるが、筋肉中からの消失は他の臓器と比べて大変遅い。

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、滝田、石井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を行った。また各班員にロイペプチン、ベスタチンを提供するとともに、臨床試料の分析を担当し臨床研究の支援を行った。

1) ロイペプチンの bioavailability と製剤研究
腸溶顆粒をつくり、イヌに経口投与したときの bioavailability は在来製剤のそれと異ならなかった。

室温密栓下に 3 年半保存した後の L-ロイペプチン残存率は、原末 92.0~95.6%, 臨床試験用 10 倍散 94.7%, カプセル 91.6% であり、低下の原因はラセミ化であった。

2) ベスタチンの bioavailability

2-1) 筋ジストロフィー雄性マウス (C57 BL/6J dy(-)) とその同腹非発症マウスにつき調べた。血中ピークは両者同様であり、減衰は発症マウスで遅かった。連続投与により、ピークは不動で減衰が遅くなることはヒトを含めた他動物種と共通しており、発症マウスでは減衰がさらに遅れた。マウスの主代謝物である (2S, 3R) AHPA の存在比は両者で同水準であり、投与量の増加に

伴って減少した。

筋肉内濃度を投与後 1 時間で比較すると、ベスタチンは血中濃度の 30~40% に達し、AHPA は血中より高いが、発症マウスの AHPA 存在比は非発症のそれより低かった。また、筋ホモジネートとベスタチンを反応させたときの AHPA 生成は発症マウスでは非発症のその半分であった。

発症マウスでの尿・糞中回収率は前報までに報告した他動物種のそれと同様に高く、代謝型も正常マウスと同様であった。

2-2) 幼若ラット (3 週齢) の亜急性毒性試験に併行して bioavailability を調べた。

投与量 117mg/kg において、最高血中濃度は 30 $\mu\text{g/ml}$ に達し、24 時間後も 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の未代謝型ベスタチンが検出された。p-hydroxy-bestatin は 2 桁低かった。以上の傾向は 3 週間連続投与後も変らなかった。

2-3) Duchenne 型筋ジストロフィー小児 2 例の 130mg \times 3 回/日投与期間における尿中の代謝物組成を福山班員と共同で測定したが、健康成人のそれと同様に大部分のベスタチンは少量の p-hydroxy bestatin と微量の (2S, 3R) AHPA から成り、代謝物は連続投与により増加した。

3) ベスタチンの安定性

室温密栓下に 2 年半保存したときの臨床試験用ドライシロップのベスタチン残存率は 98.9% であり、分解物は検出されなかった。

4) ベスタチンの幼若ラット (3 週齢) に対する経口毒性

0.5, 1.0, 2.0g/kg を 1 回投与したときの急性毒性は一般状態・体重・病理学的検査のいずれにも著変はなく、また死亡例もなかった。39, 117, 350, 700mg/kg を連日 13 週間投与したときの一般状態・尿検査・血液検査・病理学的検査のいずれにも著変なく、また死亡例も認められず、成獣におけると同様にベスタチンは幼若ラットにも低毒性であった。

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 (以下カルパイン calpain と総称する) について、その精製と性質の研究を系統的に行った。とくに、カルパインを特異的に阻害する細胞内インヒビター蛋白質の存在を発見したので、これをカルパスタチン (calpastatin) と名づけ、その精製と性質についても研究を行った。

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

カルパイン I および II は、それぞれブタ赤血球およびブタ腎臓より均質蛋白質として精製した¹⁾。精製酵素は 20mM イミダゾール緩衝液 (pH 7.5, 2mM EGTA および 5mM 2-メルカプトエタノール含有) に 4°C で十分透析した後使用した。

カルパインのカゼイン加水分解活性は、50mM トリス・HCl 緩衝液を用い、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。カルパイン I の定量には 0.1mM CaCl_2 を、カルパイン II の定量には 5mM CaCl_2 を活性化剤として加えた。いずれの場合も 5mM 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。

各種オリゴペプチド基質に対するカルパイン I および II の分解作用は、次の方法によって検討した。反応液 1 ml 中にカルパイン 9–150 μg 、基質ペプチド 57–107 nmol を加え、5mM システイン、2.5mM 2-メルカプトエタノール、および 5mM CaCl_2 存在下に 30°C で反応を進行させ、2h 以内の適當時分に EGTA を 9mM になるように加えて反応を停止させた後、生成物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって定量的に分析した。

* 京都大学医学部附属病院検査部

蛍光基質に対するカルパインの作用は、0.5 ml の反応液中にカルパイン 11–26 μg 、基質 0.002–8 μmol を含む系で 30°C にて反応を進行させ、遊離してくる 7-アミノ-4-メチルクマリンの蛍光 (380 nm にて励起, 460 nm の発光) を連続記録することにより計測した。

研究結果

カルパインはカゼインのような蛋白基質をよく分解するが、オリゴペプチドや一般に広く使用されているプロテアーゼ用合成基質にはほとんど全く作用しないというのが従来の知識であった。ところが、今回カルパインを大量に精製して、各種の天然に存在するオリゴペプチドに作用させてその生成物を HPLC で検討してみたところ、意外に多数のペプチドが加水分解を受けることがわかり、その分解切断位置の研究から、基質特異性に適合したジ-またはトリペプチジル合成基質を調製して、カルパイン活性を蛍光測定することができるようになった。以下にその結果の概要を報告する²⁾。

1. 各種ペプチドに対するカルパインの作用

図 1 には 3 種の代表的ペプチドのカルパイン I (上段) および II (下段) による加水分解の結果を掲げる。一見してこれらの 3 種ペプチドがカルパインによってかなりよく分解されること、また、分解の様相が I と II で大差のないことがわかる。

上記 3 種を含む 9 種のペプチドに対するカルパイン I および II の作用を比較して示したのが図 2 である。図の左欄横棒で示すように、各基質の切断箇所はカルパイン I と II で同じであるが、基質によっては生成物の量に若干の差異 (図の右欄数字) が認められた。図 2 の結果から一般則として、カルパインは P_1 位置に Tyr, Met または Arg (おそらくは Lys も) をもち、 P_2 位置に Leu または Val をもったペプチドを好んで加水分解するといえる。 P_3 位置は必ずしもふさがれていなくてもよく、また、 P_1' 位置はアミド基でもよいことがわかる。

2. 蛍光合成基質の調製

上記のペプチド基質に対する特異性を念頭に置いて、 P_1' 位置に MCA (4-メチルクマリル-7-ア

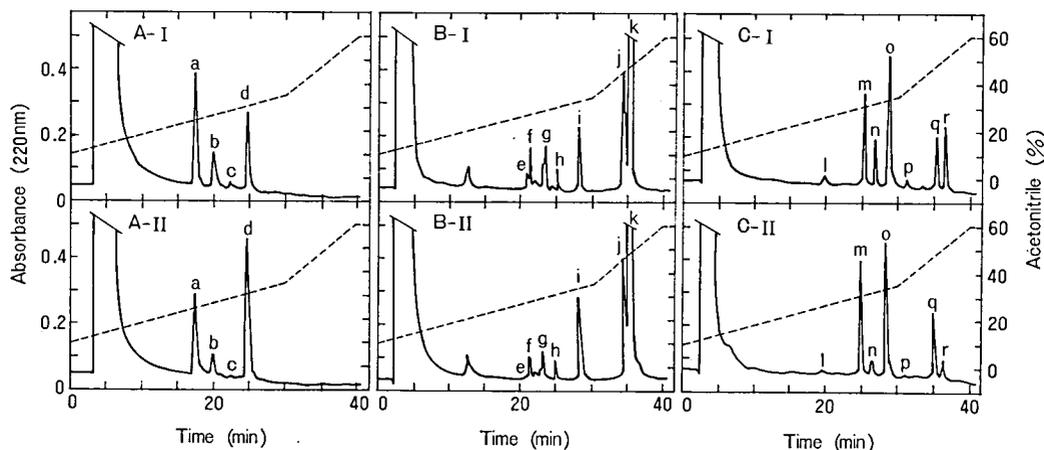


図 1 Chromatographic patterns following digestion of dynorphin, glucagon, and oxidized insulin B chain by calpains I and II. Upper row, calpain I; lower row, calpain II. Dynorphin in A-I and A-II (57 nmol), glucagon in B-I and B-II (57 nmol), and oxidized insulin B chain in C-I and C-II (57 nmol) were hydrolyzed with 20, 9, and 9 μg of calpain (either I or II). The yields of peptides a to r are shown in Fig. 2.

	I	5	10	15	20	25	30	Yield (%)	
								Calpain I	Calpain II
Hexapeptide	LWMRFA							56.8 12.4	65.3 1.2
Eledoisin-related peptide	KFIGLMNH ₂							0 63.8	40.4 23.9
α-Neo-endorphin	YGGFLRKYPL							64.1 23.4 24.7	78.6 4.5 4.6
Angiotensin I	DRVYIHPFHL							35.1 7.4 38.3	64.4 3.6 9.1
LH-RH	ZHWSYG [†] LRPGNH ₂							63.5 13.0 11.1 4.3	77.3 2.1 1.3 2.9
Neurotensin	ZLYENKPR [†] RPYIL							69.1 12.6 16.1 1.1	69.8 10.1 15.0 1.5
Dynorphin	YGGFLR [†] RI RPKLK [†] WDNQ							24.1 49.5 47.2 7.9	45.2 30.9 31.5 trace
Glucagon	HSEGTFTS DYSKYLD [†] SRRAEDF [†] VEWLMNT							47.7 13.0 3.5 5.3 1.2 2.5	53.5 10.7 4.6 2.5 trace 1.9
Oxidized insulin B chain	FVNQHL [†] CGSH [†] LVE [†] ALY [†] LVCGERGFF [†] Y [†] TPKA							5.6 4.7 27.2 21.4 7.5 1.1 2.6	7.5 1.4 28.8 30.9 2.1 0.4 0.5

図 2 Cleavage sites in oligo- and polypeptides by calpain I or calpain II and the yield of each fragment. The amounts of calpain (either I or II) used were: 60 μg for α-neoendorphin (110 nmol), neurotensin (110 nmol), and LH-RH (110 nmol); 20 μg for eledoisin-related peptide (141 nmol); 150 μg for hexapeptide (207 nmol); 50 μg for angiotensin I (77 nmol). For separation of fragments a to r, see Fig. 1. Thick or thin arrows show major or minor cleavage sites, respectively. NH₂-terminal Z of neurotensin and LH-RH represents pyroglutamy; C of oxidized insulin B chain is a cysteic acid residue.

ミド)を有するジ-およびトリペプチドに対するカルパインの作用を検討した。一定の条件下で得られたMCA基質群に対する比活性を表1にまとめて掲げる。

カルpain Iのほうがカルpain IIに比して一般にやや高い比活性を示したが、これはIのほうがCa²⁺存在下での活性持続がIIよりも良好であることを反映しているかもしれない(図3)。

表1の最初の3種の基質についてのデータから、カルpainはP₂位置にアミノ酸の存在することを絶対的に要求していること、また、P₂にはLeu ≫ Valの順で選択性があることがわかる。カルpainはP₁にArgのある基質を好み、この点はカルpainも似ているが、後者の場合はさらにP₂の種類によって決定的な支配を受けている点で前者

と異なる。

カルpain IとIIはカゼイン基質に対し、そのCa²⁺要求性を約100倍異にすることが知られているが¹⁾、このような差異は、蛍光合成基質を用いても同様に観察された(図4)。

3. カルpainの反応動力学

先の実験で良い基質であると認められた4種のMCA基質について、通常の方法によって求めたミカエリス定数(K_m)、見かけの反応速度定数(k_{cat})を表2に掲げる。比較のためにパpainを酵素とした場合のデータも含めてある。

カルpain IIのK_mおよびk_{cat}は、カルpain Iのそれより、それぞれ1.2~4.0倍および1.6~3.1倍大きい(Suc-Leu-Tyr-MCAの場合

表 1 Specificity of calpain I, calpain II, and papain on various peptidyl MCA derivatives as substrates

Substrate ^a	Concentration	10 ² × specific activity ^b		
		Calpain I	Calpain II	Papain
	mM ^c		$\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$	
Suc-Met-MCA	4.0	0.0	0.0	2.02 ± 0.04
Suc-Leu-Met-MCA	4.0	6.84 ± 0.06	5.05 ± 0.12	306 ± 1.80
Suc-Val-Met-MCA	4.0	0.43 ± 0.04	0.31 ± 0.01	554 ± 43.3
Suc-Tyr(Cl ₂ -Bzl)-MCA	0.4	0.0	0.0	0.0
Suc-Leu-Tyr(Cl ₂ -Bzl)-MCA	0.4	0.42 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.58 ± 0.01
Suc-Val-Tyr(Cl ₂ -Bzl)-MCA	0.4	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01	1.58 ± 0.09
Suc-Tyr-MCA	2.0	0.0	0.0	0.63 ± 0.04
Suc-Leu-Tyr-MCA	2.0	7.63 ± 0.45	4.00 ± 0.28	38.3 ± 3.48
Suc-Val-Tyr-MCA	2.0	0.81 ± 0.01	0.37 ± 0.01	30.7 ± 4.10
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0.2	1.81 ± 0.36	1.79 ± 0.29	161 ± 6.90
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	2.0	4.64	8.00	1220
Boc-Leu-Thr-Arg-MCA	4.0	0.84	0.36	860
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	4.0	0.0	0.0	51.7
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	4.0	0.0	0.0	240
Boc-Leu-Gly-Arg-MCA	4.0	0.0	0.0	12.0

^a No cleavage took place elsewhere than at P₁ as detected by ultraviolet absorption and ninhydrin staining on TLC.

^b The value represents the mean of four separate determination ± S. E.

^c High substrate concentration (4.0 or 2.0 mM) was used to ensure the maximum rate of hydrolysis in most cases, while with a few substrates a much lower concentration (0.4 or 0.2 mM) had to be employed due to their limited solubilities.

表 2 Comparison of kinetic parameters for calpain I, calpain II, and papain at 30°C

Substrate ^a	Enzyme ^b	K_m	k_{cat}	$10^{-2} \times \frac{k_{cat}}{K_m}$
		mM	s ⁻¹	M ⁻¹ s ⁻¹
Suc-Leu-Met-MCA	Calpain I	1.21	0.062	0.510
	Calpain II	4.78	0.194	0.405
	Papain	0.343	0.926	27.0
Suc-Leu-Tyr-MCA	Calpain I	4.74	0.369	0.779
	Calpain II	2.21	0.092	0.417
	Papain ^c	0.711	0.158	2.22
Suc-Leu-Leu-Val-Try-MCA	Calpain I	0.203	0.029	1.41
	Calpain II	0.466	0.065	1.39
	Papain	0.013	0.783	603
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	Calpain I	5.92	0.491	0.830
	Calpain II	7.08	0.805	1.14
	Papain	13.0	208	160

^a Seven to ten different concentrations (0.001 to 4 mM) for each substrate were used for Lineweaver-Burk plots.

^b The amounts added per tube were: 11 μg of calpain I, 26 μg of calpain II, and 1 μg of papain.

^c Ten μg of papain was used.

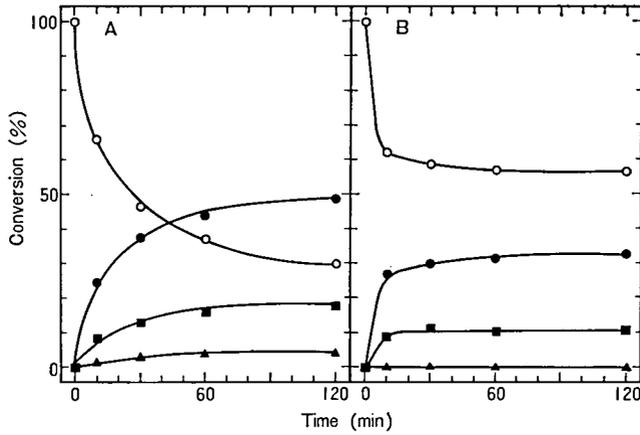


図 3 Time course of the hydrolysis of dynorphin by calpain I and calpain II. In a total volume of 6 ml, dynorphin (262 nmol) was incubated at 30°C with 5 mM CaCl₂. One-ml aliquots were withdrawn from the assay mixture after incubation for 0, 10, 30, 60 and 120 min, and the reaction was stopped by adding 9 mM EGTA. The peptide fragments from dynorphin were quantified by HPLC with a reversed phase TSK ODS-120T column and a Shimadzu integrator C-R1B. A, calpain I; B, calpain II, ○, dynorphin; ●, Arg⁷.....Gln¹⁷; ■, Tyr¹.....Arg⁶; ▲, Tyr¹.....Lys¹³.

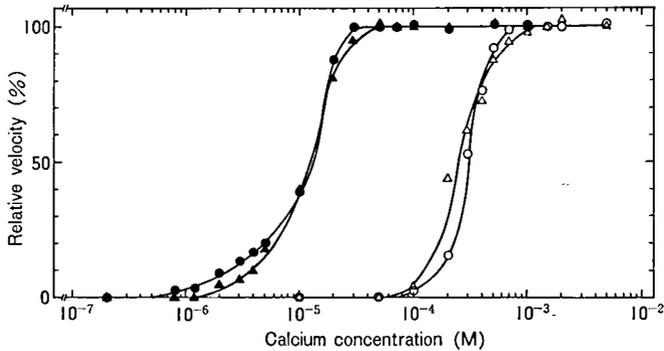


図 4 Ca²⁺ requirement of calpain I and calpain II for the hydrolysis of two different synthetic substrates. Calpain I (11 μg) or calpain II (26 μg) was incubated at 30°C in Ca²⁺/EGTA buffer with 2 mM Suc-Leu-Tyr-MCA and 4 mM Suc-Leu-Met-MCA. The rate of hydrolysis was determined by measuring fluorometrically the amount of 7-amino-4-methylcoumarin liberated. Closed symbols, calpain I; open symbols, calpain II. ● and ○, Suc-Leu-Tyr-MCA; ▲ and △, Suc-Leu-Met-MCA.

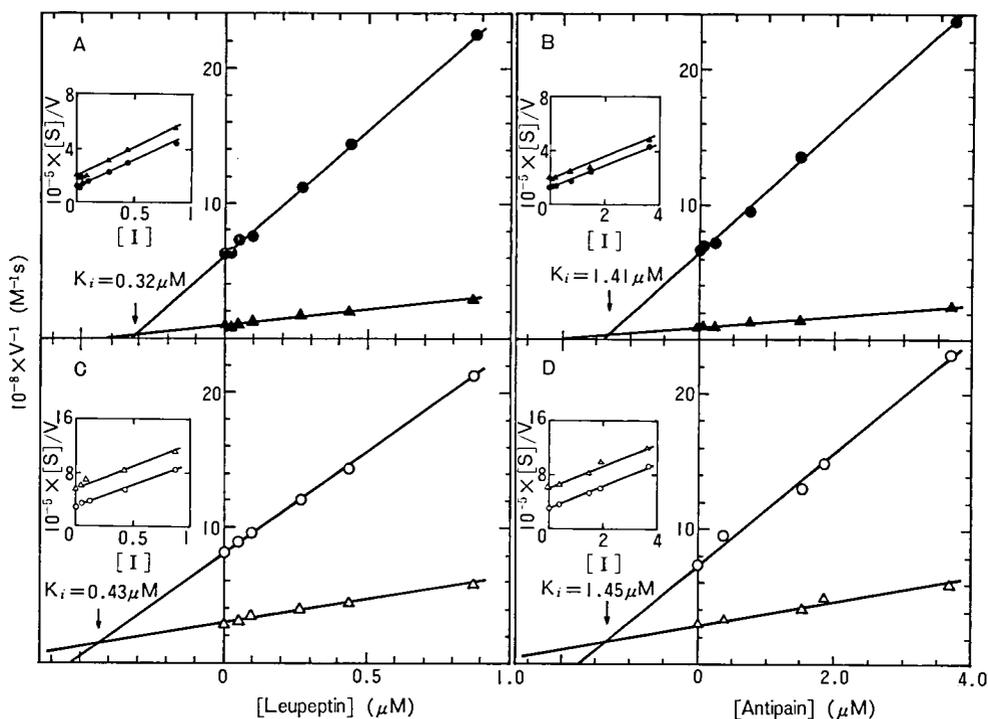


図 5 Inhibition of calpain I- or calpain II-catalyzed hydrolysis of peptidyl MCA derivatives by leupeptin and antipain. The assay was performed at 30°C and at two different concentrations, [S], of Suc-Leu-Met-MCA as substrate and with varying amounts, [I], of inhibitor in 110 mM imidazole HCl buffer, pH 7.3, containing 5 mM L-cysteine, 2.5 mM 2-mercaptoethanol, 5 mM CaCl₂ 2% Me₂SO, 2% methanol, and calpain I (11 μg) or calpain II (13 μg). The rate of hydrolysis, V, was calculated from the amount of 7-amino-4-methylcoumarin released in 5 min. Dixon plots and Cornish-Bowden plots were used to determine the K_i value and the mode of inhibition, respectively. A and C, inhibitions of calpains I and II, respectively, by leupeptin; B and D, inhibitions of calpains I and II, respectively, by antipain. [S] used are: ●, 0.2 mM; ▲, 2 mM, ○, 0.4 mM; △, 2 mM.

を除く)。 k_{cat}/K_m 値でみると、テトラペプチル MCA のほうが、ジペプチル MCA より最高 3.5 倍良好な基質であることになる。しかしカルパインの k_{cat}/K_m 値は一般にババインのそれに比して低値 (5~433 分の 1) にとどまっている。また、カルパインの K_m 値は 10^{-3} ~ 10^4 の水準にとどまっていて、カルパインの蛋白質基質に対する K_m 値が 10^{-7} ~ 10^{-8} であるといわれるのに比してはるかに高値である。

4. ロイペプチンおよびアンチバインの作用

Suc-Leu-Met-MCA を基質としてロイペプチンおよびアンチバインのカルパイン阻害作用を検

討した結果が図 5 である。各図の別枠内でみられるように、阻害形式はいずれも競争阻害であった。Lineweaver-Burk プロットから求めた阻害定数 K_i は、カルパイン I に対してロイペプチン 0.32 μM, アンチバイン 1.41 μM, また、カルパイン II に対してロイペプチン 0.43 μM, アンチバイン 1.45 μM であった。すなわち、ロイペプチンのほうがアンチバインより 3~4 倍強い阻害能を示したことになる。

ロイペプチンは R-Leu-Argininal の構造を持ち、一方アンチバインは R-Val-Argininal の構造を有する。Argininal 部位が合成基質のペプチル部分のアミノ末端残基 (すなわち P₁) に相当

すると仮定すると、その上流位の Leu または Val は P₂ に相当することとなる。そうであれば、Leu を持ったロイペプチンが Val を持ったアンチペインより数倍カルパインに対する親和力を高く示したとしても不思議がないことになる。このように、今回のカルパインの基質特異性の研究は、実験的にかねて知られていたロイペプチンの強いカルパイン阻害作用を、その機作のうえからもより一歩ふみこんで解くこととなったのである。

しかし、今回明らかにされた特異性のデータだけからではカルパインの生理学的意義を明確にすることはできなかった。ことに、カルパイン I と II との間で、特に目立った基質特異性の差が発見できなかったことは、この Ca²⁺ 要求性を異にした 2 つの分子種の同時存在の意義については依然としてその解明の手がかりがつかまえていないことを示している。

カルパインおよびカルパスタチンに関して、われわれは以上の研究のほか、特異抗体を用いた組織分布^{3,4)}、眼水晶体^{5,6)} および網膜⁷⁾ における分布と作用、ヒト赤血球膜結合性カルパイン⁸⁾ の研究、カルパインおよびカルパスタチンの酵素免疫測定法⁹⁾、カルパインサブユニット構造^{10,11)}、カルパスタチンの分子多形性¹²⁾ およびカルパインによる断片化¹³⁾、エストロゲン結合蛋白質へのカルパインの作用¹⁴⁾ などの研究を行い、また、解説論文^{15,16)} を発表した。

文 献

- 1) Kitahara, A., Sasaki, T., Kikuchi, T., Yumoto, N., Yoshimura, N., Hatanaka, M., and Murachi, T. Large-scale purification of porcine calpain I and calpain II and comparison of proteolytic fragments of their subunits. *J. Biochem.*, **95**, 1759-1766 (1984).
- 2) Sasaki, T., Kikuchi, T., Yumoto, N., Yoshimura, N., and Murachi, T. Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates. *J. Biol. Chem.*, **259**, 12489-12494 (1984).
- 3) Yoshimura, N., Hatanaka, M., Kitahara, A.,

- Kawaguchi, N., and Murachi, T. Intracellular localization of two distinct Ca²⁺-proteases (calpain I and calpain II) as demonstrated by using discriminative antibodies. *J. Biol. Chem.*, **259**, 9847-9852 (1984).
- 4) Yoshimura, N., Ohtuki, H., Hamakubo, T., Kitahara, A., Kannagi, R., and Murachi, T. Distribution of calpain in various organs of the rat: an immunohistochemical study. *Biom. Res.*, **5**, 419-424 (1984).
- 5) Yoshida, H., Murachi, T., and Tsukahara, I. Limited proteolysis of bovine lens α -crystallin by calpain, a Ca²⁺-dependent cysteine proteinase, isolated from the same tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, **798**, 252-259 (1984).
- 6) Yoshida, H., Murachi, T., and Tsukahara, I. Degradation of actin and vimentin by calpain II, a Ca²⁺-dependent cysteine proteinase, in bovine lens. *FEBS Lett.*, **170**, 259-262 (1984).
- 7) Yoshimura, N., Tsukahara, I., and Murachi, T. Calpain and calpastatin in porcine retina. Identification and action on microtubule-associated proteins. *Biochem. J.*, **223**, 47-51 (1984).
- 8) Hatanaka, M., Yoshimura, N., Murakami, T., Kannagi, R., and Murachi, T. Evidence for membrane-associated calpain I in human erythrocytes. Detection by an immunoelectrophoretic blotting method using monospecific antibody. *Biochemistry*, **23**, 3272-3276 (1984).
- 9) Takano, E., Kitahara, A., Kannagi, R., and Murachi, T. Enzyme immunoassay of calpain I and calpastatin and its application to the analysis of human erythrocyte hemolysate. *J. Appl. Biochem.*, **6**, 117-125 (1984).
- 10) Yumoto, N., Kikuchi, T., Sasaki, T., and Murachi, T. Comparison of tryptic peptides from the heavy and light subunits of calpain I and calpain II by high performance liquid chromatography. *J. Biochem.*, **96**, 1531-1537 (1984).
- 11) Kikuchi, T., Yumoto, N., Sasaki, T., and Murachi, T. Reconstitution of calpain I and calpain II from their subunits: interchangeability of the light subunits. *Arch. Biochem. Biophys.*, **234**, 639-645 (1984).
- 12) Takano, E., Yumoto, N., Kannagi, R., and Murachi, T. Molecular diversity of calpastatin in mammalian organs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 912-917 (1984).
- 13) Shigeta, K., Yumoto, N., and Murachi, T. Fragmentation of a 70000-dalton calpastatin molecule upon its complex formation with calpain. *Biochem. Intern.*, **9**, 327-333 (1984).
- 14) Murayama, A., Fukai, F., and Murachi, T. Action of calpain on the basic estrogen re-

- ceptor molecule of porcine uterus. *J. Biochem.*, **95**, 1697-1704 (1984).
- 15) Murachi, T. Calcium-dependent proteinases and specific inhibitors : calpain and calpastatin. *Biochem. Soc. Sympos.*, **49**, 149-167 (1984).
- 16) Murachi, T. Regulation of intracellular protein degradation : calpain and calpastatin. Abstr., Fourth Symposium of the Federation of Asian and Oceanian Biochemists (October, 1984), Manila, Philippines, p. 21.

蛍光 HPLC による *p*-ヒドロキシベスタチンと フォルフェニシノールの高感度定量法

大倉 洋甫*

研究協力者 石田 淳一*・田村 和彦*・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^{1,2)}、ベスタチン (Best)^{3,4)}、フォルフェニシノール (FCnol)^{5,6)} および関連化合物を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を利用して、高感度に定量できる蛍

光分析法の開発研究を行ってきた。

本年度は、Best の主代謝物である *p*-ヒドロキシベスタチン (*p*-OH Best) の蛍光 HPLC を開発した。この方法は、ホルミル化反応とアルデヒドの蛍光ラベル化剤 [4,5-ジメトキシ-1,2-ジアミノベンゼン (DDB)] を用いる反応によって、*p*-OH Best を蛍光誘導体化し (図 1)、その蛍光体を逆相分配 HPLC によって分離、測定するも

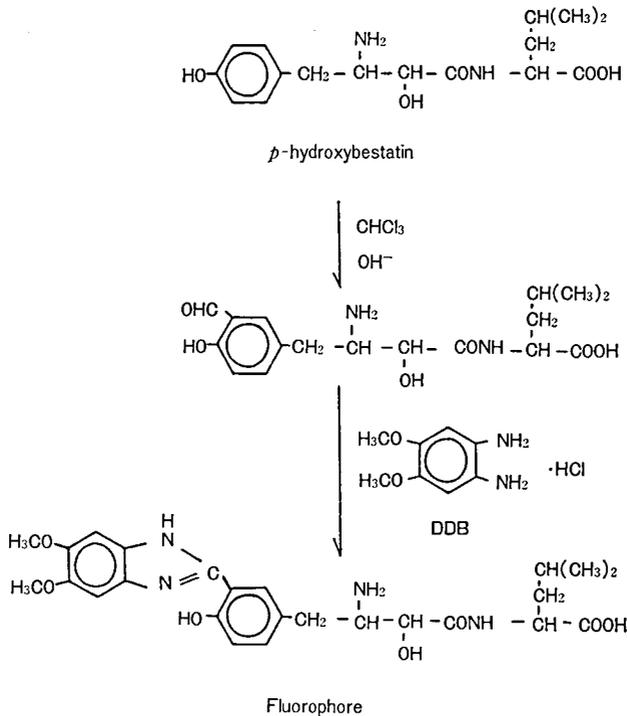


図 1 Scheme of the fluorescence derivatization of *p*-hydroxybestatin with DDB.

* 九州大学薬学部

のである。この方法によって Best を投与した筋ジストロフィー患者および健常人血清中の *p*-OH Best を、また、57 年度に開発した Best の蛍光 HPLC^{3,4)} によって同試料中の Best をそれぞれモニターした。

また、58 年度にアルカリ性酸化による FCnol の選択的蛍光誘導体化 HPLC^{5,6)} を提出したが、今回、FCnol 自身が弱酸性溶液中で蛍光を発することを発見し、この自然蛍光を検出する FCnol のより簡便で、かつ高感度な HPLC 定量法を新たに開発した。この方法によって、FCnol 投与後の血清および赤血球中のその濃度をモニターした。

I. プレカラム蛍光誘導体化による血清 *p*-OH Best の HPLC 定量法

実験方法

1) 試料溶液の調製

a) 1.3mM DDB 溶液

DDB·HCl 5.3mg を水にとかし、全量 20ml とする。調製後、2 時間以内に使用する。

b) 50mM 酢酸ナトリウム・塩酸緩衝液 (pH 2.2)

酢酸ナトリウム 6.9g を蒸留水 900ml に溶かし、濃塩酸で pH 2.2 に調整後、全量 1l とする。

2) 基準操作

a) 除蛋白

血清 (または血漿) 200 μ l に水 (検量線作成時には、*p*-OH Best 標準液) 100 μ l および 2.5M 過塩素酸 200 μ l を加え、1100g で 10 分間遠心する。上清 200 μ l を次の反応に用いる。

b) ホルミル化反応

上清 200 μ l に 2.5M 水酸化カリウム 200 μ l を加え、混和後、1100g で 5 分間遠心する (過塩素酸カリウムの除去)。上清 250 μ l をテフロンキャップ付試験管 (45 \times 15 mm i. d.) に移し、クロロ

ホルム 100 μ l を加え、70°C で 8 分間加熱する。

c) 蛍光反応

上記反応液に、14M 酢酸 50 μ l、1.3mM DDB 300 μ l および 1.0mM 過酸化水素 50 μ l を氷水中で順次加え、70°C で 10 分間加熱する。冷後、クロロホルム層と分離している上層の最終反応水溶液 100 μ l を HPLC に付す。

d) HPLC

高速液体クロマトグラフは、東洋曹達 80 3D 型 サンプルインジェクター (100 μ l ループ) 付 HPLC 用ポンプ、TSKgel ODS-120T (粒径 5 μ m) を充填したカラム (150 \times 4 mm i. d.)、12 μ l フローセルを装備した島津 RF-530 型蛍光検出器および日立 056 型レコーダーからなる。溶離液はアセトニトリルおよび 50mM 酢酸ナトリウム・塩酸緩衝液 (pH 2.2) からなる。*p*-OH Best 標準液を用いて蛍光誘導体化条件を検討する場合は、その割合を 1:4(v/v)、また、血清試料を測定する場合は、9:41 にする。流速 0.8ml/min で溶離液を送液し、溶出液の蛍光検出は、励起波長 350 nm および発光波長 425 nm で行う。カラム温度は室温 (20~27°C) である。

結果および考察

p-OH Best は、クロロホルム存在下アルカリ溶液中でホルミル化され、DDB によって定量的に蛍光ラベル化された。この方法は、チロシンを含むペプチドに対しても DDB 蛍光体を与え得るので、最近オピオイドペプチドとして注目されているロイシンエンケファリン (LEK, Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) とメチオニンエンケファリン (MEK, Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) についても *p*-OH Best と同様に蛍光誘導体化条件を検討した。

1) HPLC による分離と蛍光検出

p-OH Best、LEK および MEK の DDB 蛍光

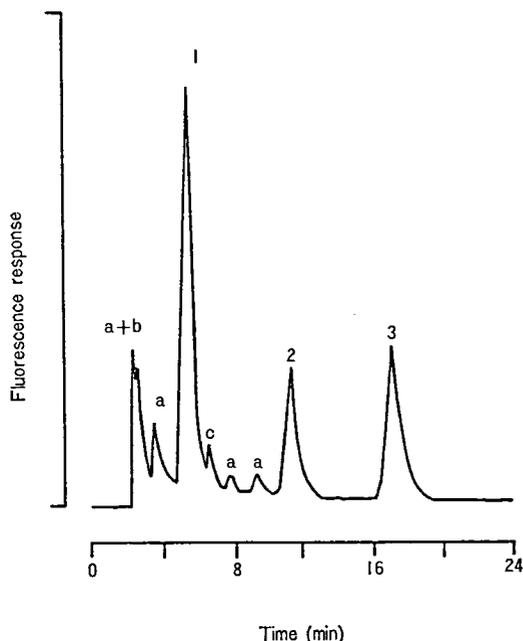


図 2 Chromatogram obtained with the reaction mixture of *p*-hydroxybestatin, leucine enkephalin and methionine enkephalin. A portion (200 μ l) of the standard solution (5 nmol/ml, each) was treated by the recommended procedure. HPLC conditions: column, TSKgel ODS-120 T; mobile phase, CH₃CN-50 mM CH₃COONa HCl buffer (pH 2.2) (1:4, v/v); flow rate, 0.8 ml/min; fluorescence detection, Ex 350 nm and Em 425 nm. Peaks: 1, *p*-hydroxybestatin; 2, methionine enkephalin; 3, leucine enkephalin; a, reagent blank; b, by-products from methionine enkephalin and leucine enkephalin; c, by-product from methionine enkephalin.

体は、逆相分配型充填剤 TSKgel ODS-120 T のカラムによって分離された (図 2)。

これらの蛍光体は、pH 1.3~3.5 の酸性溶液中で強く発光し、それらの蛍光スペクトルは、いずれも 350 および 425 nm 付近にそれぞれ励起および発光極大波長を有する。HPLC の移動相には、アセトニトリルを含む pH 2.2 の酢酸ナトリウム・塩酸緩衝液を用いているが、同 pH のリン酸塩あるいは塩化カリウム・塩酸緩衝液も同様に使用できた。図 2 の HPLC 条件により、後述する蛍光誘導体化条件を検討した。

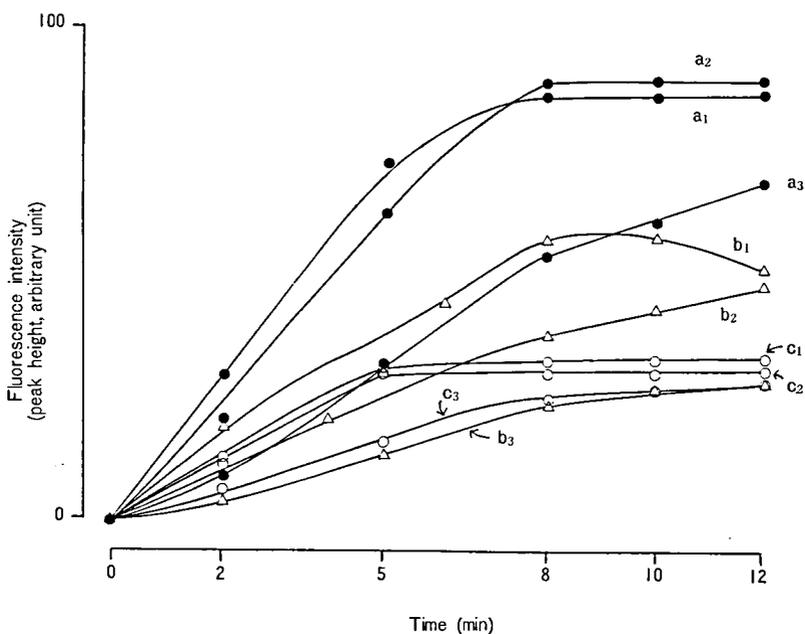
2) 蛍光誘導体化条件

p-OH Best およびチロシン含有ペプチドを DDB によって蛍光誘導体に導くために、まず、ライマー-チマン反応⁷⁾を利用し、それらのフェノール性水酸基のオルト位にホルミル基を導入した。

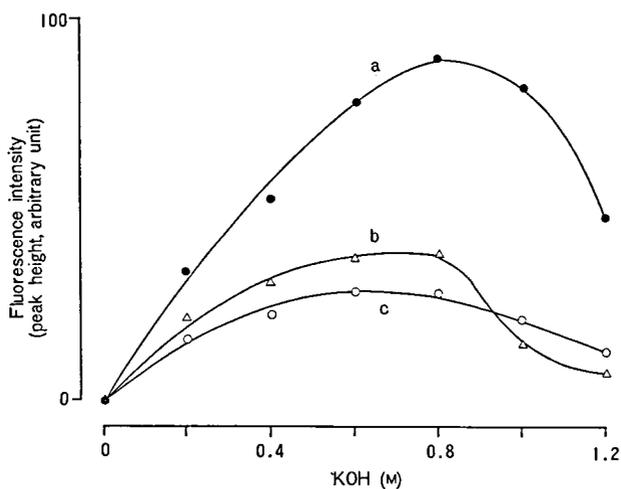
この反応は、クロロホルム存在下、強アルカリ性で加熱することにより速かに進行する。図 3 は、0.8 M 水酸化カリウム溶液中で反応したときの反応温度と時間について調べたものである。ホルミル化反応はクロロホルムの沸点より高い温度で特に速かに進行し、70 または 80°C で加熱したとき、*p*-OH Best のホルミル化体の生成は、8 分間で最大となった。一方、LEK および MEK では、70 あるいは 80°C で 5 分間以上加熱すると、それらのペプチド結合の開裂によって生じる副反応物の蛍光ピーク (図 2, b) が増大した。なお、*p*-OH Best では、検討した反応時間および温度において、副反応物に由来する蛍光ピークは観察されなかった。定量操作には、*p*-OH Best に対して最大の反応収率を与え、かつ、チロシン含有ペプチドからの副反応物の生成をできるだけ少なくするために、70°C 8 分間の反応条件を選択した。

この条件において、反応に必要な水酸化カリウム濃度を調べた。図 4 に示すように、反応液中の水酸化カリウム濃度を 0.8 M より高くすると、いずれもホルミル化体の生成率は減少した。LEK および MEK では、この場合も、ペプチド結合が開裂した副反応物の生成が著しく増加したが、*p*-OH Best では、蛍光体を与える副反応物の生成は認められなかった。したがって、ホルミル化 *p*-OH Best のペプチド結合は、これらの条件で分解しないものと推察される。基準操作では、血清試料の除蛋白に過塩素酸を使用しているため、ホルミル化反応液中約 0.72 M の濃度となるように水酸化カリウムを加えている。

反応において、添加したクロロホルムの量 (10 ~ 200 μ l) は副反応物の生成には影響を与えず、



3 Effects of reaction time and temperature on the formylation. A portion ($200\ \mu\text{l}$) of each standard solution ($5\ \text{nmol/ml}$) was treated by the recommended procedure, for various times at different reaction temperatures. a_1 - a_3 , *p*-hydroxybestatin; b_1 - b_3 , leucine enkephalin; c_1 - c_3 , methionine enkephalin. a_1 - c_1 , 80°C ; a_2 - c_2 , 70°C ; a_3 - c_3 , 60°C .



4 Effect of potassium hydroxide concentration on the formylation. A portion ($200\ \mu\text{l}$) of each standard solution ($5\ \text{nmol/ml}$) was treated by the recommended procedure with various concentrations of potassium hydroxide, and the pH of the fluorescence reaction mixture was adjusted to 3.3 with 5-17M acetic acid. a, *p*-hydroxybestatin; b, leucine enkephalin; c, methionine enkephalin.

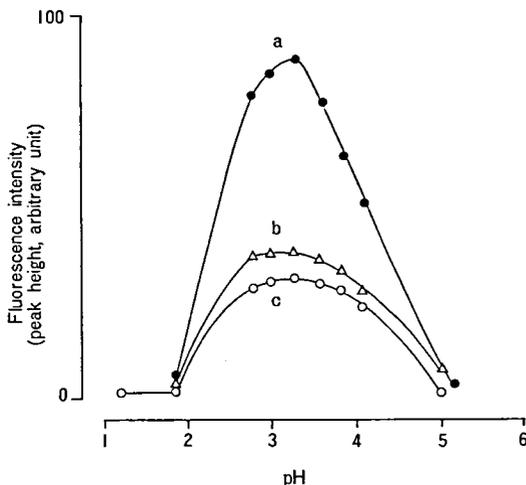


図 5 Effect of pH on the fluorescence derivatization. A portion (200 μ l) of each standard solution (5nmol/ml) was treated by the recommended procedure, but the pH of the fluorescence reaction mixture was adjusted with a mixture of 14M acetic acid and concentrated hydrochloric acid. a, *p*-hydroxybestatin; b, leucine enkephalin; c, methionine enkephalin.

50 μ l 以上で, *p*-OH Best, LEK および MEK に対して, いずれも最大のホルミル化収率を与えた。クロロホルムは反応液中水溶液と分離しているので, 反応液を振盪させた場合とさせない場合におけるホルミル化生成率の変化を調べたが, 両条件におけるホルミル化体の生成量は, ほぼ等しかった。基準操作では, 反応は静置して行っている。

上述したホルミル化条件で生成した *p*-OH Best およびチロシン含有ペプチドのホルミル化体は, いずれも pH 3.3 の酢酸酸性溶液中で DDB と反応し, それぞれ蛍光体を与えた(図 5)。

このとき, 蛍光反応の促進剤として, 過酸化水素や過ヨウ素酸ナトリウムなどの酸化剤を必要とした。図 6 に示すように, 蛍光反応時に過酸化水素が存在する場合, 蛍光体の生成は速かに進行し, 10 分間で最大となる。しかし, 存在しないときには, 少なくとも 20 分間, 蛍光反応は進行しない。この反応液に残存しているクロロホルムを分離し

て蛍光反応を行うと, 過酸化水素を添加しなくても, 反応のラグタイムは生じなかった。したがって, クロロホルム中に蛍光反応を阻害する還元性物質が存在していることが示唆された。蛍光反応を 70°C で 10 分間行う場合, 過酸化水素は反応液中 0.06~0.1mm の濃度で, *p*-OH Best, LEK および MEK に対して最大の蛍光ピークを与えた。また, 過ヨウ素酸ナトリウム(反応液中 4~10 μ M) でも, ほぼ同様な結果を得た。

蛍光反応の温度は高いほど, 蛍光体は早く生成するが(100°C では 7 分間で最大値に達する), 蛍光体の生成率には著しい差はないので, ホルミル化反応と同じ反応温度に設定している。

3) 血清 *p*-OH Best の定量

生体内には, フェノール性水酸基を有する化合物が多く存在するので, 血清中の *p*-OH Best を検出するには, HPLC によりそれらの妨害物質を分離する必要があった。図 2 のクロマトグラフィーに用いた溶離液のアセトニトリルおよび 50mm 酢酸ナトリウム・塩酸緩衝液(pH 2.2)の組成を 9:41 に変化させた場合, すなわち, *p*-OH Best の蛍光体を遅く溶出させた場合に(その保持時間は 5.5 分から 16 分になる), 良好な結果を得た。

図 7 は, Best を健康人に経口投与し, 投与前と投与後(4 時間)における血清中の *p*-OH Best [165 ng (0.51 nmol)/ml] を検出したクロマトグラムである。Best を投与していない血清から得たクロマトグラムと比較することによって, *p*-OH Best の蛍光ピークは, 内在する妨害物質の蛍光ピークと完全に分離されていることが分かる。なお, この蛍光誘導体化 HPLC では, Best は蛍光体を形成しないので, 全く検出されない。また, MEK および LEK の蛍光体は, この HPLC 分離条件でそれぞれ 23.0 分および 34.0 分の保持時間に溶出される。

基準操作に従い, ヒト血清に添加した *p*-OH Best の蛍光ピーク高さから作成した絶対検量線

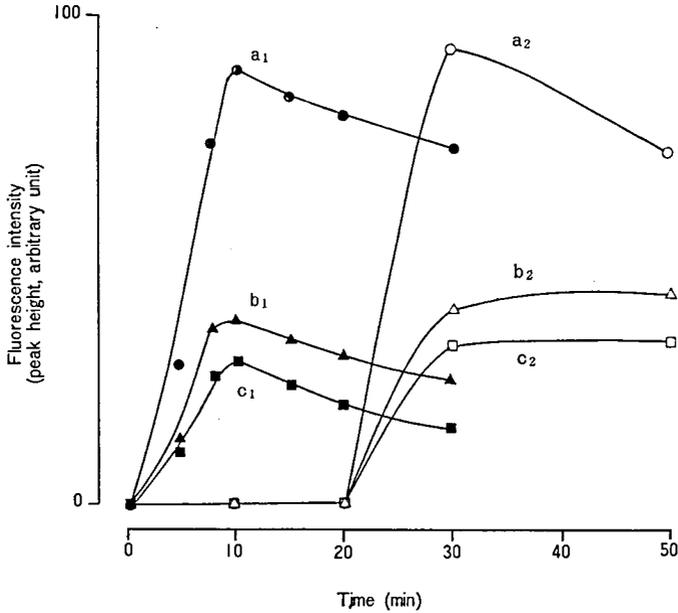


図 6 Effect of reaction time on the fluorescence derivatization. A portion (200 μ l) of each standard solution (5 nmol/ml) was treated by the recommended procedure for various reaction times at 70°C (a₁-c₁), but without hydrogen peroxide (a₂-c₂). a_{1,2}, *p*-hydroxybestatin; b_{1,2}, leucine enkephalin; c_{1,2}, methionine enkephalin.

は、少なくとも、25 nmol/ml まで原点を通る直線性を示す。このとき、除蛋白操作における *p*-OH Best の添加回収率は良好で $98 \pm 1.8\%$ ($n=5$) であった。検量線の回帰直線式による相関係数 (r) は 0.999 であった。また、 $S/N=2$ における血清中の *p*-OH Best 濃度の検出下限は 62 pmol (20 ng)/ml であった。これは HPLC 注入量で 480 fmol に相当する。

Best を投与した健常人血清を処理し、7 回繰り返して測定した定量値 (165 ng/ml) の変動係数は 3.9% であった。

Best (4.17 mg/kg) を投与した健常人血清中の *p*-OH Best の経時的濃度変化を本法によりモニターした (表 1)。同試料中の Best 濃度は、57 年度に開発した蛍光 HPLC によって定量したものである。健常人において、代謝体 *p*-OH Best

の血清濃度は Best 投与後 4 時間後に、Best のそれは 3 時間後にそれぞれ最高値を示した。

また、三吉野班員らにより Best を連続投与している筋ジストロフィー患者血清中の *p*-OH Best および Best についても、同様に測定した (表 2)。血清試料は投与開始後 6 週間目の朝に服用し、1 時間後に採血して得たものである。その試料の *p*-OH Best/Best の濃度比は、投与後 1 時間後における健常人血清から得た比に比べてかなり高い値を示している。これは、患者体内のヒドロキシダーゼの活性が高いこと、あるいは、*p*-OH Best がすでに蓄積されていることも推察されるが、筋ジストロフィー患者血清のベストチン濃度は、投与後 0.5~1 時間で最大値を示している^{3,4,8)}ことから、測定した患者の *p*-OH Best/Best の濃度比は、健常人の投与後 3 ないし 4 時

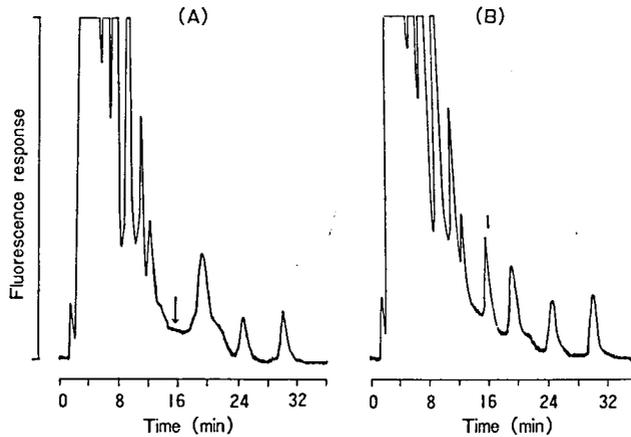


図 7 Chromatograms obtained with (A) drug-free serum and (B) serum at 4 h after oral administration of bestatin to a healthy man. Dose: 4.17 mg/kg. HPLC conditions: mobile phase, CH₃CN-50 mM CH₃COONa HCl buffer (pH 2.2) (9:41, v/v); other conditions are the same as those described in Fig.2. Peaks: 1, *p*-hydroxybestatin: others, endogenous substances and reagent blank. Serum concentration of *p*-hydroxybestatin (ng/ml): A, 0.0; B, 165.

表 1 Concentrations of *p*-hydroxybestatin and bestatin in serum after oral administration of bestatin to a healthy man

Time(h)	Concentration (μg/ml) ^{a)}		Ratio ^{b)}
	<i>p</i> -hydroxybestatin	bestatin	
0.5	ND	0.20	0
1	0.010	0.70	0.014
2	0.020	4.65	0.004
3	0.065	9.30	0.007
4	0.165	8.10	0.020
6	0.100	1.60	0.063
8	0.045	0.40	0.113

^{a)} Concentrations of *p*-hydroxybestatin and bestatin were determined in sera obtained periodically at 0.5 to 8 h after the administration of bestatin with a single dose of 4.17 mg/kg to the subject of 60 kg body weight.

^{b)} The concentration of *p*-hydroxybestatin was divided by that of bestatin in the same sample.

間で得たその比に匹適していることも考えられる。

II. 自然蛍光検出による血漿および赤血球 FCnol の HPLC 定量法

実験方法

1) 試料溶液の調製

a) 75 mM クエン酸塩緩衝液 (pH 3.5)

75 mM クエン酸および 75 mM クエン酸 3 ナトリウム溶液を混合し pH 3.5 に調整したものを使用。

2) 基準操作

a) 除蛋白

①血漿-血漿 100 μl に水 (検量線作成時には FCnol 標準液) 25 μl および アセトニトリル 200 μl を加え, 1100 g で 10 分間遠心する。上清 100 μl を HPLC に付す。②赤血球-赤血球を約 4 倍量の生理食塩水で洗浄し, 800 g で遠心した赤血球 50 μl に, 水 (検量線作成時には FCnol の標準液) 100 μl を加え, ソニケーションにより溶血させる。

表 2 Concentrations of *p*-hydroxybestatin and bestatin in sera after oral administration of bestatin to patients with Duchenne's muscular dystrophy

Patient (year, kg) ^{c)}	Concentration ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}		Ratio ^{b)}
	<i>p</i> -hydroxybestatin	bestatin	
A (9, 20.0)	0.190	4.18	0.045
B (7, 22.5)	0.330	5.98	0.055
C (7, 19.0)	0.200	6.26	0.032
D (9, 23.4)	0.365	5.06	0.072
E (8, 20.0)	0.275	5.20	0.053
F (5, 16.6)	0.350	4.18	0.084

a) Bestatin (6.67 mg/kg) was orally administered three times a day (morning, noon and evening) for six weeks. Concentrations of *p*-hydroxybestatin and bestatin were determined in sera obtained at 1 h after the last administration in the morning.

b) The concentration of *p*-hydroxybestatin was divided by that of bestatin in the same sample.

c) Age and body weight of the patient are shown in parenthesis, respectively.

この溶血液にアセトニトリル 250 μl を加え, 1100 g 10 分間遠心する。上清 100 μl を HPLC に付す。

b) HPLC

高速液体クロマトグラフは, 日立 655 型 HPLC 用ポンプ, 7120 Rheodyne 試料インジェクター (100 μl ループ), Unisil NH₂ (粒径 5 μm) を充

填したカラム (150 \times 4 mm i. d.), 18 μl のフローセルを装備した日立 650-10S 分光蛍光光度計および理化電機レコーダーからなる。アセトニトリルと 75mM クエン酸塩緩衝液 (pH 3.5) の 3:1 (v/v) の混液を溶離液として用い, 流速 1.0 ml/min で送液する。蛍光検出は, 励起波長 275 nm および発光波長 313 nm で行う。カラム温度は室

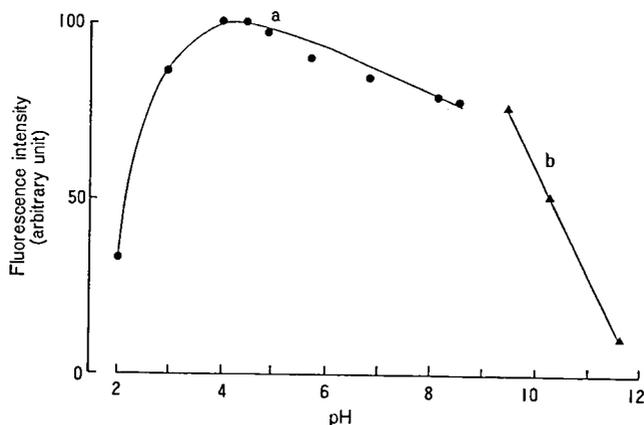


図 8 Effect of pH of the forphenicinol solution on its native fluorescence intensity. The pH of the solution was adjusted with a mixture of (a) 0.1M citric acid and 0.1M disodium hydrogen phosphate, or (b) 0.1M disodium hydrogen phosphate and 0.1M sodium hydroxide.

表 3 Native fluorescences of some biological substances

Compound (100 nmol/ml)	Relative fluorescence intensity ^{a)}	
	at Ex 275 nm and Em 313 nm	at maximum Ex and Em wavelengths (Ex max./Em max.)
Forfenicinol	100.0 ^{b)}	122.2 (283/313)
Dopa	52.6	79.0 (282/320)
Dopamine	53.0	78.0 (282/320)
Epinephrine	89.4	122.0 (282/318)
Norepinephrine	88.0	118.2 (282/320)
Tyrosine	123.0	135.6 (278/308)
Tyramine	132.0	144.0 (278/308)
Serotonin	5.7	802.0 (302/342)
Tryptophan	76.8	362.0 (282/350)

a) The fluorescence intensities were measured in 75 mM sodium citrate buffer (pH 3.5) used for HPLC.

b) The fluorescence intensity from forphenicinol was taken as 100.

温 (20~27°C) である。

結果および考察

FCnol 自身は、pH 4~5 の弱酸性溶液中で強く発蛍光する (図 8)。この蛍光スペクトルは、283 および 313 nm にそれぞれ励起および発光極大波長を有する。しかし、種々の蛍光性生体成分 (カテコールアミン類、チロシン、チラミンやトリプトファンなど) も、FCnol の蛍光と極めて類似した蛍光スペクトルを有する (表 3)。したがって、生体試料中の FCnol を測定するには、少なくともそれらの生体成分から FCnol を HPLC によって分離する必要がある。

1) HPLC による分離と蛍光検出

アミノプロピル基をシリカゲル表面に化学結合させた Unisil NH₂ カラムは、類似自然蛍光を発する生体成分と FCnol を良好に分離した (図 9)。

この HPLC の溶離液には、アセトニトリルおよび 75 mM クエン酸塩緩衝液 (pH 3.5) (3:1, v/v) の混液を用いている。クエン酸塩緩衝液の pH を 3.5 より高くすると、検討した化合物は全体的に遅く溶出し、特にカテコールアミン類がよ

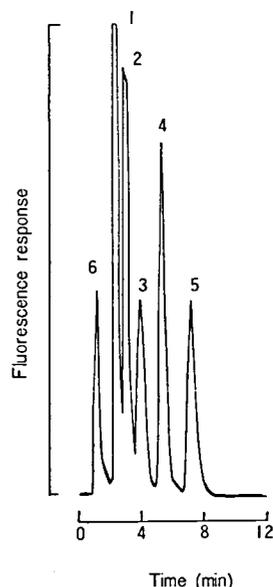


図 9 Chromatogram of a standard mixture of forphenicinol and some biological substances. HPLC conditions: column, Unisil NH₂ (5 μm, 150×4 mm i.d.); mobile phase, 75 mM sodium citrate buffer (pH 3.5)-CH₃CN (1:3, v/v); flow rate, 1.0 ml/min; fluorescence detection, Ex 275 nm, Em 313 nm. Peaks: 1, serotonin+tyramine; 2, epinephrine+dopamine+tryptophan; 3, norepinephrine+tyrosine; 4, dopa; 5, forphenicinol; 6, artifact. Amounts: 25 μmol each per 100 μl of injection volume.

り遅く溶出するため、pH 4.5 ではそれらのピークは FCnol のそれと完全に重なった。また、アセトニトリルの濃度をより高めた場合も、全体的に遅く溶出してくる。したがって、Unisil NH₂ カラムによるこれらの分離は、陰イオン交換と順相分配によって行われているものと考えられる。

HPLC に注入する試料は、移動相と類似した組成のアセトニトリルと水の混液にする必要があった。試料を水溶液にすると検討した化合物の各ピークは著しくブロードになる。

溶出液中の FCnol の蛍光は、275 nm の波長で励起し 313 nm の発光波長で測定されている。FCnol の蛍光が示す励起極大波長 283 nm で励起した場合、水のラマン光が 313 nm の発光波長に観

察され、クロマトグラムのベースラインノイズが大きくなった。なお、275 nm の励起波長では、水のラマン光は 300 nm の波長に現われる。

2) 血漿および赤血球 FCnol の定量

図 10 は、FCnol を健常人に経口投与し、投与前と投与後（4 時間）における血漿および赤血球中の FCnol を検出したクロマトグラムである。FCnol を投与した血漿および赤血球のクロマトグラム（図 10 の B および D）には、ともに保持時間 7.6 分に、FCnol のピークが明らかに観察されている。また、投与前のそれらの試料には、FCnol が溶出する保持時間には、内在性の妨害ピークは検出されていない。

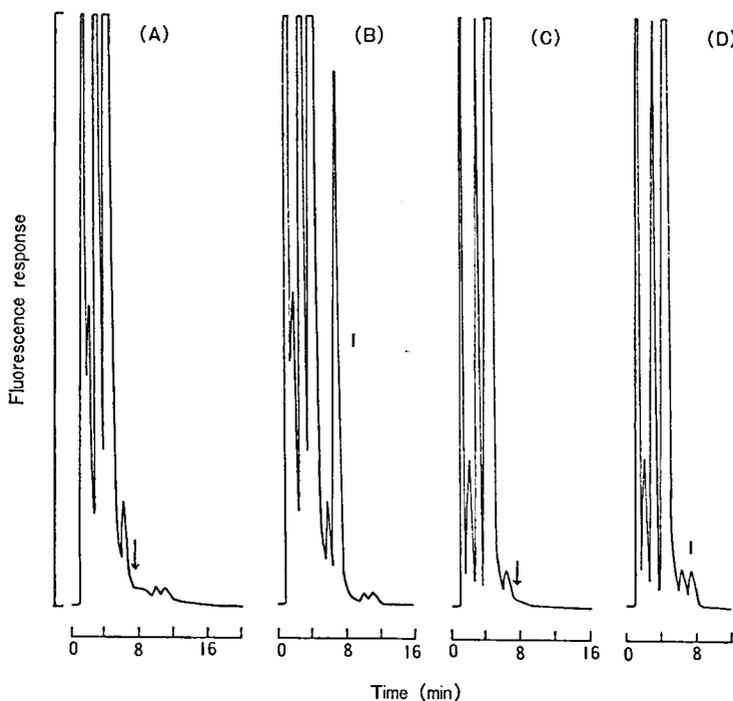


図 10 Chromatograms obtained with human plasma and erythrocytes before or after oral administration of forphenicol. Samples: (A), drug-free plasma; (B), plasma at 4 h after oral administration; (C), drug-free erythrocytes; (D), erythrocytes at 4 h after oral administration. Dose: 60 mg/man. Peaks: 1, forphenicol; others, endogenous substances. Forphenicol concentrations in plasma and erythrocytes (nmol/ml): (A), 0.0; (B), 5.9; (C), 0.0; (D), 0.95.

基準操作に従い、ヒト血漿および赤血球に添加した FCnol の検量線を作成した。両試料に添加した FCnol のピーク高さは、少なくとも 250 nmol/ml まで原点を通る直線を示す。回帰直線式における両検量線の相関係数 (r) はともに 1.000 であった。

試料は 2~5 倍容量のアセトニトリルによって除蛋白されているが、このとき FCnol の添加回収率は、両試料とも $91 \pm 1.5\%$ ($n=10$) であった。

FCnol 投与後、4 時間において得た血漿および赤血球中の FCnol の濃度を 10 回繰り返して求めた定量値 (それぞれ 2.38 および 1.24 nmol/ml) に対する変動係数は、それぞれ 2.12 および 1.88 % であった。

$S/N=2$ における本法の検出下限値は、血漿では 65 pmol (13 ng)/ml, 赤血球では 160 pmol (32 ng)/ml であった。これらの値は、HPLC 注入量とともに 2.0 pmol に相当する。この感度は、58 年度に提出した蛍光誘導体化 HPLC よりも、HPLC 注入量で 4 倍、実際試料を測定する場合

では約 15 倍高い。また、この HPLC では、溶出液中の FCnol を UV 検出することも可能であるが、図 11 に示すように、本法の蛍光検出は、UV 検出より少なくとも 5 倍以上高感度である。

FCnol を経口投与した健常人血漿および赤血球中の FCnol 濃度の経時的变化を本法によりモニターした (図 12)。投与後の血漿 FCnol の濃度変化は、58 年度に提出した結果とほぼ同様であった。一方、赤血球中の FCnol 濃度は、投与後少なくとも 8 時間まで増大する結果を得た。

本法および 58 年度に提出した FCnol のアルカリ性酸化による蛍光誘導体化 HPLC によって、それぞれ同じ血漿試料 ($n=7$) 中の FCnol (13~1.2 nmol/ml) を定量し、両定量法の相関を求めた。両者によって求めた定量値には著しい違いはなく、その相関係数 (r) は 0.996 であった。

おわりに

本研究によって、Best を投与したヒト血清中

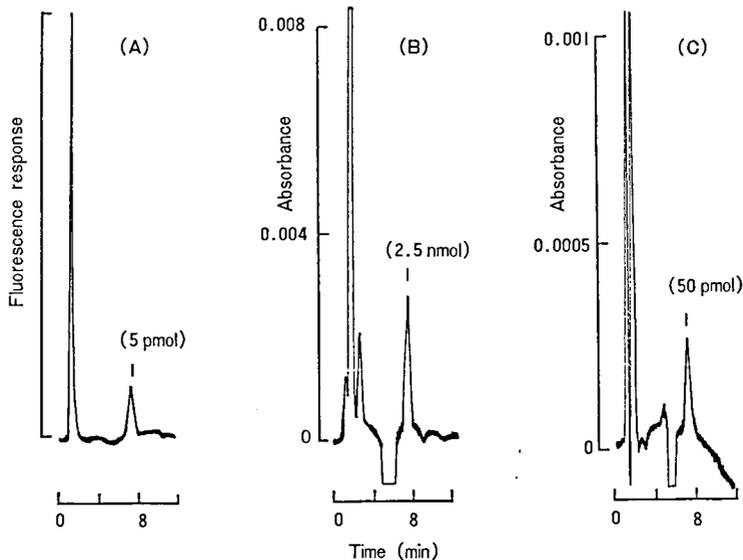


図 11 Comparison of fluorescence detection with UV detection for forphenicinol in HPLC using a Unisil NH_2 column. Detections: (A), fluorescence detection at Ex 275 nm and Em 313 nm; (B), UV detection at 210 nm; (C), UV detection at 280 nm. Peaks: 1, forphenicinol; others, artifact.

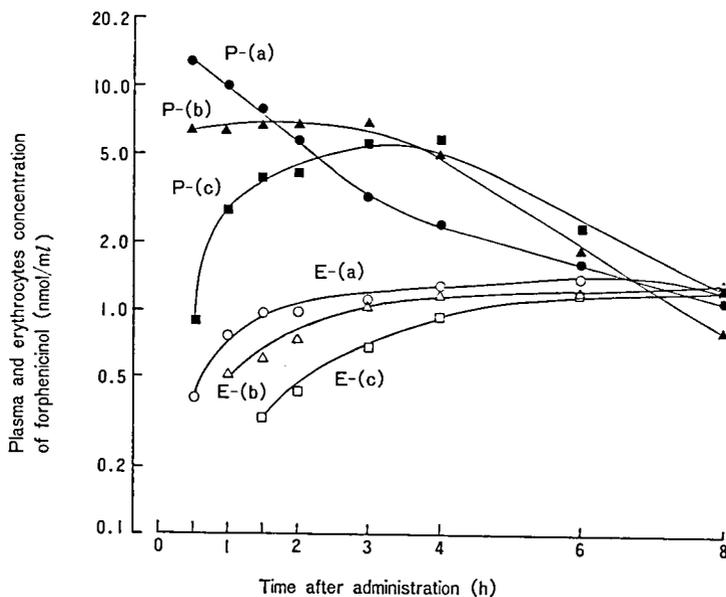


図 12 Concentrations of forphenicicol in plasma and erythrocytes after oral administration of forphenicicol to three healthy men. Samples: P-(a)-(c), plasma; E-(a)-(c), erythrocytes; (a), administration at 5 h after feeding; (b) and (c), administration at 30 min after feeding. Dose: 60 mg/man. Body weight and age: (a), 57 kg, 32 years; (b), 56 kg, 23 years; (c), 57 kg, 22 years.

