

厚生省新薬開発研究事業

微生物の二次代謝産物に由来する
難病治療薬（E-64）の開発研究

昭和60年度研究報告書

班長 今堀和友

昭和61年3月

ま え が き

厚生省新薬開発研究事業、微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の開発研究が開始されたのは昭和54年度であった。以来7年間に亘る研究を積み重ねて、E-64はその合成類似体であるE-64-c、さらにそのエステル体であるE-64-d（EST）と、より実用に適するものへと変化してきた。今回これがロキシスタチンの名のもとに、厚生省に医薬品製造承認申請を行ったことによって、本研究の歴史を閉じることとなったのである。

私がカルシウム依存性プロテアーゼの研究を行ってきたことを聞きつけ、当時大正製薬におられた沢田さんがE-64を持参し、阻害剤として有用かどうか検定してくれるよう依頼されたのが始まりであった。その後、この結果について行った日本医学会での私の講演が、厚生省の渡辺さんの耳に止まり、難病治療薬の開発研究に加えられたのである。

私は、まず *in vitro* 系における生化学研究を徹底的に行い、それに立脚しつつ順次 *in vivo* 系へと広げ、最後に臨床実験に持ち込むという方針を立て、それを実行した。したがって第1相臨床試験が報告されたのは、57年度からであった。この間基礎研究に集中したため、その方面の研究は大いに進歩したが、応用方面に携わられた方々はさぞもどかしく思われたことと思う。しかし最後まで私の方針に従い、協力して下さった班員の方々、および大正製薬開発部の方々に深甚なる敬意と謝意とを表するものである。

本研究期間を通じて、厚生省薬務局の方々より賜わった御援助の数々は挙げるに暇がない程である。今回の成果が少しでもこれらの御援助に応えるものとなることを心から念じて、本研究の締めくくりとしたい。

班長 今 堀 和 友

目 次

まえがき

I E-64 類縁体の開発

1. EST の製剤化に関する研究大関 正弘 9
2. EST 代謝物 (M-4-b) の合成検討大関 正弘 23
3. EST 代謝物 (M-4) の同定およびヒトにおける体内動態大関 正弘 27

II 酵素・細胞・組織レベルにおける研究

4. カルシウム依存性中性プロテアーゼのモノクロナル抗体.....今堀 和友 37
5. CANP 遺伝子の発現鈴木 紘一 41
6. 細胞内カルシウム依存性プロテアーゼの動態に対する
E-64 の作用——鶏胚筋分化と蛋白分解——.....野々村禎昭 47
7. EST のリソゾーム酵素の分解抑制効果について勝沼 信彦 49

III 個体レベルにおける研究

8. EST 連続投与によるラット, マウス, ハムスター肝薬物
代謝酵素系およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響.....北川 晴雄 55
9. EST の一般薬理作用
——ウサギ横隔神経高頻度同期波, 筋ジストロフィー
ハムスターの心電図および摘出臓器標本に及ぼす影響—— ...福原 武彦 61
10. 種々の原因による筋萎縮に対する EST の効果
——筋肉内アミノ酸代謝の面より寺尾 寿夫 79
11. 心筋症ハムスターの心筋構造蛋白の融解機序に
関する一考察柴田 宣彦 85
12. ハムスター呼吸筋の組織所見.....石原 傳幸 91

13. 生検筋における rimmed vacuole の検討石原 傳幸 95
14. EST による実験的クロロキンミオパチーの治療効果.....杉田 秀夫 101

IV 臨床試験

15. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する
EST の臨床的検討宮武 正 109
16. EST 臨床試験石原 傳幸 123
17. Duchenne 型筋ジストロフィーに対する
システインプロテアーゼの特異的阻害剤 EST の効果中野 今治 129
18. EST 臨床試験初期報告書.....松原 四郎 139
19. Distal myopathy with rimmed vacuole に対する
EST の臨床試験杉田 秀夫, 宮武 正 151

I E-64 類縁体の開発

1. EST の製剤化に関する研究.....大関 正弘
2. EST 代謝物 (M-4-b) の合成検討大関 正弘
3. EST 代謝物 (M-4) の同定およびヒトにおける体内動態大関 正弘

1. EST の製剤化に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 小 団 扇 省 三* 小 沢 康 雄* 吉 田 継 親*
根 本 正 美* 山 田 憲 司* 吉 田 一 義*
田 中 唯 夫* 栗 山 恵 美 子* 堀 内 宏 美*
相 沢 則 子*

目 的

筋ジストロフィー症治療薬 EST の原体および製剤（エステルカプセル 50，エステルカプセル 25 およびエステル顆粒 10%）に関して、「長期及び苛酷経時変化試験」により、安定性を予測し、「強制分解試験」により、原体の水溶液中での分解経路を推定する。

また、健常成人を対象に「生物学的同等性試験」を実施し、各製剤の生物学的利用率に差が無いことを確認する。

方 法

1. 試料

EST 原体：

大正製薬株式会社で合成された純度 98.0～102.0%の原体。

エステルカプセル 50：

大正製薬株式会社で製造された 1 個中に EST を 50 mg 含有する硬カプセル剤。

エステルカプセル 25：

大正製薬株式会社で製造された 1 個中に EST を 25 mg 含有する硬カプセル剤。

エステル顆粒 10%：

大正製薬株式会社で製造された 1 g 中に EST を 100 mg (10%) 含有する顆粒剤。

以上の試料は、医薬品の製造許可申請書に添付した各々の「規格及び試験方法」に適合した。

2. 安定性試験

安定性試験の概略を表 1 に、保存条件・期間・容器および試験項目を表 2 に示す。

性状（原体および製剤）：

日本薬局方通則に従い試験した。

カルボン酸エステルの確認（原体および製剤）：

アルカリの存在下で塩酸ヒドロキシルアミンと反応させ、ヒドロキサム酸とし、これに塩化第二鉄を作用させ、色を観察した。

アミノ基の確認（原体および製剤）：

塩酸で加水分解し、生成するアミノ基にニンヒドリンを作用させ、色を観察した。

赤外吸収スペクトルによる確認（原体のみ）：

日本薬局方一般試験法赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法により測定し、特性吸収の波数から確認した。

液体クロマトグラフ法による確認（製剤のみ）：

製剤の定量で得られた液体クロマトグラムにおいて、試料溶液および標準溶液の EST に相当するピークの、内標準物質チモールとのピークに対する相対保持時間を比較した。

旋光度（原体のみ）：

日本薬局方一般試験法旋光度測定法に従い試験した。

融点（原体のみ）：

日本薬局方一般試験法融点測定法の第 1 法により試験した。

類縁物質（液体クロマトグラフ法）（原体および製剤）：

試料につき、EST 濃度が原体約 2 mg/ml、

* 大正製薬株式会社総合研究所

I E-64 類縁体の開発

表1 安定性試験の概略

		原体	製 剤			
			カプセル剤		顆粒剤	
			エステル カプセル50	エステル カプセル25	エステル 顆粒10%	
安定比較試験	エステルカプセル50 と エステルカプセル25	—	○	○	—	
	相対比較試験	PTP包装と 缶包装	—	○	—	
経時 変化 試験	長期保存 試験	A法	—	—	○	
		B法	○	○	—	
	加速試験		—	—	○	
	苛酷 経時 変化 試験	加温保存 試験		○	○	—
		加温・加湿 保存試験		○	○	—
		光照射 保存試験		○	○	—
強制分解試験		○	—	—	—	

製剤約 1 mg/ml になる様に無水エタノールに溶解し、次の 2 条件の液体クロマトグラフ法によって試験を行い、得られたクロマトグラムのピーク面積から類縁物質の量を算出した。

[操作条件]

検出器：紫外吸光度計（測定波長：210 nm）

カラム：内径 4 mm、長さ 150 mm のステンレス管にオクタデシルシリル化した 5 μm のシリカゲルを充てんした。

カラム温度：50°

移動相：条件 1

H₂O : CH₃CN : H₃PO₄
= 720 : 280 : 1

条件 2

H₂O : CH₃CN : H₃PO₄
= 600 : 400 : 1

流 量：1 ml/min

注入量：5 μl

類縁物質（薄層クロマトグラフ法）（原体および製剤）：

試料につき、EST 濃度が約 10 mg/ml になる様に無水エタノールに溶解し、次の 3 条件の薄層クロマトグラフ法によって試験を行った。

[操作条件]

薄層板：TLC プレートシリカゲル 60

層の厚さ 0.25 mm（Merck 社製）

展開溶媒：条件 A

CHCl₃ : CH₃OH : HCOOH
= 95 : 5 : 2

条件 B

CH₃COOC₂H₅ : n-C₆H₁₄ : HCOOH
= 35 : 15 : 1

条件 C

C₂H₅OC₂H₅ : HCOOH
= 50 : 1

1. EST の製剤化に関する研究

表2 保存条件・期間・容器および試験項目

試験項目	原体			カプセル			顆粒剤			
	ロットNo.	保存条件	保存容器	ロットNo.	保存条件	保存容器	ロットNo.	保存条件	保存容器	
	エストロートカプセル50			エストロートカプセル25			エストロート顆粒10%			
安定性比較試験										
相対比較試験										
長期保存試験										
経時変化試験	加速試験									
	加温保存試験	E-4	25°・75%RH (B法) (3, 6, 9, 12, 18, 24 箇月)	缶 (閉)	EC52	40° (2箇月) 50° (2ヶ月) 65° (1ヶ月)	保存条件	保存容器	EG11 EG12 EG13	
						40°・75%RH (2, 4, 6箇月)	25°・75%RH (B法) (3, 6, 9, 12, 18, 24 箇月)	PTP包装		PTP包装
	加温・加湿保存試験	E-10	40°・75%RH (2, 4, 6箇月)	褐色ガラス瓶 (閉)	EC53	40° (2, 4, 6箇月)	50° (1, 2, 3箇月)	PTP包装	EG14	缶 (閉)
光照射保存試験	E-11	40°・90%RH (2, 4, 6箇月)	褐色ガラス瓶 (開)	EC54	40°・75%RH (2, 4, 6箇月)	40°・90%RH (2, 4, 6箇月)	PTP包装	EG16	缶 (開)	
										40°・90%RH (2, 4, 6箇月)
光照射保存試験										
試験項目	(1)性状 (2)確認試験 (3)旋光度 (4)融点 (5)顆粒物質 (6)乾燥減量 (7)定量	1) カルボン酸エステルの確認 2) アミノ基の確認 3) 赤外線吸収スペクトル	1) カルボン酸エステルの確認 2) アミノ基の確認 3) 赤外線吸収スペクトル	(1)性状 (2)確認試験 (3)顆粒物質 (4)崩壊試験 (5)定量	1) カルボン酸エステルの確認 2) アミノ基の確認 3) 赤外線吸収スペクトル	1) カルボン酸エステルの確認 2) アミノ基の確認 3) 赤外線吸収スペクトル	1) カルボン酸エステルの確認 2) アミノ基の確認 3) 赤外線吸収スペクトル	(1)性状 (2)確認試験 (3)崩壊試験 (4)定量 (5)定量	1) カルボン酸エステルの確認 2) アミノ基の確認 3) 赤外線吸収スペクトル	1) カルボン酸エステル 2) アミノ基の確認 3) 液体クロマトグラフ法による確認 4) 崩壊試験 5) 定量
強制分解試験										

I E-64 類縁体の開発

表 3(a) 生物学的同等性試験の試験方法

製 剤	エステートカプセル25 (EST 25mg含有カプセル, 大正製薬製造) エステートカプセル50 (EST 50mg含有カプセル, 大正製薬製造)
対 象	健康成人男子, 14名
投与方法	1群7名の2群に分け, EST 100 mgに相当する各製剤をそれぞれ空腹時1回経口投与。 第1回試験終了後, 1週間の休薬期間をおき, 製剤をクロスして第2回試験を実施。
採 血	投与前, 投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8時間
測定方法	ガスクロマトグラフ-質量分析法 (島津LKB9000型 GC/MS)

表 3(b) 生物学的同等試験の試験方法

製 剤	エステートカプセル50 (EST 50mg含有カプセル, 大正製薬製造) エステート顆粒10% (EST 10%含有顆粒, 大正製薬製造)
対 象	健康成人男子, 14名
投与方法	1群7名の2群に分け, EST 100 mgに相当する各製剤をそれぞれ空腹時1回経口投与。 第1回試験終了後, 1週間の休薬期間をおき, 製剤をクロスして第2回試験を実施。
採 血	投与前, 投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8時間
測定方法	ガスクロマトグラフ-質量分析法 (島津LKB9000型 GC/MS)

スポット量: 条件 A 50 μ l, 条件 B, C 25 μ l

検出方法: 条件 A, C ニンヒドリン, 条件 B 希硫酸

乾燥減量 (原体のみ):

日本薬局方一般試験法乾燥減量試験法に従い試験した。

崩壊試験 (製剤のみ):

日本薬局方一般試験法崩壊試験法に従い試験した。

定量法 (原体のみ):

試料約 0.8 g を精密に量り, 正確に 0.1 N 水酸化カリウム・エタノール液 50 ml を加えて溶かし, 10 分間放置後, 0.1 N 塩酸で滴定する。

(指示薬: フェノールフタレイン試液 3 滴)。同様の方法で空試験を行う。

定量法 (製剤のみ):

製剤を粉碎し, 製剤中の EST 量が 0.05 g に対応する量を精密に量り, 無水エタノール 30

ml を加え, 内標準溶液としてチモールの無水エタノール溶液 (7 \rightarrow 2000) 5 ml を正確に加えた後, 5 分間振り混ぜ, 無水エタノールを加えて正確に 50 ml とした。この液を毎分約 3000 回転で遠心分離し試料溶液とした。別に定量用 EST (純度 99.0 \sim 101.0%) を同じ濃度に溶かし標準溶液とした。液体クロマトグラフ法により試料溶液および標準溶液の内標準物質に対する EST のピーク面積比を求め, 含量を算出した。

[操作条件]

類縁物質 (液体クロマトグラフ法) の操作条件 1 と同様。

3. 生物学的同等性試験

エステートカプセル 25 とエステートカプセル 50 の生物学的同等性試験:

健康成人を対象とした血清中濃度比較試験 (クロスオーバー法) の試験方法を表 3(a) に示す。

1. EST の製剤化に関する研究

表 4 原体の長期保存試験結果

試験項目	保存期間	試験開始時			24箇月		
	ロットNo.	E-4	E-10	E-11	E-4	E-10	E-11
性状		(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
確認試験	カルボン酸エステルの確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	アミノ基の確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	赤外吸収スペクトルによる確認	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)
	旋光度 (°)	+51.4	+52.3	+52.0	+52.0	+51.9	+51.4
	融点 (°)	126.3	125.5	124.7	125.7	125.1	124.6
類縁物質	液体クロマトグラフ法 (%)	1.0	0.4	0.8	1.2	0.4	1.0
	乾燥減量 (%)	0.06	0.08	0.08	0.07	0.06	0.08
	定量 (%)	99.4	99.7	99.6	100.3	100.0	100.0

(a) 白色の結晶性の粉末で、においはなかった。
 (b) 3292cm^{-1} , 2961cm^{-1} , 1755cm^{-1} , 1642cm^{-1} , 1555cm^{-1} 及び 899cm^{-1} 付近に吸収を認めた。

エステルカプセル 50 とエステル顆粒 10%の生物学的同等性試験：

健康成人を対象とした血清中濃度比較試験 (クロスオーバー法) の試験方法を表 3(b)に示す。

なお、血清中 E-64-c 濃度の定量は、宮原正³⁾らと同様に実施した。

結果および考察

1. 安定性試験

原体の長期保存試験 (B 法) の結果を表 4 に、苛酷経時変化試験の結果を表 5 に示す。

原体はいずれの保存条件においても変化が認められず、安定であった。したがって、通常の流通経路において長期間安定であると判断した。

エステルカプセル 50 とエステルカプセル 25 の安定性比較試験結果を表 6 に、カプセル剤における PTP 包装と缶包装の相対比較試験結果を表 7 に示す。

両製剤および両包装形態とも変化が認められず安定であった。したがって、両製剤間および両包装形態間の安定性は等しいと考え、エステルカプセル 50 の PTP 包装品を選択し、苛酷経時変化試験を実施した。

エステルカプセル 50 の長期保存試験 (B 法) の結果を表 8 に、苛酷経時変化試験の結果を表 9 に示す。

カプセル剤はいずれの保存条件においても変化が認められず、安定であった。したがって通常の流通経路において長期間安定であると判断した。

顆粒剤は、59 年夏より検討を開始したので 1 年 3 箇月の保存期間しか得られなかった。そこで、長期保存試験および苛酷経時変化試験に加え、加速試験を実施した。長期保存試験の結果を表 10 に、加速試験の結果を表 11 に、苛酷経時変化試験の結果を表 12 に示す。顆粒剤は $40^{\circ} \cdot 90\%RH$ の加温・加湿条件保存 4 箇月間で、わずかに外観の変化、分解生成物の増加および含量の低下が認められたが、他の条件では変化が認められず安定であった。したがって、通常の流通経路において長期間安定であると判断したが、長期保存試験の実施期間から有効期間 (1 年) を設定した。

2. 水溶液中での分解経路の推定

0.1 N 塩酸溶液、水溶液および希水酸化ナトリウム試液 (65°) 中で EST を分解し、液体クロマトグラム上における分解物ピーク面積の増減を経時的に測定した結果を図 1 に示す。

また、推定した分解経路を図 2 に示す。

EST は酸性およびアルカリ性において、速やかに E-64-c に分解し、さらにエポキシ環部分の開裂を生じた。中性では、E-64-c への移行が比較的緩やかで、一部はカルボン酸エステルの分解を伴わず、そのままエポキシ環部分の

1. EST の製剤化に関する研究

表6 エステートカプセル 50 とエステートカプセル 25 の安定性比較試験結果

品名	保存条件・期間	試験開始時			40° - 2 箇月			50° - 2 箇月			65° - 1 箇月		
	ロットNo. 項目	EC52	EC53	EC54	EC52	EC53	EC54	EC52	EC53	EC54	EC52	EC53	EC54
エステートカプセル 50	性状	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
	定量 (%)	99.4	99.4	102.2	96.4	97.2	97.0	97.4	96.6	100.0	96.0	95.6	97.8
	対直後 (%)	100	100	100	97.0	97.8	94.9	98.0	97.2	97.8	96.6	96.2	95.7
エステートカプセル 25	性状	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
	定量 (%)	98.0	97.6	100.4	97.2	98.0	99.2	99.6	94.8	98.4	94.4	94.0	96.0
	対直後 (%)	100	100	100	99.2	100.4	98.8	101.6	97.1	98.0	96.3	96.3	95.6

(a) キャップ部及びボディ部がともに白色不透明な硬カプセル剤である。その内容物は白色の粉末で、においはなかった。

表7 PTP 包装と缶包装の相対比較試験結果

試験項目	保存期間	試験開始時			6 箇 月					
	包装形態	—			PTP 包装			缶包装		
ロットNo.	EC52	EC53	EC54	EC52	EC53	EC54	EC52	EC53	EC54	
性状	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	
液体クロマトグラフ法による確認	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	
崩壊試験 (分)	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-4	2-3	2-3	2-3	
定量 (%)	99.4	99.4	102.2	95.8	97.8	101.0	99.8	98.4	102.4	

- (a) キャップ部及びボディ部がともに白色不透明な硬カプセル剤である。その内容物は白色の粉末で、においはなかった。
 (b) 試料溶液における内標準物質チモールに対する EST の相対保持時間は標準溶液と等しかった。

表8 エステートカプセル 50 の長期保存試験結果

試験項目	保存期間	試験開始時			24 箇 月		
	ロットNo.	EC52	EC53	EC54	EC52	EC53	EC54
性状	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
確認試験	カルボン酸エステルの確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	アミノ基の確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	液体クロマトグラフ法による確認	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)
崩壊試験 (分)	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	
定量 (%)	99.4	99.4	102.2	99.2	97.6	101.2	

- (a) キャップ部及びボディ部がともに白色不透明な硬カプセル剤である。その内容物は白色の粉末で、においはなかった。
 (b) 試料溶液における内標準物質チモールに対する EST の相対保持時間は標準溶液と等しかった。

表9 エステートカプセル50の苛酷経時変化試験結果

試験項目	保存条件		試験開始時						加温保存			加温・加湿保存			光照射保存							
	保存容器		40°						50°			40°・75%RH			けい光灯1000ルクス							
	保存期間		P T P 包装						P T P 包装			P T P 包装			P T P 包装							
	ロットNo.		6 箇月		3 箇月		3 箇月		6 箇月		6 箇月		3 箇月		3 箇月		3 箇月		30 日			
性状	E C 52	E C 53	E C 54	E C 52	E C 53	E C 54	E C 52	E C 53	E C 54	E C 52	E C 53	E C 54	E C 52	E C 53	E C 54	E C 52	E C 53	E C 54	E C 52	E C 53	E C 54	
	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
液体クロマトグラフ法による確認	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)
	0.7	0.7	0.7	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	0.7	0.8	0.7	0.8	0.7	0.8	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9
薄層クロマトグラフ法	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)
	(A) ^(注)	(B) ^(注)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)
崩壊試験 (分)	2-3	2-3	2-3	2-4	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3
	99.4	99.4	102.2	95.6	96.8	99.0	94.8	96.2	99.6	95.8	97.8	101.0	95.8	97.8	101.0	97.8	98.8	100.0	98.4	98.2	98.2	101.4
定量 (%)																						

(a) キャップ部及びポディ部がともに白色不透明な硬カプセル剤である。その内容物は白色の粉末で、
 においはなかった。
 (b) 試験溶液における内標準物質チモールに対する E S T の相対保持時間は標準溶液と等しかった。
 (c) 分解物のスポットは認められなかった。
 (注) (A),(B) は操作条件を示す。

1. EST の製剤化に関する研究

表10 エステート顆粒 10%の長期保存試験結果

試験項目	保存期間	試験開始時			15箇月		
	ロットNo.	EG11	EG12	EG13	EG11	EG12	EG13
性状		(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
確認試験	カルボン酸エステルの確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	アミノ基の確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	液体クロマトグラフ法による確認	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)
崩壊試験(分)		1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1
定量(%)		98.6	99.0	98.8	97.8	99.4	97.5

(a) 白色の顆粒で、においはなかった。
 (b) 試料溶液における内標準物質チモールに対するESTの相対保持時間は標準溶液と等しかった。

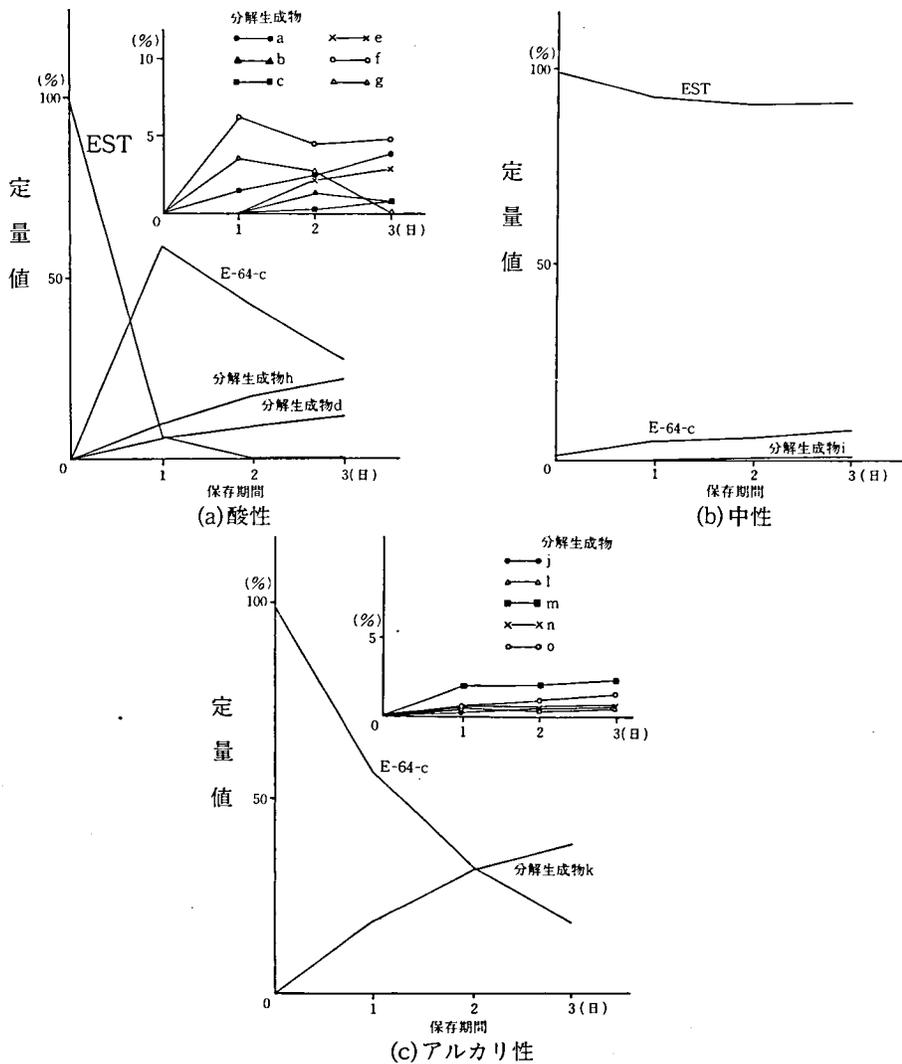


図1 水溶液中でのESTおよび分解生成物の挙動

I E-64 類縁体の開発

表11 エステート顆粒 10%の加速試験結果

試験項目	保存条件			室温			40°・75%RH			
	保存容器	試験開始時			缶(閉)					
	保存期間				6箇月			6箇月		
	ロットNo.	EG14	EG15	EG16	EG14	EG15	EG16	EG14	EG15	EG16
性状	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
確認試験	カルボン酸のエステルの確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	アミノ基の確認	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	液体クロマトグラフ法による確認	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)
崩壊試験(分)	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1
定量(%)	99.0	100.6	101.3	96.3	98.5	100.7	96.2	97.4	97.8	

(a) 白色の顆粒で、においはなかった。

(b) 試料溶液における内標準物質チモールに対するESTの相対保持時間は標準溶液と等しかった。

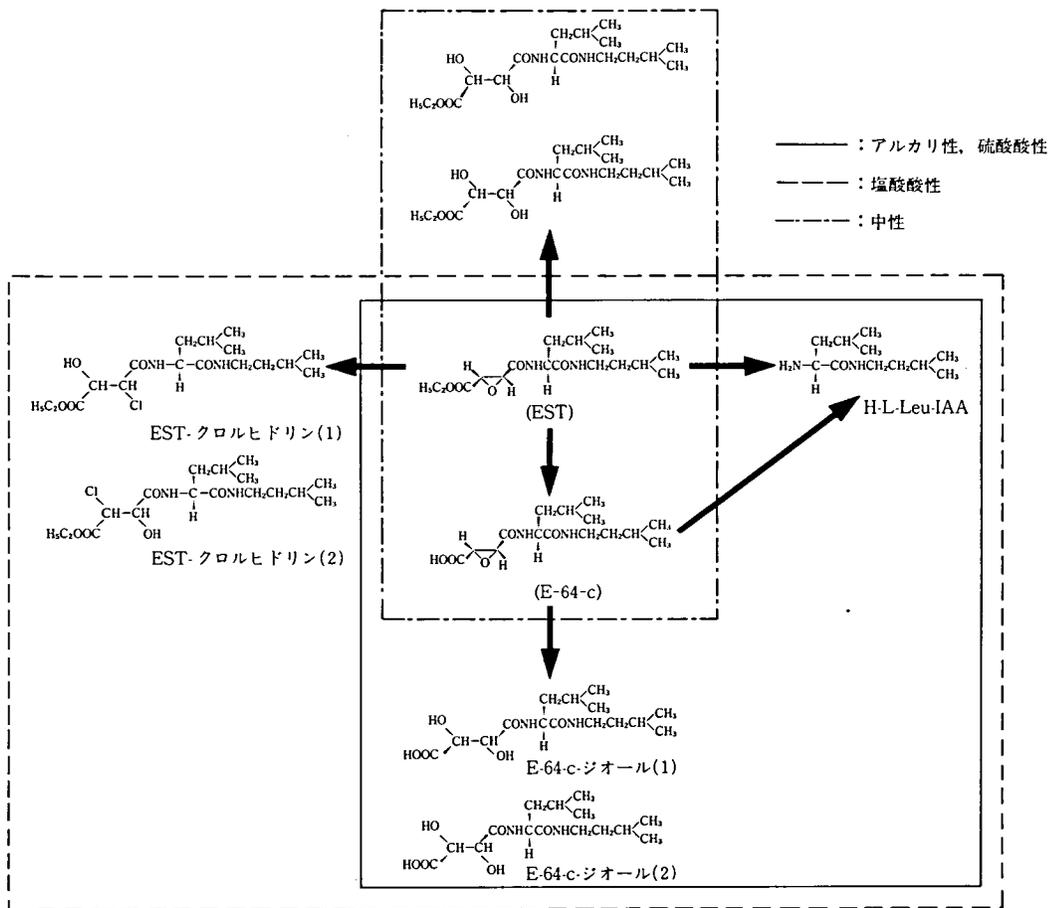


図2 水溶液中での推定分解経路

1. EST の製剤化に関する研究

表12 エステート顆粒10%の苛鹼経時試験結果

保存条件 保存容器 保存期間	加温保存			加温・加湿保存			光照射保存																
	40° (閉)			40°・75%RH			40°・90%RH			透明ガラス瓶 (開)													
	6箇月	3箇月	0箇月	6箇月	4箇月	2箇月	6箇月	3箇月	0箇月	30日	0日												
試験開始時	EG14	EG15	EG16	EG14	EG15	EG16	EG14	EG15	EG16	EG14	EG15	EG16											
性状	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(b)	(b)	(b)	(a)	(a)	(a)											
液体クロマトグラフ法による確認	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)											
液体クロマトグラフ法 (%)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.6	0.7	0.8	0.8											
薄層クロマトグラフ法 (A) ¹⁾	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)											
薄層クロマトグラフ法 (B) ²⁾	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)	(d)											
崩壊試験 (分)	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1											
定 量 (%)	99.0	100.6	101.3	98.8	99.8	98.4	96.8	98.2	98.8	95.1	98.4	98.2	95.7	98.0	97.5	94.4	97.0	96.9	96.8	98.3	98.8	98.8	100.7

(a) 白色の顆粒で、においはなかった。
 (b) 淡黄色に変化した。
 (c) 試験溶液における内標準物質をモールに対するESTの相対保持時間は標準溶液と等しかった。
 (d) 崩壊試験の結果は示されなかった。
 注) (A)(B) は操作条件を示す。

I E-64 類縁体の開発

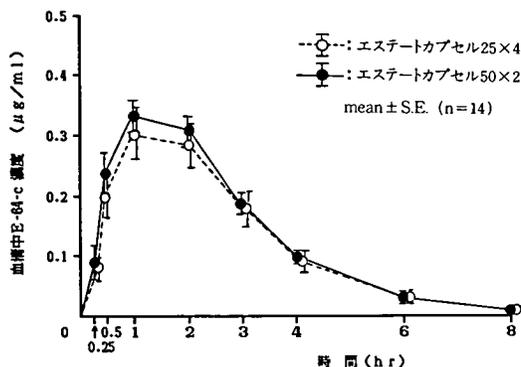


図3(a) 血清中 E-64-c 濃度推移

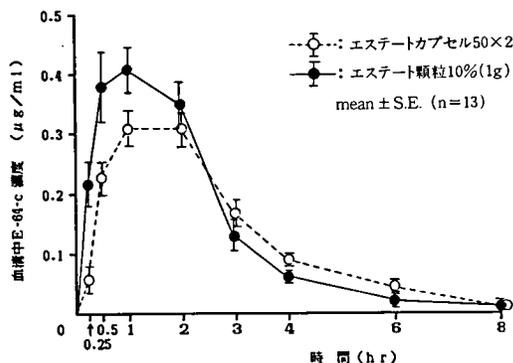


図3(b) 血清中 E-64-c 濃度推移

表13(a) 生物学的同等性試験結果
(エステルカプセル 25 vs エステートカプセル 50)

(試験結果)

薬動学的パラメーター 製薬 (平均±S.E.)	AUC _{0-∞} (μg·hr/ml)	C _{max} (μg/ml)	T _{max} (hr)	T _{1/2} (hr)
エステルカプセル25	0.99±0.08	0.36±0.03	2.00±0.28	1.19±0.18
エステルカプセル50	1.06±0.07	0.38±0.03	1.43±0.14	1.03±0.07

(統計解析)

薬動学的パラメーター	項目	検出力 1-β	最小検出差 Δ (%)	BA差 (%)	信頼区間 (%)
AUC		0.54	27.2	7.07	-26.5~12.3
	C _{max}	0.56	26.4	5.56	-24.4~13.3

AUC : 血清中濃度曲線下面積
C_{max} : 最高血清中濃度
T_{max} : 最高血清中濃度到達時間
T_{1/2} : 生物学的半減期

表13(b) 生物学的同等性試験結果
(エステルカプセル 50 vs エステート顆粒 10%)

(試験結果)

薬動学的パラメーター 製薬 (平均±S.E.)	AUC _{0-∞} (μg·hr/ml)	C _{max} (μg/ml)	T _{max} (hr)	T _{1/2} (hr)
エステルカプセル50	1.04±0.06	0.38±0.03	1.62±0.18	1.03±0.07
エステル顆粒10%	1.11±0.11	0.44±0.05	1.23±0.22	0.96±0.10

(統計解析)

薬動学的パラメーター	項目	検出力 1-β	最小検出差 Δ (%)	BA差 (%)	信頼区間 (%)
AUC		0.74	21.5	6.7	-22.1~8.6
	C _{max}	0.35	35.5	15.8	-44.2~9.6

AUC : 血清中濃度曲線下面積
C_{max} : 最高血清中濃度
T_{max} : 最高血清中濃度到達時間
T_{1/2} : 生物学的半減期

1. EST の製剤化に関する研究

開裂を生じた。

3. 生物学的同等性試験結果

試験製剤投与後の各測定時間における血清中 E-64-c 濃度推移を図 3(a)および(b)に、また薬動学的パラメータの平均値および統計解析結果を表 13(a), (b)に示す。

エステルカプセル 25 とエステルカプセル 50 投与後の血清中 E-64-c 濃度推移はきわめて類似しており、分散分析の結果からも有意差は認められなかった。また、エステルカプセル 50 とエステル顆粒 10%投与後の血清中 E-64-c 濃度推移もほぼ類似しており、分散分析の結果、有意差が認められなかった。

したがって、エステルカプセル 50、エステルカプセル 25 およびエステル顆粒

10%の 3 製剤は生物学的に同等であると判断した。

参考文献

- 1) 沢田二郎：EST 原体の規格及び試験方法の設定，厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 58 年度研究報告書，13-18，1984.
- 2) 沢田二郎：E-64-d の物理的・化学的性質及び製剤化の検討，厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 57 年度研究報告書，9-23，1983.
- 3) 宮原 正：E-64 の第 1 相臨床試験—第 1 段階—，厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 57 年度研究報告書，147-155，1983.

2. EST 代謝物 (M-4-b) の合成検討

大 関 正 弘*

研究協力者 横 尾 千 尋* 村 田 充 男*
渡 辺 慶 昭* 曾 田 馨*

目 的

EST の代謝物の一つとして M-4-b が見出されている。M-4-b は、EST のイソアミルアミド側鎖の末端メチル基の片方が酸化されたものと推定されている。本酸化反応により新たに生成した不斉炭素の絶対配置は、今のところ不明である。今回我々は、M-4-b の立体化学を含めた構造の確認を目的として、予想される二種類のジアステレオマー、11a および 11b の合成を検討した。

方 法

11a および 11b は、各々光学活性な、3-ヒドロキシ-2-メチルプロピオン酸メチル (1a, 1b) を出発原料として、図 1 に示す製法に従って合成を検討した。

結 果

森らの方法^{1,2)}に準拠し、(S)-(+)-3-ヒドロキシ-2-メチルプロピオン酸メチル (1a) より 3 工程で 4a を得た後、シアン化ナトリウムを用いてシアノ体 (5a) とした (収率：96%)。次に、5a をリチウムアルミニウムヒドライド (LAH) で還元し、重要な中間体である光学活性な (R)-4-ヒドロキシイソアミルアミン誘導体 (6a) を得た。6a は精製することなく、Z-L-ロイシンと縮合し 7a とした (収率：2 工

程 91%)。次いで 7a の Z 基 (ベンジルオキシカルボニル基) を、CTH 法 (Catalytic Transfer Hydrogenation)³⁾ を用いて除去した後、L-トランス-エポキシコハク酸メチルパラニトロフェニルエステルと縮合し、9a に導き、(収率：2 工程 77%) 更に、パラトルエンスルホン酸で THP 基 (テトラヒドロピラニル基) を除去することにより、目的とする 11a のメチルエステル体 (10a) を得た (収率：79%)。また、上記と同様の方法により、1b より 10b を得た。

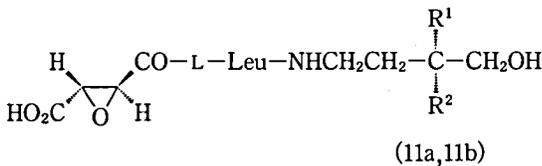
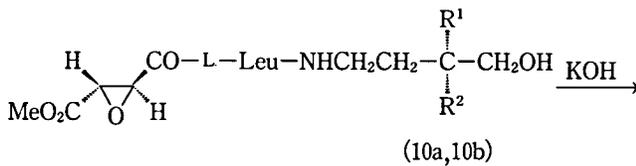
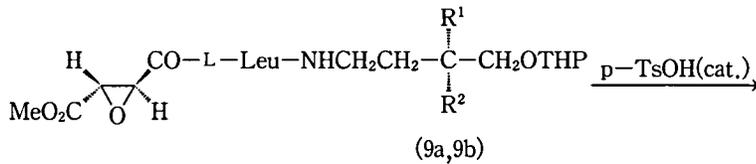
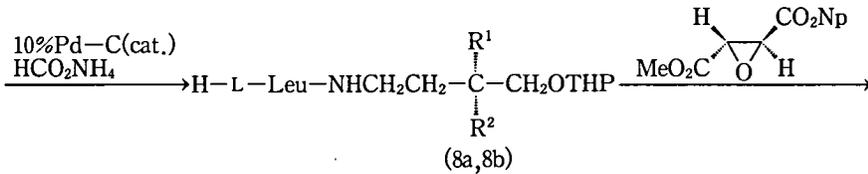
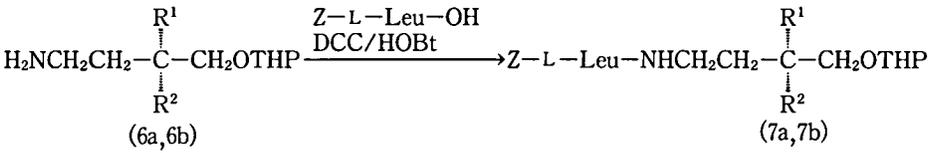
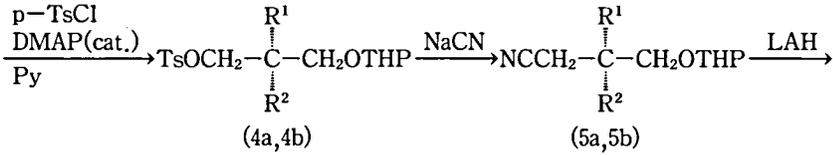
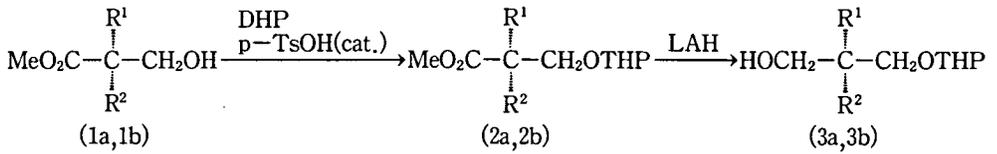
現在、目的とする 11a および 11b を得るため、10a および 10b の加水分解を検討中である。

結 論

今回、EST の代謝物である M-4-b のメチルエステル体と推定される 2 種類のジアステレオマー、10a および 10b の立体選択的な合成に成功した。また、得られた 10a および 10b は、生体由来の M-4-b メチルエステル体の同定に用いた。

今後、最終目的物の 11a および 11b を合成する。

* 大正製薬株式会社総合研究所



a: R¹=Me, R²=H b: R¹=H, R²=Me

図1 EST代謝物(M-4-b)の合成法

2. EST 代謝物 (M-4-b) の合成検討

文 献

- 1) Mori, K. and Senda, S.: Synthesis of the enantiomers of *cis*-2-methyl-5-hexanolide, the major component of the sex pheromone of the carpenter bee, *Tetrahedron*, **41**, 541, 1985.
- 2) Mori, K.: Revision of the absolute configuration of A-factor, *Tetrahedron*, **39**, 3107, 1985.
- 3) Johnstone, R. A. W. and Wilby, A. H.: Heterogeneous Catalytic Transfer Hydrogenation and Its Relation to Other Methods for Reduction of Organic Compounds, *Chem. Rev.*, **85**, 129, 1985.

3. EST 代謝物 (M-4) の同定およびヒトにおける体内動態

大 関 正 弘*

研究協力者 牛 山 洋 一* 玉 谷 隆 次* 小 勝 順*
近 藤 英 昭* 潮 田 勇* 野 田 克 己*
京 極 和 旭*

研究目的

既に、動物において種々の EST 代謝物¹⁾が発見されており、また、ヒトにおける体内動態についても、宮原らにより血清中および尿中 E-64-c の動態^{2,3)}が研究されている。

今回、ヒト尿より検出された EST の未同定代謝物を単離、精製し、その構造を決定したところ、動物で認められている代謝物の 1 つ、M-4 であることが明らかとなった。また M-4 のヒトにおける血清中および尿中濃度推移から生体内動態⁴⁾について更に詳細な検討を加えたので報告する。

実験方法

1. M-4 の分取、精製

代謝物 M-4 は健康人尿よりアンバーライト XAD-2、ディスポーザブルカラム Baker-10 spe Octadecyl (C₁₈) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製した。検出および精製に用いた HPLC 条件をそれぞれ表 1 (A), (B) に示す。

2. 質量分析

測定装置は日立 M-80A (M-003 データ処理装置付) を用いた。精製した試料をジアゾメタンによりメチル化し、EI 法および CI 法による直接導入法にて測定を行なった。なお、イオ

ン化エネルギーは EI 法で 20 eV, CI 法では 100 eV とし、反応ガスは、イソブタンを用い、イオン源圧力を 2×10^{-6} torr とした。

3. 核磁気共鳴スペクトル

本分析に用いた装置は、日本電子 JNM-GX 400 である。質量分析と同様にメチル化した試料を重クロロホルムに溶解し、内部標準として添加したテトラメチルシランのシグナルを 0 ppm とし、400 MHz の共鳴周波数で水素核についてシグナルを観測した。

4. ヒトにおける体内動態試験

健康成人男子ボランティア 6 名に EST 400 mg 相当量を朝食後 0.5 hr に適量の水にて服用させ、経時的に尿および血清を採取し代謝物の分析を行なった。

5. 代謝物の分離、定量

(1) 血清の前処理法

血清 1.0 ml に内部標準物質 ((-)-(2R, 3S)-N-[(S)-3-methyl-1-(3-methylbutylcarbamoyl) butyl] tartaric acid 2.0 μ g/20 μ l 水溶液) を添加し、1N 塩酸で pH を 4~5 に調整したのち、酢酸エチル 5.0 ml で妨害内因性物質を抽出除去した。水層を更に 1N 塩酸で pH 1.0 に調整後、酢酸エチル 5.0 ml にて抽出し、有機層を減圧乾固後、5%アセトニトリル水溶液に溶解し、HPLC 試料とした。

(2) 尿の前処理法

尿は一定量を、Showdex DT (ED-13, 0.45 μ m) フィルターによりろ過したものをそのまま HPLC 試料とした。

* 大正製薬株式会社総合研究所

表1 HPLCの装置および分析条件

Specimens	(A) Urine (Detection)	(B) Serum	(C) Preparative
Chromatograph Data system U. V. detector Pen recorder	VARIAN VISTA 5500 VISTA 402 JASCO UVIDEC-100-III YOKOGAWA 3066		
Column	HITACHI gel # 3057 (ODS, 3 μ m) 150 \times 4 mm I. D.	HITACHI gel # 3057 (ODS, 3 μ m) 250 \times 4 mm I. D.	Waters semiprep μ -Bondapak (ODS, 10 μ m), 1 F \times 3/8 in I. D.
Gradient	Linear, A to B, 30 min A : 0.1% PCA/Water B : 0.1% PCA, 90% CH3CN/Water	Linear, A to B, 25 min A : 0.1% PCA, 5% CH3CN/Water B : 0.1% PCA, 30% CH3CN/Water	Linear, A to B, 60 min A : 0.5% TFA/Water B : 0.5% TFA/CH3CN
Flow-rate Column temp. U. V. detection	1.0 ml/min 60°C 205 nm		2.0 ml/min 60°C 215 nm
Sample volume	5 μ l	100 μ l	1,000 μ l

(PCA : perchloric acid, TFA : trifluoroacetic acid)

3. EST 代謝物 (M-4) の同定およびヒトにおける体内動態

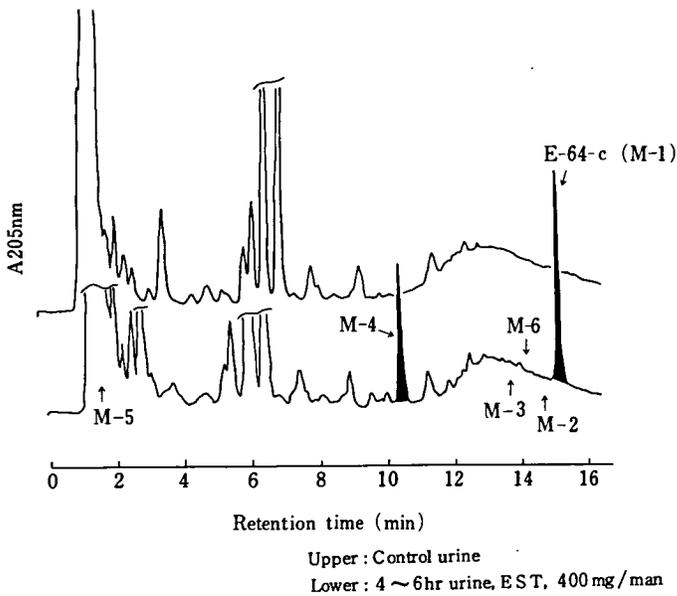


図1 ヒト尿中EST代謝物のHPLCパターン

(3) HPLC分析

各試料中の E-64-c (M-1) および M-4 は HPLC により分離定量した。尿試料の HPLC 分析条件は検出時と同じ表 1(A)の条件を、また血清試料は表 1(C)の条件を用いた。なお、M-4-a, M-4-b を各々分別定量することは極めて困難であったので両者の混合物の総量をもって M-4 とした。また、合成は同時に並行して進めたが標品を得るには至らなかったため、便宜的に極めて構造の近似した E-64-c とモル吸光係数が等しいものと仮定し、M-4 濃度を算出した。

6. 薬動力学解析

半減期 ($t_{1/2}$) は最小二乗法により算出した。また、血清中濃度曲線下面積 (AUC (0- ∞)) は台形則から求めた最終測定時 (t) までの AUC (0-t) および最終測定時からの無限時間までの AUC (t- ∞) を加算して求めた。

7. 試薬

本試験には、すべて特級またはそれ以上の純度の試薬を用いた。

結 果

1. M-4 の同定

図 1 に示すとおり、EST 投与後のヒト尿の HPLC チャートより、Control 尿には認められない未同定ピークが検出され、このピークの保持時間は動物の代謝物 M-4 と一致したことから、同一物質であることが推定された。そこで、M-4 をヒト尿より分取、精製し質量分析、核磁気共鳴スペクトル分析を行なった。

(1) 質量分析

図 2(A), (B) に、それぞれ CI 法、EI 法を用いた M-4 メチルエステルのマススペクトルを、また、図 2(C) に EI 法を用いた E-64-c メチルエステルのマススペクトルを示す。M-4 は CI 法では疑似分子イオンピーク (MH)⁺ として m/z 345、および、その脱水フラグメントとして m/z 327 が認められる。また、フラグメントイオン m/z 103, 84 は標品の E-64-c メチルエステル体ではほとんど認められないことから、水酸化はイソアミルアミン側鎖部分に起こ

