

厚生省  
新薬開発研究費

微生物の二次代謝産物に由来する  
難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究

梅 沢 班

昭和 58 年度研究報告書

昭和 59 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、第 5 年度を迎えた。

第 5 年度は、前年度までの研究に引き続き、ロイペプチン、ペスタチン、ホルフェニシノールに加え、新たにホルフェニシンおよびアルファメニンなどにつき活発な基礎研究を行うとともに、ロイペプチンおよびペスタチンの臨床研究を行い、さらにホルフェニシノールについても臨床研究を開始した。また、本年度は本研究班の基礎ならびに臨床研究のよりいっそうの充実を図るため、新たに丸山班員、青柳班員、福山班員、および松本班員を加えた。

かくして、上述の低分子酵素阻害物質の生化学的、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の研究などの広範囲の基礎領域で大きな進展が得られたわけである。さらに、臨床研究において、生後速やかに阻害物質を投与することにより、治療効果を期待しうる可能性が示唆された。この事実は刮目すべき成果といえることができる。筋ジストロフィー症の治療薬開発という困難な研究領域に、ようやく解決の兆しがみえたといえよう。

本研究班の 5 年間にわたる成果に基づいて、さらに研究を続けることは、筋ジストロフィー症を含む難病の治療に大きな光を与えるものと信ずる。しかし、臨床効果の検討には、さらに 5 年以上にわたる長期の研究が必要である。本研究を重要課題としてとりあげられた厚生省薬務局に感謝する次第である。

昭和 59 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 . . . . . 17  
村 地 孝

蛍光・HPLC による血清ホルフェニシノールの定量法と  
*p*-ヒドロキシベスタチンのプレカラム蛍光誘導体化 . . . . . 25  
大 倉 洋 甫

筋ジストロフィーマウスの筋肉代謝網に対する  
低分子酵素阻害物質の影響 . . . . . 35  
青 柳 高 明

EAE モルモットに対するロイペプチンの効果 . . . . . 43  
岩 崎 祐 三

ロイペプチンの薬理学的研究 . . . . . 49  
大 塚 正 徳

筋ジストロフィーハムスターに対するベスタチン投与の効果 . . . . .	61
高木昭夫	
塩酸ピピカイン (マーカイン) 処理による 筋崩壊と筋再生に対するベスタチンの影響 . . . . .	67
埜中征哉	
鶏ジストロフィー筋における新生児型構造蛋白質の出現 ——ベスタチンの投与と除神経の影響 . . . . .	73
丸山工作	
筋ジストロフィー症マウスに対するアルファメニン投与の影響 . . . . .	83
松下宏	
2, 3 の筋萎縮症患者に対するベスタチンの効果 . . . . .	89
村上慶郎	
ベスタチン服用時の DMD 患者の血中濃度および 臨床効果の検討 . . . . .	93
三吉野産治	
進行性筋ジストロフィー症に対するベスタチンの使用経験 . . . . .	101
福山幸夫	
筋疾患に対するベスタチンの効果に関する臨床的研究 ——Ⅰ. 神経筋疾患におけるベスタチン投与後の 尿中アミノ酸の変動 . . . . .	115
木下真男	
筋疾患に対するベスタチンの効果に関する臨床的研究 ——Ⅱ. 筋疾患に対するベスタチンの効果判定に関する 臨床的まとめ . . . . .	119
木下真男	

筋ジストロフィーに対するベスタチンの影響 ——血清 CK と muscle-specific enolase を指標として . . . . .	123
	祖父江 逸 郎
筋ジストロフィーを中心とする各種筋疾患に対する ベスタチン投与後の経過報告 . . . . .	131
	里 吉 栄二郎
ホルフェニシノールの体内動態に関する研究 . . . . .	143
	松 本 郁 男
ロイペプチンおよびベスタチンの難病治療薬としての 開発研究 . . . . .	149
	田中 亘・石井靖男
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 . . . . .	191

# 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

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年度に厚生省薬務局より新薬開発研究として発足し、現在に至っている。

微生物の二次代謝産物として発見した多くの低分子酵素阻害物質は、広範囲の生理活性を有することで世界の注目を集めている。このうち、セリン・チオールプロテイナーゼ阻害物質として見出されたロイペプチンならびに細胞膜酵素阻害物質、すなわち細胞膜結合物質として発見されたベスタチンおよびホルフェニシノールが、筋ジストロフィーマウスの発症ならびに症状の進行を阻止する効果のあることが明らかにされた。このことは、筋ジストロフィー症の治療にきわめて重要なことである。さらに、臨床研究において、すでに症状の進行した症例には治療効果を望むことは難しいが、Duchenne型のような遺伝的疾患には、生後速やかに細胞膜結合物質を投与することにより、治療効果を期待できる可能性が示唆された。なお、ホルフェニシノールは、病因に関与する遺伝子に対する作用がモデル動物の試験で認められている。上述した成果は筋ジストロフィー症の治療に大きな光を与えたものといえよう。

