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54年度研究報告書

班 長 今 堀 和 友

昭和55年 3 月

研究報告書作製にあたって

筋ジストロフィー症，特にドシャンヌ型のものはきわめて重篤な遺伝病であり，一旦発症すれば20才前後で死亡するし，発症率も1万に1人と比較的高いため難病の中でも重視されるべきものの1つである。

本症が遺伝病であることもあって，その根本的治療はきわめて困難な状態にある。しかしながら，本症は筋肉の崩壊を伴うものであるから，この崩壊を喰い止めることができれば本症の進行も喰い止めることができることは充分予想される。

筋肉の崩壊は筋肉細胞の細胞質に存在するプロテアーゼによるものと考えられるが，現在までのところその様なプロテアーゼとしては，カルシウムで活性化される中性プロテアーゼ (CANP)，カテプシンB，カテプシンLが候補となる。したがって，これらのプロテアーゼを特異的に阻害する薬物があれば，上記の治療薬となる可能性が生じる。

この様な観点から，治療薬となりうる見込みのあるものとして，ロイペプチンと E-64 が厚生省でとりあげられ，それぞれの開発を積極的に援助するため，それぞれについて研究組織が構成されることとなった。E-64 は大正製薬で開発された試薬であるが，CANP の阻害について研究していたこともあって，私が E-64 開発班の班長を命ぜられることになった。

本研究班の目的は実用に適する治療薬の開発である。それ故にこそ，私は軽々しく臨床への試用をさけ，まず基礎的データを蓄積することが大切だと考え，大別して3つの方向から研究を進めることを考えた。その第一は E-64 及びその類縁体の製造である。治療薬として実用化されるためには，前記プロテアーゼのみを特異的に阻害し，他の酵素は阻害せず，また副作用を伴わないものであることが必要条件となる。そのためには微生物の二次代謝産物である E-64 にさらに手を加え，上記条件をよりよく満足するものを開発することを目指した。その結果，E-64-a, E-64-b, E-64-c の3種類が候補として残ってきた。第二は in vitro における E-64 及びその類縁体の効果の判定である。ここにおいては，CANP やカテプシン類に対する阻害機構の解明，至適濃度の決定の他，他の代謝酵素に対する影響をも研究することとした。第三には in vivo における E-64 の効果の研究である。このグループでは E-64 及びその類縁体の毒性試験，一般薬理試験の他に，吸収，排泄，臓器分布，体内代謝など，実用に要する基礎的データをできる限り広く集めることを試みた。これに加えてモデル疾患動物に投与し，治療効果の判定にも着手している。

幸いにも各班員諸氏の御努力のおかげで，めざましい研究成果がこの一年間で得られたのである。本研究が厚生省の行った新薬開発研究事業の最初の例の1つであることから，この研究成果の今後に及ぼす影響も大きいと考えられるので，ここに研究の詳細をまとめて刊行することとした。この成果がわれわれの次年度の研究の大きな礎石となることは別としても，近縁の研究を行っておられる方々の御参考にもなると信じている。

最後に，本研究の推進に援助を惜しまれなかった厚生省薬務局の方々，本研究に協力され，かつ多忙の中にも報告書を執筆して頂いた班員の方々，さらに本報告書の作製を含め，本研究の事務を担当して頂いた大正製薬の方々に深く感謝するものである。

今　堀　和　友

目　次

研究報告書の作成に当って ……今堀　和友　3

Ⅰ　製　造　方　法

1．E-64 及びその類縁体の製造法に関する研究 ……沢田　二郎　9
2．L-トランスエポキシコハク酸製造法に関する研究 ……沢田　二郎　15

Ⅱ　安　全　性

3．E-64 及びその類縁体の急性及び亜急性毒性に関する研究 ……大関　正弘　25
4．E-64 及びその類縁体のサルモネラ菌に対する突然変異原性
　に関する研究 ……大関　正弘　37
5．E-64 及びその類縁体の生体膜に対する作用に関する研究 ……大関　正弘　41
6．E-64 及びその類縁体の局所刺激作用に関する研究 ……大関　正弘　45
7．E-64 及びその類縁体の細胞毒性に関する研究 ……大関　正弘　47

Ⅲ　In vivo の効果

（効力試験）
8．E-64 の筋ジスチキンに対する効果（臨床観察）……杉田　秀夫　51
9．E-64 及びその類縁体の薬効に関する研究 ……大関　正弘　55
（一般薬理）
10．E-64 の一般薬理作用……福原　武彦　63
　～特に呼吸・循環機能及び中枢神経系に及ぼす影響～

Ⅳ In vitro の効果

11. 微生物が産生するプロテアーゼ阻害物質の成熟ネズミ肝初代培養細胞に対する影響 ……市原　明　83
12. 培養筋細胞に対する E-64 の作用 ……小沢鉄二郎　91
12追補. E-64 処理を施したニワトリ骨格筋培養細胞の電子顕微鏡観察 ……大槻　磐男　95
13. 筋ジストロフィー症における筋膜脂質に関する研究 ……宮武　正　99
～筋ジストロフィーチキンの筋ガングリオシドに及ぼす E-64 の効果について～
14. 筋蛋白質代謝回転 ……江橋　節郎　103
15. E-64 及び E-64 誘導体によるラット肝カテプシンB及びLの阻害について (in vitro, in vivo) ……勝沼　信彦　109
16. カルシウムプロテアーゼと蛋白質燐酸化反応による生理機能の調節に関する研究 ……西塚　泰美　117
17. Ca 依存性中性プロテアーゼ (CANP) に対する E-64 の効果 ……今堀　和友　131
18. Ca 依存性プロテアーゼの活性測定法の問題点 ……杉田　秀夫　139

Ⅴ 吸収，分布，代謝，排泄

19. E-64 及びその類縁体の生体内動態に関する研究 ……大関　正弘　145
20. E-64 のラット肝薬物代謝酵素に対する影響 ……北川　晴雄　155
21. E-64 及びその類縁体の生物薬剤学的研究 ……沢田　二郎　159

I 製造方法

1. E-64 及びその類縁体の製造法に関する研究……沢田　二郎

2. L-トランスエポキシコハク酸製造法に関する研究……沢田　二郎

1. E-64 及びその類縁体の製造法に関する研究

沢 田 二 郎*

研究協力者 花 田 和 紀* 玉 井 正 晴*
安 達 孝* 小 熊 清 司*
大 村 貞 文*

目　的

E-64 は Asp. japonicus の固体培養物中より発見されたチオールプロテアーゼ特異阻害物質である[1]。今堀[2]及び Sugita ら[3]は本化合物及びその類縁体が動物筋肉中のチオールプロテアーゼである Ca^{++} activated neutral protease（以下 CANP と略）活性を強く抑制することを明らかにし，更に筋ジストロフィー症鶏への投与実験により in vivo においても本酵素に有効に作用することを認めた。我々は既に E-64 及びその類縁化合物の醗酵法並びに合成法による製造法を報告して来た[1),3)~6)]。

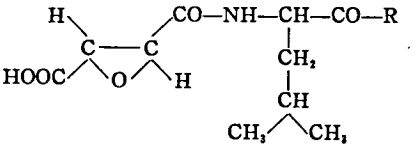
本研究の目的は人の進行性筋ジストロフィー症に対する本薬剤の臨床的な適用を意図し，その開発研究に携わる「E-64 開発研究班員」への試料の供給並びに医薬品開発に必要な製造法に関する基礎的な検討にある。

方　法

1. E-64 及びその類縁体 E-64-a, -b, -c の製造法の検討並びに製造

E-64 及びその類縁体の構造を表 1 に示した。これらの合成法並びに得られた DL-E-64 及びその混合物から各 L 及び D 体の分別結晶については大筋において既報[6]の方法に従った。又，一部アグマチンを出発原料として Hanada らの方法[4]も再検討した。

表 1　E-64 及びその類縁体の構造



	R
E-64	$-NH-(CH_2)_4-NH-\underset{\underset{NH}{\parallel}}{C}-NH_2$
E-64-a	$-NH-(CH_2)_4-NH_2$
E-64-b	$-NH-\underset{\underset{COOH}{\mid}}{CH}-CH_2-\underset{\underset{CH_3}{\mid}}{CH}-CH_3$
E-64-c	$-NH-CH_2-CH_2-\underset{\underset{CH_3}{\mid}}{CH}-CH_3$

類縁体 a, b, c については基本的には E-64 の合成法に従い，ペプチド合成の常法により合成した。類縁体の合成の各段階の反応は大別して 5 つの型に分類出来るのでその代表例を以下に述べる。又，表 1 の R にあたるアミン部分の原料合成は全て既報の方法[4]によった。

1) t-Butoxycarbonyl-L-leucyl-L-leucine ethyl ester

t-Butoxycarbonyl-L-leucine monohydrate (17.4 g), L-leucine ethyl ester hydrochloride (13.7 g), N-methylmorpholine (15.5 g) 及び 1-hydroxy benztriazole (10.4 g) を tetrahydrofurane 300 ml 及び dimethylformamide 10 ml の混液に懸濁し，氷冷攪拌下，1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (14.8 g) を徐

* 大正製薬株式会社総合研究所

々に加え，氷冷攪拌下2時間，更に室温で5時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し，残渣を300 ml の AcOEt 及び 200 ml の水に溶解した。その AcOEt 層を取り，10% citric acid, 飽和 $NaHCO_3$, 飽和 NaCl 水で順次洗浄，乾燥後 100 ml になる迄濃縮し，n-hexane を加えて結晶化した。収量 19 g (73%), mp 139～140°, $[\alpha]_D^{29}$ −49.8°(C=1, EtOH), Anal. Calcd. $C_{19}H_{36}N_2O_5$: C, 61.26; H, 9.74; N, 7.52. Found: C, 61.36; H, 9.98; N, 7.35.

2) L-leucyl isoamylamine

t-Butoxycarbonyl-L-leucyl-isoamylamine (18 g) を 99% HCOOH 200 ml 中に溶解し，室温に3時間放置後，減圧濃縮した。残渣を水 100 ml に溶解し，氷冷下 10% NaOH 水溶液にてアルカリ性にした後，chloroform にて抽出した。chloroform 層を飽和 NaCl 水にて洗浄，乾燥後溶媒を留去し，そのまま次の反応に利用した。

3) N-〔N-(L-3-trans-ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-leucyl〕-L-leucine ethyl ester

L-Monoethyl epoxysuccinate (8.54 g), L-leucyl-L-leucine ethyl ester (14.28 g) 及び 1-hydroxy benztriazole (7.43 g) を tetrahydrofurane 200 ml に懸濁し，氷冷攪拌下，dicyclohexylcarbodiimide (15.9 g) の tetrahydrofurane 溶液 100 ml を滴下した。氷冷下2時間，更に室温で5時間攪拌した後，生じた沈でんを沪別し，沪液を 50 ml になる迄濃縮し，AcOEt 200 ml で稀釈した。これを 1 N HCl, 飽和 $NaHCO_3$, 飽和 NaCl 水で洗浄，乾燥後，溶媒を留去した。残渣を ethyl ether に溶解し，petroleum ether を加えて結晶化した。収量 14.5 g (67%), mp 94～95°, $[\alpha]_D^{23}$ +18.7° (C=1, EtOH), Anal. Calcd. $C_{20}H_{34}N_2O_2$: C, 57.94; H, 8.27; N, 6.76. Found: C, 57.77; H, 8.23; N, 6.81.

4) N-〔N-(L-3-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl〕-isoamylamine (E-64-C)

N-〔N-(L-3-ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-leucyl〕-isoamylamine (19.6 g) を ethanol 150 ml に溶解し KOH (4.8 g) の ethanol 溶液 60 ml を氷冷攪拌下滴下した。氷冷下1時間，更に，室温で1時間攪拌後，反応液に氷水 700 ml を加え AcOEt にて抽出した。水層を氷冷しながら，HCl で pH 2 以下に調整し，AcOEt で抽出した。AcOEt 層を飽和 NaCl 水で洗浄し，乾燥後濃縮し ethyl ether を加えて結晶化した。収量 16.3g (80.6%) mp 158～159°, $[\alpha]_D^{25}$ +51.7° (C=1, EtOH) Anal. Calcd. $C_{15}H_{26}N_2O_5$: C, 57.31; H, 8.34; N, 8.91. Found: C, 57.29; H, 8.13; N, 8.78.

5) N-〔N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl〕-1, 4-diaminobutane (E-64-a)

N-〔N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl〕-N′-benzyloxycarbonyl-1, 4-diaminobutane (3.8 g) を MeOH: AcOH: H_2O (8:2:1) 混液 80 ml に溶解し，5% Pd-C (1.2 g) を加え弱い水素気流下室温で6時間激しく攪拌した。触媒を沪別後，沪液を濃縮し，acetone 及び ethyl ether を加え生じた沈でんを沪取し，H_2O-acetone より結晶化した。収量 2.16 g (81%) mp 203～205° (decomp.), $[\alpha]_D^{23}$ +30.6° (C=1, H_2O), Anal. Calcd. $C_{14}H_{25}N_3O_5$: C, 53.32; H, 7.99; N, 13.33. Found: C, 53.02; H, 7.89; N, 13.04.

2. E-64 及びその類縁体の ^{3}H-ラベル体の製造

1の方法で得られた DL-E-64 及びその類縁体を Wiltzbach 法により ^{3}H 置換した[7]。

結果及び考察

E-64 の合成ルート及び収率は図1に示した。この方法で得られた L-E-64 及び D-E-64〔L 及び D は各々構成々分であるトランス－エポキシコハク酸の光学活性を示し，それぞれ (2S, 3S) 及び (2R, 3R) の配位を有している。〕の物性を表2に示す。合成的に得た L 体の E-64は天然の E-64 とよく一致した。K. Hanada の方法[4] と比べると行程数も短縮出来，収率も大幅に上昇したが，なお煩雑で overall の収率が低い。E-64 の構成々分の一つであるアグマチンを出発原料として利用し，K. Hanada の方法[4] を一部改良した方法も検討した。行程

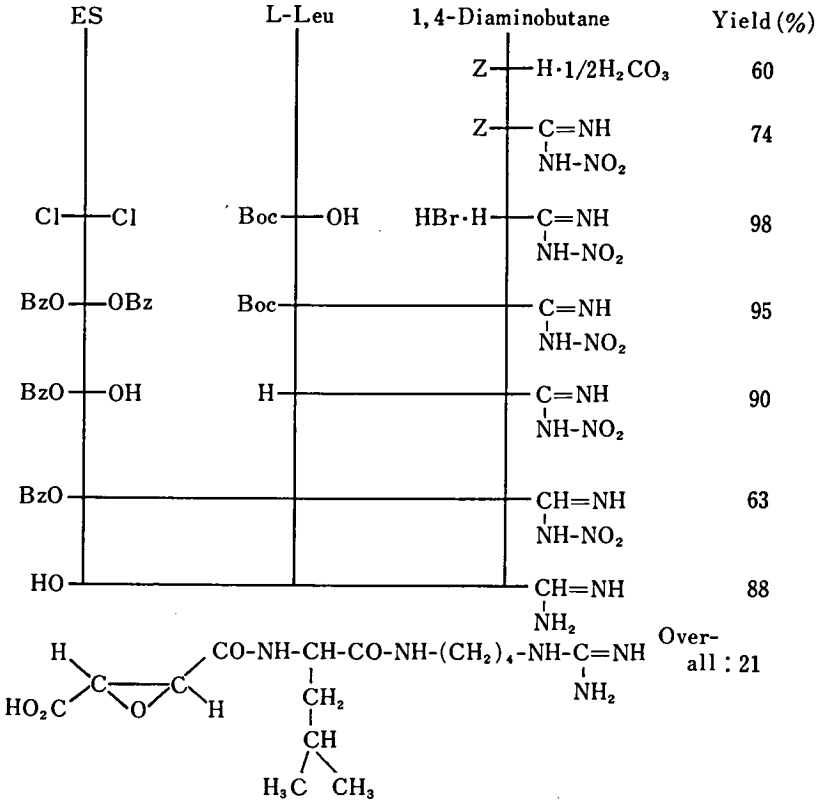


図1 E-64 の合成法

表 2 合成L及び D-E-64 の物性

	Natural		L		D	
mp	231—234°		233—237°		196—200°	
$[\alpha]_D^{28}$ (c=1, 0.1 N HCl)	+24.4°		+24.0°		−77.9°	
Elemental analysis	Found.	Calcd.	Found.	Calcd.	Found.	Calcd.
C	49.47	49.17	49.01	49.17	45.69	45.79
H	7.56	7.70	7.65	7.70	7.85	7.94
N	19.15	19.11	19.06	19.11	17.97	17.80
Molecular formula	$C_{15}H_{27}N_5O_5 \cdot 1/2\,H_2O$		$C_{15}H_{27}N_5O_5 \cdot 1/2\,H_2O$		$C_{15}H_{27}N_5O_5 \cdot 2\,H_2O$	
HPLC k′	5.64		5.64		6.18	

(HPLC: Nucleosil 5 C_{18}, 4 x 150 mm, 55°, 0.5% H_3PO_4 −10% CH_3OH-H_2O)

数は短くなる利点はあるが，アグマチンが高価であること，又，エポキシコハク酸モノエステルよりの収率が図1の方法では約55%であるのに比して約30%と低いことが欠点である。アグマチン及び光学活性エポキシコハク酸モノエステルが容易に又安価に入手出来れば，この方法を利用した E-64 の合成は更に容易になると思われる。

類縁体 a, b, c の合成ルート及び収率を図2～4に括めた。又，それらの物性を表3に示した。本年度中に得られた E-64 及びその類縁体の総計を表4に示す。いずれの類縁体も E-64 に比較し，その合成行程も短く，しかも高収率で得られることが解った。又，実験室レベルで

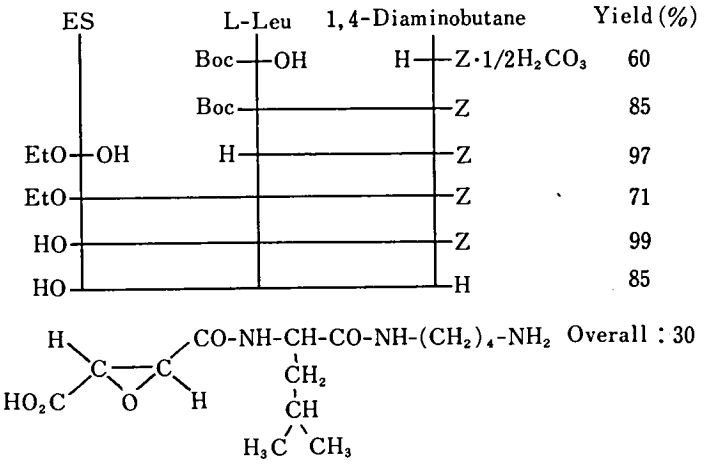


図2 E-64-a の合成法

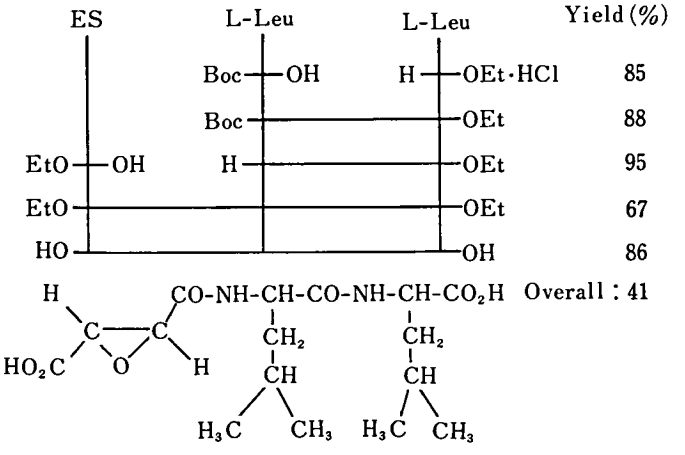


図3 E-64-b の合成法

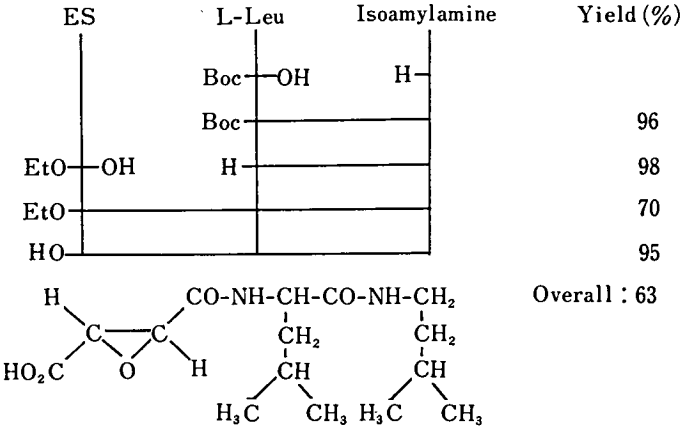


図4 E-64-c の合成法

表 3 E-64 類縁体の物性

Compound		mp (°)	$[\alpha]_D$	Molecular formula (MW)
E-64-a	L	220—225 (decomp.)	+62.1° (c=1, H_2O, 28°)	$C_{14}H_{25}N_3O_5$
	D	195—199 (decomp.)	−70.0° (c=1, H_2O, 25°)	(315)
E-64-b	L	105—107	+20.0° (c=1, EtOH, 26°)	$C_{16}H_{26}N_2O_7$
	D	205—207 (decomp.)	−96.3° (c=1, EtOH, 26°)	(348)
E-64-c	L	158—159	+51.7° (c=1, EtOH, 29°)	$C_{15}H_{26}N_2O_5$
	D	83— 85	−88.0° (c=1, EtOH, 30°)	(314)

表 4 昭和54年度に製造した E-64 及びその類縁体の総量

		(g)
E-64	DL	47
	L	100
E-64-a	DL	24
	L	5
	D	0.1
E-64-b	DL	21
	L	4
	D	0.5
E-64-c	DL	17.5
	L	342
	D	0.1

はスケールアップも可能である。c, b, a の順に合成が容易であり，それぞれの overall の収率にそれが反映されている。aについては光学的に純粋なモノベンジルエポキシコハク酸が得られれば1段階行程が短縮出来，より収率が上昇すると思われる。bについては，D体は結晶性が良いのに反し，L体は悪い。この点が大きな欠点となっている。一方，cは中でも一番行程数が短く，各段階の収率も総じて高く，又，結晶性も良く合成に関してはほとんど問題がない。cに関するかぎり大量合成の最大の問題点は光学的に純粋なモノエチルエポキシコハク酸製造法にあり，この問題が解決すれば医薬品として開発して行く上での製造上の大きな問題はなくなると思われる。

^{3}H-体の製造結果は表5に示す様に E-64, -a, -c については ^{3}H 置換，単に精製し使用出来る標品が得られたが，E-64-b は生成物が不安定なため，Wiltzbach 法により^{3}H-ラベル体を得ることは出来なかった。

表 5 ^{3}H-ラベル化合物の製造

	Total radioactivity (mCi)	Specific activity (μCi/mg)
E-64	21.62	92
E-64-a	2.04	22.9
E-64-c	18.25	365

(by Wiltzbach method)

結　論

1. E-64 及びその類縁体の合成的製造法を確立し，必要なサンプルを各班員に供給した。
2. E-64 及びその類縁体の ^{3}H-ラベル体を製造し，各班員に研究材料として提供した。

文　献

1) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., Tanaka, I.: Isolation and Characterization of E-64, a new thiolprotease inhibitor, Agric. Biol. Chem., 42, 523, 1978.

2) 今堀和友：細胞内蛋白分解酵素の新しい役割，第20回医学会総会々誌 I, 60, 1979.

3) Sugita, H., Ishiura, S., Suzuki, K., Imahori, K.: Inhibition of epoxide derivative on chicken calcium-activated neutral protease (CANP) in vitro and in vivo, J. Biochem., 87, 339, 1980.

4) Hanada, K., Tamai, M., Ohmura, S., Sawada, J., Seki, T., Tanaka, I.: Structure and synthesis of E-64, a new thiolprotease inhibitor, Agric. Biol. chem., 42, 529, 1978.

5) Hanada, K., Tamai, M., Morimoto, S., Adachi, T., Ohmura, S., Sawada, J., Tanaka, I.:

Inhibitory activity of E-64 derivatives on papain, Agric. Biol. Chem., 42, 537, 1978.

6) Hanada, K., Tamai, M., Morimoto, S., Adachi, T., Oguma, K., Ohmura, S., Ohzeki, M.: A specific thiolprotease inhibitor, E-64 and its derivatives, Peptide chemistry, 1979, 31, 1979.

7) Wiltzbach, K. E.: Tritium-labelling by exposure of organic compounds to tritium gas, J. Am. Chem. Soc., 79, 1013, 1957.

2. L-トランスエポキシコハク酸製造法に関する研究

沢田二郎*

研究協力者 花田和紀* 玉井正晴*
安達孝* 小熊清司*
金岡祐一** 飯塚廣***

目的

筋肉中には Ca^{++} により選択的に活性化を受ける中性チオールプロテアーゼ (CANP) が存在する[1]。このプロテアーゼの異常な活性化が筋ジストロフィー症発症の一つの要因であるとする有力な推論がある[2),3)]。従って，可能な治療法の1つとして CANP 阻害剤の開発が望まれている。

Asp. japonicus TPR-64 の培養エキスから単離された E-64[4] が CANP 阻害剤として効果的であること[5]，更には，E-64類縁体研究の過程から有力な類縁体 E-64-a,-b,-c がクローズアップされて来た[6]。

L-トランスエポキシコハク酸（以後，L-t-ES と略す）は E-64 及びその類縁体のチオールプロテアーゼ阻害に必須の活性基である[7]。

E-64 及びその類縁体 a, b, c の光学異性体のCANPに対する阻害作用について今堀ら[8]は t-ES が (2S, 3S) 配位を有するL体の方が，(2R, 3R) 配位を有するD体に比して極めて高い活性を示すことを述べている。従って，E-64 及びその類縁体をヒト筋ジストロフィー症治療薬として開発していく上で，工業的規模で応用可能な L-t-ES 製造法を確立することが極めて重要である。

* 大正製薬株式会社総合研究所
** 北海道大学薬学部薬品合成化学講座
*** 東京理科大学理工学部応用生物科学科

本研究の目的は光学活性 L-t-ES を選択的に製造する方法を開発し，E-64 及びその類縁体の製造原料として供することにある。

1. 合成法による L-トランスエポキシコハク酸製造法の検討

方法及び結果

K. Mori ら (1979) は δ-mutistriatin 合成の中間体として，L-diethyl-trans-epoxysuccinate を得ている。我々はこの方法を一部改良し，D-酒石酸から，簡単な操作で，高収率に L-diethyl-trans-epoxysuccinate を得，次いで水酸化カリウムで部分加水分解してモノエチルエステルK塩の白色結晶を得た。更にこれを水に溶かし，塩酸処理によりモノエチルエステルを結晶として得た。この経路の概要を図1に示す。以下各操作を詳述し，得られた化合物の物理恒数を示す。

L-Diethyl-trans-epoxysuccinate

Diethyl-2-hydroxy-3-bromosuccinate 70 g を acetone 420 ml にとかし，氷冷攪拌下，triethylamine 52.6 g を滴下し，室温で6時間攪拌した。析出した白色塩を沪別し，沪液を減圧下濃縮し，ethylether 500 ml を加え，水，1 N HCl，飽和 $NaHCO_3$ 水，飽和 NaCl 水で順次洗浄し，無水 $MgSO_4$ で乾燥した。エーテルを留去したのち，シリカゲルカラムクロマトグラフィー (benzene : acetone = 100 : 3) で精製し，油状物を得た。収量，32 g（収率65.4%）。

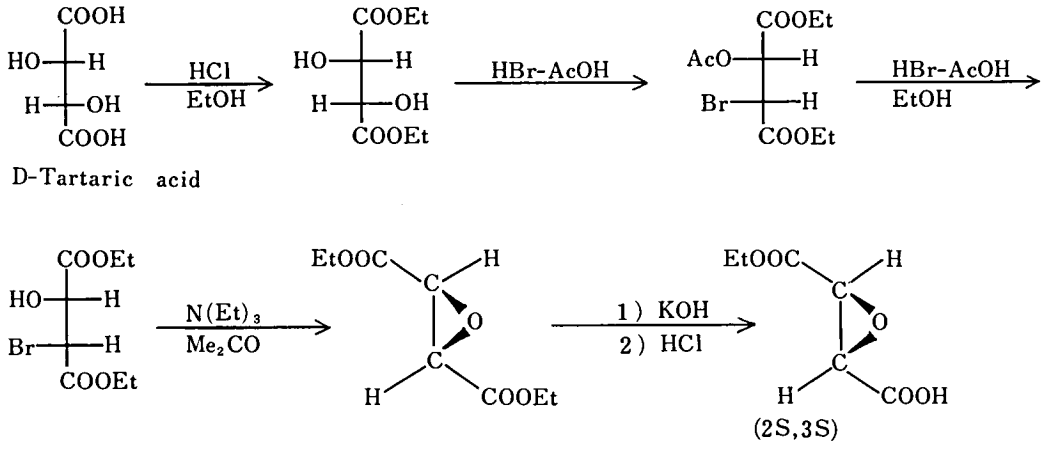


図1 光学活性トランスエポキシコハク酸モノエチルエステルの製造法

L-Ethyl,hydrogen-trans-epoxysuccinate

L-Diethyl-trans-epoxysuccinate 90.12 g を ethylalchol 300 ml にとかし，ethylalchol 200 ml にとかした potassium hydroxide 29.57 g を氷冷攪拌下滴下し，そのまま1時間攪拌した。さらに，室温で2時間攪拌したのち，ethylether 400 ml を加え，生じた白色結晶を沪取し，L-ethyl, potassium-trans-epoxysuccinate 67.72 g を得た。これを dil. HCl にとかし，ethylacetate で抽出し，水で1回洗浄後，無水 $MgSO_4$ で乾燥した。減圧で濃縮後，ethylether-petroleum ether から結晶化した。収量，52.0 g (68%)，mp 61.5-62.5°，$[\alpha]_D^{25}+114.4°$ (c=1, EtOH)，Anal. Calcd. $C_6H_8O_5$: C, 45.00; H, 5.04. Found: C, 45.04; H, 5.18.

考　　察

DL-トランスエポキシコハク酸は合成的に，G. B. Payne ら (1959) によりフマール酸から得る方法が確立しているが，天然 E-64 の構成々分であるL体に関しては，K. Mori らにより僅かに，D-酒石酸から L-diethyl-trans-epoxysuccinate の合成法が報告されているだけである。我々はこの方法を一部改良し，図1に示したルートにより最終的に高純度のL-トランスエポキシコハク酸モノエチルエステルを得ることに成功した。Mori らは diethyl-2-hydroxy-3-bromosuccinate をエポキシ化する際に，エタノール中，ナトリウムエトキシドを使用しているが，この方法は金属ナトリウムを使用するため，大量にブロモヒドリンを処理するには必ずしも適当ではない。我々は，安全にしかも効率よくこの行程をスケールアップする目的で，有機塩基を種々検討したところ，トリエチルアミンが最適であることがわかった。この際，溶媒系はアセトンあるいはジクロルメタン等を用いると反応速度も大きく実用性が高いことが明らかになった。アセトン中，トリエチルアミンによる反応は，後処理が簡単で，大量処理が容易であり，しかも光学的に高純度の目的物を得ることができる。

然しながら，この方法は原料として非天然型D-酒石酸を用いねばならず，実験室レベルでの合成法としてはすぐれているが，将来，E-64 或いはその類縁体の原料の大量供給法としてはコストの面で問題が残り，今後更に検討し，D-酒石酸に代りうる安価な原料を確保する必要がある。

2. 光学分割法による L-トランスエポキシコハク酸製造法の検討

目　　的

L-トランスエポキシコハク酸製造法研究の一環として合成的に得られるDL-トランスエポ

キシコハク酸を出発原料としてこれを化学的に分割するに必要な分割剤を開発する。

方　法

分割剤として安価に，しかも容易に製造可能なアミンを用い，酸とアミンとのジアステレオマー塩形成によるトランスエポキシコハク酸分割法を検討した。

DL-トランスエポキシコハク酸は，Payneら(1959)の方法によりフマール酸より合成し，これを出発原料とした。合成法の概要を図2に示す。

本報で使用した分割剤の一覧を表1に示す。これらのうちアミノアルコール及び，アミノ酸アミドの製造法は文献に従った。その概要及び文献を表2にまとめて示した。その他のものは市販特級試薬を使用した。

結　果

(1) アミノアルコール類による分割

分割剤として，先ずアミノアルコールについて検討した。L-チロシノール，L-バリノール，L-プロリノールはいずれも塩の結晶化が困難であり，D-α-フェニルグリシノール，L-トリプトファノールは低光学収率であったが，L-フェニルアラニノールにより高純度の右旋性のL-トランスエポキシコハク酸を得ることができ，塩形成の母液よりD-フェニルアラニノールを用いて左旋性のものを得ることができた。

(2) アミノ酸アミド類による分割

次いで，より塩の結晶性のよいことが期待さ

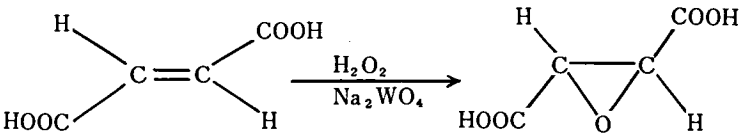
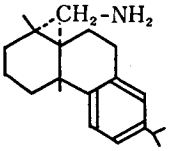


図2　DL-トランスエポキシコハク酸の合成法

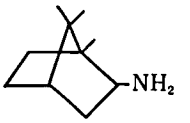
表1　被験化合物

L-Phe-ol
L-Tyr-ol
L-Try-ol
L-Val-ol
L-Pro-ol
D-α-PhGly-ol
L-Phe-NH_2
L-Tyr-NH_2
L-Try-NH_2
L-Pro-NH_2
D-α-PhGly-NH_2
D-N,N-Dimethyl-α-PhGly-NH_2
L-N,N-Dimethyl-Phe-ol
α-Phenylethylamine
α-(p-Nitrophenyl) ethylamine

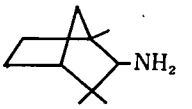
Dehydroabiethylamine



exo-Bornylamine



Fenchylamine



Nicotine

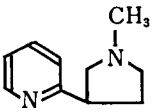
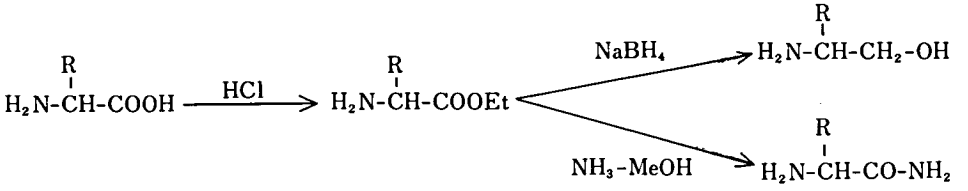


表2 分割剤の製造法



L-Phenylalaninol
S. Yamada et al., Chem. Pharm. Bull., **13**, 995, 1965.
L-Phenylalanine amide
F. Bergel and M. A. Pentherer, J. Chem. Soc., 3973, 1964.
K. Blau and S. G. Waley, Biochem. J., **57**, 538, 1954.
D-α-Phenylglycine amide
D. G. Neilson and D. E. Ewing, J. Chem. Soc. (c), 393, 1966.

表3 トランスエポキシコハク酸の分割例

Resolving agent	Salt		t-Epoxysuccinic acid	
	Composition (acid : amine)	$[\alpha]_D$ (MeOH)	$[\alpha]_D$ (EtOH)*	Overall yield (%)
L-Phenylalaninol	1 : 2	+39.8°	+121°	40.0
L-Phenylalanine amide	1 : 1	+64.6°	+110°	68.0
D-α-Phenylglycine amide	1 : 2	−62.8° (H_2O)	+111°	32.2
Dehydroabiethylamine	1 : 2	+50.8°	+116°	26.2

* +117.8° [J. Ohhashi and K. Harada, Bull. Chem. Soc. Japan, **40**, 2977, 1967.]

れるアミノ酸アミド類について検討した。L-プロリンアミドの塩は吸湿性であり，L-チロシンアミド，L-トリプトファンアミドは低光学収率であったが，L-フェニルアラニンアミドとD-α-フェニルグリシンアミドでは満足すべき光学収率であった。分割剤のアミノ基のエポキシ基への付加反応をさけるために，D-α-フェニルグリシンアミドのアミノ基をジメチル化したものを分割に用いたが塩の結晶化が困難であった。

(3) アミン類による分割

さらに，アミノ酸以外のアミンについて検討した。ニコチンの塩は吸湿性であり，L-α-フェニルエチルアミン，L-α-(p-ニトロフェニル)-エチルアミン，エキソボルニルアミン，フェンチルアミンでは低光学収率であったが，デハイドロアビエチルアミンでは純粋な右旋性のL-トランスエポキシコハク酸を得ることができた。

以上，3つのグループの分割剤のうち，成功したものを比較すると，L-フェニルアラニンアミドは塩が高純度で得られ，通算収率がJ. Ohhashiら(1967)によるエフェドリンの場合よりも高いので，今回検討したもののうちで最もすぐれた分割剤といえる。次いで，L-フェニルアラニノール，D-α-フェニルグリシンアミドがすぐれている。デハイドロアビエチルアミンは収率は多少低いが，安く市販されているのでアミノ酸誘導体よりコストの点ですぐれている。これらの結果を表3にまとめて示す。

考　察

有機酸の光学分割法には塩の形成による方法，誘導体による方法，酵素を利用する方法，クロマトグラフィーを利用する方法等があるが，本研究では酸と分割剤アミンとのジアステレオマー塩形成によるDL-トランスエポキシコハク酸の光学分割法を検討した。トランスエポ

キシコハク酸の光学分割に関しては若干の報告があり，よく用いられるアルカロイド類のシンコニン，ストリキニーネ，ブルシン等では成功しなかったが，モルヒネ，エフェドリンを用いて分割できるという報告がある (Ohhashi ら 1967)。しかし，モルヒネは麻薬であり，エフェドリンは覚せい剤原料であるので，これを工業レベルで使用することは不可能である。本報では，手軽で安価に使える分割剤アミンとして，アミノ酸誘導体を中心に検討した。分割剤として市販されている α-アミノ酸の誘導体を用いているので，必要ならアンチポードのアミノ酸を用いることによりフェニルアラニンの例で示した様に任意の旋光性のトランスエポキシコハク酸を得ることができるのがこの分割法の利点である。

表3に示したように実験室レベルではあるが，安価に製造可能なDL-トランスエポキシコハク酸を効率よく分割しうる2，3の分割剤を開発することができた。しかも，これらはいずれも安価に，かつ，容易に製造しうる。今後は，このスケールアップの検討，更には，トランスエポキシコハク酸エステルの分割等，その実用化，即ち量産に対する検討が必要である。

結　論

DL-トランスエポキシコハク酸を分割し，L-トランスエポキシコハク酸を製造する目的で，安価に，しかも容易に入手しうる分割剤の開発研究を行い，少くとも実験室レベルの規模で分割可能な L-フェニルアラニンアミド等2，3の有用な分割剤を見い出すことができた。

3. 微生物学的方法による L-トランスエポキシコハク酸製造法の検討

目　的

L-トランスエポキシコハク酸製造法研究の一環として微生物学的方法による製造法を検討する。

方　法

(1) L-トランスエポキシコハク酸を培地中へ直接生成する糸状菌の検索。

(2) フマール酸から L-トランスエポキシコハク酸を生成する糸状菌の検索。

(3) DL-トランスエポキシコハク酸を資化し，D体だけを分解する微生物の検索。

以上3つの条件を設定し広く有用微生物をスクリーニングする。

結　果

(1) L-トランスエポキシコハク酸を培地中へ直接生成する糸状菌の検索

保存株45株，新たに分離した株計124株についてスクリーニングを行ったが，陽性の結果が得られなかったので，更に土壌サンプル131点から糸状菌200株を分離した。その内訳は，Aspergillus 属29株，Penicillium 属44株，Fusarium 属4株，Mucor 属26株，Rhizopus 属5株，担子菌2株，その他90株であった。現在これらの菌株についてトランスエポキシコハク酸生成能を検索中である。

(2) フマール酸から L-トランスエポキシコハク酸を生成する糸状菌の検索

分離細菌123株について，フマール酸を唯一の炭素源として資化の有無，程度を調べた。その結果，生育の良好（フマール酸を殆ど資化）なもの88株，生育中程度（残存フマール酸が認められるもの）のもの24株，生育の認められなかったもの11株であった。生育中程度の株及び最終 pH の低かった株など22株の培養沪液について，イオン交換樹脂処理により脱塩後，薄層クロマトグラフィーを行った。供試株中 E-24-1, E-20-1, E-31, E-14-1 及び b-21-1 の5株において，トランスエポキシコハク酸と Rf の一致するスポットが認められた。現在これらのサンプルについてその生成物を確認中である。又，生育の認められなかった株については，グルコース或いはコハク酸を添加して菌を生育させ，フマール酸からのトランスエポキシコハク酸への転換の有無を検索中である。

(3) DL-トランスエポキシコハク酸からD体のみを資化する微生物の検索

(2)で用いた分離細菌123株についてDL-トランスエポキシコハク酸の有無及びその程度を調べた。その結果，資化能即ち分解能のすぐれた（残存トランスエポキシコハク酸の認められないもの）株は22株，資化能はあるが残存トランスエポキシコハク酸の認められるものは4株であった。その他の株は分解能が認められなかった。現在，完全分解菌に関しては変異株の造成，又，中程度分解菌に関しては質的分解能（例えばD体のみ分解）について検討中である。

考　　察

醗酵法により直接製造する，或いはフマール酸からの変換，更にはDL体を炭素源としてD体だけを選択的に資化する微生物のスクリーニング等種々の角度から微生物を利用してL-トランスエポキシコハク酸製造法の検討を行った。

現在フマール酸を変換し培地中にトランスエポキシコハク酸と同スポットを与える糸状菌，或いは，DL体を資化するバクテリアを分離してその生成物の確認を行っている段階である。今後変異株の作成等によりこれらの微生物がトランスエポキシコハク酸製造の一手段となりうるか否かその質的な検討を行う計画である。

更には，将来の実用化を考える時，これらの基礎データをもとに今後はDL-トランスエポキシコハク酸エステルの微生物学的（酵素学的手段を含めて）分割法が重要であろう。

結　　論

醗酵法によるL-トランスエポキシコハク酸製造に有用な微生物のスクリーニングを行い，フマール酸からの変換能を有する糸状菌，或いはDL体を部分的に資化するバクテリア等数株を分離した。現在その醗酵生成物について精査中である。

総　　括

E-64及びE-64類縁体の合成原料として将来実用可能なL-トランスエポキシコハク酸の製造法の研究を開始した。

即ち，1)合成法による方法，2)DL体の光学分割法による方法，3)微生物学的方法の3つの方向からアプローチした。

合成的にフマール酸を原料としてDL体を製造することは極めて容易であり原料面での問題はないが，D-酒石酸から光学活性なL-トランスエポキシコハク酸エステルを製造するには技術上の問題は解決されたが原料の入手が困難でかつ高価なため量産法としては必ずしも実用的ではない。従って，合成的にはD-酒石酸にかわりうる原料の開発が今後の課題である。

一方，醗酵法によるL-トランスエポキシコハク酸の直接製造能を有する微生物の検索を行ったが現段階では応用可能な有用菌は見出されていない。

更に，安価に供給しうるDL体を化学的，或いは微生物学的手法で分割しL体を製造する方法を検討した。化学的方法としては容易に製造しうる分割剤を開発するという前提でアミンとアミノ酸誘導体を中心に検討し，L-フェニルアラニンアミド，デハイドロアビエチルアミン等が極めて有用であることを明らかにした。微生物学的にはその可能性を示唆するデータが得られつつあるが更に今後の検討を要する。

今後更に，これらの基礎データをもとに，エポキシコハク酸のエステル体の化学的，或いは酵素的手段による分割等も有望と期待されるので，L-トランスエポキシコハク酸の工業的規模での実用化の見通しは極めて明るいと考えられる。

参考文献

1) 今堀和友：筋肉のCa^{++}依存性プロテアーゼ，代謝，16，139，1979.

2) 石浦章一，今堀和友：筋カルシウム依存性蛋白分解酵素とその抑制物質について，日本臨床，35，3910，1977.

3) 杉田秀夫：Z線構成蛋白とカルシウム依存性蛋

白分解酵素，日本臨床，35，3915，1977.

4) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., Tanaka, I.: Isolation and Characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor, Agric. Biol. Chem., 42, 523, 1978.

5) Sugita, H., Ishiura, S., Suzuki, K., Imahori, K.,: Inhibition of epoxide derivatives on chicken calcium-activated neutral protease (CANP) in vitro and in vivo, J. Biochem., 87, 339, 1980.

6) 沢田二郎：第1回 E-64 研究班会議発表要旨，1979.

7) Hanada, K., Tamai, M., Morimoto, S., Adachi, T., Oguma, K., Ohmura, S., Ohzeki, M.: A specific thiolprotease inhibitor, E-64 and its derivatives, Peptide chemistry, 1979, 31, 1979.

8) 今堀和友：私信.

Ⅱ 安　全　性

3. E-64 及びその類縁体の急性及び亜急性毒性に関する研究……大関　正弘

4. E-64 及びその類縁体のサルモネラ菌に対する突然変異原性に関する研究……大関　正弘

5. E-64 及びその類縁体の生体膜に対する作用に関する研究……大関　正弘

6. E-64 及びその類縁体の局所刺激作用に関する研究……大関　正弘

7. E-64 及びその類縁体の細胞毒性に関する研究……大関　正弘

3. E-64 及びその類縁体の急性及び亜急性毒性に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 笹 島 道 忠* 中 根 貞 雄*
樽 本 保 男* 木 村 正 明*
河 西 章* 岸 恭 子*
尾 上 早百合*

1. 急性毒性

目 的

E-64 及びその類縁体 a, b, c の安全性研究の一環として，これらをマウス及びラットに皮下及び腹腔内投与し，その急性毒性を検討する。

方 法

動物は 4 週齢の dd 系雄マウス（静動協：体重 20 g 前後）及び 6 週齢の Wistar 系雄ラット（静動協：体重 200 g 前後）を 5～10日の予備飼育の後，実験に使用した。被験物質は E-64 をアラビアゴム懸濁液，E-64-a を生食水溶液 E-64-b 及び -c は重曹水で中和溶解後生食水溶液とし，一投与段階あて10匹の動物に各々皮下及び腹腔内投与した。各被験物質投与後 7 日間は一般症状を観察するとともに生死を確認し，死亡例は発見後できるだけすみやかに，また投与 7 日後生存例は屠殺剖検し諸臓器の異常の有無を観察した。

結 果

(1) 一般症状

マウスでは E-64 及び a, b 5000 mg/kg の皮下あるいは腹腔内投与により，投与24時間後まで自発運動の軽度な抑制とともに一ヵ所に静止状態を保つ鎮静症状が観察されたが，投与 2 日以降はこれら症状も消失し，他に新たな症状変化の発現もなかった。E-64-c の 5000 mg/kg 投与では皮下，腹腔内投与とも鎮静症状が継続した状態でうずくまったまま投与24時間以内に死亡した。しかし E-64-c の 2500 mg/kg 投与では，これらの変化はまったく観察されなかった。

ラットでの皮下あるいは腹腔内投与においてもその症状はマウスとほとんど同様であったが E-64 の皮下投与及び E-64-c の腹腔内投与で出現した死亡例はマウスの場合より死亡までの日数がやや延長し，いずれも投与 3 日目に死亡した。この間鎮静症状とともに採食活動もまったく無くなり，また被毛の粗毛化が観察された。

(2) 剖検所見

E-64-c 投与群で死亡したマウスでは皮下，腹腔内投与例とも著変は認められず，ラットでは腹腔内投与例に腹腔内脂肪の変性が観察された。投与 7 日後生存例ではマウスの場合，皮下，腹腔内投与とも，いずれの被験物質においても胸腺萎縮，腎表面の褪色性変化，肝の限局性壊死を示す例が観察された。しかしラットではこれらの変化は明らかでなかった。なおいずれの被験物質も皮下もしくは腹腔内に検液の貯留は認められなかった。

(3) LD_{50}

LD_{50} 値を一括して表 1 に示す。E-64 のラットにおける皮下投与，E-64-c のマウスにおける皮下及び腹腔内投与ならびにラットでの腹腔

* 大正製薬株式会社総合研究所

表1　E-64及びその類縁体のマウス及びラットにおける急性毒性

Animals	Route	Sex	LD_{50} (95% C. L.) mg/kg			
			E-64	E-64-a	E-64-b	E-64-c
Mice	S. C.	♂	>5000	>5000	>5000	2500—5000
	I. P.	♂	>5000	>5000	>5000	2500—5000
Rats	S. C.	♂	1000—2500	>5000	>5000	>5000
	I. P.	♂	>5000	>5000	>5000	1000—2500

内投与を除いて，いずれの場合も物理的に投与限界量である5000 mg/kgにおいても死亡例が認められず，これらの LD_{50} 値は5000 mg/kg以上と判断された。なお上記のE-64及び-cは供試サンプル量の都合上，LD_{50} 値の範囲を示すにとどめたが，いずれも1000 mg/kg以上の LD_{50} と推察された。

考　　察

E-64及びその類縁体はマウス，ラットの皮下及び腹腔内投与においてその LD_{50} 値がいずれも1000 mg/kgを越え，総じて急性毒性の弱い物質群と推察された。被験物質相互間の比較では死亡例のあったE-64及びE-64-cがE-64-a,-bに比較して若干強いようであるが，一方一般症状，剖検所見では4者の相似性が高いことから，質的にはいずれも同様な作用を有するものと考えられる。また各被験物質とも投与経路の相違による毒性の差が少ない事から，いずれの投与経路においてもほぼ同程度でかつ良好な吸収性を示す事が推察される。なお，今後更に種差，性差およびE-64-cにおける詳細な検討が必要と考えられる。

結　　論

E-64及びその類縁体のマウス，ラットにおける皮下及び腹腔内投与による急性毒性を検討し，以下の結論を得た。

1）E-64及びその類縁体a, b, cの LD_{50} 値は皮下，腹腔内投与とも1000 mg/kg以上であった。

2）いずれの被験物質も大量投与により，肝，腎への影響が示唆された。

3）投与経路及びマウス，ラット間での種差による毒性差は認められなかった。

2.　亜急性毒性—1)

目　　的

E-64及びその類縁体a, b, cの安全性研究の一環として，これらをラットに2週間皮下連続投与し，その亜急性毒性を検討する。

方　　法

(1)動物：生後5週齢のWistar系雄ラット（静動協）を1週間の予備飼育ののち，1群8匹あて群別し，実験に使用した。これらの動物の投与開始時体重は104～133 gであった。動物は温度23±2°，湿度55±5%のバリヤーシステムの動物室で飼育し，飼料（オリエンタル酵母社製MF）と水は自由に摂取させた。

(2)投与量，投与方法：検液はE-64をアラビアゴム懸濁液，E-64-aを生食水溶液，E-64-b及び-cは重曹水にて中和後生食水溶液とし，各々5，10%（w/v）液に調製した。投与量はいずれの被験物質も200及び400 mg/kgとし，投与容量は体重100 gあたり0.4 mlとして1日1回14日間，毎日定時にラットの背部に皮下投与した。対照群には5%アラビアゴム液を同様に投与した。

(3)検査項目：

1）一般症状；毎日一般症状の観察及び体重測定を行うとともに1週間に2度摂食量の測定を行った。

2）血液学的検査；14日間の投与終了後，エーテルによる軽麻酔下に眼窩静脈叢より採取した

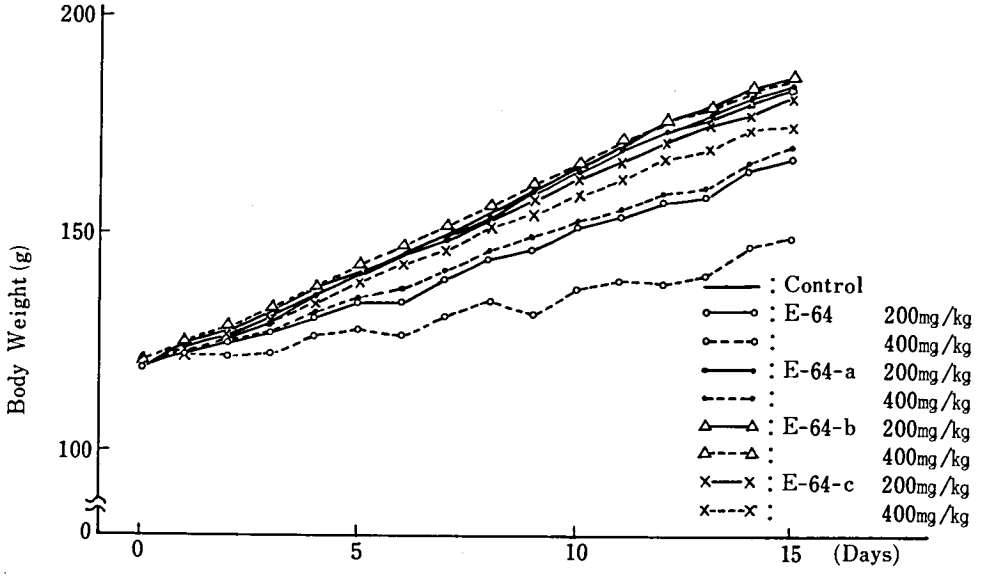


図1 E-64及びその類縁体のラットへの2週間連続投与における体重変動

新鮮血を用い，赤血球数，白血球数，血小板数（ミクロセルカウンター：東亜社），ヘモグロビン量（Cyanmethemoglobin 法），ヘマトクリット値（毛細管遠心分離法）を測定した。

3）血液生化学的検査；投与終了後，エーテルによる軽麻酔下に股動脈より採取した新鮮血を遠心分離して得た血清についてオートアナライザー（日立500型自動分析装置）を用い，総蛋白量（Biuret 法），A/G 比（アルブミン/総蛋白－アルブミン），グルコース量（ブドウ糖酸化酵素法），尿素窒素量（Urease-Indophenol 法），クレアチニン量（Jaffe 法），総ビリルビン量（Jendrassik-Cleghorn 法），総コレステロール量（Lieberman-Burchard法），トリグリセライド（ヤトロン TG-Eキット法），GOT・GPT活性（Reitman-Frankel 変法），ALP 活性（Kind-King 変法），LDH 活性（ピルビン酸ヒドラジン発色法），無機燐量（Fiske-Subbarow 法）を測定し，さらに CPK 活性（ヤトロン CPK-S キット法），Na, K（炎光法-島津原子吸光 AA-650）量についても測定した。

4）尿検査；投与終了時の強制排泄尿について蛋白，糖，pH，ケトン体，潜血（ラブスティックス－日本エームス社）の半定量的検査を行い，また各群3匹については代謝ケージで24時間尿を採取し，尿量，クレアチニン量（Jaffe 法）を測定した。

5）病理解剖学的検査；投与終了後，エーテルの軽麻酔下に放血致死させ，開胸腹して胸部，腹部諸臓器を観察し，摘出した脳，心，肺，肝，腎，脾，胸腺，下垂体，甲状腺，副腎，精巣については各々重量を測定した。これら諸臓器のうちの肝，腎ならびに大腿筋については10%ホルマリン液で固定後，常法のごとく切片を作製し H-E 及び PAS 染色を施し，病理組織学的検索を行った。

結　　果

投与期間中，いずれの被験物質投与群においても死亡及び一般症状の変化は観察されなかった。

体重変動を図1に示す。E-64 の 200, 400 mg/kg 群，E-64-a, -c の 400 mg/kg 群に比較的投与初期から有意な体重増加の抑制が認められ，この変化は E-64 の 400 mg/kg 群においてもっとも顕著であった。また体重の変化に伴って摂食量にも各々の投与群に抑制傾向が見られ，E-64 の 400 mg/kg 群に，より明らかであった。

血液学的検査所見を表2に示す。いくつかの

表2　E-64及びその類縁体のラットへの2週間連続投与における血液学的検査所見

Test items		Control	E-64 (mg/kg)		E-64-a (mg/kg)		E-64-b (mg/kg)		E-64-c (mg/kg)	
			200	400	200	400	200	400	200	400
RBC	$10^4/mm^3$	754±37	748±43	764±24	731±69	730±24	730±20	719±30	734±25	738±44
WBC	$10^2/mm^3$	101±9	112±12	127±16**	96±13	99±10	100±12	103±8	100±5	105±15
Hb	g/dl	14.2±0.4	14.0±0.2	14.1±0.2	14.1±0.2	14.0±0.4	13.8±0.4	13.7±0.4*	14.0±0.4	13.8±0.5
Ht	%	47.0±1.1	45.8±1.0*	45.9±1.4	45.5±0.9*	45.3±1.2*	45.9±0.7*	45.3±1.5*	45.9±1.0	45.9±1.2
Pla.	$10^3/mm^3$	696±74	766±94	837±111*	623±142	545±79**	644±89	780±69*	651±100	606±94

RBC=Red Blood Cell, WBC=White Blood Cell, Hb=Hemoglobin, Ht=Hematocrit, Pla.=Platelet

* P<0.05, ** P<0.01

表3　E-64及びその類縁体のラットへの2週間連続投与における血液生化学的所見

Test items		Control	E-64 (mg/kg)		E-64-a (mg/kg)		E-64-b (mg/kg)		E-64-c (mg/kg)	
			200	400	200	400	200	400	200	400
Total protein	g/dl	6.9±0.2	7.4±0.2**	7.6±0.1**	7.3±0.2**	7.3±0.2**	6.9±0.3	6.8±0.3	7.1±0.2	6.7±0.3
A/G		2.4±0.2	3.1±0.2**	3.0±0.1**	2.3±0.1	2.3±0.1	2.4±0.2	2.5±0.1	2.3±0.1	2.5±0.1
Glucose	mg/dl	159±12	152±11	152±15	191±26**	184±26**	183±19**	169±12	202±28**	224±42**
BUN	mg/dl	21.4±1.4	21.6±1.9	22.9±1.1*	25.0±2.1**	21.1±2.7	18.2±1.8**	18.3±1.7**	17.4±1.3**	18.7±1.4**
Creatinine	mg/dl	2.5±0.3	1.9±0.1**	1.9±0.1**	2.4±0.4	2.0±0.2**	2.1±0.2**	2.1±0.1**	2.2±0.2*	2.4±0.5
Total bilirubin	mg/dl	0.8±0.1	0.7±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1
Total cholesterol	mg/dl	65±3	83±6**	93±10**	77±7**	72±4**	59±5**	60±3**	64±7	66±3
Triglyceride	mg/dl	210±26	145±14**	175±18**	181±30	143±19**	147±41**	156±18**	141±25**	113±25**
GOT	K-U	122±14	133±10	202±38**	142±14*	124±12	112±10	111±8	116±8	121±20
GPT	K-U	48±7	66±11**	132±42**	55±8	49±10	43±8	38±5**	43±6	50±14
Al-P	KA-U	68.0±1.7	71.2±3.8*	72.8±3.9**	65.9±4.8	57.4±5.5**	56.8±5.6**	50.9±7.6**	52.4±6.6**	45.1±6.4
LDH	I-U	352±52	365±33	392±38	390±53	348±45	303±69	318±24	269±26**	247±47**
CPK	IU/l	237±24	241±17	245±22	255±10	251±10	245±17	247±14	246±22	233±19
IP	mg/dl	9.9±0.7	10.5±0.9	11.3±0.8**	11.2±0.9**	12.1±0.7**	12.1±0.9**	12.3±0.9**	12.5±1.3**	12.7±1.8**
Na	mEq/l	140±0.8	138±1.5**	139±1.0*	138±1.2**	138±1.1**	137±1.1**	138±0.2*	139±1.8	137±1.6**
K	mEq/l	5.2±0.2	5.2±0.3	5.8±0.4**	4.9±0.6	4.8±0.3**	4.9±0.5	5.0±0.5	4.9±0.4	5.0±0.5
Ca	mg/dl	10.4±0.4	10.4±0.7	10.6±0.4	10.6±0.4	10.7±0.2	11.0±1.0	10.8±0.4	10.9±0.7	11.0±1.4

