

厚生省
新薬開発研究費

微生物の二次代謝産物に由来する
難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究

梅 沢 班

昭和 59 年度研究報告書

昭和 60 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から第 6 年度（昭和 59 年度）を迎え、これを終了した。

本年度（昭和 59 年度）は前年度までの研究に引き続き、ロイペプチン、ベスタチン、ホルフェニシノール、アルファメニン、ホルフェ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、ベスタチンおよびホルフェニシノールの臨床研究を行い、とくにベスタチンについては Single blind cross over 法による臨床試験が試みられた。

昭和 54 年から昭和 59 年度にわたり施行された筋ジストロフィー症に対する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、また臨床研究において小児患者にベスタチン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。これは刮目すべき成果といえることができる。かくして、昭和 60 年度にはベスタチンの無作為化比較試験およびホルフェニシノールの臨床試験が行われることになった。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に対する治療薬開発の門を拓いたといえることができる。

なお、ベスタチンの無作為化比較試験とホルフェニシノールの臨床研究が本班を縮小して継続されることになったが、極めて適切なことである。ここに、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 60 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 *α*-ヒドロキシベスタチンとフォルフェニシノール
の高感度定量法 25
大 倉 洋 甫

酵素網の動的平衡に及ぼすベスタチンの効果 37
青 柳 高 明

急性脊髄損傷に対するロイペプチンの効果 47
岩 崎 祐 三

ロイペプチンの薬理学的研究 53
大 塚 正 徳

ジストロフィー筋よりの creatine kinase (CK) 遊離に対する各種薬 剤の影響	65
	高 木 昭 夫
Mdx マウスに対するロイペプチン, ベスタチンの投与成績	71
	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	77
	丸 山 工 作
筋ジストロフィー症マウスに対する高濃度ベスタチンおよびアルファ メニンB投与の効果	89
	松 下 宏
体外受精法によって作出された C57BL/6-dy ホモマウスに対する ベスタチンおよびロイペプチン投与の影響	95
	野 村 達 次
筋疾患に対するベスタチンの長期投与を中心に	99
	村 上 慶 郎
DMD 患者に対するベスタチン服用の臨床的検討について	105
	三吉野 産 治
Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMP) に対するベスタチンの 使用経験——臨床的立場から	111
	福 山 幸 夫
血清 CPK の変動に対するベスタチンの効果	121
	木 下 真 男

Duchenne 型筋ジストロフィー患者に対するベスタチンの影響

——新しい筋障害の marker を用いて 127

祖父江 逸 郎

筋ジストロフィー症に対する NK 421 (Bestatin) 長期投与後の

経過報告 135

里 吉 栄二郎

ホルヘニシノールの体内動態研究 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 155

田 中 亘

滝 田 智 久

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 183

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

梅沢浜夫らは微生物がつくる低分子の酵素阻害物質という新しい研究領域を開拓し、薬理活性を有する 50 以上の阻害物質を発見し、世界の注目を集めている。

これらの阻害物質の一つであるロイペプチンが、筋ジストロフィーマウスの発症および症状の進行を阻止することを米国ニューヨーク州立大学の Stracher 博士が発見した。ロイペプチンは筋蛋白の崩壊に関与するセリン・チオールプロテナーゼを阻害するため、試みられたわけである。

かくして、ロイペプチンについては外国で臨床研究が計画され、本班の設立とともに、ロイペプチンの毒性試験を含む前臨床研究を詳細に行い、安全な経口投与量を設定した。

一方、梅沢らは細胞膜に結合する微生物代謝産物の研究を始め、ベスタチン、ホルフェニシンなどを発見した。

すなわち、細胞膜に存在することを明らかにしたアミノペプチダーゼ、アルカリホスファターゼ、エステラーゼなどに対する阻害物質を土壌放線菌中に探索し、上記阻害物質を発見したわけである。なお、ホルフェニシンは経口投与では分解するので、より安定なホルフェニノールが詳しく研究された。

松下班員によってベスタチン、ホルフェニノールが筋ジストロフィーマウスの発症および症状の進行阻止に効果があることが確認された。青柳班員が筋ジストロフィーマウスにベスタチン、ホ

ルフェニシンを連続投与し、経時的に筋肉内の酵素網の動態を調べた結果、アミノペプチターゼを含む水解酵素活性が抑制されているという発見でも支持された。

ベスタチンは癌治療の目的で詳細な前臨床試験が行われていたが、Duchenne 型患者は小児であるので、さらに前臨床試験を行い臨床研究が始められた。臨床研究においては、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に作用する酵素阻害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。筋ジストロフィー症の治療に大きな光を与えたということができた。ベスタチンについては、なお投与量、投与方法などを検討し効果を確かめるには最低 3 年の研究が必要である。また、ホルフェニノールなどの研究も行うべきであると考ええる。

本研究班はロイペプチンおよびベスタチンなどの筋ジストロフィー症に対する治療効果を研究するため、6 年間にわたり生化学的研究、薬理学的研究、生理学的研究、病理学的研究、製剤学的研究、前臨床研究ならびに臨床研究を行い、治療薬の早期開発を目的としたが、その一端を完成したと考える。

各分担研究者により施行された研究は次のとおりである。

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):一蛍光HPLCによる *p*-ヒドロキシベスタチンとホルフェニシノールの高感度定量法

3) 青柳高明(微生物化学研究所):一酵素網の動的平衡におよぼすベスタチンの効果

4) 岩崎祐三(東北大学医学部):一急性脊髄損傷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):一ロイペプチンの薬理学的研究

