

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 α -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、 α -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 μ 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 ng/ml およ

び 5 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 (フォルスマンショック) 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。

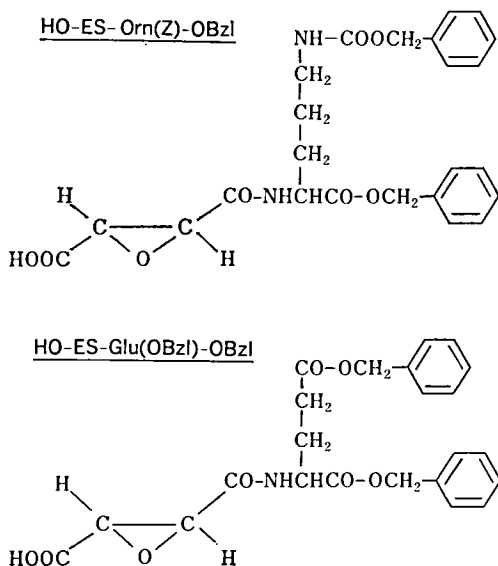
以前に著者らが報告した筋ジストロフィー症患

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。

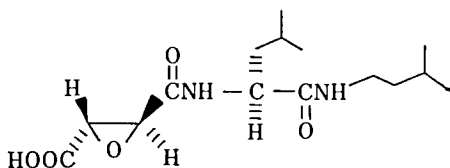
数十種の誘導体の中からパパインに対し作用が弱く、かつ CANP に強い作用を示す数種の化合物を得ることが出来た。中でも左図に示す Orn および Glu 誘導体は天然 E-64 よりも CANP に対する活性がかなり強く、本研究目的に適う有力な化合物と考えられた。更に、これらの化合物を詳細に検討し drug design することにより秀れた CANP 特異阻害剤を開発することが可能であると考えられる。

6. CANP の生物学的研究

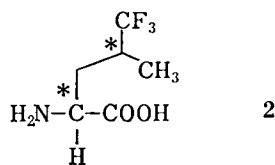
川島班員はカルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) の生理的機能を明らかにするため、CANP の組織内存在部位の検討を抗体による免疫組織学的染色により研究した。

まず、ウサギ骨格筋から2種類の CANP (μ -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、 μ 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。

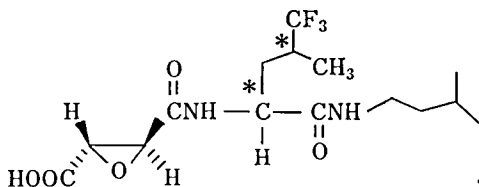
抗体染色後の巨視的にみた臓器ごとの色調の強さは、肺・脾・心・腎・精巣・脳・肝・骨格筋の順となり、CANP の含量を反映しているものと考えられる。微視的にみると、多くの器官で上皮組織が強く反応した。例えば、全ての器官で血管上皮が強く反応し、臓器特異的なものでも肺の肺



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—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- γ -ブチロラク톤の光学分割が、入手容易な α -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^{2J} 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^{2J} 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

α -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 α -アクチニンを筋崩壊の指標として、血清中の α -アクチニン測定に関する研究を行った。

ヒト骨格筋より α -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 α -アクチニン IgG とした後、架橋試薬 meta-maleimido benzoyl-N-hydro-succinimide ester (MBS) を用いて β -galactosidase との conjugate を作成した。この conjugate により enzyme immunoassay を行い α -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 α -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、 α -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ます。

