

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57年度研究報告書

昭和58年3月

研究報告書の作成にあたって

「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬（ロイペプチン）の開発研究」が、昭和54年度に厚生省薬務局より新薬開発研究としてとりあげられ、私が班長として本研究班が発足して第4年度を迎えた。

第4年度は前年度に引き続き、ロイペプチン、ベスタチンおよびフォルフェニシノールの活発な基礎研究を行うとともに、臨床研究の充実を図り、新たに里吉班員を迎えた。

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、ベスタチンならびにフォルフェニシノールの生化学的、薬理的、生理学的、病理学的研究ならびにモデル動物に対する効果などの広範囲な基礎的研究に注目すべき成果が得られ、また臨床研究を対象とした薬効評価を決めるうに、各臨床研究者の努力により大きな進展が得られた。難病治療薬開発という使命を担った本班は各班員の努力により、筋ジストロフィー症の治療薬開発に確実な前進を遂げている。

本研究班の4年間に亘る輝かしい成果を基にして、さらに研究を続けることは、筋ジストロフィー症の解決に大きな光を与えるものと信ずる。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58年3月

班長 梅 沢 浜 夫

目 次

研究報告書の作成にあたって 梅 沢 浜 夫 i

総 括 研 究 報 告

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

分 担 研 究 報 告

ロイペプチンのプロテアーゼ阻害作用に関する研究 15
村 地 孝

高速液体クロマトグラフィーによるベスタチンの微量蛍光定量 21
大 倉 洋 甫

アレルギー性脳炎の治療に関する実験的研究 27
岩 崎 祐 三

ロイペプチンの薬理学的研究 33
大 塚 正 徳

ロイペプチンの脱髄病変および培養筋への作用について 43
米 沢 猛

筋ジストロフィー症マウスに対するホルフェニシノール投与の影響 51
松 下 宏

ロイペプチンによる実験的治療	59
高木昭夫	
塩酸プロピバカイン（マーカイン）処理による筋崩壊と筋再生に対する ロイペプチンの影響	63
埜中征哉	
筋ジストロフィー動物の生産・供給	71
野村達次	
DMD に対するベスタチン投与効果	73
三吉野産治	
筋萎縮症患者に対するロイペプチン，ベスタチン効果	79
村上慶郎	
ベスタチン，ロイペプチンの筋疾患に対する効果	83
木下真男	
Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症患者に対するロイペプチン， ベスタチンの影響	93
祖父江逸郎	
各種筋疾患に対するベスタチン（NK 421）投与後の経過報告	101
里吉栄二郎	
ロイペプチンの難病治療薬としての開発研究	107
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） 開発研究班分担研究者一覧	119

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

本研究班は微生物の二次代謝産物に由来する筋ジストロフィー治療薬を開発することを目的として昭和54年に始まり、現在に至っている。本研究班の発足以前に、ニワトリの筋ジストロフィー症の筋肉で Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ (CANP) 活性の昂進が報告され、また Stracher 教授 (New York State University) らは、ロイペプチンが筋ジストロフィーニワトリおよびマウスに有効であることを見いだしていた。それゆえ、まずロイペプチンの筋ジストロフィー症への効果を調べることを第一の目的として本研究が開始された。

上記の知見を基にして、ロイペプチンをヒトに投与するための毒性が詳しく研究された。

一方、CANP 以外のプロテアーゼ、例えばアミノペプチダーゼなどが筋ジストロフィーマウス筋肉および初期の患者血清中で高い活性を示すことが認められた。これらの酵素はヒト、動物細胞の表面に存在する。さらに、これらの酵素を阻害するベスタチンは本研究班の発足以前に放線菌培養液中に発見され、それは動物細胞表面に結合し、癌患者で低下している免疫を増強し、癌治療のための臨床研究が行われていた。筋ジストロフィーの発現に細胞膜の異常が関与するという考えもあり、また上述のようにアミノペプチダーゼがジストロフィー筋で上昇している。このベスタチンの筋ジストロフィーマウスに対する効果が調べられ、

生後2週間後からの投与で50%以上にジストロフィー症状の発現を阻止することが認められた。また、細胞表面にはアミノペプチダーゼの他に、アルカリフォスファターゼなどが存在し、後者の阻害物質として放線菌培養液中からフォルフェニシンを発見していたが、その誘導体であるフォルフェニシノールは、酵素の阻害活性はきわめて弱いが細胞表面に結合するので、フォルフェニシノールの筋ジストロフィーマウスに対する効果が調べられ、ベスタチンと同様に著効を呈することが認められた。

かくして、ロイペプチン以外にベスタチンの臨床研究が行なわれることとなり、フォルフェニシノールの臨床研究も計画されるようになった。また、臨床研究者として里吉班員の参加を求め、本研究班の充実を図った。

本年度は、ロイペプチン、ベスタチン、フォルフェニシノールの生化学的研究、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らびに臨床研究を対象とした薬効評価の基準の検討が行われた。各分担研究者により施行された研究は次の通りである。