6) 高木昭夫(虎の門病院):一ジストロフィー筋よりのCK遊離に対する各種薬剤の影響

7) 埜中征哉(国立武蔵療養所神経センター):一mdxマウスに対するロイペプチン,ベスタチンの投与成績

8) 丸山工作(千葉大学理学部):一鶏ジストロフィー筋における新生児型構造蛋白の出現

9) 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対する高濃度ベスタチンおよびアルファメニンB投与の効果

10) 野村達次(実験動物中央研究所):一体外受精法により作成したC57BL-dy/dyマウスに対するベスタチンおよびロイペプチン投与の影響

11) 村上慶郎(国立療養所箱根病院):一ベスタチンの長期投与を中心として

12) 三吉野産治(国立療養所西別府病院):一DMD患者に対するベスタチン服用の臨床的検討について

13) 福山幸夫(東京女子医科大学):一Duchenne型進行性筋ジストロフィー(DMP)症に対するベスタチンの使用経験一臨床的立場から一

14) 木下真男(東京大学医学部):一運動負荷後の血清CK上昇に対するベスタチン投与の影響

15) 祖父江逸郎(国立療養所中央病院):一Duchenne型筋ジストロフィー患者に対するベスタチンの影響

16) 里吉栄二郎(国立武蔵療養所神経センター):一各種筋ジストロフィー症に対するベスタ

チン長期投与後の臨床経過

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研究

18) 田中 亘・滝田智久(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

村地班員はロイペプチンによって特異的阻害を受ける酵素としてカルパインを選び、その諸性質に、特に触媒作用特性および組織分布に関する研究を行った。

低Ca²⁺要求性カルパインIはブタ赤血球より、また、高Ca²⁺要求性カルパインIIはブタ腎臓よりそれぞれ均質標品として精製した。

(1) カルパインIおよびIIの触媒作用特性
数種オリゴペプチドの加水分解作用点を比較した結果、両酵素ともに、P₁位置にはメチオニン、チロシン、リジン、またはアルギニンのようなかさ高い残基を、そしてP₂にはロイニンまたはバリン残基を特に好む特性のあることが知られた。さらにSuc-Leu-Met-MCA始め数種のメチルクマリルアミド基質を合成し、それらを用いた蛍光測定法によってK_m, k_{cat}値を計測することができた。また、合成基質を用いて、ロイペプチンおよびアンチパインのカルパイン阻害作用が明瞭な競争阻害であること、また、ロイペプチンのほうが3分の1ないし4分の1小さいK_iを示すことを明らかにした。

(2) カルパインIおよびIIの免疫組織学的分布

それぞれの酵素の80kDaサブユニットを免疫原として特異抗体を作製し、これによって両酵素の各組織細胞における分布を明らかにすることができた。ペルオキシダーゼまたは蛍光標識抗体による検索の結果では、ブタまたはラット肝、腎、

筋肉、小腸等におけるカルパイン I と II の分布には大差のないこと、いずれの組織でもカルパインは実質細胞の細胞質に diffuse に分布していることが知られた。

2. 蛍光 HPLC による *p*-ヒドロキシベスタチンとホルフェニシノールの高感度定量法

大倉班員は血清中からベスタチンの主代謝物である *p*-ヒドロキシベスタチンを、また血漿および赤血球からホルフェニシノールを、それぞれ蛍光 HPLC により高感度で定量する方法を確立した。

1) プレカラム蛍光誘導体化による血清 *p*-ヒドロキシベスタチンの HPLC 定量法：ベスタチン (Best) の主代謝物である *p*-ヒドロキシベスタチン (*p*-OH Best) の選択的蛍光誘導体化条件を検討し、その HPLC 定量法を開発した。血清 200 ml を試料とし、過塩素酸で除蛋白後、CHCl₃ 存在下 KOH 溶液中 70°C で 8 分間加熱し、*p*-OH Best のフェノール性水酸基のオルト位にホルミル基を導入した。直ちに、その反応液を酢酸酸性 (pH 3.3) に導き、アルデヒドの蛍光試薬 DDB を加え、H₂O₂ 存在下 70°C で 10 分間加熱することによって、*p*-OH Best の蛍光体を得た。この蛍光体は、TSKgel ODS-120 T カラムおよびアセトニトリルと 50 mM 酢酸 Na·HCl 緩衝液 (pH 2.2) (9:41, v/v) からなる溶離液を用いた HPLC によって分離、蛍光検出された。この HPLC によって、Best を経口投与した健常人および筋ジストロフィー患者血清中のその代謝液 *p*-OH Best を定量した。*p*-OH Best の蛍光体は保持時間 5.5 分に、妨害血清成分は 32 分以内にそれぞれ分離溶出する。*p*-OH Best の検出下限は、血清中 62 pmol (20 ng)/ml である。

2) 自然蛍光検出による血漿および赤血球ホルフェニシノールの HPLC 定量法：ホルフェニシノール (Fenol) が発蛍光性であることを見い出し、この自然蛍光を検出する Fenol の HPLC 定

量法を開発した。血漿 100 μl および赤血球 50 μl 中の Fenol は、アセトニトリルで除蛋白後、直ちに、Unisil/NH₂ カラムおよびアセトニトリルと 75 mM クエン酸塩緩衝液 (pH 3.5) (3:1, v/v) からなる溶離液を用いた HPLC によって分離、蛍光検出された。この方法によって、血漿および赤血球にそれぞれ 65 pmol (13 ng)/ml および 160 pmol (32 ng)/ml 以上の濃度で存在する Fenol を、12 分以内に妨害物質と分離し、定量した。この方法は、58 年度に提出した Fenol の蛍光誘導体化 HPLC よりも、前処理が極めて簡便でかつ 15 倍ほど感度も高い。

