

厚生省

新薬開発研究費

微生物の二次代謝産物に由来する
難病治療薬（ロイペプチン）の開発研究

梅 沢 班

昭和 55 年度研究報告書

昭和 56 年 3 月

研究報告書の作成にあたって

「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）の研究」が昭和54年度に厚生省薬務局より新薬開発研究としてとりあげられ、私が班長として本研究班が発足し第2年度を迎えた。

第2年度は初年度に引き続き、ロイペプチンの基礎研究を行うため新たに生化学者の参加を求め、また臨床研究を始めるため国立武蔵療養所神経センター長の里吉榮二郎博士の世話で臨床研究者を班員として迎え、本研究班の充実を図った。かくして、本邦斯界の優れた研究者により本班が編成され、私は班長としての任務を全うすることができたと思う。

本年度はロイペプチンの生化学的、薬理的、生理学的、病理学的研究および前臨床試験ならびに薬効評価の基準を決める研究など、広範囲の研究が施行された。一方、ロイペプチンは筋ジストロフィーマウスに投与することにより、顕著な症状回復効果のあることが見いだされた。また、細胞膜表面に存在することを明らかにしたアミノペプチダーゼBの阻害物質として微生物培養液中から発見され、免疫増強物質として開発中のベスタチンが筋ジストロフィーマウスに対し、顕著な症状回復効果を有することが発見された。

本研究班の目的は筋ジストロフィー症の治療薬の開発を行うことであるが、班員の努力により著しい成果をあげることができた。また、これらの結果は筋ジストロフィー症の原因、経過の解明にも役立つと思われる。本研究を重要課題としてとりあげられた厚生省薬務局ならびに班員各位に感謝する次第である。

昭和56年3月

班長 梅沢 浜夫

目 次

研究報告の作成にあたって・・・・・・・・・・・・・・・・梅 沢 浜 夫・・・・ i

総 括 研 究 報 告

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）
の開発研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3
梅 沢 浜 夫

分 担 研 究 報 告

ロイペプチンのプロテアーゼ阻害作用に関する研究・・・・・・・・17
村 地 孝

高速液体クロマトグラフィーによるロイペプチンおよび
関連物質の微量蛍光定量法・・・・・・・・25
大 倉 洋 甫

ロイペプチンの細胞レベルでの研究・・・・・・・・33
岩 崎 祐 三

ロイペプチンの薬理学的研究・・・・・・・・41
大 塚 正 徳

脱髄病変に及ぼすロイペプチンの影響・・・・・・・・49
米 沢 猛

筋ジストロフィーマウスにみられる種々な酵素の活性変動 に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響	55
	松 下 宏
ラット実験的筋萎縮に対するロイペプチンの影響	63
	高 木 昭 夫
ロイペプチンの筋崩壊阻止作用に関する組織学的研究	67
	埜 中 征 哉
筋ジストロフィー症鶏の生産・供給	75
	野 村 達 次
Duchenne Muscular Dystrophy 患児へのロイペプチン	
1 回投与とその成績について	77
	三 吉 野 産 治
ロイペプチンの種々筋萎縮性疾患に対する経口投与の効果 —— I. 100 mg 1 回投与について——	81
	村 上 慶 郎
ロイペプチン投与の影響——ヒトおよび実験的筋再生に 対する検討——	85
	木 下 真 男
ロイペプチンの難病治療薬としての開発研究	93
	田 中 亘
微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）研究班 分担研究者一覧	137

總括研究報告

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬

(ロイペプチン) の開発研究

主任研究者 梅 沢 浜 夫

昭和 54 年度に新薬開発研究の一課題として、筋ジストロフィー症の治療研究に蛋白分解酵素阻害物質であるロイペプチンがとり上げられ、この新薬開発研究班が結成された。

初年度においては、ロイペプチンの臨床研究に対する基礎研究として、薬理学的研究、生理学的研究、病理学的研究、毒性試験ならびに筋ジストロフィーマウスおよび筋ジストロフィー鶏に対する作用、また効果判定のための基礎研究を行った。

筋ジストロフィー症の治療薬開発を推進する本研究班は 55 年度においては、前年度の研究課題を継続して研究するとともに、新たに 2 名の生化学者および 3 名の臨床研究者の参加を求め、本班のより充実を図った。本年度はロイペプチンの生化学的研究、薬理学的研究、生理学的研究、病理学的研究、前臨床試験、モデル動物に対する効果などを調べるとともに、臨床研究を対象とした薬効評価の基準を検討した。一方、筋ジストロフィーマウスの発症直後(2週齢)からロイペプチンを投与することにより顕著な症状回復効果のあることが確認された。また、筋ジストロフィーマウスおよびニワトリの筋肉内のアミノペプチダーゼ活性が正常群に比べ、異常に上昇していることが明らかになったので、ベスタチンの筋ジストロフィーマウスに対する効果が検討された。ベスタチンは細胞表面に存在するアミノペプチダーゼ活性を阻害するとともに細胞表面に結合する。この結果に基づき、免疫増強剤として開発中の放線菌生

産物である。本年度の研究で、ベスタチンが筋ジストロフィーマウスに著効を示すことが発見された。かくして、ロイペプチンとともにベスタチンの臨床研究が行われることになった。現在、日本国内はもとより、米国などの諸外国でロイペプチンおよびベスタチンについて活発な研究が行われている。各分担研究者により行われた研究は次の通りである。

- 1) 村地孝(京都大学医学部)：一ロイペプチンのプロテアーゼ阻害作用に関する研究
- 2) 大倉洋甫(九州大学薬学部)：一高速液体クロマトグラフィーによるロイペプチンおよび関連物質の微量蛍光定量法
- 3) 岩崎祐三(国立武蔵療養所神経センター)：一ロイペプチンの細胞レベルでの研究
- 4) 大塚正徳(東京医科歯科大学)：一ロイペプチンの薬理学的研究
- 5) 米沢 猛(京都府立医科大学)：一脱髄病変に及ぼすロイペプチンの影響
- 6) 松下 宏(和歌山県立医科大学)：一筋ジストロフィーマウスにみられる種々な酵素の活性変動に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響
- 7) 高木昭夫(国立武蔵療養所神経センター)：一ラット実験的筋萎縮に対するロイペプチンの影響
- 8) 壺中征哉(国立武蔵療養所神経センター)：一ロイペプチンの筋崩壊阻止作用に関する組織学

的研究

9) 野村達次(実験動物中央研究所):一筋ジストロフィー症鶏の生産, 供給

10) 三吉野産治(国立療養所西別府病院):一 Duchenne Muscular Dystrophy 患児へのロイペプチン1回投与とその成績について

11) 村上慶郎(国立療養所箱根病院):一ロイペプチンの種々筋萎縮性疾患に対する経口投与の効果

12) 木下真男(東邦大学医学部):一ロイペプチン投与の影響—ヒトおよび実験的筋再生に対する検討

13) 田中 亘(日本化薬株式会社):一ロイペプチンの難病治療薬としての開発研究

次に上記各班員の研究成果について要約する.

