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55年度研究報告書

班 長 今 堀 和 友

昭和56年 3 月

ま　え　が　き

難病治療薬 E-64 の研究を開始して以来2年が経ったことになる。第2年度においては初年度の研究の線に沿って，これをさらに発展させることに努力したのであるが，さらに次のような新しい試みをも加えた。

まず第一は班員の増強である。すなわち，市原明，石浦章一，宮武正，寺尾寿夫の4氏を正式班員に加えたが，市原，石浦両氏は細胞内プロテアーゼに対する E-64 の効果の判定の幅を拡げるため，宮武氏は細胞膜に対する E-64 の効果を調べるため，それぞれ参加して頂いた。他方，筋ジスモデル動物として，チキンが妥当か否かについての疑問が生じてきたので，ヒトの生筋をヌードマウスに移植し，これについての E-64 の効果を判定してもらうため，寺尾氏に参加して頂いた。

第二の点は，E-64 関連化合物中より今年度からは E-64-c に的をしぼり，その大量生産の方法を確立することにより，試料供給を保証した。また E-64-c の連続投与を行ったチキンにつき，生理学，病理学，薬理学，生化学の各方面からその効果を綜合的に判定するとともに，E-64-c の毒性に関しても徹底的に研究した。

昨年より引きつづき行われた研究については，本年度は大きな進展をみせたものが多く，その中には単に開発研究に止まらず，純学術的な立場からいっても世界の第一線級の成果が得られたものも多く含まれる。その点学術論文集としても充分価値あるものと信じている。

本研究は筋ジストロフィー治療薬の開発という視点から出発し，進みつつあるが，その成果の中には筋ジストロフィー症の研究者の参考となるものも含まれているであろう。他方，他の疾患中にも中性のチオールプロテアーゼが関与すると考えられるようになりつつあるものが増加しつつある今日，本成果はそれら疾患の研究に関係されている方々のお役にも立つのではないかと考えている。

最後に，本研究遂行に絶大な努力を払われ，かつ多忙中本報告書の執筆に労を惜しまれなかった班員の方々，本研究推進につき，すべての面で援助して頂いた厚生省薬務局の方々，さらに本報告書の出版をはじめ，班の運営につき事務のすべてを担当された大正製薬開発部の方々に深謝するものである。

今　堀　和　友

目　次

まえがき

I　製造方法

1．E-64-c の製造 ……沢田　二郎　9
2．DL-トランス-エポキシコハク酸の光学分割法 ……沢田　二郎　11
3．E-64-c 標識体の製造……沢田　二郎　15
4．E-64-c の物理化学的性質及び製剤化の検討 ……沢田　二郎　21

II　標的酵素に対する効果

5．ジストロフィーチキン骨格筋カテプシンB，H及びDの動態
　ならびに E-64-c 投与による阻害について ……勝沼　信彦　37
6．カルシウムプロテアーゼに対する E-64 の効果 ……今堀　和友　43
7．カルシウムプロテアーゼと燐脂質 ……西塚　泰美　49
8．プロテアーゼ阻害物質によるペプスタチン非感受性ヘモグロ
　ビン水解酵素の誘導 ……市原　明　55
9．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（続報）……宮武　正　61

III　組織及び細胞中のタンパク代謝に及ぼす効果

10．ニューロフィラメント変性に対する E-64-c の効果 ……杉田　秀夫　67
11．E-64-c の骨格筋内分布と in vivo におけるプロテアーゼ阻
　害作用についての検討 ……石浦　章一　71

12. カルシウムによる骨格筋の崩壊に関する研究 ……石浦　章一　75
13. 培養筋細胞に対するE-64の作用……小沢鉄二郎　85
～筋管細胞のタンパク分解速度に及ぼすE-64-cの影響～
14. N-〔N-(L-trans-3-Carboxyoxirane-2-carbonyl)L-leucyl〕-3-methyl-butylamine (E-64-c) の筋蛋白質代謝に及ぼす影響 ……江橋　節郎　89
15. ヌードマウスへの異種移植筋の再生に対するE-64の効果……寺尾　寿夫　93

Ⅳ　全身的影響に関する研究

16. E-64-cの急性及び亜急性毒性に関する研究 ……大関　正弘　99
17. E-64-cの抗原性に関する研究 ……大関　正弘　111
18. E-64-cの感覚器に及ぼす影響 ……大関　正弘　115
19. E-64-cの薬効に関する研究(1) ……大関　正弘　123
～筋ジストロフィーチキンに対する薬効試験～
20. E-64-cの薬効に関する研究(2) ……大関　正弘　131
～Serotonin myopathyに対するE-64-cの効果～
21. E-64-cの一般薬理作用 ……福原　武彦　141
～特に呼吸・循環機能及び中枢神経に及ぼす影響～
22. 取り込まれたE-64の細胞内分布と運命について ……勝沼　信彦　159
23. E-64-cの生体内動態に関する研究……大関　正弘　163
24. E-64-cの薬物代謝酵素活性への影響 ……北川　晴雄　179

I 製造方法

1. E-64-c の製造 ……沢田　二郎

2. DL-トランス-エポキシコハク酸の光学分割法 ……沢田　二郎

3. E-64-c 標識体の製造 ……沢田　二郎

4. E-64-c の物理化学的性質及び製剤化の検討 ……沢田　二郎

1. E-64-c の製造

沢 田 二 郎*

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

目 的

E-64-c, N-〔N-(L-3-**trans**-Carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl〕-3-methyl-butylamine, は合成的に得られた E-64 類縁体の一つであり，筋肉の Ca^{++}-activated neutral protease (CANP)[1] 及びラット肝カテプシン B[2] 及び L 等のチオールプロテアーゼに対し，E-64 とほぼ同等の阻害活性を有することが既に明らかにされている。又，大関ら[3),4)]は毒性，或いは生体内動態に関する比較から，E-64-c が天然 E-64 に十分比肩しうることを報告している。

本研究の目的は筋ジストロフィー症に対する E-64-c の医薬品としての開発を最終目標として，その研究に携わる「E-64 研究班員」へのサンプルの供給，並びに工場生産に必要な製造法の検討に関するものである。

方 法

E-64-c 合成法に関しては既に昭和54年度報告書[5)]中に詳細に報告した。ここではこの方法に準拠し，その製造規模をスケールアップすることに重点をおいた。尚，出発原料として用いた L 及び D-トランスエポキシコハク酸モノエチルエステルはそれぞれ立体選択的に D 及び L-酒石酸より合成した[6)]。

結 果

最終的に 2.7kg の E-64-c を得，本研究事業班員並びに研究協力者に提供した。又，E-64-c は 3 種の光学異性体を有するが，これらを E-64-c と比較する目的で合成した。その物理化学的性質を表 1 にまとめて示す。又，本年度中に得られた E-64-c 及び関連物質の総計を表 2 にまとめた。

表 1 E-64-c とその光学異性体の物性

Configuration ES	Configuration Leu	mp (°C)	$[\alpha]_D$ (c=1, EtOH)	Elemental analysis Calcd. for $C_{15}H_{26}N_2O_5$	C	H	N
					57.31	8.34	8.91
L	L	157-160	+45.5°(20°C)	Found	57.35	8.51	8.89
L	D	82-84	+86.7°(27°C)		57.22	8.42	8.81
D	L	83-85	−88.0°(29°C)		57.12	8.23	8.80
D	D	157-158	−39.0°(28°C)		57.44	8.43	8.73

ES, *trans*-epoxysuccinyl residue ; Leu, leucine residue

* 大正製薬株式会社総合研究所

表2 昭和55年度に製造した E-64-c 及びその標識体の総量

E-64-c	
L-L	2740g
L-D	0.9g
D-L	1.85g
D-D	0.5g
[^{14}C]E-64-c	11.6mCi
[^{3}H]E-64-c	2.9g

考　　察

E-64-c の合成法に関しては昨年度既に報告した。この方法により，更に，スケールアップの可否を検討したが製造工程上，余り大きな問題はなく大量製造も可能である。しかしながら，主原料である L-トランスエポキシコハク酸製造上，非天然型，D-酒石酸から5行程を経て合成するという，行程上の問題と，原料である D-酒石酸が高価でかつ，安定した入手が困難であるという大きな課題が残されている。この問題に関しては安価なフマール酸から得られる DL 体を分割する方法（昨年度一部報告）によりほぼ解決の見通しがついた。これについては別項で報告する。

参考文献

1）今堀和友：私信.
2）S. Hashida, T. Towatari, E. Kominami, N. Katumuma: Inhibition by E-64 derivatives of rat liver cathepsin B and cathepsin L *in vitro* and *in vivo*, J. Biochem., 88, 1805, 1980.
3）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，昭和54年度研究報告書 p. 25, 1980.
4）大関正弘：E-64 及びその類縁体の生体内動態に関する研究，昭和54年度研究報告書，p. 145, 1980.
5）沢田二郎：E-64 及びその類縁体の製造法に関する研究，昭和54年度研究報告書，p. 9, 1980.

2. DL-トランス-エポキシコハク酸の光学分割法に関する研究

沢 田 二 郎*

研究協力者 花 田 和 紀* 玉 井 正 晴* 小 熊 清 司*

目 的

現在，E-64 及びその類縁体を筋ジストロフィー治療薬として開発することを目指し研究が進められている。これらの化合物は筋ジストロフィー症発症の一つの要因であると推定されている Ca^{++}-activated neutral protease (CANP) を強く阻害する。更に，今堀[1]は活性基であるトランス-エポキシコハク酸（以下 t-ES と略）部分が (2S, 3S) 配位を有するL体の方がD体よりも，極めて高い活性を示すことを報告している。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，工業的規模で実用可能な t-ES 製造法を確立することが極めて重要である。我々は既に報告[2]した様に D-酒石酸より立体選択的に L-t-ES を合成する方法を確立したが，この方法は D-酒石酸が高価であり，しかも，安定に確保することが困難であるという難点がある。我々は既に昨年度，フマール酸から安価に製造出来るラセミ体 t-ES の分割法として種々のアミンを検討して，数種の有望な分割剤を発見した[2]。本年度はこれらの中で最も実用性の高いと考えられる L-フェニルアラニンアミド（以下 L-Phe-NH_2 と略）及びデヒドロアビエチルアミン（以下DAA と略）についてその実用化に足るスケールアップ法を詳細に検討した。

* 大正製薬株式会社総合研究所

方 法

L-Phe-NH_2 は既報の方法[2]で合成した。DAA は市販品（東京化成工業製）を W. J. Gottstein の方法[3]で精製して用いた。DL-t-ES は G. B. Payne の方法[4]に従ってフマール酸より合成した。L-t-ES の上記アミンとのジアステレオアイソマー塩形成による分割に際してのスケールアップに必要な諸条件を検討した。

結 果

前年度得られた分割剤の中で最も良い成績を示した L-Phe-NH_2 について10倍にスケールアップして塩形成の諸条件を検討した。表1に示す様に溶媒中の含水量を少なくすると塩の収率は多少上昇するが，その旋光度から，逆に純度が低下することが判った。表2に示す様に塩形成時の濃度は大きな影響を与えず，又，DL-t-

表1 L-フェニルアラニンアミドによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割
—塩形成用溶媒の検討—
溶媒量：30 ml
DL-t-ES：30 m mol
L-Phe-NH_2：30 m mol

Solvent	Yield (%)	$[\alpha]_D^{26}$(c=1, MeOH)
95% MeOH	49.1	+58.2°
98% 〃	77.7	+13.0°
100% 〃	66.7	+7.9°

表2 L-フェニルアラニンアミドによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割
—DL-トランス エポキシコハク 酸濃度の 影響—
溶媒：95% MeOH
DL-t-ES：30 m mol
L-Phe-NH_2：30 m mol

Solvent volume (ml)	Yield(%)	$[\alpha]_D^{26}$(c=0.9, MeOH)
36	46.8	+62.9°
30	49.1	+58.2°
27	45.7	+57.1°
24	47.5	+58.3°
22	35.1	+61.8°

表3 L-フェニルアラニンアミドによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割
—DL-トランスエポキシコハク酸と L-フェニルアラニン比の塩形成率に及ぼす影響—
溶媒：95% MeOH 30 ml
DL-t-ES：30 m mol

L-Phe-NH_2/DL-t-ES	Yield (%)	$[\alpha]_D^{26}$(c=0.9 MeOH)
1.0	49.1	+58.2°
1.1	36.3	+59.4°
1.2	64.6	+7.9°

表4 L-フェニルアラニンアミドによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割
—スケールアップ—

A. Preparation of salt

DL-ES(g)	L-Phe-NH_2(g)	Solvent	Salt	
			Yield(g)	$[\alpha]_D$
0.396	0.492	95% MeOH	0.372 (84%)	+64.6°
27.7	34.4	〃	26.1 (84%)	+61.3°

B. Separation

Salt(g)	Method	L-ES		
		Yield(g)	$[\alpha]_D$	Overall yield
0.354	Dowex 50 column	0.128 (81.1%)	+109.8°	68.0%
26.0	solvent extraction	8.34 (72.5%)	+115.4°	61.0%

ES と分割剤の比は表3に示す様に小スケールの場合と同様に1：1（モル比）が良かった。この様に検討した範囲では，塩形成は既報の条件，即ち，95%メタノールに DL-t-ES 及び L-Phe-NH_2 を共に 1 m mol/ml の濃度で溶解し，結晶を析出させる条件が最も良い成績を示した。しかし，前年度の結果と比べると収率がかなり低かったが，この原因は DL-t-ES の純度にあることが判った。後述する様に95%以上の純度の原料を用いれば，大スケールでも収率は80%を越えた。

この塩から L-t-ES を分離するために，従来イオン交換樹脂を用いて来たが，これは大量処理には不適である。そこで，溶媒抽出法について検討したところ，硫酸々性水溶液より酢酸エチルで効率よく抽出分離しうることがわかった。収率はイオン交換樹脂法より若干落ちるが，得られた L-t-ES の純度は更に上昇した。

同条件下で約70倍のスケールで行った分割結果を表4にまとめて示す。

次いで，L-Phe-NH_2 よりもはるかに安価に入手出来る DAA について同様にスケールアップ条件を塩形成の際の溶媒として種々の含水量のエタノール及びアセトンについて検討した。表5に見られる様にエタノールの場合収率は高いが純度は低い。これを再結晶しても純度は上昇するが，収率は大幅に低下するので，アセトンを溶媒として用いる方がはるかに優れて

表5 デヒドロアビエチルアミンによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割
—塩作成用溶媒の検討—
DL-t-ES : 30 m mol　　DAA : 30 m mol

Solvent	Volume(ml)	Yield(%)	$[\alpha]_D^{23}$(c=1, MeOH)
100% ethanol	10	108.6	+25.6°
95% 〃	10	98.4	+22.4°
95% acetone	40	78.1	+45.5°
90% 〃	30	65.5	+53.4°
85% 〃	15	62.0	+52.7°

表6 デヒドロアビエチルアミンによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割
—DL-トランスエポキシコハク酸濃度の影響—
溶媒：90%アセトン
DL-t-ES : 10 m mol　　DAA : 10 m mol

Solvent volume(ml)	Yield(%)	$[\alpha]_D^{23}$(c=1, MeOH)
15	71.2	+48.1°
20	66.4	+51.5°
30	68.4	+50.7°
35	67.8	+51.8°

表7 デヒドロアビエチルアミンによる DL-トランスエポキシコハク酸の分割
—DL-トランスエポキシコハク酸デヒドロアビエチルアミン比の 塩形成率に及ぼす効果—
溶媒：90%アセトン　　DL-t-ES : 10 m mol

DAA/DL-t-ES	Yield(%)	$[\alpha]_D^{23}$(c=1, MeOH)
1.0	67.2	+52.6°
1.2	84.0	+49.2°
1.4	99.4	+48.0°
1.6	121.7	+42.2°
2.0	168.1	+34.3°

表8 DL-トランス-エポキシコハク酸のデヒドロアビエチルアミンによる大量分割

A. Preparation of salt

DL-ES(g)	DAA	Solvent	Salt	
			Yield(g)	$[\alpha]_D$
0.661	1.427	EtOH	0.56 (31.1%)	+50.8°
36.6	100	90% acetone	86 (83.8%)	+52.6°

B. Separation

Salt(g)	Method	L-ES		
		Yield(g)	$[\alpha]_D$	Overall yield
0.549	Dowex 50 column	0.081 (84.1%)	+115.9°	26.2%
86.0	solvent extraction	10.7 (66.1%)	+115.7°	55.4%

いる。次に，DL-t-ES に対する溶媒量を検討したが大きな差異は認められなかった（表6）。一方，DL-t-ES と分割剤の比率は表7に示す様に分割効率に影響が認められ，収率及び純度を考慮して1：1.2～1.4が良いと思われる。

塩から L-t-ES の分離は前述の L-Phe-NH_2 の場合と同様に溶媒抽出により，アルカリ性水溶液よりクロロホルムで DAA を抽出して除いた後，水層を酸性にして酢酸エチルで L-t-ES を抽出することが出来た。

これらの結果をもとに既報のスケールの約55倍の規模にスケールアップしたところ，表8に示した様に通算収率が約2倍という好結果が得られた。

考　　察

L-Phe-NH_2，DAA で分割する方法共に今後，更に工場スケールにまでスケールアップすることが可能であろう。しかしながら，実用面から見ると後者は極めて安価に入手出来る点，より有用である。しかも，用いた分割剤は溶媒抽出により約70～80%が回収可能であるので大規模になる程，コストダウンができるという利点がある。

参考文献

1）今堀和友：私信.

2）沢田二郎：L-トランスエポキシコハク酸製造法に関する研究，昭和54年度研究報告書，p. 15, 1980.

3）W. J. Gottstein, L. C. Cheney: Dehydroabiethylamine. A new resolving agent, J. Org. Chem., **30**, 2027, 1965.

4）G. B. Payne, P. H. Wiliams: Reaction of hydroperoxide Ⅳ. Sodium tungstate catalyzed epoxidation of α, β-unsaturated acid, J. Org. chem., **24**, 54, 1959.

3. E-64-c 標識体の製造

沢 田 二 郎*

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

目 的

昭和54年度における本事業の成果として合成 E-64-c が天然 E-64 に十分代替し得るという結果を得，既に〔^{3}H〕-ラベル体を用い大関によりその生体内動態について報告されている[1]。本研究の目的は E-64-c の Ca^{++}-activated neutral protease あるいは Cathepsin 等に対する阻害機構の解明，及び代謝，生体内分布等，〔^{3}H〕-ラベル体による研究をふまえ，更に ^{14}C 標識化合物により，より詳細に検討するためその試料として，〔^{14}C〕E-64-c を製造，提供することにある。あわせて，将来人にも適用が可能な〔^{2}H〕-ラベル体を製造し，その応用性を動物レベルで検討する目的で活性基であるエポキシコハク酸部分に〔^{2}H〕を導入した〔^{2}H〕E-64-c を製造することにある。

方 法

〔^{14}C〕E-64-c は L-〔U-^{14}C〕Leucine を原料として既報の E-64-c 合成法[2]に準じて，図1に示す様なルートで合成した。又，〔^{2}H〕E-64-c は図2に示す様に〔2,3-^{2}H〕Fumaric acid を出発原料とし，K. Hanada 等の方法[3]に準じて DL-trans-ethyl hydrogen epoxysuccinate を得，それを原料として E-64-c 合成法に準じて合成した。各反応を以下に述べる。

* 大正製薬株式会社総合研究所

1. 〔^{14}C〕E-64-c の製造法

1) *t*-Butoxycarbonyl-L-〔^{14}C〕leucine monohydrate.

L-〔U-^{14}C〕Leucine (1.31g, 30 mCi) 及び triethylamine (1.52 g) の水溶液 (60 ml) に t-butyl-S-4,6-dimethylpyrimidine-2-ylthiocarbonate (4.4 g) の dioxane 溶液を氷冷攪拌下滴下した後，2時間室温で攪拌した。一夜放置後，水 (50 ml) を加え，ethylacetate (50 ml×2) で抽出した。水層を塩酸々性にして ethylacetate (50 ml×3) で抽出し，その有機層を5％塩酸水及び飽和食塩水で順次洗浄し，無水硫酸マグネシウム上で乾燥後，濃縮乾固した。得られた残渣をエタノール-水より結晶化し，そのまま次の反応に供した。

2) *t*-Butoxycarbonyl-L-〔^{14}C〕leucyl isoamylamine.

上記 t-butoxycarbonyl-L-〔^{14}C〕leucine monohydrate, 1-hydroxybenztriazol (1.62 g), N-methylmorforine (1.21 g) 及び isoamylamine (1.044 g) の tetrahydrofurane 溶液 (2.5 ml) に氷冷攪拌下，1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (2.3 g) を徐々に加え，氷冷下1時間，更に室温で2時間攪拌した後，一夜放置した。溶媒を留去後，残渣を水 (50 ml) に溶解し，ethylacetate (50 ml×3) で抽出した。有機層を合わせ，5％塩酸水，飽和重曹水及び飽和食塩水で順次洗浄し，乾燥後濃縮乾固し，2.31 g の目的物を得た。（収率：1)，2) を通算して77％）

3) L-[^{14}C]Leucyl isoamylamine.

t-Butoxycarbonyl-L-[^{14}C]leucyl isoamylamine (2.31g) をギ酸 (2.5 ml) に溶解し，一夜放置後ギ酸を減圧下留去した。残渣に水を加え，NaOH 溶液でアルカリ性にした後，ethylacetate (50 ml×3) で抽出した。有機層を合わせ，飽和食塩水で洗浄し，乾燥後濃縮乾固し，1.36 g の目的物を得た。(収率：88.3%)

4) N-[N-(L-3-*trans*-Ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-[^{14}C]leucyl] isoamylamine.

L-[^{14}C]Leucyl isoamylamine (1.36 g), L-ethyl hydrogen epoxysuccinate (1.28 g), 1-hydroxybenztriazol (1.08 g) 及び N-methylmorforine (0.81 g) を tetrahydrofurane (75 ml) に溶解し，氷冷攪拌下，1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (1.48 g) を徐々に加え，室温で4時間攪拌した。溶媒を留去し，残渣に水 (60 ml) を加えた後，ethylacetate (50 ml×3) で抽出した。有機層を合わせ，5%塩酸水，飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄し，乾燥後濃縮乾固した。残渣を ethylether-n-hexane より結晶化し，1.67 g の目的物を得た。(収率：71.7%)

5) N-[N-(L-3-*trans*-Carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-[^{14}C]leucyl] isoamylamine ([^{14}C]E-64-c)

N-[N-(L-3-trans-Ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-[^{14}C]leucyl isoamylamine (1.67 g) の ethanol 溶液 (10 ml) に ethanol-水混液 (4：1, 2.5 ml) に NaOH (2.9 g) を溶解して氷冷攪拌下滴下した後，室温で4時間攪拌した。10%塩酸水 (50 ml) を加えて酸性にした後，ethylacetate (70 ml×3) で抽出した。有機層を合わせ，飽和食塩水で洗浄し，乾燥後濃縮した。Ethylacetate-pet-ether より結晶化し，1.223 g の目的物を得た。(収率：80.5%)

2. DL-[^{2}H]-E-64-c の製造法

1) DL-[^{2}H]-*trans*-epoxysuccinic acid.

[2,3-^{2}H]Fumaric acid (10 g) 及び NaOH (5.16 g) の水懸濁液に $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ (2.82 g) の30%過酸化水素水 (12 ml) 溶液を加え，NaOH 溶液 (1.72 g, 5 ml) で pH 4.2 に調整しながら，65°C で2時間攪拌した。残余 NaOH 溶液を加え，更に 85°C で1時間攪拌した後，$BaCl_2 \cdot 2H_2O$ (42 g) の水溶液 (100 ml) を加え2時間室温に放置した。生じた沈殿を沪取し，アセトンで洗浄後，乾燥した。得られた粉末を，H_2SO_4 (8.4 g) を含む ethylether (100 ml) に懸濁し，3時間攪拌抽出した。残渣より再抽出した ethylether 溶液を合わせ，濃縮乾固して目的物 6.75 g を得た。(収率：60.1%)

2) DL-[^{2}H]-*trans*-Diethylepoxysuccinate.

DL-[^{2}H]-trans-Epoxysuccinic acid (6.75 g) 及び，*p*-toluensulfonic acid (0.486 g) を ethanol (300 ml) に溶解し，6時間煮沸還流した。溶媒を留去後，残渣を benzene (300 ml) に溶解し，飽和重曹水及び飽和食塩水で順次洗浄し，乾燥後，溶媒を留去した。得られた油状物を減圧分留して目的物 6.93 g を得た。(収率：73.5%)

3) DL-[^{2}H]-*trans*-Ethyl hydrogen epoxysuccinate.

DL-[^{2}H]-trans-Diethylepoxysuccinate (6.83 g) の ethanol 溶液 (13 ml) に氷冷攪拌下，KOH (2.24 g) の ethanol 溶液 (20 ml) を滴下し，氷冷下2時間，更に室温で1時間攪拌した。Ethylether (26 ml) を加え，生じた沈殿を沪取した。この沈殿の水溶液 (15 ml) を塩酸々性にした後，ethylacetate (20 ml×3) で抽出した。有機層を合わせ，飽和食塩水で洗浄し，次いで乾燥後濃縮乾固し目的物5.05 g を得た。(収率：70%)

4) N-[N-(DL-[^{2}H]-3-*trans*-Ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-leucyl] isoamylamine.

DL-[^{2}H]-trans-Ethyl hydrogen epoxysuccinate (5.05g), L-leucylisoamylamine (6.6 g), 1-hydroxybenztriazol (4.46 g) 及び N-methylmorforine (3.33 g) の tetrahydrofurane 溶液 (250 ml) に氷冷攪拌下，1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (6.32 g) を徐々に加え氷冷下2

時間攪拌後，一夜5°Cに放置した。溶媒を留去後，残渣に水（100 ml）を加え，ethylacetate（100 ml×2）で抽出した。有機層を合わせ，5％塩酸水，飽和重曹水及び飽和食塩水で順次洗浄し，乾燥後濃縮乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（chloroform）で精製して目的物4.65 gを得た。（収率 43％）

5）N-〔N-(DL-〔^{2}H〕-3-*trans*-Carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl〕isoamylamine（〔^{2}H〕E-64-c）

N-〔N-DL-〔^{2}H〕-3-trans-Ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-leucyl〕isoamylamine（4.65 g）のethanol溶液（26 ml）にNaOH（0.72 g）の80％含水ethanol溶液を氷冷攪拌下滴下した後，更に室温で3時間攪拌した。反応液に5％塩酸水（50 ml）を加えて酸性にした後，ethylacetate（70 ml×3）で抽出した。有機層を合わせ，飽和食塩水で洗浄し，次いで乾燥後濃縮乾固し目的物2.89 gを得た。（収率：69％）

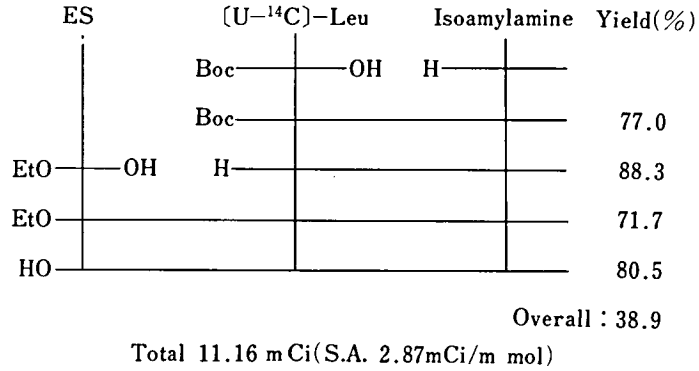


図1 〔^{14}C〕E-64-c の製造行程

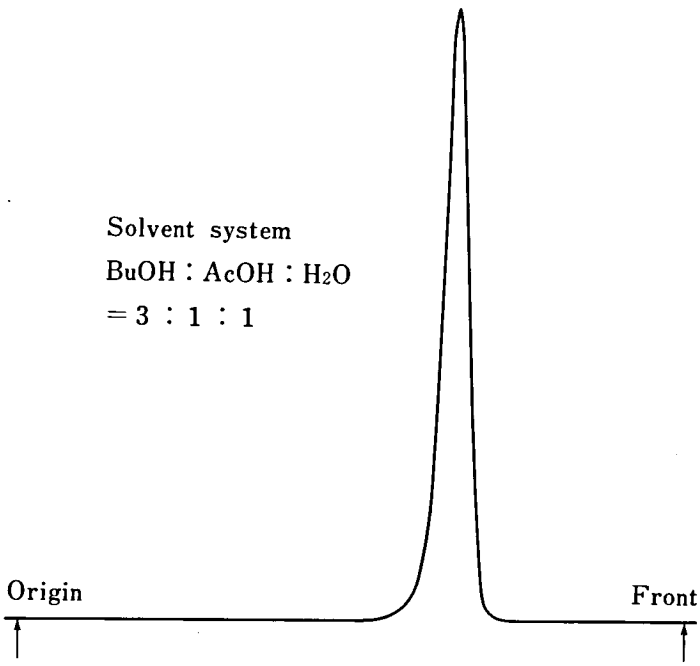


図2 〔^{14}C〕E-64-c のラジオクロマトグラム

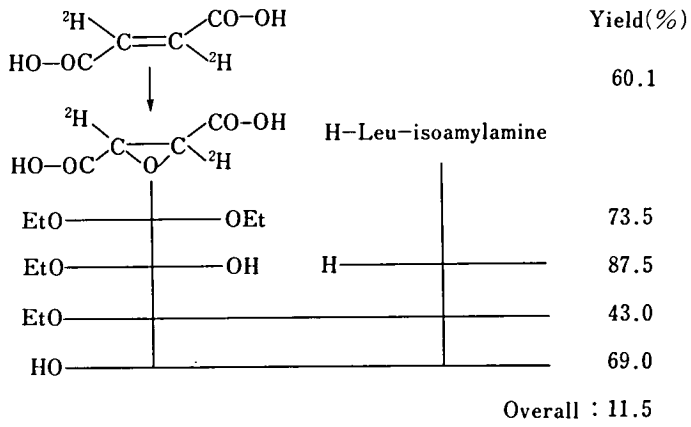


図3 DL-〔^{2}H〕E-64-c の製造行程

結　　果

〔^{14}C〕E-64-c は図1に示した様に L-〔U-^{14}C〕Leucine より5段階の反応を経て得られた。第1段階の Boc 化反応の際，原料の L-〔U-^{14}C〕Leucine が稀薄水溶液であるため反応が十分進行しないことが予備実験でわかった。又，水溶液を濃縮すると分解の恐れがあるので反応条件を検討し，Boc 化試薬を倍量用いることにより問題を解決することが出来，全行程の通算収率で最終的に 11.6 mCi の目的物（比活性 2.87 mCi/m mol）を得ることが出来た。最終産物は，図2に示した以外の展開溶媒でも TLC のラジオクロマトグラムで単一ピークを示し，放射化学的に純粋であることが確認出来た。同時に，種々の発色剤で定性的に調べたが，不純物は検出されず，極めて高純度であることが認められた。

〔^{2}H〕E-64-c の製造ルートは図3にまとめた。この方法ではフマール酸から DL-トランスエポキシコハク酸が得られるため，最終産物はエポキシコハク酸部分がD及びL体のジアステレオアイソマーの混合物である。DL-トランス-エポキシコハク酸のエステル化の際，従来は触媒として硫酸を用いていたが，*p*-トルエンスルホン酸を用いることにより，硫酸触媒法の平均収率より約10%高い収率でジエステルを得ることが出来た。以上の方法により 2.9 g の DL-〔^{2}H〕E-64-c を得た。

考　　察

E-64-c の酵素阻害活性基は L-トランス-エポキシコハク酸部分にある。従って，生体内動態，特に標的組織への分布を調べるには，この活性基の代謝を追跡することが極めて大切である。しかしながら，現段階では L-トランス-エポキシコハク酸部分を〔^{14}C〕で標識することは合成上極めて困難である。

大関らは〔^{3}H〕E-64-c を皮下投与し，放射活性の大部分は未変化体 E-64-c であることを報告している。この事実より，ロイシン部分に標識した E-64-c もその用途により十分利用しうると期待される。又，得られた標品は極めて純度が高く，十分に実験に供しうることがわかった。

しかし，経口投与の場合，トランス-エポキシコハク酸とロイシンの間の結合が一部切断されるという結果が得られているので，代謝産物を詳細に検討する際，トランス-エポキシコハク酸部分に〔^{2}H〕標識された化合物は有用な武器となりうると考えられる。又，本品は上述の如く，DL-混合物であり，収率も若干低いが，別項に報告した様に DL-トランス-エポキシコハク酸の光学分割も可能であるので，今後，目的に応じ光学的に純粋な〔^{2}H〕E-64-c の製造も可能である。

参考文献

1) 大関正弘：E-64 及びその類縁体の生体内動態に関する研究，昭和54年度研究報告書 p. 145, 1979.
2) 沢田二郎：E-64 及びその類縁体の製造法に関する研究，同上 p. 9.
3) K. Hanada, M. Tamai, S. Morimoto, T. Adachi, S. Ohmura, S. Sawada, I. Tanaka: Inhibitory activity of E-64 derivatives on papain, Agric. Biol. Chem., 42, 537, 1978.

4. E-64-c の物理化学的性質及び製剤化の検討

沢 田 二 郎*

研究協力者 和志武 三 徳* 林 英 文* 玉 城 正 夫*
小 沢 康 雄* 小 山 郁 夫* 中 池 郁 子*

目 的

E-64-c はヒト進行性筋ジストロフィー症に対する薬効が期待され，その治療薬として適用するために多角的検討がなされてきており，標的酵素である Ca^{++}-activated neutral protease 及びカテプシン B，L 等に対する阻害活性を有することが既に確認されている[1),2)]。

一方，E-64-c をモデル疾患動物において評価する場合，投与条件が血中濃度に影響し，さらには作用部位である筋肉細胞内の濃度にも影響することが考えられる。

本研究の目的は，最も有効な投与ルート，剤形などを決めるにあたって必要な基本的データである E-64-c の物理化学的性質及び生体に投与した場合の薬動力学的パラメーターを明らかにし，次にこれらに基づき基礎的な製剤化の検討をすることにある。

1．物理化学的性質

方 法

本実験に用いた試料は当研究所において合成されたもので，構造式，化学名，分子式，分子量及び元素分析値を表1に示す。

また，日本薬局方通則及び一般試験法により測定した性状，融点，重金属，ヒ素，塩化物，乾燥減量及び強熱残分の結果は表2のとおりであった。

(1) 各種溶媒に対する溶解性

各種溶媒に対する溶解性を日本薬局方通則に従って試験した。

(2) 解離定数 (pKa)

解離定数を滴定法[3)]により求めた。本品 157 mg をとり，新たに煮沸し冷却した蒸留水 47.5 ml を加えて溶かす。この液を窒素気流中で攪拌しながら 0.1N 水酸化ナトリウム液 (f=0.943) で滴定した。

(3) 旋光度

本品 0.1 g を精密に量り，測定溶媒を加えて溶かし正確に 10 ml とする。この液につき，層長 100 mm の測定管を用いて日本薬局方一般試験法の旋光度測定法により測定し，比旋光度 ($[\alpha]_D^{20}$) を求めた。

(4) 分配係数

本品の 200 μg/ml の酢酸エチル溶液を調製する。この液 20 ml ずつを正確にとり，それぞれに pH 1 の 0.2M 塩化カリウム-塩酸緩衝液及び pH 2.5, 4.5, 7.0, 9.0 の Britton-Robinson 緩衝液各 20 ml を加え，37° で1時間振盪する。遠心分離した後，水層及び有機層中の E-64-c の濃度を液体クロマトグラフ法[4)]により定量し，分配係数を求めた。

(5) 吸湿性

本品約 0.5 g をガラス容器にとり，105° で2時間乾燥した後，相対湿度54%（臭化カリウム飽和溶液），75%（塩化ナトリウム飽和溶液）及び82%（塩化カリウム飽和溶液）のデシケー

* 大正製薬株式会社総合研究所

I 製造方法

表1 E-64-c の構造

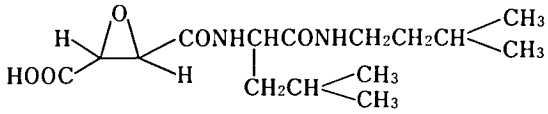
Structural formula				
Chemical name	N-[N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-3-methylbutylamine (E-64-c)			
Molecular formula	$C_{15}H_{26}N_2O_5$			
Molecular weight	314.38			
Elementary analysis	Anal.	C, 57.31	H, 8.34	N, 8.91
	Found	C, 57.35	H, 8.51	N, 8.89

表2 品質試験

Impurities	Determination method	Result
Description		White crystals or crystalline powder with odourless and a slightly bitter taste
Melting point	J.P. 9 First method	156.0°
Heavy metals	J.P. 9 Second method	<10 ppm
Arsenic	J.P. 9 Third method	<2 ppm
Chloride	J.P. 9	<0.036%
Loss on drying	J.P. 9 (1 g, 105°, 2 hr)	0.32%
Residue on ignition	J.P. 9	0.03%

ター中に入れ，40° の恒温室に7日間放置し，重量増加率（%）を化学はかりを用いて測定した。

(6) 赤外吸収スペクトル

本品 3 mg に臭化カリウム 0.5 g を加え，乳鉢で粉砕混合したものにつき，日本薬局一般試験法の赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法により測定した。

(7) 核磁気共鳴スペクトル

本品 0.04 g に重アセトン 0.4 ml を加えて溶かした液につき，内部基準として添加したテトラメチルシランのシグナルを 0 ppm とし，60 MHz の共鳴周波数で水素核について 0～12 ppm の範囲を掃引した。

(8) 熱分析

本品約 0.01 g をとり，α-アルミナを対照とし，室温から 350° まで 10°/分 で昇温させ，示差走査熱分析（DSC）及び熱重量分析（TG）を行った。

(9) X線回折

本品をめのう乳鉢で粉砕した後，ホルダーにつめ，X線発生管球対陰極は銅（ニッケルフィルター），ゴニオメータ走査速度は毎分 1°(2θ) の条件で測定した。

(10) 定量法（滴定法）

本品を乾燥し，その約 0.5 g を精密に量り，中和エタノール 20 ml を加えて溶かし，更に水 30 ml を加えた後，0.1 N 水酸化ナトリウム液（f=1.083）で滴定した（指示薬：ブロムクレゾールグリン試液 4 滴）。ただし，滴定の終点は液の黄色が青色に変わるときとする。

0.1 N 水酸化ナトリウム液 1 ml
=31.438 mg $C_{15}H_{26}N_2O_5$

(11) 水溶液中での安定性

各種 pH (3～10) の Britton-Robinson 緩衝液を用い，本品の濃度 20 μg/ml の溶液を調製する。この液をガラスアンプルに充てんし，65° 保存における残存率の経時的変化を液体クロマトグラフ法[4]により測定した。また，同様

表3 各種溶媒に対する溶解性

Solvents	Solubility Solvent(ml)/Solute(1 g)	Descriptive term in J.P. 9
Methanol	0.9	Very soluble
Dehdrated ethanol	1.4	Freely soluble
Acetone	4.3	Freely soluble
Dioxane	25	Soluble
Ethyl acetate	44	Sparingly soluble
Dichloromethane	150	Slightly soluble
Water	250	Slightly soluble
Ether	850	Slightly soluble
n-Hexane	> 10,000	Practically insoluble

表4 解離定数 (25°)

0.1 N NaOH added(ml)	pH	$\log\frac{[HA]-[H^+]}{[A^-]+[H^+]}$	pKa
0	2.32		
0.5	2.39	0.00	2.39
1.0	2.46	−0.06	2.40
1.5	2.52	−0.15	2.37
2.0	2.60	−0.23	2.37
2.5	2.70	−0.31	2.39
3.0	2.80	−0.42	2.38
3.5	2.92	−0.55	2.37
4.0	3.09	−0.70	2.39
4.5	3.33	−0.94	2.39
		Mean [pKa]	2.38

にして pH 7.4 の 1/15 M リン酸塩緩衝液中における安定性を 65°, 80° 及び 100° 保存について検討し，温度依存性を調べた。

結果及び考察

各測定結果を表3～9及び図1～6に示す。各種溶媒に対する溶解性はメタノールに極めて溶けやすく，無水エタノール又はアセトンに溶けやすく，ジオキサンにやや溶けやすく，n-ヘキサンにほとんど溶けなかった（表3）。pKa は2.38であり，エポキシ基の電子吸引性により強い酸性を示した（表4）。旋光度は無水エタノール及びジオキサンのいずれの溶媒においても右旋性を示し，比旋光度はそれぞれ +44.4° 及び +10.0° であった（表5）。酢酸エチル－水系における分配係数は通常の一塩基酸と同様に pH が高くなるにつれて減少した（表6）。

表5 各種溶媒中における比旋光度 ($[\alpha]_D^{20}$)

Solvents	$[\alpha]_D^{20}$(c=1.0)	Mean
Dehydrated ethanol	+44.4° +44.5° +44.3°	+44.4°
Dioxane	+10.1° + 9.8° +10.0°	+10.0°

表6 分配係数 (37°)

pH	Ethyl acetate/Water*
1.0	44.3
2.5	14.7
4.5	0.15
7.0	<0.01
9.0	<0.01

*Britton-Robinson buffer

表7 吸湿性（40°，7日間）

Relative humidity (%)	No.	Equilibrium moisture aborbed (%)	Mean (%)
54	1	0.0	0.0
	2	0.0	
	3	0.0	
75	1	0.0	0.0
	2	0.0	
	3	0.0	
82	1	0.0	0.0
	2	0.0	
	3	0.0	

表8 定量値

No.	Assay Results (%)
1	99.4
2	99.6
3	99.4
4	99.5
5	99.6
6	99.7
7	99.6
Mean	99.5
S. D.	0.11

表9 水溶液中での安定性（65°）

Time in Days	Residual content (%)							
	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0	pH 10.0
Initial	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
4	82.2	92.2	94.6	97.0	98.0	95.0	94.5	89.4
12	69.1	77.5	77.8	78.9	78.9	77.5	76.0	67.7
24	47.8	58.8	62.6	61.8	61.3	59.5	54.5	46.2
38	30.6	43.5	47.1	47.3	48.2	42.5	39.1	27.6

吸湿性は全く認められなかった（表7）。赤外吸収スペクトルの主な吸収帯はそれぞれ 3250 cm^{-1} は N−H 伸縮振動，2950 cm^{-1} は C−H 伸縮振動，1720 cm^{-1} はカルボキシル C=O 伸縮振動，1680 cm^{-1} 及び 1620 cm^{-1} はアミド C=O 伸縮振動，1570 cm^{-1} は N−H 変角振動，890 cm^{-1} はエポキシ環の逆対称環伸縮振動の吸収に矛盾なく帰属することができた（図1）。核磁気共鳴スペクトルの δ0.83 及び δ0.92 の 12H に相当するシグナルはロイシル基及び3-メチルブチルアミンのメチル基プロトンに，δ1.29〜1.67 の 6H に相当する多重線はロイシル基のメチレン基及びメチン基プロトン並びに3-メチルブチルアミンの2位メチレン基及びメチン基プロトンに，δ3.21 の 2H に相当する四重線（J=7 Hz）は3-メチルブチルアミンの1位メチレン基プロトンに，δ3.54 及び δ3.65 の 2H に相当する2つの二重線（J=2 Hz）はエポキシ環のプロトンに，δ4.49 の 1H に相当する四重線（J=7 Hz）はロイシル基のαメチン基プロトンに，δ7.60 及び δ7.74 の 2H に相当するシグナルは2つの NH プロトンに，δ10.13 の 1H に相当する幅広いシグナルはカルボキシル基のプロトンにそれぞれ帰属することができた（図2）。熱分析は 153° に融解による鋭い吸熱ピークを示し，190°付近に熱分解による発熱ピークと急激な重量の減少を示した（図3）。X線回析は結晶性を示した（図4）。定量法は 0.1N 水酸化ナトリウム液を用い，ブロムクレゾールグリンを指示薬とする中和滴定法について検討したところ，良好な結果を得た(表8)。水溶液中での安定性については，残存率の経時的変化（表9）から E-64-c の分解は一次反応式に従うことがわかった。分解反応速度定数 k を求め，pH と log k の関係を示した（図5）。この結果，分解反応速度定数の対数は pH 3〜10 の範囲で大きな変化を示さなかった。また，pH 7.4 におけるアレニウスプロット（図6）より得られた直線の傾きから活性化エネルギー Ea は 23.2 kcal/mole であ

4. E-64-c の物理化学的性質及び製剤化の検討

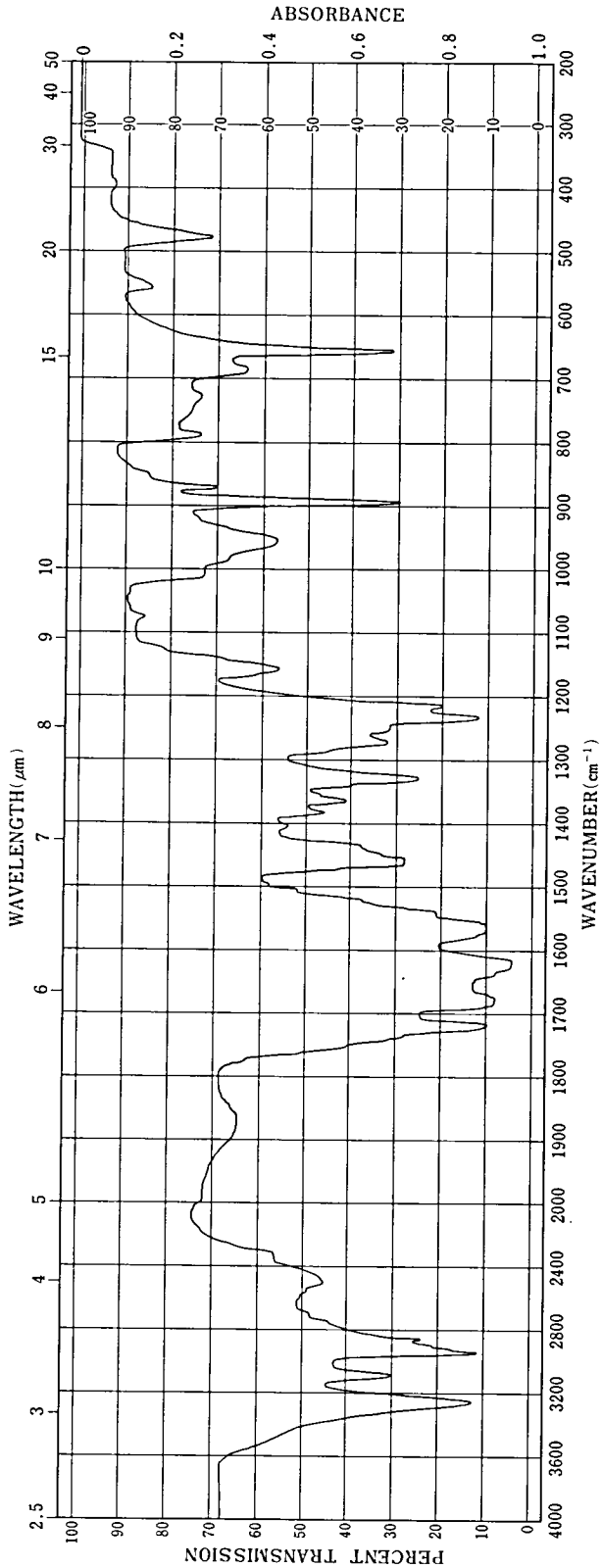


図1 赤外吸収スペクトル

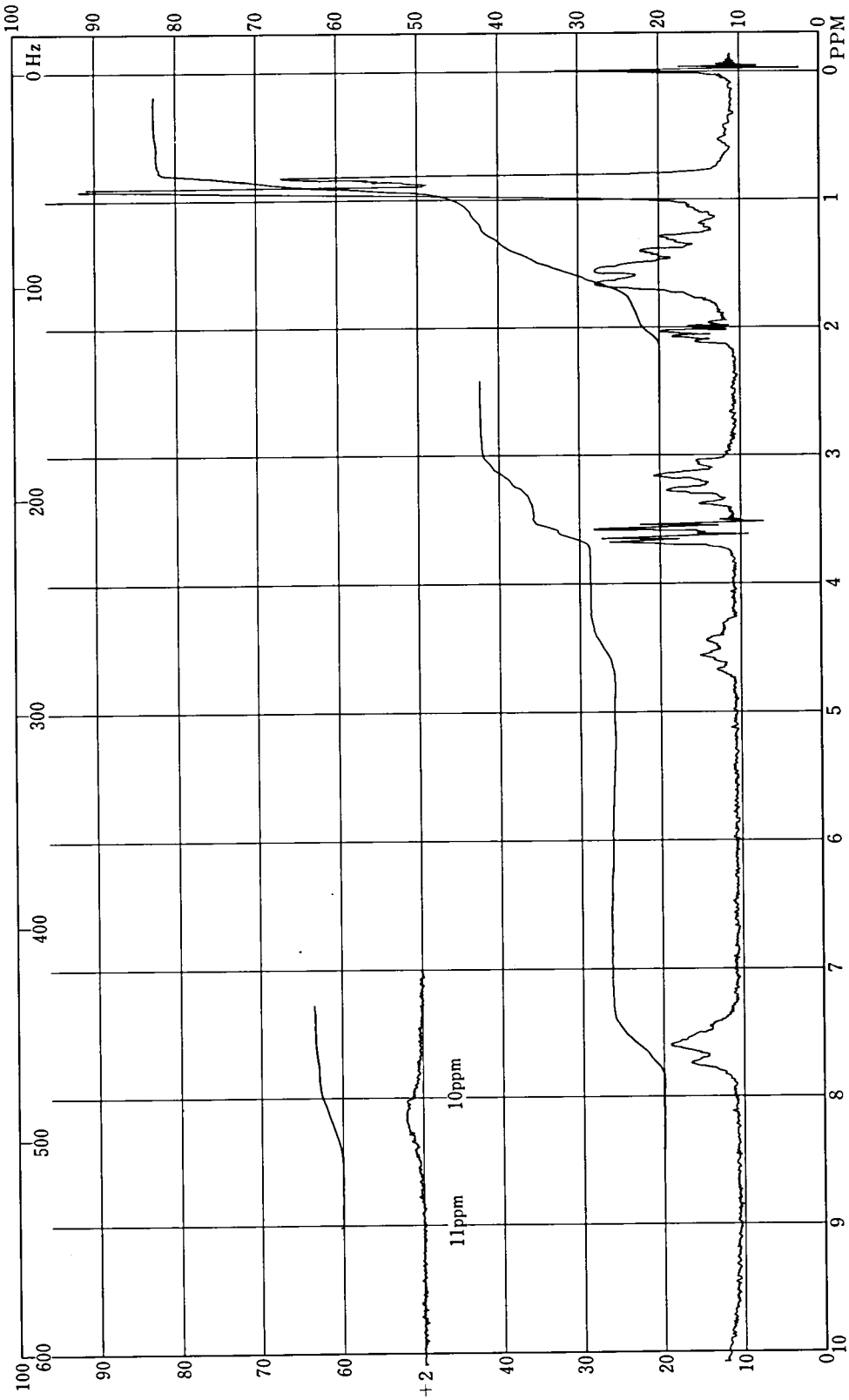


図2 核磁気共鳴スペクトル

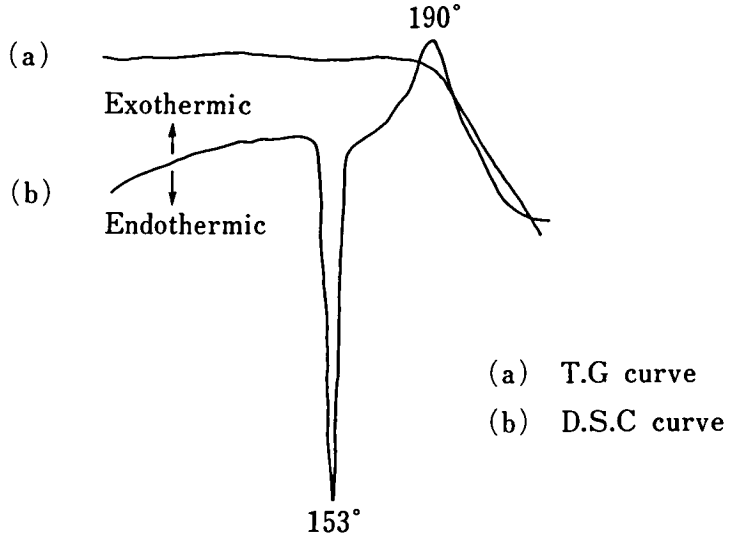


図3 熱 分 析

り，25° 保存における分解反応速度定数及び 90 %残存期間はそれぞれ 1.68×10^{-4}(day^{-1}), 627 (day) と予測された。この結果より，水溶液の製剤化には若干の安定化が必要である。

2．製剤化検討

方　　法

(1) 使用動物

ウサギは日本白色在来雄性体重約 3 kg を，犬はビーグル犬雌性体重約 10kg を用いた。

(2) 投与法

ウサギの静注は耳静脈より，犬は前腕静脈よりそれぞれ投与した。経口投与と直腸投与は24時間絶食後，試験に供した。筋注は大腿四頭筋肉へ，また皮下注は背部皮下にそれぞれ投与した。

(3) 投与製剤の調製

1）静注パラメーターの算出に用いた処方

2 %重曹水溶液に E-64-c を 5, 20, 50 mg/ml の濃度に溶解した。

2）投与ルートの検討に用いた処方

E-64-c に水酸化ナトリウム水溶液を適量用いて溶解 (Na sol.) し，これに注射用蒸留水を加えて10%溶液を調製した。

3）製剤化の検討に用いた処方

水溶液，水性懸濁液，油性懸濁液及びエマルジョンの各基剤について調製し，E-64-c の濃度はいずれの基剤も10%とした。水溶性基剤としては投与ルートの検討に用いた処方 (Na sol.) を基本処方とし，これにポリビニルピロリドンを10%配合した処方 (PVP sol.)，ニッコール BC-15 TX を 5 %配合した処方 (BC-15 TX)，更に，ニッコール MYS-25 とリノール酸をそれぞれ 5 %配合した処方 (MYS-25, oil) の 3 処方を調製した。エマルジョン剤としては基本処方にコーン油を84%とニッコール SO-15 を配合した油中水型の処方 (W/O emul.) を調製した。水性懸濁剤としては 1 % の CMC 水溶液に E-64-c を 10%懸濁した処方 (CMC susp.) を，また，油性懸濁剤としてはコーン油に E-64-c を 10% 懸濁した処方 (Oil susp.) をそれぞれ調製した。

4）採血法

ウサギは耳静脈より，犬は前腕静脈より，いずれもヘパリン処理注射筒にて採血した。

5）定量法

血中の E-64-c の定量は沢田[4]らの液体クロマトグラフ法で実施した。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，分光分析用酢酸エチル 7 ml を加えてよく振り混ぜ，

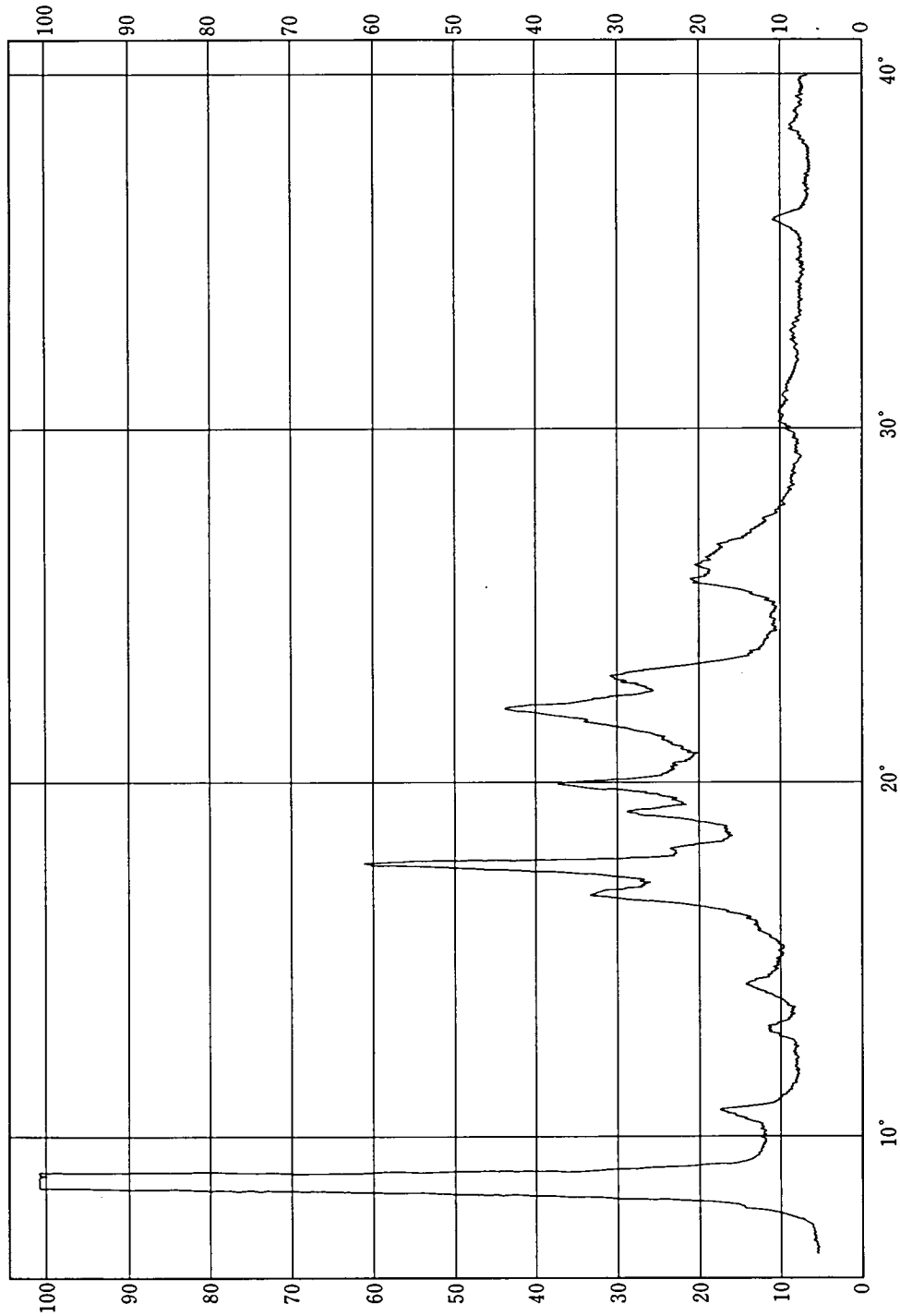


図4 X線回折

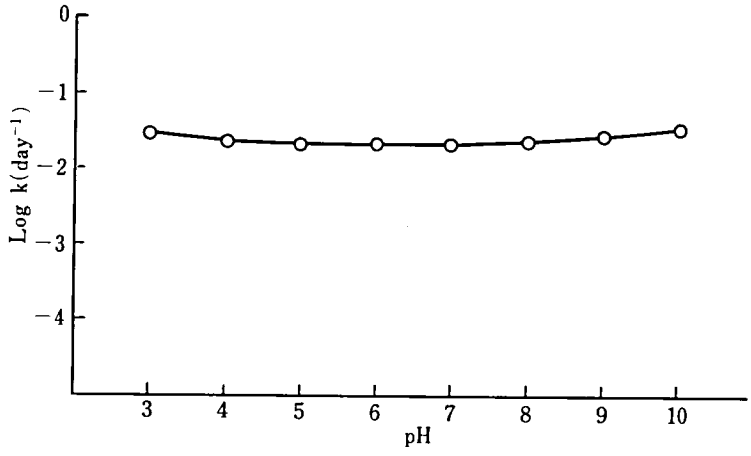


図5 pH プロファイル (65°)

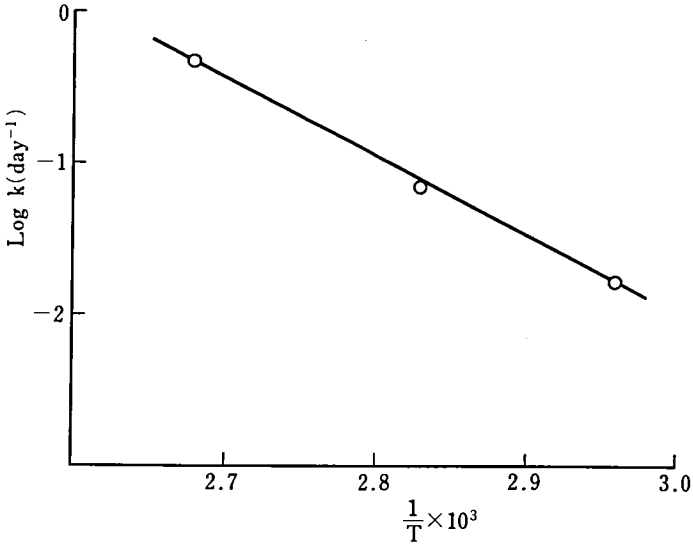


図6 アレニウスプロット (pH 7.4)

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，減圧下に濃縮する。残留物を溶離液 0.5 ml に溶かし，この液を液体クロマトグラフの試料とする。E-64-c の標準溶液とのピーク比から血漿中濃度を算出した。

結果及び考察

一般に製剤化にあたっては主薬の物理化学的，生物薬剤学的な性質を明らかにし，生体に適用されたときの条件を配慮して，投与ルート，剤形を決定する。E-64-c の生体内挙動については既に大関[5]らによる報告がある。これによると E-64-c は経口投与では血中，尿中ともにほとんどが代謝物として存在しているのに対し，皮下注及び筋注では未変化体として存在し，静注した場合には血中からの消失は速やかであることが明らかとなっている。我々はこれらの事実をもとに E-64-c の製剤化について基礎的検討を加えた。

(1) E-64-c の静注パラメーター

種々のルートから投与された E-64-c はまず

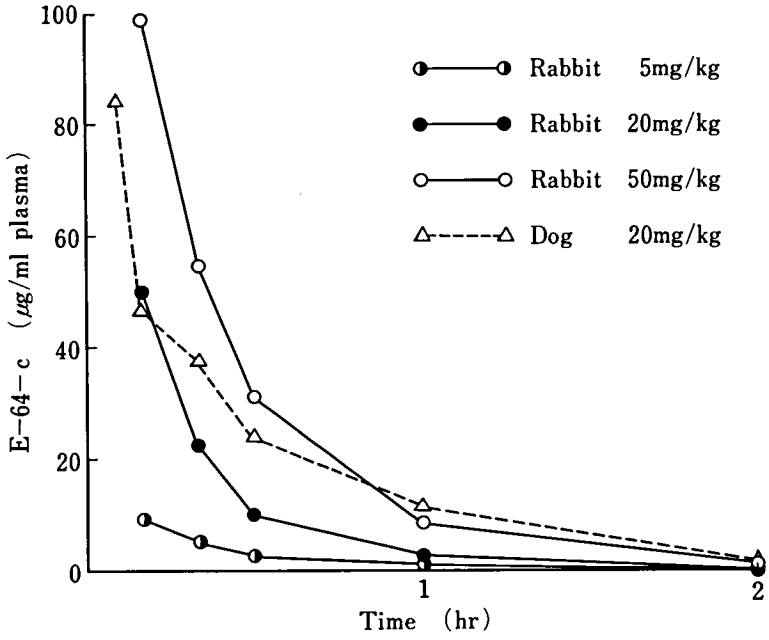


図7 静注後の血中濃度（2～3 例平均）

表10 2-コンパートメントモデルから求めた静注パラメーター

動物 / 投与量 / パラメーター	ウサギ			犬
	5 mg/kg	20 mg/kg	50 mg/kg	20 mg/kg
Ao (μg/ml)	37.29	99.79	300.10	232.91
Bo (μg/ml)	8.86	28.15	73.91	52.14
α (hr^{-1})	14.020	7.801	9.916	21.773
β (hr^{-1})	2.306	2.313	1.924	1.450
K_{12} (hr^{-1})	4.559	1.359	3.133	11.95
K_{21} (hr^{-1})	4.490	3.510	3.532	5.168
Kel (hr^{-1})	7.277	5.245	5.325	6.109
$T_{\frac{1}{2}}\beta$ (hr)	0.312	0.358	0.380	0.478
Vc (l/kg)	0.117	0.164	0.199	0.070
$V_{a\beta}$ (l/kg)	0.387	0.420	0.479	0.296
Cl (l/hr)	0.833	0.889	0.836	0.429
$AUC_{0\to\infty}$ ($\mu g \cdot ml^{-1} \cdot hr$)	6.327	25.621	64.858	46.656

（2～3例平均）

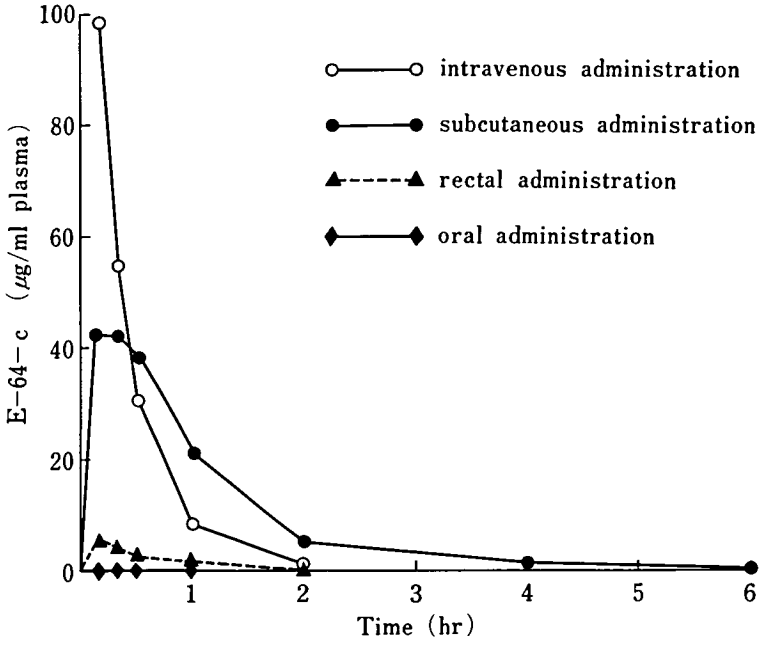


図8 投与ルートと血中濃度
(投与量；50 mg/kg ウサギ，2例平均)

循環系に移行し，次に作用部位に到達する。したがって投与ルートや剤形の検討にあたっては循環系への移行量と速度が重要な指標となる。静脈内投与は薬物が100%瞬間に循環系に移行する投与ルートであり，これから得られたパラメーターは他の投与ルートや剤形の検討において基準となる。図7はウサギと犬について種々の濃度でE-64-cの2%重曹水溶液を静注したときの血中濃度のパターンをみたものである。表10にこの結果を2-コンパートメントモデルを用いて解析して得たパラメーターを示す。データ解析は最小二乗法のプログラム (NONLIN) を用いた。ウサギについてみれば血中濃度と血中濃度曲線下面積 (AUC) はほぼ投与量に比例し，生物学的半減期 (T ½ β) は投与量を 5 mg/kg から 50 mg/kg と変えてもほぼ20分と一定値を示した。これらのことからこの投与範囲において，E-64-c は線形性を有していることが示唆され，今回得た静注パラメーターは投与ルートと剤形の検討を行う際の基準となりえることが明らかとなった。次に動物間の種差について検討する目的で犬に E-64-c を 20 mg/kg 投与し，ウサギと同様に静注パラメーターを算出した。その結果，プラズマ総クリアランス (Cl) はウサギのほぼ半分であり，半減期 (T ½ β) はウサギよりもやや長く，犬の方が血中からの消失がやや遅いことを認めた。

(2) 投与ルートの検討

ウサギに E-64-c を体重 1 kg 当たり 50 mg の割合で水溶液として，種々のルートで投与したときの血中濃度パターンを図8に示す。その結果，経口投与の場合，血中に E-64-c は検出されなかった。そこで 100 mg/kg に増量して検討を加えたが，やはり検出されなかった。次に種差の影響をみるために犬を選び 100 mg/kg の投与量で経口投与を試みた。その結果，やはり血中に E-64-c は検出されず，消化管からの吸収は悪いものと考えられる。一方直腸投与の場合，E-64-c は血中に出現したが，AUC は 3.57 $\mu g \cdot ml^{-1} \cdot hr$ であり，吸収量の指標である静注時の AUC の約6%にすぎなかった。皮下投与の場合は血中への移行は速やかであり

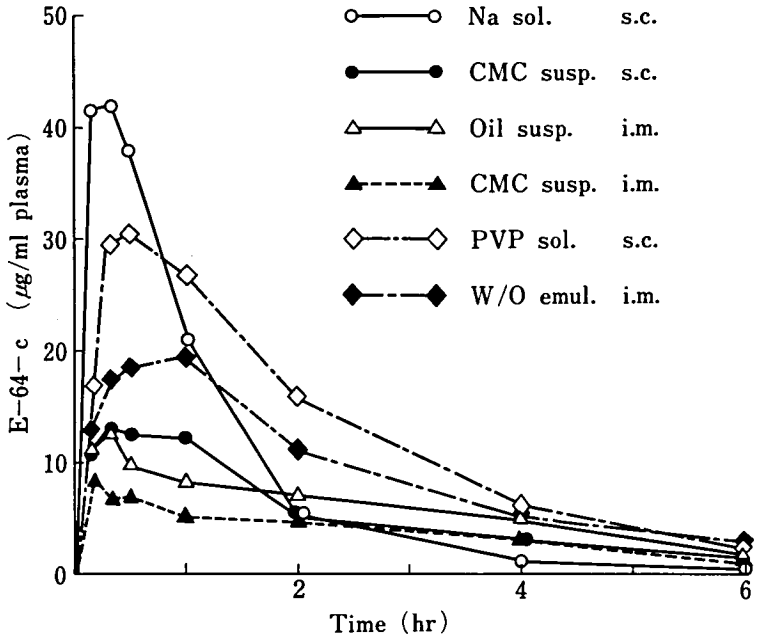


図9 注射剤の血中濃度
(投与量；50 mg/kg ウサギ，2例平均)

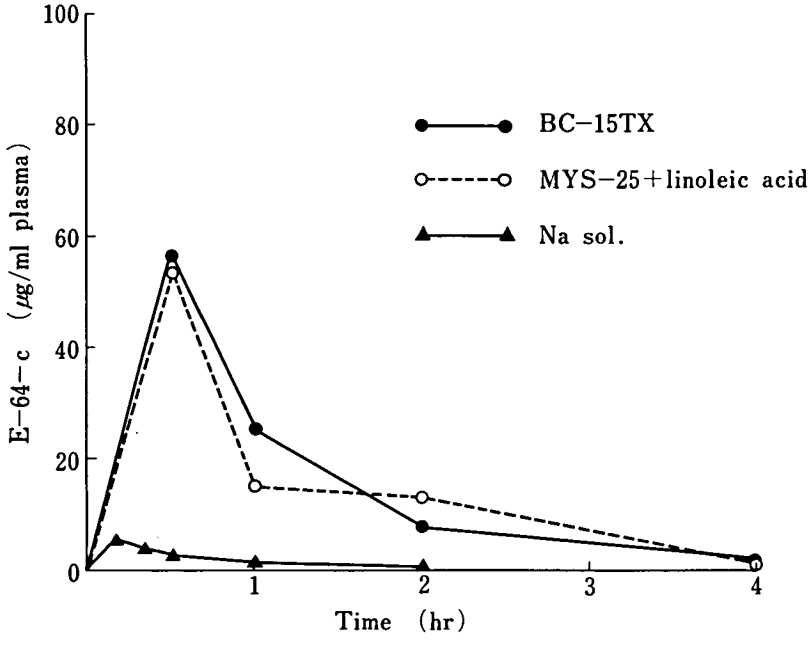


図10 直腸投与後の血中濃度に対する添加剤の影響
(投与量；50 mg/kg ウサギ，2例平均)

30分以内に最高血中濃度を示した。AUC は静注時の約80%の値を示し，皮下投与の場合，吸収率が良いことが明らかとなった。

(3) 製剤化検討

投与ルートの検討の結果，経口投与では血中に E-64-c を認めなかったが，直腸投与の場合，少量ではあるが検出した。また皮下投与の場合，吸収効率は良いが，血中からの消失が速いことが明らかとなった。そこでまず注射剤の血中濃度を持続化させるために種々の処方を調製し，ウサギを用いて検討した。その結果を図9に示す。基本処方（Na sol.）に PVP を10%加えた処方（PVP sol.）を皮下投与した場合，基本処方とほぼ同等の AUC を示し，かつ血中濃度パターンは持続化型となった。コーン油を用いた油中水型のエマルジョン性注射剤（W/O emul.）を筋肉内投与した場合，最高血中濃度は基本処方の約半分となりかつ6時間における濃度は基本処方が痕跡であるのに対し3.0 μg/ml の比較的高い値を示した。一方 CMC を用いた水性懸濁液（CMC susp.）を皮下投与及び筋肉内投与した場合には初期に著しい吸収抑制を認めたが持続化は認められなかった。また，コーン油を用いた油性懸濁剤（Oil susp.）を筋肉内投与した場合，同様に持続化を認めなかった。次に直腸投与での吸収効率の増大を計るために添加剤の配合による処方検討を実施した。その結果，図10に示すようにエーテル系活性剤を配合した処方（BC-15 TX）及びエステル系活性剤とリノール酸を配合した処方（MYS-25 Oil）の場合には著しい吸収の増加が認められ，両処方の AUC は静注時の AUC とほぼ同等となり，添加剤の選択により直腸投与の可能性が示唆された。

結　論

E-64-c の物理化学的性質及び薬動力学的パラメーターを明らかにし，基礎的な製剤化の検討を行った。

E-64-c は光学的に活性（右旋性）な強い酸性物質（pKa 2.38）であった。

静注後の半減期はウサギで約21分，犬では約29分であった。静注の場合の血中濃度曲線下面積（AUC）を100とすると，皮下注，直腸投与，経口投与の場合の AUC はそれぞれ81.9，5.5，0であり，投与ルートにより bioavailability に差が認められた。

皮下投与の場合，E-64-c は血中からの消失は速やかであった。ある種の高分子（PVP）の添加及び油中水型のエマルジョンで血中濃度の持続化が認められた。また，添加剤の選択により直腸投与の可能性が示唆された。

参考文献

1）今堀和友：第2回 E-64 開発研究班会議.
2）Hashida, S., Towatari, T., Kominami, E., Katunuma, N.: Inhibitions by E-64 derivatives of rat liver cathepsin B and cathepsin L in vitro and in vivo, J. Biochem., 88, 1805～1811, 1980.
3）松浦貞郎：イオン定数，p. 16～36, 1963.
4）沢田二郎：E-64 及びその類縁体の生物薬剤学的研究，微生物の二次代謝産物に由来する難治療薬（E-64）の開発研究，昭和54年度研究報告書，p. 159～166.
5）大関正弘：E-64 及びその類縁体の生体内動態に関する研究，微生物の二次代謝産物に由来する難治療薬（E-64）の開発研究，昭和54年度研究報告書，p. 145～154.

