

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

昭和 62 年 3 月

# 目 次

## 総括研究報告

低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究	3
江橋節郎	

## 分担研究報告

E-64c のプロテアーゼ以外の系に対する作用	17
江橋節郎	
ホルフェニシンの生体内動態—蛍光 HPLC 用高感度蛍光試薬の開発—	19
大倉洋甫	
蛋白分解酵素の役割とその阻害剤に関する研究	25
藤井節郎	
筋ジストロフィー症における各種筋肉内アミノペプチダーゼ活性の変化とその意義	31
青柳高明	
CANP 阻害剤	37
大関正弘	
CANP の生物学的研究	41
川島誠一	
CANP 阻害剤の設計及び合成に関する研究	45
向山光昭	
CANP 遺伝子のクローニングに関する研究	49
鈴木紘一	
Lysosomal cysteine proteinase inhibitor と難病治療薬開発	53
勝沼信彦	
筋ジストロフィー症の発症とトロポニンTのアイソフォーム変化	57
丸山工作	

各種酵素阻害剤投与の mdx マウス病態に与える影響について	63
	辻 繁 勝
実験的筋炎モデル動物の作成に関する研究	69
	里 吉 栄二郎
E-64 誘導体のグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性に及ぼす影響	75
	北 川 晴 雄
CANP 阻害剤の一般薬理学的研究	
—スペクトル解析法を用いた筋電図および神経活動の定量的評価法—	79
	福 原 武 彦
Duchenne 型筋ジストロフィー患者血清中 $\alpha$ -アクチニン測定を試み	83
	杉 田 秀 夫
血中骨格筋ミオシン軽鎖測定法の開発とその臨床的意義	87
	矢 崎 義 雄
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	93
	宮 武 正
治療薬の効果判定法における問題点	99
	石 原 傳 幸
Duchenne PMD に対するベスタチン, ホルフェニシノールの効果	105
	村 上 慶 郎
ベスタチンの臨床使用経験について	109
	三吉野 産 治
Duchenne 型筋ジストロフィー症に対するベスタチンの使用経験	119
	福 山 幸 夫
Duchenne 型進行性筋ジストロフィーに対するベスタチンの効果	127
	木 下 真 男
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	135

# 総括研究報告

# 低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究

主任研究者 江 橋 節 郎

「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬の開発研究」が、昭和 54 年度に厚生省薬務局より新薬開発研究として発足し、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臨床研究において注目すべき多大の成果が得られ、昭和 60 年度に 7 年間に亘る研究を終了した。

さて、厚生省薬務局経済課に医薬品先端技術振興室が設置され、本班は昭和 61 年度から新課題として研究期間 5 年の予定で発足した。新薬推進会議の先生方のご好意により、本班の研究課題「低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究」がとりあげられ、梅沢浜夫先生が主任研究者を引受けられた。本班は斯界の優れた研究者の協力により研究を開始したが、不幸にも梅沢浜夫先生が昭和 61 年 12 月 25 日にご逝去になった。本班の研究を進めるにあたり、厚生省薬務局ならびに新薬開発推進会議の先生方とご相談の結果、私が本班の主任研究者を引受けることになった。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本班に積極的に協力されている班員各位に感謝する次第である。

本研究班は筋ジストロフィー症の治療薬開発を目的とし、低分子酵素阻害物質（ベスタチンならびに E-64 誘導体など）の開発とその基礎研究、前臨床研究ならびに臨床研究を行なう。

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. E-64C のプロテアーゼ以外の系に対する作用

江橋班員は筋崩壊の機作を明らかにするため、チオール・プロテイナーゼ阻害物質である E-64c のプロテアーゼ以外の反応系に対する作用について研究した。

平滑筋の収縮調節に関与しているミオシン軽鎖キナーゼ作用（以下 M-作用と略称）と、ライオトニン作用（収縮作用、以下 L-作用と略称）を取り上げた。E-64c は L-作用を M-作用より強く抑制するが、既にこの事実は SH 阻害剤で認められている。それゆえ、E-64c の誘導体を班員の協力により合成し、M-作用、L-作用および K-作用に特異的な阻害剤の探索研究を施行中である。

## 2. ホルフェニシンの生体内動態

### — 蛍光 HPLC 高感度蛍光試薬の開発 —

大倉班員はホルフェニシンのプレカラム蛍光誘導体化 HPLC による薬物モニター法を設定する目的で、その高感度な蛍光誘導体化試薬の開発研究を行った。

ホルフェニシン分子のアルデヒド基と反応し、蛍光性のベンゾイミダゾール誘導体を与える芳香族アルデヒドの蛍光試薬 1,2-ジアミノ-4,5-ジメトキシベンゼン (DOB) 並びに今回新たに合成

して得た 1,2-ジアミノ-4,5-エチレンジオキソベンゼン (EDB) を蛍光試薬として選択し、それらとホルフェニシンの蛍光反応条件並びに EDB をプレカラム誘導体化試薬に用いるホルフェニシンの逆相 HPLC を検討した。

1. 最適蛍光反応条件：用手法によって、EDB, MDB および MDB との反応条件（反応時の pH, 反応の温度と時間, 各試薬濃度, 最終反応液の pH など）を調べた結果、ホルフェニシンは各3者の試薬、pH 2 の酸性水溶液中 60°C で 15~30 分間加熱することによっていずれも効率よく蛍光物質に誘導され、生成した誘導体は pH 6~6.5 の中性溶液でそれぞれ最も強い蛍光を発することが分かった。中でも EDB によって生じる蛍光強度は MDB のそれより 1.3 倍および DDB のそれより 1.6 倍ほど高かった。

2. プレカラム蛍光 HPLC：EDB とホルフェニシンの反応蛍光生成物は逆相 HPLC で分離したとき単一の蛍光ピークを示し、それは EDB と反応すると他の芳香族アルデヒド、 $\alpha$ -ケト酸、シアル酸などの蛍光ピークと容易に分離できた。この HPLC によるホルフェニシンの検出限界 (S/N=2) は 85 fmol (100  $\mu$  HPLC 注入量) であった。以上から、EDB はホルフェニシンに対して高い感度と選択性を有しており、この HPLC は充分ホルフェニシンの薬物モニターに利用できるものと考えられる。

### 3. 蛋白分解酵素の役割とその阻害剤に関する研究

藤井班員は筋ジストロフィー症に関与している蛋白分解酵素の動態を究明し、蛋白分解酵素に対する合成阻害剤を用いて病態モデルの治療および臨床効果を目的として研究を行った。

合成基質について、Trypsin に対する Tos-Lys-2-NE, Chymotrypsin に対する Ac-Tyr-2-NE のそれぞれの測定限界濃度は  $\text{ng/ml}$  およ

び  $5 \text{ ng/ml}$  であり、従来のアルキルエステルである TAME および ATEE よりそれぞれ 200 倍および 30 倍高感度である。Trypsin および Chymotrypsin の Zymogram について、Trypsin では 1 本の活性帯が、Chymotrypsin では 3 本の活性帯が認められた。また合成基質として Pro-Phe-Arg-2-NE は Plasma Kallikrein に特異性を示し、従来特異的だと言われている D-Pro-Phe-Arg-PNA に比し約 3 倍、組織 Kallikrein に特異的だとされている D-Val-Leu-Arg-PNA に比し Pancreatic Kallikrein を用いた場合約 8 倍高感度に測定できた。Urinary Kallikrein の Zymogram で pI 3.8, 3.9, 4.0, 4.2 および 4.3 の 6 種の等電点の異なる活性帯が認められた。今後これらの手法を用いて筋ジストロフィー症に関与していると思われる酵素について検討したい。

蛋白分解酵素に対し強力な阻害活性を示す FuT-175 (6-Amidino-2-naphthyl-4-guanidinobenzoate dimethane sulfonate) は血漿中の蛋白分解酵素を阻害 ( $C_{1F} : 2.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $C_{1S} : 5.1 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) し、補体溶血反応に対し強力に阻害 (古典的経路:  $6.9 \times 10^{-8} \text{ M}$ , 第 2 経路:  $5.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) する。補体に関与しているアレルギー反応である II 型 (フォルスンマショック) および III 型 (アルサス反応) に著効を示した。以上の成績より FuT-175 は補体の関与が考えられる疾患に対し有効性が示唆されたので、筋ジストロフィー症の動物モデルおよび臨床効果について検討したい。

### 4. 筋ジストロフィー症における各種筋肉内アミノペプチダーゼ活性の変化とその意義

青柳班員は筋ジストロフィー症において、アミノペプチターゼの役割の重要性を示唆してきたが、さらに筋ジストロフィー症の前肢筋、後肢筋および心筋についてプロテアーゼの動態を研究した。

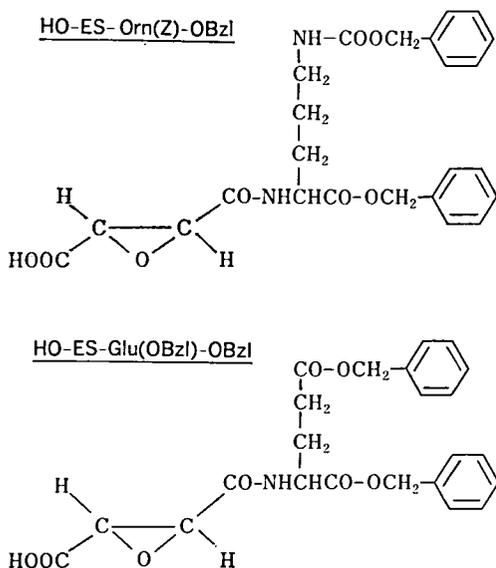
以前に著者らが報告した筋ジストロフィー症患

者血清中のアミノペプチダーゼ活性は罹病初期に高く、進行にともない減少傾向にあることを認めた。一方、エンドペプチダーゼ活性は初期にはむしろ低い、病状の進行にともない増加する傾向にあることを認めた。

患者血清中の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る。また、エンドペプチダーゼ活性は順相関であることを明らかにした。さらにアミノペプチダーゼ阻害物質であるベスタチンは筋肉内アミノペプチダーゼを強く阻害するとともに、長期間投与により生体内酵素網に規則性をもった変動を与えることを明らかにした。本報告では、さらに上記の知見を理解するため、筋ジスマウス筋肉内のプロテアーゼの動態を主成分分析法により解析し、前肢筋と後肢筋ではアミノペプチダーゼが第1主成分と高い相関を示し、両者における酵素網の変化が極めて類似していることを認めた。一方、心筋はエンドペプチダーゼと高い相関を示し、前2者と異なることを明らかにした。

## 5. CANP 阻害剤の研究

大関班員は CANP (Ca-activated neutral  
Chemical Structures of Selected Compounds



protease) の選択的な阻害剤を合成的に得ることを目的とし、チオールプロテアーゼ特異的阻害剤 E-64 およびその誘導体を合成し、CANP およびパパインに対する阻害活性を比較し、構造活性相関について研究した。

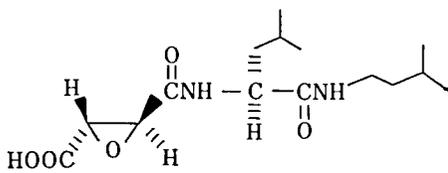
数十種の誘導体の中からパパインに対し作用が弱く、かつ CANP に強い作用を示す数種の化合物を得ることが出来た。中でも左図に示す Orn および Glu 誘導体は天然 E-64 よりも CANP に対する活性がかなり強く、本研究目的に適う有力な化合物と考えられた。更に、これらの化合物を詳細に検討し drug design することにより秀れた CANP 特異阻害剤を開発することが可能であると考えられる。

## 6. CANP の生物学的研究

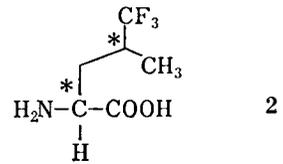
川島班員はカルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) の生理的機能を明らかにするため、CANP の組織内存在部位の検討を抗体による免疫組織学的染色により研究した。

まず、ウサギ骨格筋から2種類の CANP ( $\mu$ -CANP と mCANP) を精製し、それぞれを抗原としてモノクロナル抗体を作成した。mCANP を抗原としたものからは15種類の、 $\mu$ CANP を抗原としたものからは30種類のモノクロナル抗体が得られた。その多くは各 CANP の 80K サブユニットに特異的なものであったが、両 CANP に共通に反応するクローンもあった。CANP の全体像を把握するために後者の抗体を用い、ウサギ各種臓器切片の抗体染色を行い、CANP の組織内存在部位を決定した。

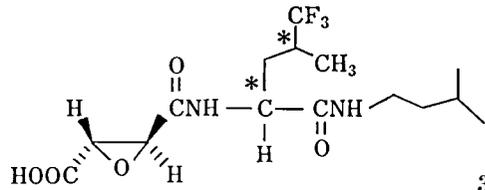
抗体染色後の巨視的にみた臓器ごとの色調の強さは、肺・脾・心・腎・精巣・脳・肝・骨格筋の順となり、CANP の含量を反映しているものと考えられる。微視的にみると、多くの器官で上皮組織が強く反応した。例えば、全ての器官で血管上皮が強く反応し、臓器特異的なものでも肺の肺



1, E-64-c



2



3

胞、胆のうの粘膜上皮、精巢の筋様細胞、肝臓の胆管、腎臓の糸球体・糸球体傍細胞・尿管・集合管・眼の角膜上皮などの上皮系組織が高濃度のCANPの存在を示した。

これらの結果は、従来CANPの機能として推定されていたもの一細胞膜および細胞骨格タンパク質の分解、タンパク質リン酸化酵素などの活性化、ステロイドホルモンや成長因子などの受容体の活性調節、生体膜の融合と密接な関係がある。

## 7. CANP 阻害剤の設計及び合成に関する研究

向山班員はCANP阻害剤の設計および合成に関する研究を行った。

システインプロテアーゼに対して特異的な阻害作用をもつE-64-c (1) は、筋ジストロフィー症治療薬としての有効性が著目されている。その構造活性相関の検討から、活性の発現にはエポキシド部分が必須であるが、アミノ酸残基としてL-ロイシンが重要であることも示唆された。

一方、医薬品をはじめとする生理活性物質のフッ素による化学修飾は、その強い電気陰性度、大きなC-F結合エネルギー、脂溶性の増大などの特異性の故に、最近極めて活発な展開をみせている。そこで、有機フッ素化合物の特異性とE-

64 関連化合物の構造活性相関に基づき、より有効なシステインプロテアーゼ阻害剤の開発を目的として、5,5,5-トリフルオロロイシン (2, 以下トリフルオロロイシンと呼ぶ) を修飾基とする一連の化合物の合成を行った。

3-トリフルオロメチル- $\gamma$ -ブチロラク톤の光学分割が、入手容易な $\alpha$ -フェネチルアミンを用いて行えることを見出し、さらに、トリフルオロロイシン (2) の4つの可能な異性体への変換も行うことができた。CD-スペクトル、X線解析によって、絶対配置も決定し、さらに、ここで得られた立体構造の明確な4種の2を修飾基として、1の類縁物質の合成を試みた。まず、2のカルボン酸部分をイソアルミアミドとした後、L-トランスエポキシコハク酸とのアミド化を行い、トリフルオロEC-64-cの4種の立体異性体(3)を合成し、生理活性試験の試料を供給することが出来た。

## 8. CANP の遺伝子のクローニング

鈴木班員は筋ジストロフィー症(DMD)時のCANP(カルシウム依存性中性プロテアーゼ)活性の昂進の原因をさぐるとともに、活性制御の研究を通じて、CANP活性を特異的に阻害する試薬の開発の基礎を築く目的で研究を行った。

本年度は CANP の細胞内活性化機構の解析のほか、特に内在性の CANP インヒビターの構造解析を行った。即ち、ウサギ肝臓のインヒビターに対応する cDNA のクローニングを行い、その全アミノ酸配列を決定した。CANP インヒビターは 718 個のアミノ酸からなるが、肝細胞で見出されるインヒビターは上記の翻訳産物の N 末端側の 79 残基が欠けた 639 残基のものであった。このアミノ酸配列は従来のプロテアーゼインヒビターの構造とは全く違っていたので、その阻害機構も従来のものとは違う可能性がある。

このアミノ酸配列はアミノ酸約 140 残基を単位とした繰返し構造が 4 個含まれていた。CANP インヒビターは以前から数分子の CANP を阻害することが知られていたもので、インヒビター 1 分子中に数個の阻害部位があることが予想された。この 140 残基からなる繰返し単位が CANP を阻害する単位であることを示すため、大腸菌で各繰返し単位を発現したところ、各繰返し単位が 1 分子の CANP を阻害することが解った。

## 9. Lysosomal cysteine proteinase inhibitor と難病治療薬開発

勝沼班員は筋ジストロフィー症における筋変性・壊死の進行において多段階に働くプロテアーゼの作用機構ならびにプロテアーゼ・インヒビターの役割について研究を行った。

低分子システインインヒビターであるロイペプチンおよび E-64 の各種誘導体の *in vitro* および *in vivo* でのリゾームシステインプロテアーゼの活性阻害、各種薬効について報告してきた。しかし、ジストロフィー筋でみられた筋細胞内カテプシン群の上昇をこれらのインヒビターが抑制するかどうかを調べたことはない。なぜなら浸潤細胞のプロテアーゼ活性を含まずに測定せねばならないからである。

Chlorogine myopathy では E-64 の投与によ

り上昇したカテプシン活性は抑制されているので、投与量と投与方法を選べば有意義に阻害されると思われる。筋ジストロフィー症以外の難病治療のためにシステインプロテアーゼインヒビターを応用できる可能性はあるが、筋ジストロフィーにおける如く、基礎研究まず先行されるべきだと感ずる。

## 10. 筋ジストロフィー症の発症とトロポニン T のアイソフォーム変化

丸山班員は筋構造蛋白質の変化を筋ジストロフィー症の発症の指標にし、鶏とマウスの筋ジストロフィー発症にともなうトロポニン T (以下 TNT と略称) の発現変化について研究した。

種々の TNT アイソフォームを、いずれも検出できるモノクローン抗体 (NT-302) を作成した。鶏胸筋、または、マウス大腿直筋の小片からの全抽出蛋白質を一次元、および、二次元電気泳動に展開した後、NT-302 を用いたイムノプロットにより、TNT のスポットを同定した。親の鶏正常胸筋には、ほとんど 1 個だけの TNT スポットが存在するのに対し、発症したジストロフィー鶏胸筋の場合、30 個以上もの TNT アイソフォームのスポットが出現した。これらの中には、親の胸筋、ヒヨコの胸筋、親の足筋の TNT スポットと重複するものもあったが、ジストロフィー筋に特徴的なスポットも存在した。一方、発症した筋ジストロフィー (dy) マウスでも、正常マウスにみられない数個の TNT スポットが明確に認められた。TNT の変化は筋ジストロフィー症の一つの指標と言える。また、NT-302 は、ほ乳類の筋を含め、種々の筋の TNT の変異体を検出するのにきわめて有効であるので、本実験での手法は、筋病変を蛋白質レベルでみる上で役立つと思われる。

## 11. 各種プロテアーゼ・インヒビター投与の mdx マウス病態に与える影響について

辻班員は8種類の新しい酵素阻害物質の筋ジストロフィー症に対する疾病抑制効果について、疾病モデル動物である C57BL/10-mdx マウスおよび C57BL/6J-dy<sup>2J</sup> マウスを用いて研究した。

生後約2カ月齢の mdx マウスならびに dy<sup>2J</sup> マウスを1組3頭ずつに別け、各阻害物質を、1日0.4mgずつ背部皮下に6週間にわたって投与し、その間の血清中 PK 活性の変化を追跡した。また同時に投与終了後屠殺した各マウスの血清中および骨格筋中の PK, CPK, LDH, GOT, GPT などの疾病のマーカー酵素の活性変化を測定し、各阻害物質の疾病進行に対する抑制効果を判定した。更に、投与終了後の各マウスの後肢筋を固定染色し、顕微鏡レベルの組織学的検索を行った。その結果投与期間中の血清 PK 活性の変動では、Actinonin, Diprotin-A ならびに Formestin-A が投与を続けるに従って活性を低下させたのに対し Post-Pro-Inh, Benadrostin, FuF-175 では次第に活性が増加した。また Bactololin および 15-Deoxyspergualin 投与のマウスは投与期間中に全て死亡した。投与終了後の血清中および骨格筋中のマーカー酵素活性の変動スペクトルから、Actinonin, Diprotin-A, Formestin-A の投与では血清中の酵素活性が低下し、骨格筋中の酵素活性が上昇する傾向、即ち、疾病の進行が抑制される傾向が認められた。他の阻害剤では、はっきりした改善傾向は認められなかった。一方、組織学的な検索では、マーカー酵素の変化とはほぼ一致した傾向は認められたが、全ての阻害剤について判然たる改善を示す像は得られなかった。このことは恐らく投与開始が既に疾病の進行した時期であること、投与量がかならずしも適当でないかも知れないことなどが原因して、はっきりした結果をもたらさなかったものと思われる。従って、前

記3阻害剤については条件の改善を行って再度実験を行う必要があるものと考える。

## 12. 実験的筋炎モデル動物の作成に関する研究

里吉班員は多発性筋炎 (PM)、皮膚筋炎の実験モデル動物を作製し、低分子酵素阻害物質の薬効について研究した。

本研究は PM, DM の実験モデル動物を作製し、低分子酵素阻害物質による薬効を検討するのが目的である。実験モデル動物作製のために、疾患特異的な抗原物質を同定しようと試みた。

その方法として、PM, DM 同様、筋に特異的自己免疫疾患である重症筋無力症 (MG) の患者血清中に筋膜成分阻害性の抗体が、PM や DM の血清より高値に出現している点に着目し、筋肉抽出物に対するモノクローナル抗体を作製した。この抗体産生ハイブリドーマライブラリーから、MG において、抗原となっている物質をスクリーニングし、3種の抗原認識モノクローナル抗体を得た。この抗体に結合する抗原物質は、電気泳動的に比較的高分子のタンパク質であり、筋組織の間接蛍光抗体法では、横紋構造に特異的に存在するように思われた。

今後、さらに、これらのモノクローナル抗体の認識する抗原物質を詳細に調べ、筋膜の障害活性の有無、PM との関連性について検討する予定である。

## 13. E-64 誘導体のグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性に及ぼす影響

北川班員は E-64 誘導体のグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性に及ぼす影響について研究した。

正常時の血漿中におけるグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 活性は極めて低いが、薬物誘発性の肝障害時には血漿 GST 活性が著しく上昇することが知られている。最近、ラットにお

いて高用量の E-64 連続投与により血中トランスアミナーゼ活性が増加することが報告されている。そこで今回、低分子酵素阻害物質の代表的化合物である E-64c と E-64d についてラットに各々 400 mg/kg 7 日間連続投与したところ、E-64d 投与群においてのみ明らかな肝の障害を反映したものと示唆された。この時、血漿中の GST 活性についても E-64d 投与群においてのみ活性の増加がみられた。一方、肝サイトソール中の GST 活性に関しては、E-64d 投与群において顕著な活性の減少が認められた。そこで、E-64d 投与群の血漿中にみられた GST 活性の増加は肝サイトソールの GST 活性の低下を反映したものか否かについて検討した。ラット肝サイトソール由来の GST 1—2 と 3—4 に対する抗体を用いて Western blot 法による解析を行った。まず、血漿を GSH アフィニティカラムにより前処理し、可溶化後 SDS-PAGE を行った。泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、それぞれの抗体を用いて PAP 染色を行った。その結果、コントロールおよび E-64c 投与群の血漿には、ほとんど染色バンドがみられないが、E-64d 投与群では明らかに GST 1—2 および 3—4 に相当する位置に染色バンドが認められた。このことは肝サイトソールの GST が肝の障害により血漿中に漏出したことによると示唆される。

以上により、薬物誘発性肝障害を判定する手段として、血漿中の GST 活性さらにはその Western blot 法による解析は肝障害をより正確に判断する上で有力な指標となる可能性が示唆された。

#### 14. CANP 阻害剤の一般薬理学的研究 —スペク

トル解析法を用いた筋電図および神経活動の定量的評価法—

福原班員は CANP 阻害剤の一般薬理学的解析としてスペクトル解析法を用いた筋電図および神経活動の定量的評価法について研究した。

呼吸筋の筋電図ならびにそれを支配する遠心性神経の電気的活動の定量的な解析に基づいた呼吸筋変性の進行と CANP 阻害剤の治療効果を評価する方法を確立するための基礎的知見を得る目的で、麻酔下のウサギから横隔膜自発性筋電図、ならびに／または横隔神経の自発性発射活動を導出し、その中に発現する約 60~130 Hz の高頻度同期波について定量解析を行って、ヒトへの応用可能性について検討した。

麻酔下非動物化動物から導出された横隔神経遠心性発射活動の自己パワースペクトルには約 80~130 Hz の帯域に高頻度同期波に相当する明瞭なピークが見出された。非線形最小二乗法によって推定されたそのピーク周波数とピーク面積は換気レベルの変化に対し極めて鋭敏に変化した。

麻酔下自発呼吸下動物から同時導出された横隔膜筋電図ならびに横隔神経発射活動の高頻度同期波の周波数帯域成分 (60~140 Hz) において、横隔神経高頻度同期波に 1 対 1 に対応した明瞭な周期約 10 ms の波を横隔膜筋電図中に見出すことが出来た。この横隔神経高頻度同期波を同期信号とした加算平均法によって確認された。

このような高頻度同期波のスペクトル解析法の応用によって、運動ニューロン以下、神経筋伝達、筋収縮に至るまでの過程における病態生理学的変化を定量的にかつ非侵襲的に評価し得るものと考えられる。この解析法が確立されれば、筋ジストロフィー症における呼吸筋変性の進行の程度および CANP 阻害剤の治療効果の非侵襲的な定量的評価の一方法と一つの臨床的に応用され得る可能性があるものと考えられる。

#### 15. Duchenne 型筋ジストロフィー患者血清中

$\alpha$ -アクチニン測定を試み

杉田班員はアクチンと結合する骨格筋の Z 帯に存在する  $\alpha$ -アクチニンを筋崩壊の指標として、血清中の  $\alpha$ -アクチニン測定に関する研究を行った。

ヒト骨格筋より  $\alpha$ -アクチニンを精製し、家兎に免疫して抗血清を得た。抗血清はアフィニティーカラムを用いて抗  $\alpha$ -アクチニン IgG とした後、架橋試薬 meta-maleimido benzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS) を用いて  $\beta$ -galactosidase との conjugate を作成した。この conjugate により enzyme immunoassay を行い  $\alpha$ -アクチニン 2 ng/ml から 2000 ng/ml にわたる検量線を作り、DMD 患者 10 名、正常対照群 10 名の血清  $\alpha$ -アクチニンを測定した。

この結果、DMD stage III の患者 2 名が正常対照群 (26.0 $\pm$ 27.2 ng/ml) と比較して有意に高値を示した。他の stage の患者では有意な増加はなかった。なお、 $\alpha$ -アクチニンレベルと CK 値の相関は、今回の検索の限りでは認められなかった。これまでの報告では、DMD 患者血清中のミオン軽鎖Ⅲを RIA に測定したものがある、stage II と III で高値を示しており、今回のわれわれの結果に類似している。

測定法の問題点として、①測定下限が 20 ng/ml であり、② 200~2000 ng/ml 領域の検量線の傾きが小さいために測定値が rough である、ということが挙げられる。特に②については抗体の affinity に原因があるかも知れず、今後の課題と考えられる。測定条件を整え、症例数の追加、病像、CK 値との相関等につき検討する予定である。

## 16. 血中骨格筋ミオン軽鎖測定法の開発とその臨床的効果

矢崎班員は血中骨格筋ミオン軽鎖測定法の開発とその臨床的意義について研究を行った。

筋肉疾患において、変性ないし障害された筋肉細胞より血中に逸脱した蛋白を測定して生化学的に診断する方法が、感度と特異性に優れていることから臨床で広く用いられている。しかし従来より指標とされている CPK を中心とした酵素は、

細胞質中に可溶性蛋白として存在するために、細胞膜の透過性亢進のみにより細胞中に逸脱して血中に流出することから、筋肉組織障害を検出する感度は高いが、筋細胞の構造崩壊過程を直接反映する指標とはならない。一方、細胞構築を構成する構造蛋白が筋障害時に血中に流出し、これを測定できれば、その血中濃度の変動が障害部筋組織の崩壊と治癒過程と直接反映する指標となり、筋肉障害の病態把握にきわめて有用である。また新しく開発された治療法の定量的な評価にも役立つものと期待される。

そこでわれわれは、筋細胞の主な構築で、収縮の最小単位である筋原線維を構成する構造蛋白ミオンに注目し、障害時に細胞外に逸脱しやすい分子量の小さなサブユニットの軽鎖のラジオイムノアッセイ法を確立して、血中軽鎖測定の臨床的意義を検討した。

マラソンなどの過激な運動により血中 CPK 値が上昇することが知られているが、われわれは 93 時間行軍訓練により、CPK ばかりでなくミオン軽鎖値も有意に上昇し、しかもその高値が CPK 値が前値に戻った 3 日後にも持続することを示した。しかし最高値は筋肉変性疾患と比較して低値であった。すなわち、過激な筋肉運動により筋細胞は、ごく一部に限られるが壊死し、筋原線維が崩壊される可能性がある。Duchenne 型筋ジストロフィー症では著しい血中軽鎖値の上昇を認めた。CPK 値とより相関がみられたが、筋細胞の変性崩壊を直接反映する指標になりうるばかりでなく、治療の評価判定にも有用と考えられた。

## 17. 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

宮武班員は Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の臨床経過について、生活動作 (ADL) の経年推移について研究を行った。

今回は ADL を治療効果の判定に用いることが可能か否かについて検討を行った。

### 1. 材料と方法

対象は国立療養所新潟病院に入院あるいはディテアー外来で観察している DMD 73 例で、ADL の変化を症例毎に観察した。また比較的初期から ADL の観察を行ってある 11 症例を用い、ADL 70 点までの値を非線形最小二乗法で処理し、curve fitting を行った。

### 2. 結果ならびに考察

DMD の ADL は年長になるに従って徐々に低下し 10 歳前後で 50 点を割った。個々の症例の ADL の経過は症例により異なり、ADL が 50 点を越える点も 8 歳前後から 15 歳頃までと広がっていた。比較的初期のステージから充分な ADL の資料がある 11 例では 70 点までの値は指数関数曲線  $y = -0.91 / (1 + e^{ax+b}) + 0.95$  に回帰された。全症例において 70 点以降 40 点前後までの ADL の値は 70 点までのポイントから得られた指数関数曲線上に認められた。

ADL 70 点までのサンプリングポイントでそれ以後のその後の症例が取るべき推計値を予測できることを示した。ADL による評価を治療効果の判定に用いようとするならば、このような予想曲線をまず出しておいて、実際の症例で、これがどの様に修飾されているかを観る必要があると思われた。

## 18. 治療薬の効果判定法における問題点

石原班員は治療薬の効果判定法における問題点について臨床の立場から研究を行った。

EST の臨床投与が開始され約 3 年間を経過した。当初の予想通り筋力・ADL などの改善を客観的に示した例はないといってよい。しかし、依然として DMD の進行を遅らせている可能性を否定しることはできない。われわれは、これまでの投与結果から障害度 4 度平均通過期間が、当

院平均より約 6 カ月の延長を見せたことから有効の可能性あることを発表してきた。しかし、この結果は他施設との比較が出来なかったことから公式には評価を受けなかった。今後は批判にたえうる客観的な指標を選ばなければならないと考えている。

英・米では 1980 年代に入り治療効果判定法を標準化しようという試みがなされてきた。両グループ共、二重盲検試験の採用や自然歴を重視する点で一致していた。英国では筋力を器械で測定し筋力の推移を特に重視した。米国では筋力の低下度の自然歴を MMT より算定し、観測された患者筋力の低下度と power 表により治療効果判定に要する患者数が算出できるとしているのが大きな特徴である。

EST 薬効判定上の問題点としては、多くを ADL, ROM, 機能テストに重点をおいてきたことがあげられる。これらに関与する因子は多く判定には困難がつきまとう。障害度については施設間のばらつきが大きいという問題点があげられる。やはり、筋力測定に重点をおくべきであろう。

今後の方針としては、二重盲検試験の採用、患者の障害度を揃え、特に歩行可能児のみにしぼって試験を行い、できれば power の概念にそう形で試験投与をすべきであると考える。

## 19. ベスタチンおよびホルフェニシノール投与について

村上班員は ベスタチン長期投与の一例および Duchenne PMD に対するホルフェニシノール投与について研究を行った。

### 1. Pre-clinical Duchenne PMD に対するベスタチン投与の一例

私どもはベスタチンを 1 歳 8 カ月の患児に 44 カ月にわたって使用した一症例について以下に報告する。ベスタチンは 60 mg/day より漸増して 1500 mg/day (100 mg/kg/day) に至り、現在は

600 mg/day (30 mg/kg/day) を投与している。CK はベスタチン投与後下降するが再び元に復するようである。立ち上がり時間は投与開始時には5秒台であったが、現在では2~3秒台である。登はん性起立は投与開始後4カ月位見られたが、その後現在まで見られない。また日常生活動作を示すパーテル指数は65点から90点まで増加した。血液、血清生化学、尿検査では異常は見られず、特別な副作用も見られなかった。この様な改善が薬物の効果なのか、自然経過なのか現時点では明らかでない。

## 2. Duchenne PMD に対するホルフェニシノールの投与について

10歳以下の歩行可能な Duchenne PMD 7例にホルフェニシノールを投与してその効果を検討した。対象は年齢5~9歳でホルフェニシノールの投与量は50~150 mg/day で投与期間は24週から64週であった。結果は立ち上がり時間は一例を除いて増加の傾向にあった。CKなどの血清酵素は投与後一時的に減少するが、その後、元に復するものが多かった。一般血液、血清生化学、尿検査にも異常は見られなかった。副作用も特に認められなかった。効果については5歳の症例を除いて、いずれも症状が進行していた。しかし、効果の判定は投与量、使用期間などの検討、さらには自然経過との比較等を行う必要がある。

## 20. ベスタチンの臨床使用経験について

三吉野班員は Duchenne muscular dystrophy (DMD) 患児に対する薬効判定を行うにあたり、患児の精神発達の程度に着目し、効果判定に関し精神発達と症状との関連性について研究した。

- 1) 以前の報告をふまえ、今回ベスタチン服薬3名、placebo 群3名の臨床使用経験より得られたデータの一部を報告した。
- 2) 今回を含めて、当院におけるベスタチンの短期または長期服薬児において、明らかに進行

の予防し得た症例は見られなかった。

今回の臨床成績のまとめにおいて、ベスタチン服薬の有無にかかわらず、効果判定の際に対象児の精神発達の差の程度により、データにバラツキのみられる項目のあることを示唆した。このことは今後より年少児の投薬効果判定の際にも参考にすべきことと思われた。

## 21. Duchenne 型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7歳以下の Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMP) に対するベスタチンの治療効果について研究を行った。

今回は特に、3例については6カ月間投与して、尿中 3-メチールヒスチジン/クレアチン比 (3 MeH/Cr) に対する影響を1回採尿法で調べた。また10例については、1年間ベスタチンまたはプラセボを同量固定法で single blind 法により投与し、治療効果および副作用を検討した。

尿中 3 MeH/Cr は3例とも全経過で1日蓄尿時の正常範囲より高値を示していた。1歳5カ月の例ではプラセボ投与期間中よりベスタチン投与期間中の方が低下する傾向にあり、6歳0カ月、7歳6カ月の2例ではむしろ増加する傾向にあった。尿中 3 MeH/Cr は臨床評価、血清酵素値の変動と共に変動する傾向にあった。今後外来において施行可能な簡易法として検討する価値があるとの印象をうけた。

1年間の single blind 法によるベスタチンの効果は、臨床的にはプラセボ群の運動機能との差は明確でなかった。血清 CPK, アルドラーゼなどの酵素値は、4歳以下のベスタチン投与群において変動が著明な印象をうけた。しかし、必ずしも低値を示すだけではなく、プラセボより高値を示すこともあった。ベスタチンを投与した症例の血清酵素値の変動が著明なことは、発育による運動機能の獲得段階における小児の単なる個体差な

のか、ベスタチンの投与による影響なのかは不明である。

## 22. Duchenne 型進行性筋ジストロフィーに対するベスタチンの効果—プラセボを対照薬とした群間比較試験—

木下班員は Duchenne 型進行性筋ジストロフィーに対するベスタチンの効果をプラセボを対照薬とした群間比較試験により研究した。

ベスタチンが筋疾患の治療薬として有効なことは動物実験では確かめられているが、ヒトでは未だ結論は得られていない。我々は以前から本剤の治験を行ってきたが、最近の共同実験では Duchenne 型筋ジストロフィーの若年患者に有効性を示唆する成績が得られている。それに基づき今回 A 群 4 歳以下、B 群 5~7 歳の 2 群の Duchenne 型患者についてそれぞれベスタチン 150 mg/日、300 mg/日を連日投与し、各群のプラセボ群と比較した。効果判定には階段昇降姿勢、同昇降時間、20 m 直進走行時間、臥位より坐位までの時間、各関節屈伸筋力、各腱反射、血清 CPK、LDH、GOT、GPT、クレアチン、クレアチニンなどの

検査値を指標とし、4 週間ごとに観察することとし、今回は 40 週までを集計した。参加は八雲、西多賀、箱根、中部、鈴鹿、宇多野、刀根山、原、徳島、西別府の各国立病院、国立精神神経センター、東邦、東京女子医、熊本、鹿児島の大大学計 15 施設、症例は A 実験群 25、対照 27、B 実験群 35、同対照 40 の計 127 例であった。

9 カ月後、A 群の階段昇り姿勢、降り姿勢、同昇り時間、降り時間、20 m 直進走行時間、座位への時間、頸筋背屈、股関節屈曲、伸展などの筋、腱反射など合計 39 項目中の 11 項目で実験群が優ることが統計学的に確かめられた。一方、血清 CPK、LDH などでは有意差は見られず、本剤が筋ジストロフィー症の筋線維破壊プロセスを防止していることを示唆する成績は得られなかったが、何らかの機序により筋機能の状態を改善していることが明らかとなった。本剤が筋ジストロフィー治療薬剤たり得る可能性が示された成績と考えられ、今後も検討を続行する必要があると判断した。

以上

# 分 担 研 究 報 告

# E-64c のプロテアーゼ以外の系に対する作用

江橋節郎\*

## 目 的

本研究班の基盤にある考えは、筋ジストロフィーによる筋崩壊過程が Ca 依存中性プロテアーゼ (CANP) によるものであり、これを阻止することにより、その経過を遅らせ得るのではないかというものである。この場合、勿論カテプシンの関与は否定できないばかりでなく、カテプシンが主役を果しているという考え方にもそれなりの根拠があると思われる。従って、筋ジストロフィーの筋の崩壊の機作を明らかにする為には CANP に特異的な阻害剤の出現が望まれるところである。残念ながら E-64c は他の阻害剤に比べれば CANP に対する作用は強いが、しかしカテプシンの方をより強く抑制するという現存の阻害剤の一般的傾向を脱していない。

このような目標に直結した研究は本班において強力進められつつあるが、これと別個にプロテアーゼ以外の反応系に対する E-64c の作用を検討することは、本問題を立体的に把握する為の一つの手がかりとなると考えられる。

本研究には、平滑筋の収縮調節に関与しているとされるミオシン軽鎖キナーゼ作用（以下M作用と略称）と、ライオトニン作用（収縮作用、以下L作用と略称）を取り上げた。その主な理由は、MLCK による磷酸化の部位は少なくとも筋肉の

場合、セリンとされている。また、SH 基阻害剤は多かれ少なかれMおよびL作用を抑制し、しかしその抑制度に差があり、L作用がM作用と直線的に関連しないことが明らかとなっている。NEM はある条件下で、M作用をより強く押さえるが、その他の阻害剤、例えば PCMS, DNTB, PDS 等は、L作用をより強く押さえる傾向がある。従って、チオール・プロテアーゼ抑制物質である E-64c がこの両作用を抑制し、しかもその程度が両者で異なっていることは充分予期できることである。

## 実験結果

図 1, および 2 にみるように、E-64c は牛胃およびニワトリ筋胃の 155K および 130K 成分粗標本MおよびL作用に対して、異なった抑制効果を示す。その効果はいずれもL作用により強く、また筋胃に対する効果は、牛胃に対するよりも弱い。

## 考 察

E-64-c は原則として、L作用をM作用より強く抑えるが、これは既に多くのSH 阻害剤で観察されていることであり、それ自体としては新味はなく、またその必要濃度は非常に高いので、実用的価値は全くない。

しかし、本研究班において他の大関（花田）班

\* 岡崎国立共同研究機構・生理学研究所

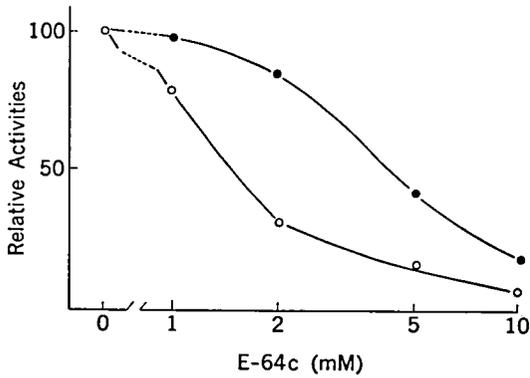


図 1 牛胃 155K 成分 (粗標本) に対する E-64c の効果  
○ : L作用, ● : M作用

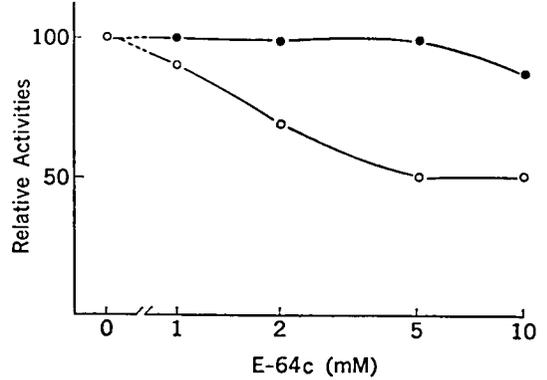


図 2 ニワトリ筋胃 130K 成分 (粗標本) に対する E-64c の効果  
○ : L作用 ● : M作用

員および向山班員らにより、カテプシンと CANP に対し、一方に著しく偏った抑制効果をもつものが既に 2, 3 発見されており、本研究班全体の目標に向け、この面からの発展も期待されるように

なった。

これらの阻害剤を K および L 作用に就いても検討することは、E-64 系阻害剤の開発に一つの示唆を与えるものと思われる。

# ホルフェニシンの生体内動態

## —蛍光 HPLC 用高感度蛍光試薬の開発—

大倉 洋甫\*

研究協力者 石田淳一, 巢 文峰, 甲斐雅亮

用した.

### 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反応を利用した蛍光検出・高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を手段として、血液ならびに筋肉中ロイペプチン<sup>1)</sup>、ベスタチン<sup>2,3)</sup>、*p*-ヒドロキシベスタチン<sup>3,4)</sup>、ホルフェニノール<sup>5,6)</sup>、アンチパイン<sup>7)</sup>などの薬物モニター法を開発し、それらの体内動態を検討してきた。本年度はプレカラム蛍光誘導体化 HPLC によるホルフェニシンの薬物モニター法を確立するために、その HPLC 用高感度蛍光試薬の開発研究を行った。

ホルフェニシンは分子構造のベンゼン核にアルデヒド基を有しているので、芳香族アルデヒドの蛍光試薬によって蛍光性の物質に誘導し得る。本研究では、既に報告したベスタチン<sup>2,3)</sup>および *p*-ヒドロキシベスタチン<sup>3,4)</sup>の薬物モニター法に利用している 1,2-ジアミノ-4,5-ジメトキシベンゼン (DDB)・モノ塩酸塩ならびに今回新たに合成して得た 1,2-ジアミノ-4,5-エチレンジオキシベンゼン (EDB)・ジ塩酸塩および 1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン (MDB)・ジ塩酸塩を用い、まずホルフェニシンとの最適蛍光反応条件を的手法により検討した (図 1)。次に、ホルフェニシンに対して最大の蛍光を与えた EDB をプレカラム誘導体化試薬として逆相 HPLC に適

### 実験方法

#### 1) 使用機器

##### a) 分光蛍光光度計

日立 MPF-4 型を使用、スリット幅は励起および発光側ともに 5 nm に設定し、角型石英セル (1×1 cm) を使用。

##### b) クロマトグラフ

高速液体クロマトグラフには、東洋曹達 803D 型サンプルインジェクター (100  $\mu$ l ループ) を備えた HPLC 用ポンプ、12  $\mu$ l フローセルを装備した島津 RF-530 型蛍光検出器および理化電機 R-21 型記録計を使用。

#### 2) 基準操作 (用手法)

試料の水溶液 100  $\mu$ l に 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 2.0) 100  $\mu$ l および 3 mM EDB, 2 mM DDB または 2 mM MDB 100  $\mu$ l を加え、60°C で加熱する。EDB の場合は 30 分間、MDB の場合は 15 分間、DDB の場合は 20 分間反応させる。反応後、EDB および DDB を用いた場合は pH 6.5 の 0.2 M リン酸塩緩衝液を、MDB を用いた場合は pH 6.0 の同緩衝液をそれぞれ 3.5 ml 加えて、蛍光を測定する。

#### 3) HPLC

試料は用手法と同様に蛍光反応を行い、反応後、中性の緩衝液を加えず 100  $\mu$ l の反応液をクロマ

\* 九州大学薬学部

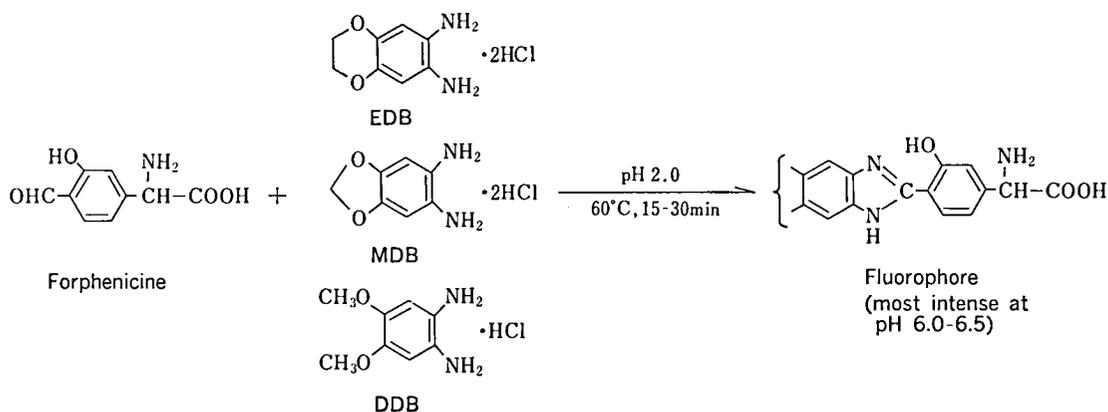


図 1 Fluorescence derivatization of forphenicine with EDB, MDB and DDB

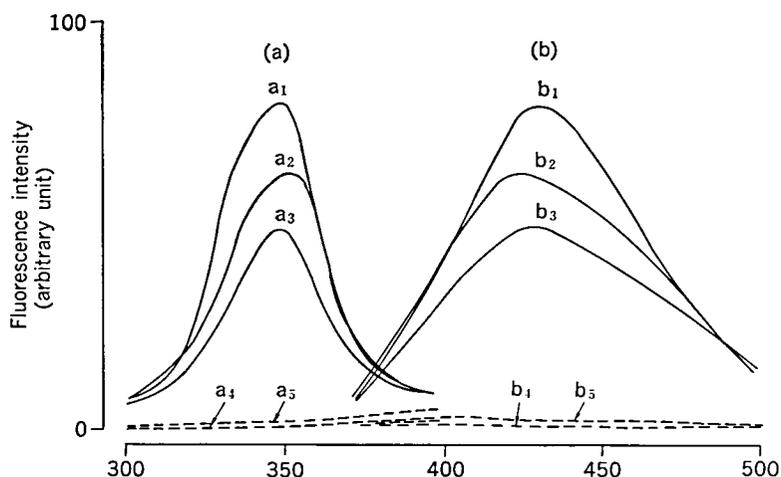


図 2 Excitation (a) and emission (b) spectra of the final reaction mixture of forphenicine (10 nmol/ml) with EDB, MDB or DDB. Portions (100  $\mu$ l) of forphenicine solution and water for the reagent blank were treated as in the recommended procedure. Curves : a<sub>1</sub> and b<sub>1</sub>, EDB; a<sub>2</sub> and b<sub>2</sub>, MDB; a<sub>3</sub> and b<sub>3</sub>, DDB; a<sub>4</sub> and b<sub>4</sub>, reagent blanks of EDB and DDB; a<sub>5</sub> and b<sub>5</sub>, reagent blank of MDB.

