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63年度研究報告書

平成元年３月

研究報告書の作成にあたって

病気の治療は必ずしも病因の究明を必要としない．猛威をふるった結核の克服は，結核病理の解明とは全く無縁のところで行われた．勿論この場合は外因的疾患であり，論理的にも充分予想し得た筈である．では遺伝子疾患のような内因性疾患においては，事態はどのように展開してゆくのであろうか．

分子遺伝学的アプローチがデュシェンヌ型筋ジストロフィー病因の解明に突破口を開くであろうことは，万人の予測したことであった．この期待は，ボストンのKunkel教授らによって見事に現実化され，我が国を初めとする世界各国の研究者がこれに続き，目を見張るような成果が次々と生まれつつある．

しかし，研究の進展とともに，その自然発生率（変異率）が異常に高いことからも予想されるように，筋ジストロフィー成立の遺伝子的要因は，まことに奥深い複雑さを持つことが明らかになりつつある．このことは，分子遺伝学的な成果を治療と直結させるためには，従来にも増した叡智と努力を必要とすることを意味する．

この様な情勢を考えると，本研究班の意図する対症的治療法の意義は，現時点において寧ろ高まってきたというべきであろう．つまり，分子遺伝学的アプローチから得られる情報を臨床症状と対比することにより，病態の立体的把握が可能となり，より具体的な指針を設定することが可能となったからである．

本研究班は，従来から手がけてきた薬物の臨床的応用に結論を下すべく努力を重ねてきたが，本年度は新しい薬物の開発にも意を注ぎ，見るべき成果を収めた．この両方のアプローチを車の両輪として，今後とも筋ジストロフィー症治療法の開発とその確立に向け，一歩一歩前進してゆきたい．

平成元年3月

主任研究者　江　橋　節　郎

目　　次

Ⅰ．分担研究報告

1）筋ジスマウスの前肢，後肢筋におけるプロテアーゼ変化の相違点……3
微生物化学研究所　青柳　高明　和田　孝雄　小島　蕗子
永井真知子　原田　滋子

2）mdx マウス骨格筋中で活性変化するアルカリ・プロテアーゼの精製と性質……9
和歌山県立医科大学第二生理学教室　辻　繁勝　楠本　茂夫
東京工業大学理学部生命理学科　沢田　均

3）実験的筋炎モデル動物の作製に関する研究……15
—自己免疫筋抗原の筋組織内分布と精製の試み—
国立精神・神経センター神経研究所　里吉栄二郎　古川　昭栄　新井左衛子
加茂　功

4）1．ベスタチンの筋細胞膜安定化作用に関する実験的研究……19
2．ベスタチン二重盲検試進歩状況……22
東邦大学医学部大橋病院第四内科　岸　雅彦　木下　眞男　栗原　照幸
日高　隆信　池田　憲　高宮　清之

5）蛋白分解酵素の役割とその阻害剤に関する研究……23
㈶大阪基礎医学研究奨励会　藤井　節郎　日坂　哲彦　山田晴雄

6）CANP 阻害剤の合成……27
東京理科大学理学部　向山　光昭　植木　正彬
大正製薬株式会社総合研究所　大関　正弘　花田　和紀　横尾　千尋
岡崎　忠靖　村田　充男
徳島大学酵素科学研究センター　勝沼　信彦

7）筋ジスハムスターにおける CANP インヒビターの分解……33
東京都老人研究所　川島　誠一　林　昌美　中村　愛

8）CANP 遺伝子のクローニングに関する研究……35
—CANP インヒビターの阻害機構と阻害部位—
東京都臨床医学総合研究所　鈴木　紘一　川崎　博史　榎森　康文
西道　隆臣　反町　洋之

9）MEL 細胞骨格タンパク質に対する CANP インヒビターの影響……39
国立精神・神経センター神経研究所　杉田　秀夫　石浦　章一　塚原　俊文

10) Recombinant Cystatin 類の治療薬としての開発に関する基礎研究 ……43
徳島大学酵素科学センター酵素化学部門　勝沼　信彦　唐渡　孝枝　二川　健
三井東圧化学株式会社ライフサイエンス研究所　池　祥雅

11) E-64-c および EST の薬物動態 ……47
—蛍光 HPLC によるモニター法の開発—
九州大学薬学部　大倉　洋甫　巣　文峰　甲斐　雅亮

12) 哺乳類横紋筋 C-タンパク質アイソフォーム：
二次元電気泳動法とイムノブロット法による解析 ……53
千葉大学理学部生物学科　丸山　工作　大日方　昂　小島　崇
新保　和彦

13) CANP 阻害剤の一般薬理学的研究 ……59
—神経活動および筋電図の周波数分析に基づく呼吸筋機能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　高野　一夫　木村　直史
加藤　総夫

14) 骨格筋ミオシン軽鎖のラジオイムノアッセイによる測定法の開発 ……65
東京大学医学部第三内科　矢崎　義雄　永井　良三　磯部　光章
加藤　祐之
国立精神・神経センター神経研究所　杉田　秀夫

15) Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における筋障害の進行過程 ……67
—CT スキャンによる定量的評価—
国立療養所東埼玉病院内科　石原　傳幸　青柳　昭雄　儀武　三郎
川村　潤　横田　名慈
国立療養所東埼玉病院リハビリテーション科　里宇　明元　園田　茂　原　行弘

16) 正常幼児の運動機能について ……73
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　炭田　沢子　岡田　典子
鈴木　暘子　宍倉　啓子　平山　義人

17) 筋ジストロフィー症患者の理学的評価法の再検討 ……79
東京大学医学部脳研病理　中野　今治
国立精神・神経センター神経研究所　杉田　秀夫
国立療養所東埼玉病院　石原　傳幸　熊井　初穂
国立療養所下志津病院　藤井　則子　土佐　千秋　石原　真弓
松村喜一郎
新潟大学脳研究所神経内科　桑原　武夫
国立療養所新潟病院　近藤　隆春　水野　京子　山崎　元義
国立療養所医王病院　崎田　朝保　本家　一也　武田　洋子
国立療養所南九州病院　幸福　圭子　福永　秀敏

18) Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の臨床的検討：……85
EST 投与群 5 年目の経過と EST 二重盲検試験の出発
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　近藤　隆春

19) ベスタチン投与剤における筋疾患マーカーの変動について　……89
国立療養所宇多野病院　西谷　裕　板垣　泰子　太田　光熙

20) ベスタチンの血清 LAP に及ぼす影響 ……93
国立療養所兵庫中央病院　高橋　桂一　梅枝　孝之　益田　喜信
森鼻　文朗　小林　浩子

21) ベスタチンの長期投与について　……97
国立療養所箱根病院　村上　慶郎　岡崎　隆　林　英人
梁　正淵

22) ベスタチン服薬および非服薬 DMD 患者における T 波の検討　……103
国立療養所西別府病院　三吉野産治　江田伊勢松

II．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 ……109

分担研究報告

筋ジスマウスの前肢，後肢筋におけるプロテアーゼ変化の相違点

青柳高明*

研究協力者　和田孝雄*　小島蕗子*
永井真知子*　原田滋子*

はじめに

筋ジストロフィー症の発症ならびに進展の機序に，プロテアーゼの異常による筋蛋白崩壊が重要な役割を演じていることが可成り明らかになり，各種プロテアーゼ阻害物質を治療に用いる試みが，多くの研究者によって報告されている．筆者らは筋ジスマウスの前肢筋および後肢筋のアミノペプチダーゼが有意に増加すること[1)~3)]，さらに患者血清中のアミノペプチダーゼとエンドペプチダーゼが発病機序に異なる役割を果していることを示唆した[4)]．

今回の研究では筋ジスマウスの前肢筋および後肢筋中のプロテアーゼ活性の動態を経時的に追究した．また，エンドペプチダーゼに属する各酵素に対しては基質特異性の高い合成基質を用い．さらに標的酵素の特異性を高めるため，低分子酵素阻害物質の添加効果についても述べる．

実験動物

筋ジスマウス（C 57 BL/6 $J^{dy}/_{dy}$）および対照マウス（C 57 BL/6 $J^{dy}/_{+}$and$^{+}/_{+}$）は実験動物中央研究所より購入した．実験動物は生後1週から11週まで，各週ごとに1匹宛屠殺したのち，直ちに前肢筋，後肢筋，心，脾，肝，腎を摘出し，−70°Cで保存した．臓器は10倍量のphosphate buffered saline（PBS）の中で，組織ホモジナイザー（Ultatrrax）を用いて1分間ホモジナイズした．酵素活性の測定には，組織ホモジェネートの3,000 xg, 20分間の遠心上清を用いた．

基質

酵素活性測定用の基質ならびに略語は下記に示す．

Glu・NA, L-glutamic acid β-naphthylamide hydrochloride；Arg・NA, L-arginine β-naphthylamide hydrochloride；Pro・NA, L-proline β-naphthylamide hydrochloride；Gly-Arg・NA, glycyl-L-arginine β-naphthylamide；Lys-Ala・NA, L-lysyl-L-alanine β-naphthylamide；Lys-Ala・NA, L-lysyl-L-alanine β-naphthylamide；Arg-Arg・NA, L-arginyl-L-arginine β-naphthyl-amide；Gly-Pro・NA, glycyl-L-proline β-naphthyl-amide；Z-Arg-Arg・NA, N-cbz-L-arginyl-L-arginine β-naphthylamide；Z-Gly-Pro・NA, N-cbz-glycyl-L-proline β-naphthylamide；Boc-Val-Leu-Lys・MCA, t-butyloxycarbonyl-L-valyl-L-leucyl-L-lysine 4-methyl-7-coumarylamide；Pro-Phe-Arg・MCA, L-prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine 4-methyl-7-coumarylamide；Boc-Gln-Ala-Arg・MCA, t-butyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-alanyl-L-arginine 4-methyl-7-coumarylamide；Suc-Leu-Leu-Val-Tyr・MCA, succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosin 4-methyl-7-coumarylamide；Suc-Ala-Pro-Ala・MCA, succinyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanine 4-methyl-7-coumarylamide；Boc-Val-Pro-Arg・MCA, t-

*微生物化学研究所

butyloxycarbonyl-L-valyl-L-prolyl-L-arginine 4-methyl-7-coumarylamide.

緩衝液

酵素活性測定用の緩衝液は0.02 M PBS (pH 7.2)を用いた．ただし，Post-Pro-Enzの測定には0.2 M Tris-HCl buffer(pH 7.8)を用いた．

酵素活性の測定

ホモジネートの遠心上清画分は，それぞれの基質溶液および緩衝液を含む反応試験管(1.5×10 cm)に分注し，37°Cで1時間の反応を行った．Post-Pro-Enzについては，前述の緩衝液を用いて測定した．すべての酵素活性の測定には3本の試験管を用い，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1**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[17]で測定した．

酵素阻害物質

ベスタチン〔(2 S,3 R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-(S)-leucine〕はAP-B, Leu-AP, tri-and tetra-aminopeptidaseなどを阻害する．

統計

多変量解析の一手法である主成分分析法[18]を用いて解析した．

結果および考察

前肢筋および後肢筋の酵素活性を筋ジスマウスと対照マウスで比較した結果，筋ジスマウスにおいてはアミノペプチダーゼが有意に増加することを認めた．筋ジストロフィー症において，アミノペプチダーゼの役割が重要であることを指摘[1),19),20)]した．さらに患者血清において，アミノペプチダーゼ活性の動態は罹病期間と逆相関であったが，エンドペプチダーゼ活性は順相関であった．疾病機序にエキソペプチダーゼとエンドペプチダーゼが異なる役割を果していることを示唆した[4)]．

今回は筋ジスマウスの前肢筋および後肢筋内のプロテアーゼの動態をアミノペプチダーゼ（7種類）とエンドペプチダーゼ（8種類）について経時的に検討した．特に，エンドペプチダーゼに属する各酵素に対しては特異的な合成基質を用い，さらに標的酵素の特異性を高めるため，低分子酵素阻害物質の添加効果を調べ，それぞれの反応系を確立した．

図1にカリクレイン活性測定におけるベスタチン添加の効果を示す．左図はカリクレイン蛋白量の変化を経時的に調べた．右図はカリクレイン（40.76 μg）を用い，同時に各種濃度のベスタチン添加時の分解曲線の変化を示す．ベスタチンは200 μg以上に加えても基質分解の低下はみられず，直線的分解を示した．カリクレ

表1 List of the proteases measured and their substrates

Enzyme	Abbreviation	Substrate	Reference for assay method
Aspartate aminopeptidase (EC3.4.11.7)	AP-A	Glu·NA	1
Arginine aminopeptidase (EC3.4.11.6)	AP-B	Arg·NA	1
Proline iminopeptidase (EC3.4.11.5)	Pro-IP	Pro·NA	5
Dipeptidyl aminopeptidase I (EC3.4.14.1)	DAP-I	Gly-Arg·NA	6
Dipeptidyl aminopeptidase II (EC3.4.14.2)	DAP-II	Lys-Ala·NA	7
Dipeptidyl aminopeptidase III (EC3.4.14.4)	DAP-III	Arg-Arg·NA	8
Dipeptidyl aminopeptidase IV (EC3.4.11.5)	DAP-IV	Gly-Pro·NA	9
Cathepsin B (EC3.4.22.1)	Cathepsin B	Z-Arg-Arg·NA	10
Prolyl endopeptidase (EC3.4.21.26)	Post-Pro-Enz	Z-Gly-Pro·NA	5
Plasmin (EC3.4.21.7)	Plasmin	Boc-Val-Leu-Lys·MCA	11
Tissue kallikrein (EC3.4.21.35)	Kallikrein	Pro-Phe-Arg·MCA	12
Trypsin (EC3.4.21.4)	Trypsin	Boc-Gln-Ala-Arg·MCA	13
Chymotrypsin (EC3.4.21.1)	Chy-try	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr·MCA	14
Leukocyte elastase (EC3.4.21.37)	Elastase	Suc-Ala-Pro-Ala·MCA	15
α-Thrombin (EC3.4.21.5)	Thrombin	Boc-Val-Pro-Arg·MCA	16

Z: carbobenzoxy, Boc: t-butyloxycarbonyl, Suc: succinyl

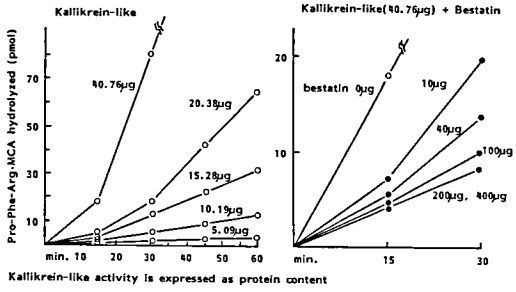


図1　Effect of bestatin on Kallikrein-like activity

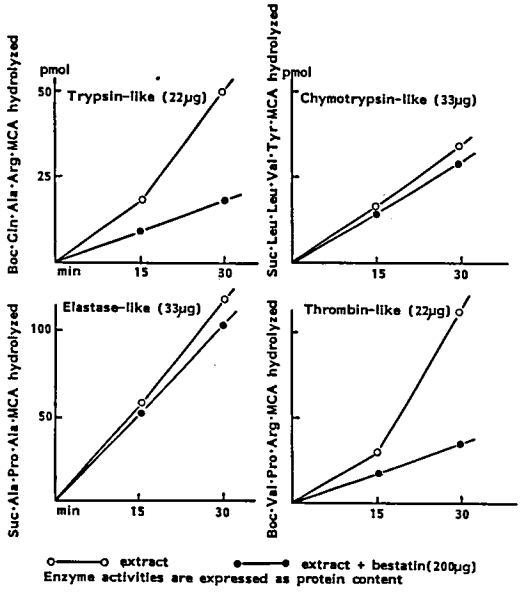


図2　Effect of bestatin on various protease activities

表2　Protease changes in forelimb and hind-limb muscles of control and dystrophic mice

Enzyme	Specific activity (nmol/min/mg protein)±SD n=11			
	Forelimb		Hindlimb	
	Control	Dystrophy	Control	Dystrophy
AP-A	0.538±0.095	0.917±0.323**	0.521±0.243	0.992± 0.228***
AP-B	7.066±1.028	7.555±1.283	7.718±2.642	7.830± 2.042
Pro-IP	1.001±0.375	1.111±0.659	1.409±0.741	1.272± 0.546
DAP-I	0.077±0.075	0.694±0.413***	0.164±0.183	0.705± 0.807*
DAP-II	4.388±1.259	8.305±1.712***	4.322±1.143	6.385± 3.801
DAP-III	1.555±0.727	2.285±0.810*	1.812±0.877	1.377± 0.394
DAP-IV	0.627±0.306	0.934±0.341*	0.769±0.473	0.836± 0.341
Cathepsin B	3.099±2.066	15.776±6.236***	2.540±1.812	13.226±12.087**
Post-Pro-Enz	2.631±0.714	3.434±0.541**	2.954±1.593	3.018± 0.969
Plasmin	0.036±0.010	0.102±0.034***	0.030±0.016	0.071± 0.023***
Kallikrein	0.028±0.013	0.060±0.055	0.021±0.009	0.031± 0.015
Trypsin	0.058±0.039	0.094±0.047	0.035±0.033	0.063± 0.046
Chymotrypsin	0.030±0.015	0.041±0.009*	0.026±0.012	0.033± 0.015
Elastase	0.032±0.008	0.069±0.025***	0.058±0.013	0.073± 0.027
Thrombin	0.083±0.048	0.170±0.081**	0.044±0.044	0.107± 0.070*

*: P<0.05, **: P<0.01, *** : P<0.001

インの基質である Pro-Phe-Arg・MCA はカリクレイン以外のベスタチンで抑制を受ける酵素により分解を受ける．それ故，カリクレイン活性の測定には 200 μg のベスタチンを加えて行なった．

図2にはトリプシン，キモトリプシン，エラスターゼ，トロンビンの分解曲線ならびにベスタチン（200 μg）添加時の分解曲線を示す．何れの酵素もベスタチン添加による影響を受けるが，特にトリプシン，トロンビンにおいて顕著である．エンドペプチダーゼに対する合成基質は特定酵素以外の影響を受け易い．それ故，特定酵素を阻害しない阻害物質を加えることが必要である．

上述した結果に基づき，前肢筋および後肢筋におけるプロテアーゼ活性を筋ジスマウスと対照マウスとの間で比較した結果を表2に示す．前肢筋についてみると，AP-A，DAP-Ⅰ，Ⅱ，ⅢとⅣ，カテプシン B，Post-Pro-Enz，プラスミン，キモトリプシン，エラスターゼ，トロンビンなどが筋ジスマウウスで有意に上昇している．また後肢筋については，AP-A，DAP-Ⅰ，カテプシン B，プラスミン，トロンビンなどが筋ジスマウスで有意に上昇していることが認められた．

これらの各酵素活性の変化を一括して論じるために多変量解析の一手法である主成分分析法を用いて解析を行った．第1主成分についての

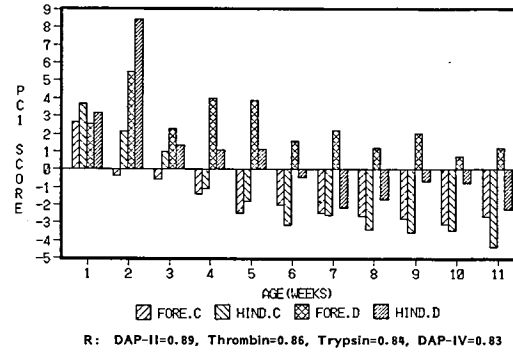


図3　Age related changes in muscular enzymes in dystrophic mice

因子得点の週齢による変化を図3に示す．対照マウスにおけるスコアは前肢筋および後肢筋をとわず，週齢にともなって低下する．一方，筋ジスマウスでは第2週に1度上昇したのち低下する．特に後肢筋において顕著であった．しかし，前肢筋では一旦上昇してからの低下度が少なく，常に後肢筋より高いスコアを示すことが認められた．前肢筋の主な酵素の活性は後肢筋より高いといえる．第1主成分と各種酵素との相関係数はDAP-II（$\gamma=0.89$），トロンビン（$\gamma=0.86$），トリプシン（$\gamma=0.84$），DAP-IV（$\gamma=0.83$）などが高い相関を示した．

この現象は，筋肉の萎縮がもっぱら後肢に起ることから一見パラドキシカルである．発病機序とこの現象との関係を考えてみるに，プロテアーゼがこの疾病の主な原因とはいわないが，少くとも増悪因子に関与していることが示唆される．対照マウスの週齢にともなう変化を正常と考えると，筋ジスマウスではこれらの酵素活性は生まれた時から上昇している．さらに，もう1つの因子が加わると，プロテアーゼが筋蛋白に作用し，萎縮を起すのではないかと思われる．しかし，一度萎縮が起ると，その筋肉細胞の萎縮のために細胞内の酵素活性そのものも低下してしまうと考える．

ま と め

筋ジスマウスの前肢筋および後肢筋における15種類のプロテアーゼの動態を経時的に調べた．エンドペプチダーゼに属する各酵素活性については基質特異性の高い合成基質を用いた．さらに，上記の各酵素を阻害しないベスタチンなどを添加することにより，標的酵素の特異性を高めた．筋ジスマウスでは前肢筋，後肢筋とも対照に比べ，各種のプロテアーゼ活性が有意に増加することを認めた．主成分分析による解析では，DAP-II，トロンビン，トリプシン，DAP-IVと関係の強い成分が前肢筋と後肢筋との間で解離することを認めた．これらのプロテアーゼと筋萎縮との関連性を究明し，難病解決の緒口としたい．

文　献

1）Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, I.: J. Clin. Invest., 67: 51-59, 1981.

2）Aoyagi, T., Tobe, H., Kojima, F., Hamada, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: J. Antibiot., 31: 636-638, 1078.

3）Umezawa, H., Aoyagi, T., Suda, H., Hamada, M. and Takeuchi, T.: J. Antibiot., 29: 97-99, 1976.

4）Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Miyoshino, S. and Umezawa, H.: Clin. Chim. Acta., 129: 165-173, 1983.

5）Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Okubo, M., Masaki, Y. and Umezawa, H.: J. Appl. Biochem., 7: 273-281, 1985.

6）McDonald, J.K. and Schwabe, C.: In proteinases in mammalian cells and tissues (ed. by Barrett, A.J.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, p.p. 314-322, 1977.

7）McDonald, J.K., Leibach, F.H., Grindeland, R.E. and Ellis, S.: J. Biol. Chem., 243: 4143-4150, 1968.

8）Ellis, S. and Nuenke, J.M.: J. Biol. Chem., 242: 4623-4620, 1967.

9）Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Osanai, M., Imahori, K. and Umezawa, H.: Biotech. Appl. Biochem., 8: 23-31, 1986.

10）Barrett, A.J. and Kirschke, H.: In methods in enzymology (ed. by Lorand, L.) Academic press, New York, p.p. 535-561, 1981.

11）Kato, H., Adachi, N., Ohno, Y., Iwanaga, S., Takada, K. and Sakakibara, S.: J. Biochem., 88: 183-190, 1980.

12) Nagase, H. and Barrett, A.: Biochem. J., 193: 187-192, 1981.

13) Kawabata, S., Miura, T., Morita, T., Kato, H., Fujikawa, K., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T. and Sakakibara, S.: Eur. J. Biochem., 172: 17-25, 1988.

14) Sawada, H., Yokosawa, H., Hoshi, M. and Ishii, S.: Experientia, 39: 377-378, 1983.

15) Mumford, R.A., Strauss, A.W., Powers, J.C., Pierzchala, P.A., Nishino, N. and Zimmerman M.: J. Biol. Chem., 255: 2227-2230, 1980.

16) Lottenberg, R., Christensen, U., Jackson, C.M. and Coleman, P.L.: In methods in enzymology (ed. by Lorand, L.) Academic Press, New York, Vol. 80. p.p. 341-361, 1981.

17) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.

18) Kendall, M.: In multivariate analysis, Charles Griffin and Co., London, p.p. 13-29, 1975.

19) Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Aoyagi, T. and Umezawa, H.: J. Pharm. Dyn., 4: 184-190, 1981.

20) Aoyagi, T., Wada, T., Yamamoto, K., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H.: J. Pharm. Dyn., 7: 312-321, 1984.

mdx マウス骨格筋中で活性変化する アルカリ・プロテアーゼの精製と性質

辻　繁勝*

研究協力者　楠本茂夫*　沢田　均**

はじめに

進行性筋ジストロフィー症の骨格筋では症状の進行に伴って種々のプロテアーゼ活性が上昇することが知られている．しかし，それぞれのプロテアーゼがどの様な形で疾病に関係しているかについては不明な点が多い．これらプロテアーゼ活性の中には症状の進行をプロモートするものもあり，あるいは発病に直接関与する活性増加もあり，疾病の発現に係わる機序は，かならずしも一様ではないと考えられる．我々はヒト DMD の疾患モデル動物である mdx マウスを用いて活性上昇を示す幾つかのプロテアーゼについて酵素蛋白の精製および性質の検索を行ない，それら酵素の筋ジストロフィー症発病に関与する機序を探ると同時に，種々の酵素阻害物質を投与した際の治療効果のマーカーとして有用であるかどうかの検討を行っている．

実験方法

使用動物

C 57 BL/10-mdx マウスおよびその正常対照の C 57 BL/10 系マウスを実験に使用した．

酵素の精製

今回は 2 つのプロテアーゼ活性について酵素蛋白の精製を行なった．いずれもアルカリ側に至適 pH 域のある酵素で，1 つは発症前の 10 日齢頃に活性のピークが現れるもので，ミクロソーム画分中に活性が認められ[1]，他は症状の進行に伴い 4 ヶ月齢頃に活性のピークに達するもので，粗ミトコンドリア画分中に存在する．前者は 20 日齢の mdx マウス後肢筋を 0.32 M蔗糖液（pH 7.4）中でホモジナイズし，14,000 g, 30 分間の遠心上清を分離し，更に 100,000 g, 90 分遠心分離して得られた沈澱をミクロソーム分画とした．ミクロソーム分画は更に 0.1 % Brji 35 を含む 1 MKCl 液（pH 8.0）で抽出し，DEAE・セファローズ，ヘパリン・セファローズ，アプロチニン・セファローズの順序でカラムクロマトグラフィーを行ない酵素精製を行なった．後者は 4 ヶ月齢の mdx マウス後肢筋を同様にホモジナイズし，14,000 g，30 分遠心分離後の沈澱を粗ミトコンドリア分画とした．粗ミトコンドリア分画は更に 1.5 MNaCl 液（pH 10.0）で抽出し，フェニール・セファローズ，LBTI セファローズの順にカラムクロマトグラフィーを行ない酵素の精製を行なった．

酵素活性測定

プロテアーゼ活性の測定はミクロソーム酵素の場合は 10 μM，Boc-Val-Pro-Arg-MCA を基質とし，pH 8.5，37°C，1 時間反応後に遊離した AMC を蛍光測定して求めた．一方粗ミトコンドリア分画の酵素活性は FITC-カゼインを基質とする方法と，5 μM の Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA を基質とする方法の両方を用いたが，いずれも pH 10.0，37°C，60 分間反応後，遊離物質を蛍光測定した．

結果及び考察

酵素の性質

まずミクロソーム分画由来の精製標品では表

* 和歌山県立医科大学第二生理学教室
** 東京工業大学理学部生命理学科

表1　Summary of purification of microsomal protease

Step	Protein (mg)	Activity (nmol/min)	Specific Act. (nmol/min/mg)	Yield (%)
100,000 g ppt	8.8	39	4.5	—
Crude extract	5.4	38	7.0	100
DEAE-Sepharose	3.2	18	5.6	49
Heparin-Sepharose	0.084	12	150	32
Aprotinin-Sepharose	0.034	6.6	190	17

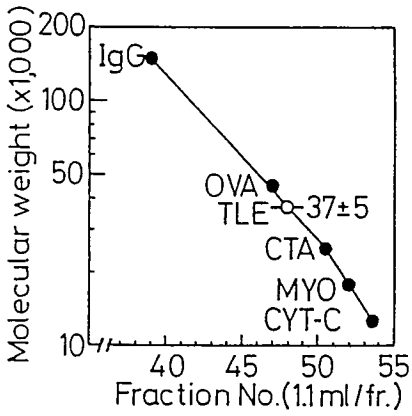


図1　Gel filtration of microsomal protease on Sephacryl S-300

1の如く，トリプシン・インヒビターであるアプロチニンを用いたアフィニティ・クロマトグラフィーの抽出液中で，ミクロソーム画分の約40倍の比活性が得られ，17％のyieldを示していた．この精製標品について性質を検査したところ，分子量はSephacryl S-300ゲル濾過法で分画すると37±5Kであり（図1），〔3H〕で酵素蛋白をラベルしてSDS-PAGE電気泳動を行なった結果でも約35Kに位置することが認められたことから約35,000と推定された．基質特異性については種々の合成基質を用いて検討した結果，P_2サイトにはプロリン残基，P_1サイトにはアルギニン残基を要求するトリプシン型のプロテアーゼであることが判った（表2）．又至適pH域はアルカリ側のpH 9近傍にあり（図2），等電点はゲル内等電点電気泳動法によりpH＝5.2であることが認められた．阻害剤に対する感受性テストではDFP，DMSFで強く阻害されることからセリン・プロテアーゼであることが認められ，ヌアンチトロンビンIII，アプロチニン，アンチパイン，ヒルジン，メシル酸ガベキサート，ロイペプチンなどでも100％近い活性阻害を受けることが判明した[2]．

表2　Substrate specificities of microsomal protease

Substrate (10 μM) P_5 P_4 P_3 P_2 P_1	% Activity
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	100
Tos-Gly-Pro-Arg-MCA	135
Tos-Gly-Pro-Lys-MCA	32
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	3
Boc-Leu-Thr-Arg-MCA	1
Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA	3
Glt-Gly-Arg-MCA	< 1
Boc-Leu-Gly-Arg-MCA	3
Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA	< 1
Z-Phe-Arg-MCA	< 1
Pro-Phe-Arg-MCA	1
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	< 1
Z-Arg-Arg-MCA	< 1
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	< 1
Bz-Arg-MCA	< 1
Arg-MCA	< 1

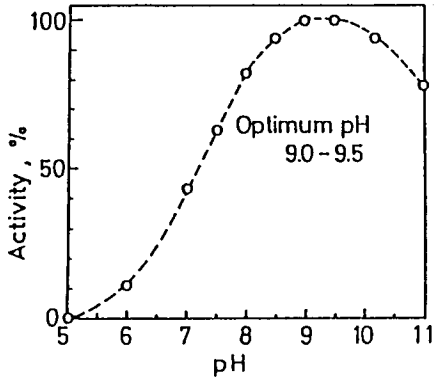


図2　Optimum pH range of microsomal protease

次に粗ミトコンドリア分画由来の精製標品の比活性を調べると表3に示す如く，LBTI-セファローズクロマトグラフィー抽出液中で粗ミトコンドリア画分の約1,700倍になっていた．又

表3 Summary of purification of protease from mitochondrial fraction

Step	Total Volume (mℓ)	Total Protein (mg)	Total Activity (nmol AMC/min)	Specific Activity (nmol AMC/min/mg)	Yield (%)
Crude extract	100	208	4.02	0.019	100
Phenyl-Sepharose	96	23	7.43	0.32	185
LBTI-Sepharose	17.6	0.118	3.91	33.14	97

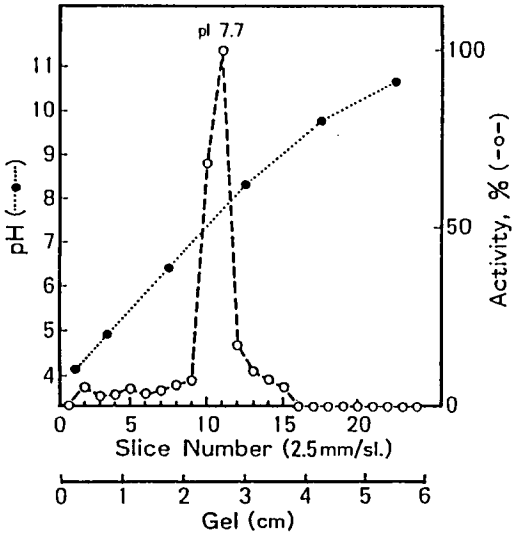


図3 Isoelectric focusing of protease from mitochondrial fraction

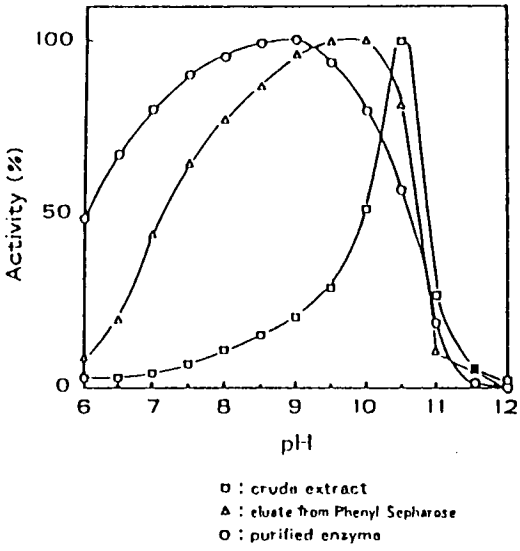


図4 Changes of optimal pH range on purification procedure

yield は 97 %であった.

フェニールセファローズ抽出液での yield が 100 %を大幅に越えているのは，酵素蛋白と結合した状態でインヒビターが内在し，精製の過程で分離したことを示している.

次に精製酵素の性質を検討したところ，分子量は Sephacryl S-300 ゲル濾過法でキモトリプシン A(25.2 K)とほぼ同じ位置に来ることが判り，SDS-PAGE で電気泳動し，銀染色した結果でも 25 K の所に単一のバンドが得られたことから約 25,000 の単鎖ポリペプチドであると推定した．又等電点はゲル内等電点電気泳動法によって pI=7.7 であることが認められた(図3)．更に基質特異性の検討結果から P_2サイトにバリン残基，P_1サイトにチロシン残基を要求するキモトリプシン型のプロテアーゼであることが示唆された．至適 pH 域の測定では図4の如く，精製酵素では pH 8.0～9.5 と，粗抽出液での至適 pH より中性に近づいた値を示したことから，生体内では酵素蛋白と結合して存在する内在インヒビターが至適 pH をアルカリ側に引張り，活性を抑制しているが，インヒビターが離れると，生理的条件下でも高い酵素活性が現われて来る可能性を示しているものと考えられる.

阻害剤に対する感受性テストでは DFP, PMSF で強く活性が阻害されることからセリン・プロテアーゼに属することが明らかであるが，ヌキモスタチン，STI, LBTI, TPCK などでも強く阻害されることが認められた.

一方，精製過程で酵素と分離されることからその存在が認められた内在インヒビターについても検討を行なった結果この物質は図5に示される如く LBTI-セファローズクロマトグラフィーの際の非吸着部分に抽出されるもので，分子量 1.2 K と 60 K 以上の二つのフラクションにピークが存在することが認められた．そのうち圧倒的に量の多い 1.2 K のものが主要なイ

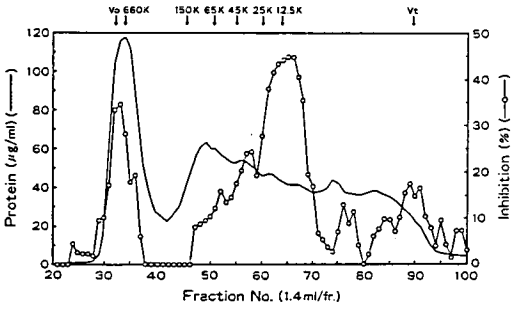


図5　Inhibitory effect of unabsorbed fraction to LBTI-Sepharose on protease activity from mitochondrial fraction

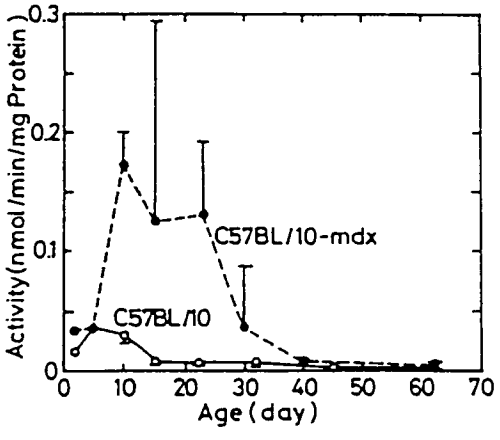


図6　Age related changes of microsomal protease activities from normal (open circle) and mdx (closed circle) mice

ンヒビターで正常状態の体内では酵素蛋白と結合し，酵素活性を抑制しているものと推測される．

酵素の機能

mdx マウス後肢筋からミクロソーム画分を採出し，その中の酵素活性を日齢順に測定すると図6の如く 10 日齢頃から急激に活性が上昇し，25 日齢頃から活性が低下し始め，40 日齢頃に正常マウスとほぼ同じレベルに戻ることが認められた．一方正常マウスでは 10 日齢迄はやや高い活性値を示しているが，15 日齢以降になると極めて低い活性値を示す様になる．以上の結果からこの酵素は mdx マウス骨格筋において 20 日齢以降に認められる急激な組織学的変化の際に主役の1つを演じている可能性が推測される．又正常マウスでは幼仔期にのみやや高い活性が認められることから，恐らくこの酵素は筋の成長期に特異的に働くものと推測され mdx マウスにおけるこの時期での急激な活性上昇が発病に一義的に関係している可能性は充分に考えられる．

一方，粗ミトコンドリア分画中の酵素活性は疾病進行に伴って活性上昇し，4ヶ月齢では正常対照の約3倍の活性が認められた．又，精製酵素標品を杉田らの方法[3]で調整した筋構造蛋白標品と混合してインキュベートし，経時的に反応液を採出して，SDS-PAGE で泳動させ，無添加の対照と比較する実験を行なうと，ミオシン，アクチンなどの収縮系蛋白がすみやかに分解消失する状態が認められた．従ってこの酵素は骨格筋中に存在し，収縮系蛋白を分解する機能を有していることが認められた．

ま と め

筋ジストロフィー症マウス(mdx)骨格筋において症状進行に伴って著しく活性上昇を示す2つのアルカリ・プロテアーゼの精製を行ない，その性質を検討した．1つはミクロソーム画分中に存在し，分子量約 34,000，等電点 6.3 の糖蛋白からなるトリプシン様セリンプロテアーゼであった．又活性の至適 pH 域は 9.0～9.5 であった．mdx マウスにおいて，この酵素は 10～30 日齢の間に急激な活性上昇を示すことから，発病の早期の過程に強く関与している可能性が推測される．一方，他の一つの酵素は粗ミトコンドリア画分から抽出され，分子量約 25,000，等電点 7.7 の単鎖ポリペプチドからなるキモトリプシン様セリンプロテアーゼであった．又活性の至適 pH 域は 8.5～9.5 であった．mdx マウスにおいてこの酵素は症状の進行に伴ってゆっくりと活性上昇する，即ち通常は内在インヒビターと結合した形で存在するため，生理的状態では低い活性を示すが，疾病進行の過程で，イ

ンヒビターが遊離する状態になると酵素活性が上昇するものと推測される．又，この酵素は，*in vitro* で主要な収縮系蛋白を分解する機能を有することが認められた．以上の結果から2つのプロテアーゼ活性は，ともに疾病に深く関与していることが考えられ，新薬の治療効果を検定する際のマーカーとして有用なものと考えられる．

文　献

1）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」班昭和59年度研究報告書，p.p.123-127，1985.