Ⅱ　標的酵素に対する効果

5. ジストロフィーチキン骨格筋カテプシン B, H 及びDの動態ならびに
E-64-c 投与による阻害について……勝沼　信彦

6. カルシウムプロテアーゼに対する E-64 の効果……今堀　和友

7. カルシウムプロテアーゼと燐脂質……西塚　泰美

8. プロテアーゼ阻害物質によるペプスタチン非感受性
ヘモグロビン水解酵素の誘導……市原　明

9. 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（続報）……宮武　正

5. ジストロフィーチキン骨格筋カテプシン B, H 及び D の動態ならびに E-64-c 投与による阻害について

勝沼信彦*

研究協力者　野田　隆*　磯貝和秀*

はじめに

筋ジストロフィーチキン (Line 413) の萎縮筋中でカテプシン群の酵素活性が上昇していることに関しては，古くから各種の報告がある[1]。リソゾームのカテプシン群は，最近では酸性域で蛋白分解活性を発揮するカルボキシルプロテアーゼ（カテプシンD）及び弱酸性から中性域で活性をもつチオールプロテアーゼ（カテプシンB[2)3)]，カテプシンH[4)]，カテプシンL[5)6)]）に大別される。最近まで此等カテプシン群の正確な分別定量は確立していなかった。今回，我々は此等カテプシン群が正常チキンと筋ジスチキンでどのような差異があるかを分別定量をおこなった。またこのチオールプロテアーゼ群に対し，in vitro で強い阻害作用を有する E-64-c[7)] を in vivo で 80 日間連日投与したチキン胸筋中のカテプシンB・H・D の活性を測定し，E-64-c の in vivo における作用を報告する。

実験材料及び方法

投与方法

Line 413 のチキンは，孵化後10日より，300 mg/kg 体重，150 mg/kg 体重，生食，の 3 群に分け E-64-c を 1 日 2 回皮下に80日間投与した。Line 412 のチキンも同様に生食を投与した。

材料

前記の処理をしたチキンの浅胸筋をとりだし，−20°C にて凍結保存した。

1. カテプシンB・Hの測定

凍結筋を 4 倍量の PBS pH 7.2 とともに，ポリトロンを用いて，5 倍ホモジネートを作製し遠心上清を75%アセトンで沈澱させ，アセトンを除いた後に 20 mM 酢酸緩衝液 pH 5.5, 5 mM β-メルカプトエタノール, 2 mM EDTA で懸濁したものを測定試料とした。カテプシンBの基質には BANA を用い，Barrett らの方法[8)] で活性を測定した。

2. カテプシンDの測定

上記のアセトン沈澱試料を 20 mM 酢酸緩衝液 pH 3.8 で一晩透析し，酸変性ヘモグロビンを用い[9)]，ペプスタチンで阻害される活性をカテプシンDの活性とした。

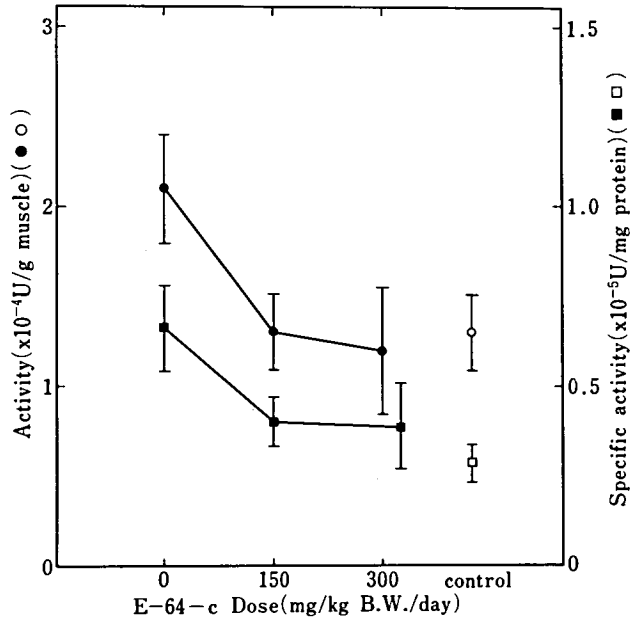
結　果

カテプシンB活性は，正常チキンに比して筋ジスチキンでは，明らかに全活性，比活性ともに高く，更に E-64-c 投与量に応じて全活性，比活性ともに減少しており，150 mg/kg 体重，300 mg/kg 体重投与の両群ともほぼ Line 412 チキンと同程度のカテプシンB活性を示している。(図 Ia)，また同様にカテプシンH活性は，正常チキンに比して，筋ジスチキンでは，明らかに全活性，比活性ともに高く，E-64-c 投与量に応じて全活性，比活性ともに減少している。(図 Ib)，図 Ia, Ib を比較してみると in

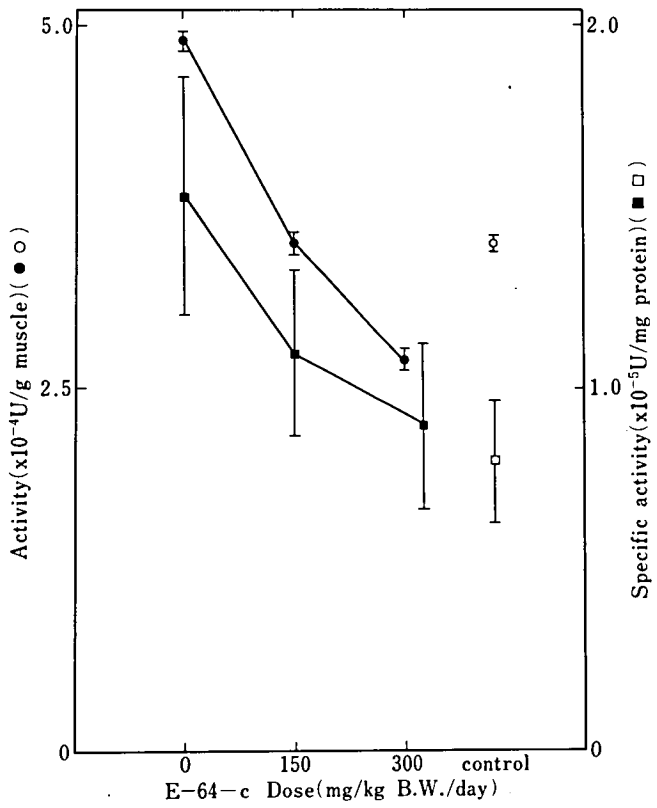
* 徳島大学医学部酵素研究施設酵素化学部門

Ⅱ　標的酵素に対する効果

図 1　E-64-c 投与量とカテプシンの活性

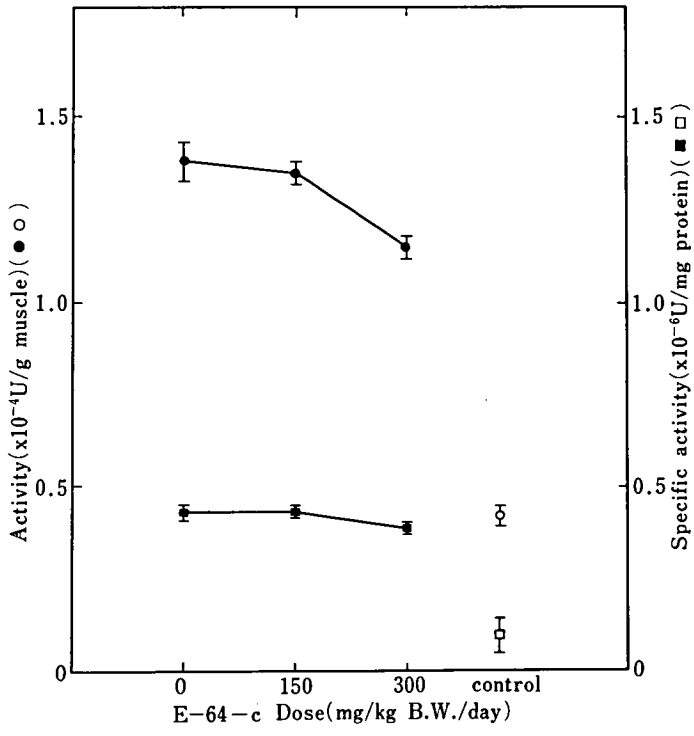


a　Change in activity of cathepsin B in chicken breat muscle



b　Change of cathepsin H activity

5. ジストロフィーチキン骨格筋カテプシンB，H及びDの動態ならびにE-64-c投与による阻害について



c Change of cathepsin D activity

表 1 E-64-c 投与によるカテプシン群及び CANP 活性とフリップテストの結果

a

		Cathepsin B activity		Cathepsin H activity		Cathepsin D activity	
		U/g muscle	U/mg protein	U/g muscle	U/mg protein	U/g muscle	U/mg protein
		x 10⁻⁴	x 10⁻⁵	x 10⁻⁴	x 10⁻⁵		
Line 413							
Saline	M (n=12)	2.2±0.36	0.69±0.13	4.9±0.87	1.58±0.31	1.56±0.42	0.050±0.015
	F (n=10)	2.1±0.22	0.63±0.11	4.9±0.79	1.48±0.37	1.17±0.39	0.035±0.012
E-64-c treated							
150 mg/kg B.W.	M (n=11)	1.2±0.14	0.41±0.06	3.0±0.51	1.01±0.17	1.35±0.33	0.045±0.01
	F (n=10)	1.3±0.28	0.39±0.09	4.0±0.79	1.20±0.24	1.35±0.18	0.041±0.05
300 mg/kg B.W.	M (n=11)	0.9±0.15	0.30±0.04	2.8±0.87	0.92±0.28	0.98±0.29	0.033±0.011
	F (n=10)	1.4±0.30	0.48±0.10	2.6±0.54	0.87±0.18	1.35±0.24	0.045±0.01
Line 412							
Saline	M (n=4)	1.2±0.13	0.27±0.04	3.6±0.76	0.84±0.21	0.48±0.19	0.011±0.004
	F (n=7)	1.34±0.22	0.31±0.05	3.4±0.64	0.78±0.15	0.40±0.23	0.009±0.006

Activity of cathepsin B was expressed as μmol p-nitroaniline produced/min.
Activity of cathepsin H was expressed as μmol β-naphthylamide produced/min.
Activity of cathepsin D was expressed as μmol amino acids released/hr.

b

		Body weight	Content of sample protein	CANP activity	Flip test
		g	mg/g muscle	cpm	10 days 80 days
Line 413					
Saline	M (n=12)	1,794±212	31.5±1.8	6,686±1,864	2.3⟶0.4
	F (n=10)	1,312±104	33.4±3.4	4,743±757	4.4⟶1.4
150 mg/kg B W.	M (n=11)	1,935±223	29.6±1.7	5,222±2,199	2.6⟶0
	F (n=10)	1,289±61	33.0±1.6	3,451±959	4.1⟶1.7
300 mg/kg B.W.	M (n=11)	1,880±163	29.8±2.2	5,389±1,684	2.5⟶0
	F (n=10)	1,333±148	30.1±2.2	3,751±852	1.8⟶0.8
Line 412					
Saline	M (n=4)	2,098±230	42.8±1.9	4,167±2,780	5⟶5
	F (n=7)	1,547±104	43.6±2.1	2,593±1,172	5⟶5

CANP : calcium activated neutral protease

vitro と同様に E-64-c に対してカテプシンBの方が in vivo でもより強い感受性を有すると思われる。図 Ic には，カテプシンD活性の変動を示した。筋ジスチキンは正常チキンに比して，著明なカテプシンD活性の亢進がみられ，E-64-c 投与群と生食投与群の間に有意な活性の変化は見られず，カテプシンDには全く影響を与えていないことが明らかとなった。またロイペプチン投与時に見られるカテプシンD様プロテアーゼ活性の上昇はみられなかった。表1にカテプシン群活性変化と体重並びに，筋蛋白含量，CANP 活性，フリップテストの結果をまとめた。(CANP 活性，フリップテスト，体重は本実験に使用したチキンのもので，大正製薬研究所で測定されたデータである。)カテプシン群の著明な変化に比し，CANP 活性は，E-64-c 投与群で阻害されるが，正常チキンのレベルには達していない。また，体重，筋蛋白含量，フリップテストは，正常チキンに比して筋ジスチキンは著しく低く，E-64-c 投与群でも改善は見られなかった。

考　　察

E-64-c 投与でカテプシンB，カテプシンHは有意に阻害されているが，筋ジストロフィー症の症状改善にはあまり効果はなかった。

この原因としては，CANP 活性があまり減少していないこと，カテプシンDが高値であること等が考えられるが，カテプシンDの著明な上昇は問題であり，ペプスタチンとの併用による効果を見る必要があるものと考える。

文　　献

1) Iodice, A. A., Chin, I., Perker, S. and weinstock, I. M.: Cathepsins A, B, C, D and autolysis during development of breast muscle of normal and dystrophic chicken, Arch. Biochem. Biophys., **152**, 166-174, 1972.

2) Barrett, A. J.: Human cathepsin B_1. Purification and some properties of the enzyne. Biochem. J., **131**, 809-822, 1973.

3) Towatari, T. and Katunuma, N.: Crystallization and amino acid composition of cathepsin B from rat liver lysosomes, Biochim. Biophys. Res. Commun., **83**, 513-520, 1978.

4) Singh, H. and Kalnitsky. G.: Separation of a new α-N-benzoylarginine-β-naphthylamide hydrolase from cathepsin B_1, J. Biol. Ciem., **253**, 4319-4326, 1978.

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

6) Kirschke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, S. and Bohley, P.: Cathepsin L. A

new proteinase from rat-liver lysosomes, Eur. J. Biochem., 74, 293-301, 1977.

7) Hashida, S., Towatari, T., Kominami, E. and Katunuma, N.: Inhibitions by E-64 derivatives of rat liver cathepsin B and cathepsin L in vitro and in vivo, J. Biochem., 88, 1805-1811, 1980.

8) Barrett, A. J.: A new assay for cathepsin B_1 and other thiol proteases, Anal. Biochem., 47, 280-293, 1972.

9) Matsuda, K. and Misaka, E.: Studies on cathepsins of rat liver lysosomes 1. Purification and multiple forms, J. Biochem., 76, 639-649, 1974.

6. カルシウムプロテアーゼに対する E-64 の効果

今 堀 和 友*

共同研究者 鈴 木 紘 一* 辻 崇 一*
久保田 俊一郎* 木 村 吉 雄*
高 橋 愛*

はじめに

筋ジストロフィーは筋タンパク質の分解によって生じる筋の退化がその主たる原因として考えられている。筋細胞中にあって，タンパク質の分解を司るプロテアーゼとしては一つにはカテプシン類が考えられ，これについては勝沼班員のグループによる報告がある。今一つとして，われわれはカルシウムで活性化される中性プロテアーゼ (CANP) に着目し，従来 CANP を精製するとともに，その性質を明らかにしてきた。特に CANP がいわゆるチオールプロテアーゼに属するものであることから，これが E-64 で強く阻害されることを発見したのであった[1~3]。

しかしながら，CANP が細胞内で作用することについては一つ難点がある。それは本酵素の活性発現には 1 mM～数 mM という Ca^{2+} イオンを必要とするからであり，これは筋細胞中の Ca^{2+} イオン濃度（数 μM）をはるかに超えた異常な濃度であるからである。

一方，犬の心筋からは 40 μM の Ca^{2+} イオン濃度の Kd をもつ CANP の存在が報告されているが[4]，同様な酵素（これを μ-CANP という）の骨格筋での存在は確めておらず，またこれと，mM 程度の Ca^{2+} イオンを必要とする従来の CANP（これを m-CANP という）との関係も不明であった。われわれは最近 m-CANP から μ-CANP への変換が自己消化によって起ることを明らかにしたので，ここに報告する。

材料及び方法

CANP としてはトリの胸筋から石浦の方法[1]により調製したものを用いた。カゼイン－セファロース 4B は，ファルマシア製の活性化したセファロース 4B にカゼインを常法に従って結合させることによって得られた。

結　　果

カゼイン－セファロース 4B カラム (1×6 cm) をバッファーA (20 mM トリス，10 mM 2-メルカプトエタノール，pH 7.5) に 10 mM $CaCl_2$ を加えたもので平衡化し，これに精製した CANP (0.5 mg/0.5 ml) を加える。まず 10 mM $CaCl_2$ を含むバッファーAでよく洗った後，10 mM EDTA を含むバッファーA で CANP を溶出した。

得られた CANP は図 1 に示すように，Ka を 40 μM にもつ μ-CANP であった。

図には m-CANP の Ca^{2+} 依存性をも同時に示してあるが，両者の Ca^{2+} 感受性の差異はきわめて明らかであろう。ついで他の 2 価イオンの影響をもしらべた。図 2 には Sr^{2+} に対する感受性，図 3 には Ba^{2+} に対する感受性を示してある。いづれの場合にも，μ-CANP は m-CANP に比し，はるかに低濃度の 2 価金属イ

* 東京大学医学部第二生化学教室
** 東京都老人総合研究所

表1　Effects of several metal ions on chicken CANP.　"Kd" (mM)

metal ions	m-CANP	μ-CANP
Ca^{2+}	0.15	0.05
Sr^{2+}	4.0	0.5
Ba^{2+}	11.5	1.8

オンで活性化されることが明らかである。

その他の金属イオンの影響をまとめて示したのが表1である。

つぎに m-CANP と μ-CANP との相互関係につき研究した。カゼインカラムから溶出されるのが，μ-CANP であるということには，少くとも二通りの説明が可能である。その1つは，粗 CANP 抽出液中には m-CANP と μ-CANP の両方が存在しており，EDTA で前者のみが溶出され，後者はカラム中に吸着されたままでいるという考え方である。第二には，粗 CANP 抽出液中には m-CANP のみが存在していたのであるが，カゼインカラム中に存在する Ca^{2+} (10 mM) の影響で自己消化を起こし，μ-CANP に変化したという考え方である。

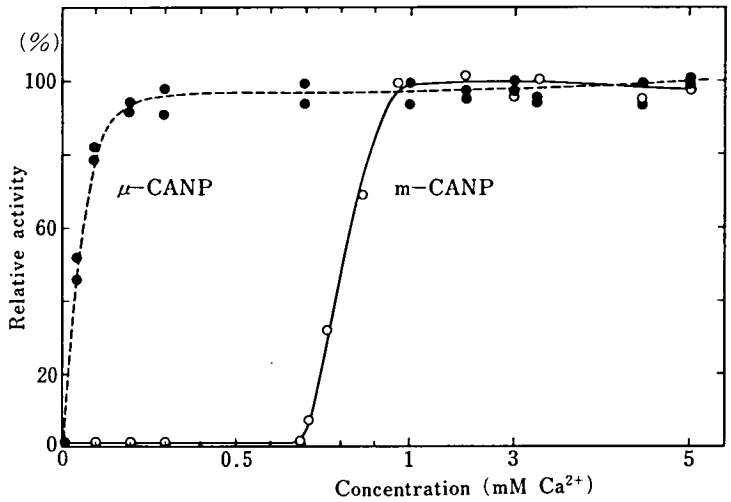


図1　m-CANP と μ-CANP とのカルシウム感受性

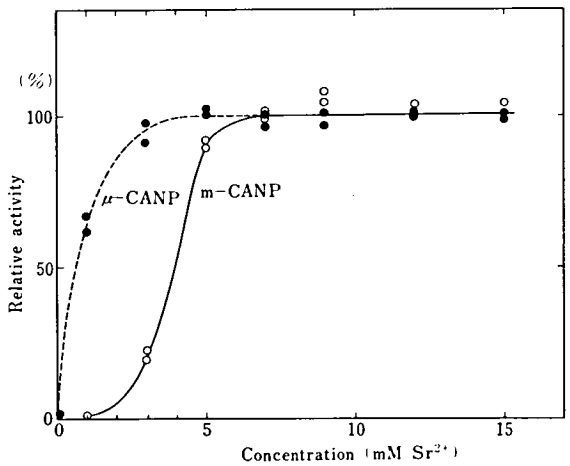


図2　m-CANP と μ-CANP とのストロンチウム感受性

6. カルシウムプロテアーゼに対するE-64の効果

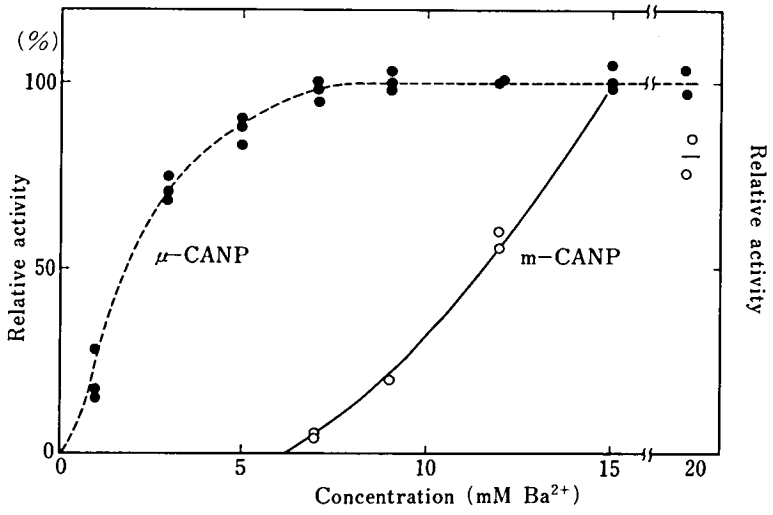


図 3 m-CANP と μ-CANP とのバリウム感受性

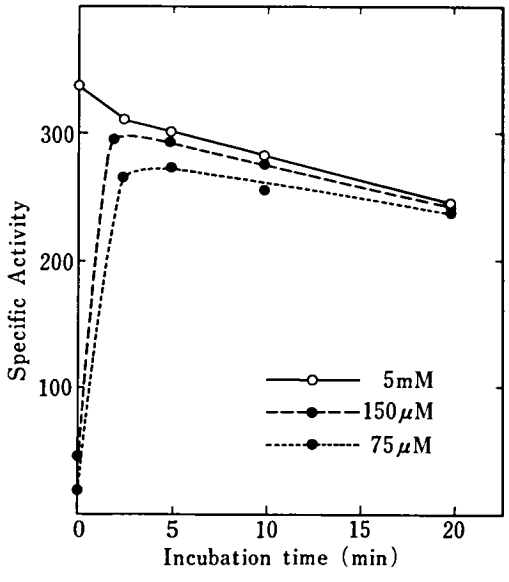


図 4 m-CANP の自己消化に伴なうカルシウム感受性の変化

10 mM $CaCl_2$ 存在下 0°C で m-CANP の自己消化を行なわせ，横軸に示した各時間で試料の一定量をとり出し，5mM, 150μM, 75μM の Ca^{2+} 存在下で活性を測定した。

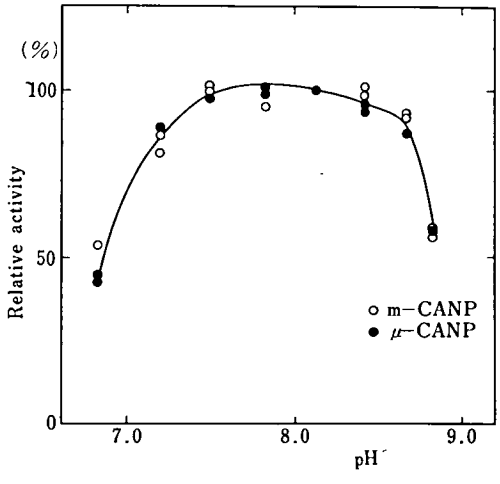


図 5 m-CANP と μ-CANP との活性の pH 依存性

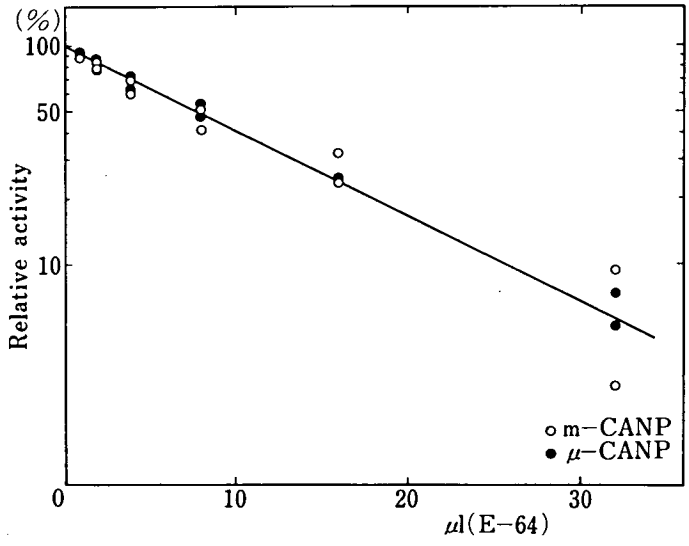


図 6　m-CANP と μ-CANP との E-64 による阻害

以下の実験は後者の考え方が正しいことを示している。まず第一に，m-CANP と μ-CANP とを SDS 電気泳動で共泳動させると，後者は前者よりわずかに早く移動し，マーカーよりその分子量は76,000と求められる。一方m-CANPの分子量は80,000であるから，自己消化により分子量4,000のペプチドが m-CANP から遊離したものが μ-CANP とすると考えやすい。

そこで，m-CANP を 10 mM Ca^{2+} 存在下 0°C で自己消化を行わせてみた。0°C にしたのは常温では自己消化速度が早すぎるため，限定加水分解物をとらえにくいからである。結果は図 4 に示してある。図では自己消化物を各時間においてとり出し，それぞれ 5 mM, 150 μM, 75 μM の Ca^{2+} 存在下で活性測定を行っている。図 1 から明らかな様に，5 mM Ca^{2+} では m, μ 両 CANP とも 100 パーセント活性であるが，150 μM Ca^{2+} では m-CANP の活性はなく，μ-CANP は85パーセントの活性を示し，75 μM Ca^{2+} では 65パーセントの活性を示す。すなわち 5 mM Ca^{2+} 存在下では，m, μ 両 CANP の活性の和を測定しているのに対し，150 μM, 75 μM では μ-CANP の活性のみを測定している。

図から明らかな様に，自己消化が進むと共に μ-CANP 活性は急に上昇し，3 分で最大値を示した。この時点で自己消化をとめ，それを SDS 電気泳動にかけると，80 K のバンドはすでに消失し，76 K のバンドになっていた。すなわち μ-CANP 活性の出現は自己消化によるものであることが明らかになったのである。自己消化の時間を長くすると，μ-CANP の活性も次第に減少するが，それに伴って SDS 電気泳動でも 76 K のバンドが減少し，56 K およびそれ以下の分子量のバンドが増加してゆく。これは自己消化がさらに進むと，CANP が失活することに対応している。

次に得られた μ-CANP につき，その性質を m-CANP のものと比較した。図 5 には m-, μ-CANP 活性の pH 依存性を示してあるが，両者は全く一致している。さらに図 6 には m-, μ-CANP に対する E-64 の阻害効果を示してあるが，これについても両者には差異が全くなかった。

なお本研究と平行して，ウサギ骨格筋の CANP についても同様な研究を行った。ウサギの場合 m-CANP の 2 価金属に対する感受性はトリのものよりさらに悪く，Ca^{2+} は 5〜10 mM を要し，Ba^{2+} では全く活性化されない。これに対し，ウサギの μ-CANP はトリの

μ-CANP とほぼ同様の金属感受性を示すようになる。m-CANP より μ-CANP への変換も，カゼインカラム処理，自己消化の両方で可能であること，変換に伴い 80 K の成分が 76 K に変わることなど，すべてにおいてトリのものと一致している。

考　　察

従来 CANP についての報告は多くあるが，Mellgren[4] のものを除けばいづれも活性に数ミリモルの Ca^{2+} を必要とする点で，その生理学的意義が疑われていた。本研究によって明らかにされた，自己消化により m-CANP が μ-CANP に変換するという事実はすこぶる重要な意味をもつであろう。例えば，細胞内の1分子の m-CANP が μ-CANP に変換されると，これが他の m-CANP を生理的条件下においても μ-CANP に変換し，これらがさらに m-CANP を限定分解するという，いわゆるカスケード反応が進行するであろう。これが無制御に進行するなら筋ジストロフィーの様な病状を起こすことは当然である。

一方今回の結果は m-CANP から μ-CANP への変換についても示唆する所がある。もしも m-CANP 単独について自己消化を行わせるなら，図4からも明らかなように，0°C においてすら限定分解の段階で止めることは困難である。ましてや常温では瞬時に失活してしまうであろう。それに反し，カゼインカラム中で自己消化を行なわせると，限定分解の所で止ってしまいそれ以上の自己消化が起らないことは重要である。すなわち基質が存在する条件下では m-CANP から μ-CANP への変換が正しく行なわれることを示している。筋細胞中の様に，CANP に対する基質が大量に存在する場にあっては，CANP の変換がうまく行なわれるであろうことは充分に予想されるのである。

現在まで報告された CANP に関する論文中 Mellgren のみが μM 程度の Ca^{2+} で活性化される CANP を犬の心筋より得ている。われわれの μ-CANP と Mellgren の CANP と比較してみると，分子量に多少のちがいがある他は，性質がきわめてよく類似している。すなわち酵素がすこぶる不安定であることや，DEAE セルロースカラムからの溶出位置（本報には示していないが，μ-CANP は m-CANP より低イオン強度で溶出される）などがよく一致している。また西塚ら[5] も昨年度の本班研究報告会で，低 Ca^{2+} イオン濃度で活性化される CANP の存在を発表しているが，これについてはわれわれの μ-CANP とその性質が全くといってよいほど一致している。したがって，これら CANP はいづれも m-CANP の自己消化に由来するものと考えられるのである。一方村地ら[6] も肝臓より低 Ca^{2+} イオン濃度で活性化される CANP を得ているが，安定性の点において μ-CANP と異っており，これが全く別物なのか，臓器のちがいによるものなのかは今後検討を要する問題である。

今回のわれわれの研究により，μ-CANP を得る方法も確立したわけであるから，今後はその基質特異性等を研究することにより，μ-CANP の生理学的役割はさらに明らかになるものと思われる。

文　　献

1) Ishiura, S., Murofushi. M., Suzuki, K. and Imahori, K.: J. Biochem., 84, 225, 1978.
2) Suzuki, K., Ishiura, S., Tsuji, S., Katamoto, T., Sugita, H., and Imahori, K.: FEBS Letter, 104, 355, 1979.
3) Ishiura, S., Sugita, H., Nonaka, I. and Imahori, K.: J. Biochem., 87, 343, 1980.
4) Mellgren, R. L.: FEBS Letter, 109, 129, 1980.
5) 西塚泰美ら：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，p. 117-130.
6) 村地孝ら：論文投稿中，生化学52巻，第8号 p. 813, 1980.

7. カルシウムプロテアーゼと燐脂質

西塚泰美*

研究協力者 岸本 明* 梶川憲雄*
田渕 光* 西山 馨*
高橋十郎* 高井義美*

はじめに

神経やホルモンの働らき等，細胞間の相互作用や識別機序の解明は今日の医学生物学にとりもっとも重要な課題の一つである。ことに細胞表面における刺激や変化がサイトスケルトン系を介して細胞の形態，機能を調節する機序は，昨今飛躍的な研究の対象となっている。私共は数年来，こうした受容識別機序に焦点をあてて酵素化学的解析を加えてきたが，最近になり生体の情報伝達系に関与すると予想される新しい型の蛋白質燐酸化酵素系を見出した[1~3]。この酵素は第1図のように従来明らかにされている cyclic AMP を介する情報伝達系に対応する可能性が高く，形質膜に与えられたシグナルによりイノシトール燐脂質 (PI) が選択的に加水分解され，ここに生成する微量のジグリセリド (DG) がその活動の引き金をひいている。この過程は可逆的でありカルシウムが必要であるが，この種の蛋白質燐酸化酵素の活性化にはこれ以外にカルシウムプロテアーゼによる限定分解の方式が関与している可能性がある[4]。そこで本年度の研究では生体の機能調節に関与するこの蛋白質燐酸化酵素の活性化反応を指標として，カルシウムプロテアーゼの解析とその役割の解明を試みた。

その結果，生体の多くの組織にはこれまであきらかにされていたプロテアーゼとは別に低濃度のカルシウムにより活性化されるプロテアーゼが分布しており，かつこのプロテアーゼは形質膜に結合している蛋白質燐酸化酵素を選択的に限定分解している可能性が強く示唆された。すなわち,この種のプロテアーゼは当初Mellgren が心筋に見出したものと同種の酵素と予想されるが，上述のイノシトール燐脂質の加水分解にひきつづいて,情報伝達系の活性化の第2段機序をなすものと推定される。したがってこのプロテアーゼ系には燐脂質が関与するため，E-64をはじめ各種の阻害剤が奏効しにくい理由がありうると思われる。以下ではこの情報伝達系についてのその後の知見を簡単にのべ，プロテアーゼと燐脂質の関係の概要を報告する。なお簡単のためこの種の蛋白質燐酸化酵素は C-Kinase, cyclic AMP の関与する酵素は A-Kinase としたい。

材料及び検索方法

本解析では主としてラット脳より調整した C-Kinase, シナプス膜，プロテアーゼを使用し，その他必要に応じて各種の臓器を用いた。各種の中性脂質，燐脂質等はすでに記載した方法に従っているが[5~9]，E-64 は大正製薬より寄贈をうけた。その他の試薬品は市販のものを用いている。

カルシウムプロテアーゼの活性測定は一部カゼインの加水分解反応を定量したが，特に記載しない限り，C-Kinase の限定分解による活性化反応すなわち出現した蛋白質燐酸化酵素の活

* 神戸大学医学部第二生化学教室

II　標的酵素に対する効果

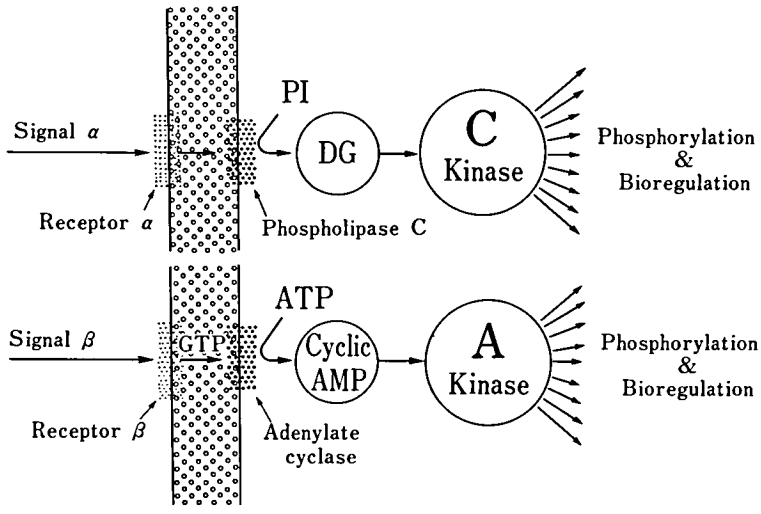


図 1　2種の受容伝達機構

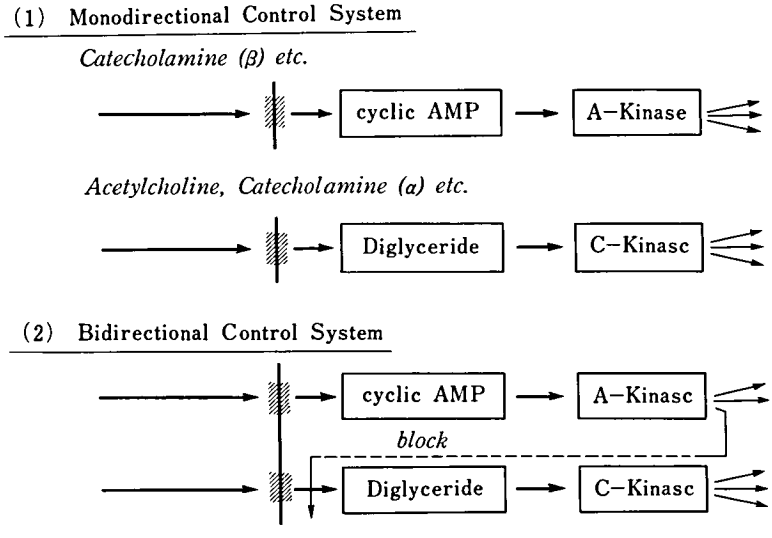


図 2　受容伝達機構と生体機能の調節

性を H1 ヒストンを基質として測定した。したがってこの活性測定はきわめて選択的であり，比較的粗抽出液においても可能と考えられる。

結　　果

(1) C-Kinase 系と A-Kinase 系の関連

過去における多数の解析結果から C-Kinase を介する情報伝達系は生体にきわめて広く分布しており[10]，かつイノシトール燐脂質の代謝回転に関する先人達の莫大な検索から，この種の伝達系はいわゆる excitatory process の調節系に関与すると想像される。例えば，アセチルコリン，カテコラミン（α作用）の他，種々のペプチドホルモンその他の生理活性物質の作用の発現に何らかの役割を果していると期待される[1~4]。A-Kinase は cyclic AMP の作用点としてこれも重要であるが，両者は通常多くの組織，細胞では併存しているように見え

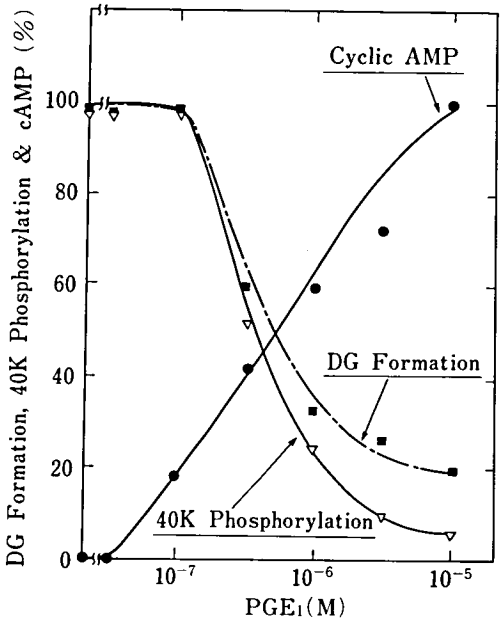
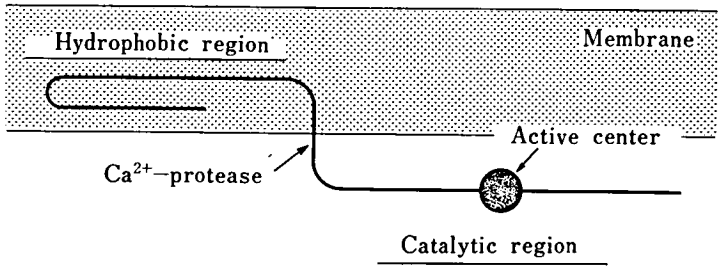


図 3 PGE_1 による血小板活性化の阻害作用

る。しかしその生理作用には組織によって著しい多様性があり，例えば第2図に示したように，両系は全く独立して存在してるが，その作用は概して同一の場合（肝臓，脂肪細胞，甲状腺等），また異っている場合がありうる。しかし多くの場合には両系はたがいに相反する生理活性物質の情報伝達に関与していて，例えば血小板，脳，血管，心臓等の数多くの組織がこれに該当している。この両系がどのような生理作用を示すかはそれぞれの組織にセットされているそれぞれの系の作用点，すなわち A-Kinase, C-kinase の基質蛋白質がその鍵を握っているように見える[1,9]。今回，これらの基質特異性については本報告書では省略するが，この両系はたがいに無関係ではなく C-Kinase 系に対して cyclic AMP 系が抑制的に作用しており，その作用点は上述のジグリセリド生成迄の段階の可能性が高い。第3図はそのような実験の1例を示したものである。この実験は典型的な例としてトロンビンによる血小板の活性化反応に対するプロスタグランジン E_1 すなわち cyclic AMP 系の抑制作用の機序の解明のための吟味であるが，プロスタグランジン E_1 の存在量に比例して cyclic AMP は増量するが，これとは逆にトロンビンによるジグリセリドの生成，および C-Kinase によって触媒される 40K 蛋白質の選択的な燐酸化反応は共に平行して抑制されることを示した。この抑制現象は cyclic AMP 自身の共存によっても観察されている。したがって第2図に示したようにトロンビン ⟶ DG ⟶ C-Kinase 系の情報伝達系の DG の生成の段階で cyclic AMP が抑制をかけていることを示唆している。



	Membrane bound C-kinase	Released catalytic fragment
$-Ca^{2+}$–protease	78%	22%
$+Ca^{2+}$–protease	13%	87%

図 4 膜結合性 C-Kinase のプロテアーゼによる活性化

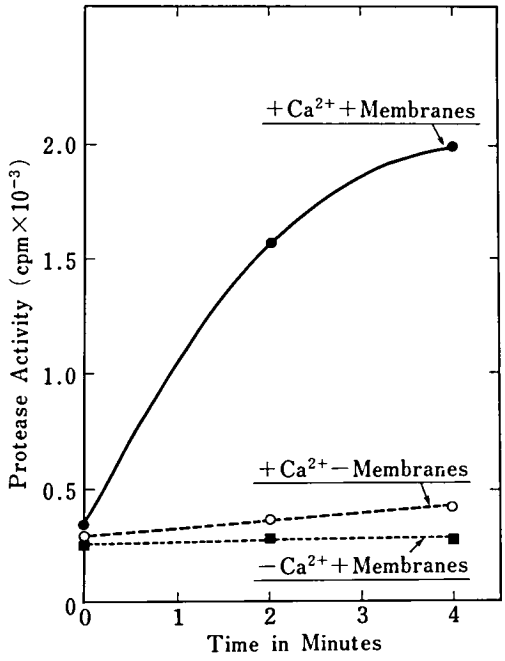


図 5　Phospholipid による Ca-Protease の活性化

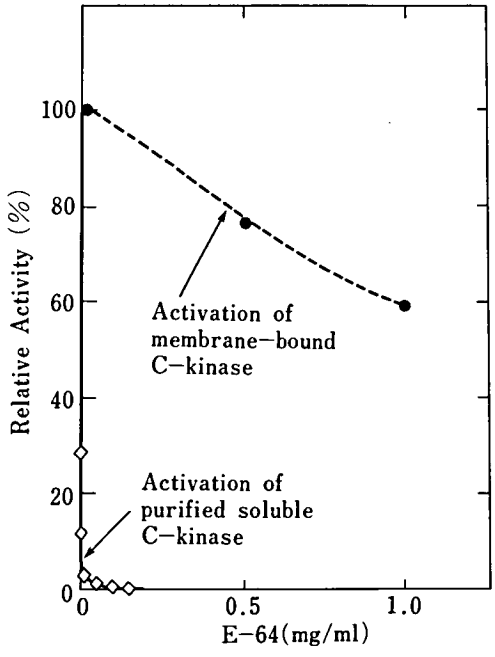


図 7　E-64 の阻害効果

	Ca^{2+} -Protease*	C-kinase**
	(units/mg protein)	
Skeletal muscle	4,510	80
Heart muscle	980	110
Brain	840	3,270
Kidned	390	280
Adipocytes	30	170
Lung	30	360
Liver	20	180

*One unit: one ng casein digested per min
**One unit: one pmol Pi transferred into histone per min

図 6　組織分布

以上の実験例に認めるように C-Kinase 系はアセチルコリンやカテコラミン(α作用)等を含めた excitatory membranes への刺激に際して認められるイノシトール燐脂質の加水分解と共役しているきわめて重要な情報受容伝達機構をなすものと推定され，cyclic AMP 系は上述の機序を介して抑制的に作用してゆく可能性が作業仮説として成立しうると考えている。

(2) カルシウムプロテアーゼとの関連

詳細な実験的根拠は省略したが上述の意義が推定される C-Kinase はその活性化の第2段の機構としてカルシウムプロテアーゼが関与する可能性を論議したい。C-Kinase は推定分子量が約77,000であり形質膜に可逆的に結合しうる hydrophobic な部分が存在するが，第4図のように限定分解をうけて活性中心を有するフラグメントが切断され，活性を発揮する可能性がある。この種のプロテアーゼはカルシウムを必須不可欠として要求しており，その濃度は 10^{-5}M 程度で充分に活性を発揮しうる点で従来多くの研究者がその対象としていたプロテアーゼとは異っている。またこの種のプロテアーゼは形質膜に結合して活性を発揮していると推定される C-Kinase を目がけて作用してゆくものと思われ，第5図に示すように C-Kinase の限定分解による不可逆的活性化には形質膜の存在が要求される。これまでの種々の解析の結

果，この形質膜，特に燐脂質はカルシウムプロテアーゼに作用して活性化しているのではなく，基質側の C-Kinase に作用し限定分解をうける状態をつくり出しているように見える。したがってカゼインのような基質を用いれば燐脂質の要求性は認められない。この事はプロテアーゼのような蛋白—蛋白間の相互関係を必要とする反応系には細胞内の局在を含めた topographical な概念を導入する必要性を強く示唆していると考えられよう。

この種のプロテアーゼは先年 Mellgren が心筋に見出した第2のプロチアーゼそれ自身であると推測されるが，第6図のように全身の組織に広く分布していて，この事は今堀和友教授，村地孝教授らも観察されている。

(3) E-64 による抑制作用

さて問題のプロテアーゼ抑制剤の作用であるが，膜と結合していない不活性型の C-Kinase を基質とする従来のカルシウムプロテアーゼの反応は精製した実験系では強力な抑制作用を示すことは多くの研究者の報告されている通りであるが，上述の生体膜に結合している C-Kinase の限定分解反応に対しては第7図に例を示すようにほとんどその抑制効果を示さない。このことが何に基因するかは現在さらに解析中であるが，この完全な理解は C-Kinase，形質膜，特に燐脂質，ジグリセリド，カルシウム，プロテアーゼ蛋白質という複数個の反応の場の解析をはなれてはあり得ないきわめて複雑な問題を提起しているように思われてならない。

考　　察

昨年度につづいて本年度の解析においてもカルシウムプロテアーゼの有する生理的意義，およびそれに対する E-64 の効果についてはその核心に迫ることには成功したとは云い難い。しかし，上述のように C-Kinase を中心とする細胞の情報伝達系，応答系を指標とした解析から，細胞内プロテアーゼのもつ意義の解析の焦点と問題があきらかになってきたように思われる。そこには脂質と蛋白質との間の分子識別の問題や，形質膜を含む局在の問題をさけては通れない課題があるように思われてならない。膜に結合した C-Kinase の活性化を完全にブロックする抑制剤を手に入れた時，C-Kinase の意義と共にカルシウムプロテアーゼ，細胞内限定分解の生理学的な解釈の一端をときほぐす緒が得られるのではないかと期待している。我田引水の点も多々あるが，御批判と御教示が頂ければ幸甚である。

昭和55年度の報告を終えるに当り，本研究に多大の御支援と御助言を賜った今堀和友教授，ならびに大正製薬株式会社の各位，原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) Nishizuka, Y.: Three multifunctional protein kinase systems in transmembrane control, Mol. Biol. Biochem. Biophys., **32**, 113, 1980.

2) Takai, Y., Kishimoto, A., Kawahara, Y., Minakuchi, R., Sano, K., Kikkawa, U., Mori, T., Yu, B., Kaibuchi, K. & Nishizuka, Y.: Calcium and phosphatidylinositol turnover as signalling for transmembrane control of protein phosphorylation, Adv. Cyclic Nucleotide Res., Raven Press, in press.

3) Nishizuka, Y. & Takai, Y.: Calcium and phospholipid turnover in a new receptor function for protein phosphorylation, Cold Spring Harbor Conf. Cell Prolif., **8**, in press.

4) Takai, Y., Kishimoto, A. & Nishizuka, Y.: Calcium and phospholipid turnover as transmembrane signalling for protein phosphorylation, Calcium and Cell Function, Academic Press, **2**, in press.

5) 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.

6) Mori, T., Takai, Y., Minakuchi, R., Yu, B. & Nishizuka, Y.: Inhibitory action of chlorpromazine, dibucaine, and other phospholipid-interacting drugs on calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase, J. Biol. Chem., **255**, 8378, 1980.

7) Kawahara, Y., Takai, Y., Minakuchi, R.,

Sano, K. & Nishizuka, Y.: Possible involvement of Ca^{2+}-activated, phospholipid-dependent protein kinase in platelet activation, J. Biochem., 88, 913, 1980.

8) Kawahara, Y., Takai, Y., Minakuchi, R., Sano, K. & Nishizuka, Y.: Phospholipid turnover as a possible transmembrane signal for protein phosphorylation during human platelet activation by thrombin, Biochem. Biophys. Res. Commun., 97, 309, 1980.

9) Iwasa, Y., Takai, Y., Kikkawa, U. & Nishizuka, Y.: Phosphorylation of calf thymus Hl histone by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase, Biochem. Biophys. Res. Commun., 96, 180, 1980.

10) Minakuchi, R., Takai, Y., Yu, B. & Nishizuka, Y.: Widespread occurrence of calcium-activated, phospholipid-dependent protine kinase in mammalian tissues, J. Biochem., 89, 1651, 1981.

8. プロテアーゼ阻害物質によるペプスタチン非感受性ヘモグロビン水解酵素の誘導

市原　明*

研究協力者　田中啓二*　生垣尚彦*

はじめに

近年，細胞内プロテアーゼの生理的意義はその阻害剤の存在と共に特に注目されているが，その詳細な機構については不明な点が多い。他方，ライソゾームは種々の水解酵素を含む細胞内小器管であり，プロテアーゼについても最近，新しい分類が確立しつつある。

我々は成熟ラット肝初代培養細胞の蛋白質代謝回転に対するライソゾームの役割について，微生物が産生するプロテアーゼ阻害剤を用い検討していたとき，或る種のプロテアーゼ阻害剤によって新しいヘモグロビン (Hb) 水解活性が強く誘導されてくることを見い出した。そこでこのプロテアーゼの性質について現在までに得られた結果を報告すると共に同様な誘導現象を in vivo ラットでも認めたので，それらの結果についても合わせて報告する。

実験方法

肝細胞の分離と初代培養

成熟ネズミ肝実質細胞はコラゲナーゼ灌流法によって分離し，血清及びホルモンを含むウィリアムスE培地に分散後，炭酸ガス培養器内で通常の静置単層培養で維持した[1]。

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，Hb 水解活性は Anson[2] の方法によって測定し，α-N-ベンゾイル-DL-アルギニン-β-ナフチルアミド (BANA) 及びロイシン-β-ナフチルアミド (Leu NA) 水解活性は Barrett[3] の方法で測定した。

細胞分画法

肝臓の分画は Ragab ら[4] の方法に準じて行った。

結　果

In vitro における Hb 水解酵素の誘導

我々は成熟ラット初代培養肝細胞にロイペプチンを処理すると，Hb 水解活性が著明に上昇してくることを見い出し[5]，また，この誘導がロイペプチンと同様，アンチパインやキモスタチンによっても観察されるが，E-64 やエラスタチナールでは認められないこともすでに報告した[6]。ロイペプチンは，酸性ホスファターゼ，チトクローム酸化酵素及び NADPH-チトクローム還元酵素などの活性には全く影響せず，特異的に Hb-水解活性を上昇させるが，この活性増加はシクロヘキシミドの同時添加で完全に抑制されるので，蛋白質合成を介した酵素誘導と考えられる。またこの誘導現象はマウスL細胞，樹立肝株細胞では認められなかった。更に，糖蛋白質の糖鎖合成を選択的に阻害する Tunicamycin[7] がこの酵素誘導を完全に抑制したので，誘導された Hb 水解酵素は糖蛋白質と推定された。

さて，この Hb 水解酵素の性質について，細胞の粗抽出画分を用い以下検討した。至適

* 徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素病理部門

II　標的酵素に対する効果

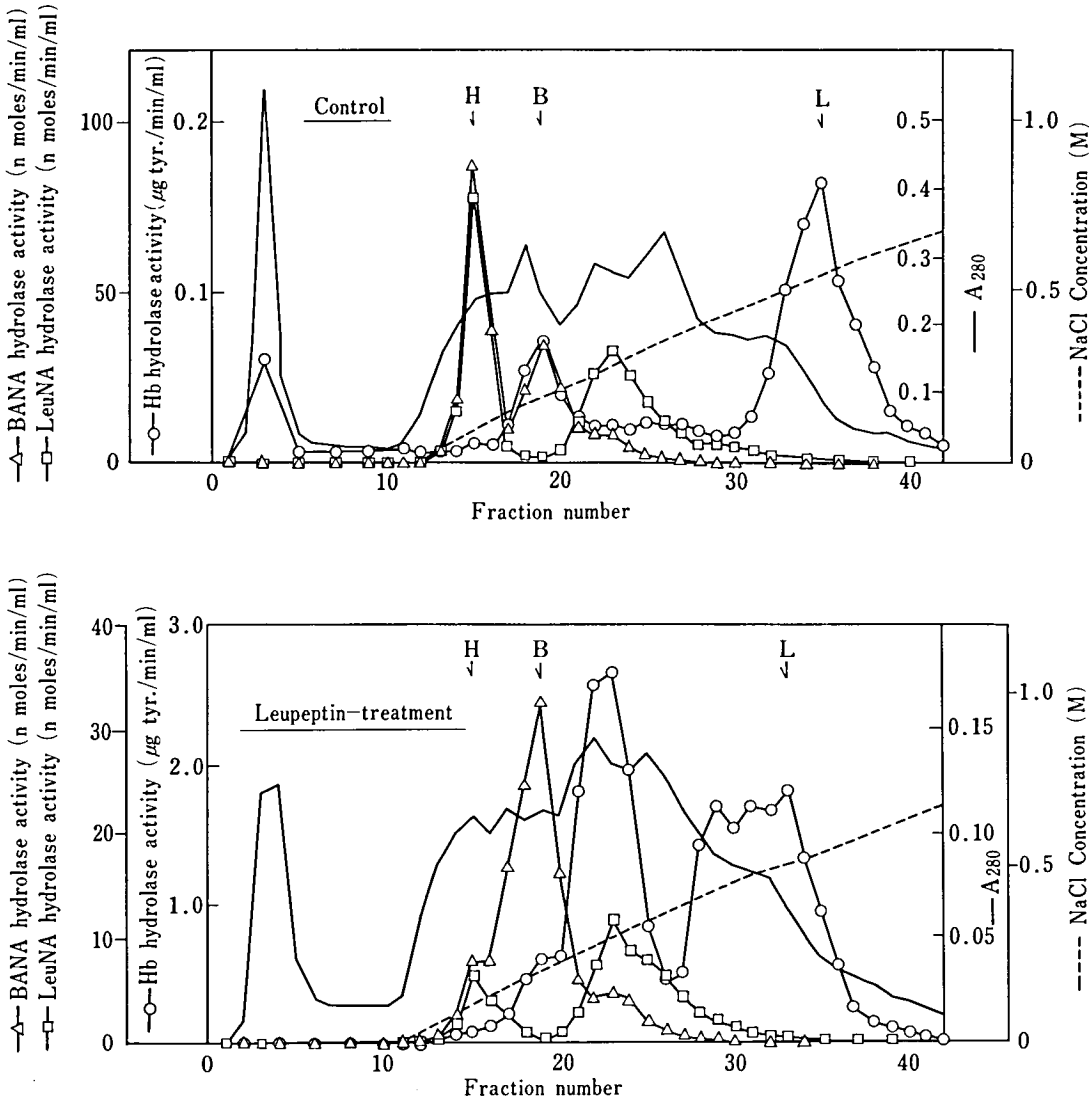


図 1　ラット肝細胞のチオール・プロテアーゼと誘導された Hb-水解酵素の Cellulose Phosphate Chromatography による分析

初代培養2日後の肝細胞にロイペプチンを終濃度 50 μg/ml で約30時間処理し，ハンクス液で洗浄後，細胞を集めた。凍結融解によって細胞から抽出した酵素を予め pepstatin-Sepharose affinity chomatography を通して Cathepsin D を分離し，その非吸着分画を濃縮後平衡化緩衝液で透析し試料標品とした。

カラム：1×7 cm，平衡化緩衝液：1 mM EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム（pH 5.0），溶出：NaCl 濃度を0から 0.8 M に増大させる直線濃度勾配法，流速：20 ml/時間，各画分の液量：5.3 ml，——：A 280 mm，……：電気伝導度から計算した NaCl 濃度　—△—BANA 水解活性，—□—：Leu NA 水解活性，—○—：ペプスタチン非感受性 Hb 水解活性（5 μg/ml のペプスタチン存在下で対照群は 5 mM 2-MSH 及び 5 mM EDTA を含む pH 5，ロイペプチン処置群では pH 4 の最大活性を示す pH 領域で測定）

上図：未処理の対照肝細胞，下図：ロイペプチン処理肝細胞，H. B. L の記号は各々，カテプシンH，B及びLの溶出位置を示している。

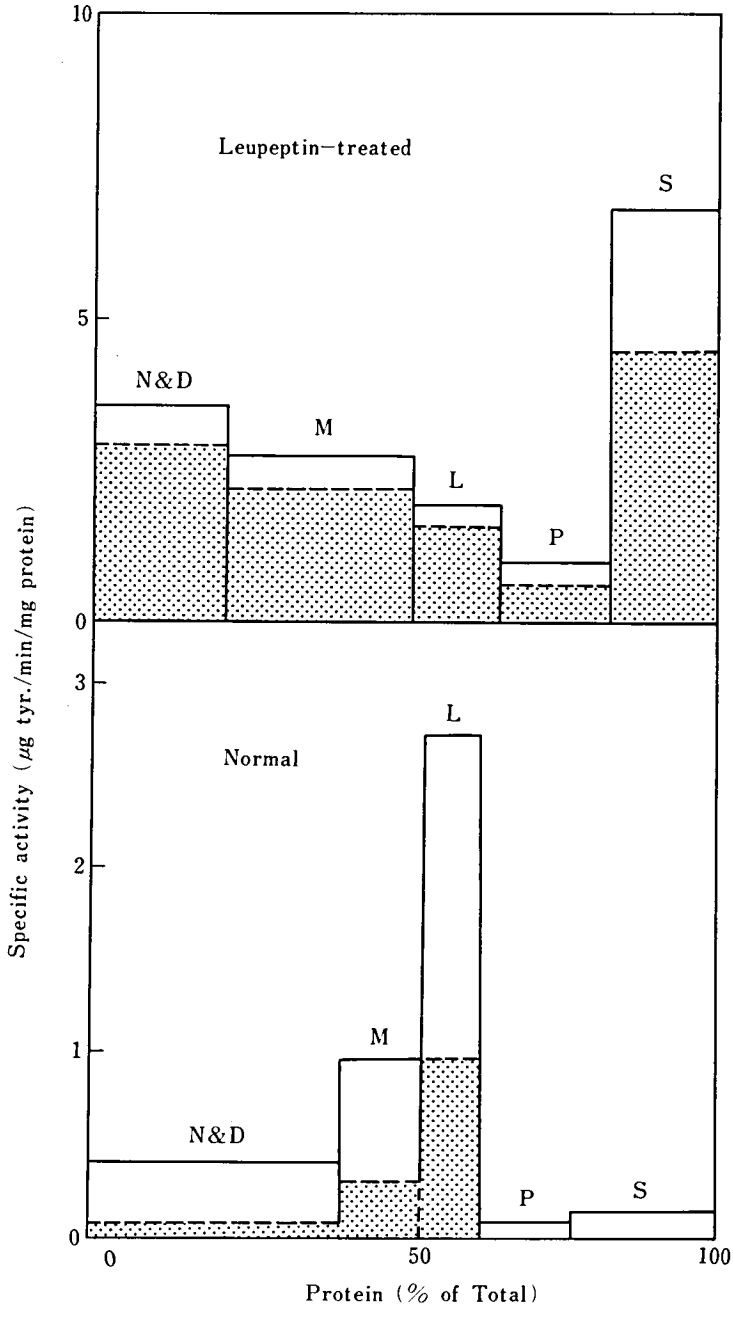


図 2 In Vivo 肝臓における Hb 水解酵素の誘導とその細胞内分布

体重 200 g ラットの腹腔内にロイペプチンを 1 回 5 mg, 12時間おきに 4 日間注射し, 最後に投与後, 絶食にして12時間後に殺し実験に使用した。細胞分画は通常の遠心分画法によって行い, light mitochondrial fraction を lysosomal fraction とした。N&D：核及び組織破片画分, M：ミトコンドリア画分, L：ライソゾーム画分, P：ミクロゾーム画分, S：上清画分, 各画分は凍結融解して酵素を抽出後, 活性を測定した。Hb 水解活性はペプスタチンの有無で測定し, 図の斜線部分はペプスタチン非感受性 Hb 水解活性を, 白抜き部分はペプスタチン感受性 Hb 水解活性即ちカテプシンD活性を示している。

pH は3～5の酸性領域にあり，pH 安定性も酸性領域で最も安定であるが，中性及び弱アルカリ性領域でも可成り安定である。これらの性質は酸性領域に至適 pH を有し，Hb をよく水解するライソゾームカテプシンDと類似しているが，本酵素がカテプシンDのようなカルボキシル－プロテアーゼに特異的な阻害剤であるペプスタチンで全く抑制されないことからカテプシンDとは異なった酵素と思われた。従って本酵素はペプスタチン－セファローズに吸着しないので，このアフィニティクロマトグラフィーによってカテプシンDと分離した。またこの酵素は PMSF, DFP などセリン残基修飾剤で抑制されず，IAA, TLCK, PCMP など SH-基修飾剤で阻害されることから，所謂，チオールプロテアーゼに属する酵素と思われる。更に微生物産生の酵素阻害物質[8] の影響を調べると，ロイペプチン，アンチパイン，キモスタチンなど本酵素の誘導物質により強い阻害を受けると共に E-64 によっても阻害されるが，エラスタチナールでは阻害されなかった。他方，本酵素の分子量をセファデックス G-75 のゲルクロマトグラフィーで求めると，BANA-水解活性とほぼ同位置に溶出され，分子量は約29,000と推定された。これらの結果は，本酵素がカテプシン B. H. L などの細胞内チオール・プロテアーゼ[9] と類似しているので，これらとの異同を検討する為に，セルロース・ホスフェイト・クロマトグラフィーによる分析を行った。図1はその結果を示したものであるが，上図は対照，下図はロイペプチンを処理したものである。まず上図の BANA-水解活性のパターンは二つのピークを示し，0.1 M NaCl で溶出する大きい方は同時に Leu NA 水解活性をも有しているが 0.2 M NaCl で溶出する小さい方は Leu NA には全く作用しなかった。即ち前者はエンド＆エクソ・ペプチダーゼ活性を持つことからカテプシンHであり，後者はカテプシンBと結論できる。次にペプスタチン非感受性 Hb 水解活性の溶出パターンを見てみると，この活性も大小二つに分布しているが，前者の小さいピークはカテプシンBの位置に一致しているので，カテプシンBによる水解と思われる。尚カテプシンHには Hb 水解活性はほとんど認められなかった。さて主な Hb 水解活性は 0.55 M NaCl で溶出されるが，この酵素は酸性 pH で陽イオン交換体と強く結合することや BANA 及び Leu NA など合成基質に全く作用しないことから，カテプシンLと推定した。そこでロイペプチンで処理した場合をみると（下図），まず BANA-水解活性の分布に著るしい変化が見られる。BANA 水解活性はロイペプチン処置で対照の約30％位までその活性が抑制されているが，この場合，カテプシンHがほとんど消失し，カテプシンBは可成り存在していることは興味深い現象である。次に，誘導されたペプスタチン非感受性 Hb 水解酵素のパターンをみてみると，一つは 0.3 M NaCl で溶出され，これは明らかにカテプシン B.L.H とは異っている。そして他に 0.4 M から 0.55 M NaCl の広領域にわたって溶出される活性が認められるが，この酵素とカテプシンとの異同については尚不明であり，現在，両酵素の精製を進めている。更に等電点分画法によってこの酵素の等電点を調べると，主な活性は pI＝5.6 にあるが，その前後に不均一なピークが認められ，この結果は図1で示したイオン交換クロマトグラフィーに見られる不均一性とよく一致した。また本酵素標品をコンカナバリンA-クロマトグラフィーにかけると吸着画分に加え，非吸着画分にも相当量の活性が回収された。各分画の酵素は再クロマトグラフィー後に同一分画に回収されるので，糖鎖構造にも可成りの不均一性が予想されたが，このことと表面荷電の不均一性との関連性については現在検討中である。

In vivo における Hb 水解酵素の誘導

初代培養肝細胞で観察したロイペプチンによる Hb-水解酵素の誘導はロイペプチンをラット腹腔内に直接注射することによって in vivo でも同様に観察された。ラット 100 g 体重当り 2.5 mg 量のロイペプチンを12時間おきに連続投与すると，4日後には肝臓のペプスタチン非感受性 Hb 水解活性は対照の約10～20倍上昇

するが，ペプスタチン感受性 Hb 水解活性即ちカテプシンD活性はほとんど変動しない。そこでこの誘導現象について臓器応答性を調べてみると，種々の臓器で誘導されたが，特に肝臓の他腎臓で著るしい誘導効果が認められた。対照動物の各臓器における Hb 水解活性は腎臓で最も高く，次いで肝，脾，肺，脳，心臓などで高いが，筋肉の活性は極めて弱い。同様な傾向は BANA-水解活性においても認められ，これはライソゾーム含量が臓器によって異なっていることを示唆している。そしてほとんどの臓器の Hb-水解活性はペプスタチンで阻害されるカテプシンDによるものであるが，腎臓は例外的にペプスタチン非感受性 Hb 水解活性が高く，その活性はカテプシンD活性よりも寧ろ高値を示し，大変興味深い。

次に，この誘導酵素の肝臓における細胞内分布を調べた結果を図2に示した。下図は対照動物の場合であり，大部分の Hb-水解活性はペプスタチン感受性及び非感受性の両者ともライソゾームを含む軽いミトコンドリア分画に回収され，典型的な細胞分画パターンを示している。しかしながら，ロイペプチンを処置したラット肝臓の Hb 水解活性はライソゾーム分画より寧ろ，核・ミトコンドリア及び上清分画にその主な活性が認められ，極めて不均一な分布を示した（上図)。そしてこの場合，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ない誘導酵素であるが，ペプスタチンによって阻害されるカテプシンD活性も同様不均一に分布する。またライソゾーム内に存在する BANA-水解活性や酸性ホスファターゼ活性も，Hb 水解活性と同様に不均一な分布を示した。この事は，ロイペプチン処理によって，ライソゾームが重い分画に移動する為，核及びミトコンドリア画分にその酵素活性が回収されることと同時にロイペプチンがライソゾーム膜を不安定化する為，ライソゾーム酵素の上清分画への漏出が起こっていることを示唆している。従ってこの誘導される Hb-水解酵素も本来ライソゾームに局在していた可能性が考えられるが，この可能性はこの酵素が糖蛋白質であることやその至適 pH が酸性領域であることなどからも支持されると考えている。

考　　察

プロテアーゼ阻害剤によるこの Hb-水解酵素の誘導機作については現在全く不明である。即ちこの誘導現象が誘導物質の構造類似性に依存したものか，若しくはプロテアーゼ阻害の特異性によるものかもよく解っていない。例えば，前者の場合なら，誘導物質が allosteric activator か或いは stabilizer として作用することなどが考えられ，また後者の場合には，チオール・プロテアーゼの強い阻害剤である E-64に誘導能力がないことから，セリン・プロテアーゼを阻害することによってこの誘導が発現する可能性が考えられる。しかしながら何れにしてもこの誘導機構については誘導酵素の細胞内局在性，誘導物質の膜透過機構とその作用部位及び誘導酵素の酵素学的性質などを詳しく解明しない限り決定的な結論は得られない。他方この誘導される Hb-水解酵素は細胞内で最も強いプロテアーゼ活性を有するライソゾーム・カテプシンDの数倍の活性を示すことから，何らかの生理的意味があると思われるが，この酵素が本来細胞内に存在するものか人工的な産物であるのか，この点も重要な問題であるので現在検討中である。

文　　献

1）田中啓二，市原明：蛋白質・核酸・酸素，**23**, 1259, 1978

2）Anson, M. L.: J. Gen. Physiol, **22**, 79, 1938.