トグラフに直接注入する。逆相分配型の TSKgel ODS-120T (粒径 5  $\mu$ m) を充填した分離用カラム (150×4.6 mm i.d.) を用い、アセトニトリルと 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.5) の 1:4 混液からなる溶離液を流速 1.0 ml/min で流す。蛍光検出は励起および発光波長をそれぞれ 350 nm および 430 nm に設定して行う。

## 結果及び考察

### 1) 蛍光反応条件

ホルフェニン標準液 (10 nmol/ml) を基準操作に従って反応したときに得られる蛍光の励起および発光スペクトルを図 2 に示す。各蛍光試薬との反応によって生じた蛍光のスペクトルは 3 者とも類似しており、それらの励起および発光極大波長は EDB および DDB ではそれぞれ 350 nm および 430 nm であり、MDB ではそれぞれ 355

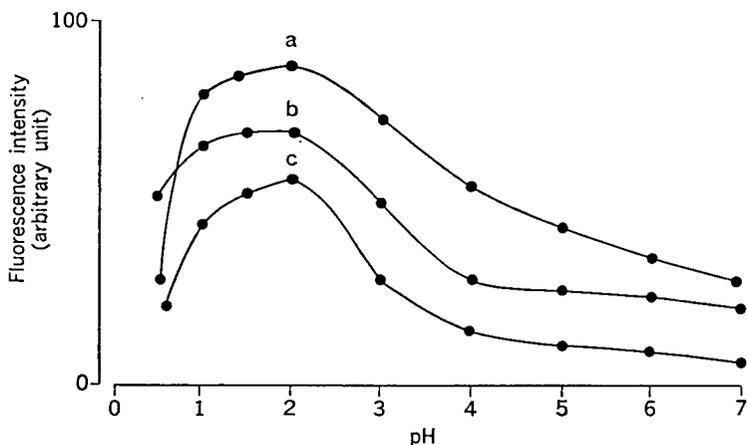


図 3 Effect of pH on the fluorescence development from forphenicine. Portions (100  $\mu$ l) of 10 nmol/ml forphenicine solution were treated as in the recommended procedure, but the pH value of the fluorescence reaction mixture was adjusted with 50 mM phosphate buffer and 0.6 M HCl. Curves : a, EDB; b, MDB; c, DDB.

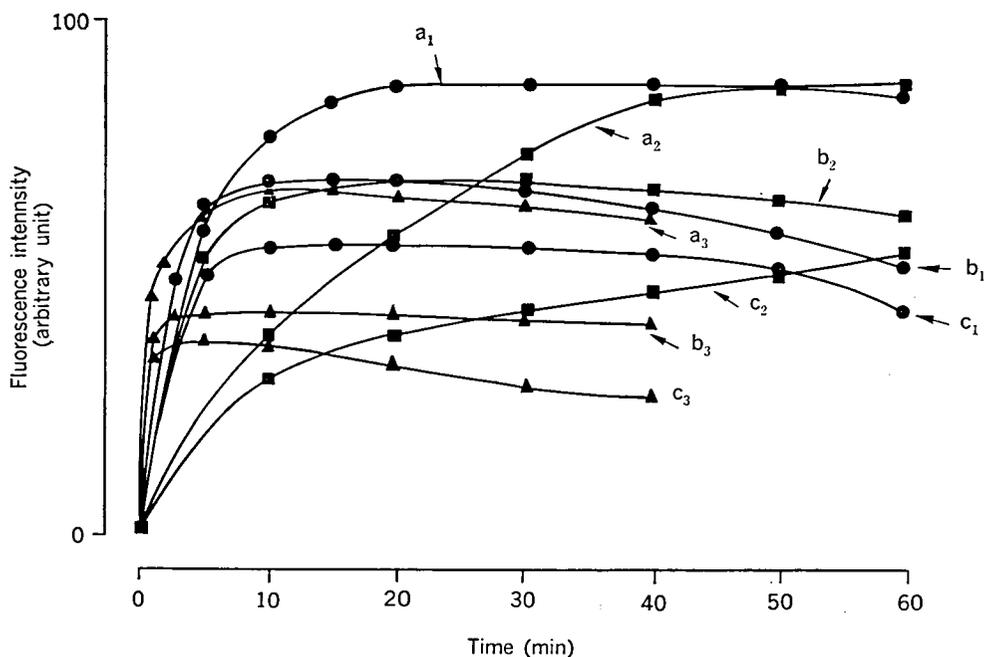


図 4 Effects of reaction time and temperature on the fluorescence development from forphenicine. Portions (100  $\mu$ l) of 10 nmol/ml forphenicine solution were treated as in the recommended procedure for various times at 37, 60 and 100°C. Curves : a<sub>1</sub>-a<sub>3</sub>, EDB; b<sub>1</sub>-b<sub>3</sub>, MDB; c<sub>1</sub>-c<sub>3</sub>, DDB. Temperatures : a<sub>1</sub>-c<sub>1</sub>, 60°C; a<sub>2</sub>-c<sub>2</sub>, 37°C; a<sub>3</sub>-c<sub>3</sub>, 100°C.

nm および 420 nm であった。また、各極大波長は最終反応液の pH (4~10) を変化させても著しくシフトしなかった。

蛍光反応時の pH の影響を調べた。EDB, MDB あるいは DDB とホルフェニシンとの蛍光反応は

pH 8 以上のアルカリ性では進行せず、いずれも pH 2.0 の酸性の緩衝液中で最大の蛍光強度を与えた (図 3)。pH 2.0 の緩衝液としてリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム・塩酸緩衝液および Britton-Robinson (リン酸塩、酢酸塩およびホウ酸塩から

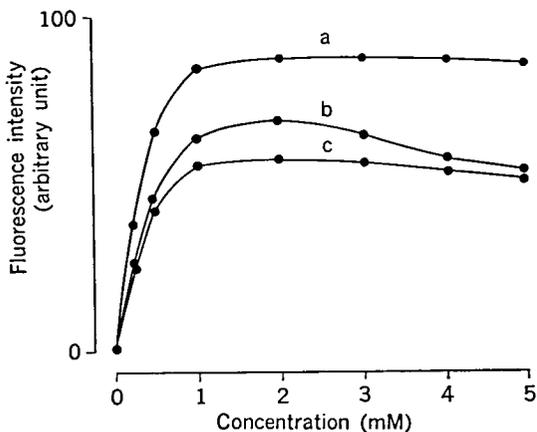


図 5 Effect of concentrations of EDB, MDB and DDB on the fluorescence development from forphenicine. Portions (100  $\mu$ l) of 10 nmol/ml forphenicine solution were treated as in the recommended procedure with various concentrations of EDB, MDB and DDB. Curves : a, EDB; b, MDB; c, DDB.

なる) 緩衝液を用いて、それらの濃度を 10~100 mM の範囲で変化させた場合、それら緩衝液の種類および濃度による蛍光強度の変化はみられなかった。従って、基準操作には、50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 2.0) を使用した。

蛍光反応における反応時間と温度について検討した結果を図 4 に示す。いずれの蛍光試薬を用いた場合でも反応温度が高いほど速やかに反応が進行したが、最大の蛍光強度を得るには 60°C もしくは 37°C で反応混液を加温した方が良かった。特に、60°C では、EDB, MDB および DDB とそれぞれ 20~40 分間、10~20 分間および 10~30 分間の反応時間で最大かつ一定の蛍光強度をホルフェニシンに与えた。基準操作では EDB, MDB および DDB に対する各反応温度をいずれも 60°C とし、反応時間はそれぞれ 30, 15 および 20 分間とした。

各蛍光試薬の濃度について検討した (図 5)。EDB では 2~4 mM で最大かつ一定の蛍光が得られた。MDB の場合は 2 mM で、DDB の場合は 1~3 mM で最大の蛍光が得られた。従って、3 mM の EDB, 2 mM の MDB および DDB を使

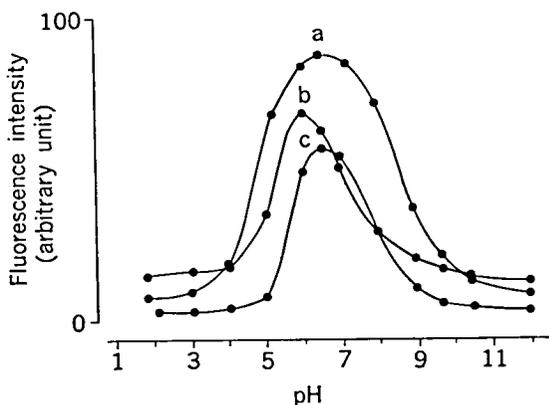


図 6 Effect of pH of the final reaction mixtures on the fluorescence from forphenicine. Portions (100  $\mu$ l) of 10 nmol/ml forphenicine solution were treated as in the recommended procedure, but the final reaction mixtures were adjusted to various pHs with Briton-Robinson buffer (40 mM, various pHs). Curves : a, EDB; b, MDB; c, DDB.

用した。EDB は水溶液の状態ですくなくとも 6 時間は安定で、得られる蛍光強度ならびに試薬ブランクは一定値を示した。一方、MDB および DDB では試薬調製後 2 時間以内に使用しなくてはならない。それ以後では著明にブランク値が上昇し、かつ反応収率も低くなる。

図 6 に示すように、ホルフェニシンから生じる蛍光生成物は最終反応液の pH を 6.0~6.5 にしたとき、最も強い蛍光を発する。基準操作では、反応後大量の 0.2 M リン酸塩緩衝液を加えて EDB および DDB の場合は pH 6.5 に、MDB の場合は pH 6.0 に調整した。なお、緩衝液として 0.1~0.5 M のリン酸塩緩衝液又は Briton-Robinson 緩衝液を用いたところ、いずれもほぼ同じ蛍光強度を与えた。また、各試薬との最終反応液を室温で放置した場合、EDB との反応液は最も安定 (4 時間) であるが、MDB および DDB との反応液は比較的不安定 (少なくとも 1 時間は安定) であった。

表 1 に EDB を用いる基準操作に従って反応した場合に得られる種々の化合物からの蛍光強度、励起および発光極大波長ならびに検出限界を示

表 1 Excitation and emission maxima of the fluorescences of EDB from aldehydes and other compounds, and their relative fluorescence intensities and lower limits of detection

Compound (10 nmol/ml)	Excitation maximum (nm)	Emission maximum (nm)	R.F.I. <sup>a)</sup>	L.D. <sup>b)</sup> (pmol/ml)
Forphenicine	350	430	100	30
Benzaldehyde	330	400	75	40
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	330	390	60	50
Salicylaldehyde	345	430	0.5	6000
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	330	385	1	3000
Vanillin	333	390	3	1000
<i>p</i> -Anisaldehyde	330	390	1	3000
2,3-Dimethoxybenzaldehyde	333	398	10	300
<i>p</i> -Chlorobenzaldehyde	332	408	1.5	2000
<i>p</i> -Cyanobenzaldehyde	354	475	30	100
2-Naphthaldehyde	344	440	15	200
Phenylacetaldehyde	339	400	1.5	2000
Cinnamicaldehyde	357	457	100	30
Pyruvic acid	368	452	0.15	20000
$\alpha$ -Ketoglutaric acid	370	454	0.3	10000
$\alpha$ -Phenylpyruvic acid	325	397	0.33	9000
<i>p</i> -Hydroxyphenylpyruvic acid	324	390	1	3000
N-Acetylneuramic acid	372	457	0.04	80000

<sup>a)</sup> The fluorescence intensity from forphenicine was taken as 100.

<sup>b)</sup> The concentration of the solution used for the reaction which gives a fluorescence intensity twice that of the blank.

す。EDBは芳香族アルデヒド類以外にも $\alpha$ -ケト酸およびシアル酸とも反応し蛍光を発する。それらはDDBの場合<sup>9)</sup>と同様にキノキサリノン誘導体を形成するものと思われる。一方、脂肪族アルデヒド(ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド)、ホルフェニシノール、カテコールアミン(エピネフリン、ノルエピネフリン)、17種の $\alpha$ -アミノ酸、還元糖(グルコース、フルクトース)およびステロイド(エストロン、エストリオール、コルチゾン)などは蛍光を発しなかった。

## 2) ホルフェニシンの HPLC

用手法による検討から、ホルフェニシンの優れた蛍光誘導体化試薬としてEDBを選択し、その蛍光体をHPLCにより分離した。

HPLCによる分離は、逆相分配型カラム(TSK gel ODS-120T)を用い溶離液にアセトニトリルと50mMリン酸塩緩衝液(pH 6.5)の1:4の

混液を用いて行った。緩衝液のpHは、ホルフェニシンの蛍光生成物が最も強い蛍光を発するpH 6.5を選択した。図7にホルフェニシン、3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドおよび*p*-ヒドロキシベンズアルデヒドの混液をEDBと反応させたときに得られるクロマトグラムを示す。これらの化合物からの蛍光ピークはそれぞれ単一であり、20分以内に完全に分離された。このHPLC条件でホルフェニシンの検量線を作成したところ、少なくとも100 nmol/mlまで原点を通る直線(相関係数=0.997)を示した。S/N=2における検出限界は2.5 pmol/mlであり、HPLC注入量で表すと85 fmolである。

なお、EDBと反応しうる化合物(表1に列記したもの)のうち $\alpha$ -ケトグルタル酸、N-アセチルノイラミン酸、ピルビン酸および*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸は図7のHPLC条件では、

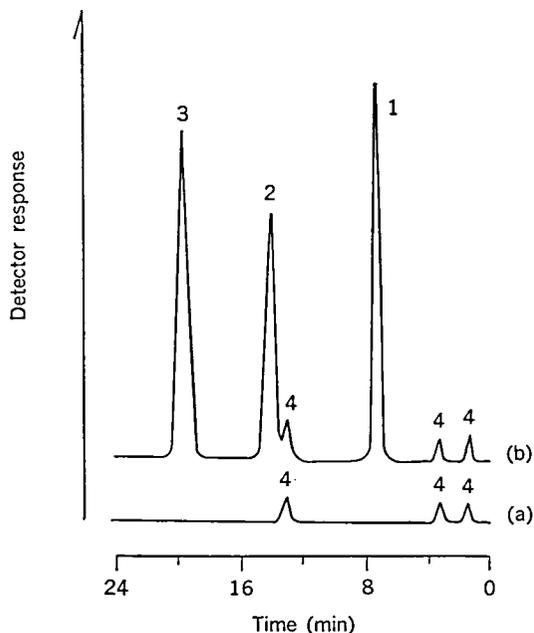


図 7 Chromatograms of (a) the EDB derivatives of forphenicine, 3,4-dihydroxybenzaldehyde and (b) the reagent blank. A portion (100  $\mu$ l) of a mixture of the aldehyde compounds or water was treated as in the recommended procedure. Peaks (nmol per injection volume): 1, forphenicine (0.17); 2, 3,4-dihydroxybenzaldehyde (0.3); 3, *p*-hydroxy-benzaldehyde (0.3); 4, reagent blank.

それぞれ 3.0, 3.2, 9.0 および 20 分に溶出し, その他の化合物はいずれも 40 分までに溶出しなかった。

### おわりに

EDB 蛍光試薬は, ホルフェニシンに対して

MDB や DDB 両試薬よりそれぞれ 1.3 および 1.6 倍ほど強い蛍光強度を与え, かつより安定な蛍光誘導体を形成する。また, 生体に存在するアミノ酸, 糖, ステロイドなどの成分には蛍光性を与えないので選択性も優れている。しかも, EDB の試薬溶液は MDB および EDB の試薬溶液よりも安定であるので扱い易い。EDB 試薬を用いるホルフェニシンのプレカラム HPLC は高感度であるので, 血液および筋肉中の微量ホルフェニシンの定量に適用可能と思われる。今後, 生体に含まれる妨害物質(ケト酸や蛍光性化合物など)を除去あるいは分離する試料の前処理および HPLC 条件について検討し, ホルフェニシンの薬物モニター法を確立する予定である。

### 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, K., 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) Hara, S., Yamaguchi, M., Nakamura, M. and Ohkura, Y. : *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 3493-3498 (1985).

# 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\*

## はじめに

米国ニューヨーク州立大学の Stracher 博士が、筋ジストロフィーマウスの発症および症状の進行をロイペプチンが阻止することを発見して以来、筋ジストロフィー症に、蛋白分解酵素が重要な役割を果たしていることが示唆され種々研究が展開されている。われわれはすでに各種蛋白分解酵素に対する合成基質とその阻害剤について検討し、合成基質を使って蛋白分解酵素に対するザイモグラムによる分析方法を確立した。また合成阻害剤については Trypsin, Plasmin, Thrombin, Kallikrein および補体系の Cl<sub>r</sub>, Cl<sub>s</sub> に対して強い阻害活性をもつ合成剤を見だし、更に *in vivo* の薬効を示すものを見出した。そこで、筋ジストロフィー症に関与している蛋白分解酵素の動態を解明し、蛋白分解酵素合成阻害剤による酵素の阻害パターンを明確にし、病態モデルでの治療を行い、臨床効果についても検討したい。今回は、合成基質の各種蛋白分解酵素に対する基質特異性と、それぞれのザイモグラムの作製、更に合成阻害剤の薬効について報告する。

## 実験方法

### 1) 合成基質

合成基質としてアミノ酸およびペプチド- $\alpha$ -

naphthylester を合成し従来の合成基質と比較検討した。合成基質は Tosyl-L-lysine- $\alpha$ -naphthylester (Tos-Lys- $\alpha$ -NE), acetyl-L-tyrosine- $\alpha$ -naphthylester (Ac-Tyr- $\alpha$ -NE), tosyl-L-arginine- $\alpha$ -naphthylester (Tos-Arg- $\alpha$ -NE), acetyl-glycyl-L-lysine- $\alpha$ -naphthylester (Ac-Gly-Lys- $\alpha$ -NE), L-prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine- $\alpha$ -naphthylester (Pro-Phe-Arg- $\alpha$ -NE) および benzoyl-L-leucyl-L-alanyl-L-arginine- $\alpha$ -naphthylester (Bz-Leu-Ala-Arg- $\alpha$ -NE) を用いて各種蛋白分解酵素に対して検討した。

$\alpha$ -NE 基質を用いて各種蛋白分解酵素は 50 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 に終濃度 0.5  $\mu$ mole/ml のそれぞれの基質を添加し、最終反応容量を 1.0 ml とした後 25°C にて 30 分間反応した。反応終了後氷冷下にて 1% Fast violet B salt (FVB) 溶液 1.0 ml を添加し 10 分間放置後、氷酢酸 1.0 ml を加え、515 nm の吸光度を測定した。

### Zymogram の調整

Zymogram の調製は電気泳動後のゲルディスクの pH を一定化するために、先ず 0.25 M リン酸緩衝液 pH 7.0 で 37°C にて約 5 分間浸し、その後、 $\beta$ -NE 基質および 0.1% FVB を含む同緩衝液に浸し 25°C にて放置する。ゲルディスク表面に赤紫色の酵素活性帯の出現が鮮明に認められた後、反応液中よりゲルディスクを取り出し、流水

\* (財)大阪基礎医学研究奨励会

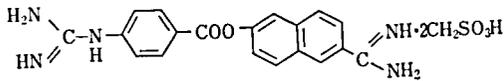


図 1 FUT-175 の構造式

にて反応溶液を除去し作製した。Trypsin および Chymotrypsin に対する電気泳動は Davis の方法<sup>1)</sup>に従い 7.5% ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動を pH 9.5 の条件で、4°C にて約 50 分間行った。

## 2) 蛋白分解酵素合成阻害剤

6-amino-2-naphthyl-4-guanidinobenzoate-dimethane-sulfonate (FUT-175) については鳥居薬品(株)研究所より供給して戴いた。構造式は図 1 に示した。

補体に関与するアレルギー反応は Coombs と、Gell の分類によると II 型と III 型である。II 型の Forssman shock はモルモットに FUT-175 を静注後 30 分に Hemolysin を静注し延命効果で判定した。

また III 型の Arthus reaction はラットに抗体を静注し 30 分後に FUT-175 を静注し更に 30 分後に抗原である Ovalbumin を皮下に投与し、5 時間後の浮腫および 24 時間後の出血傾向で効果判定を行った。最近補体に関与していると示唆されている Endotoxin shock のモデルはマウスに FUT-175 を静注後 30 分に Endotoxin を腹腔内に投与し延命効果として判定した。

## 結果および考察

蛋白分解酵素の酵素学的研究は合成基質の出現により飛躍的に進歩した。1942 年 Bergmann<sup>2)</sup>により、蛋白分解酵素は exopeptidase と endopeptidase の 2 群に大別され、1960 年 Hartley<sup>3)</sup>によりその触媒残基でセリン、チオール、酸性および金属蛋白分解酵素に分類できることが報告されるなど、合成基質の出現は酵素学的研究に対する直接的効果のみならず、臨床化学分析法に導入

され、諸種の疾患における病態生化学的研究に応用されており、間接的効果も大きい。蛋白分解酵素に対する合成基質は、1939 年 Bergmann<sup>4)</sup>による N-末端アミノ基を保護した tosyl-arginine-methylester (TAME), Tos-Arg-ME) などのアルキルエステル基質に始まり現在でも利用されている。

## 1) $\alpha$ -NE 基質を用いた Trypsin および Chymotrypsin の定量<sup>5-7)</sup>

Trypsin に対して Tos-Lys- $\alpha$ -NE, Chymotrypsin に対しては Ac-Tyr- $\alpha$ -NE をそれぞれ基質として用い、検量線を作製して  $\alpha$ -NE 基質の定量性を検討した。なお対照として Tos-Arg-ME (TAME) あるいは Ac-Tyr-EE (ATEE) を用いた図 2 に示すように、両酵素に対しても酵素量に応じて、 $\alpha$ -NE 基質は水解され、FVB との反応過程を経て直線的に吸光度は増大した。これらの結果より  $\alpha$ -NE 基質を用いる測定法は定量性が認められ、Trypsin に対する Tos-Lys- $\alpha$ -NE, Chymotrypsin に対する Ac-Tyr- $\alpha$ -NE のそれぞれ測定限界濃度は 1 ng/ml および 5 ng/ml であった。この値は従来のアルキルエステル基質である Tos-Arg-ME (TAME) および Ac-Tyr-EE (ATEE) よりそれぞれ約 200 倍および 30 倍高感度であることを示している。

## 2) $\alpha$ -NE 基質を用いた Trypsin および Chymotrypsin のザイモグラム

Trypsin に対しては終濃度 0.5 mM の Tos-Lys- $\alpha$ -NE を Chymotrypsin に対しては終濃度の 0.5 mM Ac-Tyr- $\alpha$ -NE をそれぞれ基質として用い、ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動により分離した試料について調製した結果を図 3 に示した。Trypsin では一本の活性帯が鮮明に認められ、Chymotrypsin では 3 本の活性帯が認められた。この 3 本の活性帯は Chymotrypsin の自己分解生成酵素<sup>8)</sup>の  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  および  $\delta$  型のいづれかの出現であると考えられるがそれぞれの同

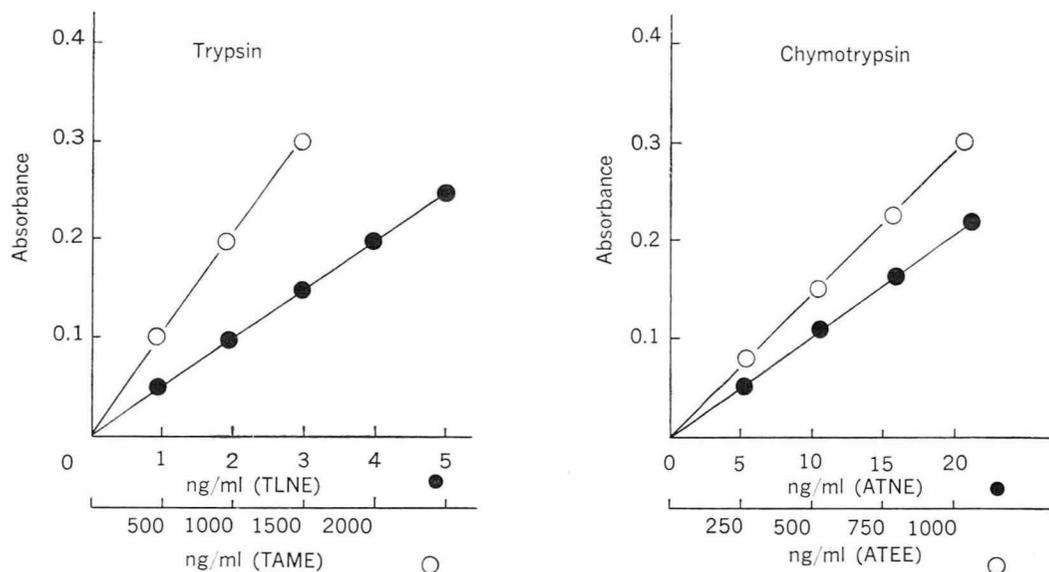


図 2 Hydrolytic activities of trypsin and chymotrypsin toward alkylester and  $\alpha$ -naphthylester substrates. TAME : Tos-Arg-methylester, TLNE : Tos-Lys- $\alpha$ -NE, ATEE : Ac-Tyr-tehylester, ATNE : Ac-Tyr- $\alpha$ -NE.

定については不明である。

### 3) トリペプチド $\alpha$ -NE 基質に関する検討

Prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine- $\alpha$ -naphthylester (Pro-Phe-Arg- $\alpha$ -NE) 基質に関して、 $\alpha$ -Thrombin, Plasmin, FactorXa, Plasma Kallikrein, Pancreatic Kallikrein, Urinary Kallikrein および Urokinase に対する基質特異性を検討した。表 1 に示すように各酵素につき  $2 \times 10^{-9}$  mol/ml の濃度を用いた場合の吸光度を示している。Pro-Phe-Arg- $\alpha$ -NE のトリペプチドは Kallikrein が Kininogen を水解する際的水解部位のアミノ酸配列-Pro-Phe-Arg-Ser- の構造であり検討した 7 種類の酵素においては Kallikrein が最も高い活性を示していた。

また従来の感度のよいといわれている合成基質と比較してみると表 2 に示すように Pro-Phe-Arg- $\alpha$ -NE は Plasma Kallikrein に特異的だとされる D-Pro-Phe-Arg-pNA に比し約 3 倍、組織 Kallikrein に特異的だとされる D-Val-Leu-Arg-pNA に比し Pancreatic kallikrein を用いた場合約 8 倍高感度に測定できることが示唆され

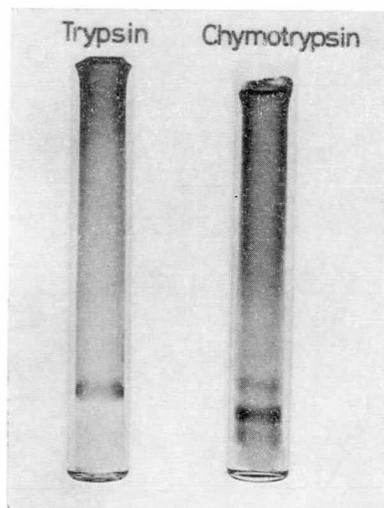


図 3 Zymogram patterns of trypsin and chymotrypsin. Substrate : trypsin=Tos-Lys- $\alpha$ -NE, chymotrypsin=Ac-Tyr- $\alpha$ -NE.

た。

Pro-Phe-Arg- $\alpha$ -NE 基質は表 1 に示したように Urinary kallikrein に対しても高感度を示し、更に Urinary kallikrein として確認するため、Trasylol および soybean trypsin inhibitor (SBTI) を阻害物質として検討した結果、Trasylol 添加により本活性は 98% 阻害され、SBTI で

表 1 Hydrolysis of Pro-Phe-Arg- $\alpha$ -NE by various proteases

Thrombin	Factor Xa	Plasmin	Kallikrein			Urokinase
			Plasma	Pancreatic	Urine	
0.30	0.05	0.225	0.80	0.70	0.75	N. D.

N.D. : not detectable.

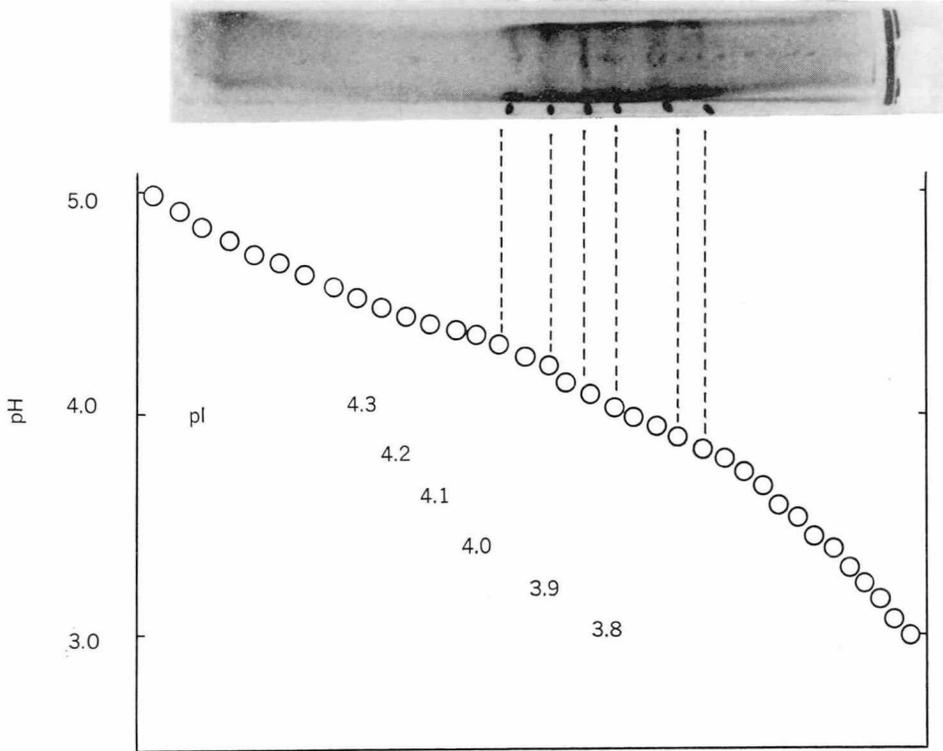


図 4 Zymogram pattern of condensed human urine by using Pro-Phe-Arg- $\alpha$ -HE as substrate

表 2 Relative hydrolytic activities of kallikreins toward various substrates

Substrate	Kallikrein	
	Plasma	Pancreatic
Tos-Arg-methylester	1	1
Pro-Phe-Arg- $\alpha$ -NE	57	101
D-Pro-Phe-Arg-pNA	20	13
D-Val-Leu-Arg-pNA	1	12

は 5% 阻害されたにすぎず、本活性は Urinary kallikrein を反映していると考えられる。次いで Urinary kallikrein による Zymogram について検討した。透析後濃縮健常者尿を試料として、Zymogram およびショ糖密度勾配等電点電気泳動による分離像を Pro-Phe-Arg- $\alpha$ -NE を基質と

して検討した。

図 4 に示すように pI 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2 および 4.3 の 6 種の等電点の異なる活性帯が認められた。本活性帯に対する Trasylol および SBTI の影響について調べると、Trasylol では 6 種の活性帯は全部消失したが、SBTI では全く影響を受けていない。以上の成績よりヒト urinary kallikrein の multiform を反映していると考えられる。これは Geiger らの報告<sup>9)</sup>と一致し、6 種類の multiform が検出されている。その他に Benzoyl-L-leucyl-L-alanyl-L-arginine- $\alpha$ -naphthyl-ester (Bz-Leu-Ala-Arg- $\alpha$ -NE) についてはヒト血漿中の prothrombin および antithrombin III の定量に関しても高感度の基質であるこ

表 3 FUT-175 の蛋白分解酵素阻害活性

	酵 素	基 質	50% 阻害濃度 (ID <sub>50</sub> : M)
補体系のプロテアーゼ	C <sub>1r</sub>	Ac-Arg-methylester	$2.1 \times 10^{-7}$
	C <sub>1s</sub>	Ac-Tyr-ethylester	$5.1 \times 10^{-8}$
	D	Factor B	$1.4 \times 10^{-5}$
	B	Leu-Ala-Arg- $\alpha$ -naphthylester	$5.8 \times 10^{-5}$
	CVF·Bb	Leu-Ala-Arg- $\alpha$ -naphthylester	$4.3 \times 10^{-5}$
血漿中のプロテアーゼ	XIIa	Pro-Phe-Arg-pNA	$3.3 \times 10^{-7}$
	Xa	Bz-Ile-Glu-Arg-pNA	$2.1 \times 10^{-6}$
	トロンビン	Phe-pip-Arg-pNA	$8.8 \times 10^{-7}$
	プラスミン	Val-Leu-Lys-pNA	$1.0 \times 10^{-7}$
	カリクレイン	Pro-Phe-Arg-pNA	$3.0 \times 10^{-9}$
その他プロテアーゼ	豚カリクレイン	Tos-Arg-methylester	$8.4 \times 10^{-6}$
	トリプシン	Tos-Arg-methylester	$1.9 \times 10^{-8}$
カタプシン	A, B, C, D, H, L		$>10^{-3}$
	G		$7.1 \times 10^{-4}$
補体溶血反応	古典的経路		$6.9 \times 10^{-8}$
	第2経路		$5.1 \times 10^{-7}$

とが明らかになり prothrombin の zymogram においてヒト血漿を試料とした酵素の前駆体の zymogram の調製の可能性が得られた。今後これらの手法を用いて筋ジストロフィー症に関与していると思われる酵素について検討したい。

#### 4) 蛋白分解酵素阻害物質 (FUT-175)<sup>10~11)</sup>

a) FUT-175 (6-amidino-2-naphthyl-4-guanidino-benzoatedimethanesulfonate) の構造式は先の図 1 に示した。本物質は血漿中の蛋白分解酵素および Trypsin を阻害し、その阻害機構は本物質のエステル部位が酵素により切断され、その酵素の活性中心であるセリン残基と結合することにより不活化する。また構造特異性等により、本物質は活性型の Trypsin 様のセリン蛋白分解酵素を阻害し、その作用は時間依存性で可逆的である。FUT-175 の各種蛋白分解酵素に対する阻害活性を表 3 に示した。その特徴は補体系の蛋白分解酵素を阻害し、補体溶血反応に対して強力な阻害活性を有していることである。補体溶血反応

に対する阻害は、古典的経路では  $6.9 \times 10^{-8}$  M, 第 2 経路では  $5.1 \times 10^{-7}$  M の濃度でおのおの溶血反応を 50% 阻害する。この阻害活性は現在報告されている抗補体物質の中で最も強い<sup>10)</sup>。また本物質は細胞内に存在する蛋白分解酵素であるカタプシン群に対する阻害は認められず Crinde<sup>12)</sup> により肝細胞内における蛋白質の分解および生合成に本物質は影響を与えないことが認められている。

#### b) FUT-175 の動物における実験的免疫反応に対する効果

補体の関与するアレルギー反応は, Coombs と Gell らによる分類では II 型と III 型である。これら II 型 (フォルスマンショック) および III 型 (アルサス反応) に対する FUT-175 の効果を検討した結果, 図 5 に示すように, フォルスマンショックに対しては明らかな致死時間の延長が認められ, アルサス反応においてもヒドロコチゾン以上の効果が認められるなど, 著明な抑制効果を認めた。

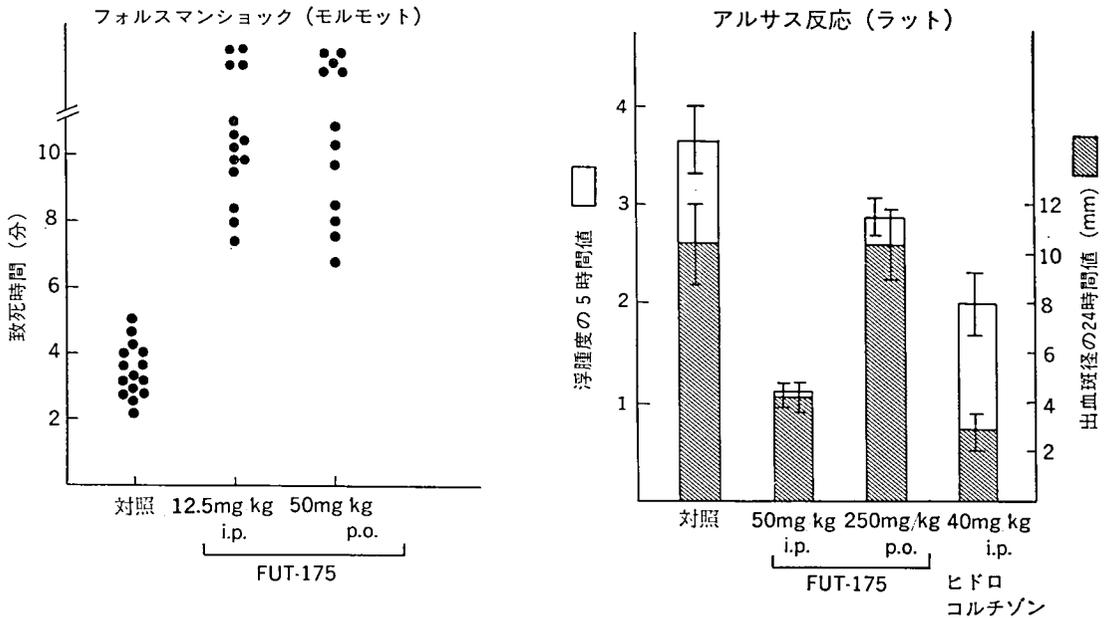


図 5 FUT-175 のⅡ型およびⅢ型アレルギーモデルに対する効果

しかしⅠ型 (PCA 反応: Passive cutaneous anaphylaxis), Ⅳ型 (塩化ピクリル接触性皮膚炎) に対する効果は弱く, Ⅱ型およびⅢ型の病態における補体の生物学的意義は重要であることが示唆された. また現在, 補体の関与が示唆されているエンドトキシンショック (マウス) に対しても本物質は著明な致死防御効果を示し, ヒドロコルチゾンと同程度あるいはより優れていた<sup>11)</sup>. 腎炎の実験モデルである馬杉腎炎 (ラット), 慢性関節リウマチの実験モデルであるアジュバント関節炎 (ラット) に対しても, デキサメサゾンあるいはインドメサシンを対照薬剤として本物質の効果を検討した結果, 著明な抑制効果が認められている.

以上の成績等により, 本物質は, 補体の関与が考えられる疾患に対し有効であることが示唆される.

補体の示す作用は多面的であり, 病態における意義もまた多様性を示すこととなる. 多くの研究者の努力により, その意義は解明されつつある. しかし, 生体に応用し得る適当な抗補体物質が得られていない現在, その証明は限られている.

FUT-175 の出現は, 補体の病態における意義の研究あるいは生化学的な研究に対し有益な材料となることのみならず, 抗補体物質の治療薬としての可能性へのアプローチである.

文 献

- 1) Davis, B.J. : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427 (1964).
- 2) Bergmann, M. : *Adv. Enzymol.*, **2**, 49-68 (1942).
- 3) Hartley, B.S. : *Annu. Rev. Biochem.*, **29**, 45-72 (1960).
- 4) Bergmann, M., Fruton, J.S., Rollack, H. : *J. Biol. Chem.*, **127**, 643-648 (1939).
- 5) Niinobe, M., Hitomi, Y., Fujii, S. : *J. Biochem.*, **87**, 779-783 (1980).
- 6) Hitomi, Y., Niinobe, M., Fujii, S. : *Clin. Chim. Acta.*, **100**, 275-283 (1980).
- 7) Hitomi, Y., Kanda, T., Niinobe, M., Fujii, S. : *Clin. Chim. Acta.*, **119**, 157-164 (1981).
- 8) Wright, H.T., Kraut, J., Wilcox, P.E. : *J. Mol. Biol.*, **37**, 363-366 (1968).
- 9) Geiger, R., Stackstedte, U., Fritz, H. : *Hoppe-Seilers Z. Physiol. Chem.*, **361**, 1003-1016 (1980).
- 10) Fujii, S., Hitomi, Y. : *Biochim. Biophys. Acta*, **661**, 342-345 (1981).
- 11) Hitomi, Y., Fujii, S. : *Int. Arch. Allergy. Appl. Immun.* **69**, 262-267 (1982).
- 12) Grinde, B. : 私信 (1983).

# 筋ジストロフィー症における各種筋肉内アミノ ペプチダーゼ活性の変化とその意義

青 柳 高 明\*

研究協力者 和田孝雄\*, 小島露子\*, 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構に、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ってきた。筆者らは病態モデル動物として筋ジストロフィー症のマウスおよびハムスターなどの筋肉を含む各種臓器内の酵素活性の変動を経時的に調べた結果、従来注目されていたエンドペプチダーゼの異常のみでなく、アミノペプチダーゼ、グリコシダーゼ、ホスファターゼ、エステラーゼなどの広範囲な酵素活性に異常が誘起されていることも報告した<sup>1-3)</sup>。さらに、長期間患者血清中の酵素活性の動態を解析し、病因にエキソペプチダーゼがエンドペプチダーゼと異なる役割を果していることを明らかにした<sup>4,5)</sup>。

正常および病態モデル動物における酵素網の変動を経時的に長期間調べ、また酵素阻害物質投与により誘起される酵素網の動態を究明することは、ホメオスタシス機構を明らかにするとともに、筋ジストロフィー症の治療への応用を可能にするものと考え<sup>6)</sup>。

本報告は筋ジストロフィーマウスの前肢筋、後肢筋および心筋におけるエンドペプチダーゼならびにエキソペプチダーゼの動態について検討したので、その結果について述べる<sup>7)</sup>。すでに報告し

た低分子酵素阻害物質の投与時に誘起される酵素網の変動ならびに活性体ベスタチン連続投与により誘起される酵素網の動態などとの関係について考察を加える。

## 実験方法

### 実験動物

7週齢(雄)の筋ジスマウス(C57BL/6J dy/dy)および対照マウス(C57BL/6J dy/+and+/+)は実験動物中央研究所より購入した。動物は屠殺後、直ちに前肢筋、後肢筋、心、脾、肝および腎を摘出し、 $-70^{\circ}\text{C}$ 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(Ultraturrax)を用いて1分間ホモジナイズした。酵素活性の測定には、組織ホモジネートの $3,000\times\text{g}$ 、20分間の遠心上清を用いた。

### 基質

酵素活性測定用の基質は下記のものを用いた。L-glutamic acid  $\beta$ -naphthylamide hydrochloride (Glu·NA), L-arginine  $\beta$ -naphthylamide (Arg·NA), L-proline  $\beta$ -naphthylamide (Pro·NA), L-leucine  $\beta$ -naphthylamide (Leu·NA), L-seryl-L-tyrosine  $\beta$ -naphthylamide (Ser·Tyr·NA), glycyl-L-proline  $\beta$ -naphthylamide (Gly·Pro·NA),  $\text{N}^{\alpha}$ -benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE),  $\text{N}^{\alpha}$ -acetyl-L-tyrosine ethyl

\* 微生物化学研究所

表 1 List of the Enzymes Measured and Their Substrates

Enzyme	Abbreviation	Substrate	Reference for assay method
Aspartate aminopeptidase (EC 3.4.11.7)	AP-A	Glu·Na	1, 8
Arginine aminopeptidase (EC 3.4.11.6)	AP-B	Arg·NA	1, 9
Proline iminopeptidase (EC 3.4.11.5)	Pro-IP	Pro·NA	1, 10
Leucine aminopeptidase (EC 3.4.11.1)	Leu-AP	Leu·NA	1, 9
Dipeptidyl aminopeptidase I (EC 3.4.14.1)	DAP-I	Ser·Tyr·NA	11
Dipeptidyl aminopeptidase IV (EC 3.4.14.5)	DAP-IV	Gly·Pro·NA	12
Serine proteinase (EC 3.4.21)	Trypsin-like	BAEE	1, 13
Serine proteinase (EC 3.4.21)	Chymotrypsin-like	ATEE	1, 14
Serine Proteinase (EC 3.4.21)	Elastase-like	Ac(Ala) <sub>3</sub> ·ME	1, 15
Carboxyl proteinase (EC 3.4.23.5)	Cathepsin D	Hemoglobin	1, 16
$\beta$ -N-Acetyl-D-glucosaminidase (EC 3.2.1.30)	GlcNAc-ase	NP-GlcNAc	1, 17
Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1)	Phosphatase	NPP	1, 18
Arylesterase (EC 3.1.1.2)	Esterase	NPA	1, 19
Ribonuclease (EC 3.1.27)	RNase	RNA	1, 20

ester (ATEE), acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine methyl ester (Ac(Ala)<sub>3</sub>ME), hemoglobin, *p*-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide (NP-GlcNAc), *p*-nitrophenyl phosphate (NPP), *p*-nitrophenyl acetate (NPA), ribonucleic acid (RNA).

#### 緩衝液

酵素活性測定用の緩衝液は 0.02 M PBS を用いた。ただし、カテプシンDの測定には 0.2 M sodium acetate buffer (pH 3.2) を用いた。

#### 酵素活性の測定

組織ホモジネートの遠心上清分画は、それぞれの基質溶液および PBS 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。カテプシンDは前述の緩衝液を用い、pH 3.2の条件下で反応を行った。すべての酵素活性の測定には3本宛の反応試験管を用い、その平均値を記載した。各酵素活性の基質および測定方法は表1に記載する。すなわち、6種類のアミノペプチダーゼ活性の測定は、2 mM  $\beta$ -naphthylamide 誘導体 (0.25 ml), PBS (0.65 ml) および上清分画 (0.1 ml, 適宜希釈) を用いて反応を行い、すでに

報告した方法<sup>1,8-12)</sup>で反応を止め、525 nm の吸光度を測定した。セリンプロテイナーゼ活性の測定は、75 mM ペプチドエステルあるいは N-アセチルアミノ酸を基質として用い、すでに報告した方法<sup>1,13-15)</sup>で反応を止め、525 nm の吸光度を測定した。カテプシンD活性の測定は、0.5% ヘモグロビン (1.0 ml, pH 3.2) を基質として用い、既報の方法<sup>1,16)</sup>で反応を止め、280 nm の吸光度を測定した。グリコシダーゼ、ホスファターゼおよびエステラーゼ活性の測定は、2.5 mM *p*-nitrophenyl 誘導体 (0.1 ml) を基質として用い、既報の方法<sup>1,17-19)</sup>で反応を止め、400 nm の吸光度を測定した。RNase 活性の測定は Meyer<sup>1,20)</sup> の方法によって測定した。

#### 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<sup>21)</sup>で測定した。

#### 統計

多変量解析の一手法である主成分分析法<sup>22)</sup>を用いて解析した。

表 2 Enzymatic Changes in Forelimb, Hindlimb, and Cardiac Muscles of Control and Dystrophic Mice

Enzyme	Specific activity (nmol/min/mg protein) ±SD N=10					
	Forelimb Muscle		Hindlimb Muscle		Cardiac Muscle	
	Control	Dystrophy	Control	Dystrophy	Control	Dystrophy
AP-A	0.94 ± 0.30	1.93 ± 0.76***	0.92 ± 0.34	1.98 ± 0.72***	0.63 ± 0.21	0.78 ± 0.28
AP-B	6.45 ± 1.07	6.94 ± 1.34	5.78 ± 0.52	6.97 ± 1.31**	4.70 ± 1.44	4.51 ± 0.97
Pro-IP	1.53 ± 0.44	1.46 ± 0.45	1.56 ± 0.24	1.81 ± 0.74	0.66 ± 0.28	0.76 ± 0.29
Leu-AP	4.38 ± 0.85	7.62 ± 1.28***	3.86 ± 0.66	7.11 ± 0.95***	2.74 ± 0.69	3.02 ± 0.64
DAP-I	0.54 ± 0.16	1.29 ± 0.63***	0.54 ± 0.15	1.37 ± 0.47***	0.41 ± 0.35	0.34 ± 0.06
DAP-IV	0.71 ± 0.23	1.63 ± 2.01	0.62 ± 0.17	1.44 ± 1.82	0.35 ± 0.08	0.46 ± 0.15*
Trypsin-like	41.79 ± 20.74	94.74 ± 52.96**	26.55 ± 14.81	50.00 ± 30.76*	52.41 ± 26.21	93.14 ± 50.59*
Cathepsin D ( $\times 10^{-3}$ )	45.68 ± 23.45	100.05 ± 64.48**	29.50 ± 13.36	57.25 ± 32.91**	57.23 ± 29.35	98.56 ± 51.59*
Elastase-like	36.98 ± 19.31	78.47 ± 43.18	27.45 ± 10.84	48.04 ± 22.35**	46.22 ± 25.33	77.31 ± 39.24*
Cathepsin D ( $\times 10^{-3}$ )	2.35 ± 1.34	4.15 ± 2.71*	1.62 ± 0.81	3.10 ± 2.41*	3.22 ± 1.76	3.09 ± 1.71
CiCNac-ase	0.29 ± 0.09	0.50 ± 0.29*	0.27 ± 0.08	0.46 ± 0.15***	0.24 ± 0.08	0.29 ± 0.15
Phosphatase	1.46 ± 0.18	1.53 ± 0.40	1.56 ± 0.35	1.54 ± 0.44	0.56 ± 0.29	0.54 ± 0.19
Esterase	37.91 ± 12.66	71.42 ± 44.08	34.88 ± 8.90	61.88 ± 49.88	41.78 ± 9.47	42.67 ± 8.86
RNase	6.31 ± 4.07	16.82 ± 11.52**	4.09 ± 2.23	10.58 ± 6.70**	5.88 ± 2.69	9.12 ± 3.90*

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$

表 3 Size of Principal Components for Various Muscles in Control and Dystrophic Mice

Component	Mean±SD (n=13)					
	Forelimb Muscle		Hindlimb Muscle		Cardiac Muscle	
	Control	Dystrophic	Control	Dystrophic	Control	Dystrophic
C1	-0.47±0.82	2.91±1.69***	-0.93±0.54	2.36±1.43***	-2.20±0.77	-1.67±0.67
C2	-0.63±1.02	0.97±2.89	-1.17±0.59	-0.65±1.73	0.04±1.15	1.48±1.89*
C3	0.99±0.74	-0.41±1.87*	1.09±0.38	0.28±1.95	-0.83±0.79	-1.11±0.48

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$

Correlated enzymes

C1 : Leu-AP,  $r=0.95$ ; DAP-I,  $r=0.88$ , AP-A,  $r=0.87$ ; AP-B,  $r=0.65$ ; GlcNAc-ase,  $r=0.63$ ; DAP-IV,  $r=0.60$

C2 : Trypsin-like,  $r=0.96$ ; Chymotrypsin-like,  $r=0.96$ ; Elastase-like,  $r=0.94$ ; RNase,  $r=0.69$

C3 : Pro-IP,  $r=0.75$ ; AP-B,  $r=0.64$

### 結果および考察

前肢筋, 後肢筋および心筋における酵素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, Leu-AP, DAP-I, trypsin-like, chymotrypsin (Chy-try)-like, cathepsin D,  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase (GlcNAc-ase), RNase などが筋ジスマウスで有意に上昇していることがわかる. また後肢筋についてみると, AP-A, AP-B, Leu-AP, DAP-I, trypsin-like, Chy-try-like, elastase-like, cathepsin D, GlcNAc-ase, RNase 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. 一方, 心筋においては RNase のみが筋ジスマウスで有意に上昇している.