I E-64 類縁体の開発

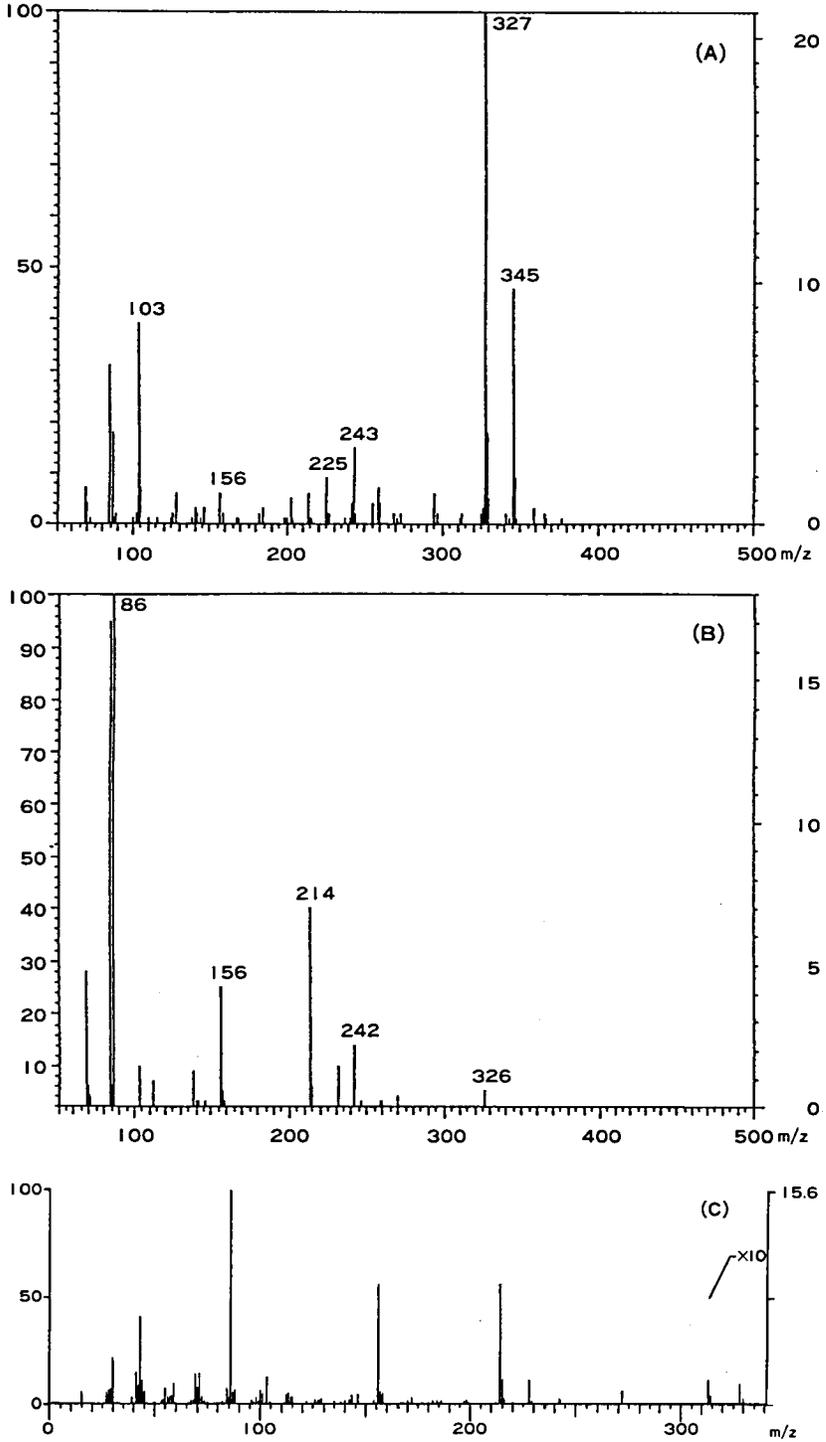


図2 E-64-c および M-4 質量スペクトル
 (A) M-4 メチルエステル (CI法) (B) M-4 メチルエステル (EI法)
 (C) E-64-c 標準試料のメチルエステル (EI法)

3. EST代謝物 (M-4) の同定およびヒトにおける体内動態

っていることが示唆された。一方、EI法において高質量域に認められた m/z 326 のイオンはCIスペクトルと同様に、分子イオンからの脱水フラグメントと思われる。また、比較的強く観測されたフラグメントイオン m/z 156, 214, 242 は標品 E-64-c メチルエステルにおいても認められることから、本代謝物は E-64-c と同様に、ロイシンおよびエポキシコハク酸部分を保持していると思われた。

(2) 核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H-NMR}$)

図 3(A), (B)に、それぞれ、E-64-c メチルエステルおよび M-4 メチルエステルの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。E-64-c と比較し、M-4 は δ 3.50, 3.70 の2つの二重線からエポキシ環の保持が推定され、 δ 4.35~4.42 の1Hに相当する四重線は、ロイシン部分のメチン基プロトンが、 δ 6.63~6.70, 6.70~6.79に相当するシグナルは2つのNHプロトンが保持されている

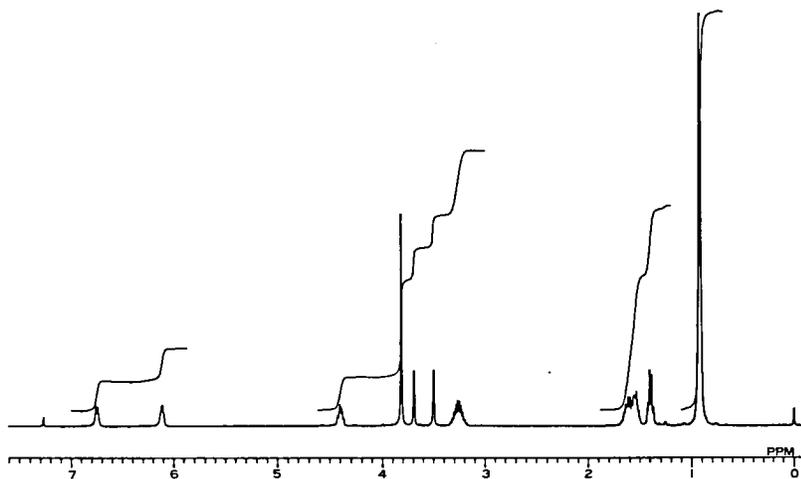


図 3(A) E-64-c メチルエステルの $^1\text{H-NMR}$

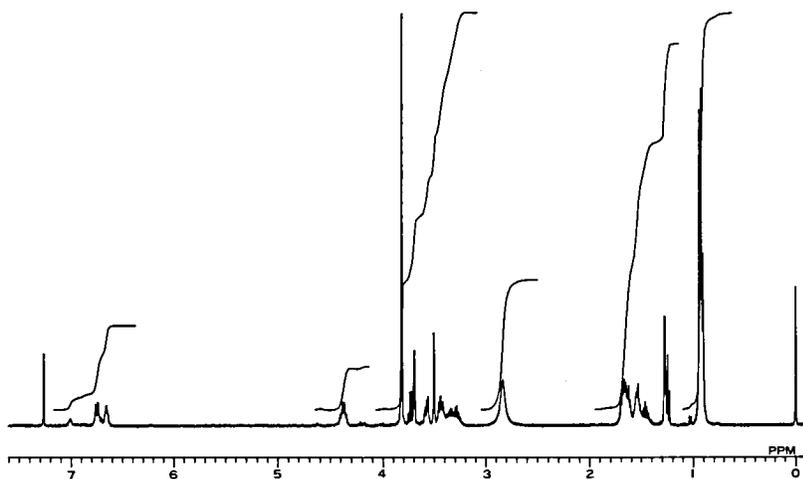


図 3(B) M-4 メチルエステルの $^1\text{H-NMR}$

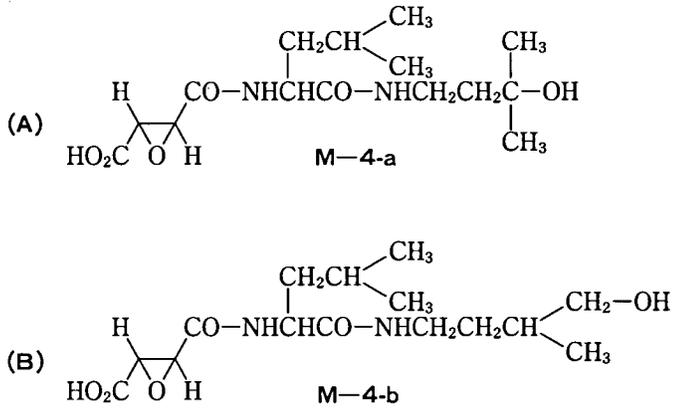


図4 EST 代謝物 (M-4) の推定構造

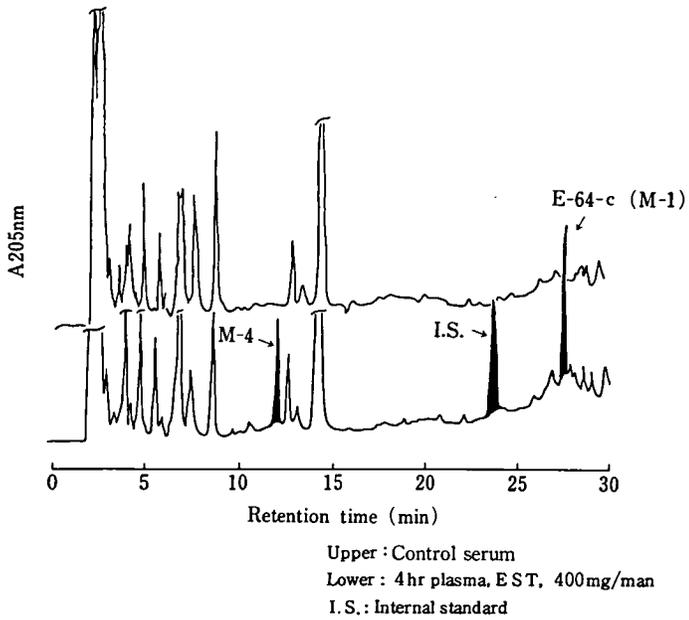


図5 ヒト血清中 EST 代謝物の HPLC パターン

3. EST代謝物 (M-4) の同定およびヒトにおける体内動態

表2 EST経口投与 (400 mg/man) 後の E-64-c および M-4 の薬動学的パラメータ

Volunteers	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$)		Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		Tmax (hr)		t _{1/2} (hr)	
	E-64-c	M-4	E-64-c	M-4	E-64-c	M-4	E-64-c	M-4
1	4.14	4.49	1.33	0.66	4	4	1.34	2.97
2	5.18	4.46	1.10	0.82	6	6	0.77	2.17
3	3.25	5.66	1.02	0.94	3	4	1.44	3.13
4	5.30	5.93	1.00	0.71	3	6	2.03	3.34
5	5.08	5.03	1.81	1.04	2	4	1.02	1.80
6	4.50	4.93	0.97	0.87	4	6	1.43	1.84
Mean	4.58	5.08	1.21	0.84	3.7	5.0	1.34	2.54
±S. E.	0.32	0.25	0.13	0.06	0.6	0.4	0.17	0.28

ことを示しているものと思われた。一方、 δ 0.90, 0.92 のイソアミルアミン部分およびロイシン部分のメチルプロトン、E-64-c では 12 H 存在するのに対し、M-4 では 9 H のみが認められた。また、 δ 2.8~2.9 のブロードなピークは重水添加により減少したことから水酸基のプロトンである可能性が考えられた。これらの結果を総合すると、M-4 は E-64-c のロイシン部分またはイソアミルアミン部分のメチル基プロトンが水酸化された構造である可能性が考えられた。

以上、質量分析および¹H-NMR の結果から M-4 の構造は M-4-b (図 4(B)) であると推定された。なお、M-4 は順相系薄層クロマトグラフィにより、動物の尿より分離、同定された M-4-a (図 4(A)) が少量混在することが確認された。

2. ヒトにおける体内動態

そこで EST 400 mg 経口投与後のヒト血清中、尿中の E-64-c および M-4 濃度推移を調べた。

(1) 血清中代謝物

EST 投与後 4 hr の血清抽出物の HPLC チャートを図 5 に、血清中代謝物の濃度推移を図 6 に示す。いずれの時点においても、未変化体は検出されず、活性体である E-64-c および M-4 が検出された。M-4 は E-64-c に遅れて漸増し、減少もゆるやかであった。血清中濃度から薬動学的パラメータを算出した結果、

表 2 に示すように、E-64-c の C max (1.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$) は M-4 (0.84 $\mu\text{g}/\text{ml}$) よりも高かった。また、M-4 は t_{1/2} が E-64-c の約 2 倍となり、T max にも差異が認められた。

(2) 尿中代謝物

EST 投与後 4~6 hr のヒト尿の HPLC パターンは図 1 に示したとおり、血清と同様に、未変化体は検出されず、E-64-c および M-4 が検出された。尿中への排泄率 (EST 換算) は 24 hr までに E-64-c として 28.9%、M-4 として 18.5% であり、両者とも投与後 8 hr までに尿中総排泄量の 90% 以上が排泄された (図 7)。

考 察

EST のヒトにおける体内動態に関してはすでに宮原ら^{2,3)} および渡辺ら⁴⁾ が質量分析計を用い、次のように報告している。すなわち、経口投与後の血清および尿中には未変化体は全く認められず、エステル加水分解物である活性体 E-64-c が検出され、食後 EST 200 mg を投与した場合 E-64-c の血清中 t_{1/2} は 1.96 hr、AUC は 3.3 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 、尿中排泄率は EST に換算して 28.0%、400 mg 投与の場合、AUC は 5.02 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 、尿中排泄率は 26.4% であった。

今回、ヒト尿より、E-64-c 以外に新たに代謝物 M-4 を分離、精製し、メチル化後、質量分析、核磁気共鳴スペクトルにより構造を決定

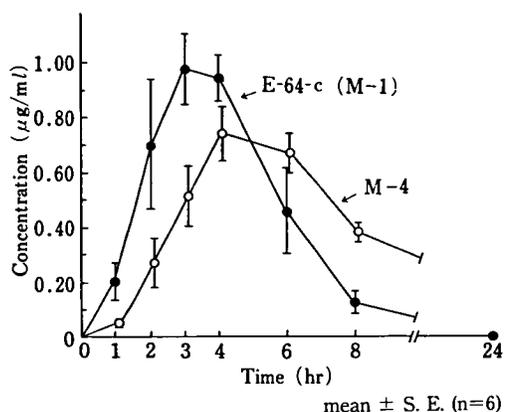


図6 EST 経口投与 (400 mg/man) 後の E-64-c および M-4 の血清中濃度推移

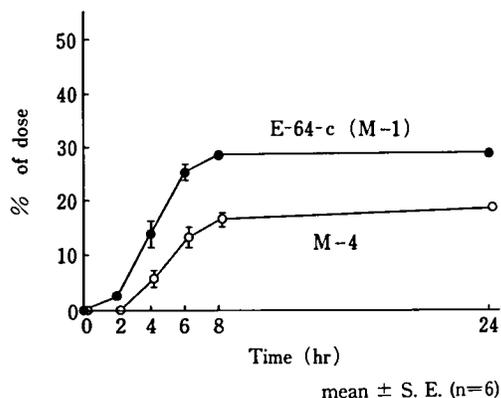


図7 EST 経口投与 (400 mg/man) 後の E-64-c および M-4 の累積排泄率

したところ、動物において認められる代謝物、M-4 であることが明らかとなった。また、薄層クロマトグラフィーにより分析した結果⁹⁾、2成分に分離され、動物の尿より分離した M-4-a、M-4-b にそれぞれ一致した。なお、M-4-a は M-4-b に比べ少量であった。そこで、EST 400 mg を食後経口投与した後の血清中、尿中代謝物、E-64-c および M-4 (M-4-a、M-4-b の混合物として分析) を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。その結果、E-64-c の $t_{1/2}$ は 1.34 hr であり、宮原らの結果と比較してほぼ同等の値であり、AUC ($4.58 \mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$) は用量比を考えると低い傾向を示したものの尿中排泄率も 28.9% とほぼ同等であったことから 400 mg 投与においても吸収、排泄に差はないものと思われた。M-4 は E-64-c に比べ、 $T_{1/2}$ が約 2 倍、 T_{max} にも明らかな差が認められ、尿中排泄も遅れた。これらの結果から、ヒトにおける EST の代謝は、腸管壁

で活性の強い E-64-c に変わり、一部は尿中に排泄され、残りの一部は肝臓内で M-4 に代謝され尿中に排泄されるものと推定された。また、ヒトの代謝パターンは、主に E-64-c 抱合体として胆汁中に排泄される¹⁾ラットのパターンと異なり、E-64-c、M-4 が主に尿中に排泄されるハムスター、ウサギのパターンに近似していると考えられた。

参考文献

- 1) 福島清美 他：基礎と臨床，20 (4)，2091-2101，1986.
- 2) 宮原 正 他：臨床薬理，16 (2)，357-365，1985.
- 3) 宮原 正 他：臨床薬理，16 (3)，537-546，1985.
- 4) 渡辺暉邦 他：未発表.
- 5) 福島清美 他：基礎と臨床，20 (4)，2102-2106，1986.

II 酵素・細胞・組織レベルにおける研究

4. カルシウム依存性中性プロテアーゼのモノクロナル抗体今堀 和友
5. CANP 遺伝子の発現鈴木 紘一
6. 細胞内カルシウム依存性プロテアーゼの動態に対する
E-64 の作用——鶏胚筋分化と蛋白分解——野々村禎昭
7. EST のリソゾーム酵素の分解抑制効果について勝沼 信彦

4. カルシウム依存性中性プロテアーゼのモノクロナル抗体

今堀和友*

研究協力者 川島誠一* 笠井陽子* 林昌美*
猪股光司* 中村愛*

はじめに

カルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) にはカルシウム感受性の異なる 2 種類の酵素 (μ CANP と mCANP) が存在する。cDNA の塩基配列などから決定されたアミノ酸配列を比較すると、 μ CANP と mCANP の 80K サブユニットはかなりの類似性を有し、30K サブユニットはほぼ同一である。また、いずれの 80K サブユニットもチオールプロテアーゼ領域やカルシウム結合領域を含むいくつかのドメインから成り、30K サブユニットにも高グリシン領域やカルシウム結合領域が存在する。同様に生物種の異なる CANP の間にも類似性がみられる。このように CANP のサブユニットはそれぞれいくつかの機能単位が融合した産物で、その一部は変異し一部は極めてよく保存されている。このような CANP を特異的に識別する目的には、抗 CANP ポリクロナル抗体は適切でない。実際、 μ CANP と mCANP あるいはウサギ CANP とニワトリ CANP の 80K サブユニットは免疫的に部分交叉し、30K サブユニットは完全に交叉する。したがって、似て非なる CANP を特異的に同定するためには、それぞれに特異的な抗体が必要とされる。これはモノクロナル抗体をスクリーニングすることにより実現可能なので、CANP に対するモノクロナル抗体の作成を試みた。

結 果

ウサギ骨格筋 mCANP でマウスを免疫し、その脾細胞とマウスミエロマ細胞を PEG 法で融合させた。できたハイブリドーマを HAT 培地で選別したのち ELISA 法により抗 CANP 抗体を産生する細胞をスクリーニングし、クローン化した。以上の操作により 15 種類の抗 CANP 抗体産生クロンを得た。いずれもその抗体力価は血清より高かった (図 1)。これらの抗体が免疫したウサギ mCANP の 80K サブユニットと 30K サブユニットのいずれを認識するかを決定するため、精製 mCANP を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動したのちニトロセルロース膜に転写し、各抗体で染色した。その結果、いずれの抗体も 80K サブユニットに特異的であった (図 2)。次に、構造上の類似性のある μ CANP の 80K サブユニットと交叉する抗体の有無を検討した。mCANP の場合と同様に、 μ CANP を電気泳動し各抗体で染色すると、1D₁₀A₇ の抗体のみが μ CANP の 80K サブユニットと反応し、他の抗体は全く反応しなかった (図 3)。さらに、同じ哺乳類であるラットや鳥類であるニワトリの CANP との交叉性を検討した。全てのモノクロナル抗体はラット mCANP の 80K サブユニットと交叉したが、ニワトリ CANP の 80K サブユニットと交叉するものは 1D₁₀A₇ のみであった (図 4)。これらのモノクロナル抗体が CANP に特異的で生物組織の他の蛋白質と反応しないことを確認

* 東京都老人総合研究所

II 酵素・細胞・組織レベルにおける研究

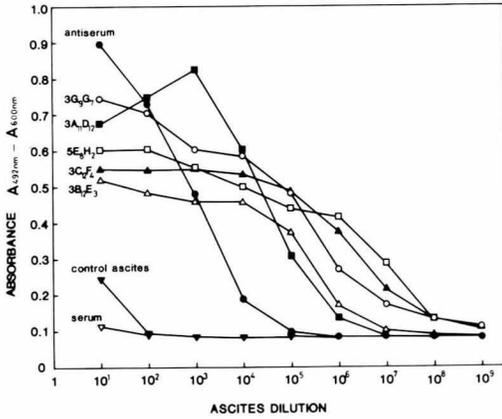


図1 抗CANPモノクロナル抗体の力価

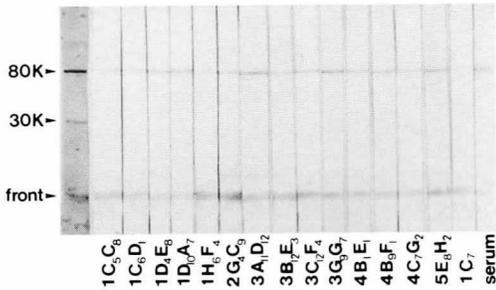


図2 モノクロナル抗体によるmCANPの染色

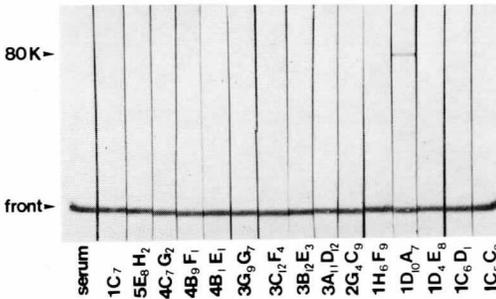


図3 モノクロナル抗体によるμCANPの染色

するため、ラットおよびウサギの各種組織を2%SDS中で直接ホモジナイズし、その抽出液を電気泳動・イムノブロットしたのち抗体と結合する蛋白質を検出した(図5)。いずれの場合もCANPの80Kサブユニットに相当する位

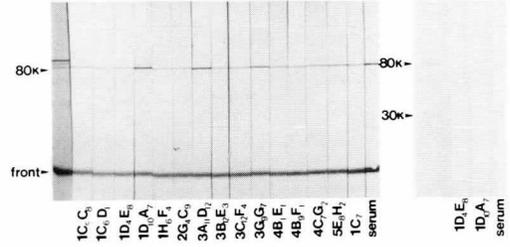


図4 モノクロナル抗体によるラットmCANP(左)とニワトリCANP(右)の染色

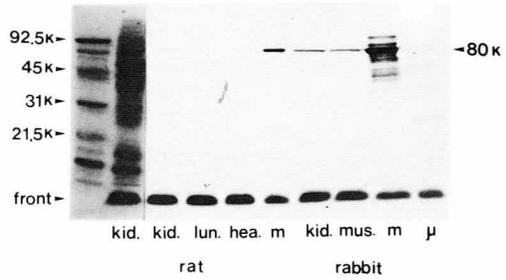


図5 ラットおよびウサギ組織の粗抽出液中のmCANPの検出

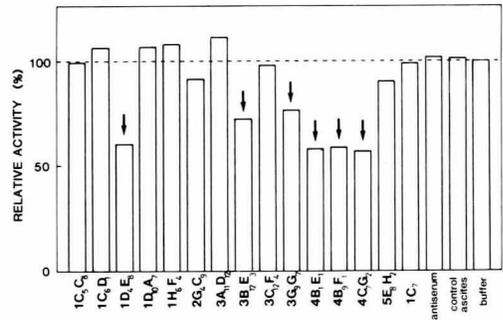


図6 モノクロナル抗体によるCANP活性の阻害

置にバンドが確認された。したがってモノクロナル抗体はCANPに特異的であり、今後CANPの同定・定量に応用できることが明らかになった。

得られたモノクロナル抗体にCANPのプロテアーゼ活性を阻害するものがあるか否かを調べるため、CANPと抗体とを反応させたのちカゼインを基質とするアッセイ系に加えその

4. カルシウム依存性中性プロテアーゼのモノクロナル抗体

表1 モノクロナル抗体の性質

Hybridoma cell lines	Subclass	Binding to			Inhibition of mCANP activity
		μ CANP	rat mCANP	chicken mCANP	
1C ₃ C ₈	IgG _{2b}	-	+	-	-
1C ₆ D ₁	IgG _{2b}	-	+	-	-
1D ₄ E ₈	IgG _{2b}	-	+	-	+
1D ₁₀ A ₇	IgG _{2a}	+	+	+	-
1H ₆ F ₄	IgG ₁	-	+	-	-
2G ₄ C ₉	IgG _{2b}	-	+	-	-
3A ₁₁ D ₁₂	IgG ₁	-	+	-	-
3B ₁₂ E ₃	IgG ₁	-	+	-	+
3C ₁₂ F ₄	IgG _{2b}	-	+	-	-
3G ₉ G ₇	IgG ₁	-	+	-	+
4B ₇ E ₁	IgG ₁	-	+	-	+
4B ₉ F ₁	IgG ₁	-	+	-	+
4C ₇ G ₂	IgG ₁	-	+	-	+
5E ₈ H ₂	IgG _{2b}	-	+	-	-
1C ₇	IgG ₁	-	+	-	-

ロテアーゼ活性を測定した。15種類のモノクロナル抗体のうち、6種類の抗体がCANP活性を阻害した(図6)。しかしその阻害は部分的で、抗体の量を増やしても最大70%の阻害しか起らなかった。サブクラス特異的ウサギ抗体を用いてドット免疫結合測定によりモノクロナル抗体のサブクラスを同定したところ、全てがIgGであり、8種類がIgG₁、6種類がIgG_{2b}に分類された(表1)。 μ CANPやニワトリCANPと交叉する1D₁₀A₇のみがIgG_{2a}であった。

考 察

CANPは広く動物界に存在する重要な細胞内プロテアーゼといわれているが、その機能は明らかでない。機能解明の手掛りとして、その細胞内および組織内での存在様式がある。2種類のCANP、即ち μ CANPとmCANPはカルシウム感受性が異なり蛋白質としても異種の酵素なので、その機能や存在部位も異なっていると考えられる。これらを解析する上で、特異性の高いモノクロナル抗体は有力な手段となり得

る。本年度はウサギmCANPに対する15種類のモノクロナル抗体を作成した。その多くはmCANPの80Kサブユニットに特異的で、今後mCANPの解析に有用と思われる。一方、種々のCANPと交叉する1D₁₀A₇抗体は、CANPのタイプ・生物種で共通の保存された構造を認識する興味ある抗体である。この抗体はCANP全体の動態を追跡する上で有用であるばかりでなく、広く生物界のCANPを探る手段となり得る。今回得られた抗mCANPモノクロナル抗体と、目下その作成が進行中の μ CANPに対するモノクロナル抗体とを組み合わせることにより、各CANPの細胞・組織における存在量・存在部位を決定でき、両CANPの機能解明への寄与が期待される。また、CANPは種々の機能が予想される複数のドメインから成っているので、それぞれの領域の機能を解析する上で、認識部位の単一なモノクロナル抗体は分子を解剖するメスとなり得る。そのためには、各モノクロナル抗体が認識する部位の決定が急務である。

5. CANP 遺伝子の発現

鈴木 紘一*

研究協力者 大野 茂男* 今城 忍* 榎森 康文*
川崎 博史* 秋田 朗子*

はじめに

カルシウム依存性プロテアーゼ (CANP) の遺伝子の発現の制御機構を知る上で、種々の実験を行った。まずはじめに CANP を構成する大 (80K) 小 (30K) 2 個のサブユニットのアミノ酸配列を cDNA の塩基配列を解析して推定した。昨年度までにニワトリ 80K の構造を明らかにしたが¹⁾、本年度は引続きヒトおよびウサギの m, μ CANP の 80K の構造を解析した。次いで、30K サブユニットの構造解析に着手し、m および μ CANP の 30K サブユニットは同一であることを証明した。この結果をもとにヒト、ウサギ 30K の cDNA の構造から、30K サブユニットのアミノ酸配列を明らかにした。その後 30K の遺伝子構造を解析し、昨年度解析した 80K の遺伝子構造²⁾と比較して検討を加えた。最後に、以上で得られた知見をもとにタンパク質レベル、あるいは酵素レベルでの実験を行い、CANP の構造と機能の解析を行った。

結果と考察

1. m, μ CANP の 80K の構造

昨年度構造決定をしたニワトリ CANP 80K の cDNA をプローブにして、ウサギの肺、骨格筋、脾臓等の cDNA バンクをスクリーニングし、大別して 2 種類のクローンを得た。こ

れらの塩基配列と、タンパク質レベルで決定した部分アミノ酸配列の結果から、得られた 2 種の cDNA クローンは m および μ CANP 80K サブユニットに対応することがわかった³⁾。さらに、この 2 種の cDNA クローンをプローブにし、ヒトの cDNA バンクをスクリーニングし、ヒトの m, μ CANP に対する cDNA クローンを得た。このようにして得られたウサギ、ヒトの m, μ CANP 80K クローンの塩基配列を決定した。80K サブユニットはいずれも約 700 個のアミノ酸配列からなり、ニワトリ CANP と同じく 4 個の明確なドメインからなっていた。ヒト m, μ およびニワトリ CANP の 80K サブユニットを比較した場合、3 者のアミノ酸の相同性は 60% 以上であった。特にプロテアーゼ活性を発現するプロテアーゼドメインでは 70~80% の高いホモロジーが見られ、生物種やカルシウムの感受性を問わず、プロテアーゼの発現に関しては、どの CANP の場合にも基本的には同じ機構であることが示唆された。

一方 C 末端にあるカルシウムを結合するドメインのアミノ酸配列は m と μ でかなりの違いが見られた。もしアミノ酸配列の差がカルシウム感受性を決める要因であるとすれば、このアミノ酸配列の差は非常に重要である。現在 m, μ CANP で明らかになっている EF ハンド構造をもとに、カルシウム結合能とアミノ酸配列との関係を解析中である。

2. 30K サブユニットの構造

30K サブユニットは今まで CANP のプロテ

* 東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部

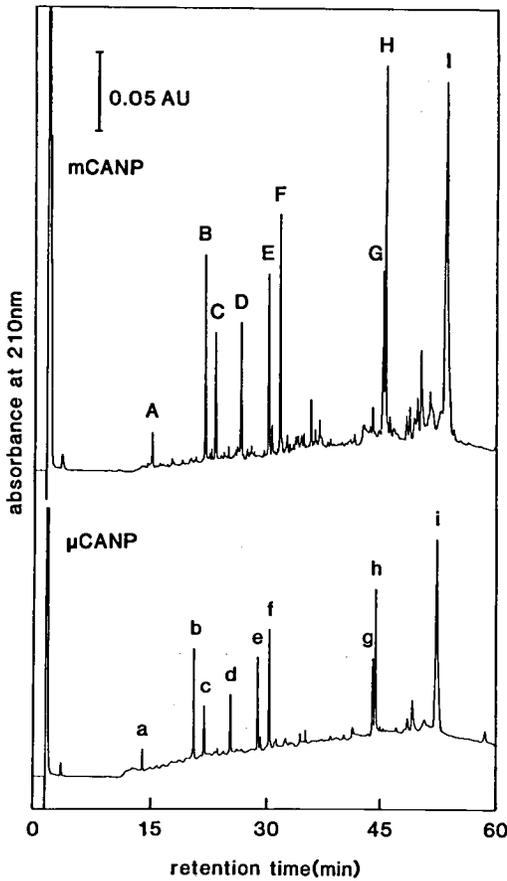


図1 m および μ CANP 30K サブユニットのペプチドマップの比較
単離した 30K サブユニットをリシルエンドペプチダーゼで消化してえられるペプチドを逆相系の HPLC で分離したパターン。

アーゼ作用でどのような役割をはたしているのか全く不明であった。そこで、アミノ酸配列を決定しその機能等を推定することにした。m および μ CANP の 30K サブユニットについては、両者の構造が似ているとの報告はあるが、どの程度類似性があるか不明なので、cDNA をクローニングする前にまずこの点を検討した。

ウサギの m, μ CANP から 30K サブユニットを単離し、これをリシルエンドペプチダーゼで消化した。こうして得られたペプチドを逆相の高速液体クロマトグラフィーで分離した (図

1)。得られたペプチドの溶出パターンは m, μ CANP で同一で、有意の差はみられなかった。両者の対応するピークに含まれるペプチドのアミノ酸組成、アミノ酸配列も全く同じであったので、m, μ CANP の 30K サブユニットは同一であると結論した⁹⁾。

ウサギ 30K サブユニットの部分アミノ酸配列をもとに、14 マーのオリゴヌクレオチドプローブ 2 組を合成し、これを使ってウサギの cDNA ライブラリーをスクリーニングした。約 10 万個のコロニーから 10 個のクローンを得、このうち最も長い約 1.5 Kb の cDNA クローンの塩基配列を解析してウサギ 30K サブユニットの構造を決定した。さらに、ウサギ 30K cDNA をプローブとして、ヒト cDNA ライブラリーから約 1.5 Kb のヒト CANP 30K サブユニットの cDNA を単離し、その構造を決定した (図 2)。

ウサギ、ヒトの 30K はそれぞれ 266 個および 268 個のアミノ酸残基からなり、分子量は共に 2.8 万であった。このアミノ酸配列を解析した結果、30K も 80K と同様明らかなドメイン構造を持ち、次のような著しい特徴があった。

①ヒトとウサギ 30K のアミノ酸配列は極めてよく似ていて、わずかに 6 ヶ所の置換と 2 ヶ所の欠失がある以外は全く同じで、その相同性は 97% 以上であった。

②N 末端側の約 70 残基はグリシンに富む領域で、No. 10~62 の間のグリシン含量は約 70% にも達する。ヒトの場合、最も長いのはグリシンが 20 個連続する配列で、11 個連続する配列もある。グリシン以外のアミノ酸としては疎水性アミノ酸が非常に多いので、この領域をグリシンに富む疎水性領域と呼ぶ。

③C 末端の領域 (No. 99-268) には 4 個の EF ハンド構造がみられた。さらに著しいことには、この部分のアミノ酸配列が 80K サブユニット中にある 4 個の EF ハンドを含むカルシウム結合領域とアミノ酸配列が非常に似ていることである。図 3 に示すように C 末端をそろえてウサギのアミノ酸配列をならべると、

5. CANP 遺伝子の発現

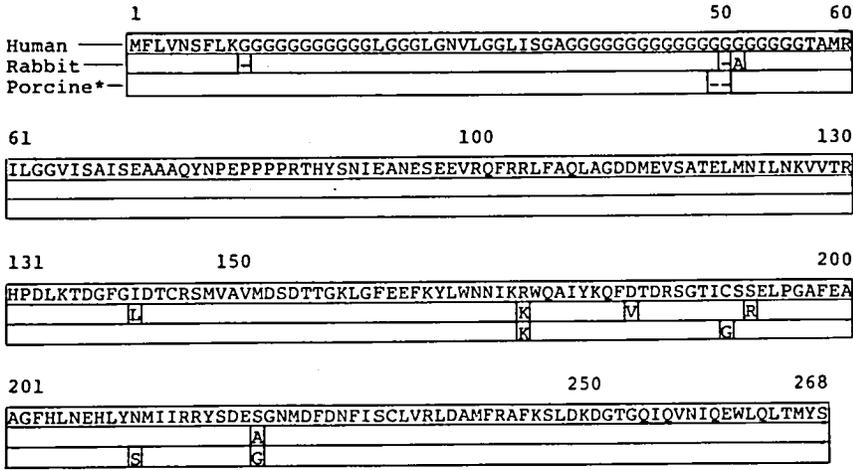


図2 ヒトとウサギ CANP 30K サブユニットのアミノ酸配列
 ウサギとブタ⁶⁾についてはヒトの配列と異なるところだけを示した。

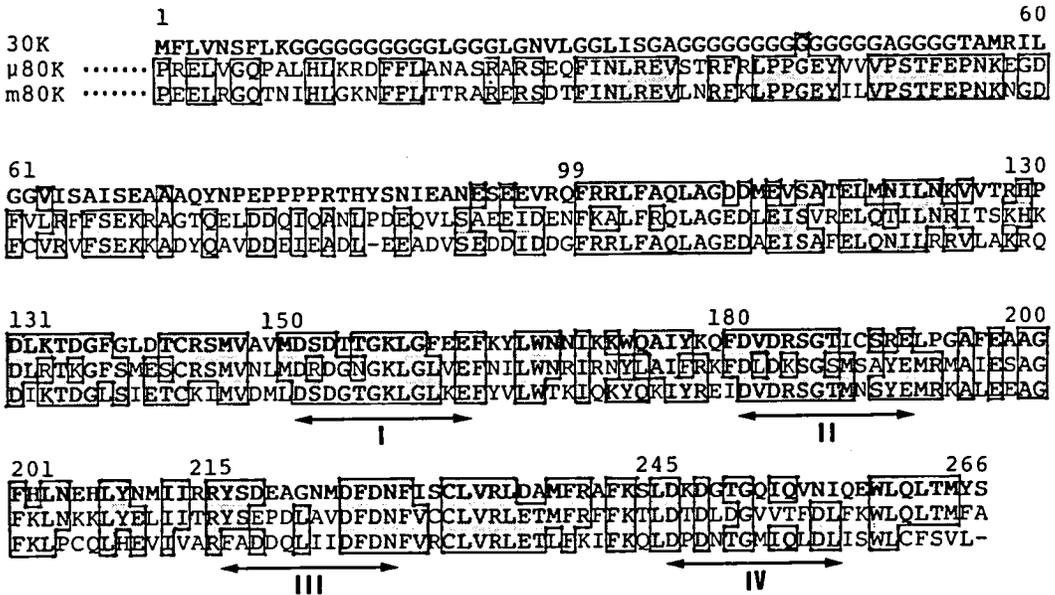


図3 ウサギ CANP の 30K, 80K サブユニットのアミノ酸配列の比較
 m, μCANP 80K サブユニットについては C 末端領域のアミノ酸配列のみを示した。

30K, 80K サブユニットの 4 個の EF ハンド構造の位置は一致し、アミノ酸配列が高い相同性をもつことがわかる。したがって、m, μCANP の 80K サブユニットおよび 30K サブユニットのカルシウム結合部位は同一の祖先に

由来するものであると予想される。

さらに著しいことには、30K と 80K の間の類似性は No. 99 を境に大きく変わり、それより N 末端の No. 1~98 では全く見られない。30K サブユニットは、N 末端側と C 末端側を

II 酵素・細胞・組織レベルにおける研究

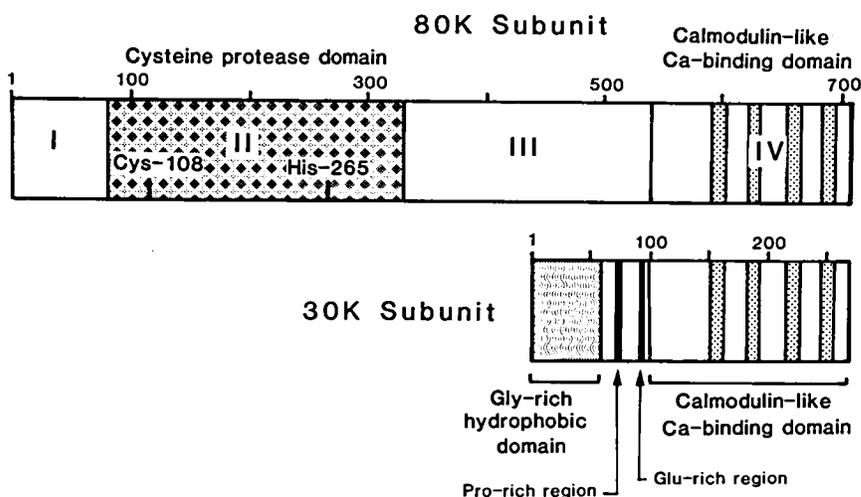


図4 CANPのドメイン構造

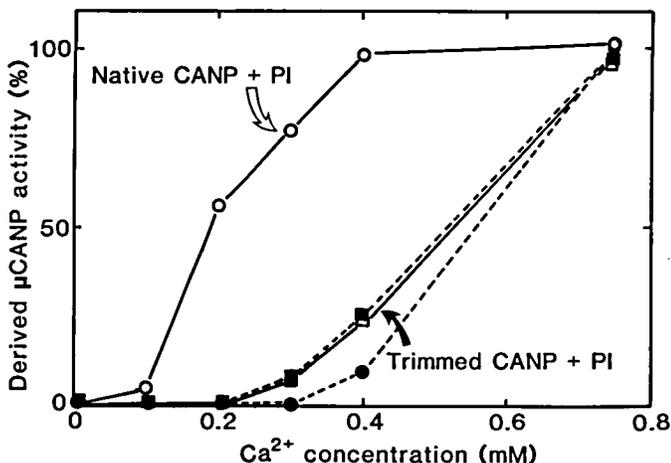


図5 自己消化に及ぼすリン脂質 (PI) の効果

Trimmed CANPとは自己消化によって調製したCANPで、30KのN末端のグリシンに富む疎水性の領域を欠くものをいう。●: native CANP, ■: trimmed CANP。白抜記号の実線はそれぞれリン脂質を含む場合。

コードする少なくとも2つの遺伝子が進化してできたものと考えられる。

④N, C末端側のドメインの間には、プロリンに富む部位と、グルタミン酸および親水性アミノ酸に富む部位が存在する。

今まで30Kサブユニットの役割は全く不明であったが、30Kの中に80Kに含まれるカルシウム結合ドメインと祖先を同じくするカルシウム結合ドメインが含まれていることから、

30KサブユニットはCANPの活性を制御するサブユニットと呼ぶことができる。また、m, μCANPの30Kサブユニットが同じであることは、30Kサブユニットの機能やカルシウム感受性を考える上で非常に重要な事実である。30Kのドメイン構造を図4に80Kとまとめて示した。

3. 30Kサブユニットの遺伝子構造

アミノ酸配列から推定したドメイン構造、分

5. CANP 遺伝子の発現

子進化などをさらにはっきりさせる目的でヒト 30K の遺伝子構造を解析した。ウサギ cDNA をプローブにしてヒト染色体の DNA バンクをスクリーニングし、ヒト 30K 遺伝子を単離した。えられたファージクローンを分析した結果、ヒト CANP 30K サブユニット遺伝子は、長さ約 10 Kb で、11 個のエキソンから出来ていた。中でも大きな特徴は、カルシウム結合ドメインにある 4 個の EF ハンド構造が各 1 個のエキソンでコードされていることである。これは、昨年度に解析したニワトリ CANP 80K のカルシウム結合ドメインで見られた遺伝子構造²⁾の特徴と同じで、さらに、イントロンの挿入位置まで完全に一致していた。この事実は 30K と 80K のカルシウム結合ドメインが同一の祖先遺伝子に由来することを強く示唆し、これらのカルシウム結合ドメインが 1 個の EF ハンド構造を持つ原始カルシウム結合ペプチドから 2 回の遺伝子重複によって生じたとする説と合致する。一方 30K の N 末端の領域は、C 末端領域や 80K の遺伝子構造とは全く違うので、30K は少なくとも N、C 両末端ドメインをコードする 2 つの遺伝子が融合してできたものといえよう。

4. CANP の自己消化とカルシウム感受性

これまでの研究で CANP の両サブユニットのアミノ酸配列と遺伝子構造が明らかになったので、この結果をもとに CANP の構造と機能の研究をさらに進めた。CANP を mM カルシウムの存在下に保温すると自己消化がおり、それと同時に CANP のカルシウム感受性が著しく上昇する。この自己消化には mM 程度のカルシウムが必要なため、普通生理的条件下ではおこらないと思われるが、リン脂質を含むリポソームの存在下では μM のカルシウムの存在下に自己消化が生じる。30K の N 末端のグリシンに富む疎水性領域は、このリポソームとの相互作用に必須で、グリシンに富む疎水性領

域を欠いた 30K サブユニットを持つ CANP ではリポソームの効果は見られない⁷⁾ (図 5)。種々の結果を総合すると、30K は N 末端の疎水性領域で細胞膜やオルガネラなどと相互作用し、プロテアーゼ活性を持つ 80K サブユニットの局在を決めるアンカーの役割をはたすと考えられる。この際、プロリンに富む領域は細胞膜と相互作用をする 30K の N 末端ドメインと、80K サブユニットとの相互作用に必要な C 末端ドメインとをつなぐ蝶番の役目をし、グルタミン酸に富む親水性のドメインは膜と相互作用する N 末端のドメインを規定する役割をはたすと考えられる。CANP が膜と相互作用をしたり、リン脂質によって活性化を受けることから、CANP は細胞膜でカルシウムを介する情報伝達系においても重要な役割をはたすことが示唆され、非常に興味深い。

文 献

- 1) Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M. and Suzuki, K.: *Nature*, **312**, 566, 1984.
- 2) Emori, Y., Ohno, S., Tobita, M. and Suzuki, K.: *FEBS Lett.*, **194**, 249, 1986.
- 3) Emori, Y., Kawasaki, H., Sugihara, H., Imajoh, S., Kawashima, S. and Suzuki, K.: *J. Biol. Chem.*, **261**, 9465, 1986.
- 4) Kawasaki, H., Imajoh, S., Kawashima, S., Hayashi, H. and Suzuki, K.: *J. Biochem.*, **99**, 1525, 1986.
- 5) Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Kawashima, S. and Suzuki, K.: *J. Biol. Chem.*, **261**, 9472, 1986.
- 6) Sakihama, T., Kakidani, T., Kannagi, R., Nakanishi, S., Ohmori, M., Takio, K., Titani, K. and Murachi, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 6075, 1985.
- 7) Imajoh, S., Kawasaki, H. and Suzuki, K.: *J. Biochem.*, **99**, 1281, 1986.

6. 細胞内カルシウム依存性プロテアーゼの動態 に対する E-64 の作用 —鶏胚筋分化と蛋白分解—

野々村 禎 昭*

研究協力者 江 橋 節 郎**

筋ジストロフィー症の発症のもとである骨格筋の崩壊はその第一の攻撃の場が何であれ、最終的には骨格筋細胞内に存在する蛋白質分解酵素が働くことによって生じる。我々の班の中心課題である E-64 の開発はこの蛋白質分解酵素に対する抵抗のために開発を目指しているわけである。このように骨格筋細胞内に存在する蛋白質分解酵素は何故に、いかなる時に存在し作用するのであろうか。実験的に筋傷害を与え、これが再生に到る過程は蛋白質分解酵素が作用する著名な例である。しかし、もっと自然な、生理的な状態で作用している例はないであろうか？

このような例として骨格筋の“生理的細胞死”または“プログラムされた細胞死”の例がある^{1,2)}。これは少なくとも鶏類では受精卵インキュベート 16 日頃にそれまで発達していた筋細胞が死に新しい細胞におきかえられる現象である。骨格筋の細胞死に関しては系統的な研究がなく、その真の姿は不明である。本研究はまず鶏の胸筋を用いて“生理的細胞死”の実像を明らかにし、今後 E-64 などの蛋白分解酵素抑制剤を用いてこの“生理的細胞死”の過程を乱すことによって発生分化の過程に何が生じるかを明らかにすることを目指した。

実験材料・方法

ジストロフィー鶏 413 およびコントロール 412 系を用いた。インキュベート 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 日目および孵化後 2~5 日頃の胚胸筋を *in situ* で 4% グルタルアルデヒド、カコジール酸バッファーで固定、以後型通りの方法で電子顕微鏡用標本作製した。超薄切片標本は鉛染色して JEM-1200Ex で観察した。

インキュベート鶏卵に対して開窓法を行った。12, 13, 14 日胚に対して無菌的に開窓、テープ添布で内容を観察した。また生理食塩水の注入を試みた。これは今後 E-64 等を注入する準備である。

結 果

12~15 日胚までは横断切片で 4~5 μm 径の比較的大きな筋細胞の周囲に 1~2 μm の小さな筋細胞または衛星細胞が附着している像が認められた。大きな細胞の特徴は中心部が粗で明るく、周辺部に筋細線維群が分布し、これら線維は六方晶形をとっていた。周囲に附着した小細胞にも筋細線維群が存在するものが多く、単なる衛星細胞とは言えない。16~17 日となると大きな細胞は認められず 1~2 μm の小さな細胞が散在している。多くの細胞に筋細線維群が存在している。18~19 日となると細胞の数がふえ、細胞間隔はせまくなっていく。孵化後 1~2 日で細胞直径は変わらず 1~2 μm であり 4

* 東京大学医学部薬理学第一

** 岡崎国立共同研究機構生理学研究所

～5日ですしずつ大きくなり3 μ m位になり、細胞はきっちりとパックされてくる。このような観察から12～15日に存在した大きな細胞は16日目までに自己分解されたと思われる。しかしその分解される姿は認められなかったもので、15～16日の間を6時間おきに固定することとした。このような結果、大きな細胞の中にライソゾームを含んだものや、筋細線維群が崩壊しつつある姿をこの15～16日の間にこまかく固定したものの中からとらえることが出来た。“生理的細胞死”の実際に生じている姿をとらえることが出来た。

一方12～16日胚をもった受精卵に対する開窓法の施行は非常に困難であった。特に生理的食塩水注入を行ったものは全て死亡した。恐らく開窓法はインキュベート後早い時期に行う必要があると考えられるが、今後も条件をかえて追求していく。

考 察

鶏骨格筋の“生理的細胞死”が証明された。16日目に直径4～5 μ mの大きな細胞は全て死に小さな細胞にとり代られる。ここで問題なのは、従来12～15日目にみられる大きな細胞に

多数の小細胞が附着している像が細胞培養でmyoblastが癒合してmyotubeやがてmuscle cellになっていくという模式図に一致しているという一般的認識である。細胞培養にみられた分化の進展は胚では16日で終りで以降は全く異なっただけに分化した細胞同士の癒合で筋細胞が形成されていくことになる。この図式の確立は、細胞培養の大きな展開で筋の発生が*in situ*でもそのようなものと考えられてしまった点を改めねばならないだろう。むしろ*in situ*での筋形成の姿を明らかにする必要がある。

E-64などの蛋白質分解酵素抑制剤を16日直前の胚にプログラムされた蛋白質分解酵素が働き出す前に与え自然の分化の過程を変化させるころみは非常に興味あるテーマであるが、方法論的に困難であることがわかった。しかし、何らかに技術的改良を加えて今後こころみていきたい。

文 献

- 1) Glücksman, A.: Biol. Rev., 26, 59, 1951.
- 2) Boyd, J. D.: Bourne, G. H. ed. "The Structure and Function of Muscle I", p. 63, Academic Press, N. Y., 1960.