3）Barret, A. L.: Anal. Biochem., **47**, 280, 1972.

4）Ragab, H., Beck, C., Dillard, C, & Tappel A. L.: Biochim. Biophys. Acta., **184**, 101, 1967.

5）Tanaka, K., Ikegaki, N. & Ichihara A.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **91**, 102, 1979.

6）Tanaka, K., Ikegaki, N. & Ichihara A.: Arch, Biochem. Biophys., **208**, 296, 1981.

7）高月　昭，田村学造：生化学 **51**, 969, 1979.

8）梅沢浜夫，青柳高明，竹内富雄：代謝，**14**, 1071, 1977.

9）Kirschke. H., Langner, J., Wieders, B., Ansorge, S., Bohley, P. & Broghammer, U.: Acta, Biol, Med, Gem., **35**, 285, 1976.

9. 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（続報）

宮武　正*,**

研究協力者　渥美哲至*　有賀敏夫**　中村京子**

はじめに

著者らは，筋ジストロフィー症における膜異常の研究の一環として，筋ジストロフィーチキンを用いて主要な筋ガングリオシドを比較検討した結果，このガングリオシドの組成に異常を認め，[1] 更に，E-64 投与群では，構造が不明の X ganglioside が減少するという結果を得，前回の報告書で報告した[2]。今回は，構造の不明なガングリオシドの構造を明らかにするとともに，個々のガングリオシドが筋ジスチキンでどのように変化するかを検討してみた。

方　法

(1) チキン筋ガングリオシドの構造決定

鶏前胸筋 30 kg よりクロロホルム-メタノール（1：2 及び 1：1，容比）で総脂質を抽出し，ついでアセトン分画によりアセトン不溶分画を得，更に Folch の分配法を行ない，粗ガングリオシドを得た。ついで Momoi ら[3]の方法で DEAE Sephadex column chromatography を行ない，4 分画 mono-, di-, tri- 及び polysialoganglioside を得た。各分画は，Ando らの方法に従い，Iatrobeads column chromatography 及び薄層クロマトグラフィーを用いて，各ガングリオシドを単離精製した。

(2) 糖組成の分析法

単離精製したガングリオシドの糖組成は，比色法及びガスクロマトグラフィーを用い測定した。ヘキソースは anthrone 硫酸法[4]，ヘキソサミンは Gatt ら[5]の方法で，シアル酸は Svennerholm ら[6]の方法を用いた。各中性糖は Sweeley ら[7]の方法で 3％ SE-30 ガラスカラムを用いるガスクロマトグラフィーで定量した。シアル酸の種類は Yu ら[8]の方法で決定した。

(3) 完全メチル化法によるシアル酸結合状態の決定

ガングリオシドの完全メチル化は，Ando ら[9]の方法を用いた。完全メチル化ガングリオシドは，メタノリーシス後，ガスクロマトグラフィー及びガスクロマトグラフ質量分析計を用いて結合状態を決定した。

(4) シアリダーゼによるガングリオシドの水解

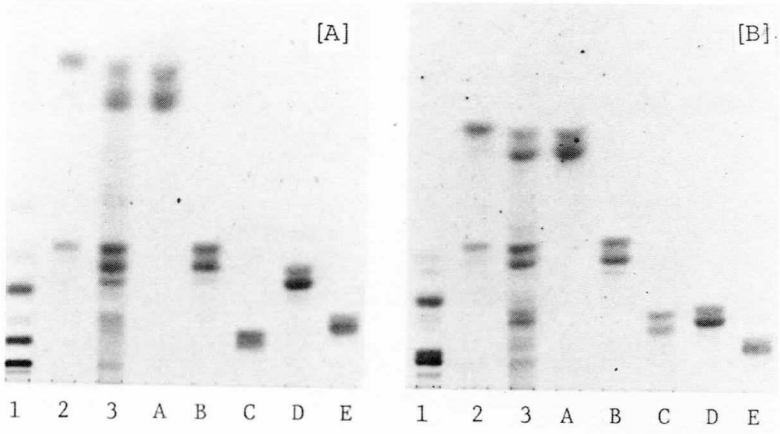
ガングリオシドは Clostridium perfringens neuraminidase で 37°C, 18時間処理し分解産物を薄層クロマトグラフィーにより同定した。

結　果

チキン胸筋より 5 個のガングリオシド（A, B, C, D, 及び E）を単離精製した。そのガングリオシドの薄層クロマトグラムは，第 1 図の如くである。A と B はそれぞれ，GM_3 と GD_3 の標準物質と同一の Rf を示した。他の 3 つのガングリオシドは特有な移動を示し，既知のガングリオシドの Rf とは一致しなかった。A，B

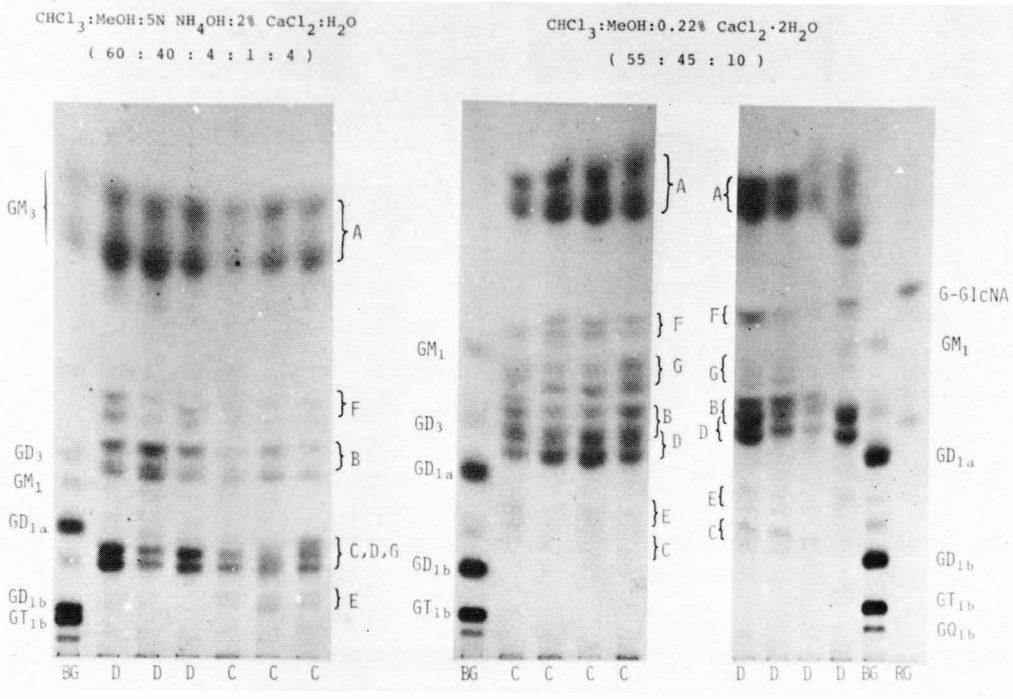
* 自治医科大学神経内科
** 東京都臨床医学総合研究所

Ⅱ　標的酵素に対する効果



1：ヒト脳ガングリオシド，2：GM_3 及び GD_3 ガングリオシド，3：チキン筋の総ガングリオシド，A—E：単離精製したチキン筋ガングリオシド

図 1　単離精製したチキン筋ガングリオシドの薄層クロマトグラフィー



BG：ヒト脳ガングリオシド，RG：ヒト赤血球膜ガングリオシド
C：Control.　D：Dystrophy.

図 2　筋ガングリオシドの薄層クロマトグラフィー

表 1 筋のガングリオシド組成

Ganglioside	Control (n=7)	Dystrophy (n=10)	Treated dystrophy		
			E-64-c-150 mg/kg (n=10)	E-64-c-300 mg/kg (n=10)	P.O. (n=2)
Total.	9.5±1.5	33.8±10.5	29.5± 6.9	34.1±11.8	28.5
A (GM_3)	4.7±0.7	11.3± 4.3	11.1± 3.2	14.5± 5.7	13.0
B (GD_3)	2.0±0.5	8.2± 2.3	6.7± 1.7	7.3± 2.6	6.5
C (GT_3)	0.4±0.3	1.9± 0.8	1.6± 0.6	1.9± 1.2	2.4
D	1.1±0.4	9.3± 3.5	6.8± 2.2	6.6± 2.2	4.0
E	0.5±0.2	2.0± 0.6	1.6± 0.5	1.3± 0.4	0.6
F	0.4±0.1	1.1± 0.5	1.4± 0.4	2.1± 0.7	1.4
G	0.5±0.3	0.1± 0.1	0.3± 0.2	0.5± 0.3	0.7
	mean±S.D.	mean±S.D.	mean±S.D.	mean±S.D.	mean

* μg NANA/g protein

及びCガングリオシドの糖組成は，グルコース (Glc)，ガラクトース (Gal) 及び N-アセチルノイラミン酸 (NANA) であり，その比 Glc: Gal: NANA は A では 1:1:1，B では 1:1:2，C では 1:1:3 であった。D ガングリオシドは更に N-アセチルグルコサミン (GlcNA) を含み，その比は，Glc: Gal: GlcNA: NANA=1:3:2:1 であった。次に，完全メチル化ガングリオシドをメタノリーシス後，ガスクロマトグラフィーを行なったところ，Aより1つのピーク (peak I) が，B及びCからは peak I の他もう1つのピーク (peak II) が認められた。Bでは，peak I と II の比が 1:1 であり，Cでそれが 1:2 であった。このピークを質量分析計で調べた結果，peak I は，1, 2, 4, 7, 8, 9-0-methyl-N-acetylneuraminic acid, peak II は 1,2,4,7,9-0-methyl-8-OTMS-N-acetylneuraminic acid であった。

ガングリオシド A, B 及びCは Clostridium perfringens neuraminidase で水解した結果，全て lactosylceramide となった。

以上の結果より，ガングリオシド A, B 及びCの構造は，A: NANA-Gal-Glc-Cer (GM_3)，G: NANA (2→8) NANA-Gal-Glc-Cer (GD_3)，C: NANA (2→8) NANA (2→8) NANA-Gal-Glc-Cer (GT_3) であることが明らかとなった。Dの糖間の結合は微量なため，決定できなかった。

次に，ジストロフィーチキン筋ガングリオシドを対照チキンと比較検討した。その薄層クロマトグラフィーの結果を図2に示した。先に分離した5個のガングリオシドの他，更に2個のガングリオシドFとGが検出された。Fは，ヒト赤血球の主要ガングリオシドである sialyl-paragloboside と同一 Rf を有し，Gは，新しいガングリオシドで，その構造は調べていないが，最近 Chien[10] らが報告した NANA-Gal-GalNA-Gal-Gal-Glc-Cer なるガングリオシドと薄層上同様な移動度を示すことから，これと同一なガングリオシドと考えられる。

次に，これらのガングリオシドの薄層クロマトプレートを二波長クロマトスキャンナーを用いてスキャンして定量した。更に，筋ジスチキン E-64-c 150 mg/kg, E-64-c 300 mg/kg 治療群及び経口投与群について検討した。その結果は表1の如くである。ジストロフィーチキン筋では，G以外の全てのガングリオシドの増加を認めた。特にDガングリオシドの増加が顕著であった。

E-64-c 治療による影響は，総ガングリオシド含量については，ジストロフィー群と差を認めなかった。各ガングリオシド分画では，Gガングリオシドを除くいずれのガングリオシドも，対照に比しジストロフィー群と同程度の増

加を認め，そのうち，Dガングリオシドの平均値はジストロフィー群で9.3±3.5 μg (NANA/g protein) に対し，E-64-c-150 投与群で 6.8±2.2, E-64-c-300 投与群では 6.6±2.2, P.O. 群では 4.0 と減少を示した。

考　　察

我々は，チキン筋ガングリオシドがジストロフィーチキン筋で増加していることを認め，又，これが E-64 投与により有意に低下することを報告した。チキン筋ガングリオシドには他の臓器には認められない特異な構造を有するものが存在するため，その抽出と分画法にあたって，多大な困難が存在する。前回の報告では構造の未知であったXガングリオシドの構造を検討したところ，この分画には5個のガングリオシドが含まれていることがわかり，そのうち3つについては構造が明らかになった。即ち，Cガングリオシドは今回我々により GT_3 であることが判明した。Fは，sialylparagloboside であり，又，Dは，糖組成及び TLC 上の Rf 値より Chien ら[10] により報告された NANA (2→3) Gal (1→4) GlcNA (1→3) Gal (1→4) GlcNA (1→3) Gal (1→4) Glc-Cer なるガングリオシドと考えられる。

ジストロフィー筋では，このDガングリオシドの増加が特に認められた。これらのガングリオシドの増加は，ジストロフィー筋において，これらのガングリオシドを含む膜の増加，又は，これらのガングリオシドの合成亢進又は分解の低下が考えられる。

次に，E-64-c 治療による効果についてであるが，先に示したように，未処理のジストロフィーチキン筋と，統計学的有意差は認められなかった。ただ，そのうち，Dガングリオシドの平均値は，E-64-c-150 投与群，E-64-c-300 投与群，及び P.O. 群で減少を示した。このDガングリオシドは，ジストロフィー筋で正常の8.5倍と最も顕著な増加があり，今後，この変化の原因を追求するとともに，E-64 による影響を例数を増して検討したい。

文　　献

1) Miyatake, T., Atsumi, T., Ariga, T. and Nakamura, K: Gangliosides in dystrophic chicken muscle. in Symposium on Muscular Dystrophy. in press.

2) 宮武　正，渥美哲至，有賀敏夫，他：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，今堀班，昭和54年度報告書，pp. 99-102.

3) Momoi, T., Ando, S. and Nagai, Y.: High resolution preparative column chromatographic system for gangliosides using DEAE-Sephadex and a new porous silica, Iatrobeads, Biochim Biophys. Acta, **441**, 488-497, 1976.

4) Scott, T. A., Jr. and Melvin, E. H.: Determination of dextran with anthrone, Anal. Chem., **25**, 1656-1661, 1953.

5) Gatt, S. and Berman, E.R.: A rapid procedure for the detemination of aminosugars on a microscale, Anal. Biochem., **15**, 167-171, 1966.

6) Svennerholm, L.: Quantitative estimation of sialic acids. II A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method, Biochim. Biophys. Acta, **24**, 604-611, 1957.

7) Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M. and Wells W.W.: Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances, J. Am. Chem. Soc., **85**, 2497-2507, 1963.

8) Yu, R.K. and Ledeen, R.W.: Gas-liquid chromatographic assay of lipid-bound sialic acids: measurement of gangliosides in brain of several species, J. Lipid Res., **11**, 506-516, 1970.

9) Ando, S., Kon, K., Nagai, Y. and Murata, T.: Chemical ionization and electron impact mass spectra of oligosaccharides derived from sphingolipids, J. Biochem. (Tokyo), **82**, 1623-1631, 1977.

10) Chien, J.L. and Hogan, E.L.: Characterization of two gangliosides of the paragloboside series from chicken skeletal muscle, Biochim. Biophys. Acta, **620**, 454-461, 1980.

Ⅲ　組織及び細胞中のタンパク代謝に及ぼす効果

10. ニューロフィラメント変性に対する E-64-c の効果……杉田　秀夫

11. E-64-c の骨格筋内分布と In vivo におけるプロテアーゼ阻害作用について
の検討 ……石浦　章一

12. カルシウムによる骨格筋の崩壊に関する研究 ……石浦　章一

13. 培養筋細胞に対する E-64 の作用……小沢　瑛二郎
～筋管細胞のタンパク分解速度に及ぼす E-64-c の影響～

14. N-〔N-(L-trans-3-Carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl〕-3-metyl-
butylamine (E-64-c) の筋蛋白質代謝に及ぼす影響 ……江橋　節郎

15. ヌードマウスへの異種移植筋の再生に対する E-64 の効果……寺尾　寿夫

10. ニューロフィラメント変性に対するE-64-cの効果

杉田秀夫*,**

共同研究者 鎌倉恵子* 井原康夫* 石浦章一**

研究目的

ラットなど，哺乳類の末梢神経軸索蛋白成分として，neurofilament (NF), microtubles 等がいわれているが，これら蛋白質の SDS polyacrylamide gel electrophoresis 上での同定についても近年，研究が進められている。Microtubules の tubulin については早くより研究が進んでいたが[1]，NF についても，1975年の Hoffman, Lasek ら[2]の slow axonal flow component の研究以来議論され，最近，森，黒川により[3]，分子量各々20万，16万，6.8万の triplet protein であることが確立された。

Schlaepfer らの1971年以来の研究により，in vitro での末梢神経切片 incubation 実験から，calcium (Ca) に依存して病理形態学的に microtubules, NF の disruption がおこり，これが in vivo での Waller 変性の際の変化に似ていることがわかった[1),7)]。又，この変化が，Ca を含まない溶液中ではおこらず，PCMB で前処置することによって阻害されることがわかった[4)]。生化学的にも，同様の実験で，SDS polyacrylamide gel 上で，先に述べた NF triplet が Ca に依存して消失し，この変化が Ca を含まない溶液中ではおこらず，PCMB, TLCK, TPCK 等で阻害されることがわかった[5),7)]。In vivo での Waller 変性で，生化学的にも NF triplet が変化することがわかった[6)]。以上から，Schlaepfer は Ca 依存性で且つ PCMB, TLCK, TPCK 等で阻害される性質を持った，特に NF に親和性のある protease の存在を推測している[7)]。

一方，invertebrate では，myxicola axoplasma に於てその NF である分子量20万の蛋白に Ca に依存して作用し，PCBM, TLCK, leupeptin で阻害される酵素の存在が[8)]，又 squid axoplasma でも NF である分子量16万の蛋白に Ca に依存して作用し，PCMB, TLCK, TPCK で阻害される酵素の存在が推測されている[9)]。

我々はラット坐骨神経切片を用い，in vitro での incubation 実験で，NF に対する Ca イオンの影響，及びそれに対する E-64-c[10),11)] の効果を SDS polyacrylamide slab gel electrophoresis を用いて検索した。

材料及び方法

1) 150～200 g のオスの Wistar ラットより坐骨神経を取り出し，根及び末梢端は除いて，6 mm の segment に切る。これを次の各溶液内で incubate した。基本溶液（以下 Basic medium. B. M. と略す）は Tris-HCl (5 mM, pH 7.4), NaCl (130 mM), KCl (4 mM), penicilline G (1000 u/ml), glucose (1 g/l) である。溶液Aは B. M.+5 mM EGTA の Ca free 溶液，溶液Bは B. M.+5 mM 又は

* 東京大学医学部脳研神経内科

** 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部

10 mM $CaCl_2$, 溶液Cは溶液Bに 0.015 mg/ml ～2 mg/ml の種々の濃度の E-64-c を加えた。すべての溶液は pH 7.4 に調製し，Ca イオンの組織内浸透をよくするため，1％ Triton X-100，又は 150 μg/ml の ionophore (A 23187) を用いた。溶液内の segment は 1％ Triton X-100 を用いた実験では 1～7 時間，ionophore を 150 μg/ml を用いた実験では 4～24時間，30～35°C で incubate し，経時的にとり出し，300 μl の 2％ SDS，0.08 M Tris-HCl (pH 6.8)，10％ vol/vol の glycerol，5 mM 2-mercaptoethanol 中で homogenize し，5分間加温した。各サンプル 10～20 μg を Laemmli[31]の方法に従い，7.5％ SDS polyacrylamide slab gel electrophoresis にかけた。Gel は Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。E-64-c の添加実験は，1％ Triton X-100 を用いた 10 mM $CaCl_2$ を含む溶液中で行なった。

2) ラット又はウサギ脊髄，及び坐骨神経より NF を Schlapfer[12]，森[13]らの方法の変法で精製した。材料を低張液中で静置して NF を抽出し，0.1 M NaCl で安定化させ，最後に 1 M sucrose を用いて pellet として回収し，これを1)の実験の対照として用いた。ウサギ脊髄より精製した NF にウサギ骨格筋より抽出した Ca-activated neutral protease（以下 CANP と略す）5 μg，又は 20 μg を 0.1 M グリセロリン酸ナトリウム-HCl，5 mM $CaCl_2$，25 mM 2-mercaptoethanol 中で 30°C で作用させ，0～60分の間経時的にとり出し，SDS，Tris を含む溶液中に溶解し，5分間加温した。一方，上記溶液中に E-64-c を加えた溶液中でも同様に作用させた。各サンプル 5 μg を 7.5％ SDS polyacrylamide slab gel electrophoresis にかけ，硝酸銀による染色を行な

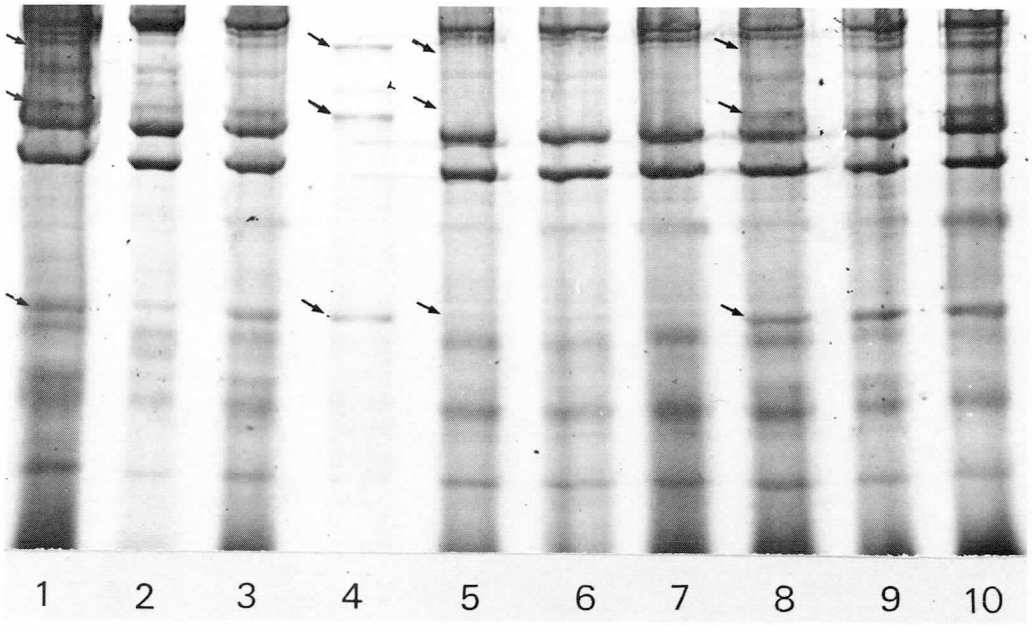


図1　1％ Triton X-100 を用いた実験の 7.5％ SDS polyacrylamide slab gel electroresis. 1, 2, 3 は Ca free, 5 mM EGTA 溶液中で incubation した結果で左より右へ 2，4，6 時間である。
5，6，7 は 10 mM Ca 溶液中で incubation した結果で左より右へ 2，4，6 時間である。
8，9，10 は 10 mM Ca＋1 mg/ml E-64-c 溶液中で incubation した結果で左より右へ 2，4，6 時間である。
4 はラット spinal cord より精製した neurofilament である。
矢印は上から下へ20万，16万，6.8万 M. W. の蛋白を示す。

った。

結　　果

1) Ca を含む溶液B中では，1% Triton X-100 を用いた場合，10 mM Ca では1時間で，5 mM Ca では2時間で，NF protein の選択的消失がみられた。これに対し，Ca free 溶液A中，及び E-64-c を添加した溶液C中では7時間までの観察では，NF triplet に変化はみられなかった（図1）。又 E-64-c の濃度を変えて実験したところ，最低 30 μg/ml で NF triplet の変化に対する阻害がみられたが，その効果は 1 mg/ml，0.5 mg/ml などよりは弱く，15 μg/ml では阻害はみられなかった。

次に ionophore を用いた実験でも Ca を含む溶液B中では，NF triplet の選択的消失がみられたが，Triton X-100 の場合より時間がかかり，10 mM $CaCl_2$ 溶液内で6時間 incubation した頃から消失が現われはじめた。Ca free 溶液，E-64-c を添加した場合には最高24時間まで incubation したが，NF triplet protein に変化はみられなかった。

2) ウサギ脊髄より精製したに NF triplet protein に CANP を直接作用させると10分ごろより消失し，この変化は E-64-c で完全に抑制された（図2）。

考　　案

以上より，in vitro において NF triplet が Ca イオンに依存して消失し，その変化が E-64-c により阻害されることがわかった。Ca イオン濃度は 10 mM では，5 mM より速く NF triplet を消失させた。このことから，末梢神経に，Ca イオンに依存性があり，thiol protease inhibitor である E-64-c で阻害される性質を持った酵素が存在し，NF に作用することが推測される。この酵素の性質は筋肉等でみつかっている CANP に非常によく似ている。事実，NF が CANP の基質となり，その変化が E-64-c で阻害されることが2)の実験より証明された。

この酵素は，筋疾患である Duchenne 型筋ジストロフィー症で，CANP が Ca により活性され Z-band に選択的に作用するように，

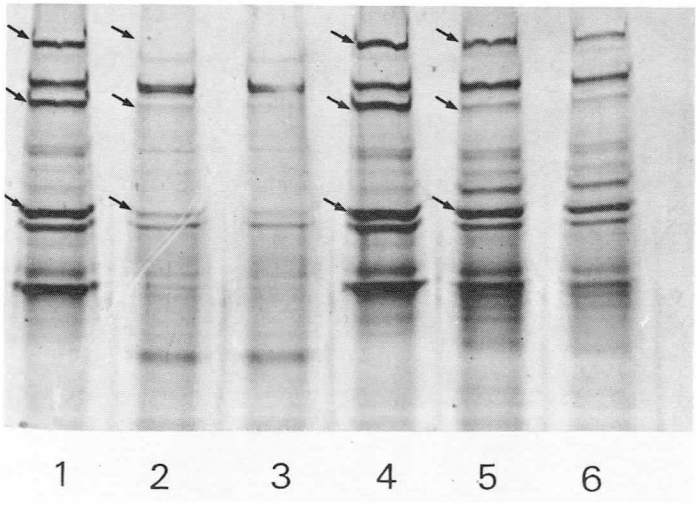


図2 ウサギ spinal cord より精製した neurofilament にウサギ骨格筋より精製した CANPを作用させた結果。

1，2，3は neurofilament 0.5 mg に CANP 20 μg を作用させた結果で左より右へ0，20，60分である。

4，5，6は上記条件に 10μg E-64-c を作用させた結果で左より右へ，0，20，60分である。

矢印は上より下へ20万，16万，6.8万の triplet protein を示す。

末梢神経の病的状態，つまり Waller 変性等で，Ca イオンが末梢神経の axon 内に流入する事により活性化され，NF に選択的に作用すると考えられる。

なお我々は，in vivo においても，ラット坐骨神経をエーテル麻酔下に切断し皮膚を縫合して Waller 変性をおこさせ，経時的に断端より末梢で末梢神経をとり出し，homogenize 後，SDS polyacrylamide gel electrophoresis にかけることにより NF の変化を調べた。手術2日後より NF triplet の選択的消失がみられた。しかし，E-64-c を in vivo に注入した結果は，皮下注，腹腔内注等の投与方法を用い，E-64-c の濃度も種々変え（10 mg/kg～50 mg/kg），且つ E-64-c の溶媒も生食，20% DMSO, olive oil などを変えて試みたが，NF 変性の阻害はみられなかった。

結　論

ラット坐骨神経切片の in vitro での incubation の実験を行ない，SDS polyacrylamide gel electrophoresis 法で調べた。Ca イオンに依存して，NF triplet protein（20万，16万，6.8万 M. W.）が消失し，この変化は E-64-c を加えた溶液中及び Ca free 溶液中ではおこらなかった。この結果は末梢神経内に，Ca イオンに依存して活性化され，E-64-c で阻害される性質を持つ酵素が存在することを推測させ，この酵素は CANP に極めてよく似た性質を持つと思われる。

文　献

1) Weisenberg, R. C., Borisy, G. G. and Taylor, E. W.: The colchicinebinding protein o: mammalian brain and its relation to microtubules, Biochemistry, **7**: 4466, 1968.

2) Hoffman, P. N. and Lasek, R. J.: The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons, J. Cell Biol., **66**, 351, 1975.

3) Mori, H. and Kurokawa, M.: Morphological and biochemical characterization of neurofilaments isolated from the rat peripheral nerve, Biomed. Res., **1**, 24, 1980.

4) Schlaepfer, W. and Hasler, M. B.: Characterization of the calcium-induced disruption of neurofilaments in rat peripheral nerve, Brain Res., **168**, 299, 1979.

5) Schlaepfer, W. W. and Micko, S.: Calcium-dependent alterations of neurofilament proteins of rat peripheral nerve, J. Neurcchem., 211, 1979.

6) Schlaepfer, W. W. and Micko, S.: Chemical and structural changes of neurofilaments in transected rat sciatic nerve, J. Cell Biol., **78**, 369, 1978.

7) Schlaepfer, W. W.: Nature of mammalian neurofilaments and their breakdown by calcium. In Progress in Neuropathology, Vol. 4 (ed. Zimmerman, H. M.) Raven Press, New York, pp. 101-123, 1979.

8) Pant, H. C. and Gainer, H.: Properties of a calcium-activated protease in squid axoplasm which selectively degrades neurofilament proteins, J. Neuroboil., **11**, 1, 1980.

9) Gilbert, P. S. and Newby, B. J.: Neurofilament disguise, destruction and discipline, Nature **256**, 586, 1975.

10) Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M. et al.: Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor, Agric. Biol. Chem., **42**, 523, 1978.

11) Hanada, K., Tamai, M., Ohmura, S. et al.: Stucture and synthesis of E-64, a new thiol protease inhibitor. Agric. Biol. Chem., **42**, 529, 1978.

12) Schlaepfer, W. W.: Studies on the isolation and substructure of mammalian neurofilaments, J. Ultrastruct., **61**, 149, 1977.

13) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4, Nature, **227**, 680, 1970.

11. E-64-cの骨格内分布と in vivo における プロテアーゼ阻害作用についての検討

石浦章一*

究協力者 花田和紀** 玉井正晴** 柏木敬子**

はじめに

E-64 並びにその類縁体のチオールプロテアーゼ阻害活性については種々の報告がある[1),2)]。中でも動物細胞のチオールプロテアーゼでは Ca 依存性プロテアーゼ[3),4)]，カテプシンB，L[5),6)]及び H[7)]を強力に阻害すると言われている。しかしながら in vivo での阻害様式については異論のあるところであり，E-64 投与によって細胞内プロテアーゼ活性が減少するのは血清中に含まれる E-64 が酵素調整の段階で混入したものではないか，とも考えられている。

我々は in vivo に投与した E-64-c が骨格筋のいかなる画分に存在するか，また生筋の中に存在する E-64-c が実際にタンパク分解阻害活性を持つのかどうかを調べる目的で，ラットに E-64-c を S. C. 投与し，骨格筋内の分布と in vivo でのインヒビターの作用を我々が開発した Z-線崩壊阻止活性[8)]で観察した。

材　料

ウイスター系ラット（200 g）を使用した。〔^{3}H〕E-64-c は 365 μCi/mg のものを用いた。

方　法

ラットに E-64-c を 10 mg/kg 皮下投与し，3時間後，及び24時間後放血し，後肢筋約 2g を採取した。骨格筋は約10倍量の 50 mM KCl を含む 20 mM トリス－マレート緩衝液，pH 6.8 を用いてホモジナイズし，1,000 r.p.m. 5分の遠心で筋フィラメント分画（MF）を得た。沈殿（MF）をもう一度同緩衝液で洗いこの上清と前に得た 1,000 r.p.m. の上清を混ぜて 19,000 r.p.m. 1時間遠心しミトコンドリア，ライソゾーム分画（ML）を得た。この上清と再び洗滌した上清とを混ぜて上清画分（PS）とした。

ライソゾームのマーカー酵素である酸性マルターゼは村上らの方法[9)]で測定した。

Ca イオノフォアを用いた α-アクチニン遊離の実験は石浦の方法[10)]によった。なお外液の α-アクチニン量は CBB 染色したポリアクリルアミドゲルを 600 nm でトレースし定量した。

結果及び考察

表1は2匹のラットを用いて行った〔^{3}H〕-E-64-c の3時間後の骨格筋内分布である。^{3}H は大部分が上清画分に回収されることが明らかになり肝臓で報告されているようなライソゾームへの濃縮[5),6)]はこの時点では起こっていなかった。表1より上清画分の比活性は MF，及び ML 分画よりも数段高く，ほとんどの〔^{3}H〕E-64-c が細胞内小器官に結合したり，とり込まれているのではなく，可溶性画分に存在するといえる。

そこで，ライソゾームへの濃縮は骨格筋では時間がかかる可能性を考え，E-64-c 投与24時間後の ^{3}H の分布を同様の方法で測定した。その結果が表2である。表2では何らかの理由によ

* 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第1部
** 大正製薬株式会社総合研究所

表1

Fraction	Protein	Total R. A.	S. A.
Exp. 1 (1.884 g)			
WH	113.8 mg	184,680 dpm	1,623
MF	71.6	42,380	592
ML	1.93	3,420	1,770
PS	19.2	83,368	4,353
Exp. 2 (1.915 g)			
WH	143.2	233,700	1,632
MF	71.7	47,522	663
ML	2.65	4,799	1,810
PS	29.1	137,689	4,735

10 mg/kg, subctaneously inject., after 3 h.

表2

Fraction	Protein	Total R. A.	S. A.	Acid Maltase	
	mg	dpm	dpm/mg	Uuits	U/mg
Exp. 1 (2.055 g)					
WH	127.4	602,360	4,832		
MF	64.4	138,380	2,147	4,788	74.3
ML	1.69	2,820	1,669	1,097	649
PS	44.5	378,378	8,505	2,390	53.7
Exp. 2 (1.892 g)					
WH	133.6	528,990	3,959		
MF	62.3	140,560	2,256	4,008	64.3
ML	1.82	3,250	1,783	1,149	630
PS	38.1	308,705	8,094	2,732	71.6

10 mg/kg, subctaneously inject., after 24 h.

り総放射活性が3時間のグループよりも異常に多く見られた。この理由は不明である。しかしながら表1と同様にライソゾーム分画への特異的な濃縮はこの時点でも見られず，やはりほとんどが上清画分に来ることが判明した。分画操作がうまくいったことは表2の酸性マルターゼの比活性が他の分画の10倍近い事実を見ても明らかである。以上の事実により，生体に投与されたE-64-cは確かに骨格筋中にはいり，しかもその可溶性画分に比較的多く存在することが明らかになった。またこの時点では血液中の^{3}Hはほとんど無視出来，しかも骨格筋中の^{3}Hはそのほとんどが E-64-c の形で存在することが明らかになり，分解産物を見ているのではないと考えられた。

次に，これらより生体内の E-64-c の濃度を算出すると，可溶性画分では（表2，Exp. 1 参照）約 23 μg/g wet weight 存在することになるが，理論的にはこれで生体内の可溶性画分に存在する Ca 依存性プロテアーゼ（10 μg/g wet weight）を阻害するのに十分な量である。そこで，in vivo に E-64-c を投与し，筋肉内濃度が最高になった時点で骨格筋をとり出し，外から Ca を筋細胞内に入れてプロテアーゼを活性化させ，その特異的 Z-線消去作用を定量すれば，実際 E-64-c が in vivo でプロテアーゼを抑えるか否かが判定できるわけである。Z線の消失は外液に流出した α-アクチニ

11. E-64-c の骨格筋内分布と in vivo におけるプロテアーゼ阻害作用についての検討

表3

Muscle	Additions	Protein	α-actinin
		mg/ml	arbitrary U
Soleus			
	EGTA	0.112	1.5
	Ca	0.320	9
	Ca (E64c)	0.288	6.5
	Ca (E64c)	0.272	6.5
EDL			
	EGTA	0.292	9
	Ca	0.544	21
	Ca (E64c)	0.708	26.5
	Ca (E64c)	0.628	23.5

25 mg/kg, subctaneously inject.
after 30 min.

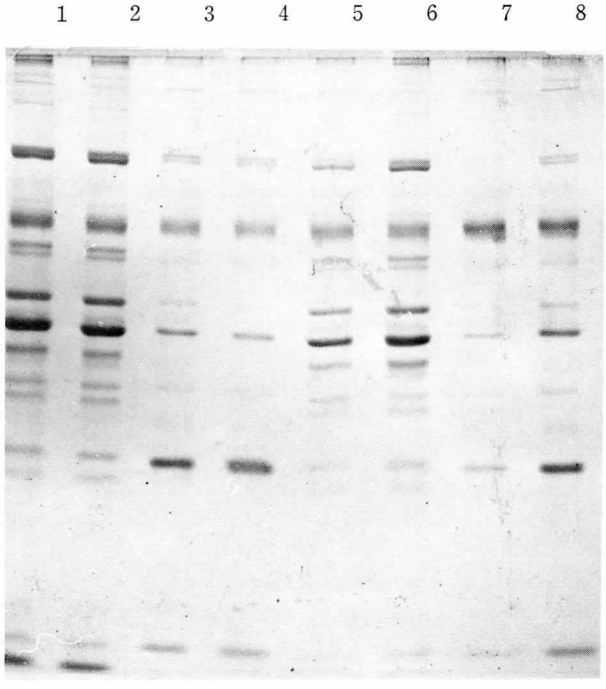


図1

外液に溶出したタンパク質の SDS（13%）ゲル電気泳動図。1-4 は E-64-c (25 mg/kg) 投与群。5-8 はその対照（非投与群）。1, 2, 5, 6 が EDL, 3, 4, 7, 8 が Soleus。反応液には 1 mM $CaCl_2$ を添加し，A23187（25 μg/ml）シクロヘキシイミド（0.5 mM）中で 37°C, 5 h インキュベート後の上清をとったもの。ただし，5 と 7 には 1 mM $CaCl_2$ の代りに 0.1 mM EGTA を加えてある。

ンの量を測定することで定量化が可能である。

図1はインキュベーション5時間後の外液のSDS ゲル電気泳動図である。赤筋であるSoleus でも白筋である EDL でも Ca が α-アクチニンの遊離を促進することは明らかである（図1の No. 5-8), そこで in vivo で E-64-c を投与したラット骨格筋ではどうなるかを見ると（図1の No. 1-4), Soleus でも EDL でも Ca による α-アクチニンの遊離を抑えないことがわかる。これを定量化したのが表3である。Soleus 筋ではある程度 α-アクチニンの遊離が抑えられているかのような印象を受けるが，EDL では全く抑えていない。この実験では使用した E-64-c の量も多く，しかも注射後30分と，生体内分布が最大の点を選んだにもかかわらず in vivo での プロテアーゼ阻害に対しては否定的な答が出たが，理由はいくつか考えられる。第1は，Z 線消失，α-アクチニン遊離に関与するのはチオール以外のプロテアーゼである，という考え方であるがこれは in vivo における E-64-c の阻害実験によって否定された。第2は精製したプロテアーゼに対する E-64-c の効果と，in vivo における効果とは違う，という可能性で，粗抽出液などでは E-64 はプロテアーゼを抑制しにくい[11]という説もあり詳細に調べる必要がある。

本研究において，E-64-c は骨格筋内細胞質可溶画分に存在することが明らかになり，ライソゾーム酵素を阻害しにくい状況にあることが判明した。しかしながら，可溶性画分に存在するZ線遊離酵素（Ca 依存性 プロテアーゼ類）を完璧に抑制することは出来ず，この点について問題があると思われる。

文　献

1) Hanada, K., Tamai, M., Morimoto, S., Adachi, T., Ohmura, S., Sawada, J. and Tanaka, I.: Inhibitory activity of E-64 derivatives on papain, Agr. Biol. Chem., **42**, 537, 1978.

2) Hanada, K., Tamai, M., Morimoto, S., Adachi, T., Oguma, K., Ohmura, S. and Ohzeki, M.: A Specificthiol protease inhibitor, E-64 and its derivatives, Peptide Chemistry, **31**, 1979.

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

4) Sugita, H., Ishiura, S., Suzuki, K. and Imahori, K.: Calcium activated neutral protease and its inhibitors. In vitro effect on infact myofibril, Muscle and Nerve, **3**, 335, 1980.

5) Hashida, S., Towatari, T., Kominami, E. and Katunuma, N.: Inhibitions by E-64 derivatives of rat liver cathepsin B and Cathepsin L in vitro and in vivo, J. Biochem., **88**, 1805, 1980.

6) Barrett, A. J.: Human cathepsins B and H.

7) Katunuma, N. and Noda, T.: Pathogenic expression of cathepsins in dystrophic muscle, Proc. Symp. Mus. Dys., pp. 42, 1980.

8) Ishiura, S. and Sugita, H.: Calcium-activated neutral protease. Its role in muscle cell degradation, Proc. Sym. Mus. Dys., pp. 47, 1980.

9) 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，**13**, 326, 1980.

10) 石浦章一，埜中征哉，杉田秀夫：本報告書

11) 西塚泰美，その他：カルシウム プロテアーゼと蛋白質リン酸化反応による生理機能の調節に関する研究，E-64 班会議昭和54年度報告書，pp. 117.

12. カルシウムによる骨格筋の崩壊に関する研究

石浦章一*

研究協力者 埜中征哉* 杉田秀夫**

はじめに

骨格筋を構成するタンパク質の代謝は，肝臓のタンパク質などに比して遅く，また数多くの因子によって調節されている。非常に精密な過程を経て合成されるタンパク質の調節機構については詳細な検討がなされているが，分解過程についてはその調節機構の存在すら示唆されていない状態である。その困難さはある特定の生体内プロテアーゼが非常に広い特異性を持ち，どのプロテアーゼがどのタンパク質を分解しているかを厳密に推定することが出来ないことに起因する。その点骨格筋は，限られた数のタンパク質によって構成されしかも量が多いという実験上の長所を持つ故，この種の実験には比較的多く用いられてきた。分解系を調節する因子としては，ホルモン，アミノ酸などの報告があるが，最近筋ジストロフィー症の病態とも関連して，カルシウムが分解系に作用しているのではないかと広く考えられている。その最たるものが，カルシウム依存性プロテアーゼの発見である。

動物の各臓器に，カルシウムに依存した新しいプロテアーゼが存在するとの報告は1970年代の初め頃から2，3あったが，ここ数年の間にほぼすべての臓器の可溶性画分に活性が回収されることが判明し，その ubiquitous な存在様式と特異な作用から全く新しい一群のタンパク分解酵素と考えられるに至った。第1の特性は二価陽イオン，特にカルシウムによって活性化されることで，生体内プロテアーゼの中ではこのように特異的な cofactor を持つものは珍しい。第2は活性発現に必要な残基はSH基であり，SH 試薬による活性化や阻害剤との反応性より典型的なチオールプロテアーゼであること。第3は，非常に奇妙な基質特異性を持ち至適 pH のある中性付近でも人工基質はほとんど水解せず，また可溶性酵素も分解しないこと。そして第4は，それぞれの臓器に特異的なインヒビターを持っており通常の状態では作用しないと考えられること，などである[1),2)]。しかしながら現在までのところ骨格筋以外では酵素は精製されておらず全く同一群の酵素であるのか，また非常に類似した酵素（例えばカテプシンBとL）が存在するのかの確証はない。1980年 Mellgren によって発見された低カルシウム依存性プロテアーゼ[3)]もその本体は不明である。我々は1978年，ニワトリ骨格よりカルシウム依存性プロテアーゼ (Calcium-Activated Neutral Protease: CANP) を精製し，それが特異的に筋構成タンパク質を分解するこ

表1 組織中の CPK 量

Muscle	wet weight (g)	CPK act. (U/g)
Soleus	0.106±0.004	611±52
EDL	0.124±0.002	1789±68

n=8. mean ± S. E. M.

* 国立武蔵療養所神経センター疾病研究第1部
** 東京大学医学脳研神経内科

とを発表した。また酵素の大部分は可溶性画分に存在するものの，その一部は骨格筋Z線に局在し[4]，筋の disassembly に関与するらしいとの結論を得た。

しかし，これらの事実から得られた筋崩壊のスキームはすべて推測であり実際に生体内において CANP がZ線に作用し，筋線維の崩壊に関与しているのかどうかさえ明らかではなかった。本研究はこの点を明確にするため，とり出した正常な骨格筋に外からカルシウムを導入しそこで観察される変化がタンパク分解作用の結果であるのか否かを検討したものである。また同時にライソゾーム酵素である種々のカテプシンの筋タンパク質崩壊に対する作用についても考察する。

方　　法

カルシウムイオノフォア A23187（図1）は，Calbiochem 社から購入し DMSO に溶解して使用した。E-64-c は大正製薬より寄贈を受けた。

まず，Wistar 系ラット（250g）から赤筋である Soleus 筋と白筋である Extensor digitorum longus（EDL）筋を腱と共にとり出し，Kameyama らの方法[5]に準じて Krebs-Ringer 溶液中でインキュベートした。この年令のラットでは Soleus 約70%が slow type で残り30%が fast type となっているが，EDL ではほぼ100%が fast type に分化していると考えられる[6]。通常のインキュベーション混液には，タンパク合成を抑えるため 0.5 mM のシクロヘキシイミドを添加した。37°C でインキュベート後，上清に遊離したタンパク質は Lowry 法で定量し，その種類は SDS 電気泳動法にて検索した。外液に遊離した CPK（クレアチンキナーゼ）量は，Boehringer 社のキットで測定した。

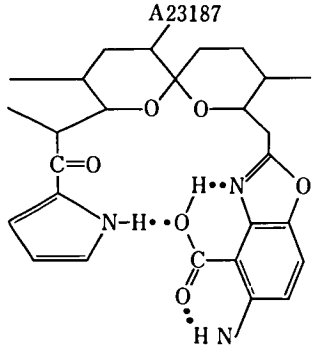


図1　イオノフォア A23187 の構造

骨格筋内の CANP 活性測定法は既報の通りであるが，特に硫安50%の沈殿にて測定した。また精製 CANP と精製カテプシンB（徳島大学医学部，野田隆先生の御厚意による）のタンパク分解活性は，サクシニルカゼインを基質として，pH 7.5（0.1M グリセロリン酸ナトリウム）と pH 5.5（0.1M 酢酸）で行った。

結　　果

(1) A23187 の生体膜に対する影響

イオノフォアとは，生体膜に作用してイオン透過能を高める働きのある抗生物質である。A23187 は図1に見られるように分子末端にカルボキシル基を持つため，カルボキシルイオノフォアに分類され，Mn>Ca>Mg>Sr>Br のイオン選択性を持つ物質であり，これら陽イオンと H^+ との間で電気的に中性な交換反応を行うとされている。しかし，A23187 を骨格筋に作用させると種々の変化が起こることから，単にイオン交換のみならず，生体膜への直接的 toxicity が想定されたので，この点について実験を開始した。膜の破損は骨格筋からの CPK の漏出を指標とした。これは，Duchenne 型筋ジストロフィー症における血清 CPK の特異的上昇と形質膜の破損の関係に対応するものと考えることができるからである。

図 2A は A23187 の反応混液中の濃度と，1時間後に反応混液に流出した CPK 量との関係をプロットしたものである。明らかに，A23187 の濃度と CPK の流出には比例関係があることがわかる。また，EDL と Soleus の違いは2つの可能性が考えられる。1つは，EDL の膜の方が Soleus よりも弱くイオノフォアによって破壊され易い，という可能性，もう1つはこの差は単に EDL と Soleus 中の CPK の量を反映しているにすぎず膜は同様に

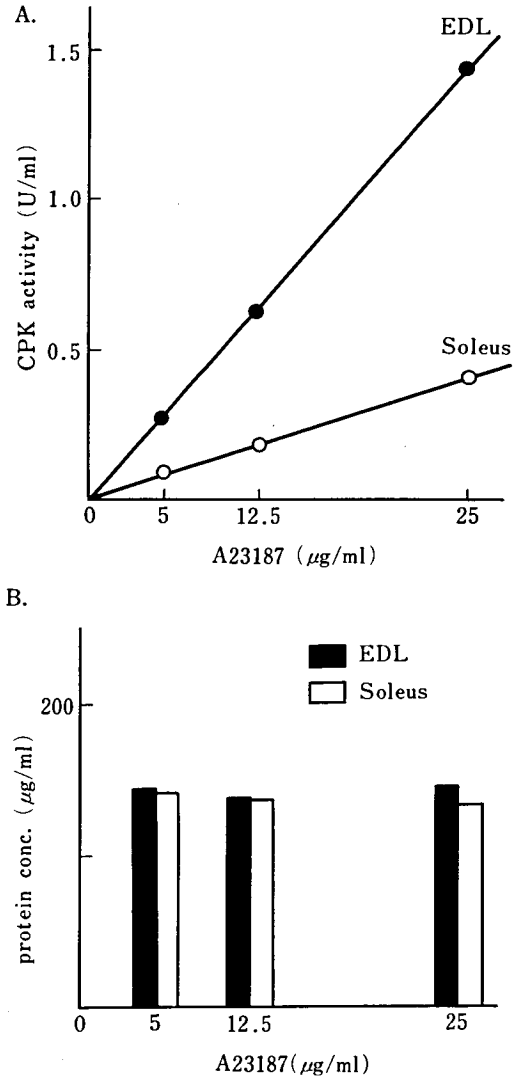


図2 A23187 の生体膜に対する影響
反応溶液 (4 ml) には A23187 (任意), シクロヘキシイミド (0.5 mM) EGTA (0.1 mM) を含む。インキュベーションは 37°C, 1 h。

破壊されているという可能性である。これを明らかにするため組織中の CPK 量を検討し表1に示した。明らかに EDL の方が約3倍多く CPK を含むことがわかり，これは図 2A のデータと対応していることから後者の可能性を示唆している。これに反して溶出総タンパク量は Lowry 法で測定する限り大差はなかった（図 2B)。このことから，この時点で CPK のような分子量の大きなタンパク質よりも，もっと小さなペプチド類の流出の方が大多数を占めていることが想像された。

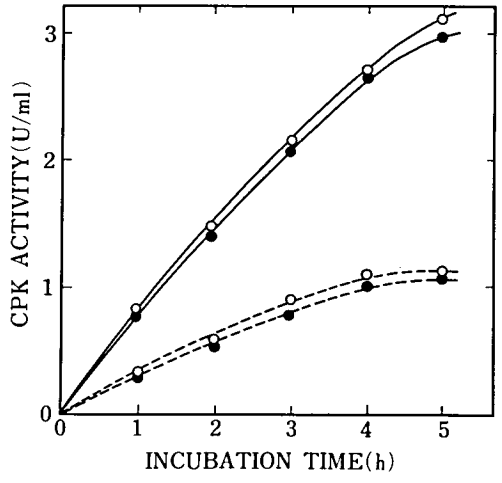


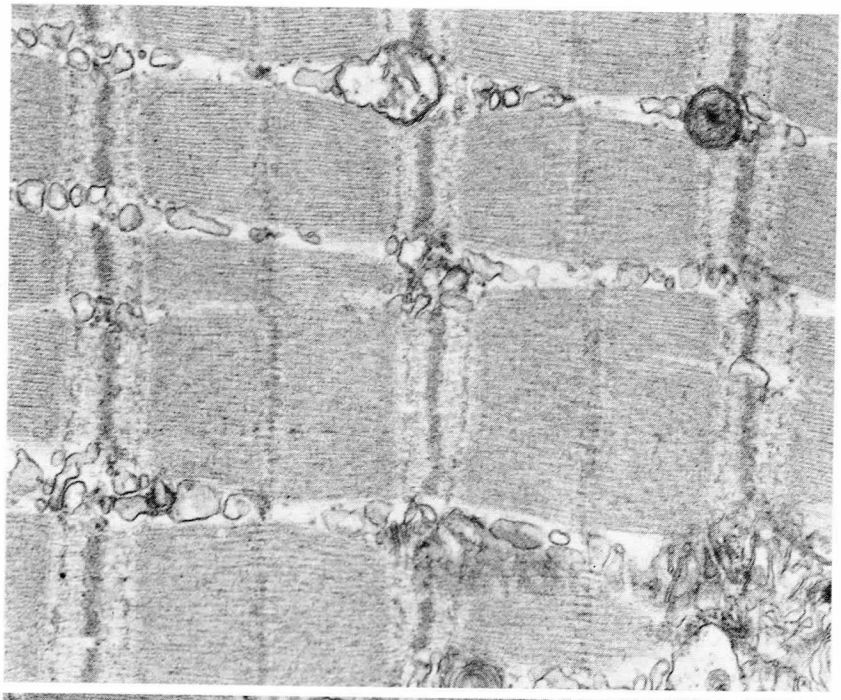
図3 カルシウムによる CPK の遊離
反応混液 (4 ml) には A23187 (25 μg/ml), シクロヘキシイミド (0.5 mM) を添加。○ +Ca (1 mM), ● +EGTA (0.1 mm)。実線は EDL, 破線は Soleus.

以上の実験により，A23187 単独でも生体膜に影響を与え，CPK のようなタンパク分子を外液に放出することが可能な程度の変化を膜に及ぼしていることが判明した。

(2) カルシウムによる骨格筋の崩壊

次にカルシウムによる CPK の遊離を見ると図3に見られるごとく，ほとんど影響を与えないことがわかる。このようにカルシウムイオンは単独では正常な骨格筋からの CPK 遊離を促進させることはなく，A23187 ほどは生体膜に悪影響を及ぼさない。しかしながら，この時，明らかに外液に流出するタンパク質の総量が増加すること（表2参照）が判明した。この差は流出するタンパク質の相違に起因するのではなく，主としてカルシウムによってタンパク質の分解が促進され，その結果としてのアミノ酸遊離の上昇を反映しているものと考えられる。形態的にはZ線の消失が見られるが，その他の構造，例えば，A, I 帯やM線の異常は認められなかった（図4)。図5は，インキュベート後の骨格筋より α-アクチニンを抽出し，その量

A



B

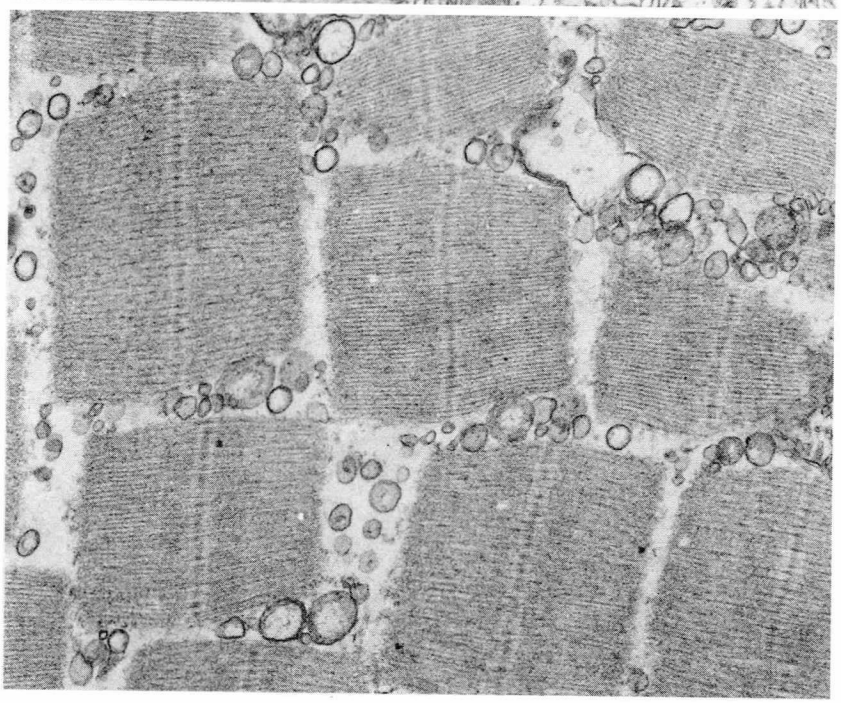


図4　インキュベート後の EDL の電顕像
A: EGTA, B: +Ca

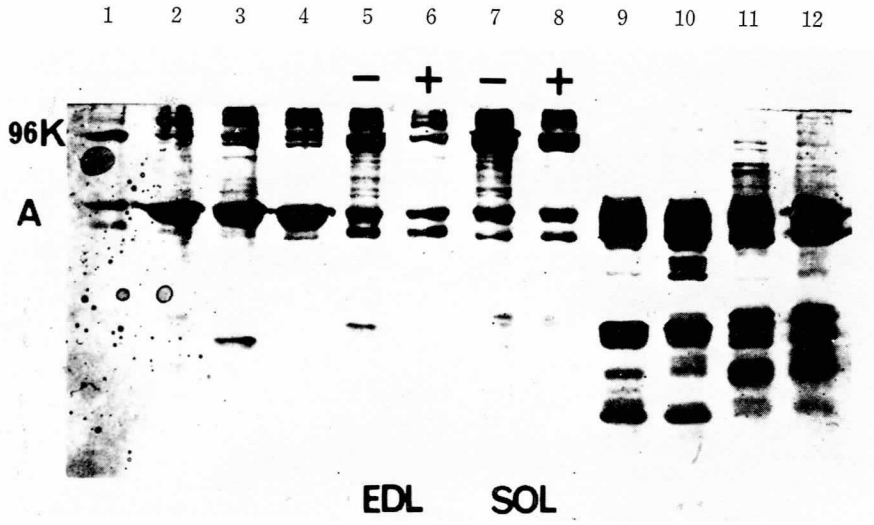


図5 骨格筋低イオン抽出物の SDS ゲル電気泳動図（14%）
No. 5-8 が抽出した α-アクチニン分画。＋，－はインキュベーション時のカルシウムの有無。
No. 6 で α-アクチニンの減少が No. 5 に比べて明白である。

表2 種々の因子によるタンパク質の遊離に対する影響

Muscle	Additions	Protein release (% of wet wt.)	
Soleus	EGTA	1.34±0.23	(n=6)
	Ca	3.29±0.10	(n=3)
	Ca, E-64-c	1.84±0.27	(n=3)
EDL	EGTA	1.28±0.27	(n=6)
	Ca	2.66±0.10	(n=3)
	Ca, E-64-c	2.17±0.32	(n=3)

(37°C, 5h) mean ± S. E. M.