これらの各種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. この方法を用いることによって, 各種酵素間における相関関係に基づいて, それらの酵素の中からいくつかの重要な成分を抽出することが可能に成る. 第 1 主成分は標本分散の最大部分を説明する成分である. 第 1 主成分とは無関係ではあるが, 次の大きな部分を説明する成分が第 2, 第 3 主成分ということになる. 上述した各成分の説明する分散の割合は, それぞれ 35.1%, 26.1%, 15.1% である (表 3). 第 1 主成分は主としてアミノペプチダーゼを代表する成分であり, これと相関の高い酵素は Leu-AP ( $r=0.95$ ), DAP-I ( $r=0.88$ ), AP-A ( $r=0.87$ ), AP-B ( $r=0.65$ ), GlcNAc-ase ( $r=0.63$ ), DAP-IV ( $r=0.60$ ) である. 第 2 主成分はセリンプロテイナーゼを代表する成分であり, これと相関の高い酵素は trypsin-like ( $r=0.96$ ), Chy-try-like ( $r=0.96$ ), elastase-like ( $r=0.94$ ) などであり, これに次いで RNase ( $r=0.69$ ) が比較的高い相関を示した.

表 3 には筋ジスマウスと対照マウスの前肢筋, 後肢筋および心筋について, これら主成分に関し

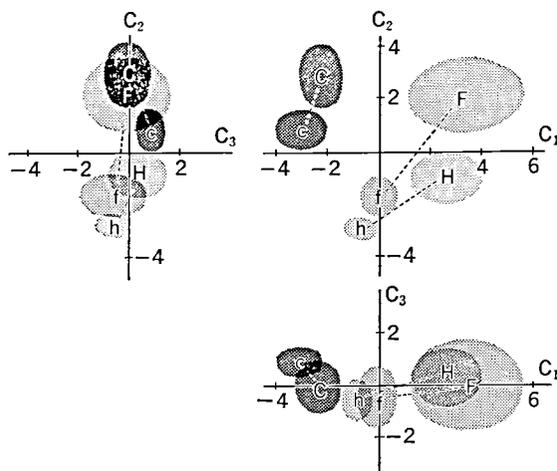


図 1 Comparison between the pathologic and control muscles on the planes composed by the axes for the first (I), second (II), and third (III) principal components. f, control forelimb; F, dystrophic forelimb; h, control hindlimb; H, dystrophic hindlimb; c, control cardiac; C, dystrophic cardiac.

て比較した。前肢筋においては、筋ジスマウスは第1主成分値について有意な高値を示し、第3主成分値については有意な低値を示した。後肢筋については、同様に第1主成分値が高値を示したが、他の成分値は有意な変化を示さなかった。心筋については、第2主成分値のみが筋ジスマウスで有意に上昇することが認められた。

図1はこれらの主成分と各群のマウスとの関連性を図示したものである。この図においてX軸およびY軸は各主成分についてのサンプルスコアを示す。ここでサンプルスコアとは、各マウスにおける酵素活性に重みづけをして総和したものである。この時に用いる重みづけの係数は、固有ベクトルから得られる。各群のマウスは楕円で表現されるが、その半径はその群に関する標準偏差を示し、その中心点は平均値を示す。

第1主成分軸と第2主成分軸についてみると、ジストロフィー群と対照群の間の差は各群内における前肢と後肢の差よりも大きいことがわかる。また心筋に相当する楕円は前肢および後肢に相当する楕円とは可成り離れてクラスターを形成する。それにもかかわらず、対照群に比したジスト

ロフィー群の酵素変化は、この楕円の位置から判断して前肢および後肢の筋肉におけるそれと同じ方向性を示している。第3主成分に関しても、前肢の筋肉における酵素変化の方向性は同じである。心筋においては第3主成分の明かな変化は認められなかった。

以前に、著者らが報告した筋ジストロフィー症患者血清中のアミノペプチダーゼ活性は罹病初期に高く、進行とともに減少する傾向にあった。一方、エンドペプチダーゼ活性は初期には、むしろ低いのが、病状の進行にともない増加する傾向にあることを認めた。患者血清中の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る。また、エンドペプチダーゼ活性は順相関であることを明らかにした<sup>4)</sup>。さらに、アミノペプチダーゼ阻害物質であるベスタチンは筋肉内アミノペプチダーゼ活性を強く阻害するとともに、長期間投与により生体内酵素網に規則性をもった変動を与えることを明らかにした<sup>23)</sup>。本報告では、さらに上記の知見を理解するため、筋ジスマウス筋肉内のプロテアーゼの動態を主成分分析法により解析し、前肢筋と後肢筋ではアミノペプチダーゼが第1主成分

と高い相関を示し、両者における酵素網の変化が極めて類似していることを認めた。一方、心筋はエンドペプチダーゼと高い相関を示し、前2者とは異なることを明らかにした<sup>7)</sup>。

## ま と め

筋ジストロフィー症の筋肉内アミノペプチダーゼの役割を明かにするため、筋ジスマウスの前肢筋、後肢筋および心筋における14種類の酵素活性の変動を調べ、対照マウスと比較した。筋肉内のプロテアーゼの動態を多変量解析の一手法である主成分分析法により解析し、アミノペプチダーゼが関与する第1主成分が前肢筋と後肢筋で有意に増加した。一方、心筋ではセリン・プロテイナーゼが関与する第2主成分のみ有意に増加することが認められた。前肢筋と後肢筋におけるアミノペプチダーゼおよび心筋におけるセリン・プロテイナーゼの変化は筋ジスマウスにおいて特徴的である。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を重視する必要がある。

## 文 献

- 1) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., and Umezawa, H. : *J. Clin. Invest.* **67**, 51-59 (1981).
- 2) Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Aoyagi, T., and Umezawa, H. : *J. Pharm. Dyn.* **4**, 184-190 (1981).
- 3) Aoyagi, T., Wada, T., Yamamoto, K., Kojima, F., Nagai, M., and Umezawa, H. : *J. Pharm. Dyn.* **7**, 312-321 (1984).
- 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., Harada, S., Kinoshita, M., Yamada, N., and Umezawa, H. : *J. Clin. Biochem. Nutr.* **1**, 65-72 (1986).
- 6) 青柳高明. 自然 10月号. 39-47 (1983).
- 7) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Harada, S., and Umezawa, H. : *Biotech. Appl. Biochem.* in press.
- 8) Aoyagi, T., Tobe, H., Kojima, F., Hamada, M., Takeuchi, T., and Umezawa, H. : *J. Antibiot.* **31**, 636-638 (1978).
- 9) Umezawa, H., Aoyagi, T., Suda, H., Hamada, M., and Takeuchi, T. : *J. Antibiot.* **29**, 97-99 (1976).
- 10) Aoyagi, T., Suda, H., Nagai, M., Ogawa, K., Suzuki, J., Takeuchi, T., and Umezawa, H. : *Biochim. Biophys. Acta* **452**, 131-143 (1976).
- 11) McDonald, J.K., and Schwabe, C. : in *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues* (Barrett, A.J., ed.), pp. 314-322, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1977).
- 12) Oya, H., Nagatsu, I., and Nagatsu, T. : *Biochim. Biophys. Acta* **258**, 591-599 (1972).
- 13) Aoyagi, T., Miyata, S., Nanbo, M., Kojima, F., Matsuzaki, M., Ishizuka, M., Takeuchi, T., and Umezawa, H. : *J. Antibiot.* **22**, 558-568 (1969).
- 14) Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Kunimoto, S., Matsuzaki, M., Hamada, M., and Takeuchi, T. : *J. Antibiot.* **23**, 425-427 (1970).
- 15) Umezawa, H., Aoyagi, T., Okura, A., Morishima, H., Takeuchi, T., and Okami, Y. : *J. Antibiot.* **26**, 787-789 (1973).
- 16) Aoyagi, T., Kunimoto, S., Morishima, H., Takeuchi, T., and Umezawa, H. : *J. Antibiot.* **24**, 687-694 (1971).
- 17) Aoyagi, T., Nagai, M., Iwabuchi, M., Liaw, W.S., Andoh, T., and Umezawa, H. : *Cancer Res.* **38**, 3505-3508 (1978).
- 18) Aoyagi, T., Yamamoto, T., Kojiri, K., Kojima, F., Hamada, M., Takeuchi, T., and Umezawa, H. : *J. Antibiot.* **31**, 244-246 (1976).
- 19) Umezawa, H., Aoyagi, T., Hazato, T., Uotani, K., Kojima, F., Hamada, M., and Takeuchi, T. : *J. Antibiot.* **31**, 639-641 (1978).
- 20) Meyer, D.H., Meyer, W.L., and Kakulas, B.A. : in *Recent Advances in Myology* (Bradley, W.G., Gardner-Medwin, D., and Walton, J.N., eds.), pp. 277-282, Excerpta Medica, Amsterdam (1975).
- 21) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. : *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
- 22) Kendall, M. : in *Multivariate Analysis*, pp. 13-29, Charles Griffin and Co., London (1975).
- 23) Aoyagi, T., Wada, T., Yamamoto, K., Kojima, F., Nagai, M., Harada, S., and Umezawa, H. : *J. Appl. Biochem.* **6**, 212-221 (1984).

# CANP 阻害剤

大 関 正 弘\*

研究協力者 花田和紀\*, 玉井正晴\*, 横尾千尋\*, 鈴木紘一\*\*

## 緒 言

筋蛋白分解には複数の蛋白分解酵素（プロテアーゼ）が作用して分解が完了するものと思われるが、今日、生理的、病理的を問わず筋蛋白の分解には非リソゾーム系とリソゾーム系の二系統のプロテアーゼが働くものと考えられる。前者に属するものとしてカルシウム依存性中性プロテアーゼ (Ca-activated neutral protease: CANP または calpain の名で呼ばれている)。後者に属するものとしてカテプシン群がある。筋疾患、とりわけ進行性筋ジストロフィー (DMD) では遺伝性の素因として筋細胞膜に異常があり、これが引き金となって筋細胞内への Ca イオンの流入、CANP の活性化、Z 帯の消化、筋原線維の分節化といった一連の筋分解のカスケードが惹起され、本疾患に特徴的な筋線維の壊死、崩壊が起るとする病因説がある<sup>1)</sup>。従って、CANP を選択的に阻害することによって本症の進行を喰い止め得ると期待される。事実、われわれは CANP, カテプシン B, L, H 等のシステインプロテアーゼを選択的に阻害する E-64 誘導体, EST が筋ジストロフィーハムスター UM×7.1 の病気の進行を遅延せしめ、延命効果をもたらすことを報告した<sup>2)</sup>。本研究の目的は E-64 関連化合物<sup>3)</sup>で得られた上記の知見を

もとに、CANP により選択性の高い阻害剤を合成的に創製し、DMD 等の筋疾患の治療薬として開発することにある。

## 材料及び方法

### 1. CANP 及び阻害活性測定法

ニワトリ CANP を骨格筋より石浦ら<sup>4)</sup>の方法で調製した。電気泳動的にほぼ均一で、比活性 570 U/mg ( $A_{280}=0.321$ ) の標品を使用した。阻害活性の測定は基本的に石浦らの方法に準じ以下の方法によった。

#### 反応溶液

0.1 M Tris-HCl, pH 7.5	460 $\mu$ l
7M 2-Mercaptoethanol	1.5 $\mu$ l
1 M CaCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu$ l
Casein (30 mg/ml in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5)	40 $\mu$ l

の割合で混合したもの 500  $\mu$ l に阻害溶液 80  $\mu$ l を加える。CANP 溶液 5~10  $\mu$ l を加えて反応を開始し、30°C, 20 分反応後、500  $\mu$ l の 10% トリクロロ酢酸を加えて反応をとめ、室温で約 20 分放置後 15,000 rpm×10 分遠心し上清の 280 nm の吸収を測定する。

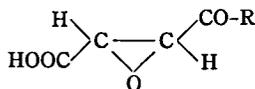
### 2. パパイン及び阻害活性測定法

パパイン活性は Sigma 社製 2 回結晶標品を用い、Z-Phe-Arg-MCA (蛋白研究奨励会製) を基質として Barrett<sup>5)</sup>の方法によった。

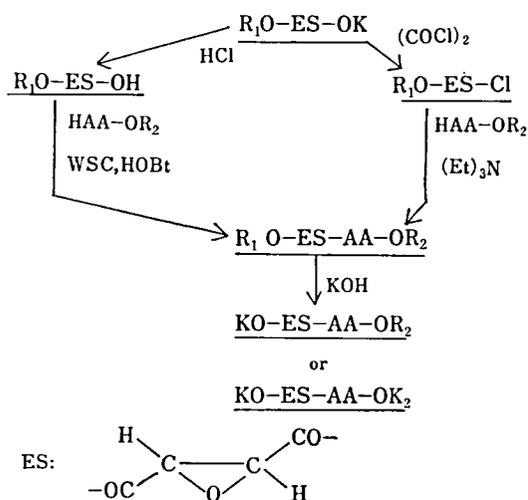
\* 大正製薬総合研究所

\*\* 東京都臨床医学総合研究所

Table 1 CANP Inhibitory Activity of Epoxysuccinyl Amino Acid (I)



R	Inhibitory activity ID <sub>50</sub>		CANP/Papain
	Papain (n mol)	CANP (mol/mol)	
Phe-OEt	0.30	570	1900
Leu-OEt	0.21	41	195
Leu-OEt(D)	0.46	642	1396
Leu-OBzl	0.29	38	131
Ile-OBzl	0.28	20	71
Orn(Z)-OBzl	0.27	1.6	5.9
Lys(Z)-OBzl	1.07	6.8	6.4
Arg-OMe	1.67	5700	3413
Glu(OBzl)-OBzl	16.9	2.3	0.14
Pro-OBzl	79.3	85	1.07



AA: Amino acid residue  
WSC: Water soluble DCC

Fig. 1 Synthetic Scheme

### 3. E-64 類縁体の合成

Fig. 1 に合成法の概要を示す。DL-トランスエポキシコハク酸モノエステルK塩 ( $R_1O-ES-OK$ ) とカルボキシル基をエステルで保護したアミノ酸 ( $H-AA-OR_2$ ) を Fig. 1 に示す二つの方法で縮合した。更に、必要に応じ苛性カリを用いてエステルを切断し  $KO-ES-AA-OR_2$  または  $KO-ES-AA-OK$  を得た。

#### 1) 縮合法

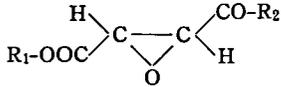
$R_1O-ES-OK$  (10 mmol) をトリエチルアミン (11 mmol) のエチルエーテル溶液 (10 ml) に懸濁しオキザリクロリド (11 mmol) のエチルエーテル溶液 (10 ml) を氷冷攪拌下に滴下。3 h 室温で攪拌した後、生じた沈澱を濾別し  $R_1O-ES-Cl$  のエチルエーテル溶液を得る。これを  $H-AA-OR_2$  (10 mmol) およびトリエチルアミン (11 mmol) のエチルエーテル溶液 (50 ml) に氷冷攪拌下に滴下。室温放置後、氷水に注ぎ酢エチで抽出。酢エチ層を洗浄後濃縮乾固。残渣をシリカゲルカラムで精製し  $R_1O-ES-AA-OR_2$  を得る。

#### 2) 加水分解法

$R_1O-ES-AA-OR_2$  (2 mmol) を  $R_2OH$  またはアセトン (5 ml) に溶解し、 $KOH$  (2 mmol) の  $R_2OH$  または水溶液 (1~3 ml) を氷冷下滴下すると  $R_1$  が選択的に切断され  $KO-ES-AA-OR_2$  の結晶が生じる。結晶が得られない場合は反応液を塩酸性酢エチで抽出し  $HO-ES-AA-OR_2$  を得る。 $KO-ES-AA-OK$  を得る場合は  $KOH$  を 6 mmol 使用する。

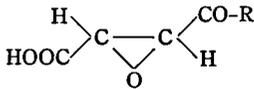
## CANP 阻害剤

Table 2 CANP Inhibitory Activity of Epoxysuccinyl Amino Acid (II)



R <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>	Inhibitory activity ID <sub>50</sub>		CANP/Papain
		Papain (n mol)	CANP (mol/mol)	
H	Phe-OH	2.85	7000	2500
H	Phe-OEt	0.30	570	1900
Et	Phe-OEt	5.36	66	12.3
Bzl	Phe-OEt	0.51	231	453
H	Leu-OH	0.36	4600	12777
H	Leu-OEt	0.21	41	195
Et	Leu-OEt	2.7	4.9	1.8

Table 3 CANP Inhibitory Activity of Epoxysuccinyl Amino Acid (III)



R	Inhibitory Activity ID <sub>50</sub>		CANP/Papain
	Papain (n mol)	CANP (mol/mol)	
Orn(Z)-OMe	0.19	45	237
Orn(Z)-OEt	0.25	58	232
Orn(Z)-O-nBut	0.17	5.1	30
Orn(Z)-OBzl	0.27	1.6	5.9
Orn(Z)-NH <sub>2</sub>	0.37	58	156
Lys(Z)-OH	1.30	560	430
Lys(Z)-OMe	0.56	140	250
Lys(Z)-OEt	0.55	84	153
Lys(Z)-OBzl	1.07	6.8	6.4

## 結果及び考察

Table 1 にエポキシコハク酸に結合したアミノ酸を変えた時のパパインおよび CANP に対する阻害活性を示した。CANP/papain が小さい程 CANP に対する選択性が高いことを示す。Orn あるいは Lys および Glu の遊離のアミノ基を Z 基で、カルボキシル基を Bz 基で保護することにより CANP に対する阻害活性が極めて強くなる。

中でも Glu の場合はパパインに対する作用は弱く CANP 特異性が高い。更に、アミノ酸 C 末

端、あるいはエポキシコハク酸のエステル化による影響を Table 2 に示した。パパイン、CANP に対する活性とも C 末端のエステル化によって増大し、エポキシコハク酸のエステル化によりパパインに対する活性は減弱するが逆に CANP 作用は強くなる。しかもエチル基の様に小さい方がベンジル基の様な比較的 bulky なものよりも効果がある。一方、Orn, Lys の C 端は bulky な基でエステル化した方が CANP に対してより選択性が高くなることがわかった。アミド化はエステル化とほぼ同等の効果がある (Table 3)。

以上 E-64 に関してこれまで得られた知見をも

とに CANP に対してより選択性の高い阻害剤を得る目的でエポキシコハク酸, アミノ酸誘導体の合成を試み, 代表的なチオールプロテアーゼであるパインと比較しながら構造活性を検討した. Orn, Glu, Lys の例でみられる様に CANP に対してかなり選択性の高い化合物が得られ今後更に詳細な検討を進めることにより CANP 特異阻害剤を合成的に得ることも可能と考えられた.

### 結 語

CANP の選択阻害剤を得ることを目的にチオールプロテアーゼの特異阻害剤, E-64 の活性基であるエポキシコハク酸を基本骨格とし各種アミ

ノ酸誘導体を合成し CANP およびパインに対する阻害活性を比較した結果, CANP に対して比較的特異性の強い数種の化合物を得ることが出来た.

### 文 献

- 1) 杉田秀夫 : *Medicina*, 22, (2), 287 (1985).
- 2) M. Tamai *et al.* : Proceeding of the International Symposium on Cysteine Proteinase and their Inhibitors. ed. by V. Turk, Walter de Gruyter & Co., Berlin. New York (1985).
- 3) 花田和紀他 : 基礎と臨床, 20, (12), 7 (1986).
- 4) S. Ishiura *et al.* : *J. Biochem.*, 84, 225 (1978).
- 5) A.J. Barrett : *Biochem. J.*, 187, 909 (1980).

# CANP の生物学的研究

川 島 誠 一\*

研究協力者 林 昌美\*, 斉藤祐見子\*

## はじめに

カルシウム依存性中性プロテアーゼ (以下 CANP) は中性 pH で活性を示す主要な細胞内プロテアーゼであり、広く動物界に分布している。本酵素はカルシウムイオンにより活性化されるが、生体内にはカルシウム感受性の異なる 2 種類の CANP (高感受性型の  $\mu$ CANP と低感受性型の mCANP) が存在する。筋ジストロフィーや心筋梗塞などの病的状態では筋肉の細胞内カルシウム濃度が上昇することが知られており、これらの疾病における筋タンパク質の異常分解は本酵素により引き起こされると推定されている。したがって、本酵素の活性を制御することによりこれらの疾病の抑止的治療が可能となることが期待される。一方、本酵素には本来の生理的機能が存在するはずである。この機能は、CANP の活性を制御する薬剤を実用化する上で大いに考慮されるべきものであるが、その実体は不明である。そこで、CANP の生理的機能を明らかにする手掛りを得るために、本酵素の組織局在性の検討を試みた。方法としては抗 CANP 抗体による免疫組織学的手法を用いることになるが、CANP には似て異なる 2 種類の CANP が存在するため、各 CANP に特異的な抗体が必要とされる。これはモノクロナル抗体をスクリーニングすることにより実現可

能なので、CANP に対するモノクロナル抗体の作成から始めた。

## 方 法

抗原として用いる  $\mu$ CANP と mCANP はウサギ骨格筋より従来の方法で精製した。各 CANP でマウスを免疫し、その脾細胞とマウスミエロース細胞を PEG 法で融合させた。できたハイブリドーマを HAT 培地で選別したのち ELISA 法により抗 CANP 抗体を産生する細胞をスクリーニングし、クローン化した。その結果、mCANP を抗原とした 15 種類の抗 mCANP 抗体産生クローンおよび  $\mu$ CANP を抗原とした 30 種類の抗  $\mu$ CANP 抗体産生クローンが得られた。

組織の抗 CANP 抗体染色は以下の方法により行った。ウサギの各種臓器を摘出後、一部はパラホルムアルデヒドで固定し、一部は液体窒素で急速凍結した。前者からはパラフィン切片および固定凍結切片を作成し、後者からは未固定凍結切片を作成した。各切片を抗 CANP 抗体で標識し、ビオチニル化抗マウス IgG ウマ免疫グロブリンと反応させたのちイミダゾール法を用いたアビジンビオチン複合法により検出した。

## 結 果

mCANP および  $\mu$ CANP を抗原として得られたモノクロナル抗体の多くはそれぞれの 80K サ

\* 東京都老人総合研究所

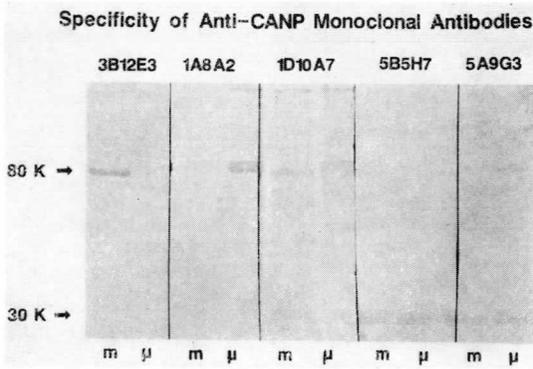


図 1 抗 CANP モノクロナル抗体の特異性

ブユニットに特異的なものであったが、抗 mCANP 抗体類の 1 種類 (1D10A7) は mCANP と  $\mu$ CANP の 80K サブユニットのいずれとも反応し、抗  $\mu$ CANP 抗体類の中には 30K サブユニット ( $\mu$ CANP と mCANP で同一) に特異的なもの (5B5H7) や 30K サブユニットと  $\mu$ CANP の 80K サブユニットと反応するが mCANP の 80K サブユニットとは反応しないもの (5A9G3) もあった (図 1)。以下に述べる組織の抗体染色には、CANP の全体像を探るために  $\mu$ CANP と mCANP のいずれとも強く反応する 1D10A7 を用いた。

抗体染色後の巨視的にみた臓器ごとの色調の強さは、肺・脾・心・腎・精巣・脳・肝・骨格筋の順となり、CANP の含量を反映しているものと考えられる。また、3 種類の方法で作成した標本での組織内局在性は本質的には余り差はないが、未固定切片ではやや分散した様相を呈し、またパラフィン切片では発色しない部位も認められた。したがって、固定凍結切片が最も正しい局在性を示していると解釈し、以下にその結果を示す。

大脳：星状膠細胞と血管が強く反応する。

小脳：プルキニエ細胞および分子層が淡く反応する。

脊髄：灰白質の神経細胞と白質の軸索が強く反応する。

坐骨神経：軸索および神経周膜が反応する。

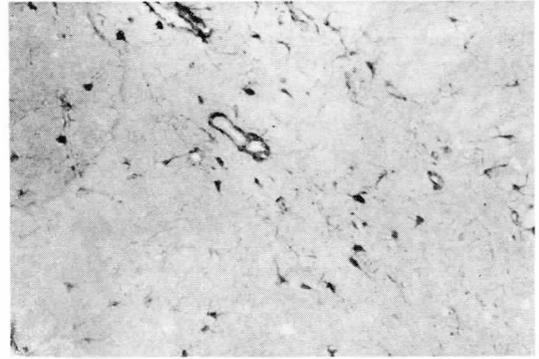


図 2 大脳



図 3 小脳

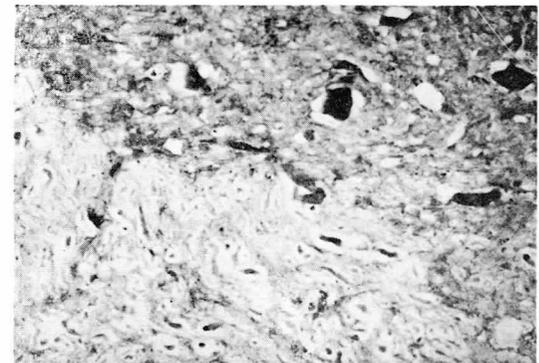


図 4 脊髄

肺臓：肺胞上皮細胞が極めて強く反応する。

胆のう：粘膜上皮細胞が強く反応する。

精巣：曲細精管を囲む筋様細胞が反応する。

肝臓：小葉間動脈，小葉間静脈，小葉間胆管が極めて強く反応するが，肝細胞自身は反応しない。

骨格筋：血管以外には特に強く反応する部位はない。

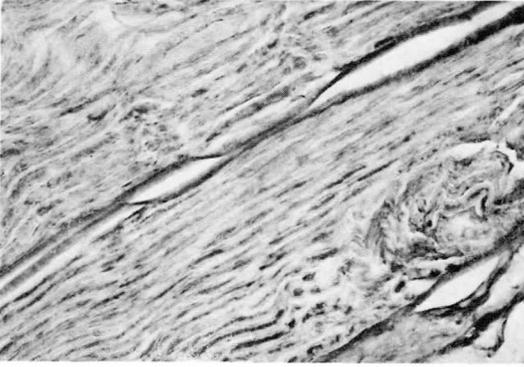


図 5 坐骨神経

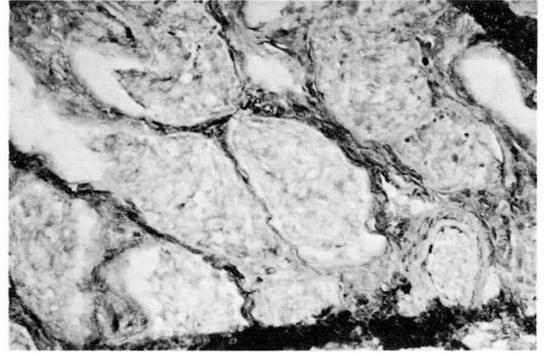


図 8 精巣

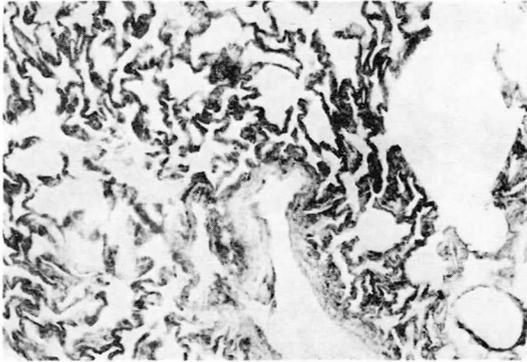


図 6 肺臓

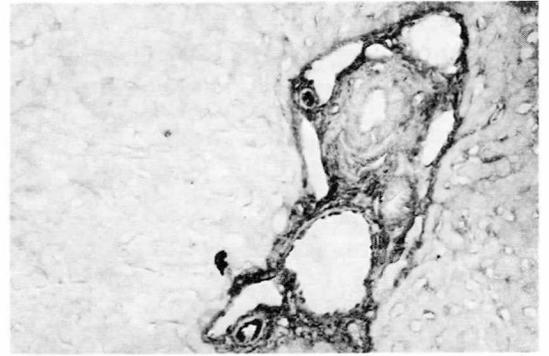


図 9 肝臓

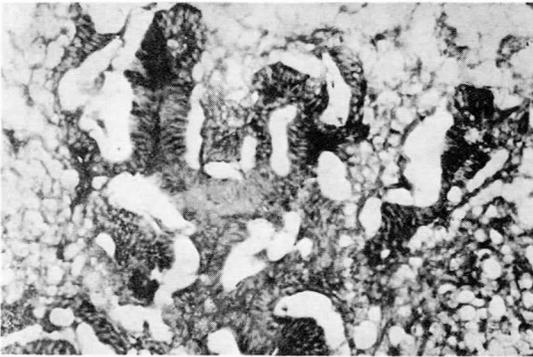


図 7 胆のう



図 10 骨格筋

腎臓：皮質では糸球体や糸球体旁細胞が，髄質では遠位尿細管や集合細管が反応する。  
眼：角膜上皮が極めて強く反応する。

### 考 察

生体内における CANP の機能として現在考えられているものの多くは試験管内反応に基づく結果からの推定であり，(1)細胞膜および細胞骨格タ

ンパク質の分解，(2)タンパク質リン酸化酵素などの活性化，(3)ステロイドホルモンや成長因子などの受容体の活性調節，(4)生体膜の融合などに関与していると考えられている。一方，本研究の結果から CANP は一般的に上皮系細胞に多く存在していることが明らかになった。これらの細胞に共通な機能として物質の吸収・放出および外部刺激の伝達・応答がある。エンドサイトシスやエキソ

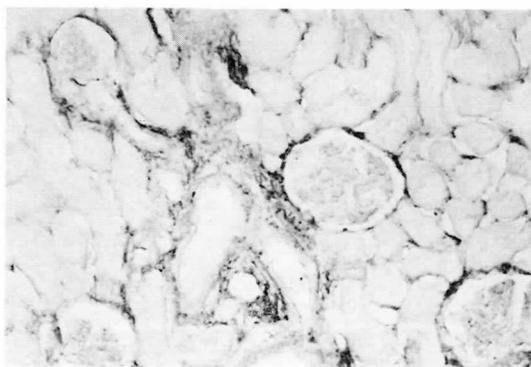


図 11 腎臓 (皮質)

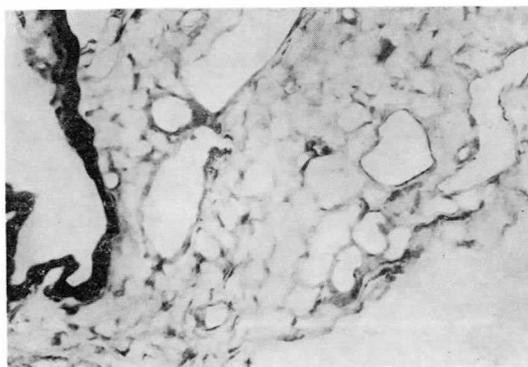


図 13 眼

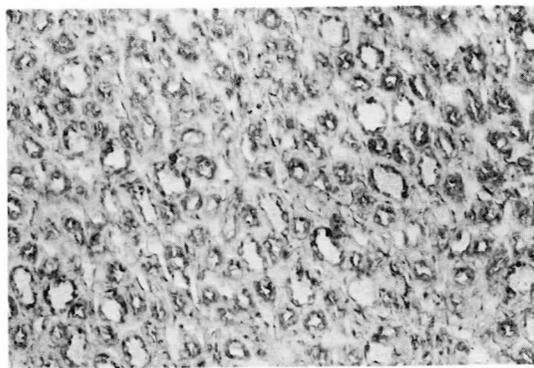


図 12 腎臓 (髄質)

サイトシスによる吸収・放出は生体膜の融合を介した過程であり、一方受容体を通じた情報伝達には細胞膜の裏打ちタンパク質や細胞骨格タンパク質が大きな役割を果たし、タンパク質リン酸化酵素なども関与している。したがって、上皮系細胞に CANP が多く存在するという今回の結果は、

従来予想されていた CANP の機能について多くの面で支持を与えるものである。

しかし、ここで得られた光学顕微鏡レベルでの観察では細胞における局在部位にまでは言及できない。今後は免疫電顕を駆使したより詳細な検討が必要とされる。また、最近主張され始めたように、CANP の細胞内存在部位は動的であり、これを追跡するためには単なる組織の抗体染色では不十分である。CANP の機能をより明確にするには、発生・分化の過程における存在量および存在部位を決定し、さらには培養細胞系を用いた動的な解析も必要となる。その達成のために、本研究で得られたモノクロナル抗体や本研究班の目的の一つである CANP 活性阻害薬剤は有力な武器になり得ると期待される。

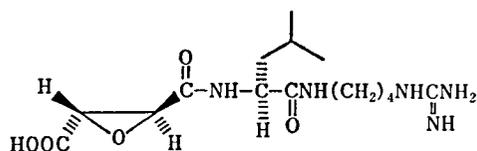
# CANP 阻害剤の設計及び合成に関する研究

向山光昭\*

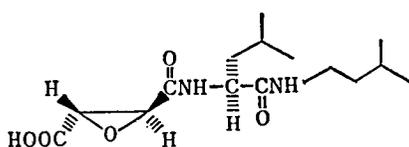
筋ジストロフィー症にみられる筋崩壊には細胞中に存在しカルシウムによって活性化される中性プロテアーゼ (CANP), ライソゾーム性のカタプシン B, H, L などのシステインプロテアーゼの関与が示唆されており, これら酵素の特異的阻害剤の筋ジストロフィー症治療薬としての有効性が注目されている。

EC-64 (1) は, *Aspergillus japonicus* TPR-

64 株の培養物中から単離され, これはパペインやカタプシンなどのシステインプロテアーゼに対して, 特異的阻害活性を示すことが明らかになっている。さらに, これまでの構造活性相関の検討によって, EC-64 (1) の高活性誘導体 EC-64-C (2) が見い出されている。活性の発現には, エポキシド部分が必須であるが, アミノ酸残基として L-ロイシンが重要であることも示唆されている。



1 EC-64



2 EC-64-C

医薬品をはじめとする生理活性物質のフッ素による化学修飾は, その特異性の故に薬理効果などの改善が期待できるため, 最近極めて活発な展開をみせている。一般的に, 生理活性を考慮する際有機フッ素化合物の特異的な性質は以下の如くである。

1) フッ素原子は立体的には水素原子に次いで小さく, ある生理活性物質中の水素原子をフッ素原

子で置換しても, 分子の立体的な変化が殆んどないため, もとの分子と同様に生体系に取り込まれる場合が多い。

2) フッ素原子は立体的には水素原子に近いが, その電気陰性度は全元素中最大である。従ってフッ素原子による修飾は, 分子内の静電的分布には大きな変化をもたらす。フッ素基の強い電子吸引性は近傍の官能基の性質 (例えば, カルボキシル基の酸性度の増加) や水素結合の形成による分子

\* 東京大学理学部

のコンホメーションの変化をもたらす場合があり、それに基づく生理活性の変化が論じられている例もある。

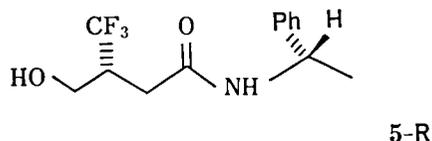
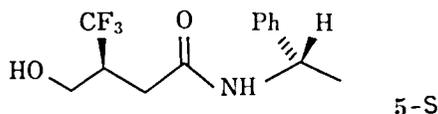
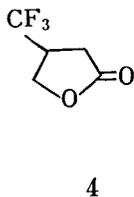
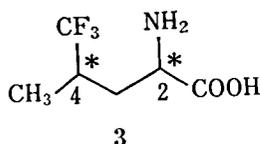
3) C-F 結合の結合エネルギーは C-H 結合のそれよりも大きく、通常 C-F 結合の開裂を伴った代謝は起り難い。

4) 有機分子にフッ素を導入すると脂溶性が増大し、生体内の血中濃度の上昇速度や輸送速度を増

大させ、また脂質部分への偏在を容易にする。

以上述べた有機フッ素化合物の特異性と、EC-64 関連物質の構造活性相関に基づき、より有効なシステインプロテアーゼ阻害剤の開発を目的として、5,5,5-トリフルオロロイシン (3, 以下トリフルオロロイシンとよぶ) を修飾基とする一連の化合物の合成を行った。

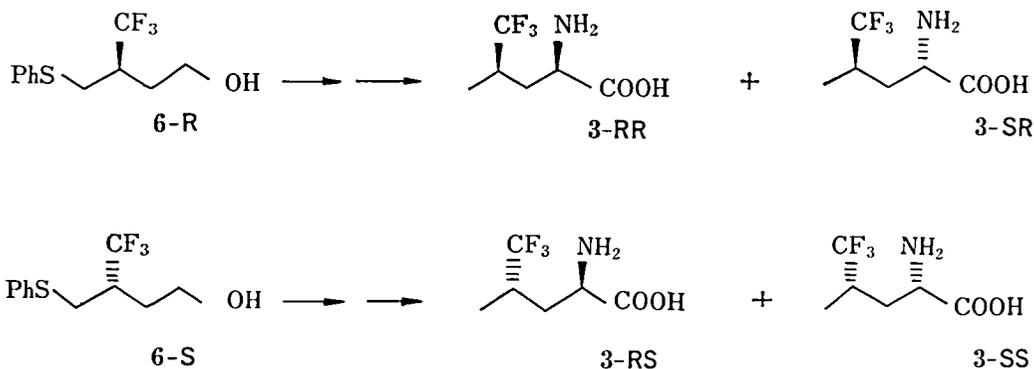
トリフルオロロイシン (3) の 2 位および 4 位は



不斉炭素であるので、四種の立体異性体が存在する。従って、3 を修飾基とする生理活性物質のアナログの生理活性を評価する場合には、異性体混合物を導入したのでは意味がなく、それぞれの異性体を作り分け導入する必要がある。

従来、トリフルオロロイシンのようにトリフルオロメチル (CF<sub>3</sub>) 基を有するキラルな分子の有効な合成法とその絶対配置の決定法は、未解決な分野であった。一方、我々は、3-トリフルオロメチル-γ-ブチロラクトン (4) の光学分割が、入手容易な α-フェネチルアミンを用いて効率良く行

えることを見出した。すなわち、4 と光学活性 (1S)-α-フェネチルアミンからアミド (5) を生成させ、再結晶およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーによってジアステレオマー分離を行うと、二種のジアステレオマーが純粹に得られる。つづいて、アミド (5) の一方のジアステレオマー (5-S) にフェニルチオ基を導入し、アミド部分を除去、還元すると、光学活性 (3R)-3-トリフルオロメチル-4-フェニルチオブタノール (6-R) が生成する。このキラルなアルコール (6-R) に Swern 酸化、Strecker 反応を行い、生じるアミノニト



ルのジアステレオマー分離を行ったのち、酸性加水分解を行うと、トリフルオロロイシンの二種の異性体 (3-RR, 3-SR) が、光学的に純粋に得られる。

また、アミド (5) の他のジアステレオマー (5-R) から、同様にトリフルオロロイシンの他の立体異性体 (3-RS, 3-SS) が合成できる。

また、ここで得られる各異性体の絶対立体配置は、トリフルオロロイシノールのベンゾイル体に変換し、その CD-スペクトル、NMR および X-線解析により決定した。

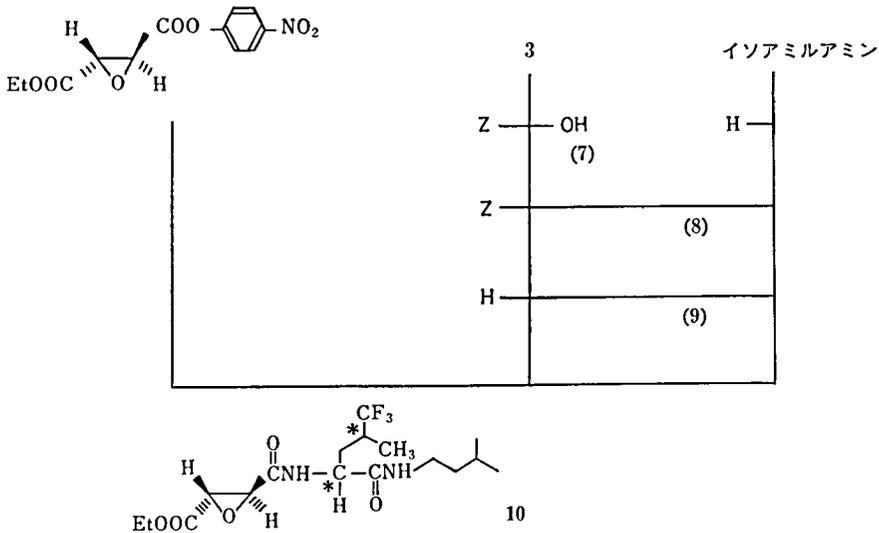
以上、トリフルオロロイシノールの四種の異性体の合成および立体構造の決定を行うことができたので、これらを修飾基とするプロテアーゼ阻害剤 EC-64-C 誘導体の合成を行った。

合成計画としては、まずトリフルオロロイシン

(3) のカルボン酸部分に、イソアミルアミンを導入し、さらに、トランスエポキシコハク酸と、トリフルオロロイシンのアミノ基を結合させることとした。

そこで、N-トリフルオロロイシン (3) のアミノ基をベンジルオキシカルボニル化し、アミノ基に保護基を導入した。これに塩化ジメチルホスフィノチオイルを縮合剤に用い、さらにイソアミルアミンを作用し、イソアミルアミド (8) に変換した。アミノ基の保護基として導入したベンジルオキシカルボニル基を、10% パラジウム/活性炭存在下水添し除去する (9)。これをトランスエポキシコハク酸エチル *p*-ニトロフェニルエステルと反応させると、目的とする EC-64-C トリフルオロロイシン誘導体 (10) が合成できた。

トリフルオロロイシンの四種の異性体を用い



て、上記合成ルートに従って EC-64-C トリフルオロロイシンの全異性体を合成することができ

た。これらの化合物合成の各ステップの収率および比旋光度を以下の表に示す。

トリフルオロロイシン (3) の絶対配置	7		8		9	10	
	収率 (%)	$[\alpha]_D^{20}$ (c, CHCl <sub>3</sub> )	収率 (%)	$[\alpha]_D^{20}$ (c, CHCl <sub>3</sub> )	収率 (%)	収率 (%)	$[\alpha]_D^{20}$ (c, CHCl <sub>3</sub> )
2S, 4S	83	-18.7° (3.0)	quant.	-31.2° (3.6)	90	68	-10.8° (0.7)
2S, 4R	76	+5.7° (4.9)	88	-19.0° (0.8)	quant.	67	-3.6° (0.5)
2R, 4S	quant.	-5.9° (3.6)	83	+24.5° (3.5)	quant.	93	+59.2° (0.9)
2R, 4R	27*	+22.0° (2.4)	95	+31.3° (2.8)	quant.	70	+70.0° (0.6)

\* 塩基として NaOH のかわりに, NaHCO<sub>3</sub> を使用

以上, EC-64-C のアナログとしてトリフルオロロイシンを導入した四種の立体異性体を合成し, 生理活性調査の試料として供給することがで

きた. 今後, 生理活性部位として必須であるエポキシコハク酸部位のフッ素原子による修飾を試みる予定である.