- 1) 村地 孝 (京都大学医学部)：—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)：—高速液体クロマトグラフィーによるベスタチンの微量蛍光定量

3) 岩崎祐三 (東北大学医学部):—アレルギー性脳炎の治療に関する実験的研究

4) 大塚正徳 (東京医科歯科大学医学部):—ロイペプチンの薬理学的研究

5) 米沢 猛 (京都脳神経研究所):—ロイペプチンの脱髄病変および培養ジストロフィー筋への作用について

6) 松下 宏 (和歌山県立医科大学):—筋ジストロフィー症マウスに対するフォルフェニシノール投与の影響

7) 高木昭夫 (国立武蔵療養所神経センター):—ロイペプチンによる実験的治療

A 脱神経筋萎縮に対する効果

B *In vitro* 筋機能に対する影響

8) 埜中征哉 (国立武蔵療養所神経センター):—塩酸ブピバカイン(マーカイン)処理による筋崩壊と筋再生に対するロイペプチンの影響

9) 野村達次 (実験動物中央研究所):—筋ジストロフィー動物の生産・供給

10) 三吉野産治 (国立療養所西別府病院):—Duchenne 型筋ジストロフィー症に対するベスタチンの投与効果

11) 村上慶郎 (国立療養所箱根病院):—筋萎縮症に対するロイペプチン, ベスタチンの効果

12) 木下真男 (東邦大学医学部):—A 実験的除神経筋に対するベスタチン投与の影響. B 神経筋疾患に対するベスタチン, ロイペプチンの臨床効果. C ベスタチン, ロイペプチンの臨床効果および臨床5施設での集計

13) 祖父江逸郎 (名古屋大学医学部):—Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症患者に対するロイペプチン, ベスタチンの影響

14) 里吉栄二郎 (国立武蔵療養所神経センター):—各種疾患に対するベスタチン投与後の経過報告

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

次に上記各班員の報告について要約する。

1. ロイペプチンのプロテアーゼ阻害作用に関する研究

村地班員は Ca^{2+} 依存性チオールプロテイナーゼに対するロイペプチンの阻害作用を検討する目的で, 各種臓器内のカルパインおよびカルバスタチンの分別定量法の研究を行った。

ロイペプチン感受性の Ca^{2+} 依存性システインプロテイナーゼは, 骨格筋の CANP はじめ, 動物諸臓器細胞に広く分布して、カルパイン [EC 3. 4. 22. 17] と総称される。また, カルパインに対する特異的内因性インヒビター蛋白質も同様に広く分布して、われわれはこれをカルバスタチンと総称している。一方, カルパインにはその完全活性化に 1 mm 以上の Ca^{2+} を要求する II 型と, 0.1 mm Ca^{2+} で十分な I 型とが存在する。われわれは, カルパイン群に属するプロテアーゼに共通なロイペプチンによる阻害の機構を, これまた共通なカルバスタチンによる阻害様式と対比して研究する目的で, まず従来完成していなかったヒト赤血球からのカルバスタチンの精製を試み, これに成功した。

400 ml のヒト血液の溶血上清を 2 回の DEAE-セルロース, ultorogel AcA, Sephacryl S-200 クロマトグラフィーおよび熱処理を組み合わせた方法で逐次分画し, 約 10,000 倍の精製度で 0.38 mg の均一蛋白質であるカルバスタチンを取得した。精製カルバスタチンは等電点 4.55 の酸性単純蛋白質で, その単量体の分子量は 70,000 と算定された。きわめて集合しやすい性質を有し, 通常は四量体の形 (280 kDa) で存在する。100°C, 15 分間の熱処理でもその阻害活性を失わず, また, カルパインの阻害は反応系からの Ca^{2+} 奪取に起因するものではない。アミノ酸分析の結果によれば, ヒト赤血球カルバスタチンは芳香族アミノ酸に乏しく, グルタミン酸およびプロリンに富

む点で先に発表されたニワトリ骨格筋カルパスタチン (68 kDa) に類似してはいるが、両者は明らかに異なる分子である。カルパイン/カルパスタチン/ロイペプチン三者間の相互作用はまだ検討を終えていない。

2. 高速液体クロマトグラフィーによるベスタチンの微量蛍光定量

大倉班員はベスタ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、高感度定量法の開発研究を行った。

ベスタチンとそのヒトにおける主代謝物 *p*-ヒドロキシベスタチンは、アルカリ性で過ヨウ素酸酸化され、それぞれフェニルアセトアルデヒド、*p*-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドとなる。これらを新規蛍光試薬 4,5-ジメトキシン-1,2-ジアミノベンゼン・モノ塩酸塩 (DDB·HCl) で蛍光ラベル化し、HPLC に付すことにより定量可能なことを見いだした。