のその代謝体 *p*-OH Best を蛍光 HPLC によって定量することが可能となった。この方法は、血清 200 μ l を必要とし、62 pmol (20 ng)/ml 以上の濃度で存在する *p*-OH Best を定量できる。

また、新たに開発した FCnol の自然蛍光を検出する HPLC は、58 年度に提出した FCnol 蛍光誘導体化 HPLC よりも、実際試料を測定する場合、約 15 倍高感度であり、前処理も極めて簡便である。この方法によって、血漿 (100 μ l) および赤血球 (50 μ l) に、それぞれ 65 pmol (13 ng)/ml および 160 pmol (32 ng)/ml 以上の濃度で存在する FCnol を定量することが可能となった。

文 献

- 1) 大倉洋甫, 甲斐雅亮, 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 (1981).
- 2) 大倉洋甫, 三浦哲朗, 甲斐雅亮, 山口政俊, 石田淳一. 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 56 年度報告書, p.21 (1982).
- 3) 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).
- 4) Ishida, J., Yamaguchi, M., Kai, M., and Ohkura, Y. *J. Chromatogr.*, **305**, 381-389 (1984).
- 5) 大倉洋甫, 田村和彦, 石田淳一, 甲斐雅亮. 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 58 年度報告書, p.25 (1984).
- 6) Tamura, K., Kai, M., and Ohkura, Y. *Jap. J. Clin. Chem.*, **13**, 195-201 (1984).
- 7) Wynberg, H. *Chem. Rev.*, **60**, 169-184 (1960).
- 8) 三吉野産治, 樋口重典, 金子 薫, 羽田 明, 襄徳也, 谷山晶彦, 原口洋吾, 折口美弘. 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 58 年度報告書, p.93 (1984).

酵素網の動的平衡に及ぼすベスタチンの効果

青 柳 高 明*

研究協力者 和 田 孝 雄*・小 島 蓓 子*・永 井 真 知 子*・原 田 滋 子*

はじめに

生命の維持にホメオスタシスが重要な役割を演じていることは周知の事実である。生化学を基盤として多面的なホメオスタシスの上に成り立っている生体を捉えるには、代謝を中心課題として考えるのが妥当である。筆者らは代謝系からみた動的平衡という立場からさまざまな酵素に対する阻害物質を探索し、また細胞レベルから生体の全体像を生化学的に捕え、複雑な生体反応を明らかにする新しい探索法を開発し、微生物培養液中から多くの低分子酵素阻害物質を発見した¹⁻¹⁰⁾。酵素阻害物質の研究は炎症、免疫、補体反応、発がん、がん転移、ホルモン産生および筋ジストロフィー症、脱髄疾患症、自己免疫症を含むさまざまな難病を理解する鍵になると思われる。

細胞膜の諸現象と細胞機能との相関性を研究することは、生命現象を明らかにするために分子生物学が指向する新しい重要な研究分野である。筆者らは各種の単層培養細胞、懸濁細胞ならびに腫瘍細胞などの細胞表面の酵素活性を調べた結果、アミノペプチダーゼ、ホスファターゼ、エステラーゼなどが存在することを明らかにした¹¹⁻¹²⁾。細胞表面に存在する酵素を指標にして阻害物質を探索し、それぞれの酵素を特異的に阻害するアマスタチン、ベスタチン、アルファメニンAとB、ホ

ルフェニン、エステラスチン、エペラクトンAとBなどを見い出した⁵⁻¹⁰⁾。

本報告は免疫調節作用を有し¹³⁻¹⁸⁾、かつ筋ジストロフィーマウスの発症阻止効果^{19,20)}のあることが報告されているベスタチンの作用機序を明らかにすることを目的として、ベスタチンおよびその立体異性体をマウスに連続投与し、経時的に採取した臓器内の酵素網の動態およびヒトにベスタチンを連続投与した前後における血清中の酵素網の経時変化について検討したので、その結果について述べる。

実験方法

動物およびヒト血清

1) ICR マウス (7 週齢, 雄) は静岡県実験動物農業協同組合から購入した。ベスタチンおよびその立体異性体 (200 μ g/マウス) は連続 30 日間、腹腔内に投与した。動物は 2 日ないし 3 日間隔で屠殺し、前肢筋、後肢筋、心、脾、肝および腎を摘出したのち、直ちに -70°C で保存した。投与方法および臓器摘出は図 1 に示す。臓器は 10 倍量の PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2) 中で、組織ホモジナイザー (ultraturrax) を用いて 1 分間ホモジナイズした。酵素活性の測定には、ホモジネートの 3,000 \times g, 20 分間の遠心上清を用いた。

2) ヒト血清 (T. A., 38 y. o., 男) は木下班員

* 微生物化学研究所

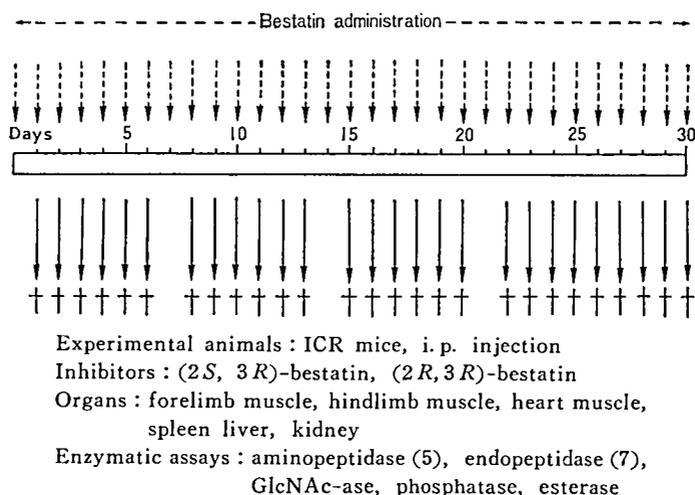


図 1 Effects of bestatin stereoisomers on enzyme networks in murine organs

から提供された。投与前 103 日およびベスタチン (180mg/日, 経口投与) 投与後 85 日間にわたり, 2 日ないし 3 日間隔で採血した。採血法および投与法は図 8 に示した方法で行った。

阻害物質

ベスタチン [(2*S*, 3*R*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-(*S*)-leucine, (2*S*, 3*R*) AHPA-(*S*)-Leu] およびその立体異性体 [(2*S*, 3*S*) AHPA-(*S*)-Leu], [(2*R*, 3*S*) AHPA-(*S*)-Leu] と [(2*R*, 3*R*) AHPA-(*S*)-Leu] を用いた。ベス

タチンおよび立体異性体の構造ならびに阻害活性は表 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 (Arg·NA), L-proline β -naphthylamide (Pro·NA), L-leucine β -naphthylamide (Leu·NA), glycyl-L-prolyl-L-leucine β -naphthylamide (Gly-Pro-Leu·NA), hippuryl-L-phenylalanine (Hip-

表 1 Inhibitory Activities of Bestatin and its Stereoisomers

	Bestatin		IC ₅₀ (μ g/ml)			
	2	3	AP-B	Leu-AP	Gly-Pro-Leu-AP	AP-A
	S	R	0.05	0.01	3	>200
	S	S	4.1	0.23	40	>200
	R	S	>200	>200	>200	>200
	R	R	>200	>200	>200	>200

表 2 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	11, 21
Arginine aminopeptidase (EC 3. 4. 11. 6)	AP-B	Arg·NA	11, 21
Proline iminopeptidase (EC 3. 4. 11. 5)	Pro-AP	Pro·NA	11, 21
Leucine aminopeptidase (EC 3. 4. 11. 1)	Leu-AP	Leu·NA	11, 21
Tripeptide aminopeptidase (EC 3. 4. 11. 4)	Gly-Pro-Leu-AP	Gly-Pro-Leu·NA	11, 21
Carboxypeptidase A (EC 3. 4. 17. 1)	CP-A	Hip-Phe	22
Carboxypeptidase B (EC 3. 4. 17. 2)	CP-B	Hip-Lys	23
Dipeptidyl carboxypeptidase (EC 3. 4. 15. 1)	ACE	Hip-His-Leu	24
Prolyl endopeptidase (EC 3. 4. 21. 26)	Post-Pro-Enz	Z-Gly-Pro	25
Plasma kallikrein (EC 3. 4. 21. 34)	Kallikrein	BAEE	21
Carboxyl proteinase (EC 3. 4. 23. 5)	Cathepsin D	Hemoglobin	21, 26
Alkaline phosphatase (EC 3. 1. 3. 1)	Phosphatase	NPP	11, 12
Arylesterase (EC 3. 1. 1. 2)	Esterase	NPA	11, 12

Phe), hippuryl-L-lysine(Hip-Lys), hippuryl-L-histidyl-L-leucine(Hip-His-Leu), carbobenzoxy-glycyl-L-proline (Z-Gly-Pro), N^α-benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride (BAEE), hemoglobin, *p*-nitrophenylphosphate (NPP), *p*-nitrophenyl acetate (NPA).

緩衝液

酵素活性測定用の緩衝液は 0.02M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) を用いた。ただし, carboxypeptidase A (CP-A) の測定には 0.05M Tris-HCl buffer (0.9M NaCl 含有, pH 7.5), carboxypeptidase B (CP-B) の測定には 0.05M Tris-HCl buffer (pH 8.0) およびカテプシンDの測定には 0.2M sodium acetate buffer (pH 3.2) を用いた。

酵素活性の測定

臓器ホモジネートの遠心上清分画およびヒト血清は, それぞれの基質溶液および緩衝液を含む反応試験管 (1.5×10 cm) に分注し, 37°C で1時間の反応を行った。CP-A, CP-B およびカテプシンDは前述の緩衝液を用い, それぞれ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本宛の試験管を用い, その平均値を記載した。各酵

素活性の測定法および基質は表 2 に示す。

蛋白の測定

標準蛋白として, ウシ血清アルブミンを用い, Lowry 法²⁷⁾で測定した。

統計

多変量解析の一手法である主成分分析法を用いて解析した²⁸⁾。

結果および考察

筆者らは正常および筋ジストロフィーマウスに低分子酵素阻害物質を投与し, 筋肉を含む各種臓器内の酵素活性の変化を経時的に調べた結果, *in vitro* の抗酵素スペクトラムを反映しないことを報告した^{29~32)}。今回はベスタチンを連続投与することにより誘起される酵素網の動態を経時的に調べ, またヒトに連続投与した前後における血清中の酵素網の動態について述べる。

1) ベスタチンおよびその異性体による酵素網の動態³³⁾

ベスタチンはその構造に3個の不斉炭素を含ん

でいる。各種の立体異性体を合成し、構造と活性の相関を検討した。各種の立体異性体の阻害活性は表1に示す。AHPA (3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid) の2位の配位がSである立体異性体はAP-B (aminopeptidase B), Leu-AP, Gly-Pro-Leu-AP 活性を阻害するが2位の配位がRの異性体はいずれの酵素に対しても阻害活性を示さない。ベスタチンの阻害活性発現には、AHPA の2位の配位がSであることが重要である。

上述した結果に基づき、活性体である(2S, 3R) AHPA-(S)-Leu (ベスタチン) と不活性体である(2R, 3R) AHPA-(S)-Leu を図1に示した方法で投与し、経時的に脾、腎、肝における酵素活性の動態を調べた。

脾、腎および肝における経時的な酵素活性の動態を図2, 3および図4に示す。ベスタチンは *in vitro* で Leu-AP と Gly-Pro-Leu-AP を強く阻害するがAP-A は阻害しない(表1)。図2に示したように、脾内における Leu-AP と Gly-Pro-

Leu-AP 活性はベスタチンの連続投与にもかかわらずほとんど阻害されない。そして、1週と3週に2つのpeakが認められた。また不活性体(2R, 3R)AHPA-(S)-Leu 投与の場合は特徴的な振動を示さない。一方、AP-A 活性は Leu-AP および Gly-Pro-Leu-AP と異なる振動が認められ、また不活性体の振動は小さい。

腎の酵素網の動態は図3に示す。ベスタチン投与群は脾と類似した振動を示し、いずれの酵素においても2つのpeakが観察された。一方、肝における酵素網の動態は脾、腎と異なり、いずれの投与群もランダムな振動であった(図4)。

図2, 3および図4に示した酵素活性の振動の意義を明らかにするため自己相関係数をプロットして図を作成した(図5, 6, 7)。脾(図5)および腎(図6)に示したように、ベスタチン投与群の自己相関係数はいずれの酵素の場合においても、sine curve型の振動をしていることを明らかにした。一方、肝(図7)ではAP-Aのみsine curve型の振動を示した。

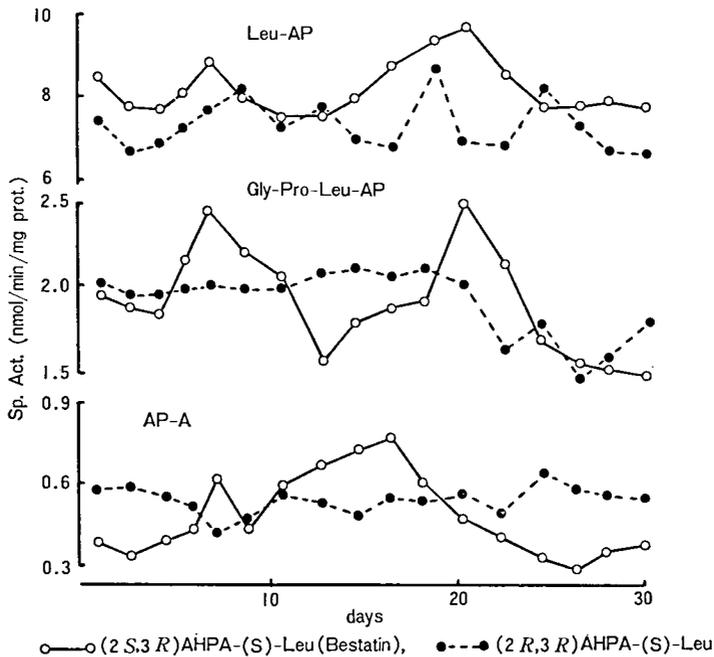


図2 Comparison of the enzymatic oscillations in spleen induced by bestatin and one of its stereoisomers.

酵素網の動的平衡に及ぼすベストチンの効果

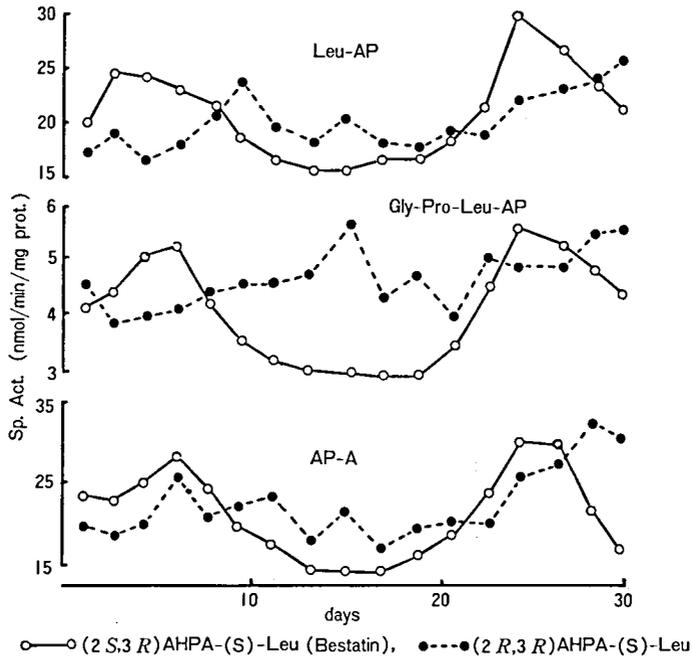


図 3 Comparison of the enzymatic oscillations in kidney induced by bestatin and one of its stereoisomers.

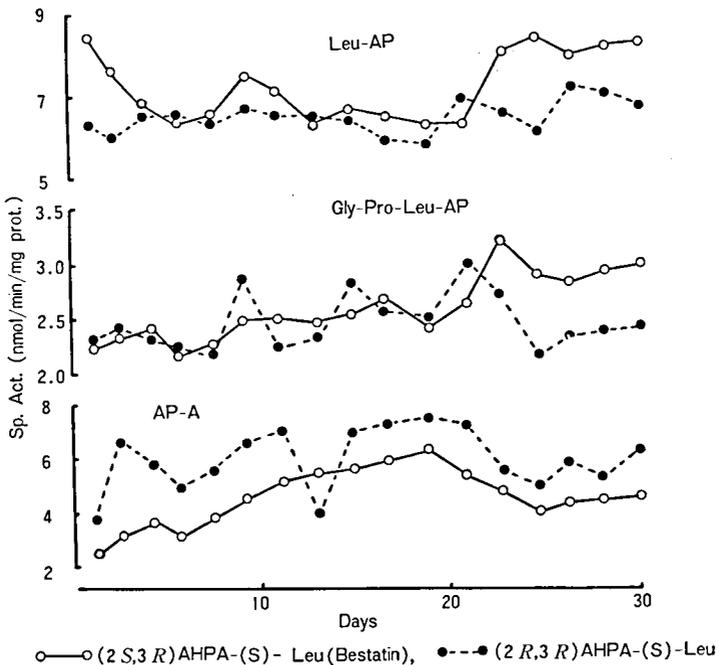
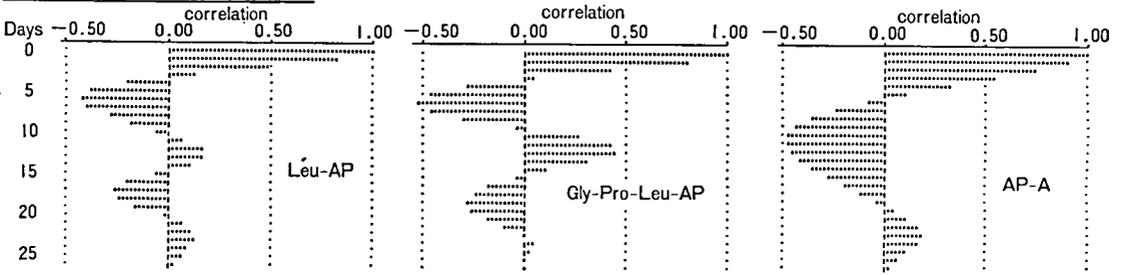
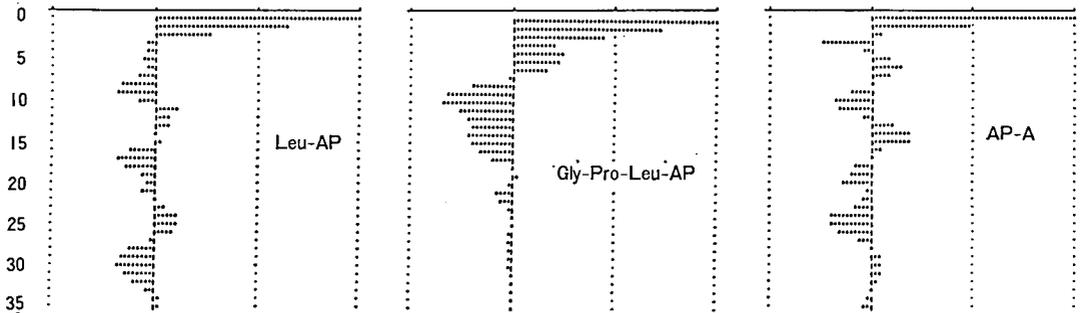


図 4 Comparison of the enzymatic oscillations in liver induced by bestatin and one of its stereoisomers.

(2*S,3R*)AHPA-(*S*)-Leu (Bestatin)

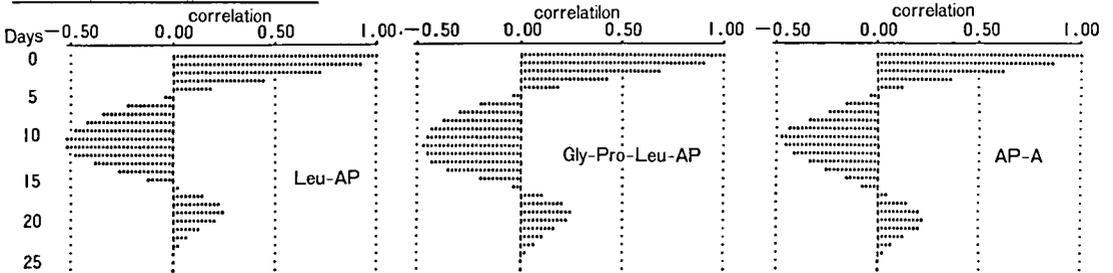


(2*R,3R*)AHPA-(*S*)-Leu

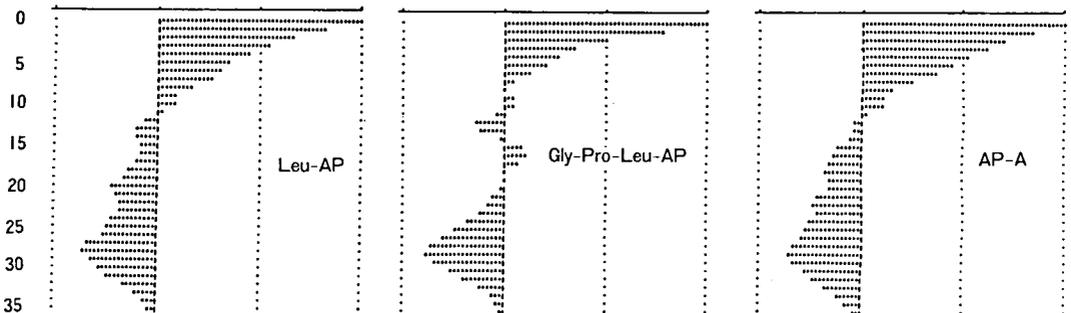


☒ 5 Autocorrelation curves for enzymatic activities in spleen treated with bestatin or one of its stereoisomers.

(2*S,3R*)AHPA-(*S*)-Leu (Bestatin)



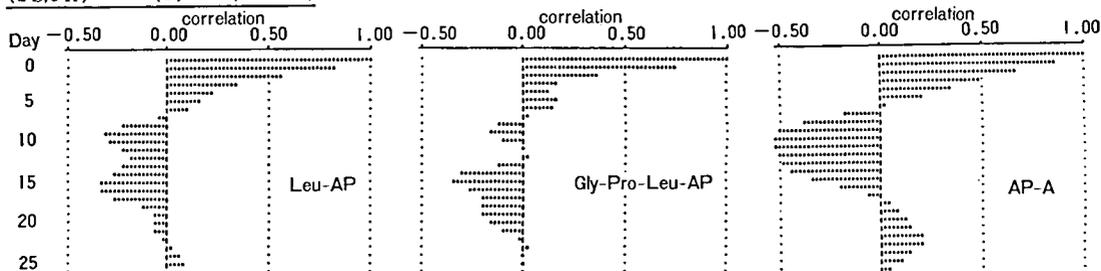
(2*R,3R*)AHPA-(*S*)-Leu



☒ 6 Autocorrelation curves for enzymatic activities in kidney treated with bestatin or one of its stereoisomers.

酵素網の動的平衡に及ぼすベスタチンの効果

(2*S*,3*R*)AHPA-(*S*)-Leu (Bestatin)



(2*R*,3*R*)AHPA-(*S*)-Leu

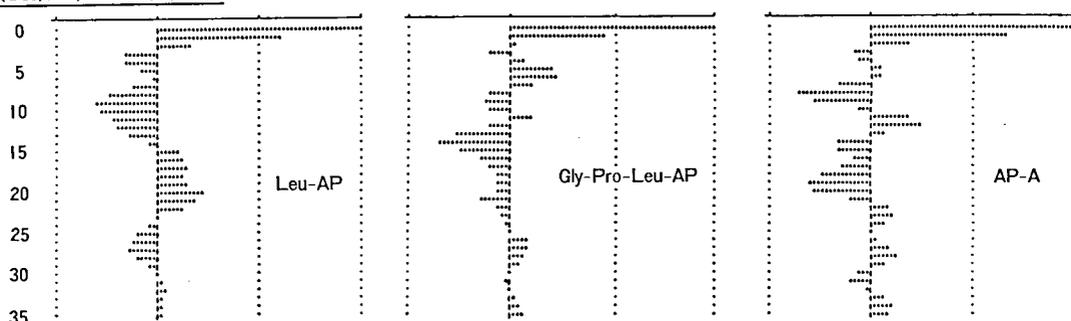


図 7 Autocorrelation curves for enzymatic activities in liver treated with bestatin or one of its stereoisomers.

ベスタチン投与群は sine curve 型の振動を表わす酵素群が、対照に比べ同調 (synchronize) していると考えられる。このことは、外界から異物を投与することにより起る非特異的な効果ではなく、臓器内の酵素網に一定な律動性のある変動を与えたことを表わしている。筆者らにより見いだされた酵素の振動現象は細胞内の動的な酵素網の制御を明らかにし、生体を理解する上に重要であると考えられる。

2) ヒト血清の酵素網に対するベスタチンの効果

ベスタチン投与前後における血清中の酵素網の変動について、木下班員から提供された患者血清について検討した。ベスタチン投与方法ならびに採血方法は図 8 に示した方法で行い、また酵素活性の測定法および基質は表 2 の方法で施行した。

患者血清中の AP-B および Pro-AP 活性の変動は図 9 に、また Leu-AP, Kallikrein および Esterase 活性の変動は図 10 に示す。酵素活性の

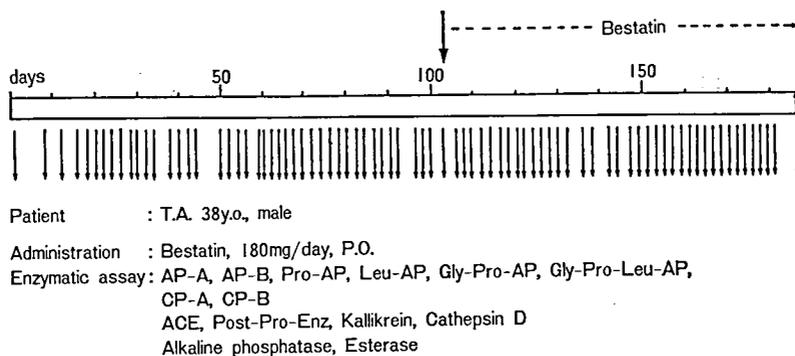


図 8 Effects of bestatin on plasma enzyme levels in man

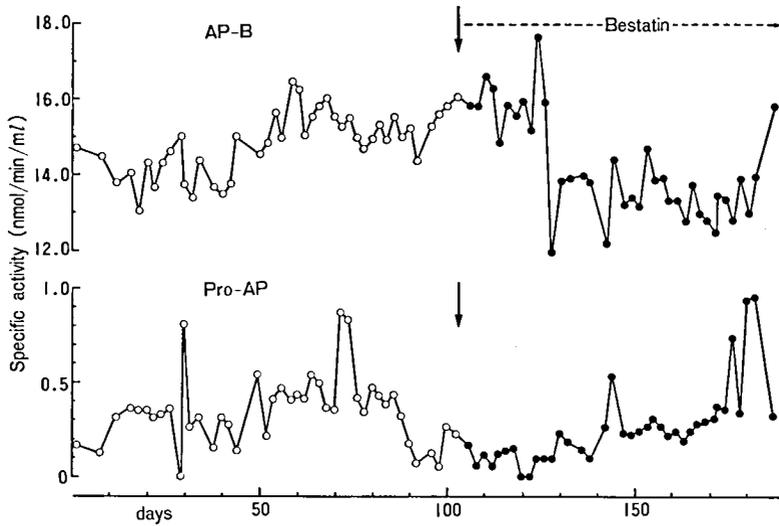


図 9 Enzymatic oscillations in human serum with or without bestatin administration

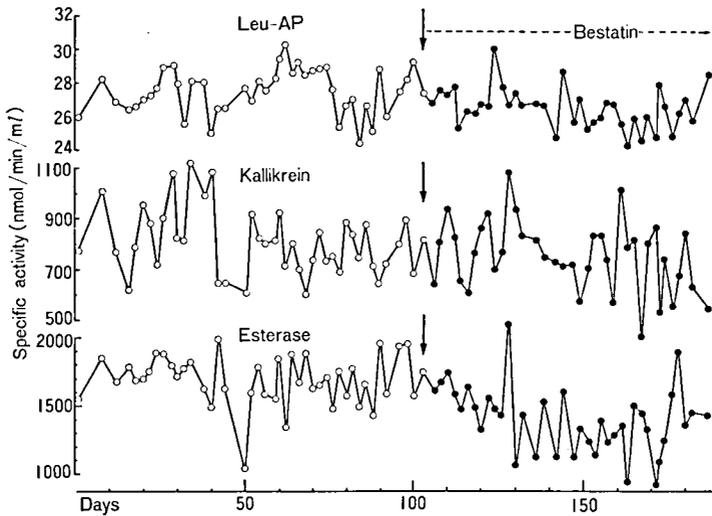


図 10 Enzymatic oscillations in human serum with or without bestatin administration.

動態はいずれの酵素においても非投与群と投与群では異なった振動が認められた。ベスタチン投与群では AP-A, AP-B, CP-B, Alkaline, phosphatase, Esterase 活性などが有意に低下することを見出した。また有意な変化を示さない酵素においても、非投与群と投与群では振動が異なっている。さらに、多変量解析の一つの方法である主成分分析法によって各種の酵素活性の相互関係

を検討した結果、ベスタチンはヒト体内の酵素網にシンクロナイズ効果を与え、前述したマウス臓器における知見と類似した結果を得た。

ま と め

ベスタチンの作用機序を明らかにすることを目的とし、ベスタチンおよびその立体異性体をマウ

スに連続投与することによる各種臓器内の酵素網の変動ならびにベスタチンをヒトに連続投与した前後の患者血清中の酵素網の動態について調べた。

ベスタチンは細胞膜に作用するとともに、オリゴペプチドの代謝に影響を与え、また間接的に蛋白代謝全般に効果をおよぼし、免疫担当細胞を含む細胞機能に変化をひき起すと考えられる。また筋ジストロフィー患者血清中の加水分解酵素にも変動を与えていることを明らかにした。

文 献

- 1) Umezawa, H. "Enzyme Inhibitors of Microbial Origin", pp.1-114, 1972. University of Tokyo Press, Tokyo.
- 2) Aoyagi, T. and Umezawa, H. In "Proteases and Biological Control", Reich, E., Rifkin, D. and Shaw, E. (Eds.), pp. 429-454, 1975. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 3) Umezawa, H. and Aoyagi, T. In "Proteinases in Mammalian Cells and Tissues", Barrett, A. J. (Ed.), pp.637-662, 1977. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- 4) Aoyagi, T. In "Bioactive Peptides Produced by Microorganisms", Umezawa, H., Shiba, T. and Takita, T. (Eds.), pp.129-151, 1978. Kodansha Scientific Press, Tokyo.
- 5) 青柳高明. 発酵と工業, 37, 615-629 (1980).
- 6) 青柳高明. 代謝「癌'81」, 18, 879-889 (1981).
- 7) Umezawa, H. In "Annual Review of Microbiology", Starr, M. P., Balows, A. and Schmidt, J. M. (Eds.), Vol. 36, pp.75-99, 1982. Annual Reviews Inc., Palo Alto.
- 8) 青柳高明. 自然, 10, 39-47 (1983).
- 9) Umezawa, H. and Aoyagi, T. In "Protease Inhibitors", Katsunuma, N., Umezawa, H. and Holzer, H. (Eds.), pp.3-15, 1983. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- 10) 青柳高明. "酵素阻害物質", 共立全書 224, pp. 1-189, 1978. 共立出版, 東京.
- 11) Aoyagi, T., Suda, H., Nagai, M., Ogawa, K., Suzuki, J., Takeuchi, T. and Umezawa, H. *Biochim. Biophys. Acta.*, 452, 131-143 (1976).
- 12) Aoyagi, T., Nagai, M., Iwabuchi, M., Liaw, W. S., Andoh, T. and Umezawa, H. *Cancer Res.*, 38, 3505-3508 (1978).
- 13) Umezawa, H., Ishizuka, M., Aoyagi, T. and Takeuchi, T. *J. Antibiot.*, 29, 857-859 (1976).
- 14) Bruley-Rosset, M., Florentin, I., Kiger, N., Schultz, J. and Mathé, G. *Immunology*, 38, 75-83 (1979).
- 15) Jarstrand, C. and Blomgren, H. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 5, 67-69 (1981).
- 16) Jarstrand, C. and Blomgren, H. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 7, 115-118 (1982).
- 17) Saito, M., Aoyagi, T., Umezawa, H. and Nagai, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 526-533 (1977).
- 18) Saito, M., Takegoshi, K., Aoyagi, T., Umezawa, H. and Nagai, Y. *Cell. Immunol.*, 40, 247-262 (1978).
- 19) 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).
- 20) 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).
- 21) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H. *J. Clin. Invest.*, 67, 51-59 (1981).
- 22) Tanaka, T., Suda, H., Naganawa, H., Hamada, M., Takeuchi, T., Aoyagi, T. and Umezawa, H. *J. Antibiot.*, 37, 682-684 (1984).
- 23) Umezawa, H., Aoyagi, T., Ogawa, K., Iinuma, H., Naganawa, H., Hamada, M. and Takeuchi, T. *J. Antibiot.*, 37, 1088-1090 (1984).
- 24) Umezawa, H., Aoyagi, T., Ogawa, K., Iinuma, H., Naganawa, H., Hamada, M. and Takeuchi, T. *J. Antibiot.*, in press.
- 25) Yoshimoto, T., Ogita, K., Walter, R., Koida, M. and Tsuru, D. *Biochim. Biophys. Acta.*, 569, 184-192 (1979).
- 26) Aoyagi, T., Kunimoto, S., Morishima, H., Takeuchi, T. and Umezawa, H. *J. Antibiot.*, 24, 687-694 (1971).
- 27) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 28) Kendall, M. In "Multivariate Analysis", pp. 13-29, 1975. Charles Griffin and Co., London.
- 29) Aoyagi, T., Wada, T., Iwabuchi, M., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H. *Biochem. Int.*, 5, 97-103 (1982).
- 30) Aoyagi, T., Wada, T., Umezawa, K., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 6, 643-653 (1983).
- 31) Aoyagi, T., Wada, T., Ohuchi, S., Kojima, F., Nagai, M., Kawahara, F. and Umezawa, H. *Biochem. Int.*, 9, 405-411 (1984).
- 32) Aoyagi, T., Wada, T., Ohuchi, S., Kojima, F., Nagai, M., Harada, S. and Umezawa, H. *J.*

Pharmacobio-Dyn., 7, 681-687 (1984).

33) Aoyagi, T., Wada, T., Yamamoto, K., Kojima,

F., Nagai, M., Harada, S. and Umezawa, H.

J. Appl. Biochem., 6, 212-221 (1984).

急性脊髄損傷に対するロイペプチンの効果

岩崎 祐三*

研究協力者 飯塚 秀明*・山本 悌司*・今野 秀彦*

神経軸索の細胞骨格系の主要構成成分のひとつである neurofilament に対し特異的に働く蛋白分解酵素が、広く中枢神経、末梢神経に存在することが知られており、それがカルシウム依存性中性プロテアーゼであることが最近明らかにされつつある¹⁻⁴⁾。また、急性脊髄損傷に際して傷害部位のカルシウム濃度が急速に上昇することも報告されている⁵⁻⁷⁾。上記のような事実をもとに、脊髄損傷における組織破壊の機序の一つとして、神経組織に内在するカルシウム依存性プロテアーゼの活性化が最近注目されており、実験的脊髄損傷においても、傷害部位より遠位にある軸索が著明に減少していることが報告されている⁸⁾。

カルシウム依存性中性プロテアーゼの阻害剤であるロイペプチンや E64 が、神経組織に内在するプロテアーゼによる neurofilament の崩壊を阻止することは、*in vitro* の実験ではすでに確かめられている。しかし、これらの酵素阻害剤の脊髄損傷に対する作用については未だ報告がない。そこでわれわれは、ラットの実験的急性脊髄損傷に対するロイペプチン投与の効果を検討した。

脊髄損傷に対する薬剤投与の効果判定法については、多くの議論がなされてきた^{9,10)}。特に、運動機能、膀胱直腸機能や Somato-sensory evoked response などを指標とする判定には批判が強い。そこで、われわれは Fink-Heimer 法¹¹⁾により軸索の初期変性をとらえ、傷害部より遠位に出現する変性軸索の量を、自動画像解析装置により定量

的に測定することにより、軸索に対する薬効を客観的に把握する方法を開発した。

方 法

実験には雄ウィスターラット 17 匹 (体重、160~220g) を使用した。ペントバルビタールソーダ (40mg/kg 体重) の腹腔内投与による麻酔後、手術用顕微鏡下に第 9・10 胸椎の椎弓を切除した (図 1)。次いで、第 11 胸髄のレベルで、硬膜外から脊髄をビーマーの血流一時遮断用クリップ (先端圧 40g) で 30 秒間圧迫して損傷を作製した (図 2)。

脊髄動物を二群に分け、10 匹にはロイペプチンを腹腔内投与、残る 7 匹には生理的食塩水を投与、対照群とした。ロイペプチン (Lot No.39) は、脊髄に損傷を加える 10~15 分前に初回投与、以後、一日二回腹腔内投与を行った。一回の投与量は手術当日および術後第 1, 2 日は 25mg/kg、術後 3 日目からは 12.5mg/kg とし、標本作製日まで継続した。

術後 7 日目に、10%ホルマリンで経心的に灌流固定した。固定後摘出した脊髄は、更に 10%ホルマリンで 3~4 週間固定したのち、第 6 腰髄の横断凍結切片を 35 μ m の厚さで作製、Fink-Heimer の方法に準じて鍍銀染色した。鍍銀染色標本の像はテレビカメラにより顕微鏡から直接 Luzex 500 Tu 型画像解析装置に送りこみ、画像の解析を行った。

* 東北大学医学部 脳疾患研究施設脳微細構造部門



図 1 椎弓切除により脊髄を露出した図。



図 2 脊髄にクリップによる損傷を加えている図。

結 果

Fink-Heimer 標本では、非脊損動物には全く見られない銀粒子が、脊損動物の白質では脊髄損傷部位より遠位の脊髄下行路に限局して、また、灰白質では、脊髄下行路および脊髄固有路の神経終末に一致して多数みられた。

図 3 は、非脊損動物の第 6 腰髄前角の Fink-Heimer 鍍銀標本で、血管壁の共染が見られるが、変性軸索に特異的な銀粒子は全く見られない。図 4 は、脊髄動物の第 6 腰髄の横断切片の Fink-Heimer 標本で、ここには多数の銀粒子が出現し、後索の錐体路、前・側索内の脊髄下行路が選択的に染め出されているほか、脳幹からの下行路、脊髄固有路の神経終末がある前角の Rexed の Lamina VII, VIII が染め出されている。このよ

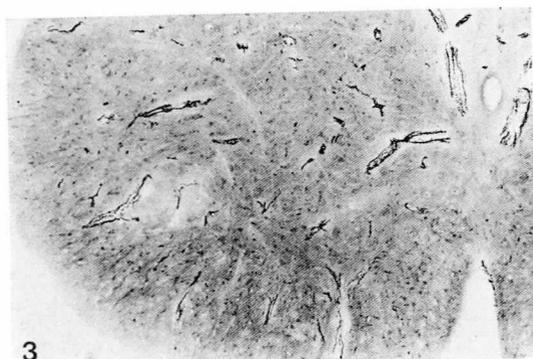


図 3 非損傷脊髄第 6 腰髄の Fink-Heimer 標本。血管壁が共染しているが、実質内には銀粒子が全くみられない。(×75)

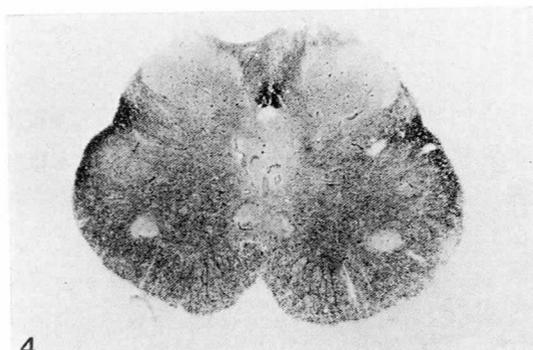


図 4 胸髄横断後にみられた変性軸索。銀粒子は脊髄下行路、前角などに広範に分布している。第 6 腰髄、Fink-Heimer 標本。(×30)

うな変性軸索の出現は、ロイペプチン投与群、非投与群に共通な所見であったが、投与群と非投与群の間にはその出現頻度に大きな差が見られた。

図 5 に、第 6 腰髄、Rexed の Lamina VIII の Fink-Heimer 標本を示す。左はロイペプチン非投与例、右はロイペプチン投与例のもので、銀粒子の量が投与例で明らかに減少している。

薬効をより定量的にとらえるために、単位面積で銀粒子の占める面積を自動画像解析装置を用いて計測した。図 6 左は画像解析装置のテレビ映像で右はその二価像である。計測は、この画面の中央に見える円に囲まれた部分 ($5.174 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$) について行った。個々の動物について、少なくとも三枚の標本の計測を行い、その相加平均値をその個体の面積率として表現したものが図 7 で、非

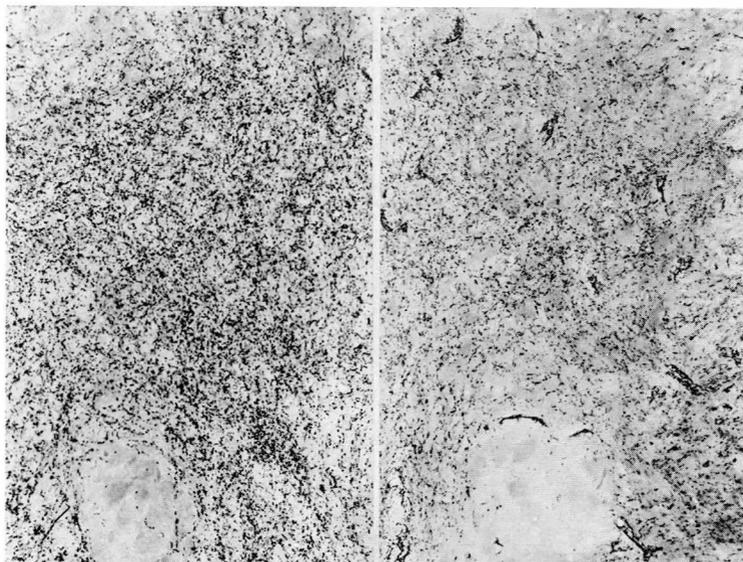


図5 クリップによる脊髄損傷後7日目の第6腰髄, RexedのLamina VIII.

非投与例(左)に比べ,ロイペプチン投与例(右)では明らかに銀粒子の量が減少している. Fink-Heimer標本, (×150)

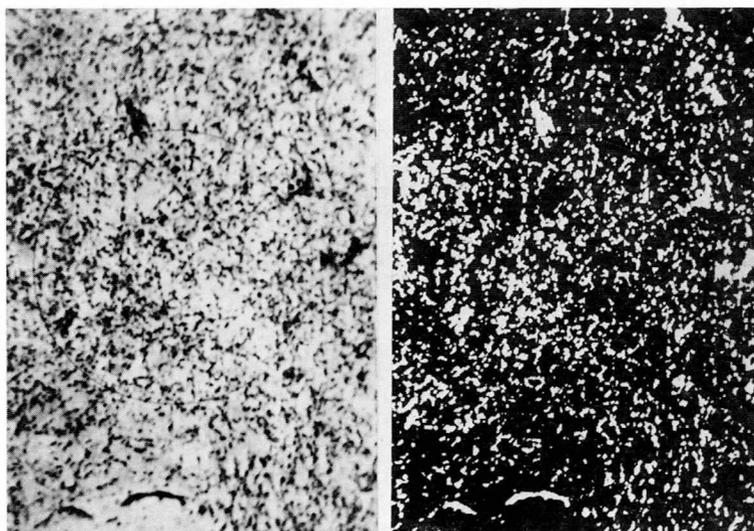


図6 Fink-Heimer標本のテレビ像(左)とその二値像(右). 図中,円で囲まれた部分で銀粒子が占める面積を自動計測した.

投与群7匹の平均が $28.4 \pm 0.77\%$ (mean \pm S. E.)であるのに対し,ロイペプチン投与群10匹の平均は $23.6 \pm 0.40\%$ と投与群のそれは有意に減少していた ($p < 0.001$). つまり,ロイペプチン投与例では非投与例に比べ,変性した軸索の量が平均16%減少していたことになる. 図8は, Fink-Heimer法で見られる銀粒子に対応して脊髄前角

にみられた軸索終末の変性像の電顕写真である.

考 察

脊髄損傷において,白質を構成する脊髄伝達路の障害が機能予後を左右することはいうまでもない. この脊髄伝達路を構成する軸索の主たる細胞

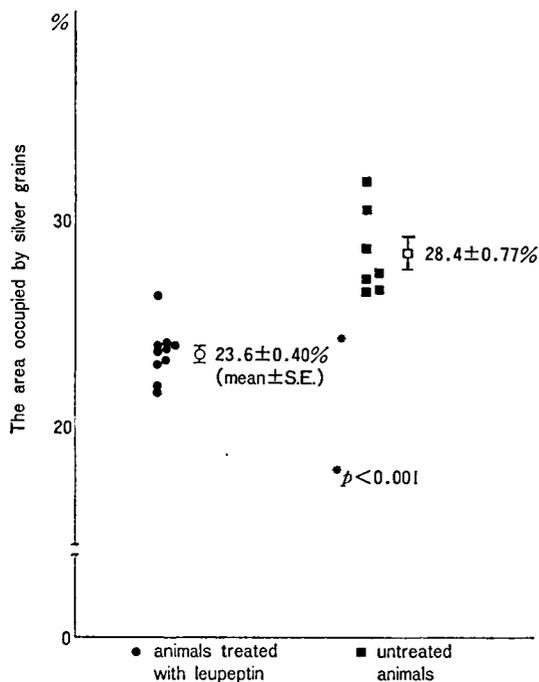


図 7 銀粒子 (变性軸索) の面積率分布.

骨格の一つである neurofilament が、損傷急性期に高度に破壊され¹²⁾、この破壊の機序として、損傷時に細胞外カルシウムの急激な細胞内流入⁷⁾による、カルシウム依存性プロテアーゼの活性化が関与していることが示唆されている¹²⁾。このことは、この酵素の拮抗剤であるロイペプチンが、損傷後の軸索変性を減少させる可能性をもつと考えられる。

脊髄損傷に対する薬物療法としては、従来より、ステロイドや、マニトールなどの浸透圧利尿剤が主として用いられ¹³⁾、また、最近ではナロキソン、TRH などが、実験的および臨床的にも試みられている^{13,14)}。各々の薬剤で、有効性も報告されているが、いずれの場合も、損傷の重症度の判定法が問題とされてきた^{9,10)}。臨床症状や、電気生理学的判定法については、従来より多くの問題点の指摘があり、特に、損傷後の神経脱落症状を、ラットなどの自動能の回復の良好な動物で判定することは困難と考えられる⁹⁾。今回の実験では、このような問題に加え、ロイペプチン投与により全

身状態の悪化が多くの個体でみられたため、対照群と臨床症状を比較することは妥当性を欠くと考えられ検討から除いた。

以上のような、種々の問題点をふまえ、われわれは、組織学的に重症度を定量化する試みとして、損傷後の軸索および終末の変性像を Fink-Heimer 法でとらえ、その変性の程度で重症度を表現する方法を開発し、今回の治療効果の検討に用いた。

今回の実験結果は、ロイペプチンの脊髄損傷に対する有効性を示唆するものといえるが、既述したように、ロイペプチン投与群では、全身状態の悪化が多くの例でみられ、投与量や、投与期間の問題をさらに検討する必要があると考えられる。また、今回は急性期の実験であるが、数カ月単位の慢性期の判定も当然必要であり、今後の課題と考えている。

文 献

- 1) Shlapfer, WW., Freeman, L. *Neuroscience*, **5**, 2305-2314 (1980).
- 2) Tshiro, T., Ishizaki, Y. *FEBS Letters*, **141**, 41-44 (1982)
- 3) Ishizaki, Y., Tshiro, T., Kurokawa, M., *J. Neurochem.*, **41**, (SUPPL), S 155 (1983).
- 4) Kamakura, K., Ishiura, S., Sugita, H., Toyokura, Y. *J. Neurochem.*, **40**, 87-92 (1983).
- 5) Happel, RD., Smith, KP., Banik, NL., et al, *Brain Res.*, **211**, 476-479 (1981).
- 6) Young, W., Yen, V., Blight, A., *Brain Res.*, **235**, 105-113 (1982).
- 7) Stokes, BT., Fox, P., Hollinden, G., *Exper Neurol.*, **80**, 561-572 (1983).
- 8) Tator, CH., Rivlin, AS., Lewis, AJ., Schmoll, B., *J. Neurosurg.*, **61**, 118-123 (1984).
- 9) Eidelberg, E., *J. Neurosurg.*, **43**, 646 (1975).
- 10) Rivlin, AS., Tator, AH., *J. Neurosurg.*, **47**, 577-581 (1977).
- 11) Fink, RP., Heimer, L. *Brain Res.*, **4**, 369-374 (1967).
- 12) Braugher, JM., Hall, ED. *J. Neurosurg.*, **61**, 290-295 (1984).
- 13) De La Torre, JC., *Spine.*, **6**, 315-335 (1981).
- 14) Faden, AI., Jacobs, TP., Smith, MT. *Neurology*, **34**, 1280-1284 (1984).

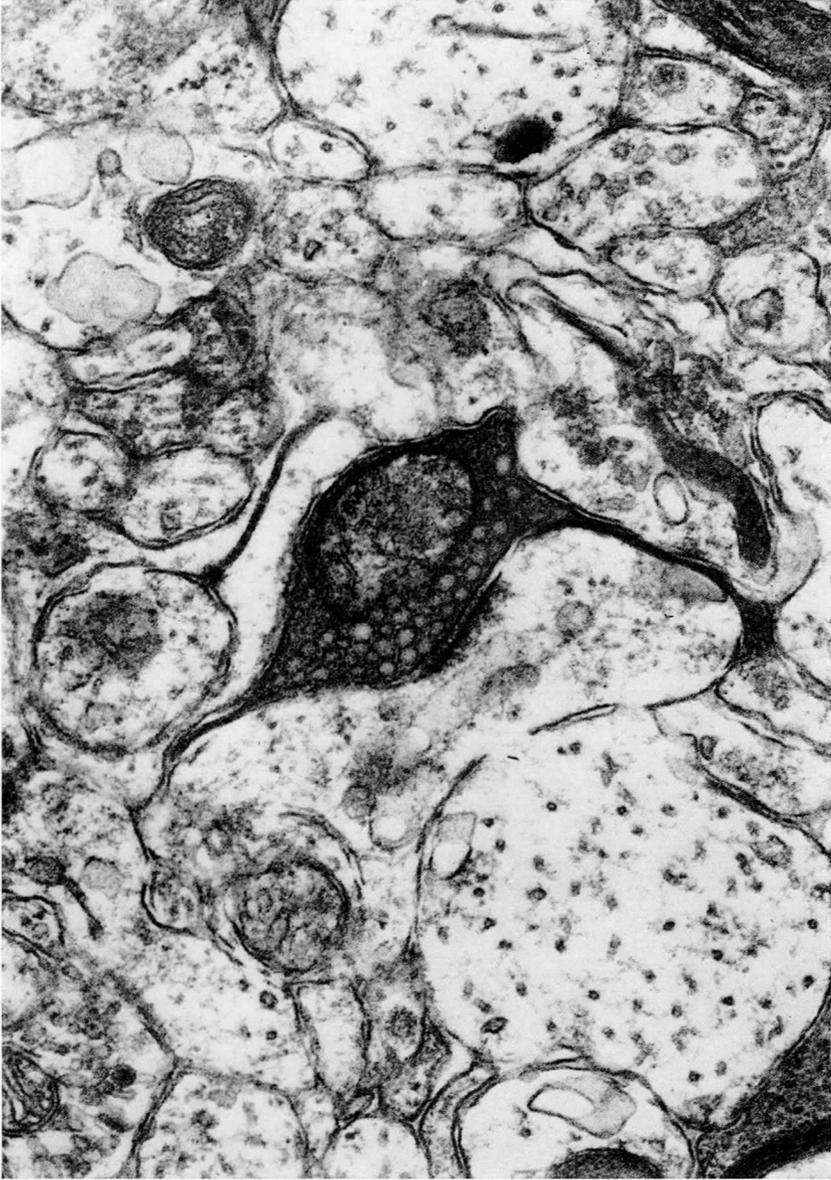


図 8 脊髄損傷後7日目の第6胸髄前角で、銀粒子に対応してみられた変性軸索終末。(×45,000)

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*・松戸 隆之*・宋 時栄*

これまでの研究にひ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7種の標本について実験を行った。

1) 血管平滑筋

ロイペプチンの血圧下降作用については昭和54年度にイヌおよびネコで田中らによって見いだされ¹⁾、昭和57年度にはわれわれもウサギで観察し報告した。この降圧作用の機序として当初は神経節遮断作用(昭和54, 55年度報告)が考えられた。しかし、昭和58年度の研究で α 型遮断薬(フェントラミン)の前処置下にロイペプチンを投与しても降圧作用が消失しないことが判明し、ロイペプチンの降圧作用機序について再検討することが必要になり、本年度は血管平滑筋に対する作用を調べた。この問題については、ロイペプチンがモルモットの大動脈ラセン状条件片標本の収縮に影響しないことをすでに昭和57年度に報告している。今回は弾性型動脈とされる大動脈ではなく、血圧調節の主役であると考えられる筋型動脈としてモルモット、ウサギ、およびネコの大動脈を用い、ロイペプチンの血管平滑筋に対する作用を調べた。

2) 気管平滑筋

ロイペプチンの呼吸機能に対する効果としては、呼吸数の変化が丸ごとの動物(ウサギ、昭和57年度)および摘出延髄-脊髄標本(ラット、昭和

58年度)について調べられ、著明な影響のないことが知られているが、気管平滑筋に対する影響についてはこれまで報告がない。ロイペプチンはアセチルコリンのムスカリン作用を増強させることがラット副交感神経節において見いだされた(昭和58年度報告)。そこでモルモットの気管ラセン状条片標本を用い、気管平滑筋に対するロイペプチンの作用を検討した。

3) 虹彩括約筋

上記の二種の平滑筋標本に加えて、今年度はウサギ虹彩括約筋に対するロイペプチンおよびベスタチンの効果を検討した。

4) 交感神経節

自律神経節に対する作用としては、昭和54年度および55年度にロイペプチンが下腸間膜動脈神経節においてコリン作動性伝達をシナプス後性に抑制することを報告し、また昨年度はラット副交感神経節においてロイペプチンがアセチルコリンの速い脱分極作用を抑制し、それに続く遅い時間経過の脱分極を増強することを報告した。本年度は交感神経節であるモルモット下腸間膜動脈神経節において実験を行った。

5) 摘出脳幹-脊髄-肺標本

昨年度は新生ラットの摘出脳幹-脊髄標本において、呼吸活動に対するロイペプチンの効果を研究した。本年度はこの標本をさらに改変して摘出

* 東京医科歯科大学医学部薬理

脳幹-脊髄-肺標本とし、呼吸反射に対する薬物の効果を検討した。

6) 摘出脊髄-尾標本

この標本は昨年度の研究で初めて用いたもので、昨年は尾に圧刺激を加えたが、本年度は化学的刺激を与え、これによって誘発される侵害反射に対するロイペプチンの作用を調べた。

7) ラット脊髄

昨年は *in situ* のラット脊髄においてロイペプチンの脊髄反射および脊髄運動ニューロンに対する効果を研究した。今年度は同様の実験をベスタチンについて行った。

実験方法

1) 血管平滑筋

大腿動脈は体重 2.5 kg 前後のウサギ、ネコおよび体重 1.2 kg 前後のモルモットから採取した。ウサギおよびネコはネブタール麻酔下に、モルモットは撲殺後ただちに大腿部を切開し、大腿動脈、静脈および神経を一括して摘出した。摘出後ただちに 95% O₂, 5% CO₂ で十分に通気した Krebs 液中で大腿動脈のみを分離し、長さ約 3 cm のラセン状条片標本作製した。

2) 気管平滑筋

モルモットを撲殺後、ただちに頸部を切開して気管を摘出し、血管平滑筋標本の場合と同じようにラセン状条片標本作製した。

作製した大腿動脈あるいは気管のラセン状条片標本は 95% O₂, 5% CO₂ 混合ガスを通気した Krebs 液 5 ml を満たしたマグヌス管内につるした。標本の一端に結んだ糸をストレンジャー (新興通信, UL-2-240) に連結し、ひずみ測定器 (三栄測器, RCTI-HORIZ-8K) 上に張力の変化を記録した。初期負荷は大腿動脈で 0.1 g, 気管で

0.5 g とした。

3) ウサギ虹彩括約筋

体重 2.5 kg 前後の家兎を、致死量の Nembutal の静脈内投与により薬殺し、眼球を摘出した。各眼球につき一片の虹彩括約筋標本作製し、8 ml の bath 中に一端を固定、他端を force-displacement transducer に結びつけ、150 mg の初期負荷をかけて、張力の記録を行った。液槽は、95% O₂, 5% CO₂ の混合ガスで飽和した Krebs 液で満たし、37°C に保った。

4) 交感神経節

モルモット (雄, 体重 150~200 g) から下腸間膜動脈神経節を摘出し、記録槽に固定して Tyrode 液 (35°C) で灌流した。顕微鏡下に観察しながら神経節細胞に微小ガラス電極 (3 M KCl, 50~100 MΩ) を刺入して細胞内電位を記録した。コリン作動性 fast EPSP (興奮性シナプス後電位, excitatory postsynaptic potential) を誘発するため、腸間膜間神経 (intermesenteric nerve) を吸引電極を介して矩形波パルス (0.1~0.2 msec, 5~8 V) で刺激した。薬物 (ロイペプチン, ヘキサメソニウム・ブロマイド, 硫酸アトロピン) は灌流によって適用した。アセチルコリン (ACh, acetylcholine chloride, 3×10^{-4} g/ml) は微小ピペット (先端外径約 3 μm) に充填し、神経節細胞の近傍に圧力パルス (0.2~0.5 kg/cm²) によって適用した。

5) 摘出脳幹-脊髄-肺標本

0~3 日齢 Wistar 系ラットからエーテル麻酔下に脳-脊髄-胸郭を摘出して四丘体レベルで除脳し、小脳も除去した。気管-気管支-肺と脳幹-脊髄を一側の迷走神経でのみ連結された状態で周囲から単離した。図 1 に示すように中枢神経系と気管-肺とを別々に灌流できるような液槽内に固定した。第 4 ないし第 5 頸髄前根から吸引電極で細胞外記

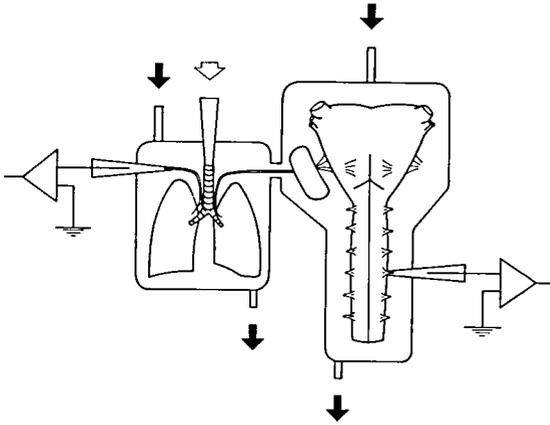


図1 反射性呼吸抑制を観察するための標本の模式図。標本の作製法は本文参照。小さな溝でつながった大小2つの液槽の大きい方(右)に脳幹-頸髄を腹側面を上にして固定し、小さい方(左)に気管-気管支-肺を固定する。両者は一側(右)の迷走神経で連絡されている。気管に挿入したガラスキャピラリー製カニューレにより気管支-肺に空気圧をかけ、その圧力を側管から圧トランスデューサーによりモニターした。自発的呼吸活動は右下に示すガラス吸引電極により第4ないし第5頸髄前根より細胞外記録した。左に示した吸引電極は迷走神経の求心性活動を記録するためのものであるが今回の実験には用いなかった。

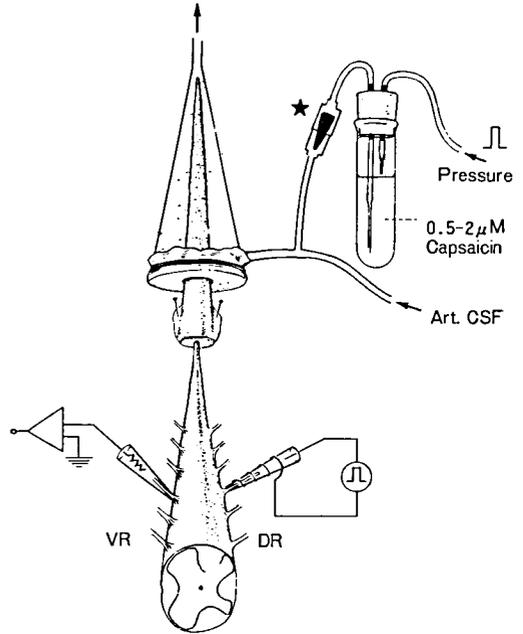


図2 脊髓-尾標本と実験装置。2~4日齢ラットより脊髓と尾を連続した状態でとり出し、それぞれを別々の灌流槽に固定した。15分に1回の割合でcapsaicin (0.5 μM~2 μM) を100~200 μl 尾に適用した。Capsaicinにより誘発される侵害反射電位は腰髄(L3~L5)の前根(VR)から細胞外吸引電極を介して記録した。DR:後根。★:逆流防止弁。

録を行い、気管にはガラスカニューレを介して空気圧を加えられるようにした。また、カニューレには側管を設けて、気管内圧をモニターした。薬物は灌流により適用した。

6) 摘出脊髓-尾標本

生後1~3日齢のラットから脊髓と尾を連続した状態でとり出し、それぞれを別々の灌流槽内に固定し、酸素を十分含んだ人工脳脊髄液で灌流した。運動ニューロンに発生する電位変化は腰髄(L3~L5)前根から吸引電極を介して記録した(図2)。

7) ラット脊髓

1カ月齢の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の高さで脊髓を切断し、脊髓動物とした。椎骨を除去

して腰部脊髓を露出し、脊髓固定装置に固定した。また、左後肢において、外側腓腹ヒラメ筋(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置いた。細胞内記録など実験方法の詳細は昨年と同様である。

実験結果

1) ロイペプチンの血管平滑筋に対する作用

ネコの大腿動脈ラセン状条片標本にノルアドレナリン0.06~0.4 μg/mlを投与して大腿動脈を収縮させ、収縮力がプラトーに達した時点で100~1000 μg/mlのロイペプチンを投与したところ、対照に比べて収縮力の減少が観察された(図3)。この収縮力の減少はロイペプチンの濃度100 μg/

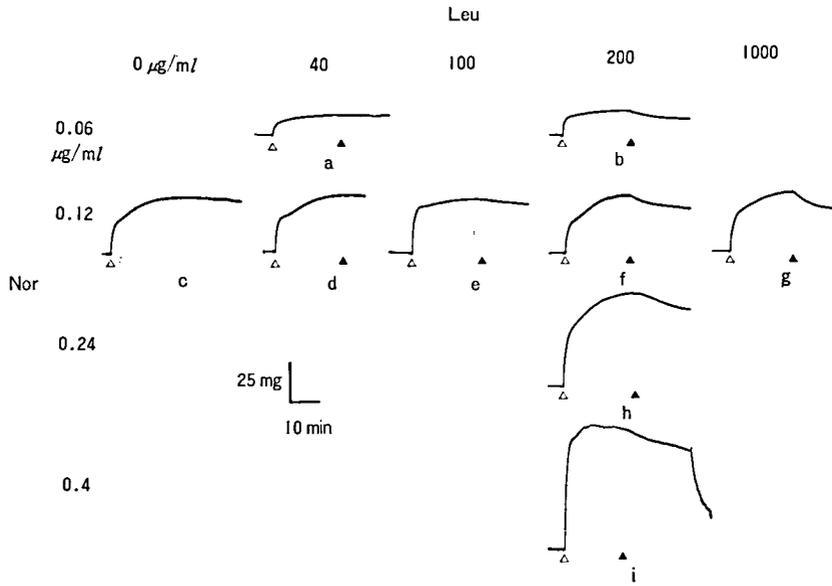


図 3 ノルアドレナリン (Nor) 0.06, 0.12, 0.24, 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 投与によるネコの大
 腿動脈ラセン状条片の収縮に対するロイペプチン (Leu) 40~1000 $\mu\text{g/ml}$ 投
 与の影響。ノルアドレナリンは Δ 印の、ロイペプチンは \blacktriangle 印の時点で投与し
 た。Cはノルアドレナリン単独投与のコントロール。