を比較したものである。カルシウム処理筋（特に EDL 筋）において96,000ダルトンの α-アクチニンの減少が見られる。この α-アクチニンの減少は図4で見られた Z線の消失に対応する。以上の事実より，Z線の特異的消失は A23187 の作用によるのではなく，カルシウムが骨格筋細胞内に流入することによって引き起こされると結論づけることができる。しかもこのカルシウムの作用はZ線に非常に特異的であり，このZ線消失は細胞内にカルシウムが流入したことを表す良い指標の1つになると考えられる。

そこで問題は，このカルシウムによるZ線の消失は既知の CANP の活性化によって直接的に起こるのか，またはカルシウムが細胞内器官を破壊しそこから新たなプロテアーゼが放出された結果であるのか，更にこれは単なる細胞内の環境の変化（ATP 量，酸化還元電位の変化，イオン組成など）によるものなのかが問題になる。まず，第1，第2の可能性，つまりタンパク分解作用を介するかどうかについて検討を加えた。その結果，インキュベーション混液にチオールプロテアーゼインヒビターを加えた時にのみZ線遊離阻害が見られた。効果があったのは E-64-c，ロイペプチンであった。表2では，まず外液に流出するタンパク量が E-64-c によってある程度抑えられていることがわかる。そこでどのタンパク質の遊離が E-64-c によって抑制されるかを見たのが図6である。E-64-c を添加した方は Soleus でも EDL でも96,000ダルトン（α-アクチニン）のみが外液流出を妨げられていることがわかる。形態的には図7に示すように E-64-c 処理筋（図7B）の方は比較的筋線維が一様なのに比して，カルシウム処理筋（図7A）では筋線維の過収縮による分断，並びにフラグメント化（図中央上部）が見られ

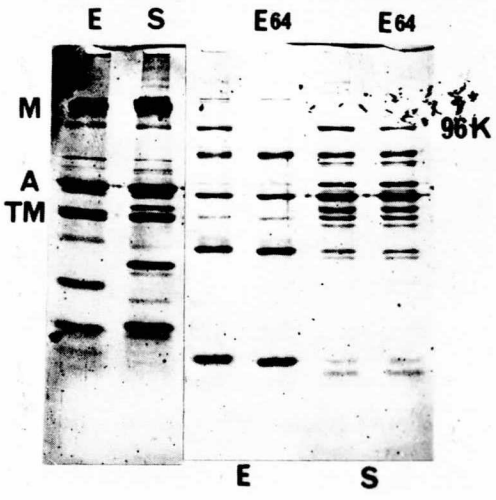


図6　外液に流出したタンパク質の SDS 電気泳動図

左の2つは E (EDL), S (Soleus) の筋線維を分子量マーカとしたもの。右4つが遊離したタンパク質。E-64-c 添加により 96K (α-アクチニン) の遊離が抑制されているのがわかる。

表3　E-64-c 処理による筋 CANP 活性の変化

Muscle	Conditions	CANP Activity	
		U/g wet wt.	% Act.
Soleus	none (n=10)	4.67±0.33	100
	E-64-c (n=5)	1.59±0.31	34
EDL	none (n=10)	2.22±0.15	100
	E-64-c (n=5)	1.68±0.67	76

mean ± S. E. M.

る。以上の事実を総合すると，カルシウムによるZ線の消失は確かにチオールプロテアーゼを介するものであり，E-64-c はカルシウムによる骨格筋のフラグメント化を強く抑制することが明らかである。

次に，E-64-c 処理筋と未処理筋中の CANP 活性を測定した（表3）。Soleus, EDL 共に E-64-C 処理で CANP の活性が大幅に低下しているのがわかる。

最後に，カテプシンがライソゾームより可溶性分画に遊離しZ線を消失させる可能性もあるため，我々が発見したもう1つのZ線遊離酵素であるカテプシンBと CANP との作用を比較した。図8は E-64-c と両プロテアーゼとの相互作用を示したものである。この結果よりカテプシンBの方が10倍ほど E-64-c に対する感受性が高いので，カテプシンBが細胞可溶画分に遊離してくるならば E-64-c によって十分に阻害される状況にあるといえる。

考　　察

本研究により，カルシウムの骨格筋崩壊に及ぼす作用は主としてタンパク分解作用を促進させてZ線を消失させることであることが明らかになった。しかしながらこのZ線に対する作用は，直接 CANP を活性化させることなのであるか，または間接的な細胞内小器官の破壊による生体内 ATP 濃度や酸化還元状態の変化によって CANP 以外のチオールプロテアーゼが活性化されたための結果であるのかは依然として

表4　Duchenne 型筋ジストロフィー症における筋崩壊過程と Ca-イオノフォアによる崩壊との比較　—CANPかカテプシンか—

Muscle deg. in DMD	Ionophore	CANP	Cathepsins
In cytosol	cytosol	cytosol	lysosome
?	thiol.	thiol.	thiol.
pH 7.4	neutral	neutral	acidic
Ca-positive fibers	Ca-sens.	Ca-sens.	Ca-insens.
Z-line loss	Z-line loss	Z-line loss	Z-line loss (B)
M-line intact	M-line intact	M-line intact	M-line loss (B)
A, I-band intact	A, I-band intact	A, I-band intact	A-band loose

(B) はカテプシン B の作用。

A

B

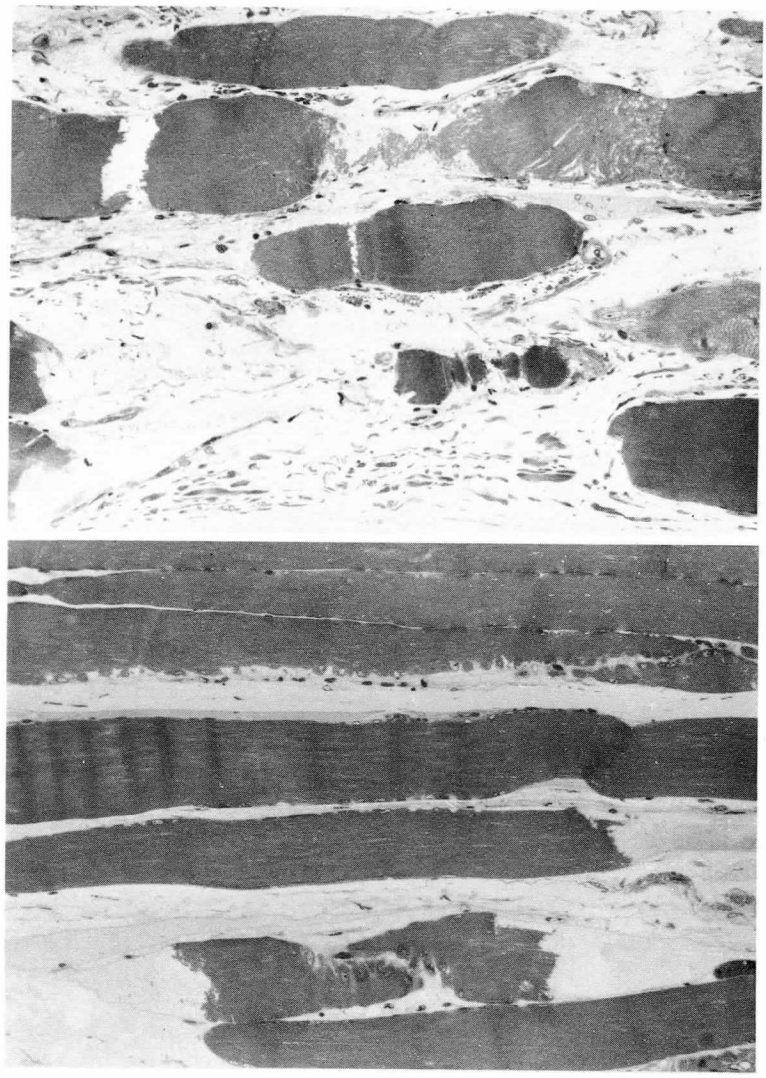


図7 エポンに固定した切片をトルイジンブール染色したもの
A：+Ca　　B：+Ca, E-64-c

不明である。表4に CANP とカテプシンの作用の比較と，イオノフォアによる筋崩壊のパターンをまとめた。同時に DMD における筋崩壊の特徴も記した。カルシウムイオノフォアによる Z 線の消失はこの表にて比較する限りカテプシン B, H, L よりも CANP によるものと考えられる。しかし，カテプシンが筋崩壊に全く関与しないというのではなく，あくまでもZ線の消失という筋崩壊の第1段階では CANP の関与が示唆される，ということである。

Z線の特異的消失の機構についてはよくわかっていない。しかしながら CANP の筋構造タンパク質への作用[7]（表5）を見ると，ある程度の推測が可能である。CANP は α-アクチニンと Z-タンパク質という Z 線の骨格を形作るタンパク質はほとんど分解せず，フィラミン，デスミン，Eu-アクチニンなどのZ線を構成するマイナータンパク質をよく分解することから，これらのタンパク質が CANP によって限定分解されて α-アクチニンが遊離し，筋原線

表5　種々の筋構成タンパク質に対する CANP の効果（ニワトリ骨格筋）

筋タンパク質		分子量	局在	分解様式	著者
ミオシン	H鎖	200,000	A帯	低分子量（7～18万）に限定分解	Sugita (1980)
	L鎖 1	25,000	A帯	一部23,000に限定分解	Ishiura (1980)
	2	18,000	A帯	分解せず	Dayton (1975)
	3	16,000	A帯	分解せず	Dayton (1975)
アクチン		42,000	I帯	分解せず	Dayton (1975)
トロポミオシン	α	34,000	I帯	18,500 と 16,000 に分割	Ishiura (1979)
トロポニン	T	40,000	I帯	14,000 と低分子量に分解	Ishiura (1979)
	I	20,000	I帯	低分子量に分解	Ishiura (1979)
	C	17,000	I帯	分解せず	Ishiura (1979)
M-タンパク質		165,000	M線	分解せず	Ishiura (1980)
C-タンパク質		135,000	A帯	低分子量に分解	Dayton (1975)
α-アクチニン		96,000	Z線	一部 78,000 に分解	Ishiura (1978)
フィラミン		250,000	Z線	240,000 と 9,500 に限定分解	Davis (1978)
Eu-アクチニン		42,000	Z線	低分子量に分解	Kuroda (1981)
デスミン		55,000	Z線	低分子量に分解	Ishiura (1980)
Z-タンパク質		54,000	Z線	分解せず	Ishiura (1980)
コネクチン		1,000,000	A，I帯	分解される	Maruyama (1981)
バンド3		600,000	N線	分解される	Maruyama (1981)
チューブリン		52,000		低分子量に分解	Ishiura (1978)
カルモデュリン		18,000		分解せず	Ishiura (1979)

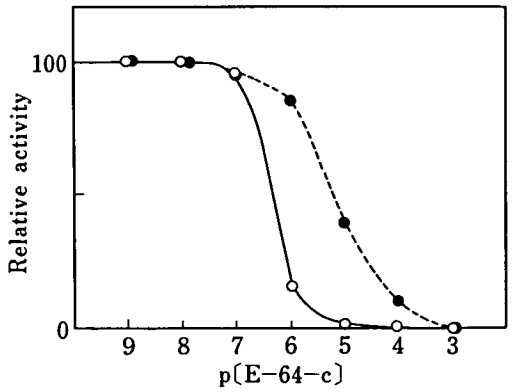


図8　E-64-c によるプロテアーゼ阻害。

横軸は反応混液中の E-64-c の濃度。縦軸はサクシニルカゼイン水解活性。反応は 30°C, 30分。

○カテプシンB，● CANP。両酵素とも単一標品である。

維のフラグメント化が誘発されると考えられる。

本研究によって，Z線の遊離が E-64-c によって抑制されることは，DMD における筋の異常な崩壊を E-64-c が in vivo にて抑える可能性があるものとして，今後の研究の進展が期待される[8]。

参考文献

1) Ishiura, S., Murofushi, H., Suzuki, K. and Imahori, K.: Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle, I. J. Biochem., 84, 225, 1978.

2) Ishiura, S., Sugita, H., Suzuki, K. and Imahori, K.: Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle, II. J. Biochenm., 86, 579, 1979.

3) Mellgren, R. L.: Canine cardiac calcium-dependent proteases, FEBS Lett., 109, 129, 1980.

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

5) Kameyama, T. and Etlinger, J. D.: Calcium-dependent regulation of protein synthesis and degradation in muscle, Nature, 279, 344, 1979.

6) Ishiura, S., Nonaka, I., Sugita, H. and Mikawa, T.: Effect of the denervation of neonatal rat sciatic nerve on the differentiation of myosin in a single muscle fiber, Exp. Neurol., 1981, in press.

7) Ishiura, S., Nonaka, I. and Sugita, H.: Calcium-activated neutral protease. Its degradative role in muscle cells, Proc. Int. Cengr. Mus. Dys. Univ. Tokyo Press, 1981, in press.

8) Ishiura, S., Nonaka, I. and Sugita, H.: Suppression of calcium-induced removal of Z-line by a thiol-protease inhibitor E-64-c, J. Biochem., **90**, 283, 1981.

13. 培養筋細胞に対するE-64の作用

～筋管細胞のタンパク分解速度に及ぼすE-64-cの影響～

小 沢 鉄二郎*

研究協力者 伊 井 一 夫* 木 村 一 郎*
萩 原 康 子* 長谷川 孝 幸*

研究目的

筋ジストロフィ症では，タンパク代謝回転速度の亢進が一般的に見られる。筋ジストロフィ症の動物からの培養筋細胞で同じようなタンパク代謝回転速度の亢進があるかどうか，また培養筋細胞でのタンパク代謝回転が体内でのタンパク代謝回転をどこまで忠実に反映しているか議論の余地のあるところであるが，培養筋細胞は薬物がタンパク代謝回転に及ぼす影響をみる系としてはすぐれていると思われる。

E-64-cはタンパク分解酵素阻害剤として開発された薬物であり，体内でもタンパク分解を抑えることにより，筋ジストロフィ症の治療に役立つ可能性があるかもしれない。この可能性を検討する一助として，E-64-cの培養筋細胞の全タンパク分解速度に及ぼす影響を調べた。

材料及び方法

実験系をできるだけ単純化するために，繊維芽細胞や筋原細胞の混入の少ない筋管細胞を次のようにして得て，用いた。

ウズラ10日胚の胸筋からKonigsberg[1]の方法で，筋原細胞（secondary culture）を得，コラーゲン処理した径60 mmのFalcon bishに，1.6×10^4の細胞をまき，EagleのMimimum Essential Medium（MEM）80%，馬血清15%，ニワトリ胚抽出物5%の混合液3 mlとともに，CO_2インキュベーター（4% CO_2, 36.5°C）中で培養した。約90時間後，筋管細胞が一面に形成され，しかもあまり密にはなっていないころ，繊維芽細胞を除くために30 μlの100 μg/mlのcytosine arabinoside（Ara-C）を加えてさらに培養を続けた。Ara-Cを加えて30時間後に20 μl（1 μCi）のL-[U-^{14}C] tyrosine（Amersham, 50 μCi/ml 2%エタノール水溶液；比活性509 mCi/m mole）を加えて培養を続けてタンパクを標識した。Tyrosineは筋肉では合成も分解もされないし，細胞内プールと外液との間で速く平衡化されると報告されている[2]のでこのアミノ酸を選んだ。^{14}C-tyrosineを加えてから24時間後に培養液をのぞき，Ara-C処理によって死に至った単核細胞とタンパクにとりこまれなかった^{14}C-tyrosineをのぞくために，5 mlの1 mM tyrosineを含んだMEMで三回洗い，3 mlのMEM 85%と馬血清15%の混合液を加えて培養を続けた。培養液を変えて2時間後，さまざまな濃度のE-64-c（0-1.53 mg/ml）を含む1 mM $NaHCO_3$—0.9% NaCl水溶液を50 μl加えてさらに22時間または48時間培養後，培養液を除き，5 mlのSaline Gで二度洗い，1 mlの2% SDS水溶液を加えて筋管細胞を集め−80°Cで保存した。

タンパク分解の結果，培養液中に遊離してくる放射能は，培養液0.6 mlに60%過塩素酸を60 μl加え0°Cで1時間以上放置し，遠心で沈殿をのぞき，その上清0.3 mlに10 mlの

* 国立武蔵療養所神経センター機能研究部

ノニオンカクテル(Nonion : Toluene 系 Cocktail＝3 : 7) を加えて放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

タンパクに残存している放射能は，筋管細胞の 2％ SDS 溶解物 0.1 ml に 1 ml の 10％ TCA を加えて，0°C で30分以上放置し，沈殿をニトロセルロースフィルター (0.45 μ) に集め，5％ TCA で洗って遊離の放射能を除いたのち，フィルターを 10 ml のノニオンカクテルに溶かして放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。計数効率は約 80％であり，バックグラウンドとして 5％ TCA で洗った filter をノニオンカクテルに溶かしたものの計数を用いた。

DNA 定量は，筋管細胞の 2％ SDS 溶解物 0.6 ml に −20°C に冷やしたエタノールを 2 倍容加え，−20°C で一晩置き，沈殿を遠心で集め，沈殿に 2 ml のエタノールを加えて 60°C で20分間加温したのち遠心し，沈殿をもう一度 2 ml のエタノールで室温で洗って乾燥させたのち，Hinegardner の方法[3]に従って行なった。標準としては仔牛胸腺 DNA (Sigma) を用いた。

結　　果

表 1 (A)は，^{14}C-tyrosine を洗いさり，新しい培養液に変えてから，2 時間後と24時間後の培養液中の酸可溶性の放射能（タンパク分解によって生じた tyrosine によると考えられる）を示す。2 時間後にすでに存在する PCA-soluble な放射能は主に速い代謝回転のタンパクの分解によると考えられる。筋タンパクは遅い代謝回転をもつと考えられる[4]ので，我々は遅い代謝回転のタンパク分解に対する E-64-c の効果を主にみるために，洗ったのち 2 時間後に培養皿を E-64-c (1 μg/ml) を入れたものとそのかわりに溶媒のみを加えた対照群に分け，さらに22時間培養を続けたのち，培養液中の PCA-soluble な放射能と細胞のタンパクに残存している放射能とを測定した。後者の場合は，培養皿ごとの筋管細胞の量の違いを補正するために DNA 量を測定して μg DNA あたりの放射能を計算し，表にあらわしている。表 1 (A)から E-64-c が PCA-soluble な放射能の増加を若干抑えていること，また(B)から細胞のタンパク中の放射能の減少を抑えていることがわかる。E-64-c を加えたものと加えなかったものとの差の t 値は，それぞれ2.81，4.40でそれは有意であった（それぞれ $P<0.05$，$P<0.02$）。(B)から全細胞タンパクの平均の半減期を求めると，+E-64-c では52.8時間，対照では48時間で，1 μg/ml の E-64-c の存在下で約10％半減期がのびると計算された。しかし，これらの差は大変小さくてこれらの差が有意にでたのは，この実験では標準誤差が小さかったことによっており，この実験だけから結論をいうのは早計であると考え，さらに同様な実験を繰り返した。

表 2 は，いろいろな濃度の E-64-c を加えて，48時間培養後の筋管細胞のタンパクに残っている放射能を測定した二つの実験の実測値（μg DNA あたりの cpm に換算している）をすべて示している。培養時間を長くしたのは半減期に近い時間のほうが薬効による差がはっきりすると考えたからである。実験 I で，E-64-c を入れる前（培養液を変えて 2 時間後）のタンパクに残っていた放射能は 15,384±339 (cpm per μg of DNA, n＝4) であり，その

表 1　ウズラ筋管細胞の蛋白分解に及ぼす E-64-c の影響
(E-64-c 1 μg/ml，1 日間インキュベーション)

(A)　培養液中の PCA 可溶性計数 (cpm/皿)

		Mean	SD	n	
2 hr		10,005	± 474	(2)	
24 hr	+E	43,550	± 1,050	(3)	t＝2.81
	−E	45,490	± 570	(3)	($p<0.05$)

(B)　細胞総蛋白中の残留計数 (cpm/μg DNA)

		Mean (％)	SD	n	
2 hr		10,967(100)	± 41	(2)	
24 hr	+E	8,218(74.9)	± 61	(3)	t＝4.40
	−E	7,999(72.9)	± 60	(3)	($p<0.02$)

表2 ウズラ筋管細胞の蛋白分解に及ぼす E-64-c の影響（2日間インキュベーション）

Conc. of E-64c (μg/ml)	0	0.2	1	5	25
Experiment I	9,575	8,975	9,348	9,562	9,811
	9,581	9,156	9,392	9,600	9,069
	8,545		8,917	8,828	9,684
	8,528		9,547	9,386	9,411
Experiment II	8,123	9,314	9,132	8,943	9,568
	8,943	8,948	9,904	8,883	9,278
	9,049	8,903	8,788	9,033	9,539
Mean of all values	8,906	9,059	9,290	9,176	9,480
SD	±549	±172	±381	±330	±251

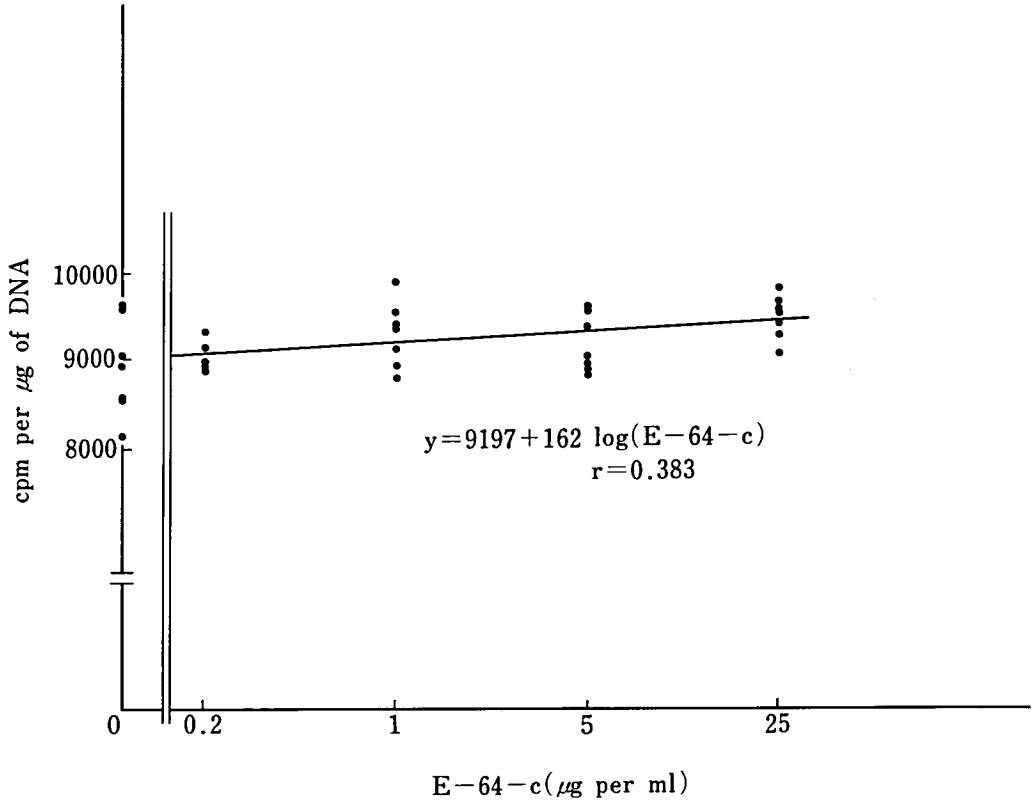


図1 ウズラ筋管細胞の蛋白分解に及ぼす E-64-c の影響

48時間後にはタンパクに残っている放射能はその60%まで減っている。E-64-c の濃度をあげたもののほうが，高い放射能を示すという傾向が実験Ⅰでも Ⅱでも見られるが，各 E-64-c 実験ごとに統計処理したものでは，どの E-64-c 濃度でも対照と比べて有意な差は認められなかった。実験Ⅰ，Ⅱの値を比べると，各 E-64-c 濃度における実験値の平均，また全実験値の分散に有意な差がないので，実験Ⅰ，Ⅱの値を総合して，一元配置分散分析を行なった。Fcal =2.39 で，有意水準 F^{4}_{28} (0.05)=2.71 には達しなかった。

さらに，表2の値を E-64-c の濃度を対数目盛にとり，プロットしたのが図1である。E-

64-c 濃度が 0.2—25 μg/ml の間でタンパク中に残存した放射能（cpm per μg DNA, y）を，log〔E-64-c〕に対して一次対応させうると考えて，回帰直線式と相関係数を求めると，y＝9197＋162 log〔E-64-c〕, r＝0.383 という値が求まるが，有意水準0.05における相関係数（自由度24）の値 0.388 には達しなかった。

考察及び結論

これまでに得られた実験結果からは，E-64-c がウズラの筋管細胞のタンパク分解を抑制すると断定することはできない。どの実験でも E-64-c を加えたもののほうが，タンパクに残存する放射能が高いことが観察された。しかし，そのタンパク分解抑制の度合は，25 μg/ml の濃度でも，タンパクに残存する放射能でみて対照の約7％にすぎず対照のタンパク分解の半減期を約10％のばすにすぎないため，誤差がきわめて小さい実験をするか，実験例数を多くするかしなければ有意な差は認められない。培養筋管細胞では，自発的収縮がおこり，細胞がはがれやすくなる。このはがれを少なくするために，コラーゲン処理したシャーレを用い，細胞が overgrowth にならないような条件（うえつけた細胞数，Ara C を加える時期を加減）を選んだ。それでもある程度の筋管細胞のはがれは避けられず，そのはがれもどのシャーレでも同じ程度におこると仮定することはできなかった。それゆえ，何らかの標準化が必要であり，DNA 量を基準にした。それは核は筋管細胞に分布しており，筋管細胞がはがれるならばその量に応じた核数が失なわれ，DNA 量はそれに応じて減ずると考えたからである。実際，多くのシャーレを用いた実験の場合，シャーレによって30％近くも DNA 量が異なることがあった。このシャーレ毎の筋管細胞の量の違いは DNA 定量による補正をしない場合，大きな実験誤差となり，タンパク分解速度の小さな抑制は有意なものとしては観察できなくなる。実際タンパクに残存する放射能を DNA あたりに標準化することにより SD は平均値の6％以下に抑えることができ，比較的小さい変化も有意な差として認めることができるはずである。しかし例数を比較的多くとった表2の結果では，有意な差を認め得なかった。したがって，E-64-c によって培養筋管細胞のタンパク分解が抑制されるかどうかをはっきりさせるためには，さらに誤差の少ない実験系をくむ必要があるとともに，E-64-c が培養筋管細胞のタンパク分解酵素を阻害しているかどうか，またどのようなタンパクの分解を抑制するかという疑問に答える必要があると思われる。

文　献

1）Konigsberg, I. R.: Skeletal myoblasts in culture, *Methods in Enzymology*, **Vol. LVIII**, 511-527, 1979.

2）Fulks, R. M., Li, J. B. and Goldberg, A. L.: Effects of insulin, glucose and amino acids on protein turnover in rat diaphragm, J. Biol. Chem., **250**, 290-298, 1975.

3）Hinegardner, R. H.: An improved fluorometric assay for DNA, Anal. Biochem., **39**, 197-201, 1971.

4）Millward, D. J.: Protein degradation in muscle and liver, in Comprehensive Biochemistry **Vol. 19B** part 1 Protein metabolism (ed. Florkin, M.) Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam, pp. 153-232, 1980.

14. N-〔N-(L-trans-3-carboxirane-2-carbonyl)-L-leucyl〕-3-methyl-butylamine (E-64-c) の筋蛋白質代謝に及ぼす影響

江 橋 節 郎*

研究協力者 小 浜 一 弘* 白 尾 智 明* 三 谷 昌 平*

研究目的

低濃度 (10^{-5}～10^{-6} g/ml) の蛋白質分解酵素阻害剤 E-64-c を生筋に細胞膜を介して投与した場合の効果を，蛋白質代謝回転を指標に検討した。

実験結果と考察

1) E-54-c の筋細胞へのとりこみ

成熟雄ラットのひらめ筋を腱をつけたまま両足より遊離した。一方を 12.6 μCi/ml の ^{3}H-E-64-c (3.4×10^{-5} g/ml)，他方を 12.6 μCi/ml の ^{3}H-イヌリンを含むリンゲル液中にて95%酸素—5%炭酸ガスを通気しながら 38°C で2時間振とうし，筋重量当りにとりこまれるアイソトープ量を比較した (図1)。ひらめ筋に取り込まれる E-64-c の放射能はイヌリンの5～10倍になり，筋湿重量当り 2.3 μg/g の E-64-c が取り込まれる計算になった。

2) 総蛋白質分解速度に及ぼす影響

両足より遊離したひらめ筋の一方は，0.5 mM シクロヘキシミドを含むリンゲル液 (KRC) 中に，他方は，5×10^{-6} g/ml の E-64-c 及び 0.5 mM シクロヘキシミドを含むリンゲル液 (KREC) 中に，95%酸素—5%炭酸ガスを通気しながら 38°C で振とう保温した (2時間)。リンゲル液中にもれ出るチロシン量は筋総蛋白質分解速度をあらわす[1]。

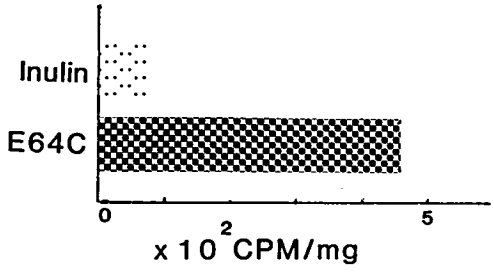


図1 生筋に対する E64C の結合

成熟雄ラットの両足のひらめ筋を腱をつけたままで取り出し，重量を測定した。片方は 12.6 μCi/ml の ^{3}H イヌリンを含むリンゲル液中に，他方は 12.6 μCi/ml の ^{3}H E-64-C (3.4×10^{-5} g/ml) を含むリンゲル液中に95%酸素—5%炭酸ガスを通気しながら38°C で2時間振とうした。筋を 0.2 N NaOH を含む 0.3 M KCl 中にて破壊しその放射能を測定した。

Solvent Space は ^{14}C-イヌリンを用いて測定した。グラフは Solvent Space 中の ^{3}H 放射能をさし引いた筋全体の総放射能を示す。

なお，データーの再現性の問題については表1を参照されたい。

E-64-c 存在下 (Tyr EC) では 196.2±74.8 n moles/mg 湿重量 (m±S.D. n=13)，そして E-64-c 非存在下 (Tyr C) では 235.8±91.5 n moles/mg 湿重量 (m±SD, n=13) のチロシンが遊離された (表2)。遊離されたチロシン量は有意 ($P<0.05$) に低下し，E-64-c は筋蛋白質総分解を抑制すると結論される。なお，E-64-c の効果は 5×10^{-8} g/ml と

* 東京大学医学部薬理学教室

表1　遊離されたチロシン量の再現性の検討

		Right	Left
Exp 1	Animal #1	107	100
	#2	113	125
Exp 2	Animal #1	160	161
	#2	161	167

(n mol Tyr/mg wet weight)

図1の説明に示される様に両足のひらめ筋を別々のフラスコ中にて 0.5 mM シクロヘキシミドを含むリンゲル液中で振とうした。Exp. 1 と2は別々の日におこなった実験で，RとLはそれぞれ1個体のラットの右及び左のひらめ筋よりのデーター（n mol/mg 湿変量）を示す。

同一実験内ではRとLの値がよく一致することに注意されたい。

表2　チロシン遊離により測定した筋蛋白質総量の分解速度に及ぼす E-64-C (5×10^{-6} g/ml) の影響。

No. of Experiment	Tyr C	Tyr EC
1	252	103
2	388	292
3	195	199
4	203	180
5	188	184
6	447	362
7	230	214
8	221	246
9	283	117
10	209	228
11	168	166
12	112	103
13	170	156
mean	235.8 ± 91.5	196.2 ± 74.8

表はすべての実験データーを集計したもので，筋単位重量（mg）当り蛋白合成阻害剤を含むリンゲル液中（KRC）に放出されたチロシンの総量（n moles）を示す。右表中 Tyr C 及び Tyr EC は，それぞれ E-64-C を含まないもの及びそれを 5×10^{-6} g/ml 含む KRC 中に放出されたチロシン量を示す。たて列の数は実験回数を示す。対応する Tyr C と Tyr EC の差はF検定上5％水準で有意な薬効が認められた。

いう低濃度においても認められた。

表2より，Tyr C が 250 n moles/mg 湿重量以上の実験例をぬき出すと（図2），それは，342.5±90.8（m±SD, n=4）であった。対応する Tyr E は 218.5±128.6（m±SD, n=4）となり，蛋白質分解は E-64-c によりコントロ

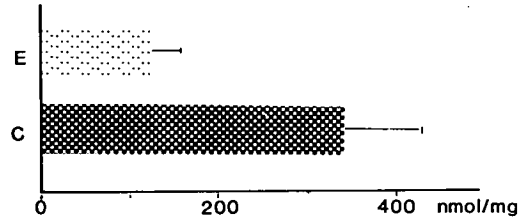


図2　蛋白質分解の促進している生筋に対する E-64-C の作用

表2より Tyr C が 250 以上のものをぬき出し（4例），対応する Tyr EC の値と共に平均したもので，CとEはそれぞれ前者と後者に対応する。CとEの間には高度（P<0.005）の有意差があった。棒は遊離されたチロシン総量（n mol/mg 湿変量），線は標準偏差を示す。

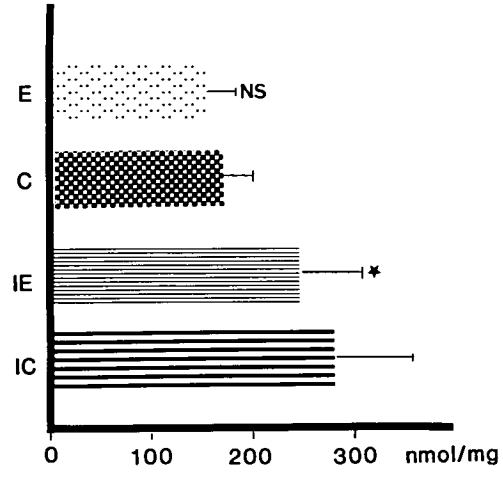


図3　イオノフォア A23187 の存在下における E-64-C の作用

10^{-4} g/ml の A23187 非存在下（E, C）及び存在下（IE, IC）のシクロヘキシミドを含むリンゲル液（KRC）へのチロシン遊離総量を棒にて示す。線は標準偏差を示す。E 及び IE は 5×10^{-6} gml の E-64-C 存在下の KRC を用い，C 及び IC は E-64-C 非存在下の KRC を用いたことを意味する。4例においてEとCの間には有意義は認められなかったが，IE と IC の間には5％水準で有意差が認められた。

他は表2の説明に同じ。

ールの63.8%にまで抑制された。E-64-c の蛋白質分解抑制は Tyr C の値の高い実験例において著明と考えられる。

図3はイオノフォア A23187 存在下と非存在下の間で E-64-c の効果を比較したものである。イオノフォア非存在下では全体のチロシン遊離量が少なく (Tyr C=175.5±30.2, Tyr EC=172.8±29.2, 2例共に m±SD n=4) 有意な E-64-c の効果がみられなかった。イオノフォア存在下では, Tyr C=275.8±77.2 (m=SD, n=4) 及び, Tyr EC=242.3±74.0 (m=4) となった。E-64-c の有無にかかわらずチロシン遊離量が多くなった。これは, 亀山と Etlinger の結果(2)を確認するものである。次に, イオノフォア存在下では, チロシン遊離量が有意に ($P<0.05$) に低下していた。これらのデーターは, イオノフォアにより筋細胞の蛋白質分解速度が促進され, 図2に示された場合と同様に, E-64-c の効果が発現され易くなったと考えられる。

次にサポニンを用い筋に穴をあけることにより直接 Ca イオン濃度を変化させ E-64-c の効果を検討した (表3)。KRC 及び KREC (いずれも 2.5 mM Ca イオンを含む)においては E-64-c はチロシン遊離を抑制するが, KRC 及び KREC の Ca イオンを 1 mM GEDTA におきかえた場合 E-64-c は無効であった。この事実は, イオノフォア存在下の E-64-c の効果と共に E-64-c の効果が Ca イオンを介している

表3 サポニン処理筋に対する Ca イオンの E-64-c の作用に及ぼす影響。

	Tyr C	Tyr EC
Ca	431	348
G	229	224

Ca : ひらめ筋を 10^{-5} g/ml のサポニンを含む KRC 又は KREC 中にて振とうした時に遊離されるチロシン総量を示す。

G : ひらめ筋を 10^{-5} g/ml のサポニンを含み Ca イオンの代りに 1 mM GEDTA を加えた KRC 又は KREC 中にて振とうした時に遊離されるチロシン総量を示す。

他は表2の説明に同じ。

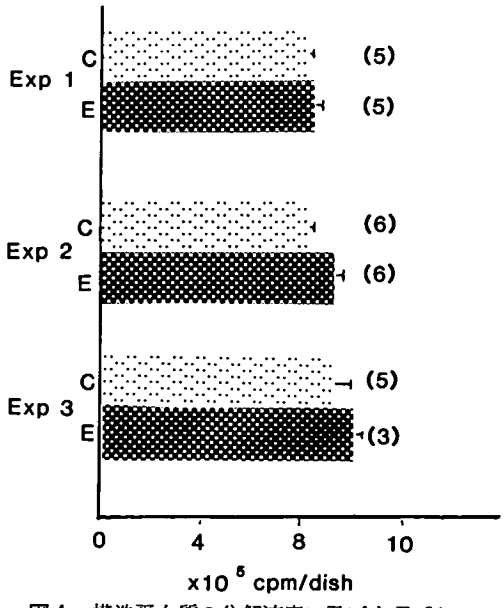


図4 構造蛋白質の分解速度に及ぼす E-64-c (1×10^{-6} g/ml) の影響。

組織培養された筋構造蛋白質に ^{3}H ロイシンをパルスした。チェース時に 1×10^{-6} g/ml の E-64-c の不存在下 (C) と存在下 (E) の2群に分けた。棒は行ったすべての実験データーを示し, 構造蛋白質全体中に残存する放射能を示す。線は標準偏差を示す。くり返しのある2元配置でかつデーターに欠損のある要因分析をブロック, デザインを用いて行なった(6)。計算されたF値 (F cal) は, 8.65で, F検定上1%水準で有意な薬効が認められた。かっこ内の数字は例数を示す。

ことを強く示唆する。Ca イオン濃度依在性について詳細に検討することが今後に残されている。

3) 筋構造蛋白に及ぼす影響

ニワトリ胚胸筋より筋芽細胞を遊離し, 同一細胞数を数多くの培養皿に播種した(3)。培養皿上筋細胞を十分に培養させたのち (約3日後), ^{3}H ラベルのロイシンを筋細胞にとり込ませた。培養皿を二群に等分し, 一方は, アイソトープを含まない培養液にて, 他方はアイソトープを含まない E-64-c を 5×10^{-6} g/ml 含む培養液にて, さらに2日間培養を継続した。培養皿ごとに筋細胞を収穫し 1 mM ジイソプロピール・フルオロフォスフェイト (DFP) を含む 0.1 M KCl 中にて細胞を破壊した。10,000×g 10

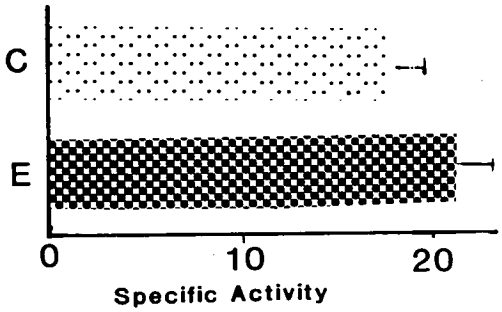


図5　ミオシンH鎖の分解速度に及ぼす E-64-c (5×10^{-6} g/ml) の影響

図4の説明通りに ^{3}H ロイシンでパルス・チエースされた培養筋細胞より，アクチン及びミオシンH鎖を遊離した。これら蛋白質に残存する比放射能(任意単位)を棒にて示す。線は標準偏差を示す。E: E-64-c 存在，C: E-64-c 非存在下，EとCの間には有意差が認められた ($p<0.05$)。

分間の遠心をすると，筋構造性蛋白質は沈殿する。沈殿を 0.2N NaOH に溶解し，液体シンチレーション・カウンターにより放射能を測定した。蛋白質の放射能総量の多いことは，それだけ筋細胞内で構造蛋白質の分解が抑制されていることを示す。

図4に示されるごとく，構造蛋白質には，E-64-c (1×10^{-6} g/ml) 存在下では非存在下よりも有意 ($P<0.01$) に多くの放射能が保持された。即ち，E-64-c は構造蛋白質の分解を抑制すると結論される。

4）ミオシンH鎖の分解速度に及ぼす影響

3)に示したプログラムで培養された筋細胞を収穫する際，培養皿ごとに個別に収穫するのではなく，E-64-c を含むものと含まないものとに大別して筋細胞をプールした。2) の 0.1M KCl 沈殿に筋重量の5倍の 1mM DFP を含むグバ・ストラウブ液を加えてアクトミオシンを抽出した。粗製アクトミオシンはグバ・ストラウブ液の9倍の冷水を加えることによって沈殿させた[4]。沈殿蛋白質を SDS 存在下のポリアクリルアミド・ゲル中に電気泳動し[5]，クマジーブリリアント・ブルー (CBB) にて染色した。ミオシンH鎖 (分子量230,000ダルトン) のバンドをカミソリで切り出した。蛋白質量は蛋白質に結合している CBB をピリジンで抽出したのち比色により[6]。そして放射能はポリアクリルアミド・ゲルを過酸化水素水にて溶解したのち，液体シンチレーション・カウンターにより測定した。

図5に示される様に，ミオシンH鎖の比放射能は，培養液に E-64-c (5×10^{-6} g/me) が存在すると 26.5±2.9 (任意単位の比放射能，m±SD, n=6) で，E-64-c が存在しないと 22.0±2.6 (m±SD, n=6) で，前者は後者より有意 ($P<0.05$) に高かった。

蛋白質分解酵素によるミオシンの筋細胞内での分解が抑制されていると考えられるが，今後例数を重ねて結論したい。

結　　語

E-64-c は低濃度で生筋に直接作用させてその蛋白質分解を抑制した。蛋白質分解の促進している筋においてこの抑制は著明であった。この過程に Ca イオンの関与がある事を示唆する事実も明らかとなった。

文　　献

1）Fulks, R.M., Li, J. B., and Goldberg, A. L.: J. Biol. Chem., **250**, 292, 1975.
2）Kameyama, T. and Etlinger, J. D.: Nature, **279**, 344, 1979.
3）Kohama, K. and Ozawa, E.: Develop., Growth, and Differ., **19**, 139, 1977.
4）Kohama, K. and Holtzer, H.: J. Biochem. 1981.
5）Laemmli, U. K.: Nature, **227**, 630, 1970.
6）Fenner, C., Traut. R. R., Manson, D. F., and Wikman-Coffelt, J.: Anal. Biochem., **63**, 595, 1975.
7）佐久間昭：薬効評価 —計画と分析— I，東京大学出版，1977.

15. ヌードマウスへの異種移植筋の再生に対するE-64の効果

寺尾寿夫*

研究協力者 大沢仲昭**

目的

筋ジストロフィー症をはじめ，多くの筋疾患の原因の解明やこれらの筋肉の再生能力の研究には，組織培養法が主に用いられている。しかし，これには種々の制約があるため，いわばin vivoの培養である筋の移植実験の価値が見直されている。しかるに，異種動物間の移植では拒絶反応が働くため，長時間の観察には，やはり困難を伴う。

そのため，われわれは数年来，胸腺を欠く細胞免疫不全動物であるヌードマウスを用いて移植実験を行なってきた。

この報告はヌードマウス内におけるジストロフィー筋の再生を観察し，これを促進する物質，とくにE-64の効果を研究するため行なっているものの第一報である。

方法

今回行なった筋移植法はマウスのExtensor digitorum longus (EDL)のhomotransplantationである。

動物はddyマウスの生後6週の雄を使用した。

移植法はddyマウスをネンブタール麻酔下に一側のEDLを除去し，その後に，他のマウスの同側EDLを摘出したものを，両端に軽いtensionをかけて固定移植した。

このようにEDLのhomotransplantationをしたマウスには毎日5mgのE-64を腹腔内に注射し，種々の時間後（主として2週後）に，ネンブタール麻酔下にsacrificeし，EDLを取り出し，その外観の観察，重量の測定を行なった，その後これを凍結し，クリオスタットで8μの切片を作り，これを組織学的，組織化学的に検討した。なおコントロールとしては，同様にhomotransplantationを行ない，E-64の代りに生理食塩水を毎日0.1ml腹腔に注射したマウスを用いた。

結果

EDLを移植した場合には，2～3日で横紋は消失し，一様な染色性を示す変性をきたす。次いで筋の周辺から血管が入り込み，またmyoblast, fibroblast, macrophageなどより成る細胞浸潤が起り，また5～7日位でbasophilicな胞体を有し，核が鎖状に並ぶmyotubeが形成され始める。この場合移植した筋肉片の中央部では変性に陥った古い筋肉が残存しているのがみられる。2週を経ると殆ど新しい再生筋線維より成る筋肉が形成されるようになる。3週以後では明瞭な横紋の形成が見られる。

次にE-64を注射した場合と注射しなかった場合につき比較してみよう。

1) 外観

E-64を毎日注射したマウスの再生筋はコントロールに比し，形，大きさにとくにきわだっ

* 帝京大学医学部第一内科

** 東京大学医学部第三内科

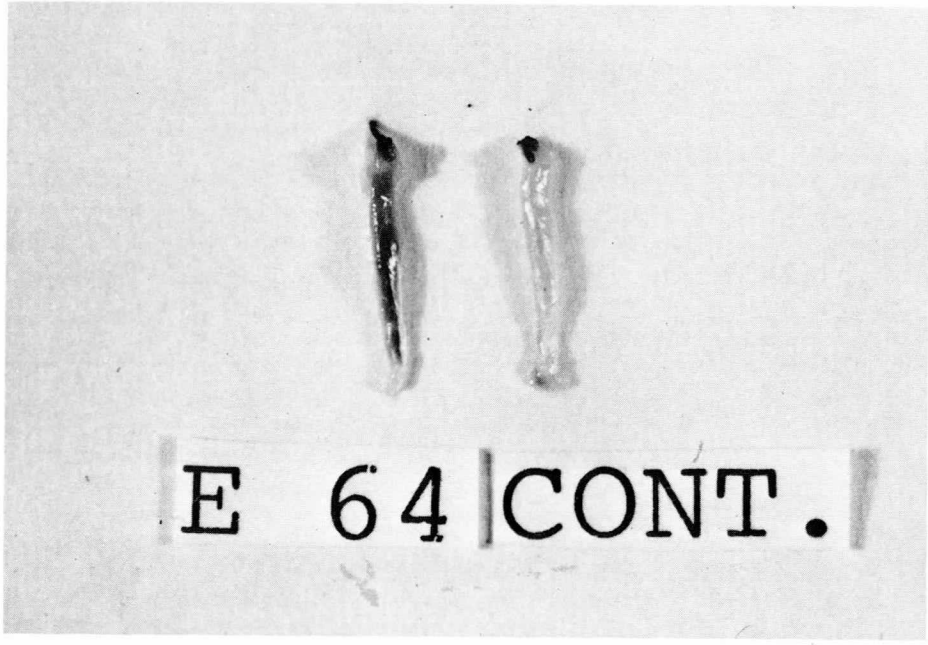
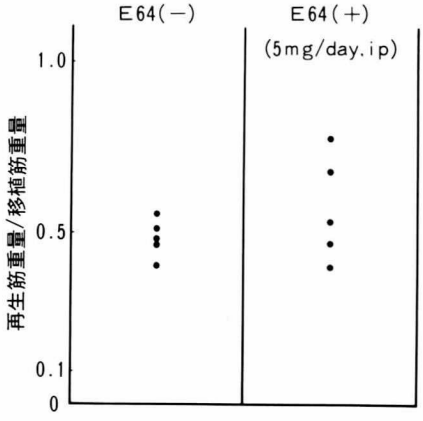


写真1



筋再生に対するE64の効果
(ddyマウスEDLのhomotransplantation2週後)

図1

た変化はみられなかったが，移植後1～2週のものはコントロールに比し赤い色を帯びているものが多かった。（写真1ではやや黒味を帯びてみえる。）

2）重量

再生筋の重量と，飼育保存してあるdonorマウスの移植に用いたものと反対側のEDLを取り出して，その重量を比較したものが第1図である。

マウスの数は充分でないが，コントロールより重いものが見られた。さらに例数を増して検討中である。

3）組織学的及び組織化学的所見

H-E等による通常の組織学的所見はE-64を注射したもの（写真2）とコントロール（写真3）との間に著明な差はみられなかった。ただE-64注射例では血管増生がやや多かったが，これが赤い色の原因とは考えられない。筋を沪紙でよくblotし血液を除いても着色は不変であったからである。

組織化学的にはMyosin ATP aseやDPNH染色では，E-64投与群は活性が強い印象を受けた。

考　　案

以上の如く種々の移植筋の再生に対するE-64の効果を検討中であるが，この場合次の点を注意する必要がある。

15.　ヌードマウスへの異種移植筋の再生に対する E-64 の効果

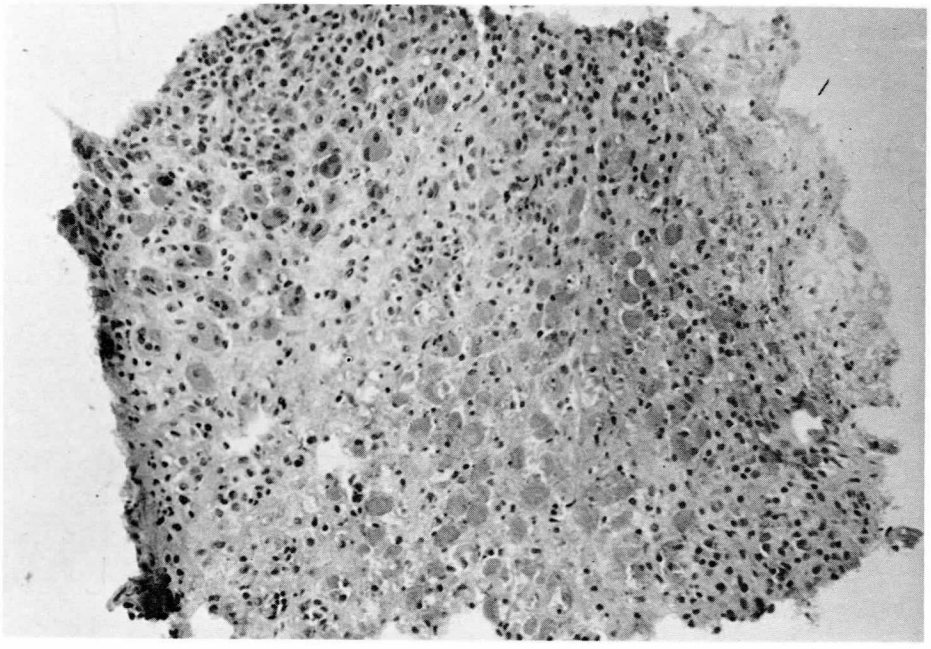


写真 2

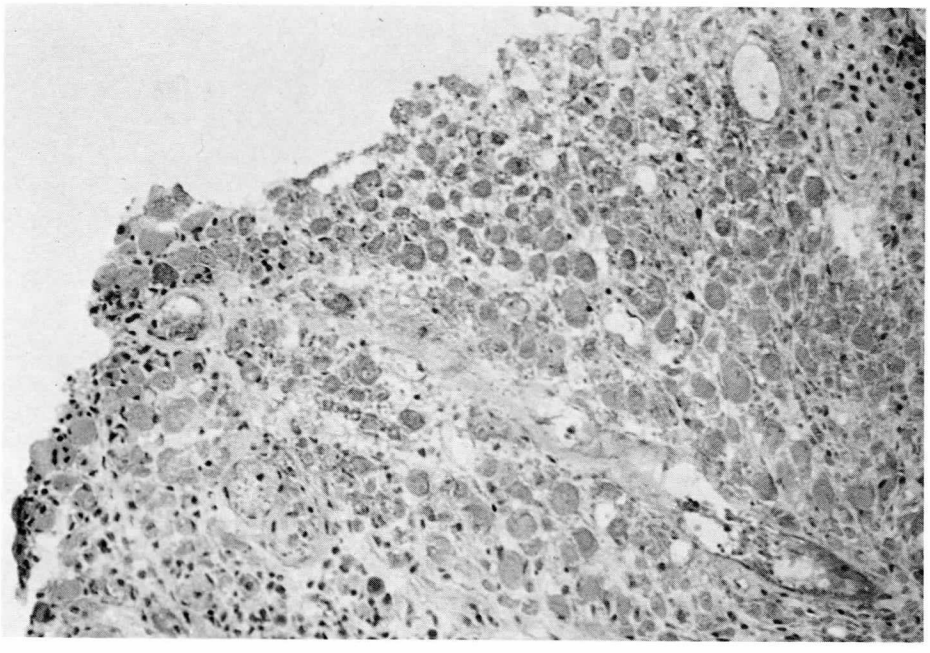


写真 3

まず第1に，移植された筋の再生においては筋線維そのものの再生と共に，これを支える血管と神経線維の再生も重要な要素であることである。生体内に移植された筋線維の再生は，in vivo と異なりこれら全体の総和として起るのである。第2には当然のことながら，出来上った筋線維は性状が E-64 注射で如何なる影響を受けるかという点である。しかし第3の問題として，再生筋はその形態学的特徴や再生量と共に，成熟した筋線維になるまでの時間的要素も考慮されなければならない。すなわち，E-64 が筋線維の再生の速度に影響を与えないかという点である。そして最後の重要な問題として，正常筋のみでなくジストロフィー筋などの病的な筋肉の再生に与える効果がある。

これらの各点につき，今後検討を進める予定である。

文　　献

1) Zalewski, A. A.: Survival, reinnervation and histochemical maturation of skeletal muscle xenograft in the nude mouse, Exp. Neurol., 58, 261, 1978.

2) Wakaya, Y., Schotland, D. L. and Bonilla, E.: Transplantation of human skeletal muscle to nude mice, a seguential morphologic study, Neurology, 30, 740, 1980.

3) Hironaka, T. and Miyata, Y.: Transplantation of skeletal muscle in normal and dystrophic mice, Exp. Neurol., 47, 1, 1975.

IV　全身的影響に関する研究

16.　E-64-c の急性及び亜急性毒性に関する研究……大関　正弘

17.　E-64-c の抗原性に関する研究……大関　正弘

18.　E-64-c の感覚器に及ぼす影響……大関　正弘

19.　E-64-c の薬効に関する研究(1)……大関　正弘
～筋ジストロフィーチキンに対する薬効試験～

20.　E-64-c の薬効に関する研究(2)……大関　正弘
～Serotonin myopathy に対する E-64-c の効果～

21.　E-64-c 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～

22.　取り込まれた E-64 の細胞内分布と運命について ……勝沼　信彦

23.　E-64-c の生体内動態に関する研究……大関　正弘

24.　E-64-c の薬物代謝酵素活性への影響……北川　晴雄

16. E-64-c 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*
瀬戸山 蔭 義* 木 村 正 明* 河 西 章*
鬼 沢 幸 男* 岸 恭 子* 岩 松 裕 子*
尾 上 早百合*

1. 急性毒性

目 的

E-64-c の安全性研究の一環として，マウス及びラットに静脈内，皮下，腹腔内及び経口投与し，その急性毒性を検討する。

方 法

動物は4週令の dd 系雌雄マウス（静動協：体重 20 g 前後）及び6週令の Wistar 系雌雄ラット（静動協：体重 200 g 前後）をそれぞれ7日間の予備飼育の後，実験に使用した。被験薬物の E-64-c は重曹水で中和溶解後，生理的食塩水液に混和し，一投与段階あて10匹の動物に各々静脈内，皮下，腹腔内及び経口投与した。投与後7日間，各動物の一般症状を観察するとともに生死を確認し，死亡例については発見後すみやかに剖検を行った。また生存例については7日目に全例の剖検を行った。

LD_{50} 値は Litchfield-Wilcoxon 法により算出した。

結 果

i) 一般症状

マウスでは腹腔内投与において投与直後に一過性の興奮，また数分後から自発運動の抑制がみられた他に著変は認められなかった。死亡はこれら症状変化の著しい例にみられ，その発生は投与2～4時間から出現し，大部分が48時間以内に死亡した。また，他の投与経路では特に症状変化は観察されなかった。ラットでは静脈内投与の数例に血尿，皮下投与例に投与皮膚面の痂皮，潰瘍及び肉芽形成，腹腔内投与例に自発運動の抑制，呼吸数の減少，血涙，下痢などがみられ，また死亡例は大部分が投与1時間後から48時間以内に観察された。経口投与では症状変化は認められなかった。

ii) 剖 検

死亡はマウス及びラットとも腹腔内投与例にのみ認められ，これら死亡例の剖検では消化管粘膜の軽度な充血以外に著変はみられなかった。またラットの生存例では腹腔内投与例に腹水増加，肝腫大及び腹腔内諸臓器の相互癒着などが観察された。一方，他の経路での投与例及びマウスでは特記すべき変化が認められなかった。

iii) LD_{50} 値

LD_{50} 値を一括して表1に示す。

静脈内，皮下及び経口投与ではマウス，ラットとも検液調整及び投与容量から考えられた最大可能量を投与しても死亡は認められなかった。腹腔内投与ではマウス及びラットとも2,100～2,500 mg/kg の LD_{50} 値を示し，マウスとラットあるいは雌雄の間に差はみられなかった。

* 大正製薬株式会社総合研究所

表 1 E-64-c のマウス及びラットにおける急性毒性

	LD_{50} (95% C. L.) mg/kg			
	Mice		Rats	
Route	Male	Female	Male	Female
i. v.	>1000	>1000	>1000	>1000
s. c.	>5000	>5000	>5000	>5000
i. p.	2476 (2179-2813)	2400 (2065-2791)	2138 (1915-2387)	2367 (2149-2607)
p. o.	>5000	>5000	>5000	>5000

考　　察

E-64-c はマウス及びラットにおいて静脈内，皮下及び経口投与では投与可能最大量においても死亡例がなく，また腹腔内投与では死亡例が出現するものの 2,000 mg/kg を越える高い LD_{50} 値を示し，その急性毒性は弱いものと推察される。しかし，皮下投与時の投与部位における炎症性の変化あるいは腹腔内投与時の腹膜炎様の変化は被験薬が何等かの刺激性を有することを示唆するものと考えられ，その刺激が E-64-c の物性によるものかいなかについては不明であるが，大量投与あるいは連続投与時にこれらの変化の増強あるいはこれらの変化に基づく二次的な毒性発現の誘発が推測される。さらに製剤学的な検討が必要と考えられる。

結　　論

E-64-c をマウス及びラットに静脈内，皮下，腹腔内及び経口投与し，その急性毒性を検討した。その結果，E-64-c のマウス及びラットへの大量投与は投与部の皮膚，腹腔内に局所的刺激を誘発するが，LD_{50} 値はいずれの投与経路においても 1,000 mg/kg 以上の値を示し，種差及び性差は認められなかった。

2. 亜急性毒性

Ⅰ ラット

目　　的

E-64-c の安全性研究の一環として，ラットに1カ月間経口及び皮下投与し，その亜急性毒性を検討する。

方　　法

(1)動物：6週令の Wistar 系雄ラット（静動協：体重160～190 g）を1週間の予備飼育後，1群10匹あて群別して実験に使用した。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)投与量及び投与方法：E-64-c は重曹水に中和溶解後，生理的食塩水に混和し，経口投与の投与量は 1,000及び 2,000 mg/kg，投与容量は 20%（w/v）検液を体重 100 g あたり各々 0.5 ml 及び 1 ml とし，また皮下投与の投与量は125，250及び 500 mg/kg，投与容量は 6.3%，12.5%及び25%（w/v）検液を体重 100 g あたり各々 0.2 ml として1日1回1カ月間，経口及び背部皮下に投与した。対照群には生理的食塩水をそれぞれ同様に投与した。

(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度摂食量及び摂水量の測定を行った。

2）血液学的検査：1カ月間の投与終了後，エーテル軽麻酔下に眼窩静脈叢より採取した新鮮血を用い，赤血球数，白血球数，血小板数（Toa Microcell Counter），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，エーテル軽麻酔下に外腸骨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（日立分析装置 712 型）により血糖量（グルコースオキシダーゼ法），総蛋白量（Biuret

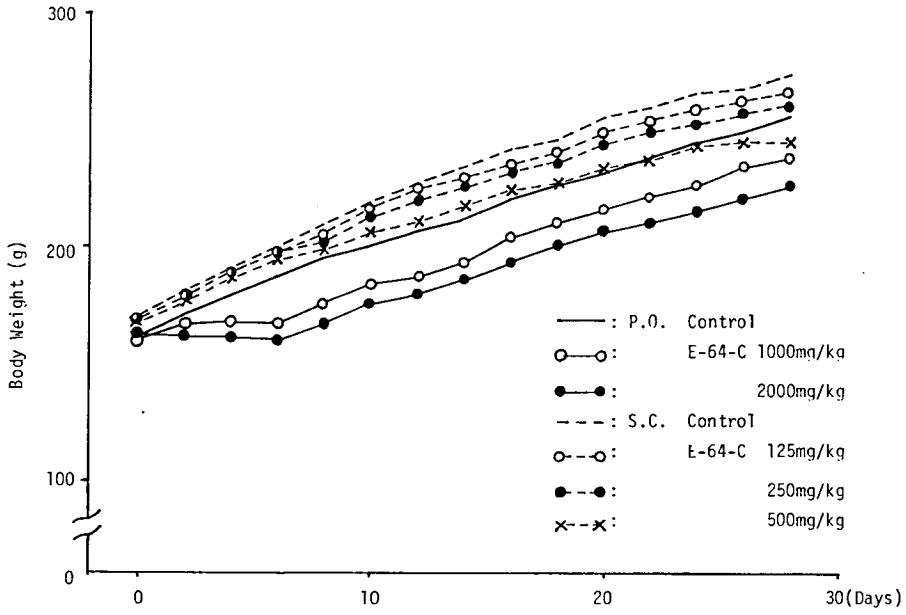


図 1 E-64-c のラットへの1カ月連続投与における体重変動

法)，アルブミン量 (BCG法)，尿素窒素量（ウレアーゼインドフェノール法)，クレアチニン量 (Jaffe 変法)，総ビリルビン量（アルカリアゾビリルビン法)，総コレステロール及び中性脂肪量 (酵素法)，GOT, GPT 活性 (UV 法)，ALP 活性 (Kind-King 変法)，LDH 活性 (UV法)，CPK活性 (Oliver 変法)，無機リン量 (Fiske-Subbarow 変法) を測定し，さらに Na, K 量（炎光法—島津原子吸光 AA-650) 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った。

5）病理学的検査：投与終了後，外表及び眼の異常の有無を観察し，エーテル軽麻酔下に放血致死させ，開胸腹して内部諸臓器を詳細に観察し解剖した。摘出した脳，心，肺，肝，腎，脾，腸間膜リンパ節，胸腺，下垂体，甲状腺，副腎，精巣及び精巣上体については各々湿重量を測定した。これら諸臓器に加え胃，十二指腸，骨格筋（大腿部）及び背部皮膚については Lillie の 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定後，常法のごとくパラフィン切片を作製し H. E. 染色，また必要に応じて腎の PAS, Masson の trichrome 及び Weigert の線維素染色を施して病理組織学的検索を行った。

結　　果

投与期間中，両投与経路のいずれの被験物質投与群にも死亡例は観察されなかったが，皮下投与群に急性毒性試験時と同様な投与部皮膚面の痂皮，潰瘍及び肉芽形成などの刺激性病変が用量依存性にみられた。

体重変動を図1に示す。

経口投与では 1,000 mg/kg 以上，皮下投与では 250 mg/kg 以上の群に有意な体重増加抑制がみられ，経口投与においてより著明であった。また体重変化を示した各々の投与群では摂食量の減少傾向もみられた。

血液学的検査結果を表2に示す。

皮下投与の 500 mg/kg 群に白血球数の増加のほか，貧血を示唆する赤血球数，ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の減少がみられた。一方，経口投与では各群とも著変は認められなかった。

表 2 E-64-c のラットへの1カ月連続投与における血液学的検査所見

Test items	P. O. (mg/kg)			S. C. (mg/kg)			
	Control	1000	2000	Control	125	250	500
RBC $10^4/mm^3$	997±119	975±37	974±38	897±28	902±28	867±38	844±43**
WBC $10^2/mm^3$	73±13	62±6*	74±22	50±10	54±9	53±12	75±19**
Hb g/dl	17.1±1.8	16.8±0.9	16.9±0.4	15.7±0.5	15.8±0.5	15.2±0.6*	14.8±0.7**
Ht %	50.6±6.3	49.3±2.2	49.0±1.9	45.3±1.8	45.7±1.0	43.6±2.2	42.6±2.0**
Pla. $10^3/mm^3$	881±181	885±46	931±85	902±46	872±48	869±115	909±70

RBC=Red Blood Cell, WBC=White Blood Cell, Hb=Hemoglobin, Ht=Hematocrit, Pla.=Platelet *P<0.05 **P<0.01

表 3 E-64-c のラットへの1カ月連続投与における血液生化学的検査所見

Test items		P. O. (mg/kg)			S. C. (mg/kg)			
		Control	1000	2000	Control	125	250	500
Glucose	mg/dl	201±36	181±17	174±26	153±27	152±15	147±11	145±13
Total protein	g/dl	6.1±0.2	6.1±0.2	6.1±0.2	5.6±0.1	5.6±0.2	5.2±0.2	5.1±0.2
Albumin	g/dl	3.3±0.1	3.3±0.1	3.3±0.1	2.8±0.1	2.9±0.1	2.6±0.1	2.5±0.1
A/G		1.1±0.03	1.1±0.04	1.2±0.1	1.0±0.04	1.1±0.1	1.0±0.1	0.9±0.04
BUN	mg/dl	24.1±1.6	21.9±1.2	24.1±2.2	22.7±2.1	21.8±2.4	21.0±2.0	20.8±1.6
Creatinine	mg/dl	0.6±0.1	0.6±0.05	0.6±0.1	0.5±0.04	0.5±0.1	0.5±0.04	0.5±0.04
Total bilirubin	mg/dl	0.2±0.03	0.1±0.03	0.1±0.03	0.1±0.01	0.1±0.02	0.1±0.02	0.1±0.02
Total cholesterol	mg/dl	66±5	76±7**	82±5**	63±4	64±6	72±7**	85±6**
Triglyceride	mg/dl	204±41	117±14**	67±17**	110±27	117±36	98±19	67±17**
GOT	K-U	96±18	149±26**	198±81**	114±84	137±39	300±196*	308±108**
GPT	K-U	31±9	53±16**	72±37**	48±44	57±20	129±106*	142±51**
ALP	KA-U	52±5	48±5	51±7	38±3	39±5	33±4	30±4**
LDH	I-U	757±81	811±98	858±155	478±125	407±94	631±237	486±160
CPK	I-U	955±297	1269±375	1209±172*	907±575	834±350	943±323	656±167
IP	mg/dl	6.9±1.1	7.9±1.1	9.3±0.5	7.9±0.8	7.9±1.0	8.7±0.8	8.8±0.7
Na	mEq/l	142±2	143±2	142±2	142±3	146±1**	139±3	144±2
K	mEq/l	5.0±0.5	5.4±0.3	5.7±0.2	5.0±0.3	4.8±0.2	4.7±0.1	4.7±0.2

*P<0.05 **P<0.01

血液生化学的検査結果を表3に示す。

経口投与では 1,000 mg/kg 以上，皮下投与では 250 mg/kg 以上の群にそれぞれ共通して血清脂質成分及びトランスアミナーゼの変動がみられた。

尿検査ではいずれの投与群においても変化は認められなかった。

主な剖検所見は経口及び皮下投与群にみられた腎の軽度腫脹及び褪色と皮下投与群の投与部痂皮及び潰瘍形成等であった。摘出各臓器の相対重量を表4に示す。

絶対重量及び相対重量の両重量において経口投与では 1,000 mg/kg 以上の群に肝の増加及び腸間膜リンパ節の減少，さらに 2,000 mg/kg 群に副腎の増加と胸腺の減少が認められた。皮下投与では 125 mg/kg 以上の群に肝，250 mg/kg 以上の群に脾，500 mg/kg 群に副腎の重量増加がみられ，また 500 mg/kg 群に腸間膜リンパ節の重量減少が認められた。その他絶対重量または相対重量のみに変化のみられる

表 4 E-64-c のラットへの1カ月連続投与における臓器重量

Organs	P. O. (mg/kg)			S. C. (mg/kg)			
	Control	1000	2000	Control	125	250	500
Brain mg%	0.62±0.02	0.65±0.03*	0.69±0.04**	0.60±0.03	0.61±0.02	0.62±0.02	0.67±0.04**
Heart mg%	271±12	272±12	278±17	272±8	271±17	279±12	272±12
Lungs mg%	346±14	355±16	359±16	335±21	327±18	343±35	358±33
Liver g%	3.68±0.11	3.69±0.16	3.74±0.19	3.86±0.13	3.94±0.29	4.09±0.18**	4.63±0.27**
Kidneys g%	0.63±0.02	0.73±0.02**	0.80±0.02**	0.65±0.02	0.69±0.02**	0.77±0.04**	0.86±0.03**
Spleen mg%	201±13	210±9	210±14	224±22	225±7	243±17*	271±11**
M. Lymph nodes mg%	55±7	42±8**	42±6**	48±5	50±34	49±8	40±8*
Thymus mg%	127±9	123±14	109±14**	137±12	128±12	128±15	125±15
Hypophysis mg%	2.6±0.2	2.8±0.2	2.7±0.3	2.6±0.3	2.5±0.2	2.8±0.3	2.7±0.2
Tyroidea mg%	5.4±1.3	5.5±0.8**	5.5±1.0	5.3±1.2	5.5±0.7	6.3±1.0*	5.4±0.8
Adrenals mg%	12±1	14±1	15±1**	13±2	13±1	14±2	15±1**
Testis g%	1.03±0.04	1.10±0.05	1.16±0.06**	0.98±0.04	1.02±0.02**	1.04±0.02**	1.09±0.04**
Epididymis mg%	256±19	276±14*	286±23**	241±15	256±14*	260±13**	264±14**

*P<0.05 **P<0.01

臓器が種々みられた。

臓器ごとの病理組織学的検査所見を以下に示す。

肝では対照群にごく小域の壊死巣，類洞内における貪食細胞の集簇及び肝細胞の胞体内エオジン好性滴状物の沈着等がいずれも軽度に観察された。被験物質投与群では経口及び皮下各群にこれら変化の増強のほか，肝細胞の大小不同，肝細胞核の膨化，分裂及び多核化等が用量依存性に認められた。経口投与の 1,000 mg/kg 群の変化は皮下投与の 250 mg/kg 群，経口投与の 2,000 mg/kg 群は皮下投与の 500 mg/kg 群のそれとほぼ同程度の強さを示した（写真1～2）。

腎では対照群に皮質外帯の一部の尿細管上皮に軽度な硝子滴沈着が認められ，この硝子滴沈着は被験物質投与の各群で増強し皮質外帯のほとんどと皮質内帯の一部の尿細管上皮に分布して観察された。このような腎における組織変化は経口及び皮下投与とも用量依存性にみられ，両投与経路の変化の強さは肝における変化と同様に経口投与の 1,000 mg/kg，2,000 mg/kg 群は皮下投与のそれぞれ 250，500 mg/kg 群とほぼ同程度であった（写真3）。

腸間膜リンパ節ではリンパ洞胞の萎縮が経口投与の 2,000 mg/kg 群及び皮下投与の 500 mg/kg 群，胸腺では実質萎縮，副腎では皮質束状層細胞の腫大が経口投与の 2,000 mg/kg 群にそれぞれ軽度にしかも一部の例に観察された。

背部皮膚では皮下投与において対照群に投与部真皮の軽度な細胞浸潤がみられたが，被験物質群ではさらに 125 mg/kg 以上の群に表皮剝脱及び錯角化が用量反応性に増強して観察され，高用量群では潰瘍性変化も散見された（写真4）。

その他観察した脳，心，肺，脾，下垂体，甲状腺，精巣及び精巣上体ではいずれの投与群にも著変は認められなかった。

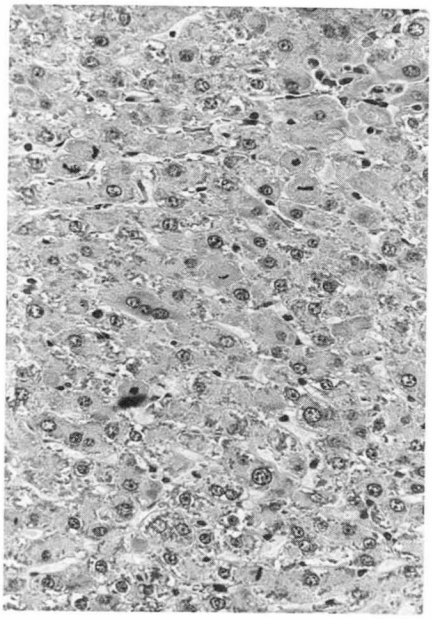


写真 1：肝（E-64-c 500 mg/kg 皮下投与，ラット）
肝細胞核の分裂増加及び多核化　×250 H. E.

