

厚生省
新薬開発研究費

低分子酵素阻害物質による
難病治療薬の開発研究

江橋 班

昭和62年度研究報告書

昭和 63 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	3
低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究	江橋 節郎
II. 分担研究報告	
1) ホルフェニシンの生体内動態	17
—蛍光 HPLC によるマウス血清および筋肉中濃度の測定—	
九州大学薬学部	大倉 洋甫 巢 文峰 甲斐 雅亮
2) 筋肉内酵素網の動態に対するベスタチンおよびその立体異性体の影響	23
微生物化学研究所	青柳 高明 和田 孝雄 小島 蒔子 永井真知子 原田 滋子
3) 蛋白分解酵素の役割とその阻害剤に関する研究	33
助大阪基礎医学研究奨励会	藤井 節郎
4) Lysosomal proteolysis の Cystatin による制御機構ならびに Cystatin の大量産生	37
第 1 部: Cathepsin 群のプロセッシングと Cystatin による Lysosomal proteolysis の 制御機構	
第 2 部: Cystatin α 遺伝子の大腸菌による発現と Lysosomal proteolysis の抑制	
徳島大学酵素科学研究センター	勝沼 信彦 木南 英紀 大和 正幸 原 研治 板東 祥晃 三井東圧化学 池 祥雅
5) C-蛋白質を指標とした筋ジストロフィー症の解析	47
千葉大学理学部生物学科	丸山 工作 大日方 昂 佐野 一裕 小島 崇
6) CANP 阻害剤の設計および合成に関する研究	53
東京理科大学理学部	向山 光昭
7) CANP 阻害剤の合成	57
大正製薬総合研究所	大関 正弘 花田 和紀 横尾 千尋 村田 充男 東京都臨床医学総合研究所 鈴木 紘一 徳島大学酵素科学研究センター 勝沼 信彦
8) CANP 阻害剤の一般薬理学的研究	61
—筋電図および神経活動中の呼吸運動関連成分の定量的評価法に関する基礎的研究—	
東京慈恵会医科大学第二薬理学教室	福原 武彦 加藤 総夫 木村 直史 高野 一夫

- 9) CANP 遺伝子のクローニングに関する研究69
 東京都臨床医学総合研究所 鈴木 絃一
- 10) 筋ジストロフィーにおける CANP 系の変動73
 東京都老人総合研究所 川島 誠一 林 昌美 中村 愛
- 11) ベスタチンの使用経験77
 —特に同量固定法 single blind 法による治験例に bestatin を再投与した
 その後の実態と double blind 登録例について—
 東京女子医科大学小児科 福山 幸夫 大沢真木子 斎藤加代子
 新井 ゆみ 平沢 恭子 川井未加子
 中田恵久子 宍倉 啓子 鈴木 陽子
 平山 義人
- 12) Duchenne 型筋ジストロフィー症の血清酵素におよぼすベスタチン (NK421) の効果83
 国立療養所兵庫中央病院 高橋 桂一 西尾 英久
- 13) Duchenne 型筋ジストロフィー症に対するベスタチンの効果87
 —尿中 3 メチルヒスチジンの測定を中心とした検討—
 国立療養所宇多野病院 西谷 裕 板垣 泰子
 大阪市立大学生生活科学部 平野久美子
- 14) ベスタチンの使用経験93
 —九州地区 5 歳以下の対象例について—
 国立療養所西別府病院 三吉野産治 江田伊勢松
- 15) フォルフェンシノールの筋ジストロフィー症に対する効果 (第 2 報)95
 国立療養所箱根病院 村上 慶郎 岡崎 隆 林 英人
 斎藤 有 馬場 繁二
- 16) ベスタチンの筋ジストロフィーに対する臨床効果に関する研究99
 東邦大学医学部第四内科 木下 真男
 国立精神・神経センター 里吉栄二郎
 東京女子医科大学 福山 幸夫
 国立療養所西別府病院 三吉野産治
 国立療養所箱根病院 村上 慶郎
- 17) Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の臨床経過: EST 投与群での検討107
 新潟大学脳研究所神経内科 宮武 正 桑原 武夫 湯浅 龍彦
 国立療養所新潟病院 山崎 元義
 国立療養所東埼玉病院 石原 傳幸
 国立療養所下志津病院 中野 今治
 国立療養所医王病院 本家 一也
 国立精神・神経センター 杉田 秀夫

18) ADL score の検討による筋ジストロフィー障害度の再評価	111
国立療養所東埼玉病院 石原 傳幸 五味慎太郎 宮川 雅仁 儀武 三郎 青柳 昭雄 東京医科歯科大学難治疾患研究所 佐久間 昭	
19) 血中骨格筋ミオシン軽鎖測定法の開発とその臨床的意義	119
—モノクローナル抗体によるキット化の試み— 東京大学医学部第三内科 矢崎 義雄	
20) 各種プロテアーゼインヒビター投与の筋ジストロフィーマウスに対する効果	125
和歌山県立医科大学第二生理学 辻 繁勝	
21) E-64誘導体による糖原病II型ウズラの治療	129
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部 杉田 秀夫 石浦 章一 塚原 俊文 須原 芳宏 菊地 建機	
22) 実験的筋炎モデル動物の作製に関する研究	133
—自己免疫筋疾患抗原物質のモノクローナル抗体による解析— 国立精神・神経センター神経研究所 里吉栄二郎 古川 昭栄 赤沢左衛子 加茂 功	
III. 低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究班分担研究者一覧	139

総括研究報告

低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究

主任研究者 江 橋 節 郎

本研究班は、低分子蛋白分解酵素阻害物質または、細胞膜酵素阻害物質を用いて、進行性筋ジストロフィー治療薬を開発するを目的とする。

この数年、遺伝子工学的手法の導入により、デュシェンヌ型ジストロフィーの本態研究に画期的な進歩があり、本研究班班員らの努力により、欠落がその原因となると考えられる蛋白が、少なくとも免疫学的に同定されるに至った。この事は、本病の治療薬開発に関し、この方向の研究の進展により、従来より遙かに具体的な指針の確立が可能となったことを意味する。

このような状況下にあっても、対症的な治療法の開発検討は、忽せにされるべきでなく、従来の暗中模索の段階から脱却し、実体的把握が可能となった現時点においては、本研究班の指向する治療法の意義がより実質的なものとなり、その具体化が焦眉の急となってきたことを意味する。この意味において、本研究班が目標としてきた新しい治療薬開発の研究に加え、本年度は従来から継続中のベスタチンおよびロキシスタチンの臨床的結果判定に関する研究にも力を注ぐこととなった。

具体的な研究結果は下記の通りである。

1. ホルフェニシンの生体内動態

——蛍光 HPLC によるマウス血清および筋肉中濃度の測定——

大倉班員は芳香族アルデヒドの蛍光試薬、1,2-

ジアミノ-4,5-エチレンジオキシベンゼン (DEB) を用いて、プレカラム蛍光誘導体化 HPLC によるホルフェニシンの薬物モニター法を確立した。また、ホルフェニシンおよびホルフェニシノールをそれぞれマウスに経口投与したときの血清および筋肉中のホルフェニシンならびにホルフェニシノールの濃度分布を調べた。

1. ホルフェニシンの HPLC 定量：マウス筋肉の酢酸ホモジネートおよび血清をそれぞれ過塩素酸で除蛋白したのち、遠心して得られた上清に DEB を加え、60°C、30分間蛍光反応を行なう。反応後、反応液を HPLC に注入し、ホルフェニシン蛍光体を分離、検出する。HPLC は TSKgel ODS-120T カラムを用い、アセトニトリル-30mM リン酸塩緩衝液 (pH6.5) (1:5, v/v) を移動相とする。蛍光検出は Ex350nm および Em420nm で行なう。この方法の検出限界 (S/N=2) は血清中 4.9pmol/ml および筋肉中 11.9pmol/g であった。

2. ホルフェニシンならびにホルフェニシノールの体内動態：ホルフェニシンを経口投与 (30 mg/kg) したマウスの体内では、投与後、1~8 時間において血清中 100-2nmol/ml および筋肉中 20-2nmol/g の経時的濃度変化を示した。このとき、ホルフェニシンの代謝物としてホルフェニシノールが比較的高濃度 (10nmol/ml or g) で観察された。一方、ホルフェニシノールを同様にマウスに投与した場合、ホルフェニシノールの血清

および筋肉中の経時的濃度変化はホルフェニン投与におけるホルフェニシンの濃度変化とほぼ同じであった。この場合も、ホルフェシノールからの代謝物としてホルフェニシンの生成が認められたが、その血清および筋肉中の濃度は低いレベル (0.01-0.1nmol/ml or g) を示した。

2. 筋肉内酵素網の動態に対するベスタチンおよびその立体異性体の影響

青柳班員は筋ジスマウス、ハムスターなどの筋肉を含む各臓器内の酵素活性の変動を経時的に調べ、広範囲の酵素に異常が誘起されていることを認めた。さらに、筋ジストロフィー症の発症機序にエキソペプチダーゼがエンドペプチダーゼと異なる役割を果していることを明らかにした。

ベスタチンは筋ジストロフィーマウスの発病前から投与することにより発症阻止効果のあることが報告され、また Duchenne 型筋ジストロフィーの5歳未満の患児における第II相比較臨床試験で病状改善効果のあることが認められている。本報告はアミノペプチダーゼインヒビターであるベスタチンの作用機序を明らかにすることを目的として、ベスタチン (活性体) およびその立体異性体 (不活性体) をマウスに連続投与し、経時的に屠殺した筋肉 (前肢筋、後肢筋) 内の酵素活性の変動について述べる。

ベスタチン (活性体) 投与および途中で中止した場合は、不活性体および生理食塩水投与の場合と異なる振動状態がみられ、よりシンクロナイズされた状態になることが確認された。

3. 蛋白分解酵素の役割とその阻害剤に関する研究

藤井班員は現在までに筋ジストロフィー症の発症および症状の進行に種々の蛋白分解酵素が重要な役割を果していることを明らかにしつつある。

われわれはすでに各種蛋白分解酵素に対する合

成基質とその阻害剤について検討を加えてきた。合成阻害剤については Trypsin, Plasmin, Thrombin, Kallikrein および補体系の C1 \bar{r} , C1 \bar{s} に対する強い阻害活性をもつものを見出し、更に *in vivo* での薬効を示すものを臨床でも応用されてきている。今回は新しい合成阻害剤について報告する。

6 Amino-2-naphthyl [4-(4, 5-dihydro-1H-imidazol-2-yl) amino] benzoate dimethane sulfonate (FUT-187) は Trypsin, Plasmin, Pancreatic Kallikrein, Thrombin C1 \bar{r} および C1 \bar{s} に対し阻害活性を有し $2.3 \times 10^{-5} \sim 2.9 \times 10^{-7} M$ で IC $_{50}$ を示す。また実験的急性膀胱炎モデルに対しても効果を示す。補体系において *in vitro* での古典的経路および第2経路を介する補体溶血反応を強力に抑制し、更に *in vivo* においてモルモットの血管内溶血反応においても強い阻害活性を示す。また補体が関与しているアレルギー反応のII型の Forssman shock および SLE 自然発症マウスにおいても、FUT-187は延命効果が認められている。補体の示す作用は多面的であり、病態における意義もまた多様性を示すこととなる。多くの研究者の努力によりその意義は解明されつつある。しかし生体に応用し得る適当な抗補体物質が得られつつあるため (FUT-175: フサン) 補体の病態における意義が解明されると同時に難治性疾患への応用も期待できると考えられる。

4. Lysosomal proteolysis の Cystatin による制御機構ならびに Cystatin の大量産生

勝沼班員は Lysosomal proteolysis の異常亢進に起因する、筋タンパク崩壊疾患を色々と報告している。細胞内のリソゾーム・プロテアーゼ群 (カテプシン群) の量と活性の制御機構を明らかにし、その原理に基づく上記疾患の治療法を開発せんとするのが目的である。特に Natural inhibitor である Cystatin の細胞内での阻害機構を明らかにし、

これを治療目的に利用すべく、リコンビナントによる大腸菌プラスミッドでの大量産生を行なった。

カテプシン群のプロセッシングに関しては、BがD. Steinerら、LとHが勝沼らにより1987年にクローニングによりプレ・プロ前駆体構造が決定された。マクロファーシ培養系によりS35-Metチェイス-イムノプロットング実験で、チェイスプロセスに各種Protease inhibitorを共存させて動態を見た。プロ部のプロセッシング・プロテアーゼは金属プロテアーゼであり、活性成熟型カテプシン群の初発限定分解はカテプシン群自身により起ることが明らかとなった。従ってプロカテプシンから活性カテプシンになる過程は金属プロテアーゼ阻害剤で抑制できるし、活性カテプシンの分解はE-64等のシステイン・プロテアーゼ阻害剤で止めることができる。更に β -Galactosidase, β -Hexosamidase等大部分のリソゾーム酵素群の分解の律速にもカテプシン群が関与しており、E-64投与で此等リソゾーム酵素群の半減期は著明に延長し、酵素タンパク量も増加する。特定のリソゾーム酵素の低下または欠損により各種のリソゾーム性蓄積症が起こることが知られている。此等の中には特定リソゾーム酵素の分解亢進に起因するものもあり、これらはカテプシン阻害剤で抑制できる可能性が示された。

次には分解すべきタンパクを食胞に封入する(Autophagy)活性の調節が大切であり、食飼条件・ホルモン条件・薬物ならびに遺伝子異常で変化するが、ここでは論じない。

第三にはリソゾーム内でのカテプシンによるタンパク分解活性の調節が問題である。最近、内在性カテプシン・インヒビター(Cystatin)が各種発見され、且つ構造決定されたが、此等によるリソゾーム内カテプシン活性調節の細胞生物学的な機構は不明であった。我々は精製したシスタチン α やシスタチンEWを培養マクロファーシや3T3細胞の培地に添加すると、エンドサイトーシスに

より細胞内に取込まれ、リソゾームと融合してリソゾーム内カテプシン活性を抑制することを明らかにした。即ち、シスタチンは細胞質から一度分泌され、エンドサイトーシスされてリソゾームと融合し、カテプシン活性を抑制することにより、多くのリソゾーム酵素の半減期を長くし、且つ酵素タンパク量も著増させる。

最後に此の原理を利用して、カテプシン作用の病的亢進をシスタチンにより抑制することに利用すべく、シスタチン α のリコンビナントcDNAを大腸菌プラスミッドにより大量発現することに成功している。菌体から簡単に精製でき、収率は5 mg/l培地と非常に高い。今後モデル疾患動物の治療実験にこれの試用を始めたい。

5. C-蛋白質を指標とした筋ジストロフィー症の解析

丸山班員は鶏筋ジストロフィー症(筋ジス)では、特に発症の著しい胸筋で遅筋型C-蛋白質の発現が引き起こされることを免疫組織化学法により既に、明らかにした。本研究では、筋ジストロフィー症の指標としてのC-蛋白質の変化を二次元電気泳動法およびイムノプロット法により更に詳しく明らかにした。

従来、C-蛋白質の二次元電気泳動は困難とされていたので、まずC-蛋白質に適した電気泳動条件を確立した。二次元電気泳動ゲル上のC-蛋白質のスポットはモノクローン抗体により同定した。その結果、最も塩基性の速筋型(FC)から、心筋型(CC)、遅筋2型(SC2)、遅筋1型(SC1)、の順で酸性側に位置する4種のC-蛋白質アイソフォームが、親の筋で識別された。分子量はCC, SC1, FC, SC2の順である。これら4種は速筋の発達過程でStage-specificに発現されるが、特にSC1とSC2の発現は胸筋と後広背筋-PLD-(いずれも速筋)の発達過程で特徴的な差を示した。即ち、ふ化直後のヒヨコでは両方の筋でFCとSC1

が発現されるが、成長につれ胸筋では SC1 の消失、PLD では SC2 の発現が起こった。筋ジス胸筋では、ふ化直後に存在した SC1 は 1 ヶ月齢頃までに一旦消失するが、発症のみられる 2 ヶ月齢には SC1 さらに SC2 も出現した。即ち、筋ジス胸筋は、C-蛋白質の発現に関してはヒヨコ胸筋とは異なり、むしろ PLD 筋と類似した。従って、発症に伴う胸筋での変化は幼若筋型への移行ではなく、PLD 型への移行と言える。除神経胸筋でも SC1、SC2 の発現が引き起こされ PLD 筋型パターンとなった。PLD 筋と ALD 筋での C-蛋白質発現については正常、筋ジス鶏の間でほとんど差異は認められなかった。

6. CANP 阻害剤の設計および合成に関する研究

向山班員はチオールプロテアーゼの特異的インヒビター E-64 の活性発現に必須な構造のうち、エポキシド部分はチオールとの反応部位、L-ロイシンアミド部分を認識部位と捉えることができた。このアミノ酸部分を変換することにより、特定のプロテアーゼに対する選択性を高めることができると期待される。

61 年度に合成した E-64c 中のロイシンを 5,5,5-トリフルオロロイシンに置換した化合物の生物活性を測定したところ、4 つの異性体のうち 2S, 4S-体は E-64c と同等の活性を示した。また、2S, 4R-体は、パパインに対する効力は変わらないが、CANP に対する効力は低下した。この結果は、本研究目的には反したが、フルオロアミノ酸の導入が、酵素に対する選択性を高める手段として有効であることがわかった。

次に CANP に対してより選択的に作用するインヒビターを得るため、内在性 CANP インヒビターのアミノ酸配列の繰り返し部分に注目し、その配列をもつ部分ペプチドのエポキシコハク酸誘導体の合成を検討した。

現在までに、N 端側にエポキシコハク酸を結合させた、ジ (Arg-Glu)、トリ (Tyr-Arg-Glu)、テトラ (Lys-Tyr-Arg-Glu)、およびヘキサ (Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-Glu) ペプチドの合成を完了し、活性を測定したところ、トリペプチド誘導体が、選択性よく CANP を阻害することがわかった。

C 端側にエポキシコハク酸を結合させた誘導体の合成には多少問題があったが、出発物質となる Boc-Glu (OBzl)-NHNH-Fmoc の合成法が確立できたので、近々ペプチド鎖を延長する合成に入れる見通しである。

また、エポキシコハク酸に代えて導入を検討する予定のフルオロフマル酸およびフルオロマレイン酸の合成が可能となったので、目下その導入法を検討中である。

7. CANP 阻害剤の合成

大関班員は昨年度に引き続き、CANP に対して特異性の高い阻害剤を得ることを目的とし、E-64 誘導体の合成を進めた。

本年度は、鈴木班員が CANP 内在性インヒビターの構造解析の研究から明らかにした、活性中心の一次構造 (—TIPPPXYR—) に着目し、この部分構造にエポキシコハク酸を活性基として導入することを試みた。

まず C 端側からの検討を進め Tyr-Arg 誘導体を十種合成した。これらについて、生体内の主システインプロテアーゼであるカテプシン B, L, H と CANP に対する阻害特異性を調べた。

その結果、これらの化合物の中に CANP に対して E-64c と同程度の阻害活性を示すものが、数種見出されたが、これらは同時にカテプシン B, L に対しても阻害活性を有しており、特異性の高いものではなかった。

しかしながら、同じ考えのもとに共同で検討を進めた向山班員の研究結果を考え併せると、エポ

キシコハク酸に Tyr-Arg 誘導体を導入することにより、カテプシン B, L 及び CANP に対して阻害活性が発現し、更に C 端を延ばした Try-Arg-Glu は CANP に対する活性は若干低下するものの、特異性が非常に高まることがわかった。このように、内在性 CANP インヒビターの活性中心のアミノ酸配列を分子設計に応用することにより、CANP に対する特異性が高められることが明らかとなった。

更に本年度は、コンピュータを用いカテプシン B の活性中心の三次元構造の解析を試みた。現在、CANP, カテプシン L についても同様の試みを行っており、今後これらの結果も分子設計に応用したいと考えている。

8. CANP 阻害剤の一般薬理学的研究

——筋電図および神経活動中の呼吸運動関連成分の定量的評価法に関する基礎的研究——

福原班員は呼吸筋の筋電図ならびにそれを支配する遠心性神経の電気的活動の定量的解析に基づいた、呼吸筋変性の程度と CANP 阻害剤の治療効果を評価する方法を確立するための基礎的知見を得る目的で、横隔神経自発性遠心性発射活動に発現する約 60~130Hz の高頻度同期波について定量的解析を行って、その生理学的性質について検討した。

麻酔下非動化動物から導出された横隔神経自発性遠心性発射活動の自己パワースペクトルには約 80~130Hz の帯域に高頻度同期波に相当する明瞭なピークが見出された。この時、同時導出された三叉、顔面、迷走ならびに舌下神経の遠心性活動の自己パワースペクトルにも横隔神経と同じ周波数の高頻度同期波のピークが検出された。これらのピーク面積は換気レベルの変化に対し極めて鋭敏に変化し、ピーク周波数は横隔神経の高頻度同期波のそれと一致したまま平行に遷移した。

横隔神経活動と三叉、顔面、舌下および迷走神

経活動とのコヒーレンスには、高頻度同期波の帯域に明瞭なピークが検出され、これらの間に、共通の発振源に由来する 1 対 1 に同期した高頻度同期波が存在することを確認した。一方、頸部交感、腎交感神経ならびに脳波には、これと同期した成分は認められず、高頻度同期波が呼吸運動性出力に特異的に含まれる成分であることが示唆された。

このような高頻度同期波のスペクトル解析法の応用によって、運動ニューロンから、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方法として、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 CANP 阻害剤の治療効果の非侵襲的な定量的評価法として臨床的に応用され得る可能性があるものと考えられる。

9. CANP 遺伝子のクローニングに関する研究

鈴木班員は昨年 CANP インヒビターの構造解析を行ない、CANP インヒビター中に約 140 残基からなる 4 回の繰返し構造があることを明らかにした。肝臓や赤血球のインヒビターおよび種々のインヒビター断片の解析から、①繰返し構造が CANP を阻害する阻害単位であること、および②繰返し構造に含まれる「TIPPX_YR」の配列が阻害に直接関係することを推測した。本年度はこの成果に基づき、上記 2 点を遺伝子工学的手法等を用いて直接証明することを試みた。

まず、ウサギ CANP インヒビターの cDNA を断片化し、「TIPPX_YR」配列を N および C 末端側に近い部位に持つ断片、さらに、この配列を中心にしてできるだけ短い断片などを調製し、これらの cDNA を発現ベクターにつないで大腸菌で発現させ、発現した断片を精製して、CANP に対する阻害活性を測定した。その結果、TIPPX_YR を含む配列は必ず CANP の阻害活性を有し、この配列を持たない断片には阻害活性がなかった。また、この配列を持つペプチドを cDNA レベルで N, C

両末端側から順次短くして活性との相関を調べたところ、この配列が欠けると阻害活性も失なわれた。このように「TIPPX_{YR}」は阻害活性に必須ではあるが、この前後につく配列、特に、その長さも阻害活性に大きな作用を持つことがわかった。この配列を含む約30個の合成ペプチドも CANP を特異的に阻害し、 K_i 値は μM 程度であった。現在引き続き最小のインヒビターを検索しつつ阻害機構の解析を行なっている。

10. 筋ジスハムスターにおける CANP 系の変動

川島班員は筋ジストロフィーにおける筋タンパク質の異常分解をもたらすプロテアーゼとして、カルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) を考えている。そこで、本酵素系を構成する成分、即ちカルシウム感受性の異なる 2 種類 (μCANP と mCANP) および CANP を特異的に阻害する内在性インヒビターの定量法を確立した。この方法を用いて、先ずラット各種組織に存在する μCANP , mCANP , CANP インヒビターの活性量を定量した。多くの組織でインヒビター量が総 CANP 量を超えていたが、その比は組織により異なり、肝臓、脾臓、腎臓などではインヒビター量が圧倒的に多かった。 μCANP 活性は主として腎臓や脾臓に高濃度に存在し、一方 mCANP は肺臓や脳に多量に存在した。したがって、 μCANP と mCANP の活性の相対量も組織により異なる。また、全ての組織で mCANP 活性が μCANP 活性より高かった。今回対象とする骨格筋は全ての活性が比較的低い組織であり、インヒビター活性は総 CANP 活性より高い。次いで、筋ジスハムスター (UM-X 7.1) と正常ハムスターの骨格筋に存在する μCANP , mCANP , CANP インヒビターの各活性量を測定した。4 週齢においては各活性とも筋ジス動物において高値を示した。10 週齢においては両 CANP 活性は正常動物と同じレベルに復しているが、インヒビター活性は依然高値を

保っていた。これらの結果は、CANP は筋ジス発症において生化学的反應の活発な比較的初期に作用し、過程の進行した段階ではむしろ沈静化していることを示唆している。

11. ベスタチンの使用経験

——特に同量固定法 single blind 法による治験例に Bestatin 再投与したその後の実態と double blind 登録例について——

福山班員は Bestatin (以下 B) 長期投与の臨床効果の検討を目的とした。

昨年度まで同量固定法の single blind 法で 1 年間 B または placebo (以下 P) 投与の 10 例を対象とした。single blind 終了時に投与希望例は直ちに B 再投与予定であったが、都合により投与まで 1 ~ 4 か月無投薬期間があった 2 例は都合により転院、3 例は B 再投与するも途中で投与中止を希望、1 例は最初 P、その後も投与希望なく、全経過 B 無投与であった。

機能障害度 (祖父江班機能障害プロジェクト案) の変化：投与開始前 (0 週), 52 週 (single blind 終了後), その 1 年後の 104 週で判定した。A single blind 時 B 投与群：1 例では 0 週より 52 週の方が 1 段階改善していたが、本例は開始前が骨折後で、その回復も改善に加味している。1 例は、全経過 stage は不変だが、起立所要時間は B 中断で延長、再投与により短縮を示した。3 例では 0 週, 52 週は不変で、104 週で 1 例は 1 段階、他の 1 例は 2 段階悪化していた。残りの 1 例では無投薬期間に 2 段階悪化し、B 再投与でも改善なく、94 週で投与中止したが、104 週では同 stage であった。B single blind 時 P 投与群：2 例は 3 歳で開始、うち 1 例は 0 週と 52 週は不変で、B 投与後の 104 週には 2 段階上昇、他の 1 例は、P 投与後の 52 週, B 投与後の 104 週ともに 1 段階ずつ上昇、1 例は stage は全経過不変だが、運動所要時間で B 投与で短縮、中止により延長の傾向が見られた。1 例は P 投与 4

週より1段階低下, 52週には2段階低下, 3週間B投与するも104週ではさらに2段階悪化した。全経過B無投与例は, いずれも1段階ずつ低下した。

運動所要時間(立ち上がり・20m 走行・起坐): 開始時5歳未満群では前者に変化なく, 後2者で2例でPからBに変更後短縮をみた。5歳以上群で, 前2者とも2例でB中断で延長, 再投与により一過性に短縮した。2例で無投薬を契機に起立不能, 再投与でも改善はなかった。

血清CPK値: 5歳以上例で, 投与開始後4週で, B例で低下, P例で上昇した。

12. Duchenne型筋ジストロフィー症の血清酵素におよぼすベスタチン(NK421)の効果

高橋班員はDuchenne型筋ジストロフィー症(DMD)の血清酵素におよぼすベスタチン(NK421)の経口投与の効果を経過において検討する。

対象はDMD患者, 年齢9~17歳, 障害度(8段階分類)3:2名, 4:5名, 5:7名, 6:7名, 7:4名, 8:4名の計29名。前日午後9時より終了まで安静を保ち, 当日午前6時に採血し, 直後にNK421 100mgあるいはplaceboを経口投与し, 8時, 10時, 12時に採血し, LAP, CK, LDH, ALDをオートアナライザーで測定した。結果は前値に対する変動率で表しpaired Student t testで検定した。最初にNK421を投与し, 2週間以上経過してから同一患者に同条件でplaceboを投与した。

NK421投与後2時間でLAPは有意($P<0.01$)に低下し, 4時間, 6時間で元のレベルに戻った。CKは変動しなかった。LDH, ALDは2時間で変動なく4時間, 6時間で有意($P<0.01$)に上昇した。

Placebo投与ではCK, LDHともに有意の変動はなかった。6時間後(12時)LAPは上昇し

(102.5%, $P<0.01$), ALDは前値に比し低下(91.8%, $P<0.01$)した。

NK421はこの条件下で2時間でLAPを抑制した。CKには影響なく, LDH, ALDが4時間および6時間で上昇したことは筋よりの酵素遊離に対する効果ではなく, 赤血球膜透過に対する影響が推定された。

Placebo投与の結果から, この条件下ではCKの有意な変動はなく, CKの日内変動も運動を制限すれば少ないことが実証された。LAP, LDH, ALDは4時間(10時)までは変動せず, この結果と比較してNK421の効果が明らかになった。

13. Duchenne型筋ジストロフィー症に対するベスタチンの効果

——尿中3メチルヒスチジンの測定を中心とした検討——

西谷班員は外来での一時採尿における3メチルヒスチジン(3MH)/クレアチニン(crn)の測定が, 筋ジストロフィー症への薬剤投与の効果判定の指標として有用かどうかを検討し, ベスタチン投与において応用した。

本院入院中のDuchenne型PMD患児4名において排尿毎に採尿し, 3MHとcrnの関係をみた。両者の相関は良好で, 適当な食事制限を加えるならば, 3MH/crnの値は常にほぼ一定である事が期待でき, 24時間蓄尿せずとも部分尿で可能ではないかと思われた。ただcrnが1mg/ml以上の濃縮尿では, 相関は乏しくなりcrnが1mg/ml以上の検体は除外した方がよいと考えられた。

外因性蛋白に関しては, 採尿前24時間以内の食事内容をチェックし, 3MH/crnの値との関係をみた。軟体類, 甲殻類の摂取, 魚肉類の中等量以上の摂取では3MH/crnは, かなり高値を示しており, これらの摂取が明らかな時はその検体を除外した。

このようにして1年間のベスタチンの二重盲検

に応用を試みた。投与前値はベスタチン群で56.9、プラセボ群で52.4で殆んど差を認めなかった。ベスタチン投与後6ヶ月位より、ベスタチン群がプラセボ群に比し、3MH/crnの値が低値となる傾向が伺われたが、有意差は認められなかった。今後は1年以上の長期投与における検討も必要ではないかと思われた。

尿中3MH/crnと血清CK値との相関は認められなかった。

14. ベスタチンの使用経験

——九州地区5歳以下の対象例について——

三吉野班員は進行性筋ジストロフィー症、特にDuchenne型(以下DMDと略す)の治療開発としてNK421(ベスタチン)の臨床的研究を担当してきた。従来の結果をふまえ、昭和62年度よりはより若年のDMD児(5歳以下)に対して、全国的に二重盲検比較試験が実施されている。今回はその二重盲検比較試験の九州地区の実施状況につき、若干の検討を加え報告した。

方法は全てNK421二重盲検試験実施要領に従った。九州地区よりは症例数として10例のDMD児が参加した。本研究参加協力施設は国立療養所沖縄病院、熊本大学発達小児科、大分医科大学小児科、久留米大学小児科、福岡大学小児科、福岡子供病院の6施設であった。症例のうちわけは3歳以下が5例、4歳～5歳が5例であった。

九州地区の5歳以下DMD児の臨床的背景としては、DMD児として診断が確定、ほぼ確定しているものは8例中7例であった(発達小児科の2例は63年4月より試験開始)。初発症状は運動発達の遅れが3例と多かった。合併症として1名に自閉的傾向が認められた。診察区分として、5歳以下という年齢もあって、全て外来通院であった。機能障害は軽く、stage 1が2例、stage 2が6例であった。さらに試験開始のプロトコールの項目より体重、身長、運動機能(10m走行、階段昇降な

ど)、生化学的項目(GOT、アルドラーゼ、LDH、CPK)を選びだし、3歳以下および4歳～5歳の2群にわけ比較検討したが、有意の差のある項目は体重、身長のみであった。

九州地区の5歳以下DMD児に対する、NK421の投与状況を班会議で述べた。投与開始より間もないため、その実施状況の報告となったが、投薬対象児はいずれも外来通院であり、DMD児低年齢層の診察区分を如実に示していた。

15. フォルフェンシノールのDuchenne型筋ジストロフィー患者に対する使用(第2報)

村上班員はフォルフェンシノールを前回に引き続きDuchenne型筋ジストロフィー症(年齢5歳から9歳)に46週から112週にわたって使用した。使用量は1日50mgから150mgである。また11例の患者で感冒の使用前1年間と使用による1年間の罹患回数を調査した。結果は9例中5例が歩行不能になり2例が立ち上がり時間が悪化した。残りの1例は5歳の男子であったが46週間使用したが立ち上がり時間は短縮していた。

次に感冒の罹患回数では使用前に比べて減少したもの7例、増加したもの2例、不変1例で64%が感冒罹患回数が減少していた。

結論 ①フォルフェンシノールの使用でDuchenne型筋ジストロフィー症の運動機能には特別の効果は見られなかった。②感冒の罹患に対して予防効果が認められた。

16. ベスタチンの筋ジストロフィーに対する臨床効果に関する研究

木下班員は昨年来ベスタチンのDuchenne型筋ジストロフィーに対する効果の群間比較試験を行なって来たが、本年度はその後半を実施し、1年間の投薬の結果が集計された。症例はA群(4歳以下)52例、B群(5～7歳)75例。計127例で、それぞれ約半数を対照群として二群に分け、1年

間の症状、所見、検査成績の変化について群間比較を行った。その結果、主としてA群において二・三の成績で群間に有意差が確かめられた。すなわち、階段昇り姿勢、同降り姿勢、上肢挙上運動、腱反射の保持、股関節屈曲筋力などで投薬群の方が改善を示した。この傾向は特に3歳以下の患者について比較した場合に明らかであり、ベスタチンが何らかの作用を有する可能性が示唆された。

以上の結果に基づき、本年度後半からはベスタチンの二重盲検試験を実施することになり、更に

前回より患児年齢を下げ、3歳以下、4～5歳の二群について全国から各60例を集め、各々30例ずつに分けて盲検試験を開始することとなった。ベスタチン投与量は前回と同じとし、1日150mgのドライシロップを分3服用とした。1年間服用後に両群の解析を行うこととし、現在すでに予定の症例数の登録をほぼ終了し、試験を開始。一部の症例は既に3ヶ月に入っている。この集計の結果を待って本剤の筋ジストロフィーに対する効果の有無の最終判定を行なう予定である。

A群 12ヶ月

薬 剤	改善	不変	軽悪	中悪	著悪	計	改善率	χ^2	悪化率	χ^2
NK 421	10	10	1	2	0	23	43%	P<0.1	13%	NS
プラセボ	518	18	1	1	0	25	20%		8%	

B群 12ヶ月

薬 剤	改善	不変	軽悪	中悪	著悪	計	改善率	χ^2	悪化率	χ^2
NK 421	3	8	11	7	4	33	9%	NS	67%	NS
プラセボ	5	7	12	11	1	36	14%		67%	

17. Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の臨床経過：EST 投与群での検討

宮武班員は Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症（以下 DMD と略す）に対する EST の治療効果について日常生活動作能力（以下 ADL と略す）の推移を検討した。

対象は国立療養所新潟病院・東埼玉病院・下志津病院・医王病院の4施設に入院（一部外来通院）中の DMD 児（全例男子）73例で、詳細は以下に示す如くである。すなわち、年齢は3歳6ヵ月～18歳10ヵ月（平均10歳6ヵ月±3歳1ヵ月）、ステージ I 7例、II 23例、III 3例、IV 14例、V 18例、VI 9例。

EST の投与量は体重あたり 4 mg から開始し、

4週後に副作用が無いことを確認した後に 8 mg に増量した。観察期間は8ヵ月から3年3ヵ月（平均1年11ヵ月±11.4ヵ月）である。

対照群は DMD 172例で、ADL の観察開始時年齢 6歳2ヵ月～28歳2ヵ月で各症例の観察期間は1ヵ月～11年5ヵ月（平均5年8ヵ月）でこの間の sampling point は 1～60（平均33 points）である。

方法として対照群の ADL の経過を EST 投与群の経過と比較検討した。

観察開始時期の ADL は対照群と EST 群の間で差を認めず、ADL 値は両群とも加齢により指数関数的に低下し、ほぼ10歳前後で50点を割った。

全ての観察点で EST 群は対照群に比し高値を示

したが両者の間に差を認めなかった。

そこで観察開始時に歩行可能であった症例（すなわち ADL50点以上）に限って ADL の推移を調査した。EST 群と対照群ともに ADL50～60点までは指数関数的に低下するが、対照群では ADL の低下がさらに続き10点まで低下した。一方 EST 群では60～50点以降低下が停滞する傾向が見られた。

今回の検討では両者の観察期間が一定化されておらず統計学的検討を行ない得なかった。しかし、このような治療的検討は比較的 ADL の良好な症例に対して施行されるべきであろうという結論が得られた。

18. ADL score の検討による筋ジストロフィー症障害度の再評価

石原班員は米・英のグループと比較し日本では筋力評価の自然歴の蓄積がなく、DMD に対する薬効判定の評価基準がなく困難を感じてきた。今回我々は ADL スコアに着目し尺度解析法により159例の DMD において ADL 項目を解析し、薬効判定に有用と思われる新障害度分類を作成し得たので報告する。対象は国立療養所東埼玉病院に入院した159例の DMD。従来より療養所で施行してきた ADL 100サブテストを独立のアイテムと考え尺度解析を施行した。結果、従来よりよく知られている8段階障害度を尺度解析したところ、信頼性のメルクマールである Rep 0.95, PPR 0.95, 新障害度分類では Rep 0.99, PPR 0.96ちなみに ADL (100点法)では 0.95, 0.67であった。新障害度分類の信頼性は従来より高かった。

新障害度分類は次の如くである。

- I. ゆっくりとしゃがむことができる
- II. 介助なく階段昇降可能
- III. 通常の高さの椅子より立ち上がり可能
- IV. 介助なく床から立ち上がり可能
- V. 手すりを用いて階段昇降可能

VI. 独立平地歩行可能

VII. 片手支持による両脚でのよりかかり立ち可能

VIII. 四つ這い可能

IX. 四つ這い位保持可能

X. 寝返りは出来ないが、横向きまで可能

XI. 自力で坐位保持可能

XII. 自力で坐位保持不能、全介助

自然歴も蓄積されており、今後 DMD の投薬に際し薬効判定に有用な障害度分類と考えられる。

19. 骨格筋ミオシン軽鎖測定法の開発

矢崎班員は筋肉組織の障害過程と進展度を特異的に反映し、定量的に推定しうる指標物質の選定とその測定法の確立が、患者の病態の把握、予後の判定さらには治療法の効果判定に必須であり、その開発が緊急の課題としている。我々は血中ミオシン軽鎖を測定するラジオイムノアッセイ法を開発し、急性心筋梗塞および骨格筋変性疾患患者におけるその測定の臨床的意義を検討した。急性心筋梗塞患者においては梗塞サイズをよく反映し、患者の予後の判定さらにはその治療法の効果を評価する際にきわめて有用な指標となることを示した。同法を筋ジストロフィー症を中心に骨格筋変性疾患患者において測定したところ、CPK とよく相関する高値が得られた。今後は両指標と病態との関連を検討したい。さらに、このような血中軽鎖測定法を一般臨床の場で使用が可能になるようにキット化するためにモノクローナル抗体を導入して二抗体サンドウィッチ法を開発した。マウスハイブリドーマを用いて心筋と骨格筋ミオシン軽鎖を広く認識するモノクローナル抗体 (ML 544) を中心に測定系を確立した。本法は簡便にしかも正確に血中ミオシン軽鎖を測定することが可能であるが、抗体の免疫組織学的な検討により白筋タイプの軽鎖には全く反応しないことが判明した。したがって、白筋タイプ骨格筋を主に障害する筋

ジストロフィー症では病態の把握あるいは治療効果の判定には感度が低い可能性がある。

そこで我々は、抗体 ML 544 を大量生産してアフィニティーカラムを作成し、ヒト骨格筋ミオシン軽鎖より赤筋タイプを吸着し、白筋タイプを主とした軽鎖を分画してこれを抗原に、再びマウスハイブリドーマを用いて、白筋タイプミオシン軽鎖を特異的に測定するアッセイ系を確立する準備を整え、本年度中には確立する予定である。

20. 各種プロテアーゼ・インヒビター投与の筋ジストロフィー症マウスに対する効果

辻班員は Actinonin, Diprotin-A, Formestin-A および FUT-175 の 4 種類の蛋白質分解酵素阻害物質を発症初期の筋ジストロフィー症 (dy) マウスに 4 週間および 6 週間連続投与する実験を行ない、これら酵素阻害物質の筋ジストロフィー症に対する *in vivo* における疾病抑制効果について検討した。

実験は生後 4 週間の C 57 BL/6 J-dy 系の疾病 (dy) マウス各 3 頭ずつを一組とし、各阻害物質の食塩水溶液 (1 mg/1 ml) を 0.2ml ずつ 1 日 2 回背部皮下に連日注射し、投与期間終了後屠殺した被検マウスについて血清中ならびに骨格筋中の疾病進行のマーカー酵素である PK, CPK, GOT および LDH の活性を測定した。又、同時に採出した被検マウスの腓腸筋で光顕用組織標本を作製し、組織学的検索を行なった。

結果は CPK および PK の活性に関しては 4 種類の酵素阻害物質投与群全てについて血清中遊出活性が低下し、骨格筋中に存在する活性が増加し、正常マウスの状態に近づくという傾向が認められ、疾病抑制に有効であることを示していた。LDH 活性の変化に関しても Diprotin-A 投与マウス骨格筋中の活性を唯一の例外として疾病抑制の傾向が認められたが、GOT 活性に関しては対照マウスとの間にあまり顕著な差異は見られなかった。

又、腓腸筋標本による組織学的観察も組織像の悪化の程度の軽減という結果を示しマーカー酵素の活性変化に見られる改善傾向を支持していた。更に投与期間中の体重変化は Formestin-A と FUT-175 で顕著な増加を示していたが他の 2 種類の阻害物では対照と変わらない変化を示していた。これらの結果は mdx マウスについて行なった実験結果とほぼ一致しており、今回用いられた酵素阻害物質は程度の差はあるがいずれも mdx マウスならびに dy マウスという異なった遺伝子によって発現される 2 種類の疾患モデル動物に共通して症状抑制に有効であることから、筋ジストロフィー症の治療薬として症状進行に対する軽減効果を期待出来るものと推察される。

21. 糖原病 II 型ウズラの EST 治療の試み

杉田班員は酸性 α -グルコシダーゼ欠損を示す糖原病ウズラの病態の解明と治療を目的として以下の実験を行なった。

本ウズラ骨格筋中の酸性 α -グルコシダーゼ活性は胎生期より正常の 20~30% と低く、これがリソゾーム内のグリコーゲン蓄積の原因であると考えられている。我々は、まずニワトリ骨格筋より大量に同酵素を精製した後、家兎を用いて免疫し抗体を得た。この抗体がウズラ酸性 α -グルコシダーゼと交叉することを確認し、粗抽出液での酵素分子種の変化をイムノプロット法を用いて検索した。結果は以下に示す通りである。

- 1) 正常ウズラ骨格筋には 110K と 98K の 2 種の免疫交叉物質が存在するが、後者が精製酸性 α -グルコシダーゼに対応した。
- 2) 糖原病ウズラ骨格筋には 110K のみが存在し、正常筋に見られる mature form である 98K 分子は検出されなかった。
- 3) 両ウズラ線維芽細胞を用いた実験により、リソゾーム中にはある程度活性を持った酵素が確かに存在した。

以上の事実より、糖原病ウズラにおいては前駆体は合成されるが、正常のプロセッシングが行なわれないか、又はリソゾームへの移行に一部欠陥がある可能性が考えられた。次に、これらがヒト成人型糖原病II型に類似しているため、タンパク分解を抑えることにより酵素の異常な分解が抑制されてグリコーゲン蓄積が軽減するのではないかと考えリソゾームカタプシン類の強力な阻害物質である EST を用いて同疾患の治療の試みを行なった。

まず、ウズラ線維芽細胞を EST の存在下で 5 日間培養し、酸性 α -グルコシダーゼ活性の上昇が見られるかどうかを検討した。その結果、EST 0.1 μ g/ml においても同酵素活性の 1.5~2 倍上昇が見られ、確かにカタプシン B & L を阻害することにより、他のリソゾーム酵素の分解が抑制され、糖原病においても一部欠損している酵素活性の回復が観察された。

22. 実験的筋炎モデル動物の作製に関する研究

——自己免疫筋疾患抗原物質のモノクローナル抗体による解析——

里吉班員は多発性筋炎、皮膚筋炎および重症筋無力症などの自己免疫筋疾患の実験モデル動物を作製し、これらを用いて低分子酵素阻害物質の薬効を評価することを目的とする。

昨年度、ラットやヒト筋肉の生理食塩水(PBS)抽出物中に、筋炎患者の一部や、重症筋無力症患者の半数以上の患者血清の IgG と抗原抗体反応を起こす物質があることを報告した。また、この抗原 (muscle extract antigen: ME antigen) に対するモノクローナル抗体を作製したことも報告した。本年度はこのモノクローナル抗体の特性と、それを用いて、ME antigen のいくつかの性質を明らかにした。以下に、結果を示す。

- 1) 抗 ME antigen モノクローナル抗体は 3 種類得られた。1E7, 2B2 は同一エピトープを、7D9 は異なるエピトープを認識する。2 種のエピトープは同一分子内に存在し、患者血清中に同じエピトープを認識する抗体が存在する。
- 2) ME antigen はラットでは骨格筋と心臓に局在するが胸腺にも微量存在する。胸腺との関連は自己免疫疾患の発症機序との関連で興味深い。
- 3) ME antigen は培養筋細胞で調べると、融合し多核となった筋管細胞でのみ発現し、しかも細胞外へ分泌される。よって、ME antigen は筋特異的細胞外マトリックス構成成分である可能性が高まった。
- 4) 高性能高速液体クロマトグラフィーの使用によって ME antigen が精製できる見通しとなった。精製品を用いて、構造解析、モデル動物作製に着手しつつある。

以上

分担研究報告

ホルフェニシンの生体内動態 —— 蛍光HPLCによるマウス血清および筋肉中濃度の測定 ——

大 倉 洋 甫 *

研究協力者 巢 文 峰 * 甲 斐 雅 亮 *

はじめに

われわれは、高選択的かつ高感度な蛍光誘導体化反応を利用した蛍光検出・高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を手段として、血液ならびに筋肉中ロイペプチン¹⁾、ベスタチン^{2),3)}、p-ヒドロキシベスタチン^{3),4)}、ホルフェニシノール^{5),6)}、アンチパイン⁷⁾などの薬物モニター法を開発し、それらの生体内動態を検討してきた。また、61年度にホルフェニシンのHPLC用高感度蛍光試薬として1,2-ジアミノ-4,5-エチレンジオキシベンゼン(DEB)を開発した。この試薬はホルフェニシン分子中のアルデヒド基と反応し、蛍光性のベンゾイミダゾール誘導体を与える(図1)。

本年度は、生体試料の前処理およびHPLC条件について検討し、DEB試薬を用いた蛍光・HPLCによるホルフェニシンの薬物モニター法を確立した。次に、ホルフェニシンの経口投与したマウスの血清および筋肉中のホルフェニシンの経時的濃度変化を調べた。このとき、同試料中にホルフェニシンの代謝物として、ホルフェニシノールの生成が認められたので、先に報告したホルフェニシノールの自然蛍光検出HPLC⁸⁾によってこれも測定した。さらに、ホルフェニシノールを経口投与したマウスの血清および筋肉中のホルフェニシノールならびに代謝によって生成したホルフェニシンの経時的濃度変化についても調べた。

実験方法

1) 経口投与および生体試料の前処理

近交系C57BLマウス(雄性, 5週齢, 約18g体重)に生理食塩水で調製したホルフェニシンあるいはホルフェニシノールを30mg/kgの投与量で経口投与した。投与後、水だけを与え、各時間ごとにマウスを頸動脈切断によって殺し、直ちに血清および僧帽筋を採取した。得られた血清と筋肉は測定まで-80°Cの冷凍庫に保存した。

血清100 μ lに1.5M過塩素酸100 μ lおよび水50 μ l(検量線作成時にはホルフェニシンまたはホルフェニシノールの標準液)を加え、1000gで15分間遠心し除蛋白した。また、筋肉(0.1g)を8.4mM酢酸150 μ lおよび水(検量線作成時にはホルフェニシンまたはホルフェニシノールの標準液)150 μ lでホモジナイズした。ホモジネートに1.5M過塩素酸250 μ lを加え、1000gで20分間遠心し除蛋白した。得られた両上清を蛍光誘導体化反応に使用した。

2) ホルフェニシンの蛍光誘導体化反応

上清100 μ lに15mM DEB水溶液を200 μ l加え、60°Cで30分間加熱した。反応液100 μ lをHPLCに注入した。

3) HPLC条件および使用機器

高速液体クロマトグラフには、サンプルインジェクター(100 μ lループ)を備えた東洋曹達803D型HPLC用ポンプ、12 μ lフローセルを装備した日立F-1000型蛍光検出器および理化電機R-21型記録計を使用した。

逆相分配型のTSKgel ODS-120T(粒径5 μ m)カラム(250 \times 4 mm, i.d.)を用い、アセトニトリルと30mMリン酸塩緩衝液(pH6.5)の混液(1:5, v/v)からなる溶離液を流速1.0ml/minで送液

* 九州大学薬学部

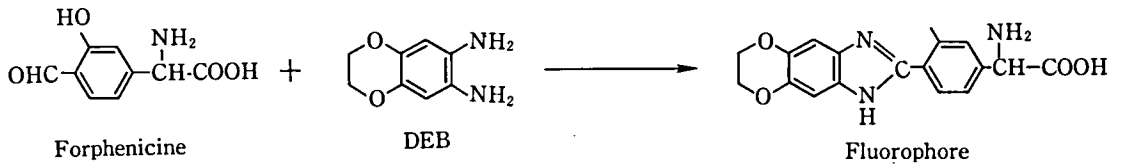


図1 Fluorescence derivatization of forphenicine with DEB

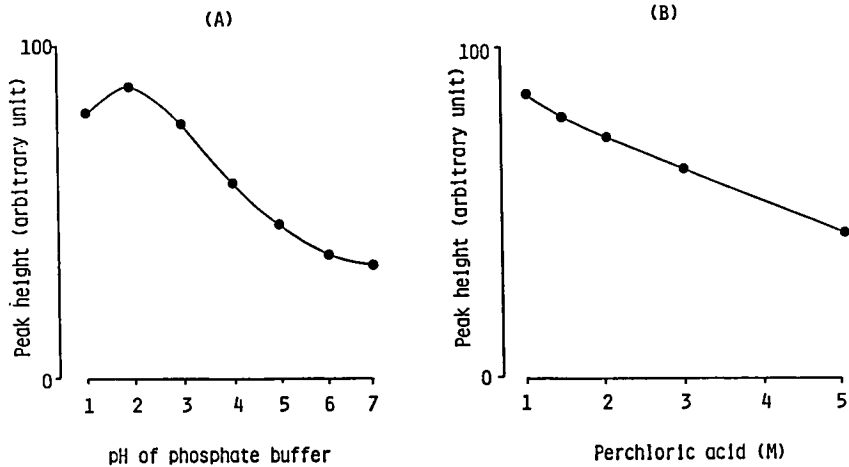


図2 Effects of (A) pH and (B) the concentration of perchloric acid used for the deproteinization on the derivatization of forphenicine. A, 50 μ l each of 10 nmol/ml forphenicine and 50 mM phosphate buffer (pH 1.0-7.0) were treated in place of a biological sample solution according to the derivatization procedure; B, a 50- μ l portion of 25 nmol/ml forphenicine was added to 100 μ l of a drug-free serum and deproteinized with perchloric acid at various concentrations, and the resulting supernatant was treated according to the procedure.