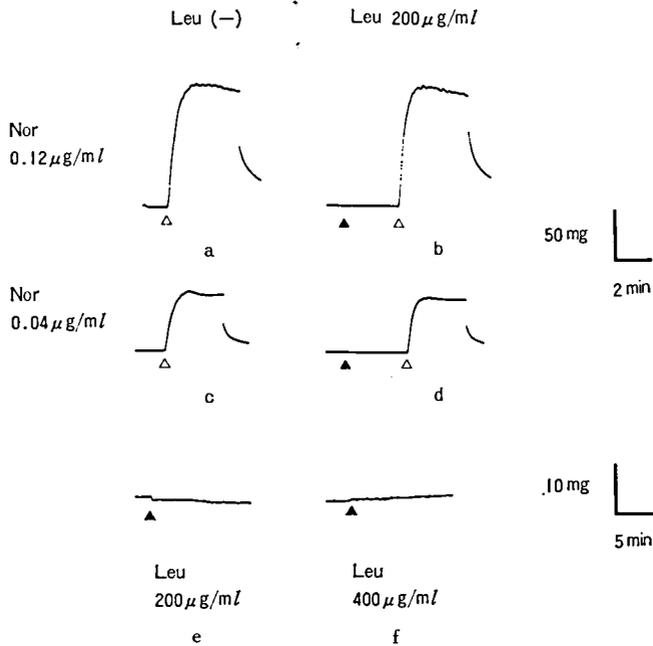


図 4 ノルアドレナリン 0.12 $\mu\text{g/ml}$ (b), 0.04 $\mu\text{g/ml}$ (d) 投与による
 大腿動脈ラセン状条片の収縮に対するロイペプチン 200 $\mu\text{g/ml}$ 投
 与の影響。a, c は対照。e, f はロイペプチン 200 $\mu\text{g/ml}$ (e),
 400 $\mu\text{g/ml}$ (f) 単独投与の効果。

ml から明らかにみられ、その程度は同一量のノルアドレナリン投与下ではロイペプチン投与量の増大とともに強まった。またノルアドレナリン投与量が少ないほど同一量のロイペプチンによる収縮力の減少は顕著で、たとえば $0.06 \mu\text{g/ml}$ のノルアドレナリン投与後ロイペプチン $200 \mu\text{g/ml}$ 投与した場合 35% の収縮力の減少が観察された。一方、ウサギでは $0.04 \mu\text{g/ml}$ のノルアドレナリン投与下でもロイペプチン $100 \mu\text{g/ml}$ により収縮力の減少は見いだされなかった。

上記の結果に対して、モルモット、ウサギ、ネコの大腿動脈ラセン状条片標本にロイペプチン $200 \sim 400 \mu\text{g/ml}$ を前処置した後に $0.04 \sim 4 \mu\text{g/ml}$ のノルアドレナリンを投与した場合には最大収縮力の減少は観察されなかった (図 4)。またロイペプチン $200 \mu\text{g/ml}$ の単独投与でも血管平滑筋の張力に目立った変化は認められなかった (図 4)。

2) ロイペプチンの気管平滑筋に対する影響

モルモット気管ラセン状条片標本にロイペプチン

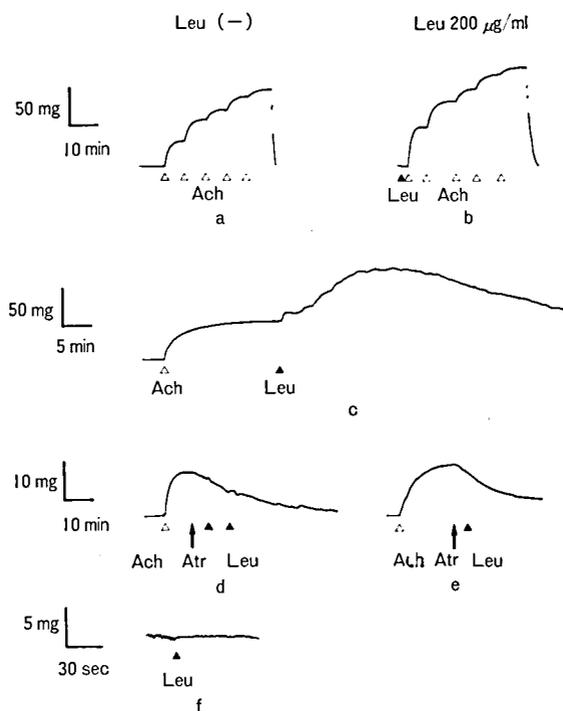


図 5 モルモット気管ラセン状条片のアセチルコリンによる収縮に対するロイペプチンの影響。a が対照例でアセチルコリンは△印の時点で投与されており、最終濃度は順に $0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 \mu\text{g/ml}$ 。b はロイペプチン $200 \mu\text{g/ml}$ 前投与の後同様の手順でアセチルコリンを投与している。c はアセチルコリン $0.2 \mu\text{g/ml}$ 投与による気管の収縮がプラトーに達した後ロイペプチン $400 \mu\text{g/ml}$ を投与した例。d, e はアトロピン存在下でのロイペプチンの気管平滑筋収縮に対する影響を示している。アトロピンはアセチルコリン $5 \mu\text{g/ml}$ 投与による収縮がプラトーに達した時点で 10^{-8}g/ml 投与した。ロイペプチンは▲印の時点で各 $400 \mu\text{g/ml}$ 投与している。f はロイペプチン $400 \mu\text{g/ml}$ 単独投与の影響を示している。

ン 200 $\mu\text{g/ml}$ を投与し、アセチルコリン 0.02~0.2 $\mu\text{g/ml}$ 投与による収縮を検討したところ、対照に比べて収縮力の増強が認められた (図 5 a, b). また 0.1~1 $\mu\text{g/ml}$ のアセチルコリンを投与し張力がプラトーに達してから 400~800 $\mu\text{g/ml}$

のロイペプチンを投与したところ張力の再上昇が観察され、その影響は 10~20 分持続した (図 5 c). このロイペプチンによるアセチルコリン作用の増強は、 10^{-8}g/ml のアトロピン添加後は認められなかった (図 5 d, e). ロイペプチン 400

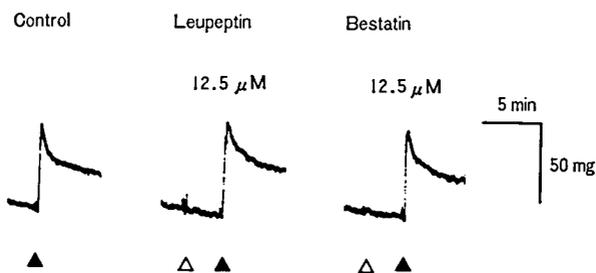


図 6 ウサギ虹彩括約筋のアセチルコリン収縮に対するロイペプチン、ベスタチンの影響。▲：アセチルコリン 125 μM を適用。△：ロイペプチンおよびベスタチン 12.5 μM を適用。各薬物は、記号から各記録の右端まで持続的に適用されている。

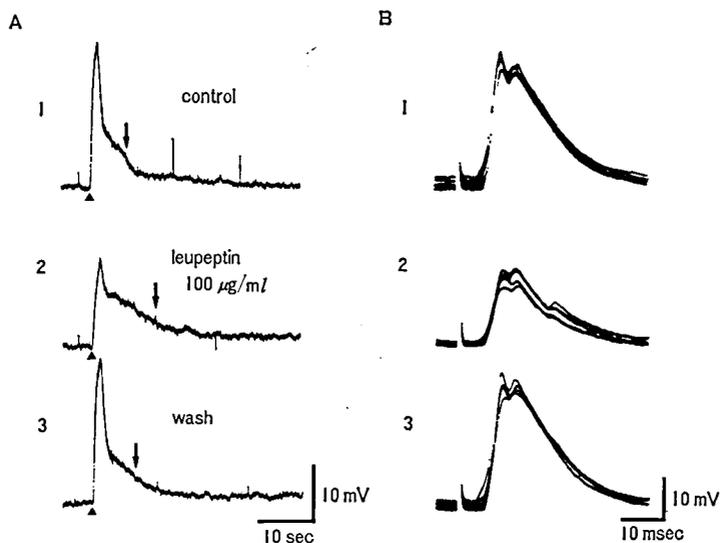


図 7 下腸間膜動脈神経節細胞から細胞内電極で記録したアセチルコリンで誘発される反応とコリン作動性 fast EPSP に対するロイペプチンの効果。A：ACh ($3 \times 10^{-4}\text{g/ml}$) を微小ピペットから圧カパルス (0.3 kg/cm^2 , 1.6 sec) によって節後ニューロン近傍に局所適用した。1, 正常溶液中での ACh による 2 相性の脱分極反応, 2, ロイペプチンを適用して 3~4 分後。3, ロイペプチンを洗い去って約 3 分後。1~3 の矢印はそれぞれ遅い脱分極反応の半減時間を示す。B：腸間膜神経を 100 秒毎に 1 Hz で 10 回刺激して誘発されたコリン作動性 fast EPSP. (5 回の反応を重ねて記録した) 1, 正常溶液中の fast EPSP. 2, ロイペプチンを適用して 3~4 分後。3, ロイペプチンを洗い去って約 10 分後。A と B は同一細胞から記録した。

$\mu\text{g/ml}$ の単独投与では気管平滑筋の張力に目立った変化はみられなかった。

3) 虹彩括約筋に対する作用

ロイペプチン、ベスタチン $10\ \mu\text{M}$ および $100\ \mu\text{M}$ の投与では、虹彩括約筋の張力に影響をおよぼさなかった。図 6 に示すようにアセチルコリン $10^{-4}\ \text{M}$ による虹彩括約筋の収縮はロイペプチン、ベスタチンそれぞれ $12.5\ \mu\text{M}$ の 3 分間前投与によっては影響を受けなかった。

4) 交感神経節に対する作用

すでに報告したようにロイペプチン ($100\ \mu\text{g/ml}$) 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 (図 7 B)。ACh を神経節細胞に圧力パルス ($0.2\sim 1.6\ \text{sec}$) で適用すると、多くの場合立ち上がりが速く持続の短い脱分極と数秒間持続する遅い脱分極から成る 2 相性反応が記録された (図 7 A)。ロイペプチン ($100\ \mu\text{g/ml}$) は、ACh の速い脱分極反応を約 40% 抑制

した。この抑制率は fast EPSP に対する抑制率とほぼ一致していた (図 7 A, B)。一方、ACh の遅い脱分極反応に対してロイペプチンは、反応の大きさをほとんど変化させなかったが、持続時間を明らかに延長させた。ロイペプチンのこれらの効果は可逆的で、薬物を洗い去って数分以内に効果は消失した。

ACh で誘発される速い反応は、ヘキサメソニウム ($2\times 10^{-4}\ \text{M}$) で完全に消失した (図 8 A)。この濃度のヘキサメソニウムは fast EPSP もほぼ完全に抑制した (図 8 B)。一方 ACh の遅い脱分極反応は、ヘキサメソニウムでは影響を受けず (図 8 A)、アトロピン ($10^{-8}\ \text{M}$) によって完全に消失した。ヘキサメソニウム処理後に ACh で誘発される遅い脱分極反応も、ロイペプチン ($2\times 10^{-4}\ \text{g/ml}$) によって大きさはほとんど変化しなかったが、持続時間は約 2 倍に延長した (図 9)。2, 3 の細胞では、ACh によって速い脱分極に続いて過分極および長い脱分極 (約 1 分間持続) が誘発された。このような細胞では実験を行わなかった。

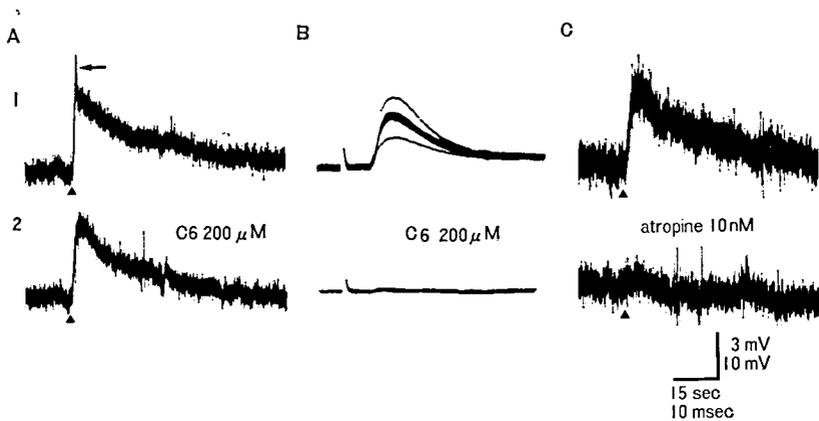


図 8 下腸間膜動脈神経節細胞から記録したアセチルコリンで誘発される反応およびコリン作動性 fast EPSP に対するコリン作動性アンタゴニストの効果。実験は図 7 とほぼ同様に行った。A と B: アセチルコリンで誘発される脱分極反応 (A) と神経刺激で引き起されるコリン作動性 fast EPSP (B) に対するヘキサメソニウムの効果。1: 正常溶液中。2: ヘキサメソニウム ($2\times 10^{-4}\ \text{M}$) を適用して約 4 分後。C: ACh で誘発される遅い脱分極に対するアトロピンの効果。1: 正常溶液中。2: アトロピン ($10^{-8}\ \text{M}$) を適用して約 2 分後。A, B, C はそれぞれ別の神経細胞から記録した。電位と時間のスケール: 上段は A と C に、下段は B に対応する。▲ の時点で ACh を圧パルスにより適用した。A 1 の矢印は ACh による速い脱分極を示す。

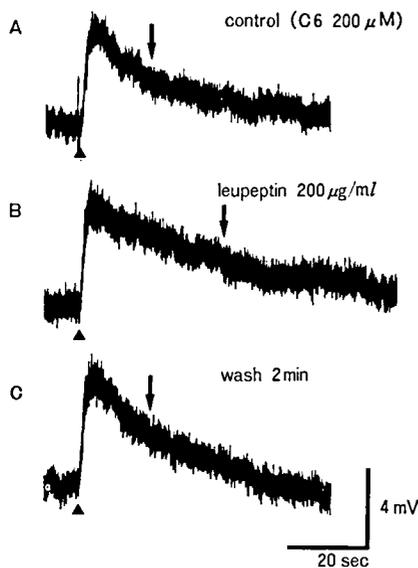


図9 下腸間膜動脈神経節細胞からヘキサメソニウム存在下に記録したアセチルコリンの遅い脱分極反応に対するロイペプチンの効果。実験は図7とほぼ同様に行った。▲の時点でAChを圧力パルスにより適用した。A：ヘキサメソニウム ($2 \times 10^{-4} M$) 含有溶液中でアセチルコリンにより誘発された遅い脱分極反応。B：ヘキサメソニウム存在下にロイペプチン ($2 \times 10^{-4} g/ml$) を適用して約4分後。C：ロイペプチンを洗い去って約2分後。1～3の矢印はそれぞれ遅い脱分極反応の半減時間を示す。

5) 摘出脳幹-脊髄-肺標本に対する作用

本標本の一部である摘出脳幹-脊髄標本が自発的呼吸活動を示すことは昨年度の研究報告に述べた。本標本では気管内圧を上げ肺を拡張させると、その間一過性に呼吸活動が抑制された(図10, 11)。この反射性抑制は中枢神経系と気管-肺をつなぐ迷走神経の切断により消失し、また、肺側液槽をテトロドトキシン $1 \mu M$ で灌流すると可逆的に消失した。よって、この反射性抑制は、気管支の受容器が内圧上昇に応じ、迷走神経を求心路として起していることがわかり、*in vivo* 動物において肺拡張により呼吸抑制を惹起するHering-Breuerの inflation reflex に相当すると考えられる。この肺拡張による呼吸抑制反射に対するロイペプチンの影響を調べた。

図10に示すようにロイペプチン $200 \mu g/ml$ ま

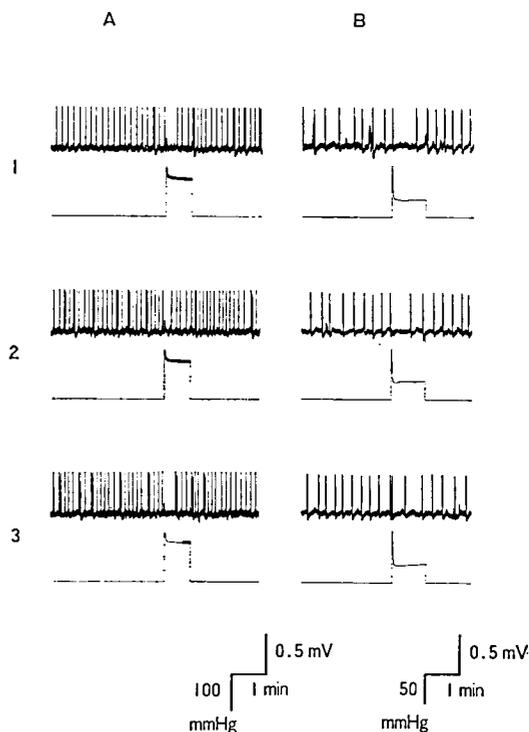


図10 脳幹呼吸中枢に投与したロイペプチンの反射性呼吸抑制に対する影響。各々の上段は呼吸活動を示す頸髄前根の電位変化。下段は同時に記録した気管内圧。圧の上昇により呼吸リズムが一過性に抑制されることがわかる。A：0日齢ラット，第4頸髄前根より記録。(1) Control。(2) ロイペプチン $200 \mu g/ml$ ，5分灌流直後に加圧。(3) 投与終了6分後に加圧。B：3日齢ラット，第5頸髄前根より記録。(1) Control。(2) ロイペプチン $400 \mu g/ml$ ，4分灌流直後に加圧。(4) 投与終了後4分後に加圧。

たは $400 \mu g/ml$ を脳幹側に灌流したが反射性抑制の顕著な変化は認められなかった。次に伸張受容器のある気管-肺系の液槽内にロイペプチン $200 \mu g/ml$ を適用したのが図11であるが、やはり反射性呼吸抑制に著しい変化はみられなかった。

6) 摘出脊髄-尾標本に対するロイペプチンの効果

発痛物質であり、またC-fiberを特異的に刺激することが知られているcapsaicinを、尾の灌流液中に短時間注入すると、約30秒持続する脱分極性の電位が腰髄前根から記録された。この電位

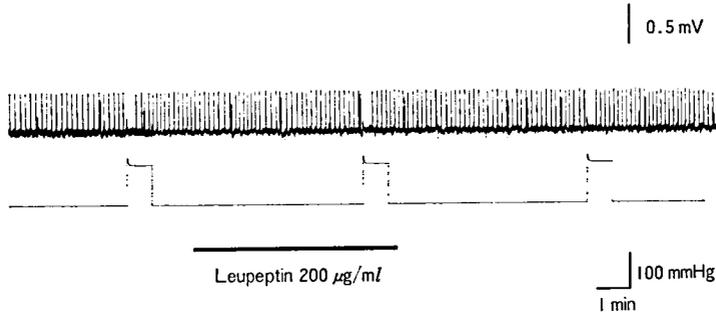


図 11 気管-肺側に投与したロイペプチンの反射性呼吸抑制に対する影響。0 日齢ラット。上段は第 4 頸髄前根よりの細胞外記録。下段は同時に記録した気管内圧。黒線に示した期間ロイペプチン 200 µg/ml を気管-肺側液槽に灌流投与した。

は注入する capsaicin の量を増すことにより増大した。Capsaicin の刺激の性質を知るため、intact の新生ラットの尾に灌流槽を装着し、capsaicin を短期間適用すると、啼鳴および逃避反射などの仮性疼痛反応がみられ、この反応は morphine により消失し、naloxone により回復した。この *in vivo* での成績から capsaicin により誘発される電位は侵害反射の一種と考えられる。

Capsaicin によって誘発される侵害反射はロイペプチン 200 µM を尾の灌流液に加えることによって明らかな影響を受けなかった(図 12)。一方、ロイペプチンを脊髄側の灌流液に加えた場合には、20 µM では明らかな効果がみられなかったが、200

µM では侵害反射の抑制がみられた(図 13)。

7) ラット脊髄に対するベスタチンの効果

図 14 は MG および LGS 運動ニューロンの電氣的性質に対するベスタチンの作用を示している。ベスタチン投与後 LGS 運動ニューロンの伝導速度に軽度の増加が見られた。しかし、Ca 依存性 K 電位の関与が示唆されている後過分極には電位の振幅および持続期間ともにベスタチンの影響は見られなかった。

図 15 は末梢筋枝神経刺激に応じて発生する Ia EPSP に対するベスタチンの効果を検討したものである。MG 運動ニューロンに発生する EPSP はベスタチン投与後に有意の増大が見られたのに対し、LGS 運動ニューロンに発生する EPSP は増大傾向は見られたもののコントロール群との間に有意の差は認められなかった。

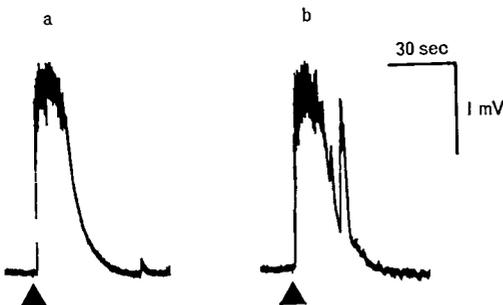


図 12 Capsaicin 誘発侵害反射電位に対するロイペプチンの作用(末梢側適用)。ロイペプチン 200 µM を尾側灌流液に適用した。0.5 µM の capsaicin を 0.4 kg/cm² の圧で 0.4 秒間尾側に灌流適用し誘発される反射電位を L3 前根から記録した。a は正常液中での侵害反射電位。b はロイペプチン灌流適用後。

考 察

1) 血管平滑筋に対するロイペプチンの作用

今回用いたモルモット、ウサギ、ネコの大腿動脈ラセン状条片標本のいずれにおいてもロイペプチン単独では明らかな作用を示さず、ロイペプチン前処置下でのノルアドレナリンによる血管収縮力にも目立った変化は認められなかった。この結

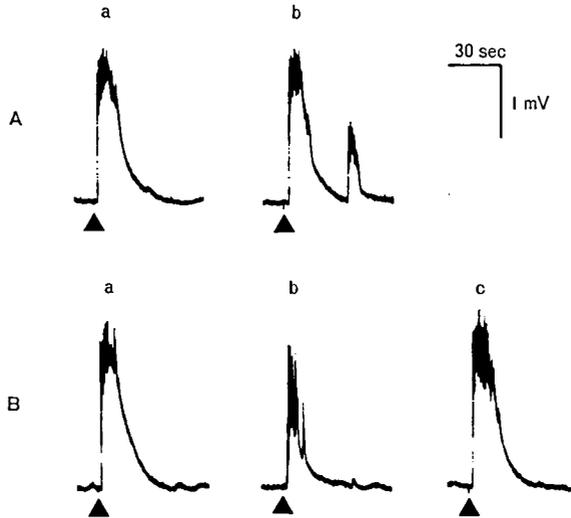


図 13 Capsaicin 誘発侵害反射電位に対するロイペプチンの作用 (中枢側適用). 図 12 と同様の実験, ただしロイペプチンは脊髄側に灌流適用した. Aa および Ba は control の反射電位. Ab はロイペプチン 20 μM , Bb は 200 μM の侵害反射電位に対する効果. Bc は洗滌後の回復を示す.

果は 57 年度のもルモット大動脈ラセン状条片標本を用いた結果に一致するものである。しかしウサギおよびネコではノルアドレナリン投与によって血管収縮がおこった後、ロイペプチンを投与すると収縮力の減少が観察された。この収縮力の減少をひき起すロイペプチンの最小有効量は 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度であった。ネコ、イヌ、ウサギで観察された血圧下降作用はロイペプチン 10 mg/kg によってひき起されている。今回用いたウサギおよびネコは体重 2.5 kg 前後であるが、体重の 1/13 が全血液量とすると 10 mg/kg のロイペプチン投与によって血中ロイペプチン濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度になることは期待し得る。しかしながらロイペプチンの降圧作用を今回観察されたノルアドレナリンによる血管収縮力の減少で説明し得るかどうかはなお検討を要する。

2) 気管平滑筋に対するロイペプチンの作用

今回観察されたロイペプチンのアセチルコリンによる気管収縮に対する増強作用は自律神経節で

得られた結果と考え合わせると興味深い。アセチルコリンによる気管収縮作用はアトロピンで拮抗され、ムスカリン作用と考えられるが、ロイペプチンがアセチルコリンのムスカリン作用を増強させることは顎下腺神経節および下腸間膜動脈神経節 (昭和 58 年度および本年度報告) で観察されている。ロイペプチン単独投与では気管の収縮は起さないことからロイペプチンはエドロフォニウムのように抗コリンエステラーゼ作用によりアセチルコリンの作用を増強している可能性が考えられるが、今回は結論を得るまでには至らなかった。

3) 交感神経節に対するロイペプチンの作用

下腸間膜動脈神経節において、ロイペプチンは神経刺激で誘発されるコリン作動性 fast EPSP と ACh 投与で誘発される速い脱分極反応 (ヘキサメソニウム感受性) の両方を同程度に抑制した。これらの結果から、ロイペプチンは神経節細胞のニコチン性 ACh 受容体に対してクラール様拮抗作用を持っていると結論される。この結論は、先

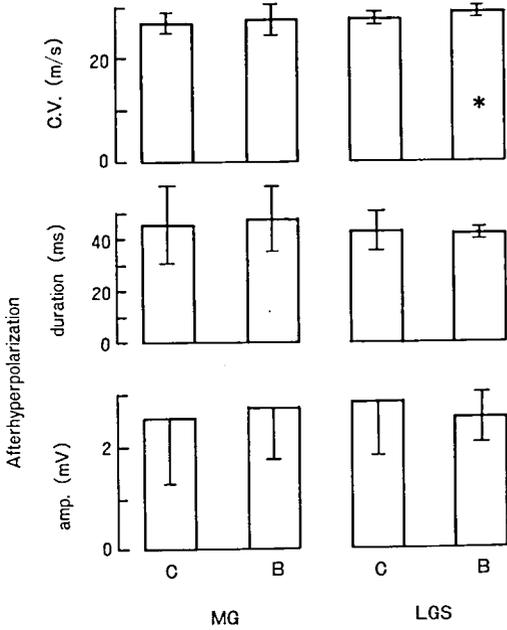


図 14 ラット脊髄運動ニューロンに対するベスタチンの効果。伝導速度(C. V.)、後過分極の持続時間(duration)および大きさ(amp)をそれぞれ()内の単位で縦軸に示した。MG: MG 運動ニューロン, LGS: LGS 運動ニューロン, C: コントロール, B: Bestatin (20mg/kg) 適用後。縦棒は S. D., *は危険率 5% で有意の差を示す。

に報告した fast EPSP の量子的解析によってロイペプチンの作用を調べた実験結果と良く一致している(昭和55年度報告)。ロイペプチンは ACh

で誘発される遅い脱分極反応(アトロピン感受性)の持続時間を延長させた。この結果は、昭和58年度報告したラット副交感神経節(顎下腺神経節)でみられた効果と一致している。ACh の遅い脱分極は、今回のコリン作動性アンタゴニストを用いた実験からムスカリン性 ACh 受容体を介する反応と考えられる。以上より、ロイペプチンはニコチン性 ACh 受容体に選択的な阻害作用を持つと結論される。一方ロイペプチンはムスカリン性 ACh 受容体反応に対しては増強作用を示すが、この効果の機序として2つの可能性が考えられる。第1は、ロイペプチンがコリンエステラーゼ阻害作用を持っている可能性であり、第2はムスカリン受容体反応への直接的な増強作用の可能性である。今回の実験ではこの点を明らかにすることはできなかった(前節参照)。

4) ラット脊髄に対するベスタチンの効果

ベスタチン投与後、MG 運動ニューロンでみられた Ia EPSP の増大の解釈として、1) 運動ニューロンの膜抵抗の増大、2) 運動ニューロンの静止電位の増大、3) Ia 伝達物質の放出量の増加、などの可能性が考えられる。1) の可能性は後過分極の大きさに変化がみられなかったことから考

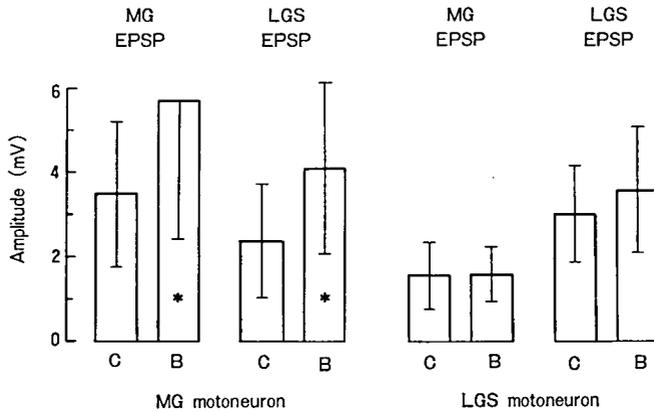


図 15 Ia EPSP に対するベスタチンの効果。EPSP の振幅を縦軸に mV で示す。MG EPSP: MG 筋枝神経刺激に応じて発生する EPSP。LGS EPSP: LGS 筋枝神経刺激に応じて発生する EPSP。他は図 14 に同じ。

えて、少ないと思われる (図 14). 2), 3) のいずれにしても, MG 運動ニューロンでは EPSP の増大がみられ, LGS 運動ニューロンでは EPSP の大きさが変らなかったことの説明は困難である.

総 括

1) ロイペプチンの平滑筋に対する作用

a) ネコの大腿動脈ラセン状条片標本にノルアドレナリンを投与し, 収縮力がプラトーに達した後, 100~400 $\mu\text{g/ml}$ のロイペプチンを加えたところ, 最大 35% に達する収縮力の減少が認められた.

b) モルモットの気管ラセン状条片標本において 200 $\mu\text{g/ml}$ のロイペプチンは, アセチルコリンによる収縮力を増強した.

c) ウサギ虹彩括約筋のアセチルコリン収縮に対しロイペプチン (12.5 μM) およびベスタチン (12.5 μM) はいずれも影響を与えなかった.

2) 交感神経節に対する作用

昨年度, 副交感神経節においてロイペプチンがアセチルコリンの速い脱分極作用を抑制し, それに続く遅い時間経過の脱分極を増強することを報告した. 本年度はモルモット下腸間膜動脈神経節において実験を行った. 神経節細胞から細胞内記録を行い, アセチルコリンを圧パルスにより適用すると速い時間経過の脱分極と, これに続く遅い時間経過の脱分極とが発生した. 拮抗薬を用いた分析によって, 前者はニコチン作用, 後者はムスカリン作用であることが分かった. ロイペプチン

はアセチルコリンのニコチン作用を抑え, ムスカリン作用の時間経過を延長させた.

3) 摘出脳幹-脊髄-肺標本に対する作用

新生ラットの摘出脳幹-脊髄-肺標本を用いて実験を行った. 空気を気管から入れて肺を拡張させると一過性に呼吸の抑制が起った. この反射性呼吸抑制はロイペプチン 200 $\mu\text{g/ml}$ を脳幹側に与えても, また肺側に灌流適用しても影響を受けなかった.

4) 摘出脊髄-尾標本に対する作用

新生ラットの摘出脊髄-尾標本で, 尾に capsaicin を与えたときに腰髄前根から記録される侵害反射は, ロイペプチン 20 μM を脊髄側に, あるいは 200 μM を尾側に灌流適用しても影響を受けなかった.

5) 脊髄運動ニューロンに対するベスタチンの効果

ラットの脊髄運動ニューロンから細胞内記録を行い, ベスタチン 20 mg/kg を腹腔内に与えた. Ia 群線維の刺激によって内側腓腹筋運動ニューロンに発生する興奮性シナプス後電位は軽度を増大した.

文 献

- 1) 田中 亘. ロイペプチンの難病治療薬としての開発研究. 厚生省新薬開発研究費, 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (ロイペプチン) の開発研究, 昭和 54 年度研究報告書, pp. 63-116 (1979).

ジストロフィー筋よりの creatine kinase (CK)

遊離に対する各種薬剤の影響

高木 昭夫*,**

研究協力者 荒木 誠*・藤田 武久*・埜中 征哉*

ヒトや動物モデルの筋ジストロフィーでは血清 CK 活性は著明に上昇している。この現象は筋ジストロフィー病因に関する膜異常仮説の論拠の1つとなっている¹⁾。血清 CK 増加の機序はまだ完全には解明されていない。われわれは骨格筋からの CK 遊離を *in vitro* で検討した。その結果、電気刺激により単収縮を反復する時、ジストロフィー筋からのみ著明な CK 遊離が発生することが判明した²⁾。筋ジストロフィーハムスターと筋ジストロフィーマウスに関係する結果を報告するとともに、2~3の薬剤のこの現象に対する影響を検討した。

方 法

ハムスターとしては筋ジス (B10 14.1) と対照 (B10 F1 B) を生後3ないし6カ月間に使用した。マウスは筋ジスとして mdx, 対照として C57 B を生後2ないし3カ月間に使用した。動物をペントバルビタールで麻酔し、動脈血を採取後、主として長趾伸筋 (EDL) を摘出した。一部の筋肉では凍結切片を使用して、組織化学染色を行った。CK遊離の実験には実体顕微鏡下で EDL を腱から腱まで無傷の状態で摘出した。実験法の詳細は既報に示したとおりである²⁾。概略としては、2.0 ml クレブスリンゲル液を含む実験槽に筋を固定

し、ストレインゲージを介して等尺性張力を記録した。30分毎に還流液を交換し、液中の CK 活性を測定した。電気刺激は筋束に平行に対置した白金板により行い、収縮に際して筋表面が損傷をうけないよう配慮した。筋長は最大の単収縮張力を発生するように調節した。

結 果

1) 筋ジストロフィーハムスター

筋ジスハムスターの血清 CK 活性や EDL の諸特性を対照と対比した (表1)。血清 CK 値は対照の14倍に増加していた。EDL の CK 活性は筋ジスで有意に低下していた。EDL の強縮張力 (P_0) は両者で差違はなかった。

In vitro における EDL よりの CK 遊離をまず静止時において検討した (図1)。最初の1時間は筋ジスと対照のいずれにおいても、CK 遊離速度は大きい、その後減少し一定の遊離速度を呈し、両者間に差はみとめられない。95% O_2 +5% CO_2 の混合ガスの代わりに 95% N_2 +5% CO_2 を通気して、低酸素状態の CK 遊離に対する影響を調べた。低酸素下では CK 遊離速度は2~3倍に増大した。対照筋の方が無酸素の影響は大きくより多量の CK 遊離が発生した。別の実験では CK 遊離速度が定常状態になった時点から、1Hz の等尺性単収縮を4時間にわたって継続した。その間の CK 遊離を比較した。筋ジスにおいてのみ

* 国立武蔵療養所神経センター

** 虎ノ門病院神経内科

表 1 血清 CK 値やその他指標の筋ジスおよび対照ハムスターにおける比較

	対 照	筋ジス	P 値
血清 CK (U/L)	802±896 (7)*	11,716±7,236 (10)*	0.001
EDL 湿重量 (mg)	28.2±4.5 (15)	35.7± 8.1 (20)	0.003
可溶性蛋白 (mg/g)	54.3±7.3 (14)	54.3±13.8 (20)	n. s.
筋 CK 活性 (U/g)	2,202±433 (15)	1,941±310 (19)	0.05
Tetanus tension (P_0 , g/cm ²)	101± 47 (9)	89± 25 (10)	n. s.
P_0 at 4 h (g/cm ²)	42± 11 (9)	46± 14 (10)	n. s.

* mean ± S. D. (例数)

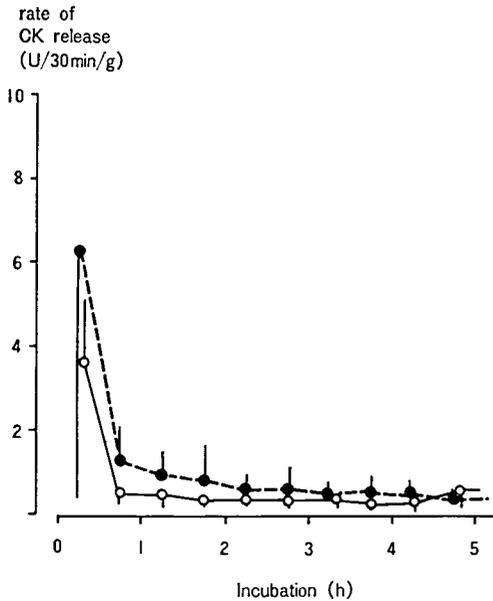


図 1 筋ジスおよび対照ハムスター EDL 筋からの静止時における CK 遊離速度。縦軸：単位湿重量あたりの CK 遊離速度，横軸，incubation の時間。●：筋ジス，○：対照。最初の 1 時間は CK 遊離は大きいですがその後一定値となり両者間に差はない。(mean ± S. D., n=)

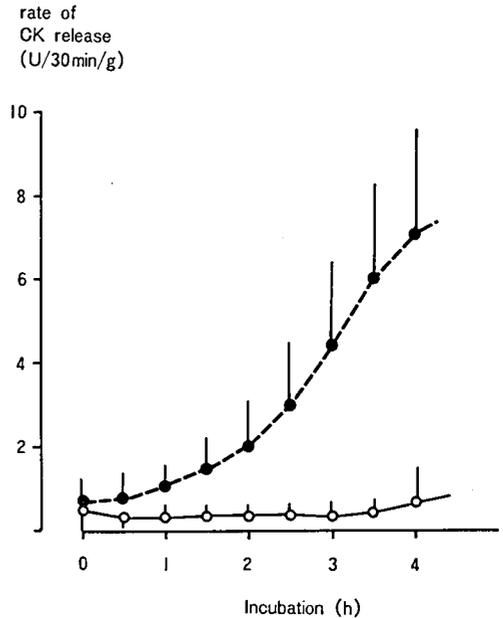


図 2 1 Hz の単収縮を反復した際の CK 遊離速度の時間経過。●：筋ジスハムスター EDL，○：対照 EDL。筋ジスでは CK 遊離速度が著増してきた。(mean ± S. D., n=)

CK 遊離速度が時間とともに増加してきた (図 2)。4 時間後には筋ジスでは P_0 は最初の 52% に減少し，対照では 42% に減少した。4 時間刺激後の筋の形態を検討した。対照では組織は浮腫状となり，濃染する筋線維が散在した。筋ジスでは対照とほぼ同様な所見であり，筋崩壊がより著明との印象は与えない。

2) 筋ジストロフィーマウス (mdx)

静止状態の EDL からの CK 遊離はハムスター

の場合と同様に少量であり，mdx と対照の間に差を認めていない。電気刺激実験は摘出筋を約 100 ml のクレブスリンゲル液で 30~60 分洗滌した後に開始した。mdx では初め 2 時間に CK 遊離速度は著増していたが，その後はほぼ一定値となった (図 3)。経過中のいずれの時点においても，mdx の CK 遊離は対照より著明に高値であった。電気刺激開始 2 時間以後の CK 遊離の平均速度は対照 1.4 ± 0.6 U/g/h，mdx 31.2 ± 25.8 であった (表 2)。

mdx の血清 CK 値は $12,556 \pm 4,853$ U/L，対

ジストロフィー筋よりの creatine kinase (CK) 遊離に対する各種薬剤の影響

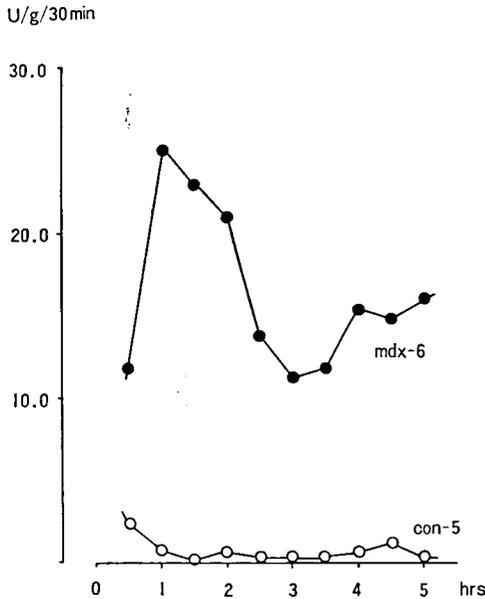


図 3 mdx および対照マウス EDL 筋からの反復単収縮中の CK 遊離速度。●, mdx; ○, 対照。代表的実験例を呈示した。mdx は最初 2 時間は CK 遊離速度は大きく、その後ほぼ一定となる。いずれの時点においても CK 遊離は対照より大きい。

照では 534 ± 527 であり、20 倍以上の増加があった (表 3)。 P_0 値は両者間に差をみとめなかった。連続電気刺激開始後 5 時間では、対照の P_0 値は 20% に減少した。一方、mdx の p_0 は 76% に低

表 2 mdx および対照マウス EDL よりの CK 遊離速度。連続電気刺激による単収縮開始後、2 時間から 4 時間までの平均値 \pm S. D. を示した。

		U/g/hr
normal	-1	0.8 ± 0.4 (4)
	-2	1.4 ± 0.6 (4)
	-3	2.2 ± 0.8 (4)
	-4	1.4 ± 0.8 (4)
	normal mean	1.4 ± 0.6
mdx	-1	37.8 ± 4.6 (4)
	-2	5.8 ± 2.0 (4)
	-3	16.0 ± 4.3 (4)
	-4	23.8 ± 5.6 (4)
	-5	72.4 ± 19.0 (4)
mdx mean	$31.2 \pm 25.8^*$	

* $P=0.001$

表 3 mdx および対照マウスの血清 CK 値 (S-CK), 強縮張力 (P_0) など。twitch/tetanus, 等尺性単収縮と強縮張力の比。 P_0 at 5h, 5 時間単収縮を反復した後に測定した強縮張力を初回の P_0 に対する % で表わした。

	normal	mdx
S-CK (U/L)	534 ± 527 (3)	$12,556 \pm 4,853^*$ (8)
P_0 (kg/cm ²)	0.09 ± 0.02 (6)	0.11 ± 0.04 (14)
twitch/tetanus	0.51 ± 0.08 (6)	0.46 ± 0.04 (16)
P_0 at 5h (% initial P_0)	20 ± 28 (6)	$76 \pm 29^*$ (16)

* $P=0.03$

下したのみで、両者間には著明な差がみとめられた。すなわち mdx では張力の減衰が著明に少なかった。

3) 薬剤の効果

生後 1 カ月の mdx マウスに leupeptin (25 mg/kg/日) と pepstatin (1 mg/kg) を 4~6 週にわたって、腹腔内投与した。その後薬剤投与群と非投与群間において CK 遊離を比較した。CK 遊離速度は投与群 32.9 ± 16.2 U/g/h, 非投与群 31.2 ± 25.8 であり、両者間に差をみとめなかった (表 4)。また leupeptin と pepstatin の慢性投与の影響を筋組織学的に検討した。筋細胞壊死巣の頻度は投与群 0~3/筋, 非投与群 2~3/筋であり、

表 4 ロイペプチン長期投与後の EDL からの CK 遊離の比較。電気刺激中の CK 遊離を比較したが、投与群と非投与群に差は認められなかった。

Control		U/g/hr
mdx	-1	37.8 ± 4.6 (4)
	-2	5.8 ± 2.0 (4)
	-3	16.0 ± 4.3 (4)
	-4	23.8 ± 5.6 (4)
	-5	72.4 ± 19.0 (4)
Total mean	31.2 ± 25.8	
Leupeptin + Pepstatin		
mdx	-11	41.6 ± 3.2 (4)
	-12	50.4 ± 6.8 (4)
	-13	14.6 ± 2.0 (4)
	-14	24.8 ± 10.4 (4)
Total mean	32.9 ± 16.2 (n. s.)	

表 5 CK 遊離に対する各種薬剤の影響. 還流液に dantrolene (25 μ M), bestatin (10 μ g/ml) + leupeptin (25 μ g/ml), menadione (23 μ M), diamox (0.1 mg/ml) あるいは ethanol (0.04 % v/v) を加え, CK 遊離に対する効果を観察した.

Addition	U/g/hr
none	46.0 \pm 11.1 (5)
dantrolene	26.2 \pm 3.8 (4)
bestatin + leupeptin	108.2 \pm 10.5 (4) ($p=0.001$)
menadione	122.2 \pm 9.9 (4) ($p<0.001$)
diamox	92.1 \pm 17.5 (4) ($p=0.01$)
ethanol	37.8 \pm 4.5 (4)

両者に本質的の差はないと推定した. 血清 CK 値は投与群 8, 254 \pm 6, 880 ($n=3$), 対照群 12, 556 \pm 4, 853 ($n=6$) と, 両者間に差をみとめていない.

別の実験では還流液に各種薬剤を混入して, CK 遊離に対する直接的影響を観察した. dantrolene (25 μ M) と Ethanol (0.04 v/v %) は CK 遊離速度に影響を与えない. diamox (0.1 mg/ml) や menadione (23 μ M) は遊離速度を増加させた. また bestatin (10 μ g/ml) と leupeptin (25 μ g/ml) はやはり CK 遊離を増加させた (表 5).

考 察

ヒト筋ジストロフィーことに Duchenne 型の場合には血清 CK 活性は著増している. この CK 活性増加の機序として, 次の 2 つが提唱されている. まず変性筋線維の筋細胞膜に断裂が生じ, そこより CK などの筋漿酵素が血中に出てくる. 第 2 は筋細胞膜は機能的に異常であり, 表面膜から筋漿酵素が漏出して来る (leaky membrane theory)¹⁾. 後者は本症の病因に関する仮説の 1 つである. この仮説に関連して, *in vitro* における骨格筋からの CK などの酵素漏出が検討されてきている. 無傷のカエル骨格筋から一定速度で CK 遊離が生ずること, また筋が小さい程, CK 遊離が多くなることが報告された³⁾. ハムスターやマウス EDL から静止時にも定常的 CK 遊離の存在を観察した.

静止時の CK 遊離速度は筋ジスと対照では異ならない. しかし単収縮を反復させた時, 筋ジスでのみ CK 遊離は著明に増加した. mdx マウスの方が CK 遊離量はより著明に増加した. これはマウス EDL 湿重量が 7~15 mg であり, ハムスターの 28~35 mg より小さいためかもしれない.

反復する単収縮によりなぜ CK 遊離が増大したかが一番の問題であろう. ハムスターのジストロフィー筋には壊死筋維が 1.5% 前後存在しており, 収縮によりこれら壊死筋維から CK 遊離が生ずるのかもしれない. しかし遊離速度の時間経過では, 速度は漸増ないし一定であり, この考えを支持しないであろう. 反復する筋収縮により筋細胞が機械的損傷をうけ, この傾向は筋ジスでより著明なのかもしれない. 実験終了後の筋の組織学的検査や P_0 の時間経過は筋ジスと対照の間に差はなく, 必ずしもこの仮定は支持されないであろう. 第 3 は機能 (収縮) している筋細胞から CK 遊離の増大が筋ジスにおいてのみ発生する可能性である. この仮説は直接証明されていないが, 今回の成績はこれを支持していると思う. ジストロフィー筋に関して注目された点として, anoxia に対して対照より抵抗性が大きい. あるいは連続刺激中の張力減少は筋ジスの方がはるかに少ないなどの現象である. しかしこれはジストロフィー筋中に相当量存在する再生筋線維の特性を反映しているのかもしれない.

前述のようにジストロフィー筋からの CK 遊離亢進の機序は未だ特定されていない. しかし筋ジストロフィーの特徴の 1 つを構成すると考えられた. 今回はこの現象に対する各種薬剤の効果を検討した. もちろんこの種の *in vitro* の成績を筋ジストロフィー個体への治療に飛躍させることはできないであろう. もし *in vitro* における CK 遊離を抑制するような薬剤が選別されるなら, *in vivo* における有効性の期待が大きくなるであろう.

Leupeptin + pepstatin を一定期間腹腔内に投与した mdx マウス EDL では, CK 遊離亢進は

依然として観察された。 *in vitro* で還流液中に諸種の薬剤を加えてCK遊離への影響を観察した。 Dantrolene 添加によりCK遊離はやや減少傾向を呈したが、統計的に有意ではなかった。 Dantrolene により単収縮張力は約50%に減少した。これがCK遊離減少に関連するかもしれない。 Diamox, menadione, bestatin, leupeptin ではCK遊離はむしろ増大した。この理由は不明であった。

結 論

筋ジスハムスターあるいはmdxマウスのEDLからのCK遊離 (*in vitro*) を分析した。連続的電気刺激により単収縮を長時間反復させた時、ジストロフィー筋からのみ著明なCK遊離が生じた。

Leupeptin+pepstatin を4~6週投与したmdxマウスにおいても、CK遊離亢進は不変であった。還流液に ethanol, dantrolene, diamox, menadione, bestatin, leupeptin を各々添加して、CK遊離への影響を調べた。CK遊離亢進を抑制する薬剤は確認されなかった。

文 献

- 1) Rowland, L. P. : Biochemistry of muscle membranes in Duchenne muscular dystrophy, *Muscle Nerve.*, **3**, 3-20 (1980).
- 2) Takagi, A., Ikai, T., Fujita, T., Sugita, H. Release of creatine kinase *in vitro* from extensor digitorum longus muscle of the dystrophic hamster. *Biomed. Res.*, **3**, 311-316 (1984).
- 3) Suarez-Kurtz, G., Eastwood, A. B. Release of sarcoplasmic enzymes from frog skeletal muscle. *Amer. J. Physiol.*, **241**. C 98-C 105 (1981).

Mdx マウスに対するロイペプチン, ベスタチンの 投与成績

埜 中 征 哉*

研究協力者 田 辺 雄 三*

進行性筋ジストロフィーの骨格筋の病理学的特徴は筋線維の壊死と再生である。筋線維が壊死する時にはカルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) のようなチオールプロテアーゼが働くと考えられている。

われわれは過去にプロテアーゼインヒビターであるロイペプチンやベスタチンを使用し、ジストロフィー鶏やハムスター骨格筋の壊死がどの程度抑制されるか検索してきたが、明らかな効果は見出し得なかった。松下ら¹⁾, Sher ら²⁾は筋ジストロフィーマウスの病初期, あるいは生直後よりベスタチン¹⁾, ロイペプチン²⁾を投与し, きわめて良好な結果を得ている。このことは筋ジストロフィーに対しては筋線維の崩壊がまだ進行していない早期より治療開始することが治療効果をあげるのに優利であることを示している。

最近入手可能となったX染色体性劣性遺伝形式をとる筋ジストロフィー (mdx) マウスは homozygote と hemizygote をかけあわせることにより全例筋ジストロフィーが得られる³⁾。本動物を使用すれば早期よりの治療実験が可能であるので, プロテアーゼインヒビターの有効性が確かめられるのではないかと期待された。mdx マウスはまだ臨床像, 病理像が十分明らかにされていないので, それを明らかにするためまず経時的な検索を行い, 次にロイペプチンとベスタチンを使用して治療を試みた。

対 象 ・ 方 法

Mdx マウスの臨床像, 病理組織像の特徴をみるため, 生直後, 生後 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 日目に mdx マウスとその対照 (C75BL/10ScSn) マウスを各々 5 匹ずつ (計: mdx マウス 40 匹; 対照マウス 40 匹) 検索した。臨床的には体重の変化と, ケージ内での動きを観察したが, 外見上では mdx と対照マウス間にはあまり差がなかったため, 筋ジストロフィーマウスに使用されている金網よじ登り試験を行った。これは 50°C に熱したホットプレートに細かい目の金網のかごをかぶせ, その中にマウスを入れるとマウスは下が熱いので金網によじ登りしがみつくとみつく。正常対照では決して落ちないが筋力低下があると落下する。マウスを 10 分間かごの中に入れ, その間に何分で落下するかその総時間を算出し筋力の示標とした。病理学的にはヒラメ筋 (赤筋), 前脛骨筋, 長指伸筋 (白筋) をとり出し直ちに凍結固定し, 連続切片を作成し, ヘマトキシリンエオジン (HE), Gomori トリクローム変法, 酸フォスファターゼ, NADH-TR, ATPase 染色を行った。

プロテアーゼインヒビターの効果をみるために 7 匹の母親より生まれた計 40 匹の mdx マウスを 20 匹ずつの 2 群に分けた。1 群にはロイペプチン 10 mg/kg とベスタチン 10 mg/kg 同時に生後 2 ~ 3 日目より背部皮下注を連日行い, 他の群は対

* 国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部

照とした。生後 30 日目まで生存したのは治療群 11 匹, 対照群 16 匹でその生存例に金網よじ登り試験, クレアチンキナーゼ (CK) の測定を行い, 組織化学的染色を行った。壊死の程度は酸フォスファターゼ染色標本より判定した。また各個体の前脛骨筋の横断切片より無差別に 200 本の筋線維を選び, その直径を計測し, 中心核線維の頻度を算出した。

結 果

1) Mdx マウスの臨床像, 病理所見の経時的変化

Mdx マウスは外見でみる限り対照マウスと何ら変わらず成長し, 動きもすばやく異常は認められなかった。体重増加は mdx マウスと対照間に有意の差はなく, また雌雄間でも大きな差はなかった (図 1)。

金網よじ登り試験では生後 30 日目には 10 分間の試行で落下するものはほとんどなかったが, 60, 120 日目と次第に落下するものが増加し, 180 日目では 10 分間の試行で全てのマウスは落下し, 金網にしがみついている時間は平均約 5 分であった。

病理学的には生直後の筋はまだ未分化で細胞の輪廓は明瞭でなく, 大型の核をもっていて, その像は正常対照と全く異なるところはなかった。

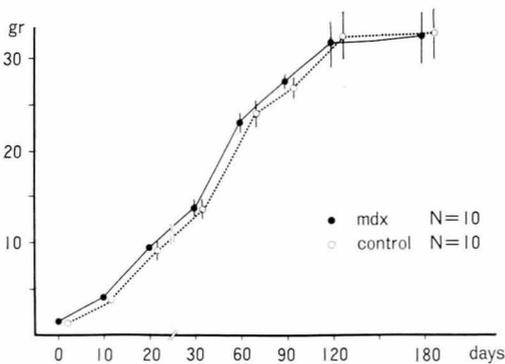


図 1 mdx および正常対照 (C 57 BL/10 ScSn) マウスの体重増加曲線。

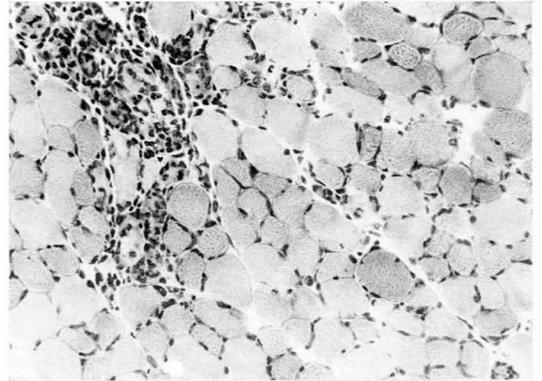


図 2 生後 20 日目の mdx マウス前脛骨筋。貪食反応を伴う壊死巣がみられる (左上方)。壊死の部以外の筋線維には中心核もなく正常である。HE, $\times 250$ 。

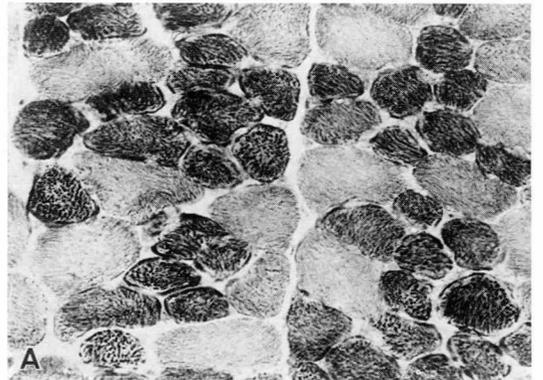


図 3A

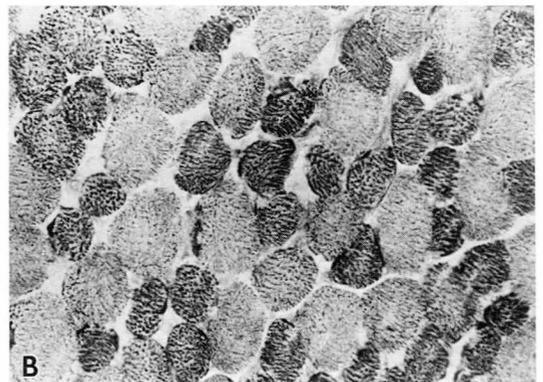


図 3B

図 3 生後 20 日目の mdx (A) と正常対照 (B) マウスの前脛骨筋。mdx マウスでも非壊死部は対照マウスの筋と同じように酸化酵素活性の高い線維と低い線維がモザイクをなして筋線維の発育, 分化の遅れはみられない。NADH-TR, $\times 500$ 。

mdx マウスに変化がみられるのは生後 20 日目で、この時期には壊死線維が群をなして出現するようになった (図 2). 少数ではあるが胞体の中心に核をもつ小径の線維も群をなして出現するようになっていた. 壊死以外の部の筋線維径は正常と変わらず、また組織化学的にも筋線維タイプの分布は正常対照と変らなかった (図 3).

壊死線維はしばしば数 10 ないし数 100 本が群をなして、初期の壊死巣には過収縮した線維 (opaque 線維) があり、その多くは Ca^{2+} 染色 (GBHA) で陽性であった. 壊死の進んだところでは単核の貪食細胞が多数浸潤している像がみられた.

生後 30 日目を以降にも壊死、再生の像がみられた. 再生線維の示標である中心核をもつ線維が増加し、平均 40% の線維には中心核がみられ、120 日目になるとほとんど全ての筋線維は中心核をもつようになっていた. 壊死線維は散在性にみられたが、その強さは 60 日目を以降軽減する傾向にあった.

2) ロイペプチン、ベスタチン投与による影響

上記薬 10mg/kg 連日皮下投与したが、注射開始後 4~5 日以内に数匹死亡した以外、体重増加は正常対照と変りなく、生後 1 月目まで生存した 11 匹の平均体重は $14.5 \pm 2.9g$ (対照: $14.2 \pm 3.0g$) と有意の差はなかった. また生後 1 月目に行った金網よじ登り試験では、治療群、非治療群とも 10 分間の試行で落下するものなく差はなかった. 血清クレアチンキナーゼ (CK) 値は治療群で $5,100 \pm 2,800 IU$ (対照: $4,700 \pm 1,980$) と有意な差は認められなかった (表 1).

病理学的にみても、治療群の骨格筋には多くの壊死線維が存在し、治療により壊死が抑制されている事実はなかった (図 4, 5). 中心核線維の頻度は治療群で $43.6 \pm 9.7\%$ (対照: $37.3 \pm 9.5\%$)、筋線維径は $30.1 \pm 5.0 \mu$ (対照: $30.2 \pm 4.1 \mu$) と、いずれにとっても有意に改善した徴候はみられな

表 1 Clinical observation (1 month old)

	Body No.	Weight	WNCT*	CK**
mdx Mouse				
Treated	11	$14.5 \pm 2.9g$	10min	$5,100 \pm 2,800$
Untreated	16	14.2 ± 3.0	10	$4,700 \pm 1,980$

* Wirenet climbing test

** Creatine kinase

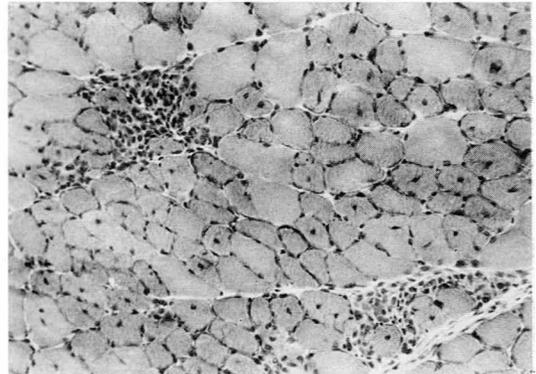


図 4 生後 30 日目の mdx マウスの前脛骨筋. 貪食細胞の集合をみる壊死線維の群と中心核をもつ線維群が散在している. HE, $\times 250$.

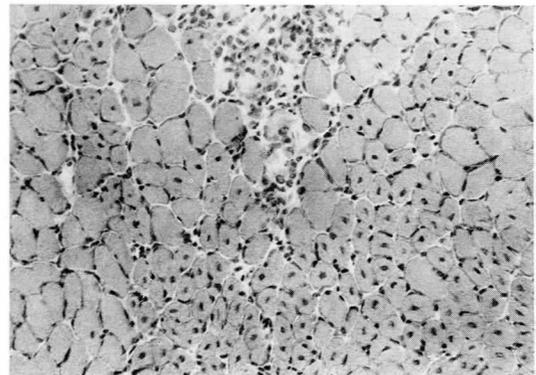


図 5 ロイペプチンとベスタチンで 1 カ月間治療した mdx マウスのヒラメ筋. 壊死線維は多く存在し、中心核線維も多く、形態学的に改善した所見は得られていない. HE, $\times 250$.

表 2 Fiber diameter and central nuclei (TA muscle)

	Central No.	Nuclei	Fiber Diameter
mdx Mouse			
Treated	11	$43.6 \pm 9.7\%$	$30.1 \pm 5.0 \mu$
Untreated	16	37.3 ± 9.5	30.2 ± 4.1

かった(表2).

考 察

今回われわれが使用した mdx マウスはX染色体性劣性遺伝をとり、ヒト Duchenne 型筋ジストロフィーの動物モデルとして利用しうるのではないかと脚光をあびている³⁾. 血清ピルビン酸や CK 値は高く、病理学的には筋線維の壊死と再生がみられている。しかし常染色体性劣性遺伝をとる筋ジストロフィーマウス(C57BL/6J dy⁺/dy⁺)と異なり、進行性の筋力低下やいそがなく外見上はほとんど変化がない。金網よじ登り試験などをすると生後 60 日目頃より、筋力低下を証明することができるが程度は軽い。筋力低下の少ないのは筋ジストロフィーハムスターと似ている。

筋ジストロフィーマウスでは生後2週間は臨床症状は少なく、2週目以降でない筋ジストロフィーマウスか否か判定できず、治療開始も遅れるという欠点があった。しかし mdx マウスでは筋力低下が少ないために、hemizygote と homozygote の交尾が可能で筋ジストロフィーマウスを確実に得ることができることは薬剤の効果をみる上に大きな利点であった。しかも mdx マウスでは筋の壊死が生後 15 日~20 日目より始まるので、それ以前に治療を開始することにより、筋の壊死が抑制ないし遅延するのではないかと期待がもたれた。そこで少数例ではあったが、ロイペプチンとベスタチン各 10mg/kg ずつを mdx マウスの皮下に連日投与し、病理像がほぼ完成する生後 1 カ月に臨床像とその病理像を検討した。

臨床的には体重、CK などに対照と差はなく、また壊死の程度にも差はなかった。筋線維は壊死すると、貪食細胞により清掃され、再生する。この再生してきた線維は中心核をもっていて、その中心核は長く細胞の中央にとどまり、周辺には移動しない。もしロイペプチンやベスタチンなどの薬剤が壊死を抑えていたとすると、壊死、再生の

プロセスは遅れて中心核線維は当然少ないはずである。しかし治療群でも中心核線維の頻度は対照と同じであり、壊死、再生のプロセスには何らの影響もみられないことが分かった。

ロイペプチンやベスタチンが筋ジストロフィー動物に対して有効であり、特に発症前からの投与が有効であったとの報告が散見される^{1,2)}.

しかしわれわれが過去に行った筋ジストロフィー鶏、ハムスターへの投与では何らの治療効果をも見出すことができず、また薬物(マーカイン)による筋壊死に対しても抑制効果はみられなかった。個体差の大きい、しかも臨床効果の判定が難しい動物が対象なので、われわれのデータからすぐロイペプチンやベスタチンは筋ジストロフィーに対し全く有効性がないとは断言できない。われわれが使用した鶏、ハムスター、mdx マウスでは筋の壊死や再生の状態が Duchenne 型筋ジストロフィーと大きく異なり、病因的に同一視してよいか否かにも疑問が残っている³⁾. 特にわれわれはヒトに最も筋病理が相似しているといわれる筋ジストロフィーマウスでの実験を行っていない。松下¹⁾、Sher²⁾が著効をみたのは全て筋ジストロフィーマウスであり、それも早期から治療を開始したものに限られている。卵巣移植などで筋ジストロフィーマウスが発症前に大量に入手可能となった時点で追試を行い、病理学的に確認したいと考えている。

文 献

- 1) 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. 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 年度報告書, pp. 55-61 (1981).
- 2) Sher, J. H., Stracher, A., Shafiq S. A. and Hardy-Stashin, J. Successful treatment of murine muscular dystrophy with the proteinase inhibitor leupeptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 7742-7744 (1981).
- 3) Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A. L. and Moore, K. J. X chromosome-linked muscular

Mdx マウスに対するロイペプチン, ベスタチンの投与成績

- dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 1189-1192 (1984),
- 4) Nonaka, I., Ishiura, S., Takagi, A. and Sugita, H. Therapeutic trial with protease inhibitor (leupeptin) in chicken muscular dystrophy. A histologic and histochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **58**, 279-285 (1982).
- 5) Nonaka, I. and Sugita, H. Intracytoplasmic vacuoles in α W fibers of dystrophic chicken ; probable early pathologic event initiates massive fiber necrosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **55**, 173-181 (1981).