# CANP 遺伝子のクローニングに関する研究

鈴木 絃 一\*

## はじめに

カルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) は筋ジストロフィー症 (DMD) 時の筋肉の崩壊の引金を引く酵素である。CANP 遺伝子は X 染色体上にはないので、CANP は DMD の遺伝子産物ではない。しかし、DMD 時には何らかの原因で CANP の活性が上昇し、それが筋崩壊に結びつく。即ち、DMD の表現型は CANP 活性の異常な昂進といえよう。そこで、CANP の活性昂進の原因を究明するため CANP の活性制御系を解析した。また、CANP 活性に大きな影響を与える内在性の CANP インヒビターの研究も行った。CANP インヒビターの阻害機構が解明できれば、CANP に特異的なインヒビターの開発が可能で、これは筋肉の崩壊を停止する試薬の開発に直結する。このような考えにもとずきインヒビターの研究を行った。

## 結果・討論

### 1. CANP の活性制御系の解析

CANP には 2 種のアイソザイムがあり、 $\mu\text{M}$  および  $\text{mM}$  カルシウムで活性を発現し、 $\mu\text{CANP}$ 、 $\text{mCANP}$  と呼ばれる。両者とも 2 個のサブユニット、80K と 30K、からなり、80K はプロテアーゼドメインとカルモデュリンドメインを持つ触

---

東京都臨床医学総合研究所

媒サブユニット、30K はリン脂質結合ドメインとカルモデュリンドメインを持つ制御サブユニットである。cDNA の構造解析から明らかになったこれらのドメイン構造、特にカルモデュリンドメインの機能の解析を行った。

CANP のカルシウムの感受性は、分子中の 2 個のカルモデュリンドメインに対するカルシウムの結合により規定されるであろう。これを実証するため、CANP 中のカルモデュリンドメインを大腸菌で発現、精製し、そのカルシウム結合能を推定した。ウサギ  $\text{m}$ 、 $\mu\text{CANP}$  の 80K、30K 中のカルモデュリン、およびニワトリ 80K のカルモデュリンの計 4 個のカルモデュリンドメインを合成した。これらはいずれも分子量約 2.5 万で、ウサギ  $\text{m}80\text{K}$  は 4 個、それ以外は各 2 個のカルシウムを結合し、見かけのカルシウムの解離定数は 35, 61, 128, 149  $\mu\text{M}$  で、この値は CANP が活性を発現するのに必要なカルシウム濃度とほぼ対応していた。この結果、CANP 中のカルモデュリンドメインが実際にカルシウムを結合し、このときの感受性で CANP のカルシウム感受性が規定されていることが判明した (表 1, 図 1)。

プロテアーゼドメインについても解析を行っているが、今のところ、活性を持つプロテアーゼドメインが発現できない。しかし、CANP のプロテアーゼ消化物中には、カルシウム非存在下でもプロテアーゼ活性を出すものがあるので、プロテ

表 1 Binding of Ca<sup>2+</sup> to Calmodulin Domains in CANP

Origin of Calmodulin Domain	No. of Ca <sup>2+</sup> Binding Site	Kd (μM)	[Ca <sup>2+</sup> ] at 30% Activation (μM)
Chicken CANP 80K	2.3 (2)	61	150-260
Rabbit mCANP 80K	3.8 (4)	130	700-800
Rabbit μCANP 80K	1.7 (2)	35	50
Rabbit CANP 30K	2.3 (2)	150	—

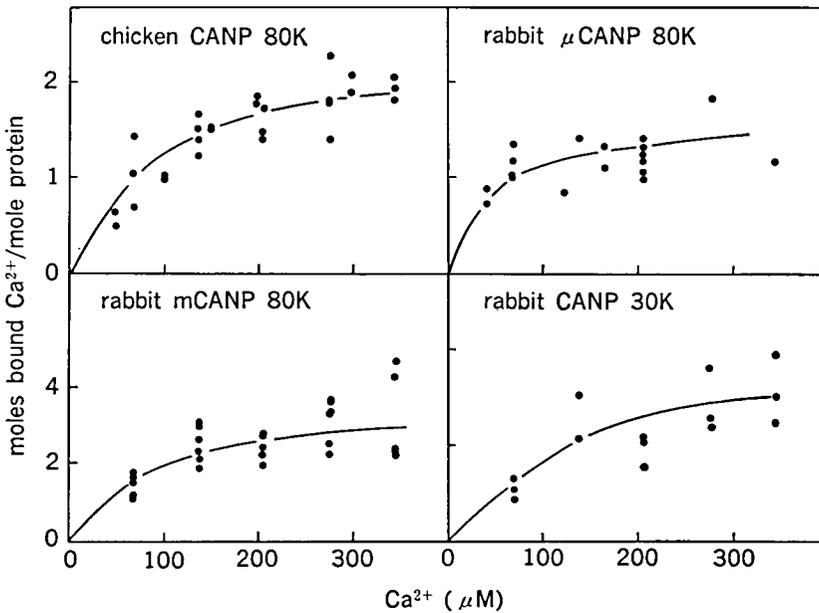


図 1 Binding of Ca<sup>2+</sup> to Calmodulin Domains in CANP

アーゼドメインは単独でもプロテアーゼ活性を発現するが、この活性はカルモデュリンドメインによって阻害され、カルモデュリンドメインにカルシウムが結合することで誘起される構造変化によって阻害がはずれ、プロテアーゼ活性が発現する。このモデルの妥当性をさらに検討している。

CANP がリン脂質の存在下で自己消化をおこす現象をさらに検討し、CANP の細胞内活性化機構を調べた。細胞質中に存在する CANP は生理的条件下では活性がないので不活性なチモーゲンと考える。カルシウム濃度が μM 程度になると 30K のリン脂質結合ドメインを通じて CANP は細胞膜と結合する。リン脂質とカルシウムによって細胞膜で CANP の自己消化がおこり、80K の N 末端側が切れて活性型 CANP となる。さら

に自己消化が進んで 30K の N 末端のリン脂質結合ドメインがきれると活性型 CANP が細胞質に遊離する。μCANP は膜を介さずに細胞内でも活性化される可能性がある。この活性化モデルについても妥当性の検討を急いでいる。

## 2. CANP インヒビターの構造解析

ウサギ肝臓から SDS 電気泳動で均一なインヒビターを精製した (図 2)。分子量は 107K であった。これをトリプシンで切断し、ペプチドを HPLC で分離し、幾つかのペプチドのアミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸配列の 1 部に相当する 18 マーのオリゴヌクレオチドプローブ (128 通りの配列の混合物) を合成してプローブとした。

一方ウサギ肺、心臓からグアニジンチオシアネ

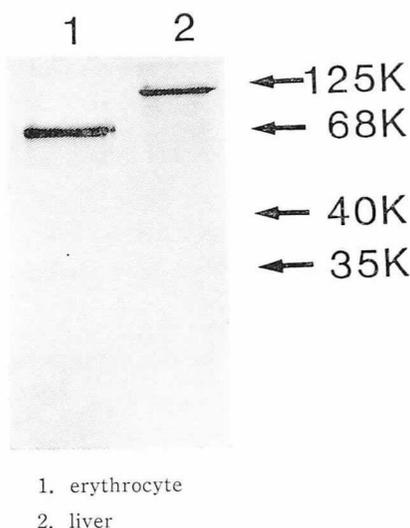


図 2 SDS-PAGE of CANP Inhibitor

ート法で RNA を抽出し、オリゴ dT セルロースカラムで polyA-RNA をえた。これをもとに 2 本鎖の cDNA を作り、2 kb 以上の長さのものを集めて  $\lambda$ gt 10 ファージベクターにつないで cDNA バンクを調製した。

ウサガ肺の cDNA ライブラリーの約 30 万個のファージクローンからヌクレオチドプローブで 3 個のクローンを選択し、さらに、この cDNA インサートをプローブとして、心臓のライブラリーをスクリーニングし、種々のクローンをえた。これらの cDNA クローンの塩基配列を解析し、約 3.8 kb の CANP インヒビターの mRNA の構造を決定した。この構造中には 2154 個のヌクレオチドからなる翻訳領域があった。これから推定される 718 個のアミノ酸配列中には、肝臓のインヒビターを使って決定したペプチドのアミノ酸配列が全て含まれていた。

この cDNA の翻訳領域をプローブにしてウサギ心臓の RNA の Northern プロットを行ったところ、3.8、3.0、および 2.5 kb の 3 本のバン

ドが検出された。3' 非翻訳領域にはポリ A 付加シグナルが 3 ケ所見出されたので、ポリ A が付加する部位を異にする 3 種の mRNA の存在が確認された。3 種の中では 3.0 のものが最も多く、次いで 3.8 で、2.5 のものは最も少なかった。

精製した CANP インヒビターの N 末端アミノ酸配列は Glu-Lys-Thr-Ala-Ser…… で、推定した 80 番目からのアミノ酸配列と一致した。従って、肝臓の CANP は 639 残基で、分子量は 68,133 である。

今まで CANP インヒビターは種々の分子種から単離され性質が調べられている。その結果、CANP インヒビターは大別して 2 群に分けられる。分子量約 110K で肝臓や心臓から分離されるものと、分子量約 70K で赤血球からとれるものである。いずれも 1 分子で数分子 (3~8 個) の CANP を阻害する。従って、CANP インヒビターにはこれを反映した構造がみられるはずである。CANP のアミノ酸反列を検討した結果、次のような特徴が見出された。(i)成熟 CANP イ

ンヒビター中には4回の繰返し構造があり、その基本単位は140残基であった。この繰返し構造の中央には約50残基の相同性の高い配列がある。この繰返しドメインが阻害の基本単位と考えられたので、これを大腸菌で発現させ、その阻害活性を調べたところ、各繰返しドメインが阻害活性を持つことが明らかになった。(ii)CANP インヒビターのアミノ酸配列は、シスタチンやキニノーゲンなどを含む構造研知のタンパク質とは類似性がなかった。そのためプロテアーゼ活性の阻害機構も違い可能性がある。特に、カルモデュリンドメインにカルシウムが結合してCANP活性が発現するので、この過程を阻害するインヒビターの可能性もある。勿論、他のプロテアーゼインヒビターのようにプロテアーゼドメインとインヒビターが直接結合する可能性が最も大きい。その場合でも、インヒビター中に反応部位があるのか、単に活性中心を物理的にふさぐだけなのかなど多くの機構が考えられ、目下検討中である。(iii)アミノ酸配列から計算したCANP インヒビターの分子量は、SDS電気泳動で推定した分子量と大きく異なる。即ち、肝臓のインヒビターは計算した分子量が98,133であるのに対し110K、赤血球のインヒビターが約47,000であるのに対し70Kである。大腸菌で作ったインヒビターのドメインがアミノ酸配列から推定した値とSDSでの値が比較的よく一致するので、この分子量の差は主に翻訳後の修飾のためと考えられる。現在、この修飾がどのようなものであるかを検討しているが、大腸菌で発現させたものが完全な阻害活性を持っているので、この修飾が阻害とは直接関係しない。

## 結 語

現在、CANP自体の活性制御系の解析とCANP

インヒビターの解析の2つを同時に行っている。前者に関しては、ドメイン構造とその機能を明らかにすることに力をそそぐと共に、細胞膜におけるプロテアーゼの活性化とCANP分子種の役割分担を明らかにする。CANPの生体内機能の解明にはこの点が最も重要と考えている。後者については、繰返しドメインが阻害の単位であると一応同定したが、アミノ酸の相同性だけでは繰返しドメインを一義的に決められなかった。現在、大腸菌で発現させたり、種々のプロテアーゼを用いたりして、インヒビターの断片を調製しその阻害効果をみている。この結果から阻害ドメインの基本単位が決まり、さらにこれを出発点としてインヒビターを小分子化し、薬として使えるものを開発すると同時に、阻害機構を解明することをめざしている。

## 発 表 論 文

- 1) K. Suzuki, Y. Emori, S. Ohno, S. Imajoh & H. Kawasaki : *J. Prot. Chem.*, 6, 7-15 (1986).
- 2) Y. Emori, H. Kawasaki, H. Sugihara, S. Imajoh, S. Kawashima & K. Suzuki : *J. Biol. Chem.*, 261, 9472-9476 (1986).
- 3) Y. Emori, H. Kawasaki, S. Imajoh, S. Kawashima & K. Suzuki : *J. Biol. Chem.*, 261, 9472-9476 (1986).
- 4) S. Imajoh, H. Kawasaki & K. Suzuki : *J. Biochem.*, 99, 1281-1284 (1986).
- 5) H. Kawasaki, S. Imajoh, S. Kawashima, H. Hayashi & K. Suzuki : *J. Biochem.*, 99, 1522-1532 (1986).
- 6) S. Imajoh, H. Kawasaki & K. Suzuki : *J. Biochem.*, 100, 633-642 (1986).
- 7) K. Aoki, S. Imajoh, S. Ohno, Y. Emori, M. Koike, G. Kosaki & K. Suzuki : *FEBS Letters*, 205, 313-316 (1986).
- 8) S. Ohno, Y. Emori & K. Suzuki : *Nucleic Acids Res.*, 14, 5559-5559 (1986).
- 9) S. Miyake, Y. Emori & K. Suzuki : *Nucleic Acids Res.*, 14, 8805-8817 (1986).

# Lysosomal cysteine proteinase inhibitor と難病治療薬開発

勝 沼 信 彦\*

研究協力者 木南英紀\*

## はじめに

細胞の変性・壊死を伴う疾患・病態では何が原因であれ、二次的にはプロテアーゼ（細胞内のみならず、浸潤細胞より分泌されるものも含む）の作用によって細胞の不可逆的な変化が進行すると考えられる。進行性筋ジストロフィー症は遺伝性疾患ではあるが、病態の進行のみならず、症状の発現以前からプロテアーゼが活動している示唆もあり、プロテアーゼインヒビターを用いた症状の進行阻止が期待される所似である。本症における筋変性・壊死の進行の過程においてプロテアーゼは多段階で働いており、作用するプロテアーゼも異なった複数が関与していると思われる。そのプロテアーゼの関与する機構を明らかにすることはプロテアーゼインヒビターの投与の適切な時期を決めるにもぜひ必要である。

ここでは主として Duchenne 型筋ジストロフィー症（DMD）を含む消耗性筋疾患におけるリソゾームのシステインプロテアーゼ群の役割に関するわれわれのデータから低分子プロテアーゼインヒビターの応用について若干考察して、今後の研究の指針としたい。

## 結果と考察

DMD あるいはその動物モデル（ジストロフィー

ーハムスター、mdx マウス）の病理組織像は筋細胞の変性・萎縮・壊死と共に、細胞浸潤・間質の増加さらに再生像が同一標本内にみられ、極めて不均一であることが一つの特徴である。以前よりこのジストロフィー筋のホモジネート中のリソゾームのシステインプロテアーゼ群（カテプシン B, H, L), カテプシン D, マスト細胞のセリン性プロテアーゼなどの活性が著明に上昇していることが報告されている。その活性上昇のばらつきは非常に大きい。われわれは免疫組織学的手法でジストロフィー筋で増加したリソゾームカテプシン群は主として浸潤してきたマクロファージに由来することを証明した<sup>1)</sup>。筋ジストロフィー症以外でも Polymyositis など炎症を伴う疾患でのカテプシン群の著明な活性上昇は浸潤マクロファージに由来する。浸潤細胞群は強力なカテプシン活性を有しており、壊死細胞に入り込み、これを清浄除去して再生のための準備状態をつくと想定されている。従ってこのマクロファージのプロテアーゼ群を阻害することは必ずしも機能維持の点では良策とは言えないかもしれない。

筋細胞内のプロテアーゼの作用を調べるためには不均一な細胞群からなる病的筋組織を用いると解析が難しくなる。Rodemann らは<sup>2)</sup> DMD 患者の皮膚生検材料から分離した培養線維芽細胞を用いて細胞内タンパク質の分解速度を調べた。ジストロフィー細胞では正常細胞より全タンパク

\* 徳島大学酵素科学研究センター酵素化学部門

の分解速度は50%増加していること、二次元の電気泳動を用いて細胞の全タンパク質を分離してその各スポットの分解速度を比較したところ、とくに限定された10種のタンパクの分解が亢進していることが明らかになった。しかし彼らはジストロフィー細胞中のタンパク分解亢進に関与するプロテアーゼを全く調べていない。勿論たとえ関与するプロテアーゼを同定できたとしても *in vivo* での病態に直ちに適用できるものではないが、細胞の変性のプロセスの一断面を知るには役立つように思われる。今後培養細胞を用いてプロテアーゼと細胞の変性壊死の関係を詳細に調べる必要がある。

一方、*in vivo* からのアプローチであるが、マクロファージなどの細胞浸潤を伴わない筋細胞の変性疾患である Rimmed vacuole を伴う Distal Myopathy (DMRV) におけるリソゾームプロテアーゼの動態を調べることからはじめた。その結果カテプシン B, H および L いずれも Rimmed vacuole に一致して局在すること、又より前段階と思われる筋細胞内に散在する小胞が強く染色されることがわかった<sup>5)</sup>。二次リソゾームあるいはその融合したものが小胞であると思われるが、Rimmed vacuole はリソゾーム由来であることは誤りのないとしてもその成因はさらに研究が必要である。本症ではカテプシン活性が上昇していることが知られているので、リソゾームの活性化による自己消化が病態と考えられる。DMRV の動物モデルとされている Chloroquine myopathy では、その症状、筋病変が E-64 の投与によって著しく改善されたとする杉田らのグループによる報告は<sup>4)</sup> この考えを支持している。では、筋ジストロフィー症でも同じように筋細胞のリソゾーム系が活性化される時期はないのであろうか。この時期に E-46 などを投与すれば、症状の改善が期待されるからである。ヒト DMD の標本を抗カテプシン B, H, L で染色し丹念にみると、hya-

line (opaque) 線維のあるものにカテプシンの染色性が著しく増加していることがわかった<sup>5)</sup>。又 mdx マウスでも opaque 線維および萎縮線維にカテプシンが異常に増加していることが見いだされた<sup>5)</sup>。しかし同じ標本中に散在する正常と思われる細胞にはカテプシンの増加はみられなかった。筋細胞内におけるカテプシンの増加は①リソゾームの数が増える ②1個のリソゾーム中のカテプシン含量が増える ③プロ酵素の活性化(成熟酵素の抗体がプロ酵素と交叉しない場合)などの可能性がある。いずれにしてもカテプシンの増加は生きた細胞の反応であり、マクロファージの浸入による壊死細胞の除去より前段階の細胞の反応であることは間違いない。しかし遺伝子の異常に基づく細胞の障害からリソゾームの活性化そして細胞壊死に至るプロセスにおける生化学的及び形態学的変化の機構は全く不明であり、このためにはこのプロセスを逐時的に追究できる実験系の確立と免疫電顕的手法の導入が要求されよう。筋細胞内のリソゾームの活性化という現象は勿論筋ジストロフィー症に特有なものではなく、DMRV でも観察されたように、細胞障害に対する細胞反応であり、本来は repair process であろう。しかしより強い障害因子が作用している病的筋細胞では、これが細胞の変性・壊死へと導くのに大きな役割をしていると想像される。従って、障害は受けてはいるが、壊死までには至っていない筋細胞を多く有する時期にはシステインプロテアーゼインヒビターは症状の進行阻止に有効であると期待できる。システインプロテアーゼインヒビターのもう一つの標的である CANP の作用するプロセスはカテプシン系より以前と推定されており、そのためにもできるだけ早期からインヒビターを投与することが望ましいことは言えよう。

筋変性とプロテアーゼの研究でもう一つ見逃がせないのは内在性インヒビターの存在である<sup>6)</sup>。

プロテアーゼの存在するところには必ずインヒビターが共存しており、リソゾームのシステインプロテアーゼにも特異的なインヒビター（シスタチンと総称）が存在する。これらとカテプシン群の細胞内における作用の仕方はまだ明らかではないが、プロテアーゼ活性の制御系として平行して調べていく必要はある。

### おわりに

低分子システインプロテアーゼインヒビターであるロイペプチンおよび E-64 の各種誘導体の *in vitro* および *in vivo* でのリソゾームシステインプロテアーゼの活性阻害、各種薬効について報告してきた<sup>7)</sup>。しかし、ジストロフィー筋でみられた筋細胞内カテプシン群の上昇をこれらのインヒビターが抑制するかどうか調べたことはない。なぜなら浸潤細胞のプロテアーゼ活性を含まずに測定せねばならないからである。Chloroquine myopathy では E-64 の投与により上昇したカテプシン活性は抑制されているので、投与量と投与方法を選べば有意義に阻害されると思われる。筋ジストロフィー症以外の難病治療のためにシステインプロテアーゼインヒビターを応用できる可能性はあるが、筋ジストロフィー症における如く、基礎研究がまず先行されるべきだと感ずる。

### 文 献

- 1) Kominami, E., Bando, Y., Ki, K., Hizawa, K. and Katunuma, N. : Increases in cathepsin B and L and thiol proteinase inhibitor in muscle of dystrophic hamsters, *J. Biochem.* 96, 1841-1848 (1984).
- 2) Rodemann, H.P. and Bayreuther, K. : Differential degradation of (<sup>35</sup>S)-methionine polypeptides in Duchenne muscular dystrophy skin fibroblasts *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2086-2090 (1986).
- 3) Ii, K., Hizawa, K., Nonaka, I., Sugita, H., Kominami, E. and Katunuma, N. : Abnormal increases of lysosomal cysteine proteinases in rimmed vacuoles in the skeletal muscle, *Amer. J. Pathol.* 122, 193-198 (1986).
- 4) 桶口逸郎, 石浦章一, 杉田秀夫, 伊井邦雄, 勝沼信彦 : 実験的クロロキンミオパチーに対する, システインプロテアーゼ阻害剤, EST の治療効果, *臨床神経学*, 第 26 巻, 928-936 (1986).
- 5) Kominami, E., Ii, K. and Katunuma, N. : Activation of the intramyofibrillar autophagolysosomal system in muscular dystrophy, *Amer. J. Pathol.*, 127, 21-26 (1987).
- 6) Katunuma, N. and Kominami, E. : Molecular basis of intracellular regulation by thiol proteinase inhibitors, *Curr. Top. Cell. Regul.*-Special Issue of Modulation by Covalent Modification (Shaltiel, S. and Chock, P.B., eds.) 27, 345-360 (1985), Academic Press.
- 7) Katunuma, N. and Kominami, E. : Abnormal expression of lysosomal cysteine proteinases in muscle wasting diseases, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, in press (1987) Springer-Verlag.

# 筋ジストロフィー症の発症とトロポニン T の アイソフォーム変化

丸山 工 作\*

研究協力者 大日方昂\*, 大島寿美子\*, 小宮 透\*, 戸塚 武\*\*

筋構造蛋白質は筋の主要蛋白質であり、筋を特徴づけるものである。筋構造蛋白質の発現様式には可塑性があり、筋成長過程で蛋白質アイソフォームの顕著な変化が起こることが知られている。鶏筋ジストロフィー症の場合、発症に伴って筋構造蛋白質に変化が生ずることが、既にいくつかの研究によって示されている。その変化の特徴として、発症に伴って発現される蛋白質のタイプが幼若筋型化することであるとされている<sup>1-5)</sup>。蛋白質の変化は、電気泳動や免疫学的手法で容易にとらえることができる。従って、筋構造蛋白質の変化を、筋ジストロフィー症の発症をみる一つの指標に使える可能性がある。本研究では、トロポニン T (以下 TNT と略す) に着目して検討した。

TNT について、最近、遺伝子レベルの研究が進み、単一遺伝子由来の mRNA のスプライシングにより多数の TNT アイソフォームが生じることが示され<sup>6,7)</sup>、現実には多数の TNT アイソフォームが、発生途上の鶏骨格筋に出現することが二次元電気泳動法により見出された<sup>8,9)</sup>。われわれは、以前、鶏筋ジストロフィー症において、TNT の発現変化が起こることを報告した<sup>1)</sup>が、最近の新しい観察を考慮すると、TNT のアイソフォームは、ジストロフィー筋において、従来考えられ

ていたよりも複雑に変化することが考えられ、また、アイソフォームの解析により発現制御レベルでの異常を推定できると思われる。

われわれは、種々の TNT アイソフォームをいづれも検出できるモノクローン抗体 (NT-302) を作成した<sup>9)</sup>。本研究ではこの抗体を用い、二次元電気泳動法により、まず、鶏の筋ジストロフィー発症に伴う TNT の発現変化について、1) 発症筋の TNT が幼若筋型と言えるのか、2) ジストロフィー筋に特徴的なアイソフォームがあるのか、3) どのくらい多くの TNT 変異体が生ずるかに着目して検討し、次に、4) ほ乳類の筋ジストロフィー症でも TNT の変化が起こるか否かについて、筋ジストロフィーマウスを対象として予備的な検討を加えた。

## 実 験 方 法

電気泳動：種々の成長段階の筋ジストロフィー鶏 (NH413) と対照鶏 (NH412) の胸筋、および、筋ジストロフィーマウス (dy) と対照マウスの大腿直筋から、全蛋白質を熱 SDS 溶液、または 8M グアニジン-HCl 液<sup>9)</sup> で抽出した。前者はそのまま SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE と略) の試料とし、後者の場合には、尿素溶液に透析し、8M 二次元電気泳動用試料とした。一次元電気泳動の場合には、13.5% ゲルを用いた SDS-PAGE (Laemmli の緩衝液系)、

\* 千葉大学理学部生物学科

\*\* 愛知県心身障害者コロニー、発達障害研

二次元電気泳動の場合には、pH 3.5~10 の Ampholine を 1.6%、pH 7~9 の Ampholine を 0.4% 含むアクリルアミドゲル中で、非平衡 pH 勾配電気泳動 (NEPHGE)<sup>10)</sup> を行なった後、二次元目の SDS-PAGE に展開した。

抗体：ヒヨコ胸筋より抽出した TNT を免疫原として、モノクローン抗体、NT-302 を作成した。抗体の特異性はイムノブロッティングと蛍光抗体法により確かめた。

イムノブロット：電気泳動ゲルから蛋白質をニトロセルロース膜に転写した後、まず抗 TNT モノクローン抗体 (NT-302) を、次にペルオキシダーゼ標識の抗マウス IgG 抗体を反応させ、ニッケル、コバルトの存在下で DAB を基質として反応させ<sup>11)</sup> NT-302 の結合した TNT のスポットを同定した。

## 結 果

### 抗体、NT-302 の特性

一次元 SDS-PAGE と組合わせたイムノブロット法により調べた結果、この抗体は TNT 以外の蛋白質とは反応しないことが確かめられた (Abe *et al.*, 1986)。更に、この抗体は速筋型の種々の TNT アイソフォーム、遅筋型、心筋型 TNT など種々の脊椎動物横紋筋の TNT アイソフォームを認識することが明らかになった (図 1)。TNT は、キモトリプシンの限定分解により N-端側の T1 フラグメントと C-端の T2 フラグメントに切断されることが知られているが、NT-302 の抗原決定基は T1 にあることもわかっている。NT-302 は電気泳動法により TNT のアイソフォーム変化を探る場合の有力な免疫学的なプローブといえる。

### 鶏ジストロフィー筋における TNT の変化

#### 1) 一次元電気泳動による解析

TNT はプロテアーゼに弱いこと、ジストロフィー筋ではプロテアーゼ活性が高まっていることを考慮して、TNT の分解によるアーテファクト

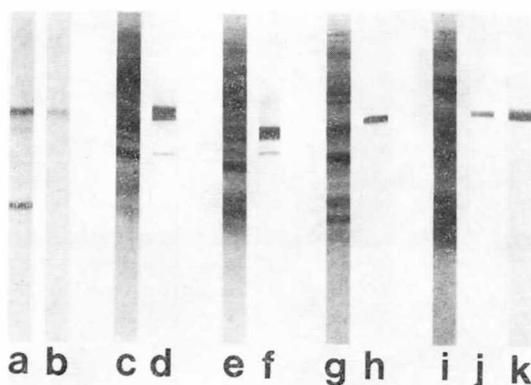


図 1 抗体、NT-302 の特性

鶏胸筋の TNT (a, b)、または胸筋 (c, d)、足筋 (e, f)、前広背筋 (g, h)、心筋 (i, j, k) の全抽出蛋白質を SDS-PAGE により分離した後、ニトロセルロース膜に転写し、抗体 (NT-302) の反応するバンドを検定した。k では心筋 TNT に特異的なポリクローン抗体、他はすべて、NT-302 を作用させた。それぞれの場合、左側に CBB 染色による蛋白質の電気泳動パターン、右側にイムノブロットのパターンを示す。いずれの場合も TNT のみが抗体を結合した。

をさけるため、まず最も単純な操作でジストロフィー筋の TNT アイソフォームを調べた。即ち、新鮮な筋からの熱 SDS 溶液による全抽出蛋白質を一次元 SDS-PAGE で分離した後、抗 TNT 抗体を用い、イムノブロット法により TNT を検出した。図 2 に示すように、ふ化直後のヒヨコ胸筋では、正常 (N)、ジストロフィー (D) 鶏いづれでも、多数の TNT のバンドが検出された。これらは分子量の大きい胸型 TNT と分子量の小さい足型 TNT に分けられる。これらのいずれもが親骨格筋の TNT とは異なる。ふ化 1 カ月後には足型 TNT はほとんど消失するが、胸型 TNT には、なお複数のバンドが認められた。この時点では N, D 間でほとんど差は見られない。ふ化 2 カ月以後には、足型 TNT の再出現がジストロフィー鶏 (N) 胸筋にのみ認められた。これらの点はわれわれの以前の報告と一致している。

#### 2) 二次元電気泳動による解析

ジストロフィー鶏胸筋の TNT を二次元電気泳動により、ヒヨコ胸筋の TNT と比較しながら、

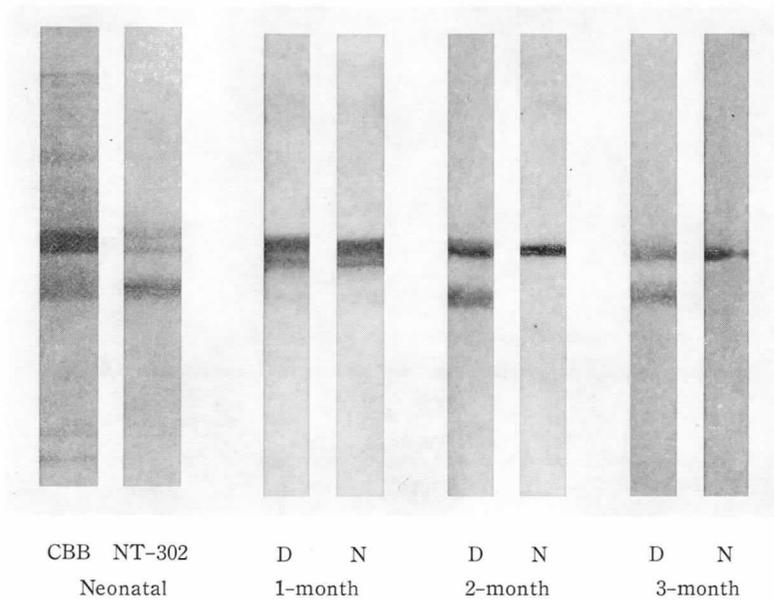


図2 一次元電気泳動によるジストロフィー筋 TNT の解析  
 SDS 溶液による筋抽出全蛋白質を SDS-PAGE により分離した後、ニトロセルロース膜に転写し、抗体 (NT-302) により TNT を次出した。ヒヨコ (Neonatal) と、1, 2, 3 ヶ月齢のジストロフィー (D), 正常 (N) 胸筋の TNT を示す。ヒヨコの場合のみ CBB により染色した電気泳動パターンとイムノプロットを対比させた。他はすべてイムノプロットの結果。

さらに詳しく解析した。NT-302 の使用により、二次元ゲル上の多数の蛋白質スポットの中から TNT のスポットだけを選択的に検出できた。ヒヨコでは沢山の TNT アイソフォームが検出されるが、正常胸筋では、1カ月齢以降ほぼ単一の TNT スポットであった。ところが、ジストロフィー鶏では発症した2カ月齢以降胸型および足型 TNT 領域に多数のスポットが見出された(図3)。特に、足型に相当する TNT には等電点と分子量の異なる沢山のアイソフォームが存在した。ヒヨコのパターンとは異なるようである。この事実は、筋ジストロフィー症発症に伴う TNT の発現変化が従来考えられていた以上に複雑であることを示唆した。また、微量の筋組織を出発材料として高感度で TNT の変化をとらえることができた。

### 3) 分離したトロポニンの解析

ジストロフィー胸筋, ヒヨコ胸筋, 親足筋, 親

正常胸筋(いずれも速筋)の TNT 相互の関連性を、より詳しく比較するために、各筋よりトロポニンを部分精製し、TNT スポットを二次元電気泳動で調べた(図4)。基本的な TNT スポットのパターンは全抽出蛋白質の場合と同じであったが分離能が改善され比較が容易となった。ほぼ単一スポットとなる親胸筋 TNT を、他のものに加えて、等電点と大きさを比較する基準とした。ジストロフィー筋には、40 弱の TNT スポットが認められた。そのうちのかなりのものは親の足筋のものに一致し、親の胸型 TNT に一致するものもあった。しかし、ヒヨコ胸筋の TNT はジストロフィー筋の TNT のものより等電点が酸性側にずれており、両者のスポットのごく一部が二次元ゲル上で重なったにすぎない。二次元ゲル上のパターンだけから判断するとジストロフィー筋にのみ特徴的に存在する数個の TNT スポットが見出された。

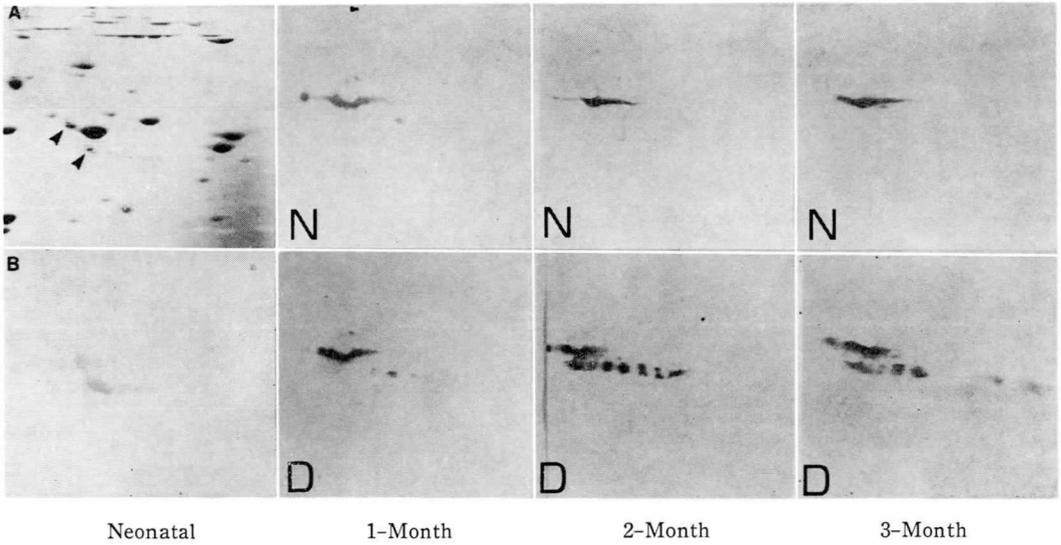


図 3 二次元電気泳動による TNT の解析

筋抽出全蛋白質を NEpHGE と SDS-PAGE の組合わせにより、二次元展開した後、ニトロセルロース膜に転写し、抗体 (NT-302) により TNT を検出した。左端にヒヨコ (Neonatal)、右側に 1, 2, 3 ヶ月齢のジストロフィー (下段, D)、正常胸筋 (上段, N) の TNT を示す。ヒヨコの場合のみ CBB により染色した電気泳動パターン (A) とイムノプロット (B) を対比させた。他はすべてイムノプロットの結果のみを示す。電気泳動パターン中の矢じりはヒヨコ筋の TNT を示す。

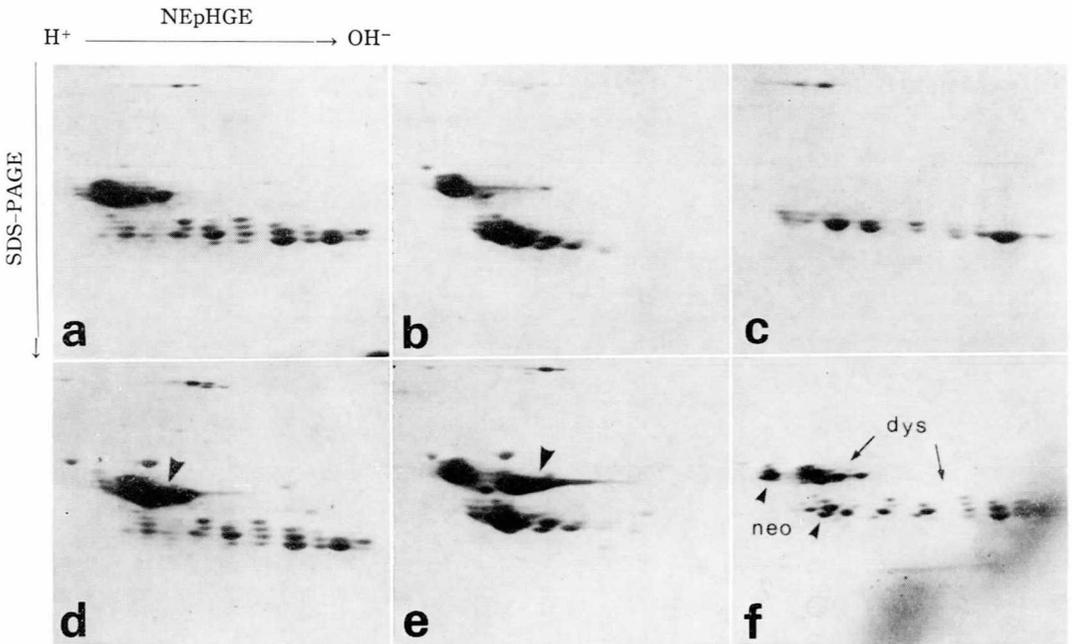


図 4 部分精製したトロポニンを用いた TNT の解析

二次元電気泳動ゲル上の TNT スポットのみを示す。a: ジストロフィー胸筋 (2 ヶ月齢), b: ヒヨコ胸筋, c: 親胸筋, d: a+親胸筋, e: b+親胸筋, f: ジストロフィー筋+ヒヨコ胸筋。下向きの矢じり (d と e) は親胸筋の TNT, 上向きの矢じり (f) はヒヨコ胸筋 (neo) の TNT, 下向きの矢印 (f) はジストロフィー胸筋 (dys) の TNT スポットを示す。

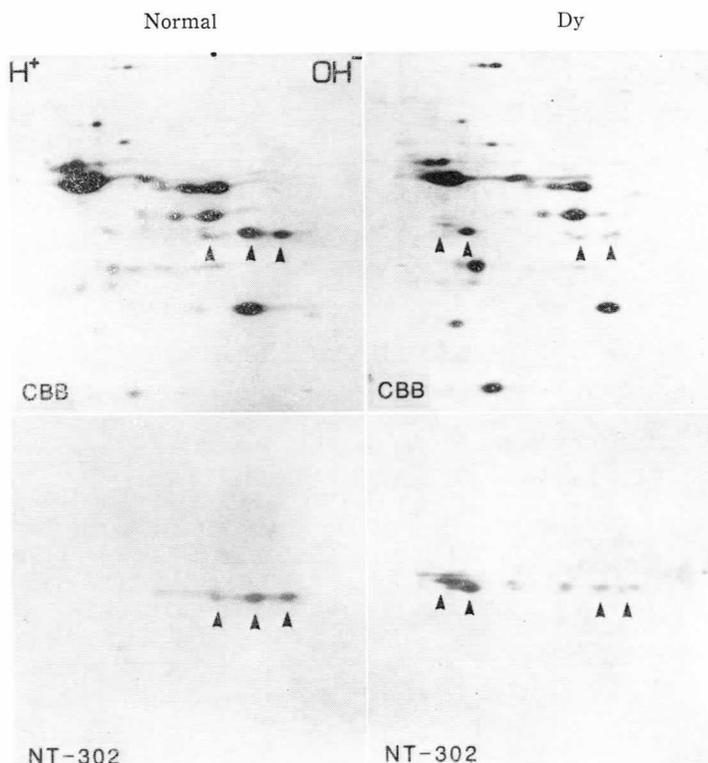


図5 筋ジストロフィー症マウスにみられる TNT の変化  
3ヶ月齢の正常 (Normal) と筋ジストロフィー (Dy) マウスの大腿直筋からの抽出全蛋白質を NEpHGE と SDS-PAGE の組合わせにより、二次元展開した後、ニトロセルロース膜に転写し、抗体 (NT-302) により TNT を検出した。CBB により染色した電気泳動パターン (上段) とイムノブロット (下段) を対比させた。矢じりは TNT のスポットを示す。

### マウスジストロフィー筋における TNT の変化

筋ジストロフィー症がかなりひどく発症している3ヶ月齢のジストロフィーマウス (dy マウス)、および、同齢の正常マウスの大腿直筋について調べた。筋ジストロフィー症の発症に伴い、この筋の萎縮が顕著にみられるからである。鶏の場合と全く同様に全抽出蛋白質を得、二次元電気泳動に展開し、イムノブロット法で TNT のスポットを解析した (図5)。正常マウスでは、3~4 けた TNT スポットが検出された。これらは、かなり塩基性の pH 領域に focus した。一方、筋ジストロフィーマウスの場合には、正常マウスには見られない数けた TNT スポットが、より酸性側 pH 領域に存在した。これらのスポットはクーマジープリリアントブルー (CBB) による蛋白質の

染色でも検出され、正常筋の TNT スポットは相対的に減少していることがわかる。筋ジストロフィー筋に現れた新しいスポットは、遅筋型 TNT ではない。幼若筋型 TNT であるかどうか目下検討中である。

### 考 察

鶏では筋ジストロフィー症の発症に伴い、TNT の発現が変化することを、われわれは以前に報告した<sup>1)</sup>。今回、二次元電気泳動とイムノブロット法を組みあわせて、より詳しく検討した結果、TNT の発現変化は以前考えた以上に複雑であることがわかった。即ち、1) 発症した筋ジストロフィー鶏胸筋の場合、約 40 ケもの TNT アイソフォームのスポットが出現した。正常胸筋にはほと

んど1ヶだけの TNT スポットのみが存在することと比べると、大変な差である。ジストロフィー筋の TNT スポットのすべてが一次構造を異にするのかどうか、蛋白質の二次的な修飾によるものも含まれるか否かは、今後慎重に検討されねばならない。2)ジストロフィー筋の TNT は、親の胸筋、ヒヨコの胸筋、親の足筋のいずれの TNT とも部分的に類似しており、かつジストロフィー筋に特徴的なスポットも見出された。従って、筋ジストロフィー症における筋の幼若化だけで、TNT の変化を説明するわけにはいかない。

今まで、ほ乳類のジストロフィー筋での構造蛋白質の変化は、必ずしも明瞭ではなかった。今回、少なくとも筋ジストロフィーマウス (dy マウス) では TNT アイソフォームの変化が認められた。mdx マウスその他、ほ乳類のジストロフィー筋についてさらに注意深く検討されることが必要である。

変化の内容的な複雑さはともかく、鶏とマウスで筋ジストロフィーの発症した筋において、TNT アイソフォームの顕著な変化が起こることは明瞭である。われわれの作成したモノクローン抗体 (NT-302) を用いて、二次元電気泳動と組合わせてイムノプロットを行うと、少量の筋組織を出発材料として、比較的簡単に、感度よく TNT の発現異常をとらえることができる。収縮構造蛋白質

の変化は発症後の二次的、三次的現象かも知れないが、TNT の変化を筋ジストロフィー症発症の指標にできるのではないかと考えている。TNT など構造蛋白質の変化が筋ジストロフィー症の指標として定着すれば、それは筋ジストロフィー症に対する薬剤投与の効果などの評価の目安として役立つかもしれない。その場合、NT-302 はモノクローン抗体なので、その再生産は容易であり役立つであろう。

#### 文 献

- 1) Obinata, T., Takano-Ohmuro, H. & Matsuda, R. : *FEBS Lett.* 120 : 195-198, (1980).
- 2) Takeda, S. & Nonomura, Y. : *Biomed. Res.* 1, 931-935 (1980).
- 3) Bandman, E. : *Science*, 227, 780-782 (1985).
- 4) Huszar, G., Vigue, L. & Haines, J. : *J. Biol. Chem.* 260, 9957-9960 (1985).
- 5) Obinata, T. & Shinbo, K. : *Muscle and Nerve.* 10, 351-358 (1987).
- 6) Breitbart, R.E., Nuguen, H.T., Medford, R.M., Destree, A.T., Mahdavi, V. & Nadal-Ginard, B. : *Cell*, 41, 67-82 (1985).
- 7) Hastings, K.E.M., Bucher, E.A. & Emerson, Jr C.P. : *J. Biol. Chem.* 260, 13699-13703 (1985).
- 8) Imai, H., Hirai, S., Hirono, H. & Hirabayashi, T. : *J. Biochem.* 99, 923-930 (1986).
- 9) Abe, H., Komiya, T. & Obinata, T. : *Dev. Biol.* 18, 42-51 (1986).
- 10) O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M. & O'Farrell, P.H. : *Cell* 12, 1133-1142 (1977).
- 11) De Blas, A.L. & Cherwinski, H.M. : *Anal. Biochem.* 133, 214-219 (1983).