した。蛍光検出は励起波長350nm および発光波長420nmで行った。

結果および考察

1) 蛍光誘導体化条件

DEB 試薬とホルフェニシンの蛍光反応は酸性の条件で進行し、pH2.0の緩衝液中で最大のピーク高さが得られた(図2 A)。しかし、実試料の除蛋白操作に用いた過塩素酸は反応に必要な酸性条件を提供した。1.0~5.0M 過塩素酸を用いて蛍光体の生成を調べた場合、濃度が低いほどホルフェニシンの蛍光ピークは高くなった(図2 B)。しかし、1.0Mのそれを用いた場合、除蛋白が不完全であったので、基準操作には、1.5Mの過塩素酸を使用した。この場合、蛍光反応時のpHは約1であった。

10mM以上のDEB試薬を用いたとき、ホルフェニシンの蛍光ピークは最大かつ一定の値を示した。従って、15mMのDEBを使用した。

蛍光反応における反応時間と温度について検討した(図3)。反応温度が高くなると、反応は速やかに進行するが、最大のホルフェニシンの蛍光ピークを得るには、60°Cまたは37°Cで反応する方が良かった。特に、60°Cでは、30分以上の反応時間で最大の反応収率を与えた。基準操作には、60°Cおよび30分間の反応条件を選択した。

反応後、反応液のpHを6.0~7.5にしたとき、ホルフェニシンの蛍光は最も強くなった。従って、HPLCの移動相にはpH6.0のリン酸塩緩衝液を加えることにした。

2) ホルフェニシンの定量

ホルフェニシンを投与したマウスの血清および

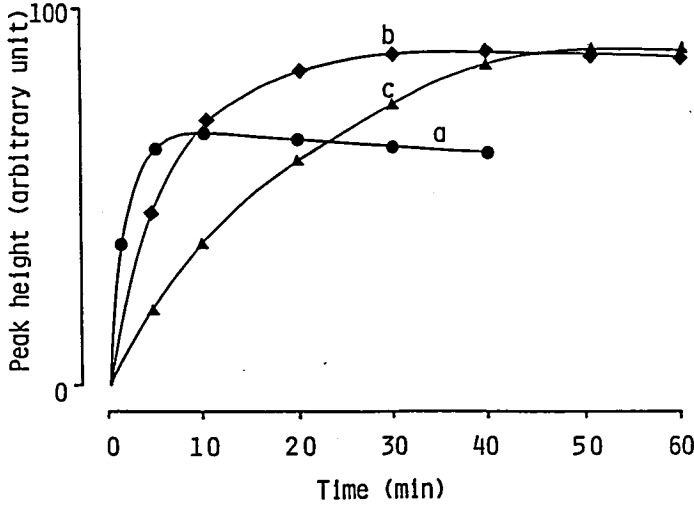


図3 Effects of reaction time and temperature on the derivatization of forphenicine. A 50- μ l portion of 10 nmol/ml forphenicine was added to 100 μ l of drug-free serum and then deproteinized, and the supernatant was treated as in the procedure for various periods at temperatures of a, 100°C; b, 60°C; c, 37°C.

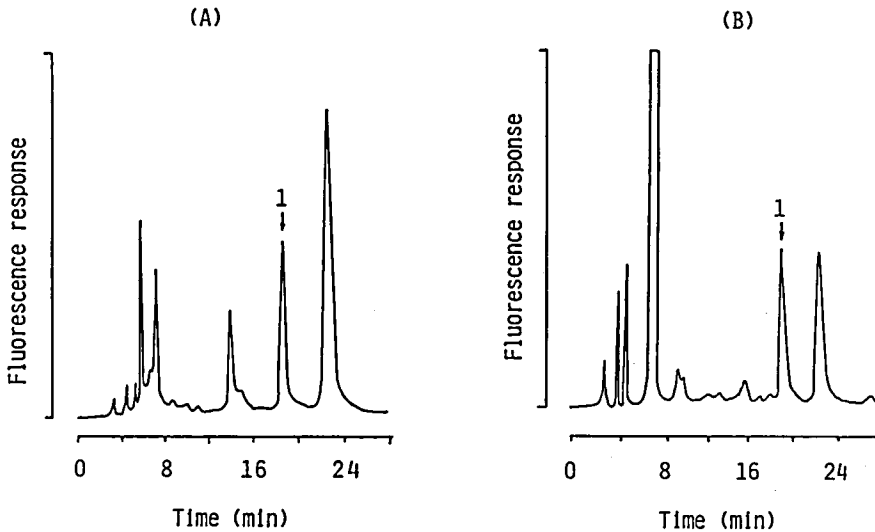


図4 Chromatograms obtained with (A) serum and (B) muscle at 8 h after oral administration of forphenicine to a mouse. Dose: 30 mg/kg. Peaks: 1=forphenicine, others=endogenous substances in serum or muscle. Concentrations of forphenicine: A, 1.85 nmol/ml in serum; B, 1.31 nmol/g in muscle.

筋肉試料を本法に従って処理したときに得られるクロマトグラムを図4に示す。ホルフェニシンの蛍光体は生体由来の蛍光物質とよく分離し、18.8分の保持時間に溶出された。

このHPLC条件でホルフェニシンの添加検量線を作成したところ、少なくともコントロールマ

ウスの血清および筋肉中にそれぞれ0~250 nmol/mlおよび0~300nmol/gの添加量まで原点を通る直線(相関係数=0.998)を示した。S/N=2における検出限界は血清中では4.90 pmol/mlまた筋肉中では11.9pmol/gであり、HPLC注入量で表すと、約66fmolに相当した。

コントロールマウスの血清ならびに筋肉にそれぞれ2.5nmol/ml(g)のホルフェニシンを添加したとき、5回測定して得られた添加回収率の平均値は、血清では97.3±4.9%、筋肉では93.4±5.2%であった。また、同じサンプルを6回繰り返して測定して得た相対標準偏差は5 nmol/ml血清の場合は5.9%で、1.5nmol/g筋肉の場合は7.6%であった。

3) ホルフェニシンならびにホルフェシノールの体内動態

図5 Aはホルフェニシンをマウスに経口投与した場合の血清および筋肉中におけるホルフェニシンおよびホルフェシノールの時間一濃度曲線である。ホルフェニシンの濃度は血清および筋肉中とも投与後約1時間で最大値に達し、その後、徐々に減少した。血清および筋肉内におけるホルフェニシンの半減期はそれぞれ1.9時間および3.2時間であった。この場合、ホルフェニシンから生成した代謝物ホルフェシノール濃度は、血清および筋肉中とも、ホルフェニシン投与後1時間で

は、それぞれ、ホルフェニシン濃度の約1/10であったが、約6時間後では、血清および筋肉中のホルフェニシンの濃度を上回り、さらに筋肉中のホルフェシノール濃度は徐々に増大する結果を得た。

一方、ホルフェシノールを同様に経口投与した場合、血清および筋肉中のホルフェシノールの経時的濃度変化(半減期、血清中1.8時間および筋肉中3.4時間)はホルフェニシンを投与したときのホルフェニシンの濃度変化曲線とほぼ同様な結果を与えた(図5 B)。この場合、ホルフェシノールの代謝物としてホルフェニシンが検出されたが、その血清および筋肉中の濃度は、ホルフェニシン投与の場合に認められた代謝物ホルフェシノールの濃度に比べて極めて低かった(1/100以下)。

以上の結果から、マウスに経口投与したホルフェニシンは速やかに血清および筋肉中に分布し、同時に、その代謝物として生成したホルフェシノールの濃度も高いレベルで血清および筋肉中に

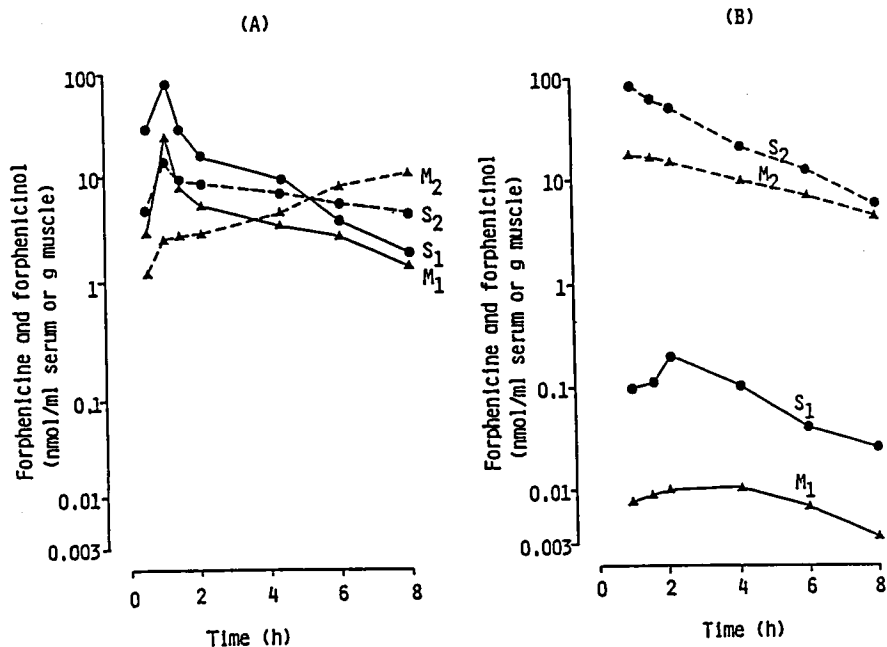


図5 Concentrations of forphenicine and forphenicidinol in serum and muscle of mice (n=3) after oral administrations of (A) forphenicine and (B) forphenicidinol. Dose: 30 mg/kg each. Curves: S₁, forphenicine in serum; M₁, forphenicine in muscle; S₂, forphenicidinol in serum; M₂, forphenicidinol in muscle.

分布することが分った。従って、薬物活性の面を考慮すると、ホルフェニシンの投与はホルフェニシノールの投与よりも、効果がより高いことが示唆された。

おわりに

本研究において開発した DEB 試薬を用いるプレカラム蛍光誘導体化 HPLC によって、ホルフェニシンおよびホルフェニシノールを投与したマウス血清および筋肉中の微量ホルフェニシンを簡便にモニターすることができた。また、ホルフェニシンおよびホルフェニシノールをそれぞれ投与したとき、それらはマウス体内で相互に代謝されることが分った。特に、ホルフェニシンから生成したホルフェニシノールの代謝物は比較的高濃度で血清および筋肉中に分布されることが分った。

文 献

- 1) Kai, M., Miura, T., Ishida, J. and Ohkura, Y.: J. Chromatogr., 345: 259-265, 1985.
- 2) Ishida, J., Yamaguchi, M., Kai, M. and Ohkura, Y.: J. Chromatogr., 305: 381-389, 1984.
- 3) Ishida, J., Kai, M. and Ohkura, Y.: Xenobio. Metabol. Dispos., 1: 397-403, 1986.
- 4) Ishida, J., Kai, M. and Ohkura, Y.: J. Chromatogr., 344: 267-274, 1985.
- 5) Tamura, M., Kai, M. and Ohkura, Y.: Jap. J. Clin. Chem.; 13: 195-201, 1984.
- 6) Kai, M., Tamura, K., Ohno, M. and Ohkura, Y.: Biomed. Chromatogr., 1: 143-146, 1986.
- 7) 甲斐雅亮, 坂本靖浩, 三浦哲朗, 大倉洋甫: 分析化学, 35: 329-331, 1986.

筋肉内酵素網の動態に対するベスタチン およびその立体異性体の影響

青 柳 高 明 *

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

はじめに

筋ジストロフィー症におけるプロテアーゼの異常に対して、各種のプロテアーゼ・インヒビターを治療に用いる試みが、多くの研究者によって行われている。なかでも Stracher らはセリン・システインプロテナーゼのインヒビターであるロイペプチンが筋ジストロフィーマウスの発症阻止に役立つ可能性を報告した^{1),2)}。さらに、松下らは細胞膜酵素阻害物質として見出したベスタチン、ホルフェニシン、ホルフェニシノールなどが上記動物の発症阻止に有効であることを示唆した^{3),4)}。

筆者らは筋ジストロフィーマウスおよびハムスターなどの各種臓器内の酵素活性の変動を経時的に調べ、エンドペプチダーゼの異常のみでなく、アミノペプチダーゼ、グリコシダーゼ、ホスファターゼ、エステラーゼなどの広範囲な酵素に異常が誘起されていることを報告した⁵⁾⁻⁷⁾。さらに、筋ジストロフィー症の発症機序にエキソペプチダーゼがエンドペプチダーゼと異なる役割を果していることを明らかにした^{8),9)}。

正常および病態モデル動物における酵素網の変化を長期間経時的に調べ、また酵素阻害物質投与により誘起される酵素網の動態を究明することは、ホメオスタシス機構を明らかにするとともに、治療への応用を可能にするものと考え¹⁰⁾。しかし、酵素阻害物質の *in vivo* の作用と、その *in vitro* のスペクトラムとの間には、明確な関連性が見出

されないのが実情である。

筆者らは各種の酵素阻害物質の *in vitro* と *in vivo* との相違を酵素網の動態から追究し、生体内においてはフィードバックやネットワークを介する間接的な影響が加わることが両者間の相違の大きなファクターとなる可能性を示唆した。

本報告はアミノペプチダーゼインヒビターであるベスタチンの作用機序を明らかにすることを目的として、ベスタチンおよびその立体異性体をマウスに連続30日間投与し、経時的に採取した筋肉内の酵素網の動態について検討したので、その結果について述べる。

実験方法

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

阻害物質

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

* 微生物化学研究所

AHPA-(S)-Leu), [(2R, 3S) AHPA-(S)-Leu] と [(2R, 3R) AHPA-(S)-Leu] を用いた。ベスタチンおよび立体異性体の構造ならびに阻害活性は表 1 に示す。

基質

酵素活性測定用の基質は下記のものを用いた。L-glutamic acid β -naphthylamide hydrochloride (Glu·NA), L-arginine β -naphthylamide (Arg·NA), L-proline β -naphthylamide (Pro·NA), L-leucine β -naphthylamide (Leu·NA), glycyl-L-prolyl-L-leucine β -naphthylamide (Gly-Pro-Leu·NA), hippuryl-L-phenylalanine (Hip-Phe), hippuryl-L-lysine (Hip-Lys), hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-His-Leu), carbobenzyoxyglycyl-L-proline (Z-Gly-Pro), N-benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride (BAEE), hemoglobin, *p*-nitrophenylphosphate (NPP), *p*-nitrophenyl acetate (NPA)。

緩衝液

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

酵素活性の測定

臓器ホモジネートの遠心上清分画は、それぞれ

の基質溶液および緩衝液を含む反応試験管 (1.5×10cm) に分注し、37°C で 1 時間の反応を行った。CP-A, CP-B およびカテプシン D は前述の緩衝液を用い、それぞれの条件下で反応を行った。すべての酵素活性の測定には 3 本宛の試験管を用い、その平均値を記載した。各酵素活性の測定法および基質は表 2 に示す。

蛋白の測定

標準蛋白として、ウシ血清アルブミンを用い、Lowry 法¹⁸⁾ で測定した。

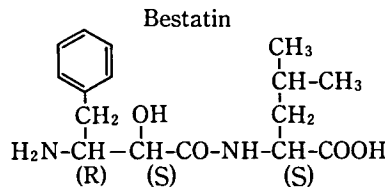
統計学的手法

酵素活性のある時点における動きが、それより過去または未来の時点における変動と何らかの関連性をもっているかを判定するためには、自己相関関数¹⁹⁾ を用いるのが有効である。もし規則性のある変動であればサインカーブ様の曲線が得られるはずである。

結 果

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

表 1 Inhibitory activities of bestatin and its stereoisomers



	Stereoisomer		IC ₃₀ (μg/ml)			
	2	3	AP-B	Leu-AP	Gly-Pro-Leu-AP	AP-A
<p>H₂N-CH(3)-CH(2)-CO-</p>	S	R	0.05	0.01	3	>200
	S	S	4.1	0.23	40	>200
	R	S	>200	>200	>200	>200
	R	R	>200	>200	>200	>200

がSであることが重要である。

上述した結果に基づき、活性体である(2S, 3R) AHPA-(S)-Leu (ベスタチン) と不活性体である(2R, 3R) AHPA-(S)-Leu および食塩水を図1に示した方法で投与した。さらに、ベスタチンを9日間のみ連続投与したのち、投薬を中止し図1の方法で経時的に酵素活性の変動を追究した。上

述した実験で得た前肢ならびに後肢の筋肉内のAP-A および Leu-AP 活性の変動を図2と図3に示す。

上述した実験条件下で得た結果は必ずしも顕著な差を示さなかった。それ故、自己相関関数¹⁹⁾による解析を試みた。

図4から図7にAP-A, Leu-APの自己相関関

表2 List of the enzymes measured and their substrates

Enzyme	Abbreviation	Substrate	Reference for assay method
Aspartate aminopeptidase (EC 3.4.11.7)	AP-A	Glu·NA	5, 11
Arginine aminopeptidase (EC 3.4.11.6)	AP-B	Arg·NA	5, 11
Proline iminopeptidase (EC 3.4.11.5)	Pro-AP	Pro·NA	5, 11
Leucine aminopeptidase (EC 3.4.11.1)	Leu-AP	Leu·NA	5, 11
Tripeptide aminopeptidase (EC 3.4.11.4)	Gly-Pro-Leu-AP	Gly-Pro-Leu·NA	5, 11
Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1)	CP-A	Hip-Phe	12,
Carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2)	CP-B	Hip-Lys	13,
Dipeptidyl carboxypeptidase (EC 3.4.15.1)	ACE	Hip-His-Leu	14,
Prolyl endopeptidase (EC 3.4.21.26)	Post-Pro-Enz	Z-Gly-Pro	15,
Plasma kallikrein (EC 3.4.21.34)	Kallikrein	BAEE	5,
Carboxyl proteinase (EC 3.4.23.5)	Cathepsin D	Hemoglobin	5, 16
Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1)	Phosphatase	NPP	5, 17
Arylesterase (EC 3.1.1.2)	Esterase	NPA	5, 17

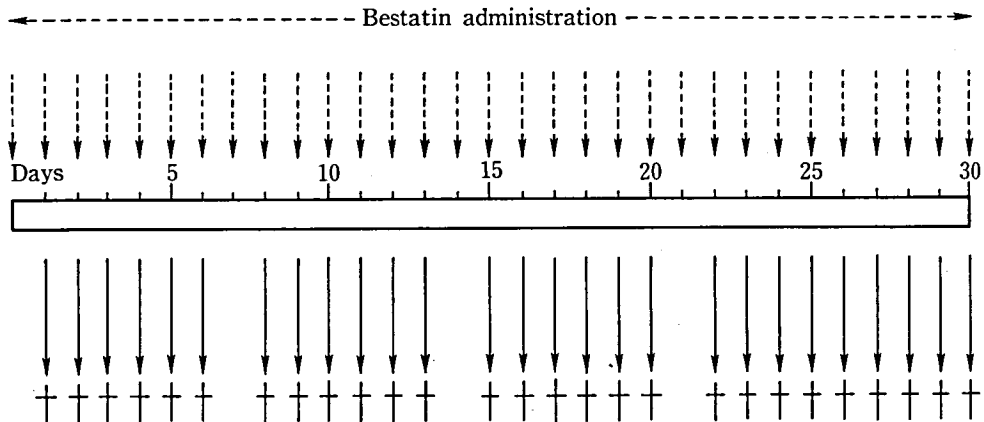


図1 Effects of bestatin stereoisomers on enzyme networks in murine organs
 Experimental animals: ICR mice, i.p. injection
 Inhibitors: (2S, 3R)-bestatin, (2R, 3R)-bestatin
 Organs: forelimb muscle, hindlimb muscle, heart muscle, spleen liver, kidney
 Enzymatic assays: aminopeptidase (5), endopeptidase (7), GlcNAc-ase, phosphatase, esterase

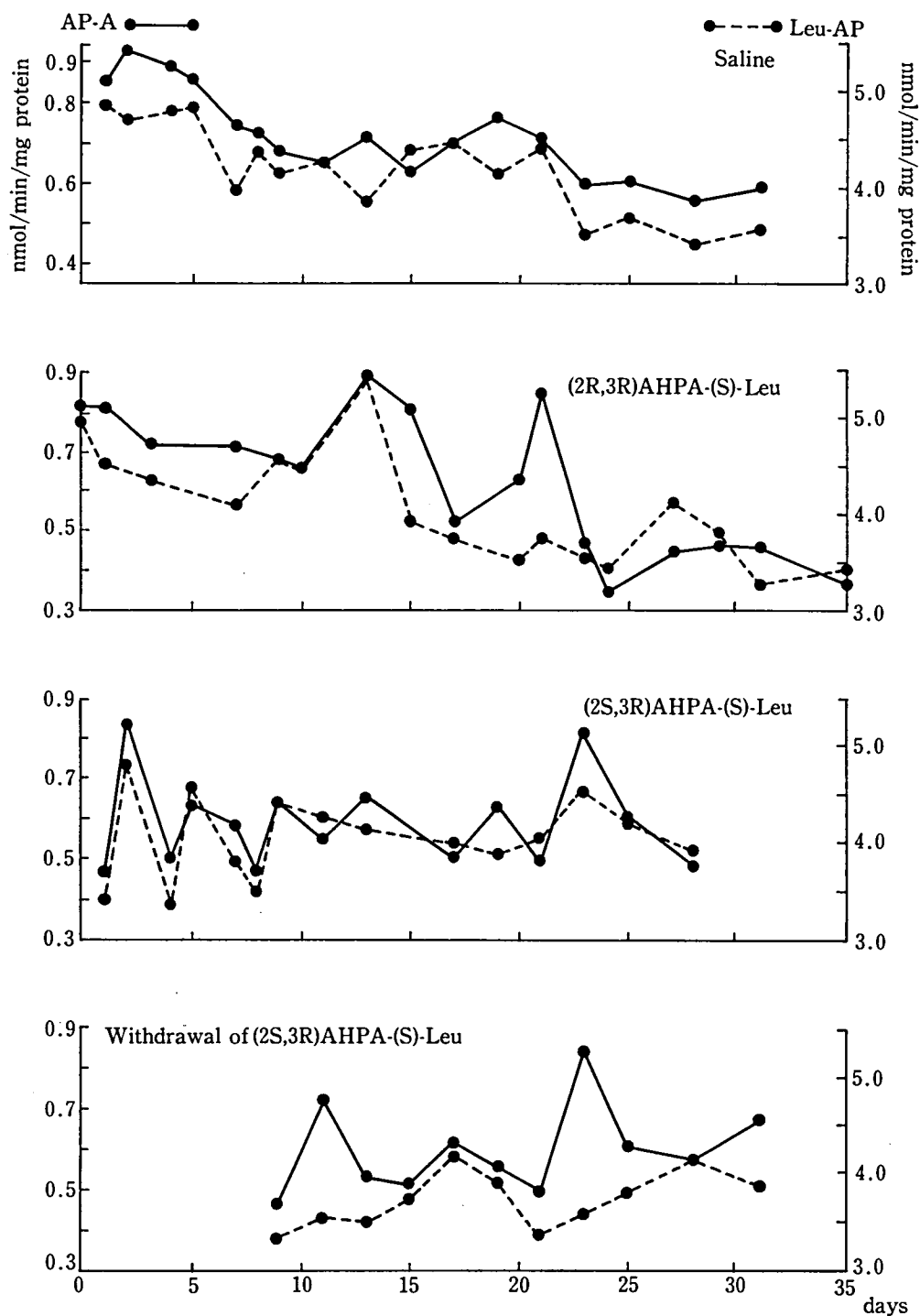


図2 各種状態における前肢筋内酵素活性の時間的変動

数曲線を示す。前肢筋におけるAP-Aの動きはSalineまたは不活性体(2R, 3R) AHPA-(S)-Leuを投与したとき、振動状態が比較的緩和あるいは

定型的ではない。しかし、ベスタチン投与ならびに投与後中止した場合は、その振動状態が規則的かつ比較的速い周期になっていることが認められ

筋肉内酵素網の動態に対するベスタチンおよびその立体異性体の影響

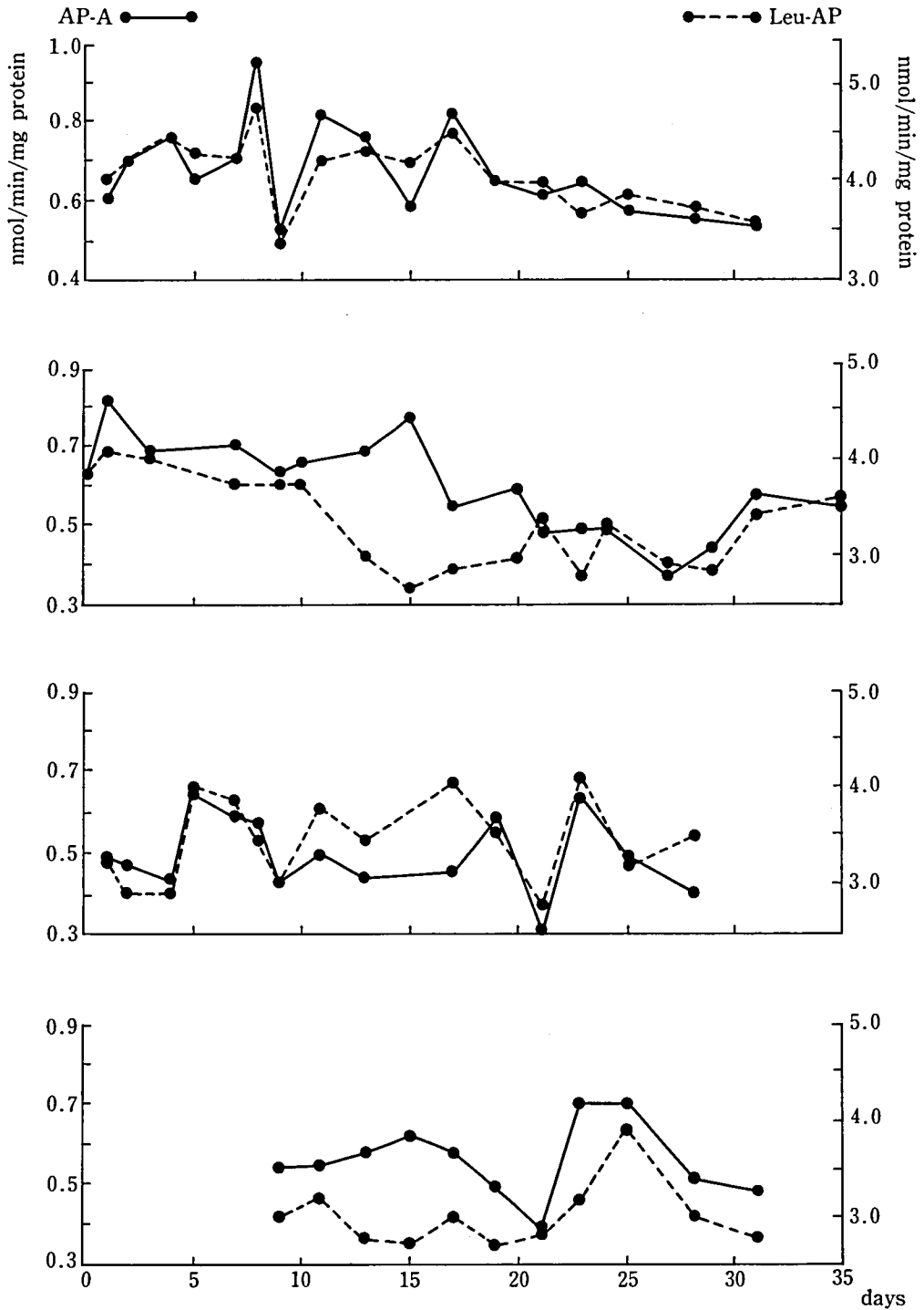


図3 各種状態における後肢筋肉内酵素活性の時間的変動

た、この傾向は Leu-AP についても同様に認められた (図5)。

図6および図7に示したように、後肢筋についても明らかに同じ傾向である。

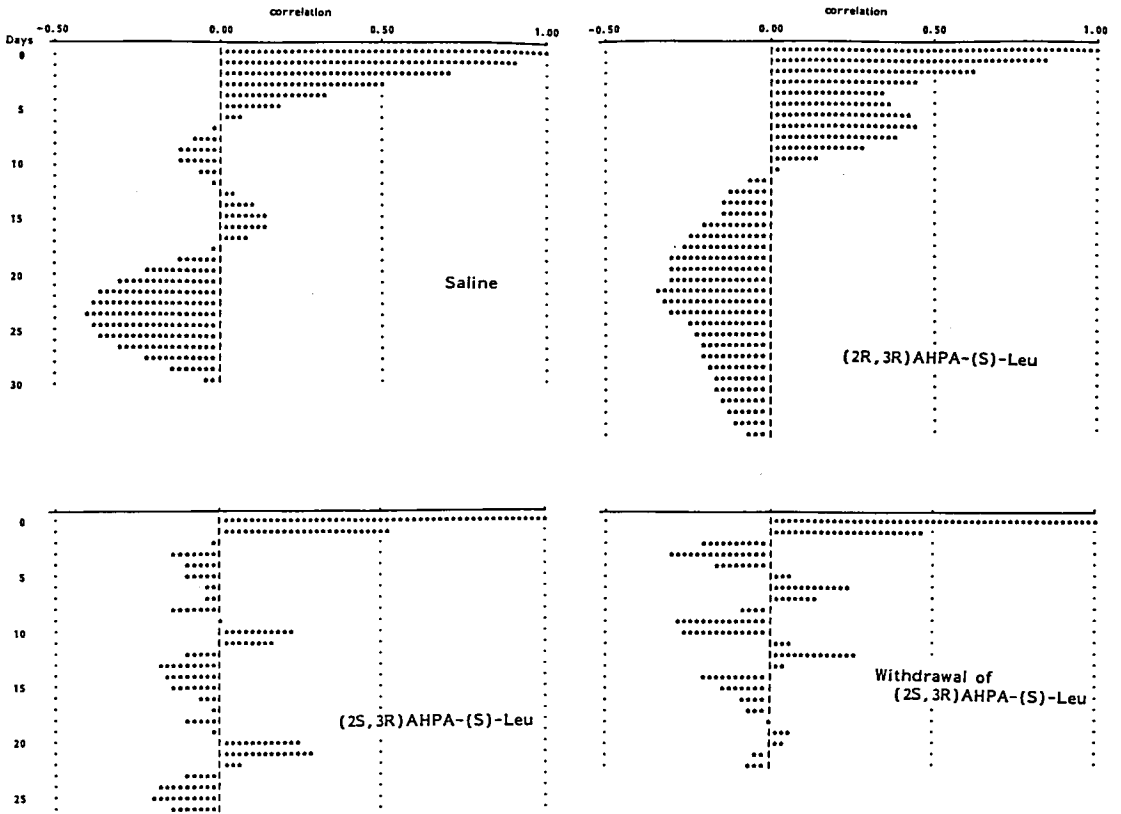


図4 前肢筋内 AP-A 活性の自己相関曲線

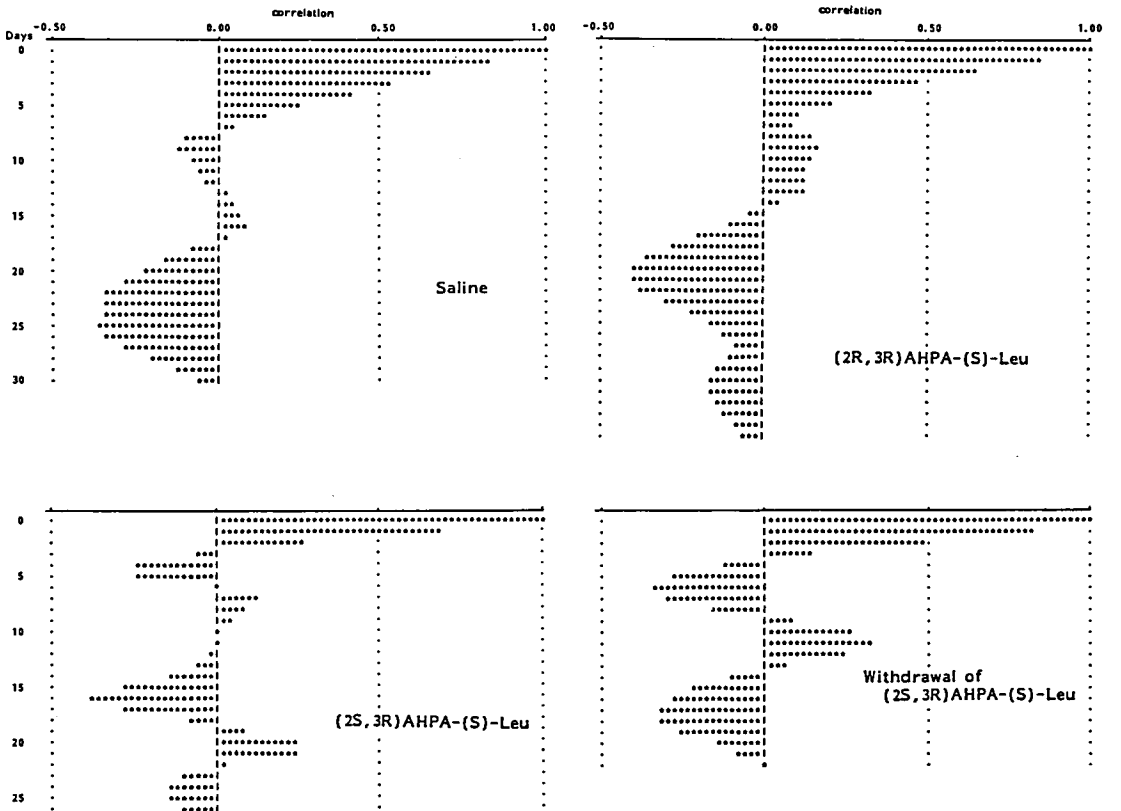


図5 前肢筋内 Leu-AP 活性の自己相関曲線

筋肉内酵素網の動態に対するベスタチンおよびその立体異性体の影響

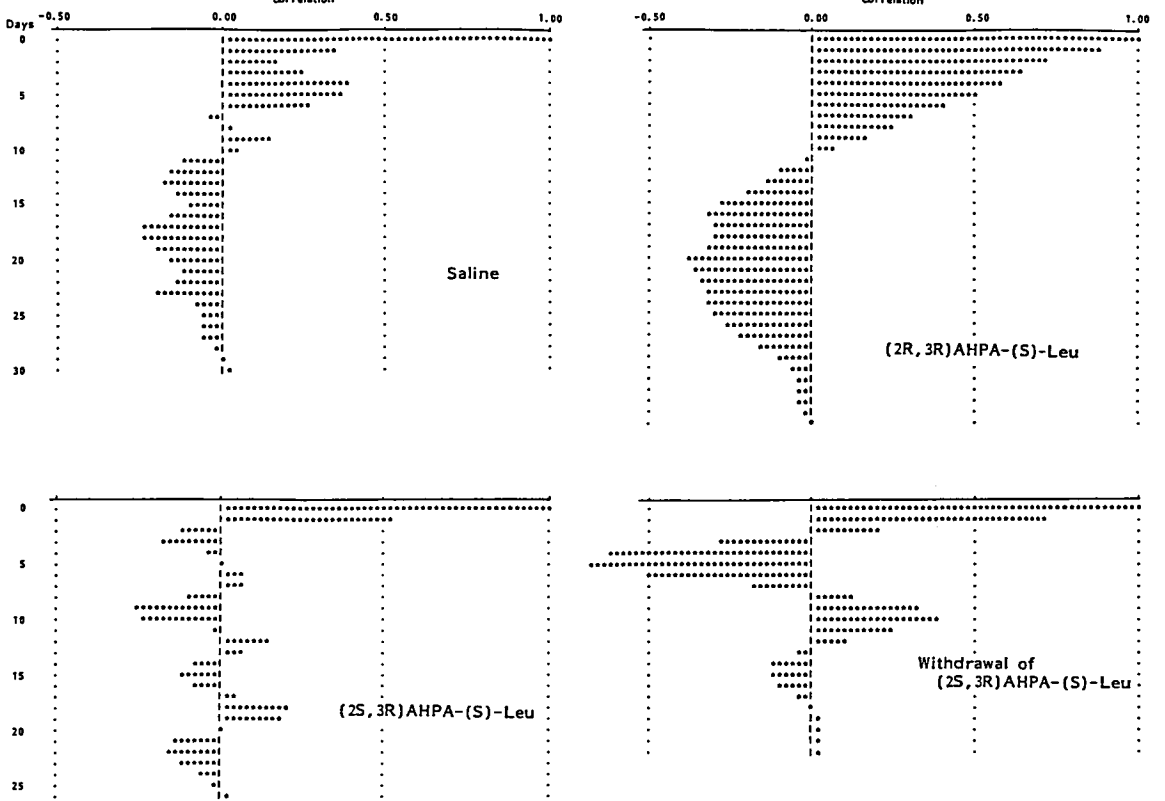


図6 後肢筋内 AP-A 活性の自己相関曲線

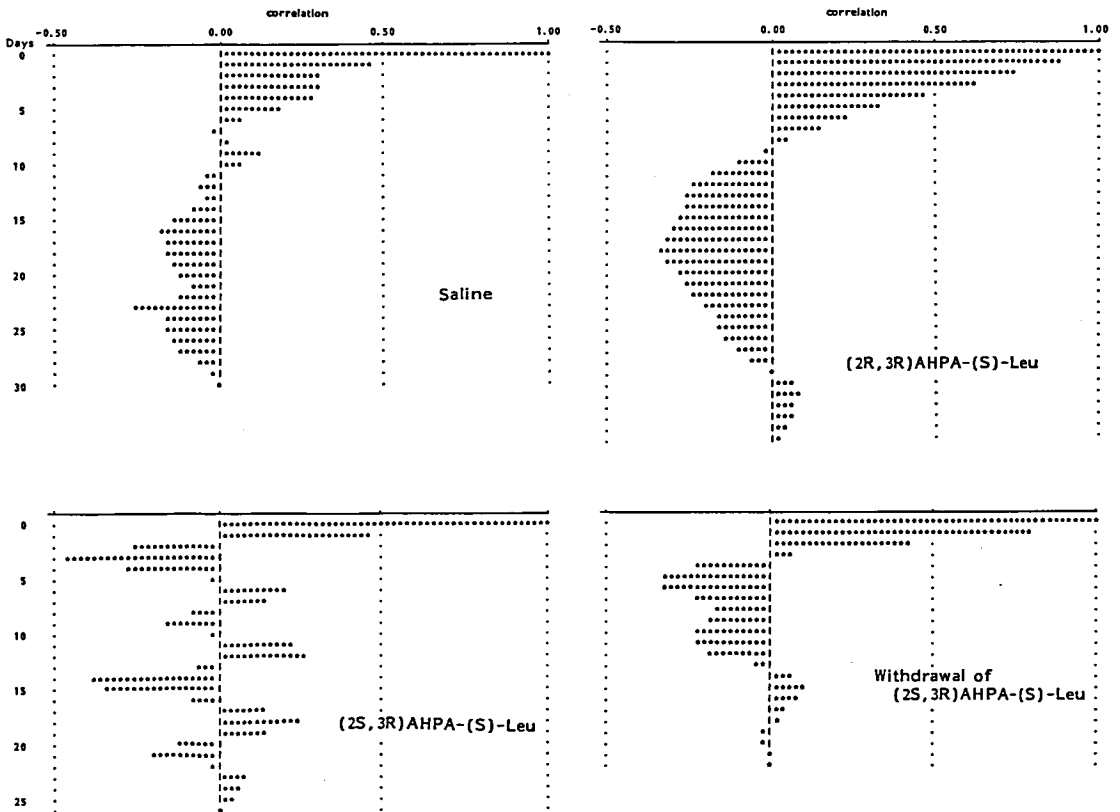


図7 後肢筋内 Leu-AP 活性の自己相関曲線

考 察

筆者らは、低分子酵素阻害物質による阻害効果が *in vitro* と *in vivo* で異なることを明らかにしてきた^{20)~22)}。筆者らの一連の実験成績は、生体内において酵素阻害物質が非常に広範なスペクトルにわたる酵素のネットワークを変化させること、ならびにその効果が恐らくその物質に固有な直接的酵素作用に端を発することを裏付けている。

本報告の研究成績もこれを裏付けるものである。すなわち、Saline あるいは不活性体ベスタチンの投与では、殆んど同じような生体内動態がみられるのに対し、活性体ベスタチン投与および途中で中止した場合にも、前者とは異なる振動状態がみられ、よりシンクロナイズされた状態となることが確認された。

一方、ベスタチンは、その阻害作用では一見して説明しがたいほどの様々な生体内作用を示すことが知られている。例えば、ベスタチンは連続投与することにより筋ジストロフィーマウス筋肉内のエンドペプチダーゼ活性を下げ、また高血圧ラット (SHR) の血圧を抑制することなどである。

従って、本報告ならびに従来の成績を全て総合して考えるならば、恐らくはベスタチンの効果により生体内のペプチド分布が変化し、種々な生理活性ペプチドのアナログが出現するという機序によって説明するのが最も合理的なように思われる。

ま と め

ベスタチンは筋ジストロフィーマウスの発病前から投与することにより発症阻止効果のあることが報告され、また Duchenne 型筋ジストロフィーの5歳未満の患児における第II相比較臨床試験で病状改善効果のあることが認められている。ベスタチンの作用機序を明らかにすることを目的とし、ベスタチンおよびその立体異性体をマウスに連続投与することによる筋肉(前肢筋、後肢筋)内の酵素網の変動について調べた。ベスタチン(活性体)投与および途中で中止した場合は不活性体、生理食塩水投与の場合と異なる振動状態がみられ、よりシンクロナイズされた状態になることが確認

された。

文 献

- 1) Stracher, A., McGowan, E.B. and Shafiq, S.A.: Science., 200: 50-51, 1979.
- 2) McGowan, E.B., Shafiq, S.A. and Stracher, A.: Exp. Neurol., 50: 649-657, 1976.
- 3) Matsushita, H.: In study on the clinical applications of secondary metabolites from microbes. Annual report of muscular dystrophy committee, supported by Ministry of health and welfare, 1980, pp. 45-50.
- 4) Matsushita, H.: In study on the clinical applications of secondary metabolites from microbes. Annual report of muscular dystrophy committee, supported by Ministry of health and welfare, 1982, pp. 51-57.
- 5) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H.: J. Clin. Invest., 67: 51-59, 1981.
- 6) Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Aoyagi, T. and Umezawa, H.: J. Pharm. Dyn., 4: 184-190, 1981.
- 7) Aoyagi, T., Wada, T., Yamamoto, K., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H.: J. Pharm. Dyn., 7: 312-321, 1984.
- 8) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Miyoshino, S. and Umezawa, H.: Clin. Chim. Acta., 129: 165-173, 1983.
- 9) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Harada, S., Kinoshita, M., Yamada, N. and Umezawa, H.: J. Clin. Biochem. Nutr., 1: 65-72, 1986.
- 10) 青柳高明: 自然10月号: 39-47, 1983.
- 11) Aoyagi, T., Suda, H., Nagai, M., Ogawa, K., Suzuki, J., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: Biochim. Biophys. Acta., 452: 131-143, 1976.
- 12) Tanaka, T., Suda, H., Naganawa, H., Hamada, M., Takeuchi, T., Aoyagi, T. and Umezawa, H.: J. Antibiot., 37: 682-684, 1984.
- 13) Umezawa, H., Aoyagi, T., Ogawa, K., Iinuma, H., Naganawa, H., Hamada, M. and Takeuchi, T.: J. Antibiot., 37: 1088-1090, 1984.

- 14) Umezawa, H., Aoyagi, T., Ogawa, K., Iinuma, H., Naganawa, H., Hamada, M. and Takeuchi, T. : J. Antibiot., 38 : 1813-1815, 1985.
- 15) Yoshimoto, T., Ogita, K., Walter, R., Koida, M. and Tsuru, D. : Biochim. Biophys. Acta., 569, 184-192, 1979.
- 16) Aoyagi, T., Kunimoto, S., Morishima, H., Takeuchi, T. and Umezawa, H. : J. Antibiot., 24 : 687-694, 1971.
- 17) Aoyagi, T., Nagai, M., Iwabuchi, M., Liaw, W.S., Andoh, T. and Umezawa H. : Cancer Res., 38 : 3505-3508, 1978.
- 18) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : J. Biol. Chem., 193 : 265-275, 1951.
- 19) Cox, D.R. and Lewis, P.A.M. : The statistical analysis of series of events, London, Methen, 1966.
- 20) Aoyagi, T., Wada, T., Yamamoto, K., Kojima, F., Nagai, M., Harada, S. and Umezawa, H. : J. Appl. Biochem., 6 : 212-221, 1984.
- 21) Aoyagi, T., Wada, T., Iwabuchi, M., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H. : Biochem. Int., 5 : 97-103, 1982.
- 22) Aoyagi, T., Wada, T., Ohuchi, S., Kojima, F., Nagai, M., Harada, S. and Umezawa, H. : J. Pharmacobio-Dyn., 7 : 681-687, 1984.

蛋白分解酵素の役割とその阻害剤に関する研究

藤井節郎*

はじめに

筋ジストロフィー症の発症および症状の進行に種々の蛋白分解酵素が重要な役割を果していることが最近の研究により明らかになりつつある。われわれはすでに各種蛋白分解酵素に対する合成基質とその阻害剤について検討し、合成基質を用いた蛋白分解酵素に対するザイモグラムによる分析法を確立した。また合成阻害剤について Trypsin, Plasmin, Thrombin Kallikrein および補体系の C1r, C1s に対する強い阻害活性をもつ合成剤を見出し、更に *in vivo* での薬効を示すものを見出した。そこで、筋ジストロフィー症に関与している蛋白分解酵素の動態を解明し、蛋白分解酵素合成阻害剤による酵素の阻害パターンを明確にし、病態モデルの治療を行ない臨床効果についても検討したい。今回は新しい合成阻害剤について報告する。

実験方法

1) 蛋白分解酵素合成阻害剤

6-Amidino-2-naphthyl [4-(4, 5-dihydro-1H-imidazol-2-yl) amino] benzoate dimethanesulfonate (FUT-187) については鳥居薬品(株)研究所より供給して戴いた。構造式は図1に示した。

2) 動物実験

a) 実験的急性膵炎

(1) トリプシン誘発急性膵炎

Wistar 系雄性ラット (体重165~230g) 1群14~18匹を用いて FUT-187 を10, 30および100 mg/kg を経口投与し1時間後に膵炎誘発剤としてトリプシン0.3mg と Sodium taurocholate の

混合液0.1ml を膵管内に注入し, 1, 2, 3および7日目の生存例で判定した。

(2) ホスホリパーゼ A₂ 誘発急性膵炎

Wistar 系雄性ラット (体重190~230g) 1群23匹を用いて FUT-187 を10, 30および100mg/kg を経口投与し, 1時間後に膵炎誘発剤として Phospholipase A₂ 300U と Sodium taurocholate 10 mg の混合液0.1ml を膵管内に注入し生存例で判定した。

(3) イヌ急性膵炎

ビーグル犬雄性 (体重8.4~13.9kg) 1群7例を用いて膵管および胆管の開口部を含むように十二指腸の両端部で切断し, Closed-loop (盲管) を作成と同時に FUT-187 を10mg/kg として盲管内に注入した。胃十二指腸の切離断端は縫合し, 消化管を再建した。延命効果および各種酵素活性に使用した合成基質は以下の通りである。

Trypsin: Boc-Phe-Ser-Arg-MCA

Plasmin: Boc-Val-Leu-Lys-MCA

Plasma Kallikrein: Z-Phe-Arg-MCA

Pancreatic Kallikrein: Pro-Phe-Arg-MCA

Thrombin: H-D-Pip-Arg-pNA

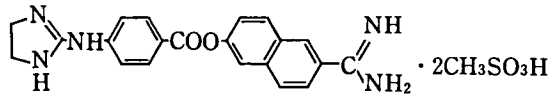
3) 補体溶血反応

感作羊赤血球 2.5×10^8 cells/ml および1/225希釈モルモット血清を用いて Baker and Cory¹⁾の方法で行った (古典的経路)。

ウサギ赤血球 1.3×10^7 cells/ml および1/55希釈モルモット血清を用いて Platts-Mills and Ishizaka²⁾の方法で行った (第2経路)。

In vivo の血管内溶血反応に対する効果は, Hartley 系雄性モルモット (体重300~490g) 1群5~6匹で FUT-187 の30, 100および300mg/kg を経口投与し, 1時間後に血管内補体溶血反応を

* 勸大阪基礎医学研究奨励会



分子式：C₂₁H₁₉N₅O₂ · 2CH₃SO₃H

分子量：565.63

化学名：6-Amidino-2-naphthyl [4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl) amino]benzoate dimethanesulfonate

図1 FUT-187の構造式

表1 FUT-187の蛋白分解酵素に対する阻害活性

Enzyme	Substrate	IC ₅₀ (μM) FUT-187
Trypsin	BPSA	0.34
Plasmin	BVLL	0.61
Kallikrein	PPA	0.48
Thrombin	TAME	6.4
Clf	AAME	23
Clf	ATEE	0.29
Chymotrypsin	ATEE	280
Cathepsin D	Hemoglobin	>1000

BPSA: Boc-Phe-Ser-Arg-MCA, BVLL: Boc-Val-Leu-Lys-MCA, PPA: Pro-Phe-Arg-MCA, TAME: Tosyl-L-Arg-methylester, ATEE: Acetyl-L-Tyr-ethylester.