* P<0.05, ** P<0.01

表4　E-64及びその類縁体のラットへの2週間連続投与における臓器重量

Organs		Control	E-64 (mg/kg)		E-64-a (mg/kg)		E-64-b (mg/kg)		E-64-c (mg/kg)	
			200	400	200	400	200	400	200	400
Brain	g%	0.81±0.05	0.91±0.05**	0.98±0.07**	0.82±0.05	0.88±0.05**	0.81±0.06	0.82±0.05	0.83±0.06	0.87±0.04*
Heart	mg%	319±10	303±10**	303±21	300±16*	303±16*	308±16	318±14	327±20	337±13**
Lungs	mg%	412±24	419±14	428±23	395±18	389±36	398±48	418±20	402±19	411±30
Liver	g%	4.17±0.10	5.31±0.14**	6.27±0.42**	4.48±0.20**	5.00±0.26**	4.05±0.16	4.03±0.25	4.10±0.23	4.11±0.12
Kidneys	g%	0.78±0.02	0.81±0.04	0.90±0.04**	0.92±0.04**	1.06±0.04**	0.79±0.02	0.82±0.02**	0.79±0.03	0.88±0.04**
Spleen	mg%	232±18	245±14	252±15*	219±16	232±15	218±14	229±9	222±18	219±18
Thymus	mg%	154±13	135±20*	70±10**	144±19	72±25**	155±25	148±13	159±24	151±29
Hypophysis	mg%	3.4±0.5	3.3±0.6	3.7±0.9	3.6±0.7	3.8±1.4	3.6±0.9	4.0±0.6	3.7±1.8	3.9±0.8
Thyroidea	mg%	7.0±0.6	6.9±1.1	7.7±1.4	7.3±0.8	8.5±1.8*	8.2±2.3	7.4±1.3	7.4±1.6	8.0±1.3
Adrenals	mg%	17.3±1.4	15.7±1.7*	17.3±1.7	16.6±1.4	15.8±2.0	17.2±2.1	17.3±1.8	17.6±1.3	17.7±1.7
Testis	g%	1.24±0.08	1.40±0.13**	1.47±0.12**	1.24±0.05	1.26±0.15	1.23±0.07	1.25±0.06	1.27±0.07	1.31±0.06
Body weight	g	183.0±7.7	164.5±8.8**	146.5±10.7**	181.0±8.8	166.2±9.4**	180.3±13.6	183.9±11.5	177.0±8.2	174.2±9.4

* P<0.05, ** P<0.01

表5 E-64及びその類縁体のラットへの2週間連続投与における病理組織所見

Findings		E-64 (mg/kg)		E-64-a(mg/kg)		E-64-b(mg/kg)		E-64-c(mg/kg)	
		200	400	200	400	200	400	200	400
[Liver]									
Irregular arrangement of liver cell cords	−	8		8	8	8	8	8	8
	±		7						
	+		1						
Various size of liver cells	−	5		8	7	8	8	8	8
	±	3			1				
	+		8						
Multinulcated liver cells	−			8	3	8	7	7	5
	±	6	1		5		1	1	3
	+	2	6						
	++		1						
Mitosis	−	4		8	5	8	7	8	8
	±	4	5		3		1		
	+		3						
Swelling of cell nuclei	−			8	2	8	8	8	8
	±	6	2		6				
	+	2	6						
Eosinophilic inclusion in the cytoplasm of liver cells	−			4	1	8	8	8	8
	±	8	1	4	7				
	+		7						
Desquamation of liver cells (councilman body formation)	−			8	6	8	8	8	8
	±	5			2				
	+	3	8						
Swelling of kupper cells	−	1	1	8	6	8	8	8	8
	±	5	1		2				
	+	2	6						
[Kidney]									
Hyaline like substance in proximal renal tubular epithelia	−	1				8	8		
	±	6						3	
	+	1	8					5	7
	++			8					1
	+++				8				
Hyaline droplet degeneration of renal tubular epithelia	−								
	±	2		4		4	4	4	2
	+	2	4		2				2
	++				2				
Atrophy and vacuolation of collecting tubular epithelia	−	8	8	8	8	8	8	8	7
	±								1
[Skeletal muscle]		No abnormal change							

− : Normal, ± : Slight change, + : Moderate change, ++ : Severe change, +++ : High severe change

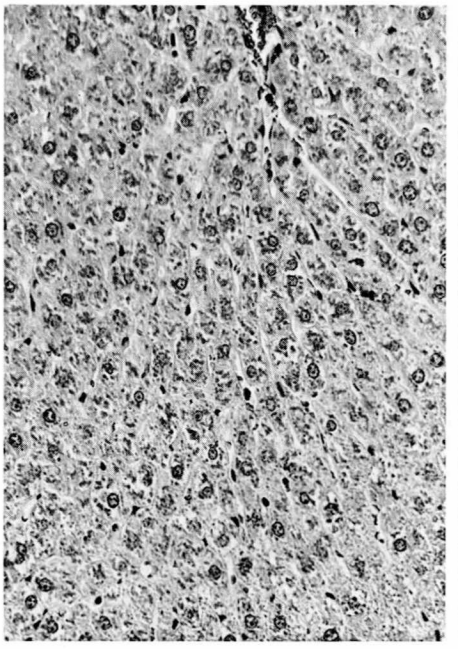
測定値に統計的有意差を認めたが，いずれも散発的で用量反応を示さず，意味のある変化とは考えられない。

血液生化学的検査所見を表3に示す。いずれの被験物質投与群においてもいくつかの測定値に統計的有意差を認めたが，E-64 400 mg/kg群の GOT, GPT 活性の増加以外は用量反応，他の検査結果との関連性に乏しく，また生理的変動範囲からの逸脱の小さいものであった。

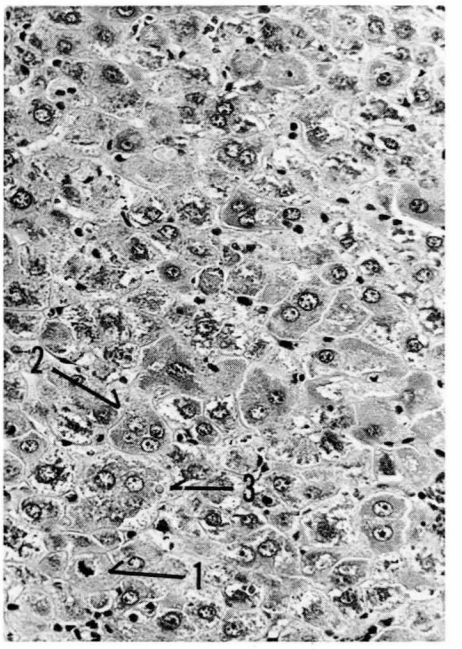
尿検査ではいずれの投与群の定性・定量値にも著明な変化は認められなかった。

剖検所見では E-64 及び -a 投与群で肝の腫大及び褪色，腎の褪色，胸腺の萎縮等が観察され，E-64-b,-c ではこれらの変化は認められなかった。またいずれの投与群にも投与部皮下に膿瘍形成のみられる例があったが，検液の貯留は認められなかった。各摘出臓器の相対重量を表4に示す。絶対重量，相対重量の両者におい

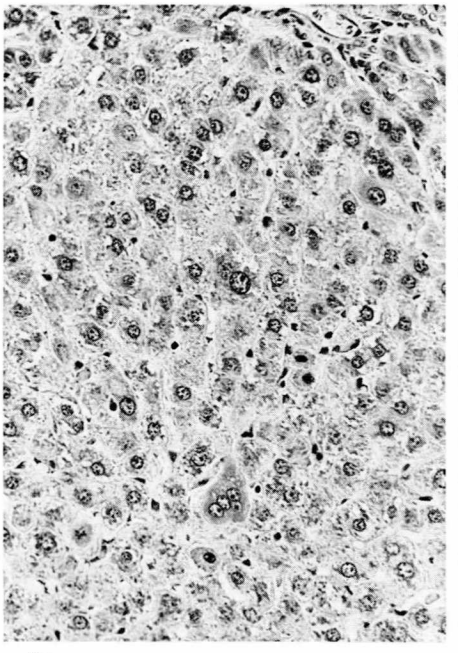
1



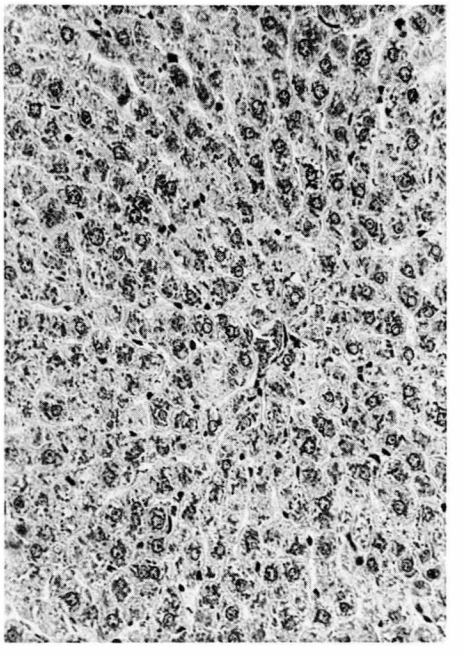
2



3



4



肝

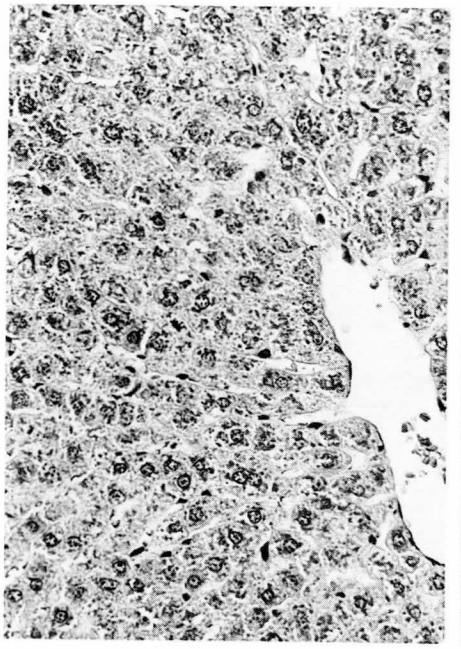
写真1：異常なし（Control H. E.×250）

写真2：肝細胞の大小不同，肝細胞索の乱れ，肝細胞核の分裂像（→1），膨化，多核性変化（→2）及び胞体内のエオジン好性封入体（→3）
（E-64 400 mg/kg H. E.×250）

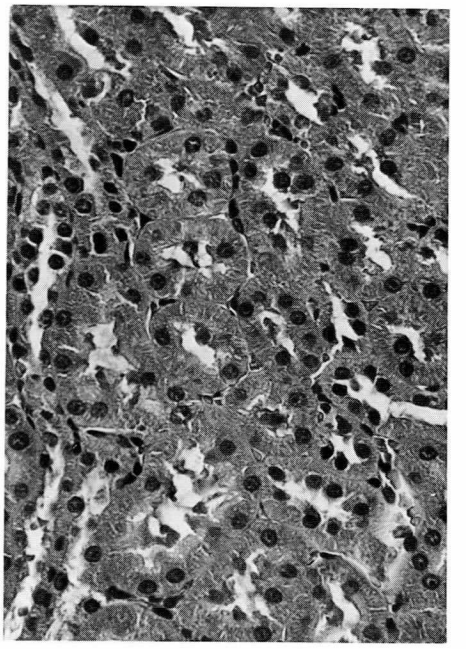
写真3：E-64 群と同質で，軽度な肝細胞の変化（E-64-a 400 mg/kg H. E.×250）

写真4：二核性肝細胞の軽度な増加（E-64-b 400 mg/kg H. E.×250）

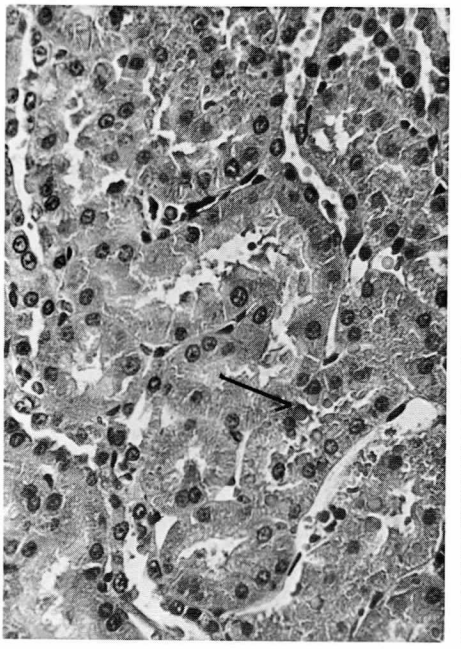
5



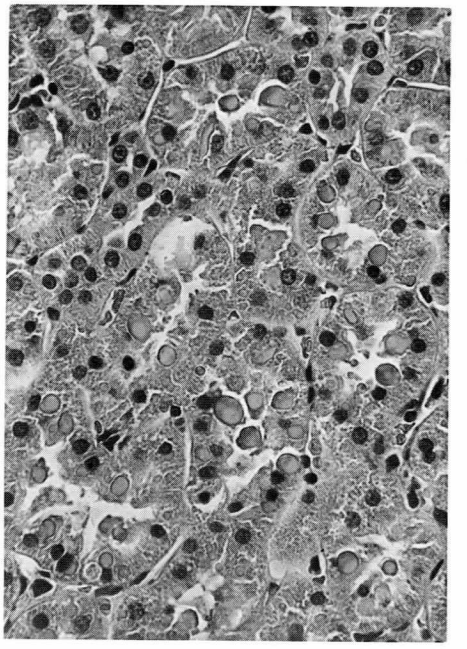
6



7



8



肝

写真 5：二核性肝細胞の軽度な増加（E-64-c 400 mg/kg H. E.×250）

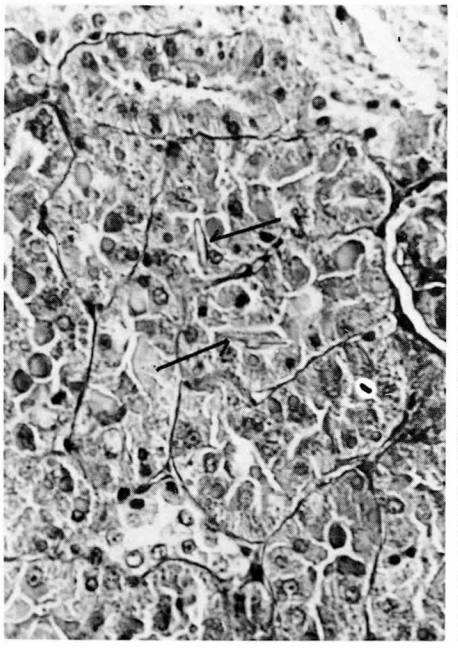
腎

写真 6：異常なし（Control H. E.×400）

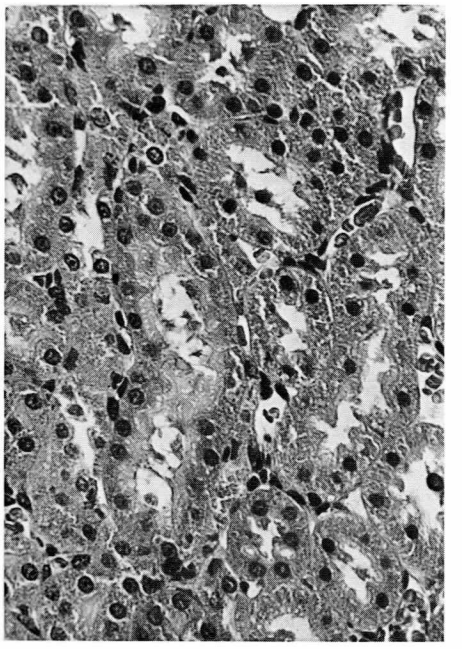
写真 7：近位尿細管上皮内の硝子様物の中等度な沈着（E-64 400 mg/kg H. E.×400）

写真 8：近位尿細管上皮内の硝子様物の高度な沈着（E-64-a 400 mg/kg H. E.×400）

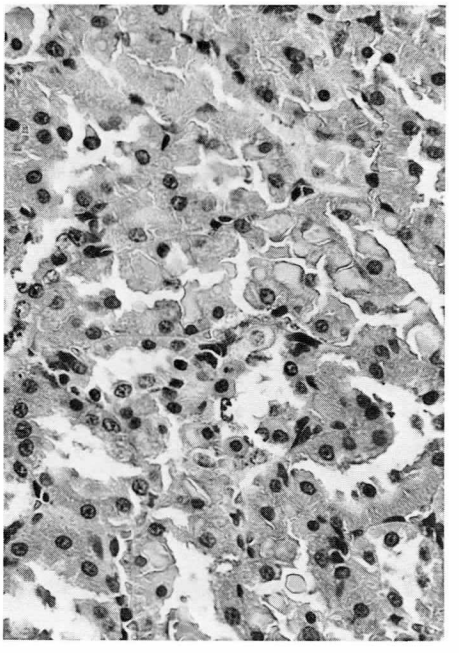
9



10



11



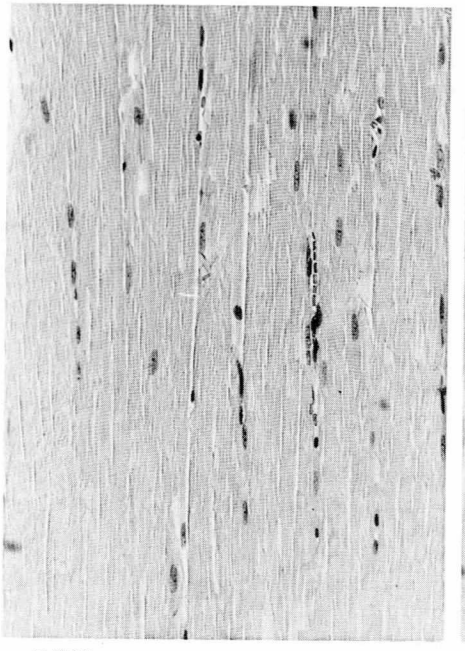
腎

写真 9：近位尿細管上皮内の結晶物の沈着
（PAS 染色　陰性）（→）（E-64-a 400 mg/kg PAS×400）

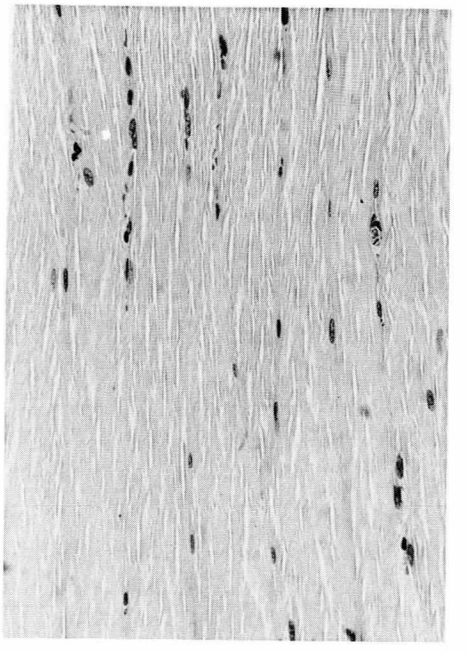
写真10：異常なし（E-64-b 400 mg/kg H. E.×400）

写真11：近位尿細管上皮内の硝子様物の中等度な沈着（E-64-c 400 mg/kg H. E.×400）

12



13



骨格筋

写真12：異常なし（Control H. E.×250）

写真13：異常なし（E-64-c 400 mg/kg H. E.×250）

て，E-64 の 200 mg/kg 群，E-64-a の 200，400 mg/kg 群に心の減少，E-64 の 200，400 mg/kg 群，E-64-a の 400 mg/kg 群に肝の増加，E-64-a の 200，400 mg/kg 群に腎の増加，E-64 の 200，400 mg/kg群，E-64-a の 400 mg/kg 群に胸腺の減少，E-64 の 200 mg/kg 群に副腎の減少が各々有意に認められた。その他絶対重量あるいは相対重量のみに変化のみられる臓器が種々認められた。

病理組織学的検索所見を表5に示す。

肝では（写真1～5）肝細胞の多核化，核の膨化・分裂，肝細胞の大小不同，肝細胞索の乱れ，胞体内エオジン好性封入体の形成，肝細胞変性脱落，クッパー星細胞の腫大が観察され，E-64 の 400 mg/kg 群ではこれらの変化が全例に軽～高度に，200 mg/kg 群ではいずれも軽減されてみられた。さらに両群ではグリソン鞘にエオジン淡染性の小型細胞の小集簇もみられた。E-64-a では 400 mg/kg 群で肝細胞索の乱れを除くすべての変化が軽度にみられたが，200 mg/kg 群では胞体内エオジン好性封入体が軽度に認められたのみであった。E-64-b では 400 mg/kg 群の 1/8 例に多核細胞及び核分裂像が軽度にみられた他は著変を認めなかった。E-64-c では多核肝細胞の軽度な増加が400 mg/kg 群の 3/8 例，200 mg/kg 群の 1/8 例に認められたのみであった。

腎では（写真6～11）E-64-b を除く投与群で近位尿細管上皮に硝子様物質が認められ，E-64-a で高度に，E-64 及び -c では 400 mg/kg 群で中等度，200 mg/kg 群で軽～中等度に観察された。また尿細管上皮の硝子滴変性が E-64-a の 400 mg/kg 群で中～高度，E-64 の 400 mg/kg 群で中等度，E-64 の 200 mg/kg 群及び E-64-c の 400 mg/kg 群で軽～中等度に観察された。さらに E-64-a 群では硝子様物質中あるいは尿細管上皮内に針状～ナビクラ型の結晶様物質が認められた。

筋肉では（写真12～13）いずれの投与群にも著変は観察されなかった。

考　　察

E-64 及びその類縁体の急性毒性試験ではいずれの物質も 1000 mg/kg 以上の高い LD_{50} 値が得られたが，それらの中で E-64-c は若干低い LD_{50} 値を示した。しかし 2 週間の連続投与による亜急性毒性試験では逆に E-64 及び E-64-a に肝，腎の変化を主徴とする影響が認められ，E-64-c, E-64-b ではその影響が微弱であった。各被験物質相互間のこのような投与回数による量的な相違は今後の課題として残されるが，質的な相違は 4 者間に明瞭なものでなく，いわゆる特異的毒性を示す物質群とは考え難い。肝の変化については投与量に応じた出現頻度及び程度の増強からみて薬物の作用に基づいたものである事が考えられる。これらの変化のうち肝細胞の増数現象は単細胞壊死や好エオジン性小体の出現などから，薬物の直接的刺激ではなく，比較的投与初期に受けた変化の再生像あるいは再生経過像と推察される。一方このような形態的変化は一般的に薬物処置外の原因，たとえばウイルス性肝炎時にも観察されることから，二次的な外的要因も否定できない。また腎にみられた退行性変性像は炎症の関与がまったくなかった事からネフローゼと考えられる。なお，尿細管上皮に含まれたエオジン好性硝子様物質及び針状～ナビクラ型結晶性物質の本態あるいは形成メカニズムについては現在のところ不明である。

今後更に各々被験物質の薬理，生体内動態等多面的な見地から詳細な検討を加えつつ毒性を評価しなければならないが，今回の結果から結論を急ぐならばヒト進行性筋ジストロフィーへの長期連投を考える時，E-64-b, E-64-c が薬物としてより望ましいと考えられる。

結　　論

E-64 及びその類縁体の 200, 400 mg/kg をラットに 2 週間皮下連続投与して亜急性毒性を検討し，以下の結論を得た。

1）肝，腎の変化を主徴とする影響が E-64＞E-64-a＞E-64-c＞E-64-bの順に強く認められた。

2）4 物質中，E-64-b 及び E-64-c が安全性の見地からは薬物としてより望ましいと考えられた。

3.　亜急性毒性—2)

目　　的

E-64 類縁体の毒性研究の一環として，E-64-a,-b,-c のエステル体を幼雛に 2 週間皮下連続投与し，その亜急性毒性を検討する。

方　　法

(1)動物：孵化 1 週令の雄白色レグホン（日本動物）を 1 群10羽あて群別し，実験に用いた。動物の投与開始時体重は 58～76 g であった。動物は温度 37° の育雛器内で飼育し，飼料（日清製粉社製幼雛用）と飲水は自由に摂取させた。

(2)投与量，投与方法：検液は E-64-a-ethyl ester（以下 E-64-a ester と略す），E-64-b-ethyl ester（以下 E-64-b ester と略す）を生食水溶液，E-64-c-ethyl ester（以下 E-64-c ester と略す）をコーンオイル懸濁液とし，各々 5，10%（w/v）液に調製した。投与量はいずれの被験物質も 100 及び 200 mg/kg とし，体重 100 g あたり 0.2 ml の液量を 1 日 1 回14日間，毎日定時に雛の腹側部皮下に投与した。対照群にはコーンオイルを同様に投与した。

(3)検査項目：投与期間中は毎日一般症状を観察するとともに体重を測定し，投与終了後には断頭により採取した血液の赤血球数（ミクロセルカウンター；東亜社），ヘマトクリット値（毛細管遠心分離法）を測定した。また同時に採取した血液を遠心分離して得た血清についてオートアナライザー（日立 500 型自動分析装置）により総蛋白量（Biuret 法），グルコース量（ブドウ糖酸化酵素法），総コレステロール量（Lieberman-Burchard法），クレアチニン量(Jaffe 法)，トリグリセライド量（ヤトロン TG-E キット法），GOT 活性（Reitman-Frankel 変法），ALP 活性（Kind-King 変法），LDH 活性（ピルビン酸ヒドラジン発色法）を測定し

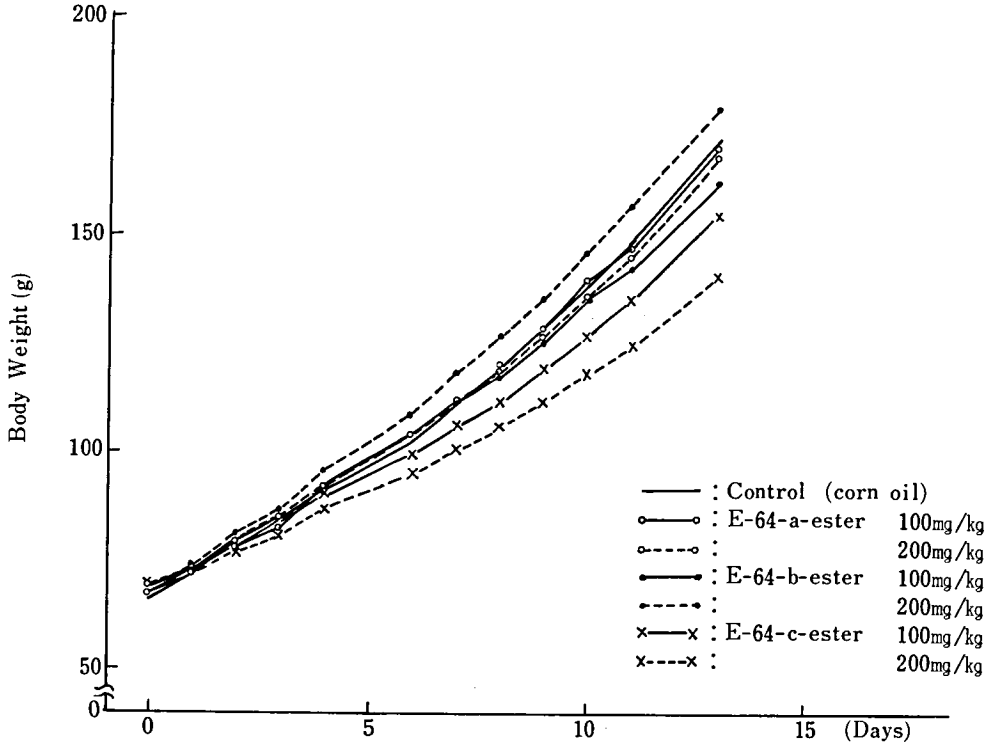


図2 E-64 類縁体の鶏への2週間連続投与における体重変動

た。採血後には剖検して胸部，腹部の諸臓器を観察の後，心，肺，肝，脾を摘出して重量を測定した。

結　　果

投与期間中いずれの投与群にも死亡例は認められなかった。一般症状では E-64-c ester 群に投与3日目頃から，投与部局所皮下組織の壊死性変化に基づく跛行が観察された他に著変は認められなかった。

体重変動を図2に示す。E-64-c ester の 100, 200 mg/kg 群に跛行のみられたと同時期から有意な体重増加抑制がみられ，この変化は投与終了時まで継続した。

血液学的検査所見を表6，血液生化学的検査所見を表7に示す。E-64-b ester 投与群に赤血球数の増加が統計的有意差として認められたが，著変を示すものでなかった。また血清分析値にも統計的有意差がいくつかの検査項目で，いずれの被験物質にも認められたが，いずれも用量反応に乏しく，また変動幅の小さいものであった。

臓器の相対重量を表8に示す。E-64-a ester 100, 200 mg/kg 群の脾，200 mg/kg 群の心，E-64-b ester 200 mg/kg 群の脾に絶対，相対両重量の有意な減少が認められた。その他，E-64-c ester では体重増加抑制に伴う肝相対重量の増加が観察された。また剖検所見ではいずれも著変を認めなかった。

考　　察

E-64 類縁体のエステル体 100, 200 mg/kg を幼雛に連続皮下投与した結果，いずれの物質にも特異的あるいは強い毒性症状の誘発は認められなかった。E-64-c ester による体重増加の抑制は，この物質のみがオイル懸濁剤で，投与24時間後にも投与部皮下局所に残留し，局所的壊死を誘発するとともに歩行障害を招いていた事から，栄養障害等の二次的影響による変化と思われる。血液，臓器重量の変化については，

Ⅱ 安　全　性

表6　E-64 類縁体の鶏への 2 週間連続投与における血液学的検査所見

Test items	Control	E-64-a-ester (mg/kg)		E-64-b-ester (mg/kg)		E-64-c-ester (mg/kg)	
		100	200	100	200	100	200
RBC $10^4/mm^3$	251±12	245±55	256±30	279±16**	271±14**	253±19	251±26
Ht　%	33.4±2.0	31.9±6.3	34.0±3.5	33.4±2.1	34.3±1.9	32.5±2.0	33.0±2.8

RBC=Red Blood Cell, Ht=Hematocrit　　**P<0.01

表7　E-64 類縁体の鶏への 2 週間連続投与における血液生化学的検査所見

Test items	Control	E-64-a-ester (mg/kg)		E-64-b-ester(mg/kg)		E-64-c-ester (mg/kg)	
		100	200	100	200	100	200
Total protein　g/dl	3.2±0.2	3.2±0.3	3.3±0.3	3.3±0.7*	3.5±0.4*	3.7±0.3**	3.6±0.4*
Glucose　mg/dl	269±14	259±12	206±83*	265±15	252±10*	229±18**	321±33**
Total cholesterol mg/dl	200±17	194±30	201±31	222±34	212±22	202±28	199±25
Creatinine　mg/dl	2.3±0.2	2.2±0.1	2.2±0.1	2.4±0.3	2.4±0.2	2.2±0.2	2.1±0.1*
Triglyceride　mg/dl	152±20	161±27	151±18	143±15	145±17	176±20*	171±27
GOT　K-U	201±10	188±22	206±14	190±12*	193±12	205±9	197±10
Al-P　KA-U	59.3±16.3	57.5±22.8	85.4±25.1*	51.3±24.3	63.8±24.0	40.6±17.7*	33.7±17.9**
LDH　IU	337±39	271±22**	275±39**	269±41**	271±38**	332±49	305±51

*P<0.05, **P<0.01

表8　E-64 類縁体の鶏への 2 週間連続投与における臓器重量

Organs	Control	E-64-a-ester (mg/kg)		E-64-b-ester (mg/kg)		E-64-c-ester (mg/kg)	
		100	200	100	200	100	200
Heart　g%	0.79±0.07	0.71±0.09*	0.70±0.08*	0.76±0.07	0.71±0.05**	0.76±0.07	0.81±0.09
Lungs　g%	0.72±0.10	0.67±0.10*	0.72±0.09	0.70±0.12	0.66±0.07**	0.73±0.11	0.79±0.11
Liver　g%	2.53±0.21	2.62±0.19	2.68±0.13	2.47±0.13	2.45±0.20	2.82±0.33*	3.04±0.38**
Spleen　g%	0.14±0.02	0.11±0.02**	0.11±0.01**	0.13±0.02	0.11±0.03*	0.13±0.03	0.13±0.03
Body weight　g	172.1±15.3	169.5±16.5	167.2±7.9	161.7±18.6	178.6±17.0	154.0±8.2**	140.2 ±18.3**

*P<0.05, **P<0.01

統計的には有意なものの，著変を示すものではなく，いわゆる生理的変動範囲に属するものと思われるが，幼雛におけるこれらの資料，経験も少い事から今後更に詳細な検討が必要と思われる。しかし総体的にはいずれのエステル体も顕著な毒性を示すものではなく，したがって E-64 類縁体は prodrug であるエステル体としてもその有用性が期待できると考えられる。

結　　論

E-64-a,-b,-c のエステル体 100, 200 mg/kg を幼雛に 2 週間皮下連続投与して，毒性面の有用性を検討した結果，いずれの被験物質にも顕著な毒性は観察されず，E-64 類縁体が prodrug であるエステル体としても有用であると考えられた。

4. E-64及びその類縁体のサルモネラ菌に対する突然変異原性に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 安 井 一* 小佐野 宏 美*
後 藤 宏 三* 大 村 貞 文*

目 的

化学物質が実験哺乳動物に対して発癌性を持つ場合，その物質は同時にある種の微生物群に対し高い確率で突然変異を誘発する(変異原性)ことが知られており，この検出の為の実験系がB. N. Amesら[1]，その他により提出されている。今回，E-64とその類縁の化合物3種の突然変異原性の有無をAmesら[1]のサルモネラ菌を用いた方法により測定したので報告する。

方 法

方法の細部に関しては文献[1]に譲り，ここでは簡略に記す。

1. 非代謝処理測定法 (S9(−) test)

試験管に被検液[注1] 0.1 ml, M/10燐酸緩衝液0.5 ml, 試験菌液[注2] 0.1 ml, 及び軟寒天液[注3] 2 mlをこの順に注ぎ入れ，軽く振盪の後，この混液を基礎寒天平板[注4]の上に一様に拡げる。放置固化後，37°Cで2日間培養し，生じたヒスチジン非要求復帰変異株 (his+) による集落数を算定する。被検液の代わりに水 0.1 ml を用いたものを盲検対照とする。

2. In vitro 代謝処理測定法 (S9(+) test)

前項の測定方法において，燐酸緩衝液に替えて肝磨砕物遠沈上清 ('S9')[注5]を主体とする酵素系 ('S9-mix')[注6] 0.5 ml を用いる。

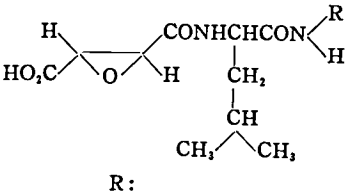
3. 陽性対照

今回の測定に用いた陽性対照化合物（既知変異原性物質）の種類と，検定平板1枚当りのそれらの供試量を記す。

試験菌株	S 9	化 合 物	供試量 (μM)
TA 1535	−	2, 3-epoxy-1-propanol	2.7
	+	2-aminoanthracene	0.05
TA 100	−	styrene oxide	4.2
	+	2-naphthylamine	0.07
TA 1537	−	9-aminoacridine	0.26
	+	3, 4-benzpyrene	0.02
TA 98	−	2-nitrofluorene	0.02
	+	3, 4-benzpyrene	0.02

注1) 被検化合物の構造式を下に示す。

基本骨格：



R:

E-64 $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2 \cdot 1/2\,H_2O$

E-64-a $-(CH_2)_4NH_2$

E-64-b $-CH(CO_2H)CH_2CH(CH_3)_2$

E-64-c $-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$

* 大正製薬株式会社総合研究所

表1　E-64及びその類縁体に対するAmes試験成績[1)]
——変異株（his⁺）集落形成数を表示——

Tester Strain	S9	Compound (μM) 0	E-64 0.03	E-64 0.3	E-64 3	E-64-a 0.1	E-64-a 1	E-64-a 10	E-64-b 0.1	E-64-b 1	E-64-b 10	E-64-c 0.1	E-64-c 1	E-64-c 10	Positive Control
TA1535	−	23	19	15	17	16	18	17	18	20	20	15	22	19	201
	+	14	18	20	20	14	10	13	14	16	20	11	15	11	192
TA100	−	120	129	137	142	120	139	117	142	122	120	136	129	115	997
	+	149	169	149	168	157	140	141	155	145	158	154	133	149	373
TA1537	−	10	5	8	6	4	7	5	6	5	6	6	2	5	616
	+	5	5	6	4	4	6	4	6	4	4	7	5	6	87
TA98	−	32	39	38	34	33	34	34	43	40	25	28	29	28	784
	+	29	30	36	30	19	25	24	30	24	25	29	34	23	346

S9(+) : In vitro activation assay using rat liver homogenate

E-64は1/30 M濃度の水溶液を，誘導体3種は何れも1/10 M濃度の水溶液を，それぞれ調製し被検原液とした。なお，溶解度を上げる目的でE-64は加温溶解し，またE-64-b，及び-cの溶解には重曹水を添加してこれを援けた。各原液を更に水で10倍，及び100倍に稀釈した。検定平板1枚当りの被検体供試量は下記の如くになる。

単位：μg(μM)

E-64	12(0.03)	122(0.3)	1220(3)
E-64-a	32(0.1)	315(1.0)	3150(10)
E-64-b	35(0.1)	348(1.0)	3480(10)
E-64-c	31(0.1)	314(1.0)	3140(10)

注2）試験菌株としてSalmonella typhimurium TA 1535，TA 100，TA 1537，及びTA 98（何れもhis⁻株）を用いた。普通ブイヨン5 mlを分注した試験管にそれぞれの菌株を接種し，37°Cで17時間静置した後，同温で4時間振盪培養した。

注3）0.7%の寒天液に0.6%の食塩，1 mg%のヒスチジンの塩酸塩，及び1.2 mg%のビオチンをそれぞれ含む。

注4）γ線で滅菌した内径86 mmのプラスチック製ペトリ皿に0.2%のブドウ糖を含むVogel-Bonner最少培地Eを25 ml注ぎ，放置固化した。

注5）PCB（カネクロール500）0.1 gと落花生油0.4 gを良く混じ，SD系ラット雄7週令の腹腔に注入して5日後，屠殺して肝を得た。保冷下，3倍重量の0.15 M KCl水溶液中で肝を十分に磨砕した後，9～11×10³Gで10分間冷却遠心分離して上清（S9）を得た。

注6）検定平板60枚分のS9-mixとして次の組成のものを用意した。

S9:	10 ml
M/20 $MgCl_2$-M/5 KCl:	5 ml
M/5 燐酸緩衝液 pH 7.4:	15 ml
ブドウ糖6燐酸（1 Na 塩）:	150 μM
NADP（Sigma 社製）:	120 μM

結果及び考察

各検定とも試験管内反応の時点から2重複で測定した。検定平板毎のヒスチジン非要求復帰変異株集落の形成数の平均値を表示する（表1）。

表示の如く，盲検値と比較する場合，試験菌株の種類の如何に拘わらず，またin vitro代謝処理の有無に拘わらず，被検の4化合物の何れにもその変異形成数に実験誤差範囲を越える有意の増加は認められない。

結　論

E-64, E-64-a, E-64-b, ならびにE-64-cはサルモネラ菌を用いるAmesらの方法[1)]による突然変異原性試験において何れも陰性と判定される。

文　献

1）Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and

mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, Mutation Research, 31, 347-364, 1975.

5. E-64 及びその類縁体の生体膜に対する作用に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 小 友 進* 樋 口 昭 平*

目 的

勝沼ら[1] によって認められたラットにおける E-64 による lysosome 酵素の漏出が，lysosome 膜に対する直接作用によるものか否かをラット肝 lysosome ならびにラット赤血球を用いた in vitro の実験系で検討した。

方 法

1. Lysosome 画分の調製

おおむね Tanaka ら[2] の方法に準拠した。前日より絶食した Wistar 系雄性ラットを断頭放血し，ただちに肝を摘出した。これを細切した後，テフロンホモジナイザーで5倍容の0.25 M sucrose-0.04 M tris-acetate 緩衝液 pH 7.4（以後緩衝液と略す）中にてホモジナイズした。ホモジネートを 700×g, 15 min 遠心分離し，さらに，その上清を 3,500×g, 15 min 遠心分離して得られた pellet を同条件にて洗浄した後，緩衝液に懸濁し，実験に供した。

2. 酵素活性の測定

1) 酸ホスファターゼ活性

酸ホスファターゼ活性は sodium p-nitrophenyl phosphate を基質として測定した。酵素液 0.5 ml, 基質 5.8 mM, 67 mM acetate 緩衝液（pH 4.8）からなる反応混液 3 ml を 37°, 15 min インキュベーションした後，1 N NaOH 1 ml を加えて反応を停止し，遊出した p-nitro-phenol を 410 nm の吸光度で測定した。

2) β-グルクロニダーゼ活性

β-グルクロニダーゼ活性はsodium p-nitrophenyl glucuronide を基質として測定した。酵素液 0.7 ml, 基質 1.25 mM, 80 mM acetate 緩衝液（pH 5.2）からなる反応混液 2 ml を 37°, 15 min インキュベーションした後，1 N NaOH 1 ml を加えて反応を停止し，遊出した p-nitro-phenol を 410 nm の吸光度で測定した。

3. インキュベーション系

インキュベーション混液は緩衝液, lysosome 画分（肝 0.34 g/ml）及び検液からなり総量15 ml とする。これらを氷冷下に調製し，室温にて10分間放置した後，37° でインキュベーションした。インキュベーション開始後一定時間にそれぞれ 2 ml を採取し，ただちに 10,000×g, 15 min 遠心分離し，上清中の酸ホスファターゼならびに β-グルクロニダーゼ活性を測定した。

4. Lysosome 酵素に対する直接作用

Lysosome 画分を緩衝液に懸濁（肝 0.17 g/ml）し，37°, 90 min インキュベーションした後，10,000×g, 15 min 遠心分離した上清を酵素液として使用した。酵素液と検液とを混合し，37° でインキュベーションした。インキュベーション開始後一定時間にそれぞれ 2 ml を採取し，酸ホスファターゼと β-グルクロニダーゼの活性を測定した。検体の影響は，検体添

* 大正製薬株式会社総合研究所

加時の酵素活性を無添加の対照の酵素活性に対する百分率であらわした。

5. 赤血球の調製

Wistar 系雄性ラットより，ヘパリン処理下に採取した血液を 3,000 rpm, 5 min 遠心分離して得た赤血球を冷生理食塩液で十分に洗浄して使用した。

6. 溶血の測定

検体を所定の濃度に溶かした 1/15 M リン酸緩衝液 pH 7.4 (NaCl で等張化) に上記赤血球を1%となるように加えて混和し，37° にてインキュベーションした。以後，経時的に一定量を採取し，3,000 rpm, 5 min 遠心分離した上清中のヘモグロビンを 540 nm の吸光度で測定した。

結　　果

1. Lysosome 膜に対する作用

37°, 120 min の lysosome とのインキュベーションによって，DL-E-64, E-64-a, -b, -c のいずれの検体においても 10^{-3}M で酸ホスファターゼ，β-グルクロニダーゼの遊出に対する作用は認められなかった (表1)。

表1　ライソゾームからの酵素遊出に対する作用

Sample (10^{-3}M)	Acid Phosphatase		β-Glucuronidase	
	60 min	120 min	60 min	120 min
E-64 (DL)	100.4	100.0	100.9	99.5
E-64-a	99.0	100.0	100.0	100.0
E-64-b	100.0	97.2	99.0	103.8
E-64-c	100.4	99.7	100.9	100.0

Enzyme activity was expressed as percentage of control. (mean of two)

2. Lysosome 酵素活性に対する直接作用

1. と同様の条件下で，E-64-c による β-グルクロニダーゼ活性のわずかな阻害がみられた以外は，他の化合物に何らの作用も認められなかった (表2)。

3. 赤血球膜に対する作用

1. と同条件でヘモグロビンの遊出に対し D- 及び DL-E-64 に何ら作用は認められなかった (表3)。

表2　ライソゾーム酵素活性に対する直接作用

Sample (10^{-3}M)	Acid Phospatase		β-Glucuronidase	
	60 min	120 min	60 min	120 min
E-64 (DL)	100.3	99.1	98.8	102.1
E-64-a	100.0	99.1	95.6	102.1
E-64-b	101.7	99.1	100.2	106.4
E-64-c	100.0	99.7	95.6	94.0

Enzyme activity was expressed as percentage of control. (mean of two)

表3　赤血球膜に対する作用

Sample (10^{-3}M)	Hemolysis	
	60 min	120 min
Control	7.5	8.3
E-64 (DL)	6.4	8.1
E-64 (D)	6.6	6.2

The value is expressed as percentage of total hemolysis.

考　　察

E-64 の腹腔内投与によりラット肝にカテプシンDなどの lysosome 酵素が漏出することが勝沼ら[1] によって指摘された。しかし，その作用が膜の破壊を伴うものか，あるいはまた，膜の透過性亢進によるものか，その詳細は不明である。我々は E-64 及びその類縁体 a, b, c の生体膜に対する直接作用の有無を調べる目的で，ラット肝 lysosome 及びラット赤血球を用い in vitro で検討した。その結果，いずれの化合物にも10^{-3}Mの高濃度において，lysosome 及び赤血球からの酵素あるいはヘモグロビンの遊出促進作用は認められず，直接作用による膜の破壊や透過性の亢進はないものと思われた。従って，勝沼ら[1] によって認められた in vivo での E-64 の作用は lysosome に対する直接作用ではないものと推察された。

結　　論

DL-E-64 及びその類縁体 a, b, c いずれも in vitro において lysosome 膜の不安定化作

用は認められなかった。従って，E-64 の in vivo におけるラット肝 lysosome 酵素の漏出は，lysosome に対する直接作用によるものではないと思われた。

文　献

1) 勝沼信彦：私信，1979.
2) Kiichiro Tanaka and Yoshio Iizuka: Suppression of enzyme release from isolated rat liver lysosomes by non steroidal anti-inflammatory drugs, Biochem. Pharmacol., **17**, 2023, 1968.

6. E-64 及びその類縁体の局所刺激作用に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 花 田 和 紀* 天 本 十四郎*
岡 崎 忠 靖* 大 村 貞 文*

研究目的

E-64 は，弱い局所刺激性を有することが既に知られている。類縁体 a, b, c においても同様な作用がみられるか否か，ヒスタミンを対照薬としてその作用を検討する。

材料及び実験方法

モルモット (Hartley, male, 350 g) を脱毛クリーム（新アレオス，大正製薬）を用いて脱毛し，3時間放置後，背部皮内に 0.05 ml の被験生食水溶液を投与し，直ちに，2％エヴァンスブルー生食溶液 (0.4 ml/head) を静脈投与した。15分後，皮膚の漏出色素斑の面積を Harada らの方法[1]で測定した。

結　　果

漏出した色素斑面積より検体のモルモット皮膚に対する刺激性を陽性対照薬であるヒスタミンの作用に対する百分率で表わした。

表1に示すように E-64 の作用は，ヒスタミンの約 1/400 と弱いながらも毛細血管からの色素の漏出があり局所刺激性が再確認された。しかしながら，その類縁体ではこの様な作用は殆んど認められなかった。

考　　察

E-64 には弱いながらも明らかな局所刺激性が認められる。しかし，a, b, c では，いずれもその様な作用は認められなかった。E-64 の agmatine を arginine に置換した化合物にも同程度の作用がみられること（未発表データ）及び E-64 と E-64-a との比較からこの刺激作用は，グアニジル基に起因するものと考えられる。

表1　E-64 及びその類縁体のモルモットの血管透過性に対する作用

	Acceleration (% to histamine)
E-64	0.25
E-64-a	0.03
E-64-b	0.06
E-64-c	0
Histamine	100

結　　論

E-64 は，ヒスタミンの約 0.25％の弱い局所刺激作用を有するが，その類縁体 a, b, c には，殆んどその様な作用は認められなかった。

文　　献

1) Harada, M., Takeuchi, M. and Fukano, T.: A simple method of the quantitative extraction of dye extravasated into the skin, J. Pharm. Pharmac., 23, 218, 1971.

* 大正製薬株式会社総合研究所

7. E-64 及びその類縁体の細胞毒性に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 花 田 和 紀* 天 本 十四郎*
山 田 正 雄* 岡 崎 忠 靖*

研究目的

E-64 及びその類縁体の安全性検討の一環として動物細胞に対する in vitro における毒性を検討する。

材料及び実験方法

マウス，C 57 BL/6，(雌)，6～10週令の脾臓より無菌的に細胞浮遊液を斎藤らの方法で調製した[1]。得られたリンパ系細胞を R. I. Mishell ら[2]の培養系即ち，RPMI 1640 培地 (1 mM L-Glu, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES 及び 5% FCS 添加を用い 10^6cells/400 μl となるようにして，37° 5% 炭酸ガスインキュベーター中で48時間培養した。検体は，生理食塩水に溶解させ，ミリポアフィルター沪過後添加した。培養後，回収細胞数及びトリパンブルー染色法[3]による生存細胞数を測定した。

結　　果

E-64 及びその類縁体の 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}M 濃度での回収率及び生存率を表1に示した。いずれも対照より生存率では約5～10%細胞回収率では約15～20%と減少し，僅かながらその影響がみられたが明確な濃度依存性は認められなかった。

表1　E-64 及びその類縁体のマウス脾細胞の生存率と回収率に対する作用

	Recovery (%)			Viability (%)		
	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}(M)	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}(M)
E-64	70	70	67	82	77	79
E-64-a	64	65	65	77	77	78
E-64-b	73	73	65	83	80	77
E-64-c	63	64	65	79	79	75
Control		87			86	

Mouse : C 57 BL/6
Medium : RPMI+L-glutamine, pyruvate, HEPES, FCS.
Incubation : 37°, 48 hr in CO_2 incubator.

考　　察

細胞生存率，細胞回収率共に弱いながら薬物による影響がみられたが，濃度依存性は認められず，更に，検討を要する。その後の実験により，E-64 及びその類縁体の免疫機能に対する影響が観察され，リンパ系細胞を細胞毒性試験に用いたこと自体（その妥当性の）問題が生じてきた。現在，ラット線維芽細胞を用い，比較検討中である。

結　　論

E-64 及びその類縁体は，マウス脾臓細胞に対し in vitro 培養系において，僅かながら細胞生存率，細胞回収率共に影響が認められた。

* 大正製薬株式会社総合研究所

文　　献

1) 斎藤和久，多田隈卓史：Cunningham and Szenberg のプラーク法，免疫実験操作法A，日本免疫学会編集，485，1975.

2) Mishell, R. I. and R. W. Dutton: Immunization of Dissociated Spleen Cell Cultures from Normal Mice, J. exp. Med., **126**, 423, 1967.

3) H. J. Phillips: Dye Exclusion Test for Cell Viability, Tissue Culture, edited by Paul F. Kruse et al., Academic press, New York, 406, 1973.

Ⅲ　In vivo の効果

（効力試験）

8.　E-64 の筋ジストチキンに対する効果（臨床観察）……杉田　秀夫

9.　E-64 及びその類縁体の薬効に関する研究……大関　正弘

（一般薬理）

10.　E-64 の一般薬理作用……福原　武彦
～特に呼吸・循環機能及び中枢神経系に及ぼす影響～

8. E-64の筋ジストロフィーに対する効果
(臨床観察)

杉田秀夫*,**

研究協力者 高木昭夫* 埜中征哉*
石浦章一* 村上博彦*

目的

ミオパチーモデル動物であるジストロフィーチキンに対してE-64投与の効果を観察し，投与法，慢性毒性などに関する基礎的データを得ることを目的とした[1)~3)]。

実験法

L-E-64はガラス蒸留水に10 mg/ml となるように溶解し，冷蔵庫に保存した。孵化後1週目より週3回，体重1 kg当り20 mgのE-64を後背部皮下に注射し，その経過を観察した。実験は正常群 (n=10)，E-64投与正常群 (n=5)，筋ジストロフィー群 (n=16) 及びE-64投与筋ジストロフィー群 (n=11，そのうち1羽は直接筋注) で開始した。

体重は，フリップテストとは無関係におよそ15日おきに測定した。

フリップテストは，発症確認が可能な最低日数である4週目から行った。方法は，両羽を広げた状態で静かに仰臥させ，そこからの起立能力を判定した。評価は，起立したものを1点，10秒経過して起立不能のものを0点とし，この操作を5回くり返して起立回数(Flip Number, FN) を記録した。

孵化後3ヶ月までに病死した個体はなく，成長は一見順調であると考えられた。

* 国立武蔵療養所神経センター，疾病研究第一部
** 東京大学医学部脳研・神経内科

表1 100日齢チキンの体重

	N	Body weight (g)	%
Normal line 412	10	2262.0±318.8	100
E-64 treated	5	2064.0±366.4	91.2
Dystrophy line 413	10	1987.0±358.6	100
E-64 treated	11	1826.4±258.4	91.9

結果

表1に孵化後100日のニワトリの平均体重を示した。正常鶏 (line 412) の方が約2262 g，筋ジストロフィー鶏 (line 413) が約1987 gと正常群の方が14%ほど高値を示した。一方，E-64投与群の方は，正常鶏約2064 g，筋ジストロフィー鶏約1826 gと明らかに軽度の低下(約9%) を示した。この値は，ジフェニルヒダントイン投与時の体重低下[4)] (30日で約25%)，ペニシラミン投与時の減少[5)] (100日で約15%)，及びセロトニンアンタゴニスト投与時の減少[6)] (60日で約20%) に比べて緩徐であり，急性の毒性はないと考えられた。しかしながら，同様のタンパク分解酵素阻害剤であるロイペプチン投与においては体重変化が全くないこと[7)] を考えあわせると，長期投与の影響はなお慎重に検討すべきものであると思われた。

また，E-64投与において体重変化に性差があることが判明した。表2にその結果をまとめた。これでまず明らかなことは，一般的に雄の方の体重増加が顕著であり，標準偏差を考慮して全く重なりあわないことがわかる。この雌雄

Ⅲ In vivo の効果

表2 E-64 投与チキンの体重変化

	Normal line 412		Dystrophy line 413	
	Untreated	Treated	Untreated	Treated
Male	2452.9±97.8 (n=7)	2313.3±187.2 (n=3)	2111.3±277.6 (n=8)	2002.9±89.4 (n=7)
Female	1816.7±60.3 (n=3)	1790.0±169.7 (n=2)	1500.0±14.1 (n=2)	1517.5±81.4 (n=4)
Female/Male	0.74	0.77	0.71	0.76

表3 チキンの体重に対する E-64 の影響

	Normal line 412	Dystrophy line 413
M.	0.94*	0.95*
F.	0.99*	1.01*

* The values are the ratio of E-64 treated chickens to untreated chickens.

表4(a) Dystrophy line 413 (Untreated)

No.	Sex	35	55	60	70	75	85	90	95	102 days
25	m.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	m.	0	0	1	0	0	0	0	0	0
27	m.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	m.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	m.	0	0	0	1	1	1	2	0	1
30	m.	0	1	0	—	—	—	—	—	—
31	m.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	m.	4	2	1	1	0	3	1	2	1
34	m.	0	0	0	0	1	0	0	0	0
35	m.	0	0	0	1	0	0	0	0	0
37	m.	0	0	0	0	0	0	0	0	1
32	f.	2	2	2	0	1	3	2	5	4
36	f.	3	0	0	3	3	0	1	0	0
38	f.	1	3	1	1	0	0	0	0	0
40	f.	0	2	1	0	1	0	0	0	0
Mean FN (FN/例数)		0.67	0.67	0.40	0.50	0.50	0.50	0.43	0.50	0.50

表4(b) E-64 treated dystrophy

No.	Sex	35	55	60	70	75	85	90	95	102 days
21	m.	0	0	0	0	0	0	0	1	0
22	m.	1	0	0	0	0	0	0	1	3
24	m.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	m.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	m.	2	0	0	0	0	0	0	0	0
29	m.	2	0	0	0	1	0	0	1	0
30	m.	1	0	2	1	0	0	0	0	0
23	f.	5	3	4	4	4	4	5	1	5
26	f.	0	0	0	0	0	0	1	2	4
28	f.	0	0	0	1	0	0	0	0	0
31	f.	3	5	2	1	0	2	3	5	3
Mean FN (FN/例数)		1.27	0.73	0.73	0.64	0.45	0.55	0.82	1.00	1.36

の差は，栄養状態が同一であるにもかかわらず生後60日目頃からあらわれ，また同時にFNにも関係してくる重要な因子の1つである。また，表2より雌雄の体重比を計算したところ表中に示すようにその比が 0.71～0.77 となったが，正常鶏，筋ジストロフィー鶏いずれもE-64投与群の方がその割合が高かった。これは，E-64投与によって雌の方がほとんど体重変化がないのに反して，雄の方はかなり減少する，という事実を反映しているものである。その差をわかりやすく表3にまとめた。この事実は他の薬物投与実験では見られない新しい知見であり，E-64が両性において異なる薬理作用を持つ可能性もあることを指摘したい。

次に両群の起立能力について調べた（表4）。表4(a)は未処理，(b)はE-64投与の筋ジストロフィー群である。正常鶏の結果はここでは記さなかったが，もちろん未処理及びE-64投与群ともに毎回完全に起立した。表4では，個々の個体についてのFNを示した。表4(a)，(b)共に明らかな雌雄の差が読みとれる。つまり生後約30日の時点でほとんどの雄が起立不可能になるのに反して，雌は生後70日でもかなり起立できることがわかる。表4(b)のE-64投与群では(a)の未処理群との差がほとんど見出せなかった。少々の希望は，E-64投与群の雌で90日目以降FNの上昇がわずかに見られる。しかし雄の方には全く変化がなく，学習効果によるという仮定も否定できない。また，生後35日目においてE-64投与群の起立成績が未処理群に比して良いが，E-64が若干の発症の遅延をもたらしたものかどうかの判定はむずかしい。35日目から102日目までのすべての成績の平均をとりE-64の効果を表したのが表5である。これよりE-64は雌に対して起立能力を少々改善するように働いたと考えられる。

表5　ジストロフィーチキンの平均起立回数（35～102日齢）

	Untreated	E-64 treated
Male	0.28	0.25
Female	1.14	1.86

考　察

E-64皮下投与において体重と起立能力の変化を見た。体重は未処理群に比べてE-64投与群では若干の減少を見たが，それはすべて雄の体重低下によるものであった。今後，例数を増してこの事実を確認する必要がある。

一方，同齢のニワトリにおいては，体重の少ない方が起立能力も高いという報告がある。これは今回の実験において雌雄間でこの関係が成立することはわかったが，雄同志，また雌同志では必ずしも成り立たないことがわかった。

今回の実験で明らかになったことは，個体差が想像以上に大きく，例数が少ないとFNに誤差を生ずる危険が大きいことが判明した。このことは，筋肉内酵素活性や血清酵素活性でも同様で，生後100日における筋ジストロフィーline 413群でのばらつきは大きく，例えば血清CPKは 1.2～3.6 U/m*l* と約3倍もばらつく（正常は 0.019～0.028 U/m*l* とかなりせまい範囲に落ちつく）ことがわかった例もある。少なくとも10羽以上で検討しなければ正確な値は出ないとの感触を得た。

参考文献

1) 埜中征哉，春原経彦，石浦章一，杉田秀夫，高田邦安：筋ジストロフィーチキンに対する protease inhibitor (E-64) の効果——形態学的側面——，及び筋ジストロフィーチキン骨格筋の組織化学的特徴，厚生省神経疾患研究委託費，「筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究」（三好班）昭和53年度報告書，pp. 40-44.

2) 杉田秀夫，石浦章一：筋ジストロフィーチキンに対する protease inhibitor (E-64) の効果——生化学的側面——，同上 pp. 45-48.

3) Sugita, H., Ishiura, S., Suzuki, K. & Imahori, K.: Inhibition of epoxide derivatives on chicken calcium-activated neutral protease (CANP) in vitro and in vivo, J. Biochem. 87, 339-341, 1980.

4) Chou, T., Hill, E. J., Bartle, E., Woolley, K., Lequire, V., Olson, W., Roelofs, R. & Park, J. H.: Beneficial effects of penicillamine treat-

ment on hereditary avian muscular dystrophy, J. Clin. Invest., 56, 842-849, 1975.

5) Bhargava, A. K., Barnard, E. A. & Hudecki, M. S.: Effects of serotonin antagonists on the development of inherited musculary dystrophy in the chicken, Exp. Neurol., 55, 583-602, 1977.