2）Sawada, H., Tsuji, S., et al: FEBS Lett., 199(2): 193-197, 1986.

3）Sugita, H., Katagiri, T. et al: Basic Research in Myology (ed by Kakulas,B.A.) Excerpta Medica Amsterdam: p.p.291-297, 1974.

実験的筋炎モデル動物の作製に関する研究
—自己免疫筋抗原の筋組織内分布と精製の試み—

里　吉　栄二郎*

研究協力者　古　川　昭　栄*　新　井　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アセチルコリン受容体(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，また，その抗原物質は筋膜または，筋特異的細胞外マトリックスに存在するのではないかと考えた．

*国立精神・神経センター神経研究所

著者らはこれまでにこの種の抗原物質が筋肉や心筋に存在することを明らかにし，さらに，この抗原に対するモノクローナル抗体を作製し，抗体や抗原分子の特性を生化学的に明らかにした．本年度は 1)モノクローナル抗体を用いて筋抗原の筋組織内分布の同定，2)アフィニティクロマトグラフィーによる筋抗原の精製を試みた．

方　　法

ラット筋肉からの抗原物質の抽出法，抗原活性の測定法はすでに報告した方法[7)]によった．モノクローナル抗体の調製法は昨年度報告した．

筋抗原の筋組織内分布

ラット腓腹筋を液体窒素で冷却したイソペンタンで急速冷却し，クライオスタットで 10 μm 切片とした．この筋組織切片を −20°C 冷却アセトンで 5 分間固定し，0.5 %スキムミルクに 30 分間浸してブロッキングした．その後，筋抗原に対するモノクローナル抗体 1 E 7, 7 D 9を2.5-20 μg/ml の濃度となるように，10 %ラット血清, 10 %ブタ血清, 40 %ウマ血清を含む 0.01 M Tris-HCl buffer(pH 7.6)で調製し，切片上に滴下して 4°C で 2 日間反応させた．コントロールにはマウス血清またはマウス IgG を用いた．次に抗体を除去，洗浄後，示適濃度のビオチン化抗マウス IgG 抗体，ストレプトアビジン標識 horseraddish peroxidase を順次室温で 90 分間反応させた後，3-amino-9-ethylcarbaszole, H_2O_2で発色させた．

筋抗原のアフィニティクロマトグラフィー

1)抗体カラムの調製：1 ml 体積の proteinA

結合樹脂(Bio-Rad, MAPS) 2本にそれぞれ，抗筋抗原モノクローナル抗体7D9，コントロールモノクローナル抗体5E4を含むマウス腹水1mlを流してIgGを結合させた．1M MaClを含む0.05M phosphate buffer(pH 6.5)でよく洗浄後，樹脂を取り出し，10mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide中で30分間反応させた．この処理によりprotein AとIgGが共有結合で架橋される．樹脂をよく洗浄後，再びカラムに充塡した．

2)アフィニティクロマトグラフィー：カラムを順次，1M NaClを含む0.1M borate buffer (pH 8.6)，0.1M acetate buffer(pH 5.0)で洗浄し，0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.6)で中和した．ゲルろ過で部分精製したラット筋抗原画分を，抗体カラムに約5時間かけて通した．洗浄に使ったと同じbufferで非特異的結合物質を除き，0.17M glycine-HCl buffer(pH 2.3)でカラムから溶出した．溶出液は直ちにNaOHで中和した．溶出液の抗原活性はモノクローナル抗体で，蛋白組成は5-20%濃度勾配ゲルによるSDS電気泳動で調べた．

結　　果

2種のモノクローナル抗体は同一分子を認識する

モノクローナル抗体1E7，7D9が認識する分子は同一らしいこと，しかも認識エピトープが全く異なることはすでに昨年報告した．さらにこのことを確認するため2種のモノクローナル抗体の一方をプラスチックの表面に物理吸着させ，抗原を反応させた後，ビオチン化したもう一方の抗体が結合するかどうかを調べた．図1右に示すように，7D9を固相に用いた時，ビオチン化1E7のみが十分に結合した．7D9は結合しなかった．また1E7を固相に用いた場合は1E7，7D9のいずれもほとんど結合しなかった(図1左)．固相化された7D9抗体に結合した抗原分子に，さらに1E7抗体が結合したことから，この2種の抗体は同一抗原分子を認識していることが確かめられた．抗体の役割を逆にすると結合が起こらない理由は不明であるが，固相1E7と結合した抗原分子上の7D9エピトープが固相面側に向いてしまい，7D9抗体が入り込めない状態になっているのかもしれない．

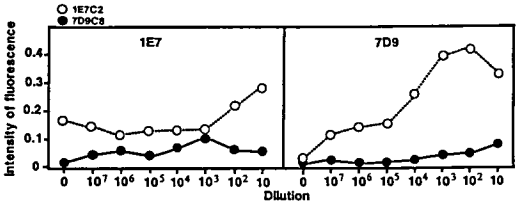


図1　2種のモノクローナル抗体の筋抗原との結合様式
右：モノクローナル抗体7D9を固相化し筋抗原と反応させた後，ビオチン化した1E7(○)または同7D9(●)と反応させそれらの結合性を調べた．ストレプトアビジン標識ベータガラクトシダーゼを結合させ，結合した酵素活性によって，結合ビオチン化抗体を定量した．
左：モノクローナル抗体1E7を固相化した．
以下同じ．

筋抗原の筋組織内分布

モノクローナル抗体1E7，7D9は基本的には同一の組織染色パターンを示した．コントロール抗体や血清では特異的染色はみられなかった．

図2は筋線維の走行方向に対し直角よりやや斜めに切断した切片をモノクローナル抗体7D9で染色した時の典型的なパターンを示す．筋膜か細胞外マトリックスかは明確ではないが，筋線維を取り囲む構造体と，筋線維内の横紋構造に特異的な染色がみられた．位相観察下で横紋構造がみえない筋線維は内部構造の染色がみられなかった．一方，線維走行方向に平行に切った切片でも，筋線維の外側と内部の横紋構造が染色された．モノクローナル抗体1E7でもほぼ同様な結果であったが，筋線維周囲の染色性が弱い傾向があった(図3)．この染色性の微

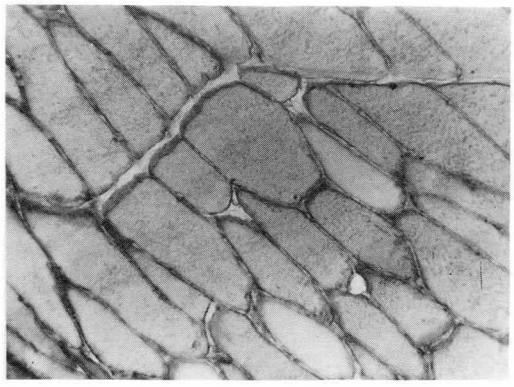


図2　モノクローナル抗体7D9による筋組織内の抗原分布
筋線維走行方向に対し直角よりやや斜めに切った切片．他の方法は本文に示した．拡大倍率200×

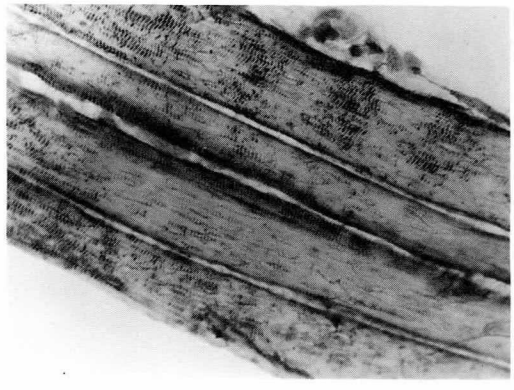


図3　モノクローナル抗体1E7による筋組織内の抗原分布
筋線維の走行方向と平行に切った切片．方法，条件は図2と同じ．

妙な違いは認識エピトープの違いに起因すると考えられた．すなわち，膜系構造部分と横紋構造部分とでこの筋抗原の存在様式が異なることを反映しているのかもしれない．

抗体アフィニティクロマトグラフィーによる抗原物質の精製の試み

モノクローナル抗体7D9を樹脂に固相化し，抗原物質をアフィニティクロマトグラフィーによって精製しようと試みた．非特異的結合が無視できないと思われたので比較のため筋肉成分を認識しないモノクローナル抗体を同様にカラ

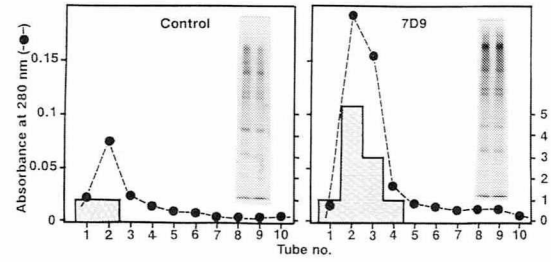


図4　モノクローナル抗体結合カラムからの筋抗原物質の溶出とその電気泳動パターン
方法は本文に示した．A：コントロールカラムからの溶出，B：モノクローナル抗体7D9カラムからの溶出，実線は280 nmでのタンパク質の吸収を，棒グラフは抗原活性の強さを表す．抗原活性は任意の値を示すのに必要な溶出液の最大希釈倍数で示してある．
図中の写真はA，BともtubeNo.2を電気泳動したものである．

ムに固相化したコントロールカラムを作り，同様の操作を加えた．カラムからの溶出パターンと溶出液の電気泳動蛋白染色パターンを図4に示す．コントロールカラムからもわずかに活性物質が溶出したが，7D9カラムからはそれより多くの抗原活性が回収された．いずれも電気泳動では複数の蛋白質バンドが認められたが7D9カラムから特異的に溶出されたバンドは一種類しかなく，分子量210Kを示した．回収された活性の強さ，210K蛋白のバンドの濃度を検討した結果，この分子が筋抗原物質である可能性が高いと思われる．さらにいくつかのクロマトグラフィーを重ねることによって完全精製を達成したい．

ミオシンと筋抗原の比較

1)筋抗原モノクローナル抗体は筋組織中の横紋構造を認識すること(図2，3)，2)アフィニティクロマトグラフィーで特異的に結合，溶出する分子の分子量が210Kであること，3)古くから抗横紋筋抗体の抗原と考えられてきた，ことなどから，著者らの検討している筋抗原物質はミオシンH鎖ではないかという可能性が考えられた．そこで，八木[8]の方法でミオシンを調

製し，モノクローナル抗体と筋抗原との結合を阻害するかどうかを調べた．その結果，ミオシンには阻害活性がないことが判明した．

考　　察

以上の結果から，1)筋抗原物質は横紋構造と，筋線維周囲に存在する，2)分子量は 210 K である，ことが明らかになった．また結果には示さなかったが，予備実験では抗原活性を含むラットまたはヒト筋肉画分をルイスラットに免疫すると筋力低下を引き起こすことが観察された．今後，物質としての同定と，モデル動物作製実験に力を注ぐ必要がある．

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) 八木康一：生化学実験講座，筋肉，東京化学同人，1974, p.3.

1．ベスタチンの筋細胞膜安定化作用に関する実験的研究
2．ベスタチン二重盲検試進歩状況

木　下　眞　男*

研究協力者　岸　雅　彦*　栗　原　照　幸*　日　高　隆　信*
池　田　憲*　高　宮　清　之*

1．ベスタチンの筋細胞膜安定化作用に関する実験的研究

1975年，梅沢らによりStreptomyces olivoreticuliの培養液より発見されたアミノペプチダーゼB阻害剤，すなわちBestatinは，免疫担当細胞の表面に作用し，免疫調整作用を示すことが知られており，低毒素の抗癌剤として臨床的に使用されている．さらにBestatinの持つプロテアーゼ阻害作用が筋ジストロフィー症の筋崩壊を抑制する可能性があることより，モデル動物への効果や臨床効果が検討されている．我々は，微小電極法を用いて，X-linked muscular dystorophy (mdx) mouseにおけるBestatinの効果を検討したので報告する．

方　法

対象として，4週齢，8週齢のmdx mouseを使用した．Bestatin治療マウスは，Bestatin 1 mg/dayの腹腔内投与を一週間続けた．8週齢のマウスには，生食0.5 cc/dayの腹腔内投与を一週間施行し，これを対照とした．正常対照としては，C_{57}BL/10 Sc (B 10) mouseを使用した．これらのマウスの横隔膜標本を作成し，95％O_2と5％CO_2の混合ガスで酸素化したTyrode溶液に浸しながら3 M KClを満たしたガラス管微小電極を用いて筋細胞内記録を行なった．その他4週齢のmdx mouseを使用し，BestatinをTyrode溶液250 mlに対し10 mg加えて，30分後に筋細胞内記録を行ない，短時間における筋細胞への直接作用も検討した．

1対象につき60～100本の筋線維の静止膜電位を測定し，ヒストグラムを作成した．さらに，週齢を合わせた各対象の静止膜電位に対しWilcoxon検定を施行し，Bestatinの効果について検討した．

結　果

正常controlのB 10 mouseの静止膜電位は平均−86.1 mVで，ばらつきは少なかった(図1)．しかし，mdx mouseでは静止膜電位の低い筋線維が正常に較べて多く見られ(図2)全体としての静止膜電位も平均−78.3 mV，−76.6

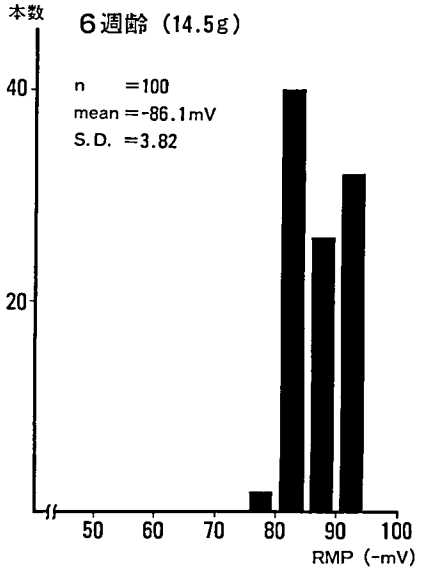


図1　B 10 mouseの静止膜電位(RMP)

*東邦大学医学部大橋病院第四内科

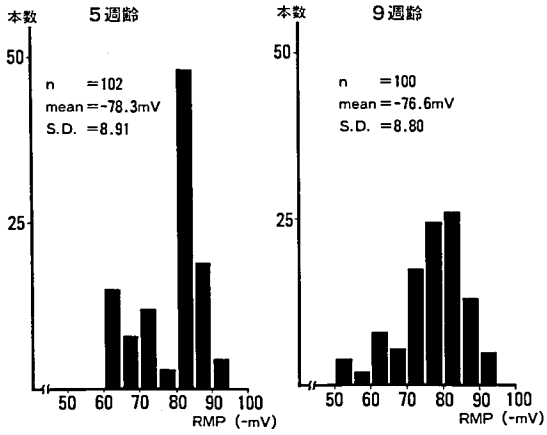


図2　mdx mouse の静止膜電位(RMP)

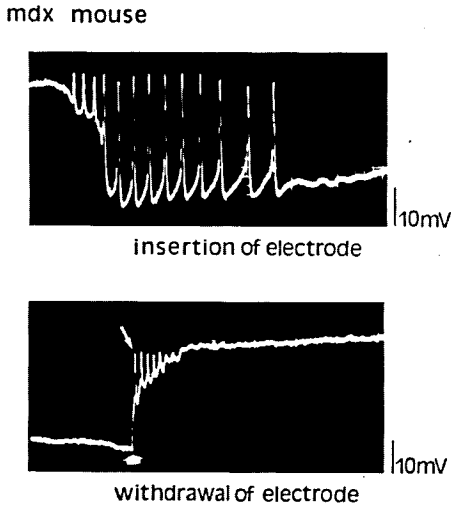


図3　mdx mouse での連続発火

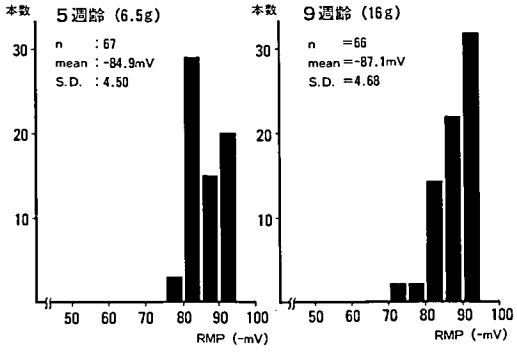


図4　mdx mouse の静止膜電位(RMP)
—Bestatin 投与後—

表1　各対象での静止膜電位，及び burst 頻度

対　象	年齢(日)	RMP (-mV) n	RMP (-mV) mean	RMP (-mV) S.D.	burst 頻度(%)
B10 mouse					
無処理	6	30	79.9	5.02	—
無処理	15	40	85.1	4.22	5
無処理	36	100	86.1	3.82	9
mdx mouse (in vivo)					
無処理	28	30	73.6	6.82	—
無処理	34	102	78.3	8.91	25
無処理	58	103	69.9	9.63	25
無処理	70	40	76.8	7.03	18
saline 投与	71	100	76.6	8.80	20
bestatin投与	34	60	84.1*	5.05	13
bestatin投与	35	67	84.9*	4.50	17
bestatin投与	64	60	84.7*	3.43	7
bestatin投与	65	66	87.1*	4.68	11
mdx mouse (in vitro)					
前	25	100	78.1	8.40	51
bestatin投与	〃	115	82.9*	7.84	33

*Wilcoxon test : $p<0.005$

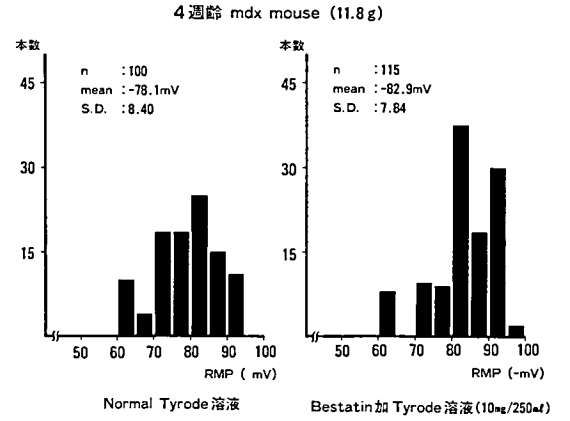


図5　*in vitro* での Bestatin 投与による mdx mouse の静止膜電位(RMP)の変化

mV と有意な低値を認めた．(Wilcoxon test : $P<0.005$)

また，mdx mouse では電極刺入時に連続発火(myotonic burst)が高頻度に認められ，これは B 10 mouse ではほとんど認められなかった(図3)．

in vivo において mdx mouse に Bestatin を投与すると，静止膜電位の低い線維は見られなくなり，全体としての静止膜電位は平均−84.9 mV, −87.1 mV と正常化する傾向を認めた(図

4)．そして，電極刺入時の myotonic burst の頻度も減少した(表1)．

in vitro において mdx mouse に Bestatin を投与した場合も，*in vivo* と同様に，静止膜電位の低い筋線維の減少と，全体としての静止膜電位の有意な上昇，および myotonic burst の減少を認めた(図5・表1)．

考　　察

我々の用いた mdx mouse は，形態学的にも筋線維の変性と再生が認められる時期のものであり[1]，mdx mouse において認められた筋線維の静止膜電位低下は変性・再生線維における筋細胞膜の異常を反映していると考えられる．又，電極刺入時に認められる myotonic burst も，同様に筋細胞膜の異常により生じていると考えられている[2]．Bestatin は，mdx mouse の低下した筋細胞膜の静止膜電位を B 10 mouse とほとんど変わらない状態まで回復させ，myotonic burst を抑制した．

Bestatin の作用機序として，筋ジストロフィー症において活性化されているプロテアーゼを阻害し，筋変性を予防する効果が考えられている．しかし，この効果だけで今回我々の実験において得られた結果を説明するのは困難と思われる．*in vitro* での Bestatin 投与では，30 分でその効果が現われていることより，Bestatin は筋細胞膜に直接作用して，膜安定作用を発現するものと考えられた．

Bestatin は，免疫担当細胞の表面に結合し，免疫賦活作用を示す事が知られているが[3]，mdx mouse の筋細胞膜にどのように働いているのかは不明である．しかし，筋ジストロフィー症の治療薬として Bestatin を考える上で，プロテアーゼ阻害作用に加えて，この筋細胞膜安定作用は重要であると考えられた．

Bestatin が dy/dy mouse に有効であったという報告[4]において用いられた薬量は 0.4 mg/day であり，我々の実験で用いた薬量の約半分である．しかし，臨床的に用いる場合，我々が用いた投与量は約 100 mg/Kg/day となり，抗癌剤として臨床的に用いられている量と比較すると，100 倍近くの投与量となる．Bestatin は副作用の少ない薬剤であるが，臨床応用に向けて薬用量についてはさらに検討が必要と考えられる．

文　　献

1) Bulfield, G., Siller, W.G. et al: X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 1189, 1984.

2) 栗原照幸ら: mdx マウスにみられる myotonic burst の筋細胞内記録．厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究（杉田班）昭和 62 年度研究報告書，1988, p. 227.

3) Umezawa, H., Aoyagi, T. et al: Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B produced by actinomycetes. J. Antibiotics, 29: 97, 1976.

4) Tsuji, S., Matsushita, H.: Successful treatment of murine muscular dystrophy with the protease inhibitor Bestatin. J. Neurol. Sci., 72: 183, 1986.

2．ベスタチン二重盲検試験の進歩状況

表1に示すように，昭和62年より29施設においてベスタチン二重盲検試験を実施中である．登録症例数は115例，現在までに66例が試験を終了，そのうち3例は脱落例である．試験継続例は49例で，全部が終了するのは平成元年10月の予定である．解鍵は12月に行い，平成2年早々には最終結論が出る予定になっている．

現在各症例とも10m直進歩行時間，起立時間などで緩徐な症状の進行を示唆する数値を示しており，また血中CKは特に3歳以下群で上昇傾向を示している．全体として疾患の進行度は緩徐ながら明らかと考えられる．

副作用は11例に見られているが，軽度の消化器症状を示すのみであり，薬剤特異性に乏しい．

表1

組　織

治験代表者	国立精神・神経センター	里吉栄二郎
事務局	東邦大学医学部第4内科	木下　真男
評価委員	東京女子医科大学小児科	福山　幸夫
	国立療養所箱根病院	村上　慶郎
	国立療養所宇多野病院	西谷　裕
	国立療養所兵庫中央病院	高橋　桂一
	国立療養所西別府病院	三吉野産治
コントローラー	愛媛大学医学部	小川　暢也

治験施設

国立療養所八雲病院	南　良二	神戸市立中央市民病院	吉岡三恵子
北海道社会事業協会帯広病院	高橋　豊	鳥取大学医学部	竹下　研三
国立療養所西多賀病院	山本　克哉	国立療養所原病院	亀尾　等
国立療養所岩木病院	秋元　義巳	国立療養所徳島病院	松家　豊
東京都立神経病院	水野　美彦	愛媛大学医学部	長尾　秀夫
国立療養所鹿屋病院	飯田　光男	高知医科大学	倉繁　隆信
市立岡崎病院	神田　亨	高知県立子鹿園	江口寿栄夫
浜松医科大学	坂本　政信	福岡大学医学部	清智　昭久
福井医科大学	平山　幹生	福岡市立こども病院	花井　敏男
名古屋市立東市民病院	榊原　弘喜	久留米大学医学部	三池　輝久
国立療養所刀根山病院	妻　進	大分医科大学	平松公三郎
国立療養所西奈良病院	岩垣　克己	国立療養所沖縄病院	中川　正法

治験施設数　２９

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*

研究協力者　白　坂　哲　彦*　山　田　晴　雄*

はじめに

本来，蛋白分解酵素の生理的役割とその活性発現は複雑な生体のネットワークによってその恒常性が保たれているが，そのバランスに異常が起きると種々の疾患が生ずることになる．筋ジストロフィーの発症成因においても，蛋白分解酵素の関与が明らかになり，その特異的阻害剤の使用により治療効果が認められつつある事は周知のところである．

前回までにわれわれは，蛋白分解酵素の基質特異性を始めとする生化学的諸性質を明らかにする目的で，各種酵素基質の合成とその測定方法の確立，および特異的な蛋白分解酵素阻害剤である FUT-175 や FUT-187 の開発とその臨床応用に則した基礎的検討について報告した．

Duchenne 型筋ジストロフィーを始めとする各種筋疾患の中で，III型アレルギーにもとづく筋疾患には多発性筋炎や皮膚筋炎があり，その治療には抗炎症剤（副腎皮質ステロイド）や免疫抑制剤が使用されている．III型アレルギーは免疫異常を基盤とした自己免疫疾患で，自己抗体により免疫複合体が形成され補体系が活性化されることなど，液性および細胞性免疫に異常が認められている．

そこで本研究においては，補体系の関与する III型アレルギーの代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス（SLE）の動物モデル，(NZB×NZW)F_1マウスを用いて，ループス腎炎に対する FUT-175 の効果について検討を行った．併せて，得られた知見から補体系の関与する上記各筋疾患の治療の可能性についても考察したい．

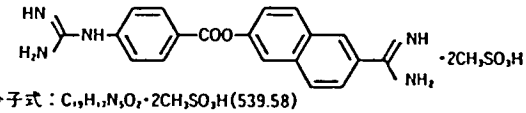
実験方法

1）動物および試薬

(NZB×NZW)F_1マウス(B/WF_1マウス)は，交配飼育後に雌を使用した．

FUT-175 (6-amidino-2-naphthyl p-guanidinobenzoate dimethanesulfonate; nafamostat mesilate; FUTHAN)は鳥居薬品㈱より提供された．FUT-175 の構造式とその生化学的特性を図1および表1に示した．

ステロイド剤の Prednisolone と Dexamethasone はそれぞれ Sigma 社，Schering 社から入手した．



分子式：$C_{19}H_{19}N_5O_2 \cdot 2CH_3SO_3H$(539.58)

図1　FUT-175 の構造式

表1　FUT-175 の蛋白分解酵素阻害活性

	酵　素	基　質	50%阻害濃度 (ID_{50}：M)
補体系のプロテアーゼ	C$\bar{1}$r	Ac-Arg-methylester	2.1×10^{-7}
	C$\bar{1}$s	Ac-Tyr-ethylester	5.1×10^{-9}
	D	Factor B	1.4×10^{-5}
	B	Leu-Ala-Arg-α-naphthylester	5.8×10^{-5}
	CVF-Bb	Leu-Ala-Arg-α-naphthylester	4.3×10^{-5}
血漿中のプロテアーゼ	XIIa	Pro-Phe-Arg-pNA	3.3×10^{-7}
	Xa	Bz-Ile-Glu-Arg-pNA	2.1×10^{-6}
	トロンビン	Phe-pip-Arg-pNA	8.8×10^{-7}
	プラスミン	Val-Leu-Lys-pNA	1.0×10^{-7}
	カリクレイン	Pro-Phe-Arg-pNA	3.0×10^{-5}
その他プロテアーゼ	膵カリクレイン	Tos-Arg-methylester	8.4×10^{-6}
	トリプシン	Tos-Arg-methylester	1.9×10^{-6}
カテプシン	A, B, C, D, H, L		$>10^{-4}$
	G		7.1×10^{-4}
補体溶血反応	古典的経路		6.9×10^{-6}
	第2経路		5.1×10^{-7}

*㈶大阪基礎医学研究奨励会

表2　B/WF$_1$マウスにおけるFUT-175の予防効果実験の系

Group	Treatment	Dose (mg/kg)
C	None (Control)	
F$_1$	FUT-175 (p.o.)	100
F$_2$	FUT-175 (p.o.)	200
F$_3$	FUT-175 (p.o.)	400
F$_4$	FUT-175 (i.p.)	15
D$_1$	Dexamethasone (p.o.)	1
D$_2$	Dexamethasone (p.o.)	3
F$_2$D$_1$	FUT (p.o.)+Dexa (p.o.)	200+1

表3　B/WF$_1$マウスにおけるFUT-175の治療効果実験の系

Group	Treatment	Dose (mg/kg)
C′	None (Control)	
F$_2'$	FUT-175 (p.o.)	200
F$_3'$	FUT-175 (p.o.)	400
F$_4'$	FUT-175 (i.p.)	15
D$_1'$	Dexamethasone (p.o.)	1
F$_2'$D$_1'$	FUT (p.o.)+Dexa (p.o.)	200+1
	FUT(p.o.)+Dexa (p.o.)	

2）動物実験

自然発症性自己免疫疾患動物であるB/WF$_1$マウスは，6月齢でループス腎炎を呈するので，FUT-175による発症予防効果は表2に示した方法で4月齢より開始し4ヶ月間投薬を行った．更に，FUT-175の治療効果を判定する実験では，6月齢のマウスより開始し2ヶ月間投薬した（表3）．

3）血液および生化学的検査

Ht, BUN, ANAおよび蛋白尿，潜血は常法により測定した．

4）組織病理学的検査

マウス各組織はPAS染色により検索した．糸球体腎炎の重度判定は1～4＋に分画し，重度3～4＋は，致死に及ぶ範囲である．

結果および考察

本研究の詳細はわれわれが既に報告している[1]．FUT-175は表1に示した様にトリプシン，カリクレイン，プラスミン，トロンビンを始め補体系のC1$\bar{r}$，C1$\bar{s}$など各種蛋白分解酵素を強力に阻害する[2]．また，Zymosanにより補体を活性化させたラット脚浮腫に対してもFUT-175は抑制効果のある事が認められている[3]．

1）B/WF$_1$マウスのループス腎炎に対するFUT-175の予防効果

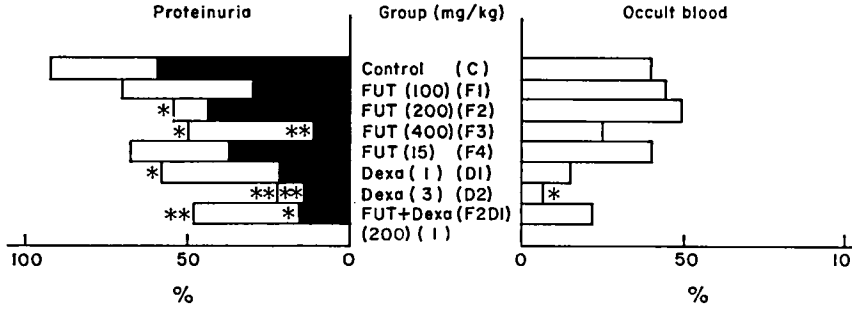
高重度の蛋白尿（>300 mg/dl）群に対してFUT-175は400 mg/kgの投与によって発症を高頻度に抑えた(図2)．一方，Dexamethasoneは3 mg/kgの投与により潜血を10％以下に抑制した．更に，表4に示した様にBUN, Ht, 形態学的変化に対しても上記用量およびFUT-175(200 mg/kg)とDexamethasone(1 mg/kg)の併用により改善が認められた事から，腎機能や糸球体障害の改善が推測される．糸球体へのIgGおよびC3の沈着は蛍光抗体法による測定により，Dexamethasone (3 mg/kg) に効果が認められたが，ANA価に対しては両薬剤とも効果がなかった．

2）B/WF$_1$マウスのループス腎炎に対するFUT-175の治療効果

表3の実験系で週6回投薬による2ヶ月の治療期間で，FUT-175 (400 mg/kg) は蛋白尿，潜血ともに低頻度であったがDexamethasoneには効果が認められなかった(図3)．表5の結果から，高用量のFUT-175 (400 mg/kg) は治療に対しても効果があり事実，組織病理学的所見においてもFUT-175は糸球体障害を軽減していた．この様な現象はDexamethasoneにおいては認められなかった．

以上の結果からFUT-175は，ヒトのSLEモデルとしてB/WF$_1$マウスのループス腎炎に対して，予防および治療効果が認められた．実験系の中で，薬剤の腹腔内投与で効果が弱かった理由としては，薬剤の半減期に起因する血中濃度の低下が考えられる．また，FUT-175のマウスにおける安全性については，400 mg/kg以下の用量で消化管障害および体重変化は認められていない．

ループス腎炎を含むSLEの治療には，炎症



Percentages of proteinuria and occult blood in each group are indicated: (□) proteinuria greater than 100 mg/dl; (■) proteinuria greater than 300 mg/dl. *Significance of difference in results between treated and non-treated (control) groups ($P<0.05$). **Significance of difference in results between treated and non-treated (control) groups ($P<0.01$).

図2　蛋白尿と潜血に対する FUT-175 の効果

表4　B/WF$_1$マウスのループス腎炎に対する FUT-175 の予防効果

Group	Treatment (mg/kg)	BUN (mg/dl)	Ht (%)	ANA titre	Glomerular deposits IgG	Glomerular deposits C3	Degree of glomerular damage
C	None (control)	57±13	37±2·0	92±22	2·7±0·14	2·5±0·17	2·3±0·24
F$_1$	FUT-175 (100)	35±8	36±1·4	162±36	2·5±0·16	1·8±0·18	2·2±0·27
F$_2$	FUT-175 (200)	33±2	38±0·9	246±53	2·6±0·14	2·0±0·14	2·2±0·25
F$_3$	FUT-175 (400)	22±2§	42±0·9§	129±21	2·2±0·14	1·8±0·19	1·1±0·29§
F$_4$	FUT-175 [15(i.p.)]	59±15	34±2·0	188±46	2·5±0·17	2·1±0·18	2·0±0·29
D$_1$	Dexamethasone (1)	34±6	39±1·0	159±22	2·7±0·14	1·9±0·17	2·0±0·30
D$_2$	Dexamethasone (3)	24±5	42±0·9§	140±58	1·6±0·19§	0·9±0·19§	0·7±0·27§
F$_2$D$_1$	FUT+Dexa (200+1)	19±3§	41±0·7§	193±52	2·1±0·15§	1·5±0·15	1·3±0·23§

§ Significance of difference in results between treated and non-treated (control) groups ($P<0.01$).

表5　B/WF$_1$マウスのループス腎炎に対する FUT-175 の治療効果

Group	Treatment (mg/kg)	BUN (mg/dl)	Ht (%)	ANA titre	Degree of glomerular damage
C′	None (Control)	90±26	33±2·2	96±16	2·4±0·38
F′$_2$	FUT-175 (200)	46±7	37±1·6	87±10	2·4±0·25
F′$_3$	FUT-175 (400)	19±1§	43±0·5§	57±12	0·8±0·23§
F′$_4$	FUT-175 [15(i.p.)]	41±8	42±0·9§	50±10	1·7±0·29
D′$_1$	Dexamethasone (1)	61±12	36±1·7	36±16	2·3±0·42
F′$_2$D′$_1$	FUT+Dexa (200+1)	29±5§	38±1·6	68±10	1·5±0·24*

§ Significance of difference in results between treated and non-treated (control) groups ($P<0.01$).
* Significance of difference in results between treated and non-treated (control) groups ($P<0.05$).

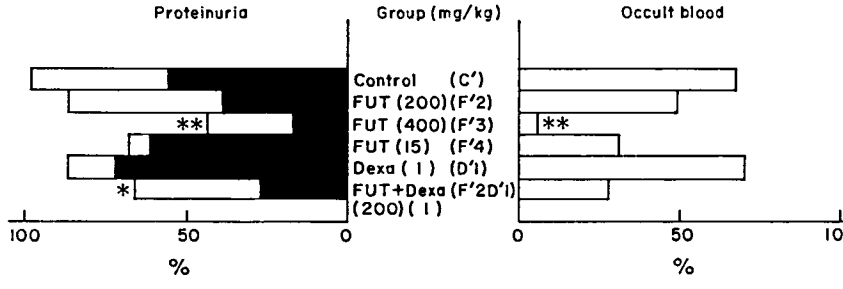


図3　蛋白尿と潜血に対する FUT-175 の効果

反応の抑制と免疫異常の調節の観点からステロイド剤や免疫抑制剤が使用されている．更に最近では Robenzarit や Levamisole などの免疫調整剤やパルス療法，全身リンパ節照射などの治療法が行われつつあるが，今回得られたわれわれの結果から，SLE の治療に対し蛋白分解酵素阻害剤も有用であることが示唆された．既に，FUT-175 は液性免疫複合体 (CIC$_s$) の形成と糸球体への CIC$_s$ の沈着を抑制し，糸球体障害と CIC 値とに相関性のある事が認められている[4]．

生体における補体系の関与は多岐にわたり，補体受容体 (CR 1) は免疫複合体のクリアランス，B 細胞分化，免疫応答などに深く関わっている[5]．今後，FUT-175 の免疫系に対する影響

や筋疾患の病因解明等の実験が求められるとともに，ステロイド剤であるPrednisoneがDuchenne型筋ジストロフィーの治療に効果が認められた事から[6]，筋疾患に対する治療としてFUT-175を含めた広範囲な多剤併用の必要性が示唆される．

文　献

1) Ikehara, S., Shimamura, K., Aoyama, T., Fujii S., and Hamashima Y.,: Immunology., **55**: 595, 1985.

2) Fujii, S. and Hitomi, Y. : Biochim. Biophys. Acta., **661**: 342, 1981.

3) Sato, T., Ino, Y., Koshiyama, Y., Motoyoshi, A., Oda, M. and Iwaki, M.: Japan. J. Pharmacol., **42**: 587, 1986.

4) Ikehara, S., Good, R.A., Nakamura, T., Sekita, K., Inoue, S., Oo, M.M., Muso, E., Ogawa, K. and Hamashima, Y.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **82**: 2483, 1985.

5) J.P. Athins: Springer Semin. Immunopathol., **9**: 179, 1986.

6) Fenichel, G.M.: American. Pharmacy. NS., **27**: 849, 1987.

