

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62年度研究報告書

昭和 63 年 3 月

# 目 次

I. 総括研究報告	3
低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究	江橋 節郎
II. 分担研究報告	
1) ホルフェニシンの生体内動態	17
—蛍光 HPLC によるマウス血清および筋肉中濃度の測定—	
九州大学薬学部	大倉 洋甫 巢 文峰 甲斐 雅亮
2) 筋肉内酵素網の動態に対するベスタチンおよびその立体異性体の影響	23
微生物化学研究所	青柳 高明 和田 孝雄 小島 蒔子 永井真知子 原田 滋子
3) 蛋白分解酵素の役割とその阻害剤に関する研究	33
助大阪基礎医学研究奨励会	藤井 節郎
4) Lysosomal proteolysis の Cystatin による制御機構ならびに Cystatin の大量産生	37
第 1 部: Cathepsin 群のプロセッシングと Cystatin による Lysosomal proteolysis の 制御機構	
第 2 部: Cystatin $\alpha$ 遺伝子の大腸菌による発現と Lysosomal proteolysis の抑制	
徳島大学酵素科学研究センター	勝沼 信彦 木南 英紀 大和 正幸 原 研治 板東 祥晃 三井東圧化学 池 祥雅
5) C-蛋白質を指標とした筋ジストロフィー症の解析	47
千葉大学理学部生物学科	丸山 工作 大日方 昂 佐野 一裕 小島 崇
6) CANP 阻害剤の設計および合成に関する研究	53
東京理科大学理学部	向山 光昭
7) CANP 阻害剤の合成	57
大正製薬総合研究所	大関 正弘 花田 和紀 横尾 千尋 村田 充男 東京都臨床医学総合研究所 鈴木 紘一 徳島大学酵素科学研究センター 勝沼 信彦
8) CANP 阻害剤の一般薬理学的研究	61
—筋電図および神経活動中の呼吸運動関連成分の定量的評価法に関する基礎的研究—	
東京慈恵会医科大学第二薬理学教室	福原 武彦 加藤 総夫 木村 直史 高野 一夫

- 9) CANP 遺伝子のクローニングに関する研究 .....69  
 東京都臨床医学総合研究所 鈴木 絃一
- 10) 筋ジストロフィーにおける CANP 系の変動 .....73  
 東京都老人総合研究所 川島 誠一 林 昌美 中村 愛
- 11) ベスタチンの使用経験 .....77  
 —特に同量固定法 single blind 法による治験例に bestatin を再投与した  
 その後の実態と double blind 登録例について—  
 東京女子医科大学小児科 福山 幸夫 大沢真木子 斎藤加代子  
 新井 ゆみ 平沢 恭子 川井未加子  
 中田恵久子 宍倉 啓子 鈴木 陽子  
 平山 義人
- 12) Duchenne 型筋ジストロフィー症の血清酵素におよぼすベスタチン (NK421) の効果 .....83  
 国立療養所兵庫中央病院 高橋 桂一 西尾 英久
- 13) Duchenne 型筋ジストロフィー症に対するベスタチンの効果 .....87  
 —尿中 3 メチルヒスチジンの測定を中心とした検討—  
 国立療養所宇多野病院 西谷 裕 板垣 泰子  
 大阪市立大学生生活科学部 平野久美子
- 14) ベスタチンの使用経験 .....93  
 —九州地区 5 歳以下の対象例について—  
 国立療養所西別府病院 三吉野産治 江田伊勢松
- 15) フォルフェンシノールの筋ジストロフィー症に対する効果 (第 2 報) .....95  
 国立療養所箱根病院 村上 慶郎 岡崎 隆 林 英人  
 斎藤 有 馬場 繁二
- 16) ベスタチンの筋ジストロフィーに対する臨床効果に関する研究 .....99  
 東邦大学医学部第四内科 木下 真男  
 国立精神・神経センター 里吉栄二郎  
 東京女子医科大学 福山 幸夫  
 国立療養所西別府病院 三吉野産治  
 国立療養所箱根病院 村上 慶郎
- 17) Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の臨床経過: EST 投与群での検討 .....107  
 新潟大学脳研究所神経内科 宮武 正 桑原 武夫 湯浅 龍彦  
 国立療養所新潟病院 山崎 元義  
 国立療養所東埼玉病院 石原 傳幸  
 国立療養所下志津病院 中野 今治  
 国立療養所医王病院 本家 一也  
 国立精神・神経センター 杉田 秀夫

18) ADL score の検討による筋ジストロフィー障害度の再評価 .....	111
国立療養所東埼玉病院 石原 傳幸 五味慎太郎 宮川 雅仁 儀武 三郎 青柳 昭雄 東京医科歯科大学難治疾患研究所 佐久間 昭	
19) 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 .....	119
—モノクローナル抗体によるキット化の試み— 東京大学医学部第三内科 矢崎 義雄	
20) 各種プロテアーゼインヒビター投与の筋ジストロフィーマウスに対する効果 .....	125
和歌山県立医科大学第二生理学 辻 繁勝	
21) E-64誘導体による糖原病II型ウズラの治療 .....	129
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部 杉田 秀夫 石浦 章一 塚原 俊文 須原 芳宏 菊地 建機	
22) 実験的筋炎モデル動物の作製に関する研究 .....	133
—自己免疫筋疾患抗原物質のモノクローナル抗体による解析— 国立精神・神経センター神経研究所 里吉栄二郎 古川 昭栄 赤沢左衛子 加茂 功	
III. 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 .....	139

# 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

本研究班は、低分子蛋白分解酵素阻害物質または、細胞膜酵素阻害物質を用いて、進行性筋ジストロフィー治療薬を開発するを目的とする。

この数年、遺伝子工学的手法の導入により、デュシェンヌ型ジストロフィーの本態研究に画期的な進歩があり、本研究班班員らの努力により、欠落がその原因となると考えられる蛋白が、少なくとも免疫学的に同定されるに至った。この事は、本病の治療薬開発に関し、この方向の研究の進展により、従来より遙かに具体的な指針の確立が可能となったことを意味する。