6) Entrikin, R. K., Patterson, G. T., Weidoff, P. M. & Wilson, B. W.: Righting ability and skeletal muscle properties of phenytoin-treated dystrophic chickens, Exp. Neurol., 61, 650-663, 1978.

7) 埜中征哉，高木昭夫，石浦章一，村上博彦，杉田秀夫：ロイペプチンのジストロフィー鶏に対する作用，厚生省新薬開発班会議（梅沢班）昭和54年度発表.

9. E-64 及びその類縁体の薬効に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 笹 島 道 忠* 中 根 貞 雄* 樽 本 保 男*
木 村 正 明* 河 西 章* 岸 恭 子*
尾 上 早百合* 花 田 和 紀* 玉 井 正 晴*
安 達 孝* 小 熊 清 司* 倉 地 道 雄*
岩 松 裕 子* 相 原 弘 和*

目 的

E-64 及びその類縁体 a, b, c はいずれも in vitro において強い CANP (Ca# activated neutral protease) 阻害活性を有し[1]，ヒトの進行性筋ジストロフィーに対して期待される。これらの薬物の臨床的評価の前段階として，モデル疾患動物における有効性を検討することが有力な手段である。

進行性筋ジストロフィーの疾患モデルとしては，マウス[2]，鶏[3]，ハムスター[4]等の遺伝性発症モデルが開発されているが，とりわけヒトの疾患モデルとしては鶏のそれがより類似性が高いといわれている。一方，最近 Parker ら[5]により，セロトニンミオパチーの Duchenne 型ジストロフィー症との類似性が報告されている。

われわれは遺伝性及び薬物発症の両タイプの疾患モデルを用い，E-64 及びその類縁体の薬効を評価する目的で筋ジストロフィー鶏に対する投与実験及びセロトニンミオパチーモデルの確立を行った。

* 大正製薬株式会社総合研究所

1 筋ジストロフィー鶏における E-64 類縁体の薬効評価

目 的

われわれは in vitro における CANP 阻害活性，安全性，生体内動態等の多角的評価から E-64 類縁体の中で E-64-c が E-64 凌駕しうる化合物であることを報告した[6]。

本研究は E-64-c の in vivo における薬効をジスロフィーチキンを用いて検討することにある。

方 法

(1) 動物

ジストロフィーチキン (Line 413) 及びコントロールチキン (Line 412) を使用した。

(2) 薬物

E-64-c の生食水溶液

(3) 投与法

孵化 1 週間後より上記薬物 40 mg/kg 及び 100 mg/kg・体重 を皮下注。

(4) 投与スケジュール

毎日 1 回投与で 3 ヶ月間連投。

結 果

投与群，コントロール群共に一群 5 羽でスタートし，i) CPK 及び LDH の測定，ii) フリ

ップテストを10日間隔で実施し，5月現在実験継続中である。経過観察し，投与終了後，筋肉の酵素活性及び病理観察等の評価を行い総合的に薬効評価を行う予定である。

考　　察

E-64 のジストロフィーチキンに対する薬効評価は杉田ら[7] により実施された。われわれは E-64 及びその類縁体に関する安全性，Bioavailability，さらにはその製造の容易さなど総合的な評価から類縁体 E-64-c が E-64 グループの中では将来医薬品として開発するに最適であるとの判断を下した。しかしながら，その最終的な評価は in vivo における薬効試験の結果をまたねばならないことはいうまでもない。ジストロフィーチキン，一群5羽，40 mg/kg，100 mg/kg の2ドースでパイロットテストを開始した。3ヶ月の投与スケジュールで症状観察及び病理所見等総合的に評価し，さらに必要ならば実験規模をスケールアップし，統計的に信頼しうる評価を行う計画である。

2　セロトニンミオパチーに対する薬効試験

目　　的

筋ジストロフィー症治療薬の効果を検討する場合，自然発症モデルを用いることは勿論であるが，薬物発症モデルも有用な手段となりうるであろう。しかし，そのためにはモデル動物，すなわち実験的ミオパチー動物がヒト筋ジストロフィー症と類似の異常，あるいは病理組織像を呈するか否かを明確にする必要がある。イミプラミンとセロトニンによるミオパチー（セロトニンミオパチー）では Duchenne 型筋ジストロフィー症に特徴的な lesion が出現し[5]，血中 CPK 及び LDH 活性の上昇が認められ[8),9)]，さらに，膜異常[10] も報告されていることからヒト・ジストロフィーのモデルとして再考する価値があろう。本研究は E-64 及びその誘導体のセロトニンミオパチーに対する作用を検討するための基礎的研究を目的とし，今回，セロトニンミオパチーにおける筋肉重量，血中酵素活性及び病理組織学的変化の特徴を明らかにするとともに，発症のための薬物投与スケジュールを検討し，さらにヒトの筋ジストロフィー症との類似点について考察した。

方　　法

6週齢の Wistar 系雄性ラットを用い，表1に示すスケジュールでイミプラミン (Im) 及びセロトニン (Se) を投与した。すなわち1日1回 Im を投与し，4日目の Im 投与の6時間後に（スケジュールⅠ及びⅡ），あるいは毎日乃至3及び4日目の Im 投与の2時間後に（スケジュールⅢ）Se を投与した。この4日間を1 cycle とし，それぞれ表1に示した cycle 数を繰り返した後，大腿四頭筋及び腓腹筋を分離し，重量を測定した。次に，これらの筋肉を10%中性緩衝ホルマリンで固定し，常法に従いパラフィン切片とした後，H・E，PAS 及びトリクローム染色を施し，病理組織学的検査を行った。また，スケジュールⅡ-A について，1 cycle における Se 投与後の血漿中 CPK 活性を測定した。なお，トフラニール（藤沢薬品）は原液を，硫酸セロトニンクレアチニン（東京化成）は 0.4% CMC に懸濁し，腹腔内投与した。また，CPK 活性の測定にはイアトロセット CPK-S（三光純薬）を用いた。

結　　果

(1) 行動観察

イミプラミンの1回あるいは連続投与によっても，著明な変化は観察されなかった。しかし，セロトニンの投与によって著明な行動上の変化が観察された。すなわち，セロトニンの投与後数分で，動物は転倒し，呼吸は緩徐かつ不規則となり，瞳孔の散大，チアノーゼ及び後肢の筋力低下が認められた。これらの変化は1～2時間持続したが，その程度は個体間で，かなりの差が認められた。また，薬物投与の cycle 数を重ねるにつれて，セロトニンに対する軽度の tachyphylaxis が観察された。

表1 セロトニンミオパチー発症のための薬物投与スケジュール

Schedules		Im * (mg/kg)	Se ** (mg/kg)	Cycle (number)	Mortality (%)
I (Im ↓ 1, Im ↓ 2, Im ↓ 3, Im ↓ 4 (day), Se ↓)	cont.	0	0	5 or 10	0
	A	10	25	5	0
	B	10	50	5 or 10	27.8
	C	20	50	5 or 10	25.0
II (Im ↓ 1, Im ↓ 2, Im ↓ 3, Im ↓ 4 (day), Se ↓)	cont.	0	0	3	0
	A	10	75	3	0
	B	10	100	3	47.8
III (Im ↓↓ Se$_1$ 1, Im ↓↓ Se$_1$ 2, Im ↓↓ Se$_{1,2}$ 3, Im ↓↓ Se$_{1,2}$ 4 (day))	cont.	0	0	3	0
	A	10	25 (Se$_1$)	3	0
	B	10	50 (Se$_2$)	3	14.3

*;Imipramine HCl **;Serotonin-creatinine sulfate

(2) 体重及び筋重量

Im (10 or 20 mg/kg) の投与により，体重の自然増加は抑制され，さらに Se (50 mg/kg) の投与によって体重は著明に減少した。しかし，投与を続けることによって体重減少はみられなくなった。大腿四頭筋及び腓腹筋の湿重量は Im 及び Se 投与群において有意に減少した（図2）が体重 100 g 当たりの筋重量に換算した場合には有意差は認められなかった。

(3) 病理組織学的所見

薬物投与群の大腿四頭筋において，筋線維の変性及び萎縮，貪食反応を伴った壊死線維，筋核の増加，中心化及び鎖状配列，間質細胞の増加及び間質線維成分の増生が認められた。しかし，その病変形態及び程度は多彩であるので，筋症所見及び病変の分布状態により5種類に分類（図3）した。すなわち，分類①では軽度の細胞浸潤の認められるもの，分類②～④では，筋線維の萎縮及び壊死，核の中心化及び鎖状配列等の認められるもので，その分布及び程度に

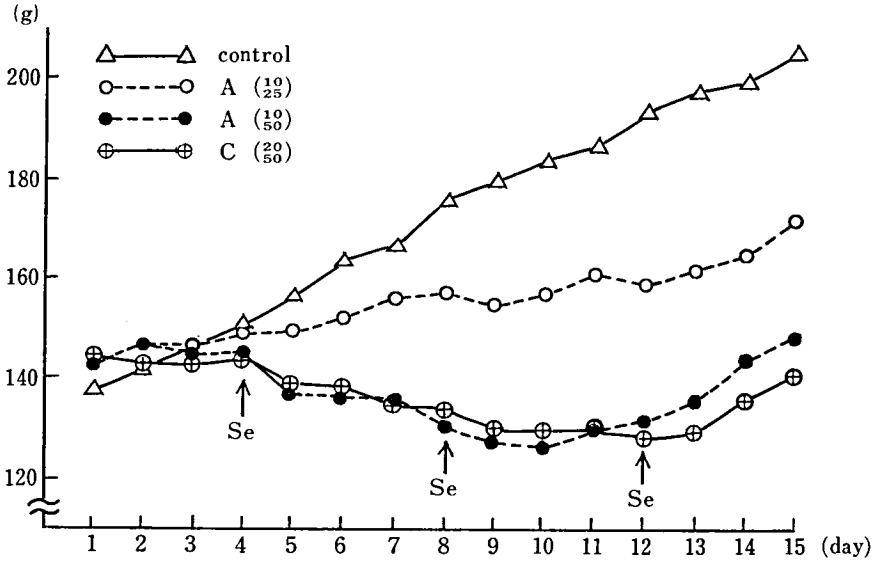


図1 イミプラミン及びセロトニン投与による体重変化

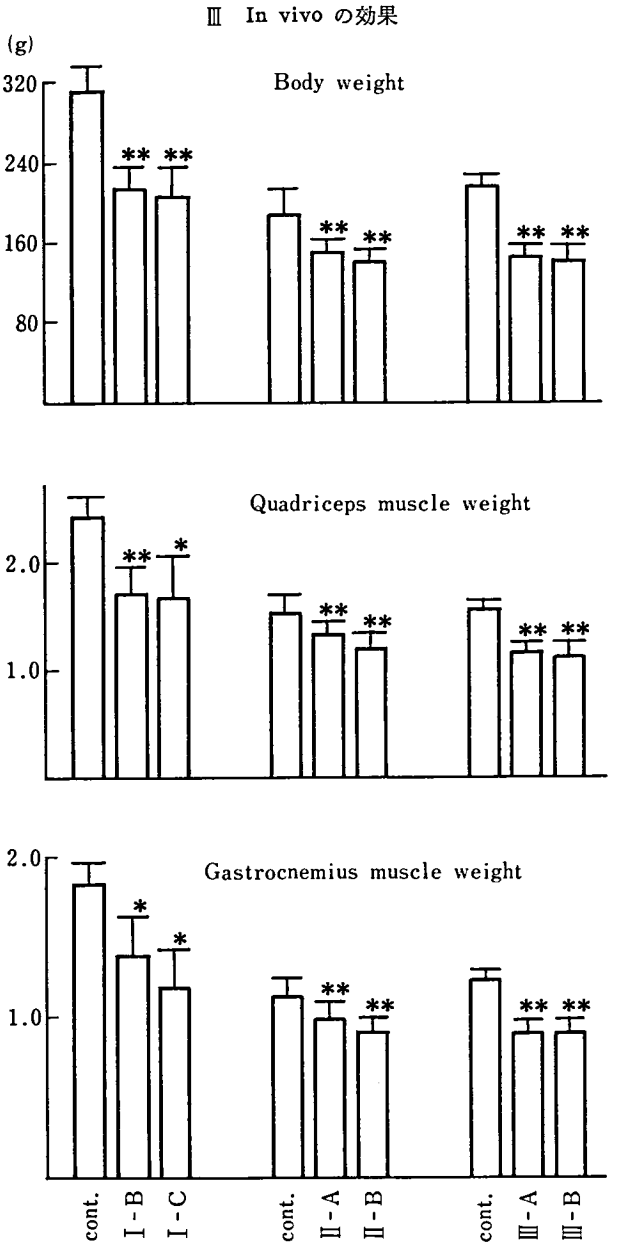


図2 イミプラミン及びセロトニンを投与したラットの体重及び筋湿重量
*；P<0.05, **；P<0.01 平均±S.D.

より3種類に分類した（写真1～3）。分類⑤では間質の著明な拡大，白血球の浸潤が認められ，分類①～④とは変化が異質のものである（写真4）。以上の分類に属する例数をスケジュール毎に示した（表2）。一方，腓腹筋についても同様の変化が観察されたが，その程度は極く軽度のものであった。

(4) セロトニン投与後の血中 CPK 活性の変化

Ⅱ-A のスケジュールにおいて cycle 数を1とした場合の最終セロトニン投与後の血漿中 CPK 活性を経時的に測定した（図4）。CPK 活性は，セロトニン投与後1.5時間にピーク値を示し，6時間では，ほぼ回復した。

考　　察

セロトニンミオパチーは Duchenne 型筋ジ

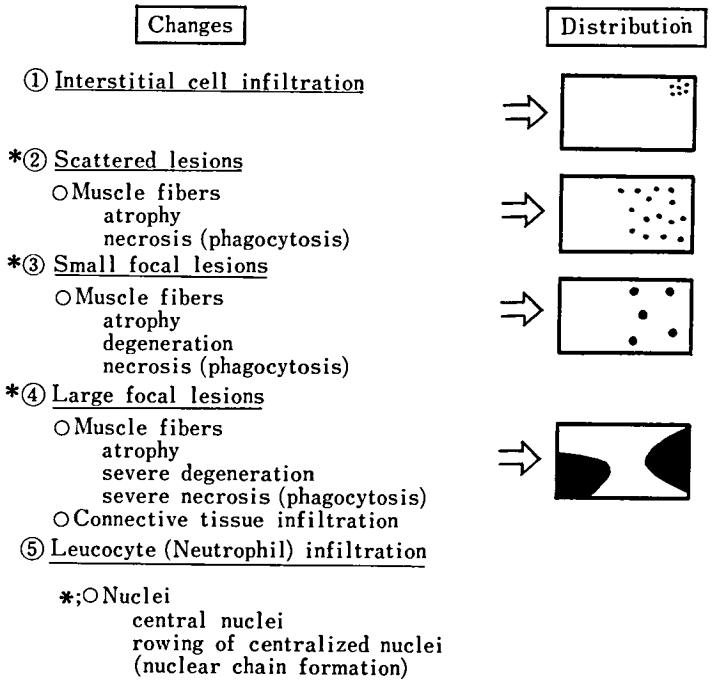


図3 セロトニンミオパチーにおける病理組織学的所見の分類及び分布形態—大腿四頭筋—

ストロフィー(DMD)類似の病変を形成すると報告[11]されて以来，DMD類似の組織学的損傷，血中酵素活性の上昇，膜異常等，モデル動物としての妥当性を示唆する報告がある[5),8)~10)]が，他方，それに疑問を投げかける報告[12]も提出されている。

今回，われわれはラットにセロトニンミオパチーを作成し，その変化の特徴を観察した。イミプラミン及びセロトニンの投与により，大腿四頭筋及び腓腹筋の湿重量は対照群に比し有意に減少した。これらの筋肉について病理組織学的検討を行ったところ，大腿四頭筋に多彩な組織変化が認められたので，その病変形態及び分布により5種類に分類した。このうち，②③及び④の分類にみられた筋線維及び筋核の変化と間質結合織の増生等の所見は Parker ら[5]の報告と一致している。彼らは，これらの変化をDMDにみられる所見と共通のものとしている。従って，これらの諸変化が観察される実験的ミオパチーはDMDの病態モデルとしての可能性を有する。すなわち，Ⅰ-B，Ⅱ-A，Ⅱ-B及びⅢ-Bであるが，これらのうちⅡ-Aを除くすべてにおいて死亡例が認められた。そこでスケジュールⅡ-AについてDMDの特徴の1つである血中CPK活性の上昇が認められるか否かを検討したところ，すでに1cycleでのセロトニン投与後1時間より有意な上昇が認められ，6時間後には回復していた。これは血中セロトニンの消失が早いためと推定される。また，腓腹筋の病変は大腿四頭筋のそれに比べてかなり弱いものであった。これら2種類の筋肉における病変の違いは何によるものか，現在のところ不明である。

以上，セロトニンミオパチーがDMDと類似の変化を現わすことを示したが，さらに詳細な検討，すなわち，病変の進行及び治癒過程での組織化学を含む病理所見及び各種酵素活性の測定，生理的変化の究明等が必要と思われる。

結　論

E-64及びその類縁体のヒト筋ジストロフィー治療薬としての開発に当って，その病態モデ

Ⅲ In vivo の効果

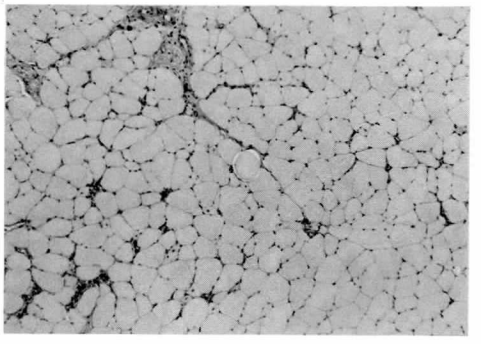


写真 1 大腿四頭筋，I-A group
(H. E. 染色，100倍)
Scattered lesions

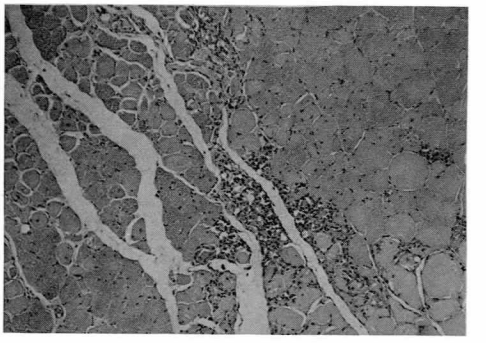


写真 2 大腿四頭筋，I-B group
(H. E. 染色，100倍)
Small focal lesions

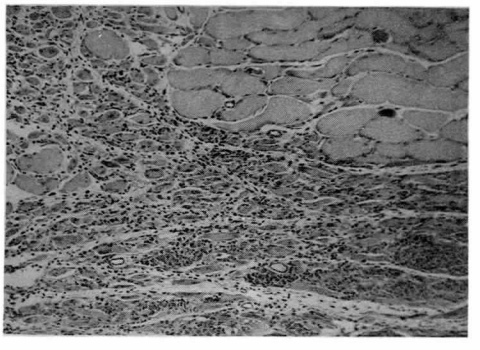


写真 3 大腿四頭筋，I-B group
(H. E. 染色，100倍)
Large focal lesions

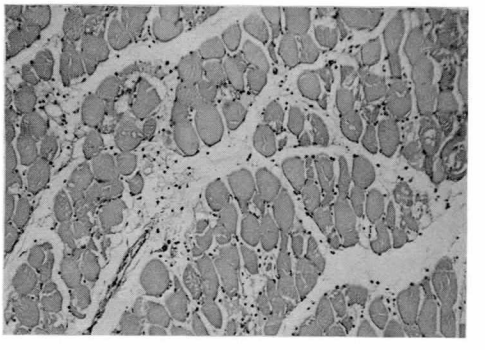


写真 4 大腿四頭筋，II-A group
(H. E. 染色，100倍)
Leucocyte (Neutrophil) infiltration

表 2 セロトニンミオパチーにおける病理組織学的変化
—大腿四頭筋—

Groups		Doses (mg/kg) Im—Se	No. of Rats	Changes ①	②	③	④	⑤	Mortality (%)
Ⅰ	A	10 — 25	2/6		2				0
	B	10 — 50	5/18		5	3	4		27.8
	C	20 — 50	2/12		2				25.0
Ⅱ	A	10 — 75	5/21	1	5	3		2	0
	B	10 — 100	5/23	1	5	4	3		47.8
Ⅲ	A	10 — 25	5/21	2	3				0
	B	10 — 50	5/21	2	5	2			14.3

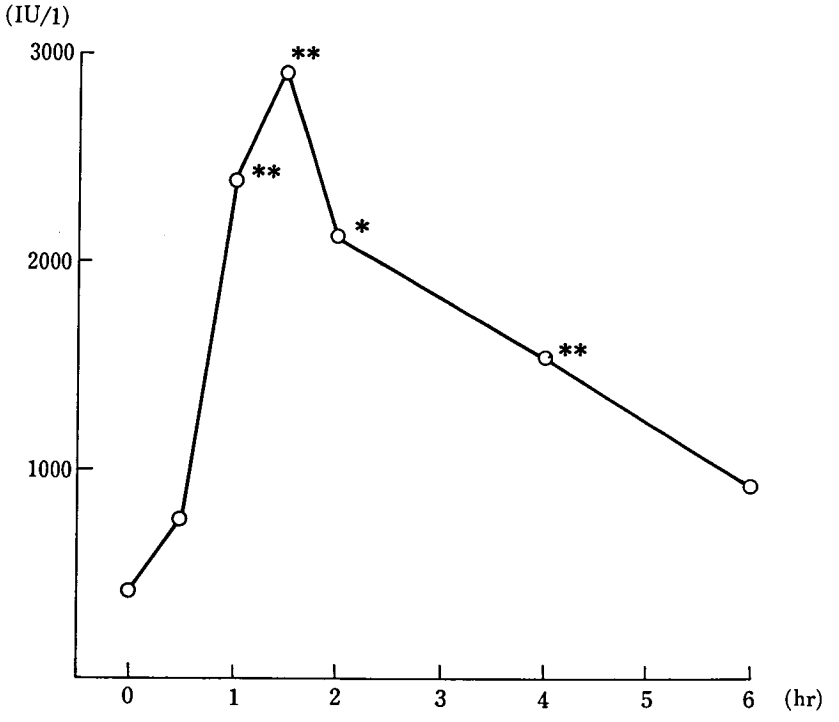


図4　セロトニン投与後の血漿中 CPK 活性の変化
(Schedule II-A, one cycle)　*; P<0.05, **; P<0.01

ルとして，薬物発症ミオパチーであるセロトニンミオパチーについて，その当否につき若干の検討を行った。

(1) イミプラミン及びセロトニンの投与により，呼吸の異常，チアノーゼ，後肢の筋力低下等が観察された。

(2) 薬物投与群において，大腿四頭筋及び腓腹筋の湿重量は有意に減少したが，体重 100 g 当たりの筋重量に換算した場合には有意差は認められなかった。

(3) 薬物投与群の大腿四頭筋において，筋ジストロフィー症で観察される筋線維の変性及び萎縮，筋核の増加，中心化及び鎖状配列，間質細胞の増加及び間質線維成分の増生が認められた。

(4) セロトニン投与後，CPK 活性は著明に上昇した。

参考文献

1) 今堀ら：本誌
2) 辻繁勝：疾患モデル動物ハンドブック，川俣順一，松下宏編，p. 419，筋ジストロフィーマウス (dy, dy^{2J})，1979.
3) 石浦章一，杉田秀夫：同上，p. 414
4) L. Proschek and G. Jasmin: Progression of Hereditary Cardiomyopathy in Hamsters UM-X 7.1 Line, J. Mol. and Cellular Cardiology vol. 11, Suppl. 1, 50, 1979.
5) Parker, J. M. and Mendell, J. R.: Proximal myopathy induced by 5-HT-imipramine simulates duchenne dystrophy, Nature, **247**, 103-104, 1974.
6) 大関正弘：本誌
7) 杉田ら：本誌
8) Silverman, L. M. and Gruemer, H. D.: Sarcolemmal membrane changes related to enzyme release in the imipramine/serotonin experimental animal model, Clin. Chem., **22**, 1710-1714, 1976.
9) Mendell, J. R., Engel, W. K. and Derrer, E. C.: Increased plasma enzyme concentrations in rats with functional ischemia of muscle provide a possible model of duchennemuscular dystrophy, Nature, **239**, 522-524, 1972.

10) Verril, H. L., Pickard, N. A. and Gruemer, H. D. : Mechanisms of cellular enzyme release. I. Alterration in membrane fluidity and permeability, Clin. Chem., 23, 2219-2225, 1977.

11) Mendell, J. R., Engel, W. K. and Derrer, E. C.: Duchenne muscular dystrophy: Functional ischemia reproduces its characteristic lesions, Science, 172, 1143-1145, 1971.

12) Munsat, T. L., Hodsson, P. and Johnson, M. A.: Experimental serotonin myopathy, Neurology, 27, 772-782, 1977.

10. E-64の一般薬理作用

～特に呼吸・循環機能及び中枢神経系に及ぼす影響～

福原武彦*

研究協力者 木口百合子* 後藤和利* 高野一夫*
西川嘉伸* 八反丸善文* 宮川政昭*
亀井淳三*

研究目的

E-64, DL体及びL体の一般薬理作用の追究を目的とする。本年度は薬理作用のうち，急性実験条件下のイヌ，ネコ，ウサギにおいて，とくに循環機能，呼吸機能及び中枢神経系の活動に及ぼす影響について検討を行った。

研究方法

(1)実験動物：成熟した両性のイヌ，ネコ及びウサギを用いた。

(2)実験条件：麻酔下及び非動化，局麻，人工呼吸下の急性実験条件に化合体の薬理作用を検討した。麻酔にはpentobarbital (10 mg/kg～30 mg/kg 静脈内適用) を用いた。非動化動物の人工換気レベルは呼気ガス O_2 及び CO_2 濃度ならびに動物血酸素分圧 (Pao_2) の連続測定を行いつつ，適正レベルに維持された。

(3)被験化合体：E-64，L体[1),2)] 及びDL体[2)] を生理食塩液に 20～25 mg/ml の濃度に溶解し，静脈内に適用した。三種の実験動物においてL体の1回適用量，1～100 mg/kg，累積適用総量 15～350 mg/kg，DL体の1回適用量 5～100 mg/kg，累積適用総量 10～110 mg/kg を適用した。

(4)循環機能

i）動脈血圧：大腿動脈血圧を圧トランスデューサーを用いて観血的に測定，他の諸現象記録と共にペン書記録器を用い記録した。

ii）心電図（ECG）：標準肢第一導出によった。

iii）大腿動脈脈波：脈波の波型変化を平均加算解析法によって検討した。

iv）交感神経（大内臓神経）自発発射活動電位を導出記録した。

(5)呼吸機能

i）呼吸運動：胸囲法により胸郭周径変化を，サミスターを用いて呼吸流速を測定記録した。

ii）横隔神経自発発射活動電位：頸部で横隔神経を分離，切断中枢端から遠心性活動電位を導出した。導出された電位はデータレコーダーを用い磁気テープに収録，要に応じて再生して，医用電算機を用いてデータ解析を行った。

(6)Pao_2：ポーラログラフ法により腸骨動脈における Pao_2 を連続的に測定，記録した。

(7)呼気ガス酸素濃度 (FEO_2) 及び炭酸ガス濃度 ($FECO_2$)：呼気ガス瞬時分析装置（三栄測器，1H02 及び 2H01）を用いて連続的に測定記録した。

(8)脳波 (EEG)：頭皮上脳波又は皮質脳波を双球銀電極を用いて導出，記録した。導出された脳波を磁気テープに収録し，医用電算機を用いてパワースペクトル分析を行った。

(9)諸現象の記録：上述の諸パラメーターはそれぞれ増幅され，同時にポリグラフ的にペン書オ

* 東京慈恵会医科大学　第二薬理学教室

シログラフに記録した。他方，これらの諸現象をデータレコーダを用いて磁気テープに収録し，医用電算機を用いて詳細なデータ解析を行った。

(10)医用電算機によるデータ解析

上述の諸現象を医用コンピューターの種々のプログラムを用いて解析，評価した。

i）心拍数：心電図のR波の時間間隔ヒストグラムを演算し，平均値，標準偏差を得，心拍数変化を分析した。

ii）脈波波形：大腿動脈脈波の平均加算(100回）を行い波形変化の有無を検討した。

iii）横隔神経活動電位：活動電位放電群を構成するスパイク電位の数と振幅のヒストグラムを演算，平均値と標準偏差を算出した。

iv）EEG：脳波のパワースペクトル分析を行った。

研究成果

（I） 実験動物の種類及び実験条件，ならびに化合体適用量

急性実験条件下の麻酔イヌ，非動化ネコ，非動化ウサギにDL体を，非動化ウサギ及び麻酔ウサギにL体を，静脈内適用し，その影響を検討した（表1）。

表1 E-64のDL体（DL）及びL体（L）の作用を検討した動物種と実験条件

	DL		L	
	Paral.	Anesth.	Paral.	Anesth.
Dog	—	○	—	—
Cat	○	—	—	—
Rabbit	○	—	○	○

Paral.：非動化し，呼気からO_2およびCO_2濃度の連続監視のもとに適正な人工換気で維持した条件.

Anesth.：pentobarbital麻酔下の実験条件.

記号○：実験を実施済の条件.

(1)一回適用量及び適用総量

i）L体：麻酔ウサギにおける一回適用量は10～100 mg/kg，総量は120mg/kg，非動化ウサギでは，一回適用量は1～100 mg/kgの範囲にあり，2～3時間内における適用総量は15～350 mg/kgであった（表2）。

ii）DL体：麻酔イヌで一回適用量5～40 mg/kg，適用総量65～75 mg/kg，非動化ネコ

表2 E-64（L体）の静脈内一回適用量と適用回数（N）及び適用総量

Dose	N
1 mg/kg	3
1.78	2
5	2
10	22
20	6
40	1
100	7

Total Dose
15 mg/kg
25.56
90
100
150
206
350

Dose	N
20 mg/kg	1
100	1

左表：非動化ウサギ，中央：2～3時間内における適用総量，右表：麻酔ウサギ.

表3 E-64（DL体）の静脈内一回適用量と適用回数（N）

Dose	N
5 mg/kg	1
10	2
20	1
40	1
100	1

Dose	N
6.2 mg/kg	1
8.5	1
10	1

Dose	N
5 mg/kg	2
10	1
20	2
40	2

左表：非動化ウサギ，中央：非動化ネコ，右表：麻酔イヌ.

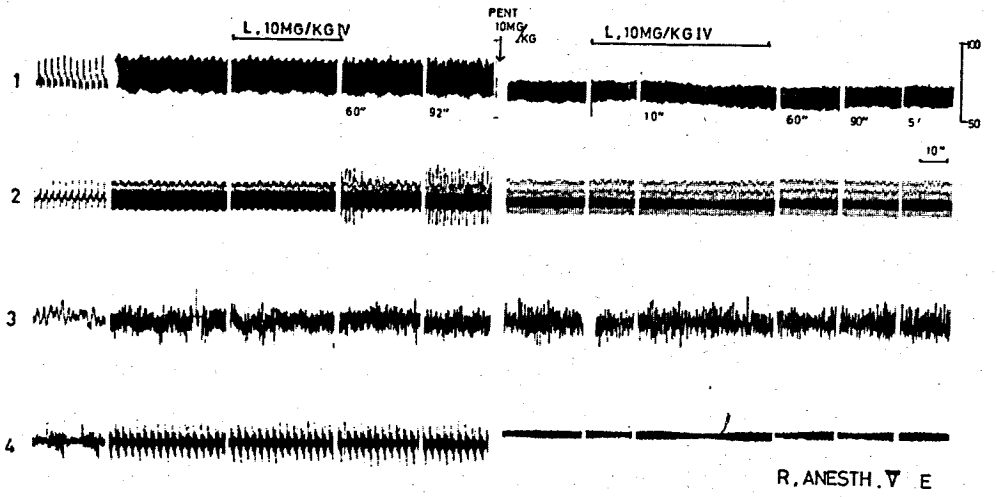


図1　E-64（L体）の影響

1：動脈血圧（記録右端の較正，mmHg），2：心電図，3：脳波，4：横隔神経活動電位．L：E-64，L体，PENT：pentobarbital．図の左側半部に人工呼吸下に非動化したウサギ，右側半部に人工呼吸下に麻酔したウサギにおけるL体10 mg/kg 静脈内適用前後の記録を示した（記録1上部の横線は適用期間を示す）．

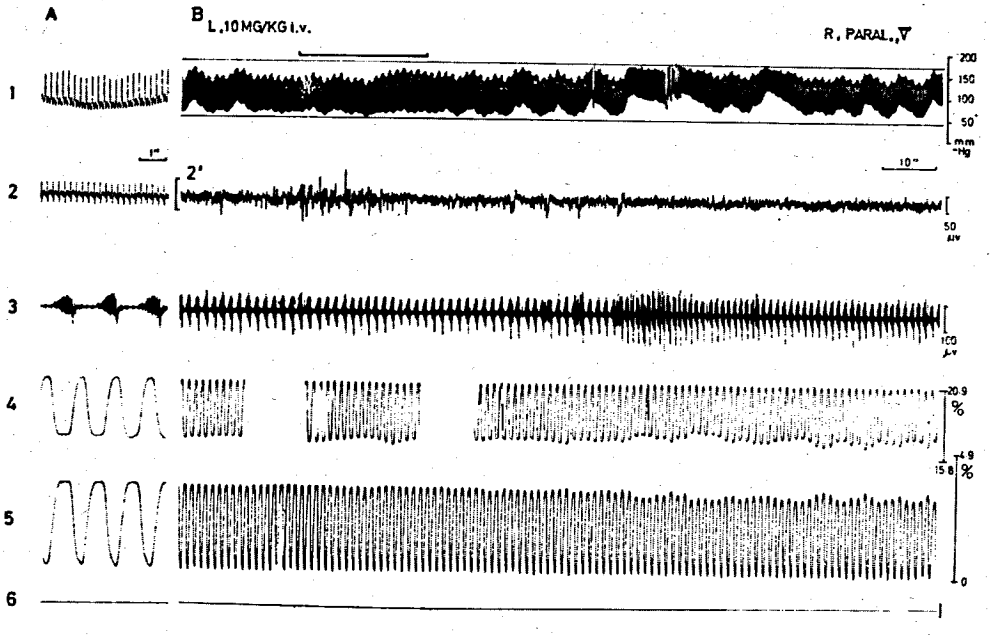


図2　E-64（L体）の影響

非動化ウサギ．1：動脈血圧，2：心電図，2′：脳波，3：横隔神経活動電位，4：呼気ガス酸素濃度，5：呼気ガス炭酸ガス濃度，6：動脈血酸素分圧（記録右端の電流較正値 $=0.1\times10^{-8}$A）．

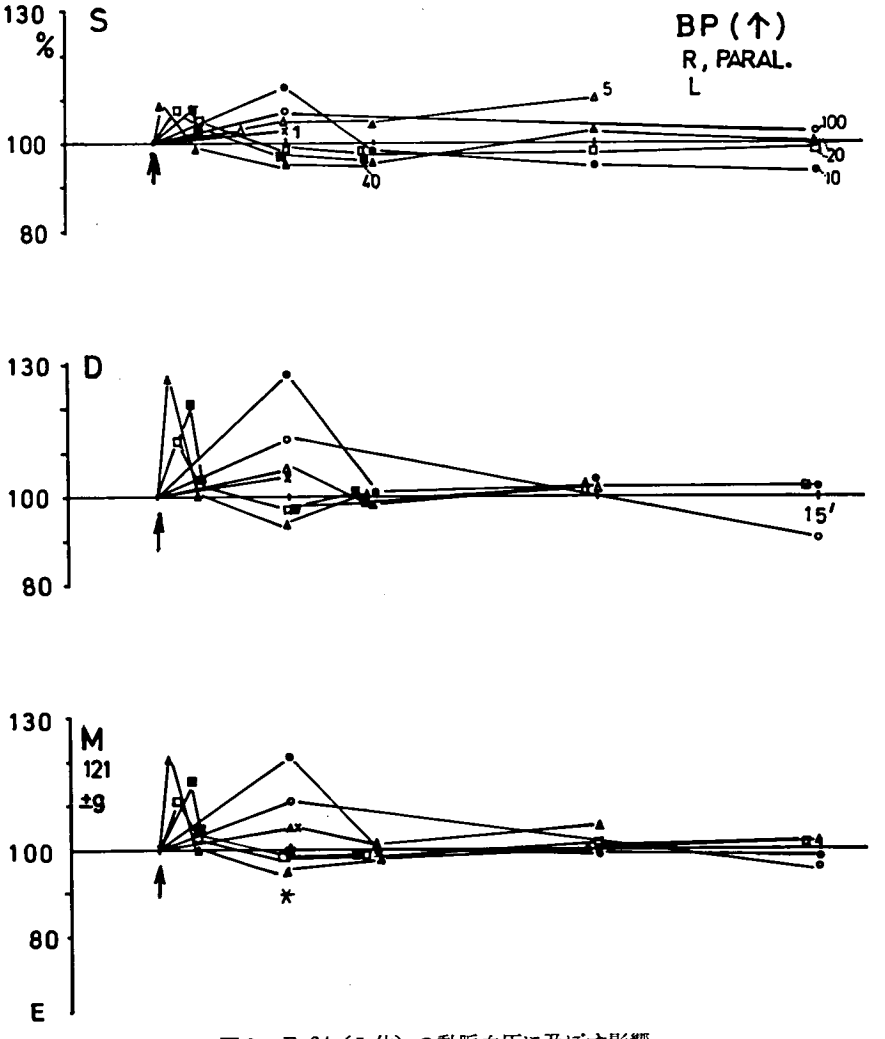


図3　E-64（L体）の動脈血圧に及ぼす影響
血圧上昇を示した非動化ウサギ（7例，適用前の平均血圧 121±9 mmHg）における血圧変化の時間経過．S：収縮期圧，D：拡張期圧，M：平均血圧．縦軸：適用前の値に対する百分率，横軸：時間．各記号はそれぞれ一実験例を示し，曲線右端の数字は適用量（mg/kg）を現わす．

では，それぞれ6.2～10 mg/kg，10～18.5 mg/kg，非動化ウサギでは 5～100 mg/kg，95～110 mg/kg であった（表3）。

(2)毒性：上述の適用総量を2～3時間にわたる実験時間内に数回に分けて間歇的に静脈内適用した。

化合体適用によって，前述の各実験条件下の実験動物において，循環機能の変化をはじめとして種々の影響が発現した。しかし，総量適用後3～4時間の観察時間内に，いずれの動物においても致死効果は認められなかった。

（Ⅱ）循環機能に及ぼす影響

イヌ・ネコ・ウサギにおいて動脈血圧，脈波，心電図，ネコにおいては，これらの諸パラメーターに加えて血管収縮神経遠心性活動電位に及ぼす影響を検討した。

(1)L体の作用

i）麻酔ウサギにおける作用

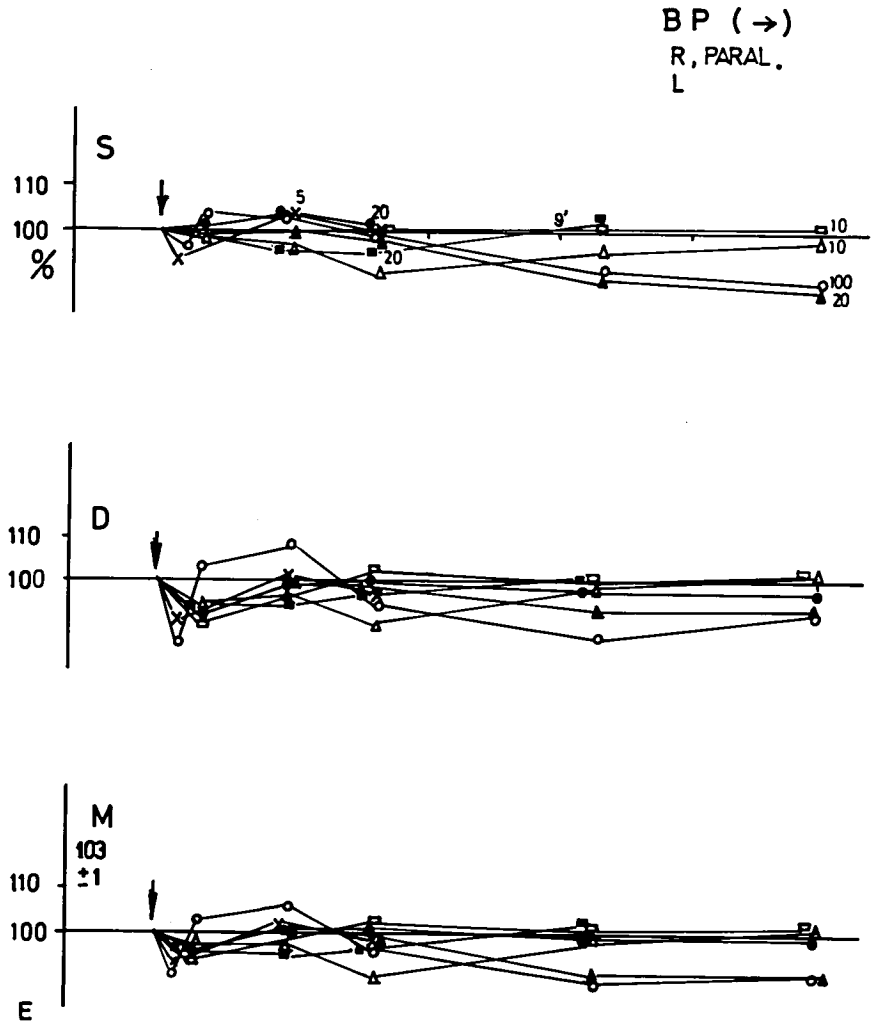


図4　E-64（L体）の動脈血圧に及ぼす影響
有意の変化を示さなかった6例（適用前の平均血圧 103±1 mmHg）．非動化ウサギ．
S，D，M，縦軸，横軸，記号，曲線右端の数字の説明については図3参照．

Ether 麻酔下で，両側迷走神経切断，神経筋接合部遮断薬を用いて非動化した人工呼吸下のウサギを pentobarbital 10 mg/kg 静注によって麻酔した。E-64, L 体 10 mg/kg, 100 mg/kg 適用により数分間にわたって，ごく軽度の動脈圧下降が認められたが，ECG，脈波には有意の変化が認められなかった。図1に 10 mg/kg 適用時の変化を示した。

ii）非動化ウサギ（両側迷走神経切断）における作用

L体 1～100 mg/kg（累積適用 15～350 mg/kg）を適用し影響を検討した。

1）動脈血圧：L体の 1～100 mg/kg 静脈内適用直後から10～15分後にわたって上昇（7例）（図2，図3），変化が認められない場合（5例）（図4）及び下降（7例）（図5）の三様の変化が認められた（図6）。上昇（図7）または下降がおこる場合，収縮期圧，拡張期圧及び平均血圧は，ほぼ並行して変化した。血圧上昇は緩徐に発現し，上昇例における平均血圧の変化率は，適用前のレベルの10～20%（図3，M），下降例のそれは10～30%の範囲にあり（図

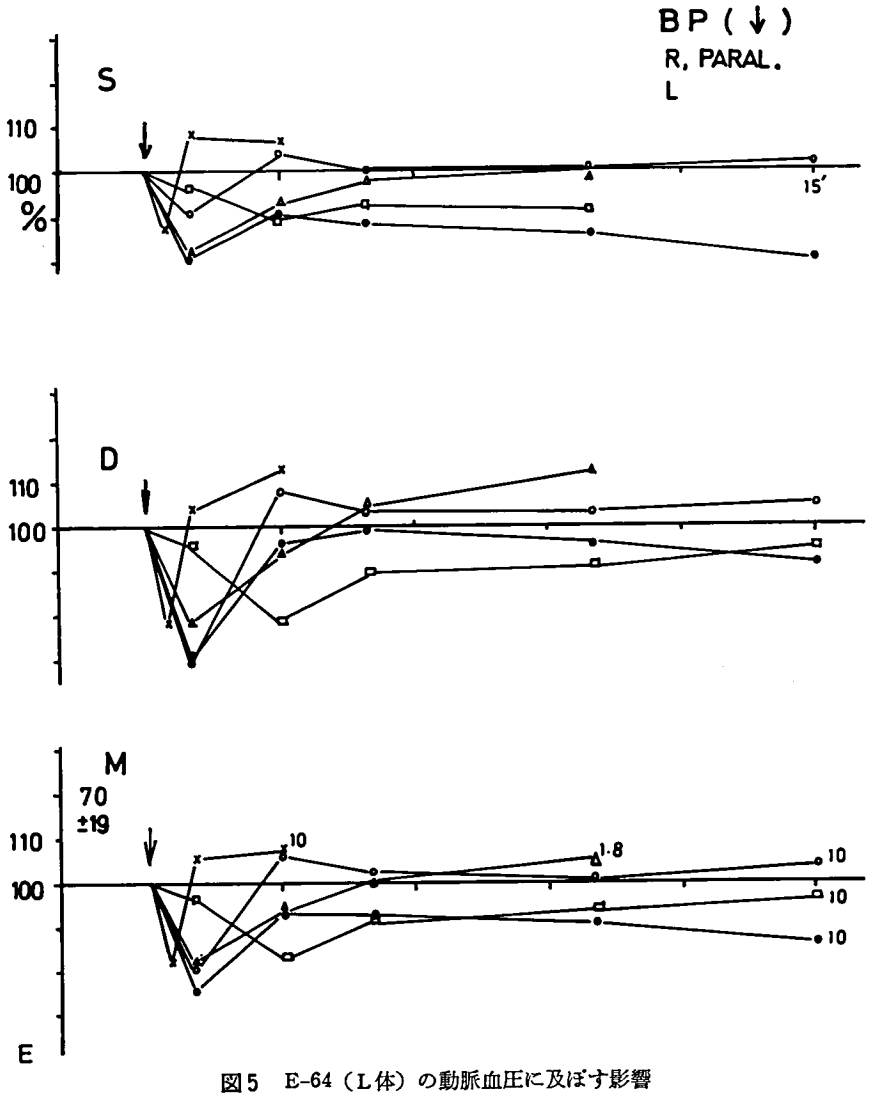


図5 E-64（L体）の動脈血圧に及ぼす影響
血圧下降を示した5例（適用前平均血圧 70±19 mmHg）．非動化ウサギ．S，D，M，縦軸，横軸，記号，曲線右端の数字の説明は図3参照．

5)，変化のピーク時の平均値と適用前の平均値の差は統計的に有意であった（表4）。これら血圧反応の三型の変化方向と適用前の動脈圧レベルとの間には相関関係が認められた。すなわち，血圧上昇，不変，下降例のL体適用前の平均血圧の平均値（±SD）はそれぞれ 121(±9)，103(±11)，70(±19) mmHg であってこれらの平均値相互間の差はいずれも有意であった（表5）。

三段階の適用量，1，10，100 mg/kg の作用強度を比較すると，10 mg/kg のそれが最大であり，100 mg/kg，ついで 1 mg/kg の順であった（図8）。10 mg/kg を30～60分の時間間隔で繰り返し，適用した場合の血圧変化にタキフィラキシーは認められなかった。

2) 脈波：電算機による100回の平均加算演算の成績を検討した。化合体適用前後の波型に差は認められなかった（図9，A～D）。

3) ECG：

a）波型には著変が認められないが，一部の

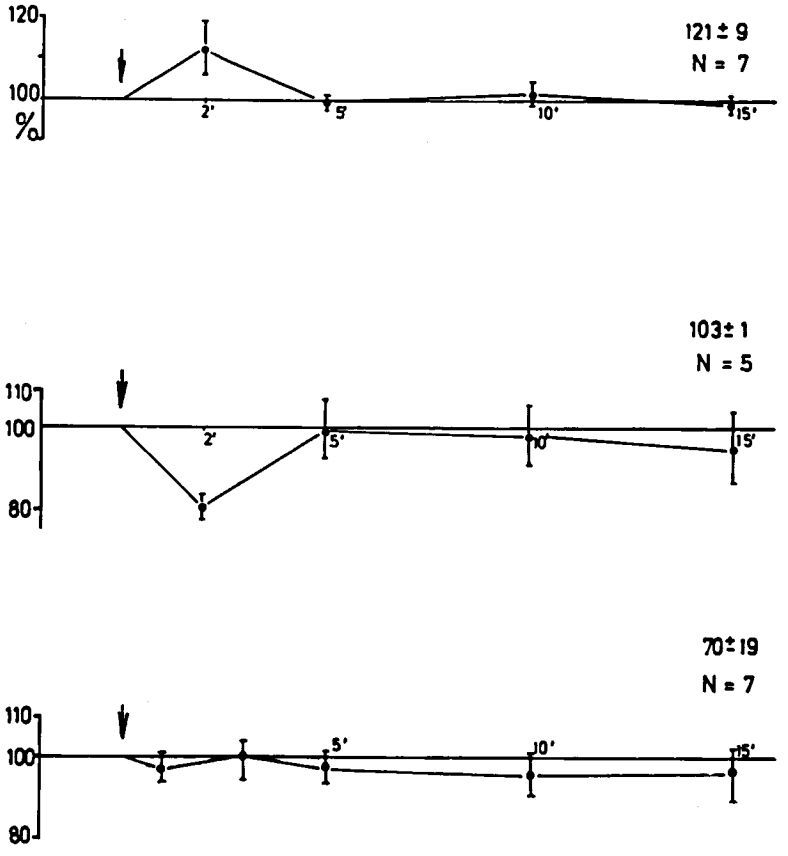


図6 E-64（L体）の平均血圧に及ぼす影響
非動化ウサギにおける平均血圧変化の時間経過を平均値で示した．縦軸：適用前の平均血圧値に対する百分率，横軸：時間，矢印：適用時点，上段：血圧上昇例（適用前の平均血圧の平均値＝121±9 mmHg），中段：血圧下降例（103±1 mmHg），下段：血圧の変化を示さなかった例（70±19 mmHg）．上段及び中段のグラフの適用後2分の値と適用前の値の差は統計学的に有意．

表4 E-64（L体）の平均血圧に及ぼす影響

	A	B	C
	$\bar{x}$±SD (N=7)	$\bar{x}$±SD (N=5)	$\bar{x}$±SD (N=7)
Control	100%	100%	100%
1-3 Min	112.9±6.5	98.9±3.7	80.9±3.0
5	99.7±1.1	97.6±3.8	99.6±7.4
10	101.8±3.0	95.9±5.5	98.4±7.3
15	99.1±2.4	96.1±6.3	95.6±8.7

非動化ウサギにおける平均血圧変化の時間経過を示した．
A：血圧上昇例（適用前の平均血圧の平均値＝121±9 mmHg）
B：血圧不変例（103±1 mmHg）
C：血圧下降例（70±19 mmHg）

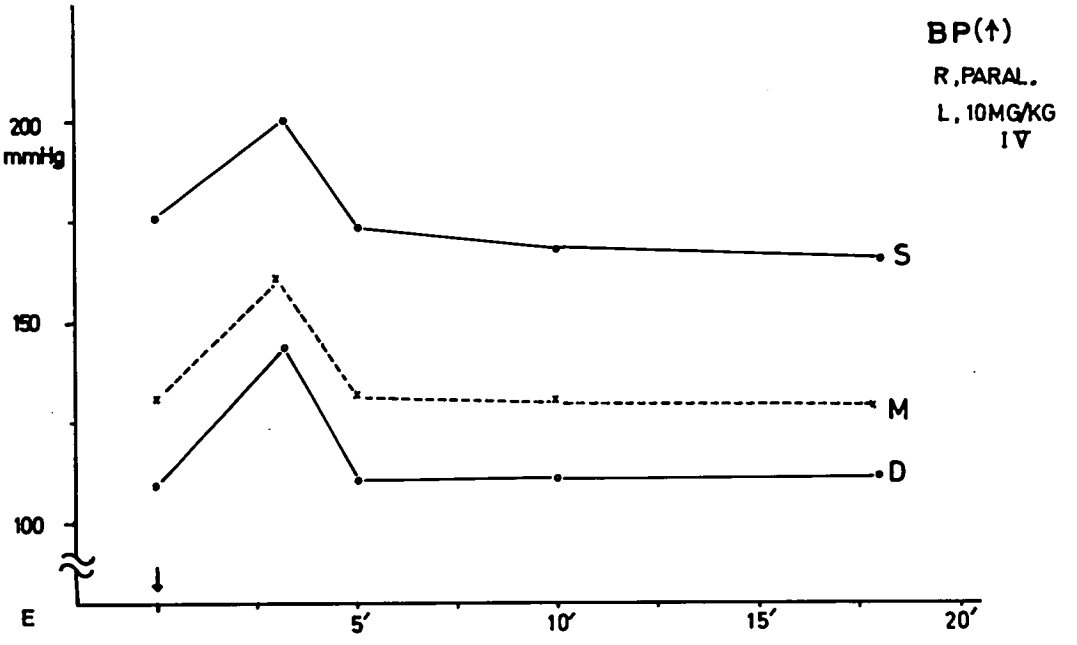


図7　E-64（L体）の動脈血圧に及ぼす影響
血圧上昇を示した一例を示す．非動化ウサギ．縦軸：動脈圧．S，M，D，横軸の説明は図3に同じ．矢印：L体適用時点．

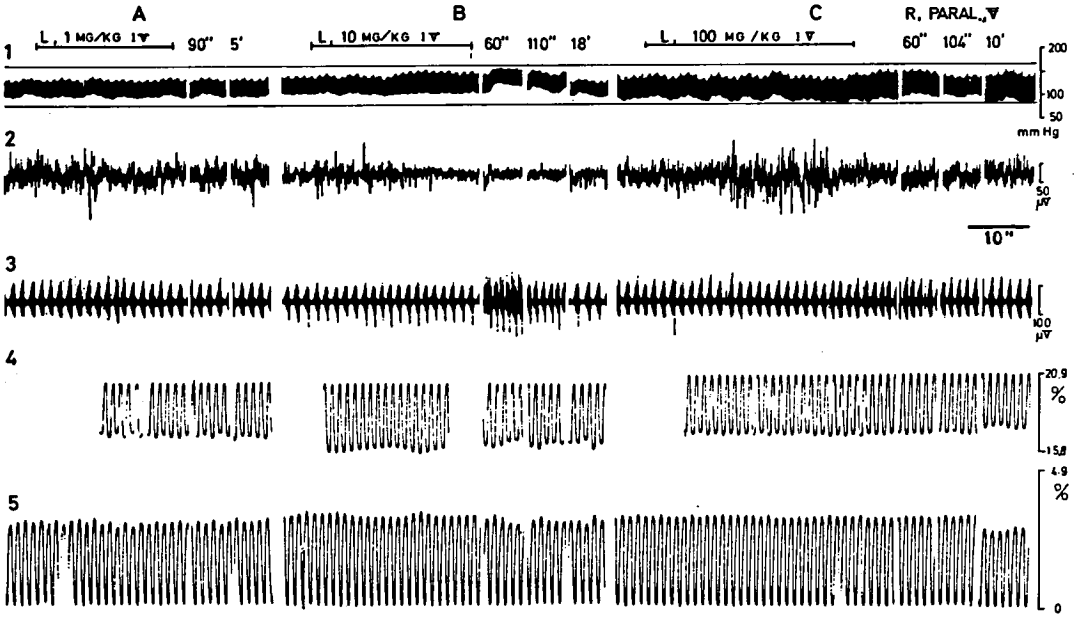


図8　E-64（L体）の作用比較
非動化ウサギ．1：動脈血圧，2：EEG，3：横隔神経活動電位，4：呼気ガス O_2 濃度（連続記録の一部を示す），5：呼気ガス CO_2 濃度．
A：L体 1 mg/kg 静脈内適用，B：10 mg/kg 適用，C：100 mg/kg 適用．

表5 E-64（L体）による動脈血圧の変化方向と化合体適用前の平均血圧との関係

	A (N=7)	C (N=5)	B (N=7)
A (N=7)		Sig. P<0.05	Sig. P<0.05
C (N=7)			Sig. P<0.05

	N	$\bar{x}$±SD (Torr)
A	7	121±9
B	7	103±11
C	5	70±19

非動化ウサギ．A：血圧上昇群，B：血圧変化を示さない群，C：血圧下降群．N：実験例数．
左表：三群の平均値の差はいずれも有意である．右表：各群の平均血圧の平均値と標準偏差($\bar{x}$±SD)．

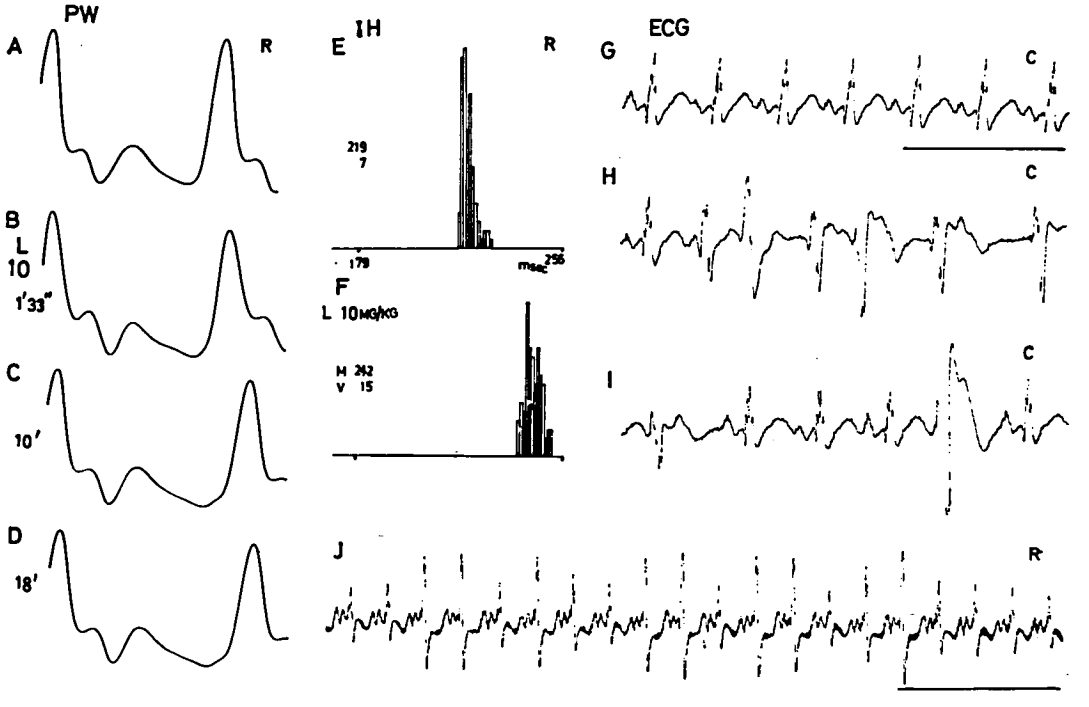


図9 E-64（L体）の脳波（A～D），心拍数，心電図（G～J）に及ぼす影響
A～F，J は非動化ウサギ，G～I は非動化ネコにおける記録，時標（G及び J の右下部）：1秒．A：L体適用前，B：10 mg/kg 静脈内適用後1分33秒，C：10分後，D：18分後．E：L体適用前の R-R 間隔ヒストグラム（平均値±標準偏差＝219±7 msec），F：10 mg/kg 静脈内適用後10分（242±15 msec）．G：L体適用前の ECG，H～J：適用後の ECG．

例で適用後30～90秒後から一過性に不整脈が発現し（図9，J），ある例では心室性期外収縮が現われた。

b）電算機によるヒストグラム解析によって心拍数に及ぼす影響を検討した（図9，E，F）。13例中3実験例において，適用前の値の5～20%の減少が認められ，このL体適用による徐脈は 100% O_2 の吸入下においても発現した。

(2) DL体の作用

i）麻酔イヌにおける作用

DL体 5 mg/kg 適用により動脈圧に有意の変化は認められなかった（図11，B）。一部の実

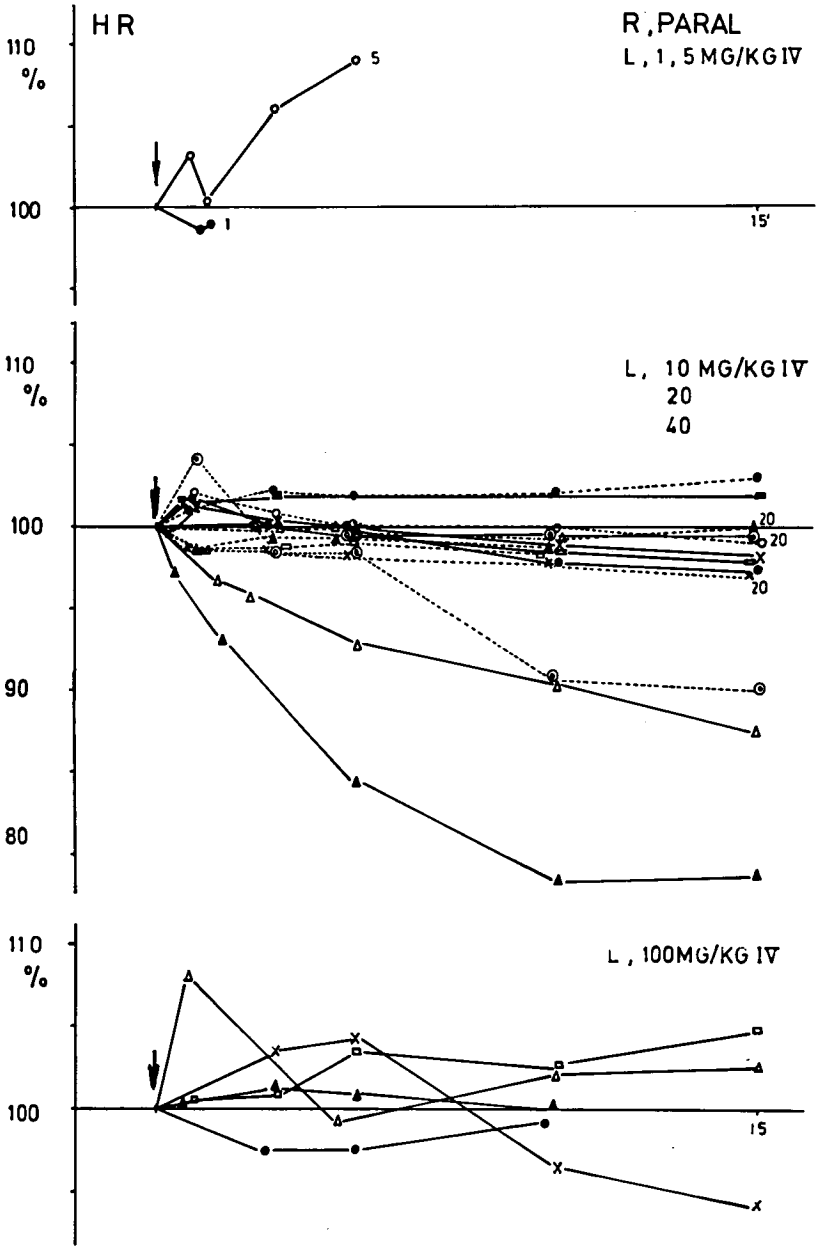


図10 E-64（L体）の心拍数に及ぼす影響

非動化ウサギ．縦軸：適用前の心拍数に対する百分率，横軸：時間．上段：L体1または 5 mg/kg 静脈内適用後の変化の経過，中段：10（9例），20（4例），40 mg/kg（1例）適用後，下段：100 mg/kg 適用後（5例）．

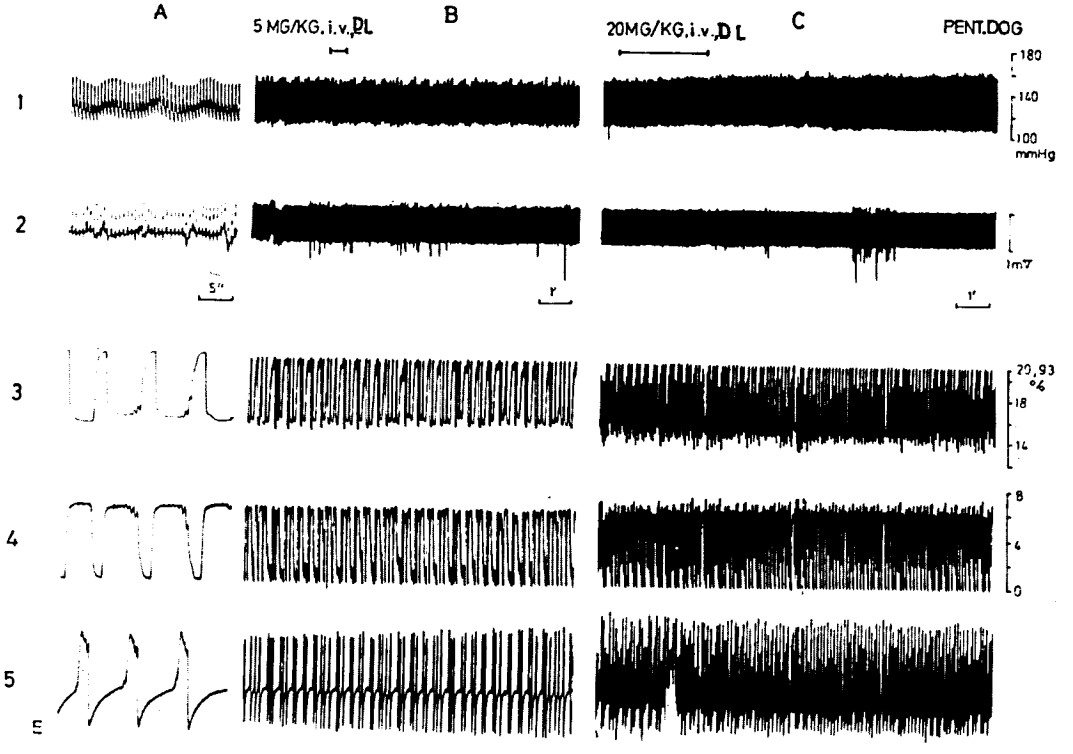


図11 E-64 (DL 体) の影響
麻酔イヌ. 1：動脈血圧, 2：心電図, 3：呼気ガス酸素濃度, 4：呼気ガス炭酸ガス濃度, 5：呼吸流速曲線（上方のふれが吸息). B：DL 体 5 mg/kg 静脈内適用（1 上部の横線は静注持続を示す). C：20 mg/kg 適用.