CANP 阻害剤の合成

向山光昭* 大関正弘**

研究協力者 植木正彬* 勝沼信彦*** 花田和紀**
横尾千尋** 岡崎忠靖** 村田充男**

はじめに

我々は，筋ジストロフィー症における筋崩壊に深いかかわりがあると考えられている，カルシウム依存性中性プロテアーゼ（CANP）に対する特異的阻害剤の創製を目的に研究を行なっている．

今年度は昨年に引き続き，鈴木班員の研究により明らかとされた内在性 CANP インヒビターの阻害活性中心の部分構造に，阻害活性基としてエポキシコハク酸を導入した化合物を約40種合成し，CANP およびカテプシン B，L，H に対する阻害活性を検討した．

図1に内在性 CANP インヒビター活性中心の一次構造と，エポキシコハク酸の導入位置を示した．

```
I    II   III        IV   V
↓    ↓    ↓          ↓    ↓
-Thr-Ile-Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-Glu-
-Thr-Val-Pro-Ala-Glu-Tyr-Arg-Leu-
-Thr-Ile-Pro-Pro-Asp-Tyr-Arg-Leu-
-Thr-Ile-Pro-Pro-Glu-Tyr-Arg-His-
```

図1 内在性 CANP インヒビター活性中心の一次構造[1]とエポキシコハク酸の導入位置（I～V）

方法

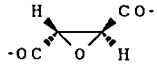
1．合成

本年度新たに合成した化合物の構造を表1に示した．合成はすべて液相法により，下記の方法に準じて行なった．

t-ブトキシカルボニル（Boc）アミノ酸誘導体を原料とし，塩化ジメチルホスフィノチオイルを用いた混合酸無水物（Mpt-MA）法，または

表1 本年度合成した化合物の構造式

Compound No	Structure
CA-014	HO-tES-Tyr-Arg-OEt
CA-015	EtO-tES-Pro-Pro-OBzl
CA-016	EtO-tES-Pro-Pro-OH
CA-017	EtO-tES-Tyr-Arg-OEt
CA-018	BzlO-tES-Pro-Pro-OBzl
CA-019	HO-tES-Pro-Pro-OH
CA-020	EtO-tES-Tyr-Arg-OH
CA-021	BzlO-tES-Pro-Pro-OMe
CA-022	EtO-tES-Pro-Pro-OMe
CA-023	HO-tES-Tyr-Arg-OH
CA-024	HO-tES-Pro-Pro-OMe
CA-025	BzlO-tES-Ile-Pro-OBzl
CA-026	EtO-tES-Ile-Pro-OBzl
CA-027	BzlO-tES-Ile-Pro-OMe
CA-028	HO-tES-Ile-Pro-OH
CA-029	HO-tES-Ile-Pro-OMe
CA-030	EtO-tES-Ile-Pro-OH
CA-031	HO-tES-Thr-Ile-Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-Glu-OH
CA-032	HO-tES-Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-Glu-OH
CA-033	HO-tES-Lys-Tyr-Arg-Glu-OH
CA-034	HO-tES-Tyr-Arg-Glu-OH
CA-035	EtO-tES-Leu-Ala-OMe
CA-036	EtO-tES-Ser-IAA
CA-037	BzlO-tES-Thr-Ile-OMe
CA-038	BzlO-tES-Thr-Ile-OBzl
CA-039	EtO-tES-Thr-Ile-OBzl
CA-040	HO-tES-Thr-Ile-OMe
CA-041	HO-tES-Thr-Ile-OH
CA-042	EtO-tES-Thr-Ile-OH
CA-043	HO_2C-CO-Leu-IAA
CA-044	HO_2C-CO-Leu-IAA
CA-045	HO-tES-Thr-Ile-Pro-Pro-OH
CA-050	HO-tES-Tyr-Arg(NO_2)-OBzl
CA-052	Boc-Thr-Ile-Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-Glu-OH
CA-053	EtO-tES-Tyr-Arg-Leu-OH

-tES- : 

-IAA: $-NHCH_2CH_2CH(CH_3)_2$

* 東京理科大学理学部
** 大正製薬株式会社総合研究所
*** 徳島大学酵素科学研究センター

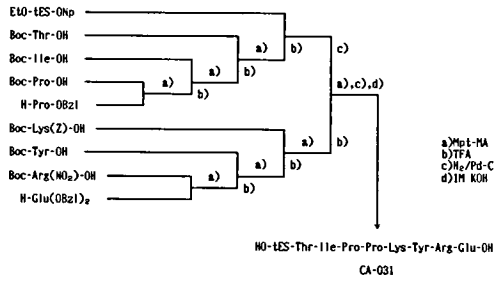


図2　CA-031の合成法

ジフェニルリン酸アジド(DPPA)法を用いて保護ペプチドを合成した．次いで得られた保護ペプチドのN端Boc基を除去し，これにエポキシコハク酸誘導体をp-ニトロフェニル活性エステル法により導入した．更に必要に応じて保護基を除去し，目的化合物を得た．図2に代表的な例として，オクタペプチド誘導体CA-031の合成法を示した．

2．CANP阻害活性の測定

下記の反応溶液に検体溶液50 μlを加え，30°Cで5分間プレインキュベーションした後，更に50 μlのCANP溶液（豚赤血球μ-CANP，200 u/mg/ml，半井化学）を加え，30°Cで20分反応させた．10％トリクロロ酢酸500 μlを加えて反応を止め，60分放置後遠心し上清のA_{280}を測定した．

反応溶液

1.2％Casein	100 μl
100 mM sodium glycerophosphate-HCl (pH 7.5)	200 μl
50 mM $CaCl_2$	50 μl
250 mM 2-Mercaptoethanol	50 μl

3．カテプシンB，L，H阻害活性の測定

ラット肝より単一にまで精製したカテプシンB (85 u/mg)，カテプシンH (500 u/mg) およびカテプシンL (600 u/mg) を用い，それぞれZ-Arg-Arg-MCA，Arg-MCA，Z-Phe-Arg-MCAを基質として，次のように測定した．

下記反応溶液を37°Cで3分間プレインキュベーションした後，基質(0.04 mM) 0.25 mlを加え，37°Cで5分間反応させた．0.1 Mモノクロロ酢酸ソーダ (in 0.1 M Acetate Buffer, pH 4.3) 1 mlを加えて反応を止め，更に0.5 mlの水を加えた後，励起波長370 nm，測定波長460 nmで蛍光測定を行なった．

反応溶液

0.4 M Acetate Buffer pH 5.5 (Containing 4 mM EDTA)	250 μl
200 mM Cysteine	40 μl
Inhibitor (in DMSO)	0～10 μl
＊Cathepsin	10 μl
H_2O	
total volume	750 μl

＊　酵素量は5分間に約1.5 nmAMCを生成する量にそれぞれ調整した．

またカテプシンLの測定の場合，100 μgのBSAを添加した．

結果および考察

表2～4に，今回合成した化合物のCANPおよびカテプシンB，L，Hに対する阻害活性を，50％阻害濃度で示し，エポキシコハク酸の導入位置ごとにまとめた．

表2の上段には，内在性CANPインヒビターの阻害活性中心のアミノ酸配列のうち，Thr-Ileから始まる部分構造を有するものを示した．この中では，CA-040が最も強いCANP阻害活性を示した．またCA-041，045，031の比較から，内在性CANPインヒビターの阻害活性中心の一次構造にそってペプチド鎖を延長することにより，CANP阻害活性が強まっていることがわかる．この事から，エポキシコハク酸側鎖のペプチド鎖を更に延長することにより，活性が増強される可能性が考えられる．なお，CA-031とCA-052を比べた場合，エポキシコハク酸を持たないCA-052には活性が認められない事から，このペプチド鎖のみにより阻害活性が発現する可能性はないものと考えられる．

また下段のIle-Pro配列の誘導体の中で，CANPに対して阻害活性を示したのは，CA-028，029のみであった．

表 2　Thr-Ile 誘導体および Ile-Pro 誘導体の CANP およびカテプシン B, L, H に対する阻害活性

Compound		Inhibitory Activity IC_{50} (nM)			
		CANP	Cath.B	Cath.L	Cath.H
E-64-c	HO-tES-Leu-IAA	3,000	3.36	0.087	1,640
CA-042	EtO-tES-Thr-Ile-OH	>200,000	54	>1,000,000	>1,000,000
CA-039	EtO-tES-Thr-Ile-OBzl	>200,000	3,862	17,000	71,000
CA-037	BzlO-tES-Thr-Ile-OMe	>200,000	2,397	15,600	260,000
CA-038	BzlO-tES-Thr-Ile-OBzl	>200,000	1,232	1,233	137,000
CA-041	HO-tES-Thr-Ile-OH	104,000	500	3,250	54,000
CA-040	HO-tES-Thr-Ile-OMe	16,000	140	765	18,200
CA-045	HO-tES-Thr-Ile-Pro-Pro-OH	75,000	195	660	370,000
CA-031	HO-tES-Thr-Ile-Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-Glu-OH	27,000	420	6,000	>100,000
CA-052	Boc-Thr-Ile-Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-Glu-OH	>200,000	>40,000	**	**
CA-030	EtO-tES-Ile-Pro-OH	>500,000	3	35,000	320,000
CA-026	EtO-tES-Ile-Pro-OBzl	>500,000	930	4,060	1,900
CA-027	BzlO-tES-Ile-Pro-OMe	>500,000	580	1,016	46,000
CA-025	BzlO-tES-Ile-Pro-OBzl	>500,000	250	640	34,000
CA-028	HO-tES-Ile-Pro-OH	82,000	160	810	6,250
CA-029	HO-tES-Ile-Pro-OMe	43,000	23	45	1,600

** 測定中

表 3　Pro-Pro 誘導体および Lys-Tyr 誘導体の CANP およびカテプシン B, L, H に対する阻害活性

Compound		Inhibitory Activity IC_{50} (nM)			
		CANP	Cath.B	Cath.L	Cath.H
E-64-c	HO-tES-Leu-IAA	3,000	3.36	0.087	1,640
CA-016	EtO-tES-Pro-Pro-OH	>500,000	50	138,000	1,940,000
CA-022	EtO-tES-Pro-Pro-OMe	>500,000	230,000	152,000	72,500
CA-015	EtO-tES-Pro-Pro-OBzl	>500,000	18,000	6,800	22,600
CA-021	BzlO-tES-Pro-Pro-OMe	460,000	260,000	10,800	500,000
CA-018	BzlO-tES-Pro-Pro-OBzl	120,000	19,800	780	55,000
CA-019	HO-tES-Pro-Pro-OH	>500,000	800,000	490,000	>1,000,000
CA-024	HO-tES-Pro-Pro-OMe	>500,000	310,000	32,000	>1,000,000
CA-032	HO-tES-Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-Glu-OH	>500,000	>50,000	>100,000	>100,000
CA-013	EtO-tES-Lys-Tyr-Glu-OH	>500,000	1,000,000	1,200,000	>400,000
CA-033	HO-tES-Lys-Tyr-Glu-OH	>500,000	6,050	8,000	174,000

表 4　Tyr-Arg 誘導体の CANP およびカテプシン B, L, H に対する阻害活性

Compound		Inhibitory Activity IC_{50} (nM)			
		CANP	Cath.B	Cath.L	Cath.H
E-64-c	HO-tES-Leu-IAA	3,000	3.36	0.087	1,640
CA-010	EtO-tES-Tyr-Arg(NO_2)-OH	106,000	2,300	14,400	>400,000
CA-001	EtO-tES-Tyr-Arg(NO_2)-OMe	267,000	40,000	9,000	>400,000
CA-002	EtO-tES-Tyr-Arg(NO_2)-OEt	38,000	25,000	2,200	>400,000
CA-003	EtO-tES-Tyr-Arg(NO_2)-OBzl	36,000	5,400	7,000	>400,000
CA-004	BzlO-tES-Tyr-Arg(NO_2)-OMe	83,000	5,200	770	>400,000
CA-005	BzlO-tES-Tyr-Arg(NO_2)-OEt	100,000	9,000	920	>400,000
CA-006	BzlO-tES-Tyr-Arg(NO_2)-OBzl	66,000	1,600	950	>400,000
CA-009	HO-tES-Tyr-Arg(NO_2)-OH	44,000	2,400	440	>400,000
CA-007	HO-tES-Tyr-Arg(NO_2)-OMe	5,000	170	18	>400,000
CA-008	HO-tES-Tyr-Arg(NO_2)-OEt	3,000	150	16	>400,000
CA-050	HO-tES-Tyr-Arg(NO_2)-OBzl	460	310	4.8	250,000
CA-020	EtO-tES-Tyr-Arg-OH	>500,000	860	740	>1,000,000
CA-017	EtO-tES-Tyr-Arg-OEt	40,000	880	100	1,200,000
CA-023	HO-tES-Tyr-Arg-OH	14,000	1,190	110	1,280,000
CA-014	HO-tES-Tyr-Arg-OEt	2,000	49	2	240,000
CA-053	EtO-tES-Tyr-Arg-Leu-OH	15,800	1,600	**	**
CA-012	EtO-tES-Tyr-Arg-Glu-OH	372,000	2,000,000	200,000	>400,000
CA-034	HO-tES-Tyr-Arg-Glu-OH	>500,000	>500,000	>500,000	>1,000,000

** 測定中

表 3 の Pro-Pro 配列の誘導体の中では，CA-018 が弱い CANP 阻害活性を示したが，他のものには活性は認められなかった．

Lys-Tyr 配列の誘導体に関しては，現在のところ CANP に対して阻害活性を示すものは見出されていない．

表 4 に示した Tyr-Arg 配列の誘導体（昨年度報告したものを含む）の中には，CANP に対

して阻害活性を示すものが比較的多く，このアミノ酸配列が他の配列と比べ，活性発現にかなり重要な働きをしていると考えられる．特にCA-050はE-64cよりも約10倍強いCANP阻害活性を示しており，本年度の成果としてあげられる．

このCA-050とCA-007，008，009を比較すると，アルギニンC端カルボン酸を，メチル，エチル，ベンジルエステルに変化させるにつれてCANP阻害活性が増強しており，アルギニンC端への脂溶性基導入による活性増強の可能性が示唆された．更にこのことは，アルギニンC端へグルタミン酸を導入したCA-012のCANP阻害活性よりも，ロイシンを導入したCA-053の方が強いことからも推測される．

図3には，表2〜4に示した化合物の中で，CANPに対する阻害活性がE-64cの1/10以上の強さを有するものについて，活性の強い順にそのIC_{50}値を示した．構造別に見ると，CA-050，014，008，007，023の上位5種がTyr-Arg誘導体であり，CA-040，031はThr-Ile誘導体であった．

次に，これらの化合物について選択性を比較するため，それぞれのCANPに対する阻害活性を1とした時の，カテプシンB，L，Hに対する相対活性を，図4に示した．

この図より次のことが明らかとなった．

Tyr-Arg誘導体はいずれも，カテプシンHに対して阻害活性が弱く，CANPとの活性分離が認められた．中でもCA-050はカテプシンBに対する相対活性が最も低く，CANP阻害活性の強さとともに，選択性の面からも注目すべき化合物といえる．

また，このCA-050と他のTyr-Arg誘導体とを比較すると，アルギニンC端エステル部の違いが，CANP阻害活性の強さに与えた影響と同様に，選択性に対しても大きく影響することがわかった．

一方Thr-Ile誘導体は，Tyr-Arg誘導体とは異なった選択性を示し，カテプシンLに対する相対活性が低下していることが特徴といえる．このうちCA-031は，カテプシンHに対してもやや選択性が認められる点で注目に値する．

また，CA-031は，Thr-Ilrから始まる内在性CANPインヒビター活性中心の全アミノ酸配列を導入したものであり，ペプチド鎖の短い

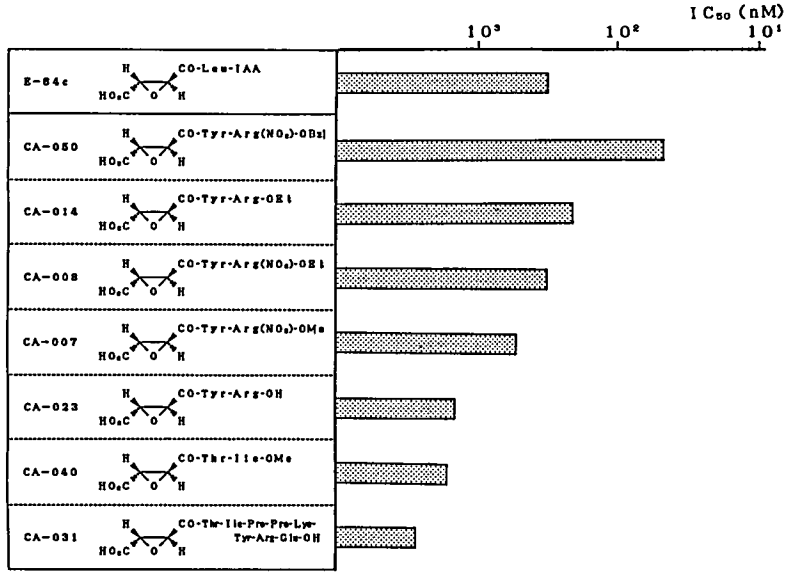


図3　CANP阻害活性の比較

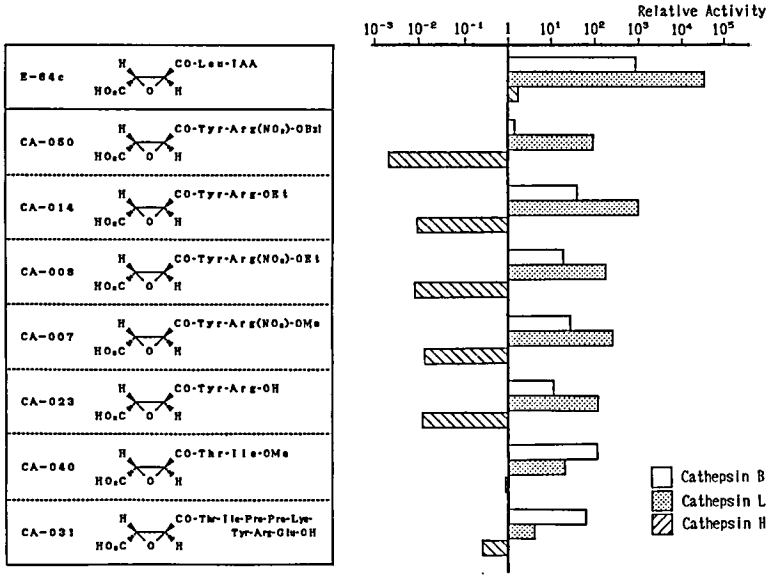


図4　カテプシン B，L，H に対する相対活性の比較

CA-040 よりも選択性が認められたことから，ペプチド鎖の延長は，活性増強とともに選択性の増強にも有効である可能性が考えられる．

結　　語

昨年度に引き続き，内在性 CANP インヒビター活性中心の一次構造を分子設計に応用し，約 40 種の化合物の合成と評価を行ない，次の結果を得た．

(1)エポキシコハク酸を Tyr-Arg の N 端へ導入した化合物の中に，E-64 c よりも約 10 倍強い CANP 阻害活性を有し，かつカテプシン L および B に対する選択性の面で改善が認められた，CA-050 を見出した．また，この CA-050 のペプチド部分を修飾することにより，活性および選択性が容易に変化することが分かり，特異的 CANP 阻害剤開発の足掛りが得られた．

(2)エポキシコハク酸を Thr-Ile の N 端導入した化合物のうち CA-031 に，カテプシン L および H に対する選択性の改善が認められた．また，更にペプチド鎖を延長することにより，活性および特異性を増強しうる可能性が示唆された．

文　　献

1）Emori, Y., Kawasaki, H., Imaioh, S., Imahori, K. and Suzuki, K.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84：3590, 1987.

筋ジスハムスターにおけるCANPインヒビターの分解

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タンパク質の異常分解をもたらすプロテアーゼの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．そこで，昨年度は筋ジスハムスターUM-X 7.1を用いて，実際に筋ジストロフィーの骨格筋に含まれるCANP（μCANPとmCANP）およびその内在性阻害物質（CANPインヒビター）の活性量を測定した．その結果，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．しかし，CANPは通常不活性な前駆体として存在し，この実験で測定したCANP活性はこの前駆体によるものであり，前駆体の量は必ずしも活性化されたCANP量を反映しているとは限らない．重要なのは活性化されたCANPの量であるが，それを特異的に定量する手段の無い現状では他の方法に頼らざるを得ない．そこでCANPの活性化の痕跡を求めることにした．CANPインヒビターはCANPを特異的に阻害する物質であり，CANPの阻害に伴い自身は分解を受ける[1]．このCANPインヒビターの変化から筋ジストロフィーにおけるCANPの異常な活性化の有無を検討した．

実験方法

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-X 7.1）は大正製薬総合研究所より恵与していただいた．それぞれの骨格筋および心筋を各種低分子プロテアーゼインヒビター存在下でホモジェナイズし，遠心した上清を熱処理した物を試料とした．試料はSDS-PAGEした後ニトロセルロース膜に転写し，抗インヒビター抗体でインヒビターを検出した．抗インヒビター抗体は，インヒビターのドメインⅠに含まれる34残基（Asp-105からGly-138）およびドメインⅣに含まれる34残基（Glu-522からPro-555）のペプチドを抗原とし，モルモットに免疫して作成した．

結　　果

正常ハムスターおよび筋ジスハムスターの骨格筋に存在するCANPインヒビターをイムノブロット法で検出したところ，正常ハムスターでは分子量約11万のインヒビターのみであったが，筋ジスハムスターではその分解物と思われるものも認められた（図1）．この分解物は4週齢および10週齢いずれの筋ジスハムスターにも存在し，ドメインⅠおよびドメインⅣに対するいずれの抗体とも反応した．したがって，筋ジスハムスター骨格筋ではCANPインヒビターはごく限定的な分解を受けていることがわかる．一方，4週齢の心筋ではこの分解物は認められないが，10週齢になると心筋にも分解物が現われてくる（図2）．このことから，CANPインヒビターの断片化は，時期のずれあるいは程度の差はあるが，筋ジスハムスターの筋組織に特徴的な現象といえる．

次に，この限定的分解がどのプロテアーゼによりもたらされるかを検討した．まず，有力な候補と考えられるCANPについてインヒビターの分解パターンを追跡した．しかし，その経

* 東京都老人総合研究所

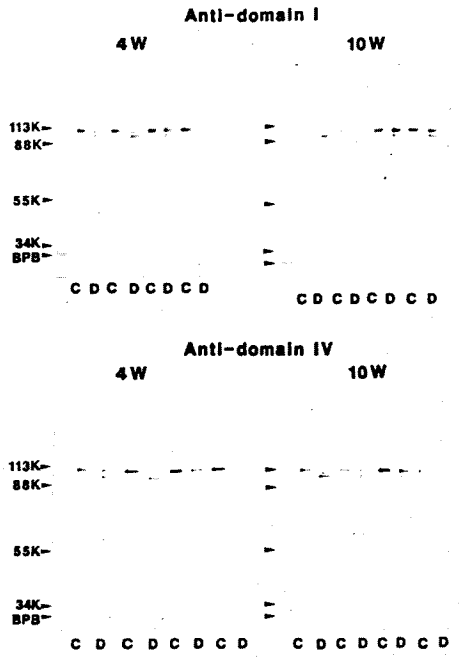


図1　正常ハムスター(C)および筋ジスハムスター(D)骨格筋のCANPインヒビター

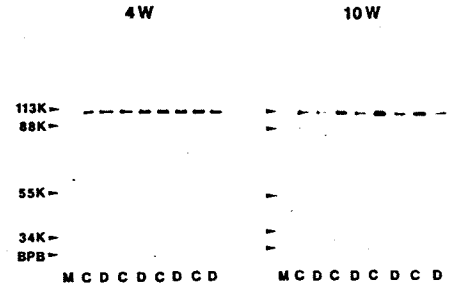


図2　正常ハムスター(C)および筋ジスハムスター(D)心筋のCANPインヒビター
ドメインⅠに対する抗体を用いた.

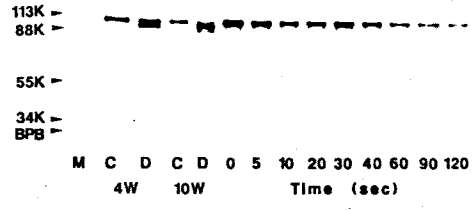


図3　mCANPによるインヒビターの分解（時間経過）. ドメインⅠに対する抗体を用いた.

時的変化のなかには，筋ジスにおける分解物に相当する断片は認められなかった（図3）．そこで，他の細胞内プロテアーゼについても検討したが，カテプシンおよびインゲンシンのいずれも該当しなかった．

考　　察

本研究で，筋ジスハムスターの筋組織ではCANPインヒビターの分解が起こっていることが明らかになった．この分解はプロテアーゼ活性の昂進によるものと考えられる．CANPインヒビターの本来の機能，即ちCANP活性の特異的抑制を考慮すると，筋ジストロフィーにおけるCANP活性の異常な昂進を抑えるためにCANPに作用し，自身が分解を受けたとすると理解しやすい．しかし，試験管内でインヒビターにCANPを作用させても同一のフラグメントは生じなかった．この結果は，CANP以外のプロテアーゼ活性が関与している可能性を示唆している．実際，CANPインヒビターはプロテアーゼに対する感受性が極めて高い[2]．試験管内では，他のプロテアーゼ（カテプシン・インゲンシン）でもこのフラグメントは生じない．従って，このフラグメントを生ぜしめるプロテアーゼは本研究で吟味しなかったものであるか，あるいは生体内では試験管内と異なる切断様式が存在するのかも知れない．

文　　献

1）Nakamura, M., Inomata, M., Imajoh, S., Suzuki, K. and Kawashima, S.: Biochemistry, 28：449-455, 1989.
2）Nakamura, M., Inomata, M., Hayashi, M., Imahori, K. and Kawashima, S.: J.Biochem., 98：757-765, 1985.

CANP 遺伝子のクローニングに関する研究
― CANP インヒビターの阻害機構と阻害部位―

鈴 木 紘 一*

研究協力者　川 崎 博 史*　榎 森 康 文*
西 道 隆 臣*　反 町 洋 之*

はじめに

カルシウム依存性中性プロテアーゼ（CANP）の内在性インヒビター（CANP インヒビター）は CANP に特異的な蛋白性のインヒビターである．すでに報告したように，CANP インヒビターには，アミノ酸約 140 残基からなる繰り返し構造（ドメイン I ～IV）が見いだされ，各ドメインの中には特異的なアミノ酸配列 TIPPXYR が存在する．大腸菌で発現させた種々の断片の CANP に対する阻害活性から，この TIPPXYR 配列の周辺が，阻害活性に重要な部位であることが明らかになった．本年度はこの TIPPXYR 配列の周辺のアミノ酸配列をもとにペプチドを化学合成し CANP インヒビターの阻害機構及び阻害部位を明らかにする実験をおこなった．

実験方法および材料

すでに報告した，ウサギ CANP インヒビターの 4 つのドメインの TIPPXYR 配列の周辺のアミノ酸配列をもとに 34 残基からなる 4 種類のペプチドをペプチド合成機により合成した．また，酵素消化などにより，これらのペプチドから得た断片も使用した(図 1)．E-64 及び TIPPXYR 配列をもとにした E-64 誘導体は大正製薬から供与されたものを用いた（表 3）．

CANP 活性及び CANP インヒビター活性の測定は，カゼインを基質にして常法によりおこなった．

CANP インヒビターの血小板凝集における効果は，以下のようにして測定した．血小板は，クエン酸採血したヒト末梢血より得た多血小板血漿（platelet-rich plasma, PRP）を用い，CANP インヒビター存在下における血小板凝集を 8 チャンネル凝集計（NBS 社，Hema Tracer 1）で計測した．PRP は，3 分間 37℃で preincubation し，DMSO に溶解した CANP インヒビターを加え，さらに 5 分間 incubation

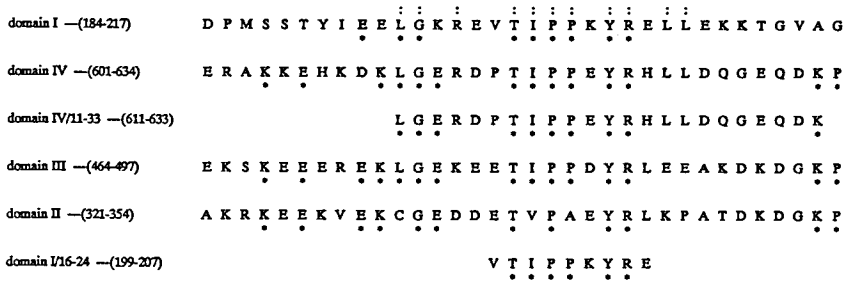
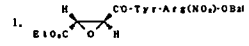
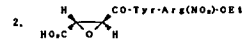
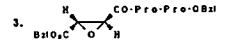
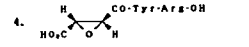
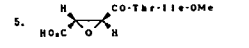


図 1　合成ペプチドのアミノ酸配列

* 東京都臨床医学総合研究所

表3　E-64 誘導体

CANP Inhibitors

#	structure	CANP (μM)	K_i Papain (nM)	Cath-B (nM)
1.		36	3,700	19,000
2.		3	24	500
3.		120	10,000	>40,000
4.		14	64	3,900
5.		46	3,300	550
6.	(E64-D) → E64-C	3	13	17

した後，コラーゲン刺激をおこなった．

結果および考察

合成ペプチドによる CANP 阻害

4種の34残基からなるペプチドの mCANP 及び μCANP に対する阻害活性を調べた．図2及び表1に示すように mCANP に対しても μCANP に対してもドメインⅠペプチドが最も阻害活性が強く，次がドメインⅣペプチドであった．ドメインⅢペプチドは mCANP を阻害するが μCANP はほとんど阻害しなかった．ドメインⅡペプチドは mCANP, μCANP どちらに対してもほとんど阻害しなかった．これらのペプチドはいずれも μCANP よりも mCANP を強く阻害した．また，これらのペプチドはパパインを全く阻害しなかった．ドメインⅠペプチドをV8プロテアーゼで消化すると VTIPP-KYRE という配列の9残基のペプチドが得られる．しかしながら，このペプチドは，いずれの CANP に対する阻害活性も示さなかった．しかし，ドメインⅣペプチドからリジルエンドペプチターゼ消化でN末端10残基を欠いた23残基のペプチドが得られるが，このペプチド

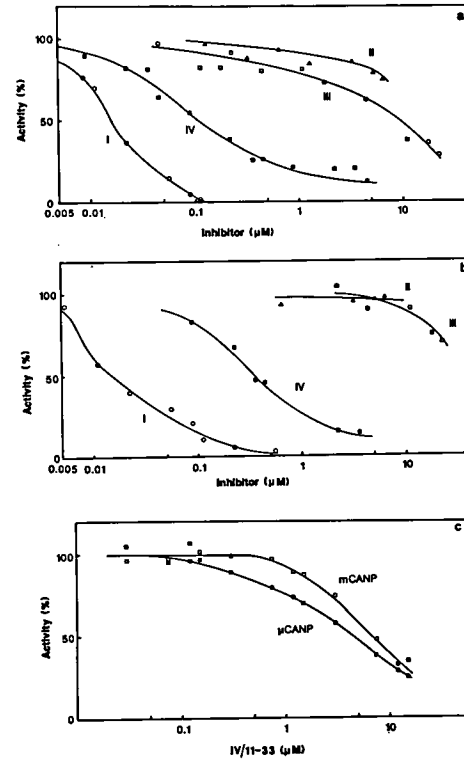


図2　合成ペプチドによる CANP の阻害
a) mCANP に対する阻害
b) μCANP に対する阻害
c) ドメインⅣ/11−33ペプチドによる mCANP, μCANP の阻害

表1　ペプチドインヒビターによる CANP の阻害
a) 50％阻害に必要な濃度
b) no inhibition
c) not determined

Petide	IC_{50} a) mCANP	μCANP
	μM	
Doamin I	0.016	0.016
Domain II	n.d.	- b)
Domain III	8.5	n.d. c)
Domain IV	0.12	0.32
Domain I/16-24	-	-
Domain IV/11-33	7.0	4.4

は mCANP も μCANP もともに阻害した．表1に示すこれらのペプチド阻害活性と図1に示したアミノ酸配列の類似性から，CANP を阻害するのに必要な部位は，LGXK(R)E(D)XTIPPXYRXLL と推定した．

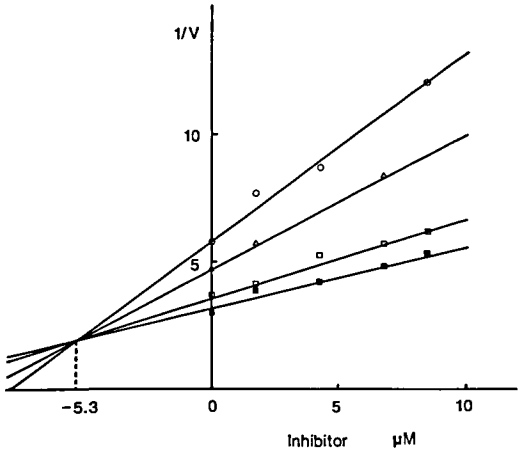


図3 Dixon plot
拮抗阻害を示し，Ki は 5.3 μM である．

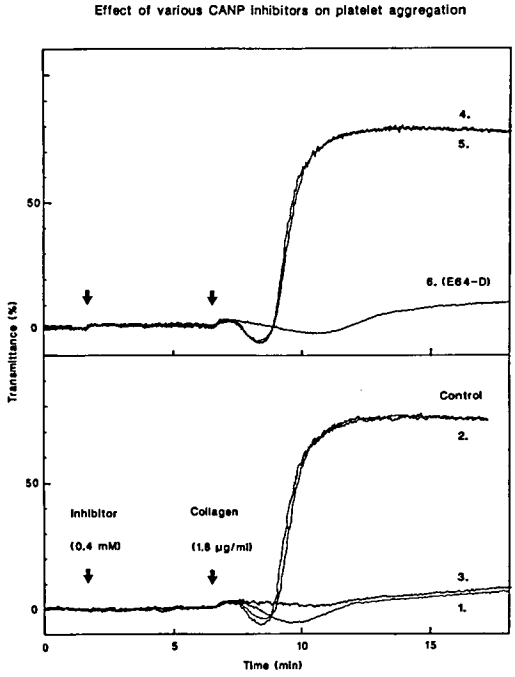


図4 E-64 誘導体による血小板凝集の阻害
番号は表3に示した各誘導体に対応している．

比較的弱い阻害活性をもつドメインIIIペプチドを用いて mCANP に対する Ki を求めた．このペプチドは，基質と拮抗的に CANP を阻害し，Ki は 5.3 μM であった．これは IC 50 の値とよい一致を示す．拮抗阻害を示すことから，

表2 ペプチドインヒビターによる CANP の保護効果
カルシウム存在下でペプチドインヒビター（11 μM）を氷上で2分間 incubate した後，E-64（7 μg/ml）を加え室温で5分間 incubate した．EDTA を加えて反応を停止して，限外濾過で阻害剤を除去した後，CANP 活性を測定した．回収された比活性の比率が示してある．

Inhibitor	(Calcium)	Specific Activity (%) of recovered CANP E-64 +	E-64 -
Domain I	(+)	19	88
Domain II	(+)	17	75
Domain III	(+)	10	82
Domain IV	(+)	63	95
(-)	(+)	0	-
(-)	(-)	100	-

CANP インヒビターが CANP のプロテアーゼドメインの活性部位と相互作用することが明確になった．昨年，報告したように，TIPPXYR 配列は，セリンプロテアーゼに対するインヒビターの reactive site と類似性が見られる．セリンプロテアーゼのインヒビターでは，多くの場合 reactive site において切断が見られるが，CANP インヒビターでは，TIPPXYR の周辺での切断は見られない．また，ここで用いたペプチドインヒビターも CANP による切断は全くうけないし，TIPPXYR 配列の周辺には，CANP が好んで切断する配列が見いだされない．阻害機構を考える上でこのことは重要な点である．

興味深いことに，ペプチドインヒビターの阻害活性の強さと E-64 に対する競合の度合が一致しないことが明らかになった．E-64 はカルシウム存在下で CANP の活性中心のシステインと反応して CANP を不可逆的に失活させることが知られている．CANP インヒビターは基質と拮抗的に CANP を阻害するから，CANP インヒビターによって E-64 による CANP の失活が保護されると期待される．しかしながら，表2に示すように，ドメインIVペプチドは E-64 に対して CANP の活性を保護するが，最も強い阻害活性を持つドメイン I ペプチドは，保護

効果がほとんどない．このことは，CANPインヒビターはCANPの活性中心の近くと相互作用するが，活性中心のシステイン残基との相互作用は強くないことを示している．TIPPXYR配列はセリンプロテアーゼのP′側と類似性があることを昨年報告した．TIPPXYR配列のN末端側にエポキシ基を持つE-64誘導体がCANPをよく阻害することも明らかになっている．これらのことは，CANPインヒビターによるCANP特異的な阻害にP′側とS′側の相互作用が重要であることを示している．現在，パパインの構造をもとにCANPとCANPインヒビターの相互作用のモデルを作成している．

CANPインヒビターによる血小板凝集の阻害

血小板は，トロンビン刺激などによって凝集反応を起こす際に細胞内のカルシウム濃度の上昇が必要であると考えられており，カルシウムによる刺激伝達の経路の同定が注目されている．凝集反応に伴ってactin-binding proteinやタリンがカルシウム依存的に分解されることが知られており，これはCANPによると考えられている．そこで，細胞内での合成CANPインヒビターの効果を検討するため，E-64及びCANPインヒビターのTIPPXYR配列をもとに設計されたE-64誘導体による血小板凝集の阻害を測定した．図4に結果を示すが，阻害の強さは，誘導体3>E-64 d>1>>5>2>4の順位であった．最も強い阻害活性を示した誘導体3は，CANP活性を阻害するIC 50の値は高いが，CANPに対する特異性は最も高い．この誘導体は構造上疎水性が強く，細胞膜透過性が高いと推測され，この点が重要であると考えられた．現在，凝集に伴って，CANPが切断すると考えられるタンパク質の分解が抑えられているかどうかを検討している．

MEL 細胞骨格タンパク質に対する CANP インヒビターの影響

杉 田 秀 夫*

研究協力者　石 浦 章 一*　塚 原 俊 文*

目　的

E-64 誘導体の *in vivo* の作用を検討する目的で血球細胞のタンパク分解に対する効果を検索した．鈴木らによって CANP インヒビターのドメイン構造が明らかにされ，活性部位のアミノ酸配列 TIPPXYR の一部とエポキシコハク酸を結合させた新規化合物 5 種が合成された．これらは CANP に対して比較的低濃度で阻害活性を持つ物質であるが，*in vivo* の CANP 作用に対する効果はまだ知られていない．今回，CANP の *in vivo* の基質の 1 つを明らかにすると共に，阻害物質の性質を検討した．

実験方法

1）CANP の *in vivo* 作用に対する影響

実験にはマウス赤白血病細胞（Murine Erythroleukemia cell, MEL）を用いた．MEL 細胞（5×10^6cell/ml）をまず 100 μM の各阻害剤と共に 60 分間インキュベートし，阻害剤をとりこませた．次いで Ca^{2+} イオノフォア A 23187 10 μM を加え，再び 60 分間インキュベートすることによって，細胞内に存在する CANP を活性化させた．その後，遠心によって細胞を集め，SDS 電気泳動後ニトロセルロース膜に転写させ，抗細胞骨格タンパク質抗体で染色した．

2）タンパク合成，分解に対する影響

MEL 細胞 5×10^5/ml を Leu-free 培地で 6 時間培養した後，100 μM の阻害剤と共に ^{3}H-Leu 5μCi/ml を加えタンパク質を標識した．16 時間後，RPMI-10 %牛胎児血清培地で 3 回洗滌し，再び cold Leu と共に 100 μM の阻害剤を加え，1，3，6，9，12 時間後上清の TCA 可溶性のカウントを測定した．