1. ロイペプチンのプロテアーゼ阻害作用に関する研究

村地班員は, Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ(CANP)を含むより広い類縁酵素群に対するロイペプチンの阻害作用を研究する目的で, まずこの類縁酵素群をカルpain (calpain, カルシウムの cal とチオールプロテアーゼの語尾 -ain の造語) と命名し, その骨格筋以外の臓器における分布を研究した.

ラット肝臓および脳のカルpainは, これに対する内因性的の特異インヒビター蛋白質と共存していることが明らかにされた. このインヒビターはカルpainと同様に広い分布を示し, カルpastatin (calpastatin) と命名された. カルpainとカルpastatinは, pH 7.5 における DEAE-セルロース・クロマトグラフィーまたはゲル濾過によって分別採取されることが知られた.

カルpastatinは 28~30 万ダルトンの分子サイズで, きわめて耐熱性の蛋白質である. カルpainの阻害は Ca^{2+} を奪取するために引き起されるものではない.

ラット肝臓には少なくとも2種のカルpainが

存在する. カルpain Iは $40 \mu\text{M}$ Ca^{2+} で 50% の活性化を起すが, カルpain IIの完全活性化には 3~5 mM の Ca^{2+} を必要とする. カルpastatinに対しては, カルpain IIのほうがカルpain Iより高い感受性を示すが, 阻害様式そのものには差異がない.

ロイペプチンは肝臓カルpain IおよびIIをほとんど同程度に阻害する. その阻害度はアンチpainのそれより強く, また, カルpain IおよびIIはペpastatinまたはエラストチナールの阻害を受けない. これらの様相は, 骨格筋 CANP について知られている阻害剤のスペクトルとほとんど差がなく, CANP がカルpain群の1つの酵素であるとみなして差支えないことを示している.

2. 高速液体クロマトグラフィーによるロイペプチンおよび関連物質の微量蛍光定量法

大倉班員はロイペプチンの筋ジストロフィー症に対する薬効を判定する目的でロイペプチンおよびその関連物質の高感度定量法の開発研究を行った. 大倉班員らが開発したベンゾインによるグアニジン類の蛍光反応を適用し, ロイペプチン酸 (Leup COOH) およびロイシルアルギニン (Leu-Arg) の蛍光誘導体を作成し, これを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離する方法である. ロイペプチンはそのままでは反応しにくいので, あらかじめ還元してロイペプチノール (Leup OH) にしている.

測定法は, 試料 $100 \mu\text{l}$ に 1.5 mg/ml NaBH_4 , $50 \mu\text{l}$ を加え室温で5分間放置後, 1.5 M HCl $50 \mu\text{l}$ を添加し, さらに10分間放置することにより過剰の NaBH_4 を分解する. 4 mM ベンゾイン (メチルセロソルブ中) $100 \mu\text{l}$, 0.1 M β -メルカプトエタノール, 0.2 M Na_2SO_3 $100 \mu\text{l}$, 1.5 M KOH $200 \mu\text{l}$ を加え 100°C で90秒間加熱後, 氷冷下で 0.5 M トリス緩衝液 (pH 9.2), 1.25 M HCl $200 \mu\text{l}$ を加え, その $100 \mu\text{l}$ を HPLC に流す. カラムは Lichrosorb RP-18 ($0.4 \times 15 \text{ cm i. d.}$), 溶離は

メタノール、0.5 M トリス緩衝液 (pH 9.0) および 1% テトラ-*n*-ブチルアンモニウム塩の混液 (7:1:2)、検出器は日立蛍光モニター (フィルター式) を用いた。

結果は、ロイペプチン、Leup COOH および Leu-Arg のベンゾイン蛍光体を9分以内に分離・検出することができた。これらの化合物の検出限界は HPLC 注入量 100 μ l では、それぞれ 150, 100 および 150 pmol であった。つぎに、ヒト血漿 (血清) 中のロイペプチン類の定量法を検討した。血漿中 100 pmol/ml (50 ng/ml) 以上のロイペプチン および Leup COOH を再現性よく測定しえた。さらに血漿中に妨害物質として存在する大量のアルギニンおよびペプチド類を除去するため、酢酸エチルでロイペプチンの蛍光体を抽出した。血漿中 10 pmol/ml のロイペプチンを測定することが可能になった。本法は、ヒト血液中に微量に存在するロイペプチンを定量することが可能であり、さらに動物体内におけるロイペプチンの動態ならびにその代謝産物の検索に適用できる。

3. ロイペプチンの細胞レベルでの研究

岩崎班員はジストロフィー鶏の筋細胞膜に対するロイペプチンの影響ならびに正常マウスの成育に及ぼす影響を検討した。

- 1) 凍結切断法を用いてジストロフィー鶏の筋細胞膜の異常を caveolae の密度の変化を指標として定量的にとらえる方法を開発、この方法を用いて、ロイペプチン投与が筋細胞膜構築に及ぼす影響を定量的にとらえることを試みた。まず孵化直後では、ジストロフィー鶏の筋細胞膜の構造が対照正常鶏のそれと異ならないこと、つまりジストロフィー鶏における筋細胞膜の異常は孵化後 2~5 週の間発現することを明らかにし、ついでジストロフィー鶏にロイペプチン 50 mg/体重 1 kg を腹腔内に連続投与した場合と非投与ジストロフィー鶏の比較を行った結果、孵化後 13

および 27 週目の浅胸筋と外転筋についてみた場合、ロイペプチン投与鶏と非投与鶏の筋細胞膜の構造は識別しがたく、両者とも正常対照鶏の筋細胞膜構造とは著しく異なることを知った。

- 2) 正常マウスの成育に対するロイペプチン連続投与の影響を知る目的で、ICR 系マウスの新生児同胞を 2 群に分け、一方に生後 10 日目よりロイペプチン 1 mg/体重 10 g を腹腔内に連続投与、最長 15 週間の観察を行った。投与開始後 5 週目からロイペプチン投与群に体重増加の程度が対照群より大となる傾向がみられたが、投与 7 週および 15 週のマウスについて行った脳、肺、心臓、肝、脾臓、腎臓、胸腺、大動脈、副腎についての光学顕微鏡的検索では異常を認めなかった。現在、電子顕微鏡による検索をすすめている。