表2 モルモット血管内溶血反応に対するFUT-187の作用

FUT-187 (mg/kg)	% Inhibition	
	古典経路	第2経路
30	-9.5	21.1
100	15.3	71.5**
300	100**	77.5**

** p<0.01

誘発する感作羊赤血球を静脈内投与3分後に心採血を行ない吸光度541nmで測定した(古典的経路)。またイヌ血清で誘発する場合は15分後に同様に測定した(第2経路)。

4) Forssman shock

Hartley系雄性モルモット(体重250~350g)1群8~23匹にFUT-187の25~200mg/kgを経口投与後1時間目に抗羊赤血球ウサギ血清(hemolysin)0.5mlを静脈内投与し生存例で判定した。

5) SLE自然発症マウス

NZB/WF₁ SLE自然発症モデルにFUT-187の100および300mg/kgを6ヶ月齢より毎日合計3ヶ月間経口投与し延命効果で判定した。

実験結果および考察

1. 蛋白分解酵素阻害物質(FUT-187)

a) FUT-187(6-Amidino-2-naphthyl[4-(4,

5-dihydro-1H-imidazol-2-yl) amino] benzoate dimethanesulfonateの構造式は図1に示した。本化合物は表1に示すように血漿中の蛋白分解酵素およびTrypsinを阻害し、その阻害機構は本化合物中のエステル部位が酵素により切断され、その酵素の活性中心であるセリン残基と結合することにより不活化する。また本化合物は細胞内に存在する蛋白分解酵素であるカテプシン群に対する阻害活性は認められない。FUT-187の特徴は補体系の蛋白分解酵素を阻害し、補体溶血反応に対して強力な阻害活性を有していることである。補体溶血反応に対する阻害は、古典的経路では 1.7×10^{-7} M、第2経路では 3.2×10^{-6} Mの濃度でおおの溶血反応を50%阻害する。モルモットの血管内溶血反応に対するFUT-187の作用は表2に示すように、古典的経路を介する補体溶血反応は100mg/kg以上で阻害し、第2経路を介する反応に対しても30mg/kg以上で阻害を示した。

b) FUT-187の急性膵炎モデルにおける効果

トリプシン誘発急性膵炎に対しFUT-187を30および100mg/kgの経口投与により明らかな延命効果を示した(図2)。またホスホリパーゼA₂誘

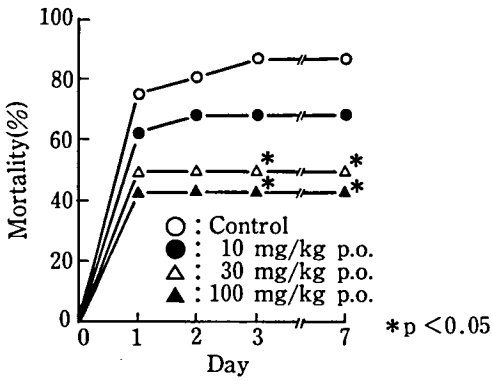


図2 ラット・トリプシン誘発急性膵炎に対するFUT-187の作用

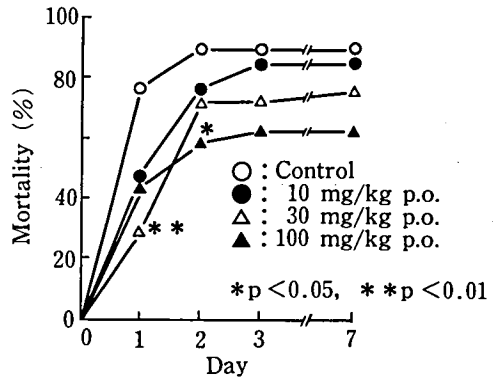


図3 ラット・ホスホリパーゼA₂誘発急性膵炎に対するFUT-187の作用

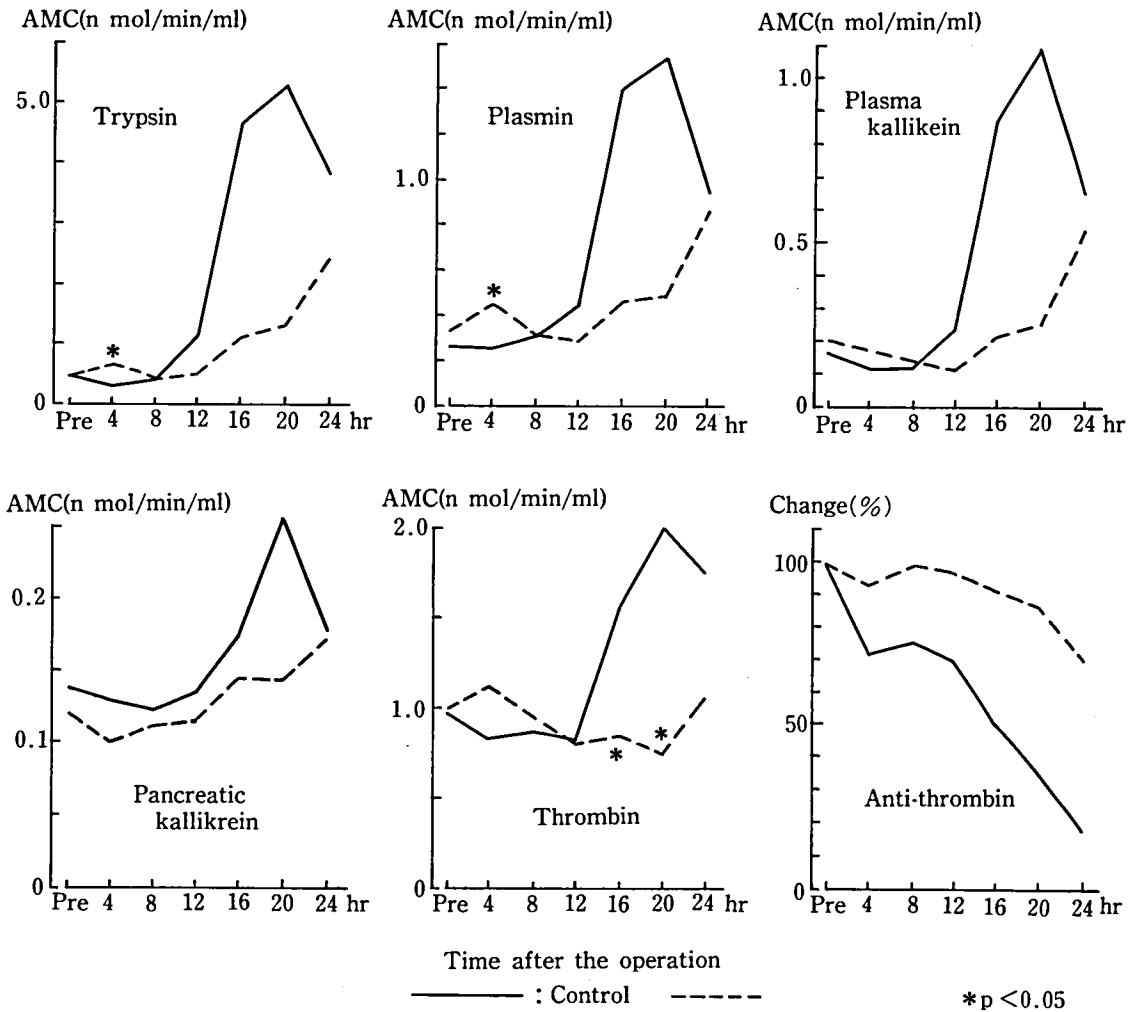


図4 イヌ急性膵炎モデルの血中パラメーターに対するFUT-187の作用

表3 イヌ急性膵炎モデルに対する
FUT-187の作用

Drug Dose (mg/kg, i.d.)	No. of animals	生存動物数				* : p < 0.05
		20	24	48	72hr	
Control	7	●	●●●●	●●●●	●	
FUT-187 (10)	7		●		●●●●●●●	*

表4 モルモット Forssman shock に対する
FUT-187の作用

Drug (mg/kg, p.o.)	Survived animals				** p < 0.01
	0	0.5	1	24hr	
Control	●●●●●●●●				
FUT-187	25	●●●●●●●●	●		
	50	●●●●●●●●	●	●●●●	**
	100	●●●●●●●●		●●●●●●	**
	200	●		●●●●●●●	**

**p < 0.01

発急性膵炎に対し100mg/kgの経口投与で明らかな延命効果を示した(図3)。イヌ急性誘発膵炎モデルにおいて、FUT-187は10mg/kgの十二指腸内投与で明らかな延命効果を示した(表3)。またこの時の血中に於ける各種酵素活性は図4に示すように Trypsin, Plasmin, Plasma Kallikrein, Thrombin など対照群の活性上昇を抑制している。

c) Forssman shock に対する効果

補体の関与するアレルギー反応で Coombs と Gell による分類ではII型とIII型がある。このうちII型 (Forssman shock) に対する FUT-187の効果を検討した結果表4に示すように明らかに致死時間の延長が認められた。II型の病態における補体の生物学的意義が重要であることが示唆された³⁾。

d) SLE 自然発症モデルに対する効果

補体系の関与が考えられている自己免疫疾患について検討した。図5に示すように、SLE 自然発

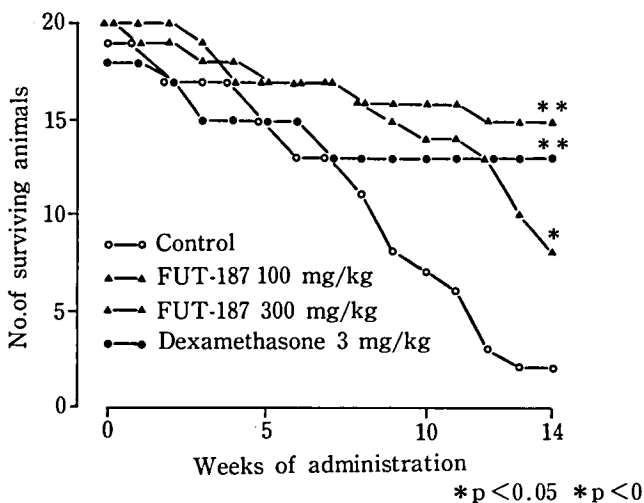


図5 SLE自然発症モデル NZB/W F₁ マウスに
対する FUT-187の作用

症モデルのマウスに FUT-187を3ヶ月間連続経口投与すると生存日数において100, 300mg/kgで有意の延命が認められた。

補体の示す作用は多面的であり、病態における意義もまた多様性を示すことになる。最近多くの研究者によりその意義が解明されつつある。しかし生体に応用し得る適当な抗補体物質が得られていない現在その証明が限られており先に報告した FUT-175 (フサン)^{3), 4)}の臨床適応により補体の病態における意義が明確になるであろう。

文 献

- 1) Baker, B.R. and Cory, M.: J. Med. Chem., 12: 1049-1052, 1969.
- 2) Platts-Mills, T.A. and Ishizaka, K.: J. Immunol., 113: 348-358, 1974.
- 3) Hitomi, Y., Fujii, S.: Int. Arch. Allergy. Apple. Immun., 69: 262-267, 1982.
- 4) Fujii, S., Hitomi, Y.: Biochim. Biophys. Acta., 661: 342-345, 1981.

Lysosomal proteolysis の Cystatin による 制御機構ならびに Cystatin の大量産生

第 1 部：Cathepsin 群のプロセッシングと Cystatin による Lysosomal proteolysis の制御機構 第 2 部：Cystatin α 遺伝子の大腸菌による発現と Lysosomal proteolysis の抑制

勝 沼 信 彦*

研究協力者 木 南 英 紀* 大 和 正 幸* 原 研 治*
板 東 祥 晃* 池 祥 雅**

はじめに

Lysosomal proteolysis の異常亢進に起因する筋タンパク崩壊疾患は色々と報告されている。細胞内のリソゾーム・プロテアーゼ群 (カテプシン群) の量と活性の制御機構を明らかにし、その原理に基づく上記疾患の治療法を開発せんとするのが目的である。特に natural inhibitor である Cystatin の細胞内での Lysosomal proteolysis の阻害機構を明らかにし、これを治療目的に利用すべく、リコンビナントによる大腸菌プラスミッドでの大量産生をおこなった。

第 1 部 Cathepsin 群のプロセッシングと Cystatin による Lysosomal proteolysis の制御機構

カテプシン前駆体構造の比較

リソゾームのシステイン・プロテアーゼの主なものはカテプシンの B, H および L である。活性のある成熟型の B と H は筆者ら^{7),9)}により、H は

Kirschke らにより初めて単離された⁹⁾。その後に B と H の一次構造は筆者らにより蛋白側から決定された¹⁾⁻³⁾。前駆体構造は 1986 年に B が Steiner ら⁴⁾により、L と H が 1987 年に筆者らによりクローニングにより決定された^{5),6)}。

図 1 には、これらのプレ・プロ部の構造を比較してあるが、類似性は成熟部よりはるかに少ない。プロ部には本来 N-グルコシッド結合をすべき糖鎖結合部位が 2 か所あるが、1 か所が欠損している B や、2 か所とも結合できなくなっている L が存在しており、糖鎖の役割には興味もたれる。全前駆体からのプロセッシングと分解の初発切断部位が、図 2 に模式で示されている。

前駆体のプロセッシング^{9),10)}

クローニングにより得られた前駆体構造から推定できるプロセッシングが実際に起こっているのか、またそれに関与するプロテアーゼはいかなるものかを追求した。培養マクロファージを S³⁵メチオニンでラベルし、チェイス後 SDS 電気泳動に供し、フルオログラフィーをカテプシン B につき行ったものが、図 3 に示してある。チェイスの初期には 39K のプロ型ができており、時間とともに 29

* 徳島大学酵素科学研究センター

** 三井東圧化学

HOMOLOGY OF PRE-PRO-PART CATHEPSINS

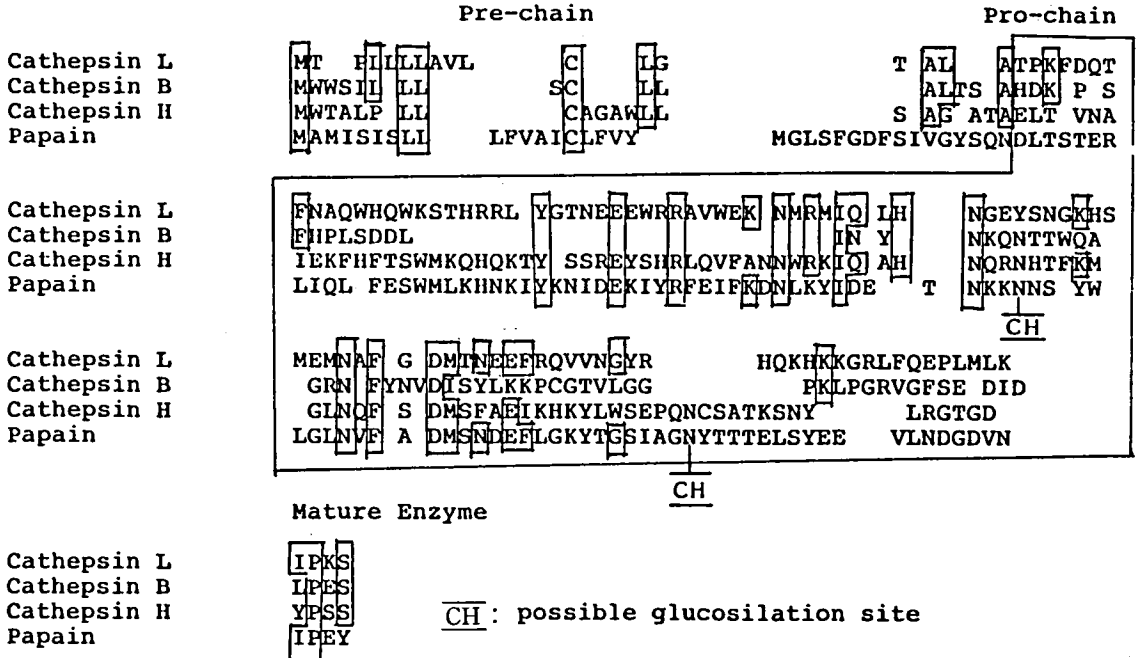


図 1

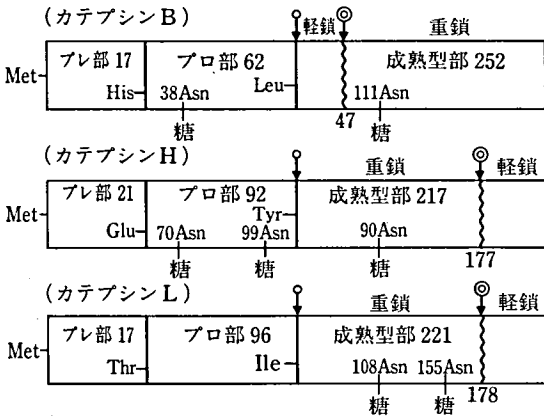


図 2 カテプシン B, H, L の前駆体構造とプロセッシングおよび分解の初発ステップ

{○→メタロ・プロテアーゼ}
 {◎→システイン・プロテアーゼ}

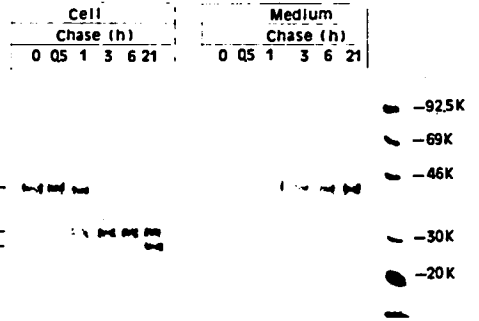


図 3 Cathepsin B のプロセッシング (S³⁵-Methionine でラベル: フルオログラフィー)

39K: プロ・カテプシン B, 29K: 一本鎖成熟型, 26K: 分解産物の重鎖

K の成熟型が生成している。長時間たつと 26K の分解産物重鎖ができてくる。一部分はプロ型で培地に放出されるが、これは成熟型にプロセスされていない。H と L についても全く同様のプロセスをとることが明らかとなった。

但し初めの分解産物は B においては必ず 26K

であり、47 番目で切断された産物が重鎖としてでき、L は 23K で 178 番目で切断され、H は 24K で 177 番目で切断されている。即ち活性酵素の分解のイニシエーションは、上記の厳密な限定分解で始まることになる。

以上の二つのステップに関与するプロテアーゼ

を検索するため、上記のチェイス実験において2種のプロテアーゼ阻害剤を添加した場合の結果が図4である。金属プロテアーゼ阻害剤オルトフェナントロレン (O-Ph) 添加でプロ部の切断が阻害されプロ部で止まる。システイン・プロテアーゼの阻害剤 E-64を加えた場合には成熟型は生成するが、成熟型から分解産物である重鎖の生成は停止する。しかし、セリン・プロテアーゼやアスパルテート・プロテアーゼなどのプロテアーゼ阻害剤は、これら両ステップに阻害を示さない。プロ・カテプシンのプロセッシングには金属プロテアーゼが関与しており、成熟カテプシン群が重鎖に分解されるステップにはシステイン・プロテアーゼ自身が関与していることが明らかになった。プロ・カテプシンが成熟型になるのは、結合糖鎖をマーカーとしてゴルジからリソゾームへ封入されるステップで起こる。従って、糖鎖端のマノーズを磷酸化する酵素の欠損しているムコリポジスII型、I cell 病では、ファイブプロラスト培養系において、大部分は培地にプロ型のまま分泌される。また一部の細胞内に留まっているものは、異常なプロセッシングを受けた中間体ができていることが明らかとなった¹³⁾。

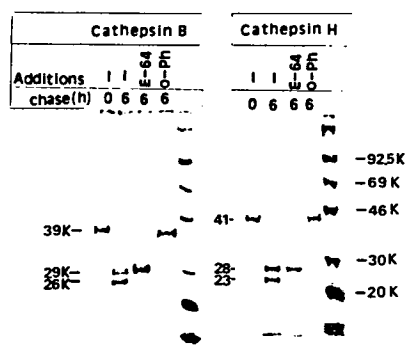


図4 Cathepsin BとHのプロセッシングに対する protease 阻害剤の作用 (図3と同一条件)
39Kと41Kはそれぞれcathepsin BとHのプロ型
29Kと28Kはそれぞれの本鎖成熟型
26Kと23Kはそれぞれの分解産物重鎖

リソゾーム内酵素群の分解に果たすカテプシン群の役割¹²⁾

カテプシン群の分解の初発反応にはカテプシン群自身に関与していることを示した。その他のリソゾーム局在の酵素群の分解にもカテプシンが関与しているであろうか。培養肝細胞に E-64を添加して、カテプシン活性を阻害した場合の半減期と含有量の変化を、抗体を使用して各種リソゾーム酵素につき測定したものが表1である。確かに E-64によりカテプシン群の半減期も含有量(蛋白量)も3~5倍に増加する。さらに、蛋白分解酵素以外の多くの酵素群の半減期も著明に長くなり、酵素蛋白量が増加蓄積することにより、それぞれの酵素活性も著増している。この原理は、これらの酵素の低下に起因する各種のリソゾーム病治療の基礎となっている。細胞質内には内在性のカテプシン・インヒビター(シスタチン)群が見出されている^{14),17)}。分子量は1万内外でカテプシンに特異性を持つ。シスタチンを培養細胞に加えると、細胞内に取り込まれてリソゾーム内のカテプシン群を阻害する。従って E-64を添加した場合同様にリソゾーム内の β -ヘキサミナーゼ等の分解が低下してそれらの量を増加させる。シスタチンは分泌され易いことから考えて、この機構が、シスタチンによるリソゾーム内カテプシンの自然の調節機構である可能性があると考えている(図5)。

リソゾームによる細胞質蛋白分解の調節^{15),18),19),21)}

細胞内での蛋白分解は、ホルモン条件および食餌条件で大きく左右されることはよく知られている。飢餓動物および再摂食動物にロイペプチンを投与して、二次リソゾーム内での取り込み蛋白の分解を止めた肝から分解したリソゾーム内に蓄積した酵素蛋白量を、それぞれの抗体により定量した。本来細胞質に局在し、二次リソゾームに取り込まれた(オートファゴサイトーシス)酵素蛋白群は飢餓時に非常に多く、摂食させると極端に少なくなる。即ちオートファジーは停止することが表2に示されている。ヘテロファジーである細胞外から取り込んだアシアロフェチン量は大きな変

表1 E-64投与によるリソゾーム酵素群の半減期と含有量の変化

	半減期		含有量	
	無処置	E-64投与時間	無処置	E-64投与 ng/mg protein
カテプシン B	14	50	380	920
カテプシン H	14	80	280	600
カテプシン L	24	100	105	510
			n moles/min/mg protein	
β -ガラクトシダーゼ			0.45	0.92
β -グルクロニダーゼ			1.22	3.05
β -ヘキササミダーゼ	24	100	0.86	2.58
アリアル・サルファターゼ	28	90	27.3	55.8
酸フォスファターゼ	65	100	32.0	37.8

表2 二次リソゾーム内に取込まれた酵素蛋白量の食飼条件による変動

	酵素蛋白	(μ g/units)	
		飢餓時	再摂食時
オートファゴゾーム内	チロジン・アミノトランスフェラーゼ	15.1	1.27
	乳糖脱水素酵素	13.3	0.49
	カタラーゼ	0.7	0.02
ヘテロファゴゾーム内	アミロフェチン	163	156
全リソゾーム内	カテプシン B	68.5	85.9
	カテプシン H	64.1	85.5
	カテプシン L	64.6	39.5

Hypothesis on Cystatin Function on Regulation of Lysosomal Enzyme Degradation

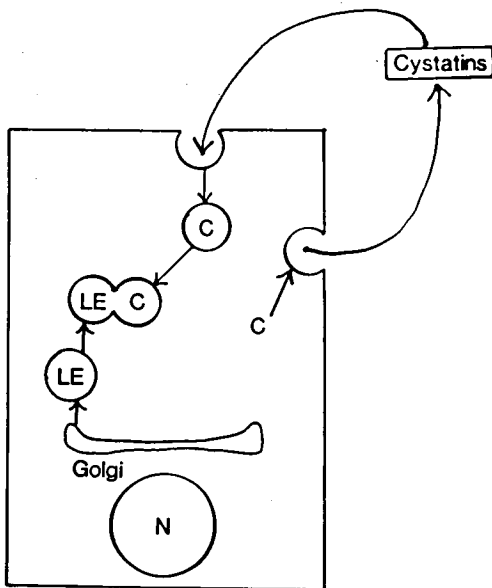


図5

化を示さない。オートファジーはインシュリン投与で亢進し、グルカゴンにより抑制される。

以上のように取り込みに変化を起こす上記条件で、分解を担当するカテプシン群はどのような応答の変化をするのであろうか。カテプシンBとHは再摂食により軽度上昇するが、Lは著明な減少を起こす。これはBが特にヘテロファジーに多くの役割を持ち、Lは特にオートファジーに多く関与するためであると、筆者は多くの傍証を含めて解釈している。食作用（外来蛋白）の強いマクロファージ等はB(H)活性が他細胞より圧倒的に強く、カゼイン等で食作用を活性化すると6倍強（194から1259ng/10⁶ cell）に誘導的增加をする事実があり、カテプシン群は誘導も起こる。また病態としては distal myopathy with rimmed vacuole（バコール形成を起こす四肢末端型筋萎縮症）や duchenne muscle dystrophy（ドセンヌ型筋ジストロフィー症）などの筋細胞内にオートファジーの亢進が起こり、カテプシン群の異常増加が起こっていることが筆者らにより証明された²⁰⁾。

文 献

- 1) Takio, K., Towatari, T., Katsunuma, N. and Titani, K.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 87: 340-346, 1980.
- 2) Takio, K., Towatari, T., Katsunuma, N., Teller, E.C. and Titani, K., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 3666-3670, 1983.
- 3) Katsunuma, N., Kominami, E.: In Curr Top Cellul Regul (ed. by Horecker, B.L., Stadtman, E.R.) Academic Press, New York 1983, Vol. 22, p. 71.
- 4) Chan, S.J., Segundo, B.S., McCormick, M.B. and Steiner, D.F.: Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 7721-7725, 1986.
- 5) Ishidoh, K., Imajoh, S., Emori, Y., Ohno, S., Kawasaki, H., Minami, Y., Kominami, E., Katsunuma, N. and Suzuki, K.: FEBS. Lett, 223: 69-73, 1987.
- 6) Ishidoh, K., Imajoh, S., Emori, Y., Ohno, S.,

- Kawasaki, H., Minami, Y., Kominami, E., Katsunuma, N. and Suzuki, K. : FEBS Lett : 1987 (in press).
- 7) Towatari, T., Tanaka, K., Yoshikawa, D. and Katsunuma, N. : FEBS Lett, 67 : 284-288, 1976.
- 8) Towatari, T., Kawabata, Y. and Katsunuma, N. : Eur. J. Biochem., 102 : 279-289, 1979.
- 9) Kirschke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansoerge, S. and Bohley, P. : Eur. J. Biochem., 74 : 293-301, 1977.
- 10) Kominami, E., Tsukahara, T., Hara, K. and Katsunuma, N. : FEBS Lett, 231 : 225-228, 1988.
- 11) Hara, K., Kominami, E. and Katsunuma, N. : FEBS Lett, 231 : 229-231, 1988.
- 12) Kominami, E., Tsukahara, T., Bando, Y. and Katsunuma, N. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 144 : 749-756, 1987.
- 13) Katsunuma, N., Kominami, E. and Okada, S. : Satellite Meeting of the 4th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (Lysosomal Diseases), at Osaka, Japan, 1987.
- 14) Katsunuma, N. and Kominami, E. : Curr Top Cellul Regnl (ed. by Shaltiel, S., Chock, P.B.) Academic Press, New York, London, 1985, Vol. 27. p.p. 345-360.
- 15) 勝沼信彦 : 実験医学, 5 (0) : 50-54, 1987.
- 16) 勝沼信彦, 木南英紀 : 蛋白質・核酸・酵素, 33 (3) : 751-753, 1988.
- 17) 勝沼信彦 : 代謝, 臨時増刊号 (代謝病ハイライト), 25 : 1988.
- 18) Ohshita, T., Kominami, E., Ii, K. and Katsunuma, N. : J. Biochem., 100 : 623, 1986.
- 19) Kominami, E., Tsukahara, T., Bando, Y. and Katsunuma, N. : J. Biochem., 98 : 87, 1985.
- 20) Katsunuma, N. and Kominami, E. : Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol (Springer-Verlag, Berlin), 108 : 1-17, 1987.
- 21) 勝沼信彦 : 眼で見るページ. 代謝24(2) : 275, 1987.

第2部 Cystatin α 遺伝子の大腸菌による発現と Lysosomal proteolysis の抑制

筋ジストロフィー症やジスタールミオパチー (リンノバコール型) 等の筋タンパク崩壊の進展過程には, オートファジーの亢進がおり, その内のカテプシン群の異常増加がみられることを明らかにした¹⁾. クロロキンによるリンノバコール形成をとまなう筋タンパク崩壊には EST が著効を奏した. また DMD 患者でも初期のものにはある程度の効果が証明されつつある. 従ってカテプシン群の特異的阻害タンパクであるシスタチンを大量に製造して, これらの筋タンパク崩壊疾患に試用することにも多くの期待が持たれる. またシスタチンは, CANP との分別阻害剤としても活用できる. 今回はシスタチン α の遺伝子を化学合成し, 大腸菌で大量生産することに成功して, 細胞培養系でこれによるリソゾーム内カテプシンの阻害ができることを明らかにしたので報告する.

実験方法

1. 遺伝子の構築

すでに決定されているシスタチン α のアミノ酸配列²⁾に基づき, 大腸菌の codon usage³⁾に従って19個のオリゴヌクレオチド断片を構築した. 5'及び3'末端にはそれぞれ EcoRI および BamHI による認識部位を付加した (図1).

2. オリゴヌクレオチドの化学合成

19個のオリゴヌクレオチドは DNA 合成機 (Microsyn 1450A) を使い, フォスホラミダイト法^{4,5)}によって合成した. 合成産物を固相より分離したのち, ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なって精製した. ゲル上のバンドを UV で検出し, 切り出したのち溶出し, さらにエタノール沈殿によって合成産物を取得した.

3. 遺伝子断片のアセンブリーと化学合成した遺伝子のクローニング

図2に示したようにアセンブリーを行なった. まず断片 1, 2, 11, 12 および 13 を混合し, りん酸化した. アニールングしたのち, 連結して二本

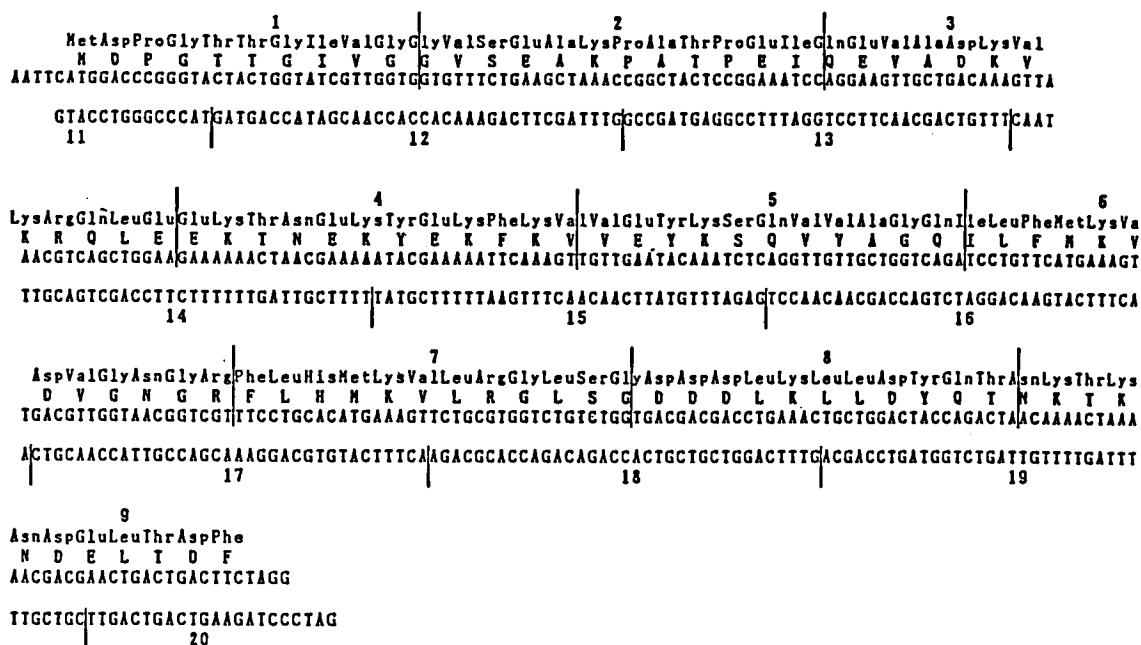


図1 Amino acid sequence and its synthetic gene of cystatin α

鎖断片Aを得た。断片Aはポリアクリルアミドゲル電気泳動およびDE-52カラムクロマトグラフィーにより、精製、単離した。他の二本鎖断片B、CおよびDも同様の方法によって取得した。次に断片AとBより断片ABを、断片CとDより断片CDを同様にしてそれぞれ取得した。最後に断片ABとCDを連結してシスタチン α の全遺伝子を得た。かくして得られた遺伝子をフェノール/クロロホルムで抽出したのち、エタノール沈殿によって単離した。

クローニングの手順も図2に示した。合成したシスタチン α の遺伝子をプラスミドpBR322のEcoRI-BamHI部位に連結したのち、大腸菌MC1061株に導入した。アンピシリン耐性の形質転換株を選択し、さらにラベルしたオリゴマー1および20(図1)をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーション法でスクリーニングを行なった。ハイブリダイゼーション陽性の8個の形質転換株のうち5個が、シスタチン α の遺伝子を保有していることが分った。クローニングした遺伝子の塩基配列は、マキサム・ギルバート法によって確認した。

4. シスタチン α 遺伝子の大腸菌での発現

図3に示すように大腸菌での発現用プラスミドを作成した。まず、クローニングしたプラスミドpTPI-010のEcoRI-BamHI断片を含むEcoRI-Hind III断片を切り出し、大腸菌のtacプロモーター支配の発現プラスミドpKK223-3⁹⁾のEcoRI-Hind III断片に連結した。次にこれを大腸菌MC1061株に導入し、3と同様の方法により形質転換株を得た。それらのうちのひとつE204株を以後の培養に用いた。

5. 大腸菌組換え株(E204)の培養

E204株をLプロス(トリプトン1%, 酵母エキス<Difco>0.5%, 塩化ナトリウム1%, アンピシリン30 μ g/ml)を培地として、37 $^{\circ}$ Cで16時間、振とう培養を行なった。培養終了後、10,000 \times g, 30分間の遠心分離により集菌し、シスタチン α の精製に供した。

6. 大腸菌組換え株菌体よりシスタチン α の精製と単離

まず菌体を凍結融解し、25mMのトリス・塩酸バッファー(pH7.5)で抽出した。次に10,000rpm, 15分間の遠心分離により遠心上清を得て、こ

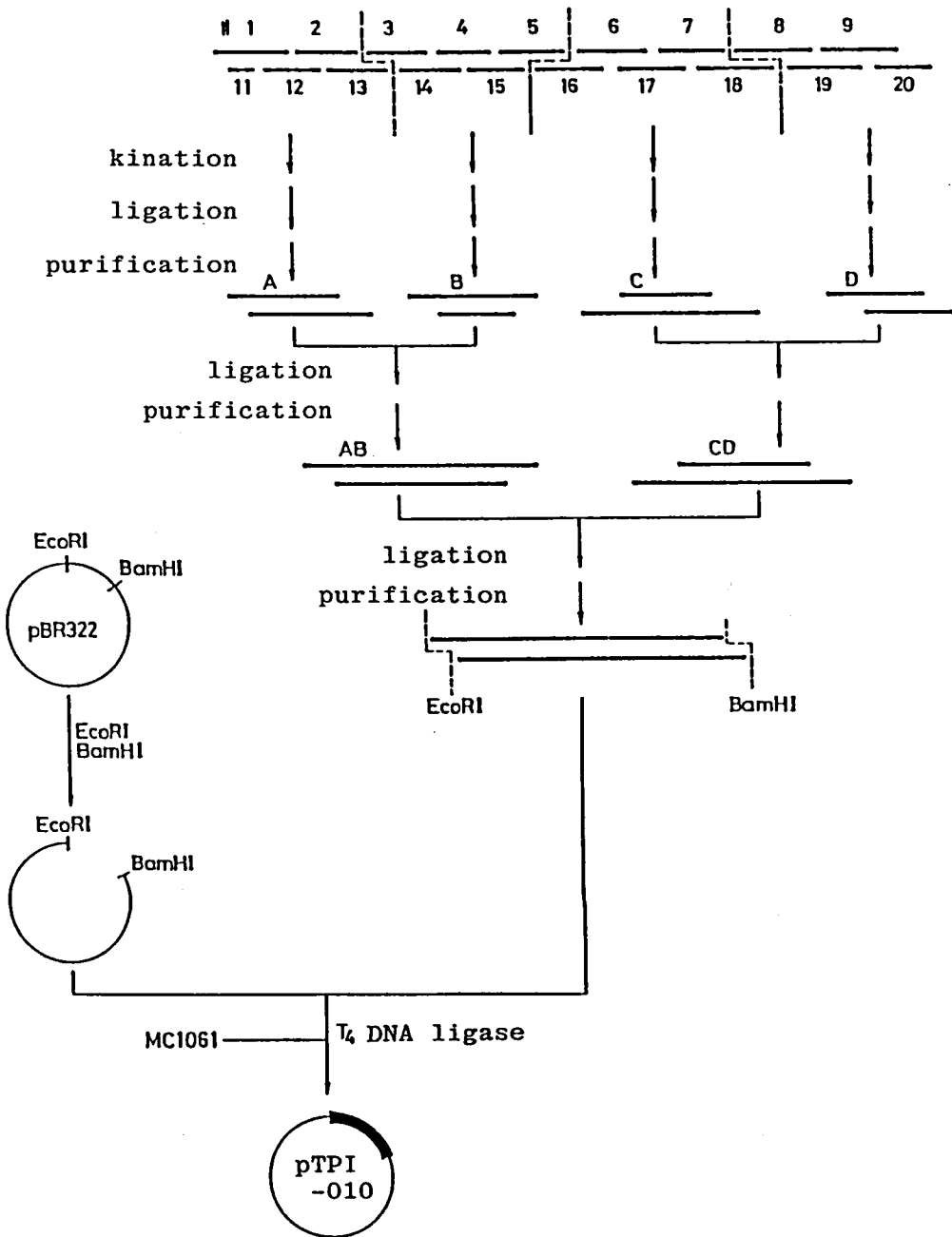


図2 Construction of a plasmid containing the synthetic gene

れを濃縮したのち、0.15M 塩化ナトリウムを含む同バッファーで平衡化したセファデックス G-50 で精製した。シスタチン α を含む画分を集めて濃縮し、10mM のトリス・塩酸バッファー (pH8.0) 中で透析したのち、同バッファーで平衡化した

DE-52にチャージした。同バッファーで十分に洗浄したのち、同バッファー中、0-0.2M の塩化ナトリウムで濃度勾配溶出を行なった。シスタチン α を含む画分を集めて濃縮し、保存した。

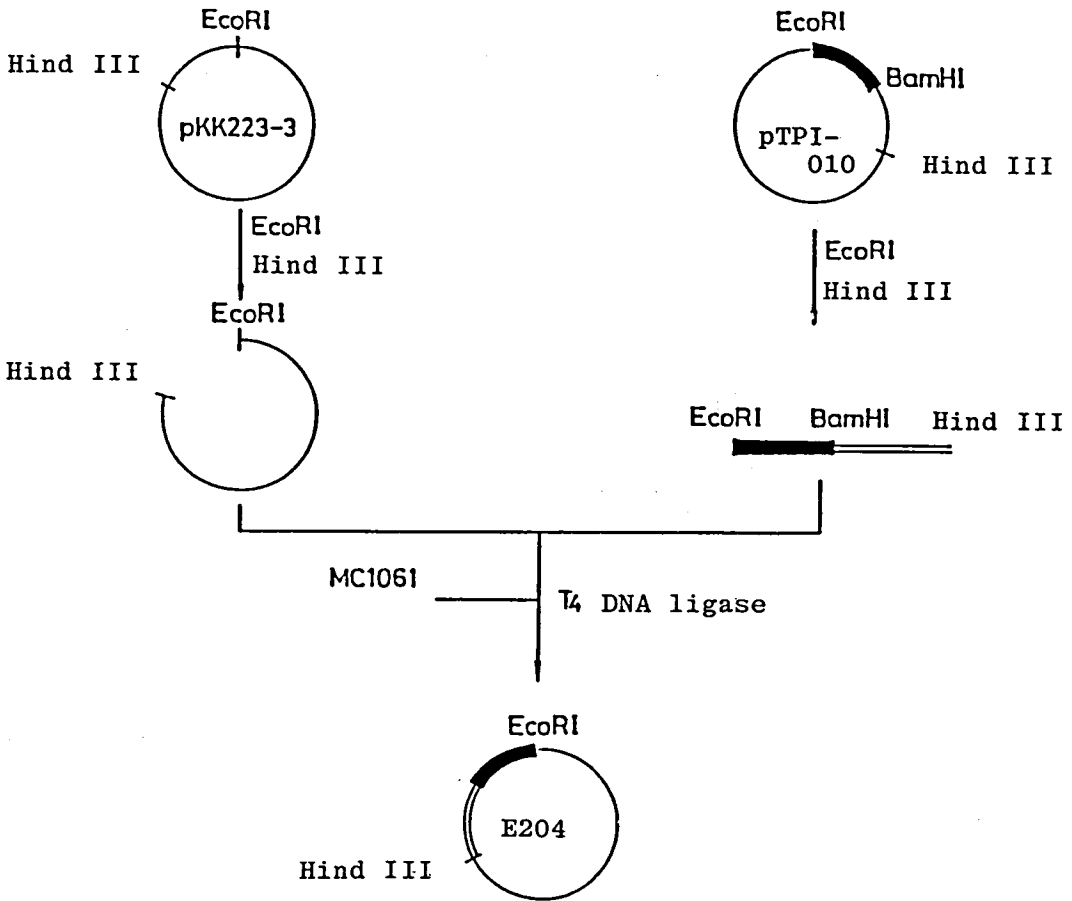


図3 Plasmid construction for the expression of cystatin gene under tac promoter control

7. NIH3T3細胞へのシスタチン α のマイクロインジェクションとリソゾーム酵素に対する効果

NIH3T3細胞を、6cmのペトリ皿中、10%牛血清を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)で37°C、5% CO₂ 雰囲気下で、コンフルエンス直前まで培養した。培地を除去し、37°Cに保温したシスタチン α の溶液(2.8mg/ml) 1mlを添加して、直ちにスクレイブ・ローディング⁷⁾を行なった。その後、15%牛血清を含む2mlのDMEMを添加し、同条件下で2日ないし3日培養した。コントロール培養としては、シスタチン溶液の代わりに同量のDMEMを添加してスクレイブを行ない、その後、2mlのDMEM(15%牛血清)とE-64-d(最終濃度20 μ g/ml)を添加したものをを用いた。培養終了後、スクレイブにより細胞をペトリ皿よりはが

し、洗浄と遠心を3回くり返して細胞を集めた。この細胞を0.5mlのPBSに懸濁し超音波で破碎したのち、リソゾーム酵素の活性を測定した。

結果と考察

1. 組換え型シスタチン α の精製とその性質

シスタチン α は、凍結融解とその後のバッファ一抽出という簡単な処理によって菌体より可溶化できた。また、その後の精製においてもG-50のみで、かなり純度の高い標品を得ることができた。これは、大腸菌のつくる蛋白質で分子量が10,000前後のものが比較的少ないことに起因すると考えられる。最終的に、DE-52カラムクロマトグラフィーにより、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドを示す標品を得ることができた。この精製工程により、1gのwet cellより約2mg

のシスタチン α を得た (H818株)。この精製標品を、1%メルカプトエタノール存在下、6NHCl で 110°C, 24時間加水分解した後の、アミノ酸分析の結果を表 1 に示した。すでに報告されている天然型シスタチン α の分析値²⁾ と良く一致した。さらに、パパインの BANA 水解活性に対して天然型と同程度の阻害活性を示した(データ省略)。以上の結果、組換え型シスタチンは天然型と同じ性質を持つことが分った。

2. シスタチンによるリソゾーム酵素の分解抑制効果の予備検討

シスタチン α の新薬としての可能性を探るため、マウス NIH3T3 培養細胞を用いてリソゾーム酵素の分解抑制効果を調べた。表 2 に、スクレイ

表 1 Amino acid composition of cystatin α

Residues	Recombinant	Native*
Asp/Asn	12.5	11.3(13)
Thr	7.3	6.7(7)
Ser	3.3	3.9(3)
Glu/Gln	14.4	13.8(14)
Pro	3.2	4.1(3)
Gly	9.6	9.4(9)
Ala	4.5	5.0(4)
Val	9.5	8.7(11)
Met	3.0	2.7(3)
Ile	2.6	2.9(3)
Leu	9.6	8.8(9)
Tyr	3.7	2.9(3)
Phe	4.4	4.0(4)
His	1.2	1.3(1)
Lys	12.6	11.6(13)
Arg	3.8	3.3(3)

* : Takio, K. et. al.,
B. B. R. C., 121(1), 149-154, 1984

表 2 Lysosomal enzyme activities of 2 days' culture

	β -Hex	β -Glc	Cath.L
Control	139	200	130
Cystatin α	182	280	216
Egg White Cystatin	256	322	194
E-64-d (20 μ g/ml)	240	289	75

Enzyme activities were expressed as units/mg protein.

プ・ローディングによりシスタチンを細胞内に導入し、その後 2 日間培養したときの細胞破碎液中のリソゾーム酵素活性を示した。リソゾーム内の 2 つの糖水解酵素である β -ヘキソサミニダーゼ (β -Hex) および β -グルキュロニダーゼ (β -Glc) は、E-64-d によっていずれも分解が抑制された。これは培養マクロファージ系での結果と一致した⁸⁾。卵白シスタチンは、 β -Hex については E-64-d と同程度の、 β -Glc についてはより強い分解抑制効果を示した。また、シスタチン α は、 β -Hex については若干弱いものの、 β -Glc については E-64-d と同程度の分解抑制効果を示した。これらの結果は、シスタチンが細胞内で E-64-d と同様な作用をすることを示唆している。一方、カテプシン L はマクロファージ系で E-64-C により、そのレベルが約 5 倍に上昇することが判明している⁸⁾。本実験系でもそのレベルが上昇する可能性は大きい。しかし、今回の予備実験では酵素免疫法を用いたカテプシン L のレベルの定量は行なわず、細胞破碎液中の活性を測定するにとどめた。

今後、同位元素または蛍光性化合物で標識したシスタチンを用いて細胞内に取り込まれた分子数を把握し、かつ細胞内での移行や局在を明らかにしたいと考えている。さらに、シスタチンのより効率的な導入法として、シスタチンをマンノース-6-リン酸などのマーカーを結合させたりポソームに封入し、これを細胞と接触させる方法を検討する予定である。

文 献

- 1) 勝沼信彦: 眼で見るページ。代謝, 24(2): 275, 1987.
- 2) Takio, K., Kominami, E., Bando, Y., Katsunuma, N. and Titani, K.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 121: 149, 1984.
- 3) Grantham, R., Gantier, C. and Gouy, M.: Nucl. Acids. Res., 9: 43, 1981.
- 4) Froehler, B.C. and Matteucci, M.D.: Tetrahedron Lett., 27: 469, 1986.
- 5) Froehler, B.C. and Matteucci, M.D.: Nucl. Acids. Res., 14: 5399, 1986.

6) de Boer, H.A., Comstock, L.J. and Vasser, M.: Proc. Natl. Acad. Sci., 80: 21, 1983.
7) McNeil, P.L., Murphy, R.F., Lanni, F. and Taylor, D.L.: J. Cell. Biol., 98: 1556, 1984.

8) Kominami, E., Tsukahara, T., Bando, Y. and Katsunuma, N.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 144: 749, 1987.

C-蛋白質を指標とした筋ジストロフィー症の解析

丸山 工 作 *

研究協力者 大日方 昂* 佐野 一 裕* 小 島 崇*

C-蛋白質はミオシンに結合して横紋筋の収縮構造を支持する調節蛋白質として知られる。免疫学的特徴から数種のアイソフォームの存在が知られた^{1),2)}。そして、鶏骨格筋(特に胸筋)ではそれらの発現は筋の成長段階に依存的であり、かつ筋ジストロフィー症の発症や筋の除神経に際しても著しく変化することが既に示されてきた^{2)~5)}。このようにC-蛋白質は筋の成長段階や病変をみる良い指標と言える。そして、この変化を免疫組織化学的に可視化するためのプローブ(モノクローン抗体)を作成した^{1),2)}。筋ジストロフィー症での筋蛋白質の変化の特徴は、発症に伴ない発現される蛋白質のタイプが幼若筋のものに類似することである^{5)~9)}。例えば、成熟した鶏胸筋では速筋型C蛋白質のみが発現されているが、ジストロフィー筋では、これに加えて、ヒヨコ筋に類似して遅筋型C蛋白質の発現が誘起される⁵⁾。これらのことからすると、筋ジストロフィー症での変化は筋の崩壊、再生過程で引き起こされる筋の幼若化であるとも言える。しかし、ジストロフィー筋で発現される蛋白質が幼若筋のものと同様であるかどうかは、かならずしも明確ではない。我々は今迄、C-蛋白質の変化を、各アイソフォームを特異的に認識するモノクローン抗体を用いて明らかにしてきた^{2)~5)}。しかし、より詳細な解析のためには二次元電気泳動による蛋白質の解析が必要である。そこで、本研究ではC-蛋白質を二次元電気泳動で解析する系を確立し、それにより鶏ジストロフィー筋のC-蛋白質を幼若筋のものと比較検討し、筋ジストロフィー症に特異的な変化を把握することを目

的とした。

実験方法

C-蛋白質の解析のために、白色レグホンの種々の横紋筋組織、または正常(NH412)および筋ジストロフィー鶏(NH413)の種々の成長段階の胸筋白色部を用いた。電気泳動用試料は、新鮮なこれら組織から蛋白質の分解をさけるため、8M グアニジン HCl で全蛋白質を抽出しそれを5M 尿素-1M チオ尿素液に透析して作成した¹⁰⁾。等電点電気泳動は平林の方法(1981)¹⁰⁾に従い、支持体はアガロースを用い、pH 領域の異なる酸性、中性、塩基性のゲル3層を重ねて行った(詳しくは文献10を参照)。その後、二次元目をSDS-10%アクリルアミドゲル上に展開し、ニトロセルロース膜に転写した後、C-蛋白質のスポットは3種の抗C-蛋白質モノクローン抗体(McAb)(C-315, ALD66, MF-1:それぞれ心筋、遅筋、速筋C-蛋白質を認識する^{1),2)})を用いてイムノプロット法により同定した。即ち、ニトロセルロース膜は3%ゼラチン-TBS液(0.6M NaClを含むトリス緩衝液)でブロッキング後、McAbを反応させ、次にペルオキシダーゼ標識の抗マウスIgG抗体を反応させ、ニッケル、コバルトの存在下でのDAB反応により抗C-蛋白質McAbの結合したスポットを同定した¹¹⁾。

結 果

(1) 成鶏横紋筋のC-蛋白質アイソフォームの二次元電気泳動による解析

従来、C-蛋白質の二次元電気泳動は困難とされていたので、まずC-蛋白質に適した電気泳動条件

* 千葉大学理学部生物学科

を確立した。心筋、遅筋(前広背筋：ALD筋と略す)、速筋(後広背筋：PLD筋と略す、および胸筋)からの抽出蛋白質を二次元電気泳動に展開し、ニトロセルロース膜に転写した後、心筋型、遅筋型、速筋型 C-蛋白質アイソフォームをそれぞれ特異的に認識するモノクローン抗体、C-315、ALD-

66、MF-1 を作用させて C-蛋白質のスポットを同定することができた。

図 1 に鶏胸筋の蛋白質の典型的な電気泳動パターンを示す。抗体 (MF-1) によって同定された速筋 C-蛋白質を矢印でマークした。この手法により、心筋型として 1 個のスポット (CC)、速筋型と

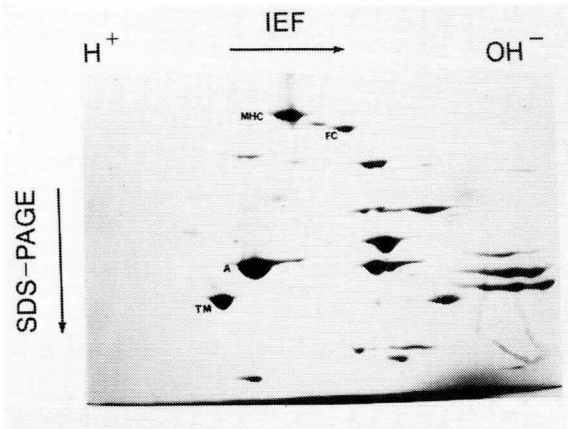


図 1 二次元電気泳動による C-蛋白質の解析
親鶏胸筋の二次元電気泳動パターンと抗体 (MF-1) により同定された C-蛋白質のスポット。
MHC：ミオシン重鎖、FC：C-蛋白質、
A：アクチン、TM：トロポミオシン、
TNT：トロポニン T

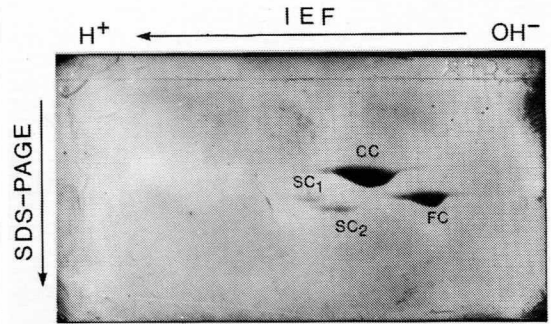


図 3 各 C-蛋白質の分子量、pI の比較
心筋、ALD筋、PLD筋の抽出蛋白質を混合し、それを二次元に展開し、心筋型 (CC)、速筋型 (FC)、遅筋型 (SC1、SC2) アイソフォームを 3 種の McAb で検出し、それらの相互の位置関係を比較した。

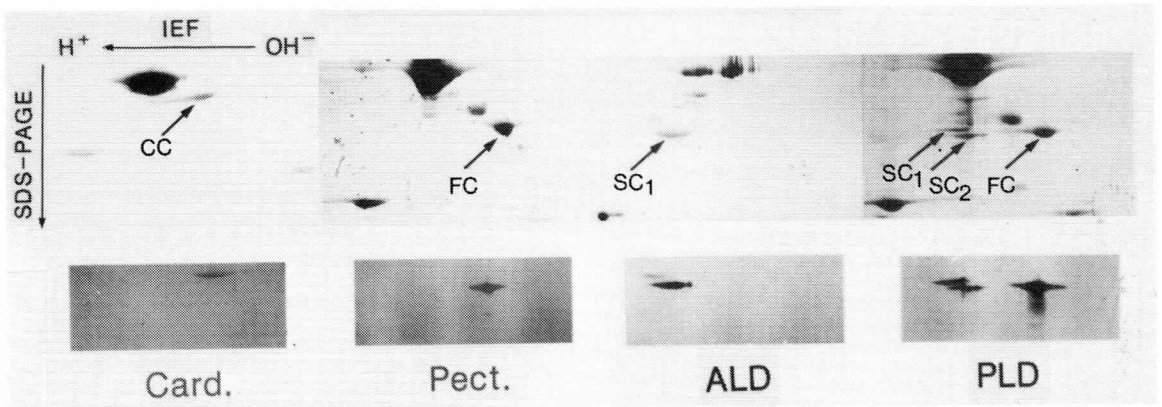


図 2 筋の種類による C-蛋白質の違い
鶏心筋 (Card)、胸筋 (Pect)、前広背筋 (ALD)、後広背筋 (PLD) からの抽出蛋白質を二次元に展開し、C-蛋白質アイソフォーム：心筋型 (CC)、速筋型 (FC)、遅筋型 (SC1、SC2) を 3 種の McAb により識別した。矢印が C-蛋白質を示す。上段に蛋白質の染色パターン、下段にイムノプロットの結果を示す。

して1個のスポット(FC), 遅筋型として2個のスポット(SC 1, SC 2)が見出された(図2). C-蛋白質がスポットを作る pH 領域はミオシンの pI に近く, おおよそ中性付近であった. 各C-蛋白質アイソフォームは等電点と分子量により区別された. 即ち, 塩基性側から酸性側へ FC, CC, SC 2, SC 1 の順であり, 分子量の大きさから言うと CC, SC 1, FC, SC 2 の順であった(図3). 成鶏では心筋に CC, ALD 筋に SC 1, 胸筋に FC のみであるのに対して, 興味あることに, PLD 筋(速筋)には FC に加えて更に SC 1, SC 2 が見出された(図2).