3）MEL 分化に対する影響

MEL 細胞 4×10^4cell/ml を DMSO 1.5 % によって前赤芽球に分化させた．4 日目頃から Hb 合成が顕著になり 6 日目には相当量の Hb が合成され細胞も赤色に変化した．阻害剤は 1 日目から 100 μM の濃度となるように加え，その影響を見た．対照には DMSO によって分化しない DMSO 耐性 MEL 株を用いた．6 日後，遠心により細胞を集め細胞内のカテプシン B&L 活性を Z-Phe-Arg-MCA を基質として測定した．

結果ならびに考察

1）Ca^{2+} によるフィラミンの分解

CANP の *in vivo* の作用を検討するため A 23187 を用いて細胞内に Ca^{2+} を導入し，60 分後の細胞骨格タンパク質の分解をウエスタンブロット法で検討した．用いた抗体は，抗フィラミン，抗ビンキュリン，抗 NF，抗 α-アクチニン骨格筋型，及び平滑筋型である．図 1 にその結果を示す．A 23187 を加えたものでは，細胞内のフィラミン量が減少しておりこれは CANP によって分解されたと考えられる．E-64 誘導体を加えた実験では Pro-Pro を持つ CA-018 は全く阻害効果がなかったが，Thr-Ile（CA-040）は多少分解を阻害した．一方，Try-Arg を持つ CA-003, 008, 023 はすべて効果があり，特に Arg（NO_2）を持ち末端がエステル化されている CA-003, 008 の阻害作用が顕著であった．

*国立精神・神経センター神経研究所

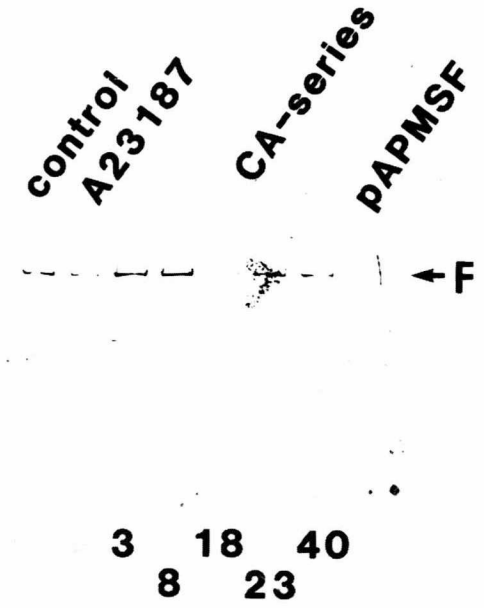


図1　抗フィラミン抗体によるイムノブロット．control は無処理の MEL 細胞．A 23187 とインキュベートするとフィラミン(F)が減少するのがわかる．同時に，阻害剤 CA-003～040 及び pAPMSF を 100 μM 添加したものを並べてある．CA-003, 008, 023 では分解が抑制されているのがわかる．

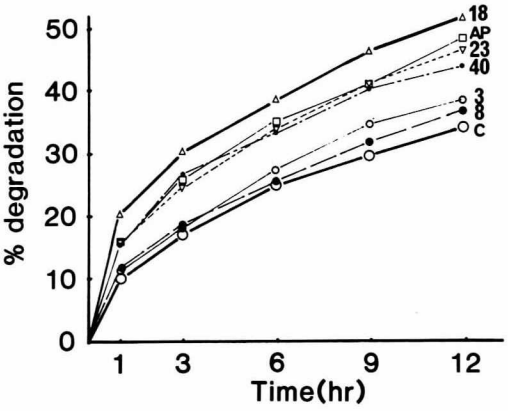


図2　^{3}H-Leu で標識した MEL タンパク質の分解．一定時間後，外液をとり TCA 可溶性のカウントを定量した．無添加の対照(c)よりタンパク分解を抑制するものはなかった．実験結果は 3 ボトルの平均で表してある．

この他の細胞骨格タンパク質であるビンキュリン，α-アクチニン，NF は全く A 23187 投与で変化がなく，これらは CANP に耐性であることが判明した．フィラミンは血小板においても凝集時に CANP によって分解されると考えられており，今回の MEL での結果もそれに一致するものである．CANP に対する作用は 8>23>3 であるにもかかわらず CA-023 が *in vivo* で効果が少ないのは膜透過性に問題があるものと思われる．CA-023 はカルボキシル基がエステル化されておらず，この点が透過性に影響を与えていると考えられ，今後の検討が必要と思われる．

2）各阻害剤のタンパク分解に対する作用．

1）は 60 分という短期間の効果であったが，次に 1～12 時間でのタンパク分解に対する作用を検討した．まず，MEL 細胞を 16 時間^{3}H-Leu で標識し，その後外液にリリースされる^{3}H アミノ酸量をタンパク分解量と定義した．

まず，^{3}H-Leu 標識時に阻害剤を加え，タンパク合成に対する影響を見たところ，CA-003, 008, 018, 023, 040 及びセリンプロテアーゼ阻害剤 pAPMSF 100 μM の添加では対照の 86, 100, 75, 78, 88, 80 %と若干低下気味であった．しかし，16 時間では毒性は見られなかった．

次いで cold Leu でチェイスを行ったところ，タンパク分解を抑制するものはなく(図 2)，CA-003, 008 のみが対照と同程度であった．

3）各阻害剤の長期投与効果

次に，6 日間長期投与実験を行い，MEL 細胞の分化に対する影響，並びに毒性を検討した．MEL は DMSO 1.5 %添加により前赤芽球に分化し Hb を合成しはじめる（図 3）．この時，カテプシン活性も増加することが知られているので，阻害剤の影響をカテプシンを指標として測定することが可能となる．一方，6 日後のタンパク量で細胞毒性を測定することができる．今回の実験では，DMSO を加えても前赤芽球に分化しない DMSO 耐性 MEL 株を対照（阻害剤の透過性の指標）としてカテプシン B&L を測

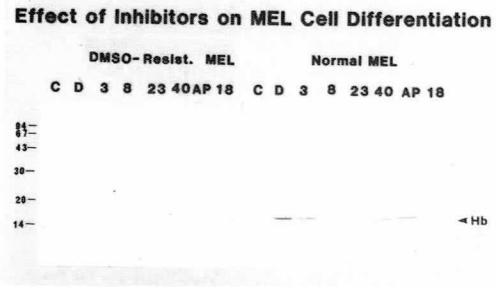


図3　MEL 細胞の DMSO による分化
DMSO 耐性株及び通常の MEL 細胞を 1.5 % DMSO(D)の存在下 6 日間培養した．その後，抗ヘモグロビン抗体（抗 Hb）により合成 Hb 量を観測した．対照(c)，並びに CA シリーズは番号で示してある．AP は pAP-MSF 添加．

表1　分化後のタンパク質とカテプシン B&L 活性．
詳細は図 3 参照．

Effect of Various Inhibitors on the Cell Growth of MEL Cells and DMSO-Resistant Cells

	DMSO-Resistant MEL		Normal MEL	
	Protein (mg/dish)	Cathepsin B&L (n mole/min/mg)	Protein (mg/dish)	Cathepsin B&L (n mole/min/mg)
None	1.371	0.497	1.356	0.664
DMSO	1.561	1.383	0.999	0.855
3	1.388	0.452	0.910	0.197
8	1.404	0.737	0.931	0.305
18	0.008	—	0.010	—
23	1.286	0.200	0.886	0.059
40	1.360	0.076	0.915	0.042
pAPMSF	1.066	0.630	0.047*	0.544

定した（**表 1**）．

表 1 より Pro-Pro を含む CA-018 は MEL に対しては細胞毒性を示し，6 日後にはほとんどの細胞が死滅した．その他の化合物には毒性は見られなかった．まず，DMSO 耐性株に注目すると，すべての細胞は Hb は合成しないが DMSO によってカテプシン活性は約 2.8 倍に上昇した．CA-003，008，023，040 共に効果があったが，特に CA-023，CA-040 の阻害効果が顕著であった．

表2　実験のまとめ．
IC_{50} は CANP，カテプシン B（cath. B）に対するもの（μM）ですでに発表ずみであるものを引用した．A 23187 は図 1 の結果を，DMSO Hb は図3，DMSO cathBL は表 1 の結果を表示したものである．

Inhibitors	IC_{50} CANP	IC_{50} Cath.B	A23187	DMSO Hb	DMSO Cath.BL
3 EtO-ES-Tyr-Arg(NO_2)-OBz	30	19	++	→	++
8 HO-ES-Tyr-Arg(NO_2)-OEt	3	0.5	++	↓	+
18 Bz-ES-Pro-Pro-OBz	120	>40	-	toxic	toxic
23 HO-ES-Tyr-Arg-OH	14	3.9	+	↓	+++
40 HO-ES-Thr-Ile-OMe	46	0.55	+	→	+++
pAPMSF	-	-	-	→	-

+, effective　　-, no effect

一方，通常の MEL は DMSO によって 4 日目より Hb を合成し始める．6 日後には細胞のタンパク量は減少するが，これは分化した証拠である．カテプシン活性は約 1.3 倍に上昇するが，各阻害剤は DMSO 耐性株よりは効きが良く，CA-018 以外はよく阻害した．やはり CA-023，040 の効果が CA-003，008 を上回った．

以上の結果より，分化した細胞はしないものよりも阻害剤の効果が上回ることから，阻害剤が細胞にとり込まれ易いと考えられる．また，カテプシン B&L に対する阻害活性は，*in vitro* とは異なり CA-023, 040 の方が高いと結論づけられた．

結　　論

CANP のフィラミン分解に対しては CA-003，008 が，カテプシンに対しては CA-023，040 が効果があり，CA-018 は長期投与には不適当であることが判明した（**表 2** 参照）．

Recombinant Cystatin 類の治療薬としての開発に関する基礎研究

勝沼信彦*

研究協力者　唐渡孝枝*　二川　健*　池　祥雅**

緒　論

Lysosome の Cysteine protease 群（Cathepsin 群）作用の異常亢進，異常低下およびプロセス異常に起因する疾患は多い．異常亢進に起因する疾患には筋ジストロフィーを初め各種の筋タンパク崩壊疾患，オステオポローシスなどがある．また異常低下とプロセス異常では Lipofuscinosis（Batten 病）が CathepsinH の欠損であり I cell 病は全 Cathepsin 群が Lysosome に封入されずに細胞外に放出されるものであり，それぞれの代表的な疾患としてあげられる．従ってこれらの疾患の病因の研究や治療薬開発には，Cathepsin 群に特異性が高く，強い阻害活性をもち，細胞内の目的部位に高濃度に到達できる，かつ毒性の弱い阻害剤が要求されている．この目的でまず取上げられたのが E-64 誘導体である．現時点までの E-64 誘導体ではすべての必要条件を必ずしも満足させてはいない．従って新しい阻害物質の開発は依然として重要な課題である．

最近数年間に Lysosome の Cathepsin 群に特異性のある細胞内のペプチド性インヒビター Cystatin 群が数種類，発見され，構造決定された．その中の Cystatinα と Cystatinβ は我々が発見し，構造決定したものである．ラットの Cystatinα とその人間型 CystatinA を上記疾患の治療薬として開発する目的で以下のごとき基礎実験をおこなってきた．

Cystatinα と A の合成 cDNA による大腸菌リコンビナント・プラスミドによる大量発現と精製に成功した．また結合部位のアミノ酸を cDNA レベルで変換した人工 Variant を作り，阻害特性の目的に沿う変換を試みている．

Cystatinα 遺伝子の合成と E.Coli による発現

Cystatinα をコードした遺伝子 cDNA を化学合成し，クローニングし，E.Coli に発現させ，更にそれを大量精製する方法を確立した．即ち 318 塩基ペアーを 19 のオリゴヌクレオチッドとして合成し，これらを酵素的に結合させたものを大腸菌 pBR 322 プラスミドに入れた．これの EcoRAI-BamHI フラグメントを tac promoter でコントロールすべく pKK 223-3 発現プラスミドに入れ換えて発現させた．

菌体を凍結融解することにより容易に Cystatin を可溶化できる．これを Sephadex G 50 でワンピークとして精製できる．HPLC DEAE-5 PW を使用して更に精製する必要がある場合もある（発現量の少ない場合）．CystatinA およびこの人工 Variant の場合も同一の方法によった．収量は Cystatinα の場合は 2 mg/g 湿菌量であるが，CystatinA 及び，その Variant・Cystatin の場合は 0.1 mg/g 湿菌

表 1　Purification of recombinant cystatin A from E. Coli

	Total Activity	Specific Activity	Yield
Extract	22.5	0.12	100 %
Sephadex G-50	16.3	1.56	72 %
HPLC-5PW	9.0	8.05	40 %

*徳島大学酵素科学研究センター酵素化学部門
**三井東圧化学・ライフサイエンス研究所

量である．精製過程とその収量は表1に示されている．これらのRecombinant Cystatin群は天然から精製したものと物理化学的ならびに阻害活性ともに同一である．CystatinAの精製過程は表1のごとくである．

Variant Recombinant CystatinAにおける阻害特性の変換

Cystatin類はカテプシンと1モル対1モルが結合して完全に失活させる．Cystatin類のカテプシンとの結合部位は数種類のCystatin群の構造中で図1のごとく最もホモロジーの高い部位であるQVVであると推定されてきた．しかし，実証は全く存在しなかった．我々はこれを実証すべくCystatinAの合成cDNAのQVVの中でQをKに変換したもの，二番目のVをTに変換したもの，および両者を変換したものの三種のバリアントcDNAを合成して大腸菌で発現させた．その結果，QをKに変換したバリアントは全体としての阻害活性は大した低下は認められなかったが，カテプシンB，H，Lおよびパパインに対する阻害の特異性（阻害強度の順位）は大きな変化があった（表2）．本来天然のCystatinAはCathepsinHを一番よく阻害し，CathepsinLとPapainに対してはCathepsinHを阻害する数倍量を必要とする．

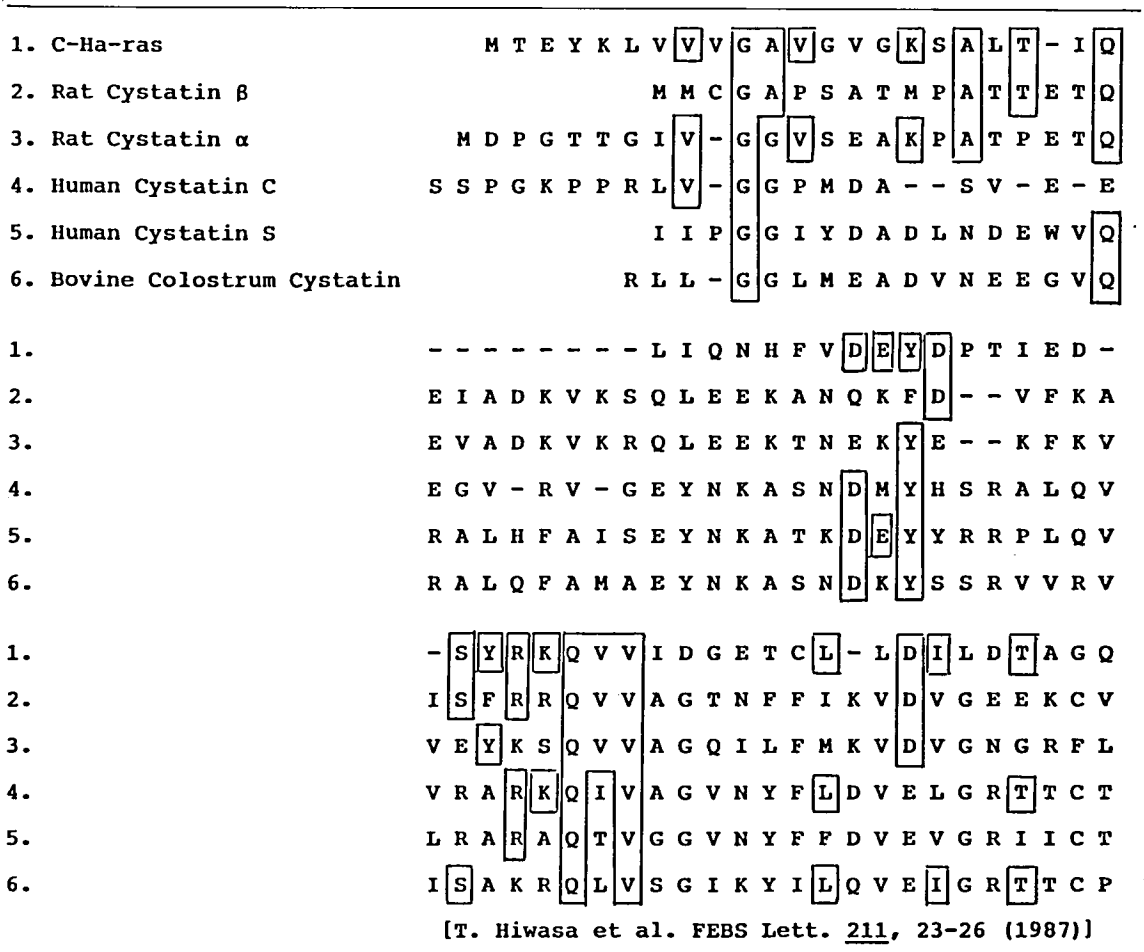


図1 Composite alignment of amino acid sequences of cystatin family and CHa-ras

表2 Comparison of inhibitory activity of variant cystatin A for various cysteine proteases (ID 50×10^{-5} moles)

	Cathepsin B	Cathepsin H	Cathepsin L	Papain
Natural	170	0.6	2.2	3.1
Q → K	290	11	1.3	1.1
Q → K V → T	2700	∞	20	6.3

これはCathepsinBはほとんど阻害しない．しかしQをKに変換したバリアントではCathepsinLとPapainに対する阻害剤は上昇し，逆にCathepsinHに対する阻害度は20倍程悪くなるので，CathepsinHとCathepsinLに対する阻害度は逆転する．一方で，二番目のVをTに変換したものはほとんど阻害活性を失った．従って分子中のQVV周辺の構造はCysteine protease群の中の阻害特異性の決定と阻害活性の発現に大きな関与をしていることが明らかになった．此の部分の各種の変換により阻害度の更に強いもの，特異性を目的に合ったものに変換する研究を進めるつもりである．

またCystatin類は分子量が一万強であるために，細胞内，更にはLysosome内に取込まれ易くするために次に二つの方法を進めている．Cystatinを包埋したりリポゾームを作る場合にLysosome酵素群の認識シグナルであるマンノース6燐酸をコレステロールに結合させた化合物を作り，これをリポゾームのリピッド二重膜に浮かせたものを作りLysosome tropicな製剤を作ることを試みている．今一つの方法はCystatinをSMAポリマーとの結合物にする方法を企画している．

文　献

Katunuma, N., Yamato, M. Kominami, E. and Ike Y.: Total synthesis of the cystatin α gene and its expression in E. Coli, FEBS Lett., 238: 116-118, 1988.

E-64-c および EST の薬物動態
—蛍光 HPLC によるモニター法の開発—

大 倉 洋 甫*

研究協力者　巣　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試薬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に分布しているロイペプチン[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)]，ホルフェニシン[8)]などの実用的かつ簡便な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．

本年度は，ペプチド様化合物である E-64-c および EST の簡便な高感度分析法を開発するために，蛍光ラベル化剤として当分担研究者らが既に開発している 3-ブロモメチル-6, 7-ジメトキシ-1-メチル-2(1 H)-キノキサリノン (Br-DMEQ) を用い[9),10)]，E-64-c のカルボキシル基を蛍光ラベルする反応条件を検討した．また，EST のラベル化には，EST の E-64-c への加水分解反応条件を検討し，同様に Br-DMEQ によってラベル化する方法を試みた(図1)．生成する蛍光ラベル化体は逆相 HPLC によって試薬由来の妨害物質と分離・蛍光検出した．

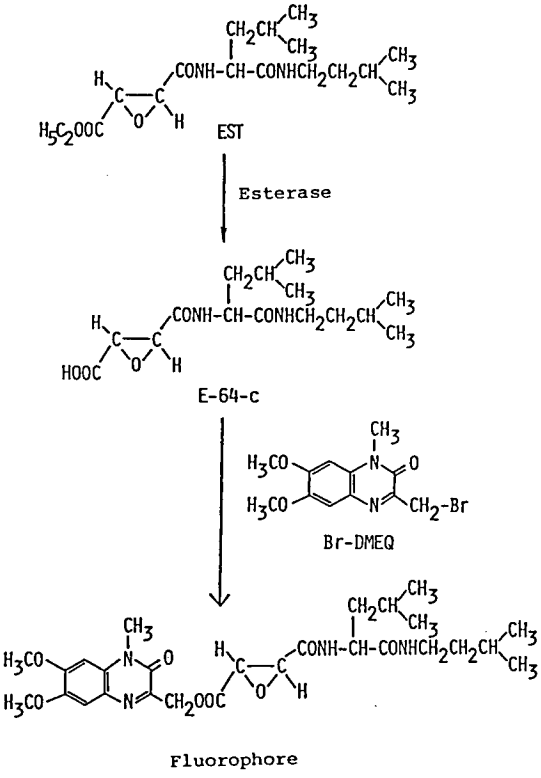


図1　Fluorescence derivatization of EST and E-64-c with Br-DMEQ

実験方法

1）E-64-c の誘導体化反応

遮光バイヤルに 5 mM $KHCO_3$ の 80 % (v/v) ジメチルホルムアミド (DMF) 水溶液 10 μl，E-64-c の DMF 溶液 20 μl および 3 mM Br-DMEQ の DMF 溶液 70 μl を加える．密栓し，100℃で 20 分間加熱したのち，冷却後，反応液 50 μl を HPLC に用いる．

2）EST の加水分解

EST の水溶液 100 μl に 300 units (10 mg)/ml カルボキシエステラーゼ(0.1 M リン酸塩緩衝液，pH 8.0) 10 μl を加え，室温 (24±5℃) で 30 分間放置する．この酵素反応液 20 μl にアセトンを 200 μl 加え，1000 g で 5 分間遠心する．その上清 20 μl を上記の蛍光誘導体化反応

*九州大学薬学部

に用いる．

3）HPLC 条件

カラムは TSKgel ODS-120 T（150×4 mm, i.d.；粒径，5 um）を使用した．CH_3CN-H_2O（2：3, v/v）の溶離液を流速 0.8 ml/min で送液した．E-64-c の蛍光体が溶出したのち，直ちに CH_3CN-H_2O（19：1, v/v）の溶離液を同じ流速で流し，カラムを洗浄した．蛍光検出は，励起波長 380 nm および発光波長 460 nm で行った．

結果および考察

1）HPLC による分離

基準操作に従い，蛍光ラベル化した E-64-c のクロマトグラムを図 2 に示す．E-64-c の Br-DMEQ のラベル化体は未反応の試薬および分解物のピークと良く分離し，保持時間 20.0 分に溶出した．試薬由来のピークは 40 % CH_3CN を含む溶離液ではカラムから完全に溶出されないので，95 % CH_3CN を含む溶離液で溶出した．一方，大部分の有機酸（パルミチン酸，オレイン酸，シュウ酸，マロン酸，乳酸およびリンゴ酸）の DMEQ ラベル化体は 40 % CH_3CN の溶離液を 60 分間流しても，カラムから溶出しなかった．

そのほか，α-ケト酸（p-ヒドロキシフェニルピルビン酸，フェニルピルビン酸），L-α-アミノ酸（アルギニン，チロシン），糖（グルコース，フルクトース）およびアミン（ヒスタミン，チラミン）に基づく蛍光ピークは検出されなかった．

E-64-c ラベル化体の蛍光スペクトルは，励起および発光極大波長をそれぞれ 380 および 460 nm に示した．また，E-64-c の蛍光ラベル化体は，反応後，室温で 24 時間放置しても安定であった．

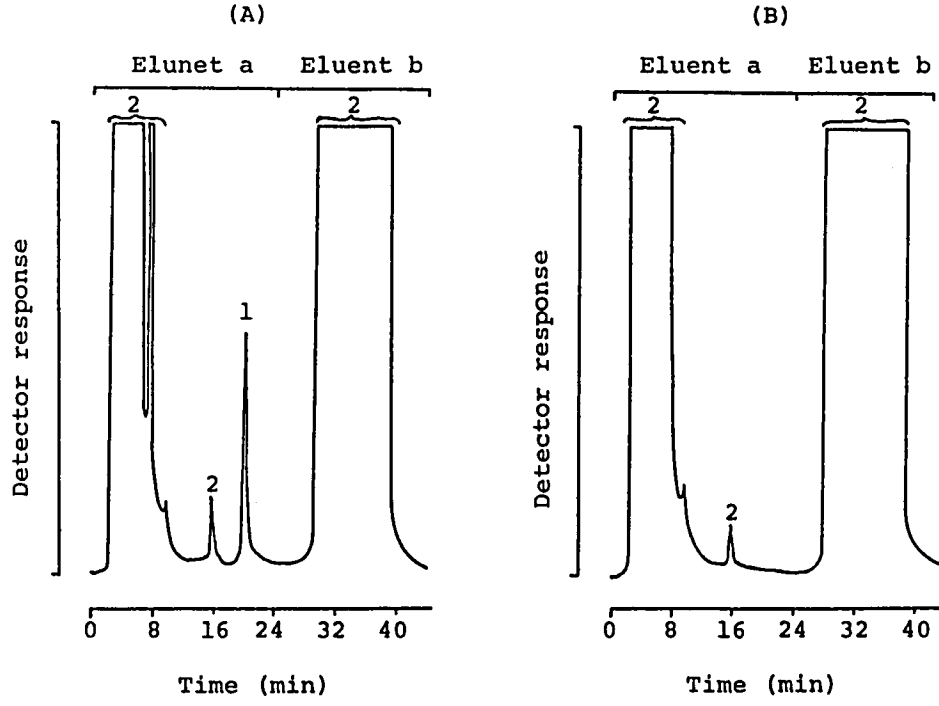


図 2 Chromatograms of the DMEQ derivative of (A) E-64-c and (B) the reagent blank
Peaks: 1, E-64-c derivative; 2, the reagent blank HPLC conditions: Column, TSK gel ODS-120 T (150×4 mm, i. d., particle size, 5 μm); Eluent a, CH_3CN-H_2O (2：3, v/v); Eluent b, CH_3CN-H_2O (19：1, v/v); Flow rate, 0.8 ml/min; Detection, Ex=380 nm, Em=460 nm.

2）ラベル化条件

Br-DMEQ によるカルボン酸の蛍光ラベル化反応は K_2CO_3 粉末と 18-Crown-6 の存在下 CH_3CN 溶媒中 50℃で加熱することによって行われる[10]．この方法では，無水条件を必要とするので，生体試料に応用し難く，また，反応液を HPLC に注入したとき，K_2CO_3 粉末がサンプルループなどに詰まり易い．したがって，少量の水を含み粉末のない反応系について検討した．

図3は，水（2％，v/v）を含む反応液に可溶な K_2CO_3，$KHCO_3$，KCl あるいは有機塩基（ピリジン，トリエチルアミン，テトラ-n-ブチルアンモニウムヒドロキシド）を加えた場合の蛍光ラベル化体の生成量について調べたものである．カリウム塩は有機塩基よりも効率よく E-64-c 蛍光ラベル化体の生成を促進させ，特に 5 mM $KHCO_3$ を使用したときに蛍光ラベル化体の生成量が最大となった．

図4は，5 mM　$KHCO_3$，2.5 mM，K_2CO_3 または 5 mM　KCl を用いた各反応条件において，反応液中の水の含量による影響を調べたものである．3 者とも最終反応液中 2％（v/v）の水を含む場合に，蛍光ラベル化体の生成量が最大になった．このとき，18-crown-6（5 mM）をそれぞれ反応液に存在させても，蛍光体の生成は促進されなかった．

反応の溶媒として用いた DMF のかわりに，アセトニトリルおよびジメチルスルホキシドを用いた場合には，蛍光ラベル化体の生成量は DMF の場合に比べてそれぞれ 24 および 40％と低く，メタノール，ジオキサンおよびアセトンではほとんど生成しなかった．したがって，DMF を反応溶媒として選択した．

2.5 mM 以上の Br-DMEQ 試薬を用いたとき，E-64-c の蛍光ラベル化体の生成量は最大になったので，基準操作では 3 mM を使用した．

ラベル化反応は，図5に示すように，反応温度が高いほど速やかに進行した．最大の生成量を得るために，基準操作では，100℃で 20 分間の反応条件を選択した．なお，本反応は室内光下でも進行するが，遮光した場合約 1.2 倍生成量が増大したので，遮光バイアル中で反応を行った．

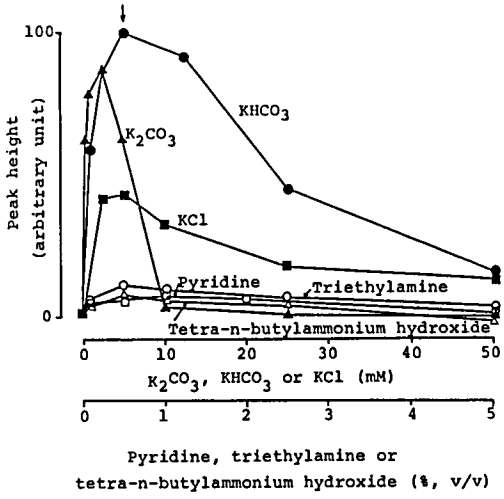


図3　Effect of the concentrations of the bases on the derivatization of E-64-c
A 20-μl portion of 10 nmol/ml E-64-c was treated as in the recommended procedure with various bases.

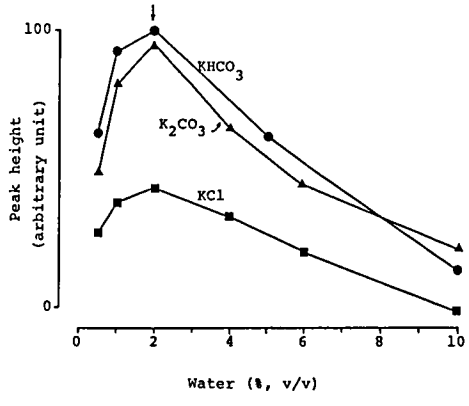


図4　Effect of the amount of water in the reaction mixture on the derivatization of E-64-c
A 20-μl portion of 10 nmol/ml E-64-c was treated as in the recommended procedure at various amounts of water in the reaction mixture.

3）EST の加水分解

EST は酸性（1.0 M　HCl）およびアルカリ

性（0.5 M　NaOH）溶液中では，効率よく E-64-c に変換されず，ブタ肝臓の精製カルボキシエステラーゼを用いて加水分解したとき，ほぼ完全に E-64-c へ変換した（図 6）．また，酵素濃度を 100-500 units/ml の範囲で変化させた場合（室温で 30 分間のインキュベーション），いずれも 100 %の反応収率を与えた．

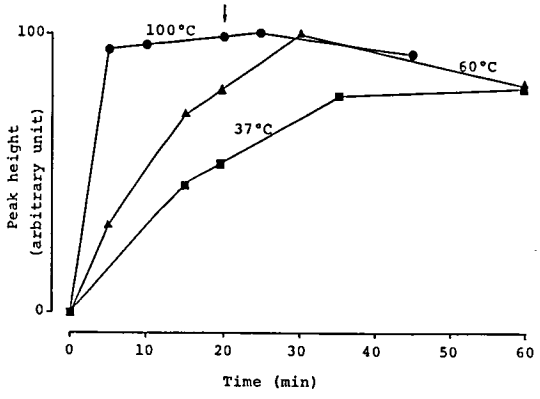


図 5　Effect of reaction time and temperature on the derivatization of E-64-c
A 20 μl portion of 10 nmol/ml E-64-c was treated as in the recommended procedure for various periods at 37, 60 and 100℃.

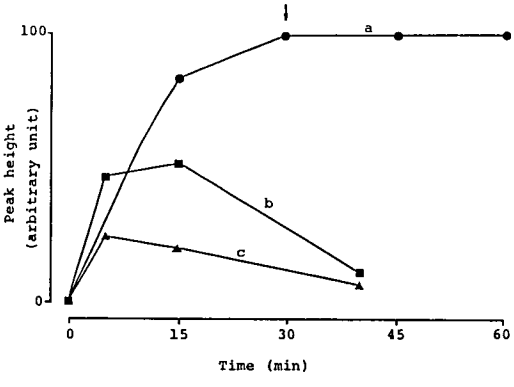


図 6　Time course of the hydrolysis of EST with esterase, sodium hydroxide or hydrochloric acid
A 100 μl portion of 10 nmol/ml EST was treated with (a) 10 μl of 300 units/ml esterase at room temperature (25℃), (b) 100 μl of 0.5 M NaOH at 100℃ and (c) 100 μl of 1.0 M HCl at 100℃ for various periods.

4）検量線および感度

本法による E-64-c および EST の検出限界（S/N＝3）は，HPLC 注入量（50 μl）中，両者とも 500 fmol であった．また，両者の検量線は原点を通り，少なくとも HPLC 注入量中 100 nmol まで直線性を示した．

おわりに

本研究において，E-64-c を含水溶媒中で効率よく Br-DMEQ により蛍光ラベル化できることが分かった．このラベル化体は容易に逆相 HPLC によって分離され，高感度に蛍光検出された．検出感度は 500 fmol レベルであった．また，EST の E-64-c への加水分解反応を検討した結果，酵素を用いる加水分解により 100 %の反応収率を得ることができた．以上により，本法は生体試料中の E-64-c および EST の微量分析に十分応用できるものと考える．

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.

8）Chao, W.-F., Kai, M. and Ohkura, Y.: J. Chromatogr., 430: 361-367, 1988.

9）Yamaguchi, M., Hara, S., Matsunaga, R.,

Nakamura, M. and Ohkura, Y.: Anal. Sci., 1: 295-296, 1985.

10) Yamaguchi, M., Hara, S., Matsunaga, R., Nakamura, M. and Ohkura, Y.: J. Chromatogr., 346: 227-236, 1985.