このような状況下にあっても、対症的な治療法の開発検討は、忽せにされるべきでなく、従来の暗中模索の段階から脱却し、実体的把握が可能となった現時点においては、本研究班の指向する治療法の意義がより実質的なものとなり、その具体化が焦眉の急となってきたことを意味する。この意味において、本研究班が目標としてきた新しい治療薬開発の研究に加え、本年度は従来から継続中のベスタチンおよびロキシスタチンの臨床的結果判定に関する研究にも力を注ぐこととなった。

具体的な研究結果は下記の通りである。

## 1. ホルフェニシンの生体内動態

——蛍光 HPLC によるマウス血清および筋肉中濃度の測定——

大倉班員は芳香族アルデヒドの蛍光試薬、1,2-

ジアミノ-4,5-エチレンジオキシベンゼン (DEB) を用いて、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した。また、ホルフェニシンおよびホルフェニシノールをそれぞれマウスに経口投与したときの血清および筋肉中のホルフェニシンならびにホルフェニシノールの濃度分布を調べた。

1. ホルフェニシンの HPLC 定量：マウス筋肉の酢酸ホモジネートおよび血清をそれぞれ過塩素酸で除蛋白したのち、遠心して得られた上清に DEB を加え、60°C、30分間蛍光反応を行なう。反応後、反応液を HPLC に注入し、ホルフェニシン蛍光体を分離、検出する。HPLC は TSKgel ODS-120T カラムを用い、アセトニトリル-30mM リン酸塩緩衝液 (pH6.5) (1:5, v/v) を移動相とする。蛍光検出は Ex350nm および Em420nm で行なう。この方法の検出限界 (S/N=2) は血清中 4.9pmol/ml および筋肉中 11.9pmol/g であった。

2. ホルフェニシンならびにホルフェニシノールの体内動態：ホルフェニシンを経口投与 (30 mg/kg) したマウスの体内では、投与後、1~8 時間において血清中 100-2nmol/ml および筋肉中 20-2nmol/g の経時的濃度変化を示した。このとき、ホルフェニシンの代謝物としてホルフェニシノールが比較的高濃度 (10nmol/ml or g) で観察された。一方、ホルフェニシノールを同様にマウスに投与した場合、ホルフェニシノールの血清

および筋肉中の経時的濃度変化はホルフェニン投与におけるホルフェニシンの濃度変化とほぼ同じであった。この場合も、ホルフェシノールからの代謝物としてホルフェニシンの生成が認められたが、その血清および筋肉中の濃度は低いレベル (0.01-0.1nmol/ml or g) を示した。

## 2. 筋肉内酵素網の動態に対するベスタチンおよびその立体異性体の影響

青柳班員は筋ジスマウス、ハムスターなどの筋肉を含む各臓器内の酵素活性の変動を経時的に調べ、広範囲の酵素に異常が誘起されていることを認めた。さらに、筋ジストロフィー症の発症機序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。

ベスタチンは筋ジストロフィーマウスの発病前から投与することにより発症阻止効果のあることが報告され、また Duchenne 型筋ジストロフィーの5歳未満の患児における第II相比較臨床試験で病状改善効果のあることが認められている。本報告はアミノペプチダーゼインヒビターであるベスタチンの作用機序を明らかにすることを目的として、ベスタチン (活性体) およびその立体異性体 (不活性体) をマウスに連続投与し、経時的に屠殺した筋肉 (前肢筋、後肢筋) 内の酵素活性の変動について述べる。

ベスタチン (活性体) 投与および途中で中止した場合は、不活性体および生理食塩水投与の場合と異なる振動状態がみられ、よりシンクロナイズされた状態になることが確認された。

## 3. 蛋白分解酵素の役割とその阻害剤に関する研究

藤井班員は現在までに筋ジストロフィー症の発症および症状の進行に種々の蛋白分解酵素が重要な役割を果していることを明らかにしつつある。

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を加えてきた。合成阻害剤については Trypsin, Plasmin, Thrombin, Kallikrein および補体系の C1 $\bar{r}$ , C1 $\bar{s}$  に対する強い阻害活性をもつものを見出し、更に *in vivo* での薬効を示すものを臨床でも応用されてきている。今回は新しい合成阻害剤について報告する。

6 Amino-2-naphthyl [4-(4, 5-dihydro-1H-imidazol-2-yl) amino] benzoate dimethane sulfonate (FUT-187) は Trypsin, Plasmin, Pancreatic Kallikrein, Thrombin C1 $\bar{r}$  および C1 $\bar{s}$  に対し阻害活性を有し  $2.3 \times 10^{-5} \sim 2.9 \times 10^{-7} M$  で IC $_{50}$  を示す。また実験的急性膀胱炎モデルに対しても効果を示す。補体系において *in vitro* での古典的経路および第2経路を介する補体溶血反応を強力に抑制し、更に *in vivo* においてモルモットの血管内溶血反応においても強い阻害活性を示す。また補体が関与しているアレルギー反応のII型の Forssman shock および SLE 自然発症マウスにおいても、FUT-187は延命効果が認められている。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つつあるため (FUT-175: フサン) 補体の病態における意義が解明されると同時に難治性疾患への応用も期待できると考えられる。

## 4. Lysosomal proteolysis の Cystatin による制御機構ならびに Cystatin の大量産生

勝沼班員は Lysosomal proteolysis の異常亢進に起因する、筋タンパク崩壊疾患を色々と報告している。細胞内のリソゾーム・プロテアーゼ群 (カテプシン群) の量と活性の制御機構を明らかにし、その原理に基づく上記疾患の治療法を開発せんとするのが目的である。特に Natural inhibitor である Cystatin の細胞内での阻害機構を明らかにし、