4. ロイペプチンの薬理学的研究

大塚班員はロイペプチンのジストロフィー鶏の筋収縮に及ぼす影響ならびにラットの筋線維およびモルモット神経細胞膜に対する効果などについて検討した。

- 1) ジストロフィー鶏における研究：ロイペプチンがジストロフィー鶏の筋収縮力を増強するかどうかを検討するために、以下の実験を行った。体重約 2 kg のジストロフィー鶏 (line 413) をエーテル麻酔下に大脳を除去した後、背位に固定し、長橈側手根伸筋およびこれを支配する神経を露出した。刺激としては a) 筋の単一直接刺激、b) 筋の連続刺激 (100 Hz, 100 発)、c) 支配神経の単一刺激、d) 神経の連続刺激 (100 Hz, 100 発) の 4 種を用い、これによって生ずる長橈側手根伸筋の収縮をトランスデューサーを介してペンレコーダー上に記録した。上記 4 種類の刺激に対する収縮が約 1 時間にわたって安定に記録されることを確かめた後、ロイペプチ

ン (2 mg/kg) を腹腔内に投与した。筋あるいは神経の単一または連続刺激によって生ずる単収縮および強縮はロイペプチン注射後 1.5 時間にわたってまったく変化しないか、あるいは軽度の減少を示した。以上の結果から、ロイペプチンはジストロフィー鶏の筋収縮を急性実験の範囲では増強しないものと推定されているが、慢性的に投与した場合の効果については今後さらに検討する必要がある。

2) 筋線維および神経細胞の細胞膜に対する効果：ロイペプチンが細胞膜の透過性に影響を与えるかどうかを、a) ラットの長趾伸筋およびヒラメ筋、b) モルモットの交感神経節細胞、および c) ラット脊髄の運動ニューロンについて、細胞内電極法を用いて検討した。ロイペプチン $5 \times 10^{-5} \sim 10^{-4}$ g/ml は筋線維および神経細胞の静止電位、活動電位には影響を与えなかったが、節前線維刺激によって交感神経節細胞から記録される興奮性シナプス後電位を抑制した。

5. 脱髄病変に及ぼすロイペプチンの影響

米沢班員は脱髄疾患の特徴的病変である脱髄病変の誘起に関与するプロテアーゼに対するロイペプチンの効果を検討した。

脱髄病変は賦活化された食細胞による髓鞘の破壊であるが、これには食細胞から放出されるプロテアーゼの活性によるとされ、プロテアーゼ阻剤による脱髄病変の抑制が示唆されている。

したがって、まず、ロイペプチンが小脳培養に及ぼす中毒性変化、ことに髓鞘形成に及ぼす影響を検討し、ついで、ロイペプチン処理を行った小脳培養に脱髄疾患血清を投与して脱髄像の修飾を検討した。

1) 型のごとく、マウス新生仔小脳を培養し、培養 2 日後よりロイペプチンを投与した場合、 $10 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で髓鞘形成の抑制がみられ、オリゴデンドログリアの変性が目立っ

ている。培養 5 日後よりロイペプチンを投与した場合、中毒性変化はかなり軽減される。髓鞘形成完了後にロイペプチンを投与した場合、 $50 \mu\text{g/ml}$ では中毒性変化はみられない。

2) 髓鞘形成の完成した培養を $50 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ で 1 週間処置したのち、EAE 家兔血清、多発性硬化症患者の増悪期血清を 10~50% の濃度で培養液に混じて培養に投与し、脱髄の出現、そのパターン等を検討したが、対照の無処置の培養と同様の変化であった。これは抗体による脱髄に対してロイペプチンは影響を与えていないことを示すものと思われる。感作リンパ球による脱髄に際してのロイペプチンがどのような修飾を生ずるかを検討する必要がある。

6. 筋ジストロフィーマウスにみられる種々な酵素の活性変動に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響

松下班員は、筋ジストロフィーマウスにおいて症状進行に伴って認められる血清中、骨格筋および腎臓中の種々の酵素活性に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響ならびに筋ジストロフィーマウスの発症直後からベスタチンを連続投与したときの症状回復について検討した。

筋ジストロフィーマウスにおいて、症状進行に伴って認められる血清中、骨格筋中および腎臓中のクレアチンキナーゼ (CPK)、ピルビン酸キナーゼ (PK)、GOT、GPT、Ca 依存性中性プロテアーゼ (CANP)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) およびロイシン・アミノペプチダーゼ (LAP) の活性変動に対するロイペプチンおよびベスタチン投与の影響ならびに発症直後の 2 週齢からベスタチンを連続投与した筋ジストロフィーマウスの症状回復について検討を行った。

1) 2 カ月齢の C57BL/6J-dy 系疾病マウスおよびその同腹正常マウスについて上記酵素の活性を測定した結果、筋ジストロフィーマ

ウス血清中では CANP, γ -GTP, LAP を除く各酵素の活性が著しく上昇し、一方、骨格筋中では CPK, PK が著しく活性低下し、CANP, γ -GTP, LAP が活性上昇していることが認められた。

- 2) 2～8週齢の筋ジストロフィーマウスにロイペプチンまたはベスタチンを 0.2 mg ずつ 1日2回連続投与、2カ月齢および3カ月齢で酵素活性を測定した。また同濃度のロイペプチンおよびベスタチンを 1/2 量ずつ6週齢の疾病マウスに投与し、4週間後に酵素活性の測定を行った結果、両インヒビターともに血清中の各酵素活性を低下させ、筋中の CANP および γ -GTP 活性を低下させ、CPK, PK, GPT 活性を上昇させる効果をもつことが認められた。また、筋中の LAP 活性はロイペプチンで増加し、ベスタチンで減少することがわかった。一般にベスタチンの効果の方がロイペプチンより大きく、かつ早期に投与を開始したほど効果が著しい傾向が認められた。また両者併用の加重効果はわずかであるが認められた。筋のミトコンドリア中の酵素活性は両インヒビターとともに GOT, GPT が増加し、 γ -GTP が減少する傾向がみられ、腎中の γ -GTP は増加していた。
- 3) ベスタチン長期投与群では2カ月齢で約半数に著しい体重増加、筋力の回復および症状の消失が認められた。残りの半数にも一旦症状の回復がみられたが、2カ月齢を過ぎると体重が減少し、症状の進行が元に戻ってくるということが認められた。