哺乳類横紋筋C-タンパク質アイソフォーム：二次元電気泳動法とイムノブロット法による解析

丸 山 工 作*

研究協力者　大日方　昂*　小 島　崇*　新 保 和 彦*

C-タンパク質は横紋筋の筋原繊維上に存在する筋特異タンパク質である．最近までの研究で，鶏の心筋，遅筋，速筋に存在する特徴的なアイソフォームが免疫学的な手法と[1,2]，二次元電気泳動法によって[3,4]明瞭に区別され，親の鶏では心筋と速筋に各一ケ（それぞれCCとFC），遅筋には二ケのアイソフォーム（SC_3，SC_4）（胚の筋では更に2ケの遅筋アイソフォーム，SC_1，SC_2）が明らかになっている．これらのアイソフォームの発現は，鶏骨格筋では発生の過程[5]や筋が除神経された場合[6]，さらに筋ジストロフィー症が発症した場合[7]に著しく変化することが明らかにされている．鶏胸筋では正常には速筋型C-タンパク質のみが発現されるのに反して，筋ジストロフィー症が発症した場合には，速筋型C-タンパク質に加えて遅筋型C-タンパク質も発現される[7]．これらのことから，鶏では遅筋型C-タンパク質の発現は筋ジストロフィー症の発症過程をみるための良い指標になることが指摘された[7]．

哺乳類でも，鶏の場合のようにC-タンパク質の発現変化を指標として筋ジストロフィーの発症を見ることが可能かどうかはっきりしていない．哺乳類のC-タンパク質アイソフォームを調べるために適切なモノクローン抗体(McAb)が準備されていないことが一つの理由である．そこで本研究においては，まず哺乳類のC-タンパク質に反応性のあるMcAbを検索し，更にC-タンパク質アイソフォームの基本的パターンを二次元電気泳動法とイムノブロット法の組合せにより明らかにし，筋ジストロフィー症における変化を探る足がかりとすることを目的とした．

実験の方法

主にウサギとラットを材料とし，速筋としては長指伸筋(EDL)，遅筋としてヒラメ筋，および心筋（心室）を用いた．電気泳動用試料は，タンパク質の分解を避けるため，新鮮な筋を8Mグアニジン HCl 抽出しそれを5M尿素-1Mチオ尿素液に透析して作成した[8]．等電点電気泳動は平林の方法（1981）[8]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3層のゲルを重ねて行った．その後，二次元目の電気泳動法をSDS-7％アクリルアミドゲル上に展開し，CBB染色するか，ニトロセルロース膜に転写した後，C-タンパク質に対するMcAbを作用させて，その反応からC-タンパク質のスポットを同定した(イムノブロット法)．イムノブロット法の詳細は既に記した[4,9]．

結　　果

(1)哺乳類のC-タンパク質を認識するモノクローン抗体の検索

今まで我々が進めてきた研究の中で既にC-タンパク質に対するモノクローン抗体が6種類作成されている（表1）が，それらはいずれも鶏のタンパク質を免疫原として作成されたものである．これらの中に，哺乳類のC-タンパク質にも反応するものがあるかどうかを調べた．ラッ

*千葉大学理学部生物学科

トの速筋（EDL），遅筋（soleus），心筋（心室）の全タンパク質抽出液をSDS-PAGEで展開した後ニトロセルロース膜に転写し，イムノブロット法により6種類の抗体を検定したところ，一つのクローン（FC-18）が速筋と心筋と反応し，単一のバンドを与えることがわかった（図1）．そのサイズは分子量約140 kDaで，鶏のC-タンパク質のバンドと移動度が一致した．この抗体はヒヨコの胸筋のC-タンパク質を免疫原として作成されたものであるが，鶏の場合，速筋と心筋のC-タンパク質を特異的に認識することが，既にわかっている[10]．これらのことから考えて，FC-18は哺乳類の速筋型，心筋型C-タンパク質とも交差反応するが，遅筋C-タンパク質とは反応しないものと判断された．特異性は筋凍結切片を用いた蛍光抗体法による解析によっても確かめられた．ウサギおよびマウスのC-タンパク質も全く同様な反応性を示した．他の5種類のMcAbは哺乳類のC-タンパク質とは全く反応しなかった（表1）．C-タンパク質の抗原性は，鳥類と哺乳類間ではかなり異なるように見える．以上の結果から，FC-18を用いることにより哺乳類の速筋，心筋のC-タンパク質を解析することは可能であることがわかったが，遅筋C-タンパク質のための免疫学的プローブは見つけられなかった．

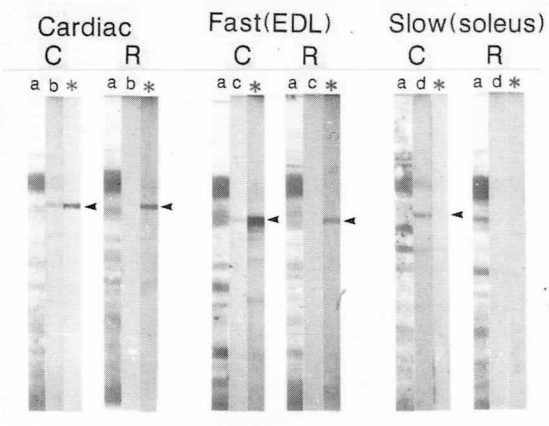


図1　哺乳類C-タンパク質を認識するモノクローン抗体FC-18の検定
鶏（C）またはウサギ（R）の心筋，速筋，遅筋の全タンパク質抽出液をSDS-PAGE（7％ゲル）に展開し，イムノブロット法により抗体の反応性を調べた．a，アミドブラック染色による電気泳動パターン（a）とモノクローン抗体C-315(b)，MF-1(c)，ALD-66（d），FC-18（＊）による反応を示す．抗体については表1を参照のこと．

(2)二次元電気泳動法による解析

ウサギの心筋，EDL，ヒラメ筋の全タンパク質抽出液を二次元電気泳動法で展開し，ニトロセルロース膜に転写した後，FC-18を作用させることにより心筋C-タンパク質（CC）と速筋C-タンパク質（FC）それぞれに一ケずつのスポットを検出することができた（図2）．C-タンパク質のスポットはCBB染色でも明瞭に見ることができた．分子量的にはCCがFCより若干大きい．比較のために，同一ゲル上でミオシンH-鎖（MHC）のスポットをMcAb（MF-20）を用いて検出したところ，C-タンパク質のスポットはMHCよりやや塩基性側に位置した．また，心筋とEDLの抽出液を混合して電気泳動し，CCとFCを同一ゲル上で比較してみると，両者の等電点はほぼ等しいことがわかった．鶏ではCCとFCは等電点電気泳動で明らかに区

表1　C-タンパク質に対するモノクローン抗体ニワトリとウサギのC-タンパク質アイソフォームとの反応性

	C-タンパク質のタイプ					
	ニワトリ			ウサギ		
	速筋型	遅筋型	心筋型	速筋型	遅筋型	心筋型
MF－1	＋	－	－	－	－	－
MF－21	＋	－	－	－	－	－
FC－18	＋	－	＋	＋	－	＋
FC－20	＋	－	－	－	－	－
ALD－66	－	＋	－	－	－	－
C－315	－	－	＋	－	－	－

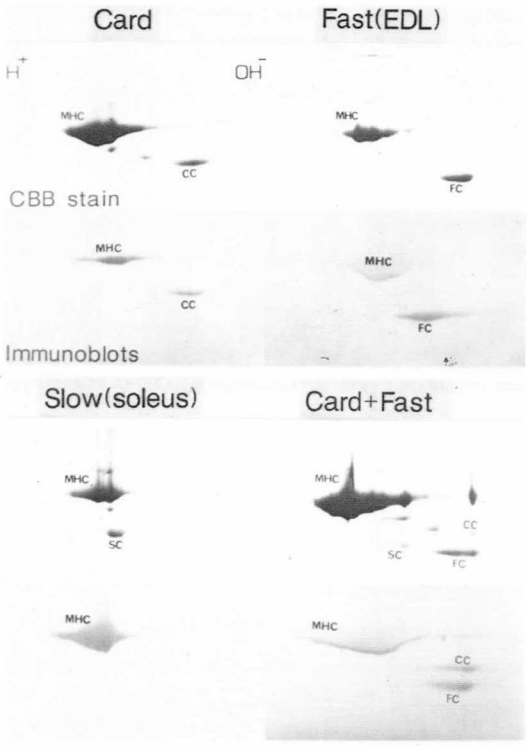


図2　ウサギのC-タンパク質の二次元電気泳動による解析
心筋（Card），速筋（Fast），遅筋（Slow）の抽出タンパク質を二次元に展開し，CBBによる染色（上段）またはFC-18とミオシンH-鎖（MHC）に対するMcAb（MF-20）の二重処理によるイムノブロット（下段）より，心筋（CC），速筋（FC）C-タンパク質を同定した．遅筋C-タンパク質（SC）は電気泳動パターンから推測した．図にはミオシンH-鎖とC-タンパク質領域のみを示している．

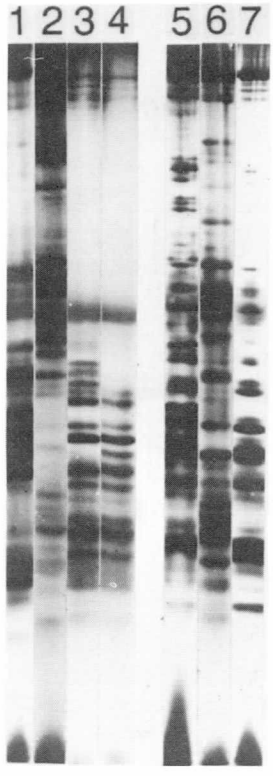


図4　鶏とウサギの各種C-タンパク質アイソフォームのペプチドマップによる比較二次元電気泳動で分離されたC-タンパク質スポットを切り出し，Clevelandの方法[11]に従ってV-8プロテアーゼにより分解，フラグメントを13.5％アクリアミドゲル内でSDS-PAGEにより展開した．1，2，3，4は鶏のFC，CC，SC_3，SC_4，5，6，7はウサギのFC，CC，SCのパターン．

別され，前者が後者より少し塩基性の等電点を示すことが観察されており，この点では鶏と哺乳類が異なる．抗体（FC-18）が反応しないために，遅筋（ヒラメ筋）のC-タンパク質（SC）のスポットを明確に特定することはできなかったが，ミオシンH-鎖の近傍に位置し分子量14万程度の明らかなスポットは一個しかなかったのでとりあえずこれをSCとみなした．このタンパク質スポットのV8プロテアーゼによるペプチドマップを，鶏SCのそれと比べたところ，かなりよく似ていた（図4）．このSC様スポットはFC，CCより酸性の等電点をもつ．

ラット，マウスのC-タンパク質についても，同様に二次元電気泳動法で解析したところ，ウサギの筋の場合とよく似たパターンを示した（図3）．C-タンパク質は種が異なっても哺乳類共通のパターンを示すと思われる．

筋ジストロフィー症（mdx）マウスと正常マウスのEDL筋の間で，C-タンパク質のタイプ（二次元電気泳動法パターン）に差がみられるかどうかを予備的に調べてみたが，FC-18で検出されるFCのスポットについては両者で明ら

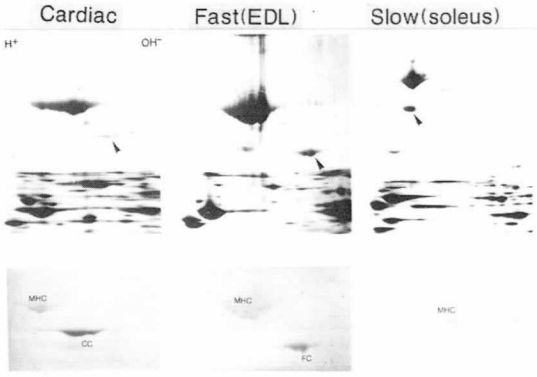


図3　ラットのC-タンパク質の検出
心筋（Card），速筋（Fast），遅筋（Slow）の抽出タンパク質を二次元に展開し，図2の場合と同様に，心筋（CC），速筋（FC）C-タンパク質を同定，MHCとの位置関係を比較した．矢印がC-タンパク質と考えられるスポット．

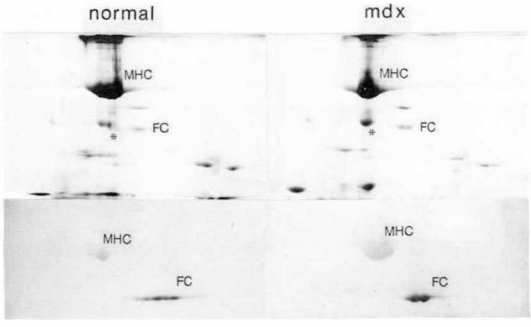


図5　正常およびmdxマウスの速筋（EDL）におけるC-タンパク質の比較
筋の全抽出タンパク質を図2同様に，解析した．上段はCBB染色，下段はイムノブロットのパターン．＊印が遅筋C-タンパク質と推定されるスポット．

かな違いは見いだされなかった（図5）．遅筋C-タンパク質（SC）については抗体による確かな同定はできないが，CBB染色で見られるタンパク質スポットの内＊印のものがSCと推測される．このスポットはmdx，正常いずれにも見られるがmdxの方が量的に多いように見える．抗SC抗体を作成し厳密に検討したい．

考　　察

本研究において，哺乳類筋ジストロフィー症をC-タンパク質を指標として追跡するための第一歩として，横紋筋C-タンパク質の二次元電気泳動における基本パターンをおおよそ明らかにした．筋ジストロフィー鶏では，遅筋型C-タンパク質（SC）の発現が促されていることが特徴として知られる．哺乳類の場合ではどうかを明らかにすることが，当面の最終目標である．SCのスポットは電気泳動法のパターンからもある程度わかるが，鶏の例からするとSCには複数の変異体があることが推測され，哺乳類の遅筋C-タンパク質を認識するMcAbを手にしていない現状では，確かな結論を下すことはできない．現在，目的に合うMcAbの作成を進めている．作成に成功次第，イムノブロット法と免疫組織化学の手法を組み合わせて，筋ジストロフィー症に伴うC-タンパク質の変動について最終的な結論を得たい．

文　　献

1）Reinach, F.C., Masaki, T., Shafig, 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）Takano-Ohmuro, H., Goldfine, S.M., Kojima, T., Obinata, T., Fischman, D.A.: J. Muscle Res. Cell Motil. in press.
4）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），62年度研究報告書，1988，p.p.47-51.
5）Obinata, T., Reinach, F.C., Bader, D., Masaki, T., Kitani, S. and Fischman, D.A.: Dev. Biol., **101**: 116-124, 1984.
6）Obinata, T.: Zool. Sci., **2**: 833-847, 1986.
7）Obinata, T. and Shinbo, K.: Muscle and Nerve, **10**: 351-358, 1987.
8）Hirabayashi, T.: Anal. Biochem., **117**:

443-451, 1981.

9) Ogasawara, Y., Komiya, T. and Obinata, T.: J. Biochem., 102: 25-30, 1987.

10) Kojima, T., Shinbo, K., Obinata, T.: Zool. Sci., 5: 1227, 1988.

11) Cleveland, D.W., Fischer, G.S., Kirschner, W. and Laemmli, U.K.: J. Biol. Chem., 252: 1102-1106.

CANP 阻害剤の一般薬理学的研究
—神経活動および筋電図の周波数分析に基づく呼吸筋機能評価法に関する基礎的研究—

福 原 武 彦*

研究協力者　高 野 一 夫*　木 村 直 史*　加 藤 總 夫*

目　的

ヒト筋ジストロフィー症に対する治療薬の開発と研究を推進するにあたり，生理学ならびに病態生理学的基盤に立った薬効の定量的評価法を確立することが急務であることはいうまでもない．その第一歩として，疾患モデル動物における病態および薬効の評価を可能とする信頼度の高い方法を確立し，その上で，モデル動物において治療薬の効果を定量的に評価し，臨床応用のもととなる基礎的知見を得ることは，研究推進の重要な基礎である．さらに，その評価法において用いられる指標が可及的に非侵襲的な計測手法によって測定することができ，しかも，実際の臨床症例に対しても適用可能であり，さらに治療薬の薬効のみならず病態，およびその進行もしくは改善の程度の評価方法としても応用され得ることが確認されるならば，その評価法の有用性は，極めて高いものとなるものと考えられる．

我々は既に，高等哺乳動物の横隔神経活動電位中に発現する約 60～130 Hz 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，そしてこの成分が，炭酸ガス負荷による呼吸性ドライブの増大に伴って増加することをウサギで確認し，報告した[7),9)]．また，昨年度，我々は，この研究成績を踏まえて，この「高頻度同期波」成分が，呼吸中枢からの呼吸運動性出力に特異的に発現する成分である可能性を計量的方法によって示した[8),11)]．

一方，高頻度同期波が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は，ウサギ以外の高等哺乳動物種においても確認されており[5),6)]，さらに，健常人の肋間筋もしくは横隔膜の筋電図から，これに相当する成分を検出した報告もある[1),3),4),12),13)]．したがって，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，これらの機能的な異常を定量的に評価し得る可能性がある．

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，重症筋無力症あるいは筋萎縮性側索硬化症などの運動単位の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．

今年度，我々は，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検査ならびに診断，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て，動物における呼吸運動性出力を含む遠心性神経活動の導出とそのコヒーレンス解析を行なった．コヒーレンス（関連度関数）解析は，二つの信号の間に共通の周期性成分を検出し，その同期の程度，すなわち相関関数を各周波数ごとに定量的に推定することを可能とする解析法であ

*東京慈恵会医科大学第二薬理学教室

る[2]．さらに，その臨床応用の可能性を検討することを目的として，健常人における呼吸筋および呼吸に補助的に関与する骨格筋の筋電図の導出とコヒーレンス解析を行なった．

I　動物において導出された遠心性神経活動中の高頻度同期波の定量的解析

I-1）方法

体重 2.0～3.0 kg の両性のウサギを Diethyl-ether 麻酔下に gallamine (5 mg/kg, i.v.) により非動化した後，呼気ガス CO_2 および O_2 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，ならびに両側の頸動脈洞神経を切断した．直腸温を 37℃前後に維持し大腿動脈血圧を監視した．頸部において横隔神経ならびに舌下神経の遠心性発射活動を導出し，これらをデータレコーダー (TEAC, R-210) 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，7 T 17) を用いて，横隔神経活動と舌下神経活動の自己パワースペクトル密度関数およびコヒーレンスを，0～200 Hz の周波数帯域について，FFT 法により推定した（0.25 Hz/bin, 20～45 回加算)[2]．この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．

I－2）実験成績

舌下神経活動と横隔神経活動のコヒーレンス・スペクトルには，両神経活動中に 1 対 1 に同期した約 100 Hz の周期性成分が存在することを示唆する明瞭なピークが見出された（図 1, 図 2 それぞれ左)．過換気によって，このピークの高さならびに幅は，減少し (図 1 右)，換気低下によって増大した (図 2 右)．横隔神経活動と舌下神経活動の高頻度同期波帯域における最大コヒーレンスは，適正換気下（呼気炭酸ガス終末濃度：3.7±0.1 %，平均値±標準偏差；n=11～14) で，0.82±0.12，高炭酸状態 (5.2±0.1 %) で，0.87±0.05 ($P<0.05$)，低炭酸下で (2.4±0.1 %)，0.79±0.11 ($P<0.01$) と有意に変化した．

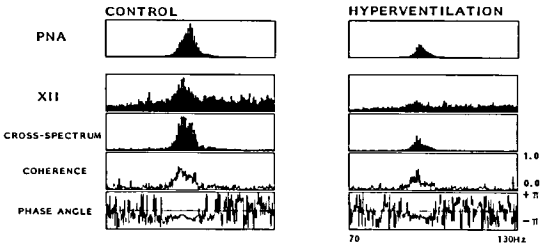


図 1　麻酔下に非動化され人工換気下に維持されたウサギから導出された横隔神経活動と舌下神経活動の周波数解析．いずれも 70～130 Hz, PNA, 横隔神経活動の自己パワースペクトル．XII, 舌下神経活動の自己パワースペクトル．CROSS-SPECTRUM, 横隔神経活動と舌下神経活動の相互パワースペクトル．COHERENCE, 同コヒーレンス，PHASE ANGLE, 同位相角．左：適正換気．右：過換気．

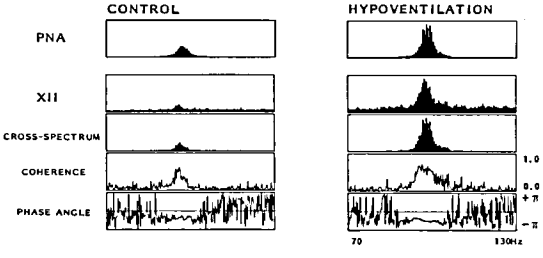


図 2　麻酔下に非動化され人工換気下に維持されたウサギから導出された横隔神経活動と舌下神経活動の周波数解析．いずれも 70～130 Hz. PNA, 横隔神経活動の自己パワースペクトル．XII, 舌下神経活動の自己パワースペクトル．CROSS-SPECTRUM,横隔神経活動と舌下神経活動の相互パワースペクトル．COHERENCE, 同コヒーレンス．PHASE ANGLE, 同位相角．左：適正換気．右：換気低下．

II　ヒト呼吸筋筋電図中の高頻度同期波関連成分の導出と解析

II－1）方法

健常男子二名（30～41 歳）を被験者とし，一例においては，左顎二腹筋前腹上 (図 4, 5 右下

の模式図の 1)，横隔膜胸骨部近傍上の剣状突起両側（同 2，3）および第 7，第 8 肋間前腋窩線上の左右肋間部（同 4，5）における表面集合筋電図を，また，もう一例においては，横隔膜肋骨部の起始部近傍である第 12～第 7 肋軟骨下縁上の左右計六箇所における表面集合筋電図を（図 7, 8 右下の模式図の 1～6)，それぞれ表面皿電極により双極性に同時導出した．これら筋電図の記録を呼気中炭酸ガス濃度の連続記録とともにデータレコーダ (SONY，PC-108) に収録し，実験終了後，筋電図中に混入する心電図成分を R-波同期 FFT 法により除去した上で[13]，これらのすべての組合せについてコヒーレンスを演算した (0～200 Hz，2 Hz/bin；集合平均加算回数≧45)．

II－2）実験成績

安静呼吸下において導出された左顎二腹筋，左右剣状突起部および左右肋間部の筋電図（図 3 左）の間のコヒーレンス・スペクトルには，左右の剣状突起の両側部の間を除き，商用交流電源に由来する 50 Hz およびその高調波以外に各筋電図記録に共通の成分の存在を示唆する特徴的なピークは見出されなかった（図 4)．しかし，努力呼吸中に導出されたこれらの筋電図間（図 3 右）のコヒーレンス・スペクトルには，0～200 Hz の広範な帯域において同期した成分が存在することを示唆する複数のピークが検出された（図 5)．このようなピークは，顎部および胸部筋群の非呼吸性の随意的な収縮運動によっては発現しなかった．

一方，安静呼吸下に横隔膜周縁の六箇所から導出された筋電図（図 6 左）の間のコヒーレンス・スペクトルには，20 Hz 以下の低周波数帯域において，高いコヒーレンスを示すピークが認

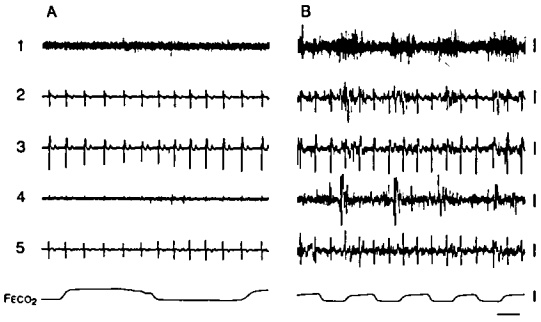


図 3　1～5，健常人から導出された筋電図記録．$FECO_2$，呼気炭酸ガス濃度（較正は 0～5 %)．較正は，10 μV (1) ならびに 50 μV (2～5)．時標は 1 s. A，安静呼吸．B，努力呼吸．筋電図の導出部位については本文および図 4, 5 を参照されたい．記録 2～5 中のスパイク様電位は，ECG の混入．

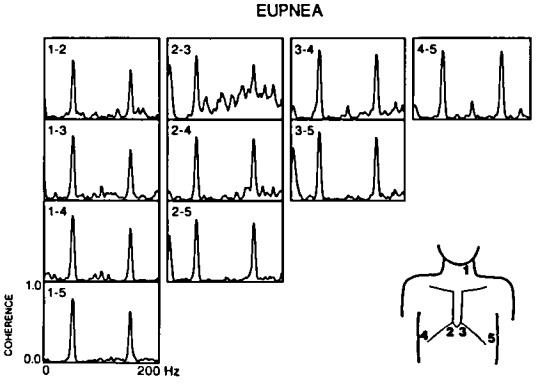


図 4　安静呼吸下に導出された筋電図群間のコヒーレンス・スペクトル．0～200 Hz．縦軸はいずれもコヒーレンス (0.0～1.0)．各スペクトル中の数字の組は，それぞれ，図中右下に示した各導出部位の筋電図間のコヒーレンスであることを示す．図 3 と同じ被験者の記録の解析結果．

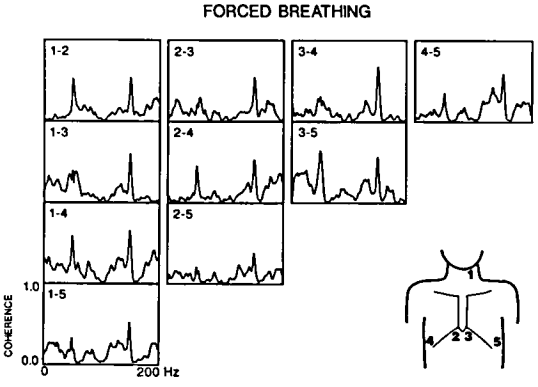


図 5　努力呼吸下に導出された筋電図群間のコヒーレンス・スペクトル．詳細は図 4 に準ずる．

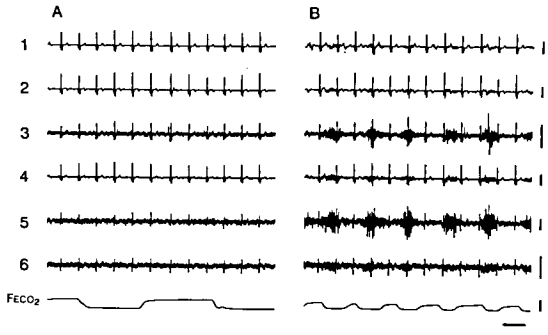


図6　1～6，健常人から導出された筋電図記録．$FECO_2$，呼気炭酸ガス濃度（較正は0～5％）．較正は，50 μV．時標は1 s．A，安静呼吸，B，努力呼吸．筋電図の導出部位については本文および図7，8を参照されたい．記録の1～6中のスパイク様電位は，ECGの混入．

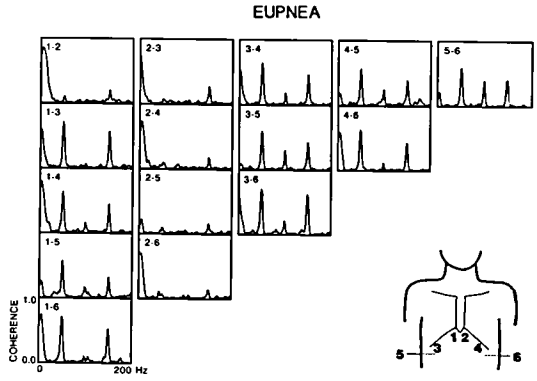


図7　安静呼吸下に導出された筋電図群間のコヒーレンス・スペクトル．0～200 Hz．縦軸はいずれもコヒーレンス（0.0～1.0）．各スペクトル中の数字の組は，それぞれ，図中右下に示した各導出部位の筋電図間のコヒーレンスであることを示す．図6と同じ被験者の記録の解析結果．

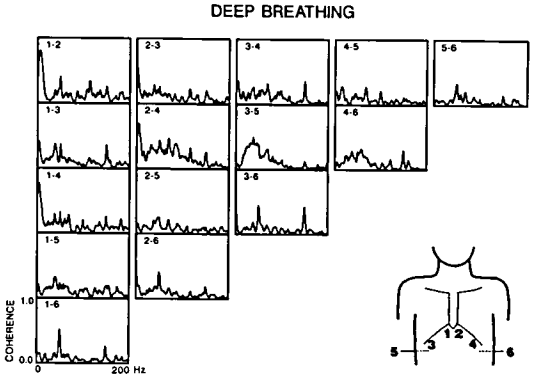


図8　深呼吸下に導出された筋電図群間のコヒーレンス・スペクトル．詳細は図7に準ずる．

められたが，これ以外に特徴的な共通成分は検出されなかった（図7）．しかしながら，努力呼吸下，あるいは，深呼吸下（図8）において導出されたこれらの筋電図のコヒーレンスには，いずれの筋電図間の組合せにおいても，0～200 Hzまでの広い帯域において，高い値を示す複数のピークが発現した．

考　　察

動物実験の成績より，呼吸運動に直接関与する骨格筋を支配する遠心性神経活動に特徴的な成分である高頻度同期波は，上気道，ことに舌筋を支配する舌下神経活動中にも，横隔神経活動中の高頻度同期波と同期して発現することが明らかとなった．しかも，その同期の程度が，血中炭酸ガス分圧の上昇による呼吸性ドライブの増加にともなって増大する事実は，このコヒーレンス解析を炭酸ガス応答などの従来から用いられている種々の呼吸生理学的検査法と組合せることによって，呼吸筋支配神経から呼吸筋筋線維までを含む運動単位の機能検査法として応用し得る可能性を示すものである．

我々は既に，横隔神経活動と舌下神経活動の高頻度同期波帯域におけるコヒーレンスが，主として中枢神経系におけるシナプス伝達効率を低下させると考えられているpentobarbital[14]の静脈内小用量適用によって，有意に減少する事実を報告している[10]．この事実は，このコヒーレンスによる解析法が，導出する2つの生体信号中の同期性活動が発現するまでの過程におけるいずれかの箇所においてその伝達特性が損われた場合に，その変化を鋭敏に検出し得る解析法であることを示すものである．

一方，健常人において，努力呼吸下という，呼吸性ドライブを意識的に高めた状態において

導出された呼吸筋群の筋電図中に，互いに同期した成分が存在することをコヒーレンス法によって確認し得た事実は，この高頻度同期波に相当すると推定される成分が，呼吸筋を支配する神経の発射活動だけではなく，その筋電図に基づいても，定量的に解析され得る可能性を示すものである．従って，筋電図を導出している部位の近傍において，筋線維の萎縮や，神経筋接合部の機能的障害などの病態生理学的な変化が生じた場合，その筋電図中における発現の様式ならびに程度は，定性的かつ定量的に変化するものと推察される．

しかしながら，本研究においては，安静呼吸下に導出された左右横隔膜表面筋電図のコヒーレンス中に高頻度同期波性のピークが存在するとした Ackerson and Bruce の報告[1]とは異なり，安静呼吸下において動物の高頻度同期波に相当すると考えられる成分は検出し得なかった（しかし彼らの示したコヒーレンス値は極めて低く約 0.1 以下である）．また，本研究では努力呼吸下において発現したコヒーレンス・スペクトル中の高頻度同期波に相当すると考えられるピークの形状およびその周波数帯域にも，個体差や，時間経過に伴う変動が認められた．

従って，次の研究課題は，本研究において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，動物ならびにヒトにおいてさらに検討を加え，その結果に基づき，適正かつ最適な測定条件，筋電図の導出方法などを初めとした標準的な計測ならびに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．

参考文献

1）Ackerson,L.M. and Bruce, E.N. : Bilaterally synchronized oscillations in human diaphragm and intercostal EMGs during spontaneous breathing. Brain Research, 271 : 346-348, 1983.

2）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）Dittler, R. und Garten, S. : Die zeitliche Folge der Aktionsströme in Phrenicus und Zwerchfell bei der natürlichen Innervation. Z. Biol., 133 : 420-450, 1912.

6）Gasser, H.S. and Newcomer, H.S. : Physiological action currents in the phrenic nerve. An application of the thermionic vacuum tube to nerve physiology. Amer.J. Physiol., 57 : 1-26, 1921.

7）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.

8）福原武彦：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－，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, 1988.

9) Kato, F., Kimura, N., Takano, K. and Hukuhara, T.,Jr.: Quantitative spectral analysis of high frequency oscillations in efferent nerve activities with respiratory rhythm, In: "Respiratory Muscles and their Neuromotor Control", (ed by, G.C. Sieck, S.C. Gandevia and W.E. Cameron.) Alan R. Liss, New York, 1987, pp.263-267.

10) Kato, F., Kimura, N., Takano, K. and Hukuhara, T., Jr.: Effect of pentobarbital on coherent relationship between high-frequency oscillations in inspiratory discharges of the phrenic and cranial nerves. Japan J. Pharmacol., 43 suppl.: 59 1987.

11) 加藤總夫, 木村直史, 福原武彦：呼吸リズムを発現する遠心性神経活動における高頻度同期波の局在とその機能的意義. 自律神経, 25：503-510, 1988.

12) Sapuntsov, L.E.: Correlation analysis of electrical activity of human muscles of respiration. Bull. Exp. Biol. Med., 71：604-606, 1971.

13) Schweitzer, T.W., Fitzgerald, J.W., Bowden, J.A. and Lynne-Davies, P.: Spectral analysis of human inspiratory diaphragmatic electrograms. J. Appl. Physiol., 46：152-165, 1979.

14) Willow M. and Johnston, G.A.R.: Pharmacology of barbiturates: electrophysiological and neurochemical studies. Int. Rev. Neurobiol., 24：15-49, 1983.

骨格筋ミオシン軽鎖のラジオイムノアッセイによる測定法の開発

矢 崎 義 雄*

研究協力者　永 井 良 三*　磯 部 光 章*
加 藤 祐 之*　杉 田 秀 夫**

骨格筋の変性疾患の際に，障害された骨格筋より血中に逸脱した骨格筋蛋白を測定して生化学的に診断する方法が，感度と特異性にすぐれ，しかも非侵襲的であることから臨床に広く用いられている．特に骨格筋障害の程度と範囲が，その血中濃度ないしは流出量から定量的に測定することが可能であるとして注目されている．このような生化学的診断の指標となる蛋白として，従来から骨格筋細胞中に存在するCPKやGOTなどの酵素やミオグロビンなどが検討された．

しかし，これら指標物質は細胞中に可溶性蛋白として存在しているために，骨格筋の障害ないしは変性による細胞膜透過性亢進によって細胞外に逸脱して血中に流出するものであり，骨格筋障害を検出する感度は高いが，骨格筋細胞の構造崩壊過程を経時的に反映する指標とはならない．特に筋ジストロフィー症においては，骨格筋の病変がまず細胞膜障害として出現するために，CPKなどの指標物質が早期に細胞外に逸脱してしまい，その血中濃度と骨格筋障害の程度との相関が，重症な患者ほど失われる可能性がある．

一方，骨格筋における主たる細胞構築は筋原線維であり，特異的な構造蛋白によって構成されている．もし骨格筋疾患において，障害された骨格筋からこのような構造蛋白が血中に流出し，しかもこれを測定できれば特異性にすぐれた診断法になるばかりでなく，その血中濃度の経時的な変動は，障害された骨格筋の崩壊と治療過程を反映し，病態の正確な把握ばかりでなく，薬物による治療効果を定量的に評価することが可能となり，臨床的に極めて有用である．このような観点から我々が開発したのが骨格筋ミオシン軽鎖測定用のラジオイムノアッセイ法である．すなわち，ミオシンは筋細胞における構造蛋白の約60％を占め，最も含有量の多い蛋白である．その分子量の小さなサブユニットである軽鎖は容易にミオシン分子より解離して細胞外に逸脱し血中に流出する．しかもきわめて安定な蛋白であることから，われわれは筋組織障害の指標物質としてその測定を試みた．今回はその方法の解説と臨床応用およびその限界について報告する．

I．骨格筋ミオシン軽鎖抗体の作成

ミオシンは死後4時間以内に剖検された，何等病変を有しない大腿筋より改良せる希釈法により抽出し，DEAE A 25のカラムにより精製した．軽鎖は5モル塩酸グアニジンによりミオシン分子から分離し，アルコール分画法によって重鎖を遠沈後，透析と凍結乾燥により得た．抗ミオシン軽鎖抗体は，ウサギを精製した軽鎖にて免疫することにより作製した．すなわち，軽鎖をリン酸緩衝液に1 mg/mlとなるように溶解した後，等量の完全フロイントアジュバンドを加えて混和し，その500 μlをウサギの皮内に2週間おきに6回注入し抗体価の上昇をみた．

* 東京大学医学部第三内科
** 国立精神・神経センター神経研究所

II. ミオシン軽鎖のラジオイムノアッセイ法

3羽のウサギを免疫して，もっとも抗体価の上昇したウサギより採血し，抗体血清を得た．ラジオイムノアッセイ法は，表1に示すような方法により行った．すなわち，試料血清ないしは精製した標準液を100 μl，クロラミンT法により^{125}Iで標識した軽鎖を10,000 cpm/100 μl，200倍希釈の抗血清100 μl，そして1％ウシ血清アルブミンを含んだリン酸緩衝液100 μlを混和し，4℃で18時間インキュベーションした．そしてB/F分離をヤギ抗ウサギIgG血清を用いた二抗体法により行い，遠沈して結合した放射能をγシンチレーションカウンターにより測定し，試料血清中のミオシン軽鎖濃度を算出した．

図1は骨格筋ミオシン軽鎖ラジオイムノアッセイ法の標準曲線である．測定限界は7 ngと，われわれがすでに確立した心筋ミオシン軽鎖測定法の1 ngと比べて感度は低かった．抗血清の希釈を低めて抗体濃度を上昇させても，これ以上の測定感度を得ることはできなかった．

表1 骨格筋ミオシン軽鎖のラジオイムノアッセイ法

試料血清又は標準溶液	100 μl
標識抗原(^{125}I)溶液	100 μl
血清抗体溶液(200倍)	100 μl

↓

インキュベーション　18時間

↓

第2抗体(ヤギ抗マウスIgG抗体)　500 μl

↓

インキュベーション　1時間

↓

遠心(3000 rpm 20分)

↓

放射能をγカウンターにて測定

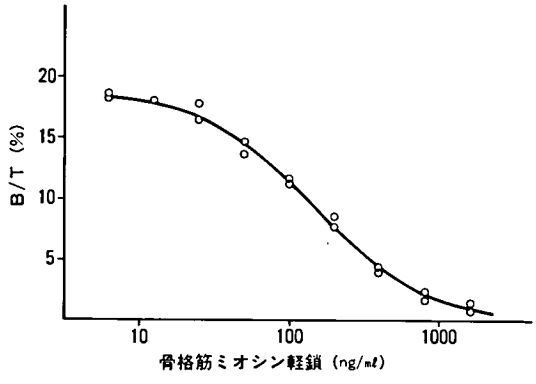


図1 骨格筋ミオシン軽鎖ラジオイムノアッセイの標準曲線

III. 筋ジストロフィー患者における血中骨格筋ミオシン軽鎖値

健常者の血清では，今回のラジオイムノアッセイ法によって検出される軽鎖値は10 ng/ml以下であった．一方，10名の筋ジストロフィー患者の血清においては，図2に示すように，200 ngから600 ngの広い範囲に渡って高値を呈していた．そして全ての患者血清において骨格筋ミオシン軽鎖は検出され，10 ng/ml以下の症例はなく，診断の感度は100％となることが判明した．今後は多数の症例で測定し，病態との関連，経時的変化の観察，薬物療法の効果の評価などに用いて検討を進めていく予定である．

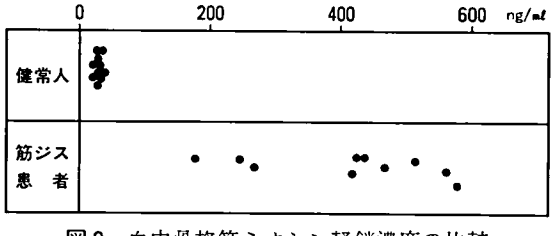


図2 血中骨格筋ミオシン軽鎖濃度の比較
—健常者と筋ジストロフィー患者—

IV. 今後の課題

今回12週間に渡り免疫を施行したが，抗体価の上昇が十分でなく，用いた抗血清の最終倍率は200倍と低く，多数の症例を多施設で測定するためには適していないのが現状である．今後は測定方法をキット化すべく，骨格筋ミオシン軽鎖を更に抽出分画し，多数のウサギをより多量の抗原蛋白を用いて免疫を行い，抗体価の極めて高い抗血清を作成し，測定感度も1 ng/mlのレベルになるよう新しくラジオイムノアッセイ系の確立を試み，改めて免疫することをすでに開始している．

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における筋障害の進行過程—CT スキャンによる定量的評価

石 原 傳 幸*

研究協力者　里 宇 明 元**　園 田 茂**　原 行 弘**
青 柳 昭 雄*　儀 武 三 郎*　川 村 潤*
横 田 名 慈*

はじめに

CT を用いて骨格筋を形態学的に評価する方法は，従来からいくつか試みられてきた[1)~6)]．しかし，筋病変の程度，分布および進行過程を定量的に評価する方法は，まだ充分確立していない．我々は，従来の CT 値と断面積の測定に加えて，残存する筋の割合と脂肪置換の程度を評価するための指標として，筋および脂肪の%断面積（正常の筋および脂肪の CT 値を有する部分の全体に占める割合）を求める方法を考案し，方法の信頼性と再現性を確認した上で疾患群に応用してきた[7)8)]．今回は，この方法を用いて，Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症（DMD）例の下肢筋の障害の進行過程を検討し，自然歴の解明と治療効果判定への応用を試みたので報告する．

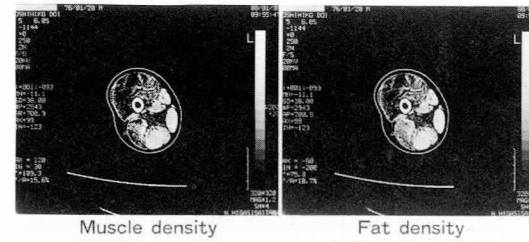
対象および方法

対象は臨床所見，血清 CPK 値，筋電図，筋生検により DMD と確診された Swinyard stage 2 から 8 までの 71 例で，stage 別の例数および平均年齢は**表 1** に示すとおりである．

CT スキャナーは，Hitachi CTW-500 を用い，撮影条件は，スライス幅 5 mm，スキャン時間 6 秒，X 線 120 KVp，200 mA とした．また，CT 値の安定性を確認するための較正を毎週行った．スライス部位は大腿中央部および下腿最大径部とし，大腿と下腿各筋の CT 値の平均，断面積および%断面積を求めた．%断面積は，正常例での検討結果をもとに[7)]，CT 値が 30 から 120 の筋の部分と，−60 から −200 の脂肪の部分各々について求めた．**図 1** に実際の方法を示す．トラックボールで目的とする筋を囲うことにより，CT 値の平均と断面積が表示される．次に，level detection を用いて 30 から 120 の正常の筋 CT 値を有する部分の割合を求める．こ

表 1　Subjects

Swinyard stage	No. of cases	Age
2	7	6.7 ± 0.8
3	6	8.8 ± 1.7
4	3	11.3 ± 1.5
5	14	11.4 ± 2.7
6	16	13.6 ± 3.1
7	16	14.8 ± 2.0
8	9	17.7 ± 6.0
Total	71	



Biceps femoris (Stage 4)

図 1　The procedures (see text)

*国立療養所東埼玉病院内科
**国立療養所東埼玉病院リハビリテーション科

の例では，15.6％と表示されている．さらに右に示すように－60から－200の脂肪のCT値を有する部分の割合を求める．本例では10.7％と表示されている．以上の操作を下肢の各筋において行い，各筋のCT値，断面積，筋および脂肪の％断面積を求めた．