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)：—螢光・

HPLCによる血清ホルフェニシノールの定量法と *p*-ヒドロキシベスタチンのプレカラム螢光誘導体化

- 3) 青柳高明 (微生物化学研究所)：—筋ジストロフィーマウスの筋肉代謝網に対する低分子酵素阻害物質の影響

- 4) 岩崎祐三 (東北大学医学部)：—EAE モルモットに対するロイペプチンの効果

- 5) 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

- 6) 高木昭夫 (国立武蔵療養所神経センター)：—筋ジストロフィーハムスターに対するベスタチン投与の効果

- 7) 梶中征哉 (国立武蔵療養所神経センター)：—塩酸ピピバカイン (マーカイン) 処理による筋崩壊と筋再生に対するベスタチンの影響

- 8) 丸山工作 (千葉大学理学部)：—鶏ジストロフィー筋における新生児型構造蛋白質の出現—ベスタチン投与と除神経の影響

- 9) 松下 宏 (和歌山県立医科大学)：—筋ジストロフィーマウスに対するアルファメニン投与の影響

- 10) 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

- 11) 村上慶郎 (国立療養所箱根病院)：—2,3の筋萎縮症患者に対するベスタチンの効果

- 12) 三吉野産治 (国立療養所西別府病院)：—ベスタチン服用時の DMD 患者の血中濃度およ

び臨床効果の検討

13) 福山幸夫(東京女子医科大学):一進行性筋ジストロフィー症に対するベスタチンの使用経験

14) 木下真男(東邦大学医学部):一筋疾患に対するベスタチンの効果に関する臨床的研究

15) 祖父江逸郎(名古屋大学医学部):一筋ジストロフィーに対するベスタチンの影響—血清CKとmuscle-specific enolaseを指標として

16) 里吉栄二郎(国立武蔵療養所 神経センター):一筋ジストロフィーを中心とする各種筋疾患に対するベスタチン投与後の経過報告

17) 松本郁男(万有製薬株式会社):一ホルフェニシノールの体内動態に関する研究

18) 田中 亘(日本化薬株式会社):一ロイペプチンおよびベスタ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、腎臓からカルパインの精製を行った。

動物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(カルパインと総称する)は、その  $Ca^{2+}$  要求性に関し2種類あることが知られてきたが、そのいずれもがロイペプチンの強い阻害作用を受ける。

彼らは、ラット腎臓からI型、II型の2種類のカルパインを、ほとんど同様の方法により並行して精製した。3.64gの粗蛋白質分画から出発して、カルパインIを0.53mg(6,170倍精製)、カルパインIIを0.33mg(4,160倍精製)収得した。精製標品はいずれもゲル電気泳動的に均質性を示した。I型の等電点は5.3、II型のそれは4.6であった。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、

I・II両カルパインとも、80kDaおよび25kDaの2つのサブユニットから成るヘテロ二量体であることが明らかとなった。両酵素のアミノ酸組成はかなり類似しているが、決して同一ではない。

I型は $2.0\mu M Ca^{2+}$ で50%活性化を受けるのに対して、II型は $200\mu M Ca^{2+}$ で50%活性を発現する。I型は $Sr^{2+}$ のほか $Ba^{2+}$ および $Mn^{2+}$ によってもかなり活性化されるが、II型では $Sr^{2+}$ 以外のイオンはほとんど無効であった。

筋肉以外の組織からカルパインIとカルパインIIを同時に並行精製することは、いままで成功していなかった。今回の研究により、同一臓器の両酵素の直接比較が可能となったわけで、両酵素の類似点と相違点がかかなり明瞭に示された。今後、両者のサブユニット同士の比較実験や、免疫学的連関性などの研究により、これら諸酵素の作用および阻害機構が分子構造の水準で明らかにされるものと期待される。

## 2. 蛍光・HPLCによる血清ホルフェニシノールの定量法とp-ヒドロキシベスタチンのプレカラム蛍光誘導体化

大倉班員は、ホルフェニシノール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。

ホルフェニシノールがアルカリ性で酸化され、強い蛍光を発することを見出した。この蛍光反応条件を検討し、血清ホルフェニシノールの蛍光・HPLCによる定量法を開発した。また、57年度に提出したベスタチンの蛍光・HPLCでは血清中微量に存在するその代謝物p-ヒドロキシベスタチン[1nmol(400ng)/ml以下]を有意に定量できなかったため、新たにp-ヒドロキシベスタチンのHPLCにおける蛍光誘導体化法の基礎研究を行った。

### 1) 蛍光・HPLCによる血清ホルフェニシノールの定量

血清100 $\mu l$ を過塩素酸で除蛋白し、その



上清 100  $\mu$ l に 25 mM フェリシアン化カリウム 50  $\mu$ l および 3.5 M KOH 200  $\mu$ l を加え、50°C で 15 分間加温する。反応液に、1.5 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  50  $\mu$ l および 1.0 M アンモニア緩衝液 (pH 8.5) と c. HCl の等容混液 100  $\mu$ l を加える。この反応液 100  $\mu$ l を HPLC に付す。HPLC は、カラムに Li Chrosorb RP-18 を、溶離液に 4 mM テトラ-*n*-ブチルアンモニウムヒドロキシドを含む 0.1 M アンモニア緩衝液 (pH 8.5) を用いて行う。蛍光検出は、励起 385 nm および発光 485 nm で行う。この方法により、血清中 1 nmol(200 ng)/ml 以上の濃度で存在するホルフェニシノールを 6 分以内に分離し、精度よく定量できた。

## 2) HPLC における *p*-ヒドロキシベスタチンの蛍光誘導体化

*p*-ヒドロキシベスタチンのフェノールのオルト位にアルデヒド基を導入し、アルデヒド試薬の 4,5-ジメトキシ-1,2-ジアミノベンゼンモノ塩酸塩によって蛍光ラベル化する。このラベル化反応は、チロシン含有ペプチドに対しても蛍光体を与える。これらのラベル化体は、逆相分配 HPLC により分離され、高感度に検出された (4~10 pmol/HPLC 注入量)。検量線は、少なくとも 5 nmol (HPLC 注入量) まで、それぞれ原点を通る直線性を示した。

## 3. 筋ジストロフィーマウスの筋肉代謝網に対する低分子酵素阻害物質の影響

青柳班員は、筋ジストロフィーマウスに対する低分子酵素阻害物質の治療効果を調べる目的で、阻害物質投与により誘起される筋肉を含む諸臓器内における酵素網の動態に関する研究を行った。

ロイペプチン (500  $\mu$ g/日)、ベスタチン (200  $\mu$ g/日)、ホルフェニシノール (500  $\mu$ g/日)、およびホルフェニシン (500  $\mu$ g/日) は筋ジストロフィーマウスに、毎日 1 回腹腔内に 8 日間連続投与