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

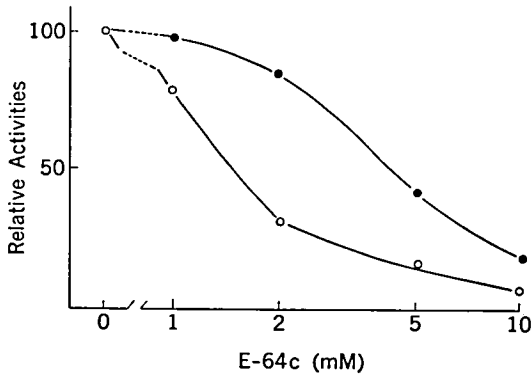


図 1 牛胃 155K 成分 (粗標本) に対する E-64c の効果
○ : L作用, ● : M作用

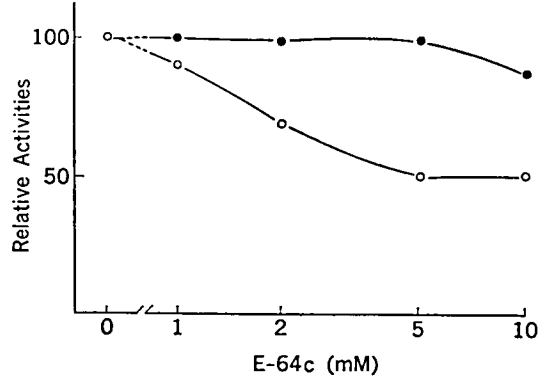


図 2 ニワトリ筋胃 130K 成分 (粗標本) に対する E-64c の効果
○ : L作用 ● : M作用

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¹⁾、ベスタチン^{2,3)}、*p*-ヒドロキシベスタチン^{3,4)}、ホルフェニノール^{5,6)}、アンチパイン⁷⁾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^{2,3)}および *p*-ヒドロキシベスタチン^{3,4)}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 μ l ループ) を備えた HPLC 用ポンプ、12 μ 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 μ l に 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 2.0) 100 μ l および 3 mM EDB, 2 mM DDB または 2 mM MDB 100 μ 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 μ l の反応液をクロマ

* 九州大学薬学部

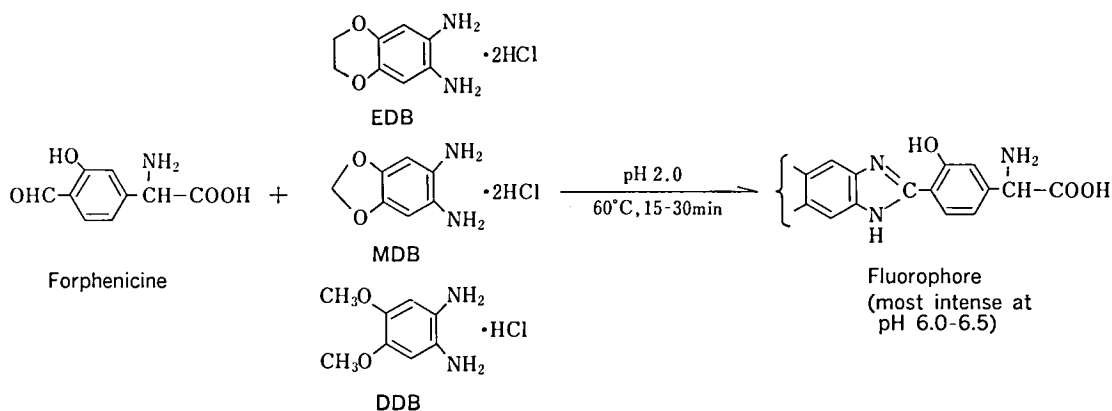


図 1 Fluorescence derivatization of forphenicine with EDB, MDB and DDB

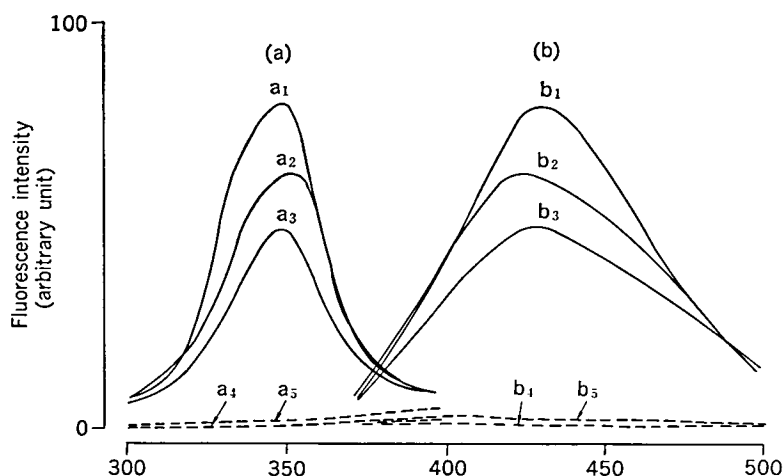


図 2 Excitation (a) and emission (b) spectra of the final reaction mixture of forphenicine (10 nmol/ml) with EDB, MDB or DDB. Portions (100 μ l) of forphenicine solution and water for the reagent blank were treated as in the recommended procedure. Curves : a₁ and b₁, EDB; a₂ and b₂, MDB; a₃ and b₃, DDB; a₄ and b₄, reagent blanks of EDB and DDB; a₅ and b₅, 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 μ 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