測定法の概要は次の通りである。ベスタチンおよび *p*-ヒドロキシベスタチン溶液 100 μ l に 1.5 M NH₄OH と 0.6 mg/ml NaLO₄ を加え、定温で 20 分間放置後 1.5 mg/ml Na₂SO₃ で過剰の NaLO₄ を分解する。DDB·HCl 溶液を加え 37°C で 50 分間加温する。1.0 M NaOH で反応を停止し、その 100 μ l を HPLC に付す。血清は、その 50 μ l に水またはベスタチン標準液と 4.2 mM 酢酸を加え 100°C、5 分間加熱後遠心して除蛋白し、上清 100 μ l を試料とする。HPLC は、カラムに Lichrosorb RP-18、溶離液にアセトニトリル-0.1 M トリス緩衝液 (pH 8.7) を用い、蛍光検出 (励起 320 nm, 発光 390 nm) によって行う。

標準液を用いた場合、ベスタチンおよび *p*-ヒドロキシベスタチンを 12 分以内に分離検出できた。両物質の検出限度は、HPLC 注入量 100 μ l とともに 5 pg 以下であった。これをヒト血清中のベスタチンおよび *p*-ヒドロキシベスタチンの

定量に応用した。血清中 0.32 nmol/ml (100 ng/ml) 以上のベスタチンが再現性よく測定しえた。血清中の *p*-ヒドロキシベスタチンは極めて低濃度であるため、現在のところ測定不能である。本法により、三吉野産治班員より提供されたベスタチン投与患者の血中濃度を測定し良好な結果を得た。本法はヒト血液中ベスタチンの微量定量が可能で、動物体内における動態の検索に適用できる。

3. アレルギー性脳炎の治療に関する実験的研究

岩崎班員はロイペプチンの炎症性脱髄疾患に関する基礎的研究を行った。

Cammer らの炎症性脱髄性疾患における髄鞘の破壊が、中性プロテアーゼによるミエリン塩基性蛋白の破壊によることを示唆する報告、永井らによる実験的アレルギー性脳炎のロイペプチンによる治療成績、われわれが昨年報告したロイペプチンによるウサギ視神経の破壊阻止などの成績をふまえ、ロイペプチンの中樞神経の炎症性脱髄疾患への適応に関する基礎的実験を行った。

まず、高濃度のロイペプチンの神経毒性を調べる目的で 10 mg/ml または 1 mg/ml の濃度のロイペプチンを 50 μ g/hr, 14 日間、各群 5 匹の成熟ラットの脳内皮下に埋込み浸透圧ポンプを用いて連続注入した。臨床的に異常を認めなかったのみならず、全例において組織学的検索でも全く異常を認めなかった。

次いで、脳血液関門を通過しないロイペプチンを脳実質組織に移行させる方法として、高張マニトールの頸動脈内注入による脳血液関門の可逆的破壊実験を行った。エバンスブルー標識アルブミンは最初、脳内の血管にのみ局限していたが、術後 12-14 時にはマニトール注入側の大脳皮質、脳幹の神経細胞にエバンスブルーの蛍光が陽性となった。

さらにウイルス感染後脳症のモデルとしてセン

ダイウイルス (HVJ) 脳内接種マウスにみられる炎症, 変性病変に対する効果をみた. 非投与例 6 匹全例に病変が出現したのに対し, ロイペプチン 2mg を連日腹腔内に投与した群では病変の発現は 6 匹中 3 匹に減少していた.

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およびベスタチンの血圧, 呼吸, 血管平滑筋, ならびに摘出脊髄などに対する作用を検討した.

1) ウサギの血圧, 呼吸, 心電図に対するロイペプチンの効果: ウレタン麻酔下にウサギの大腸動脈から血圧を記録した. ロイペプチン 5-10 mg/kg を静脈内に与えると血圧は一過性に下降したが, 呼吸数および心電図に変化はみられなかった. 血圧下降の機序としては先に報告した神経節遮断作用が考えられる.

2) 血管平滑筋に対する作用: モルモットの胸部下行大動脈を摘出し, らせん状に切って作った条片をマグヌス管内に懸垂し, 張力を記録した. ロイペプチンまたはベスタチンを 2-200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で適用したが, 張力の変化は起らなかった. しかし, ベスタチンはノルアドレナリン (0.3-2 μM) の血管平滑筋収縮作用を増強した.

3) 幼若ラット摘出脊髄に対する作用:

a) 下行性抑制: 高位同側側索の条件刺激によって単シナプス反射および後根電位は抑制を受けたが, この抑制に対してロイペプチン 100 $\mu\text{g/ml}$ は顕著な影響を与えなかった.

b) 侵害刺激による反射電位: 半截脊髄を坐骨神経, 腰部および下肢が繋がったままとりだし, 前根から電位を記録した. 皮膚に機械的侵害刺激を加えると, L_4-5 の前根から遅い時間経過の脱分極性反射電位が記録された. この反射電位はエンケファリンにより抑制され, この抑制をロイペプチンおよびベスタチン 200 μM は著しく増強した.

c) ペプチド作動性シナプス伝達を含む反射電

位: 後根に単一刺激を加えると反射側前根から遅い時間経過の反射電位が記録され, この反射電位発生にはペプチドが関与していると思われる. この電位はエンケファリンにより抑制され, この抑制をロイペプチンは軽度に, ベスタチンは著しく増強した.

d) ロイペプチンはアセチルコリンの脱分極作用に顕著な拮抗作用を示した.