3. 酵素網の動的平衡におよぼすベスタチンの効果

青柳班員はベスタチンの作用機序を明らかにするために、ベスタチンにより誘起される臓器内および血清中の酵素網の動態について研究を行った。

ベスタチンは ICR マウスに 30 日間連続投与し、経時的に屠殺した臓器内の酵素網の動態ならびにベスタチンを筋ジストロフィー患者に連続投与した前後の血清中における酵素網の動態について検討した。

ベスタチン [(2S, 3R) AHPA-(S)-Leu] 投与群のマウス脾、腎で特徴的な変化が認められ、一定な律動性を有する酵素活性の振動が認められた。一方不活性体 [(2R, 3R) AHPA-(S)-Leu] ではランダムな振動を示すだけであった。この結果はベスタチンが生体内の酵素網にシンクロナイズ効果を与え、細胞機能の変化を誘起したことを示唆する。

また、患者血清中における酵素網の動態はベスタチン投与群では、アミノペプチダーゼ A (AP-A)、AP-B、カルボキシペプチダーゼ B (CP-B)、アルカリホスファターゼ、エステラーゼ活性が有意に低下することを見い出した。有意な変化を示さない酵素においても、投与群と非投与群で異なった振動が見られた。多変量解析により、この変

動を検討した結果、ベスタチンはヒト体内の酵素網にシンクロナイズ効果を与え、マウス臓器における知見と類似した結果を得た。

ベスタチンは細胞膜に作用するとともに、オリゴペプチドの代謝に影響を与え、また間接的に蛋白代謝全般に効果をおよぼし、免疫担当細胞を含む細胞機能に変化をひき起すと考えられる。また筋ジストロフィー患者血清中の加水分解酵素活性にも、明らかな変動を与えるので、今後症例を増やして検討する必要があると考える。

4. 急性背髄損傷に対するロイペプチンの効果

岩崎班員は急性脊髄損傷に対するロイペプチンの効果に関する研究を行った。

筋組織のみならず、中枢神経組織の損傷に対する蛋白分解酵素阻害剤の効果を検討してきたが、今回は、急性脊髄損傷でみられる軸索の変性がロイペプチンの投与により有意に抑制し得ることを実験的に証明し得たので報告する。

脊髄伝達路を構成する軸索の主要な細胞骨格系の一つである Neurofilament が脊髄損傷に際し高度に破壊されること、また、この破壊にはカルシウム依存性プロテアーゼの関与が大きいことが示唆されている。

脊髄損傷に対する薬物療法の効果判定の困難性はしばしば指摘されている。われわれは、軸索終末の初期変性を Fink-Heimer 法により組織化学的にとらえ、これを自動画像解析装置により計測、脊髄損傷に伴う軸索変化の程度を定量的に表現する方法を新たに開発し、この実験系を用いてロイペプチンの薬効を判定した。

成熟ラットの第 9, 10 胸椎の椎弓を切除、脊髄を一定圧で 30 秒間圧迫することにより脊髄損傷を作製、これに伴う脊髄下行路の変性を検索するため、術後 7 日目に第 6 腰髄の Fink-Heimer 染色を行い、Rexed の Lamina VIII において変性軸索終末の占める面積をルーゼックス 5000 画像解析装置により計測した。実験群にはロイペプチ

ン 25mg/kg を手術当日より 1 日 2 回連続投与した (3 日目以降、半量に減量)。単位面積 ($5.174 \times 10^{-2} \text{mm}^2$) 当りの変性軸索の占める割合は、対照群 (7 匹) の $28.4 \pm 0.77\%$ (mean \pm S. E.) に対し投与群 (10 匹) では $23.6 \pm 0.40\%$ で、投与群で有意 ($p < 0.001$) に減少していた。

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) ロイペプチンの平滑筋に対する作用

a) ネコの大腿動脈ラセン状条片標本にノルアドレナリンを投与し、収縮力がプラトーに達した後、 $100 \sim 400 \mu\text{g/ml}$ のロイペプチンを加えたところ、最大 35% に達する収縮力の減少が認められた。

b) モルモットの気管ラセン状条片標本において $200 \mu\text{g/ml}$ のロイペプチンは、アセチルコリンによる収縮を増強した。

2) 交感神経節に対する作用

昨年度、副交感神経節においてロイペプチンがアセチルコリンの速い脱分極作用を抑制し、それに続く遅い時間経過の脱分極を増強することを報告した。本年度はモルモット下腸間膜動脈神経節において実験を行った。神経節細胞から細胞内記録を行い、アセチルコリンを圧パルスにより適用すると速い時間経過の脱分極と、これに続く遅い時間経過の脱分極とが発生した。拮抗薬を用いた分析によって、前者はニコチン作用、後者はムスカリン作用であることが分かった。ロイペプチンはアセチルコリンのニコチン作用を抑え、ムスカリン作用の時間経過を延長させた。

3) 摘出脳幹-脊髄-肺標本に対する作用

新生ラットの摘出脳幹-脊髄-肺標本を用いて実験を行った。空気を気管から入れて肺を拡張させると一経過に呼吸の抑制が起った。この反射性呼吸抑制はロイペプチン $200 \mu\text{g/ml}$ を脳幹側に与えても、また肺側に灌流適用しても影響を受けな