これを治療目的に利用すべく、リコンビナントによる大腸菌プラスミッドでの大量産生を行なった。

カテプシン群のプロセッシングに関しては、BがD. Steinerら、LとHが勝沼らにより1987年にクローニングによりプレ・プロ前駆体構造が決定された。マクロファーシ培養系によりS35-Metチェイス-イムノプロットング実験で、チェイスプロセスに各種Protease inhibitorを共存させて動態を見た。プロ部のプロセッシング・プロテアーゼは金属プロテアーゼであり、活性成熟型カテプシン群の初発限定分解はカテプシン群自身により起ることが明らかとなった。従ってプロカテプシンから活性カテプシンになる過程は金属プロテアーゼ阻害剤で抑制できるし、活性カテプシンの分解はE-64等のシステイン・プロテアーゼ阻害剤で止めることができる。更に $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Hexosamidase等大部分のリソゾーム酵素群の分解の律速にもカテプシン群が関与しており、E-64投与で此等リソゾーム酵素群の半減期は著明に延長し、酵素タンパク量も増加する。特定のリソゾーム酵素の低下または欠損により各種のリソゾーム性蓄積症が起こることが知られている。此等の中には特定リソゾーム酵素の分解亢進に起因するものもあり、これらはカテプシン阻害剤で抑制できる可能性が示された。

次には分解すべきタンパクを食胞に封入する(Autophagy)活性の調節が大切であり、食飼条件・ホルモン条件・薬物ならびに遺伝子異常で変化するが、ここでは論じない。

第三にはリソゾーム内でのカテプシンによるタンパク分解活性の調節が問題である。最近、内在性カテプシン・インヒビター(Cystatin)が各種発見され、且つ構造決定されたが、此等によるリソゾーム内カテプシン活性調節の細胞生物学的な機構は不明であった。我々は精製したシスタチン $\alpha$ やシスタチンEWを培養マクロファーシや3T3細胞の培地に添加すると、エンドサイトーシスに

より細胞内に取込まれ、リソゾームと融合してリソゾーム内カテプシン活性を抑制することを明らかにした。即ち、シスタチンは細胞質から一度分泌され、エンドサイトーシスされてリソゾームと融合し、カテプシン活性を抑制することにより、多くのリソゾーム酵素の半減期を長くし、且つ酵素タンパク量も著増させる。

最後に此の原理を利用して、カテプシン作用の病的亢進をシスタチンにより抑制することに利用すべく、シスタチン $\alpha$ のリコンビナントcDNAを大腸菌プラスミッドにより大量発現することに成功している。菌体から簡単に精製でき、収率は5 mg/l培地と非常に高い。今後モデル疾患動物の治療実験にこれの試用を始めたい。

## 5. C-蛋白質を指標とした筋ジストロフィー症の解析

丸山班員は鶏筋ジストロフィー症(筋ジス)では、特に発症の著しい胸筋で遅筋型C-蛋白質の発現が引き起こされることを免疫組織化学法により既に、明らかにした。本研究では、筋ジストロフィー症の指標としてのC-蛋白質の変化を二次元電気泳動法およびイムノプロット法により更に詳しく明らかにした。

従来、C-蛋白質の二次元電気泳動は困難とされていたので、まずC-蛋白質に適した電気泳動条件を確立した。二次元電気泳動ゲル上のC-蛋白質のスポットはモノクローン抗体により同定した。その結果、最も塩基性の速筋型(FC)から、心筋型(CC)、遅筋2型(SC2)、遅筋1型(SC1)、の順で酸性側に位置する4種のC-蛋白質アイソフォームが、親の筋で識別された。分子量はCC, SC1, FC, SC2の順である。これら4種は速筋の発達過程でStage-specificに発現されるが、特にSC1とSC2の発現は胸筋と後広背筋-PLD-(いずれも速筋)の発達過程で特徴的な差を示した。即ち、ふ化直後のヒヨコでは両方の筋でFCとSC1



が発現されるが、成長につれ胸筋では SC1 の消失、PLD では SC2 の発現が起こった。筋ジス胸筋では、ふ化直後に存在した SC1 は 1 ヶ月齢頃までに一旦消失するが、発症のみられる 2 ヶ月齢には SC1 さらに SC2 も出現した。即ち、筋ジス胸筋は、C-蛋白質の発現に関してはヒヨコ胸筋とは異なり、むしろ PLD 筋と類似した。従って、発症に伴う胸筋での変化は幼若筋型への移行ではなく、PLD 型への移行と言える。除神経胸筋でも SC1、SC2 の発現が引き起こされ PLD 筋型パターンとなった。PLD 筋と ALD 筋での C-蛋白質発現については正常、筋ジス鶏の間でほとんど差異は認められなかった。

## 6. CANP 阻害剤の設計および合成に関する研究

向山班員はチオールプロテアーゼの特異的インヒビター E-64 の活性発現に必須な構造のうち、エポキシド部分はチオールとの反応部位、L-ロイシンアミド部分を認識部位と捉えることができた。このアミノ酸部分を変換することにより、特定のプロテアーゼに対する選択性を高めることができると期待される。

61 年度に合成した E-64c 中のロイシンを 5,5,5-トリフルオロロイシンに置換した化合物の生物活性を測定したところ、4 つの異性体のうち 2S, 4S-体は E-64c と同等の活性を示した。また、2S, 4R-体は、パパインに対する効力は変わらないが、CANP に対する効力は低下した。この結果は、本研究目的には反したが、フルオロアミノ酸の導入が、酵素に対する選択性を高める手段として有効であることがわかった。

次に CANP に対してより選択的に作用するインヒビターを得るため、内在性 CANP インヒビターのアミノ酸配列の繰り返し部分に注目し、その配列をもつ部分ペプチドのエポキシコハク酸誘導体の合成を検討した。