5. ロイペプチンの脱髄病変および培養ジストロフィー筋への作用について

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.

I. 脱髄病変に及ぼすロイペプチンの影響

脱髄疾患の特徴的病変である脱髄は免疫学的背景による食細胞の賦活化を来し, 髄鞘を特異的に破壊する変化である. 脱髄病巣でプロテアーゼ活性の上昇することから, この食細胞での活性を抑制することにより病巣の進展を阻止しようという作業仮説が一部でなされている現状である. このことを検討するため脱髄に関与する因子, 抗体・感作リンパ球・リンフォカインのおのおのによる神経組織培養での脱髄病変にロイペプチンがいかに関与するかを調べた. 被検材料はヒトの MS, ADAM, サルやウサギの EAE より得たものである. いずれの場合も, ロ剤前処置を行った培養でも, 非処理培養でも, 異なるところはなく, 脱髄の進行がみられた.

プロテアーゼ活性が食細胞で上昇するにせよ, 脱髄に関係する最初の変化は同細胞が髄鞘の層状構造を解離することであり, 髄鞘の脆弱性と相俟って脱髄が起ると考えられる. したがって, プロテアーゼ活性が作用するよりも前に脱髄という現象が起っているわけである.

II. 家鶏ジストロフィー筋および健康筋へのロイペプチンの影響

筋ジストロフィー家鶏 (California Davis 413) およびその対照動物 (同 412) の胚 (10-13 日) の浅胸筋の培養を用いてロ剤の影響を調べた。ロ剤は幼若培養細胞に対しきわめて毒性が強く、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて 24 時間内に中毒性顆粒の出現をみる。いったん病変を生じたものもロ剤投与を中止すると回復してくるが、筋線維の発育成長の遅延が残る。また筋原線維の発育も悪い。しかし比較的侵襲の少ない筋線維でもジストロフィー病変の出現がみられる。このことによりロ剤によりプロテアーゼ抑制が生じてジストロフィー病変の出現を阻止しえないものと思われる。

6. 筋ジストロフィー症マウスに対するフォルフェニシノール投与の影響

松下班員は筋ジストロフィー症マウスに対するベスタチンの疾病回復効果の作用機序を追求する手段の一つとして、フォルフェニシノールをベスタチンと同様な条件で連続投与する実験を行った。

まず約 1 カ月齢ですでに症状がある程度進行している疾病マウスを用いて、1 週間、2 週間および 6 週間の連続投与を行い、血清中ならびに骨格筋中のマーカー酵素の活性変化を調べた結果、PK および CPK 酵素の活性は血清中で減少し、骨格筋中で増加するという典型的な回復変化を示し、筋線維での膜機能がフォルフェニシノール投与によって改善の方向に向かっていることが示唆された。萎縮骨格筋におけるミトコンドリア分画中の GOT, GPT 活性の著しい低下および可溶性分画中の活性増加傾向がフォルフェニシノール投与によって、いずれも正常方向に改善されていることが認められた。しかし一方、投与期間中の体重増加は食塩水投与群と全く同じ変化を示し、臨床症状にも目立った改善の徴候はみられなかった。そこで発症後できるだけ早い時期に投与を開始するようにしたところ、投与マウスの約 2/3 に著しい体重増加および筋ジストロフィー症状の消失が

認められた。しかし、そのうち、2 カ月以降徐々に後肢の固直状態を発現する個体が現れ、4 カ月齢で完全に正常状態を維持しているマウスは投与マウス全体の約 1/3 程度であった。これらの個体では、臨床症状は全く消失し、筋の耐久力も正常と変わらないほど、増強されていた。また、このような完全回復個体が得られる頻度は投与開始時期と相関性があり、生後 20 日までにフォルフェニシノールの投与を開始すると約 50% の個体に、生後 30 日までに開始すると約 30% の個体に完全回復が得られた。しかし、1 カ月齢を経過してから連続投与を開始しても、もはや回復個体は得られなかった。これらの結果から immunomodulator を連続投与することによってマウスの筋ジストロフィー症の症状進行を抑制できる可能性が明らかになった。

7. ロイペプチンによる実験的治療

A 脱神経萎縮に対する効果

B *In vitro* 筋機能に対する影響

高木班員は昨年度、ロイペプチンが脱神経後の筋萎縮にわずかではあるが有意な抑制効果のあることを認めた。本年度は例数を増やして、さらに検討を行った。

哺乳類の骨格筋を *in vitro* で反復収縮させると短時間で劣化現象が生ずる。この理由はまだ十分に理解されていないようだ。この経時的劣化に対するロイペプチン、ベスタチンおよびペプスタチンの影響を検討した。