った。

4) 脊髄運動ニューロンに対するベスタチンの効果

ラットの脊髄運動ニューロンから細胞内記録を行い、ベスタチン 20mg/kg を腹腔内に与えた。Ia群線維の刺激によって内側腓腹筋運動ニューロンに発生する興奮性シナプス後電位は軽度増大した。

6. ジストロフィー筋よりのCK遊離に対する各種薬剤の影響

高木班員はMDXマウスを用いて、長趾伸筋(EDL)からCKの遊離を、各種薬剤を*in vivo*(慢性)に投与して、CK遊離に対する影響を検討した。

ハムスターは筋ジス(B10 14.1)と対照(B10 FIB)を使用した。MDXマウスと対照(C57 B1)を使用した。実験法は既報(Biomed Res 5: 311, 1984)によった。還流液に混じ直接効果を検討した薬剤はLeupeptin, Bestatin, Pepstatin, menadione, dantrolene, diamoxである。またleupeptinとpepstatinを4~6週腹腔内に投与して慢性的効果を検討した。1側下腿筋の形態的検討を行った。

1 Hz 単収縮反復中のCK遊離速度(*in vitro*)は、対照マウス 1.4 ± 0.8 (U/g/hr, $n=16$)、MDXマウス 36.0 ± 25.8 ($n=28$, $p < 0.001$)であった。leupeptinとpepstatinを腹腔内投与したMDXでは 35.6 ± 16.4 ($n=12$)であり、未処理のものと差は認めなかった。

Bestatin, leupeptin, pepstatin, dantrolene, menadione, diamoxの直接投与はいずれもCK遊離に影響を与えなかった。leupeptinとpepstatin投与は形態的指標に対して影響を与えなかった。

今回使用した実験系において、CK遊離の機序として筋膜を通しての漏出が推定されている。しかしまだ確実ではない。ジストロフィー筋に特長

的であり、1指標として考えられた。この現象に影響を及ぼす薬剤は発見されなかった。

7. mdxマウスに対するロイペプチン、ベスタチンの投与成績

榎中班員はX染色体性劣性遺伝をとる筋ジストロフィー(mdx)マウスの筋病変に対するプロテアーゼインヒビターの効果について研究を行った。

まずmdxマウスの臨床、病理学的特徴を明らかにするため、生後0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120日目にmdxマウスとその対照(C57 BL/10 ScSn)マウス各々5匹ずつにつき金網よじ登り試験、体重測定を行い、ヒラメ筋(赤筋)、長指伸筋、前脛骨筋(白筋)を採取し病理学的検索を行った。治療の対象としたのはmdxマウス11匹で生後3日目よりロイペプチン10mg/kgとベスタチン10mg/kgを30日間連日皮下注射し、その効果をみた。同腹の16匹を対照とした。

mdxマウスには生後10日目まで壊死線維はみられず、筋線維の発育、分化は対照と何ら変らなかったが、15~20日目頃より壊死線維が群をなして出現し、壊死に続く再生線維をみるようになった。再生線維は中心核と塩基好性の胞体で特徴づけられていて、30日目には中心核線維はいずれの筋でも筋線維の約40%を占めた。

治療群マウスでは外見的に非治療群と差はなく、1月治療後の体重は 14.5 ± 2.9 g(対照: 14.2 ± 3.0)であり、CK値は 5.100 ± 2.800 IU(4.700 ± 1.980)で有意の差はなかった。病理学的にみると治療群にも筋線維の壊死と再生像はほぼ等しく存在し、筋線維の平均径は $30.1 \pm 5.0 \mu$ (対照: 3.02 ± 4.1)と有意差なく、また中心核線維の頻度も $43.6 \pm 9.7\%$ (37.3 ± 9.5)と両者間に差は認められなかった。

mdxマウスに対して筋線維の壊死出現(発症)以前よりロイペプチン、ベスタチンを投与したが、壊死過程の抑制効果は認められなかった。

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を筋ジストロフィー症の発症の指標として、ベスタチンの効果について研究を行った。

筋構造蛋白質には異なる分子種が存在し、その発現は胚から新生児、親への成長過程で著しく変化する。また、鶏のジストロフィー筋では、新生児期を特徴づける蛋白質（遅筋型C蛋白質、 β トロポミオシンなど）が発現されること、および除神経筋でも同様の変化が起ることがすでに見い出された。本研究では、これらの新生児型蛋白質の出現を筋ジストロフィー症の発症の指標として、薬剤（ベスタチン）投与が筋ジストロフィー症に対してどのような効果をもつかを検討した。前年度、ふ化直後から1カ月齢までベスタチンを継続投与した時、筋ジストロフィー鶏胸筋における遅筋型C蛋白質を含む細胞の出現が抑制される傾向にあるという予備の結果を得た。本年度は、発症が顕著となる3か月齢までベスタチンを継続投与した時の効果を、主として遅筋型C蛋白質の発見の面から検定した。ベスタチンは微化研青柳博士からご供与いただき1~2週齢の期間は5mg/kg、それ以降は10mg/kgを連日皮下に投与した。3月齢の鶏胸筋の凍結切片にC蛋白質に対する抗体を作用させて免疫組織化学的に調べた結果、正常鶏ではこの月齢では全く遅筋型C蛋白質は検出されないが、筋ジストロフィー鶏（無処理または生理食塩水投与）ではかなり多くの細胞（雄では15~50%の細胞）に遅筋型C蛋白質、さらに少数の小型細胞に心筋型C蛋白質も検出された。遅筋型C蛋白質の出現は明らかに雌より雄に多く、筋ジストロフィー症は雄に顕著であることを示唆した。ベスタチン投与された鶏では、対照鶏より遅筋型C蛋白質をもつ細胞の出現率が低い傾向があるが、遅筋型C蛋白質の出現を阻止するこ