現在までに、N 端側にエポキシコハク酸を結合させた、ジ (Arg-Glu)、トリ (Tyr-Arg-Glu)、テトラ (Lys-Tyr-Arg-Glu)、およびヘキサ (Pro-Pro-Lys-Tyr-Arg-Glu) ペプチドの合成を完了し、活性を測定したところ、トリペプチド誘導体が、選択性よく CANP を阻害することがわかった。

C 端側にエポキシコハク酸を結合させた誘導体の合成には多少問題があったが、出発物質となる Boc-Glu (OBzl)-NHNH-Fmoc の合成法が確立できたので、近々ペプチド鎖を延長する合成に入れる見通しである。

また、エポキシコハク酸に代えて導入を検討する予定のフルオロフマル酸およびフルオロマレイン酸の合成が可能となったので、目下その導入法を検討中である。

## 7. CANP 阻害剤の合成

大関班員は昨年度に引き続き、CANP に対して特異性の高い阻害剤を得ることを目的とし、E-64 誘導体の合成を進めた。

本年度は、鈴木班員が CANP 内在性インヒビターの構造解析の研究から明らかにした、活性中心の一次構造 (—TIPPPXYR—) に着目し、この部分構造にエポキシコハク酸を活性基として導入することを試みた。

まず C 端側からの検討を進め Tyr-Arg 誘導体を十種合成した。これらについて、生体内の主システインプロテアーゼであるカテプシン B, L, H と CANP に対する阻害特異性を調べた。

その結果、これらの化合物の中に CANP に対して E-64c と同程度の阻害活性を示すものが、数種見出されたが、これらは同時にカテプシン B, L に対しても阻害活性を有しており、特異性の高いものではなかった。

しかしながら、同じ考えのもとに共同で検討を進めた向山班員の研究結果を考え併せると、エポ

キシコハク酸に Tyr-Arg 誘導体を導入することにより、カテプシン B, L 及び CANP に対して阻害活性が発現し、更に C 端を延ばした Try-Arg-Glu は CANP に対する活性は若干低下するものの、特異性が非常に高まることがわかった。このように、内在性 CANP インヒビターの活性中心のアミノ酸配列を分子設計に応用することにより、CANP に対する特異性が高められることが明らかとなった。

更に本年度は、コンピュータを用いカテプシン B の活性中心の三次元構造の解析を試みた。現在、CANP, カテプシン L についても同様の試みを行っており、今後これらの結果も分子設計に応用したいと考えている。

## 8. CANP 阻害剤の一般薬理学的研究

### ——筋電図および神経活動中の呼吸運動関連成分の定量的評価法に関する基礎的研究——

福原班員は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解析に基づいた、呼吸筋変性の程度と 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、横隔神経自発性遠心性発射活動に発現する約 60~130Hz の高頻度同期波について定量的解析を行なって、その生理学的性質について検討した。

麻酔下非動化動物から導出された横隔神経自発性遠心性発射活動の自己パワースペクトルには約 80~130Hz 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。この時、同時導出された三叉、顔面、迷走ならびに舌下神経の遠心性活動の自己パワースペクトルにも横隔神経と同じ周波数の高頻度同期波のピークが検出された。これらの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、ピーク周波数は横隔神経の高頻度同期波のそれと一致したまま平行に遷移した。

横隔神経活動と三叉、顔面、舌下および迷走神

経活動とのコヒーレンスには、高頻度同期波の帯域に明瞭なピークが検出され、これらの間に、共通の発振源に由来する 1 対 1 に同期した高頻度同期波が存在することを確認した。一方、頸部交感、腎交感神経ならびに脳波には、これと同期した成分は認められず、高頻度同期波が呼吸運動性出力に特異的に含まれる成分であることが示唆された。

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、運動ニューロンから、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方法として、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法として臨床的に応用され得る可能性があるものと考えられる。

## 9. CANP 遺伝子のクローニングに関する研究

鈴木班員は昨年 CANP インヒビターの構造解析を行ない、CANP インヒビター中に約 140 残基からなる 4 回の繰返し構造があることを明らかにした。肝臓や赤血球のインヒビターおよび種々のインヒビター断片の解析から、①繰返し構造が CANP を阻害する阻害単位であること、および②繰返し構造に含まれる「TIPPX<sub>Y</sub>R」の配列が阻害に直接関係することを推測した。本年度はこの成果に基づき、上記 2 点を遺伝子工学的手法等を用いて直接証明することを試みた。

まず、ウサギ CANP インヒビターの cDNA を断片化し、「TIPPX<sub>Y</sub>R」配列を N および C 末端側に近い部位に持つ断片、さらに、この配列を中心にしてできるだけ短い断片などを調製し、これらの cDNA を発現ベクターにつないで大腸菌で発現させ、発現した断片を精製して、CANP に対する阻害活性を測定した。その結果、TIPPX<sub>Y</sub>R を含む配列は必ず CANP の阻害活性を有し、この配列を持たない断片には阻害活性がなかった。また、この配列を持つペプチドを cDNA レベルで N, C

両末端側から順次短くして活性との相関を調べたところ、この配列が欠けると阻害活性も失なわれた。このように「TIPPYR」は阻害活性に必須ではあるが、この前後につく配列、特に、その長さも阻害活性に大きな作用を持つことがわかった。この配列を含む約30個の合成ペプチドも CANP を特異的に阻害し、 $K_i$  値は  $\mu\text{M}$  程度であった。現在引き続き最小のインヒビターを検索しつつ阻害機構の解析を行なっている。