7. ラット実験的筋萎縮に対するロイペプチンの影響

高木班員は、部分的に筋ジストロフィーにおける蛋白減少と類似の機序と思われる実験的筋萎縮をラットに作製し、ロイペプチンの効果を検討した。

筋萎縮モデルとして足関節固定による不動性筋萎縮、および座骨神経切断による脱神経性筋萎縮を作製した。手術直後より前者に対してはロイペプチン 40 mg/kg を背部皮下に投与した（12回、4週間）。後者にはロイペプチン 8 mg/kg、ベスタチン 4～8 mg/kg および dimethylsulfoxide (5%) を下腿前面に筋注した（10回、2週間）。ラット体重、筋湿重量、筋蛋白量や筋組織像などの項目を検討した。

- 1) 不動性筋萎縮：表示したように、筋湿重量と筋蛋白の減少はロイペプチンにより阻止されなかった。

i) ヒラメ筋湿重量 (萎縮側/健側, %)		
ロイペプチン投与	54±6% (n=5)	
非投与	50±2% (n=5)	
ii) ヒラメ筋蛋白量 (mg/wet g)		
	萎縮側	健側
ロイペプチン	130±18(5)	141±19(5)
非投与	126±9(5)	159±20(5)
iii) ヒラメ筋 non-collagen protein (mg/wet g)		
	萎縮側	健側
ロイペプチン	72±13(5)	139±21(5)
非投与	72±23(5)	112±8(5)

- 2) 脱神経筋萎縮に対するロイペプチン、ベスタチンの筋肉内注射：薬剤投与群の前脛骨筋や長趾伸筋には著明な細胞浸潤、浮腫と壊死を認めた。ヒラメ筋には軽度の浮腫を認めた。溶剤のみの投与では細胞浸潤を認めた。薬剤の滅菌、脱神経筋 viability などを再考する必要があると思われる。

8. ロイペプチンの筋崩壊阻止作用に関する組織学的研究

莖中班員は、ロイペプチンの筋崩壊過程に及ぼす影響を筋ジストロフィー鶏を用いた *in vivo* において、また Ca^{2+} イオノフォア (A 23187) による *in vitro* における効果を検討した。

- 1) 筋ジストロフィー鶏による実験：筋ジストロフィー鶏 (line 413) 雄 21羽を3群（無治療6羽、ロイペプチン 50 mg/kg/日 9羽、10 mg/kg/日 6羽）に分けた。ロイペプチンは腹

腔内連日投与で、4カ月間経過をみた。体重増加は3群で差はなく、全身への影響はなかった。フリップテストではいずれの群も孵化後10週ではほぼ不能となり、3群間に差は認めなかった。最も侵される浅胸筋に HE, NADH, APS, AchE, 酸フォスファターゼ, oil red O 染色を行い、酵素活性の差、壊死線維数、筋線維径を測定した。効果判定に重要な指標である壊死線維数は 100 mm² 当り無治療群で 43.24, 10 mg/kg 群 47.65, 50 mg/kg 群 46.40 本で壊死過程の阻止はみられず、ロイペプチンの腹腔内投与は前回の皮下投与と同じく筋ジストロフィー鶏に何らの効果も示さなかった。

- 2) Ca²⁺(イオノフォア(A 23187)による実験：ラットヒラメ筋、長趾伸筋を A 23187 で処理して実験的ミオパチーを作り、試験管内でのロイペプチンの効果をみた。

ロイペプチンは CPK の遊離は抑えないが蛋白質の遊離はヒラメ筋で 9.8%、長趾伸筋で 17.2% 抑えた。外液に遊離する α -アクチニン量はロイペプチンによって減少することが SDS 電気泳動により明らかとなった。電顕的にもロイペプチン加処理筋では Z 線が比較的よく保たれる傾向にあった。このことは Ca イオンによって活性化されるプロテアーゼの活性をロイペプチンが抑制し、Z 線から始まる筋崩壊をある程度阻止していることを表わしている。

9. 筋ジストロフィー症鶏の生産・供給

野村班員は筋ジストロフィー症治療薬開発研究班の班員に筋ジストロフィー鶏の卵を供給する目的で、種卵の生産を検討した。

前年度に引き続き、財団法人日本生物科学研究所(日生研)に委託し、筋ジストロフィー鶏 NH-413 系の雄 5, 雌 10, 計 15 羽、およびその対照として正常鶏 NH-412 系の雄 5, 雌 7, 計

12 羽を、それぞれ生産用コロニーとして維持し種卵の生産を実施している。本年度は約 2,000 個の種卵を生産した。前年度に比較し種卵の生産数が低下したが、この要因は生産コロニーの更新について全羽数を一度に行わず、一部の種鶏についてのみ行ったため、老齢鶏が残存していたことによるものであった。今後は、定期的にコロニーの更新を実施する予定である。

NH-412, 413 系を長期間飼育した結果判明したことを以下に略記する。

- 1) NH-412 系の雄の射精能力は、若い雄では NH-413 系の雄と同様に良好であるが、加齢に伴い筋ジストロフィー鶏の NH-413 系に比較して著しく低下する。
- 2) 痛風の発症個体は NH-412 系の雄に多発する。また雌では休産中に発症するものがほとんどで、産卵中に発症するものはないようである。ひとたび痛風を発症した個体は、射精能力、産卵能力ともに著しく低下し、回復するものはみられない。
- 3) 雌の産卵能力は、NH-412, 413 両系ともに産卵開始から1年を経過すると急激に低下する。

以上の結果から、今後は生産コロニーの定期的更新を予定し、種卵の生産・供給の増加を図る。

10. Duchenne muscular dystrophy 患児へのロイペプチン1回投与とその成績について

三吉野班員は臨床研究の第一歩として Duchenne muscular dystrophy (DMD) 患児に対するロイペプチン1回投与による血中濃度測定、および投与前後における臨床検査上の諸因子の変動ならびに副作用などについて検討した。

- 1) 対象および方法：DMD 患児7名と原因不明のミオパチー患児1名の計8名について、ロイペプチンを、Augsberger の式に従って投与量を算定し、空腹時1回経口投与を行い、投与前、投与後 30 分、60 分、240 分の4回

にわたり採血を行い、血中濃度の測定、CPK、血中ミオグロビンの変動、投与前後 24 時間目の一般検血、出血凝固時間、プロトロンビン時間の検査のほか、副作用として自覚症、発疹の有無、消化器症状等、また脈拍、体温、血圧等についてチェックした。