とはできなかった。 β トロポミオシンの出現や運動機能の検定（フリップテスト）の結果も、遅筋C蛋白質を指標とした結果と同じ傾向であった。前年度の結果と合わせ考えると、今回のベスタチン投与方法では、鶏筋ジストロフィーの発症をやや遅延させるものの、発症を抑えることはできないと思われる。

9. 筋ジストロフィーマウスに対する高濃度ベスタチンおよびアルファメニンB投与の効果

松下班員は筋ジストロフィーマウスに対するベスタチンおよびアルファメニンBの効果を、投与量ならびに投与時期などについて研究を行った。

筋ジスマウスに発症初期から投与を開始することによって回復効果があることが認められているベスタチンを、従来の5倍（2mg/day）および10倍（4mg/day）の投与量で、症状のかなり進行している1か月齢の筋ジスマウスに短期間投与し、症状進行を抑制する効果の有無を検討する実験を行った。その結果、4週間および6週間の投与では血清中のマーカー酵素（PK, CPK）活性は著しく低下し、骨格筋中のマーカー酵素（PK, CPK, GOT, GPTなど）はいずれも有意に増加していた。また骨格筋中のAlkaline proteaseおよびNeutral proteaseは共に有意に活性低下を示していた。さらにその間の体重変化を見ると、投与開始から1週間位の間に急激に体重が増加するのが認められたが、その後は対照マウスと同様にゆるやかな減少傾向を示した。これらの結果から、すでに症状の進行している筋ジスマウスに対しても高濃度のベスタチンを投与することで症状の進行をある程度抑制することが可能であること、ならびに、その効果は連続投与よりも、むしろ時々休む断続的な投与方法の方が良いかも知れないことが示唆された。

次にアルファメニンBの投与量を変えて疾病マウスに6週間および12週間投与する実験を行っ

た。その結果 0.4mg/day, 0.8mg/day, 1.2mg/day 投与で、いずれも血清中および骨格筋中のマーカー酵素の活性変化、あるいは尿中のクレアチン排泄量の変化などから症状改善効果があることが認められたが、全般的に 0.8mg/day 投与の場合が最も大きな効果を示していた。同じアルファメニンBの連続投与による延命効果をしらべる実験を各投与量について平均 15 頭ずつの疾病マウスを用いて行った。その結果食塩水投与の対照マウスに比較して、いずれの投与群も明らかな延命効果を示したが、やはり 0.8mg/day dose で最も効果が認められた。1.2mg/day 投与では、平均寿命としては延命効果があるが、全投与マウスが数日以内に死亡するという他の場合とはやや異なった傾向を示した。これらの結果から、アルファメニンBをすでに症状の進行した筋ジスマウスに投与すると症状改善効果が認められ、寿命の延長が得られるが、1日投与量は 0.8mg が最も効果的であるという結論が得られた。

10. 体外受精法によって作成された C 57 BL 16-dy/dy マウスに対するベスタチンおよびロイペプチン投与の影響

野村班員は体外受精法により得られた C 57 BL 16-dy/dy マウスを用いて、ベスタチンおよびロイペプチン投与の効果を研究した。

従来、筋ジストロフィー dy ホモマウスを得るためには、dy 遺伝子をヘテロにもつ保因マウスのメス、オスを交配する方法がとられている。しかし、この交配では、その仔の4分の1に dy ホモマウスが現れるのみであり、しかも生後 2~3 週齢にならないと正常と筋ジストロフィーを区別することが出来ないために胎生期や生後の早い時期にホモのマウスを実験に使用することができなかった。そこで、体外受精の技術を用いて dy ホモマウスを作出し、ベスタチンおよびロイペプチン投与の影響を調べた。

〔成 果〕 筋ジストロフィーを発症した dy ホ

モマウスを用い、メスにホルモン処理をして排卵を誘起した後に卵管膨大部から未受精卵を採取した。一方、オスの精巣上体から精子を採取して、試験管内で受精能を獲得させた。これらの卵と精子の浮遊液体を体外で混合して、受精を成立させ、さらに細胞期まで培養した。この α 細胞期の胚を、あらかじめ擬妊娠を起させた借腹親の卵管内に移植して胎仔あるいは出生仔まで発生させた。

ベスタチンおよびロイペプチンは 2mg/ml の濃度に溶かし、dy ホモマウス（生後 1~2 週齢）の頸部皮下に連日投与した。対照群は生理食塩水を同様に投与した。経時的に体重、発症時期などを調べた結果、ベスタチンおよびロイペプチンとも、dy 筋ジストロフィーマウスの症状改善に、はっきりとした効果は認められなかった。今後さらに詳細な検討が必要と考える。

11. ベスタチンの長期投与を中心として

村上班員は筋疾患のうち Duchenne 型筋ジストロフィー症を中心にベスタチンの長期投与の影響の検討を行った。

対象は肢体型筋ジストロフィー症 3 例、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー症 2 例、筋強直ジストロフィー症 4 例、多発性筋炎 2 例、Duchenne 型筋ジストロフィー症 10 例、計 21 例で男性 17 例、女性 4 例であった。使用期間は 2 カ月から 42 カ月で、使用量は 60mg から 1.500mg（体重 1kg 当り 2mg から 100mg）に及んでいる。