結　　果

測定期間を通じてCT値は充分安定していた．各測定値の再現性も4％以内の変動で良好であった．図2aにSwinyard stageと大腿各筋のCT値の平均との関係を示すが，stageの進行とともにCT値が低下していく傾向が認められた．また，CT値の低下の程度には各筋間に差異が存在し，大腿二頭筋，内転筋群，大腿四頭筋は早期より低下するのに対し，内側ハムストリングスはstage 5以降低下を示し，縫工筋，薄筋は比較的末期まで高いCT値を示していた．

次にstageと％断面積の関係をみると（図2b，2c），正常の筋CT値を有する部分の割合は，stageの進行とともに減少するのに対し，脂肪のCT値を有する部分の割合は増加する傾向がみられた．各筋ごとに検討すると，大腿二頭筋，内転筋群，大腿四頭筋は早期から脂肪化が進むのに対し，内側ハムストリングスはstage 5より脂肪化が進行し，縫工筋，薄筋は脂肪化の進行が遅い傾向を示した．

個々の筋についてみると，図3に縫工筋の例を示すが，同一stageでも測定値にはある程度の幅が認められた．しかし全体的には，stageの進行とともにCT値と筋の％断面積は減少し，脂肪の％断面積は増加する傾向が認められた．

以上，stageの進行とともに筋線維部分の減少と脂肪置換が進むことがCT上確かめられたが，次にどのような順序で筋障害が進展するかを検討するためにFriedmanの順位検定を行った．結果を表2に示すが，CT値，筋の％断面積，脂肪の％断面積ともに一部を除いて各筋間に有意差が認められ，全体としてみると障害は大腿二頭筋→内転筋群，大腿四頭筋→内側ハムストリングス→縫工筋，薄筋の順に進行していく傾向が認められた．

図4にstage 5の症例を示す．比較的残存している縫工筋では筋の％断面積が63.5％，脂肪

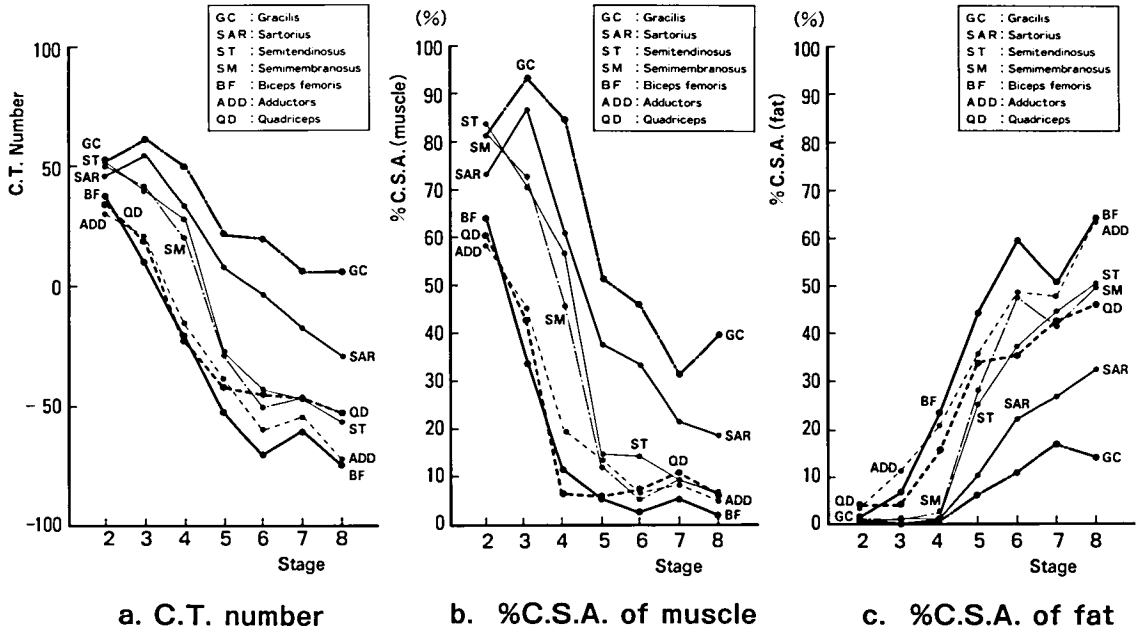


図2　Swinyard stage and CT parameters (thigh)

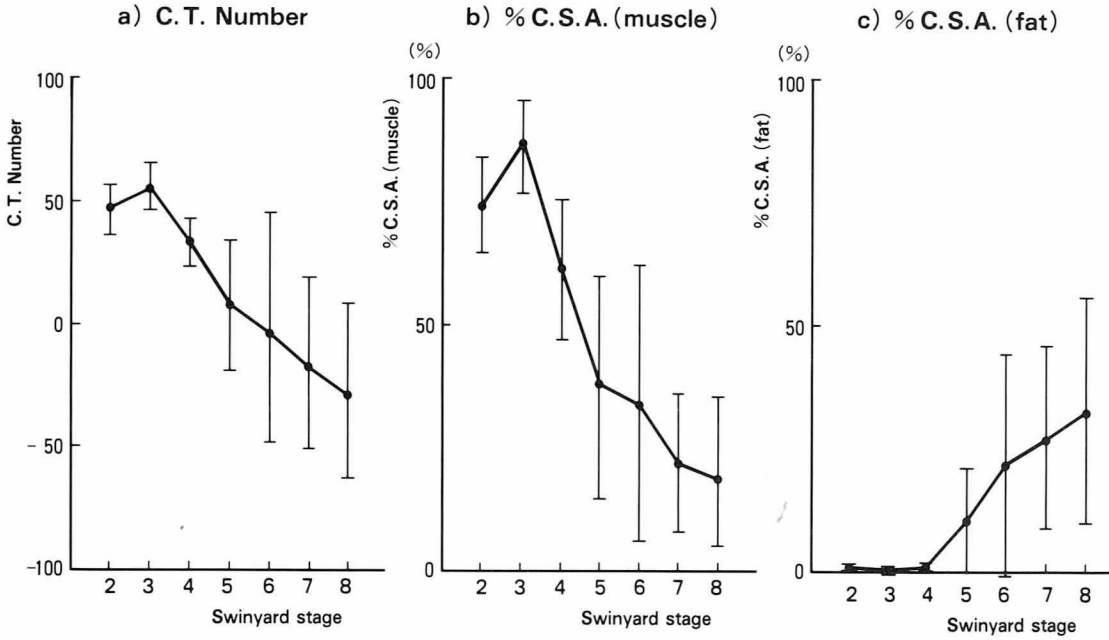


図3 Swinyard stage vs C.T. number, % C.S.A. of muscle and fat for sartorius muscle (means± SD are shown).

表2 Friedman rank test (thigh-see text)

1. CT number

stage \ order	1	2	3	4	5	6	7	P-value
stage 2	ST	GC	SM	SAR	QD	BF	ADD	P<0.01
stage 3	GC	SAR	SM	ST	QD	ADD	BF	P<0.01
stage 4	GC	SAR	ST	SM	ADD	BF	QD	P<0.05
stage 5	GC	SAR	ST	SM	ADD	QD	BF	P<0.05
stage 6	GC	SAR	ST	QD	SM	ADD	BF	P<0.05
stage 7	GC	SAR	QD	ST	SM	ADD	BF	P<0.05
stage 8	GC	SAR	QD	ST	SM	ADD	BF	P<0.05

2. %CSA-muscle

stage \ order	1	2	3	4	5	6	7	P-value
stage 2	ST	GC	SM	SAR	QD	BF	ADD	P<0.01
stage 3	GC	SAR	ST	SM	ADD	QD	BF	P<0.01
stage 4	GC	SAR	ST	SM	ADD	QD	BF	P<0.05
stage 5	GC	SAR	ADD	ST	SM	BF	QD	P<0.05
stage 6	GC	SAR	ADD	ST	QD	SM	BF	P<0.05
stage 7	GC	SAR	QD	ADD	SM	ST	BF	P<0.05
stage 8	GC	SAR	ST	ADD	QD	SM	BF	P<0.05

3. %CSA-fat

stage \ order	1	2	3	4	5	6	7	P-value
stage 2	QD	BF	ADD	SAR	GC	SM	ST	P<0.01
stage 3	ADD	BF	QD	ST	SM	SAR	GC	NS
stage 4	QD	BF	ADD	ST	SAR	GC	SM	P<0.05
stage 5	BF	ADD	QD	SM	ST	SAR	GC	P<0.05
stage 6	BF	ADD	SM	ST	QD	SAR	GC	P<0.05
stage 7	ADD	ST	QD	SM	BF	SAR	GC	P<0.05
stage 8	ADD	BF	ST	SM	QD	GC	SAR	NS

* GC : Gracilis　BF : Biceps femoris
SAR : Sartorius　ADD : Adductors
ST : Semitendinosus　QD : Quadriceps
SM : Semimembranosus

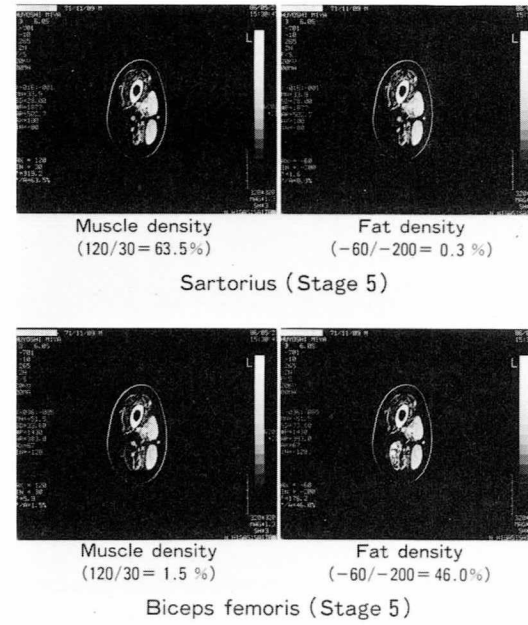
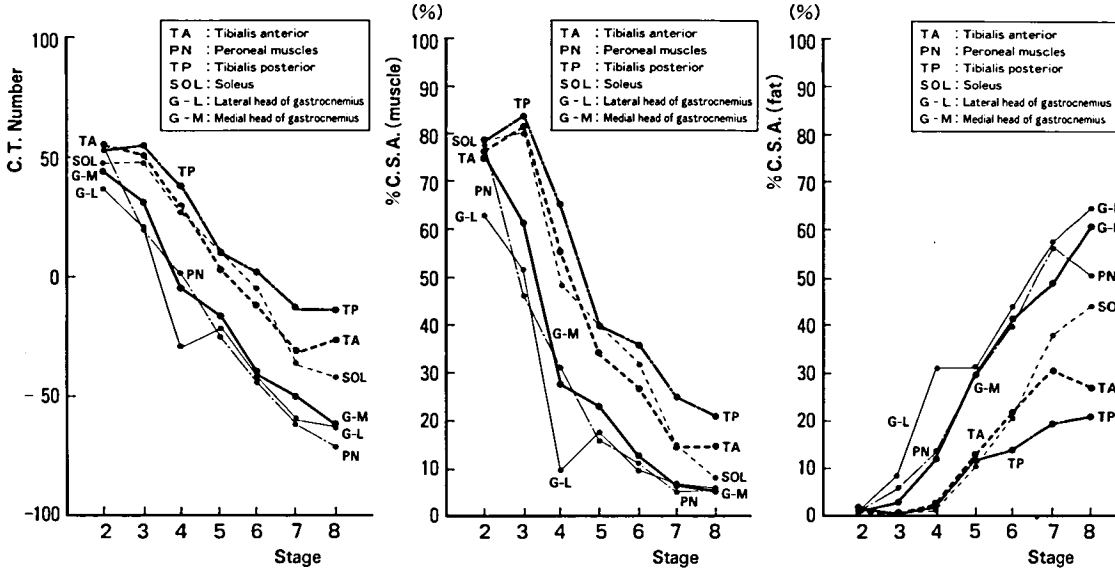


図4 An illustrative case (see text)



a. C.T. number　　b. %C.S.A. of muscle　　c. %C.S.A. of fat

図5 Swinyard stage and CT parameters (lower leg)

の%断面積が0.3%であるのに対して，最も障害の強い大腿二頭筋では筋の%断面積が1.5%，脂肪の%断面積が46%と，両筋に大きな差が認められた．

下腿においても同様の検討を行なったところ，Swinyard stageの進行とともにCT値と筋の%断面積は低下し，脂肪の%断面積は増加する傾向が認められた．その程度には筋により差異が存在し，腓骨筋と腓腹筋は比較的早期から脂肪化が進むのに対し，後脛骨筋は比較的末期まで保たれていた（図5a，b，c）．次に，下腿における筋障害の進行過程を検討するために大腿と同様にしてFriedmanの順位検定を行なった．結果を表3に示すが，各指標とも一部を除いて有意差があり，全体としてみると障害は，腓骨筋，腓腹筋→前脛骨筋→ヒラメ筋→後脛骨筋の順に進行していく傾向が認められた．

考　　察

近年，CTスキャンは神経筋疾患の筋病変を非侵襲的に評価する方法としてその有用性が認められており[9]，DMD例においても筋障害のパターン分類[1)2)]，CT値の検討[3)4)]，CTindexの検討[5)]などいくつかの報告がなされている．我々は，残存する筋の割合と脂肪置換の程度を定量的に評価する目的で筋および脂肪の%断面積という指標を導入し，正常例において再現性，信頼性の検討を行った上で，神経筋疾患例の筋障害の評価に応用してきた[7)8)]．今回はDMD例の下肢筋の障害の進行過程を分析したが，各筋間に障害の進行に関して一定の順序があることが判明し，大腿では筋障害は，大腿二頭筋→内転筋群，大腿四頭筋→内側ハムストリングス→縫工筋，薄筋の順に，下腿では腓骨筋，腓腹筋→前脛骨筋→ヒラメ筋→後脛骨筋の順に進行していく傾向が認められた．従来の報告と比べると，早期より侵される筋および比較的末期まで残存する筋については大体の傾向は一致するが，個々の筋の障害の進行過程について本研究のように系統的に検討した報告は少ない．

今回我々が報告した方法は，充分なquality controlを行なえば，測定値の再現性もよく，深部の筋の評価も容易であり，筋力の評価と合わせて，疾患の自然経過を知る上で有用と考えられる．図6に本方法を用いて，EST治験例11例において投与前の評価を行なった結果を示すが，

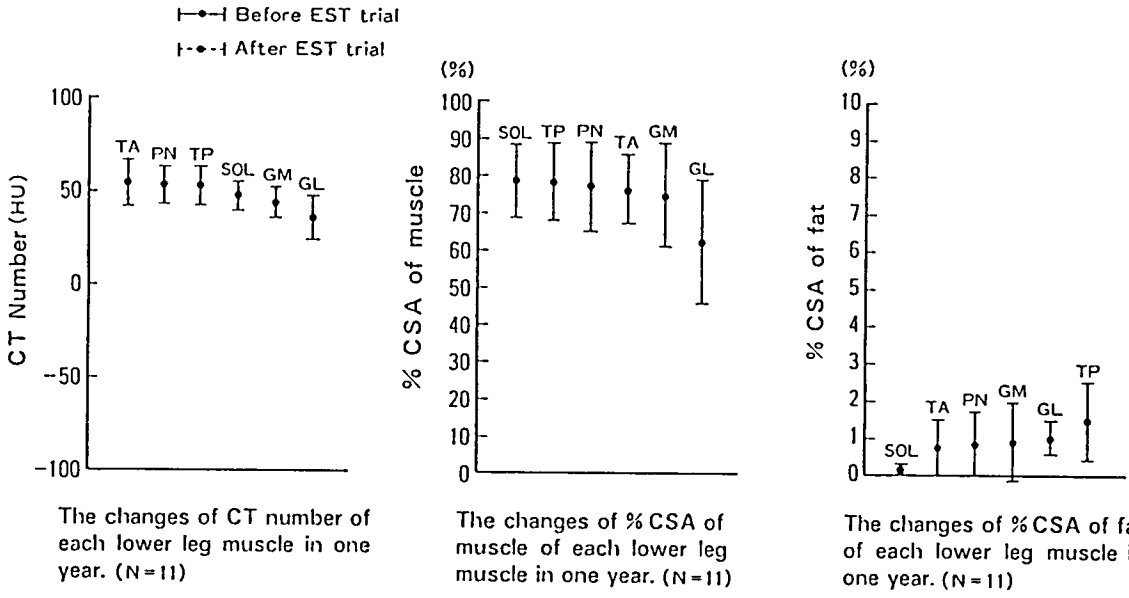


図6 Quantitative CT evaluation of muscle damage in EST cases (means±SD are shown).

本方法による継時的評価が自然歴の解明や各種の治療効果の判定に有用な可能性があると思われ，今後さらに追跡を行なっていく予定である．

文　献

1）O' Doherty, D.S., Schellinger, D. et al. : Computed tomographic patterns of pseudohypertrophic muscular dystrophy : preliminary results. J. Computer Assisted Tomography, 14 : 482, 1977.

2）川井充，国本雅也ら：Duchenne 型筋ジストロフィー症の骨格筋 CT 所見とこれにもとづく病期分類，臨床神経，25：578，1985.

3）立野勝彦，西村敦ら：進行性筋ジストロフィー症の下肢筋群の CT パターンについて，総合リハ，10：525，1982.

4）山田重昭，西村正明：進行性筋ジストロフィー症における下肢骨格筋 CT 所見の検討．筋ジストロフィー症の疫学，病態および治療開発に関する研究，昭和 60 年度報告書，p. 26.

5）岩垣克己，堀川博誠ら：Duchenne 型筋ジストロフィー下肢筋 CT 像の定量的解析―筋力および血清 CK 値との対比―筋ジストロフィー症の疫学，病態および治療開発に関する研究，昭和 59 年度報告書，p. 181.

6）Stern, L.M., Caudrey, D.J. et al. : Progression of muscular dystrophy assessed by computed tomography. Developmental Med. Child Neurol., 26 : 569, 1984.

7）石原傳幸，里宇明元ら：CT スキャンによる筋障害の定量的評価法．第 1 報　正常例での検討，筋ジストロフィー症の疫学，病態および治療開発に関する研究，昭和 61 年度研究報告書，p. 184.

8）石原傳幸，里宇明元ら：CT スキャンによる筋障害の定量的評価法．第 2 報　Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における下腿筋の障害の進展過程，筋ジストロフィー症の疫学，病態および治療開発に関する研究，昭和 62 年度研究報告書　p. 114.

9）川井充，中野今治：骨格筋 CT―神経・筋疾患の新しい画像診断報―CT 研究　7(5)：485，1985.

正常幼児の運動機能について

福　山　幸　夫*

研究協力者　大　沢　真木子*　斎　藤　加代子*　新　井　ゆ　み*
炭　田　沢　子*　岡　田　典　子*　鈴　木　腸　子*
宍　倉　啓　子*　平　山　義　人*

医学の進歩に伴い，筋ジストロフィー症の1歳未満での診断例も増加した．乳幼児期から新薬治療開始例も多く，効果判定の指標として寝返り，起坐，起立，10 m 走行などの日常動作の所要時間測定およびその様式の観察が行われてきた．しかし，正常児におけるそれらの基礎資料が不足しており，屢判定に困難を要する．また乳幼児例では同日常動作誘発が困難で観察不能のことも多い．我々は健康幼児における各日常動作の所要時間測定と動作様式の観察，さらに効果的動作誘発法について検討したので報告する．

表1　対象
保育園に通っている健康乳幼児

年　齢	平　均	数		
歳：月	歳：月	男	女	計
1:00～1:11	1:7	6	7	13
2:00～2:11	2:6	12	9	21
3:00～3:11	3:7	10	10	20
4:00～4:11	4:4	16	6	22
5:00～5:11	5:4	11	12	23
6:00～6:11	6:4	9	10	19
計		64	54	118

対象ならびに方法

対象（表1）は，某保育園通園中の1歳以上7歳未満の健康な幼児，計118名である．

寝返り（腹臥位から背臥位およびその逆），起坐，起立，10 m 走行を誘発し，その所要時間測定と起坐・起立様式の観察を行った．さらに効果的な各動作の誘発法を検討した．

所要時間測定はセイコーとカシオのデジタル型ストップウォッチを用い，各年齢別平均値と標準偏差および所要時間と児の月齢間の単相関を検討し回帰曲線を求めた．

起坐・起立動作様式の観察は，肉眼により，一部の例で（1,2歳各7例）Victor video movie GR-A 30 での撮影および反復再生の観察によった．

各動作の誘発方法は，1．口頭説明，2．検査者が動作を示しての説明，3．担当保母の口頭説明，介助による児の受動的動作体験およびその後の口頭指示，4．保母の口頭説明と，児と並んで担当保母が該当動作を実行することによる児の模倣動作誘発によった．

結　　果

1）各動作所要時間（表2）

A．背臥位から腹臥位への寝返り（図1）：図に散布図，平均値±SD，回帰曲線を示した．所要時間は0.30から2.81秒までで，2，3，4歳間および5，6歳間の差は認められなかった．所要時間（y）と月齢（x）との単相関では相関係数 $r=-0.31634$，危険率（P）<0.001 で $y=1.21979-0.00736x$ の負の相関を示した．

B．腹臥位から背臥位への寝返り（図2）：所要

*東京女子医科大学小児科

表2　年齢別各動作所要時間の平均

年齢		背臥位→腹臥位	腹臥位→背臥位	起　坐	起　立	10m走行
1歳～	所要秒数	1.16±0.43	0.61±0.06	2.57±0.88	3.27±0.92	8.40±2.39
	例数	(10)	(3)	(13)	(11)	(10)
2歳～	所要秒数	0.83±0.22	0.98±0.48	1.89±0.70	3.00±0.96	4.82±1.17
	例数	(20)	(19)	(19)	(19)	(20)
3歳～	所要秒数	0.84±0.31	1.03±0.36	2.17±1.07	2.32±1.32	3.83±0.52
	例数	(21)	(22)	(22)	(22)	(22)
4歳～	所要秒数	0.83±0.32	0.92±0.37	1.32±0.47	1.71±0.40	3.25±0.29
	例数	(23)	(24)	(24)	(24)	(25)
5歳～	所要秒数	0.74±0.26	0.59±0.19	1.25±0.43	1.76±0.45	3.04±0.39
	例数	(23)	(19)	(23)	(23)	(20)
6歳～	所要秒数	0.64±0.24	0.65±0.31	0.96±0.21	1.51±0.27	2.94±0.16
	例数	(20)	(21)	(20)	(20)	(18)

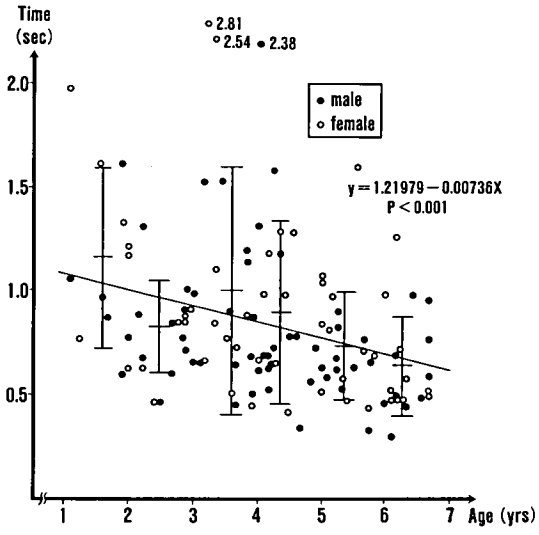


図1　寝返り：背臥位→腹臥位の所要時間
縦のbarは各年齢における平均±SD値を，斜の線は所要時間と月齢との相関について回帰曲線を示す．相関係数r＝−0.31634であった．

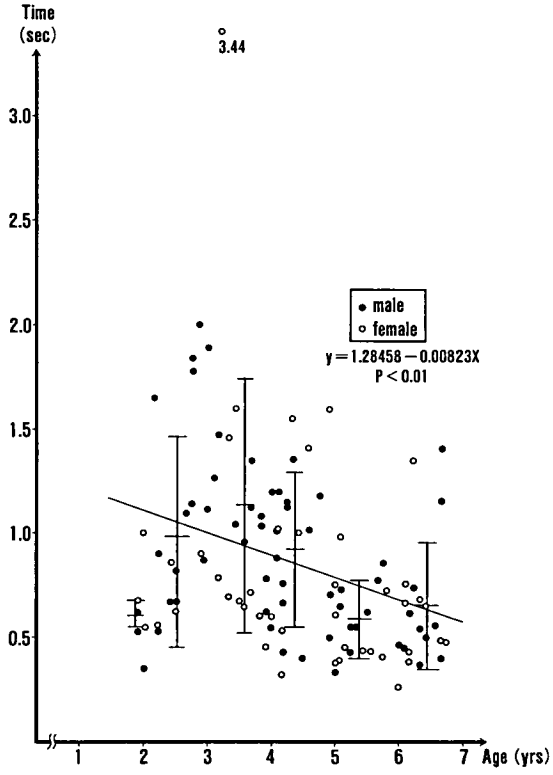


図2　寝返り：腹臥位→背臥位の所要時間
縦のbarは各年齢における平均±SP値を斜の線は所要時関と月齢の相関についての回帰曲線を示す．相関係数r＝−0.29586

時間は 0.34 から 3.44 秒まで．1 歳児では動作誘発可能性例が 3 例であったが，1，2，3，4 歳間および 5，6 歳間での差はなかった．所要時間と月齢との単相関では r＝－0.29586，P＜0.01 で回帰曲線 y＝1.28458－0.00823 x であった．

C．背臥位から起坐（図 3）：所要時間は 0.47 から 8.82 秒であった．各年齢群でみると 1 歳児では 1 秒未満 0 %，1 秒台 44 %，2 秒台 33 %，3 秒台 22 %，2 歳児では順に 17 %，58 %，25 %，0 %，3 歳児では 11 %，29 %，24 %，5 %，4 歳児では 24 %，71 %，4 %，0 %，5 歳児では 33 %，57 %，4 %，0 %，6 歳児では 58 %，42 %，0 %，0 %であり，2，3 歳間と 4，5 歳間は差がなかった．所要時間と月齢との単相関では r＝－0.48786，P＜0.00001 で回帰曲線 y＝3.05823－0.02818 x であった．

D．背臥位から起立（図 4）：所要時間を各年齢群でみると，1 歳児では 1 秒未満 0 %，1 秒台 10 %，2 秒台 40 %，3 秒台 30 %，4 秒台 20 %，2 歳児では順に 0 %，23 %，46 %，23 %，2 %，3 歳児では 5 %，50 %，39 %，5 %，0 %，4 歳児では 4 %，68 %，27 %，0 %，0 %，5 歳児では 0 %，65 %，35 %，0 %，0 %，6 歳児では 0 %，95 %，5 %，0 %，0 %であり，所要時間と月齢との単相関では r＝－0.58480，P＜0.00001 で回帰曲線 y＝3.84773－0.03342 x で負の相関を示した．

E．10 m 走行（図 5）：平均値±SD をみると，加齢とともに所要時間の短縮をみ，標準偏差も 3 歳以上では 1 秒未満の値を示していた．所要時間と月齢との単相関では r＝－0.65427，P＜0.00001 で回帰曲線 y＝8.07919－0.08100×で，5 項目中最も強い負の相関を示した．

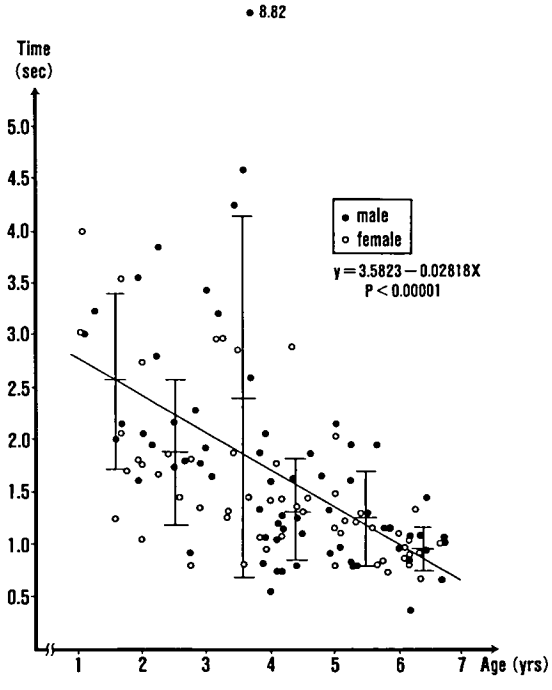


図 3　背臥位から起座の所要時間
縦の bar は各年齢における平均±SD 値を，斜の線は所要時間と月齢の相関についての回帰曲線を示す．相関係数 r＝－0.48786

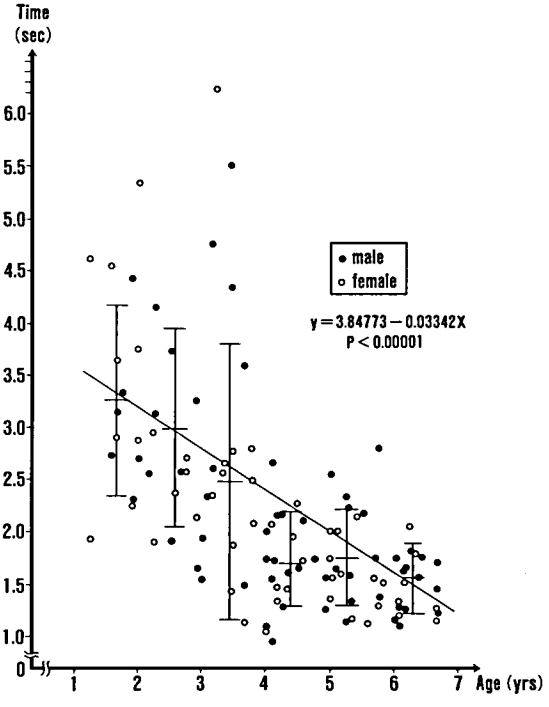


図 4　背臥位から起立の所要時間
縦の bar は各年齢における平均±SD 値を，斜の線は所要時間と月齢の相関についての回帰曲線を示す．相関係数 r＝－0.58480 であった．

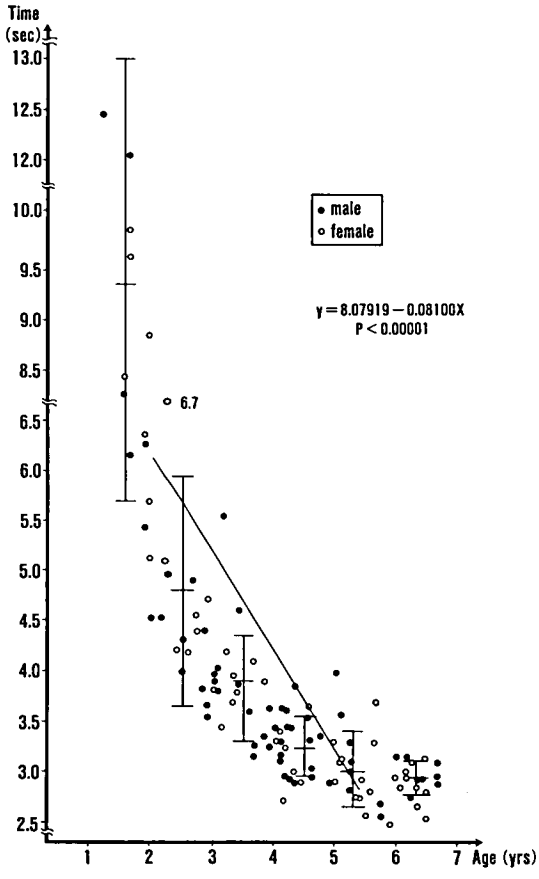


図5　10 m 走行所要時間
縦の bar は平均±SD 値を示し，斜の線は所要時間と月齢の関係の回帰曲線を示す．相関係数 r＝−0.65427 であった．

2）起坐・起立様式

A．起坐様式：次の5通りを示した．

様式1．臥位→上体回旋→四つ這い位→起坐

様式2．臥位→上体半回旋→片手支持→起坐

様式3．臥位→片手支持→起坐

様式4．臥位→上肢の反動利用＋腹筋→起坐

様式5．臥位→腹筋→起坐

1歳児は様式1，または2，2歳児は様式1，2，3，3歳児は様式1，2，3，4，4歳児は様式3，4，5，の夫々いづれかを5歳児は主に様式4または5，まれに様式3を，6歳児は全例様式4または5を示した．

B．起立様式：次の4通りを示した．

様式1．臥位→上体（半）回旋→四つ這い位→高這い位→起立

様式2．臥位→上体（半）回旋→四つ這い位→片膝立て（手を膝上に当てる）→起立

様式3．臥位→上体（半）回旋→坐位→四つ這い位→片膝立て→起立

様式4．臥位→（上肢の反動＋腹筋）利用→起坐→蹲踞→起立

1歳児では2/9例が様式2，他7/9例は様式1を示した．2歳児では7/9例は様式1を示し，様式3，4を示した例が各1例いた．3歳児では2/23例で様式1，他の例は様式3，4，4歳児以上では全例が様式3または4を示した．

3）動作誘発法の検討結果

A．寝返りの誘発：児が理解し難い動作であり，特に腹臥位から背臥位への寝返りが最も理解され難かった．5，6歳児でも誘発方法1に加えて誘発方法2が必要なこともあった．3，4歳児では誘発方法2に加えて誘発方法3，時には4が必要なこともあった．1，2歳児では誘発方法3，4を要し，しかも反復が必要で，特に腹臥位から背臥位は一部を除き1歳児では誘発不能であった．

B．起坐の誘発：寝返りに比し容易であったが，2，3歳では長坐位より正座の方が速く到達可能な例もあり，可及的に速く坐位をとることを指示したところ，年長例では正座なのか長坐位なのか形にこだわる例もありややとまどいがあった．3-6歳児では方法1に加えて方法2が必要なことがあった．1，2歳では方法4．が非常に有効であった．

C．起立の誘発：5，6歳児では誘発方法1で可能，3,4歳児では時に方法2が必要であった．

D．10 m 走行の誘発：4，5，6歳児では方法1で可能であり，同時走者の存在が走行速度を速めるのに有効であった．3歳では，児が好む人物が笑顔でゴール地点で児を呼び招くことと，同時走者の存在が有効であった．1，2歳では同時走者の存在はかえって混乱を招くこともあり，児が好む人物が笑みを湛えてゴール地点で児を呼び招くことが有効であった．

考　　察

各動作所要時間と月齢の単相関では，例数が多いためかいずれも負の相関が認められたが，寝返りではpも低くなく，平均値をみると，背臥位から腹臥位への所要時間は2，3，4歳が殆ど同程度の値を示し，腹臥位から背臥位への所要時間は年齢とは無関係に変動している．寝返り機能自体は1歳代には充分獲得済でその後は殆んど変化しないことが推測される．発達により余り影響を受けないという点では，状態改善の有無の指標としては適当とも考えられる．しかし特に腹臥位から背臥位は乳幼児には理解し難い誘発困難な運動でもあるので，運動機能の低下してきた年長のDuchenne型筋ジストロフィー症（以下DMDと略）児用の指標としては有用であるが，乳幼児の機能改善の指標とはなり難いと思われた．これに対し起坐・起立動作は2，3歳間と4，5歳間の所要時間平均値には差がないが，腹筋力その他の改善による動作様式の変化に伴い短縮されるものと思われる．又特に1,2歳児では坐位姿勢にとどまらず起立してしまう例もみられ，起立動作は誘発し易い運動であり，総合的な筋力増強，運動神経系の発達の指標としては有用と思われた．また10m走行は4，5，6歳間の差はないが，加齢とともに所要時間の短縮をみ，また誘発し易い運動であるので，DMDの乳幼児例での評価には（DMDの場合最大速度の歩行ということになるが）有用と思われた．

乳幼児の日常動作様式についての観察の報告は余りない．北原ら[1]は起立動作について**表3**の如くまとめている．我々の今回の観察でも大要は同じであるが，(d)は認めなかった．1，2，3歳児では，様式1．上体回旋→四這い位→高這い位→起立，様式2．上体回旋→四這い位→片膝立ち→起立をとる．北原らは四這い位→片膝立ち→起立の(b)様式は2-5歳で観察されると述べているが，この際の上肢の動きについては言及していない．我々は同様様式で起立するが，その際『軽く膝の上方に手を添える例』すなわち様式3を1歳児9例中2例で認めた．この動作様式が正常か否か問題である．観察例が少なく断定はできないが，この2例では他に異常所見は認めず，『軽く膝の上方に手を添える』ことは，児が起立に際し1歳という年齢にしては高級な起立様式をとっていることに起因すると推測した．梅沢班班会議で『1歳前から新薬服用例が始めての起立時に軽く膝に手を当てて起立したが，同剤服用中に膝に手を当てずに起立するようになり薬効と考えるか否か迷う』という報告があった[2]．正常児でも一過性に同様動作をとり得るのか否かさらに例数を増して検討したい．軀幹筋筋力低下に伴い起立能力が低下したDMDで屢観察する動作様式は，様式1．に『高這い位において上肢で自分の下肢を把握し徐々に把握位置を上昇させ，上肢の支持により上半身を挙上するいわゆる登はん性起立の要素』の部分を加えたもの，あるいは様式2．に片膝立ちから起立途中で『片手あるいは両手を膝上について手の力で自分の上体を支持して挙上する』という要素を強めたものである．印東[3]は，DMDの機能障害の進行は正常児の運動発達の方向とちょうど正反対の方向を取ると述べている．起立様式についても病気の進展過程において，運動発達として獲得してきた行動様式をちょうど正反対の方向で喪失し，さらに筋力低下による修飾が加味しているものと思われた．低年齢のDMD児の起立様式を観察する場合には，運動発達段階として様式1，2，3，の型をとっている例もあるので，喪失期の型か発達期の型か区別を要する．

表3　立上り動作の大筋

開始前	(1) 準備開始	(2) 立ち上り開始	(3) 立上り中期
背臥位(a)	体幹の全回旋 (ね返り)	高這い	両膝半屈 上体挙立
(b)	体幹の半回旋 (側臥位)	四つ這い	片膝立ち 上体挙立
(c)	無　回　旋 (坐位上肢前方挙上反動)	蹲　踞	両膝伸展 上体前傾
(d)	無　回　旋 (上肢後方伸展支持)	上肢後方伸展支持 膝半屈曲坐位	両膝半屈 上体軽度前傾

aのみ，bのみ，などの組合せが多いが，a·1→b·2→b·3やb·1→c·2→c·3などの経過をとる例も稀ではない，aは3歳以下，bは2～5歳，c，bは4歳以後が主。

文献1）より引用

結　　語

1歳以上7歳未満の正常幼児計118名を対象に，寝返り，起坐，起立10 m走行の所要時間測定と，起坐・起立様式の観察を肉眼と一部videoを用いて行い，同時に1，2歳児で最も効果的な動作の誘発法を検討した．各所要時間については平均値±標準偏差，および所要時間と月齢との単相関をみた．特に起坐・起立動作，10 m走行は$p<0.00001$で負の相関をみ，同動作は誘発が容易であった．1，2歳でほぼ全例に，3歳では約1割に起立および起坐時の上体回旋または半回旋がみられ，1歳では全例，2，3歳では9割に四つ這い位→高這い位または四つ這位→片膝立てからの起立が見られた．