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

鶏ではふ化後の成長期に、胸筋に存在する筋蛋白質のタイプが著しく変化する。顕著な例としてふ化直後には遅筋型C蛋白質、 β トロポミオン、足型トロポニンTが存在するが、2週齢位までにいずれも消失してしまうことがすでに知られ¹⁾、これらを胸筋における新生児型蛋白質とみなすことができる。それに対して、速筋型C蛋白質、 α -トロポミオン、胸型トロポニンTはふ化直後から親に至るまで存在し、成鶏胸筋を特徴づける蛋白質となっている。このような蛋白質にみられる変化は免疫化学的手法や、電気泳動法により容易にとらえることができる。

最近鶏ジストロフィー胸筋では、親型への蛋白質の変化が遅延したり、新生児型蛋白質の発現が引き起されることが明らかになってきた^{2,3)}。一方、われわれは除神経された鶏胸筋でもみかけ上ジストロフィー筋の場合に類似した筋構造蛋白質の変化が起ることを見出した⁴⁾。このように、筋肉における構造蛋白質の発現は筋の成熟度、病変、その他の生理的要因により変りうる可塑性をもつことが明らかになってきた。そのような変化が種々の筋構造蛋白質に一樣に起るのかどうか明らかではない。しかし、C蛋白質を含め、数種の蛋白質の変化がジストロフィー症に相応して起るよう

にみえることから、少なくとも鶏の場合には筋構造蛋白質の変化を筋ジストロフィー症発症の指標としようと思われる。

本研究では、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症によく似た状態を示す除神経筋での筋構造蛋白質の変化がどの程度広範に及ぶかを知るために、最も主要な筋構造蛋白質であるミオンについて解析した。

実験材料と方法

1) ベスタチンの投与

ベスタチンは、徴化研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)にふ化1週齢から2週齢まで、ベスタチン(0.9%食塩水溶液)を5mg/kg/日となるように、2週齢以降は10mg/kg/日となるように連日皮下注射により投与した。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

ふ化直後または2月齢の鶏胸筋を支配する神経(14, 15, 16頸椎神経)を脊髄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

* 千葉大学理学部

端部を背部の皮膚に縫いつけて固定した⁴⁾。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。

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、トロポミオシンおよび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）、抗遅筋型C蛋白質抗体（モノクローナル抗体、ALD66)⁶⁾、および抗心筋型C蛋白質抗体

(C315)を用い、免疫組織化学的に行った。すなわち、筋の凍結連続切片を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蛋白質のタイプを調べた。さらに、量的な解析のためにラジオイムノアッセイを行った。この場合は筋から得られた粗ミオシン画分をマイクロタイタープレートに乾燥固定した後、抗C蛋白質抗体および¹²⁵I-抗マウス IgG 抗体を順次作用させ、測定した。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

3 m old Male (NH 413)

Control

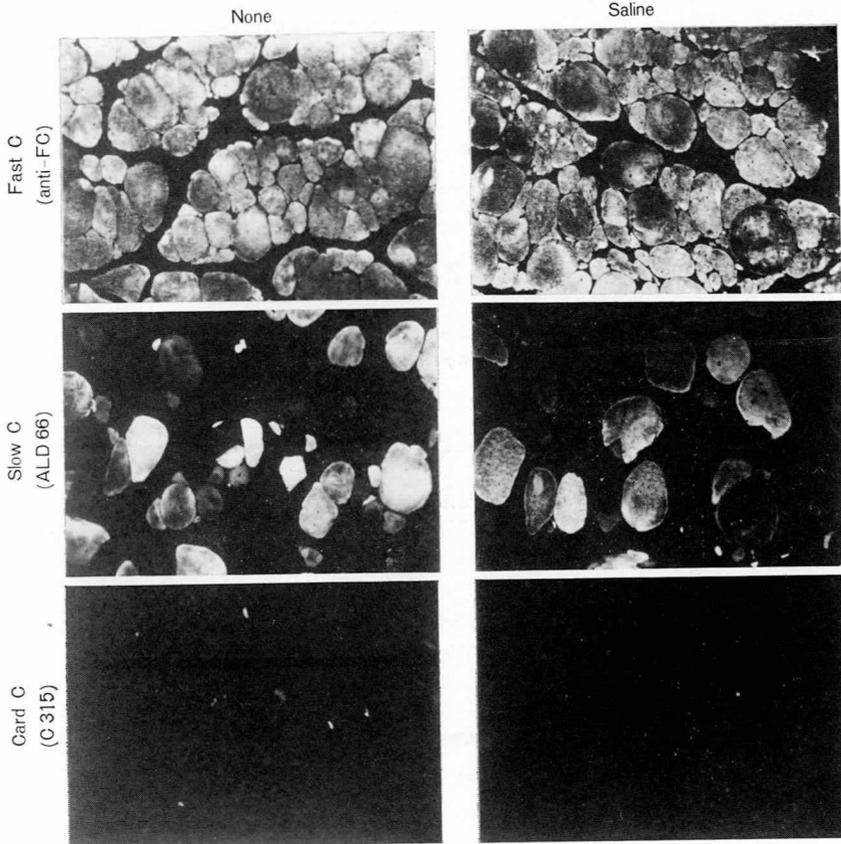


図 1 3カ月齢雄ジストロフィー鶏にみられる C 蛋白質の変化。無処理 (None) および生理食塩水 (Saline) を投与された鶏胸筋の凍結切片を抗速筋 C 蛋白質抗体 (anti FC)、抗遅筋 C 蛋白質抗体 (ALD 66) および抗 C 蛋白質抗体 (C 315) で処理した。C 315 に反応性をもつ小型細胞の存在に注意。

表 1 雄鶏筋ジストロフィーに対するベスタチンの効果
—遅筋型 C 蛋白質の出現を指標として—

		No of Cells counted	Stained with ALD-66		
			+	++	Total
None	#1	133 (100%)	35 (26.3)	33 (24.8)	68 (51.1)
	#2	190 (100%)	25 (13.1)	49 (25.8)	74 (38.9)
Saline	#1	265 (100%)	35 (13.2)	27 (10.2)	62 (23.4)
	#2	221 (100%)	15 (6.8)	15 (6.8)	30 (13.6)
Bestatin	#1	261 (100%)	8 (3.1)	21 (8.0)	29 (11.1)
	#2	158 (100%)	33 (20.9)	33 (20.9)	66 (41.8)
	#3	250 (100%)	9 (3.6)	25 (10.0)	34 (13.6)
	#4	191 (100%)	5 (2.6)	14 (7.3)	19 (9.9)

無処理, 生理食塩水, ベスタチンを注射したものについて調べた。#1, #2 などは鶏個体の番号をしめす。ALD-66 は抗遅筋 C 蛋白質抗体。

ミオシンの存在の有無に着目して分析した。

ミオシンについては, すでに作成されている 3 種のモノクローン抗体 (MF20: 胚, 新生児および親型ミオシン H 鎖を認識, MF30: 新生児および親型ミオシン H 鎖を認識, MF14: 親型ミオシン H 鎖のみを認識)⁵⁾ を用いてラジオイムノアッセイおよび筋凍結切片を用いた免疫組織化学法により解析した。

結 果

1) ベスタチン投与による影響

ベスタチンの継続投与が, 鶏筋ジストロフィー症にどのような効果をもつかについて, 主として, 新生児型構造蛋白質 (特に遅筋型 C 蛋白質) の出現を指標として検討した。前年度, ジストロフィー鶏 (NH413) に 1 月齢までベスタチン投与した場合, ジストロフィー症の発症がやや遅延する傾向にあることを観察した⁷⁾。そこで本年度は筋ジ

ストロフィー症が更に顕著になる 3 月齢まで投与を続けた時の効果を調べた。特に本実験では, ジストロフィー症の発症に関して雌雄間で差があるという杉田らの報告¹⁰⁾を参考にして, 雌雄それぞれについてベスタチン投与の効果を検討した。ふ卵後 2 日目に鑑定師に依頼して, 雌雄の確認をした後, 雌雄それぞれを 3 群にわけ, 無処理, 生理食塩水のみ投与, ベスタチンを含む食塩水の投与を行った。

3 カ月齢に到達した時点で胸筋の表層中央部を採取し, 8 μ m の連続凍結切片を作成し, 各標本を抗速筋 C 蛋白質抗体, 抗遅筋 C 蛋白質抗体 (ALD-66), および抗心筋 C 蛋白質抗体 (C-315) のいずれかで処理, 更に FITC 標識 2 次抗体を反応させ, 蛍光顕微鏡で観察した。図 1~3 に典型的な観察例を示す。ここにみられるように, 無処理または生理食塩水のみを注射された 3 カ月齢の雄鶏では遅筋型 C 蛋白質がかなりの細胞にみられた (図 1)。(今回は示さないが, 正常鶏 (NH412) ではこの月齢では遅筋 C 蛋白質を全くもたない)。全体の筋細胞の中で遅筋型 C 蛋白質を含む細胞のパーセントは個体差があり, 少ないもので 15%, 多いもので 50% 程度であった (表 1)。この時期, ジストロフィー筋に特徴的な細胞の大きさの不均一性がみられたが, 遅筋 C 蛋白質は細胞の大きさを問わず出現していた。位相差顕微鏡像と対比させた結果, 速筋型 C 蛋白質はほとんどすべての細胞に含まれているのが認められた。ジストロフィー筋にはかなり小さい細胞があり, ここでは心筋型 C 蛋白質が含まれる場合がある (後述) が, このような小さい細胞のすべてが速筋 C 蛋白質を含むかどうかは確認できない。ベスタチンをふ化後 1 週から 3 カ月齢まで投与した場合でも, 遅筋 C 蛋白質の出現が十分抑制されることはなかった (図 2)。ベスタチン投与の場合でも細胞の肥大化, または小型化したものが混在し両者とも抗遅筋 C 蛋白質抗体により染まる。ベスタチン投与された 4 羽の雄ジストロフィー鶏について遅筋 C 蛋白質

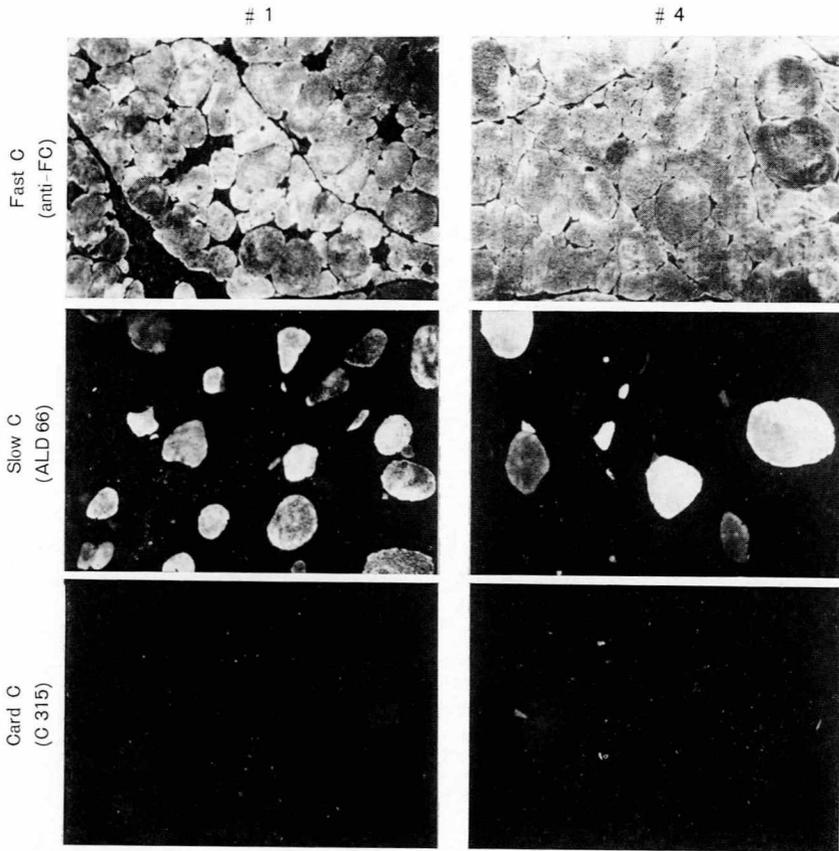


図 2 雄ジストロフィー鶏胸筋におけるC蛋白質の発現に対するベスタチン投与の効果. ベスタチン投与された3カ月齢の鶏. 2個体(#1, #4)の例を示す. その他の説明は図1参照.

を含む細胞のパーセントを検数したところ, 1例だけ42%と高い値を示したが, 他の3例は14%以下で対照鶏(無処理または生理食塩水のみ投与)の場合に比べてやや低い傾向にあった(表1, 図4参照). しかし, 対照群, 実験群ともに個体差もかなりあるのでベスタチンの効果をどの程度評価できるか断定的にはいえない.

一方, ジストロフィー筋における心筋型C蛋白質の出現の有無を抗心筋型C蛋白質モノクローン抗体(C-315)を用いて免疫組織化学的に調べたところ, ジストロフィー筋中に存在する主として小型の細胞が抗体と反応するのが認められた. しか

し, その数はそれほど多くはない. 成鶏では心筋型C蛋白質は心筋のみにしか存在しない. しかし, 胚発生途上の若い骨格筋では心筋C蛋白質が一時的に発現されることがすでに知られている⁹⁾. さらに, 筋の凍結損傷などによって引き起される再生筋細胞でも, この蛋白質の発現が起ることが観察されている. 心筋C蛋白質の存在は幼若骨格筋の指標である. ジストロフィー筋にみられる抗心筋C蛋白質抗体に陽性の細胞はジストロフィー筋に出現している再生細胞⁹⁾であろう. このような細胞は対照筋でもベスタチン投与された場合にも見出し, 両者で特に差があるようにはみられな

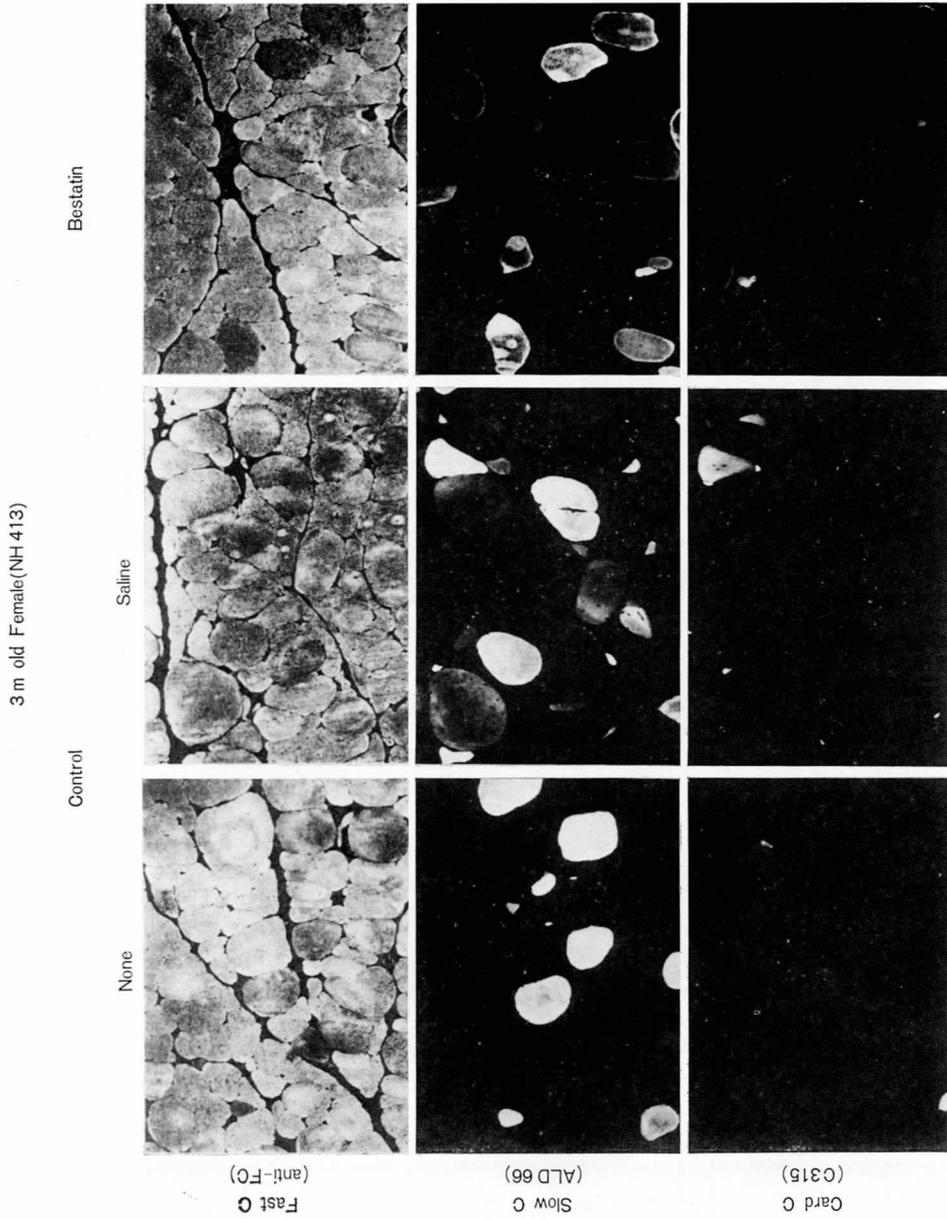


図 3 雌ジストロフィー鶏におけるC蛋白質発現に対するベスタチン投与の効果. ベスタチン投与された3カ月齢の雌ジストロフィー鶏および対照 (Control) として無処理 (none) および生理食塩水投与 (saline) の筋を調べた. 他の説明は図1に同じ.

表 2 雌鶏筋ジストロフィーに対するベスタチンの効果
—遅筋型 C 蛋白質の出現を指標として—

		No of Cells counted	Stained with ALD-66		
			+	++	Total
None	#1	172 (100%)	5 (2.9)	3 (1.7)	8 (4.7)
	#2	162 (100%)	2 (1.2)	9 (5.6)	11 (6.8)
Saline	#1	228 (100%)	5 (2.2)	4 (1.8)	9 (3.9)
	#2	270 (100%)	25 (9.3)	12 (4.4)	37 (13.7)
	#3	215 (100%)	0 (0)	3 (1.4)	3 (1.4)
Bestatin	#1	232 (100%)	10 (4.3)	9 (3.9)	19 (8.2)
	#2	219 (100%)	4 (1.8)	0 (0)	4 (1.8)

無処理, 生理食塩水, ベスタチンを注射したものについて調べた。#1, #2 などは鶏個体の番号をしめす。ALD-66 は抗遅筋 C 蛋白質抗体。

かった。いいかえれば, ベスタチン投与が筋の再生に大きな影響を与えるようには思えない。

すでに杉田ら¹⁰⁾によれば, 筋ジストロフィー症の進行は雌鶏より雄鶏でより顕著である。遅筋 C 蛋白質の出現の面からみても, このことは確かめ

られた。図 3 にみられるように, 3 カ月齢の雌鶏胸筋にも, 抗遅筋 C 蛋白質抗体 (ALD66) と強く反応する細胞が認められるが, その数は雄鶏胸筋の場合に比して少なく, 3 月齢の時点でも多くの場合, 全細胞中の 10% 以下であった。遅筋 C 蛋白質を含む細胞を検数した結果 (表 2, 図 4) から, 雌雄の差は歴然としている。雌鶏の場合でも, ベスタチン投与によりジストロフィー筋内への遅筋 C 蛋白質の出現を食いとめることはできなかった。さらに, ベスタチン投与の有無に関わらず, 雌胸筋内に心筋 C 蛋白質を含む少数の細胞が観察された。

筋ジストロフィー鶏の胸筋では, もう一つの構造蛋白質トロポミオシンにも変化が起ることがすでに指摘されている²⁾。すなわち, 発症に伴い, 孵化直後のヒヨコ胸筋と同様に, β トロポミオンが発現されるようになる。ベスタチンの投与によりジストロフィー筋における β トロポミオシンの出現が影響されるかどうかを 2 次元電気泳動法により調べた。正常鶏 (NH412) では 1 カ月齢では α トロポミオシンのみで, β トロポミオンは検出されないのに, 1 カ月齢および 3 カ月齢い

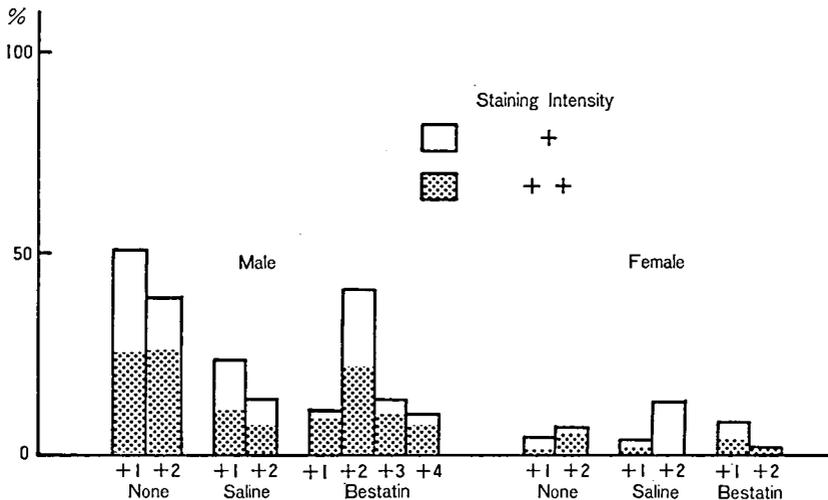


図 4 鶏筋ジストロフィー症における遅筋型 C 蛋白質の発現, 無処理 (none), 生理食塩水 (saline) またはベスタチン投与 (Bestatin) の各場合について, 全細胞中の抗遅筋 C 蛋白質抗体 (ALD66) 陽性細胞のパーセントを示す。

れのジストロフィー鶏でも微量 β トロポミオンが見い出され、ベスタチン投与した場合でも、 β トロポミオンが消失することは認められなかった。

2) 除神経筋にみられる蛋白質の変化

(1) 心筋型C蛋白質の発現

すでに述べたように、心筋型C蛋白質は骨格筋では胚や再生時にのみ発現されるので、骨格筋の幼若度の一つの指標ともいえる⁸⁾。一方、鶏胸筋の場合、遅筋型C蛋白質は新生児期を特徴づける蛋白質である。前年度、除神経筋では遅筋型C蛋白質の発現が持続的に起ることを報告したが、今回、除神経筋において心筋型C蛋白質の発現が引き起されるかどうか検討し、ジストロフィー筋の場合と比較した。

ふ化直後または2月齢の時点で胸筋を除神経し、3～6週間後に筋の連続凍結切片を作成し、抗C

蛋白質抗体を作用させ、間接蛍光抗体法で検定したところ、除神経筋中のほとんどすべての細胞が抗速筋および抗遅筋C蛋白質と反応性を示すものの、抗心筋型C蛋白質抗体(モノクローン抗体C-315)とは反応性はみられなかった(図5)。対照筋では速筋C蛋白質しか検出されない。この事実は除神経により筋の幼若化が引き起されるものの、その変化は新生児型への変化であり、胚子期の状態が再現されるような変化ではないことを示唆している。同時に除神経にみられる変化は筋再生にみられる変化と異なることを示唆する。この点、ジストロフィー筋の場合と異なっている。図1～3で示したようにジストロフィー筋の場合、心筋型C蛋白質の出現がみられた。また、除神経筋では、ほぼすべての細胞で遅筋型C蛋白質が発現されているのに、ジストロフィー筋では遅筋C蛋白質をもつ細胞は50%以下にとどまっていた。このような事実は除神経筋に比してジストロフィ

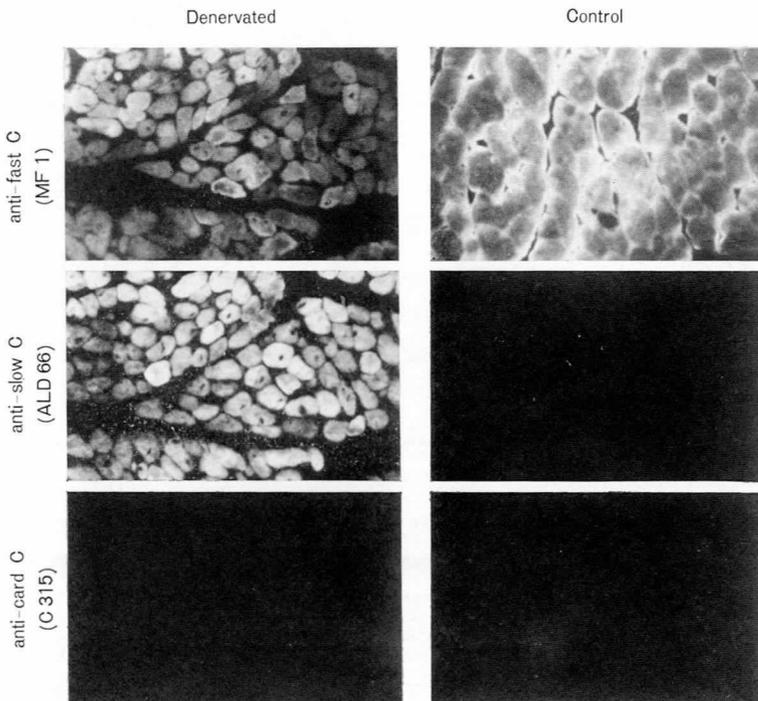


図5 2カ月齢鶏胸筋を除神経した場合にみられるC蛋白質の変化、除神経後、6週の筋の連続凍結切片を図中に示す3種の抗C蛋白質抗体で処理し、間接蛍光抗体法で調べた。

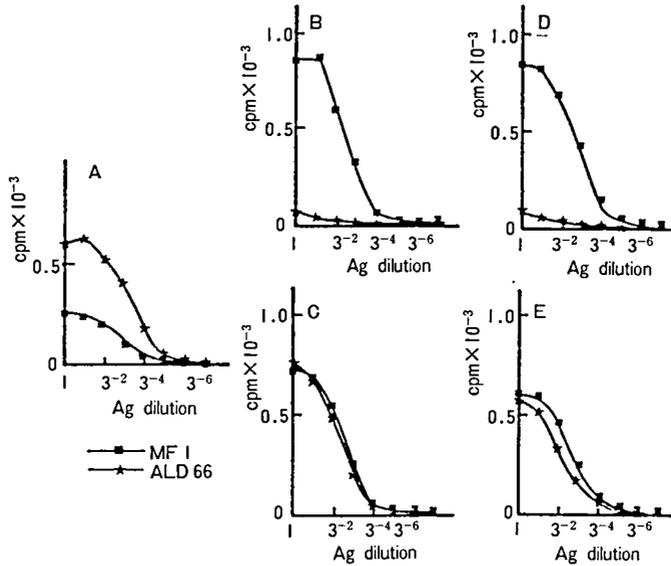


図6 除神経胸筋にみられる遅筋型C蛋白質の出現ラジオイムノアッセイによる解析. ふ化直後ヒヨコ筋の場合(A), 新生児筋を除神経し, 3週後の筋(C)とそれに対する対照筋(B), 2カ月齢鶏胸筋を除神経し, 3週後の筋(E)とそれに対する対照筋(D)の場合を示す. それぞれの場合について, C蛋白質を含む粗ミオシン画分を抗原とし, 抗原量 $10\mu\text{g}\sim 10\times 3^{-7}\mu\text{g}$ の範囲で変えた(横軸). 縦軸は抗遅筋C蛋白質抗体(MF1)または抗遅筋C蛋白質抗体(ALD66)を用いた場合の抗体反応量.

一筋ではより複雑な要因が関係する変化の過程を経ていることを示唆する.

(2) 除神経筋におけるC蛋白質とミオシンH鎖の発現の変化

筋発生過程で, C蛋白質のアイソフォームに変化が起ることをすでに述べた. それに加えて, 鶏胸筋の発生, 成長過程でミオシンH鎖アイソフォームの発現が変化していくことがモノクローン抗体を用いた研究により明らかにされている³⁾. ミオシンH鎖に対する3種のモノクローンMF20, MF30, MF14は, 胚, 新生児, 親胸筋ミオシンとの反応性が異なる. すなわち, 3種の抗体のうち, MF20は胚から親に至るすべてのミオシンと反応するのに対し, MF30は新生児以降のミオシンと, MF14は親のミオシンとのみ反応性を示す. 筋の発生, 成長に伴うC蛋白質とミオシンの発現

の変化がどのように神経支配に依存しているかを知るために, ふ化直後または2月齢の鶏胸筋を除神経し, 発現されるC蛋白質とミオシンH鎖に対する各種抗体を用いて調べた. 除神経および対照筋より, C蛋白質を含む粗ミオシン画分を得, C蛋白質とミオシンH鎖をラジオイムノアッセイ法により調べた結果を, 図6, 7に示す.

C蛋白質に関してはすでにのべたように, ふ化直後の胸筋にはモノクローン抗体, MF1により認識される速筋型C蛋白質に加えて, ALD66により認識される遅筋型C蛋白質が共存する(図6, A)が, 成長過程で遅筋C蛋白質が減少し, 速筋C蛋白質が増加する(図6, B). しかし, ふ化直後に除神経された場合, 遅筋C蛋白質は減少することなく存在し続けることが明瞭に認められた(図6, C). 一方, 速筋C蛋白質しかもたない2月齢の鶏胸筋(図6, D)を除神経した場合, 2~

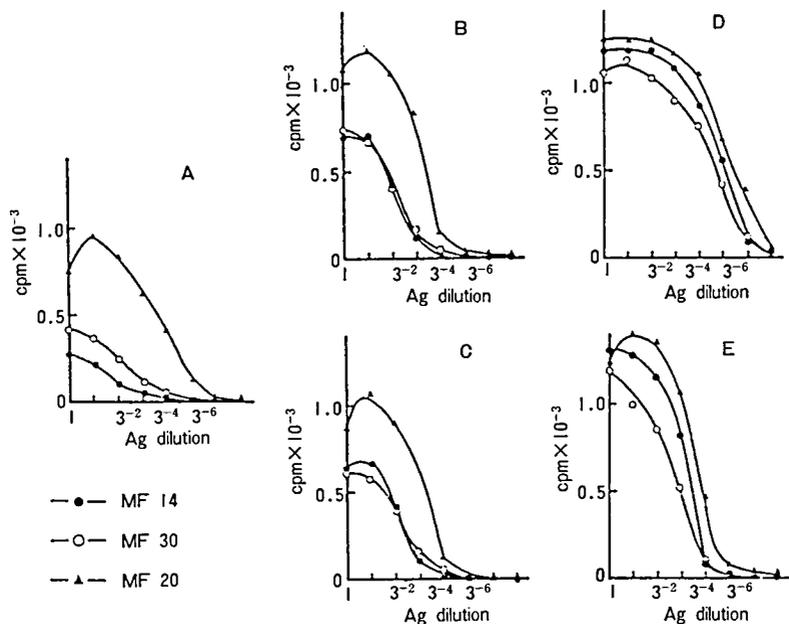


図7 除神経胸筋におけるミオシンH鎖の発現ラジオイムノアッセイによる解析。ふ化直後のヒヨコ筋(A), 新生児筋を除神経し、3週の筋(C)と対照筋(B)および2カ月齢鶏筋を除神経し3週の筋(E)と対照筋(D)の場合を示す。図6の場合と同様の実験を3種の抗ミオシンH鎖抗体(MF14, MF30, MF20)を用いて行った。

3週後には再び遅筋C蛋白質の出現が明瞭にみられた(図6, E)。このようにC蛋白質の発現は、神経支配の有無により大きく影響されるが、ミオシンの場合には、除神経された場合でも、あまり顕著な変化はみられなかった(図7)。ラジオイムノアッセイによる測定結果では、ふ化直後の筋に存在するミオシンはMF20に比べてMF14とMF30との反応性はかなり低い(図7, A)。ふ化後の成長期に、MF14, MF30の反応性は、除神経筋および対照筋いずれも徐々に上昇し、両者であまり差はみられなかった(図7, B, C)。一方、2月齢の鶏胸筋を除神経した場合、上記のようにC蛋白質に大きな変化がみられた除神経後3週の筋のミオシンのMF20, 14, 30との反応性は対照筋と比べて大きな差はみられなかった(図7, D, E)。このことは除神経後6週を経ても同様であった。更に、除神経によって起るC蛋白質とミオシンの変化を、個々の細胞レベルで免疫組織化学的手法によって調べてみると、ラジオイム

ノアッセイで得られた結果が再確認された(図8)。2月齢の成鶏を除神経した後、6週の胸筋のすべての細胞がMF1とALD66で強く染色され、速筋および遅筋C蛋白質の共存が証明されるのに対し、ミオシンH鎖については、除神経筋、対照筋のいずれもが3種のミオシンH鎖モノクローン抗体で同程度に染色され、差がみられなかった。このように、除神経によって引き起こされる変化をC蛋白質とミオシンの発現について比較してみると、両者で大きな違いがあることが明らかになった。C蛋白質の発現がミオシンに比して、より可変性があるといえる。筋ジストロフィーの場合にもミオシンアイソフォームの変化はあまり顕著ではない。C蛋白質は筋ジストロフィーにおける変化を蛋白質レベルでみる場合の指標として適切であると思われる。

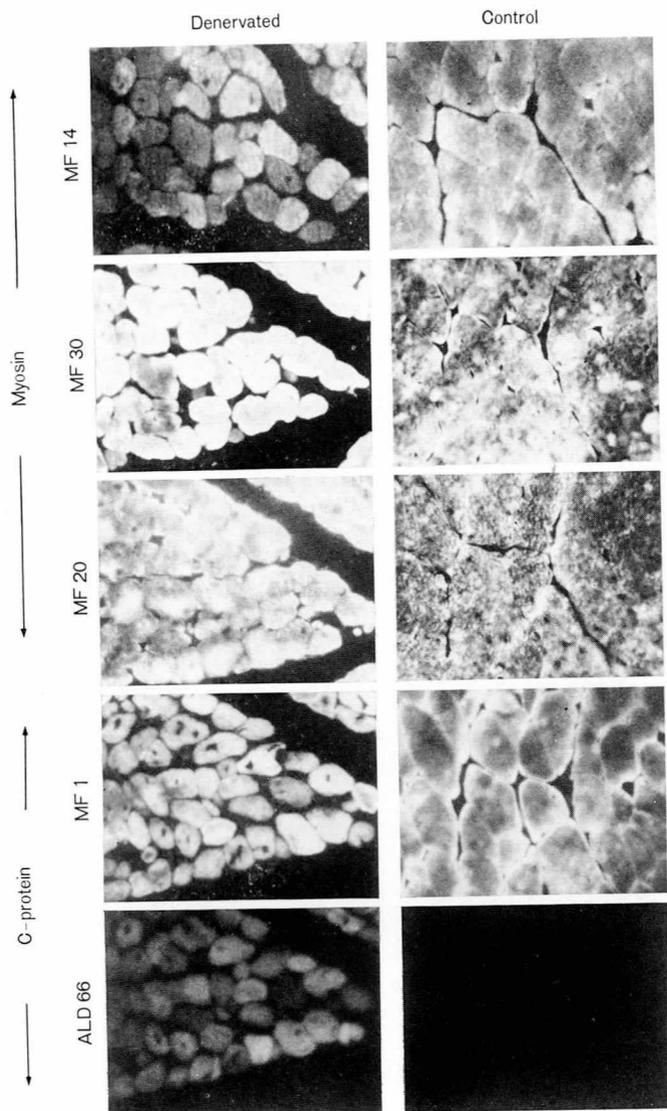


図 8 除神経筋における C 蛋白質とミオシンの比較 2 カ月齢鶏胸筋を除神経し、6 週後に筋凍結切片を作成し、間接蛍光抗体法により調べた。図中に用いた抗体を示す。

まとめと考察

鶏筋ジストロフィー症に対してベスタチンの効果を筋構造蛋白質の発現の面から検討した結果、ベスタチンがややジストロフィー症の進行を遅らせる傾向がみられたものの、発症を抑制することはできなかった。運動能（フリップテスト）の面からみても、基本的には同様の結果であった。す

で杉田らにより報告されたジストロフィー発症についての雌雄間の差¹⁰⁾は、蛋白質の面からも顕著であった。なお、ジストロフィー筋における蛋白質の変化については、個体差もあり解析を複雑にした。マウス筋ジストロフィー症に対してベスタチンが有効であることが報告されている¹¹⁾。本研究との違いは、トリと哺乳類という違いの可能性が考えられる。今回われわれが用いた抗体は哺乳類とは反応しないため、マウス筋ジストロフィ

一症について、蛋白質の面から検討することはできなかった。

除神経筋においてC蛋白質は顕著に変化するが、ミオシンの変化は少なかった。ジストロフィー筋でみられるC蛋白質の変化と合わせ考えると、病変、除神経などに伴う筋の変質を蛋白質の面で解析する上で、C蛋白質はとりわけ良い指標であると考えられる。

文 献

- 1) 大日方昂. 筋肉の分化—筋蛋白質の多型性と可変性—科学 Vol.53, pp.689-696 (1983).
- 2) Takeda, S. and Nonomura, Y. Presence of the tropomyosin 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 muscle. *FEBS Lett.*, **120**, 195-198 (1980).
- 4) Obinata, T., Saitoh, O. and Takano-Ohmuro, H. Effect of denervation on tropomyosin, troponin T and myosin isozymes in chicken breast muscle. *J. Biochem.*, **95**, 585-588 (1984).
- 5) Bader, D., Masaki, T. and Fischman, D. A. Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.*, **95**, 763-770 (1982).
- 6) Reinach, F. C., Masaki, T., Shafiq, S., 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).
- 7) 丸山工作. 筋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. 厚生省新薬開発研究(梅沢班)昭和58年度研究報告書.
- 8) Obinata, T., Kawashima, M., Kitani, S., Saitoh, O., Masaki, T., Bader, D. M. and Fischman, D. A. Expression of C-protein isoforms during chicken striated muscle development and its dependence on innervation. In "Molecular Biology of Muscle Development" (Emerson, C., Fischman, D. A., Nadal-Ginard, B. Siddiqui, M. A. Q. eds), Alan R. Liss, New York. In Press.
- 9) Nonaka, I., Fujita, T. and Sugita, H. Regenerative capability of skeletal muscle in chicken muscular dystrophy. *Muscle and Nerve.*, **7**, 400-407 (1984).
- 10) Sugita, H., Kimura, M., Tarumoto, Y., Tamai, M., Hanada, K., Ishiura, S., Nonaka, I., Ohzeki, M. and Imahori, K. *In vivo* administration of a thiol protease inhibitor, E-64-C, to hereditary dystrophic chicken. *Muscle and Nerve.*, **5**, 738-744 (1982).
- 11) 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.

筋ジストロフィー症マウスに対する高濃度ベスタチン およびアルファメニンB投与の効果

松 下 宏*

研究協力者 辻 繁勝*・楠本茂夫*・土井芳夫

研究目的

筋ジストロフィー症 (dy) マウスを用いて発症直後から1日量 0.4mg のベスタチンを連続投与することによって疾病から回復する個体が得られることが分かっている。また、症状が進行した dy マウスに同量のベスタチンを投与してもはや疾病から回復することはないが大幅な延命効果が見られることもすでに報告した¹⁾。そこで今年度は1カ月齢ですでに症状の比較的進行した状態の dy マウスに対して、従来の投与量の5倍 (2mg/day) ないし10倍 (4mg/day) 量を連続投与した場合に症状の改善効果がどの程度に認められるかあるいは副作用が出現するか否かなどについて検討を行った。

また、同時に昨年度、1日量 0.4mg で連続投与する実験を行い、症状進行に対する抑制効果が認められたアルファメニンBについても、従来の2倍 (0.8mg/day) ないし3倍 (1.2mg/day) 量を長期間にわたって投与した場合の症状進行に対する抑制効果ならびに延命効果の有無を検討した。

材料と方法

実験には自家繁殖または実験動物中央研究所より購入した1カ月齢の C57BL/6J-dy 系マウス

* 和歌山県立医科大学第二生理学教室

の疾病個体 (dy/dy) および同齢の正常対照個体 (+/-) を使用した。

ベスタチン投与実験には疾病マウス各 10 匹ずつを1実験区として、1日投与量 2mg のグループ、および 4mg のグループをそれぞれ4週間連続投与実験と6週間投与実験に分けて、合計4実験区とし、さらに各実験区に対照として10匹ずつの食塩水投与群をおいた。一方、アルファメニンBの投与実験には1日投与量 0.4mg, 0.8mg および 1.2mg の各グループをそれぞれ6週間連続投与実験と12週間投与実験に分け計6実験区とし、さらに各実験区に対照として10匹ずつの食塩水投与群をおいた。

アルファメニンB投与による延命効果を検討するために、1日投与量 0.4mg, 0.8mg および 1.2mg について平均15匹ずつの実験区を作り、1カ月齢から死亡するまで投与を続け寿命を記録した。

ベスタチン粉末は、使用直前に食塩水に 4mg/ml濃度に溶解し、1回 0.5ml と 0.25ml ずつを1日2回ずつ、それぞれの実験区のマウス背部皮下に注射した。アルファメニンB粉末も使用直前に必要量を食塩水に溶解し、1日2回ずつ、0.4mg/day, 0.8mg/day, および 1.2mg/day 量になるように皮下注射した。対照マウスは食塩水を同量ずつ、その都度皮下注射した。

投与期間を終了したマウスは、直ちに断頭採血し、血清中および骨格筋中のマーカー酵素群の活

性ならびに尿中のクレアチンおよびクレアチニン含量の測定を行った。

酵素活性測定には新鮮血清はそのまま、また屠殺後直ちに採取した後肢筋は 20 倍容の 0.32 M 蔗糖液に入れ、テフロンホモジナイザーでホモジナイズした後通常の Schneider 法に従って可溶画分とミトコンドリア画分に分離し、前者はそのまま、後者はさらに低張処理によって膜の破碎を行ったのちに、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 & Pennington の方法²⁾、中性プロテアーゼ活性は Dayton ら³⁾の CANP 活性測定法に準じて、total neutral protease 活性をはかる方法、また、クレアチンキナーゼ活性 (CPK) は Hess らの UV 法⁴⁾、乳酸脱水素酵素活性 (LDH) は Wroblewski らの方法⁵⁾、GOT および GPT 活性は Karmen 法⁶⁾、ピルビン酸キナーゼ活性 (PK) は Tanaka らの方法⁷⁾にそれぞれ準じて行った。また酵素標品中の蛋白含量測定は、Lowry 法で行った。さらに、尿中のクレアチンおよびクレアチニン含量は Jaffe 反応による Tausky 法⁸⁾によって測定された。

結 果

1. 高濃度ベスタチン投与の効果

筋ジストロフィー症発症後やや時間が経過し、症状の進行が見られる 1 カ月齢の疾病マウスを用いて、ベスタチンを従来の投与量の 5 倍量および 10 倍量で 4 週間と 6 週間に分けて短期連続投与実験を行った。血清中に遊出している疾病のマーカー酵素である PK および CPK の活性変動に与える影響をしらべた結果は表 1 のようであるが、PK 活性が 2mg 投与で 4 週間のマウスでのみ、対照と相違を示さなかった以外は、全ての投与マウスの血清中で PK および CPK の活性値が有意に低下していることが認められた。特に CPK 活性の変化については、投与量が多い程、また投与

表 1 Effects of high dose Bestatin on serum enzyme activities in dystrophic mice

Enzyme	2 mg		4 mg	
	4 weeks	6 weeks	4 weeks	6 weeks
PK	103.0	65.7*	66.6*	78.2*
CPK	64.2*	53.1*	71.8*	32.4*

Unit : Bestatin/Saline×100

* $p < 0.01$

表 2 Effects of high dose Bestatin on muscle enzyme activities in dystrophic mice

Enzyme	2 mg		4 mg	
	4 weeks	6 weeks	4 weeks	6 weeks
PK	134.7*	130.2*	121.2	123.2
CPK	140.4*	188.1*	149.5*	151.5*
GOT	—	112.1	—	133.3*
GPT	—	105.3	—	147.8*
LDH	—	75.0	—	72.4*
Alk. protease	81.9	57.6*	75.2	57.2*

Unit : Bestatin/Salin×100

* $p < 0.01$

期間が長い程大きな活性低下を示しており、血清遊出酵素の活性変動に関しては明らかな改善効果が認められた。一方、骨格筋中の各種マーカー酵素の活性変化は表 2 のように、アルカリ・プロテアーゼ活性はベスタチン投与によって明らかな低下傾向を示し、6 週間投与ではいずれの投与量でも対照と比較して有意な差異を示していた。また、CPK 酵素はあらゆる場合に有意な活性上昇を示しているのに対して、PK 酵素は 2mg 投与の場合だけ有意な活性上昇を示した。しかし有意差はなかったが 4mg 投与の場合でも、活性増加の傾向は認められた。一方、GOT、GPT 両酵素の活性は 2mg 投与では有意な増加を示さないが 4mg に投与量を増加すると有意差を示すようになった。LDH 活性は有意な変化を示さなかった。

以上のように、高濃度のベスタチンの投与によってマーカー酵素の活性変化に明らかな症状改善の傾向が示されたので、次に体重変化に対する投与の影響をしらべて見た。図 1 は 1 カ月齢で投与を開始したマウスの 30 日間の体重変化を示した

筋ジストロフィー症マウスに対する高濃度ベスタチンおよびアルファメニンB投与の効果

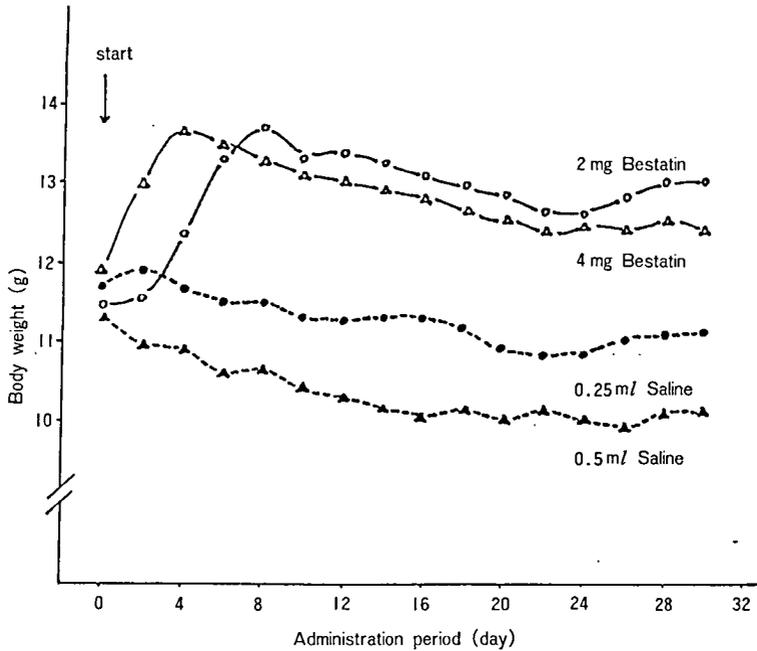


図 1 1カ月齢の筋ジストロフィー症マウスにベスタチンを連続投与したときの体重変化

ものであるが、対照マウスに比較してベスタチン投与群はいずれの投与量でも明らかに体重増加の傾向が有ることが認められる。特に投与開始後1週間位は急速な体重増加を示すが、その後は対照群と同様ゆっくり減少するという共通のパターンが見られる。また、4mg 投与の方が初期効果がより早く現われているが、その後の経過は2mg とほぼ同じであった。

2. 種々の濃度のアルファメニンB投与による効果

昨年度の実験結果から1日投与量 0.4mg のアルファメニンBを1カ月齢の筋ジストロフィー症マウスに連続投与することによって明らかな改善効果が見られることが分かったので、投与量を2倍および3倍に増加した場合にどのような効果が見られるかを検討した。

まずそれぞれの投与マウス血清中でのマーカー酵素活性の変化は表3のようであった。PK 酵素は全実験区において著しい活性低下を示していた。

表 3 Effects of Arphamenine B on serum enzyme activities in dystrophic mice

Enzyme	6 weeks			12 weeks	
	0.4 mg	0.8 mg	1.2 mg	0.4 mg	0.8 mg
PK	45.0	65.8	59.1	64.4	82.4
CPK	100.8	80.1	68.3	110.6	102.0
LDH	140.4	92.0	108.5	115.2	94.3

Unit : Arphamenine B/Saline×100

CPK 酵素は6週間投与で投与量が多い程、大幅な活性低下を示していたが、12週間投与では対照との間に変化は見られなかった。さらにLDHの場合には0.8mg 投与量の場合にわずかに減少傾向を示したがほとんど変化がなく、むしろ0.4mg、6週間投与では活性が対照に比較して増加していた。一方骨格筋中での酵素活性は表4で見られるように、アルカリおよび中性プロテアーゼがいずれも全実験区で減少傾向を示しているが、特に0.4mg 投与のマウスではいずれの投与期間においても著しい活性低下を示していた。また、PK 活性は0.4mg で12週間投与のマウス以外は全て

表 4 Effects of Arphamenine B on muscle enzyme activities in dystrophic mice

Enzyme	6 weeks			12 weeks	
	0.4 mg	0.8 mg	1.2 mg	0.4 mg	0.8 mg
PK	78.2	89.3	85.4	114.3	88.8
CPK	70.9	133.1	102.5	100.2	111.3
LDH	145.8	121.7	116.8	133.7	109.9
Alk. protease	61.5	87.3	83.8	45.4	95.4
Neut. protease	83.9	90.1	99.8	60.9	68.7

Unit : Arphamenine B/Saline×10

表 5 Effects of Arphamenine B on urinary creatine secretion in dystrophic mice

Period	Daily dose	Creatine	Creatinine	Ratio
6 weeks	Saline	16.53	9.63	1.72
	0.4 mg	6.34	5.98	1.06
	0.8 mg	7.05	7.83	0.90
	1.2 mg	5.75	4.71	1.22
12 weeks	Saline	14.61	9.18	1.60
	0.4 mg	11.38	10.19	1.12
	0.8 mg	7.74	13.37	0.58
	1.2 mg	9.79	11.35	0.86

Unit : mg/dl urine

減少の傾向を示していた。CPK 活性は 0.4 mg で 6 週間投与の場合にわずかに減少を示していたが

0.8 mg で 6 週間投与のマウスでは増加の傾向を示し、その他の場合は対照との間に差異は無かった。

さらに、尿中クレアチンおよびクレアチニン量の変化は表 5 のようにいずれの投与量でも改善の傾向を示したが、特に 0.8 mg 投与量で最も著明な効果を現わしていることが認められた。また体重変化に対する影響は図 2 のように、0.8 mg 投与で最も効果が大きく、1.2 mg 投与では投与開始初期での効果が大きく認められるが、その後は対照マウスと同様な減少傾向を示し、30 日後では 0.8 mg 投与マウスよりもむしろ低い体重になった。

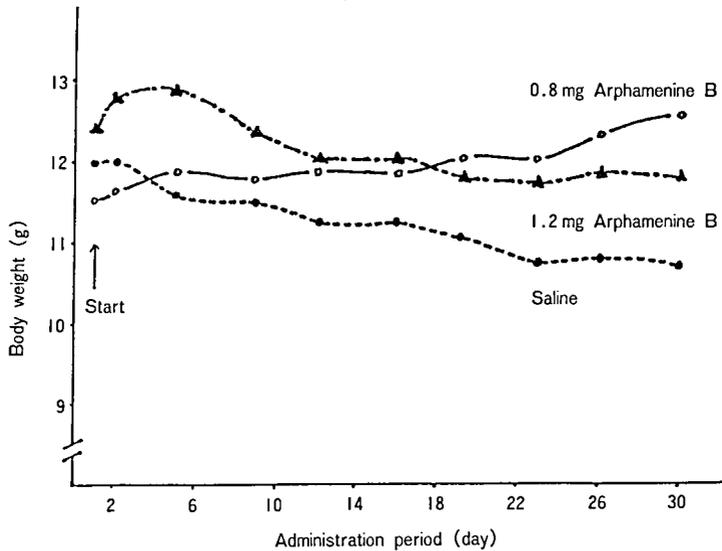


図 2 1 カ月齢の筋ジストロフィー症マウスにアルファメニン B を連続投与したときの体重変化

筋ジストロフィー症マウスに対する高濃度ベスタチンおよびアルファメニンB投与の効果

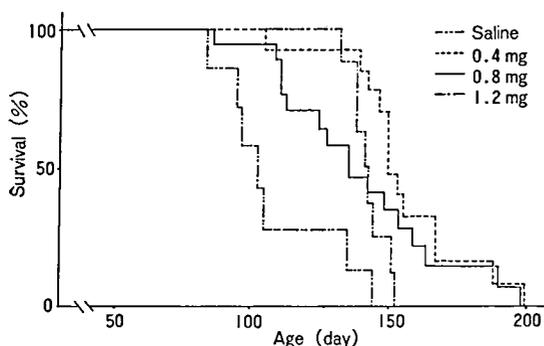


図3 筋ジストロフィー症マウスに種々の量のアルファメニンBを投与したときの延命効果

次に各投与量におけるマウスの寿命の変化について実験を行った結果は図3のようにいずれの投与量についても、対照マウスと比較して明らかな寿命の延長傾向が認められたが、0.4 mg と 0.8 mg で最も効果が大きく、1.2 mg 投与では平均寿命の延長は見られるが投与マウスが短期間のうちに一斉に死亡するという傾向が見られた。

考 察

発症初期から投与を開始することによって筋ジストロフィー症マウスに対して疾病回復効果が有ることが認められているベスタチンを従来の投与量の5倍および10倍に増量して1カ月齢ですでにかなりの程度に症状の進行している筋ジストロフィー症マウスに投与した場合に症状進行に対してどのような抑制効果があるかを検討する実験を行った。その結果血清遊出酵素のPKおよびCPK活性はいずれも著しく減少して明らかに症状改善の傾向を示していた。一方骨格筋中のマーカー酵素も分解系酵素であるアルカリ・プロテアーゼは有意に活性減少を示し、同化系酵素であるPK, CPK, GOT あるいはGPTなどの活性は有意に増加していることが分かった。また、この症状改善傾向はベスタチン投与量が多い程著しく、また、投与期間が長い程強く現われていることから、1日投与量をもう少し増加することによってより大

きな効果が得られる可能性が考えられる。さらに体重変化に与える効果も著しく、特に投与開始の初期(1週間)における急速な体重増加は、両投与量で共に明らかに認められた。このことは長期連続投与のみでなく一定の間隔で断続的に投与を行う方法を今後試みる必要があることを示唆しているものと思われる。以上の結果を総合すると、マウスの筋ジストロフィー症の場合、すでに症状の進行した段階からでも大量のベスタチンを連続投与する治療を行うことによってかなりの程度に症状の改善が得られる可能性を強く示唆しているものと考えられる。また、ベスタチンの投与量についても、今回の投与量では多い程、効果が大きい傾向を示しており、また、全く副作用と思われる現象が認められなかったことから、さらに高濃度に投与する試みも可能と思われる。

次に、種々の投与量におけるアルファメニンBの疾病に対する改善効果の比較であるが昨年度に実験を行い効果が認められた1日投与量0.4 mgの場合を含めて、2倍量(0.8 mg)、3倍量(1.2 mg)で共に明らかな症状抑制効果が認められた。しかし、そのうち2倍量投与が全般的に最も大きな効果を示しているものと考えられる。特に延命効果における3倍量投与マウスにおける一斉死亡などの傾向はこの物質の効果の限界量を示すものとも考えられるが、この点については未だ実験例があまり多くないので、さらに繰り返し、実験を積み重ねる必要がある。今回データは示さなかったが同様投与量におけるアルファメニンAの効果を見る実験も同時に行った。しかし、結果は1日投与量0.8 mg以上では逆に毒性効果が強く出て症状を悪化させる傾向が認められたので、実験を中止した。しかし昨年度に報告したように、低濃度の投与ではアルファメニンAの方がむしろアルファメニンBより強く症状抑制効果が現われることが示されているので両物質についての適当濃度による投与効果の実験はさらに続行する必要があるものと考えられる。

文 献

- 1) 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. p. 55-61 (1980).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) Hess, J. W., Murdock, K. J., and Natho, G. J. W. Creatine phosphokinase. A spectrophotometric method with improved sensitivity. *Am. J. Clin. Pathol.*, **50**, 89 (1968).
- 5) Wroblewski, F., and LaDue, J. S. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **90**, 210-213 (1955).
- 6) Karmen, A., Wroblewski, F., and LaDue, J. S., Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.*, **34**, 126 (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) Tausky, H. H. A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffe reaction *J. Biol. Chem.*, **208**, 853-861 (1954).

体外受精法によって作出された C57BL/6-dy ホモマウス に対するベスタチンおよびロイペプチン投与の影響

野村達次*

研究協力者 横山峯介*・日置恭司*・江崎孝三郎*・谷本義文*

従来、筋ジストロフィー dy マウスを得るためには、dy 遺伝子をヘテロにもつ保因マウスのメス・オスを交配する方法がとられている。しかし、この交配では、その仔の4分の1に dy ホモマウスが現われるのみであり、また、生後2~3週齢にならないと正常と筋ジストロフィーを区別することができないために、胎生期や生後の早い時期に dy ホモのマウスを実験に使用することができなかった。そこで、体外受精の技術を用いて dy ホモマウスを作出することを試みた。さらに、得られた発症前の dy ホモマウスを用いて、ベスタチンならびにロイペプチン投与の影響を調べた。

材料および方法

体外受精用としては、当研究所で生産された C57BL/6-dy マウスのメスとオスを使用した。これらは、筋ジストロフィーの発症が確認された生後2~4カ月齢で実験に供した。体外受精によって得られた受精卵(胚)を移植するためのレシピエント(借腹メス)には、Jcl:ICRの3~5カ月齢メスを用いた。

体外受精に使用する未受精卵は、dy ホモマウスのメスに5IUのPMSG(妊馬血清性腺刺激ホルモン)と5IUのhCG(絨毛性腺刺激ホルモン)を48時間間隔で腹腔内注射して排卵を誘起した。卵は処理マウスをhCG注射後16~17時

間に殺処分して卵管膨大部から採取した。一方、精子はオスの精巣上体尾部から採取して、体外受精用のメディウム¹⁾に懸濁し、受精能獲得を誘起するために炭酸ガス培養装置内で1~1.5時間インキュベーションしてから使用した。媒精は、卵を含むメディウム内に少量の精子懸濁液を加えて行った。精子の侵入が起り、受精が成立した卵は、温度が37°C、気相が5%炭酸ガス・5%酸素・90%窒素の閉鎖形の条件下で培養し²⁾、2細胞期へと発生させた。

2細胞期へと発生させた胚は、あらかじめ精管結紮オスとの不妊交配で偽妊娠を誘起しておいたDay1(陰栓観察日を第1日として)のレシピエントマウスの卵管内へ常法により移植した。片側の卵管あたりの移植胚は5~7個とし、両側合わせて10~14個とした。以上の操作により得られた dy ホモマウスは、ベスタチンおよびロイペプチン投与の実験に供した。

今回の投与実験に用いたベスタチンおよびロイペプチンは、微生物化学研究所の青柳高明博士よりご提供いただいたものである。これらは生理食塩液に2mg/mlの濃度で溶かし、dy ホモマウスの頸背部皮下に、1日2回ずつ連日投与した。投与量は、生後1~2週齢の間は0.05mlとし、その後10週齢までは0.1mlとした。また、一部の dy ホモマウスには、同量の生理食塩液のみを同様に投与して、対照群とした。

投与を行った個体は、定期的に体重を測定し、

* (財)実験動物中央研究所

筋ジストロフィーの発症時期等を調べた。また、10 週齢で、50°C のホットプレート上に置かれた金アミケージを用いて、筋の耐久力試験を行った。さらに、殺処分ののち、血液生化学的検査として、GPT (glutamate-pyruvate transaminase), GOT (glutamate-oxaloacetate transaminase), LDH (lactate dehydrogenase), CK (creatine phosphokinase), Aldolase, ALP (alkaline phosphatase) の各酵素活性を測定した。

結 果

1) 体外受精および移植成績

筋ジストロフィーの発症が確認された 43 匹の dy ホモマウスのメスにホルモン処理を施したところ、その内の 32 匹 (74.4%) に排卵が認められ正常な未受精卵が回収された。これらの大多数は体外受精により、前核期の受精卵とすることができ、総数 222 個 (一匹あたり 6.9 個) であった。さらに培養により、209 個 (94.1%) の卵が形態的に正常な 2 細胞期胚へと発生した。これらのうちの 171 個の胚を 13 匹のレシピエントメスの卵

管内に移植したところ、11 匹 (84.6%) で妊娠が成立し、59 匹 (34.5%) の仔が得られた。

2) ベスタチンの投与

体外受精の手法によって作出された発症前の dy ホモマウスに、ベスタチンを 1 週齢から連日投与したさいの体重曲線を図 1 に示した。ベスタチン投与群および生理食塩液投与群とも 5 週齢までは良好な体重増加を示したが、その後プラトーに達し、増加はみられなかった。さらに、ベスタチン投与群および生理食塩液投与群の個体とも、生後 2~3 週齢で筋ジストロフィーの症状が現われはじめ、4 週齢では全例で発症が確認された。このようなことから今回の実験からは、ベスタチン投与による dy ホモマウスの体重増加ならびに筋ジストロフィーの症状改善の効果は認められなかった。

3) ロイペプチンの投与

dy ホモマウスにロイペプチンを 1 週齢から連日投与したさいの体重曲線を図 2 に示した。ロイペプチン投与群および生理食塩液投与群とも、5

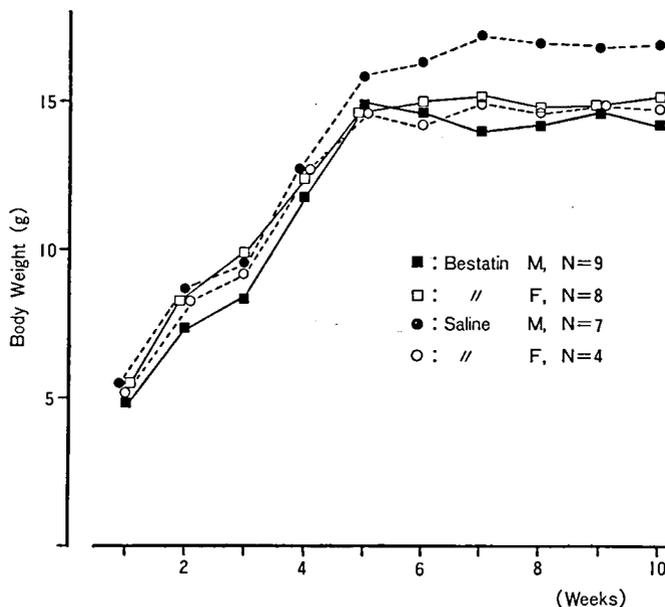


図 1 ベスタチン投与 dy ホモマウスの体重曲線

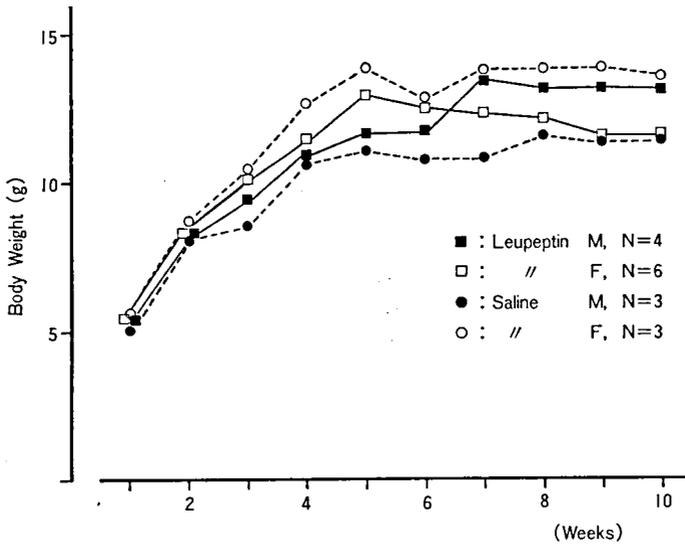


図 2 ロイペプチン投与 dy ホモマウスの体重曲線

週齢までは良好な体重増加を示したが、その後プラトーに達し、大きな変動はみられなかった。また、ロイペプチン投与群、生理食塩液投与群の個体とも生後2~3週齢で筋ジストロフィーの症状が現われはじめ、4週齢では全例で発症が確認された。このようなことから今回の実験においては、ロイペプチン投与による dy ホモマウスの体重増加ならびに筋ジストロフィーの症状改善の効果は認められなかった。

4) 筋の耐久力試験

ベスタチンおよびロイペプチンを連日投与した個体は、10週齢で筋の耐久力試験を行った。方法としては、50°Cのホットプレート上に置かれた金網ケージ内にマウスを一定時間(10分間)入れ、金網によじ登っている時間を測定した。ただし、ホットプレートにマウスが連続して1分間以上とどまった場合は、その時点で実験を中止した。正常無処置のマウス(C57BL/6)では、10分間の実験実施中にホットプレート上に数秒以上とどまったり、登りついた金網から落下するものはまったくみられなかった。一方、ベスタチンおよびロイ

ペプチンを投与した dy ホモマウスは、全例とも金網によじ登ることができず、ホットプレート上にとどまった。また、生理食塩液を投与したそれぞれの対照群の個体でも、まったく同じ結果であった。

5) 血液生化学的検査

各実験群のマウスを10週齢で殺処分後実施した血液生化学検査の結果を表1に示した。GPT, GOT, ALPについては、ベスタチンおよびロイペプチン投与群とも、生理食塩液を投与した対照群と有意差は認められなかった。また、正常無処置群と比べ有意差があってもその差は小さいものであった。

今回のベスタチンおよびロイペプチン投与効果の判定マーカー酵素として特に重要視したLDH, CKならびにAldolaseとも、投与群とそれぞれの生理食塩液のみを投与した対照群との間に有意差は認められなかったが、正常無処置の値と比較すると有意に高いものであった。したがって、dyホモマウスに対するベスタチンおよびロイペプチン投与の効果は、血液生化学的な面からみても認

表 1 血液生化学的検査の成績

	例数	GPT (IU/ml)	GOT (IU/ml)	LDH (IU/ml)	CK (IU/ml)	Aldolase (IU/ml)	ALP (IU/ml)	
ベスタチン投与	♂	8	44±11 ^{a)}	94±30	529±161	567±227	201±109	124±45
	♀	7	29±3	67±12	408±69	295±128	125±43	145±26
生食液投与	♂	6	32±6	93±30	383±91	479±255	147±49	117±24
	♀	4	31±3	65±7	452±101	336±58	130±24	138±15
ロイペプチン投与	♂	3	26±5	85±5	197±23	380±105	343±65	140±3
	♀	5	34±14	57±25	250±56	401±182	323±104	122±29
生食液投与	♂	3	28±8		369±4	786±254	440±43	132±10
	♀	2	31±4	90±14	321±64	435±148	322±85	105±4
正常無処置	♂	3	28±7	38±6	90±21	48±8	70±23	174±16

a) Mean±SD

められなかった。

考 察

マウス卵の体外受精に関しては、1968年に最初の成功例³⁾が得られて以来、数多くの報告がなされている。この体外受精の技術は、繁殖障害を伴うような疾患モデル系統の維持・生産の手法のひとつとして、有用であると考えられてきたが、実際的な報告はみられなかった。今回われわれは、筋ジストロフィーを発症した dy ホモマウスのメスとオスを使用し、産仔を得ることができた。この手法で作出される個体は、新生期や胎生期から遺伝子型が明確なので、いままで困難であった実験も可能になり、dy 筋ジストロフィーマウスの利用の幅も広がったと考えられる。

dy 筋ジストロフィーマウスに対して、各種のプロテアーゼインヒビターの投与が、症状改善に効果があるという報告^{4,5)}がなされている。しかし、今回われわれが行った実験では、ベスタチン

およびロイペプチンとも、dy 筋ジストロフィーマウスの症状改善に対しては、はっきりとした効果は認められなかった。効果に差の出た原因については、現段階では不明であるので、今後さらに詳細な検討が必要と考えている。

文 献

- 1) 豊田 裕, 横山峯介, 星 冬四郎: マウス卵子の体外受精に関する研究 I. 精巣上体精子による受精成績, 家畜繁殖誌, 16, 147 (1971).
- 2) Whitten, W. K.: Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryo *in vitro*. *Advan. Biosci.*, 6, 129 (1971).
- 3) Whittingham, D. G.: Fertilization of mouse eggs *in vitro*. *Nature.*, 220, 592 (1968).
- 4) Tsuji, S. and Matsushita, H.: Effects of protease inhibitors on the activity changes of several enzymes in murine muscular dystrophy. *J. Physiol. Soc. Japan*, 43, 374 (1981).
- 5) 松下 宏, 述 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 (1981).