した。最終投与時の 3 時間後に屠殺したのち、前肢筋、後肢筋、心、脾、肝、腎を摘出し、ホモジネートの遠心上清について、7 種類のアミノペプチダーゼ、5 種類のエンドペプチダーゼ、3 種類のグリコンダーゼ、クレアチンキナーゼ、ホスファターゼ、およびエステラーゼなどの酵素活性の変動について検討した。上述の阻害物質を投与することにより、誘起された各臓器内の酵素活性の変動は、これらの阻害物質の *in vitro* における阻害活性とは無関係に、さまざまな酵素活性に影響を与えていることを明らかにした。

4 種の阻害物質投与により誘起された酵素変化のパターンには、何らかの類似性があることが推察された。それゆえ、順位相関係数を求めて検討した結果、前肢筋および後肢筋の酵素網に、上述の阻害物質がきわめて高い類似性をもった変動を与えることを明らかにした。ホルフェニシンはロイペプチン、ベスタチン、およびホルフェニシノールと同様に、筋ジストロフィーマウスの治療に有効であることを示唆した。

一方、脾の酵素網に対してはホルフェニシノールのみが、他の阻害物質の作用と異なることを認めた。ホルフェニシノールは免疫応答細胞に対し、他の阻害物質と異なる影響を与えるものと考えられる。

## 4. EAE モルモットに対するロイペプチンの効果

岩崎班員は、炎症性脱髄疾患に関するロイペプチンの研究を行った。

EAE (experimental allergic encephalomyelitis) は、ヒトの脱髄性神経疾患の動物モデルとして研究されている。この髄鞘脱落のメカニズムとして、免疫反応の中で活性化された macrophage の分泌する neutral proteinase が髄鞘の崩壊をきたすという考え方がある。この酵素の主なものが plasmin であるということから、その拮抗剤であるロイペプチンが脱髄現象を防ぎうるのではないかと考えられる。このような考えから、以下の実

験を試みた。

〔方法〕 220~420 g の成熟モルモットを4群に分けた。第1群(15匹)、感作の前日よりロイペプチン 25 mg/kg, 2回/日腹腔内に投与したもの;第2群(15匹)、感作後1週目より同様にロイペプチンを投与したもの;第3群(15匹)、発症した日からロイペプチンを投与したもの;第4群(7匹)、ロイペプチンを投与しなかったもの。毎日の観察と体重測定を続けたのち、21日目にすべて灌流固定を行い、大脳と脊髄とを採取して組織観察に供した。効果判定に用いた項目は、臨床的および組織的発症率、発症日、臨床症状を5段階に分けて得られた臨床的重症度、一定の部位の観察から得られた組織的重症度、および体重の推移などである。

〔結果〕 1) 臨床的発症率では第1・2群でやや低率であったが、組織的発症率では差がなかった。2) 第3・4群の発症日は同じであったが、第1・2群ではそれより1日、2日遅かった。3) 臨床的重症度では、軽度ながら差がみられ、第1・2群で軽かった。しかし、組織的重症度には差はなかった。4) 体重増加の割合は、第1・2群に比較して第3・4群で高かった。体重増加の頂点に至る時期は第2・3・4群で一致していたが、第1群ではそれより3日遅れた。5) 発症後同時期に得られた脳、脊髄の標本で、第1・2・3群のものに好中球、microglia の浸潤が目立った。

以上の結果から、EAE モルモットに対するロイペプチン効果は、有効とはいいがたいものの、その過程の中で何らかの影響があるものと考えられた。

## 5. ロイペプチンの薬理学的研究

大塚班員は、ロイペプチンの薬理学的研究を行った。

### 1) ロイペプチンの血圧下降作用の検討

ロイペプチンによりウサギの血圧が一過性に下降することを昨年度報告し、神経節遮断作用によるものと推測した。この点を検討したところ、フェントラミン処置下においてもロイペプチンにより血圧下降がみられた。

### 2) 副交感神経節に対する作用

摘出したラット顎下神経節を Tyrode 液で灌流し、神経節細胞より細胞内記録を行った。ロイペプチンは、節前神経刺激で発生するコリン作動性 fast EPSP を抑制した。アセチルコリンを節後神経細胞に適用すると、時間経過の速い脱分極と、それに続く遅い経過の脱分極とが記録された。ロイペプチンは前者を抑制し、後者を増強した。

### 3) 脊髄運動ニューロンおよび $I_a$ シナプス伝達に対する作用

ラットを人工呼吸器で維持し、脊髄運動ニューロンの細胞内記録により、活動電位、静止電位、後過分極を測定した。ロイペプチンを静脈内投与したのち最高4時間にわたって記録を行ったが、上記電気的性質の変化はみられなかった。また、 $I_a$  感覚神経刺激により発生する EPSP にも変化はみられなかった。

### 4) 摘出脳幹-脊髄標本に対する作用

本標本は最近開発され、呼吸様活動を *in vitro* で記録、観察しうる特性をもつ。ロイペプチンを灌流液中に適用したところ、9例中2例において呼吸様活動の頻度の増加が観察され、この効果はアトロピンにより抑制された。

### 5) 摘出脊髄-尾標本に対する作用

本標本で尾に圧侵害刺激を加えると、痛み反応と考えられる電位を前根から記録できる。圧侵害刺激により発生する時間経過の遅い電位はエンケファリンにより抑制された。ロイペプチンは、単独ではこの電位に影響を与えなかったが、エンケファリンの作用を増強し

た。

## 6. 筋ジストロフィーハムスターに対するベスタチン投与の効果

高木班員は、筋ジストロフィーハムスターにベスタチンを皮下注射により長期投与し、筋ジストロフィーの自然経過に対する影響を研究した。

〔方法〕筋ジスハムスター（BIO 14.6）19匹および対照（BIO FIB）8匹に、ベスタチン 2mg/動物/日を6～8週間にわたって背部皮下に連日投与した。筋ジストロフィー病変の指標として、血清CK値と筋組織中の壊死線維および再生線維数を採用した。