## 10. 筋ジスハムスターにおける CANP 系の変動

川島班員は筋ジストロフィーにおける筋タンパク質の異常分解をもたらすプロテアーゼとして、カルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) を考えている。そこで、本酵素系を構成する成分、即ちカルシウム感受性の異なる 2 種類 ( $\mu\text{CANP}$  と  $\text{mCANP}$ ) および CANP を特異的に阻害する内在性インヒビターの定量法を確立した。この方法を用いて、先ずラット各種組織に存在する  $\mu\text{CANP}$ ,  $\text{mCANP}$ , CANP インヒビターの活性量を定量した。多くの組織でインヒビター量が総 CANP 量を超えていたが、その比は組織により異なり、肝臓、脾臓、腎臓などではインヒビター量が圧倒的に多かった。 $\mu\text{CANP}$  活性は主として腎臓や脾臓に高濃度に存在し、一方  $\text{mCANP}$  は肺臓や脳に多量に存在した。したがって、 $\mu\text{CANP}$  と  $\text{mCANP}$  の活性の相対量も組織により異なる。また、全ての組織で  $\text{mCANP}$  活性が  $\mu\text{CANP}$  活性より高かった。今回対象とする骨格筋は全ての活性が比較的低い組織であり、インヒビター活性は総 CANP 活性より高い。次いで、筋ジスハムスター (UM-X 7.1) と正常ハムスターの骨格筋に存在する  $\mu\text{CANP}$ ,  $\text{mCANP}$ , CANP インヒビターの各活性量を測定した。4 週齢においては各活性とも筋ジス動物において高値を示した。10 週齢においては両 CANP 活性は正常動物と同じレベルに復しているが、インヒビター活性は依然高値を

保っていた。これらの結果は、CANP は筋ジス発症において生化学的反応の活発な比較的初期に作用し、過程の進行した段階ではむしろ沈静化していることを示唆している。

## 11. ベスタチンの使用経験

——特に同量固定法 single blind 法による治験例に Bestatin 再投与したその後の実態と double blind 登録例について——

福山班員は Bestatin (以下 B) 長期投与の臨床効果の検討を目的とした。

昨年度まで同量固定法の single blind 法で 1 年間 B または placebo (以下 P) 投与の 10 例を対象とした。single blind 終了時に投与希望例は直ちに B 再投与予定であったが、都合により投与まで 1 ~ 4 か月無投薬期間があった 2 例は都合により転院、3 例は B 再投与するも途中で投与中止を希望、1 例は最初 P、その後も投与希望なく、全経過 B 無投与であった。

機能障害度 (祖父江班機能障害プロジェクト案) の変化：投与開始前 (0 週), 52 週 (single blind 終了後), その 1 年後の 104 週で判定した。A single blind 時 B 投与群：1 例では 0 週より 52 週の方が 1 段階改善していたが、本例は開始前が骨折後で、その回復も改善に加味している。1 例は、全経過 stage は不変だが、起立所要時間は B 中断で延長、再投与により短縮を示した。3 例では 0 週, 52 週は不変で、104 週で 1 例は 1 段階、他の 1 例は 2 段階悪化していた。残りの 1 例では無投薬期間に 2 段階悪化し、B 再投与でも改善なく、94 週で投与中止したが、104 週では同 stage であった。B single blind 時 P 投与群：2 例は 3 歳で開始、うち 1 例は 0 週と 52 週は不変で、B 投与後の 104 週には 2 段階上昇、他の 1 例は、P 投与後の 52 週, B 投与後の 104 週ともに 1 段階ずつ上昇、1 例は stage は全経過不変だが、運動所要時間で B 投与で短縮、中止により延長の傾向が見られた。1 例は P 投与 4

週より1段階低下, 52週には2段階低下, 3週間B投与するも104週ではさらに2段階悪化した。全経過B無投与例は, いずれも1段階ずつ低下した。

運動所要時間(立ち上がり・20m 走行・起坐): 開始時5歳未満群では前者に変化なく, 後2者で2例でPからBに変更後短縮をみた。5歳以上群で, 前2者とも2例でB中断で延長, 再投与により一過性に短縮した。2例で無投薬を契機に起立不能, 再投与でも改善はなかった。

血清CPK値: 5歳以上例で, 投与開始後4週で, B例で低下, P例で上昇した。

## 12. Duchenne型筋ジストロフィー症の血清酵素におよぼすベスタチン(NK421)の効果

高橋班員はDuchenne型筋ジストロフィー症(DMD)の血清酵素におよぼすベスタチン(NK421)の経口投与の効果を経過において検討する。

対象はDMD患者, 年齢9~17歳, 障害度(8段階分類)3:2名, 4:5名, 5:7名, 6:7名, 7:4名, 8:4名の計29名。前日午後9時より終了まで安静を保ち, 当日午前6時に採血し, 直後にNK421 100mgあるいはplaceboを経口投与し, 8時, 10時, 12時に採血し, LAP, CK, LDH, ALDをオートアナライザーで測定した。結果は前値に対する変動率で表しpaired Student t testで検定した。最初にNK421を投与し, 2週間以上経過してから同一患者に同条件でplaceboを投与した。

NK421投与後2時間でLAPは有意( $P<0.01$ )に低下し, 4時間, 6時間で元のレベルに戻った。CKは変動しなかった。LDH, ALDは2時間で変動なく4時間, 6時間で有意( $P<0.01$ )に上昇した。

Placebo投与ではCK, LDHともに有意の変動はなかった。6時間後(12時)LAPは上昇し

(102.5%,  $P<0.01$ ), ALDは前値に比し低下(91.8%,  $P<0.01$ )した。

NK421はこの条件下で2時間でLAPを抑制した。CKには影響なく, LDH, ALDが4時間および6時間で上昇したことは筋よりの酵素遊離に対する効果ではなく, 赤血球膜透過に対する影響が推定された。

Placebo投与の結果から, この条件下ではCKの有意な変動はなく, CKの日内変動も運動を制限すれば少ないことが実証された。LAP, LDH, ALDは4時間(10時)までは変動せず, この結果と比較してNK421の効果が明らかになった。

## 13. Duchenne型筋ジストロフィー症に対するベスタチンの効果

——尿中3メチルヒスチジンの測定を中心とした検討——

西谷班員は外来での一時採尿における3メチルヒスチジン(3MH)/クレアチニン(crn)の測定が, 筋ジストロフィー症への薬剤投与の効果判定の指標として有用かどうかを検討し, ベスタチン投与において応用した。