筋疾患に対するベスタチンの長期投与を中心に

村上 慶 郎*

研究協力者 岡崎 隆*・石川和彦*・林 英人*

はじめに

今年度は、前年度に引き続きベスタチンを2, 3の筋疾患に長期間投与した成績および Duchenne 型筋ジストロフィー症に長期間大量に投与した成績について報告する。

対象および方法

対象は国立療養所箱根病院に入院または外来通院中の筋疾患患者で、肢体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、筋強直性ジストロフィー症4例、多発性筋炎2例、Duchenne 型筋ジストロフィー症10例、計21例であった。このうち女性は4例、男性は17例であった。年齢は2歳から55歳までであった。

使用量は30~90mgより漸増し、副作用、検査成績などを参考にして、2週~4週で増量した。最高は1500mgに及んだものもある。これは体重1kgにつき2mgから10mgに相当する。使用期間は2カ月から42カ月に及んでいる。

臨床症状の評価は、定期的な握力、床からの立ち上がり時間の測定、一部に筋力測定、10m歩行時間の測定を行った。また、日常生活動作の評価には Barthel Index (バーテル指数)を用いた(表1)。

* 国立療養所箱根病院

日常生活動作のテストとしては、数多くのものがあるが、国際的に統一されたものがなく、我が国では最近日本リハビリテーション医学会の試案がだされているが、いまだに広く用いられるに至っていない。そこで私共は、近年米国で、神経疾患の治療薬、リハビリテーションの効果の評価に用いられている Barthel Index を用いた。このテストはこまかい点での評価は十分ではないが、簡単に日常生活動作が数量化されるので便利である。

血清酵素としては CPK, LDH, GOT, GPT を用い、その他副作用のチェックのため、末梢血、肝・腎機能検査および尿検査を行った。

成 績

前年度に報告したように、肢体型筋ジストロフィー症、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー症、筋強直性ジストロフィー症では特に効果は認められず、悪化の傾向を示している。

多発性筋炎ではステロイドの節約効果がみられたが、長期間の使用では、症状の進行がみられた(表2)。

10例の Duchenne 型筋ジストロフィー症では、5例に症状の悪化がみられた。残りの5例は、1例を除いて、比較的短期間の使用であったので効果の判定は困難であった。

多発性筋炎および Duchenne 型筋ジストロフィー症では、ベスタチンの使用開始後 CPK の一時

表 1 生活動作のパーテル指数

0~25 点	非常に高度の介助を要する
30~50 点	高度な介助を要する
55~75 点	中等度の介助を要する
80~95 点	ほとんど自己動作により処理可
100 点	自己動作 介助不要

氏名																				
	項 目																			
1	食 事																			
2	ベットから立上がる																			
3	洗 顔, 結 髪																			
4	大 便, 小 便																			
5	入 浴																			
6	平 な 所 を 歩 く																			
7	階 段 の 昇 降																			
8	着 物 の 着 脱																			
9	大 便 を も ら す																			
10	小 便 を も ら す																			
	合 計 点 数																			

	項 目	評 価	点 数	評 価	点 数
1	食 事	で き る	10 点	助 け て も ら う	0 点
2	ベットから立上がる	で き る	15 点	助 け て も ら う	0 点
3	洗 顔, 結 髪	で き る	5 点	助 け て も ら う	0 点
4	大 便, 小 便	で き る	10 点	助 け て も ら う	0 点
5	入 浴	で き る	5 点	助 け て も ら う	0 点
6	平 な 所 を 歩 く	で き る	15 点	助 け て も ら う	0 点
7	階 段 の 昇 降	で き る	10 点	助 け て も ら う	0 点
8	着 物 の 着 脱	で き る	10 点	助 け て も ら う	0 点
9	大 便 を も ら す	も ら さ ない	10 点	も ら す	0 点
10	小 便 を も ら す	も ら さ ない	10 点	も ら す	0 点

的な低下がみられ、その後徐々に増加の傾向がみられた。ベスタチンを増量することにより CPK の低下のみられるものとそうでないものがみられた。LDH, GOT, GPT もほぼ同様の傾向を示した。

副作用としての消化器症状が従来からあげられているが、今回の私共の症例ではみられなかった。その他、尿、血液検査上、異常値を示したものはなかった。

筋疾患に対するベスタチンの長期投与を中心に

表 2 ベスタチン投与患者一覧

症例	病名	年齢	性	最大投与量	投与期間	臨床症状	副作用
1. A. K	肢体型筋ジストロフィー	55	女	270mg	42ヵ月	進行	なし
2. H. M	肢体型筋ジストロフィー	32	女	600mg	5ヵ月		なし
3. H. F	肢体型筋ジストロフィー	21	男	600mg	2ヵ月		なし
4. J. S	顔面肩甲上腕型	50	男	270mg	42ヵ月	進行	なし
5. N. M	顔面肩甲上腕型	21	男	270mg	42ヵ月	進行	なし
6. J. S	筋緊張性ジストロフィー	37	女	270mg	42ヵ月	進行	なし
7. S. R	筋緊張性ジストロフィー	41	男	270mg	42ヵ月	進行	なし
8. K. O	筋緊張性ジストロフィー	40	男	90mg	38ヵ月	進行	なし
9. N. I	筋緊張性ジストロフィー	38	男	90mg	15ヵ月	進行	なし
10. T. I	多発筋炎	51	男	1400mg	42ヵ月	進行	なし
11. M. S	多発筋炎	32	男	1400mg	42ヵ月	進行	なし
12. K. S	Duchenne 筋ジストロフィー	2	男	240mg	2ヵ月		なし
13. T. M	Duchenne 筋ジストロフィー	12	男	600mg	42ヵ月	進行	なし
14. M. T	Duchenne 筋ジストロフィー	16	男	500mg	12ヵ月	進行	なし
15. M. M	Duchenne 筋ジストロフィー	12	男	1000mg	12ヵ月	進行	なし
16. K. K	Duchenne 筋ジストロフィー	15	男	1000mg	8ヵ月	進行	なし
17. S. K	Duchenne 筋ジストロフィー	8	男	1000mg	4ヵ月		なし
18. K. Y	Duchenne 筋ジストロフィー	7	男	400mg	4ヵ月		なし
19. H. O	Duchenne 筋ジストロフィー	11	男	600mg	2ヵ月		なし
20. K. T	Duchenne 筋ジストロフィー	2	男	1500mg	24ヵ月		なし
21. T. S	Duchenne 筋ジストロフィー	8	男	900mg	12ヵ月	進行	なし

表 3 ベスタチン投与時の立上がり時間, バーテル指数の変化 Duchenne PMD 6歳男子

	投与前	2週後	4週後	6週後	8週後	10週後	12週後	15週後	18週後	21週後
ベスタチン, mg	0	90	90	90	90	400	400	400	400	600
立上がり時間, 秒	3.5	5.0	5.3	4.7	5.2	4.9	4.2	6.3	7.9	8.2
バーテル指数	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80

Duchenne 型筋ジストロフィー症の症例について

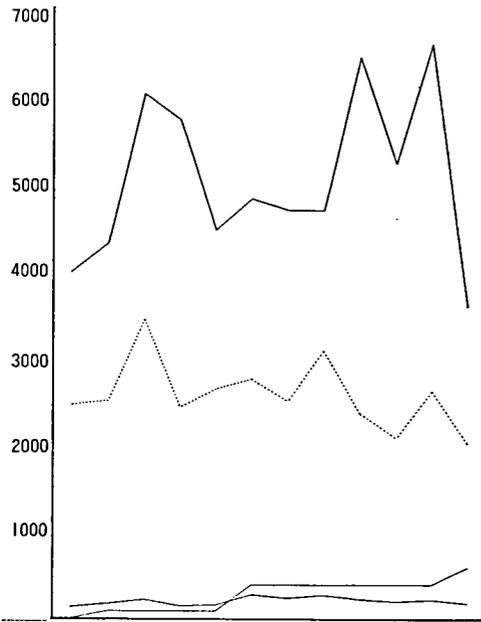
1. 6歳の Duchenne 型筋ジストロフィー症の男子. 3歳頃, 異常歩行のため某大学小児科で Duchenne 型筋ジストロフィー症と診断. 昭和59年6月当院外来を受診, 外来受診時には登はん性起立を示し, 階段昇降に際し手摺りを使用するような状態であった. また, 床よりの起立時間は3~4秒位であった. ベスタチンは90mgより開始し, 10週目より400mgに増量し, 21週目に600mgに増量した(図1, 表3).

結果は臨床的には歩行, 筋力, 日常生活動作には著明な変化はなく, 床よりの立ち上がり時間は

3~4秒から少しずつ増加して, 10週目には4.2秒となった. しかし, 14週目の終りには感冒に罹り, 自宅で床につき, 数日ベスタチンを服用しない日があった. その後15週目には床よりの起立時間は6.3秒と悪化し, その後は感冒は治癒したにもかかわらず, 床よりの起立時間は増加している. 日常生活動作を示す Barthel Indexは変化を示していない.

血清 CPK は第9週目(90mg/day)で低下を示し, 400mgに増量してやや低下しているが, 15週の感冒罹患中は立ち上がり時間と同様に増加を示している. 血清 LDH, GOT, GPTも同様の傾向を示している. この症例では体重1kg当たり30mg/dayに増加すると急激にCPK, LDHが低

単位：unit, mg

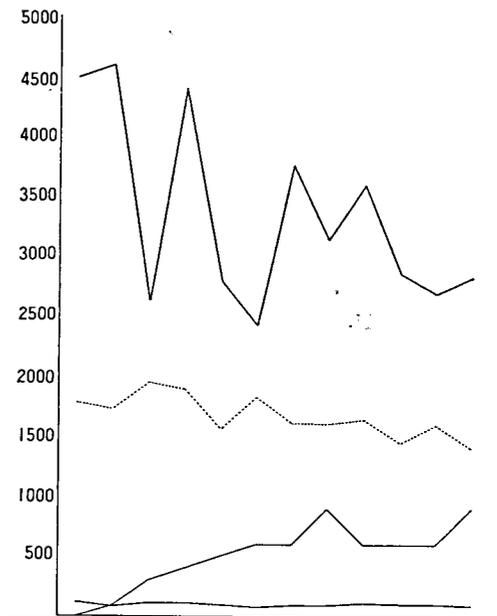


	投与前	2週	4週	6週	9週	10週	12週	13週	15週	17週	19週	21週
-- ベスタチン	0	90	90	90	400	400	400	400	400	400	400	600
-- CPK	4030	4370	6110	5810	4530	4895	4764	4758	6543	5310	6705	3642
-- LDH	2490	2538	3486	2469	2678	2792	2537	3126	2396	2107	2659	2044
-- GOT	140	180	229	152	164	283	244	281	232	203	227	183

投与期間

図 1 ベスタチン投与例 1 (Duchenne PMD 6 歳男子)

単位：unit, mg



	投与前	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	12月
-- ベスタチン	0	90	300	400	500	600	600	900	600	600	600	900
-- CPK	4490	4595	2630	4400	2795	2430	3765	3145	3603	2856	2694	2833
-- LDH	1780	1726	1948	1892	1561	1828	1612	1608	1646	1450	1602	1406
-- GOT	121	82	114	115	99	79	96	99	118	109	108	96

投与期間

図 2 ベスタチン投与例 2 (Duchenne PMD 9 歳男子)

表 4 ベスタチン投与時の握力, 立上がり時間, バーテル指数の変化 Duchenne PMD 9 歳男子

	投与前	1月後	2月後	3月後	4月後	5月後	6月後	7月後	8月後	9月後	10月後	11月後	12月後
ベスタチン mg	0	90	300	400	500	600	600	900	600	600	600	600	900
握力 (右) kg	30	10	35	35	35	20	30	30	20	15	15	10	8
立上がり時間 (秒)	10.0	9.9	9.0	10.0	9.9	7.9	9.0	13.3	12.9	15.3	16.0	16.0	15.0
バーテル指数	75	75	75	70	70	70	65	65	60	60	55	55	55

下しているがその後は漸増の傾向にあった。

2. 9歳のDuchenne型筋ジストロフィー症の男子。3歳頃に歩行異常に気づき、近医を受診するも診断不明、6歳頃某大学病院にてDuchenne型筋ジストロフィー症と診断。昭和59年1月に当院を受診、以後外来通院中である(図2,表4)。

外来受診時は臨床的には登はん性起立を示し、階段を昇ることは非常に困難で、手摺りを使用してやって可能であった。

本患者にベスタチン90mgから、3~4週毎に300mg, 400mg, 500mg, 600mg, 900mgと増量し、次いで600mgに減量、再び900mgに増

量して12カ月間使用した(体重1kg当り3mgから30mg)。

血清CPKは4500単位からベスタチン300mg/day使用で2500単位に下降。その後患者が感冒に罹患しベスタチンを中止すると再びCPKは上昇した。その後ベスタチンを増量(500~600mg/day)によって再びCPKは低下した。ベスタチン使用開始後6カ月目に転倒し、右腫骨骨折のため自宅安静。その際1週間ベスタチン服用を中止した。この際CPKの上昇がみられ900mg/dayに増量しCPKは低下の傾向を示している。このCPKの低下は600mg/dayにしても著明な変化

はみられない。LDH, GOT, GPT もほぼ同様の变化を示している。

臨床的には、握力は最初 30 kg 前後から 12カ月後には 10 kg 前後に低下しており、床からの立ち上がり時間も 10 秒前後から 15 秒前後に増加しており、Barthel Index も 75 から 55 と低下しておりかなりの悪化が認められた。

3. 3歳のDuchenne型筋ジストロフィー症。本症例は昭和 58 年度に報告した pre-clinical な症例で、その後引続きベスタチンの投与を続け、現在までに 24 カ月を経過している。

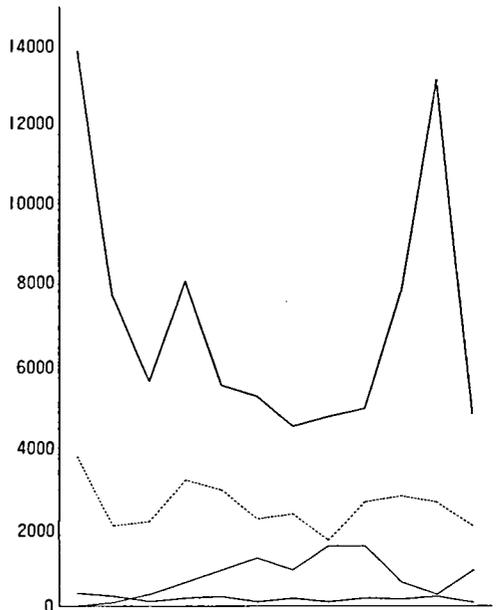
ベスタチンの使用量は最高 1 日量 1500 mg (100 mg/kg) であったが現在は、1 日量 900 mg (60 mg/kg) を使用中である。

血清 CPK はベスタチン使用前は 10000 単位以上であったが、ベスタチン使用開始と共に低下の傾向を示していた。この傾向はベスタチン投与量の減量または発熱などで再び増加し、その後再度増量で CPK は低下の傾向を示した。

CPK は最初 300 mg (20 mg/kg) で急激に下向しその後 1500 mg (100 mg/kg) までの増量では非常に緩やかな下降を示し、1500 mg から 300 mg にベスタチンを急に減量すると CPK は再び 10000 単位以上となった。そこで 900 mg/day (60 mg/kg) に増量するとまた CPK は減少した。LDH, GOT, GPT もほぼ同じ傾向であった。

床からの立ち上がり時間は、使用開始時には 5 秒前後から、現在は 3 秒前後と短縮している。いわゆる Gowers's Sign は使用前陽性であったが、現在は時に手を膝にあてる位で余り Gowers's Sign はみられない。母親の言葉でも手を使用せずに立ち上がることがほとんどであるとのことで

単位：unit, mg



	投与前	2月	4月	6月	8月	10月	12月	14月	16月	18月	22月	24月
-- ベスタチン	0	90	300	600	900	1200	900	1500	1500	600	300	900
-- CPK	13880	7720	5620	8120	5510	5230	4490	4730	4930	7851	13175	4788
-- LDH	3717	2008	2112	3151	2904	2174	2294	1650	2602	2744	2592	1998
-- GOT	325	248	121	203	238	112	199	105	204	176	250	92

投与期間

図 3 ベスタチン投与例 3 (Duchenne PMD 2歳男子)

ある (図 3, 表 5)。

Barthel Index も 65 から現在は 90 と改善を示している。

臨床的には、母親によると以前より活動が激しくなり、おそいけれども走れるようになったと述べている。

考 案

今回の報告では臨床部会が行っているシングルブラインドテストの症例については部会長の報告があるので省略した。

表 5 ベスタチン投与時の立上がり時間、バーテル指数の変化 Duchenne PMD 2歳男子

	投与前	2月後	4月後	6月後	8月後	10月後	12月後	14月後	16月後	18月後	20月後	22月後	24月後
ベスタチン mg	0	90	300	600	900	1200	900	1500	1500	600	300	300	900
立上がり時間, 秒	5.4	5.0	4.6	4.8	5.4	5.4	5.1	3.4	4.2	3.6	3.1	3.1	2.9
バーテル指数	65	65	70	70	75	80	85	85	90	90	90	90	90

従来から行っている投与方法で長期間投与した症例については、前年度の報告と同様に肢体型筋ジストロフィー症、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー症、筋強直性ジストロフィー症には効果は明らかではなかった。

多発性筋炎ではステロイドとの併用で、症状の多少の軽減が認められたが病気の進行はくいと思われられないようである。

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症ではベスタチン投与後、大多数の症例で、血清 CPK の下降がみられたが経過と共に上昇し、また減量または中止により CPK の増加がみられた。この CPK の経過と共に増加するのは薬剤の“慣れ”のためかも知れない。また歩行可能な Duchenne 型筋ジストロフィー症のうち 5~10 歳の患者にベスタチンを投与した場合 CPK などの酵素は低下の傾向にあるが、臨床症状は長期間の使用では進行し、特に呼吸器感染症、骨折などで短期間の安静を取った場合には急速に悪化がみられるが、これは Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の自然経過によくみられる現象であり、この点からも従来のベスタチンの使用法では効果はみられないものと思われる。

幼児や pre-clinical の Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症に使用した場合、一応臨床的にも

改善がみられ、血清 CPK などの酵素の低下がみられるが、これが薬剤の効果なのか、自然経過であるのか、さらに長期間の使用とこのような pre-clinical な症例の数を増やして統計学的方法で効果を検定する必要がある。

ま と め

1. 21例の筋疾患患者にベスタチンを2カ月から42カ月間投与しその結果について検討した。
2. 肢体型筋ジストロフィー症、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー症、筋強直性ジストロフィー症には効果は認められなかった。
3. 多発性筋炎では、臨床的にはステロイドの節約作用が認められたが、進行は阻止し得なかった。
4. Duchenne 型筋ジストロフィー症では、歩行可能者でも症状の進んでいるものは、ベスタチンの投与で CPK は低下の傾向にあるにもかかわらず、症状は進行してくるものが多かった。幼児および pre-clinical な Duchenne 型筋ジストロフィー症は長期間使用でも、臨床的な悪化はみられず、CPK も低下し、一見効果のあるようである。
5. 特別な副作用はなかった。

DMD患者に対するベスタチン服用の 臨床的検討について

三吉野 産治*

研究協力者 陳 正貴*・松金 郁郎*・板井 義男*・折口 美弘*
金子 薫*・吉田 祐三*・守田 和正*・小園 美昭*

目 的

われわれは、10歳以下の入院中の Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) 患者 6 例に、ベスタチンを投与し、血中濃度、血液生化学所見、運動機能、ADL などについて臨床的効果を検討したので報告する。

方 法

対象は DMD 患者 6 例、年齢は 5 歳から 9 歳 Stage (上田の分類) は 1 から 4 である (表 1)。ベスタチンの投与量は 20 mg/kg/日 (1000 mg/日/成人) を、7 時、13 時、21 時の 3 回に分け服用する。投与法は Single blind cross over 法で、交叉期間を 8 週間とする。つまり 8 週間ベスタチンを投与し、その後 8 週間はプラセボに変更し、再びベスタチンを 8 週間投与する (表 2)。検査は

GOT, GPT, LDH, CPK, クレアチン, クレアチニンを 4 週間ごとに、血清総蛋白, 電解質, 一般検血, 一般検尿を 4 週間おきに行った。血中濃度は 4 週, 6 週, 8 週目の朝服薬 1 時間後に採血した血清を用いて測定した。

運動機能評価として 4 週ごとに日常生活動作 (ADL: 整形外科的筋ジストロフィー症 ADL テスト, 厚生省基準), 10m 往復走行時間, 階段昇降時間, 立ち上がり時間 (立ち上がり動作をビデオ記録し, 再生画像で動作時間を 3 回測定し平均時間を求めた), 握力, 筋力を測定し指標とした。

表 2

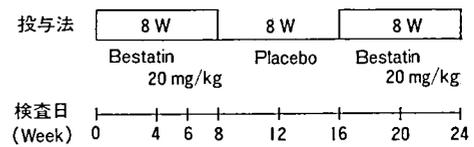


表 1

No	Name	Sex	Age (y)	Stage	Diagnosis	Weight (kg)
1	F. K.	M	9	2	DMD	19.5~21.5
2	S. U.	M	7	1	DMD	22.5~23.0
3	E. T.	M	7	2	DMD	18.0~19.0
4	M. M.	M	8	4	DMD	18.0~20.0
5	Y. K.	M	9	2	DMD	23.0~24.5
6	M. H.	M	5	2	DMD	16.5~18.5

* 国立療養所西別府病院

副作用は皮膚症状、消化器症状などの一般状態を
チェックした。

した。

血中濃度は、症例6の8週目の 17.5ug/ml を
除き、 4.95 ± 0.56 から 5.14 ± 0.39 ug/ml までに
安定な状態を保っていた。CPK では、1例はほと
んど変化しなかった。他の1例は4週目より低下
したままであった。低下後再上昇ないし上昇後再

結 果

すべてのデータは平均値の標準偏差として表示

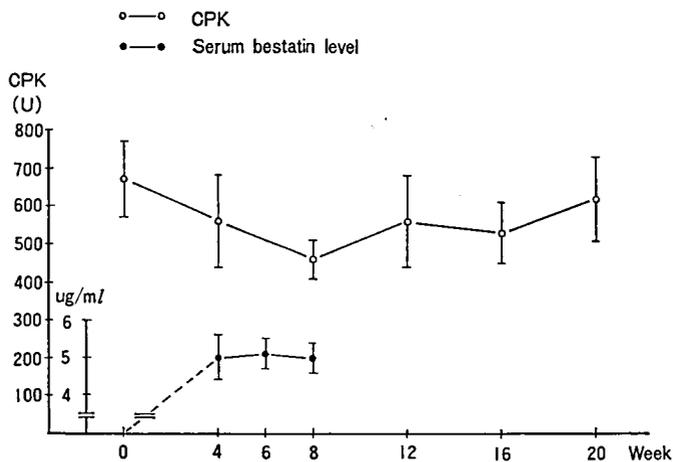


図 1 血清 CPK と血中濃度の推移 (Mean±S.E.)

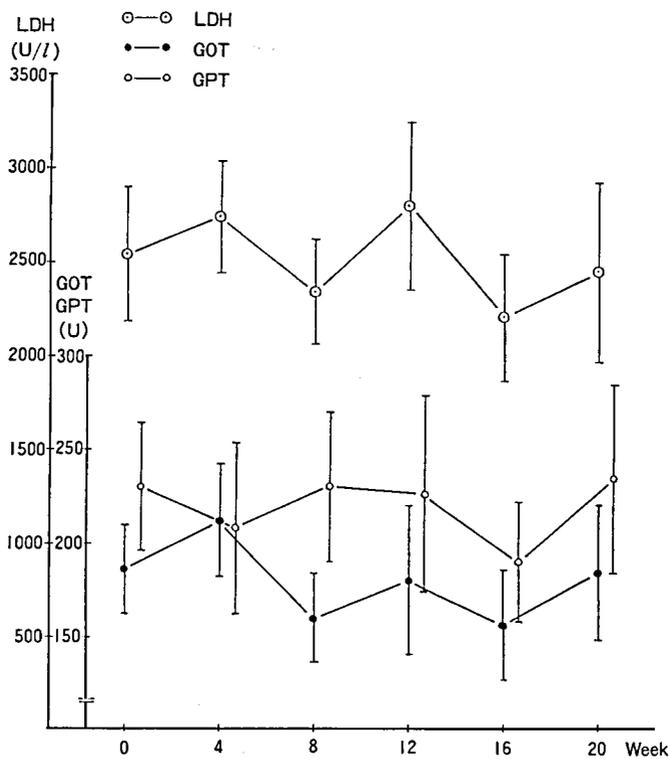


図 2 血清酵素の推移 (Mean±S.E.)

DMD患者に対するベスタチン服用の臨床的検討について

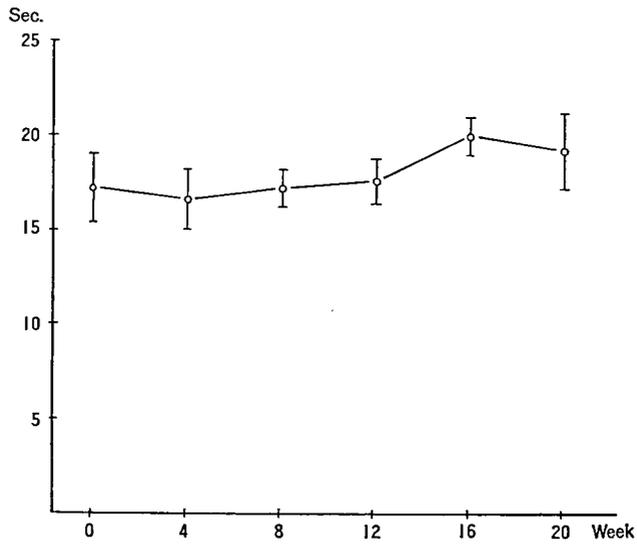


図 3 10m 往復走行時間の推移 (Mean±S. E.)

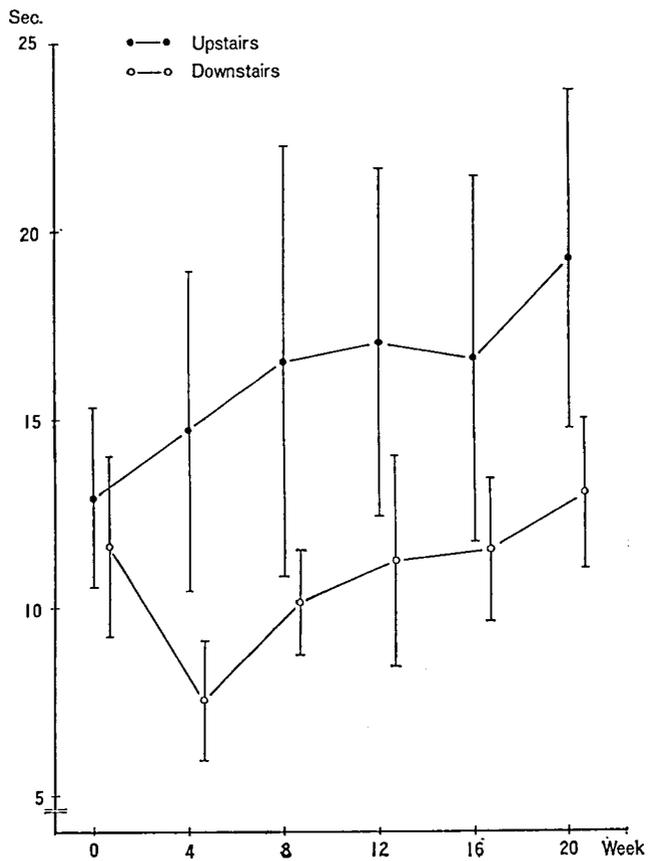


図 4 階段昇降時間の推移 (Mean±S. E.)

低下は各2例であった。平均として、ベスタチン投与前の 675.83 ± 103.92 単位から8週目の 462.00 ± 51.86 単位と低下した。プラセボに変更してから、12週目に一旦上昇し、16週目に再び低下したが、ベスタチン再投与後、20週目に 620.00 ± 110.68 単位までの上昇が見られた(図1)。血清 GOT, GPT, LDH などでは、有意的な変動はなかった(図2)。

運動機能評価については、症例3は軽度知能発

達遅延があり、ときに協力が得られにくく、症例4は途中で走行困難がすすんできて、測定値のばらつきが大きかったので、評価対象からはぶいた。

10m 往復走行時間は4週目を除き、投与前より増加した(図3)。階段昇降時間では、昇りは投与前より延長した。降りは4週目に明らかに低下し、その後次第に増加した(図4)。握力では、8週目より、左右ともにほぼ平行に変動し、全般として軽度増強があった(図5)。立ち上がり時間

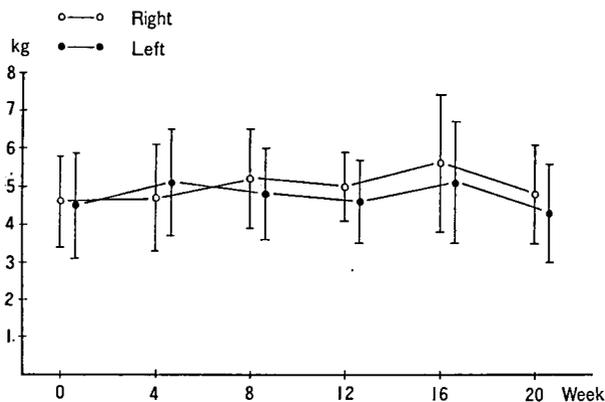


図5 握力の推移 (Mean±S. E.)

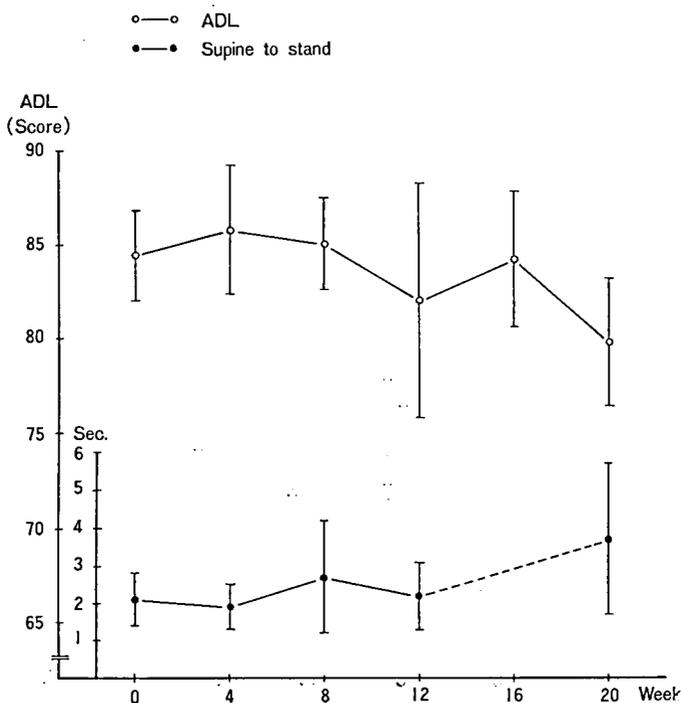


図6 ADLと立ち上がり時間の推移 (Mean±S. E.)

DMD患者に対するベスタチン服用の臨床的検討について

は4週目に若干短縮したが、以後延長する傾向にあった。ビデオ器械故障のため16週目の1回は測定しなかった。ADLは、ほぼ不変が1例、そのほか全例悪化であった。全体として、8週目までやや改善があり、その後変動しながら低下していた(図6)。

その他の血液生化学、一般検血、一般検尿では、投与前に比べて異常変化はなかった。経過中、発疹、嘔気などの副作用は認めなかった。

ま と め

今回のベスタチンの使用では、血中濃度は3回しか測定しなかったが、前回、われわれの報告したように、1日3回投与方法でほぼ安定した血中濃度が得られた。ベスタチン投与により、CPKが一時低下し、プラセボとベスタチンの再投与で上

昇傾向を示し、いわゆる反動現象が認められた。統計学的にCPKは有意差がなかったが、血中濃度の上昇にしたがって、下降してきた。臨床効果については、10m往復走行、階段からの降り、握力、立ち上がり、ADLなどは一過性に運動機能の改善が見られる例があったが、全体として運動機能が悪化する傾向にあった。またADLに対して、CPK、投与期間、投与量を用いて重回帰分析をした結果、CPKはADLに最も相関する変数であったが、5%の有意差は認められなかった。

今度の調査計画の終了は、3月中旬までの予定であり、今回は中間報告として発表する。

最後に、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。

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMP) に対する

ベスタチンの使用経験

—臨床的立場から—

福山 幸夫*

研究協力者 大沢真木子*・川井未加子*・中田恵久子*

鈴木暘子*・平山義人*・宍倉啓子*

目 的

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検討する。

対 象

東京女子医科大学小児科外来通院中の Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症(以下 DMP) 12 例(年齢 2～8 歳)および非典型的な良性 DMP 1 名(12 歳)である(表 1)。2 歳の新鮮例 1 例を除き全例投薬開始時には歩行可能であった。

方 法

1) 投与方法

ベスタチン 20mg/kg/日を 8 週間、次に偽薬を 8 週間、その後再びベスタチンを 8 週間にわたり 1 日 3 回に分けて投与するという single blind cross over 法に従った。すでにベスタチンの投与歴のある例では 2 週間以上休薬後に投与開始した。本論文の各症例の年齢はすべて今回のプロトコルによる投与開始時の年齢である。また偽薬投与後に家族が悪化を訴えてきた場合には、2～4 週間で真薬に戻して検討した。

* 東京女子医科大学小児科学教室

2) 検 査

服用前と投与開始後 4 週間ごとに採血および 1 日採尿を行い、クレアチン・フォスフォカイネース (CPK) などの血清酵素、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った。

3) 臨床評価

各運動機能所要時間(20m 走行・階段昇降・起立・起坐・寝返り)の測定および運動機能・筋力の変化について問診および診察により評価した。

結 果

今回は紙面の都合もあり、ベスタチン投与による運動機能と血清酵素の変動についてのみ記述する。また全期間の観察を終了しておらず中間報告である。

1) 血清 CPK 値(図 1)

DMP 新鮮例 5 例中 4 例では、投与開始後 4 週の時点で著明に低下していた。1 例では投与前値が比較検討に不十分な値しか得られておらず判断不能であった。使用経験を有する例では昨年報告したように初回投与開始初期には低下を示したが、今回の投与ではこの傾向は明確ではなく休薬・偽薬投与・真薬投与によりそれぞれ不定の反応を示

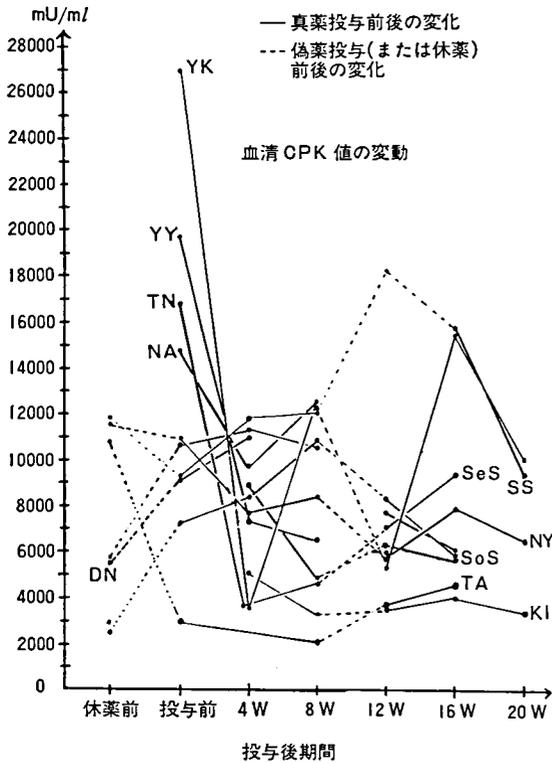


図1 血清CPK値の変動

した。

2) 各症例における投与前後の臨床的变化

A. ベスタチン使用経験を有する例

休薬前・開始前・開始後・偽薬後の変化につき検討した。数例につき記述する。

a) 症例 SS 2歳3カ月 DMP

本例は preclinical stage である1歳2カ月よりベスタチンの投与を開始、以後運動機能の獲得が漸次得られ1歳11カ月より歩行開始した症例である。休薬により下肢が細くなったという訴えがあったが、運動機能については偽薬に変更後も特に変化はなかった。

b) 症例 SeS 4歳0カ月 DMP (図2)

歩行開始1歳6カ月。2歳10カ月より3歳3カ月までベスタチンを投与したが、その後36週間休薬していた。休薬直後に運動機能は軽度低下した¹⁾が、休薬のままでもその後再び改善し、休

薬前と今回の投与開始前とで比較すると各運動所要時間はほとんど無変化であった。運動機能については、今回の投与開始後階段下降時の姿勢に改善(片手で手すりにつかまる⇒手の介助不要)がみられ、偽薬変更4週間には悪化した。また起立時間その他についても投与後軽度短縮したが、偽薬変更4週間には悪化し、特に起立所要時間が3秒延長した。偽薬は4週間のみにとどめ真薬に戻したところ、その4週後に起立・起坐時間の短縮が、8週後に階段下降時の姿勢の改善がみられた。

c) 症例 DN 6歳4カ月 DMP (図3)

5歳2カ月より使用開始していた。本例では、休薬により運動機能が悪化し、今回の投与開始後もさらに各運動の所要時間の延長および階段昇り時の姿勢の悪化がみられていた。しかしながら偽薬変更後の各運動所要時間の延長は真薬投与中よりも著明であり、また自力起立可能な状態から何か物につかまらなければ起立不能の状態へと悪化した。真薬に戻しても4週後では依然として悪化し続け、連続歩行可能距離が短縮したという訴えもあった。8週間には階段昇り時間・起立時間・起坐時間の短縮をみ、また連続歩行可能距離も延長するというように改善を示した。

d) 症例 SoS 6歳7カ月 DMP (図4)

症例2の兄。5歳5カ月より使用開始。本例では、休薬による運動機能悪化はなかった。運動機能では、偽薬後階段昇りの姿勢の悪化・起立時間の延長がみられ、真薬変更4週後に階段昇り時間はさらに延長したが、8週間にはいずれの運動所要時間も短縮し、階段昇り時の姿勢の改善(片手ですり+片手膝の状態⇒手の介助なし)を示した。

e) 症例 NY 7歳9カ月 DMP (図5)

本例では、真薬投与中も階段昇りの姿勢が悪化してきた。偽薬変更2週間後に「急な悪化」を訴えて診察予定日より早く来院した。偽薬に変更後、それまで「かろうじて一人で下校していたのが下校途中で下肢痛のため歩行不能となり、他の人に背負われて帰宅した」というものであった。その

Duchenne 型 6 歳 4 か月 ベスタチン使用経験有

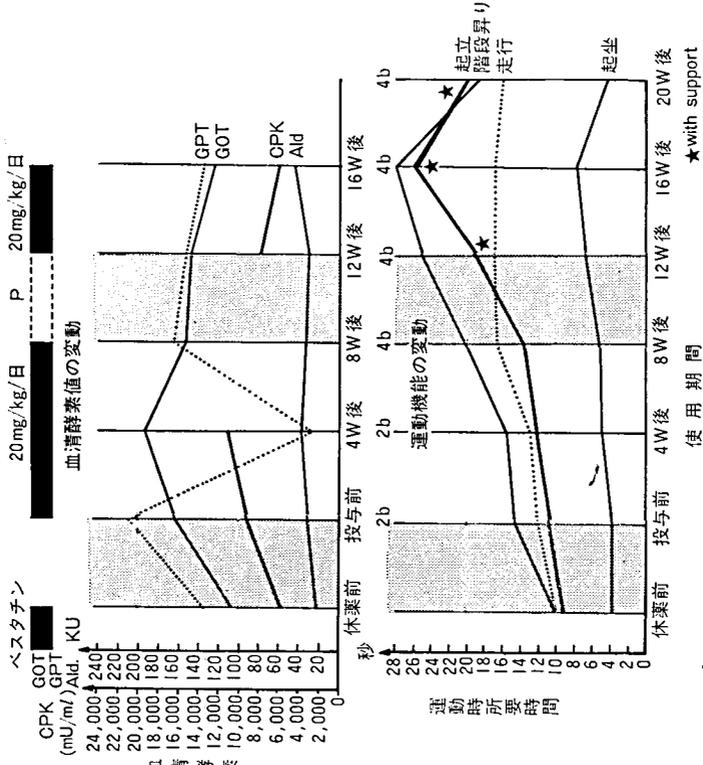
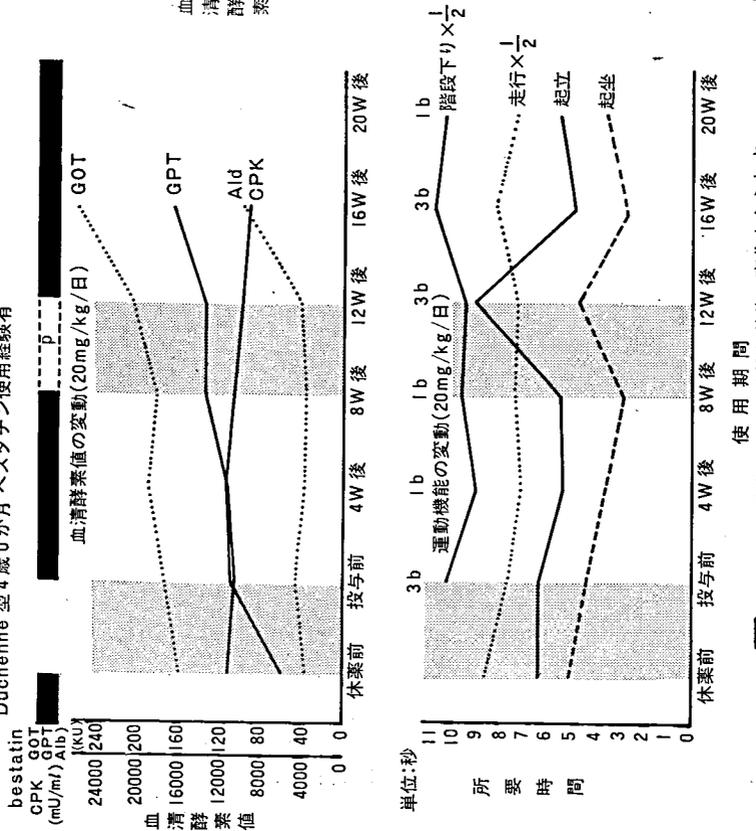


図 3 DN, 6 歳 4 か月, DMP 偽薬により悪化, 真薬変更後 4 週もさらに悪化した, 真薬変更後 8 週に改善傾向を示している例。

Duchenne 型 4 歳 0 か月 ベスタチン使用経験有



□ 休薬前後の変化または偽薬投与前後の変化をあらわす。

図 2 症例 SeS, 4 歳 0 か月, DMP

Duchenne 型 6 歳 7 か月 ベスタチン使用経験有

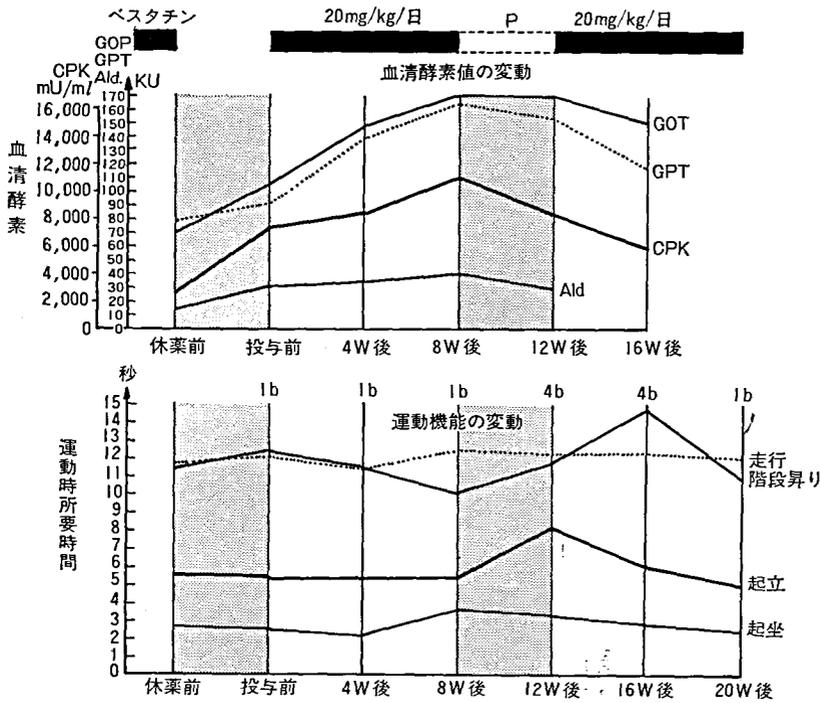


図 4 SoS, 6 歳 7 か月 DMP 偽薬後階段昇り姿勢の悪化, 真薬 4 週後では悪化し続けるも 8 週後には改善傾向を示した.

bestatin Duchenne 型 7 歳 9 か月 ベスタチン使用経験有

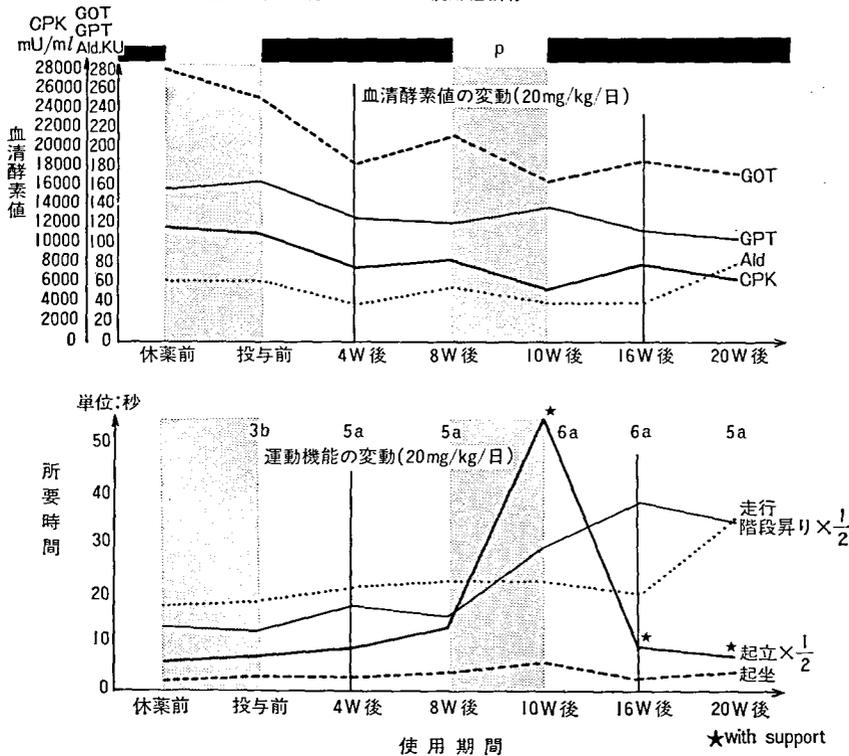


図 5 NY, 7 歳 9 か月 DMP

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMP) に対するベスタチンの使用経験

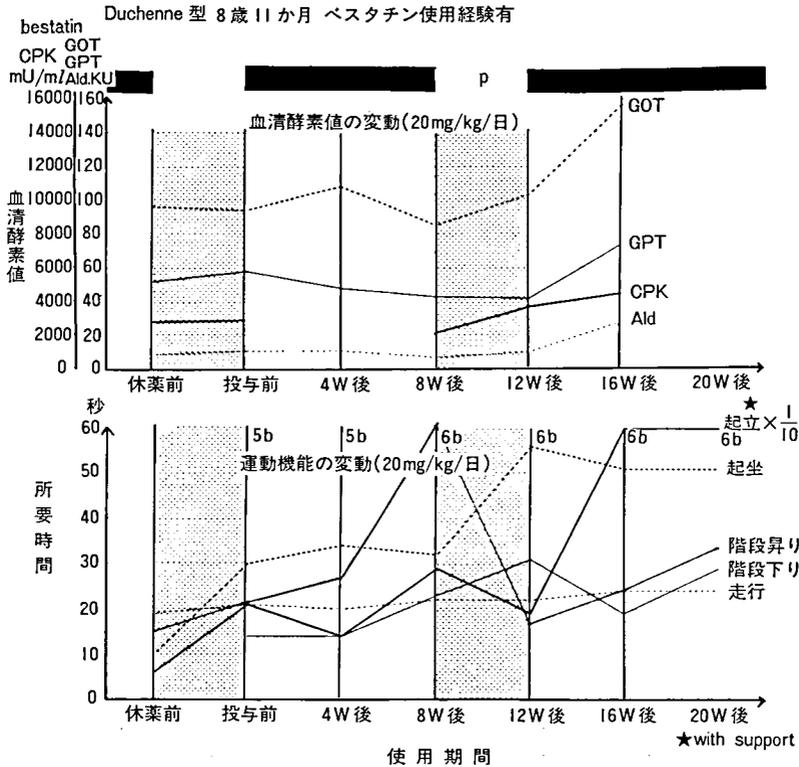


図 6 TA, 8 歳 11 か月, DMP

後は母が自転車で送迎している。運動機能でみると、偽薬変更前には自力で起立可能であったのが偽薬変更後には物につかまらなければ起立できなくなり、所要時間も著明に延長していた。2週で真薬に変更した。真薬に変更4週後8週後と起立・起坐時間は短縮傾向を示し改善を思わせたが、階段昇り時間は4週後で延長8週後で短縮、走行時間は4週後無変化8週後延長した。

f) 症例 TA 8 歳 11 か月 DMP (図 6)

休薬により運動機能の悪化がみられたが、今回の投与開始後もさらに悪化し続け、階段昇り・起立時間はむしろ偽薬変更により短縮、真薬変更後起立不能となった。階段下り・起坐時間は偽薬変更により延長、真薬変更4週後に軽度改善傾向を示している。全体としては進行している。

B. 新鮮例

2例のみ偽薬投与まで観察し得た。

a) 症例 NA 2 歳 4 か月 DMP

偽薬後の変化については未だ観察していないが、ベスタチン投与開始後立位保持可能(支持要)状態から起立(支持要)および歩行可能状態となり全経過を通じ運動機能の獲得・改善を示した。

b) 症例 YK 5 歳 3 か月 DMP (図 7)

投与後改善、偽薬後悪化、真薬再投与後改善を示した。投与開始前の各運動機能所要時間の値が得られていないが、投与開始後にそれまで不能であった縦 8~12cm の箱を飛び越えることが可能となった。また母も日常動作に活発さが出てきたと喜んでた。偽薬後4週では膝を屈曲してかろうじて 8cm の箱を飛び越えることは可能であったが、12cm の方は不能であり、母も日常動作に活発さがなくなったと訴えた。真薬再投与後4週で再び箱を飛び越えることが可能となった。各運動機能所要時間にはほとんど無変化であった。

c) 症例 TN 7 歳 11 か月 DMP (図 8)

投与開始後も軽度悪化していたが、偽薬後明ら

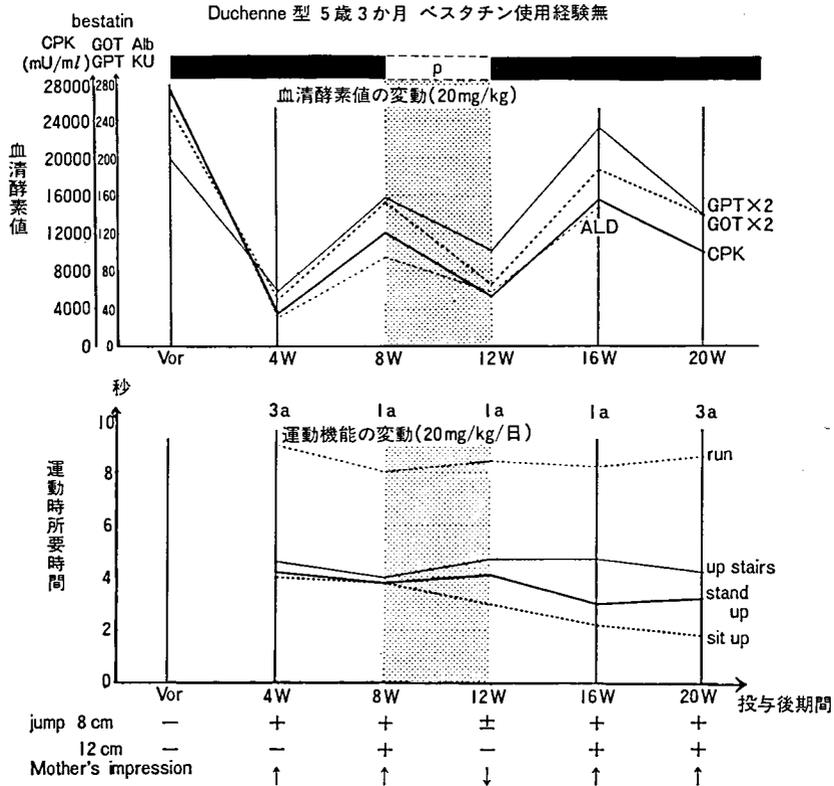


図 7 YK, 5 歳 3 か月, DMP, 箱を飛び越えることが可能となった症例。

かな悪化を示した。家人からの訴えがなかったの
で偽薬を 8 週間継続したが、4 週後・8 週後共に
悪化傾向を示していた。

3) 各運動所要時間の検討 (図 9~12)

A. 起坐所要時間

休薬による悪化が 2 例, 改善が 1 例, 無変化 2
例。

偽薬投与 4 週間後に延長を示したのが 5 例 (こ
の中真薬に変更後改善を示した例が 4 例, 1 例は
未観察), 短縮したのが 3 例 (この中真薬に変更
後もさらに短縮したのが 2 例, 悪化したのが 1 例),
無変化 1 例であった。

B. 20m 走行に要する時間

休薬による悪化が 4 例, 改善が 1 例。

偽薬投与 4 週間後に延長を示したのが 1 例 (真
薬に変更後改善), ほとんど無変化 7 例 (中 1 例

は真薬に変更 4 週間後改善を示したが 8 週間後
には悪化を示した)。

C. 起立所要時間

休薬による悪化が 2 例, 改善が 3 例, 無変化 1
例。

偽薬投与 4 週間後に延長を示したのが 5 例 (真
薬に変更後改善 4 例, 1 例は未観察), 短縮した
のが 1 例 (真薬に変更後不能となる。本例は所要
時間が長すぎるため図 11 には記入されていない),
無変化 2 例, 判定不能 1 例であった。

D. 階段昇り時間

休薬による悪化が 1 例, 改善が 3 例。

偽薬投与 4 週間後に延長を示したのが 3 例 (真
薬に変更後改善 2 例, 1 例は未観察), 無変化 4
例 (真薬に変更後改善 1 例, 無変化 2 例, 悪化 1
例)。

以上まとめてみると起坐所要時間については起

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMP) に対するベスタチンの使用経験

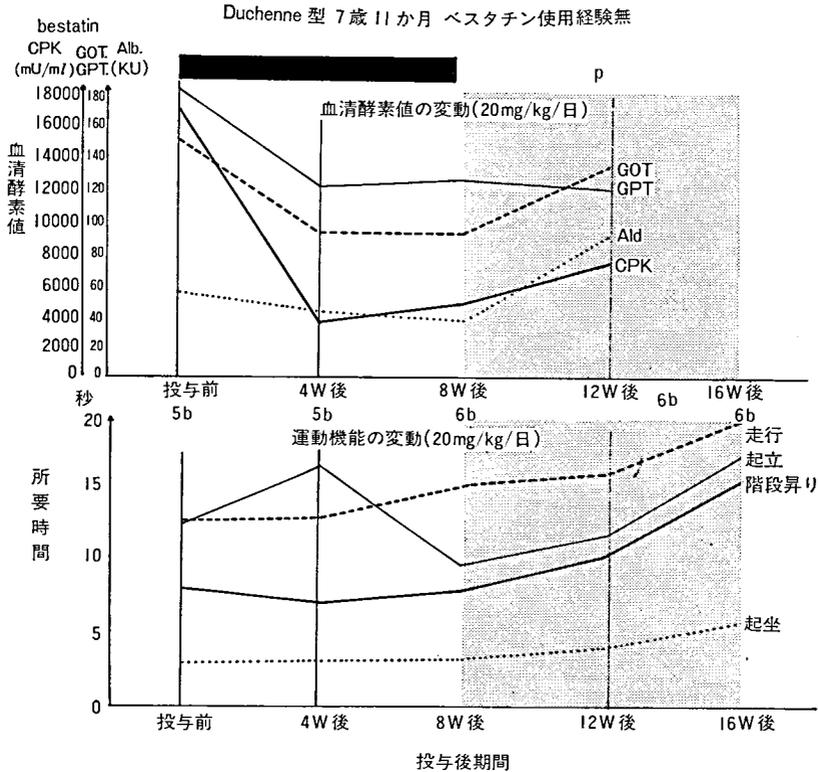


図 8 TN, 7歳 11 月, DMP

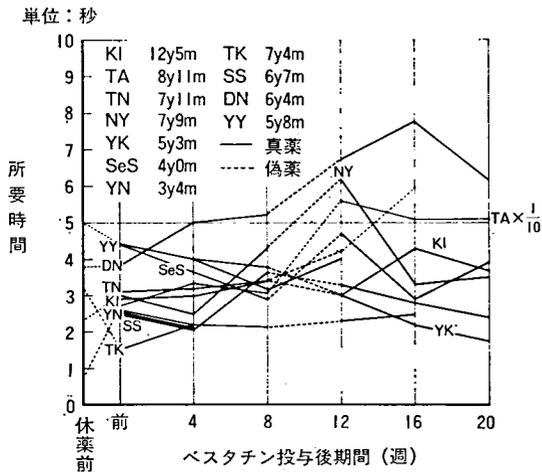


図 9 ベスタチン 20mg/kg/日使用例における起座所要時間の変化.

坐動作が容易と思われる例では真薬・偽薬に関係なく改善した。

その他の機能を全体的にみると、偽薬投与後に悪化し真薬に変更後改善を示した例が4名、真薬投与中から悪化し偽薬投与にて改善、真薬に戻し

て再び悪化した例が1例(8歳)、全経過ほとんど無変化の例が1例(良性 DMP 12歳)、投与期間が短く判定不能が3例、幼若のため運動機能判定不能が1例であった。

4) 使用経験を有する例の休業前と新鮮例の投与前の運動機能の比較(表1)

IK例は良性 DMP なので比較は不相当としても、年齢を合致させてみて使用経験を有する例の方が良好という傾向は無かった。

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

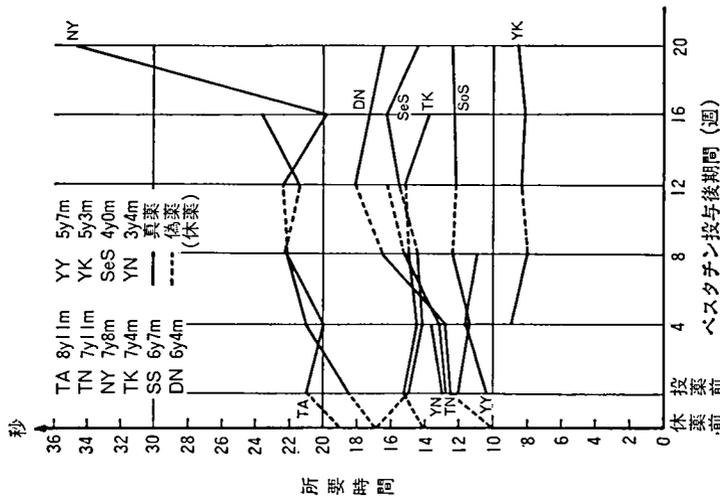


図 10 ベスタチン 20 mg/kg/日 使用例における 20m 走行に要する時間

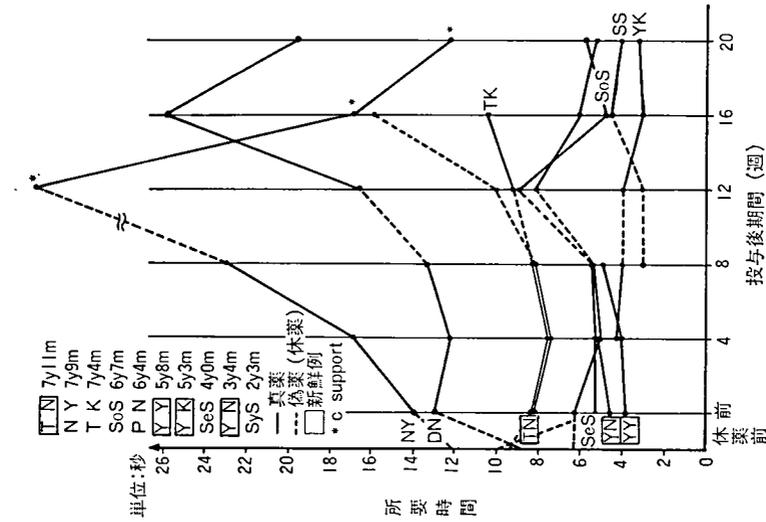


図 11 ベスタチン 20 mg/kg/日 使用例における 起立所要時間

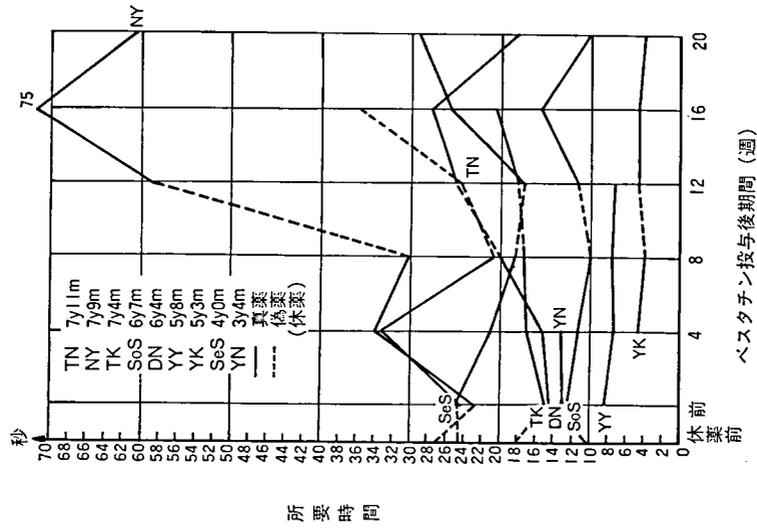


図 12 ベスタチン 20 mg/kg/日 使用例における 階段昇り時の変化

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMP) に対するベスタチンの使用経験

表 1 対象症例一覧, およびベスタチン使用経験を有する例の休業前と新鮮例の投与前の各運動機能所要時間 (秒) 比較

症例	年齢	ベスタチン 投与歴	休業期間 (週)	休業前投与 量 mg/kg/日	階段昇り 姿勢/時間	階段下り 姿勢/時間	起立	走行	起坐
K I	12Y5M†	—			6b 102.4	不能	38	212	2.9
T A	8Y11M	+	2	15	5b 169.1		56.3	18.8	9.8
T N	7Y11M†	—			5b 24.9	4b 10.8	8.2	12.7	3.1
N Y	7Y8M	+	2	15	5b 27.1		12.1	17.3	2.4
T K	7Y4M	+	2.5	15	4b 18.1	4b 8.7	9.3	14.2	3.3
S o S	6Y5M	+	4	10	1b 11.3		5.5	11.4	2.8
D N	6Y4M	+	2.5	30	2a 10.0		9.1	10.0	3.8
Y Y	5Y7M†	—			1a 8.2	1b 7.8	3.9	10.6	4.4
Y K	5Y3M†	—							
S e S	4Y0M	+	36	10	4b 24.9		6.3	17.0	5.0
Y N	3Y4M†	—			13.6	3b 14.5	4.6	13	2.6
S S	2Y3M	+	2	10					
N A	2Y4M†	—							

† fresh case 階段昇降姿勢 1. 手の介助なし 2. 手の膝おさえ 3. 片手すり { a 一段ずつ片足交互
4. 片手すり+手の膝おさえ 5. 両手すり 6. 四つんばい { b 一段ずつ両足揃え

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²⁾. 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り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³⁾.

今回のわれわれの経験では偽薬投与後に悪化・真薬による改善を示したのは, 偽薬投与後に悪化を示しても真薬後の改善を示さない症例よりも機能が良好な症例であった. このことから, より進行した症例に投与するよりも軽症例に投与する方が効果が出る可能性があると思われた. また, この場合真薬変更後 4 週ではさらに悪化しても 8 週で改善する症例があった. このことから, 一時的なリバウンドがありその後は自然に改善する可能性も考えられるが, 症例 NT では偽薬後 4 週, 8 週ともに悪化が著明となっており, 今後この症

例が真薬により改善を示すあるいはほとんど悪化しないとすれば, 偽薬 4 週後の悪化は単なるリバウンドではないと言えると思われる.

今回の治験中ベスタチン投与に関係なく悪化し, むしろ時には偽薬中の方が良い状態を示すこともあった症例 TA は, 過去の投与時には, 各運動機能所要時間の改善を示したことや, 学校の担任教師から改善の印象を報告されたこともあった症例である¹⁾. また今回新鮮例の YK はベスタチン投与後より 高さ 8cm, 12cm の箱を飛び越えることが可能となっており, それが偽薬の時には不能となり再び真薬で改善している. また一方, 血清 CPK 値も初回投与の初期には低下がみられる. 動物実験では初期効果ということが言われているが, 我々の経験でも初回投与時の反応の方が良いように思われ, ベスタチンを長期に投与すると生体の反応が変化する可能性も存在すると考えられる.