各C-蛋白質アイソフォーム相互の関係を知るために, アルファキモトリプシンにより限定分解しペプチドマップ法(Cleaveland法)により比較したところ, SC 1 と SC 2 の間では2個ほどのフラグメントが異なるのみで, 他はよく一致を示した. それに対して CC と FC は SC 1, SC 2 とは大きく異なっていた. このことは SC 1 と SC 2 は同一遺伝子由来で選択的スプライシングなどにより生じた産物である可能性を示唆する.

(2) 筋成長に伴うC-蛋白質アイソフォームの発現変化

既に, 免疫組織化学的手法により, 胸筋の発生,

成長過程でC-蛋白質のタイプが大きく変化していくことが知られている. 特に, ふ化直後には速筋型および遅筋型C-蛋白質が発現され, 成長につれ遅筋型が消失する. そこで, このような過程で発現されるC-蛋白質の内容を2次元電気泳動により調べた. その結果, ヒヨコ胸筋にはFCとSC 1が存在し, 成長に伴い後者が消失してFCのみになっていくことがわかった(図4). 一方, PLD筋の場合には, ふ化直後は胸筋と同様FCとSC 1が存在するが, ふ化後の成長過程で新たにSC 2が発現され, 3種のC-蛋白質が共存するようになることがわかった(図5).

(3) ジストロフィー筋のC-蛋白質

種々の成長段階の筋ジストロフィー鶏(NH413)の胸筋, PLD筋, ALD筋のC-蛋白質を同様の方法で解析した. 胸筋では, ふ化直後に存在したSC 1は1ヶ月齢頃までに一旦消失するが, 筋ジストロフィー症の発症する2ヶ月齢にはSC 1さらにSC 2も出現してくるのが認められた(図4). これらがSC 1, SC 2であることはMcAbの反応性, ALD筋, PLD筋内のC-蛋白質(SC 1, SC 2)と二次元ゲル上での一致から確認された. 従来の免疫組織化学的研究はジストロフィー胸筋への遅筋型C-蛋白質の出現を見たに

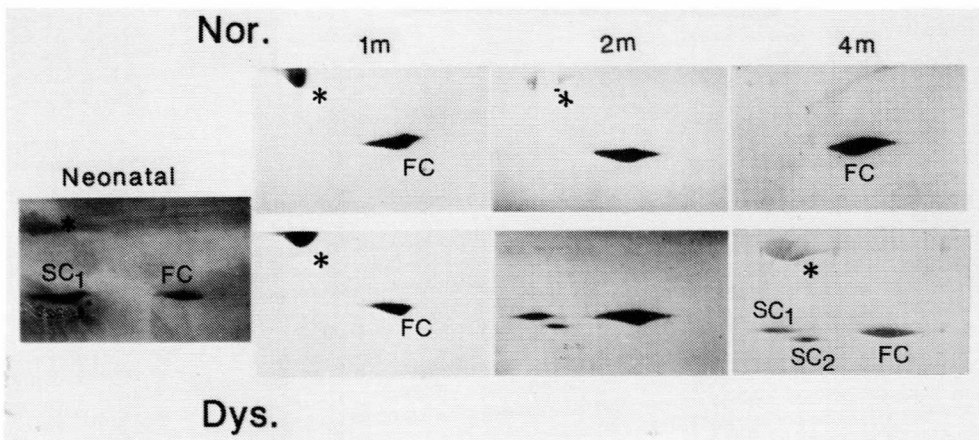


図4 鶏筋ジストロフィー症の発症に伴うC-蛋白質の変化
1ヶ月(1m), 2ヶ月(2m), 4ヶ月(4m) 齢の正常(上段)とジストロフィー鶏(下段) 胸筋のC-蛋白質. 左端はヒヨコ胸筋(この時期にはジストロフィーおよび正常筋で差はない). *はモノクローン抗体(MF-20)で検出したミオシンH鎖を示す.

とどまったが、今回の二次元電気泳動による解析は遅筋型C-蛋白質の中味を明確にした。その結果、ジストロフィー胸筋は、C-蛋白質の発現に関してはヒヨコ胸筋とは異なり、むしろPLD筋と類似することが結論される。除神経胸筋でもSC 1, SC 2の発現が引き起こされPLD筋型パターンとなった。鶏ジストロフィー筋は除神経筋と相通ずるところがある。PLD筋とALD筋でのC-蛋白質発現については正常(NH412)、筋ジス鶏(NH413)の間でほとんど差異は認められなかった(図5)。以上をまとめると、筋ジストロフィー症にともなうC-蛋白質の変化は、1)胸筋では顕著に起こるがPLD筋やALD筋ではほとんど起こらず、また、2)胸筋での変化は幼若筋型への移行ではなく、PLD型への移行を示すのである。

考 察

本研究では、筋ジストロフィー症の指標としてC-蛋白質の変化をとりあげた。その結果、鶏での筋ジストロフィー症の発症時のC-蛋白質の変化の実体が明確となった。従来、鶏ジストロフィー筋は筋蛋白質のタイプからみて、幼若化した筋の性質をもつことが、指摘されてきた^{5)~9)}。しかし、本研究で得られたC-蛋白質についての結果は、鶏筋ジストロフィー症の発症が単純に筋の幼若化をもたらすのではないことを示す。即ち、ジストロフィー鶏胸筋は、C-蛋白質についてヒヨコ胸筋と同様の面(SC 1の発現)をもちつつ、一方、正常胸筋では現れることのないPLD筋型のC-蛋白質(SC 2)の発現をも示した。ジストロフィー筋では遺伝子発現の制御系に変化が生じていると思

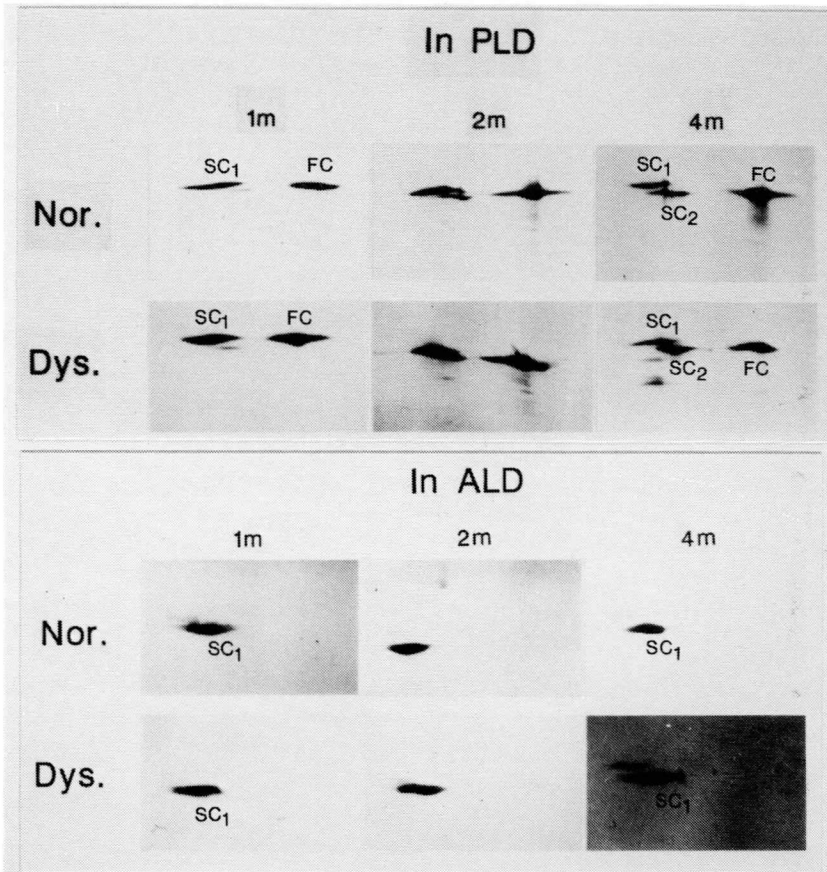


図5 正常および筋ジストロフィー鶏のPLD筋、ALD筋C-蛋白質の比較
 ぶ化後の成長過程で、PLD筋ではSC 2の発現が起こっていくが、ALD筋では変化がみられない。いずれの筋でも、正常鶏(上段)および筋ジストロフィー鶏(下段)の間で大きな違いは見られない。

われる。データは示さなかったが、除神経筋は C-蛋白質の発現に関してジストロフィー筋と極めて類似していた。従って、鶏の場合には除神経筋はジストロフィー筋のモデルとしての面を含んでいる。鶏ジストロフィー筋と幼若筋とが同一でないことは、TNT の場合についても既に報告した¹²⁾。

今後の問題として、ほ乳類の筋ジストロフィー症の発症、進行過程で C-蛋白質に変化が生ずるか否か、特に MDX と関連して重要である。しかし、現在のところ一連のモノクローン抗体が、ほ乳類 C-蛋白質にはほとんど反応性を示さないのて解析がうまくいっていない。あらたな抗体を作成するなどの準備が必要とされる。

前年度、筋ジストロフィー症を探る指標蛋白質として TNT をとりあげ、ほ乳類 (マウス) 筋ジストロフィー症でも TNT アイソフォームの変化が起こることを予報として述べた。今年度この点をさらに確認するために、2つの筋ジストロフィー症マウス (dy, mdx) について、成長過程、発症過程をおって詳しく検討した。その結果、生後の成長過程で TNT の変化は起こるものの、正常と筋ジストロフィー症マウスの間で TNT の発現にはほとんど差がないという結論に到達した。筋ジストロフィー症動物では筋の萎縮が著しい故、特に筋の採取部位に注意を払うことが必要である。

文 献

- 1) Reinach, F.C., Masaki, T., Shafiq, S., Obinata, T. and Fischman, D.A.: *J. Cell Biol.*, 95: 78-84, 1982.
- 2) Kawashima, M., Kitani, S., Tanaka, T. and Obinata, T.: *J. Biochem.*, 9: 1037-1047, 1986.
- 3) Obinata, T., Reinach, F.C., Bader, D., Masaki, T., Kitani, S. and Fischman, D.A.: *Dev. Biol.*, 101, 116-124, 1984.
- 4) Obinata, T.: *Zool. Sci.*, 2: 833-847, 1986.
- 5) Obinata, T. and Shinbo, K.: *Muscle and Nerve*, 10: 351-358, 1987.
- 6) Takeda, S. and Nonomura, Y.: *Biomed. Res.*, 1: 931-935, 1980.
- 7) Obinata, T., Takano-Ohmuro, H. and Matsuda, R.: *FEBS Lett.*, 120: 195-198, 1980.
- 8) Huszar, G., Vigue, L. and Haines, J.: *J. Biol. Chem.*, 260: 9957-9960, 1985.
- 9) Bandman, E.: *Science*, 27: 780-782, 1985.
- 10) Hirabayashi, T.: *Anal. Biochem.*, 117: 443-451, 1981.
- 11) Ogasawara, Y., Komiya, T. and Obinata, T.: *J. Biochem.*, 102: 25-30, 1987.
- 12) 丸山工作: 厚生省「低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究」(江橋班), 61年度研究報告書, 1987, p.p. 57-62.

CANP 阻害剤の設計および合成に関する研究

向山 光 昭*

はじめに

筋ジストロフィー症にみられる筋崩壊は、細胞中に存在し、カルシウムイオンによって活性化される中性プロテアーゼ (CANP) によって引き起こされるとされ、その特異的阻害剤は、筋ジストロフィー症の治療薬として期待される。

本研究は、チオールプロテアーゼの特異的インヒビターである E-64 をリード化合物として、CANP に特異的なインヒビターの開発を、合成化学を基盤に検討したものである。

E-64 の活性発現に必要な構造のうち、エポキシド部分はチオールとの反応部位、L-ロイシンアミド部分を認識部位と捉えることができる。このアミノ酸部分を変換することにより、特定のプロテアーゼに対する選択性を高めることができると期待できるので、以下の検討を試みた。

結果および考察

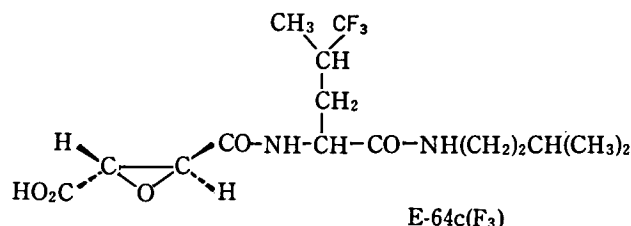
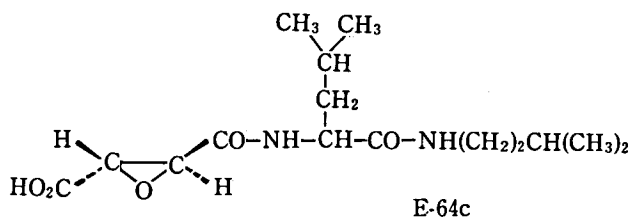
1. フルオロアミノ酸を含む類縁体の活性

フッ素原子は、立体的には水素原子に次いで小さいことに加え、電気陰性度は全原子中最大である。従って、ある分子中の水素原子をフッ素原子に置換することにより、分子の立体的な変化を伴わずに分子内の静電的分布を大きく変化させることができる。この手法は、プロテアーゼ間の選択性を見極め、より高い選択性をもったインヒビターを開発する有力な手段となり得る。そのような目的で、昨年度に E-64 c 中のロイシンを 5,5,5-トリフルオロロイシンに置換した誘導体 (E-64 c (F₃) と表す) を合成した。その 4 つの異性体の

インヒビター活性を測定した結果を表 1 に示した。2 S, 4 S-体は E-64 c と同等の活性を示した。また、2 S, 4 R-体および 2 R, 4 S-体は、パパインに対する効力は変わらないが、CANP に対する効力は低下した。この結果は、CANP に特異的に作用するインヒビターを検索する本研究目的には反したが、フルオロアミノ酸の導入が、酵素に対する選択性を高める手段として有効であるという特質を明らかにすることができた。

表 1 Inhibitory activity of fluorinated E-64c derivatives against CANP and papain

Entry	Compound	Inhibitory Activity ID ₅₀ (10 ⁻⁶ M)	
		CANP	Papain
1	2S,4S-E-64c(F ₃)	6	10
2	2S,4R-E-64c(F ₃)	50	7
3	2R,4S-E-64c(F ₃)	100	9
4	2R,4R-E-64c(F ₃)	100	60
5	E-64c	2	7



* 東京理科大学理学部

2. 内在性 CANP インヒビターのアミノ酸配列の
繰り返し部分の配列をもつペプチドフラグメン
トのエポキシコハク酸誘導体の合成

榎森らにより cDNA の解析から明らかにされた
内在性の CANP インヒビターのアミノ酸配列
には 4 回の繰り返し構造がある。この繰り返し部
分が阻害活性に直接関わっていると思われるが、
その阻害の機構は明らかでない。本研究において
は、これらの繰り返し部分は活性中心を物理的に
ふさぐだけであるとの仮定に立ち、反応部位とし
てエポキシコハク酸を導入したペプチドの合成を
行った。

合成はすべて液相法で行った。第三ブチルオキ
シカルボニル (Boc) -アミノ酸を、塩化ジメチル
ホスフィノチオイルを用いる混合酸無水物 (Mpt-
MA) 法で逐次延長して得た保護ペプチドの N 端
保護基を除去したのち、エポキシコハク酸エチル
エステル (EtO-ES-) 部分を p-ニトロフェニル活
性エステル法により導入した。最後にすべての保
護基を還元により除去して目的物を得た。代表的
な例として、ヘキサペプチド誘導体の合成例を図

1 に示した。

現在までに、N 端側にエポキシコハク酸エチル
エステルを結合させた、ジ (EtO-ES- Arg-Glu-
OH)、トリ (EtO-ES-Tyr-Arg-Glu-OH)、テトラ
 (EtO-ES-Lys-Tyr-Arg-Glu-OH)、ヘキサ (EtO-
ES-Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-Glu-OH)、およびオ
クタ (EtO-ES-Thr-Ile-Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-
Glu-OH) ペプチドを合成することができた。それ
らの一部について活性を測定した結果を表 2 に示
した。

今回 CANP の対照として用いたカテプシンに
対して、ジ、トリ、テトラペプチド誘導体は、い
ずれも阻害活性を示さなかった。これに対して
CANP に対する作用は、ペプチドの構造により大
きく異なり、トリペプチド誘導体が特に高い選択
性をもって CANP を阻害することがわかった。
この結果は、C 端の、繰り返し部分に含まれない、
グルタミン酸を他のアミノ酸に変換することによ
り、より高活性なインヒビターが得られる可能性
を示しており、今後詳細に検討するに値する課題
である。

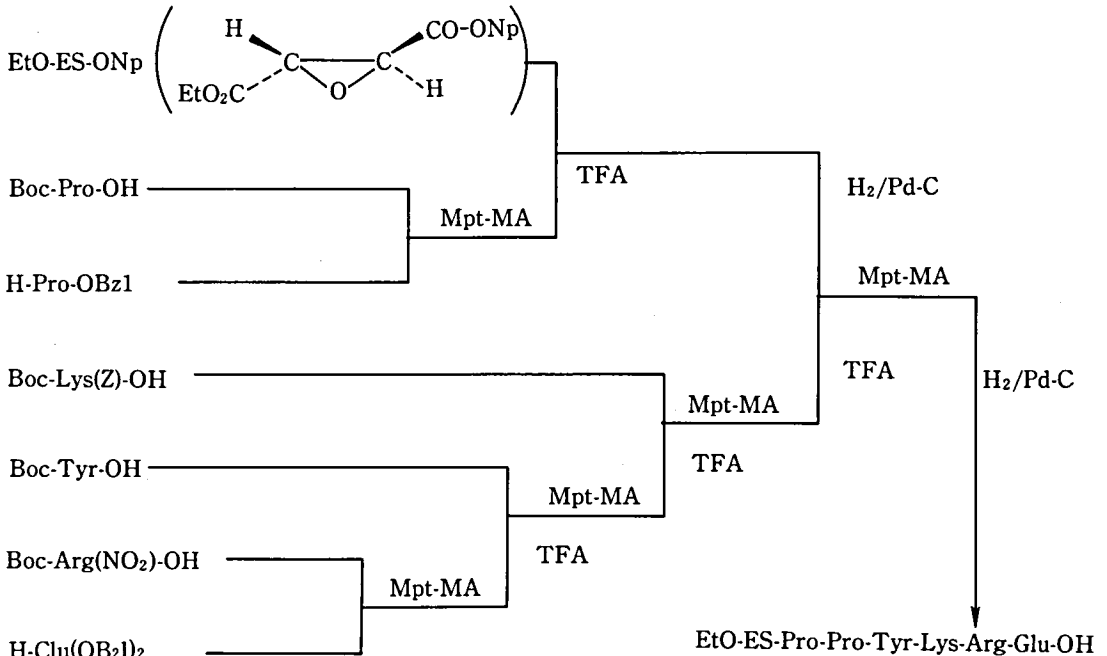


図1 Synthetic scheme of epoxysuccinoyl-hexapeptide

表2 Inhibitory activity of epoxysuccinic acid derivatives against CANP and cathepsins

Entry	Compound	Inhibitory Activity ID ₅₀ (10 ⁻⁶ M)			
		CANP	B	Cathepsin	
				H	L
1	EtO-ES-Arg-Glu	>125	5000	>400	>1000
2	EtO-ES-Tyr-Arg-Glu	25	2000	>400	200
3	EtO-ES-Lys-Tyr-Arg-Glu	>125	1000	>400	1200

3. エポキシコハク酸部分のフッ素による修飾

E-64の活性発現に必須なエポキシコハク酸部分の他のグループへの変換も、構造と活性の関係を調べる上で重要な課題である。さきに、ロイシンをフルオロロイシンに置き換え、興味ある結果を得たことから、エポキシコハク酸部分について

もフッ素による修飾を検討した。現在までに、合成中間体であるジフルオロフマル酸およびマレイン酸を合成することができたので、それらのエポキシ化および、E-64cとの活性比較のためロイシンのイソアミルアミドにそれらを結合させる反応を検討中である。

CANP 阻害剤の合成

大 関 正 弘*

研究協力者 花 田 和 紀* 横 尾 千 尋* 村 田 充 男*
鈴 木 紘 一** 勝 沼 信 彦***

はじめに

筋ジストロフィー症における筋崩壊には、カルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) の関与が大きいと考えられている。そこで、本症における筋崩壊の機作を明らかにし、CANP の役割を解明するためには、CANP に対する特異的阻害剤の開発が望まれている。

我々は既に、CANP, カテプシン B, L, H などのシステインプロテアーゼを選択的に阻害する E-64c, さらにそのプロドラッグである EST を開発し¹⁾、現在筋ジストロフィー症を対象として臨床治験中である。

しかしながら、E-64c は CANP と同時にカテプシンをも強く阻害することから、上記の目的に適したものとは言えない。このようなことから、現在我々は E-64 誘導体において、CANP 阻害活性とカテプシン阻害活性を分離し、筋ジストロフィー症に対してより選択性の高い薬剤の開発を目的に、新たな E-64 誘導体の合成研究を進めてい

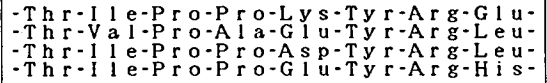


図 1 内在性 CANP インヒビター活性中心の一次構造²⁾

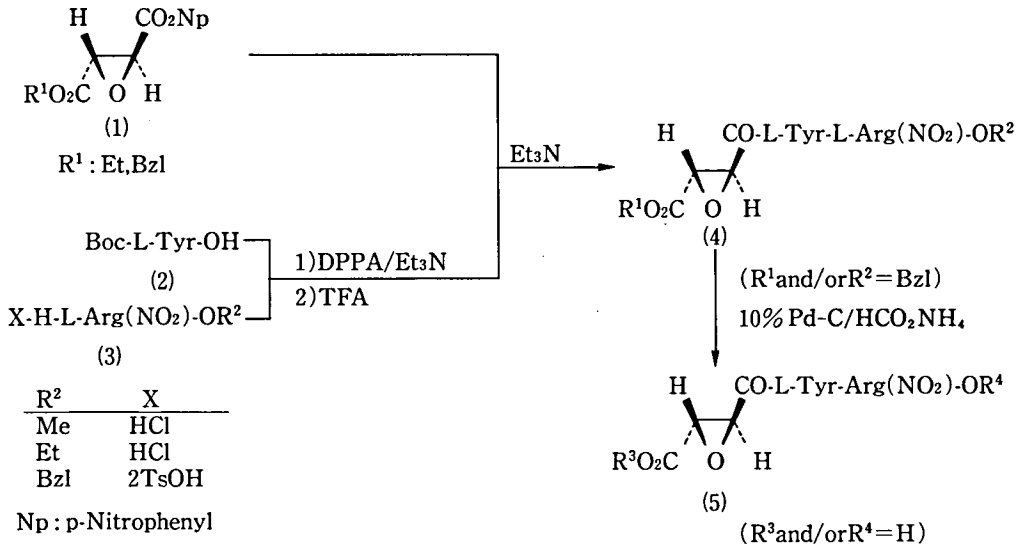


図 2 E-64 誘導体の合成法

* 大正製薬総合研究所
** 東京都臨床医学総合研究所
*** 徳島大学薬学科学研究センター

る。

昨年度は、エポキシコハク酸に種々のアミノ酸誘導体を縮合した化合物についてスクリーニングしたが、本年度は、鈴木班員の研究により明らかとされた、内在性 CANP インヒビターの活性中心の一次構造 (図 1)²⁾ に着目し、この部分構造にエポキシコハク酸を活性基として導入することを向山班員と分担し試みた。まず我々は Tyr-Arg 誘導体にエポキシコハク酸を導入した化合物を合成し、CANP, カテプシン B, L, H に対する阻害特異性を検討した。

方 法

1. E-64誘導体の合成

図 2 に示す方法に従い、Boc-L-チロシン(2)と N^ε-ニトロ-L-アルギニン誘導体(3)をジフェニルリン酸アジド(DPPA)を用いて縮合後、トリフルオロ酢酸で脱 Boc 化した。得られたトリフルオロ酢酸塩と L-トランスエポキシコハク酸 α -ニトロフェニルエステル誘導体(1)を、トリエチルアミン存在下反応させ 4 (CA-001~006) を得た。更に、ベンジルエステル基を有するものは、CTH (Catalytic Transfer Hydrogenation) 法により還元的にこれを除去し 5 (CA-007~010) とした。

2. CANP 阻害活性の測定

種々の濃度の検体溶液に、下記の Assay mix-

ture 300 μ l を加え、更に 5 μ l の CANP 溶液 (ニワトリ CANP, ca 200u/mg, A₂₈₀=0.220) を加えて 30°C で反応させた。20 分後に 15% トリクロロ酢酸 300 μ l を加えて反応を止め、15 分放置後 18,000 rpm で 10 分遠心し、上清の A₂₈₀ を測定した。ブランクとしては、全く同様に処理し CANP の代わりに CANP を調製した時の透析外液を加えたものを使い、この A₂₈₀ 値を差し引いた。

Assay mixture

Casein 30mg/ml	
in 1M Tris-HCl, pH7.5	40 μ l
H ₂ O	460 μ l
1M CaCl ₂ aq. soln.	3 μ l
2-Mercaptoethanol	1.5 μ l

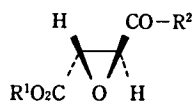
3. カテプシン B, L, H 阻害活性の測定

カテプシン B と L については、Z-Phe-Arg-MCA を基質として、またカテプシン H については、Arg-MCA を基質として、Barrett らの方法³⁾ に従い測定した。

結果および考察

表 1 に、今回合成した化合物 (CA-001~010) と比較のために向山班員の合成した化合物 (CA-011~013) の構造式を示した。また表 2 には、それらの CANP 及びカテプシン B, L, H に対する阻害活性を示した。

表 1 Structure of Epoxysuccinic acid de-rivatives



Compound No.	R ¹	R ²
CA-001	Et	-Tyr-Arg(NO ₂)-OMe
CA-002	Et	" -OEt
CA-003	Et	" -OBzl
CA-004	Bzl	" -OMe
CA-005	Bzl	" -OEt
CA-006	Bzl	" -OBzl
CA-007	H	" -OMe
CA-008	H	" -OEt
CA-009	H	" -OH
CA-010	Et	" -OH
CA-011	Et	-Arg-Glu-OH·2H ₂ O
CA-012	Et	-Tyr-Arg-Glu-OH·2H ₂ O
CA-013	Et	-Lys-Tyr-Arg-Glu-OH·2AcOH·3H ₂ O

表2 Inhibitory activity of Epoxysuccinic acid derivatives against Cathepsins and CANP

Compound	Inhibitory Activity IC ₅₀ (10 ⁻⁶ M)			
	B	Chathepsin L	H	CANP
CA-001	40.	9.0	>400	>20
CA-002	25.	2.2	>400	>20
CA-003	5.4	7.0	>400	>20
CA-004	5.2	0.77	>400	>20
CA-005	9.0	0.92	>400	>20
CA-006	1.6	0.95	>400	7
CA-007	0.17	0.018	>400	3-4
CA-008	0.15	0.016	>400	3-4
CA-009	2.4	0.44	>400	8-9
CA-010	2.3	14.4	>400	>20
CA-011	5000	>1000	>400	>125
CA-012	2000	200	>400	25
CA-013	1000	1200	>400	>125

いずれの化合物もカテプシンHに対しては、阻害活性を示さなかった。

CANP に対しては、Tyr-Arg を導入した誘導体 CA-001~010のうち、CA-001~005およびCA-010は阻害活性を示さなかったが、CA-006~009はE-64cと同程度の阻害活性を示した。これらの結果から、一般的にはエポキシコハク酸部分のカルボン酸はフリーの方が良く、ペプチド部分C端のカルボン酸は、エステル化されていた方が良いと思われる。

ただしCA-006のように、エポキシコハク酸部分、ペプチド部分C端のカルボン酸がともにエステル化されたジエステル体のなかに、CANP に対して阻害活性を示すものがあり、更に、構造と活性の関係について精査してゆく必要があると考えている。

しかしながら、これらの化合物はいずれも、カテプシンB、Lに対しても阻害活性を有しており、CANP に特異性の高いものではなかった。

次に、CA-006~009と向山班員の合成したCA-011~013を比較してみると、Tyr-Arg のN端にエポキシコハク酸があるもののみが、カテプシンB、LおよびCANP に対して阻害活性を示しており、このアミノ酸配列が活性発現に重要であることがうかがえる。

更に注目すべき事には、Tyr-Arg のC端にGluを延ばしたCA-012はCA-006~009と比べ、CANP に対する阻害活性が1/5~1/2程度低下している一方、カテプシンB、Lに対しては1/1,000~1/10,000も低下しており、CA-012はCANP に対してかなり特異性が高まっているといえる。

なおCA-012は、エポキシコハク酸部分がエチルエステルであることから、これを加水分解することにより、CANP に対する阻害活性が高められることが期待でき、今後検討する必要があると思われる。またこのCA-012については、更にC端の延長、Gluの変換などの検討も必要と思われる。

結 語

CANP に対する特異的阻害剤の開発を目的として、鈴木班員の研究により明らかとされた、内在性CANP インヒビターの活性中心のアミノ酸配列を分子設計に応用した。その結果、カテプシンとCANP に対する阻害活性を分離しうることがわかった。このため今後更に、内在性CANP インヒビターのN端側のアミノ酸配列についても、同様の検討を進める予定である。

また我々は、このような検討とは別に、より効率的な分子設計を目的として、コンピューターを用いて酵素および阻害剤の三次元構造を解析するこ

とを試みている。本年度はカテプシンBについて検討したが、更に現在 CANP, カテプシンLについても検討を進めている。今後これらの結果が得られ次第、分子設計に応用してゆきたいと考えている。

文 献

- 1) 花田和紀, 横尾千尋, 村田充男, 小熊清司, 玉井正晴, 大村貞文, 渡邊慶昭, 曾田馨, 松本和子: 基礎と臨床, 20: 6295, 1986.
- 2) Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Imahori, K. and Suzuki, K.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3590, 1987.
- 3) Barrett, A.J. and Kirschke, H.: Methods Enzymol., 80: 535, 1981.

CANP 阻害剤の一般薬理学的研究 ——筋電図および神経活動中の呼吸運動関連成分の 定量的評価法に関する基礎的研究——

福原 武彦*

研究協力者 加藤 総夫* 木村 直史* 高野 一夫*

目 的

ヒト筋ジストロフィー症に対する治療薬開発研究において、その有効性評価法に関する研究推進の重要な一環として、疾患モデル動物におけるヒトに応用可能な可及的に非侵襲的であって、しかも信頼度の高い薬効評価方法の確立が強く要請されている。我々は既に、心電図の定量的解析に基づいた心筋変性の非侵襲的評価法を確立するための基礎的知見を報告した⁷⁾。また、昨年度の研究において、動物の横隔神経活動電位中に発現する約60-130Hzの成分、すなわち「高頻度同期波」と1対1に対応した成分が、横隔膜の筋電図中にも検出され得ることをウサギで確認し、報告した⁸⁾。この研究成績を踏まえ、今年度は、呼吸性リズム活動を示すが、呼吸運動に一次的には関与しない遠心性神経、すなわち、交感神経および諸遠心性神経の活動との対比を行ないつつ、呼吸運動に直接関与する骨格筋を支配する遠心性神経の活動電位を定量的に解析することによって、この高頻度同期波の生理的意義を検討するとともに、筋電図に発現する高頻度同期波の定量的解析法の臨床的診断および治療薬の薬効評価への応用に際して必須の理論的基礎となる高頻度同期波の基本的な生理学的性質を明らかにすることを目的とした。

横隔神経活動電位中の遠心性吸息性発射が約60-130Hzの高い周波数で同期する現象はウサギ、ネコおよびイヌにおいて確認されており^{5),6)}、これは高頻度同期波 (high-frequency oscillations)

と呼ばれている⁹⁾。高頻度同期波は神経筋伝達を介して呼吸筋の筋電図中にも発現することが知られており^{6),8)}、随意呼吸中の健常人の肋間筋筋電図から、これに相当する成分を検出したとする報告もある^{1),3),4),11)}。また、昨年度我々は、麻酔下のウサギから横隔膜自発性筋電図、ならびに横隔神経の自発性発射活動を同時導出し、横隔筋電図中に、横隔神経の高頻度同期波帯域成分と1対1に対応した周期約10msの同期波が存在すること(図1)、ならびに、加算平均法によって得られた横隔膜筋電図中の高頻度同期波の振幅が、炭酸ガス吸入によって増大し(図2)、神経筋接合部遮断薬の

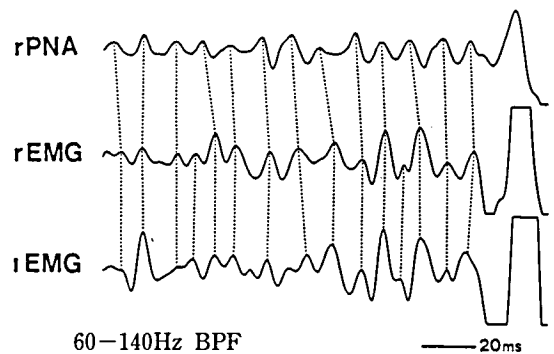


図1 ウレタン-クロラロス麻酔下、自発呼吸下のウサギから導出された右側横隔神経活動(rPNA)、右側横隔膜筋電図(rEMG)および左側横隔膜筋電図(lEMG)。60-140Hzの帯域濾波後の波形。破線で示した通り、横隔神経活動と横隔膜筋電図中に1対1に対応した周期約10msの周期性成分が検出されている。時標は20ms。

* 東京慈恵会医科大学第二薬理学教室

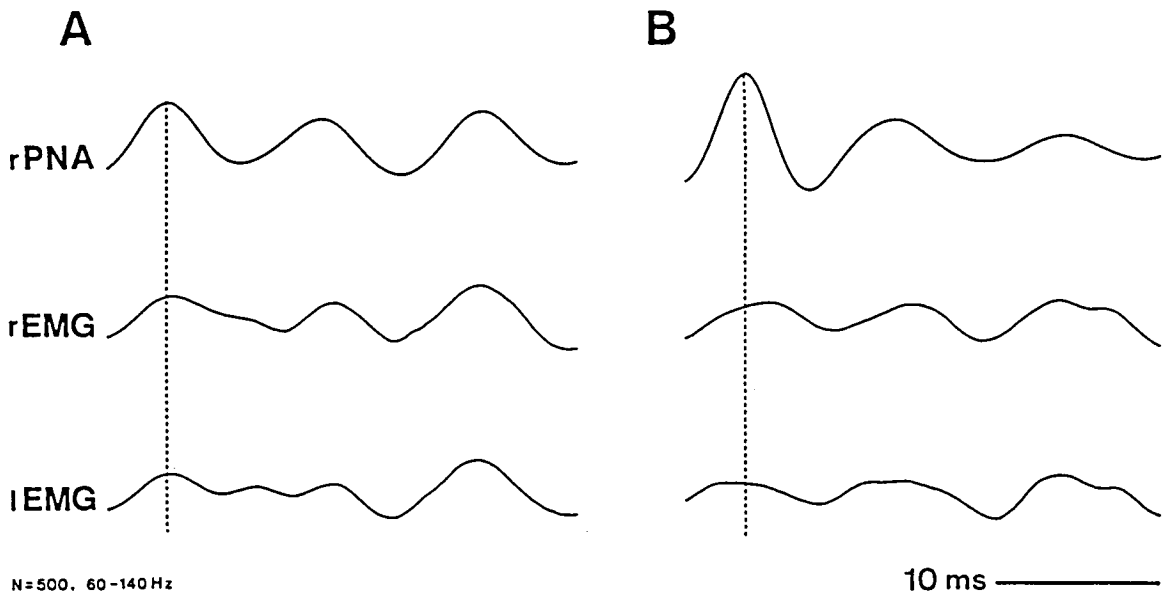


図2 ウレタン-クロロロス麻酔下、自発呼吸下のウサギから導出された右側横膈神経活動 (rPNA)、右側横膈筋電図 (rEMG) および左側横膈筋電図 (lEMG) を60-140Hzの帯域濾波後、横膈神経活動中の高頻度同期波を同期信号として500回加算した波形。破線は同期時点を示す。時標、10ms。A、室内空気換気時。B、93%酸素+7%炭酸ガス吸入時。

適用によって著明に小さくなること (図3) を報告した⁸⁾。これらは、ヒトにおいても、呼吸筋筋電図を非侵襲的に導出することによって、高頻度同期波を同定し、呼吸機能、神経筋伝達、および筋収縮機能との関連のもとに、これを定量的に評価し得る可能性があることを意味する重要な所見である。この評価法が、一つの臨床検査法として確立されれば、筋ジストロフィーのような骨格筋変性、重症筋無力症などの神経筋伝達障害、さらに筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの運動ニューロン障害をきたす疾患の病態やその治療薬の薬効を、機能的かつ非侵襲的に評価する方法として応用し得る可能性が期待される。

実験方法

体重2.0-2.8kgの成熟、両性のウサギを用いた。Diethylether 麻酔下に gallamine (5mg/kg, i.v.) により非動化後、呼気ガス CO₂ および O₂ 濃度の連続監視下に、人工呼吸により換気を適正に維持した。両側の迷走、減圧および頸部交感神経を頸

部で切断した。換気回数を変化させて過換気と換気低下状態を起こす実験においては、両側の頸動脈洞神経も切断した。直腸温を37℃前後に維持した。頸部において横膈神経の切断中枢端からその遠心性発射活動を導出し、併せて、以下の神経の遠心性放電を、それぞれ同時に導出した。

- 1) 三叉、顔面 (第3枝)、舌下神経
- 2) 頸部交感、腎交感神経
- 3) 迷走神経 (頸部において導出。したがって反回神経枝を含む)

また、迷走神経活動と同時に前頭後頭頭皮上脳波も導出した。導出された各神経の自発性遠心性発射活動、ならびに脳波をデータレコーダー (TEAC, R-210, R-81) を用いて磁気テープに収録した。

実験終了後、医用電算機 (日本電気三栄, 7T17) を用いて、以下の解析を行った。解析には本教室において本研究のために作成されたプログラムを用いた。

- 1) コヒーレンスおよび位相角解析による高頻

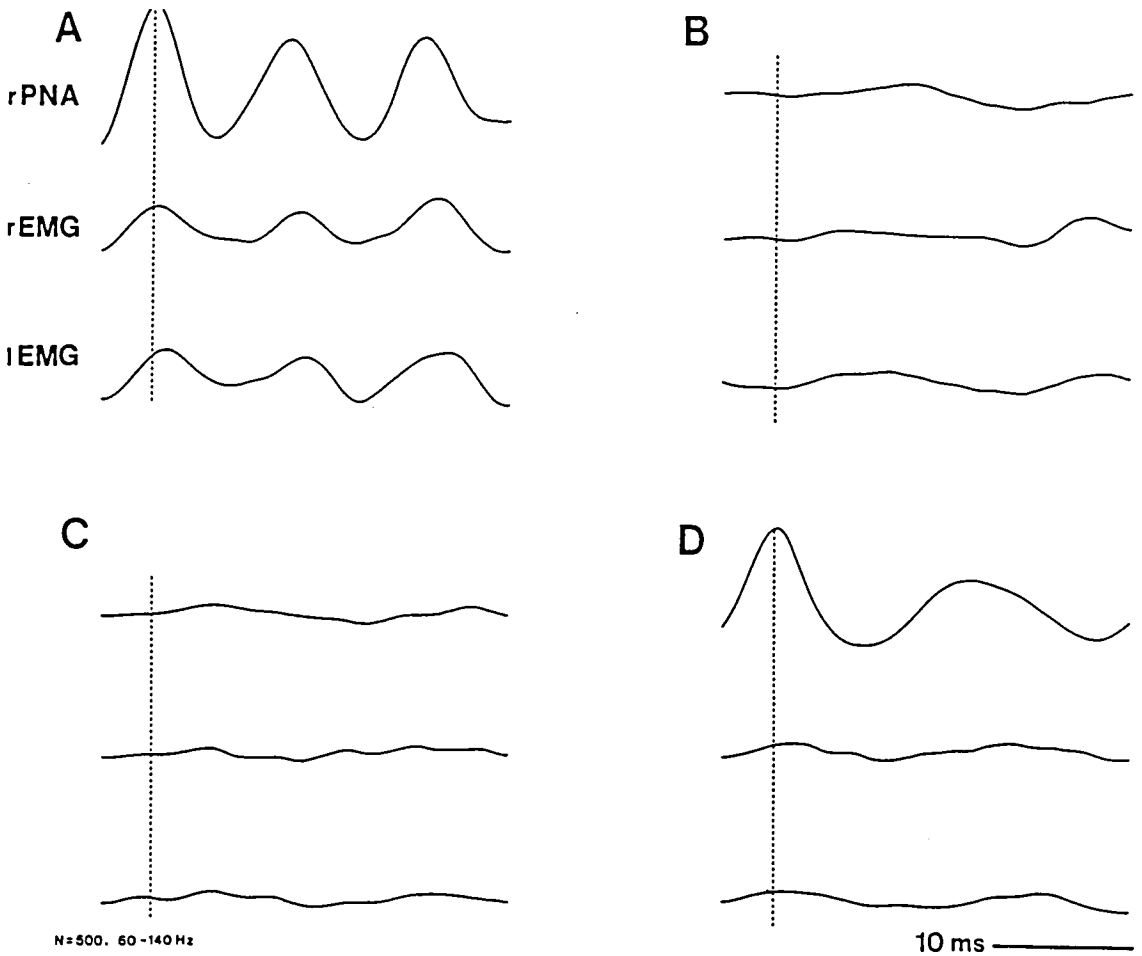


図3 加算平均結果。詳細は図2に準ずる。A, 対照。横隔神経高頻度同期波を同期信号として加算。B, ランダム間隔パルス列を同期信号として加算。C, 50 Hz 交流信号を同期信号として加算。D, gallamine triethiodide 5mg/kg 適用後。BとCの加算平均結果において高頻度同期波が検出されていないこと、ならびに神経筋接合部遮断薬の適用によって筋電図中の高頻度同期波成分のみ消失していることに注目されたい。

度同期波成分の検出：0～200Hzの周波数帯域における神経活動の自己パワースペクトル密度関数、ならびに横隔神経活動と他の神経活動間の相互パワースペクトル、コヒーレンス、およびに位相角をFFT法により演算した(0.25Hz/bin, 20-30回加算)。横隔神経活動中の高頻度同期波と同期した成分の存否を定量的に確認するため、高頻度同期波のピーク周波数におけるコヒーレンス値(ピーク・コヒーレンス)を正規分布に従うよう変換した後²⁾、t-検定によって比較検討した。

2) パワースペクトル法による高頻度同期波成分の定量化：自己パワースペクトル上の高頻度同期波のピークのピーク周波数およびピーク面積を、非線形最小二乗法を用いて推定した^{9),10)}。この解析を適正換気、換気低下、および過換気下のデータについて行ないこれらのパラメータに及ぼす影響を定量的に検討した。

実験成績

1) 適正換気下において、三叉(図4)、顔面、

Trigeminal nerve activity

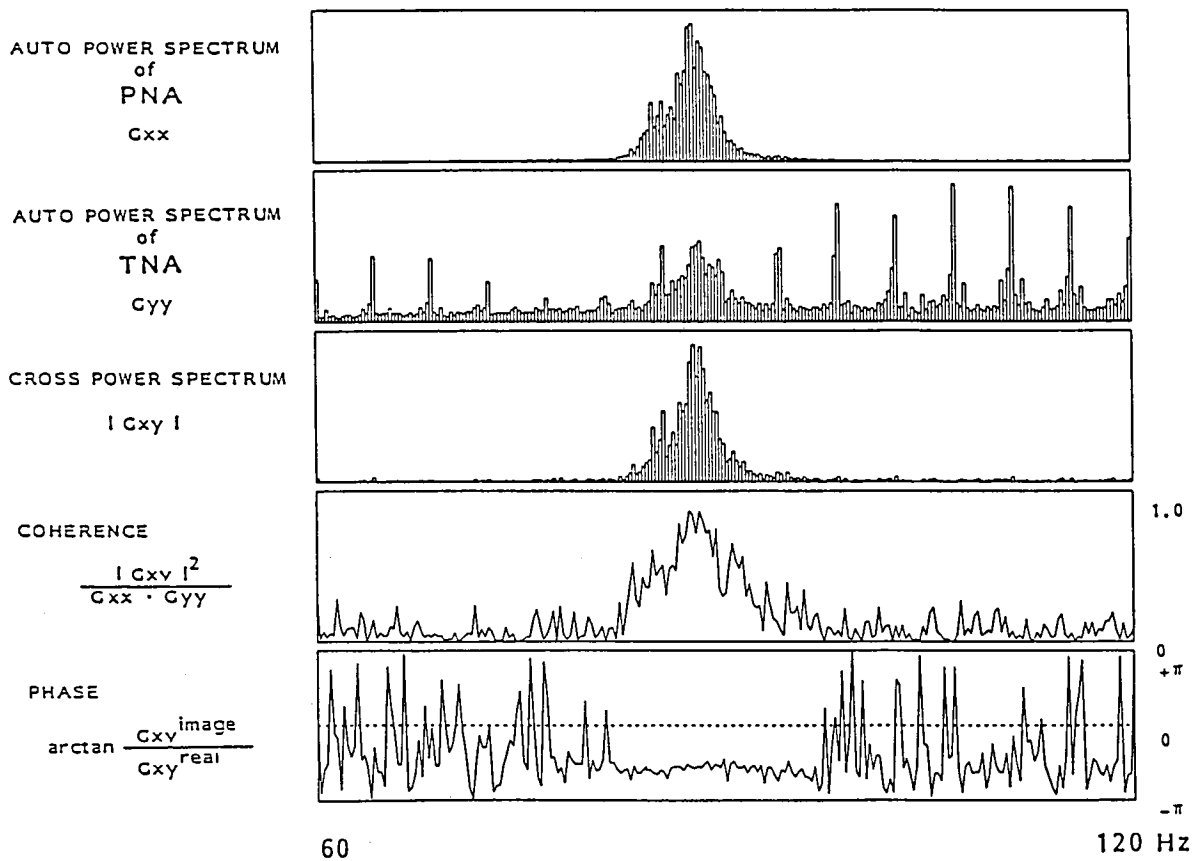


図4 横隔神経活動と同時導出された三叉神経活動のスペクトル解析。60-120Hzの帯域を示す。上段より、横隔神経活動の自己パワースペクトル、三叉活動の自己パワースペクトル、両神経活動の相互パワースペクトル、コヒーレンス、および位相角スペクトル。

舌下および迷走神経活動と横隔神経活動との間のコヒーレンス（関連度関数）には、高頻度同期波の帯域に明瞭なピークが検出され、位相角スペクトルは、その帯域において、これらの神経活動の間に定常的な位相関係があることを示した（図5）。一方、頸部交感、腎交感神経活動および脳波中には、呼吸リズム性活動は検出されたものの、横隔神経高頻度同期波と同期した成分は、検出されなかった（図5）。顔面、舌下、および迷走神経と横隔神経の間のピーク・コヒーレンスは、ランダム白色雑音と横隔神経間のピーク・コヒーレンスより有意に大きい値を示し、一方、交感神経、脳波、およびランダム白色雑音と横隔神経間のピ

表1 諸神経活動と横隔神経活動間のピーク・コヒーレンス

神経活動	平均値±標準偏差	例数
顔面神経	0.69±0.05*	14
迷走神経	0.75±0.03*	10
舌下神経	0.76±0.03*	10
腎交感神経	0.04±0.01	9
頸部交感神経	0.04±0.03	9
脳波	0.04±0.01	12
ランダム白色雑音(対照)	0.04±0.01	5

*, P<0.001

ーク・コヒーレンスの間には有意な差は認められなかった（表1）。

2) 顔面、舌下ならびに横隔神経活動中の高頻

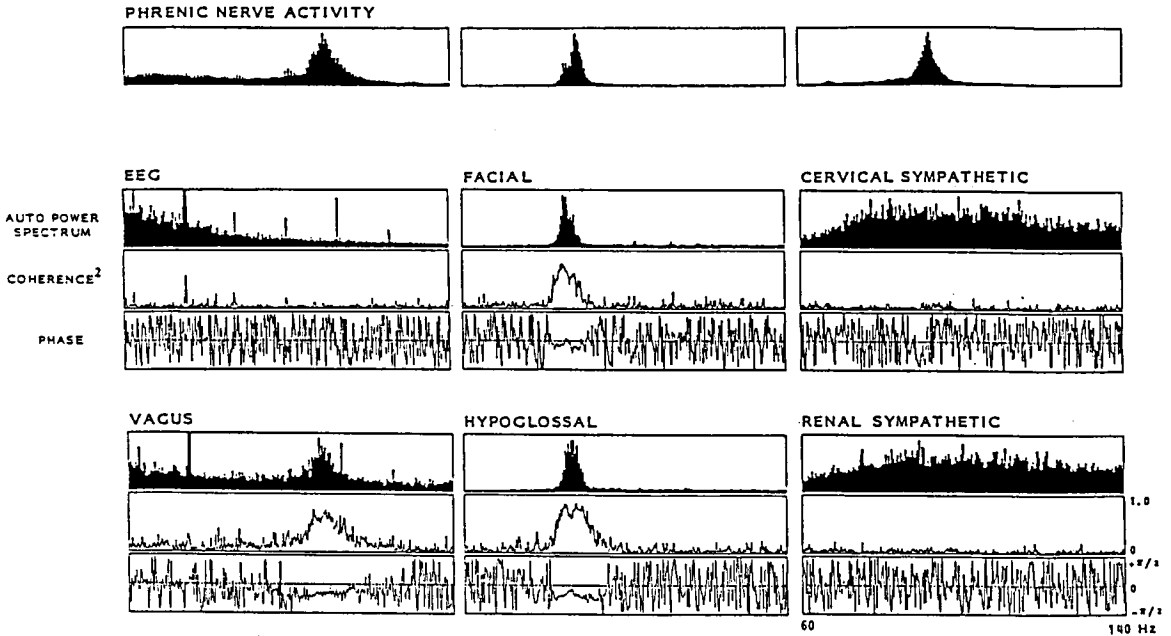


図5 最上段は3実験例における横膈神経活動の60-140Hzの帯域におけるパワースペクトルを示す。それぞれの下に、同時導出された脳波(左列上段)、迷走神経活動(左列下段)、顔面神経活動(中列上段)、舌下神経活動(中列下段)、頸部交感神経活動(右列上段)、ならびに腎交感神経活動(右列下段)の、各々、自己パワースペクトル(第1行)、横膈神経活動とのコヒーレンス(第2行)、および位相角スペクトル(第3行)を示す。

度同期波に対する、過換気ならびに換気低下の影響を検討した。高頻度同期波のピーク面積は、適正換気下(呼気炭酸ガス終末濃度: $3.7 \pm 0.1\%$ 、平均値±標準偏差)と比し、高炭酸状態($5.2 \pm 0.1\%$)で、3神経活動ともに有意に増加、低炭酸($2.4 \pm 0.1\%$)により、有意に減少した。またピーク周波数は、3神経活動ともに、高炭酸で有意に上昇、低炭酸により有意に下降した。この時、ピーク周波数は、3神経活動ともに互いにほぼ一致したまま、有意な差を示さずに遷移した(図6)。

考 察

コヒーレンスならびに位相角解析の結果は、横膈神経と共通の高頻度同期波が三叉、顔面、舌下および迷走神経活動中には存在するが、脳波および交感神経活動中に存在しない、という事実を示している。したがって、高頻度同期波は、呼吸り

ズム性動揺を示す総ての神経活動中に必ず発現するのではなく、呼吸運動に直接関連した骨格筋を支配する神経活動に共通して発現する成分であることが示唆される。BruceおよびAckersonは、ヒトにおいて、努力呼吸下もしくは加重負荷下に、横膈膜、肋間筋、咬筋、胸鎖乳突筋および上腕二頭筋について、それぞれの左右両側から導出された筋電図間のコヒーレンス解析を行なった結果、横膈膜、咬筋および肋間筋にのみ左右に共通な60-84Hzの成分が検出されたことを報告しており、これが、呼吸筋の呼吸性の収縮に関連して発現する成分であろうと推察している⁴⁾。彼らは、その成分が互いに異なる筋の活動間に共通かどうか検討していないが、我々が得た結果は呼吸運動に関連した骨格筋を支配する神経活動それぞれに発現する高頻度同期波を同期させる神経機構の存在を示唆している。

また、横膈、顔面ならびに舌下神経活動中の高

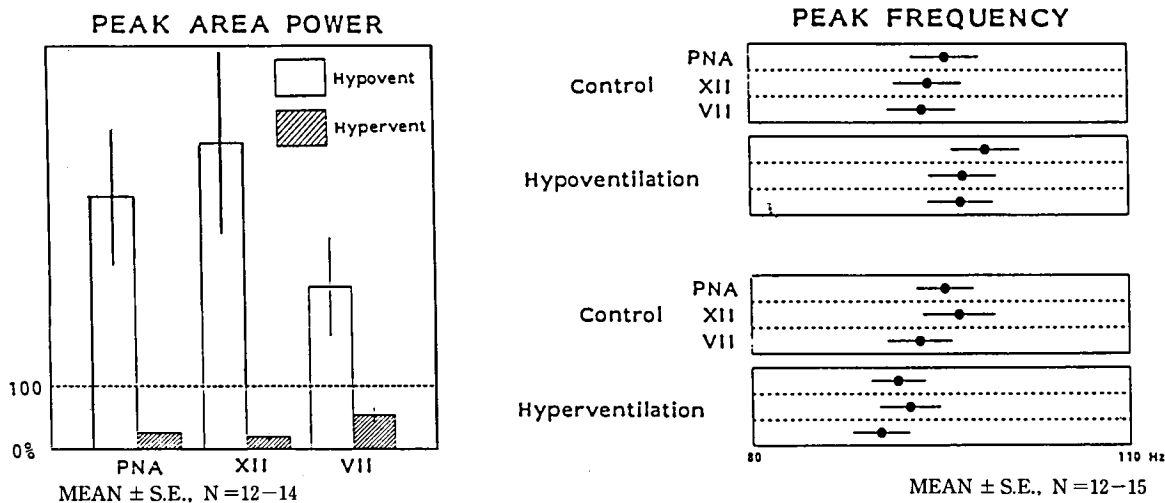


図6 非線形最小2乗法によって推定された、換気低下および過換気における横膈神経(PNA)、舌下神経(XII)および顔面神経活動(VII)中の高頻度同期波のピーク面積(左)およびピーク周波数(右)の平均値および標準誤差を示す。

頻度同期波のピーク周波数が、炭酸ガス濃度の変化に伴って、高周波数側、もしくは低周波数側に、3神経活動とも、そのピーク周波数が一致したまま遷移した事実は、炭酸ガス濃度によって影響される高頻度同期波の単一の発振源の存在を示唆する意義深い所見である。

呼吸筋筋電図中の高頻度同期波を定量的に解析することが、運動ニューロンから、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検査法として、将来、臨床的に有望である理由は次の通りである。第一に、それが、常に一定の周波数帯域に発現し、しかも本研究で明らかになったように、呼吸運動に関連する骨格筋の筋電図もしくはその支配神経活動中のみ、互いに同期して発現するため、その同定が、確実に、かつ正確に行ない得ること、そして第二に、それが、呼吸運動調節機能と密接に関連していることから、すでに臨床呼吸生理学の分野で確立されている様々な呼吸機能検査法とその結果の意味付け、および臨床例との対応と併せて考察することによって、適切な測定条件を満たした上で、機能障害の部位と程度を判定することが可能であること、の二点である。

従って、次の研究課題は、本研究の動物実験で得られた成果をふまえ、様々な生理的条件下における高頻度同期波の性質を、まず動物において、その後さらにヒトにおいて検討を加え、その結果に基づき、適正な測定条件、試験方法、解析方法および測定結果の解釈(臨床的所見との対応を含む)につき十分な知見を積み重ねることである。このような検討の結果に基づき確立される解析法は、筋ジストロフィー症における呼吸筋変性の進行の程度の機能面からの判定およびCANP阻害剤の治療効果に関する非侵襲的な定量的評価方法としても有効な臨床的応用が期待される。

文 献

- 1) Ackerson, L.M. and Bruce, E.N.: Bilaterally synchronized oscillations in human diaphragm and intercostal EMGs during spontaneous breathing. *Brain Research*, 27: 346-348, 1983.
- 2) Bendat, J.S. and Piersol, A.G.: "Random Data: Analysis and Measurement Procedures". John Wiley and Sons, New York, 1971.