1歳の四つ這位→片膝立て→起立動作例で『片手を軽く膝に添える』動作が認められた．

1，2歳児の動作誘発には，各児が好む人間が同時に同じ動作を行ない模倣させることが最も効果的であった．

文　　献

1）北原佶，有馬正高：小児の姿勢．診断と治療社，東京，1980．

2）村上慶郎他：2，3の筋萎縮症患者に対するベスタチンの効果．厚生省新薬開発研究費「微生物治療薬（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. 89-92．

3）印東利勝：運動障害評価の方法-運動年齢評価法について．祖父江逸郎，西谷裕(編)筋ジストロフィー症の臨床．医歯薬出版，東京，1985，p.p. 135-141．

筋ジストロフィー症患者の理学的評価法の再検討

中野今治*

研究協力者　杉田秀夫**　石原傳幸***　熊井初穂***
浅野賢***　藤村則子****　土佐千秋****
石沢真弓****　松村喜一郎****　桑原武夫†
近藤隆春††　水野京子††　山崎元義††
崎田朝保†††　本家一也†††　武田洋子†††
幸福圭子††††　福永秀敏††††　藤田繁‡
青木寛‡　篠由美子‡

はじめに

ESTの臨床治験は従来倫理的な観点からopen studyが行なわれ，副作用の詳細が不明であったため入院患者を対象としていた．Open studyであることから，理学的評価は詳細を要し，入院患者を対象としたため参加者が少なく，多数項目の評価も可能であった．例えば日常生活動作（ADLと略す）を取り上げてみると上肢機能も含めて25項目を100点満点で評価するという手間のかかる評価も可能であった．

このopen studyに対し，1986年11月の薬事審議会でopen studyでは不十分であり，比較試験が必要との回答が出された．これを受けて翌年2月28日，筋ジス施設の医師，OT，PTを構成メンバーとして比較試験の為の実務委員会が発足した．そこでの検討の結果，二重盲検試験が最適との結論に達し，統計処理上最低1群50人，両群で100人の患者の参加が必要と考えられた．しかも，歩行可能な軽症患者を対象にしているので，入院患者だけでは必要な患者数の確保が困難である．そこで，今回は全国筋ジス施設の入院患者と外来患者の双方を対象とすることにした．

つまり，新しい治験では1．患者の数が増え，かつ全国の療養所にまたがること，2．外来患者であるため，評価に時間的制約があること，が問題になる．これらの点を踏まえて，新治験の為の評価法を作成したので，その概要と，作成に到る経過とを報告する．

旧評価法の問題点

新治験に評価法を適用するにあたっての問題点として，以下のような点が上げられる．

1）評価項目が多すぎる．例えば，前述したが，ADL 25項目では項目が多すぎて時間的に不可能である．

2）旧評価方では下肢機能以外にも相当なウェイトが置かれていた．例えばADL 25項目中12項目が上肢挙上，手拭を絞るなど下肢以外の機能をはかる項目であるが，これらは軽症患者では短期間では変化しない．

3）Scalogramでエラーが大きい．旧評価法は入念に検討して作成されたものであるが，実際に適用してみると評価基準が不明瞭な項目，

* 東京大学医学部脳研病理
** 国立精神・神経センター神経研究所
*** 国立療養所東埼玉病院
**** 国立療養所下志津病院
† 新潟大学脳研究所神経内科
†† 国立療養所新潟病院
††† 国立療養所医王病院
†††† 国立療養所南九州病院
‡ 大正製薬㈱開発部

学習効果が大きく作用する項目などが含まれており，そのため，ある項目では軽症者（総得点の多い患者）は出来ないのにかえって重症者（総得点の少ない患者）が出来るという矛盾が生じていた．

表1に，旧評価法のADL中の“階段を昇る”を評価基準の不明瞭な項目の例として取り上げてみた．“片手を手すりに掛ければ昇れる”患者には2点を与え，“横向きになって両手で手摺にすがって昇る”患者には1点を与えているが，それでは“前向きになってかつ両手を手摺に掛けて昇る”患者には何点を与えればよいのか不明である．一方，手摺を使わず一歩で一段を昇る患者は“普通に昇れる”わけであるが，やはり手摺は使わないけれども二歩で一段しか昇れない患者に対する評価点は示されていない．

また，旧評価法の機能テストでは“車椅子で10 m進むのに要する時間”を計る項目が有るが，治験対象者の大部分は普段車椅子を使わず，かつその使用には習熟を要するのでこれも適切な項目ではない．

新評価法の条件

上述のような問題点を考慮すると，新評価法の条件として以下のことが上げられる．即ち，

1）簡略であること．そのためには項目数を減らす必要がある．
2）軽症例で短期間に変化する項目を選ぶこと．具体的には下肢機能が中心となる．
3）再現性を有すること．全国の筋ジス施設にまたがる治験であるから，誰が何時行なっても同じ動作や機能には同じ評価点を出せるような評価基準が必要となる．そのためには時間測定などを含めた出来るだけ客観的な評価基準を作成する事が望まれる．
4）Scalogram上エラーの少ないもの．エラーの大きい項目は3）の“評価基準”に問題がある場合もあるのでこのことも考慮して検討する必要がある．

この様な条件を満たす項目を選ぶためにはまず問題項目を排除する必要が有る．問題項目の例として，坂道を昇るなど斜面の傾きの統一が困難なため，測定方法の統一化が困難な項目や，車椅子使用，手ぬぐいを絞るなど病態や筋力以外の要因に大きく左右される項目などが挙げられる．さらに項目としては必要だが，設問あるいは判定基準が不適切で判断に迷う項目の判定基準の改訂が必要となる．

表1

旧ADLの中の“階段を昇る”
4：普通に昇れる
3：手で膝を押えて昇る
2：片手を手摺にかければ昇れる
1：横向きになって両手で手摺にすがって昇る
0：介助なしには昇れない

新評価法の決定と評価基準の統一の試み

このような諸条件を勘案して，1988年3月，実務委員会で新評価法を決定した．

ADLでは，旧評価法の25項目から一気に9項目に減らした．1）立っている，2）椅子に座る，3）椅子から立ち上がる，4）しゃがむ，5）這う，6）床から立ち上がる，7）階段を昇る，8）階段を降りる，9）歩くの9項目である．“這う”を除いて8項目が主に下肢機能に関するものである事が分かる．

表2には新評価法のADLの1項目，“階段を昇る”の評価基準を示してある．ここで2点を与えてある“両手を手摺に掛ければ昇れる（前

表2

新ADLの中の“階段を昇る”
6：普通に昇れる（1足1段）
5：普通に昇れる（2足1段）
4：手で膝を押さえて昇る
3：片手を手摺にかければ昇れる
2：両手を手摺にかければ昇れる（前向き）
1：両手を手摺にかければ昇れる（横向き）
0：介助なしには昇れない

向き)”の項が旧評価法(**表1**)にはなく，“片手を手摺にかければ昇れる”から，“両手で手摺にすがって横向きに昇る”に跳んでいる．

また，旧評価法(**表1**)では6点と5点の“普通に昇れる”のところを一まとめにしているが，新評価法では“普通に昇れる”のところを一段を一歩で昇るか，二歩で昇るかに分けて評価点を変えている．

これは些末な事のように見えるが，一段を一歩で昇るのと二歩で昇るのでは後者の方が明らかに機能的に劣っており，この2者は区別して評価する必要が有るのは言うまでもない．同様に，両手に手摺にかけるにしても前向きに昇るのか横向きに昇るのかでも，機能に明らかな差がある．

次に徒手筋力テストだが，旧評価法の7項目のうち首，肘関節，手関節の3つを削除して肩関節と下肢の3関節(股関節，膝関節，足関節)のみを残した．また，関節可動域は旧評価法の肩関節，肘関節など6関節から股関節伸展と足関節背屈の2項目だけに減らした．削除した関節は，軽症例では短期間では変化しないか，評価基準の統一が困難な関節である．

表3には新評価法の運動機能テスト項目を示してある．前述のように車椅子走行は不適切であるので削除した．旧評価法では歩行不能になった患者用の機能テスト項目が含まれていないので，“仰臥位からの起きあがり”と“3m這行”を加えた．その為に新評価法では，旧評価法の5項目から6項目にむしろ増えているが実施上は特に問題にはなっていない．

このようにして作成した新評価法の信頼性を確かめる目的で入院患者11名をVTRに撮り，実務委員会に持ち寄って検討した．意見の分かれるような場面では評価方法の統一を図り，また一部では評価基準の見直しを行なった．

図1はその時の結果の一部を示したものである．11人の患者の“椅子に座る”動作をVTRに撮り，OT，PT 9人が採点し，患者別に棒グラフにしたものである．横軸に点数を示し，縦軸にその点数を与えた検者の数を示してある．これによると特にNo.1とNo.5の2人の患者では評価点が1点と2点の2つに大きく割れているのが分かる．2点は“手を膝についてゆっくり座る”動作であり，1点は“支えきれずにドスンと座る”動作であるが，患者によってはこの2つの動作を判別するのがかなり難しいことが予想される．このような評価の割れる動作に対してはその評価基準に対して補足項目を加えて基準をより明確にするように努めた．

表3

新評価法の決定における運動機能

1）仰臥位からの立ち上がり
2）仰臥位からの起きあがり
3）椅子からの立ち上がり
4）階段4段昇り
5）10m走行，歩行
6）3m這行

以上の諸点を踏まえて新しい評価基準に基づく新評価法を作成し(**表4**)，1988年9月10日，国立療養所22施設のOT，PTを一堂に集め，新評価法の説明会を患者のVTRを用いて行い，OT，PT全員の評価基準の統一を図った．

考　案

DMDの理学的評価基準としては，日本では厚生省筋ジス研究班のものがあり[1]，また，海外ではBrookeらのプロトコール作成の試みが知られている[2]．我々の旧評価法はこれらを基準にして作成されたものである．

しかし，旧評価法はほぼ全ステージの筋ジス患者をカバーしようとしているために，ESTのopen studyに参加した軽症患者に実際に適用してみると種々不都合な点が見出された．前述したように，軽症患者では殆ど変化しない上肢機能に関する項目が多く含まれていたり，手拭を絞るなど習熟を要する項目が含まれている．

ESTはDMDの原因治療薬ではなく，またこれまでのopen studyから症状の著名な改善も期待できない．今回の二重盲検試験では外来患

表4　新評価法によるADL，徒手筋力テスト，関節可動域，機能テストの一覧

日常生活動作（ADL）テスト　〔該当する箇所（評価）に○印を付す〕

項目	評価基準
①立っている（静止位保持，上体の姿勢は問わない）	4. 左右の踵を左いにつけて30秒以上立っていられる。 3. スタンスを広げれば30秒以上立っていられる。 2. スタンスを広げれば30秒未満なら立っていられる。 1. 物につかまれば立っていられる。 0. 物につかまっても立っていられない。
②椅子に坐る（背面位）（下腿の高さの椅子）（スタンスを広げても良い）	3. 手を使わずにゆっくり坐る。（膝関節屈曲約45°位で一時停止ができる） 2. 手を膝についてゆっくり坐る。（膝関節屈曲約45°位で一時停止ができる） 1. 支えきれずドスンと坐る。（膝関節屈曲約45°位で一時停止ができない） 0. 介助なしでは坐れない。
③椅子から立ち上がる（背もたれのない椅子）（スタンスを広げても良い）	4. 普通にできる。 3. 膝に手をついて立ち上がる。 2. 坐面を使って立ち上がる。 1. 立ち上がろうとして腰を浮かせるが立ち上がれない。 0. 腰を浮かせることもできない。
④しゃがむ	4. 最後までゆっくりとしゃがめる。 3. 手で膝を支えれば、最後までゆっくりとしゃがめる。 2. 崩れるようにしゃがむが、その姿勢（スクワット位，床に手をついても可）が保てる。 1. 崩れるようにしゃがむが、そのまま坐ってしまう。 0. 介助なしにはしゃがめない。
⑤這う（マット上）（両膝を基点とする）	4. 3m這行　5秒未満。 3. 〃　5秒以上30秒未満。 2. 〃　30秒以上60秒未満。 1. 〃　60秒以上。又は四つ這い位の自力保持可能。 0. 四つ這い位の自力保持不能。
⑥床（正坐位）から立ち上がる	4. 手を使わずに立ち上がれる。 3. 床に手をつかずに、手で膝を押して立ち上がる。 2. 床に手をつき、手で膝を押して立ち上がる。 1. 物につかまれば立ち上がれる。 0. 全くできない。
⑦階段を昇る（5段全段）	6. 普通に昇れる（1足1段）。 5. 普通に昇れる（2足1段）。 4. 手で膝を押えて昇る。 3. 片手を手摺にかければ昇れる。 2. 両手を手摺にかければ昇れる。（前向き） 1. 両手で手摺にすがって昇る。（横向き） 0. 介助なしには昇れない。
⑧階段を降りる（5段全段）	5. 普通に降りられる（1足1段）。 4. 普通に降りられる（2足1段）。 3. 片手を手摺にかければ降りられる。 2. 両手を手摺にかければ降りられる。（前向き） 1. 両手で手摺にすがって降りる。（横向き） 0. 介助なしには降りられない。
⑨歩く（3m以上）	4. 普通に歩ける。 3. 動揺性歩行をする。 2. 物につかまれば（手摺，壁づたい）独りで歩ける。 1. 何等かの補助（平行棒・車椅子押し，介助など）があれば歩ける。ただし、Braceは用いない。 0. 全く歩けない。

筋力テスト

項目			観察日 / 測定者
徒手筋力テスト	肩関節	右	外転
		左	外転
	股関節	右	屈曲
			伸展
		左	屈曲
			伸展
	膝関節	右	屈曲
			伸展
		左	屈曲
			伸展
	足関節	右	底屈
			背屈
		左	底屈
			背屈
握力	右		
	左		

運動機能テスト

項目	観察日 / 測定者
仰臥位からの立ち上がり（無補助）	
仰臥位からの起き上がり（無補助）	
椅子からの立ち上がり（椅子の背もたれ無）	
階段4段昇り時間	
10m走行・歩行時間（無補助）	
3m這行（マット上）	

関節可動域（ROM）テスト

項目（正常可動域）		観察日 / 測定者
股伸展（0～15）	右	
	左	
足首背屈（0～20）	右	
	左	

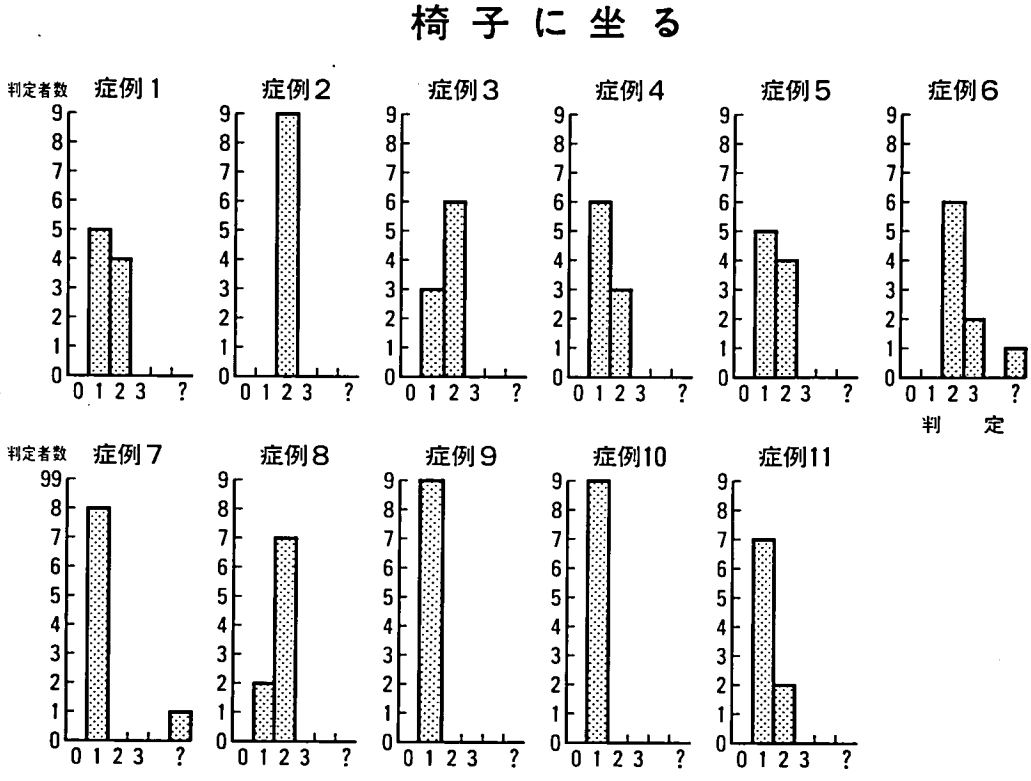


図1　11人の筋ジス患者の"椅子に座る"動作のVTRを計9人のOT，PTが評価して患者別に棒グラフにしたもの．患者によっては評価が大きく割れることが分かる．横軸に評価点を示す（0：介助無しでは座れない，1：支えきれずドスンと座る，2：手を膝についてゆっくり座る，3：手を使わずにゆっくり座る）．

者の参加ということもあり，検査できる項目数にも限りがある．従って，この治験に参加する軽症患者を評価するに当たっては，この年齢の患者の評価に適した項目のみを選び，かつそれぞれの項目の評価基準を出来るだけ客観化し再現性を有するものにする必要がある．我々は1年半の歳月をかけ，日常，筋ジス患者の評価，指導に当たっている筋ジス施設の多数のOT，PTの知識と経験を生かして，軽症患者を目的にして，全国の外来患者をも対象とできるような理学的評価法の作成に努めた結果，一応の成果を得たのでその概要を報告した．

文　献

1）野島元雄，松家豊，松田芳郎，他：関節機能障害，脊柱運動障害，恥骨機能障害，拘縮について．筋ジストロフィー症の臨床．祖父江逸郎，西谷裕編，医歯薬出版，東京，1985，p.p. 88-106.

2）Brooke, M.H., Griggs, R.C., Mendell, J.R. et al : Clinical trial in Duchenne dystrophy. I. The design of the protocol. Muscle Nerve, 4 : 186-197, 1981.

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の臨床的検討：EST 投与群 5 年目の経過と EST 二重盲検試験の出発

宮　武　　正*

研究協力者　山　崎　元　義**　近　藤　隆　春**
桑　原　武　夫*　湯　浅　龍　彦*

はじめに

厚生省新薬開発事業研究班により，Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症（以下 DMD）に対して E-64（以下 EST）投与による臨床治験が開始されて約 5 年が経過した．昨年，桑原らは EST 投与群 73 例と非投与群 172 例の臨床的検討を日常生活動作能力（ADL）の全得点による経年推移から行い，全ての観察時点で EST 投与群が非投与群に比して高値を取る傾向にあったことを報告した．

しかし全 ADL score では症例間のばらつきが大きいため，治療効果の判定は容易ではない．EST の治療効果があらわれるとすれば，下肢機能に強く反映するのではないかという前提にたち，今回私達は，歩行可能な比較的下肢機能の保たれている DMD 児について，下肢 ADL による検討を EST 投与群と非投与群において行い，EST が DMD の下肢 ADL の推移に及ぼす影響について検討したので報告する．

対象と方法

対象は国立療養所新潟病院に入院中の DMD 児（全例男子）であり，同院での EST 投与児 24 名中，EST 投与開始時 ADL score 50 点以上すなわち歩行可能であった 7 例である．投与開始時年齢は 8 歳 5 カ月より 12 歳（平均 9 歳 6 カ月±1 歳 1 カ月），開始時体重は 16.4 より 41.0 kg（平均 23.2±7.9 kg），ステージⅠ～Ⅳまでの症例で投与期間は 4 年 9 カ月，投与量は体重当たり 4 mg/日で開始し，副作用のないことを確認した後に 4 週間後より 8 mg/kg/日に増量した．

対照群は上記 7 例とほぼ同年齢で体重にあまり差のない同院の DMD 児 24 例である．

方法は厚生省研究班制定の ADL 25 項目中より，本研究班で新たに選定された，下肢機能の推移を経年的に順当に反映すると思われた 8 項目合計 32 点満点を 100 %とする方法で経年推移を検討した．8 項目は①立っている，②椅子にすわる，③椅子から立ちあがる，④しゃがむ，⑤床から立ちあがる，⑥階段を登れる，⑦階段をおりる，⑧歩く，である．また最大努力歩行 10 m の時間を 2 回連続して測定した平均歩行速度も検討した．

結　　果

平均下肢 ADL score の経年変化を図 1 に示す．縦軸には下肢 ADL 8 項目 32 点を 100 %として表示しており，10 %以下になると歩行不能

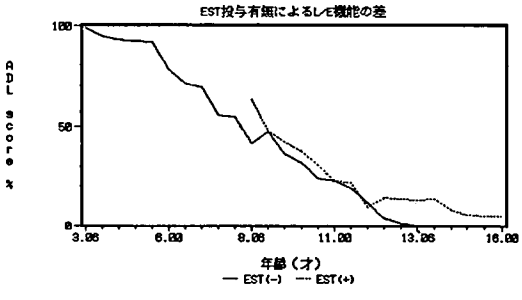


図 1　平均下肢 ADL score の経時的推移

*新潟大学脳研究所神経内科
**国立療養所新潟病院

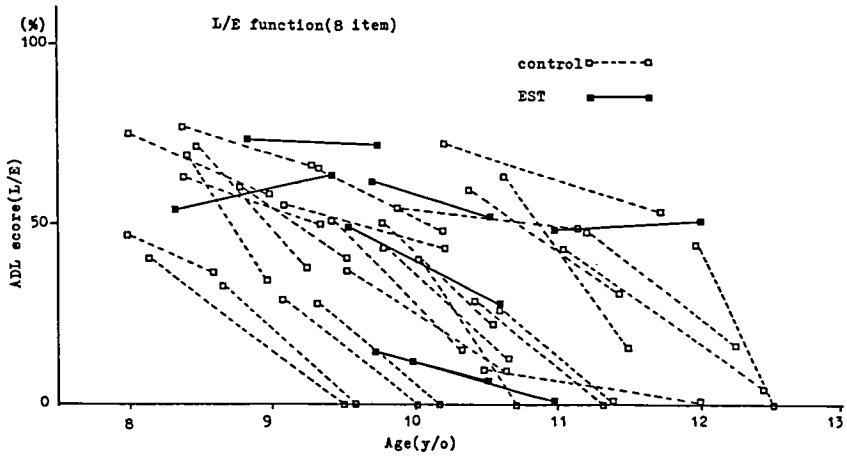


図2　1年間の個々の症例における下肢 ADL score の推移

となる．EST 投与群は投与開始時すでに 80％と低下していた．減少率に差異は認められなかった．次に個々の症例における下肢 ADL score の約1年間の推移につき，みてみると（図2），非投与群では全例経年毎に下肢 ADL 機能が低下していたのに対して，EST 投与群では7例中3例で若干の改善を，2例でその減少率が非投与群に比して軽い傾向にあった．しかし開始時低値であった2例は早期に歩行不能となっていた．次に EST 投与開始時歩行可能であった7例中，1年後も歩行可能であった5例につき，その歩行速度を示す．（図3）同院入院中の小児慢性疾患患児の平均を健常値とした．（平均 2.58±0.13 m/s）EST 投与群3例において，1年後の歩行速度に若干の改善を認めた．

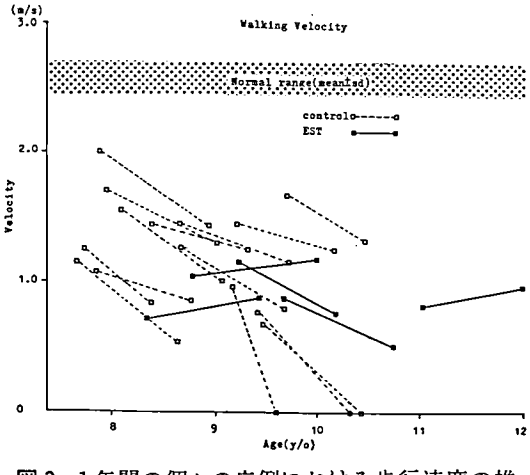


図3　1年間の個々の症例における歩行速度の推移

考　　案

進行性の疾患である DMD に対する治療効果判定は非常に困難な問題を含んでいるが，石原，桑原らは，① Natural history の把握の重要性，②歩行可能で筋萎縮が高度でない患児に対象をしぼること，③観察期間を統一かつ限定すること，④ ADL 項目をより簡便で合理的なものにすること，⑤動作時間の項目を導入すること，などを提唱した，従来の厚生省筋ジス班の ADL 25 項目での評価では，EST 投与群と非投与群の推移に明らかな差異は認めなかった．この点については，非投与群の DMD 児の中にも比較的機能の保たれる症例も少数ながらみられること，及び今までの治験方法では上記①～⑤の点について若干統一を欠く面があり，十分な薬効判定が困難であると思われる．

今回，新たに EST 二重盲検試験が開始されたが，自然な発達で，みかけ上機能が改善されたようにみえる例が混入するおそれのある5歳以下を除外し，ステージⅠ～Ⅲに対象をしぼり，期間を1年間に限定し，より簡便かつ合理的な基準を共通の効果判定としたプロトコールが作

製された．下肢機能に重点をおいたプロトコールに採用された下肢 ADL 機能 8 項目について，EST 投与時歩行可能であった 7 例について検討しなおしたところ，1 年間経過しても比較的機能が維持された 3 例を経験した．私達の施設では，natural course の中でこのような症例の経験はなく，とりわけ発達の終了したと考えられる 8～10 歳の DMD 児において認めたことは，今後の検討を，より機能のよい，より筋肉量の保たれている，より多数の症例において，さらに検討を要する必要性を再確認させるものと思われる．

結　論

EST 投与開始時歩行可能群 7 例につき下肢機能の推移を検討した．3 例に下肢 ADL score の改善を認めた．今後は，より多数の歩行可能群につき検討していくことが必要と思われた．

文　献

1）石原傅幸ほか：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）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．同報告書 1987，p.p. 93-97.

3）石原傅幸ほか：ADL score の検討による筋ジストロフィー障害度の再評価．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 62 年度研究報告書，1988，p.p. 111-117.

4）宮武　正ほか：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．同報告書，1988，p.p. 107-109.

5）Cohen, L., Morgan, J., et al.: Fast walking velocity in health and Duchenne muscular dystrophy : A statistical analysis. Arch. Phys. Med. Rehabil., 65 : 573-578, 1984.

ベスタチン投与例における筋疾患マーカーの変動について

西谷　裕*

研究協力者　板垣泰子**　太田光熙***

はじめに

従来薬物投与における血清酵素のマーカーとしてはcreatine kinase (CK) を中心とした主として白筋酵素を用いることが多かった．今回我々は，5例のデュシャンヌ型筋ジストロフィー症患者にベスタチンを投与し，その筋病変に及ぼす影響の有無を赤筋酵素においても観察し，白筋酵素との相違の有無を注目した．

対象ならびに方法

対象は6歳から10歳までのデュシャンヌ型筋ジストロフィー症患者5例である．機能障害度はI度ないしII度であった（表1）．ベスタチン投与量は300 mg/日で，投与期間は4ないし5ケ月間である．4週間毎に採血を行い，白筋酵素としては，血清CK値とaldolase (ALD) を測定し，赤筋酵素としてはcarbonic anhydrase III (CA-III) とmyoglobin (Mb) とを測定した．また機能的には，採血前に10 m走行時間と起立時間を測定した．

表1

No.	症例	年令	障害度
1	H.F.	6	I
2	K.S.	7	II
3	D.M.	8	I
4	K.T.	8	II
5	F.M.	10	II

*国立療養所宇多野病院
**国立療養所宇多野病院小児科
***国立療養所宇多野病院臨床研究部

結　果

血清CK値は，投与1ケ月では前例が投与前値よりも低値を示していた．投与2ケ月目では，やや増加して投与前値に近くなるものもあり，投与3ケ月目では特に一定の傾向は見られなかった．血清ALDは，ほぼ血清CK値と同様の経過で，投与1ケ月目では前例低下，投与2ケ月目より前値に戻る傾向を示すものもあるが，大部分の例で投与前値を下回っていた（表2）．

赤筋酵素であるCA-IIIでは，ベスタチン投与後1ケ月で，1例は大幅な上昇を示していたが，他の4例では軽度に低下したもの2例，軽度の上昇を認めた物2例で，ほぼ投与前値に近い値を示した．投与3ケ月後からは投与前値よりもむしろ高い値を示すものが多かった．Mbでは，投与後上昇した例が2例，低下した例が3例でCA-IIIの動きとほぼ似ているが，その変動幅はより大きかった（表3）．

5例における投与前値よりの変化率の平均を表にしてみると，CK，ALDでは低下，CA-III，Mbでは上昇，機能的には軽度進行という結果であった（表4）．

このように白筋酵素と赤筋酵素では，かなりその動きが異なることが示されたが，個別にその違いが大きかった症例を見てみると，症例4ではCK，ALDは投与後下降し，投与4ケ月後に前値に復帰しているが，CA-III, Mbはむしろ投与初期より逆に上昇していた．この症例における機能的な側面を見てみると，10 m走行では大きな変化は見られなかったが，起立時間は徐々に延長していた．特に投与3ケ月目の時点では，体調が悪く起立，走行ともかなりの時間

表 2

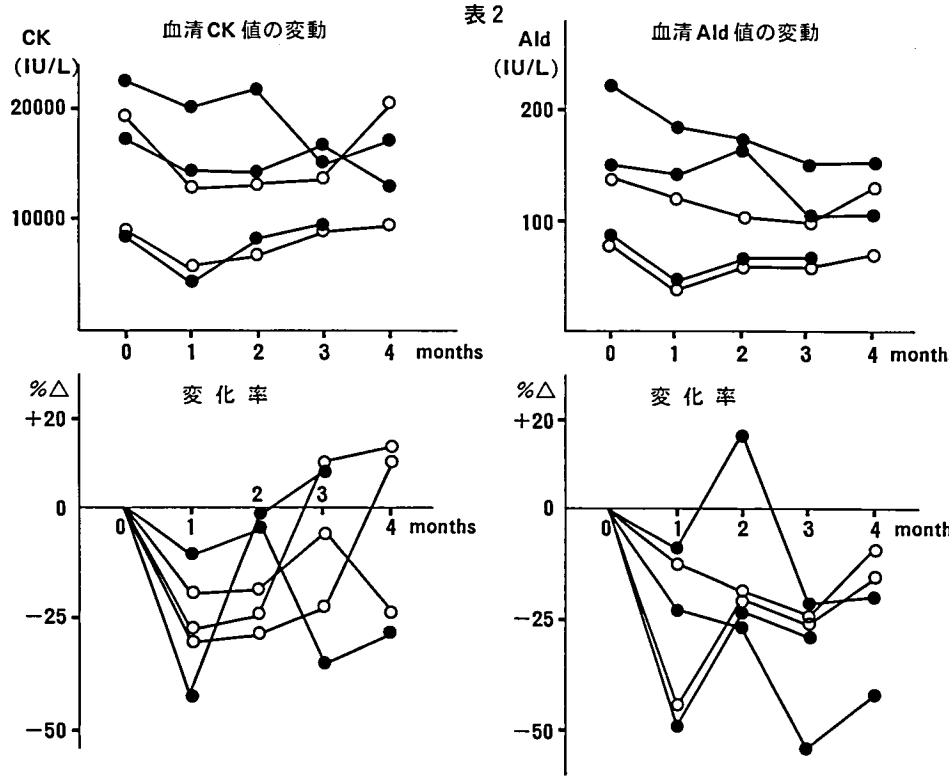

血清CK値の変動
CK
(IU/L)
20000
10000
0 1 2 3 4 months
血清Ald値の変動
Ald
(IU/L)
200
100
0 1 2 3 4 months
変化率
%△
+20
0
−25
−50
0 1 2 3 4 months
変化率
%△
+20
0
−25
−50
0 1 2 3 4 months

表 3

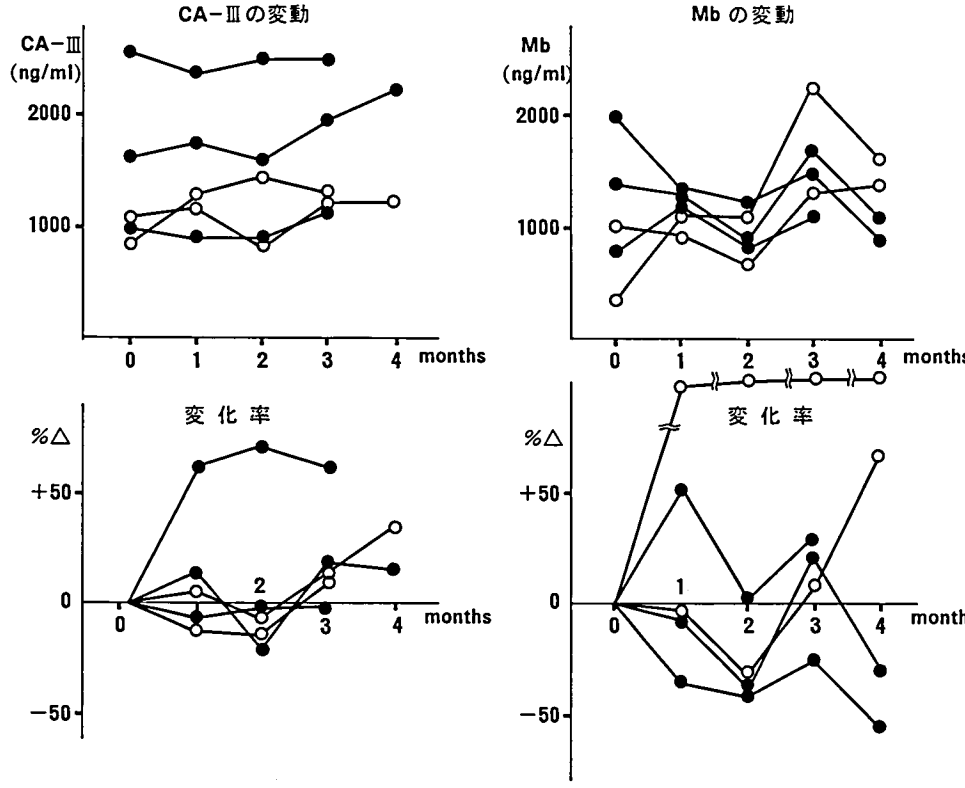

CA−Ⅲの変動
CA−Ⅲ
(ng/ml)
2000
1000
0 1 2 3 4 months
Mbの変動
Mb
(ng/ml)
2000
1000
0 1 2 3 4 months
変化率
%△
+50
0
−50
0 3 4 months
変化率
%△
+50
0
−50
0 2 3 4 months

表4

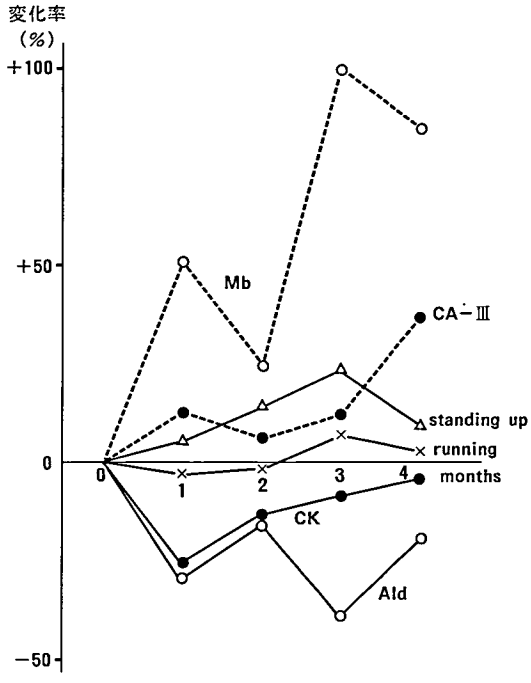


表5

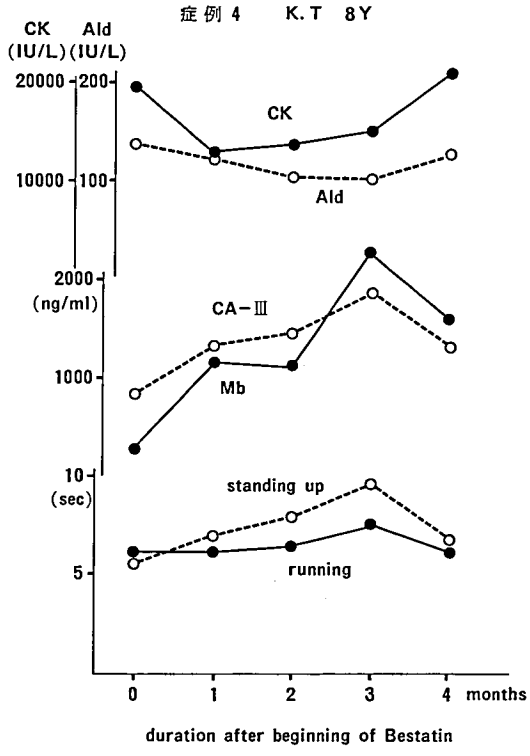


表6　各種筋疾患マーカーの比較

	筋疾患	心疾患	肝疾患	脳障害	運動負荷
CA-III (MW 28,000)	↑↑↑	→	→	→	↑
Myoglobin (MW 18,000)	↑↑↑	↑↑	→	→	↑↑
CK (MW 80,000)	↑↑↑	↑↑	→	↑	↑↑
Aldolase (150,000)	↑↑	↑	↑↑	↑	↑

（島らによる）

を要した．この時，CK，ALD値にはさほどの動きはみられなかったが，CA-IIIとMbはかなりの上昇を認めた（表5）．

考　　察

CA-III, Mbは，主としてI型繊維に多く含まれその血中での動態は，II型繊維に多く含まれるCK, ALD, LDH等とは異なる点を有することが知られている．Ostermannらの健康成人での運動負荷によるデーターでは，運動負荷直後よりまず血中に流出してくるのはCA-IIIとMbであるが，その流出量はMbがCA-IIIの2倍以上であったとしている．それに比しCKは，CA-III，Mbより遅れて血中に流出し運動負荷中止後も上昇を続け最大のピークは24時間後であったとしている．またCA-III，Mbは翌朝には運動負荷前の値に戻っていたのに比べ，CKでは前値に復帰するのに48時間以上要したとしている．LDHはCKよりさらに前値に戻るのに時間を要している（表6）．

Duchenne 型筋ジストロフィー症においては各種の運動負荷により容易にこれらの蛋白が血中に流出してくることが知られている．特に歩行可能な年少者では種々の筋疾患マーカーの日内変動の大きさは常に指摘されるところである．従って薬物投与での治験には，CK，LDH といった白筋酵素（II型繊維酵素）を中心とした測定では検査前日までの運動負荷による血中酵素の影響をかなり考慮しなければならないと思われる．その点 ALD のほうがむしろ安定した情報を提供してくれるのではないかと考えられるが，臓器特異性の点から考慮すると必ずしも CK より優れたマーカーとは言いにくいとも思われる．それに比し CA-III，Mb では検査当日の起床時より採血までの運動負荷がほぼ一定であれば，より安定した指標として有用ではないかと考えられた．今後の治験においては CK 等の白筋酵素と同時に赤筋酵素も測定することが望ましいと思われた．

今回のベスタチン投与において機能的な結果は，不変が 2 例，軽度悪化したもの 3 例であった．検査値では血清 CK，ALD 値が投与 1 ケ月で全例とも低下しており薬剤の影響も考えられたが，患児らの年齢から考えて自然経過の可能性もあるものと思われた．CA-III, Mb に対する影響はプラセボー投与との比較がなく，はっきりしなかった．

文　献

1）島功二，日比望ら：Carbonic anhydrase III (CA-III)．神経内科，28：464，1988.