ま と め

1. ベスタチンを DMP 12 例 (新鮮例 5 例, 使用経験有 7 名), 良性 DMP 1 例に single blind cross over method にて投与した。

2. 血清 CPK 値は DMP 新鮮例 5 例中 4 例では, 投与開始後 4 週の時点で全例低下していた。

使用経験を有する例ではこの傾向は明確ではなかった。

3. 運動機能の変化は以下のごとくであった。

1) preclinical stage と思われる 2 歳の 2 例では, 使用経験を有する例も新鮮例も共に投与開始後の運動機能は上昇していた。

2) 4 歳以上の使用経験有の例では, 休薬前・開始前・開始後・偽薬後の変化につき検討した。

a) 3 例では休薬後悪化し, 投与開始後もさらに悪化, 偽薬後著明な悪化があったが, 1 例 (DN: 6 歳 4 カ月) では真薬再投与後軽度改善, 1 例 (YN: 7 歳 8 カ月) では真薬再投与後 4 週で改善 8 週で再び悪化, 他の 1 例 (TA: 8 歳 11 カ月) では 4 週も 8 週もさらに悪化した。

b) 3 例 (SeS: 4 歳 0 カ月, SoS: 6 歳 5 カ月, TK: 7 歳 4 カ月) では休薬の変化は明確でなかったが, 偽薬後悪化があり, 真薬再投与後軽度改善していた。

いずれの症例も全体の機能は a) の 3 例よりも良好であった。

3) 新鮮例では, 2 例のみ偽薬投与まで観察し得た。

a) 5 歳の 1 例は投与後改善, 偽薬後悪化, 真薬再投与後改善を示した。

b) 7 歳の 1 例は投与後も軽度悪化していたが,

偽薬 4 週後明らかな悪化を示し 8 週でもさらに悪化し続けた。

4. 使用経験の有る例の休薬前と新鮮例の投与前の運動機能を比較したが, 年齢を合致させてみて使用経験の有る例の方が良好という傾向はなかった。

以上ベスタチン投与により一時的な改善を示す例はみられたが, 著明な臨床効果の認められた例はなかった。機能低下の急速に進む 6~7 歳例では, 休薬および偽薬に変更後の悪化が服薬中よりも目立つ印象を受けた。またやや軽症の例では偽薬で悪化しても真薬投与後 4 週または 8 週で軽度改善傾向がみられた。しかしながら, 使用経験の有る例の休薬前と新鮮例の投与前の運動機能を比較し, 年齢を合致させてみた場合使用経験の有る例の方が良好という傾向は無く, 現在のところ本剤の治療効果については結論できない。

文 献

- 1) 福山幸夫, 大沢真木子, 宍倉啓子, 鈴木陽子, 陶山亜理子, 森本武彦. 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. 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, pp. 101-114.
- 2) 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 日. pp. 3-14.
- 3) 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.
- 4) 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.

血清 CPK の変動に対するベスタチンの効果

木下真男*

研究協力者 山田信興*・李延植*

馬場繁二*・川村力*

これまでのわれわれの経験および諸家の報告からみて、ベスタチン投与が筋ジストロフィー症患者の血清 CPK に影響を及ぼしている可能性が考えられる^{1,2)}。しかし、血清 CPK は種々の要素で変動することもたしかであり、ベスタチンの影響を一概に疾患そのものに対する効果と断定することも不可能である。

われわれは今回、同一症例について長期間頻回に血清 CPK を測定し、治療の効果を検討することによりこの問題に何らかの示唆を得ようと試みた。また、運動負荷が血清 CPK に大きな影響を及ぼすことも知られており³⁻⁷⁾、これとベスタチン投与との関係についても検討し、ベスタチン効果の機序を解明する手がかりを得ようと考えた。以下がその成績とあらましであり、これに若干の考察を加えた。

方法

1. 同一症例での長期検討

38 歳、Becker 型筋ジストロフィー症患者において、長期にわたって頻回に血清 CPK を測定し、ベスタチン投与による効果を統計的に検討を行った。また、投与方法の違いおよびベット上安静の有無により血清 CPK がどのように変動するかを種々の方法で検討した。

1) ベスタチン投与前および 180mg/日を維持

経過表

38 歳

1) Becker 型筋ジストロフィー症

2) 入院時

握力 右	11 kg
左	9 kg
10m 歩行	11.8 秒
階段昇り	14.2 秒

ベスタチン投与により、自他覚的に有意な変化はなかった。

3) 12/14~1/8 まで nasal polyp の手術後ベット上安静となった。

ベット上安静の間リハビリテーションは禁止し、トイレ歩行のみ可とした。

4) ベスタチン投与により 360mg/日で若干血清 CPK の低下を示したが、600mg/日では変化なく、その後の 360mg/日投与でも、有意な変化は認めなかった。

量にし、40 日間にそれぞれ 32 回、27 回の血清 CPK を測定し、投与による効果を検討した。この間、運動はリハビリテーションのための運動療法を含め日常の入院生活を行った。以下、安静時以外同様である。

2) 360mg/日、600mg/日と漸増法による血清 CPK の変化について検討を行った。

3) トイレ歩行以外は運動療法を中止し、ベット上安静にて 600mg/日投与と placebo との比較をし、さらに、同様の方法で通常の入院生活での血清 CPK の変化を比較検討した。

4) 600mg/日、360mg/日と漸減法によって血清 CPK がどのように変動するかを検討した。

* 東邦大学医学部第 4 内科

2. 運動の影響

1) 健康成人 2 名に、トレッドミルを使用して Bruce 法換算 6~8Mets 相当の運動負荷を行った。

a) 血清 CPK およびその分画を各々、運動前、運動後 1, 12, 24, 48, 72 時間に測定した。

b) ベスタチン 600mg/日を 1 週間服用後に同程度の運動負荷をかけ、a) と同様に血清 CPK を測定した。

2) 健康成人 5 名に、野球一試合前後における血清 CPK の変動を観察した。一試合中ポジションは変えず、ピッチャー、キャッチャー、セカンド、ショート、サードの 5 名に各々、試合前、試合後 6, 24 時間後に血清 CPK を測定した。

3) 運動選手(ラグビー部員) 7 名に 6~8Mets 相当の運動負荷をかけた。原則として運動負荷前に最低 5 日間はラグビーを禁止した。

a) 運動負荷前と運動負荷後 24 時間の血清 CPK を測定した。

b) ベスタチン 600mg/日を 1 週間服用後に a) と同様の検討を行った。

c) 運動負荷後の血清 CPK 上昇値がベスタチン服用の有無での影響を比較検討した。

d) 安静時ベスタチン 600mg/日を 1 週間服用後の血清 CPK を比較検討した。

成 績

1. 1) ベスタチン投与前と 180mg/日投与後の血清 CPK はそれぞれ 595.9 ± 130.1 (SD) mU/ml (以下省略) 641.0 ± 154.2 (SD) と有意差は認めなかった(図 1)。

2) 漸増法による血清 CPK の変動は、360mg/日投与で 523.0 ± 67.9 (SD) と若干の低下を示したが、その後 600mg/日投与では上昇を示した(図 1)。

3) 安静による効果では、600mg/日投与および placebo 投与での血清 CPK は、おのおの 226.3 ± 26.0 (SD), 349.2 ± 96.2 (SD) と低下を示した。しかし、その後、安静解除により血清 CPK は上昇した(図 1)。

4) 安静解除後、placebo, 600mg/日, 360mg/日の順に投与を行ったが、血清 CPK は、placebo 投与で 455.7 ± 63.8 (SD) に比べ、600mg/日投与では 546.5 ± 88.9 (SD), 360

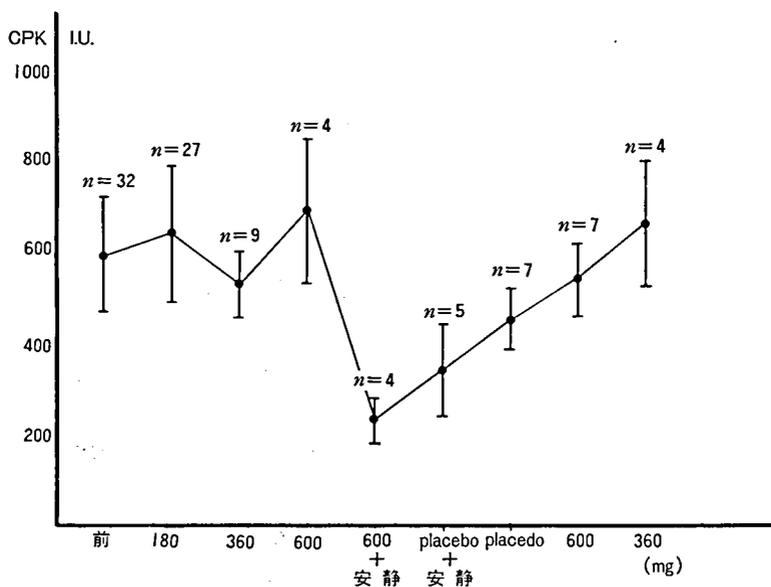


図 1 Becker 型筋ジストロフィー症患者における血清 CPK の変化

血清 CPK の変動に対するベスタチンの効果

表 1 Becker 型筋ジストロフィー症患者における血清 CPK

	非投与	投与
安静 (-)	570.8±138.8 (n=39)	623.0±181.9 (n=51)
安静 (+)	349.2±96.2* (n=5)	226.3±26.0* (n=4)

* p<0.05

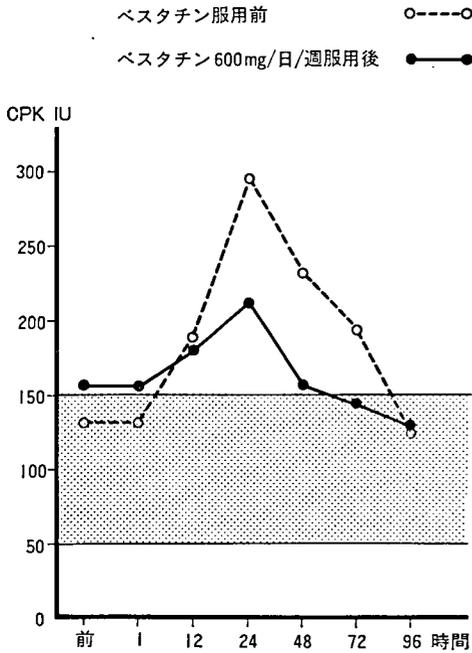


図 2 健康成人(1): トレッドミル負荷後の血清 CPK の変動

mg/日投与では 666.7±143.6 (SD) と上昇を示した(図 1)。

2. 1)-a) 健康成人 2 名に運動負荷をかけ、運動前、運動後 1, 12, 24, 48, 72, 96 時間に測定した血清 CPK の変化は、運動後 24 時間にピークを示した(図 2, 図 3)。

b) a) の 2 名にベスタチン 600mg/日, 1 週間投与後にも運動負荷後 24 時間に血清 CPK はピークを示したが, 2 名ともベスタチン服用前と比べて血清 CPK は低い傾向にあった(図 2, 図 3)。

2) 健康成人 5 名に野球一試合前後の血清

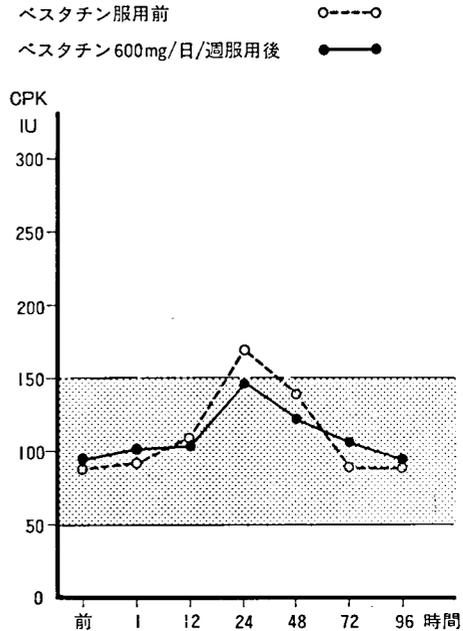


図 3 健康成人(2): トレッドミル負荷後の血清 CPK の変動

表 2 野球試合による血清 CPK の変動

	試合前	6 時間後	24 時間後
①投手	66	318	1349
②三塁手	121	442	545
③遊撃手	55	99	308
④捕手	63	201	220
⑤二塁手	35	73	203

Normal : 10-80IU

CPK を各ポジションごとに測定した結果, 血清 CPK は全員上昇し, 試合後 24 時間には試合前の 3.5 倍~20.4 倍と上昇を認めた(表 2, 図 4)。

3) a)b) ベスタチン服用, 非服用時ともに, 運動負荷後血清 CPK は有意に上昇を示した(図 5)。

c) ベスタチン非服用時血清 CPK 上昇値の平均は, 51.0±5.68 (SE) であり, ベスタチン服用時では, 28.6±4.20 (SE) であった。ベスタチン服用時には非服用時に比べ, p<0.025 で運動負荷後の血清 CPK の上昇を抑制

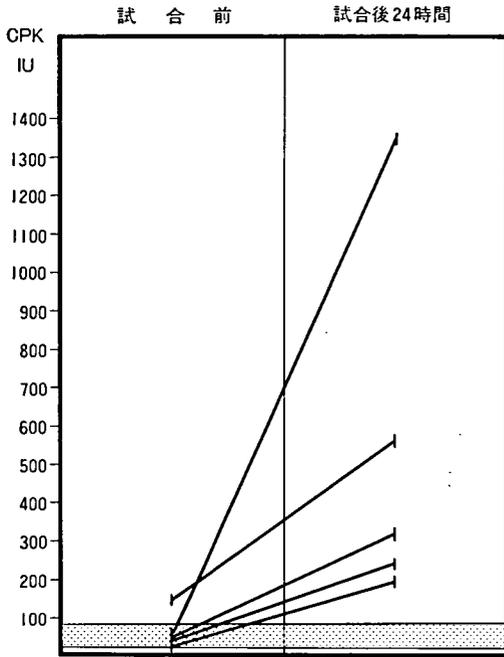


図 4 野球試合による血清 CPK の変動

した (表 3)。

d) 安静時血清 CPK は、ベスタチン服用による影響はうけなかった (表 4)。

考 按

従来より血清 CPK は、運動負荷により上昇す

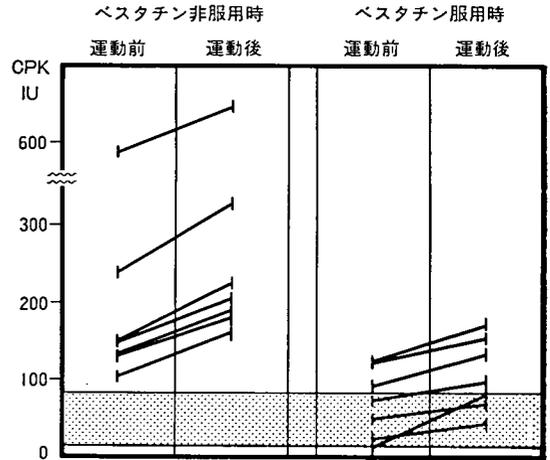


図 5 ラグビー部員における運動前後の血清 CPK の変動およびベスタチン投与による影響

ることが知られており、今回われわれも健康成人においてトレッドミル負荷、野球試合、ラグビーのトレーニングにより血清 CPK が上昇することを確認し、そのピークは筋肉痛を認める時期とほぼ相関して運動負荷後 24 時間であった。

また、筋疾患患者において、ベスタチンが血清 CPK を低下させる報告もあり、今回われわれは、39 歳の Becker 型筋ジストロフィー症患者に種々のベスタチン投与方法および安静の有無による血清 CPK の変動をみたが、前述のごとくベスタチ

表 3 ラグビー部員における運動前後の血清 CPK の変動およびベスタチン投与による影響

	ベスタチン非服用時の CPK			ベスタチン服用時の CPK		
	運動前	運動後	CPK 上昇値	運動前	運動後	CPK 上昇値
1	238	321	83	122	150	28
2	132	179	47	50	69	19
3	104	154	50	26	48	22
4	592	638	46	123	175	52
5	145	194	49	96	122	26
6	145	195	50	78	100	22
7	132	174	42	45	76	31

Normal : 10-80IU

{	ベスタチン非服用時 運動前	{	ベスタチン服用時 運動前
	213.0 ± 65.2 (S. E.)		77.0 ± 13.8 (S. E.)
{	ベスタチン非服用時 運動後	{	ベスタチン服用時 運動後
	265.0 ± 36.1 (S. E.)		106.0 ± 17.4 (S. E.)

血清 CPK の変動に対するベスタチンの効果

表 4 安静時におけるベスタチンの影響：ラグビー部員

	ベスタチン服用前	600mg/日/週服用後
1	59	122
2	101	50
3	71	26
4	91	123
5	128	96
6	69	78
7	43	45

Normal : 10-80IU

服用前	服用後
80.0±11.0 (S. E.)	77.0±15.0 (S. E.)

ン 600mg/日投与時ばかりでなく placebo 投与時においてもベット上安静で血清 CPK が有意に低下し (表 1), 安静解除後ベスタチン 600mg/日を投与しているにもかかわらず, 血清 CPK は上昇を示した. このことから, 血清 CPK の変動には安静の有無が大きな要素を有していることがわかった.

今後, ベスタチン投与による影響を判定するにあたって, 血清 CPK を指標とする場合には, 運動量も検討しなければならないと思われる.

次に, 運動による血清 CPK の上昇にベスタチンがどのような影響を及ぼすかという点に関しては, ラグビー部員のトレーニングの結果からも明らかとなり, ベスタチンにより運動後の血清 CPK 上昇は抑制される傾向にあった. この機序に関しては未だ明確な解答は得られていないが, 可能性の1つとしては, 筋線維膜の安定化が考えられる. すなわち, ベスタチンの血清 CPK 低下

作用には, 疾患そのものに対する効果の他に, 非特異的な膜安定作用も関与している可能性が示唆される.

結 語

1. ベスタチンの筋ジストロフィー症患者の血清 CPK に与える影響について検討し, 運動負荷による影響と比較した.
2. ベスタチンは, 運動負荷後上昇する血清 CPK に対して抑制的な作用を有する.

参 考 文 献

- 1) 村上慶郎他. 2, 3の筋萎縮症患者に対するベスタチンの効果. 厚生省, 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 (梅沢班) 報告書. 昭和59年3月. p. 89.
- 2) 里吉栄二郎. 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. 厚生省, 梅沢班報告書, 昭和59年3月. p. 131.
- 3) Remmers, A. R. & Roljot, M. V. Serum transaminase levels effect of strenuous and prolonged physical exercise on healthy young subjects. *J. A. M. A.*, **21**, 968 (1963).
- 4) Schlang, H. A. & Rirkpatrick, C. A, The effect of physical exercise on serum transaminase. *Amer. J. Med. Sci.*, **242**, 338 (1961).
- 5) 山崎芳徳他. 長距離走者における血清 CPK 値の検討. 日内会誌, **64**, 1303 (1975).
- 6) 大村一郎, 小泊好幸他, 運動選手と血清 CPK 値, 医療. **31**, 37 (1977).
- 7) Siegel, A. J. & Silverman, L. M., et al. Elevated skeletal muscle creatine kinase MB isoenzyme levels in marathon runners. *J. A. M. A.*, **250**, 2385 (1983).

Duchenne 型筋ジストロフィー患者に対する ベスタチンの影響

—新しい筋障害の marker を用いて—

祖父江 逸郎*

研究協力者 陸 重雄**・空野謙次***・印東利勝***・加藤兼房****

はじめに

進行性筋ジストロフィー（以下 PMD と略す）患者に対する蛋白分解酵素阻害剤の効果に関しては多大な注目を集めながらも明確な結論が得られないまま今日にいたっている。これまでの経験を通じ、薬効を検討するうえで重要な問題がいくつか存在することを指摘したい。第1に PMD 患者に薬剤の投与を開始する時期、投与量・方法などもっぱら治療方法に関する問題、第2として評価方法をどうするかという問題である。前者については、発症早期に大量投与するという方向が本班で示されており、当面大きな障害はないようである。後者に関しては血清 CK 活性値などの検査所見と実際の運動機能との二者があげられるが、血清 CK 活性値などの酵素は変動が大きく、運動機能は発達の影響があり、また鋭敏でないなどいずれも問題をかかえている。われわれはこのような短所を了解したうえで、より鋭敏であると思われる血清酵素の評価を中心にして薬剤の影響をみてきた。

最近、骨格筋障害の指標として、従来最も信頼性が高いとされてきた血清 CK 活性値のほかに同

等またはそれ以上の優れたマーカーとなり得る酵素の存在が報じられている¹⁻³⁾。当教室でもこれらの酵素を測定し血清 CK 活性値と比較検討した結果、極めて有用性の高いことがわかってきたので、薬効判定に利用することを考え、muscle specific enolase（以下 MSE）について昨年本班会議で発表した。本年はさらに carbonic anhydrase III（以下 CA-III と略す）も加え、これら酵素に対するベスタチンの影響をみた。

ここではまず CA-III の PMD 患者における特徴を紹介し、ついでベスタチン投与によって血清 CK 活性値、MSE、CA-III などの値がどのような影響を受けるか報告する。

対象と方法

1. PMD 患者における血清 CA-III

PMD 患者 143 例（Duchenne 型 104 例、肢帯型 19 例、顔面肩甲上腕型 11 例、先天型 9 例）、年齢 4~61 歳（平均 20.1±11.7 歳）、男 129 例、女 14 例を対象として、EIA 法によって血清 CA-III を測定した。同じ検体を用い CK 活性値、MSE を測定し、CA-III と比較検討した。対照として性と年齢をマッチさせた 54 名の正常人または非神経筋疾患々者（年齢 5~55 歳、平均 20.4±12.3 歳、男 49 例、女 5 例）について同様に CA-III を測定した。

* 国立療養所中部病院

** 名古屋大学医学部神経内科。現在 藤田学園保健衛生大学医学部神経内科

*** 名古屋大学医学部神経内科

**** 愛知県心身障害者コロニー生化学部門

2. Duchenne 型 PMD 患者に対するベスタチン投与の影響

対象は 10 例の Duchenne 型 PMD 患者で年齢 5~14 歳，全例歩行可能であり，このうち 6 例は階段昇降も可能。ベスタチンは，カプセルまたはドライシロップ剤を用い体重 1 kg あたり 20 mg を 1 日 3 回毎食後に分服させた。8 週間連続投与し，その後さらに 8 週間 placebo を同量 single blind 法で投与し，合計 16 週間観察した。

評価項目として，血清 CK，MSE，CA-III のほか，当班臨床分科会で決められた一般血液生化学・末梢血・尿，運動機能に関する諸種目を採用，血清 CK，MSE，CA-III については二週間に一度，その他の項目については 4 週間に一度評価した。血液の採取は，筋運動による各酵素の変動をさけるために早朝覚醒時とした。

結 果

1. PMD 患者における血清 CA-III

1) PMD 患者の血清 CA-III の値は，Duchenne 型 13.0~1250 ng/ml (243±228 ng/ml，平

表 1 進行性筋ジストロフィー (PMD) 患者の血清 CA-III 値

Diagnosis	No.	CA-III (ng/ml)	
		Range	Mean±SD
Controls	54	2.1~24.8	9.9±5.3
Duchenne type	104	13.0~1250	243 ±228*
LG	19	9.2~333	83.1±80.0*
FSH	11	13.5~58.8	26.1±14.2*
Congenital	9	43.5~310	171 ±105*

* $P < 0.001$

均 ±SD，以下同様)，肢帯型 9.2~333 (83.1±80.0) ng/ml，顔面肩甲上腕型 13.5~58.8 (26.1±14.2) ng/ml，先天型 43.5~310 (171±105) ng/ml，であるのに対し，対照群では 2.1~24.8 (9.9±5.3) ng/ml であった (表 1)。

2) PMD 患者の血清 CA-III と CK，MSE との相関を調べた。CA-III と CK の相関係数は $r = 0.8471$ ($p < 0.001$)，同様に CA-III と MSE では $r = 0.7818$ ($p < 0.001$) といずれも高い相関を示した (図 1, 2)。

3) PMD 患者の病型別に血清 CK，MSE，CA-III の異常値の出現率をみた (表 2)。CA-III は CK，MSE に比べ異常値の出現率が同等また

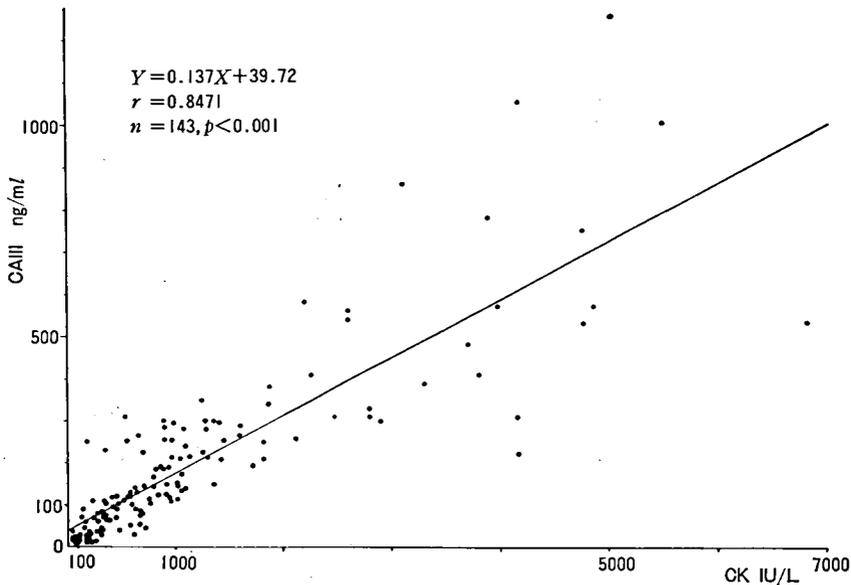


図 1 PMD 患者の血清 CK 活性値と CA-III 値の相関。

Duchenne 型筋ジストロフィー患者に対するベスタチンの影響

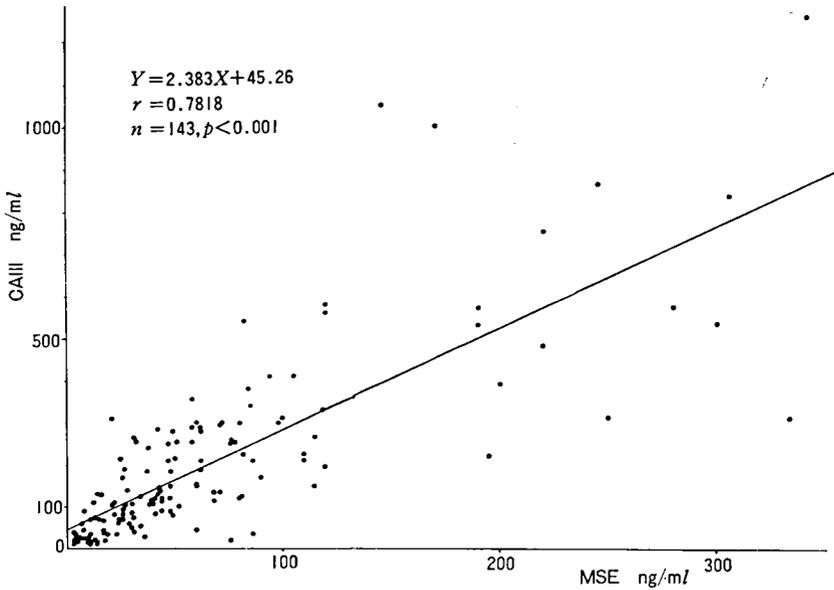


図 2 PMD 患者の血清 MSE 値と CA-III 値の相関。

表 2 PMD 患者の病型別にみた血清 CK, MSE, CA-III の異常値出現頻度。

Type	No.	No. (%) with elevated serum levels of		
		CA-III	CK	MSE
Duchenne	104	101 (97%)	101 (97%)	96 (92%)
LG	19	15 (79%)	14 (74%)	11 (58%)
FSH	11	7 (64%)	3 (27%)	2 (18%)
Congenital	9	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)

は高頻度であったが、有意に高率というわけではなかった。

2. Duchenne 型 PMD 患者に対するベスタチン投与の影響

1) 血清 CK 活性値, MSE 値, CA-III 値の変化

a) 血清 CK 活性値：ベスタチン投与により次第に下降傾向をとり、第 6 週 (3278 ± 1856 IU/L) では投与前 (4004 ± 1863 IU/L) に比べ有意に低値を示した ($p < 0.01$) が、最終の第 8 週 (3291 ± 1845 IU/L) では有意な低下を示さなかった。Placebo にしてから 4 週間目 (通算第 12 週) で CK 活性値は上昇 (4430 ± 1893 IU/L)、ベスタチン

終了時の第 8 週に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。しかしその後は再び下降した (図 3)。

b) 血清 MSE 値：ベスタチン投与により特に下降傾向を示さず、ほぼ横ばい状態であったが、placebo に変更してから上昇し、4 週目 (通算第 12 週) で最高値 (189 ± 116 ng/ml) に達し、ベスタチン投与第 8 週目の値 (122 ± 84 ng/ml) に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。その後は CK 活性値同様下降した (図 3)。

c) 血清 CA-III 値：MSE 同様、ベスタチン投与による有意な下降はみられなかった。しかし placebo に変更後は前 2 者同様上昇し、第 4 週目 (通算第 12 週) の値 (509 ± 207 ng/ml) はベスタチン終了時の第 8 週目の値 (295 ± 119 ng/ml) よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。その後は前 2 者同様下降した (図 4)。

以上の血清酵素の変化に対応させ、各例の運動機能をみると、ベスタチン投与により明らかな改善が得られた例はなかった。全体的に悪化したものの 3 例、部分的悪化 2 例、ほぼ不変 5 例であった。

d) 機能障害の特に軽い 6 例の検討：臨床症状が軽い患者の方がベスタチンの効果が得られやす

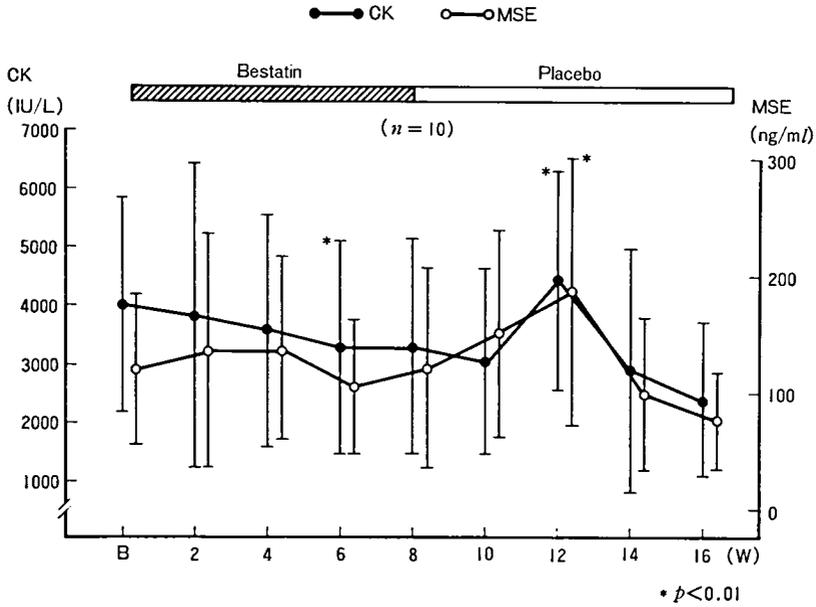


図 3 ベスタチンおよび placebo 投与による血清 CK 活性値と MSE 値の推移.

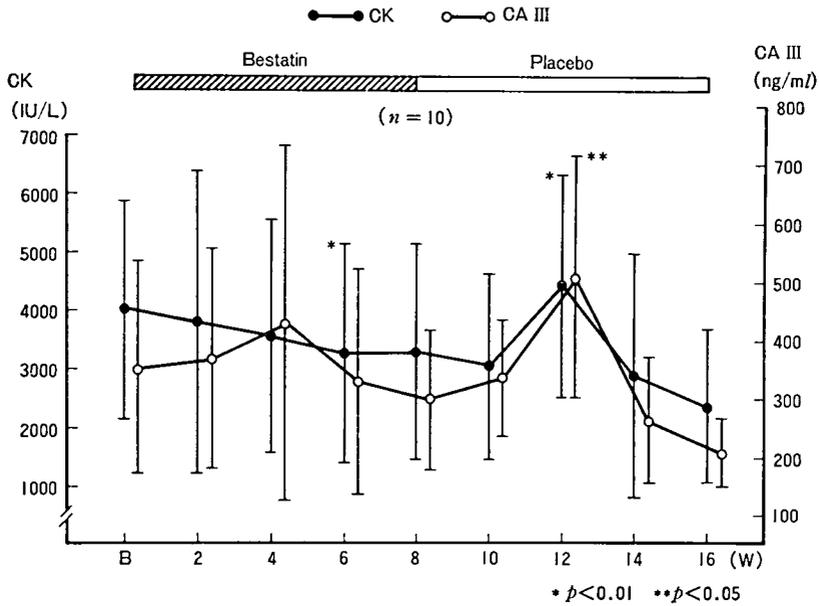


図 4 ベスタチンおよび placebo 投与による血清 CK 活性値と CA-III 値の推移

いであろうとの仮定に立って、10例の中から階段昇降の可能な6例を選び出し、同様の検討を行った。ベスタチンを投与した8週間では、3種類のいずれの酵素とも有意な変化を示さなかった。しかし、placeboに変更後4週目(通算12週)で

は全例で検討した時同様いずれの酵素も有意に高い値を示した。すなわち血清CK活性値は、第8週 4058 ± 1930 IU/L, 第12週 5518 ± 1474 IU/L と後者で高値 ($p < 0.05$), 同様に MSE 値は、各々 143 ± 96 ng/ml, 243 ± 115 ng/ml ($p < 0.01$),

Duchenne 型筋ジストロフィー患者に対するベスタチンの影響

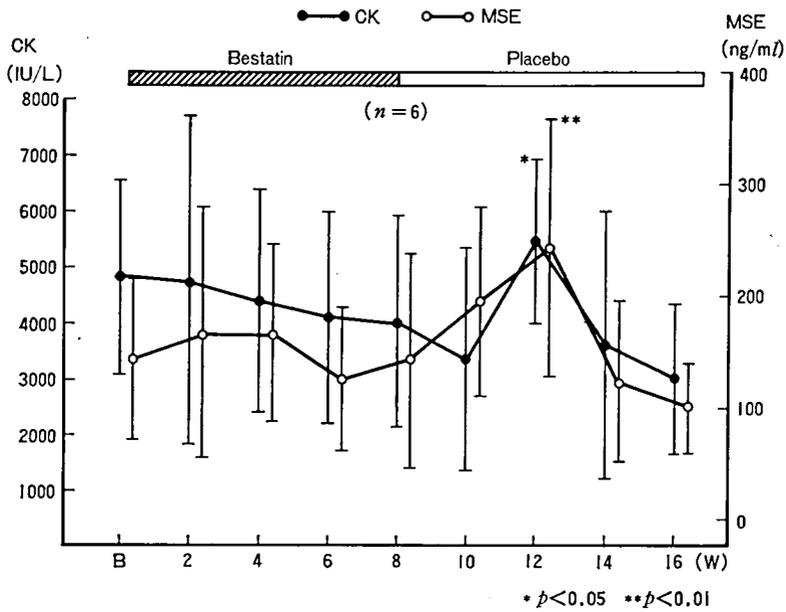


図 5 (a)

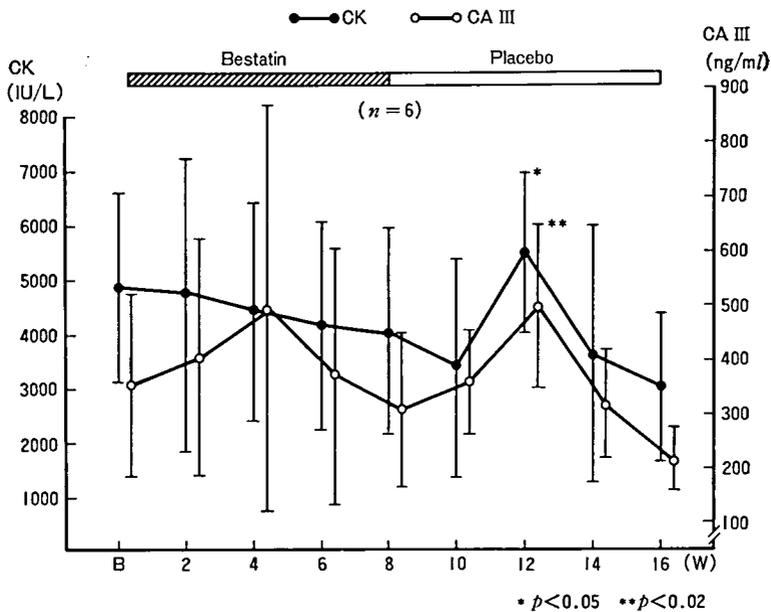


図 5 (b)

図 5 階段昇降の可能な 6 例の患者でみられた各酵素の推移。
a: CK と MSE, b: CK と CA-III.

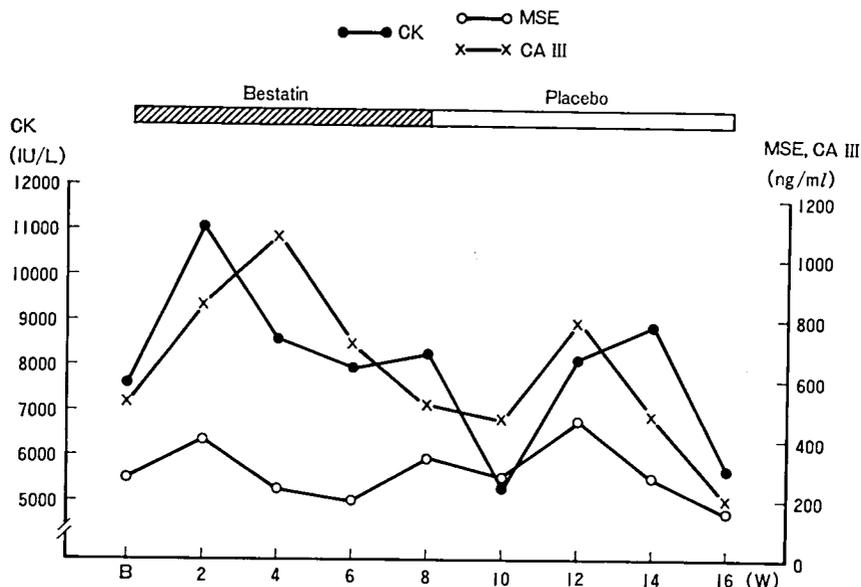


図 6 5歳, 男児でみられた各酵素の推移.

CA-III 値は $312 \pm 143 \text{ ng/ml}$, $500 \pm 154 \text{ ng/ml}$ ($p < 0.02$) であった (図 5 a, b).

特記すべき副作用は認められなかった.

最後に今回の対象中最も症状の軽かった5歳の患者の経過を示す. 血清CK活性値はベスタチン投与開始後2週間でいったん著しい高値を示し, 以後は投与前値よりやや高いまま横ばい, placebo変更後いったん下降しその後上昇をつづけ第16週で下降するという経過をとった. 血清MSE値は上昇下降を示しながらもほぼ横ばいの状態であった. 血清CA-III値は, 投薬後4週目まで上昇, その後第10週目まで下降傾向を示したが, ベスタチン終了時の第8週目でも投与前値とほぼ同様であった (図6). この間患者の運動機能は明らかな改善も悪化も示さず, ほぼ不変と判定された.

考 察

近年, carbonic anhydrase には I, II, III 型のアイソザイムが存在し, そのひとつである III 型 (CA-III) は骨格筋に多く存在することが明らかにされた^{4,5)}. この CA-III の大きな特徴として, CK や MSE と異なり心筋には微量しか存在しないこと, MSE が主に骨格筋の type II 線維に存在するのに対し, CA-III は主に type I 線維に局在する, という2つの点があげられる⁴⁻⁶⁾. 最近各種神経筋疾患患者の血清 CA-III が測定され, 本酵素が血清 CK 活性値に相当するまたはそれ以上の鋭敏さをもつ筋障害の指標となり得るとの報告がある^{2,3)}. 今回, われわれが PMD 患者を対象として CK, MSE と比較した結果では, CA-III は異常値の出現率では CK, MSE と大体同程度であり, これら酵素との相関も高く, 骨格筋障害の指標として極めて有用性が高いと考えられた.

2) 副作用

ベスタチンの剤形はカプセル, ドライシロップの2種類を用いたが, いずれでも食欲不振・胃部不快感などの胃腸障害をはじめ, 特記すべき副作用は自覚的にも他覚的にも認められなかった.

また一般血液生化学, 末梢血, 尿の諸検査でも,

次に, ベスタチン投与による各酵素の動きをみ

ると、血清 CK 活性値は次第に下降傾向をとり、第 6 週のみであるが有意な低下を示し、さらに、placebo に変更後再上昇するという一見リバウンドが生じたとも解釈される経過をとった。このような CK の変化が何によってもたらされたか説明することは必ずしも容易ではないが、ひとつの考え方として筋崩壊が抑制された結果と推測することも可能であろう。ただその際、placebo の投与継続で CK が投薬前よりもさらに低値を示すにいたった点は大きな疑問として残る。また運動機能の改善がこれと平行してあるいは遅れて得られなかった点も問題であるが、血清 CK 活性値の低下した程度が大きくない点からして、8 週間という短期間では当然の結果かもしれない。

血清 MSE, CA-III とも比較的 CK に近い動きを示したのみで、ベスタチン投与によって何ら特別な変化をとることはなかった。両酵素ともベスタチン投与期間中の 8 週間では有意な低下を示さなかったが、CK 同様、placebo にして 4 週目に有意に高い値をとりその後下降するという態度をとった。今回の結果を通じ、ベスタチン投与に対する効果判定の有用性という観点から CK と MSE, CA-III とを比較してみると、ベスタチンによってこれら新しい筋障害のマーカーが CK と異なった影響を受けたとは思われず、全体の動きなどをみても CK 以上の価値をもつとは考え難い。したがって、今後ベスタチンの効果判定にこれらの酵素を用いていくことには積極的な意味がないと思われる。

最後に、本研究ではベスタチンを 1 日 20 mg/kg と大量に投与したが 8 週間では自覚的ならびに諸検査のうえで特に問題とすべき副作用は認められず、安全性の高いことがあらためて確認された。ここに発表したのはベスタチン 8 週間、placebo 8 週間の結果であるが、ひきつづきベスタチンの再投与を実施しており、今後いかなる結果が得られるか、その展開に期待したい。

ま と め

1. 血清 carbonic anhydrase III (CA-III) の値を PMD 患者で測定し、血清 CK 活性値、muscle specific enolase (MSE) 値と比較した結果、CA-III は CK, MSE と同等の筋障害の指標となることが示された。

2. 10 例の歩行可能な Duchenne 型 PMD 患者にベスタチンを大量投与 (20 mg/kg/日) して、本剤の影響を種々の項目で評価した。

1) 血清 CK 活性値はベスタチン投与によって下降傾向を示し、placebo に変更後 4 週間で有意に高い値をとった。

2) 血清 MSE, CA-III の値はベスタチンによって有意な変化を示さなかったが、CK 同様 placebo に変更して 4 週目で高値を示した。

3) 血清 MSE, CA-III はベスタチンによって CK と類似の変化を示し、これらが CK 以上の価値を薬効判定上もつとは考えられなかった。

4) 血清酵素の変化に伴う運動機能の明らかな改善または悪化は認められなかった。

5) 特記すべき副作用はみられなかった。

文 献

- 1) Mokuno K, Riku S *et al*: Serum muscle-specific enolase in progressive muscular dystrophy and other neuromuscular diseases, *J. Neurol. Sci.* **63**, 345 (1984).
- 2) Carter ND, Heath R *et al*: Carbonic anhydrase III in Duchenne muscular dystrophy, *Clin. Chim. Acta.* **133**, 201 (1983).
- 3) Heath R, Schwartz MS *et al*: Carbonic anhydrase III in neuromuscular disorders, *J. Neurol. Sci.* **59**, 383 (1983).
- 4) Tipler TD, Edwards YH *et al*: Developmental changes in the protein profiles of human cardiac and skeletal muscle, *Ann. Hum. Genet.* **41**, 409 (1978).
- 5) Kato K and Mokuno K: Distribution of immunoreactive carbonic anhydrase III in various human tissues determined by a sensitive enzyme immunoassay method, *Clin. Chim. Acta.* **141**, 169 (1984).

6) Shima K, Tashiro K *et al*: Carbonic anhydrase III immunohistochemical localization

in human skeletal muscle, *Acta. Neuropathol*, **59**, 237 (1983).

筋ジストロフィー症に対する NK 421 (Bestatin)

長期投与後の経過報告

里吉 栄二郎*

研究協力者 富 英明*

昭和 56 年より各種筋ジストロフィー症に対し NK 421 (Bestatin) を経口投与し臨床経過を観察してきた。今回、約 4 年にわたる投与中の臨床症状、血液化学的变化につき報告する。

対 象

対象は、昭和 60 年 3 月現在まで経過観察を続けている筋ジストロフィー症の 9 例である。内訳は、肢帯型筋ジストロフィー症 (LG-PMD) 5 例、(男 3, 女 2), 年齢 37~54 歳, 罹病期間 17~27 年, NK 421 投与期間 27~45 カ月。顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー症 (FSH-PMD) 2 例、(男 1, 女 1), 年齢 29, 50 歳, 罹病期間 17, 33 年, NK 421 投与期間 20, 43 カ月。Duchenne 型筋ジストロフィー症 (Duchenne-PMD) 2 例、(男 2) 年齢 1, 10 歳, 罹病期 6 年, 他の 1 例は、CPK 値のみ高値の Subclinical な例である。NK 421 投与期間は、7, 20 カ月 (表 1)。

方 法

NK 421 投与は、少量より漸増し、消化器症状などの副作用を監視しながら、症例に応じ、1 カ月単位で漸増した。途中、副作用と思われる症状が出現した場合は、減量あるいは、一時中止し様子観察後、再開、増量した。昭和 60 年 3 月現在での最高投与量は、1000 mg/日 1 例, 900 mg/日 3 例, 800 mg/日 1 例, 500 mg/日 2 例, 240 mg/日 1 例, 200 mg/日 1 例である。(表 2)

これら 9 例の NK 421 投与開始からの全投与期間は、7~45 カ月で平均 32.7 カ月である。

臨床効果判定には、原則的に 1 カ月間隔で 10m 歩行、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、これらより総合的臨床評価を行った。同時に、午前中一定時刻での安静時血清 CPK 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

表 1 対 象

	M/F	年齢 (歳)	罹病期間 (年)	最大投与量 (mg/日)	投与期間開 始よりの月数
1. 肢帯型筋ジストロフィー症 (LG PMD)	3/2	37~54	17~27	500~1000	27~45
2. 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー症 (FSH PMD)	1/1	29, 50	17, 33	200, 800	20, 43
3. Duchenne 型筋ジストロフィー症 (Duchenne PMD)	2/0	1, 10	6,	240, 900	7, 20
			1 例は、Subclinical		

* 国立武蔵療養所神経センター

表 2 最大投与量

最大投与量(mg/日)	例数
1000	1
900	3
800	1
500	2
240	1
200	1
計 9 例	

表 3 測定項目

1. 10m 歩行時間
2. 階段 11 段昇降時間
3. 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, 前銘筋, 広背筋, 上腕二頭, 三頭筋, 腕橈骨筋, 手関節筋, 握力, 腸腰筋, 大腿内転, 外転筋, 大腿四頭筋, 大腿屈筋, 前脛骨筋, 下腿三頭筋
4. 体重
5. 自覚症状
6. 副作用
7. 血液 RBC, WBC, Hb, Plt., CPK, Aldolase, ESR, T. P., T. Bil., GOT, GPT, LDH, Al-p, BUN, CRNN
8. 尿蛋白

平均値との比をとった。(表 3)

この比が, 1 より小さくなれば, CPK 値が低下したことになる。

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, CRNN を, 尿より尿蛋白を測定した。

結 果

9 例の NK 421 長期投与後の経過を表 4 にまとめた。臨床的改善を示した例は 1 例もなく, subclinical な Duchenne PMD (No.9), FSH PMD (No.6) をのぞき, 全例, 症状の進行をみた。CPK 値は, No.1 の LG PMD をのぞき低下がみられた。この傾向は, Duchenne PMD など CPK 値が特に高値を示す例で顕著に認められた。

NK 421 投与中, No.2, No.3 の L.G-PMD, No.8 の Duchenne PMD で消化器症状を一時的に訴えた。これらに対しては, 一時的に投与中止あるいは減量を行い, 症状消失後, 再び NK 421 投与を継続することが出来た。血液生化学データでは, 貧血, 肝機能障害など特に重篤な障害は認められなかった。

図 1 は, No.1, LG-PMD の経過表である。臨床的には症状が進行し, CPK 値でも改善がみられなかったが, 昭和 59 年暮, 1 カ月 NK 421 を中止したところ自覚的に脱力感の増強を訴えた。その後, 900mg/日まで増量し現在も経過観察中である。

表 4 KN-421 長期投与患者経過表

症例	病名	年齢	罹病期間(年)	最大投与量(mg/日)	投与期間(月)	CPK 平均値(比) 開始時→現在[U/l]	臨床症状	副作用
1. S. A.	LG PMD	55M	16	900	44	450→598 (1.33)	進行	
2. M. Y.	"	37F	17	1000	44	1253→757 (0.60)	"	食欲低下(1000mg)
3. Y. A.	"	52F	13	900	27	2035→1293(0.64)	"	悪心(450mg)
4. K. O.	"	38M	27	500	45	668→428 (0.64)	"	
5. N. K.	"	49M	21	500	44	1054→564 (0.53)	"	
6. Y. M.	FSH-PMD	50M	33	800	20	161→111 (0.69)	不変	
7. M. S.	"	29F	17	200	43	122→85 (0.70)	進行	
8. R. K.	Duchenne PMD	10M	6	240	20	4636→1814(0.39)	"	悪心・下痢(120mg)
9. T. K.	" (Subclinical)	1M	—	900	7	5610→4150(0.74)	無症状	

筋ジストロフィー症に対する NK 421 (Bestatin) 長期投与後の経過報告

No.1 S.A. 55, M LG-PMD

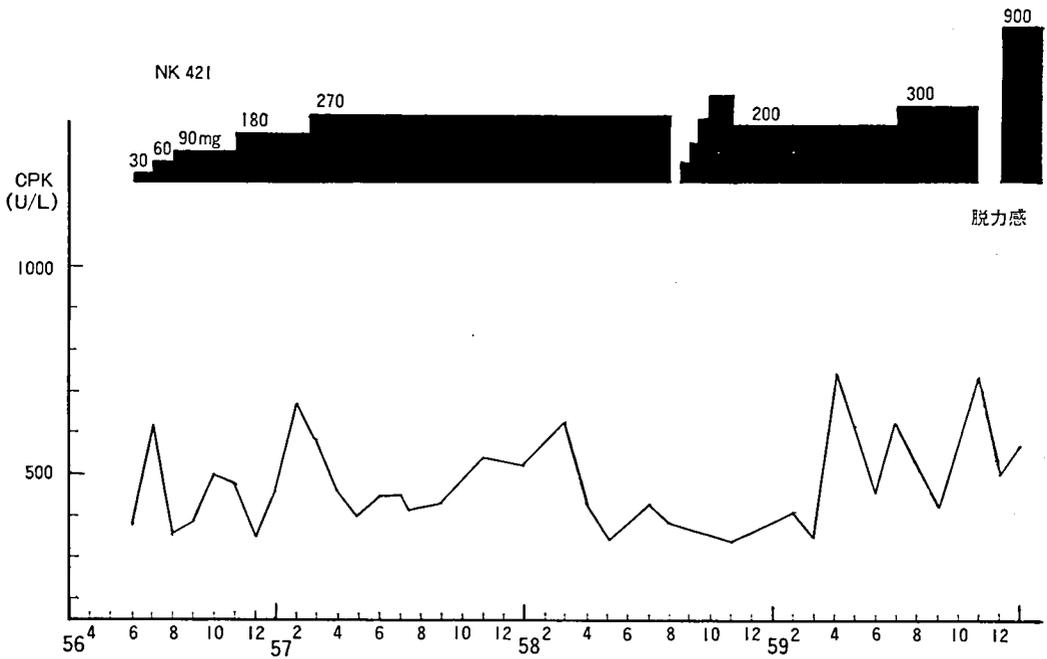


図 1

No.2 M.Y. 37, F LG-PMD

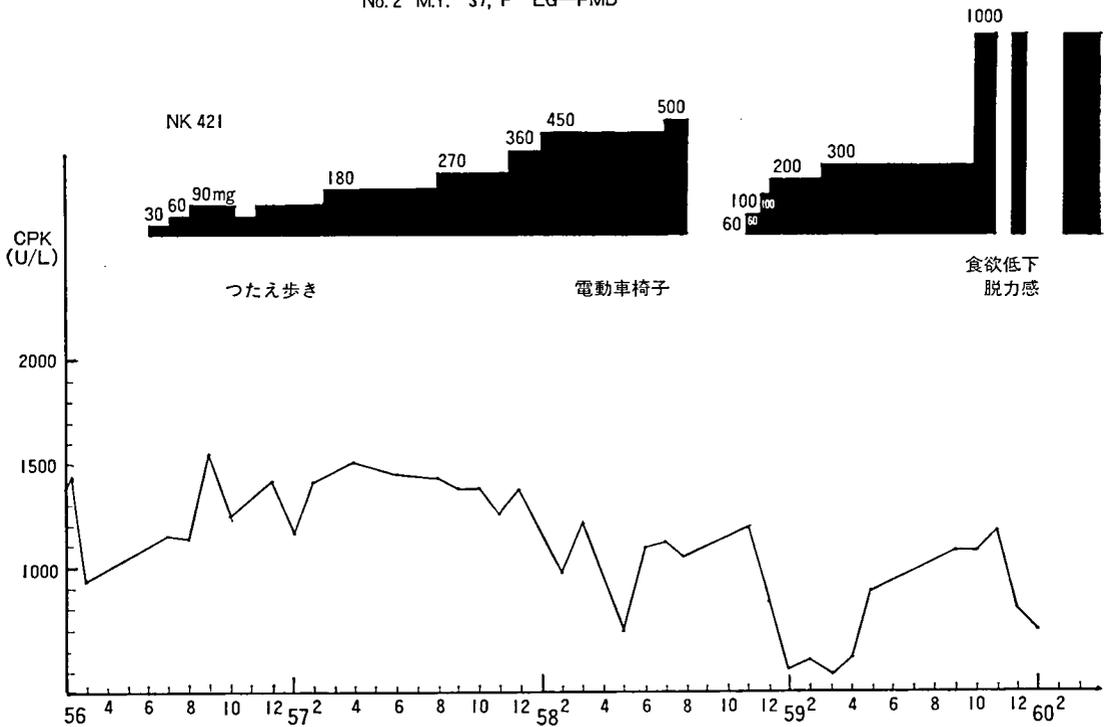


図 2

No.3 Y.A. 52, F LG-PMD

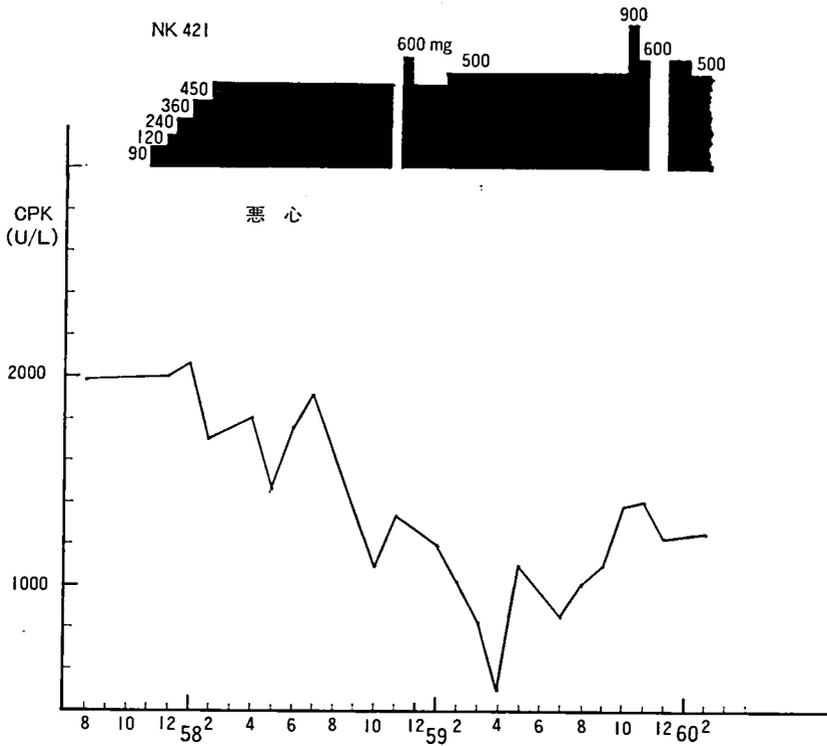


図 3

No.4 K.O. 38, M LG-PMD

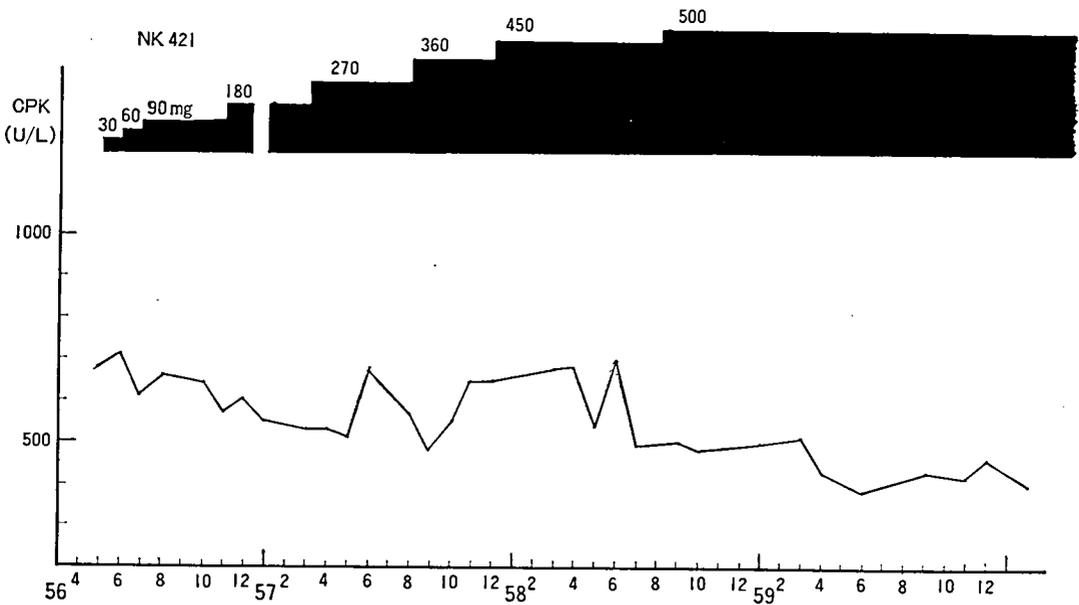


図 4

筋ジストロフィー症に対する NK 421 (Bestatin) 長期投与後の経過報告

No.5 N.K. 49, M LG-PMD

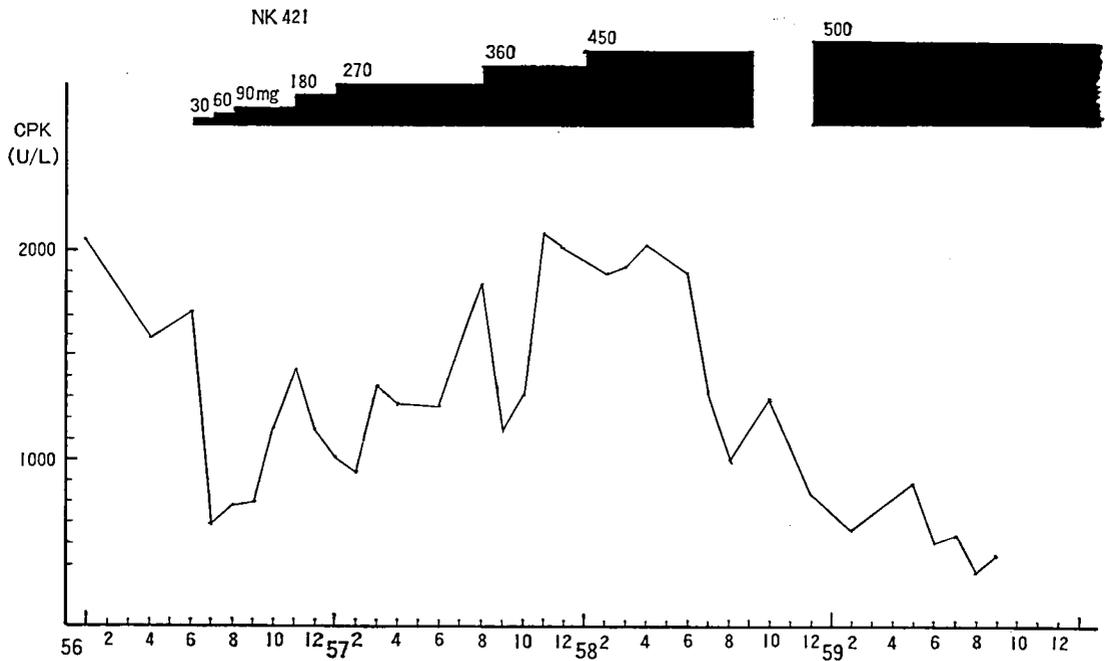


図 5

No.6 Y.M. 50, M FSH-PMD

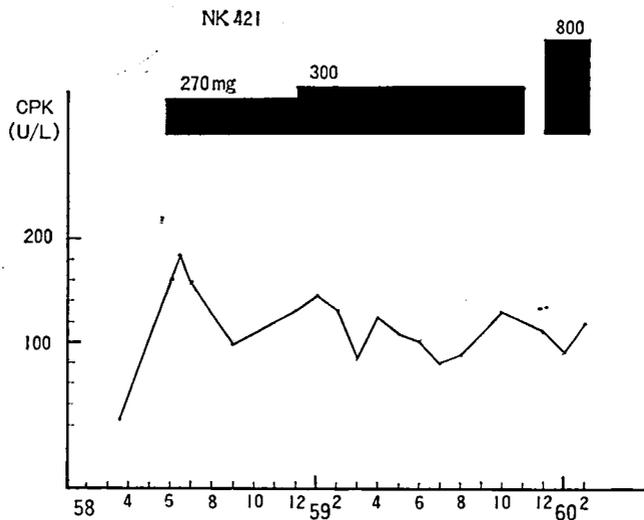


図 6

No. 7 M.S. 29, F FSH-PMD

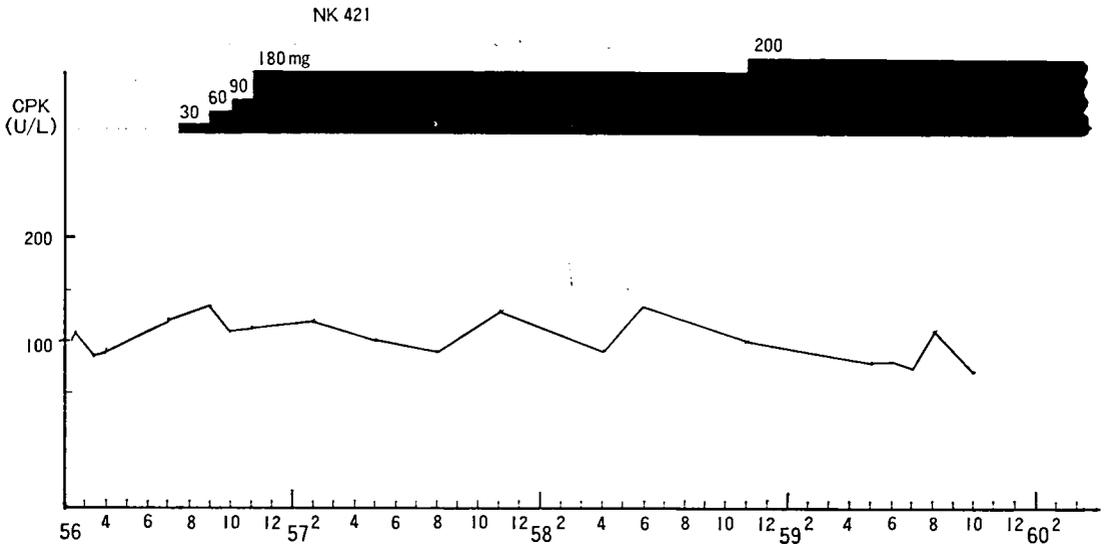


图 7

No. 8 R.K. 10, M Duchenne

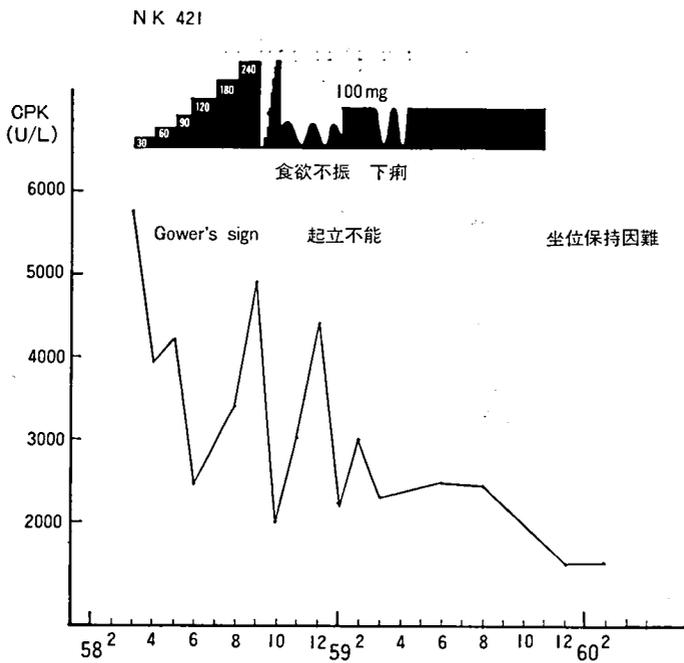


图 8

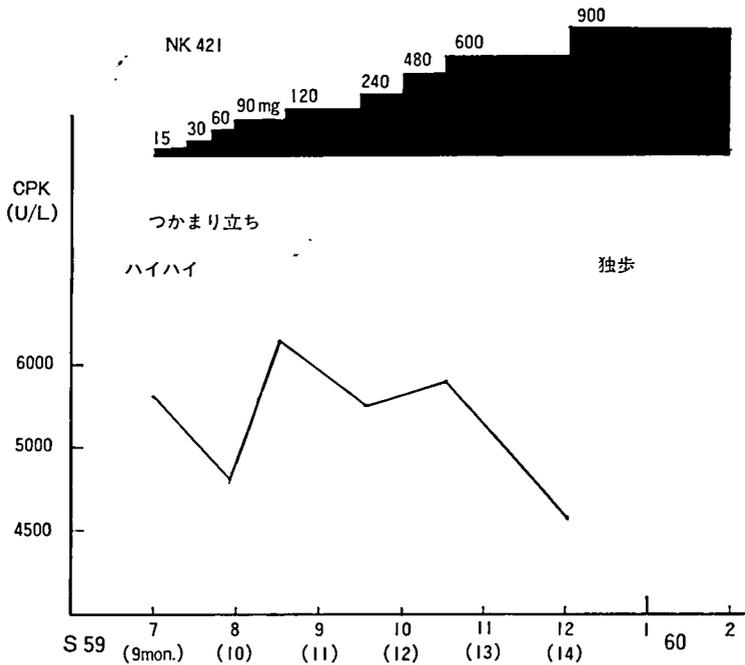


図 9

図 2 は、No. 2 LG-PMD 例である。NK 421 漸増中、CPK 値の低下を認めたが、症状は進行性であった。NK 421, 1000mg/日投与後に一過性の食欲低下を認めたため、一時断薬したところ脱力感増強を自覚した。