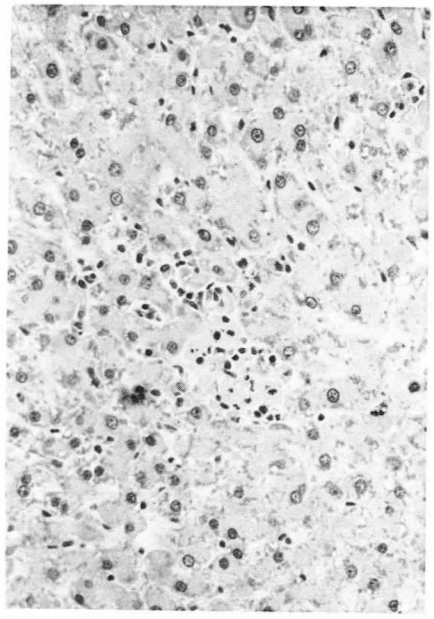


写真 2：肝（E-64-c 500 mg/kg 皮下投与，ラット）
肝細胞の小壊死巣　×250 H. E.

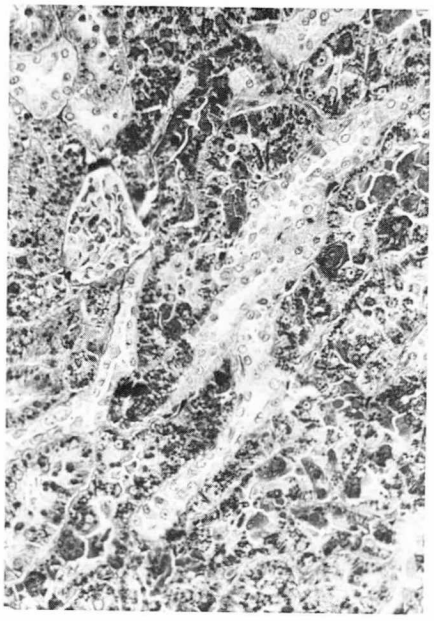


写真 3　腎（E-64-c 500 mg/kg 皮下投与，ラット）
尿細管上皮の硝子滴沈着　×250 Masson's trichrome

写真 4：皮膚（E-64-c 500 mg/kg 皮下投与，ラット）
潰瘍形成　×100 H. E.

考　　察

今回実施した1カ月間の連投試験では既報[1]の2週間の皮下投与の結果に比べて，E-64-c の影響が強く認められた。しかしながら，質的な相違はあまり認められないことから，これらの現象は投与量の増加及び投与期間の延長によるものと考えられる。投与経路による影響の程度は投与量の違いを考慮すると，皮下投与においてより強く認められたが，これは吸収，排泄等，E-64-c の生体内動態の違いと併せて，投与部位への刺激的な影響等，その二次的な要因にもよると考えられる。

それぞれの投与経路における肝の変化は組織学的に肝細胞核の変化と壊死像に代表され，また腎の変化は変性に属する病変と分類される。変性，壊死等は物質代謝障害によって生ずる退行性変化であって，これらの病変がさらに進行すると，生命の危険にさえ達するものであるが，少なくとも今回の結果では致死例は認められず，重篤な病的変化には至っていないと推察された。

結　　論

E-64-c をラットに1カ月間，経口投与で 1,000，2,000 mg/kg，皮下投与で 125，250，500 mg/kg 処置し，その亜急性毒性を検討した結果，経口投与では 1,000 mg/kg 以上，皮下投与では 250 mg/kg 以上に肝，腎を主体とした中等度の影響がみられた。投与経路の違いによる毒性の比較では経口投与よりも皮下投与の方がより強い影響が認められた。

II　筋ジストロフィーチキン

目　　的

安全性研究の一環として筋ジストロフィーチキンを用いた E-64-c の薬効試験に併せて毒性的影響を検討する。

方　　法

(1)動物：孵化10日令の雌雄筋ジストロフィーチキン (line 413) を1群10～12羽あて群別し，実験に用いた。その他，対照として同日令の正常チキン (line 412) の雄5羽，雌6羽を使用した。動物は1カ月間，37° の育雛器内，それ以降は温度23±2°，湿度55±5％の動物室で自動水洗ケージ内に1ケージ1羽ずつ収容して飼育し，飼料（日清製粉社製）と水は自由に摂取させた。

(2)投与量及び投与方法：E-64-c は重曹水に中和混和後，生理的食塩水に混和し，7.5及び15.0％ (w/v) 液に調整した。投与量は150及び 300 mg/kg とし，体重 100 g あたり 0.2 ml の液量を1日2回 (AM 9:00 及び PM 4:00) に等分して80日間，腹側部皮下に投与した。対照群には生理的食塩水を同様に投与した。なお，正常チキンは無処置とした。

(3)検査項目：投与期間中は毎日一般症状を観察し，10日に1回体重測定を行った。投与終了時には断頭により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（日立自動分析装置712型）により血糖量（グルコースオキシダーゼ法），総蛋白量 (Biuret 法)，アルブミン量 (BCG 法)，尿素窒素量（ウレアーゼインドフェノール法），クレアチニン量 (Jaffe 変法)，総ビリルビン量（アルカリアゾビリルビン法），TTT（肝機能研究班規準操作変法），総コレステロール及び中性脂肪量（酵素法），GOT, GPT 活性 (UV 法)，ALP 活性 (Kind-King 変法)，無機リン量 (Fiske-Subbarow 法)，リン脂質，尿酸量（酵素法），Ca 量 (OCPC 法) を測定し，さらに Na, K 量（炎光法），Cl 量（電気滴定法）も測定した。採血後には剖検して内部諸臓器を観察後，心，肺，肝，腎，脾，副腎，精巣，卵巣を摘出し重量を測定した。これらの諸臓器は Lillie の10％中性緩衝ホルマリンに固定後，常法の如くパラフィン切片による H. E. 染色，また必要に応じて腎の Masson の trichrome 及び Weigert の fibrinoid 染色標本を作製して病理組織学的検査を行った。

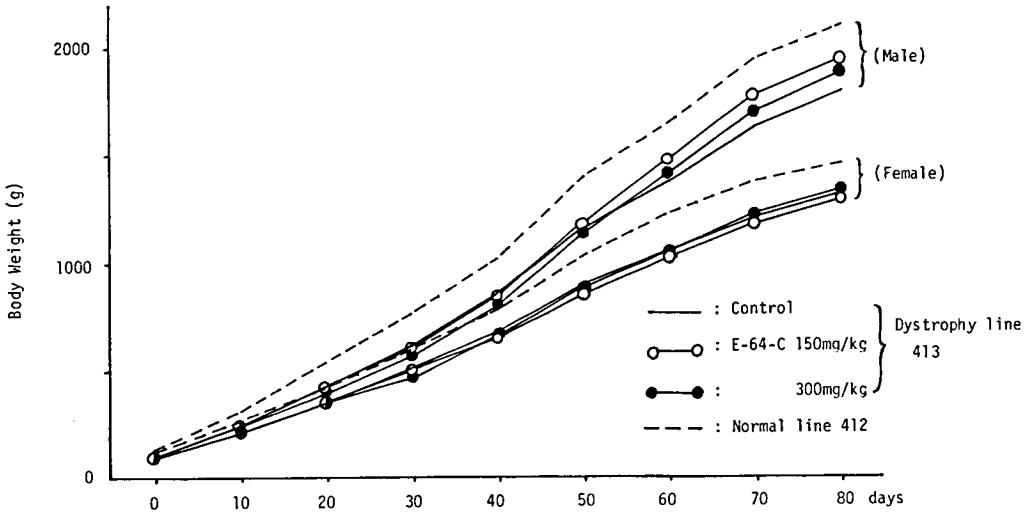


図 2 E-64-c の筋ジストロフィーチキンへの80日間連続投与における体重変動

表 5 E-64-c の雄筋ジストロフィーチキンへの80日間連続投与における血液生化学的検査所見

Test items		Dystrophy line 413			Normal line 412
		Control	E-64-c (mg/kg)		
			150	300	
Glucose	mg/dl	240±10	235±20	242±12	278±21
Total protein	g/dl	3.5±0.2	3.2±0.2**	3.0±0.3**	3.6±0.5
Albumin	g/dl	1.3±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1
A/G		0.6±0.1	0.7±0.1**	0.7±0.1**	0.6±0.2
BUN	mg/dl	2.3±0.2	2.7±0.3**	2.6±0.2**	2.8±0.5
Creatinine	mg/dl	0.3±0.02	0.3±0.01	0.3±0.02	0.3±0.04
Total bilirubin	mg/dl	0.10±0.01	0.12±0.01**	0.13±0.02**	0.14±0.02
TTT	K-U	0.1±0	0.1±0	0.1±0.05	0.1±0
Total cholesterol	mg/dl	104±19	105±14	104±17	113±8
Triglyceride	mg/dl	43±7	45±9	51±8*	44±13
GOT	K-U	985±403	1032±203	822±126	149±18
GPT	K-U	5±1	6±2	5±1	5±4
ALP	KA-U	43±10	39±11	42±9	37±23
IP	mg/dl	5.5±0.5	5.7±0.8	4.6±0.8**	5.7±0.6
Phospholipid	mg/dl	193±36	204±35	224±52	208±20
Uric acid	mg/dl	14.9±2.9	13.3±2.9	12.5±3.6	14.1±2.8
Na	mEq/l	149±5	149±6	156±5**	158±5
K	mEq/l	5.8±0.5	6.0±0.9	5.8±0.5	6.5±1.3
Ca	mg/dl	10.4±0.5	10.8±0.7	10.6±1.2	10.9±1.2
Cl	mEq/l	121±3	120±5	119±5	116±3

*P<0.05 **P<0.01

表 6 E-64-c の雌筋ジストロフィーチキンへの80日間連続投与における血液生化学的検査所見

Test items		Dystrophy line 413			Normal line 412
		Control	E-64-c (mg/kg)		
			150	300	
Glucose	mg/dl	250±15	250±14	247±10	271±26
Total protein	g/dl	3.3±0.2	3.0±0.3*	3.1±0.2*	3.3±0.3
Albumin	g/dl	1.4±0.05	1.3±0.1*	1.4±0.1	1.5±0.1
A/G		0.7±0.04	0.8±0.04*	0.8±0.05*	0.8±0.04
BUN	mg/dl	3.1±0.2	3.4±0.5	3.2±0.3	3.5±0.2
Creatinine	mg/dl	0.3±0.03	0.3±0.02	0.3±0.02	0.3±0.04
Total bilirubin	mg/dl	0.16±0.01	0.18±0.02*	0.18±0.01**	0.19±0.02
TTT	K-U	0.1±0.04	0.1±0	0.1±0	0.3±0.2
Total cholesterol	mg/dl	100±10	92±12	98±9	113±18
Triglyceride	mg/dl	63±18	46±11*	53±13	90±33
GOT	K-U	660±164	586±114	760±236	163±15
GPT	K-U	7±2	6±1	6±2	6±2
ALP	KA-U	40±6	41±7	45±13	62±14
IP	mg/dl	5.1±0.5	5.2±0.6	4.9±0.5	6.2±0.8
Phospholipid	mg/dl	200±12	197±29	197±18	236±42
Uric acid	mg/dl	12.2±2.2	10.9±2.5	12.1±1.4	13.3±4.7
Na	mEq/l	151±6	151±3	155±4	155±4
K	mEq/l	5.8±0.5	6.1±0.6	6.4±0.7*	6.5±0.5
Ca	mg/dl	11.4±0.8	10.0±1.5*	10.3±1.2*	10.7±1.1
Cl	mEq/l	117±6	117±7	113±7	113±2

*P<0.05 **P<0.01

結　果

投与期間中，いずれの投与群においても死亡例はみられなかった。症状変化では対照群の雄1例に孵化40日頃から歩行異常，起立不能が認められたが，E-64-c 投与群では異常例がみられなかった。またマウスやラットのような投与部皮膚の病変はまったく観察されなかった。体重変動を図2に示す。

正常チキンと筋ジストロフィーチキン及び雌雄の間には差が認められるものの，筋ジストロフィーチキンでの対照群と E-64-c 投与群との間には差はみられなかった。

血液生化学的検査結果を表5，6に示す。

E-64-c 投与群において雌雄共通した変動として，総蛋白量の減少，A/G 比の上昇，総ビリルビン量の増加が認められた。その他一部の検査項目に雌雄間に共通性のない変動がみられた。

剖検所見では起立不能を呈した対照群の雄において腎の黄白色調の隆起状大豆大結節がみられ，また薬物投与の如何に拘らず，各群の数例に比較的小さな精巣が散見された。摘出各臓器の相対重量を表7に示す。

150 mg/kg 以上の投与群に精巣重量の減少がみられたが，その他の臓器には著変が認められなかった。

病理組織学的所見では腎において尿細管上皮の硝子滴沈着が雌雄とも 150 mg/kg 以上の投与群に観察された（写真5）。この硝子滴は屈折性を有し，エオジン及び Masson の trichrome 染色で赤染，Weigert の線維素染色で濃青紫色の染色態度を示した。その他の所見として，正常チキンの肝細胞の脂肪化，対照群

表 7　E-64-c の筋ジストロフィーチキンへの80日間連続投与における臓器重量

Organs		Dystrophy line 413			Norma line 412
		Control	E-64-c (mg/kg)		
			150	300	
Male					
Heart	g%	0.46±0.03	0.49±0.05	0.45±0.04	0.51±0.07
Lungs	g%	0.46±0.07	0.51±0.07	0.44±0.05	0.46±0.07
Liver	g%	1.52±0.17	1.59±0.13	1.53±0.09	1.68±0.33
Kidneys	g%	0.63±0.15	0.63±0.06	0.68±0.04	0.67±0.08
Spleen	g%	0.12±0.03	0.12±0.02	0.11±0.03	0.16±0.02
Adrenals	mg%	13±3	13±2	12±4	15±6
Testis	g%	0.70±0.16	0.50±0.16**	0.48±0.25*	0.23±0.14
Female					
Heart	g%	0.44±0.11	0.39±0.01	0.42±0.09	0.45±0.05
Lungs	g%	0.50±0.10	0.46±0.04	0.47±0.08	0.47±0.06
Liver	g%	1.74±0.18	1.63±0.11	1.71±0.17	1.62±0.16
Kidneys	g%	0.62±0.07	0.65±0.09	0.67±0.04	0.57±0.06
Spleen	g%	0.14±0.04	0.14±0.04	0.13±0.03	0.13±0.02
Adrenals	mg%	11±2	10±3	10±3	8±3*
Ovarys	mg%	32±6	39±6*	37±7	35±8

*P<0.05　　**P<0.01

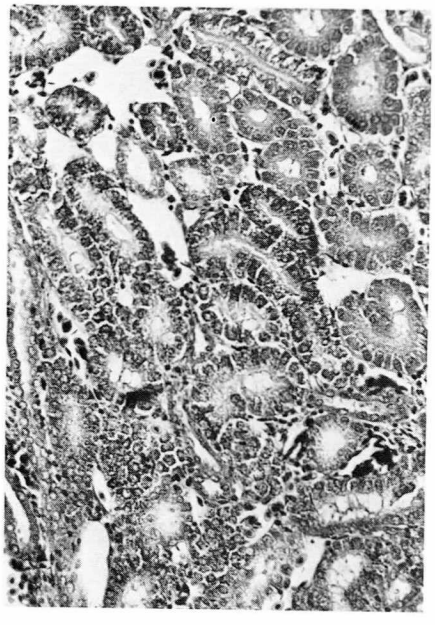


写真 5　腎（E-64-c　300 mg/kg 皮下投与，雄の筋ジストロフィーチキン）
尿細管上皮の硝子滴沈着　×250　Masson's trichrome

の雄1例の腎炎及び尿管炎，薬物投与の有無に拘らず，肺胞内石灰様物質の沈着とその貪食反応，精巣の精細管萎縮，精細胞の巨大細胞様 syncytial mass の形成及び間質炎等が観察された。

考　　察

E-64-c 投与による影響として，血清値の変動と腎の組織変化があげられる。組織所見における腎の変化は尿細管上皮の硝子滴沈着で，これは先のラット亜急性毒性試験で観察されたものと同質の変化で，物質代謝障害に基づく退行性変性を示すものである。血清蛋白量の変動も著変を示すものではないが，この腎病変に関連しているのかも知れない。なお，精巣の重量変化は組織的に対照群より増強された変化が得られなかったことから判断して，偶発的な変化と考えられる。

結　論

筋ジストロフィーチキンに E-64-c 150 及び 300 mg/kg を 80 日間連続皮下投与し，その毒性を検討した結果，150 mg/kg から一部の血清分析値にわずかな変動と組織学的に腎の尿細管上皮変性が観察されたが，その他，特に毒性的徴候は認められなかった。

文　献

1）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，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，pp. 25-36

17. E-64-c の抗原性に関する研究

大 関 正 弘*

研究協力者 小 友 進* 中 池 司 郎*
国府田 寿 子* 森 千鶴子*

研究目的

E-64-c の安全性検討の一環として，ウサギ及びモルモットに対する抗原性を検討する。

材料及び実験方法

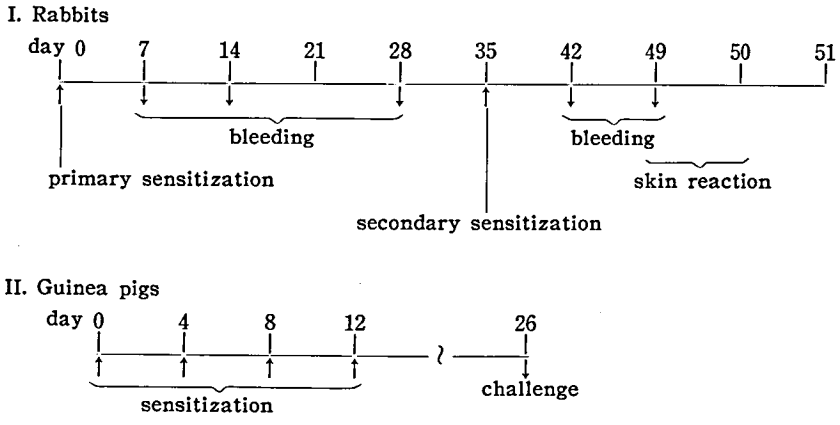
1. ウサギによる抗体産生

NZW 系雌性ウサギ (2.5～3.0 kg) を用いた。感作抗原として E-64-c と正常ウサギ血清の incubation mixture (37°C, 30分) を用い，表1のIに示すスケジュールで感作した。一次感作では，抗原液と等量の Freund's complete adjuvant (Difco) の懸濁液を，E-64-c として 0.5 及び 5 mg/kg 四肢足蹠に皮下投与した。二次感作では，抗原液を E-64-c として 1 及び 10 mg/kg 背部皮下投与した。感作後経日的に採血し，得られた血清について，Hartley 系雌性モルモットを用いた受身皮膚アナフィラキシー (PCA)[1] により，E-64-c に対する抗体価を測定した。惹起抗原としては，E-64-c と正常ラット血清の incubation mixture(37°C, 30分；E-64-c-RTS) を用いた。

2. ウサギ遅延型皮膚反応

1 で用いたウサギを使用した。day 49 に左脇腹を刈毛し，E-64-c の saline 溶液 (1 mg/ml), E-64-c-RTS及び RTS 各 0.1 ml ずつ皮内注射した。注射後24及び48時間目に皮膚を観察し，Draize の皮膚一次刺激性試験の判定基準[2] に従いランク付けした。

表 1 実験スケジュール



* 大正製薬株式会社総合研究所

表 2 ウサギ抗血清の PCA

Sensitizing dose (mg/kg)	Animal No.	Serum dilution	PCA reaction of the antisera				
			day 7	day 14	day 28	day 42	day 49
0	1	× 10	—	—	—	—	—
		× 20	—	—	—	—	—
	2	× 10	—	—	—	—	—
		× 20	—	—	—	—	—
	3	× 10	—	—	—	—	—
		× 20	—	—	—	—	—
	4	× 10	—	—	—	—	—
		× 20	—	—	—	—	—
Primary 0.5 +secondary 1	5	× 10	—	—	—	—	—
		× 20	—	—	—	—	—
	6	× 10	—	—	—	—	—
		× 20	—	—	—	—	—
	7	× 10	—	—	—	—	—
		× 20	—	—	—	—	—
	8	× 10	—	—	—	—	—
		× 20	—	—	—	—	—
Primary 5 + secondary 10	9	× 10	—	—	—	—	—
		× 20	—	—	—	—	—
	10	× 10	—	—	—	—	—
		× 20	—	—	—	—	—
	11	× 10	—	—	—	—	—
		× 20	—	—	—	—	—
	12	× 10	—	—	—	—	—
		× 20	—	—	—	—	—

3. モルモット全身性アナフィラキシー

Hartley 系雌性モルモットを用い，表1のⅡに示すスケジュールで感作した。E-64-c は saline に溶解後，等量の FCA との懸濁液とし，E-64-c として0.3及び 3 mg/kg を後肢筋肉内に投与した。最終投与の2週間後に抗原の静脈内投与による惹起を行なった。すなわち E-64-c-RTS を E-64-c として 2.5 mg/kg 投与後，江田[3] の方法に従い，アナフィラキシー症状を観察し，症状の全般的評価（general symptoms）として，何らの症状を示さないものを0，1～3症状を示すものをⅠ，4～7症状を示すものをⅡ，8症状以上または死亡したものをⅢとした。

結　　果

1. ウサギによる抗体産生

PCA の結果，いずれの被検血清を用いても色素漏出は認められず，E-64-c に対する抗体は産生されていないものと考えられた（表2）。

2. ウサギ遅延型皮膚反応

表3に結果を示す。コントロール群では RTS 惹起により4例中1例でかすかな紅斑が認められた（24時間目のみ）。E-64-c 低用量感作群では，24時間目には，いずれの抗原惹起においても1～2例にかすかな紅斑が認められたが，48時間目には RTS 惹起のみ1例に認められた。E-64-c 高用量感作群でも，24時間目にはいずれの抗原惹起においても1例ずつかすかな紅斑が認められたが，48時間目にはいずれも消失していた。

各判定時間において，対応する惹起抗原ごとに Wilcoxon's rank sum test により統計処理を行なったが，コントロール群と E-64-c 感作群の間に有意差は認められなかった。

3. モルモット全身性アナフィラキシー

結果を表4に示す。いずれのモルモットにおいてもアナフィラキシーショックの誘発は認め

表 3 ウサギ遅延型皮膚反応

Sensitizing dose (mg/kg)	No. of animal	Time (hr)	Challenging antigen	Score 0	1	2	3	4	% of positive	Mean of score	P
0	4	24	RTS	3	1	0	0	0	25	0.25	
			E-64-c	4	0	0	0	0	0	0	
			E-64-c-RTS	4	0	0	0	0	0	0	
		48	RTS	4	0	0	0	0	0	0	
			E-64-c	4	0	0	0	0	0	0	
			E-64-c-RTS	4	0	0	0	0	0	0	
Primary 0.5 + secondary 1	4	24	RTS	2	2	0	0	0	50	0.50	N. S.
			E-64-c	3	1	0	0	0	25	0.25	N. S.
			E-64-c-RTS	3	1	0	0	0	25	0.25	N. S.
		48	RTS	3	1	0	0	0	25	0.25	N. S.
			E-64-c	4	0	0	0	0	0	0	N. S.
			E-64-c-RTS	4	0	0	0	0	0	0	N. S.
Primary 5 + secondary 10	4	24	RTS	3	1	0	0	0	25	0.25	N. S.
			E-64-c	3	1	0	0	0	25	0.25	N. S.
			E-64-c-RTS	3	1	0	0	0	25	0.25	N. S.
		48	RTS	4	0	0	0	0	0	0	N. S.
			E-64-c	4	0	0	0	0	0	0	N. S.
			E-64-c-RTS	4	0	0	0	0	0	0	N. S.

表 4 モルモット全身性アナフィラキシー

Sensitizing dose (mg/kg)	No. of animals	General Symptoms 0	I	II	III	% of positive
0	4	4	0	0	0	0
0.3	4	4	0	0	0	0
3	5	5	0	0	0	0

られず，E-64-c には全身性アナフィラキシー誘発作用はないものと考えられた。

考　　察

一般に新規薬剤の抗原性試験は，薬物を FCA のような強力なアジュバントとともに免疫したり，あるいは，薬物を予め *in vitro* で血清などと incubate し，その mixture を免疫したりして，薬物に特異的な抗体を動物に産生させるか否かで抗原性が判定されている。本試験においては，E-64-c を血清と incubate 後，FCA とともにウサギに皮下注射して感作し，得られた抗血清についてモルモット PCA を行なったが，E-64-c に対する抗体は認められなかった。また，ウサギ遅延型皮膚反応試験においては，各群で1～2例ずつかすかな紅斑が認められたが，惹起抗原として RTS を用いた場合にも認められたこと，コントロール群でも認められたことより，RTS もしくは E-64-c の一次刺激性による紅斑形成であり，E-64-c に対する細胞性免疫反応によるものではないと考えられた。モルモットに E-64-c を FCA と

共に4回筋肉内注射し，最終感作後2週間目にE-64-cを静脈内注射しても，全身性アナフィラキシーショックの誘発は認められなかった。

以上の結果より，E-64-cは，抗原性物質になる可能性は極めて少ないものと考えられた。

結　　論

E-64-cの抗原性について，ウサギによる抗体産生，ウサギ遅延型皮膚反応及びモルモット全身性アナフィラキシーの3試験法により検討したが，E-64-cに対する液性及び細胞性免疫反応は認められなかった。従って，E-64-cは，抗原性物質になる可能性は極めて少ないものと考えられる。

文　　献

1）岡田秀親：モルモットにおけるPCA反応，免疫実験操作法A，626頁，1970.
2）森川藤凰：局所刺激試験法，白須泰彦，松岡理編，“新しい毒性試験と安全性の評価”，ソフトサイエンス社，433頁，1975.
3）江田昭英：薬物アレルギー試験,薬効の評価(2)，地人書館，181頁，1973.

18. E-64-c の感覚器に及ぼす影響

大 関 正 弘*

研究協力者 笹 島 道 忠* 中 根 貞 雄* 大 島 隆*
阿 部 訓 志* 渡 辺 百合子* 吉 鷹 朗 美*

目　的

E-64-c の安全性研究の一環として，E-64-c の視覚及び聴覚に及ぼす影響を検討する。

方　法

1. E-64-c の網膜機能に対する作用

試験動物として，9週令のウィスター系雄性ラット（日本動物）体重 240～300 g を使用し，1群6匹とした。

E-64-c は水に難溶であるため，静脈内投与に際し，飽和 $NaHCO_3$ —生理食塩水にて溶解後，pH 7.4，濃度 250 mg/ml の水溶液に調製して用いた。

網膜機能の指標として網膜電図（ERG）を用い，蓮井の方法[1]（1968）により観察，記録した。すなわち，局所麻酔下（0.1％塩酸リドカイン：藤沢）でY字型気管カニューレを挿入したラットに，筋弛緩薬（アメリゾール：吉富）0.1 mg を腹腔内投与し不動化させ，直ちに人工呼吸（110回1分：高橋商店）を施し，ラットを固定した。

関電極と不関電極には，生理食塩水を含ませた黒綿で白金を覆った白金—綿電極を使用し，関電極は左眼角膜中央部を少しはずれた場所に，不関電極は前頭部の皮膚を切除し，露出させた骨膜上にそれぞれ接触させた。なお，右眼は瞬間接着剤（アロンアルファ：東亜合成）により閉眼させ，電極の乾燥を防ぐため10分毎に生理食塩水を滴下した。

刺激光は光刺激装置（MSP-2R：日本光電）によるキセノン光とし，0.3 ジュールの強度で左眼より 50 cm の場所から照射した。

ERG の増幅と観察はブラウン管オシロスコープ（VC-9：日本光電）と前置増幅器（AVB-2：日本光電）により行い，データ処理装置（ATAC-350：日本光電）及びレコーダー（056：日立及び B-2：東新電気）により記録した。また，ERG の頂点潜時測定のため光刺激時は，フォトトランジスター（P-6：日本電気）を使

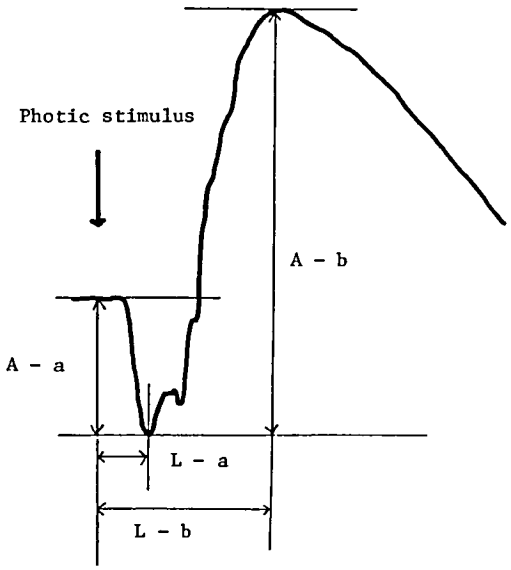


図 1　ERG 要素の模式図
A-a：a 波振巾，A-b：b 波振巾，
L-a：a 波頂点潜時，L-b：b 波頂点潜時

* 大正製薬株式会社総合研究所

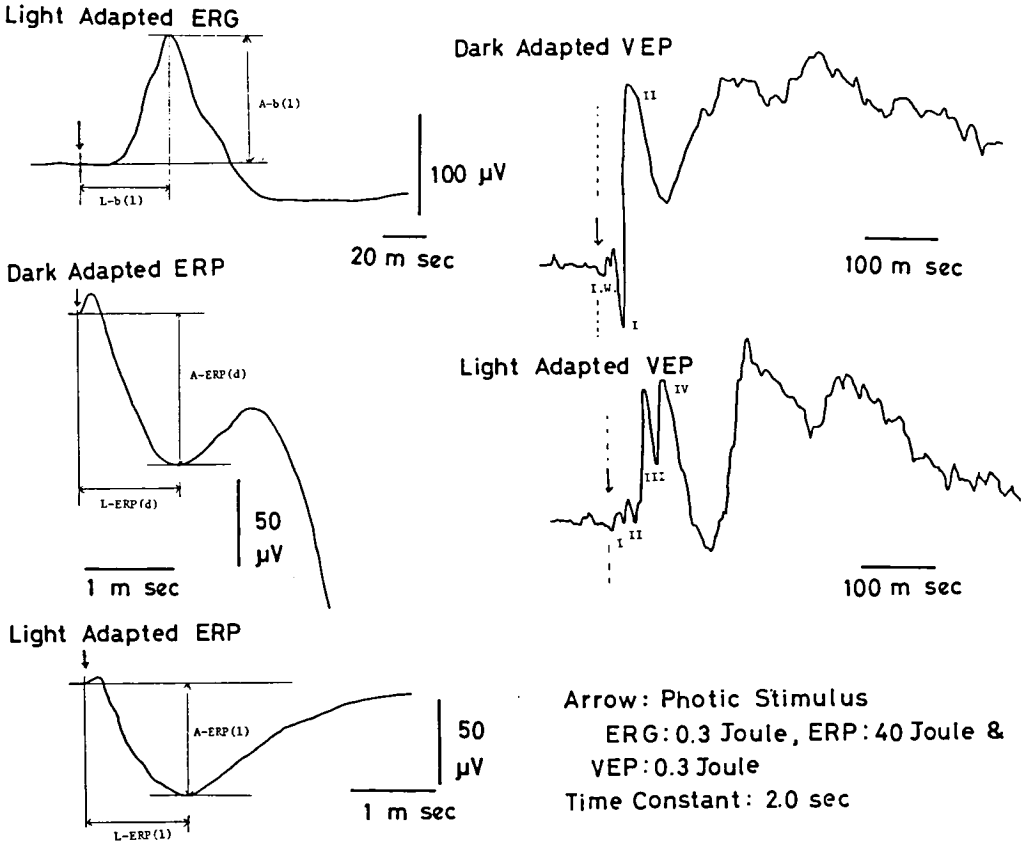


図 2　ERG, ERP 及び VEP 各要素の模式図
A：振巾，L：頂点潜時，(e)：明順応，(d)：暗順応，I.W.：初期波

用し，ブラウン管オシロスコープの他のチャンネルに記録した。

なお，ラットには試験開始16時間前より暗順応を与え，気管切開その他の操作は暗い赤色光照明下で行った。ERG の記録は暗順応下で，薬物投与前，投与後 2，5，10，15，20，30，45及び60分に行った。

ERG の各要素の計測は時定数 2.0 sec の記録より，図1の様式に従って行い，a波とb波の振幅と頂点潜時を求めた。

2. E-64-c の視覚系及び聴器に及ぼす影響

試験動物として10週令の ACI/N 系雄性ラット（星野試験動物）体重 180～220 g を使用した。

E-64-c は前記の方法で溶解し，ラット 12匹に 500 mg/kg を30日間皮下投与し，対照として同数のラットに生理食塩水 0.25 ml/100 g を皮下投与した。

（1）視覚系に及ぼす影響

投与期間終了後，眼底カメラ（RC-2：コーワ）により眼底を観察し，16時間の暗順応後，（1）ERG，（2）早期受容器電位（ERP）（3）脳波視覚誘導電位（VEP）を暗順応下及び明順応下（125ルックス）で以下のように観察記録した。

前述の方法にて ERG 用電極を装着後，0.3 ジュールの刺激光で ERG を観察・記録し，40ジュールの刺激光で ERP を記録した。

VEP 記録には，ラット頭部皮膚と骨膜を切除し，直径 1.5 mm のネジ電極を十字縫合の右方 3 mm，下方 6 mm と嗅球上の頭蓋骨に埋め込み，刺激光として 0.3 ジュールのキセノ

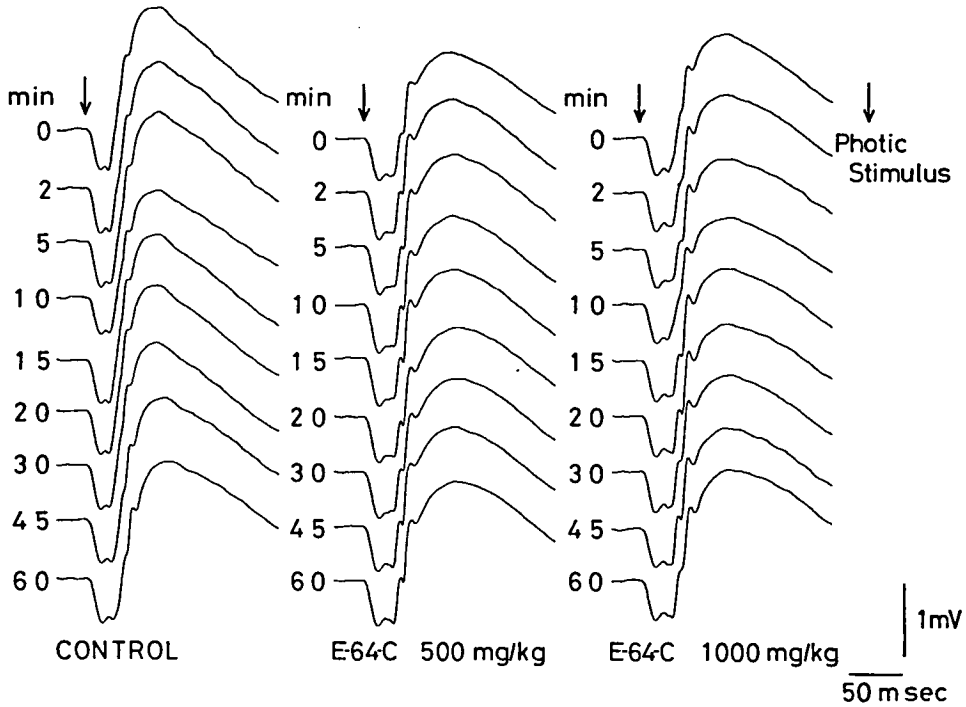


図 3 E-64-c 500 mg/kg 及び 1000 mg/kg を静脈内投与した場合の ERG 変化

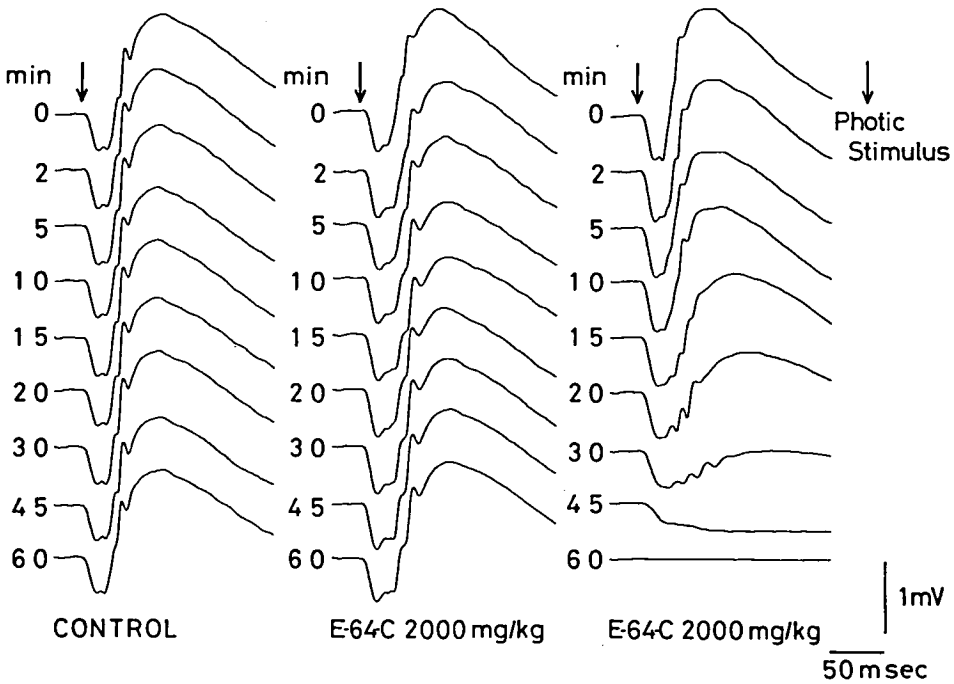


図 4 E-64-c 2000 mg/kg を静脈内投与した場合の ERG 変化
右の例には死亡例における変化を示す

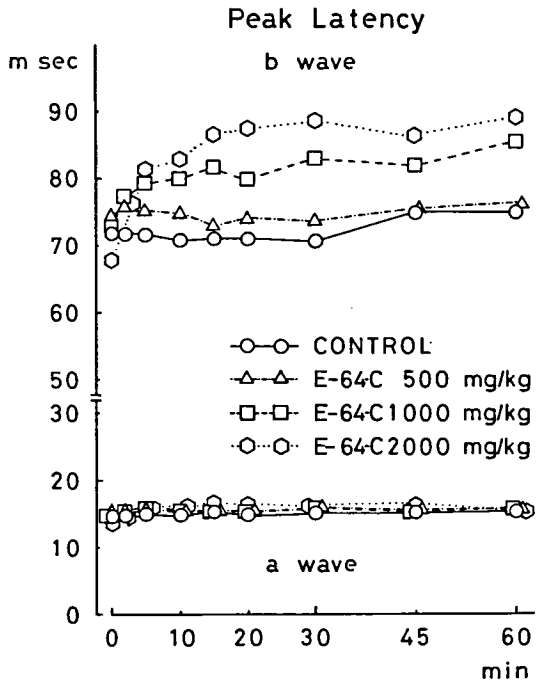


図 5 E-64-c の静脈内投与による ERG 頂点潜時の変化

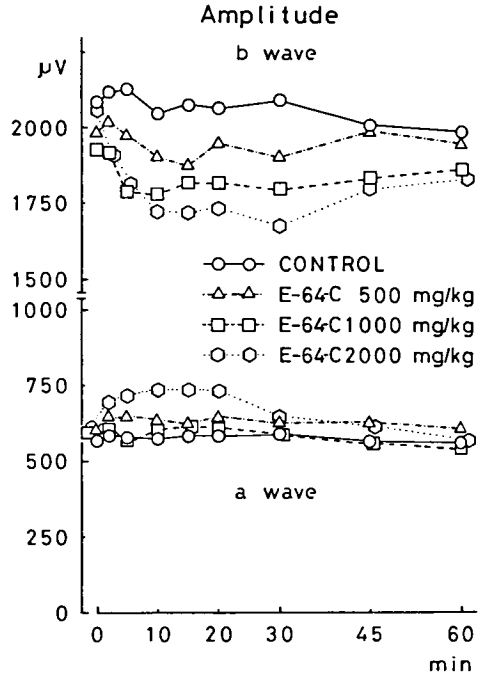


図 6 E-64-c の静脈内投与による ERG 振巾の変化

ン光を3秒に1回の頻度で30回ラット左眼に照射した。VEP の増幅は前置増幅器とブラウン管オシロスコープにより行い，電位はデーターレコーダー（DFR-3915：ソニー・マグネスケール）を介して，データ処理装置にて加算した。

電気生理学的検査は，最初，暗順応下で ERG, ERP, VEP の順に10分間隔で行った後，明順応下（125ルックス）で20分間放置し，VEP, ERG, ERP の順に10分間隔で行った。

ERG, ERP 及び VEP の計測は図2の様式にて行った。

（2）聴器に及ぼす影響

投与期間終了後，全例の動物について耳介反射を利用した聴力検査を行った。

耳介反射閾値の測定は動物用プライエル・オージオメーター（PA-1：永島医科器械）を用い，0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15及び20 kHz の周波数について行った。

3. 推計学的処理

測定値は平均と標準偏差を求めて，t 検定により平均値の有意性を検討した。

結　　果

1. E-64-c の網膜機能に対する作用

暗順応ラットに生理食塩水，E-64-c 500 及び 1000 mg/kg を静脈内投与した場合の ERG 変化を図3に示し，E-64-c 2000 mg/kg を静脈内投与した場合の ERG 変化を図4に示した。

また，E-64-c 投与後の ERG 各指標の変化を図5及び6に示した。

対照群（生理食塩水投与）及び E-64-c 500 mg/kg 投与群では，静脈内投与後60分まで顕著な変化は認められなかったが，E-64-c 1000 及び2000mg/kg投与群では，b波頂点潜時の延長及び振幅の減少が用量相関的に認められた。

なお，E-64-c 500 mg/kg 以上の投与により心拍数の減少が認められ，2000 mg/kg 投与

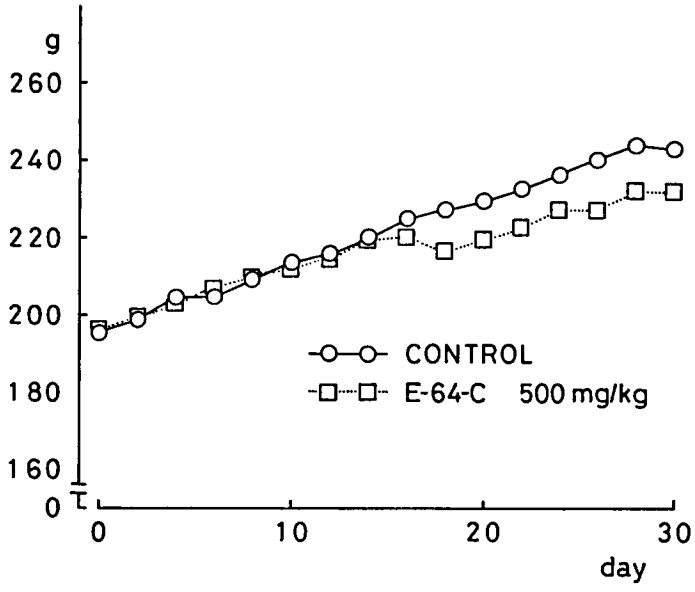


図 7 E-64-c を30日間皮下投与したラットにおける体重変化

群では1例が図4右のような ERG 変化を示し，投与後35分に死亡した。

2. E-64-c の視覚系及び聴器に及ぼす影響

E-64-c 500 mg/kg を 30 日間皮下投与した場合に，運動抑制が認められ，図7に示すように投与後18日目より体重増加の抑制傾向が認められた。さらに，投与後22日には1例の死亡が認められた。

(1)視覚系に及ぼす影響

1) 眼底検査

投与期間終了時の眼底検査において，何ら異常は認められなかった。

2) 視覚機能検査

E-64-c 500 mg/kg 投与群における ERG, ERP 及び VEP の測定結果をそれぞれ表1，2及び3に示した。

ERP 及び VEP の各要素には E-64-c 投与による変化が認められなかったが，ERG では a 波と b 波の振幅減少が認められた。しかし，個々の ERG 記録には顕著な変化は認められなかった。

(2)聴器に及ぼす影響

投与期間終了時に測定した耳介反射閾値の平均値は表4に示すとおりで，E-64-c 500 mg/kg 投与群では 20 kHz の刺激音に対して反射閾値の上昇が認められた。

考　察

視覚系は視覚受容器及び中枢への伝導路のほか，数多くの付属器を含む感覚系であり，臨床上では多様な検査法により障害の検索がなされている。これら諸検査法のうち ERG は網膜の機能をよく反映するとされており，ERG 各波の発生部位についてもほぼ明確にされている[2)~4)]。

E-64-c を静脈内に投与した場合，1000 mg/kg 以上で ERG b 波が顕著に変化し，E-64-c が双極細胞[5)]あるいはミュラー細胞[6)]に何らかの影響を与えることが示唆された。しかし，b 波は酸素の影響を受け易く[7)]，E-64-c 投与により心拍数の減少が認められたことにより b 波の変化はアノキシア等の二次的な影響と考えられ，E-64-c は網膜神経機能に直接作用しないものと考えられる。

E-64-c 500 mg/kg を30日間皮下投与したラットにおいて，ERG 波形の変形は認められなかったが，ERG の計測の結果では a 波及び b 波振幅の減少が認められた。

ジアミノジフェニルアルカンの視覚毒性はタンパク質等のチオール基との反応によるとする

Ⅳ 全身的影響に関する研究

表 1 E-64-c を30日間皮下投与したラットにおける ERG の計測結果

Group	N	Peak Latency (m sec)		Amplitude (μV)	
		a wave	b wave	a wave	b wave
Dark Adaptation					
Control	12	26.5±1.4	72.4±2.7	455±49	2122±194
E-64-c 500 mg/kg	11	26.0±1.4	73.3±5.1	**401±31	*1955±150
Light Adaptation					
Control	12	—	46.2±3.4	—	46±12
E-64-C 500 mg/kg	11	—	47.1±5.2	—	52±10

*p<0.05 **p<0.01 Mean±S. D.

表 2 E-64-c を30日間皮下投与したラットにおける ERP の測定結果

Group	N	Peak Latency (m sec)	Amplitude (μV)
Dark Adaptation			
Control	12	1.11±0.08	39±4
E-64-c 500 mg/kg	11	1.05±0.09	42±5
Light Adaptation			
Control	12	1.12±0.08	22±7
E-64-c 500 mg/kg	11	1.13±0.09	23±7

Mean±S. D.

表 3 E-64-c を30日間皮下投与したラットにおける VEP の測定結果

Group	N	Dark Adaptation			Light Adaptation			
		Initial Wave	Wave I	Wave II	Wave I	Wave II	Wave III	Wave IV
Control	8	25.4±3.8	36.6±5.2	68.8± 7.8	11.9±1.8	34.9±7.7	56.8±9.2	85.5±18.4
E-64-c 500 mg/kg	8	23.0±5.0	36.4±2.5	60.2±10.1	13.7±2.5	38.9±7.3	61.3±6.3	86.7±13.0

Mean±S. D. (unit : m sec)

表 4 E-64-c を30日間皮下投与したラットにおける耳介反射閾値

Dose	Number of Animals	Frequency (KHz)									
		0.5	1	2	4	6	8	10	12	15	20
Control	12	39.3 ±4.5	36.0 ±4.1	25.5 ±3.1	23.2 ±5.2	5.5 ±4.1	16.2 ±4.0	16.3 ±4.7	15.3 ±5.3	26.3 ±5.1	26.0 ±7.5
E-64-c 500 mg/kg	12	36.9 ±2.3	36.0 ±3.1	25.1 ±5.5	21.5 ±4.7	6.2 ±3.5	14.9 ±2.1	16.2 ±2.3	15.8 ±2.6	28.5 ±2.2	*32.7 ±4.3

* p<0.05 Mean±S. D. (単位 : dB)

報告があり[8]，E-64-c はチオールプロテアーゼに特異的に作用するとされるものの，他のタンパク質に対しても作用する可能性があることを考慮すると，E-64-c 投与による ERG の振幅減少は，E-64-c の網膜内チオール基に対する作用が反映されたものとも考えられる。

一方，聴覚に関しても，20 kHz の音に対する耳介反射閾値の上昇が認められた。この変化は薬物による聴器障害の初期変化として認められるものであるが[9]，反射閾値の上昇が軽度であり，20 kHz の音に対してのみ認められたことにより，E-64-c が聴覚系に影響を及ぼす薬物とは断定できなかった。

以上のように，E-64-c は視覚及び聴覚に影響を及ぼす可能性が示唆されたが，いずれの変化も軽度であったことから，より長期の連続投与により詳しく検討することが必要と考えられる。

結　論

E-64-c の視覚及び聴覚に及ぼす影響をラットにおいて検討した結果，視覚，聴覚とも軽度の影響が認められた。

文　献

1）蓮井勲：シロネヅミの網膜電図，一般波形及び早期電位について，日眼，**72**，364—376，1968.

2）Granit, R.: The components of the retinal action potential and their relation to the discharge in the opfic nerve, J. physiol., **77**, 207～240, 1933.

3）Cone, R. A.: Early receptor potential: photo reversal change displacement in rodopsin, Science, **155**, 1128～1131, 1967.

4）米村大蔵，河崎一夫：網膜電図の臨床応用一律動様小波を中心として。日本医事新報，No. 2538, 23—27 1972.

5）Brawn, K. T.: The elctroretinogrm: Its components and their origins, Vision Res. **8**, 633～677, 1968.

6）Tomita, T. Electrophysiological studies of retinal cell function, Invest. Ophthalmol., **15**, 171～187, 1976.

7）Brawn, K. T. and Murakami, M.: A new receptor potential of the mokey retina with no detectadl latency, Nature, **201**, 626～628, 1964.

8）Reading, H. W.: Effect of a retinotoxic phenoxyalkane on the visual cycle in rabbit retina, Biochem. Pharmacol, **19**, 1303～1313, 1970.

9）秋吉正豊：抵生物質による聴器障害の病理，動物の内耳の病理組織像を中心に，Medicina, **10**, 881～888, 1973.

19. E-64-c の薬効に関する研究 (1)

～筋ジストロフィーチキンに対する薬効試験～

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* 鬼 沢 幸 男* 岸 恭 子*
岩 松 裕 子* 花 田 和 紀* 玉 井 正 晴*
柏 木 敬 子*

目　的

筋ジストロフィーチキン (line 413) に E-64-c を 80 日間連続皮下投与して，その治療効果を検討する。

方　法

(1)動物：孵化後10日目の筋ジストロフィーチキン (line 413) 雌雄を1群10～12羽あて群別し，また対照として同日令の正常チキン (line 412) の雄5羽，雌6羽を使用した。

(2)投与量及び投与方法：E-64-c は重曹水にて中和溶解後，生理的食塩水に混和し7.5及び15.0% (w/v) 液を調整した。投与量は 150 及び 300 mg/kg とし，体重 100 g あたり 0.2 ml の液量を1日2回 (AM 9:00 及び PM 4:00) に等分して 80 日間腹側部皮下に投与した。対照群には生理的食塩水を同様に投与した。なお，正常チキンは無処置とした。

(3)検査項目：投与期間中は 10 日間隔に体重，血漿中の PK, CPK 及び LDH 活性の測定ならびにフリップテストを行った。

フリップテストの判定法は，両羽を広げた状態で静かに仰臥させ，それからの起立能力とした。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点とした。この操作を5回くり返して起立回数をもとめた。

80日間の投与終了時に断頭により放血屠殺して浅胸筋を採取し，これらの組織学的，組織化学的検索ならびに筋中の Ca^{++}-activated neutral protease (CANP) 活性の測定を行った。浅胸筋の採取部位は，検索部位を統一するために鎖骨直下，胸骨近位部の外表膜を含めその直下部を選んだ。

組織学的，組織化学的検索用として採取した筋は液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結し，10 μ の連続切片を作成し，H. E., acid phosphatase, acetylcholinesterase, PAS, NADH-TR 染色を施し，各群での比較検討を行った。筋線維直径は H. E. 染色標本から最終倍率250倍の写真を作成し，各々300本の筋線維径を計測して作成したヒストグラムで比較した。また，壊死線維に対する抑制効果をみるために壊死線維の貪食細胞に陽性反応を示すacid phosphatase 染色標本から 100 mm^2 stück における壊死線維数をかぞえて記録した。

筋肉中の CANP 活性は杉田等の方法[1]に従って，筋ホモジネートより等電点沈澱法で得た画分の活性を測定した。なお，測定感度を上げるために N. Jentoft の方法[2]に準じて調整した [^{14}C]-メチルカゼインを基質として使用した。測定法を図1，基質製造法を図2に示す。

結　果

フリップテストの結果を各々の群ごとに起立能力の平均値として表1に示す。

* 大正製薬株式会社総合研究所

Reaction mixture (0.2 ml)
- 0.23% [^{14}C]-methyl-casein (0.2 μCi/mg)
- 70 mM glycerophosphate buffer, pH 7.5
- 30 mM 2-mercaptoethanol
- 20 μl enzyme (prepared by the method of Ishiura *et al.*)
- 6 mM $CaCl_2$ (presence and absence)

↓ 30°C, 30 min

← 0.2 ml of 10% TCA

↓ 0°C, 20 min

↓

centrifugation 3000 rpm, 10 min

ppt. ← | ↓ sup.

determination of radioactivity (0.1 ml)

図 1 チキンの筋中 CANP 活性測定法

Reaction mixture (20 ml)
- 300 mg Casein (Hammarsten)
- 20 mM [^{14}C]Formaldehyde (0.5 mCi/m mol)
- 0.1 M HEPES buffer, pH 7.5
- 40 mM $NaCNBH_3$

↓ 24 hr at 25°C

Dialysis against 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0

↓

[^{14}C]-Methyl-casein

240 mg; 98 μCi (0.41 μCi/mg)

図 2 [^{14}C]-メチルカゼインの製造法

表 1 E-64-c を処置した筋ジストロフィーチキンのフリップステストにおける平均起立回数

	10	20	30	40	50	60	70	80 days
Male								
Control	2.25	1.25	0.58	0.42	0.17	0.58	0.33	0.42
E-64-c 150 mg/kg	3.18	1.64	0.55	0	0	0	0	0
300 mg/kg	2.45	2.55	0.91	0.36	0	0	0	0
Female								
Control	4.40	4.80	2.10	1.00	0.80	0.90	0.70	1.40
E-64-c 150 mg/kg	4.60	4.20	1.90	1.30	0.80	0.50	1.00	1.70
300 mg/kg	1.80	2.40	1.40	0.70	0	0.80	0.80	0.80
Total Mean FN								
Control	3.23	2.86	1.27	0.68	0.45	0.73	0.50	0.86
E-64-c 150 mg/kg	3.86	2.86	1.19	0.62	0.38	0.24	0.48	0.81
300 mg/kg	2.14	2.48	1.14	0.52	0	0.38	0.38	0.38

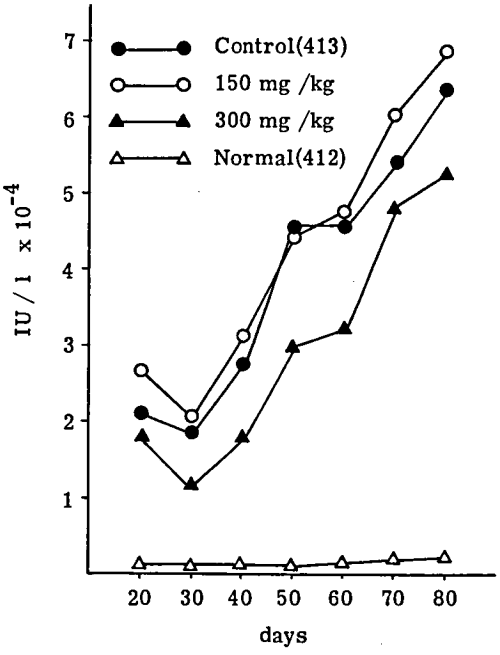


図 3 E-64-c 処置による雄筋ジストロフィーチキンの血漿中 CPK 活性

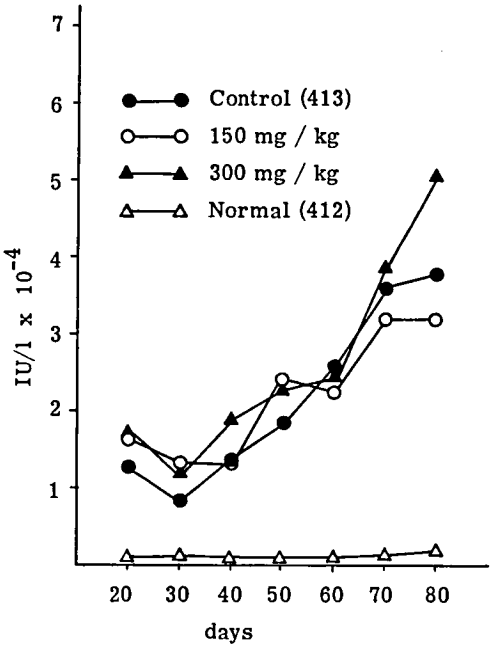


図 4 E-64-c 処置による雌筋ジストロフィーチキンの血漿中 CPK 活性

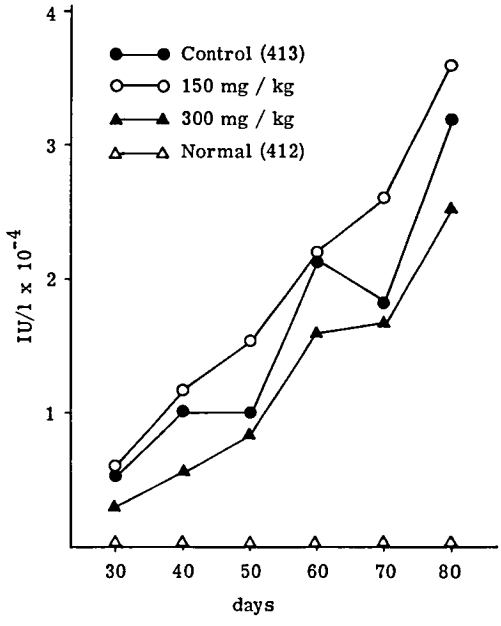


図 5 E-64-c 処置による雄筋ジストロフィーチキンの血漿中 PK 活性

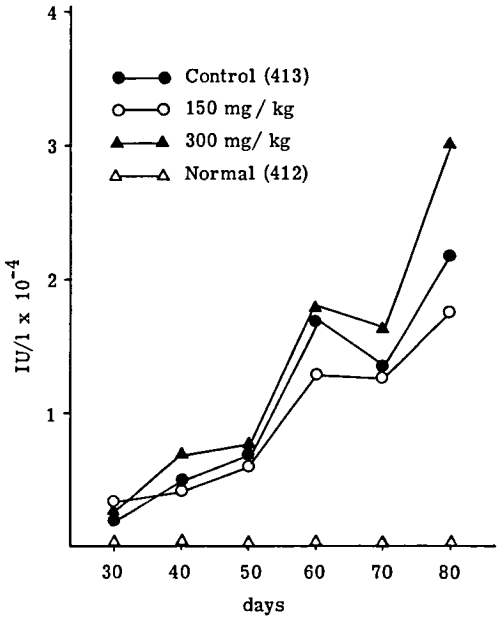


図 6 E-64-c 処置による雌筋ジストロフィーチキンの血漿中 PK 活性

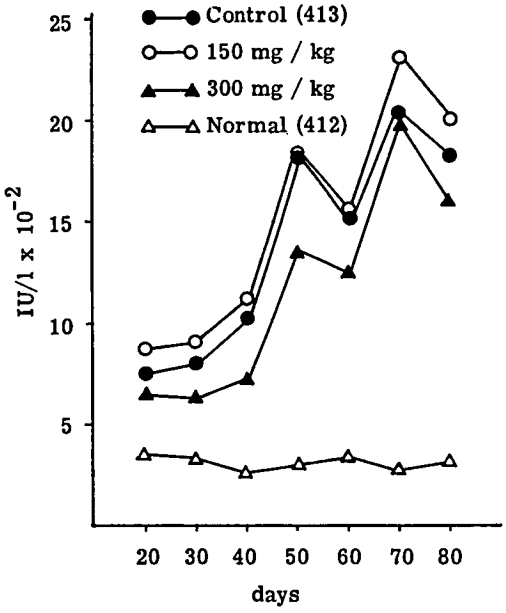


図 7 E-64-c 処置による雄筋ジストロフィーチキンの血漿中 LDH 活性

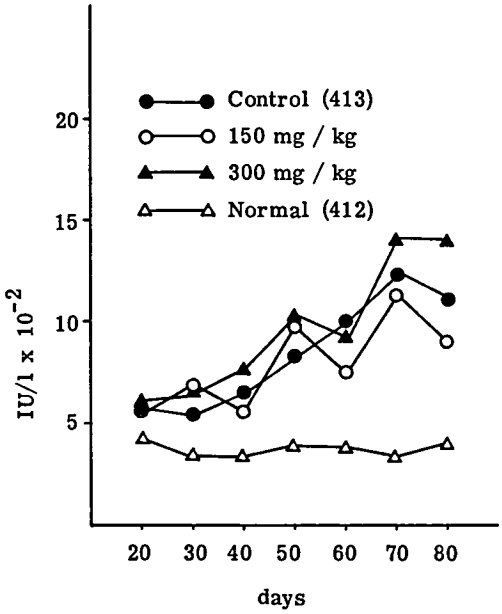


図 8 E-64-c 処置による雌筋ジストロフィーチキンの血漿中 LDH 活性

起立能を雌雄間で比較すると，いずれの検査日においても雌の方が高い起立頻度を示した。対照群と E-64-c 治療群との比較ではむしろ後者の方が低頻度の起立能を示し，E-64-c による起立改善はうかがわれなかった。