験例で 20 mg/kg 適用により軽度の平均血圧の上昇 (10 mmHg 程度), 収縮期及び拡張期圧の上昇及び脈圧の拡大が認められ, これらの変化は十数分間持続した (図11, C)。このとき, 適用直後に短時間不整脈が発現する少数例を例外として, 心電図及び脈波波型に有意の変化は認められなかった。

ii）非動化ネコにおける作用

Ether 麻酔下に, 神経筋接合部遮断薬で非動化, 人工呼吸で維持したネコにおいて, 両側迷走神経及び頸動脈洞神経を切断し, 未梢受容器からの反射性影響を除いた条件下に, DL 体の影響を検討した。

DL 体 6.2～10 mg/kg 静脈内適用により, 動脈血圧が収縮期及び拡張期圧の軽度の上昇 (10～15 mmHg) が約 10 分間にわたって発現した (図12, B)。この時, 一部の例の ECG において適用直後, 心室性期外収縮がおこった(図 9, H, I）が, いずれも一過性でありその後 ECG 波形, 心拍数, 脈波波形に有意の変化は認められなかった。交感性血管収縮神経線維を含む大内臓神経及び腎交感神経遠心性発射活動のいずれにも有意の変化は認められなかった。

iii）非動化ウサギ（両側迷走神経切断）における作用

DL 体 5～100 mg/kg（総量 95～110 mg/kg) 適用により数分間にわたり, 軽度の動脈圧下降が認められたが, この時の平均血圧は 110 mmHg 前後であった。また同時に, 7 例中 1 例において対照値の15%程度の徐脈がおこったが, 他の 6 例では有意の心拍数の変化は認められなかった (図13)。

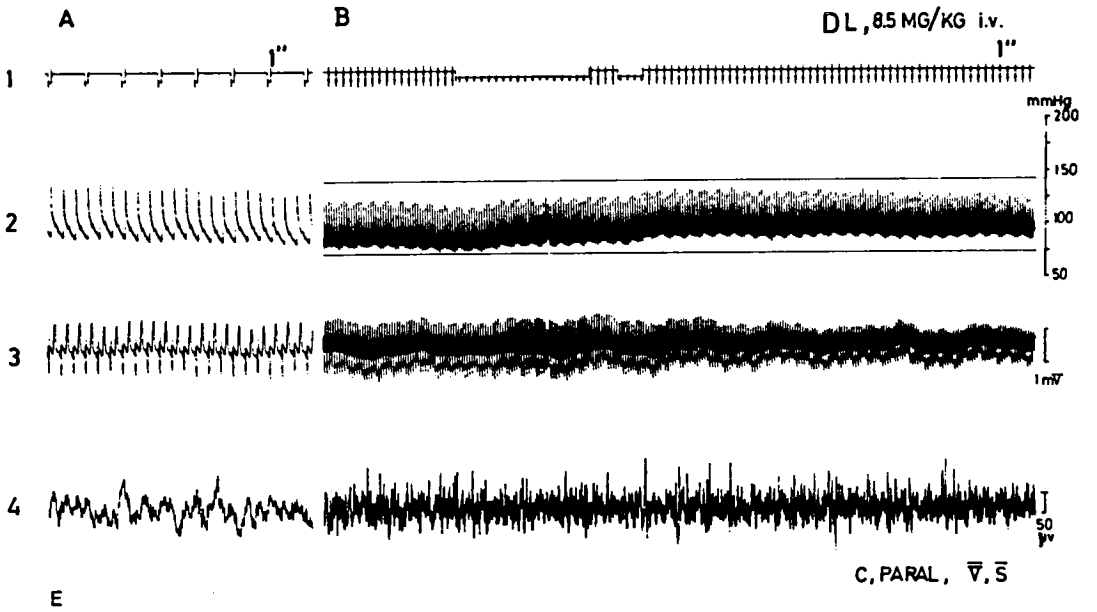


図12 E-64 (DL 体) の影響
非動化ネコ (両側迷走交感神経幹, 頸動脈洞神経切断). 1 : 時標, 2 : 動脈血圧, 3 : 心電図, 4 : 脳波. B : DL 体 8.5 mg/kg 静脈内適用.

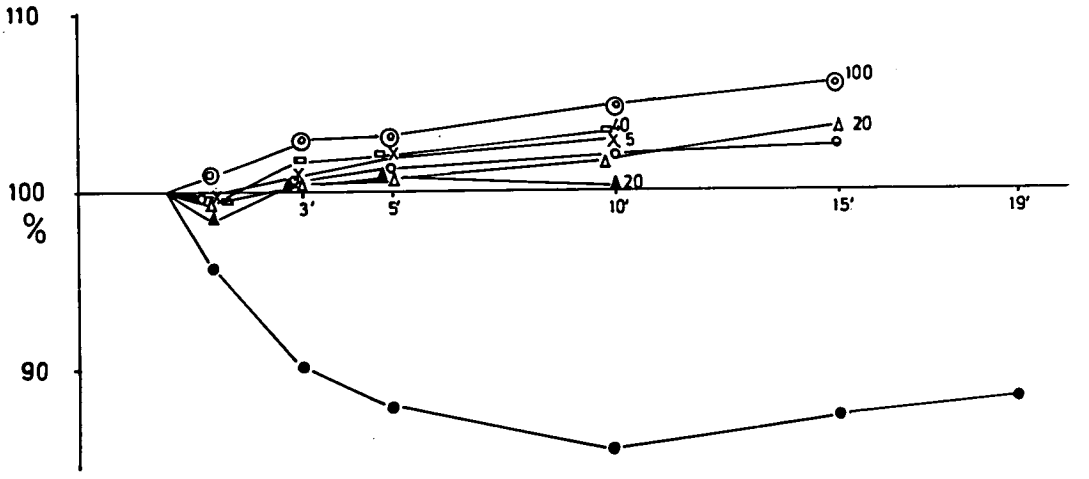


図13 E-64 (DL 体) の心拍数に及ぼす影響
非動化ウサギ. 縦軸 : 適用前の心拍数に対する百分率, 横軸 : 時間. 記号はそれぞれ一実験例を示し, 各曲線右端の数字は静脈内適用量を示す. 5～100 mg/kg (N=7).

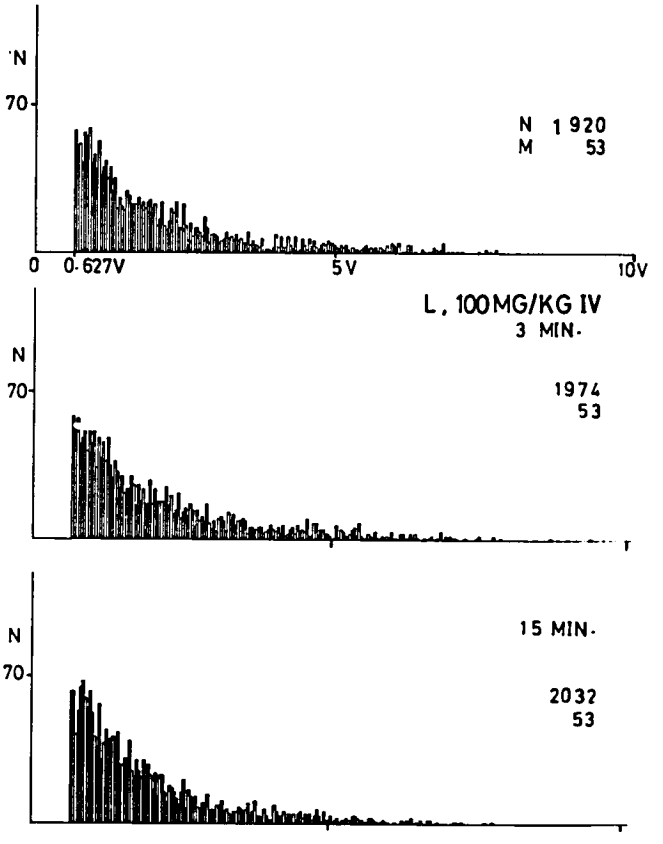


図14 E-64（L体）の横隔神経活動電位に及ぼす影響
非動化ウサギ．各グラフは電算機演算によって得られた振幅ヒストグラム，縦軸：活動電位に含まれるスパイク数，横軸：電圧で表わされたスパイクの振幅，上段：適用前（スパイク数N＝1920，平均値M＝53），中段：100 mg/kg 静脈内適用後3分（N＝1974，M＝53），下段：適用後15分（N＝2032，M＝53）．適用前後における N×M の値の差は有意ではない．

（Ⅲ） 呼吸機能に及ぼす影響

(1)L体の作用

i）Pentobarbital 麻酔下のウサギにおける作用

横隔神経遠心性発射活動電位に現われる呼吸性放電群の周期，及び放電群に含まれるスパイクの数と振幅の積に及ぼす影響を検討した。後者は，横隔神経の呼吸性活動総体増減の量的指標と考えられ，電算機による演算によって算定され総活動量（スパイク総数×振幅の平均値）として表わされる。

L体 10～100 mg/kg 適用により，横隔神経放電群周期及び活動総量に有意の変化は認められなかった（図1，右側，4）。

表6 E-64（L体）の横隔神経活動電位の呼吸性放電群の周期に及ぼす影響

	N	Before (Sec)	After (Sec)	
1- 5 mg/kg	9	1.36±0.25	1.35±0.24	N.S.
10-20 mg/kg	18	1.59±0.21	1.60±0.23	N.S.
100	4	1.54±0.04	1.51±0.06	N.S.

非動化ウサギ．N：実験例数．Before：適用前の周期の平均値と標準偏差，After：L体静脈内適用後10～15分後における周期．N.S.: not significant.

ii）非動化ウサギにおける作用

L体 1 mg/kg 適用例では，放電群周期，総

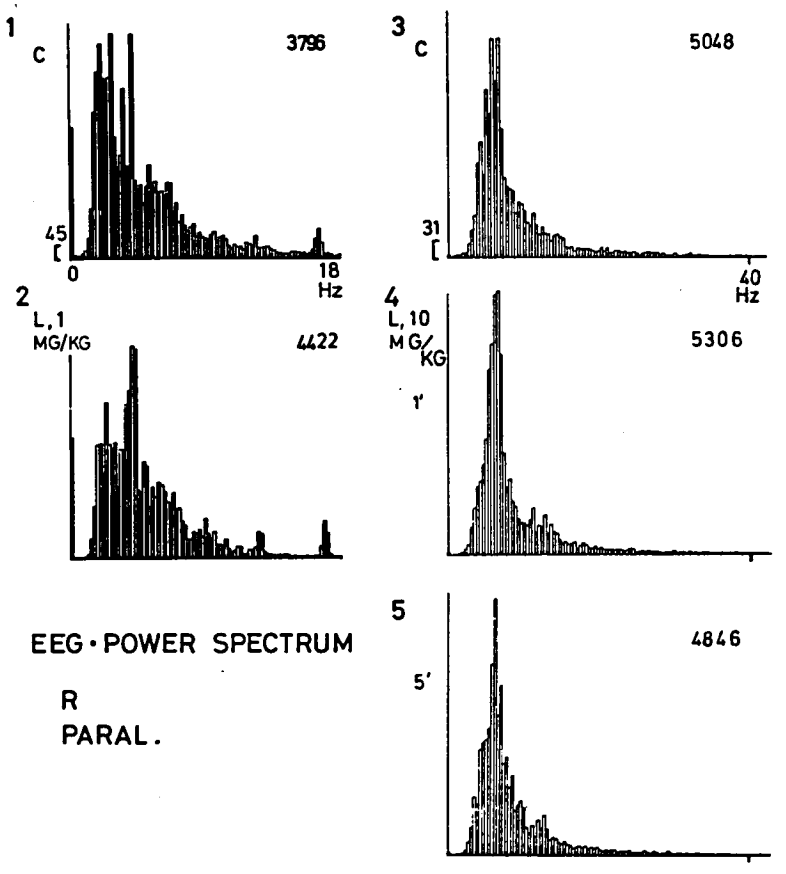


図15 E-64（L体）の EEG に及ぼす影響
非動化ウサギ．電算機演算により得た EEG のパワースペクトル．縦軸：パワー値，横軸：周波数．1，3：L体適用前，2：1 mg/kg 静脈内適用後1分，4：10 mg/kg 適用後1分．5：10 mg/kg 適用後5分．1と2及び3と4または3と5の総パワー値の差はいずれも有意ではない．

活動量に変化が認められない。10～100 mg/kg 適用により静注直後から5～6分間にわたって多くの例で，適用直後に神経発射活動の増加と放電群周期の短縮が起った（図2，B，3；図8，B，C，3）が，以後，有意の変化は認められなかった（図14）。表6に L体適用前後の放電群周期を比較して示した。

(2)DL体の影響

i）麻酔イヌにおける作用

呼吸流速に及ぼす影響を検討した。5～40 mg/kg 適用により有意の変化は認められなかった（図11，B，C，5）。

ii）非動化ネコにおける作用

両側で迷走神経及び頸動脈洞神経を切断した非動化ネコの横隔神経活動は DL 体 6.2～10 mg/kg（総適用量 10～18.5 mg/kg）によって有意の変化を示さなかった。

表7 E-64（L体）の呼気ガス O_2 濃度（F_{EO_2}），CO_2 濃度（F_{ECO_2}）及び動脈血 O_2 分圧（Pa_{O_2}）に及ぼす影響

	N	Before	After	
F_{EO_2}（%）	11	17.1±0.9	17.2±1.1	N.S.
E_{ECO_2}(%)	11	3.42±0.59	3.19±0.80	N.S.
Pa_{O_2}	18	1.00	1.018±0.076	N.S.

非動化ウサギ．N：実験例数．Before：適用前の平均値と標準偏差，After：L体 1～100 mg/kg 静脈内適用後10分．N.S.: not significant.

iii) 非動化ウサギにおける作用

両側迷走神経切断後において，5～100 mg/kg（適用総量 95～110 mg/kg）適用前後の横隔神経活動の放電群周期及び総活動量に有意の差は認められなかった。

（Ⅳ） 呼吸，循環の化学的調節因子に及ぼす影響

i）L体の作用

頸部で両側の迷走，減圧及び交感神経を切断した Pentobarbital 麻酔ウサギ，及び非動化ウサギにおける F_{EO_2}，F_{ECO_2}，Pa_{O_2} は，それぞれ 20～100 mg/kg（適用総量 120 mg/kg）及び 1～100 mg/kg（適用総量 15～350 mg/kg）適用によって有意の変化を示さなかった（表7；図2，B，4，5；図8，A，B，C，4，5）。

ii）DL 体の作用

Pentobarbital 麻酔下のイヌ（図11，B，C，3，4），非動化ネコ（迷走，頸動脈洞神経切断）の F_{EO_2} 及び F_{ECO_2} はそれぞれ DL 体 5～40 mg/kg（適用総量 65～75 mg/kg），6.2～10 mg/kg），6.2～10 mg/kg（適用総量 10～18.5 mg/kg）によって有意の変化を示さなかった。また，両側迷走，減圧，交感神経を切断した非動化ウサギの F_{EO_2}，F_{ECO_2}（図2，B，4，5；図8，4，5），Pa_{O_2}（図2，6）にも DL 体5～100 mg/kg（適用総量 75～200 mg/kg）適用により有意の変化が認められなかった。

（Ⅴ） 脳波（EEG）に及ぼす影響

i）L体の作用

Pentobarbital 麻酔ウサギ及び非動化ウサギ（両側迷走神経切断）の頭皮上EEGに及ぼす影響を電算機を用いるパワースペクトル分析によって検討した。麻酔ウサギの EEG はL体 20～100 mg/kg 適用により著明な変化を示さなかった（図1，右側，3）。L体 1～100 mg/kg を適用した24例の中，4例（10 mg/kg，100 mg/kg 適用例それぞれ2例）において適用直後から2～6分間にわたって速波化し，総パワー値の著減（対照値の 40% 減少）（図8，A，B，2），2例では同期化パターン（図8，C，2）が一過性に出現したがそれ以後，有意の変化は認められなかった。適用直後の変化は 1 mg/kg あるいは 100 mg/kg 適用時に比べて 10 mg/kg 適用時に最も著しく，かつ持続も長かった。図15にL体1及び 10 mg/kg 適用前後における非動化ウサギ EEG のパワースペクトルを示した。

ii）DL 体の作用

DL 体 5～100 mg/kg 適用によって非動化ウサギ（両側迷走神経切断）の頭皮上 EEG に有意の変化は認められなかった。また，非動化ネコ（両側の迷走，頸動脈洞神経切断）の体性運動野及び体性感覚野の皮質脳波は DL 体 6.2～10 mg/kg（適用総量 10～18.5 mg/kg）適用によって認めるべき変化を示さなかった。図12に 8.5 mg/kg 適用時の EEG パターン（同図，4）を示した。

考　　察

今年度は，イヌ・ネコ・ウサギの三種動物を用いて，急性実験条件において E-64 のL体及び DL 体の一般薬理作用のうち，とくに呼吸機能，循環機能，呼吸，循環調節の化学的因子及び中枢神経の電気的活動に及ぼす影響について検討した。

急性実験は麻酔下で行われることが多い。この場合，麻酔薬の種類と麻酔の深さは呼吸系，循環系，中枢神経系の機能を著しく変化させる[3),4)]。本研究では，この問題を考慮して pentobarbital 麻酔及び非動化の両条件下にある動物において化合体の作用を検討した。また，一般に動物種によって上記の三機能系の物に対する反応が異なる場合も予想される。この見地から，研究ではイヌ・ネコ・ウサギの三種について比較検討を行った。

ウサギでのL体の2～3時間内における累積適用総量の最大値は 350 mg/kg（静脈内），DL 体のそれは，ウサギで 110 mg/kg，イヌで 75 mg/kg，ネコで 18.5 mg/kg であったが，いずれの場合も致死効果は発現しなかった。マウス，ラットにおける 50%致死量の推定値は 1 g（腹腔内）以上といわれている[5)]。

麻酔下及び非動化条件の三種動物のいずれにおいても，呼吸，循環機能の化学的調節因子，呼気ガス O_2，CO_2 濃度及び動脈血 O_2 分圧には，

L体，DL 体の適用後，有意の変化が認められなかった。

麻酔及び非動化条件下三種動物のいずれにおいても，頭皮上及び新皮質 EEG にも適用直後の一過性の変化以外に変化が認められないこと，また呼吸中枢の活動状態の直接的指標である横隔神経活動電位，血管運動の中枢神経機構の活動を示す交感神経活動に対しても適用直後に発現する軽度の変化以外には認むべき変化が発現しなかった。これらの生体諸電気活動への E-64 L 体，DL 体の影響の有無は通常の視察法による評価のみならず，電子計算機を用いるデータ解析に基づいて判定された。

麻酔及び非動化条件下のウサギ，ネコ，イヌにおいて，化合体適用後10～15分以内に以下に述べる循環機能のパラメーターの種々の変化が発現したが，それ以後有意の変化は認められなかった。

ウサギ・イヌ・ネコにおいて，L体適用による動脈血圧の上昇及び下降は，直後から発現し，圧受容器から中枢への反射性入力が著しい影響を及ぼさなくなると考えられる時期（適用後10～15分後）迄持続した。血圧下降相に不整脈または徐脈の発現を伴わない例があった。この事実及び動脈血 PO_2，呼気ガス O_2，CO_2 濃度に殆ど変化が認められていないという成績は，今後L体適用による血圧変化の機序を解析していく場合の重要な基礎的知見となる。この少数の例においてのみではあるが，脈波波型の変化を伴うことなく徐脈が発現することが確められた。また，迷走及び頸動脈洞神経切断後のネコにおいて DL 体適用により血圧上昇が認められたが，非動化のウサギでは血圧の軽度の下降が認められた。これには麻酔による適用前の血圧レベルの低下が関係していると考えられる。

DL 体と L体の作用を非動化ウサギにおける作用について比較すると，DL 体適用による血圧上昇例がなかったこと及び徐脈の発現が認められなかった点でL体の場合と異なっていた。麻酔下及び血圧の対照値の低い実験例では，両化合体によって軽度の血圧下降がおこる点では共通していたが，下降の程度はL体の方が大であった。

L体による血圧上昇，L及び DL 体による血圧下降の薬理学的性格は，今後の検討に待たねばならない。現在，予備実験においてL体による昇圧がアドレナリン作動性効果遮断薬（α 型）前処置により降圧に反転することが観察され，さらに詳細な検討を加えつつある。

ウサギでの血圧上昇または下降及び徐脈の程度について見ると，L体の 1 mg/kg と 10 mg/kg の効果との間には用量依存性が認められるが，100 mg/kg の効果は 10 mg/kg のそれより軽度であった。この理由を明らかにするためには，L体の生体内運命，薬動力学的知見との関連を考慮しつつ今後の検討が必要である。

要　　約

ウサギ・ネコ・イヌを用い，麻酔下及び非動化の急性実験条件のもとに E-64 L 体及び DL 体の呼吸，循環機能及び中枢神経系に及ぼす影響を検討した。

L体の静脈内適用量はウサギにおいて，1～100 mg/kg，DL 体のそれはウサギで 5～100 mg/kg，ネコでは 6.2～10 mg/kg，イヌで 5～40 mg/kg であった。

1）両化合体適用により呼吸，循環機能の化学的調節因子，呼気ガス O_2 濃度，CO_2 濃度及び動脈血酸素分圧には変化が認められなかった。

2）ウサギ・ネコの横隔神経遠心性活動電位は化合体適用直後一過性の活動増加を示したが，以後，有意の変化を示さず，イヌの呼吸流速にも変化が認められなかった。

3）両化合体は，ウサギ・ネコの脳波に影響を及ぼさなかった。

4）L体適用によりウサギの動脈圧は実験例により軽度の上昇，無変化，軽度の下降の三様の変化を示し，それぞれの群の対照時の平均血圧は，121±9，103±11，70±19 mmHg であった。両側迷走交感神経幹，頸動脈神経を切断したネコの動脈圧は DL 体適用により軽度の上昇を示した。

5）少数例のウサギにおいてL体，DL体適用後10～20分間にわたって，徐脈が発現したが，この時，脈波波形，心電図波形に変化は認められなかった。また，一部の側で不整脈が発現した。

文　献

1) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J. and Tanaka, I.: Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor, Agric. Biol. Chem., 42, 523-528, 1978.

2) Hanada, K., Tamai M., Ohmura, S., Sawada, J., Seki, T. and Tanaka, I.: Structure and synthesis of E-64, a new thiol protease inhibitor, Agric. Biol. Chem., 42, 529-536, 1978.

3) Hukuhara, T., Jr., Saji, Y., Kumadaki, N., Kojima, H., Tamaki, H., Takeda, R. and Sakai, F.: Die Lokalisation von atemsynchron entladenden Neuronen in der retikulären Formation des Hirmstammes der Katze unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path., 263, 462-484, 1969.

4) Uvnäs, B.: Central cardiovascular control, Hdb. Physiol. Sect. 1, Neurophygiol., Vol. II., Amer. Physiol. Soc., Wash D. C., 1131-1162, 1960.

5) 沢田，大関：私信.

Ⅳ In vitro の効果

11. 微生物が産生するプロテアーゼ阻害物質の成熟ネズミ肝初代培養細胞に対する影響 ……市原　明

12. 培養筋細胞に対する E-64 の作用 ……小沢鉄二郎

13. E-64 処理を施したニワトリ骨格筋培養細胞の電子顕微鏡観察……大槻　磐男

14. 筋ジストロフィー症における筋膜脂質に関する研究 ……宮武　正
～筋ジストロフィーチキンの筋ガングリオシドに及ぼす E-64 の効果について～

15. 筋蛋白質代謝回転 ……江橋　節郎

16. E-64 及び E-64 誘導体によるラット肝カテプシン B 及び L の阻止について (in vitro, in vivo) ……勝沼　信彦

17. カルシウムプロテアーゼと蛋白質燐酸化反応による生理機能の調節に関する研究 ……西塚　泰美

18. Ca 依存性中性プロテアーゼ (CANP) に対する E-64 の効果……今堀　和友

19. Ca 依存性プロテアーゼの活性測定法の問題点……杉田　秀夫

11. 微生物が産生するプロテアーゼ阻害物質の成熟ネズミ肝初代培養細胞に対する影響

市原　明*

研究協力者　田中啓二*　生垣尚彦*

はじめに

細胞内蛋白質量はその合成速度と分解速度の釣り合いによって変動するが，そのメカニズム，特に分解機構については不明な点が多い。しかしながらライソゾームが発見されて以来，この細胞内顆粒の蛋白質分解に対する役割が注目されいる。そこで著者らは微生物が産生するプロテアーゼ阻害剤を利用して肝臓のライソゾーム，プロテアーゼの役割について初代培養肝細胞を用い検討したところ，カテプシンの生理的意義の他，種々の特異的現象を見い出したので報告する。

尚，成熟ネズミ肝初代培養系は種々の肝機能を維持しており，その具体的な方法及び蛋白質代謝を中心とした細胞機能についてはすでに発表し[1),2)]，また総説[3)]でも述べたので省略する。

材料及び方法

肝実質細胞の分離と初代培養法

肝細胞はコラゲナーゼ灌流法により分離し，ファルコン組織培養用プレートを用い静置単層培養した。培養液としてウィリアムスE培地に10%牛血清，抗生物質，インスリン（10^{-7}M）及びデキサメサゾン（10^{-5}M）を添加したものを用いた。これらの詳細については既報[1),3)]の通りである。

* 徳島大学　医学部　附属酵素研究施設　酵素病理部門

酵素活性の測定

酵素標品は凍結融解後の細胞上清画分を用い，ヘモグロビン（Hb）及びα-N-ベンゾイル-DL-アルギニン-β-ナフチルアミド（BANA）水解活性はそれぞれ Anson[4)] 及び Barret[5)] の方法で測定した。

結果

細胞内蛋白質分解に対する酸性及びチオールプロテアーゼの役割

ライソゾーム中には二種のエンドペプチダーゼ，即ち酸性（カルボキシル）プロテアーゼとチオールプロテアーゼが存在していることが知られている。前者はカテプシンDと呼ばれているが，後者はカテプシンB，H，Lの3種の異ったプロテアーゼに細分されること[6)]が最近明らかになってきた。一方梅沢ら[7)]は酸性プロテアーゼの特異的阻害剤としてペプスタチンを，またチオールプロテアーゼの特異的阻害剤としてロイペプチンを微生物より分離・精製した。そこでこれらの阻害剤の両酵素活性に対する影響について検討した。酸性プロテアーゼはHb-水解活性として，またチオールプロテアーゼはBANA-水解活性として測定した。図1-Aに示すように，培養2日後の肝細胞にペプスタチンを添加するとBANA-水解活性に何ら影響することなく，Hb-水解活性を強く抑制した。ペプスタチンはジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し，DMSOの終濃度は1%にしたが，この濃度のDMSOは両酵素活性には全く影響

Ⅳ In vitro の効果

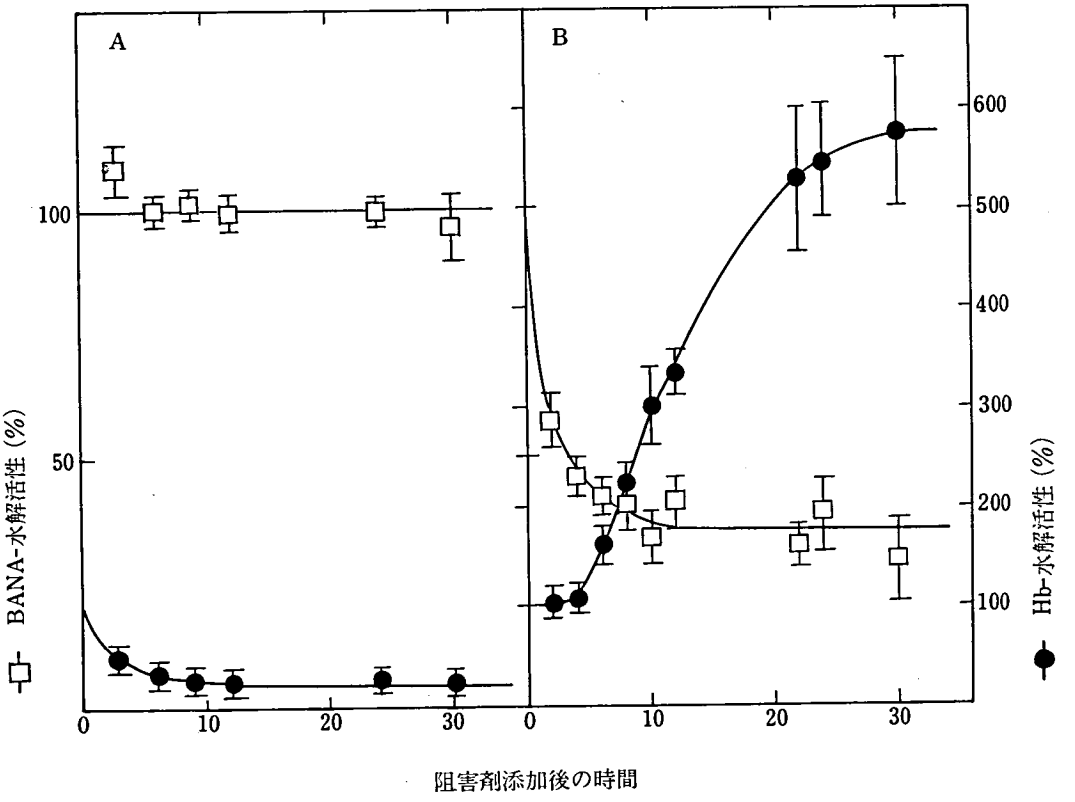


図1 BANA- 及び Hb-水解活性に対するペプスタチン及びロイペプチンの影響
2日間培養した肝細胞に A：ペプスタチン(50μg/ml) 及び B：ロイペプチン(50μg/ml) を添加した後，経時的にプロテアーゼ活性を測定した．活性は阻害剤未処理のものを対照とし，それに対する%で表示した．結果は平均値±標準偏差（3実験）である．

しなかった。同様に図1-Bはロイペプチンの影響について調べたものであるが，BANA-水解活性は添加後急速に阻害された。しかしながら予想に反して，Hb-水解活性は添加4～5時間経過後から急速にその活性が上昇し，24時間後では対照値の5～6倍の値を示した[8]。このHb-水解活性の増加については後述する。

次に両阻害剤の蛋白質代謝回転に対する影響について検討した[9]。両阻害剤は細胞内蛋白質の合成活性にもまた細胞外蛋白質の分泌活性にも全く影響しなかった。更に位相差顕微鏡による細胞形態にも特別の変化は認められず，細胞に対する毒性効果はほとんどないと考えられた。そこで蛋白質分解活性に対する結果について図2に示した。

蛋白質分解活性はハンクス液中へのニンヒドリン陽性アミノ酸の放出速度で測定した。この方法は比較的全体蛋白質の分解活性を観察していると思われるが，細胞内含量の少い蛋白質及び代謝回転速度の遅い蛋白質などは含まれていないかも知れない。さて，ペプスタチンは徐々に作用し，添加1日後で約15%の蛋白質分解の抑制が観察されたにすぎなかった。他方ロイペプチンは急激に作用し，添加15時間後最大に達し約60%の強い抑制が観察されたが，更に長期間作用させると，蛋白質分解抑制の部分的な回復が観察された。この結果は図1-Bで示したHb-水解活性の誘導との関連性が示唆される。またペプスタチン及びロイペプチンを同時添加すると，常に相加的な蛋白質分解の抑制が観察され，更にペプスタチンが存在してもロイペプチンの長期間処理による蛋白質分解抑制の回復は認められた。これはロイペプチンによって誘導されるHb-水解活性がペプスタチンによる

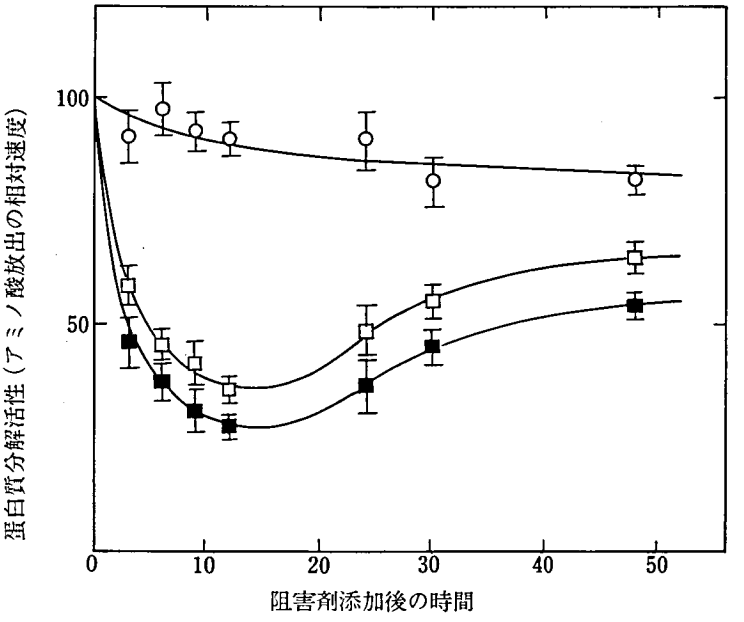


図2 蛋白質分解活性に対するペプスタチン及びロイペプチンの影響
○：ペプスタチン（100μg/ml），□：ロイペプチン（50μg/ml），
■：ペプスタチン＋ロイペプチン
蛋白質分解活性はハンクス液中へのニンヒドリン陽性アミノ酸の放出速度を測定し対照値の％で表示した．

阻害を受けないこと（後述）と一致すると思われる。

以上の結果をまとめると，細胞内の蛋白質分解に対しては特にチオールプロテアーゼの役割が重要であることが示唆されたが，同時に酸性プロテアーゼもチオールプロテアーゼとは異った役割を演じている可能性が示唆された。

酵素阻害物質による Hb-水解活性誘導の特性

ロイペプチンによる Hb-水解活性の上昇はシクロヘキシミド及びピューロマイシン等蛋白質合成阻害剤で完全に抑制されることから，この活性増加は新しい蛋白質合成を介した酵素誘導と考えられる。またこの現象は Hb-水解活性に特異的であり，酸性ホスファターゼ，チトクローム酸化酵素及び NADPH-チトクロームC還元酵素等他の顆粒画分の活性にはほとんど影響しなかった。更にこの誘導は樹立株細胞であるマウスL細胞では見出せなかった。現在，他の細胞株について検討中である。

次にロイペプチン以外の他の阻害剤について検索すると，3種の異った影響を示した。即ち図3-A のように，ロイペプチンの他にもアンチパインは BANA-水解活性を抑制し，逆相関的に Hb-水解活性を誘導させた。

またキモスタチンは BANA-水解活性に影響せずに Hb-水解活性を誘導させた。尚キモスタチンの場合は図3-B のように添加24時間後では誘導効果が弱いが，更に10時間位経過すると5～6倍の値に達し，ロイペプチンと同程度の効果を示した。他方図3-C に示すようにエラスチナール及び E-64 は BANA-水解活性を強く阻害したが，Hb-水解活性には全く影響しなかった。この結果は Hb-水解活性の誘導に対して BANA-水解活性の抑制が必須な要因ではないことを示唆している。しかしながらこの酵素誘導を発現させる阻害剤の構造上の類似性については明確でなく，現在その機構について解析中である。

ロイペプチンによって誘導された Hb-水解酵素の性質

ロイペプチンによって誘導された Hb-水解酵素は量的に乏しい為，精製が困難であるが現

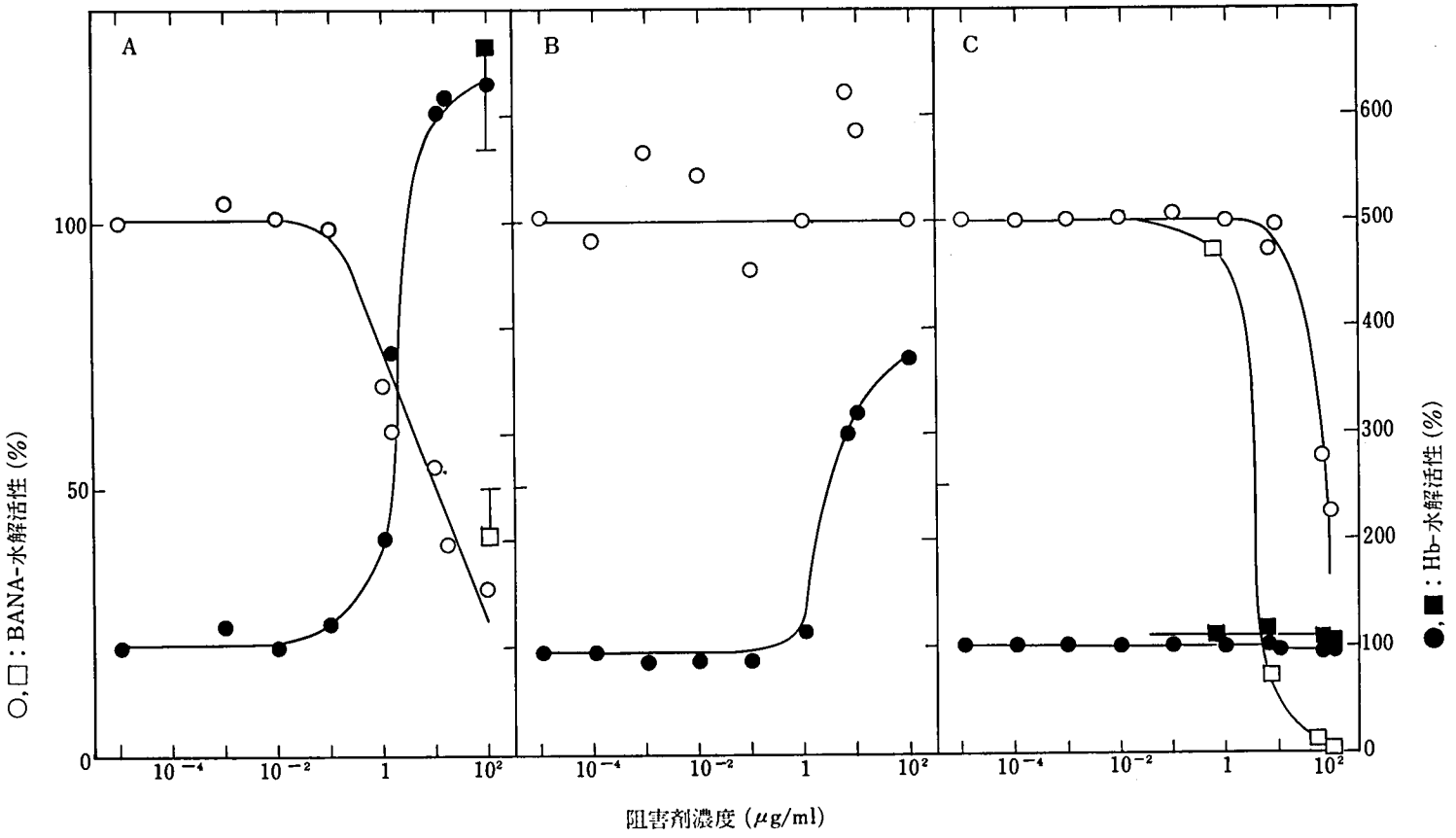


図3　BANA- 及び Hb-水解活性に対するプロテアーゼ阻害剤の影響
阻害剤を種々の濃度で添加し，更に24時間培養後のプロテアーゼ活性を測定した．
A：ロイペプチン（○●），アンチパイン（□■）
B：キモスタチン
C：エラスチナール（○●），E-64（□■）

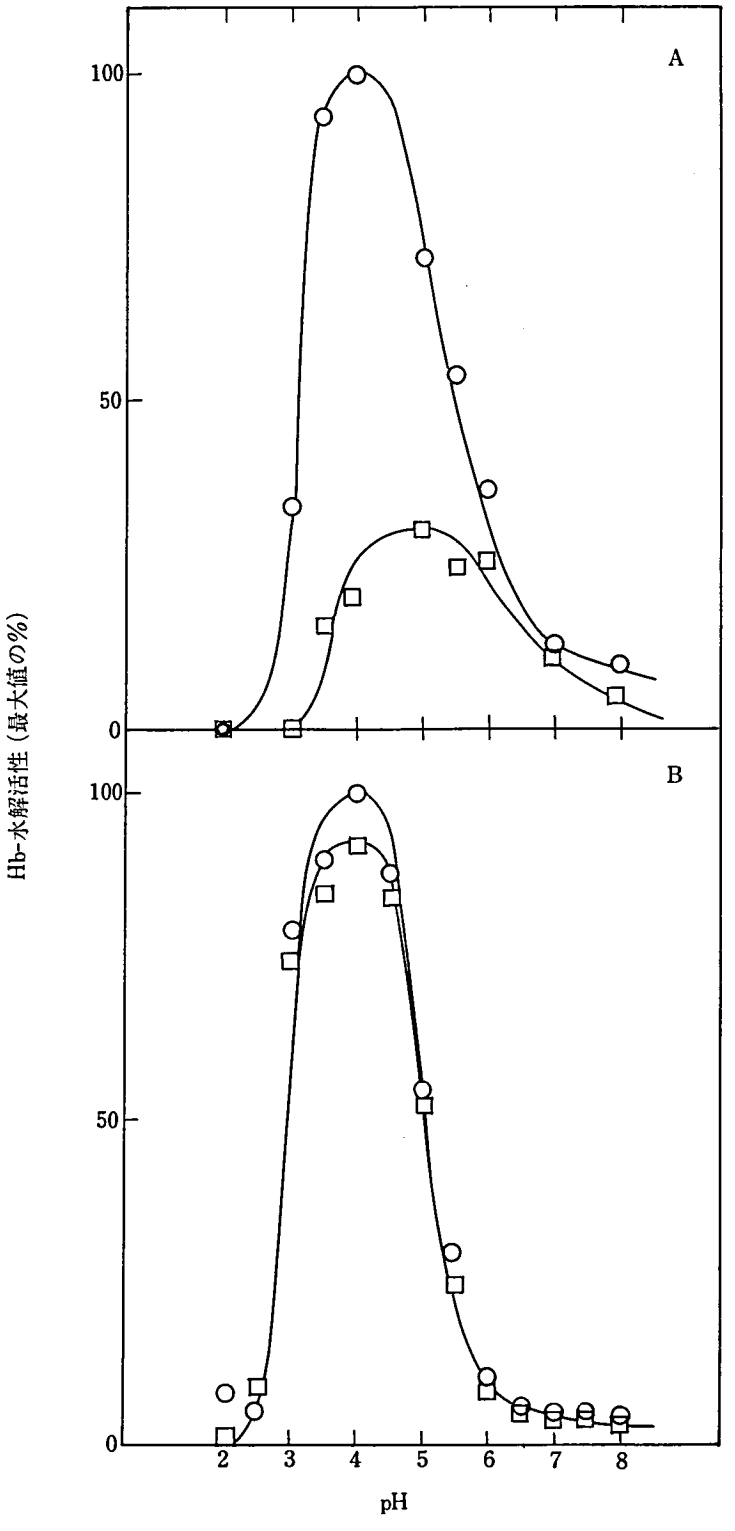


図4 Hb-水解酵素の pH 活性曲線
A：対照細胞標品，
B：ロイペプチン処理細胞標品
-○- 全酵素活性，
-□- ペプスタチン（10 μg/ml）存在下での活性
pH 2.0～3.0ではグリシン塩酸緩衝液を，pH 3.5～5.5では酢酸ナトリウム緩衝液を，pH 6.0～8.0 ではリン酸カリウム緩衝液を用いた。いずれも終濃度 0.125M である。

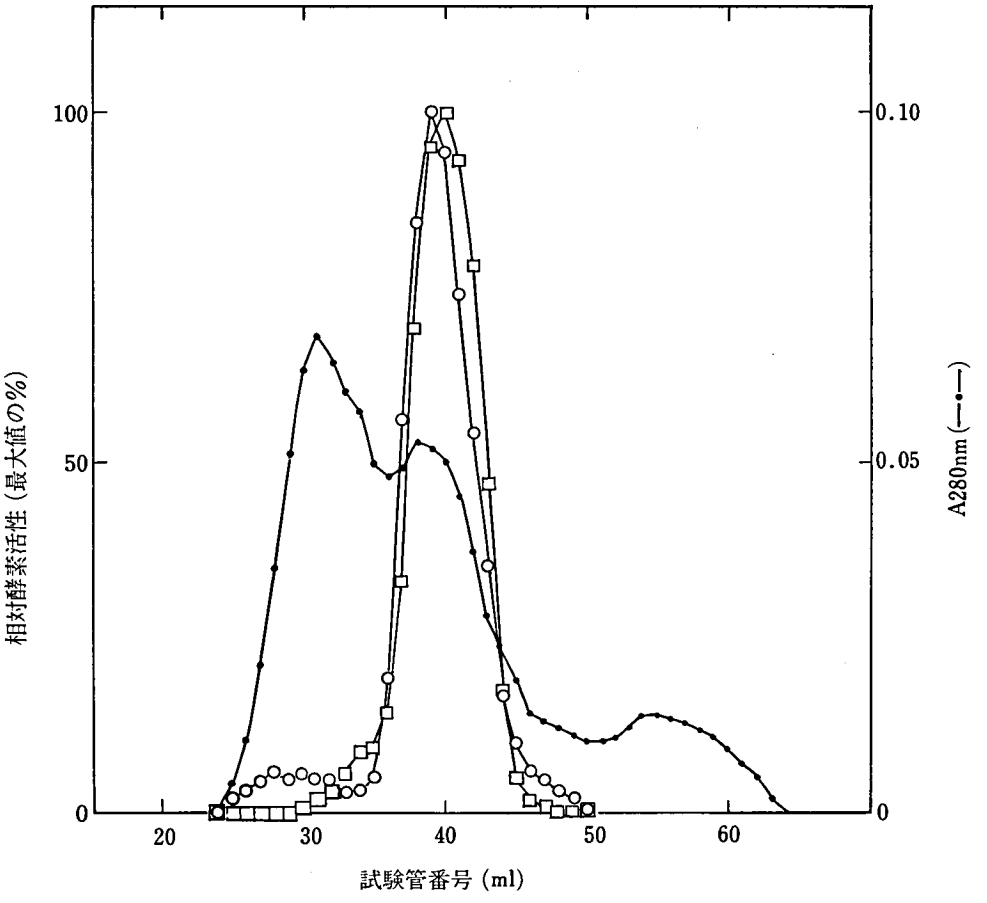


図5 Hb-水解酵素のセファデックス G-75 によるゲルクロマトグラフィー
-○- BANA-水解活性，-□- Hb-水解活性
カラム（1.6×20 cm），50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.0，100 mM NaCl，試料はロイペプチンによる Hb-水解酵素の誘導比が 6.2 のものについて分析した．

在までに得られた結果を整理すると，まず，至適 pH は図4-B に示すように 3～5 の酸性領域にありカテプシンDと類似している。しかしながら，ロイペプチン未処理細胞の Hb-水解活性はそのほとんどがペプスタチンによって阻害されるカテプシンD である（図4-A）のに反して，誘導酵素はペプスタチンによる阻害を全く受けなかった。尚図4-A のペプスタチン存在下で見られる Hb-水解活性はカテプシンLを中心としたチオールプロテアーゼの作用と思われる。次にセファデックス G-75 によるゲル・クロマトグラフィーを行うと，図5に見られるように，本酵素活性は BANA-水解活性に少し遅れて溶出され，分子量は約25,000と推定された。また等電点分画法によってこの酵素の等電点を調べると 5.6 であった。次にこの酵素の pH 安定性（図6）を調べると，中性及び弱アルカリ性領域でもかなり安定であり，酸性領域でのみ安定な BANA-水解活性とは明らかな相違が認められた。更にペプスタチン以外のプロテアーゼ阻害剤の影響を調べると，本酵素は PMSF, TPCK では阻害されず，高濃度の IAA, TLCK, PCMB で阻害された。また本酵素は驚くべきことに誘導物質であるロイペプ

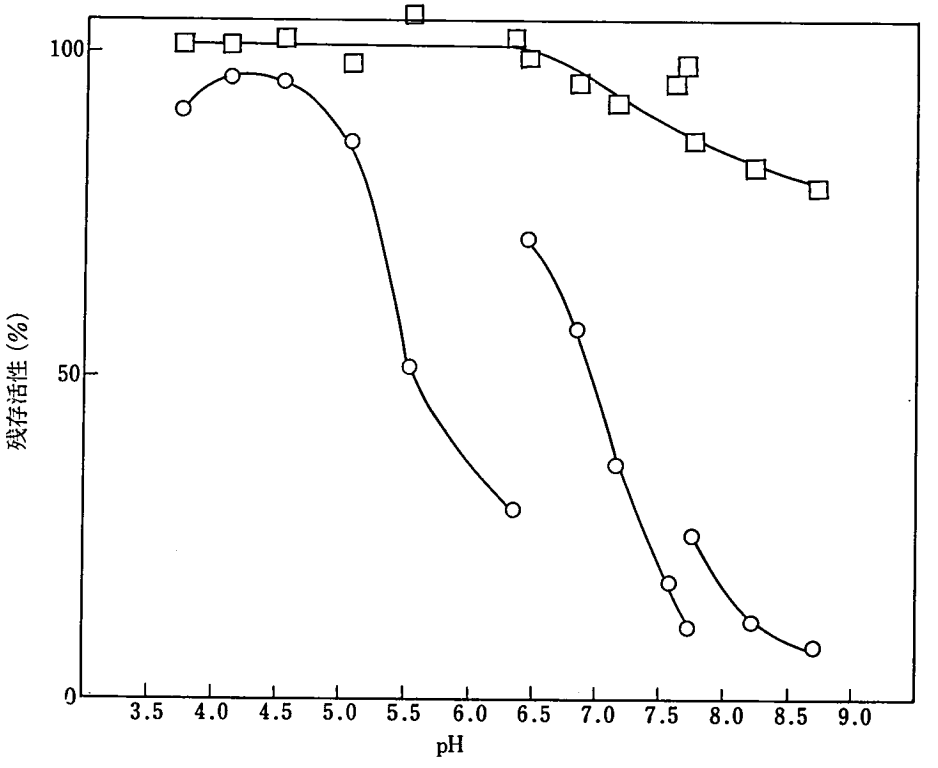


図6 BANA- 及び Hb-水解酵素の pH 安定性曲線
-○- BANA-水解活性, -□- Hb-水解活性
pH 3.76～6.35 までは酢酸ナトリウム緩衝液を, pH 6.46～7.72 まではリン酸カリウム緩衝液を, pH 7.74～8.68 まではトリス塩酸緩衝液を用いた. いずれも各 pH, 37° で1時間保温した後, 酵素活性を測定してその残存活性を%で表示した.
Hb-水解酵素はロイペプチン処理後の試料を, また BANA-水解酵素は未処理の試料を使用した.

チン, アンチパイン及びキモスタチンにより著明な阻害を受けると共に E-64 によっても阻害されるが, エラスチナールでは阻害されない。これらの結果は本酵素がチオールプロテアーゼに属する可能性を示唆するものと考えられるが, チオール基が活性発現に必須か否かは不明である。尚, 本酵素はコンカナバリンA-セファローズに吸着するので糖鎖を有した糖蛋白質であると推定された。

以上の結果は, 細胞の粗抽出画分で検討した不十分な成績であるので, 現在この Hb-水解酵素の精製を進めておりまたその詳しい性質についても解析中である。

考 察

ライソゾーム・プロテアーゼの機能について

Dean[10]は肝灌流実験において, ペプスタチンを処理すると肝蛋白質の分解が抑制されることから細胞内の蛋白質分解にライソゾームが直接関与している可能性を示唆したが, その後 Seglen ら[11]及び Neff ら[12]は分離肝細胞系及びその初代培養系においてロイペプチンにより蛋白質の分解が抑制されることを報告した。

また Ward ら[13]は肝灌流実験においてペプスタチンとロイペプチンが相加的に蛋白質分解を抑制することを見出したが, この結果は我々の成績[9]と一致した。また木南ら[14]はラットにロ

イペプチンあるいはE-64を処置すると肝のアルドラーゼの分解が停止することを示した。しかしこれらの阻害剤の成績から蛋白質分解機序におけるライソゾームの関与を直接的に結論するのは困難である。と言うのは細胞内にはライソゾーム以外にも種々のプロテアーゼが存在しているからである。たとえば細胞質には Ca^{++} 依存性のプロテアーゼ[15]やATPによって活性化される高分子量プロテアーゼ[16]などが存在しこれらはチオールプロテアーゼであるのでロイペプチンなどを処置した場合，これらも阻害されている可能性も考えられる。しかしながら細胞質にはチオールプロテアーゼの天然阻害剤が存在すること[17]やロイペプチンは細胞質を経由しないで直接ライソゾームにエンドサイトーシスされる可能性もありまた酸性プロテアーゼはその至適pHからライソゾームに局在して作用していると考えられることなどから，現在，このような阻害剤の影響は主にライソゾームを介した結果と結論されている。

Hb-水解酵素の誘導について

ロイペプチンによって誘導されるHb-水解酵素の細胞内局在性については細胞分画が困難である為，正確には解からないが，至適pHが酸性であることや糖蛋白質らしいことからライソゾームの可能性が強いと思われる。しかしながら，ロイペプチン処理によってBANA-水解酵素が阻害されているにも拘らず，本酵素活性は抑制されていないので，ロイペプチンが直接ライソゾーム内に蓄積し，誘導される酵素がライソゾーム外に存在するとすれば説明可能であるが，まだ推量の域を出ていない。しかし，もしライソゾーム内酵素であったにしても酸性ホスファターゼ活性に変化がないので，ライソゾームそのものの量的増加とは考えられない。

他方，誘導されたHb-水解酵素は至適pHが酸性領域にあることから，最初はカテプシンDと思われたが，ペプスタチンによる阻害を受けないことや分子量が25,000位であることから寧ろチオールプロテアーゼに近似していると考えられた。しかしながら中性及び弱アルカリ性においてもかなり安定なことからカテプシンB，L，Hとは異なる酵素であるとも思われる。等電点が5.6であることやHbをよく分解することから本酵素がカテプシンB及びHではなく，カテプシンLが何らかの修飾を受けた可能性も否定出来ないが，その場合，特に安定性の増大，ロイペプチンへの感受性の低下，あるいは蛋白質合成の必要性などを合理的に説明することは難しい。

何れにしてもこのHb-水解酵素とライソゾーム・プロテアーゼとの異同については明確にする必要があると思われる。またこのような現象の生理的意義及びその普偏性についても今後の問題であるように思われる。

文　献

1) Tanaka, K., Sato, M., Tomita, Y. & Ichihara, A.: J. Biochem., 84, 937, 1978.
2) Tanaka, K., Kishi, K. & Ichihara, A.: J. Biochem., 86, 863, 1979.
3) 田中啓二，市原　明：蛋白質　核酸　酵素, 23, 1259, 1978.
4) Anson, M. L.: J. Gen. Physiol., 22, 79, 1938.
5) Barret, A. L.: Anal. Biochem., 47, 280, 1972.
6) Kirschke, H., Langer, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., Bohley, P. & Broghammer, U.: Acta. Biol. Med. Germ., 35, 285, 1976.
7) 青柳高明：酵素阻害物質，共立出版，1978.
8) Tanaka, K., Ikegaki, N. & Ichihara, A.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 91, 102, 1979.
9) Tanaka, K., Ikegaki, N. & Ichihara. A.: 投稿中.
10) Dean, R. T.: Nature, 257, 414, 1975.
11) Seglen, P. O., Grinde, B. & Solheim, A. E.: Eur. J. Biochem., 95, 215, 1979.
12) Neff, N. T., DeMartino, G. M. & Goldberg, A. L.: J. Cell. Physiol., 101, 439, 1979.
13) Ward, W. F., Chua, B. L., Li, J. B., Morgan, H. E. & Mortimore, G. E.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 87, 92, 1979.
14) Kominami, E., Hashida, S. & Katunuma, N.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 93, 713, 1980.
15) 今掘和友：代謝，16, 139, 1979.
16) DeMartino, G. N. & Goldberg, A. L.: J. Biol Chem., 254, 3712, 1979.
17) Lenney, J. F., Tolan, J. R., Sugai, W. J. & Lee, A. G.: Eur. J. Biochem., 101, 153, 1979.