長期間の投与成績は血清酵素（CPK, LDH, GOT, GPT）はベスタチン使用開始後暫くの間は低下するが、その後は徐々に増加の傾向が多く見られる。しかし、そうでないものも見られる。長期間の投与で症状の改善の見られたものは Preclinical の Duchenne 型筋ジストロフィー症の 1 例のみで多発性筋炎 2 例はステロイドの節約作用が見られたが病状は進行していた。尿検査、血液一般検査に異常は認められず、認むべき副作用もなかった。

12. DMD 患者に対するベスタチン服用の臨床的検討について

三吉野班員はベスタチンの臨床効果を評価するため、Duchenne muscular dystrophy (DMD) 症患者 (10 歳以下) 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。

10 歳以下の Duchenne 型筋ジストロフィー症の入院患者 6 例にベスタチン、プラセボ、ベスタチンの順で、20mg/kg/日 (1.000mg/日/成人) 分 3 (7時, 15時, 21時) で 8 週間ずつを投与し、血中濃度 (4W, 6W, 8W)、血液生化学所見、運動機能、ADL などについて、臨床効果を検討した。

その結果 1) 朝服薬 1 時間後の血中濃度は 18 週目の 1 例を除き、安定な状態を呈した。2) CPK は、ほぼ不変が 1 名、低下したまま 1 名、低下後上昇が 2 名、上昇後低下が 2 名であった。平均として、ベスタチン投与で低下し、プラセボに変更後、上昇を示した。3) GOT, GPT, LDH などでは、有意な変動はなかった。4) 10m 往復歩行時間、立ち上り時間、階段昇降時間、握力などでは、変動があったが、有意差は認められなかった。ADL は一時改善があり、その後低下していた。5) 皮診、嘔気などの副作用は見られなかった。

まとめとして、CPK は、血中濃度の上昇にしたがって、下降してきた。重回帰分析により、CPK は ADL に最も相関する変数であったが、5% の有意差は認められなかった。臨床効果については、10m 往復歩行、立ち上り、握力、ADL などは一過性に運動機能の改善が見られる例があったが、全体として運動機能が悪化する傾向にあった。

今回のベスタチン治験はまだ進行中なので、中間報告として発表する。

13. Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症 (DMP) に対するベスタチンの使用経験—臨床的立場から—

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検討する目的で、東京女子医科大学小児科通院中の Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症 (以下 DMP) 12 例 (年齢 2 歳～8 歳) および非典型的な良性 DMP 1 名 (12 歳) に、ベスタチン 20mg/kg/日 を 8 週間交代の Single blind cross over 法に従い 1 日 3 回に分けて投与した。ベスタチン投与歴のある例では 2 週間以上休薬後、投与を開始した。また偽薬投与後に家族が悪化を訴えてきた場合には、2～4 週間で真薬に戻して検討した。

服用前と投与開始後 4 週間ごとに採血および 1 日採尿を行い、クレアチン・フォスフォカイネース (CPK) などの血清酵素、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った。

各運動機能所用時間 (20m 走行・階段昇降・起立・起坐・寝返り) の測定および運動機能・筋力の変化につき評価した。

〔結果〕 1. 血清 CPK 値: DMP 新鮮例 5 例中 4 例では、投与開始後 4 週の時点で全例低下した。使用経験有の例ではこの傾向は明確でなかった。

2. 運動機能の変化: 1) Preclinical stage の 2 歳の 2 例では、使用経験有の例も新鮮例も共に投与開始後の運動機能は上昇していた。

2) 4 歳以上の使用経験有の例では、休薬前・開始前・開始後・偽薬後の変化につき検討した。

a) 3 例では休薬後悪化し、投与開始後もさらに悪化、偽薬後著明な悪化をみたが、1 例では真薬再投与後軽度改善、1 例では真薬再投与後 4 週で改善 8 週で再び悪化、他の 1 例では 4 週も 8 週も更に悪化した。

b) 3 例では休薬の変化は明確でなかったが、偽薬後悪化があり、真薬再投与後軽度改善した。

いずれの症例も全体の機能は a) の 3 例より良好であった。

3) 新鮮例では、2 例のみ偽薬投与まで観察し得た。5 歳の 1 例は投与後改善、偽薬後悪化、真薬再投与後改善した。7 歳の 1 例は投与後も軽度悪化していたが、偽薬 4 週後、明らかな悪化を示し、8 週でもさらに悪化し続けた。

3. 使用経験有の例の休薬前と新鮮例の投与前の運動機能を比較したが、年齢を合致させてみて前者の方が良好という傾向は無かった。

以上ベスタチン投与により著明な臨床効果の認められた例はなかったが、一時的な改善を示す例はみられた。進行が急速な 6～7 歳例では、休薬および偽薬に変更後の悪化が服薬中よりも目立つ印象を受けた。また軽症例では偽薬で悪化しても、真薬投与後改善する傾向がみられた。しかしながら、使用経験有の例の休薬前と新鮮例の投与前の運動機能を比較し、年齢を合致させてみた場合、前者のそれの方が、良好という傾向は無く、現時点では本剤の治療効果について結論し難い。

14. 運動負荷後の血清 CK 上昇に対するベスタチン投与の影響

木下班員は運動負荷後の血清 CK 上昇に対するベスタチン投与の影響および 6 施設での評価について集計を行った。

進行性筋ジストロフィーの患者において、血清 CK が高値を示すことは良く知られているが、最近ベスタチン投与でこれが低下傾向を示すことが相次いで報告されている。その作用機序については未だ詳細が明らかではないので、これに関する解明の手がかりを得る目的で次の研究を行った。