血漿中の CPK, PK, LDH 活性の各検査結果を図3～8に示す。

各活性値とも対照群との間に有意な差は認められなかった。

投与終了時における浅胸筋の組織学的，組織化学的検索結果では，対照群の筋ジストロフィーチキンの浅胸筋に，肥大線維が多数存在し，筋線維の大小不同が著明で，強い貪食反応を受ける壊死線維が散在性にみられ，その貪食細胞に acid phosphatase 活性が認められた。また PAS, 酸化酵素反応 (NADH-TR), あるいは acetylcholinesterase 等の各染色で，それぞれ活性の高い線維が多くみられ，いずれも筋ジストロフィーチキンに特徴的な変化が確認された。

正常チキン群と筋ジストロフィーチキンの対照群との筋線維径の分布を図9に示す。

筋ジストロフィーチキンは正常チキンに比べ大型線維が多く，小径のものから大径へと幅広い分布を示した。次に筋ジストロフィーチキンの対照群と E-64-c の各治療群との筋線維径の分布を図10，11に示す。

E-64-c の各治療群における筋線維の直径は対照群のそれに比べてむしろ大径化を示し，60 μ以上の肥大線維の数は増加し，正常チキンの分布パターンへの改善はみられなかった。

表2に各群の 100 mm² stück における壊死線維数を示す。

対照群に比べ，各治療群ではむしろ壊死線維数の増加傾向がみられ，E-64-c の壊死線維に対する抑制効果は認められなかった。

さらに，PAS や NADH-TR, acetylcholinesterase の各活性も各治療群と対照群とはほぼ同等な反応結果が得られ，両者間に明らかな差は認められなかった。

筋肉中の CANP 活性の測定結果を表3に示す。

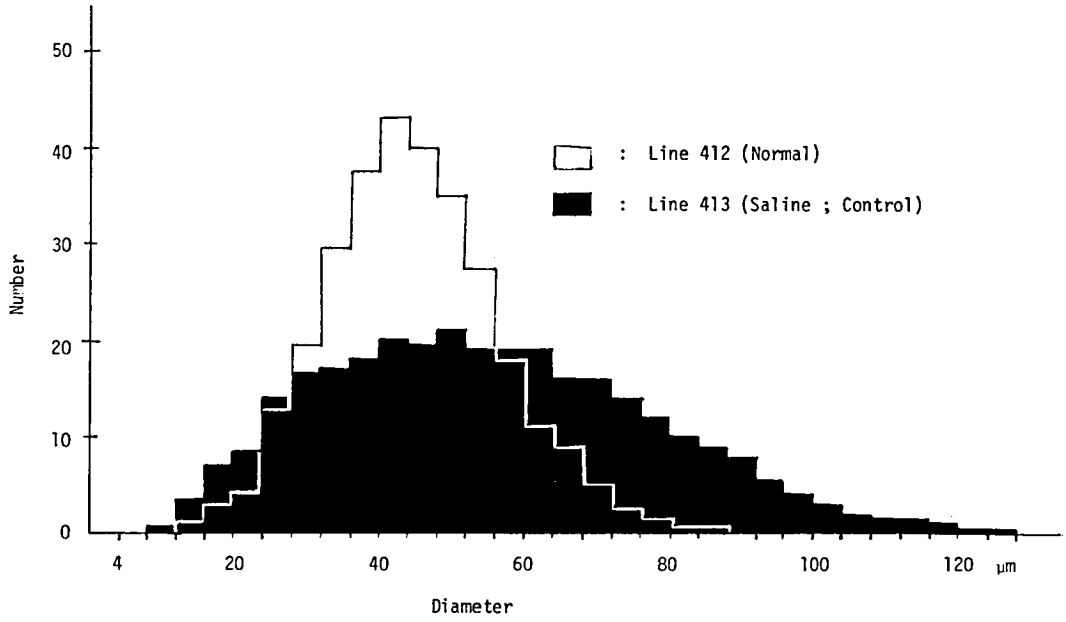


図 9 正常チキン及び筋ジストロフィーチキン（対照群：雄）浅胸筋の筋線維径ヒストグラム

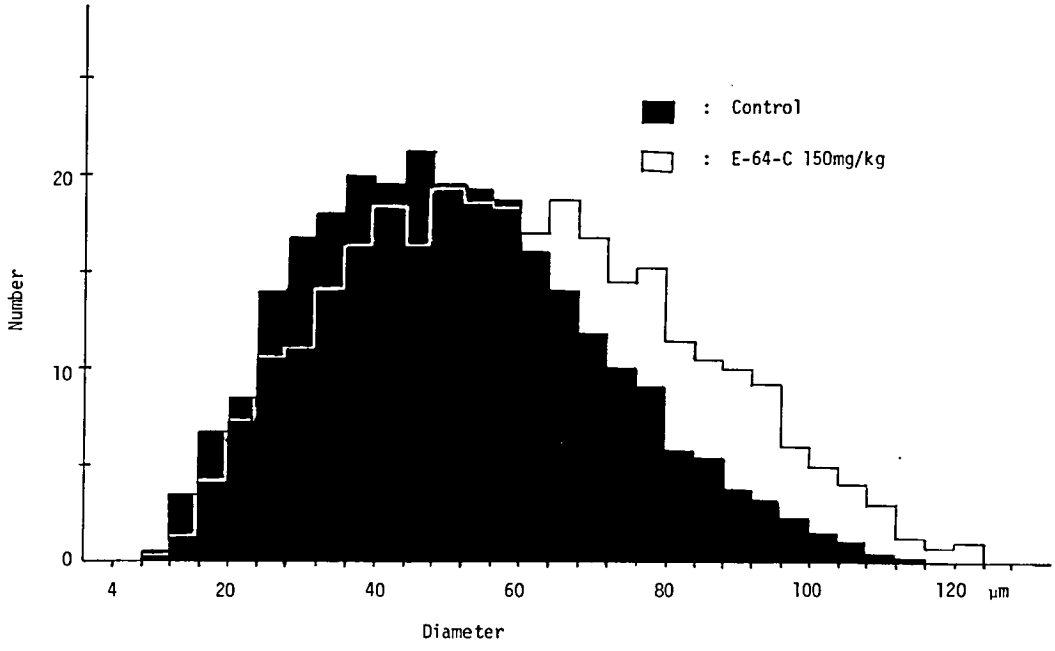


図 10 無処置（対照群）及び E-64-c 150 mg/kg 処置した筋ジストロフィーチキン（雄）浅胸筋の筋線維径ヒストグラム

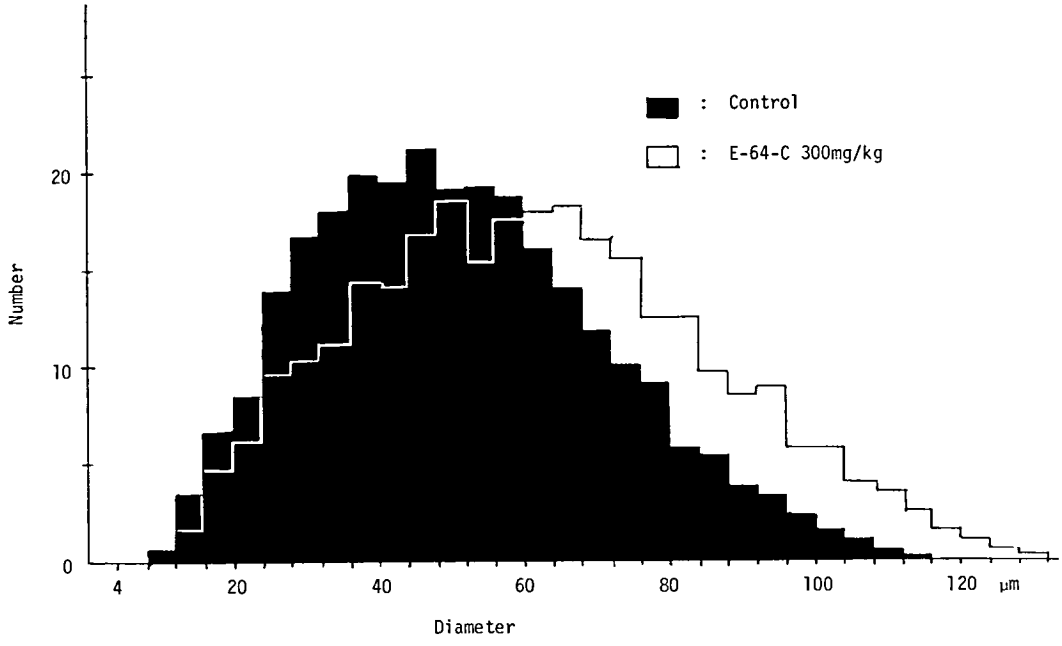


図 11　無処置（対照群）及び E-64-c 300 mg/kg 処置した筋ジストロフィーチキン（雄）浅胸筋の筋線維径ヒストグラム

表 2　E-64-c を処置した筋ジストロフィーチキン（雄）浅胸筋の壊死線維数　— per 100 mm² —

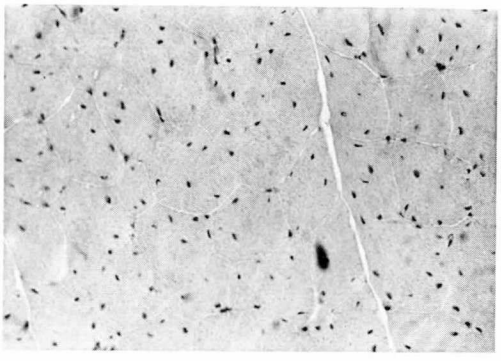
Groups	Aninal No.	Number of necrotizing fibers
Control	10	122.7±53.3
E-64-c 150 mg/kg	8	155.8±66.4
300 mg/kg	10	127.0±62.2

Mean±S. D.

表 3　E-64-c 処置による筋ジストロフィーチキン浅胸筋中の CANP 活性

	Male		Female	
	cpm±SD	n	cpm±SD	n
Control (413)	6686±1864	12	4743± 759	10
150 mg/kg	5222±2199	11	3451± 959	10
300 mg/kg	5389±1684	11	3751± 852	10
Normal (412)	416˜±2780	4	2593±1172	7

1



2

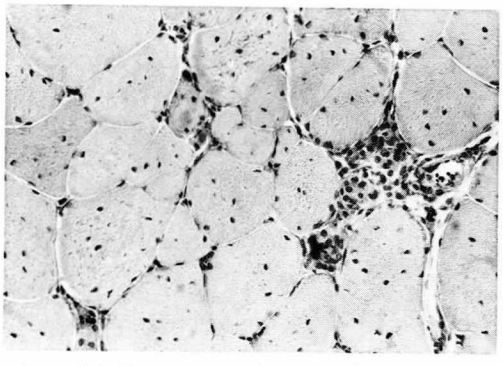


写真 1 浅胸筋(正常チキン) ×100 H. E.

写真 2 浅胸筋(対照群筋ジストロフィーチキン) 筋線維の大小不同及び貧食反応を伴う壊死線維 ×100 H. E.

3

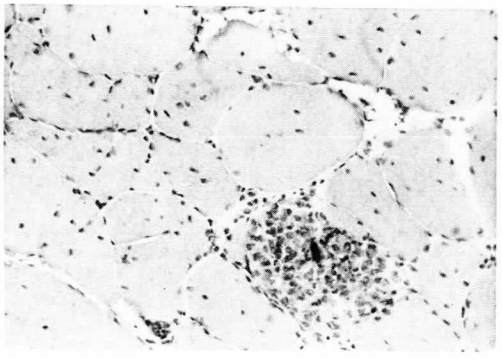


写真 3 浅胸筋 (E-64-c 300 mg/kg 治療群, 筋ジストロフィーチキン)
写真2より筋線維の大径化を示すが, その他は同様所見 ×100 H. E.

対照群の筋ジストロフィーチキンでは正常チキンの約1.6〜1.8倍の CANP 活性値の上昇が認められた。またこれらの値は雌雄の間でかなりの差があり, 雄の方が約 1.5 倍の高い値を示して発症度と一致した傾向がみられた。

E-64-c の投与により CANP 活性は低下する傾向がみられ, 明瞭な用量依存性は認められないものの, 雄の 150 mg/kg 群では有意な低下がみられた。

考　　察

筋ジストロフィーチキンに E-64-c を150及び 300 mg/kg 80 日間皮下投与して, その治療効果を検討した結果, フリップテスト及び罹患浅胸筋の組織学的, 組織化学的検索において, 機能的及び形態的変化の改善を示唆する所見は得られなかった。一方, 筋肉中の CANP 活性は E-64-c 投与により低下する傾向がみられたが, 上記各所見との相関は認められなかった。本報で用いた CANP 活性の測定法は筋肉中の全活性 (不活性型も含めて) を測定する方法であり, 生体内で実際に作動している CANP 活性を観察するという意味では問題の残る方法である。今後, さらにすぐれた測定法の開発が必要であろう。

今回の投与量は, われわれが先に行った 40, 100 mg/kg 投与によるパイロット試験の成績において毒性的所見がほとんど得られなかったこと, また鶏における血中濃度がラットに比べてかなり低いことから設定したものである。しかし, 今回の場合, この高投与量ではすでに物質代謝障害が誘発され, その他にも何等かの非特異的な影響のあったことが推察され, 効果判定としては他の要因がかかわり過ぎており, またこれらの要因が効果発現の妨害になったことも考えられ, *in vitro* における種々の効力結果を考慮に入れると, より低用量の方が結果的には適していたように思われる。一方, 最近, 筋ジストロフィーチキンは病態モデル動物としての適性に若干の問題点も指摘されており, 今後, より多様な病態モデル動物での検討が必要と思われる。

結　　論

筋ジストロフィーチキンに E-64-c を 80 日間投与して機能及び組織形態面から治療効果を検討した結果，筋肉中の CANP 活性の低下傾向がみられたが，その他のいずれの所見においても改善効果は得られなかった。今後，筋ジストロフィーチキンを用いて E-64-c の薬効評価を行う場合，E-64-c の適用量の検討がさらに必要であろう。他の病態モデル動物における薬効の評価についても検討の余地があると思われる。

文　　献

1）杉田秀夫，石浦章一：各種神経筋疾患の CANP 活性，厚生省筋ジス（三好班），昭和54年度報告書.
2）N. Jentoft and D. G. Dearborn : Labeling of proteins by reductive methylation using sodium cyanoborohydride, J. Biol. Chem., 254, 4359-4365, 1979.

20. E-64-c の薬効に関する研究 (2)

～Serotonin myopathy に対する E-64-c の効果～

大 関 正 弘*

研究協力者 相 原 弘 和* 土 田 武 司* 倉 地 道 雄*

目　的

Serotonin myopathy は薬物により発症する myopathy として1971年 MENDELL ら[1] により報告されて以来，DUCHENNE 型ジストロフィー症との比較に関する多くの報告が提出されている[2][3]。我々は，昨年 Serotonin myopathy における行動，筋肉重量，血中 Creatine phosphokinase (CPK) 活性，光顕像等についてその特徴を明らかにした[4]。今回はさらに種々の血中酵素活性，電顕像及び血中アミノ酸濃度について検討を加え，Serotonin myopathy の特徴を明らかにしたうえで，E-64-c の効果を検討した。

方　法

(1) Serotonin myopathy の作成

Wistar 系雄性ラット（体重 120～140 g）に1日1回 Imipramine•HCl (Imip.) 10 mg/kg を4日間腹腔内投与し，4日目の Imip. 投与の6時間後に Serotonin Creatinine Sulfate (Serotonin) 75 mg/kg を腹腔内投与した。また，この4日間を 1-cycle とし 3-cycle まで繰り返し投与を行った。E-64-c 及び対照薬としての抗セロトニン剤 Cyproheptadine•HCl は，1日1回 Imip. 投与の4時間後に毎日皮下投与した。

(2) 血中酵素活性及びアミノ酸分析

1-，2- 及び 3-cycle のラットより，Serotonin 投与の 1, 2, 4 及び8時間後に heparinized syringe で心臓から採血し，3,000 rpm 20分間遠沈し，血漿を調製した後，その酵素 (Creatine phosphokinase; CPK, Lactate dehydrogenase ; LDH 及び Pyruvate kinase; PK) 活性及び各種のアミノ酸含量を測定した。なお，CPK 及び PK はそれぞれ Rosalki 法[5] 及び Boyer 法[6] を用い，LDH および各種アミノ酸はそれぞれ自動分析装置（日立 712 型）及び高速アミノ酸分析計（日立 835 型）により測定した。

(3) 電顕試料の作製

ラットの大腿四頭筋を採取し，2.5% グルタルアルデヒド（リン酸緩衝）溶液及び 1% オスミウム酸（リン酸緩衝）溶液により二重固定を行った後，50%からの上昇アルコール系列で脱水し，プロピレンオキシドを経て Epon-812 に包埋した。電顕観察用の超薄切片作製に際しては，予め 1.0～1.5 μm の光顕用切片を作りこれにトルイジンブルー染色を施し電顕的検索の視野の選定を光顕的に行った。超薄切片はライヘルトミクロトーム (Om U 2) で作製し，酢酸ウランと鉛の二重染色を施し，電子顕微鏡（日立 HU-12 A）で観察した。

結　果

(1) 血中酵素活性

Serotonin myopathy において CPK, LDH 及び PK 活性すべてが，正常レベルより上

* 大正製薬株式会社総合研究所

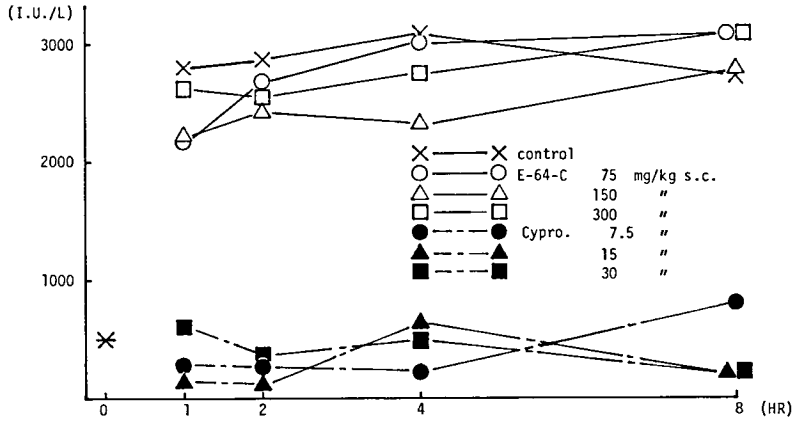


図 1　セロトニン投与後の血漿中 CPK 活性の変化及び薬物の影響 (1-cycle)　横軸；セロトニン投与後の時間　*; intact rat の CPK 活性

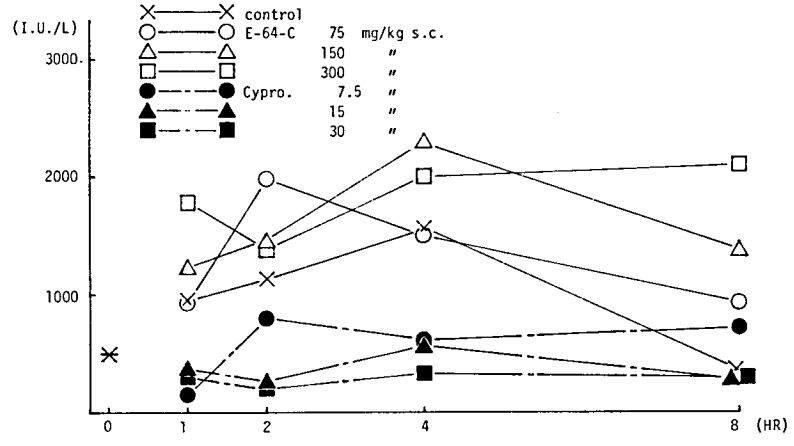


図 2　セロトニン投与後の血漿中 CPK 活性の変化及び薬物の影響 (2-cycle)　横軸；セロトニン投与後の時間　*; intactrat の CPK 活性

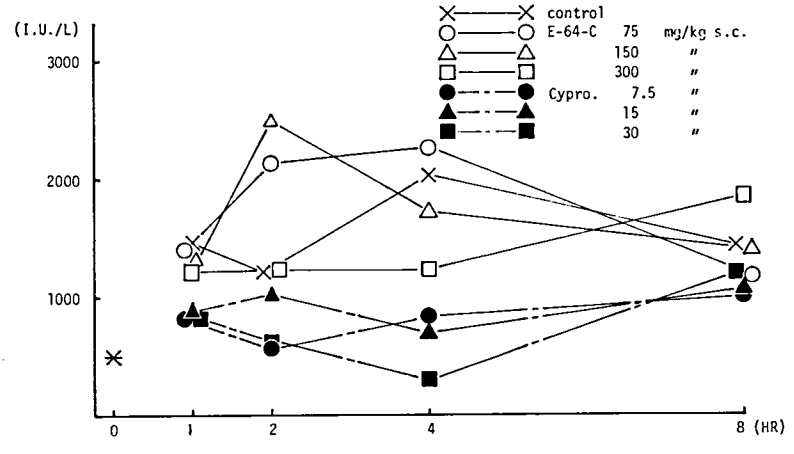


図 3　セロトニン投与後の血漿中 CPK 活性の変化及び薬物の影響 (3-cycle)　横軸；セロトニン投与後の時間　*; intact rat の CPK 活性

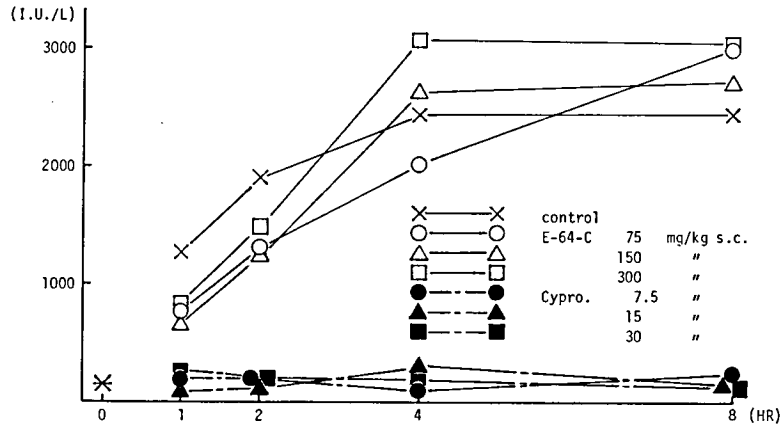


図 4 セロトニン投与後の血漿中 LDH 活性の変化及び薬物の影響 (1-cycle) 横軸；セロトニン投与後の時間 *; intact rat の LDH 活性

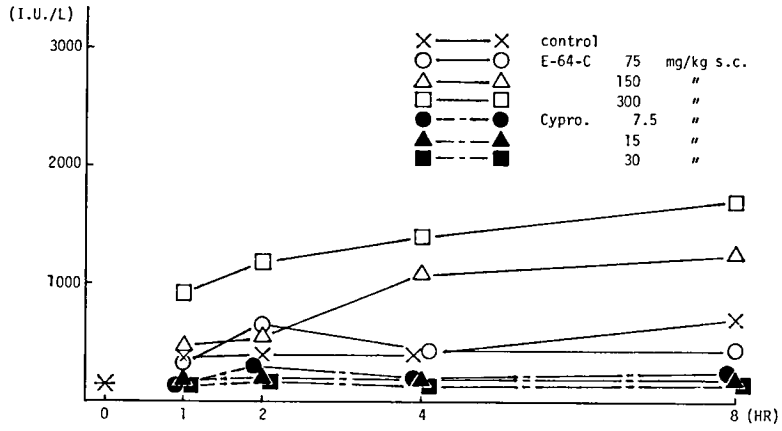


図 5 セロトニン投与後の血漿中 LDH 活性の変化及び薬物の影響 (2-cycle) 横軸；セロトニン投与後の時間 *; intact rat の LDH 活性

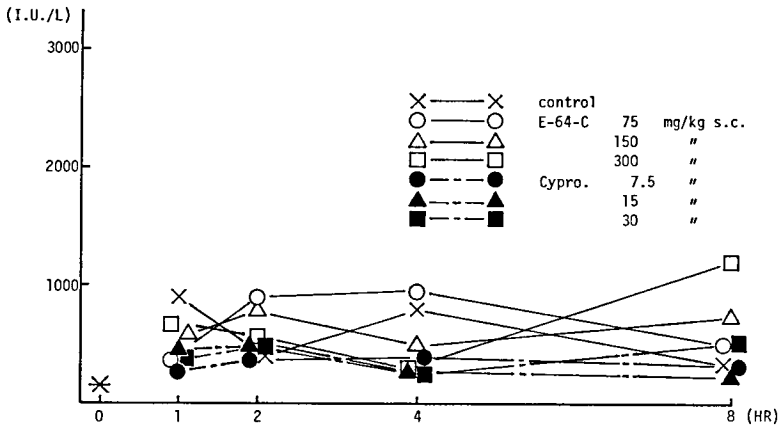


図 6 セロトニン投与後の血漿中 LDH 活性の変化及び薬物の影響 (3-cycle) 横軸；セロトニン投与後の時間 *; intact rat の LDH 活性

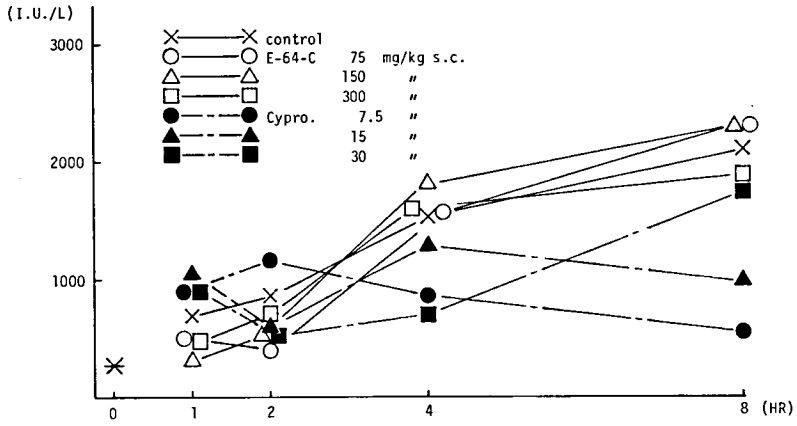


図 7　セロトニン投与後の血漿中 PK 活性の変化及び薬物の影響 (1-cycle)　横軸；セロトニン投与後の時間　*; intact rat の PK 活性

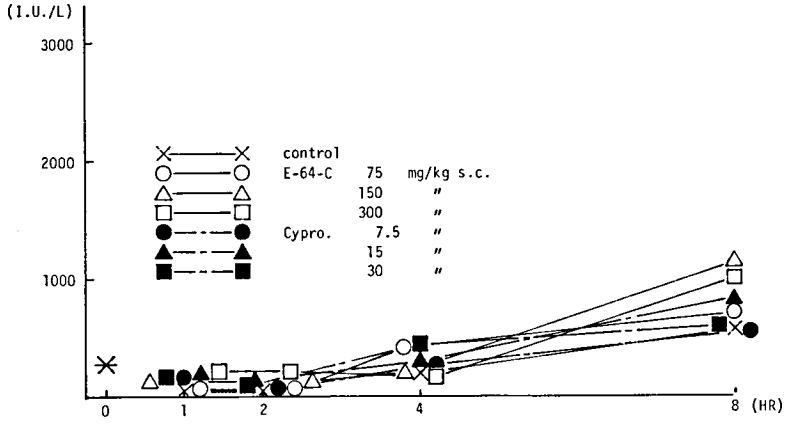


図 8　セロトニン投与後の血漿中 PK 活性の変化及び薬物の影響 (2-cycle)　横軸；セロトニン投与後の時間　*; intact rat の PK 活性

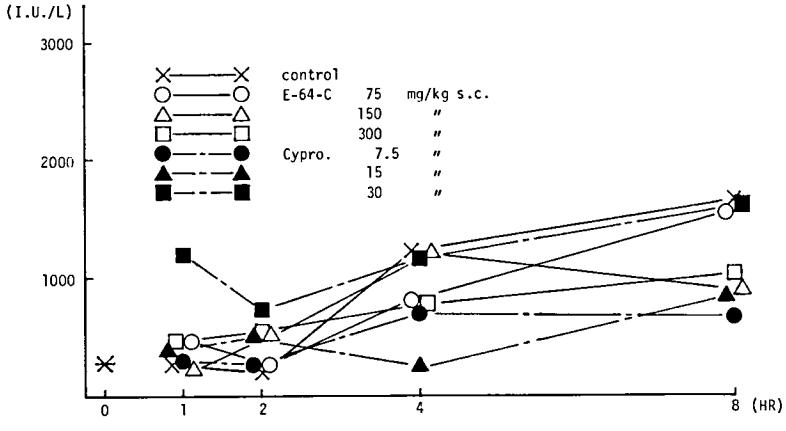


図 9　セロトニン投与後の血漿中 PK 活性の変化及び薬物の影響 (3-cycle)　横軸；セロトニン投与後の時間　*; intact rat の PK 活性

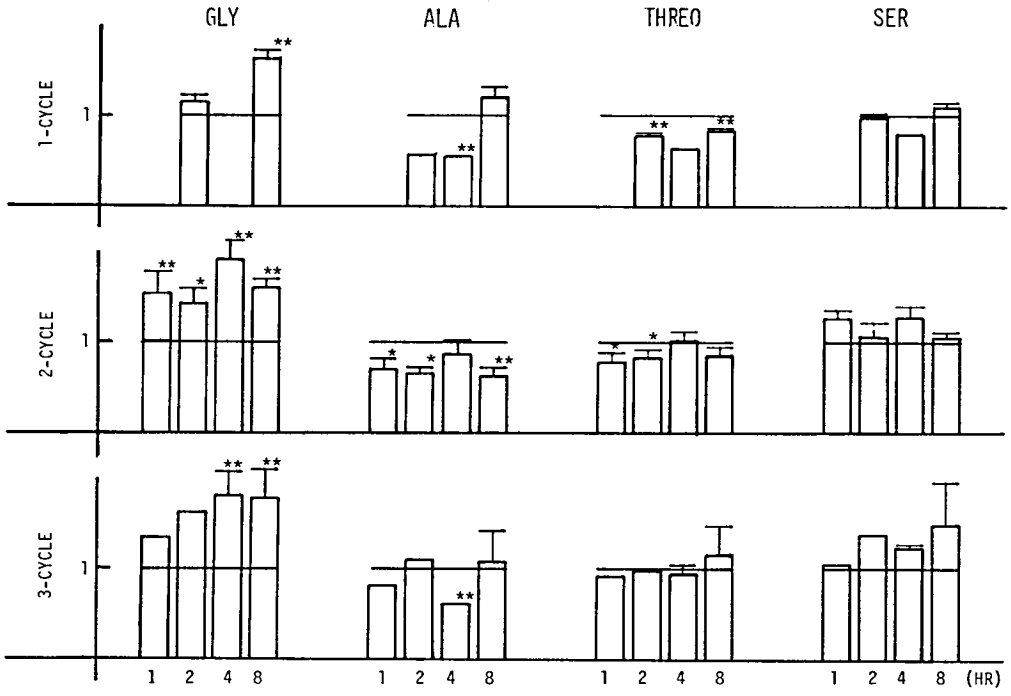


図 10 血漿中の糖新生アミノ酸含量 横軸；セロニトン投与後の時間 縦軸；intact rat の血漿中含量に対する比 GLY；glycine, ALA；alanine, THREO；threonine, SER；Serine. ＊；P<0.05, ＊＊；P<0.01.

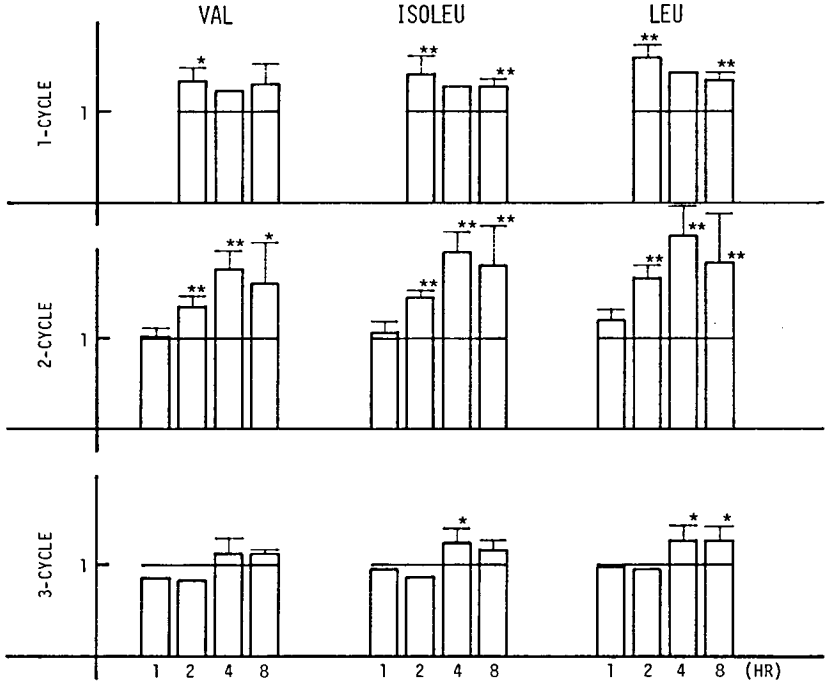


図 11 血漿中の側鎖型アミノ酸含量 横軸；セロトニン投与後の時間 縦軸；intact rat の血漿中含量に対する比 VAL；valine, ISOLEU；isoleucine, LEU；leucine. ＊；P<0.05, ＊＊；P<0.01.

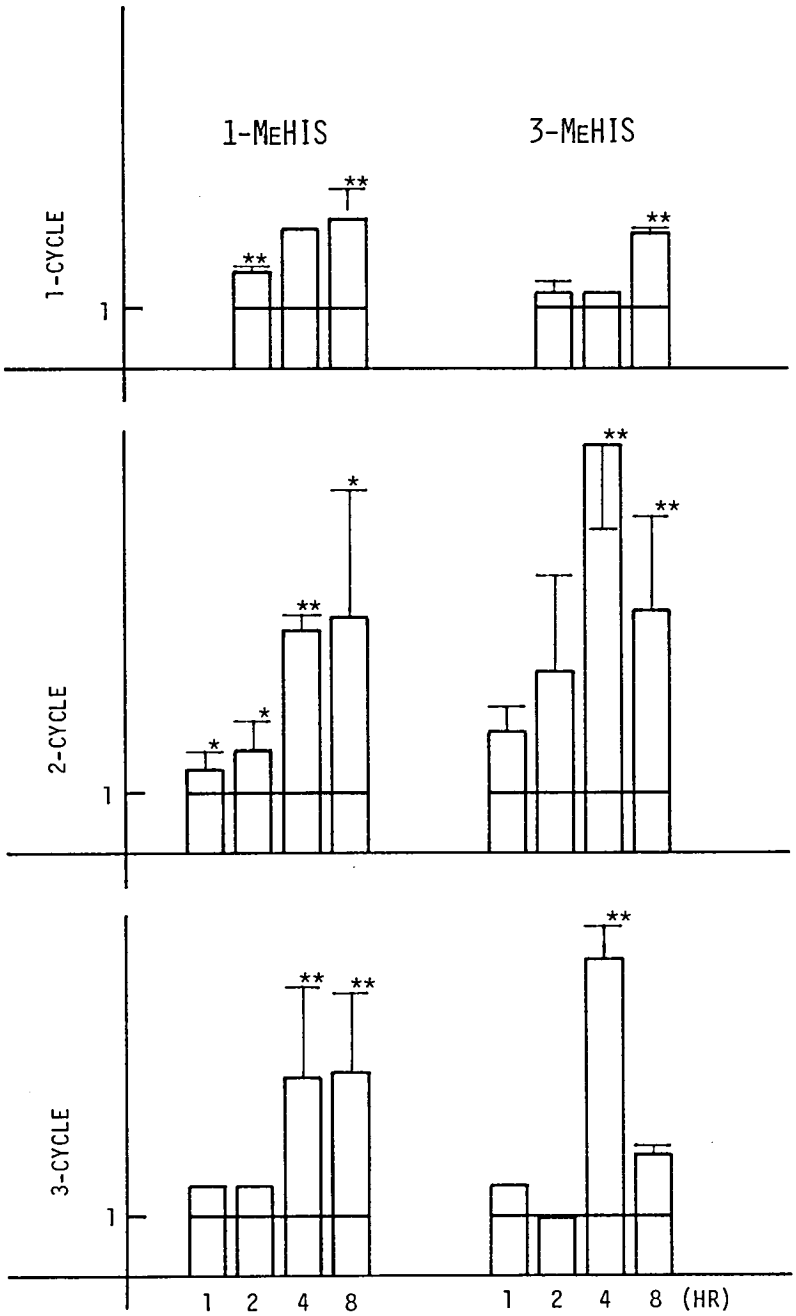


図 12　血漿中の N-メチルヒスチジン含量
横軸；セロトニン投与後の時間　縦軸；intact rat の血漿中含量に対する比
1-MEHIS；1-メチルヒスチジン，3-MEHIS；3-メチルヒスチジン，＊；P<0.05，＊＊；P<0.01

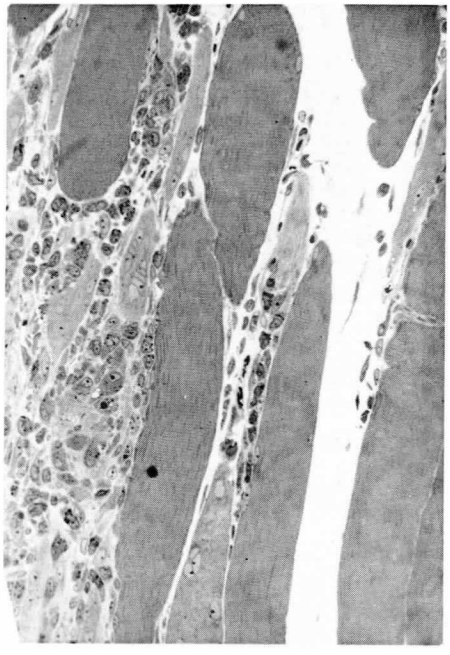


写真 1 大腿四頭筋，トルイジンブルー染色，250 倍
セロトニン myopathy, control

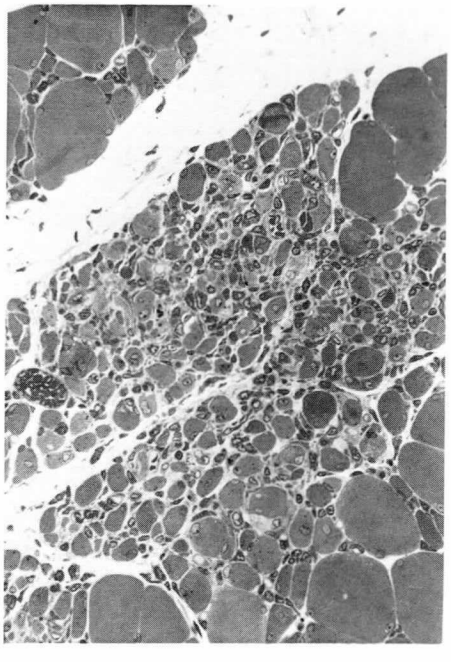


写真 2 大腿四頭筋，トルイジンブルー染色，250 倍
セロトニン myopathy, E-64-c 投与

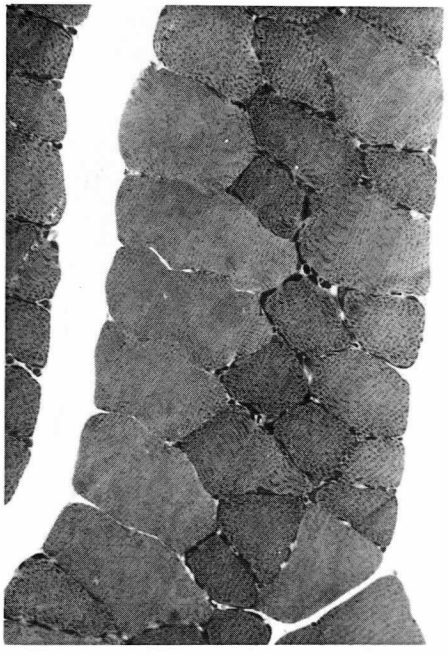


写真 3 大腿四頭筋，トルイジンブルー染色，250 倍
セロトニン myopathy, cyproheptadine 投与

昇していた。

これらの上昇率は cycle が進むに従って減少した。また，E-64-c (75, 150 及び 300 mg/kg s. c.) はこれらの活性上昇を抑制しなかった。他方，抗セロトニン剤である Cyproheptadine•HCl (7.5, 15 及び 30 mg/kgs. c.) 群では，血中酵素活性は PK を除いて正常レベルにあった。

(2) 血中アミノ酸濃度

発症ラットにおける糖新生アミノ酸，側鎖型アミノ酸及び N-メチルアミノ酸について検討したところ，側鎖型アミノ酸及び N-メチルアミノ酸の著明な上昇が認められた。

(3) 光顕及び電顕像

Serotonin myopathy 群での大腿四頭筋では，光顕的に筋肉細胞の大小不同及び壊死，核の中心化及び鎖状配列等が認められ，また，電顕的には，筋線維の蛇行，萎縮及び断裂，Z 帯の消失，ミトコンドリアの増加，Opaque 線維に相当すると思われる過収縮像等が認められた。

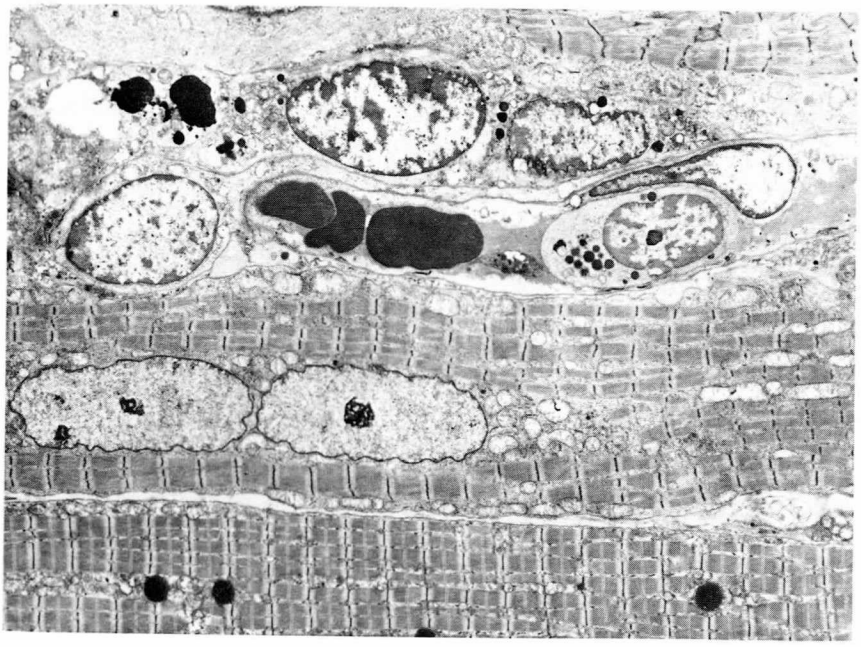


写真 4　セロトニン myopathy の電子顕微鏡写真，2,600倍
明瞭な核小体を有する核は，中心核及び鎖状配列を呈する

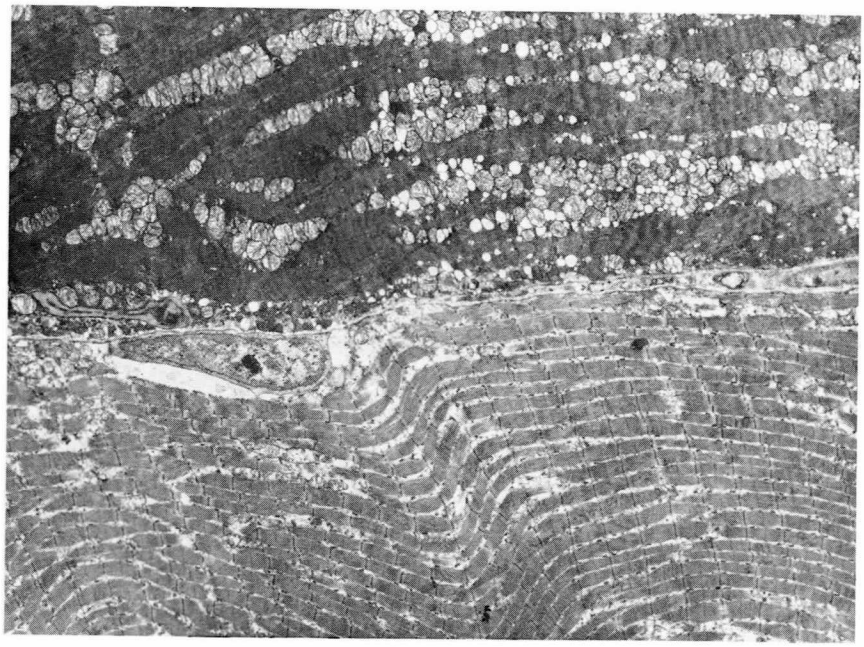


写真 5　セロトニン myopathy の電子顕微鏡写真，2,600倍
写真上部には過収縮していると思われる筋線維が認められる

また，血管内皮細胞の異常は認められなかった。E-64-c 投与群では，光顕，電顕像ともに，これらの変化を改善しなかった。

他方，Cyproheptadine 投与群は，間質細胞の増加が観察されたこと以外はほぼ正常の状態を保持していた。

考　　察

（1）Serotonin myopathy では，血中酵素活性（CPK, LDH 及び PK）の著明な上昇が認められた。しかし，CPK 及び LDH は cycle を重ねるごとに活性の上昇は減少した。これは，Serotonin の頻回投与により行動上の変化の程度が減少する（tachyphylaxis）ことと関係しているかもしれない。E-64-c はこれらの血中酵素活性の上昇を抑制しなかった。

（2）Duchenne 型ジストロフィー症患者の血中アミノ酸に変動がある[7]とするものとそうでないとする報告[8]がある。そこで，Serotonin myopathy における血中アミノ酸濃度を測定したところ，側鎖型アミノ酸及び N-メチルアミノ酸の著明な上昇が認められた。3-メチルヒスチジン（3-Mehis）は，アクチンとミオシンの構成アミノ酸であり[9]，また，蛋白分解により遊離された 3-Mehis は再利用されず，そのまま尿中に排泄される[10][11]ことより，後者に関してはおそらく筋収縮蛋白の分解あるいは，代謝回転の促進により生じたものと推定される。しかし，前者に関しては，その成因は不明である。

（3）Serotonin myopathy における大腿四頭筋の光顕及び電顕での特徴を観察した。光顕的には筋肉細胞の大小不同及び壊死，核の中心化及び鎖状配列等，電顕的には筋線維の蛇行及び萎縮，Z 帯の消失，ミトコンドリアの増加，Opaque 線維に相当すると思われる過収縮像等が認められたが，これらの変化がセロトニン投与後，どのような順序で進行するのかは，現在のところ不明である。また，E-64-c 投与群はこれらの変化を改善しなかった。これは，E-64-c の血中よりの消失が早いことによるものかもしれない。他方，抗セロトニン剤である Cyproheptadine は，光顕及び電顕像ともほぼ正常な像が観察された。また，Munsat ら[12]は，Serotonin myopathy において血管異常すなわち，血管内皮細胞の空胞化あるいは血管内腔に水泡の存在が著明に認められることを報告している。しかしながら，我々はそのような異常を見出すことはできなかった。

結　　語

ラットに Serotonin myopathy を発症させ，その血中酵素活性，血中アミノ酸量，光顕像及び電顕像における特徴を明確にし，E-64-c の効果を抗セロトニン剤である Cyproheptadine を対照薬として検討したところ，いずれも，E-64-c の有効性は，認められなかった。

文　　献

1）J. R. Mendell, *et al.*; Science, **172**, 1143, 1971.
2）J. M. Parker and J. R. Mendell; Nature, **247**, 103, 1974.
3）L. M. Silverman and H. D. Gruemer; Clin. Chem, **22**, 1710, 1976.
4）昭和54年度研究研告書 p. 56.
5）S. B. Rosalki; J. Lab. Clin. Med., **69**, 696, 1967.
6）P. D. Boyer; "The Enzymes", 2nd ed. Vol. 6 p. 95, 1962.
7）E. Spargo; Lancet ii; 1300, 1979.
8）W. J. Bank, et al.; Arch. Neurol., **24**, 176, 1979.
9）P. Johnson, et al.; Biochem. J., **105**, 361, 1967.
10）C. L. Long, et al.; Metabolism, **24**, 929, 1975.
11）V. R. Young, et al.; J. Biol. Chem., **247**, 3592, 1972.
12）T. L. Munsat, et al.; Neurol., **27**, 772, 1977.

21. E-64-c 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* 木 村 直 史*

目　　的

E-64 及びその類縁体はヒトの進行性筋ジストロフィー症に対する治療薬の候補の一つと期待され，それらの有効性に関する基礎的ならびに総合的研究が推進されつつある[1]。E-64 及びその類縁体が治療薬として実用化されるためにはそれらの有効性，安全性及び臨床的副作用検討のための基礎的所見として薬効薬理学的所見とあわせて，それらの一般薬理学的性格が明らかにされていなければならない。E-64 及びその類縁体の治療薬としての有効性評価の一環として昨年度は E-64（L体及び DL 体）の一般薬理作用を検討した[2]。これにつづいて本年度は，急性実験条件下のウサギにおいて E-64-c の循環，呼吸機能及び中枢神経系の活動に及ぼす影響を検討し，さらに E-64（DL体，L体）及び E-64-c の動脈血圧に対する作用の機転について薬理学的解析を行なった。

方　　法

1）**実験動物**：ウサギ（雌性，1.9～2.6 kg）及びネコ（1.8～2.6 kg）を用いた。

2）**実験条件**：局麻下に非動化，人工呼吸下の急性実験条件において化合体の薬理作用を検討した。呼気ガス O_2 及び CO_2 濃度ならびに外腸骨動脈における動脈血酸素分圧（Pa_{O_2}）の連続測定を行ないつつ，人工換気を適正レベルに維持した[3]。

3）**被験化合体及び適用法，適用量**：E-64-c を飽和重炭酸ナトリウム液に溶解し（濃度 296.2 mg/ml），静脈内に適用した。水溶液の pH は 6.5～7.5 の範囲にあった。ウサギにおける E-64-c の一回適用量は 5～226 mg/kg，累積適用総量は 145～869 mg/kg の範囲にあり，ネコにおける DL-E-64 の一回適用量は 6.2～10 mg/kg であった。

4）**循環機能**

(1)動脈血圧：圧トランスデューサーを用いて大腿動脈血圧を観血的に測定，直記式記録器を用いて他の諸現象記録と共に記録した。

(2)心電図（ECG）：標準肢第一導出によった。

(3)大腿動脈脈波：コンピューターを用いる平均加算解析法によって脈波の波型変化を検討した。

5）**呼吸機能**

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。データレコーダー（TEAC, R81）を用い導出された電位を磁気テープに収録し，必要に応じて再生して医用電算機（三栄測器，7T08）を用いて種々のプログラムによるデータ解析を行った。

6）Pa_{O_2}：ポーラログラフ法により腸骨動脈における Pa_{O_2} を連続的に測定，記録した。

7）**呼気ガス酸素濃度（$F_{E_{O_2}}$）及び炭酸ガス濃度（$F_{E_{CO_2}}$）**：呼気ガス分析装置（三栄測器，1H

* 東京慈恵会医科大学　第二薬理学教室

21）を用いて連続的に測定，記録した。

8）**脳波（EEG）**：頭皮上脳波を針電極を用いて導出，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なった。

9）**諸現象の記録**：上述の諸パラメーターを直記式オシログラフを用いポリグラフ的同時記録を行なった。他方，データレコーダを用いてこれらの諸現象を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なった。

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。

(1)　心拍数：心電図のR波の時間間隔ヒストグラムを作り，平均値，標準偏差を得，被験化合体適用による心拍数変化を分析した。

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

(3)　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についてのヒストグラムを演算し，平均値と標準偏差を得，両平均値の積を算出した。この値は横隔神経の呼吸性発射活動総体の増減の量的指標と考えられる。

(4)　EEG：脳波のパワースペクトル分析を行った。

結　　果

1.　実験条件ならびに化合体適用量

Ether麻酔下に両側迷走，交感，減圧神経切断，神経筋接合部遮断薬（gallamine triethiodide）を用いて非動化し，人工呼吸下のウサギに E-64-c の静脈内適用を行ない，その影響を検討した（表1）。

1）**一回適用量及び適用総量**

一回適用量は 5～226 mg/kg の範囲にあり，3～4時間にわたる実験期間における適用総量は 145～869 mg/kg であった。

2）**急性毒性**：上述の適用総量を3～4時間にわたる実験期間内に数回にわけて間歇的に静脈内適用した。化合体適用により，前述の実験条件下のウサギにおいて，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おいて致死効果は認められなかった。

2.　循環機能に及ぼす影響

1）ECG

i)　波型には著変が認められなかったが，91例中4例において適用後1～15分にわたって心室性期外収縮を含め，種々の型の不整脈が発現した(図2)。しかし，これらの異常調律の発現は一過性であり，また，適用量(5-226mg/kg)の大，小による発現率に差は認められなかった。

ii)　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。5～226mg/kg を適用した59実験例中9例において，適用後2分間にわたって適用前の値の5～10%の心拍数減少が認められたが，この変化は一過性であって以後，変化は認められなかった。また適用量（5～226 mg/kg）の大，小による発現率の差も認められなかった。大多数の例では心拍数の変化は発現しなかった。

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。平均加算により得た化合体適用前後の波型に差は認められなかった(図1)。

3）**動脈血圧に対する作用**：

(1)　**変化の方向**

本化合体 5～226 mg/kg の静脈内適用直後から5～10分後にわたって血圧上昇（23例）（表2，A，図3，4，5，図7の1），変化が認められない場合（14例）（表2，C，図5の3）および血圧下降（12例）（表2，B，図6，図7の2）の三様の変化が認められた。上昇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。

(2)　**変化の程度と持続**

上昇例における平均血圧の変化率は適用前のレベルの10～70%，下降例のそれは5～30%の範囲にあり，両群における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。血圧上昇及び下降は1～2分間にわたる一過性の変化であり，以後，血圧レベルの変化は発現しなかった。血圧変化の持続は用量依存的に延長するが，ここで適用した最大量による

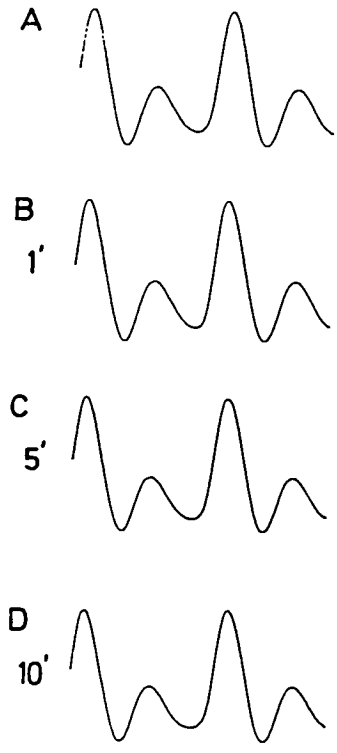


図1 E-64-c の脈波に及ぼす影響。
非動化ウサギ（迷走，交感，減圧神経切断）。A：E-64-c 適用前，B：適用後1分，C：5分後，D：10分後，各脈波波形はいずれも加算平均（100回）による波形。

表1 E-64-c の静脈内一回適用量と適用回数（N）及び適用総量

Dose	N
5 mg/kg	2
10	8
20	7
40	12
50	1
80	15
100	9
113	14
160	9
200	1
226	3

Total Dose	
145 mg/kg	430 mg/kg
273	460
275	473
330	499
346	520
353	550
413	579
419	869

変化の持続は2分以内であった。

(3) 適用量と血圧変化の方向の関係

これら三型血圧反応の，すなわち血圧上昇，下降，不変例の E-64-c 適用量の平均値はそれぞれ136.1±52.4 mg/kg(範囲20～226mg/kg)，75.8±36.5 mg/kg（10～160 mg/kg），43.8±35.4（10～100 mg/kg）であった。また同一個体2例において本化合体適用により用量依存的に三型の血圧変化が認められたが，2例ともそれぞれ小量（10～40 mg/kg または 40 mg/kg）で不変，中等量（40～80 mg/kg，または 80

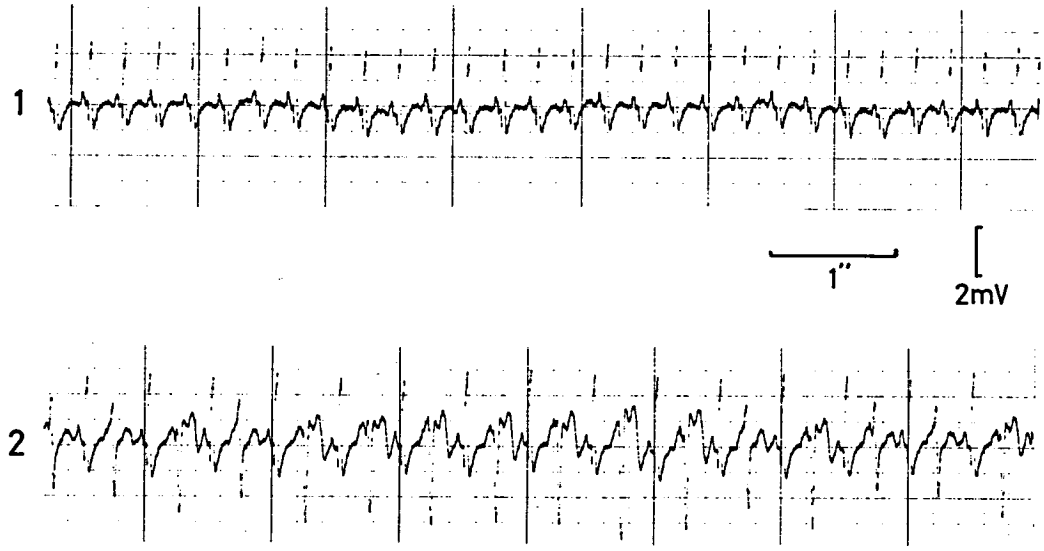


図2 E-64-c の心電図に及ぼす影響
非動化ウサギ（迷走，交感，減圧神経切断）．1：E-64-c 適用前，2：適用後2分。

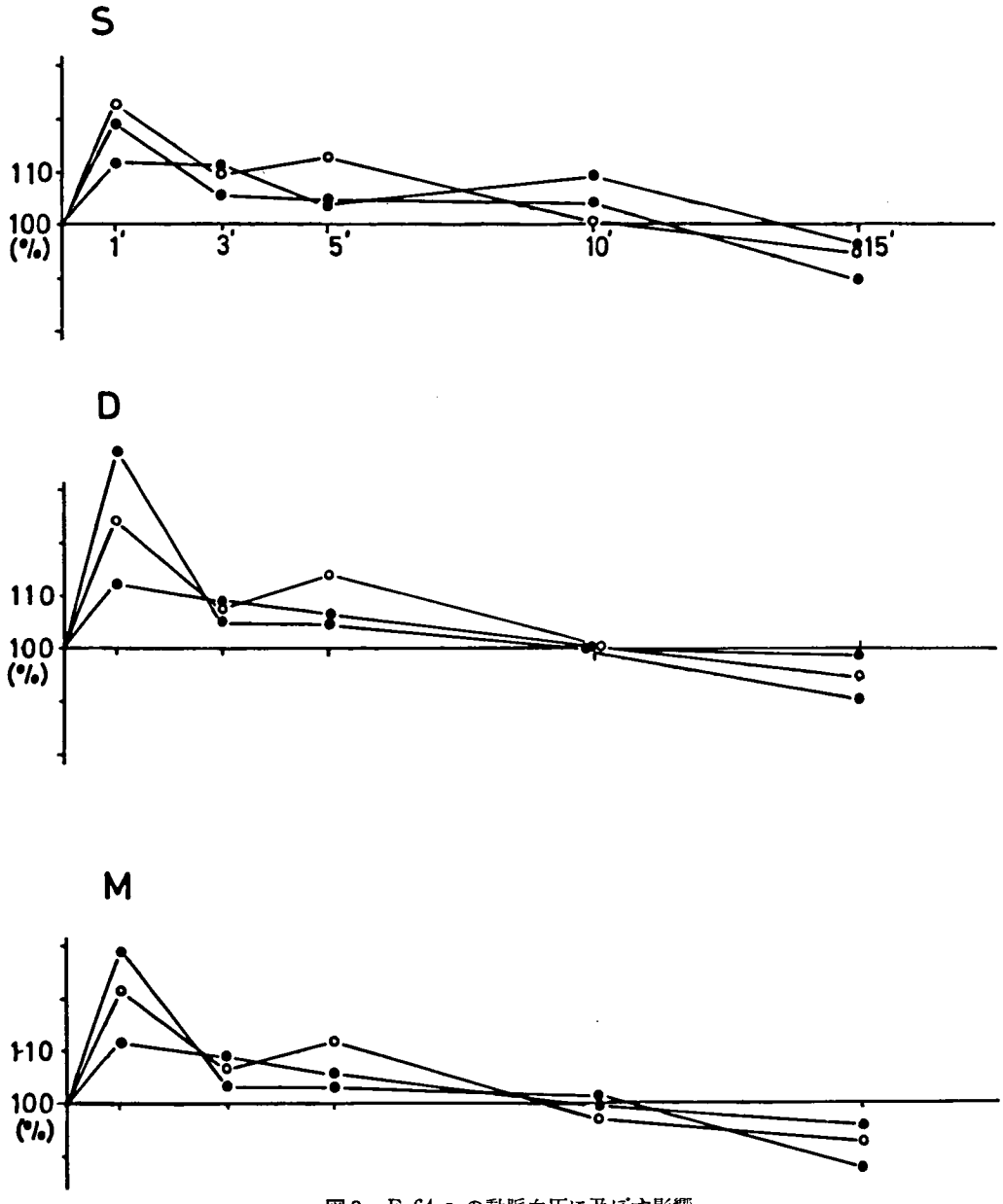


図3　E-64-c の動脈血圧に及ぼす影響

非動化ウサギ（迷走，交感，減圧神経切断）。小量適用時に血圧上昇を示した例（3例，一回適用量20または 80 mg/kg i. v.）における血圧変化の時間的経過，S：収縮期圧，D：拡張期圧，M：平均血圧，縦軸：適用前の血圧値に対する百分率，横軸：時間。各記号はそれぞれ1実験例を示す。

mg/kg）で血圧下降，大量（113～226 mg/kg，または 80～160 mg/kg）で血圧上昇を示した（図7の4）。

(4)　血圧変化の用量依存性

用量範囲 20～226 mg/kg の本化合体適用時に血圧上昇のみを示した実験例（7例）において適用量と血圧上昇作用の程度及び持続との関係を比較検討した。5例において用量依存的に血圧上昇の程度は増大したが（図8，1；図9，1），2例においてはそれぞれの最大適用量 160

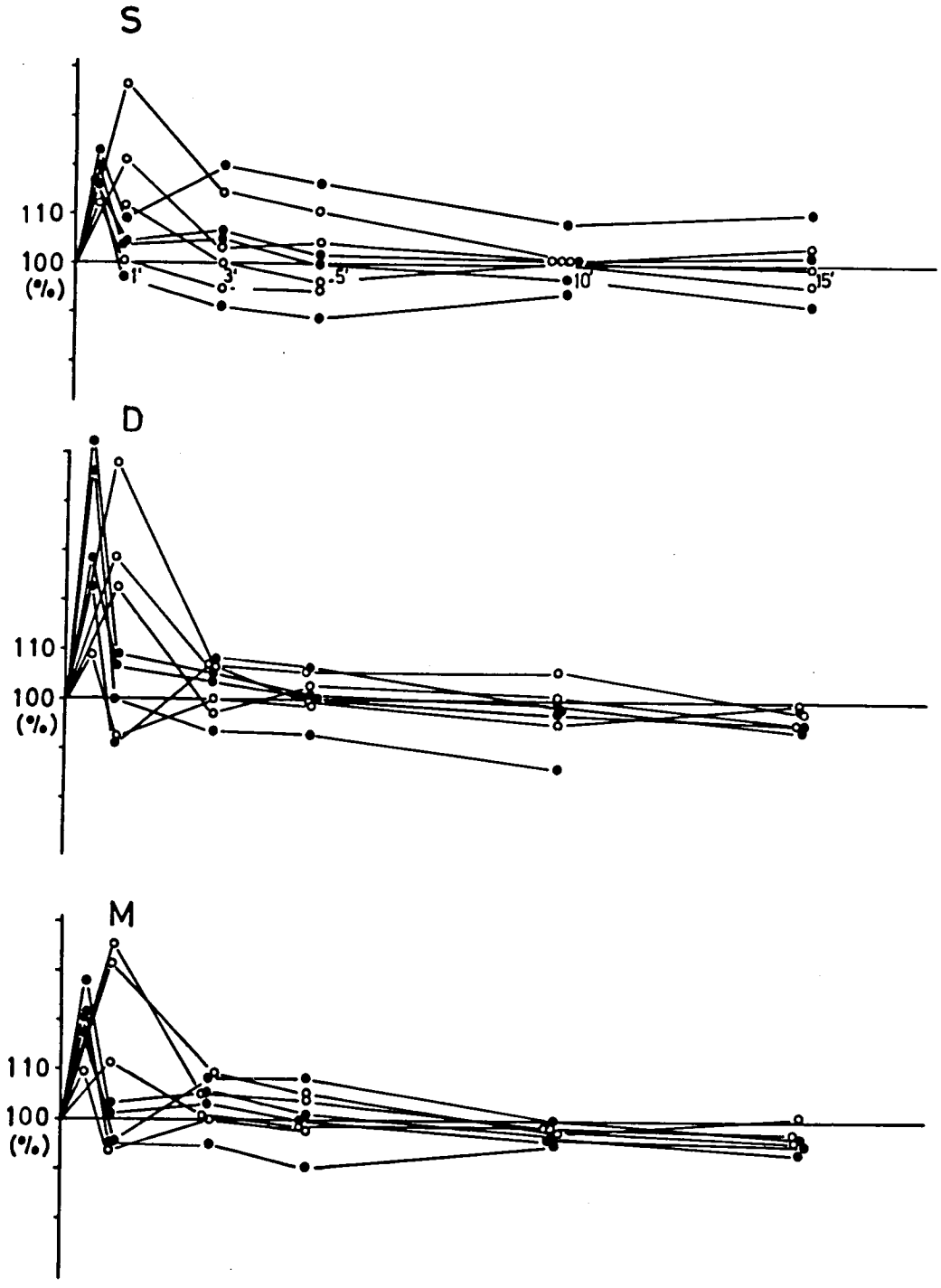


図4 E-64-c の動脈血圧に及ぼす影響

非動化ウサギ（迷走，交感，減圧神経切断）。中等量適用により血圧上昇を示した例（9例，一回適用量 110 または 113 mg/kg, i. v.）における血圧変化の時間経過。S，D，M，縦軸，横軸，記号の説明は図3と同様。