7. EST のリソゾーム酵素の分解抑制効果について

勝 沼 信 彦*

研究協力者 木 南 英 紀* 塚 原 俊 文*

はじめに

E-64 は強力なチオールプロテアーゼの阻害剤であり, in vitro のみならず in vivo でもリソゾームのチオールプロテアーゼ群, カテプシン B, L を強く阻害することを明らかにしてきた¹⁾。また, 昨年培養マクロファージを用い, E-64-c に比べ, そのエステル体である EST はカテプシン B, L 活性の阻害および自己タンパク質の分解速度の抑制を指標とした場合 10~20 倍の低濃度で同じ効果を示すことを明らかにした。本年は E-64 がリソゾームのカテプシン群の活性を阻害した時, リソゾームの酵素の分解はどのような影響を受けるかを調べた。

材料と方法

①生理食塩水に溶解させた 6% のカゼイネイト 20 ml を腹腔内注射し 3~4 日後に腹腔洗浄でマクロファージを集めた。径 60 mm のファルコンシャーレを用い 10% 子牛血清を含む RPMI 1640 培地で培養した。シャーレ 1 枚あたりの細胞数は $3\sim 4 \times 10^6$ とした。

②細胞内タンパク分解に対する E-64 誘導体の効果を見る時には, 一晩の培養による細胞の spreading の完了後, 10% 子牛血清を含む無ロイシン MEM 培地に $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -ロイシン/dish を加えたものに換えタンパクをラベルした。24 時間後, 細胞を PBS で 2 回洗浄後,

血清および 10 mM のロイシンを含む MEM 培地に換え chase を行った。インヒビターは chase の期間に加え, 効果を判定した。すべての実験は 3 回の培養実験の平均である。chase の後, 培地および細胞に 100 mM ロイシンを含む 10% TCA を加え, 上清はそのまま放射活性を測定し, 沈澱は 10 mM のロイシンを含む 5% TCA で 2 回洗浄後, NCS に溶解し, 放射活性を測定した。内在性タンパク分解は

$$\frac{\text{TCA 可溶性画分の放射活性 (培地+細胞)}}{\text{全放射活性 (TCA 可溶性画分 + 細胞の TCA 沈澱画分の放射活性)}} \times 100$$

で表現した。

③動物実験では E-64-c (2 mg/100 g 体重) あるいは生食を朝, 夕 2 回腹腔内投与した。E-64-c 投与 3 日目よりシクロヘキシミド (100 μg /100 g 体重) を 8 時間毎に腹腔内注射し, 0, 8, 16, 24 時間後に各々 5 匹づつのラットを殺し肝のカテプシン B, H および L のレベルを測定した。カテプシン B, H および L は Kominami ら²⁾ および Bando ら³⁾ 酵素免疫測定法に従った。

結果と考察

ラット腹腔マクロファージを採取し, 一夜培養皿に接着後, 血清を含む培養液に交換し, その中に各種プロテアーゼインヒビターを添加し, リソゾーム酵素に対する効果をみた。インヒビター添加後 3 日目の各種リソゾーム酵素

* 徳島大学医学部附属研究施設酵素化学部門

II 酵素・細胞・組織レベルにおける研究

表1 EST およびペプスタチンのマクロファージリソゾーム酵素のレベルに及ぼす影響

Treatment Enzymes	Control	EST (10 µg/ml)	Pepstatin (100 µg/ml)	EST+Pepstatin
	ng/10 ⁶ cells			
Cathepsin B*	1200 ± 420	2650 ± 650	1560 ± 410	3450 ± 760
Cathepsin H*	260 ± 15	490 ± 72	290 ± 35	530 ± 90
Cathepsin L*	90 ± 21	350 ± 84	126 ± 36	490 ± 86
	nmol/min/10 ⁶ cells			
β-Galactosidase	12.1 ± 2.1	17.4 ± 1.7	12.2 ± 1.4	17.9 ± 2.2
β-Glucuronidase	33.0 ± 4.9	71.6 ± 7.6	40.5 ± 2.1	86.0 ± 4.8
β-Hexosamidase	12.6 ± 1.4	27.2 ± 1.9	15.3 ± 3.1	32.0 ± 3.5
α-Mannosidase	2.4 ± 0.2	4.6 ± 0.3	2.2 ± 0.2	3.7 ± 0.3

*酵素免疫測定

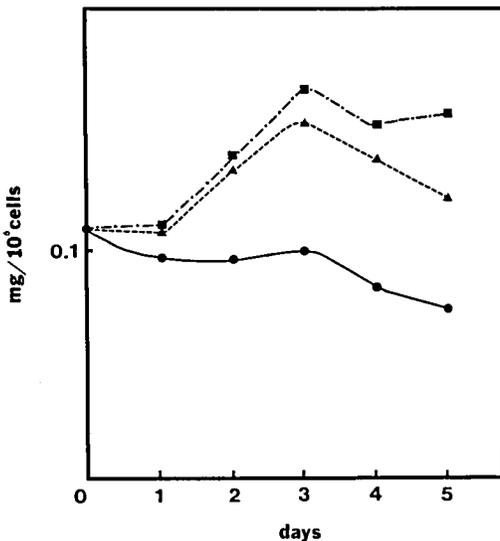


図1 EST およびロイペプチンのマクロファージ細胞内タンパクの蓄積に及ぼす影響
 (—●—) 無添加, (---■---) EST10 µg/ml,
 (···▲···) ロイペプチン 100 µg/ml

およびカテプシン B, H, L の活性あるいは量の変化が表 1 に示されている。カテプシン群は EST, ロイペプチンの存在下では活性が測定できないので酵素免疫測定法によって測定した。若干の活性あるいは量の増加の程度差はあるが、システインプロテアーゼインヒビターである EST およびロイペプチンの添加によりリソゾーム酵素活性(量)が著しく増加してい

る。それに反し、アスパルギン酸プロテアーゼの阻害剤ペプスタチンによるリソゾームの酵素活性(量)に及ぼす効果は極めて弱い。しかしシステインプロテアーゼインヒビターとの併用では、システインプロテアーゼインヒビター単独より、リソゾーム酵素の活性(量)を増加させる作用は強い。この表は各種インヒビター添加後 3 日目のものだが、時間経過を追うと 1 日目ではいずれのリソゾーム酵素でも EST による活性増加は弱く、2 日目以後時間を追って増加は著明になる。しかし、4 日目、5 日目になると細胞の培養皿よりの脱離も増えてくるので活性増加は鈍ってくる。次にこの EST の効果がリソゾーム酵素の増加だけに留まるのかどうかを調べるために、マクロファージの全タンパク量を測定した。図 1 に示すごとく、10⁶細胞あたりの細胞タンパク量は EST の添加で著しく増えている。その効果はリソゾーム酵素に対する影響と同じく、EST+ペプスタチン > EST > ペプスタチンの順であった。E-64, ロイペプチン, ペプスタチンなどのプロテアーゼインヒビターはマクロファージのタンパク合成能に大きな影響を及ぼさないことが知られているので、この細胞内タンパクの蓄積という現象はリソゾーム内タンパク分解阻害に基づくと推定できよう。それを確かめるために、タンパク合成能が一定としてタンパク分解速度の阻害の程度から、蓄積するタンパク濃度を計算し、実

7. EST のリソゾーム酵素の分解抑制効果について

表2 EST およびペプスタチンの細胞内のタンパク分解およびタンパクの蓄積に及ぼす影響

Treatment	% Degradation	Inhibition	Accumulation	
			Calculated	Measured
		%	mg/10 ⁶ cells	
Control	48.6±0.6		0.241	0.241±0.007
EST (10 µg/ml)	36.2±1.5	(25.5)	0.331	0.346±0.027
Pepstatin (100 µg/ml)	47.0±2.3	(3.3)	0.250	0.213±0.05
EST+Pepstatin	28.1±1.5	(42.8)	0.386	0.383±0.055

表3 ラット肝のカテプシン B, H および L の半減期に及ぼす E-64-c 投与の影響

Enzymes	Control	E-64-treated
		(h)
Cathepsin B	14	50
Cathepsin H	14	>80
Cathepsin L	24	100

150 g のウィスター系雄ラット 5 匹に生食あるいは E-64-c (2 mg/100 g 体重) を 1 日 2 回 4 日間投与した。

最終投与 24 時間前からいずれの群にもシクロヘキシミドを 8 時間毎に投与した。

シクロヘキシミド投与後 0, 8, 16, 24 時間後にラット肝を分離し、肝中のカテプシンのレベルを酵素免疫測定法で定量した。半減期は 5 匹のラットの平均値より算出した。

測した細胞タンパク量と比較した (表 2)。タンパク分解速度は昨年の報告と同じ方法で、細胞を¹⁴C-ロイシンで Pulse labeling (24 時間) し、24 時間 chase 後の細胞および培地中の TCA 沈澱および可溶性画分の放射活性を測定して行った (材料と方法の項参照)。EST, ペプスタチンおよび EST+ペプスタチンのタンパク分解の阻害率はそれぞれ 25.5, 3.3 および 42.8% であり、インヒビター添加前の細胞内タンパク量は 0.241 mg/10⁶ 細胞であるので、3 日後のタンパク濃度はそれぞれ 0.331, 0.250 および 0.386 mg/10⁶ 細胞になると計算できる。実測値が右端欄に示されているが、計算値は実測値に非常に近い値となっている。すなわ

ち、EST による細胞内タンパク濃度の増加は、タンパク分解の阻害の結果と考えられる。さらにこの結果はマクロファージではリソゾーム系、とくにその中のシステインプロテアーゼ群が細胞内タンパク分解に非常に重要な役割をもっていることを示す。すなわち、プロテアーゼ群の阻害が、リソゾーム酵素の分解のみならず、他の cytoplasmic タンパクの分解をも阻害し、そのため細胞内タンパクが蓄積してきたと考えられるからである。他の多くの細胞では EST やロイペプチンによって細胞内タンパクがこれほど蓄積することはない。線維芽細胞や肝細胞では、せいぜい 20% ぐらいの増加に留まっている。なぜ、マクロファージでは著明なタンパクの蓄積があるのかその原因は不明だが、マクロファージは著しくリソゾームの発達した系であることおよび他の細胞ではリソゾームに蓄積したタンパクを培地中へ放出するエクソサイトーシスの可能性も考えなければならないだろう。

マクロファージの系では EST の添加によってタンパク濃度のみならず、システインプロテアーゼであるカテプシン B, H, L 3 種とも量が増えており、それらの分解の抑制の結果と考えられる。その可能性を調べるため、動物実験を行った。E-64-c をラットの腹腔内に投与すると肝リソゾームのカテプシン活性が著しく阻害されることは以前明らかにしたが、1 日に 2 回 E-64-c を投与すると肝臓のカテプシン B, L は実験期間阻害され続ける。3 日間生食あるいは E-64-c を投与したラット肝のカテプシン B, H および L のレベルは E-64-c 投与群がそ

れぞれ 3.1, 2.1 および 5.0 倍高くなっている。E-64-c 投与 3 日後, E-64-c の投与は続ける一方, シクロヘキシミド (100 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 体重) をラットに 8 時間毎に注射する。シクロヘキシミド投与後 0, 8, 16, 24 時間後にラット肝を分離し, カテプシン B, H, L のレベルを定量した。これらの結果をまとめたのが表 3 である。生食投与群ではカテプシン B, H および L のシクロヘキシミドを用いての半減期は, 14, 14 および 21 時間であり, E-64-c を連続投与しておくと, それらの半減期はそれぞれ 50, >80 および 100 時間と著しく延びている。すなわち, リソゾームのシステインプロテアーゼ群の細胞内分解はそれら自身が行っていることを意味している。これは肝臓でのデータであるが, マクロファージでも E-64 の添加によりカテプシン B, H, および L の量の増加があるわけであるから, 同じ機序が働いていると思われる。以上の結果はリソゾーム内のタンパク分解はカテプシン B, H, L といったシステインプロテアーゼ群が主役を果しており, 補助的な役割をカテプシン D がなしていると考えられる。カテプシン D だけの阻害では大きな効果はないが, システインプロテアーゼが阻害

された場合, カテプシン D の作用が表に出てくる (表 1, 2) ことがこれを支持している。カテプシン D はシステインプロテアーゼ群が阻害された時, それらの作用の一部を代償するのであろう。E-64 を長期間投与した時でも, 肝障害は軽微であることが確認されているが (動物差はある), カテプシン D を同時に投与すると強い肝障害がおこる⁵⁾。EST とカテプシン D を阻害するような薬剤を同時に投与することはまず考えられないが, 注意は要するであろう。

文 献

- 1) Kominami, E., Hashida, S., and Katunuma, N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**, 713-719, 1980.
- 2) Hashida, S., Towatari, T., Kominami, E., and Katunuma, N.: *J. Biochem.*, **88**, 1805-1811, 1980.
- 3) Kominami, E., Tsukahara, T., Bando, Y., and Katunuma, N.: *J. Biochem.*, **98**, 87-93, 1985.
- 4) Bando, Y., Kominami, E., and Katunuma, N.: *J. Biochem.*, in press, 1986.
- 5) 古野浩二, 石川豊子, 宮本 要, 井手照一郎, 加藤敬太郎: *生化学*, **56**, 1050, 1984.

III 個体レベルにおける研究

8. EST 連続投与によるラット, マウス, ハムスター肝薬物
代謝酵素系およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響北川 晴雄
9. EST の一般薬理作用
——ウサギ横隔神経高頻度同期波, 筋ジストロフィー
ハムスターの心電図および摘出臓器標本に及ぼす影響——福原 武彦
10. 種々の原因による筋萎縮に対する EST の効果
——筋肉内アミノ酸代謝の面より寺尾 寿夫
11. 心筋症ハムスターの心筋構造蛋白の融解機序に関する一考察柴田 宣彦
12. ハムスター呼吸筋の組織所見石原 傳幸
13. 生検筋における rimmed vacuole の検討石原 傳幸
14. EST による実験的クロロキンミオパチーの治療効果杉田 秀夫

8. EST 連続投与によるラット, マウス, ハムスター肝薬物代謝酵素系およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響

北川 晴雄*

研究協力者 五十嵐 隆* 大森 栄*

目 的

一般に, 多くの薬物は主に肝臓の薬物代謝酵素系により代謝された後, 抱合を受け排泄されるが, 近年, 代謝されて活性中間体となり毒性を発現する例も多く報告されている。生体は活性代謝物の毒性に対する防御機構の一つとしてグルタチオン抱合系を備えている。一方, 肝薬物代謝酵素系およびグルタチオン代謝系には, それぞれ著明な種差が知られている。また, このような薬物代謝酵素系およびグルタチオン関連酵素系は異物の連続投与により変動することが知られている。

そこで, 昨年度はラット, マウス, ハムスターを用いて EST の薬物代謝酵素活性およびグルタチオン関連酵素系に対する影響を検討したところ, EST 5 日間連続投与により, ラットにおいてのみ, これらの両酵素活性に著明な変動がみられることを見出した。そこで本年度は, この様な EST の影響の種差に関してさらに検討するために EST の投与期間を長くし, 亜急性毒性試験で用いられている 2 週間連続投与した場合のラット, マウス, ハムスターにおける種々の薬物代謝およびグルタチオン関連酵素活性に対する影響を検討した。

実験材料および方法

動物は Wistar 系雄性ラット (8 週齢),

ddY 系雄性マウス (6 週齢) および Golden 系雄性ハムスター (5 週齢) を用い, 約 1 週間予備飼育した後, 実験に供した。EST は 5% アラビアゴム溶液に用時懸濁し 200 mg/kg を 14 日間連続経口投与した。なお, 対照群には 5% アラビアゴム溶液を 5 ml/kg の割合で経口投与した。最終投与 24 時間後に, 動物は断頭瀉血し, 可及的速やかに肝臓を取り出し, その湿重量を秤量した。秤量後, 1.15% KCl にて灌流し, 肝重量の 3 倍容 (マウスの場合は 3 匹の肝臓を pool して用いた) の冷 1.15% KCl を加えて 25% ホモジネートにした。この様にして得られたホモジネートの一部はガーゼを通して後, γ -GTP 活性の測定に用いた。また, ホモジネートの一部は可及的速やかに HClO_4 -EDTA 溶液で除蛋白し, 遠心して得られた上清についてグルタチオン量を測定した。さらに, ホモジネートの残りは常法に従い超遠心分離によりミクロゾーム (Ms) 画分と細胞質 (Cytosol) 画分とに分離した。Ms 画分は一定量の冷 1.15% KCl に懸濁して酵素材料とした。 γ -GTP 活性は γ -GTP カラーテスト「三共」キットを用いて測定した。また, 総グルタチオン量は Tietze の方法¹⁾により定量した。さらに, Ms のアミノピリン N-脱メチル化活性は Nash 法²⁾により, アニリン水酸化活性の測定は Imai らの方法³⁾に準じて行った。また, Ms の NADPH-Cyt. C 還元酵素活性は Phillips と Langdon の方法⁴⁾により, チトクローム P-450 および b_5 含量は Omura と Sato の方法⁵⁾

* 千葉大学薬学部薬効安全性学講座薬物学研究室

Ⅲ 個体レベルにおける研究

表1 Effect of treatment with EST on the activities of aminopyrine N-demethylation and aniline hydroxylation in liver microsomes from rats, mice and hamsters

Species	Treatment	Aminopyrine N-demethylation		Aniline hydroxylation	
		(nmole/min/ mg prot)	(nmole/min/ g liver)	(nmole/min/ mg prot)	(nmole/min/ g liver)
Rat	Control	4.78±0.36	79.54±7.89	0.42±0.04	6.83±0.59
	EST	3.08±0.16**	50.13±6.33*	0.36±0.02	5.97±0.91
Mouse	Control	7.92±0.40	119.82±3.99	1.03±0.02	14.99±0.63
	EST	6.45±0.45*	109.16±4.06	0.83±0.05*	14.24±1.48
Hamster	Control	9.94±0.35	173.47±1.40	0.80±0.04	13.94±0.20
	EST	9.80±0.48	170.64±4.18	0.74±0.03	12.94±0.51

Each value represents mean ± S. E. obtained from 5 animals.

All animals were treated orally with 200 mg/kg/day of EST for 14 days.

*P<0.05, **P<0.01 vs control.

表2 Effect of treatment with EST on hepatic microsomal cytochrome P-450 and b₅ contents in rats, mice and hamsters

Species	Treatment	Cytochrome P-450		Cytochrome b ₅	
		(nmole/mg prot)	(nmole/g liver)	(nmole/mg prot)	(nmole/g liver)
Rat	Control	0.93±0.16	14.71±0.83	0.50±0.01	7.88±0.36
	EST	0.56±0.04***	10.74±1.54	0.40±0.02**	6.45±0.87
Mouse	Control	1.20±0.02	18.41±1.18	0.53±0.02	8.10±0.53
	EST	1.06±0.06	18.41±2.29	0.45±0.02*	6.80±0.39
Hamster	Control	1.49±0.03	26.55±0.92	0.41±0.04	7.27±0.70
	EST	1.55±0.03	27.36±2.19	0.40±0.03	7.21±0.95

Each value represents mean ± S. E. obtained from 5 animals.

All animals were treated orally with 200 mg/kg/day of EST for 14 days.

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs control.

により測定した。さらに、Cytosol中のグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) 活性は過酸化水素 (H₂O₂) を基質として Lawrence と Burk の方法⁶⁾により、また、グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性は基質として 1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼン (CDNB) を用い、Habig らの方法⁷⁾に従い測定した。なお、蛋白定量は Lowry らの方法⁸⁾により行った。

実験結果

1. 肝 Ms 薬物代謝酵素活性に及ぼす影響

肝 Ms におけるアミノピリンの脱メチル化活

性およびアニリンの水酸化活性に及ぼす EST の影響を表 1 に示した。アミノピリン N-脱メチル化活性に関しては、ラットにおいて EST 投与により mg 蛋白および g 肝あたりいずれでも約 35% の活性減少がみられ、マウスでは mg 蛋白あたりの活性で約 20% の活性減少が認められたが、ハムスターではほとんど変動しなかった。次に、アニリン水酸化活性ではいずれの動物でも著明な活性変動はみられなかった。

また、表 2 に示すように肝 Ms のチトクローム P-450 および b₅ 量に対する影響ではいずれ

8. EST 連続投与によるラット、マウス、ハムスター肝薬物代謝酵素系およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響

表3 Effect of treatment with EST on the activity of hepatic microsomal NADPH-Cytochrome C reductase in rats, mice and hamsters

Species	Treatment	NADPH-Cyt. C reductase activity	
		(unit/mg prot)	(unit/g liver)
Rat	Control	0.25±0.02	4.11±0.53
	EST	0.20±0.01	3.25±0.45
Mouse	Control	0.23±0.01	3.65±0.05
	EST	0.19±0.01**	3.26±0.31
Hamster	Control	0.39±0.01	7.57±0.83
	EST	0.35±0.01*	6.25±0.51

Each value represents mean ± S. E. obtained from 5 animals.
All animals were treated orally with 200 mg/kg/day of EST for 14 days.

*P<0.05, **P<0.01 vs control.

表4 Effect of treatment with EST on the activity of glutathione peroxidase of hepatic cytosol in rats, mice and hamsters

Species	Treatment	Glutathione peroxidase activity	
		(unit/mg prot)	(unit/g liver)
Rat	Control	0.48±0.04	31.48±0.93
	EST	0.32±0.01**	23.02±2.01*
Mouse	Control	0.42±0.01	39.94±2.12
	EST	0.41±0.01	38.37±2.12
Hamster	Control	0.48±0.02	44.81±2.68
	EST	0.52±0.02	49.92±3.47

Each value represents mean ± S. E. obtained from 5 animals.
All animals were treated orally with 200 mg/kg/day of EST for 14 days.

*P<0.05, **P<0.01 vs control.

もラットにおいてのみ有意な低下がみられ、マウスやハムスターでは変動しなかった。さらに NADPH-Cyt. C 還元酵素活性に対する影響は表3に示した。ラット、マウス、ハムスターとも有意な減少あるいは減少傾向がみられたが、その程度は10~20%と低かった。

2. グルタチオン関連酵素活性に対する影響

表4に示すようにラットの GSH-Px 活性は EST 投与により約40%の活性減少がみられた

が、マウスやハムスターでは有意な変動はみられなかった。一方、同じ Cytosol 中の酵素である GST 活性に対しては、表5から明らかのように、いずれの動物においてもほとんど変動しなかった。さらに肝γ-GTP 活性に対する影響は表6に示した。ラットにおいては EST 投与による有意な活性の上昇がみられたが、マウスやハムスターではほとんど変動しなかった。また、肝グルタチオン量に及ぼす EST 投与の

III 個体レベルにおける研究

表5 Effect of treatment with EST on the activity of hepatic cytosolic glutathione S-transferase in rats, mice and hamsters

Species	Treatment	Glutathione S-transferase activity	
		(munit/mg prot)	(unit/g liver)
Rat	Control	1.29±0.09	92.80±7.70
	EST	1.23±0.04	86.91±4.05
Mouse	Control	5.82±0.52	527.88±42.2
	EST	5.41±0.51	497.58±30.3
Hamster	Control	6.46±0.32	594.66±35.0
	EST	7.40±0.31	715.46±51.5

Each value represents mean±S. E. obtained from 5 animals.
All animals were treated orally with 200 mg/kg/day of EST for 14 days.

表6 Effect of treatment with EST on the hepatic activity of γ -glutamyltranspeptidase in homogenates from rats, mice and hamsters

Species	Treatment	γ -glutamyltranspeptidase activity	
		(munit/mg prot)	(munit/g liver)
Rat	Control	2.42±0.07	376.83±10.05
	EST	2.69±0.07*	422.62±15.34*
Mouse	Control	2.47±0.10	446.65±17.86
	EST	2.53±0.06	478.58±27.49
Hamster	Control	1.97±0.02	350.25±7.14
	EST	1.93±0.06	339.22±6.87

Each value represents mean±S. E. obtained from 5 animals.
All animals were treated orally with 200 mg/kg/day of EST for 14 days.

*P<0.05 vs control.

影響は表7に示したが、いずれの動物においても有意な変動は認められなかった。

考察および結論

薬物の薬効・毒性の発現および解毒機構に密接に関連している薬物代謝酵素およびグルタチオン関連酵素活性には著明な種差がみられることが知られている。我々は本研究班の昨年度の研究報告⁹⁾でラット、マウス、ハムスターにお

ける薬物代謝およびグルタチオン関連系の諸酵素活性を比較検討すると同時に、EST投与による影響を報告した。その中で、これらの酵素活性には著しい種差が認められるがEST (200 mg/kg, p. o.) 5日間連続投与の影響はラットにおいてのみ顕著であり、マウス、ハムスターではほとんど影響しないことを報告した。

今回、この様なESTの薬物代謝酵素およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響の種差に

8. EST 連続投与によるラット, マウス, ハムスター肝薬物代謝酵素系およびグルタチオン関連酵素系に及ぼす影響

表7 Effect of treatment with EST on the hepatic glutathione level in rats, mice and hamsters

Species	Treatment	Total glutathione
		(GSH eq, mM)
Rat	Control	7.85±0.32
	EST	9.02±0.42
Mouse	Control	9.47±0.24
	EST	10.52±0.82
Hamster	Control	7.68±0.08
	EST	6.74±0.38

Each value represents mean±S.E. obtained from 5 animals.

All animals were treated orally with 200 mg/kg /day of EST for 14 days.

関して, さらに検討するために EST の投与期間を 2 週間に延長して, 同様に行った。肝 Ms の薬物代謝酵素系に対する影響に関しては, 薬物代謝反応の末端酸化酵素であるチトクローム P-450 や b_5 量はラットにおいてのみ顕著な低下がみられた。一方, 表 1 に示す様にアミノピリン N-脱メチル化活性に対する影響ではラットで最も著明であり, このことはチトクローム P-450 量の低下を反映したものと示唆される。また, グルタチオン関連酵素系に関しては, GSH-Px 活性はラットにおいてのみ有意な活性低下がみられ, アミノピリン N-脱メチル化活性と同様にマウスやハムスターではほとんど変動しなかった。また, 肝 γ -GTP 活性はラットでのみ有意な活性上昇がみられたが, その程度は 10~15% であり, EST (200 mg/kg, p. o.) を 5 日間連続投与した場合に肝 γ -GTP 活性は約 5 倍上昇した⁹⁾のに対比して極めて小さかった。

以上, 要約するとラット, マウス, ハムスターを用いて EST (200 mg/kg, p. o.) を 14 日間連続投与した場合に, 肝 Ms 薬物代謝酵素活性およびグルタチオン関連酵素活性に及ぼす影響では, ラットが最も顕著でありマウスおよびハ

ムスターではほとんど影響しなかった。このラットでみられる諸酵素活性の変動は, EST (200 mg/kg, p. o.) を 5 日間連続投与した場合のラットにおける影響⁹⁾と対比して考察すると, 今回, 14 日間投与での影響は同等か, あるいは肝 γ -GTP 活性からみられるように, むしろ軽減するものと示唆される。

引用文献

- 1) Tietze, F.: Anal. Biochem., 27, 502, 1969.
- 2) Nash, T.: Biochem. J., 55, 416, 1953.
- 3) Imai, Y., Ito, A. and Sato, R.: J. Biochem., 60, 417, 1966.
- 4) Phillips, A. H. and Langdon, R. G.: J. Biol. Chem., 237, 2652, 1962.
- 5) Omura, T. and Sato, R.: J. Biol. Chem., 239, 2370, 1964.
- 6) Lawrence, R. A. and Burk, R. F.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 71, 952, 1976.
- 7) Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B.: J. Biol. Chem., 249, 7130, 1974.
- 8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. L.: J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
- 9) 北川晴雄: 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 59 年度研究報告書, 113, 1985.

9. EST の一般薬理作用

—ウサギ横隔神経高頻度同期波，筋ジストロフィー—
ハムスターの心電図および摘出臓器標本に及ぼす影響—

福原武彦*

研究協力者 高野一夫* 木村直史*
加藤総夫* 藤崎康人*

目 的

E-64 およびその類縁体の進行性筋ジストロフィー症に対する治療薬としての有効性評価に関する開発研究の一環として、59 年度までに E-64 (DL 体, L 体), E-64-c および EST (E-64-d) の呼吸, 循環機能および中枢神経系の活動に及ぼす影響, E-64-c および EST の諸種摘出臓器標本に及ぼす影響ならびに EST の筋ジストロフィー—ハムスターの心電図に及ぼす影響について薬理学的研究を行ってきた^{8-17, 25-27)}。本年度は、1) EST および E-64-c の筋ジストロフィー—ハムスター (UM-X7.1 系) の摘出臓器標本に及ぼす影響, 2) 昨年度^{13, 17)}に引き続き、筋ジストロフィー—ハムスター (UM-X7.1) およびゴールデンハムスターの心電図に及ぼす EST の長期間 (26 週間) 投与の影響, 3) EST のウサギ横隔神経活動に発現する高頻度同期波^{5, 6, 22-24)}に及ぼす影響について検討した。

特に 2) および 3) は筋ジストロフィー症における心筋障害^{19, 33)}および呼吸筋変性の進行の程度と EST の治療効果を可及的に非侵襲的かつ機能的に評価する方法としての心電図所見および高頻度同期波のスペクトル解析の有用性について検討するために行なった。

ヒト筋ジストロフィー症に対する治療薬の有効性評価に関する研究推進の基礎として、疾患

モデルにおいてヒトに応用可能な可及的非侵襲的な薬効評価方法を確立することが必要である。本年度の研究では昨年度に引き続き、UM-X7.1 系統の筋ジストロフィー—ハムスター¹⁹⁾の心電図上の変化について定量的解析を行ない、心電図解析法の EST 薬効評価法としての有用性について検討した。

ウサギ, ネコおよびイヌの横隔神経遠心性発射活動の吸息相には約 80~120 Hz の周期性成分 (high frequency oscillations, 高頻度同期波) が発現することが知られている^{5, 6)}。この高頻度同期波は中枢神経系内において形成されると考えられているが、神経筋伝達を介して呼吸筋の筋電図中からも検出されることが確認されており⁴⁾、随意呼吸中の健常人の肋間筋筋電図からも導出され得ることが報告されている^{1, 3)}。また、これまでの我々の研究の結果、高頻度同期波は横隔神経の他に舌下神経や顔面神経など呼吸運動に関連する骨格筋を支配する神経遠心性活動に特徴的な活動成分であることが確認されている^{23, 24)}。したがって呼吸筋筋電図中の高頻度同期波のスペクトル解析は将来、筋ジストロフィーのような骨格筋の変性をきたす疾患、重症筋無力症など神経筋伝達の障害をきたす疾患、および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの運動ニューロンの障害をきたす疾患の病態の進行の程度を機能的かつ非侵襲的に評価し得る方法として期待される。さらに EST に高頻度同期波に対する中枢性の作用がほとんど認められないならば、呼吸筋筋電図中の高頻度同期波

* 東京慈恵会医科大学第 2 薬理学教室

III 個体レベルにおける研究

表1 UM-X7.1 ハムスターの摘出心房標本および摘出横隔神経-横隔膜標本に及ぼす EST の影響

		N	control	EST		Ethanol	
				3×10^{-6} g/ml mean \pm SD	3×10^{-5} g/ml mean \pm SD	0.1% mean \pm SD	1.0% mean \pm SD
Atria	H. R.	9-10	100%	102.3 \pm 13.5	91.4 \pm 12.9	99.7 \pm 6.6	100.4 \pm 9.6
	Amp.	9-10	100%	98.2 \pm 11.0	48.9 \pm 9.9*	98.4 \pm 5.8	42.1 \pm 9.4*
Phrenic nerve diaphragm	Indirect	10	100%	95.4 \pm 19.7	57.6 \pm 36.0*	95.9 \pm 14.1	47.1 \pm 28.2*
	Direct	8-9	100%	101.6 \pm 30.1	51.9 \pm 21.9*	80.5 \pm 19.4	59.1 \pm 25.3*

N: 例数. H. R.: 心拍数. Amp.: 収縮力. Indirect: 神経刺激 (3~10V, 50 msec, 0.2 Hz).

Direct: 筋刺激 (3~9V, 50 msec, 0.2 Hz). mean \pm SD: 平均値 \pm 標準偏差. *: P < 0.05.

のスペクトル解析を行なうことによって、筋ジストロフィーにおける呼吸筋変性の進行の程度を評価できるばかりでなく、EST の治療効果を非侵襲的に評価し得る可能性が考えられる。そこで本年度は横隔神経活動に発現する高頻度同期波に及ぼす EST の中枢性の作用について定量的に検討した。

I. EST の筋ジストロフィーハムスター (UM-X7.1 系) の摘出臓器標本に及ぼす影響

実験方法

本年度は UM-X7.1 ハムスターの心房および横隔神経-横隔膜標本について検討した。雌雄の UM-X7.1 ハムスター (6~7 週齢, 体重 78~99 g) を断頭、放血した後心房標本および横隔神経-横隔膜標本を摘出し、心房標本を 100% 酸素ガスで飽和した 25°C の Ringer-Locke 液中に、横隔神経-横隔膜標本を 95% 酸素, 5% 炭酸ガスの混合ガスで飽和した 37°C の Krebs-Ringer 液中に懸垂した。張力トランスデューサーを用いて、マグヌス法の常法に従い、心房標本の自発収縮および横隔神経-横隔膜標本の神経および筋の電気刺激 (持続 50 msec, 頻度 0.2 Hz の矩形波, 電圧は神経刺激 3~10 V, 筋刺激 3~9 V) により誘発される収縮に対する EST および E-64-c の影響を検討した。

EST を無水エタノールに溶解して適用し、マグヌス管内最終濃度をそれぞれ 3×10^{-5} g/ml または 3×10^{-6} g/ml とした。対照として

EST 溶液の調製に用いた量と同量のエタノール溶液 (マグヌス管内最終濃度 0.1% および 1%) を適用し、その影響を検討した。また、E-64-c を飽和炭酸水素ナトリウム溶液 1 ml に溶解して適用し、マグヌス管内最終濃度を 10^{-4} g/ml, 10^{-5} g/ml とした。対照として E-64-c 溶液の調製に用いた量と同量の炭酸水素ナトリウム溶液 (マグヌス管内最終濃度 0.001% および 0.01%) を適用し、その影響を検討した。

結果

1. 摘出心房標本に及ぼす影響 (図 1, 2, 表 1, 2)

EST 3×10^{-6} g/ml によって心房標本の収縮力および心拍数に顕著な変化は認められず、対照のエタノール適用時と有意の差も認められなかった。EST 3×10^{-5} g/ml により心房標本の心拍数に顕著な変化は認められなかった。心房標本の収縮力は EST 3×10^{-5} g/ml によって、対照のエタノール適用時と同程度抑制された。心房標本の収縮力および心拍数は E-64-c 10^{-5} g/ml および E-64-c 10^{-4} g/ml によって変化せず、対照の炭酸水素ナトリウム溶液適用時との有意の差も認められなかった。

2. 摘出横隔神経-横隔膜標本に及ぼす影響 (図 3, 4, 表 1, 2)

横隔神経-横隔膜標本の神経および筋の電気刺激により引き起こした横隔膜の収縮力は EST 3×10^{-6} g/ml により変化せず、対照のエタノール適用時との有意の差も認められなかった。横隔膜の収縮力は EST 3×10^{-5} g/ml によ

9. EST の一般薬理作用

表2 UM-X7.1 ハムスターの摘出心房標本および摘出横隔神経-横隔膜標本に及ぼす E-64-c の影響

		N	control	E-64-c		NaHCO ₃	
				10 ⁻⁵ g/ml mean ± SD	10 ⁻⁴ g/ml mean ± SD	0.001% mean ± SD	0.01% mean ± SD
Atria	H. R.	7-9	100%	99.8 ± 3.7	107.0 ± 11.9	104.1 ± 15.6	104.8 ± 7.0
	Amp.	7-9	100%	106.3 ± 9.6	102.4 ± 5.0	102.8 ± 8.2	106.2 ± 3.3*
Phrenic nerve diaphragm	Indirect	8-10	100%	89.9 ± 22.7	100.3 ± 20.5	89.6 ± 19.5	109.2 ± 30.0
	Direct	7-9	100%	86.8 ± 37.7	103.7 ± 15.0	82.5 ± 30.1	98.7 ± 21.0

N: 例数. H. R.: 心拍数. Amp.: 収縮力. Indirect: 神経刺激 (3~8V, 50 msec, 0.2 Hz).
Direct: 筋刺激 (3~9V, 50 msec, 0.2 Hz). mean ± SD: 平均値 ± 標準偏差. *: P < 0.05.

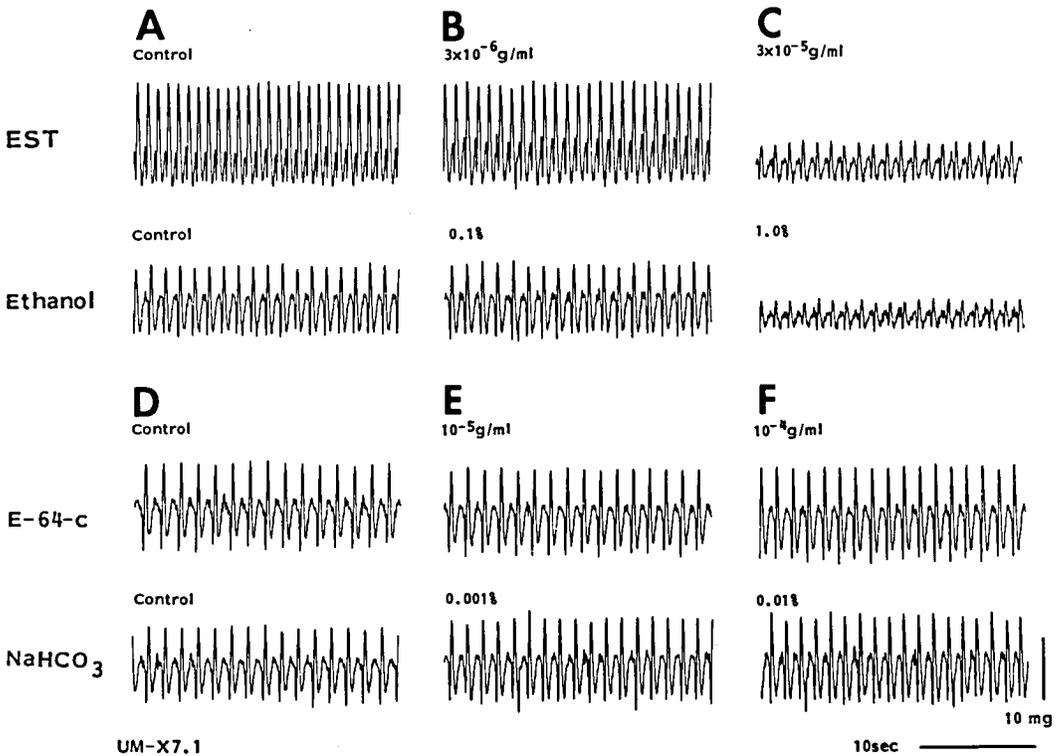


図1 筋ジストロフィーハムスター (UM-X 7.1 系) の摘出心房標本に及ぼす EST および E-64-c の影響
A: 薬物適用前. B: EST 3×10^{-6} g/ml および 0.1% エタノール. C: EST 3×10^{-5} g/ml および 1.0%
エタノール. D: 薬物適用前. E: E-64-c 10^{-5} g/ml および 0.001% NaHCO₃. F: E-64-c 10^{-4} g/ml
および 0.01% NaHCO₃. B, C, E, F はいずれも薬物適用後 5 分の記録. 図中, 右下部の横線は時標
10 秒を, 縦線は較正 10 mg を示す.

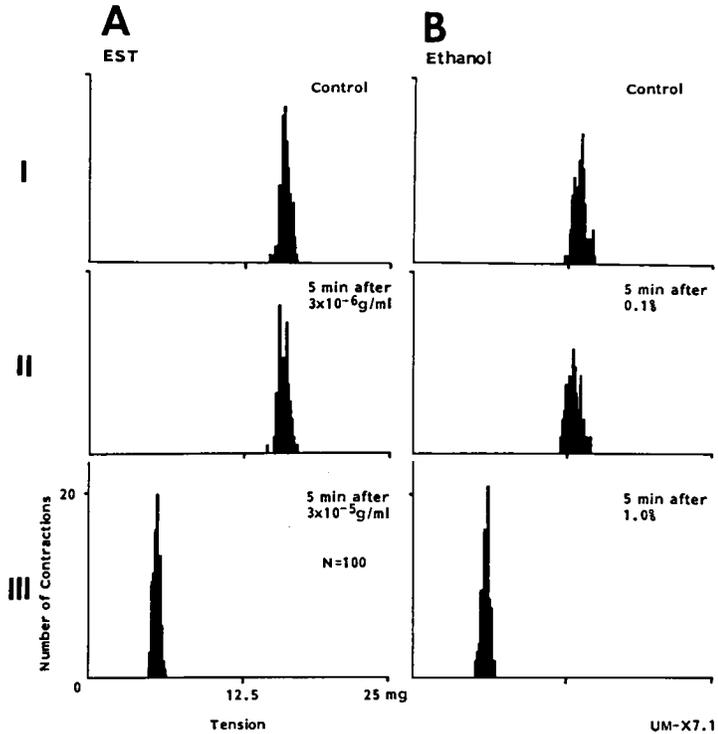


図2 UM-X 7.1 ハムスター摘出心房標本の張力ヒストグラムに及ぼす EST の影響

A : EST 適用前 (I) および EST 3×10^{-6} g/ml (II), EST 3×10^{-5} g/ml (III) の適用後 5 分の記録。B : エタノール適用前 (I) および 0.1% エタノール (II), 1.0% エタノール (III) の適用後 5 分の記録。図中、横軸は摘出心房標本の張力 (mg) を、縦軸は収縮回数を示す。

り対照のエタノール適用時と同程度抑制された。横隔神経-横隔膜標本の神経および筋の電気刺激により引き起こした横隔膜の収縮は、E-64-c 10^{-5} g/ml および E-64-c 10^{-4} g/ml によって変化せず、対照の炭酸水素ナトリウム溶液適用時との有意の差も認められなかった。

考 察

今回、検討した濃度の E-64-c ならびにその対照として用いた炭酸水素ナトリウム溶液では、UM-X7.1 の心房標本および横隔神経-横隔膜標本に変化が認められなかった。一方、EST 3×10^{-5} g/ml の適用により心房標本の収縮力は有意に減少した。この収縮力抑制作用は EST の溶媒として用いたエタノールの抑制作

用と考えられる。Gimeno ら⁷⁾は摘出ラット心房標本に対して、エタノールが速効性かつ可逆的な負の変力作用を有することを報告し、その原因が活動電位の減少と収縮機構に対する直接作用にあることを示唆している。横隔神経-横隔膜標本の神経および筋の電気刺激により誘発される収縮に対して EST 3×10^{-5} g/ml 適用により収縮力の有意な減少が認められた。この収縮力抑制作用も Knutsson²⁸⁾が報告したエタノールによる骨格筋細胞の脱分極によるものと考えられ、EST 自体の作用とは考え難い。

今回、用いた UM-X7.1 ハムスターの摘出臓器標本に対する EST の作用と、既に報告したゴールデンハムスターの同種摘出臓器標本に対する EST の作用^{11,16)}との間には質的、および

9. EST の一般薬理作用

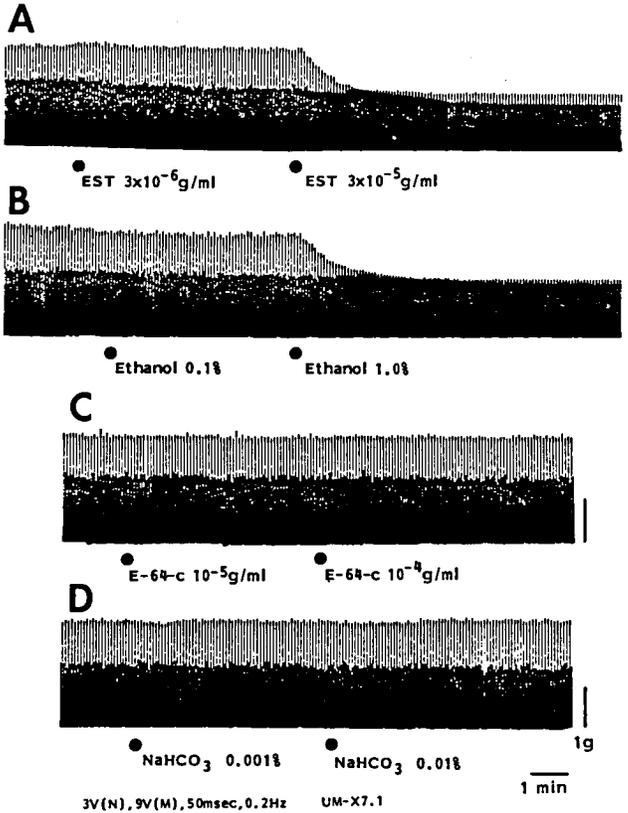


図3 UM-X 7.1 ハムスターの摘出横隔神経-横隔膜標本に及ぼす EST および E-64-c の影響

A : EST 3×10^{-6} g/ml および EST 3×10^{-5} g/ml の影響。B : 0.1% エタノールおよび 1.0% エタノールの影響。C : E-64-c 10^{-5} g/ml および E-64-c 10^{-4} g/ml の影響。D : 0.001% NaHCO₃ および 0.01% NaHCO₃ の影響。黒丸の時点で適用。刺激持続 50 msec, 刺激頻度 0.2 Hz の矩形波により横隔神経および横隔膜を電気刺激した。刺激電圧は神経刺激の場合は 3V, 筋刺激では 9V であった。薬物適用前, 収縮力の大きい方が横隔神経刺激による筋収縮, 収縮力の小さい方が横隔膜の直接刺激による筋収縮。図中, 右下部の横線は時標 1 分を, 縦線は較正 1 g を示す。

量的な差異は認められず, かつ EST の対照液による影響との間に差異が認められなかった。

以上のことから, 本実験条件下において EST および E-64-c は筋ジストロフィーハムスター (UM-X7.1 系) の摘出心房および横隔神経-横隔膜標本には用いた濃度以下で影響をもたないものと考えられる。

II. 筋ジストロフィーハムスター (UM-X7.1 系) の心電図に及ぼす EST の影響

実験方法

9 週齢の雌雄のゴールデンハムスター 14 匹 および, 10 週齢の UM-X7.1 系の雌雄の筋ジストロフィーハムスター 11 匹を用い, それぞれを 2 群に分け, 片方を対照群とし, もう一

Ⅲ 個体レベルにおける研究

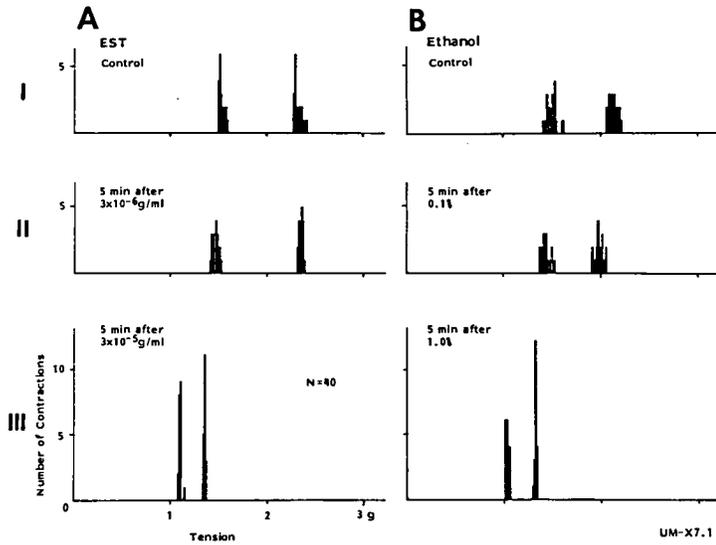


図4 UM-X 7.1 ハムスター摘出横隔神経-横隔膜標本の張力ヒストグラムに及ぼすESTの影響

A: EST 適用前 (I) および EST 3×10^{-6} g/ml (II), EST 3×10^{-5} g/ml (III) 適用後 5 分。B: エタノール適用前 (I) および 0.1% エタノール (II), 1.0% エタノール (III) 適用後 5 分。刺激持続 50 msec, 刺激頻度 0.2 Hz の矩形波により横隔神経および横隔膜を電気刺激した。刺激電圧は神経刺激の場合は 3V, 筋刺激では 9V であった。黒のヒストグラムが横隔神経刺激による筋収縮を, 白のヒストグラムが横隔膜の直接刺激による筋収縮を示す。図中, 横軸は横隔神経-横隔膜標本の張力 (g) を, 縦軸は収縮回数を示す。

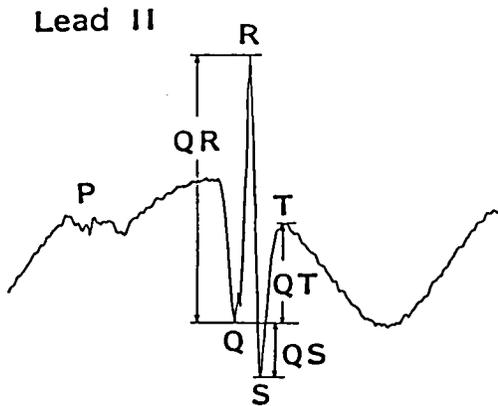


図5 心電図の平均加算波形
心電図第Ⅱ誘導の平均加算波形 (100 回加算) より PQ, QRS および ST 間隔 (msec) と ST 上昇率 (%) を算出した。ST 上昇率は図中, QR の電位差を基準として $QS \times 100 / QR$ および $(QT + QS) \times 100 / QR$ によって計量的に評価した。

方を EST 投与群とした。EST を粉末飼料に 0.375% の比率に混合し, 給餌した。この量は平均すると EST 約 300 mg/kg/day に相当した。対照群には飼料のみを与えた。9 および 10 週齢で投与を開始し, 35 および 36 週齢まで 26 週間継続投与し, その後投与を中止して 49 および 50 週齢 (投与開始後 40 週間) まで飼育した。

EST 投与開始直前および EST 投与開始後, 2, 4, 6, 8, 22, 25 および 40 週においてハムスターをペントバルビタール (50 mg/kg, i. p.) により麻酔した後, 心電図を標準肢誘導, 第Ⅰおよび第Ⅱ誘導によって導出し, 呼吸数と共に記録した。医用電算機 (日本電気三栄, 7T-08 および 7T-17) を用いて心電図の R-R 間隔とその変動係数^{20,21)}の算出 (500 区間の R-R 間隔の標準偏差 $\times 100 /$ 平均値) および心電図の平