2）川井尚臣，足立克仁ら：Myoglobin (Mb)．神経内科，28：474，1988.

3）Ostermann, P.O., Askmark, H., et al : Serum carbonic anhydrase III in neuromuscular disorders and in healthy persons after a long-distance run. J Neuro Sci, 70：347, 1985.

4）Florence, J.M., Fox, P.T., et al : Activity, creatine kinase, and myoglobin in Duchenne muscular dystrophy : a clue to etiology? Neurology, 35：758, 1985.

5）木下真男，里吉栄二郎ら：ベスタチンの筋ジストロフィーに対する臨床効果に対する研究．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，1988, p.99.

ベスタチンの血清 LAP に及ぼす影響

高 橋 桂 一*

研究協力者　梅 枝 孝 之**　益 田 喜 信**
森 鼻 文 朗**　小 林 浩 子**

目　的

昨年度，我々は Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) にベスタチンを投与すると 2 時間後に血清 leucine aminopeptidase 活性 (LAP) が有意に低下し，placebo では低下しないことを報告した[1].

今回はこの現象が体内での現象であることを証明するために, LAP 測定系におけるベスタチン (NK 421) の影響を検討した.

またベスタチンの長期投与の結果を検討するため, 現在進行中の二重盲験の患者血清の LAP 活性を測定した.

方　法

市売の 3 種の基質を異にするアッセイキットを用い, 血清に NK 421 を添加し, 日立 736 オートアナライザーを用いて LAP 活性を測定した.

測定法 A は L-ロイシル-p-NN-ジスルフォプロピルアミノアニリドを基質 (LSPA と略) とし 37°C, 5 μl のサンプルを反応液 300 μl に添加後 3 分間プリインキュベートし 150 μl の基質を加え，700/600 nm 4.5 分間の rate assay を行った (デタミナ-LAP 協和).

測定法 B は L-ロイシル-p-ニトロアニリド (p-nitro と略) を基質に用い，7 μl のサンプル，反応液 250 μl，基質 250 μl，480/415 nm で，同様の反応時間で行った (シノテスト). 測定法 C は L-ロイシル−3.5-ジブロム−4-ヒドロキシアニリド (3,5-Br と略) を基質とし，10 μl のサンプル，250 μl の反応液，250 μl の基質液, 600/505 nm で, 同様の反応時間で行った (セラテスタム M LAP 日立化成).

サンプルとして血清の 100 分の 1 容量の生食に溶かした NK 421 を示した最終濃度 (サンプルでの) になるよう添加した.

また現在進行中のベスタチンの二重盲験の患者血清の LAP 活性を測定し，検討した. NK 421 ドライシロップ 50 mg を 1 日 3 回食後服薬および placebo の投与である.

結　果

図 1 に NK 421 の比較的低濃度のアッセイ系に及ぼす影響を示す. 3,5-Br で 2 μg/l においてすでに抑制効果がみられ，濃度に依存して抑制が増加している. p-nitro および LSPA では抑制はみられなかった.

図 2 にはさらに高濃度の NK 421 の影響を示す. 著明な抑制が 3,5-Br の基質でみられた.

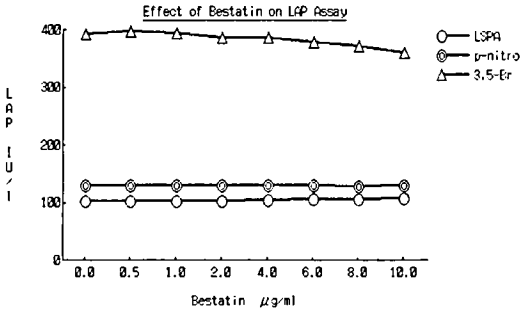


図 1　ベスタチン (低濃度) の LAP 測定系におよぼす影響

*国立療養所兵庫中央病院
**国立療養所兵庫中央病院研究検査科

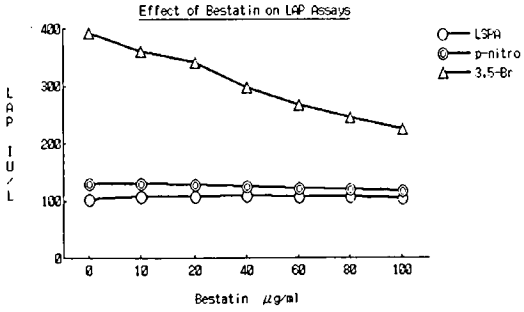


図2　ベスタチン（高濃度）のLAP測定系におよぼす影響

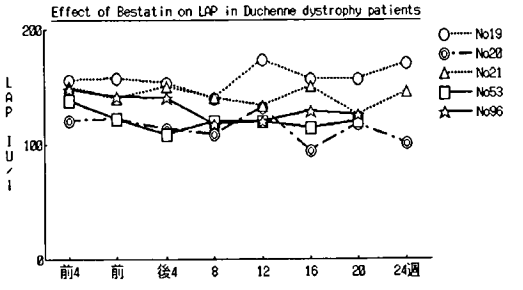


図3　デュシャンヌ型筋ジストロフィー症におけるベスタチン長期投与の血清LAP活性におよぼす影響

図3に5例のDMDにおける血清LAPの変動を示した．No 53とNo 96ではLAPの低下がみられ，No 19とNo 21では低下は明らかでなく，No 20は12週の高値のためどちらとも判定出来ない例である．いずれも冬季の開始で，夏期に至るまでのデータである．

昨年度のLAPの測定結果および今回の臨床データーは測定法Bのp-nitroによる方法である．

考　　察

昨年度の結果は測定法Bによるもので，今回の結果より，服薬により血中に増加したベスタチンのLAP測定系に及ぼす影響によるものではないことが明らかになった．従ってベスタチン投与後のLAP値の低下は生体内での現象と言える．服薬後に発現した組織内でのLAP抑制効果の反映か，血中に増加したベスタチンの血中での抑制効果かは断定できない．

血清LAPは夏期に上昇することが知られている．従って夏期におけるLAPの薬効判定は慎重であらねばならない．ここには夏期のデーターは除外した．事実8月から9月にかけて上昇のみられた例があった．DMDでLAPの低下した例があるが，これがベスタチン投与例であるかどうか，まだ二重盲験が進行中であるので，今後の検討に待たねばならない．臨床症状の判定も全国規模の対照データーが蓄積されつつあるので，いずれ明らかになる筈である．

なお測定法Aは肝，胆道系の閉息疾患時に上昇するアリルアミダーゼを特異的に測定するもので，true LAPやcystine aminopeptidaseは測定しない．従って筋疾患の検索には適しない．

AoyagiらはDMDの血清でLAPの上昇することを報告し[2]，山本らはカラムクロマトグラフィーを用いてDMDの血清中に認められる活性は骨格筋由来のaminopeptidaseで，leucine methylcoumarinamideとarginine methylcoumarinamideを同程度に分解すること，およびDMDの障害度5ないし6まで漸増し，その後低下することを報告している．またこの活性はベスタチンによりin vitroで抑制をうける[3]．

結　　論

LAP測定系に及ぼすベスタチンの影響を検討した．L-ロイシル−3,5-ジブロム-4-ヒドロキシアニリドを基質とする方法ではベスタチンの低濃度で抑制を受けた．我々が用いているL-ロイシル-p-ニトロアニリドを基質とする測定法では，抑制はみられず，先に報告したDuchenne型筋ジストロフィー症でのベスタチンによる血清LAPの低下は生体内での現象であることが明らかになった．

ベスタチンの長期投与例の血清LAPの変動についても報告した．

文　　献

1）高橋桂一，西尾英久：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（NK 421）の効果．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，1988，p.p. 83-85.

2）Aoyagi, T., Wada, T. et al.: Two different modes of enzymatic changes in serum with progression of Duchenne muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta., 129: 165-173, 1983.

3）山本真理，佐藤　猛，杉田秀夫：Duchenne型筋ジストロフィー患者血清のAminopeptidase活性―骨格筋に由来する酵素の同定および活性について―．臨床神経学，28：735-741，1988.

ベスタチンの長期投与について

村 上 慶 郎*

研究協力者　岡 崎　隆*　林　英 人*　梁　正 淵*

はじめに

一昨年の本研究班の報告で，私どもは pre-clinical な Duchenne 型筋ジストロフィー患者に長期間，ベスタチンを使用した一症例を報告したが，今回は，歩行可能な時期から5年間ベスタチンを使用した Duchenne 型筋ジストロフィー症8例について報告する．

対　象

国立療養所箱根病院外来通院中の Duchenne 型筋ジストロフィー症8例で，いずれも歩行可能な患者である．年齢は4歳6か月1例（症例1），5歳1か月2例（症例2，3），5歳6か月1例（症例4），以上4例を5歳群とした．

次に6歳1か月1例(症例5)，6歳8か月1例(症例6)，6歳10か月2例（症例7，8）の4例を6歳群とした．

投与方法

ベスタチンは最初の2年間は30 mg/日から漸増して300 mg/日に至った．その後は150 mg/日を3回に分けて投与した．投与期間は，5年間（60か月）であった．

評価及び検査

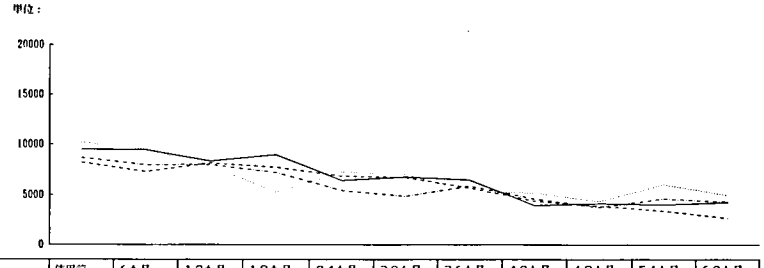
服用前と投与開始後，3か月毎にクレアチンキナーゼ（CK）を含む血清酵素（LDH, GOT, GPT），血液生化学，末梢血，尿などの一般検査を行った．また，運動機能評価としては，立ち上がり時間，握力，20 m 走行時間及び日常生活活動としてバーテル指数を測定した．

結　果

クレアチンキナーゼ（CK）

CK は，5歳からの使用群では，使用前に4例とも10000単位前後であったが，5年後には5000単位前後に半減していた（図1）．

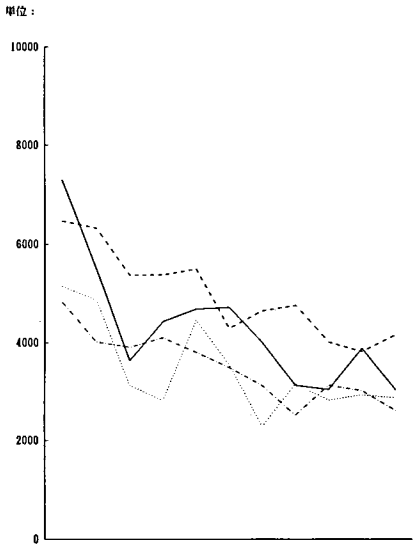
6歳から使用したグループでも，同様に5年後には半減していた（図2）．



	使用前	6か月	12か月	18か月	24か月	30か月	36か月	42か月	48か月	54か月	60か月
― 症例1	9486	9468	8352	8975	6440	6792	6503	3962	4124	4024	4231
‥ 症例2	10200	9484	7920	5288	7293	7068	5286	5218	4354	6010	4964
-- 症例3	8234	7296	8169	7728	6890	6730	5718	4406	3896	3406	2690
-・ 症例4	8675	7995	8012	7230	5462	4880	5919	4623	3754	4620	4290

図1　ベスタチンの長期使用成績　使用開始5歳から CK の推移

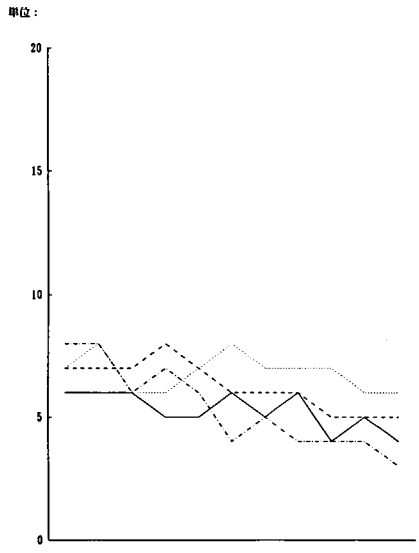
*国立療養所箱根病院



	前	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
― 症例5	7292	5516	3632	4432	4682	4720	3998	3128	3039	3888	3032
･･･ 症例6	5152	4870	3130	2810	4460	3552	2281	3152	2825	2927	2871
-- 症例7	6468	6326	5378	5384	5500	4292	4652	4760	4020	3820	4164
-･- 症例8	4820	4020	3912	4102	3806	3500	3118	2518	3128	3020	2612

月

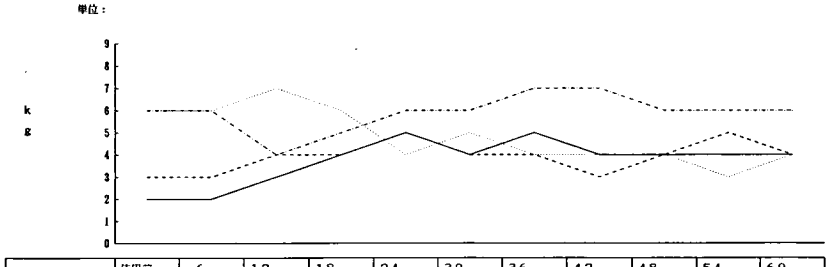
図2　ベスタチンの長期使用成績
使用開始6歳からCKの推移



	前	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
― 症例5	6	6	8	5	5	6	5	6	4	5	4
･･･ 症例6	7	8	6	6	7	8	7	7	7	6	6
-- 症例7	7	7	7	8	7	6	6	6	5	5	5
-･- 症例8	8	8	6	7	6	4	5	4	4	4	3

月

図4　ベスタチンの長期使用成績
使用開始6歳から握力の推移（右側）



	使用前	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
― 症例1	2	2	3	4	5	4	5	4	4	4	4
･･･ 症例2	6	6	7	6	4	5	4	4	4	3	4
-- 症例3	3	3	4	4	5	4	4	3	4	5	4
-･- 症例4	6	6	4	5	6	6	7	7	6	6	6

月

図3　ベスタチンの長期使用成績　使用開始5歳から握力の推移（右側）

握力

5歳より開始した症例群では，2例に増加の傾向が見られたが，残りの2例は特別な傾向は見られなかった（図3）．

6歳から開始した群では，4例ともベスタチンの使用期間中，増加は見られなかった（図4）．

立ち上がり時間

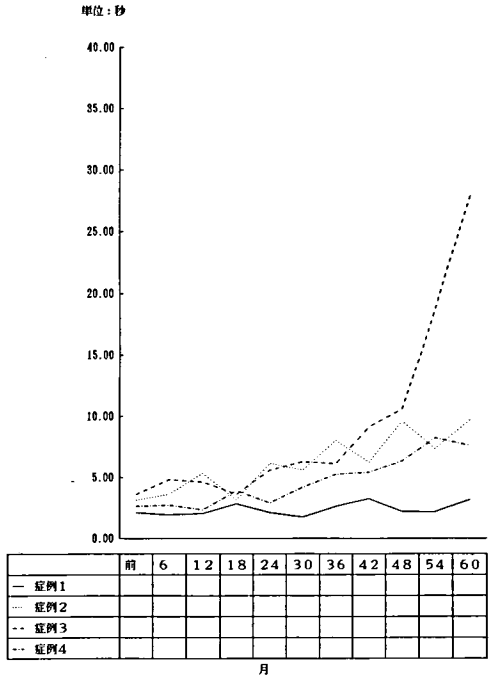
5歳からの使用開始群では，5年後に4例とも，立ち上がり可能であったが，1例はかなり悪化していた（図5）．

6歳から使用したグループでは，1例は使用開始後1年（7歳）で立ち上がり不能となり，残りの3例のうち2例は，使用開始後4年（9歳）で立ち上がりが出来なくなった．

残りの1例も使用開始後5年目（11歳）には相当悪化していた（図6）．

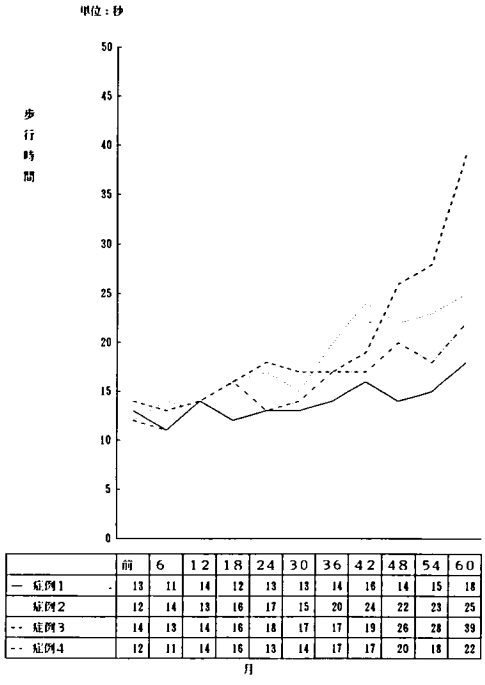
歩行時間

5歳で使用開始した4例は，いずれも5年後



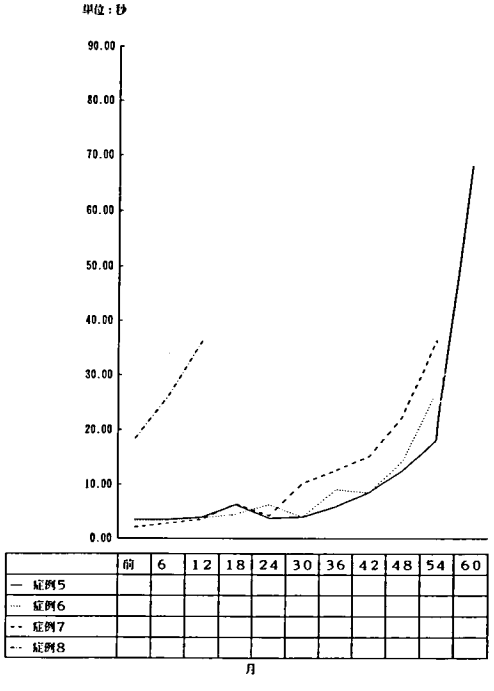
	前	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
— 症例1											
···· 症例2											
-- 症例3											
-·- 症例4											

図5　ベスタチンの長期使用成績
使用開始5歳から立ち上がり時間の推移



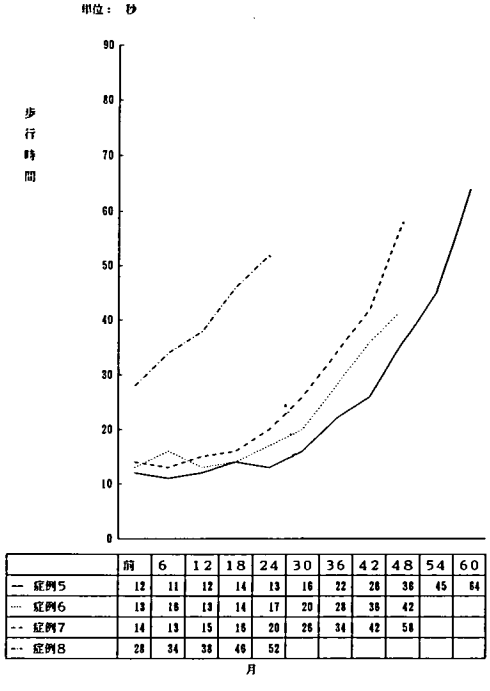
	前	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
— 症例1	13	11	14	12	13	13	14	16	14	15	18
···· 症例2	12	14	13	16	17	15	20	24	22	23	25
-- 症例3	14	13	14	16	18	17	17	19	26	28	39
-·- 症例4	12	11	14	16	13	14	17	17	20	18	22

図7　ベスタチンの長期使用成績
使用開始5歳から歩行時間の推移（20 m 歩行）



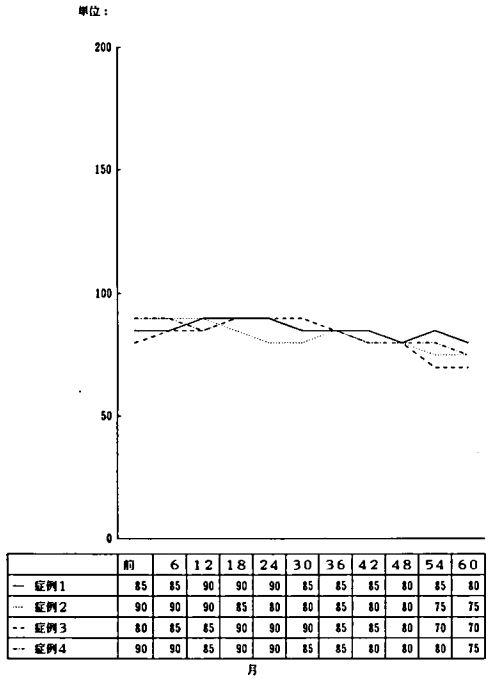
	前	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
— 症例5											
···· 症例6											
-- 症例7											
-·- 症例8											

図6　ベスタチンの長期使用成績
使用開始6歳から立ち上がり時間の推移



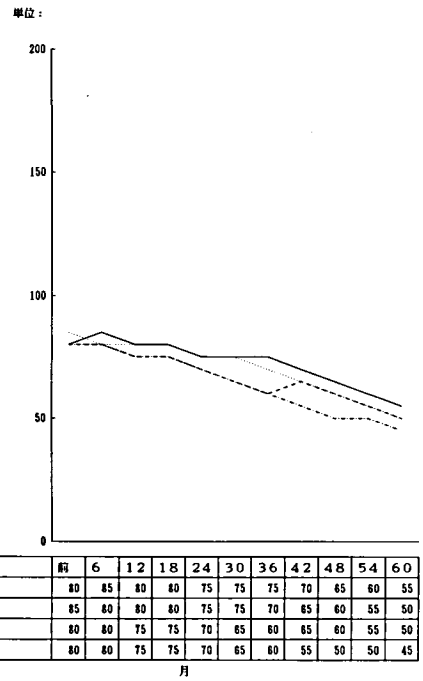
	前	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
— 症例5	12	11	12	14	13	16	22	26	36	45	64
···· 症例6	13	16	13	14	17	20	28	36	42		
-- 症例7	14	13	15	16	20	26	34	42	58		
-·- 症例8	28	34	38	46	52						

図8　ベスタチンの長期使用成績
使用開始6歳から歩行時間の推移（20 m）



	前	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
― 症例1	85	85	90	90	90	85	85	85	80	85	80
･･･ 症例2	90	90	90	85	80	80	85	80	80	75	75
-- 症例3	80	85	85	90	90	90	85	85	80	70	70
-･- 症例4	90	90	85	90	90	85	85	80	80	80	75

図9　ベスタチンの長期使用成績
使用開始5歳からバーテル指数の推移



	前	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
― 症例5	80	85	80	80	75	75	75	70	65	60	55
･･･ 症例6	85	80	80	80	75	75	70	65	60	55	50
-- 症例7	80	80	75	75	70	65	60	65	60	55	50
-･- 症例8	80	80	75	75	70	65	60	55	50	50	45

図10　ベスタチンの長期使用成績
使用開始6歳からバーテル指数の推移

(10歳) 歩行可能であった (図7).

6歳から使用開始した群では,1例が使用開始後2年(8歳)で歩行不能に, 2例が, 使用開始後4年半(10歳6か月)で歩行不能になった(図8).

バーテル指数

5歳から使用開始した群では,5年後にはいずれも, 軽度の減少を示していた (図9).

6歳からの使用群では,5年後にはかなりの減少がみられていた (図10).

その他

感冒の罹患回数の減少, 症状の軽減は全例に見られた.

副　作　用

特別のものはみられなかった. また, 一般血, 尿, 血液生化学についても異常は認められなかった.

考案ならびに結語

進行性筋ジストロフィー症のように, 慢性で進行性の経過をとる疾患については, 治療薬や治療法の効果の判定については, 種々の問題がある.

一般に, 長期間の薬物の使用の効果を見るには, 運動機能に及ぼす影響を見る方法が行われている.

今回の実験では長期間のベスタチン投与の効果を主として運動機能の面から見る目的で行った. また, ベスタチンの使用開始年齢を5歳群と6歳群に分けたが, これはDuchenne型筋ジストロフィーに対して長期間のプラセボ投与の実験が非常に困難であると言うこと及びDuchenne型筋ジストロフィーの自然歴がわが国に少ないこと, 長期間歩行可能な時期を見るには, 5~6歳が適当である, 1~5歳では成長の因子が強くこれの効果の除外が困難であるなどの理由による.

CKについては, 従来の報告と変わりなく, 年齢

と共に減少が見られている．握力については，5年間のベスタチンの使用で，あまり変化が見られていない．今回使用した通常の握力計は成人用のものを使用したために，細かい変動が明らかでなかったものと思われる．立ち上がり時間については，6歳から使用したグループの4例中3例が途中で立ち上がり不能になっているが，5歳から開始した群は4例とも時間は増加しているが，起立可能であったことは興味深い．20 m 歩行でも，5歳から使用していた例は，全例（4例）共歩行可能であったが，6歳群では4例中3例が歩行不能となっている．バーテル指数では5歳群が比較的軽度の減少を示していたのに対して，6歳群では，ほぼ半減していた．

辻らは，ベスタチンの早期投与が，動物の筋ジストロフィーで有効であったと報告しているが，ヒトではあまりはっきりしていない．今回の私どもの成績では6歳群と5歳群とでは5歳群の方が歩行期間は延長していたが，個体差もあり，断定は出来ない．さらに多数の症例の積み重ねが必要である．

以上，比較的少数例ではあるが，Duchenne 型筋ジストロフィーに対するベスタチンの5年間の長期投与では，早期の投与開始で，多少の運動機能の延長が見られる可能性を示唆している．

ベスタチン服薬および非服薬 DMD 患者における T 波の検討

三吉野　産　治*

研究協力者　　江　田　伊勢松*

はじめに

アキレス腱反射は，重要な臨床神経学的所見の一つとして表現されている．その客観的評価の一つとして活動電位記録法を用いて得られる T 波の分析がある．小児における T 波の正常パターンの研究は既に報告されており，高倉ら[1]によれば，その潜時は身長の伸びに極めて良く相関する．又進行性筋ジストロフィー症に対しての T 波の分析も少ないながらあり，笠木ら[2]は Duchenne 型ではかなり年長においてもその振幅の存在を認めることを報告している．我々も[3]以前に Duchenne 型筋ジストロフィー症において，その振幅は機能進行度と極めて良く相関すること，T 波活動持続時間は正常対照に比して有意に延長することを述べてきた．

今回我々は昭和 61 年度から昭和 63 年度の間に少なくとも 1 年以上ベスタチンを内服した患児 5 名と今まで一度もベスタチンを服薬した経験のない DMD 児 5 名について，昭和 61 年の 9 月と昭和 63 年の 9 月にアキレス腱反射の活動電位波形（いわゆる T 波）を分析し，両群間の比較を行ったので報告をする．

対象および方法

対象はベスタチン服薬群としての 5 名の DMD 児と，ベスタチン非服薬群としての 5 名の DMD 児である（**表 1**）．ベスタチン服薬群の 5 名のうち 3 名は昭和 61 年度には placebo を服薬しており，昭和 62 年度よりベスタチンを服薬している．いずれの症例も少なくとも 1 年以上のベスタチンを服薬している．又ベスタチン非服薬群は過去において一度も，期間中を含めてその内服はない．ベスタチン服薬患児は 300 mg/日の量を内服しており，量的な差はない．

T 波測定はモジュール式筋電計 MS 6（三栄）を用い，高倉らの方法に準じてなされた．測定は 22～24°C の室温でなされ，T 波の分析は最も早い，最も高い波形を対象として分析した（図 1）．

表 1　対象

進行性筋ジストロフィー症（Duchenne 型）		
	10 名（8 才～18 才）	
(1)ベスタチン服薬児	5 名（8 才～12 才）	
	昭和 61 年度歩行可能児	4 名
	昭和 63 年度歩行可能児	2 名
(2)ベスタチン非服薬児	5 名（11 才～18 才）	
	昭和 61 年度歩行可能児	2 名
	昭和 63 年度歩行可能児	0 名

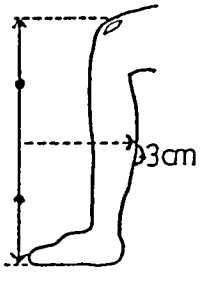


図 1　方法
(1)装置はモジュール式筋電計 MS 6（三栄）を使用
(2)測定は室温 22-24°C にて実施した
(3) T 波測定は各肢とも，少なくとも 10 回以上実施した

*国立療養所西別府病院

結　　果

図2に正常対照児のT波波形を示す．正常ではT波の振幅は約1～10 mVと極めて広いばらつきを示し，一般的に右足の振幅が高い．ただ正常児の多くは3～5 mVの振幅を示した．

図3はその正常対照児とDMD児の身長とT波の潜時を示したものである．正常対照児とDMD児ともにT波の潜時は身長と正の相関をもっていることがわかる．

図4は今回の対象であるDMD児10名の運動機能の変化を昭和61年度と63年度で比較したものである．ベスタチンを期間中に服薬した児を○で示し，非服薬を●で示してある．又↙のある症例はこの期間を通じてベスタチンを服薬していたDMD児である．ベスタチンを服薬している2名とstage 7の非内服児1名がこの期間中，stage分類での進行は認められないが，

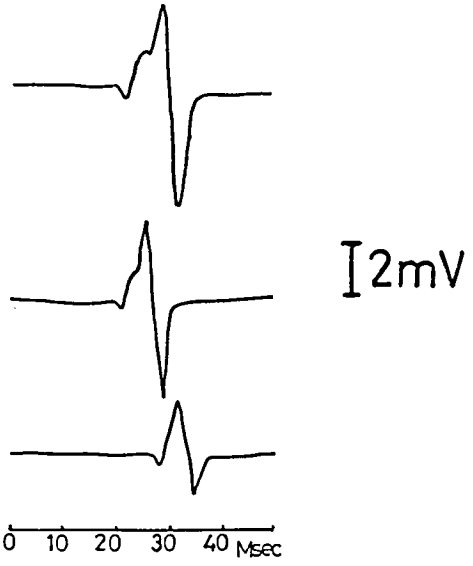


図2　正常対照児のT波の波形

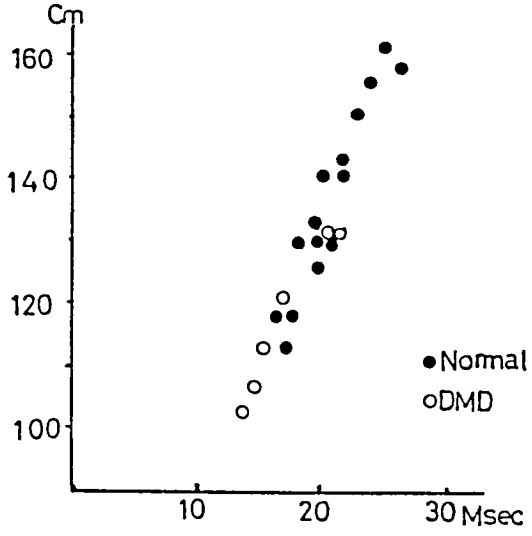


図3　正常対照児のT波潜時と身長との関係

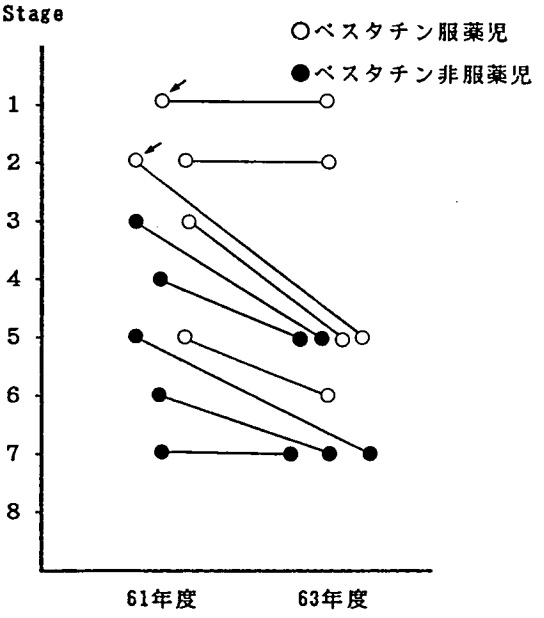


図4　DMD児10名の運動機能の変化

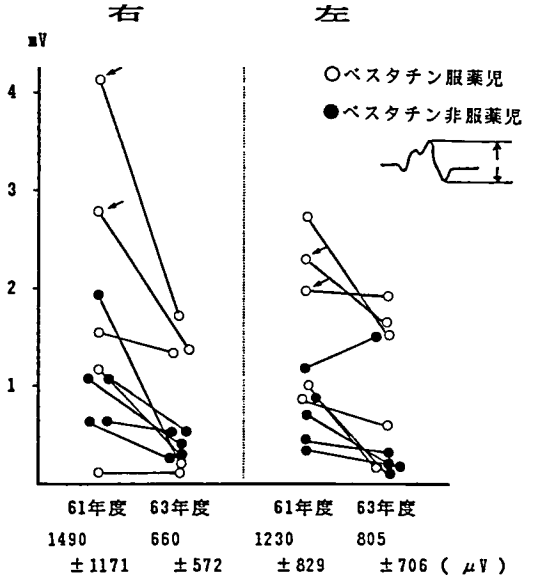


図5　DMD児のT波振幅の継時的変化

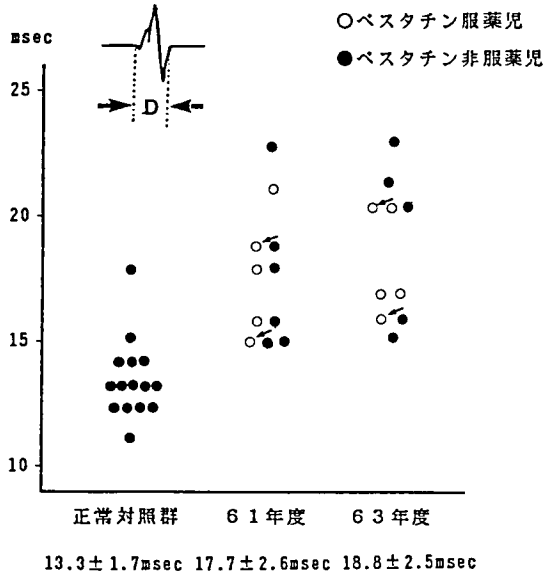


図6　DMD児のT波活動時間の継時的変化

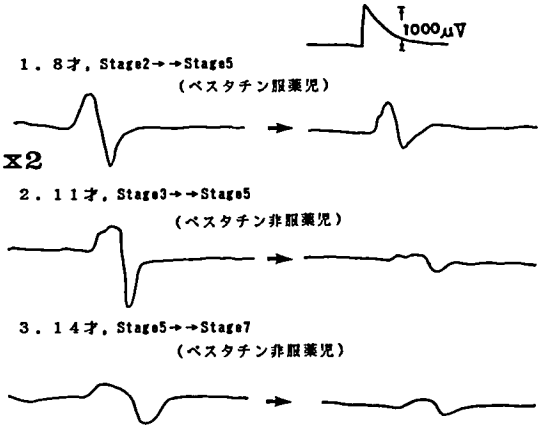


図7　DMD児T波の波形の継時的変化

他の7症例はいずれも運動機能が低下している．

図5は同様にベスタチン内服児と非服薬児とのT波振幅の変化を比較したものである．ベスタチン服薬児は全例，ベスタチン非服薬児は左足の振幅が上昇した1例を除く4例がその振幅を減じていた．その減少率よりみても両者間の差はない．

図6は両者間のT波活動持続時間の差をみたものである．正常対照群に比してDMD群では有意の差をもって活動持続時間が延長していた．しかし，両群間では63年度の結果よりみてもわかるように差は認められない．

最後に波形の変化を図7に示す．症例1がベスタチン服薬児であり，どろんとした波形がますます，その振幅を下げている．ベスタチン非服薬児の波形は症例2，3である．やはり服薬児と同様の結果を示している．これら3名の他の症例はここには示さなかったがいずれも同様であった．

考　　案

ベスタチン服薬，非服薬のDMD児各々5名についてT波を検討し，その結果を報告した．

ベスタチン服薬群，非服薬群の両群の間にはT波の振幅，活動持続時間，潜時および波形の差は認められず，経年的変化（61年，63年）においてもそれらの差は認められないように思われた．ただ我々の症例ではベスタチン服薬児の年齢が非服薬群に比して若干若いこと，又ベスタチンもより幼若なころより服薬している症例がないことなどにより，今回の結果でベスタチンの効果を単純には結論は出せないと考える．

ただ臨床的機能進行度の変化のないベスタチン服薬児においても，T波振幅でみるとその程度は著しく進行しており，いずれはその臨床的機能の低下を認めることが推測される．いずれにしても，このことはDMDのベスタチンの薬効判定にT波が有効な検査であることを裏付けるものであると思われた．

文　　献

1）高倉広喜，笠木重人ら：アキレス腱反射-T波-の正常発達および病的亢進例との比較．脳波と筋電図，12：190，1984．

2）笠木重人，高倉広喜ら：筋疾患におけるM波，T波の臨床的検討．厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の疫学，病態および治療開発に関する研究」（杉田班）昭和61年度報告書，1986，p.292．

3）三吉野産治，江田伊勢松ら：筋ジストロフ

ィー症のT波に関する研究. 厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症の疫学, 病態および治療開発に関する研究」(杉田班) 昭和61年度報告書, 1986, p. 289.

分担研究者一覧

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5101
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	187　小平市小川東町 4-1-1	0423-41-2711 内2100
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長	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㈱　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
班員	中野　今治	東京大学医学部脳研病理	113　文京区本郷 7-3-1	03-815-5411
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	三菱化成生命科学研究所	194　町田市南大谷 11	0427-26-1211