1) 筋ジストロフィー症患者について長期間血清 CK を連日測定し、小量投与、大量投与、薬剤なしの安静保持、大量投与で安静保持の 4 期に分けてベスタチンの影響を比較検討したところ、血清 CK は安静によっても大きな影響を受け、有意な低下を示した。また、これにベスタチン投与を

加えるとさらに低下の傾向が見られたが、安静を守らない場合には明らかな効果は見られなかった。

2) 健康成人に種々の種類の運動を負荷し、血清 CK が上昇することを確認してから、ベスタチン投与で、これがどう変動するかを検討した。CK は負荷後 24 時間で最高に達するが、ベスタチン非服用時には平均 51.0 単位の上昇を示すのに対し、服用を 1 週間続けた後では平均 28.57 単位の上昇で、前値に比して減少の傾向を示した。

運動負荷後の血清 CK の上昇の機序は明らかではなく、細胞膜からの透過、筋線維の断裂などの機序が想定されているが、通常程度の運動では形態学的変化は確認されておらず、膜の透過の可能性が高い。今回の研究の結果、ベスタチンがこれを抑制する作用を有することが示唆され、本剤の筋ジストロフィー症の血清 CK 低下作用には、こうした非特異的な膜の安定作用も加わっているのではないかと推定した。

15. Duchenne 型筋ジストロフィー (PMD) 患者に対するベスタチンの影響——新しい筋障害の marker を用いて——

祖父江班員は進行性筋ジストロフィー (PMD) 患者に対するベスタチンの影響を検討するため、血清 CK と新しい筋障害の marker である muscle-specific enolase (MSE), carbonic anhydrase III (CA-III) について研究を行った。

1) 143 例の PMD 患者で調べた血清 CA-III の異常値出現率は、CK や MSE と同程度かそれ以上であった。

2) 血清 CA-III 値と CK 活性値の相関係数は 0.8471, MSE 値とでは 0.7818 というれも高い値を示した ($p < 0.001$)

3) 10 例の歩行可能な Duchenne 型 PMD 患者に 8 週間ベスタチン投与 (20mg/kg/日) を行った結果、6 週目に血清 CK 活性値は薬剤投与前に比べ有意に低い値を示した。しかし血清 CA-III, MSE では有意な変化はみられなかった。

4) ベスタチン投与終了後ひきつづき Placebo を8週間投与した。Placebo に変更後4週間の時点で薬剤投与中止時に比べ、CK, MSE, CA-III のいずれの酵素も有意に高い値を示した。

5) 血清 CA-III は CK, MSE とほぼ同様の推移をとり、ベスタチン投与によって特別な変化を示さなかった。

6) 血清酵素の変動に平行した運動機能の改善はみられなかった。

7) 特記すべき副作用はみられなかった。

16. 各種筋ジストロフィー症に対するベスタチン長期投与後の臨床経過

里吉班員はベスタチン (NK 421) を各種筋ジストロフィー症の患者に長期投与を行い、その臨床経過について研究した。

約4年間にわたる長期 NK 421 投与を続け、臨床経過を観察中の9例。内訳は、肢帯型筋ジストロフィー (LG PMD) 5例、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSH PMD) 2例、Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne PMD) 2例である。以上の症例に対し、NK 421 を少量より経口投与開始し、副作用の発現に注意した上で症例により1カ月単位で漸増させた。昭和60年3月現在での最大投与量は、200~1,000mg/day でNK 421 投与期間は7~45カ月(平均32.7カ月)である。

臨床症状の判定には定期的な全身の筋力評価、10m歩行時間、階段昇降時間を用いた。血液生化学的指標には CPK を用い、その他副作用監視のため、末梢血液、肝、腎機能、尿所見を観察した。

〔結果〕臨床的に改善を示した例はなく、臨床的に不変の FSH, PMD の1例と subclinical な Duchenne PMD の計2例を除き全例に症状の進行がみられた。一方血清 CPK 値は LG PMD の1例を除き低下傾向がみられた。この傾向は Duchenne PMD などの、従来より CPK が著しく高値を示す例で顕著にみられた。しかしこれら

の例でも臨床的には明らかに症状の進行がみられており、CPK 血清値の動きと臨床的变化との間に相関はみられなかった。

NK 421 投与中、3例に悪心、食欲低下、下痢などの消化器症状を訴えたものがあつた。(240mg, 450mg, 1,000mg 服用中)しかしこれらの例でも、減量、一時的休業にて自然に症状消失、その後も NK 421 の投与を続けることが出来た。血清、血液生化学、尿所見では異常がみられず、重篤な副作用はみられなかった。

NK 421 投与により、明らかな症状改善を示す例はなかったが、多くの例で CPK の低下を認めており、症状の進行を遅らせている可能性は否定出来ず、今後、二重盲検法などによる検討がさらに必要と思われた。

17. ホルフェニシノール (BF-121) の体内動態研究

松本班員はホルフェニシノールの体内動態を調べるため、ラット、ウサギ、イスおよびヒトに単回投与を行い、血中濃度、尿、糞中排泄、代謝物を測定し、動物種差の体内動態の比較検討を行った。また、ラットに単回経口投与した時の組織内分布についても研究した。