9. EST の一般薬理作用

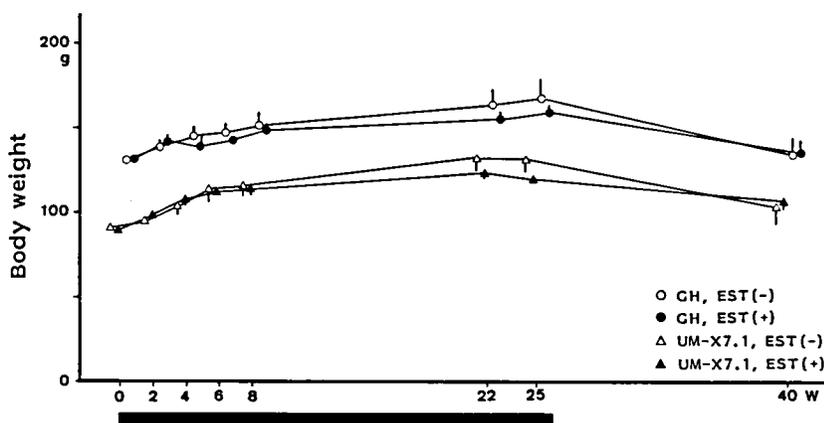


図6 ハムスターの体重に及ぼす EST の影響
 白丸：ゴールデンハムスター，対照群（EST 非投与群），N=2~7。黒丸：ゴールデンハムスター，EST 投与群，N=6~7。白三角：UM-X 7.1，対照群（EST 非投与群），N=4~5。黒三角：UM-X 7.1，EST 投与群，N=4~6。平
 均値（印）と標準誤差（縦線）を示す。縦軸：体重（g），横軸：EST 投与後の週数（weeks）。横軸下の太線の期間（26 週間）において EST を投与した。

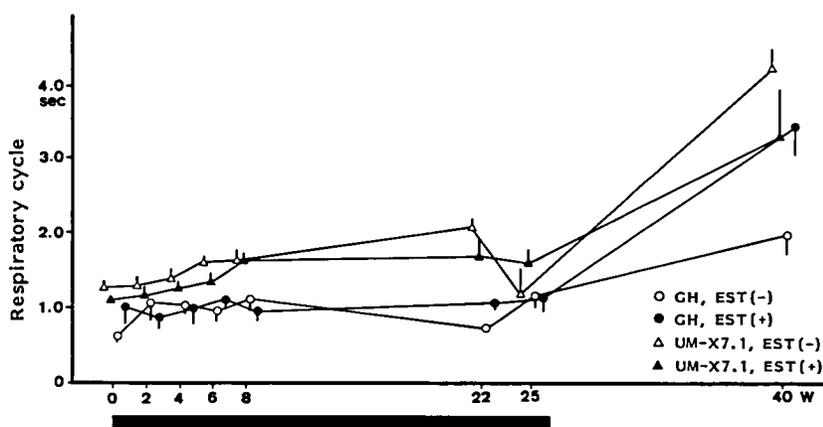


図7 ハムスターの呼吸周期に及ぼす EST の影響
 白丸：ゴールデンハムスター，対照群（EST 非投与群），N=2~6。黒丸：ゴールデンハムスター，EST 投与群，N=6~7。白三角：UM-X 7.1，対照群（EST 非投与群），N=3~5。黒三角：UM-X 7.1，EST 投与群，N=4~6。平
 均値（印）と標準誤差（縦線）を示す。縦軸：呼吸周期（sec），横軸：EST 投与後の週数（weeks）。横軸下の太線の期間（26 週間）において EST を投与した。

均加算（100回加算）を行なった。心電図の平均加算図より，PQ，QRS および ST 間隔を，また QR 間の電位差を基準として ST 部分の上昇率を算出した（図5）。統計学的有意差の検

定は Student's *t*-test により行い，危険率5%以下を有意とした。

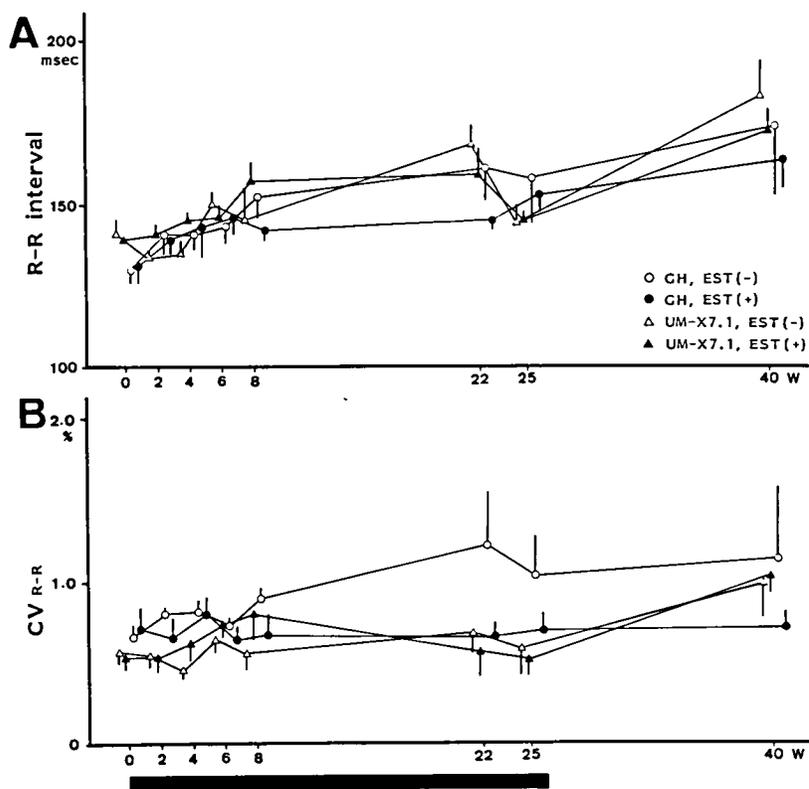


図8 心電図 R-R 間隔および R-R 間隔の変動係数に及ぼす EST の影響
 A: 縦軸は心電図 R-R 間隔 (msec)。B: 縦軸は心電図 (第Ⅱ誘導) R-R 間隔の変動係数 (%)。変動係数は 500 拍の R-R 間隔について算出した。横軸: EST 投与後の週数 (weeks)。横軸下の太線の期間 (26 週間) において EST を投与した。白丸: ゴールデンハムスター, 対照群 (EST 非投与群), N=2~7。黒丸: ゴールデンハムスター, EST 投与群, N=5~7。白三角: UM-X 7.1, 対照群 (EST 非投与群), N=4~5。黒三角: UM-X 7.1, EST 投与群, N=4~6。平均値 (印) と標準誤差 (縦線) を示す。

実験成績

1. 筋ジストロフィーハムスター (UM-X7.1 系) の体重 (図6)

10 週齢の UM-X7.1 の体重 (77~98 g) は EST 投与直前において既に 9 週齢のゴールデンハムスターの体重 (123~140 g) に比べ軽量であった。ゴールデンハムスターでは, EST 投与後 25 週間, UM-X7.1 では 22 週間にわたり体重が増加したが, その後, 各群共減少した。UM-X7.1 群はゴールデンハムスター群に比べ実験期間中, 常に有意に低体重であっ

たが, EST 投与群と対照群の体重の間に有意差は認められなかった。

2. 筋ジストロフィーハムスター (UM-X7.1 系) の呼吸周期に及ぼす EST の影響 (図7)

呼吸周期は各群とも週齢を経るにつれて延長した。UM-X7.1 の呼吸周期はゴールデンハムスターのそれに比べて EST 投与前より有意に延長しており, EST 投与開始後 8~22 週までは有意の差が認められた。しかしながら, EST 投与開始後 25 週以降においては, EST を投与した UM-X7.1 およびゴールデンハムスター群間で呼吸周期に差が認められなくなっ

9. EST の一般薬理作用

た。一方、EST を適用しなかった UM-X7.1 群の呼吸周期は 40 週において、EST を適用しなかったゴールデンハムスター群のそれに比べ有意に延長していた。EST 投与開始後 8 週までは EST 投与群と対照群の呼吸周期の間に有意の差は認められなかったが、EST 投与開始後 22 週において、EST を投与したゴールデンハムスターの呼吸周期は EST 非投与群のそれに比べて有意に延長した。しかしながら、EST 投与開始後 25 週以降においては、EST 投与群および非投与群間で呼吸周期の有意の差は再び認められなくなった。

3. 筋ジストロフィーハムスター (UM-X7.1 系) の心電図 R-R 間隔およびその変動係数に及ぼす EST の影響 (図 8)

心電図の R-R 間隔は各群とも週齢を経るにつれて延長した。EST 投与前, UM-X7.1 の R-R 間隔はゴールデンハムスターのそれに比べ有

意に延長していたが、EST 投与後 22 週以降この差は認められなくなった。統計学的に有意ではないが、EST 投与開始後 22 週および 40 週において、EST 投与群の R-R 間隔は EST 非投与群のそれに比べて短縮する傾向が認められた。

EST 投与前, UM-X7.1 の R-R 間隔の変動係数はゴールデンハムスターのそれに比べて小さい値を示した。UM-X7.1 のうち EST 投与群の R-R 間隔の変動係数は EST 投与開始後 8 週および 40 週において EST 投与前に比べて有意に大きくなったが、対照群 (非投与群) では小さいままであった。また、EST 投与後 8 週において、EST 非投与群のゴールデンハムスターの R-R 間隔の変動係数は EST 非投与群の UM-X7.1 に比べて有意に大きくなった。EST 非投与群のゴールデンハムスターの R-R 間隔の変動係数は次第に大きくなったが、

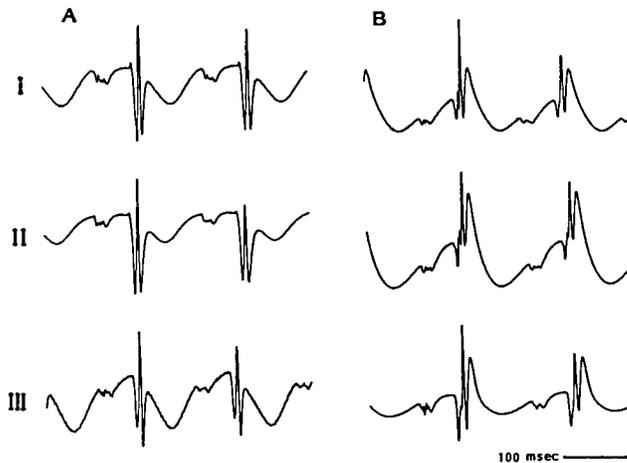


図 9 ハムスターの心電図の平均加算波形

Computer によって演算した心電図 (第 II 誘導) の平均加算波形 (100 回平均加算)。

A : ゴールデンハムスターの心電図の平均加算波形。B : UM-X 7.1 の心電図の平均加算波形。I : EST 投与前 (9 および 10 週齢)。II : EST 非投与例 (17 および 18 週齢)。III : EST 投与後 8 週 (17 および 18 週齢)。UM-X 7.1, EST 非投与例 (17 および 18 週齢) の平均加算心電図では ST 部分の上昇が顕著である。時標 : 100 msec。

Ⅲ 個体レベルにおける研究

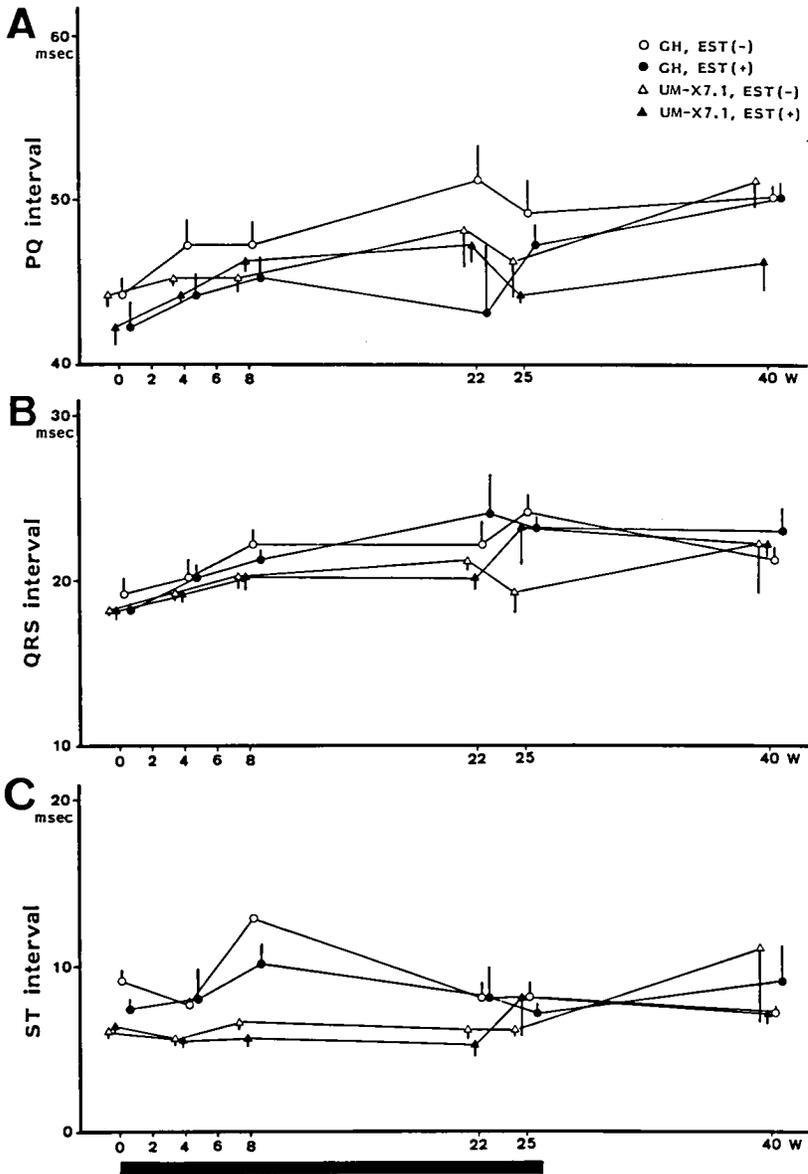


図10 ハムスターの心電図のPQ, QRSおよびST間隔に及ぼすESTの影響
 A: 縦軸はPQ間隔 (msec)。B: 縦軸はQRS間隔 (msec)。C: 縦軸はST間隔 (msec)。横軸はEST投与後の週数 (weeks)。横軸下の太線の期間 (26週間) においてESTを投与した。白丸: ゴールデンハムスター, 対照群 (EST非投与群), N=2~7。黒丸: ゴールデンハムスター, EST投与群, N=6~7。白三角: UM-X 7.1, 対照群 (EST非投与群), N=3~5。黒三角: UM-X 7.1, EST投与群, N=4~6。平均値 (印) と標準誤差 (縦線) を示す。

9. EST の一般薬理作用

EST を投与した群の R-R 間隔の変動係数は大きくならなかった。

4. 心電図 PQ 間隔, QRS 間隔および ST 間隔に及ぼす EST の影響 (図 10)

PQ 間隔および QRS 間隔は週齢を経るにつれて、延長する傾向が認められた。EST 投与開始後 22 週まではゴールデンハムスターおよび UM-X7.1 間, EST 投与群および対照群間で PQ 間隔に有意差は認められなかった。しかしながら, EST 投与開始後 40 週において, EST を投与した UM-X7.1 の PQ 間隔は対照群に比べて短くなる傾向が認められた ($p < 0.1$)。

UM-X7.1 の心電図の ST 間隔はゴールデンハムスターに比べて有意に短縮しており, EST 投与開始後 22 週まではこの差が認められたが, 25 週以降, 有意差が認められなくなった。EST 投与群および対照群間で ST 間隔に有意差は認められなかった。

5. 筋ジストロフィーハムスターの心電図 ST 上昇率に及ぼす EST の影響 (図 9, 11)

EST を投与前より, UM-X7.1 の ST 部分はゴールデンハムスターのそれよりも有意に上昇しており, この有意差は EST 投与開始後 8 週においても認められたが, EST 投与開始後 25 週において, EST を投与した UM-X7.1 の ST

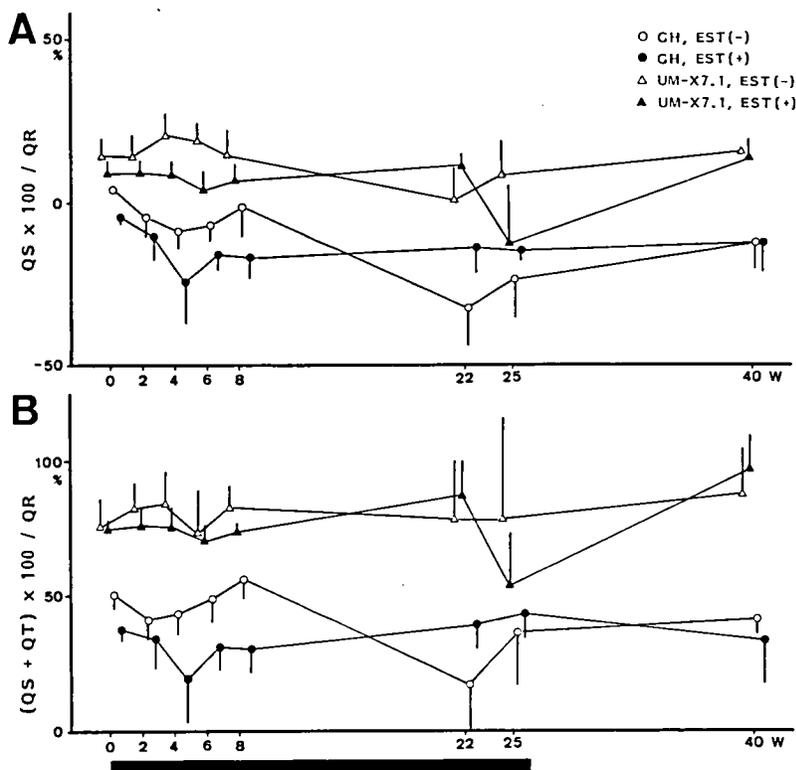


図11 ハムスターの心電図の ST 上昇率に及ぼす EST の影響

A: 縦軸は S 波の上昇率 (%). B: 縦軸は S および T 波の上昇率 (%). 横軸: EST 投与後の週数 (weeks). 横軸下の太線の期間 (26 週間) において EST を投与した。白丸: ゴールデンハムスター, 対照群 (EST 非投与群), $N=2\sim6$ 。黒丸: ゴールデンハムスター, EST 投与群, $N=4\sim7$ 。白三角: UM-X 7.1, 対照群 (EST 非投与群), $N=2\sim5$ 。黒三角: UM-X 7.1, EST 投与群, $N=4\sim6$ 。平均値 (印) と標準誤差 (縦線) を示す。

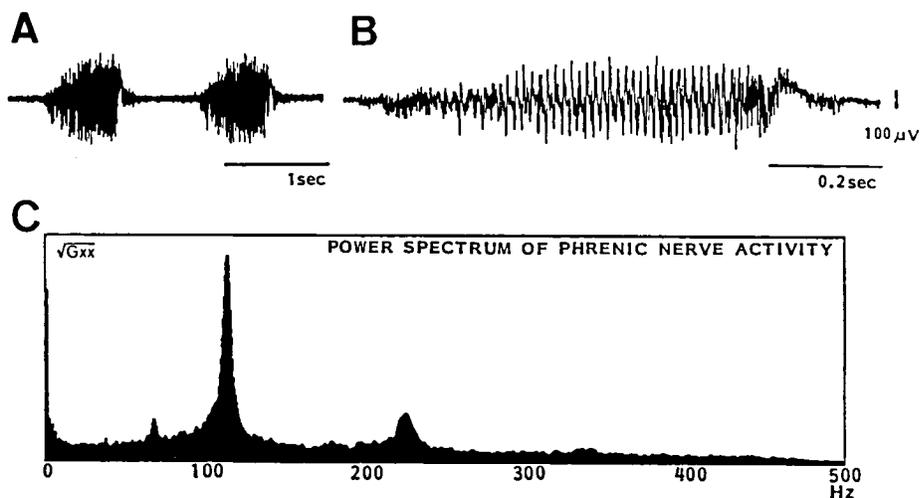


図12 ウサギ横隔神経発射活動とその自己パワースペクトル

A: ウサギ横隔神経の自発性遠心性活動電位。呼吸性の周期的放電群を発現している。B: 図Aの呼吸性放電群の吸息相を時間軸を延長して描記した記録。吸息相中に80~120 Hz程度の周期性成分、高頻度同期波が観察される。C: 横隔神経の活動電位の自己パワースペクトル。横軸は周波数、縦軸は自己パワースペクトル密度関数(平方根)を示す。110 Hz付近に高頻度同期波に相当する明瞭なピークが観察される。

上昇率が低下する傾向が認められ(ただし非投与群との有意差はない)、ゴールデンハムスターのST上昇率との有意の差が認められなくなった。しかしながら、EST投与を中断後、再び、STが上昇する傾向が認められた。

考 察

UM-X7.1と正常のゴールデンハムスターの心電図を比較すると、UM-X7.1では心電図R-R間隔の変動係数の低値(図8)、平均加算心電図波形において、STの上昇(図9, 11)、生後約30週齢までの期間におけるST間隔の短縮(図10)などの異常所見が観察された。また心電図所見以外にもゴールデンハムスターと比較して、低体重(図6)、呼吸周期の延長(図7)などの所見が認められた。これまでに筋ジストロフィーハムスターの心電図について検討した報告は少なく^{2, 29-31)}、これらの所見は重要な基礎的知見となると考えられる。また、疾患モデル動物においてESTの薬効評価および副作用の検討を進めていく上でも基礎となる

知見である。EST投与後のUM-X7.1でR-R間隔の変動係数がEST投与前に比べて一時的にはあるが有意に大きくなったこと、一方、EST非投与群のUM-X7.1ではR-R間隔の変動係数は低値に留まったという事実は、ESTにUM-X7.1の心筋障害に対する治療的効果または進行を抑制する作用がある可能性を示唆している。しかしながら、ESTを投与されたゴールデンハムスターにおいて非投与群に認められたようなR-R間隔の変動係数の増大が観察されなかったという結果は、長期間大量に投与されたESTが正常のゴールデンハムスターに対しては副作用を発現する可能性があることも示唆している。EST投与開始後、ESTを投与したUM-X7.1のST上昇率が統計学的に有意ではないが低下する傾向が認められ、ゴールデンハムスターのST上昇率との有意の差が認められなくなったこと、EST投与を中断後、再びSTが上昇する傾向が認められたことはESTにUM-X7.1に発症した心筋障害を改善する効果がある可能性を示唆している。したが

9. EST の一般薬理作用

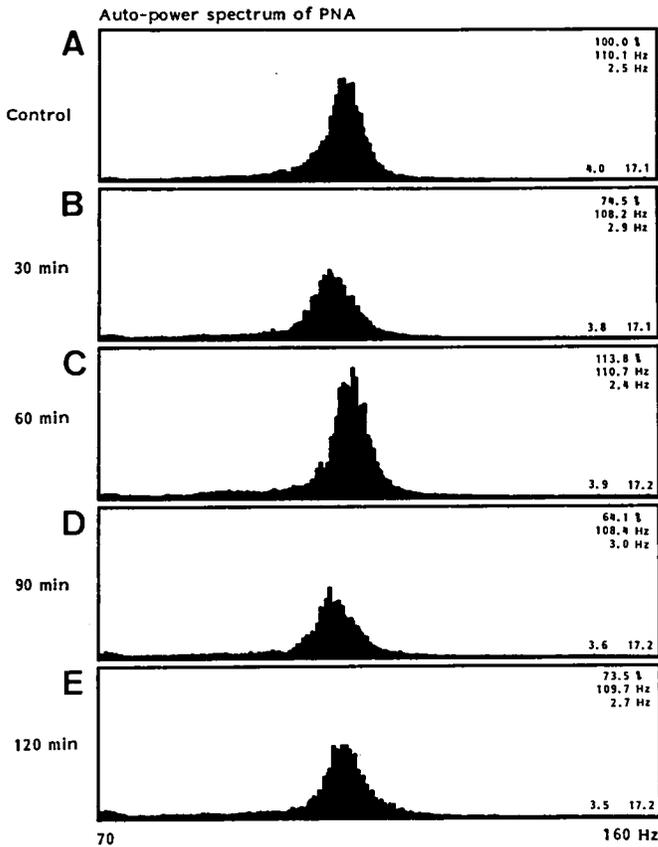


図13 EST (1 g/kg, p. o.) 適用前後の横隔神経活動の自己パワースペクトル
 横軸は周波数 (70~160 Hz), 縦軸は相対パワースペクトル密度を示す。上段より各々, EST 適用前 (A), 適用 30 分後 (B), 60 分後 (C), 90 分後 (D), 120 分後 (E) の記録の解析結果。各スペクトルの右上の数値は, 上段より相対ピーク面積 (適用前を 100% とする), ピーク周波数, 半値幅を, また, 各スペクトルの右下の数値は左が終末呼気炭酸ガス濃度値, 右が同酸素濃度値を表わす。高頻度同期波のピーク周波数, ピーク面積は呼気炭酸ガス濃度のわずかな経時的変動に伴って変動するのみで EST の適用によると考えられる変化は認められなかった。

って, 以上の成績から EST の薬効評価および副作用の監視において, R-R 間隔の変動係数および平均加算心電図波形などの心電図所見の経時的観察が有用な一つの方法となり得る可能性が示唆された。

Ⅲ. EST の横隔神経発射活動に発現する高頻度同期波に及ぼす影響

実験方法

1. 実験動物

体重 2.2~2.6 kg の成熟, 両性のウサギを用いた。

2. 実験条件

エーテル麻酔下に gallamine triethiodide (5 mg/kg, i. v.) により非動化後, 呼気ガス二酸化

炭素および酸素濃度の連続監視下に人工呼吸により換気条件を適正レベルに維持した。また動物を温熱マットで保温し、直腸温を 36.8~37.6°C に維持した。両側の迷走、減圧および頸部交感神経を頸部で切断した。

3. 被験薬物の適用法および適用量

EST を 5% アラビアゴム溶液、または 0.5% CMC 溶液に懸濁し、カテーテルを介して胃内に適用した。EST の適用量は 500 および 1,000 mg/kg, 適用量は 5 ml/kg とした。

4. 横隔神経活動

横隔神経の遠心性発射活動を横隔神経の切断中枢端より導出し、同時に導出された大腿動脈血圧、呼気ガス炭酸ガス濃度と共にデータレコーダー (TEAC, R-81) により磁気テープに収録した。薬物適用前より適用後 80~160 分間にわたり上記各パラメーターに及ぼす影響を検討した。実験終了後、医用電算機 (日本電気三栄, 7T-17) を用いて、0~200 Hz の周波数帯域における横隔神経活動の自己パワースペ

クトル密度関数を FFT 法により演算した (0.25 Hz/bin, 30 回加算: 図 13)。特に約 80~120 Hz の帯域に発現する高頻度同期波に及ぼす EST の影響について定量的に検討するため、演算された自己パワースペクトラム上の高頻度同期波のピークを背景雑音性成分より分離し、そのピーク周波数、ピーク面積、ならびに半値幅を、ピーク波形がコーシー分布に従うという仮定の下にガウス-ニュートン法に基づく非線形最小二乗法を用いて推定した^{22-24,32)}。

実験成績

ウサギ横隔神経の自発性遠心性活動電位には呼吸性の周期的放電群以外に吸息相中に 80~120 Hz 程度の周期性成分、高頻度同期波が観察された (図 12A, B)。横隔神経の活動電位の自己パワースペクトル上には、110 Hz 付近に高頻度同期波に相当する明瞭なピークが観察された (図 12C)。

横隔神経活動の自己パワースペクトルにおい

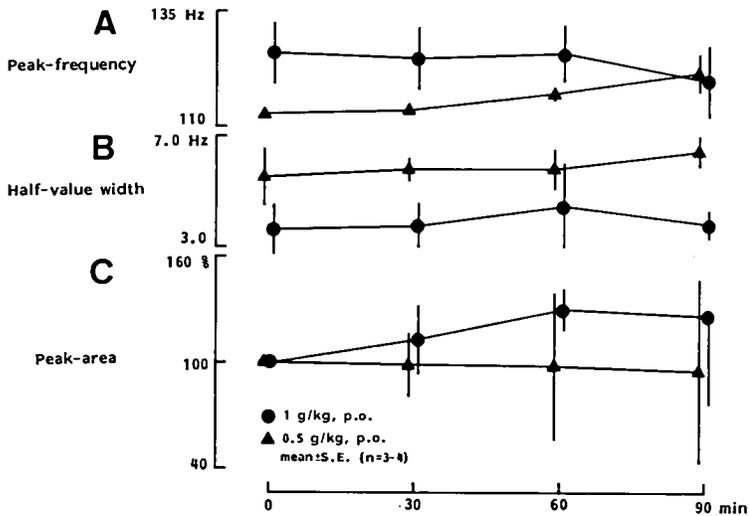


図14 非線形最小二乗法によって推定された横隔神経高頻度同期波のピーク周波数、半値幅、相対ピーク面積に及ぼす EST 経口適用の影響

A: ピーク周波数。B: 半値幅。C: 相対ピーク面積。黒丸: EST 1g/kg 経口適用時。黒三角: EST 0.5g/kg 経口適用時。3~4 例の平均値 ± 標準誤差を示す。横軸は適用後の時間。いずれのパラメーターにも EST 適用前後において有意な変化は認められなかった。

て、高頻度同期波のピーク周波数、ピーク面積は呼気炭酸ガス濃度のわずかな経時的変動に伴って変動するのみで EST の適用によると考えられる変化は認められなかった (図 13)。

横隔神経活動の自己パワースペクトル上、非線形最小二乗法によって推定された高頻度同期波のピーク周波数、半値幅、相対ピーク面積は EST0.5 および 1 g/kg の経口適用例において適用後 90 分にわたり、有意の変化が認められなかった (図 14)。

考 察

非線形最小二乗法によって推定された高頻度同期波の 3 つのパラメーター、すなわちピーク面積、ピーク周波数、および半値幅は各々、高頻度同期波の総エネルギー値、平均周波数、そして周波数の分散を反映するものと考えられる。したがってこれらのパラメーターが、急性実験条件下において、0.5 および 1 g/kg という大量の EST 経口適用によっても有意な変化を示さなかったという実験結果は、EST が横隔神経高頻度同期波の発現に関与する中枢神経系の神経機構に対して、ほとんど作用を有さないことを意味している。

この高頻度同期波は呼吸中枢からの出力として、呼吸運動に関与した骨格筋を支配する遠心性神経活動に特徴的に含まれる成分であると考えられており、換気レベルの変化や、中枢神経系作用薬によって著明に影響されることが確かめられている^{23,24)}。また、神経筋伝達を介して呼吸筋筋電図中からも検出されることが確認されている^{1,3,4,6)}。本研究の結果より EST には横隔神経高頻度同期波の発現に関与する中枢神経系の神経機構に対する作用はほとんどないと考えられた。このことは呼吸筋筋電図中に発現する高頻度同期波のスペクトル解析を行なうことによって、運動ニューロン以下、神経筋伝達、筋収縮に至るまでの過程における病態生理学的変化を定量的にかつ非侵襲的に評価し得る可能性を示している。ヒトの呼吸筋筋電図に発現する高頻度同期波をコヒーレンス・スペクトル解析によって定量的に検出し得ることが報告され

ているので^{1,3)}、この解析法が確立されれば、筋ジストロフィー症における呼吸筋変性の進行の程度および EST の治療効果の非侵襲的な定量的評価方法として応用され得るものと考えられる。

要 約

1. 今回、検討した濃度では、UM-X7.1 の摘出心房標本および横隔神経-横隔膜標本に EST の作用によると考えられる変化は認められなかった。

2. UM-X7.1 と正常のゴールデンハムスターの心電図所見を比較すると、UM-X7.1 では心電図 R-R 間隔の変動係数および平均加算した心電図波形、特に ST 部分に変化をきたしていることが判明した。このことより筋ジストロフィー症の進行の程度を評価する際、心電図所見も重要であると考えられる。

3. EST 投与群で R-R 間隔の変動係数が一時的にせよ大きくなったこと、EST 非投与群の UM-X7.1 R-R 間隔の変動係数が小さいままであったこと、および統計学的に有意ではないが EST 投与群で ST の上昇が抑制される傾向が認められたことは EST の薬効評価においても心電図所見が有用である可能性が示唆される。

4. ウサギ横隔神経遠心性発射活動の自己パワースペクトル上の高頻度同期波に相当するピークのピーク面積、ピーク周波数、および半値幅を非線形最小二乗法によって推定した。これらのパラメーターは EST (0.5~1 g/kg、経口適用) の適用前から適用後 90 分に至るまで有意の変化を示さなかった。このことは、EST が横隔神経高頻度同期波の発現に関与する中枢の神経機構に対して、ほとんど作用を発現しないことを意味する。

5. 4. の解析法の応用として、呼吸筋筋電図中に発現する高頻度同期波のスペクトル解析を行なうことによって筋ジストロフィーにおける呼吸筋変性の進行の程度、さらには、それに対する EST の治療効果を非侵襲的にかつ定量的に評価し得る可能性が考えられる。

参考文献

- 1) Ackerson, L. M. and Bruce, E. N.: Bilaterally synchronized oscillations in human diaphragm and intercostal EMGs during spontaneous breathing, *Brain Research*, **271**, 346-348, 1983.
- 2) Bajusz, E.: Hereditary cardiomyopathy: A new disease model, *Amer. Heart J.*, **77**, 686-696, 1969.
- 3) Bruce, E. N. and Goldman, M. D.: High-Frequency Oscillations in Human Respiratory Electromyograms during Voluntary Breathing, *Brain Research*, **269**, 259-265, 1983.
- 4) Dittler, R.: Über die Innervation des Zwerchfelles als Beispiel einer tonischen Innervation, *Pflügers Arch.* **130**, 400-443, 1909.
- 5) Dittler, R.: Über die Aktionsströme des Nervus phrenicus bei natürlicher Innervation, *Pflügers Arch.*, **131**, 581-588, 1910.
- 6) Dittler, R. and Garten, S.: Die zeitliche Folge der Aktionsströme in Phrenicus und Zwerchfell bei der natürlichen Innervation, *Pflügers Arch.*, **133**, 420-450, 1912.
- 7) Gimeno, A. L., Gimeno, M. F. and Webb, J. L.: Effects of ethanol on cellular membrane potentials and contractility of isolated rat atrium, *Amer. J. Physiol.*, **203**, 194-196, 1962.
- 8) 福原武彦: E-64 の一般薬理作用—特に呼吸・循環機能及び中枢神経系に及ぼす影響—, 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 54 年度研究報告書, 63-79, 1980.
- 9) 福原武彦: E-64-c の一般薬理作用—特に呼吸・循環機能及び中枢神経系に及ぼす影響—, 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 55 年度研究報告書, 141-158, 1981.
- 10) 福原武彦: E-64-c の一般薬理作用—諸種摘出臓器標本に及ぼす影響—, 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 56 年度研究報告書, 121-130, 1982.
- 11) 福原武彦: E-64-d の一般薬理作用—呼吸・循環機能および中枢神経系に及ぼす影響ならびに諸種摘出臓器標本に及ぼす影響—, 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 57 年度研究報告書, 79-91, 1983.
- 12) 福原武彦: E-64-d の一般薬理作用—呼吸・循環機能および中枢神経系に及ぼす影響ならびに諸種摘出臓器標本に及ぼす影響—, 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 58 年度研究報告書, 65-74, 1984.
- 13) 福原武彦: E-64-d の一般薬理作用—筋ジストロフィーハムスターの心電図に及ぼす影響を中心として—, 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 59 年度研究報告書, 37-47, 1985.
- 14) 福原武彦, 木村直史, 高野一夫, 蜂谷芳弘: EST (E-64-d) の呼吸・循環機能および中枢神経系に及ぼす影響, *慈恵医大誌*, **100**, 1207-1214, 1985.
- 15) 福原武彦, 木村直史, 高野一夫, 蜂谷芳弘: E-64 類縁体 (E-64-c) の諸種摘出臓器標本に及ぼす影響, *慈恵医大誌*, **100**, 1215-1222, 1985.
- 16) 福原武彦, 木村直史, 高野一夫, 加藤総夫, 中川辰郎, 山田順子: E-64 類縁体 (EST) の諸種摘出臓器標本に及ぼす影響, *慈恵医大誌*, **100**, 1223-1231, 1985.
- 17) 福原武彦, 木村直史, 高野一夫, 加藤総夫, 中川辰郎, 山田順子: EST (E-64-d) の筋ジストロフィーハムスター (UM-X7.1 系) の心電図に及ぼす影響, *慈恵医大誌*, **100**, 1233-1240, 1985.
- 18) Jasmin, G. and Eu, H. Y.: Cardiomyopathy of hamster dystrophy, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **317**, 46-58, 1979.
- 19) James, T. N.: Observations on the cardiovascular involvement, including the cardiac conduction system, in progressive muscular dystrophy, *Amer. Heart J.*, **63**, 48-56, 1962.
- 20) 景山茂, 持尾聰一郎, 阿部正和: 定量的自律神経機能検査法の提唱—一心電図 R-R 間隔の変動係数を用いた非侵襲的検査法—, *神経内科*, **9**, 594-596, 1978.
- 21) 景山茂: 糖尿病性自律神経障害の定量化とその進行因子の分析に関する研究, *慈恵医大誌*, **95**, 191-202, 1980.
- 22) Kato, F., Kimura, N., Takano, K. and Hukuhara, T., Jr.: Quantitative analysis of high frequency oscillation in phrenic and cranial nerve activity, *J. Physiol. Soc. Japan*, **47**, 577, 1985.
- 23) 加藤総夫, 木村直史, 高野一夫, 福原武彦: 横隔神経および脳神経活動に発現する高頻度同期波の pentobarbital 感受性, *日本薬理学雑誌*, **86**, 6-7, 1985.

9. ESTの一般薬理作用

- 24) 加藤総夫, 木村直史, 高野一夫, 福原武彦: 呼吸リズムを持つ神経活動に見出される高頻度同期波の機能的役割—その定量的スペクトル解析—, *J. Physiol. Soc. Japan*, **47**, 688-689, 1985.
- 25) 木口百合子, 後藤和利, 高野一夫, 西川嘉伸, 八反丸善文, 宮川政昭, 亀井淳三, 福原武彦: 微生物二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の呼吸, 循環機能および脳波に及ぼす影響, *慈恵医大誌*, **96**, 701-711, 1981.
- 26) 木口百合子, 高野一夫, 西川嘉伸, 八反丸善文, 宮川政昭, 木村直史, 福原武彦: E-64 類縁体 (E-64-c) の循環機能に及ぼす影響, *慈恵医大誌*, **97**, 1-9, 1982.
- 27) 木口百合子, 福原武彦: ウサギ, ネコの横隔神経発射活動に及ぼす E-64 の影響, *東京慈恵会医科大学昭和 55 年度学内共同研究報告書*, 74-77, 1981.
- 28) Knutsson, E.: Effect of ethanol on the membrane potential and membrane resistance of frog muscle fibers, *Acta Physiol. Scand.*, **52**, 242-253, 1961.
- 29) 小西真人, 栗原 敏, 小林啓三, 川村 武, 酒井敏夫: 心疾患モデルハムスターにおける心機能の検討, *体力科学*, **32**, 459, 1983.
- 30) Lossnitzer, K.: Genetic induction of a cardiomyopathy. In: J. Schmier and O. Eichler, *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. XVI /3, pp. 309-344 (Berlin, Heidelberg, New York 1975).
- 31) Lossnitzer, K., Grewe, N., Konrad, A. and Adler, J.: Electrocardiographic changes in cardiomyopathic Syrian hamsters (strain BIO 8262), *Basic Res. Cardiol.*, **72**, 421-435, 1977.
- 32) 中川 徹, 小柳義夫: 最小二乗法による実験データ解析—プログラム SALS, UP 応用数学, 東京大学出版会, 1982.
- 33) Perloff, J. K., Roberts, W. C., de Leon, A. C. and O'Doherty, D.: The distinctive electrocardiogram of Duchenne's progressive muscular dystrophy, *Amer. J. Med.*, **42**, 179-188, 1967.

10. 種々の原因による筋萎縮に対する EST の効果 ——筋肉内アミノ酸代謝の面より

寺尾 寿夫*

研究協力者 高津 成美* 五嶋 峰子* 永井 由紀子*

目 的

我々は昭和 57 年度¹⁾および 58 年度²⁾の本班会議において、ジストロフィーハムスターでは、3-メチルヒスチジン (3-MH) の尿中排泄が増加しており、これが E-64 投与により減少することを示した。また昨年度は動物のクロロキンミオパチーにみられる 3-MH やタウリンの尿中排泄増加も EST によって抑制されることを報告し、EST がこれらの病的状態における筋の崩壊を防ぐことを示唆した。

今回の研究の目的は、EST の効果を筋肉中遊離アミノ酸の面から検討することである。

方 法

1. 骨格筋中遊離アミノ酸の測定

ジストロフィー動物は a) ジストロフィーハムスター UM-X 7.1, b) BIO 14.6, c) mdx マウスを用いた。いずれも雄性で生後 2 ヶ月のものである。a), b), c), のコントロールとしてはそれぞれ Golden hamster, BIO f₁b, C57 BL/10 cs を使用した。

骨格筋は Quadriceps を用いた (V. E 欠乏ラットでは EDL を使用)。筋肉は切除後、直ちに homogenize し、過塩素酸にて除蛋白後アミノ酸自動分析機にて各アミノ酸を測定した。

2. V. E 欠乏ラット

生後約 2 ヶ月の Wistar ラットに、コーンス

ターチ、ビタミンフリーカゼインなどより成る V. E 欠乏飼料を与えた。一方、コントロールラットには同成分の飼料に 100 g 当り 2 mg の酢酸トコフェロールを加えたもので飼育した。

尿中アミノ酸の測定は 24 時間蓄尿したものを除蛋白して使用し、骨格筋は EDL を取り出し 1. と同様に処理してその中の各遊離アミノ酸を測定した。

結 果

1. 各種実験的ミオパチーの筋肉中遊離アミノ酸濃度の変化

(1) ジストロフィーハムスター UM-X7.1

図 1 は生後 2 ヶ月のジストロフィーハムスター UM-X の Quadriceps 中の遊離アミノ酸の濃度を示したものである。筋肉中には taurine, glutamine, glycine, alanine, anserine, carnosine などが多い。

UM-X の Quadriceps 中の遊離アミノ酸はコントロールに比し、taurine が多く、また glutamine も増加していた。Anserine はやや低い程度であり、carnosine は変化がみられなかった。

(2) ジストロフィーハムスター BIO 14.6

BIO 14.6 の Quadriceps 中の遊離アミノ酸も UM-X と似ており、taurine は有意に増加し、glycine, alanine などは減少していた。ただし、この場合は glutamine は減少傾向があり、carnosine も有意に減少していた。

* 帝京大学第 1 内科

III 個体レベルにおける研究

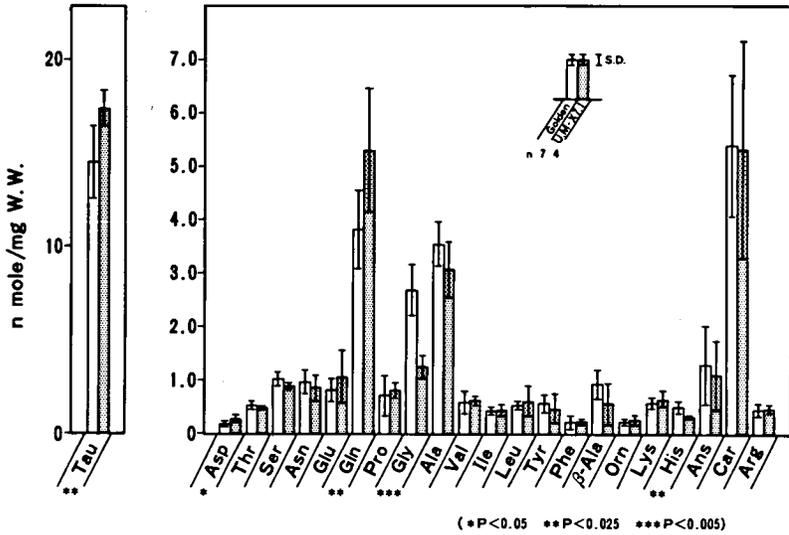


図1 Free amino acid levels in Quadriceps of dystrophic hamster (UM-X 7.1)

表1 Changes of free amino acid concentrations in skeletal muscle of muscular dystrophies and experimental myopathies in animal

Amino acid	Myopathy	dystrophic hamster (BIO14.6)*	dystrophic hamster (UM-X7.1)*	dystrophic mouse (mdx)*	chloroquine myopathy*(hamst.)	V.E deficient** (rat)
Taurine		↑	↑	↑	↑	↑
Glutamic acid		↑	↑	↑	↑	↓
Glutamine		↓	↑	↑	↑	↓
Glycine		↓	↓	↓	↓	↓
Alanine		↓	↓	↓	↓	→
Lysine		↑	↓	↓	↓	↓
Anserine		↓	↓	↓	↓	→
Carnosine		↓	→	↓	↓	↓

* Quadriceps ** EDL ↑↓ P<0.05

(3) mdx マウス

生後2ヶ月のmdxマウスのQuadriceps中の遊離アミノ酸濃度をC57BL/10csと比較してみると、mdxマウスではtaurine, glutamineは増加し、glycine, alanineなどのアミノ酸やanserine, carnosineなどのdipeptideは著明に減少していた。

表1は以上3種のジストロフィー動物と昨年報告したクロロキンミオパチーおよび後述するV.E欠乏ラットの骨格筋中遊離アミノ酸の

中、主要なものの変動をまとめたものである。この表中、太い矢印は5%以下の危険率で有意であることを示している。これにみる様に筋肉内遊離アミノ酸はジストロフィー動物でも実験的ミオパチーの場合でもかなり類似した変化を示すことがわかる。増加するアミノ酸はtaurine, glutamic acid, glutamineであり、とくにtaurineはすべての場合に有意に増加を示した。逆に減少するものはglycine, alanine, lysineなどのアミノ酸であり、anserine, car-

10. 種々の原因による筋萎縮に対する EST の効果

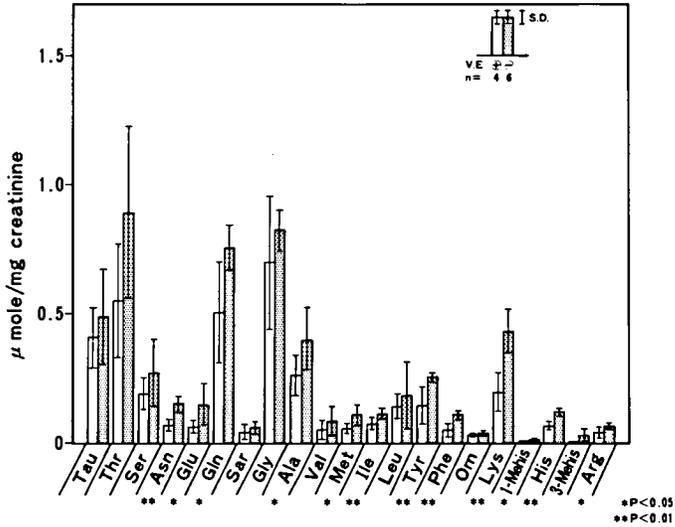


図2 Urinary amino acid levels of V. E deficient rat (4W)

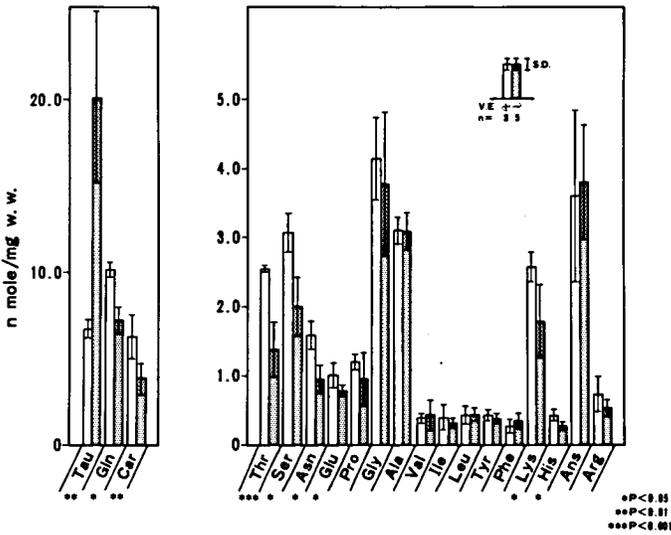


図3 Free amino acid levels in EDL of V. E deficient rat (4W)

nosine なども減少を示すことが多かった。

2. V. E 欠乏ラット

V. E 欠乏も筋病変を起こすことは良く知られており、V. E 欠乏動物のリソゾームの異常が指摘されている³⁾。

(1) 尿中遊離アミノ酸

図2はV. E 欠乏飼料で4週間飼育したラットの尿中に排泄される各アミノ酸をコントロールのそれと比較したものである。コントロール群に比し、尿中に排泄されるアミノ酸は増加するものが増えている。しかし、この場合は筋肉崩壊の指標となる3-MHの排泄増加はみ

Ⅲ 個体レベルにおける研究

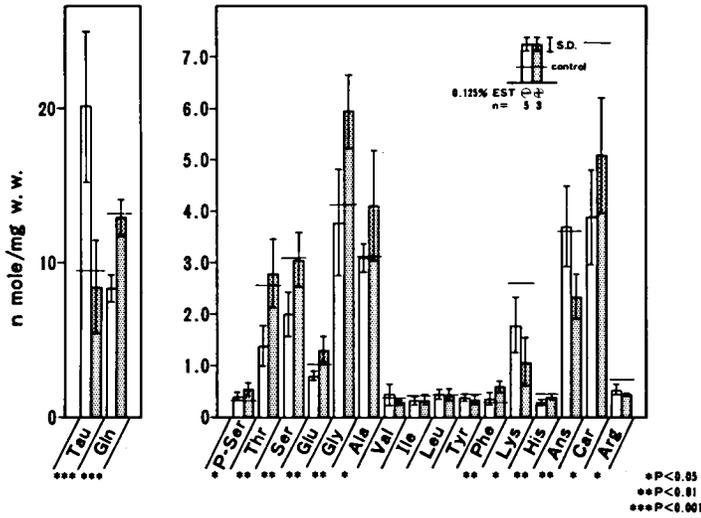


図4 The effect of EST on free amino acid levels in EDL of V. E deficient rat (4W)

られなかった。3-MHの尿中排泄増加はV. E 欠乏飼料を10ヶ月間にわたり与えたラットでも同様に認められなかった。

(2) V. E 欠乏ラットの骨格筋中遊離アミノ酸

V. E 欠乏食を与えて4週目のラットのEDLを取り出し、H. E.染色標本を作製してみても、ほとんど変化はみられなかった。しかし、この時期でも筋肉内遊離アミノ酸には変化がみられた。図3はV. E 欠乏4週目のラットのEDL中の遊離アミノ酸をコントロールと比較したものである。

V. E 欠乏ラットでは、他の原因の筋萎縮と同様に taurine は著しく増加している。他方、threonine, serine, lysine, carnosine をはじめ、glutamic acid, glutamine も減少していた。

(3) V. E 欠乏ラットの筋肉内アミノ酸の変化に及ぼす EST の効果

ラットを2群に分け、1群にはV. E 欠乏飼料を与え、他群にはこれに0.125%の割合にESTを加えた飼料を与えて、4週後に各々のEDL中のアミノ酸濃度を比較したものが図4である。この図中の横線はV. E 非欠乏ラットの値を示している。

これに示すごとく、ESTを投与することに

よって、増加していた taurine は減少して横線で示した正常値に近づき、逆に減少していた threonine, serine などのアミノ酸は正常値まで増加していた。中には glycine, alanine の様に正常よりかえって上昇するものや、carnosine の様に上昇するが正常値に達しないものもあった。また anserine は減少した。

表2は筋肉内の主要なアミノ酸濃度を taurine 濃度で除して、各々の比を求めたものである。この比はV. E 欠乏飼料を与えることにより著しく減少を示すが、これに0.125%にESTを加えたV. E 欠乏食を与えると、これらの比率は多くのアミノ酸で増加し、正常値に近づき、なかにはそれ以上に達するものもあった。

考 察

骨格筋中の遊離アミノ酸のパターンは他の組織とは異なる独特のものであるが、筋中の個々のアミノ酸の働きはわかっていない。

これらの中、taurine は電氣的に興奮する組織たとえば骨格筋、心筋、中枢神経などに多く含まれ⁹⁾、なかでも骨格筋に大部分が含まれている。taurine はCaのtransportや膜の安定

10. 種々の原因による筋萎縮に対する EST の効果

表2 Free amino acid/taurine ratio in EDL of V. E deficient rat (4W)

Amino acid Taurine	Threonine	Serine	Glutamic acid	Glutamine	Glycine	Alanine	Lysine	Anserine	Carnosine
V·E ⊕ (n=3)	0.33 ±0.02	0.39 ±0.02	0.12 ±0.01	1.50 ±0.08	0.54 ±0.12	0.40 ±0.01	0.33 ±0.05	0.20 ±0.05	0.93 ±0.14
V·E ⊖ (n=5)	0.06 ±0.00	0.10 ±0.04	0.04 ±0.01	0.43 ±0.12	0.19 ±0.07	0.16 ±0.04	0.09 ±0.01	0.04 ±0.00	0.20 ±0.06
V·E ⊖ +0.125%EST (n=3)	0.37 ±0.17	0.41 ±0.19	0.18 ±0.11	1.75 ±0.73	0.86 ±0.53	0.52 ±0.14	0.13 ±0.05	0.12 ±0.08	0.71 ±0.39

性を保つ上に必要であり、脳では glutamic acid の濃度と平行して変化するといわれている⁵⁾。また anserine や carnosine も筋中に多く含まれるが、これらの dipeptide は筋が発育する際、神経筋接合部のアセチルコリン、コリンエステラーゼの濃度と平行して増加し、神経支配の豊富な筋程高く、除神経により減少するといわれている⁶⁾。

これら以外にも高濃度に存在し、働きのわからないアミノ酸が多いが、いずれも筋病変時には著しく変化することが明らかになった。これは V. E 欠乏ラットでも同様であったが、この変化は V. E 欠乏飼料と同時に EST を与えることにより、正常化または軽減されることが明らかになった。

結 語

1. ジストロフィーハムスター (UM-X, BIO 14.6), ジストロフィーマウス (mdx) およびクロロキンミオパチーの骨格筋中の遊離アミノ酸は、かなり類似した変化を示す。すなわち一般に taurine, glutamic acid, glutamine は増加し、他の多くのアミノ酸は減少する。

2. V. E 欠乏ラットの骨格筋中には taurine の増加と他のアミノ酸の減少がおこる。

3. V. E 欠乏飼料に EST を加えて飼育すると骨格筋中アミノ酸の異常は抑制されるかまたは軽減される。

文 献

- 1) 寺尾寿夫：移植筋の再生ならびにアミノ酸代謝に対する E-64 の効果，厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 57 年度研究報告書，201, 1983.
- 2) 寺尾寿夫：筋ジストロフィーハムスターの移植筋の再生およびアミノ酸代謝に及ぼす EST の効果，厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 58 年度研究報告書，149, 1984.
- 3) 加藤敬太郎：ビタミン E とリソゾーム，ビタミン E—基礎と臨床—(福場博保，美濃 真監修，五十嵐修編集) 医歯薬出版，東京，p. 123, 1985.
- 4) Jacobsen, J. G., and Smith, L. H.: Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives, *Physiol. Res.*, **48**, 424, 1968.
- 5) Van Gelder, N. M.: Taurine, the compartmentalized metabolism of glutamic acid, and the epilepsies, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **56**, 362, 1978.
- 6) Thomsen, W. and Marshall, F. D.: Effects of neuromuscular blockers on carnosine levels in rat skeletal muscle, *Experimentia*, **41**, 374, 1985.