本院入院中のDuchenne型PMD患児4名において排尿毎に採尿し, 3MHとcrnの関係をみた。両者の相関は良好で, 適当な食事制限を加えるならば, 3MH/crnの値は常にほぼ一定である事が期待でき, 24時間蓄尿せずとも部分尿で可能ではないかと思われた。ただcrnが1mg/ml以上の濃縮尿では, 相関は乏しくなりcrnが1mg/ml以上の検体は除外した方がよいと考えられた。

外因性蛋白に関しては, 採尿前24時間以内の食事内容をチェックし, 3MH/crnの値との関係をみた。軟体類, 甲殻類の摂取, 魚肉類の中等量以上の摂取では3MH/crnは, かなり高値を示しており, これらの摂取が明らかな時はその検体を除外した。

このようにして1年間のベスタチンの二重盲検

に応用を試みた。投与前値はベスタチン群で56.9、プラセボ群で52.4で殆んど差を認めなかった。ベスタチン投与後6ヶ月位より、ベスタチン群がプラセボ群に比し、3MH/crnの値が低値となる傾向が伺われたが、有意差は認められなかった。今後は1年以上の長期投与における検討も必要ではないかと思われた。

尿中3MH/crnと血清CK値との相関は認められなかった。

#### 14. ベスタチンの使用経験

##### ——九州地区5歳以下の対象例について——

三吉野班員は進行性筋ジストロフィー症、特にDuchenne型(以下DMDと略す)の治療開発としてNK421(ベスタチン)の臨床的研究を担当してきた。従来の結果をふまえ、昭和62年度よりはより若年のDMD児(5歳以下)に対して、全国的に二重盲検比較試験が実施されている。今回はその二重盲検比較試験の九州地区の実施状況につき、若干の検討を加え報告した。

方法は全てNK421二重盲検試験実施要領に従った。九州地区よりは症例数として10例のDMD児が参加した。本研究参加協力施設は国立療養所沖縄病院、熊本大学発達小児科、大分医科大学小児科、久留米大学小児科、福岡大学小児科、福岡子供病院の6施設であった。症例のうちわけは3歳以下が5例、4歳～5歳が5例であった。

九州地区の5歳以下DMD児の臨床的背景としては、DMD児として診断が確定、ほぼ確定しているものは8例中7例であった(発達小児科の2例は63年4月より試験開始)。初発症状は運動発達の遅れが3例と多かった。合併症として1名に自閉的傾向が認められた。診察区分として、5歳以下という年齢もあって、全て外来通院であった。機能障害は軽く、stage 1が2例、stage 2が6例であった。さらに試験開始のプロトコールの項目より体重、身長、運動機能(10m走行、階段昇降な

ど)、生化学的項目(GOT、アルドラーゼ、LDH、CPK)を選びだし、3歳以下および4歳～5歳の2群にわけ比較検討したが、有意の差のある項目は体重、身長のみであった。

九州地区の5歳以下DMD児に対する、NK421の投与状況を班会議で述べた。投与開始より間もないため、その実施状況の報告となったが、投薬対象児はいずれも外来通院であり、DMD児低年齢層の診察区分を如実に示していた。

#### 15. フォルフェンシノールのDuchenne型筋ジストロフィー患者に対する使用(第2報)

村上班員はフォルフェンシノールを前回に引き続きDuchenne型筋ジストロフィー症(年齢5歳から9歳)に46週から112週にわたって使用した。使用量は1日50mgから150mgである。また11例の患者で感冒の使用前1年間と使用による1年間の罹患回数を調査した。結果は9例中5例が歩行不能になり2例が立ち上がり時間が悪化した。残りの1例は5歳の男子であったが46週間使用したが立ち上がり時間は短縮していた。

次に感冒の罹患回数では使用前に比べて減少したものの7例、増加したものの2例、不変1例で64%が感冒罹患回数が減少していた。

結論 ①フォルフェンシノールの使用でDuchenne型筋ジストロフィー症の運動機能には特別の効果は見られなかった。②感冒の罹患に対して予防効果が認められた。

#### 16. ベスタチンの筋ジストロフィーに対する臨床効果に関する研究

木下班員は昨年来ベスタチンのDuchenne型筋ジストロフィーに対する効果の群間比較試験を行なって来たが、本年度はその後半を実施し、1年間の投薬の結果が集計された。症例はA群(4歳以下)52例、B群(5～7歳)75例。計127例で、それぞれ約半数を対照群として二群に分け、1年

間の症状、所見、検査成績の変化について群間比較を行った。その結果、主としてA群において二・三の成績で群間に有意差が確かめられた。すなわち、階段昇り姿勢、同降り姿勢、上肢挙上運動、腱反射の保持、股関節屈曲筋力などで投薬群の方が改善を示した。この傾向は特に3歳以下の患者について比較した場合に明らかであり、ベスタチンが何らかの作用を有する可能性が示唆された。

以上の結果に基づき、本年度後半からはベスタチンの二重盲検試験を実施することになり、更に

前回より患児年齢を下げ、3歳以下、4～5歳の二群について全国から各60例を集め、各々30例ずつに分けて盲検試験を開始することとなった。ベスタチン投与量は前回と同じとし、1日150mgのドライシロップを分3服用とした。1年間服用後に両群の解析を行うこととし、現在すでに予定の症例数の登録をほぼ終了し、試験を開始。一部の症例は既に3ヶ月に入っている。この集計の結果を待って本剤の筋ジストロフィーに対する効果の有無の最終判定を行なう予定である。

**A群 12ヶ月**

薬 剤	改善	不変	軽悪	中悪	著悪	計	改善率	$\chi^2$	悪化率	$\chi^2$
NK 421	10	10	1	2	0	23	43%	P<0.1	13%	NS
プラセボ	518	18	1	1	0	25	20%		8%	