12. 培養筋細胞に対するE-64の作用

小 沢 鉄二郎*

研究協力者 木 村 一 郎* 萩 原 康 子*
三 浦 力*

表題のような研究のために，培養筋細胞すなわち in vitro で発生分化を行っている細胞に対して適当な時期に E-64 を作用させそれが数日後に細胞に及ぼしている影響を調べた。マーカーとして用いたものは光学顕微鏡及び電子顕微鏡による形態変化像と，培養細胞中に含まれるクレアチンキナーゼ活性の蓄積とである。このうち電子顕微鏡による観察は，九州大学医学部薬理学教室大槻磐男に委託して行ったのでこの報文の追補として大槻による報文を附ける。この報文では主としてクレアチンキナーゼ活性の蓄積による結果について述べるが，E-64 を筋管細胞が形成されてから与えるとクレアチンキナーゼ活性の蓄積を促進する効果があるが，結果にはバラツキがあり更に今後の検討を要する。

材料と方法

正常ニワトリ受精卵を孵卵し，10日から12日胚の胸筋を切り出し，コラゲナーゼで処理して単細胞を集めて使用した。Eagle の Minimum Essential Medium 85%，馬血清 15% の混合液中に，2%以下のニワトリ血清を加えた液中で一晩培養した後，細胞を0.05%トリプシン溶液にて培養皿から剝離して集めた。この細胞を20分自至40分培養し，その時点でもまだ培養液中に浮游している細胞を集めて実験に用いた。

実験用の培養皿（Falcon 35 mm プラスチックペトリ皿）に 3～5×10^5 cells/dish 播き上記培養液 2.5 ml と共に CO_2 インキュベーター中で培養した。

ラセミ体又はL体の E-64 を生理的食塩水に溶かし，培養の始めからあるいは途中から培養液中に加えた。適当時間培養後細胞を光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡で観察した。また培養皿に附着した細胞を 155 mM NaCl・1 mM $CaCl_2$ 溶液で洗った後に，蒸留水中で剝離して集めた。細胞内に含まれるクレアチンキナーゼの活性を Noda らの方法の変法で測定した。なお E-64 はクレアチンキナーゼの測定に影響を与えなかった。

結 果

単一細胞を上記培養液中で培養すると，初めは培養皿に定着し，筋芽細胞や線維芽細胞などに分化して特有の形をとってくる。すなわち筋芽細胞は紡錘形であり，線維芽細胞は平に展びた多角形をとる。2～3日培養すると融合して筋管細胞となる。この時期以降，クレアチンキナーゼ活性の蓄積が起ることが知られている。さらに成長すると横紋がみられるようになる。

以上のような成長の時期に，E-64 を与えてクレアチンキナーゼ活性の蓄積に及ぼす影響を観察した。図1の横軸は細胞が E-64 と接触していた日数を示している。すなわち細胞を播いた翌日に E-64 を与えたものは横軸で7日になっている。0日は全期間中 E-64 を与えなかったものを示す。細胞を集めた日は（すなわち培養の全日数は）すべての細胞で同じである。0日をコントロールとして比較すると，融合が起

* 国立武蔵療養所神経センター機能研究部

Ⅳ In vitro の効果

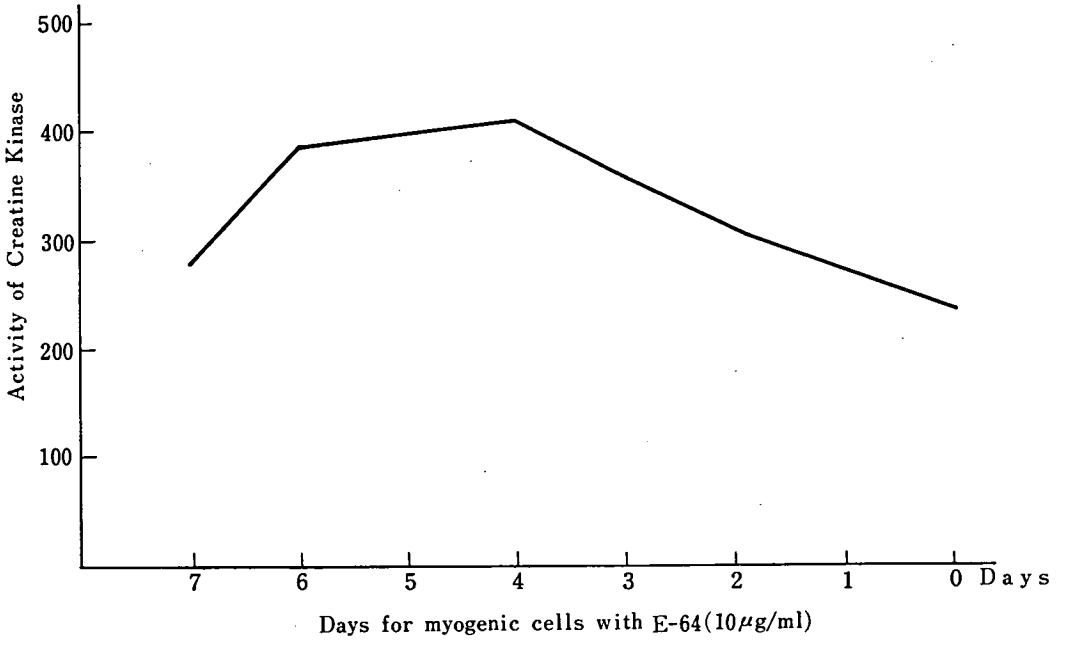


図1

ってからの時期に E-64 を与え長い時間培養したものでは，活性値は高かった。しかしその後 E-64 の作用時間の短いものでは高さの程度は下ってくる。問題なのは培養の初期に E-64 を加えた場合で，図1ではコントロール値よりも高いが，他の実験ではコントロール値よりもずっと低い値を示した。

培養の初期に起ることは，細胞が培養皿へ定着すること，分裂すること及び融合することなどである。E-64 が細胞の定着に対して及ぼす影響について調べた（表1）。定着は E-64 10 μg/ml を与えても与えなくても殆んど変りはなくｔ検定でも両者に差はなかった。

細胞を播いてから1～2日は分裂期である。一方，図1でみるように細胞が定着した後に E-64 を与えたものでは活性は下るので分裂に対して抑制的に働いている可能性は否定できない。光学顕微鏡的には筋芽細胞が典型的な紡錘型をとらず，変形がはなはだしいので定量的な検討は行わなかった。しかし電子顕微鏡の観察では単核細胞に空胞がみられるという大槻の観察はこの点と関連して考えると重要であると思われる。

表1　筋原細胞定着に及ぼす E-64 の影響

Control	E-64 (10 μg/ml)
3936	3983
4153	3264
4024	3393
3788	3966
2877	3486
3580	3482
3726	3596

t=0.58

Plating の効果は細胞を播いてから15時間後に測定した.

図2は，図1で E-64 の効果のみられた日，すなわち筋管細胞が形成されてからの時期に E-64 を与え，それ以後日を追って培養細胞を集め，クレアチンキナーゼ活性の増加を観察したものである。破線は E-64 を入れないコントロールで，活性の自然の増加である。細胞融合が起ってしばらくの間は活性の増加はあまり多くないが，その後筋管細胞の発達とともに活性は増加し，活性の蓄積は，培養日数に対してＳ字曲線を示した。E-64 を入れると定性的には

12. 培養筋細胞に対する E-64 の作用

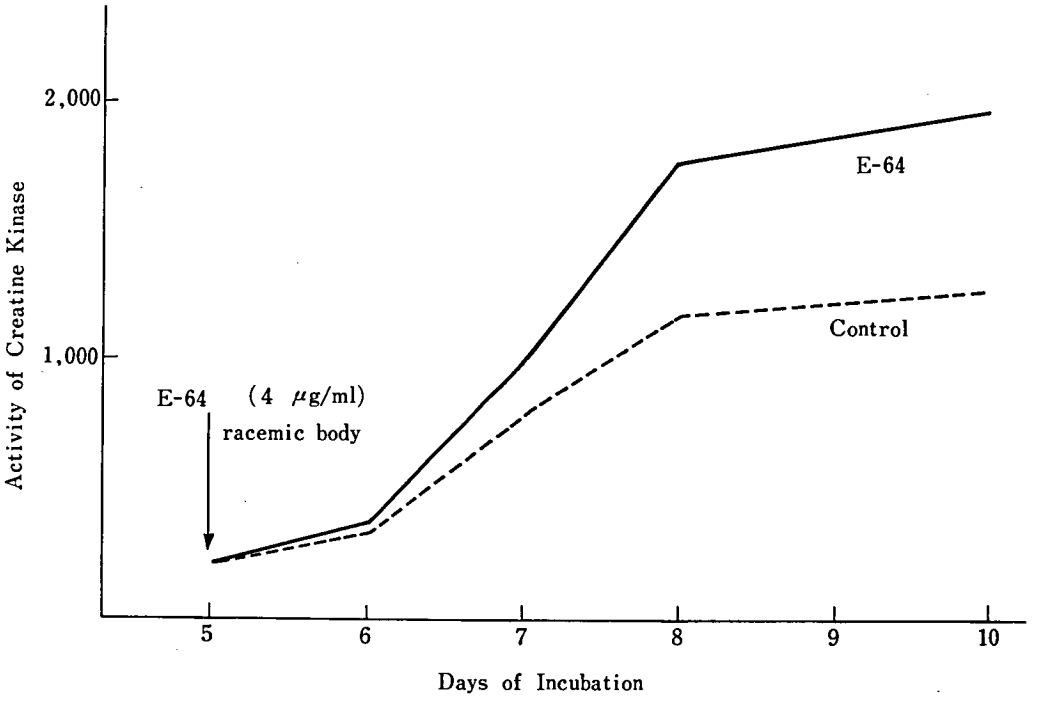


図2

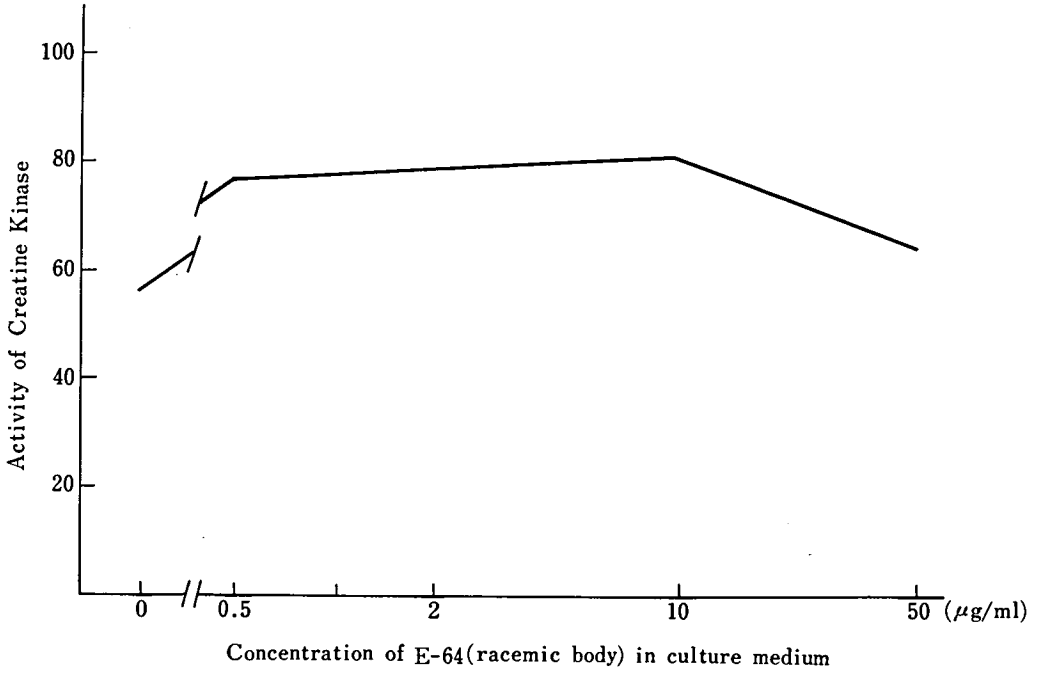


図3

コントロールと変らない経過をたどるが，活性蓄積の速度が促進されただけではなく，プラトーの水準も高くなった。

これまで述べてきた実験は，E-64 を 4～10 μg/ml というかなり高い濃度を用いたものであった。次の実験では，一度筋管細胞が形成されてから後に種々の濃度の E-64 を加えて一定時間培養した後に細胞を集めクレアチンキナーゼ活性の蓄積の状態をみたものである。図3に示すように 0.5 μg/ml でもかなりの効果がみられた。図には示していないが，0.3 μg/ml でも有効であるという結果も得られている。逆に濃度を上げてゆくと活性は下るが，光学顕微鏡では，50～70 μg/ml 以上で筋管細胞が破壊される像が観察された。

考　　察

この研究は，E-64 の bath application を行って，筋原細胞への作用を主としてクレアチンキナーゼ活性の蓄積をマーカーとして観察することによって行われたものである。従って初めにマーカーとしてのクレアチンキナーゼ活性蓄積の意味について述べたい。培養筋細胞を定量的に取扱う際に，いくつかの方法が考えられる。まず単核筋細胞の特性である分裂は，核の数を算えることによって推定することができる。しかし primary culture では線維芽細胞が必ず混入するために算える際に両者を形態的に識別しながら筋芽細胞のみを算えてゆくことになる。この方法の詳細については，我々は既に報告しているが，形態識別は常に容易であるとはいえず，さらに今回のように E-64 で細胞の形自体が変化してしまっている場合には殆んど用いられない。筋管細胞を取扱うにはその特徴であるミオシンなどのいわゆるぜいたくな蛋白の合成をマーカーにすることは可能であるが操作は必ずしも容易でない。

細胞が大きくなるから細胞の大きさ，あるいは細胞が占める面積はマーカーとしてはあまり信頼できない。それは細胞の厚さが細胞によって均一ではないからである。クレアチンキナーゼもぜいたくな蛋白であるので筋管細胞が形成された後に増加して来る。この際にクレアチンキナーゼ活性の殆んどのものが，単核細胞に由来するのではなく筋管細胞に由来することが示されている。また培養液から Ca イオンを除くと，筋管細胞が選択的に破壊されると共にクレアチンキナーゼ活性が低下することが示されている。これらの事実からはクレアチンキナーゼ活性が筋管細胞の“量”を示すマーカーとして考えることは自然であろう。その手技の容易なことも利点である。

さて上に述べた実験結果からは E-64 は少くともクレアチンキナーゼ活性の蓄積を促進するようにみえる。初めにも述べたようにこれらの結果には実験によりバラツキがみられるし，特にL体を用いた際には全く作用がでないことも経験しているので結論を下すためには慎重を要する。

12追補. E-64 処理を施したニワトリ骨格筋培養細胞の電子顕微鏡観察

小 沢 鉄二郎*
研究協力者 大 槻 磐 男**

方 法

ニワトリ胚胸筋からコラゲナーゼ処理によって単細胞化した標本を径 3.5 cm のプラスチックシャーレに 4×10^5 個の密度で播き4日間培養したのち，E-64 を加えて更に2日間培養した。この標本をグルタールアルデヒド及び四酸化オスミウム固定し，1%酢酸ウランでブロック染色，エタノール脱水を施してからエポキシ樹脂に包埋，加熱固化した。固化した標品の中央部分を切り出しジュラルミン台に固着し，丁度シャーレ底面に平行になるように超ミクロトームを用いて培養細胞の超薄切片を作製した。切片はカーボン蒸着したコロジオン膜上にすくい取り，Reynolds 法鉛染色を施して電子顕微鏡（日立-HS 8 型）下で観察した。

結果と考察

培養4日目の標本では，筋管細胞(myotube)は比較的径が細く内部に筋原線維が殆んど認められない未成熟なものが大部分を占めていた。単核細胞の空胞形成は殆んどみとめられなかった。

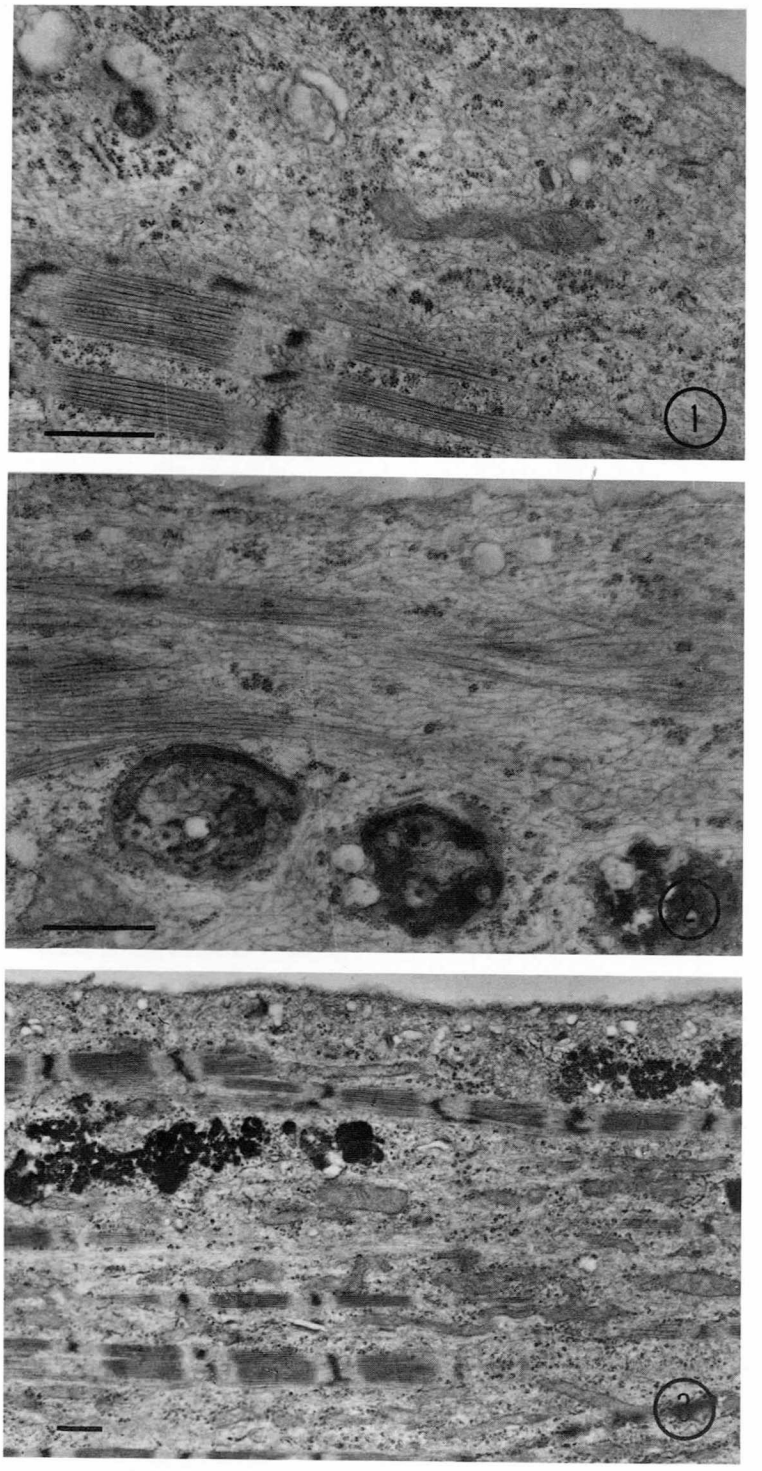
E-64 を添加しさらに2日間培養をつづけた標本で以下の様な所見が得られた。用いた E-64の濃度は，1 μg/ml，3 μg/ml，10 μg/ml であり，無添加標本（0 μg/ml）と計4種類である。無添加標本では筋管細胞の径が増加し，内部には筋原線維が明瞭に認めることができるようになり一部では明らかなZ帯とM線をもった筋原線維の成熟型が規則的に配列している例も観察することができた。単核細胞の空胞化は散見されるもののそれ程著明ではなかった。

E-64 を加えた例では，10 μg/ml の場合でも筋管細胞の発達は良好であり内部の筋原線維の分布，膜等の発達などの点で無処理標本（0 μg/ml）と有意の差を見出すことは出来なかった。ただ 0 μg/ml，10 μg/ml の両例で最も発達がよい細胞について比較を行なうと，10 μg/ml の方がむしろわずかに発達が遅れている印象をうけたが，この点に関しては今後詳細な形態学的な検討を行って裏付ける必要があるものと考えられる。E-64 1 μg/ml，3 μg/ml 処理例では 0 μg/ml と筋管細胞については全く差がみとめられなかった。単核細胞についてみると，E-64 の濃度が高い程空胞形成が著明になる傾向がみられた。

この他，筋管細胞内に，E-64 0 μg/ml 例でも少数ではあるが高密度の膜構造に覆われている封入体が観察された。E-64 1 μg/ml 処理例ではこの頻度は殆んど変化しなかった。E-64 3 μg/ml 処理によってわずかに頻度が増し内部に膜状物をとり込んだものもみとめられた。形状も大型なものが見出された。さらに E-64 10 μg/ml 処理を施した筋管細胞においてはこの高密度構造の数が著しく増加し，とくに細胞膜周辺の細胞表層部には大型の管状に全体としてみえる構造を形成していることが見られた。ミトコンドリア膜をとり込んだ例も観察された。

* 国立武蔵療養所神経センター機能研究部
** 九州大学医学部臨床薬理学教室

Ⅳ In vitro の効果



写真説明 E-64 処理培養筋管細胞の電子顕微鏡写真
1．無処理例　2．E-64 3 μg/ml　3．E-64 10 μg/ml
図中の横線は 1 μ の長さを示す．

単核細胞においても E-64 の濃度が増すに従って，このライソゾーム様構造の数と大きさが増すことが観察された。これらの所見は E-64 によって細胞内代謝が何らかの変化をうけることを示唆するものである。培養条件をさらに吟味することによってこの結論は明確になるものと思われる。なお上述のライソゾーム様構造が観察された筋管細胞において，他の一般的な特徴は正常例と何ら差異がみとめられなかった。

13. 筋ジストロフィー症における筋膜脂質に関する研究

～筋ジストロフィーチキンの筋ガングリオシドに及ぼすE-64の効果について～

宮武　正*,**

研究協力者　渥美哲至*　有賀敏夫**　中村京子**

はじめに

筋ジストロフィー症における筋線維崩壊の原因として膜異常の存在を示唆する数多くの研究がなされている[1]。ガングリオシドは膜の脂質二重層の外表面に存在する糖脂質であり，免疫学的抗原，コレラ，テタヌストキシンなどの受容体として機能し，又最近副腎髄質のクロマフィン顆粒の膜にガングリオシドが高濃度に存在することが明らかにされその生理作用との関連が問題となっている。

著者らは，筋ジストロフィー症における膜異常研究[2)~4)]の一つとして筋ジストロフィーチキン筋と対照の差およびCANPインヒビターであるE-64投与の影響について検討を行った。

方　法

1. **チキン筋組織ガングリオシドの構造解析**：チキン前胸筋を用い，クロロホルム－メタノール(1：1，容比)及び(1：2，容比)により総脂質を抽出し，DEAE Sephadex column chromatography を行い neutral lipid と acidic lipid に分け，acidic lipid 分画をアルカリ水解によりガングリオシドを得た。さらに DEAE Sephadex column chromatography を行って精製ガングリオシドを得たのち，薄層クロマトグラフィーで個々のガングリオシドに分離し，ガスクロマトグラフィーにより，おのおのの糖組成を同定した。

2. **筋ジスチキン筋組織のガングリオシド分析**：材料は対照，筋ジスチキン及びE-64治療[5)]を行った筋ジスチキン，各々7，8，8羽の前胸筋を用いた。筋をホモゲナイズしAndoらの方法[6)]に従って粗ガングリオシドを得，薄層クロマトグラフィーを行い，個々のガングリオシドを分離し，島津二波長クロマトスキャナーを用いて定量した。

結　果

1. チキン筋組織粗ガングリオシドのDEAE Sephadex による elution pattern は fraction Ⅰ，Ⅱ及びⅢに分けられ，Ⅰの薄層クロマトグラフィーを行ったところ3個のスポットが検出された。この分画の preparative 薄層クロマトグラフィーを行った。3つの主分画A，B及びCのうちAとBはおのおの薄層クロマトグラフ上 GM_3 及び GD_3 ガングリオシドの Rf と一致し，Cは既知のガングリオシドとは一致していなかった。AとBのガスクロマトグラフィーによる糖組成は，グルコース，ガラクトース，Nアセチル－ノイラミン酸よりなり，それぞれのモル比は，Aが1：1：1，Bが1：1：2であった。Clostridium perfringens の Neuraminidase 処理によりAとBはいずれも Ceramide-dihexoside となった。しかしCは2つの band よりなり，単一物質でない可

* 自治医科大学神経内科

** 都立臨床医学総合研究所中間代謝部門

Ⅳ In vitro の効果

表1 チキン筋肉中のガングリオシド

	control	dystrophy	treated dystrophy
total sialic acid	n=12	n=7	n=9
μg NANA/g protein	26.0±3.4	75.0±22.5*	50.0±9.7*△
μg NANA/g wet weight	6.1±0.7	14.2±3.9*	10.5±1.7*△△
ganglioside fractions	n=7	n=7	n=3
GM_3: μg NANA/g protein	6.3±2.6	24.9±13.4*	20.3±5.2*
	(25.2±8.2%)	(31.7±8.1%)	(35.9±7.9%)
GD_3: μg NANA/g protein	9.5±2.0	22.9±6.0*	27.2±6.7*
	(39.0±6.1%)	(31.1±3.6%)**	(37.2±7.2%)
X : μg NANA/g protein	8.6±1.7	27.2±6.7*	17.0±3.3*△△
	(35.8±9.8%)	(37.2±7.2%)	(31.5±1.7%)

*: $t<0.01$, **: $t<0.05$ for each sample to control.
△: $t<0.01$, △△: $t<0.05$ for each sample to dystrophy.

能性がでてきたため，更に検討を行っている。これらの結果よりAは，GM_3 ガングリオシドであり，Bは GD_3 ガングリオシドであることが明らかとなった。Cは6糖よりなると考えられるが，その構造はさらに解析中である。

2. 筋ジスチキン筋組織ガングリオシド分析結果を表1に示した。筋ジスチキン筋組織ガングリオシドの蛋白あたり，及び湿重量あたりの含量は，いずれも対照に比し明らかに増加し，E-64 治療筋ジスチキンでは，対照に比し増しているが，筋ジスチキンに比べると減少しており，いずれも有意な差を認めた。

筋ジスチキンのガングリオシド分画，GM_3，GD_3 及び unknown X のいずれもが増しているが，最も増しているのは GM_3 ガングリオシドであった。E-64 治療群では，筋ジスチキンに比べXガングリオシドの減少が明らかであった。

考　　案

ジストロフィー症患者及び動物モデルのジストロフィーマウス，チキン各々について以下に述べる如く筋組織の膜酵素，膜脂質，小胞体などに異常の存在を示す報告が蓄積されている。

患者筋の膜酵素に関しては，筋ホモジネートを用いた測定により adenyl cyclase 活性のエピネフリンや NaF に対する感受性の低下が指摘されている[7),8)]。又 guanylate cyclase 活性の低下も報告されている[9)]。一方分離筋膜を用いた測定では，Na^+K^+ATPase，Mg^{++}ATPase 活性いずれも正常と差がなく，膜脂質にも正常と差がないと報告されている[10)]。

筋ジスマウスの筋膜酵素については，分離筋膜の Na^+K^+ATPase 活性の低下，ウアバイン感受性の低下が報告されている[12)]。しかし正常と差がない[11)]か，又はウアバイン感受性の亢進があるとする報告もある[12)]。筋膜の adenyl cyclase 活性についても亢進が報告されているが，エピネフリンや NaF による活性化には差がないか又は亢進していると分れている[13),14)]。Guanylate cyclase 活性についても亢進が報告されている[15)]。筋膜脂質については総脂質含量が増し，特に中性脂質の増加と遊離コレステロールの相対的減少，リン脂質の軽度増量が報告されている[16)]。

筋ジスチキンについては，Na^+K^+ATPase 活性の低下，ウアバイン反応性の低下，adenyl cyclase 活性の亢進が報告され，いずれもアンホテリシンB処理により差がみられており，膜コレステロールを介しての膜受容体・環境変化の誘起に差のあることが示されている[17)]。又，ペリレンの脂溶螢光ラベルを用いた膜の微細粘度の測定により，粘度の増加が示され，膜の脂質流動性の減少が報告された[18)]。

筋小胞体 (SR) に関しては，患者筋の SR 分画の Ca 摂取能の低下，ATPase 活性の低下

が報告され[19),20)]，SR蛋白及び主要脂質含量は正常と差がなく，フォスファチジルコリンの減少が認められている[20)]。

筋ジスマウスのSRについても微細粘度の低下があり，脂質流動性の低下が示され，SR膜脂質の分析でコレステロールの増加が報告されている[21)]。

筋ジスチキンのSRについては，Ca摂取能の低下はあるが，膜蛋白，Ca++ATPase活性は正常でフリーズフラクチャー法で蛋白顆粒の減少があるとする報告[22)]とCa++ATPase活性の低下を認めるも精製ATPaseの蛋白には正常と差がなく，脂質環境の影響を想定する報告[23)]がある。

以上のごとく，患者筋，動物モデル筋の膜酵素活性や小胞体に異常が報告され，又その要因として膜脂質の異常を想定する報告も出されている。しかし未だ膜脂質に関しては充分なデータが得られていない。

私達は膜脂質研究の一つとして筋ガングリオシドの分析を行っている。今回私達の行ったチキン筋ガングリオシド含量は，ヒト[24)]，ブタ[25)]，ウサギ[25),26)]，ネコ[27)]，ラット[25),27)]の筋ガングリオシド含量とほぼ一致する。

チキン筋ガングリオシド分画はGM_3，GD_3，Xガングリオシドの3主分画よりなっていた。ヒト筋ではGM_3，GM_2，GD_1，GM_1ガングリオシドが主であり[24)]，ウサギ筋ではGM_3，その他2種の構造未決定のガングリオシドからなる[26)]。また，ネコ，ウサギ，ラットではGM_3ガングリオシドが主分画である[27)]と報告されており，現在までの報告では，いずれの種についてもGM_3ガングリオシドが主分画の一つであることは共通するが，その他は，種によってガングリオシドを異にするという興味深い結果が出ている。

病的状態の筋組織ガングリオシドについては，ウサギ脱神経筋においてGM_3を主とするガングリオシドの増加[27)]及び筋ジストロフィーラット筋では逆にガングリオシドの減少が報告され[28)]，一方ビタミンE欠乏によるウサギの実験的ジストロフィー症の筋ではガングリオシドが2倍に増加していると報告されている[29)]。今回のジストロフィーチキン筋では，ガングリオシドが明らかに増加し，特にGM_3ガングリオシドが増加していた。またE-64治療を行った筋ジストロフィーチキンでは，ガングリオシドが対照に比し増していたが，未治療のジストロフィーチキンに比べると減少し，特にXガングリオシドの減少が認められた。これらガングリオシドの変化は，ジストロフィー筋の膜成分の変化を示すと考えられるが，筋組織における筋線維以外の組織成分の変化の影響を検討する必要があり，E-64投与による変化についても更に追究する必要がある。

文　献

1）Rowland, L. P.: Pathogenesis of muscular dystrophies, Arch. Neurol., 33, 315-321, 1976.

2）渥美哲至，宮武正，大林民典他：Duchenne型ジストロフィー症の赤血球の形態及び生化学的研究，筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究，冲中班，昭和51年度報告書，173頁.

3）吉田充男，渥美哲至，宮武正他：筋ジスチキン赤血球膜に関する研究，筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究，冲中班，昭和52年度報告書，141頁.

4）宮武正，渥美哲至，前沢政次他：筋ジストロフィー症における筋膜脂質に関する研究，三好班，昭和54年度報告書.

5）杉田秀夫他：筋ジストロフィーチキンに対するprotease inhibitor (E-64) の効果，三好班，昭和54年度報告書.

6）Ando, S., Chang, N. C. and Yu, R.: High performance thin-layer chromatography and densitometric determination of brain ganglioside compositions of several species, Anal. Biochem., 89, 437-450, 1978.

7）Mawatari, S., Takagi, A., et al.: Adenyl cyclase in normal and pathologic human muscle, Arch. Neurol., 30, 96-102, 1974.

8）Susheela, A. K., Kaul, R. D., et al.: Adenyl cyclase activity in Duchenne dystrophic muscle, J. Neurol. Sci., 24, 361-363, 1975.

9）Cerri, C., Canal, N. and Frattola, L.: Guanylate cyclase activity in normal and diseased

human muscle, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, **41**, 805-808, 1978.

10) Peter, J. B.: A (Na^++K^+) ATPase of sarcolemma from skeletal muscle, Biochem. Biophys. Res.Commun., **40**, 1362-1367, 1970.

11) Boegman, R. J.: The isolation and partial characterization of membranes from dystrophic and normal muscle, Comp. Biochem. Physiol., **48A**, 237-244, 1974.

12) Bray, G. M.: A comparison of the ouabain-sensitive (Na^++K^+)-ATPase of normal and dystrophic skeletal muscle, Biochim. Biophys. Acta, **298**, 239-245, 1973.

13) Strickland, K. P., Hudson, A. J. and Thakar, J. H.: Biochemical studies in dystrophic mouse muscle, Ann. N. Y. Acad. Sci., **317**, 187-205, 1979.

14) Canal, N. and Frattola, L. : In Recent Advances in Myology, W. G. Bradley, D. Gardner-Medwin and J. N. Walton, Eds., Excerpta Medica. Amsterdam, The Netherlands, p. 273-276, 1975.

15) Blosser, J. C. and Appel, S. H.: Properties and distribution of mammalian skeletal muscle guanylate cyclase, J. Biol. Chem., **253**, 3088-3093, 1978.

16) De Kretser, T. A. and Livett, B. G.: Skeletal-muscle sarcolemma from normal and dystrophic mice. Isolation, characterization and lipid composition, Biochem. J., **168**, 229-237, 1977.

17) Rodan, S. B., Hintz, R. L., et al.: The activity of membrane bound enzymes in muscular dystrophic chicks, Nature, **252**, 589-591, 1974.

18) Sháafi, R. I., Rodan, S. B., et al.: Abnormalities in membrane microviscosity and ion transport in genetic muscular dystrophy, Nature, **254**, 525-526, 1975.

19) Samaha, F. J. and Gergely, J.: Biochemical abnormalities of the sarcoplasmic reticulum in muscular dystrophy, N. Engl. J. Med., **280**, 184-188, 1969.

20) Takagi, A., Schotland, D. L., et al. : Sarcoplasmic reticulum in Duchenne muscular dystrophy, Arch. Neurol., **28**, 380-384, 1973.

21) Rubsamen, H., Barald, P. and Podleski, T.: A specific decrease of the fluorescence depolarization of perylene in muscle membranes from mice with muscular dystrophy, Biochim. Biophys. Acta, **455**, 767-779, 1976.

22) Scales, D., Sabbadini, R. and Inesi, G.: The involvement of sarcotubular membranes in genetic muscular dystrophy, Biochim. Biophys. Acta, **465**, 535-549, 1977.

23) Hanna, S. D. and Baskin, R. J.: Comparison of the (Ca^{2+}+Mg^{2+})-ATPase proteins from normal and dystrophic chicken sarcoplasmic reticulum, Biochim. Biophys. Acta, **540**, 144-150, 1978.

24) Svennerholm, L., Brace, A., Mansson, J., et al.: Sphingolipids of human skeletal muscle, Biochim. Biophys. Acta, **280**, 626-636, 1972.

25) Puro, K., Maury, P. and Huttunen, J. K.: Qualitative and quantitative patterns of gangliosides in extraneural tissues, Biochim. Biophys. Acta, **187**, 230-235, 1969.

26) Lassaga, F. E., I. Albarracin de Lassaga and Caputto, R.: Rabbit muscle gangliosides, J. Lipid Res., **13**, 810-815, 1972.

27) Max, S. R., Nelson, P. G. and Brady, R. O.: The effect of denervation on the composition of muscle gangliosides, J. Neurochem., **17**, 1517-1520, 1970.

28) Max, S. R. and Brady, R. O.: Alteration of the ganglioside composition of skeletal muscle in murine muscular dystrophy, Nature, **233**, 55-56, 1971.

29) Albarracin, I., Lassaga, F. E. and Caputto, R.: Changes of gangliosides and other lipids in skeletal muscle from rabbits with experimental dystrophy, J. Lipid Res., **15**, 89-93, 1974.

14. 筋蛋白質代謝回転

江 橋 節 郎*

研究協力者 小 浜 一 弘*

E-64 の筋蛋白質代謝回転に与える影響を検討するにあたり，本報告書においては正常及び異常筋における筋蛋白質代謝回転に関する文献的考察を行うとともに，予備的実験として正常及びジストロフィー症ニワトリにおける各種構造蛋白質のアミノ酸取り込み量測定のデーターを示す。

生体内外における筋総蛋白質代謝回転

筋は最も蛋白質含量が多く総蛋白質の分解と合成速度（代謝回転）の遅い器官のひとつである。各器官のうちやや高い総蛋白質代謝回転を示すグループに属する肝の½～⅙程度にしかすぎない[1)~5)]。

最もよく利用されているラットでは合成された筋総蛋白質の量が半減するのに要する時間は約10日（6～19日の範囲)[3),4)] である。ニワトリ[6)]及びマウス[5)]もほぼ同程度である。しかしウサギ[7)]及びブタ[1)]はもっと多くの日数を要すると考えられる。

筋総蛋白質は構造蛋白質と酵素類を含む可溶性蛋白質に大別される。構造蛋白質の方が代謝回転がより遅く[3),5),8)~12)]，外因による影響もうけにくい（次節参照)。肝における可溶性蛋白質に含まれる酵素は代謝回転上多様性があり，代謝回転の最も速いものは最も遅いものの750倍になる[13)]。一方，構造蛋白質の間では代謝回転上の多様性があるものの，最も速いものと最も遅いものの間で10倍程度の開きしかなく[14)~17)]，事実多様性を検出できなかった報告もある[18),19)]。

速筋は代謝回転が最も遅く，遅筋，心筋及び平滑筋の½程度である[9),11),20)]。構造蛋白質よりも可溶性蛋白質の方に筋種による差が大きい[11)]。

発育途上にある筋総蛋白質は，幼若な時代に代謝回転が速く，成熟に伴って低くなる[21),22)]。

筋を生体より取り出して栄養液中に数時間生体内と同じ総蛋白質代謝回転を保たせることが可能である[23),24)]。細胞培養された筋の構造蛋白質の代謝回転[19),25)]は生体内におけるとの同範囲にある[6)]。

筋総蛋白質量の増減と総蛋白質代謝回転

種々の因子によって筋の肥大または萎縮がもたらされる[9),13),26),38)]。筋総蛋白質の合成速度と分解速度の差が正なら肥大を，負なら萎縮がもたらされる。

筋総蛋白質量の増減を種々の方法で引き起し，蛋白質合成速度と分解速度を比較したGoldberg らの仕事によれば，これらは比較的独立に制御されていてそれぞれの原因に特異的であると考えられる[9),13),38)]。

ほとんどの筋萎縮には蛋白質分解の促進が起るが，蛋白質合成は必ずしも抑制されない[9),13),53)]。事実，ジストロフィー症筋では蛋白質合成が促進されている[5),6),21),36)]。除神経された筋では手術直後には蛋白質合成は抑制されるが，やがて蛋白質合成の促進がみられる[43)~46)]。

肥大には蛋白質の合成の促進と分解の抑制が

* 東京大学医学部薬理学教室

共にみられる[9),13)]。物理的方法（運動，伸張，刺激）によって起った肥大では，Goldberg らは蛋白質分解の抑制が主な原因だと主張している[9),13),26)]が，Goldspink らは蛋白質合成の促進が主な原因とみなしている[27)~29)]。

小沢らによって血清より分離された筋成長促進因子は細胞培養された筋細胞に対し有効であった[30)]。血中の因子活性はオスの方がメスよりも高く，アンドロジェン注射が因子活性を促進することを示した[31)~35)]。アンドロジェン注射によって生じた肥大筋と筋成長因子存在下で培養した筋細胞における代謝回転の変化を比較したデーターはない。

細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と筋総蛋白質代謝回転

Ionasescu らはジストロフィー筋を培養し，栄養液に A 23187 を加え筋細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させるとロイシンの筋蛋白質へのとり込み量が増加することを示した[36)]。

亀山と Etlinger[37)] は筋細胞内の Ca^{2+} 濃度を同様の方法で増加させ筋総蛋白質代謝回転を検討した。蛋白質合成のみならず分解も促進を受けた。蛋白質分解速度は栄養液にロイペプシンを加えることによって抑制された。

短時間の筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は筋収縮時にもたらされる[39)]。慢性的刺激を受けている筋または筋小胞体の Ca^{2+} 結合能の低下しているジストロフィー筋においては Ca^{2+} 濃度は長時間の間上昇しているであろう。これらは細胞内 Ca^{2+} の新しい機能すなわち筋蛋白質の合成または分解に対する作用を示唆する実験結果である。

各種構造蛋白質の代謝回転

構造蛋白質の代謝回転が一致していないということは3つのグループによって独立に発表された[14)~17),40)]。小泉[16)]はウサギ骨格筋において各種構造蛋白質の蛋白量当りのアミノ酸取り込み量を調べた（表1）。この結果は小浜[40)]によってもニワトリ骨格筋において確認された。取り込み量の多い順から，M蛋白質≧トロポニン＞可溶性総蛋白質＞トロポミオシン ≒ α-アク

表1

	a	b	c	d		e	
				R	C	R	C
Act	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Myo	6.3	3.0	0.48	2.5	2.3	1.2	1.1
TM	1.8	0.23	0.13	3.3	2.3	0.43	0.30
TN	2.0	0.25	0.13	6.5	3.0	0.85	0.39
α	2.8	0.10	0.04	3.0	2.8	0.12	0.11
M	4.0	0.03	0.008	(7*)	3.0	(0.06)	0.02

Act：アクチン，Myo：ミオシン，TM：トロポミオシン，TN：トロポニン，α：α-アクチニン，M：M-蛋白質，a：分子量比，b：細胞内蛋白量存在比（47），c：細胞内分子数比（b/a），d：蛋白質量あたりのアミノ酸取り込み比，e：細胞内で合成される分子数比（c×d），R：ウサギ(16)，C：ニワトリ（図1）

* 純粋なM蛋白質でない

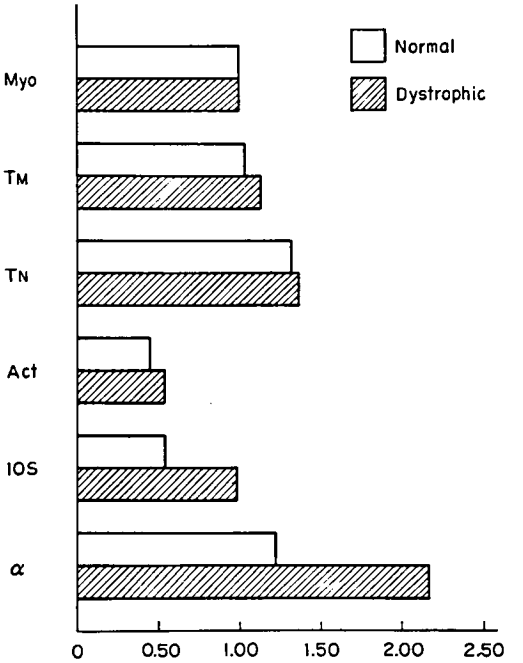


図1 ジストロフィー筋におけるアミノ酸取り込み量

Normal（412系統）及び Dystrophic（413系統）のニワトリ（生後450日経過）に ^3H ラベルのロイシンを注射し，22時間後胸筋をとり出し各種タンパク質を抽出し，タンパク質量当りの放射能を求めた。ミオシンの比放射能に対する同系の各種タンパク質の比放射能の比率で，相対的アミノ酸取り込み量を示す。（10S 10S-アクチニン，他は表1参照）

チニン≧ミオシン>10 S-アクチニン>アクチンである（表1，図1）。平滑筋でもミオシンはアクチンより代謝回転が速い[41]。

肝における酵素のうち肝機能上重要な機能をもつものは非常に代謝回転が速い[13]。筋の可溶性蛋白質のうち分子量の大きいものほど代謝回転が速い[42]。構造蛋白質もこの原則にほぼ従う（表1）。ミオシンは分子量の大きさに比較して取り込み量が少い。トロポニンは分子量に比較して取り込み量が大きい。収縮機能上重要な作用を担っている[39),47]ことを意味するであろう。

各々の構造蛋白質の分子量と細胞内存在量[47]より，表1に示される様に細胞内で合成される分子数総量が計算される。アクチンとミオシンは最も多くかつ同程度に合成され[脚注]，トロポニンとトロポミオシンはこれに次いでいる。Devilin と Emerson[48] は培養筋細胞のアクチンの合成分子総量はミオシンと同じであることを報告した。

10 S-アクチニンとアクチンの異同については議論の余地がある[47]。表1及び図1に示される様に，10 S-アクチニンはアクチンの1.7倍または1.2倍のアミノ酸取り込み量を示す[16),40]。これは抗 10 S-アクチニン抗体がアクチンと反応しない[49]ことと共に 10 S-アクチニンがアクチンと異なる分子であることを示唆する。

成熟骨格筋のアクチンは等電点が最も酸性である α-アクチン のみから成立していると考えられる[50]。小浜[51]は成熟骨格筋よりアクチンを抽出する際，抽出時間が長く温度の高い方が40%程度アミノ酸取り込み量の大きいアクチン標品が得られることを報告した。このことは新しく合成されたアクチンは筋原線維上アクチン標品として抽出されにくい部位に組み込まれていることを示唆する。また，10 S-アクチニンを抽出する条件では新しく合成されたアクチンが容易に抽出され 10 S-アクチニン標品となる可能性も示唆される。

小浜[40]はニワトリ胚またはふ化直後のニワトリの未熟な筋のアクチンはミオシンの取り込み量のそれぞれ0.71及び0.51倍であることを示した。成熟筋では0.43倍（表1）なので未熟な筋ではアクチンのアミノ酸取り込み量が大きい。Rubinstein ら[19]は細胞培養された骨格筋のアクチンとミオシンの蛋白質量当りのアミノ酸取り込み量が等しいことを示し，上述の構造蛋白質の代謝回転上の不均一性に疑問を投げかけた。しかし，彼らのデーターは細胞培養された骨格筋が幼若型であることを示しているにすぎない。

近年になって非筋組織にもアクチンとミオシンが存在し細胞性運動に関与していることが明らかになってきた[50]。アクチン及びミオシンの代謝回転は筋組織より非筋組織の方が速い[19]。

除神経萎縮筋とジストロフィー症筋における構造蛋白質の代謝回転

清水[46]は除神経により蛋白質合成が促進しているウサギ萎縮筋において各種構造蛋白質のアミノ酸取り込み量を測定した。これらのうち特に α-アクチニンと 10 S-アクチニンのアミノ

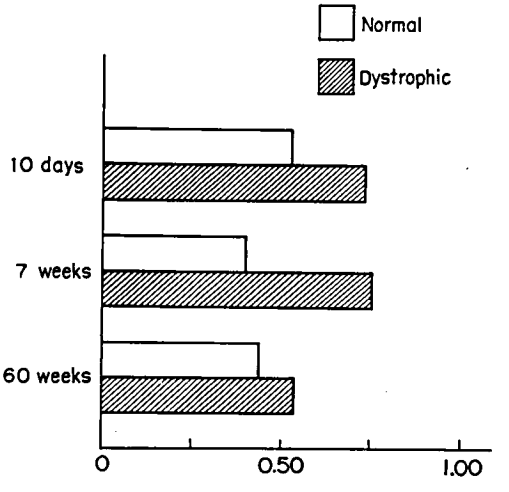


図2　アクチンのアミノ酸取り込み量
生後10日，7週そして60週のニワトリ胸筋のミオシンとアクチンへのタンパク質量当りのロイシンの取り込み量を求めた。各々の筋肉のミオシンに対するアクチンのロイシンの取り込み量の比率で示した。Normal (412系統)，Dystrophic (413系統)。

脚注）後述のアクチンのアミノ酸取り込みの不均一性を考えても，このことは成り立つと考えられる

酸取り込みが促進していた。

前述の様にジストロフィー症でも筋蛋白質合成は促進している。小浜[30]は遺伝性ジストロフィー症ニワトリとコントロールニワトリ[51]の間で各種構造蛋白質へのアミノ酸取り込み量を比較した（図1，図2）。成長期においてはアクチンのアミノ酸取り込み量がジストロフィー症の方で著しく促進されていた。これはジストロフィー筋の分化が遅れているという各種データーに良く一致する[52]。

一年以上加令し十分に発症したジストロフィー症ニワトリにおいては，アクチン及びトロポニンのアミノ酸取り込み量の増加は著しくなく，α-アクチニンと 10S-アクチニンのアミノ酸取り込み量の増加が著しかった（図1）。

ニワトリジストロフィー症では α-アクチニンのあるZ帯の異常[6]及びトロポニン存在部位の異常[53]が報告されている。α-アクチニンのアミノ酸取り込み量の促進はZ帯の破壊に伴うものであろう。トロポニンに関しては，その各々のサブユニットについての合成の促進を検討する必要があろう。

ジストロフィー症筋で合成の促進を受けている蛋白質が除神経萎縮筋で合成の促進を受けている蛋白質と同じである[40),46]。このことはジストロフィー症発症に神経性の要因のあることを示唆している。

文　献

1) Garlick, J. P., Burk, T. L. & Swick, R. W.: Am. J. Physiol., **230**, 1108-1112, 1976.

2) Garlick, J. P., Willward, D. J., James, W. P. T. & Waterlow, J. C.: Biochem. Biophys. Acta, **414**, 71-84, 1975.

3) Millward, D. J.: Clin. Sci., **39**, 577-590, 1970.

4) Millward, D. J.: Clin. Sci., **39**, 591-603, 1970.

5) Simon, R. J., Gross, C. S. & Lessell, I. M.: Arch. Biochem. Biophys., **96**, 41-46, 1962.

6) Rouke, A. W.: J. Cell Physiol., **86**, 343-352, 1975.

7) McManus, I. R. & Mueller, H.: J. Biol. Chem., **241**, 5967-5975, 1966.

8) Everett, A. W., Taylor, R. R. & Sparrow, M. P.: Biochem. J., **166**, 315-321, 1977.

9) Goldberg, A. L., Griffin, G. E. & Dice, J. F. Jr.: in Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies, pp 376-385 (Rowland, L. P. ed.), 1977.

10) Leurent, G. J., Sparrow, M. P. & Millward, D. J.: Biochem. J., **176**, 407-417, 1978.

11) Leurent, G. J., Sparrow, M. P., Bates, P. C. & Millward, P. J.: Biochem. J., **176**, 393-405, 1978.

13) Goldberg, A. L. & St. John, A. C.: Ann. Rev. Biochem., **45**, 474-803, 1976.

14) Funabiki, R. & Cassens, R. G.: Nature New Biol., **236**, 249, 1972.

15) Funabiki, R. & Cassens, R. G.: J. Nutr. Sci. Vitaminol., **19**, 361-368, 1973.

16) Koizumi, T.: J. Biochem., **76**, 431-439, 1974.

17) Low, R. B. & Goldberg, A. L.: J. Cell. Biol., **56**, 590-595, 1973.

18) Zak, R., Rakitzis, E. & Rabinowitz, M.: Fed. Proc., **30**, 1147A, 1971.

19) Rubinstein, N., Chi, J. & Holtzer, H.: Expl. Cell Res., 387-393, 1976.

20) Goldberg, A. L., Jablecki, C. & Li, J. B.: Annal. N. Y. Acad. Sci., **288**, 190-202, 1974.

21) Srivastava, U.: Can. J. Biochem., **46**, 35-41, 1968.

22) Millward, D. J., Garlick, P. J., Stewart, R. J. C., Nnancyelugo, D. O. & Waterlow, J. C.: Biochem. J., **150**, 235-243, 1975.

23) Fulks, R. M., Li, J. B., & Goldberg, A. L.: J. Biol. Chem., **250**, 290-298, 1975.

24) Li, J. B. & Goldberg, A. L.: Am. J. Physiol., **231**, 441-448, 1976.

25) Walker, C. & Strohman, R.: Expl. Cell Res. **116**, 341-348, 1978.

26) Goldberg, A. L., Stlinger, J. D., Goldspink, D. F. & Jablecki, C.: Med. Sci. Sport., **7**, 248-261, 1975.

27) Goldspink, D. F.: J. Physiol., **264**, 283-296, 1977.

28) Goldspink, D. F.: J. Physiol., **264**, 267-282, 1977.

29) Goldspink, D. F.: Biochem. J., **174**, 595-602, 1978.

30) Ozawa, E. & Kohama, K.: Proc. Jap. Acad., **49**, 852-856, 1973.
31) Kohama, K. & Ozawa, E.: Proc. Jap. Acad., **49**, 857-860, 1973.
32) Ozawa, E. & Kohama, K.: Muscle & Nerve, **1**, 230-235, 1978.
33) Kohama, K. & Ozawa, E.: Muscle & Nerve, **1**, 236-241, 1978.
34) Ozawa, E. & Kohama, K.: Muscle & Nerve, **1**, 314-319, 1978.
35) Kohama, K. & Ozawa, E.: Muscle & Nerve, **1**, 320-321, 1978.
36) Ionasescu, V., Zellweger, H., Ionasescu, R. & Lara-Braud, C.: in Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies, (Rowland, L. P. ed.) pp 376-385, 1977.
37) Kameyama, T. & Etlinger, J. D.: Nature, **279**, 344-346, 1979.
38) Goldberg, A. L. & Odessey, R.: in Explaratory Concepts in Muscular Dystrophy (Milhorat, A. J. ed.) pp 187-199, 1974.
39) Ebashi, S. & Endo, M.: Prog. Biophys. Mol. Biol., **18**, 123-183, 1968.
40) Kohama, K.: Jap. J. Pharmacol., **29**, (Suppl.) (in press), 1979.
41) Kohama, K.: (unpublished observation).
42) Dice, J. F., Dehlinger, P. J. & Schmke, R. T.: J. Biol. Chem., **248**, 4220-4228, 1973.
43) Goldspink, D. F.: Biochem. J., **156**, 71-80, 1976.
44) Pater, J. L. & Kohn, R. R.: Proc. Soc. Expl. Biol. Med., **125**, 476-481, 1967.
45) Turner, L. V. & Garlick, P. J.: Biochem. Biophys. Acta, **349**, 109-113, 1974.
46) Simizu, T.: (in preparation), 1980.
47) Ebashi, S. & Nonomura, Y.: in the Structure and Function of Muscle (2nd ed, Bourne, G. H. ed.) Vol. 3, pp 285-262, 1973.
48) Devlin, R. B. & Emerson, C. P. Jr.: Cell, **13**, 599-611, 1978.
49) Sugita, H., Masaki, T. & Ebashi, S.: J. Biochem., **75**, 671-673, 1974.
50) Clark, M. & Spudich, J. A.: Ann. Rev. Biochem., **46**, 797-822, 1977.
51) Kohama, K.: J. Biochem., **87**, 997-999, 1980.
52) Wilson, W., Randall, R., Patterson, G. T. & Entrikin, R. K.: Annal. N. Y. Acad. Sci., **307**, 224-246, 1979.
53) Irish, J. M., Hirabayashi, T. & Wilson, F. J.: Tissue & Cell, **9**, 499-505, 1977.