11. 心筋症ハムスターの心筋構造蛋白の融解機序に関する一考察

柴田 宣彦*

研究協力者 和田 昭**

心筋症ハムスターはヒトの心筋症の病態に酷似し、心筋自体の病理組織学的所見でも本質的差異を見出し得ず、ヒトの心筋症の発症機序を心筋症ハムスターを材料に検討して来た。

その結果、組織学的にハムスター心筋症の心筋構造蛋白の変性融解はアクチン (Ac) よりもミオシン (My) が先行し、心筋 Ca^{2+} 量の増大がみられ、時間の経過につれ変性した心筋にはカルシウムが沈着 (磷酸カルシウム) することなどを報告して来た¹⁻³⁾。

そして、生化学的には、 Ca^{2+} 依存性プロテアーゼ (CANP) 阻害因子の活性が心筋症心筋のものでは健常心筋のものに比し小であるため、心筋構造蛋白の変化に CANP の関与が考えられることを述べて来た^{4,5)}。

ここでは、上述の所見の妥当性につき検討した結果を述べる。

方 法

心筋症ハムスター BIO 14.6 および健常対照ハムスター BIO・RB から心房を除き、心室筋を得て、それぞれ心筋症心筋、健常心筋とした。

心筋構造蛋白の分析は心筋片を 1% SDS・8 M 尿素で処理融解後、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動図 (PAGE) によった。今堀・石浦・鈴木らによる骨格筋 mCANP の調製法に

従い、健常心筋より mCANP を部分精製 (図 1, 2)^{5,6)}、その活性は変性カゼインを基質に既報の方法⁵⁾で測定した (図 2)。

心筋小胞体の調製は Harigaya-Schwartz の方法により調製⁷⁾、その Ca^{2+} 取込み能は $^{45}\text{CaCl}_2$ を用い、Millipore filter 法により測定した。

成績ならびに考察

(1) 心筋症ハムスター左心室筋の構造蛋白の PAGE

図 3 は、心筋症の左心室筋と健常の左心室筋の 5% PAGE を示す。図で明らかなように、心筋症のものでは My 重鎖に相当する 200 Kd のバンドが細くなり、より分子量の小さな数バンドに分れ泳動されている像を示した。しかし、43 Kd の Ac 相当バンドなど、その他の構造蛋白成分には健常心筋との間に大きな差異はみられなかった。

この成績は、心筋症心筋では構造蛋白の中でも、特に My に変化の強いことを示すものと言え、組織化学的にみたミオシン染色法での脱落所見に符号した¹⁾。このような My の崩壊機序を考えてみると、心筋症心筋の My は、そのアミノ酸配列構造が遺伝的に健常心筋のものとは異っているとしても、何らかの蛋白分解酵素の作用をうけない限り崩壊は難しいと思われる。然りとすれば、どの様な蛋白分解酵素が関与しているのかが問題である。この点を考察すると次のごとくに要約される。①本症心筋は組織学的所見上、炎症細胞浸潤をみず、心筋細胞

* 大阪府立成人病センター第一内科

** 大阪府立成人病センター病理科

III 個体レベルにおける研究

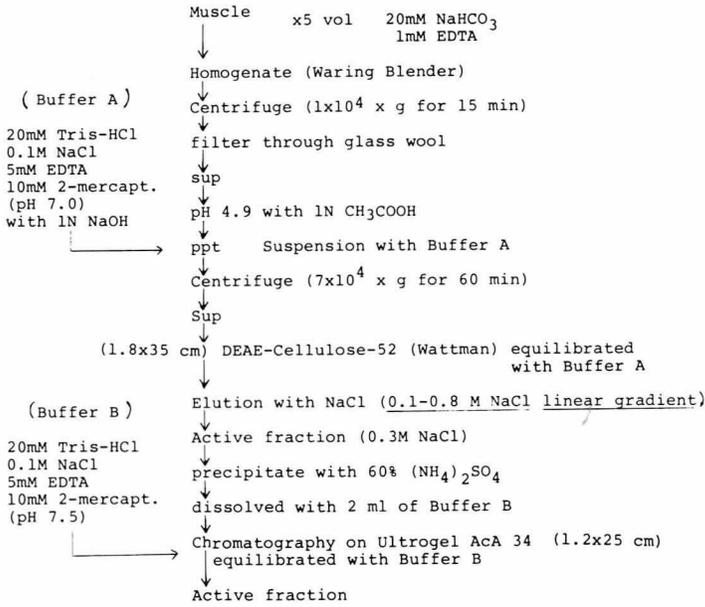


図1

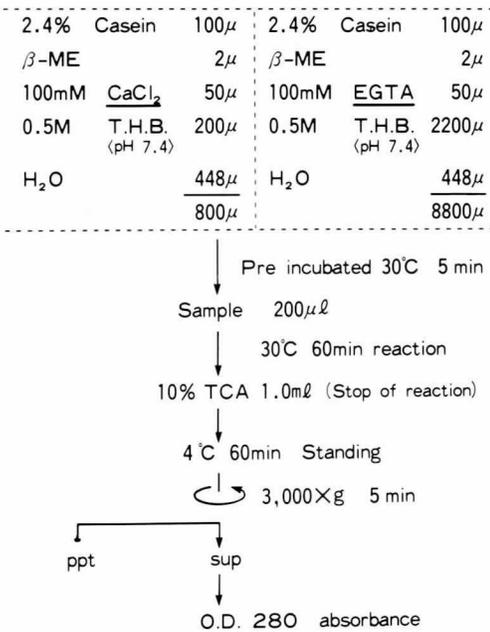


図2 CANP 活性測定

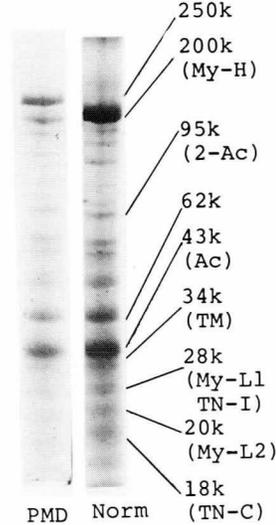


図3 心筋ミオシンBの粗標品75μgを1% SDS-8 M 尿素で処理後電気泳動

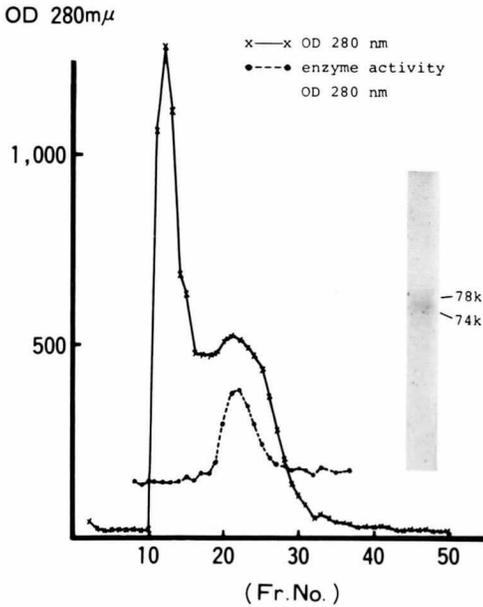


図4 Preparation of Cardiac Ca^{2+} -protease (Ultrogel ACA 34)

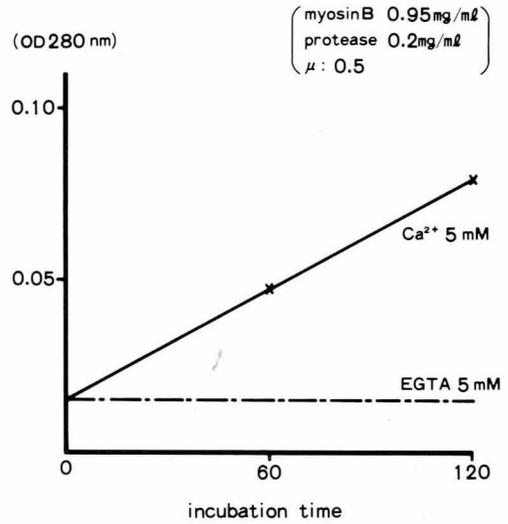


図5 An effect of cardiac Ca^{2+} -protease for cardiac myosin B from healthy hamster

の変化は好酸性変性ないし凝固壊死で、これが細胞個々ないし巣状におこり、これに組織球の集簇、線維芽細胞の増生などが続発（肉芽期）し線維化に到る；②糸粒体の変性、介在板の解離など細胞内膜系の変化も電顕的レベルで認められる²⁾；③本症心筋では Ca^{2+} 含量が高く³⁾、組織での酸塩基平衡の変化もみられない；などの点から、 Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ (CANP) の活性化による構造蛋白崩壊の可能性が考えられた。

(2) 健常ハムスター心筋から抽出されたミオシン B と CANP との反応

前項での考察に基づき、健常心筋から CANP を部分精製し、分子量が 78 Kd, 74 Kd の 2 成分からなる標品を得た (図 4)。本酵素は 5 mM $CaCl_2$ の存在下で健常心筋から得た My. B と孵置すると、反応時間と共に反応系上清の OD 280 nm での吸光度の増大がみられ、My. B 分解の進行が示唆された (図 5)。そこで、健常心筋から収縮蛋白粗標品ミオシン B を調製、 Ca^{2+} 存在下に上記 CANP と共に中

性反応液中で孵置、所定時間後 1% SDS-8M 尿素で融解、5% PAGE により構造蛋白の変化を孵置時間の経過の下に検討し、健常および心筋症心筋構造蛋白の 5% PAGE と比較した。結果は図 6 の如くで、 Ca^{2+} 存在下では孵置時間と共に 200 Kd の My 重鎖に相当するバンドの崩壊が明白となり、反応後 2 時間のもものでは心筋症心筋の構造蛋白の 5% PAGE に酷似するパターンを示した。

以上の成績は、心筋 CANP が Ca^{2+} の存在下に活性化され、これは心筋構造蛋白の中でも My の崩壊を来し得ることを示すと共に、心筋症心筋での My の崩壊に関与している可能性を示唆する。

健常心筋では、細胞内 Ca^{2+} 濃度は筋小胞体の Ca^{2+} 取込み能により調節され、最大収縮刺激時でも、CANP の活性化に必要な $10^{-3}M$ レベルに達することはあり得ない。それ故、心筋症心筋で Ca^{2+} 濃度が上昇しているとする、その機序の解明が必要である。そこで健常および心筋症心筋から筋小胞体を調製し、それぞれ

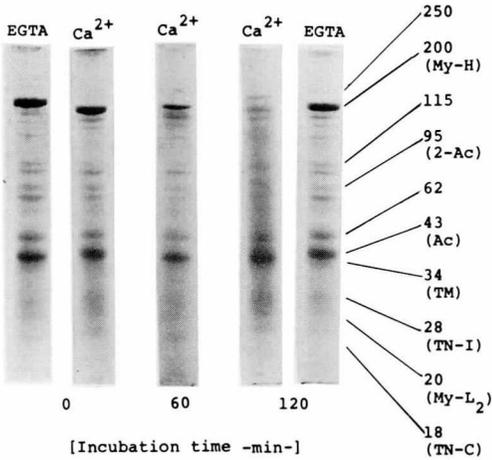


図6 健常心筋 My.B と CANP との反応後の PAGE

My.B: 350 μ g, CANP: 50 μ g, 20 mM tris-mal. buffer (pH 7.0), 5 mM CaCl_2 or 5 mM EGTA 存在下に 30°C で incubate。所定時間後、最終 1% になるように SDS を加え反応を止め 5% PAGE に反応液中の蛋白 50 μ g を供す。

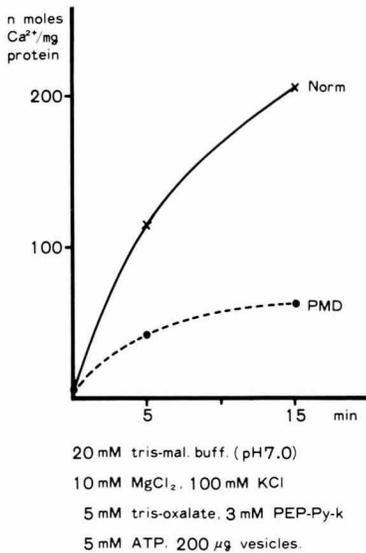


図8 Ca^{2+} -uptake by hamster's microsomal vesicles (Normal and PMD) at 25°C

Norm: 健常心筋小胞体

PMD: 心筋症心筋小胞体

PEP-Py-k (phosphoenolpyruvate-pyruvate kinase), $^{45}\text{CaCl}_2$ 0.1 mM 存在下で反応。

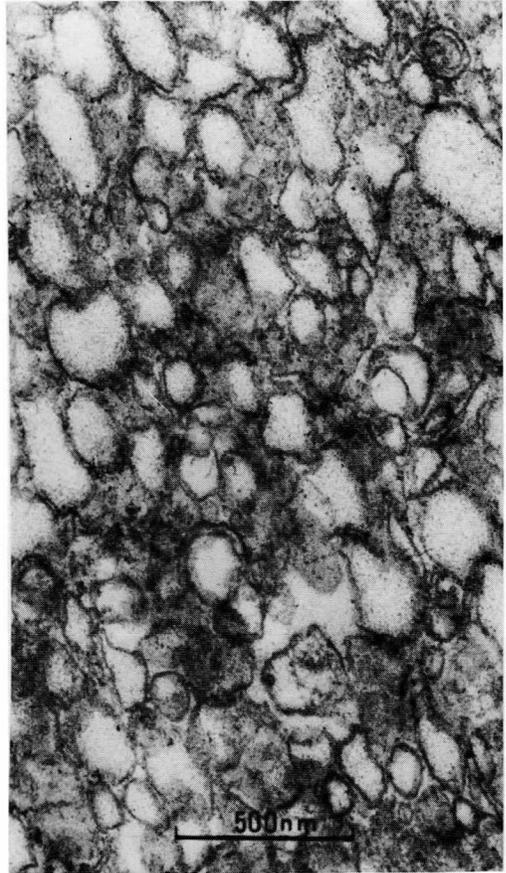


図7 心筋症ハムスター心筋小胞体の電顕像
健常ハムスター心筋小胞体のもと差異をみない。

の Ca^{2+} 取込み能を比較検討した。

(3) 心筋症心筋小胞体の Ca^{2+} 取込み能

心筋症心筋から分離調製された小胞体の電顕像は図7のごとくで、電顕的には健常心筋のもとと差異をみない。しかし、 ATP-Mg^{2+} を基質とする Ca^{2+} 取込み能をみると、図8の如く、心筋症のものでは健常心筋のものに比し有意に小さく、約 50% であった。

以上の成績は、心筋症心筋では、筋小胞体を主体とする細胞内膜系に異常のある心筋細胞においては、細胞内 Ca^{2+} 濃度が増高して、CANP が活性化され、構造蛋白、特に My の崩壊が起り、収縮要素の減弱化と共にうっ血型心筋症が進展するとの考えに矛盾しない。心筋

11. 心筋症ハムスターの心筋構造蛋白の融解機序に関する一考察

症ハムスターの心筋細胞小胞体で示された細胞内膜系の障害は、本動物の場合、心筋以外の臓器、例えば赤血球膜でも SDS-PAGE でのパターンの相違としてみられている。また、生後の時間経過と共に心筋のみならず骨格筋にもヒトの筋ジストロフィー様の変化がみられ、心筋におけると同様の組織変化を示して来る。それ故、本症は細胞の膜系の異常が遺伝的に出現する一次的变化とも考えられるが、胎生期の心筋でも筋原線維に乏しい心筋細胞が巣状に出現する⁹⁾ことも認められている。このことは My の生合成過程そのものに遺伝的異常があることも否定出来ない。したがって、心筋症心筋の My 自体の質的異常の有無が検討されねばならず、目下免疫学的に検討を進めている。

結 論

1. ヒトの拡張型原発性心筋症に酷似の病態を示す心筋症ハムスター BIO 14.6 を材料に、心筋症の発症機序を検討した。

2. 1%SDS-8M 尿素に溶解した心筋症心筋の PAGE は、健常心筋のものに比しミオシンの崩壊が目された。

3. 健常心筋から部分精製した Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼは、SDS-PAGE 上 78 Kd, 74 Kd の 2 バンドを示し、 $Ca^{2+} > 3 \text{ mM}$ でミオシンを融解した。

4. 健常心筋から調製したミオシン B は $Ca^{2+} 5 \text{ mM}$ 存在下に Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼでミオシンが分解され、PAGE 上心筋症心筋の SDS-PAGE に酷似した。

5. 心筋症心筋から分離調製された小胞体は電顕像で健常心筋のものと差異をみないが、 $ATP \cdot Mg^{2+}$ を基質とした Ca^{2+} 取込み能は約 1/2 と低い。

6. 以上から、心筋症心筋では、小胞体の Ca^{2+} 取込み能の減弱している心筋細胞では、細胞内 Ca^{2+} の増大が招来され、 Ca^{2+} 依存性中

性プロテアーゼが活性化され、これにより主としてミオシンの分解が生じ、マクロファージの浸潤を経て線維化が起ってくるという融解変性機作が示唆された。

文 献

- 1) Büchner, F. et al.: Cardiomyopathy associated with systemic myopathy. Genetic defect of actomyosin influencing muscular structure and function, Urban and Schwarzenberg, Baltimore-Munich, 1978.
- 2) Wada, A. et al.: An approach to the genesis of idiopathic cardiomyopathy. In: Advances in Myocardiology, Vol. 2, ed. by Tajuddin et al., University Park Press, Baltimore, pp. 259-268, 1980.
- 3) 柴田宣彦, 和田昭: ハムスター心筋症発生機序の解明およびその抑制に関する研究, 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 58 年度研究報告書, 155-164, 1984.
- 4) Shibata, N. et al.: A cardiac Ca^{2+} -activated neutral protease and its role in the hereditary cardiomyopathy in Syrian hamster, J. Mol. Cell Cardiol., 11 (supp. 3) 41, 1979 (abstract).
- 5) 柴田宣彦, 和田昭: ハムスター筋症発生機序の解明およびその抑制に関する研究—心筋の中性 Ca^{2+} プロテアーゼ (CANP) とその内在性阻害因子の検討ならびに EST による治療実験, 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 59 年度研究報告, 101-108, 1985.
- 6) Ishiura, S. et al.: Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle, J. Biochemistry, 84, 225-230, 1978.
- 7) Harigaya, S. and Schwartz, A.: Rate of calcium binding and uptake in normal and failing human cardiac muscle, Circulation Res., 25, 781, 1969.
- 8) Wada, A. et al.: Cardiomyocytes in the embryonal stage of Syrian hamsters with a hereditary cardiomyopathy, J. Mol. Cell Cardiol., 9, 799-805, 1977.

12. ハムスター呼吸筋の組織所見

石原 傳 幸*

研究協力者 津谷 恒 夫* 儀 武 三 郎*
青柳 昭 雄* 山 崎 徹 夫**

はじめに

昨年の当班研究報告書で、EST 投与により筋ジストロフィーハムスターの生存期間が有意に延長したことが報告されたが、ジストロフィーハムスターの末期病態がヒトの Duchenne 型筋ジストロフィー（以下 DMD と略す）と同一であるかどうかは興味深い点である。もし両者が同一の病態で死の転帰をとるとすれば、ハムスターと同様に DMD の延命も可能となるからである。今回、大正製薬の好意により最末期ジストロフィーハムスター 3 匹の呼吸筋を組織化学的に検索する機会を得たので、①ジストロフィーハムスターの最末期病態を DMD と比較検討すること、②呼吸筋に対する EST の効果を検討する、以上 2 つの目的で研究を行ない若干の知見を得たので報告する。

対象と方法

対象は UBX ジストロフィーハムスター 3 匹で、No. 1 は EST 非投与ハムスター、実験日当日は生後 192 日で、実験日朝死亡した。No. 2 は EST 30 mg/日投与、No. 1 と同日出生。No. 3 は EST 100 mg/日投与、実験当日生後 178 日であった。

エーテル麻酔下にて開胸・開腹し動脈血採血を試みた後、横隔膜、EDL、ヒラメ筋、さら

に No. 3 では肋間筋をも採取し型通りの組織化学的検索を施行した。

なお、EST は離乳直後より実験日まで混餌投与した。

結 果

図 1 には、横隔膜の H & E 染色結果を示す。No. 1 では石灰化、壊死、細胞浸潤などが著明であり、No. 2 は No. 1 より比較的良好に保持されていたがやはり壊死・再生が認められた。No. 3 では、壊死は No. 1 や No. 2 に比べ少なく良好に保たれていた。

細胞浸潤は、No. 1 と No. 2 では同程度にみられ No. 3 にはやや少ない印象であった。石灰化は No. 1 のみにみられ No. 2 と No. 3 には認められなかった。好塩基性に染色される筋細胞は No. 1~3 まで多数みられ、さらに No. 3 でも type II C fiber が数多くみられることから再生現象の存在が考えられた。

ヒトの呼吸筋にみられると同様のセントラル・コア変化は¹⁾、No. 1 の横隔膜には少ないながらも図 2 のごとく存在したが、No. 2 ではごく少なく、No. 3 ではほとんど認められなかった。以上の結果を表 1 にまとめて示す。

一方、EDL、ヒラメ筋では 3 匹共に大きな差はみられなかった。

考 案

DMD の死因の大部分は呼吸筋の変性萎縮に起因する呼吸不全（肺泡低換気）により占めら

* 国立療養所東埼玉病院

** 清水市立病院

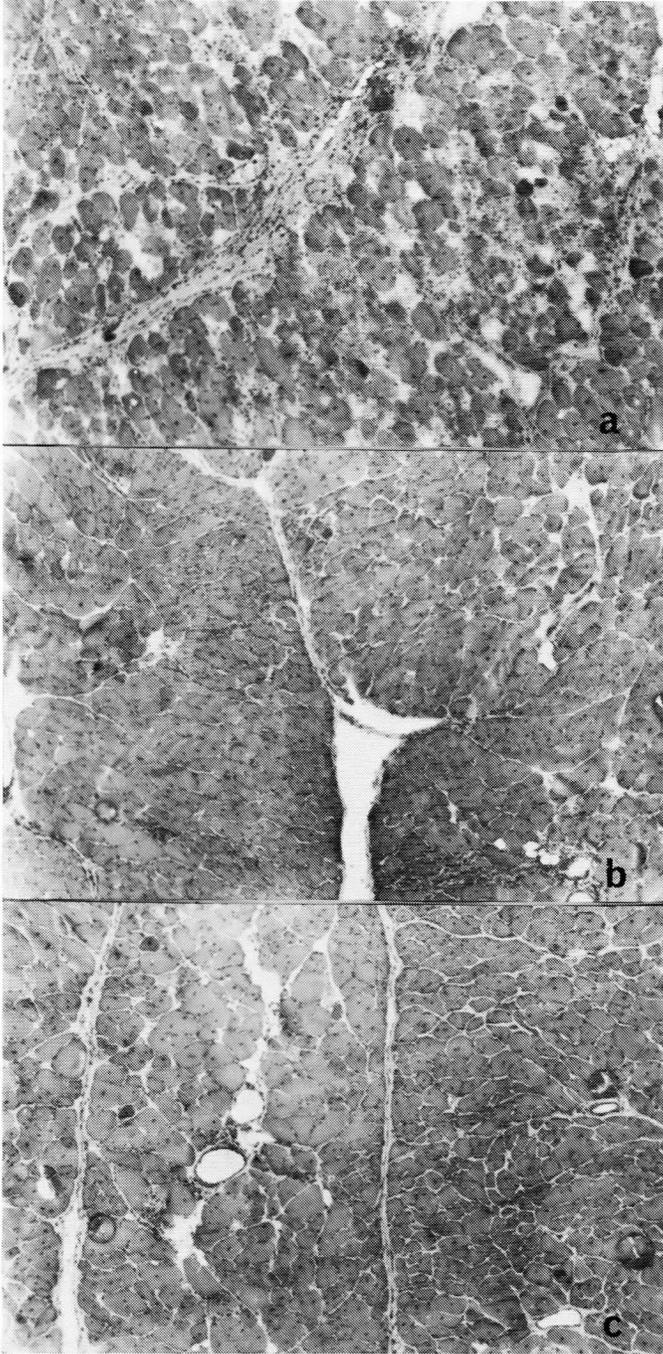


図1 ジストロフィーハムスターの横隔膜 (H & E 染色, ×66)
a : EST 非投与, b : EST30 mg/日投与, c : EST100 mg/日投与ハムスター
aでは壊死や石灰化が著しくみられるが, bでは石灰化は認めない。しかしbでは細胞浸潤が下部に認められる。cでは筋の破壊が少なく, a, bに比べよく保たれている。

表1 Pathological Findings of Diaphragm in Dystrophic Hamster

EST	-	30 mg/day	100 mg/day
Necrotic fibers	+++	++	+
Phagocytosis	++	++	+
Basophilic fibers	??	++	+
Internal nuclei	+	+	+
Cellular infiltration	++	++	+
Calcification	++	-	-
Type II C fibers	++	++	+
Central cores	+	+~±	±

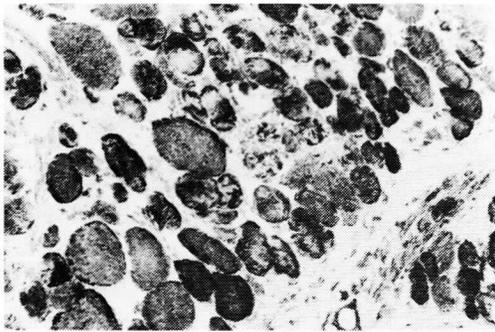


図2 EST非投与ハムスターの横隔膜 (NADH-TR染色, ×164) セントラル・コア変化が認められる。

れるといわれ、当院筋萎縮症病棟でもDMD死亡26例中20例(約75%)を占めていた。これに対し心筋変性による左心不全は26例中3例(約12%)のみであった。肺胞低換気末期患者で右心カテーテルにより心機能を検討した結果、左心不全は意外に少なく、多分低酸素血症より生じたと思われる肺高血圧症の存在が著明であった。このことより肺胞低換気患者の末期は肺高血圧症より右心不全(肺性心)が生じ、従来考えられていた左心不全のfactorはあまり関与していないと考えられるようになってきた²⁾。

DMDの横隔膜では、ハムスター呼吸筋に比べ筋線維数は極端に少なく、その上NADH-TR染色では、前述のセントラル・コアが著明にみられる。DMDでは横隔膜では100%セントラル・コアが出現する。しかし、非神経筋疾

表2 ジストロフィーハムスターとDMDの末期病態

○ハムスターとDMDの約15%
心筋変性→左心不全→肺水腫→右心不全 →全身浮腫
○DMDの約75%
呼吸筋変性→肺胞低換気→低酸素血症 →肺高血圧→右心不全(肺性心)→全身浮腫

患でも、何らかの呼吸不全を伴う症例の横隔膜にはセントラル・コアが高率に認められる³⁾。

一方、少ない率ではDMDでも、心係数(C.I.)の著しい低下と肺動脈楔入圧(PCWP)の上昇を示す左心不全例も確かに存在する。DMD心筋は肉眼的にも線維化が確認できるほど著明な変化がある。しかし、ジストロフィーハムスターのような石灰化は全く認められない。1972年Abelmannらはジストロフィーハムスターにおけるhemodynamic studyを施行し、左室拡張期終末期圧の上昇と右室拡張期終末期圧の上昇を報告しており⁴⁾、左心不全から右心不全に至る両心不全がジストロフィーハムスターの末期病態であると考えられる。表2にはDMDとジストロフィーハムスターの末期病態を示す。ジストロフィーハムスターとDMDの約15%程度は心筋変性から左心不全、肺水腫、右心不全、全身浮腫に至る経路が考えられ、DMDの75%は呼吸筋変性より肺胞低換気に陥り、動脈血酸素分圧の低下から肺高血圧症が発生し、右心不全(肺性心)、全身浮腫へと進行するものと考えられる。この2つの

メカニズムの鑑別のために生存中のハムスターの動脈血ガス分析を試みたが成功しなかった。病理学的には左心不全の目安としては肺水腫や肺胞内心臓病細胞の有無がきめてとなる。この点については大部分の死亡ハムスターで前述の変化があったとされている⁵⁾。

以上、DMDとジストロフィーハムスターの最末期病態は、①ハムスターでは左心不全より生じた両心不全が主であること、②呼吸筋の変化は、ハムスターでは末期まで呼吸筋がよく保たれており、セントラル・コア変化も軽度である。以上の2点でDMDとは異なっている。

結 論

①ジストロフィーハムスター3匹の骨格筋、呼吸筋を組織化学的に検討した。

②ハムスターの横隔膜ではEST投与により筋変性が抑制されていることが示唆された。

③ハムスターの横隔膜では、筋変性およびコア変化が、Duchenne型筋ジストロフィーの呼吸筋に比較し軽度であった。

④ハムスターの死因は心筋変性による両心不全が主と考えられ、Duchenne型筋ジストロフィーの一部の症例に類似するものの、心筋の変

化は、ハムスターでは石灰化が強度であり、少なくとも両者が同一病態で死亡するのではないと考えられた。

参 考 文 献

- 1) 石原傳幸, 井上 満, 埜中征哉 他: 横隔膜筋に core 構造を認めた Duchenne 型筋ジストロフィーの1例, 神経内科, 12, 495-497, 1980.
- 2) 石原傳幸, 津谷恒夫, 半谷満太郎 他: Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における右心カテーター所見について, 厚生省神経疾患研究委託費, 「筋ジストロフィー症の疫学, 病態および治療開発に関する研究」昭和59年度研究成果報告書, 96~98, 1985.
- 3) 石原傳幸, 津谷恒夫, 半谷満太郎 他: Duchenne 型筋ジストロフィー呼吸筋の組織化学的検討, 厚生省神経疾患研究委託費, 「筋ジストロフィー症の疫学, 病態および治療開発に関する研究」昭和59年度研究成果報告書, 323~325, 1985.
- 4) Abelmann, W. H., Jeffrey, F. E. and Wagner, R.: Hemodynamics of the hereditary cardiomyopathy of Syrian hamsters, In. Myocardiology, 225-234, Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, 1972.
- 5) 木村正明: 私信, 1986.

13. 生検筋における rimmed vacuole の検討

石原 傳 幸*

研究協力者 儀 武 三 郎* 青 柳 昭 雄*

山 崎 徹 夫** 渡 辺 雄 幸***

はじめに

Rimmed vacuole (RV) は周知のように、1973年 Dubowitz と Brooke により、眼-咽頭型筋ジストロフィーに特異的な所見として報告された¹⁾。一方、1981年頃より RV を伴う遠位型ミオパチー (DMRV) の患者が、我が国で次々と報告され^{5,6,7)}、RV は盛んに研究されてきた。1984年には、木南、勝沼らにより、RV にカテプシン B と H が局在することが証明され、リソゾーム由来であることが強く示唆されるに至り⁸⁾、DMRV に対してリソゾームチオールプロテアーゼの阻害剤である E-64 による治療試験が開始されている。既に RV の形態学的検討は、福原、田辺らによりなされているが^{2,3,4)}、いかなる疾患で、RV がどの程度の比率で出現するかを知り、他の RV を伴う疾患群に対する E-64 による治療の応用の可能性を検討する目的で、多数の生検筋で再検討を行なった。また、ATPase 染色により筋線維タイプ別に RV の出現率を検討したので報告する。

対象と方法

1977年より1985年5月までに、国立療養所東埼玉病院で、筋生検の組織化学染色を施行

した290例を対象とした。症例の内訳は表1の通りで、神経原性疾患43例、筋原性疾患168例、神経筋接合部疾患1例、その他38例、総計290例である。Hematoxylin and eosin (H & E) 染色と、Gomori trichrome 変法染色のプレパラートを鏡検し、各疾患毎に RV の出現率を求め、また RV 陽性の症例については、各症例毎に、H & E 染色のプレパラートを50倍で写真撮影し、約720倍に引き伸ばして、筋線維総数および RV 陽性線維数を数え、その比率を求めた。数えた筋線維数は総計79,480本である。また、ATPase 染色 (routine および pH 4.6 と 4.3) のプレパラートを同様に写真撮影し、RV 陽性線維について

表1 対 象

1. 神経原性疾患	
A. 運動ニューロン疾患	31例
B. 末梢神経障害	12
2. 筋原性疾患	
A. 筋ジストロフィー	130
B. 筋炎	44
C. 先天性ミオパチー他	13
D. 内分泌性ミオパチー	11
E. ミオグロビン尿症他	5
F. 糖原病	2
G. 脂質代謝異常	0
H. その他	3
3. 神経筋接合部疾患	1
4. その他	38
総 計	290例

* 国立療養所東埼玉病院

** 清水市立病院小児科

*** 埼玉医科大学神経内科

Ⅲ 個体レベルにおける研究

表2 RVの出現頻度

1. 神経原性疾患		
A. 運動ニューロン疾患		
a. Werdnig-Hoffmann病	0/5例	0%
b. Kugelberg-Welander病	0/8	0
c. 脊髄性筋萎縮症	3/17	17.6
d. Kennedy-Alter-Sung型筋萎縮症	0/1	0
B. 末梢神経障害		
a. Charcot-Marie-Tooth病	0/8	0
b. 末梢神経炎	0/4	0
	神経原性疾患	3/43
2. 筋原性疾患		7.0
A. 筋ジストロフィー		
a. Duchenne型筋ジストロフィー	0/49	0
b. Becker型筋ジストロフィー	1/5	20.0
c. 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー	0/12	0
d. 遠位型筋ジストロフィー		
(1) 三好型	1/6	16.7
(2) DMRV	4/4	100
e. 肢帯型筋ジストロフィー	1/21	4.8
f. 先天性筋ジストロフィー	0/7	0
g. 眼筋型筋ジストロフィー	0/6	0
h. 眼-咽頭-遠位型ミオパチー	2/2	100
i. 筋緊張性ジストロフィー	3/18	16.7
B. 筋炎	3/44	6.8
C. 先天性ミオパチー	0/13	0
D. 内分泌性ミオパチー他	1/11	9.1
E. ミオグロビン尿症他	0/5	0
F. 糖原病Ⅱ型	2/2	100
G. 脂質代謝異常	0/0	
H. その他	1/3	33.3
	筋原性疾患	19/208
3. 神経筋接合部疾患	0/1	0
4. その他	0/38	0
総計	22/290	7.6

筋線維タイプ分類を行なった。DMRVの4例については全筋線維のタイプ分類も行ない筋線維タイプ別のRV出現率を検討した。

結 果

1) 各疾患別のRVの出現頻度(表2): 神経原性疾患では、脊髄性筋萎縮症(SPMA)で、17例中3例にRVが出現し、神経原性疾患の総計43例中3例(7.0%)にRVが認め

られた。筋原性疾患では、DMRVの4例以外に、Becker型筋ジストロフィー、三好型の遠位型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、眼-咽頭-遠位型ミオパチー、筋緊張性ジストロフィー、筋炎、内分泌性ミオパチー、糖原病Ⅱ型、Unknown proximal myopathyで、表2のような頻度でRVを認めた。筋原性疾患としては総計208例中19例(9.1%)にRVが出現し、総計、290例中22例

13. 生検筋における rimmed vacuole の検討

表3 各症例におけるRVの陽性率

	RV 陽性線維数/筋線維総数	RV 陽性率
1. DMRV 4例		
①T. A. 29才 M	453/5533本	8.19%
②S. M. 47才 F	102/3407	2.99
③S. T. 59才 M	53/3679	1.44
④H. F. 21才 F	16/11574	0.14
2. 眼-咽頭-遠位型ミオパチー 2例	3/1744&14/3356	0.17&0.42
3. 糖原病Ⅱ型 2例	112/10638&118/1551	1.05&7.61
4. 脊髄性筋萎縮症 3例	1/2971~6/1442	0.03~0.42
5. 筋緊張性ジストロフィー 3例	1/3686~2/1206	0.03~0.17
6. 筋炎 3例	1/3184~4/4821	0.03~0.08
7. その他 5例	1/6639~3/1102	0.02~0.27

表4 DMRV 4例の筋生検所見

	壊死	再生	タイプⅡC線維	細胞浸潤	封入体
①T. A. 29才 M	+	+	+	-	+
②S. M. 47才 F	+	-	-	-	-
③S. T. 59才 M	+	+	+	+	-
④H. F. 21才 F	-	-	-	-	-

表5 RV 陽性線維の筋線維タイプ分類

	タイプⅠ	タイプⅡA	タイプⅡB	タイプⅡC
1. DMRV 4例				
①T. A. 29才 M	203本(45%)	156(34%)	73(16%)	21(5%)
②S. M. 47才 F	85 (83%)	10(10%)	7(7%)	-
③S. T. 59才 M	23 (43%)	16(30%)	9(17%)	5(10%)
④H. F. 21才 F	11 (69%)	3(19%)	2(12%)	-
2. 眼-咽頭-遠位型ミオパチー 2例	2&6	1&6	0&2	-
3. 糖原病Ⅱ型 1例	22	20	70	-
4. 脊髄性筋萎縮症 3例	0&2&1	1&3&0	0&1&0	-
5. 筋緊張性ジストロフィー 3例	0&1&2	1&0&0	0&0&0	-
6. 筋炎 3例	3&0&1	0&0&0	0&1&0	1&0&0
7. その他 5例	0~1	0~1	0~2	-

(7.6%)にRVを認めた。Duchenne型筋ジストロフィーでは49例検索したが1例もRVは認められなかった。

2) RV陽性の症例における筋線維総数に対するRV陽性線維数の比率(表3):RV陽性の22症例について、各々、筋線維総数に対するRV陽性線維の占める比率を検討した。DMRVでは、各々、8.19%、2.99%、1.44%、

0.14%であり、眼-咽頭-遠位型ミオパチーでは、0.17%、0.42%であった。SPMAでは、0.03%、0.42%、0.05%であり、糖原病Ⅱ型では、7.61%、1.05%と高率であったが、その他の疾患では、0.02~0.27%と低率であった。

3) DMRV 4例の筋生検所見(表4):当然RVが主な病理所見であるが、DMRVでも、壊死、再生、タイプⅡC線維、細胞浸潤や封入

Ⅲ 個体レベルにおける研究

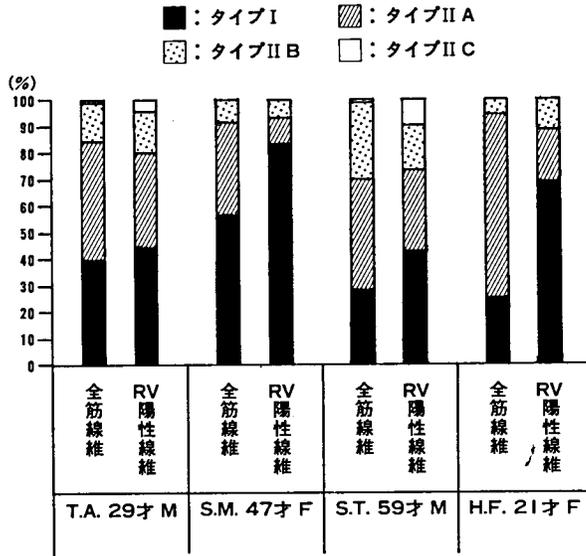


図1 筋線維タイプ別のRV陽性線維出現率 (DMRVの4例)

体を一部に認めるものもあり、それらの有無を表4に示した。また small angulated fiber が一部群をなして存在している所見も認められた。

4) RV陽性線維の筋線維タイプ分類(表5): ATPase染色(routineおよびpH4.6と4.2)のプレパラートを同様に写真撮影し、RV陽性線維について筋線維タイプ分類を行なった。なお糖原病Ⅱ型のうち1例はATPase染色が不良であり筋線維タイプ分類が不能であったため残りの21例について検討した。RVは全てのタイプの筋線維に出現し、またタイプⅡC線維のみられる症例においては、タイプⅡC線維にもRVが認められた。DMRVにおいては、4例ともタイプⅠ線維にRVが多く認められた。図1に示すようにDMRVにおいては、全筋線維のタイプ分類と比較してもタイプⅠ線維にRVが多く認められる傾向にあった。

考 案

最近、E-64によるDMRVの治療試験が開かれ、当班でも発表されている。しかし、他のRVを伴う疾患群に対してもE-64による治

療の応用が考えられるため、いかなる疾患でどの程度RVが出現するかの再検討が必要と考え、多数の生検筋でRVの出現率を検討した。RVの出現率は、田辺らの報告では、総計1,275例中43例(3.4%)⁴⁾で、福原の報告では、320例中12例(3.2%)²⁾であるが、我々の検索では、290例中22例(7.6%)であり、過去の報告に比べ高率に出現することがわかった。田辺らによると、DMRVの他、SPMAにおいて32.6%にRVを認めており、この2群においてより特異性が高いとされているが⁴⁾、我々の検索では、DMRVの他、眼-咽頭-遠位型ミオパチー2例共にRVを認めたが、SPMAにおいては17.6%であり、筋緊張性ジストロフィーやBecker型筋ジストロフィーとほぼ同程度の出現率を示した。また、田辺らによるとRVは下肢遠位筋に多く認められたと報告されているが、我々の検索では筋生検は全て上腕二頭筋で検索し、ミオパチーの因子を伴った症例のみ生検したのでこの差がでたものと思われる。また、Duchenne型筋ジストロフィーでは49例検索したが、他の報告例も併せて1例もRVは認められず、一般にRVは非特異

13. 生検筋における rimmed vacuole の検討

的に出現するとされているが、RV を認めない疾患群については特異性があることが示唆された。次に各症例毎に、筋線維総数に対する RV 陽性線維の率を検討してみると、福原の 12 例の検討では DMRV 3 例中 1 例は 14.4% と高い陽性率を示しているが、他の 2 例は 0.4%、0.5% と低率である。その他の疾患の RV 陽性率は 0.2~8.2% であったとしている²⁾。我々の検索では DMRV の 4 例中 3 例は他疾患に比べ高い陽性率を示しており、糖原病 II 型以外のその他の疾患では 0.02~0.42% であり福原の報告に比べ低い傾向にあった。福原の報告では筋線維総数および RV 陽性線維数の記載がないが、我々の検索の方が筋線維総数が多いためか、あるいは、RV 陽性線維が少ない症例も検索したためかもしれない。DMRV のうち RV 陽性率の低い 1 例については、罹病期間が約半年と短いためとも思われる。また、眼-咽頭-遠位型ミオパチーでは、2 例とも RV の出現を認めており、眼-咽頭-遠位型ミオパチーや、眼-咽頭型筋ジストロフィーでも、E-64 による治療を試みる価値があると思われる。今回、糖原病 II 型でみられた vacuole が、光顕所見上、RV と同様の形態を示したのでここに入れたが、これは電顕ではグリコーゲンを貪食している像であり、本来の RV とは違う可能性がある³⁾。したがって DMRV においては他疾患に比べ RV の出現率が高いと考えられる。また RV の出現率を実際に筋線維タイプ別に数えた報告は未だない。今回、我々の検索では全てのタイプの筋線維に出現したが、DMRV においては 4 例ともタイプ I 線維に多く認められる傾向にあった。しかしタイプ I 線維に多く認められる理由は現在不明であり今後の検討が必要と思われる。その他の疾患においては全てのタイプの筋線維に非特異的に出現し一定の傾向は認められなかった。

結 論

①今回 290 例の神経筋疾患生検筋において、22 例 (7.6%) に RV の出現を認めた。

②RV の出現には疾患特異性はないが、RV

を全く認めない疾患群もあった。

③DMRV では、RV の占める比率が、他疾患に比べ高率のものが多く認められた。

④RV は全てのタイプの筋線維に出現したが、DMRV においてはタイプ I 線維により多く認められる傾向にあった。

⑤眼-咽頭-遠位型ミオパチーや眼-咽頭型筋ジストロフィーにおいても E-64 による治療が有効の可能性がある。

御助言を頂きました国立武蔵療養所神経センター杉田秀夫先生、埜中征哉先生に深謝致します。

参 考 文 献

- 1) Dubowitz, V. and Brooke, M. H. : Muscle Biopsy, A Modern Approach (London; Saunders), 233, 1973.
- 2) Fukuhara, N., Kumamoto, T. & Tsubaki, T. : Rimmed Vacuoles, Acta Neuropathol. (Berl.), 51, 229, 1980.
- 3) 田辺 等, 内潟雅信, 小島 進, 松井孝道, 野沢胤美, 松原四郎: 筋病変における rimmed vacuole ないしはその類似所見について, 厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」(三好班) 昭和 57 年度研究報告書, 231, 1983.
- 4) 田辺 等, 内潟雅信, 小島 進, 松井孝道 他: "Rimmed vacuole 型 distal myopathy" と "rimmed vacuole を伴う緩徐進行性神経原性筋萎縮症群" との比較検討, 厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」(三好班) 昭和 58 年度研究報告書, 179, 1984.
- 5) Nonaka, I., Sunohara, N., Ishiura, S. and Satoyosi, E. : Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar (myeloid) body formation, Journal of the Neurological Sciences, 51, 141, 1981.
- 6) 水沢英洋, 中野今治, 井上聖啓, 高木昭夫, 万年 徹, 豊倉康夫: 筋線維に高度の空胞変性を伴った distal myopathy の一病型, 神経内科, 12, 40, 1980.
- 7) 吉良潤一, 藤井直樹, 石本進士 他: 筋線維に著明な空胞変性を伴う distal myopathy の一病型—自験 6 症例の検討, 臨床神経, 22, 594, 1982.
- 8) 木南英紀, 勝沼信彦 他: Rimmed vacuole を

Ⅲ 個体レベルにおける研究

伴う distal myopathy におけるカテプシン B 及び H の局在, 厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の臨床病態と成因に関する研究」昭和

59 年度研究報告書, 271, 1985.
9) 福原信義: 筋疾患にみられる vacuole, 神経内科, 20, 613, 1984.