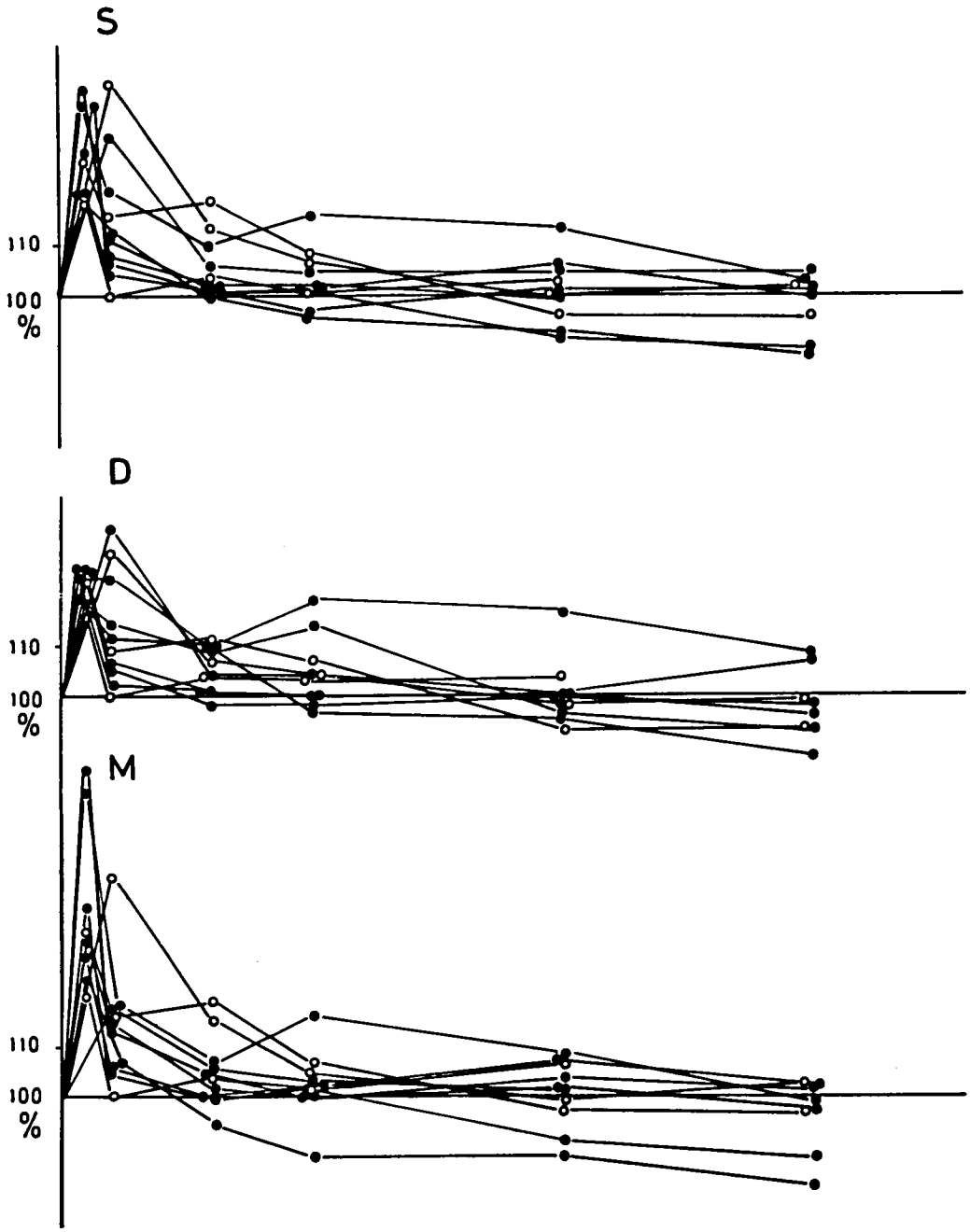


図5　E-64-c の動脈血圧に及ぼす影響

非動化ウサギ（迷走，交感，減圧神経切断）。大量適用により血圧上昇を示した例における血圧変化の時間経過（10例，一回適用量 160または 226 mg/kg, i. v.)。S，D，M，縦軸，横軸，記号の説明は図3と同様。

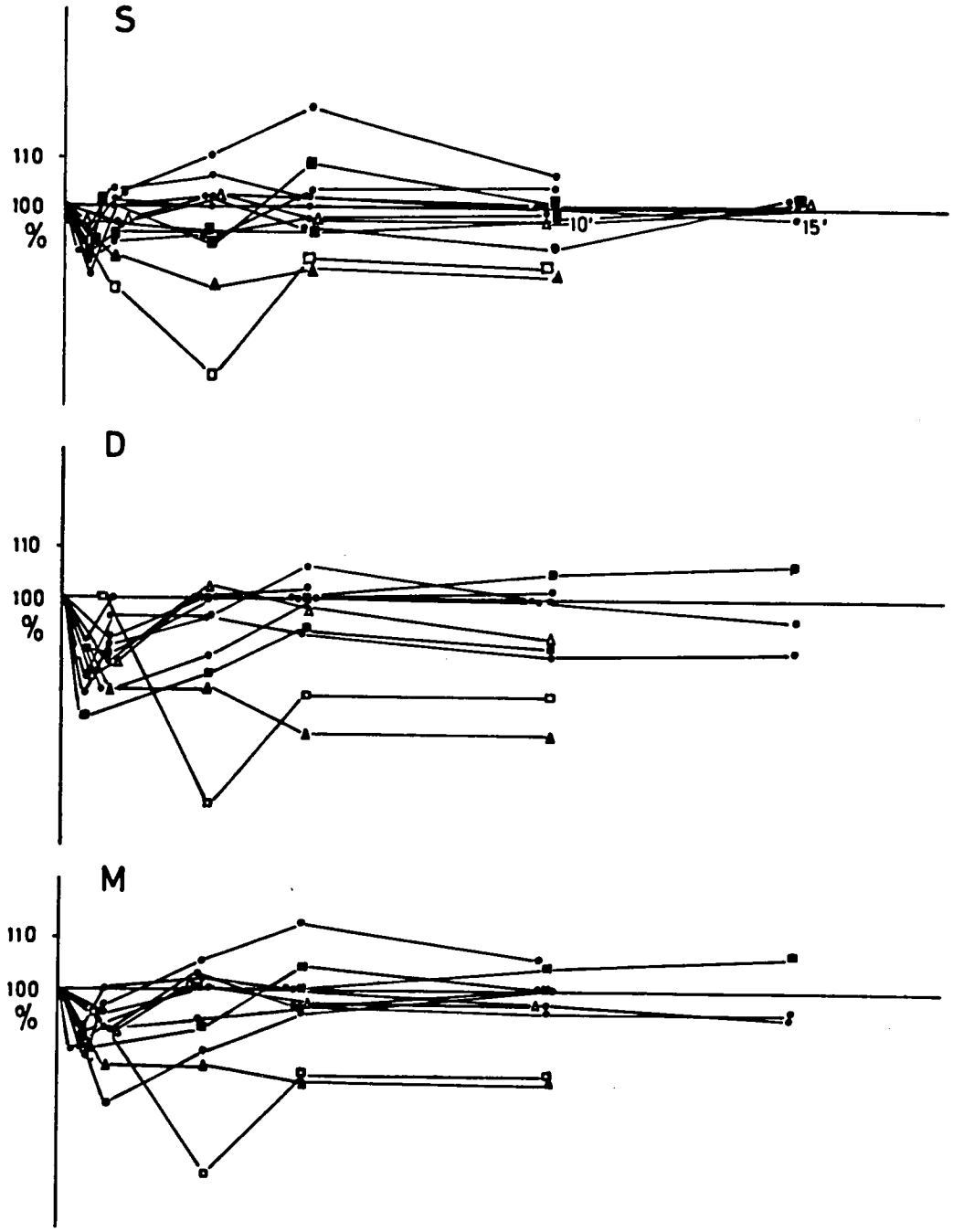


図6 E-64-c の動脈血圧に及ぼす影響

非動化ウサギ（迷走，交感，減圧神経切断）。小量ないし中等量適用により血圧下降を示した例における血圧変化の時間経過（12例，一回適用量 10～160 mg/kg. i. v.）。S，D，M，縦軸，横軸，記号の説明は図3と同様。

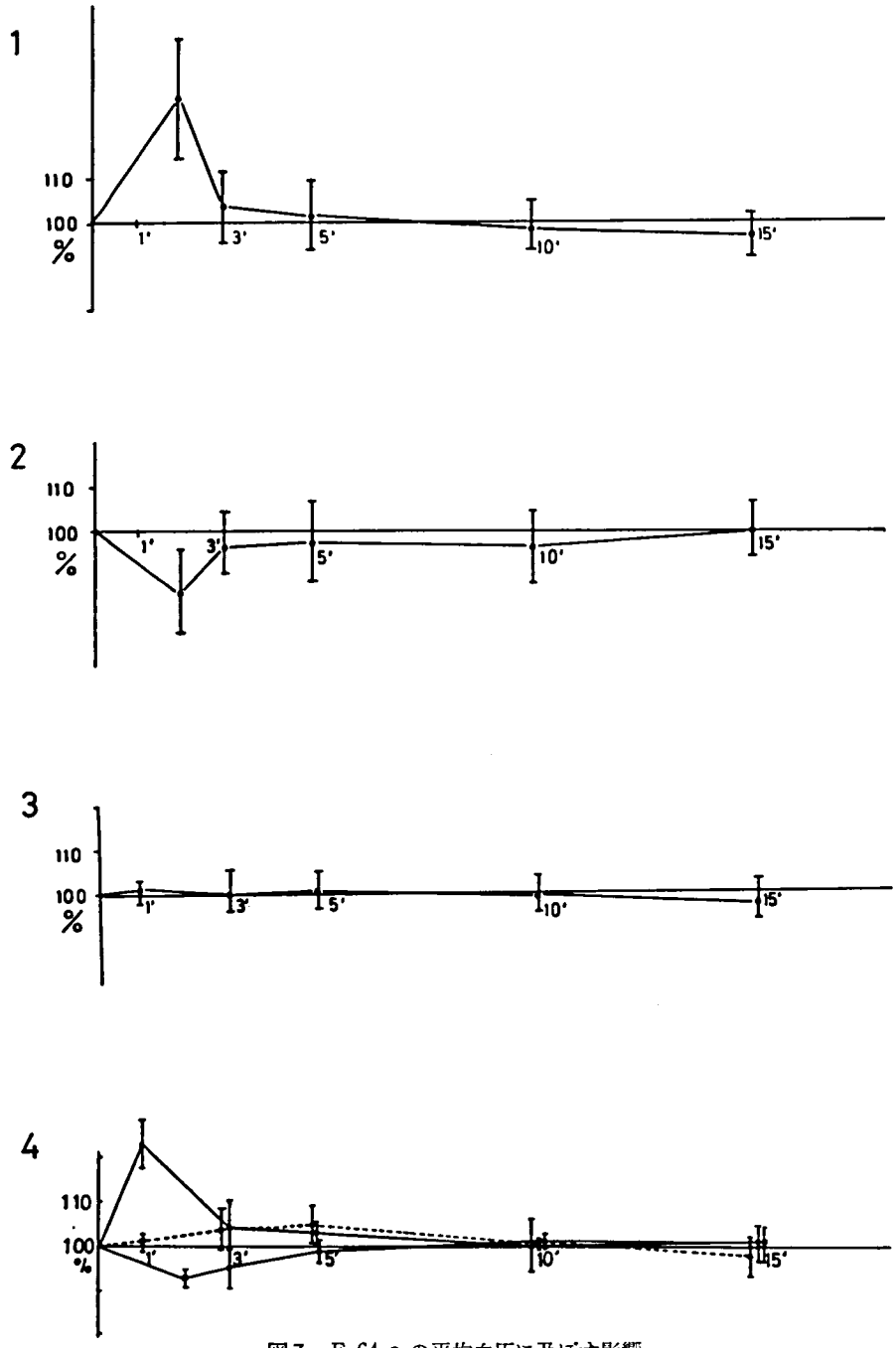


図7　E-64-c の平均血圧に及ぼす影響

非動化ウサギ（迷走，交感，減圧神経切断）。平均血圧変化の時間的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。1：血圧上昇例（23例，一回適用量の平均値 136.1±52.4 mg/kg），2：血圧下降例（12例，75.8±36.5 mg/kg），3：有意の血圧の変化を示さなかった例（14例，43.8±35.4 mg/kg），4：同一個体によって用量依存性に血圧変化方向の変化を示した3例における血圧変化の時間経過，点線，中等量適用時の変化；昇圧を示す実線，大量適用時：降圧を示す実線，中等量適用時。

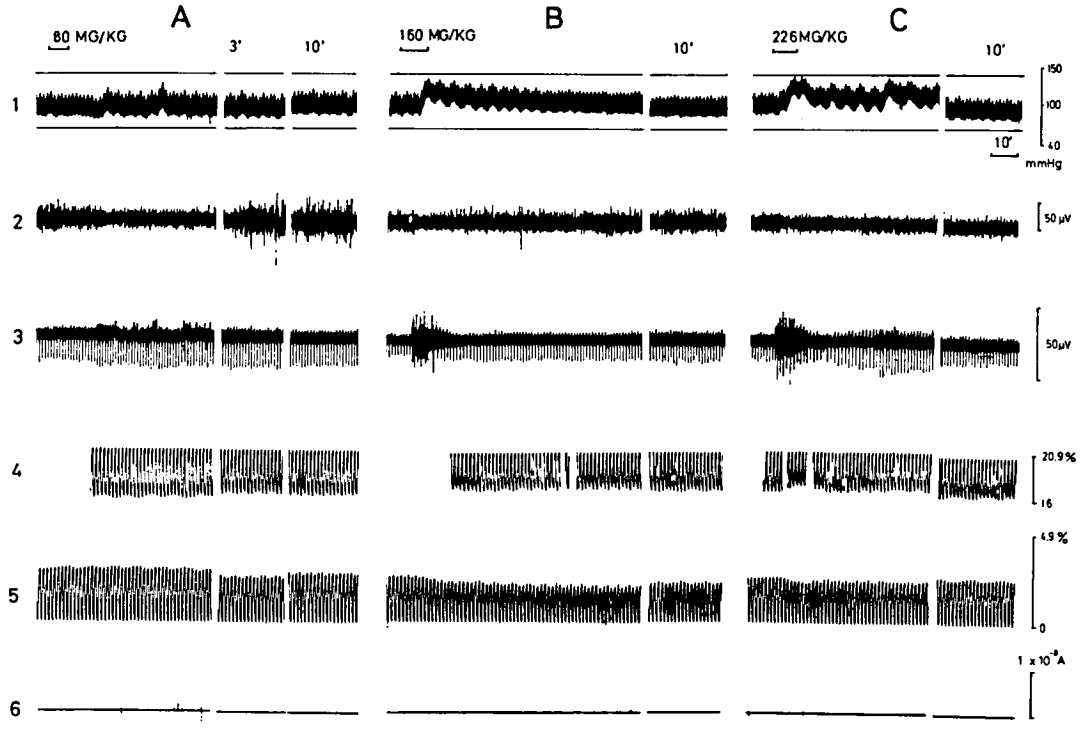


図8　E-64-c の作用比較

非動化ウサギ（迷走，交感，減圧神経切断）。A：E-64-c 80 mg/kg 適用，B：160 mg/kg 適用，C：226 mg/kg 適用。1，動脈血圧；2，EEG；3，横隔神経発射；4，F_{EO_2}；5，F_{ECO_2}；6，Pa_{O_2}，（記録1上部の短かい横線は静脈内適用持続を示す）。

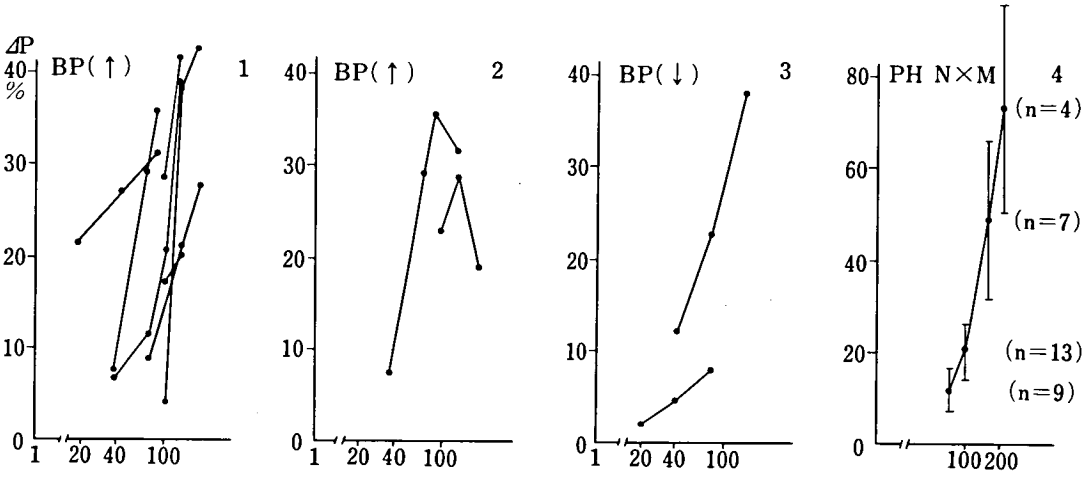


図9　E-64-c の用量—反応曲線

非動化ウサギ（迷走，交感，減圧神経切断）。縦軸，変化分の適用前の値に対する百分率；横軸，用量 mg/kg（対数目盛）。1，血圧上昇を示した7例における変化と用量との関係；2，大量（160 または226 mg/kg i.v.）適用による反応強度低下例；3，血圧下降例；4，横隔神経活動電位放電群のスパイク数（N）と電位振幅（M）の積（N×M）の変化と用量との関係，n，実験例数，各適用量における変化の平均値と標準誤差（短い縦線）を示してある。

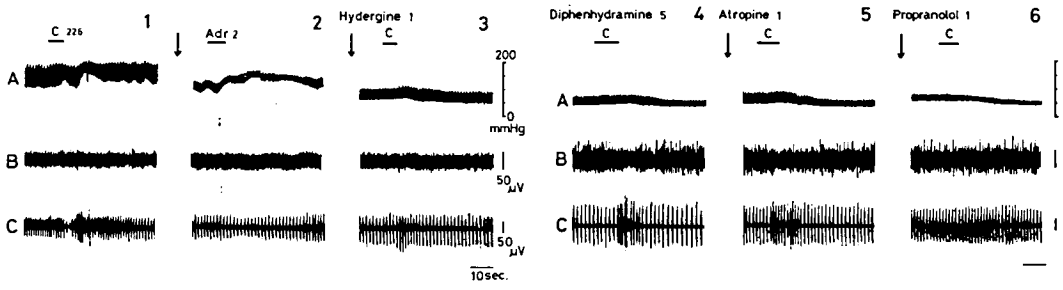


図10　E-64-c による血圧上昇に及ぼす諸種遮断薬の影響

非動化ウサギ（迷走，交感，減圧神経切断）。A，動脈血圧；B，EEG；C，横隔神経活動；c，E-64-c. 1，E-64-c 226 mg/kg i. v.；2，adrenaline 2 μg/kg i. v.；3，Hydergine 1 mg/kg i. v. 後における E-64-c 226 mg/kg の作用；4，diphenhydramine 5 mg/kg 前処置後における E-64-c 226 mg/kg の作用；5，atropine 1 mg/kg 前処置後における E-64-c 226 mg/kg の作用；6，propranolol 1 mg/kg 前処置後における E-64-c 226 mg/kg の作用。1～6は同一実験例で順次，記録された。（記録A上部の横線は適用持続を示す）。

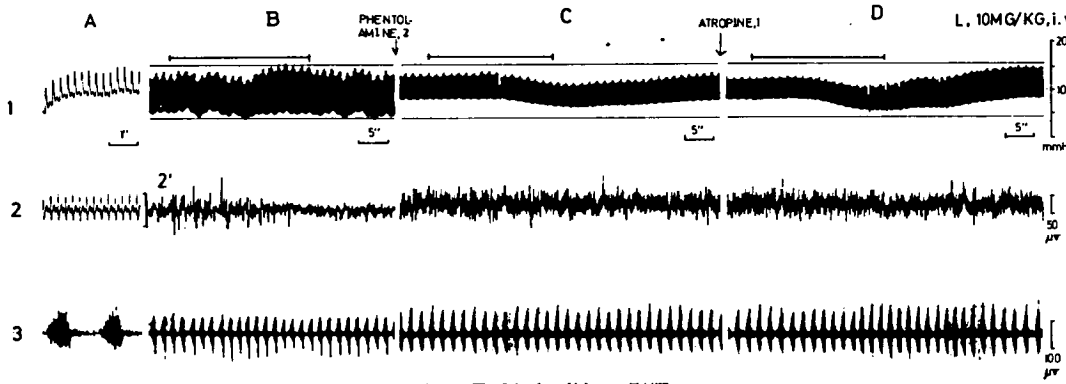


図11　E-64（L体）の影響

非動化ウサギ（迷走，交感，減圧神経切断）。1，動脈血圧；2，心電図；2′，EEG；3，横隔神経発射。記録1上部の横線はL体10 mg/kg 適用持続，矢印はそれぞれ phentolamine 2 mg/kg（BとCの間），atropine 1 mg/kg 前処置（CとDの間）を示す。

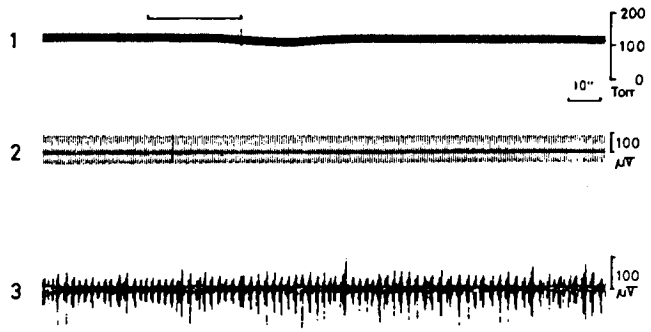


図12　Dihydroergocornine（DHC）（0.28 mg/kg）前処置後における E-64（DL 体）の影響

非動化ネコ（迷走交感神経幹切断）　1，動脈血圧；2，心電図；3，横隔神経発射。記録1上部の横線は DL 体 10 mg/kg 適用持続を示す。

表2 E-64-c の平均血圧に及ぼす影響

	A $\bar{x}\pm SD$ (N=23)	B $\bar{x}\pm SD$ (N=12)	C $\bar{x}\pm SD$ (N=14)
Control	100%	100%	100%
1′	128.3 ± 13.4	86.5 ± 8.8	100.8 ± 1.8
3′	103.5 ± 7.7	96.9 ± 6.6	100.7 ± 4.1
5′	101.7 ± 7.9	97.3 ± 8.8	100.8 ± 4.0
10′	98.8 ± 5.7	96.6 ± 7.9	99.3 ± 4.3
15′	96.8 ± 5.0	100.0 ± 6.1	97.8 ± 4.4

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。適用前の平均血圧を100%とする。$\bar{x}\pm SD$：適用前の平均血圧に対する百分率の平均値と標準偏差。N：実験例数，A：血圧上昇例，100%=85.9±22.5 mmHg（平均適用量=136.1±52.4 mg/kg），B：血圧下降例，100%=68.1±24.3 mmHg（75.8±36.5 mg/kg），C：血圧不変例，95.2±19.9 mmHg（43.8±35.4 mg/kg）

mg/kg，226 mg/kg 適用によりかえって上昇の程度は軽度となった（図9，2）。

4）E-64 及び E-64-c 適用による血圧上昇に及ぼす諸種遮断薬の影響

(1) E-64-c

E-64-c 適用により血圧上昇が認められたウサギ（両側迷走，減圧，交感神経切断）の実験例においてα型アドレナリン作動性効果遮断薬（phentolamine 1～4 mg/kg あるいは Hydergine 1 mg/kg）を前処置した14例の全実験例において，同量の化合体の適用により血圧降下がおこり，血圧反応の反転が認められた（図10，3のA）。この降圧はコリン作動性効果遮断薬（atropine, 1 mg/kg），β型アドレナリン作動性効果遮断薬（propranolol, 1 mg/kg）前処置によっても消失しなかった（図10，5および6のA）。さらに抗ヒスタミン薬（diphenhydramine, 5 mg/kg）前処置によっても，4例中3例において E-64-c による降圧は消失しなかったが（図10，4のA），1例においては，抗ヒスタミン薬前処置による降圧の程度の減弱が認められた。

(2) E-64, L 体及び DL 体

i）ウサギにおけるL体の作用

E-64, L 体適用により持続1～2分間にわたる血圧上昇が認められたウサギ（非動化，迷走，減圧，交感神経切断）において，phentolamine 1～2 mg/kg 前処置後，同量のL体（10 mg/kg）及び DL 体（100 mg/kg）の適用により1～2分間持続する血圧降下が発現し，血圧反応の反転が認められた（図11，C，1）この時，心拍数および ECG 波形ならびに $F_{E_{O_2}}$，$F_{E_{CO_2}}$，Pa_{O_2} には著しい変化がなかった。この降圧は，E-64-c の場合と同様，atropine（1 mg/kg）適用後にも認められた（図11，D，1）。

ii）ネコにおける DL 体の作用

非動化し両側の迷走交感，頸動脈洞神経を切断したネコにおいて，E-64, DL 体（6.2～10 mg/kg i. v.）により軽度の血圧上昇が認められたが，dihydroergocornine（DHC）（0.28 mg/kg あるいは 1.28 mg/kg i. v.）前処置後，同量の DL 体適用により血圧は下降し，血圧反応の反転が認められた（図12，1；図14，1；図15，1）。DHC 前処置により DL 体による血圧下降が認められた時期に adrenaline（5 μg/kg i. v.）適用によっても明瞭な血圧下降がおこり血圧反応の反転が認められた（図13，1）。このとき心拍数，ECG 波形，$F_{E_{O_2}}$，$F_{E_{CO_2}}$，Pa_{O_2} に著明な変化は発現しなかった。

3．呼吸機能に及ぼす影響

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及びその振幅の積に及ぼす影響を検討した。後者は横隔神経活動に現われる呼吸性成分の総体としての計量的指標と考えられ，電算機演算により得られるスパイク数及びスパイク電位振幅の両平均値の積として表わされる。

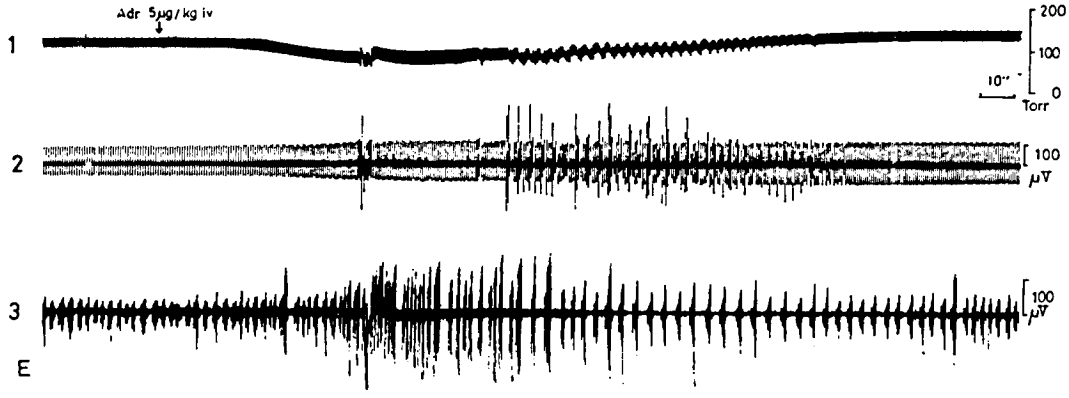


図13　DHC (0.28 mg/kg i. v.) 前処置後における adrenaline の作用
非動化ネコ（図12における同一個体）。1，2，3は図12と同様。矢印は adrenaline 5 μg/kg 適用時点を示す。

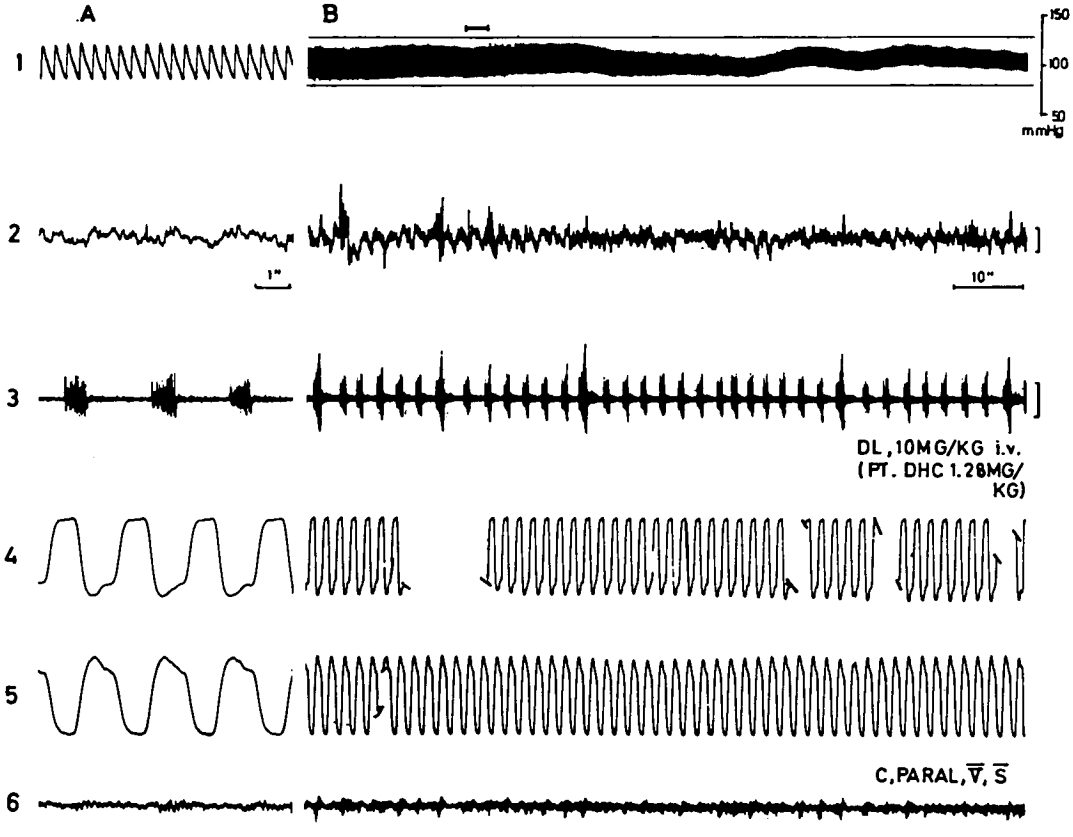


図14　DHC (1.28 mg/kg i. v.) 前処置後における E-64 (DL 体) の作用。
非動化ネコ（迷走交感，頸動脈洞神経切断）1，動脈血圧；2，EEG；3，横隔神経発射；4，$F_{E}O_2$；5，$F_{E}CO_2$；6，大内臓神経活動。記録1の上部の横線は DL 体 10 mg/kg 適用期間を示す。

表3 E-64-c の横隔神経活動電位に及ぼす影響

	Before	n	1 min after ($\bar{x}$±SD)	n	15 min after ($\bar{x}$±SD)
5-50 mg/kg	100%	21	104.6 ± 15.7	13	100.5 ± 7.7
80	100	9	112.7 ± 14.1*	6	94.0 ± 6.7
100-113	100	13	120.5 ± 19.6*	8	95.9 ± 11.2
160	100	7	148.6 ± 45.8*	7	98.0 ± 14.2
160-226	100	4	173.3 ± 46.5**	2	99.2 ± 0.4

電算機演算によって得られた振幅ヒストグラムにおける電位振幅の平均値 (M) 及びスパイク電位の総数 (N) を計測し，適用前の両者の積 (N×M) を 100% として変化を検討した。$\bar{x}$±SD：適用前の (N×M に対する百分率の平均値と標準偏差，n：実験例数，* $p<0.05$, ** $p<0.01$

表4 E-64-c 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)	
5- 40 mg/kg	21	1.63 ± 0.35	1.70 ± 0.36	NS
80-113 mg/kg	20	1.56 ± 0.30	1.57 ± 0.30	NS
160-226 mg/kg	11	1.45 ± 0.33	1.51 ± 0.32	NS

R, CX, PH-P

N：実験例数，Before：適用前の周期の平均値と標準偏差，After：適用後10分後における周期，NS：not significant.

表5 E-64-c 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} (%)	16	17.0 ± 0.8	17.2 ± 0.9	NS
F_{ECO_2} (%)	18	3.34 ± 0.63	3.2 ± 0.62	NS
Pa_{O_2} (%)		100	98.8 ± 3.4	NS

N：実験例数，Before：適用前の平均値と標準偏差，After：適用後10分，NS：not significant.

E-64-c の 5～50 mg/kg 適用により総活動量に変化は認められないが(図16，A)，80 mg/kg 以上の適用量では，ほとんどの例で静注直後から1～2分間にわたって一過性の神経発射活動の増加が起った（図8，3，図16，2)。この時，総活動量の増加率は用量依存的に増大した（図17 B-E，図9，C)。表3にそれぞれ 180 mg/kg (N=9)，100～113 mg/kg (N=13)，160 mg/kg (N=7)，200～226 mg/kg (N=4) 適用による総活動量の増加率の平均値を示した。

E-64-c, 5～226 mg/kg 適用により横隔神経遠心性発射活動放電群の周期に有意な変化は認められなかった（表4)。

4．呼吸，循環機能の化学的調節因子に及ぼす影響

頸部で両側の迷走，交感及び減圧神経を切断した非動化ウサギにおける F_{EO_2} 及び F_{ECO_2} は E-64-c 適用後血圧の変化に伴い，1～2分間にわたって一過性に軽度に変化し，F_{EO_2} は上昇，F_{ECO_2} は下降したが，その後，有意の変化は認められなかった（表5)。また，Pa_{O_2} には適用前後をつうじて変化が認められなかった。

5．脳波 (EEG) に及ぼす影響

電算機によるパワースペクトル分析によって頭皮上 EEG に及ぼす E-64-c の影響を検討した（図18)。本化合物 5～226 mg/kg 適用によ

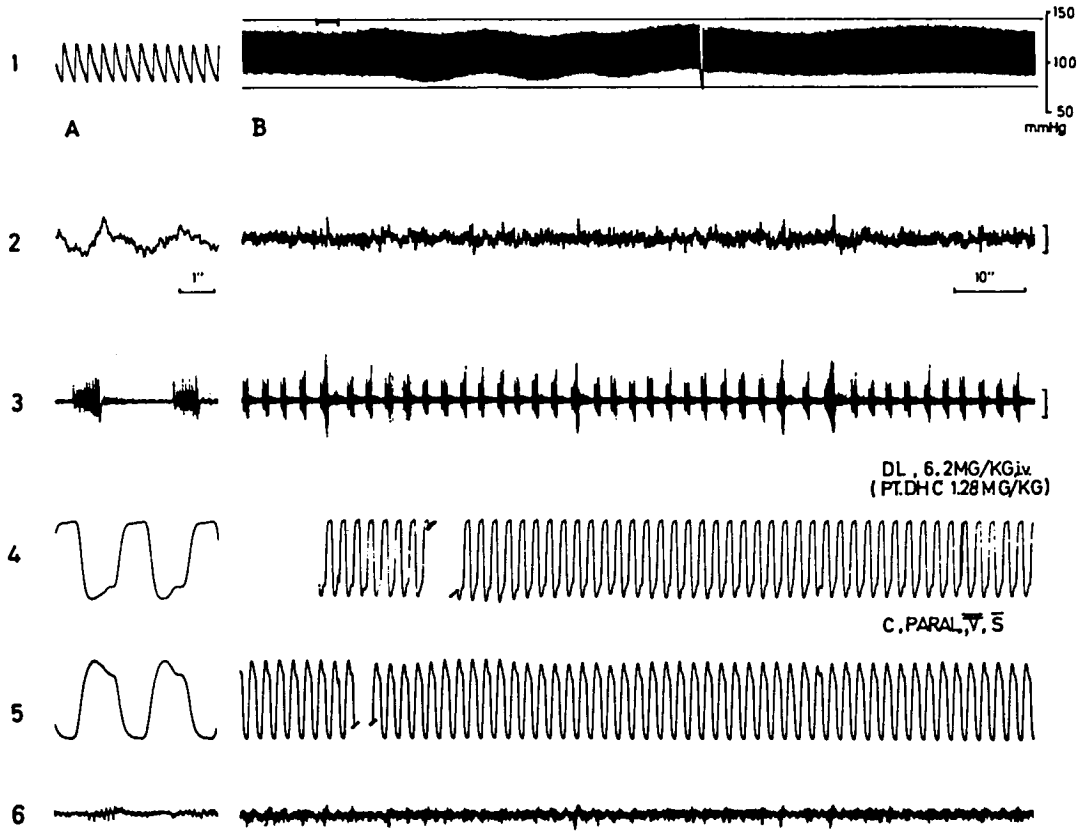


図15　DHC (1.28 mg/kg i. v.) 前処置後における E-64 (DL 体) の作用
非動化ネコ (図14における同一個体)。1～6は図14と同様。記録1上部の短い横線は DL 体 6.2 mg/kg 適用持続を示す。

り動脈血圧の上昇が認められる例では，昇圧期に一致して一過性に脳波覚醒パターンが発現したが，49例の中2例 (10 mg/kg, 113 mg/kg) においては適用後5分における総パワー値の著減 (対照値の30%減少) が認められたが，一過性であって，その後，有意の変化は認められなかった。

考　　察

昨年度は E-64 の DL 体及び L 体の一般薬理作用に関する研究を行なった。これに引続き今年度は E-64 の類縁体の一つである E-64-c のウサギにおける急性毒性，ウサギの呼吸，循環機能及び中枢神経系の電気的活動に及ぼす影響ならびに種々の自律神経遮断薬を用いてウサギにおける E-64-c による動脈血圧上昇，ウサギ及びネコにおける E-64 L 体及び DL 体による動脈血圧上昇の機転の薬理学的性格について検討した。

急性毒性：マウス，ラットにおける皮下，腹腔内適用による LD_{50} は 1000 mg/kg 以上と推定されている[4]。今回の研究において3～4時間内における E-64-c の累積適用総量の最大値は 869 mg/kg i. v. であったが，全例において致死効果は発現しなかった。

呼吸，循環機能の化学的調節因子：E-64-c (一回適用量 5～226 mg/kg i. v., 総量 145～869 mg/kg i. v.) 適用後，呼気ガス O_2 濃度，CO_2 濃度及び動脈血 O_2 分圧の3化学的調節因子には一過性の軽度の変化が現われるが，いずれも数分以内に適用前の状態に回復し，その後，有意の変化は認められなかった。この所見

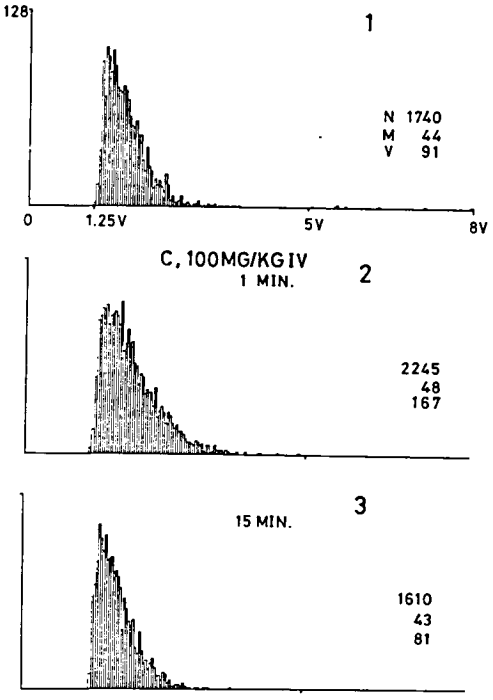


図16 E-64-c の横隔神経活動電位に及ぼす影響
非動化ウサギ（迷走，交感，減圧神経切断）。1，2，3は電算機演算によって得られた振幅ヒストグラム。縦軸：活動電位に含まれるスパイク数，横軸：スパイク振幅（電圧で表示）。1：E-64-c 100 mg/kg 適用前（スパイク数 N=1740，スパイク振幅の平均値 M=44，分散 V=91）。2：適用後1分（N=2245，M=48，V=167）。3：適用後 15 分（N=1610，M=43，V=81）。1分後の N×M の値は有意に増加している。

は E-64 の影響[2]と共通している。

EEG：適用直後，軽度，一過性の覚醒パターンの発現及びパワー値の減少がおこる以外には変化が認められなかった。

呼吸の中枢性調節神経機構に及ぼす影響：血圧調節神経切断による反射求心路が遮断され，化学的調節因子に変化のない状態で呼吸中枢及び横隔膜支配脊髄運動ニューロン群複合系の活動状態の直接的指標と考えられる横隔神経活動電位[5]は 80 mg/kg 以上の用量の適用後，一過性の増加を示し，その強度は用量依存的であったことは E-64-c が軽度ながら中枢直接作用を有することを示唆する。

循環機能に及ぼす影響：両側迷走，交感，減圧神経を切断したウサギにおいて E-64-c 適用により，中等量で血圧下降，大量で血圧上昇が3～5分間にわたって発現した。この時期に脈波には変化がなく，ごく少数例で不整脈，ECG 波形変化，徐脈が一過性に発現したが，大多数の例では著明な変化が認められなかった。E-64 の L 体，DL 体に関する昨年度の研究[2]結果と比較すると E-64-c, E-64 の L 体及び DL 体の動脈血圧に対する作用はいずれも適用後，3～5分以内の一過性変化に止まる点は共通している。しかし，E-64-c の作用における用量と血圧変化の方向との関係は，血圧の変化方向が用量よりも適用前の血圧レベルに依存する E-64 の L 体，DL 体のそれ[2]とは異なり，同一個体においても中等量で血圧下降，大量で血圧上昇が発現し，用量依存性を示した。このような差異の原因を明らかにするには今後さらに両化合体の作用点，作用様式とともに体内における薬力学的動態との関連をも考慮しつつ検討を行なう必要がある。しかし，E-64-c と両 E-64 の血圧反応にこのような差異が認められる事実は両者の循環系への作用の機転，さらにその作用機序の追究をすすめる場合の重要な基礎所見となる。

ウサギにおいて心拍数，ECG 波形に及ぼす影響は一過性で，しかも軽度であった。しかしこの所見は E-64-c の治療薬としての実用化をすすめていくための臨床的研究をすすめて行く場合にヒトの心機能に及ぼす E-64-c の影響を十分に検討しておく必要があることを示唆するものと考えられる。

E-64-c, E-64 の L 体及び DL 体の動脈血圧に対する作用の機転の薬理学的性格：両側の迷走，減圧，交感神経を切断したウサギにおいて E-64-c, E-64 の L 体及び DL 体による昇圧は α 型アドレナリン作動性効果遮断薬適用によって反転し，血圧下降に転じた。そしてこの降圧はムスカリン様コリン作動性効果遮断薬，β 型アドレナリン作動性効果遮断薬および H_1 型抗ヒスタミン薬適用後にも発現した。両側の迷走交感，頸動脈洞神経を切断したネコにおいても E--64 の DL 体による昇圧は α 型遮断薬

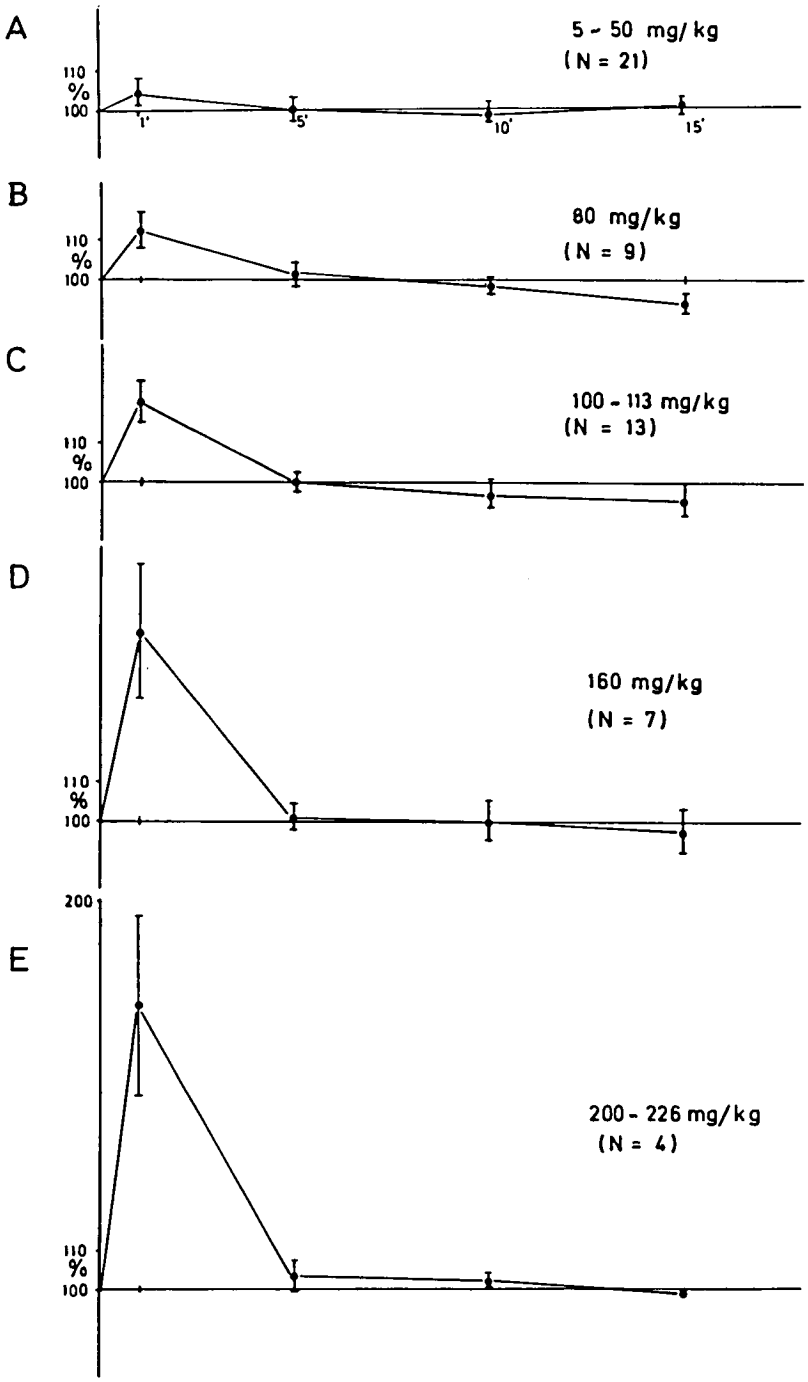


図17　E-64-c の横隔神経活動電位に及ぼす影響

非動化ウサギ(迷走, 交感, 減圧神経切断)。縦軸：適用前のスパイク数とスパイク振幅の平均値の積の値を100%とした時の百分率。横軸：時間, A, E-64-c 5～50 mg/kg 適用例における 平均値と標準偏差（実験例数 N=21）; B, 80 mg/kg (N=9); C. 100～113 mg/kg (N=13); D, 160 mg/kg (N=7); E. 220～226 mg/kg (N=4),

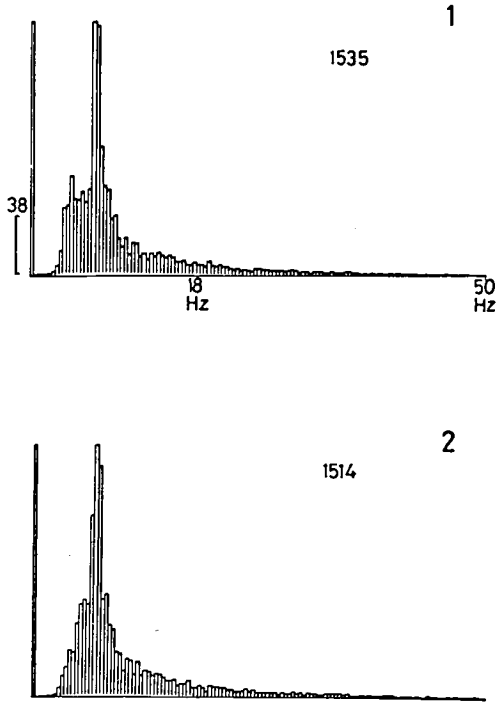


図18 E-64-c の EEG に及ぼす影響
非動化ウサギ（迷走，交感，減圧神経切断）。1，2 は EEG のパワースペクトル。縦軸：パワー値，横軸：周波数（Hz）。1，E-64-c，適用前；2，E-64-c 100 mg/kg 適用後5分。適用前後の総パワー値（1535，1514）には有意の差がない。

によって降圧に転じた。この様な血圧反応が起こっている時期に化学的調節因子（F_{EO_2}，F_{ECO_2}，Pa_{O_2}）の変化はいずれも軽度であったことから考えて血圧反応へのこれらの諸因子の関与は除外されよう。また，昇圧及びその反転は血圧調節神経の切断後にも認められているから反射性効果の関与の可能性は考え難い。昇圧と同時に横隔神経活動の増加及び EEG に覚醒パターンの発現が認められている事実は昇圧に関与する機転の一様式として中枢神経系の関与[6]を示唆する。また，昇圧にはアドレナリン作動性機序が関与していることが示されたが，中等量の E-64-c 及び α 型遮断薬前処置後の E-64 及び大量の E-64-c による血圧下降の機転については今後さらに心機能変化が関与する可能性の有無，また，β 型アドレナリン作動性及びムスカリン様コリン作動性機序，ならびに H_1 型ヒスタミン受容体が関与する機序以外の機転の血圧下降への関与の可能性についてさらに検討を行なう必要がある。これらの事実は今後さらに E-64 及び E-64-c による動脈血圧変化の機序の解析をすすめていくための足場となる基礎的所見と考えられる。

要　約

ウサギを用い，非動化の急性実験条件下に E-64-c 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。さらにウサギ及びネコにおいて E-64（L 体，DL 体），E-64-c の血圧作用の機転について薬理学的解析を行なった。

1）両側の迷走，減圧，交感神経を切断したウサギにおいて E-64-c 145～869 mg/kg の数時間にわたる静脈内適用による致死効果の発現は認められなかった。

2）呼気ガス O_2 濃度，CO_2 濃度及び動脈血酸素分圧は E-64-c（一回適用量 5～226 mg/kg i. v.）適用により著明な変化を示さなかった。

3）横隔神経活動電位は E-64-c 適用後，一過性の増加を示したが，以後，有意の変化を示さなかった。

4）中等量の E-64-c 適用により動脈血圧は軽度，かつ一過性の下降，大量により上昇し，用量依存的に上昇度が増大した。

5）E-64-c 適用により全例の 4.4% の実験例で1～15分にわたり不整脈が，15%の例において1～2分間にわたって軽度の徐脈が認められたが，脈波には変化がなかった。

6）両側の血圧調節神経を切断したネコ及び両側の迷走，減圧，交感神経を切断したウサギにおいて E-64，L 体，DL 体及び E-64-c による血圧上昇は α 型アドレナリン作動性効果遮断薬適用により血圧下降に反転し，ウサギにおける反転後の血圧下降は propranolol, atropine, diphenhydramine 適用後にも発現した。

文　献

1）今堀和友（班長）：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　昭和55年3月.
2）福原武彦ら：微生物二次代謝産物に由来する難病治療薬（E-64）の呼吸・循環機能及び脳波に及ぼす影響，慈医誌，96, 701-711, 1981.
3）福原武彦：Fominobenの脳幹部呼吸中枢神経機構の活動に及ぼす影響，慈医誌，91, 236-251, 1976.
4）大関正弘ら：上記1)，pp. 25-36.
5）Wyss, O. A. M.: Die nervöse Steuerung der Atmung, Ergebn. Physiol., 54, 7-479, 1964.
6）Koepchen, H. P., Hilton, S. M. and Trzebski, A.: Central interaction between respiratory and cardiovascular control systems, Berlin, Springer-Verlag, 1980.

22. 取り込まれたE-64の細胞内分布と運命について

勝沼信彦*

研究協力者 木南英紀* 橋田誠一*

研究目的

E-64を動物に投与すると，肝リソゾーム中のチオール性プロテアーゼであるカテプシンB及びLが阻害される[1)~3)]。大関ら[4)]は〔^{3}H〕-E-64を動物に投与して組織内分布を調べたところ，肝に最も高濃度集まると報告している。しかし，実際に肝細胞内のリソゾームにとりこまれるか，取り込まれたものが阻害活性を持つ型のまま入っているのか，又，どのような機構で取り込まれるのか明らかでない。本研究は，E-64がリソゾームに選択的に集中するか否か，その機構はピノサイトージスによるのか，細胞質を透過してリソゾームに入るのか，カテプシンBやLの活性の阻害との関連はどうかを明らかにすることを目的としている。

材料及び方法

ウィスター系雄ラット100～120gを使用し，実験中は固形飼料により飼育した。〔^{3}H〕-DL-E-64は大正製薬より提供して頂いた。

標識検体は担体を加えて生理食塩水溶液とし，1mg/匹（41 μCi/匹）を腹腔内に投与した。血清と肝臓を分離し，肝臓は生食で十分かん流した後肝臓はDe duve[5)]らの方法によって細胞下分画を行った。血清及び各分画は凍結融解後3倍量のメタノールで沈澱させ，上清はそのまま，沈澱は無標識のE-64を含む75%メタノールで洗條後，NCS (Amersham) 1.0 mlを加え，一晩放置後ACS II シンチレーター10 mlを添加し，液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。メタノール上清の放射活性を遊離のE-64とし，メタノール沈澱画分をタンパク結合性のE-64とした。カテプシンB活性はベンゾイル-DL-アルギニン・パラニトロアニリドを基質としてOttoら[6)]の方法で測定した。

結　果

肝臓を細胞下分画を行ない，顆粒画分は凍結融解後，0.38 μCi/g肝の〔^{3}H〕-E-64をin vitroで各分画に添加して，10分間インキュベート後，遊離，結合及び全放射活性を測定した結果が表1に示されている。細胞質やミクロゾーム分画にはタンパク結合性放射活性は極めて低く，主として軽ミトコンドリア以下（リソゾームを主体とする）の顆粒分画にある。同時に測定したリソゾームの標識酵素カテプシンB活性は放射活性の分布とよく一致しており，添加した〔^{3}H〕-E-64は主としてリソゾーム分画の蛋白に結合することがわかる。なお2倍量の〔^{3}H〕-E-64を加えても，それ以上タンパク結合E-64の増加はみられない。

次にラットに〔^{3}H〕-E-64を1回腹腔内投与して，経時的にラットを殺し，血清及び肝を分離した。E-64投与後24時間の細胞下分画におけるE-64の放射活性の分布を示したのが図1である。リソゾームの標識酵素としてのカテプ

* 徳島大学医学部酵素研究施設酵素化学部門

表1　〔^{3}H〕-(DL)-E-64 のラット肝各細胞画分への結合

fractions	total	free	bound	bound/total
		DPM/g liver		%
Homogenate	258,300	169,000	61,800	23.9
Cell debris	258,200	207,200	35,500	13.7
Heavy Mit.	257,900	217,000	21,200	8.2
Light Mit.	255,000	177,400	62,900	24.7
Microsome	244,500	234,200	4,100	1.7
Cytosol	196,500	173,800	3,900	2.0

各細胞画分に 0.38 μCi/g 肝の〔^{3}H〕-(DL)-E-64 を添加し10分，37°C でインキュベート後，75%(v/v) のメタノール沈澱を行ない，遊離 E-64 とタンパク結合 E-64 とに分離し，放射活性を測定した。

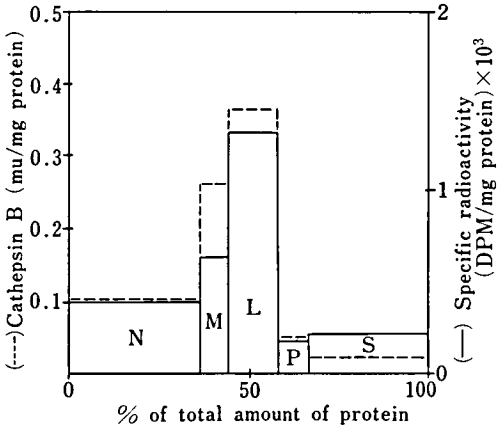


図1　放射活性の分布パターン
N；核及び細胞破壊物，
M；重ミトコンドリア，
L；軽ミトコンドリア，
P；ミクロゾーム
S；細胞

シンB活性が同時に示されている。E-64 の分布はカテプシンB活性の分布とよく一致しており，肝内に入った E-64 はリソゾームに集中すると考えられる。E-64 投与後1時間目では遊離の E-64 の放射活性が24時間目に比し高いが，タンパク結合性の放射活性の分布は24時間目の結合とほぼ一致していた。

血清，肝細胞質及び全沈澱画分（図1の結果から沈澱分画への取り込みは大部分リソゾームへの取込みとみなし得る）への取り込み時間経過をみると（図2），血清，細胞質，沈澱画分への順に取り込みの増大がみられる。この時，血清及び細胞質では大部分が遊離の E-64 として存在している。この結果は，血中の E-64 は一旦細胞質を経由して，リソゾームの中へ取り込まれることを示唆している。沈澱画分のタンパク結合性放射活性の推移とリソゾームのカテプシンB活性との逆相関を示したのが図3である。E-64 の投与によりカテプシンB活性が阻害されているが，その時間的経過はリソゾーム中のタンパク結合放射活性と鏡像関係にありリソゾームに取り込まれた E-64 はチオール性プロテアーゼと結合して存在すると推定される。

考　　察

ラット肝ではカテプシンB及びLを合わせて約 2～3n mole/g liver 存在すると推定されている[7]。リソゾームのタンパク結合部分に取り込まれた E-64 は放射活性より計算すると 1.5～2n mole/g liver であった。カテプシンB1モルは1モルの E-64 の結合によって完全に阻害されるので，E-64 投与後実際に測定したリソゾーム中の低いカテプシンB活性は，リソゾームに取り込まれた放射活性から説明されるであろう。

今回我々の結果では E-64 は細胞質を経由してリソゾームに選択的に取り込まれる可能を示し，ピノサイトージスによるとは考えにくい。しかし，リソゾームへ取り込まれる全てのプロテアーゼ阻害剤は同じ機構ばかりでなく，特にロイペプチンは E-64 とは異なる可能性が考えられる。

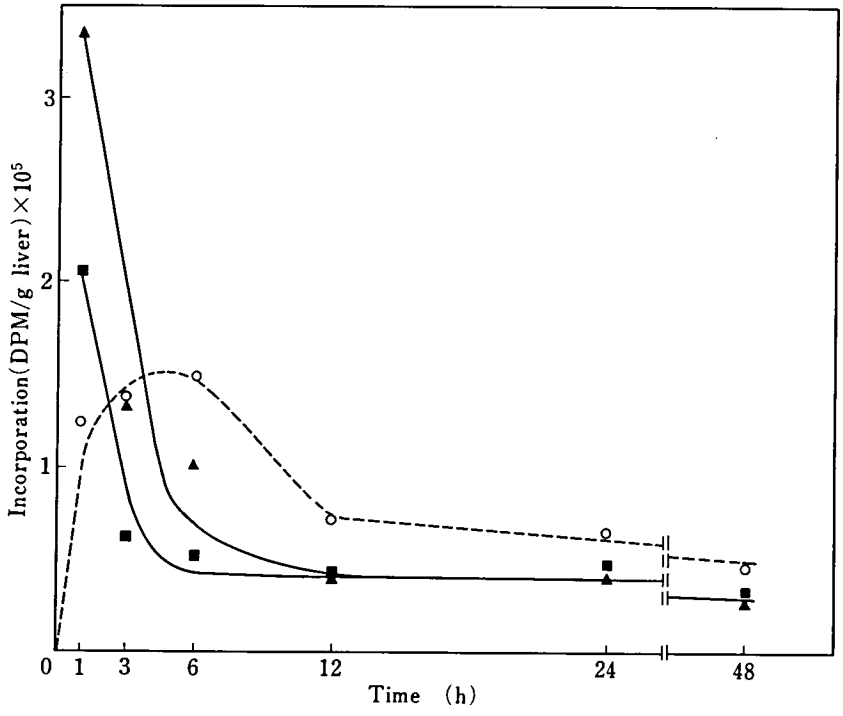


図2 〔³H〕-(DL)-E-64 の血清及び肝への分布の時間経過

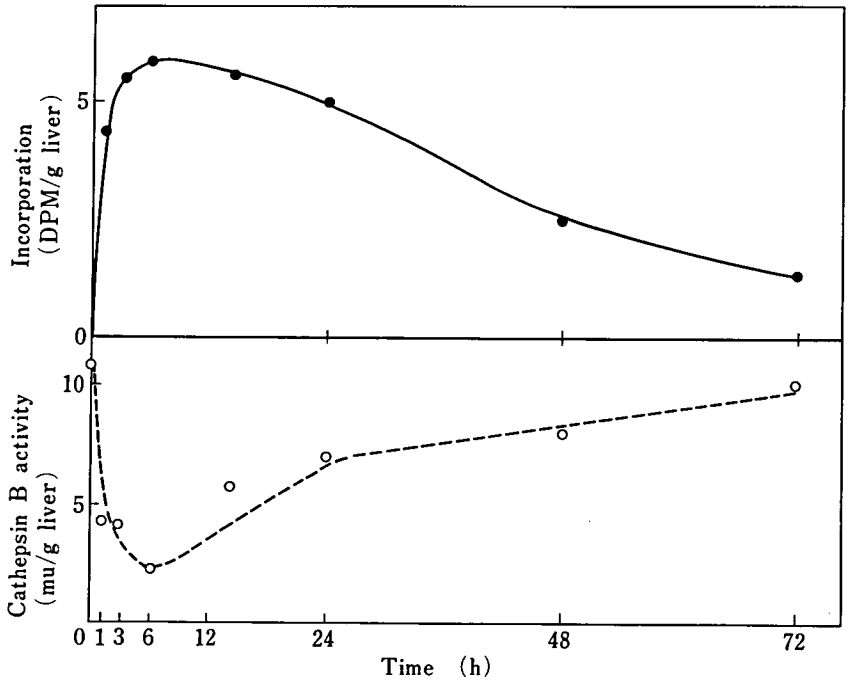


図3 〔³H〕-(DL)-E-64 投与後の肝リソゾーム分画におけるタンパク結合性放射活性とカテプシンB活性の時間経過

文　献

1) Kominami, E., Hashida, S. and Katunma, N.: Inhibiting of degradation of rat liver aldolase and lactic dehydrogenase by E-64 or leupeptin in vivo, Biochem. Biocphys. Res. Commun., **93**, 713-719, 1980.

2) 勝沼信彦，橋田誠一，唐渡孝枝，木南英紀：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 and in vitro) 昭和54年度 厚生省 新薬開発研究報告書，109-115, 1979.

3) Hashida, S., Towatari, T., Kominami, E. and Katunma, N,: Inhibitions by E-64 derives of rat liver cathepsin B and cathepsin L in vitro and in vivo, J. Biochem., 88. 1805-1811, 1980.

4) 大関正弘，野津隆司，諏訪俊男，河野喜郎：E-64 及び類縁体の生体内動態に関する研究，昭和54年度厚生省新薬開発研究報告書，145-154, 1979.

5) De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F.: Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue, Biochem. J., **60**, 604-617, 1955.

6) Otto, K. and Bhakdi, S.: Zur kenntnis des kathepsins B_1 spzititat und eigenschaften, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **350**, 1577-1588, 1969.

7) Kirschke, H., Langner, J., Riemann, S., Wiederanders, B., Ansorge, S. and Bohley, P.: Lysosoml cyseine-proteinases, in Protein Degradation in Health and Disease (Ciba Foundation Symposium 75), p. 15-25, 1980.