15. E-64及びE-64誘導体によるラット肝カテプシンB及びLの阻害について (in vivo, in vitro)

勝沼信彦*

研究協力者 橋田誠一* 唐渡孝枝*
木南英紀*

はじめに

E-64は花田ら[1]によって，Aspergillus japonicus TPR-64から発見精製されたチオールプロテアーゼの新しい阻害剤である。E-64は，パパイン，ブロメライン，フシン[1]やカルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP)[2] を特異的に阻害する。しかし，同じチオール酵素であるクレアチンキナーゼや乳酸脱水酵素[2]は阻害しない。私達は既に in vitro[3),4)] 及び in vivo[5)] でラット肝リソゾームのカテプシンBとLが，E-64 及びロイペプチンによって強力に阻害されることを報告した。現在，リソゾーム中に存在するカテプシン群が細胞内のタンパク質の分解に関与していると考えられているが，その機構については明らかでない。一方では各種プロテアーゼ阻害剤によって，特定なタンパク質の分解が減少することは知られている。また，ロイペプチンやペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤は，タンパク質の分解に関与しているプロテアーゼの性格の判定に役立っている[6)~8)]。E-64 はその特異性，強力性ならびに毒性の無さから考えてこれらの阻害剤以上に細胞内での特定なタンパク質の分解機構の解明に有効であると期待できる。

今回，ラット肝から単一迄精製化したカテプシンBとLに対するE-64 及びロイペプチンの阻害キネテックスを詳細に，in vivo での肝リソゾーム中のカテプシンBとLの阻害態度と比較検討した。

* 徳島大学医学部酵素研究施設酵素化学

材料及び実験方法

材料

正常食100～120gウィスター系雄ラット，アゾカゼイン，BAPA，BAA（シグマ社），イースト・グルコース-6-リン酸脱水素酵素（ベーリンガー社）を使用した。E-64とその誘導体，[^{3}H]-E-64(DL) は大正製薬花田氏から供与された。

方法

1. カテプシンBとLの精製と活性

カテプシンBとLは，唐渡ら[3),4)]の方法により精製した。

カテプシンB活性は，BAPAを用いて，Ottoら[9)]の方法によった。

カテプシンL活性は次の三種の方法で測定した。1）阻害機構においては，BAAを用いて[10)] 2）E-64 とその誘導体の in vitro での活性は，唐渡ら[4)]のグルコース-6-リン酸脱水素酵素の失活によって測定した。3）E-64 とその誘導体の in vivo で（の活性）は，アゾカゼインを用いて[10)] E-64 存在下と非存在下で活性を測定することによって，E-64 依存性アゾカゼイン水解活性をカテプシンLの活性として測定した。

2. カテプシンBの活性チオール基の測定

カテプシンBは，2，2′-ジチオジピリジンと0.1Mリン酸緩衝液中 pH 6.0，25°Cで反応し

チオール基を算出した。また，反応液中より 20 μl くみ出して，活性を測定した。2, 2′-ジチオジピリジンの分子吸光係数は 7.060M^{-1} cm^{-1} [11]を用いた。

3. カテプシンBと〔^{3}H〕-E-64 (DL) の結合

4.8 n mol のカテプシンと〔^{3}H〕-E-64 (DL) を0.1Mリン酸緩衝液 pH 6.0 中で反応し，活性を測定した。被放射能は 10 ml のトライトン-トルエン系で測定した。

4. E-64 とその誘導体の in vitro での阻害機構

E-64 とその誘導体は，生理食塩水または，飽和重曹水に溶かし，中和後，生理食塩水で等量とした。カテプシンBとLの活性は，E-64 またはその誘導体と反応液中 37°C で5分間，予備反応後，それぞれの基質添加によって反応を開始した。ID_{50}はカテプシンBとLを50%阻害する阻害剤の濃度とした。

5. E-64 とその誘導体の in vivo での阻害態度

1 mg/100 g ラットの E-64 とその誘導体を，腹腔内注射，1時間後，肝臓を摘出しホモジネート遠心して，リソゾーム分画をとり[5]，カテプシンBとLの活性を測定した。E-64 とその誘導体の阻害活性の比較は，それぞれの阻害%を E-64 の阻害%で割り，E-64 の阻害活性を 100 とした。

6. タンパク量は，Lowry ら[12]の方法によった。

結　　果

1. E-64 (L) による精製カテプシン B 及び L の阻害機構

BAPA と BAA を使って，カテプシンBとLに対する，E-64 の阻害機構を検討した。Lineweaver-Burk プロット（図1a, 1b）に示すように，E-64 はカテプシンB及びLに対し，非拮抗阻害形式をとった。この阻害が，可逆的か不可逆的か判断するため，速度を縦軸にとって，横軸に酵素量をとった時の各種濃度の E-64 存在下での酵素反応を検討した。（図1b, 2b）に示すように，それぞれの E-64 濃度での直線の傾きは同じで，（直線）は横軸を交差する。このことより，E-64 はカテプシンB及びLに不可逆的に結合するものと考えられる。

2. E-64 (L) とカテプシンBの結合

E-64 とカテプシンBの結合量を知るために，〔^{3}H〕-E-64 (DL) を使って，検討した。図3に示すように，カテプシンBは1モルの E-64 と結合することによって活性の完全な消失がみられた。カテプシンBと 2, 2′-ジチオジピリジンを変性剤のない状態で反応させると，1個のSHが滴定され，1個の SH の修飾により，活性は完全に消化し，活性には約1ケのチオール基のみが関与していることがわかった。（図4）これらのことより，E-64 はカテプシンBの活性基である特定の1ケのチオール基と結合すると完全に活性を消失することが明らかとなった。

3. カテプシン B 及び L に対する E-64 とその誘導体の阻害能の比較

E-64 の誘導体は，E-64 のアグマチン部分の変換物を使った。（表1）この誘導体のカテプシンBとLに対する阻害活性を in vitro と in vivo で検討した。In vitro では，精製したカテプシンBとLを用いて阻害活性を比較した。活性測定には，カテプシンBは BAPA を，カテプシンLには，グルコース-6-リン酸脱水素酵素を用いた。ほとんどの誘導体はカテプシンBとLに対して，E-64 とほぼ同程度の阻害活性を示したが，E-64 (D) は E-64 (L) の約半分の阻害活性を示した。In vivo では，E-64 及びその誘導体を 1 mg/100 g ラットで腹腔内に注射した。1時間後，肝臓のカテプシンBとLの活性を測定した。（表2）E-64 (L) と E-64-c (SS) が，一番強い阻害活性を示し，他の誘導体は E-64 (L) に比し，若干弱い阻害活性を示した。しかし，E-64-b (RR) は全く in vivo では阻害活性がなかった。

4. E-64 (L), E-64-a (SS), E-64-c (SS) の細胞内での阻害活性の時間変化

E-64 (L), E-64-a (SS), E-64-c (SS) を前項と同量ラットに投与し，それぞれの時間ごとに肝臓のカテプシンBとLとの活性を測定した。E-64 (L) と E-64-c (SS) は1時間以

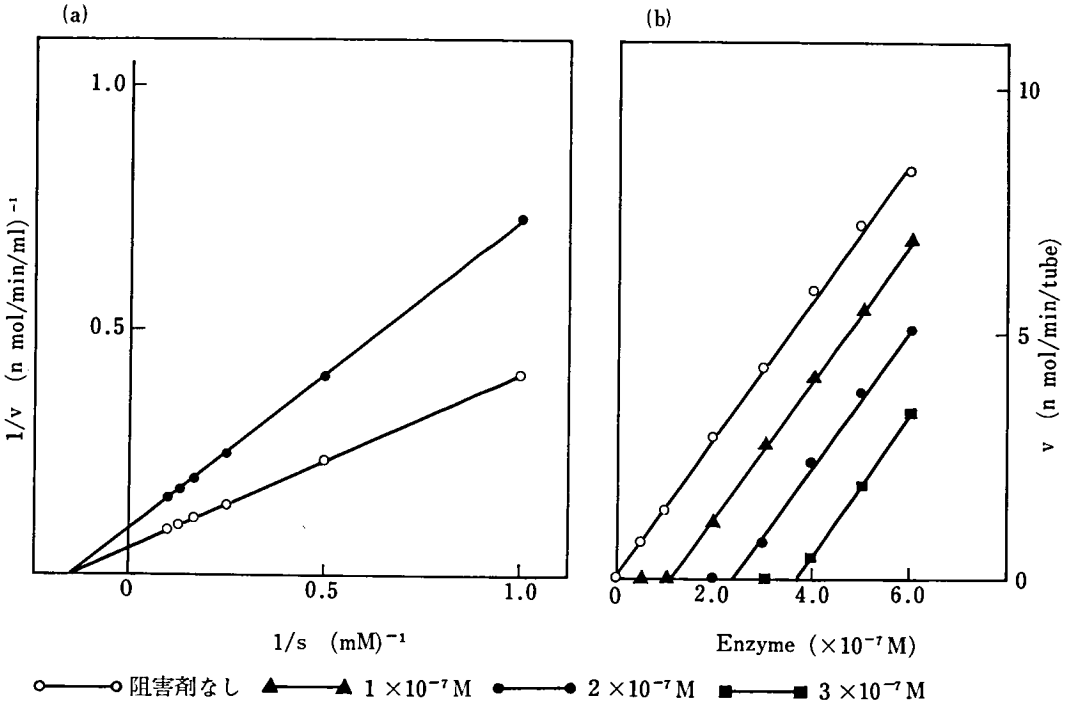


図1 カテプシンBに対する E-64 (L) の阻害機構

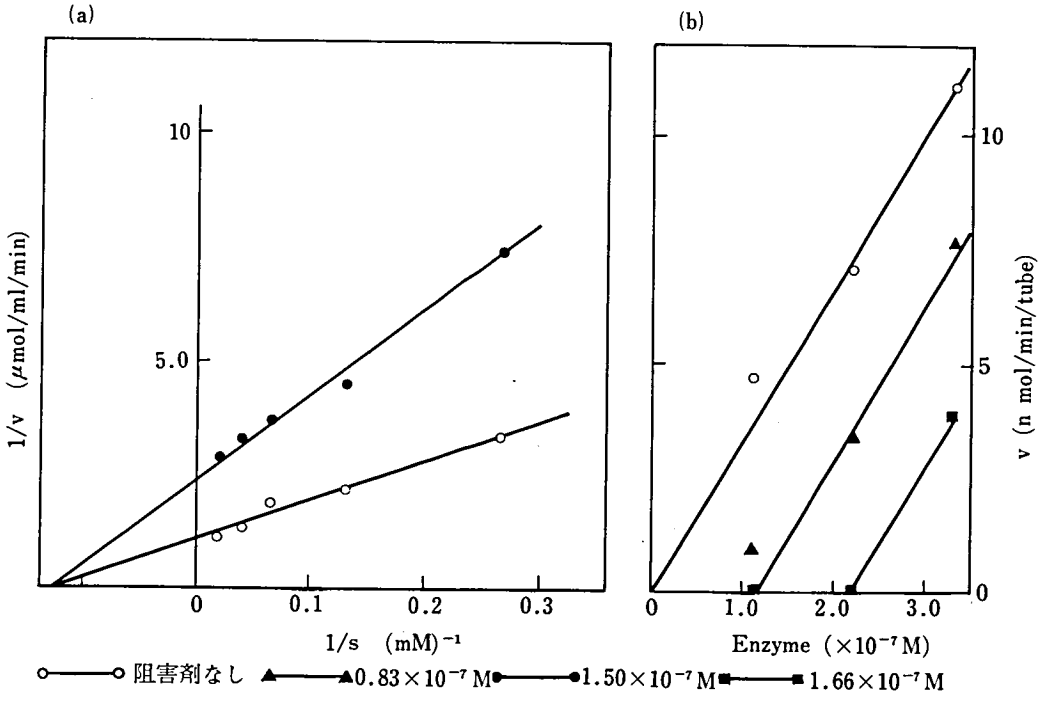


図2 カテプシンLに対する E-64 (L) の阻害機構

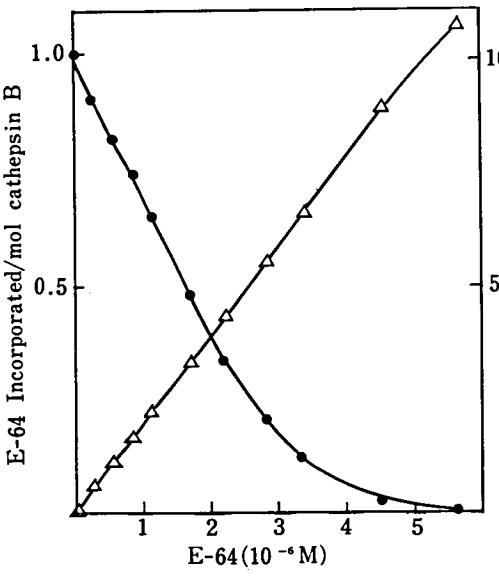


図3 カテプシンBへの〔³H〕-E-64 (DL) の取り込み

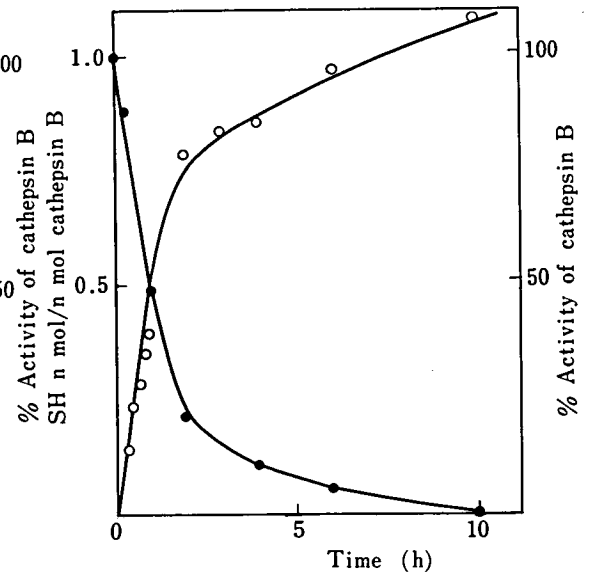
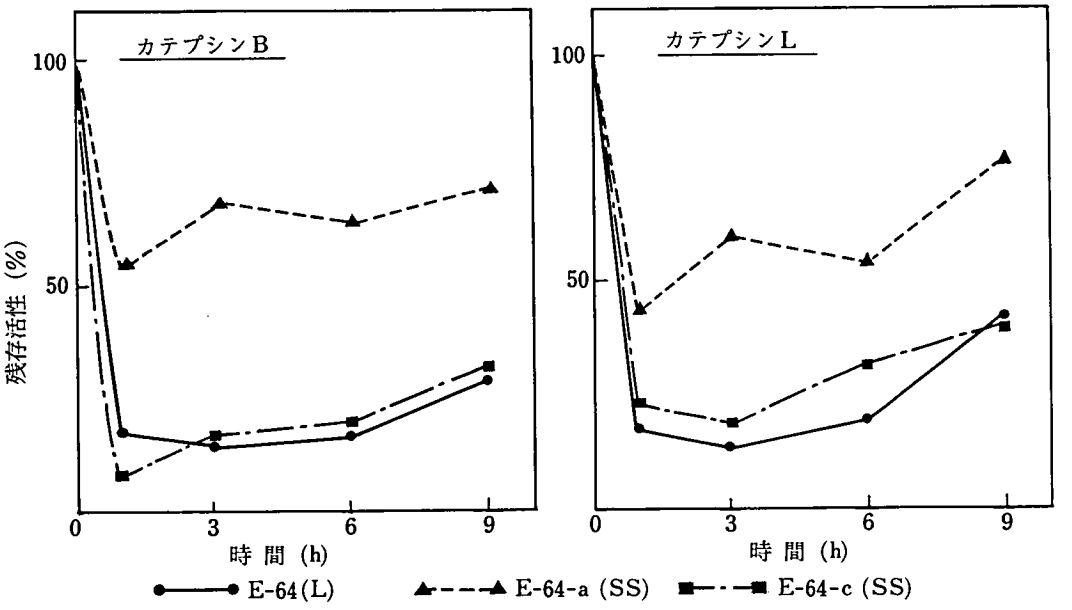


図4 カテプシンBのSH基の 2,2′-ジチオジピリジンによる滴定

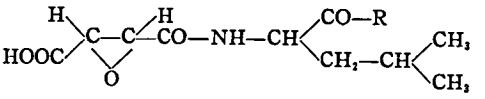


1 mg/100 g ラットで E-64 (L), E-64-a (SS) と E-64-c (SS) をラット腹腔内注射後それぞれの時間で肝リソゾーム中カテプシンの活性を測定した。

図5 E-64 (L), E-64-a (SS), E-64-c (SS) 投与後のカテプシンBとLの阻害活性の時間変化

15. E-64 及び E-64 誘導体によるラット肝カテプシンB及びLの阻害について

表1 In vitro における E-64 とその誘導体のカテプシンBとLに対する阻害活性



化合物	R	カテプシン活性 カテプシンB	カテプシンL	E-64 (L) に対する阻害活性 カテプシンB	カテプシンL
		(M)	(M)	(%)	(%)
1. E-64 (L)	$-NH-(CH_2)_4-NH-C(=NH\cdot\frac{1}{2}H_2O)(NH_2\cdot 2H_2O)$	2.4×10^{-7}	1.1×10^{-7}	100	100
2. E-64 (D)		5.4×10^{-7}	1.7×10^{-7}	44.4	64.7
3. E-64-a-z (SS)	$-NH-(CH_2)_4-NH-COOCH_2-C_6H_5$	2.4×10^{-7}	1.0×10^{-7}	100	110
4. E-64-a-z (RR)		3.0×10^{-7}	1.3×10^{-7}	80.0	84.6
5. E-64-a (SS)	$-NH-(CH_2)_4-NH_2$	2.4×10^{-7}	1.4×10^{-7}	100	78.6
6. E-64-b (SS)	$-NH-CH(CH_2-CH(CH_3)_2)-COOH$	2.8×10^{-7}	1.4×10^{-7}	85.7	78.6
7. E-64-b (RR)		3.5×10^{-7}	1.4×10^{-7}	68.6	78.6
8. E-64-c (SS)	$-NH-CH_2-CH_2-CH(CH_3)_2$	2.4×10^{-7}	1.3×10^{-7}	100	84.6
9. E-64-c (RR)		2.4×10^{-7}	0.9×10^{-7}	100	122

表2 In vivo における E-64 とその誘導体のカテプシンBとLに対する阻害活性

化合物	カテプシン活性* カテプシンB	カテプシンL	E-64 (L) に対する阻害活性 カテプシンB	カテプシンL
	(mU/g liver)		(% Inhibition/E-64Inhibition)	
Without Inhibitor	12.3 ±1.30	32.4±4.12	—	—
1. E-64 (L)	2.15±0.52	3.6±3.23	100	100
2. E-64 (D)	3.89±0.49	8.4±1.65	82.9	83.3
3. E-64-a-z (SS)	6.08±1.53	8.9±3.76	61.3	81.6
4. E-64-a-z (RR)	6.34±0.26	17.7±2.19	58.8	51.1
5. E-64-a (SS)	6.76±0.77	12.7±4.32	54.5	68.6
6. E-64-b (SS)	4.88±0.91	19.9±4.37	73.1	43.5
7. E-64-b (RR)	12.4 ±0.92	33.1±7.82	0	0
8. E-64-c (SS)	1.12±0.25	7.6±6.45	110	86.3
9. E-64-c (RR)	6.56±0.68	25.7±3.29	56.6	23.2

* 1 mg/100 g ラットでそれぞれの阻害剤をラット腹腔内注射，1時間後，ラット肝リソゾーム中カテプシンの活性を測定した。

内に最高の阻害活性を示し，以後徐々に阻害活性が弱まっている。しかし，6時間までは十分に阻害活性が認められた。E-64-a (SS) も同じような態度を示したが，相対的に（他の2つより）阻害活性が低かった。

考　　察

E-64 は，非拮抗的不可逆的にカテプシンB及びLを阻害する。（図1，2）カテプシンBは約10ケのチオール基を持っているが[3]，E-64 が特定の1ケの活性チオール基に結合すること

によってカテプシンBの活性を阻害するものと考えられる。(図3，4) これは花田ら[1]によるパパインや杉田ら[2]による CANP の報告と一致する。その上プロテアーゼに特異的であり他のチオール酵素の活性には影響を与えない[2]。この阻害機構は，ロイペプチンによるチオールプロテアーゼの阻害機構[13]とは異なるようである。In vitro での E-64 の誘導体のカテプシンBとLに対する阻害活性では，E-64 (D) がやや低いほかは，ほぼ同程度の阻害活性が認められた (表1)。このことは，E-64のアグマチン部分が，カテプシンBやLの阻害には必須でないことが考えられる。杉田ら[2]によって，E-64-b は E-64 に比べて CANP に対する阻害活性が低く，D体も阻害活性が低いことが認められている。このことは，カテプシンBやLと CANP に対する E-64 の阻害作用は各種の誘導体間で異なるのではないかと考えられる。In vivo E-64 の誘導体の阻害活性では，E-64-b (RR) は in vitro で強い阻害活性を有するにもかかわらず，in vivo ではほとんど阻害活性がなかった。しかし，E-64(L), E-64(D), E-64-c(SS) が特に強い阻害活性を示した。このことは，E-64誘導体によって細胞への取り込み活性が異なることが示されている。In vivo の実験において，誘導体の選択が重要であることを示唆している。大関ら[14]は，E-64, E-64-a, E-64-c の ^{3}H 体を使って in vivo ではそれぞれ阻害剤が素速く肝臓に集まることを報告している。しかし，E-64 (L) と E-64-b (SS) は阻害活性が特に強いが，全体的にみると，E-64 (L)，E-64-b (SS)，E-64-c (SS) の in vivo での阻害活性の消失の時間変化に態度の差異はこの3種で差はみられなかった。私達は以前，ロイペプチンについての時間変化を発表した[5]が，これよりは少し阻害活性の消失時間が遅いようである。しかし，少なくとも，6時間は十分に肝臓中で阻害活性を維持できることが確かめられた。

以上のことより，E-64 (L)，E-64-c (SS) は細胞内でカテプシンBとLを特異的に最も強く阻害し，動物実験で阻害剤として有効に使用できることが解った。この2種の阻害剤は，細胞内タンパク質の分解機構の解明や，それに関与するプロテアーゼの分類の研究に有効であろう。

文　献

1) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J. & Tanaka, I.: Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor, Agric. Biol. Chem., **42**, 523-528, 1978.

2) Sugita, H., Ishiura, S., Suzuki, K. & Imahori, K.: Inhibition of epoxide derivatives on chicken calcium-activated neutral protease *in vitro* and *in vivo*, J. Biochem., **87**, 339-341, 1980.

3) Towatari, T., Tanaka, K., Yoshikawa, D. & Katunuma, N.: Purification and properties of a new cathepsin from rat liver, J. Biochem., **84**, 659-671, 1978.

4) Towatari, T., Kawabata, Y. & Katunuma, N.: Crystallization and properties of cathepsin B from rat liver, Eur. J. Biochem., **102**, 279-289, 1979.

5) Kominami, E., Hashida, S. & Katunuma, N.: Inhibitions of degradation of rat liver aldolase and lactic dehydrogenase by E-64 or leupeptin in vivo, Biochem. Biophys. Res. Commun., **93**, 713-719, 1980.

6) Dean, R. T.: Direct evidence of importance of lysosomes in degradation of intracellular proteins, Nature, **257**, 414-416, 1975.

7) Hopgood, M. F., Clark, M. G. & Ballard, F. J.: Inhibition of protein degradation in isolated rat hepatocytes, Biochem. J., **164**, 399-407, 1977.

8) Seglen, P. P., Grind, B. & Solheim, A. E.: Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methyl amine, chloroquine and leupeptin, Eur. J. Biochem., **95**, 215-225, 1979.

9) Otto, K. & Bhakdi, S.: Zur kenntnis des kathepsins B, Spezitität und Eigenschaften, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **350**, 1577-1588, 1969.

10) Kirshke, H., Langeer, J., Wiederanders, B., Ansorge, S. & Bohley, P.: Cathepsin L, a new thiol proteinase from rat liver lysosomes, Eur. J. Biochem., **74**, 293-301, 1977.

11) Glassetti, D. R. & Murray, Jr. J. R.: Determination of sulfhydryl groups with 2, 2′- or 4, 4′-dithiodipyridine, Arch. Biochem. Biophys., **119**, 41-49, 1967.

12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein mesurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., **193**, 265-275, 1951.

13) Knight, C. G.: Principle of the design and use of synthetic substrates and inhibitors for tissue proteinase, Barrett, A. J., editor, "proteinases in mammalian cells and tissues" North- Holland Pub., 583-636, 1977.

14) 大関正弘, 野津隆司, 諏訪俊男, 河野喜郎：E-64 及びその類縁体の生体内動態に関する研究, 第3回 E-64 研究班会議.

15) 今堀和友：Ca 依存性プロテアーゼと生体制御, 蛋白質, 核酸, 酵素, **25**, 483-491, 1980.

16. カルシウムプロテアーゼと蛋白質燐酸化反応による生理機能の調節に関する研究

I. E-64の生理作用の解析法について

西塚泰美*

研究協力者 高井義美* 岸本明* 川原康洋*
森光寿* 水口龍次* 吉川潮*
于秉治* 佐野公彦* 貝渕弘三*
田渕光* 梶川憲雄*

はじめに

多彩な生体の現象を適応・応答の機序に焦点をあててその化学的基盤を解明することは，今日医学・生物学の重要な研究課題となっている。ことにホルモンや神経伝達物質など，外界シグナルに対する標的組織の受容と応答の機序は最近飛躍的な進展をみせ始めている。このような生体反応の機構は，1958年 Sutherland[1] により cyclic AMP が発見され，いわゆるセカンドメッセンジャーの概念が導入されて以来，多くの知見がもたらされた。そして今では外界シグナルに対する標的組織の多岐にわたる機能の応答，ないし代謝の応答には，蛋白質燐酸化酵素が重要な役目をになうことがあきらかにされつつある。

図1に示すように蛋白質の燐酸化反応，脱燐酸化反応による機能の調節は，その迅速性，可逆性においてあきらかにすぐれた機構であるが，実際にそれは糖代謝や多くの代謝調節において重要な役割を果しており，cyclic AMP は蛋白質燐酸化反応を介して，その生理活性をあらわしていることが確立されている。しかし一方，数多くのホルモンや生理活性物質の作用機序が仔細に解析されるにつれて，生体の受容・応答の機構には cyclic AMP のみではなく，カルシウムもまたきわめて重要な役割を果すことが示唆されるようになった[2]。

今日，カルシウムと代謝調節との具体的なかかわりあいの機序としては次の3つの機構が知られている。その第1はいわゆるモジュレーター蛋白質（カルモジュリン）と呼ばれる蛋白質を介して多彩な機能を発揮する様式であり[3]，その第2は本稿で問題とするカルシウム要求性のプロテアーゼを介する様式[4), 5]，そして第3は蛋白質燐酸化酵素の活性化を通して多岐にわたる機能を発揮する様式である[6), 7]。ことに第3の蛋白質燐酸化酵素を介するカルシウムの働きは，cyclic AMP と対立するホルモンや生理活性物質の受容・応答と直接関連する可能性が強い。この種の蛋白質燐酸化酵素は生体にきわめて広く分布しており，脳やリンパ球，血小板等，組織によっては cyclic AMP に対応する蛋白質燐酸化酵素よりも数十倍の活性が認められる。その活性化には2つの過程があり，カルシウムと燐脂質の代謝が共役する可逆的活性化の過程の他に，上述のカルシウムプロテアーゼによる限定分解が関与する不可逆的活性化の過程がこれであって，いずれの場合にもカルシウムイオンを必須不可欠としている。この2つの活性化の過程はそれぞれその機作が異なっているが，最終的な蛋白質燐酸化反応による生体

* 神戸大学医学部第2生化学教室

Ⅳ In vitro の効果

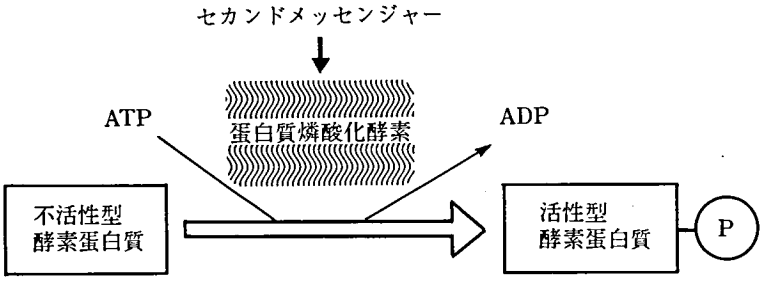


図1　蛋白質の燐酸化反応

制御の効果は同一であり，多岐多彩におよぶ生体の受容と応答，生理現象に果す役割はきわめて大きく，cyclic AMP と並ぶ重要性をになうものと予想される。

筋萎縮症の進行とカルシウムプロテアーゼとの関連を中心課題とする本研究班に参加する機会にめぐまれたのを契機として，今回，我々は上述のような生体の受容と応答の機序においてカルシウムプロテアーゼがどの程度の意義をもち，生体反応の調節に役割を果しているのかについて，解析を実施しようとした。ことにその解析には，種々の外界シグナルのトランスメンブレンコントロールに働く上記の蛋白質燐酸化酵素の可逆的・不可逆的活性化というきわめて好都合のパラメーターが存在し，それぞれの活性化の過程を選択的に抑制することによって，逆にその重要性を推定することが可能であると考えたからである。

実際にはいくつかの問題点があることが判明し，なお解決しなければならない点が見出されたが，以下では昭和54年度に得られた成果の概略について中間的に報告する。簡単のためこの種の蛋白質燐酸化酵素をCキナーゼ，これに対して cyclic AMP の生理活性の発揮に中心的役割を果す蛋白質燐酸化酵素をAキナーゼと呼ぶこととする。両者はいずれも多岐にわたる触媒活性を有しており，生体内では pleiotropic な役割を果すものであるがこの点については次回に譲り，ここでは主としてCキナーゼの活性化反応とカルシウムプロテアーゼに焦点をあてたい。なおカルシウムプロテアーゼは以下Ca^{2+}プロテアーゼと記載する。

材料及び方法

(1) 材料

本研究には主としてラットの脳を材料とし，その他必要に応じてヒトの血小板を用いた。Cキナーゼ及びCa^{2+}プロテアーゼはラット脳より前報にしたがい調整した[8]。

各種の燐脂質は赤血球より抽出分画した他，オレイン酸，ジオレイン，その他の中性脂質は市販品を用いている[9]。本実験に使用したシナプス膜はラット脳より Krueger ら[10]の方法にしたがい調整した。蛋白質燐酸化反応の基質として用いたヒストンは仔牛胸腺から前報にしたがい調整した[11]。A23187はエーライリリー社，E-64 は大正製薬より寄贈をうけた他，ジブカイン等の種々の薬剤は各社より寄贈されたものを用いた。

(2) 酵素活性の測定

CキナーゼはH1ヒストンを基質として，燐脂質，ジオレイン，カルシウムの存在下に〔γ-^{32}P〕ATP よりの放射能のとり込みを測定した。またCa^{2+}プロテアーゼの活性測定はCキナーゼを基質として用い，その限定分解の結果あらわれるキナーゼ活性をH1ヒストンを基質として測定した[8]。

(3) その他の方法

血小板の凝集はアグリゴメーターを用いて測定した。放射能の測定は Nuclear-Chicago 社製ガスフローカウンターを主として使用した。なお，各試薬はCa^{2+}を除去するため Chelex 100 のカラムを通し，蒸留水はいずれも石英ガラスによる二重蒸留を実施して調整した。

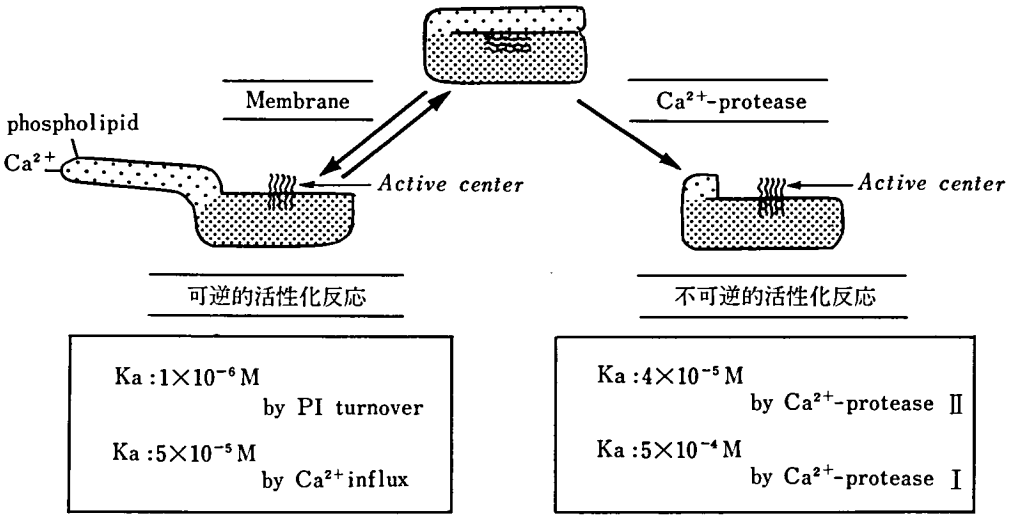


図2　蛋白質燐酸化反応の活性化様式と Ca^{2+} の濃度

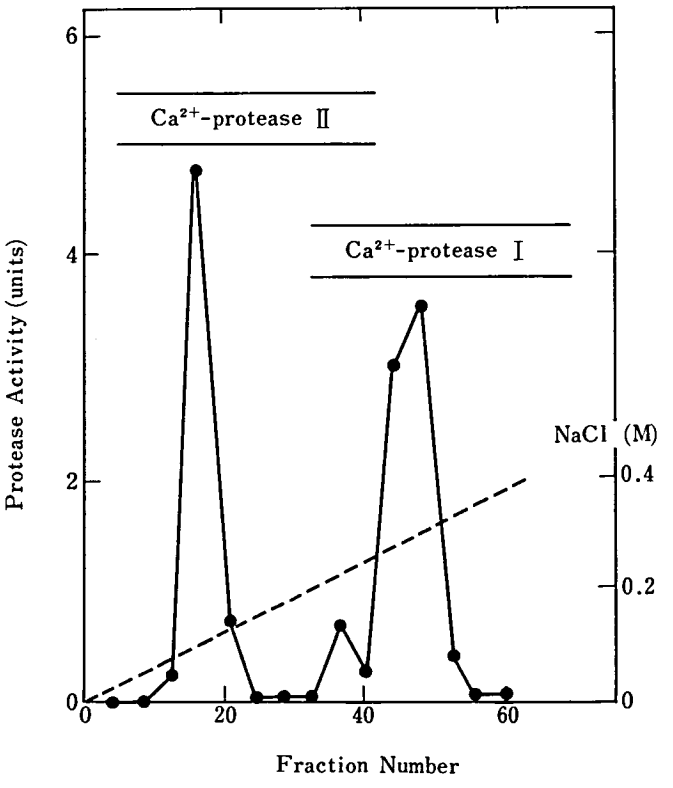


図3　脳における2種の Ca^{2+} プロテアーゼ
(DEAE-Cellulose column chromatography)

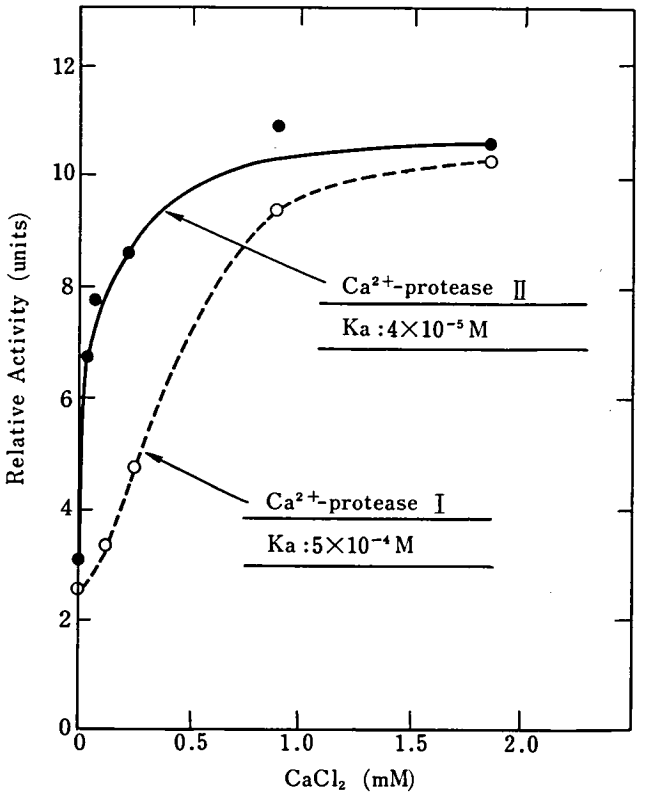


図4　2種の Ca^{2+}プロテアーゼと Ca^{2+} 濃度

表1　種々の蛋白質燐酸化酵素とその活性化反応

Protein kinase	Activator	Proteolytic activation by Ca^{2+}-protease	Proteolytic activation by Trypsin
A-Kinase	Cyclic AMP	−	+
G-Kinase	Cyclic GMP	−	+
C-Kinase	Ca^{2+}, phospholipid	+	+
b-Kinase	Ca^{2+}, calmodulin	+	+
MLC-Kinase	〃	?	+

結　　果

(1) 蛋白質燐酸化酵素の概要とCキナーゼ

外界情報の細胞内伝達物質，すなわちセカンドメッセンジャーとして今日では cyclic AMP, cyclic GMP 及び Ca^{2+} の3者が注目を集めているが，表1はこれらの伝達物質に対応する種々の蛋白質燐酸化酵素の一覧表である。表中のA及びCキナーゼは上述の酵素であり，Gキナーゼは cyclic GMP によって選択的に活性を顕わす酵素である[12]。この3者はその機能が多彩である点で多くの類似性，共通性が認められる[6]。これに対してbキナーゼ，MLCキナーゼとはそれぞれホスホリラーゼbキナーゼ，ミオシンL鎖キナーゼであり，いずれも Ca^{2+}-モジュレーター蛋白質によって活性化されるが，

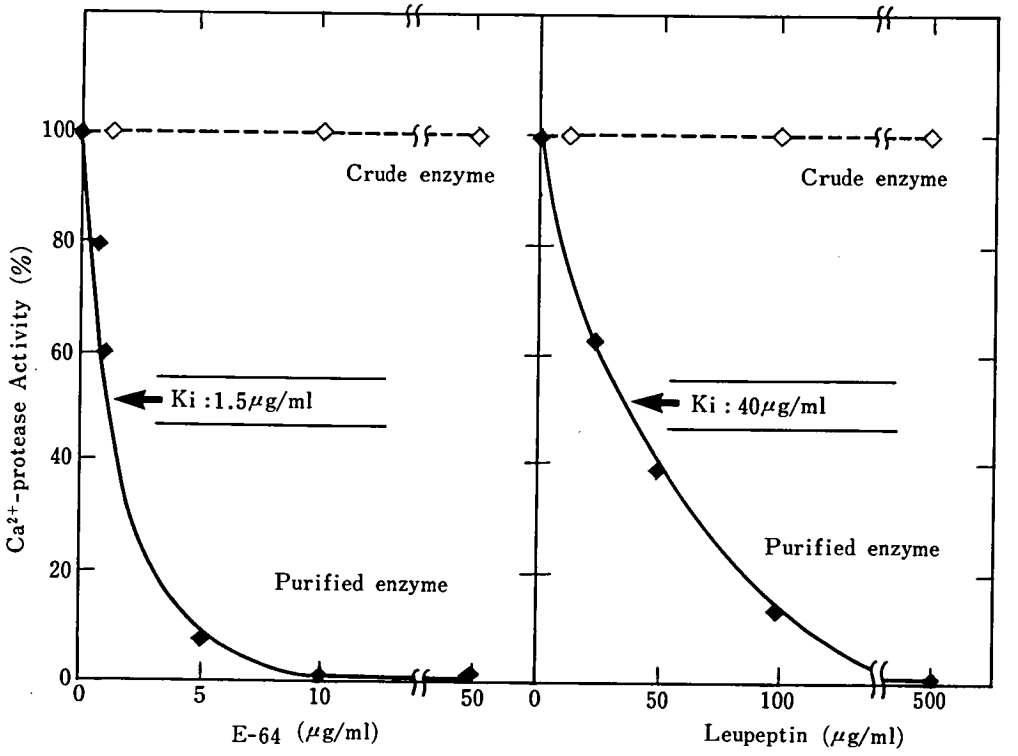


図5　脳 Ca^{2+}プロテアーゼに対する阻害効果

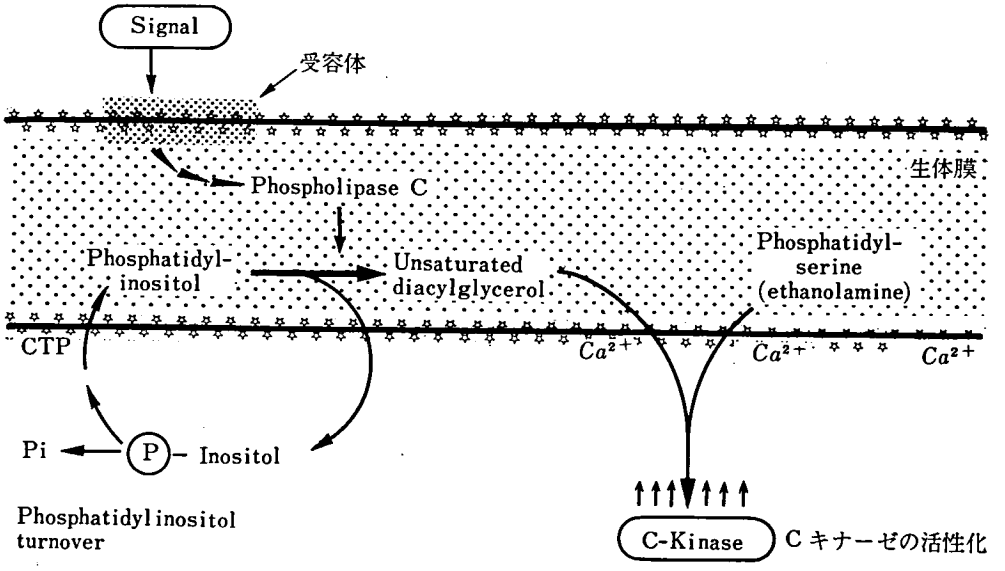


図6　Cキナーゼの可逆的活性化機構

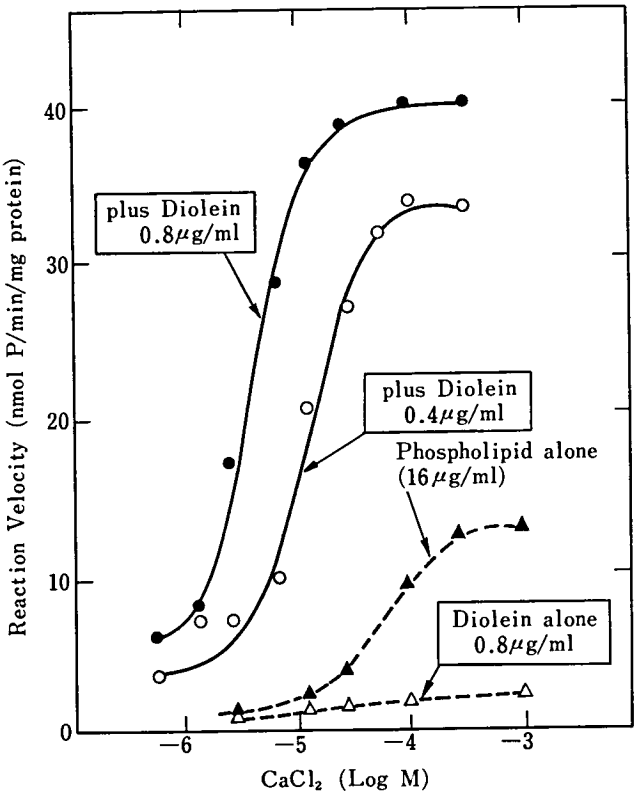


図7 Cキナーゼのジグリセリドによる活性化現象

その機能は両者ともやや限定されていて，その活性化様式も異なっている。この中でその活性及び機能の点から，外界情報の伝送・増幅にもっとも重要と考えられるものはAキナーゼとCキナーゼである。Gキナーゼは節足動物では重要と思われるが量的には哺乳動物においては著しく少なく，その意義は今日もなお不明である。これらの蛋白質燐酸化酵素はいずれもトリプシンによって限定分解をうけて活性を保持するフラグメントが得られるが，Ca^{2+}プロテアーゼによって活性化現象が確認されているのはCキナーゼとbキナーゼのみである。

以下に焦点をあてるCキナーゼではこのような限定分解による不可逆的な活性化様式と，生体膜の燐脂質が関与する可逆的な活性化様式とが認められ，その様子を図2に模式的に示した。可逆的な活性化様式については後に詳しくのべるが，この場合には生体膜を構成する燐脂質とCa^{2+}が必要であり，イノシトール燐脂質の代謝回転と共役している場合には10^{-6}M以下のCa^{2+}により，またCa^{2+}の流入によって活性化される場合には10^{-5}M程度のCa^{2+}が関与する。これに対してCa^{2+}プロテアーゼによる限定分解によって活性化される場合には，このプロテアーゼのCa^{2+}要求性が問題となるが，従来はこの種のCa^{2+}プロテアーゼは10^{-4}M程度のCa^{2+}を要求する点でその生理機能には疑義がもたれていた。しかし，最近になり10^{-5}M程度のCa^{2+}によって充分に活性をあらわすCa^{2+}プロテアーゼが見出され，限定分解によるCキナーゼの活性化の様式も生理的に存在しうる可能性を考慮する必要が生じてきた。そこでまずこれらのCa^{2+}プロテアーゼとともに，不可逆的なCキナーゼの活性化様式について概要をのべたい。

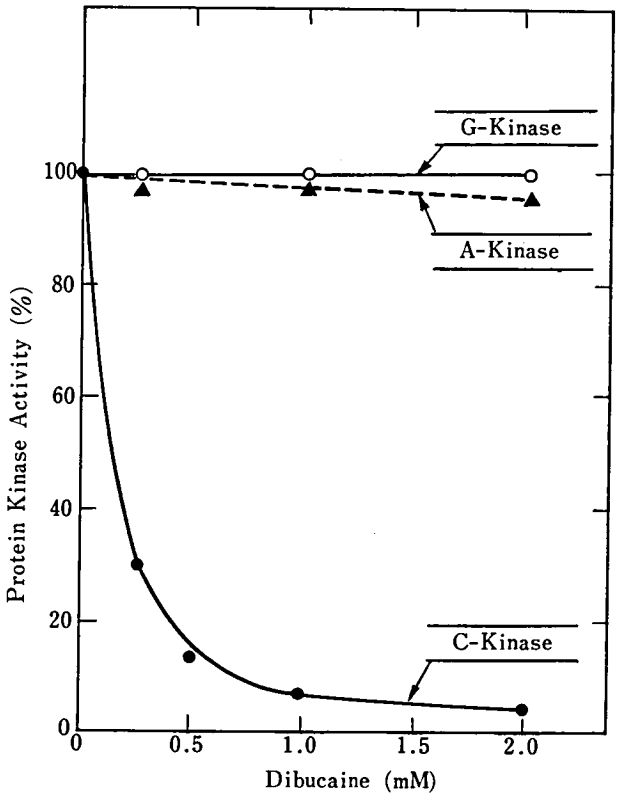


図8　ジブカインによるCキナーゼの選択的阻害

(2) Ca^{2+}プロテアーゼによるCキナーゼの不可逆的活性化反応とその選択的抑制

Cキナーゼは分子量約77,000と推定され，通常は不活性型として可溶性分画に存在するが，Ca^{2+}プロテアーゼによって限定分解をうけると分子量は約51,000のフラグメントが生成する。これはCa^{2+}，燐脂質と無関係にそれ自身で活性を顕わすので，見かけの上では図2のように，活性を抑制していた部分が除去されたように見える。Ca^{2+}プロテアーゼについては最近 Mellgren[13] は犬の心筋中にCa^{2+}が低濃度において活性を示す酵素の存在を報告しているが，同様にラットの脳などにもこの種のCa^{2+}プロテアーゼを見出すことができる。通常の温度に対しては著しく不安定のため，やや低温(15°C)において活性を測定すると図3に示すように2種のCa^{2+}プロテアーゼがDEAEセルロースのカラムクロマトグラフィーによって分離される。試験管番号45～50付近のCa^{2+}プロテアーゼⅠは従来見出されていた酵素であるが[8]，低濃度の食塩によって溶出されるCa^{2+}プロテアーゼⅡは分子量8万前後であり，きわめて不安定な酵素であって容易に活性が消失する。しかし，図4に示すようにCa^{2+}濃度は約10分の1，すなわち10^{-5}Mで充分の酵素活性を示すことができる。この両Ca^{2+}プロテアーゼの相互の関係は不明である。なお，Ca^{2+}プロテアーゼⅠはCa^{2+}濃度に対してややS字状をなすがこの理由も今の処不明である。

さて，E-64によるこれらCa^{2+}プロテアーゼの活性抑制であるが，両プロテアーゼともにE-64，ロイペプチンによってきわめて強く抑制され，その模様を図5に示した。しかし，非常に特長的なことにこれらの阻害程度，すなわちプロテアーゼ阻害剤の効力は酵素の純度と密接に関係しており，図5のようにある程度純化し

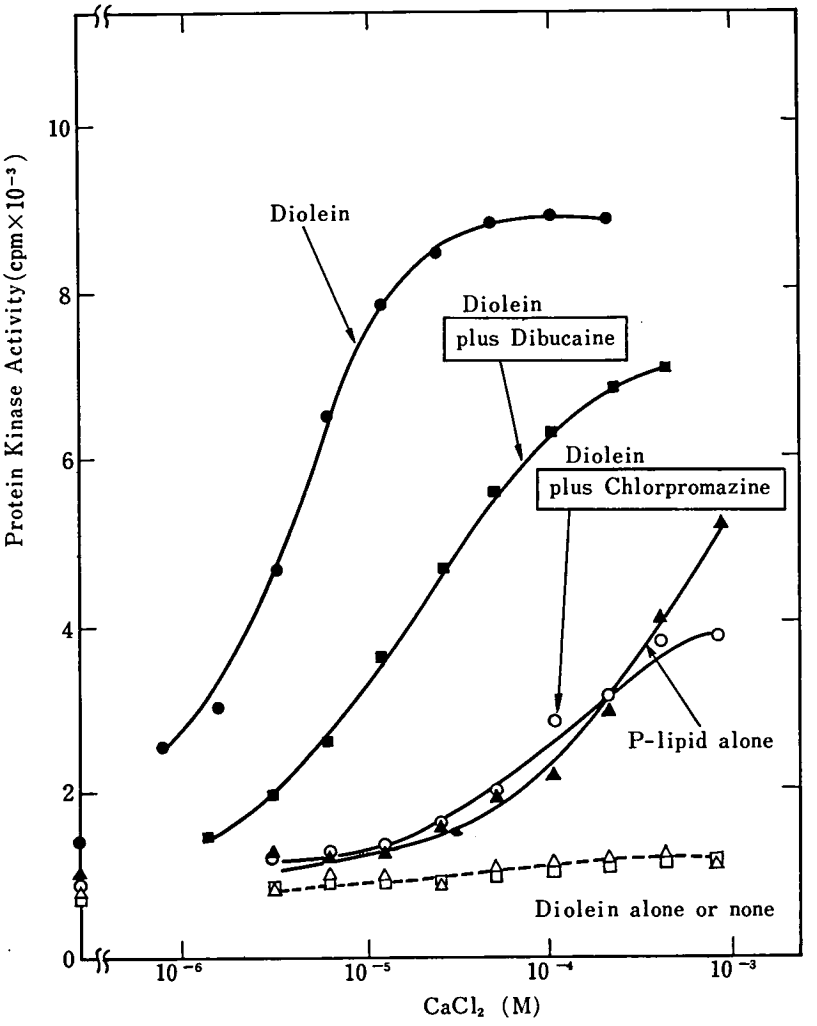


図9　Cキナーゼの阻害様式

た Ca^{2+}プロテアーゼに対してはきわめて強力な抑制を示し，K_i 値は非常に低い。しかし，比較的夾雑物の多い粗抽出液においてはほとんど阻害効果が認められず，1 mg/ml の高濃度においてようやく数十パーセントの抑制が認められるにすぎない。この事は非常に重要な点であり，後述のようにCa^{2+}プロテアーゼの生理的機能を判定する上において問題になるように思われる。

これらの結果からCキナーゼの Ca^{2+}プロテアーゼによる活性化現象は生理的な Ca^{2+} 濃度において充分あり得るものと推定されるが，しかしこの過程を E-64 やロイペプチンによって選択的に抑制することは純粋な酵素系では100% 可能であるが，生体内で可能であるとは考えられない。この点については後に論議することとしたい。

(3) 燐脂質によるCキナーゼの可逆的活性化反応とその選択的抑制

次にCキナーゼの可逆的活性化反応についてはその概要を図6に示しているが，この過程は，従来より観察されているイノシトール燐脂

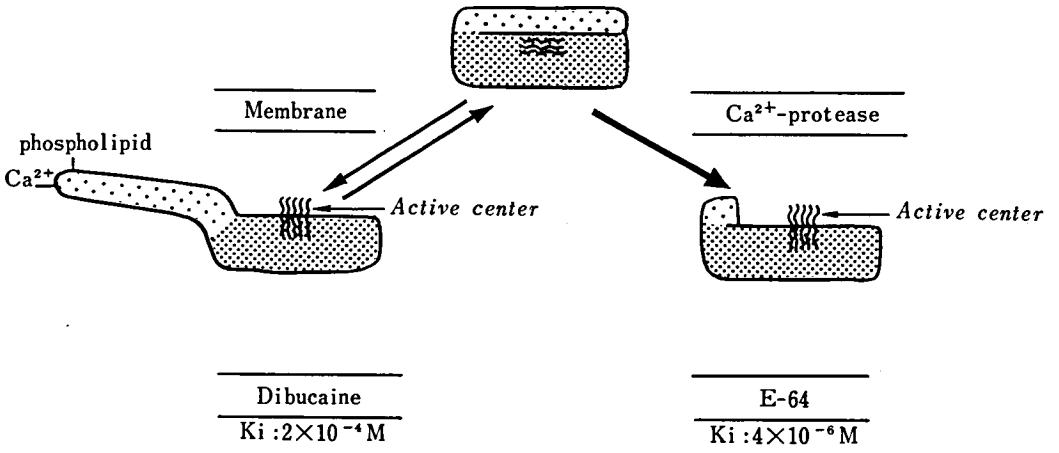


図10 蛋白質燐酸化酵素活性化反応の選択的阻害

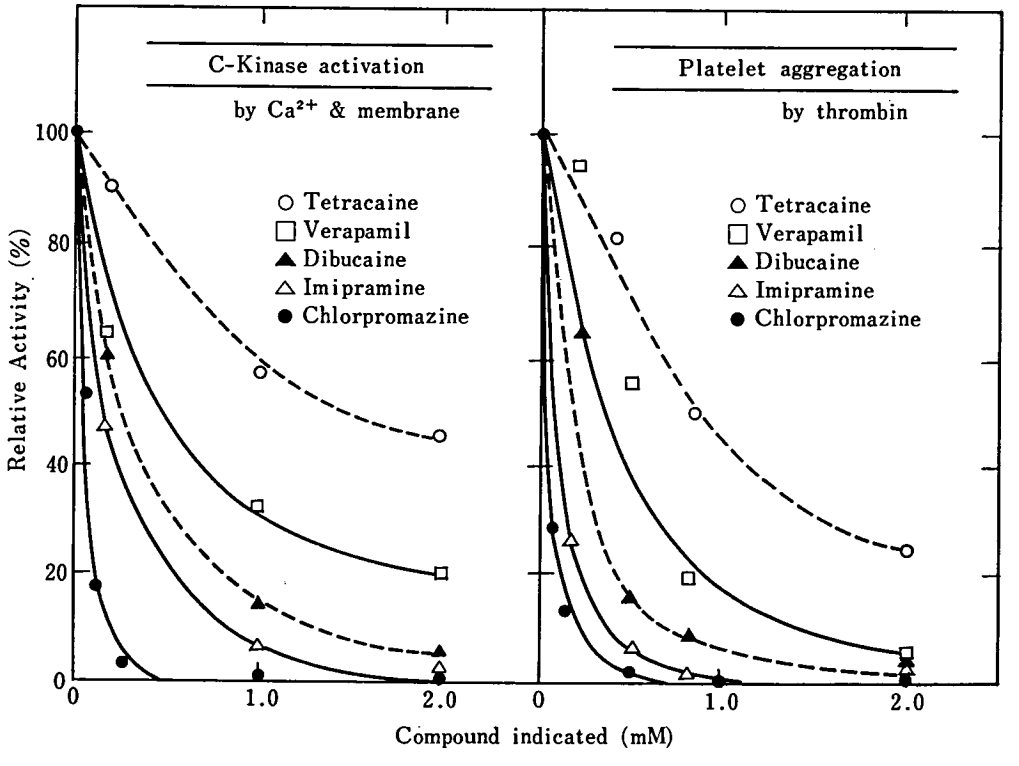
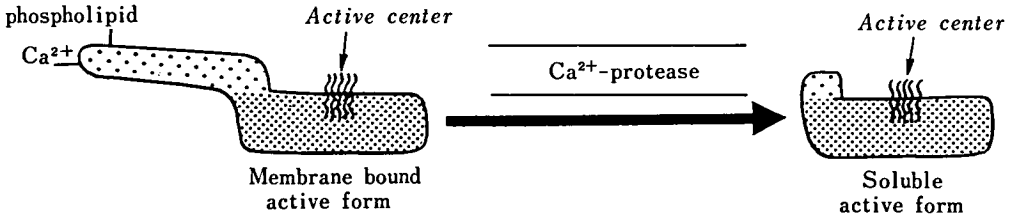


図11 Cキナーゼの可逆的活性化反応と血小板凝集反応



	Membrane bound active form	Soluble active form
minus Ca^{2+}-protease	78 %	22 %
plus Ca^{2+}-protease	13 %	87 %

図12 生体膜結合性Cキナーゼの限定分解による細胞質への移行

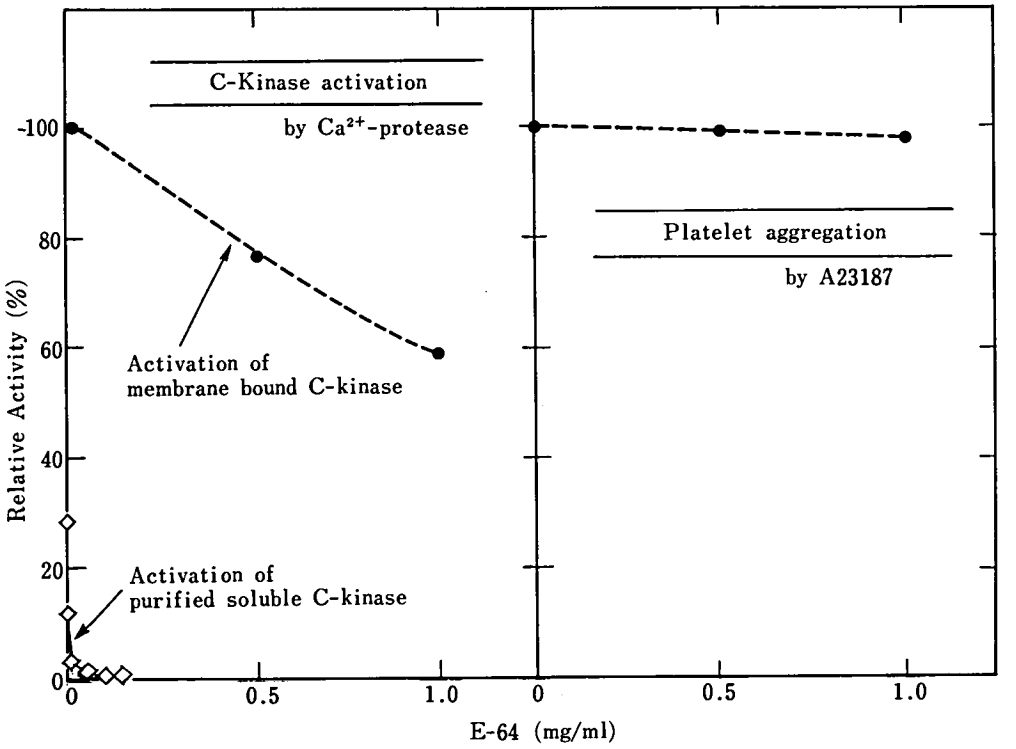


図13 Cキナーゼの不可逆的活性化反応と血小板凝集反応

質の代謝回転と密接な関係があり，細胞膜における燐脂質の代謝が重要な意義をもっている。イノシトール燐脂質の代謝回転は約25年前，Hokin によってアセチルコリン感受性の組織においてはじめて観察された[14]。この現象は外界のシグナルによってイノシトール燐脂質が特異的に分解され，イノシトール燐酸とジグリセリドが産生される反応であるが，観察される現象としては再合成の過程で放射性のイノシトールや燐酸がこの燐脂質へ再びとり込まれてゆく事実を指している。この現象はその生理的意義が不明のまま生体受容機構との関係が重視され，今日まで莫大な研究が行われ，当初のアセチルコリンのみでなく，cyclic AMP を介さない今一群のホルモンや生理活性物質の作用に際して認められている[15]。今日の処，これら多数の外界シグナルがどのような機序によって標的細胞膜のイノシトール燐脂質を選択的に加水分解するかはあきらかではないが，今回の我々の解析によって，ここに生成するジグリセリドがCキナーゼの活性化の引き金をひいていることが見出された[9),16]。すなわち図6のように，ジグリセリドが cyclic AMP と同様にセカンドメッセンジャーとして作用しており，細胞膜の脂質2重層をなす燐脂質，中でもセリン燐脂質と共同してCキナーゼを生体膜に結合させ，その活性を発揮させるというきわめてユニークな機序が働いている。この過程は可逆的であり，Ca^{2+} が必要であって，Ca^{2+} を除去するか，ジグリセリドが消失すればCキナーゼは再びもとの不活性型となる。換言すると，生体膜の脂質2重層の中で，外界シグナルの作用に際して何らかの機序でホスホリパーゼCが作用し，イノシトール燐脂質の極性基が除去されると，これが引き金となってCキナーゼが生体膜に結合して活性化するという仕組みである。この作用の結果としてジグリセリドは再び燐脂質に再合成されるが，これが久しく多くの研究者によって観察されていたイノシトール燐脂質の代謝回転である。

図7はこの代表的な実験成績である。Cキナーゼの活性の発現には燐脂質のみではなく，微量のジグリセリド，この実験においてはジオレインが共存すると著明に活性が上昇し，同時に必要な Ca^{2+} の濃度が著しく低下することを示している。すなわち 10^{-6}M 程度の生理的な濃度の Ca^{2+} が存在する条件では，Cキナーゼの活性は事実上ジグリセリドの存在に依存しており，したがってジグリセリドがいわばセカンドメッセンジャーとして作用してCキナーゼを活性化しているといえよう。このことは外界シグナルによりアデニル酸シクラーゼが活性化され，ATP から cyclic AMP が産生され，これがセカンドメッセンジャーとしてAキナーゼを選択的に活性化することと対比することができる。

この種のジグリセリドとしては不飽和脂肪酸を含有することが必須条件であり，オレイン酸，リノール酸，リノレン酸，アラキドン酸などが少くとも2位に1個存在すればよい[9),16]。実際，高等動物組織に存在するイノシトール燐脂質はほとんど100％ 2位にアラキドン酸を含有していることが特長的であるので，外界シグナルによりイノシトール燐脂質から産生するジグリセリドはCキナーゼの活性化の引き金を引くことができる。一方，燐脂質の特異性としてはセリン燐脂質がもっとも有効であり，ついでエタノールアミン燐脂質が僅かの活性を示すのみでコリン燐脂質は全く無効である。したがって生体膜を構成する燐脂質にはそれぞれ独自の機能分担があり，このCキナーゼの活性化に関するかぎり，イノシトール燐脂質とセリン燐脂質とが共同して働き，外界シグナルの受容機構において重要な役割を果している[16]。

次に Ca^{2+} の特異性はきわめて高く，Sr^{2+} がわずかに有効である以外は，他の金属は全く無効である。ところで上述の機構によれば，Ca^{2+} の濃度変化は必ずしも必要ではなく，イノシトール燐脂質の加水分解がCキナーゼの活性化の引き金となっている。しかし，図6の結果からみればジグリセリドの生成を伴わずとも Ca^{2+} の濃度の上昇のみによってもCキナーゼが活性化しうることがあきらかである。したがってCキナーゼの可逆的な活性化反応においてもCa^{2+}

の濃度に対応して種々の機構が働きうるものと考えられる。

以上のようにCキナーゼは生体膜の燐脂質の代謝と共役し，Ca^{2+} の存在下に活性を発現するが，この過程はすでにのべたように可逆的である。そしてこの過程を特異的に抑制することが可能である。ジブカインやテトラカイン等の局所麻酔剤やクロルプロマジン等のトランキライザー，その他の薬物の中には燐脂質と結合して，それ本来の作用以外に，種々の細胞の活動を抑制するものが知られており，近年多くの細胞生物学的解析にもちいられている[17]。これらの薬物は，興味のあることにCキナーゼの可逆的な活性化の過程のみを選択的に抑制することができる。図8はその一例であり，Cキナーゼがジブカインによって阻害されることを示している。この阻害現象はCキナーゼの活性中心の抑制ではなく，燐脂質と結合することによる活性化の抑制に基づいている。したがって先にのべた限定分解によって活性をあらわしたCキナーゼはジブカインによっては全く抑制されない。図9にあげる解析を含めて，種々の検討の結果この種の抑制は燐脂質と競合的であり，Ca^{2+} やジグリセリドとは関係しないことがあきらかになっている。なお，ジブカイン等の薬剤は先にのべた Ca^{2+}プロテアーゼには作用しないため，不可逆的なCキナーゼの活性化反応は抑制しない。

以上の結果を総合すると，Cキナーゼの活性化とその抑制は図10に示すように理解される。すなわちCキナーゼには可逆的及び不可逆的な2つの活性化の様式があり，いずれも比較的幅広い Ca^{2+} 濃度の変化に対応して作動するように仕組まれている。そしてそれぞれの過程はこれを選択的に抑制することが可能である。すなわち生体膜の関与する可逆的過程はジブカイン等の薬剤により，Ca^{2+}プロテアーゼによる不可逆的過程は E-64 等のプロテアーゼ阻害剤によって抑制することができる。そこでこの現象を利用して Ca^{2+} プロテアーゼの生理機能の調節に果す意義を知るべく，以下においては血小板を用いて細胞レベルの実験を企画した。

(4) 血小板凝集反応における Ca^{2+}プロテアーゼの関与の評価

ヒトの血小板はトロンビンや ADP，コラーゲン等に反応して凝集し，セロトニンを遊離する他，プロスタグランジン等によってその抑制が認められる等，多彩な応答反応を示すため，ホルモン作用の類型として古くから多くの研究がおこなわれている。実際，血小板にはCキナーゼの含量が著しく多く，Aキナーゼの20倍以上の活性が認められる。血小板をトロンビンで刺激するとイノシトール燐脂質が速やかに分解されジグリセリドが生成され，Cキナーゼが活性化される。そしてCキナーゼが血小板内での蛋白質燐酸化反応に関与していることを強く示唆する成績が得られている。

図11はこの事を示唆する実験成績の一つであるが，Cキナーゼの可逆的な活性化反応と血小板のトロンビンによる凝集反応がいずれも数多くの薬剤によって平行して抑制されることを示している。この際，実験成績は示していないが，血小板内の蛋白質燐酸化反応もまた平行して抑制されることがあきらかになっている。したがってトロンビン刺激による血小板の応答に際して，可逆的なCキナーゼの活性化反応が重要な役割を果すことが強く示唆される。

次に不可逆的活性化反応の役割を知る目的から次の解析を行った。A23187 は Ca^{2+} 流入を促進し，トロンビンと同様に血小板の凝集をひきおこすことがすでに確立されており，血小板内の蛋白質の燐酸化反応を促進することもあきらかとなっている。そこで，この際，Ca^{2+}プロテアーゼによるCキナーゼの不可逆的活性化反応が作動するか否かがきわめて興味のある点である。実際，血小板には多量のCa^{2+}プロテアーゼが存在しており，試験管内の解析によると図12に示すように生体膜に結合して活性をもっているCキナーゼにも Ca^{2+}プロテアーゼが作用し，可溶性分画へ活性型のCキナーゼを移行させる能力をもっている。しかしすでにのべたように，E-64 は粗抽出液中，あるいは生体内における Ca^{2+}プロテアーゼを抑制し得ないため，A23187 による血小板の反応における不可逆的

活性化反応，すなわちCa^{2+}プロテアーゼの生理機能に関しては明瞭な結論に達することは出来なかった。図13はA23187による血小板の凝集も，生体内に近い条件におけるCキナーゼの不可逆的活性化反応も，いずれもE-64は抑制し得ないことを示している。しかし，これらの結果はA23187による血小板の反応に際してはCa^{2+}プロテアーゼが重要な役割を果す可能性を残すものであろう。

考　　察

今回の解析によってCa^{2+}プロテアーゼが果す機能が確立されたわけではないが，少なくともその意義を知りうる実験系を開拓することができたように思われる。この解析の途上，E-64は純粋な酵素の実験系においてはCa^{2+}プロテアーゼの強力な阻害剤として作用するが，生体内においてはほとんど無効に近いことが示唆され，そのためにCa^{2+}プロテアーゼの果す生理的役割を知ることには現段階では限界があることが判明した。今後生体内でも作用しうる強力なCa^{2+}プロテアーゼの抑制剤を開発することによって，プロテアーゼの生体制御に果す意義とその重要性を評価することができると考えられる。

本稿は与えられた課題に対しては現段階では中間的な報告にとどまっているが，しかし少なくとも蛋白質燐酸化反応，とくにCキナーゼの可逆的，不可逆的活性化反応をパラメータとして，1つの解析の緒口が得られたように思われる。これまで全く推定の域を出ていない限定分解反応のもつ生物学的意義に関して，今後種々の実験系をもちいて解析を続けたいと考えている。

昭和54年度の報告を終えるに当って，本研究の推進に当り，多大の御支援と御助言を賜わった今堀和友教授，ならびに大正製薬株式会社の各位，厚生省新薬開発研究助成に対して深い感謝の意を捧げたい。

文　　献

1) Rall, T. W. & Sutherland, E. W.: Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles, J. Biol. Chem., **232**, 1065, 1958.