14. EST による実験的クロロキンミオパチーの治療効果

杉田 秀夫*

研究協力者 樋口 逸郎* 石浦 章一* 佐野 元規**
伊井 邦雄*** 木南 英紀**** 勝沼 信彦****

実験的クロロキンミオパチーに対する EST の予防効果については、すでに EST 約 60~90 mg/kg/day 投与により発症抑制が可能であることを報告している¹⁾。今回我々は臨床的にも使用可能である少量投与による予防効果および発症後の治療効果について検討した。また、システインプロテアーゼがクロロキンミオパチーの発症に関与することを証明するため、カテプシン B および H の抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。

方 法

雄のウィスターラット (体重 200~250 g) 52 匹を 3 群に分け、A 群 41 匹にはクロロキン (以下 CQ) 50 mg/kg/day を連日腹腔内へ投与し、B 群 6 匹には CQ 投与とともに餌に 0.025% EST を混合して投与した。C 群 5 匹は対照とし CQ の代わりに生食を連日腹腔内へ投与した。8 週後まで生存した A 群 32 匹、B 群 5 匹のうち各々 9 匹、5 匹を断頭しひらめ筋について予防効果を検討した。C 群 5 匹と A 群の残り 23 匹は治療実験に移行し、A 群はさらに 4 群に分けた。a₁ 群 5 匹は CQ の投与を続行し、a₂ 群 10 匹は CQ 投与を続けるとともに EST の経口投与を開始した。a₃ 群は CQ を

中止し自然回復を観察し、a₄ 群は CQ を中止したうえ EST を投与した。治療開始後 5 週まで生存した a₁ 群 4 匹、a₂ 群 9 匹、a₃ 群 3 匹、a₄ 群 4 匹、C 群 4 匹のラットを断頭し、ひらめ筋について治療効果を判定した。実験方法を表 1 に一括して示した。

臨床的に効果を判定するため、まずラットの体重を毎朝測定し各群の体重変動を比較した。また、各ケージ毎の摂食量を毎週計量し平均 EST 投与量を計算した。平均 EST 投与量は約 10 mg/kg/day であった。予防実験開始後 8 週および治療実験開始後 5 週にラットを断頭しひらめ筋を採取し、左側は形態学的に検討し、右側は湿重量を測定するとともに生化学的分析を行った。形態学的には 10 μ の凍結切片に一連の各種組織学的ならびに組織化学的染色を行い比較するとともに、HE 染色標本について筋線維を 200 本ずつ数え、光顕的に空胞の認められる筋線維の頻度を調べ定量的に比較した。生化学的にはひらめ筋の湿重量の 10 倍量の phosphate buffered saline-0.1% Triton X-100 (pH 7.4) を加えてホモジナイズし、8,000 × g、15 分の遠沈後上清について既報のごとく各種リソゾーム酵素活性を測定した²⁻⁴⁾。

免疫組織化学的検討は、CQ 50 mg/kg/day を 1 週間腹腔内投与して作成した CQ ミオパチー発症早期のラットひらめ筋を用いて行なった。カテプシン B および H はラットの肝臓より精製し⁵⁾、石川らのマレイミド法⁶⁾を用いて抗カテプシン B および抗カテプシン H ペルオキ

* 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部
** 東京医科歯科大学神経内科
*** 徳島大学医学部第一病理
**** 徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素化学部門

Ⅲ 個体レベルにおける研究

表1 予防実験および治療実験のプロトコール

実験動物：雄のウィスターラット 52 匹 (体重 200~250 g)	
クロロキン (CQ) : 50 mg/kg/day, 連日腹腔内投与	
EST : 10 mg/kg/day, 経口投与 (餌に混合)	
対照群：生理食塩水を連日腹腔内投与	
予 防 実 験 8 週 間	治 療 実 験 5 週 間
A. 41 (C Q の み) → 32	5 (a ₁ : CQ のみ) → 4
	10 (a ₂ : CQ+EST) → 9
	4 (a ₃ : CQ 中止, 普通食) → 3
	4 (a ₄ : CQ 中止, EST 食) → 4
	9 (断頭)
B. 6 (C Q + E S T) → 5	5 (断頭)
C. 5 (対 照 群) → 5	→ 4

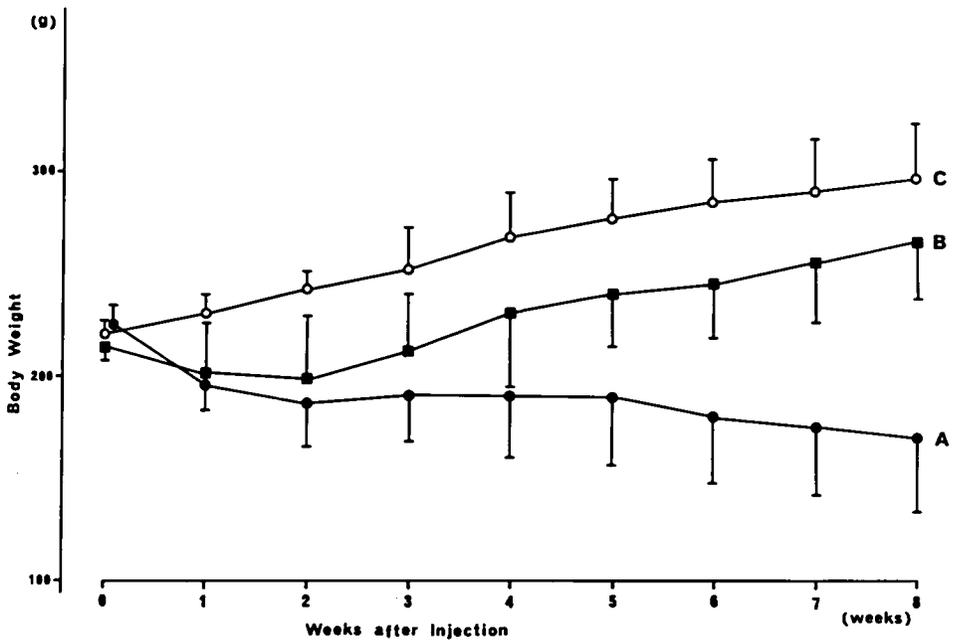


図1 予防実験における体重変動曲線 (平均値と標準偏差を示す)

シダーゼ標識 Fab' を作成した。免疫組織化学法は既報のごとく⁷⁾直接法にて施行した。

結 果

予防実験における体重変動曲線を図1に示した。CQのみを投与したA群ラットの体重は

次第に減少したが、ESTを併用投与したB群では投与当初一時減少するが3週目頃から増加し始め対照であるC群の体重に近づき、8週後A、B群間の平均体重は有意差を示した (P<0.005)。また、治療実験における体重変動は図2に示すようにCQのみを続行したa₁

14. EST による実験的クロロキンミオパチーの治療効果

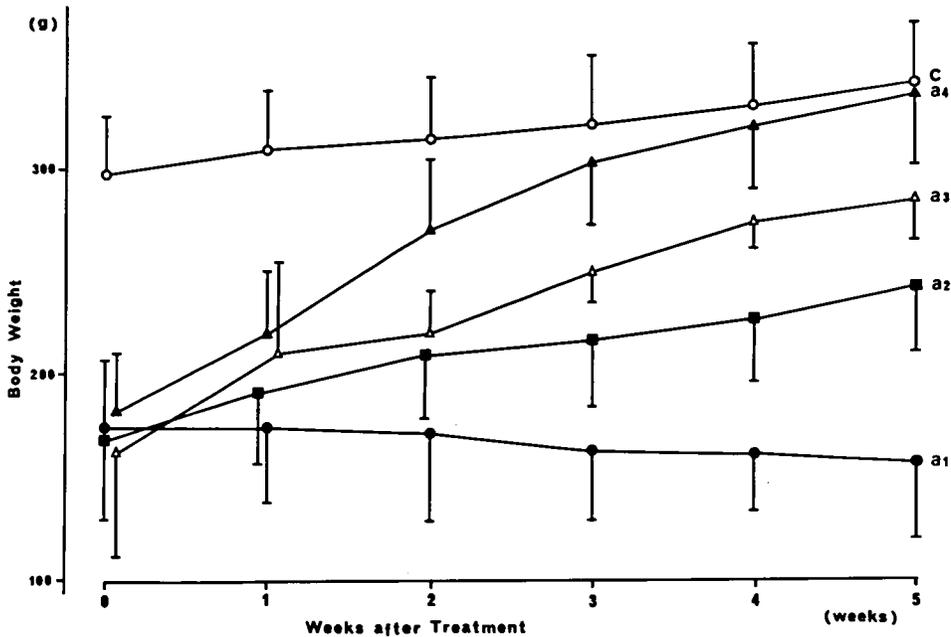


図2 治療実験における体重変動曲線 (平均値と標準偏差を示す)

群の平均体重はさらに徐々に減少するが、CQ とともに EST の投与を開始した a₂ 群では体重は増加し始め、5 週後 a₁ 群と a₂ 群の体重は有意差を示した (P<0.005)。CQ 投与を中止した a₃ 群と a₁ 群はともに速やかな体重の回復を示し対照群の体重に接近した。ひらめ筋の湿重量は表 2 に示すように A 群と B 群で有意差を認めた (P<0.005)。また、治療実験においても a₁ 群と a₂ 群は有意差を示した (P<0.025)。形態学的検討では、CQ 投与のみを 8 週間続行した A 群のラットには例外なく、vacuolar myopathy の発症が認められた (図 3A)。また、acid phosphatase 染色で活性が著明に亢進していた (図 3B)。CQ とともに EST を併用投与した B 群ラットのひらめ筋では、CQ ミオパチーの発症は著明に抑制されており (図 3C)、acid phosphatase 活性も抑制されていた (図 3D)。治療実験においては、CQ のみを 3 ヶ月間投与した a₁ 群では A 群で認められた vacuolar myopathy はさらに進行していた (図 4A, B)。CQ とともに EST 投与を開始し

た a₂ 群では、治療開始後 5 週には CQ ミオパチーは著明に改善していた (図 4C, D)。CQ 投与を中止した a₃ 群、a₄ 群ではミオパチーは軽快し、軽度の筋線維大小不同を認める程度に回復していた。各群ラットのひらめ筋において光顕的に空胞の認められる筋線維の頻度は、A 群 62.1±8.4%、B 群 8.3±5.9%、a₁ 群 69.6±5.0%、a₂ 群 13.6±10.9% であり A 群と B 群および a₁ 群と a₂ 群の間にそれぞれ有意差が認められた (P<0.005)。生化学的分析の結果は表 2 に示すように、CQ の長期投与により A 群および a₁ 群では各種リソゾーム酵素活性が著明に亢進していた。予防実験で EST を併用投与した B 群ではリソゾーム酵素活性の上昇は A 群に比べ著明に抑制されていた。治療実験においても EST 投与を開始した a₂ 群では a₁ 群に比べリソゾーム酵素活性は低下していた。免疫組織化学的検討の結果、図 5 に示すように CQ ミオパチー発症早期のラットひらめ筋において、空胞形成の初期と思われる部分がカテプシン B の抗体により陽性に染色された。

Ⅲ 個体レベルにおける研究

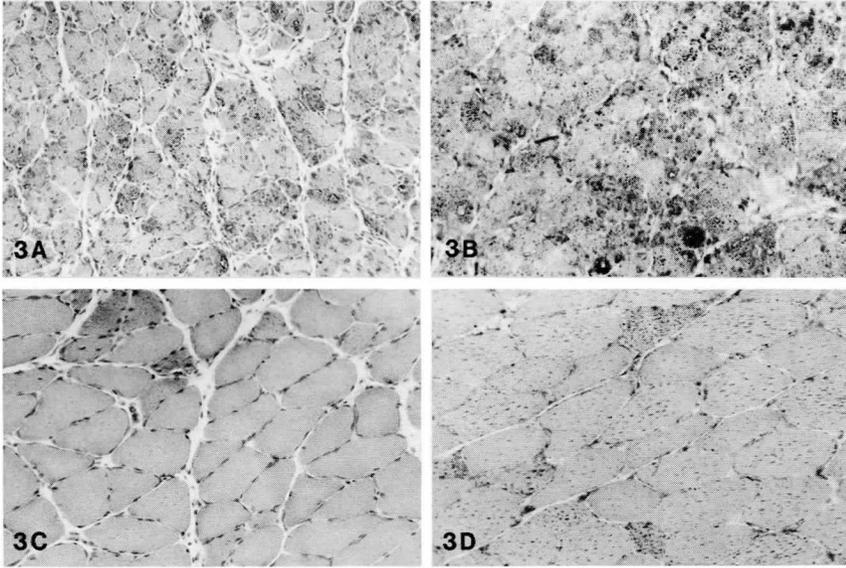


図3 予防実験終了後のラットひらめ筋
A : A群ラット, HE染色 ×200
B : A群ラット, acid phosphatase染色 ×200
C : B群ラット, HE染色 ×200
D : B群ラット, acid phosphatase染色 ×200

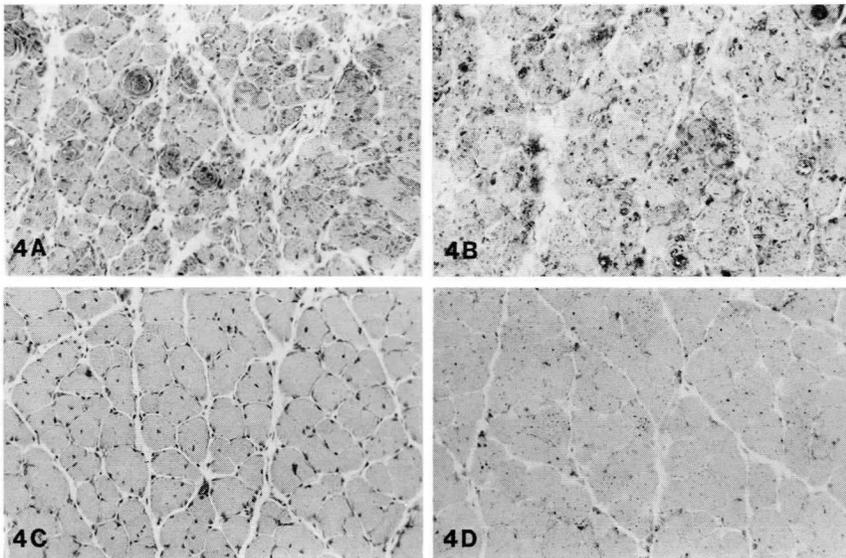


図4 治療実験終了後のラットひらめ筋
A : a₁群ラット, HE染色 ×200
B : a₁群ラット, acid phosphatase染色 ×200
C : a₂群ラット, HE染色 ×200
D : a₂群ラット, acid phosphatase染色 ×200

14. EST による実験的クロロキンミオパチーの治療効果

表2 リソゾーム酵素活性およびひらめ筋の湿重量に対する EST の効果

酵素活性は上清の蛋白 1 mg あたりの活性を示す (U/mg)

1 : 1U=0.308 nmol/h.

2 : 1U=0.154 nmol/h.

3 : 1U=0.658 nmol/h.

4 : 1U=ΔA₄₀₅/30 min.

Group (Number)	A (9)	B (5)	a ₁ (4)	a ₂ (9)	a ₃ (3)	a ₄ (4)	C (4)
Cathepsin B & L ¹	0.14 ± 0.02	0.04 ± 0.02**	0.25 ± 0.12	0.07 ± 0.03**	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.003	0.03 ± 0.007
Cathepsin H ²	0.43 ± 0.06	0.20 ± 0.10**	0.35 ± 0.05	0.36 ± 0.08	0.23 ± 0.06	0.19 ± 0.03	0.10 ± 0.003
α-Glucosidase ³							
pH 4.0	3.54 ± 0.26	2.25 ± 0.54**	3.83 ± 0.87	2.84 ± 0.28**	1.83 ± 0.22	1.83 ± 0.22	1.18 ± 0.10
pH 6.5	3.12 ± 0.29	2.20 ± 0.46*	3.59 ± 0.42	3.01 ± 0.32*	2.66 ± 0.15	2.80 ± 0.16	2.09 ± 0.16
Acid phosphatase ⁴	0.22 ± 0.02	0.11 ± 0.02**	0.30 ± 0.06	0.15 ± 0.03**	0.10 ± 0.002	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.07
Protein (mg/ml)	1.73 ± 0.40	3.51 ± 0.41**	1.52 ± 0.26	2.40 ± 0.49**	4.65 ± 0.15	5.31 ± 0.67	7.17 ± 0.65
Wet weight of right soleus muscle (g)	57.6 ± 10.6	116.6 ± 19.1**	69.0 ± 6.8	88.3 ± 13.4*	133.3 ± 10.7	132.8 ± 27.2	164.0 ± 14.4
Mean ± S. D.	* p < 0.025, ** p < 0.01 : group A and B. • p < 0.025, ** p < 0.01 : group a ₁ and a ₂ .						



図5 クロロキンミオパチー発症早期のラットひらめ筋のカテプシン B 抗体による免疫組織化学 ×700。
筋鞘下に小さな rimmed vacuole の形成がみられ、その部に一致して陽性所見がみられる (矢印)。

また、カテプシン H の抗体による染色でも同様の結果が得られた。

考 察

経口投与された EST は腸管壁から吸収され

E-64-c に変換されるが、E-64-c は in vitro においてシステインプロテアーゼ、特にカテプシン B & L を著明に抑制することが報告されている⁸⁾。予防実験において CQ とともに EST を併用投与した B 群のラットは、臨床的、形態学的、生化学的にミオパチーの発症は著明に抑制されており、EST 10 mg/kg/day という少量投与によっても CQ ミオパチーは充分予防できることが明らかとなった。治療実験においては、CQ 50 mg/kg/day を 8 週間連日腹腔内投与したラットを CQ ミオパチーとして用いた。この方法によると 100% CQ ミオパチーを作成しうることがすでに確認されており⁹⁾、今回の A 群のラットでも 8 週後に断頭したものは全例 vacuolar myopathy が認められた。EST の併用投与を開始した a₂ 群では CQ のみの a₁ 群と異なり体重が増加し始め 5 週後には有意差を示し、形態学的にも vacuolar myopathy は著明に改善していた。生化学的にも a₂ 群では各種のリソゾーム酵素活性は有意に抑制され、特にカテプシン B & L の抑制効果

が著明であった。これらの実験結果より、EST 10 mg/kg/day の経口投与は CQ ミオパチーの予防効果のみならず、著明な治療効果を示していることは明らかである。カテプシン B および H の抗体を用いた免疫組織化学的検討にて CQ ミオパチー発症早期のひらめ筋において、空胞の形成初期と思われる部分が陽性に染色されたことより、これらのシステインプロテアーゼは CQ ミオパチーの rimmed vacuole 形成に一次的に関与しているものと考えられる。したがって EST による CQ ミオパチーの予防および治療効果の発現は、autolysosome に由来するカテプシンの上昇を EST が抑制することにより筋蛋白分解を抑えるという機序を介するものと想定される。Rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチーにおいても CQ ミオパチーと同様にリソゾーム酵素活性は上昇し、かつ rimmed vacuole の周辺がカテプシン B および H の抗体で染色されることが報告されており¹⁰⁾、類似の発症機序が関与するものと考えられる。今回、EST 10 mg/kg/day という臨床投与が充分可能な少量投与でも CQ ミオパチーの治療効果が認められたことより、rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチーのような autophagic vacuole の形成を主体とするミオパチーに対しても EST の効果が大きいと期待されるものと思われる。

文 献

1) 杉田秀夫, 佐野元規, 石浦章一: 実験的クロロキンミオパチーにおける EST の効果, 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 59 年度研究報告書, 123, 1985.
 2) Ishiura, S., Nonaka, I., Nakase, H., Tada, A. and Sugita, H.: Two-step mechanism of myofibrillar protein degradation in acute plasmocid-induced

muscle necrosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **798**, 333, 1984.
 3) Taga, E. M. and Van Etten, R. L.: Human liver acid phosphatases: Purification and properties of a low-molecular-weight isozyme, *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 505, 1982.
 4) De Barsey, J., Jacquemin, P., Devos, P. and Hers, H. G.: Rodent and human acid α -glucosidase purification, properties and inhibition by antibodies. Investigation in type II glycogenosis, *Eur. J. Biochem.*, **31**, 156, 1972.
 5) Kominami, E., Tsukahara, T., Bando, Y. and Katunuma, N.: Distribution of cathepsin B and H in rat tissues and peripheral blood cells, *J. Biochem.*, **98**, 87, 1985.
 6) Ishikawa, E., Imagawa, M., Hashida, S., Yoshitake, S., Hamaguchi, Y. and Ueno, T.: Enzyme-labelling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining, *J. Immunoassay*, **4**, 209, 1983.
 7) Kominami, E., Bando, Y., Ii, K., Hizawa, K. and Katunuma, N.: Increase in cathepsin B and L and thiol proteinase inhibitor in muscle of dystrophic hamsters. Their localization in invading phagocytes, *J. Biochem. (Tokyo)*, **96**, 1841, 1984.
 8) Barret, A. J., Kambhavi, A. A., Brown, M. A., Kirschke, H., Knight, C. G., Tamai, M. and Hanada, K.: L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitor of cysteine proteinases including cathepsin B, H and L, *Biochem. J.*, **201**, 189, 1982.
 9) 佐野元規: 実験的クロロキンミオパチーの生化学的研究—第 1 報, *臨床神経*, **25**, 627, 1985.
 10) Ii, K., Hizawa, K., Nonaka, I., Sugita, H., Kominami, E. and Katunuma, N.: Abnormal increases of lysosomal cysteine proteinases in rimmed vacuoles in the skeletal muscle, *Am. J. Pathol.*, **122**, 464, 1986.

IV 臨床試験

15. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する
EST の臨床的検討宮武 正
16. EST 臨床試験石原 傳幸
17. Duchenne 型筋ジストロフィーに対するシステインプロテアーゼの
特異的阻害剤 EST の効果中野 今治
18. EST 臨床試験初期報告書松原 四郎
19. Distal myopathy with rimmed vacuole に対する
EST の臨床試験杉田 秀夫, 宮武 正

15. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する EST の臨床的検討

宮 武 正*

研究協力者 桑 原 武 夫** 西 澤 正 豊**

緒 言

筋ジストロフィー症は、進行性の遺伝性疾患で臨床症状は病型により異なるが、中でも Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、患者数も各病型のうち最も多く症状も重篤で、2~4 才より発症し次第に運動能力が低下し、10 才前後で歩行不能となり 20 才前後には主として呼吸機能および循環機能障害によって死に至る。

発症の原因については、これまで神経原説 (自律神経説)、血管説、筋原説等が提唱され、治療法に関しても ATP 製剤、ビタミン剤、ホルモン剤等について検討されたが、未だ有効と思われる治療法は見出されていない。

近年では、筋膜の形態学的異常や膜構成成分の生化学的異常所見等から、膜系の異常により多量の Ca が細胞内に流入し、Ca の存在下で活性化される蛋白分解酵素 (Ca 依存性中性プロテアーゼ; CANP) が活性化され筋原線維に変性が生じ、筋崩壊が進行するとする膜異常説 (膜損傷説、膜脆弱説) が世界の趨勢となっている。よって、膜の安定化作用を持つ薬剤や、Ca の筋細胞内への流入を阻止する薬剤あるいは CANP の活性を阻害する薬剤によって症状の進行を阻止あるいは抑制できると考えられる。

EST (図 1) は、筋ジストロフィー症の治療薬として開発が進められているシステインプロテアーゼの特異的阻害剤である。本剤は、筋蛋白分解に関与する CANP, カテプシン B, L, H 等のシステインプロテアーゼに対し特異的な阻害作用を有し¹⁾、筋ジストロフィーモデル動物に対しても症状進行の抑制ならびに延命効果を示すことが確認されている^{2,3)}。

一方、安全性については、種々の動物試験の結果、ラットにのみ種特異的な肝臓への影響ならびに催奇形性が認められた以外特記すべき毒性はなかったと報告されている^{4,5)}。

また、健常成人男子および筋疾患患者 (成人および小児) を対象とした第 1 相臨床試験においても、安全性に本質的な問題は認められず、治療試験実施の妥当性が示されている。

今回我々は、DMD に対する本剤の臨床的有用性を検討したので報告する。

対象および投与方法

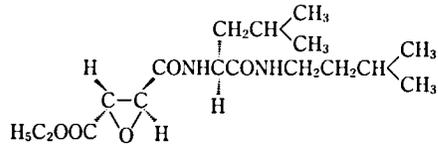
1. 対象

国立療養所新潟病院に入院中の 24 名の DMD 患児を対象とした (表 1)。患児は全て男児であり、兄弟例を 1 家系含む。長期試験は 10 名で平均年齢 10.1±2.0 才、障害度は 1 度 1 名、2 度 6 名、4 度 1 名、5 度 2 名であった。短期試験は 14 名で平均年齢 12.9±2.7 才、障害度 (Stage) は 2 度 1 名、5 度 6 名、6 度 7 名と長期試験に比べ、比較的障害度の進んだ患児を対象とした。

* 新潟大学脳研究所神経内科

** 国立療養所新潟病院神経内科

IV 臨床試験



Ethyl (+)-(2S,3S)-3-[(S)-3-methyl-1-(3-methylbutylcarbamoyl)-butylcarbamoyl]-2-oxiranecarboxylate

図1 ESTの化学構造式

表1 患者の背景

試験	症例 No.	年齢 (才)	障害度 (Stage)	体重 (kg)	投与量 (mg/kg/日)	
					開始時	増量後
長期	201	9	5	21.5	100	200
	202	12	5	36.0	150	300
	203	14	2	36.0	150	300
	204	9	2	18.2	75	150
	205	11	2	40.0	175	300
	206	9	4	19.5	75	150
	207	12	2	37.8	150	300
	208	8	1	19.3	75	150
	209	9	2	20.1	75	150
	210	8	2	27.4	75	150
平均 ± S. D.		10.1 ± 2.0	/	27.6 ± 8.9	110 ± 41	215 ± 75
短期	601	11	5	19.5	75	150
	602	12	5	34.0	150	300
	603	12	5	36.5	150	300
	604	10	5	23.5	100	200
	605	12	5	28.2	125	250
	606	17	5	36.0	150	300
	607	9	2	17.0	75	150
	608	12	6	28.0	125	250
	609	14	6	28.0	125	250
	610	14	6	25.0	125	250
	611	17	6	42.0	175	350
	612	18	6	37.5	150	300
	613	11	6	44.4	175	350
	614	12	6	30.5	125	250
平均 ± S. D.		12.9 ± 2.7	/	30.7 ± 8.1	129 ± 32	250 ± 55

15. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する EST の臨床的検討

表 2 検査項目

マニュアルテスト	
筋力テスト (MMT) : 13種 計24項目 ^{*1}	
関節可動域 (ROM) テスト : 11種 計22項目 ^{*1}	
機能テスト : 5項目 ^{*1}	
日常生活動作 (ADL) テスト : 25項目	
臨床検査	
血液一般検査 : 赤血球数, 白血球数, ヘモグロビン, ヘマトクリット, 血小板数, 白血球分類	
血清電解質検査 : Na, K, Cl, Ca, P	
血液生化学検査 : CK, GOT, GPT, Al-P, γ -GTP, LDH ^{*2} , ICDH ^{*3} , 総ビリルビン, BUN, クレアチニン, 総コレステロール, トリグリセライド, 総蛋白	
尿 検 査 : 糖, 蛋白, ウロビリノーゲン, 沈渣, クレアチニン (CRN) ^{*3} , クレアチン ^{*3} , 3-メチルヒスチジン (MH) ^{*3}	
そ の 他 : 一般症状, 心・肺機能, 体重	

*1 : 長期試験のみ実施

*2 : 集中測定

*3 : 集中測定 (長期試験 : 24時間蓄尿, 短期試験 : 起床時早朝尿)

表 3 総合評価一覧

症例 No.	総合効果	副作用	有用性	
長期試験	201	やや有効	無	有用
	202	無効	無	有用性なし
	203	やや有効	無	やや有用
	204	無効	無	有用性なし
	205	やや有効	嘔吐	やや有用
	206	やや有効	無	やや有用
	207	やや有効	γ -GTP の軽度上昇	やや有用
	208	やや有効	無	有用
	209	やや有効	無	やや有用
	210	やや有効	嘔気・嘔吐	有用
短期試験	601	無効	無	どちらともいえない
	602	無効	γ -GTP の軽度上昇	どちらともいえない
	603	やや有効	無	やや有用
	604	やや有効	無	やや有用
	605	やや有効	無	やや有用
	606	やや有効	無	どちらともいえない
	607	有効	無	有用
	608	無効	無	どちらともいえない
	609	無効	無	どちらともいえない
	610	無効	無	どちらともいえない
	611	やや有効	無	やや有用
	612	無効	無	どちらともいえない
	613	無効	γ -GTP, ICDH 軽度上昇	どちらともいえない
	614	やや有効	無	やや有用

IV 臨床試験

表4 障害度の推移（長期試験）

症 例 No	開始 時 年 齢	障 害 度 の 推 移							
		0	4	12	24	36	48	(12)	(24)(週)
		4mg/kg/日				8mg/kg/日			
201	9才10ヶ月	5	5	5	5	5	5	5	5
202	12才6ヶ月	5	5	5	5	5	5	5	5
203	14才2ヶ月	2	2	2	2	3	4	4	4
204	9才7ヶ月	2	4	4	4	4	5	6	6
205	11才11ヶ月	2	2	2	2	2	2	2	2
206	9才9ヶ月	4	4	4	5	5	5	5	5
207	12才10ヶ月	2	2	2	2	2	2	3	5
208	8才8ヶ月	1	1	2	2	2	2	2	2
209	9才6ヶ月	2	2	2	2	2	2	2	2
210	8才4ヶ月	2	2	2	2	2	2	2	2

2. 投与方法・投与期間

EST25 mg カプセル, 50 mg カプセルおよび10%顆粒を用いた。

長期試験では、昭和59年5月より、ESTを約4 mg/kg/日朝食後投与した。開始後約1年で約8 mg/kg/日に増量し、朝夕の2回に分け食後投与した。

短期試験においては、昭和60年6月より、ESTを約4 mg/kg/日の割合で投与し、5週間後より約8 mg/kg/日(分2)に増量した。

3. 併用薬剤・併用療法

併用薬剤としては、カルシウム拮抗剤は併用しないこととし、すでに投与中の症例については1ヶ月間のwash out期間を設けた。その他の薬剤は、原則として用法・用量を変更せずに投与を継続した。また、従来より行っている理学療法もそのまま継続した。

4. 観察項目および観察方法

予め決められた試験計画書に従い、定められた項目について観察した(表2)。なお試験期間を通じ同一患児の評価は可能な限り同一検査者が行った。

5. 効果判定

効果判定については、PT、看護婦および患児の両親を参考にしながら担当医師が行った。総合効果は、「著効」、「有効」、「やや有効」、「無効」の4段階で、また、安全性については試験期間中に発現した副作用および臨床検査値の推移を考慮して、全般的な安全性を、「副作用なし」、「軽度の副作用」、「中等度の副作用」、「高度の副作用」の4段階で評価した。有用性については、総合効果、安全性を総合的に考慮し、「極めて有用」、「有用」、「やや有用」、「どちらともいえない」、「有用性なし」の5段階

15. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する EST の臨床的検討

表 5 障害度の推移 (短期試験)

症 例 No	開 始 時 年 齢	障 害 度 の 推 移			
		0	2	4	(12) (週)
601	11才	5	5	5	5
602	12才3ヶ月	5	5	5	6
603	12才5ヶ月	5	5	5	5
604	10才8ヶ月	5	5	5	5
605	12才	5	5	5	5
606	17才3ヶ月	5	5	5	5
607	9才2ヶ月	2	2	2	2
608	12才6ヶ月	6	6	6	6
609	14才5ヶ月	6	7	7	7
610	14才8ヶ月	6	7	7	7
611	17才2ヶ月	6	6	6	6
612	18才10ヶ月	6	7	7	7
613	11才4ヶ月	6	6	6	6
614	12才3ヶ月	6	6	6	6

で評価した。

結 果

各症例についての現時点における評価を表 3 に一括して示した。総合評価は有効 1 例 (4.2%), やや有効 14 例 (58.3%), 無効 9 例 (37.5%) であった。また, Stage の推移, MMT, ADL 総点数の推移, 主な臨床検査値の推移を表 4, 5, 図 2, 3 に示した。

以下に各症例について述べる。

症 例 201 : 9 才 10 ヶ月
(昭和 49 年 6 月 13 日生)
3 才発症で 9 才で Stage 5 となったが, これ

は下肢の筋力低下によるものではなく下肢関節の拘縮が早期に進行して歩行不能になったためのものである。

治験開始後, 肘屈曲が 3⁺→3⁻, 肘伸展が 3⁻→2 と低下した他は上肢遠位筋, 下肢筋の筋力には特に変化がなく, ADL score も開始時 50 点以下であったが, DMD の自然経過では考えられないレベルの状態では低下が停止しており, EST が何らかの効果を現わしたものと思われる。また歩行スピードの変化についても同様のことがいえる。

正常範囲内 (0~60) ではあるが検査上 γ-GTP が軽度上昇傾向 (8→17) にあり, 今後観察が必要と考える。

IV 臨床試験

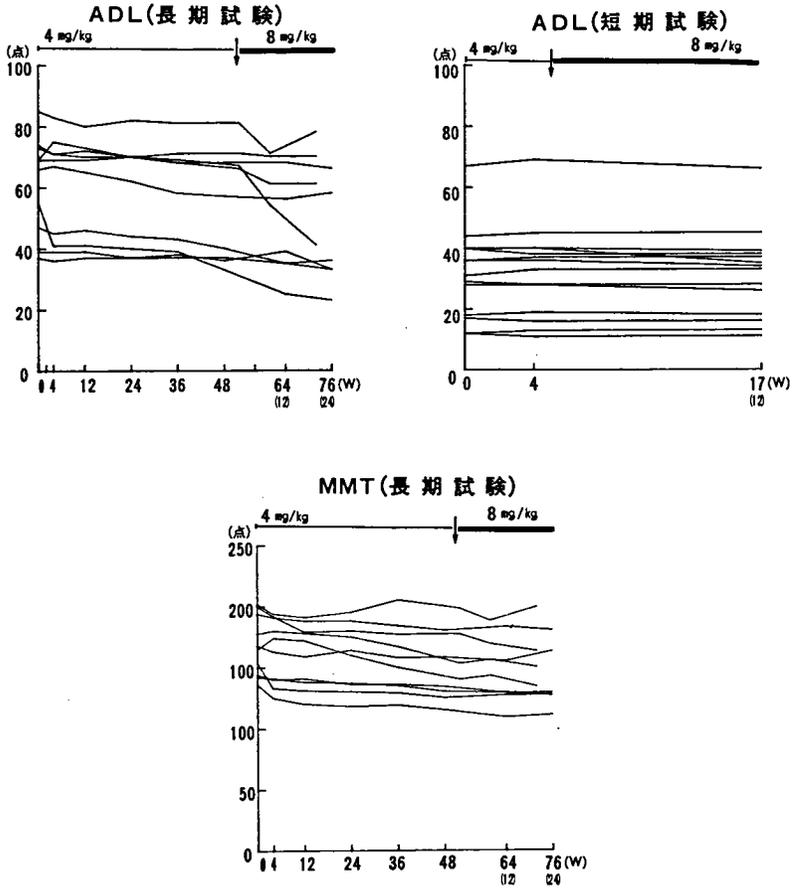


図2 ADL, MMT の推移

症例 202: 12才6ヶ月

(昭和46年10月31日生)

3才発症, 12才で歩行不能となった。一年8ヶ月とはほぼ平均的期間で Stage 5 を通過して Stage 6 に入っている。

治験開始後, 肩外転 3⁻→2⁻, 肘伸展 3→2⁺, 股関節屈曲 2→2⁻ など筋力低下の進行が認められるが, 進行は平均的な自然経過をとっていると判断される。

体重 over があり, これが ADL の一因となっていると思われるもののほぼ自然の進行に従っていると判断され, 今のところ有用とはいえない。

正常範囲内ではあるが, γ -GTP が上昇傾向 (11→20) にあり, 今後観察が必要と考える。

症例 203: 14才2ヶ月

(昭和45年2月25日生)

10ヶ月で処女歩行したが, 1才7ヶ月より歩行障害が出現した。下腿筋の pseudohypertrophy, 筋電図上の筋原性変化, CK 高値を認め, 発症後の進行がきわめて緩徐であり高度の mental retardation を伴ってはいるが, Duchenne 型と考えられる症例である。13才で Stage 2, 15才で Stage 3→4, 現在自力歩行は不能で Stage 5 となっているが下腿筋力は低下しておらず, 歩行不能となったのは筋力低下のためでなく股関節の屈曲・拘縮が進行して lumbar lordosis で代償できなくなったためと考えられる。

治験開始後, 肩外転が 3⁻→2⁺ と低下した他

15. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する EST の臨床的検討

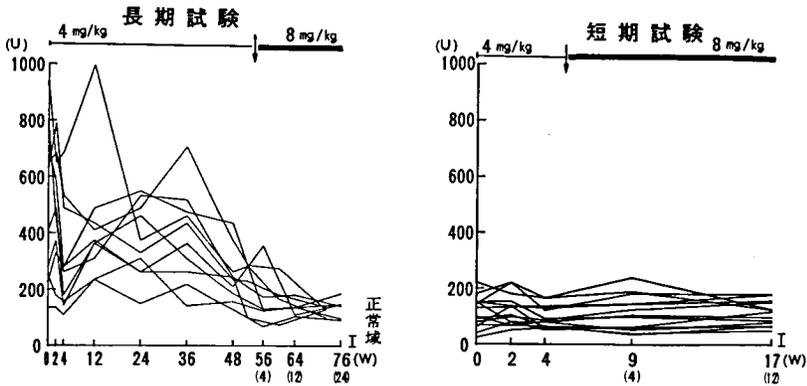


図3-1 臨床検査値の推移 (CK)

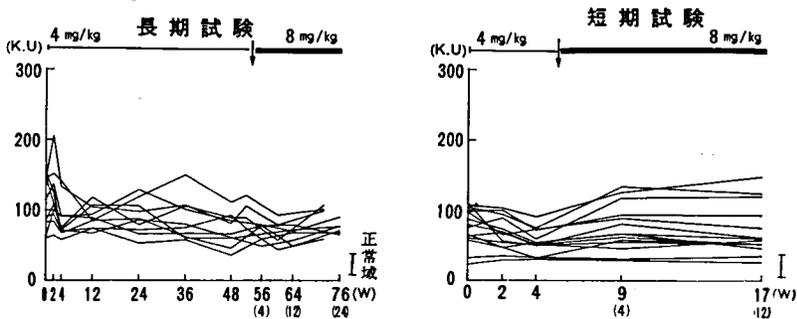


図3-2 臨床検査値の推移 (GOT)

は筋力に著変なく quadriceps も 3⁺~4⁻ と保たれている。

正常範囲内ではあるが検査上 γ -GTP が漸増傾向(8→22)にあり、今後観察が必要と考える。

症例 204 : 9才7ヶ月

(昭和49年10月6日生)

処女歩行2才で歩行開始遅延がある。EST投与前後で Stage2→4→5→6 と進行がかなり rush であり、ADL score も 55→23 点とかなり進行している。本 case では進行も速く EST が効を奏したとは思えない。

正常範囲内であるが γ -GTP の軽度上昇 (9→22) を認める。他の胆道系 enzyme に異常を認めないが観察を要すると考える。

症例 205 : 11才11ヶ月

(昭和47年5月14日生)

発症5才、9才で Stage 1→2 へ移行、その後現在まで Stage 2 である。この間 ADL score は、8才88点、12才71点、13才5ヶ月66点と EST を投与前後で著変は認められない。MMT も deltoid 3⁺→3⁻、hamstrings 4⁺→3⁺ 以外の諸筋では殆ど変化を認めず、進行が停止しているかの様である。

経過は全体が緩徐であるが、かなりの期間 Stage 2 が維持されており、EST 投与前後で ADL に変化がなく、筋力も殆ど低下していない点は注目に値する。

EST 投与直後、嘔吐を認めたが、投与時間・方法の変更で症状は消失した。正常範囲内ではあるが、 γ -GTP が軽度上昇傾向 (6→14)

IV 臨床試験

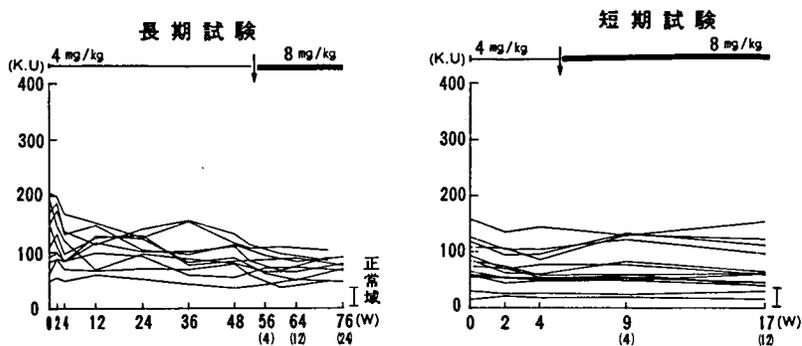


図3-3 臨床検査値の推移 (GPT)

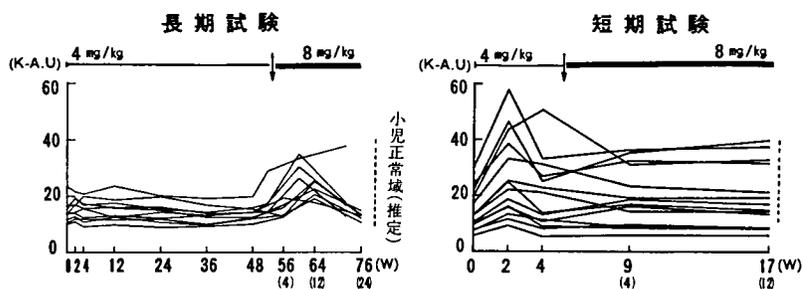


図3-4 臨床検査値の推移 (AI-P)

にあり、今後注意を要する。

症例 206：9才9ヶ月
(昭和49年8月6日生)

同胞内発症は認められない。1才3ヶ月で診断確定、8才階段昇り不能、9才頃より立ち上がり不能、10才で歩行不能となる。EST投与後 Stage 4→5 と低下した。しかし、ADL score は47→33点と著変を認めない。

筋力低下も認めるが、全体の経過としては Stage 4 が9ヶ月と比較的長期間維持された。Stage 3→4 への移行はほぼ平均的な経過をたどっていると思われるが、Stage 4 が9ヶ月と平均より長期間保たれている。

症例 207：12才10ヶ月
(昭和46年7月6日生)

3才発症、13才まで歩行可能であったが、試験開始後56週目(60年7月6日)転倒し

て右大転子部を打撲し、疼痛あり。その後歩容が悪くなり股関節の屈曲拘縮が進行したため(60年6月股関節伸展 -30° →8月 -40°)筋力は変わらないにもかかわらず、歩行不能の Stage 5に入った。

Stage 2で30ヶ月経過し、平均の11ヶ月を上回っている。

臨床検査上、 γ -GTPが上昇傾向(15→40)にあり、軽度の副作用と考える。今後の推移によっては、減量・休薬が必要となるかもしれない。

症例 208：8才8ヶ月
(昭和50年9月8日生)

同胞に同病者あり。処女歩行1才6ヶ月、歩行障害6才であった。進行は比較的遅く、EST投与開始時8才8ヶ月で Stage 1、9才で Stage 2で現在まで Stage 2が維持されている。

15. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する EST の臨床的検討

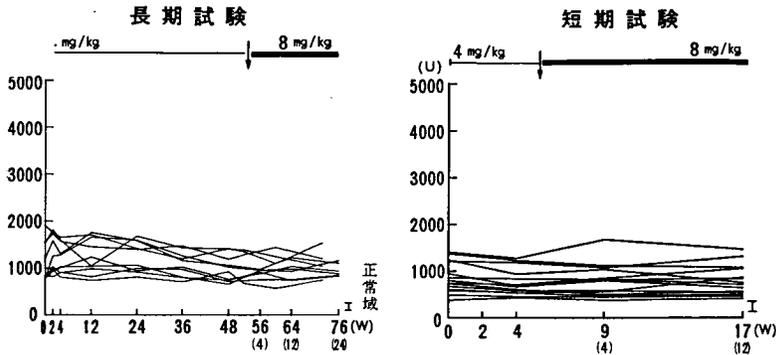


図3-5 臨床検査値の推移 (LDH)

ADL score は 85→78 点と軽度の低下を認める。

投与前までの経過は DMD としては比較的良好な経過を維持していた様にも思われるが、歩行期間も同ステージ持続の平均より長期間維持されており、有効と思われる。

正常範囲内ではあるが、 γ -GTP が軽度上昇傾向 (9→15) にあり、注意を要する。

症例 209 : 9才6ヶ月

(昭和49年11月15日生)

つかまり立ち1才2ヶ月、つたい歩き2才と発育遅延あり、CK 4717 と高値である。同胞内発症は認めないが姉のCK高値が報告されている。

EST 投与前後で ADL score 69→75→61 点と推移した。

現在 Stage 2 でこれが 36 ヶ月と平均より長期間維持されている。Stage 1→2 の時期の年齢も平均より高く、もともとの natural course が緩徐である可能性もあるが、歩行維持期間が同ステージの平均より延長しており有効と思われる。

正常範囲内で γ -GTP の軽度上昇 (4→12) が認められる。他の胆道系 enzyme に異常を認めないが、観察を要すると考える。

症例 210 : 8才4ヶ月

(昭和51年1月16日生)

兄が同病にて死亡している。2才4ヶ月で転倒しやすいことに気付かれている。53年5月(2才)～57年5月(6才)まで Stage 1, 57年11月頃より現在まで Stage 2 が続いている。筋力は EST 投与前後で肩外転 4⁻→3⁻, quadriceps 3⁻→2⁺ と低下している。

ADL score は 2才時 95 点, 7才 80 点, 8才 69 点と低下したが, EST 投与前後で 69→70 点と低下せず, EST 投与により ADL score の低下が抑制されたためと思われる。

また、握力の変化は ADL score 以上に variation があり、一様なことはいえないが、本症例では、EST 投与後、低下が抑制されていると思われ、有効と判定した。

EST 投与開始直後嘔吐が頻発したが、投与時間の変更、ナウゼリン、ストロカイン等の併用で現在は支障ない。

症例 601 : 11才

(昭和49年6月13日生)

症例 201 と一卵性双生児であるが、下肢関節の拘縮の進行が速いため、歩行不能となり、Stage 5 に入っている。症例 201 より早期に歩行不能となっているが、MMT, ADL score はまだかなりよく保たれており、上肢挙上も可能である。Stage の進行は筋力低下以上に下肢の拘縮によるものと考えられる。

治験開始後、deltoid が 3→2⁺ となった他は期間内に明らかな進行が認められない。現時点

IV 臨床試験

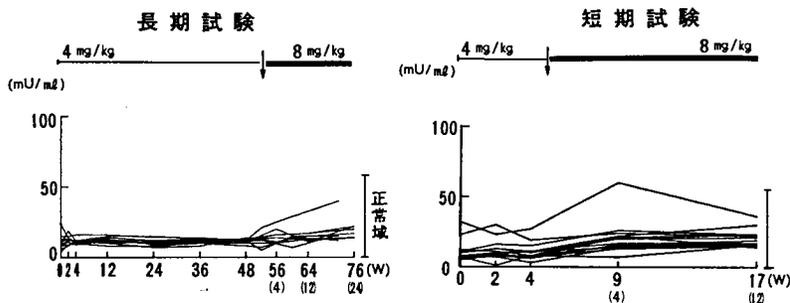


図3-6 臨床検査値の推移 (γ -GTP)

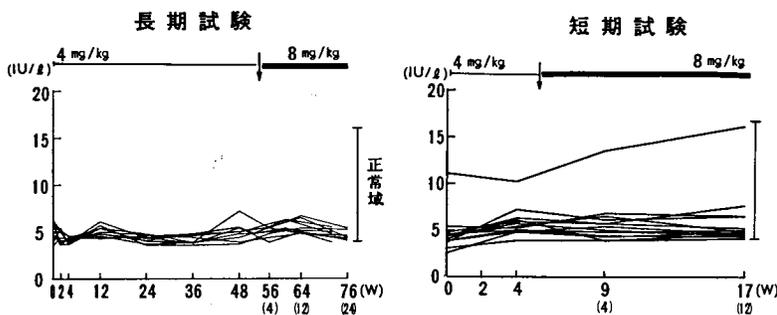


図3-7 臨床検査値の推移 (ICDH)

で、Stage 5 の範囲内にあり、通過期間も判定できない。

正常範囲内ではあるが、 γ -GTP が軽度上昇傾向 (5→19) にあり、今後観察が必要と考える。

症例 602：12才3ヶ月
(昭和48年3月3日生)

58年3月、Stage2→3、58年7月、Stage 4→5 となり LLB の使用を開始した。60年10月より Stage 6 となっている。Stage 3~4 の通過期間は短い Stage 5 は2年以上と平均より長く、筋力低下もゆるやかで、平均的自然経過よりはやや良好な経過をとっていると判断される。

治験開始後、sternocleidomastoid 3⁻→2⁻、deltoid 3⁻→2⁻ と低下した他は MMT 上著変なく、ADL score も保たれており、進行はゆる

やかである。

臨床検査所見上、 γ -GTP の上昇 (7→30) が明らかで正常域上限に近づいており注意を要する。休業・減量が必要となる可能性も考えられる。

本症例は、そもそも自然経過がゆるやかであったと考えられ、現時点で判定は困難である。

症例 603：12才5ヶ月
(昭和48年1月4日生)

59年4月、Stage 4 となり、同7月より Stage 5 となったが、筋力はまだまだ保持されており、歩行不能となった原因は下肢諸関節の拘縮が進行したためと考えられる。

治験開始後は、quadriceps が 3⁻→2⁻ と低下したのみで、他の諸筋には MMT 上変化なく、筋力の低下はゆるやかであると判断され、この点では有効と思われる。

15. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する EST の臨床的検討

正常範囲内であるが、 γ -GTP が上昇傾向 (8→23) にあり注意を要する。

症例 604: 10才8ヶ月

(昭和49年10月6日生)