図 3 は、No. 3 LG-PMD 例である。NK 421 450mg/日で悪心が出現。その後、CPK 値の低下傾向を認めたが、症状は進行性である。

図 4 は、No. 4 LG-PMD 例である。CPK 値は、軽度減少傾向にあるが、臨床的には進行性である。

図 5 は、No. 5 LG-PMD 例である。昭和 58 年以後、CPK 値は低下傾向にあるが、臨床的には進行性である。

図 6 は、No. 6 FSH-PMD 例である。臨床的にも CPK 値も大きな変化がみられない。現在 800 mg/日に増量し経過観察中である。

図 7 は、No. 7 FSH-PMD 例である。臨床的に軽度進行。CPK 値は変化ない。

図 8 は、No. 8 Duchenne-PMD 例である。NK

421 投与後、CPK 値は動揺を示しながらも低下傾向がみられた。240mg/日投与後より消化器症状が出現し、服薬が不規則となっているが、現在も CPK 値は、低下している。しかしながら、臨床的には明らかに進行している。

図 9 は、No. 9 Duchenne-PMD (Subclinical) である。出生後 9 カ月時点での CPK 値は、5600 U/L と高値を示しているが、その後の運動発達は正常である。NK 421, 900mg/日まで増量しているが、CPK 値の低下は認められない。

ま と め

各種筋ジストロフィー症例に対して約 4 年にわたる NK 421 の長期投与を行い経過を観察してきたが、この間、臨床的に改善を示した例はなかった。血清 CPK 値は、NK 421 の投与後、低下を示す例が多く、特に従来より CPK 値が高値を示す Duchenne 型 PMD にこの傾向が強くみられ

た。しかしこれらの例でも明らかに臨床症状は進行しており NK 421 投与により臨床症状を改善することは出来なかった。このように、NK 421 投与により疾患の進行を止めることは出来なかったが、LG-PMD の 2 例で休薬後、自覚的に脱力感を訴えたり、CPK 値が多くの例で低下してい

ることを考慮すると、NK 421 が疾患の進行を遅らせている可能性も否定できず、今後、二重盲検法などにより検討を加える必要性が残された。

副作用としては、軽度消化器症状以外には、血液、尿所見とも異常を認めなかった。

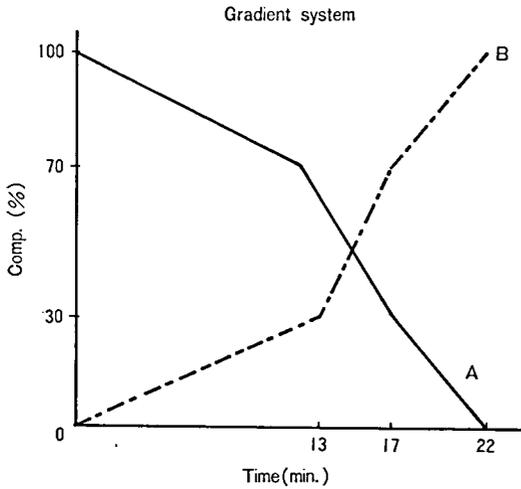


図 2 Conditions of HPLC

Column : Fine SIL C₁₈T-5, 4.6×300 mm
(pre : 50 mm)

Flow rate : 1 ml/min

Injection volume : 20 μ l

Wavelength : 245 nm (M-2 : 263, M-6 : 230 nm)

Solvent system : A, 0.025 M H₃PO₄-CH₃CN
(95 : 5)

B, 0.01 M H₃PO₄-CH₃CN
(60 : 40)

体に誘導して測定した。

また動物への投与はすべて絶食下にて経口投与した。

結 果

1. 血中濃度

図 3 にラットにホルヘニシノール 45 mg/kg 経口投与した場合の血中濃度の経時変化を示したが、消化管から速やかに吸収され、投与約 30 分後に最高血中濃度に達し、以後急速に減衰して 24 時間後には血中にはほとんど認められない。血中代謝物は未変化体 (M-1) が大部分であるが、わずかに尿中の主代謝物である N-アセチルホルヘニシノール (M-6) が認められる。この傾向は 1 mg/kg, 15 mg/kg を経口投与した場合でも同様であり、また台形方式で求めた [AUC]_{0-∞} と投与量との間にはよい相関 ($r=0.9997$) が認められ、ラ

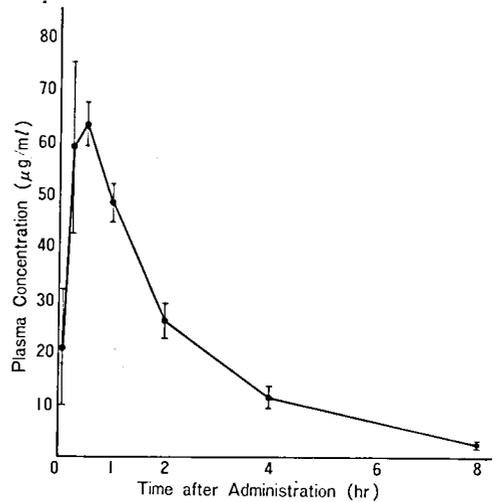


図 3 Plasma Concentration of BF-121 after Oral Administration of BF-121 in Rats (45 mg/kg)

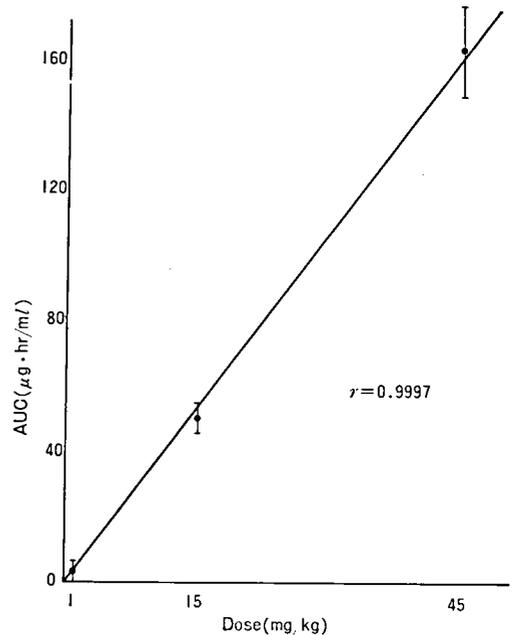


図 4 Dose Dependence of AUC in Rats

ットの場合 45 mg/kg までは吸収に飽和のないことを示した。

図 5 はウサギに 45 mg/kg 経口投与した時の血中濃度の経時変化を示したものである。ラットに比べると吸収がやや遅く、最高血中濃度に達する

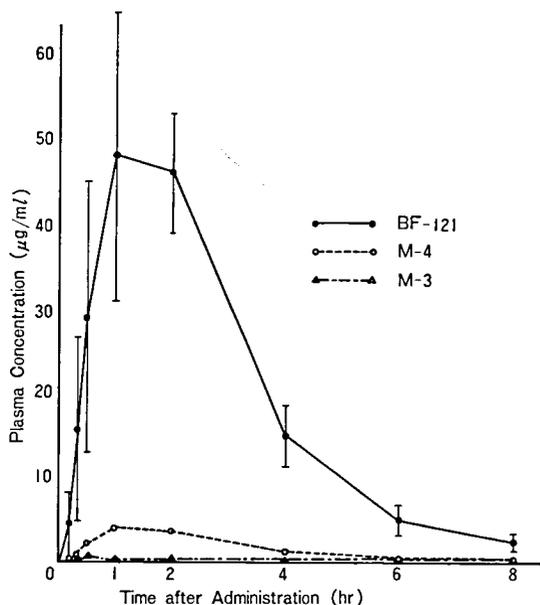


図 5 Plasma Concentration of BF-121 after Oral Administration of BF-121 in Rabbits (45 mg/kg)

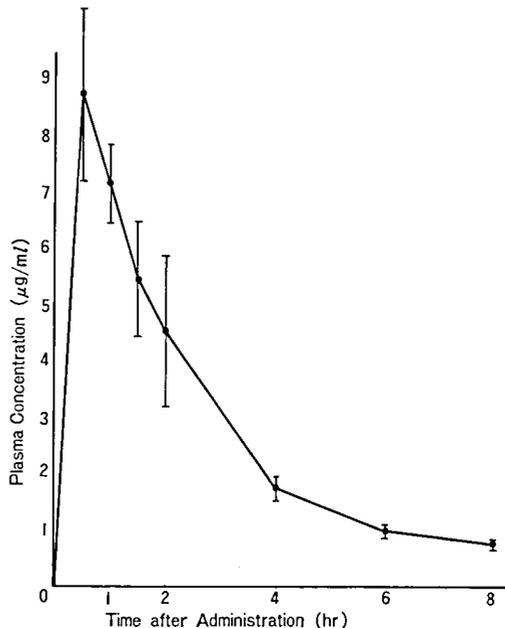


図 6 Plasma Concentration of BF-121 after Oral Administration of BF-121 in Men (240 mg/man)

のは投与約 1 時間後である。しかし最高血中濃度はラットと比べて大きな相違は認められず、また血中からの消失もラットと同様に早い。血中代謝物はほとんど未変化体 (M-1) である。

図 6 は Phase I study において健常成人に 240 mg/man 経口投与した時の血中濃度の経時変化を示したものである。吸収はやはり早く、投与約 30 分後に最高血中濃度約 9 $\mu\text{g/ml}$ に達し、その後急

速に減少する。

イヌの血中濃度については現在測定中である。

2. 尿・糞中排泄

図 7 にラットおよびウサギに 45 mg/kg 経口投与した時の尿・糞中への累積排泄率を示した。ラットでは投与 48 時間後までに投与量の 90% が排泄され、その大部分は尿中への排泄であって、糞

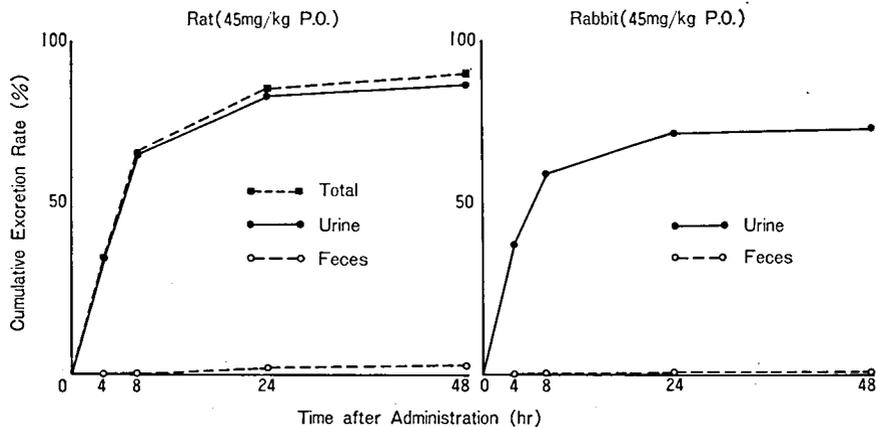


図 7 Cumulative Excretion in Urine and Feces after Administration of BF-121

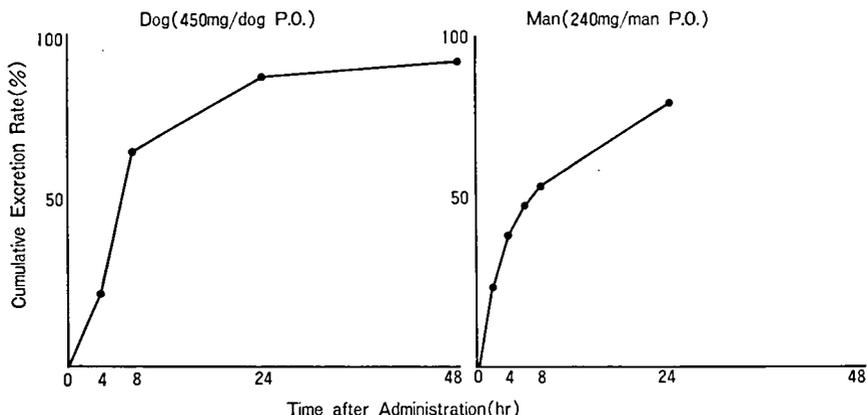


図 8 Cumulative Excretion in Urine after Administration of BF-121

中への排泄はわずか 1~2% 程度である。ウサギにおいても糞中への排泄はほとんど認められず、投与量の 75% が 48 時間までに尿中へ排泄される。

図 8 にイヌに 450 mg/kg, ヒトに 240 mg/man 経口投与した時の尿中への累積排泄率を示した。投与 24 時間までに、イヌでは投与量の 88%, ヒトでは 80% が尿中に排泄された。

これらの結果からホルヘニシノールは、いずれの動物種においても消化管からの吸収が良く、また尿中へ速やかに排泄される薬剤であることが明らかとなった。

3. 尿中代謝物

いずれの動物種においても尿中への排泄が主たる排泄経路であることが明らかとなったので次に尿中代謝物の検討を行った。図 9 にラット、ウサギ、イヌ、ヒトにおける尿中総排泄量に対する各代謝物の割合を示した。各代謝物の構造は図 10 に示した。

血中濃度、尿・糞中排泄は動物種差はあまり認められず、良く似た動態を示したが、代謝に関しては種差は大きく、各動物の主代謝物はすべて異なることが明らかとなった。すなわちラットにおいては M-6 が 55% を占め、ついで M-3 が 20%、

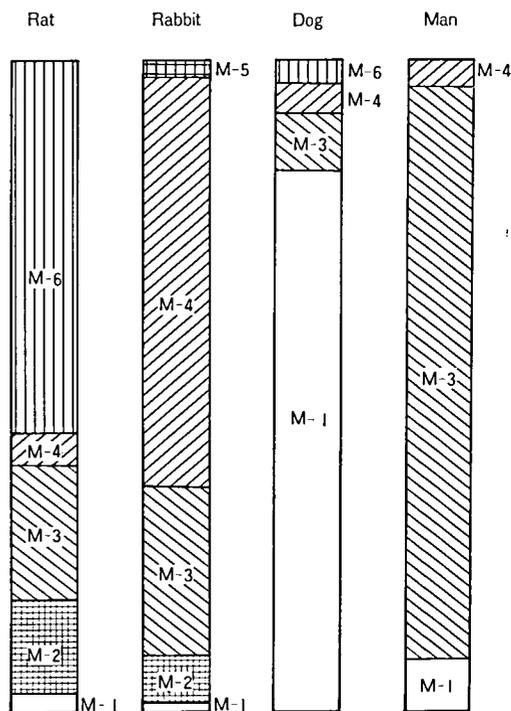


図 9 Metabolites in Urine

M-2 が 15% を占めているが、ウサギにおいてはラットの主代謝物 M-6 は認められず、ラットでは 5% を占めるにすぎない M-4 が 60% を占め、M-3 が 25%, M-2 が 8% であった。イヌでは M-1 が 80% 以上を占め、ほとんど代謝をうけずに尿中へ排泄されることを示している。またヒト

ホルヘニシノールの体内動態研究

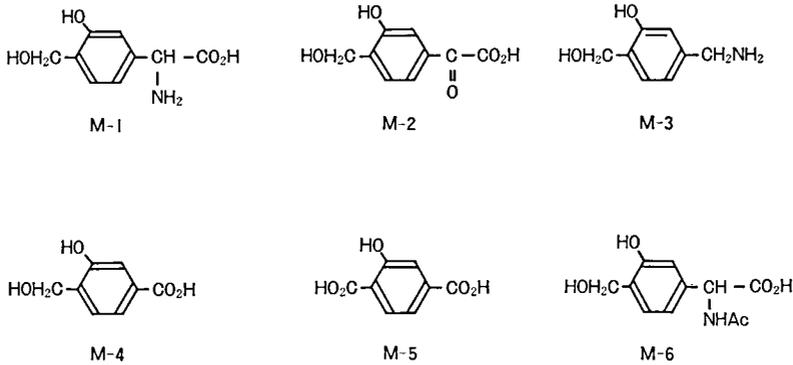


図 10 Metabolites of Forphenicinol

においては M-3 が 80% 以上を占め、その他に M-1 と M-4 が少量認められる。

4. 組織分布

ラットに [³H]-ホルヘニシノールを 1mg/kg 経口投与し、各組織内濃度の経時変化について検討を行い、その結果を図 11 に示した。濃度は組織 1g あるいは 1ml あたりのホルヘニシノール換算量で表わした。また組織中放射能濃度の半減期(ピーク～4時間)を表 1 にまとめた。

大部分の組織では、投与 30分～1 時間後に最高濃度に達し、血中からの消失とほぼ同様な経過で速やかに消失し、24 時間後には組織内にほとんど検出されないようになり、蓄積性のないことを示した。またほとんどの組織において、組織内濃度が血中濃度を上まわり組織移行性の良いことが明らかにされた。特に脳下垂体には高濃度に分布し、投与 1 時間ではプラズマ中濃度の 12 倍に達するが、他の組織と同様急速に減少し、24 時間後にはわずか 0.19 μg/g 認められるにすぎない。次いで腎臓、脾臓に高濃度に分布し、投与 1 時間後の値はそれぞれプラズマ中濃度の 5.4 倍、4.4 倍の値を示した。しかし一般に高濃度に分布することの多い肝臓にはあまり分布せず、プラズマ中濃度とほぼ同程度の値しか示さなかった。またホルヘニシノールは免疫調節作用を有することが知られているが^{2,3)}、免疫担当組織であるリンパ節、胸腺、

表 1 組織中放射能濃度の半減期 (peak～4hr)

組 織	T _{1/2} (peak～4 hr)
血 液	1.71 hr
血 漿	1.42
皮 膚	2.07
皮 下 脂 肪	2.21
腋窩リンパ節	1.61
腸間膜リンパ節	1.81
副 腎	3.26
脾 臓	1.85
脾 臓	2.03
膀 胱	1.65
前 立 腺	1.48
精 の う	2.64
精 巢 上 体	3.31
精 巢	3.73
胃	0.69 ¹⁾ , 2.45 ²⁾
小 腸	1.03 ¹⁾ , 1.71 ²⁾
大 腸	1.34 ¹⁾ , 3.89 ²⁾
腹 腔 内 脂 肪	1.23
腎 臓	1.53
肝 臓	1.94
胸 腺	2.45
肺	1.80
心 臓	3.98
大 動 脈	1.91
顎 下 腺	1.62
甲 狀 腺	1.66
気 管	1.75
眼 球	2.58
脳 下 垂 体	1.65
筋 肉	16.27
骨 髄	1.48

¹⁾ 0.5～2hr ²⁾ 2～8hr

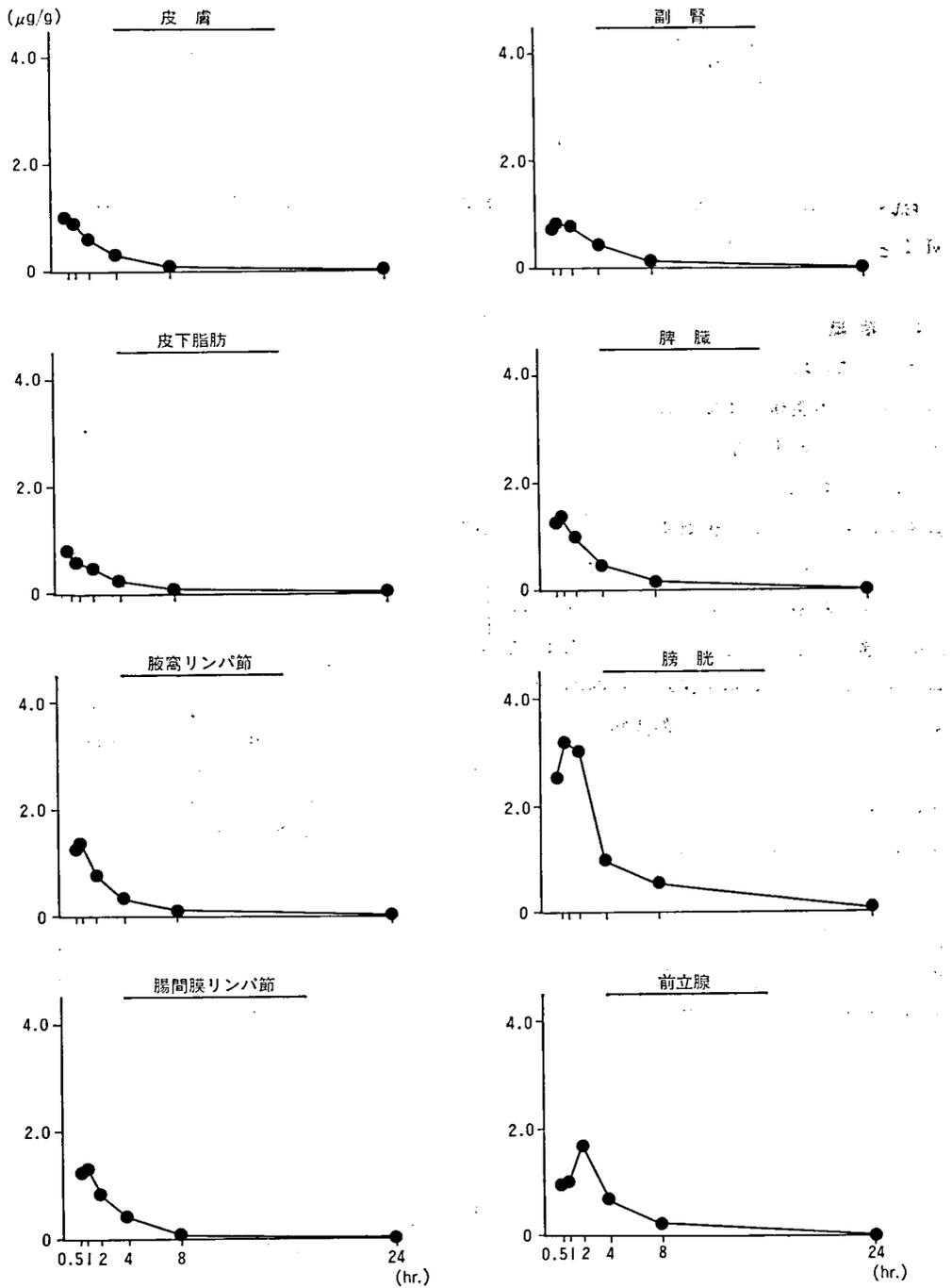


図 11-1 各組織内濃度の経時変化

ホルヘニシノールの体内動態研究

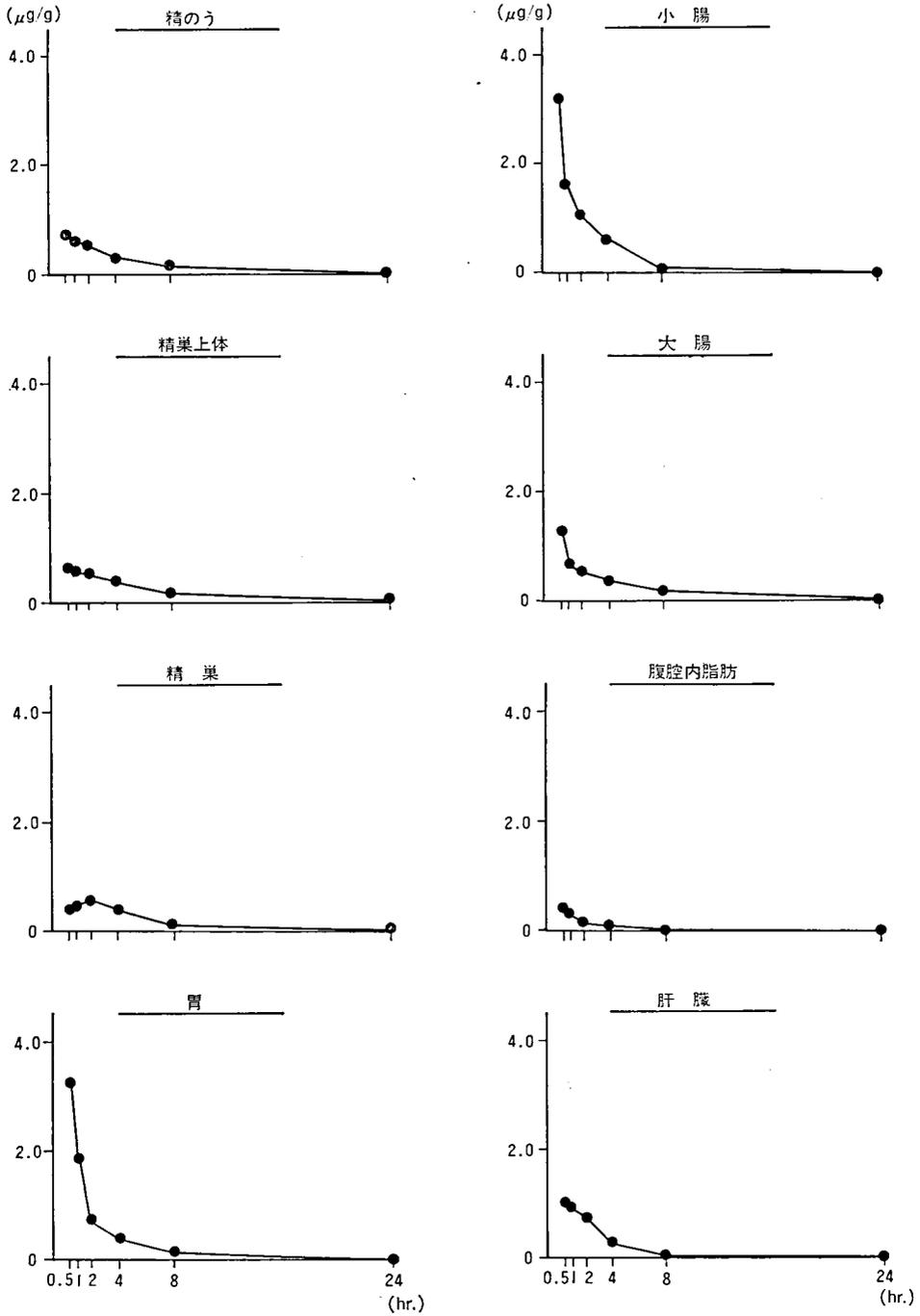


図 11-2 各組織内濃度の経時変化

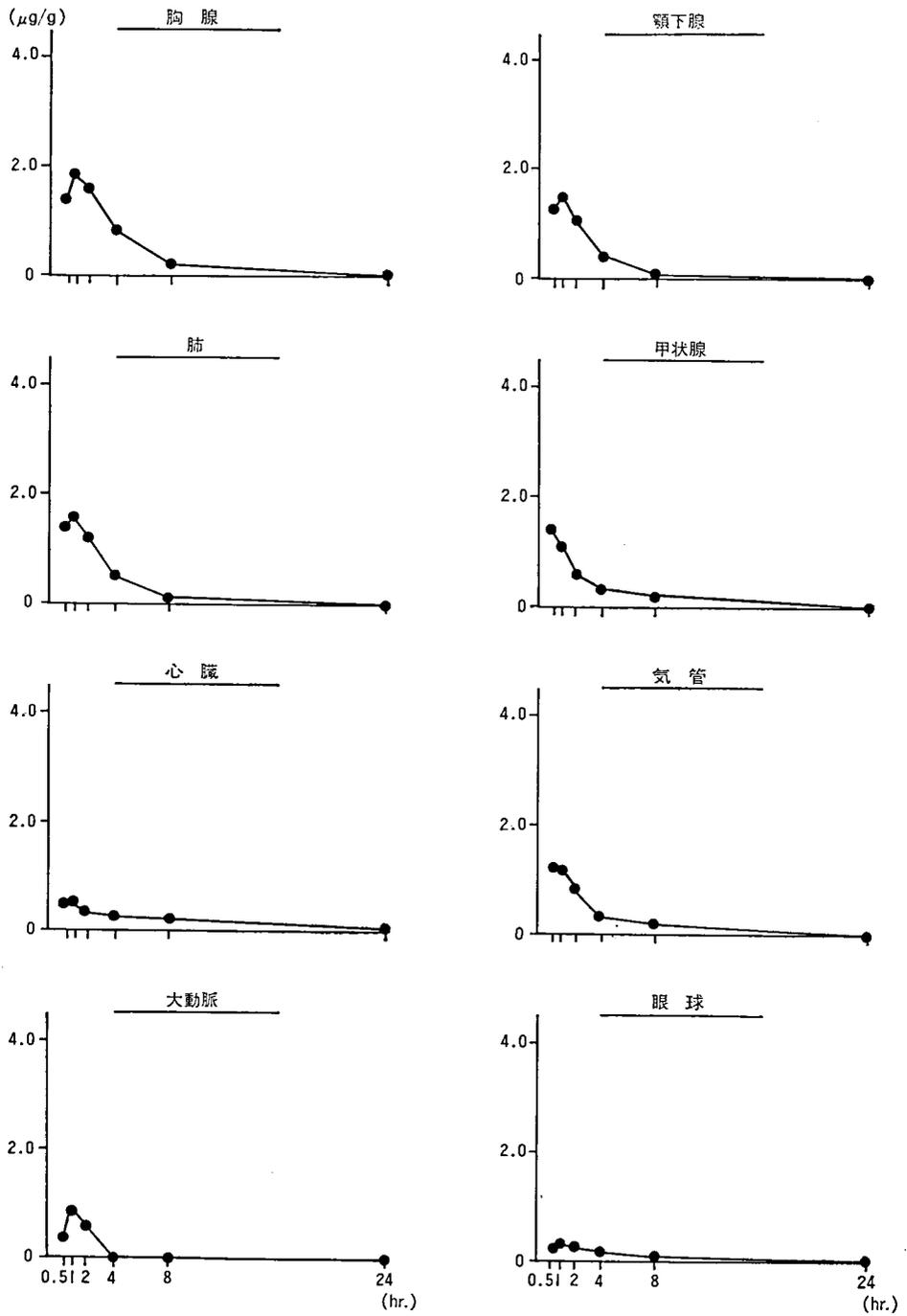


図 11-3 各組織内濃度の経時変化

ホルヘニシノールの体内動態研究

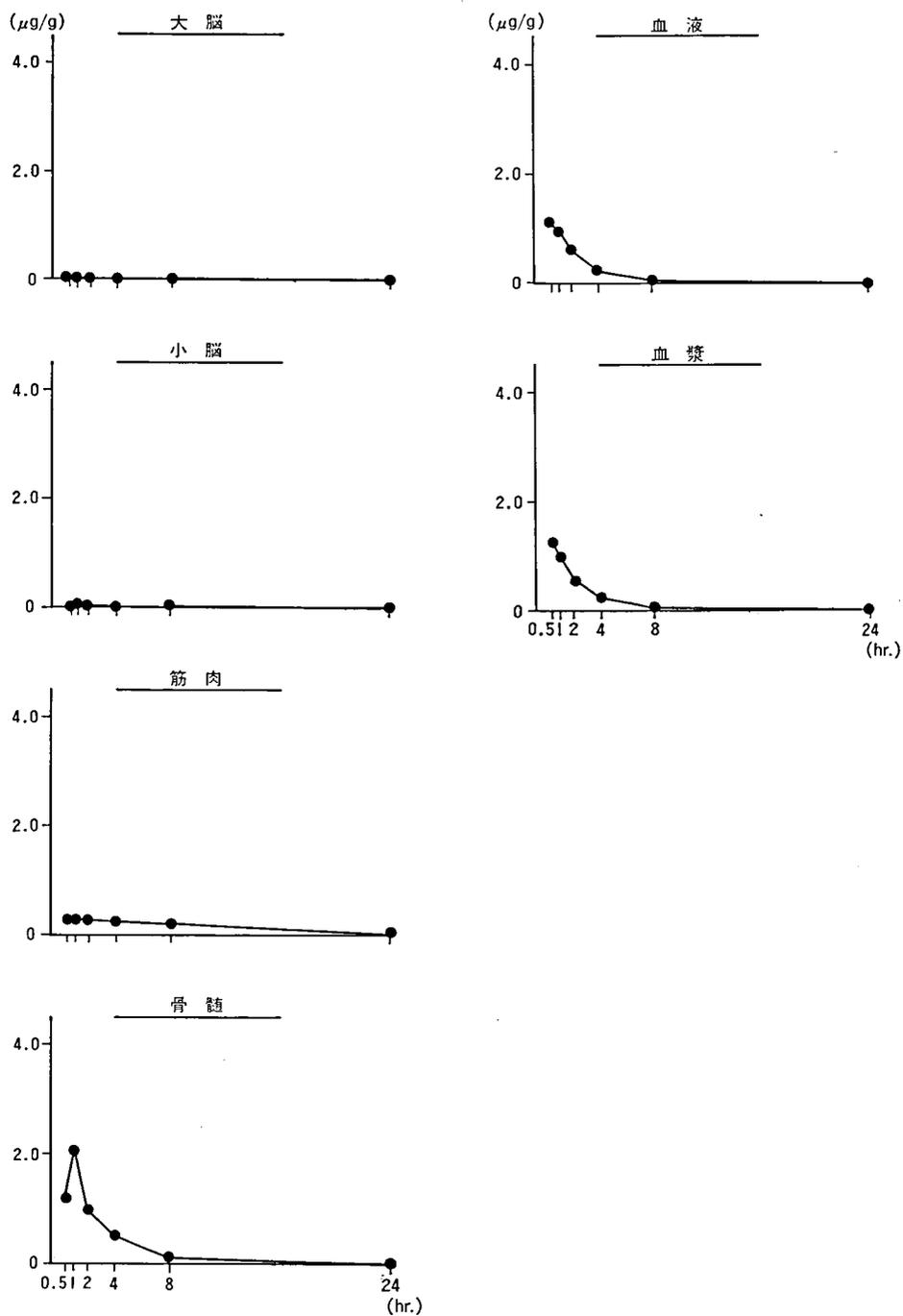


図 11-4 各組織内濃度の経時変化

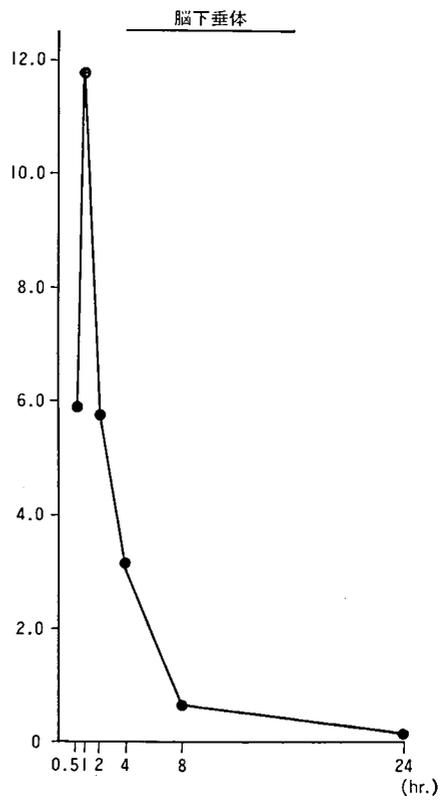
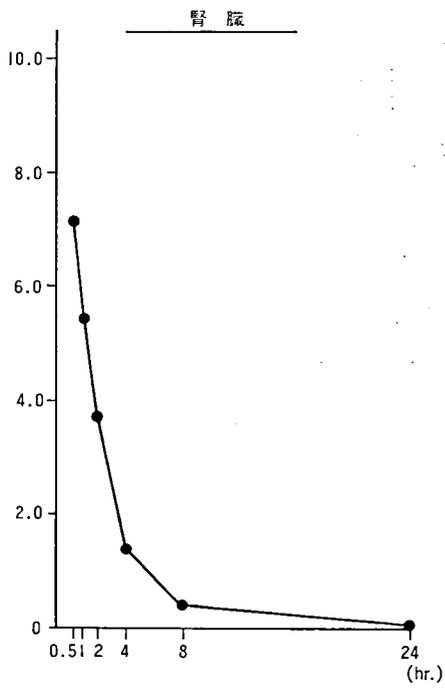
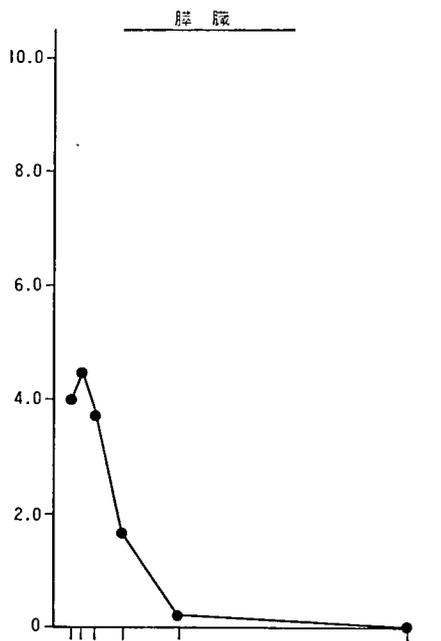


図 11-5 各組織内濃度の経時変化

骨髄、脾臓に比較的高濃度に分布し、薬理効果を体内動態の面から裏付けた。また大脳、小脳への分布は最も低いが、筋肉への分布も低い値となっている。しかし、筋肉中からの減衰は他の組織に比べると遅く、表1に示したようにその半減期は、他の組織では1~4時間であるのに対し16時間と極端に長く、投与4時間以後は血中よりも筋肉中濃度の方が高い値となっている。

次に薬物の代謝に関与する臓器である肝臓、腎臓、脾臓における代謝物の割合の経時変化について検討し、その結果を図12に示した。腎臓においてはM-1とM-6の割合が多く、またM-3も認められるが、この割合は時間が経過してもあまり変化しない。これに対し脾臓では腎臓と同様やはりM-1とM-6の割合が多く、投与初期ではM-1とM-6の割合が1:1であるが、時間の経

過と共にM-6の割合が増加し、投与4時間後には80%を占めた。肝臓ではM-1の割合が多いがその割合は時間の経過と共に減少し、逆にM-6の割合が増加してくる。M-3も次第に減少し、4時間後にはもはや認められないが、M-4の割合はあまり変化せず対照的である。これらの結果から腎臓ではM-6、M-3への代謝、脾臓ではM-6への代謝、肝臓ではM-4、M-6への代謝が行われていると推定される。また免疫担当組織であるリンパ節、脾臓、胸腺における投与1時間後の代謝物の割合は、胸腺で4%程度のM-6が検出される他はM-1以外は認められない。

まとめ

1. ホルヘニシノールはラット、ウサギ、イス、ヒトのいずれの動物種においても消化管から速やかに吸収され、その大部分が尿中へ速やかに排泄され、蓄積性は認められない。
2. 代謝は種特異性が高く、主代謝物はラットではM-6、ウサギではM-4、イスではM-1、ヒトではM-3である。
3. 組織への移行性は良く、多くの組織ではプラズマ中よりも高濃度に分布する。筋肉中濃度は低いが半減期は長い。

文献

- 1) 松本郁男. ホルヘニシノールの体内動態に関する研究. 厚生省新薬開発研究(梅沢班). 昭和58年度研究報告書. pp. 143-148 (1984).
- 2) 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).
- 3) Ishizuka, M., Ishizeki, S., Masuda, T., Momose, A., Aoyagi, T., Takeuchi, T., and Umezawa, H. Studies on effects of forphenicinol on immune responses. *J. Antibiot.* 35, 1042-1048 (1982).

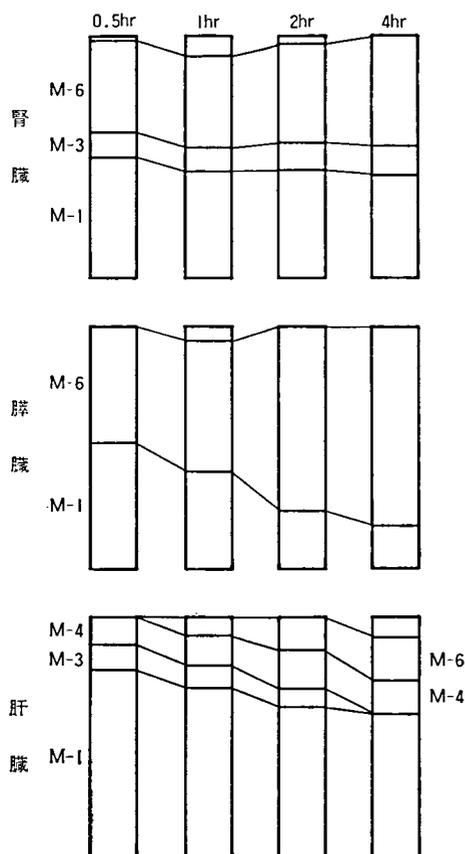


図12 各臓器における代謝物の経時変化

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*1・滝田 智久*2・石井 靖男*1

I. Bioavailability

1. ロイペプチンの Bioavailability

研究協力者 山下幸和*2, 渡辺恵子*2, 高山秀樹*2, 石橋正元*2

2. 筋ジストロフィー発症マウスにおけるベスタチンの Bioavailability

研究協力者 諏訪正人*2, 亀谷俊一*2, 渡辺紀子*2, 浅川紀子*2, 小山通則*2, 石橋正元*2

3. ベスタチンの幼若ラットにおける血中動態

研究協力者 笹原富弥*2, 坪崎正寿*2, 高橋 泰*2

4. Duchenne 型進行性筋ジストロフィー小児患者におけるベスタチンの代謝

研究協力者 浅川紀子*2, 諏訪正人*2, 小山通則*2, 石橋正元*2, 福山幸夫*3, 大沢真木子*3

II. 製剤研究

1. 硫酸ロイペプチンの安定性に関する研究

研究協力者 石間戸秀之*2, 青木 稔*2, 寺田 隆*2

2. 硫酸ロイペプチン製剤の研究

研究協力者 石間戸秀之*2, 青木 稔*2, 寺田 隆*2

3. ベスタチンドライシロップ剤の安定性に関する研究

研究協力者 石間戸秀之*2, 青木 稔*2, 寺田 隆*2

III. 毒性試験

1. ベスタチンの幼若ラットにおける毒性——急性毒性試験および亜急性毒性試験（経口投与）

研究協力者 萩原隆夫*2, 大塚登紀男*2, 伊藤公一*2, 林 幹人*2, 坪崎正寿*2, 高橋 泰*2, 和田 浩*4
仲川憲一*4

*1 日本化薬（株）医薬事業本部

*2 日本化薬（株）総合研究所

*3 東京女子医科大学小児科学教室

*4（株）日本バイオリサーチセンター羽島研究所

ロイベス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. ロイベプチンの Bioavailability

昨年度までマウス¹⁾, ラット²⁾, イヌ¹⁾, ニワトリ¹⁾を用いてロイベプチン (Leup) の Bioavailability を検討してきたが, 経口投与における Bioavailability はいずれも低い結果を示した. そこで, 今回昨年度に引き続き, 腸溶剤の可能性を検討するため, イヌにおける腸溶顆粒剤の bioavailability について検討した.

1) 実験方法

a) 製剤および投与方法

Leup カプセル (対照カプセル), Leup 腸溶顆粒カプセル (本研究報告書 II.2 節) の 2 カプセル (50mg/cap) を経口投与し, 直ちに水 50 ml 投与した. なお, 同一個体に対して, 10 日間間隔で対照カプセル, 腸溶顆粒カプセルを経口投与した.

b) 動物

ビーグル犬雄性, 体重約 10 kg, $n=4$). 投与前 24 時間絶食した.

c) 採血

投与後, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24 時間に前肢静脈より採血した. ただし, 対照カプセルについては, 投与後 5 時間は採血しなかった. 血液は常法により血漿とし, 測定まで -20°C で凍結保存

した.

d) 血漿中濃度の測定

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

各製剤をイヌに経口投与したときの血漿中濃度を図 1 に示した. 対照カプセルに比べて, 腸溶製

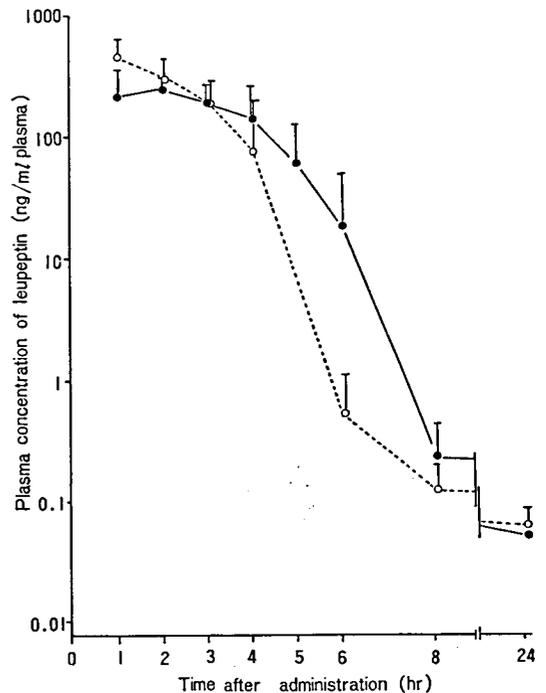


Fig. 1 Plasma concentration of leupeptin in male beagle dogs after oral administration of leupeptin (50mg \times 2/head): capsules (O.....O) and enteric coated-granules (●—●).

剤は投与4時間以降若干の持続性を示したものの、その血漿中濃度は大きく改善されなかった。一方、 $[AUC]_{0-24\text{hr}}$ は対照カプセル 1.057 ± 0.491 、腸溶顆粒カプセル $0.881 \pm 0.465 (\mu\text{g} \cdot \text{hr} \cdot \text{ml}^{-1})$ であり、腸溶顆粒カプセルは、対照カプセルに近い AUC を示したが、腸溶顆粒の AUC は低い結果となった。

腸溶剤のなかでは、昨年度報告した腸溶錠⁴⁾を含めて、腸溶顆粒カプセルが最も高い AUC を示したが、腸溶剤化によって AUC を高めることはできなかった。

2. 筋ジストロフィー発症マウスにおけるベスタチンの bioavailability

昭和58年度において、われわれは C57BL/6 マウスにおける単回および連続投与時のベスタチン血中動態および筋肉中におけるベスタチンとその代謝物の動態を明らかにし、さらに尿中代謝物について検討した結果を報告した。今回さらに筋ジストロフィー発症マウスと同腹非発症マウスを用いて単回および連続投与時のベスタチン血中動態および筋肉中におけるベスタチンとその代謝物の動態を明らかにし、両者の比較検討を行うこととした。また、ベスタチン投与時の筋ジストロフィー発症マウスにおける尿中代謝物を検索した。

1) 実験方法

a) 試薬

ベスタチンおよび $[^3\text{H}_1]$ -ベスタチンは前報に記載したものを使用した。

b) 実験動物および投与方法

筋ジストロフィー発症雄性マウス C57BL/6J dy (-) および同腹非発症雌性マウス C57BL/6J dy (+) は日本クレアより購入した。

単回投与群 (一群3匹) に対して、 $[^3\text{H}_1]$ -ベスタチンを $5.04 \text{mg} \cdot 0.90 \text{mCi/kg}$ および $12.47 \text{mg} \cdot 2.23 \text{mCi/kg}$ の割合で経口投与した。連続投与群

(一群3匹) に対しては $[^3\text{H}_1]$ -ベスタチンを $12.47 \text{mg} \cdot 2.23 \text{mCi/kg}$ の割合で1日1回、7日間連続経口投与した。

c) 血液および筋肉中濃度の測定

i) 単回投与群

血液中濃度測定： $[^3\text{H}_1]$ -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 (国産遠心機(株), 東京) で経時的に採血し、COMBUSTCONE および PAD (Packard 社, Illinois, USA) にとり乾燥後サンプルオキシダイザー (B-306 型, Packard 社) 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) でその放射能を測定した。

筋肉中濃度測定： $[^3\text{H}_1]$ -ベスタチン投与後1時間にエーテル麻酔下、上腕動脈より放血死させ、血液および筋肉 (後肢大腿部) を採取し、血液中放射能測定の場合と同様にその放射能を測定した。

ii) 連続投与群

最終回投与後、i) と同様の方法で血液、筋肉中放射能を測定した。

d) 尿、糞中排泄率の測定

単回投与群について前報に記載した方法により測定した。

e) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による尿、血漿、筋肉中代謝物の同定および定量

HPLC 条件、HPLC 分析のための試料調製は前報に記載した方法により行った。

2) 結果および考察

筋ジストロフィー発症マウスと非発症マウスに $[^3\text{H}_1]$ -ベスタチンを $5.04 \text{mg} \cdot 0.90 \text{mCi/kg}$ の割合で単回経口投与した時の血液中濃度 (放射活性値のベスタチン換算値) の推移を図2に、また $12.47 \text{mg} \cdot 2.23 \text{mCi/kg}$ の割合で単回経口投与し

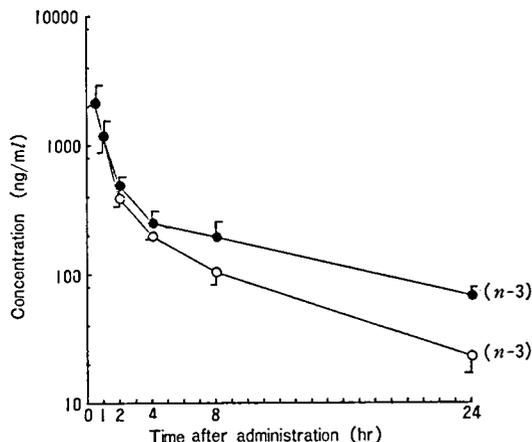


Fig. 2 Blood concentrations of the radioactivity after a single oral administration to normal (-○-) and dystrophic mice (-●-) in a dose of 5.04 mg/kg of [³H] bestatin. The radioactivity was calculated in the amount of bestatin.

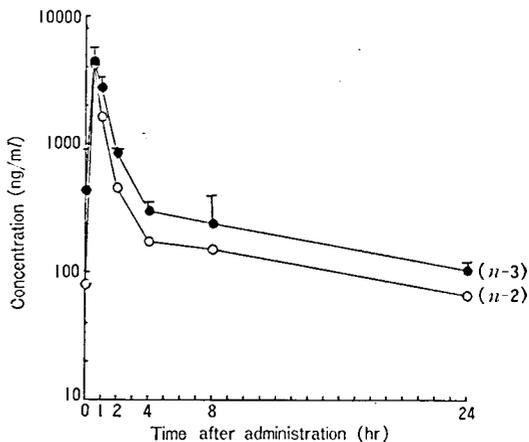


Fig. 4 Blood concentrations of the radioactivity after a repeated oral administration to normal (-○-) and dystrophic mice (-●-) in daily dose of 12.47 mg/kg of [³H] bestatin for 7 days. The radioactivity was calculated in the amount of bestatin.

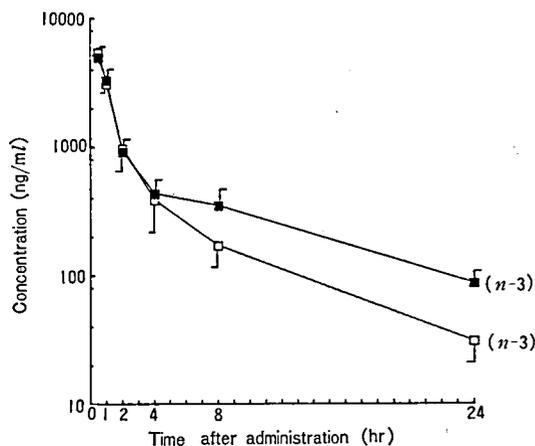


Fig. 3 Blood concentrations of the radioactivity after a single oral administration to normal (-□-) and dystrophic mice (-■-) in a dose of 12.47 mg/kg of [³H] bestatin. The radioactivity was calculated in the amount of bestatin.

た時のそれを図3に示した。さらに、筋ジストロフィー発症マウスと非発症マウスに [³H]₁-ベスタチンを 12.47 mg・2.23mCi/kg の割合で1日1回、7日間連続投与した時の最終回投与後の血液中濃度の推移を図4に示した。これら血液中濃度より算出した pharmacokinetic parameters を表

1に示した。単回経口投与時の血液中濃度曲線より、 T_{max} は筋ジストロフィー発症マウス群、非発症マウス群ともに0.5時間であった、また C_{max} は両マウス群の間に差はなく、ほぼ同様の値を示すとともに、投与量の増加にもなってその値も増加した。両マウス群の血液中濃度曲線はいずれも2相性を示し、 α 相の半減期はいずれの投与量においても0.4~0.5時間(投与後0.5~2時間値で算出)を示した。 β 相の半減期(投与後4~24時間値で算出)は非発症マウスの6~7時間に対し、筋ジストロフィー発症マウスでは8~11時間とその延長が認められた。両マウス群の $[AUC]_{0-24}^{0.5}$ は投与量の増加にもなって増加し、筋ジストロフィー発症マウスのそれは非発症マウスに比較して約1.2~1.4倍高い値を示した。この差は発症マウスにおいて投与後8、24時間の血液中濃度値が有意に(それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$) 高いことと、 β 相の半減期の延長によるものと思われる。

連続経口投与群の血液中濃度曲線も単回投与群の場合と同様に二相性を示した。両マウス群の T_{max} は単回投与群と同様に0.5時間であった。また C_{max} も両群ともほぼ同様の値を示すものの、

Table 1 Pharmacokinetic parameters of mean blood concentration after a single and a repeated oral administration of [³H] bestatin to male mice on several doses.

dose (mg/kg)	animal	[AUC] ₀ ²⁴	C _{max}	T _{max}	t _{1/2α}	t _{1/2β}	K _{ea}	K _{eβ}
5.04	dystrophic	5918.00	2116	0.5	0.48	10.65	1.452	0.065
	normal	4361.50	2162	0.5	0.43	6.68	1.629	0.104
12.47	dystrophic	11910.00	5036	0.5	0.41	8.47	1.682	0.082
	normal	9717.50	5527	0.5	0.47	5.73	1.484	0.121
12.47*	dystrophic	9766.00	4409	0.5	0.50	13.23	1.390	0.052
	normal	6554.75	4182	0.5	0.38	14.18	1.804	0.049

* : repeated in daily dose of 12.47 mg/kg for 7 days

[AUC]₀²⁴ : Area under blood concentration VS time curve (ng·h/ml)

C_{max} : Maximum blood concentration (ng/ml)

T_{max} : Time to maximum blood concentration (h)

K_{ea} or K_{eβ} : Elimination rate constant (h⁻¹)

t_{1/2α} or t_{1/2β} : Blood half-life (h)

Table 2 Concentration and relative percentage of bestatin and (2S, 3R) AHPA in plasma at 1 hr after a single and a repeated oral administration to male mice (n=3). The radioactivity was calculated in terms of bestatin equivalent.

Dose (mg/kg)	Mouse	Concentration			
		ng/ml plasma		Relative %	
		Bestatin	(2S, 3R) AHPA	Bestatin	(2S, 3R) AHPA
5.04	Dystrophic**	621	125	81.9	18.1
	Normal	399±183	85±16	81.3	18.7
12.47	Dystrophic**	1234	142	89.4	10.6
	Normal	1261±162	129±48	90.6	9.4
12.47*	Dystrophic	10642±5092	347±96	96.5	3.5
	Normal**	3527	110	96.2	3.8

* : repeated in daily dose of 12.47mg/kg for 7 days.

** : (n=2)

Table 3 Concentration and relative percentage of bestatin and (2S, 3R) AHPA in muscle at 1 hr after a single and a repeated oral administration to male mice (n=3). The radioactivity was calculated in terms of bestatin equivalent.

Dose (mg/kg)	Mouse	Concentration			
		ng/g muscle		Relative %	
		Bestatin	(2S, 3R) AHPA	Bestatin	(2S, 3R) AHPA
5.04	Dystrophic	244±17	156±51	61.6	38.4
	Normal	132±61	127±7	49.2	50.8
12.47	Dystrophic	423±100	226±45	64.8	35.2
	Normal	313±88	254±13	54.5	45.5
12.47*	Dystrophic	2764±1997	230±91	90.9	9.1
	Normal**	2298	438	84.5	15.5

* : repeated in daily dose of 12.47 mg/kg for 7 days.

** : (n=2)

単回投与時のそれと比較したとき両マウス群ともわずかながら減少する傾向が見られた。連続投与時における筋ジストロフィー発症マウス群の [AUC]₀₋₂₄ は非発症マウス群のそれに比較して約 1.5 倍高い値を示した。

筋ジストロフィー発症マウスと非発症マウスに [³H]₁-ベスタチンを単回投与したとき、および連続投与したときの投与後 1 時間における血漿中および筋肉中代謝物の検索を行った。

血漿抽出物中に存在する放射活性を HPLC-RID にて検索した結果、前報と同様に血漿中には未変化体であるベスタチンとアミド結合の切断により生成する (2*S*, 3*R*) AHPA の存在が確認された。これらの放射活性をベスタチン換算したときの血漿中濃度を表 2 に示した。さらに筋肉中のそれらを表 3 に示した。単回投与後 1 時間における血漿中ベスタチン濃度は両マウス群とも投与量の増加にともなって増加し、筋ジストロフィー発症マウスの方が非発症マウスに比較して高い傾向を示した。しかしながら血漿中のベスタチンと (2*S*, 3*R*) AHPA の存在比は両マウス群ともよく一致しており、高投与量の場合、ベスタチンの存在比が高い値を示すことが認められた。連続経口投与時の最終回投与後 1 時間における血漿中ベスタチン濃度は両マウス群とも単回投与群に比べて高い値を示し、その存在比は 96% であった。

さらに筋肉中に存在するベスタチンと (2*S*, 3*R*) AHPA の存在比を検討したとき、ベスタチンの存在比は血漿中のそれに比較して低い値を示し、(2*S*, 3*R*) AHPA の存在比の高いことが確認された。また筋ジストロフィー発症マウスの筋肉中に存在するベスタチンの割合は非発症マウスのそれに比較して約 1.2~1.3 倍高い値を示した。連続投与時の筋肉中ベスタチン濃度は両マウスとも単回投与群に比して約 6~7 倍高い値を示し、さらに筋ジストロフィー発症マウスの方が高い傾向を示した。また筋肉中ベスタチンの存在比は筋ジストロフィー発症マウスで 90.9%, 非発症マウス

Table 4 (2*S*, 3*R*) AHPA formation in the incubation mixture of [³H] bestatin and mouse skeletal muscle homogenate.

(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>) AHPA Formed*	
Normal	Dystrophic
20.4	10.2

* pmol/28.6 mg protein/24 hr

スでは 84.5% と前者の方が高い値を示した。

標的組織である筋肉中におけるベスタチンと (2*S*, 3*R*) AHPA の存在比が両マウス群ともに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考えられた。そこで両マウスの筋肉ホモジネートを用い、[³H]₁-ベスタチンと 24 時間 *in vitro* でインキュベートした。表 4 に示すように、この反応により [³H]₁-ベスタチンから (2*S*, 3*R*) AHPA が生成することが確認され、その生成量は筋ジストロフィー発症マウスの筋肉ホモジネートを使用したとき、非発症マウスのそれに比較して 1/2 にすぎなかった。このことより筋肉中に移行したベスタチンが筋肉中に存在する加水分解酵素により (2*S*, 3*R*) AHPA に変換するものと考えられ、筋肉中ベスタチンの存在比が血漿中のそれより低い値を示す原因の一つと考えられる。さらに筋ジストロフィー発症マウスと非発症マウスの筋肉中に存在するベスタチンの量的変化はベスタチンに対する水解酵素の量的変化に寄因するものなのか、それともベスタチンに対する酵素のアフィニティー変化すなわち質的变化を伴うものであるのかは現在不明であるが極めて興味深いところである。

筋ジストロフィー発症マウスに [³H]₁-ベスタチンを 12.47 mg·2.23 mCi/kg の割合で単回経口投与したとき、投与後 24 時間における放射活性の尿および糞中排泄率を表 5 に示した。投与した [³H]₁-ベスタチンは 0~24 時間にその放射活性の 83.4% が尿中に、2.5% が糞中に排泄された。またこの尿を HPLC-RID にて尿中代謝物を検索し

Table 5 Excretion rates (% of dose) of the radioactivity in 24 hr urine and feces after a single oral-administration to male dystrophic mice ($n=4$) in a dose of 12.47 mg/kg of [^3H] bestatin.

Mouse No	% of Dose		
	Urine	Feces	Total
1	94.4	3.4	97.8
2	84.3	2.8	87.1
3	86.7	1.4	88.2
4	68.1	2.5	70.6
Mean \pm S. D.	83.4 \pm 11.1	2.5 \pm 0.8	85.9 \pm 11.3

Table 6 Excretion rates (% of dose) of bestatin and (2S, 3R) AHPA as metabolite in 24 hr urine after a single oral administration to male dystrophic mice ($n=4$) in a dose of 12.47 mg/kg of [^3H] bestatin.