- 2) 結果および考案：血中濃度が CPK については、この報告までに結果がでていない。一般検血にては、赤血球数、白血球数は変化なかったが、血小板の減少がみられた。また出血凝固時間の延長がみられた。しかしこれらは 1 カ月後のものであり有意とは断定しがたい。プロトロンビン時間は正常であった。血中ミオグロビンは減少傾向がみられた。その他全身状態にはとくに変化を認めず、重篤な副作用はみられなかった。まだデータが十分にそろっておらず、また今回の検査 1 回のみであり、血中ミオグロビンの変化などもう一度再投与して見て同じような動きをするか今後検討してみたい。

11. ロイペプチンの種々筋萎縮性疾患に対する経口投与の効果—第 1 報 100 mg 1 回投与について

村上班員は臨床研究の第一歩として、種々の筋萎縮性疾患にロイペプチンを 1 回投与して、血漿中のロイペプチンの濃度を測定するとともに、種々の臨床検査を投与前後に測定し、かつ副作用の有無を検討した。

- 1) 対象および方法：対象は Limb-girdle dystrophy, Duchenne dystrophy, myotonic dystrophy, polymyositis, おのおの 1 例ずつ scapulo-peroneal type muscular atrophy および Charcot-Marie-Tooth 病のおのおの 1 例で計 7 例である。年齢は 15~56 歳までで、男性 5 例、女性 2 例である。ロイペプチンは 100 mg の 1 回経口投与方法で投与前および 24 時間後に種々の臨床検査を行った。また、血

漿ロイペプチンについては投与 30 分、1 時間、3 時間後に行った。

諸検査は、赤血球数、白血球数、血色素量、ヘマトクリット、プロトロンビン時間、総蛋白量、GOT, GPT, LDH, アルカリホスファターゼ、 γ -GTP, BUN, CPK, コレステロール尿蛋白、尿糖、尿ウロビリノーゲン、尿赤血球、尿白血球、上皮について測定した。筋力は manual muscle testing によった。自他覚的副作用についても検討した。

- 2) 成績および考案：一般血液検査に異常なく、プロトロンビン時間も著明な変化はみられなかった。血清総蛋白も正常範囲内にあり、肝機能検査では、GOT, GPT, LDH, アルカリホスファターゼなどに異常を認めず、尿素窒素、コレステロールも正常範囲内であった。 γ -GTP は正常範囲内で多少の変動がみられた。CPK は limb-girdle dystrophy, Duchenne dystrophy および scapulo peroneal atrophy の各 1 例に減少を示しており、polymyositis の 1 例では逆にやや増加を示していた。

これらの結果は症例が少なく、24 時間という短時間のため、にわかに結論づけることは困難である。筋力テストでは特別な変化はみられなかった。検尿については著変は認められず、また、認むべき副作用は現れなかった。血漿ロイペプチンについては、目下検討中である。

12. ロイペプチン投与の影響—ヒトおよび実験的筋再生に対する検討

木下班員は臨床研究の第一歩として、健康対照者ならびに進行性筋ジストロフィー症患者にロイペプチンを投与したときの影響を調べ、またラットにおける筋線維再生に対するロイペプチンの効果を検討した。

- 1) 健常対照者に対する影響：healthy volun-

teer 5例にロイペプチン 100 mg を早朝空腹時に1回投与し、その後の変化を観察した。体温、脈拍、血圧、臨床所見、肝機能、腎機能、血液学的検査、血清諸酵素などにつき投与 24 時間後までに何ら認むべき異常は出現しなかった。

- 2) 肢帯型筋ジストロフィー症に対する影響：肢帯型筋ジストロフィー症 1例に1回 50 mg を連日 1週間投与し、1)と同じ観察を行ったが、同様に明らかな変化はなかった。この間筋萎縮、脱力にも変化はなく、血清 CPK の異常値の改善もなかった。
- 3) 実験的筋再生に対する影響：ラット後肢三頭筋に機械的損傷を加え、その後の筋線維再生にロイペプチンがどのような影響を有するかを検討した。対照動物では受傷後 2週間ではほぼ再生が完了するのに対し、投与群には 2週間後筋線維直径の大小不同が目立ち、一部に小円形細胞の浸潤がみられた。これらの変化は 10 mg/kg/日群よりも 50 mg/kg/日群に著しかった。しかし再生が完了してから本剤の投与を開始した群では明らかな差異はなかった。このことから考えて、本剤は筋線維の損傷から修復の機転において何らかの作用を有すると判断したが、その機序については再生実験を反復して検討する必要があると判断した。

13. ロイペプチンの難病治療薬としての

開発研究

田中班員はロイペプチンの難病治療薬としての開発研究の基礎研究を行うとともに、各班員にロイペプチンを提供することを目的とし、ロイペプチンの 1) 原末試製、2) 吸収、排泄、分布および代謝、3) 製剤研究、4) 一般薬理作用、5) 毒性試験などを検討した。以下に要約を示す。

- 1) 原末試製：2 m³ 発酵タンク 2基分を 1ロットとし、3ロット試製して、3.18 kg の硫

酸ロイペプチンを得た。

- 2) 吸収、排泄、分布および代謝：ロイペプチンとトリプシンとの間の強固 ($K_a=8.2 \times 10^6 M^{-1}$) で選択的(代謝物と考えられるロイペプチン酸、アセチルロイシンなどとの交叉反応性は <0.05%) な可逆結合を利用した competitive binding radioassay を開発し、筋ジストロフィーマウスの経口、皮下投与、腹腔内投与における 15 分～8時間の血中濃度推移と、筋ジストロフィー鶏の経口、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与における 30 分～6時間の血中濃度推移を追跡した。

また、同法を用いて、ロイペプチンの健康志願者についての第 1 相試験(木下班員)における血中濃度推移の追跡を分担した。結果を次表に示すが、経口投与後の動態の目安である ACU (area under the curve) (ng·hr/ml) を投与量 (mg/kg) で除した量は健康志願者で 0.0885 hr, 筋ジストロフィーマウスで 0.143 hr, 筋ジストロフィー鶏で 0.0267 hr であり、比較的良い一致を示した。