処女歩行1才4ヶ月、5~6才で歩行障害を認めた。同胞に同病者認めず。著明な知能低下を認め、発言遅滞を呈する。EST投与前後で Stage 5→5と変化なく、ADL scoreも36→37点と低下を認めない。

Mental disturbance 強く、十分な協力を得られていないが、EST投与中はADL, Stageともに変化していない。同Stageの他児に比べ、装具歩行能力維持期間が長くなっている。

正常域内ではあるが γ -GTPの漸増(8→17)が認められる。しかし、他の胆道系enzymeに著変を認めず、理由は不明であるが観察を要する。

症例 605: 12才

(昭和48年6月5日生)

定頭4ヶ月と遅延している以外、運動機能獲得に問題は認めない。5才時走行不能となり、9才6ヶ月で歩行不能となる。

EST投与前後で、ADL score 40→39点とほとんど変化を認めないかあるいはわずかに低下している程度である。同Stageの他児に比し、装具歩行維持期間、四這い能力維持期間が延長していると思われる。

γ -GTPのみ正常域内で漸増(10→21)を認めるが、他の胆道系enzymeに異常を認めず、理由は不明であるが観察を要する。

症例 606: 17才3ヶ月

(昭和43年3月17日生)

処女歩行ならびにその後の発育に問題なし。6才時歩行障害で発症。歩行不能は11才10ヶ月と進行が比較的緩徐であり、Stage 5は現在まで6年間維持されている。比較的良好な経過をとるタイプと思われるが、それでもADL score上は進行が緩徐でありやや有効と思われる。

症例 607: 9才2ヶ月

(昭和51年4月15日生)

処女歩行1才8ヶ月と歩行開始遅延を認める。同胞に同病者あり、17才で死亡している。

低緊張で進行が速いと思われたタイプで、EST投与前は入院後1~2ヶ月で歩行不能になるであろうと予想された症例であるが、EST投与前後で、Stage 2→2と変化なく、EST投与後ADL scoreの変化が平坦化し、ESTにより低下が抑制されたものと思われる。またGowers' signを示すが自力で起立可能である。歩行スピードも、EST投与前の低下に比べ、投与後は低下が緩徐であり、投与6ヶ月目でも歩行が維持されている点は注目すべきである。明らかに有効であったと思われる。正常範囲内ではあるが γ -GTPが、軽度上昇傾向(7→16)にあり、注意を要する。

症例 608: 12才6ヶ月

(昭和47年12月18日生)

60年5月までStage 4であったが、その後左足関節の拘縮が急速に進行して、左足での支持ができなくなったため歩行不能となった。さらに58年夏頃より両側肘関節の屈曲拘縮が始まり(右-5°, 左-10°)、進行したため、四這い姿勢をとれず、60年夏にはStage 6の状態となった。明らかな知能低下を合併しており、十分な協力が得られにくい、MMT上筋力はかなりよく保たれ、12才まで歩行可能であったことから、これまでの自然経過は進行がゆるやかで、良好であったと判断される。治験開始後も、MMT, ADL scoreに著変は認められないが、現時点での有効性の判定は何ともいえない。正常範囲内ではあるが γ -GTPが軽度上昇傾向(7→17)にあり、注意を要する。

症例 609: 14才5ヶ月

(昭和45年12月25日生)

54年8月、9才時よりStage 5に入り、その後、56年9月、Stage 5→6、60年7月、Stage 7と進行してきているが、各Stageの通過期間は平均的であり、標準的な自然経過をと

IV 臨床試験

っている。

治験開始時にすでに low score ではあるが、MMT, ADL score とも著変を認めない。検査所見上も特に異常を認めない。

標準的な経過をとった症例であるが、Stage 6 からのスタートでは投与開始時期が遅すぎるように思われる。

症例 610: 14才8ヶ月

(昭和45年10月10日生)

症例 201, 601 兄弟の兄にあたる。53年4月, Stage 4→5, 57年10月, Stage 5→6, 60年7月, Stage 7 と進行してきたが、ほぼ平均的な自然経過をとっていると考えられる症例である。

治験開始後、MMT, ADL score ともに著変を認めていない。

Stage 6 でのスタートでは投与開始時期として遅いという印象が強い。すでに症状の進行もゆるやかになっているので、現時点で有効性を判定することは困難である。正常範囲内ではあるが、 γ -GTP が軽度上昇傾向 (7→16) にあり、今後注意を要する。

症例 611: 17才2ヶ月

(昭和43年4月20日生)

55年4月, Stage 4→5, 56年10月, Stage 5→6 と進行してきているが、現在も Stage 6 にとどまっており、自然経過は平均よりもゆるやかであり、筋力もかなり良く維持されている。

治験開始後も MMT, ADL score (28点) 上変化を認めず、現状を維持している。夜間の体交頻度が少なくなったとの家人の報告がある。

正常範囲内であるが、 γ -GTP が軽度上昇傾向 (10→19) にあり、注意を要する。

症例 612: 18才10ヶ月

(昭和41年8月6日生)

56年3月, 14才で Stage 5 に入り, 57年5月, Stage 5→6, 同9月, Stage 6 となり, 60年7月より Stage 7 となっている。これま

での経過は明らかに平均を上回り、良好であった症例である。

治験開始時すでに ADL score 18点と低値ではあるが、開始後も、MMT, ADL score に変化を認めない。

そもその自然経過がゆるやかであり、治験のスタートも時期が遅いため、現時点での有効性の判定は困難である。

正常範囲内ではあるが、 γ -GTP が軽度上昇傾向 (6→15) にあり、今後注意を要する。

症例 613: 11才4ヶ月

(昭和49年2月14日生)

処女歩行1才6ヶ月, 7才で歩行不能と経過が速い。8才で Stage 6 となった。

EST 投与前後で Stage 6→Stage 6~7 の移行期であり、ADL score 17→16点と殆ど変化を認めない。EST 投与開始時期が Stage 6 と比較的遅かったと思われる。判定には体重増加の要素を加味する必要があると思われる。

EST 投与以前より、肝機能障害を指摘されており、今回の肝機能検査値の動き (γ -GTP: 32→36, ICDH: 11.1→16.1) は EST の影響も否定できないものの、いずれによるものか判定できない。

症例 614: 12才3ヶ月

(昭和48年3月15日生)

57年9月, Stage 2, 58年9月, Stage 4, 同10月, Stage 4→5, 59年6月, Stage 5→6 と進行してきた。

右肘関節に -10° の屈曲拘縮があり、このために四這いが不能となっていて Stage 6 に分類されているが、deltoid 3⁻ など12才という年齢を考慮すれば筋力によく保たれており、いざりの能力、スピードも充分で Stage 以上の運動能力を有している。自然経過は平均よりもゆるやかであると思われるが、治験開始後、triceps が右で3→2⁺ と低下したのみで、他の筋には MMT 上変化なく ADL score も保たれている。

同 Stage の他児に比べ、一日行動量の低下

は少なく薬剤が有効である可能性も考えられる。

正常範囲ではあるが、 γ -GTP が軽度上昇傾向 (11→23) にあり、今後注意を要する。

総 括

DMD は 2~4 才頃に発症し、20 才前後で死亡するまで不可逆性の筋崩壊が進行する疾患であり、現在のところ治療法はないとされている。

今回、DMD 発症の原因として有力視されている筋細胞膜異常およびこれに関連した筋蛋白分解亢進に着目して開発が進められているシステインプロテアーゼ阻害剤 EST による治療を試みた。

EST のような作用機序を有する薬剤の場合、本疾患の完治は望むべくもないが、患者の日常生活動作の低下抑制、延命に寄与する可能性はあると考えられる。しかし、それを明確にするためには相当長期間に及ぶ追跡調査が必要である。したがって、現時点における薬効評価は、PT、看護婦および親の意見を参考に主治医がまとめたものであり、担当者の主観的印象を主体にした初期的な報告である。

EST を投与した 24 例中、「有効」、「やや有効」と判定された症例は 15 例 (62.5%) であった。「無効」と判定された 9 例の中には、現在までの経過では本剤の有効性について判定す

るのは非常に困難と考えられたため、一応「無効」とした症例も含まれる。これら無効例も含め、本剤が DMD に対して有効であるか否か、より明確に判断するためには、今後、さらに長期にわたる観察が必要であろう。

副作用については、試験開始初期、2 例で嘔気・嘔吐を認めたが、投与時間・方法の変更等で継続投与可能であった。

臨床検査所見に関しては、 γ -GTP が正常範囲内 (0~60) の値ではあるが、徐々に上昇傾向を示す症例が目立った。その他の肝・胆道系 enzyme には著変を認めないが、今後注意深く観察する必要がある。

文 献

- 1) *In vitro* and *in vivo* inhibition of cysteine proteinases by EST, a new analog of E-64, Pharm. Dyn., 投稿中.
- 2) EST, a new analog of E-64, can prolong the life span of dystrophic hamsters (UM-X7.1), Proceedings of the International symposium: Cysteine proteinases and their inhibitors, 1985.
- 3) Beneficial effect of new thiol protease inhibitors, epoxide derivatives, on dystrophic mice, *Experimental Neurology*, **91**, 23-29, 1986.
- 4) EST の毒性研究—肝臓におよぼす影響, 基礎と臨床, **20** (4) 307-318, 1986.
- 5) EST の生殖試験 (第 2 報) —ラットにおける器官形成期投与試験一, 医薬品研究, **17** (3) 617-631, 1986.

16. EST 臨床試験

石原 傳 幸*

研究協力者 津 谷 恒 夫* 儀 武 三 郎* 青 柳 昭 雄*

はじめに

悲惨な遺伝子性疾患である Duchenne 型筋ジストロフィー（以下 DMD と略す）に有効な治療法は未だ発見されておらず、毎年多数の患者が夭折しているのが現状である。本症における蛋白分解酵素の役割が検討され、Ca 依存性中性プロテアーゼ、カテプシンなどの蛋白分解酵素が筋崩壊に重要な関与をしていることが明らかとなってきた。これらの蛋白分解酵素の阻害剤として E-64 が開発され、筋疾患患者における生体内動態の検討の段階より本院の DMD 患者に E-64-d (EST) を投与してきたが、治療試験を開始して以来約 1 年半を経過したので現在までの治験経過について報告する。

対象および方法

対象は国立療養所東埼玉病院に入院中の 27 名の DMD 患者、全例男児であり兄弟例を 1 家系含む。対象者を 2 群に分け、A 群は 14 名で平均年齢 10 ± 1.8 歳、障害度は 8 度分類で 1~4 度が 13 名、5 度が 1 名であった。B 群は 13 名で平均年齢 12 ± 2.0 歳、障害度は 2 度が 1 名、4 度が 1 名、5 度が 9 名、6 度が 2 名であった（表 1, 2）。

A 群は昭和 59 年 5 月より EST を 4 mg/kg 体重の割合で朝食後に投与した。開始後約 50

週で 8 mg/kg 体重に増量し朝夕の 2 回に分け食後投与した。B 群については、昭和 60 年 6 月より EST を 4mg/kg 体重の割合で投与し、6 週後より 8 mg/kg 体重に増量した。

併用薬剤としてはカルシウム拮抗剤は併用しないこととし、投与していた患者は投与前 1 ヶ月より中止した。筋力テスト (MMT)、日常生活動作 (ADL) テスト、血液・尿検査を定期的に行った¹⁾。

DMD の場合、個々の症例により様々な経過をたどるため薬効の判定は極めて困難であるが、自然経過と比較し判定することとした。極力、客観的に評価するため、本院の筋萎縮症病棟が昭和 45 年 10 月に開棟して以来の DMD 患者における各種パラメーターをコンピューター処理し、これを自然歴として今回の各種検査結果と比較した。今回は各種パラメーターのうち障害度通過期間を算出し、EST 投与患者（昭和 60 年 12 月で算出）と比較した。症例 113 をのぞく A 群と、B 群の症例 506, 512 はいずれも歩行可能者であり、これらの症例のうち障害度 4 度より 5 度に至る期間を障害度 4 度通過期間とし自然歴と比較可能であった。ただし、他の歩行不能者については、薬効判定に適当なパラメーターを見出し得ず判定できなかった。

血清生化学値の比較では、A 群では ICDH と CK は投与開始前、開始後 48 週、増量後 4 週および 24 週での値を用い、治療中に測定法の変更を余儀なくされた GPT, Al-P, γ -GTP に

* 国立療養所東埼玉病院

IV 臨床試験

表1 患者の背景(1)

群	症例 No.	年齢 (才)	障害度	体重 (kg)	投与量 (mg/kg/日)	
					開始時	増量後
A	101	11	4	23.0	100	200
	102	13	4	31.6	125	250
	103	11	4	28.2	125	250
	104	11	4	26.2	100	200
	105	12	4	26.2	100	200
	106	7	2	20.0	100	200
	107	8	3	17.5	75	150
	108	10	4	26.2	100	200
	109	10	4	25.6	100	200
	110	8	2	20.2	75	150
	111	9	4	21.2	75	150
	112	10	4	28.6	125	250
	113	11	5	25.2	100	200
	114	7	1	20.2	75	150
平均±S. D.		10±1.8		24.3±4.0	98±18	196±37

表2 患者の背景(2)

群	症例 No.	年齢 (才)	障害度	体重 (kg)	投与量 (mg/kg/日)	
					開始時	増量後
B	501	11	5	24.0	100	200
	502	11	6	25.8	100	200
	503	10	5	19.2	75	150
	504	13	5	36.2	125	250
	505	12	5	55.0	200	400
	506	9	4	22.0	75	150
	507	12	5	37.0	125	250
	508	17	5	40.4	150	300
	509	11	6	42.0	150	300
	510	12	5	37.4	125	250
	511	13	5	31.0	125	250
	512	10	2	31.0	125	250
	513	10	5	21.2	75	150
平均±S. D.		12±2.0		32.5±10.2	119±36	239±71

16. EST 臨床試験

表3 障害度の推移 (A群)

症 例 No	年 齢	投与開始時 障 害 度 (Stage)	投 与 期 間 (週)							各障害度 通過期間 (月)
			増量 62 74 48↓ (増量12) (増量24)							
			4	12	24	36	48	62	74	
			投与量: 4 mg/kg/日				8 mg/kg/日			
101	11才8ヶ月	4	4	4	4	4	4	4	4	4度:31ヶ月
102	13才4ヶ月	4	4	4	4	5	5	5	5	4度:12ヶ月
103	11才4ヶ月	4	4	4	4	4	4	4	4	4度:31ヶ月
104	11才11ヶ月	4	4	4	5	5	5	6	6	4度:42ヶ月
105	12才6ヶ月	4	4	4	4	4	5	5	5	4度:13ヶ月
106	7才3ヶ月	2	2	2	3	5	5	5	5	4度:3ヶ月
107	8才5ヶ月	3	3	3	3	3	3	3	3	3度:22ヶ月
108	10才9ヶ月	4	4	4	4	5	5	5	5	4度:27ヶ月
109	10才8ヶ月	4	4	4	4	5	5	6	6	4度:20ヶ月
110	8才3ヶ月	2	3	3	3	4	5	4	5	4度:7ヶ月
111	9才9ヶ月	4	4	4	4	5	5	5	5	4度:6ヶ月
112	10才6ヶ月	4	6	6	6	6	6	6	6	4度:12ヶ月
113	11才11ヶ月	5	5	5	5	5	5	5	5	5度経過中
114	7才10ヶ月	1	1	1	1	1	1	2	2	2度経過中

については開始後4週, 48週, 増量後4週および24週で比較した。B群についてはICDH, CK, GPT, Al-P, γ -GTPそれぞれにつき, 前値, 開始後4週, 増量後4週および12週の値で比較した。統計処理はYHP社製9845Bコンピューターを用いて中央値検定を行った。

結 果

各症例の障害度の推移を表3, 4に示す。投与開始時の障害度が4度以下であったA群の13名およびB群の2名(506, 512)の計15名のうち, EST投与期間中に障害度4度を通過し5度に進行した患者は表5に示すように12名であった。その通過期間の平均は18.3±12.0ヶ月であった。表6には当院筋萎縮症病棟開棟以来集積し得た各障害度通過期間の平均を示す。障害度4度通過者は過去36例が明確に把握されておりその平均は12.6±10.2(3~

39ヶ月)であった。したがって, EST投与中障害度4度通過者の平均通過期間は約6ヶ月延長していたことになる。ただし両群の4度通過期間には統計学上有意の差はなかった。またA群の症例107は障害度3度の通過期間は22ヶ月で, 当院の自然歴9.7±6.5ヶ月を大きく越えていた。B群の症例504は障害度5度の通過期間が42ヶ月であり, 本院97例の通過期間は24.1±17.1ヶ月であったので, これも延長していたと判断した。

次に通常筋崩壊の指標として使用されるCKの動向を検討した。A群では前値に比し, 開始後48週で有意な低下をみた。また開始前と増量後4週および24週では低下傾向が認められた。B群では, 前値に比し4週, 増量後4週および12週で平均値は低下したが有意差をみなかった。

副作用については, 投与開始初期, 嘔気, 嘔

IV 臨床試験

表4 障害度の推移 (B群)

症 例 No	年 齡	投与開始時 障 害 度 (Stage)	投 与 期 間 (週)				各 障 害 度 通 過 期 間 (月)
			2	4	10	18	
			増量 ↓		増量		
			投与量: 4 mg/kg/日		8 mg/kg/日		
501	11才6ヶ月	5	5	5	5	5	5度: 28ヶ月経過中
502	11才11ヶ月	6	6	6	6	6	6度経過中
503	10才10ヶ月	5	5	5	5	5	5度: 21ヶ月経過中
504	13才3ヶ月	5	5	5	5	6	5度: 42ヶ月
505	12才0ヶ月	5	5	5	5	5	5度経過中
506	9才2ヶ月	4	4	4	4	4	4度: 16ヶ月
507	12才7ヶ月	5	5	5	5	5	5度: 34ヶ月経過中
508	17才8ヶ月	5	5	5	5	5	5度: 57ヶ月経過中
509	11才11ヶ月	6	6	6	6	6	6度経過中
510	12才1ヶ月	5	5	5	5	6	
511	13才6ヶ月	5	5	5	5	5	5度経過中
512	10才0ヶ月	2	2	2	2	2	2度経過中
513	10才1ヶ月	5	5	5	5	5	5度経過中

表5 障害度4度通過期間

症例 No.	4度通過期間 (ヶ月)
101	31
102	12
103	31
104	42
105	13
106	3
108	27
109	20
110	7
111	6
112	12
506	16
n=12	18.3±12.0 (平均±S. D.)

表6 東埼玉病院における各障害度通過期間
(昭和45年10月～昭和59年12月)

障害度	症例数	通過期間 (ヶ月: 平均±S. D.)
1	12	16.8±4.5 (10~24)
2	39	18.4±11.3 (1~51)
3	39	9.7±6.5 (1~34)
4	36	12.6±10.2 (3~39)
5	97	24.1±17.1 (1~73)
6	89	23.3±19.7 (2~80)
7	62	25.5±20.4 (2~93)
8	39	24.5±18.1 (2~61)

表7 投与開始時と各時期における臨床検査値の比較

群	検査項目	48週	増量4週	増量24週
A	ICDH	N.S.	N.S.	N.S.
	γ -GTP*	↑	↑	↑
	GPT*	N.S.	N.S.	N.S.
	AI-P*	N.S.	N.S.	N.S.
	CK	↓	N.S.	N.S.
群	検査項目	4週	増量4週	増量24週
B	ICDH	N.S.	N.S.	N.S.
	γ -GTP	↑	↑	↑
	GPT	N.S.	N.S.	N.S.
	AI-P	N.S.	N.S.	N.S.
	CK	N.S.	N.S.	N.S.

* : 投与開始4週目と比較

↑, ↓ : P<0.05

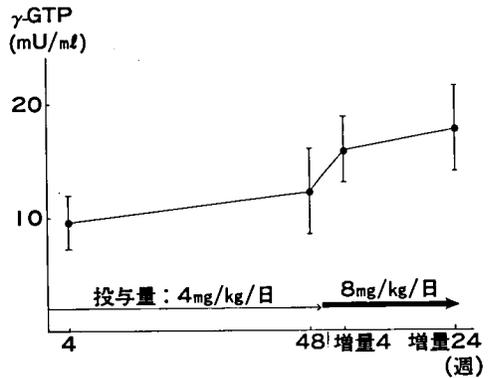
N.S. : not significant

吐などの消化器症状を6例に認めたが、食欲増進剤などの投与と剤型変更により軽快し、その後問題なく投与が継続されている。

次に投与中に γ -GTPが上昇する症例が多いことに気づき、肝機能障害の可能性が否定できないため、 γ -GTP, GPT, AI-PおよびICDHの値につき検討を加えた。 γ -GTPについてはA群では開始後4週以降検査法が変更されたため、開始後4週, 48週, 増量後4週, 増量後12週の値を比較した。表7に示すごとく基礎値に比し有意の増加を示し、しかも経過と共に上昇していることが明らかとなった。図1にA群の γ -GTP値の推移を示した。GPTはA群では開始後4週を基礎値として計算すると、48週および増量後も有意差は認められなかった。B群では4週, 増量後で平均値に下降傾向を認めたが有意差はなかった。AI-Pは、いずれの時期でも有意差を認めなかった。ICDHについても同様であった。

考 察

薬効判定の基準はDMDのような常に進行性

図1 γ -GTP値の推移 (A群)

の疾患においては病気の原因そのものを治療する薬剤でないかぎりないといってよい。当院筋萎縮症病棟設立以来16年間で集めたデータもばらつきが大きく、CK一つをとっても比較は困難である。また、EST自体、筋ジストロフィーの病因が解明されて根本的治療としてつくられた薬剤ではなく、筋崩壊を防止し、その結果として進行を遅らせる意味での薬剤であることは周知の事実である。しかし、EST臨床試験開始後約1年半を経過したので何らかのまとめを行い今後の展望を行うために、今回は当院で集積された自然歴のうち障害度通過期間をクライテリアとしてEST薬物効果の判定を試みたわけである。

障害度4度通過者は両群で12名であったが、前述の通り平均で約6ヶ月の延長をみた。症例104では42ヶ月と当院での最長を記録した。ESTの投与期間は障害度4度の最後の6ヶ月間のみであったが、この間DMDの進行を遅らせた可能性は否定できない。症例107は3度通過期間が平均 \pm S.D.を大きく越え、B群の504も5度通過期間が延長していた。このように一見してDMDの進行を遅らせたような印象を与えるが、A群患者は原則として歩行可能者、B群は多くが歩行不能者でも比較的進行度が小さい患者を選んだため、今回の患者が緩徐進行型のDMD患者が多かった可能性もあ

り、今後の進行を注意深く見守らなければならない。

EST が筋に対して悪影響を及ぼし、DMD の進行を助長する可能性は否定されたといっても過言ではないが、EST が真に本症に有効であるかどうかは、今後長期間にわたる観察の上で慎重に判定すべきであり断定的な結論は差し控えたい。

次に副作用については、 γ -GTP は正常範囲内の値ではあるが徐々に上昇してきている。 γ -GTP はアルコール性肝障害や胆汁うっ滞の際上昇するといわれる酵素であるが、胆汁うっ滞の際上昇すると思われる AI-P は A 群では 1 年半後の値は平均で低下しており胆汁うっ滞を EST が引き起こしたとは判定できない。次に肝機能の指標である GPT は A, B 両群ともやや低下しているが有意差を認めなかった。同様の意義をもつ ICDH の上昇も認められないことより肝機能障害の存在も否定的である。 γ -GTP は、腎、脳、筋の順に多く存在するといわれており²⁾、現在のところ腎や脳の障害を思わせる所見もない。このように γ -GTP の上昇は今後注意深い観察が必要である。

結 論

①27 例の DMD 男児に EST を 4 mg ないし 8 mg/kg 体重投与し、A 群 14 例については 1 年半経過を観察した。

②機能障害度 4 度を通過した患者は 12 名で、通過期間は 18.3 ± 12.0 ヶ月 (6~42 ヶ月) であった。当院での自然歴 (12.6 ± 10.2 ヶ月) に比し約 6 ヶ月の延長をみた。

③副作用としては 6 例に嘔気、嘔吐などを一過性に認めた。 γ -GTP が徐々に上昇しており今後注意が必要である。

④以上より EST 投与により DMD の進行が助長される可能性は否定的であり、本剤が本症に有効である可能性がある。

文 献

- 1) 今堀和友, 杉田秀夫, 宮武 正 他: EST 第 2 相臨床試験—中間報告—, 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 59 年度研究報告書, 133~140, 1985.
- 2) Neerunjuin, J. S. & Dubowitz, V.: Comparison of γ -glutamyl transpeptidase activity in tissues of normal and dystrophic hamsters and mice, J. Neurol. Sci., 33, 335-340, 1977.

17. Duchenne 型筋ジストロフィーに対するシステインプロテアーゼの特異的阻害剤 EST の効果

中野 今治*

研究協力者 藤村 則子** 土佐 千秋** 石沢 真弓**
 神山 潤* 後藤 順* 松村 喜一郎*
 玉岡 晃*

はじめに

対象および投与方法

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は進行性筋ジストロフィーの中で最も代表的なものである。本症は一度発症すると連続的に筋崩壊・壊死が進み、一定の経過をたどって進行し、平均 10 歳頃には歩行不能となる。

本症の発症機序に関してはまだ十分に解明されていないが、筋細胞膜の異常説が最も有力視されており、これを示唆する所見がいくつか得られている¹⁻⁴⁾。

一方、筋ジストロフィーにおける筋たん白分解の亢進⁵⁾が見い出されて以来、筋たん白分解酵素に関する研究が進み、DMD ではシステインプロテアーゼの 1 つであるカルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) の働きが注目されて来ている。

すなわち、DMD では筋細胞膜異常のため過剰に流入したカルシウムにより CANP が活性化され、これが DMD の筋崩壊の第一段階であるとの推察がなされている⁶⁾。

今回、特異的なシステインプロテアーゼ阻害作用を有する EST: ethyl (+)-(2S, 3S)-3-[(S)-3-methyl-1-(3-methylbutylcarbamoyl)butylcarbamoyl]-2-oxiranecarboxylate を、DMD 患者に投与しその効果を検討したので報告する。

1. 対象

当院入院中の独立歩行可能な Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の患児 12 例を対象とした。患児は全て男児で、投与開始時の年齢は 3~10 歳 (平均 7 歳 8 ヶ月)、機能障害度 (stage) は 1~3 度であった (表 1)。

2. 用法・用量および投与期間

初期投与量は 1 日 4 mg/kg を目安とし、12 週間服用させ、13~36 週目までは 1 日 8 mg/kg を目安に増量した。なお、服用は全て食後とした。

3. 観察項目および観察方法

あらかじめ決められた試験計画書に従い、定められた項目について観察した (表 2, 3)。

結 果

1. 機能障害度 (stage) の推移

和式生活に則した機能障害度の分類により 1 度から 8 度までの 8 段階で評価した。各症例の試験期間中の stage 推移を表 1 に示した。症例 310 で 1 度から 2 度へ進み、症例 311 で 2 度と 3 度を往復したがこれ以外には、試験期間を通して変化は認められなかった。

2. 筋力テスト (MMT) の推移

13 種類 24 項目それぞれについて、13 段階で評価し、これを点数化し、各人の総点数 (288 点満点) の推移を表 4 に示した。この結果、症例 301, 306 では 36 週目においても投

* 国立療養所下志津病院 神経内科

** 同 理学診療科

IV 臨床試験

表1 症例一覽

症 例 No	年 齡 (開始時)	体重 (開始時) kg	投 与 量 mg/body/日		Stage の 推 移					
			開始時	増量後	増量後					
					0	4	0	12	24	36 (週)
					4mg/kg			8mg/kg		
301	3才6ヶ月	12.5	50	100	1	1	1		1	1
302	4才0ヶ月	16.0	75	150	1	1	1		1	1
303	5才1ヶ月	15.2	75	150	1	1	1		1	1
304	7才10ヶ月	18.0	75	150	2	2	2		2	2
305	7才2ヶ月	20.0	100	200	2	2	2		2	2
306	7才6ヶ月	17.8	75	150	2	2	2		2	2
307	9才0ヶ月	19.0	100	200	1	1	1		1	1
308	9才1ヶ月	19.0	100	200	2	2	2		2	2
309	9才5ヶ月	17.0	75	150	2	2	2		2	2
310	9才10ヶ月	22.0	100	200	1	2	2		2	2
311	9才4ヶ月	18.0	100	200	3	2	3		2	3
312	10才10ヶ月	22.0	100	200	2	2	2		2	2

表2 観察スケジュール

評価日 (開始後・週) (増量後・週)	0	2	4	9	12 0	16 4	24 12	30 18	36 24
機能障害度 (stage)	○		○		○		○		○
マニュアルテスト { 筋力テスト 機能テスト ROMテスト ADLテスト	○		○		○		○		○
臨床検査 { 血液検査 尿検査	○	○	○		○	○	○	○	○
尿中3-MeH, CRN, CR	○		○	○	○	○	○	○	○

与開始時と比較して、ほとんど点数の減少は認められなかった。症例 302 では、点数の増加が認められた。症例 307, 308, 309 では、投与開始後 12 週までは減少傾向をみたが、その後、やや回復が認められた。残りの 6 例については徐々に点数の減少が認められた。

3. ADLテストの推移

25 項目について、各項目 0~4 点で評価し

た。総点数 (100 点満点) の推移を表 5 に示した。

投与開始時と 12 週目を比較すると、点数が増加あるいは不変だったのは、12 例中 2 例であった。一方、12 週目 (増量前) と 24 週目 (増量後 12 週目) を比較すると、12 例中 7 例が増量後の方が好成績であった。

17. Duchenne 型筋ジストロフィーに対するシステインプロテアーゼの特異的阻害剤 EST の効果

表3 観察項目

機能障害度 (stage) : 和式生活様式の基準により 8 段階評価
筋力テスト : 13 種類 24 項目
ROM テスト : 11 種類 22 項目
機能テスト : 5 項目 (立ち上り, 階段昇り 他)
ADL テスト : 25 項目
心肺機能 : 肺活量, 動脈血液ガス, 心電図
臨床検査
血液検査 : 赤血球数, 白血球数, Hb, Ht, 血小板数, 白血球分類
血清電解質 : Na, K, Cl, Ca, P
血液生化学検査 : CK, GOT, GPT, Al-P, γ -GTP, 総ビリルビン, BUN, クレアチニン, 総コレステロール, トリグリセライド, 総たん白, LDH, ICDH
尿検査 : 糖, たん白, ウロビリノーゲン, 沈渣 3-メチルヒスチジン, クレアチニン, クレアチン

表4 筋力テスト総点数の推移

症例 No	0		増量後 0		8		12		24 (週)	
	0	4	12	20	24	24	36			
	4mg/kg		8mg/kg							
301	207	206	202		204		207			
302	182	184	199		201		201			
303	184	192	188		176		169			
304	183	177	170		170		167			
305	162	164	147		140		138			
306	155	159	157		156		154			
307	212	203	187		169		185			
308	173	157	143		136		140			
309	174	144	134	(147)	141		142			
310	181	167	187		173		166			
311	149	146	144		138		132			
312	185	187	183		178		173			

IV 臨床試験

表5 ADLテスト総点数の推移

症例 No.	0		増量後 0		8		12		24 (週)	
	0	4	12	20	24	24	24	36	36	36
	4mg/kg				8mg/kg					
301	85	86	86			87				88
302	88	86	86			88				86
303	86	85	84			81				82
304	74	73	74			74				74
305	72	68	69			68				63
306	70	69	69			67				65
307	95	89	87			85				82
308	73	69	64			64				64
309	68	67	63		(64)	63				59
310	82	82	81			82				78
311	60	62	55			57				54
312	80	81	79			76				76

4. 機能テストの推移

5項目について、各試験に要した時間(秒)で評価した。なお、120秒以内に完了しない場合は不能と判定した。

症例309では、12週目(増量前)に比べ増量後は改善が認められた。また症例311では、投与開始時に比べ24週目(増量後12週目)で改善が認められた(図3, 5)。

5. 臨床検査(図1)

血液検査、血清電解質検査では薬剤によると考えられる変動は認められなかった。

DMD患者では、CK, GOT, GPT, LDHは健常人に比べ非常に高値を示すことが知られているが、今回の結果も同様であった。GOT, GPT, LDHは試験期間を通じ検査値の上昇は認められなかった。CKは投与前と36週目を比較すると差はなかったが、12週目(増量前)

と比較して、36週目(増量後24週目)では有意な低下(P<0.05)が認められ、ESTの効果につながる可能性が高い。

γ-GTPについては正常域内の変動ではあったが、投与前に比較して上昇する傾向が認められた。

その他の血液生化学的検査項目については、薬剤によると考えられる変動は認められなかった。

尿検査についても特に異常と考えられる所見は認められなかった。

6. 副作用

症例303で投与開始初日に嘔吐がみられたが、それ以降は認められず、投与継続可能であった。他の患児では副作用は認められなかった。

17. Duchenne 型筋ジストロフィーに対するシステインプロテアーゼの特異的阻害剤 EST の効果

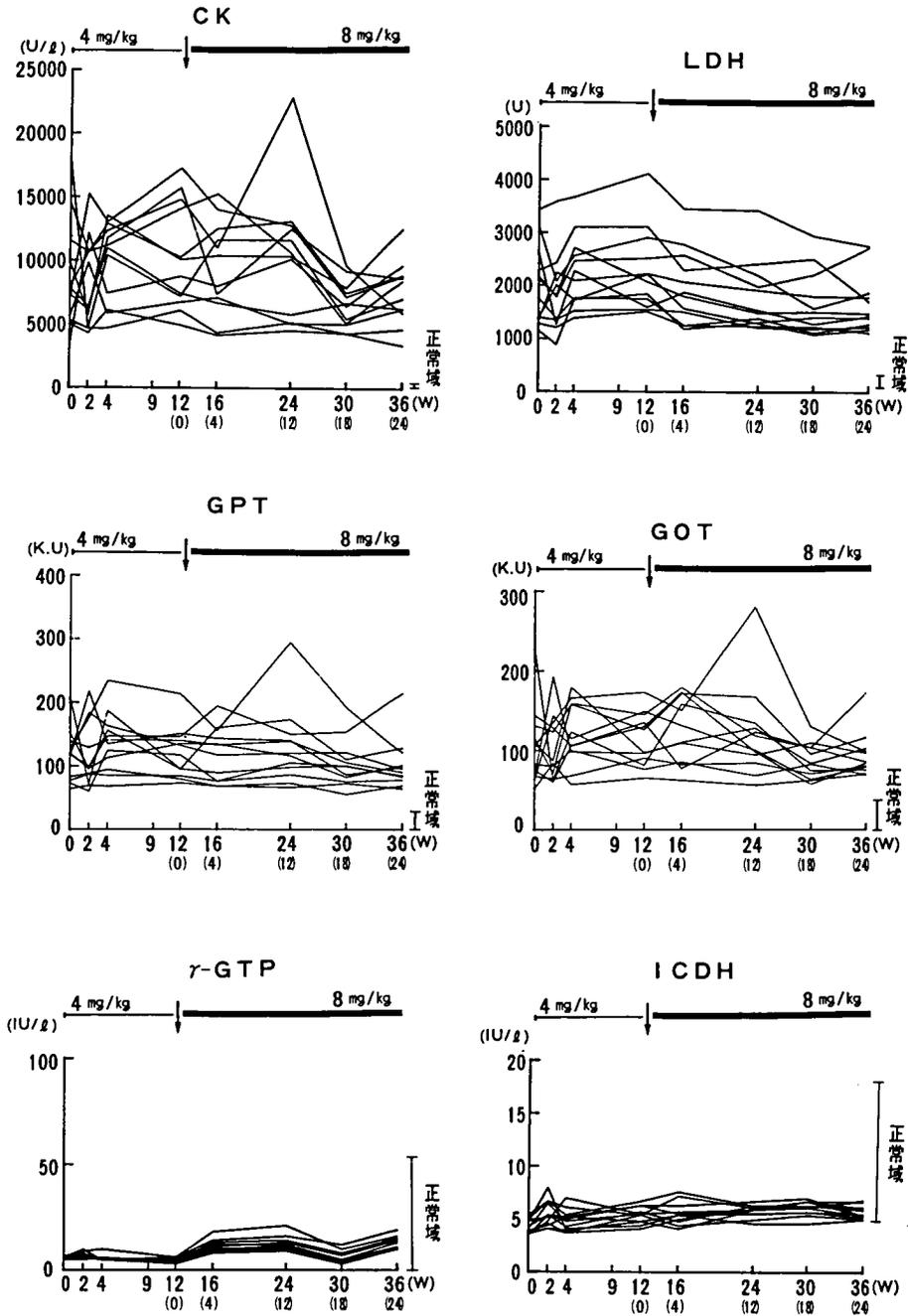


図1 臨床検査値の推移

IV 臨床試験

表6 効果判定

症例 No.	効 果	副 作 用	有 用 性
301	無 効	な し	どちらともいえない
302	無 効	な し	どちらともいえない
303	無 効	有 (嘔吐)	どちらともいえない
304	無 効	な し	どちらともいえない
305	無 効	な し	どちらともいえない
306	無 効	な し	どちらともいえない
307	無 効	な し	どちらともいえない
308	無 効	な し	どちらともいえない
309	やや有効	な し	やや有用
310	無 効	な し	どちらともいえない
311	やや有効	な し	やや有用
312	無 効	な し	どちらともいえない

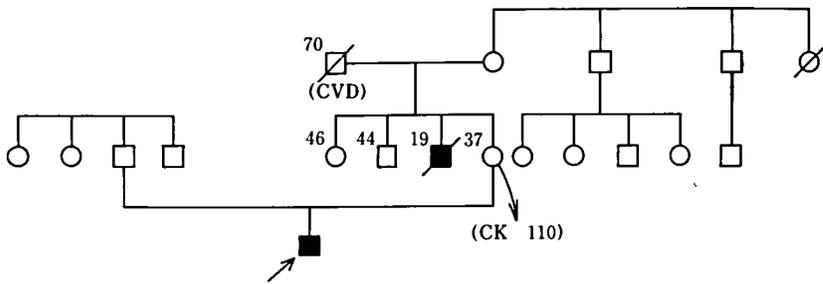


図2 症例309の家族歴

7. 効果判定

各症例についての現時点における評価を表6に一括して示した。やや有効2例、無効10例であった。なお、無効例の中にはこれまでの経過のみでは判定し得ない症例も含まれている。以下にやや有効と判定した2例について述べる。

〔症例309〕9才5ヶ月（昭和50年8月13日生）家族歴は図2に示した。

（生育歴、現病歴）

本児妊娠中には異常を認めなかったが、出産が遅れたため、帝王切開、生下時体重3250g、仮死⊖、黄疸が強いため保育器に入った。顎定6ヶ月、坐位10ヶ月、始歩1歳6ヶ月でこの頃より“片言”を話し始めた。2歳6ヶ月頃よ

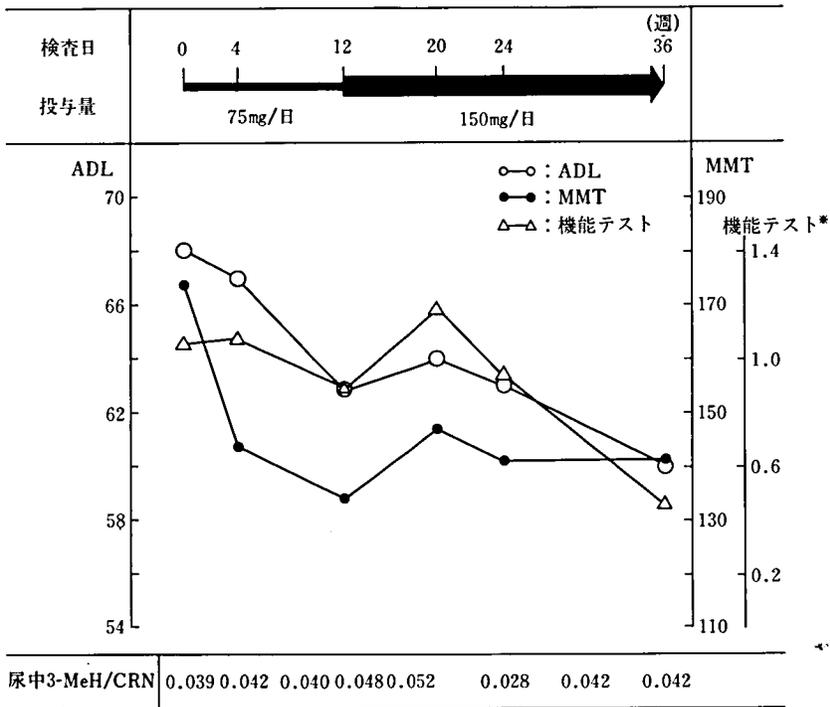
り運動が遅く、転倒しやすかった。膝に手をつかないと起立出来ず、つま先で歩くようになった。2歳11ヶ月の時、某医大小児科でCK高値を指摘され、DMDと診断された。3歳時当科受診、筋生検では dystrophic change を認めた。以後しばらく通院しなかったが、昭和58年12月（8歳）、当科再受診。

（再受診時所見）

精神発達遅滞⊕、落ち着きがなく、協力を得られない。一般内科的には特記すべき事項なし。

脳神経：対光反射検査不能、眼球運動に明らかな異常なし。眼輪筋、口輪筋および咬筋に異常なし。咽頭の動き、咽頭反射に異常なし。舌運動、構音障害なし。咬合不全あり。

17. Duchenne 型筋ジストロフィーに対するシステインプロテアーゼの特異的阻害剤 EST の効果



$$* : \frac{1}{5\text{項目の総所要時間(sec.)}} \times 100$$

図3 症例309 (開始時9才5ヶ月) の経過

四肢・体幹：起立可，階段昇りには手摺り使用，Gowers' sign ⊕, lumbar lordosis ⊕, つま先歩行。筋力測定は協力が得られず筋力テストは検査不能だが，全体的に 4/5 はあると思われる。上下肢帯，上下肢近部位に中等度筋萎縮あり。腓腹筋の仮性肥大あり。

腱反射： BTR TTR RTR PTR ATR
 右 — — — — 正常
 左 — — — — 正常

Stage：2度。

臨床検査：血算異常なし，CK 8400, Ald 66.6, Na 138, K 4.3, Cl 104, P 5.0, Ca 4.4, TP 7.3, Alb 5.1, BUN 12.8, CRN 0.4, ZTT 5.6, UA 3.7, T. Bil 0.1, GOT 132, GPT 115, Al-P 15.0, LDH >1,100, LAP 108, γ-GTP 5

胸部 X-P, EKG：np.

Brain CT：明らかな異常なし。

筋 CT：臀筋群に中等度の低吸収域化⊕，大腿筋群に虫食い状の低吸収域⊕。

(経過) (図3)

昭和60年1月9日，EST 治験のため入院，2月1日よりEST 75 mg/日 1×服用開始。明らかな副作用なく，4月26日より150 mg/日 2×に増量した。6月に入り，付き添っていた母親が起立回数が増え，階段昇りが速くなったとの印象を持った。このため本児については特に6月21日(20週目)にも検査を行った。実際，6月21日(20週目)，7月19日(24週目)のADLでは“椅子からの立ち上り”，“しゃがみ”で1ランク5月1日(12週目)より上昇し，総点数でも12週目が63であるのに対し，20週目64に増加し，24週目63に戻っている。また，機能テストにおいても12週目に比較して20週目では，①仰臥位か

IV 臨床試験

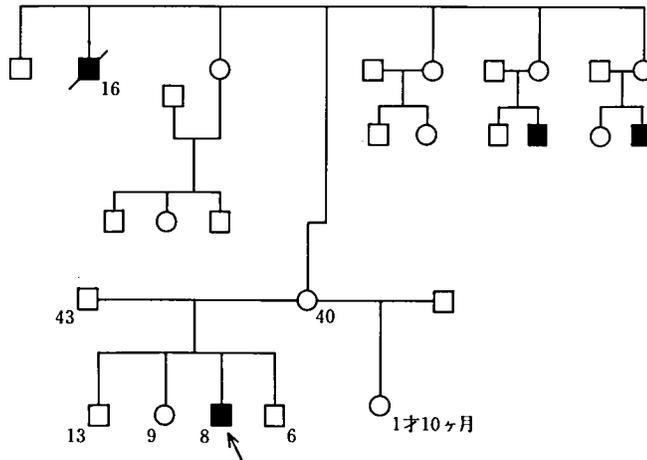
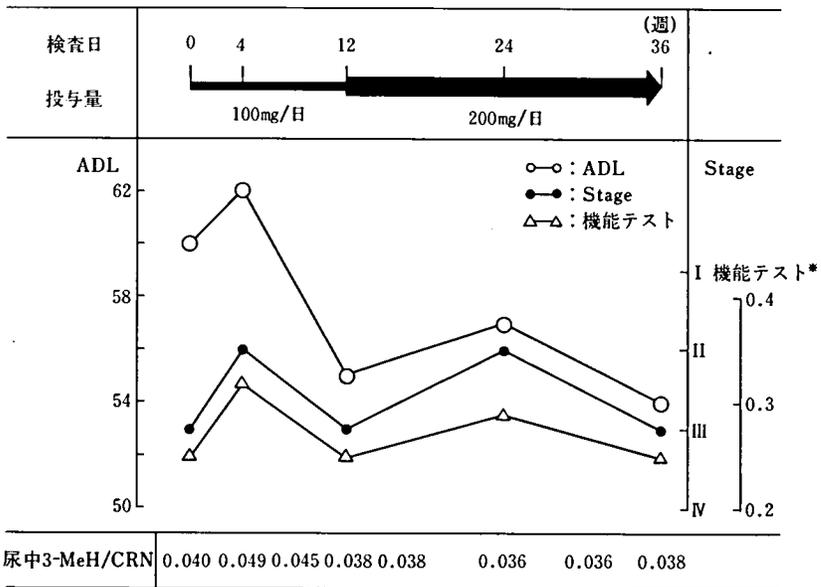


図4 症例311の家族歴



$$* : \frac{1}{5\text{項目の総所要時間(sec.)}} \times 100$$

図5 症例311 (開始時9才4ヶ月)の経過

らの立ち上り時間, ②階段4段昇り時間, ③10 m 走行時間, ④椅子からの立ち上り時間, ⑤車椅子での10 m 走行時間の全ての項目において, また24週目でも②~④の項目に改善が認められた。さらに筋力テストでも, 12週目

に比べ20週目では, 24項目中, 13項目で改善がみられ, 不変が9項目, 低下したのは左右手関節屈曲の2項目のみであった。また, 尿中3-メチルヒスチジン/クレアチニン値(3-MeH/CRN)が, 16週目まで0.04~0.05前後

17. Duchenne 型筋ジストロフィーに対するシステインプロテアーゼの特異的阻害剤 EST の効果

であったのが、24 週目には 0.028 にまで低下しているのが注目される。なお CK には著変がみられなかった。

(症例 311) 9 才 4 ヶ月 (昭和 50 年 9 月 12 日生) 家族歴は図 4 に示した。

(生育歴, 現病歴)

妊娠, 出産は異常なく満期産, 頸定 3 ヶ月, 坐位 4~5 ヶ月, 始歩 1 歳 3 ヶ月, 3 歳頃よく転び, 5 歳頃動揺性歩行に気付いた。昭和 59 年 6 月 29 日 (8 歳) 当院に入院。

(入院時所見)

体格中等度, 知的には多少劣るが協力的。一般内科的には異常なし。脳神経領域にも異常なし。

四肢・体幹: 物につかまって起立可, lumbar lordosis 著明, 動揺性歩行を示す。上下肢帯, 上下肢近位部の筋萎縮あり。腓腹筋の仮性肥大あり。筋力テストでは下肢帯は左右とも 3~4-, 膝屈曲 4-, 膝伸展 2-, 足関節背屈 3+~4-, 底屈 5。

腱反射:	BTR	TTR	RTR	PTP	ATR
右	—	—	—	—	↓
左	—	—	—	—	↓

臨床検査: 血算異常なし, CK 9738, 肝機能検査異常なし。

Brain CT: 明らかな異常なし。

筋 CT: 腰帯筋, 脊柱傍筋, 大腿筋の低吸収域化。

EMG: 筋原性。

(経過) (図 5)

昭和 60 年 2 月 1 日より, EST 100 mg/日 1×投与開始。12 週目 (4 月 26 日) より 200 mg/日 2×に増量した。12 週目と 24 週目 (7 月 22 日) の ADL を比較すると, 12 週目では“床からの立ち上り”が全くできなくなっていたのが, 物につかまって可能となり, “階段昇降”不能だったのが, 手摺りを使って可能になった。“寝返り”など低下した項目もあるが, 総点数では 55→57 と増加した。また, 階段昇降が可能となったため, stage も 3 度→2 度へと改善した。機能テストでは階段昇り時間,

10 m 走行時間, 車椅子で 10 m 走行時間に改善がみられている。しかし, 筋力テストでは 12 週目と 24 週目を比べると 24 週目の方が軽度ながら低下している。尿中 3-MeH/CRN は徐々に低下し, 24 週目では 0.036 まで低下している。

本患児は EST 服用 4 週目に, stage が 1 ランク上り, 12 週目にはもとに戻り, 増量後, 再び 1 ランク上り, やがてもとに戻るという現象がみられた点で特異的である。一時的ながら EST が奏効した可能性がある。

考 察

DMD の原因究明および治療法確立の試みは, これまで多数の検討がなされて来ているにもかかわらず, 原因については依然必ずしも定説はなく, 治療法は対症療法ですら確立されたものはないと言って過言ではない。

今回, DMD の原因として現在最も有力視されている筋細胞膜異常およびこれに関連した筋たん白分解亢進に着目して開発されたシステインプロテアーゼ阻害剤 EST を DMD 治療に試みた。

効果判定は, 主に筋力テスト, ADL テスト, 機能テストの成績および患児の日常の観察結果をもとに行った。

EST を投与した 12 例の患児の中で, 病気の進行が抑えられている可能性が示唆されたのは, 機能障害度, 筋力テスト, ADL テストの結果, 他の患児に比べ明らかな低下抑制の認められている 9 歳の患児 2 例 (症例 309, 311) のみであった。すなわち, DMD の病気の進展はほぼ一定の経過をたどり段階的に進行することはよく研究されているが, 上記の 2 例では一時的ではあるが低下した機能の回復が認められた。

他の 10 例については, 現在までの経過だけでは, 本剤の有効性について判定を行うことは非常に困難と考え, 一応現時点では無効と判定した。しかし, これらについても本剤の有効性を完全に否定したのではなく, 今後試験を継続して行った場合, 有効へと転じる可能性は十

分残されるものと考える。

DMDは段階的にその病状が進行する一方、その進行の速度は各症例間でかなりの幅があり、また、幼児期においては自然成長が病気の進行にまさる場合もあり一時的には機能向上が認められることがよく経験される。今回の試験において機能向上が認められた3例(症例301, 302, 303)についても、年齢は3~5歳であり、自然成長の影響を排除して考えることは困難なため、現時点では無効と判定した。

今後、stageの持続期間、歩行不能年齢、その他DMDの進行に関し詳細に検討されてきた項目についてESTを投与した場合を比較検討することが薬効評価に結びつくと思われる。しかし、このためには、長期間にわたり多数の症例を対象に詳細な試験を行う必要のあることは言うまでもない。

DMD患者に臨床検査を実施した場合、CKばかりではなく、GOT, GPT, LDHについても高値を示す上、変動も大きい⁷⁾。そこで肝の特異的のマーカ―としてICDHを特に検査項目に加えたが、いずれの症例についても正常範囲内の変動であった。なお、GOT, GPT, LDHについては高値で経過したが、特に異常と考えられるような変化は認められなかった。血清クレアチニンについては低値で推移したが変動はほとんど認められなかった。他の項目については全

て正常範囲内の変動であった。

副作用として症例303で投与開始日に嘔吐がみられたが、2日目以降は増量時においても全く認められなかった。したがって、これについては試験を進めて行く上で問題とはならなかった。これ以外の症例については特に副作用は認められなかった。臨床検査値に関しては、正常範囲内ではあるが、 γ -GTPの変動がみられた。その他の肝機能の指標に同様な変動は認められていないが、今後注意が必要である。

本研究の遂行に当たり、多大の援助を頂いた当院筋ジス病棟および栄養管理室の各スタッフに深謝致します。

文 献

- 1) Schotland, D. L. et al.: Science, 196, 1005, 1977.
- 2) Mokri, B. et al.: Neurology, 25, 1111, 1975.
- 3) Engel, W. K.; Mauro, A. (Ed.): Muscle Regeneration, Raven Press, New York, 1979, pp. 285-296.
- 4) Bodensteiner, J. B. et al.: Neurology, 28, 439, 1978.
- 5) Simon, E. J. et al.: Archives of Biochemistry and Biophysics, 96, 41, 1962.
- 6) 杉田秀夫 他: 神経進歩, 24, 821, 1980.
- 7) 今堀和友 他: 臨床薬理, 16, 749, 1985.