方法：一側坐骨神経を切断したラットにミニ浸透圧ポンプを使用してロイペプチン (30 mg/kg/日) を投与した。7 日目に前脛骨筋 (TA) 長趾伸筋 (EDL) とひらめ筋 (SOL) をとり出して各種分析を行った。*in vitro* 実験は重量 20-30 mg の EDL を使用した。通気 (95% O₂-5% CO₂) した Krebs-Ringer 液中で白金板電極により連続電気刺激を行い、等尺性張力を測定した。

また筋肉中あるいは外液中の CPK 活性を測定して、酵素遊離を検討した。

結果：A：i) 脱神経後の筋萎縮は SOL で最も著明で、健側の 52% であった。ロイペプチン投与群では 61% であった ($p=0.07$)。TA や EDL ではこの効果はみられなかった。ii) ロイペプチンは健側および脱神経側で蛋白量を増加させる傾向を呈した。しかし統計的には有意ではなかった。

B：i) 強縮張力は薬剤群ではやや低値であった。ii) 1 Hz の連続刺激を継続して 60 分後には、単収縮張力は 21%、強縮張力は 32% に減弱した。薬剤投与群にも全く同程度の劣化が生じた。iii) 60 分後には両群において静止張力は約 10% (p.o. に対して) 増加した。iv) 両群において筋内の CPK 活性の約 0-30% が喪失した。

8. 塩酸プロピバカイン (マーカイン) 処理による筋崩壊と筋再生に対するロイペプチンの影響

莖中班員は過去にロイペプチンの生体に対する影響をみるため、筋ジストロフィー鶏、筋ジストロフィーハムスターを使用し実験をしてきたが、陽性の結果は得られなかった。今回はヒト筋ジストロフィーと筋の崩壊像が酷似する塩酸プロピバカイン (BPVC) を使用しての実験を行った。

Wistar 系オスラット (約 250 g) を 2 群、すなわちロイペプチン 50 mg/kg/日 (miniosmotic pump 2002 使用) 投与群と非投与群に分けた。各群をさらに 0.5% BPVC 処理群と非処理群に分け、注射後 48 時間、7、14 日目に筋をとり出し、組織学的、生化学的に検索した。

0.5% BPVC をヒラメ筋内に注射すると、95-100% の筋線維は壊死に陥り、0.1% 液ではそれが局所的であった。壊死線維は 48 時間後には著明な貪食反応を伴っていた。ロイペプチン投与はその壊死、貪食過程に何らの影響を与えなかった。

7、14 日目には明らかな再生線維として出現し、ロイペプチン投与群ではそれぞれ平均線維径 24.4 ± 5.3 , 29.9 ± 6.4 、非投与群では 29.0 ± 5.5 , $36.5 \pm 6.2 \mu\text{m}$ であり、投与群で再生線維は有意に小径であった。

BPVC 処理筋でライソゾーム酵素、とくにカテプシン B & L は 48 時間後著明に上昇し、再生が進むにつれて次第に低下していった。ロイペプチンはカテプシン活性の上昇は抑制せず、むしろその値を上昇させた。

以上よりロイペプチンは筋の崩壊、処理に関与する貪食細胞に十分とり込まれず、ライソゾーム酵素活性は抑制しないと思われた。ロイペプチン投与により再生筋が小径であったことは、ロイペプチンの大量投与による影響か、他の要因によるものか、その意味については、なお検討を要すると思われた。

9. 筋ジストロフィー動物の生産・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、種卵の生産ならびに飼育の改良を行った。さらに、米国産筋ジストロフィーハムスターの供給を行うとともに、遺伝的背景の均一な筋ジストロフィーハムスターの育成を検討している。

10. Duchenne 型筋ジストロフィー症に対するベスタチンの投与効果

三吉野班員はベスタチンの臨床効果を評価する目的で、Duchenne muscular dystrophy (DMD) 症患者にベスタチンを投与し、臨床効果および副作用の検討を行った。

1) 対象：年齢 4-10 歳、stage 1-2 DMD 患者 13 人を対象とした。

2) 方法：ベスタチンは、Ausberger 式を用い、成人量 30 mg/日 に相当する量を 10% ドライシロップの形で 1 カ月連日朝 1 回投与した。

1カ月の休薬期間の後2倍に増量し、同様の方法で4倍量まで増量を試みた。

3) 結果および考察：血清CPK値を生化学的指標としたが、内服前後の値に一定の傾向はなく、各投与量間の差異もみられなかった。また、ADL、10m走、階段昇降、立ち上がり時間でみた運動機能の改善も得られなかった。しかし、重大な副作用が認められなかったことから、より大量かつより長期にわたるプロトコールを計画し、今後の研究を進める方針である。

11. 筋萎縮症に対するロイペプチン、ベスタチンの効果

村上班員は前年度に引き続き、種々の筋萎縮症にロイペプチン、ベスタチンを投与してその効果について検討を加えた。

対象としてはロイペプチンを使用したもの7例（肢帯型、シャルコー・マリー・トース病、脊髄性進行性筋萎縮症、多発性筋炎、Duchenne型のおおの1例ずつ、筋強直性ジストロフィー症2例）、ベスタチンを使用したものは21例〔筋強直性ジストロフィー症8例、筋ジストロフィー症7例（肢帯型4例、顔面肩甲上腕型2例、Duchenne型1例）、その他6例（クーゲルベルグ・ヴェランダー病2例、多発性筋炎2例、シャルコー・マリー・トース病、Duchenne型筋ジストロフィー症の保因者の各1例〕であった。