2) Rasmussen, H. & Goodman, D. B. P.: Relationships between calcium and cyclic nucleotides in cell activation, Physiol. Rev., **57**, 421, 1977.

3) Cheung, W. Y.: Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation, Science, **207**, 19, 1980.

4) 今堀和友：筋肉のCa^{2+}依存性プロテアーゼ，代謝，**16**, 139, 1979.

5) 岸本明，森光寿，高井義美：肝臓のCa^{2+}依存性プロテアーゼ，代謝，**16**, 147, 1979.

6) Nishizuka, Y., Takai, Y., Hashimoto, E., Kishimoto, A., Kuroda, Y., Sakai, K. & Yamamura, H.: Regulatory and functional compartment of three multifunctional protein kinase systems, Mol. Cell. Biochem., **23**, 153, 1979.

7) Nishizuka, Y.: Three multifunctional protein kinase systems in transmembrane control, Chemical Recognition in Biology (Chapeville, F. & Haenni, A. L. eds), Springer-Verlag, Berlin, in press, 1980.

8) Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y. & Nishizuka, Y.: Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain, J. Biol. Chem., **252**, 7610, 1977.

9) Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. & Nishizuka, Y.: Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover, J. Biol. Chem., **255**, 2273, 1980.

10) Krueger, B. K., Forn, J. & Greengard, P.: Depolarization-induced phosphorylation of specific proteins, mediated by calcium ion influx, in rat brain synaptosomes, J. Biol. Chem., **252**, 2764, 1977.

11) Hashimoto, E., Takeda, M., Nishizuka, Y.,

Hamana, K. & Iwai, K.: Studies on the sites in histones phosphorylated by adenosine 3′: 5′-monophosphate-dependent and guanosine 3′: 5′-monophosphate-dependent protein kinases, J. Biol. Chem., **252**, 6287, 1976.

12) Kuo, J. F. & Greengard, P.: Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. VI. Isolation and partial purification of a protein kinase activated by guanosine 3′, 5′-monophosphate, J. Biol. Chem., **245**, 2493, 1970.

13) Mellgren, R. L. : Canine cardiac calcium-dependent proteases: resolution of two forms with different requirements for calcium, FEBS Lett., **109**, 129, 1980.

14) Hokin, L. E. & Hokin, M. R. : Effects of acetylcholine on the turnover of phosphoryl units in individual phospholipids of pancreas slices and brain cortex slices, Biochim. Biophys. Acta., **18**, 102, 1955.

15) Michell, R. H. : Inositol phospholipids in membrane function, Trends Biochem. Sci., **4**, 128, 1979.

16) Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T. & Nishizuka, Y.: Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system, Biochem. Biophys. Res. Commun., **91**, 1218, 1979.

17) Seeman, P. : The membrane actions of anesthetics and tranquilizers, Pharmacol. Rev., **24**, 583, 1972.

17. Ca 依存性中性プロテアーゼ (CANP) に対する E-64 の効果

今 堀 和 友*

研究協力者 鈴 木 紘 一* 辻 崇 一*
久保田俊一郎* 木 村 吉 雄*
石 浦 章 一*

I. 筋崩壊とプロテアーゼ

急激に壊死に陥った筋線維を電顕的に観察すると筋線維が部分的に過収縮 (hypercontraction) している像を見ることがある。これは通常の強い収縮ではなく，Z線をミオシンフィラメントとアクチンフィラメントが突き抜けるように収縮し，もはやもとには戻れなくなってしまった像である。ここではフィラメントの区別がつかなくなり，過剰に収縮しているため横断面を見ると膨化して正常筋線維よりも直径が大きい。この像は，電顕切片作製上の人工産物であるとの批判も出たが，正常人の細胞にはほとんど見られず，ミオパチー，特に Duchenne 型筋ジストロフィー症に多く見られる事実であること，また貪食細胞 (phagocyte) を含むことがあること，付近に再生線維が観察されることなどから疾患に特徴的な現象であると考えられている。このように Duchenne 型筋ジストロフィー症などの進行性筋萎縮を呈する疾患でのみ過収縮現象を見るということは，この現象そのものが筋線維崩壊の異常な亢進を反映していると考えてさしつかえないであろう。以下，この過収縮の原因と，現在までに得られた過収縮線維の性質をまとめてみる。

電顕で観察された過収縮線維の一番の特徴は，それを囲む基底膜 (basement membrane) には変化がないが，多くの場合その原形質膜 (plasma membrane) に損傷があることで，これは多くの研究者によって指摘されているところである。電顕観察では，その現象が原因であるのか，過収縮の結果生じたものであるのかは議論できないが，単純に考えると損傷が生じた結果筋細胞外の Ca^{2+} が細胞内に流入し，そのために一瞬にしてA及びIフィラメントのすべりが起こり，同時に筋小胞体の機能が破壊されて不可逆的に収縮したままになり，その後タンパク分解作用を受けてフィラメントの区別がつかなくなるまでに部分消化を受けたものと考えられる。過収縮線維中の Ca 濃度は，Engel ら[1] によって組織化学的に測定されており，GBHA 染色より 2～3 mM とされている。もしもそうなら，このように高い濃度の Ca^{2+} により活性化されるプロテアーゼがこの分解を行うと考えることができる。

II. Ca 依存性プロテアーゼ (CANP) の定義

Ca 依存性プロテアーゼという言葉は，活性発現に Ca^{2+} を必要とするプロテアーゼを総称するように思われ，たとえば微生物由来のサモライシンなどもこれに属するようにみえる。しかしここで述べようとするのは，動物の臓器中（本稿ではとくに筋肉中）に存在する Ca^{2+} で活性化される中性プロテアーゼ (calcium activated neutral protease, CANP と略す) のことを意味するものであることを了解してい

* 東京大学医学部第二生化学教室

ただきたい。

この種のプロテアーゼの存在は1968年 Huston と Krebs[2] とにより，ウサギ筋肉中にホスホリラーゼキナーゼを限定加水分解することにより活性化する因子として発見された。彼らはこれを kinase activating factor (KAF) と命名した。その後この種のプロテアーゼの存在は多くの人々によって確認され，種々の名称がつけられている。Busch[3] は筋細胞の細胞質に，そのZ帯を分解する能力を有する因子がやはり Ca^{2+} で活性化されることを発見し，これを CASF (Ca^{2+} activated salcomic factor) と名づけた。また Reddy ら[4] は同様な因子に CAF (Ca^{2+} activated factor) と名づけた。

このように，KAF, CASF, CAF など種々の名がつけられたのは，それぞれの機能に着目したことによるが，もう1つこれら因子になるものが精製されておらず，まったく同一の酵素なのか，異なるものかの判定さえつかないことにも由来している。最近までのところ Dayton らがブタの筋肉から85%まで精製したというのが最高の精製であった[5),6)]。

そのような情勢に基づき，筆者らは種々の生物より，Ca 依存性プロテアーゼの完全精製に着手し，これに成功した[7)]。これは活性発現に 1 mM 程度の Ca^{2+} を必要とすること，至適 pHが中性にあることなどの特色を有するので，これを前述のように CANP (Ca^{2+} activated neutral protease) という名を付することにした。

すなわち，完全精製によってこれが単純蛋白質であり，蛋白分解酵素以外の何ものでもないことが明らかになったから，正体不明のものにつける因子 (factor) という名前を排し，正式にプロテアーゼと認定したことになる。一方，CANP と，KAF, CASF, CAF については，現在必ずしも明確なことはいえないが，筆者らの CANP が，KAF, CASF としての性質をそなえていることは明らかであるから，同一物と考えてよいと思われる。筆者らの CANP が筋肉より抽出したものであるから，RTF や，C-キナーゼ活性化プロテアーゼ（脳と肝臓）と同一物か否かは判定しがたい。ただ筆者らは精製した CANP に対する抗体をもっているので，これを用いて免疫的に同一であるか否かは判定できると思う。

むしろ CANP とはいっても，生物種によりやや性質を異にする点に注目しなければならない。反応機構その他は共通であっても，たとえばトリとウサギの CANP は免疫学的にはほとんど交叉せず，またサブユニット構造も異にしている。したがって今後はむしろ，どの生物種より得られた CANP であるかを明記することのほうが大切と考えられる。

Ⅲ. CANP の精製と性質

著者らは，トリ[7)]，ウサギ[8)]，ヒト[9)]などの筋肉よりそれぞれ CANP を完全精製したが，その操作を表1に示してある。表1はトリの胸筋

表1 CANP の精製

精製段階	全蛋白質量 (mg)	全活性 (単位)	比活性 (単位/mg)
粗抽出液	49,400	3,850	0.078
pH 4.9 沈殿	1,330	2,960	2.23
第1回 DEAE	36.8	2,680	72.8
ウルトロゲル	12.0	1,140	95.0
第2回 DEAE	4.0	980	213.0

1 kg より出発したものの例であるが，他の材料についても同じ方法で行うことができた。すなわち胸筋 1 kg を3倍量の炭酸ナトリウム緩衝液，1 mM EDTA とともにブレンダーを用いてホモジナイズし，10,000g，15分の遠心で上清をとり，これを粗抽出液とする。次にこれを pH 4.9 にすることにより等電沈殿を得るわけであるが，これは精製における最も重要な点である。なぜなら，筋肉中には本酵素に対する特異的な阻害蛋白質があり，CANP はこれと複合体を形成しているものが多いと考えられる。この等電沈殿の操作は，複合体を解離させるとともに，CANP は沈殿に，阻害蛋白質は上清にと分別するので，精製上とくに効果的なのである。

このようにして，精製度は2,700倍，収率25%で CANP を得た。1 kg のトリ胸筋より 4.6

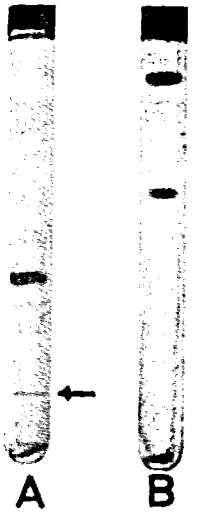


図1　精製したヒト CANP の電気泳動図
A：ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動，pH 8.3，矢印はマーカー色素のバンドを示す
B：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

mg の酵素が得られる。他の材料よりの精製もほぼこれと同じである。

こうして得られた CANP はいずれもディスク電気泳動では単一のバンドを示し，完全に精製されたことを示している。ただし，図1に示すように SDS ゲル電気泳動においては，トリの CANP は分子量8万のバンド1本を示すのに対し，ウサギ，ヒトの CANP では8万と3万のバンドが現れ，そのモル比は1：1であった。このことから，ウサギ，ヒトなど哺乳類の CANP はサブユニットを有する点，トリのものと異なっている。

精製された各 CANP の性質を比較したのが表2である。

サブユニット組成が異なる以外は，至適 pH，活性に必要とする Ca^{2+} の濃度（表2では最大活性の半分を発現するに必要な Ca^{2+} の濃度の対数の絶対値，pKa を示す）など，ほぼ同じである。

ウサギにつき，2つのサブユニットが共に活性に関与するか否かを調べるため，つぎの実験を行った。まずウサギ CANP をサブユニットの解離させる条件を調べた。種々の条件で酵素を保温後ポリアクリルアミド電気泳動で検討した結果，6 M 以上の尿素で処理すると CANP は 80 K と 30 K サブユニットに解離することを見出した。この条件（6 M 尿素，2 mM EDTA，5 mM 2-メルカプトエタノールを含むト

表2　種々の CANP の比較

	ブタ[6]	トリ[7]	ウサギ[8]*1	ヒト[9]	ウサギ[10]	ウシ心筋[11]	ラット肝[12]
分子量	110,000	80,000	110,000	110,000	73,000	80,000～92,000	93,000
サブユニット	80K, 30K	80K	80K, 30K	80K, 30K	80K	80K	—
至適 pH	7.5	7.5-7.8	7.6	7.5	7.5	7.5-8.0	7.5-8.0
Ca^{2+} による活性化 (pKa)*2	0.6	0.8	1.3	2.5	—	1	0.4
金属イオンによる活性化*3							
Ca^{2+}	100	100	100	100	100	100	100
Sr^{2+}	0*4	100	50	0	64	45*5	25*6
Mg^{2+}	0*4	0	0	0	34	0*5	0*6
Mn^{2+}	0*4	0	0	0	0	19*5	10*6
Ba^{2+}	0*4	0	0	0	0	36*5	0*6
比活性 (μ/mg)	—	300	410	340	504	—	—
等電点	4.9	4.9	4.5	4.5	4.3	—	—

*1　辻ら未発表
*2　50%活性を発現するときの Ca^{2+} 濃度 (mM)
*3　10 mM Ca^{2+} 存在下の活性を100%としたときの活性（金属イオン濃度 10 mM）
*4, *5, *6　金属イオン濃度各々 1 mM, 5 mM, 2 mM

リス緩衝液，pH 7.5，4°C，2時間処理）で CANP を解離させた後，尿素を除いて酵素活性を回復させる条件を調べた。CANP を 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 5 mM 2-メルカプトエタノール，pH 7.5 に対し 4°C で一晩透析して尿素を除いてから 30°C で40分保温すると活性の回復がみられた。活性の回復率は約55%でまだ100% 活性が回復する条件が見出せないが，この解離会合系を用いて 30 S サブユニットの役割を調べた。ウサギ CANP を上述の 6 M 尿素で処理し尿素の存在下で Sephadex G-75 のゲル沪過を行って 80 K と 30 K サブユニットを分離した。この2種のサブユニットを単独または混合して変性を回復させ活性の戻りを調べた。表3に示した結果から明らかなように，80 K 及び 30 K サブユニット単独では活性が出現せず，両者を混合した場合にのみ活性の回復がみられた。また，あらかじめ尿素を除いて変性を回復させた 80 K と 30 K サブユニットを 30°C で保温するときに混合しても活性の回復は高くないので，尿素を除き変性を回復させる以前に 80 K と 30 K サブユニットが共存することが活性の回復には必須である。Ca^{2+} の代用ができる金属としては，トリ，ウサギの場合 Sr^{2+} があるが，いずれも Ca^{2+} よりはるかに大量を必要とする。ヒトの場合には測定に用いた限りでは Sr^{2+} では活性化されなかった。

表3　ウサギ CANP の再構成実験

	比活性 (μ/mg)	相対活性 (%)	
未処理 CANP	335	—	100
再構成 CANP			
コントロール*1	185	100	55
(80K)*2	10	5	3
(30K)*2	0	0	0
(80K)+(30K)*3	8	4	2
(80K+30K)*4	83	45	25

*1　6 M 尿素で解離後そのままサブユニットを分解せずに尿素を除いたもの
*2　分離したサブユニットを各々単独で尿素を除いたもの
*3　分離したサブユニットから尿素を除いたのち 30°C で保温するとき両者を混合したもの
*4　分離したサブユニットを再び混合してから尿素を除いて再構成したもの

その他，これらの CANP がヨード酢酸，pCMB, DTNB など SH 修飾試薬で失活することも共通しており，これらの CANP は Ca^{2+} で活性化される，中性のチオールプロテアーゼという点ではすべて共通である。

Ⅳ. CANP と SH 基

CANP の活性発現に SH 基の存在が必要であることが明らかになったので，トリの CANP につき以下くわしく検討した。

図2はトリの CANP を DTNB で滴定したときの結果を示す。すなわち，まず CANP 分子の表面に存在する3個の SH 基が修飾される。ついで活性発現に必要な 1 mM の Ca^{2+} を添加するとさらに1個の SH が滴定され，6 M の尿素をこれに加えると，もう2個の SH 基が滴定される。以上の結果は CANP には，はじめから表面に存在する SH 基3個（第一族 SH），Ca^{2+} の添加ではじめて表面に露出する SH 基1個（第二族 SH），尿素で変性してはじめて露出する SH 基2個（第三族 SH）があることを示している。

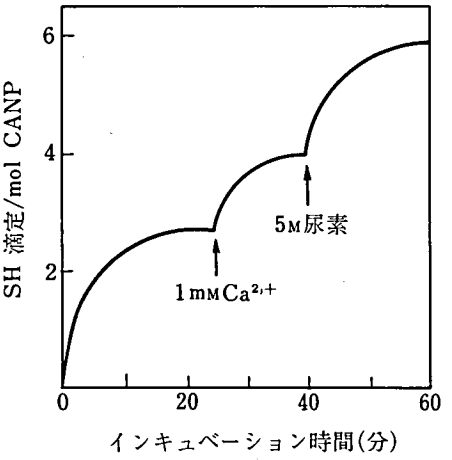


図2　CAMP の SH 基の DTNB 滴定
矢印の点で，Ca^{2+}，尿素を添加する

図3は第二族の SH の滴定度を Ca^{2+} 濃度に対してプロットしたものである。この曲線は

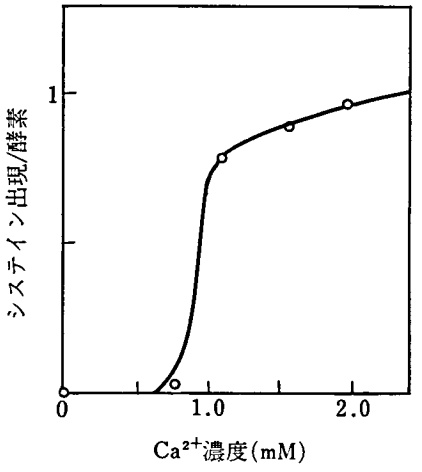


図3　表面の SH 基を修飾してある CANP の SH 基の出現と Ca^{2+} 濃度との関係

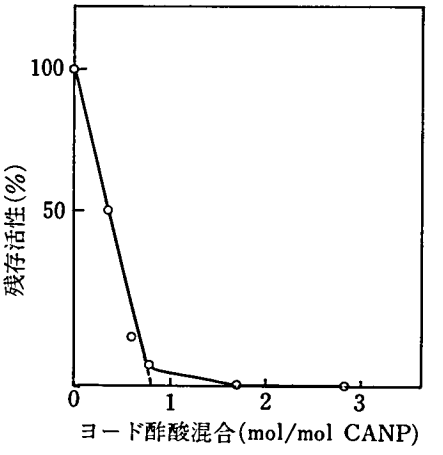


図4　^{14}C-モノヨード酢酸による滴定

CANP の活性を Ca^{2+} 濃度に対してプロットしたものとほぼ一致する。このことは，第二族 SH 基が活性に関与していることを示唆するものである。

しかし，次の実験事実はこの考えが誤りであることを示している。まず，CANP を DTNB で修飾するとき，修飾の度合に比例して活性が減少し，3個修飾されたところで，活性は0になる。このことは表面にある第一族の SH 基，3個ともが活性に関与するか，または活性に関与するのは1個でも，修飾されやすさは3個同等であるかのいずれかである。そこで，DTNB の代わりに，ヨード酢酸で修飾してみた。その結果が図4である。

^{14}C で標識されたヨード酢酸は CANP に3個とり込まれるが，1個とり込まれたところで活性は消失する。このことは第一族の SH のうちの一つが活性に関与することを示すものである。

第二族の SH 基が活性に関与しないことをさらに示すために，まず第一族の SH 基をすべて DTNB で修飾する。ついでこれに Ca^{2+} を加えると第二族の SH 基が露出するので，これをヨード酢酸を用いて不可逆的に修飾する。この後で，DTT，またはメルカプトエタールを用いて，DTT による修飾をはずしてやると，活性は回復するのである。

これらの結果から，活性に関与する SH 基は第一族のもののうちの一つで，Ca^{2+} の効果はむしろ CANP にコンホメーション変化を与え，必要な活性中心を構成することにあると判定された。

なお，ウサギ CANP についてはこのようなくわしい実験は行ってはいないが，活性に関与する SH 基は8万のサブユニット側に局在することはわかっている[10]。

V. CANP の阻害剤

阻害剤，とくに競合的阻害剤は酵素の活性部位の微細構造の研究に有力な手段になりうる。しかしながら CANP が低分子基質をもたないという事実はこの種の研究にきわめて不利である。それは一方では，低分子の競合的阻害剤の存在の可能性が少ないことを示しているし，また他方ではたとえ存在したとしても，これを用いての動力学を行うことがほとんど不可能だからである。

すなわち，CANP の活性測定にはどうしてもカゼインのような高分子基質を用いなければならないが，Km や k_{cat} の値は切断するペプチド結合の種類に応じてまちまちの値をとるであろうから，たとえ Lineweaver-Burk プロットをとってみても，それから求められる Km, Vm, K_I 値などはたいして意味あるものとはならないからである。

Ⅳ In vitro の効果

表4 ヒト，トリ CANP の活性に及ぼすインヒビターの効果

	ヒト CANP	トリ CANP
ロイペプチン	25*1	15
アンチパイン	52	55
キモスタチン	100	150
ペプスタチン	3,400	2,100
エポキシコハク酸誘導体*2		
E-64	61	51
M-23	127	60
Ep 236	359	436
Ep 402	49	41
PBES	421	350
Ep 241	603	502

*1 数字は LD_{50} 値（酵素活性を50%阻害するときの阻害剤と酵素のモル比）

*2 図4に示した R_1 と R_2 が異なる種々の誘導体

そこで筆者らはもう少し一般的な阻害剤を試してみた。その結果を表4にまとめてある。

上に述べたように，阻害定数 K_I を求めることは不可能なので，カゼインを基質としたとき CANP の活性を半分にまで抑えるのに要する阻害剤と CANP の比で阻害の強さを示してある。この比が小さいほど，阻害能力が大きいことになる。

まずダイズのトリプシンインヒビターやオボムコイドなど，トリプシンの強力な阻害剤となるものは，CANP を全くといってよいほど阻害しない。一方，梅沢らにより発見された微生物の第二次代謝産物の阻害剤を調べたところ，表4に示すようにいずれの CANP についても同じ傾向にあり，ペプシンなど酸性プロテアーゼに特異的なペプスタチンを除けば，いずれもある程度の阻害を示した。中でもチオールプロテアーゼにとくによく効くロイペプチンは強力な阻害効果を示すが，これは CANP がチオールプロテアーゼの一種であることとよく合致する。

一方，CANP が SH 酵素であることを利用して，これを不可的に失活させる阻害剤が考えられる。一般にエポキシド誘導体は図5に示すように酵素の SH 基と反応して，これを修飾

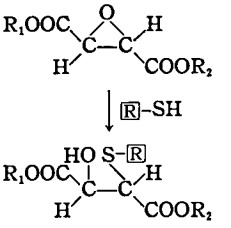


図5 エポキシコハク酸誘導体の構造と反応機構

することが知られている。

大正製薬では，図5のようにコハク酸のトランスエポキシドの誘導体を種々つくっており，これらのあるものが，パパインのようなチオールプロテアーゼを不可逆的に阻害することを発見していた。筆者らは，図5の構造における，R_1 及び R_2 の性質により，CANP には作用するが，他の SH 酵素には作用しないものがみつかるとの想定のもとに，多数の化合物中よりこの条件に合格するものを探した。その結果も表4に示してある。すなわち E-64 と呼ばれる化合物（R_1=H, R_2=ロイシルアグマチン）が CANP をきわめて能率よく失活させるが，筆者らの試した限り解糖系などの SH 酵素は阻害も失活もしなかった。事実 ^{14}C でラベルしたエポキシコハク酸誘導体を用いて，その CANP へのとり込みと，失活との時間経過を調べると，CANP 当たり，1 mol とり込まれたところで，活性は完全に消失することから，この試薬は図4におけるヨード酢酸の場合と同様，第一族の SH のうち活性に関与するものを修飾したと想定される。

この試薬は CANP のほか，パパイン，カテプシンBのようなチオールプロテアーゼには作用するが，そのほかの SH 酵素には作用しないという特性をもっている点でヨード酢酸など，いわゆる SH 試薬とは異っている。したがって後述のように，CANP の活性の抑制が効かなくなったことによる病気の治療薬としては有効なものと考えられる。

一方，ウサギの CANP に対するエポキシコハク酸誘導体の効果を判定するためエポキコハク酸の誘導体（Ep 241）をウサギ酵素に反応させ，80 K，30 K どちらのサブユニットと反

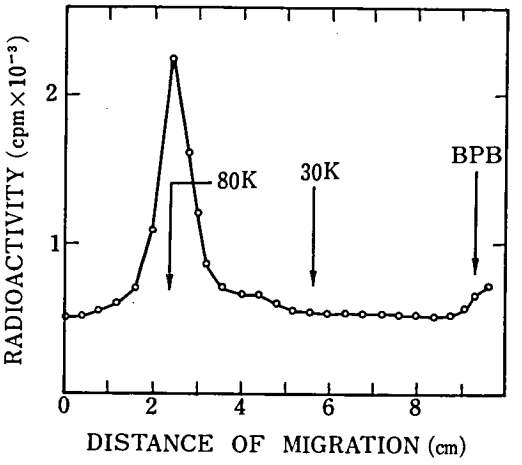


図6 ウサギ CANP とトリチウムラベルしたエポキシコハク酸誘導体 (Ep 241) の反応
ウサギ CANP に Ep 241 を 30°C で 5 分間反応させて失活させ，SDS ポリアクリルアミド電気泳動でサブユニットを分離し，細片したゲルの放射活性を測定した．矢印は同時に泳動した CANP のサブユニットの位置を示す．

応するかを調べた。ウサギ CANP とトリチウムでラベルした Ep 241 を保温すると酵素 1 分子当り Ep 241 が 1 分子とりこまれて酵素活性が消失した。この CANP を SDS 電気泳動にかけ泳動後トリチウムの放射活性を測定した。Ep 241 は図6に示した結果からウサギ CANP の 80 K サブユニット中にある SH 基と特異的に反応したので，ウサギ CANP の 2 個のサブユニットのうち 80 K サブユニットが直接酵素活性に関与するサブユニットであることが明らかになった。

Ⅵ. 筋タンパクの分解と E-64 による阻害

CANP について特筆すべきことはその基質特異性である。種々の蛋白質，ペプチドにつき，CANP で分解されるものと，分解されないものとに分類したのが表5である。まず注目されるのは，右下に示したように，トリプシン，キモトリプシン，ペプシン，エラスターゼ，コラゲナーゼなどに対する合成基質を CANP はいっさい分解しないという事実である。

それでは高分子基質はすべて CANP が切断するかといえばそうでもなく，ある種の選択性がある。未変性のままで分解するのは，ミエリン蛋白質，チューブリン，スペクトリンのほかアクチンを除く筋肉蛋白質である。CANP は非常に特異的にグリコーゲンホスホリラーゼキナーゼなどの解糖系調節酵素，トロポニン，トロポミオシンなどの収縮調節タンパク質，フィラミン，デスミン，Eu アクチニンなどのZ帯タンパク質を切断することが in vitro で証明されたわけである。

表5 CANP の基質特異性

分解されるもの	分解されないもの
カゼイン	アルブミン
ヘモグロビン(変性)	ホスホリラーゼ A
チトクロムc(変性)	調整蛋白質
インスリンB鎖	アクチン
ミエリン	
スペクトリン	Bz-Arg-OEt, Bz-Tyr-pNA
チューブリン	Z-Glu-Tyr, Z-Leu-Tyr
筋蛋白質	Z-Gly-His-Leu, Z-Phe-Leu
ミオシン	Suc-$(Ala)_3$-pNA
トロポニン	Z-Phe-Leu-NH_2
トロポミオシン	Z-Phe-Leu-Ala
α-アクチニン	Z-His-Phe(NO_2)-Phe-OMe
Z-Tyr-ONP	Z-Gly-Pro-Phe-Leu-Ala
	Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro
	Z-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala

次に，これら蛋白質の分解の仕方にも特色がある。CANP が，ホスホリラーゼキナーゼや C-キナーゼを活性化するという事実は，この分解がきわめて限定的なものであることを示唆している。

トロポミオシン，及びトロポニンの CANP による分解の経時的変化を調べたところトロポミオシンの場合，CANP はその分子のほぼ中央で切断して，18,500と16,000の分子量をもつ2つの断片しか生じない。トロポニンTの場合には，30,000，26,000，14,000としだいに小分子化してゆくが，ここでは明らかな限定分解がみられる。このほか α-アクチニンやミオシンのH鎖についても，まず限定分解が先行することがみられた[13]。

この様に，筋蛋白質中の選択性や，小分子化

のパターンはすべて筋ジストロフィー患者の生検より得られた結果と一致する。われわれがCANP と筋ジストロフィーとの関連性を考えたのはこのためである。

次に，筋蛋白質の CANP による分解に対する E-64 の効果を調べた。その結果，E-64 の添加により，すべての筋蛋白質の小分子化は起らなくなった。

筋ジストロフィー患者の筋肉中では CANP 活性が上昇していることが報告されている。一方，モデル動物である筋ジスチキンにおいても，対照に比し，CANP 活性が上昇している。そこで E-64 を筋ジスチキンに投与することにより，CANP 活性の上昇が防止できるか否かを検討した[14]。

体重 1 kg 当り 10 mg の E-64 を孵化直後から，1週2回ずつ筋注した。対照の筋ジスチキンには溶媒のみを注射した。3ヵ月後調べてみると，筋ジスチキンのうち，無処理，E-64 処理の CANP 活性は，9.92±1.84 (n=5)，7.00±2.51 (n=8)（筋 wet weight 当りの単位）で，E-64 処理により CANP 活性は減少したが，健全なチキンの CANP 活性 3.99±1.59 よりはまだ大きかった。

文　献

1) Mokri, B. & Engel, A. G.: Neurology, **25**, 1111-1120, 1975.

2) Huston, R. B. & Krebs, E. G.: Biochemistry, **7**, 2116, 1968.

3) Busch, W. A., Stromer, M. H., Goll, D. E. & Suzuki, A.: J. Cell Biol., **52**, 367, 1972.

4) Reddy, M. K., Estringer, J. D., Rabinowitz, M., Fischman, D. A. & Zak, R.: J. Biol. Chem., **250**, 4278, 1975.

5) Dayton, W. R., Goll, D. E., Zeece, M. G., Robson, R. M. & Reville, W. J.: Biochemistry, **15**, 2150, 1975.

6) Dayton, W. R., Reville, W. J., Goll, D. E. & Stromer, M. H.: Biochemistry, **15**, 2159, 1975.

7) Ishiura, S., Murofushi, H., Suzuki, K. & Imahori, K.: J. Biochem., **84**, 225, 1978.

8) Tsuji, S. & Imahori, K.: 未発表

9) Suzuki, K. & Imahori, K.: FEBS Letters, **104**, 355, 1979.

10) Azanza, J.-L., Raymond, J., Robin, J.-M., Cottin, P., & Ducastaing, A.: Biochem. J., **183**, 339, 1979.

11) Toyo-oka, T., & Masaki, T.: J. Mol. Cell. Cardiol., **11**, 769, 1979.

12) 岸本明，森光寿，高井義美：肝臓の Ca^{2+} 依存性プロテアーゼ，代謝，**16**, 147, 1979.

13) Ishiura, S., Sugita, H., Suzuki, K. & Imahori, K.: J. Biochem., **86**, 579, 1979.

14) Sugita, H., Ishiura, S., Suzuki, K. & Imahori, K.: J. Biochem., **87**, 339, 1980.

18. Ca依存性プロテアーゼの活性測定法の問題点

杉田秀夫*,**

研究協力者 石浦章一* 村上博彦*
埜中征哉* 高木昭夫*

目的

E-64 投与の直接的効果を見るため，細胞内チオールプロテアーゼの1つである Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ（Ca-activated neutral protease: CANP と略す）の活性変化を検討するのが目的である。本酵素は，大部分が細胞内可溶性分画に存在するが，生体内ではインヒビターと結合しているため一見非常に弱い活性しか持たず，粗抽出液での活性測定には大きな誤差が伴うため正確な定量が困難であった。今回は同酵素の細胞内分布と，種々の活性測定法の検討を行った。

実験

ニワトリ骨格筋 5g を10倍量の 0.25M Sucrose-1 mM EDTA, pH 7.0 溶液と共にすりつぶした。核及び筋原線維の分画は次のようにして行った。まず懸濁液をガーゼでろ過し筋原線維を分けた。次に 600×*g*，10分間の遠心で沈殿したものを核分画とした。当然この分画には筋原線維の断片が混在していた。上清部分はその後，100000×*g*，60分間遠心し，ミクロゾーム，ライソゾーム及びミトコンドリア分画を得た。上清部分を可溶性分画とした。特に骨格筋においてはライソゾーム，ミトコンドリア（10000×*g* 沈殿）分画はほとんどなく，まとめて 100000×*g* の沈殿をとった。α-グルコシダーゼは村上の方法[1]で，その他の酵素は既知の方法で測定した。CANP 活性は，後述の等電沈殿法[2]で測定した。なお CANP 活性の測定は，以下の二法を比較検討した。第一は硫安沈殿法である。ニワトリ骨格筋 2g を4倍量の 20 mM トリス-0.1M KCl-2 mM EGTA, pH 7.5 溶液と共にホモゲナイズし，8000×*g*，10分間の遠心で上清を集めた。次に固体硫安を加え pH が下がらないように調整して 0°C，10分放置した後沈殿を集めた。沈殿はその後 20 mM トリス-0.1M KCl-1 mM EGTA-20 mM メルカプトエタノール，pH 7.5 溶液に懸濁し，4°C，一晩同緩衝液に透析した。この溶液を粗 CANP 溶液とした。第二の方法は等電沈殿法である。前法と同様に粗抽出液を集めた後，1N 酢酸を用いて pH を 4.5～4.9 に調整した。生じた沈殿を 0.1M グルセロリン酸ナトリウム-1 mM EDTA, pH 7.5 溶液に懸濁し，粗 CANP 溶液とした。

結果

(1) CANP の細胞内分布を示したのが表1で

表1

細胞内分布	タンパク質 (%)	LDH (%)	CANP (%)	α-グルコシダーゼ (%)
核	9.0	10.2	0.7	30.0
ライソゾーム ミトコンドリア ミクロゾーム	8.0	1.3	0.3	27.3
上清	83.0	71.3	82.7	35.8
%回収率	100.0	82.8	83.7	92.8

* 国立武蔵療養所神経センター，疾病研究第一部
** 東京大学医学部脳研・神経内科

Ⅳ In vitro の効果

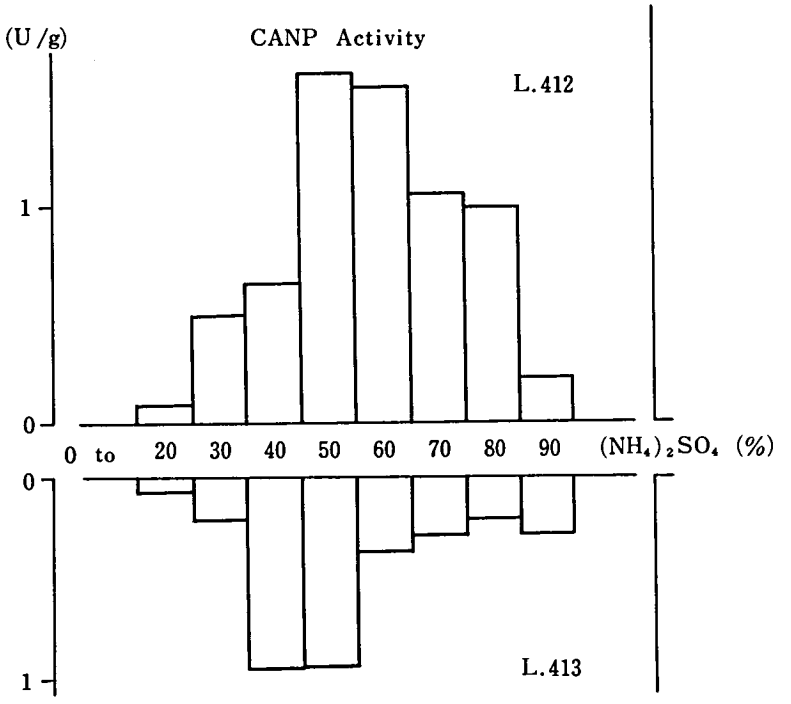


図1

ある。これで明らかなように CANP 活性はそのほとんどが可溶性分画から回収される[3]。この傾向は同様の可溶性酵素である乳酸脱水素酵素 (LDH) にも見られ，これらの酵素がライソゾームやミクロゾームに存在しないことは明瞭である。一方，ライソゾーム酵素である酸性α-グルコシダーゼ（酸性マルターゼ）活性は可溶性分画のみならず広く存在している。これは同様のライソゾーム酵素であるカテプシンDについても言え，ホモゲナイズでライソゾームが破壊されてこのような広い分布を示すと考えられた。少なくともこの結果より CANP がライソゾーム酵素である可能性は否定された。

(2) 次に CANP 活性測定法上の問題点について検討した。図1は，正常ニワトリ (line 412) と筋ジストロフィーニワトリ (line 413) 骨格筋の CANP 活性を硫安沈殿法を使って測定したものである。値はすべて硫安の%飽和で示した。正常ニワトリでは CANP 活性は最大50%飽和で回収された。また硫安濃度が高くなるにつれて回収率が悪くなるのは，1つは混在する内因性のインヒビターのせいであり，1つは CANP 自身が硫安の存在下で活性低下を示すせいである。しかし，この実験では透析で硫安を除いてあるので後者の可能性は否定される。筋ジストロフィーニワトリでは，ほぼ40%飽和で最大活性を示すが，これは内因性インヒビターが50～80%飽和で回収される事実と，筋ジストロフィーニワトリの方がインヒビター活性が高い，という事実に合致する結果である。ゆえにこの方法ではいつも混在するインヒビター活性を考慮に入れねばならず，生体内での CANP 活性をどこまで反映しているかという問題を考える場合十分検討を要するところである。

次に等電沈殿法での CANP 活性の回収率を図2に示す。図1と同様，正常（C）と筋ジストロフィー (Dy) ニワトリについて行った。正常，筋ジストロフィー共 pH 約4.5で最大の回収をみた。正常では約1U/g であり筋ジスでは約3U/g であった。この等電沈殿法では CANP と内因性インヒビターは分離し，CANP の絶対量が測定可能である。図1と比較すると，正

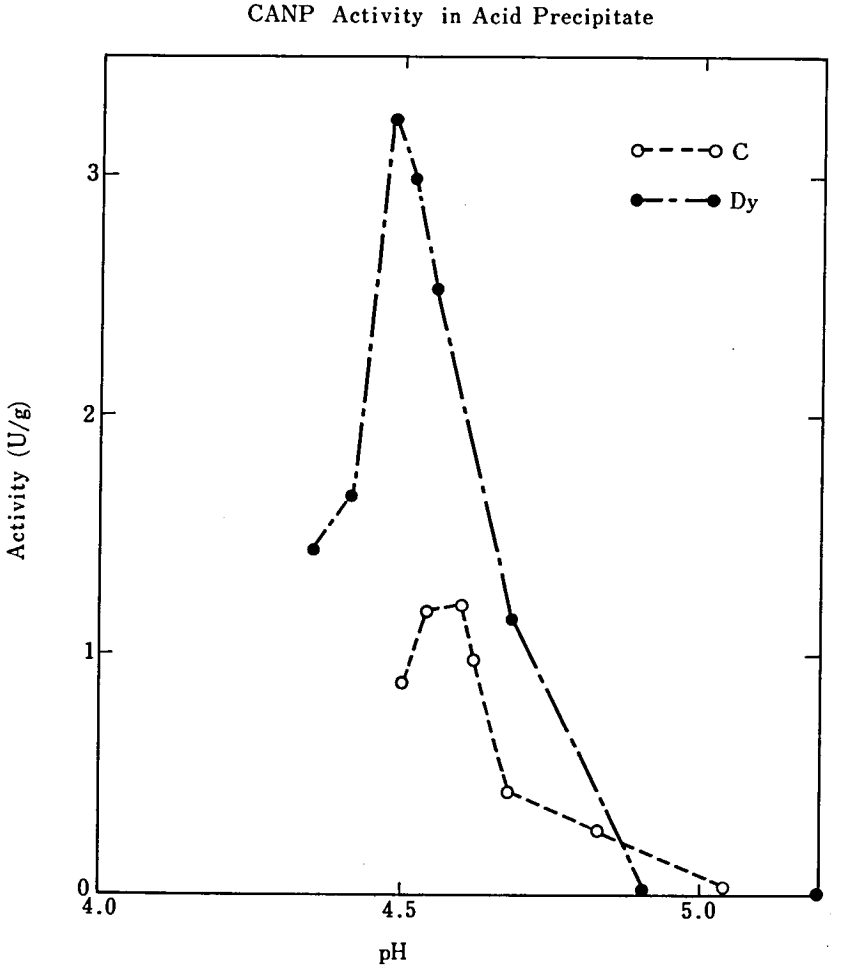


図2

常ニワトリではほぼ同様の回収率を示すにもかかわらず，筋ジストロフィーニワトリでは約3倍に活性が上昇する。これは明らかにインヒビターがはずれたためと理解できる（図2）。

考　　察

本研究により，CANP 活性はその測定方法によって異なった値をとることが判明したが，これは，CANP の絶対量を測定するか，インヒビター共に活性を測定するかの違いである。E-64 の効果を見る場合，もし E-64 が不可逆的に CANP に結合するならば，CANP の絶対量を測定すればいいのであるが，もし可逆的に阻害した場合にはこの方法では不十分であると考えられる。また，実際生体内で CANP がどれだけ働いているかは，そのインヒビター結合量とも関係し，インヒビターを全く除外して測定することは生体内プロテアーゼの in vivo の作用を無視することになる。これらの点を考慮に入れると，CANP の測定法にはまだまだ問題点があると考えざるを得ない。

参考文献

1）村上博彦，高木昭夫，埜中征哉，石浦章一，杉田秀夫，水谷誠：日本ウズラに発見された糖原病Ⅱ型，神経内科，1980印刷中.

2）杉田秀夫，石浦章一：各種神経筋疾患罹患筋の CANP 活性，厚生省筋ジス（三好班），昭和54年

度報告.
3) Ishiura, S., Sugita, H., Nonaka, I. & Imahori, K.: Calcium-activated neutral protease. Its localization in the myofibril, especially at the Z-band, J. Biochem., 87, 343-346, 1980.

V　吸収，分布，代謝，排泄

19.　E-64 及びその類縁体の生体内動態に関する研究……大関　正弘

20.　E-64 のラット肝薬物代謝酵素に対する影響……北川　晴雄

21.　E-64 及びその類縁体の生物薬剤学的研究……沢田　二郎

19. E-64 及びその類縁体の生体内動態に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 野 津 隆 司* 諏 訪 俊 男*
河 野 喜 郎*

目 的

E-64 は Aspergillus japonicus の固体培養代謝産物であり[1], CANP (Ca^{2+} activated neutral protease) 阻害活性を有し[2),3)], 筋ジストロフィー発症鶏における予防試験において有効性が認められていることから[3)], ヒトの進行性筋ジストロフィー症に対する治療効果が期待されている。しかしながら E-64 は固体培養での生産効率が低く，且つ精製も困難であり，また化学合成も長い行程[4)]を要して大量合成が難しいため，医薬品としての供給に問題が残されている。そこで E-64 の各種類縁体を合成し[5)], in vitro での薬効スクリーニングを行った結果，E-64-a, E-64-b 及びE-64-c の 3 検体に E-64 に匹敵する生理活性を認めた。本研究では E-64 及びこれらの類縁体につき，医薬品開発上の評価の一環としてラットにおける生体内動態を比較検討した。

方 法

(1) 標識化合物

沢田[5)]により Wilzbach 法[6)]で ^{3}H ガス標識された ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a 及び ^{3}H-E-64-c を標識検体として使用した。^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a 及び ^{3}H-E-64-c の比放射能はそれぞれ 92.0, 22.9, 36.5 μCi/mg であり，放射化学的純度は各種展開溶媒による薄層クロマトグラフィーの結果，いずれもほぼ 100% であった。なお E-64-b の ^{3}H 標識も試みたが，精製過程で不純物を生じ，精製が困難であったため，今回の検討から除外した。

(2) 実験動物及び検体投与法

動物は体重 180-200 g の Sprague-Dawley 系雄ラットを 1 群 3 ～ 4 匹使用した。ラットは日本チャールス・リバー（株）から購入し，1 週間予備飼育後に実験に供した。標識検体は担体を加えて生理食塩水溶液とし，5 mg/kg（約 20 μCi/匹）を背部皮下へ皮下注または経口ゾンデを用いて胃内に経口投与した。なお ^{3}H-E-64-c は予め少量の 1/10N 重曹水に溶解後，生理食塩水で一定量とした。また経口投与の場合は投与前 16 hr 及び投与後 6 hr 絶食した。

(3) 放射能の測定

血液と糞は乾燥させたのち，一定量を自動試料燃焼装置（Aloka LSC-111 型）で処理し，血清，胆汁及び尿はその一定量にキシレンで 2 倍に希釈した PCS シンチレーター（Amersham）3 ml を添加し，また組織は 20%（w/v）水ホモジネート液を調製し，その 0.25 ml を減圧乾固後に水 50 μl を加え，または分取した湿重量 100 mg あるいは小臓器をそのまま用い，可溶化剤 Soluene-350 (Packard) 0.5 ml を加え，一晩放置して可溶化後，キシレン希釈 PCS シンチレーター 3 ml を添加し，いずれも液体シンチレーションカウンター（Aloka LSC-502 型）で放射能を計測した。なお試料のクエンチングは外部線源法により補正した。

(4) 血中濃度の測定

^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a 及び ^{3}H-E-64-c 5 mg/

* 大正製薬株式会社総合研究所

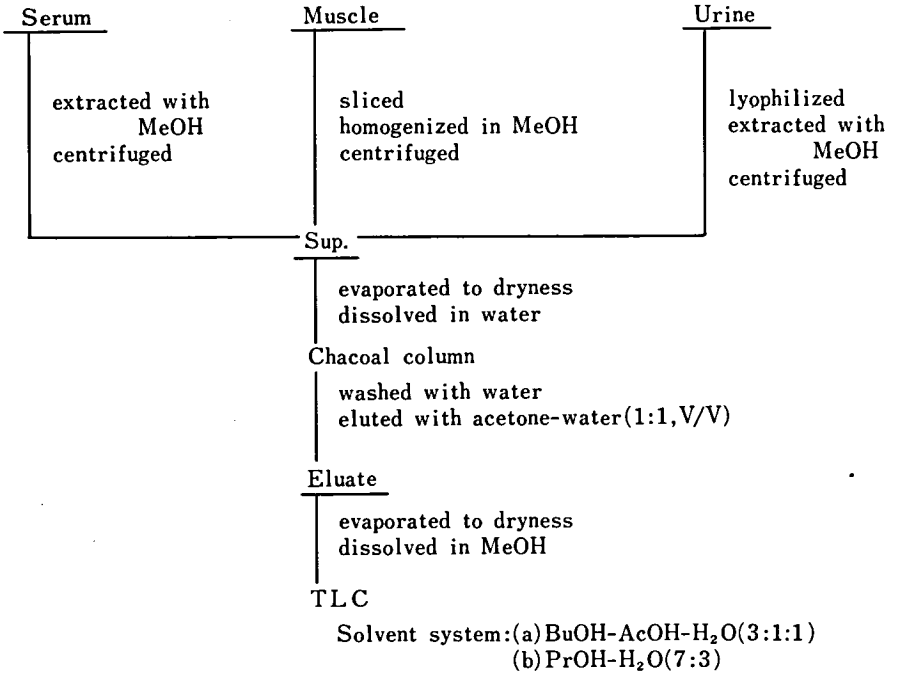


チャート1　E-64 の代謝物の分離方法

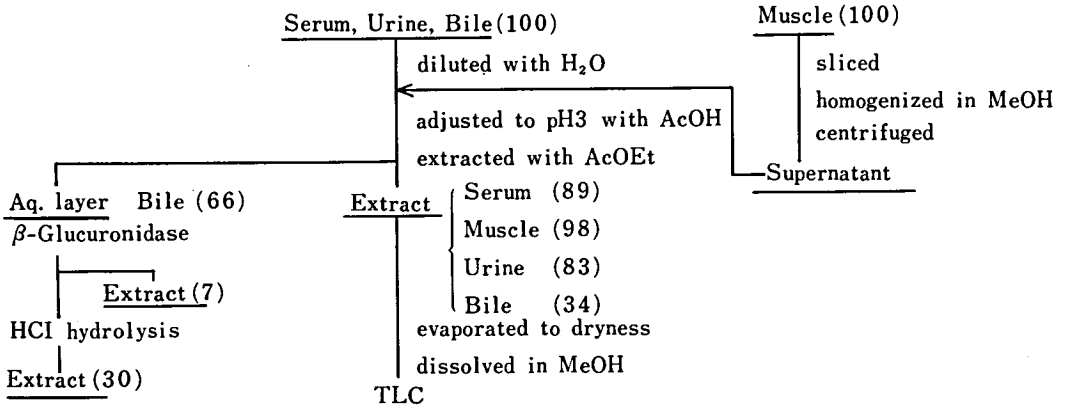


チャート2　E-64-c 代謝物の分離方法

kg をラットに皮下注または経口投与したのち，経時的に尾静脈より 20 μl を採血し，2×5 cm の沪紙片に吸着させて風乾後，放射能を測定した。

(5) 尿，糞及び胆汁中排泄率の測定

ラットに標識検体 5 mg/kg を皮下注または経口投与し，代謝ケージに収めて 24 hr ごとに 3 日後及び 5 日後までの尿と糞を分別採集し，放射能を測定した。一方，胆汁中への排泄はエーテル麻酔下に開腹し，胆管 cannula を施したラットに標識検体 5 mg/kg を皮下注または経口投与し，ボールマンケージに収めて 1 hr

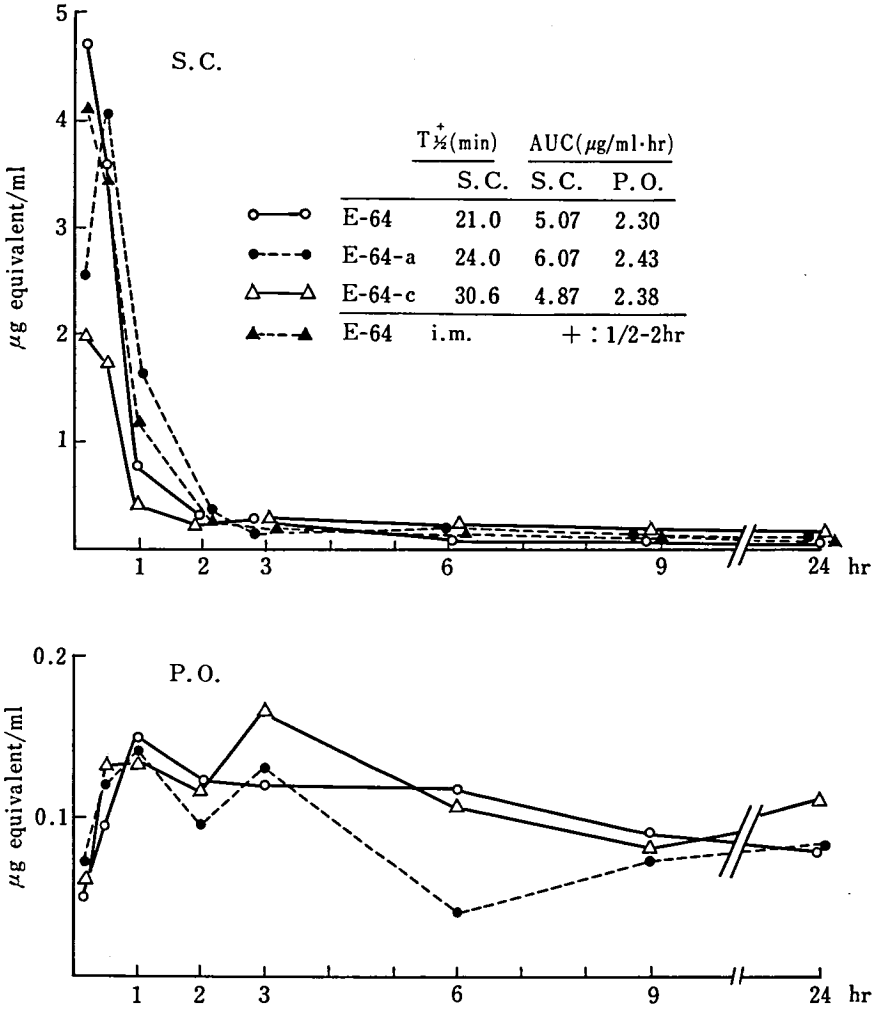


図1 ラットに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a 及び ^{3}H-E-64-c を皮下または経口投与時の血中濃度及び薬動力学パラメーター（投与量：5 mg/kg）

ごとに 6 hr まで及び 24, 30 hr 後までの胆汁を採集し，放射能を測定した。

(6) 組織内濃度の測定

ラットに標識検体 5 mg/kg を皮下注または経口投与し，1/2, 3 及び 24 hr 後に放血死させたのち，組織を摘出して全血，血清，肝及び筋肉（大腿筋）の放射能を測定した。また ^{3}H-E-64 についてのみ，他に腎，心，肺，脾，副腎及び脳について同様な実験を行った。

(7) 代謝物の検索

^{3}H-E-64 5 mg/kg をラットに皮下注し，1/2 hr の血清，筋肉，及び 24 hr までの尿中の代謝物をチャート 1 に示す操作に従って抽出精製後，シリカゲルプレート（Silica gel 60 precorted）上で展開したのち，薄層クロマトスキャンナー（Aloka JTC-202B 型）で走査した。なお各試料からの MeOH による抽出効率はいずれも85%以上であった。また ^{3}H-E-64-c についても 24 hr 胆汁を加え，チャート 2 に従って代謝物を抽出精製し，同様な検討を行った。