# 各種酵素阻害剤投与の mdx マウス病態に与える影響について

辻 繁 勝\*

## 研究目的

われわれは当班において従来より、種々の新しい酵素阻害物質を筋ジストロフィー症モデル動物に連続投与する事によって *in vivo* に於ける疾患抑制効果を検討する研究を行っている。本年度は8種類の酵素阻害物質に就いて mdx マウスならびに dy<sup>2J</sup> マウスを用いて筋ジストロフィー症に対する改善効果の有無を検査する実験を行った。使用された酵素阻害物質は aminopeptidase-M のインヒビターである Actinonin, poly (ADP-ribose) synthetase のインヒビターである Benadrostin, dipeptidyl aminopeptidase IV のインヒビターである Diprotin-A, f.Met-aminopeptidase のインヒビターである Formestin-A, post-proline clearing enzyme のインヒビターである Post-Pro-Inhibitor, kallikrein のインヒビターである FUT-175, 抗菌物質の一種である Bactobolin, 免疫抑制物質である 15-Deoxyspergualin の8種類である。

## 材料と方法

実験に使用された動物は約2カ月齢の C57BL/10-mdx, および C57BL/6J-dy<sup>2J</sup> 系の疾病マウスである。mdx マウス3頭づつを一組として各酵素阻害物質を6週間にわたり投与し, 10日間隔で

計4回尾部より採血し血清 PK 活性を測定した。更に投与期間終了後, 屠殺した各マウスに就いて, 血清中ならびに骨格筋中の疾病進行のマーカー酵素である PK<sup>3)</sup>, CPK<sup>2)</sup>, LDH<sup>3)</sup>, GOT<sup>4)</sup>, GPT<sup>4)</sup> の活性を測定した。対照として生理食塩水のみを投与したマウスを各実験区に1頭づつ作り, 同様の測定を行った。dy<sup>2J</sup> マウスに就いては Actinonin および Diprotin-A のみを投与し, 同様の実験を行った。又各マウスから屠殺後直ちに腓腸筋を採出し, 光顕用標本を作製し, 組織学的検索を行った。各酵素阻害物質は使用直前に 1 mg/1 ml の濃度で生理食塩水中に溶解し, 0.2 ml づつを1日2回背部皮下に注射した。

## 結 果

図1は, 各酵素阻害物質の投与期間中に見られた mdx マウス血清 PK 活性の変動を示したものである。8種類のうち Bactobolin と 15-Deoxyspergualin に就いては被検マウスが投与期間中に死滅した為, 結果が得られなかった。投与開始後10日目頃では, 全ての阻害物質で, PK 活性が一旦低下傾向を示していたが, その後次第に活性が低下するグループ (Actinonin, Diprotin-A, Formestin-A) と活性が上昇するグループ (Post-pro-Inh, Benadrostin, FUT-175) に大別される変化が認められた。血清 PK 活性は mdx マウスで発病に伴って正常対照の約6倍に

\* 和歌山県立医科大学, 第二生理学教室

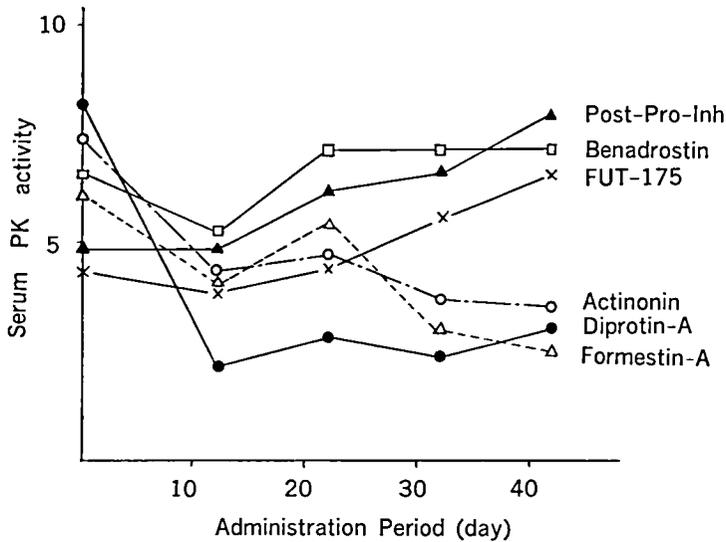


図 1 Changes of serum PK activities in mdx mice by inhibitor administration

表 1 Effects of inhibitor administrations on serum PK and CPK activities in mdx mice

Inhibitor	PK	I/S	CPK	I/S
Saline	7.74±0.41	—	2.70±1.90	—
Actinonin	3.82±0.13	0.49	3.38±0.53	1.25
Benadrostin	8.30±2.45	1.07	5.29±2.70	1.96
Diprotin-A	3.21±1.18	0.41	4.67±1.16	1.73
Formestin-A	3.34±0.54	0.43	2.57±0.38	0.95
Post-Pro-Inh	8.73±0.47	1.13	2.72±1.37	1.01
FUT-175	9.86±1.81	1.27	2.60±1.04	0.96
Bactobolin	8.52±1.68	1.10	—	—
15-Deoxy spergualin	6.12±0.64	0.79	—	—

Unit : NADH  $\mu$ mole/min/ml serum

上昇し、症状進行を示す最も特徴的なマーカー酵素である。従って投与によって、活性低下を示すグループでは疾病の進行が抑制されている事が推測される。表 1 は各阻害物質を 6 週間投与した後の血清 PK 活性と CPK 活性を示したものである。対照群との比較では、PK 活性は図 1 の経日的変化とよく一致して、活性が著しく低下するグループと、上昇ないし、無変化のグループにはっきり別れている。又、Bactobolin と 15-Deoxyspergualin に就いての結果は 3 週間投与後のものである。一方、CPK 活性は Benadrostin と Diprotin-A で活性増加が見られる他は、あまり大きな

変化は見られない。表 2 は血清中の LDH と GOT 活性を示したものであるが、Benadrostin 投与群では両酵素が共に活性上昇し、Formestin-A と Post-Proline Inhibitor では活性低下の傾向が認められる。又、FUT-175 投与群では LDH 活性は対照群よりも低下していたが、GOT 活性は測定出来なかった。次に、各マウスの後肢筋中の疾病マーカー酵素の活性に就いて測定を行った。表 3 はそのうち PK 活性と CPK 活性を示したものであるが PK 活性は Actinonin と Benadrostin の投与群で上昇し、Post-proline-inhibitor 投与群で低下の傾向が認められる。こ

各種酵素阻害剤投与の mdx マウス病態に与える影響について

表 2 Effects of inhibitor administrations on serum LDH and GOT activities in mdx mice

Inhibitor	LDH	I/S	GPT	I/S
Saline	2.94±0.34	—	0.61±0.11	—
Actinonin	2.99±0.06	1.02	0.55±0.06	0.90
Benadrostin	3.59±1.59	1.22	1.08±0.64	1.77
Diprotin-A	3.24±0.96	1.10	0.63±0.04	1.03
Formestin-A	1.67±0.41	0.57	0.49±0.23	0.80
Post-Pro-Inh	1.48±0.26	0.50	0.51±0.15	0.84
FUT-175	2.26±0.59	0.77	—	—

Unit : NADH  $\mu$ mole/min/ml serum

表 3 Effects of inhibitor administrations on muscle PK and CPK activities in mdx mice

Inhibitor	PK	I/S	CPK	I/S
Saline	0.58±0.16	—	9.70±0.84	—
Actinonin	0.79±0.07	1.36	14.10±0.56	1.45
Benadrostin	0.87±0.07	1.50	12.48±5.79	1.29
Diprotin-A	0.59±0.04	1.02	8.62±1.49	0.89
Formestin-A	0.58±0.12	1.00	13.40±1.69	1.38
Post-Pro-Inh	0.43±0.13	0.74	9.67±0.93	0.99
FUT-175	0.69±0.08	1.19	12.60±1.12	1.30

Unit : NADH  $\mu$ mole/min/mg protein

表 4 Effects of inhibitor administrations on muscle LDH, GOT and GPT activities in mdx mice

Inhibitor	LDH	I/S	GOT	I/S	GPT	I/S
Saline	2.72±0.55	—	0.43±0.10	—	0.019±0.005	—
Actinonin	3.42±0.45	1.26	0.44±0.02	1.02	0.018±0.006	0.95
Benadrostin	3.11±1.25	1.14	0.42±0.05	0.98	0.017±0.007	0.89
Diprotin-A	2.04±0.02	0.75	0.45±0.02	1.05	0.060±0.012	3.16
Formestin-A	3.06±0.02	1.13	0.45±0.04	1.05	0.052±0.019	2.74
Post-Pro-Inh	2.62±0.04	0.96	0.54±0.06	1.26	0.106±0.008	5.58
FUT-175	1.30±0.03	0.48	0.46±0.07	1.07	0.105±0.012	5.53

Unit : NADH  $\mu$ mole/min/mg protein

れに対して CPK 活性は Diprotinin と Post-proline-inhibitor の投与群でやや低下傾向を示した以外は、いずれの投与群でも上昇傾向が認められる。又、LDH, GOT, および GPT 活性に就いても、表 4 の如く、LDH は Diprotin-A, FUT-175 および Post-proline-inhibitor 投与群で活性低下し、他の群は活性上昇する傾向を示している。GOT 活性は Post-proline-inhibitor でわずかに

上昇傾向が認められるのみで他の群では変化が見られず、GPT 活性は Actinonin, Benadrostin 投与群でわずかに低下傾向が見られた以外は大幅に活性上昇している事が認められる。

次に  $dy^{2J}$  マウスに対する投与実験では表 5 の如く、Actinonin および Diprotin-A の投与によって血清中の PK 活性と LDH 活性がいずれも低下傾向を示したが、CPK 活性はやや増加して

表 5 Effects of inhibitor administrations on serum enzyme activities in dystrophic mice

Inhibitor		PK	I/S	CPK	I/S	LDH	I/S
Saline	2.09±0.04	—	1.20±0.21	—	1.97±0.18	—	—
Actinonin	1.09±0.03	0.52	1.35±0.23	1.13	1.77±0.14	0.90	0.90
Diprotin-A	1.67±0.12	0.80	1.40±0.18	1.17	1.86±0.26	0.94	0.94

Unit : NADH  $\mu$ mole/min/ml serum

表 6 Effects of inhibitor administrations on muscle enzyme activities in dystrophic mice

Enzyme	Non-treated	Actinonin	A/N	Diprotin-A	D/N
PK	0.44±0.01	0.68±0.04	1.55	0.81±0.06	1.84
CPK	7.95±0.39	8.68±0.98	1.09	10.10±0.86	1.27
LDH	1.40±0.68	2.78±0.46	1.99	3.94±0.51	2.81
GOT	0.03±0.02	0.41±0.08	1.37	0.53±0.07	1.77
GPT	0.090±0.009	0.030±0.002	0.33	0.125±0.011	1.39

Unit : NADH  $\mu$ mole/min/mg protein

いる事が認められる。又、骨格筋中での酵素活性変化は、Actinonin 投与群で GPT が著しく低下している以外は全て活性が増加し、Diprotin-A では測定された全てのマーカー酵素に就いて活性上昇傾向が認められる。

以上の疾病進行のマーカーと考えられている酵素群の活性変動から、血清中の活性低下と骨格筋中の活性増加を疾病の改善傾向を示すものと考えた場合、総合的に判断すると、Actinonin, Diprotin-A および Formestatin-A の投与群では改善効果が有ったものと認められる。従って、この3種の阻害物質を投与した mdx マウスの腓腸筋に就いて H・E 染色標本による組織学的検索を行った。結果はいずれも生理食塩水投与 mdx マウスとの間に判然たる差異は得られなかったが、例えば、necrosis を示す部位の分布、ヒアリン化細胞の数、中央核を持ち、再生筋と思われる小型の筋細胞の密集度などを指標として判断すると<sup>5)</sup>、やはり、マーカー酵素の活性変動パターンと同様な傾向が認められた。

## 考 察

8種類の新しい酵素阻害物質に就いて、筋ジストロフィー症に対する治療効果の有無を検討する為、疾患モデル動物である mdx マウスと  $dy^{2J}$  マウスに6週間にわたる連続投与を行い *in vivo* における影響をしらべる実験を行った。阻害物質のうち Bactolobin および 15-Deoxyspergualin を投与した mdx マウスは、いずれも投与期間途中で死滅したので、その効果を知る為の結果は得られなかった。この理由は恐らく投与量が過剰だった事(約 20 mg/kg 体重)に依るものと考えられる。又、残りの6種類の阻害物質に就いては、mdx マウスで疾病の進行に伴って特徴的に活性上昇を示す事が知られている血清 PK<sup>6)</sup> をマーカーとして投与期間中の活性変動を見たところ、投与開始後3週間頃から明らかに活性が低下を示す群として Actinonin, Diprotin-A および Formestatin-A 投与群が認められたが、この傾向は6週間の投与終了後に測定された幾つかの疾病進行のマーカー酵素の活性変化に就いてもほぼ同様の傾向が認められた。即ち上記3種の阻害物質投与

群ではいずれの場合も全体として各マーカー酵素で、血中に遊出される酵素活性が低下し、骨格筋中に存在する酵素活性が増加し、正常対照の活性値に近づくという傾向を示していた。更に、この傾向は組織学的検索による組織像の悪化の程度の軽減という結果によっても支持された。この3種類の物質がなぜ、改善傾向をもたらしたかに就いては、その理由は不明である。然し、これらがいずれも aminopeptidase の inhibitor である事で、他の酵素阻害物質とその作用機序がやや異なる事に原因の一つが在る可能性が考えられる。いずれにしても今回の実験は、約2カ月齢で疾病が既にかなり進行した状態の動物を使用したためか、はっきりした疾病抑制効果を示す結果は得られなかった。然しながら上記3種類の阻害物質に就いては適正な投与量により、発症前或いは発症直後から連続投与を行えば、より明白な改善効果を得る可能性は充分考えられる。

## 文 献

- 1) Tanaka, T., Harano, Y., Sue, F. and Morimura, H. : Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinases isolated from rat tissues. *J. Biochem.* 62, 71-91 (1967).
- 2) Hess, J.W., Murdock, K.J. and Natho, G.J.W. : Creatine phosphokinase. A spectrophotometric method with improved sensitivity. *Am. J. Clin. Pathol.* 50, 89 (1968).
- 3) Wroblewski, F. and LaDue, J.S. : Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90, 210-213 (1955).
- 4) Karmen, A., Wroblewski, F. and LaDue, J.S. : Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.* 34, 126 (1955).
- 5) 杉田秀夫, 田辺雄三, 桗中征哉, 江崎孝三郎, 野村達次 : 筋ジストロフィー症モデル動物の開発, mdx マウス骨格筋の病理学的研究. 厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症動物の開発供給に関する研究」昭和 59 年度研究報告書 pp. 13-32 (1985).
- 6) Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A.L. and Moore, K.J. : X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1189-1192 (1984).

# 実験的筋炎モデル動物の作成に関する研究

里 吉 栄二郎\* 古 川 昭 栄\*

多発性筋炎 (polymyositis : PM), 皮膚筋炎 (dermatomyositis : DM) は筋肉に特異的に細胞性免疫反応が認められ<sup>1,2)</sup>, 自己免疫疾患の角度から研究されているが, 発症機構はいまだ不明である。本研究は PM, DM の実験モデル動物を作成し, 低分子酵素阻害物質による薬効を検討するのが目的である。

PM, DM では筋肉が特異的に免疫細胞の浸潤, 攻撃を受けることから, 筋肉にのみ存在する何等かの構成成分が自己免疫反応の標的になっていると推定される。これまでに見出されている PM や DM に特徴的な自己抗体としては抗ミオグロビン抗体<sup>3)</sup>, 抗ミオシン抗体<sup>4)</sup>, 抗核抗体<sup>5)</sup>があるが, 前二者は疾患特異性が低いとされている。一方, PM や DM と同じく, 筋肉に特異的な自己免疫疾患である重症筋無力症 (myasthenia gravis : MG) は神経筋接合部のアセチルコリン受容体の障害によって引き起こされると考えられており, 実際, 患者血中には, 抗アセチルコリン受容体抗体が高頻度に見出される。また, アセチルコリン受容体以外の筋肉成分に対する抗体も検出され, これらの抗体にアセチルコリン受容体の劣化を促進し, アセチルコリン受容体の数を減少させる作用があることが報告されている<sup>6)</sup>。最近 Drachman<sup>7)</sup> らは作用は弱い<sup>7)</sup>が, 8 例中 7 例の高率で, PM の患者血中 IgG にも同様のアセチル

コリン受容体劣化促進作用があることを見出し, PM と MG には筋細胞膜成分障害性の類似抗体が存在すると報告している。著者らはこの抗体の出現が PM の病因と関連しているのではないかと考え, アセチルコリン受容体以外の筋肉成分に対して高抗体価を示す MG 患者血清を指標として, 筋肉成分に対するモノクローナル抗体を作成し, 抗原の同定を試みた。

## 方 法

### 筋肉抽出物の作成

すでに報告した方法<sup>8)</sup>に従った。すなわち, ラットの腹部, 下肢部の筋肉を 10% (w/v) で冷 PBS にてホモジナイズし, 100000×g で遠心した。沈殿物について同じ操作を 2 回繰り返す。その遠心上清を集め, 筋肉抽出物 (muscle extracts : ME) とした。

### 筋肉抽出物に対する血中抗体価の測定

すでに報告した ELISA 法<sup>9)</sup>で行った。ME を抗原として 96 穴マルチウエルプレートに被覆し, 順次, 患者または正常人血清 (1000× 希釈), ビオチン化抗ヒト IgG 抗体, アビジン-ビオチンパーオキシダーゼ複合体を反応させ, マルチウエルプレートに結合したパーオキシダーゼ活性を測定した (ABC 法)。

### 筋肉抽出物に対するモノクローナル抗体の作成

3 週間間隔で 4 回, 1 mg タンパク量の ME 液

\* 国立精神・神経センター 神経研究所

を等容量の Freund's complete adjuvant で乳化して Balb/c マウスの背部に注射した。最後の免疫から3週間後に、ME のみを腹腔内に投与し、3日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞とミエローマ (P3U1 株) を細胞融合した。融合細胞を8枚の96穴マルチウエルプレートに60穴ずつまき、HAT 選択培養液で培養した。2週間後に、あらかじめ ME を被覆後、正常人または MG 血清でインキュベートした96穴マルチウエルプレートに、100  $\mu$ l のハイブリドーマ培養液を加えて1時間反応させた。96穴マルチウエルプレートに結合したマウス IgG をビオチン化抗マウス IgG 抗体をもちいる ABC 法で検出した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis : PAGE) とウエスタンブロット

SDS を含まない5% ポリアクリルアミドゲル、pH 9.4 の系で ME を PAGE し、PAGE 後、0.1M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.6) に浸したニトロセルロース膜にゲルを一夜密着させて、ゲル中のタンパクをニトロセルロースに転写した。そのニトロセルロースは抗体と反応させた後、4-クロロナフトールを発色剤として、ABC 法によって可視化した。

筋肉組織染色

凍結ラット下肢筋をクライオスタットで筋線維と平行方向に 10  $\mu$ m 厚で切り、切片を4% パラホルムアルデヒドで固定した。固定組織切片に、順次、1% ウシ血清アルブミン、作成したモノクローナル抗体 (腹水を100倍希釈して使用)、10% ラット血清、ローダミン標識抗マウス IgG ウサギ抗体を反応させ、蛍光顕微鏡下で蛍光分布を観察した。マウス血清 IgG をモノクローナル抗体と同じ濃度に調製し、コントロールとした。

## 結果と考察

MG 患者血清中には高頻度に抗 ME 抗体が検

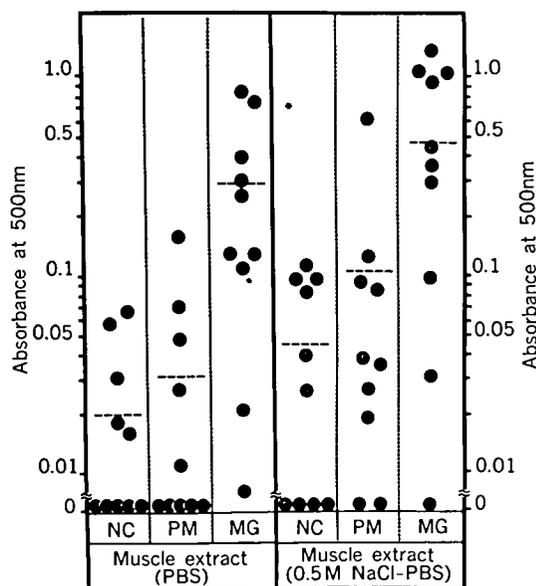


図1 ラット骨格筋抽出物に対する重症筋無力症 (MG)、多発性筋炎 (PM)、正常人 (NC) 血清中抗体の測定

出された。また、PM 患者血清でも、正常人より明らかに高い値を示すものがあつた (図1)。しかし、ME と同様の方法で調製した心筋抽出物を抗原として測定すると、正常人、MG、PM 間で全く差を認めなかつた。脳、肝臓抽出物でも陰性であつた。ME を PAGE 後転写したニトロセルロースに、高抗体価を示した MG 血清または PM 血清を反応させ、抗体の結合分布を調べたところ、MG では明確なバンドを含めタンパク泳動部の上の部分が染色され、PM 血清では、特定のバンドの染色は見られなかつたが、正常人血清に比べ、全体的に濃く発色した。これらの結果は、MG 患者血清ばかりでなく、一部の PM 患者血清中にも抗 ME 抗体が存在すること、しかも筋肉抽出物に特異的な抗体が存在することを示していると考えられる。

ME 中の抗原活性は、1) pH 3 以下、11 以上で完全に失活、2) 8M 尿素存在下で完全に失活、3) プロナーゼ処理で50% 失活、4) SDS 処理で完全に失活することなどから、抗原物質の実体はタンパク質であると考えられる。

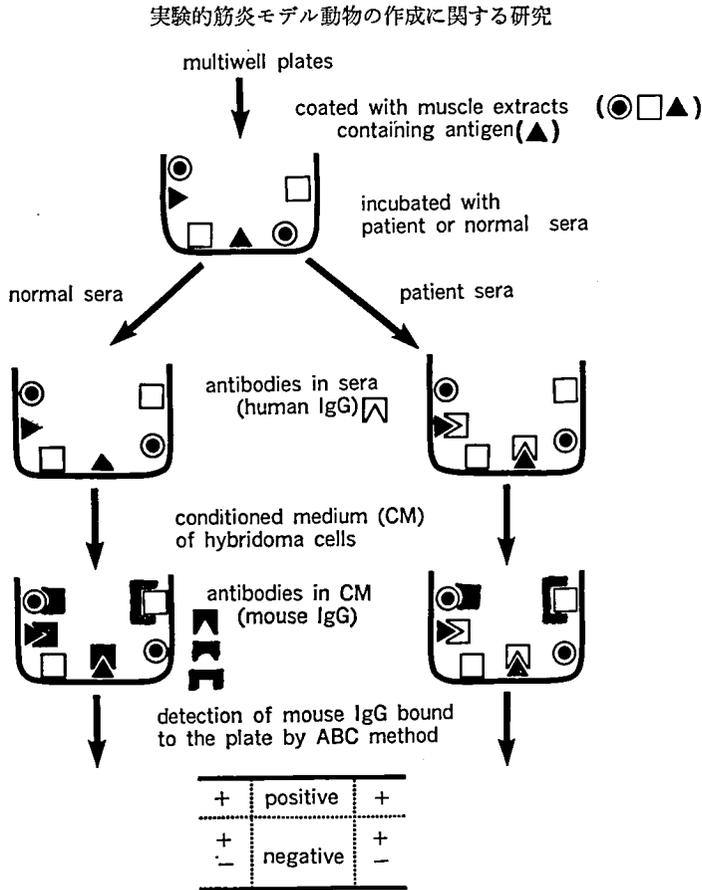


図 2 筋肉抗原に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング原理

ME を免疫したマウスの脾臓細胞とミエロマ細胞との融合によって、480 個のウェルすべてにハイブリドーマコロニーの形成を認めた。図 2 に示した原理に従い抗原特異性を持つハイブリドーマを検索した。ME を固相化したウェルに、順次、高抗 ME 抗体価 MG 患者血清または正常人血清、ハイブリドーマの培養液を反応させ、正常人血清で陽性となり、かつ、MG 血清で陰性または、シグナルが減弱するハイブリドーマが抗原を認識するモノクローナル抗体を産生していると考えられる。このようなハイブリドーマは 480 個中 35 個のウェルに見出された。差の顕著なウェル 15 個についてハイブリドーマをクローニングし、増殖させてマウスの腹腔へ移入した。最終的に 3 種のモノクローナル抗体を得た (抗体名 1E7, 2B2, 3D8)。この 3 種のモノクローナル抗体の ME に

対する用量依存性の結合を示したのが図 3 である。1E7, 2B2, 3D8 の 3 種のモノクローナル抗体は、それ以外のモノクローナル抗体 (4G10, 7D9) と異なり、MG 血清でウェルをプレインキュベートすると、ME との結合が阻害される。この結果は、MG 血清中のある抗体と、得られたモノクローナル抗体の認識部位が構造的に一致、または、極めて近傍であることを示していると考えられる。

ME を PAGE 後転写したニトロセルロースで認識抗原の分布を見たのが図 4 である。抗原認識モノクローナル抗体は 3 種とも上端部を巾広く認識しており、4G10 や 7D9 と異なるパターンを示した。

間接蛍光抗体法を用いて、2B2, 3D8 で筋肉組織を染色した。図 5 に示すように、2B2, 3D8 は

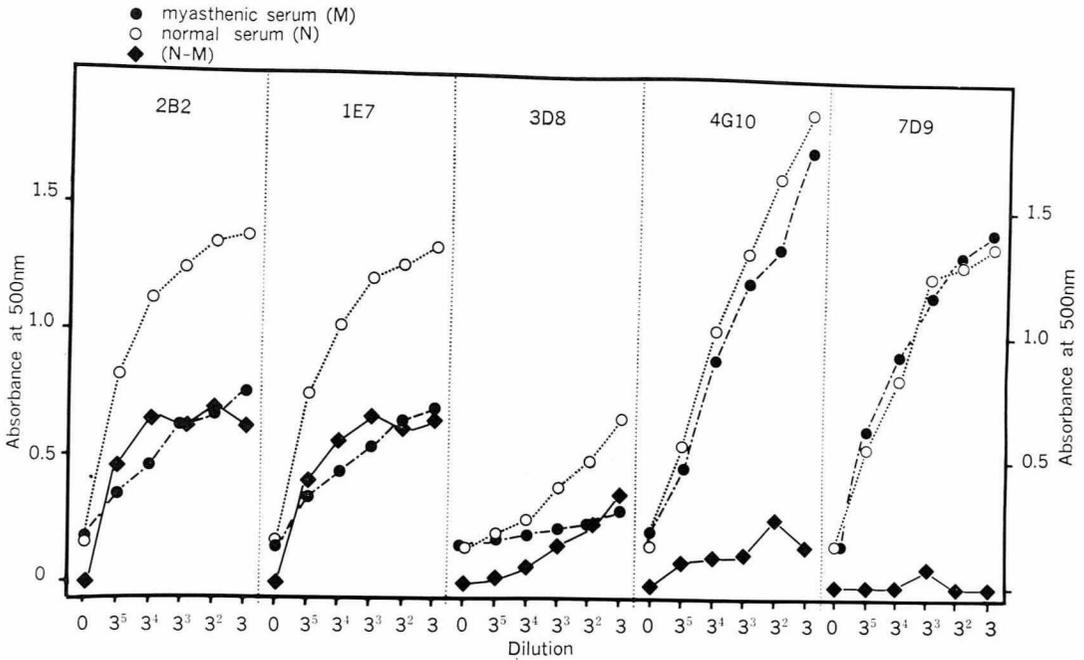


図 3 筋肉抽出物へのモノクローナル抗体の結合の用量依存性  
 横軸はハイブリドーマ培養液の希釈培数を示す。●：MG 患者血清存在下，○：正常人血清存在下，  
 ◆：○の値から●の値をひいたもの

## ANALYSIS OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST MUSCLE ANTIGENS BY IMMUNOBLOTTING

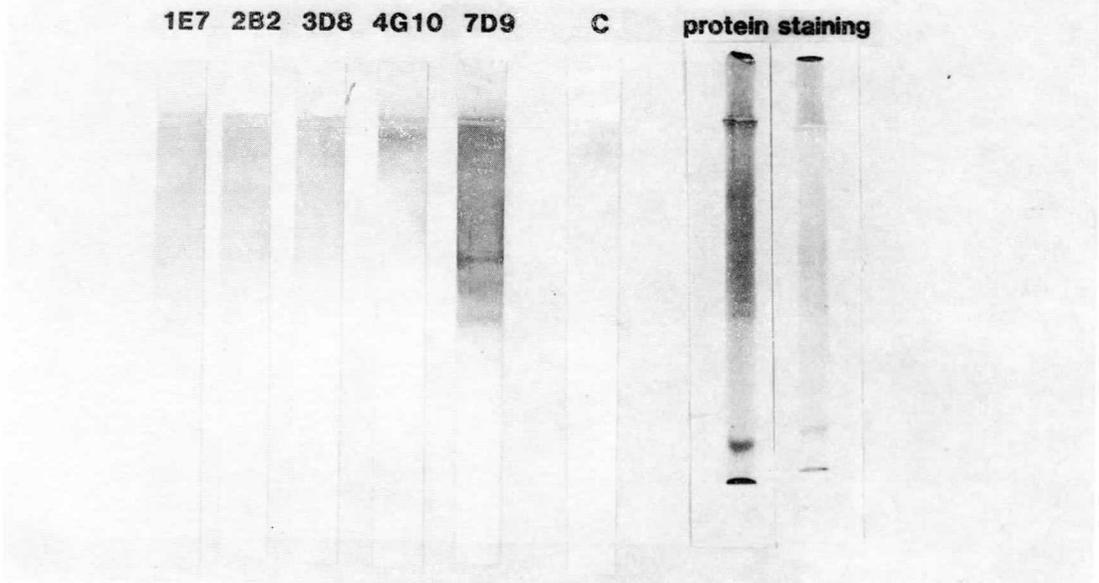


図 4 イムノブロッティングによるモノクローナル抗体の解析

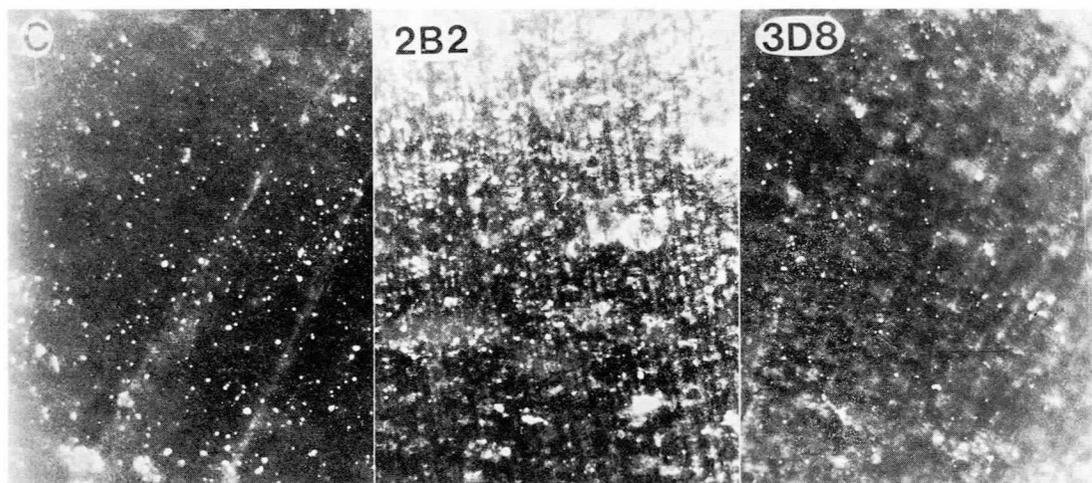


図5 筋抗原認識モノクローナル抗体による筋組織蛍光染色

筋肉の横紋構造に特異的に結合しているように見える。組織の固定に用いた4%パラホルムアルデヒドはELISAで調べると、抗原活性を部分的に障害することから、固定法を改善して再度調べる必要がある。

今後、このモノクローナル抗体と、その認識抗原を詳細に調べ、筋膜成分の障害活性の有無、PMとの関連性、について検討する予定である。また、本研究と同じ手法によって、PMにおける筋肉抗原を認識するモノクローナル抗体の作成を試みる予定である。

#### References

- 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 Homma, 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 (1980).
- 6) Mossman, S., Vincent, A. and Newsom-Davis, J.: *Lancet* 1, 116 (1986).
- 7) Pestronk, A. and Drachman, D.B.: *Muscle Nerve*, 8, 233 (1985).
- 8) Akazawa, S., Furukawa, S., Kamo, I., Furukawa, Y., Satoyoshi, E. and Hayashi, K.: *J. Immunol. Methods*. 94, 161 (1986).

# E-64 誘導体のグルタチオン S-トランスフェラーゼ 活性に及ぼす影響

北川 晴 雄\*

## 目 的

一般に、多くの薬物は主に肝臓の薬物代謝酵素系により代謝された後、抱合を受け排泄されるが、近年、代謝されて活性中間体となり毒性を発現する例も多く報告されている。生体は活性代謝物の毒性に対する防御機構の一つとしてグルタチオン抱合系を備えている。グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) はこのグルタチオン抱合反応を触媒する重要な酵素である。本酵素は肝臓に多く存在し、サイトソール総蛋白の約5~10%を占める。最近、GST には複数のアイソザイムの存在が明らかとなって以来、次々と新しいアイソザイムが発見されている。正常時の血漿中における GST 活性は極めて低いが、四塩化炭素などによる薬物誘発性肝障害時には血漿 GST 活性が著しく上昇すると報告されている<sup>1)</sup>。このことから、血漿 GST 活性はトランスアミナーゼ (GOT, GPT) 活性と同様、肝障害の良い指標となることが示唆されている<sup>2)</sup>。

一方、カルシウム依存性プロテアーゼ (CANP) 阻害剤の一つである E-64d はラットにおいて高用量の連続投与により血中トランスアミナーゼ活性が上昇することが報告されている<sup>3)</sup>。このことから E-64d による肝への障害が示唆されている。

そこで、低分子酵素阻害物質の代表的化合物と

して E-64 の誘導体である E-64c と E-64d をラットに高用量連続投与した場合の血漿トランスアミナーゼ (GOT, GPT) 活性に対する影響と血漿および肝サイトソール GST 活性への影響を比較検討した。

## 実験材料および方法

動物は Wistar 系雄性ラット (8 週齢) を用い、約 1 週間予備飼育した後、実験に供した。E-64c および E-64d は 5% アラビアゴム溶液に用時懸濁し、400 mg/kg を 7 日間連続経口投与した。なお、対照群には 5% アラビアゴム溶液を 5 ml/kg の割合で経口投与した。最終投与 24 時間後に動物は犠殺した。血液はエーテル麻酔下、開腹し腹部大動脈より採血し、ヘパリン処理のチューブに移し、遠心して血漿を得た。肝臓は可及的速やかに取り出し、その湿重量を秤量した。秤量後、1.15% KCl にて灌流し、肝重量の 3 倍容の冷 1.15% KCl を加えて 25% ホモジネートとした。ホモジネートは 105,000×g 60 分超遠心分離を行い、その上清をサイトソールとして用いた。GST 活性の測定は Habig らの方法<sup>4)</sup>に従い、サイトソールの場合は基質として 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB)、1,2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン (DCNB) および t-フェニルブテノン (t-PBO) を用い、血漿の場合は CDNB を用いて行った。また、血漿トランスアミナーゼ (GOT,

\* 千葉大学薬学部

**Table 1** Effect of treatment with E-64c and E-64d on the activity of plasma transaminase and glutathione S-transferase in rats

Treatment	GOT		GPT		Glutathione S-transferase	
	Karmen Unit/ml				munit/ml	
Control	73.9 ± 4.5		24.2 ± 1.4		67.71 ± 2.94	
E-64c	73.4 ± 3.4		22.3 ± 0.8		66.67 ± 2.16	
E-64d	175.2 ± 24.8**		60.4 ± 11.8*		79.69 ± 8.48	

Each value represents mean ± S.E. obtained from 8 rats.

Rats were treated orally with 400 mg/kg/day of E-64c or E-64d for 7 days.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs control.

**Table 2** Effect of treatment with E-64c and E-64d on the activity of hepatic cytosolic glutathione S-transferase in rats

Treatment	Glutathione S-transferase activity towards					
	CDNB		DCNB		t-PBO	
	(mU/mg plot)	(U/g liver)	(mU/mg prot)	(U/g liver)	(mU/mg prot)	(U/g liver)
Control	1.19 ± 0.05	109.39 ± 4.93	53.02 ± 2.48	4.81 ± 0.21	13.24 ± 1.37	1.21 ± 0.13
E-64c	1.12 ± 0.02	90.75 ± 2.31	52.96 ± 1.81	4.29 ± 0.15	12.03 ± 1.38	0.98 ± 0.11
E-64d	1.30 ± 0.05	101.36 ± 3.41	56.15 ± 2.72	4.36 ± 0.15	8.49 ± 0.31*	0.66 ± 0.02*

Each value represents mean ± S.E. obtained from 8 rats.

Rats were treated orally with 400 mg/kg/day of E-64c or E-64d for 7 days.

\*  $p < 0.05$  vs control.

GPT) 活性はヤترون社製のキットを用いて測定した。Western blot 法は Towbin らの方法<sup>6)</sup>に準じ、PAP 染色法<sup>6)</sup>により行った。なお、蛋白定量は Lowry らの方法<sup>7)</sup>により行った。

### 実験結果

**Table 1** は E-64c および E-64d 連続投与による血漿トランスアミナーゼおよび GST 活性に対する影響を示している。トランスアミナーゼ活性に関しては、GOT, GPT いずれの活性においても E-64d 投与群で約 2~3 倍の有意な上昇がみられた。それに対し、E-64c 投与群では何ら活性の変動は認められなかった。一方、この時の血漿 GST 活性の変動では E-64d 群においてのみ約 20% の活性増加がみられた。次に肝サイトソールの GST 活性に対する E-64c および E-64d 投与の影響を検討した。その結果は **Table 2** に示す。GST 活性の基質として CDNB, DCNB を

用いた場合には、いずれの投与群でもほとんど活性の変動はみられなかった。しかし、t-PBO に対する活性では E-64d 投与群において mg 蛋白あたりの活性でコントロールの約 65%, g 肝あたりの活性では約 55% と顕著に減少した。そこで E-64d 投与群にみられた血漿 GST 活性の増加は、肝サイトソールの酵素活性の減少を反映したものの否か、更に検討した。コントロール、E-64c および E-64d 投与群の 3 群における血漿を GSH-アフィニティーカラムにより GST 画分を得た。これを各々同蛋白量だけ可溶化後、12.5% の SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、その後ニトロセルロース膜へ転写した。これにラット肝サイトソールから得られた GST 1~2 および GST 3~4 の抗血清を用いて PAP 染色を行った。その結果、E-64d 群において GST 1~2 および 3~4 に相当する位置に明らかな染色バンドが認められた。

## 考 察

最近、高用量の E-64d 連続投与により血中トランスアミナーゼ活性が増加することが報告されている<sup>3)</sup>が、今回、E-64c およびそのエステル体である E-64d 両化合物について、各々 400 mg/kg 7日間連続投与により、E-64d 投与群においてのみ明らかな GOT, GPT 活性の上昇が認められた。これは肝の障害を反映したものと示唆される。この時、血漿中の GST 活性の変動では E-64d 投与群においてのみ活性の上昇がみられた。

一方、ラット肝サイトソールにおける GST には複数のアイソザイムが存在することが知られている。最近の酵素化学的、免疫化学的研究から主要なアイソザイムとして免疫学的に交叉しない GST 1~2 グループ (GST 1~1, 1~2, 2~2 の 3種) と GST 3~4 グループ (GST 3~3, 3~4, 4~4 の 3種) が存在することが明らかになった。そこで今回、GST 1~2 および GST 3~4 の抗体を用いて Western blot 法による解析の結果、E-64d 投与群の血漿中には明らかに GST 1~2 および 3~4 が出現していることが判明した。こ

のことは E-64d 投与群において肝サイトソールの GST が肝の障害により血漿中に漏出したことによると示唆される。これらの知見より薬物誘発性の肝障害を判定する手段として血中トランスアミナーゼ活性の変動のみならず、血漿中の GST 活性の測定さらには Western blot 法による解析は肝臓の障害の有無をより正確に判断する有力な指標となる可能性が示唆される。

## 文 献

- 1) Aniya, Y. and Anders, H.W. : *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 4239-4244 (1985).
- 2) Bass, N.M., Kirsch, R.E., Tuff, S.A. and Saunders, S.J. : *Gastroenterology*, **75**, 589-594 (1978).
- 3) 大関正弘 : 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 57 年度研究報告書 pp. 27-54 (1983).
- 4) Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. : *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139 (1974).
- 5) Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4350-4354 (1979).
- 6) Guengerich, F.P., Wang, P. and Davidson, N.K. : *Biochemistry*, **21**, 1698-1706 (1982).
- 7) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.L. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).

# CANP 阻害剤の一般薬理学的研究

—スペクトル解析法を用いた筋電図および神経活動の定量的評価法—

福原武彦\*

研究協力者 高野一夫\*, 木村直史\*, 加藤総夫\*

## 目 的

ヒト筋ジストロフィー症に対する治療薬の有効性評価に関する研究推進の基礎として、疾患モデル動物においてヒトに応用可能な可及的に非侵襲的な薬効評価方法を確立することが必要である。われわれは既に、心電図の定量的解析に基づいた心筋変性の非侵襲的評価法を確立するための基礎的知見を報告しているが<sup>4)</sup>、今年度は、呼吸筋の筋電図ならびに呼吸筋を支配する遠心性神経の活動電位の定量的な解析に基づいた、呼吸筋変性の進行と CANP 阻害剤の治療効果を評価する方法を確立するための基礎的知見を動物実験によって得ることを目的とした。

横隔神経活動電位中の遠心性吸気性発射が約 60~130 Hz の高い周波数で同期している現象はウサギ、ネコおよびイヌにおいて確認されており、これは高頻度同期波 (high frequency oscillations) と呼ばれている<sup>2,3)</sup>。高頻度同期波は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が知られており<sup>3)</sup>、随意呼吸中の健常人の肋間筋電図から検出した報告もある<sup>1)</sup>。この高頻度同期波の生理的機能的意義については未だ十分に確定されていないが、これまでのわれわれの研究から、これが呼吸運動に関連する骨格筋を支配する遠心性神経の電気的活動に特徴的な活動成分であ

ることが示されており<sup>5)</sup>、高頻度同期波は呼吸運動の中樞性調節において主要な役割を演じているものと考えられる。従って呼吸筋筋電図中の高頻度同期波の定量的解析は将来、筋ジストロフィーのような骨格筋の変性をきたす疾患、重症筋無力症など神経筋伝達の障害をきたす疾患、および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの運動ニューロンの障害をきたす疾患の病態の進行の程度、さらにはこれらの疾患の治療薬の薬効を、機能的かつ非侵襲的に評価し得る方法として期待されるものである。

今回われわれは麻酔下のウサギ横隔膜自発性筋電図、ならびに横隔神経の自発性発射活動電位を導出し、その高頻度同期波成分について定量的解析を行なって、ヒトへの応用可能性について検討した。

## 実 験 方 法

### 1. 実験動物

体重 2.0~3.4 kg の成熟、両性のウサギを用いた。

### 2. 実験条件

i) 非動物動物における横隔神経遠心性発射活動導出実験: Diethylether 麻酔下に gallamine triethiodide (5 mg/kg, i.v.) により非動物化後、呼気ガス二酸化炭素および酸素濃度の連続監視下に人工呼吸により換気条件を適正レベルに維持し

\* 東京慈恵会医科大学第2薬理学教室

た。途中、換気回数の変化によって過換気と換気低下状態を起こした。直腸温を 37°C 前後に維持した。両側の迷走、減圧および頸部交感神経を頸部で切断した後、頸部において横隔神経の切断中枢端からその遠心性発射活動を双極電極を用いて導出した。

ii) 麻酔下自発呼吸下動物における横隔膜自発性筋電図ならびに横隔神経発射活動同時導出実験：Urethan (600 mg/kg) と  $\alpha$ -chloralose (50 mg/kg) の腹腔内適用によって、もしくは diethylether による導入麻酔後、thiamylal (4~8 mg/kg) の静脈内適用によって、麻酔を維持した。気管挿管後、自発呼吸下に呼気ガス二酸化炭素および酸素濃度を連続監視した。93% O<sub>2</sub> と 7% CO<sub>2</sub> の混合ガス吸入によって CO<sub>2</sub> 負荷を行った。直腸温を 37°C 前後に維持した。小型留置式双極電極を右頸部にて横隔神経に装着し自発性発射活動電位を導出した。胸部第Ⅶ肋骨直下、剣状突起から約 1~2 cm 離れた両側に約 1 cm の間隔で経皮的に左右各一对の針電極(長さ：15 mm, 直径：200  $\mu$ m) を刺し双極性に横隔膜自発性筋電図を導出した。

### 3. 信号解析

横隔神経自発性発射活動ならびに横隔膜筋電図を呼気ガス炭酸ガス濃度と共にデータレコーダー (TEAC, R-81) 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, 7T17) を用いて、以下の解析を行った。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。

1) パワースペクトル法：0~200 Hz の周波数帯域における神経活動もしくは横隔膜筋電図の自己パワースペクトル密度関数、ならびに神経活動と筋電図間の相互パワースペクトル、コヒーレンス、および位相角を FFT 法により演算した (0.25 Hz/bin, 20~30 回加算)。演算は筋電図原信号中に混入する心電図 QRS 波成分を数学的に

除去した後に行った。演算された自己パワースペクトル上の高頻度同期波のピークを背景雑音成分より分離し、そのピーク周波数およびピーク面積を、ピーク波形がコーシー分布に従うという仮定の下にガウス-ニュートン法に基づく非線形最小二乗法を用いて推定した。

2) 加算平均法：横隔神経活動および横隔膜筋電図の高頻度同期波の周波数帯域成分 (60~140 Hz) をアナログ・フィルター (エヌエフ回路設計ブロック, FV-604T) によって抽出したのち、横隔神経活動に現れる高頻度同期波のピークを数学的に検出し、それを同期信号として同時に導出された横隔神経活動および横隔膜筋電図を加算平均した (500 回)。

### 実験成績

i) 非動物化動物における横隔神経遠心性発射活動同時導出実験

横隔神経活動の自己パワースペクトルには約 80~130 Hz の帯域に高頻度同期波に対応する明瞭なピークが見出された。非線形最小二乗法によって推定されたその平均ピーク周波数は  $95.5 \pm 10.4$  Hz ( $n=15$ , 呼気炭酸ガス終末濃度： $3.7 \pm 0.1\%$ , 平均値土標準偏差) であった。ピーク面積は高炭酸状態 ( $5.2 \pm 0.1\%$ ) で有意に増加し、低炭酸 ( $2.4 \pm 0.1\%$ ) により有意に減少した。またピーク周波数は高炭酸で  $98.7 \pm 10.5$  Hz まで有意に上昇し、低炭酸により  $91.59 \pm 8.0$  Hz まで有意に下降した。

ii) 麻酔下自発呼吸下動物における横隔膜筋電図ならびに横隔神経発射活動同時導出実験

横隔神経活動および横隔膜筋電図には、互いに同期した明瞭な呼吸リズム性の放電群を観察することができた。この呼吸性放電群は CO<sub>2</sub> 負荷によってその振幅を増し、著明になった。

同時導出された横隔神経活動および横隔膜筋電図の高頻度同期波の周波数帯域成分 (60~140

Hz) を時間軸を延長して描記したところ横隔神経活動の周期性振動に一つ一つに対応した明瞭な周期約 10 ms の波を横隔膜筋電図中に見出すことができた。

#### 1) パワースペクトル法による解析結果

横隔膜筋電図から心電図 QRS 波成分を除去したのちに高速フーリエ変換を行ったところ、心拍リズム性成分の混入が極めて少ないパワースペクトルを得ることができた。横隔神経活動ならびに横隔膜筋電図のパワースペクトルには、上述の、非動化された迷走神経切断動物から導出された横隔神経活動のパワースペクトルにおいて観察されたような明瞭な高頻度周期波のピークは認められなかった。しかしながら約 50~170 Hz の帯域において、著明な単峰性のピークは形成しないものの、一側の横隔神経活動と両側の筋電図各々の間に、共通の同期した成分が非定常的に存在する可能性を示唆する所見が相互パワースペクトル、コヒーレンス、ならびに位相角のスペクトルから得られた。また CO<sub>2</sub> 負荷によって横隔膜筋電図のパワースペクトルの、高頻度同期波の帯域における総パワー値（自己パワースペクトル密度関数の周波数積分値）が増加する例が認められた。

#### 2) 加算平均法による解析結果

横隔神経活動中の高頻度同期波を同期信号として、一側の横隔神経活動および両側横隔膜筋電図の高頻度同期波の周波数帯域成分 (60~140 Hz) を 500 回加算平均したところ、いずれの活動にも、互いに同期した周期約 10 ms の波が見出された。加算平均された横隔神経活動の高頻度同期波は横隔膜筋電図のそれに対し、約 1~4 ms 先行していた。この加算平均結果に見出された高頻度同期波成分は、CO<sub>2</sub> 負荷によって、横隔神経活動および横隔膜筋電図ともにその振幅が増大し、明瞭になった。また横隔膜筋電図中のこの成分は、筋弛緩薬 (gallamine triethiodide, 5 mg/kg, i.v.) 適用後、検出されなくなった。

## 考 察

非線形最小二乗法によって推定された高頻度同期波の 2 つのパラメーター、すなわちピーク面積およびピーク周波数は各々、高頻度同期波の総エネルギー値ならびに中心周波数を反映するものと考えられる。これらのパラメーターが、CO<sub>2</sub> レベルの変化によって極めて鋭敏に変化した事実は、われわれのこれまでの研究成果<sup>5)</sup>と考え併せると、この高頻度同期波が呼吸中枢からの出力のなかでも、とくに呼吸運動の調節における最も主要な成分として、呼吸筋を支配する神経の遠心性活動に含まれている成分であることを示唆するものである。

自発性筋電図は、非侵襲的に導出されうる電気生理学的指標の中でも、最もその定量化が難しいものの一つである。その原因の一つとして信号中に様々な発生源を持つ活動電位が非定常的に混入し、従来の積分法などの解析法によってはそれらを弁別して定量化することが困難であったことを挙げることができる。特に呼吸筋の筋電図を解析する場合、大きな影響を及ぼすのは心電図である。本研究においては生体信号をデジタル信号化して記憶素子に蓄えたのちに、数学的处理によって、混在する心電図 QRS 波成分を除去することに成功した。これはヒトの呼吸筋筋電図の定量的解析を試みる上で重要な基礎技術となり得よう。また、本研究において加算平均法によって確認された横隔膜筋電図中の高頻度同期波の存在は、それが第一に、呼吸運動に関連した骨格筋を支配する神経活動に特異的に同期して含まれる成分であること<sup>9)</sup>、第二に、常に一定の周波数領域に発現する成分であることを利用すれば、スペクトル解析法を用いることによって、呼吸以外の運動や姿勢保持などに由来する筋電図成分との弁別が可能となり、従来よりも精度と信頼性のはるかに高い自発性筋電図の定量的解析の可能性を示すものであ

る。

このような高頻度同期波のスペクトル解析法の  
応用によって、運動ニューロン以下、神経筋伝達、  
筋収縮に至るまでの過程における病態生理学的変  
化を定量的にかつ非侵襲的に評価し得る可能性が  
あるものと考えられる。既に、随意呼吸下のヒト  
呼吸筋筋電図に発現する高頻度同期波をコヒーレ  
ンス・スペクトル解析によって定量的に検出した  
報告<sup>1)</sup>や、健康人の横隔膜筋電図のパワースペク  
トルの中心周波数が、動物の高頻度同期波に近い  
88~97 Hz の帯域に発現することを見出した報告  
があり<sup>6)</sup>、本研究の動物実験で得られた成果をふ  
まえてヒトにおける知見を積み重ねることが次の  
課題である。この解析法が確立されれば、筋ジス  
トロフィー症における呼吸筋変性の進行の程度お  
よび CANP 阻害剤の治療効果の非侵襲的な定量  
的評価方法として臨床的に応用され得るものと期  
待される。

## 文 献

- 1) Bruce, E.N. and Goldman, M.D. : High-frequency oscillations in human respiratory electromyograms during voluntary breathing, *Brain Research*, 269, 259-265 (1983).
- 2) Cohen, M.I. : Synchronization of discharges, spontaneous and evoked, between inspiratory neurons, *Acta Neurobiol. Exp.*, 33, 189-218 (1973).
- 3) Dittler, R. and Garten, S. : Die zeitliche Folge der Aktionsströme in Phrenicus und Zwerchfell bei der natürlichen Innervation, *Z. Biol.* 133, 420-450 (1912).
- 4) 福原武彦, 木村直史, 高野一夫, 加藤総夫, 中川辰郎, 山田順子 : EST (E-64-d) の筋ジストロフィーハムスター (UM-X7.1 系) の心電図に及ぼす影響, *慈恵医大誌*, 100, 1233-1240 (1985).
- 5) 加藤総夫, 木村直史, 高野一夫, 福原武彦 : 呼吸リズムを持つ神経活動に見出される高頻度同期波の機能的役割—その定量的スペクトル解析—, *J. Physiol. Soc. Japan*, 47, 688-689 (1985).
- 6) Schweitzer, T.W., Fitzgerald, J.W., Bowden, J.A. and Lynne-Davies, P. : Spectral analysis of human inspiratory diaphragmatic electromyograms, *J. Appl. Physiol.*, 46, 152-165 (1979).