1) 測定法：ラットの体内動態はすべて [^3H]-BF-121 を用いて行った。他の実験は、M-1 (未変化体)、M-3 は RIA 法 (前年度報告)、M-2, M-4, M-5, M-6 は HPLC 法で分析したが、M-2 についてはその不安定性のためにメトキシイミノ体に誘導したのち測定した。

2) 結果：ホルフェニシノールは、いずれの動物種においても消化管から速やかに吸収され、投与30分~1時間で最高血中濃度に達し、また血中からの消失も早い。いずれの動物種においても血中代謝物は、大部分が未変化体である。

総排泄率は80%前後であるが、そのほとんどが尿中に排泄され、経口吸収性は良く、また蓄積性は認められなかった。

尿中代謝物については大きく種差が認められ、ラットでは M-6, ウサギでは M-4, イヌでは M-1, ヒトでは M-3 が主代謝物で、それぞれ尿中代謝物の 50% 以上を占めた。

組織への移行性は良く、多くの組織では血中よりも高濃度に分布し、特に脳下垂体、腎臓、膵臓が高い値を示したが、排泄も早く、血中からの消失とほぼ並行する。しかし肝臓にはあまり分布せず、免疫系に関与するリンパ節、胸腺、骨髄、脾臓に比較的高濃度に分布するのが特徴的である。

また筋肉中へはあまり高濃度に分布せず、投与 1 時間後で血中濃度のはぼ 3 分の 1 であるが、筋肉中からの消失は他の臓器と比べて大変遅い。

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、滝田、石井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を行った。また各班員にロイペプチン、ベスタチンを提供するとともに、臨床試料の分析を担当し臨床研究の支援を行った。

1) ロイペプチンの bioavailability と製剤研究
腸溶顆粒をつくり、イヌに経口投与したときの bioavailability は在来製剤のそれと異ならなかった。

室温密栓下に 3 年半保存した後の L-ロイペプチン残存率は、原末 92.0~95.6%, 臨床試験用 10 倍散 94.7%, カプセル 91.6% であり、低下の原因はラセミ化であった。

2) ベスタチンの bioavailability

2-1) 筋ジストロフィー雄性マウス (C57BL/6J dy(-)) とその同腹非発症マウスにつき調べた。血中ピークは両者同様であり、減衰は発症マウスで遅かった。連続投与により、ピークは不動で減衰が遅くなることはヒトを含めた他動物種と共通しており、発症マウスでは減衰がさらに遅れた。マウスの主代謝物である (2S, 3R) AHPA の存在比は両者で同水準であり、投与量の増加に

伴って減少した。

筋肉内濃度を投与後 1 時間で比較すると、ベスタチンは血中濃度の 30~40% に達し、AHPA は血中より高いが、発症マウスの AHPA 存在比は非発症のそれより低かった。また、筋ホモジネートとベスタチンを反応させたときの AHPA 生成は発症マウスでは非発症のその半分であった。

発症マウスでの尿・糞中回収率は前報までに報告した他動物種のそれと同様に高く、代謝型も正常マウスと同様であった。

2-2) 幼若ラット (3 週齢) の亜急性毒性試験に併行して bioavailability を調べた。

投与量 117mg/kg において、最高血中濃度は 30 $\mu\text{g/ml}$ に達し、24 時間後も 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の未代謝型ベスタチンが検出された。p-hydroxy-bestatin は 2 桁低かった。以上の傾向は 3 週間連続投与後も変らなかった。

2-3) Duchenne 型筋ジストロフィー小児 2 例の 130mg \times 3 回/日投与期間における尿中の代謝物組成を福山班員と共同で測定したが、健康成人のそれと同様に大部分のベスタチンは少量の p-hydroxy bestatin と微量の (2S, 3R) AHPA から成り、代謝物は連続投与により増加した。

3) ベスタチンの安定性

室温密栓下に 2 年半保存したときの臨床試験用ドライシロップのベスタチン残存率は 98.9% であり、分解物は検出されなかった。

4) ベスタチンの幼若ラット (3 週齢) に対する経口毒性

0.5, 1.0, 2.0g/kg を 1 回投与したときの急性毒性は一般状態・体重・病理学的検査のいずれにも著変はなく、また死亡例もなかった。39, 117, 350, 700mg/kg を連日 13 週間投与したときの一般状態・尿検査・血液検査・病理学的検査のいずれにも著変なく、また死亡例も認められず、成獣におけると同様にベスタチンは幼若ラットにも低毒性であった。

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 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行った。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った。

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

カルパイン I および II は、それぞれブタ赤血球およびブタ腎臓より均質蛋白質として精製した¹⁾。精製酵素は 20mM イミダゾール緩衝液 (pH 7.5, 2mM EGTA および 5mM 2-メルカプトエタノール含有) に 4°C で十分透析した後使用した。

カルパインのカゼイン加水分解活性は、50mM トリス・HCl 緩衝液を用い、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。カルパイン I の定量には 0.1mM CaCl_2 を、カルパイン II の定量には 5mM CaCl_2 を活性化剤として加えた。いずれの場合も 5mM 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。

各種オリゴペプチド基質に対するカルパイン I および II の分解作用は、次の方法によって検討した。反応液 1 ml 中にカルパイン 9-150 μg 、基質ペプチド 57-107 nmol を加え、5mM システイン、2.5mM 2-メルカプトエタノール、および 5mM CaCl_2 存在下に 30°C で反応を進行させ、2h 以内の適當時分に EGTA を 9mM になるように加えて反応を停止させた後、生成物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって定量的に分析した。

* 京都大学医学部附属病院検査部