本研究の標的器官である筋肉内のロイペプチン濃度を測ることは血中濃度を測ることよりも重要であるが、competitive binding radioassay より高感度の測定を要する。その目的のために radioimmunoassay 法をロイペプチンの 2種の誘導体をハプテンとして開発した。2種のハプテンに対応する抗血清はともにロイペプチンよりもロイペプチノールに対して、より強い親和性を示し、ハプテン A で $1.21 \times 10^8 M^{-1}$ 、ハプテン B で $1.03 \times 10^8 M^{-1}$ であった。ハプテン A に対応する抗血清 A を用いて radioimmunoassay により正常および筋ジストロフィーのマウスにロイペプチンを皮下投与したときの筋肉、血漿、肝、肝ライソゾーム中の濃度推移を表示する。

筋肉内濃度は血漿内濃度より低い、より持続的である。

Bioavailability of leupeptin in mouse and chicken

Animal	Route of administration	Dose (mg/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$)	Maximum conc. of leupeptin $\mu\text{g}/\text{ml}$ (hr)
Mouse	p. o.	33	1.6	4.3(0.26)	1.6 (0.5)
	s. c.	30	0.3(α)	16.8(1.00)	14.7 (0.25)
	i. p.	30	2.6(β)	10.9(0.65)	12.8 (0.5)
			0.2(α)		
Chicken	p. o.	30	1.7(β)	0.8	0.23(2.0)
			1.2		
	s. c.	10	2.0	6.7(1.00)	3.13(0.5)
	i. p.	10	0.2(α)	3.4(0.51)	2.44(0.5)
			2.3(β)		
i. m.	10	0.7	1.4(0.21)	1.05(0.5)	

Serum concentrations of leupeptin after oral administration of single dose (100mg) in five volunteers

Volunteer	Age	Body weight (kg)	Leupeptin (ng/ml)							AUC [0~4hr] (ng·hr/ml)
			0.25	0.5	1	2	4	8	12 (hr)	
A	47	66	63.7	40.4	32.8	43.3	N. D. *	20.3	N. D. *	128.1
B	41	60	56.0	61.0	82.5	45.3	37.5	25.5	16.5	204.2
C	57	54	N. D. *	58.3	64.0	26.5	22.0	19.2	N. D. *	133.5
D	39	59	61.0	81.5	24.2	37.5	N. D. *	N. D. *	N. D. *	127.7
E	42	66	52.5	42.2	38.0	**	18.6	N. D. *	N. D. *	133.4
\bar{X}			48.1	56.7	48.3	38.2	18.6	16.0	9.3	145.4
S. D.			23.1	16.7	24.2	8.4	12.4	8.1	4.0	33.0

* N. D. = less than 15 ng/ml (minimal detectable concentration).

** not measured because of hemolysis.

筋ジストロフィー鶏の ^{14}C -ロイペプチンによるラジオオートグラフィーを行った。最高血中に近い時点（腹腔内投与、皮下投与では30分、経口では2時間）と腹腔内投与では6時間を採ったが、いずれにおいても筋肉での放射能は弱かった。

同じ鶏から採取した標本についてのエタノール除蛋白上清をロイペプチンとみなしての濃度推移を下表に示す。筋肉内濃度は0.57~0.68 $\mu\text{g}/\text{g}$ であり、血漿内濃度より低いが、持続的である。

筋ジストロフィーマウスの全身凍結切片を ^{14}C -ロイペプチン水溶液に浸漬し水洗乾燥した後ラジオオートグラムをとると、脳、筋肉、腸管、軟骨に最も高濃度に吸着していた。

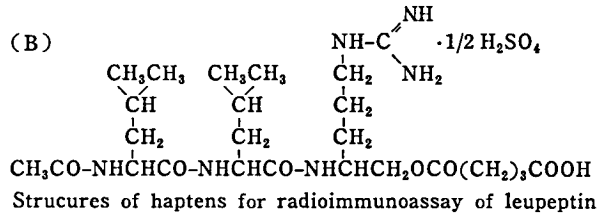
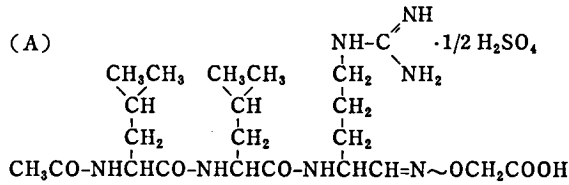
前述した筋肉内濃度の持続性と総合して、ロイペプチンの筋肉への親和性が結論される。

3) 製剤研究：原末の光安定性は実用上の問題とならない。鶏用飼料に用いる10%含量の安定な果粒を試製した。

経口または舌下投与用果粒剤、直腸坐剤、軟膏、汎用粉剤のそれぞれ安定なものを得て、予備試験的にイスに投与した。

血漿中濃度のACUでは、静注<経口、舌下、直腸>経皮の順の生物学的利用率であったが、標的器官である筋肉内濃度の多時点測定技術を開発した後、正式に投与経路の選択資料を採る。

4) 一般薬理作用：ガラミン不動化ネコの脳波に対して、ロイペプチン10mg/kg/分で10



Tissue concentrations of leupeptin in mice after subcutaneous administration of leupeptin (30 mg/kg)

	Concentration of leupeptin ($\mu\text{g/g}$ or ml)											
	Muscle			Plasma			Liver			Liver lysosome		
	0.5	2.0	6.0	0.5	2.0	6.0	0.5	2.0	6.0	0.5	2.0	6.0 (hr)
Muscular dystrophy	6.52	1.97	0.42	38.32	3.42	0.23	11.97	7.78	5.37	3.18	2.66	0.51
Normal	3.15	2.35	0.52	16.39	1.93	0.23	26.01	8.45	2.07	8.67	3.43	2.23

分間の静注は作用を示さなかった。心電図に対しては波型に変化はきたさなかったが RR, QT, PR 間隔の延長すなわち心拍数低下が認められた。血圧に対しては著明な低下作用を示し、それは 3 mg/kg/分でも認められた。

ウレタン麻酔ネコ脊髄反射電位に対して、10 mg/kg の静注は作用を示さなかった。

無麻酔イヌの血圧および心拍数に対して、100 mg/kg の経口投与は経度の低下および減少作用を示した。

以上の結果から静注の最大無作用量は、脳波および心電図により判断すると 10 mg/kg 以上である。また、経口最大無作用量はイヌの血圧に対して 50~100 mg/kg と結論できる。第 1 報で述べたように、ロイペプチンによる降圧あるいは徐脈はその節遮断作用に基づくものと思われる。

5) 毒性試験

5-1) イヌ経口投与における 亜急性毒性 (35 日): 300 mg/kg(雌 2), 200 mg/kg, 100 mg/

kg (以上雄 3, 雌 4), 20 mg/kg, 対照 (以上雄 2, 雌 4) で 11~15 カ月齢のビーグル犬を用いて検討した。なお、雄 200 mg/kg, 100 mg/kg, 雌 200 mg/kg, 100 mg/kg, 20 mg/kg, 対照の各群から 1 頭ずつを投与終了後 35 日間休薬させた。