**B群 12ヶ月**

薬 剤	改善	不変	軽悪	中悪	著悪	計	改善率	$\chi^2$	悪化率	$\chi^2$
NK 421	3	8	11	7	4	33	9%	NS	67%	NS
プラセボ	5	7	12	11	1	36	14%		67%	

**17. Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の臨床経過：EST 投与群での検討**

宮武班員は Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症（以下 DMD と略す）に対する EST の治療効果について日常生活動作能力（以下 ADL と略す）の推移を検討した。

対象は国立療養所新潟病院・東埼玉病院・下志津病院・医王病院の4施設に入院（一部外来通院）中の DMD 児（全例男子）73例で、詳細は以下に示す如くである。すなわち、年齢は3歳6ヵ月～18歳10ヵ月（平均10歳6ヵ月±3歳1ヵ月）、ステージ I 7例、II 23例、III 3例、IV 14例、V 18例、VI 9例。

EST の投与量は体重あたり 4 mg から開始し、

4週後に副作用が無いことを確認した後に 8 mg に増量した。観察期間は 8ヵ月から 3年3ヵ月（平均1年11ヵ月±11.4ヵ月）である。

対照群は DMD 172例で、ADL の観察開始時年齢 6歳2ヵ月～28歳2ヵ月で各症例の観察期間は 1ヵ月～11年5ヵ月（平均5年8ヵ月）でこの間の sampling point は 1～60（平均33 points）である。

方法として対照群の ADL の経過を EST 投与群の経過と比較検討した。

観察開始時期の ADL は対照群と EST 群の間で差を認めず、ADL 値は両群とも加齢により指数関数的に低下し、ほぼ10歳前後で50点を割った。全ての観察点で EST 群は対照群に比し高値を示

したが両者の間に差を認めなかった。

そこで観察開始時に歩行可能であった症例（すなわち ADL50点以上）に限って ADL の推移を調査した。EST 群と対照群ともに ADL50～60点までは指数関数的に低下するが、対照群では ADL の低下がさらに続き10点まで低下した。一方 EST 群では60～50点以降低下が停滞する傾向が見られた。

今回の検討では両者の観察期間が一定化されておらず統計学的検討を行ない得なかった。しかし、このような治療的検討は比較的 ADL の良好な症例に対して施行されるべきであろうという結論が得られた。

## 18. ADL score の検討による筋ジストロフィー症障害度の再評価

石原班員は米・英のグループと比較し日本では筋力評価の自然歴の蓄積がなく、DMD に対する薬効判定の評価基準がなく困難を感じてきた。今回我々は ADL スコアに着目し尺度解析法により159例の DMD において ADL 項目を解析し、薬効判定に有用と思われる新障害度分類を作成し得たので報告する。対象は国立療養所東埼玉病院に入院した159例の DMD。従来より療養所で施行してきた ADL 100サブテストを独立のアイテムと考え尺度解析を施行した。結果、従来よりよく知られている8段階障害度を尺度解析したところ、信頼性のメルクマールである Rep 0.95, PPR 0.95, 新障害度分類では Rep 0.99, PPR 0.96ちなみに ADL (100点法)では 0.95, 0.67であった。新障害度分類の信頼性は従来より高かった。

新障害度分類は次の如くである。

- I. ゆっくりとしゃがむことができる
- II. 介助なく階段昇降可能
- III. 通常の高さの椅子より立ち上がり可能
- IV. 介助なく床から立ち上がり可能
- V. 手すりを用いて階段昇降可能

VI. 独立平地歩行可能

VII. 片手支持による両脚でのよりかかり立ち可能

VIII. 四つ這い可能

IX. 四つ這い位保持可能

X. 寝返りは出来ないが、横向きまで可能

XI. 自力で坐位保持可能

XII. 自力で坐位保持不能、全介助

自然歴も蓄積されており、今後 DMD の投薬に際し薬効判定に有用な障害度分類と考えられる。

## 19. 骨格筋ミオシン軽鎖測定法の開発

矢崎班員は筋肉組織の障害過程と進展度を特異的に反映し、定量的に推定しうる指標物質の選定とその測定法の確立が、患者の病態の把握、予後の判定さらには治療法の効果判定に必須であり、その開発が緊急の課題としている。我々は血中ミオシン軽鎖を測定するラジオイムノアッセイ法を開発し、急性心筋梗塞および骨格筋変性疾患患者におけるその測定の臨床的意義を検討した。急性心筋梗塞患者においては梗塞サイズをよく反映し、患者の予後の判定さらにはその治療法の効果を評価する際にきわめて有用な指標となることを示した。同法を筋ジストロフィー症を中心に骨格筋変性疾患患者において測定したところ、CPK とよく相関する高値が得られた。今後は両指標と病態との関連を検討したい。さらに、このような血中軽鎖測定法を一般臨床の場で使用が可能になるようにキット化するためにモノクローナル抗体を導入して二抗体サンドウィッチ法を開発した。マウスハイブリドーマを用いて心筋と骨格筋ミオシン軽鎖を広く認識するモノクローナル抗体 (ML 544) を中心に測定系を確立した。本法は簡便にしかも正確に血中ミオシン軽鎖を測定することが可能であるが、抗体の免疫組織学的な検討により白筋タイプの軽鎖には全く反応しないことが判明した。したがって、白筋タイプ骨格筋を主に障害する筋

ジストロフィー症では病態の把握あるいは治療効果の判定には感度が低い可能性がある。

そこで我々は、抗体 ML 544 を大量生産してアフィニティーカラムを作成し、ヒト骨格筋ミオシン軽鎖より赤筋タイプを吸着し、白筋タイプを主とした軽鎖を分画してこれを抗原に、再びマウスハイブリドーマを用いて、白筋タイプミオシン軽鎖を特異的に測定するアッセイ系を確立する準備を整え、本年度中には確立する予定である。