〔結果〕1)筋ジスハムスターは、実験中に約半数が死亡した。しかし、これは薬剤の影響でないことは明瞭であった。一般に、筋ジスハムスターの成長は対照に比して遅滞していた。2)筋ジスの血清CK値に関して、ベスタチン投与群と非投与群の間に差を認めなかった。しかし、両群において、CK値のばらつきは著明であった。3)筋ジスEDL筋における壊死線維の比率は薬剤群0～1.5%、生食群0～0.4%、また再生線維については、薬剤群2.8～26.4%、生食群4.6～17.7%であった。いずれについても、薬剤の影響は認めなかった。筋ジスSOLについても、同様な結果であった。

〔考案とまとめ〕今回の実験の問題点の第1は、筋ジス群の死亡数が多く少数例の観察となった点である。第2は、指標とした血清CK値あるいは壊死・再生線維数は、筋ジスでは明らかに異常であった。しかし、筋ジス個体間でのばらつきが著明なため、微妙な薬剤の効果を検出することは不可能と思われた。このような条件下の実験であったが、ベスタチンは筋ジスハムスターの自然経過に著明な影響を与えることはない結論された。

## 7. 塩酸プピバカイン（マーカイン）処理による筋崩壊と筋再生に対するベスタチンの影響

榎中班員は、塩酸プピバカイン処理による筋崩壊と筋再生に対するベスタチンの影響について研究を行った。

局所麻酔剤である塩酸プピバカイン（マーカイン）は、筋細胞膜のみを破壊し、他の支持組織は損傷しないので、筋線維の強い壊死のあとでも再生は早い。また、再生線維は均一で、その発育と分化過程に再現性があり、統計的処理が可能である。この実験系にベスタチンを投与し、その影響をみた。

約250gのWistarラット84匹を次の4群に分けた。①無処置、無治療群、②ベスタチン10mg/kg/日投与群、③マーカイン（0.25%液）0.5ml筋注群、④マーカイン、ベスタチン治療群。マーカインは、ヒラメ筋内に直接筋注した。①～④群とも、マーカイン注後2、7、14日目に相当する日に各群7匹ずつ計28匹よりヒラメ筋を採取し、生化学的、組織化学的検索を行った。

ベスタチン単独投与では酸ホスファターゼ、カテプシンD活性が多少上昇する傾向にあったが、それ以外の $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ値には変動はなく、また筋線維径にも影響を与えなかった。マーカイン注により上記ライゾチーム酵素活性は上昇し、ベスタチンは酸ホスファターゼの活性をやや抑制する傾向にあったが、壊死の過程には大きな影響を与えなかった。再生線維はベスタチン投与によっても影響を受けず、その筋線維径、分化の状態は無治療群のそれと差はみられなかった。

マーカインによる筋の壊死はあまりに強烈であるので、緩徐に壊死、再生と繰り返す筋ジストロフィーと病変過程を等しくは評価できない。ロイペプチンは筋の再生を著明に遅延させたが、ベスタチンは再生の抑制はなかった。

## 8. 鶏ジストロフィー筋における新生児型構造蛋白質の出現—ベスタチン投与と除神経の影響

丸山班員は、ベスタチン投与における鶏ジストロフィー症の発症に及ぼす効果について研究を行った。

鶏胸筋では、孵化後の成長期に筋構造蛋白質のタイプが著しく変化する。たとえば、孵化直後のヒヨコの幼若筋には遅筋型C蛋白質が存在するが、孵化後2週間で消失し、速筋型に変る。他方、遺伝性の筋ジストロフィー鶏（NH 413系）では、筋ジストロフィー症の発症に伴い、消失した遅筋型C蛋白質が再出現し、孵化直後のヒヨコの筋に類似したものになる。したがって、C蛋白質のタイプの変化は筋ジストロフィー症の指標になりうる。

本研究では、ベスタチン投与が鶏における筋ジストロフィー症の発症に及ぼす効果について、主として遅筋型C蛋白質の消長を指標として検討した。

孵化後1週齢から、体重1kg当り5mgずつベスタチンを連日皮下注射により投与した。1カ月後、鶏筋胸をとり出し凍結切片を作製して抗遅筋C蛋白質抗体で処理し、蛍光抗体法により検出を試みたところ、大胸筋表層部細胞のうち遅筋型C蛋白質を含むものの割合は、ベスタチン投与したもので0.6%、非投与のもので3%であった。このことは、ベスタチン投与により、筋ジストロフィー症の進行がやや遅れることを示唆している。しかし、3カ月齢に達したものでは、今回の投与量ではベスタチンの効果はあまり認められなかった。

次に、筋ジストロフィー症の実験モデル系の1つとして、鶏除神経胸筋を作成して調べたところ、除神経後1~2週間で遅筋型C蛋白質や $\beta$ 型トロポミオシンの出現が認められ、筋ジストロフィー筋とよく似た状態となることが明らかとなった。

## 9. 筋ジストロフィーマウスに対するアルファメニン投与の影響

松下班員は、アルファメニンを発症直後の筋ジストロフィーマウスに投与し、その症状回復効果について研究を行った。

ベスタチンおよびホルフェニシノールを発症直後の筋ジストロフィーマウスに連続投与することにより症状進行が完全に抑制されることが見出されたので、引き続き他のimmunomodifierについて、同様な方法によって症状進行に対する抑制効果の検定を行っている。本年度は、ベスタチンに類似した阻害活性を示すアルファメニンAおよびBを用いて実験を行った。