100 mg/kg 以上の群で用量依存的な頻度で出現した全身の脱力、眼瞼下垂、瞳孔散大、体表部の発赤・浮腫および重症例で出現した呼吸抑制 (300 mg/kg 群はすべて毎回呼吸抑制を起し 5, 7 日目の投与後に死亡した。) およびその後の反応が 1~1.5 時間で回復することから、ロイペプチンは自律神経系および呼吸中枢に対する一過性の薬理作用を有していると思われる。

血液学的には血液凝固およびプロトロンビン時間の軽度の延長傾向が認められた。

病理組織検査では肝細胞の軽度の水腫様膨化と肝細胞内の好酸性微細顆粒出現とを認められたが、血液生化学検査で認められた ALP,

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）の開発研究

Leupeptin levels in chick muscles

Route and dose of administration	Time (hr)	Leupeptin ($\mu\text{g/g}$ muscle)					
		Plasma		Femoral biceps		Superficial pectoralis	
		sup	ppt	sup	ppt	sup	ppt
i. p. (10 mg/kg)	0.5	1.38	0.28	0.57	0.22	0.57	0.25
	6.0	0.54	2.81	0.68	1.10	0.64	1.34
s. c. (10 mg/kg)	0.5	2.18	0.47	0.67	0.45	0.64	1.02
p. o. (10 mg/kg)	2.0	0.55	1.24	0.66	1.03	0.63	1.17

Pharmacokinetic parameters obtained for several routes of leupeptin administrated in dogs

Route of administration	Dose (mg/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	K_d	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$)	Maximum conc. of leupeptin $\mu\text{g/ml}$ (hr)
Intra-venous	10	0.25(α)	2.67(α)	15.31(100.0)	21.05(0.2)
		1.37(β)	0.52(β)		
Per ca	10	1.38	0.53	2.76(18.7)	1.15(0.5)
Sublingual	10	1.29	0.64	3.09(20.2)	0.82(2.0)
Intra-rectal	10	1.40	0.55	3.96(25.9)	1.18(0.5)
Per cutaneous	10	—	—	0.56(3.6)	0.03(8.0)

K_d : 排泄速度定数.

GPT, GOT の上昇を説明するに足るものではなかった。腎の近位尿管上皮細胞内に微細な硝子滴を認めたが、血液生化学検査および尿検査では腎障害を示す所見はなかった。

イヌの急性毒性で骨髄の造血機能減退を示唆する所見があったが、本試験では血液学的にも組織学的にも対応する所見を認めなかった。

最大無作用量は 20 mg/kg と推定された。

5-2) ラット経口投与における慢性毒性 (6 カ月): 5 週齢の Sprague Dawley 系雌雄ラットで 400, 200, 100 および 50 mg/kg の連日投与を行った。なお、1 群 24 匹とし半数は 1 カ月間回復試験を行った。

200 mg/kg 以上の群で用量依存的に出現した死亡例は、亜急性毒性試験におけると同様にいずれも胃粘膜のピランおよび空・回腸管壁の潰瘍、穿孔、癒着を示し、腹水を伴う腹膜炎を呈し、ロイペプチンの胃腸管に対する直接の局所作用を推察させた。なお、この消

化管障害は個体差が大きく、生存例ではまったく異常所見のない例が多かった。

血液学的検査においては 200 mg/kg 以上群で貧血傾向がみられ、100 mg/kg 以上群で白血球の増加傾向がみられたが、対応する骨髄および脾臓の組織学的所見には著変はみられなかった。本傾向は消化管障害に由来するものと推察した。血液学的には変化を認めなかった。

血液生化学的には雌雄で総蛋白、アルブミン値の用量依存的な減少が認められ、雄では 50 mg/kg から LDH, GPT, GOT の上昇と雌では 200 mg/kg から逆に GPT, GOT の低下傾向がみられた。

病理組織学的検査では肝細胞の腫大と好塩基性顆粒の減少がみられ、とくに雌で肝細胞内の硝子滴の沈着、肝細胞の壊死および肝重量の増加がみられた。腎重量の増加、近位尿管上皮細胞内に硝子滴を認めたが、血液生化学検査および尿検査では腎障害を示す所見

はなかった。脾重量は用量依存的に増加し、腺房細胞の腫大と分泌顆粒の増加がみられた。無作用量は 50 mg/kg 以下と推定された。

5-3) イヌ静脈内投与における急性毒性：10～12 カ齢の雌雄ビーグル犬を用い、141, 100, 71 および 50 mg/kg に相当する量のロイペプチンを 1 頭当り 10 ml の投与容量となるよう生理食塩水に溶かし滅菌し、25 ml/分の注入速度で投与した。

投与後 14 日間観察したが、死亡は 10 分以内に生じ、LD₅₀ 値は 100 と 141 mg/kg の間にあった。死因は呼吸障害により、経口投与の場合に比し呼吸抑制は急激に起るが持続は短かかった。毒性標的臓器である骨髓、腎、肝の障害は軽く、消化管には障害は認められなかった。

血液学的には血小板数の減少、活性化部分

トロンボプラスチン時間 (APTT)・全血凝固時間 (WBCT) の延長が著明であったが、一過性であった。

5-4) イヌ静脈内投与における亜急性毒性 (35 日)：雌雄ビーグル犬を用いて、20, 8, 3.2 mg/kg で行った。

20 mg/kg 群では投薬 1～3 日間、投与後直ちに自発運動の低下とともに筋の脱力を起し、流涙、耳介発赤、結膜充血がみられたが 20 分後には回復した。8 mg/kg 群でもさらに軽度の症状がみられた。

血液学的試験では 20 mg/kg 群で血液凝固試験に軽度の延長がみられた。

組織学的には 20 mg/kg 群の腎の近位尿細管上皮細胞内に硝子滴がみられ、一部の例では肺胞上皮の腫大と空胞化がみられた。最大無作用量は 3.2 mg/kg と推定された。

分 担 研 究 報 告

ロイペプチンのプロテアーゼ阻害作用に関する研究

村 地 孝*

研究目的

ニワトリ骨格筋の Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ (CANP) がロイペプチンによって強く阻害されることはよく知られている。われわれは、ラット肝臓、脳、腎臓、脾臓、赤血球、胸腺などに広く分布する同種のプロテアーゼが、その Ca^{2+} 要求性および SH 還元剤要求性において、CANP と著しく類似していることを知り、これらに対する放線菌由来の一群のプロテアーゼ阻害剤の効果を検討したところ、とくにロイペプチンによって強い阻害を受けることを見いだした。