- 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) Bruce, E.N. and Ackerson, L.M.: High-frequency oscillations in human electromyograms during voluntary contractions. *J. Neurophysiol.*, 56: 542-553, 1986.
- 5) Cohen, M.I.: Synchronization of discharges, spontaneous and evoked, between inspiratory neurons. *Acta Neurobiol. Exp.*, 33: 189-218, 1973.
- 6) Dittler, R. und Garten, S.: Die zeitliche Folge der Aktionsströme in Phrenicus und Zwerchfell bei der natürlichen Innervation. *Z. Biol.*, 133: 420-450, 1912.
- 7) 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.
- 8) 福原武彦: CANP 阻害剤の一般薬理学的研究—スペクトル解析を用いた筋電図および神経活動の定量的評価法—. 厚生省新薬開発研究費「低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究」江橋班昭和61年度研究報告書, 1987.
- 9) Kato, F., Kimura, N., Takano, K. and Fukuhara, T., Jr.: Quantitative spectral analysis of high frequency oscillations in efferent nerve activities with respiratory rhythm. In: "Respiratory Muscles and their Neuromotor Control", eds, Sieck, G.C., Gandevia, S.C. and Cameron, W.E., p.p. 263-267, Alan R. Liss, New York.
- 10) 中川徹, 小柳義夫: 最小2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, 東京, 1982.
- 11) Schweitzer, T.W., Fitzgerald, J.W., Bowden, J.A. and Lynne-Davies, P.: Spectral analysis of human inspiratory diaphragmatic electromyograms. *J. Appl. Physiol.*, 46: 152-165, 1979.

CANP 遺伝子のクローニングに関する研究

鈴木 紘一*

はじめに

カルシウム依存性プロテアーゼ (CANP) の特異的タンパク性阻害剤 (CANP インヒビター) の構造を昨年度決定して報告した。この中にはアミノ酸140残基からなる4回の繰返し構造が見出され(図1参照)、各繰返し構造中には特異的なアミノ酸配列「TIPPXYR」が見出された。肝臓、赤血球及び遺伝子工学的に調製した断片は、この繰返し構造をそれぞれ4、3、2個持つが、これらのインヒビターはそれぞれ4、3、2分子のCANPを阻害した。この事実から、140残基の繰返し構造は阻害の機能単位であり、各繰返しドメインが1分子のCANPを阻害すると推定した。また、140残基の配列中に含まれる特異的な配列「TIPPXYR」が阻害作用の活性部位であろうと推定した。本年度はこれらの知見にもとづき、遺伝子工学的に上記の事実を証明する実験を行った。

実験方法・材料

昨年度単離したウサギCANPインヒビターのcDNAクローンをを使い(pCI-213, pCI-11)これをBstN1, Sau 3A1で切断してえられる断片をpUC9, 又は18に組み込み図2,3のようにして発現用のプラスミドを調製した。前者をBシリーズ断片(B1~4)、後者をSシリーズ断片(S1~4)と呼ぶ。また、BシリーズのプラスミドをBamH1とPst1又はBamH1とSau 3A1で消化してえられる断片をpUC18につなぎ、BSシリーズ用の発現ベクターを作った。

これらの組換えプラスミドを含む大腸菌を定常期まで培養し、集菌後、イソプロピル-β-チオガラ

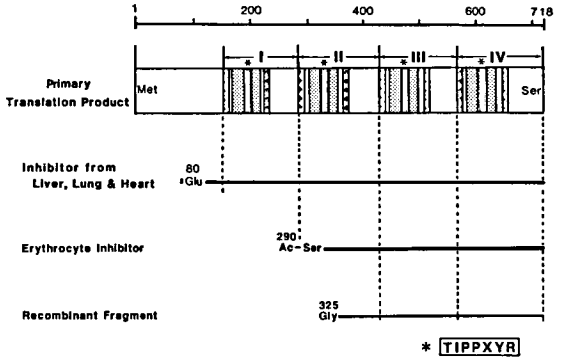


図1 CANP インヒビターの模式図

クトピラノシドで新しい培地中で発現を誘導した。発現した大腸菌は集菌後、超音波で破壊し、粗抽出液を100℃で10分間処理した。冷却後沈殿を遠心で除き、上清に0.02Nの塩酸を加え、中性にもどしてから、再び沈殿を除いた。こうして得た部分精製品を用いて阻害活性を測定した。

結果および討論

1. インヒビター断片の阻害活性

TIPPXYR配列(以後T配列と呼ぶ)が阻害の作用部位であると考え、このT配列を中心に種々のインヒビター断片を設計した(図2,3)。Bシリーズ(図2)はT配列のC末端を短くし、N末端側に長い配列をとったもの、S配列(図3)は逆にT配列のC末端側を長くしたものである。これらの断片の阻害活性を調べたのが表1である。B、Sシリーズとも、1~4の各ドメインは阻害活性を持つ。即ち、1分子中に少なくとも阻害活性を持つ4つの部位があることが判明した。1~4のドメインのうち特に3番目のドメインの活性は他のドメインに比べて弱い。また、ドメイン1は4つのドメインの中では最も活性が強い。mCANPは

* 東京都臨床医学総合研究所

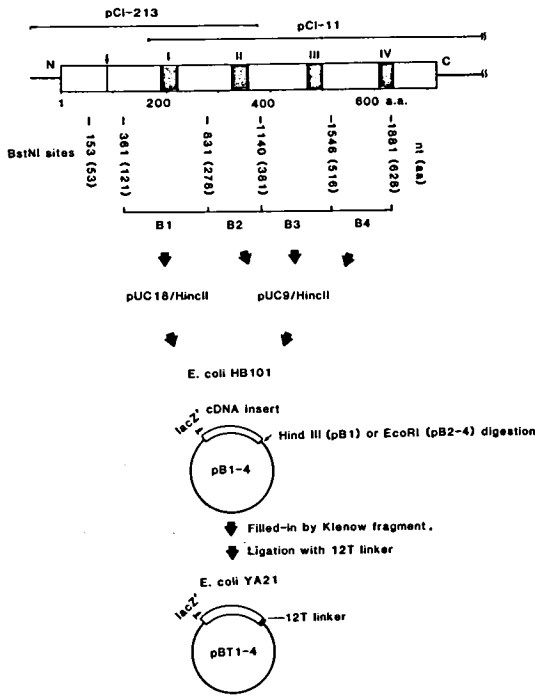


図2 CANP インヒビターの発現用プラスミドの調製 (B配列)

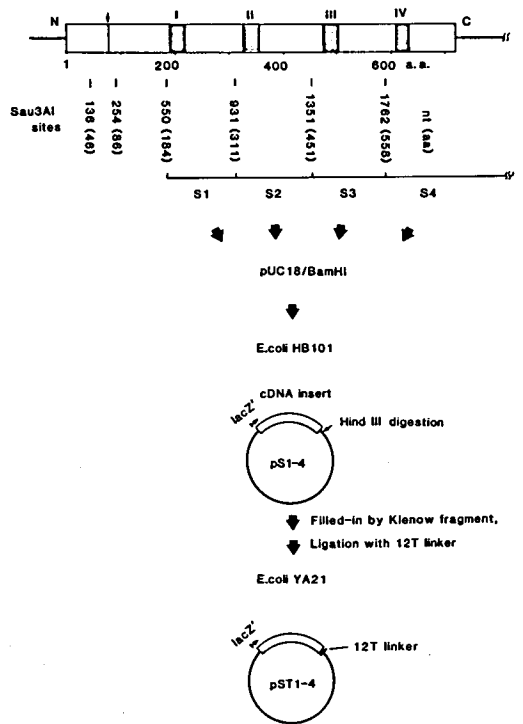


図3 CANP インヒビターの発現用プラスミドの調整 (S配列)

表1 CANP インヒビター断片の阻害活性(1)

	CANP の残存活性 (%)			
	m CANP 10 μ l ²⁾	50 μ l	10 μ l	μ CANP 50 μ l
B シリーズ				
1 (122-277) ¹⁾	20	7	37	9
2 (278-381)	16	< 2	8	6
3 (381-516)	65	43	>98	95
4 (516-628)	12	8	11	10
S シリーズ				
1 (187-311)	28	< 2	42	10
2 (311-451)	51	12	66	28
3 (451-588)	15	13	86	74
4 (589-718)	35	14	55	35
pUC 18	>98	>98	>98	>98

1) 残基番号。1～4のTIPPXYR配列はそれぞれNo.200, 337, 487, 617からはじまる。

2) CANP インヒビター (5～20 μ g/ml) の添加量

どの断片でもよく阻害されるが、 μ CANP は mCANP に比べると阻害がかかりにくい。

T配列の前後の配列をさらに短くするとどうなるかを BS シリーズで検討した。BS シリーズは T配列の N末端側を S シリーズから C末端側を B シリーズからとってつなぎ合せたもので、全体の長さは41~71残基である。表2の結果から BS シリーズもすべて阻害活性を示す。しかしドメイン3は μ CANP に対してはほとんど阻害活性を持たない。また、興味あることに、ドメイン4は mCANP より μ CANP を強く阻害する。この傾向は他のドメインとは逆である。T配列の前後で共通する最小の長さを求めると、T配列の前に16残基、後側に6残基、T配列は7残基なので、合計29残基が最小の阻害断片になる。

2. インヒビター断片のNおよびC末端側からのきりつめ

1番強い阻害活性を持つドメイン1を選び、N、C末端からきりつめて、T配列を欠くようにしたら阻害活性はどうかを検討した。C末端側に長い配列を持つS1をN末端から切断すると、T配列が失なわれると阻害活性も消失する。N末端からきりつめても、全体の長さはそれほど変化しないので、T配列が活性に必須で、T配列がないと阻害活性がない。またB1をC末端から切りつめていった場合も、T配列がなくなると活性がなくなる。この場合も、阻害活性が消失する前後で、ペプチドの長さには著しい変化はないので、T配列の消失が阻害活性の消失を意味するものと思われる。

結局、T配列が阻害活性に必須な配列で、この配列を含まないインヒビターの断片は阻害活性を示さない。T配列は1分子中に4分子あるので、CANP インヒビターは4分子のCANPを阻害する。

以上の解析で、昨年度推定した2点、すなわち、CANP インヒビター中の140残基の繰返しドメインが阻害の機能単位で、TIPPX_{YR} が阻害に必須であることが証明された。

3. T配列と他のプロテアーゼインヒビターとの類似性

CANP インヒビターは他のタンパク質インヒビターとアミノ酸配列が全く異なることから、今までのインヒビターとは違った全く新しい型のプロテアーゼインヒビターと考え、その阻害の機構も他のプロテアーゼインヒビターの場合とは異なる可能性があることを指摘した。CANP と CANP インヒビターはカルシウムの存在下に複合体を形成する。複合体としては単に両者が会合している場合と、両者が共有結合ないしはそれに近い形で結合したものがある。後者の例としては、インヒビターが擬基質として働き、CANP の活性中心に結合した状態が固定されたものももっとも考えやすい。この場合には、酵素が阻害剤を見分ける特定のアミノ酸配列の存在が予想されるが、前者の場合是一次構造より、高次構造が両者間の識別でより有効に作用するであろう。CANP インヒビターの場合、T配列が阻害に必須であることは、後者の可能性を示唆すると思われる。その場

表2 CANP インヒビター断片の阻害活性(2)

	残存CANP 活性 (%)			
	m CANP		μ CANP	
	10 μ l ¹⁾	50 μ l	10 μ l	50 μ l
BS シリーズ				
1 (184-242) ²⁾	19	15	23	21
2 (311-381)	22	12	23	20
3 (451-516)	>98	93	>98	>98
4 (588-628)	84	68	63	57

1) CANP インヒビター (5~20 μ g/ml) の添加量

2) 残基番号。1, 2, 3, 4のTIPPX_{YR} 配列は各々No.200, 337, 487, 617からはじまる。

合, CANP が T 配列のどこかを認識して活性中心がその部位に結合するであろう。いいかえると, TIPPXYR のどこかが reactive site である。T 配列を他のプロテアーゼインヒビターの reactive site の配列と比較したのが図 4 である。図から明らかのように, T 配列とセリンプロテアーゼイン

ヒビターの reactive site の配列の間に類似性がみられる。これが有意の類似性であるか否かは現時点では不明だが, 図 4 のならべ方が正しいとすれば, T 配列の前が P₁ 部位, すなわち, reactive site に相当する。

一方, CANP の作用の第一の特徴が限定分解であることから, CANP はアミノ酸配列を見分けるより, 高次構造を見分けて基質を切断することも十分考えられる。事実, CANP が切断する結合の近傍の配列には共通なものが見られない。結局, CANP は一次構造と高次構造の両方を見分けて切断するのが事実であろうが, 今後, T 配列が reactive site の一部であることが固定できれば, この配列をもとに CANP に特異的な小分子の合成阻害剤の設計が可能になろう。

現在, T 配列を含む約 30 残基のペプチドを合成し, 阻害の機構と反応部位の検索を続けている。

CANP Inhibitor consensus (minor)	T I P P E Y R (V) (A) (D, K)
Serine Protease Inhibitors	
Serpin Family Human α1-AT Chicken Ovalb	S I P P E V K S Y S E E F R
Bowman-Birk Family MAI-DE-3 Region 1 Region 2	S I P P Q C R S I P A Q C V
Kazal (PSTI) Family OMJPQ3	A C P K D Y R
Potato Inhibitor 1 Family Cl-2	I Y T M E Y R

図 4 T 配列と他のプロテアーゼインヒビターの配応部位の比較

筋ジスハムスターにおける CANP 系の変動

川 島 誠 一 *

研究協力者 林 昌 美 * 中 村 愛 *

はじめに

筋ジストロフィーにおける筋肉タンパク質の異常分解をひき起こすプロテアーゼの1つとしてカルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) が考えられている。その根拠として、*in vitro* で骨格筋に CANP を作用させると、筋ジス骨格筋における特徴である α -アクチニンの遊離-Z線の崩壊が起こり、さらに筋ジス骨格筋では細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇していることが挙げられる。このような視点から筋ジス骨格筋の CANP 活性を測定した結果がいくつか報告されている。CANP には Ca^{2+} 感受性の異なる 2 種類 (高感受性の μ CANP と低感受性の mCANP) が存在し、さらに CANP を特異的に阻害するタンパク性物質 (インヒビター) が共存し Ca^{2+} と併せて CANP 活性を制御している。このように CANP 系は複雑な因子から成っているにもかかわらず、既報の多くは単に骨格筋粗抽出液をそのまま酵素源として用い、CANP 活性の多寡を論じている。その結果は筋ジスにおいて CANP 活性は著しく上昇しているとするものである。しかし通常は骨格筋には総 CANP 活性を上まわるインヒビター活性が存在するため、CANP 活性は検出し得ないはずである。そのため、これまでの報告では酵素学的に非常識と考えられる長時間の反応を行い "CANP 活性" の変動を論じている。このような活性測定から得られる結果はインヒビターの分解・不活性化によるもので、真の CANP 活性を反映しているとは考え難い。よしんばこの測定方法が適切であっても、"CANP 活性" の変化が μ CANP、

mCANP のいずれによるものか、あるいはインヒビター活性の変動による相対的なものなのかは不明である。そこで、このような現状を打破し、筋ジストロフィーの発症・進行における CANP の関与を検討するため、CANP 系を構成する μ CANP、mCANP、インヒビターの各活性を個別定量する方法を確立し、ラット各種臓器および筋ジスモデル実験動物 (ハムスター) 骨格筋について応用した。

実験方法

材料—— 4 週齢と 10 週齢の正常ハムスターと筋ジスハムスター (UM-X7.1) は大正製薬総合研究所より恵与していただいた。CANP およびインヒビターの臓器分布測定には 6 カ月齢のフィッシャー系ラットを用いた。標準とした精製 μ CANP および mCANP は既報の方法でウサギ骨格筋より精製した^{1),2)}。

CANP およびインヒビターの部分精製—— 抽出した組織に 3 容の 20mM トリス-5mM EDTA (pH7.5) (緩衝液 A) を加えホモゲナイズ後、35,000×g で 20 分間遠心して粗抽出液を得た。粗抽出液 (10ml 以下) を 3 ml の DE-52 カラムに流し、吸着したタンパク質を 0.15M 食塩および 0.40M 食塩で順次溶出する。0.15M 分画に 4M 食塩を加え 0.40M としたのち 1ml のフェニルセファロースカラムに流し、0.4M 食塩-緩衝液 A で充分洗いインヒビターを除去する。次いで μ CANP を 60% エチレングリコール-緩衝液 A で溶出する。インヒビター試料としては、その熱安定性を利用し粗抽出液を 100°C、5 分間処理したのち熱変性したタンパク質を遠心除去した上清を用いた。この熱処理

* 東京都老人総合研究所

でCANPや他のプロテアーゼおよび血清由来のチオールプロテアーゼインヒビターは失活する。

活性測定—CANP活性は ^{14}C -無水コハク酸でラベルしたウシ血清アルブミン³⁾を基質として用い、図1の方法で測定した。この方法では0.1単位以下の粗CANP活性を定量的に検出可能である。インヒビター活性は、外から加えた一定量の精製mCANP活性を阻害する活性として測定した。

結 果

まず μCANP とmCANPをそれぞれ活性的に純化し得る必要最小限の過程を決定した。過去のCANP精製の経験から、両者はDEAE-セルロースカラムクロマトにより分離が可能であることは

明らかであった。しかし、活性の分散を抑えるためには、両者を個別に段階的溶出することが必要である。精製した μCANP とmCANPをそれぞれDE-52カラムに吸着させ、食塩濃度を段階的に上昇させると、 μCANP は0.13Mと0.15Mの分画に、mCANPは0.20Mと0.25Mの分画にそれぞれ溶出された(図2)。そこで、0.15M食塩で μCANP を溶出したのち0.40M食塩でmCANPを溶出することにした。この方法をラット肺臓の粗抽出液に適用した結果が図3である。0.40M分画にmCANP活性が溶出されるが、0.15M分画にはインヒビターが共に溶出されるため μCANP 活性は検出されない。しかし、0.15M分画をさらにフェニルセファロースカラムに吸着させ、エチレングリコールで溶出することにより

Assay mixture

^{14}C -succinylated BSA
28mM β -ME
6mM CaCl_2
0.1M Tris (pH 7.4)
sample or standard

final 100 μl

↓ 30°C, 5min
↓ 50% TCA 10 μl
↓ 10,000rpm, 5min
sup
↓ 55 μl spotted
↓ dried
↓ toluene scintillator
counted

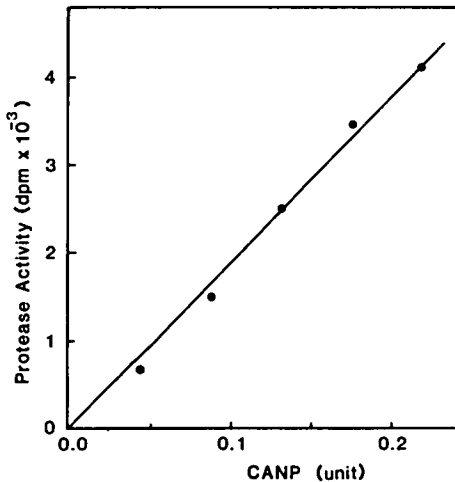


図1 CANPの活性測定法と定量直線

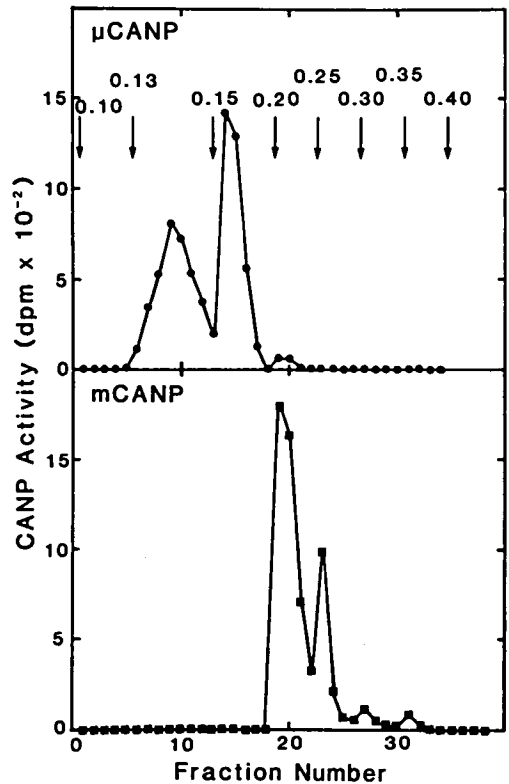


図2 精製した μCANP とmCANPのDE-52カラムからの溶出。矢印の数値は食塩濃度(M)を示す。

μ CANP 活性を得ることができた。

方法が確立したので、ラット各種臓器に存在する μ CANP, mCANP およびインヒビターの各活性を定量した(図4)。それぞれの活性は臓器に特異的な分布を示した。 μ CANP 活性は脾臓・腎臓に、mCANP 活性は肺臓・脳に多かったが、全ての臓器で mCANP 活性の方が μ CANP 活性より

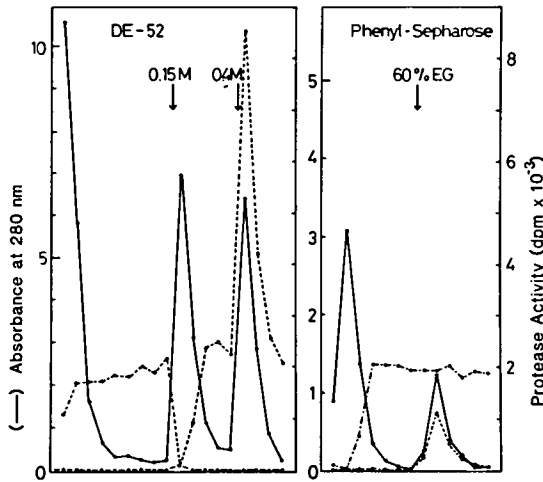


図3 μ CANP および mCANP 分画の調製

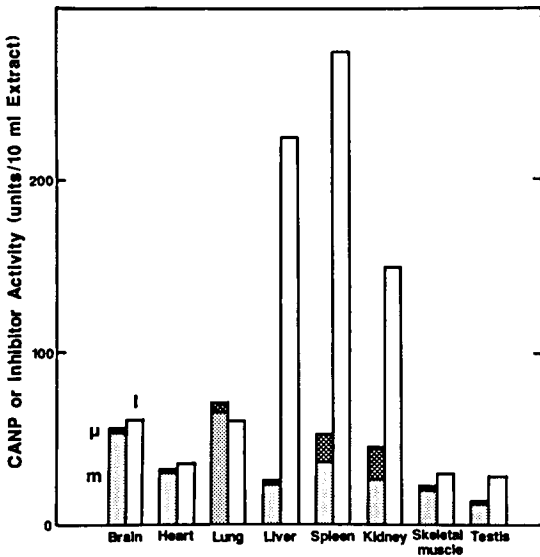


図4 ラット各種臓器に存在する μ CANP, mCANP およびインヒビターの活性量

高かった。インヒビター活性は肝臓・脾臓・腎臓で著しく高く、総 CANP 活性をはるかに上回っていた。骨格筋は各活性が比較的低い組織であることがわかる。

この方法の有効さが実証されたので、筋ジスハムスターの骨格筋について応用し、CANP 系の変動を検討した(図5)。病理的变化には至っていないが生化学的变化が活発である4週齢の筋ジスハムスターでは μ CANP・mCANP・インヒビターのいずれの活性も上昇していた。しかし、筋ジストロフィーが進行し筋肉の壊死・再生が繰り返されている10週齢の筋ジスハムスターでは、インヒビター活性は高値を保っていたが、 μ CANP および mCANP の活性は正常ハムスターにおける値に復していた。

考 察

本研究での測定結果では、筋ジス骨格筋における CANP 活性の著しい上昇は認められなかった。筋ジス発症の初期において CANP 活性は有意に上昇していたが、進行に従い正常に復していた。この初期における上昇が筋ジス骨格筋タンパク質の異常分解開始の引き金(不可逆的過程)であり、その後の進行は他のプロテアーゼ(例えばリゾソームのカテプシン類)に依るとすると、これまで

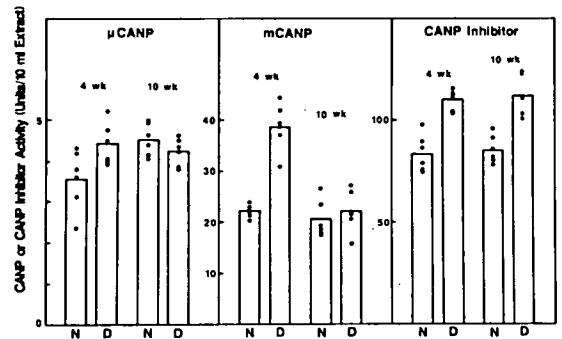


図5 4週齢および10週齢の正常および筋ジスハムスターの骨格筋粗抽出液に存在する μ CANP, mCANP および CANP インヒビターの各活性

の諸結果の多くが説明できる。また、実際に CANP 阻害剤である EST を筋ジス患者に投与した場合、発症初期あるいは若齢の患者には効果的であるが症状の進行した患者には効果が少ないとする臨床結果とも合致する。筋ジスでは CANP インヒビター活性も上昇するが、生体内での局在部位や CANP 活性の阻害機構が解明されるまでは、単に算術的に判断するのは危険である。もし CANP 活性とインヒビター活性の差を生体内での CANP 活性とするならば、多くの組織で CANP は機能し得ないことになるからである。

骨格筋は本来 CANP 活性の低い組織であり、昨年度報告したように抗 CANP 抗体による免疫組織染色でも骨格筋自身の反応は弱く血管が強く染色される。そこで CANP 活性が骨格筋組織のどの部位で上昇しているかが問題となる。もし CANP を多く含む細胞が侵潤すれば、容易に CANP 活性の上昇として表われてくる。また、CANP は生体内で不活性前駆体として存在し、 Ca^{2+} で活性化されたのち自己消化して失活すると考えられている。したがって本研究で測定した

CANP 活性は正確には CANP 前駆体の活性であり、必ずしも活性化された CANP 量を反映していない。閉鎖系を仮定すると、CANP (前駆体) 活性の減少はむしろ CANP が活性化され消失したことを意味するのかも知れない。10週齢において CANP (前駆体) 活性が4週齢より減少しているのは、10週齢でより多くの CANP が活性化された結果とも解釈できる。これらの複雑な問題を解決するためには抗 CANP 抗体および抗インヒビター抗体を用いた解析が必要であり、目下検討中である。

文 献

- 1) Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Imahori, K. and Kawashima, S.: J. Biochem., 93: 291-294, 1983.
- 2) Kawashima, S., Nomoto, M., Hayashi, M., Inomata, M., Nakamura, M. and Imahori, K.: J. Biochem., 95: 95-101, 1984.
- 3) Mellgren, R.L., Repetti, A., Muck, T.C. and Easley, J.: J. Biol. Chem., 257: 7203-7209, 1982.

ベスタチンの使用経験

——特に同量固定法 single blind 法による治験例に bestatin を再投与したその後の実態と double blind 登録例について——

福 山 幸 夫 *

研究協力者 大 沢 真木子* 斎 藤 加代子* 新 井 ゆ み *
平 沢 恭 子* 川 井 未加子* 中 田 恵久子*
宍 倉 啓 子* 鈴 木 暘 子* 平 山 義 人 *

はじめに

昨年度我々は Bestatin (以下 B) または Placebo (以下 P) を同量固定法の single blind 法により 1 年間投与した治療効果および副作用につき 10 例で検討し報告した。今年度は、この 10 症例のうち投与継続希望例にはさらに B を投与し、また新たに 6 歳未満の症例を double blind 法による治験に登録し治験を開始した。前者 10 例のその後の臨床像の実態を報告し、double blind 例 10 例の投与前の背景につき簡単に紹介する。

表 1 対象および投与方法

case	age	schedule	dose	stage at		
				0	52w	104w
4	4y0m	○	150mg/日	I-1	I-1	I-2
5	5y0m	●		II-15	II-13	—
6	6y6m	○	300mg/日	I-2	I-2	III
7	7y5m	○		III	III	V
8	7y8m	○		II-14	II-14	II-14
9	3y2m	○	150mg/日	III	III	II-13
10	3y3m	●		II-15	II-14	II-13
11	5y1m	○	300mg/日	II-14	II-14	II-14
12	6y6m	○		II	III	V
13	7y4m	○		II-14	II-15	III

○にて来院し、臨床評価と検査を行なう
●Bestatin 投与 ○Placebo 投与

I. Duchenne 型筋ジストロフィー症 (以下 D 型 PMD) におけるベスタチン治療開始後 2 年の実態

目 的

B 長期投与の臨床効果を検討する。

対象ならびに方法

表 1 に対象症例を示す。昨年度まで同量固定法の single blind 法で 1 年間 B または P 投与の 10 例である。case 4-8 は single blind 時に B 投与、case 9-13 は P 投与例である。原則として、1 年間の single blind 終了時にいずれの群も投与希望があればそのまま直ちに B 再投与予定であったが、薬剤

- I-1 階段昇降可 手すり不要 手の介助不要
- I-2 階段昇降可 手すり不要 手の膝おさえ要
- II-13 階段昇降可 手すり要 片手手すり
- II-14 階段昇降可 手すり要 片手手すり手の膝おさえ要
- II-15 階段昇降可 手すり要 両手手すり
- III イスからの立ち上がり可能
- IV 歩行可能
- V 四つ這い可能 車椅子上 ADL 独立
- VI 四つ這い不能 いざり可 車椅子上 ADL 介助要
- VII 坐位保持可能 車椅子作動可 背部支持要
- VIII 坐位保持不能 ねたきり全介助

生産の関係で供給不能の状態があり、実際には再投与までに、症例により 1 カ月から 4 カ月を要した。case 5, case 12 は都合により転院、および case 7, 8, 11 は B 再投与するも途中から希望により投与中止、case 13 は最初 P、その後も投与を希望せず、全経過 B 無投与であった。

* 東京女子医科大学小児科

臨床評価は原則として、4週間ごとに筋力、運動機能、各運動（立ち上がり、起坐、20m 走行）所要時間、副作用などについて行なった。血清CPK その他の血液・尿検査は single blind 中は4週間ごとに、その後は8週間ごとに施行した。

また、投与開始前（0週）、52週（single blind 終了時）、その1年後の104週で機能障害度を判定した。年齢は開始時のものであるので、52週、104週はそれぞれ1年および2年後の年齢に相当する。機能障害度基準には、祖父江班の機能障害プロジェクトチーム案¹⁾を用いた。

結 果

1. 機能障害度の変化

A. single blind 時 B 投与群：case 5では、0週では stage II-15：階段昇りに両手手摺を要していたが、52週時にはII-13片手手摺のみで可能となり、52週の方が1段階改善していた。しかし、本例は開始前が骨折後で、その回復も改善に加味している。case 8は、全経過 stage は不変だが、起立所要時間はB中断で延長、再投与により短縮を示した。3例すなわち case 4, 6, 7は0週、52週は不変で、104週で case 4は1段階悪化、すなわち階段昇りに手の介助不要であったのが、手の膝おさえを要するようになり、case 6は2段階悪化し、手の膝おさえで階段を昇れたのが不能となった。case 7では無投薬期間に2段階悪化し、歩行不能になり、B再投与にても改善はなく、その後94週で投与中止したが、104週では同 stage であった。

B. single blind 時 P 投与群：2例は3歳で投与開始、階段の1段の高さが患児にとっては高過ぎた可能性もあるが、case 9は0週、52週では、四つ這いでしか階段が昇れなかったのが、104週には2段階上昇し片手手摺で可能、case 10は、52週、104週と1段階ずつ上昇した。case 11は stage は全経過不変だが、運動所要時間でB投与で短縮、中止により延長の傾向が見られた。case 12は開始時で両手で手摺に摺まれば階段が昇れたが、P投与4週より1段階低下して不能となり、52週時2段階低下してステージIII、その後3カ月B投与するも104

週ではステージV：歩行不能であった。

全経過B無投与の case 13は、開始時II-14：階段昇りに片手手摺と膝手、52週時II-15：両手手摺、104週時IV歩行可能なるも椅子からの立ち上がり不能と低下した。

以上各症例経過の概略を示したが、7歳でしかも開始時機能レベルがほぼ同様であった case 8と case 13について注目して比較してみると、いずれもII-14で投与開始したのに、case 8は不変、case 13は104週時最初からみると3段階低下していた。この両者の相違は、意味があるように思える。

2. 運動所要時間の変化

A. 立ち上がり所要時間（図1）

開始時5歳未満の群では、いずれの場合もあまり大きな変化は見られなかった。

5歳以上の群では、case 6では上気道炎を反復した44週頃から無投薬の66週まで所要時間が延長し、再投与によりやや短縮したが、88週より目だ

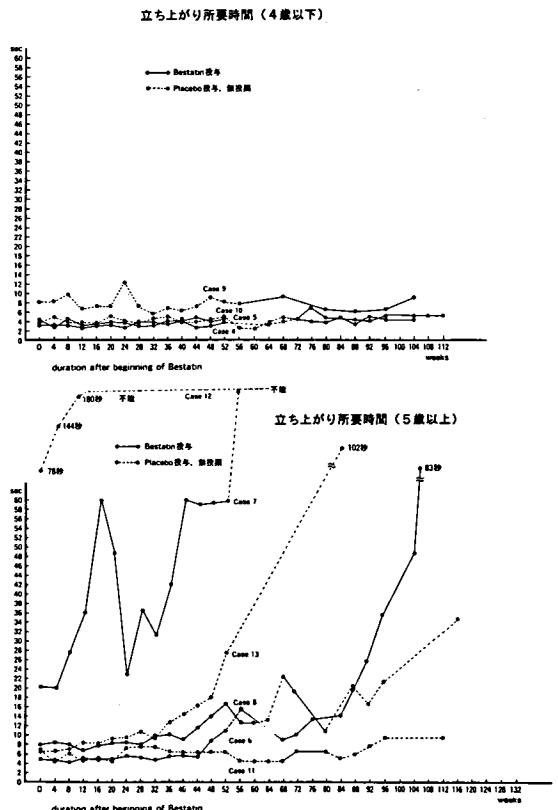


図1 起立所要時間

って延長し、108週からは立ち上がり不能となった。case 7ではB投与中から、立ち上がり困難であったが、無投薬を契機に不能となっており、その後再投与でも改善は得られていない。case 8でも、B中止により所要時間延長、再投与によりやや短縮、その後無投薬期に延長という経過がみられた。case 11ではBとPの差がほとんどなく、case 12では、P投与中に立ちあがり困難から不能となり、再投与によっても改善はみられてなかった。case 13は全経過無投薬だが、8歳頃より特に延長した。

B. 20m 走行時間 (図2)

5歳未満の群では、case 9, 10では、PからBに変更後、所要時間の短縮が見られたが、case 4ではあまり大きな変動はなかった。

5歳以上の群では、case 6では投薬の有無の影響はほとんど無く、case 8, case 11ではB中止により延長、再投与によりやや短縮、その後無投薬期に延長という傾向が少し認められた。しかし逆に case 7と case 12を比較すると、投薬前には両者

の所要時間はほぼ同じなのに、その後はB投与例 (case 7)の方が、Pの case 12よりも所要時間が長い傾向が認められた。

C. 起坐所要時間 (図3)

5歳未満の群では、20m 走行の場合と同様に、case 9, 10では、PからBに変更後、所要時間の短縮が見られている。

5歳以上の群では、症例によってはB中止で悪化、再投与でやや改善を思わせる例もあったが、PやB投与中でも変動がみられ、薬剤の影響を強く思わせる例はなかった。

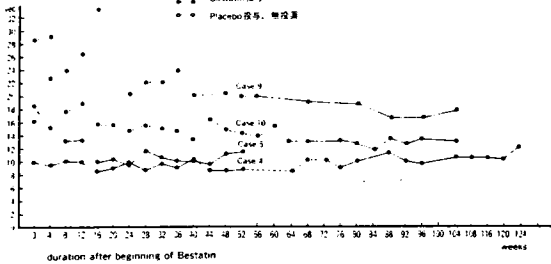
3. 血清CPK値

5歳以上の例では、投与開始4週の時点で、B投与例は低下、P例ではやや上昇という両者の違いがみられたが、その他は全く両者に差を認めなかった。

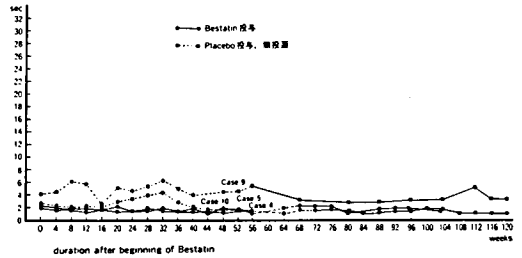
考 案

ベスタチンは、アミノペプチダーゼBおよびロ

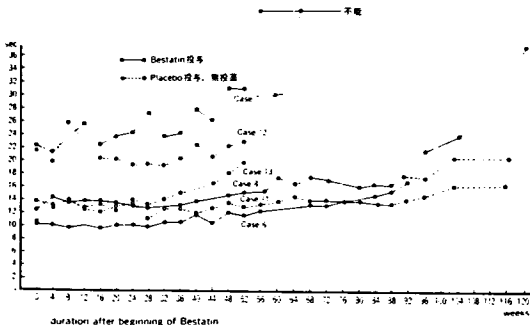
20m 走行所要時間 (4歳以下)



起坐所要時間 (4歳以下)



20m 走行所要時間 (5歳以上)



起坐所要時間 (5歳以上)

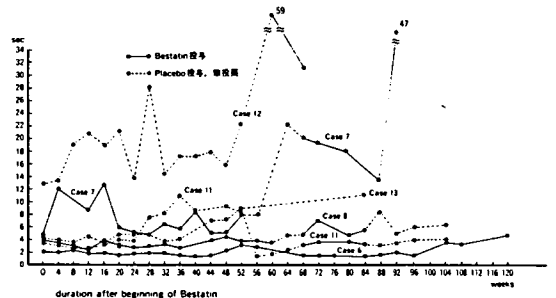


図2 20m 走行所要時間

図3 起坐所要時間

イシンアミノペプチダーゼの活性を拮抗阻害する作用をもつと同時に、細胞表面に結合する。従来免疫増強剤として開発されてきた。PMD マウスおよびニトリの筋肉内のアミノペプチダーゼ活性が正常群に比して異常に上昇していることから、本剤が PMD の治療薬として使用されるようになった³⁾。PMD マウスの実験では発症初期に投与開始すると効果があるという^{4),5)}。59年度の我々の経験でも、血清 CPK 値は初回投与の初期には低下がみられ、偽薬による上昇・真薬による低下を示したのは、機能が良好な症例であり、より進行した症例に投与するよりも軽症例に投与する方が効果が出る可能性が示唆された⁶⁾。しかしながら、昭和60年度臨床分科会のプロトコールに基づく検討では、B投与例とP投与例では特に差は見られなかった^{7),8)}。今回の我々の検討では、5歳未満の例でPからBに変更後経過良好な傾向があったが、発達の要素も含まれ、結論は下せなかった。

結 語

昨年より引き続き10例においてベスタチン投与の臨床効果を検討した。

開始時5歳未満の症例で、PからBに変更した群においては、20m 歩行と起坐所要時間において改善傾向が認められた。

開始時5歳以上の症例では立ち上がり所要時間、20m 走行においてB中断により悪化、再投与により改善の傾向が認められた。

血清 CPK においては薬剤による影響を同定し得なかった。

II. double blind 登録例 (登録時6歳未満)

投与前の背景を表2に示した。年齢分布は2歳から6歳であるが、2歳代と3歳代が各4名いる。運動機能では年少の2例を除き全段階昇降可能で、床からの立ち上がりに手の介助を要さない症例が3例、両足跳躍が可能な症例が1例のみおり、この両足跳躍が可能な症例については Becker 型との鑑別が問題になる。現在1例を除き投与を開

表2 Double blind 登録症例

症例	生年月日	開始年月日	stage	Gowers 徴候	開始時年齢	過去の使用経緯	歩行開始年齢	両足跳躍
H.K.	S.56.10.21	S.62.11.24	2 II-13	-	6:01	無	1:04	0cm
H.T.	S.58.2.19	S.63.2.2	2 II-13	+	4:11	無	2:00	0
Y.S.	S.59.1.20	S.62.10.20	2 II-13	-	2:09	無	1:10	0
H.O.	S.59.4.21	S.62.10.20	2 II-13	+	3:06	有	1:06	0
D.N.	S.59.9.26	S.62.11.10	2 II-15	+	3:02	無	1:06	0
K.Y.	S.59.9.28	S.63.4予定	2 II	+		無	1:03	0
H.M.	S.59.10.16	S.62.11.20	2 II-13	-	3:00	無	1:03	2
Y.K.	S.60.1.26	S.62.12.9	2 II-13	+	2:10	有	1:03	0
S.O.	S.60.6.11	S.63.2.2	3 III	+	2:07	有	1:04	0
T.S.	S.60.9.30	S.62.10.20	3 III	+	2:00	無	1:05	0

始し経過観察中である。

文 献

- 1) 福山幸夫, 高柳哲也, 野島元雄, 松家豊, 上田敏, 湊治郎, 井形昭弘, 堀三津夫: 筋ジス患者における機能障害の進展過程に関する研究。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および疫学的研究(祖父江班), 昭和55年度研究成果報告書, 1981, p.p.4-7.
- 2) 福山幸夫, 大沢真木子, 宍倉啓子, 鈴木陽子, 陶山亜理子, 森本武彦: 進行性筋ジストロフィー一症に対するベスタチンの使用経験。厚生省新薬開発研究費, 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究(梅沢班), 昭和58年度研究報告書, 1984, p.p.101-114.
- 3) 梅沢浜夫, 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究。厚生省新薬開発研究費, 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究(梅沢班), 昭和55年度研究報告書, 1981, p.p.3-14.
- 4) 松下 宏, 辻 繁勝: 筋ジストロフィーマウスにみられる種々な酵素活性変動に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響, 昭和55年度研究報告書, 1981, p.p.55-61.
- 5) 松下 宏, 辻 繁勝: ハムスター筋ジストロフィー一症に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響。厚生省新薬開発研究費, 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究(梅沢班), 昭和56年度研究

報告書, 1982, p.p. 51-56.

- 6) 福山幸夫, 大沢真木子, 川井未加子, 中田恵久子, 宍倉啓子, 鈴木暘子, 平山義人, 斎藤加代子, 岡田典子: 進行性筋ジストロフィー症に対するベスタチンの使用経験. 厚生省新薬開発研究費, 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (ロイペプチン) の開発研究 (梅沢班), 昭和59年度研究報告書, 1985,
- 7) 福山幸夫, 大沢真木子, 川井未加子, 中田恵久子, 宍倉啓子, 鈴木暘子, 平山義人, 斎藤加代子, 岡田典子: 進行性筋ジストロフィー症に對

するベスタチンの使用経験. 厚生省新薬開発研究費, 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (ロイペプチン) の開発研究 (梅沢班), 昭和60年度研究報告書, 1986.

- 8) 福山幸夫, 斎藤加代子, 大沢真木子, 川井未加子, 中田恵久子, 宍倉啓子, 鈴木暘子, 平山義人, 岡田典子: 進行性筋ジストロフィー症に對するベスタチンの使用経験. 厚生省新薬開発研究費, 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (ロイペプチン) の開発研究 (江橋班), 昭和61年度研究報告書, 1987.

Duchenne 型筋ジストロフィー症の血清酵素におよぼす ベスタチン (NK421) の効果

高橋 桂一*

研究協力者 西尾 英久*

目 的

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) の血清酵素におよぼすベスタチンの経口投与の効果を経過時間において検討する。

方 法

対象は入院中の DMD 患者で、年齢 9~17 歳、障害度 (8 段階分類) 3:2 名, 4:5 名, 5:7 名, 6:7 名, 7:4 名, 8:4 名の計 29 名。前日午後 9 時より終了まで安静を保ち、当日午前 6 時に採血し、直後にベスタチン (NK421) 100mg あるいは Placebo を経口投与し、8 時, 10 時, 12 時に採血し、leucine aminopeptidase (LAP), creatine kinase (CK), lactic dehydrogenase (LDH), aldolase (ALD) をオートアナライザーで測定した。結果は前値に対する変動率で表わし paired student t test で検定した。最初にベスタチンを投与し、2 週間以上経過してから同一患者に同条件で Placebo を投与した。

結 果

ベスタチン投与の結果を表 1 に示す。経口投与後 2 時間で LAP は有意 ($p < 0.01$) に低下し、4 時間, 6 時間で元のレベルに戻った。CK は変動しなかった。LDH, ALD は 2 時間で変動なく 4 時間, 6 時間で有意 ($p < 0.01$) に上昇した。

Placebo 投与の結果を表 2 に示す。Placebo 経口投与では CK, LDH とともに有意の変動はなかった。6 時間後 (12 時) LAP は上昇し ($p < 0.01$)、

表 1 Effect of Bestatin on serum enzymes in Duchenne muscular dystrophy.

Enzyme	Time	6:00 0	8:00 2	10:00 4	12:00 6	A.M. hour
LAP	100	94.6 ± 5.2	5.2 $p < 0.01$	99.9 ± 6.6	n.s.	102.1 ± 6.2 n.s.
CK	100	99.8 ± 12.3	n.s.	103.6 ± 18.7	n.s.	104.2 ± 20.7 n.s.
LDH	100	99.6 ± 12.7	n.s.	110.3 ± 14.4	$p < 0.01$	116.5 ± 25.9 $p < 0.01$
ALD	100	102.5 ± 16.4	n.s.	116.1 ± 21.3	$p < 0.01$	124.0 ± 36.2 $p < 0.01$

The number of patients = 29. n.s.: not significant.

表 2 Serum enzymes after oral administration of Placedo in DMD.

Enzyme	Time	6:00 0	8:00 2	10:00 4	12:00 6	A.M. hour
LAP	100	101.7 ± 5.0	n.s.	102.1 ± 5.6	n.s.	102.5 ± 4.3 $p < 0.01$
CK	100	101.2 ± 14.5	n.s.	102.4 ± 19.5	n.s.	103.3 ± 25.9 n.s.
LDH	100	98.3 ± 9.6	n.s.	96.4 ± 12.1	n.s.	98.4 ± 12.9 n.s.
ALD	100	99.3 ± 11.8	n.s.	94.9 ± 15.2	n.s.	91.8 ± 14.5 $p < 0.01$

The number of patients = 29. n.s.: not significant.

ALD は前値に比し低下 ($p < 0.01$) した。

考 察

ベスタチンはこの条件下で、2 時間で LAP を抑制した。血中ベスタチン濃度は 60~480mg の経口投与後 2 時間でピークを示し、4 時間後には低下してくる¹⁾。従ってこの LAP の低下は組織内で

* 国立療養所兵庫中央病院

酵素阻害が起きた結果が血中に反映したか、あるいは血中に増加したベスタチンが血中でLAP活性を抑制したか、もしくは血中に増加したベスタチンが酵素活性測定系の中で直接酵素阻害を示したかのいずれかであり、今後確かめる予定である。

CKはベスタチン投与により変動しなかった。LDHおよびALDが4時間および6時間後上昇し、Placebo投与の結果と対比して明らかな差がありベスタチンの影響であると言える。血球成分を含めいかなる組織や臓器に由来した結果であるかは今後検討を要する。ベスタチンが細胞表面に結合し、抗腫瘍作用を持つことから考えて、恐らく膜透過性の変化による結果と推定され更に検討する予定である。

松下らは筋ジストロフィーハムスターにベスタチンを投与し6週間後生理的食塩水投与群と比較したが、CKは筋肉内、血中共に有意な低下を示さなかった。ロイペプチンでは低下を示した²⁾。祖父江らはベスタチンがDMDの血清CKの日内変動を抑制する傾向のあることを報告しているが³⁾、その後の報告ではCKやmuscle-specific enolase (MSE)の遊離がベスタチンで阻止されたとはいいがたいと述べている⁴⁾。更にその後、指標にcarbonic anhydrase III (CA-III)を加えて、歩行可能なDMD10名でのcross over試験(8週+8週)ではベスタチン投与で6週後に血清CKのみが有意に低下し(8週目は有意差なし)、Placeboにしてから4週後にCK、MSE、CA-IIIは8週目に比し有意に上昇し、あと低下したと報告している。しかし階段昇降の可能な6例ではベスタチン投与後のこれらの酵素の低下は有意でなく、Placeboに替えてから4週後の上昇は有意であった⁵⁾。木下らは運動によるCKの上昇に対してベスタチンは抑制的に作用すると報告している⁶⁾。一方、高木らは*in vitro*の還流実験で、ジストロフィーハムスターの長肢伸筋からのCK遊離がベスタチンとロイペプチンの添加で2倍以上に増加することを報告しているが、どちらの薬剤の影響かは明らかでない⁷⁾。我々のここに示した短時間の観察ではベスタチンは血清CKに対して

有意な影響を示さなかった。各酵素で時間経過における変動が相違することは興味があり、その機構を解明することは、ベスタチンの有用性の検討にも重要であると思われる。

結 論

DMD患者に安静下でベスタチン100mgを経口投与した。投与後2時間でLAPは低下したがCKには影響なく、LDH、ALDが4時間および6時間で上昇した。

Placeboの投与では4時間まではこれらの酵素の有意な変動はみられなかった。

文 献

- 1) 木下真男, 山田信雄ら: 筋疾患に対するベスタチンの効果に関する臨床的研究. I. 神経筋疾患におけるベスタチン投与後の尿中アミノ酸の変動. 厚生省新薬開発研究費・微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究(梅沢班), 昭和58年度研究報告書, 1984, p.p. 115-118.
- 2) 松下 宏, 辻 繁勝: ハムスター筋ジストロフィー症に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響. 厚生省新薬開発研究費・微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究(梅沢班), 昭和56年度研究報告書, 1982, p.p. 51-56.
- 3) 祖父江逸郎, 陸 重雄ら: Duchenne型進行性筋ジストロフィー患者に対するロイペプチン, ベスタチンの影響. 厚生省新薬開発研究費・微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究(梅沢班), 昭和56年度研究報告書, 1982, p.p. 85-90.
- 4) 祖父江逸郎, 陸 重雄ら: 筋ジストロフィーに対するベスタチンの影響. 血清CKとmuscle-specific enolaseを指標として. 厚生省新薬開発研究費・微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究(梅沢班), 昭和58年度研究報告書, 1984, p.p. 123-130.
- 5) 祖父江逸郎, 陸 重雄ら: 筋ジストロフィーに対するベスタチンの影響. 新しい筋障害の mar-

ker を用いて、厚生省新薬開発研究費・微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (ロイペプチン) の開発研究 (梅沢班), 昭和59年度研究報告書, 1985, p.p. 127-134.