Mouse No	% of Dose		Total
	(2S, 3R)AHPA	Bestatin	
1	13.0	81.4	94.4
2	12.7	71.6	84.3
3	10.0	76.7	86.7
4	7.6	60.5	68.1
Mean \pm S. D.	10.8 \pm 2.5	72.6 \pm 9.0	83.4 \pm 11.1

た結果、前報と同様に尿中には未変化体であるベスタチンとその代謝物である (2S, 3R) AHPA のみが存在し、他の代謝物を確認するには至らなかった。表 6 に示すように、両代謝物の尿中排泄率はベスタチン 72.6% および (2S, 3R) AHPA 10.8% であった。これらの結果は前報に記載した結果と良く一致しており、筋ジストロフィー発症マウス、および同系非発症マウスにおいて、その 24 時間における排泄率および尿中代謝物の割合に差は認められなかった。

ベスタチンは筋ジストロフィー発症マウス、非発症マウス共にすみやかに吸収されその血液中濃度曲線は 2 相性を示した。ベスタチン単回投与群、連続投与群共に T_{\max} は 0.5 時間を示し、 $[\text{AUC}]_{0-24}^{\text{h}}$ は投与量の増加に伴い高い値を示した。

血漿中には未変化体であるベスタチンが 80% 以上存在し、その値は投与量の増加に伴って高い値を示した。また、両マウス群の投与量の増加に伴う血漿中ベスタチンおよび代謝物である (2S, 3R) AHPA の存在比に差は見られなかった。

筋肉中ベスタチンの存在比は血漿中のそれに比べて低い値を示した。特に非発症マウスにおけるベスタチンの存在比は発症マウスのそれに比して低い値を示した。*in vitro* の実験結果より、この原因の一つとして筋肉中に存在する加水分解酵素によりベスタチンが (2S, 3R) AHPA へと変換されることが確認できた。

さらに筋ジストロフィー発症マウスと非発症マウスの筋肉中に存在する加水分解酵素の量的あるいは質的变化がうかがえる。

ベスタチンの尿中排泄率は 83.4% を示し、吸収後すみやかに排泄される。また、その尿中にはベスタチンが 72.6%、(2S, 3R) AHPA が 10.8% 存在しており他の代謝物は確認できなかった。

AHPA

3. ベスタチンの幼若ラットにおける血中動態について

ベスタチンは難病治療薬として小児への適用が (筋ジストロフィー) 検討されている。そこで今回、幼若ラット (離乳後の 3 週齢ラット) にベスタチンを単回経口投与または、3 週間連続経口投与した後、経時的に採血を行いベスタチンおよび *p*-ハイドロキシベスタチンの血中濃度測定を行い、その血中動態について検討を行った。

1) 実験材料および方法

a) 実験動物

チャールスリバー社より購入した Sprague-Dawley 系雄ラットを実験に供した。動物は 1 ケージにつき 1 匹を収容し、飼料 (固型飼料, CRF-1, オリエンタル酵母) および飲料水 (水道水) は自

由摂取させた。飼育条件は、室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ とし、照明は午前 6:00 から午後 6:00 までの 12 時間とした。

経時的採血には各時間 5 匹を配し計 40 匹を使用した。

b) 投与量

ベスタチンの臨床用量として、 $600 \sim 1.200 \text{ mg/body/day}$ と高用量が用いられることがあるので、本実験の投与量は、すでに亜急性毒性試験でラットにおける最大安全量と確認されている 117 mg/kg/day を設定した。

c) 投与薬剤の調製

ベスタチンは、ボールミルを用いて 0.5% Carboxymethyl cellulose sodium salt 溶液に約 2 時間攪拌懸濁させた後、実験に供した (23.4 mg/ml)。

d) 採血および検体保存

ラットにベスタチンを 117 mg/kg の割合で経口投与し、投与 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0, 24.0 時間後にエーテル麻酔下、腹大動脈より採血し、室温下 30 分放置後 $3,000 \text{ rpm}$ で 10 分間遠心分離し上層 (血清) をサンプル瓶に採取し、測定まで -20°C 下で保存した。

e) 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。通常の分析試薬は和光純薬より、無水トリフルオロ酢酸 (TFAAn) およびトリメチルシリルジメチルアミン (TMSDMA) は東京化成より、 $[^2\text{H}_4]$ メタノールはメルクジャンより、アンバーライト XAD-IV はオルガノ社よりそれぞれ購入した。塩酸- $[^2\text{H}_4]$ メタノール溶液 (5%) は、 $[^2\text{H}_4]$ メタノールに塩酸ガスを導入することによって調製した。

内部標準物質は、 $[^2\text{H}_6]$ Bestatin : [(2S, 3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl(AHPA)- $[^2\text{H}_6]$ S, R-[leucine], $[^2\text{H}_6]$ *p*-hydroxybestatin : [*p*-hydroxy(2S, 3R) AHPA- $[^2\text{H}_6]$ S, R-[leucine] をそれぞれ用いた。

f) 抽出、誘導化および測定法

ベスタチンおよび *p*-ヒドロキシベスタチンの抽出、誘導化および測定は Koyama⁵⁾ らの方法に従って行った。

2) 結果および考察

幼若ラットにベスタチンを 117 mg/kg の割合で単回投与および 3 週連続投与したときのベスタチン、*p*-ヒドロキシベスタチンの血清中濃度の推移を図 5 に、また、ベスタチンについてこれらの血清中濃度値より算出した pharmacokinetic parameter を表 7 に示した。

単回および 3 週連続投与のいずれにおいても T_{max} は 0.5 時間を示し、 $[\text{AUC}]_{0-24}$ はそれぞれ $67502, 60617 \text{ ng}\cdot\text{hr/ml}$ であり、ほとんど変化は認められなかった。連投による α 相の半減期は単回投与時の約 1.4 倍となり、やや長くなる傾向が見られた。β 相の半減期は単回投与時の約 4 倍と長くなったが、これは単回投与時の 12 時間値 (650 ng/ml) が 6 時間値 (435 ng/ml) より高い値になっている (この原因は不明) ことに起因するものであり、実際にはそれ程の違いはないものと思われる。

p-ヒドロキシベスタチンの血清中濃度の推移は、今回 3 点 (1, 2, 4 時間) しか測定できなかったが、連投による変化は見られなかった。

今回、ベスタチンを幼若ラットに単回および 3 週連続経口投与したときの血清中ベスタチン、*p*-ヒドロキシベスタチン濃度を測定した結果、連投によって α 相の半減期がやや長くなった他、変化は認められず、特に連投による血中への蓄積性は認められなかった。

4. Duchenne 型進行性筋ジストロフィー小児患者におけるベスタチンの代謝

健康成人男子におけるベスタチンの生体内動態については詳細に検討されているが小児に対して

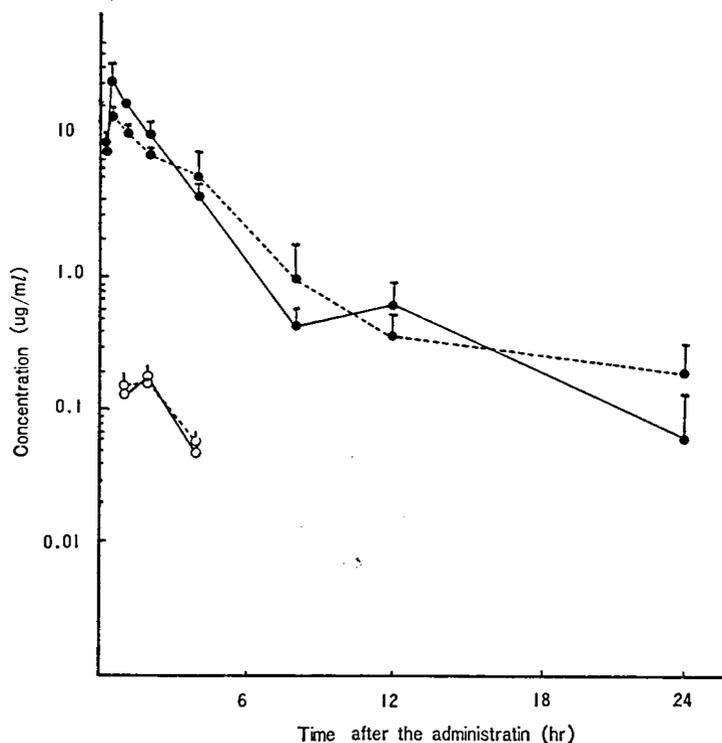


Fig. 5 Serum concentration of bestatin (●) and *p*-hydroxybestatin (○) in rats after the oral administration of bestatin (117 mg/kg, *n*=5)
 —; single administration,
; repeated administration for three weeks

Table 7 Pharmacokinetic parameters of serum concentration after the oral administration of bestatin.

Administration	[AUC] ₀₋₂₄	T _{max}	half-life		K _{ea}	K _{eβ}
			α	β		
single	67502	0.5	1.14	4.95	0.610	0.140
repeated	60617	0.5	1.62	19.63	0.429	0.0353

[AUC]₀₋₂₄: area under blood concentration (ng·hr/ml)

T_{max}: time to maximum blood concentration (hr)

K_{ea}, K_{eβ}: elimination rate constant (hr⁻¹)

の報告はない。今回、Duchenne型進行性筋ジストロフィー症の小児に対し、その治療を目的としてベスタチンが連続投与されたのを機会に、尿中代謝物のプロファイルを検討したのでその結果について報告する。

1) 実験方法

a) 対象および投与方法

対象は東京女子医大小児科で加療中のベスタチン投与歴のないDMD患者2例に1ないし2カ月間ベスタチンを連続経口投与した。ただし、尿の採取日の前日は朝1回の服薬とした。

b) 尿中代謝物の同定

初日および投与1カ月および2カ月後の尿の1部を, Amberlite XAD-IV カラムクロマトグラフィ (18 mm ID×15 cm) に付した. 水洗後, メタノールにて溶出しその溶出液を減圧濃縮し, 残留物を塩酸-メタノールで処理し, メチルエステル誘導体とした. ついで無水トリフルオロ酢酸 (TFAAn) でトリフルオロアセチル化 (TFA 化) した後, 過剰の TFAAn を減圧下で留去した. 残留物に *N*-トリメチルシリルジメチルアミン (TMSDMA) を加えて GC-MS 試料とした.

GC-MS

JMA-DA 5000 mass data system (日本電子, 東京) を装着した JMS-DX 300 mass spectrometer (日本電子) を用いた. 分析には 3% の OV-3 を chromosorb W-HP (80~100mesh) にコーティングしたものを充填したガラスカラム (3 mm ID×1 m) を使用した. 気化室温度, セパレーターおよびイオン源温度は 250°C で使用した. カラム温度は 170°C で 5 分間保持した後, 4°C/min で 260°C まで昇温, 同温度で 10 分間保持した. イオン加速電圧およびイオン化電圧はそれぞれ 3.0 kV および 70 eV とした. 調製した試料を GC-MS に注入し, その 1 分後から 1.5 秒ごとにスキャンを繰り返した. 得られたデータからベスタチンおよびその代謝物のマススペクトルの情報に基づいたそれぞれの化合物に特徴的なイ

オンをモニタリングイオンとして用いてマス chromatogram を描かせた. さらに代謝物の特徴的なイオンに反応したピークはそのマススペクトルを描かせ, ベスタチン, *p*-OH-ベスタチンおよび (2*S*, 3*R*) AHPA 標準品のマススペクトルと比較し, 代謝物の同定を行った.

2) 実験結果

図 6 にベスタチン, *p*-OH ベスタチン, (2*S*, 3*R*) AHPA 標準品のメチルエステル-*N*-TFA アミド-*O*-TMS エーテル誘導体のマススペクトルを示した. ベスタチン, *p*-OH ベスタチン, (2*S*, 3*R*) AHPA 共に分子イオンは観察されないものの分子イオンからメチル基の脱離した *m/z* 475, 563, 362 の各イオンが観察された. さらにベスタチン, *p*-OH ベスタチンにおいて基準イオンとして McLafferty 転位による *m/z* 275 のイオンが観察された. また, ベンジル基に由来するトロポニウムイオンである *m/z* 91 のイオンがベスタチン誘導体のマススペクトルに, *p*-OH ベンジル基に由来する *m/z* 179 が *p*-OH ベスタチン誘導体のマススペクトルにそれぞれ特徴的なイオンとして観察された. また, *p*-OH ベスタチン誘導体のマススペクトルに観察された, *m/z* 293 のイオンはこのペプチドの CH-CONH 結合の切断により生じた *m/z* 406 のイオンからさらに CF₃

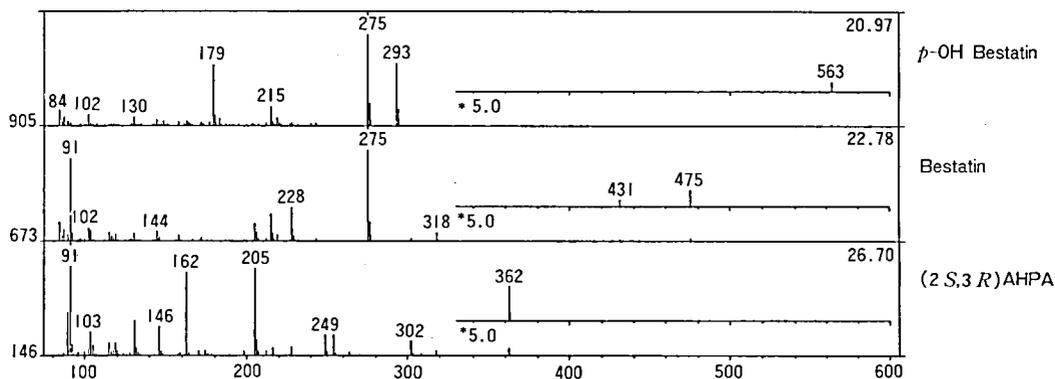


Fig. 6 Mass spectra of the *N*-TFA-*O*-TMS ether methyl ester derivatives of (2*S*, 3*R*) AHPA, bestatin and *p*-OH bestatin.

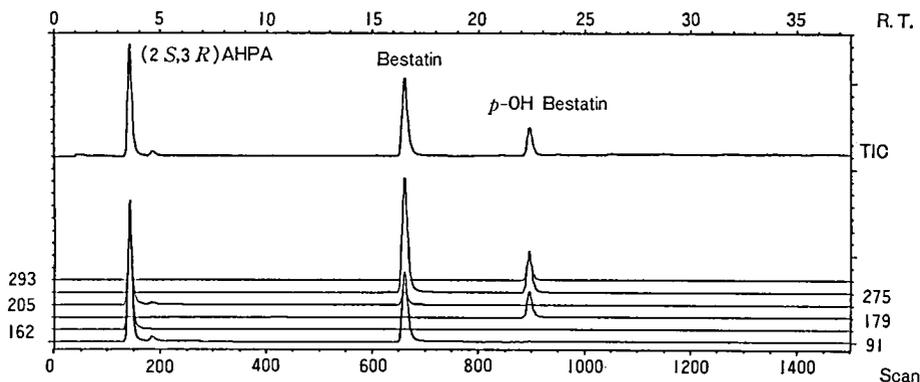


Fig. 7 Mass chromatogram of the *N*-TFA-*O*-TMS ether methyl ester derivatives of (2*S*, 3*R*) AHPA, bestatin and *p*-OH bestatin.

CONH₂ の脱離によって生じたものと推察された。(2*S*, 3*R*) AHPA 誘導体のマススペクトルにはベスタチン、*p*-OH ベスタチンと同様に McLafferty 転位による *m/z* 162 のイオンが観察されるとともにベンジル基に由来するトロポニウムイオンである *m/z* 91 のイオンが観察された。また、*m/z* 205 のイオンは分子イオンから COOCH₃ 基の脱離によって生じたイオン *m/z* 318 からさらに CF₃CONH₂ の脱離によって生じたイオンである。これらベスタチン、*p*-OH ベスタチン、(2*S*, 3*R*) AHPA に特徴的なイオンである *m/z* 91, 162, 179, 205, 275 をモニタリングイオンとして使用したときのセレクトッドイオンレコーディング法によるマスクロマトグラムを図 7 に示した。クロマト上にはこれら特徴的なイオンにそれぞれ応答する 3 本のピークが得られ、各ピークに相当するマススペクトルおよび GC-MS 上における保持時間から 3.5 分に (2*S*, 3*R*) AHPA, 16.5 分にベスタチン, 22.3 分に *p*-OH ベスタチンが出現することが確認できた。これらの知見をもとに各患者の尿から抽出した試料を分析した結果について述べる。

〈症例 1 : 7 歳 10 カ月, 体重 18 kg, 投与量 130 mg/日〉

投与第 1 日目と連続投与 1 カ月後および 2 カ月後の 24 時間尿抽出物のクロマトグラムを図 8 に

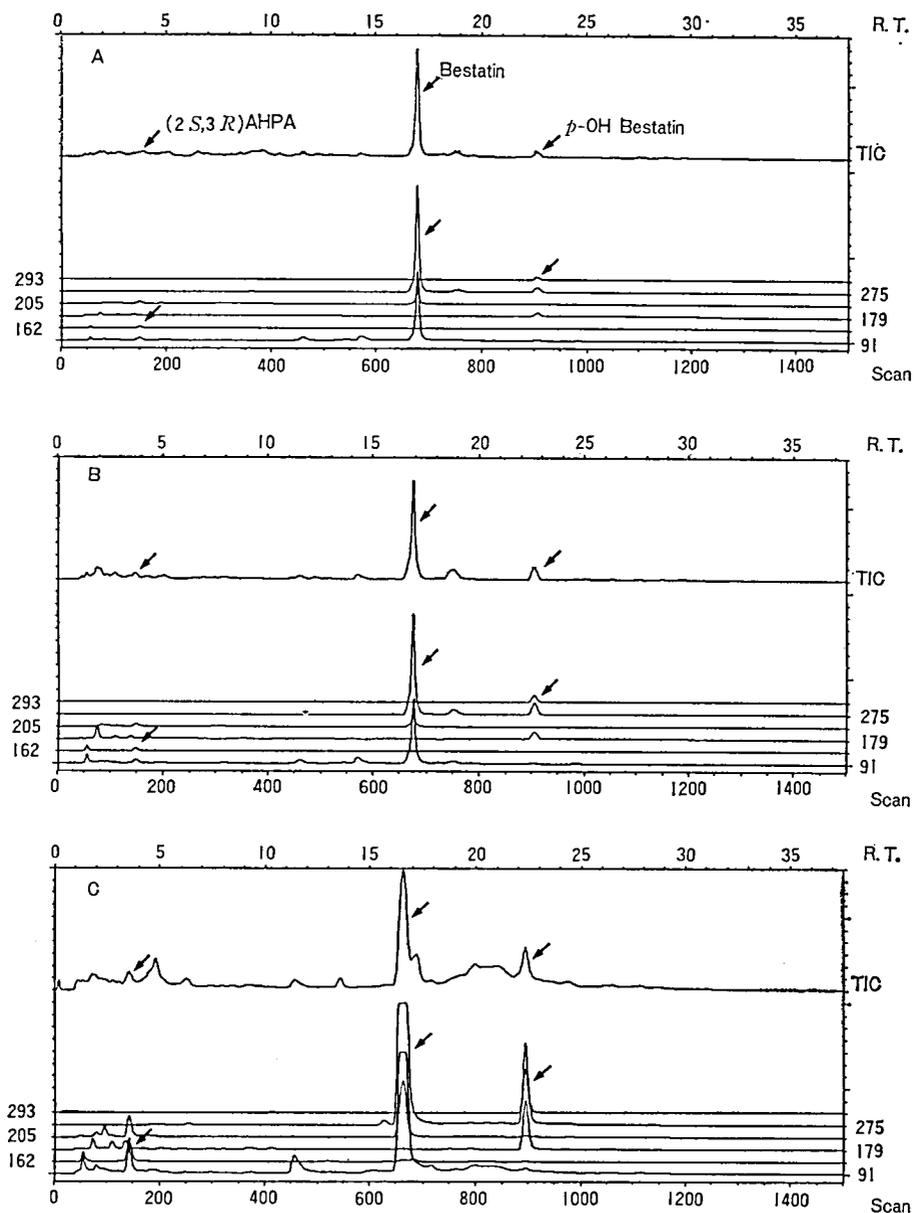
示した。クロマト上には *m/z* 91, 162, 205 のモニタリングイオンに反応するピークが 3.5 分に、*m/z* 91, 205, 275 に反応するピークが 16.5 分に、*m/z* 179, 275, 293 に反応するピークが 22.3 分に出現し、これら 3 本のピークはそれぞれ (2*S*, 3*R*) AHPA, ベスタチン, *p*-OH ベスタチンであることがそれらのマススペクトルから確認された。それ以外の代謝物は長期連用した際にも認められなかった。ベスタチンを連続投与する時、第 1 日目に比べてベスタチンに対する代謝物 (*p*-OH ベスタチンおよび (2*S*, 3*R*) AHPA) の量比に変化が見られ、連続投与により代謝物の増加する傾向が示唆された。

〈症例 2 : 5 歳 8 カ月, 体重 15.2 kg, 投与量 100 mg/日〉

投与第 1 日目と連続投与 1 カ月後の 24 時間尿抽出物のクロマトグラムを図 9 に示した症例 1 と同様に代謝物として *p*-OH ベスタチン, (2*S*, 3*R*) AHPA が確認され、さらに連続投与により代謝物の増加する傾向が示唆された。

3) 考 察

ベスタチンを人に投与したとき、投与量の 90% が尿中に排泄され、しかもその大部分が未変化体であり、代謝物としては *p*-OH ベスタチン, (2*S*, 3*R*) AHPA が確認されている。



T. N. (a boy of 7 years and 10 months) 18 kg, dose of 130 mg/day(3times)

A : 24 hrs, urine of first day

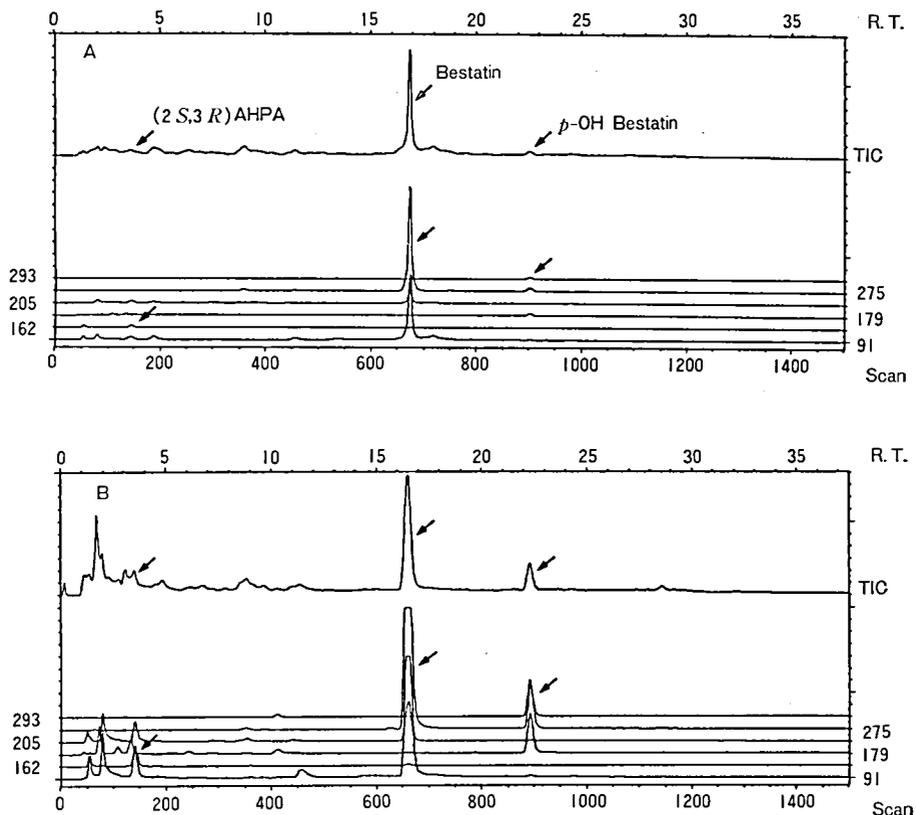
B : 24 hrs, urine after 1 month

C : 24 hrs, urine after 2 months

Fig. 8 Mass chromatograms of the *N*-TFA-*O*-TMS ether methyl ester derivatives of urinary metabolites after continuous administration of bestatin (20 mg/kg) in the dystrophic patient.

今回、小児DMD患者2名に連続投与されたベスタチンの体内動態を検討すべくその尿中代謝物を検索した。その結果、尿中に排泄された大部分

が未変化体であるベスタチンであり、これに加えて代謝物として *p*-OH ベスタチン、(2*S*, 3*R*) AHPA が確認された。また、投与回数の増加に



Y. Y. (a boy of 5 years and 8 months) 15.2 kg, dose of 100 mg/kg (3 times)

A : 24 hrs, urine of first day

B : 24 hrs, urine after 1 month

Fig. 9 Mass chromatograms of the *N*-TFA-*O*-TMS ether methyl ester derivatives of urinary metabolites after continuous administration of bestatin (20 mg/kg) in the dystrophic patient.

つれて、代謝物である *p*-OH ベスタチン、(2*S*, 3*R*) AHPA の比率の増加する傾向が認められた。これらの結果から、ベスタチンは小児、健康成人男子のいずれにおいてもほぼ同様の代謝パターンを示すことが示唆された。

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、室温下に密封状態で 36 カ月および 42 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、ロイペプチンを水素化ホウ素ナトリウムで還元してロイペプチノールとし、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

Table 8 The stability of leupeptin bulk stored at the room temperature.

Lot No.		Residual amount (%) of leupeptin	
		Storage time (month)	
		36	42
32	L-form	95.8	95.4
	D-form	5.3	3.5
35	L-form	92.4	92.0
	D-form	5.8	2.6
36	L-form	94.4	95.6
	D-form	2.9	2.1

量の低下は、ほとんどラセミ化によることがわかった。なお、外観の変化は認められなかった。

2. 硫酸ロイペプチン製剤の研究

前年度に引き続き、bioavailabilityの向上を目的とした腸溶性製剤の研究として、今回は、ロイペプチンの腸溶カプセル剤および腸溶顆粒剤の検討を行った。

検出器：日立 638-4 型紫外吸光度計
(測定波長 200nm)

カラム：Nucleosil 5C18 (H) 4.6mm i.d.×150mm

カラム温度：30°C

移動相：0.05Mリン酸—アンモニウム：メタノール：アセトニトリル=80：12：8

流速：1.4ml/min.

2-1. 腸溶カプセル剤の研究

a) 腸溶カプセル剤の試製実験

ロイペプチン1部、D-マンニトール2部を十分混合し、腸溶性の基材である 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) から成る2号カプセル* (信越化学工業、東京) に充填 (1カプセル中にロイペプチン 50mg および D-マンニトール 100mg を含む) し、腸溶カプセル剤とした。

2) 結果および考察

a) 硫酸ロイペプチン原末の安定性

表8に示すように、室温 42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92.0~95.6%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9に示すように、室温 42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、散剤で94.7%、カプセル剤で91.6%であり、L体含

Table 10 Test results of leupeptin enteric capsules

Test items	Results
Appearance	White powder in clear and colorless capsules
Leupeptin content	46.5 mg/cap.
Disintegration time	
The 1st fluid	Not disintegrated
The 2nd fluid	17~20 (min.)
Weight variation test (deviation)	Within 10%

Table 9 The stability of leupeptin in the oral preparation for the clinical trial stored at the room temperature.

Preparations		Residual amount (%) of leupeptin	
		Storage time (month)	
		36	42
Powder (Leup. 10% in D-mannitol)	L-form	98.3	94.7
	D-form	4.2	6.3
Capsule (Leup. 50mg)	L-form	94.7	91.6
	D-form	5.1	8.7

Table 11 Test results of leupeptin enteric-coated granules

Test items	Results
Appearance	Pale yellow granules
Leupeptin content	7.8%
Disintegration time	
The 1st fluid	Not disintegrated
The 2nd fluid	2~3 (min.)
Particle size distribution	500~1410 (μm)

b) 結果および考察

得られた腸溶カプセル剤の製剤試験の結果を表 10 に示す。これらの結果から、ロイペプチン腸溶カプセル剤は、日局 10、一般試験法記載の崩壊試験法および重量偏差試験法に適合し、腸溶性製剤の特質を十分保持しうるものである。

2-2. 腸溶顆粒剤の研究

a) 腸溶顆粒剤の試製実験

顆粒の処方は、種々検討した結果、ロイペプチン 10 部、D-マンニトール 87 部、PVP (ポリビニルピロリドン) 3 部を混合し、常法により造粒、乾燥後、整粒を行いロイペプチン顆粒を得た。

次に、腸溶性の基材である HPMC-AS 溶液を、裸顆粒に対して 20% 重量部スプレーコーティングし、ロイペプチン腸溶顆粒の試製を行い、ロイペプチン含量約 8% の製剤を得た。

b) 結果および考察

得られた腸溶顆粒剤の製剤試験の結果を表 11 に示す。これらの結果から、ロイペプチン腸溶顆粒剤は、日局 10、一般試験法記載の崩壊試験法および製剤総則記載の顆粒剤の粒度試験に適合し、腸溶性製剤の特質を十分保持しうるものである。なお、製造工程での分解物の生成は、HPLC では認められなかった。

3. ベスタチンドライシロップ剤の安定性に関する研究

前報に引き続きベスタチンドライシロップ剤の安定性を検討した。

1) 実験方法

a) 試料

ベスタチンドライシロップ剤を、室温下に密栓状態で 30 カ月保存したのちに、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に供した。

b) 測定法

試料のベスタチン含量の測定は、昭和 58 年度の本報告書に記載された方法により行った。

2) 結果および考察

室温 30 カ月保存後において試料中のベスタチンの残存率は 98.9% であり、外観も白色であり変化は認められなかった。また、薄層クロマトグラフのスポットは単一であり、分解物の生成は認められず安定であった。

Ⅲ. 毒性試験——ベスタチンの幼若ラットにおける毒性——急性毒性試験および亜急性毒性試験

ベスタチン (以下、NK 421 と略す) は *Streptomyces olivoreticuli* の培養濾液中からアミノペプチダーゼ B 阻害物質として発見されたペプチドで、免疫応答に増強作用を示し、生体の防衛機構を賦活化し癌に抑制作用を示すことから、その抗腫瘍剤としての開発が進められている。

また一方、難病筋ジストロフィー治療薬としてもその適用が注目されているので、今回幼児への臨床適用を考慮し、幼若期ラットを用い、経口投与による急性毒性試験および 13 週間亜急性毒性

試験を実施したのでその結果を報告する。

1. 急性毒性試験

試験方法

1) 材料および方法

a) 使用動物

動物は8週齢で購入したSD系雌雄ラット〔日本チャールス・リバー(株)〕を約4, 5週間飼育後交配し、自然分娩させて得た3および4週齢の雌雄ラットを使用した。動物数は対照群を含め4投与群を設定し、各群には雌雄各5匹を配し、計80匹を使用した。

飼育は温度 20~24°C, 湿度 40~70%, 換気回数12回/時間, 照明時間12時間(午前6時から午後6時まで)のバリエーションシステム内の飼育室で行い、動物は生後19日で離乳させるまで母獣とともにエコネージで、離乳から投与前日まではポリカーボネートケージでそれぞれ群飼いし、投与後は、5連ケージで個別飼育した。

飼料はオリエンタル酵母(株)製の固型飼料CRF-1を、水は水道水をそれぞれ自由摂取させた。

b) 投与方法

NK 421は日本化薬(株)で製造したロット番号004-2Rを使用した。

投与用量はすでに実施したラットの急性毒性試験⁶⁾(5週齢で開始)を参考にして、0.5g/kg, 1.0g/kg および2.0g/kg(投与可能最大量)を設定した。

NK 421は0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム(以下、CMCと略す)溶液に6.25g/100mlの濃度で懸濁させ、投与容量を8, 16および32ml/kgと調整し、調製後30分以内に各投与群に所定の用量を投与した。対照群には0.5% CMC溶液を投与した。

投与は滅菌したガラス製注射筒および金属性胃

ゾンデを使用し、前日から摂水下で約16時間絶食している動物へ単回経口投与した。

1) 諸検査

a) 一般状態観察

一般状態の観察は投与後14日間行った。投与日は投与後6時間まで、翌日からは1日1回全例について実施した。

b) 体重測定

体重測定は1日1回全例について実施した。

c) 病理学的検査

観察期間終了後、全例を剖検し肉眼的観察を行った。

肉眼的観察終了後、さらに最高用量2.0g/kg投与群の雌雄各3例について、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、心臓、胃および十二指腸、小腸(空回腸)、副腎、精巣、卵巣を摘出し、常法に従って10% Buffered formalin 水溶液で固定し、パラフィン包埋、薄切の後、HE染色を施し組織学的検索を行った。

d) 統計学的解析

体重は対照群と各投与群の間でStudentt検定を行い解析した。

試験成績

1) 一般状態および死亡の有無

一般状態観察では3週齢および4週齢のラットとも試験期間を通じ著変はみられず、また、死亡も認められなかった。

2) 体重変動(Fig.10, 11)

3週齢および4週齢のラットとも、体重変動に著変はみられなかった。

3) 剖検所見

3週齢および4週齢のラットとも、剖検所見に異常はみられなかった。

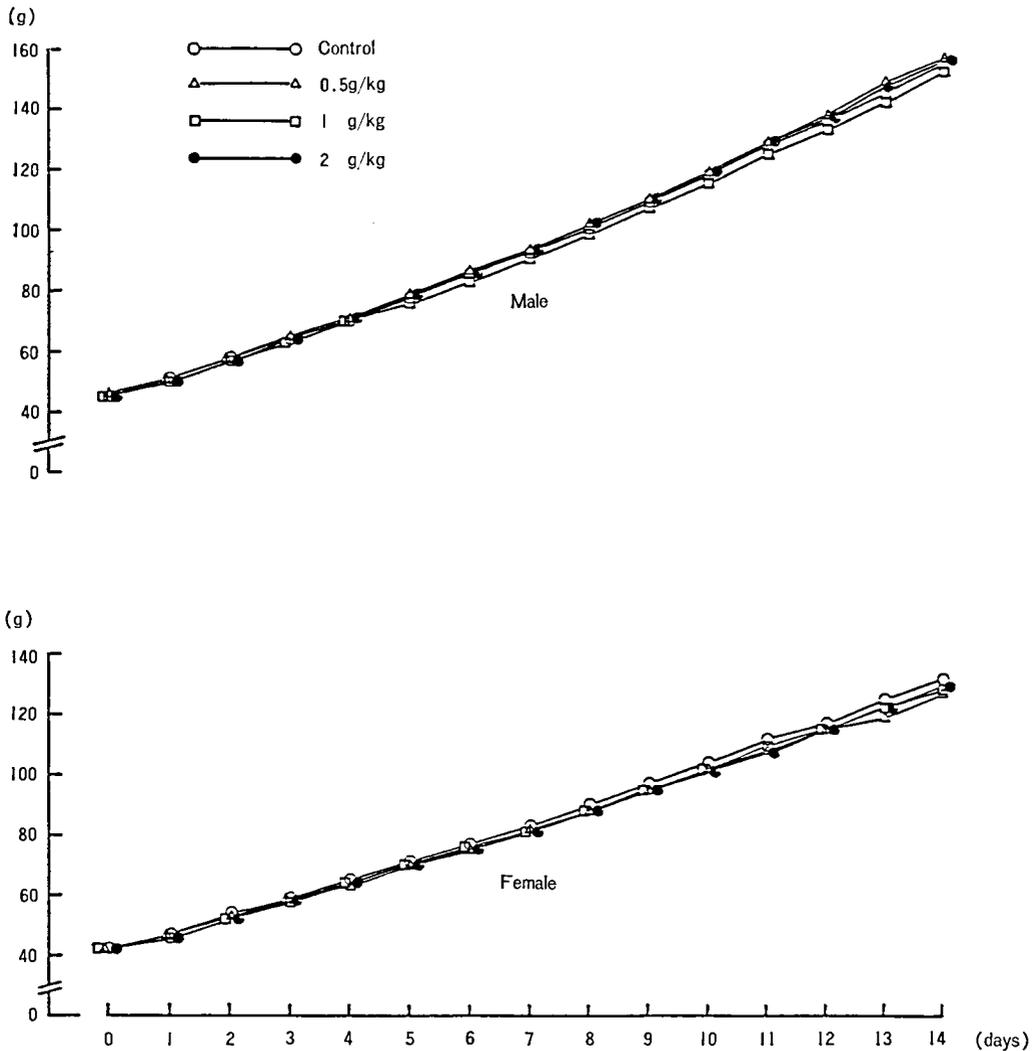


Fig. 10 Average body weight changes in rats (3 weeks of age) treated singly PO with NK 421

4) 病理組織学的検査

病理組織学的検査では3週齢および4週齢の2.0g/kg投与群で、肝臓に小細胞浸潤巣の散在、腎臓に尿細管上皮の再生・間質性細胞浸潤などがそれぞれ軽度に散見されたが、いずれも対照群にも認められた。

その他の器官には著変はみられなかった。

まとめ

3週齢および4週齢の幼若ラットを用い、NK 421の経口投与による急性毒性試験(投与量: 0.5, 1.0および2.0g/kg)を実施したが、投与可能最大量(2.0g/kg)投与においても、一般状態、体重変動、病理学的検査のいずれにも著変はみられず、NK 421は幼若ラットにおいても、極めて低毒性の物質であることが認められた。

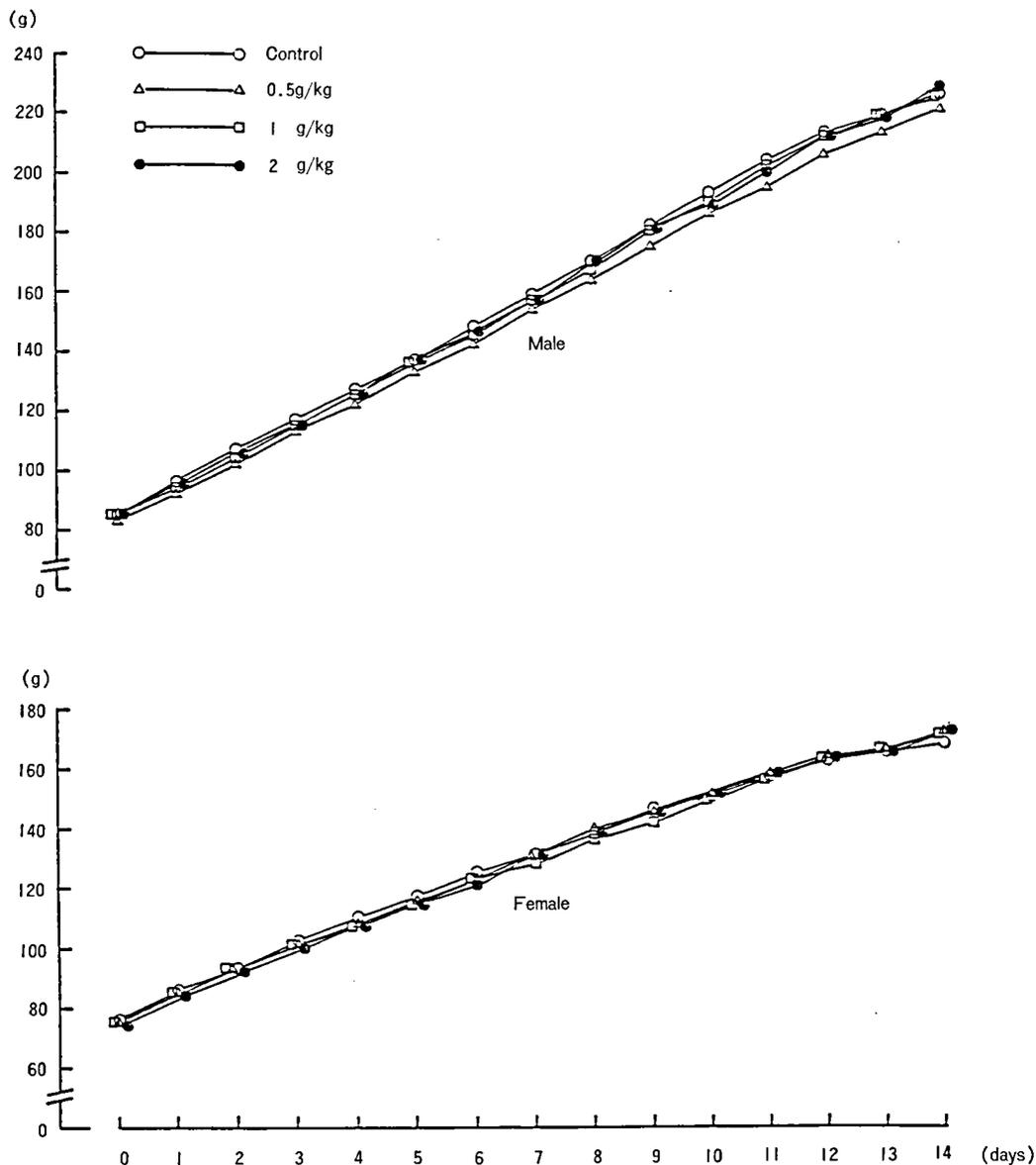


Fig. 11 Average body weight changes in rats (4 weeks of age) treated singly PO with NK 421

2. 亜急性毒性試験

試験方法

1) 材料および方法

a) 使用動物

動物は生後2週齢のSD系雌雄ラット〔日本チャールスリバー(株)〕を母獣とともに購入し、1

週間母獣と一緒に飼育した後3週齢で離乳させ、試験を開始した。動物数は対照群を含め5投与群を設定し、各群には雌雄各15匹を配し、計150匹を使用した。

飼育は温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数12回/時間、照明時間12時間(午前6時から午後6時まで)のオープンシステムの飼育室で行い、動物はラット用ハンギング型ケージ(ステンレス製)に1ケージ当り1匹を収容した。

飼料はオリエンタル酵母(株)製の固型飼料 CRF-1 を、水は水道水をそれぞれ自由摂取させた。

b) 投与方法

NK 421 は日本化薬(株)で製造したロット番号 004-2R および 002 を使用した。

投与用量はすでに実施したラットの亜急性毒性試験^{7,8)} (5 または 6 週齢で開始)における, 39 mg/kg (最大無作用量), 117 mg/kg (安全量), 350 および 700 mg/kg (生理的投与可能最大量)を設定した。

NK 421 は各用量毎に投与容量が 5 ml/kg 体重 (ただし, 700 mg/kg 投与群では 10 ml/kg) になるように, 毎日投与前に滅菌した 0.5% CMC 溶液にポールミルを使用して 2 時間以上攪拌懸濁させ投与した。対照群には 0.5% CMC 溶液を投与した。

投与は滅菌したガラス製注射筒および金属性胃ゾンデを使用し, 1 日 1 回 13 週間連続経口投与した。

2) 諸検査

a) 一般状態観察 (体重・摂餌量)

ラットの一般状態の観察は 1 日 1 回全例について投与直後に実施した。体重および摂餌量の測定は毎週 1 回全例についてそれぞれ実施し, 摂餌量は 1 週間の累積摂取量を測定した。

b) 血液検査

13 週間投与終了後, 各群雌雄 10 例について約 18 時間絶食後, エーテル麻酔下で腹大動脈より採血し, 下記の項目について実施した。

i) 血液学的検査

血液学的検査では赤血球数, 白血球数, ヘモグロビン量 (以上, トーア自動血球計数装置 CC-108 システム), ヘマトクリット値 (高速遠心法), 血小板数 (トーアプレートレットカウンター PL-100) および末梢血液像 (Wright 染色) を測定した。

ii) 血液生化学的検査

b) で得られた血漿を日本電子(株)製の臨床自

動分析装置クリナライザー N2C4 型を使用して, 以下の項目について分析を行った。

トランスアミナーゼ (GOT, GPT : NADH₂ 法), アルカリフォスファターゼ (ALP : *p*-NPP 法), ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP : *l*-L-*p*-NA 法), 乳酸脱水素酵素 (LDH : NADH₂ 法), 血糖 (GLU : GOD-POD 法) 総コレステロール (T-CHO : 酵素法), 総蛋白質 (T-P : Biuret 法), A/G 比 (A/G ratio : T-P 値および ALB 値から算出), 尿素窒素 (BUN : Urease GLDH-NADH 法), クレアチニン (CRNN : Jaffe 変法), また, ナトリウム (Na : 炎光光度法) およびカリウム (K : 炎光光度法) は日立製炎光光度計 205D 型を, クロライド (Cl : 電量滴定法) は平沼製クロライドカウンター CL-3 型を使用して測定を行った。

c) 尿検査

30, 60 および 90 回投与終了後, 各群雌雄 5 例のラットから直接新鮮尿を採取し, 尿診断用試験紙マルチスティックス [マイルス三共(株)] を用いて, pH, 蛋白質, 糖, 潜血, ケトン体, ビリルビンおよびウロビリノーゲンを測定した。比重は屈折法により測定した。

d) 病理学的検査

b) で腹大動脈から採血し放血致死させた動物について胸腹部および頭蓋部を切開し, 諸器官の肉眼的観察を実施した。

肉眼的観察終了後, 心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 胸腺, 精巣, 卵巣, 前立腺, 子宮, 脳, 下垂体, 膀胱を摘出し, 全例についてメトラー電子天秤 PK 300 でその湿重量を測定した。

さらに, 全例について, 重量測定器官および脊椎骨, 大腿骨, 胃および十二指腸, 小腸 (空回腸), 大腸 (結腸), 腸間膜リンパ節, 膵臓, 甲状腺を摘出し, 常法に従って 10% Buffered formalin 水溶液で固定し, パラフィン包埋薄切の後, HE 染色およびアザンマロリー染色を施して組織標本を作製し, 組織学的検索を行った。

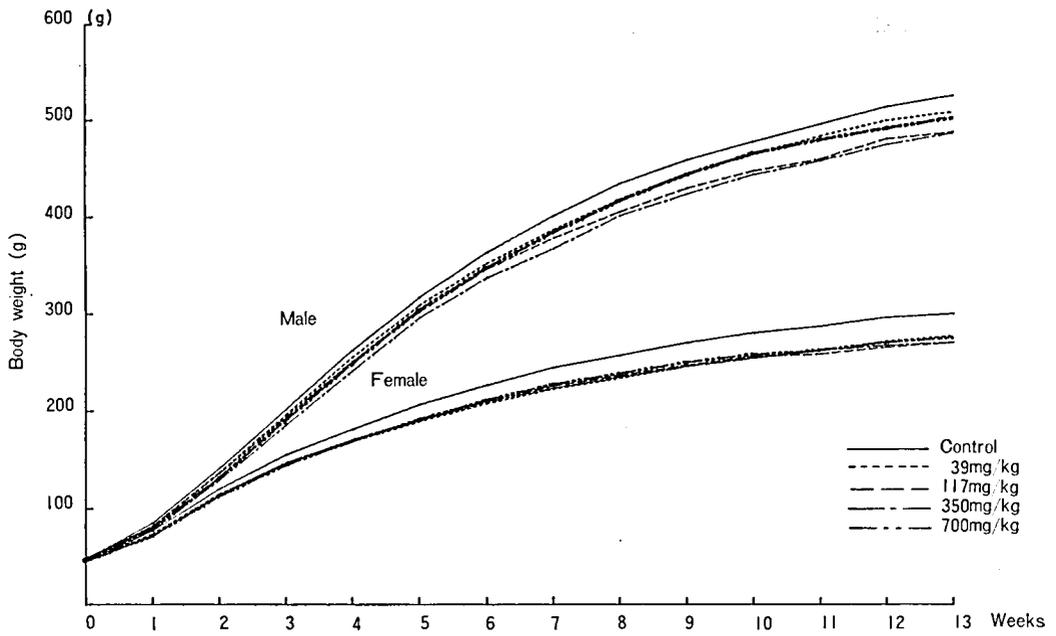


Fig. 12 Average body weight changes in rats treated PO with NK 421 for 13 weeks

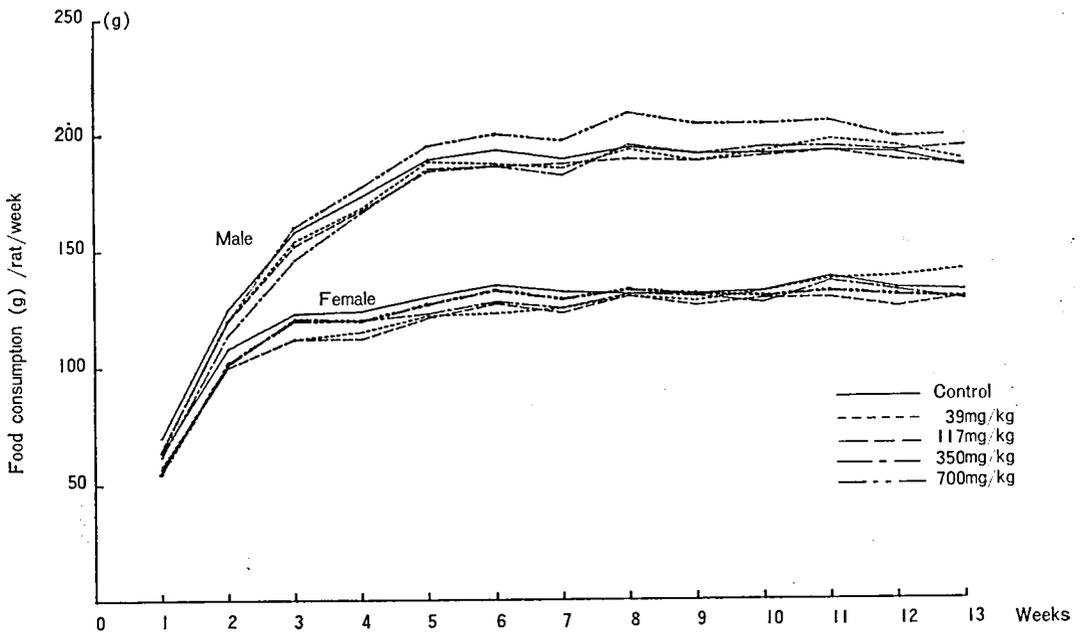


Fig. 13 Food consumption in rats treated PO with NK 421 for 13 weeks

Table 12 Urinary analysis in rats treated PO with NK 421 for 13 weeks

After dosing times	Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	pH		Protein	Glucose	Ketone body	Bilirubin	Occult blood	Urobilinogen	Specific gravity (Mean±SD)		
				6	7								8	9
30	Male	Control	5	1	4	1	3	1	5	5	1	4	1.047±0.0129	
		39	5	4	4	1	3	1	5	5	5	5	1.028±0.0158	
		117	5	2	3	4	1	5	5	5	2	3	1.036±0.0145	
		350	5	1	1	3	5	5	5	5	1	4	1.052±0.0129	
	700	5	1	1	3	3	2	5	5	1	3	1	1.050±0.0102	
	Female	Control	5	1	3	1	5	5	5	5	2	2	1	1.026±0.0088
		39	5	2	3	4	1	5	5	5	2	3	5	1.030±0.0119
		117	5	3	2	3	2	5	5	5	4	1	5	1.024±0.0189
		350	5	1	1	2	1	4	5	5	2	3	5	1.026±0.0044
		700	5	1	4	5	1	4	5	5	2	3	5	1.024±0.0109
Control		5	2	1	2	1	4	5	5	3	2	5	1.045±0.0060	
60	Male	39	5	2	3	5	5	5	5	5	4	1	1.042±0.0033	
		117	5	5	5	5	5	5	5	3	2	5	1.046±0.0031	
		350	5	3	1	1	5	5	5	5	5	5	1.049±0.0036	
		700	5	1	4	4	4	1	5	5	3	2	5	1.054±0.0077
	Female	Control	5	1	1	1	2	1	2	2	2	2	3	1.039±0.0117
		39	5	1	4	3	2	5	5	5	5	5	5	1.031±0.0104
		117	5	1	1	2	1	2	3	5	5	5	5	1.035±0.0182
		350	5	1	1	1	2	1	4	5	5	5	5	1.029±0.0033
		700	5	2	3	3	2	5	5	5	5	5	5	1.032±0.0120
		Control	5	1	1	3	4	1	5	5	2	1	2	1.056±0.0158
90	Male	39	5	2	3	1	4	5	5	5	5	5	1.047±0.0096	
		117	5	5	5	4	1	5	5	5	5	5	1.043±0.0076	
		300	5	2	2	1	1	3	1	5	5	4	1	1.048±0.0058
		700	5	3	2	4	1	5	5	5	3	1	1	1.050±0.0050
	Female	Control	5	1	1	2	1	2	2	5	5	5	5	1.038±0.0076
		39	5	2	3	5	5	5	5	5	5	5	5	1.029±0.0125
		117	5	1	1	3	5	5	5	5	5	5	5	1.038±0.0080
		350	5	1	2	2	2	3	5	5	5	5	5	1.031±0.0071
		700	5	1	2	1	1	3	2	5	5	5	5	1.032±0.0152
		Control	5	1	1	1	1	2	2	5	5	5	5	1.032±0.0152

Table 13 Hematological values in rats treated PO with NK 421 for 13 weeks

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	Differential white blood cell (%)							PI ($\times 10^2/\text{mm}^3$)
							Ly	Neut		Eo	Ba	Mo	Others	
								St	Seq					
Male	Control	10	841	14.5	46.4	117	78	0	18	1	0	3	0	629
			36.9	0.50	1.54	35.4	10.7	0.0	9.9	1.1	0.0	1.6	0.0	61.9
	39	10	842	14.6	46.2	115	84	0	13	1	0	2	0	674
			31.1	0.78	2.20	35.0	6.6	0.3	7.4	0.8	0.0	1.6	0.0	64.5
	117	10	861	14.7	46.4	107	84	0	13	0*	0	2	0	610
			43.6	0.47	2.08	35.3	5.3	0.0	5.3	0.5	0.0	1.0	0.4	72.2
	350	10	860	14.6	46.0	103	84	0	11	1	0	4	0	592
		43.4	0.80	2.38	26.7	5.7	0.0	5.2	0.9	0.0	2.3	0.0	62.6	
700	10	839	14.1	44.7*	95	81	0	15	1	0	3	0	584	
		29.0	0.39	1.49	14.7	4.8	0.0	3.7	0.8	0.0	1.8	0.3	66.6	
Female	Control	9	788	14.6	46.6	93	86	0	12	1	0	2	0	637
			49.2	0.98	2.13	30.8	2.6	0.0	2.2	1.0	0.0	1.2	0.0	41.0
	39	10	790	14.4	45.9	68	80*	0	17*	1	0	2	0	602
			15.2	0.40	1.47	20.6	6.7	0.0	5.9	1.3	0.0	1.8	0.7	60.3
	117	10	812	14.6	46.1	83	87	0	10	2	0	1	0	608
			24.3	0.65	2.09	28.7	8.8	0.0	6.4	2.1	0.0	1.2	0.3	46.0
	350	10	809	14.4	45.6	63*	86	0	11	1	0	2	0	597
		25.9	0.46	2.32	27.3	3.2	0.0	2.6	1.0	0.0	1.3	0.3	66.4	
700	10	803	14.1	44.8*	71	84	0	13	1	0	2	0	581*	
		35.2	0.46	1.40	31.1	4.4	0.3	3.7	1.2	0.0	1.6	0.3	55.9	

Significant difference from Control, * : $p < 0.05$

Table 14 Biochemical values in rats treated PO with NK 421 for 13 weeks

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	GOT (IU)	GPT (IU)	ALP (IU)	LAP (IU)	LDH (IU)	BIL (mg/gL)	GLU (mg/dl)	T-CHO (mg/dl)	T-P (g/dl)	A/G ratio	BUN (mg/dl)	CRNN (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
Male	Control	10	106 18.0	27 2.7	215 50.0	66 4.9	2038 649.0	0.17 0.040	165 21.9	65 10.6	6.10 0.254	1.32 0.083	15 1.9	0.30 0.046	146 3.2	4.1 0.28	108 3.5
	39	10	104 17.6	29 4.8	193 49.2	68 8.0	1587 683.7	0.13* 0.022	140** 15.0	60 8.6	6.19 0.254	1.35 0.077	15 2.2	0.26 0.066	144 6.7	3.8* 0.27	109 4.6
	117	10	102 19.1	31* 4.4	202 38.7	69 10.0	1538 700.5	0.15 0.030	153 19.8	56 13.9	6.32 0.566	1.35 0.097	14 1.7	0.25 0.061	143 8.3	3.8 0.50	111 4.1
	350	10	106 14.7	38*** 7.5	238 49.5	68 5.5	1247** 484.2	0.15 0.040	154 25.4	50** 12.4	6.20 0.326	1.41* 0.100	14 1.5	0.29 0.060	144 3.6	3.6*** 0.27	108 1.7
	700	10	108 18.5	39** 10.8	196 37.9	65 4.6	1475 705.1	0.14* 0.017	152 18.8	50** 6.6	6.22 0.272	1.36 0.055	14 0.9	0.26 0.044	142 6.5	3.8 0.42	109 3.2
	Control	10	78 12.2	29 8.1	139 38.7	66 5.5	622 198.0	0.17 0.042	166 19.3	81 14.9	6.35 0.208	1.39 0.051	15 2.0	0.34 0.052	146 3.1	3.4 0.43	110 3.7
	39	10	87 16.7	29 9.2	122 20.3	64 5.0	608 145.3	0.16 0.034	137** 15.7	80 12.6	6.56 0.376	1.44 0.110	15 2.1	0.30 0.064	146 1.6	3.4 0.67	112 5.6
	117	10	84 13.0	29 7.9	126 36.3	67 4.4	657 179.2	0.16 0.026	136*** 13.6	75 8.9	6.47 0.141	1.46* 0.080	15 1.1	0.31 0.067	147 2.3	3.2 0.31	112 2.8
	350	10	92* 11.4	36 14.2	136 35.6	63 4.7	627 307.2	0.19 0.028	132** 22.3	75 18.1	6.81** 0.330	1.47* 0.089	16 2.0	0.28** 0.035	147 2.7	3.6 1.01	111 3.9
	700	10	92* 14.7	35 9.6	135 36.4	64 7.5	657 205.2	0.18 0.029	129*** 16.4	74 10.9	6.55 0.266	1.49*** 0.062	16 1.9	0.28* 0.048	146 2.2	3.4 0.31	111 4.0

Significant difference from Control, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$

Table 15 Organ wet weights in rats treated PO with NK 421 for 13 weeks

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Heart (g)	Lung (g)	Liver (g)	Spleen (g)	Kidneys (g)	Adrenals (mg)	Thymus (mg)	Brain (g)	Pituitary (mg)	Testes (g) Ovaries (mg)	Prostatic (g) Uterus (g)	U. bladder (g)
Male	Control	10	493	1.35	1.83	12.82	0.70	3.07	70	474	2.22	13	5.62	0.83	0.166
			46.5	0.121	0.220	1.755	0.046	0.265	9.7	93.1	0.063	2.4	0.849	0.183	0.0550
	39	10	475	1.35	1.84	12.49	0.78	3.34	77	492	2.26	14	5.33	0.82	0.195
			43.8	0.100	0.172	1.356	0.140	0.396	11.3	145.7	0.074	3.0	0.546	0.216	0.0645
	117	10	443*	1.34	1.67	12.65	0.74	3.07	69	406	2.25	12	5.20	0.80	0.190
			36.7	0.124	0.130	1.408	0.092	0.278	9.8	85.7	0.073	1.2	0.373	0.229	0.0734
	350	10	451	1.35	1.82	12.04	0.71	2.98	74	438	2.20	12	5.22	0.85	0.175
			46.0	0.140	0.188	1.506	0.085	0.292	12.7	136.8	0.107	3.4	0.474	0.304	0.0512
	700	10	469	1.38	1.82	13.94	0.84*	3.09	80*	418	2.21	13	5.35	0.97	0.157
			59.7	0.140	0.289	2.339	0.151	0.283	5.7	102.8	0.122	3.7	0.776	0.257	0.0586
Female	Control	10	274	0.89	1.32	6.72	0.46	1.79	86	372	2.02	15	118	0.57	0.101
			23.2	0.088	0.176	0.853	0.053	0.211	9.4	96.1	0.104	4.1	22.9	0.169	0.0176
	39	10	256	0.87	1.23	6.56	0.44	1.86	78	305	2.02	16	123	0.53	0.110
			21.8	0.091	0.158	0.572	0.046	0.143	14.4	77.2	0.113	5.6	14.7	0.169	0.0449
	117	10	253	0.88	1.20	6.56	0.49	1.85	76*	309	2.03	14	118	0.55	0.096
			25.1	0.089	0.070	0.830	0.055	0.225	11.1	50.9	0.101	2.1	19.9	0.110	0.0115
	350	10	253	0.90	1.22	6.88	0.47	1.88	81	286*	2.01	14	136	0.54	0.106
			26.2	0.101	0.119	0.931	0.062	0.206	13.6	78.6	0.116	2.7	16.7	0.154	0.0435
	700	10	257	0.90	1.24	6.60	0.48	1.80	80	281*	2.05	14	131	0.56	0.094
			22.7	0.076	0.084	0.764	0.047	0.125	12.3	56.7	0.100	2.6	13.2	0.155	0.0157

Significant difference from Control, * : $p < 0.05$

Table 16 Relative organ weights in rats treated PO with NK 421 for 13 weeks

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Heart (g%)	Lung (g%)	Liver (g%)	Spleen (g%)	Kidneys (g%)	Adrenals (mg%)	Thymus (mg%)	Brain (g%)	Pituitary (mg%)	Testes (g%) Ovaries (mg%)	Prostate (g%) Uterus (g%)	U. bladder (g%)
Male	Control	10	0.27 0.028	0.37 0.041	2.60 0.167	0.144 0.0128	0.62 0.038	14.2 1.69	97 20.1	0.45 0.038	2.6 0.38	1.14 0.146	0.168 0.0419	0.034 0.0115
	39	10	0.29 0.016	0.39 0.032	2.63 0.083	0.164* 0.0194	0.70*** 0.043	16.4* 2.23	105 32.1	0.48 0.041	3.0 0.62	1.13 0.111	0.174 0.0448	0.042 0.0155
	117	10	0.30* 0.032	0.38 0.024	2.85** 0.179	0.167* 0.0222	0.70*** 0.047	15.7 2.92	92 17.6	0.51** 0.046	2.8 0.38	1.18 0.053	0.181 0.0530	0.043 0.0173
	350	10	0.30* 0.020	0.40 0.042	2.66 0.154	0.158 0.0184	0.66* 0.046	16.6 3.67	97 26.2	0.49 0.048	2.8 0.88	1.16 0.116	0.187 0.0615	0.039 0.0091
	700	10	0.30* 0.030	0.39 0.046	2.96*** 0.209	0.180*** 0.0234	0.66 0.048	17.2** 2.15	90 24.6	0.48 0.050	2.9 0.77	1.15 0.177	0.206 0.0522	0.034 0.0135
Female	Control	10	0.33 0.028	0.48 0.041	2.45 0.175	0.169 0.0155	0.66 0.049	31.4 3.28	136 32.0	0.74 0.078	5.4 1.29	48 7.0	0.209 0.0545	0.037 0.0080
	39	10	0.34 0.025	0.48 0.050	2.57 0.123	0.173 0.0104	0.73** 0.058	30.5 5.27	119 28.3	0.80 0.104	6.2 1.96	49 6.3	0.205 0.0580	0.043 0.0189
	117	10	0.35 0.027	0.48 0.050	2.58 0.142	0.194* 0.0233	0.73* 0.067	30.0 4.39	124 29.4	0.81 0.098	5.7 1.01	47 9.1	0.220 0.0447	0.038 0.0052
	350	10	0.35 0.023	0.49 0.042	2.71** 0.157	0.187 0.0259	0.74** 0.052	32.2 5.76	115 35.8	0.80 0.087	5.5 0.91	54** 7.4	0.212 0.0571	0.042 0.0165
	700	10	0.35 0.021	0.49 0.049	1.57 0.125	0.189* 0.0171	0.70 0.038	31.2 4.03	110 25.8	0.80 0.064	5.4 1.00	51* 5.8	0.219 0.0616	0.037 0.0085

Significant difference from Control, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$

e) 統計学的解析

諸測定値および検査成績は、対照群と各投与群との間で Student-t 検定を行い解析した。

試験成績

1) 一般状態

一般状態の観察では試験期間を通じ全投与群に著変はみられず、死亡も認められなかった。

2) 体重変動 (Fig. 12)

体重変動では試験期間を通じ、雌雄とも全投与群で体重増加の抑制が軽微に認められたが、用量依存性はみられず、対照群とほぼ同様の推移を示した。

3) 摂餌量 (Fig. 13)

摂餌量の推移では投与前半に雌雄全投与群で摂餌量の軽微な減少が認められたが、投与期間を通して対照群と比べて著変は認められなかった。

4) 尿検査 (Table 12)

尿検査では、試験期間の各検査を通じ、雌雄全投与群に著変は認められなかった。

5) 血液検査

a) 血液学的検査 (Table 13)

血液学的検査では雄または雌の高用量群で、ヘマトクリット値、白血球数および血小板数に統計学的有意差のみられる減少が認められたが、いずれも軽微な生理的変動範囲内の変化であり、全投与群とも対照群に比べて著変は認められなかった。

b) 血液生化学的検査 (Table 14)

血液生化学的検査では雄または雌の高用量群で、GOT値・GPT値・A/G比の増加傾向およびGLU値・T-CHO値・CRNN値の減少傾向が認められたが、いずれも軽微な変化で明確な用量依存性はなく、対照群に比べて著変は認められなかった。

6) 病理学的検査

a) 剖見所見

剖見所見では全投与群に著変は認められなかった。

b) 器官重量 (Table 15, 16)

700 mg/kg 投与群の雄で、脾臓および副腎の増加が湿重量および比体重が相関して、ともに統計学的有意差を示して認められたが、著明なものではなかった。その他にも対照群と比べ統計学的有意差のみられる器官が散見されたが、いずれも用量依存性はみられず、対照群と比べ著変は認められなかった。

c) 病理組織学的検査

検体適用との関連性が推察される変化として、腎臓では髓質外帯の尿細管上皮細胞でビマン性に刷子縁の短縮や脱落、好塩基性化を伴う萎縮、さらに散在的核肥大が全投与群でほぼ用量依存的に観察されたが、これらの変化は二次的な組織反応または尿細管の壊死、強度の脂肪変性などの明確な障害像を伴わない極めて軽微な器質的变化であった。

また、胸腺では皮質リンパ球に散在性の単細胞壊死が 117 mg/kg 以上の投与群で極軽微に観察されたが、明確な用量依存性は認められなかった。

さらに脾臓では腺房細胞の散在性の単細胞壊死が全投与群に用量依存性を示して極めて軽微に観察されたが、対照群にも認められた。

しかし、上述した器質的变化はいずれも軽微なもので、血液検査においてそれに関連する機能障害性を疑う知見は全く認められなかった。

その他には、心臓で単核細胞浸潤を伴う限局性の心筋の変性・線維化、肺で限局性の気管支炎・泡沫様細胞、肝臓で小肉芽形成や細胞浸潤、あるいは限局性の出血や細胞浸潤を伴う肝細胞壊死、脾臓でラ氏島細胞や腺房細胞の線維化が散見されたが、いずれも用量依存性を示すものではなく、背景病変と考えられた。

ま と め

離乳直後の3週齢SD系雌雄ラットを用い、NK 421の13週間連続経口投与による亜急性毒性試験（投与量：39, 117, 350および700mg/kg）を実施し、以下の結果を得た。

1. 一般状態観察では全投与群に著変はみられず、死亡も認められなかった。
 2. 体重変動では試験期間を通じ全投与群に軽微な体重増加の抑制がみられたが著明な変化ではなく、対照群と同様の推移を示した。
 3. 摂餌量の推移では試験期間前半に軽微な減少がみられたが、対照群に比べて著明な変化ではなかった。
 4. 尿検査では全投与群に著変は認められなかった。
 5. 血液学的検査では全投与群に著変は認められなかった。
 6. 血液生化学的検査では全投与群に著変は認められなかった。
 7. 病理学的検査では、剖検所見、器官重量および病理組織学的検査のいずれの検査においても著変は認められなかった。
- 以上のように、NK 421の幼若ラットにおける

長期間連続経口投与試験で、最高用量700mg/kg投与群においても一般状態・尿検査・血液検査・病理学的検査のいずれにも著変はみられず、著明な毒性標的器官は認められなかった。したがって、NK 421は幼若ラットにおいてもすでに報告した亜急性毒性試験の場合と同様に、経口的に極めて低毒性の物質であることが認められた。

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).
- 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.104 (1982).
- 4) 田中 亘. 同上. 昭和58年度研究報告書, p.151 (1984).
- 5) M. Koyama, M. Hashimoto, N. Asakawa, M. Ishibashi, and H. Miyazaki, *Biomedical Mass Spectrometry*, **7**, pp.372-376 (1980).
- 6) Sakakibara, T. *et al.* Toxicological studies on Bestatin. I. Acute toxicity test in mice, rats and dogs, *Jpn. J. Antibiot.* **36** (11), 2971-2984, November (1983).
- 7) Huntington Research Centre. Toxicological studies on Bestatin. Subacute toxicity test and recovery study in rats. Unpublished
- 8) Hagiwara, T. *et al.* Toxicological studies on Bestatin. Subacute toxicity test and recovery study in rats. *Pharmacometrics*, **27** (3) (Oyo Yakuri) March (1984).

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 2311)
〃 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	虎の門病院神経内科	105	東京都港区虎の門 2-2-2 03-588-1111 (内 2016)
〃 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 4-1-1 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	国立療養所中央病院	474	大府市森岡町源吾 36-3 0562-46-2311
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 4-1-1 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	日本化薬株式会社医薬事業本部	102	東京都千代田区富士見 1-11-2 東京 富士見ビル 03-237-5131
班員 滝田 智久	日本化薬株式会社医薬事業本部 総合研究所	115	東京都北区志茂 3-31-12 03-901-2878
〃 石井 靖男	日本化薬株式会社医薬事業本部	102	東京都千代田区富士見 1-11-2 東京 富士見ビル 03-237-5131
〃 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
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