実験は、約1カ月齢で軽度な症状を示す筋ジストロフィーマウスを用いて行い、これらにアルファメニンAおよびBを1日2回ずつ2, 4, 6, および12週間連続投与したのち、血清中ならびに骨格筋中のマーカー酵素の活性に及ぼす影響を与えるかについて検討した。その結果、血清中のPK活性はAあるいはBの投与によって著明に低下していることが認められ、またCPK活性も同様に低下の傾向を示していた。骨格筋中での酵素活性の変化は、まずアルカリおよび中性プロテアーゼが全投与群で、著しい活性低下を示していることが注目された。また、PK, CPK, LDHなどの酵素活性は逆に、いずれの投与群でも増加の傾向を示していた。とくに、A投与群ではこの傾向が顕著であった。これらの結果は、アルファメニンの投与によって、筋線維の膜機能に関してやや改善の徴候がみられることを示唆しているものと考えられる。しかし一方、尿中のクレアチンおよびクレアチニンの含量は、アルファメニン投与によっても大きな変化を示さず、むしろ重篤なクレアチン尿症の状態を続けていた。また、6週間投与実験の場合の体重変化を調べてみると、AまたはB投与群とともに食塩水投与疾病マウスに比較してやや増加の傾向を示してはいたが、正常並みには戻らず、12週間投与によっても症状の進行

はまったく抑制されなかった。

以上の結果から、アルファメニンAまたはBは、すでに発症している筋ジストロフィーマウスの症状進行に対して、これを顕著に改善させる効果があるとは断定できなかった。しかしながら、投与時期をさらに早めることによって効果が得られる可能性はまだ残っているものと考えられる。

#### 10. 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、筋ジストロフィーマウスの供給を行うとともに、米国产筋ジストロフィーハムスターの供給を行い、また、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。

#### 11. 2,3 の筋萎縮症患者に対するベスタチンの効果

村上班員は、前年度に引き続きベスタチンを筋疾患患者に投与して、その効果について検討した。

対象は 19 例で、一部に前回から使用している症例が含まれている。使用期間は 6 カ月から 30 カ月。投与方法は、1 日量 60, 270 mg の固定法と、1 日量 30 mg より毎週、一部隔週に 30, 100 mg ずつ増量し、600 mg から 1,500 mg に及んだものもある。

成績は、自覚症状が初期に軽度の改善を認めた多発性筋炎の 1 例および 1 歳 8 カ月の Duchenne 型筋ジストロフィー症で症状の改善と血清 CPK の低下の傾向を認めたのみで、他はいずれも効果はみられなかった。

検査成績では、白血球数を含む一般血液検査、尿検査、血圧、心電図、握力、血液生化学検査に著変はみられなかった。

1 歳 8 カ月の Duchenne 型筋ジストロフィー症では、ベスタチンの増量とともに血清 CPK 値は低下の傾向を示し、症状でも、登はん性起立が

改善し、歩行も転倒回数の減少、階段の昇降が可能となったが、現在、経過観察中である。検査成績を含めて、特別の副作用はみられなかった。

#### 12. ベスタチン服用時の DMD 患者の血中濃度および臨床効果の検討

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。

これまで、ベスタチンを朝食前 1 回服用させ血中濃度について検討してきたが、安定した血中濃度を得ることができなかった。

今回、DMD 患者 20 名にベスタチン成人量 60 mg/日を毎食後 3 回 1 週間服用させ、そのうちの 5 名は 1 週間ごとに倍量して成人量 480 mg/日まで漸増し、血中濃度と臨床効果について新たに検討した。

その結果、1) 分割投与により安定した血中濃度を得ることができた。2) 漸増法では、投与量増加とともに血中濃度が上昇した。3) 20 例中 19 例が 30 分後に最高血中濃度  $0.72 \pm 0.22 \mu\text{g/ml}$  を示し、1 時間より半減期  $130 \pm 68$  分の短い安定した分布を示したことより、ベスタチンは半減期の短い比較的吸収の速い薬物であることが推測された。4) 1 日 1 回隔日投与より、1 日 3 回連日投与のほうが安定した血中濃度が得られた。5) 漸増法においては、GOT, GPT, LDH の漸増法実施前後の値に有意な差をみなかったが、CPK の低下してくる例がみられた。6) 服用期間が長くなると、CPK の低下する例がみられ、また血中濃度と CPK がともに上昇している例数が減少する傾向がみられた。7) ADL では、1 週間服用者 5 名中軽快 1 名、不変 1 名、低下 3 名であり、4 週間服用者 5 名中軽快 1 名、低下 4 名であった。8) 副作用として発疹 1 名、悪心・嘔吐 1 名をみたが、後者の因果関係は不明であった。

これらのことより、今後の方針として、1) 副作

用に注意しながら、投与量を成人量 480 mg/日より増量しつつ血中濃度の飽和点を見出すこと、2) その量の3ないし4分割投与による長期投与を行いながら臨床効果を判定したい、と考えている。

### 13. 進行性筋ジストロフィー症に対するベスタチンの使用経験

福山班員は、進行性筋ジストロフィー症に対するベスタチンの治療効果を評価する目的で、東京女子医大小児科外来に通院中の Duchenne 型 10 名 (preclinical case 1 例を含む)、Becker 型 3 名、肢帯型 2 名、先天型 5 名 (福山型 4 名、良性型 1 名) 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。

原則として、最初の 4 週間は成人相当量 60→120→240→480 mg を 1 日分として、1 週間ごとに漸増投与し、分 3 で服用させた。480 mg 相当量に達したのちは最終量で維持した。その後、副作用を認めない場合、30 mg/kg/日 まで増量した。この際、Duchenne 型の 1 例で、最高 45 mg/kg/日 を 5 週間服用した例があった。服用前と投与開始後最初の 4 週間は 1 週間ごとに採血および 1 日採尿を行い、血清 CPK などの酵素、ベスタチンの血中濃度、カルニチン、血中、尿中のクレアチン、クレアチニン、尿中 3-メチルヒスチジンの測定を行い、その後は約 1 カ月間隔で同血清酵素を検討した。同時に運動機能も評価した。1 例を除いて全例最初の 1 週間のみ入院で評価し、その後は外来で評価した。