投与方法はロイペプチンは100mg/dayから毎週50mgずつ増量して300mg/day、一部に450mg/dayで維持量とした。使用期間は21週から96週であった。ベスタチンは90mg/dayから開始して毎週30mgずつ増量して270mg/day、一部に480mg/dayで維持量とした。使用期間は12週から87週であった。

成績はロイペプチンでは不変または軽度の悪化のみられたもの2例、明らかに悪化したもの5例であった。副作用は特にみられなかった。ベスタ

チンは筋ジストロフィー症では、不変または軽度に悪化したもの2例、明らかに悪化したもの5例で、筋強直性ジストロフィーでは不変または軽度に悪化したもの4例、悪化したもの4例であった。その他の筋萎縮症では有効であったもの（多発性筋炎）1例、不変1例、悪化したもの4例であった。

副作用は胃障害5例、心房細動？ 2例、一過性の発疹が1例であった。

12. 筋障害に対するベスタチンおよびロイペプチンの影響ならびに臨床施設での集計

木下班員はベスタチン、ロイペプチンの筋疾患患者に対する影響および実験的筋障害の修復過程に及ぼす影響を検討した。さらにベスタチン、ロイペプチンの臨床5施設での集計を行った。

1) 実験的除神経筋に対するベスタチン投与の影響：ラット坐骨神経切断後、ベスタチン2mg/kg、20mg/kgの注射を連続し、腓腹筋の変化を経時的に観察したが、対照との間に明らかな差はなく、除神経後の筋萎縮に対する本剤の効果は証明されなかった。

2) 神経筋疾患に対するベスタチン、ロイペプチンの臨床効果—当教室での経験：現在、当教室では17例の神経筋疾患患者にロイペプチンあるいはベスタチンを継続投与中であり、最長3年に及ぶが、わずかに血清CPKの低下をみた例と、自覚症状の改善をみた例とがあるが、全体としては著しい効果は両剤ともに認められていない。しかし、本来進行性の病勢を示す疾患が対象であるから、本剤投与が自然の進行に対してどの程度阻止作用を有しているかは明らかでない。

3) ベスタチン、ロイペプチンの臨床効果—臨床5施設での集計：国立療養所西別府病院、同箱根病院、国立武蔵療養所神経センター、名古屋大学、東邦大学の5施設の集計では、計72例の神経筋疾患患者にロイペプチン、ベスタチンのい

ずれかを一定量速日、一定量間歇、漸増速日などの方法で投与した結果、一部の症例で血清 CPK の有意の低下をみた。しかし、10m 歩行、階段昇降などの運動機能で明らかな改善を示した例はきわめて稀で、多くの判定資料のそろっているベスタチン群 43 例、ロイペプチン群 16 例の投与前後の各数値の比較では、両群とも悪化を示していた。しかし、これは前述のように進行性経過を示す症例が投与の対象であり、厳密な意味で効果を検討するには投与前後の比較ではなく、基礎疾患、初発年齢、罹患期間、投与期間に一致した観察期間を一致させた対照群の病勢の推移と比較する必要があると考える。

13. Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症患者に対するロイペプチン、ベスタチンの影響

祖父江班員は Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症 (DMD) 患者にロイペプチン、ベスタチンを投与して、本症患者に対する薬剤の影響をみた。

対象は DMD 患者 17 例で、これを以下の 3 群に分けた。A 群：ロイペプチン投与群で stage 1-4 の者 5 例。B 群：ベスタチン投与群で stage 1-4 の者 5 例。C 群：ベスタチン投与群で stage 5 以上の者 7 例、薬剤は各 1 cap/日 から投与開始し、3 cap/日 を維持量とした。ロイペプチンは 1 cap 50 mg、3 cap/日 を維持量とした。ロイペプチンは 1 cap 50 mg、ベスタチンは 1 cap 30 mg のものを用いた。各薬剤の影響を調べるために投与前と投与後 1 カ月、6 カ月、12 カ月の時点で ①運動機能：ADL、10m 平地往復歩行時間、階段昇降時間、②CPK 活性値、血清ミオグロブリンの日内変動(午前 5 時 30 分、15 時 30 分の 2 回)、③一般血液生化学、末梢血、尿の各検査、④凝固・線溶機能、などの諸点に検討を加えた。また自覚的副作用、合併症なども適宜チェックした。

結果は、①運動機能と CPK 活性値・ミオグロブリンなどを総合的に評価すると、明らかに改善を示した症例やまたは進行が停止したと考えられる症例は存在しなかった。②凝固系に若干の有意な変動がみられたが、それ以外とくに薬剤投与による変化はなかった。また凝固系の変動も正常域でのことであり、臨床上問題とはならなかった。③特記すべき自覚的副作用、合併症は出現しなかった。