# Duchenne 型筋ジストロフィー患者血清中

## $\alpha$ -アクチニン測定を試み

杉田 秀夫\*

研究協力者 山本剛司\*

### はじめに

Duchenne 型筋ジストロフィー症 (DMD) では、血清中にミオグロビンや筋漿内酵素である creatine kinase (CK) が増加することが知られているが、この流出の機序は明らかでなく、筋崩壊以外の要因も関与するものと考えられている。われわれは、本症の病態および病像の把握には筋崩壊現象を直接反映する指標が必要であるとの観点から、筋蛋白そのものを血清中で測定することを検討した。

$\alpha$ -アクチニンは分子量 95,000 の調節蛋白であり、骨格筋では Z 帯に存在してアクチンに結合している。最近、われわれは、この  $\alpha$ -アクチニンを健常人および DMD 患者血清中で定量、比較することを試みたので報告する。

### 対象と方法

#### 1. 対象

健常人男性 (18~25 歳) 10 名を正常対照群とした。DMD 患者は、今回予報として 10 名を検索した。その内訳は Swinyard の分類<sup>1)</sup>で stage I から V まで各 2 名であった。

#### 2. 方法 (酵素抗体法)

#### ① 抗 $\alpha$ -アクチニン IgG の作成

$\alpha$ -アクチニンはヒト骨格筋から抽出、精製し<sup>2)</sup>、SDS 電気泳動にて分子量約 95,000 付近にバンドを認めた。精製された  $\alpha$ -アクチニンを Freund complete adjuvant と共に家兎にくり返し免疫して抗血清を得た。抗体の確認は、immunodiffusion および immunoblotting により行なった。抗血清は次に protein A sepharose 4B により IgG 溶液とし、リガンドとして  $\alpha$ -アクチニンを結合させた affinity column を用いて抗  $\alpha$ -アクチニン IgG とした。

#### ② Enzyme-antibody conjugate の作成

抗  $\alpha$ -アクチニン IgG 1.0 mg/PBS に対して 0.32 mg の meta-maleimidobenzoyl-N-hydro-succinimide (MBS)/15  $\mu$ l 1-4 dioxan を加え、30°C, 1 h 反応させた後 Sephadex G25 column にかけて未反応の MBS を除去する。架橋試薬である MBS の結合した IgG を 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2) に置換し、1.5 mg の  $\beta$ -galactosidase を加え、再び 30°C, 1 h 反応させた後 10 mM mercaptoethanol 0.8  $\mu$ l/ml で反応を停止させ、Sephacryl CL-6B column にかけて conjugate fraction を得た。本法は、O'sullivan<sup>3)</sup>によるものであるが、この他に架橋試薬を N,N'-o-phenylenedimaleimide に代えて conjugate を作成する方法もある。

\* 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第 1 部

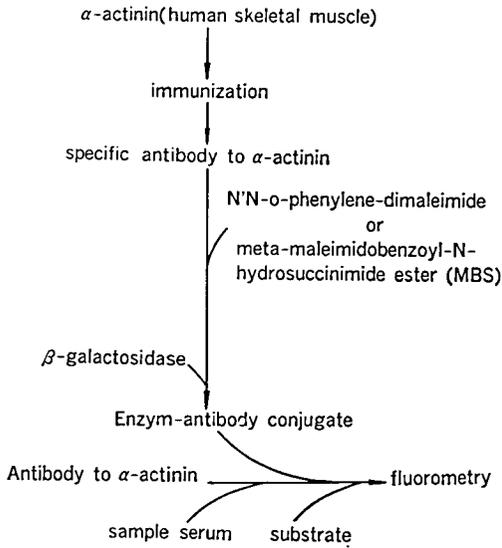


図 1  $\alpha$ -アクチニンの測定法

### ③ $\alpha$ -アクチニンの定量

抗 $\alpha$ -アクチニン IgG (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を EIA tube (栄研 2号) に 200  $\mu\text{l}$  入れ 30 分かけて coating する。BSA にて blocking した後, sample 血清を tube に入れて 4°C overnight で反応させる。buffer で wash した後, Enzyme-antibody conjugate を 200~20,000 倍希釈で 3 h 反応させ再び wash する。この後  $\beta$ -galactosidase の基質である 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside を加え, 1 h 後に蛍光を測定した (図 1)。

## 結 果

$\alpha$ -アクチニンの検量線を図 2 に示す。精製した  $\alpha$ -アクチニンを 2, 20, 200, 2,000  $\text{ng}/\text{ml}$  の濃度に希釈し, 蛍光光度計の示値を得た。横軸を対数表示としたが, 2  $\text{ng}/\text{ml}$  では  $\alpha$ -アクチニンを含まないコントロールとの差がほとんどなく, 本法による測定限界は 20  $\text{ng}/\text{ml}$  以上と考えられた。また, 検量線は  $\alpha$ -アクチニン濃度の増加に伴って上昇したが, 200 から 2,000  $\text{ng}/\text{ml}$  の領域では上昇幅が小さくなった。

この検量線を用いて正常対照群および DMD 患者血清中の  $\alpha$ -アクチニンの定量を実施した (図 3)。正常対照群の血清中  $\alpha$ -アクチニンは, 26.0

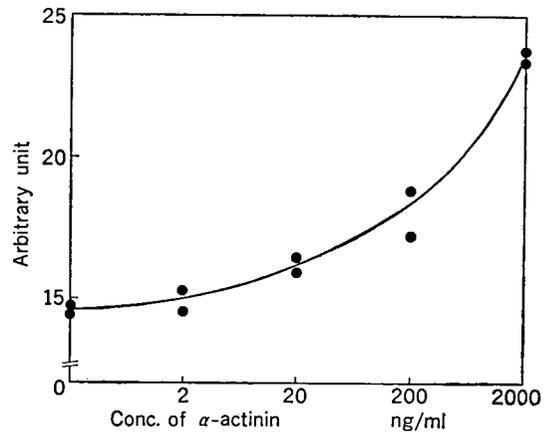


図 2  $\alpha$ -アクチニンの検量線

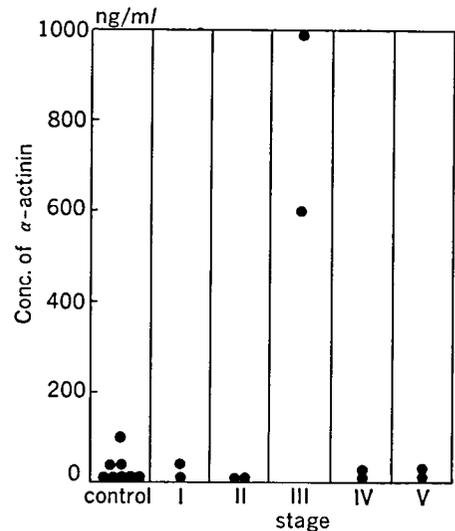


図 3 DM 患者血清中の  $\alpha$ -アクチニンレベル

$\pm 27.2 \text{ ng}/\text{ml}$  ( $n=10$ ) であった。DMD 群では stage I, II, IV, V の 8 症例については正常対照群と比較して有意な上昇は認められなかったが, stage III については 600  $\text{ng}/\text{ml}$  以上の有意な増加を認めた。なお, 今回測定した DMD 10 例については, その  $\alpha$ -アクチニン量と CK 値とに相関はなかった。

## 考 察

$\alpha$ -アクチニンは DMD 骨格筋中で減少することが知られており<sup>4)</sup>, また ELISA 法を用いて測定した抗骨格筋  $\alpha$ -アクチニン抗体価も DMD 血

表 1 Content of structural proteins in skeletal muscle

Proteins	MW	Content (%)	Localization
Myosin			
heavy-chain	200,000	50	A-band
light-chain L1	25,000	2.5	
L2	20,000	5	
L3	16,000	2.5	
Actin	42,000	20	I-band
Tropomyosin	65,000	3	
Troponin	70,000	4.5	
$\alpha$ -actinin	95,000	1	Z-line

清中で高値を示した点<sup>6)</sup>からみて、筋崩壊に伴って  $\alpha$ -アクチニンが血清中に流出している可能性が大きい。stage I, II, IV, V で正常値をとり、stage III で高値を示した点も筋崩壊の程度と関連して興味深い。

DMD 患者血清中の筋蛋白の定量は、これまで心筋ミオシン<sup>6)</sup> や骨格筋ミオシン軽鎖III<sup>7)</sup> について行なわれており、いずれも DMD 患者血清中で高値を示すことが報告されている。このうち後者については stage II と III で特に高値を示す症例が多く、今回の  $\alpha$ -アクチニンの結果と類似している。ミオシン軽鎖IIIの検出量は 1,000~3,500 ng/ml で、 $\alpha$ -アクチニンの 3~5 倍であるが、骨格筋中の各々の含量 (表 1) を考慮すると、およそ合理的な結果と考えられる。

酵素抗体法による血清中  $\alpha$ -アクチニンの測定法については、今後いくつかの問題点を残した。第 1 に、測定し得る最少量が 20 ng/ml である点である。stage I, II, IV, V で正確な定量を行なうには、さらに検出感度を鋭敏にする必要がある。第 2 に 200~2,000 ng/ml での検量線の上昇が鈍く、この領域での定量が rough になる点が挙げられる。今回検索した stage III の 2 症例は、正常対照群および他の stage の 8 症例と比較して  $\alpha$ -アクチニンが高値を示す点は問題ないと思

われるが、その程度については実際にはもっと低いのではないかと考えている。予備実験から抗血清の抗体価は十分と考えられるが抗体の affinity に原因があるのかも知れない。

上記の点を改良した上で症例数を追加し、stage との関連、CK 値との相関等を検討してゆく予定である。

#### 文 献

- 1) Swinyard, C.A., Deaven, G.G. *et al.*: Gradient of functional ability of importance in rehabilitation of patients with progressive muscular and neuromuscular diseases. *Arch. Physic. Med.* 38, 574 (1957).
- 2) Ebashi, S., Ebashi, F.:  $\alpha$ -Actinin, a new structural protein from skeletal muscle. I. Preparation and action on actomyosin-ATP interaction. *J. Biochem.* 58, 7-12 (1965).
- 3) O'Sullivan, M.J. *et al.*: Comparison of two methods of preparing enzyme-antibody conjugates: Application of these conjugates for enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* 100, 100-108 (1979).
- 4) 杉田秀夫: 疾患筋 (筋ジストロフィー筋). 日本生化学会編, 生化学実験講座筋肉, 東京化学同人東京 p.133 (1975).
- 5) 山本剛司, 杉田秀夫: 私信による.
- 6) 矢崎義雄, 永井良三: ミオシン軽鎖. 日本臨床 40 (秋季増刊), 107 (1982).
- 7) 小長谷正明: 他血清ミオシン軽鎖値の測定法開発と Duchenne 型筋ジストロフィー症での検討. 臨床神経 26, 783-791 (1986).

# 血中骨格筋ミオシン軽鎖測定法の開発とその臨床的意義

矢崎 義雄\*

筋肉疾患において、変性ないし障害された筋肉細胞より血中に逸脱した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ていることから臨床に広く用いられている。とくに筋肉組織の障害されている程度を、その蛋白の血中流出量から定量的に推定される<sup>1)</sup>として注目されている。このような生化学的診断法の指標となる蛋白として、従来から筋肉細胞に存在する 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、これらの指標物質は細胞質中に可溶性蛋白として存在しているために、筋組織の障害による細胞膜の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、筋肉組織の障害を検出する感度は高いが、筋肉細胞の構造崩壊過程を直接反映する指標とはならない。さらに骨格筋組織の場合には、生理的ではあるが、過度の運動によってもこれら蛋白が血中に逸脱してくることも知られている。

一方、筋肉細胞における主たる細胞構築は、収縮の最小単位である筋原線維であり、特異的な構造蛋白によって構成されている。もし、筋肉疾患において障害された筋組織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が、障害部筋組織の崩

壊と治癒過程を直接反映するために、筋肉障害の病態把握に臨床的にきわめて有用な方法となり、また新しく開発された治療法の定量的な効果判定に役立つことが期待される。このような観点からわれわれが開発したのがミオシン軽鎖測定法である。そこで骨格筋疾患における血中ミオシン軽鎖測定<sup>2)</sup>の臨床的意義を、心筋梗塞症における検討をもあわせて述べる。

## I ミオシンおよび軽鎖の生化学的特性

そもそもミオシンは、筋原線維の太いフィラメントを構成し、収縮機序の中心的な役割を担っている蛋白である。ミオシン分子は分子量の大きな重鎖と小さな軽鎖のサブユニットからなっている。その中で、軽鎖はフィラメントを構成している重鎖の頭部に、非共有結合により緩く結合している。このようなミオシンのサブユニットである軽鎖は、筋肉の細胞障害を反映する生化学的指標として以下のような適した特性を有している。

1) 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。2) 心筋と骨格筋では、ミオシンのサブユニット構成が異なり、とくにその中で、軽鎖は分子量ばかりでなく、アミノ酸組成を中心とした一次分子構造が異なっている。3) そして軽鎖は pH などの変化により容易にミオシン分子より解離する。したがって、障害時により筋原線維より直接ミオシン軽鎖が遊

\* 東京大学医学部第三内科

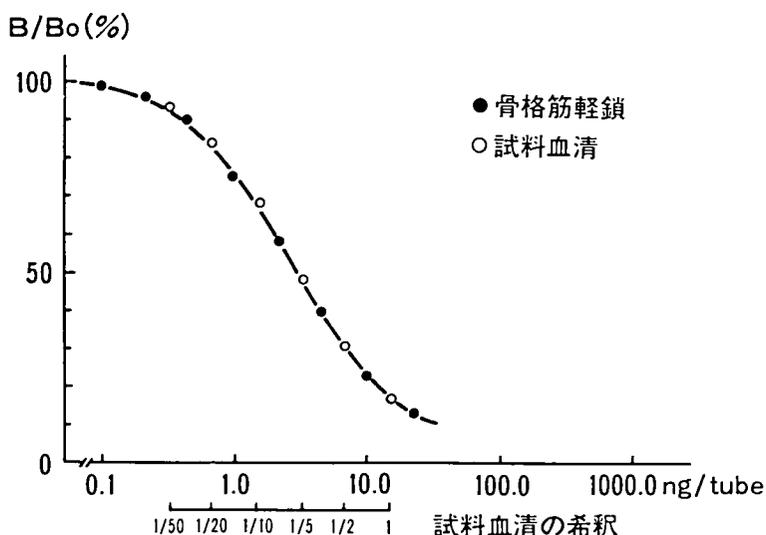


図1 骨格筋ミオシン軽鎖（アルカリ軽鎖I）のラジオイムノアッセイによる標温曲線

離してくる可能性がある。4) さらにミオシン軽鎖は分子量が小さく、障害時に細胞外に逸脱しやすい。5) しかも SH 基などの含有量が少なく生化学的にみて安定した蛋白であり、血中において分解され難いため、試料血液の処理と保存が簡便にできる。

このようなミオシン軽鎖の生化学的な特性に注目し、筋組織障害の診断とその拡がりの判定、さらには筋細胞構築崩壊に関する情報をうる目的で、ミオシン軽鎖のラジオイムノアッセイ (RIA) による測定法を確立し、その測定の臨床的意義を、骨格筋疾患において検討した。

## II ミオシン軽鎖のラジオイムノアッセイ法

われわれは軽鎖の RIA 法を確立するにあたり、まず急性心筋梗塞症での検討を考へて、ヒト心筋ミオシン軽鎖に対する抗体を作成してその測定法を開発し、次いで骨格筋ミオシン軽鎖と 100% 交叉する抗体を選択して、骨格筋ミオシン軽鎖の測定法を確立した。

ミオシンは死後 4 時間以内に剖検された正常心筋より改良せる希釈法により抽出し、DEAE A25 のカラムで精製した。軽鎖は 5M 塩酸グアニジ

ンによりミオシン分子から分離し、分画電気泳動法にて軽鎖 I と II に分画した。モルモットを精製した軽鎖 I にて免疫することにより抗軽鎖 I 抗体を作製した。その RIA の方法は、軽鎖 I をクロロミン T 法により  $^{125}\text{I}$  で標識し、B/F 分離は二抗体法を用いて行った。その測定感度は、心筋および骨格筋ミオシン軽鎖ともに  $1 \text{ ng/ml}$  と十分に臨床応用できるものであった (図 1)。成人健康者 20 名の血中軽鎖 I 値は  $3.1 \pm 0.6 \text{ ng/ml}$  (骨格筋ミオシン軽鎖としては  $2.4 \pm 0.6 \text{ ng/ml}$ ) であった。

## III 急性心筋梗塞における血中軽鎖の変動

図 2 は急性心筋梗塞患者における CPK、および軽鎖値の典型例を示す。軽鎖値は構造蛋白であるにもかかわらず、発作 6 時間後の比較的早期に出現し、その値は徐々に上昇して 2 日ないし 5 日後に最高値に達し、再び徐々に低下するが、1 週間以上の長期間にわたって高値を保つ特徴ある変動パターンを呈した。血中から軽鎖は迅速に消失することから、梗塞部心筋からその間軽鎖が流出しつづけていることが示された。したがって、血中軽鎖値を経時的に測定することにより、梗塞部

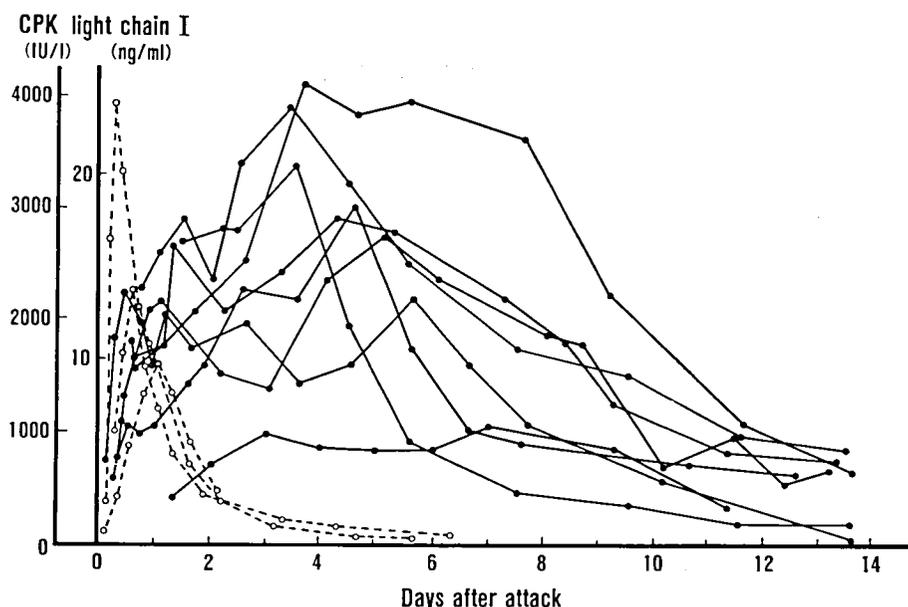


図2 心筋梗塞発症後の血中ミオシン軽鎖 (light chain I) と CPK 値の変動パターン (● 軽鎖値, ○ CPK 値)

心筋の崩壊と治癒過程を知ることが可能となった。その他に、1) 血中軽鎖値が梗塞心筋量とよい相関を示す。2) 血中濃度の変動パターンが緩やかなために、1日1回の採血で最高値を正確に捉えることが可能である。3) 発作後経過してCPKなどの指標が正常化してしまった症例でも、軽鎖値は高値を持続するために、retrospectiveに診断が可能である。4) 心室瘤形成など、心筋組織の崩壊が高度であった症例では、血中軽鎖値の著しい高値を認めた。

このように従来の指標であるCPKなどでは得られなかった、梗塞部心筋の病態に直接関連した多くの情報を、血中軽鎖の測定により知ることができるようになった。そして、現在急性心筋梗塞の積極的な治療法として注目されている、冠動脈内血栓溶解療法の治療効果を非侵襲的に、しかも定量的に評価できる唯一の指標として期待されている。

#### IV 骨格筋疾患における血中軽鎖値

同様の方法で、骨格筋疾患において骨格筋ミオ

シン軽鎖を測定し、その臨床的意義を検討した。

##### 1) 運動負荷が骨格筋に及ぼす影響

過激な筋肉運動、例えばマラソンなどにより、血中のCPK値が有意に上昇することが報告されている。しかし、先に述べたようにCPKは細胞質中に存在する蛋白で、軽度な細胞障害による細胞膜の透過性亢進により逸脱して血中に出現してくる可能性があり、必ずしも壊死に至る細胞障害の存在を示さない。そこで、過度の運動が骨格筋をはたして損傷しうるものであるか、臨床的にも解明すべき重要な課題である。われわれは防衛医大第三内科との協同研究により、93時間の連続した激しい行軍訓練の前後で、CPK、CPK・MB、LDHそしてミオシン軽鎖を測定して比較した。

CPK値は行軍訓練開始後徐々に上昇をはじめ、93時間後訓練終了時に最高値に達し、3日後には訓練前の値に戻った(表1)。CPK・MBの占める割合は5%前後で、訓練により影響を受けることはなかった。LDHも同様の変化を示し、訓練終了時に最高値に達し、3日後には前値に戻った。しかし、最高値の上昇程度はCPKと比べて低か

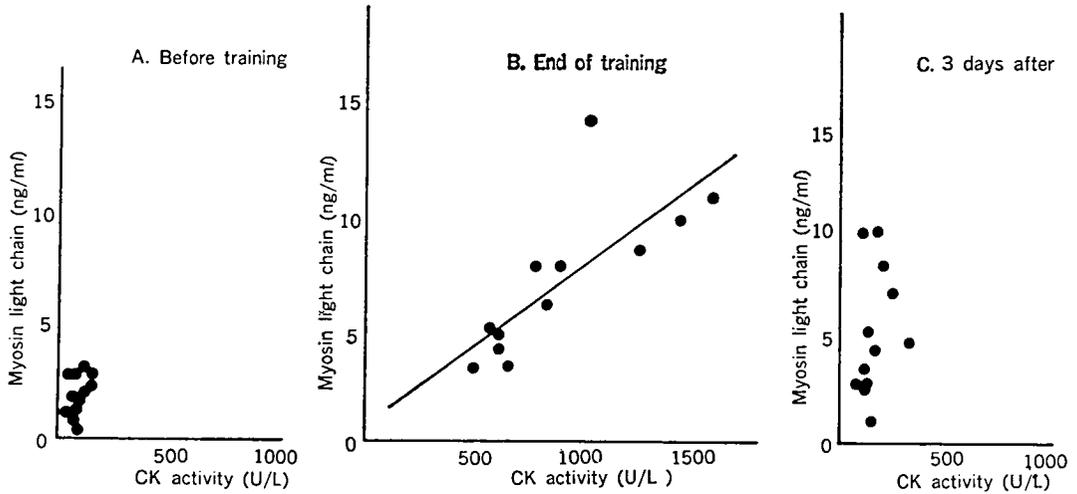


図3 93時間行軍訓練による血中CPK, ミオシン転鎖値の変動  
A. 訓練前, B. 訓練直後, C. 訓練終了3日後

った。またアイソザイムもLDH<sub>1</sub>の割合は増加せず、CPKとともに骨格筋より流出したものであることが示された。一方、軽鎖値は訓練終了時には有意に上昇し、興味あることにはCPK値が前値に戻った3日後においても高値を保っていた(図3)。しかし血中軽鎖値の上昇は、最高でも15ng/ml以下で、次に述べる骨格筋疾患例と比較すると極めて低値である。

以上の結果より、過激な運動によって骨格筋細胞の膜透過性亢進をきたす代謝障害が生じ、CPKが逸脱してくるものと考えられる。このようなCPK値の上昇に伴って、軽度ながら軽鎖値の増加を認め、しかも3日後にも高値を保っていたことから、障害された筋細胞のごく一部が壊死に陥っている可能性が示唆された。すなわち、運動も過激になると筋細胞の壊死を起こしうることを示されたわけである。心筋障害を伴っている可能性は、アイソザイムの検討などを含めて認めなかった。

## 2) Duchenne型筋ジストロフィー症

4歳から20歳までの55例について血中軽鎖値を測定したところ、殆んどすべての症例で著しい上昇が認められた。その値は20ng/mlから

520ng/mlの広い範囲に分布していた(図4)。心筋梗塞の場合には、最も大きな梗塞でも最高値は100ng/ml以下であることから、相当量の骨格筋組織が崩壊過程にあることが示された。また血中軽鎖値はCPK値とも比較的よい相関を保っていた。流出機序の異なるCPK値と軽鎖値を比較することにより、患者の病態、すなわち筋組織の崩壊の状況を的確に把握することが可能になるものと期待される。また筋組織の崩壊を抑制するような治療法の効果を正確に定量的に評価できると考えられる。

## 3) 多発性筋炎

CPK値の上昇している活動期の症例では、15~25ng/mlと上昇し、筋原線維の崩壊が生じていることが生化学的に示された。しかしその値はDuchenne型筋ジストロフィー症のような骨格筋の変性疾患と比較して低値であることから、筋組織の崩壊の程度は軽いものと考えられる。

## 4) 神経性筋疾患

背髄性進行性筋萎縮症などでも、CPKとともに血中軽鎖値の上昇を認めたが、やはり骨格筋変性疾患と異なり、その上昇は軽度にとどまった(10~24ng/ml)。

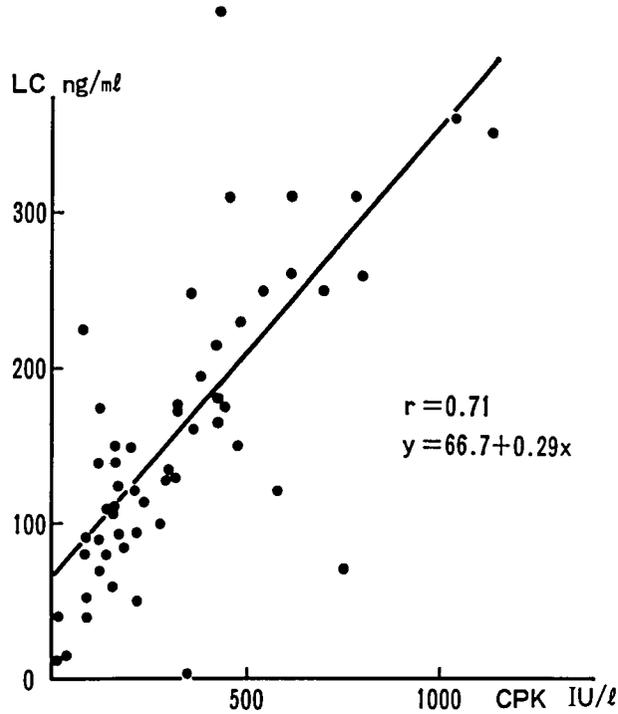


図 4 Duchenne 型筋ジストロフィー症における血中ミオシン軽鎖値と CPK 活性値の相関

おわりに

筋組織の障害度を非侵襲的に推定する方法として、筋肉細胞の主たる構造蛋白のミオシン、とくに分子量が小さく細胞外に逸脱しやすいサブユニットの軽鎖の測定法を開発し、急性心筋梗塞症や骨格筋疾患において実際に血中の軽鎖値を測定し、その病態と比較して検討を行った。このようなわれわれの方法は、筋組織障害の進展を的確に把握することを可能ならしめ、また、新しく開発される骨格筋変性疾患に対する治療薬の評価にきわめて有用であることが明らかとなった。

文 献

- 1) 永井良三ほか：ラジオイムノアッセイによる血中ヒト心筋ミオシン軽鎖 I の測定および急性心筋梗塞症におけるその臨床的意義，日本内科学会雑誌 70, 1098 (1981)。
- 2) Nagai, R., *et al.* : Evaluation of methods for estimating infarct size by myosin LC2 : comparison with cardiac enzymes. *Am. J. Physiol.* 245, H413 (1983)。
- 3) 矢崎義雄ほか：ミオシン軽鎖，日本臨床 43, 134 (1985)。
- 4) Kosano, H., *et al.* : Changes in concentrations of myogenic components of serum during 93h of strenuous physical exercise. *Clin. Chem.* 32, 346 (1986)。

# 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

宮 武 正\*

研究協力者 桑原武夫\*\*, 近藤隆春\*\*, 湯浅龍彦\*

進行性筋ジストロフィー症にはいくつかの病型が含まれるが、中でも Duchenne 型筋ジストロフィー症は患者数も多く、急激な経過をたどることが知られている<sup>1)</sup>。

この Duchenne 型筋ジストロフィー症 (以下 DMD) は 2~3 歳で発症し、一般に 10 歳前後で歩行不能となり、20 歳前後で死亡するとされている<sup>2)</sup>。

今日、このような DMD に対していくつかの治療的試みがなされ、どのような指標を用いてこれの効果を判定するののかということが一つの問題であると思われる。

今回は、日常生活動作能力 (ADL) がどの様に推移するのか、この ADL の推移は予測可能か否か、この様な ADL を治療効果の判定に用いることが可能か否かについて検討を行った。

## 材 料 と 方 法

対象は国立療養所新潟病院に入院あるいはデイケア外来で観察している DMD 73 例で、ADL の変化を症例毎に観察した。ADL は厚生省研究班制定のものを用いた。

比較的初期のステージから ADL の観察を行なっている 11 症例を用い、ADL 70 点までの値を非線形最小二乗法で処理し、curve fitting を行

なった。

## 結 果

DMD の ADL の平均値の年次推移を図 1 に示す。ADL は年長になるに従って徐々に低下し 10 歳前後で 50 点を割った。

個々の症例での ADL の経年変化を図 2 に示す。経過は症例により異なり、ADL が低下して 50 点を通過する点は 8 歳前後から 15 歳頃までと広がっていた。また大多数の症例において ADL が 70 点くらいまで緩徐に低下し、その後急激に低下し、次に 30 点頃から非常にくだらかな低下を示した。

比較的初期のステージから十分な ADL の資料がある 11 例では 70 点までの値は指数関数曲線  $y = -0.9 / (1 + e^{ax+b}) + 0.95$  に回帰された (図 3)。

全症例において 70 点以降 40 点前後までの ADL の値は 70 点までのポイントから得られた指数関数曲線の延長線上に認められた (図 3)。

## 考 案

DMD の臨床経過を追跡するために、われわれが日常的に用いている指標は、機能評価法として、日常生活動作能力 (ADL)、stage 分類、そして歩行群では歩行速度の測定などがあり、その他、心肺機能検査や Creatine kinase (CK) の測定など

\* 新潟大学脳研究所神経内科

\*\* 国立療養所新潟病院

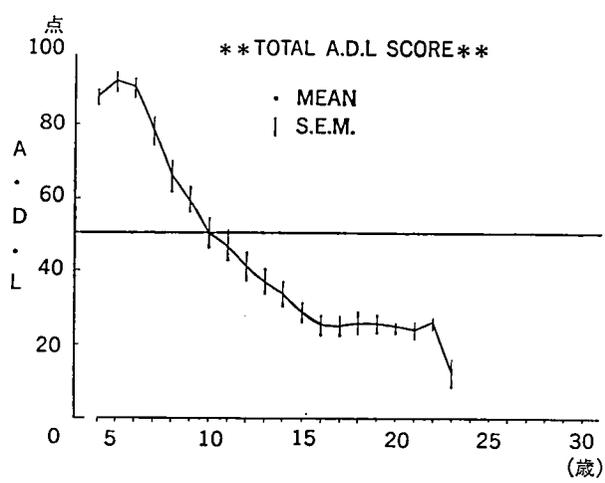


図 1 ADL の平均値の年次推移

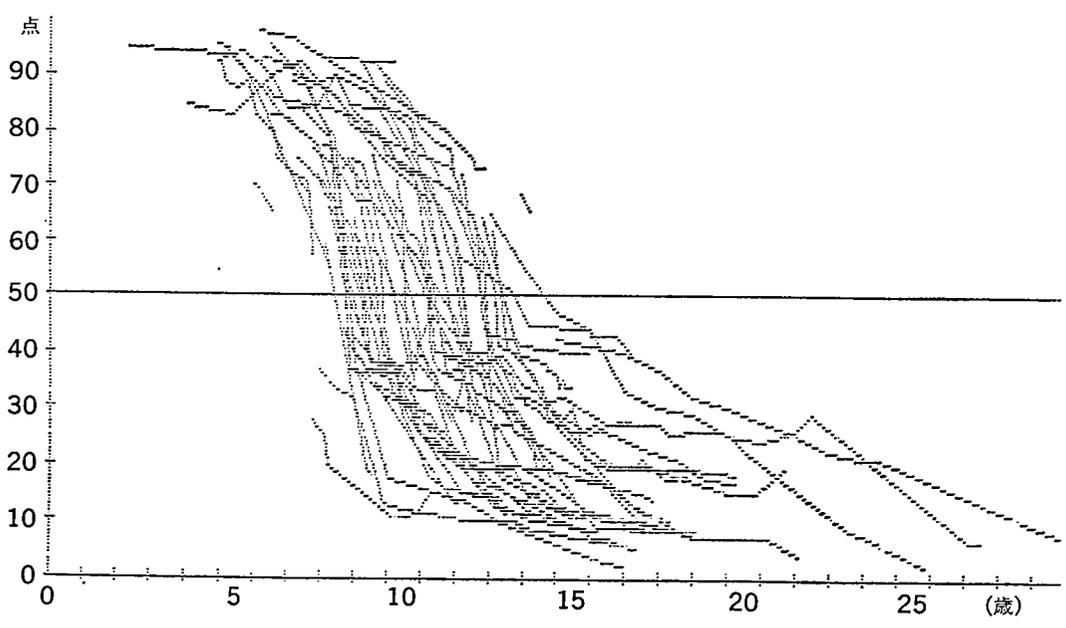


図 2 個々の症例での ADL の年次推移

がある。

図 4 に DMD の歩行速度の経年推移を示す。速度は一旦ピークに達したのち暫時低下して来る。低下は、一般には、ここでも示されている様に linear に起り、Cohen らはこれを治療効果の指標に用いている<sup>2)</sup>。

図 5 には心肺機能のうち頸動脈脈波 PEP/ET

の経過を示す。症例により差があるが、年を経るに従って PEP/ET は悪化してくる。しかし、中には心機能が殆ど悪化しない例もある。

呼吸機能の指標となる動脈血液ガス分析値の推移を図 6 に示す。DMD の末期になると換気能力低下による呼吸不全を呈して来る。

CK の年次推移を図 7 に示す。小長谷らは長期

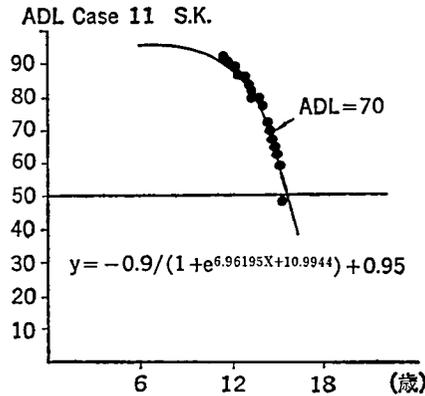


図 3 ADL 70 点までのサンプリングでそれ以降のその症例が取るべき推計値を予測できる

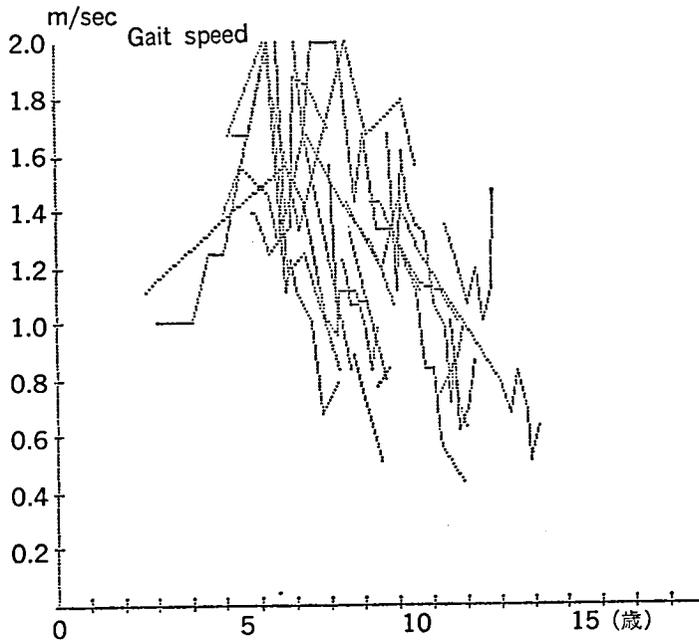


図 4 歩行速度の経年推移

観察例の CK 値の推移は、毎回の測定ごとの変動があるものの、10 歳代初期に変曲点を有する指数関数状に低下して行くと報告している<sup>3)</sup>。

これらの指標のうち、今回は ADL をとりあげ、(1) DMD の ADL はどのように推移するのか。(2) この ADL は予測可能か否か。(3) このような ADL を治療効果の判定に用いることが出来るかどうか検討した。

その結果、ADL 70 点までのサンプリングポイ

ントでそれ以後の症例が取るべき推計値を予測できることを示した。

このシュミレーションを行なうためには、70 点までの観察点が多ければ多いほど予想曲線が正確になり、最低 6 ポイント、理想的には 8~10 ポイント、しかも 70 点代と 80 点代で均等なサンプリングが必要である。

しかしながら、われわれがこのような ADL 評価の方法を治療効果の判定に用いようとするなら

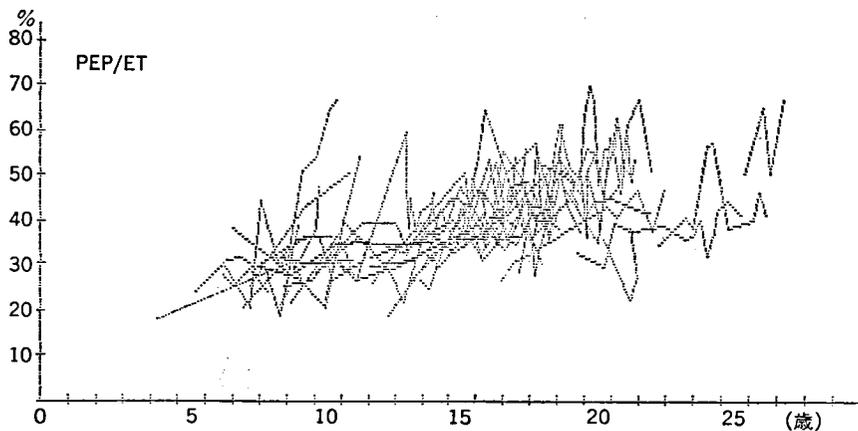


図 5 頸動脈脈波 PEP/ET の経年変化

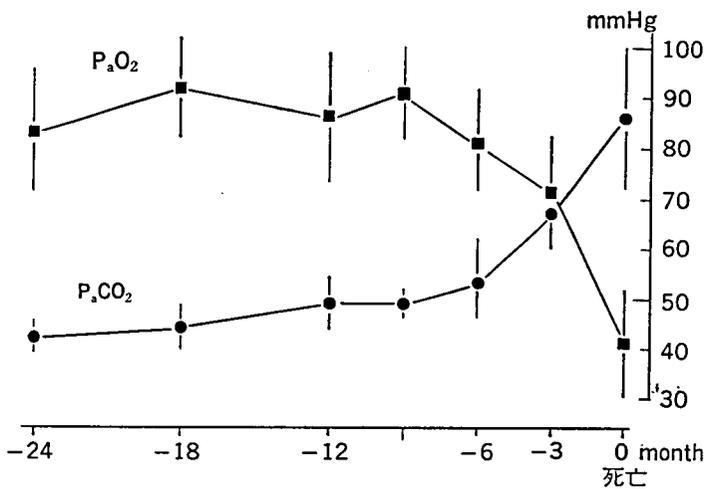


図 6 呼吸不全で死亡した症例の日中活動時の  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$  の推移

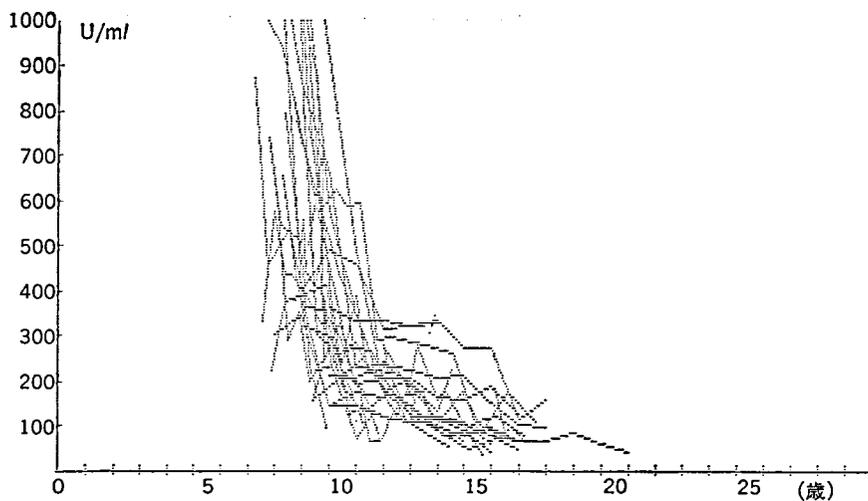


図 7 CK の経年推移

ば、このような予想曲線をまず出しておいて、実際の症例でこれがどのように修飾されているかを観る必要があると思われた。

文 献

1) 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. 1985

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

3) 小長谷正明, 高柳哲也：Duchenne 型筋ジストロフィー症筋崩壊の進行経過—血清 Creatine kinase 推移の指数方程式による解析. 臨床神経(抄) 24 (12), 1422 (1984).

## 治療薬の効果判定法における問題点

石原 傳 幸\*

共同研究者 宮川雅仁\*, 儀武三郎\*, 青柳昭雄\*, 杉田秀夫\*\*

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、従来決定的な治療手段が見い出せなかったこともあり、これまで行なわれてきた薬剤効果の判定についてもまちまちの方法がとられてきた。しかし、1980年、Dubowitzらにより標準化の試みがなされた<sup>1)</sup>。彼らは効果判定に必要な条件として、①診断基準の作成、②適当な対照群の設定、③二重盲検試験、④簡単な臨床検査に加え詳細な検査による評価、⑤2年またはそれ以上の期間、の5点をあげた。Brookeらは、治療効果判定に必要な条件として、①診断の確実性を増すための診断基準の作成、②二重盲検試験、③Power算出、④データの収集や各評価者間のばらつきをモニターできることの4点をあげている<sup>2)</sup>。

わが国でも厚生省新薬開発事業研究班が組織され、ベスタチンやE-64による治療が開始された。E-64研究班では、1984年度より第二相臨床試験が開始され、われわれも第二相臨床試験の開始時よりE-64治療に関与してきた<sup>3)</sup>。

DMDが常に進行性の経過をとることは周知の事実である上、E-64 (EST) のような蛋白分解酵素阻害剤は、DMDの本態を直接攻撃する薬剤ではない。したがって、中核症状である筋力低下を逆転させる効果は期待できず、当初より進行性の経過を遅らせることが可能かという程度の効果し

か期待できなかつた。このため、開始時より薬効の判定が可能かどうかということが、われわれ臨床家にとっての最大関心事であった。以下にE-64研究班での臨床試験の結果を述べ、治療判定法の問題点を明らかにしたい。

### E-64 研究班での経過

当院入院患児27名を対象に、ESTを4mg～8mg/kgの量で投与した。うちA群14名は1984年5月より、B群13名は1985年6月より投与中である。開始時にA群は歩行可能児が13名、B群は歩行可能児2名のみであった。観察項目は表1に示す通りである。臨床検査値の推移に関しては表2の通りであり、 $\gamma$ -GTPの上昇を別にすれば、特に大きな変動をみとめなかつた。効果判定のため、まず当院開棟以来のデータをhistorical dataとして各パラメーターとの比較を試みようとした。CKは7年分、ADL、機能障害度は13年分のデータをコンピューターで集計した(表3, 4, 5)。両群間で比較を試みたが、治療患者はこのhistorical dataの範囲内に全て入ってしまい、特に有効であるという結論を導き出すことはできなかった。MMTでは、筋力の回復が一時的に認められる例もあるものの、検者の側の測定誤差の問題があり、平均すると測定したすべての筋肉で下降傾向をみせた。なお、MMT、ROMについてのhistorical dataは見出せなかつた。

\* 国立療養所東埼玉病院内科

\*\* 国立精神・神経センター

表 1-1 患者の背景 (1)

群	症例 No.	年齢 (歳)	障害度	体重 (kg)	投与量 (mg/kg/日)	
					開始時	増量後
A	101	11	4	23.0	100	200
	102	13	4	31.6	125	250
	103	11	4	28.2	125	250
	104	11	4	26.2	100	200
	105	12	4	26.2	100	200
	106	7	2	20.0	100	200
	107	8	3	17.5	75	150
	108	10	4	26.2	100	200
	109	10	4	25.6	100	200
	110	8	2	20.2	75	150
	111	9	4	21.2	75	150
	112	10	4	28.6	125	250
	113	11	5	25.2	100	200
	114	7	1	20.2	75	150
平均± S. D.		10±1.8	—	24.3±4.0	98±18	196±37

表 1-2 患者の背景 (2)

群	症例 No.	年齢 (歳)	障害度	体重 (kg)	投与量 (mg/kg/日)	
					開始時	増量後
B	501	11	5	24.0	100	200
	502	11	6	25.8	100	200
	503	10	5	19.2	75	150
	504	13	5	36.2	125	250
	505	12	5	55.0	200	400
	506	9	4	22.0	75	150
	507	12	5	37.0	125	250
	508	17	5	40.4	150	300
	509	11	6	42.0	150	300
	510	12	5	37.4	125	250
	511	13	5	31.0	125	250
	512	10	2	31.0	125	250
	513	10	5	21.2	75	150
	平均± S. D.		12±2.0	—	32.5±10.2	119±36

そこでわれわれは、当院開棟以来 (昭和 45 年) の各障害度通過期間を算定し (表 6)、特に障害度 4 度の通過期間を EST 投与者のそれと比較した (表 7)。障害度 4 度通過期間は当院では装具歩行も 4 度と算定してあるため他院よりも一段と長い

が、EST 投与群で表 7 の通り約半年延長していた。しかし、両群間には統計学上有意な差が見られなかった。当院での結果は以上であった。他に国立療養所新潟病院、国立療養所下志津病院、国立療養所医王病院でも EST 投与を行なったが、

治療薬の効果判定法における問題点

表 2 投与開始時と各時期における臨床検査値の比較

群	検査項目	48週	増量4週	増量24週
A	ICDH	N. S.	N. S.	N. S.
	$\gamma$ -GTP*	↑	↑	↑
	GPT*	N. S.	N. S.	N. S.
	Al-P*	N. S.	N. S.	N. S.
	CK	↓	N. S.	N. S.
群	検査項目	4週	増量4週	増量24週
B	ICDH	N. S.	N. S.	N. S.
	$\gamma$ -GTP	↑	↑	↑
	GPT	N. S.	N. S.	N. S.
	Al-P	N. S.	N. S.	N. S.
	CK	N. S.	N. S.	N. S.