全経過を通じ運動機能の獲得、改善を示したのは、Duchenne 型の preclinical case の 1 例と、先天型の 3 例 (全例運動機能上昇期にある) のみであった。これらの症例の投与後の運動機能獲得経過は、Duchenne 型、先天型の平均的自然経過に比して差がなかった。このほかに、Duchenne 型 2 例では全経過で軽度運動機能レベルの改善がみられた。他の症例では、一時的に起立時間、走行時間の改善をみた例もあったが、6 カ月全体を

通してみると悪化し、機能レベルとしては使用前のそれより低下していた。

Becker 型、LG 型では一過性にやや改善を示した 1 例を除き、運動機能レベル、走行時間、起立時間に変化がなかった。

Duchenne 型の検査所見では、血清 CPK は 1 例を除いて全例投与開始後 1, 2, 3 週目の値は低下傾向を示したが、その後は一定の傾向がなかった。45 mg/kg/日 服用した例では、服用後の CPK 値が服用前値の 1/5 の値まで低下していた。尿中の 3-メチルヒスチジン/クレアチニン比は開始前後で有意差なく、投与量 (mg/体重/日) とともに特別な関係はなかった。明確な副作用は消化器症状のみであり、服用中止、減量、消化剤投与などで改善した。服用中に全身倦怠を示し、中止後改善した例があったが、同時期に感冒症状もあり、ベスタチンの副作用か否かは不明である。

### 14. 筋疾患に対するベスタチンの効果に関する臨床的研究

木下班員は、ベスタチンの筋疾患患者に対する影響および 6 施設での評価について集計を行った。

#### 1) 当施設での検討 (尿中アミノ酸の検討)

10 例の神経筋疾患患者に連続 4 週から 3 年にわたりベスタチンを投与し、1 例に有効性を認めた。また、同時に行った尿中アミノ酸の変動に関する検討では、とくに 3-メチルヒスチジンの排泄量を測定したが、有意な変化は得られなかった。

#### 2) 6 施設での成績のまとめ

東邦大学、国立神経センター、国立箱根病院、国立西別府病院、名古屋大学、東京女子医大の 6 施設での 74 例の集計では、とくに Duchenne 型ジストロフィー症で投与開始後比較的早期に血清 LDH、CPK の一時的な改善があり、投与方法の改良によってはさらに有効な成績が得られる可能性が示唆された。また、多発筋炎の症例の一部では、ステロイ

ドとの併用で臨床所見の改善がみられ、このような使用法の有用性も確かめられた。

### 15. 筋ジストロフィーに対するベスタチンの影響—血清 CK と muscle-specific enolase を指標として

祖父江班員は、各種神経筋患者血清中の  $\beta$  型 enolase を測定し、ベスタチンの効果を検討した。

〔目的〕筋障害の指標として血清 CK が広く利用されてきた。一方、解糖系酵素である  $\beta$  型 enolase (muscle-specific enolase, MSE) は、骨格筋、心筋に存在し、CK 同様、筋障害の指標となることが期待される。そこで、さまざまな神経筋疾患患者で両者の関係を調べ、ベスタチン投与によってこれらがどのような影響を受けるか検討した。

〔対象と方法〕1) 血清 MSE と CK: 各種神経筋疾患患者 162 例と対照 53 例の血清 MSE を enzyme immunoassay 法で測定し、血清 CK 値、ミオグロビン値との相関をみた。PMD 患者における MSE と CK 値の異常値出現率を比較した。2) 当班のプロトコールに従ってベスタチンの投与（漸増法）と採血を行い、CK 値と MSE 値を中心に諸検査結果の推移を調べた。対象患者は 5 例（肢帯型 2 例、Duchenne 型 2 例、筋緊張性ジストロフィー 1 例）で年齢 19~36 歳。4 週間の漸増投与後、さらに 4 週間 90 mg/日 固定投与を行い、同様の方法で検査した。

〔結果〕1) 対照群の血清 MSE 値は  $7.5 \pm 3.8$  ng/ml であり、PMD 群では有意に高い値を示した。2) 血清 MSE と CK 値の相関係数は  $0.831$  ( $P < 0.001$ )、ミオグロビンとは  $0.595$  ( $P < 0.001$ ) であった。3) 神経筋疾患における CK と MSE の異常値出現率には有意な差がなかった。4) ベスタチン投与によって血清 CK 値、MSE 値とも有意な変動を示さなかった。5) 血中、尿中のクレア

チニン、クレアチン値とも明らかな変化を示さなかった。6) 自覚的に特記すべき副作用は認められなかった。

### 16. 筋ジストロフィーを中心とする各種筋疾患に対するベスタチン投与後の経過報告

里吉班員は、ベスタチン (NK 421) を各種筋疾患に長期投与を行い、その臨床経過を検討した。

〔対象と方法〕長期観察例の対象は、LG PMD 6 例、FSH PMD 1 例、myotonic dystrophy 2 例、Duchenne PMD 5 例、polymyositis 2 例、dermatomyositis 1 例の計 17 例で、最大投与量は 500 mg/日 5 例、450 mg/日 4 例、300 mg/日 2 例、240 mg/日 1 例、200 mg/日 2 例、60 mg/日 2 例、30 mg/日 1 例である。投与期間は 8~33 カ月（平均 19.2 カ月）である。以上の症例に対して 10 m 歩行、階段昇降時間、筋力テスト、血清 CPK 値を測定し、評価を行った。また、経過中 3 回にわたって低頻度反復電気刺激を行い、母指内転筋張力を測定した。NK 421 血中濃度測定の対象は、1 w 用量固定法では LG PMD 5 例、FSH PMD 1 例、myotonic dystrophy 3 例、Duchenne PMD 3 例、成人型 Pompe 1 例の計 13 例、4 w 用量漸増法では LG PMD 1 例、myotonic dystrophy 2 例の計 3 例である。