以上、これら薬剤を DMD 患者に投与した結果、1 年間の投薬期間では今回の評価方法から明らかな有効性は検出できなかった。安全性は高い薬剤と思われた。

14. 各種疾患に対するベスタチン (NK 421) 投与後の経過報告

里吉班員はベスタチンを各種筋疾患に投与し、臨床経過を検討した。

対象は LG PMD 6 例、FSH PMD 1 例、Duchenne PMD 1 例、Becker PMD 1 例、myotonic dystrophy 3 例、polymyositis 5 例、dermatomyositis 1 例、distalmyopathy 1 例、ALS 1 例の計 20 例で、これらの症例に対し、NK 421 を 30 mg/日 より漸増投与した。最高投与量は 450 mg/日 7 例、360 mg/日 1 例、270 mg/日 3 例、180 mg/日 5 例、90 mg/日 1 例、60 mg/日 1 例、30 mg/日 2 例である。また経過観察期間は 1 カ月-1 年 7 カ月である。なお、myositis の 4 症例では steroid、Imuran を併用した。

臨床効果判定には、1 カ月ごとに 10m 歩行、階段 11 段昇降時間、全身 18 筋の 5 段階筋力評価、血清 PK、aldolase 値を用いた。さらに LG PMD の 4 例に対し経過中 2 回にわたり (6 カ月間隔)、尺骨神経に電氣的に低頻度反復刺激を与え、母指内転筋より筋張力、stair case の程度、収縮時間、1/2 弛緩時間を測定し半年の推移を観察した。さ

らに副作用監視のため末梢血一般生化学、尿蛋白を測定した。

結果および考察：LG PMD の 2 例，myositis の 3 例の計 5 例に経過中一過性の自覚的な筋力改善がみられ，うち LG PMD の 1 例，myositis の 3 例には他覚的な改善がみられた。しかし長期的観察では臨床的改善を示した例はなかった。また若干 CPK 値の低下傾向があったのは FSH PMD, myotonic dystrophy の各 1 例のみであった。電気生理学的検索を施行した LG PMD 4 例のうち 3 例は症状の進行が示唆された（筋張力減少，収縮時間，1/2 弛緩時間延長）。筋力，CPK 値とも比較的安定していた 1 例では，収縮時間，1/2 弛緩時間ともに延長していたが筋張力に改善がみられた。以上の総合判定により明白な改善を示した症例はなかったが，進行を遅らせている可能性はある。投与中，複視，霧視，眼痛，ふらつき，頭痛，消化器症状がみられたが，多くは一過性で NK 421 との因果関係は不明であった。

15. 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，ベスタチンを提供し，各班員から提供される血液，筋肉などの生物体試料中のロイペプチン，ベスタチン量を測定することを目的とし，ロイペプチンの 1) 原末試製，2) 製剤研究，3) 薬効研究，4) 毒性試験などを行った。それぞれの研究結果を以下に要約する。

1) 原末試製：硫酸ロイペプチン原末 4.5 kg を製造した。3 ロットを実施した。

2) 製剤研究：室温 18 カ月の安定性を測定した。硫酸ロイペプチン原末は室温 18 カ月で 2% 前後の力価低下を示し，その主因は C 末アルギニナルのラセミ化であることを確かめた。

臨床試験に提供している経口剤（散剤およびカ

プセル剤）の安定性についても，原末と同様な安定性が示された。

3) 薬効研究：線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の野生株 (N2) および筋肉発育異常を生ずる変異株 (E444) の形態および生態の観察を行い，それに対するロイペプチンおよびその同族体，ベスタチンおよびその同族体，蛋白同化ホルモンの効果を検討した。

ロイペプチンおよびその同族体に線虫の運動麻痺発現の遅延効果が認められたが，それは一般的成長の遅延で説明のつく水準を超えなかった。また，一般的成長の不全を解除できなかった。また，ノマルスキー微分干渉顕微鏡で観察される筋細胞 Z 線類似のデンス・ボディ配列についても改善は認められなかった。

筋ジストロフィーマウス (10-13 週齢で既発症のもの) に脱毛しないままロイペプチン軟膏を 30 mg/kg 左右後肢部の全面にわたって 1 回または 1 日 1 回連続 1 カ月間塗布して一般行動と車廻し運動とを観察したが，改善は認められなかった。このことは昭和 55 年度班研究報告に松下班員が，また，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981 に Stracher 博士らが記しているように，ロイペプチンまたはベスタチンを筋ジストロフィーマウスの発症以前の幼若期 (3 週齢以前) から投与開始することが奏効の条件であることを考慮すれば，当然のことである。

ただし，同時に測定した筋肉中のロイペプチン濃度は著しく高く，1 回投与では 1 時間後に平均 4.9 $\mu\text{g/g}$ ，1 カ月連続投与では 3.1 $\mu\text{g/g}$ が達せられていた。

4) 毒性試験：微生物突然変異原性試験は *S. typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538 および *E. coli* WP 2 *uvrA* の 6 株につき，S-9 ミックス添加の有無にかかわらず陰性であった。