そこで、骨格筋の CANP に関する進んだ知見と平行して、上記の全身組織細胞に広く分布している Ca^{2+} 依存性チオールプロテアーゼ (以下カルパイン calpain と総称する) につき (その精製と性質の研究を系統的に展開することとした。とくに、肝臓および脳について、カルパインを特異的に阻害する細胞内インヒビター蛋白質の存在を発見したので、これをカルパスタチン (calpastatin) と名づけ、その精製と性質についても研究を行うこととした。

これらの研究を通じて、ロイペプチンのプロテアーゼ阻害作用の一般的分子機構を解明するとともに、その生理的病的意義を明らかにすることが本研究の目的である。

研究方法

主として Wistar 系ラット (体重 120~180 g) を用いた。臓器のカルパインおよびカルパスタチン活性の測定にあたっては、臓器の血液含量を最少にするよう灌流、洗浄につとめた。これは、血液 (赤血球) 中にカルパインおよびカルパスタチンが存在するので、それらの混入を極力さげなければならないからである。摘出した臓器または組織は、冷所で 4 倍量のつぎの組成の液でホモジナイズし、その 105,000 g 遠心上清を酵素 (およびインヒビター) 液とした。用いた緩衝液は、20 mM トリス塩酸 (pH 7.5), 0.25 M 蔗糖, 1 mM EGTA, 5 mM 2-メルカプトエタノールを含む液である。

プロテアーゼ活性は、50 mM トリス塩酸緩衝液を用いたカゼイン加水分解により定量した。通常、pH 7.5, 30°C で 30 分間温置によるトリクロル酢酸可溶性ペプチド等の増量を Folin-Lowry 法により、750 nm の吸光度増加として計測した。のちに述べるように、カルパインには、I 型と II 型の 2 種があるので、I 型の定量には 0.1 mM CaCl_2 を、II 型の定量には 5 mM CaCl_2 を活性化剤として加えた。いずれの場合も 5 mM L-システインを共存させた。プロテアーゼの 1 単位は 750 nm の吸光度 1.0 の増加を 30 分間で与えるべき酵素量と定義した。

プロテアーゼインヒビターの作用をみるためには、インヒビターをあらかじめプロテアーゼと

* 京都大学医学部附属病院検査部

pH 7.5, 30°C で 10 分間接触させたのちに、反応混液のカゼイン加水分解活性を測定し、活性の低下度を計測する方法を用いた。1 単位のカルパインを失活させるインヒビター活性を 1 単位とした。

研究結果

1) 内因性インヒビター、カルパスタチンの存在

ラット肝臓ホモジネートの 105,000 g 遠心上清そのものにつきカルパイン活性を測定したところ、Ca²⁺ および システインの十分量を添加してもまったく活性を検出することができなかった。ところが、この上清を pH 7.5 で DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーに供したところ、**図 1** に示すように、カルパイン活性が 0.25 M NaCl 溶出画分に明瞭に出現した。そこでこの活性画分を集め、透析処理ののち、この酵素活性に

対する阻害作用をもった分画の有無を検討したところ、**図 1** に示すとおり、0.1 M NaCl 溶出画分に強い阻害活性のあることが知られた。このようにして、肝臓可溶性画分から、カルパインとカルパスタチンが分別されたのである。

カルパスタチンは見かけの分子サイズが巨大(おそらく 200,000 以上)であることが知られたので、分子量約 90,000 のカルパインとはゲル濾過法によって、もっと簡単に分別されうるのであろうことが期待された。その期待通りの実験結果の得られたことが**図 2** に示してある。図の上段はラット肝臓の、下段はラット脳の実験結果である。いずれの実験においても、セファデックス G-200 ゲル濾過の各画分に、あらかじめ一定量の部分精製カルパインを加えておき、混液のカゼイン加水分解活性をみたもので、あらかじめ加えたカルパイン活性による基準値を超えて高いプロテアーゼ

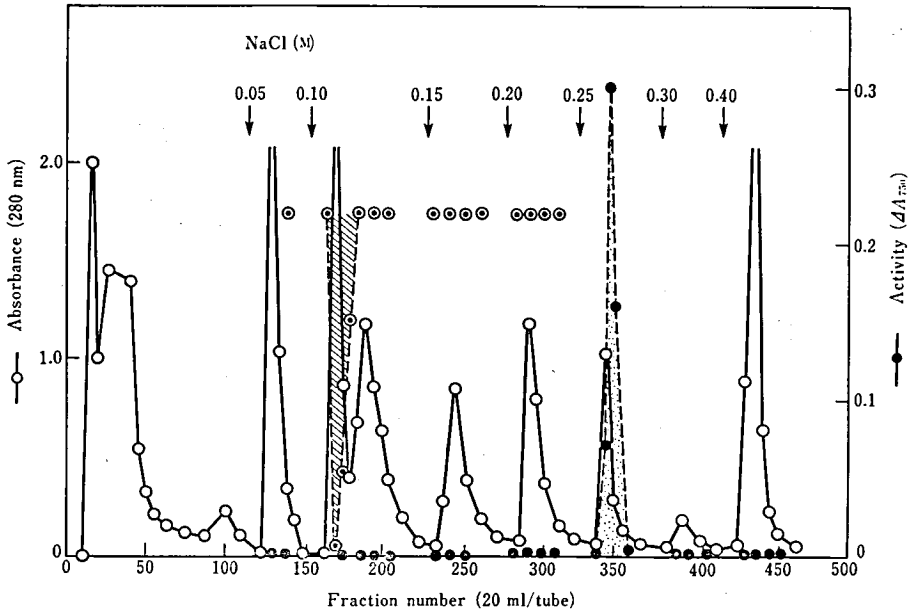


図 1 Resolution of calpain and calpastatin upon DEAE-cellulose chromatography at pH 7.5. The soluble fraction from 200g (wet weight) of rat liver was applied to a DEAE-cellulose column (5×20 cm) which had been equilibrated with 20mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 1mM EGTA and 5mM 2-mercaptoethanol. The adsorbed proteins were eluted by stepwise gradient of NaCl, as indicated by arrows in the figure. A 0.5-ml aliquot of each fraction was assayed for the proteolytic (●) or inhibitory (○) activity, as described in the text. Those fractions that are shaded were pooled for further purification.