- 6) 木下真男, 山田信興ら: 血清 CPK の変動に対するベスタチンの効果。厚生省新薬開発研究費・微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (ロイペプチン) の開発研究 (梅沢班), 昭和

59年度研究報告書, 1985, p.p. 121-125.

- 7) 高木昭夫, 荒木 誠ら: ジストロフィー筋よりの creatine kinase (CK) 遊離に対する各種薬剤の影響。厚生省新薬開発研究費・微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (ロイペプチン) の開発研究 (梅沢班), 昭和59年度研究報告書, 1985, p.p. 65-69.

Duchenne 型筋ジストロフィー症に対するベスタチンの効果 ——尿中 3 メチルヒスチジンの測定を中心とした検討——

西 谷 裕*

研究協力者 板 垣 泰 子* 平 野 久 美 子**

筋ジストロフィー症における薬剤の治療効果の判定をどのようにするかは大きな課題である。我々は外来採尿にて尿中 3 メチルヒスチジン (3MH) を測定し、その有用性について検討した。外来で 3MH の測定を行なう場合の問題点としては、おおきくは外因性蛋白と部分尿の問題と考えられるが、これらを考慮しつつベスタチンの二重盲検試験においてその応用を試みたので報告する。

1) 部分尿に関して

病棟入院中の Duchenne 型 PMD 患者 4 名において排尿毎に採尿し、3MH とクレアチニンとの関係をみた (図 1)。食事制限は特になかった。4 例とも 3MH とクレアチニンは良好な正の相関を示しており、相関係数も 0.91~0.99 と高値であった。適当な食事制限を加えるならば、恐らくクレアチニンに対する 3MH の値は常に一定であることが期待できるものと思われた。ただクレアチニンが 1mg 以上の濃縮尿では相関は薄くなる傾向が見られ、クレアチニンが 1mg/ml 以上の検体は除外したほうが良いと推測された。

2) 外因性蛋白に関して

外来患者において 4 週毎に 1 年間採尿し、3MH と 1MH とを測定した。また 24 時間以内の食事内容をチェックし、3MH と 1MH の値との関連を検討した。1MH は 3MH と同様その殆どが筋肉中に存在するが、尿中では内因性のものに比し外因性の物の占める割合が多いとされている。我々は 1MH を同時に測定することにより、3MH におけ

る外因性蛋白の占める割合の指標にならないかと考えた。しかし、図 2 のごとく 3MH と 1MH は必ずしも相関を見なかった。24 時間以内に食べた食事内容との関係を見てみると、イカ、タコ、エビ等を食べたときは少量でも 3MH の値は高値を示したが 1MH は低値で、鮭、鶏肉等では逆に 1MH が高値となることが分かった。牛肉、豚肉等では 1MH と 3MH はほぼ相関していた。従って 3MH における外因性蛋白を考慮するには、1MH の測定は余りに立たず、食事内容とその摂取量を十分に聴取し検討を加えたほうが良いと判断された。従って、イカ、タコ、エビ等や多量の魚肉の飲食をしたことがわかり、尿中 3MH の値がかなり高値を示している検体は除外して考えたほうが良いと判断された。本例においては 4 週 (エビの摂取)、52 週 (肉の摂取) の検体を除外した。

3) ベスタチン二重盲検試験での試み

1)、2) の結果より、クレアチニンが 1mg/ml 以上の検体、軟体類や甲殻類、魚肉類の摂取が明らかな検体は省くことにして、ベスタチンの 1 年間の二重盲検試験にて応用した。

対象は 4 歳から 6 歳までのデュシャンヌ型 PMD 患者 10 名で、そのうち 4 名がベスタチン服用者で、6 名がプラセボ服用者である。4 歳以下は 1 日 150mg、5 歳以上は 300mg を服用した (表 1)。投与期間は 1 年間であり、4 週毎に尿中 3MH の測定を行ない、同時に血清 CK 活性を測定した。尿は前日の夕食より魚肉禁止とし、当日の昼食前に採尿した。また夕食、朝食の食事内容をチェックした。

結果は図 3 で示したが、服薬前値はベスタチン

* 国立療養所宇多野病院

** 大阪市立大学生生活科学部

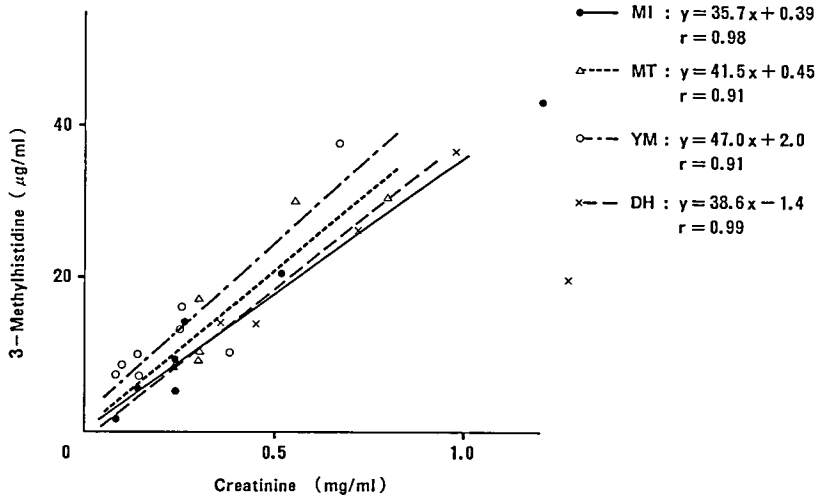


図1 Relation between urinary 3-methylhistidine and creatinine in single untimed urine samples

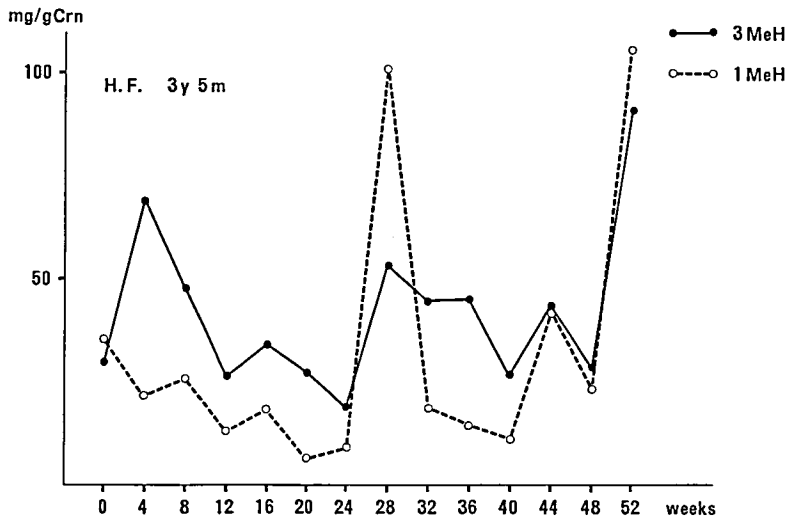


図2 Relation between urinary 3-methylhistidine and 1-methylhistidine

群で56.9mg/gCreatinine, プラセボ群で52.4 mg/gCreatinineであり殆ど差はなかった。現在までの報告からは Duchenne 型 PMD において24時間蓄尿, 3日間魚肉禁止にて測定されている値 (67.4 ± 10.9 熊谷ら, 86.7 ± 35.6 McKeranら)とほぼ同じか, または若干低値であると思われた。同様の条件における正常人のコントロールは 27.4 ± 11.4 mg/gCreatinineであり, 約2倍の高値であった。

測定週毎にかなり動揺が認められるが, 投与前の平均値からの各測定週の平均値の差をみた図4よりは, 大まかな傾向としてベスタチン群では, 投与初期に低下傾向があり, その後10カ月を過ぎたころより再び低下してくる傾向が窺えた。それに比し, プラセボ群では投与前値より+19.1~ -11.1mg/g Creatinineの間での動揺で, ベスタチン群に比して投与前値との差が少ないように思われた。しかし T-検定を試みたが, 有為差を得

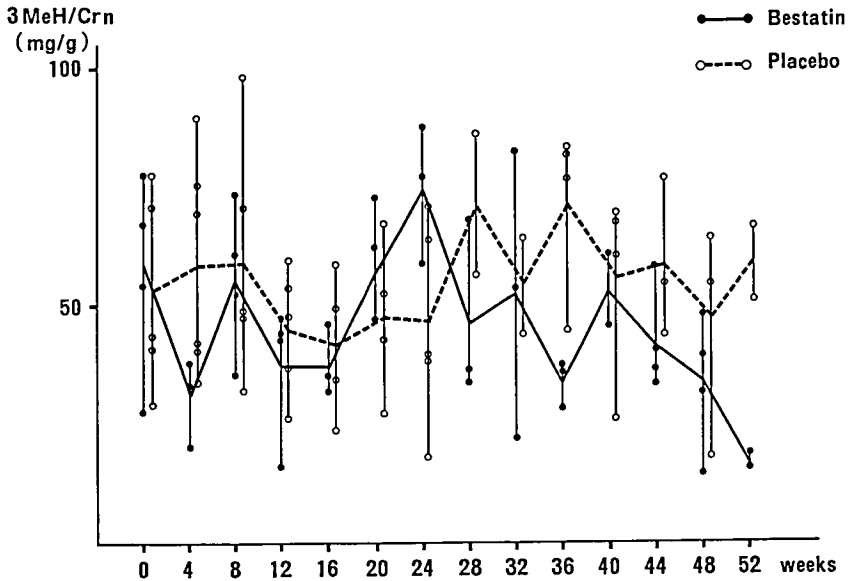


図3 Changes in mean excretion rate of 3-MeH/Crn

表1 対象および投与方法

CASE	AGE	STAGE	DOSE
Bestatin			
1. KF	4 y 3 m	I	150mg/day
2. MU	4 y 10m	I	150mg/day
3. SH	5 y 7 m	I~II	300mg/day
4. KT	6 y 2 m	I	300mg/day
Placebo			
1. HF	3 y 5 m	I	
2. SM	4 y 9 m	I~II	
3. KS	4 y 11m	I	
4. DM	5 y 2 m	I	
5. TT	6 y 3 m	I~II	
6. KO	6 y 10m	I~II	

考 察

筋ジストロフィー症のように進行性の経過をたどる疾患において、特に対症的な治療を行う場合、その評価をどのように行なうかは常に問題となるところである。特に評価期間が短く機能的な判定が困難な場合、確かな指標となるものが不可欠である。ベスタチンの投与においては、現在までの報告では血清CKの値は著変ないことが示されており、それに変わる客観的な指標が要求されると思われる。3MHはアクチンやミオシンの分解中に存在するメチル化したヒスチジン残基であり、蛋白合成に再利用されずそのまま尿中に排泄される。そのため尿中3MHの測定は筋蛋白の崩壊を直接反映するものと考えられている。現在までの報告では尿中3MHの75~90%は筋肉組織に由来するものと考えられ、3MH量と筋肉蛋白量との相関が示されている。また尿中クレアチニン量が筋肉量を反映するものとして3MHをクレアチニンで割った値は筋組織の直接の異化率を表わすと考えられるほか、血清CK値のように病勢の進行につれて低下せず、ほぼ一定の値を取ることも報告されており、薬剤効果の判定の指標としては好ましいと考えられる点も多い。ただ内因性の3MHの

ることは出来なかった。検体数が少ない週もあるため服薬後3カ月毎の群間比較で再度検討した(図5, 図6)。全体としてベスタチン群では服薬前値より低い値を示しており(-0.5~-20.1 mg/gCreatinine)、プラセボ群では服薬前値とほぼ同じか高値を示していた(-7.6~+14.5 mg/gCreatinine)。

血清CK値との関係では特に相関は見られなかった(図7)。

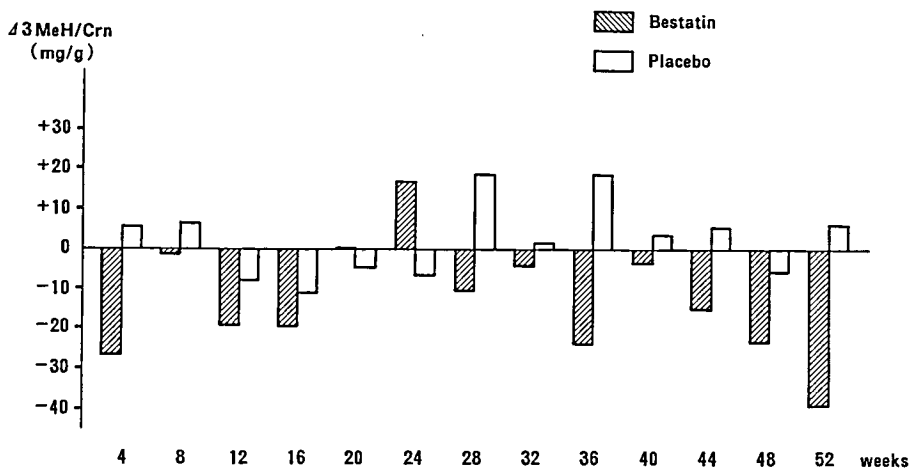


図4 Comparison of mean excretion rate of 3MeH/Crn before and during administration of drugs

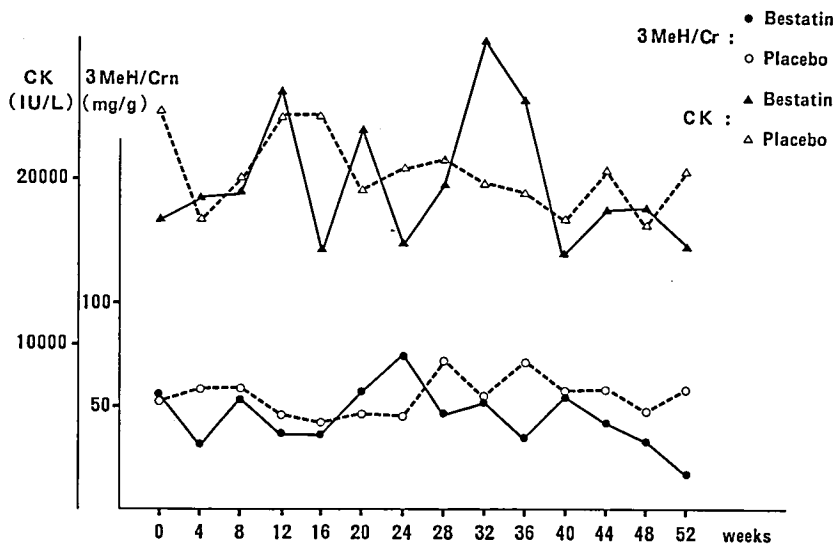


図5 Changes in mean excretion rate of 3-MeH/Crn (3month mean)

測定のためには、約3日間の魚肉禁止、24時間蓄尿が必要とされるため外来での検査として行なうには無理があった。今回の我々の結果では、クレアチニン1mg/ml以上の濃縮尿は省くこととし、24時間の食事制限を行ない、もし摂取が明らかで3MHの値がかなり高値を呈しているときはその値をカットする事で比較的安定した結果が得られたように思われた。今後食事に関しては軟体類、甲殻類は2日間、他の魚肉類は一日間の禁止とすること

とし、さらに検体量を増やすことで外来で行なえる簡易な検査法として有用ではないかと考えられた。

ベスタチン投与における3MHの測定の結果からは、有意差は無かったもののプラセボ群に比して投与前値より低下する傾向が窺われ、特に10か月を過ぎたころより明らかなように思われた。今までの報告からも、本剤の作用はかなり緩徐なものと思われるが、1年以上の長期的な投与における検索も興味を持たれるものと思われた。

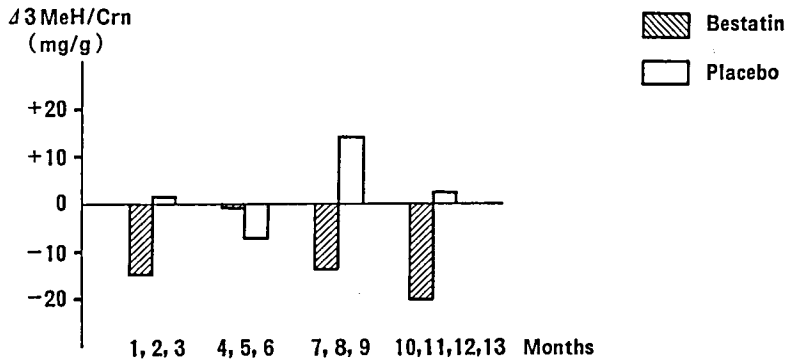


図6 Comparison of mean excretion rate of 3MeH/Crn before and during administration of drugs (3month mean)

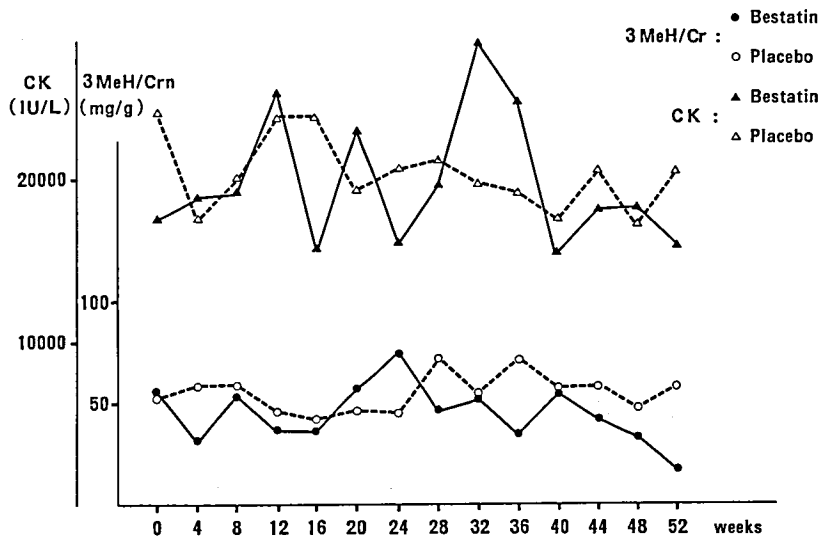


図7 Time course of urinary 3MeH/Crn and serum CK levels

文 献

- 1) McKeran, R.O., Halliday, D. et al: Clin. Sci. Mol. Med., 54: 471-475, 1978.
- 2) Tomas, F.M., Ballard, F.J. et al: Clin. Sci., 56: 341-346, 1979.
- 3) Stewart, P.M., Walser, M. et al: Muscle Nerve, 5: 197-201, 1982.
- 4) Mussini, E., Cornelio, F. et al: Muscle Nerve, 7: 388-391, 1984.
- 5) 熊谷俊幸, 竹内達生ら: 脳と発達, 16: 445-449, 1984.

ベスタチンの使用経験

——九州地区 5 歳以下の対象例について——

三吉野 産 治 *

研究協力者 江 田 伊勢松 *

はじめに

我々は進行性筋ジストロフィー症、特に Duchenne 型筋ジストロフィー症（以下 DMD と略す）の治療開発として NK421（以下ベスタチン）の臨床的研究を担当してきた。過去においては、ベスタチンを投与するにあたり、血中濃度を測定し、人では 1 日 3 回投与、1 日 300mg が可能であること、又その効果判定のための 10m 走行時間、床面よりの立ちあがり時間の必要性などを指摘してきた。62 年度よりは 5 歳以下の DMD 児に対して、過去と同様のプロトコールに従った二重盲検比較を実施している。今回はその二重盲検試験の九州地区の実施状況につき、若干の検討を加え報告をする。

対象および方法

被験薬として 1 包中ベスタチン 50mg 含有の細粒剤を 1 日 3 回、計 150mg を服薬させる。対照薬としては乳糖細粒剤を用いる。その他も実施要領に従った。九州地区の症例は総計 10 名であり、全て男児である（表 1）。その内わけは 3 歳以下が 5 例、4 歳～5 歳が 5 例である。本研究参加協力施設は国立療養所沖繩病院、熊本大学発達小児科、大分医科大学小児科、久留米大学小児科、福岡大学小児科、福岡子供病院である。登録症例のうち、熊本大学発達小児科の症例は 63 年 4 月の試験開始となっている。

表 1 九州地区登録症例

登録施設名	登録症例数		
	～3才	4～5才	合計
国立療養所沖繩病院	2	1	3
熊本大学医学部小児発達科	(2)	0	(2)
大分医科大学小児科	1	0	1
久留米大学医学部小児科	0	2	2
福岡大学医学部小児科	0	1	1
福岡市立子供病院感染症センター	0	1	1
合計	5	5	10

（ ）：4 月試験開始症例

結 果

表 2 は発達小児科の 2 例を除く、8 例の試験開始時の背景である。DMD として診断が確定あるいはほぼ確定している症例は 8 例中 7 例である。年齢構成は先に述べたので省略する。初発症状は運動発達遅滞が 3 例と最も多く、ころびやすい、歩行異常、仮性肥大、筋萎縮が各 1 例であった。既往症では腎盂腎炎、股関節開排制限、けいれん発作が各 1 例に認められた。合併症としては自閉的傾向をもつものが 1 例存在した。8 例中全てはその 5 歳以下という年齢よりみて外来通院であった。機能障害度は軽く、stage 1 が 2 例、stage 2 が 6 例であった。

次に試験開始時のプロトコールの項目より、いくつかの項目を抜き出したものが表 3 である。そ

* 国立療養所西別府病院

表2 試験開始症例の背景

項 目		例数	項 目		例数		
診断確定度	確定	5	既往症	無し	5		
	ほぼ確定	2		有 り		腎盂腎炎	1
	記載無し	1				股関節開排制限	1
年齢	2 歳	1	強直性発作		1		
	3 歳	2	合併症	無し	7		
	4 歳	3		有り		自閉症	1
	5 歳	2	診断区分	外来	8		
初発症状	運動発達遅滞	3		入院		0	
	易転倒性	1	機能障害度	stage 1	2		
	歩行異常	1		stage 2	6		
	仮性肥大	1					
	筋萎縮	1					
	記載無し	1					

表3 試験開始時の値

項 目	平均値±標準偏差(症例数)		
	3歳以下	4～5歳	
体 重(kg)	12.8±0.5 (3)	15.5±1.7 (5)	
身 長(cm)	90.0±2.4 (3)	98.7±5.8 (5)	
10m走行時間(秒)	9.2±1.5 (3)	8.1±3.3 (5)	
階 段	昇り時間(秒)	26.0±12.6(3)	16.2±5.8 (5)
	降り時間(秒)	23.3±8.7 (3)	13.1±5.7 (5)
起立時間(秒)	8.8±0.9 (2)	6.0±2.6 (5)	
G O T(U)	272±52 (3)	284±97 (5)	
Aldolase (U)	127±55 (3)	117±40 (3)	
L D H (U)	2,017±1,335(3)	2,695±952(5)	
C P K (U)	11,432±13,699(3)	10,555±9,160 (5)	

それぞれの値を3歳以下、4～5歳と分けてある。体重および身長は当然3歳以下が小さいものとなっている。以下10m 走行、階段昇降、起立時間の3項目には両者間の差はない。さらにGOT, Aldolase, LDH, CPKの各生化学的項目にも両者間の差異はないと思われる。

考 案

今回は九州地区におけるNK421投与筋ジストロフィー症児の登録状況および投与開始時のその背景を報告した。投与開始より期間がまだ浅く、その後のデータは現在加算中である。又今回の結果は全国集計されるべきものであり、その結果がまたれる。ただ九州地区の登録背景をみると、やはり外来通院が全てであり、療養所は沖縄病院を除くと認められず、DMD児低年齢層の診療区分を明確に示しているものと推測される。

フォルフェンシノールの筋ジストロフィー症に 対する効果(第2報)

村上慶郎*

研究協力者 岡崎 隆* 林 英人*
斎藤 有* 馬場 繁二*

はじめに

私どもは昭和62年度に引き続き、フォルフェンシノールを Duchenne 型筋ジストロフィー症に使用して、長期間投与の効果を検討した。

対象および方法

年齢は5～9歳でフォルフェンシノールの投与量は50～150mg/dayで、使用期間は46週から112週であった。

検査は、一般血液検査、CK等の血清酵素を含む血清生化学的検査、尿検査を行い、更に握力、立ち上がり時間等の運動機能を含む臨床症状をチェックした。

結果(表1)

9例中5例が歩行不能となった。残りの3例は歩行可能であったが、一例を除いては立ち上がり時間は増加していた。体重は、症例1, 4, 9は歩行不能になった後急速に増加してきたが、歩行可能である症例2, 5, 6, 8は余り増加しなかった(図1)。

CKは前回述べたように投与後、一時減少するものが多かったが、その後は薬物の影響としての一定の傾向は見られなかった。歩行不能時には低下していた。立ち上がり時間については、歩行不能になる前に、急速に悪化するものが多かった。

症例1は、使用前3.92秒から69週後には16.6秒

表1 Duchenne 型筋ジストロフィー症に対するBF-121の効果

No.	症例	年齢(開始時) 歳	体重(開始時) kg	(現在) kg	投与量 mg/day	投与期間 週	CKの動き unit/l	起立時間の動き 秒	効果	副作用
1.	N.T.	8	26	36	50→100	69	10840→2095	3.92→不能	進行	—
2.	D.I.	8	25	27	50→150	88	8962→6918	2.28→4.06	進行	—
3.	K.K.	9	32	33	50→150	104	3898→2774	16.15→不能	進行	—
4.	K.M.	6	20	26	50→100	92	14630→6821	5.92→不能	進行	—
5.	S.O.	5	18	17	50	72	7314→4332	4.84→5.32	進行	—
6.	H.K.	7	24	25	50→150	96	14750→6297	3.56→10.58	進行	—
7.	A.S.	7	19	22	50→150	112	8660→4974	4.41→不能	進行	—
8.	T.S.	5	16	17	50→150	46	11466→8217	3.42→3.32	—	—
9.	S.O.	7	20	22	50→150	48	6909→4104	7.62→不能	進行	—

* 国立療養所箱根病院

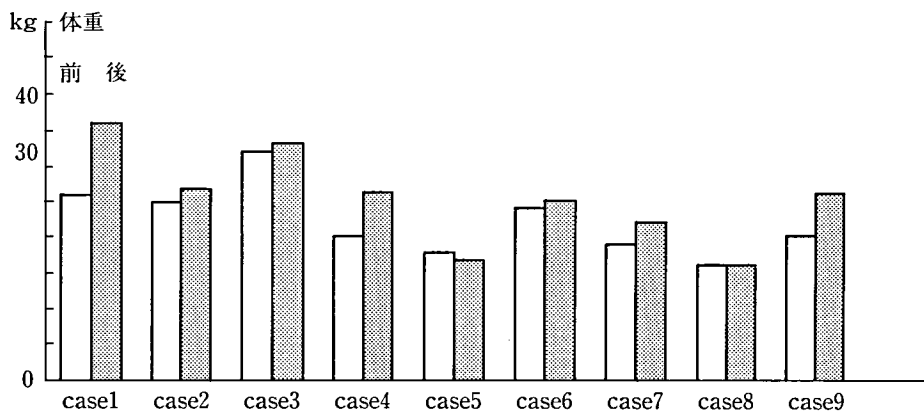


図1 体重の推移



図2 立上がり時間 (症例1)

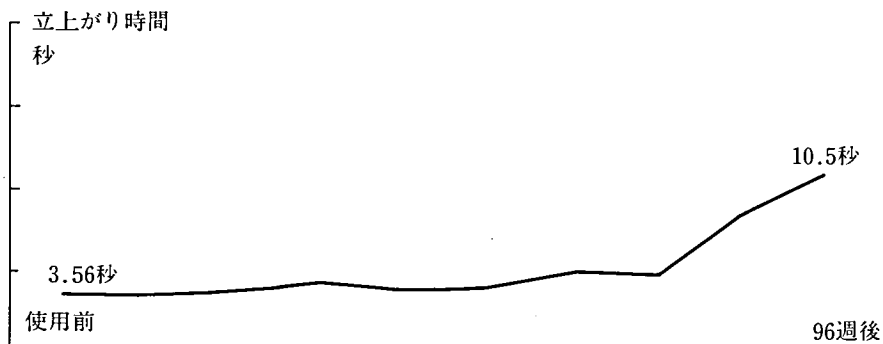


図3 立上がり時間 (症例6)

で、4週後に来院した時は起立不能になっていた(図2)。

症例6は、使用前3.56秒から96週後10.6秒となっていたが現在なお歩行可能である(図3)。

次に右手の握力の変化は図4に示すごとくである。症例1と6に増加が見られたが、残りは減少か使用前値にとどまっていた。

図5はフォルフェンシノール使用前の一年間お

単位: kg

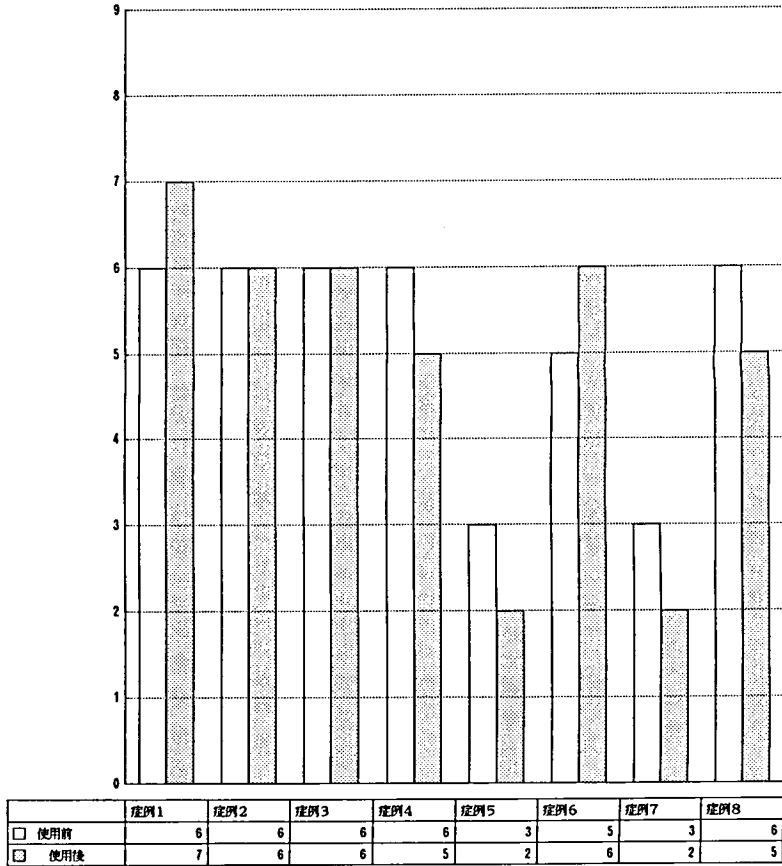


図4 BF-121使用に因る握力の変化(右手)

よび使用開始後一年間の感冒の罹患回数である。症例10, および11は歩行不能の車椅子患者で14歳と16歳でかなり重度であり, 使用量は50mg/dayであった。

症例1は使用前は年間3回の感冒罹患から使用により年間2回となり, しかも軽症であった。

症例2は年間5回の感冒罹患から使用により年間3回と減少し, しかも軽症であった。

症例10はフォルフェンシノール50mg/dayの使用であったが年間2回の感冒罹患から, 使用により全く罹らなくなった。

11例中, 9例に感冒の罹患回数の減少を見た。また罹っても軽度であることが多かったと, フォルフェンシノールを使用した患者全てが述べていた。

臨床検査成績では, 血清酵素以外は特別な異常値を認めず, 副作用も特に認められなかった。

考 案

Duchenne型筋ジストロフィー症に対して, 種々のプロテアーゼ阻害剤の使用が試みられているが, フォルフェンシノールもプロテアーゼ阻害作用を有するものの一つである。

今回私どもは前年度に続いて, フォルフェンシノールを Duchenne型筋ジストロフィー症に長期間使用して効果を検討したが, 臨床面を主としたこの様な方法では, 効果をはっきりと示すことは出来なかった。しかし, 感冒罹患回数は著明に減少し, かつ罹患しても軽症で終わる例が多く見られた。

単位：一年間の回数

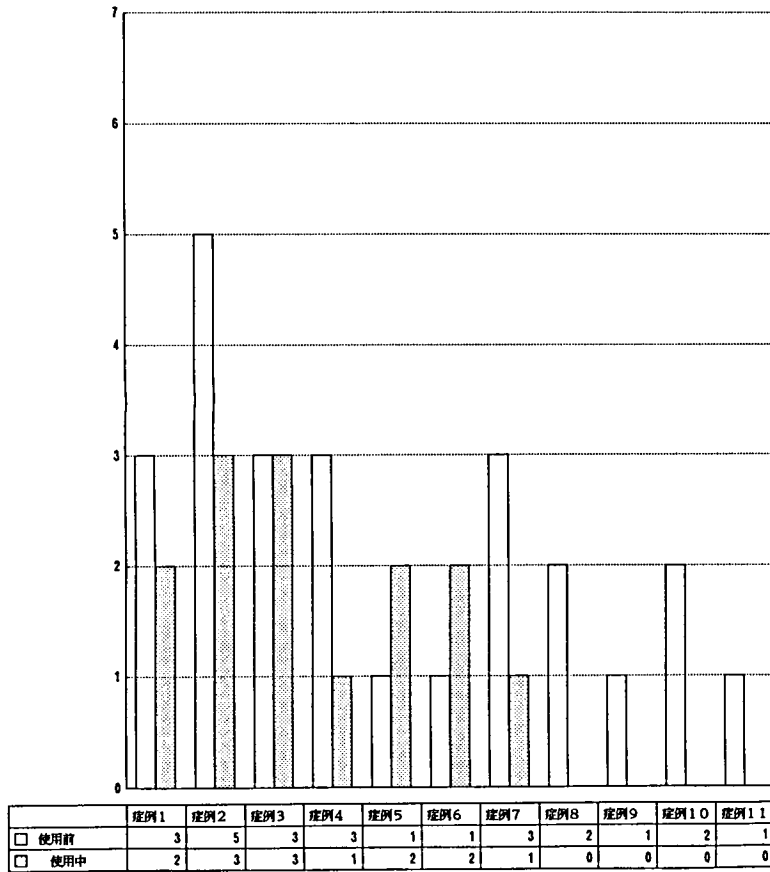


図5 BF-121使用後の感冒罹患回数

進行性筋ジストロフィー症、特に Duchenne 型筋ジストロフィー症は、死因として呼吸不全によるものが多く、呼吸不全の原因としての呼吸器感染症の予防・治療は非常に重要な問題である。

また Duchenne 型筋ジストロフィー症の歩行不能になる要因として、感冒等の呼吸器感染症による臥床の後、歩行不能に陥る事が多く、臥床期間を出来るだけ短期間にする事が望ましい。

フォルフェンシノールは、免疫抵抗を増強することが動物実験で証明されており、ヒトに対しても免疫性疾患に効果を示す可能性があり、今後の検討が必要である。このフォルフェンシノールの Duchenne 型筋ジストロフィー症に対する感冒の罹患回数の減少、症状の軽症化は、免疫抵抗の増

強作用によるものと思われるが、更に検討が必要である。

結 語

1. 9例の歩行可能な Duchenne 型筋ジストロフィー症に対してフォルフェンシノールを長期間投与して、その効果を検討した。
2. 臨床的には、Duchenne 型筋ジストロフィー症の運動機能には特別の効果は見られなかった。
3. 認むべき副作用は見られなかった。
4. Duchenne 型筋ジストロフィー症の感冒の罹患に対して予防効果が認められた。

ベスタチンの筋ジストロフィーに対する臨床効果に関する研究

木下真男*

研究協力者 里吉栄二郎** 福山幸夫***
三吉野産治**** 村上慶郎*****

ベスタチンが筋ジストロフィーの治療薬剤たり得るか否かについては、既に昭和56年以来研究が続けられている^{1)~3)}。動物モデルに対してはかなりのはっきりした効果が報告されている⁴⁾にもかかわらず、臨床例についてはそれほど明確な成績は得られていないのが現状である。これはもちろん筋ジストロフィーが長期経過を有する疾患であり、本来短時日での治療効果を示し得る性質のものではないためにもよるが、またひとつには投与対象としている疾患が多岐にわたるためと、投与方法、期間、効果判定法などが研究者毎に不定であるためなどもある。そうした意味から、対象を筋ジストロフィーのうち Duchenne 型にしぼり、また投与方法、評価方法を一定にした全国規模での研究が要求され、昭和60年⁵⁾以来多施設協同の研究が行われた。その結果、幼児 Duchenne 型について若干の有効性が示唆されたので、61年度から本年度にかけて、表1に示すような施設の症例について対照群を設定しての群間比較試験を行った。昨年度研究報告書には9ヶ月終了までの集計を記載したが、今回1ヶ年間治療継続後の成績が集計されたので以下に報告し、且つそれ以後の研究方針について簡単にまとめた。

1. 1年間投薬による群間比較試験

症例と方法

前回の報告書に記した通り、表2に示した症例

表1 群間比較試験参加施設

国立療養所八雲病院	南良二
国立療養所西多賀病院	佐藤元
国立精神・神経センター	里吉栄二郎
東京女子医科大学	福山幸夫
東邦大学医学部大橋病院	木下真男
国立療養所箱根病院	村上慶郎
国立療養所中部病院	祖父江逸郎
国立療養所鈴鹿病院	飯田光男
国立療養所宇多野病院	西谷裕
国立療養所刀根山病院	姜進
国立療養所徳島病院	松家豊
愛媛大学医学部	小川暢也
国立療養所原病院	亀尾等
国立療養所西別府病院	三吉野産治
熊本大学医学部	三池輝久
鹿児島大学医学部	井形昭弘

を対象とし、A群に対しては150mg/日、B群に対しては300mg/日のベスタチンを投与、各群の対照群には外観からは識別不能な剤型とした乳糖を投与した。52週連続投薬後、前回通りの方法で両群の比較を試みた。

また、前回若年児ほど効果があらわれやすい傾向が散見されたので、今回は上記A、B群の分け方とは別に、3歳以下、4~6歳、7歳以上の3群に年齢層を分け、それぞれ対照群との比較も行ったのであわせて報告する。

A、B2群の分け方においては、A群において階段昇り姿勢、階段降り時間、20m走行時間など

* 東邦大学医学部第四内科
** 国立精神・神経センター
*** 東京女子医科大学
**** 国立療養所西別府病院
***** 国立療養所箱根病院

二、三の検査項目で薬剤群と対照群の間に有意差が見られ、総合改善率でもA群で有意な成績が得られた(表3)。また血清CPKはB群において有意な低下を示した。しかしその他の値はあまり大きな変動はなく、僅かに薬剤の効果はうかがえる

ものの影響はあまり明らかではなかった。これに對して3歳以下、4～6歳、7歳以上の3群に分けての検討では、階段降り姿勢、同昇り姿勢、上肢挙上運動(図1)、上腕三頭筋腱反射、橈骨反射、膝蓋腱反射(図2)の各項目で3歳以下は有

表2 対象症・例

登録症例			
ベスタチン		プラセボ	
A群	B群	A群	B群
25	35	27	40

除外症例				解析症例			
ベスタチン		プラセボ		ベスタチン		プラセボ	
A群	B群	A群	B群	A群	B群	A群	B群
2	2	2	3	23	33	25	37

A群：4才以下

B群：5～7才

除外理由

- ① Duchenne型でない症例
- ② 試験開始時に独歩不可能な症例

表3 A・B両群の1年服薬後の総合判定

A群 12ヶ月

薬剤	改善	不変	軽悪	中悪	著悪	計	改善率	χ^2	悪化率	χ^2
NK 421	10	10	1	2	0	23	43%	P<0.1	13%	NS
プラセボ	5	18	1	1	0	25	20%		8%	

B群 12ヶ月

薬剤	改善	不変	軽悪	中悪	著悪	計	改善率	χ^2	悪化率	χ^2
NK 421	3	8	11	7	4	33	9%	NS	67%	NS
プラセボ	5	7	12	11	1	36	14%		67%	

分類値の変動

— : ベスタチン群 - - - : プラセボ群

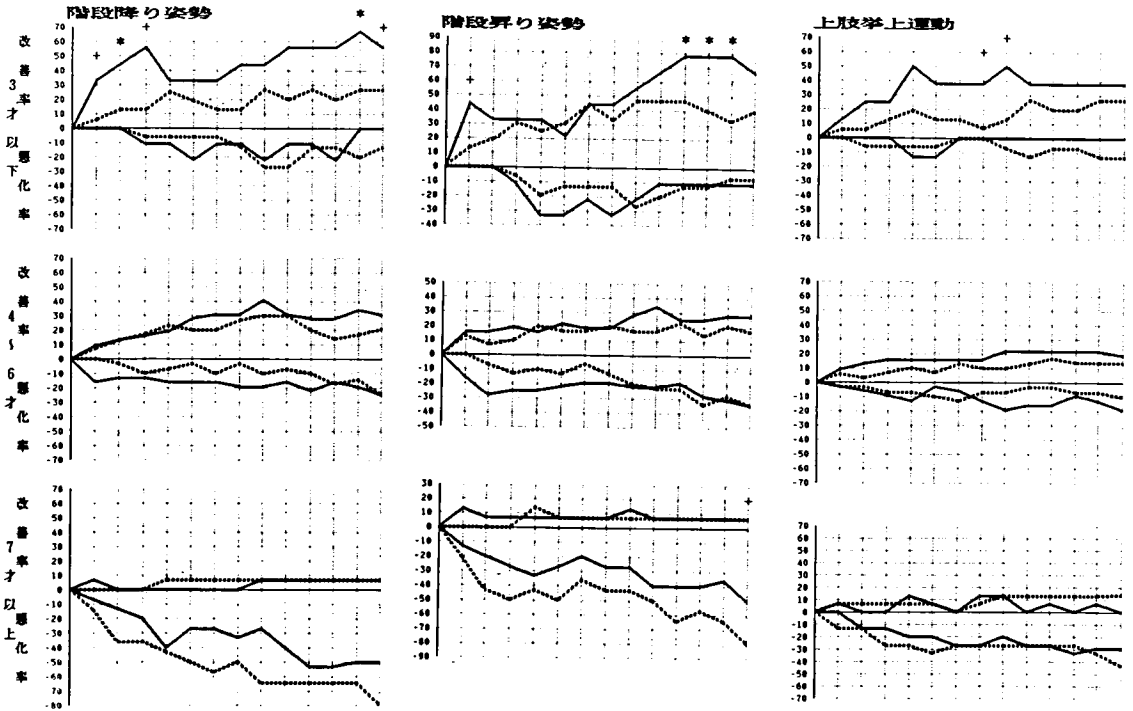


図1 年齢別臨床所見の変化(1)

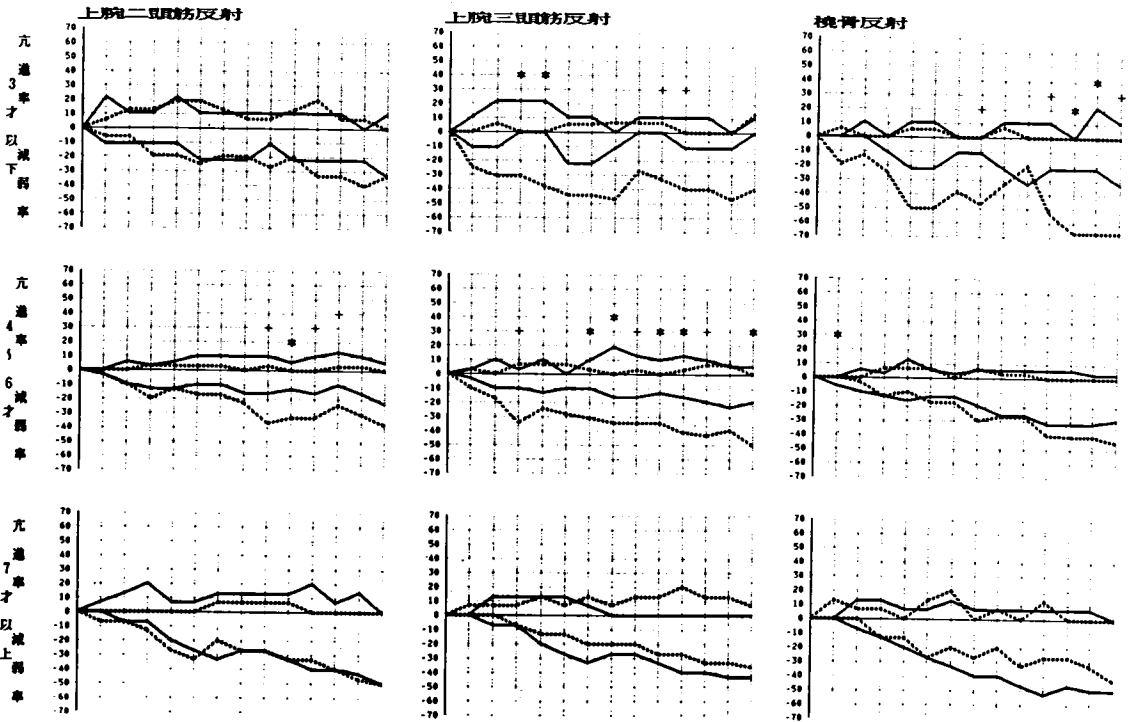


図2 年齢別臨床所見の変化(2)

意に対照に優り、また腱反射の保持は4～6歳でも見られた。また階段降り時間でも3歳以下で有意(図3)、肺活量は4～6歳で有意差が見られた(図4)。検査値では血清CK値が3歳以下、4～6歳で投与開始3ヶ月で有意の低下を示している(図5)。

2. ベスタチン二重盲検試験

以上の群間比較試験の結果、幼若例において効果があらわれ易いとの印象が得られたので、更に年令を下げた症例群において以下の要領でベスタチンの二重盲検試験を行うこととした。

対象疾患

進行性筋ジストロフィー症のDuchenne型と診断された5歳以下の独歩可能な患者を対象とした。

薬剤

試験薬剤：NK421ドライシロップ

(1包中ベスタチン50mg含有)

対照薬：プラセボドライシロップ

(マンニトールを調整)

但し、味・におい・色・剤型などにより両剤を識別することは困難であることはコントローラーにより確認されている。

薬剤割付

薬剤はコントローラーが無作為に薬剤番号1～60番, 61～120番でそれぞれNK421群, プラセボ群が同数になるように割り付けた。

キーコードは密封され、試験終了までコントローラーが保管する。

登録

試験担当医師は、患者が対象として適格である

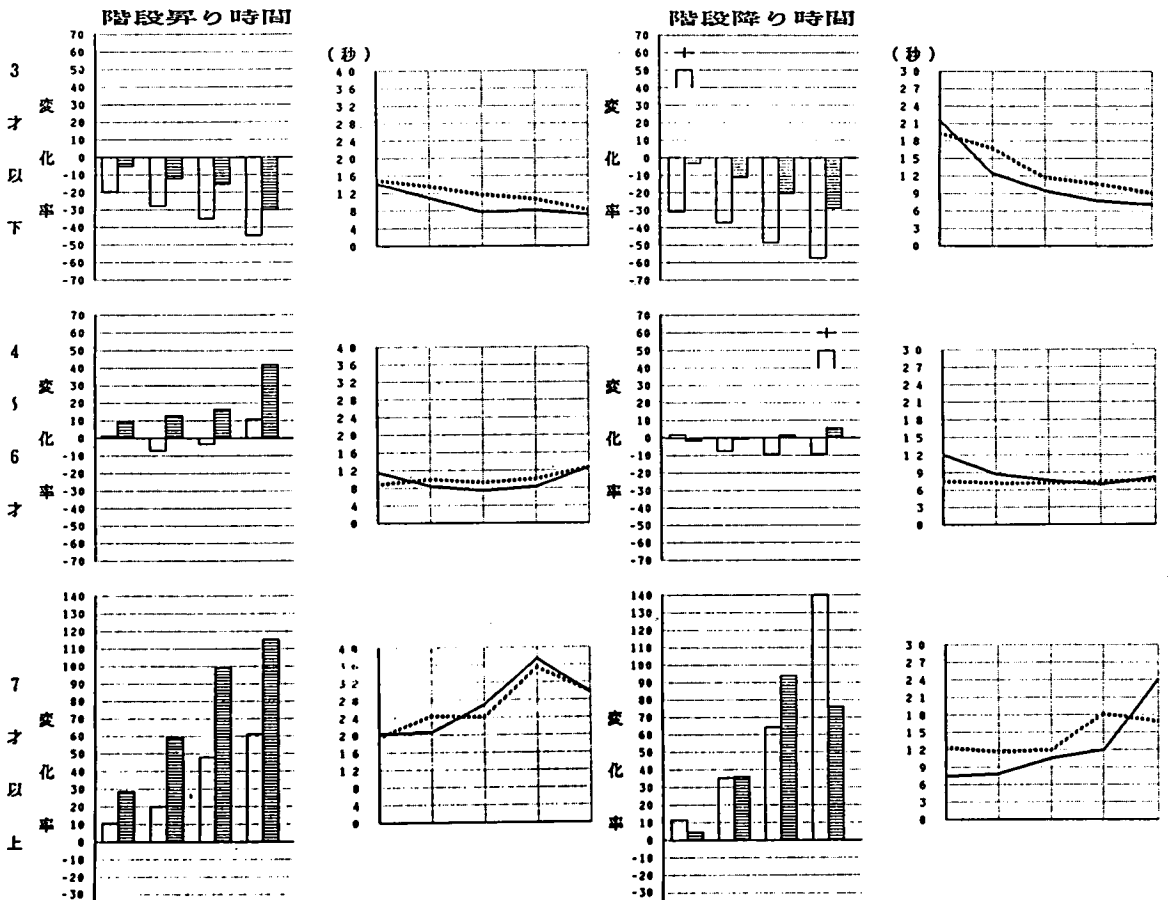


図3 年齢別臨床所見の変化(3)

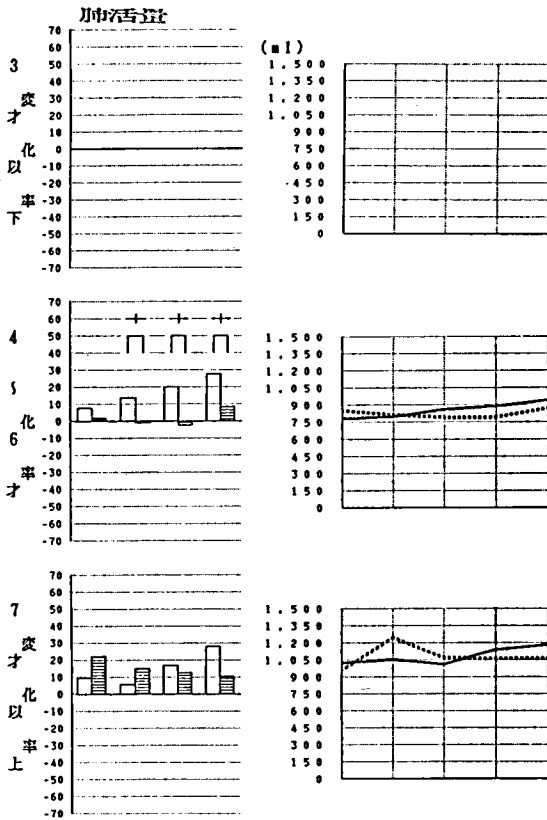


図4 年齢別臨床所見の変化(4)

ことを確認し、保護者に試験参加の承諾を得た後、登録センターに登録する。登録センターは4～5歳は薬剤番号1番より60番まで、3歳以下は薬剤番号61番より120番まで登録順に割り付け、該当する番号の薬剤を発送する(登録期間 昭和62年9月～昭和64年8月)。

投与方法

用法・用量：1回1包，1日3回食後投与する
投与期間：52週間(364日)

全国に表4の世話人を置き、現在までに表5の登録症例を得て、試験を開始している現状である。

おわりに

ベスタチンは現在までの多数の使用例において重篤な副作用は全く見られず、安全性では問題のない薬剤と考えられる。今回の二重盲検試験で投薬による直接の影響を検討すると共に、幼時に本剤を服用した患児の病情がその後どのような推移を示すか、長期の追跡調査も極めて重要と考えている。

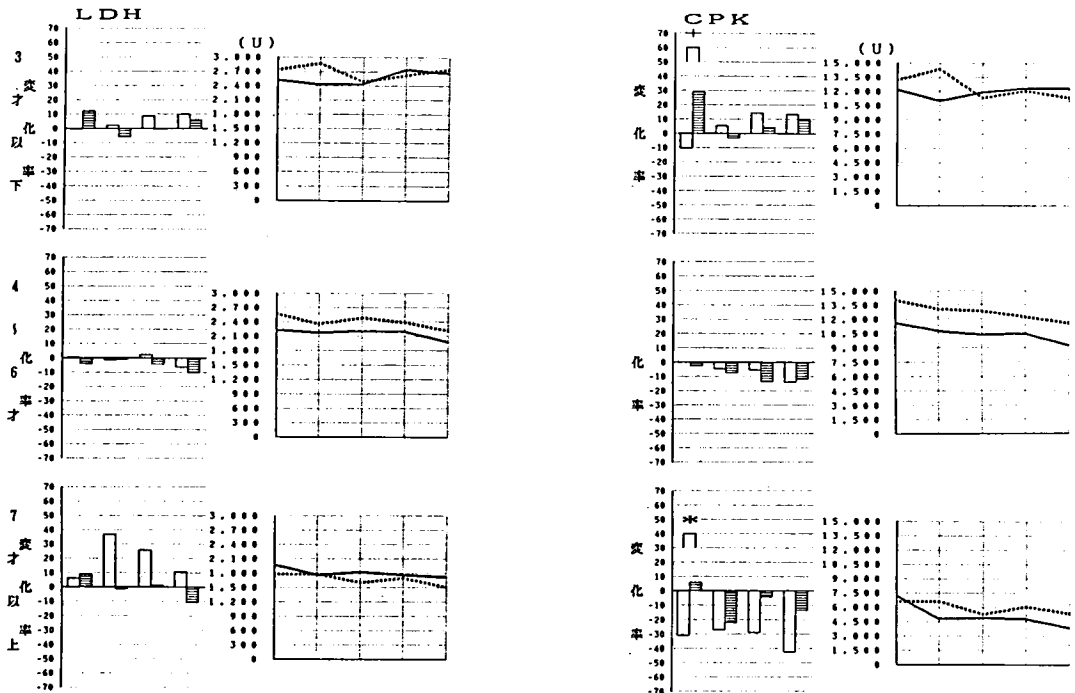


図5 年齢別臨床所見の変化(5)

表4 二重盲検試験全国世話人

治験代表者	里吉 栄二郎	国立精神・神経センター
コントローラー	小川 暢也	愛媛大学医学部薬理学教室
事務局	木下 真男	東邦大学医学部大橋病院
評価委員	福山 幸夫	東京女子医科大学小児科
評価委員	西谷 裕	国立療養所宇多野病院
北海道地区	南 良二	国立療養所八雲病院
東北地区	佐藤 元	国立療養所西多賀病院
関東地区	村上 慶郎	国立療養所箱根病院
中部地区	飯田 光男	国立療養所鈴鹿病院
関西地区	高橋 桂一	国立療養所兵庫中央病院
山陽地区	亀尾 等	国立療養所原病院
山陰地区	竹下 研三	鳥取大学医学部脳研
四国地区	松家 豊	国立療養所徳島病院
九州地区	三吉野 産治	国立療養所西別府病院

表5 二重盲検試験参加施設と対象症例

昭和63年3月10日現在

施設名		登録症例数			施設名		登録症例数			
		～3才	4～5才	計			～3才	4～5才	計	
1	国立療養所八雲病院	1	5	6	18	国立療養所原病院	6	2	8	
2	国立療養所西多賀病院	5	5	10	19	鳥取大学医学部付属脳幹性疾患研	5	3	8	
3	国立療養所岩木病院	1	2	3			20	愛媛大学医学部小児科	2	3
4	東京女子医科大学小児科	8	2	10	21	高知医科大学小児科	1	0	1	
5	国立精神・神経センター	0	7	7	22	国立療養所徳島病院	0	1	1	
6	都立神経病院	2	4	6	23	高知県立小鹿園	1	0	1	
7	国立療養所箱根病院	3	2	5	24	国立療養所沖繩病院	2	1	3	
8	国立療養所鈴鹿病院	1	3	4	25	久留米大学医学部小児科	0	2	2	
9	名古屋市立東市民病院	0	2	2	26	大分医科大学小児科	1	0	1	
10	福井医科大学第2内科	0	1	1	27	熊本大学医学部小児発達科	2	0	2	
11	浜松医科大学第1内科	0	1	1	28	福岡大学医学部小児科	0	1	1	
12	市立岡崎病院	1	0	1	29	福岡市立子供病院感染症センター	0	1	1	
13	国立療養所刀根山病院	3	4	7	計			51	60	111
14	国立療養所兵庫中央病院	1	4	5						
15	国立療養所宇多野病院	4	1	5						
16	神戸市立中央市民病院	1	2	3						
17	国立療養所西奈良病院	0	1	1						

文 献

- 1) 木下真男：筋障害に対するベスタチン，ロイペプチンの影響。——実験的および臨床的検討。厚生省新薬開発研究費・微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）の開発研究，梅沢班昭和56年度研究報告書，1982，p. 77.
- 2) 村上慶郎：種々の筋萎縮症患者に対するロイペプチン，ベスタチンの効果。厚生省新薬開発研究費・微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）の開発研究，梅沢班昭和56年度研究報告書，1982，p. 73.
- 3) 祖父江逸郎：Duchenne型進行性筋ジストロフィー患者に対するロイペプチン，ベスタチンの影響。厚生省新薬開発研究費・微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）の開発研究，梅沢班昭和56年度研究報告書，1982，p. 85.
- 4) Tsuji, S. and Matsushima, H. : Successful treatment of murine muscular dystrophy with the protease inhibitor bestatin. *J. Neurol. Sci.*, 72 : 183, 1986.
- 5) 木下真男他：Duchenne型進行性ジストロフィーに対するベスタチンの効果。厚生省新薬開発研究費・微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）の開発研究，梅沢班昭和61年度研究報告書，1987，p. 127.