ウサギにおける器官形成期投与試験によれば，

母体に対する安全量は 100-200 mg/kg 程度であり，胎児に対しては 300 mg/kg 程度までは著明な毒性を示さないと結論された。

ウサギにおける経皮毒性試験を 10%，20%，

ワゼリン軟膏につき，1 頭当り 0.5 g を剃毛した背部皮膚 25 cm² に週 6 回 1 カ月間塗布して，毒性および血漿中ならびに筋肉内ロイペプチン濃度を測定した。

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+} 依存性システインプロテイナーゼ (以下カルパイン calpain と総称する) について、その精製と性質の研究を系統的に展開することにした。とくに、カルパインを特異的に阻害する細胞内インヒビタータンパク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、その生理的病態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

材料となるヒト赤血球は、健康人からの採取血より白血球および血小板を注意深く除去して得た。5 倍容量の 1 mM EGTA および 5 mM 2-メルカプトエタノールを含む 20 mM トリス・HCl 緩衝液 (pH 7.5) を加えて溶血させ、30 分間 10,000 g 遠沈上清を上記の緩衝液に 50 mM NaCl を加えた溶液に対して一夜透析して、これを精製の出発材料とした。

プロテアーゼ活性は、50 mM トリス・HCl 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。

カルパインに対するカルパスタチンの作用をみるためには、カルパスタチン標品を予めカルパインと 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

* 京都大学医学部附属病院検査部

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

ヒト赤血球シトソル画分よりカルパスタチンを均一タンパク質として精製し、その諸性質を明らかにした。

1. カルパスタチンの精製

出発材料 700 ml を 400 ml の DEAE-セルロースゲルと混じ、これを十分洗浄することによってヘモグロビンを除去したのち、カルパスタチン活性画分を 150 mM NaCl 含有緩衝液によって溶出させた。ついで溶出液をアミコン PM-10 により濃縮し、これを Ultrogel AcA 34 ゲルカラムによって分画した。カルパスタチン活性の大部分は 280 kDa の位置に溶出され、一方カルパイン活性は 80 kDa 付近に溶出されたので、この操作によって酵素とインヒビターの完全分離の行われたことが知られた。280 kDa 画分を第 2 回目の DEAE-セルロースクロマトグラフィーにかけ、溶出されてくるカルパスタチン活性画分を 10 ml に濃縮したのち、pH 7.5 で 100°C、15 分間の熱処理を行い、その遠沈上清をコロジオンバッグで濃縮して Sephacryl S-200 ゲルカラムにより分画した。再び 280 kDa 画分を集めて精製カルパ

スタチンとした。

表 1 に総括するとおり、400 ml 血液より 0.38 mg の精製標品を得た。表の第(3)段階まではカルパインとカルパスタチンの相互分離が達成されていないので、真の精製度を直接計測することができない。すなわち、第(3)段階からの比較では 32.1 倍にすぎない精製度であるが、溶血液からの推定比較では約 10,000 倍の精製となる。第(5)段階、すなわち熱処理が精製度を飛躍的に高めていることがわかる。熱処理でなお僅かに残った混在タンパク質が最後の Sephacryl S-200 カラムで除去される。

精製の第(3)-(6)段階での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を図 1 に示す。すでに第(4)段階の標品でも、カルパスタチン活性は 70 kDa 付近に局在しており、これがそれ以降の段階で純化されてゆく過程がよくわかる。最終段階では 70 kDa の単一バンドを与えている。図 1 は Fairbanks らの方法によった結果であるが、Laemmli 法によるときは、標品によって 70 kDa のほかに 68 kDa のバンドの現われる場合があったが、その原因を明らかにすることはできなかった。

表 1 Purification of calpastatin from human erythrocyte cytosol

Step	Total protein ^a (mg)	Total activity		Specific activity		
		Units	%	Units/mg protein	Fold ^b	Fold ^c
(1) Hemolysate ^d (supernatant)	39,900	(2,710) ^e		(0.068) ^f		1
(2) 1st DEAE-cellulose (eluate)	271	(2,710) ^e		(10.0) ^f		141
(3) Ultrogel AcA 34 (inhibitor fraction)	117	2,710	100	23.2	1	341
(4) 2nd DEAE-cellulose (inhibitor fraction)	37.4	1,270	46.9	34.0	1.47	500
(5) Heat treatment (100°C, 15 min; supernatant)	1.92	895	33.0	466	20.1	6,853
(6) Sephacryl S-200 (peak fraction)	0.38	284	10.5	747	32.2	10,985

^a Calculated on the assumption that $A_{280}^{1\%} = 10$. Correction for heme was made in the case of hemolysate.

^b A found specific activity of 23.2 units/mg protein for step 3 was taken as unity. ^c A deduced specific activity of 0.068 units/mg protein for step 1 was taken as unity. ^d From 400 ml of blood. ^e Total activity in these fractions could not be directly determined and was therefore assumed to be equal to the total activity found in step 3. ^f The value was obtained from the deduced total activity.