〔結果および考察〕筋ジストロフィーの長期投与例で臨床的改善を示した例はなかった。誘発筋電図では、2 例に筋張力低下がみられたが、1 例では 2 年半の経過中、筋張力低下は生じなかった。myositis 例では、steroid、免疫抑制剤に NK 421 を併用することにより臨床的改善を示す傾向があった。血清 CPK 値は、筋ジストロフィーの多数例で低下を示し、この傾向は CPK 高値の Duchenne PMD 例で強くみられた。血中濃度測定では、20 mg 服用後 1~2 hr で  $500 \sim 1,000$  ng/ml の peak

値が得られ、480mg/日に漸増後(160 mg 服用後)には、7,000~8,000 ng/ml まで peak 値が上昇した。この観察期間中、多くの例で血清 CPK の低下がみられ、長期観察例でみられたと同様、高 CPK 値を示す LG PMD、Duchenne PMD 例で強くみられた。なお、血中 NK 421 濃度と血清 CPK 値の改善度の間に相関はなかった。NK 421 投与中、4 例に消化器症状がみられたが、NK 421 の増量により出現する傾向があった。しかし、これらの例でも一時中止、減量により症状が消失し、その後投与を続行することができた。血液、尿所見に異常はなかった。

#### 17. ホルフェニシノールの体内動態に関する研究

松本班員は、ホルフェニシノールの難病治療薬としての開発研究に対する基礎研究を行った。

##### 1) ホルフェニシノールの製造

各班員にホルフェニシノールを供給するために製造法の改良を行い、ホルフェニシノールの製造を行った。

##### 2) 体内動態研究

2-1) ホルフェニシノールの未変化体血漿中濃度の測定法として、簡便で高感度の RIA 法の検討を行った。代謝物 M-2~M-6 の中で M-3 のみが 14% の交叉反応性を示したが、血漿中ではほとんど未変化体としてのみ存在しているため、とくに前処理を行うことなく定量できることを明らかにした。測定限界は 10 ng であった。

2-2) 代謝物 M-1~M-6 の定量法について検討を行った。尿中代謝物として現在までに知られている M-1~M-6 までの代謝物のうちアミノ基を有する M-1、M-3 は、強酸性イオン交換樹脂に吸着させ、分別溶出したのち RIA 法で定量する方法を確立した。また、未吸着の M-2、4、5、6 は、M-2 の不安定性

のためそのままでは測定できなかったため、メトキシイミノ体に誘導したのち HPLC で一斉分析する方法を、現在確立しつつある。

3) [<sup>3</sup>H]-ホルフェニシノールを経口および静脈内投与し、血中濃度、総排泄、bioavailability の検討を行った。1 mg/kg の経口投与では、投与後 21 分で最高濃度 1.703 μg/ml に達し、ピーク以後は速やかに減少し、投与後 8 時間で最高濃度の 1/30 以下までに減少した。また、静脈注射した場合の AUC と比較することにより、経口投与における bioavailability の高いことが示された。

また、投与後 48 時間までに投与量の 90~95% が尿中に排泄され、蓄積性があまりないことが示された。

#### 18. ロイペプチンおよびベスタチンの難病治療薬としての開発研究

田中・石井両班員は、ロイペプチンおよびベスタチンの難病治療薬としての開発研究に対する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た。

##### 1) 治験薬の試製と製剤研究

治験用ベスタチン 10% ドライシロップ剤 8 kg およびベスタチン 100 mg カプセル剤 5 万カプセルを試製した。また、それらおよびロイペプチンの原末と治験用製剤(散剤、カプセル剤)の安定性を、前年度に引き続き追跡した。

##### 2) Bioavailability

2-1) ベスタチンをマウスに経口投与したときの血中・筋肉中濃度の推移と代謝物を、<sup>3</sup>H-ベスタチンを用い、単回または 1 日 1 回 7 日間の連与について検討した。血中、筋肉中の放射活性は投与量に比例する。連与すると後期(投与後 4、8 時間)の値が上がり、24 時間の血中濃度曲線下面積は単回の 1.6 倍にのぼった。尿中回収率は単回で 83~91%、連



与で 97% に達し、投与量に依存しないが、低投与量 (1.32 mg/kg) では代謝物である AHPA が尿中放射活性の 47% を占め、高投与量 (12.47 mg/kg) では 22% と投与量に依存した。筋肉中でも同傾向であり、低投与量では 69%、高投与量では 26% の AHPA が検出された。血中 AHPA は少ない。血液・筋肉・尿中に他の代謝物は検出されなかった。なお、AHPA の存在比は連与によって増加しなかった。筋肉中濃度は初期 (投与後 1 時間) では血中の約半分であるが、後期では同等となり、連与 (12.6 mg/kg) の 1, 4, 8 時間値は放射活性でそれぞれ 750, 450, 220 ng/g であり、放射活性中の未変化ベスタチンの存在比は 1 時間値で 78% であった。したがって、筋肉にベスタチンを到達させて濃度を維持することは、ロイペプチンに比べて容易である。

2-2) ロイペプチンをラットに経口、十二指腸 (30 mg/kg)、門脈 (10 mg/kg) 投与したときの 6 時間の血中濃度曲線下面積はそれぞれ 0.36, 8.31, 20.47 ng・hr/ml であった。しかし、腸溶錠としたロイペプチンをイヌに経口投与したときの血中濃度は、裸錠のそれよりも低かった。また、フラジオマイシン前投与でラットの腸内細菌叢を減弱させておいても血中濃度は向上しなかった。人工胃液、人工腸液中 37°C での残存はそれぞれ 94% (4 時間)、80% (6 時間) であった。ロイペプチンのジエチルアセタールの経口血中濃度もロイペプチンのそれと異ならなかった。