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の臨床経過： EST 投与群での検討

宮 武 正*

研究協力者 桑 原 武 夫* 湯 浅 龍 彦* 山 崎 元 義**
石 原 傳 幸*** 中 野 今 治**** 本 家 一 也*****
杉 田 秀 夫*****

はじめに

近年わが国において厚生省新薬開発事業研究班が組織され、ベスタチンや E-64 による治療が開始された。E-64 研究班では昭和 59 年度より第二相臨床試験が開始された。我々も第二相臨床試験の開始時より E-64 (以下 EST) 治験に関与し、日常生活動作能力 (以下 ADL)、徒手筋力検査 (以下 MMT)、creatin kinase (以下 CK) 値、3-MeH/Cre 比などの指標を用いて検討してきた¹⁾。

今回は EST が DMD の ADL の推移に及ぼす影響についてこれまでの治療経過について報告する。

対象と方法

対象は国立療養所新潟病院・東埼玉病院・下志津病院・医王病院の 4 施設に入院 (一部外来通院) 中の DMD 児 (全例男子) 73 例で、詳細は以下に示す如くである。すなわち、年齢は 3 歳 6 カ月～18 歳 10 カ月 (平均 10 歳 6 カ月 ± 3 歳 1 カ月)、ステージ I 7 例、II 23 例、III 3 例、IV 14 例、V 18 例、VI 9 例である。

投与開始時体重は 11.9～55.0kg (平均 26.2 ± 8.72kg) で、EST の投与量は体重あたり 4mg を 4

週間投与し、副作用が無いことを確認した後に 8mg に増量した。

観察期間は 8 カ月から 3 年 3 カ月 (平均 1 年 11 カ月 ± 11.4 カ月) である。

対照群 (以下非投与群と略す) は DMD 172 例の historical data を用いた。ADL の観察開始時年齢 6 歳 2 カ月～28 歳 2 カ月で各症例の観察期間は 1 カ月～11 年 5 カ月 (平均 5 年 8 カ月) でこの間の sampling point は 1～60 (平均 33 points) である。

方法としては①非投与群の ADL の経過と EST 投与全症例の経過の対比、②観察開始時の ADL が 50 点以上であった非投与群 (n=40) と EST 群 (n=40) の経過の比較を行なった。

ADL は厚生省研究班制定のものを用いた。

結 果

非投与群の ADL の経年変化を図 1-A に、そしてその平均 ± 標準偏差値 (M ± SD) を図 2-B に示す。昨年度の本班会議にて示した如く ADL の推移は症例によって異なるがほぼ 10 歳前後で 50 点を割った (歩行不能となった)²⁾。

EST 群の ADL の推移を図 2-A に、そしてその M ± SD を図 2-B に示す。推移の傾向は非投与群と同様で暫時減少するが 50 点を割る時期は 11 歳前後であった。

EST 群と非投与群の ADL を比較したものを図 3 に示す。ADL 値は観察開始時期は両群の間に差異を認めなかったが、加齢により指数関数的に

* 新潟大学脳研究所神経内科
** 国立療養所新潟病院
*** 国立療養所東埼玉病院
**** 国立療養所下志津病院
***** 国立療養所医王病院
***** 国立精神・神経センター

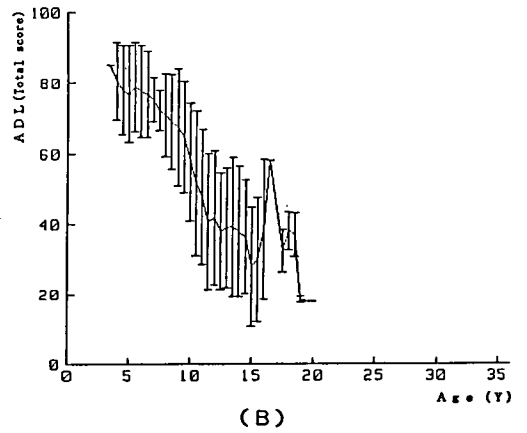
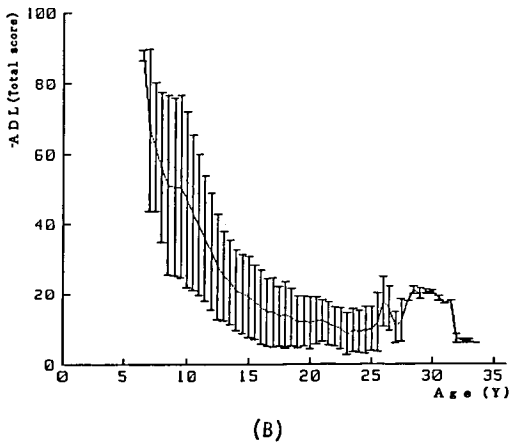
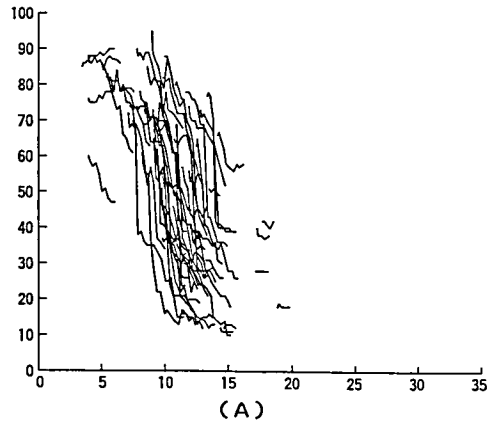
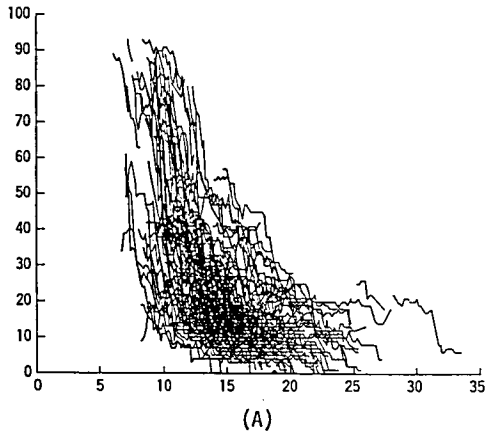


図1 EST 非投与群の ADL の経年推移。
(A) 個々の推移と (B) その Mean±SD

図2 EST 群の ADL の経年推移。
(A) 個々の推移と (B) その Mean±SD

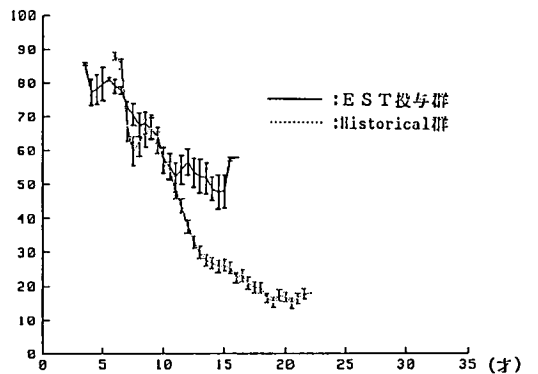
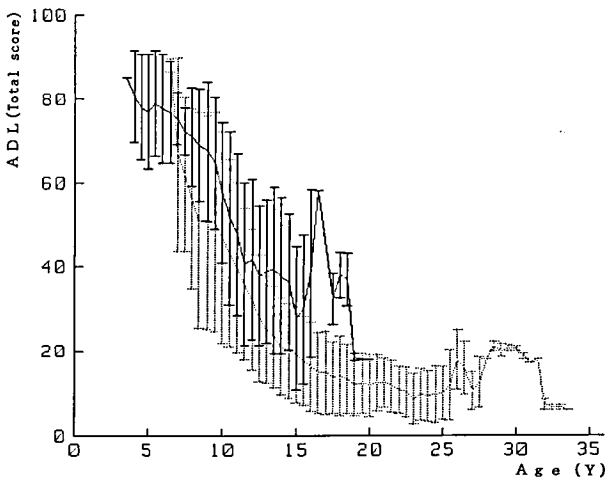


図3 EST 非投与群 (.....) と EST 群 (—) の ADL の経年推移 (Mean±SD).

図4 観察開始時に歩行可能であった症例の ADL の推移。[.....: EST 非投与群, —: EST 群 (Mean±SE)]

低下した。歩行不能に陥る時期は、非投与群ではほぼ10歳前後であったが、EST 群ではほぼ11歳前後であった。また全ての観察点でEST 群は非投与群に比し高値を示したが両者間には有意の差は認められなかった。

観察開始時に歩行可能であった症例（すなわちADL50点以上）のADLの推移を図4に示す。EST 群と非投与群ともにADL50～60点までは指数関数的に低下するが、その後も非投与群ではADLの低下がさらに続き10点まで低下した。いっぽう、EST 群では減少が緩やかな傾向があり、さらに60～50点以降低下が停滞する傾向が見られた。

まとめと考察

今回、約2年間のESTのopen studyの結果をADLの推移について示した。

EST 非投与群のADLの経年推移は昨年度の本学会議で報告したごとく症例によって異なり、歩行不能となる年齢は8歳前後から15歳頃までと広がっており、平均は10歳前後であった。

EST 投与群のADLの経年推移も対照群と同様な経過を取り、歩行不能となる年齢も8歳前後から15歳と症例によって異なっており、非投与群との間に差を認めなかった。

いっぽう、比較的ADLが良好な時期にEST 投

与を開始した症例ではADLが良好な時期から観察を行ない得た非投与群に比べてADLの低下が緩徐であり、しかも歩行不能となる時期が11歳前後と遅くなる傾向を認めた。

しかしながら、今回の検討では両者の観察開始時年齢が一定でなく、しかも単一症例で全経過のADLを検討していない。さらにEST 投与群と非投与群のmassとしての平均値を比較しているため統計学的検討を行ない得ず、今回、両群間で認められた経過の違いを単純に有意の差として評価することが出来なかった。

したがって、今後はこのような治療的検討は観察期間を一定化し、比較的ADLの良好な症例に対して施行されるべきであると考えられた。

文 献

- 1) 宮武正ほか：EST 臨床試験。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」班会議（今掘班），昭和60年度研究報告書，1986，109-121。
- 2) 宮武正ほか：Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の臨床経過：日常生活動作能力（ADL）の経年推移。厚生省新薬開発研究費「低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究」班会議（江橋班），昭和61年度研究報告書，1987，93-97。

ADL score の検討による筋ジストロフィー障害度の再評価

石原 傳 幸*

研究協力者 佐久間 昭** 五味 慎太郎* 宮川 雅 仁*
儀 武 三 郎* 青 柳 昭 雄*

目 的

昨年度は Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の薬剤治療における薬効判定上の問題点を、西欧における事情を紹介しながら発表し、さらに国立療養所東埼玉病院における過去十数年の各種パラメーター値を DMD の自然歴と考え EST 投与を行った DMD 児における各値と比較したところ、EST 投与群において機能障害度 (8 度分類) 4 度通過期間が平均 6 ヶ月程度自然経過より延長していたことを発表した¹⁾。

しかし、本院でのデータは客観性および普偏性につき疑問がなげかけられ、何らかの客観的基準の設定が求められた。これに答えるため、本年は種々のパラメーターの中から特に ADL スコアをとりあげ、Guttman scalographic analysis (尺度分析) を行った結果、薬効判定にも有用と思われる新しい DMD の障害度分類を作成し得たので報告する。

対象と方法

対象は、昭和50年より昭和61年までに当院に入院した DMD 患者159例 (7歳から24歳まで)、25歳以上の患者および入院6ヶ月以内の症例は除き、各症例で2回の ADL 検査 (厚生省研究班の作成によるもので、25項目100点満点) の各100項目を独立の変数と考え尺度分析法を施行した表1、2に示す通りの25項目であるが、この各項目のサブテストを全て独立変数と考え、各サブテストをすべて表1、2の通り番号をつけ分析した。

Guttman の尺度分析法は、すでに1976年研究協力者の佐久間らにより片麻痺機能テストの標準化に応用された方法である。表3に示すような $S_1 \sim S_4$ のアイテムがあり、そのアイテムが可能な場合を1点、不可能な場合を0点と評価する。表3の中段のように0~4の5人がいて重症者より順に並べ積算すれば下段のように可能率 P_j が計算できる。表3のように順序よく並べば、どのアイテムまで可能でどこで不能になるかを知ることにより重症度が決定できる。理想的にアイテムが並んでいけば、重症度、合計点は同義語となる。理想的な場合は、図1の左側のグラフのように、反応型0では全て S_j に対し可能率0%、反応型1では S_1 で100%、しかし S_2 では0%となりすっきりした右上がりの特性曲線が出来上がる。一方、理想的でなかった場合は、右端のグラフのように S_1 についてみると重症度が高い人で可能率が高く、軽症の人で低くなるという結果となり、この S_1 というアイテムは不適当と測定できる^{2),3)}。

今回、100アイテム別に可能率を算出し、可能率の高い方から順に並べ、全く同じものがあれば1つとし、1の領域への0の混入数、又その逆を誤反応とし誤反応が最小となりまたその間隔が等しくなるように11のアイテムをピックアップし、アイテム行例を固定した。

結 果

国立療養所東埼玉病院入院 DMD 患者の ADL スコアを縦軸に、年齢を横軸にとり図示すると図2のようになる。年齢が進行するに従い ADL スコアは低下して行くことが明らかであった。

* 国立療養所東埼玉病院内科

** 東京医科歯科大学難治疾患研究所

表1 厚生省研究班作成のADL

(1) 立っている		(7) 両脚でよりかかり立ち	
4	4 踵をつけ気をつけの姿勢で楽に立っておれる	28	4 介助を要しないで立っておれる
3	3 スタンスを広げれば楽に立っておれる	27	3 片手で支持すれば立っておれる
2	2 スタンスを広げても約30秒位しか立っておれない	26	2 両手で支持すれば立っておれる
1	1 大腿部をおさえれば辛うじて立っておれる	25	1 物によりかかれれば立っておれる
0	0 介助なしでは立っておれない	0	0 よりかかっても立っておれない
(2) 片足で立つ (便利な足を使って)		(8) 階段を昇る	
8	4 片脚で楽に立っておれる	32	4 普通に昇れる
7	3 片脚でしばらく (15秒~1分) しか立っておれない	31	3 手で膝をおさえ昇る
6	2 物につかまれば片脚でしばらく (1分以上) 立っておれる	30	2 片手を手摺りにかければ昇れる
5	1 物につかまれば辛うじて片脚立ちができる	29	1 横向きになって両手で手摺りにすがって昇る
0	0 他人の介助があっても、片脚立ちができない	0	0 介助なしには昇れない
(3) 椅子に坐る (膝の高さの椅子で)		(9) 階段を降る	
12	4 手を使わずにゆっくりと坐れる (尻を浮かしてイスをはずしてもその姿勢が保てる)	36	4 普通に降れる
11	3 手を使わずにゆっくりと坐れる (尻を浮かしてイスをはずすとその姿勢が保てない)	35	3 手で膝を支えて降る
10	2 手を膝についてゆっくりと坐れる	34	2 片手を手摺りにかければ降れない
9	1 支えきれずにドスンと崩れるように坐る	33	1 横向きになって両手で手摺りにすがって降る
0	0 介助なしでは坐れない	0	0 介助なしには降れない
(4) 椅子から立ち上る		(10) 坂道を登る	
16	4 普通にできる	40	4 急な坂でも普通に登れる (傾斜角度15度)
15	3 膝に手をついて立ち上る	39	3 ゆるやかな坂なら普通に登れる (" 5度)
14	2 物につかまって立ち上る	38	2 ゆるやかな坂を、ゆっくりと登る
13	1 立ち上ろうと膝を浮かせるが立ち上れない	37	1 舗装していない路を歩ける (10m)
0	0 立ち上る動作もできない	0	0
(5) シャがむ		(11) 走る・駆ける	
20	4 ゆっくりとシャがめる	44	4 10mを全力で走る5秒以内で
19	3 手で膝を支えて、ゆっくりとシャがむ	43	3 " 6~10秒要す
18	2 くずれるように床に手をついてシャがむが、その姿勢が保てる	42	2 " 11~15秒要す
17	1 くずれるように床に手をついてシャがむが、そのまま倒れてしまう	41	1 " 16~20秒要す
0	0 介助なしには全くできない	0	0 " 21秒以上要す (O印)、駆けられない (X印)
(6) 床から立ち上る		(12) 歩く	
24	4 膝に手をつかないで、普通の速さで立ち上れる	48	4 普通に歩ける
23	3 手を使わずに、強く前かがみになって立ち上る		軽度の動揺性歩行をする
22	2 手で膝をおして立ち上るが、15秒未満でできる	47	3 著明な "
21	1 手で膝をおして、又は四つ這い位から立ち上れるが15秒以上要す	46	2 物につかまれば独りで歩ける
	物につかまれば立ち上れるが、非常に時間 (30秒以上) 要す	45	1 介助者なしでは歩けない
0	0 全くできない	0	0 全く歩けない
		(13) 寝返る	
		52	4 ぐるぐる廻れる
		51	3 普通の速さで寝返れる
			手と足を使って寝返るが、やや困難を感じる
		50	2 時間をかければ (15~30秒)、やっと寝返りができる
		49	1 寝返りではできないが横向きまではなれる
		0	0 横向きにもなれない

このADLスコアの100サブテストを scalogram に図示すると図3のようになる。縦軸が可能率で横軸はADL総点である。最下段は症例数を示す。右下がりに図示されるアイテムがいくつか存在することがわかった。これらは不適当なアイテムとし削除された。

表4は前述の各アイテムの可能率を高い方から低い方に順に並びかえた表である。各アイテム番号は表1, 2に示す通りである。ERは反応数, ER%は反応率である。誤反応率10%以上を四角で囲

んだ。この100項目のうち11項目を選んで作成したのが、図4のグラフである。大体右上がりの特性曲線が作られた。この11のアイテムは後で表5に示すI~XIの項目である。従来行われてきた8度分類での結果を図5に示す。

考 察

尺度解析の検定法としては、表5に示すRep (Guttmanの再現性指数) とPPR*が使われる。Repは0.9以上となれば、1次元的尺度を張ると

表2 厚生省研究班作成のADL(2)

(14) 這う		(20) 寝転ぶ (坐位→仰臥位)	
56	4 四つ這いで普通の速さ以上で這える	80	4 手を使わずにゆっくりと仰向けに寝転べる
55	3 掌をついて、指先を外方以上にまわして、普通の速さで這える	79	3 肘をついて "
54	2 肘をついて這う	78	2 一旦横向きになってから寝転ぶ
53	1 四つ這い位 (肘をついての姿勢も) を保持できるが這えない	77	1 手で支えきれずに、そのまま崩れるように寝転ぶ
0	四つ這い位を保持することも這うことも、いざることもできない	0	介助なしには寝転べない
(15) 上肢挙上		(21) 起き上る (臥位→坐位)	
60	4 坐位でバンザイができる	84	4 手を使わずに起き上る
59	3 坐位で上腕を肩の高さまで挙上可能	83	3 手を使って起き上る
58	2 坐位で上腕を45°まで挙上可能	82	2 まず、腹臥位となり起き上る
57	1 臥位で上肢を動かせる	81	1 まず、腹臥位となり時間 (20秒~1分) を要す
0	上肢運動不能	0	肘をついて肩肘をわずかも起こすことはできるが坐位までにはなれない 肩肘を起こすこともできない
(16) 首のすわり		(22) 坐位姿勢を保つ	
64	4 仰向けに普通にできる	88	4 バランスが崩れても立ち直れる (40°以上肩肘を傾けても)
63	3 肩ばいでは頭をもたげられるが、仰向けではできない	87	3 多少のバランスがとれる (10°~35°肩肘を傾けても)
62	2 肩ばいでも頭をもたげられない	86	2 少しのバランスを崩すとすぐ倒れる (10°未満の傾きで)
61	1 坐位では首がすわっているが、少しでも後に傾けると頭が倒れる	85	1 少しの支えがあれば坐っておれる
0	首のすわり不能	0	よりかからなければ坐っておれない
(17) 顔を洗う		(23) 手拭を絞る	
68	4 立位で、両手で顔を洗う	92	4 十分に絞り切れる
67	3 立位では、片手で身体を支え、他方の手で顔を洗う	91	3 絞れるが充分でない
66	2 坐位で両手で顔を洗う	90	2 絞った手拭から水分が落ちる
65	1 手は顔まで届くが、洗うことができない	89	1 タオルを持ってるのが、絞れない
0	顔を洗えない	0	タオルも持てない
(18) ズボンをはく		(24) 字を書く	
72	4 立ってズボンがはける	96	4 肘を上げて字が書ける
71	3 坐って大腿部まではき、立って又は臥位で腰まではき	95	3 肘をつき、前腕を動かして字が書ける
70	2 大腿部までしかはけない	94	2 手首を使って字が書ける
69	1 坐って足先まで手は届くがはけない	93	1 やつと書ける
0	足先までも手が届かない	0	字が書けない
(19) 息が続く (3回の平均)		(25) 茶碗を持って食事をする	
76	4 Aーと連続発声、20秒以上続く	100	4 普通の茶碗と箸を持って茶に食事ができる
75	3 " 15~20秒未満	99	3 肘で支えて茶碗を持ち食事をする
74	2 " 10~15秒未満	98	2 上記の様にして食事をするが、くたびて途中でやめる
73	1 " 5~10秒未満	97	1 茶碗は持てないが箸又はスプーンでやつと食事をする
0	" 5秒未満	0	箸も持てない

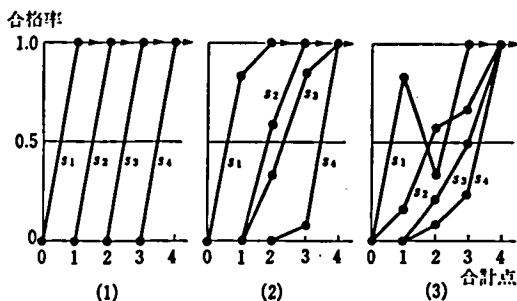


図1 合格率特性曲線 (文献2より引用)

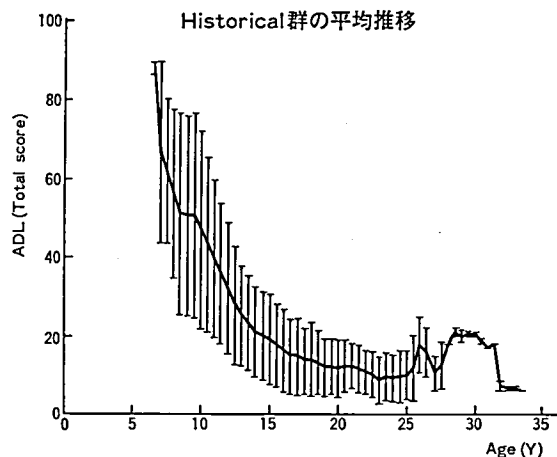


図2 東埼玉病院入院DMD患者のADLスコアの自然歴

表3 Guttman の scalographic analysis

S₁: 1人でベットに起きあがれるか
 S₂: 1人でトイレまで歩けるか
 S₃: 1人で買い物にでかけられるか
 S₄: 1人で1泊程度の旅行が出来るか
 (S_j: アイテム, サブテスト)

	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	
反	0	0	0	0	n ₀
応	1	0	0	0	n ₁
型	2	1	1	0	n ₂
	3	1	1	1	n ₃
	4	1	1	1	n ₄

可能率 P₁ > P₂ > P₃ > P₄

$$P_j = \frac{\text{反応1の例数}}{\text{全例数}} \cdot n \quad (\text{可能率, 合格率})$$

いわれている。表5の通り、本方法は Rep 0.997, PPR* 0.96と100項目の ADLscore, 8段階障害度分類よりもよい数値を得ており、信頼性の優れたアイテム行列といえよう。この11アイテム行列の最後に1項目を加え、12段階とした新障害度分類を表6に示す。

さて、昨年報告した通り西欧では DMD の薬効判定に筋力を定量的に測定したり、筋力検査、時間機能テスト、ADL 測定などを組み合わせているが、残念ながら薬効判定に利用できるような DMD の自然歴が日本では蓄積されていないのが現状である。広く行われてきた8段階分類(表7)はよくできた分類ではあるが、今回の解析からわ

表5 信頼性の検討

Guttman の再現性指数		Rep = Σe _j /pn (e _j : 誤反応数)		
PPR* (plus percentage ratio)		PPR = 1/pΣRep _j - MR _j /1 - MR _j		
	100項目 ADL	8段階	新評価法	
Rep	0.95	0.95	0.99	
PPR*	0.67	0.95	0.96	

表4 ADL100項目における可能数と誤反応数

ITEM	97	93	61	89	94	85	57	73	65	90	86	98	77	62	69	91	95	49	87	66
SUM	307	302	295	289	265	245	240	240	235	230	215	201	180	176	176	174	171	166	156	153
ER	5	7	18	14	11	30	26	36	26	14	28	27	17	16	22	46	40	21	25	37
ER%	2	2	6	4	3	9	8	11	8	4	9	8	5	5	7	14	13	7	8	12
ITEM	99	63	58	70	74	78	79	53	59	50	81	71	54	60	51	96	55	82	100	88
SUM	149	149	146	134	132	124	122	114	111	108	103	99	98	93	92	89	88	85	81	79
ER	41	26	27	15	84	25	25	16	19	21	18	22	16	19	14	46	15	13	33	40
ER%	13	8	8	5	26	8	8	5	6	7	6	7	5	6	4	14	5	4	10	13
ITEM	1	25	26	64	67	2	3	92	45	27	9	75	46	5	13	28	83	68	14	17
SUM	73	73	69	68	65	63	61	59	58	57	56	55	55	53	53	52	51	50	50	49
ER	19	16	15	46	12	17	17	51	8	7	5	55	7	5	4	6	31	16	2	4
ER%	6	5	5	14	4	5	5	16	3	2	2	17	2	2	1	2	10	5	1	1
ITEM	52	37	6	47	10	21	33	38	29	18	56	4	48	7	15	30	39	41	11	34
SUM	47	45	45	45	43	41	41	40	40	38	35	35	33	32	31	30	29	28	27	27
ER	26	9	11	5	7	6	4	12	5	6	26	16	9	13	8	8	11	9	10	6
ER%	8	3	3	2	2	2	1	4	2	2	8	5	3	4	3	3	3	3	3	2
ITEM	42	80	19	22	40	43	76	72	12	8	16	35	31	36	23	84	32	20	44	24
SUM	25	24	24	24	20	19	17	16	15	13	12	10	9	7	6	4	3	3	2	1
ER	8	22	12	8	7	6	17	10	8	12	7	5	4	5	5	3	2	0	1	0
ER%	3	7	4	3	2	2	5	3	3	4	2	2	1	2	2	1	1	0	0	0

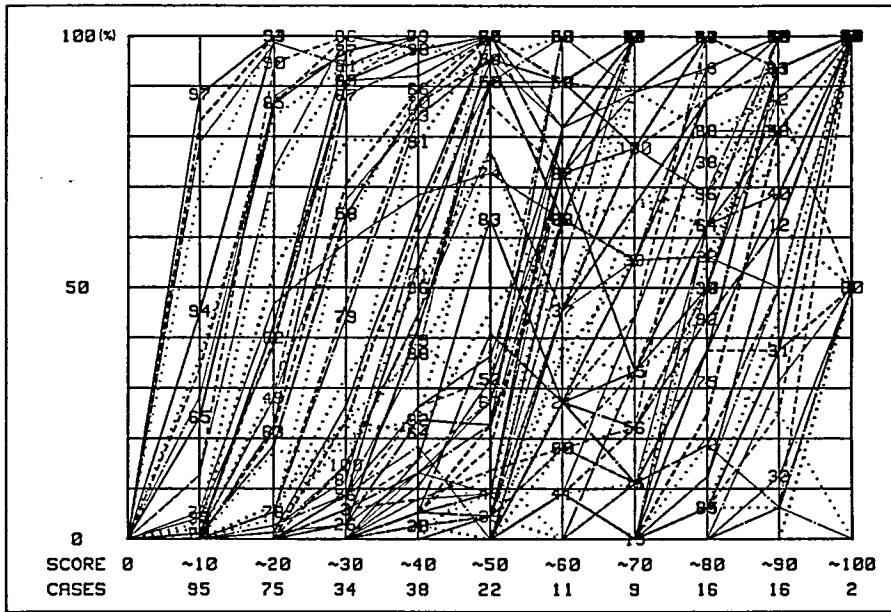


図3 ADLスコア全体の尺度分析

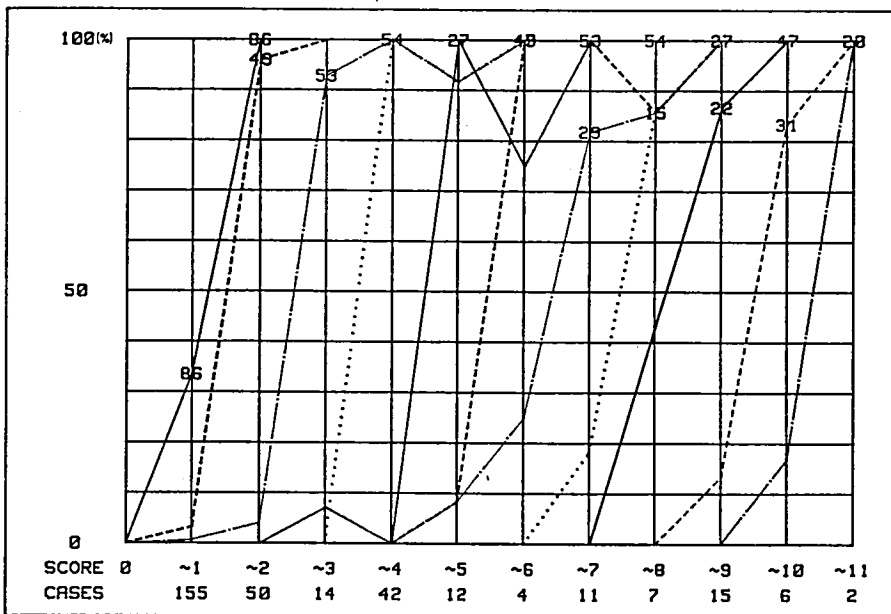


図4 今回選んだ11項目による尺度分析

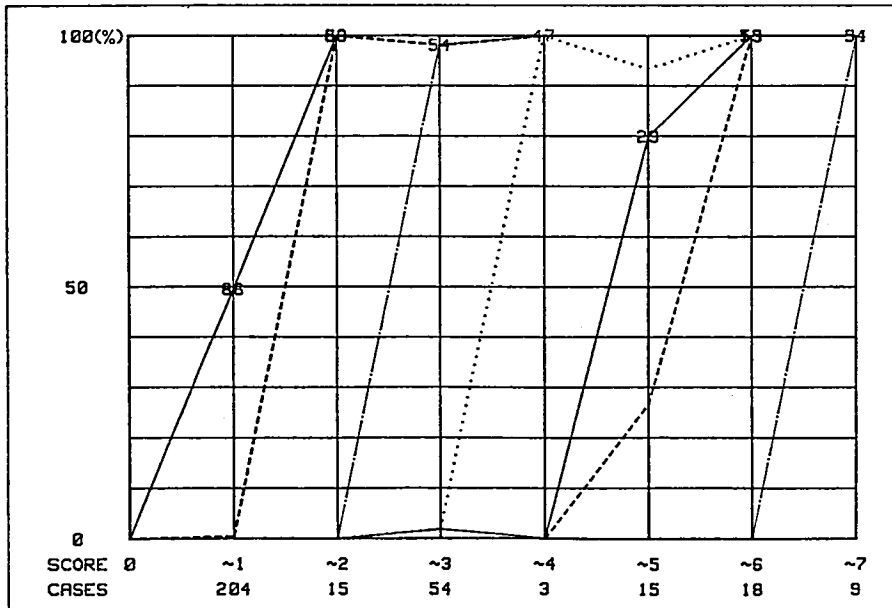


図5 8段階分類法による尺度分析

表6 新ステージ分類

- I. ゆっくりとしゃがむことができる
- II. 介助なく階段昇降可能(手で膝を押しても良いが、手すりは用いない)
- III. 通常の高さの椅子から立ち上がり可能(手で膝を押しても良い)
- IV. 介助なく床から立ち上がり可能(手で膝を押しても良いが、15秒未満でできる)
- V. 手すりを用いて階段昇降可能(介助なし)
- VI. 独立平地歩行可能(動揺性歩行でも良い)
- VII. 片手支持による両脚でのよりかかり立ち可能
- VIII. 四つ這い可能(肘をついても良い)
- IX. 四つ這い位保持可能(肘をついても良い)
- X. 寝返りはできないが、横向きまでは可能
- XI. 自力で坐位保持可能
- XII. 自力で坐位保持不能, 全介助

かる通り、階段昇降と椅子よりの立ち上がりの動作の難易度は、実際には逆となり不適當な障害度分類であることが今回の結果から明らかとなった。また8段階分類は、RepやPPR*は比較的よいが、間隔が広くラフな分類であることから、薬効

の判定には不適當であろう。我々は結局ADLに着目せざるを得ない立場に追いこまれたが、ADLスコアはscalogramからもわかる通り不適切なアイテムを多数含んでおり、このままでは使用できなかった。このような理由から新障害度分類を作成したが、各障害度の通過期間は比較的短かいと考えられ、薬効判定のためには有用な分類法と考えられる。

結 論

国立療養所東埼玉病院入院159名のADLスコアを尺度解析法で検討した結果、DMD薬効判定に有用と思われるDMD12段階障害度分類を作成し得た。

表7 従来の8段階分類

ニューヨーク大学 (NYU) 式障害ステージ分類	日本の生活様式に則した障害ステージ分類
ステージ I : 歩行可能: 介助なく階段昇降可能 (手すりも用いない)	ステージ I : 歩行可能: 介助なく階段昇降可能 (手すりも用いない)
II : 階段昇降に介助 (手すりなど) を必要とする	II : 階段昇降に介助 (手すりなど) を必要とする
III : 階段昇降不能: 平地歩行可能: 通常の高さの椅子からの立ち上がり可能	III : 階段昇降不能: 平地歩行可能: 通常の高さの椅子からの立ち上がり可能
IV : 歩行可能: 椅子からの立ち上がり不能	IV : 平地歩行可能: 椅子からの立ち上がり不能
V : 歩行不能: 車椅子上日常生活動作独立 (移乗—transfer—動作も含む)	V : 歩行不能: 四つ這い可能
VI : 歩行不能: 車椅子上日常生活動作に介助を要する	VI : 四つ這い不能だが, それ以外の這いかた (いざり這い) 可能
VII : 車椅子を動かすことはできるが遅く, 姿勢が悪く, 背部支持 (コルセットなど) 必要	VII : 這うことはできないが, 自力で坐位保持可能
VIII : 寝たきりで最大限の介助を要する	VIII : 自力で坐位保持不能, 全介助

文 献

- 1) 石原傳幸, 宮川雅仁, 儀武三郎, 青柳昭雄, 杉田秀夫: 治療薬の効果判定法における問題点. 厚生省新薬開発研究費・「低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究, 昭和61年度研究報告書, 1987, p.p. 99-103.
- 2) 佐久間昭: 薬効評価. 一計画と解析—II, 東京大学出版会, 1981, p.p. 328-339.
- 3) 上田 敏: 片麻痺の評価. 武田薬品工業, 1978, p.p. 15-19.

血中骨格筋ミオシン軽鎖測定法の開発とその臨床的意義

—モノクローナル抗体によるキット化の試み—

矢崎 義雄*

筋肉組織の障害過程と進展度を定量的に反映する指標の選択と、その特異性と感度の高い測定法を確立することは、筋疾患の治療法の効果判定、特に治療薬開発にあたって欠くことのできないきわめて重要な課題である。従来から、筋組織の障害時に細胞内より血中に逸脱してくるCPKを中心とした酵素蛋白を指標に病態の把握が行われてきた。最近では筋組織の崩壊時に血中に流出してくる3メチルヒスチジンを測定する方法が開発され、治療薬の効果判定の基準として用いられるようになった。しかしCPKなどの酵素蛋白は細胞質中に可溶性分画として存在するために、細胞膜透過性亢進のみによっても細胞外に逸脱し、その血中濃度の上昇は必ずしも筋細胞の崩壊を反映しない。さらには、メチルヒスチジンではその測定法がきわめて複雑であり、多数の試料の測定には適さない。また肉類の摂取による値の変動が大きいことも臨床的に問題である。我々は、筋原線維を構成する構造蛋白のミオシンに注目し、障害時に血中に流出してくる分子量の小さなサブユニットの軽鎖を指標に、特異性と感度に優れたラジオイムノアッセイ法を確立してその臨床的意義を明らかにした。

すなわち、血清軽鎖値は長期間高値を保つ特徴ある変動パターンを示し、梗塞部心筋の崩壊と治療過程を反映すると共に、その最高値から梗塞サイズを正確に推定できる指標としてきわめて臨床的に有用であることが示された。さらには心筋梗塞ばかりでなく、筋ジストロフィー症を中心とし

た骨格筋疾患においても血中軽鎖値の上昇を認め、骨格筋組織の障害程度をよく反映する指標になり得ることも示した。しかし、このように臨床的に有用な血中軽鎖値の測定法は我々が開発したラジオイムノアッセイ系で行われるが、抗体量に制限のあること、標準蛋白としてヒトミオシン軽鎖を用いなければならないことから、一般の臨床に導入することが可能なキット化ができず、多施設による検討も行われなかった。

今回、我々はモノクローナル抗体を用いた血中ミオシン軽鎖の測定法をはじめて開発し、キット化に成功した。そして急性心筋梗塞患者で実際に測定を行い、ラジオイムノアッセイ法と同等の性能を有すること、骨格筋ではタイプI筋細胞の障害を特異的に反映することが明らかとなったので報告する。

モノクローナル抗体を用いたミオシン軽鎖法の確立

モノクローナル抗体の作成は図1のように行ったり。免疫に用いた抗原蛋白は、ヒト心室筋ミオシン軽鎖である。心疾患を有さない患者の剖検心より稀釈法にて抽出し、Sephadex DEAE25カラムにより精製後の心筋ミオシンより塩酸グアニジン法により軽鎖を分画した。この軽鎖蛋白をBALB/cマウスに2週間おきに腹腔内に Freundのアジュバントに混じて注入して免疫し、十分に抗体価が上昇した時点で脾臓を摘出して脾細胞を分離し、マウス骨髄腫細胞であるP₃U₁株と融合してハイブリドーマを作成した。HAT培地を経て増殖するハイブリドーマの中から、ELISA法に

* 東京大学医学部第三内科

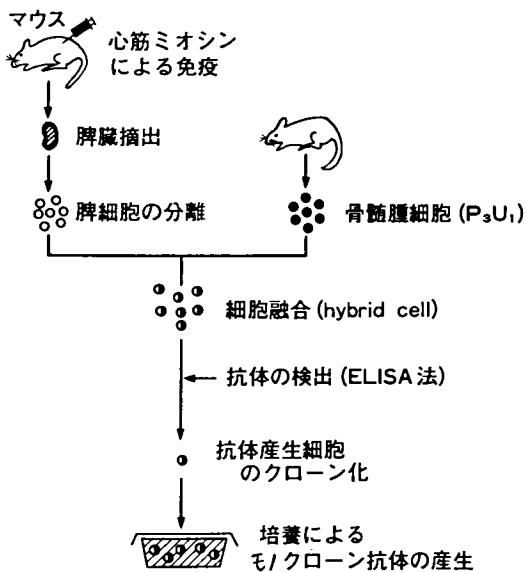


図1 マウスハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体

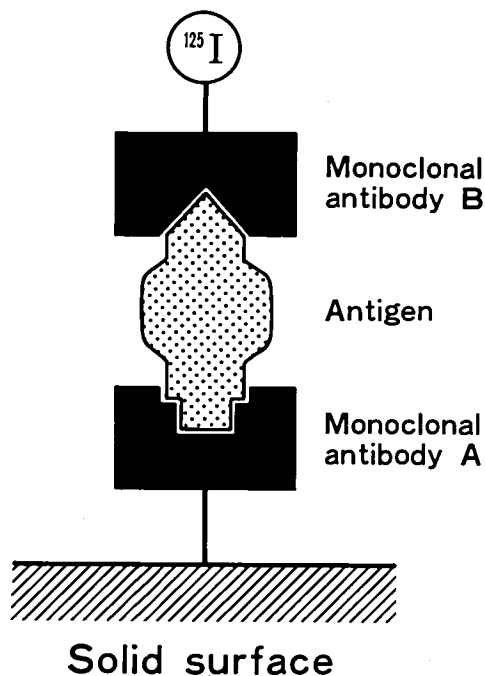


図2 二種類のモノクローナル抗体を用いた二抗体サンドウィッチ法 (イムノラジオメトリックアッセイ法) の原理

よりミオシン軽鎖と最も結合親和性と特異性の高い抗体を産生するクローンを選別した。そして互いに結合特性を干渉し合わない、軽鎖蛋白において離れた抗原決定基を認識して結合する2種類のモノクローナル抗体 (ML508, ML544) を選択して、二抗体サンドウィッチ法 (ラジオメトリックアッセイ法) による血中軽鎖測定法を確立した。

その原理は図2に示すように、まずモノクローナル抗体 A (ML508) をポリエチレンチューブに吸着させ、これに試料血清100 μ l と¹²⁵I で標識した他方のモノクローナル抗体 B (ML544) を混じて加えて34°C 1時間インキュベートした後、洗滌して γ シンチレーションカウンターにてカウントする。標識した抗体 ML544 が、ミオシン軽鎖蛋白を介して抗体 ML508 に結合して試験管に吸着する。したがって、試料血清に存在する軽鎖量に比例して試験管にアイソトープが集積するところとなり、放射能が得られる。その結果、試料血清中の軽鎖量に比例してカウントが増加し、図3に示す標準曲線が得られ、感度よく血中軽鎖量の測定が可能となった²⁾。その測定感度は 1 ng/ml とラジオイムノアッセイと同程度の値が得られた。本法によれば、B/F 分離のための二抗体沈降法によるインキュベーションあるいは遠沈法も必要としない操作のきわめて簡便な短時間での測定が可能となった。さらにはモノクローナル抗体が培養系

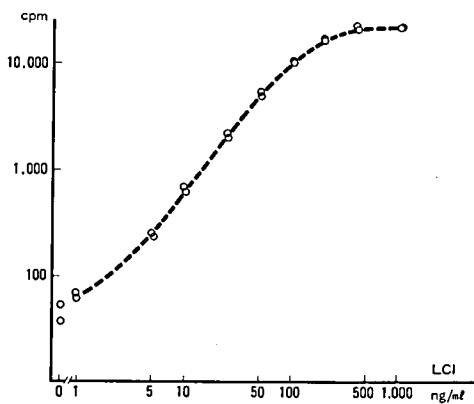


図3 血中軽鎖値 (LCI) のイムノラジオメトリックアッセイによる標準曲線

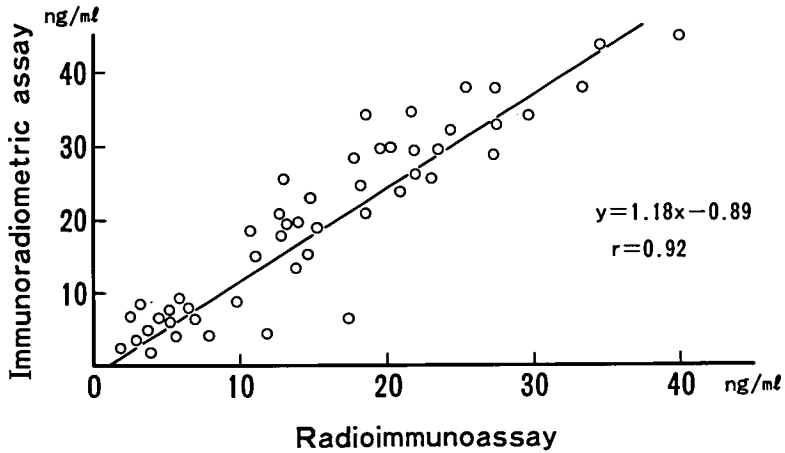


図4 血中軽鎖値 (LCI) のラジオイムノアッセイ法とイムノラジオメトリックアッセイ法による比較
両者の測定系でよい相関が得られている。

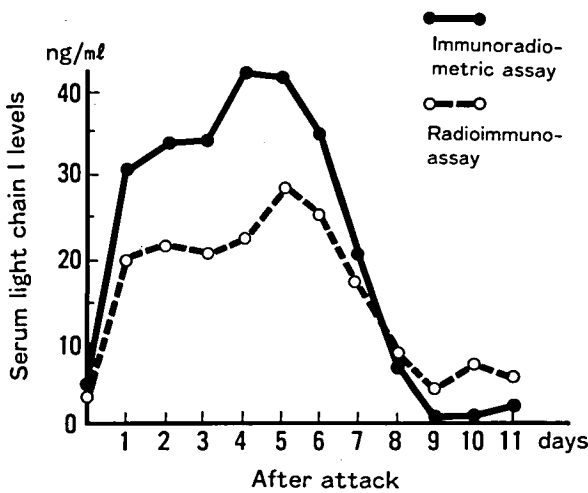


図5 急性心筋梗塞患者における血中軽鎖値の変動。
ラジオイムノアッセイ法とイムノラジオメ
トリックアッセイ法の比較

血中ミオシン軽鎖測定キットの評価

我々は心筋ミオシン軽鎖 (アルカリ軽鎖) を抗原にして測定系を確立した。図4は従来のラジオイムノアッセイ法とイムノラジオメトリックアッセイ法で得られた血中軽鎖値の比較を示している。相関係数 $\gamma=0.92$ とよい相関が得られた。図5は急性心筋梗塞症における血中ミオシン軽鎖値の変動をイムノラジオメトリック法とラジオイムノアッセイ法で比較したもので、両者はよく一致し、長期間血中の軽鎖値は高値を維持していることがよくわかる。図6, 7は実際の症例でCPK値と比較したものである。図6のMI-92症例で示すように、CPKの血中への逸脱は迅速で24時間以内で最高値に達し、数日で発作前のレベルに戻る。一方軽鎖値は、徐々に上昇して4~5日で最高値に達し、1週間以上高値を保持している。CPKは3~6時間間隔で採血しないと正確な最高値は得られないが、軽鎖値はこのように1日1回の採血で血中変動パターンがとらえられ、最高値の測定も可能となり、心筋障害の程度と治療過程が正確に推定でき、患者の予後の判定や治療効果の評価にきわめて有用な指標であることがわかる。患者のリハビリテーションのプログラムの設定にも有用である。MI-77(図7)の症例は発作後24時間経て入院した患者である。CPKはすでに最高値を過ぎ