18. EST 臨床試験初期報告書

松原 四郎*

研究協力者 高守 正治* 本家 一也** 松谷 功**

はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) の 10 症例 (年齢 4~13 才) に 5 乃至 7 ヶ月間 EST の投与を行った。投与スケジュール (表 1) および観察項目 (表 2) については、予め決定されたプロトコールに従った。

本稿では 10 症例の各例につき病歴、治験開始前現症および治験開始後経過を述べた。訓練担当者の意見を参考にしながら医師がまとめた各例についての薬効に関する印象を後に付したが、担当者の主観の入った初期的な報告である。

なお、症例一覧 (表 3)、筋力テスト・ADL の総点数の推移 (表 4)、主な臨床検査の推移 (図 1~4) を参考のため付した。

症例 401 : 5 才 (昭和 54 年 10 月 30 日生)
[現病歴]

胎生期、周産期、乳児期には異常を認めなかった。処女歩行は 1 才 2 ヶ月で、精神発達に遅滞はなかった。3 才頃より階段昇降が遅くなり、一段ごとに足をそろえて昇降することに気づいた。この頃から、徐々に動揺性歩行が出現し、4 才になってから顕著となった。6 才年長の兄が同病に罹患している。母親の血清 CK 値は高く、彼女も軽度の近位筋の筋力低下を示している。既往には特記すべき疾患なし。

* 金沢大学医学部附属病院神経内科

** 国立療養所医王病院

[治験開始前現症]

体格と栄養は中等で、身長 119 cm、体重 20.0 kg。脈拍 92/分・整で、血圧 90/38 mmHg。一般身体所見は異常なし。精神知能発達は正常。四肢近位筋と下肢帯に軽度の筋萎縮と筋力低下があり、軽度の腰椎前彎、翼状肩甲、腓腹筋の仮性肥大を呈する。アキレス腱反射を除き深部反射は消失している。足関節に軽度の拘縮があり、立位でわずかに腫が床から浮くため、歩行時の動揺が著しい印象を与えている。軽度だが明瞭な登攀性起立を示し、階段の昇降でもちょっと膝に手を添える。Stage 2 の状態であった。血液生化学検査では筋酵素の著増を示す。心電図は V_1R の増高傾向を示す。筋電図では筋原性変化を認めた。

[治験開始後経過]

EST の服用に直接関連する問題は生じなかった。運動機能には明瞭な悪化がなかったのみならず、一部には改善のみられた点もある。仰臥位からの立ち上がりは時間的に変化は目立たないが、服薬前よりスムーズで力強い感じがする。しかし、これには入院と同時に訓練が本格化したことが関与している可能性も考慮すべきであろう。

検査成績に特記すべき変動は認められなかった。

症例 402 : 5 才 (昭和 54 年 11 月 28 日生)
[現病歴]

在胎期間、周産期に異常なく、処女歩行は 1

IV 臨床試験

表1 観察スケジュール

週 (開始後・週) (増量後・週)	0	2	4	7 (0)	11 (4)	19 (12)	31 (24)
機能障害度 (Stage)	○	○	○	○	○	○	○
マニュアルテスト 筋力テスト 機能テスト 可動域 (ROM) テスト 日常生活動作 (ADL) テスト	○		○			○	○
臨床検査 血液検査 尿検査	○	○	○		○	○	○
尿中 3-MeH, CRN, CR	○		○		○	○	○

表2 観察項目

機能障害度 (stage)	洋式生活様式の規準により 8 段階評価
筋力テスト	13種類 24項目
ROM テスト	11種類 22項目
機能テスト	5 項目 (立ち上り, 階段昇り 他)
ADL テスト	25項目
心肺機能	肺活量, 動脈血液ガス, 心電図
臨床検査	
血液検査	赤血球数, 白血球数, Hb, Ht, 血小板数, 白血球分類
血清電解質	Na, K, Cl, Ca, P
血液生化学検査	GOT, GPT, ALP, γ -GTP, CK, ALD, 総ビリルビン, BUN, クレアチニン, 総コレステロール, トリグリセリド, 総たん白, LDH, ICDH
尿検査	糖, たん白, ウロビリノーゲン, 沈渣 3-メチルヒスチジン (3-MeH), クレアチニン (CRN), クレアチン (CR)

才 2 ヶ月であった。徐々に転倒しやすい傾向が明瞭となり、3 才時には歩容の異常が指摘された。しかし、今回 EST 治験のため入院するまでは一般の保育園に通園し、健常児と同じ生活をしており、遠足にも参加していた。男の同胞 2 名のうち 1 名は同病に罹患している。母の兄 2 名が同病で死亡している。特記すべき既往歴なし。

[治験開始前現症]

身長 105 cm, 体重 17.0 kg。体格・栄養中等。脈拍 102/分・整。血圧 98/58 mmHg。一般身体所見に異常なし。精神知能発達はやや

遅滞しており、語彙が非常に少なく単純な受け答えができる程度である。好奇心が強く、さかんに悪戯をするが、年齢に比してかなり幼稚な感じである。上下肢帯、四肢近位筋の筋萎縮と筋力低下があり、中等度の翼状肩甲、腰椎前彎、腓腹筋仮性肥大がみられる。登攀性起立、動揺性歩行が明らかであるが、ADL 上の障害は少ない。階段の昇降には、軽く膝に手をあてる。ジャンプはできない。アキレス腱反射は保たれているが、他の腱反射は消失している。足関節にわずかに拘縮を認める。

血液生化学検査で筋酵素の著増をみる。心電

表3 症例一覽

症例 No.	年齢	体重 (kg)	機能障害度 (Stage)	投与量 (mg)		総合評価		総合コメント	
				開始時	増量時	総合効果	安全性		有用性
401	5	20.0	2	75	150	有効	副作用なし	有用	投与期間を通じて筋症状は悪化せず、一部の指標では改善を示すものもあった。特に“仰臥位からの立上り”は投与前に比してスムーズで、膝に手をつくことも少なくなった。訓練効果や自然の成長の影響も否定できないが、現時点では有効の印象を受けている。
402	5	17.0	2	75	150	無効	副作用なし	どちらともいえない	ほぼ自然経過に近い進捗が観察されたと思われる。現時点では、検査データ上も明らかな改善はみられていない。また、検査成績上副作用と関連する明らかな変動は認めなかった。
403	6	19.1	2	75	150	やや有効	副作用なし	有用	全体的に目立った進捗は認められなかった。投与後アルドラーゼがやや低下傾向を示した。
404	8	16.4	2	75	150	無効	副作用なし	どちらともいえない	試験期間中同一 stage にとどまったものの、その範囲内で明らかな症状の進行がみられ、自然経過と大差ないと思われた。 臨床検査成績には特記すべき変動は認めなかった。
405	8	22.2	2	100	200	やや有効	副作用なし	やや有用	症状は若干進したが、その程度は軽比較較的緩徐である印象を受けた。アルドラーゼは低下傾向を示した。γ-GTP が上昇傾向(6→13)を示したが、投与量を変えないまま正常範囲(0→20)にとどまった。
406	10	38.0	4	150	300	やや有効	中等度の副作用	やや有用	心拍比、肺活量では若干の進行が示唆されたが、運動機能上の進行は認められなかった。投与量増量後にγ-GTP(5→25→11)、Al-P(14.7→23.5→20.1)、ICDH(6.3→10.7→9.8)が軽度上昇したが、減量により回復がみられた。
407	10	26.0	4	100	200	やや有効	軽度の副作用	有用	歩容はわずかに悪化しているが、全体的には筋力低下が目立たず進行は緩徐と思われた。服用初期に1度だけ嘔吐したが、その後服用継続可能であった。γ-GTP がやや上昇傾向(6→13→8)を示したがその後低下した。アルドラーゼの減少傾向がみられた。
408	10	24.6	2	100	200	やや有効	副作用なし	やや有用	筋力のわずかな低下がみられたが、自然経過と大きな差はないものの、全体としては比較的緩徐な経過を示していると思われた。感冒のため、投与5ヶ月目に1回だけ腹痛、軟便の排泄と共に嘔吐したが、服薬自体に問題はなかった。アルドラーゼは低下傾向を示した。γ-GTP はわずかながら上昇傾向(5→16)を示した。
409	14	34.3	4	150	300	有効	副作用なし	有用	かろうじて歩行可能である4度の状態を保持し、手すりを用いつつ階段の昇降も可能な状態が維持されている筋力も全体にはよく維持されている。服用開始前より次の stage に移行しつつある筋力増進傾向がみられる。運動機能はよく維持されていると判断できよう。γ-GTP が正常範囲内で上昇傾向(8→19)を示したが、他の検査成績に変動は認められなかった。
410	4	11.9	2	50	100	やや有効	副作用なし	やや有用	観察期間が他思より約2ヶ月短い。この間症状の進展は認められなかった。投与開始当初、一旦口に入れた薬物を吐き出してしまいうことが数回あったが、看護婦がつきまそうことで解決した。

表4 筋力テスト・ADLの総点数の推移

週 No.	筋力テスト				ADL			
	開始時	4W	19W	31W	開始時	4W	19W	31W
401	194	197	196	196	82	82	81	81
402	190	190	185	170	82	83	79	76
403	173	173	174	164	80	79	78	77
404	169	167	167	161	78	76	75	71
405	176	173	172	166	75	75	71	71
406	145	149	149	149	52	53	52	51
407	142	142	138	137	50	49	49	47
408	184	189	179	178	69	63	65	66
409	149	143	144	146	60	59	57	58
410	161	158	159*	—	76	75	75*	—

* : 24W

図は正常。筋電図は筋原性変化を示した。

[治験開始後経過]

ESTの服用自体には障害がなかった。筋力は上肢筋では不変であったが、下肢近位筋では1/4~3/4グレード弱くなっている。歩行は若干動揺性を増し、遅くなった程度だが、床や椅子からの起立は、開始前の2倍近くの時間を要し、登攀性起立自体もかなり著明となった。関節拘縮もやや進展している。検査成績上、特記すべき変動は認められなかった。

症例403:6才(昭和53年8月5日生)

[現病歴]

在胎期および周産期に特記異常なし。生後11ヶ月で処女歩行。3才頃から、他の子供より走るのが遅れることや、階段昇降のスピードが遅く、膝に手を添えるなどの動作がみられるようになった。言葉の発達が悪いと思われたため、昭和59年10月、金沢大学小児科を受診したところ、筋疾患の精査のため入院をすすめられた。筋電図、筋生検、血液検査等の結果より、DMDと診断された。

[家族歴・既応歴]

母親は患児出産後間もなく離婚し、家を出て

いるので家族歴の詳細は不明。既往に特記すべき疾患なし。

[治験開始前現症]

一般理学的には特記すべき異常なし。身長111cm、体重19.1kg、精神知能発達の遅滞があり、簡単な単語2,3を続けて言うのが聞かれる程度。活発で好奇心は強いが、落ち着きがなく、大人の指示もあまりきかない。神経学的には上下肢帯、四肢近位筋に軽度の筋萎縮と中等度の筋力低下をみる。軽度の翼状肩甲と明瞭な下腿筋の仮性肥大あり、明らかな登攀性起立を臥位および椅子からの起立時に示す。歩行は軽度に動揺性だが、走ったり、低くジャンプしたりできる。階段昇降時に膝に手を添える。Stage2の状態。検査成績では、血清中の筋酵素の増加に加えて、ECGにてV₁Rの増高を認めた。

[治験開始後経過]

ESTの服用自体には全く障害はなかった。血液生化学検査上は筋以外の臓器障害を示唆する変化なし。精神知能発達障害のため、徒手筋力検査や各種の機能テスト結果の評価は若干慎重を要すると思われる。全体の印象としてはADL上も神経所見上もあまり変化がないとい

18. EST 臨床試験初期報告書

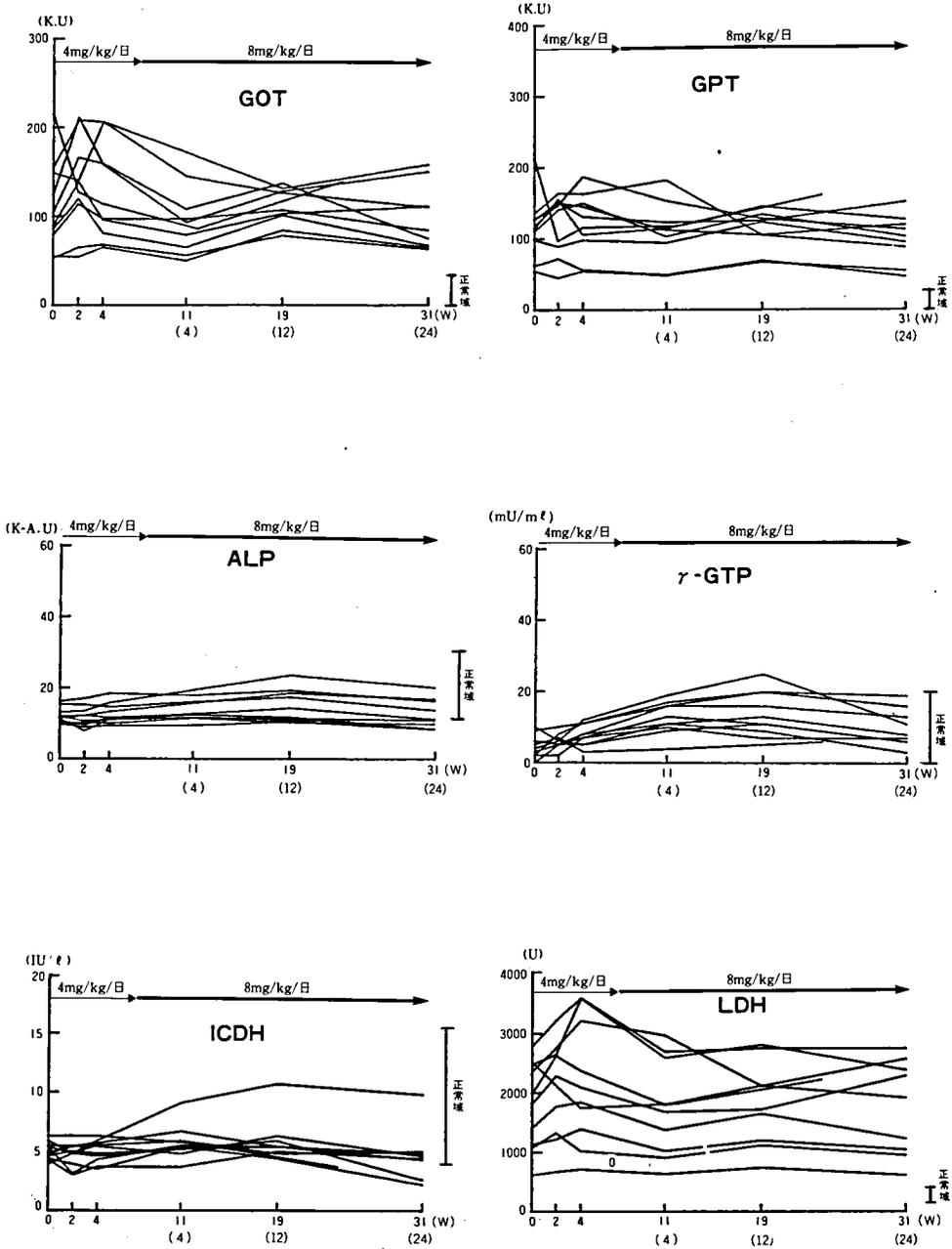


図1 臨床検査値の推移

IV 臨床試験

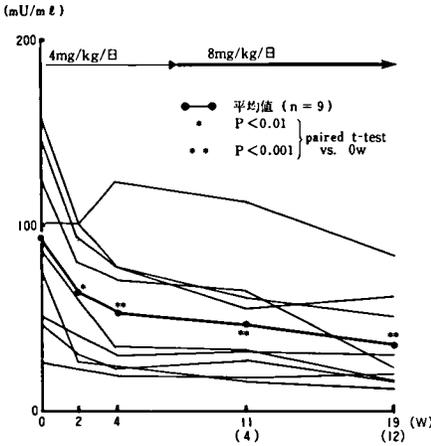


図2 アルドラーゼの推移

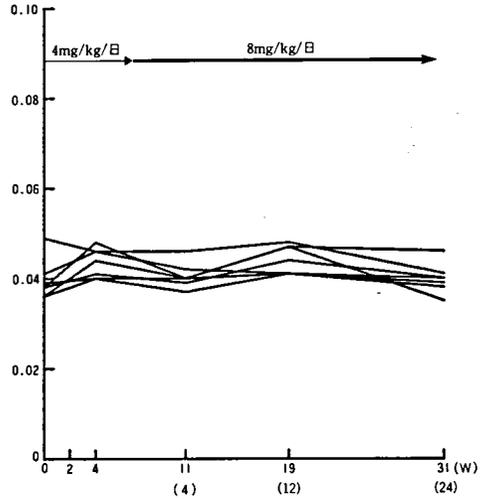


図3 尿中3-MeH/CRNの推移

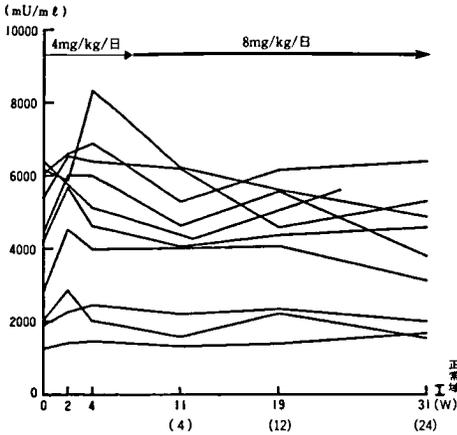


図4 CKの推移

えよう。臥位からの起立時間はやや延長しているが、歩容はあまり変化がない。膝関節の可動域にやや制限が出る兆候を見せている以外、ROMについても悪化は目立たない。椅子からの立ち上がりや、階段の昇りに関してはいくぶん進行しているかもしれないが、全体からはあまり大きな進行とは思われない。検査成績に目立った変動はなかったが、アルドラーゼはやや低下の傾向を示した。

症例 404：8才（昭和52年3月18日生）
〔現病歴〕

在胎期間、周産期に異常はなかった。処女歩行は1才6ヶ月であったが、転倒することが多いように家人は感じていた。3才頃から動揺性歩行が目立つようになり、このため、努めて身体を鍛えるようにしていたという。7才になって歩行中、くずれるように倒れこむようになり、石川整肢学園および金沢大学を受診、DMDの診断を受けた。筋疾患の家族歴はないが、家庭は複雑で、父親と母方祖母は精神病に罹患しているらしい。詳細は不明。既往歴に特記事項なし。

〔治験開始前現症〕

身長109cm、体重16.4kg。体格中等で、やや痩せている。一般身体所見に特記事項なし。精神知能発達の遅滞があり、IQは4才7ヶ月となっているが、言語面では、3才児位の能力に相当する感じである。数語の単語からなる簡単な受け答えはできるが、大体は何でも直接行動で対処している。好奇心が強く、活動的でひどい悪戯をすることが多いが、困っている他患児をみると助けている。四肢近位筋と上下肢帯に2~3とかなり高度な筋萎縮と筋力低下があり、翼状肩甲、腰椎前彎、腓腹筋の仮性肥大が明らかにみられる。アキレス腱反射は保たれているが、その他の腱反射は消失している。関節拘縮は目立ったものはない。かなり程

度の進んだ登攀性起立を示す。極くまれに失敗して途中で倒れてしまうことがある。強い動揺性歩行を認めるが、上肢については目立ったADL上の障害はない。Stage 2度。血液生化学検査で中等度から高度の筋酵素の増加がみられる。心電図は V_1R の増高と V_1 、 V_5 、 V_6 のQ波のやや深いことが指摘される。筋電図は筋原性変化を示した。

〔治験開始後経過〕

ESTの服用に直接関連する問題は発生しなかった。筋力は徐々に低下し1/2~1/4グレード低下した。ROMは不変であったが、ADLは床からの立ち上がりや、階段昇降などで若干の悪化を示した。特に臥位からの立ち上がりは開始前の5月には、9~10秒でスムーズにできていたが、10月には15秒、11月には17秒、12月14日21秒、12月24日と1月11日には立ち上がることができなかった。椅子からの起立は何とかでき、Stageは一応2度であるが、実質は3度に近い。平地歩行は大体安定しているものの、坂道ではかなり遅く、階段昇降の所要時間は、5秒から8.4秒へと若干延長している。

検査成績には特記すべき変動を認めなかった。

症例405：8才（昭和51年10月26日生）

〔現病歴〕

胎児期、周産期に特記異常なし。頸定3ヶ月、処女歩行1才2ヶ月。4才時、保育所職員より運動発達が遅れがちで持久力がないと指摘されている。普通学校に通学をはじめたが、起立時や階段昇降に際し、時間がかかり異常が目立つようになったため、7才時専門医の診察を受けDMDといわれた。両親は遠い親戚にあたるといわれているが詳細は不明。

〔治験開始前現症〕

体格・栄養中等、身長122.5 cm、体重22.2 kg。脈拍108分・整。血圧102/68 mmHg。一般理学的所見では特に異常は認めず。精神知能発達は正常。素直で真面目な子供だが、患児仲間からはよくいじめられている。上下肢帯と

四肢近位筋に中等度の筋萎縮と筋力低下があり、立位で軽い腰椎前彎を認める。翼状肩甲あり。中等度の腓腹筋肥性を認める。アキレス腱がごく軽い短縮を示す以外、ROMの異常なし。著明な登攀性起立と動揺性歩行を示し、階段昇降には手摺りが必要。仰臥位からの立ち上がりは約10~13秒を要するが、途中で頓挫することは全くない。ジャンプは不能であった。全体としてはStage 2の状態であった。血液生化学的には、筋酵素の増加を認める。心電図、肺活量は正常。筋電図ではミオパチー性変化のパターンを示した。

〔治験開始後経過〕

ESTの服用自体に障害はなく、血液生化学的にも臓器障害の副作用を示唆する変化は認められなかった。筋症状については、経過中かなりの変動、すなわち、一時的な悪化とそれに続く緩徐な回復がみられ、全体としてはわずかながら症状の進行がみられた。短期間内に少なくとも2回みられたこの悪化には、恐らく外泊が関係していると推定された。11月初旬、週末に外泊した後、一時的に起立不能となった。その後、1週間位で、21秒で再び起立できるようになり、12月には16~19秒と、かなりスムーズに立つことができるまでになった。しかし、正月の外泊後1月11日には再び臥位からの起立不能となっている。このような動揺を差し引いて全体をみても膝および足関節のROM制限は次第に目立つようになり、著明な動揺性歩行の原因の一つとなっている。このように、起立に要する時間は、変動しながらも治験前の2倍近くになっているが、歩行や階段の昇り時間などに大きな変化はない。筋力は1/4グレード程、一部の筋が弱くなっているものの全体的にはごく軽い低下である。内容はやや悪くなっているが、機能障害ステージは依然2度にとどまっている。肺活量、ECGその他の検査に明らかな変動はみられなかった。 γ -GTPは16まで増加の傾向を示したが服用量の変更をしないまま正常にとどまった。アルドラーゼは低下傾向を示した。

症例 406：10 才（昭和 50 年 5 月 8 日生）
〔現病歴〕

在胎期間および周産期に異常はなかった。処女歩行 1 才 3 ヶ月。3 才頃保母から歩容の異常を指摘され、母親も登攀性起立に気づき金沢大学整形外科を受診した。5 才頃金沢医科大学、関東通信病院、瀬川クリニック等を次々に受診、金沢医科大学での筋生検の結果も含めて、DMD といずれの施設でも言われた。また、心電図変化も指摘された。昭和 58 年より当院に入院、養護学校に通学している。この間、動揺性歩行は徐々に増強し、臥位よりの起立は、介助なしでは困難となり、しばしば転倒。階段昇降は不能となった。同胞は妹 1 人で、本人の他に同様の症状を有する血縁者はいない。

〔治験開始前現症〕

身長 135 cm、体重 38.0 kg と肥満している。脈拍 90/分・整、血圧 102/42 mmHg。一般理学的所見では異常なし。精神知能発達は正常。理屈っぽいところがあり、ちょっとしたことで盛んに苦情をいう。軀幹筋、上下肢帯および四肢近位部の諸筋に 2~3 の中等度の筋萎縮、筋力低下があり、手内筋など遠位筋もやや弱い。腓腹筋に仮性肥大を認める。足関節に軽度の関節拘縮が存在する。起立は臥位からも椅子からも不能で、一旦、介助により起立すると著明な動揺性歩行ながら 100 m 以上歩行可能である。臥位から四這いになるのには 15 秒程要するが可能。検査成績のうち、血液生化学的には筋酵素の増加を認めた。心電図上は II、III、aV_F に異常 Q 波を記録した。筋電図は筋原性変化のパターンを示した。

〔治験開始後経過〕

自覚的および一般身体所見上、EST の服用に直接関連する障害は認められなかった。しかし、血液検査上、8 月、9 月に γ -GTP、ALP および ICDH の軽度上昇傾向がみられたため、一旦増量した薬剤量を 300 mg/日から 150 mg/日に減量した。その後、検査成績は旧に復する方向に推移している。その他、服用開始後、神経学的にも、実際の ADL 面でも明瞭な変化はみられていない。筋力、ROM について

も同様である。歩行持続力、歩容も目立った変化はない。しかし、検査成績のうち、胸部レ線所見では心胸比が 0.50 から 0.56 へと進展した。心電図では変化なし。肺活量は 1840 から 1690 とやや減少を示した。

症例 407：10 才（昭和 49 年 8 月 9 日生）
〔現病歴〕

在胎期間、周産期に異常なし。処女歩行は 1 才 3 ヶ月であったが、間もなく母は下腿の仮性肥大に気づいた。徐々に歩行は不安定となり、9 才頃から転倒するようになった。

5 才時、当院外来にて、DMD と診断された。9 才 4 ヶ月で当院に入院し、養護学校に通い始めた。5 才年長の兄が同病に罹患している。既往歴は特になし。

〔治験開始前現症〕

体格中等、身長 129.9 cm、体重 26 kg。一般身体所見は特記すべき異常なし。脈拍 108/分・整。血圧 94/62 mmHg。精神知能発達は正常で、やや神経質な面があるが素直な性格で友人が多い。上下肢帯と四肢近位筋に筋萎縮と筋力低下がみられるが、下肢が 2~ と弱い割には上肢は 3 以上と保たれている。腓腹筋の軽度の仮性肥大あり。アキレス腱反射がわずかに認められる以外は、腱反射は消失している。股関節・膝関節・足関節に軽度の拘縮がある。自力では立てないが、壁に片手で寄り掛かって立位を保ったり、脚を広げて、ほんのしばらく立っていることはできる。約 10 分間膝関節の伸展訓練をすると自力歩行できるが、10~15 m 程度で、実用的には、時々壁などに手をつきながら歩いている。この歩き方だと坂もゆっくり昇降可能。実質的には階段昇降不能。四這いの姿勢をとったり、寝返りには問題ない。上肢については大体のことはできる程度保たれており、球技なども可能である。血液生化学検査では筋酵素の中等度の増加をみる以外、特記すべき異常なし。心電図、胸部レ線は正常。筋電図は筋原性変化を示した。

〔治験開始後経過〕

服用を始めた当初、薬の苦味を訴えることが

あり、服用開始2週間後の5月29日朝より腹痛とともに1度嘔吐した。しかし、翌日にはもと通り服用し、その後も問題なく服用を継続している。8月13日に嘔気を訴えたが、それ以降は嘔気出現していない。筋力にはほとんど変化がみられなかったが、歩容はやや動揺性、不安定を増し遅くなった印象がある。これは膝関節等のROMが若干悪化したこと、膝関節の伸展訓練を以前より長時間行わないと歩行ができなくなっていることと関連性があると推察される。検査成績に明瞭な変動は認められなかったが、 γ -GTPはやや上昇傾向を示した。アルドラーゼは減少する傾向がみられた。

症例408：10才（昭和49年6月7日生）

〔現病歴〕

出産時臍帯巻絡のため、酸素欠乏の状態となったということが詳細は不明。処女歩行は1才6ヶ月とやや遅く、言語の発達が遅延したため2才頃より金沢医科大学を受診し、同病院の言語教室に通っていた。言葉は6才頃には普通に話せるようになったが、歩容が次第に動揺性となり、走る際、競歩のような走り方をしていた。6才頃から階段昇降に手摺りを使用するようになった。8才時、同院でDMDと診断された。同胞2名（男1人、女1人）には異常なく、特記すべき家族歴なし。また特記すべき既往歴もなし。

〔治験開始前現症〕

身長128 cm、体重24.6 kg、体温36.5°、脈拍72/分・整、血圧110/60 mmHg。一般理学的に異常所見なし。年齢に比して幼稚な感じで、時々吃音が聞かれ語彙は少ない。四肢近位筋および上下肢帯に筋萎縮、筋力低下がみられ、上肢帯で3⁺、下肢帯で2~3程度の筋力を示す。翼状肩甲著明。軽度の側彎と腰椎前彎がみられ、下腿筋の中等度の仮性肥大あり。明瞭な関節拘縮は認められない。膝蓋腱反射消失。起立時著明な登攀性起立を示し、調子が良い時は、仰臥位から20~30秒で起立できるが、2回に1度位は途中で転倒してしまい起立できない。階段昇降は手摺りに両手でつかまり横

きにゆっくり可能だが実用的ではない。著しい動揺性歩行を示し、ジャンプは不能。椅子からの起立は、時には介助なしで膝に手をつけて可能だが、途中で坐りこむか転倒してしまうこともある。総合的に、洋式生活でのStageは2。検査成績では、CKをはじめとする筋酵素の上昇を認める以外、特記すべき異常はなかった。〔治験開始後経過〕

ESTの服用自体に障害はなかった。服用開始5ヶ月目の10月23日に感冒のため1回だけ腹痛、軟便の排泄とともに嘔吐したことがあるが、その他全身症状には特記事項なし。筋症状の変化に関しては、服薬開始前後の1ヶ月間に軽度の悪化がみられたが、その後は、ほとんど不変か軽度の改善が認められた。5月から6月にかけて起立、椅子からの立ち上がりで失敗する頻度が高くなり、一時ほとんど不能となった。その後9月から10月頃は一時的に成功するようになった。この期間は薬の服用とともに本人も意欲的に膝関節の伸展などの理学的訓練にとりこんでいた。しかし、翌年（61年）の正月の帰宅から帰院した後、状態はまた少し悪化しており起立が困難となっている。この半年間に筋力は上下肢帯で約1/2グレード低下し、以前は目立たなかった膝関節とアキレス腱に軽度ながら拘縮がみられるようになった。薬の服用と訓練の結果か、ADL上では目立った悪化はなく、Stageも2にとどまったものの、全体の筋、関節症状は軽度ながら進展したと思われる。検査成績では、 γ -GTPがわずかながら上昇の傾向を示した以外著変なかった。アルドラーゼの低下傾向が認められた。

症例409：14才（昭和46年5月1日生）

〔現病歴〕

胎生8ヶ月目に胎盤早期剥離のため早産の危険があったが事無きを得、40週で分娩したが仮死状態であった。生下時体重2750 g。乳児期はほぼ正常な発達過程を辿ったが、3才時に動揺性歩行を指摘された。4才になり金沢大学整形外科で入院精査を受け、筋生検の結果も総合してDMDと診断された。その後、階段の

昇降、独力での立ちあがり障害されるなど徐々にADLの低下をみたため、中学進学と同時に本院に入院した。妹が1人以外同胞なし。家族歴、既往歴ともに特記事項なし。

〔治験開始前現症〕

身長162 cm、体重34.3 kg、体格中等。一般身体所見に異常なし。精神知能発達は正常。おとなしく、普段は周囲とも協調性があるが、やや神経質で情緒的に不安定な面がある。四肢・軀幹全般に筋萎縮と筋力低下があり、特に近位筋に著明。腓腹筋仮性肥大をわずかに認める。側彎が中等度にみられ、股関節、膝関節、足関節に軽度から中等度の拘縮を認める。床上の寝返り、臥位から四這いへの姿勢変換は自力でできるが、臥位から坐位およびその逆、立ちあがりは全く不能。介助で立たせると、両下肢をひろげて、ものにつかまらず立っていられるが、かなり不安定。歩行は極端に動揺性で不安定だが、ゆっくりともものにつかまらず可能。時に臀部に手をそえて、手で腰部と下肢の固定を補助するように歩行する。極めて不安定だが、横向きで手摺りに腰をあずけるようにしながら、低い階段を昇降してみせる。しかしこれは実用的ではない。全体ではStage 4と判断した。検査成績のうち、血液生化学検査では筋酵素の中等度増加をみる。肺活量は1940 mlと減少している。心電図はV₁Rの増高があり、筋電図は筋原性の変化を示した。

〔治験開始後経過〕

EST服用開始前から、1~2ヶ月に1回の頻度で、腹痛、下痢、嘔気、頭痛などの愁訴があったが、EST服用中も時折り嘔気を訴えた。しかし、嘔吐はなく、理学的所見上、異常がみられず、訴える様子も重篤な印象を受けなかったため、薬の投与を継続した。恐らく薬剤の直接作用に関連した消化器症状ではないと考えられた。年長児らしく、薬の効果がはっきりしないなどの苦情をもらしながらも、きちんと服薬している。運動機能の面ではほとんど変化がなかった。筋力テストでは微妙な差で数値が変動しているが、実際の印象ではほとんど変化がなかった。神経学的には、アキレス腱反射が以前

より出にくくなっていることを除けば、特記すべき変動はない。血液検査、心電図、肺活量等の検査成績に大きな変動はみられなかったが、 γ -GTPは正常範囲内で上昇傾向を示した。

症例410：4才（昭和56年7月4日生）

〔現病歴〕

在胎期間中および周産期に特記すべき異常なし。しかし、精神知能と運動発達のいずれも遅延傾向がみられ、一応2才頃歩行は可能となったが、不安定であった。2才3ヶ月の時、金沢大学で入院精査し、筋電図、筋生検を含む検査の結果、DMDと診断された。その後、運動発達は進み、3才以後はやや動揺性ながら、むしろ2才時よりも安定した歩行を示している。知能については、1才半頃から単語を話し出したが、語彙、言語理解力は十分に発達せず、しだいに異常が明瞭となっている。母親のCKは高値である。既往歴に特記事項なし。

〔治験開始前現症〕

身長87.9 cm、体重11.9 kgと体格・栄養中等で、脈拍102/分・整、血圧118/68 mmHg。一般身体所見では特記すべき異常なし。知能は遅れており、言葉は2才程度。自発言語は促されないかぎりほとんどなく、大部分は復唱である。簡単な指示は理解でき、素直に従うことが多い。おとなしく、悪戯も余りしない。下肢近位筋、上下肢帯の一部、頸部などに軽度の筋萎縮と筋力低下があり、わずかながら、翼状肩甲と軽度の腓腹筋仮性肥大がみられる。臥位および低い坐位からの立ちあがりに際して、明瞭な登攀性起立が認められる。歩行はやや動揺性である。膝蓋腱反射は減弱しているが、他の腱反射はほぼ正常に保たれている。関節拘縮なし。階段の昇降には手摺りを使用する。Stage 2の状態。血液生化学検査では筋酵素の中等度から高度の増加がみられ、筋電図は筋原性変化を示した。心電図には異常なし。

〔治験開始後経過〕

投薬開始当初、一旦口に入れた薬を吐き出してしまふことが数度あった。しかし服用に際し、看護婦が付き添って確認することでこのよ

うなことは起こらなくなった。運動機能に関しては服用開始 6 ヶ月目までは変化はない。神経学的にも変わらないが、精神的には少し発達して、理解できる言葉の数は次第に増加している。

総 括

薬剤の効果判定には、治験プログラムの性格上、担当者の主観的印象がかなり影響することを避けられなかった。今回は、評価に際して、主治医、PT、OT、生活指導員が意見を述べ、これを主な拠りどころに主治医が判断し総合評価として記入した。意見を述べるに先立って、各自が互いに話し合わない段階で、評価用紙に記入しコメントを書き入れた。多少の差はあったものの全体的に評価は極めてよく一致しており、意見が大きく別れた例はなかった。主治医より実際に訓練にあっている他の 3 名の評価が有効性を支持する方に傾いていた。個々の症例についての判定は表 3 に示したが、全体をまとめると、有効 2 例 (401, 409)、やや有効 6 例 (403, 405, 406, 407, 408, 410)、無効 2 例 (402, 404) の結果となった。やや有効例中でも、比較的有效性を支持する意見の多かった例 (403, 406, 407) と否定的な意見のあった例 (405, 408) があった。

投与開始後に 3 例 (407, 408, 409) で消化器症状があった。これらのうち 408 では服用開始 5 ヶ月目に 1 回だけ腹痛、軟便、嘔吐を認めたが感冒によるものと判断した。409 では、EST 服用開始前から 1~2 ヶ月に 1 回の頻度で消化器症状や頭痛の訴えがあり、今回認

められた症状についても本剤によるものとは考えなかった。407 では服用を始めた当初、薬の苦味を訴え、嘔気・嘔吐を認めた。この苦味も消化器症状の一因として考えられた。いずれについても服薬の継続に支障はなく、症状出現の翌日からこれまで通り服薬できた。

臨床検査値については、 γ -GTP が 4 例 (405, 406, 408, 409) で上昇した。このうち 406 では γ -GTP が小児の正常域を超え、ALP、ICDH も正常範囲ながら上昇傾向を示したため、投与量を減らしたところ検査値は低下した。

特に γ -GTP については、大部分が増量後に上昇していること、投与量を減らすことにより下がることから、dose-dependent な傾向のあることが示唆された。

アルドラーゼ (ALD)、尿中 3-MeH/CRN、CK については薬効評価の試みとして検査項目に加えたが、このうち ALD については EST 投与開始後いずれの症例においても漸減し、19 週目には平均で投与開始時の約 40% と有意 ($p < 0.001$) な低値を示し、薬効との関連性が示唆された (図 2)。一方、尿中 3-MeH/CRN については 404 で漸減したが、全体としては特筆すべき変化ではなかった (図 3)。CK については変動も大きく一定方向の変化は認められなかった (図 4)。

以上担当者の主観を交え EST の薬効に関する印象をまとめたが、今後はさらに長期間にわたるデータを蓄積し、客観的評価を試みて行きたい。

19. Distal myopathy with rimmed vacuole に対する EST の臨床試験

杉田 秀夫* 宮 武 正**

研究協力者 石原 傳幸*** 中野 今治**** 樋口 逸郎*
田中 恵子** 湯浅 龍彦**

Rimmed vacuole を伴う distal myopathy (DMRV) は近年殊に本邦において注目されている疾患である¹⁾。その理由は幾つかあるが、本症の rimmed vacuole の成立機転にチオールプロテアーゼ、殊にカテプシン B や H の活性亢進が何らかの関連を有することが明らかにされ²⁾、プロテアーゼ阻害剤である EST (E-64-d) によって rimmed vacuole の生成の抑制、ひいては疾病の進展防止への期待が生まれてきたからである。

対象患者

6 施設に入院または通院中の DMRV 患者のうち、本研究班員によって確定診断をつけられ、本人の同意の得られた 11 例が今回の対象とされた。年齢分布は 22~53 歳 (男 5, 女 6)、初発年齢は 18~38 歳であった。家族内発症は 5 家系にみられ、同胞発病が 4 家系に、父子間発病が 1 家系にみられた。血族結婚は 4 家系に認めた。初発症状は全例で下肢の運動障害であったが、2 例は上肢の障害を同時期に自覚していた。筋生検では全例に rimmed vacuole が認められているが、その頻度はまちまちであった。

* 国立武蔵療養所神経センター

** 新潟大学脳研究所神経内科

*** 国立療養所東埼玉病院

**** 国立療養所下志津病院

EST 投与量と投与方法

EST は経口投与された。初期投与量を 4 mg/kg/日とし 4 週間の経過をみたのち、8 mg/kg/日 が維持量とされた (表 1)。カルシウム拮抗剤の併用は禁止された。

経過観察

本研究のために特別のケースカードを作成しこれにのっとり、経過観察を行なった。

観察項目としては表 2 のような諸項目が含まれた。

結 果

今回の結果は EST 投与開始後 12 週~30 週間の観察資料に基づくものである。

まず副作用としては 4 症例において EST 投与開始後 4 日目と 14 週・17 週に胃部不快感、嘔気、嘔吐などの消化器症状が一過性に出現した。しかしこれらは軽く、投薬中止に至るものはなかった。血液一般検査、血液生化学検査、尿検査等には異常を認めなかった。

次に臨床機能テストのうち、握力検査では、1 例に握力の著しい増加を認め、2 例で軽微な上昇をみた。ADL テストでは 2 例が進行し、8 例が不変、1 例で 1 段階の上昇を認めた (図 1)。

CK ならびに 3-メチルヒスチジン/クレアチニン比は、EST によっては変化を受けなかった。

IV 臨床試験

表1 患者の背景

症例No.	施設名	年齢(才)	性別	罹病期間	Stage	投与量 (mg/day)	
						(約 4mg/kg → 約 8mg/kg)	
1	下志津病院	35	女	3年9ヶ月	2	220 ^{4w} → 300 ^{10days} → 450 →	
2		37	女	3年2ヶ月	1	216 ^{4w} → 450 →	
3		34	女	17年	6	175 ^{4w} → 350 →	
4	武蔵療養所	37	男	1年7ヶ月	1	250 ^{10w} → 375 ^{4w} → 500 →	
5	東埼玉病院	51	女	32年	5	150 ^{10w} → 300 →	
6		22	女	8ヶ月	1	200 ^{17w} → 400 →	
7	新潟大学	51	女	20年	2	175 ^{4w} → 350 →	
8		53	男	16年	2	200 ^{5w} → 400 →	
9	犀潟療養所	30	男	8年	5	150 ^{5w} → 300 →	
10		38	男	14年	5	250 ^{7w} → 500 →	
11	新潟病院	34	男	9年	5	250 ^{9w} → 500 →	

表2 検査項目

マニュアルテスト	
筋力テスト	16種 計30項目
機能テスト	6項目
ADLテスト	10項目
臨床検査	
血液一般検査	赤血球数, 白血球数, ヘモグロビン, ヘマトクリット, 血小板数, 白血球分類
血清電解質検査	Na, K, Cl, Ca, P
血液生化学検査	CK, GOT, GPT, Al-P, γ -GTP, LDH, ICDH*, 総ビリルビン, BUN, クレアチニン, 総コレステロール, トリグリセライド, 総蛋白
尿検査	糖, 蛋白, ウロビリノーゲン, 沈渣, クレアチニン (CRN)*, クレアチン*, 3-メチルヒスチジン (MH)*
その他	CT (X線 CT または NMR-CT)

*: 集中測定

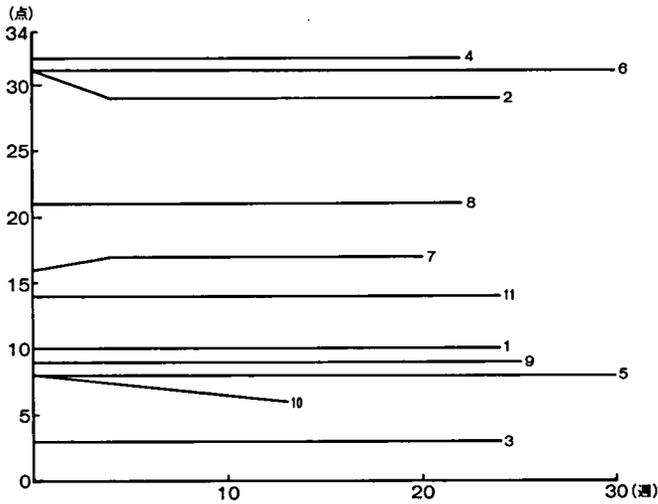


図1 ADLテスト

考 察

文 献

DMRV の vacuole は autophagic vacuole の集合体であり³⁾、勝沼らによりカテプシン B や H の活性が証明されている²⁾。杉田らは実験的クロロキンミオパチーの筋細胞に autophagosome が出現すること、そしてこれらの筋でカテプシン B、B & L が著しく増加していることを示した⁴⁾。彼らはさらに EST の投与によりクロロキンミオパチーの autophagosome の出現が阻止される⁵⁾ことを証明し、DMRV の EST 治験についての根拠を与えた。今回は 11 例の DMRV について 12 週～30 週間の臨床経過を観察し、1 例に ADL の 1 段階の改善を認めた。2 例は進行し 8 例は不変であった。副作用としては軽度の消化器症状を一過性に認めた。このような結果から本研究はさらに観察期間を延ばして行なわれるべきこと、そしてより発病早期の症例について実施されるべきと考えられた。結論を得るまでには今後二重盲検試験を組み入れて検討されることが重要と思われた。

- 1) 水澤英洋, 豊倉康夫: 遠位型ミオパチー, 神経内科, 20, 555-572, 1984.
- 2) 木南英紀, 勝沼信彦, 伊井邦雄 他: Rimmed vacuole を伴う distal myopathy におけるカテプシン B 及び H の局在, 厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の臨床, 病態と成因に関する研究」昭和 59 年度研究報告書, 271-274, 1985.
- 3) 埜中征哉: Rimmed vacuole による筋変性の特異性—rimmed vacuole を伴う遠位型ミオパチーと遠位型筋ジストロフィー症 (三好型) との対比を中心として—, 神経内科, 20, 622-630, 1984.
- 4) 杉田秀夫, 佐野元規, 石浦章一: 実験的クロロキンミオパチー—autolysosome の形態学的・生化学的検討—, 厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の臨床, 病態と成因に関する研究」昭和 59 年度研究報告書, 278-282, 1985.
- 5) 杉田秀夫, 佐野元規, 藤田武久 他: 実験的クロロキンミオパチーにおける EST の効果, 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 59 年度研究報告書, 123-127, 1985.

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究班
班 員 および 関係者名簿

氏 名	施 設 名	所 在 地
主任研究者 今堀 和友(班長)	東京都老人総合研究所	〒173 板橋区栄町35-2
分担研究者 江橋 節郎(幹事)	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
杉田 秀夫(幹事)	国立武蔵療養所 神経センター 疾病研究第一部	〒187 小平市小川東町4-1-1
勝沼 信彦	徳島大学医学部附属 酵素研究施設 酵素化学部門	〒770 徳島市蔵本町3-18-15
福原 武彦(幹事)	東京慈恵会医科大学第2薬理学	〒105 港区西新橋3-25-8
北川 晴雄(監事)	千葉大学薬学部 薬効・安全性学講座薬物学	〒260 千葉市弥生町1-33
寺尾 寿夫	帝京大学医学部第一内科	〒173 板橋区加賀2-11-1
宮武 正	新潟大学脳研究所 神経内科	〒951 新潟市旭町通一番町757
柴田 宣彦	大阪府立成人病センター 第一内科	〒537 大阪市東成区中道1-3-3
鈴木 紘一	東京都臨床医学総合研究所 遺伝情報部門	〒113 文京区本駒込3-18-22
野々村禎昭	東京大学医学部第一薬理学	〒113 文京区本郷7-3-1
石原 傳幸	国立療養所東埼玉病院 第三内科	〒349-01 蓮田市大字黒浜4147
中野 今治	国立療養所下志津病院 神経内科	〒284 四街道市鹿渡934-5
大関 正弘(幹事)	大正製薬(株) 総合研究所	〒330 大宮市吉野町1-403
会沢 孝雄	大正製薬(株) 開発部	〒171 豊島区高田3-24-1
班友 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
青柳 高明	微生物化学研究所	〒141 品川区上大崎3-14-23
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
小沢鏑二郎	国立武蔵療養所 神経センター 機能研究部	〒187 小平市小川東町4-1-1
松原 四郎	金沢大学医学部附属病院 神経内科	〒920 金沢市宝町13-1