23. E-64-c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* 福 島 清 実* 河 野 喜 郎*
浦 野 英 俊* 吉 田 英 生*

目　的

E-64-c は E-64 の類縁化合物のスクリーニングにより選出されたもので，筋ジストロフィーに対する治療効果が期待されている。先に著者[1]は E-64-c の生体内動態について，^{3}H 標識体を用いて予備的検討を行ったが，今回前臨床試験の一環として新たに ^{14}C 標識体を合成し，これを用いてラット及びウサギにおける吸収，分布，代謝及び排泄について検討した。

実験材料及び実験方法

1．標識化合物

実験に使用した〔^{14}C〕E-64-c は L-〔U-^{14}C〕leucine (The Radiochemical Centre) から沢田[2]により当社総合研究所で合成された。〔^{14}C〕E-64-c の比放射能は 9.13 μCi/mg であり，薄層クロマトグラフィーによる放射化学的純度はほぼ 100% であった。

2．実験動物及び検体投与法

動物は体重 180～200 g の Sprague-Dawley 系雄ラット及び体重 2.5-3.0 kg の日本在来白色種雄ウサギを使用した。別にラットについて性差検討のため同週令の雌ラット，胎仔移行及び乳汁中移行検討のため妊娠18日目及び分娩後15日目の雌ラットを使用した。ラットは日本チャールス・リバー（株），ウサギは金丸動物（株）から購入し，1週間予備飼育後実験に供した。

標識検体は予め少量の 1/10 N 重曹水に溶解後，生理食塩水で一定量とし，特記する場合を除いて 5 mg/kg を単回又は10日間連続して動物背部へ皮下投与又は経口ゾンデを用いて胃内へ直接投与した。別にラットは大腿静脈，ウサギは耳介静脈から静脈内投与も行った。なお定量実験では概ね1群4匹を使用し，単回経口投与時は投与前 16 hr 及び投与後 6 hr 絶食した。

3．血中濃度の測定

〔^{14}C〕E-64-c をラット及びウサギに静脈内及び皮下投与，並びに 5, 20, 100 mg/kg をラットに経口投与した後，ラットは尾静脈より，ウサギは耳介静脈より経時的に 20 μl ずつ採血し，その放射能を測定した。

4．尿，糞及び胆汁中排泄率の測定

ラット及びウサギに〔^{14}C〕E-64-c を経口又は皮下投与し，代謝ケージに収めて 24 hr ごとに5日後までの尿と糞を分別採取し，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 を施した後薬物投与し，ラットはボールマンケージに収め，ウサギは固定台に保定して 1 hr 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。更に採取したラットの胆汁の一部を別のラットの十二指腸内へ投与し，同様に胆汁中放射能を測定することにより腸肝循環の有無を調べた。

* 大正製薬株式会社総合研究所

5．組織内濃度の測定

ラットに〔^{14}C〕E-64-cを経口及び皮下投与後の各所定時間に放血死させた後，各種組織を摘出して放射能を測定した。血液は一部を採取後，残部を遠心分離して血漿を得た。なお妊娠ラットについても経口及び皮下投与後の所定時間に同様に処理した。

6．乳汁中濃度の測定

分娩後15日目のラットに〔^{14}C〕E-64-cを投与し，所定の採乳時間の1 hr 前に予め oxytocin（パルトミン注射液，持田製薬）0.5 U/匹を腹腔内投与して 20 μl ずつ採乳し，同時に尾静脈から採血して放射能を測定した。

7．連続投与実験

ラットに〔^{14}C〕E-64-cを1日1回10日間連続経口及び皮下投与し，投与期間中各日の経口投与後 6，24 hr 及び皮下投与後 1/6，24hr の血中濃度，並びに最終投与後 120 hr までの血中濃度推移を3，と同様にして測定した。また最終投与後経口投与では 6，24，120 hr 皮下投与では 1/6，24，120 hr の組織内濃度，更に投与期間中 24 hr ごとに10日間及びその後5日間の尿糞中への排泄についても単回投与時と同様に測定した。

8．代謝物の検索

〔^{14}C〕E-64-c をラット及びウサギに皮下又は経口投与し，24 hr までの尿及び胆汁中代謝物をチャート1に示す操作に従い，またラットに 20 mg/kg を単回又は 5 mg/kg を10日間連続皮下及び経口投与したときの血漿及び筋肉中代謝物をチャート2に示す操作に従って抽出精製後，シリカゲルプレート（Merk, Silica gel 60 precorted）上で展開した後，薄層クロマトスキャンナー（Aloka, JTC-202 B 型）で走査す

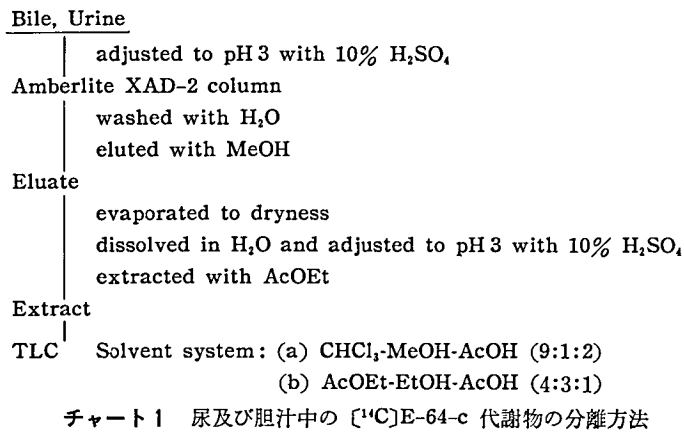


チャート1　尿及び胆汁中の〔^{14}C〕E-64-c 代謝物の分離方法

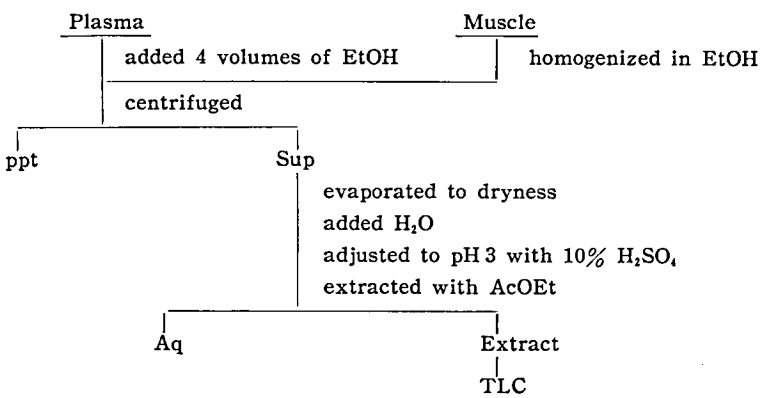


チャート2　血漿及び筋肉中の〔^{14}C〕E-64-c 代謝物の分離方法

るとともに，各画分の放射能を測定した。

9．放射能の測定

血液は Soluene-350 (Packard) —イソプロパノール（1：1）0.5 ml で可溶化後，30%過酸化水素水 0.4 ml を添加して脱色し，0.5 N 塩酸-Insta-Gel (Packard) (1：9) 10 ml を加えて液体シンチレーションカウンター (Packard, 3255型) で放射能を測定した。また血漿は 100 μl に，尿は 50 ml，胆汁は 10 ml にメスアップしてその 200 μl に，乳汁は Soluene-350 0.5 ml を添加して可溶化後，また代謝物の水溶性画分及び酢酸エチル画分 200 μl に，いずれも Insta-Gel 7 ml を加え，ほかに糞は乾燥後2倍量の蒸留水を加えて乳鉢で均質化し，50-100 mg の一定量を採取して Soluene-350 1 ml で溶解後，30%過酸化水素水 0.4 ml で脱色してから Insta-Gel 10 ml を加えて液体シンチレーションカウンターで測定した。一方，組織は蒸留水を添加して20%ホモジネート液を調製し，その 0.5 ml を分取して減圧乾固後蒸留水 0.1 ml を加え，あるいは湿重量 100 mg 又は小臓器はそのままを用い，Soluene-350 1 ml で可溶化後，蛋白沈澱画分も Soluene-350 1 ml で可溶化後，また薄層クロマト板上の代謝物存在部位かきとりシリカゲルは Carb-O-sil (Packard) 400 mg 添加後，いずれも Insta-Fluor (Packard) 10 ml を加えて液体シンチレーションカウンターで測定した。

10．オートラジオグラフィー

ラットに〔^{14}C〕E-64-c 20 mg/kg を経口及び皮下投与後，各所定時間に動物をエーテル麻酔死させ，直ちにドライアイス-n-ヘキサン中で凍結した。凍結動物は −18° の PMV クライオミクロトーム (LKB, 2250型) で 40 μ 厚の全身切片を作成した。切片は凍結乾燥後マクロオートラジオグラフィー用フィルム（サクラ，MARG フィルム ^{3}H タイプ）と1週間露出し，全身オートラジオグラムを得た。

また皮下投与後 30 min の大腿四頭筋について，凍結後 −15° のクリオスタット（中川製作所，NA-300 型）内でミクロトーム (Leiz, 1300型) にて 5 μ 厚の凍結切片を作成し，−20° 下で原子核乾板（フジ）に20日間露出し，現像，定着後 Hematoxylin-Eosin 染色を施して光学顕微鏡で 500 倍のミクロオートラジオグラムを得た。

結　　果

1．血中濃度

ラット及びウサギに〔^{14}C〕E-64-c 5 mg/kg

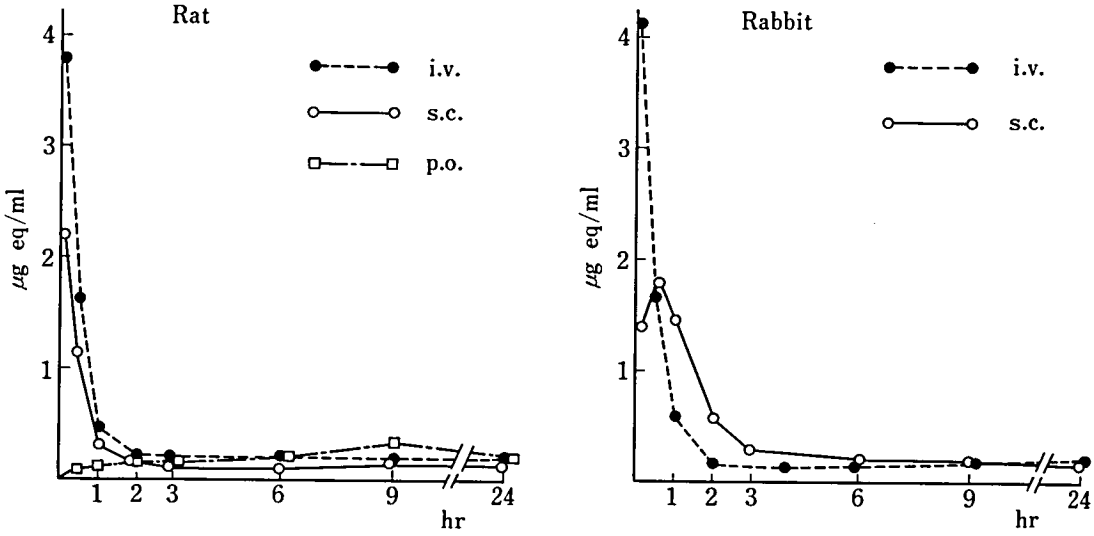


図1　ラット及びウサギに〔^{14}C〕E-64-c 5 mg/kg を投与後の血中放射能濃度
各点は4匹の平均値を示す。

表1　ラット及びウサギに〔^{14}C〕E-64-c 投与時の薬動力学的パラメーター

	Rat 5 mg/kg i. v.		Rat 5 mg/kg s. c.		Rat p. o.				Rabbit 5 mg/kg	
					Male			Female		
	Male	Female	Male	Female	5	20	100	5 mg/kg	i. v.	s. c.
C_{max}(μg/ml)	3.77	2.19	2.19	1.29	0.33	0.88	2.53	0.28	4.18	1.79
t_{max}(hr)	0.17	0.17	0.17	0.33	9	9	9	6	0.17	0.50
$t_{1/2}$(hr)	0.27*	0.35*	0.30	0.58	28.1	24.5	23.2	43.6	0.30*	0.89
$AUC_{0\to24hr}$ (μg hr/ml)	6.68	5.74	4.33	4.59	5.75	13.49	38.87	5.25	6.74	7.25

* $t_{1/2\alpha}$

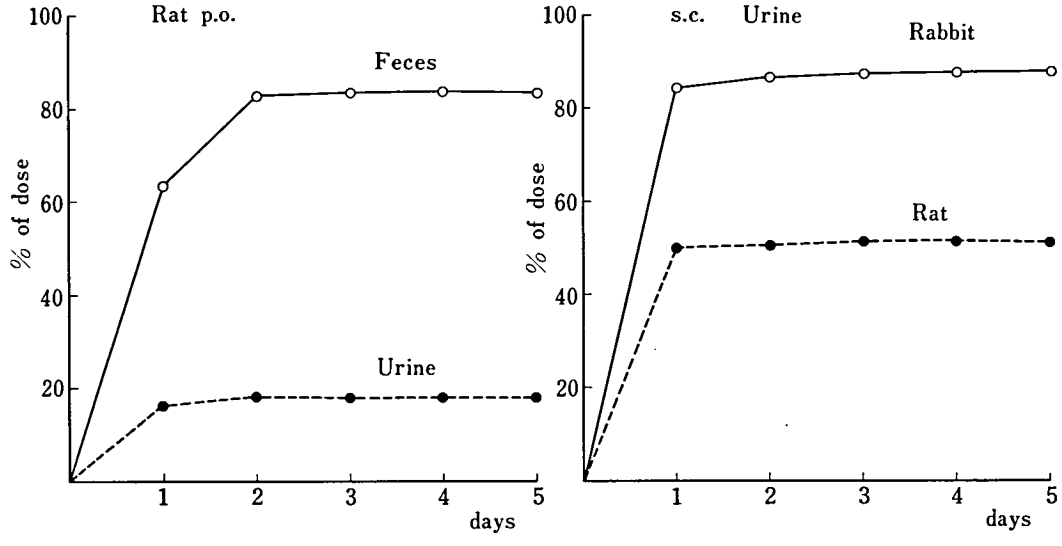


図2　ラット及びウサギに〔^{14}C〕E-64-c 5 mg/kg を経口又は皮下投与後の放射能の尿糞中排泄　各点は4匹の平均値を示す

を投与したときの血中濃度推移を図1に，また血中放射能濃度の薬動力学パラメーターを表1に示す。静脈内投与時の 1 hr 後までの半減期($t_{1/2\alpha}$) はラット，ウサギそれぞれ 16.0，18.1 min であり，両種ほぼ同レベルで速やかに減衰した。皮下投与時の最高血中濃度はラットでは 10 min 後，ウサギでは 30 min 後にそれぞれ 2.19，1.79 μg eq/ml であり，初期の半減期はそれぞれ 17.7，53.6 min で，濃度レベルは近似していたが，ウサギの方が血中への移行，消失とも遅延する傾向がみられた。

また経口投与時のラットの血中濃度は漸増，漸減し，9 hr 後に 0.33 μg eq/ml の最高値を認めた。別に雌ラットでは雄に比べて最高血中濃度が若干低い傾向がみられたが，AUC 上の差異は少なかった。また 5，20，100 mg/kg を経口投与した場合の血中濃度では用量に依存した増加傾向を認めた。

2．尿糞及び胆汁中への排泄

〔^{14}C〕E-64-c をラットに経口投与したときの尿糞中への排泄，並びにラット及びウサギに皮下投与したときの尿中排泄を図2に，また胆汁中への排泄を図3に示す。ラットに経口投与後速やかに主に糞中へ，一部が尿中へ排泄された。皮下投与時の尿中排泄は5日後までにラットでは投与放射能の50.7%であるのに対し，ウ

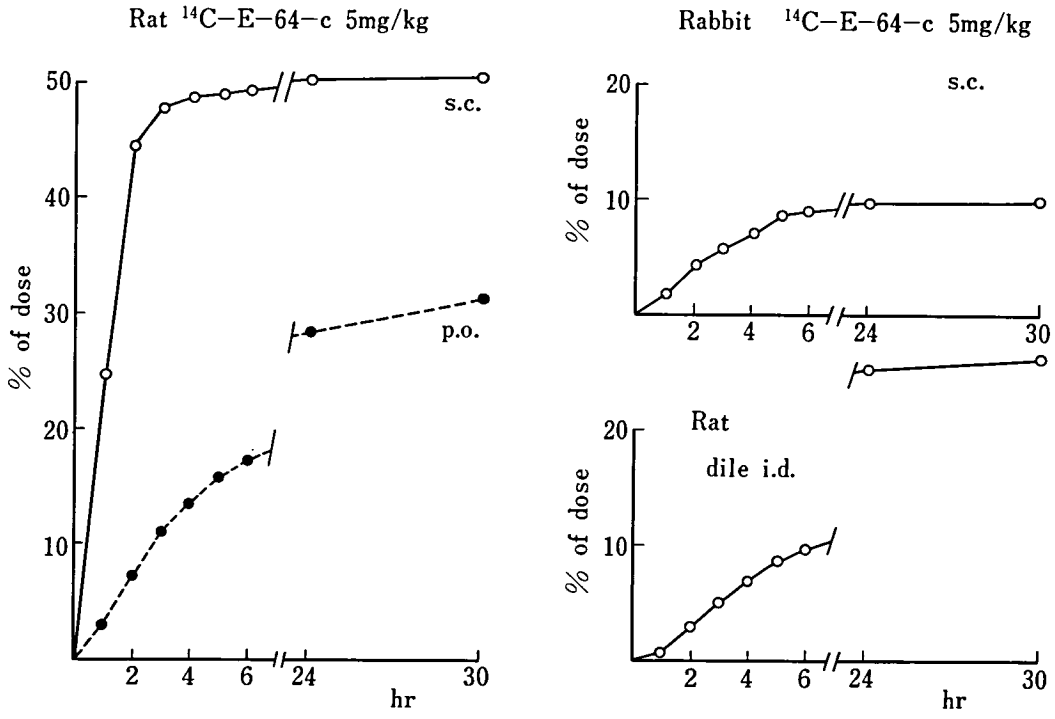


図3 ラット及びウサギに〔^{14}C〕E-64-c を皮下又は経口投与後の放射能の胆汁中排泄
各点は4匹の平均値を示す

サギでは87.8%が排泄された。またラットの胆汁中への排泄率は 30 hr 後までに皮下及び経口投与でそれぞれ，50.1，31.1%に達し，これに対しウサギでは皮下投与時9.7%に過ぎなかった。なおラットから採集した胆汁を別のラットの十二指腸内に注入して胆汁中排泄を調べたところ26.4%が回収された。

3．オートラジオグラフィー

〔^{14}C〕E-64-cをラットに経口投与後 3，9 hr，皮下投与後，30 min，3 hr の全身オートラジオグラムを図4，図5に示す。両投与時とも肝，腎及び消化管内容に高濃度の分布があり，ほかに経口投与時は骨髄，消化管壁等，皮下投与時は投与部位，血液等にも分布を認めた。筋肉はマクロオートラジオグラムでは特に黒化像としては検出されなかったが，皮下投与後 30 min の大腿四頭筋のミクロオートラジオグラムを作成した結果，筋細胞上並びに血管内，血管壁及びその周辺の結合組織に黒化銀粒子を認めた（図6）。

4．組織内濃度

〔^{14}C〕E-64-c をラットに経口投与後 3，6，24 hr，及び皮下投与後 1/6，3，24 hr の組織内放射能濃度を表2及び表3に示す。経口投与時は肝と腎に最も高濃度の分布があり，ほかに骨髄，胃壁，副腎，膵にも若干の分布を認めた。皮下投与時も肝と腎に著明な分布があり，骨髄と膵にも若干の移行がみられたが，それらを除き血中濃度推移に従って速やかに減衰した。

5．連続投与時の吸収，分布及び排泄

〔^{14}C〕E-64-c をラットに10日間連続経口及び皮下投与したときの血中濃度推移を図7に示す。両投与時とも5—7日目以後ほぼ定常状態に達し，連続投与により血中濃度の明らかな増加と投与中止後も長時間持続する傾向がみられた。すなわち10回投与後 24 hr の値は単回投与に比較して経口投与時は約4倍，皮下投与時は約7倍に上昇し，蓄積性と残留性が認められた。

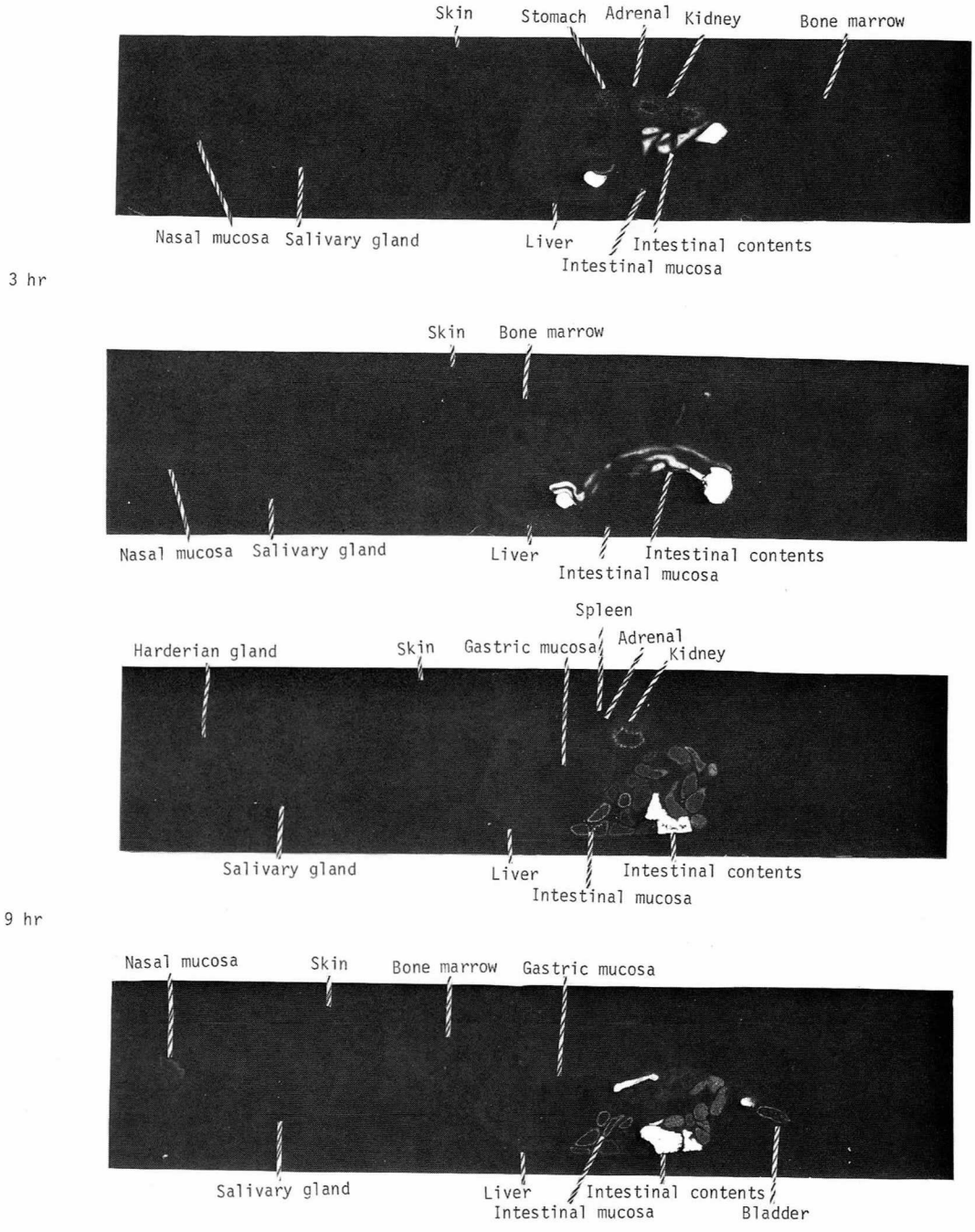


図4　ラットに〔^{14}C〕E-64-c 20 mg/kg を経口投与後，3, 9 hr の全身オートラジオグラム

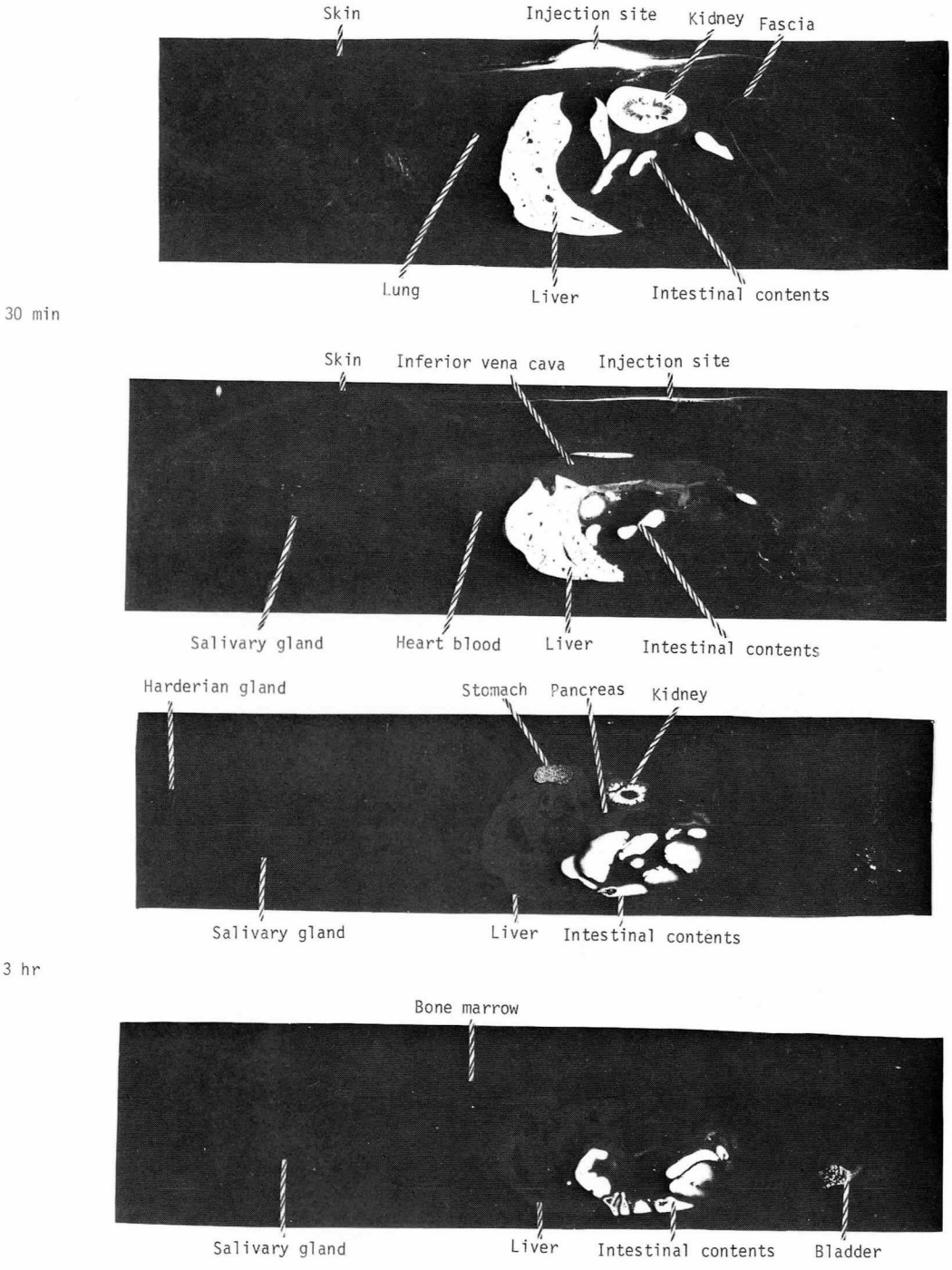


図5　ラットに〔^{14}C〕E-64-c 20 mg/kg を皮下投与後，30 min, 3 hr の全身オートラジオグラム

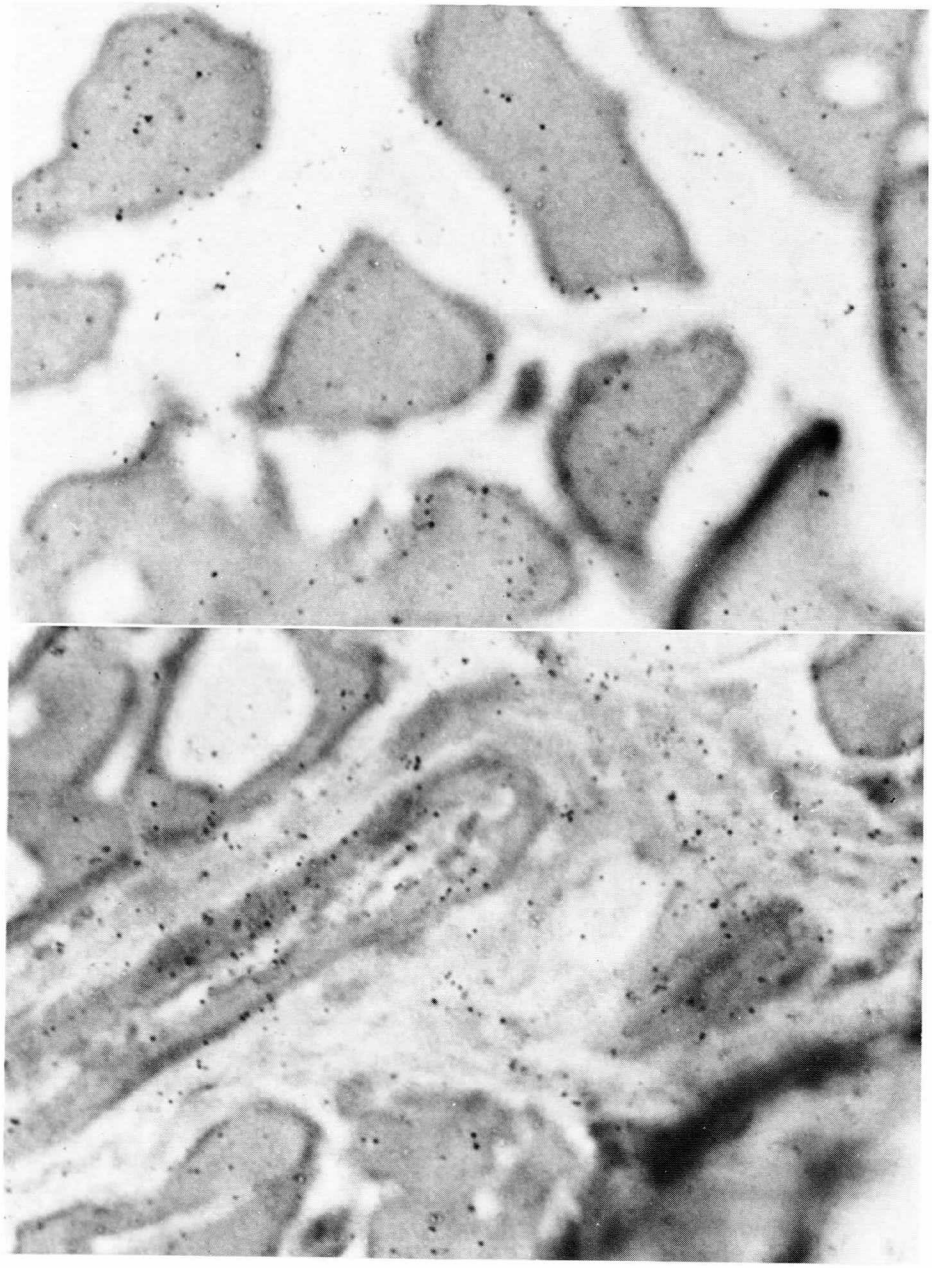


図6　ラットに〔^{14}C〕E-64-c 20 mg/kg を皮下投与後，30 min の大腿四頭筋のミクロオートラジオグラム

表2 ラットに〔^{14}C〕E-64-c 5 mg/kg を経口投与後の放射能の組織内分布

Tissue	Radioactive concentration (μg E-64-c eq/ml or g)		
	3	6	24 hr
Blood	0.180 ± 0.023	0.194 ± 0.031	0.138 ± 0.034
Plasma	0.210 ± 0.045	0.114 ± 0.018	0.044 ± 0.007
Muscle	0.109 ± 0.059	0.038 ± 0.014	0.069 ± 0.012
Liver	1.537 ± 0.166	1.431 ± 0.206	0.825 ± 0.137
Kidney	1.215 ± 0.074	1.318 ± 0.193	1.714 ± 0.168
Heart	0.065 ± 0.003	0.050 ± 0.008	0.082 ± 0.013
Lung	0.110 ± 0.012	0.091 ± 0.023	0.155 ± 0.012
Brain	0.057 ± 0.004	0.044 ± 0.005	0.066 ± 0.012
Spleen	0.139 ± 0.026	0.125 ± 0.032	0.112 ± 0.005
Bone-marrow	0.406 ± 0.053	0.389 ± 0.095	0.474 ± 0.171
Thymus	0.078 ± 0.008	0.074 ± 0.010	0.114 ± 0.032
Adrenal	0.362 ± 0.073	0.267 ± 0.065	0.391 ± 0.026
Thyroid	0.131 ± 0.023	0.108 ± 0.036	0.259 ± 0.048
Testis	0.052 ± 0.004	0.042 ± 0.012	0.097 ± 0.018
Prostate	0.175 ± 0.039	0.145 ± 0.048	0.282 ± 0.070
Hypophysis	0.189 ± 0.036	0.182 ± 0.079	0.353 ± 0.018
Pancreas	0.440 ± 0.094	0.260 ± 0.028	0.129 ± 0.041
Stomach	0.583 ± 0.082	0.312 ± 0.079	0.058 ± 0.004
Small intestine	0.172 ± 0.015	0.193 ± 0.055	0.067 ± 0.000
Skin	0.180 ± 0.011	0.099 ± 0.023	0.210 ± 0.051
Fat	0.091 ± 0.018	0.048 ± 0.014	0.066 ± 0.018

数値は4匹の平均値 ±S.E. を示す

表3 ラットに〔^{14}C〕E-64-c 5 mg/kg を皮下投与後の放射能の組織内分布

Tissue	Radioactive concentration (μg E-64-c eq/ml or g)		
	1/6	3	24 hr
Blood	1.937 ± 0.142	0.110 ± 0.011	0.163 ± 0.032
Plasma	3.463 ± 0.168	0.180 ± 0.019	0.208 ± 0.020
Muscle	0.610 ± 0.109	0.091 ± 0.023	0.088 ± 0.009
Liver	16.785 ± 2.348	2.220 ± 0.132	1.435 ± 0.059
Kidney	19.368 ± 1.271	9.358 ± 0.543	7.463 ± 0.126
Heart	1.653 ± 0.171	0.078 ± 0.008	0.099 ± 0.016
Lung	1.679 ± 0.179	0.171 ± 0.017	0.170 ± 0.016
Brain	0.116 ± 0.046	0.058 ± 0.005	0.060 ± 0.000
Spleen	1.683 ± 0.339	0.159 ± 0.013	0.225 ± 0.023
Bone-marrow	0.609 ± 0.050	0.452 ± 0.028	0.464 ± 0.018
Thymus	1.678 ± 0.383	0.110 ± 0.028	0.151 ± 0.016
Adrenal	1.077 ± 0.248	0.259 ± 0.014	0.277 ± 0.032
Thyroid	0.512 ± 0.078	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Testis	1.065 ± 0.121	0.085 ± 0.004	0.094 ± 0.000
Prostate	0.549 ± 0.174	0.194 ± 0.021	0.070 ± 0.006
Hypophysis	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
Pancreas	1.780 ± 0.311	0.471 ± 0.012	0.309 ± 0.028
Stomach	1.125 ± 0.138	0.166 ± 0.006	0.117 ± 0.019
Small intestine	1.127 ± 0.032	0.242 ± 0.021	0.162 ± 0.053
Skin	1.188 ± 0.090	0.186 ± 0.006	0.230 ± 0.011
Fat	1.007 ± 0.055	0.103 ± 0.039	0.047 ± 0.005

数値は4匹の平均値 ±S.E. を示す

表4　ラットに〔^{14}C〕E-64-c 5 mg/kg を1日1回10日間連続経口投与後の放射能の組織内分布

Tissue	Radioactive concentration (μg E-64-c eq/ml or g)		
	6	24	120
Blood	0.713 ± 0.082	0.704 ± 0.021	0.573 ± 0.034
Plasma	0.161 ± 0.017	0.140 ± 0.012	0.049 ± 0.001
Muscle	0.460 ± 0.018	0.326 ± 0.099	0.435 ± 0.047
Liver	2.206 ± 0.090	1.549 ± 0.098	0.848 ± 0.100
Kidney	4.779 ± 0.312	3.855 ± 0.131	1.984 ± 0.265
Heart	0.569 ± 0.041	0.459 ± 0.024	0.523 ± 0.123
Lung	0.832 ± 0.046	0.666 ± 0.019	0.389 ± 0.042
Brain	0.363 ± 0.022	0.264 ± 0.003	0.238 ± 0.018
Spleen	0.804 ± 0.031	0.669 ± 0.055	0.431 ± 0.052
Bone-marrow	1.339 ± 0.100	1.012 ± 0.051	0.533 ± 0.050
Thymus	0.700 ± 0.047	0.548 ± 0.008	0.261 ± 0.025
Adrenal	1.431 ± 0.064	1.143 ± 0.139	0.726 ± 0.132
Thyroid	0.866 ± 0.047	0.763 ± 0.056	0.511 ± 0.142
Testis	0.442 ± 0.030	0.405 ± 0.039	0.302 ± 0.024
Prostate	1.031 ± 0.119	0.751 ± 0.055	0.536 ± 0.053
Hypophysis	1.100 ± 0.037	0.806 ± 0.047	0.608 ± 0.157
Pancreas	1.218 ± 0.064	0.728 ± 0.022	0.489 ± 0.049
Stomach	1.499 ± 0.039	0.715 ± 0.046	0.428 ± 0.035
Small intestine	1.302 ± 0.182	0.715 ± 0.064	0.367 ± 0.087
Skin	0.608 ± 0.077	0.568 ± 0.018	0.348 ± 0.037
Fat	0.503 ± 0.112	0.536 ± 0.009	0.445 ± 0.019

数値は4匹の平均値 ±S. E. を示す

表5　ラットに〔^{14}C〕E-64-c 5 mg/kg を1日1回10日間連続皮下投与後の放射能の組織内分布

Tissue	Radioactive concentration (μg E-64-c eq/ml or g)		
	1/6	24	120
Blood	3.956 ± 0.275	1.119 ± 0.049	1.152 ± 0.036
Plasma	6.467 ± 0.139	0.395 ± 0.131	0.095 ± 0.013
Muscle	0.978 ± 0.047	0.865 ± 0.070	1.029 ± 0.049
Liver	21.336 ± 2.143	3.220 ± 1.295	2.091 ± 0.586
Kidney	68.468 ± 5.244	44.014 ± 5.830	23.349 ± 3.892
Heart	1.608 ± 0.172	0.941 ± 0.085	0.969 ± 0.087
Lung	2.597 ± 0.216	1.576 ± 0.101	1.078 ± 0.034
Brain	0.538 ± 0.014	0.548 ± 0.168	0.569 ± 0.020
Spleen	1.591 ± 0.041	1.361 ± 0.087	0.896 ± 0.080
Bone-marrow	2.851 ± 0.195	2.015 ± 0.195	1.472 ± 0.167
Thymus	1.550 ± 0.149	1.194 ± 0.129	0.856 ± 0.061
Adrenal	2.730 ± 0.268	2.578 ± 0.166	1.836 ± 0.219
Thyroid	2.335 ± 0.190	1.583 ± 0.170	1.358 ± 0.115
Testis	0.953 ± 0.053	0.796 ± 0.042	0.742 ± 0.022
Prostate	1.874 ± 0.110	1.639 ± 0.094	1.182 ± 0.068
Hypophysis	3.008 ± 0.572	1.973 ± 0.137	1.550 ± 0.213
Pancreas	1.761 ± 0.152	1.850 ± 0.211	1.347 ± 0.193
Stomach	1.762 ± 0.089	1.040 ± 0.150	0.892 ± 0.056
Small intestine	3.301 ± 1.103	1.127 ± 0.144	0.916 ± 0.048
Skin	2.077 ± 0.228	0.875 ± 0.115	1.056 ± 0.120
Fat	0.915 ± 0.198	1.006 ± 0.119	1.107 ± 0.069

数値は4匹の平均値 ±S. E. を示す

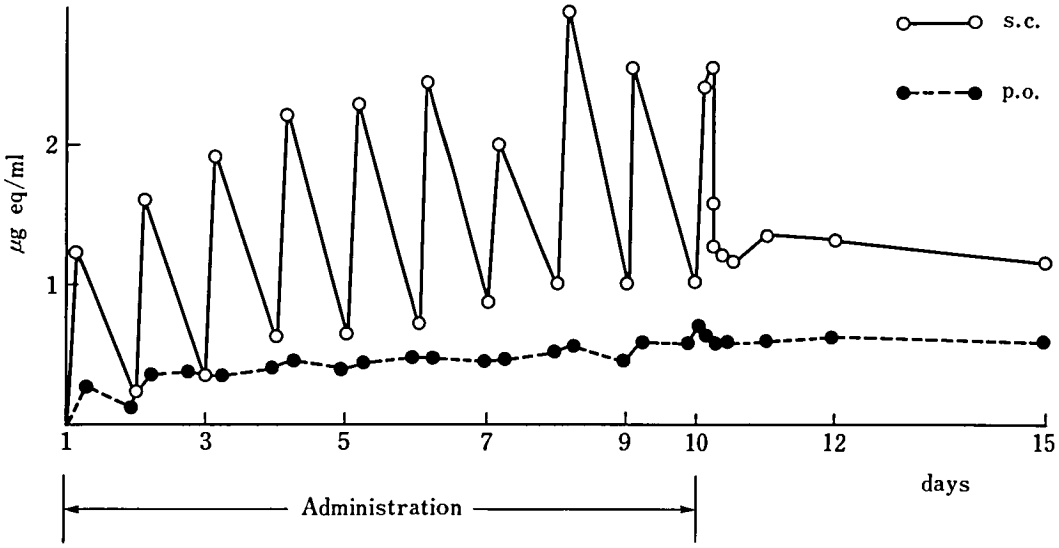


図7 ラットに〔^{14}C〕E-64-c 5 mg/kg を1日1回10日間連続皮下又は経口投与時の血中放射能濃度
各点は4匹の平均値を示す

一方，経口及び皮下連続投与後の組織内放射能濃度を表4及び表5に示す。血中濃度に対応してすべての組織で単回投与時より高い濃度を示し，最終投与後 120 hr も残留傾向を認めた。血中濃度は皮下連続投与後 10 min を除き，皮下及び経口投与時とも血漿よりはるかに高く，血球中への移行性が示唆された。また筋肉への分布も両投与時とも連続投与により単回投与時に比べて5—10倍の濃度増加がみられ，心筋でも同様な傾向が認められた。ほかに肝では連続投与により2倍弱であったが，腎，小腸，骨髄そのほかほとんどの組織で数倍ないし10倍の濃度増加がみられ，全身的にある程度の蓄積性があるものと考えられる。

また尿糞中への排泄に関しては，尿中排泄は累積投与量に対する回収率が経口投与後4日目以降11—12%のほぼ一定値を示し，皮下投与の場合は経日的に若干増加する傾向がみられたが，40—50%の範囲内であった。また糞中排泄も経口投与後6日目以降81—83%，皮下投与時は全期間を通じて31—35%とほぼ一定値を示した。経口投与の場合は単回投与時と異なり，非絶食だったため，連続投与初期に吸収，排泄の遅延がみられ，また皮下投与の場合は回収率がやや低く，一部が体内に残留する傾向が示唆された。

6．胎仔及び乳汁中への移行

〔^{14}C〕E-64-c を妊娠ラットに経口及び皮下投与したときの組織への分布を表6に示す。胎仔への移行は初期には少ないが，24 hr 後には母獣血中濃度と同レベルになり，胎盤関門の存在とある程度の移行性を認めた。

また乳汁中濃度は皮下投与 20 min 後では極めて低いが，血中濃度推移に遅れて乳汁中への移行が認められ，経口，皮下投与時とも 3 hr 以降は血中濃度の1.4—3.7倍程度であった（表7）。

7．血漿，筋肉，尿及び胆汁中代謝物

〔^{14}C〕E-64-cをラットに経口及び皮下投与後，またウサギに皮下投与後 24 hr の尿及び胆汁中代謝物の酢酸エチル抽出層の薄層クロマトスキャンニングの結果を図8及び図9に示す。酢酸エチル層中に尿中放射能の85—90%が抽出され，ラットに経口投与したときは極性の低い未知代謝物が大量に生じ，未変化の E-64-c は酢酸エチル層中放射能の7.3%に過ぎなかったが，皮下投与時は50% 以上が未変化体として存在し，ウサギの場合は更に 72.2% と高率であっ

表6 妊娠ラットに〔^{14}C〕E-64-c 5 mg/kg を皮下又は経口投与後の放射能の組織内分布

	Radioactive concentration (μg E-64-c eq/ml or g)			
	s. c.		p. o.	
	1/3	24 hr	6	24 hr
Blood	2.533 (1.00)	0.147 (1.00)	0.289 (1.00)	0.170 (1.00)
Liver	18.476 (7.29)	1.333 (9.07)	0.879 (3.04)	0.783 (4.61)
Kidney	38.292(15.12)	9.707(66.03)	1.809 (6.26)	1.143 (6.72)
Muscle	0.614 (0.24)	0.027 (0.18)	0.036 (0.12)	0.044 (0.26)
Placenta	0.849 (0.34)	0.191 (1.30)	0.153 (0.53)	0.243 (1.43)
Amniotic fluid	0.036 (0.01)	0.017 (0.12)	0.011 (0.04)	0.012 (0.07)
Fetus	0.024 (0.01)	0.170 (1.16)	0.069 (0.24)	0.243 (1.43)
Fetal blood	0.110 (0.04)	0.139 (0.95)	0.094 (0.33)	0.146 (0.86)
Fetal liver	0.110 (0.04)	0.314 (2.14)	0.229 (0.79)	0.469 (2.76)
Fetal kidney	0.091 (0.04)	0.228 (1.55)	0.158 (0.55)	0.323 (1.90)

数値は4匹の平均値 ±S. E. を示す
( ) は血中濃度を1としたときの相対値を示す

表7 授乳期のラットに〔^{14}C〕E-64-c 5 mg/kg を経口又は皮下投与後の乳汁中及び血中放射能濃度

	Time (hr)	Radioactive concentration (μg E-64-c eq/ml or g)		M/B
		Milk	Blood	
p. o.	3	0.288 ± 0.039	0.213 ± 0.069	1.35
	6	0.589 ± 0.089	0.216 ± 0.020	2.73
	24	0.737 ± 0.154	0.197 ± 0.015	3.74
s. c.	1/3	0.077 ± 0.033	1.577 ± 0.167	0.05
	3	0.378 ± 0.043	0.239 ± 0.065	1.58
	24	0.402 ± 0.053	0.201 ± 0.043	2.00

数値は4匹の平均値 ±S. E. を示す

た。また胆汁中放射能の酢酸エチル層中への抽出率は31—34%であり，抱合体等水溶性代謝物が多いものと推定されるが，ラットに経口投与した場合は酢酸エチル抽出代謝物中の42.3%が未変化体であったのに対し，皮下投与時はラット，ウサギともほとんどが未変化体であった。

一方，ラットに〔^{14}C〕E-64-c を皮下及び経口投与後の血漿中代謝パターンを図10に示す。皮下投与後の血中動態は血漿中総放射能に対して未変化体が 10 min では76.6%，30 min では40.0%存在するが，経時的にその存在率は低下し，逆に蛋白沈澱画分とそのほかの代謝物の割合が増大した。また経口投与時は未変化体の割合が少なく，蛋白結合画分の割合が多かった。血漿中総放射能に対する未変化体の割合を AUC で比較すると，皮下投与時は45.4%であるのに対し，経口投与時は7.3% となり，経口投与時の代謝が著しいことが示唆された。

またラットに〔^{14}C〕E-64-c を単回又は10日間連続して皮下及び経口投与したときの筋肉内代謝パターンを表8に示す。皮下投与時は単回投与後 10 min では酢酸エチル層中へ筋肉中放射能の58.4%が，連続投与後 10 min では17.0%が抽出され，いずれもそのほとんどが未変化体であった。一方，経口投与時は単回投与後 6 hr では蛋白結合画分に多く，未変化体はほとんど存在しなかったが，連続投与後 6 hr では酢酸エチル層中に15.1%が抽出され，その大部分が

表8 ラットに〔^{14}C〕E-64-c 20 mg/kg を単回又は 5 mg/kg を1日1回10日間連続皮下又は経口投与後の筋肉内放射能の代謝パターン

	Muscle (μg eq/g)	EtOHppt %	Aq %	AcO Et extract	
				Total %	E-64-c %
Single s. c. 10 min	100 (2.70)	21.9	19.7	58.4	53.0
Single p. o. 6 hr	100 (0.16)	79.8	18.4	1.8	trace
Repeated s. c. 10 min	100 (0.98)	79.0	8.1	17.0	15.8
Repeated p. o. 6 hr	100 (0.46)	78.2	6.8	15.1	12.4

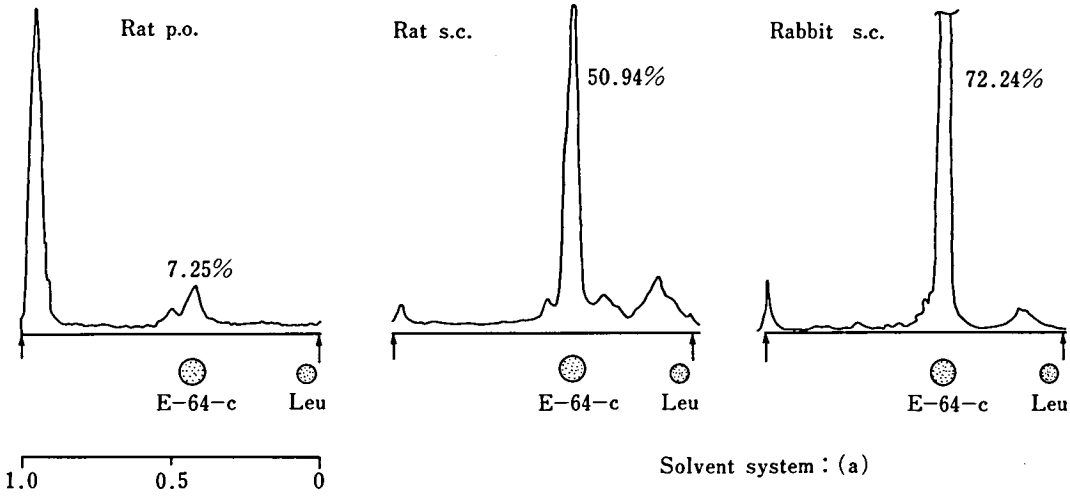


図8 ラット及びウサギに〔^{14}C〕E-64-c 5 mg/kg を経口又は皮下投与後 24 hr の尿抽出物のラジオ薄層クロマトグラム

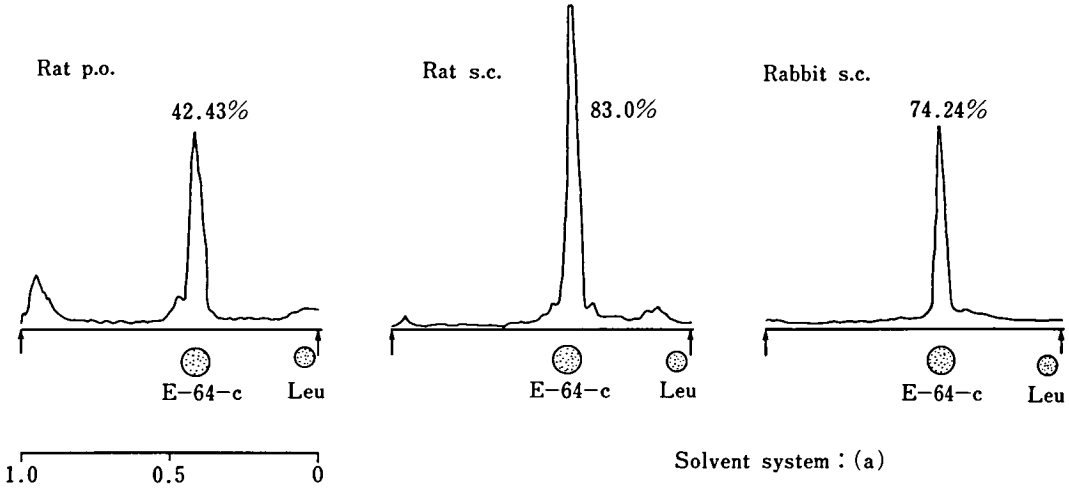


図9 ラット及びウサギに〔^{14}C〕E-64-c 5 mg/kg を経口又は皮下投与後 24 hr の胆汁抽出物のラジオ薄層クロマトグラム

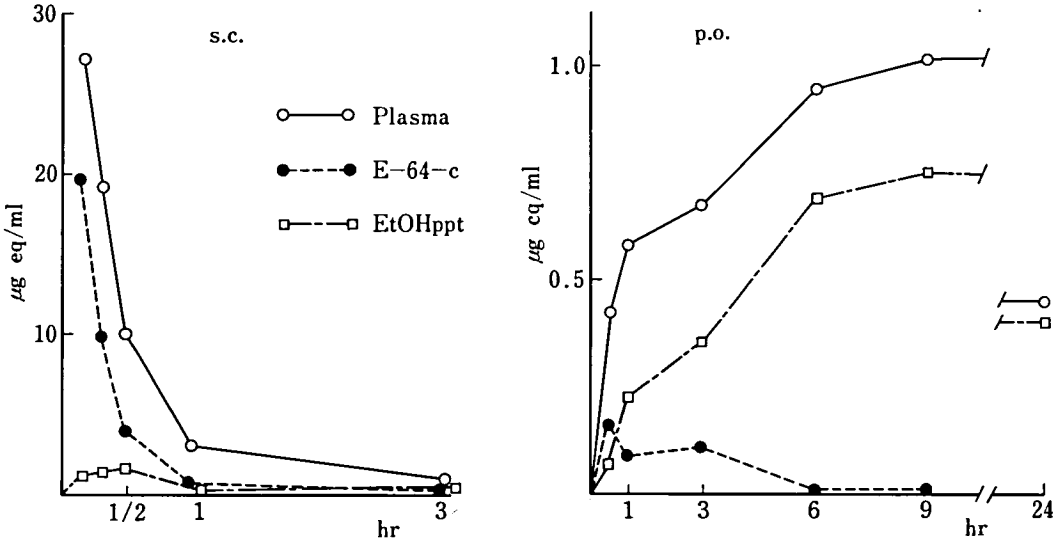


図10　ラットに〔^{14}C〕E-64-c 20 mg/kg を皮下又は経口投与後の血漿中放射能の代謝パターン

E-64-c であったことから，単回投与時の結果は酢酸エチル抽出が不十分だったことに起因して未変化体が少なかったものと考えられる。

別に蛋白結合率を限外沪過法で調べた結果，ヒト血清アルブミンと〔^{14}C〕E-64-c との *in vitro* での蛋白結合率は40%程度であり，ラットの血漿蛋白との *in vitro* での結合率は皮下投与後3 hr，経口投与後6 hr でそれぞれ84.5，75.3%であった。

考　　察

〔^{14}C〕E-64-c をラット及びウサギに静脈内及び皮下投与した際の血中放射能濃度は速やかに減衰し，本薬物の非経口投与時の血中からの消失は速やかであった。しかしながらウサギに皮下投与した時の血中濃度推移はラットに比べて遅延する傾向が認められ，皮下投与時の消失速度には種差があるものと考えられる。またラットに経口投与した時の最高血中濃度は前回[1]は3 hr 後に 0.16 μg eq/ml を示したのに対し，今回は 9 hr 後に 0.33 μg eq/ml の結果を得た。これは経口投与時の血中濃度レベルが低いための実験誤差とも考えられるが，後述するように経口投与では皮下投与の場合より代謝が著るしく，放射能標識が前回は Wilzbach 法[3]による ^{3}H 標識であったのに対し，今回はロイシン部位の ^{14}C 標識であることが関与している可能性が考えられる。

またラットに〔^{14}C〕E-64-c 経口投与後の尿中及び胆汁中排泄率はそれぞれ18.3，31.1%であり，前回の，11.7，38.7%と若干異なる結果を得たが，両者を加算するといずれの場合も約50%となり，消化管吸収率は50%程度と推定される。ウサギはラットに比べて尿中排泄率が高く，胆汁中排泄率が低い結果を得，排泄ルートに種差を認めた。更に尿中未変化体の割合がラットより多かったことから，ウサギではラットの場合より代謝速度が遅いことが示唆された。なおラットでは一部腸肝循環の形成が認められた。

全身オートラジオグラムの結果から，E-64-c は肝と腎で速やかに代謝，排泄されることが推定された。また経口投与時に消化管壁と骨髄に分布が認められ，これらの組織は蛋白合成活性が高いことから，〔^{14}C〕E-64-c の標識ロイシン部分が一部遊離して蛋白に取り込まれた可能性が考えられる。

更に尿中及び胆汁中代謝物に関し，皮下投与に比べて経口投与時の代謝が著しいこと，また経口投与時に血漿及び筋肉中放射能の蛋白結合

画分の比率が高いことから，投与ルートによる代謝パターンの差異が推定され，経口投与の場合は消化管内で腸内細菌による代謝あるいは肝における初回通過効果が関与している可能性が考えられる。

一方，連続投与により経口及び皮下投与時とも血中濃度は5—7日以降定常状態に達し，多くの組織で単回投与時の数倍から10倍程度の蓄積傾向を示した。筋肉への移行も単回投与では少ないが，連続投与により増大し，また単回投与時のミクロオートラジオグラムで筋細胞内への分布を確認し，薬効を期待し得るものと考えられる。

結　　論

E-64-c の ^{14}C 標識体を用いてラット及びウサギにおける生体内動態を検討した。E-64-c は消化管から50%程度が吸収され，非経口投与時は血中から速やかに消失するが，消失速度及び排泄ルートには種差が認められた。またラットにおいて一部腸肝循環の形成，胎仔及び乳汁中への移行性も認められた。一方，経口投与した場合は皮下投与時に比べて代謝が著しい傾向にあった。また E-64-c 投与後その放射能は尿及び胆汁中へ速やかに排泄されるが，連続投与により蓄積する傾向がみられた。筋肉への分布は連投により高まり，未変化体としての移行並びに筋細胞内への分布を確認した。

文　　献

1）大関正弘：E-64 及びその類縁体の生体内動態に関する研究，昭和54年度研究報告書，p. 149, 1980.
2）沢田二郎：E-64-c 標識体の製造，本誌，1981.
3）Wilzbach, K. E.: Tritium-labelling by exposure of organic compounds to tritium gas,, J. Am. Chem. Soc., 79, 1013, 1957.

24. E-64-c の薬物代謝酵素活性への影響

北 川 晴 雄*

研究協力者 佐 藤 哲 男* 北 田 光 一**

研究目的

昨年度は E-64 の薬物代謝酵素に対する影響を検索した。それに引続き，本年度は E-64 の誘導体の一つである E-64-c の薬物代謝酵素活性に対する影響を in vitro ならびに in vivo で検討した。又，東大，杉田先生より E-64 投与の筋ジストロフィーチキンの肝を恵与され，その薬物代謝酵素活性をも測定した。

実験材料及び方法

体重 180～200 g の SD 系雄性ラットを使用し，飼育期間中は 23°C の恒温，湿度60%の下で飼育した。動物は日本クレア KK のラット・マウス用飼料 (CE-2) を与え，飲料水は自由に摂取させた。すべての場合，動物は実験に使用する20時間前から絶食した。E-64-c は必要最少量の $NaHCO_3$ 溶液に溶解し 50 mg/kg の割合で皮下投与した。なお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。

In vivo 実験の場合，動物は断頭瀉血後肝をとり出し，肝重量を測定後 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。この様にして得られた25%ホモジネートを常法に従い超遠心分離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，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 を酵素材料として用いた。

N-脱メチル化活性の測定は，インキュベーション後に生成するホルムアルデヒドを Nash 法[1]にて，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]で各々測定した。又，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。なお蛋白量は，Gornall の方法[6]により定量した。

結　　果

1）In vitro 試験

脱メチル化活性の測定には基質として，アミノピリン，ベンツフェタミン及びエチルモルヒネを，水酸化活性測定にはアニリンを基質として用いた。4 濃度の E-64-c を $NaHCO_3$ 溶液に溶解し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測定した。その結果，表 1 に示す様に，E-64-c の 0.05 mM から 1.00 mM の間では無添加群と比較して殆ど差は認められず，E-64 の場合と同様に in vitro では薬物代謝酵素活性に対する影響は認められなかった。

さらに 4 濃度 (0.025 mM～0.500 mM) の

*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病院薬剤部

Ⅳ 全身的影響に関する研究

表 1 In vitro における E-64-c 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	85.80	121.66	247.34	18.9
0.05	88.67 (103.3)	126.39 (103.9)	219.88 (88.9)	18.7 (98.9)
0.10	89.24 (104.0)	126.90 (104.3)	222.69 (90.0)	19.0 (100.5)
0.50	85.37 (99.5)	127.63 (104.9)	226.67 (91.6)	17.8 (94.2)
1.00	87.12 (101.5)	122.29 (100.5)	221.41 (89.5)	18.3 (96.8)

* nmole HCHO formed per mg of protein per 20 min.
** nmole *p*-aminophenol formed per mg of protein per 20 min.
Numbers in parentheses represent per cent of control.

表 2 In vitro における E-64-c のラット肝ミクロゾームの薬物代謝に関連する電子伝達系に及ぼす影響

Concentration (mM)	NADPH-Cytochrome *c* reductase (units per mg of protein)	NADH-Ferricyanide reductase (units per mg of protein)
None	0.132	3.541
0.025	0.137 (103.8)	3.484 (98.3)
0.050	0.134 (101.5)	3.427 (96.8)
0.250	0.133 (100.8)	3.313 (93.6)
0.500	0.138 (104.5)	3.484 (98.4)

Numbers in parentheses represent per cent of control.

表 3 In vivo における E-64-c 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

	Control (n=10)	Treated (n=10)	p
Aminopyrine N-demethylation (nmoles/mg/20 min)	55.73±2.99	63.64±6.14	n.s.
Aniline hydroxylation (nmoles/mg/20 min)	30.24±0.99	34.20±1.03	<0.02
NADPH-Cytcchrome *c* reductase (units/mg)	0.089±0.003	0.116±0.006	<0.001
NADH-Ferricyanide reductase (units/mg)	2.571±0.111	2.736±0.157	n.s.
Cytochrome P-450 (nmoles/mg)	0.908±0.034	1.059±0.093	n.s.
Cytochrome b_5 (nmoles/mg)	0.438±0.020	0.487±0.027	n.s.

Rats were treated with E-64-c at a dose of 50 mg/kg, sc. for 5 days.

表 4 In vivo における E-64 の先天性筋ジストロフィーチキンの肝ミクロゾーム薬物代謝酵素活性に及ぼす影響

Line	Sex	E-64	n	Aminopyrine N-demethylation (nmoles product/mg prot./20 min)		Aniline hydroxylation (nmoles product/mg prot./20 min)	
412	Male	Untreated	7	51.41±8.61		13.94±2.71	
412	Male	Treated	3	73.20±7.34	n. s.	20.85±1.64	n. s.
412	Female	Untreated	2	41.98		10.91	
412	Female	Treated	2	75.07		24.38	
413	Male	Untreated	8	41.73±6.19		10.42±1.69	
413	Male	Treated	7	78.81±9.44	$p<0.01$	22.40±2.67	$p<0.01$
413	Female	Untreated	2	56.65		15.23	
413	Female	Treated	4	84.67±8.18		23.84±2.52	

E-64 (20 mg/kg, sc) was administered to chickens 3 times weekly for 100 days.
Normal line 412 and dystrophy line 413 chickens were used.

表 5 In vivo における E-64 の先天性筋ジストロフィーチキンの肝ミクロゾームチトクロム P 450 量及び NADPH-チトクロムCレダクターゼ活性に及ぼす影響

Line	Sex	E-64	n	NADPH-Cytochrome *c* reductase (unit/mg prot.)		Cytochrome P-450 (nmole/mg prot.)	
412	Male	Untreated	7	0.078±0.007		0.239±0.011	
412	Male	Treated	3	0.102±0.011	n. s.	0.246±0.031	n. s.
412	Female	Untreated	2	0.068		0.274	
412	Female	Treated	2	0.104		0.238	
413	Male	Untreated	8	0.055±0.005		0.252±0.023	
413	Male	Treated	7	0.087±0.007	n. s.	0.225±0.021	n. s.
413	Female	Untreated	2	0.087		0.218	
413	Female	Treated	4	0.107±0.006		0.189±0.012	

For details, see the legend to Fig. 4.

E-64-c をインキュベーション混液に添加して薬物代謝酵素の電子伝達系の一つである NADPH-チトクロムCレダクターゼ及び肝 Ms チトクロム P450 量の変動を検討した結果，無添加群との間に有意差は認められなかった（表2）。

2）In vivo 試験

E-64-c を可及的少量の $NaHCO_3$ 溶液に溶解し 50 mg/kg の割合で連続5日間皮下投与した。その結果，表 3 に示す様に，アニリン水酸化活性は対照群に比較して有意に増加し，NADPH-チトクロムCレダクターゼ活性は有意に上昇した。その他のパラメーターはすべて対照群との間に有意差はみられなかった。

3）先天性筋ジストロフィーチキンへの E-64 投与による肝薬物代謝酵素活性の影響

先天性筋ジストロフィー雌雄チキンに E-64 (20 mg/kg, sc) を連続投与（一週3回，100日間）した際の肝薬物代謝酵素活性への影響を検索した。その結果，表 4 から明らかな様に，アミノピリン脱メチル化活性及びアニリン水酸化活性は正常チキンでは E-64 の影響が何ら認められないのに対して筋ジストロフィーチキンでは雄性においてのみ E-64 投与により代謝活性の有意な増加がみられた。又，同一条件下においてチトクロム P450 量及び NADPH-チトクロムCレダクターゼ活性は何れの群においても E-64 による有意な変動は認められなかっ

た（表 5）。

考察及び結語

In vitro 試験において，E-64-c を添加することにより薬物代謝酵素活性ならびにそれに関連する電子伝達系及びチトクロム P 450 量の何れも無添加群との間に有意差はみられなかった。これに対して in vivo で E-64-c を投与した場合，アニリン水酸化活性ならびに NADPH-チトクロムCレダクターゼ活性は対照群に比べて有意に増加した。しかし，チトクロム P 450 量，アミノピリン脱メチル化活性などは全く影響がみられないことから，E-64-c による上記の活性増加は薬物代謝酵素活性の一般的な増加とは考え難く，又 E-64-c による本酵素の誘導現象はないものと思われる。

文　献

1）T. Nash: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction, Biochem. J., **55**, 416-421, 1953.

2）Y. Imai, A. Ito. and R. Sato.: Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction, J. Biochem., **60**, 417-428, 1966.

3）T. Omura and R. Sato.: The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes, J. Biol. Chem., **239**, 2370-2378, 1964.

4）A. H. Phillips and R. G. Langdon.: Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome *c* reductase: Isolation, characterization, and kinetic studies. J. Biol. Chem., **237**, 2652-2660, 1962.

5）K. Mihara and R. Sato. Partial purification of NADH-cytochrome b_5 reductase from rabbit microsomes with detergents and its properties, J. Biochem., **71**, 725-735, 1972.

6）A. G. Gornall, C. S. Badawill and M. M. David.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, J. Biol. Chem., **177**, 751-759, 1949.

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　及び　関係者名簿

氏　　名	施　設　名	所　在　地
主任研究者		
今堀　和友(班長)	東京大学医学部第二生化学	〒113 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 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 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 徳島市蔵本町3-18-15
西塚　泰美	神戸大学医学部第二生化学	〒650 神戸市中央区楠町7-5-1
福原　武彦(幹事)	東京慈恵会医科大学第二薬理学	〒105 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 小平市小川東町2620
野村　達次	実験動物中央研究所	〒213 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 千葉市弥生町1-33
市原　明	徳島大学医学部附属 酵素研究施設　酵素病理部門	〒770 徳島市蔵本町3-18-15
石浦　章一	国立武蔵療養所 神経センター　疾病研究第一部	〒187 小平市小川東町2620
宮武　正	自治医科大学神経内科	〒329-04 栃木県河内郡 南河内町薬師寺3311-1
寺尾　寿夫	帝京大学医学部第一内科	〒173 板橋区加賀2-11-1
大関　正弘(幹事)	大正製薬㈱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㈱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 小平市小川東町2620