により大量に産生できることから、抗体も量的な制限を受けることもなくなった。またこの系では標準蛋白としてブタのミオシン軽鎖がヒトと変りない結合特性を有することから、標準蛋白として用いられることも明らかとなった。このようにモノクローナル抗体を導入することにより測定系の大量生産が可能となり、はじめてキット化され一般臨床においても使用できるようになった。

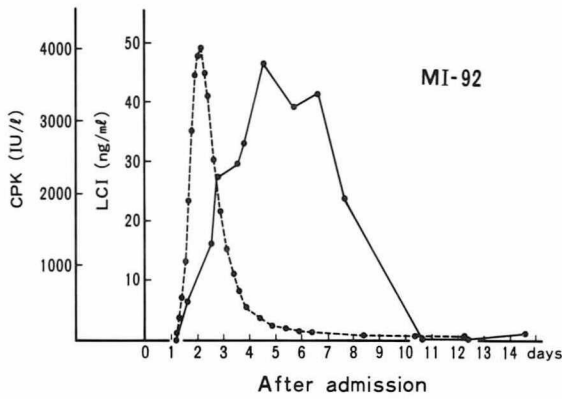


図6 急性心筋梗塞患者における血中CPKと軽鎖値の変動パターン (MI-92)

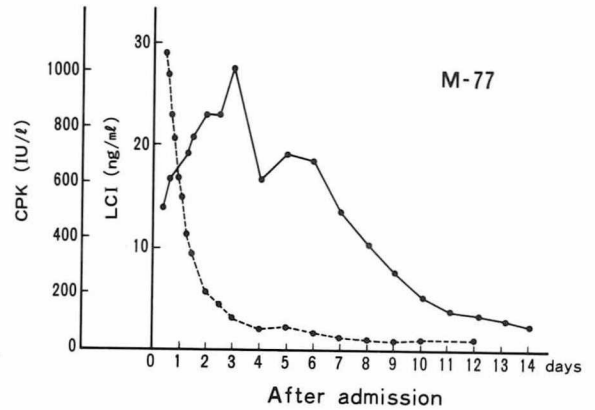


図7 急性心筋梗塞患者における血中CPKと軽鎖値の変動パターン (M-77)

ており、このような症例では梗塞サイズの推定は不可能である。ところが血中軽鎖値を測定すればこのような症例においても最高値がとらえられ、梗塞の大きさの推定が可能となる。さらにはCPK値が正常域に戻ってしまった、発作後数日を経過した症例でも急性心筋梗塞がretrospectiveに診断することが出来、従来の指標では得られない臨床的に有用な情報を知ることが可能となった。

測定キットによる骨格筋障害の診断

このように我々が確立した血中ミオシン軽鎖の測定系が、血中に逸脱した骨格筋ミオシン軽鎖を検出し、骨格筋組織の障害を診断し、しかも定量的に推定できるかが、本研究班において我々がなすべき課題である。そこで我々が開発したML508, ML544のモノクローナル抗体が骨格筋ミオシンとどのような反応を示すかまず検討する必要がある。

本研究班の杉田秀夫班員の御協力で行われた結果、これらモノクローナル抗体はタイプI筋細胞のミオシン軽鎖とよく反応することが明らかにされた。すなわち、ATPase染色により陽性と判定されたタイプI筋細胞に一致して、モノクローナル抗体による蛍光抗体染色での発色が観察された。他方のタイプII筋細胞には全く反応を認めなかった。したがって我々のモノクローナル抗体はタイプI、すなわち赤筋タイプのミオシン

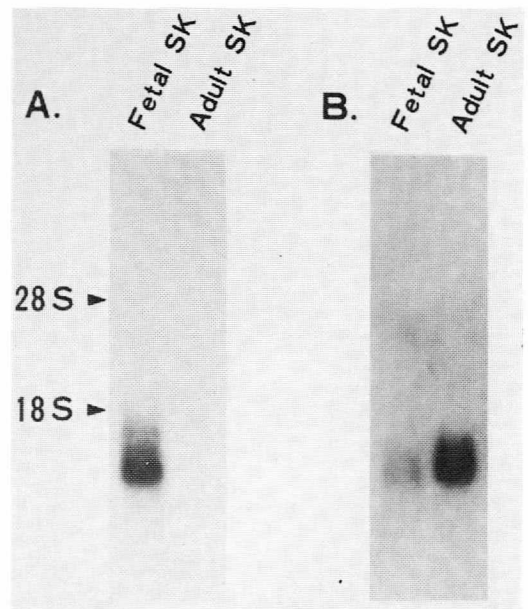


図8 ヒト心筋ミオシン軽鎖cDNAによる胎児および成人骨格筋mRNAのNorthern blot解析 A. 心筋ミオシン軽鎖cDNAによる解析, B. 心室筋ミオシン軽鎖cDNAによる解析成人骨格筋において心室筋ミオシン軽鎖遺伝子がよく発現されていることを示す。心筋ミオシン軽鎖は胎児型軽鎖と言える。

ン軽鎖に特異的に反応することが示されたわけである。我々がクローニングした心筋ミオシンのアルカリ軽鎖遺伝子の特異的な塩基配列をプローブに、骨格筋のmRNAをNorthern blot解析した結果からも、図8に示すように、心室筋ミオシン軽鎖cDNAと骨格筋mRNAが強く反応するこ

とが示され、骨格筋タイプIのミオシン軽鎖は遺伝子レベルにおいては同一であり、少なくとも蛋白レベルでも転写後の修飾がない限り同一とみなしてよいものと思われる。したがって、我々のモノクローナル抗体が、心筋ミオシン軽鎖ばかりでなく骨格筋ミオシン軽鎖のタイプIもよく認識することは当然と言える。

以上の結果から、骨格筋疾患患者における血中軽鎖値の変動は、骨格筋組織障害の中でタイプI筋細胞の障害を反映するものである。一方タイプII筋細胞、すなわち白筋タイプの筋細胞には全く反応しないことから、その障害に関する情報を得ることはできない。

この測定系で健常者の血清を測定してもミオシン軽鎖を検出することはなかった。前回ラジオイムノアッセイ系を用いて、93時間行軍訓練後に血中のCPK値の上昇をみると共に、血中軽鎖値の有意の上昇を認めることを報告した。今回運動部学生30名のトレーニングの前後で、東大保健診療所長遠藤康夫教授の要請にて測定したところ、4名の学生にトレーニング後に3ng/ml以上の有意

の上昇を認めた。運動負荷に対する骨格筋の感受性が個人によって異なることが示され、そのような症例では運動により骨格筋組織の一部が損傷される可能性が示唆されたわけである。

今後この測定系を用いて筋ジストロフィー患者の血中ミオシン軽鎖を検討すると共に、ML544のアフィニティークロマトカラムによって骨格筋ミオシン軽鎖よりタイプIを除き、タイプIIが主成分を占める蛋白によって新たにマウスを免疫して、タイプII筋細胞ミオシン軽鎖測定系を確立し、その障害程度を推定できることを示し、筋ジストロフィー症の病態の解析と治療薬の効果判定に役立つ方法論を開発し、班研究の推進に努めたい。

文 献

- 1) Tsuchimochi, H. et al: Isozymic changes in myosin of human atrial myocardium by overload. *J. Clin. Invest.*, 74: 662, 1984.
- 2) Yazaki, Y. et al: Diagnosis of myocardial infarction using monoclonal antibodies. *Asian Med. J.*, 29: 510, 1986.

各種プロテアーゼインヒビター投与の筋ジストロフィーマウスに対する効果

辻 繁 勝 *

研究目的

新しく開発された種々の低分子酵素阻害物質について難病治療薬としての可能性を探る研究の第一歩として、筋ジストロフィー症のモデル動物に発症初期から連続的に皮下投与することによって、これら物質の *in vivo* における疾病抑制効果を検討する実験を行っている。昨年度は8種類の低分子酵素阻害物質を用いて mdx マウスを対象としてそれぞれの物質の連続投与の疾病進行に対する抑制効果を検討する実験を行い、そのうち aminopeptidase - M のインヒビターである Actinonin, dipeptidyl aminopeptidase IV のインヒビターである Diprotin - A, f. Met - aminopeptidase のインヒビターである Formestin - A および Kallikrein のインヒビターである FUT - 175 に関して症状改善の効果があることを認めたり、そこで本年度は引続いて上記の4種類の蛋白質分解酵素阻害物質について筋ジストロフィー症の一つである dy マウスを対象として再度発症初期からの連続投与実験を行い、筋ジストロフィー症の症状進行に対する抑制効果の有無を検査した。

材料と方法

実験に使用された動物は4週齢の C57BL/6J - dy 系の疾病 (dy) マウスである。dy マウス各3頭ずつを一組とし、各蛋白質分解酵素阻害物質を4週間および6週間にわたって連続投与し、投与期間終了後屠殺した各マウスについて、血清中ならびに骨格筋中の疾病進行のマーカー酵素である

PK²⁾, CPK³⁾, GOT⁴⁾, LDH⁵⁾ の活性を測定した。対照として生理食塩水投与群を4週間と6週間各1組ずつ作り同様の測定を行い投与実験群との酵素活性の比較を行った。又、各被検マウスから屠殺後直ちに腓腸筋を採出し、光顕用標本を作製し、組織学的検索を行った。投与に用いる各蛋白質分解酵素阻害物質は使用直前に1mg/ml の濃度で生理食塩水中に溶解し、1回0.2ml ずつを1日2回背部皮下に注射した。

結 果

図1は投与期間中の被検マウスの体重変化を示したものである。生理食塩水投与の対照マウスの体重は投与期間中には殆んど変化が見られなかったのに対して FUT - 175, および Formestin - A 投与のマウスでは投与開始後に明らかな体重増加が認められた。一方 Diprotin - A および Actinonin 投与マウスでは対照と同じく大きな体重変化は認められなかった。表1は各蛋白質分解酵素阻害物質を4週間並びに6週間投与した後の血清中の CPK 活性と PK 活性を示したものである。対照群との比較では CPK 活性は Actinonin および Diprotin - A 投与群で4週間並びに6週間投与で共に著しい活性低下を示しているのに対して FUT - 175 投与群ではいずれの投与期間でも、やや活性増加の傾向が認められた。又 Formestin - A 投与群では4週間投与で活性低下を示しているが、6週間投与では逆にやや活性増加の傾向が認められた。一方 PK 活性については、Formestin - A 投与群のうち4週間投与でやや活性増加を示したのを除いて全て活性低下の傾向が認められた。表2は

* 和歌山県立医科大学第二生理

血清中の GOT 活性と LDH 活性を示したものであるが Diprotin-A 投与群と Formestin-A 投与群の 4 週間投与では両酵素の活性が共に著しく低下している事が認められた。又 6 週間投与では

Actinonin 投与群で LDH 活性が低下している以外は全て増加の傾向が認められた。

次に各被検マウスの後肢筋ホモジネートの cytosol 画分中のマーカー酵素の活性について測

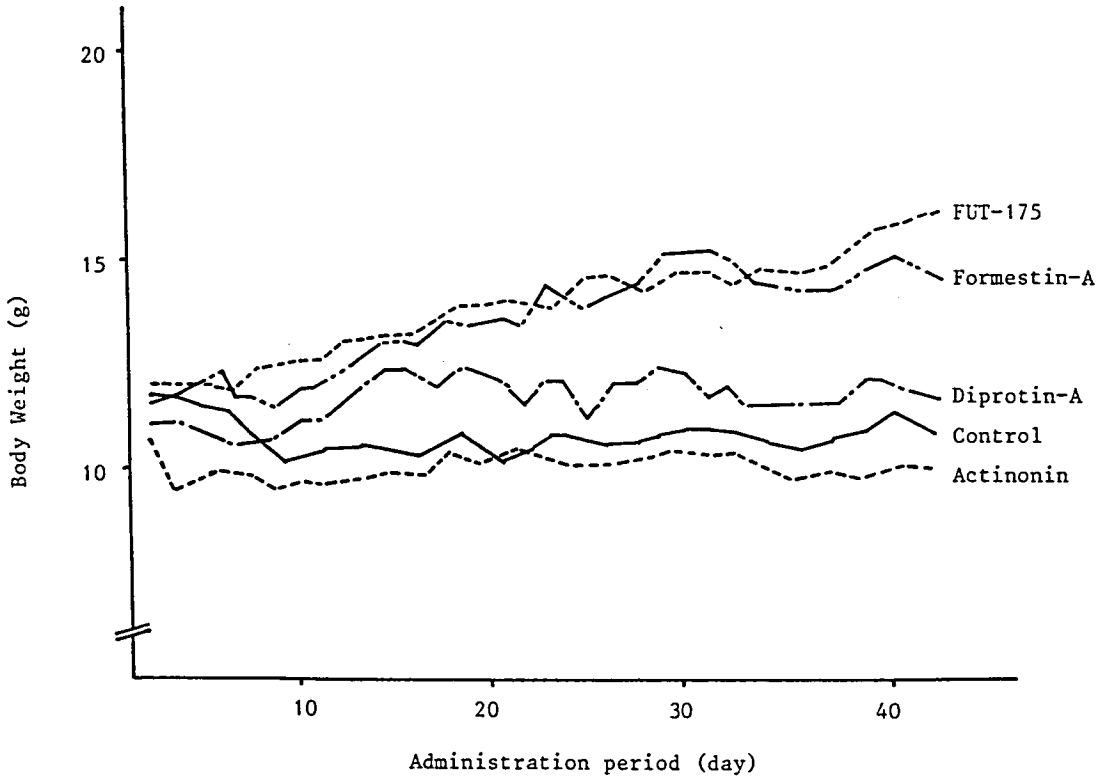


図1 Body weight changes of dystrophic mice by inhibitor administration

表1 Effects of inhibitor administrations on serum CPK and PK activities in dystrophic mice

Period	Inhibitor	CPK	I/S	PK	I/S
4 week	Saline	0.77 ± 0.13	—	1.03 ± 0.07	—
	Actinonin	0.58 ± 0.11	0.75	0.59 ± 0.02	0.57
	Diprotin-A	0.51 ± 0.28	0.66	0.46 ± 0.05	0.44
	Formestin-A	0.63 ± 0.24	0.81	0.49 ± 0.04	0.48
	FUT-175	1.01 ± 0.28	1.31	0.89 ± 0.16	0.86
6 week	Saline	1.05 ± 0.07	—	1.74 ± 0.99	—
	Actinonin	0.58 ± 0.10	0.55	1.58 ± 0.13	0.91
	Diprotin-A	0.73 ± 0.03	0.69	1.52 ± 0.13	0.87
	Formestin-A	1.28 ± 0.17	1.22	1.99 ± 0.36	1.14
	FUT-175	1.20 ± 0.35	1.14	1.62 ± 0.15	0.93

Unit: μ moles NADH/min/ml serum

表2 Effects of inhibitor administrations on serum GOT and LDH activities in dystrophic mice

Period	Inhibitor	GOT	I/S	LDH	I/S
4 week	Saline	0.29 ± 0.01	—	1.42 ± 0.57	—
	Actinonin	0.33 ± 0.26	1.14	2.20 ± 0.71	1.55
	Diprotin-A	0.06 ± 0.02	0.21	0.65 ± 0.39	0.46
	Formestin-A	0.07 ± 0.03	0.24	1.07 ± 0.22	0.75
	FUT-175	0.40 ± 0.28	1.38	1.90 ± 0.30	1.34
6 week	Saline	0.13 ± 0.02	—	1.12 ± 0.05	—
	Actinonin	0.14 ± 0.02	1.08	0.71 ± 0.02	0.63
	Diprotin-A	0.16 ± 0.02	1.23	1.35 ± 0.14	1.21
	Formestin-A	0.23 ± 0.16	1.77	1.44 ± 0.16	1.29
	FUT-175	0.20 ± 0.02	1.54	1.12 ± 0.12	1.00

Unit: μ moles NADH/min/ml serum

定を行った。表3はそのうちCPK活性とPK活性を示したものであるが、全ての蛋白質分解酵素阻害物質投与群について4週間並びに6週間投与で両酵素が共に活性増加の傾向を示していた。特にFormestin-A投与群とFUT-175投与群では対照群に比較して著しく高い活性が認められた。又、GOTおよびLDH活性については表4の如く、Actinonin投与群、Formestin-A投与群、およびFUT-175投与群ではLDH活性が増加の傾向を示していたがDiprotin-A投与群では活性低下が認められた。これに対してGOT活性は全ての蛋白質分解酵素阻害物質投与群について無変化又は活性低下の傾向を示していた。

以上の実験で得られた疾病進行のマーカー酵素

と考えられている4ケの酵素活性の変動について血清中の活性低下と骨格筋中の活性増加を疾病の改善傾向を示すもの(+)、その逆(-)、投与による影響がはっきりしない(±)と考えてまとめたものが表5である。

又投与実験が行なわれた全マウスについて腓腸筋を採出し、H・E染色標本による組織学的検索を行った結果、いずれの投与群についても対照の生理食塩水投与マウスとの間に歴然とした回復状態は認められなかったが、総体的にマーカー酵素の活性変化に見られると同様な疾病進行抑制の傾向が認められた。

考 察

4種類の蛋白質分解酵素阻害物質について筋ジストロフィー症に対する治療効果の有無を*in vivo*で検討するため疾患モデル動物の一つであるdyマウス(4週齢)を対象として4週間および6週間にわたる連続皮下投与実験を行った。結果は昨年度にmdxマウスを対象として行った同様な実験で得られた結果¹⁾とほぼ一致した。即ち、測定したマーカー酵素のうちCPKおよびPKの活性に関しては、4種類の蛋白質分解酵素阻害物質を投与した群の全てについて明らかに血清中に遊出される酵素の活性が低下し、骨格筋中に存在する酵素の活性が増加し、いずれも正常マウスの活性値に近づくとする傾向を示した。このことは、これらの物質が少なくともmdxマウス並びにdy

表3 Effects of inhibitor administrations on muscle CPK and PK activities in dystrophic mice

Period	Inhibitor	CPK	I/S	PK	I/S
4 week	Saline	16.8 ± 4.3	—	0.43 ± 0.16	—
	Actinonin	19.7 ± 1.3	1.17	0.53 ± 0.07	1.23
	Diprotin-A	21.9 ± 5.7	1.30	0.76 ± 0.44	1.77
	Formestin-A	27.9 ± 9.5	1.66	0.88 ± 0.26	2.05
	FUT-175	30.9 ± 0.3	1.84	0.89 ± 0.16	2.07
6 week	Saline	11.9 ± 1.5	—	0.44 ± 0.03	—
	Actinonin	13.0 ± 1.2	1.09	0.52 ± 0.10	1.18
	Diprotin-A	18.8 ± 1.8	1.58	0.48 ± 0.04	1.10
	Formestin-A	11.9 ± 2.0	1.00	0.63 ± 0.01	1.43
	FUT-175	15.1 ± 1.6	1.27	0.82 ± 0.08	1.86

Unit: μ moles NADH/min/mg protein

表4 Effects of inhibitor administrations on muscle GOT and LDH activities in dystrophic mice

Period	Inhibitor	GOT	I/S	LDH	I/S
4 week	Saline	0.84 ± 0.09	—	5.44 ± 0.08	—
	Actinonin	0.58 ± 0.01	0.69	7.21 ± 3.03	1.32
	Diprotin-A	0.62 ± 0.27	0.74	2.64 ± 1.29	0.49
	Formestin-A	0.56 ± 0.25	0.65	4.34 ± 3.32	0.80
	FUT-175	0.82 ± 0.25	0.98	4.94 ± 2.18	0.91
6 week	Saline	0.54 ± 0.01	—	4.08 ± 0.27	—
	Actinonin	0.54 ± 0.04	1.00	4.23 ± 0.24	1.04
	Diprotin-A	0.46 ± 0.22	0.85	2.53 ± 0.36	0.62
	Formestin-A	0.54 ± 0.07	1.00	4.56 ± 0.09	1.12
	FUT-175	0.51 ± 0.07	0.94	4.80 ± 0.32	1.18

Unit: μ moles NADH/min/mg protein

表5 Summary of the effects of inhibitors on the enzyme activities in dystrophic mice

Inhibitor	Period (week)	Serum				Muscle			
		CPK	PK	GOT	LDH	CPK	PK	GOT	LDH
Actinonin	4	+	+	-	-	+	+	-	+
	6	+	+	±	+	±	+	±	±
Diprotin-A	4	+	+	+	+	+	+	-	-
	6	+	+	-	-	+	+	-	-
Formestin-A	4	+	+	+	+	+	+	-	-
	6	-	-	-	-	±	+	±	+
FUT-175	4	-	+	-	-	+	+	-	-
	6	-	+	-	±	+	+	-	+

+: serum; decrease, muscle; increase
 -: serum; increase, muscle; decrease
 ±: no-change

マウスという遺伝子座位の異なる2種類の疾患モデル動物における筋ジストロフィー症に共通して発現する一般症状を抑制するのに有効であるということを示しているものと思われる。LDH活性の変化に関しても、Diprotin-A投与群における骨格筋中活性の低下のように例外は見られるものの全体としてCPKおよびPK両酵素の活性変化とほぼ同様な傾向が認められた。一方、GOT活性に関しては対照マウスと比較してあまり顕著な変化は認められなかった(表5)。又、これらのマーカー酵素群の活性変化のパターンに見られる改善傾向は全被検マウスの腓腸筋について行った組織学的観察によって得られた組織像の悪化の程度の軽減という結果によって支持された。更に、投与期間中の体重変化に関する測定結果は今回用いられた4種類の蛋白質分解酵素阻害物質のうち、特にFUT-175とFormestin-Aを投与した被検マウスで顕著な体重増加が起っていることを示しているが、このことはFUT-175とFormestin-Aが*in vivo*における疾病に対する作用機序に関して他の2物質とは若干異なる面を持っていることを示唆しているものと考えられる。

今回得られた結果を総合的に判断すると、用いられた4種類の蛋白質分解酵素阻害物質は程度の差はあるが、いずれも筋ジストロフィー症の治療薬として症状進行の軽減という面で効果が得られる可能性が示唆されたものと考えられ、更に*in vitro*における薬理効果或いは作用機序などを追求するための多角的な実験を行う価値があるものと推察される。

又mdx, dy, myd, croなどの筋ジストロフィー症の疾患モデルマウスにおいて、症状の進行に伴って著しく活性上昇を示すアルカリ・プロテアーゼが存在することが知られているが⁹⁾、我々はこの酵素の精製に成功し、*in vitro*の実験系で筋の収縮系蛋白(ミオシン、アクチン)を分解する

機能を有することを確認している⁷⁾。更に今回の投与実験においても予備的所見ではあるが各酵素阻害物質の投与によってこの酵素の活性が低下することを見ているので、この酵素を将来筋ジストロフィー症状進行のマーカー酵素として治療薬の効果検定の研究に利用出来る様に目下開発中である。

文 献

- 1) 辻 繁勝：各種酵素阻害剤投与のmdxマウス病態に与える影響について。厚生省新薬開発研究費・「低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究」江橋班、昭和61年度研究報告書、1987, p.p. 63-67.
- 2) Tanaka, T., Harano, Y., Sue, F. and Morimura, H.: Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinases isolated from rat tissues. *J. Biochem.* 62: 71-91, 1967.
- 3) Hess, J.W., Murdock, K.J. and Natho, G.J.W.: Creatine phosphokinase. A spectrophotometric method with improved sensitivity. *Am. J. Clin. Pathol.* 50: 89, 1968.
- 4) Wroblewski, F. and LaDue, J.S.: Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90: 210-213, 1955.
- 5) Karmen, A., Wroblewski, F. and LaDue, J.S.: Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.* 34: 126, 1955.
- 6) 辻 繁勝：幾つかの筋ジストロフィー症モデルマウスにおけるAlkaline protease活性の変化。厚生省特定疾患・「難病の疾患モデル調査研究」京極班、昭和59年度研究報告書、1985, p.p. 123-127.
- 7) Kusumoto, S., Doi, Y., Sawade, H. and Tsuji, S.: Purification and properties of alkaline protease in murine muscular dystrophy. *J. Physiol. Soc. Japan* 49: 485, 1987.

E-64 誘導体による糖原病II型ウズラの治療

杉 田 秀 夫 *

研究協力者 石 浦 章 一 * 塚 原 俊 文 *
須 原 芳 宏 * 菊 地 建 機 *

はじめに

日本ウズラに発見された糖原病II型は、ヒト成人型モデルとして有用であると考えられている^{1)~6)}。今回我々は、培養系、および疾患ウズラを用いて、蛋白分解酵素阻害剤投与の効果を検討した。

本疾患モデルでは、リソゾーム酵素の一種である酸性 α -グルコシダーゼ(酸性マルターゼとも呼ばれる)活性が胎生期より正常の15~20%と低値を示すことが明らかにされており、イムノブロット法によって98kの正常酵素分子が存在しないことが判明している。しかしながら、前駆体と考えられる110k分子は正常と同程度発現されており、これがわずかながら活性を持つため一見酵素量が少ないかのごとく見えることがわかっている。そこで、最も適当であると思われる説は、何らかの異常により酵素のプロセッシング又は代謝が正常に比べて速い、というものであり、本研究はこの仮説を出発点とし、異常酵素の分解を抑制することによって酵素活性の回復をはかり、症状を改善することを目的として行われた。

方 法

正常、並びに疾患ウズラより線維芽細胞を培養(90% Eagle's MEM-10% Fetal calf serum)し、confluent な状態でESTを投与した。ESTはDMSOに溶解し、DMSO濃度は1%を越えることのないように調節した。なお、培養液は1日ごとにとり換え、投与は5日間とした。

動物への投与はE-64-c (10mg/kg)を連日背部皮下に14日間行った。実験終了後、胸筋をとり出し、種々の酵素活性を測定した。

結果ならびに考察

培養細胞に対する効果

実験はまず、正常ウズラ1種および疾患ウズラ2種の計3種の線維芽細胞を用いて行った。ESTは2種類(10および50 μ g/ml)の濃度を用いた(表1)。表より明らかなように、リソゾーム酵素である酸性 α -グルコシダーゼ(α -Glu, acid)と α -ガラクトシダーゼ(α -Gal)は、3種の細胞共にEST投与によって活性が数倍に上昇しているのがわかる。特に2種類の糖原病ウズラ線維芽細胞(AMD, No 7と8)では α -グルコシダーゼ活性

表1 培養線維芽細胞に対するEST投与の効果(実験1)
活性はすべてEST非投与を100として相対値で表してある。

Cells	Relative Activity		
	α -Glu (acid)	α -Gal	α -Glu (neutral)
* Normal fibroblast			
no addition	(100)	(100)	(100)
EST 10 μ g/ml	165	345	105
50 μ g/ml	183	279	94
* AMD fibroblast No.7			
no addition	25	137	73
EST 10 μ g/ml	48	605	59
50 μ g/ml	55	781	63
* AMD fibroblast No.8			
no addition	22	225	91
EST 10 μ g/ml	36	477	102
50 μ g/ml	39	466	82

* 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部

が2倍近くにも上昇しており、ESTにより酵素前駆体の分解が抑えられていることが明らかである。一方、小胞体酵素と考えられている中性 α -グルコシダーゼ (α -Glu, neutral) 活性はEST投与の影響を受けないことがわかる。以上の結果より、ESTはリソゾーム内の蛋白分解を抑制することによりリソゾーム酵素の蓄積を誘導することが実証された。

次に、ヒトEST投与実験より血中E-64-c濃度が $1\mu\text{g/ml}$ を越えないことを考慮してEST濃度を下げ、効果が出るかどうかを検討した。表2にその結果を示す。ESTは $0.1\sim 10\mu\text{g/ml}$ の5段階とし、対照として細胞内可溶性分画に存在するアミノペプチダーゼB (AP-B) もつけ加えた。この表より明らかなように、酸性 α -グルコシダーゼ活性は、EST $0.1\mu\text{g/ml}$ 投与においても上昇しており、低濃度のESTでも効果が認められることが判明した。また、実験1 (表1)と同様にリソゾーム酵素活性のみを上昇させていることも明らかになりESTの有効性が培養条件下では常に再現可能であることが示された。

一方、実験2 (表2)においてEST $0.1\mu\text{g/ml}$ で抑えられるシステインプロテアーゼはカテプシンB, Lであり、カテプシンHではないことも同

時に明らかとなった。この事実は、リソゾーム酵素の代謝にカテプシン類、特にBとLが重要な役割をになっていることを示す直接的な証拠ともなると考えられる。

次に、EST投与の前段階として活性型E-64-cを糖原病ウズラに投与し、筋肉を採取後、 α -グルコシダーゼ活性を測定した。投与量は 10mg/kg とし、背中皮下に連日投与した。結果を表3に示す。E-64-c投与群 ($n=9$)では、体重は有意に上昇し、ウズラに対する副作用はないと考えられた。酸性 α -グルコシダーゼ値は、上昇はしているものの個体差が大きく、有意差は検出されなかった。個々のウズラについては値を図1に示す。この実験では、酸性 α -グルコシダーゼ以外のリソゾーム酵素活性も上昇せず、明らかに培養系と異なる結果が得られたため今後投与方法、投与量などに検討の余地があると考えられた。

おわりに

本研究より、リソゾーム病においても適量のE-64誘導体を使用することにより、欠損酵素の分解を抑制し反応物質の蓄積を防ぐことが可能であることが明らかとなった。今後動物モデルを用いて効果的な投与方法を検討すると共に、発症機構を明らかにしたい。

表2 培養線維芽細胞に対するEST投与の効果 (実験2)
値は表1を参照。

Cells	Relative Activity			
	α -Glu (acid)	β -Gal	α -Glu (neutral)	AP-B
* Normal fibroblasts				
no addition	(100)	(100)	(100)	(100)
EST 0.1 $\mu\text{g/ml}$	144	135	92	104
0.5 $\mu\text{g/ml}$	147	156	85	97
1.0 $\mu\text{g/ml}$	146	151	91	93
5.0 $\mu\text{g/ml}$	162	155	98	97
10.0 $\mu\text{g/ml}$	173	157	96	104
* AMD fibroblasts				
no addition	33	85	106	84
0.1 $\mu\text{g/ml}$	39	95	101	85
0.5 $\mu\text{g/ml}$	50	102	115	88
1.0 $\mu\text{g/ml}$	48	106	102	84
5.0 $\mu\text{g/ml}$	58	106	121	86
10.0 $\mu\text{g/ml}$	57	101	106	82

表3 糖原病ウズラに対するE-64-c投与の効果
E-64-cはSalineに溶解し、 10mg/kg を連日14日間投与した。各酵素活性は、骨格筋中のmgタンパク質当りの活性として表してある。

* Body weight	AMD (n=9)	AMD + E-64-c (n=9)
	79.0 ± 7.8	$84.0 \pm 4.2^*$
* Enzyme activity		
acid α -glucosidase	36.0 ± 14.8	47.5 ± 35.1
α -galactosidase	12.7 ± 4.1	13.3 ± 4.1
β -glucuronidase	14.5 ± 3.2	$12.6 \pm 3.5^*$
N-Ac- β -glucosaminidase	45.7 ± 10.7	$39.8 \pm 6.5^*$
neutral α -glucosidase	38.1 ± 6.7	33.7 ± 14.0

* $P < 0.25$

文 献

**Acid α -glucosidase activity
in quail muscle**

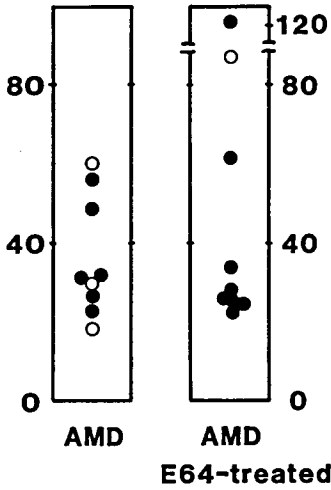


図1 E-64-c 非投与群 (AMD) 並びに投与群 (E-64 treated) の骨格筋酸性 α -グルコシダーゼ活性 (U/mg)
● : グリコーゲン蓄積ウズラ
○ : グリコーゲン非蓄積ウズラ

- 1) Murakami, H., Takagi, A., Nonaka, I., Ishiura, S., Sugita, H. and Mizutani, M.: Type 2 glycogen storage disease in Japanese quails (ed. by Ebashi, S.), in *Muscular Dystrophy*, 1982, p.p. 37-48.
- 2) Usuki, F., Ishiura, S. and Sugita, H.: Isolation and characterization of α -glucosidase from Japanese quails, *J. Biochem.*, 99: 985-988, 1986.
- 3) Usuki, F., Ishiura, S. and Sugita, H.: Developmental study of α -glucosidase in Japanese quails with acid maltase deficiency. *Muscle Nerve*, 9: 537-543, 1986.
- 4) Higuchi, I., Nonaka, I., Usuki, F., Ishiura, S. and Sugita, H.: Acid maltase deficiency in Japanese quails; early morphological event in skeletal muscle. *Acta. Neuropathol.*, 73: 32-37, 1987.
- 5) Usuki, F., Ishiura, S., Nonaka, I. and Sugita, H.: α -Glucosidase isoenzyme in normal and acid maltase-deficient human skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 1988, in press.
- 6) Usuki, F., Ishiura, S., Higuchi, I. and Sugita, H.: Reappearance of embryonic neutral α -glucosidase isozyme in acid maltase-deficient muscle of Japanese quail. *Exp. Neurol.*, 1988, in press.

実験的筋炎モデル動物の作製に関する研究

— 自己免疫筋疾患抗原物質のモノクローナル抗体による解析 —

里 吉 栄二郎*

研究協力者 古川 昭 栄* 赤 沢 左衛子* 加 茂 功*

多発性筋炎 (polymyositis : PM), 皮膚筋炎 (dermatomyositis : DM) は筋肉に特異的に細胞障害性免疫反応が認められる¹⁾²⁾。これら疾患の発症機構は未だ不明であるが, 自己免疫疾患の角度から研究されている。本研究はこれら疾患の病態をよく反映する実験的モデル動物を作製し, 低分子酵素阻害物質の発病抑止効果, 治療薬としての効果を検討するのが目的である。

PM, DM では筋肉が特異的にリンパ球による細胞浸潤を受けることから, 筋肉にのみ特異的に存在するなんらかの成分が自己免疫反応の標的になっていると推定される。これまでに PM や DM に見いだされている自己抗体としては, 抗ミオグロビン抗体³⁾, 抗ミオシン抗体⁴⁾, 抗核抗体⁵⁾があるが, 疾患特異性が低いとされており, PM, DM の発症の引金となる抗原物質は他に存在すると考えられる。

重症筋無力症 (myasthenia gravis : MG) は神経・筋シナプス後膜に特異的に存在する AChR に対する抗体が産生され, その抗体によって AChR が障害される疾患と考えられている⁶⁾。しかし, MG 患者血清中には未だ未同定の筋肉抗原に対する抗体が高頻度に存在している。PM や DM でみられる筋特異的リンパ球の浸潤を考慮するとき, 著者らはこれらの抗原物質の中に, 細胞性免疫反応の標的となる物質が存在するのではないかと考えた。

昨年度は, この様な抗原物質の存在と, ある抗原に対するモノクローナル (MC) 抗体を作製し得たことを報告した。本年度は, この MC 抗体の特異性と, その認識する抗原物質のいくつかの特性を明らかにしたので報告する。また, 抗原物質そのものの精製も試みたので, その結果についても報告する。

方 法

抗原物質のラット筋肉からの抽出法, 抗原活性の測定法はすでに報告した方法⁷⁾によった。抗原感作リンパ球とミエローマとのハイブリドーマ作製法, MC 抗体のスクリーニング法は昨年度報告した。

MC 抗体の大量調製

すでに昨年度確立した 3 種のハイブリドーマ (1E7, 2B2, 7D9) を 10% 仔牛胎児血清 (fetal calf serum : FCS) を含む Dulbecco's MEM (DMEM) 液で拡大培養し, 各細胞約 5×10^6 個をあらかじめプリスタン投与しておいた Balb/c マウスの腹腔内へ移入した。約 10 日後に腹水を集め, これらの MC 抗体は IgG であることが判っているので, 遠心分離上清を protein A カラムによるアフィニティクロマトグラフィーを行って, IgG を精製し以下の実験に用いた。

MC 抗体のビオチン標識

精製 MC 抗体 $50 \mu\text{g}$ を含む PBS 液 $100 \mu\text{l}$ に $2 \mu\text{l}$ の N, N-dimethylformamide に溶解した $20 \mu\text{g}$ の biotinyl-aminocaproic acid N-hydroxy-succinimide を添加し, 30°C で 2 時間反応させた。0.1ml の 1.5M トリス-HCl 緩衝液 (pH8.8) を加

* 国立精神・神経センター神経研究所

えて反応を止めた後、0.1%牛血清アルブミン、0.1% NaN_3 を含む0.1M トリス-HCl 緩衝液を0.8 ml 添加して4°Cで保存した。この方法で、1E7, 2B2, 7D9の各MC抗体と、対照となる他のMC抗体を2種類ビオチン化した。

MC抗体-抗原間の結合の阻害実験

昨年度報告した方法でポリスチレンチューブに物理吸着した粗抗原(骨格筋のPBS抽出物)とビオチン化MC抗体との結合を調べたところ、約50 ng/mlのMC抗体濃度が示適であった。抗体の特異性を調べるために、この濃度の各ビオチン化MC抗体を、あらかじめ種々の濃度に希釈した非標識MC抗体、またはMC患者血清とプレインキュベートした抗原被覆チューブに添加した。チューブに結合したビオチン化抗体量はその後ストレプトアビジン標識-horseradish peroxidase (HRP) または、同標識-beta-D-galactosidase を反応させ、各々の酵素活性を測定することによって定量した。

筋抽出物の二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) とウエスタンブロット

Manabeらの方法⁹⁾で、一次元目を等電点電気泳動、二次元目をpH9.4の系でPAGEした後、ゲルをニトロセルロース膜に一夜密着させてゲル中のタンパク質をセルロース膜に転写した。膜上に転写された抗原活性は、順次、ビオチン化抗体、ストレプトアビジン-HRPを反応させ、4-クロロナフトールを発色剤として可視化した。

培養胸線筋様細胞における抗原の発現

Kamoらによってラット胸線から樹立された株化細胞R651B2⁹⁾を10% FCSを含むDMEMで培養した。部分的に細胞が融合、筋管を形成した時点で、細胞を純メタノールで3分間固定し、順次、ビオチン化MC抗体(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、ストレプトアビジン-alkaline phosphataseと反応させ、Vector Redで発色させた。

結果と考察

抗原分子の生体内分布

まず、対象とする抗原の生体内での分布を詳細

に検討した。抗原を検出する抗体として、典型的なMC患者血清を用いた。6週齢ラットの各臓器をPBSでホモジナイズ、10万×g遠心分離した上清中の抗原をチューブに物理吸着させて調べたのが図1である。抗原活性は骨格筋と、心筋に多く、微量ながら胸線にも存在していた。胸線には筋様細胞があることが知られており、胸線筋様細胞にもこの抗原分子があることを示唆している。胸線は自己免疫疾患の発症機序に深く関わっていると推定されており興味深い。

MC抗体の特異性の検討

次に、筋抗原認識MC抗体の特異性を調べた。チューブに固相吸着した抗原へのビオチン化MC抗体の結合を阻害する程度を各MC抗体についてみたのが図2である。MC抗体1E7, 2B2は互いに同程度の結合阻害を示し、7D9やコントロールは結合を全く阻害しないところから、同一のエピトープを認識する抗体と考えられた。7D9はそれ

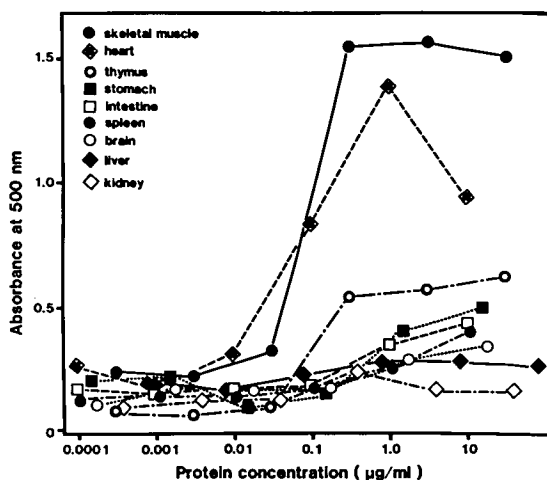


図1 抗原活性のラット臓器分布
6週齢ラットの各臓器を冷却PBSでホモジナイズ(5%w/v)後、10万×gで遠心分離した上清を順次3倍希釈し、チューブに被覆した。1000倍希釈したMG患者血清P-1をチューブに加え反応させたのち、チューブに結合したIgGをABC法で定量した。縦軸: peroxidase活性の吸光速度
横軸: チューブ被覆に用いた臓器抽出物のタンパク濃度

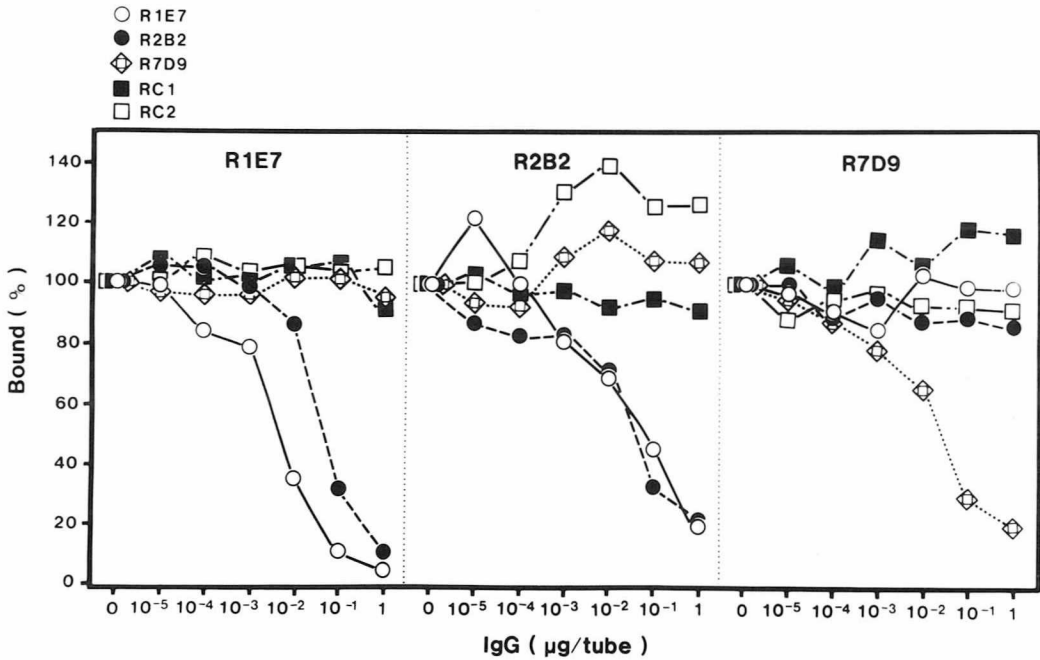


図2 モノクローナル抗体の特異性

筋肉抽出物を被覆したチューブに各種モノクローナル抗体を種々の濃度で添加（横軸），反応させた後，¹²⁵I 標識した 1E7, 2B2, 7D9 抗体を反応させた．チューブに結合した放射活性を計測し，抗体無添加での値を100%として表現した（縦軸）．

自体でのみ結合が阻害されることから，1E7, 2B2とは異なるエピトープを認識する抗体と考えられる．同様の結合阻害実験を，MC 患者血清についても行ったところ，1E7, 7D9いずれのエピトープに対する抗体も一部の患者血清中に存在することが判った．患者血清中の存在頻度は1E7エピトープが約50%，7D9エピトープが約15%であった．

MC 抗体認識抗原の解析

この2種のMC 抗体の認識するエピトープが同一の分子上にあるのか，異なる分子上にあるのかを検討した．筋肉抽出物を二次元電気泳動し，ニトロセルロース膜にウエスタンブロット後，抗体と反応させて抗原分子の分布をみた．図3に示すように，3つの等電点の異なる位置に，縦に長く抗原が分布しており，分子多様性がきわめて高いことが判る．しかも1E7, 7D9, 患者P-1血清が認識する抗原の分布は全く同じであった．即ち，この2種のMC 抗体と患者P-1の認識する抗原

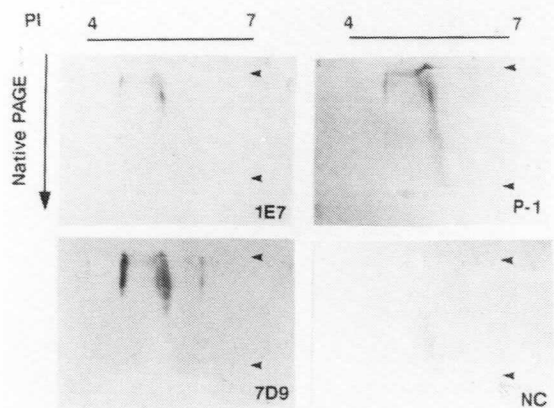


図3 抗原分子の二次元電気泳動による解析
筋肉抽出物（50µgタンパク）を二次元電気泳動後，ニトロセルロース膜に転写した，膜をモノクローナル抗体またはMG患者血清P-1と反応させ，ビオチン化抗マウスまたはヒトIgG抗体と反応させた後，ABC法で4-クロロナフトールにより発色させた．

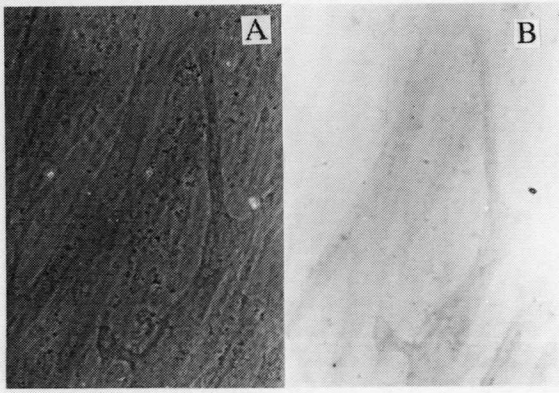


図4 培養胸線筋様細胞における抗原物質の酵素抗体法による染色

培養胸線筋様細胞 (R651B2 株) を純メタノールで固定後、順次、ビオチン化モノクローナル抗体 7D9、ストレプトアビジン-alkaline phosphatase と反応させ、Vecter Red で発色させた。

A: 位相差写真; B: 透過光写真; 倍率 200×。

分子は全く同じであると考えられた。

胸線筋様細胞における抗原の分布

ほぼ器壁いっぱい増殖し、部分的に細胞融合のみられる状態のラット胸線筋様細胞を 1E7, 7D9 MC 抗体で染色した。図4に示すように、何れの抗体でも融合細胞のみに染色が認められた。即ち、この抗原分子は筋芽細胞には存在せず、筋管形成後にはじめて遺伝子が発現されてくると推定される。

抗原物質の精製の試み

骨格筋の PSB 抽出物を出発材料として、抗原

分子の精製を試みた。Sephacrose CL-6B カラムによるゲルろ過を2回、高速液体クロマトグラフィー下、モノ Q カラムによるイオン交換クロマトグラフィーを2回行って得られた試料を pH9.4 系一次元電気泳動で調べた。数本の MC 抗体陽性のバンドが検出され、これらを加算すると抗原分子の存在比が80%以上となった。今後、ゲルからの抽出または、逆相カラムによって、さらに精製し、アミノ酸構造解析を行う予定である。その結果、この抗原の物質としての同定ができるものと期待される。

文 献

- 1) Goust, J.M., Castaigne, A. and Moulias, R.: Clin. Exp. Immunol., 18: 39, 1974.
- 2) Haas, D.C. and Arnason, G.B.W.: Archs. Neurol., 31: 192, 1974.
- 3) Nishikai, M. and Honma, M.: Lancet, 2: 1205, 1972.
- 4) Wada, K. et al.: Clin. Exp. Immunol., 52: 297, 1983.
- 5) Nishikai, M. and Reichlin, M.: Arthritis Rheum., 23: 881, 1983.
- 6) Vincent, A.: Physiol. Rev., 60: 756, 1980.
- 7) Akazawa, S., Furukawa, S., Kamo, I., Furukawa, Y., Satoyoshi, E. and Hayashi, K.: J. Immunol. Methods, 94: 161, 1986.
- 8) Manabe, T., Tachi, K., Kojima, K. and Okuyama, T.: J. Biochem., 85: 649, 1979.
- 9) Kamo, I., Nonaka, I., Furukawa, S. and Satoyoshi, E.: Biosci. Rep., 4: 925, 1984.

分 担 研 究 者 一 覽

低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究班・班員名簿

氏名	所属	所在地	電話番号
班長 江橋 節郎	岡崎国立共同研究機構 生理学研究所	444 岡崎市明大寺西郷中38	0564-53-7345 (直)
幹事 青柳 高明	微生物化学研究所 酵素研究部	141 品川区上大崎 3-14-23	03-441-4173
幹事 木下 真男	東邦大学医学部大橋病院 第四内科	153 目黒区大橋 2-17-6	03-468-1251
幹事 勝沼 信彦	徳島大学酵素科学研究センター	770 徳島市蔵本町 3-18-15	0886-31-3111 内2550
監事 福原 武彦	東京慈恵会医科大学 第二薬理学教室	105 港区西新橋 3-25-8	03-433-1111 内2255
運営 幹事 杉田 秀夫	国立精神・神経センター 神経研究所	187 小平市小川東町 4-1-1	0423-41-2711 内5111
班員 丸山 工作	千葉大学理学部生物学科	260 千葉市弥生町 1-33	0472-51-1111 内2622
班員 藤井 節郎	大阪基礎医学研究奨励会	520-01 大津市唐崎 1-11-1	0775-79-2280
班員 大倉 洋甫	九州大学薬学部 薬品分析化学教室	812 福岡市東区馬出 3-1-1	092-641-1151 内6151
班員 辻 繁勝	和歌山県立医科大学 第二生理学教室	640 和歌山市9番丁9	0734-31-2151 内319
班員 里吉栄二郎	国立精神・神経センター 神経研究所	187 小平市小川東町 4-1-1	0423-41-2711 内5101
班員 福山 幸夫	東京女子医科大学 小児科教室	162 新宿区河田町8-1	03-353-8111
班員 三吉野産治	国立療養所西別府病院	874 別府市大字鶴見 4548	0977-24-1221
班員 村上 慶郎	国立療養所箱根病院	250 小田原市風祭 412	0465-22-3196
班員 鈴木 紘一	東京都臨床医学総合研究所 遺伝情報研究部	113 文京区本駒込 3-18-22	03-823-2101
班員 川島 誠一	東京都老人総合研究所 生化学部臨床第一研究室	173 板橋区栄町 35-2	03-964-1131 内3068
班員 向山 光昭	東京理科大学 理学部化学教室	162 新宿区神楽坂 1-3	03-260-4271 内268
班員 大関 正弘	大正製薬(株) 総合研究所	330 大宮市吉野町 1-403	0486-63-1111 内351
班員 矢崎 義雄	東京大学医学部第三内科	113 文京区本郷 7-3-1	03-815-5411 内8274, 8278
班員 宮武 正	新潟大学脳研究所神経内科	951 新潟市旭町通一番町757	0252-23-6161 内5180
班員 石原 傳幸	国立療養所東埼玉病院 第三内科	349-01 蓮田市大字黒浜 4147	0487-68-1161
班員 西谷 裕	国立療養所宇多野病院	616 京都市右京区 鳴滝音戸山町 8	075-461-5121
班員 高橋 桂一	国立療養所兵庫中央病院	669-13 三田市大原 1314	07956-3-2121
班友 石井 靖男	日本化薬株式会社	102 千代田区富士見町 1-11-2	03-237-5154
班友 岩城 正広	鳥居薬品株式会社	272 市川市南八幡 3-14-3	0473-78-4121
顧問 今堀 和友	三菱化成命化学研究所	194 町田市南大谷 11	0427-26-1211