## 20. 各種プロテアーゼ・インヒビター投与の筋ジストロフィー症マウスに対する効果

辻班員は Actinonin, Diprotin-A, Formestin-A および FUT-175 の 4 種類の蛋白質分解酵素阻害物質を発症初期の筋ジストロフィー症 (dy) マウスに 4 週間および 6 週間連続投与する実験を行ない、これら酵素阻害物質の筋ジストロフィー症に対する *in vivo* における疾病抑制効果について検討した。

実験は生後 4 週間の C 57 BL/6 J-dy 系の疾病 (dy) マウス各 3 頭ずつを一組とし、各阻害物質の食塩水溶液 (1 mg/1 ml) を 0.2ml ずつ 1 日 2 回背部皮下に連日注射し、投与期間終了後屠殺した被検マウスにつ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, CPK, GOT および LDH の活性を測定した。又、同時に採出した被検マウスの腓腸筋で光顕用組織標本を作製し、組織学的検索を行なった。

結果は CPK および PK の活性に関しては 4 種類の酵素阻害物質投与群全てについて血清中遊出活性が低下し、骨格筋中に存在する活性が増加し、正常マウスの状態に近づくという傾向が認められ、疾病抑制に有効であることを示していた。LDH 活性の変化に関しても Diprotin-A 投与マウス骨格筋中の活性を唯一の例外として疾病抑制の傾向が認められたが、GOT 活性に関しては対照マウスとの間にあまり顕著な差異は見られなかった。

又、腓腸筋標本による組織学的観察も組織像の悪化の程度の軽減という結果を示しマーカー酵素の活性変化に見られる改善傾向を支持していた。更に投与期間中の体重変化は Formestin-A と FUT-175 で顕著な増加を示していたが他の 2 種類の阻害物では対照と変わらない変化を示していた。これらの結果は mdx マウスについて行なった実験結果とほぼ一致しており、今回用いられた酵素阻害物質は程度の差はあるがいずれも mdx マウスならびに dy マウスという異なった遺伝子によって発現される 2 種類の疾患モデル動物に共通して症状抑制に有効であることから、筋ジストロフィー症の治療薬として症状進行に対する軽減効果を期待出来るものと推察される。

## 21. 糖原病 II 型ウズラの EST 治療の試み

杉田班員は酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼ欠損を示す糖原病ウズラの病態の解明と治療を目的として以下の実験を行なった。

本ウズラ骨格筋中の酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は胎生期より正常の 20~30% と低く、これがリソゾーム内のグリコーゲン蓄積の原因であると考えられている。我々は、まずニワトリ骨格筋より大量に同酵素を精製した後、家兎を用いて免疫し抗体を得た。この抗体がウズラ酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼと交叉することを確認し、粗抽出液での酵素分子種の変化をイムノプロット法を用いて検索した。結果は以下に示す通りである。

- 1) 正常ウズラ骨格筋には 110K と 98K の 2 種の免疫交叉物質が存在するが、後者が精製酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼに対応した。
- 2) 糖原病ウズラ骨格筋には 110K のみが存在し、正常筋に見られる mature form である 98K 分子は検出されなかった。
- 3) 両ウズラ線維芽細胞を用いた実験により、リソゾーム中にはある程度活性を持った酵素が確かに存在した。



以上の事実より、糖原病ウズラにおいては前駆体は合成されるが、正常のプロセッシングが行なわれないか、又はリソゾームへの移行に一部欠陥がある可能性が考えられた。次に、これらがヒト成人型糖原病II型に類似しているため、タンパク分解を抑えることにより酵素の異常な分解が抑制されてグリコーゲン蓄積が軽減するのではないかと考え、リソゾームカテプシン類の強力な阻害物質である EST を用いて同疾患の治療の試みを行なった。

まず、ウズラ線維芽細胞を EST の存在下で 5 日間培養し、酸性  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の上昇が見られるかどうかを検討した。その結果、EST 0.1 $\mu$ g/ml においても同酵素活性の 1.5~2 倍上昇が見られ、確かにカテプシン B & L を阻害することにより、他のリソゾーム酵素の分解が抑制され、糖原病においても一部欠損している酵素活性の回復が観察された。

## 22. 実験的筋炎モデル動物の作製に関する研究

### ——自己免疫筋疾患抗原物質のモノクローナル抗体による解析——

里吉班員は多発性筋炎、皮膚筋炎および重症筋無力症などの自己免疫筋疾患の実験モデル動物を作製し、これらを用いて低分子酵素阻害物質の薬効を評価することを目的とする。

昨年度、ラットやヒト筋肉の生理食塩水(PBS)抽出物中に、筋炎患者の一部や、重症筋無力症患者の半数以上の患者血清の IgG と抗原抗体反応を起こす物質があることを報告した。また、この抗原 (muscle extract antigen: ME antigen) に対するモノクローナル抗体を作製したことも報告した。本年度はこのモノクローナル抗体の特性と、それを用いて、ME antigen のいくつかの性質を明らかにした。以下に、結果を示す。

- 1) 抗 ME antigen モノクローナル抗体は 3 種類得られた。1E7, 2B2 は同一エピトープを、7D9 は異なるエピトープを認識する。2 種のエピトープは同一分子内に存在し、患者血清中に同じエピトープを認識する抗体が存在する。
- 2) ME antigen はラットでは骨格筋と心臓に局在するが胸腺にも微量存在する。胸腺との関連は自己免疫疾患の発症機序との関連で興味深い。
- 3) ME antigen は培養筋細胞で調べると、融合し多核となった筋管細胞でのみ発現し、しかも細胞外へ分泌される。よって、ME antigen は筋特異的細胞外マトリックス構成成分である可能性が高まった。
- 4) 高性能高速液体クロマトグラフィーの使用によって ME antigen が精製できる見通しとなった。精製品を用いて、構造解析、モデル動物作製に着手しつつある。

以上

# 分担研究報告