結　　果

(1) 血中濃度

ラットに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a 及び ^{3}H-E-

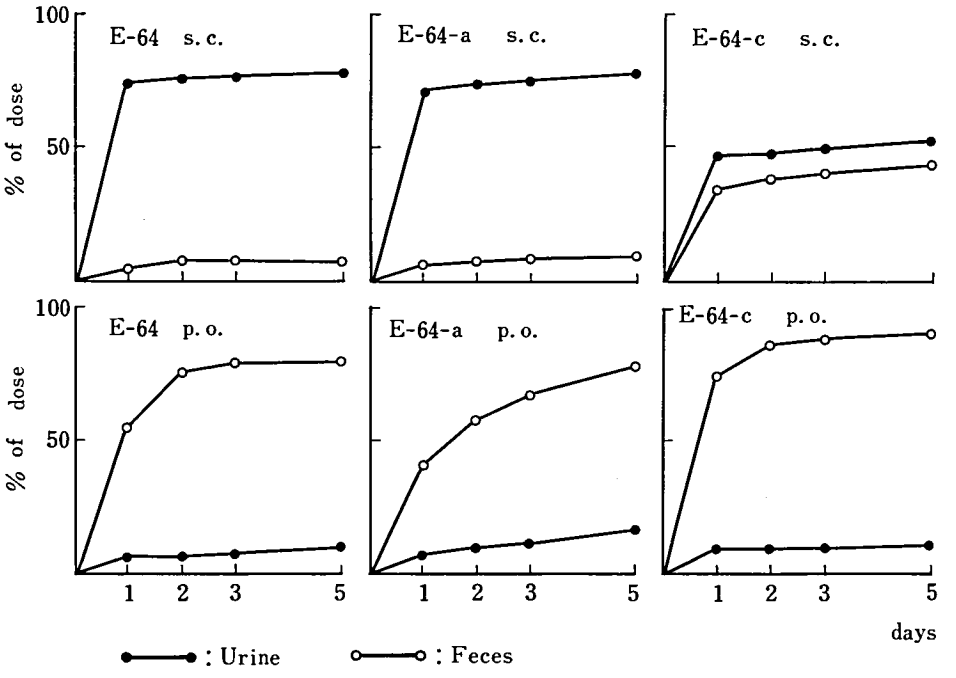


図2 ラットに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a 及び ^{3}H-E-64-c を皮下または経口投与後の放射能の尿中及び糞中排泄（投与量：5 mg/kg） N=3

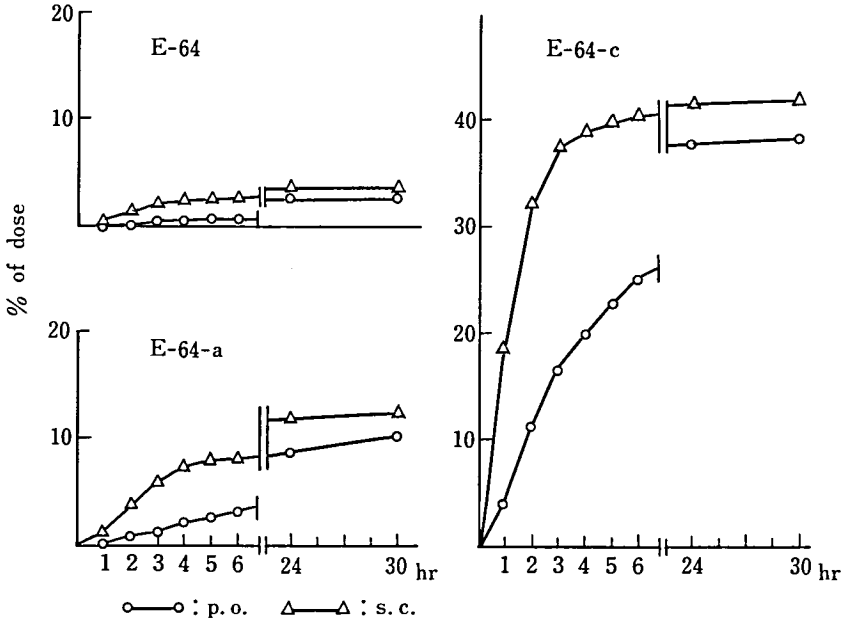


図3 ラットに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a 及び ^{3}H-E-64-c を皮下または経口投与後の放射能の胆汁中排泄（投与量：5 mg/kg） N=3-4

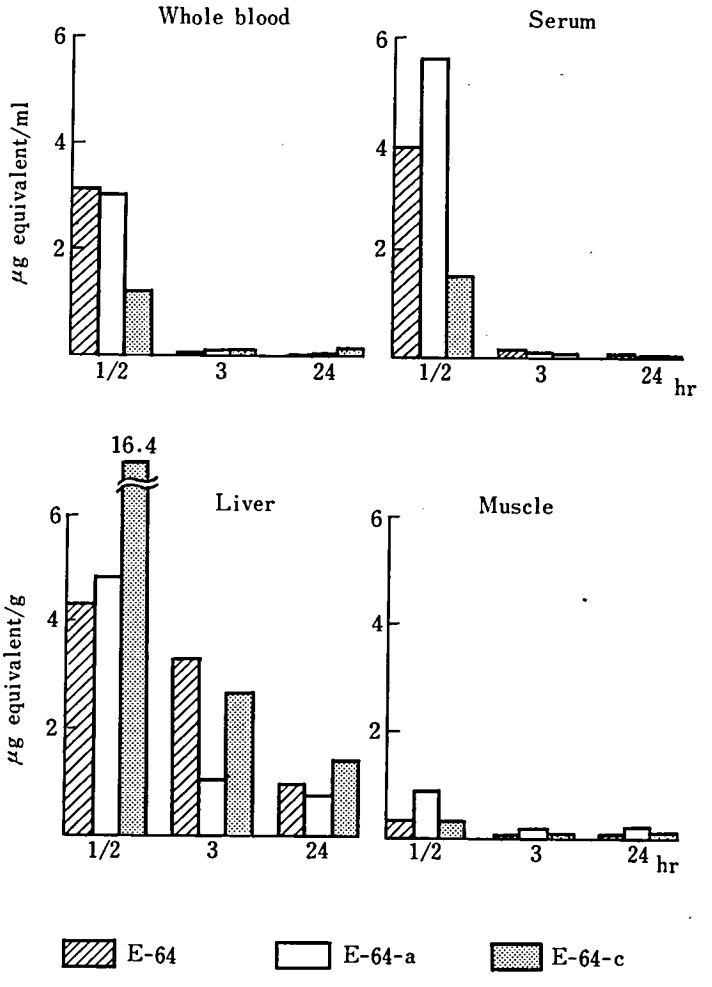


図4 ラットに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a 及び ^{3}H-E-64-c を皮下投与後の放射能の組織内分布（投与量：5 mg/kg） N=3

64-c を投与したときの血中濃度を図1に示す。皮下注後短時間の血中放射能濃度は E-64 と E-64-a が E-64-c に優っており，3者とも速やかに減衰するが，1/2-2 hr における半減期（T½）は E-64 が最も早く 21 min であり，次いで E-64-a, E-64-c の順であった。E-64-c は他の2者に比べて吸収が若干遅れ，その後の消失も遅れる傾向がみられた。一方，経口投与時の血中濃度は3者ともほぼ同じレベルで推移し，1-3 hr 後に 0.15 μg/ml 前後の最高値を示し，24 hr 後までの血中濃度曲線下面積(AUC)はほとんど差異を認めなかった。なお E-64 を筋肉内注射した場合の血中濃度は皮下注時に近似していた。

(2) 尿，糞及び胆汁中への排泄

ラットに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a 及び ^{3}H-E-64-c を投与したときの尿，糞中への排泄を図2に，胆汁中への排泄を図3に示す。E-64 は皮下注後 24 hr までに尿中に投与放射能の74.5%，糞中に 3.5%，5日後までにそれぞれ77.9%，5.5% が回収され，主に尿中へ，一部が糞中へ排泄された。また経口投与時は 24 hr 後までに尿中へ 6.0%，糞中へ 55.9%，5日後までにそれぞれ10.1%，79.3%が回収され，主に糞中へ，一部が尿中へ排泄された。E-64-a は E-64 に類似した排泄パターンを示した。これ

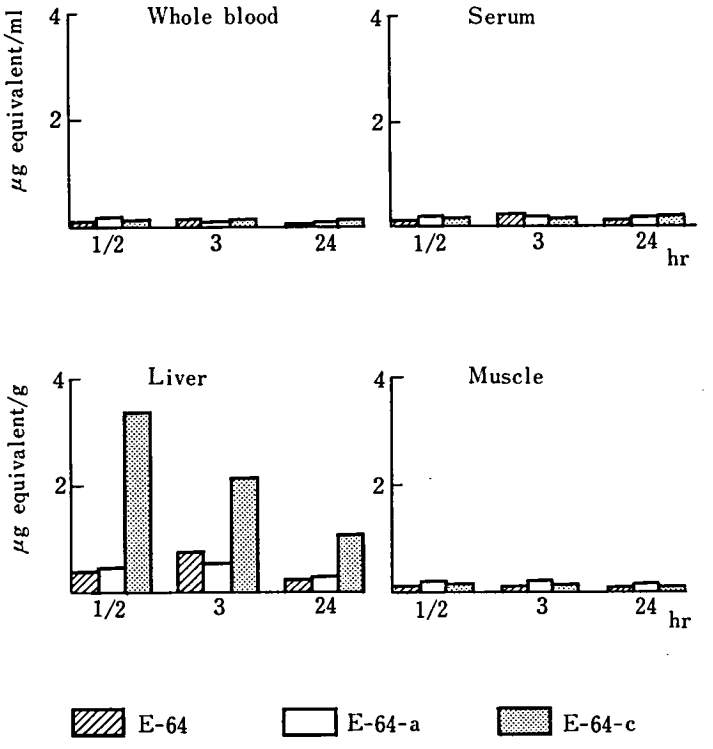


図5　ラットに ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a 及び ^{3}H-E-64-c を経口投与後の放射能の組織内分布（投与量：5 mg/kg）　N=3

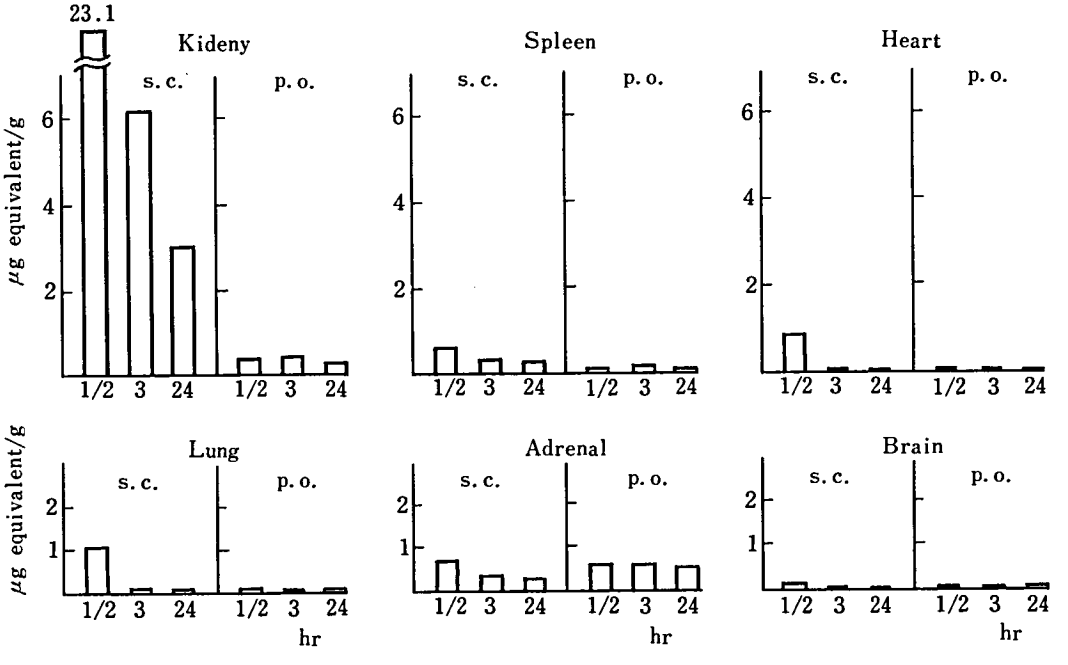


図6　ラットに ^{3}H-E-64 を皮下または経口投与後の放射能の組織内分布（投与量：5 mg/kg）　N=3

表1 ^{3}H-E-64, ^{3}H-E-64-a 及び ^{3}H-E-64-c を皮下または経口投与したラットの筋肉内濃度（投与量：5 mg/kg）

	Time	Concentration (μg equivalent/g)		
	(hr)	E-64	E-64-a	E-64-c
S.C.	1/2	0.342±0.004	0.829±0.121	0.320±0.109
	3	0.037±0.002	0.204±0.018	0.102±0.049
	24	0.051±0.004	0.202±0.021	0.083±0.020
P.O.	1/2	0.024±0.005	0.191±0.012	0.111±0.058
	3	0.065±0.010	0.200±0.006	0.115±0.048
	24	0.065±0.021	0.132±0.015	0.086±0.004

N=3, Mean±S.E.

に対し，E-64-c は皮下注時の糞中排泄が5日後までに42.0%に達し，糞中排泄の割合が高かった。

一方，胆汁中への排泄は皮下注，経口投与時とも30 hr 後までに，E-64 では約4%，E-64-a は10%強，E-64-c は約40%が回収された。E-64-c は胆汁中への排泄率が最も高く，これに起因して糞中への排泄率も高まったものと考えられる。

(3) 組織への分布

^{3}H 標識 E-64, E-64-a 及び E-64-c 5 mg/kg をラットに皮下注及び経口投与後 1/2, 3, 24 hr の全血，血清，肝及び筋肉への放射能分布を図4，図5に示す。皮下注後 1/2 hr の全血中濃度は E-64-c に比べて E-64 と E-64-a が高く，3 hr では減衰が著しかった。血清の場合も同様な傾向を示した。肝への分布は胆汁中排泄の割合の高い E-64-c が皮下注，経口投与時とも高い値を示した。疾患時の標的部位である筋肉への移行性は3者とも特異的な分布は認められなかったが，皮下注 1/2 hr を除いて E-64 は約 0.05 μg/g, E-64-a は約 0.2, E-64-c は約 0.1 を示し，ある程度の移行性と長時間ほぼ一定濃度が保持される分布が認められた（表1）。

^{3}H-E-64 投与時のその他の組織への分布を図6に示す。皮下注時の腎に高濃度移行がみられたほかは，いずれも極めて低濃度であった。脳へはほとんど分布せず，また腎，心，肺で皮下注時いずれも速やかに減衰した。

(4) 血清，筋肉，尿及び胆汁中代謝物

ラットに ^{3}H-E-64 を皮下注後 1/2 hr の血清，筋肉及び 24 hr 尿について薄層クロマトスキャンニングした結果を図7に示す。血清及び筋肉では標品の ^{3}H-E-64 に一致する単一ピークを得，ほとんどが未変化体のまま存在することが解った。また尿中へも主として未変化体のまま排泄されるが，他の代謝物ピークも認められた。

一方，^{3}H-E-64-c についても胆汁を追加して同様な処理を行った（図8）。血清及び筋肉ではほとんどが未変化体として存在し，尿中へも大部分が未変化体のまま排泄された。また酢酸エチルによる抽出効率は血清89%，筋肉98%，尿83%と高率であったのに対し，胆汁では34%に過ぎず，抽出残渣中にグルクロン酸抱合体とアミノ酸抱合体がそれぞれ7，30% 存在するものと推定されたが（チャート2），非抱合体画分中の放射能はほとんどが未変化体であった。

考　　察

^{3}H 標識 E-64, E-64-a 及び E-64-c をラットに皮下注したときの血中濃度はいずれも速やかに減衰した。投与後短時間では E-64-c が他の2者より低かった。しかし 2 hr 以降では3者間に大差はないが，逆に E-64-c がわずかに高い傾向がみられた。これは物性上 E-64 と E-64-a は水溶性であるため皮下部位から速かに拡散，吸収され，そのため初期の血中濃度が著明に上昇し，その後の消失が速かったものと考えられる。経口投与時は3者ほぼ同レベルで

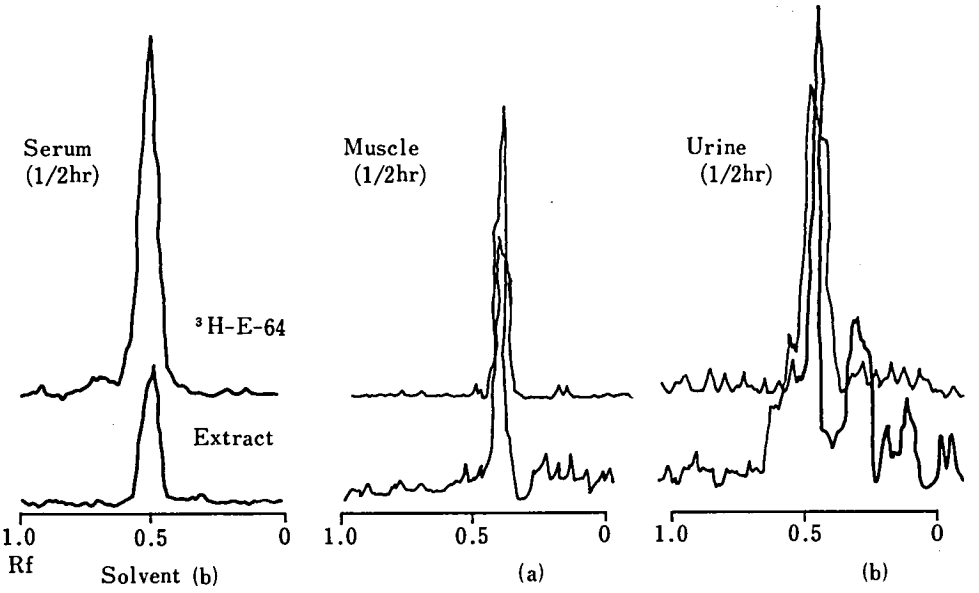


図7 ラットに ³H-E-64 を皮下投与後の血清，筋肉及び尿中代謝物のラジオ薄層クロマトグラム

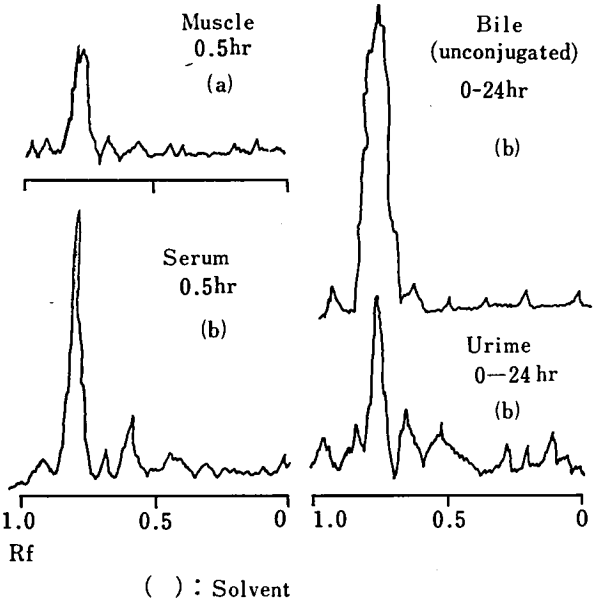


図8 ラットに ³H-E-64-c を皮下投与後の血清，筋肉，尿及び胆汁中代謝物のラジオ薄層クロマトグラム

あり，AUC も近似していたことから，生物学的利用率は同等と推定される。

一方，経口投与時の尿中排泄量は5日後までに E-64 は投与放射能の 10.1%，E-64-a は 17.3%，E-64-c は 11.7% であった。この値に胆汁中排泄量を加算して消化管からの吸収率と仮定すると，E-64 は 13.7%，E-64-a は 27.8%，E-64-c は 50.4%となり，消化管吸収率は E-64-c が最も高く，次いで E-64-a, E-64 の順であると解せられる。E-64-c は脂溶性を有するため，消化管粘膜でのリピド親和性が高く，他の2者に比べて吸収率が高いものと考えられる。

組織への分布は別に行ったラットにおける全身オートラジオグラムの結果，3者とも皮下注時は投与部位，肝，腎，膀胱及び消化管内容にのみ明瞭な分布を認め，経口投与時は E-64-c 投与の肝にわずかに移行がみられたほか，消化管内容にのみ黒化像が得られた。いずれの場合も 24 hr 後は消化管内容にのみ放射能が検出された。定量実験の結果を合わせて，3者とも肝，腎を除き，高濃度の移行は認められず，いずれの組織からも速やかに減衰し，全身からの消失及び尿，糞中への排泄が速やかだったことから，特定の組織への親和性あるいは蓄積性はないものと推定される。なお E-64 の定量実験及びオートラジオグラムの結果，3者とも脳へはほとんど移行せず，血液・脳関門を通過しにくい物質と推定される。一方，作用部位である筋肉へはある程度移行し，低レベルではあるが長時間ほぼ一定濃度が保持される特徴ある分布が認められ，薬効発現の可能性を期待し得るものと考えられる。

また生体内の代謝を E-64 と E-64-c について調べた結果，両者とも化学構造上比較的安定であり，皮下注 1/2 hr 後の血清，筋肉中ではいずれもほとんどが未変化体として存在していた。従ってこれらは作用部位である筋肉へ薬理活性を保持したまま到達することが確認された。

今回生体内動態試験を行った3検体を比較すると，経口投与時の生物学的利用率はほぼ同等であり，筋肉への移行性は E-64-a が最も高く，E-64-c がそれに次いでいた。しかしながら E-64-c は消化管吸収率，ラットにおける亜悪性毒性が低い点で他の2者に優り[7]，CANP 阻害活性も E-64 と同等で E-64-a の約2倍であり，さらに製造が容易な利点も有するため，3者の中では医薬品開発上 E-64-c がより勝れていると考えられる。

結　論

E-64とその類縁化合物 E-64-a，E-64-c の3検体につき，^{3}H 標識体を用いてラットにおける生体内動態の比較試験を行った。経口投与時の生物学的利用率は3者ほぼ同等であり，消化管からの吸収率は E-64-c が最も高く，次いで E-64-a, E-64 の順であった。3者とも肝，腎を除いて高濃度分布を示す組織はなく，体外へ速やかに排泄されるが，作用部位である筋肉へある程度分布し，E-64 と E-64-c は未変化体のまま移行していることが確認された。生体内動態による評価では E-64-c が他の2検体に優ると考えられた。

文　献

1) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J. and Tanaka, I.: Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor, Agric. Biol. Chem., 42, 523, 1978.

2) 今堀和友：細胞内蛋白質分解酵素の新しい役割，第20回医学会総会会誌，I-p. 60, 柱 I-L-3, 1979.

3) Sugita, H., Ichiura, S., Suzuki, K. and Imahori, K.: Inhibition of epoxide derivatives on chichen calcium-activated neutral protease (CANP) in vitro and in vivo, J. Biochem., 87, 339, 1980.

4) Hanada, K., Tamai, M., Ohmura, S., Sawada, J., Seki, T. and Tanaka, I.: Structure and synthesis of E-64, a new thiol protease inhibitor, Agric. Biol. Chem., 42, 529, 1978.

5) 沢田二郎：E-64 及びその類縁体の製造に関する研究，本誌，1980.

6) Wilzbach, K. E.: Tritium-labelling by ex-

posure of organic compounds to tritium gas, J. Am. Chem. Soc., 79, 1013, 1957.

7）大関正弘：E-64 及びその類縁体の急性及び亜急性毒性に関する研究，本誌，1980.

20. E-64 のラット肝薬物代謝酵素に対する影響

北 川 晴 雄*

研究協力者 佐 藤 哲 男* 北 田 光 一**

はじめに

E-64 はチオールプロテアーゼの特異的阻害剤として近年注目されている物質であり，臨床面における有用性としては筋ジストロフィー症の治療薬として目下基礎的研究が広範に進められている。本分担研究では主として E-64 の代謝ならびに体内動態を知る目的で，本年度は肝薬物代謝酵素に対する影響について，in vivo ならびに in vitro の系を用いて検討した。

材料及び方法

体重 180～200 g の JCL-SD 雄性ラットを使用し，飼育期間中は 23°C の恒温室にて市販のラット，マウス用固型飼料（日本クレア K. K., CE-2）により飼育した。飲料水としては水道水を自由に摂取させた。動物はすべての場合実験に供する20時間前から絶食した。In vivo 実験の場合，E-64 (500 mg/kg) は生理食塩水に溶解し，1日1回5日間背部皮下に投与した。なお，この際対照群には生理食塩水を 0.5 ml/100 g 体重の割合で同様に投与した。

動物は断頭瀉血後肝をとり出し，肝重量を測定した後 1.15% KCl にて灌流し，肝重量の3倍容の 1.15% KCl を加えてホモジナイズした。得られた25%ホモジネートを常法に従い超遠心分離法によりミクロゾーム (Ms) 画分を分離し，一定量の 1.15% KCl に懸濁しツンベルグ管に入れ窒素気流中に −80°C で保存した。In vitro 実験では，未処理ラットから上記の方法により調製した肝 Ms を用いた。

N-脱メチル化活性の測定は基質としてアミノピリン，エチルモルヒネ及びペンツフェタミンを用い，表1のインキュベーション組成液を用いて10分間インキュベーション後，生成するホルムアルデヒドを Nash 法[1]にて測定した。又，アニリン水酸化活性は生成するパラヒドロキシアニリンを Imai らの方法[2]で測定した。チトクロム P-450, チトクロム b_5 及び NADPH-チトクロム c レダクターゼ活性は各々 Omura と Sato[3] 及び Phillips と Langdon の方法[4]に準じて行った。NADH-フェリシアナイドレダクターゼ活性は Mihara と Sato の方法[5]に従って行った。なお Ms 蛋白量は Gornall の方法[6]により定量した。

表1 薬物代謝酵素活性用インキュベーション組成液

Microsomes (5mg/ml)	0.2 ml
0.2 M Na, K-phosphate (pH 7.4)	0.4 ml
0.5 mM EDTA	0.2 ml
Substrate (10 mM aniline or aminopyrine)	0.1 ml
NADPH-generating system (3.3 mM NADP, 80 mM glucose 6-phosphate, 1 unit glucose 6-phosphate dehydrogenase, 60 mM $MgCl_2$)	0.1 ml
	1.0 ml

* 千葉大学 薬学部薬効・安全性学講座 薬物学研究室

**千葉大学薬学部医療薬学講座薬剤部

表2 In vitro における E-64 のラット肝ミクロゾーム薬物代謝酵素活性に及ぼす影響

Concentration (mM)	Substrate			
	Aminopyrine*	Benzphetamine*	Ethylmorphine*	Aniline**
None	95.33 (100)	120.66 (100)	231.67 (100)	15.32 (100)
0.05	96.04 (101)	117.65 (98)	230.49 (99)	15.87 (104)
0.10	94.12 (99)	120.66 (100)	223.22 (96)	15.87 (104)
0.50	90.49 (95)	118.25 (98)	230.47 (99)	16.00 (104)
1.00	90.49 (95)	125.49 (104)	232.88 (101)	15.26 (99)

* HCHO formed nmoles/mg protein/15 min.
** nmoles/mg protein/15 min.
Figures in parentheses represent per cent of control.

表3 In vivo における E-64 のラット肝ミクロゾーム薬物代謝酵素活性に及ぼす影響

Enzyme activity	Control (n=10)	Treated (n=10)	P
Aminopyrine N-demethylase			
(nmoles/mg/15 min)	107.67±7.50	92.41±3.60	n. s.
(μmoles/g liver/15 min)	2.20±0.22	2.11±0.21	n. s.
Aniline hydroxylase			
(nmoles/mg/15 min)	22.49±1.23	21.79±1.04	n. s.
(nmoles/g liver/15 min)	460.07±42.05	510.20±66.13	n. s.

Rats were treated with E-64 at a dose of 50 mg/kg s. c. for 5 days.

表4 In vivo における E-64 のラット肝ミクロゾーム電子伝達系に及ぼす影響

Component	Control (n=10)	Treated (n=10)	P
NADPH-cytochrome c reductase			
(Units/mg protein)	0.130±0.010	0.130±0.010	n. s.
(Units/g liver)	2.68±0.27	2.99±0.38	n. s.
NADH-ferricyanide reductase			
(Units/mg protein)	2.40±0.13	1.84±0.11	<0.01
(Units/g liver)	48.8±4.5	43.2±6.4	n. s.
Cytochrome P-450			
(nmoles/mg protein)	0.65±0.06	0.63±0.03	n. s.
(nmoles/g liver)	13.32±1.50	14.16±1.52	n. s.
Cytochrome b_5			
(nmoles/mg protein)	0.40±0.02	0.33±0.02	<0.02
(nmoles/g liver)	7.98±0.68	7.29±0.75	n. s.

Rats were treated with E-64 at a dose of 50 mg/kg s. c. for 5 days.

結 果

(1) **In vitro 試験**

水に溶解した4濃度の E-64 溶液をインキュベーション混液に加え，一定時間インキュベート後の薬物代謝酵素活性を4種の基質を用いて測定した。その結果，表2に示す様に，0.05 mM から 1 mM の間では無添加群と比較して殆んど差は認められず，E-64 の濃度と代謝酵素活性との間には有意な関連性はみられなかった。

(2) **In vivo 試験**

E-64 を5日間ラットに連続投与し肝薬物代謝酵素活性の変動の有無を検討した。その結果，表3から明らかな様にアミノピリン脱メチル化活性は E-64 処理群で若干の低下が認められたが有意差はなく，アニリン水酸化活性も対照群との間で差がみられなかった。さらに肝 Ms 電子伝達系の各因子について検討した所，NADH-フェリシアナイドレダクターゼ及びチトクロム b_5 において有意差が認められたが，NADH-チトクロム c レダクターゼ活性及びチトクローム P-450 量については対照群とほぼ同程度であった（表4）。

考 察

E-64 のラット肝 Ms 薬物代謝酵素活性及び Ms 電子伝達系に対する影響を in vitro ならびに in vivo で検討した。その結果，in vitro においては 1 mM まで E-64 の添加量を増加しても代謝酵素活性には殆んど影響がみられなかった。又，in vivo においては E-64, 50 mg/kg をラットに5日間連続皮下投与した場合でも薬物代謝酵素活性は処理群と対象群間で有意差が認められず，電子伝達系因子である NADH-フェリシアナイドレダクターゼ及びチトクロム b_5 において若干の低下が認められた。若し E-64 が薬物代謝酵素の誘導剤となり得るならば，連続投与実験において薬物代謝酵素活性の有意な増加がみられる筈であり，又，阻害剤として作用するならば，in vitro で顕著な阻害が認められねばならない。従って今回の実験結果からラット肝薬物代謝酵素系に対しては特に大きな影響をもたないものと結論づけることが出来る。今後はラット以外の種を用いて検討し，薬物代謝酵素に対する種属差の有無を究明する予定である。

参考文献

1) Nash, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction, Biochem. J., **55**, 416-421, 1953.

2) Imai, Y., Ito, A. & Sato, R.: Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction, J. Biochem., **60**, 417-428, 1966.

3) Omura, T. & Sato, R.: The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes, J. Biol. Chem., **239**, 2370-2378, 1964.

4) Phillips, A. H. & Langdon, R. G.: Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: Isolation, characterization, and kinetic studies, J. Biol. Chem., **237**, 2652-2660, 1962.

5) Mihara, K. & Sato, R.: Partial purification of NADH-cytochrome b_5 reductase from rabbit microsomes with detergents and its properties, J. Biochem., **71**, 725-735, 1972.

6) Gornall, A. G., Badawill, C. S. & David, M. M.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, J. Biol. Chem., **177**, 751-759, 1949.

21. E-64 及びその類縁体の生物薬剤学的研究

沢 田 二 郎*

研究協力者 吉 田 継 親* 中 嶋 由 紀*
小 熊 清 司* 花 田 和 紀*
玉 井 正 晴*

研究目的

E-64 及びその類縁体のヒト進行性筋ジストロフィー症に対する臨床的評価に先だって，その実験動物レベルにおける有用性の評価が極めて重要である。更に，その薬効評価に際しては薬物の標的組織内濃度が重要な意味を有する。

本研究は E-64 及びその類縁体の動物レベルにおける吸収性及び組織への移行性を検討し，薬剤学的評価の尺度とすべく，更には，疾患モデル動物実験における薬剤の投与基準を設定することを目的に，各薬物の定量法を確立し，次いでそれに基づいて実験動物における bioavailability を検討することにある。

方 法

(1) E-64 及びその類縁体の血中濃度定量法

1) 材料

i) 試験化合物　E-64 及びその類縁体 a, b, c はいずれも沢田らの合成した標品を用いた。

ii) 試薬・溶媒　酢酸エチル，アセトンは特級品を蒸留し，メタノール，アセトニトリルは和光純薬(株)製クロマトグラフ用を用い，その他の試薬，溶媒は，すべて特級品を用いた。

iii) 標準溶液　E-64 及びその類縁体 a, b, c をそれぞれ精密に量り，E-64 及び E-64-a は水に，E-64-b 及び E-64-c はそれぞれの溶離液に溶かして，1～50 μg/ml の溶液を調製し，検量線作成のための標準溶液とした。

iv) 活性炭カラム　和光純薬(株)製クロマトグラフ用活性炭をアセトン，次いで水で各々数回洗浄し，クロマト用ガラス管に充填した (0.7×3 cm)。

v) シリカゲルカラム　和光純薬㈱製ワコーゲル C-200 を酢酸エチルに懸濁し，クロマト用ガラス管に充填した。

2) 動物及び投与法

i) 動物

ラット　Wistar 系ラット，雄，8 週令，体重 180～200 g。

家兎　日本白色ウサギ，雄，体重約 2.5 kg。

鶏　白色レグホン，雄，1 ケ月令，体重約 250 g。

ii) 剤形　コーンオイル懸濁液及び生理食塩水溶液（ただし，E-64-b 及び E-64-c は濃重曹水で中和後使用）の両剤形を用いた。

iii) 投与法及び採血法　背部皮下投与及び経口投与にて比較した。いずれの動物においても，体重 200 g 当りオイル懸濁液の場合 1 ml，生理食塩水溶液の場合 0.5 ml になる様，検体を調製し，投与した。尚，採血は鶏の場合，翼下静脈より，ラットの場合は鼠蹊部動脈より，家兎の場合，耳静脈より，いずれも ml 当り10 単位のヘパリンを添加した試験管に採取し，

* 大正製薬株式会社総合研究所

500 r. p. m.，5分間，次いで 1500 r. p. m.，15分間遠心分離後の上澄を血漿溶液として供試した。

3) 高速液体クロマトグラフ条件

i) 機種　日立635型高速液体クロマトグラフ

ii) 分離カラム　内径 4.0 mm，長さ 150 mm の日立製ステンレスカラムに，ナーゲル社製充填剤ヌクレオシル C18（平均粒子径 5 μ）を，粘度法により充填した。

iii) 分離カラム温度　55°

iv) 検出波長　E-64, E-64-b, E-64-c は 205 nm, E-64-a は 350 nm に設定した。

v) 溶離液　使用する溶媒，溶液はすべてメンブランフィルター（0.45 μ）を用いてろ過し，下記の容量比率で混合し，減圧下で脱気した。

E-64　メタノール・水（10：90）

E-64-a　リン酸・アセトニトリル・水（0.04：37：63）

E-64-b　テトラ-n-ブチルアンモニウムヒドロキシドの 10% 水溶液 10 ml にリン酸を加えて pH 5.0 に調整し，水を加えて 550 ml とした液・メタノール（55：45）

E-64-c　リン酸・メタノール・水（0.5：42.5：57）

4) 定量法

i) E-64

供試動物の血漿 0.5 ml に，メタノール 1 ml を加えてよく振り混ぜ，室温で5分間放置した後，3分間遠心分離（3000 r. p. m.）する。この上澄液 1 ml に，水 1 ml を加えて振り混ぜ，あらかじめ調製した活性炭カラムに流し込む。次に水・メタノール混液（2：1）15 ml を用いて活性炭カラムを洗った後，水・アセトン混液（1：1）20 ml を用いて E-64 を溶出する。溶出液は減圧下で濃縮乾固し（操作は 50° 以下），残留物を水 0.5 ml に溶かし，この液 100 μl を高速液体クロマトグラフの分離カラムに注入し，E-64 のピーク高さを測定する。別に E-64 標準溶液を用いて作成した検量線より，血漿中の E-64 の濃度を求める。

ii) E-64-a

供試動物の血漿 0.5 ml に，無水エタノール 1 ml を加えてよく振り混ぜ，室温で5分間放置した後，3分間遠心分離（3000 r. p. m.）する。この上澄液 1 ml に，2,4-ジニトロフルオロベンゼンの 4% 無水エタノール溶液 0.1 ml 及び炭酸水素ナトリウム飽和溶液 0.5 ml を加えて，50° の水浴中で30分間反応する。冷後，6 N 塩酸 0.5 ml 及び水 10 ml を加えておだやかに振り混ぜた後，酢酸エチル 25 ml を加えてよく振り混ぜ，3分間遠心分離（3000 r. p. m.）し，酢酸エチル層 20 ml を分取し，減圧下に濃縮乾固する。残留物を少量の酢酸エチルに溶かし，あらかじめ調製したシリカゲルカラムに流し込み，次に酢酸エチル・酢酸混液（997：3）40 ml を用いてシリカゲルカラムを洗った後，酢酸エチル・メタノール・酢酸混液（89：10：1）25 ml を用いて E-64-a（DNP-誘導体）を溶出し，溶出液は減圧下で濃縮乾固する。残留物に溶離液 0.5 ml を加えて溶かし，この液 50 μl を高速液体クロマトグラフの分離カラムに注入し，E-64-a（DNP-誘導体）のピーク高さを測定する。

別に E-64-a の標準溶液を用いて全操作を同様に行って検量線を作成し，血漿中の E-64-a の濃度を求める。

iii) E-64-b

供試動物の血漿 0.5 ml に，5% リン酸溶液に硫酸ナトリウムを飽和させた液 0.5 ml を加えた後，酢酸エチル 7 ml を加えてよく振り混ぜ，3分間遠心分離（3000 r. p. m.）する。この酢酸エチル層 5 ml を分取し，減圧下に濃縮乾固する。残留物を溶離液 0.5 ml に溶かし，この液 100 μl を高速液体クロマトグラフの分離カラムに注入し，E-64-b のピーク高さを測定する。

別に標準溶液を用いて作成した検量線より血漿中の E-64-b の濃度を求める。

iv) E-64-c

供試動物の血漿 0.5 ml に，5% リン酸溶液 0.5 ml を加えた後，酢酸エチル 7 ml を加えてよく振り混ぜ，3分間遠心分離（3000 r. p. m.）

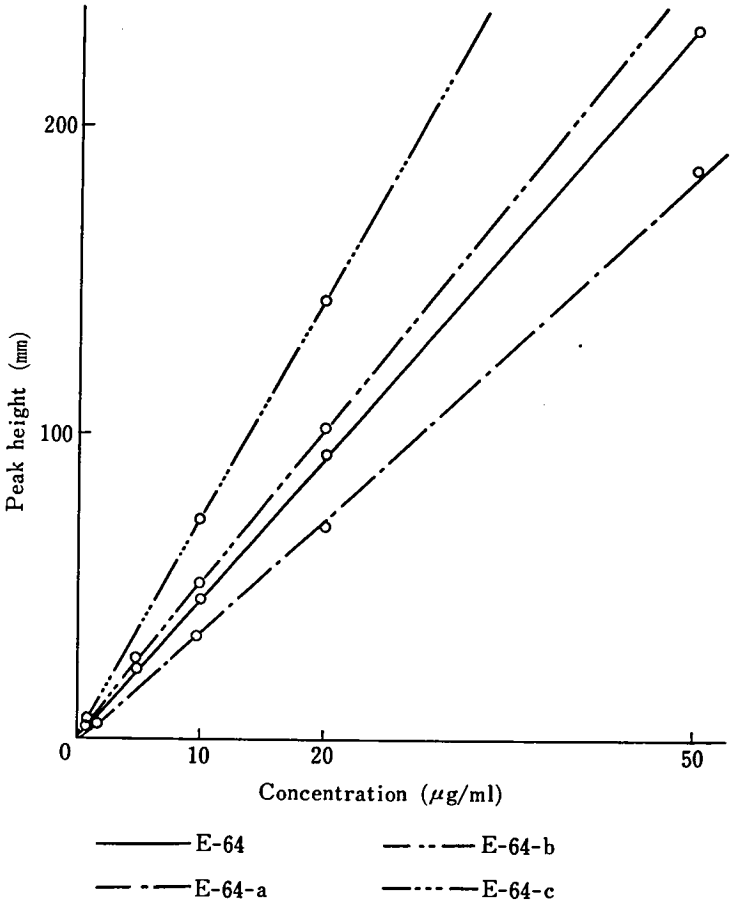


図1 検量線

表1 E-64 及びその類縁体の家兎血漿からの回収率

Compounds	Added (μg/ml)	Recovery (%)	
		Av. (n=3)	Range
E-64	1	97.4	11.3
	5	95.4	4.8
	10	95.5	5.0
E-64-a	1	103.8	3.5
	5	96.2	6.0
	10	100.3	0.4
E-64-b	1	103.2	9.3
	5	99.2	0.0
	10	97.9	2.7
E-64-c	1	99.7	0.1
	10	95.8	5.4

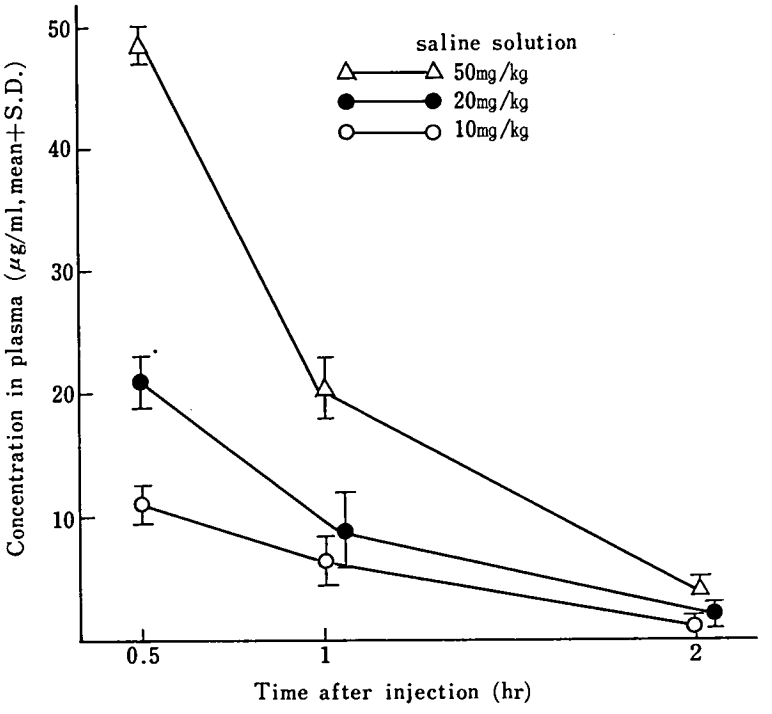


図2 E-64 のラットにおける皮下投与後の血漿中濃度の変動

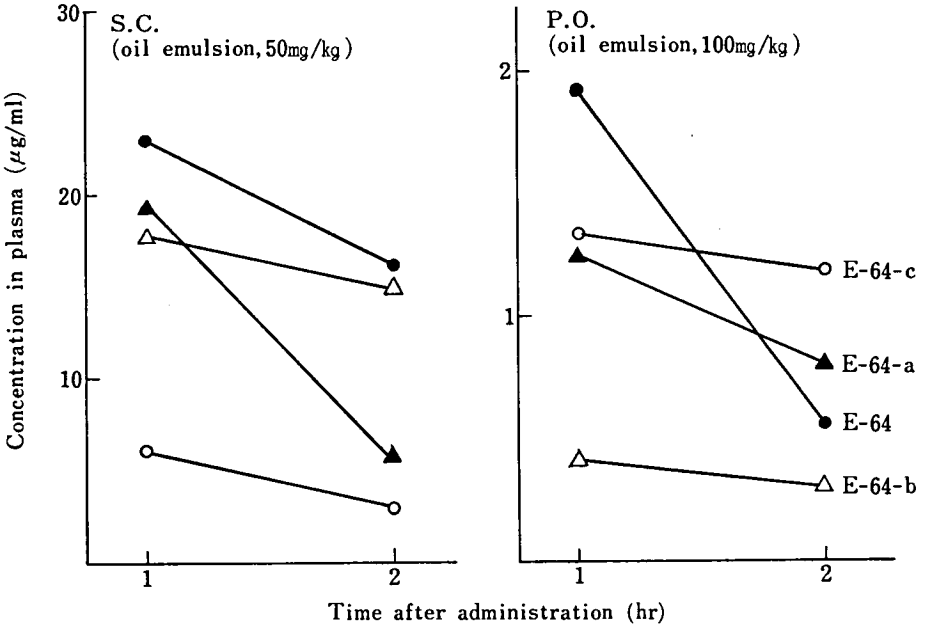


図3 E-64 及びその類縁体のラットにおける皮下及び経口投与後の血漿中濃度の変動 (n=2)

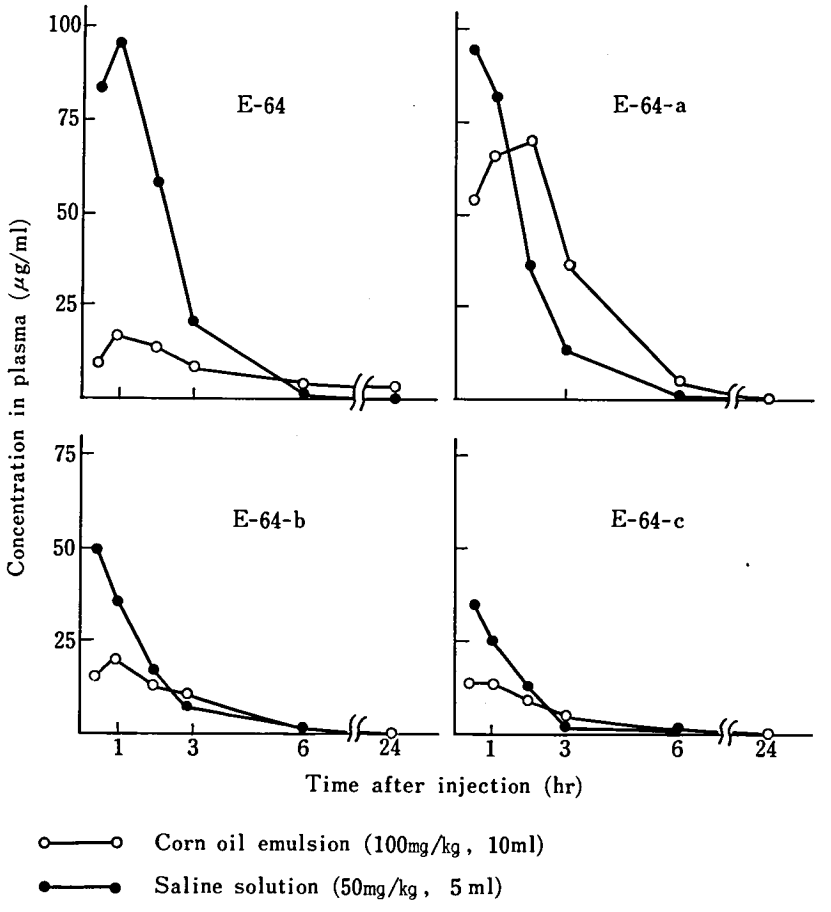


図4 E-64 及びその類縁体の家兎における皮下投与後の血漿中濃度の変動

する。この酢酸エチル層 5 ml を分取し，減圧下に濃縮乾固する。残留物を溶離液 0.5 ml に溶かし，この液 100 μl を高速液体クロマトグラフの分離カラムに注入し，E-64-c のピーク高さを測定する。

別に標準溶液を用いて作成した検量線より血漿中の E-64-c の濃度を求める。

結果及び考察

(1) E-64 及びその類縁体 a, b, c の血中濃度定量法

方法の項で述べた定量法に従って作成した検量線の1例を図1に示し，家兎血漿に添加した時の回収率を表1に示した。検量線はいずれも原点を通る良好な直線となり，回収率はすべて95%以上の良好な値を得た。検出限界は，E-64 0.2 μg/ml, E-64-a 0.6 μg/ml, E-64-b 0.2 μg/ml, E-64-c 0.1 μg/ml であった。

従って本法は，E-64 及びその類縁体の定量法として十分信頼性があると判断した。

(2) E-64 及びその類縁体の動物における血中濃度

ラットにおける E-64 の生理食塩水溶液の皮下投与量とその血漿中濃度の相関を図2に示す。明らかな投与量依存性が認められた。一方，剤形の比較及び E-64 及びその類縁体 a, b, c がいずれも水溶性が高い点を考慮し，油性形にして徐放化することを合わせて検討する目的でコーンオイルエマルジョン化し，ラットに皮下及び経口投与した。この結果を図3に示す。

皮下投与では，E-64 は生理食塩水溶液の方がコーンオイルエマルジョンにくらべて，吸収のピークは約2倍高いが排泄が早く，油性化による徐放化の効果も僅かに認められる。また，

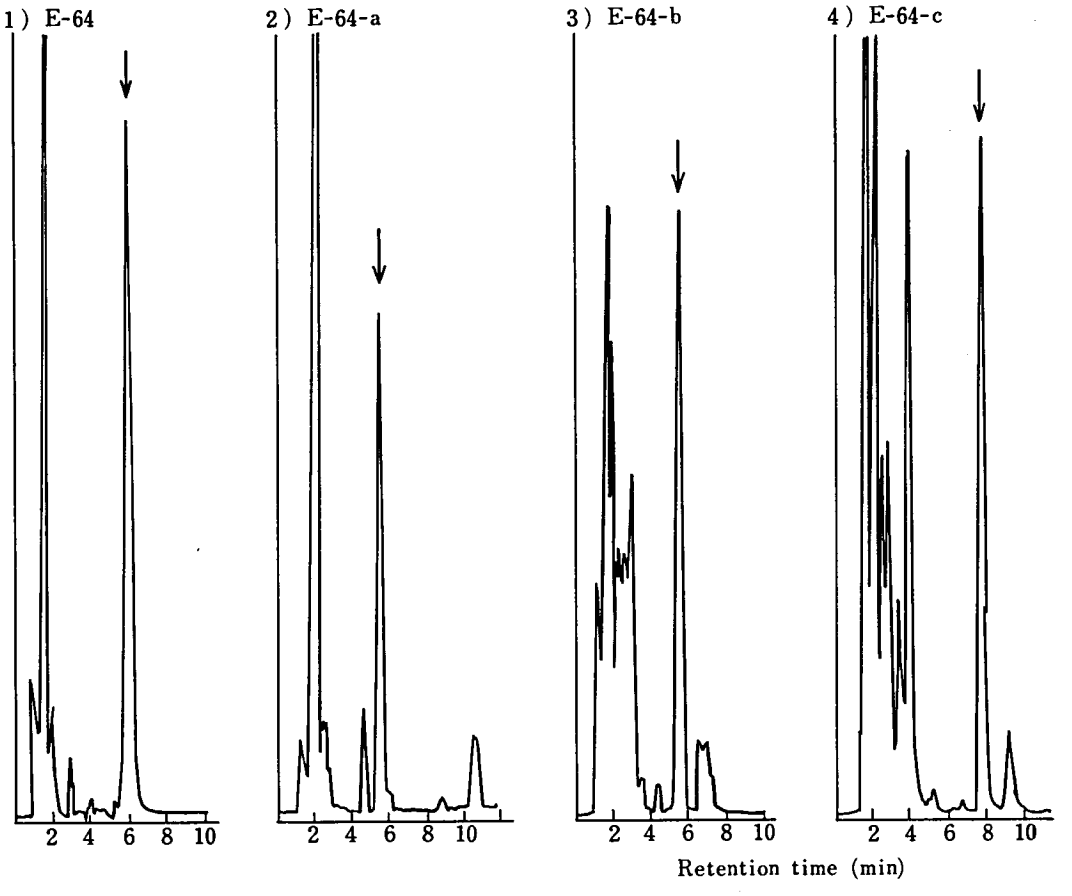


図5 E-64 及びその類縁体の家兎皮下投与後1時間血漿の高速液体クロマトグラム
（生理食塩水溶液）（矢印はそれぞれの化合物のピークを示す.）

経口投与では皮下投与にくらべて，いずれもその血中濃度は1/10～1/40と低いが，明らかな吸収が認められ，今後，剤形などの製剤学的検討によりこれらの薬物を経口薬として使用しうる可能性も高いと考えられる。

次いで，同一個体による血中濃度の推移を観察する目的で，家兎皮下投与後の経時変化を調べた。この結果を図4に，また，この際のクロマトグラムの例を図5に示す。

家兎の場合，ラットに比較していずれの薬物でもその血中濃度は2乃至3倍高く，これは種差によるものと考えられる。家兎においても，ラットの場合と同様に，生理食塩水溶液の方がオイルエマルジョンよりそのピークは高く（E-64-a ではほぼ同等），また僅かながら油性化による徐放化の効果も認められた。

更に，ジストロフィーチキンでの薬効評価に際して各薬物の投与基準を設定する目的で白色レグホンにおける皮下投与後の血中濃度を測定した。この結果を図6に示す。

各薬物の血中レベルは，投与量を換算すると，家兎にくらべて E-64-a はほぼ同レベル，E-64-b は約½，E-64 及び E-64-c は約¼のレベルであった。また哺乳動物にくらべて比較的その排泄速度が早い傾向がうかがわれ，特にその傾向は E-64-c において顕著である。

(3) E-64 の D，L 異性体の分離定量

天然の E-64 は，エポキシコハク酸部分はL体であるが，フマール酸を原料とする合成品では，DL 混合物が得られる。両者は互いにジア

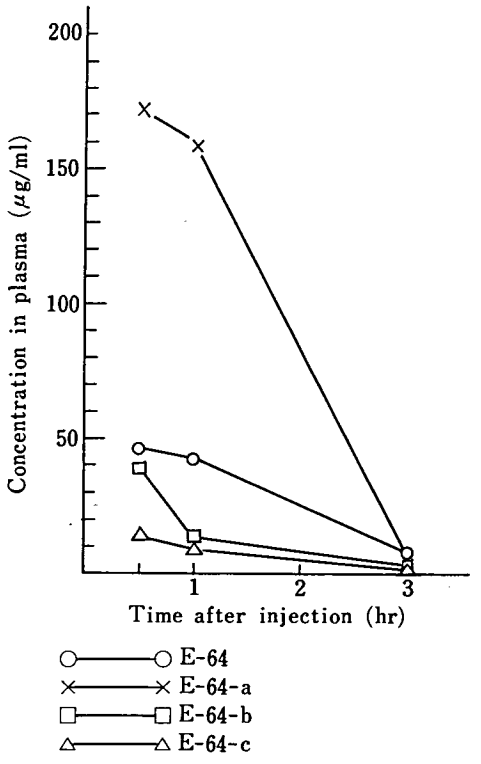


図6 E-64 及びその類縁体の鶏（白色レグホン）における皮下投与（生理食塩水溶液，100 mg/kg）後の血漿中濃度の変動

ステレオアイソマーであるため，高速液体クロマトグラフィーでの分離が可能と考え，その分離条件を検討した。その結果，E-64 用の溶離液に少量のリン酸を加えることにより，ほぼ良好に分離されることがわかった。この時のクロマトグラムの1例を図7に示した。そこで生体内での DL 体の挙動の差を知る目的で，合成品をラットに皮下投与して血漿中の DL 体の分離定量を行ったところ，表2に示すとおり，血漿中にも投与に用いた原料と同じ比率で DL 体が現われることがわかった。なお，投与に用いた原料中のL体含量は天然の E-64 を標準として定量したところ，58.9%であった。従って，生体内での DL 体の挙動には差はないものと考えられる。

結　論

1．E-64 及びその類縁体 a, b, c の高速液体クロマトグラフ法による定量法を確立した。

2．この方法により実験動物血中濃度測定法を検討した結果，E-64 及び a, b, c の各検出限界 0.2 μg, 0.6 μg, 0.2 μg, 0.1 μg の各範囲内で測定しうることがわかった。

3．ラット，家兎，鶏を用い，E-64 及びその類縁体 a, b, c の生理食塩水溶液，及びコーンオイルエマルジョンについて皮下，及び経口投与後の血中濃度を調べ，各薬剤の吸収性を比較した。皮下投与ではいずれも高い血中濃度が得られたが，その順序は E-64≒E-64-a>E

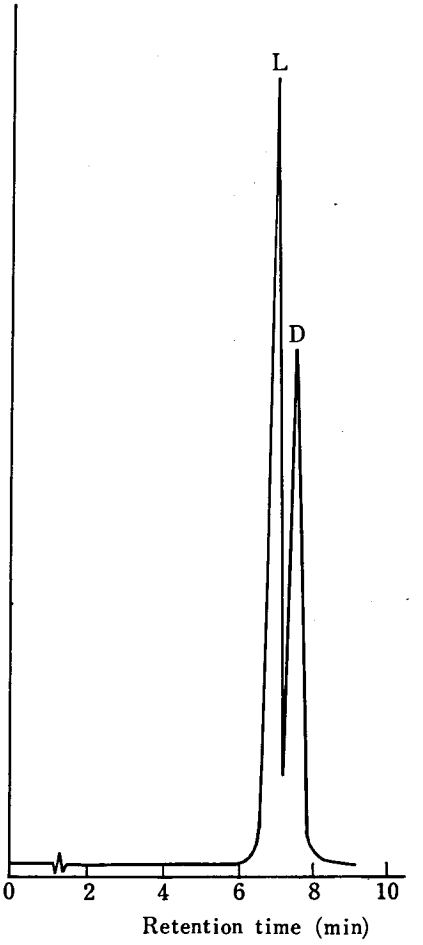


図7 D, L-E-64 の高速液体クロマトグラム
高速液体クロマトグラフ条件
カラム　ヌクレオシル C18 (5 μ)
溶離液　リン酸：メタノール：水 (0.5：10：90)

表2 D- 及び L-E-64 の皮下投与後のラット血漿中の分離定量
(オイルエマルジョン，50mg/kg)

Time after injection (hr)	No. of rats	Found (μg/ml)			
		L	D	Total	Ratio (L : D)
1	1	6.5	4.2	10.7	60.7 : 39.3
	2	11.2	8.0	19.2	58.3 : 41.7
2	3	2.9	2.4	5.3	54.7 : 45.3
	4	7.5	5.5	13.0	57.7 : 42.3

DL ratio of E-64 injected is 57.9 : 42.1

-64-b>E-64-c であった。ラットの経口投与では皮下投与にくらべて$^{1}/_{10}$～$^{1}/_{40}$と低いがいずれもその吸収は認められた。又，生理食塩水溶液ではいずれも3乃至6時間で速やかに排泄されるが，油性形のオイルエマルジョンにして用いることにより，血中レベルの保持時間を延長しうる。尚，血中レベルは動物種差により若干変動がみられた。

微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(E-64)の開発研究班

班員および関係者名簿

氏　　名	施　　設　　名	住　　所
主任研究者		
今堀和友(班長)	東京大学医学部第二生化学	〒113 東京都文京区本郷7-3-1
分担研究者		
江橋節郎	東京大学医学部第一薬理学	〒113 東京都文京区本郷7-3-1
杉田秀夫	東京大学医学部附属 脳研究施設　神経内科	〒113 東京都文京区本郷7-3-1
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 徳島県徳島市蔵本町3-18-15
西塚泰美	神戸大学医学部第二生化学	〒650 兵庫県神戸市生田区楠町7-12-1
福原武彦(幹事)	東京慈恵会医科大学第二薬理学	〒105 東京都港区西新橋3-25-8
小沢鉄二郎	国立武蔵療養所神経センター 機能研究部	〒187 東京都小平市小川東町2620
野村達次	実験動物中央研究所	〒213 神奈川県川崎市高津区野川1430
北川晴雄(監事)	千葉大学薬学部薬物学	〒280 千葉県千葉市弥生町1-33
大関正弘(幹事)	大正製薬株式会社総合研究所	〒330 埼玉県大宮市吉野町1-403
沢田二郎	大正製薬株式会社総合研究所	〒330 埼玉県大宮市吉野町1-403
班友		
里吉栄二郎	国立武蔵療養所神経センター	〒187 東京都小平市小川東町2620