経皮投与を親水軟膏でラットについて試みた結果は、30 mg/kg で 2, 4, 8 時間後に恒常的に約 100 ng/g の筋肉内濃度を示した。血中濃度も同水準であり、これを先に記した経口投与時のそれと比べると、血中濃度曲線下面積で 2.5 倍であった。また、3) に記すウサギの経皮毒性試験に際して、血漿、投与部位筋肉、非投与部位筋肉の標本を採取して分析したとき、最高血中濃度は初日に 150~280 ng/ml に達した。しかし、連与による上昇は認められなかった。筋肉中濃度は、連与による上昇傾向と用量依存傾向を示した。

2-3) ベスタチンの簡易定量法を開発した。

1 つは蛍光 HPLC 法であり、溶出ベスタチンと *o*-phthalaldehyde の反応生成体の蛍光検出により、血漿 0.2 ml 標本で 200 ng/ml まで測れる。これにより、臨床研究班員のプロトコールスタディーの血漿標本を測定した。他法はベスタチンの抗血清による RIA であり、1.25 ng/ml まで測ることができ、ベスタチンの生体内代謝物との交叉反応はない。

3) 毒性試験

ロイペプチンの経皮毒性試験として、日本白色種雄ウサギの刈毛した背部皮膚 (5×5 cm<sup>2</sup>) に 0, 10, 20, および 30% 硫酸ロイペプチン軟膏を 0.5 g, 35 日間連続塗布した結果、4 群とも死亡例なく、一般状態の変化も各検査所見のロイペプチンによると考えられる変化も認められず、この条件では何ら毒性を示さないと結論される。

# 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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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出した。

そこで、骨格筋の CANP に関する進んだ知見と並行して、上記の全身組織細胞に広く分布している  $\text{Ca}^{2+}$  依存性システインプロテイナーゼ (以下カルpain 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pain 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pastatin (calpastatin) と名づけ、その精製と性質についても研究を行うことにした。

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

ウィスター系ラット (200~300 g) を用い、断頭後可及的速やかに血液を除いた腎臓を4倍量の 20 mM トリス-HCl 緩衝液 (1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.25 M 蔗糖, 5 mM 2-メルカプトエタノール含有, pH 7.5) でホモゲナイズし、105,000 g, 90 分間超遠心して、その上清をカルpain I (低  $\text{Ca}^{2+}$  要求性) およびカルpain II (高  $\text{Ca}^{2+}$  要求性) の精製のための出発材料とした。

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などの増量を Folin-Lowry 法により、750 nm の吸光度増加として計測した。カルpain I の定量には 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  を、カルpain II の定量には 5 mM  $\text{CaCl}_2$  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pain に対するカルpastatin の作用をみるためには、カルpastatin 標品をあらかじめカルpain と pH 7.5, 30°C で 10 分間接触させたのち、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pain を失活させるインヒビター活性を 1 単

\* 京都大学医学部附属病院検査部

位とした。

質蛋白質標品として取得し、その諸性質を比較した。

## 研究結果

### 1. カルパイン I および II の並行精製

ラット腎臓よりカルパイン I および II を、ほぼ同様の方法により並行して精製し、それぞれを均

出発材料 360 ml を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフに供した結果を図 1 に示す。

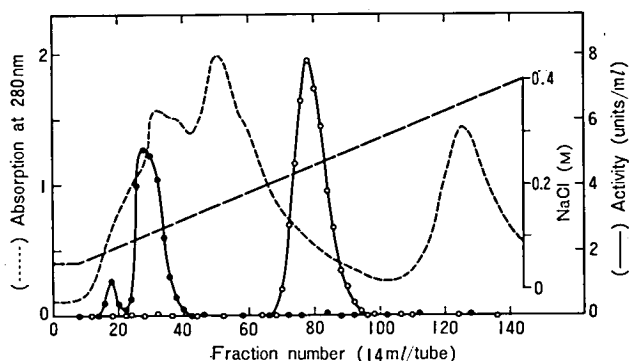


図 1 DE 52 chromatography of rat kidney crude extract. A column of DE 52 (3.2×17 cm) was loaded with rat kidney crude extract containing 3,640 mg of protein in 360 ml and eluted with 2 l of buffer A having a linear gradient of 50 to 400 mM NaCl and at a rate of 50 ml/hr. Fractions of 14 ml each were collected. ---, absorbance at 280 nm; -●-, calpain I activity; -○-, calpain II activity.

表 1 Purification of calpain I and calpain II from rat kidney

Protease	Step*	Total activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification (-fold)	Yield (%)
Calpain I	(1)	170**	3,640	0.0465	1	
	(2)	856	380	2.25	48	100***
	(3)	506	16.1	31.4	675	59.1
	(4)	236	1.13	203	4,470	27.6
	(5)	152	0.53	287	6,170	17.8
Calpain II	(1)	562**	3,640	0.154	1	
	(2)	1,810	134	13.5	87	100***
	(3)	619	3.43	180	1,170	34.2
	(4)	344	0.86	401	2,600	19.0
	(5)	215	0.33	642	4,160	11.9

\* Steps are: (1) crude extract, (2) DE 52 chromatography, (3)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractionation and followed by TSK-Gel G 3000 SWG chromatography, (4) blue Sepharose CL-6B chromatography, and (5) DEAE-Bio-Gel A chromatography.

\*\* Calpain activities in crude extract were only apparent values, since both enzymes were not separated and inhibitor(s) co-existed. We assumed that the proteolytic activity measured as 0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  represented only calpain I activity and the activity measured at 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  represented calpain I plus calpain II activity.

\*\*\* Activities after DE 52 chromatography were taken as 100% for the respective enzymes.