\*: 投与開始4週目と比較  
 ↑, ↓:  $p < 0.05$   
 N.S.: not significant

表 3 血清 CK の自然歴  
 CK (Historical data-東埼玉病院-)

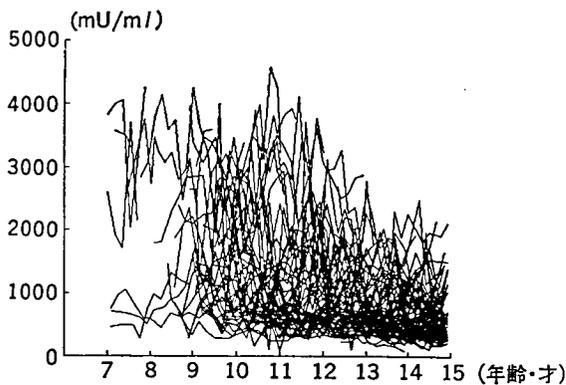


表 4 障害度の自然歴  
 Stage (Historical data-東埼玉病院-)

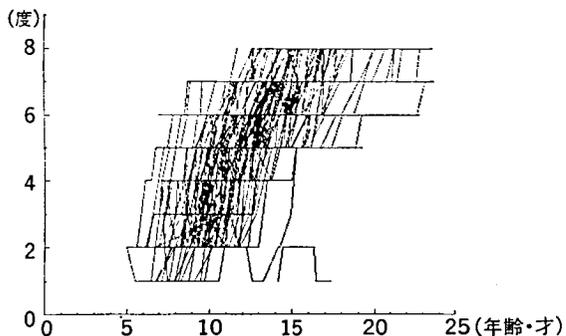


表 5 ADL の自然歴  
 ADL 総点 (Historical data-東埼玉病院-)

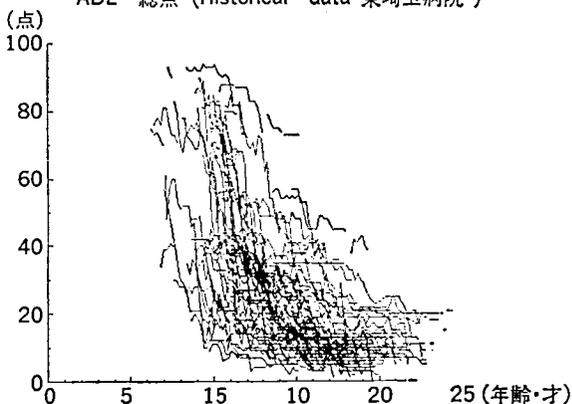


表 6 東埼玉病院における各障害度通過期間  
 (昭和 45 年 10 月~昭和 59 年 12 月)

障害度	症例数	通過期間 (ヶ月: 平均±S.D.)
1	12	16.8±4.5 (10~24)
2	39	18.4±11.3 (1~51)
3	39	9.7±6.5 (1~34)
4	36	12.6±10.2 (3~39)
5	97	24.1±17.1 (1~73)
6	89	23.3±19.7 (2~80)
7	62	25.5±20.4 (2~93)
8	39	24.5±18.1 (2~61)

表 7 障害度 4 度通過期間

症例 No.	4 度通過期間 (ヶ月)
101	31
102	12
103	31
104	42
105	13
106	3
108	27
109	20
110	7
111	6
112	12
506	16
n = 12	18.3±12.0 (平均±S.D.)

有効性を確定できるような良い判定法を見い出せなかったのが現状である。

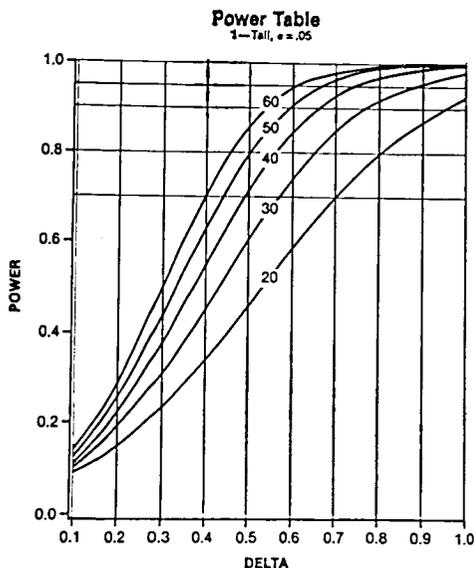


Figure 13. Power table indicating the probability of an effect in this report, clinical improvement being detected at a level of significance of  $P < 0.05$ . The curves represent groups of different numbers of patients followed for 1 year.

図 1 Power 表 (文献 2) より)

### 外国での現状

1981 年より Brooke らにより発表された臨床評価法は、E-64 研究班と細目では多少の差があるものの殆ど同様である。当然ではあるが、彼らはまず疾患の natural history の把握の重要性を強調した。多くのパラメーターの中で MMT を特に重視し、筋力テストの結果を点数化し、一年間に  $0.40 \pm 0.39$  (平均  $\pm$  S.D.) の割合で低下することを見出した。この数値から Power 表を使い薬効判定に役立てようという Power の概念を導入した (図 1)。

イギリスの Dubowitz らは同様のプロトコールを作成したが、彼らの特徴はやはり筋力測定を重視し、electromyometer で筋力を判定し、さらに大腿四頭筋でトルクを判定していることである。やはり natural history の把握を重要視している。

イタリアの Angelini のプロトコールは、四頭筋の myometer による筋力測定と、三頭筋、三角筋、四頭筋、大殿筋の MMT と種々の動作の

実行時間と簡単な臨床検査のみで成っていた。

### 薬効判定上の問題

以上に EST の薬効判定と外国の判定法の実情を述べてきた。EST については昨年、薬事審議会での審査の際問題となった一つの点は、有効性の判定について、すべての施設において共通の判断基準を設定し得なかったことであった。施設間による過去のデータの集積がバラバラであり、批判に充分たえうる natural history の集積がなかった。また、開始時期の障害度も全くバラバラで比較しようがなかった。われわれが採用した障害度についても判断基準があいまいで各施設間で比較ができなかった。英米の薬効評価基準と EST の場合を比較してみると、確実な診断基準の設定については、これまでの参加施設が筋ジストロフィー専門施設であり DMD という診断には問題ないと考えられる。

次の二重盲検試験については、DMD のような悲惨な疾患に二重盲検試験を行なうのは倫理的な問題があるとする意見もあるが、学問的には対照群との比較が必要なことは自明の理である。データ収集の施設間でのばらつきについては、今回の EST 試験で、各施設の医師、看護婦、PT、OT が開始時期に集まり評価法を一定にすることを試みてきたので、それ程問題はなかったものと考えられる。Dubowitz らは electromyometer で種々の筋肉の筋力を測定し、大腿四頭筋のトルクを測定している。われわれも筋力の推移に評価の中心をおくことには賛成である。障害度の判定は各施設のばらつきが多い。ADL や動作時間を測る機能テストについては筋力だけでなく、運動発達、知能、バランス、拘縮などの要因が加味されるからである。ROM については、マッサージにより余りに違う値をとりうるなどの問題点が多い。又、臨床検査については尿中クレアチン、3-メチルヒスチジンなどに対する効果はあったものの、

これらの指標が臨的にどのような意義があるのかという問題については議論のあるところであろう。最後は Power 概念の導入であるが、40 例の症例で 70 パーセント位の進行をおさえるとすれば、一年間で対照群との差を算出するし、60 パーセント程度の抑制率であれば、60 名程の患者をフォローすることが必要となる。二重盲検で行なうとすれば、80 から 160 名程度の患者数が必要となり、各施設における協力が必要となる。

### 今後の対策

今後の方針としては、患者の対象をしぼること、即ち効果は筋肉量の多い患者に著しく出るだろうという想定のもとに、歩行可能児のみを対象にする。ADL の項目を減らすこと、その分動作時間

の項目を多くすること、臨床検査についてはこれまで通り行うこと、二重盲検試験にすること、症例数によっては Power の概念を導入し薬効判定に役立てたり、期間は 1 年間とすることなどを提案したい。

### 参考文献

- 1) Dubowitz, V., Heckmatt, J. : Management of muscular dystrophy : Pharmacological and physical aspects. *Br. Med. Bull.* 36, 139-144 (1980).
- 2) Brooke, M.H., Fenichel, G.M., *et al.* : Clinical investigation in Duchenne muscular dystrophy : 2. Determination of the "Power" of Therapeutic trials based on the natural history. *Muscle Nerve.* 6, 91-103 (1983).
- 3) 石原傳幸他 : EST 臨床試験, 厚生省新薬開発研究事業「微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬 (E-64) の開発研究」昭和 60 年度研究報告書, 123 (1986) .

# Duchenne PMD に対するベスタチン, ホルフェニシノールの効果

村上 慶 郎\*

共同研究者 岡崎 隆, 林 英人, 斉藤 有, 馬場繁二

## 1. Preclinical Duchenne PMD に対するベスタチンの長期投与の一例

私どもは、ベスタチンを1歳8カ月 Preclinical の時点から44カ月にわたって使用した、Duchenne PMD の一症例について報告する。(本症例は、昭和59年度梅沢班の研究報告の症例のその後の経過である)。

症例は1歳8カ月(初診時)の男子

主訴は一人立ちの遅れ、

家族歴では患児の母親の兄弟に、2名の Duchenne PMD がおり、兄は22歳で、弟は当病院で18歳で死亡している。

現病歴は同胞2人の次男として、満期安産、生下時体重3000g、頸定4カ月、一人すわり7カ月、生後13カ月頃、姉に比し一人立ちが遅れたので、保健所と相談の上本院を受診。

初診時は体重11kg、脈拍100、血圧110/76、歩行は不能であったが、這い這いは可能であった。また、つかまり立ちも可能であった。精神面での遅れは見られなかった。両下腿に仮性肥大をみると、さらに下肢筋力の低下を思わしめた。

検査成績は表1に示す如くで、GOT、GPT、LDH、CKの高値を認めた。特にCKは20000単位を越えていた。

経過では昭和58年6月28日より、ベスタチ

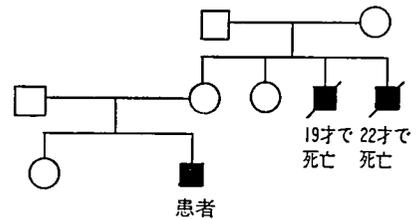
\* 国立療養所箱根病院

## 症 例

患者：1歳8カ月、男性

主訴：一人立ちの遅れ

家族歴：



既往歴：特記するものなし

現病歴：満期安産：

昭和58年6月、保健所の健診で下肢筋力低下、両下腿に仮性肥大、血清CK高値のため6月22日当院受診

外来受診時所見：

体重12kg、脈拍110、血圧100/60  
四肢近位筋筋力低下、両腓腹筋部に仮性肥大、起立はつかまり立ち可能

昭和58年6月27日よりベスタチン60mgより投与開始

図1

ン60mg/day(5mg/kg/day)より開始し、漸増して1500mg/day(100mg/kg/day)にいたり、現在では600mg/day(30mg/kg/day)を投与している。

生後1年9カ月(ベスタチン開始後1カ月)で数歩位歩く様になり、生後2年(ベスタチン開始後7カ月位)で、一人立ち可能となった。(Gower sign陰性)その後1年位で再び登はん性起立をしたり、しなかつたりするようになったが、ベスタ

表 1 検査成績 (初診時)

赤血球	477×10 <sup>5</sup>
白血球	7200
血色素	11.2 g/dl
ヘマトクリット	34.9%
血小板	26.2×10 <sup>5</sup>
GOT	325 I.U.
GPT	241 I.U.
LDH	1276 I.U.
ALP	361 I.U.
LAP	361 I.U.
γ-GPT	4 I.U.
BUN	15 mg/dl
クレアチニン	0.4 mg/dl
CK	20470 I.U.
Total Protein	6.6 g/l
Albumin	72.5%
α <sub>1</sub> -G1	3.2%
α <sub>3</sub> -G1	9.7%
β-G1	9.3%
α-G1	5.3%

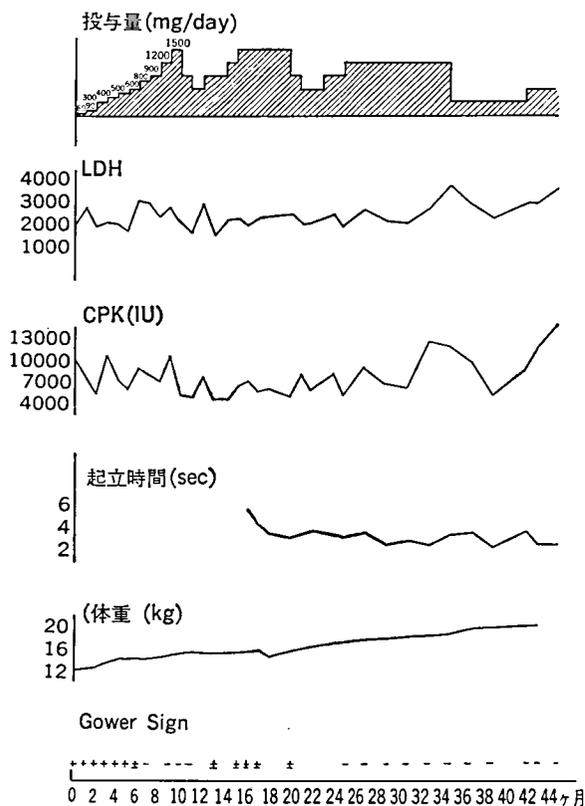


図 2

チン使用開始後 24 カ月 (生後 3 年 6 カ月) 頃より, 手を使用せず起立可能となり現在に至っている。

歩行は最初の頃は waddling gait が著明であったが, 現在ではかなり改善されている。階段はてすりを使用して登る時が多いが, 降りる時は使用しない。

CK, LDH はベスタチンの増量により低下の傾向を示したが, 一度減量して再度繰返して増量した場合は低下の程度は少なくなる傾向にある。

起立時間は投与開始後 16 カ月から測定を始めたが, 最初は 5~4 秒台から現在では 2~3 秒台に減少してきた。

日常生活動作を表わすバーテル指数では開始時 65 点であったのが現在は 90 点と改善を示している。

#### 小括

松下, 辻班員らにより, ベスタチンを発症直後の筋ジス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示されたが, 人では証明されていない。私どものこの成績は 1 例のみで, 自然経過も考えられ, 効果の有無は断定できず, 更に長期間の観察と症例の積み重ねが必要となる。

## 2. Duchenne PMD に対するホルフェニシノール投与について

次に私どもは 10 歳以下で歩行可能な Duchenne PMD の患者 7 例にプロテアーゼインヒビターであるホルフェニシノール (BF-121) を投与してその効果を検討した。

対象は Duchenne PMD の患者 7 例, 年齢 5~9 歳でホルフェニシノールの投与量は 50~150 mg/day (1.5 mg/kg/day~8 mg/kg/day), 使用期間は 24 から 64 週間である。

検査は一般血液, CK を含む血清生化学, 尿検査を行い, 更に立上がり時間などの運動機能を含

Duchenne PMD に対するベスタチン, ホルフェニシノールの効果

表 2 Duchenne 型筋ジストロフィー症に対する BF-121 の効果

No.	症例	年齢(開始時) (歳)	体重(開始時) (kg)	投与量 (mg/day)	投与期間	CK の動き (unit/l)	起立時間の動き (秒)	効果	副作用
1	N. T.	8	26	50→100	48週	10840→5185	3.92→5.22	進行	—
2	D. I.	8	25	50→100	40	8962→8995	2.28→3.60	進行	—
3	K. K.	9	32	50→150	56	3898→2774	16.15→不能	進行	—
4	K. M.	6	20	50→100	44	14630→11095	5.92→10.85	進行	—
5	S. O.	5	18	50	24	7314→7911	4.84→3.89	—	—
6	H. K.	7	24	50→150	48	14750→5976	3.56→7.69	進行	—
7	A. S.	7	19	50→150	64	8660→6044	4.41→6.47	進行	—

む臨床症状をチェックした。

結果

1例に歩行不能になったものを除いて、残り6例は歩行可能であった。立上がり時間は1例を除いて増加した。血清CK等の酵素値は投与後、1時減少したが、その後は増加するものが多く見られた。その他の血清生化学、電解質、一般血液、尿検査では、特に薬物によると思われる変動は見られなかった。

小括

本研究は preliminary の研究であるので効果

について断定は出来ないが、5歳の症例を除いては症状はいずれも多少の差は有るが、進行していた。しかし、これらの進行した例でも、全く無効とはいいたくない面もあり、特に患者の両親は薬の使用により、運動が活発になった等のことを述べるものも多く、又薬の使用により感冒にかかり難くなったなどと申し述べる場合もあり、このような点からも検討の必要があり、更に症例の増やし、薬用量、患者の年齢についてもベスタチン同様若年者に就いての検討が必要である。

# ベスタチンの臨床使用経験について

三吉野 産 治\*

共同研究者 江田伊勢松\*, 田上昭人\*, 三瀬 浩\*, 日高 健\*, 吉田祐三\*, 守田和正\*, 小堀良治\*

## はじめに

今回当院において Duchenne 型筋ジストロフィー症（以下 DMD と略す）6 名についてベスタチンの盲検試験を行ない若干の知見を得たので報告をする。ただし本研究の盲検試験の結果は全国集計がなされ、全体としてのデータは既に出ているため、本文は当院の個々の症例の動きを中心に述べる。又この研究の効果判定を行なう際に若干の注目すべき点があり、その点についても述べていく。

## 症 例

表 1 は今回のベスタチン服用、非服用を含めた 6 名の患者のリストである。服用患者の症例 1 お

よび症例 3 は以前よりベスタチンを服用しており若干の空白期間はあるも長期服用症例である。診断はいずれも DMD であり、診断に問題はない。

## 結 果

以下今回得られた多くの判定項目の中から、データの一部を記載する。

図 1 は血清 CPK の動きをみたものである。●はベスタチン服用、○は非服薬の症例である。○の 2 症例の CPK 値がしだいに落ちているが、残りの 1 人は高い変動を示しており、服薬、非服薬群の差はないと思われる。

同様に図 2 は血清 GPT の変化を示したものである。CPK 値同様に両者間の差はない。血清 GOT, LDH 値も同様であり、やはり両者間に差

表 1 症例の一覧表

	治験番号	生年月日	診察区分
●ベスタチン投与群			
症例 1 (Y. T)	7 B 組 1 番	53. 10. 27	外来
症例 2 (S. O)	7 B 組 5 番	54. 10. 19	外来
症例 3 (T. T)	7 B 組 4 番	55. 9. 20	入院
○ベスタチン非投与群			
症例 4 (T. E)	7 B 組 2 番	53. 2. 21	入院
症例 5 (Y. G)	7 A 組 1 番	56. 8. 25	外来
症例 6 (H. K)	7 B 組 3 番	53. 2. 15	入院

\* 国立療養所西別府病院

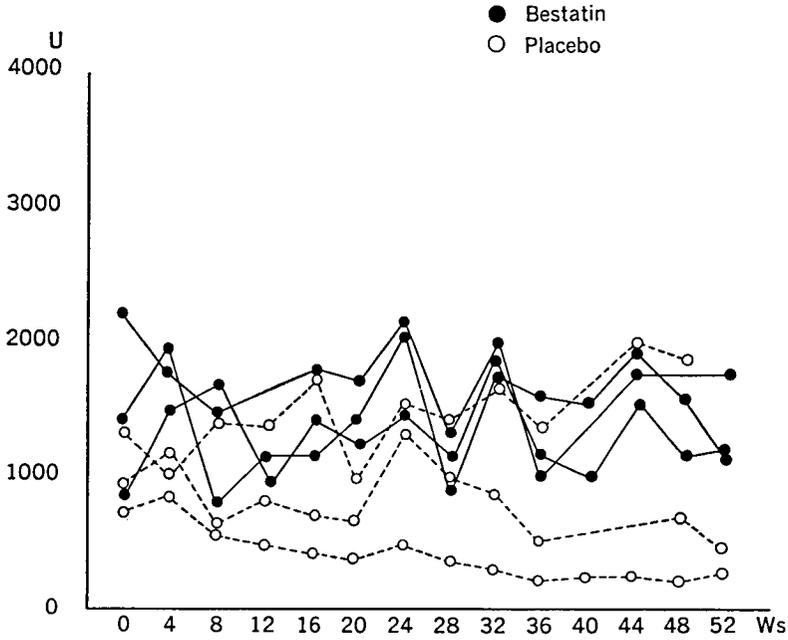


図 1 CPK の動き

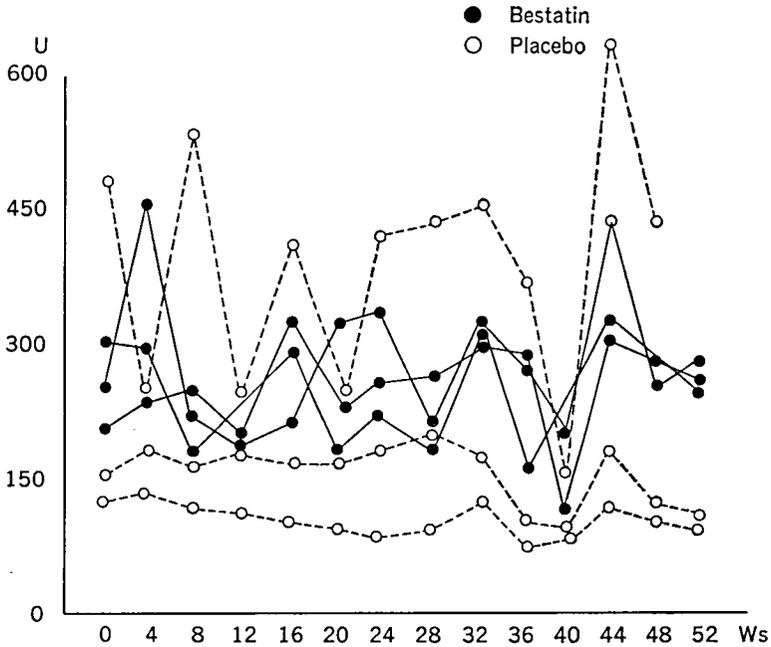


図 2 GPT の動き

はなかった。ただ図 1, 図 2 の全体の変動からもわかるように、ベストアチンの服用、非服用にも関係なく、各血清逸脱酵素の高い時と低い時が一致する傾向にあった。検査室での精度管理は実施し

ており、又採血も外来又は病棟では同時に実施しているも、採血から血清分離の時間、分離から活性測定までは厳密に管理しておらず今後の注意点としたい。

ベスタチンの臨床使用経験について

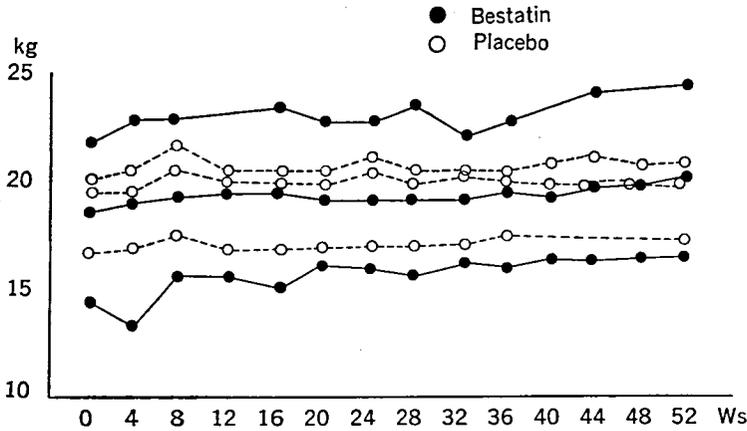


図3 体重の変化に関して

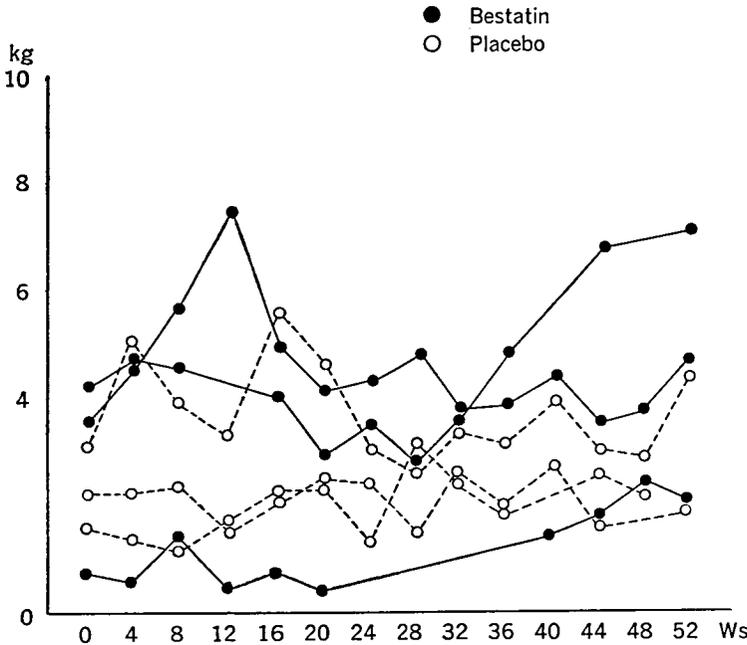


図4 握力に関して

図3, 図4は体重および握力の変化を示した図である。体重はこの年齢の子はベスタチン服用, 非服用にかかわらず自然に増加するようである。握力にも両者間の差はない。図5, 6, 7は20m走行, 仰臥位から坐位, 階段昇りの変化を示す図である。いずれもやはりベスタチン服用, 非服用間の差はないものと思われる。

以上今回のベスタチンの服用, 非服用両者の一部のデータを一時的に述べた。その他の項目の

データでもこの少ない症例では両者間の差で目につくものはないと思われた。ただ今回われわれは偶然にも, 6名の患者の理解度いいかえれば患者の精神発達の程度が割りと良好なる3名, 不良なる3名の2群に分けられることに気づき, 今まで示してきたデータの一部分をこの2群に分け比較検討したのでその結果を以下に示す。

表2は先の表1の患者を精神発達の程度に大きく2つに分けたものである。●は精神発達良好

表 2 症例の一覧表

	生年月日	診察区分	精神発達
●理解良好群			WISC-R
症例 1 (Y. T)	53. 10. 27	外来	I Q (63)
症例 2 (S. O)	54. 10. 19	外来	I Q (82)
症例 6 (H. K)	53. 2. 15	入院	I Q (80)
○理解不良群			遠城寺式
症例 3 (T. T)	55. 9. 20	入院	D Q (29)
症例 4 (T. E)	53. 2. 21	入院	D Q (34)
症例 5 (Y. G)	56. 8. 25	外来	D Q (39)

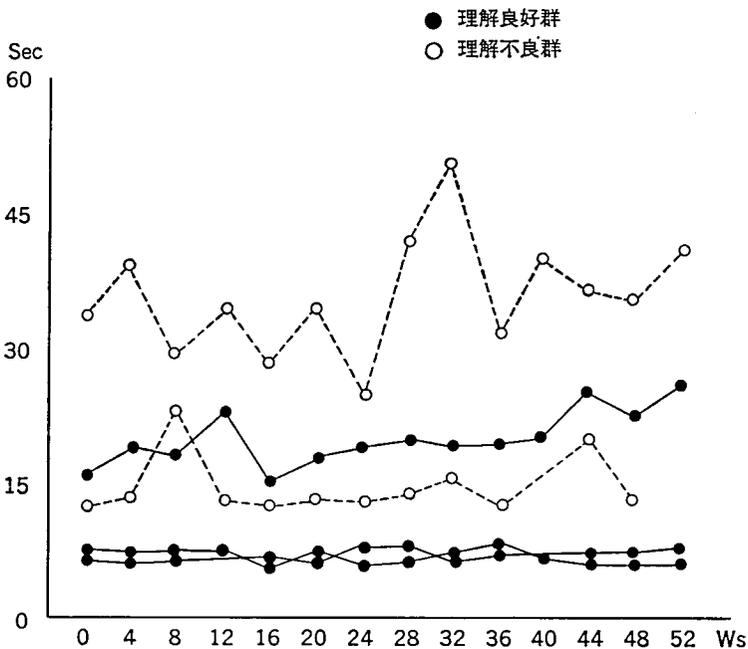


図 5 20 m 走行に関して

群であり、その IQ は表の右に示してある。○は精神発達不良群であり、WISC-R にて IQ は測定不能 (IQ 40 以下に相当) であるため DQ を右に示してある。以下先に示したデータの一部をこの両者に分けて示していく。

図 8, 9 は CPK, GPT の血清中の変化を示したものである。理解良好群、理解不良群の両者間の差はないと思われる。同様に図 10, 11 に示す体重の変化、握力の変化にも両者間に差は認められない。

図 12 は仰臥位から坐位への時間を表わしたものである。これをみると理解良好群と理解不良群の間にやや差がみられ、不良群で示した個々の症例の差が (変動が) 週ごとで激しい傾向がみられる。不良群でもっともこの時間の短い症例の変動は図でみる限り少ないようにみえるが、実際は測定不可能な週がいくつかみられ、この値を実際この症例にあてはめていくと、理解不良群は 3 名とも変動の激しいものになってしまう。

図 13 は 20 m 走行の変化を、図 14 は階段昇

ベスタチンの臨床使用経験について

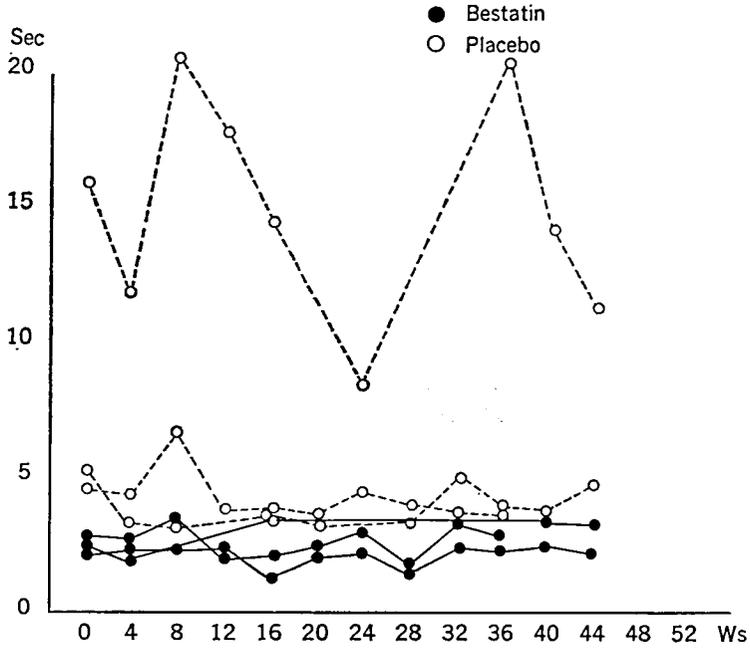


図 6 仰臥位→坐位に関して

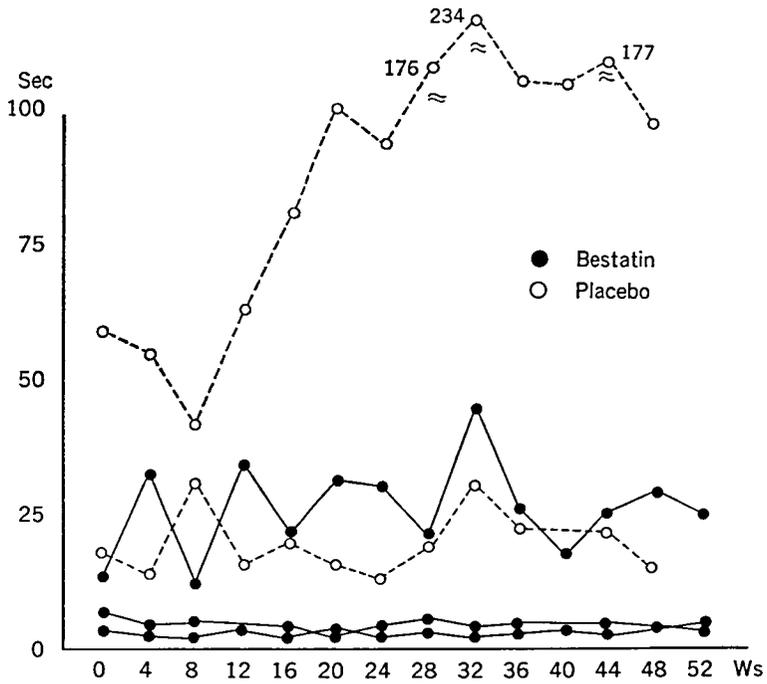


図 7 階段昇りに関して

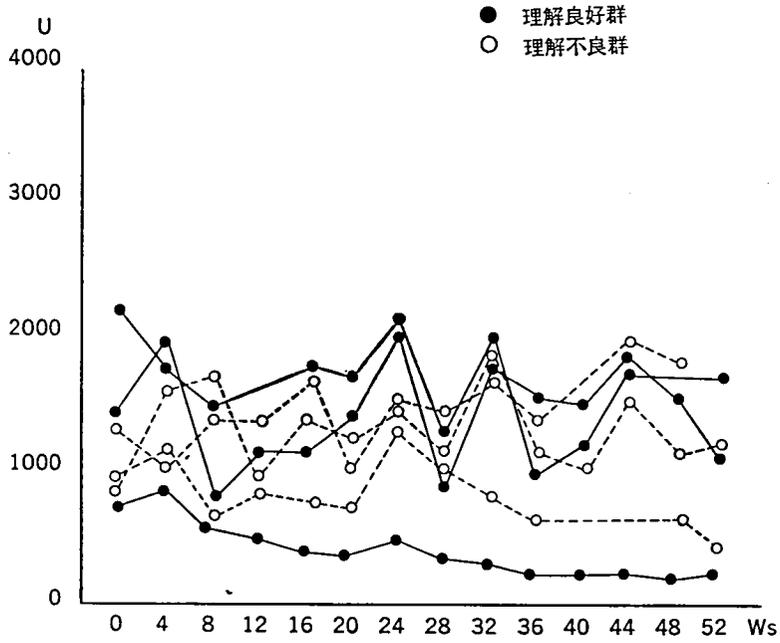


図 8 CPK の動き

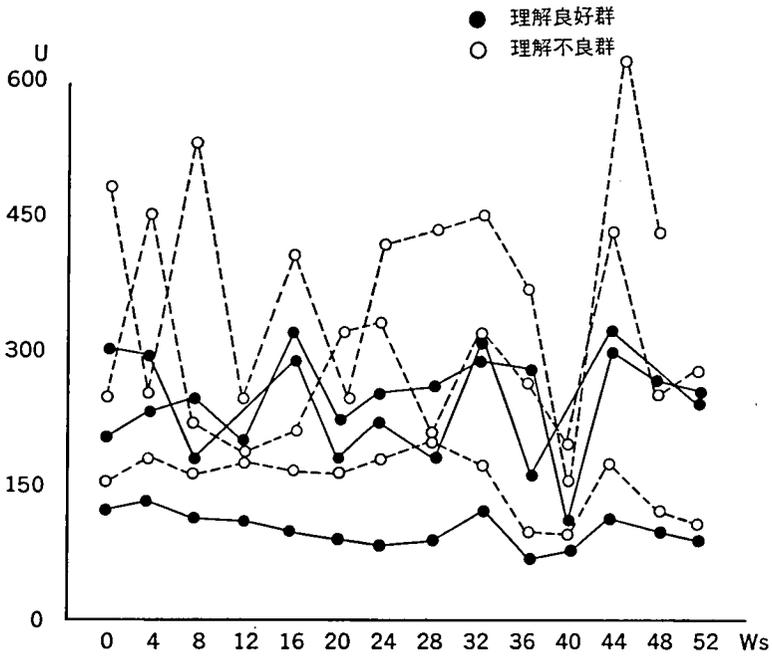


図 9 GPT の動き

ペスタチンの臨床使用経験について

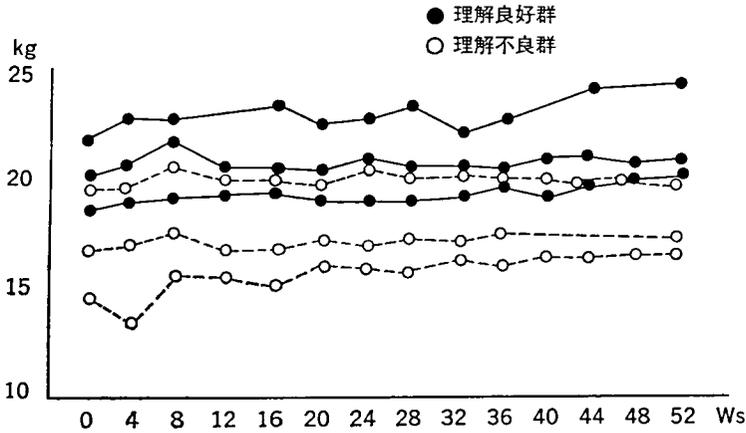


図 10 体重の変化に関して

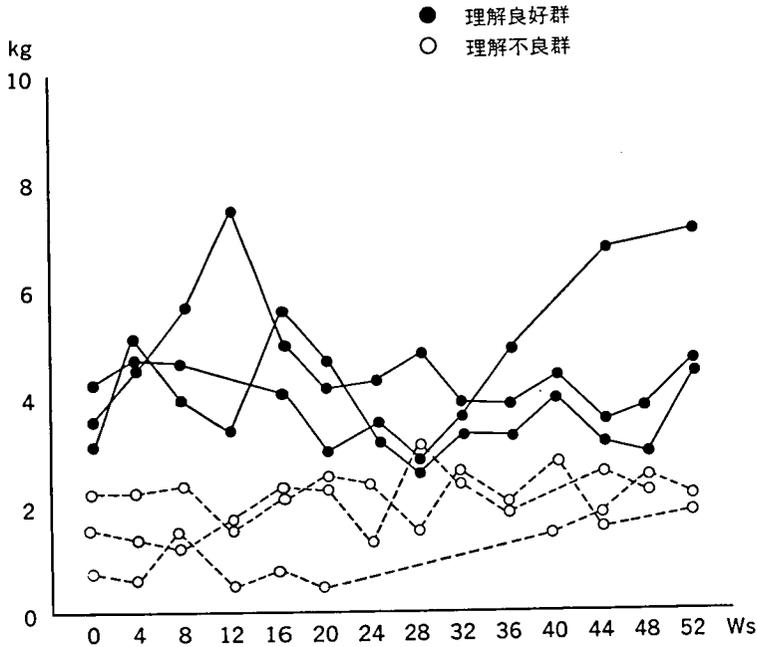


図 11 握力に関して

りの変化を示したものである。これらの2つの図は理解良好群と不良群の差を如実に示しており、良好群（内1名は歩行不能のため2名となっている）は極めて変動が少なく、不良群は各々のデータの週ごとのバラツキが多くなっている。

考 案

以上 DMD 6名の盲検試験の結果を述べてきた。ペスタチン服薬、非服薬という点からみれば、

この少ない症例数では結論が出ず、全国的集計がまたれる。

又われわれは今回の判定表の中で患児の精神発達の程度が多少なりとも影響することがあるのではないかという可能性について述べた。このことは DMD にこのような項目をするのは無意味といっているのではなく、判定する際に各検査項目に対する患者の理解度を把握しておく必要があるのではないかということである。61年度の厚生省

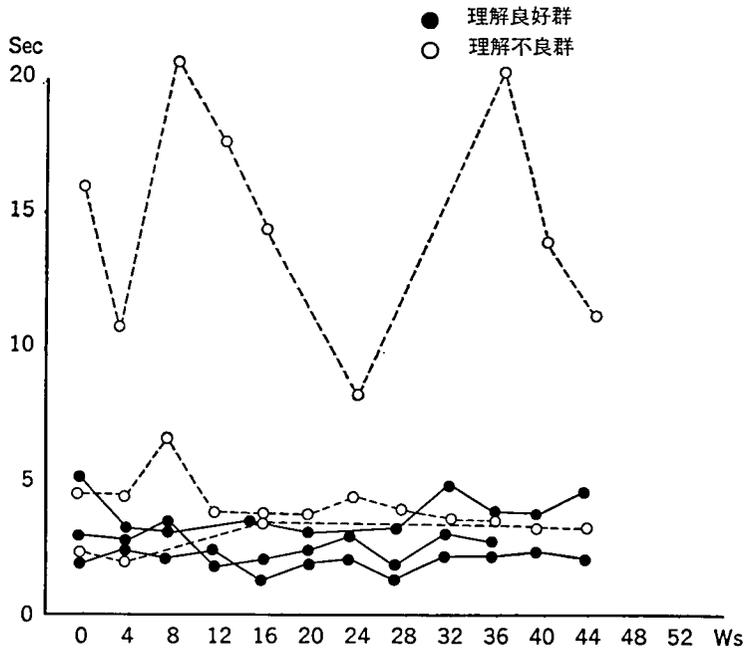


図 12 仰臥位→坐位に関して

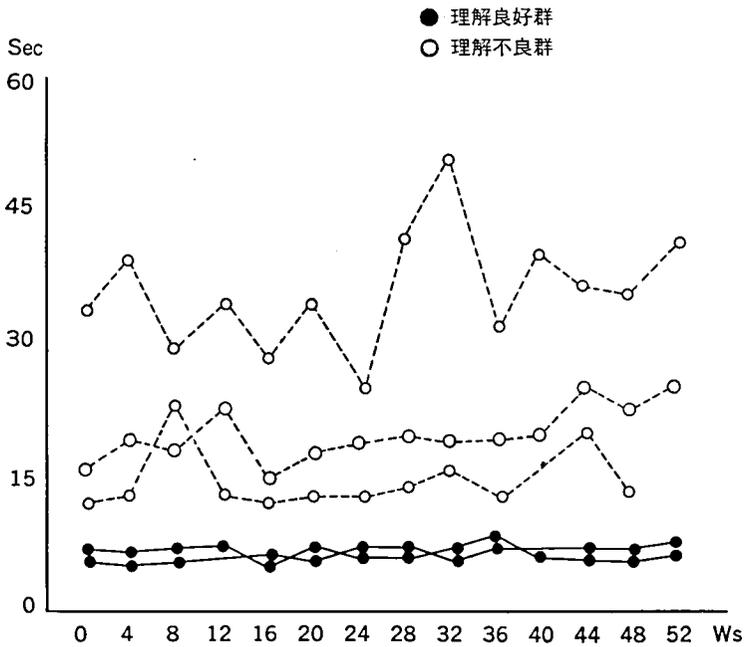


図 13 20 m 走行に関して

ベスタチンの臨床使用経験について

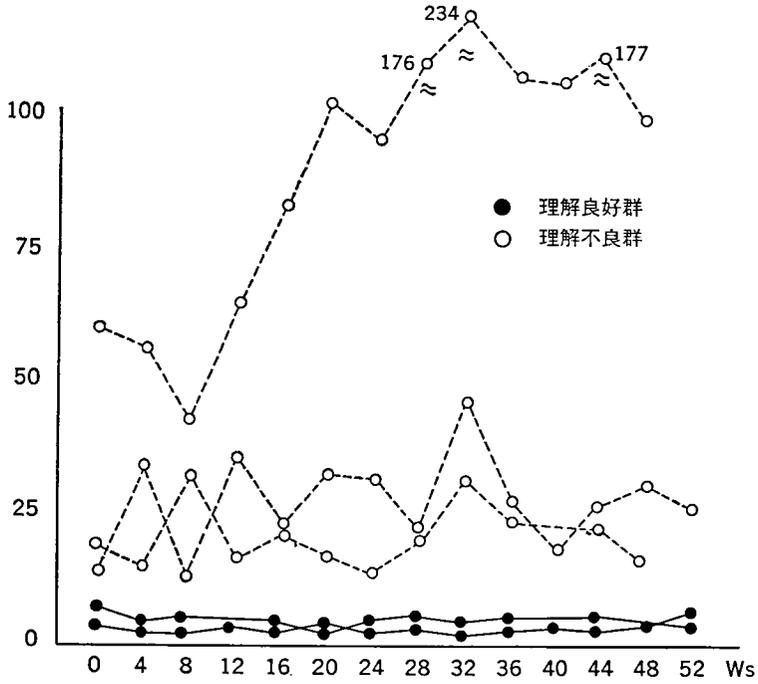


図 14 階段昇りに関して

筋ジス班会議でも、DMD に知的障害を合併する症例が多く存在することは既に衆知の事実であり、われわれの症例のみが特殊ではないと考える。ただ知的障害の程度が軽症で理解良好でも、重度で不良であっても DMD ということには変りな

く、今回の全国集計のごとくそれらを全体としてとらえることはもちろん必要である。さらに知的障害の程度により各項目を再評価することもまた必要なことかもしれないと思われた。



## Case 1 (1y5m, I-1)

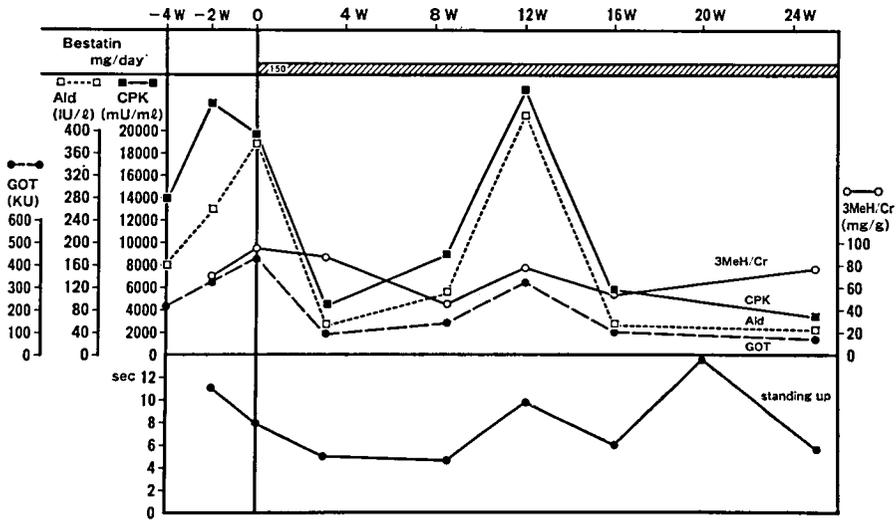


図 1 Case 1 の臨床経過

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なった。尿 3 MeH/Cr 比は日本化薬株式会社の御協力により、相互生物医学研究所で NIN 法<sup>1)</sup>により測定をしていただいた。患児は、採血日前日の肉魚等の摂取を控えるようにして、尿は外来にて一回採尿を行なった。

臨床評価は、各運動機能所要時間(20 m 走行、階段昇降、起立、起坐、寝返り)の測定および、運動機能、筋力の変化について、問診および診察により評価した。

### 2) ベスタチンまたは placebo の1年間継続投与例

5例のベスタチン投与と、5例の placebo 投与の single blind 方式で行なった。投与方式は表のように同量固定法で1年間継続投与し、検査は尿中 3 MeH-Cr 以外は上記と同様、臨床評価も同様に行なった。

## 結 果

### 1) ベスタチンの尿中 3 MeH/Cr 比への影響

3例共ベスタチン初回投与である。臨床的には Case 1 が、使用開始 3~8.5 週において転びに

く、活発になったとの印象である(図 1)。同時に立ち上がり時間の短縮と血清酵素値の低下を認めた。しかし、何ら原因なく、12 週では血清酵素値の著明な上昇と立ち上がり所要時間の延長がみられた。尿中 3 MeH/Cr 比は 3.5 週において、placebo 投与時より低下し、12 週で増加している。この症例では尿 3 MeH/Cr 比は経過中、血清酵素および立ち上がり所要時間の変動と同じような変動を示していた。Case 2 は臨床的には緩徐な進行を示し、20 m 走行、立ち上がり所要時間の軽度な延長を認めた(図 2)。血清酵素値の変動は Case 1 ほど著明ではなかった。尿中 3 MeH/Cr 比は Case 1 と同程度の変動を示したが、臨床像、血清酵素の動きとの関連は明らかではなかった。Case 3 ではベスタチン使用前にすでに血清酵素も 2,000~14,000 台と変化がみとめられ、尿 3 MeH/Cr 比、臨床評価も同じように変動した(図 3)。ベスタチン使用開始後 4 週に血清酵素値は低下し、立ち上がり所要時間が短縮したが、尿 3 MeH/Cr 比はむしろ上昇していた。臨床的には徐々に運動所要時間の延長があり、血清酵素値の変動は Case 1 ほどではなかった。

尿中 3 MeH/Cr 比をこれら 3 例でグラフにし

Case 2 (6y0m, II-13)

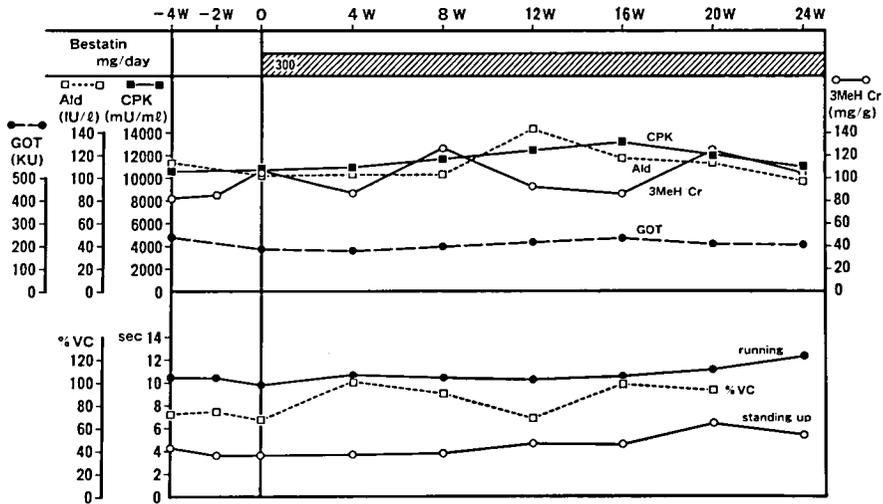


図 2 Case 2 の臨床経過

Case 3 (7y6m, II-14)

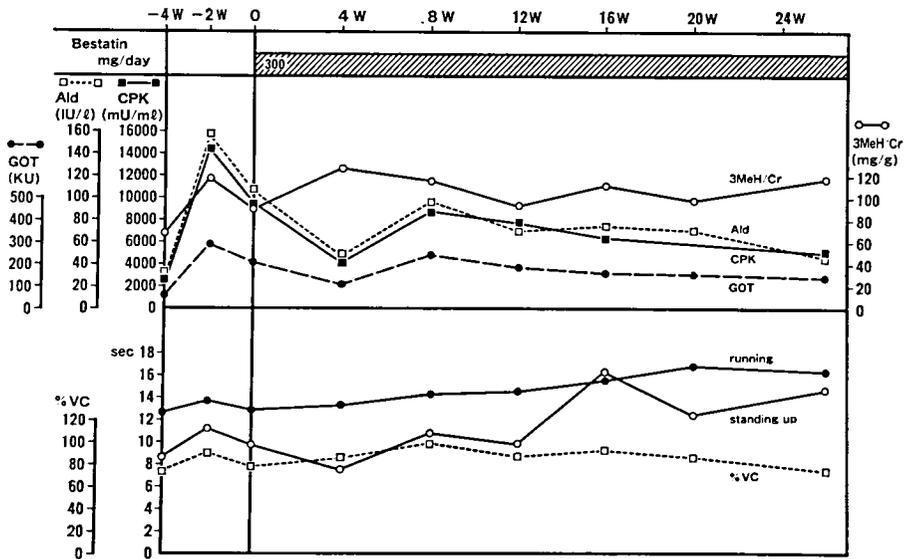


図 3 Case 3 の臨床経過

てみると図 4 のように、全例で、既に述べられている正常値より高値を示していた。各々の症例の回帰直線を比較すると、ベスタチンは使用後、年長の Case 2, 3 に対し 1 歳 5 カ月の Case 1 では低下傾向があった。さらに placebo 投与期間中と、ベスタチン投与期間中において、それぞれ尿 3 MeH/Cr 値の平均値と標準偏差を各々の症例で比べると (図 5)、Case 1 では placebo 投与

中よりベスタチン投与中の方が低下していたが、Case 2, 3 ではベスタチン投与後、尿中 3 MeH/Cr 比は増加した。しかし、これらの間に有意差はなかった。

2) ベスタチンの 1 年間継続投与による影響

登録時 4 歳以下のベスタチン投与 2 例, placebo 投与 2 例, 5 歳以上のベスタチン投与 3 例, placebo 投与 3 例の計 10 例で検討した。

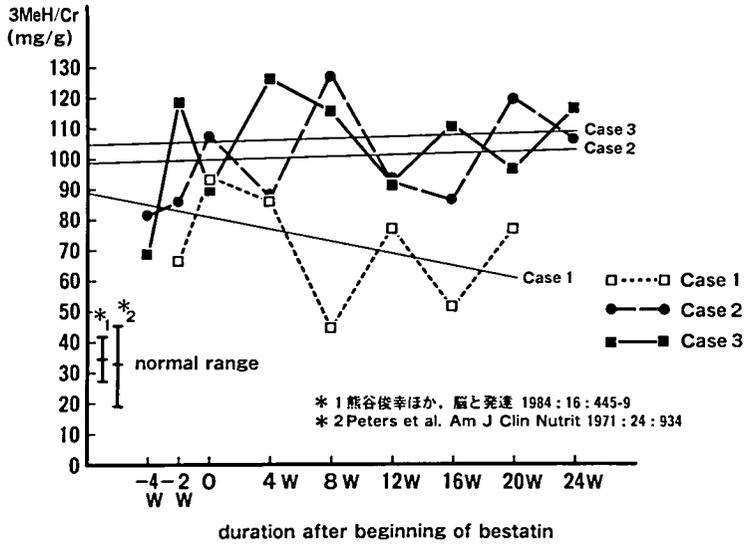


図 4 Bestatin 投与による尿中 3 MeH/Cr の変化  
図の中の直線は回帰直線をあらわす

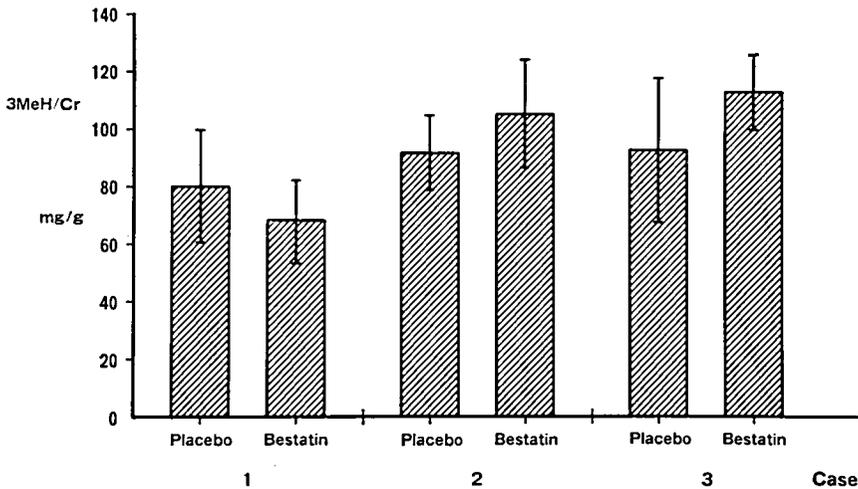


図 5 Placebo 投与と Bestatin 投与による尿 3 MeH/Cr の変化

① 20 m 走行所要時間 (図 6) : 4 歳以下の例で, ベスタチン投与群 (B 群) も placebo 投与群 (P 群) も時間経過と共に改善傾向を示した. ベスタチン投与後初期に B 群特に Case 5 において短縮が著しかった. 1 年間の効果を P 群, B 群で比較すると著明な差は認めなかった. 5 歳以上では, 同じ運動機能レベルによる患児 2 例を比べると, Case 7, 12 が stage III であり, ベスタチン投与の Case 7 の方がむしろ遅くなっていた. Case 8 と Case 13 は stage II-14 であるが, ベスタチン投与をうけた Case 8 の方が 24 週目

以降, 所要時間の延長の程度は少ない. Case 9 (5 歳 0 カ月, stage II-15, ベスタチン投与例) と Case 11 (5 歳 1 カ月, stage II-14, placebo 投与例) の 2 例を比べると開始前にむしろ運動機能レベルのよかった Case 11 よりも, ベスタチン投与をうけた Case 5 の方が 8 週目より逆転して 20 m 走行時間の短縮を示し経過している.

(2) 立ち上がり所要時間 (図 7) : 4 歳以下では, B 群, P 群とも 1 年間に著明な改善も悪化も認められなかった. 5 歳以上では, P 群の 1 例 Case 12 は投与前より 78.5 秒かかり, 12 週以降立ち

Duchenne 型筋ジストロフィー症に対するベスタチンの使用経験

20 m 走行所要時間 (4 歳以下)

20 m 走行所要時間 (5 歳以上)

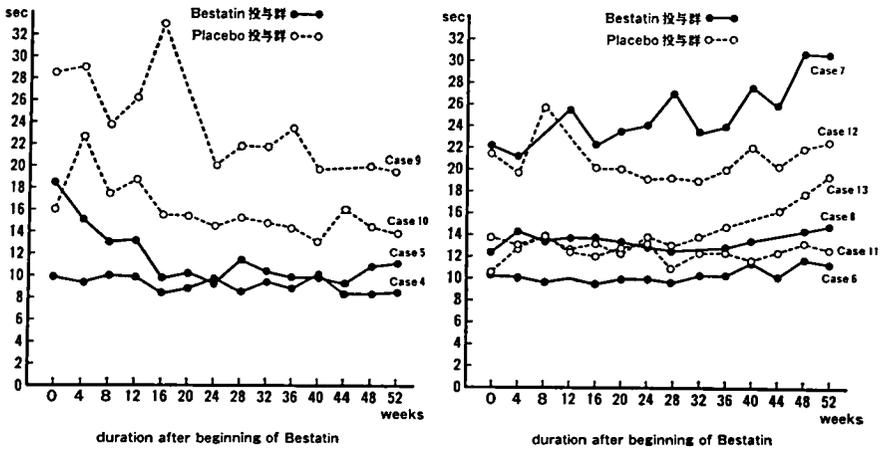


図 6 Bestatin 投与群, Placebo 投与群の運動機能評価 (20 m 走行所要時間)

立ち上がり所要時間 (4 歳以下)

立ち上がり所要時間 (5 歳以上)

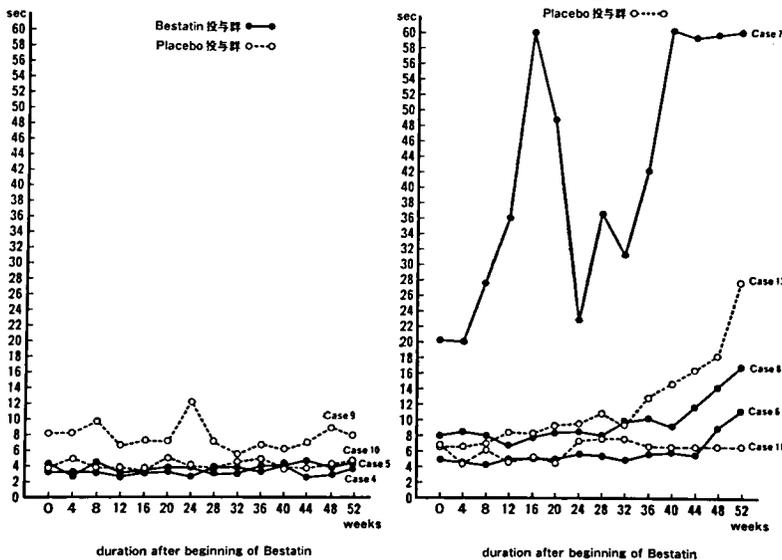


図 7 Bestatin 投与群, Placebo 投与群の運動機能評価 (立ち上がり所要時間)

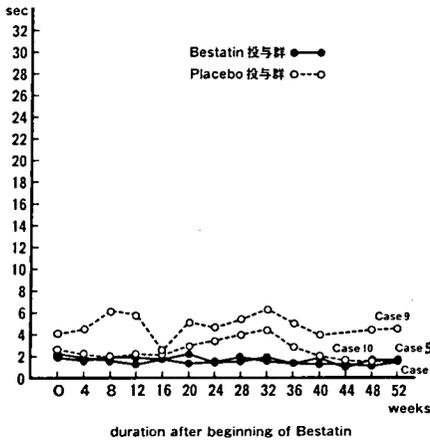
上がりは不能となった。ベスタチン投与例, placebo 投与例とも経時的に立ち上がり所要時間の延長が認められた。改善例は 1 例もなかった。

③ 起坐所要時間 (図 8) : 4 歳以下では, 使用前よりベスタチン投与群は placebo 投与群より低値を示していたが, 1 年間終始 P 群より低値であった。5 歳以上では, 同じ運動機能レベルを有する症例どうしを比較すると, stage II-14 の Case 8

と Case 13, stage III の Case 7 と Case 12 で, ベスタチン投与をうけている Case 8, 7 の方が起坐所要時間は短い傾向があったが, これは投与前値でも同様であり, ベスタチンの効果と断定することはできない。

④ 血清 CPK 値 (図 9) : 4 歳以下では Case 4 が著明に変動し, placebo 群を下まわる低値を示す場合が 6 回, 上まわる高値をしめす場合が 3 回

起坐所要時間(4歳以下)



起坐所要時間(5歳以上)

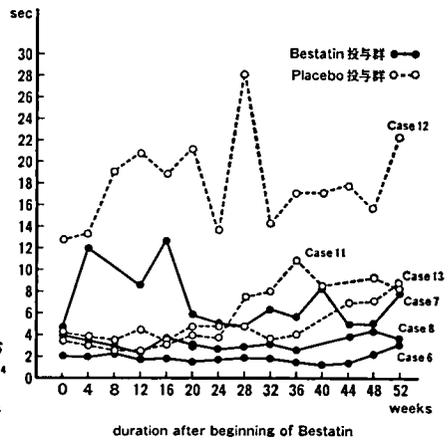
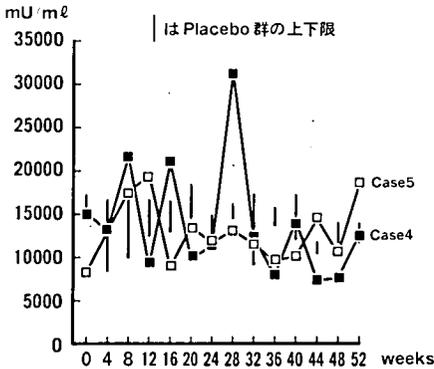


図 8 Bestatin 投与群, Placebo 投与群の運動機能評価(起坐所要時間)

Bestatin 投与による CPK の変動(4歳以下)



Bestatin 投与による CPK の変動(5歳以上)

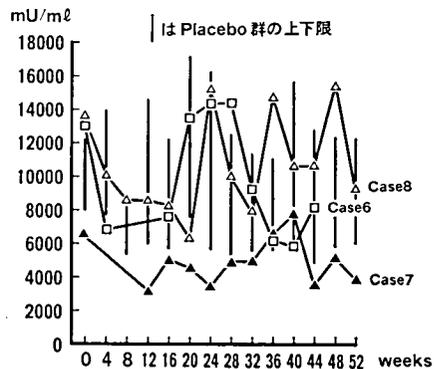


図 9 Bestatin 投与による CPK の変動

みられた。Case 5 も変動を示し、P群の下限以下を示した場合は8回、上限以上を示した場合は4回みられた。5歳以上の症例では、Case 7 で経過中 CPK はP群より低値を示しており、Case 6, 8 ではP群と同様の動きを示す傾向にあった。

ベスタチン投与全期間の CPK 値の平均値と標準偏差を示すと(図 11-a), 平均値は4歳以下, 5歳以上ともB群, P群で有意差はなかった。しかし標準偏差に関しては、4歳以下のベスタチン投与群で変動が大きい傾向にあった。5歳以上では、ベスタチン投与, placebo 投与にかかわらず、CPK が高い例は変動幅も大きい傾向にあった。

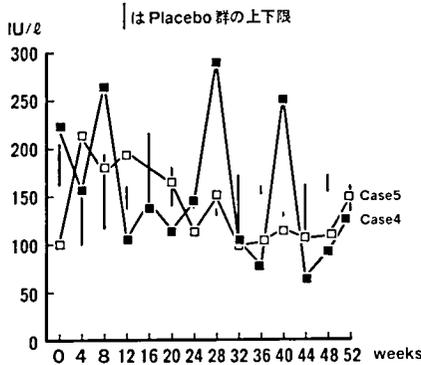
⑤ Aldolase (図 10) : 4歳以下では、CPK と同様の傾向があった。

5歳以上では、Case 6 が終始P群より高い値を示す傾向にあったが、有意ではなかった。Aldolase の変動幅は(図 11-b), 4歳以下のベスタチン投与例で大きい傾向にあった。平均値は4歳以下, 5歳以上ともB群, P群の間で有意差はなかった。

副作用

Case 2 において、経過中1回/2週位の頻度で腹痛を訴えることがあった。特に腹部の局所所見なく、プロトコル終了後にベスタチンを中止し

Bestatin 投与による Aldolase の  
変動(4歳以下)



Bestatin 投与による Aldolase の  
変動(5歳以上)

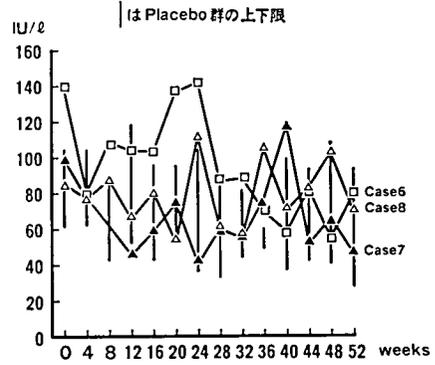
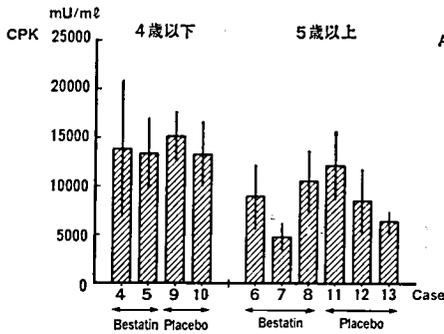


図 10 Bestatin 投与による Aldolase の変動

a. Bestatin 投与, Placebo 投与による血清  
CPK の変動



b. Bestatin 投与, Placebo 投与による血清  
Aldolase の変動

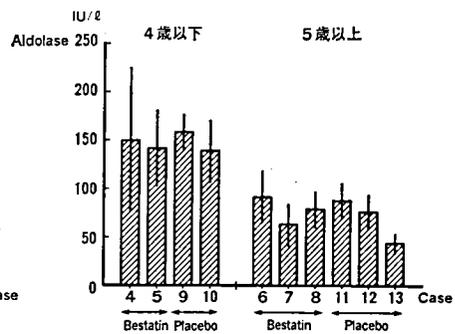


図 11 Bestatin 投与, Placebo 投与による血清酵素の変動  
a. CPK, b. Aldolase

た後も、症状は継続し、ベストチン以外の原因が考えられた。その他には、ベストチンによる副作用と考えられる異常は認められなかった。

### 考 察

ベストチン投与中の尿中 3-メチルヒスチジンの測定は、従来 1 日蓄尿で行ない<sup>2,3,4,5)</sup>、小児で外来で行なうのに、困難な事も多い。今回われわれは 1 回採尿法を 3 例のベストチン新規投与患者でおこない、3 MeH/Cr 比を調べた。全例で 1 日蓄尿時の正常範囲より高値を示していた。また、ベストチン投与により、1 歳 4 カ月の例では placebo 投与中より低下する傾向がみられ、6 歳 0 カ月、7 歳 6 カ月の 2 例では placebo 投与中よ

りむしろ増加する傾向にあった。また、臨床経過、血清酵素値の変動と同様に変動する傾向もあった。さらに 1 日蓄尿と 1 回採尿の比較を行ない、外来において施行可能な簡易法として検討する価値はあるとの印象をうけた。

1 年間の single blind 法によるベストチンの効果は、臨床的には placebo 群の運動機能との差は明確ではなかった。血清 CPK, Aldolase などの酵素値は、ベストチン投与群の方が変動が著明な印象をうけたが、必ずしも低値を示すだけでなく、placebo より高値を示すこともあった。アミノペプチダーゼ B および、ロイシンアミノペプチダーゼ活性を拮抗阻害する作用を有するベストチンは筋線維膜の表面に結合し、筋の崩壊を予防

するのではないかと考えられている。ベスタチンを投与した4歳以下の2症例の血清酵素値の変動が著明なことから、ベスタチンの筋線維膜に対する保護作用の存在との関連性は不明である。血清酵素値の変動が、発育による運動機能の獲得段階にある低年齢群における、ベスタチン投与による変動なのか、または単なる個体差なのかという検討には、今後の低年齢群の全国的な症例の蓄積が必要であると考えらる。

### 結 語

- 1) 7歳以下のDMP 13例に対してベスタチンを経口投与し、検討した。
- 2) 尿中3-MeH/Crは、3例で測定した。1歳5カ月の例でplacebo投与期間中よりベスタチン投与期間中の方が低下する傾向にあった。また6歳0カ月、7歳6カ月の2例ではむしろ増加する傾向にあった。
- 3) 1年間のsingle blind法によるベスタチンの効果は、臨床的にはplacebo群との差は明確

ではなかった。血清酵素値は4歳以下のベスタチン投与群で変動が著明な傾向があり、必ずしも低値を示すだけではなく、placebo群より高値を示すこともあった。

### 文 献

- 1) Berridge, B.J. Jr., Chao, W.R. and Peters, J.H.: Analysis of plasma and urinary amino acids by ion-exchange column chromatography. *J. Clin. Nutr.* 24, 934 (1971).
- 2) Elia, M., Carter, A., Bacon, S., Wineals, C.G. and Smith R.: Clinical usefulness of urinary 3-methylhistidine excretion in indicating muscle protein breakdown. *Br. Med. J.* 282, 351-4 (1981).
- 3) 熊谷俊幸, 竹内達生, 原紀美子他: 小児神経疾患の尿中3-メチルヒスチジン, 脳と発達 16, 445-9 (1984).
- 4) Ballard, F.J., Tomas, F.M. and Stern, L.M.: Increased turnover of muscle contractile proteins in Duchenne muscular dystrophy as assessed by 3-methylhistidine and creatinine excretion. *Clin. Sci.* 56, 347-52 (1979).
- 5) Mussini, E., Cornelio, F., Colombo, *et al.*: Increased myofibrillar protein catabolism in Duchenne muscular dystrophy measured by 3-methyl histidine excretion in the urine. *Muscle Nerve.* 7, 388-91 (1984).

# Duchenne 型進行性筋ジストロフィーに対する ベスタチンの効果

木下 真 男<sup>1)</sup>

共同研究者 里吉栄二郎<sup>2)</sup>, 福山幸夫<sup>3)</sup>, 三吉野産治<sup>4)</sup>, 村上慶郎<sup>5)</sup>

ベスタチンが筋疾患の治療薬として有効であることは動物実験で確かめられている<sup>1)</sup>が、ヒトでは未だ正確なデータはない。われわれは従来から種々の筋萎縮症疾患に本剤を用いて来たが、最近の共同研究では<sup>2)</sup>, Duchenne 型筋ジストロフィー患者のうち若年者に有効性が示唆されたので、今回、同症若年者に限定して本試験を実施した。

## 1. 方 法

表 1 に示す 15 施設の外来及び入院 Duchenne 型筋ジストロフィー患者を対象とした。試験開始時 5 歳未満を A 群, 5~8 歳未満を B 群とし、両群共に対照群と実験群に分けた。種々な条件を設けて対象としての適格性を検討の後、登録センターにおいて番号順に実験群, プラセボ群に分けた。実験群には A 群に対して 1 日 150 mg, B 群に対して 1 日 300 mg を 3 回に分服投与し、対照群には外観, 味, においなどの識別不能な剤型とした乳糖を投与した。研究期間は 52 週間とし、そのうち 40 週間までの成績が本報告書に集計された。

効果を判定する調査項目としては、運動能, 筋力, 血清酵素値など図 1 に示す調査表を用いた。

表 1 研究参加施設

施 設 名	研究担当者
国立療養所八雲病院	南 良二
国立療養所西多賀病院	佐藤 元
国立精神・神経センター	里吉栄二郎
東邦大学医学部附属大橋病院第四内科	木下 真男
東京女子医科大学病院小児科	福山 幸夫
国立療養所箱根病院	村上 慶郎
国立療養所中部病院	祖父江逸郎
国立療養所鈴鹿病院	飯田 光男
国立療養所刀根山病院	姜 進
国立療養所宇多野病院	西谷 裕
国立療養所原病院	亀尾 等
国立療養所徳島病院	松家 豊
国立療養所西別府病院	三吉野産治
熊本大学医学部附属病院小児発達科	三池 輝久
鹿児島大学医学部附属病院第三内科	井形 昭弘

## 2. 成 績

9 カ月終了の時点で表 2 に示す症例数となっている。これらについての年齢, 症状, 既往歴, 併用薬, 合併症, 発育歴などの背景因子はいずれも対照群, 実験群の間で有意差のないことが確認された。

試験期間中の調査項目の変動については、詳細は省略し、概略のみを示す。試験開始時を 0 とした場合の その後の 変化を主な 所見について表すと、図 2~4 のようになる。

有意な改善を示したのは A 群のみで、階段昇り姿勢, 降り姿勢, 上腕三頭筋, 橈骨, 膝蓋などの

<sup>1)</sup> 東邦大学  
<sup>2)</sup> 国立精神・神経センター  
<sup>3)</sup> 東京女子医科大学  
<sup>4)</sup> 国立療養所西別府病院  
<sup>5)</sup> 国立療養所箱根病院



Duchenne 型進行性筋ジストロフィーに対するベスタチンの効果

表 2 登録及び解析症例数

	A群 5歳未満 50 mg×3/日投与		B群 5歳～8歳未満 100 mg×3/日投与		A群+B群	
	ベスタチン	プラセボ	ベスタチン	プラセボ	ベスタチン	プラセボ
登録症例	25	27	35	40	60	70
9ヶ月中間解析症例	25	27	35	40*	60	67

\* 途中脱落1例をふくむ。

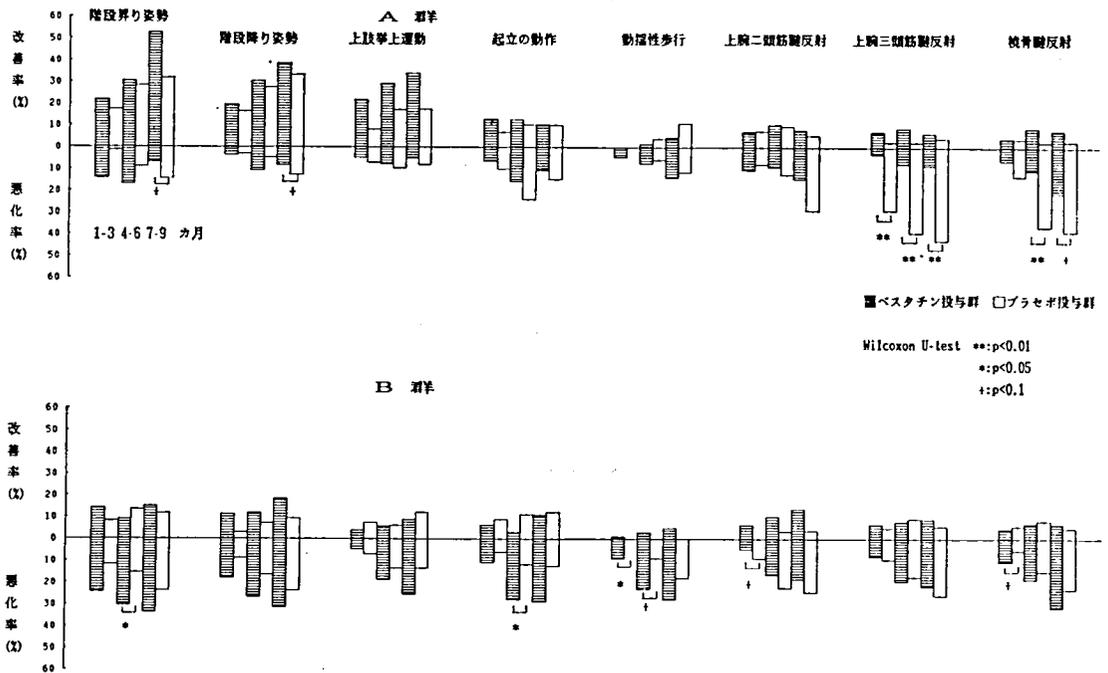


図 2 臨床所見の変化 (1)

腱反射，頸筋背屈，股関節屈曲，同伸展など 24 項目中 8 項目で対照群に優る成績が見られた。しかし足関節の筋力は特に底屈において悪化が見られた。これに対して B 群では起立動作，動揺性歩行，橈骨腕反射，肘関節伸展，手関節屈曲，股関節屈曲，同伸展，膝関節屈曲，同伸展など 9 項目で一時的あるいは最終調査時点で対照群に劣る結果が出ている。また諸検査数値の変化としては図 5～8 に示す通りで，有意差としては 20 m 直進走行時間，階段昇り時間，同降り時間，仰臥位から座位への時間などいずれも A 群で対照に優る結果を示している。B 群ではこれらに大きな変化は

ないが，血清 LDH 及び CPK 活性で対照群より低値を示している。

副作用としては僅かに消化器症状を示す例があったが (表 3)，全体としては重篤なものはなく，本剤の安全性にはとらえず問題はないと判断された。

### 3. 考 按

Duchenne 型筋ジストロフィーの筋中にカルシウム依存性中性プロテアーゼの活性上昇が知られて以来，プロテアーゼ阻害剤が治療剤として有効ではないかとの考えがいわれて来た。ベスタチン

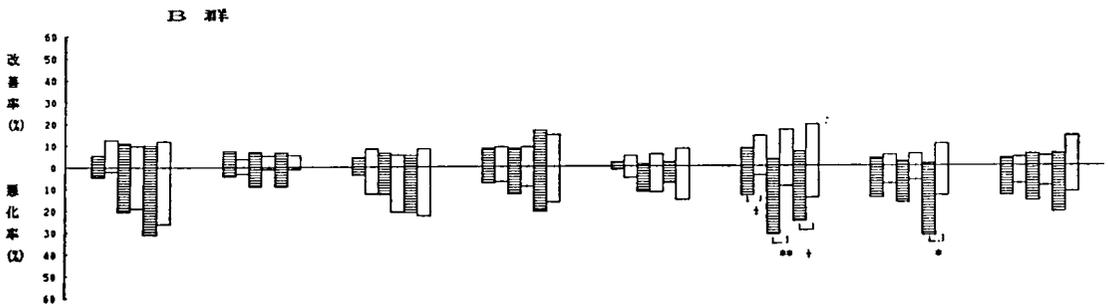
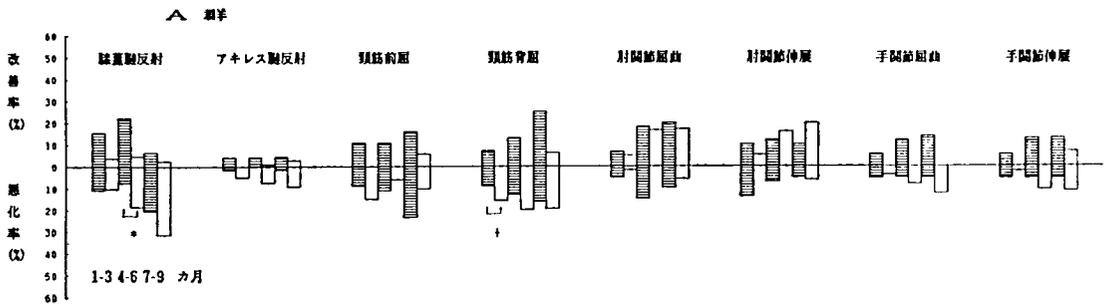


図 3 同 (2)

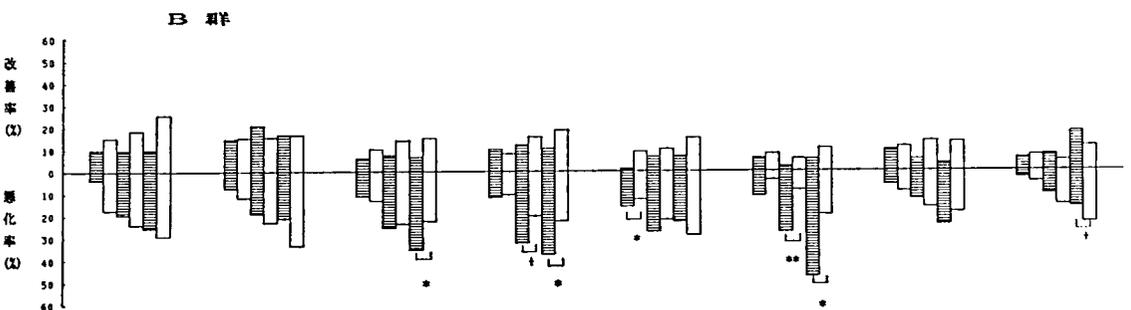
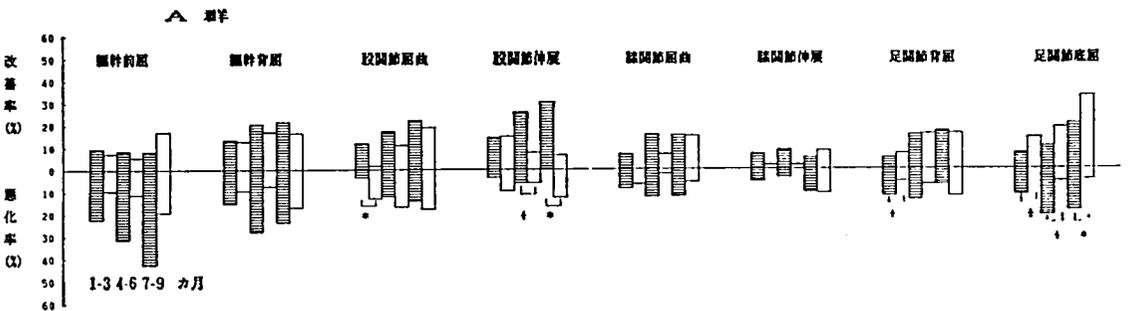


図 4 同 (3)

もプロテアーゼ阻害作用を有するため有効であると考えられているが<sup>1)</sup>, 免疫性疾患に効果を有する可能性も知られており, ジストロフィーに対

する作用も正確には未知の機序によるものである。今回の観察では5歳未満の若年群で, 階段昇り姿勢など6項目の日常運動機能, 頸筋, 股関節

Duchenne 型進行性筋ジストロフィーに対するベスタチンの効果

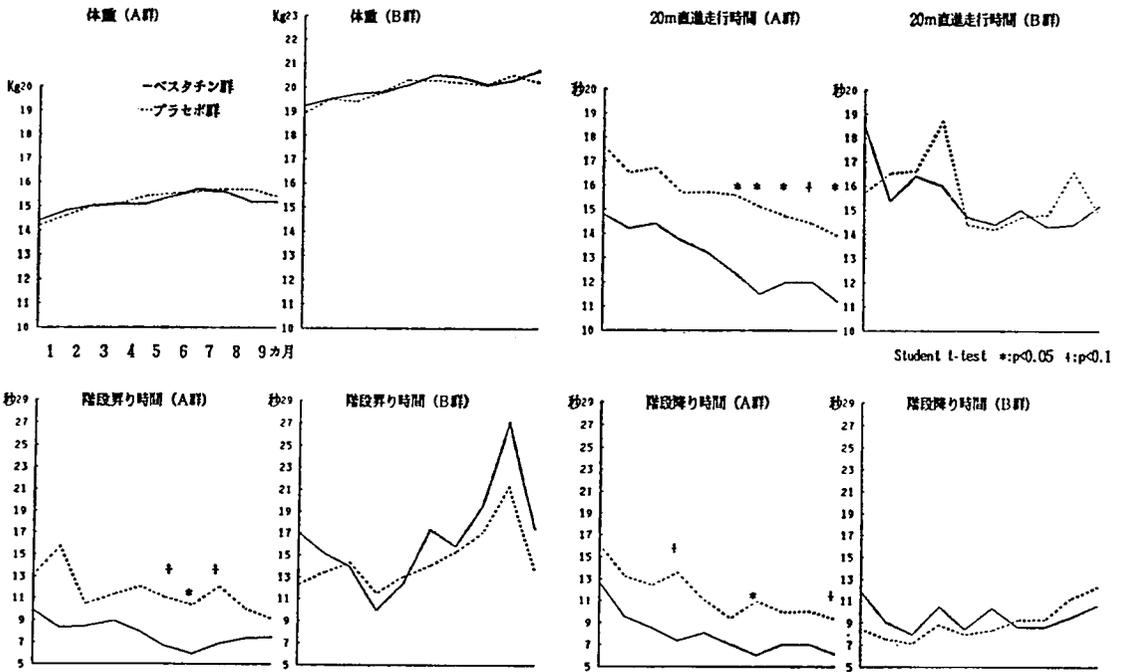


図 5 同 (4)

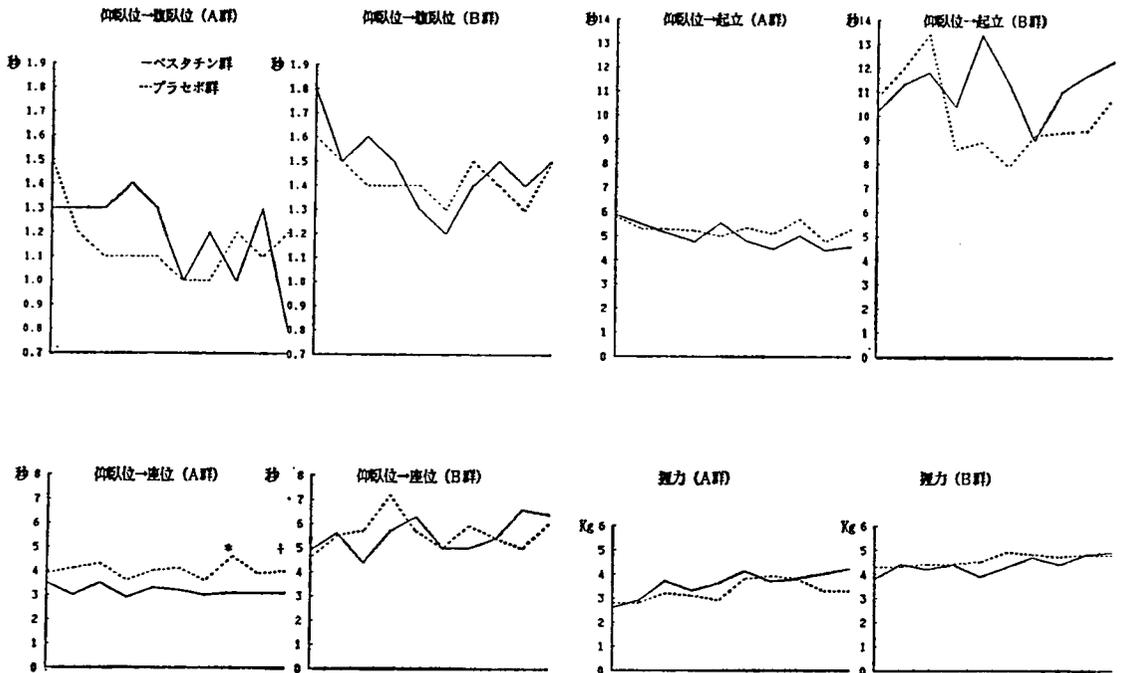


図 6 同 (5)

筋の筋力改善, 3つの腱反射において対照群に比較して有意の成績が見られた. しかし 5~8 歳未満の年長群ではこうした傾向は見られず, ベスタ

チン効果は若年のみに限られることが明らかとなった. このことが何を示唆しているのかは不明であるが, 少なくとも二つの可能性が考えられる. ひと

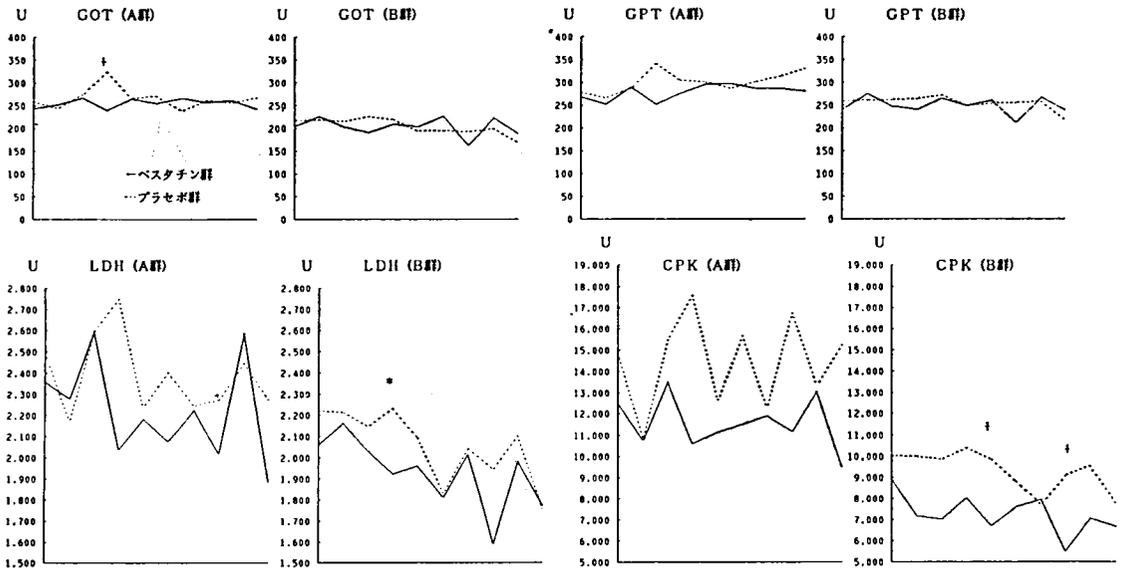


図 7 同 (6)

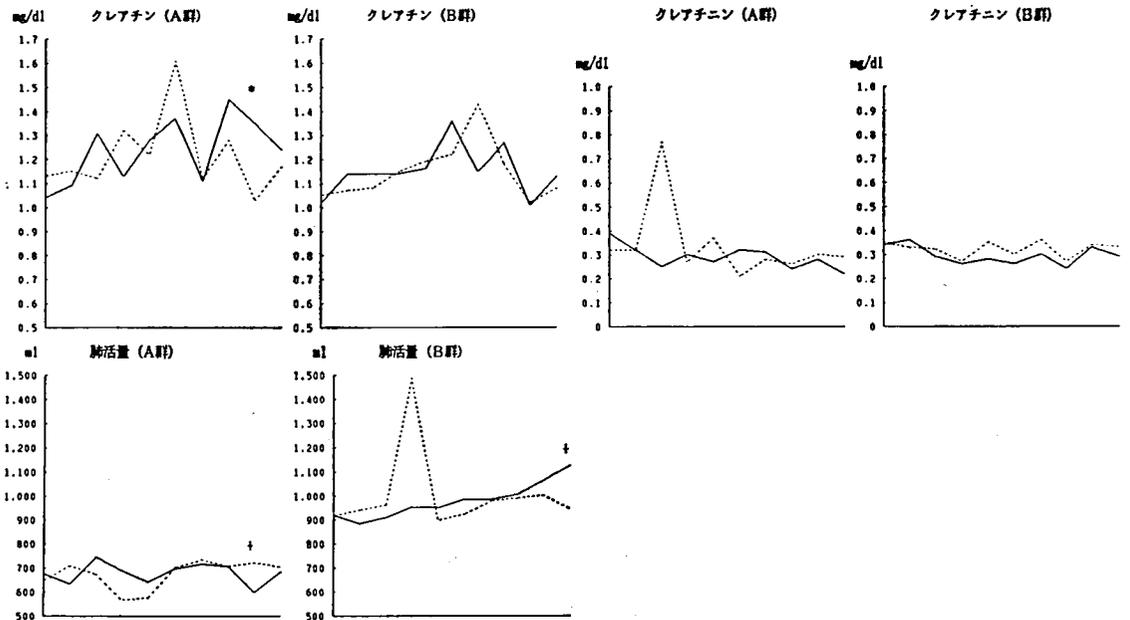


図 8 同 (7)

つは本剤が早期の筋ジストロフィー症の筋破壊過程に効果を有する可能性である。しかし筋破壊量のひとつの目安と見なされている血清中の筋逸脱酵素はベスタチン投与によって有意な影響を受けていないことを考えるとこの可能性は必ずしも重要視できず、今後の検討が必要である。もうひと

つの可能性は、この時期の小児はたとえ筋ジストロフィーであれ、疾患の進行よりも自然の発育の方が優り、運動機能は向上の一途をたどるが、ベスタチン投与によりこの発育曲線が多少とも正常に近くなるのではないかということである。20 m 直進走行時間、階段昇降時間の変化 (図 5) など

表 3 副作用

薬 剤	症例 No.	症 状	発現時期	程 度	薬剤との因果関係
ベスタチン	1A 4	発疹	8週		
	6A 5	嘔吐, 発疹	8週		
	12B 6	下痢	4週		
プラセボ	1A 2	下痢	16週	中等度	無し
	3A 3	嘔吐	20週		
		下痢	28週	軽度	不明
	3A 5	下痢, 腹痛	4~16週	軽度	有り
	8A 1	異常痛	4週	軽度	無し
		食欲不振	8週	軽度	不明
		腹痛	16週	軽度	不明
	8A 3	発疹	8週	軽度	不明
	12A 2	嘔吐, 下痢, 発熱	4週	中等度	不明
	14A 1	手の浮腫	8週	中等度	不明
	3B 5	下痢	4~28週	軽度	不明
	3B 6	下痢	20週		
	8B 4*	下痢	1週		
	12B 4	掻痒感	8週	軽度	不明
	16B 3	下痢	12週	軽度	不明

\* : 副作用により中止

を見るとその可能性が推測される。ではこの運動機能発育正常化の機序は何かとなるとこれも現時点では不明であるが、筋自体に対する作用か、他の全身性作用か今後充分検討を重ねる必要がある。血清 LDH, CPK の変化 (図 7) を見ると、値そのものに有意差はなくても変動の幅が小さくなり、比較的一定してくる傾向も見られ、生体における何らかの安定化傾向をうかがうこともできる。筋ジストロフィーに対する本剤長期投与による生体中の代謝サイクルの変化<sup>3)</sup>とも考えあわせ、今後の研究が期待される。

### 結 語

Duchenne 型筋ジストロフィーにベスタチンを

投与して対照群と比較した。5歳未満の患児では階段昇降姿勢、頸筋、股関節筋の改善を認め、20m 直進走行、階段昇降、仰臥位から起坐などに要する時間も短縮した。以上の結果から本剤が筋ジストロフィーの治療薬たり得る可能性が存在すると推定した。

### 文 献

- 1) Tsuji, S. and Matsushita, H. : Successful treatment of murine muscular dystrophy with the protease inhibitor bestatin. *J. Neurol. Sci.*, 72 : 183 (1986).
- 2) 里吉栄二郎ほか : Bestatin 臨床応用の歩み, 未刊行
- 3) Aoyagi, T. *et al.* : Bestatin suppresses the serum levels of several hydrolytic enzymes in a patient with progressive muscular dystrophy. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 1, 65 (1986).

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

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	0564-54-1111 0564-53-7345 (直)
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
〃 藤井 節郎	大阪基礎医学研究奨励会	520-01 大津市唐崎 1-1-1	0775-79-2280
幹事 青柳 高明	微生物化学研究所・酵素研究部	141 東京都品川区上大崎 3-14-23	03-441-4173
班員 大関 正弘	大正製薬株式会社総合研究所	330 大宮市吉野町 1-403	0486-63-1111 内 351
〃 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	173 東京都板橋区栄町 35-2	03-964-1131 内 3068
〃 向山 光昭	東京大学理学部化学科 有機化学第二講座	113 東京都文京区本郷 7-3-1	03-812-2111 内 4343
〃 鈴木 紘一	東京都臨床医学総合研究所 遺伝情報研究部	113 東京都文京区本駒込 3-18-22	03-823-2101
幹事 勝沼 信彦	徳島大学医学部附属 酵素研究施設酵素化学部門	770 徳島市蔵本町 3-18-15	0886-31-3111 内 2550
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
〃 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
〃 里吉栄二郎	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
監事 北川 晴雄	千葉大学薬学部 薬効・安全性学講座薬物学	260 千葉市弥生町 1-33	0472-51-1111 内 2711-2
班員 福原 武彦	東京慈恵会医科大学 第二薬理学教室	105 東京都港区西新橋 3-25-8	03-433-1111 内 2255
幹事 杉田 秀夫	国立精神神経センター神経研究所 疾病研究第一部	187 小平市小川東町 4-1-1	0423-41-2711
班員 矢崎 義雄	東京大学医学部内科学第三	133 東京都文京区本郷 7-3-1	03-815-5411 内 8274, 8278
〃 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
〃 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
〃 村上 慶郎	国立療養所箱根病院	250 小田原市風祭 412	0465-22-3196
〃 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
〃 福山 幸夫	東京女子医科大学小児科教室	162 東京都新宿区河田町 8-1	03-353-8111
幹事 木下 真男	東邦大学医学部附属大橋病院 第四内科	153 東京都目黒区大橋 2-17-6	03-468-1251
班友 伊藤 信平	日本化薬株式会社医薬事業本部	102 東京都千代田区富士見 1-11-2	03-237-5154
〃 岩城 正広	鳥居薬品株式会社研究所	272 市川市南八幡 3-14-3	0473-78-4121
〃 今堀 和友	株式会社三菱化成生命学研究所	194 町田市南大谷 11	0427-26-1211